

## **Metagenomsequenzierung von klinischen Liquor-Proben - Standard Operating Protocol -**

Dr. Meik Dilcher, Abteilung für Virologie, Universitätsmedizin Göttingen

E-mail: mdilche1@gwdg.de

Dieses Protokoll wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Pilotprojektes „Liquor-Pyrosequenzierung“, Förderkennzeichen 01 KI 1103, Laufzeit 01.01.2012 – 30.06.2013, entwickelt und ist optimiert für die Roche/454-Pyrosequenzierung, jedoch adaptierbar auf andere Sequenzierplattformen. Einige Schritte, wie die Nuklease-Vorbehandlung oder die Entfernung ribosomaler RNA's, scheinen für die 454-Metagenom-Sequenzierung essentiell zu sein, da bei dieser Plattform weniger Reads als bei anderen Plattformen erzeugt werden, und es daher wichtig ist kontaminierende Nukleinsäuren zu entfernen. Bei der Verwendung von Illumina-Sequencern, die wesentlich mehr Reads erzeugen, ist die Anwesenheit eines Hintergrundes an Humansequenzen weniger kritisch.

**Wichtig:** um Nukleinsäure-Kontaminationen über Reagenzien-Kits abschätzen zu können, sollten immer parallel zu den zu analysierenden Liquor-Proben 1-2 Negativkontrollen mit DEPC-behandeltem Wasser (z.B. #T143.4, Carl Roth) mitgeführt werden. Außerdem sollten der Workflow und die Reagenzienkits für die diagnostische Metagenom-Sequenzierung strikt von der allgemeinen Sequenzierung getrennt werden.

### **1) Nuklease-Vorbehandlung** (Durchführung z.B. in Virus-Labor)

- > diese Behandlung soll kontaminierende humane Nukleinsäuren entfernen. Zu diesem Zeitpunkt sind die viralen oder bakteriellen Nukleinsäuren durch das Capsid bzw. die Zellwand vor der Nuklease-Behandlung geschützt.
- 100 µl Liquor-Probe (bei größeren Probenvolumina kann das Protokoll upgescaled werden, max. Probenvolumen = 350 µl) werden mit 5 µl RNase A (20 mg/ml, #12-RA-02, Peqlab), 2 µl Turbo-DNase (2 U/µl, #AM1907 bzw. #AM2238, Life Technologies), sowie 0.5 µl Benzonase (25 U/µl, #70664-3, Merck Millipore) versetzt und für 1.5 h bei 37°C inkubiert um kontaminierende Nukleinsäuren zu entfernen.
- Zugabe von 90.5 µl PBS (z.B. #51225, AccuGene PBS, Lonza) und 2 µl 500mM EDTA (#51201, Lonza) zur Inaktivierung der Nukleasen.

### **2) Gesamtnukleinsäure-Extraktion** (Durchführung z.B. in Virus-Labor)

- > um sowohl DNA-Pathogene als auch RNA-Pathogene detektieren zu können, sollten nach Möglichkeit Gesamtnukleinsäuren extrahiert werden.
- Gesamtnukleinsäure-Extraktion mittels MagNA-Pure Compact Roboter von Roche [Vorteile: A) Höhere Effizienz der Nukleinsäure-Extraktion im Vergleich zu Spin-Column-Kits, B) niedrigeres Risiko des Eintrags von Fremd-Nukleinsäuren, da keine Silica-Matrices benutzt werden, C) gute Reproduzierbarkeit, D) Möglichkeit der UV-Dekontamination] und MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (#03730964001, Roche Applied Science). Probenvolumen = 200 µl; Elutionsvolumen = 50 µl; Protokoll = Total\_NA\_Plasma\_100\_400; Probenmaterial = other.
- Aufteilen der Probe (Proben können jetzt bei -80°C gelagert werden):
  - o 17 µl für Herstellung der DNA-Libraries (X1)
  - o 17 µl für Herstellung der RNA-Libraries (X2)
  - o 16 µl als Backup für PCR's

