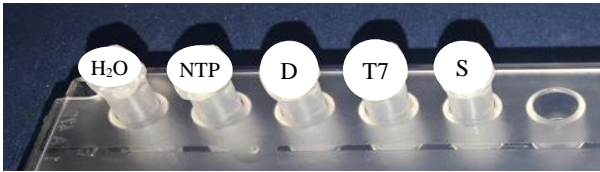


1. Syntéza gRNA



1.1 Napipetujte následující činidla do prázdné zkumavky S pro syntézu gRNA.

Zkumavka	Obsah	Objem
H ₂ O	H ₂ O bez nukleáz	16 μ L
NTP	NTP pufovací mix	10 μ L
D	DNA Duplex	2 μ L
T7	T7 RNA polymeráza	2 μ L
Celkový objem zkumavky S		30 μL

1.2 Pro slepou kontrolu syntézy gRNA napipetujte 5 μ L ze zkumavky S do nové zkumavky označené S_{t0} a číslem vaší skupiny a dejte chadit na led.

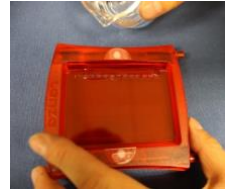


1.3 Zkumavku S nechte 1 hodinu inkubovat při teplotě 37 °C.



2. Kontrola vyprodukované gRNA pomocí gelové elektroforézy

2.1 Otevřte gelovou kazetu a naplňte jamky H₂O_{dest.} (destil. vodou)



2.2 Přebytečnou vodu odsajte papírovou utěrkou.

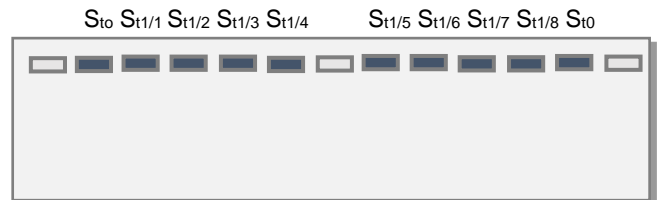


2.3 Vložte flash gel kazetu do flashgel stanice (Lonza).

2.4 Napipetujte 5 μ L vaší gRNA ze zkumavky S do nové zkumavky. Tu označte S_{t1} a číslem vaší skupiny.

2.5 Do zkumavek S_{t0} a S_{t1} přidejte 1 μ L nanášejícího pufru (LB).

2.6 Podle následujícího schématu napipetujte do jamek 6 μ L gRNA ze zkumavek S_{t1} skupin (1-8) a S_{t0} dvou skupin na začátek a konec řady.



2.7 Připojte flashgel stanici (Lonzu) do zdroje elektřiny, ten nastavte na 180 V.



2.8 Zapněte UV lampu na flashgel stanici a sledujte průběh gelové elektroforézy.

Úkol: Na základě gelové elektroforézy vyhodnoťte úspěšnost vaší gRNA syntézy.

3. Střih plazmidu pBR322 nukleázou Cas9



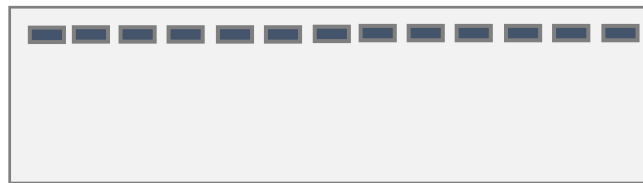
3.1 Napipetujte podle následující tabulky vzorky 1 – 3:

Vzorek	1	2	3
	pBR322 svinutý	pBR322+ svinutý Cas9 (- gRNA)	pBR322 svinutý + Cas9 + gRNA
H₂O (bez nukleáz)	25 µL	24 µL	23 µL
CP (Pufr)	3 µL	3 µL	3 µL
S (syntetizovaná gRNA)	0 µL	0 µL	1 µL
Cas9 nukleáza	0 µL	1 µL	1 µL
Zamíchejte zkumavky poklepáváním o stůl a inkubujte 10 minut při pokojové teplotě			
P (pBR322 svinutý 0,5 µg/µL)	2 µL	2 µL	2 µL
Zamíchejte zkumavky poklepáváním o stůl a inkubujte 15 minut při teplotě 37 °C			
Celkový objem vzorku	30 µL	30 µL	30 µL

