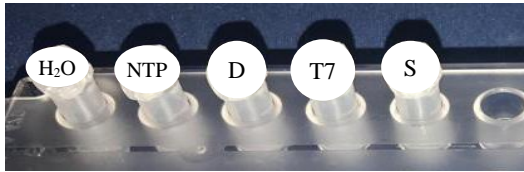


1. gRNA-Synthese



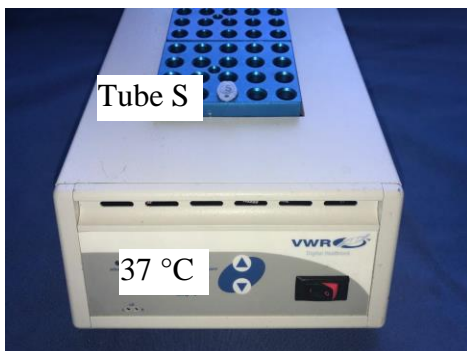
1.1 Pipettieren Sie folgende Reagenzien in Ihr weißes Eppi (S).

Eppi	Inhalt	Vol.
H ₂ O	nucleasefreies H ₂ O	16 µL
NTP	NTP Puffermix	10 µL
D	DNA Duplex	2 µL
T7	T7 RNA Polymerase	2 µL
Gesamtvolumen in S		30 µL

1.2 Entnehmen Sie 5 µL aus Ihrem Ansatz (S) und stellen Sie dieses Tube als Kontrolle, beschriftet mit S_{t0} und Ihrer Gruppennummer, auf Eis.

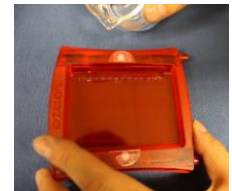


1.3 Inkubieren Sie Ihren Ansatz (S) bei 37 °C für 1 Stunde.



2. Überprüfen der synthetisierten gRNA durch Gel-Elektrophorese

2.1 Öffnen Sie die Flash-Gelkassette und benetzen Sie die Taschen mit H₂O_{dest.}



2.2 Überschüssiges Wasser wird mit Saugpapier abgeseugt.

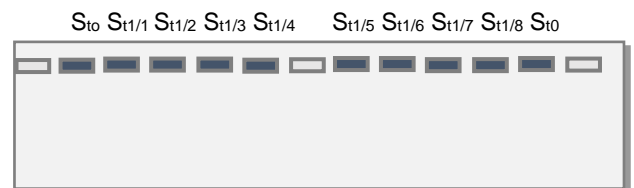


2.3 Pipettieren Sie 5 µL des gRNA Syntheseansatzes (S) in ein mit S_{t1} und Ihrer Gruppennummer beschriftetes Eppi.

2.4 Pipettieren Sie zu S_{t0} und S_{t1} jeweils 1 µL Ladebuffer (LP).

2.5 Setzen Sie die Flash-Gelkassette in das FlashGel-Dock ein.

2.6 Pipettieren Sie gemäß dem folgenden Pipettierschema je 6 µL der gRNA-Syntheseansätze S_{t1} mit Ladebuffer der verschiedenen Arbeitsgruppen und zweimal S_{t0} in die Taschen des Gels:



2.7 Schließen Sie das FlashGel-Dock an das Power Supply an und starten Sie die Elektrophorese bei 180 V.



2.8 Kontrollieren Sie den Verlauf der Gel-Elektrophorese durch Einschalten der UV-Lampe des FlashGel-Docks.

Aufgabe: Werten Sie Ihr Gel bezüglich der gRNA-Synthese aus.

3. Schneiden des Plasmids pBR322 mit der Nuclease Cas9



3.1 Pipettieren Sie folgende Reagenzien gemäß dem folgenden Pipettierschema in die Ansätze 1 - 3:

Ansatz	1	2	3
	pBR322 supercoiled	pBR322 supercoiled + Cas9 - gRNA	pBR322 supercoiled + Cas9 + gRNA
H₂O (Nuclea- sefrei)	24 µL	23 µL	22 µL
CP (Puffer)	3 µL	3 µL	3 µL
S (gRNA- Synthese)	0 µL	0 µL	1 µL
Cas Nuc- lease	0 µL	1 µL	1 µL
Mischen, zentrifugieren und inkubieren Sie für 10 Minuten bei RT			
P (pBR322 super- coiled 0,5 µg/µL)	2 µL	2 µL	2 µL
H₂O (Nuc- lease-frei)	1 µL	1 µL	1 µL
Inkubieren Sie für 15 Minuten bei 37 °C			
Gesamt Vol.	30 µL	30 µL	30 µL

