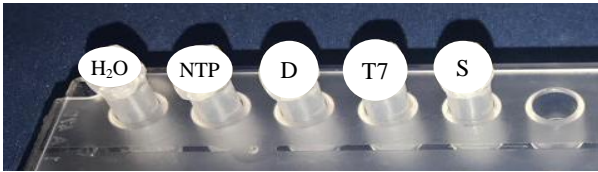


1. gRNA-Syntese



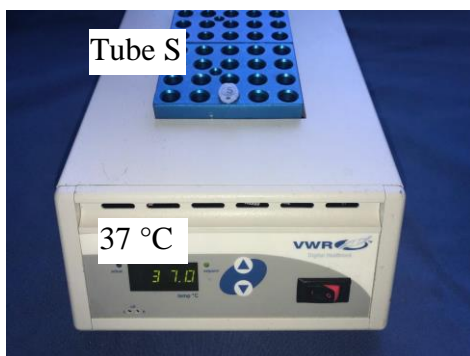
1.1 Pipetter følgende reagenter i dit tomme rør S til gRNA-syntese.

Rør	Indhold	Vol.
H ₂ O	Nukluase fri H ₂ O	16 μ L
NTP	NTP-buffer mix	10 μ L
D	DNA Duplex	2 μ L
T7	T7 RNA Polymerase	2 μ L
Total Volumen i rør S		30 μL

1.2 Som den negative kontrol for gRNA-syntese pipetter 5 μ L ud af dit rør S over i et nyt rør mærket med S₁₀ og dit gruppenummer og læg det på is.

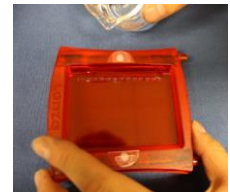


1.3 Inkubér dit rør S ved 37 °C i en time.



2. Kontrol af produceret gRNA ved gel-elektroforese

2.1 Åben gel-kassette og fugt brøndene med H₂O_{dest.}



2.2 Fjern overskydende vand ved brug af køkkenrulle.



2.3 Indsæt flash gel-kassette i flash gelholderen.

2.4 Pipetter 5 μ L ud af dit gRNA-syntese rør (S) over i et nyt rør mærket med S₁₁ og dit gruppenummer.

2.5 Tilføj til begge rør S₁₀ og S₁₁ 1 μ L af loadingbuffer.

2.6 Pipetter ud fra følgende skema 6 μ L gRNA-synteserørene S_{11/1} – S_{11/8} og 2 grupper S₁₀ i gelens brønde:



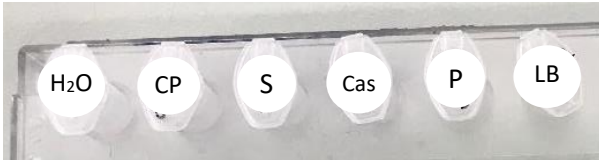
2.7 Forbind flash gelholderen til en strømforsyning og start elektroforesen ved 180 V.



2.8 Se forløbet af elektroforesen ved at tænde UV-lampen på holderen.

Spørgsmål: Evaluér din gel med henblik på RNA-syntese.

3. Klipping af plasmid pBR322 med nuclease Cas9.



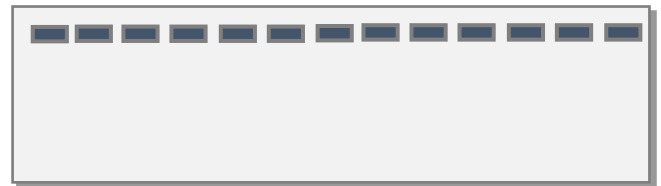
3.1 Pipetter prøve 1 – 3 som i følgende tabel:

