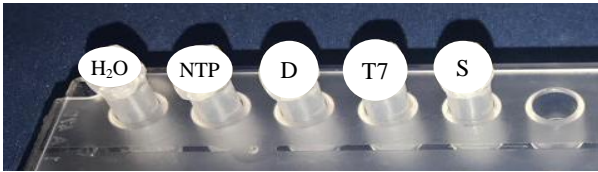


1. gRNR Sintezė



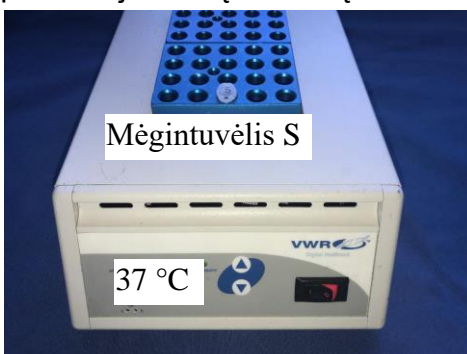
1.1 Pipete įlašinkite lentelėje pateiktus reagentus į mėgintuvėlį S gRNR sintezei.

| Mėgintuvėlis | Turinys | Tūris |
|--------------------------|-------------------------------|--------------|
| H ₂ O | Vanduo be nukleazių | 16 μL |
| NTP | NTP buferinio tirpalo mišinys | 10 μL |
| D | Dvigrandė DNR | 2 μL |
| T7 | T7 RNR Polimerazė | 2 μL |
| Bendras tūris (S) | | 30 μL |

1.2 gRNR sintezės kontrolei pipete perpilkite 5 μL mišinio iš mėgintuvėlio S į naują mėgintuvėlį pažymėtą S₁₀ ir jūsų grupės numeriu ir įdėkite jį į ledą.

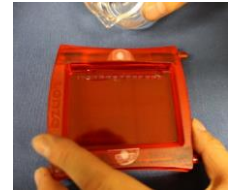


1.3 Inkubuokite mėgintuvėlį S 37 °C temperatūroje vieną valandą.



2. Pagamintos gRNR patikrinimas elektroforezės būdu

2.1 Atidarykite Flash-Gel kasetę ir sudrėkinkite šulinėlius H₂O_{dist.}



2.2 Pašalinkite vandens perteklių popieriniu rankšluosčiu.



2.3 Įstatykite FlashGel kasetę į FlashGel prietaisą.

2.4 Pipete įlašinkite 5 μL iš jūsų gRNR sintezės mėgintuvėlio (S) į naują mėgintuvėlį, pažymėtą S_{t1} ir jūsų grupės numeriu.

2.5 Į mėgintuvėlius S_{t0} ir S_{t1} įlašinkite po 1 μL mėginio suleidimo dažo (LB).

2.6 Į gelio šulinėlius įpilkite po 6 μL gRNR iš jūsų grupės mėgintuvėlių pažymėtų S_{t1/1} – S_{t1/8}, o į du šulinėlius - iš mėgintuvėlio S_{t0} pagal nurodytą schemą:



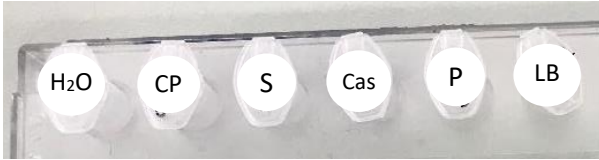
2.7 Prijunkite FlashGel prietaisą prie maitinimo šaltinio ir pradėkite elektroforezę su 180 V įtampa.



2.8 Įjungę prietaiso UV spindulių lempą stebėkite elektroforezės eigą.

Užduotis: Įvertinkite elektroforezės rezultatus gRNR sintezės atžvilgiu.