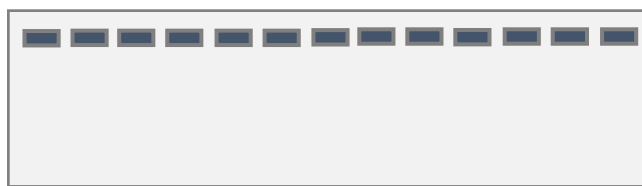
4. Důkaz stříhu plazmidu (pBR322_{lin}) nukleázou Cas9 pomocí gelové elektroforézy

- 4.1 Napipetujte 8.5 µL z vašich vzorků 1 – 3 do tří nových zkumavek a označte je opět 1, 2 a 3
- 4.2 Přidejte do každé ze tří nových zkumavek 1,5 µL nanášecího pufru (LB) a zamíchejte pocvrknutím ukazováčkem
- 4.3 Otevřete gelovou kazetu a naplňte jamky H₂O_{dist.} (destilovanou vodou)
- 4.4 Přebytečnou vodu odsajte papírovou utěrkou.
- 4.5 Vložte flashgelovou kazetu do flashgelové stanice
- 4.6 Podle následujícího schématu napipetujte do svých jamek
 - 4 µL markeru (M),
 - 10 µL vašich vzorků 1 - 3

M 1/1 1/2 1/3 2/1 2/2 2/3 3/1 3/2 3/3 4/1 4/2 4/3



M 5/1 5/2 5/3 6/1 6/2 6/3 7/1 7/2 7/3 8/1 8/2 8/3



- 4.7 Připojte flashgelovou stanici ke zdroji elektřiny, a ten nastavte na 180 V.
- 4.8 Zapněte UV lampu a sledujte průběh elektroforézy.

Úkol: Vyhodnoťte na základě výsledků vaší gelové elektroforézy úspěšnost štěpení plazmidu nukleázou Cas 9.

**5. Příprava DNA knihovny**

Seznam chemikálií a vzorků v Rapid Barcoding Kit RBK004:

Název	Zkratka	Barva	Počet tubiček	Objem v μL
Fragmentační směs	RB01-RB12	bez barvy	12	20
Rapid Adapter	RAP	zelená	1	10
Nanášecí kuličky	LB	růžová	1	360
Sekvenační pufr	SQB	červená	1	30

5.1 Pipetujte **7,5 μL CRISPR/Cas9 plazmidové DNA ze vzorku číslo 3** do 1,5 mL zkumavky označené písmenem B (B znamená barcoding - kódování).

5.2 Do zkumavky B přidejte **2,5 μL jedné z 12 fragmentačních směsí** (RB01-12) a promíchejte ji pipetováním nahoru a dolů (takto to provedete postupně u všech fragmentačních směsí).

5.3 Pro zakódování DNA inkubujte zkumavku B po 1 minutu při teplotě 30 °C, což je ideální teplota pro enzym **transposáza**.



5.4 Pro denaturaci **transposázy** inkubujte zkumavku B po 1 minutu při teplotě 80 °C.

5.5 Chladte zkumavku B v ledu po dobu 3 minut.

5.6 **Slijte 10 μL vzorky ode všech pracovních skupin do jedné 1,5 mL zkumavky označené písmenem P** (P znamená Pool - slít)

Pouze jedna skupina dělá následující kroky:

5.7 Pipetujte **10 μL ze zkumavky P do nové zkumavky L s objemem 1,5 mL** (L znamená Library – knihovna).

5.8 Přidejte **1 μL rapid adapter (RAP)** do **10 μL kódované DNA ve zkumavce L** a smíchejte jej pipetováním nahoru a dolů (dohromady 11 μL).