Prøver	1	2	3
	pBR322 <i>oversnoet</i>	pBR322+ <i>oversnoet</i> Cas9 (- gRNA)	pBR322 <i>oversnoet</i> + Cas9 + gRNA
H ₂ O (nucleas e fri)	25 µL	24 µL	23 µL
CP (Buffer)	3 µL	3 µL	3 µL
S (syntetis eret gRNA)	0 µL	0 µL	1 µL
Cas9 nuclease	0 µL	1 µL	1 µL
Bland ved at knipse på røret og inkubér i 10 minutter ved stuetemperatur.			
P (pBR322 <i>oversnoet</i> t 0,5 g/µL)	2 µL	2 µL	2 µL
Bland ved at knipse på røret og inkubér i 15 minutter ved 37 °C.			
Samlet prøve Vol.	30 µL	30 µL	30 µL

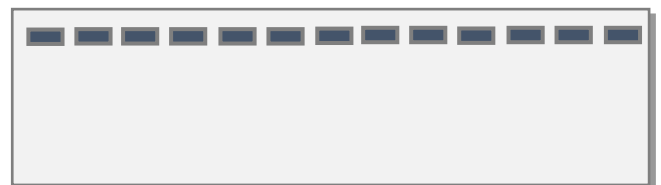
4. Påvisning af Cas9-klippning af plasmid(pBR322_{in}) ved hjælp af gelelektroforese.

- 4.1 Pipetter 8,5 µL ud af prøve 1 – 3, i 3 nye rør og markér dem med 1, 2 og 3.
- 4.2 Tilføj i hvert af de 3 nye rør 1.5 µL af loadingbuffer (LB) og bland ved at knipse på røret.
- 4.3 Åben gelkassetten og fugtiggør brøndene med H₂O_{dist.}
- 4.4 Opsug det resterende vand med køkkenrulle.
- 4.5 Indsæt flashgel-kassetten i flashgel-holderen.
- 4.6 Pipetter i henhold til følgende pipetteringsskema i hver brønd på din gelkassette.
 - 4 µL farve (M),
 - 10 µL af prøverne 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 Forbind flashgel-holderen til strømforsyningen og start gelelektroforese ved 180 V.
- 4.8 Se forløbet af elektroforese ved at tænde UV-lampen på maskinen

Opgave: Evaluér din gel vedrørende nukleaseCas9-spaltning

5. Forberedelse af DNA-biblioteket

Reaktanterne i "Flash-Barcode"-sættet RBK004:

Navn	Forkortelse	Farve på låget	Rør	Vol. (µL)
Fragmenterings-Blanding	RB01-RB12	farveløs	12	20
Rapid Adapter	RAP	grøn	1	10
Loading Beads	LB	pink	1	360
Sekvenserings-Buffer	SQB	rød	1	300

5.1 Pipetter **7,5 µL af CRISPR/Cas9-klippet plasmid-DNA fra test 3** i et 1,5 mL rør markeret med B (B står for Barcode).

5.2 Tilføj i rør B **2,5 µL af én af de 12 fragmenteringsblandinger** (RB01-12) og bland det sammen ved at pipettere op og ned.

5.3 For at „Barcode“, inkubér dit rør B i 1 minut ved 30 °C, som er den optimale temperatur for enzymet transposase.



5.4 For at denaturere transposasen, inkubér rør B ved 80 °C i 1 minut.

5.5 Afkøl rør B i 3 minutter på is.

5.6 **Saml de 10 µL volumen fra alle arbejdsgrupper i et 1,5 mL rør markeret med P** (P står for "Pool" (samling)).

Kun 1 gruppe skal fortsætte med arbejdet:

5.7 Pipetter **10 µL af rør (P) i et nyt 1,5 mL rør L** (L står for "Library", (bibliotek)).

5.8 Tilføj **1 µL "Rapid Adapter" (RAP) til 10 µL "Barcode" DNA i rør L** og bland det ved at pipettere op og ned (Vol. = 11 µL).

5.9 Inkubér rør L i 5 minutter ved 20 °C og mål DNA-koncentrationen med et fluometer.

6. Måling af koncentrationen af DNA-bibliotek (L)

6.1 Pipetter i et 0,5 mL rør **200 µL QuantiFluor®ONE dsDNA-farve og 1 µL af DNA-bibliotek (L)**.

6.2 Efter inkubering i 5 minutter i **mørke** skal DNA-koncentrationen i 0,5 mL-røret måles med fluorometeret.

Vælg følgende indstilling i fluorometeret:
- Prøvevolumen: 200 µL
- Units: ng/µL



Den målte DNA-koncentration skal være mellem 10 – 400 ng/µL.