3. Plazmidės pBR322 suskaidymas nukleaze Cas9



3.1 Pipete įlašinkite mėginius 1-3 pagal pateiktą lentelę:

| Mėginys | 1 | 2 | 3 |
|--|-----------------------------|--|---|
| | pBR322 <i>ištiesinta</i> | pBR322+ <i>ištiesinta</i> Cas9 (- gRNA) | pBR322 <i>ištiesinta</i> + Cas9 + gRNA |
| H₂O (be nukleazių) | 25 μL | 24 μL | 23 μL |
| CP (buferinis tirpalas) | 3 μL | 3 μL | 3 μL |
| S (susintetinta gRNA) | 0 μL | 0 μL | 1 μL |
| Cas9 nukleazė | 0 μL | 1 μL | 1 μL |
| Maišykite lengvai tapšnodami mėgintuvėlius ir inkubuokite 10 minučių kambario temperatūroje | | | |
| P (pBR322 <i>ištiesinta</i> 0,5 μg/μL) | 2 μL | 2 μL | 2 μL |
| Maišykite lengvai tapšnodami mėgintuvėlius ir inkubuokite 15 minučių 37°C temperatūroje | | | |
| Galutinis mėginių tūris | 30 μL | 30 μL | 30 μL |

4. Plazmidės (pBR322_{lin}) DNR perkirpimo Cas9 nukleazėmis įrodymas elektroforezės būdu

4.1 Pipete įlašinkite 8.5 μL iš mėgintuvėlių 1 – 3 į 3 naujus mėgintuvėlius, kuriuos taip pat pažymėkite skaičiais 1, 2 ir 3.

4.2 Į kiekvieną iš 3 naujų mėgintuvėlių įlašinkite po 1.5 μL mėginio suleidimo dažo (LB) ir tapšnodami maišykite.

4.3 Atidarykite gelio kasetę ir sudrėkinkite šulinėlius H₂O_{dist}.

4.4 Pašalinkite vandens perteklių popieriniu rankšluosčiu.

4.5 Įdėkite FlashGel kasetę į FlashGel prietaisą.

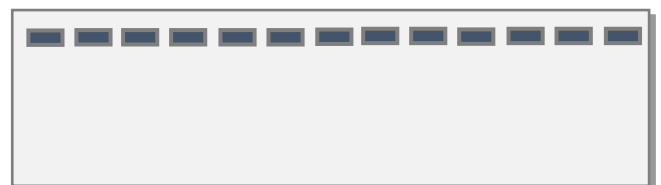
4.6 Pagal nurodytą schemą į gelio šulinėlius pipete įlašinkite

- 4 μL molekulinės masės žymens (M),
- 10 μL mėginių 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 Įjunkite FlashGel prietaisą prie maitinimo šaltinio ir pradėkite elektroforezę su 180 V įtampa. Stebėkite elektroforezės eigą įjungę UV lempą ant prietaiso.

Užduotis: pagal elektroforezės rezultatus įvertinkite, ar Cas9 nukleazė įvykdė plazmidės DNR kirpimą.



5. **DNR “duombazės” paruošimas**
Reagentai “Greitojo brūkšninio kodavimo” rinkinyje (Rapid Barcoding Kit) RBK004:

| Pavadinimas | Sutrumpinimas | Dangtelio spalva | Mėgintuvėliai | Tūris (μL) |
|--------------------------------|---------------|------------------|---------------|------------|
| Fragmentavimo mišinys | RB01-RB12 | be spalvis | 12 | 20 |
| Greitasis adapteris | RAP | žalia | 1 | 10 |
| Suleidimo karoliukai | LB | rožinė | 1 | 360 |
| Sekoskaitos buferinis tirpalas | SQB | raudona | 1 | 300 |