5.9 Inkubujte **zkumavku L** 5 minut při teplotě 20 °C a změřte koncentraci DNA pomocí fluorometru.

6. Měření koncentrace DNA ve zkumavce L – DNA knihovna

6.1 Do 0,5 mL zkumavky pipetujte **200 μL QuantiFluor®ONE dsDNA Dye** a přidejte **1 μL DNA knihovny ze zkumavky L**.

6.2 Po 5 minutách inkubace **ve tmě** se DNA koncentrace v 0,5 mL zkumavce změní pomocí fluorometru. Nastavte fluorometr tak aby:

- Objem měřeného roztoku:

200 μL

- Jednotky: ng/ μL

Změřená koncentrace DNA by měla být v rozmezí 10 – 400 ng/ μL .

**7. Dokončování a úprava DNA knihovny (L) pro nahrání do Flongle Flow Cell**

7.1 Homogenizujte nanášecí kuličky (LB – loading beads) v Rapid Barcoding Kit RBK004 po mocí vortexování.

7.2 Pipetujte následující směsi do 1,5 mL zkumavek, také označených písmenem L (DNA-Library) a promíchejte pipetováním nahoru a dolů.

Vzorky	Barva	Objem
Sekvenační buffer	červená	15 μL
Nanášecí kuličky	růžová	10 μL
DNA-knihovna	L	5 μL
Finální produkt	L	30 μL

MinKNOW by už měl běžet , Flongle Flow Cell check a Priming by už měl být hotov.

7.3 Odstraňte nálepkou z Flongle Flow Cell, **abyste zamezili vzniku bublinek pipetujte pouze 25 μL z celkových 30 μL ve zkumavce/knihovně L** do nanášecího portu Flongle Flow Cell.

7.4 Otevřete sekvenační setup v MinKNOW a začněte sekvenovat.



Příprava Flongle Flow Cell a Flow Cell Check

1. Vložte Flongle Adapter do zařízení MinION (**Noste rukavice abyste zamezili kontaminaci**)

Otevřete MinION a vyjměte Configuration test cell (CTC).



Oddělte kryt CTC protection z Flongle adapteru.
Vtlačte Flongle adapter pod nerezový klip dokud necvakne – tak poznáte, že je adaptér na svém místě

Klikněte na odkaz a zhlédněte film o celé proceduře
→

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



2. Připojte MinION k vašemu počítači



Připojte počítač se zařízením MinION pomocí USB kabelu

→ Pokud je MinION připojen správně a proudí do něj elektřina, rozsvítí se LED dioda červeně.

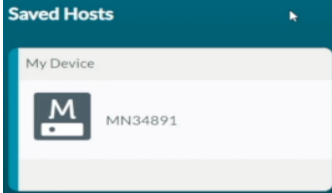
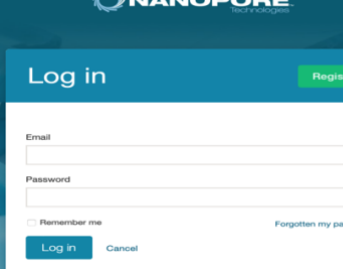
3. Vložte Flongle Flow Cell do Flow Cell Adapteru



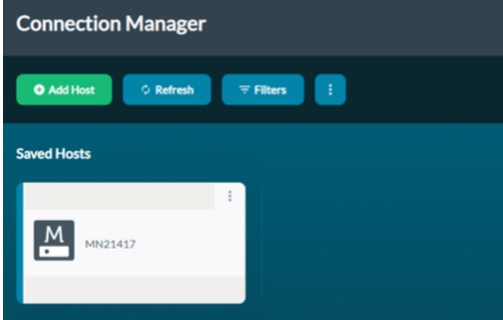

Vložte Flongle Flow Cell ve směru šipky pod nerezový klip MinION a tlačte v opačném směru
→ se cvaknutím poznáte, že je Flongle Flow Cell usazena