7. Færdiggørelse af DNA-biblioteket (L) for at indlæse i "Flongle Flow Cell"

7.1 Bland "Loading Buffer" (LB) med "Rapid Barcode Kit" RBK004 og ryst let indtil blandingen er homogen.

7.2 Pipetter de følgende reaktanter i et 1,5 mL rør, igen markeret med L (for DNA-Library) og bland ved at pipettere op og ned:

Reaktanter	Rørets låg	Volumen
Sekvenseringsbuffer	rød	15 µL
Loading Beads	pink	10 µL
DNA-bibliotek	L	5 µL
Samlet Vol.	L	30 µL

"MinKNOW" skal allerede være klar, og "Flongle Flow Cell"-kontrol og "priming" skal være klargjort.

7.3 Fjern klistermærket på "Flongle Flow Cell". For at undgå luftbobler i det klargjorte sæt **pipetteres kun 25 µL af de 30 µL "Library" L** i loading-rummet i "Flongle Flow Cellen".

7.4 Forbered set-uppet i "MinKNOW" og begynd herefter at sekvensere.

Forberedelse af 'Flongle Flow Cell' maskinen og 'Flow Cell Check'

1. Indsæt 'Flongle adapteren' i MinION (**Bær handsker for at undgå forurening**)
Åben MinION og udtag konfigurationstestsellen (CTC)

		<p>Tag CTC-beskyttelse ud af 'Flongle adapteren'.</p> <p>Skub 'Flongle adapteren' under den rustfri stålclips, indtil den klikker på plads.</p>
---	--	---


Klik på billedet for at se en film om proceduren →

Alternativ: Åben det følgende link i browseren:



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



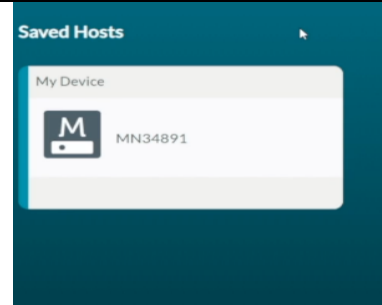
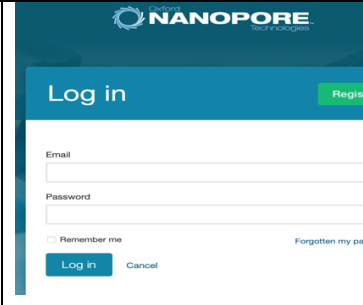
2. Forbind MinION med en computer

	<p>Forbind computeren med MinION med et USB stik.</p> <p>→ MinION får adgang til elektricitet, og LED lyser rødt.</p>
---	---

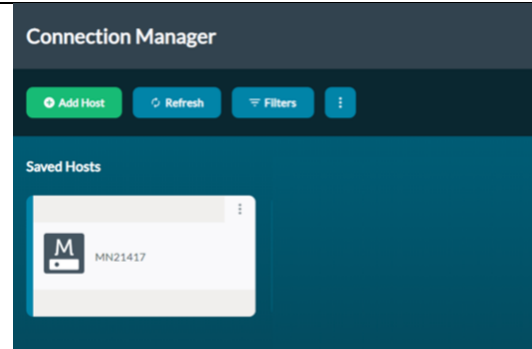
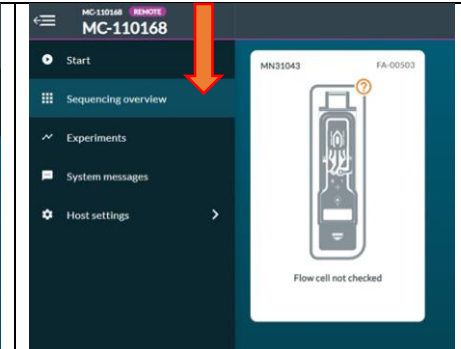
3. Indsæt 'Flongle Flow Cell' i 'Flow Cell Adapteren'