### 3) Herstellung von DNA-Libraries (Durchführung in Library-Preparation-Area unter separater Sterilbank mit Möglichkeit der UV-Dekontamination)

- Zusätzlicher RNase-Verdau: Zugabe von 2 µl RNase A (20 mg/ml, #12-RA-02, Peqlab) zu den 17 µl Probe für DNA-Libraries (X1) um evtl. vorhandene Rest-RNAs zu entfernen.
- Inkubation für 30 Minuten bei 37°C.
- Zugabe von 62 µl TE-Puffer, pH 8.0 z.B. aus dem Roche Rapid-Library Preparation Kit (#05608228001, Roche Applied Science) oder separat als TE Buffer, Molecular Grade (#V6231, Promega). Endvolumen = 100 µl.
- Reinigung mittels Genomic DNA Clean & Concentrator-Kit (# D4010, Zymo Research): Zugabe von 200 µl CHIP DNA Binding Buffer, auf Säule laden, 2x waschen mit 200 µl Wash Buffer.
- Elution in 12 µl TE-Puffer, pH 8.0.
- DNA-Konzentrationsbestimmung über Nanodrop (Konzentrationen sind in der Regel nur max. 2 ng/µl)
- Überprüfung von 1 µl im High-Sensitivity DNA Kit (#5067-4626, Agilent) im Bioanalyzer -> teilweise ist ein hochmolekularer Peak zwischen 500 und 10.000 bp sichtbar.
- Es gibt nun zwei Möglichkeiten Sequenzier-Libraries für die DNA-Proben herzustellen:
  - o Nextera XT DNA-Sample Prep Kit für MiSeq-Illumina-Sequencer (#FC-131-1096, Illumina). Im Fall der anderen Illumina-Sequencer muss dieses Kit für ein Barcoding und Multiplexing verschiedener Proben mit der TruSeq Dual Indexing Primer Box (#FC-121-1003, Illumina) kombiniert werden. Zur Library-Herstellung wird nur 1 ng DNA benötigt.
  - o Da das Nextera DNA Sample Prep Kit Roche Titanium-compatible #NT09115 von Biozym leider nicht mehr erhältlich ist, müssen im Falle von Roche Sequencern die DNA-Libraries über das WTA2-Kit von Sigma-Aldrich hergestellt werden (siehe Nr. 4 RNA-Library-Herstellung).

Bei der Nextera-DNA-Library-Herstellung müssen die Ansätze nach der Tagmentation Reaction und vor der PCR-Amplifikation mit dem DNA Clean & Concentrator-5-Kit aufgereinigt werden. Hier ist es wichtig, das entsprechende Kit mit capped columns (#D4013, Zymo Research) zu verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Nach der PCR-Amplifikation wird der Ansatz zunächst auch mit dem DNA Clean & Concentrator-5-Kit (#D4013, Zymo Research) aufgereinigt und in 12 µl Elution Buffer eluiert. Die DNA-Konzentration wird im Nanodrop bestimmt und die Probe mit TE-Puffer auf 50 ng/µl in 100 µl Gesamtvolumen verdünnt. Um Fragmente < 300 bp zu entfernen, wird die DNA-Library nun über Agencourt Ampure XP Beads (#A63880, Beckman Coulter) in einem Verhältnis von 0.7 Vol. Beads : 1 Vol. DNA aufgereinigt. Hierzu werden 70 µl gut-resuspendierte und auf RT äquilibrierte Ampure XP Beads zu den 100 µl verdünnter DNA-Library gegeben, gevortext, für 10 Minuten auf dem Schüttler inkubiert, anschließend in den DynaMag-2-Magneten (#12321D, Life Technologies) gestellt und der klare Überstand verworfen. Die Beads werden 3x mit 500 µl frisch hergestelltem 70%igen EtOH gewaschen (hierbei nicht vortexen) und anschließend für 3 Minuten bei RT getrocknet. Die DNA wird mit 18 µl TE eluiert und die Konzentration im Nanodrop bestimmt. 1 µl einer Verdünnung auf 25 ng/µl in TE wird daraufhin im High-Sensitivity DNA Kit (#5067-4626, Agilent) im Bioanalyzer überprüft und quantifiziert.