4. Dvakrát klikněte na MinKNOW a program se otevře
Přihlaste se se svým Nanopore účtem (Email a heslo).

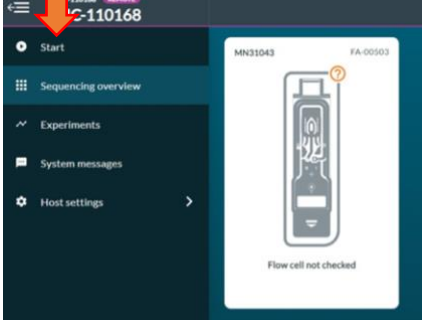
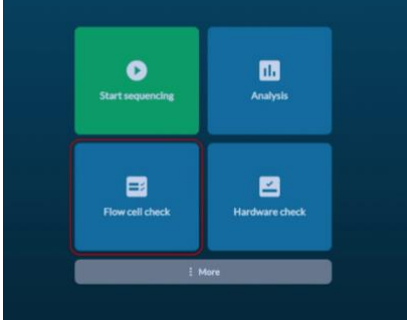


	<p>Klikněte na následující odkaz pro vytvoření Nanopore účtu</p> <p>https://community.nanoporetech.com/support</p> <p>Přihlaste se svým emailem a heslem</p>	
---	---	---

5. Vyberte v Connection Manager sekvenční zařízení připojené k vašemu počítači

		<p>V přehledu o sekvenci se zobrazí ikona Flongle Flow Cell.</p>
--	---	--

6. Rozklikněte Start a klikněte na „Flow Cell Check“

		<p>Klikněte na Flow Cell Check.</p>
---	--	-------------------------------------

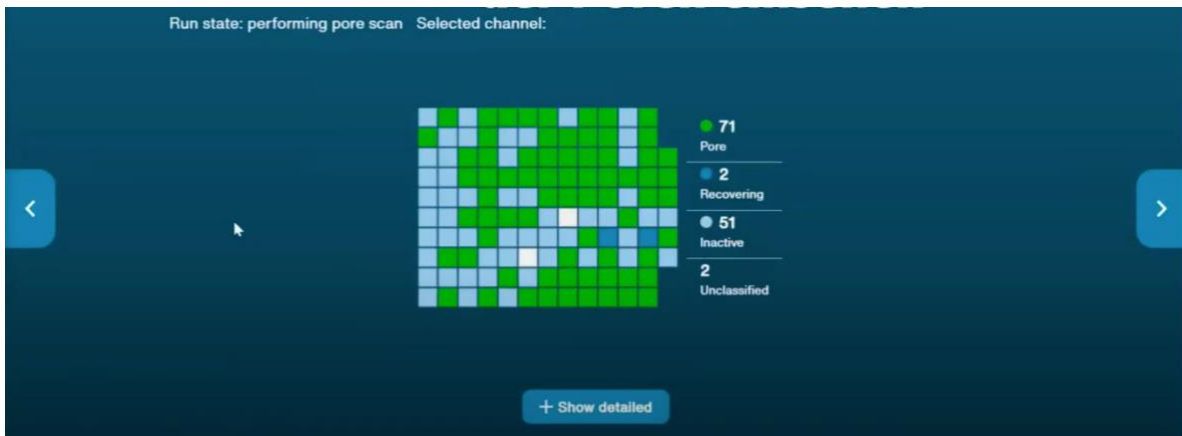


7. Přidejte Flongle Flow Cell ID a vyberte Flow Cell Type: FLO-FLG001.

		<p>Vytvořte Flongle Flow Cell ID (3 písmena a 3 čísla bez mezery). Vyberte typ FLO-FLG001. Klikněte na start Flow Cell Check.</p>
--	--	---

Flow Cell Check zabere pár minut.

Klikněte na **Experiments** a **current Flow Cell Check** abyste viděli parametry kontroly:



Na konci Flow Cell Check kontroly se objeví jedna ze tří možností:

--	--	--

Zelené šipka znamená „Připraven k sekvenování” – zkouška byla úspěšná.