		<p>Skub 'Flongle Flow Cell' i pilens retning under de rustfri stålclips af MinION'en, og tryk den ned på den anden side → med et klik klikker 'Flongle Flow Cell' i.</p>
---	--	--

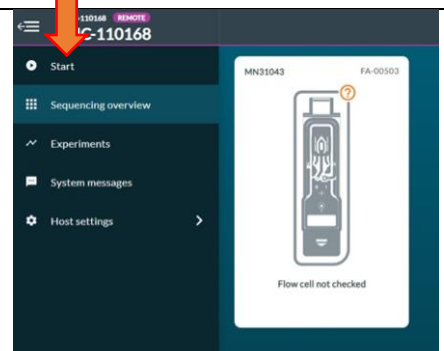
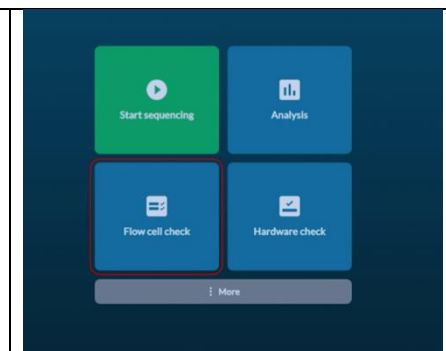
4. Med et dobbeltklik startes 'MinKNOW' programmet.
Log ind med din Nanopore-konto (E-mail og adgangskode).

	<p>Tryk på det følgende link for at logge ind på 'Nanopore-hjemmesiden':</p> <p>https://community.nanoporetech.com/support</p> <p>Log ind med din Email og adgangskode.</p>	
---	--	---

5. Vælg I 'Connection Manager' den sekvenseringsenhed, som er forbundet med din computer.

		<p>I sekvenseringsoversigten vises 'Flongle Flow Cell'.</p>
--	---	---

6. Naviger til start og vælg „Flow Cell Check“

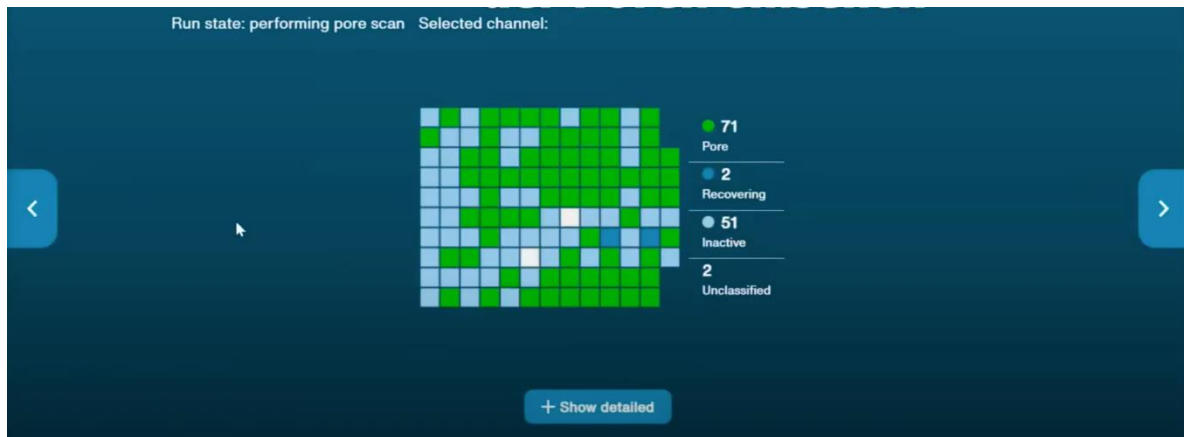
		<p>Klik på knappen 'Flow Cell Check'.</p>
---	--	---

7. Tilføj 'Flongle Flow Cell ID' og vælg 'Flow Cell' Typen: FLO-FLG001.

		<p>Tilføj 'Flongle Flow Cell ID' (3 bogstaver og 3 tal, uden mellemrum). Vælg type: FLO-FLG001. Klik på start 'Flow Cell Check'.</p>
--	--	--

'Flow Cell Check' tager nogle minutter.

