

POP: Transcrição reversa e PCR multiplex para amplificação do genoma de SARS-CoV-2

Este POP descreve instruções passo a passo para a transcrição reversa e amplificação por PCR multiplex do genoma completo de SARS-CoV-2 e purificação por beads magnéticas e quantificação dos produtos recuperados.

Para citar esse protocolo:

Resende P. et al. *SARS-CoV-2 genomes recovered by long amplicon tiling multiplex approach using nanopore sequencing and applicable to other sequencing platforms.*

BioRxiv: doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.30.069039>

(<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.30.069039v1>)

Resende P. *Long reads nanopore sequencing to recover SARS-CoV-2 whole genome V.3*

https://www.protocols.io/view/long-reads-nanopore-sequencing-to-recover-sars-cov-bfy7jpn?version_warning=no

Lista de reagentes e materiais necessários:

Transcrição Reversa

- SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System. (200 reactions) Cat: 18091200 Invitrogen

PCR

- Q5® High-Fidelity 2X Master Mix. Cat: M0492L NEB
- Água livre de nucleases
- Conjuntos de primers listados na tabela 1.

A concentração final de cada Pool de primers será de 10uM. Para obtenção dessa concentração adicionar o volume indicado na coluna mistura para 10uM da Tabela 1 em nos tubos de 1.5mL para Pool 1 e Pool 2 respectivamente dos

primers na concentração estoque de 100uM.

Após a mistura dos primers a 100uM. Diluir 1:10 o pool de primers a 100uM para obtenção da concentração de uso final de 10uM.

Purificação e Quantificação

- Qubit ds DNA HS kit. Cat: Q32854 Thermofisher
- Qubit™ Assay Tubes
- PCR tubes LoBind 1.5mL
- Ampure XP. Cat: A63881 Beckman Coulter
- Rack Magnética

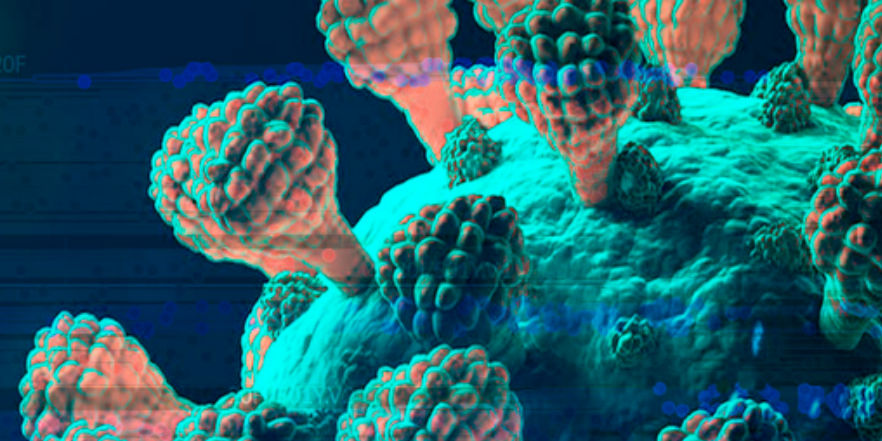
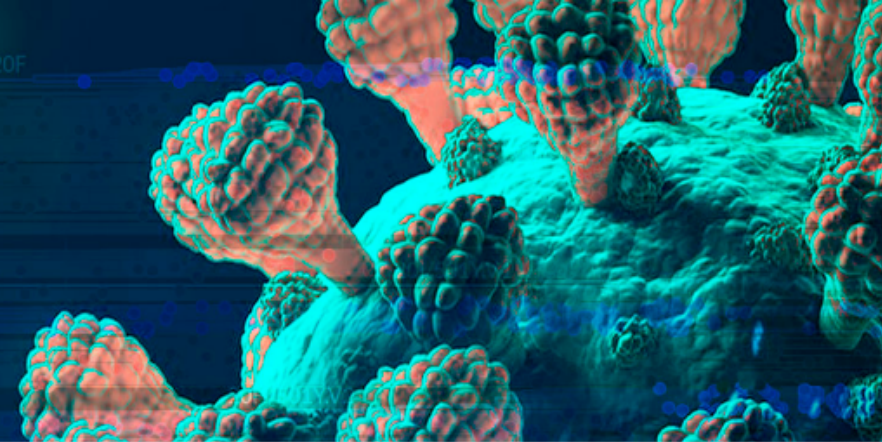


Tabela 1. Primers para preparo dos Pools de Primer 1 e 2.

