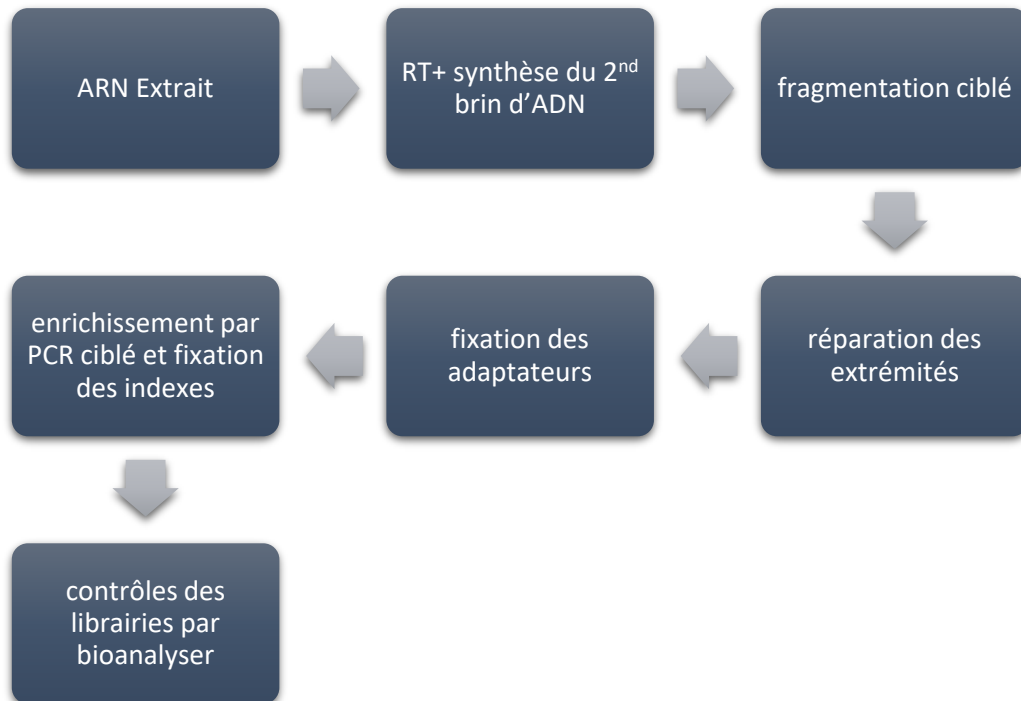


## Protocole d'amplification des métagénomés des virus

L'amplification des génomes des virus ARN nécessitent plusieurs étapes qui sont réalisées grâce à des kits dédiés (NebNext ultra II RNA Library prep kit). Le protocole a été optimisé à partir des conditions des fournisseurs.



- **Préparation de l'ARN extrait**

L'ARN, issu des échantillons d'eau ou de TD d'huitres, est transcrit en ADNc par RT avec des randoms hexamer et une enzyme Superscript II. L'ADNc ainsi obtenu est simple brin, la synthèse du second brin est réalisée grâce aux enzymes présentes dans le kit et une incubation d'1 h à 16°C.

<b>SECOND STRAND SYNTHESIS REACTION</b>	<b>VOLUME</b>
First Strand Synthesis Product	45 µl
●(orange) NEBNext Second Strand Synthesis Reaction Buffer (10X)	8 µl
●(orange) NEBNext Second Strand Synthesis Enzyme Mix	4 µl
Nuclease-free Water	23 µl
<b>Total Volume</b>	<b>80 µl</b>

- **Fragmentation de l'ADN**

Un ultrasonicateur (Covaris) est utilisé pour fragmenter l'ADN double brin en séquences de 200 bp environ. C'est par le réglage de l'intensité des ultrasons et le temps d'exposition que l'on obtient cette précision. Cette taille est compatible avec la plateforme de séquençage Illumina qui sera utilisée.

- **Purification de l'ADN**

Des billes magnétiques sont utilisées pour purifier l'ADN des réactifs des réactions enzymatiques précédentes.

- 140 µl de billes (NebNEXT purifications beads) sont ajoutés à chaque échantillon.