#### 4) Herstellung von RNA-Libraries (Durchführung in Library-Preparation-Area unter separater Sterilbank mit Möglichkeit der UV-Dekontamination)

- Zusätzlicher DNase-Verdau:
- Zugabe von 2 µl 10xTurbo-DNase-Puffer sowie 1 µl Turbo-DNase (2 U/µl, #AM1907 bzw. #AM2238, Life Technologies) zu den 17 µl Probe für RNA-Libraries (X2) um evtl. vorhandene Rest-DNAs zu entfernen.
- Inkubation für 30 Minuten bei 37°C.
- Zugabe von 2 µl DNase Inactivation Reagent, vortexen, 5 Minuten bei RT inkubieren, zwischenzeitlich mischen.
- Zentrifugation für 1.5 Minuten bei 10.000xg.
- Überstand (= 20 µl RNA) in neues Eppi überführen.
- Glykogen-Präzipitation der RNA:
- Zugabe von 480 µl DEPC-behandeltem Wasser (#T143.4, Carl Roth)
- Zugabe von 2 µl RNase-freiem Glykogen (35 µg/µl, #37-1810, Peqlab), vortexen
- Zugabe von 500 µl Isopropanol, vortexen
- Präzipitation üN bei -20°C
- Am nächsten Tag wird die Probe für 15 Minuten bei 12.000xg und 4°C zentrifugiert
- Die Pellets werden 2x mit 1 ml -20°C-kaltem 75% EtOH gewaschen (Zentrifugation für jeweils 5 Minuten bei 12.000xg und 4°C).
- Die Pellets werden für 20 – 30 Minuten bei RT im geöffneten Eppendorf-Tube getrocknet
- Resuspendierung der Pellets in 7 µl DEPC-behandeltem Wasser (#T143.4, Carl Roth). Evtl. kann die Probe zur besseren Resuspendierung für 5 Minuten bei 56°C inkubiert werden.
- RNA-Konzentrationsbestimmung über Nanodrop (Konzentrationen sind in der Regel zwischen 10 und 60 ng/µl)
- Optional: Entfernung eukaryontischer ribosomaler RNA's über das RiboMinus Eukaryote Kit for RNA-Seq (#A10837-08, Life Technologies):
- Hybridisierung von RNA und Sonden (Low-input protocol mit Abwandlung)
- Ein Heizblock wird auf 75°C und ein zweiter Heizblock auf 37°C vorgewärmt
- In ein steriles, RNase-freies 1.5 ml E-Cup werden 27 µl Hybridisierungspuffer, 1 µl RiboMinus Probe (15 pmol/µl) sowie 5 µl aufgereinigte RNA (100 – 500 ng) gegeben
- Inkubation für 5 Minuten bei 75°C
- Überführung des Ansatzes in 37°C-Heizblock und Inkubation für 30 Minuten (A)
- Vorbereitung der Beads
- In der Zwischenzeit werden die Beads vorbereitet (Low-input protocol)
- 75 µl Beads werden in ein steriles, RNase-freies 1.5 ml E-Cup pipettiert
- Das Tube wird für 1 Minute in den DynaMag-2-Magneten gestellt
- Der klare Überstand wird entfernt und die Beads 2x mit 75 µl Nuklease-freiem Wasser gewaschen
- Die Beads werden danach in 75 µl Hybridization Buffer resuspendiert
- 25 µl der in Hybridization Buffer resuspendierten Beads werden in ein neues E-Cup transferiert und bis zum späteren Gebrauch im 37°C-Heizblock inkubiert (B)