4. Überprüfen des Cas9-Schnittes im Plasmid pBR322 mittels Gel-Elektrophorese

- 4.1 Pipettieren Sie aus den Ansätzen 1 – 3 jeweils 8,5 µL in 3 Eppis und beschriften Sie diese mit 1, 2 und 3.
- 4.2 Geben Sie in jedes der mit 1 – 3 beschrifteten Eppis 1,5 µL Ladepuffer (LP) hinzu und mischen Sie durch Auf- und Abpipettieren.
- 4.3 Öffnen Sie die Flash-Gelkassette und benetzen Sie die Taschen mit H₂O_{dest.}
- 4.4 Überschüssiges Wasser wird mit Saugpapier abgeseugt.
- 4.5 Setzen Sie die Flash-Gelkassette in das FlashGel-Dock ein.
- 4.6 Pipettieren Sie 4 µL Marker (**M**) und jeweils 10 µL Ihrer Proben **1 - 3** in die Gel-taschen gemäß dem folgenden Pipettierschema:

M 11 12 13 21 22 23 31 32 33 41 42 43



M 51 52 53 61 62 63 71 72 73 81 82 83



- 4.7 Schließen Sie das FlashGel-Dock an das Power Supply an und starten Sie die Gel-Elektrophorese bei 180 V.
- 4.8 Kontrollieren Sie den Verlauf der Gel-Elektrophorese durch Einschalten der UV-Lampe des FlashGel-Docks.

Aufgabe: Werten Sie Ihr Gel bezüglich des Nuclease Cas9-Schnittes aus.

5. Vorbereitung der DNA-Library

Komponenten des Rapid Barcoding Kits RBK004:

Name	Kürzel	Cap colour	Anzahl Eppis	Vol.
Fragmentation Mix	RB01-RB12	farblos	12	20
Rapid Adapter	RAP	Grün	1	10
Loading Beads	LB	pink	1	360
Sequencing Buffer	SQB	Rot	1	300

5.1 Pipettieren Sie **7,5 µL Ihrer CRISPR/Cas9 geschnittenen Plasmid-DNA aus Ansatz 3** in ein 1,5 mL Eppi (B).

5.2 **Pipettieren Sie 2,5 µL von einem der 12 Fragmentation Mixes (RB) hinzu** und durchmischen Sie durch Auf- und Abpipettieren.

5.3 Inkubieren Sie Ihren Ansatz bei der Optimaltemperatur der Transposase 30 °C für 1 Min.

5.4 Inkubieren Sie zur Denaturierung der Transposase Ihren Ansatz bei 80 °C für 1 Min.

5.5 Kühlen Sie Ihren Ansatz für 3 Min. im Eis.



5.6 **Poolen Sie alle 10 µL Ansätze der Arbeitsgruppen in einem 1,5 mL Eppi (P).**

Nur noch 1 Gruppe arbeitet weiter:

5.7 Entnehmen Sie **10 µL aus Eppi (P) in ein neues Eppi L (L für Library).**

5.8 Pipettieren Sie **1 µL Rapid Adapter (RAP) zu den 10 µL gebarcodeter DNA im Eppi L** und durchmischen Sie durch Auf- und Abpipettieren (Vol. = 11 mL).

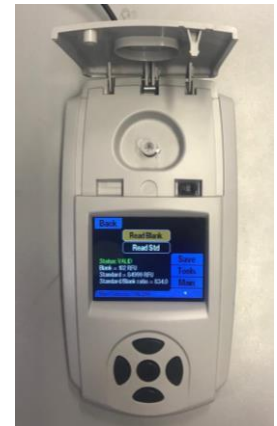
5.9 Inkubieren Sie Ihr Eppi L für 5 Min. bei 20 °C und messen Sie dann die DNA-Konzentration mittels Fluorometer.

6. Konzentrationsmessung der gebarcodeten DNA Library (L)

6.1 In ein 0,5 mL Eppi werden **200 µL Quanti-Fluor®ONE dsDNA Dye und 1 µL der DNA-Library (L)** pipettiert.

6.2 **Nach 5 minütiger Inkubation im Dunkeln** wird die Probe in den Fluorometer gestellt und gemessen:

Die DNA-Konzentration sollte zwischen 50 – 400 ng/µL liegen.



7. Fertigstellung der DNA-Library (L) für die Beladung der Flongle Flow Cell

7.1 Homogenisieren Sie die Loading Beads (LB) im Rapid Barcoding Kit (RBK004) durch Vortexen.

7.2 Pipettieren Sie folgende Reagenzien in ein erneut mit L (für DNA-Library) beschriftetes 1,5 mL Eppi, und durchmischen Sie durch Auf- und Abpipettieren.

Reagents cap	Tube-	Volume
Sequencing-Buffer	rot	15 µL
Loading Beads. pink		10 µL
DNA-Library	L	5 µL
Total		30 µL

7.3 Entfernen Sie den Sticker der Flongle Flow Cell und pipettieren Sie, **um Luftblasen im Array zu vermeiden, nur ca. 25 µL der 30 µL Library L** in den Probenport der Flongle Flow Cell.