- Après une incubation de 5 min, les billes ayant fixé l'ADN sont captées par un aimant, et le surnageant est aspiré
- Les billes+ADN sont lavées 2 fois avec de l'éthanol 80% puis séchées
- L'ADN est élué dans 50 µL de TE 0,1X

Cette purification sera répétée après chaque réaction enzymatique. Les échantillons peuvent être stockés à -20°C.

- **Réparation des extrémités de l'ADN**

Afin de permettre la fixation des adaptateurs et des index, les extrémités des fragments doivent être réparés.

END PREP REACTION	VOLUME
Second strand cDNA Synthesis Product	50 µl
●(green) NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer	7 µl
●(green) NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix	3 µl
<b>Total Volume</b>	<b>60 µl</b>

L'incubation se fait dans un thermocycleur avec le programme suivant :30 minutes at 20°C, 30 minutes at 65°C, Hold at 4°C

- **Fixation des adaptateurs**

Les adaptateurs sont des amorces spécifiques permettant la reconnaissance par le séquenceur. Ces séquences, dont la concentration est ajustée selon la quantité d'ADN dans l'échantillon, sont ajoutées par ligation.

LIGATION REACTION	VOLUME
End Prepped DNA	60 µl
Diluted Adaptor	2.5 µl
●(red) NEBNext Ligation Enhancer	1 µl
●(red) NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	30 µl
<b>Total Volume</b>	<b>93.5 µl</b>

Après une incubation de 15 min à 20°C, l'enzyme (3 µl) est ajouté puis le mélange est incubé à 37°C pendant 15 min.

Les bibliothèques produites sont purifiées (voir protocole de **Purification de l'ADN**)

- **Fixation des index**

Les index sont des combinaisons de séquences permettant l'identification des bibliothèques pendant le séquençage. Cette combinaison doit être unique pour chaque échantillon.

COMPONENT	VOLUME
Adaptor Ligated DNA (Step 4.7.9)	15 µl
●(blue) NEBNext Ultra II Q5 Master Mix	25 µl
Index Primer Mix*	10 µl
<b>Total Volume</b>	<b>50 µl</b>

L'amplification par PCR permet l'enrichissement en ciblant les adaptateurs ainsi que la fixation des index.

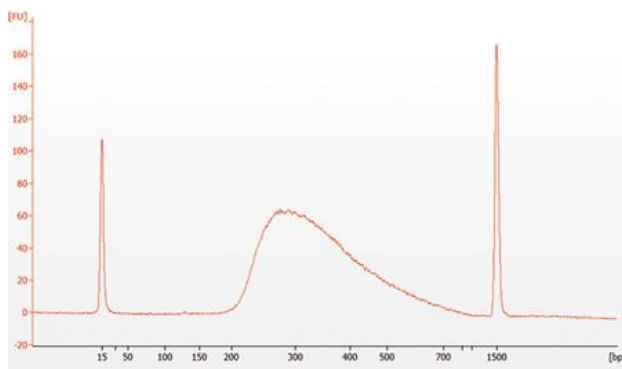
CYCLE STEP	TEMP	TIME	CYCLES
Initial Denaturation	98°C	30 seconds	1
Denaturation	98°C	10	seconds 5–12
Annealing/Extension	65°C	75 Seconds	
Final Extension	65°C	5 minutes	1
Hold	4°C	∞	

Le nombre de cycle peut être ajusté selon la quantité d'ADN, dans une certaine limite pour éviter une amplification trop importante.

Les librairies produites sont purifiées (voir protocole **Purification de l'ADN**)

- **Contrôle des librairies sur BioAnalyser (Agilent)**

Les librairies sont déposées (1 µl) sur une DNA 1000 chip (ou High sensitivity selon la quantité d'ADN). La distribution de la taille de la librairie doit être autour de 300bp (voir exemple).



*Publications de référence :*

Strubbia Sofia, Schaeffer Julien, Besnard Alban, Wacrenier Candice, Le Mennec Cecile, Garry Pascal, Desdouits Marion, Le Guyader Soizick (2020). Metagenomic to evaluate norovirus genomic diversity in oysters: Impact on hexamer selection and targeted capture-based enrichment . International Journal Of Food Microbiology , 323, 108588 (13p.) . Publisher's official version : <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108588>