- Die restlichen 50 µl werden wieder für 1 Minute in den DynaMag-2-Magneten gestellt, der Überstand entfernt und die Beads anschließend in 20 µl Hybridization Buffer resuspendiert und bis zum späteren Gebrauch im 37°C-Heizblock inkubiert (C)
- Entfernung der rRNA
- Nachdem die Mischung aus RNA und RiboMinus Probe für 30 Minuten auf 37°C abgekühlt wurde (A) erfolgt eine kurze Zentrifugation
- Nun wird der Ansatz (ca. 33 µl) zu den unter (C) auf 37°C vorgewärmten und in 20 µl Hybridization Buffer resuspendierten Beads gegeben. Der Ansatz wird durch auf- und abpipettieren gemischt und anschließend für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und ab und zu gemischt.
- Der Ansatz wird daraufhin kurz anzentrifugiert und für 1 Minute in den DynaMag-2-Magneten gestellt, aber der Überstand (enthält RiboMinus RNA) nicht verworfen (D).
- Parallel hierzu werden die in 25 µl Hybridization Buffer resuspendierten und bei 37°C inkubierten Beads (B) ebenfalls für 1 Minute in den DynaMag-2-Magneten gestellt und der Überstand daraufhin verworfen.
- Der Überstand (ca. 53 µl) mit der RiboMinus RNA (D) wird nun auf das Bead-Pellet pipettiert und durch auf- und abpipettieren resuspendiert.
- Es folgt eine Inkubation für 15 Minuten bei 37°C. Der Ansatz wird dabei ab und zu gemischt.
- Danach wird der Ansatz kurz anzentrifugiert und für 1 Minute in den DynaMag-2-Magneten gestellt.
- Der Überstand (ca. 50-53 µl) mit der RiboMinus RNA wird in ein neues RNase-freies 1.5 ml E-Cup pipettiert.
- Aufkonzentrierung der RiboMinus RNA über das RiboMinus Concentration Module (#K1550-05, Life Technologies) -> alternativ hierzu kann die RiboMinus RNA auch über Agencourt RNAClean XP Beads (#A63987, Beckman Coulter) in Kombination mit der MagMax Lysis/Binding Solution (#AM8500, Life Technologies) aufkonzentriert werden:
- Zu der RiboMinus RNA (ca. 50 µl) wird 1 Volumen (50 µl) Binding Buffer L3 sowie 3 Volumen (150 µl) 96-100% EtOH (Finale EtOH-Konzentration = 60%) gegeben und gevortext.
- Der Ansatz wird nun auf eine Spin-Säule in einem Auffanggefäß gegeben und für 1 Minute bei 12.000xg zentrifugiert.
- Der Durchwasch wird entfernt und die Säule in das gleiche Auffanggefäß gesteckt.
- Nun werden 200 µl Wash Buffer (W5) dem EtOH zugesetzt wurden hinzugegeben und die Säule wieder für 1 Minute bei 12.000xg zentrifugiert.
- Der Durchwasch wird entfernt und die Säule in ein neues Auffanggefäß überführt.
- Die Säule wird nun für 3 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit trocken zentrifugiert.
- Die Säule wird in ein RNase-freies 1.5 ml E-Cup überführt und 12 µl Nuklease-freies Wasser auf die Säule pipettiert und für 1 Minute inkubiert.
- Zentrifugation für 1 Minute bei Maximalgeschwindigkeit.
- Die eluierte RiboMinus RNA kann nun weiterverarbeitet werden oder bei -80°C gelagert werden.
- RNA-Konzentrationsbestimmung über Nanodrop (Konzentrationen liegen im Bereich von 1-5 ng/µl).
- 1 µl kann über das RNA 6000 Pico Kit (#5067-1513, Agilent) mit dem Eukaryote-Total-RNA-Pico-Protocol im Bioanalyzer untersucht werden.