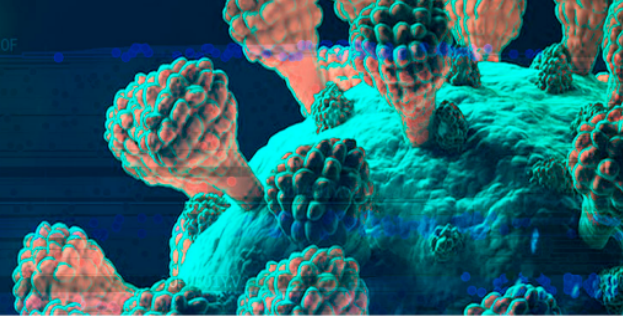
	Fragmento	Nome do Primer	Sequencia 5' - 3'	Mistura para 10uM
POOL 1	F1	hCoV-19_1_F	ACCAACCAACTTTCGATCTCTTGT	10uL
		hCoV-19_1_R	ACACCACCTGTAATGTAGGCCA	10uL
	F3	hCoV-19_3_F	AGCGGACACAATCTTGCTAAACA	10uL
		hCoV-19_3_R	GGTTGTCTGCTGTTGTCCACAA	10uL
	F5	hCoV-19_5_F	CACTATTGCAACCTACTGTACTGGT	10uL
		hCoV-19_5_R	CGTGTGTCAGGGCGTAAACTTT	10uL
	F7	hCoV-19_7_F	TGTACGCTGCTGTTATAAATGGAGA	10uL
		hCoV-19_7_R	TTTGACAGCAGAATTGGCCCTT	10uL
	F9	hCoV-19_9_F	CCTTGACCAGGGCTTTAACTGC	10uL
		hCoV-19_9_R	ATCATCTACAAAACAGCCGGCC	10uL
	F11	hCoV-19_11_F	GCTGAAATTGTTGACACTGTGAGT	10uL
		hCoV-19_11_R	AGCACCACCTAAATTGCAACGT	10uL
	F13	hCoV-19_13_F	ACAAAAGAAAATGACTCTAAAGAGGGTTT	10uL
		hCoV-19_13_R	TGTGCTACCGCCTGATAGATT	10uL
	F15	hCoV-19_15_F	TCAGAGTGTGTACTTGGACAATCAA	10uL
		hCoV-19_15_R	GTACCGTTGGAATCTGCCATGG	10uL
	F17	hCoV-19_17_F	GGAATCATCACAACCTGTAGCTGCA	10uL
		hCoV-19_17_R	TAGGCAGCTCTCCCTAGCATTG	10uL



Rede Genômica Fiocruz



POOL 2	F2	hCoV-19_2_F	CTGCTCAAAATCTGTGCGTGT	10uL
		hCoV-19_2_R	GGTCAGCACCAAAAATACCAGCT	10uL
	F4	hCoV-19_4_F	TTGTGCACTTATCTTAGCCTACTGT	10uL
		hCoV-19_4_R	TGCCAAAACCACTCTGCAACT	10uL
	F6	hCoV-19_6_F	GTACACTGACTTTGCAACATCAGC	10uL
		hCoV-19_6_R	AACGGCAATTCCAGTTTGAGCA	10uL
	F8	hCoV-19_44_F	GCAGGCTGTTGCTAATGGTGAT	10uL
		hCoV-19_8_F	TGGTACAACATTTACTTATGCATCAGC	10uL
		hCoV-19_8_R	TGGGTGGTATGTCTGATCCCAA	20uL
	F10	hCoV-19_55_F	TGCTCGCAAACATACAACGTGT	10uL
		hCoV-19_10_F	AGCAAATGTTGGACTGAGACTGA	10uL
		hCoV-19_10_R	CCAAGCAGGGTTACGTGTAAGG	20uL
	F12	hCoV-19_12_F	TGCATTCCACACACCAGCTTTT	10uL
		hCoV-19_12_R	TAACAAAGGCTGTCCACCATGC	10uL
	F14	hCoV-19_14_F	CAGGCTGCGTTATAGCTTGAA	10uL
		hCoV-19_14_R	CATGACAAATGGCAGGAGCAGT	10uL
F16	hCoV-19_16_F	ACGTGAGTCTTGATAAACCTCTTTTT	10uL	
	hCoV-19_16_R	ACTGCCAGTTGAATCTGAGGGT	10uL	