- 5.1 Pipete įlašinkite **7,5 μL sukarpytą plazmidės DNR CRISPR/Cas9 iš testavimo metodo 3** į 1,5 mL mėgintuvėlį, pažymėtą B („B“ reiškia brūkšninį kodavimą).
- 5.2 Į mėgintuvėlį B įdėkite **2,5 μL vieno iš 12 fragmentacijos mišinių** (RB01-12) ir sumaišykite įtraukdami ir išleisdami pipete.
- 5.3 Brūkšniniam kodavimui inkubuokite mėgintuvėlį B 1 minutę 30 °C temperatūroje, kuri yra optimali fermentui transpozazei.
- 5.4 Transpozazės denatūravimui inkubuokite mėgintuvėlį B 80 °C temperatūroje 1 minutę.
- 5.5 Atvėsinkite mėgintuvėlį B 3 minutes lede.
- 5.6 **Sujungti visus 10 μL visų darbo grupių tūrius į 1,5 mL mėgintuvėlį, pažymėtą P** (“P” reiškia sujungimą (Pool)).



Tik 1 grupė tęsia darbą:

- 5.7 Pipete perkelkite **10 μL iš mėgintuvėlio (P) į naują 1,5 mL mėgintuvėlį L** (“L” reiškia “duombazę” (Library)).
- 5.8 Įlašinkite **1 μL greitojo adapterio (RAP) į 10 μL brūkšninio būdu sukoduotos DNR į mėgintuvėlį L** ir maišykite pipete įtraukdami ir išleisdami (tūris = 11 μL).
- 5.9 Inkubuokite mėgintuvėlį L 5 minutes 20 °C temperatūroje ir išmatuokite DNR koncentraciją fluorometru.

6. **DNR “duombazės” (L) koncentracijos matavimas**
- 6.1 Į 0,5 mL mėgintuvėlį pipete įlašinkite **200 μL QuantiFluor®ONE dsDNA Dye (dažo)** ir **1 μL DNR “duombazės” (L)**.

- 6.2 Po 5 minučių inkubacijos **tamsoje** DNR koncentracija 0,5 mL mėgintuvėlyje bus išmatuota fluorometru.

Pasirinkite fluorometro nustatymus:

- Mėginio tūris 200 μL
- Matavimo vienetai ng/μL

Išmatuota DNR koncentracija turėtų būti tarp 10 – 400 ng/μL.



7. **DNR “duombazės” (L) galutinis paruošimas pakrovimui į Flongle Flow Cell (tėkmės kamera)**

- 7.1 Homogenizuokite suleidimo karoliukus (LB) “Greitojo brūkšninio kodavimo” rinkinyje (Rapid Barcoding Kit) RBK004 maišant.
- 7.2 Pipete įlašinkite šiuos reagentus į 1,5 mL mėgintuvėlį, vėlgi pažymėtus L (DNR “duombazė”) ir sumaišykite įtraukdami ir išleisdami pipete:

| Reagentai | Mėgintuvėlio dangtelis | Tūris |
|--------------------------------|------------------------|--------------|
| Sekoskaitos buferinis tirpalas | raudona | 15 μL |
| Suleidimo karoliukai | rožinė | 10 μL |
| DNR “duombazė” | L | 5 μL |
| Bendras tūris | L | 30 μL |

MinKNOW jau turėtų veikti, Flongle Flow Cell (tėkmės kameros) patikra ir pradmenų prijungimas turėtų būti baigti.

- 7.3 Nuimkite Flongle Flow Cell (tėkmės kameros) lipduką ir pipetuokite vengdami oro burbuliukų pradinio mišinio viduje tik **25 μL iš 30 μL “duombazės” L** Flongle Flow Cell (tėkmės kameros) pakrovimo prievade.

- 7.4 Įveskite sekoskaitos nustatymus į MinKNOW programą ir pradėkite sekoskaitą.



Flongle Flow Cell (Tekmės Kameros) paruošimas ir Flow Cell (Tekmės kameros) patikrinimas

1. Įstatykite Flongle Adapterį į MinION prietaisą Atidarykite MinION prietaisą ir išimkite konfigūracijos bandymo kamerą (CTC).



Išimkite CTC apsaugą iš Flongle adapterio.