7.4 Starten Sie die Sequenzierung im Programm MinkNOW und geben Sie das Set-up für die Sequenzierung ein.

Einrichten der Flongle Flow Cell und Durchführung eines Flow Cell Checks

1. Einsetzen des Flongle Adapters in das MinION



Der Adapter wird schräg unter die MinION Klemme bis zum Einrasten geschoben.

Die gesamte Anleitung ist auch als Video visualisiert.
Einfach hier Klicken →

Alternativ:

<https://www.youtube.com/embed/Wnx59DhrUe8?feature=oembed>



2. Verbindung herstellen zwischen MinION + Adapter und dem PC



Über das beigegefügte USB-Kabel wird die Verbindung zwischen PC und MinION aufgebaut.

→ MinION wird stromversorgt (LED leuchtet).

3. Einsetzen der Flongle Flow Cell in den Flow Cell Adapter



Die Flongle Flow Cell wird in Pfeilrichtung unter die MinION-Klemme geschoben und auf der anderen Seite nach unten gedrückt.

→ Die Flongle Flow Cell rastet mit einem Click ein.

4. Durch Doppelklick wird das Programm MinKNOW gestartet. Melden Sie sich mit Ihrem Nanopore Account auf der Nanopore Homepage an.

	<p>Melden Sie sich über folgenden Link auf der Nanopore Homepage an: https://community.nanoporetech.com/support</p>	
--	---	--

5. Wählen Sie im Connection Manager das Sequenziergerät aus, welches mit Ihrem PC verbunden ist.

		<p>Im Sequenzier - Überblick wird die Flongle Flow Cell angezeigt.</p>
--	--	--

6. Navigieren Sie zur Start Homepage und wählen Sie „Flow Cell Check“ aus

		<p>Klicken Sie auf Flow Cell Check.</p>
--	--	---

7. Wählen Sie den Flow Cell Typ FLO-FLG001 aus und geben Sie die Flongle ID-Nummer ein.

		<p>Geben Sie die Flongle Flow Cell ID ohne Leerzeichen ein. Klicken Sie auf start Flow Cell Check.</p>
--	--	--

Der Flow Cell Check dauert einige Minuten. Dann wird eines der drei folgenden Ergebnisse angezeigt.

--	--	--


Flongle Flow Cell Priming

(Austausch des Aufbewahrungspuffers gegen den Sequenzierungspuffer und wird durchgeführt vor dem Beladen mit einer ge-barcodeten Library und dem Start der Sequenzierung.)

1. Vorbereitung des Flongle Flow Cell Priming Puffers (FLB)

Pipettieren Sie aus dem Flow Cell Priming Kit EXT-FLP002 in ein 1,5 mL Eppi:

117 µl Flush Buffer (FB) + 3 µl Flush Tether (FLT) = 120 µl FLB

<p>Das Flongle Flow Cell Priming im Video Einfach hier Klicken →</p> <p>Alternativ den folgenden Link öffnen:</p> <p>https://www.youtube.com/watch?v=ExTMvDuOGK4</p>	
--	--

2. Priming der Flongle Flow Cell


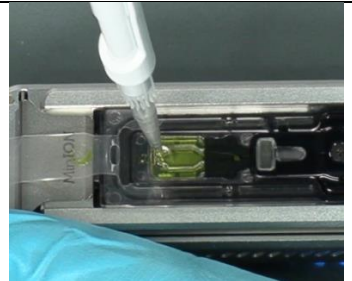

1. Abziehen des Klebestreifens (stickers)

		<p>Ziehen Sie den Klebestreifen der Flongle Flow Cell in Pfeilrichtung ab und kleben Sie den Sticker am Deckel des MinIONs fest.</p>
--	---	--

2. Ersetzen des Aufbewahrungspuffers der Flow Cell durch Priming Puffer (FLB)

Nehmen Sie 120 µl FLB **luftblasenfrei** in Ihre Pipette auf.

Stecken Sie die Pipettenspitze in den Ladeport. Prüfen Sie den festen Sitz der Pipettenspitze im Ladeport und befüllen Sie das Array mit 110 µl.

 <p>Spitze luftblasenfrei</p>		 <p>Volumenrest 5 µl</p>	<p>Achtung:</p> <ul style="list-style-type: none">- Nur etwa 110 µl Primingbuffer (FLB) sind einzufüllen!- Damit keine Luft in die Poren des Arrays pipettiert wird, verbleibt ein Volumenrest in der Pipette!
---	---	--	--

Die Flongle Flow Cell ist jetzt betriebsbereit für die Beladung mit einer ge-barcodeten Library und damit für die Sequenzierung.