Pokud Flongle Flow Cell check objeví aspoň padesát pórů, je kontrola úspěšná a zařízení je připraveno k použití.



			<p>Důležité:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Na vyplnění sekvenační destičky Flongle je potřeba jen 110 μl priming-pufru (FLB) - Abychom zabránili vzduchovým bublinám v prostoru sekvenační destičky musí zbytek kapaliny zůstat v tipu pipety
<p>Tip pipety naplněn 120 μl FLB bez vzduchových bublin.</p>	<p>Pipetování 110 μl FLB do vstupního portu Flongle.</p>	<p>Zbytek FLB tekutiny (může to být 5 – 10 μl)</p>	

Příprava sekvenační destičky Flongle

Po kontrole Flongle Flow Cell musí být pufr, který je uložený uvnitř Flongle, nahrazen sekvenovacím pufrem. Toto by mělo být provedeno těsně před začátkem sekvenování.

1. Příprava sekvenační destičky Flongle Priming pufru (FLB)

Přepipetujte Priming sadu sekvenační destičky (EXT-FLP002) do 1,5 mL zkumavky:

117 μ l Flush pufr (FB) + 3 μ l Flush Tether (FLT) = 120 μ l FLB

<p>Video o přípravě sekvenační destičky Flongle</p>	
<p>Klikněte na obrázek →</p>	
<p>Pro více informací využijte následující link:</p>	
<p>https://www.youtube.com/watch?v=ExTMvDuOGK4</p>	

2. Příprava Flongle

2.1 Sundejte nálepku, kterou je přelepena sekvenační destička Flongle

		<p>Sundejte nálepku z Flongle Flow Cell ve směru, který je naznačen šipkami a zafixujte ji na vnitřní straně víčka MiniON.</p>
<p>Odstraňte nálepku</p>	<p>Vstupní port je otevřen</p>	

2.2 Náhrada storage pufru v sekvenační destičce Flongle priming pufrem (FLB)

Nasajte pipetou 120 μ l priming pufru (FLB). Pipetu dejte do vstupního portu sekvenační destičky Flongle. Zkontrolujte, že tip pipety pasuje do vstupního portu. Přepipetujte 110 μ l FLB ze 120 μ l do sekvenační destičky (**bez vzduchových bublin!**).

Sekvenační destička Flongle je připravena pro načtení DNA knihovny (viz strany 3; 7.3) a začátek sekvenování.



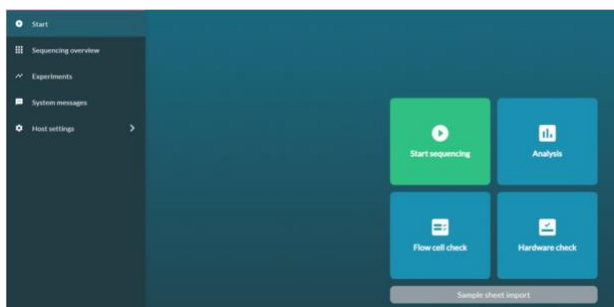
Začátek sekvenování

Program MinKNOW pořád běží a příprava Flow Cell Priming byla úspěšná

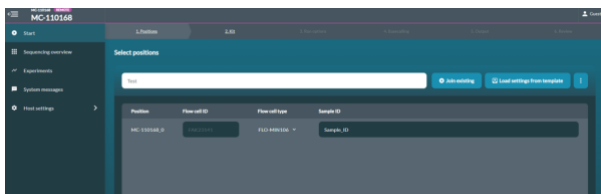
Program MinKNOW kontroluje MinION Flow Cell nahrávání nezpracovaných dat, basecalling a barcode demultiplexing.