Stumkite Flongle adapterį po nerudijančio plieno fiksatoriumi iki kol jis užsifiksuos.

Spauskite ant nuotraukos, kad pamatytumėte Vaizdo įrašą apie šį procesą. →

Arba: Atsidarykite nuorodą naršyklėje
<https://www.youtube.com/embed/Wnx59DhrUe8?feature=oembed>



2. Prijunkite MinION prietaisą prie kompiuterio



Sujunkite kompiuterį su MinION prietaisu USB laidu.

→ MinION prietaisas prisijungia prie elektros ir LED lemputė užsižiebia raudonai.

3. Įstatykite Flongle Flow Cell (Tekmės Kamera) į Flow Cell (Tekmės Kameros) adapterį



Stumkite Flongle Flow Cell (Tekmės kamera) rodyklės kryptimi po MinION prietaiso nerudijančio plieno fiksatoriumi, o iš kitos pusės spauskite jį žemyn.
→ su spragtelėjimu Flongle Flow Cell (Tekmės Kamera) įsistatys į vietą.



4. Spustelėjus dukart pasileidžia MinKNOW programa. Prisijunkite su savo Nanopore paskyra (El. paštas ir slaptažodis).

| | | |
|--|---|--|
| | <p>Paspauskite nuorodą, kad prisijungtumėte prie Nanopore puslapio:</p> <p>https://community.nanoporetech.com/support</p> <p>Prisijunkite su savo el. paštu ir slaptažodžiu.</p> | |
|--|---|--|

5. Connection Manager skiltyje pasirinkite sekoskaitos prietaisą, kuris yra prijungtas prie jūsų kompiuterio.

| | | |
|--|--|---|
| | | <p>Skiltyje Sequencing overview pamatysite Flongle Flow Cell (Tėkmės Kamera).</p> |
|--|--|---|

6. Skiltyje Start pasirinkite „Flow Cell Check“

| | | |
|--|--|---|
| | | <p>Paspauskite mygtuką Flow Cell Check.</p> |
|--|--|---|

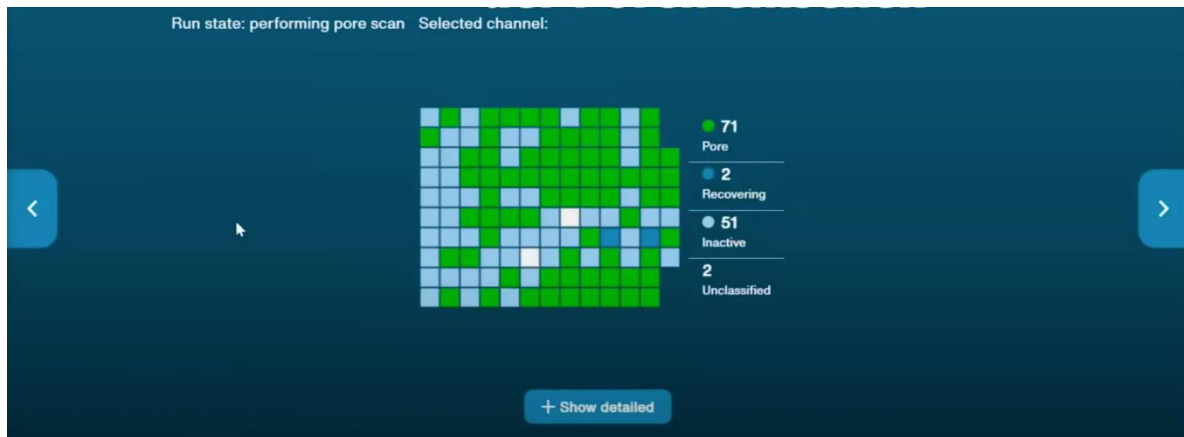


Įveskite Flongle Flow Cell ID ir pasirinkite Flow Cell Type FLO-FLG001.

| | | |
|--|--|--|
| | | <p>Pridėkite Flongle Flow Cell ID (3 raidės ir 3 skaičiai be tarpų). Pasirinkite tipą FLO-FLG001. Stuselėkite start Flow Cell Check.</p> |
|--|--|--|

Flow Cell patikra trunka kelias minutes.