- Herstellung von amplifizierten, fragmentierten cDNA-Libraries aus der RiboMinus RNA über das Transplex Whole Transcriptome Amplification Kit (#WTA2-10rxn, Sigma-Aldrich): -> kann auch für die Herstellung von DNA-Libraries verwendet werden
- Library Synthesis Reaction (in diesem Schritt erfolgt sowohl die Fragmentierung als auch die cDNA-Synthese)
- Zu 1.5 µl Library Synthesis Solution werden 8.46 µl RiboMinus RNA gegeben (ca. 8 – 40 ng), gemischt und für 5 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Parallel hierzu wird eine Negativkontrolle mit 1.5 µl Library Synthesis Solution sowie 8.46 µl Nuklease-freies Wasser hergestellt und ebenfalls für 5 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert (da das WTA2-Kit auch für die Herstellung von DNA-Libraries alternativ zum Nextera-Kit verwendet werden kann, müssen in diesem Fall jedoch die Proben für 5 Minuten bei 95°C inkubiert werden).
- Die Ansätze werden daraufhin direkt für ca. 2 Minuten auf Eis (oder noch besser erst flüssiger Stickstoff und danach für 2 Minuten auf Eis) überführt.
- Zu jedem Ansatz werden nun 1.5 µl Library Synthesis Solution, 2.34 µl Nuklease-freies Wasser sowie 1.5 µl Library Synthesis Enzyme (Endvolumen = 15 µl) gegeben und die Ansätze für die Fragmentierung und cDNA-Synthese im Thermocycler unter folgendem Programm inkubiert (hierbei zuerst den Thermocycler starten und die Proben erst dann reinstellen, wenn der Thermocycler 18°C erreicht hat):

18°C	11 Minuten
25°C	10 Minuten
37°C	30 Minuten
42°C	10 Minuten
70°C	20 Minuten
12°C	Pause

- Die Ansätze können nun bei -20°C gelagert, oder weiterverarbeitet werden.
- Amplifikations Reaktion
- Der Amplification Mix sowie die 10 mM dNTPs werden zuvor auf Eis aufgetaut.
- Zunächst wird ein PCR-Ansatz mit Eva-Green (#PCR-352, Jena Bioscience) sowohl für die Probe(n) als auch für die Negativkontrolle (NK) hergestellt, um den Kurvenverlauf der Amplifikationsreaktion zu ermitteln.
- Hierzu werden folgende PCR-Ansätze zusammen pipettiert:

PCR-Ansatz mit Eva-Green für Probe(n)

59.70 µl	Nuklease-freies Wasser
7.50 µl	Amplification Mix
1.50 µl	WTA dNTPs (10 mM)
0.75 µl	Amplification Enzyme
0.75 µl	EvaGreen (50x) von Jena Bioscience, Cat-no. PCR-352
<b>+ 4.80 µl</b>	<b>Library Synthesis Reaction Probe</b>
75.00 µl	Endvolumen

PCR-Ansatz mit Eva-Green für NK

59.70 µl	Nuklease-freies Wasser
7.50 µl	Amplification Mix
1.50 µl	WTA dNTPs (10 mM)
0.75 µl	Amplification Enzyme
0.75 µl	EvaGreen (50x) von Jena Bioscience, Cat-no. PCR-352
<b>+ 4.80 µl</b>	<b>Library Synthesis Reaction Negativkontrolle</b>
75.00 µl	Endvolumen

- Die Amplifikation erfolgt im Light Cycler 480 (Roche) in verschiedenen Wells einer 96-Well-Platte unter folgendem Programm:

94°C	2 Minuten	
94°C	30 Sekunden	25 Zyklen
70°C	5 Minuten	
40°C	5 Minuten	

- Nachdem der Kurvenverlauf der Amplifikationsreaktion ermittelt wurde und klar ist, nach wieviel Zyklen die jeweilige Probe das Amplifikationsplateau erreicht, wird für jede Probe ein doppelter PCR-Ansatz ohne Eva-Green angesetzt:

60.45 µl	Nuklease-freies Wasser
7.50 µl	Amplification Mix
1.50 µl	WTA dNTPs (10 mM)
0.75 µl	Amplification Enzyme
<b>+ 4.80 µl</b>	<b>Library Synthesis Reaction Probe</b>
75.00 µl	Endvolumen

(zwei dieser PCR-Ansätze pro Probe!)

- Die Amplifikation erfolgt wieder im Light Cycler 480 (Roche) in verschiedenen Wells einer 96-Well-Platte.
- Die Länge des PCR-Programms richtet sich nach dem ermittelten Amplifikationsplateau der jeweiligen Probe

94°C	2 Minuten	
94°C	30 Sekunden	Amplifikations-Plateau + 2 Zyklen
70°C	5 Minuten	
40°C	5 Minuten	

- Zwei Zyklen nach Erreichen des Amplifikationsplateaus wird die Reaktion gestoppt und beide 75 µl-Ansätze pro Probe werden vereint und über eine Qiaquick-PCR-Purification-Säule (#28104, Qiagen) aufgereinigt.
- Die Elution erfolgt mit 50 µl TE.
- DNA-Konzentrationsbestimmung über Nanodrop (die Konzentration beträgt in der Regel ca. 200 ng/µl).
- Aufreinigung über Ampure XP Beads (um Fragmente < 300 bp zu entfernen):
- Die Ampure XP Beads werden für 30 Minuten auf RT äquilibriert.
- 70 µl gut-resuspendierte Ampure XP Beads werden in ein E-Cup pipettiert
- Die über die Qiaquick-PCR-Purification-Säule aufgereinigte DNA wird auf 50 ng/µl in 100 µl TE verdünnt und zu den 70 µl Ampure XP Beads gegeben.
- Der Ansatz wird für 10 Minuten bei RT auf dem Drehrad inkubiert
- Der Ansatz wird anschließend in den DynaMag-2-Magneten gestellt und der Überstand verworfen
- Die Beads werden 3x mit je 500 µl frisch-hergestelltem 70%igen EtOH gewaschen (jeweils für 30 Sekunden inkubieren, dabei jedoch nicht vortexen, sondern den Ansatz einfach im Magneten stehen lassen)
- Die Beads werden anschließend für 3 Minuten bei RT getrocknet und mit 18 µl TE eluiert
- DNA-Konzentrationsbestimmung im Nanodrop (die Konzentration liegt in der Regel bei ca. 70 ng/µl)

- 1 µl einer Verdünnung auf 25 ng/µl in TE wird im High Sensitivity DNA Kit (#5067-4626, Agilent) im Bioanalyzer überprüft.
- 300 – 400 ng aufgereinigter WTA2-Reaktion werden mit TE auf ein Endvolumen von 16 µl aufgefüllt (300 ng wenn die Nanodrop-Konzentration > 100 ng/µl ist, 350 ng wenn die Nanodrop-Konzentration zwischen 80 und 100 ng/µl ist und 400 ng wenn die Nanodrop-Konzentration < 80 ng/µl beträgt).
- Nun werden 9 µl des End-Repair-Mixes vom GS Rapid Library Preparation Kit (#05608228001, Roche Applied Science) hinzugegeben und die Ansätze nach dem Rapid Library Preparation Protocol ab Schritt 3.2 (Fragment End Repair) weiter verarbeitet um Roche-Sequenzier-Libraries herzustellen. Im Adapter-Ligation-Schritt (3.4) können RL-MID-Adaptoren verwendet werden, um ein Multiplexing der Proben zu erlauben. Alle weiteren Schritte (SV emPCR für Titration, MV oder LV emPCR, Sequenzierung) folgen den entsprechenden Roche/454-Protokollen. Sollte eine andere Sequenzierplattform benutzt werden, so kann man auch hier ab dem End-Repair-Schritt des Library Preparation Protokolls für Shotgun bzw. Paired-End-Libraries einsteigen. Verschiedene MID-getaggte Proben sollten so zusammen gemischt werden, dass am Ende im Minimum 40.000 – 60.000 Reads pro Probe entstehen.