Vyberte možnost spuštění

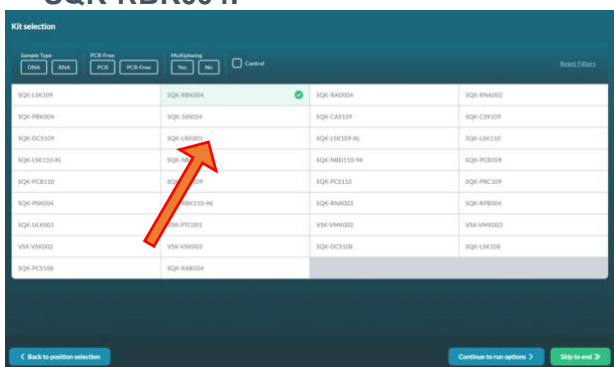
1. Vyberte sekvenační destičku Flongle připojenou k počítači, klikněte na start a přejděte na nastavení sekvenování.



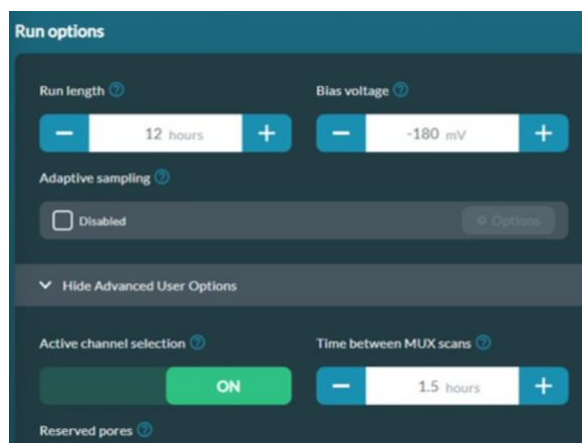
2. Vyberte: Select positions -> „1. Positions“. Pojmenujte experiment a vyberte přístupové číslo.



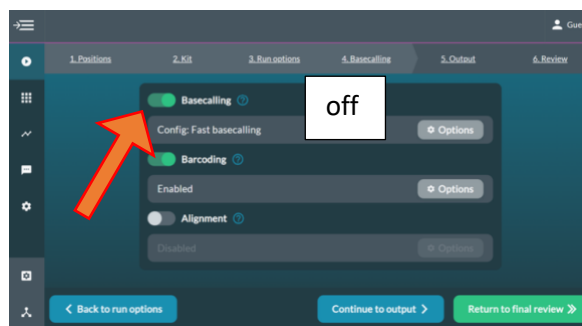
3. Vyberte: „Continue to kit selection“
Ve výběru sady klikněte na: **SQK-RBK004**.



4. Klikněte na „Continue to run options“
Možnosti spuštění jsou nastaveny → neměňte!
- délka běhu: 24 h
- aktivní výběr kanálu: zapnuto

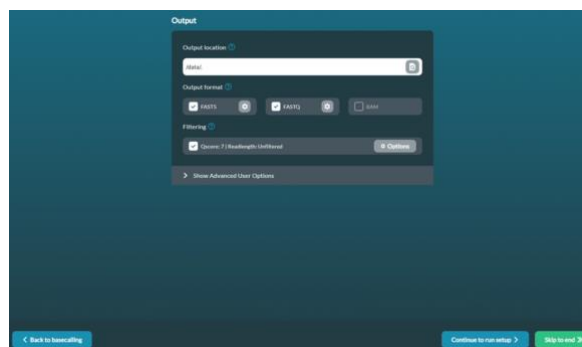


5. Klikněte na „Continue to basecalling“



Pod „Continue to Basecalling“ basecalling musíte vypnout (– musí to být šedé). Pokud není zaznamenán objem dat během basecallingu, tak je to pro počítač moc velký objem.

6. Klikněte na „Continue to output“
Vyberte na počítači, kde se mají tyto data uložit (např.: C/data/ + jméno)



7. Projděte si znova nastavení sekvenování podle vzorového příkladu → Klikněte na: **Start**
Po 15 minutách budou první nezpracovaná data 1000 přečtena a uložena v c/data/.. jako Fast5 složka