Klik på 'Experiments' og den aktuelle 'Flow Cell Check' for at se parametrene under kontrollen:



I slutningen af 'Flow Cell Check' vil et af de 3 følgende resultater blive vist:

Den grønne pil viser „Klar til sekvensering”

Et resultat af 'Flongle Flow Cell' kontrol, med mere end 50 fundne porer, er fint.

--	--	--



"Flongle Flow Cell" Priming (forberedelse)

Efter "Flongle Flow Cell" kontrol skal lagerbufferen inde i Flonglen erstattes af sekventeringsbufferen. Dette skal gøres umiddelbart før start af sekventering

1. Klargøring af "Flongle Flow Cell" Priming Buffer (FLB)

Pipetter fra "Flow Cell Priming Kit (EXT-FLP002)" i et 1,5 mL rør:

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

Video om "Flongle Flow Cell Priming"

Tryk på billedet →

For alternativ klik på følgende link:

<https://www.youtube.com/watch?v=ExTMvDuOGK4>



2. Priming af "Flongle Flow Cell"

2.1 Træk mærkaten af "Flongle Flow Cell"



Træk mærkaten af



Indlæsningsporten er åben

Træk mærkaten af "Flongle Flow Cell" i retningen markeret med pile og fastgør mærkaten inde i låget på "MinION".

2.2 Udskiftning af lager buffer i "Flongle Flow Cell" med Priming Buffer (FLB)

Udtag 120 µl priming buffer (FLB) med din pipette. Pipetten skal være fri for luftbobler.

Placer pipettespidsen i indlæsningsporten på "Flongle Flow Cell." Kontrollér, at pipettespidsen passer ind i indlæsningsporten.

Pipetter uden luftbobler i "Flongle Flow Cell" indlæsningsporten 10 µl FLB ud af 120 µl.



Pipettespids fyldt med 120 µl FLB som er fri for luftbobler.



Afpipettering af 110 µl FLB i indlæsningsporten på en "Flongle"



Resten af FLB-væske (kan være 5 – 10 µl)

Vær opmærksom på:

- Det er kun nødvendigt at afpipettere 110 µl af priming-buffer (FLB) for at udfylde indlæsningsporten i "Flongle Flow Cell"!
- For at undgå luftbobler i indlæsningsporten af "Flongle Flow Cell", forbliver en rest af væsken i pipettespidsen!

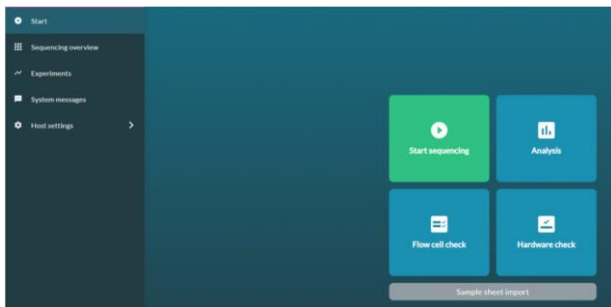
"Flongle Flow Cell" er nu klar til brug til loading af et DNA-bibliotek (se side 3; 7.3) og start sekvensering.

Start sekvensering

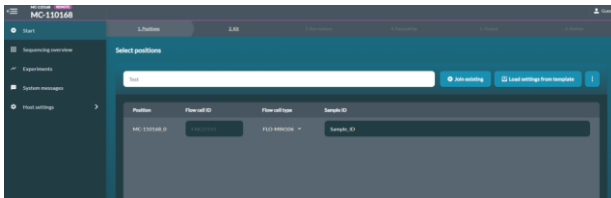
Programmet "MinKNOW" kører stadig og "Flow Cell Priming" var vellykket
 Programmet "MinKNOW" styrer "MinION Flow Cell", rådataen, "basecalling" og stregkodedemultipleksing

Vælg "Run options"