Etapa 1: Transcrição reversa

NOTA: Serão utilizados de 11 a 16 μL de RNA, recomendamos o uso de amostras que apresentem o *cycle threshold* (Ct) < 25 para um dos alvos de SARS-CoV-2 no ensaio de RT-PCR em tempo real.

1. Prepare a seguinte mistura e adicione 2 μL da mistura abaixo em tubos de PCR de 0.2mL ou placas de 96 de 0.2mL.

Transcrição Reversa Master Mix 1	Vol. μL (1x)	25 amostras	x amostras (N de amostras + 2)
50 μM Random Hexamers	1	25	
10mM dNTPs mix (10mM cada)	1	25	
Total	2	50	

2. Configure o termociclador e submeta o **Master Mix 1** a reação acima a seguinte ciclagem:

65°C/5 min

3. Deixe a reação no gelo por 1 min
4. Prepare o **Master Mix 2** em um tubo de 1,5mL

Master Mix 2 Transcrição Reversa	Vol. μL (1x)	25 amostras	x (N de amostras + 1)
5x SSIV Buffer	4	100	
100mM DTT	1	25	
RNaseOUT ou RNase Inhibitor	1	25	
SSIV Reverse Transcriptase	1	25	
Total	7	175	

5. No mesmo tubo, adicione 7 μL do Master mix 2 aos tubos contendo o Master Mix 1.

6. Configure o termociclador para a seguinte ciclagem:

42°C/50min

70°C/10min

4°C/hold

NOTA: O cDNA pode ser armazenado em -20°C.

Etapa 2: PCR multiplex

NOTA: Nesta etapa serão utilizados para cada reação 2,5uL do cDNA (totalizando 5uL) em 22,5uL da mistura para o Pool 1 e para o Pool 2 conforme descrito abaixo abaixo:

1. Prepare a seguinte mistura para o PCR multiplex em tubo 1,5mL Pool 1 e Pool 2.

Master Mix PCR multiplex	Vol. µL Pool 1 (1x)	Vol. µL Pool 2 (1x)	25 amostras (Pool1/Pool2)	x (N + 1)
Q5 Master Mix de alta fidelidade 2X	12,5 µl	12,5 µl	312,5	
Conjunto primers (Pool 1 ou Pool 2) 10uM	3,0	3,0	75	
Água livre de Nucleases	7,0	7,0	175	
Total	22,5	22,5	562,5	

2. Configure o termociclador para a ciclagem:

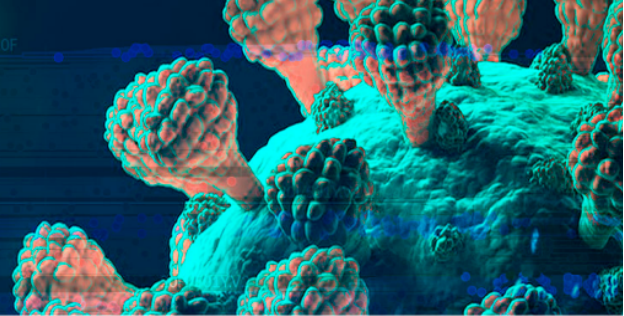
1. Denaturação inicial: 98°C/30sec (1 ciclo)

2. Denaturação: 98°C/15sec

3. Anelamento/extensão: 65°C/5min

4. 4°C/hold

} 35 ciclos



Etapa 3: Purificação e quantificação

NOTA: Nesta etapa, são utilizadas as Beads Ampure XP para purificar o produto de PCR.