Das beschriebene Protokoll kann neben Liquor auch auf andere klinische Proben, z.B. Blut, Urin, homogenisiertes Biopsie-Material etc. angewendet werden, allerdings wird hier der Anteil an kontaminierenden Humansequenzen voraussichtlich höher sein.

## 5) Bioinformatische Analyse:

Zunächst wird entweder die Nextera-Transposon-Sequenz (5'-AGATGTGTATAAGAGACAG-3') im Falle der DNA-Libraries oder die WTA2-Adapter-Sequenz (5'-GTGGTGTGTTGGGTGTGTTTGGG-3') im Falle der RNA-Libraries herausgetrimmt. Zusätzlich können die Reads noch gegen das Humangenom gemappt werden, um Humansequenzen zu subtrahieren (z.B. mit SeqMan NGen). Danach sollten die Fasta- oder Fastq-Files der ungemappten Reads parallel über zwei verschiedene Metagenom-Analyseprogramme untersucht werden, da es sich gezeigt hat, dass manche Pathogen-Sequenzen von manchen Programmen übersehen werden. Solche Pathogen-Sequenzen, die von beiden Programmen detektiert werden, besitzen außerdem eine höhere Aussagekraft. Zur Metagenomanalyse kann zum einen das open-source Programm MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov/>) verwendet werden, welches sowohl die Nukleinsäure-Sequenzen als auch die translatierten Protein-Sequenzen gegen verschiedene Datenbanken, darunter GenBank, RefSeq, TrEMBL, IMG, M5NR, SEED, SwissProt etc. mappt. Zum anderen kann die Metagenomanalyse über das Programm RIEMS (Rapid Information Extraction of Metagenomic Sequences) durchgeführt werden, welches von Matthias Scheuch und Dr. Dirk Höper aus der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Martin Beer am Institut für Virusdiagnostik des Friedrich-Loeffler-Instituts auf der Insel Riems in Greifswald entwickelt wurde. Dieses Programm führt zunächst eine Blastn- und Megablast-Analyse der Sequenzdaten gegen GenBank durch. Alle übrigbleibenden Reads und Contigs werden im Anschluss translatiert und über Blastp gegen die NCBI-Proteindatenbank gemappt. Zur Datenanalyse kann ein Kontakt zu Matthias Scheuch (Mattias.Scheuch@fli.bund.de) bzw. zu Dr. Dirk Höper (Dirk.Hoeper@fli.bund.de, Tel.: 038351-7-1235) hergestellt werden.

Es ist vorgesehen, dieses Protokoll in der folgenden Form in einer Fachzeitschrift zu publizieren: "Protocol for metagenome sequencing of CSF from patients with meningoencephalitis of unknown etiology", authors: Meik Dilcher<sup>1\*</sup>, Bastian Dörrbecker<sup>1</sup>, Franziska Weber<sup>1</sup>, Matthias Scheuch<sup>2</sup>, Dirk Höper<sup>2</sup>, Martin Beer<sup>2</sup>, Helmut Eiffert<sup>3</sup>, Ursula Meyer-König<sup>4</sup>, Frank T. Hufert<sup>1</sup>.

1: Department of Virology, University Medical Center Göttingen, Germany

2: Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Germany

3: Institute for Medical Microbiology, University Medical Center Göttingen, Germany

4: Department of Environmental Health Sciences, University Medical Center Freiburg, Germany

\*: corresponding author