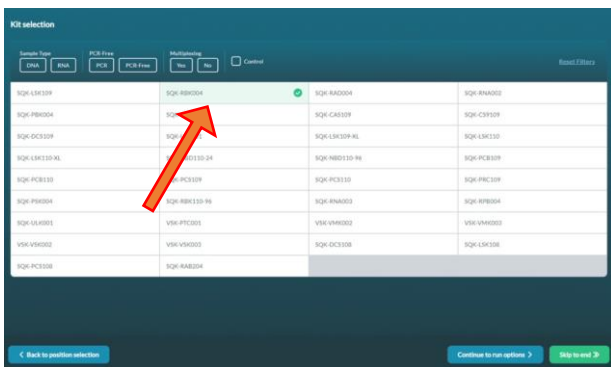
1. Vælg "Flongle Flow cell" der er forbundet med computeren og klik på start-knappen for at gå ind i sekvensopsætningen.



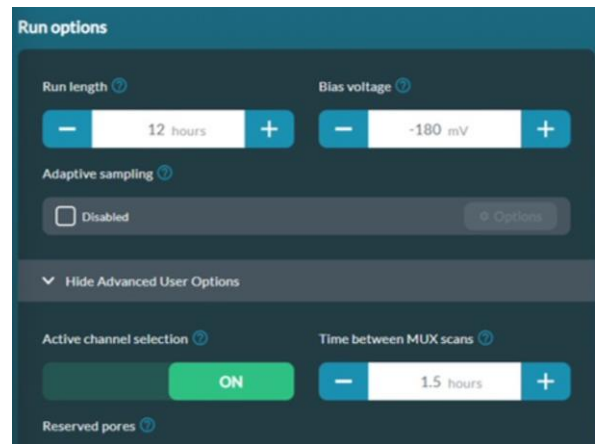
2. Vælg position.
 Vælg "1. Positions"
 Navngiv dit eksperiment og vælg et tilførselstal



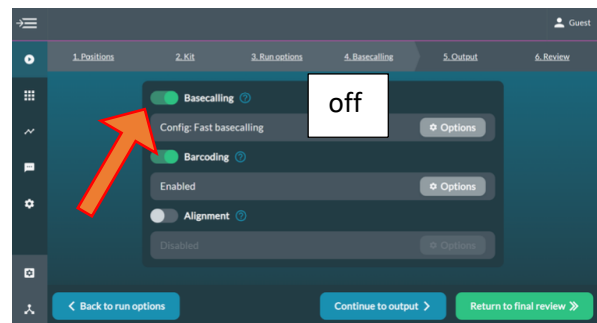
3. Vælg knappen „Continue to kit selection“
 I "kit selection table" tryk på **SQK-RBK004**.



4. Klik på knappen „Continue to run options“
 kørselsmuligheder er fastsatte → ændres ikke!
 - "run length" (Kørselsvarighed): 24 timer
 - "Active channel selection": "on"

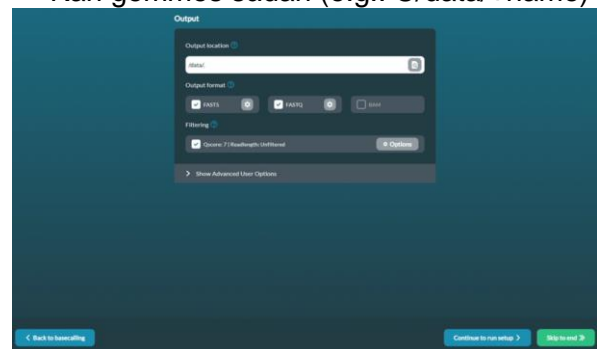


5. Tryk på knappen "Continue to basecalling"



Under „Continue to Basecalling“ skal "basecalling" være slået fra (den skal være grå).
 Hvis den ikke er grå er datavolumen under "basecalling" for høj for computeren.

6. Tryk på knappen „Continue to output“
 Vælg på computeren hvor dataen skal gemmes
 Kan gemmes sådan (e.g.: C/data/+name)



7. Gennemgå din sekvensopsætning I henhold til den viste tabel
 → Tryk på knappen: Start
 Efter 15 min. vil den første rådata-pakke med 1000 aflæsninger blive gemt i c/data/+navn som en Fast5-fill