1. Retirar as beads magnéticas da geladeira 30 minutos antes do início desta etapa para que estejam em temperatura ambiente. Uma vez em temperatura ambiente, é importante vortexar para que esteja homogênea.
2. Preparar solução fresca de álcool 70% a partir de álcool absoluto e água livre de nuclease.
3. Misturar o Pool 1 e o Pool 2 totalizando o volume final de 50uL.
4. Centrifugar os microtubos a 280 x g a 20°C por 1 minuto.
5. Para limpar os produtos de PCR, use uma proporção de 1:1 AMPure XP.
Por exemplo: Adicione 50 µl de esferas AMPure XP a 50 µl do produto do PCR. Pipete para cima e para baixo para misturar (10 x). A cor da mistura deve parecer homogênea após a mistura.
6. Incubar em temperatura ambiente por 5 minutos.
7. Colocar os tubos na estante magnética por 3 minutos (ou até o líquido ficar transparente)
8. Sem encostar a ponteira nas beads, remover e descartar o sobrenadante.
9. Realizar a seguinte limpeza das beads duas vezes:
 - a. Com os tubos na estante magnética, adicionar 200 µL de álcool 70% sem misturar.
 - b. Incubar por 30 segundos
 - c. Sem encostar nas beads, remover e descartar o sobrenadante
10. Usar uma pipeta de 20µL ou 10ul para remover e descartar resíduos de álcool 70%.
11. Prosseguir o procedimento quando os tubos estiverem secos e sem nenhum resíduo aparente de álcool 70%. Cuidado para não secar demais as beads.

12. Retirar os tubos da estante magnética e adicionar 32 μL de RSB (Tampão de ressuspensão) ou água nuclease free as beads.
13. Pipetar 10 vezes para misturar
14. Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos
15. Devolver os tubos a estante magnética
16. Após 2 minutos, quando o líquido estiver transparente, retirar 30 μL do sobrenadante com cuidado para não transferir o resíduo de bead.
17. Transferir os 30 μL para microtubos de 500 μL previamente identificados.
18. Quantifique 1 μL do amplicon usando o fluorômetro Qubit™ de acordo com o Anexo I.

NOTA:

Se a concentração for muito alta, é necessário fazer uma diluição de 1:5 (20 μL de água + 5 μL de DNA) e realizar a quantificação novamente.

Após esta etapa segue a normalização e a construção das bibliotecas ou estocar os tubos a -20°C .

ANEXO I

Fluorômetro Qubit

NOTA: O volume final em cada tubo deve ser 200 μ L. Cada tubo padrão requer entre 180-199 μ L de solução (tampão e fluorômetro). Verifique se você possui soluções de trabalho Qubit™ suficientes para acomodar todos os padrões e amostras.

Para evitar contaminação cruzada, recomendamos que, ao invés de pipetar diretamente do frasco da solução de trabalho para cada tubo, você prepare alíquota com quantidade suficiente de solução de trabalho necessária para suas amostras e padrões do frasco e adicione o volume necessário aos tubos apropriados (Qubit™ Assay Tubes).

1. Configure o número necessário de tubos de 0,5 ml para padrões e amostras. O ensaio Qubit™ 1X dsDNA HS requer 2 padrões.
2. Rotule as tampas dos tubos. Não rotule a lateral do tubo, pois isso pode interferir na leitura da amostra. Rotule a tampa de cada tubo padrão corretamente. A calibração do fluorômetro Qubit™ exige que os padrões sejam inseridos no instrumento na ordem correta.
3. Adicione o tampão 1X Qubit™ 1X dsDNA a cada tubo padrão (190 μ L) e a cada tubo de amostra (199 μ L)
4. Adicione 10 μ L de cada padrão Qubit™ ao tubo apropriado.
5. Adicione 1 μ L de cada amostra ao tubo apropriado
6. Permita que todos os tubos incubem à temperatura ambiente por 2 minutos e prossiga para “Ler padrões e amostras” (Read standards and samples).
7. Registre cuidadosamente todos os resultados para executar a normalização da biblioteca.