Spustelėkite **Experiments** ir **current Flow Cell Check**, kad matytumėte parametrus patikros metu:



Flow Cell patikros pabaigoje bus pateiktas vienas iš trijų galimų rezultatų:

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

Žalia varnelė reiškia „Ready for sequencing”

Flongle Flow Cell patikros rezultatas su daugiau nei 50 porų yra patenkinamas.



Flongle Flow Cell (tėkmės kameros) pagrindų paruošimas

Po Flongle Flow Cell (tėkmės kameros) patikros Flongle saugyklos viduje esantis buferis turi būti pakeistas sekoskaitos buferiniu tirpalu. Tai turėtų būti padaryta iš karto prieš pradėdant sekoskaitą.

1. Flongle Flow Cell (tėkmės kameros) parengimas pagrindų buferiniu tirpalu (FLB)

Pipetuokite iš Flow Cell Priming Kit (tėkmės kameros parengimo rinkinio) (EXT-FLP002) į 1,5 mL mėgintuvėlį:

117 μ l nuplovimo buferinis tirpalas (FB) + 3 μ l Flush Tether (FLT) = 120 μ l FLB

Vaizdo įrašas apie Flongle Flow Cell (tėkmės kameros) paruošimą

Paspauskite ant paveikslėlio →
Arba paspauskite pateiktą nuorodą:

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

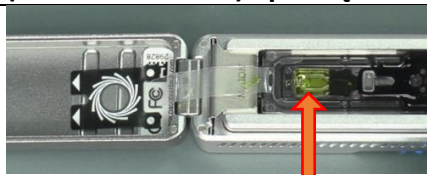


2. Flongle Flow Cell (tėkmės kameros) paruošimas

2.1 Nuimkite Flongle Flow Cell (tėkmės kameros) lipduką



Nuimkite lipduką



Pakrovimo prievadas yra atidarytas

Nuimkite Flongle Flow Cell (tėkmės kameros) lipduką rodyklių kryptimi ir pataisykite lipduką MinION dangtelio viduje.

2.2 Buferinio tirpalo saugyklos pakeitimas Flongle Flow Cell (tėkmės kameroje) paruošiant buferiniu tirpalu (FLB)

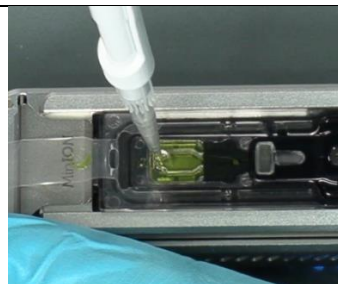
Paimkite 120 μ l paruošimo buferinio tirpalo (FLB) be oro burbuliukų į savo pipetę.

Įstatykite pipetę į pakrovimo prievadą Flongle Flow Cell (tėkmės kameroje). Patikrinkite, ar pipetės antgalis telpa į pakrovimo prievadą.

Be oro burbuliukų į Flongle Flow Cell (tėkmės kameros) masyvą pipetuokite 110 μ l FLB iš 120 μ l.



Pipetės antgalis, pripildytas 120 μ l FLB, be oro burbuliukų



110 μ l FLB įdėjimas į Flongle pakrovimo prievadą



Likęs FLB skystis (gali būti 5 – 10 μ l)

Dėmesio:

- Tik 110 μ l iš paruošimo buferinio tirpalo (FLB) yra reikalinga, kad pripildytume Flongle Flow Cell (tėkmės kameros) masyvą!
- Kad išvengtume oro burbuliukų Flongle Flow Cell (tėkmės kameroje), likęs skystis lieka pipetės antgalyje!

Flongle Flow Cell (tėkmės kamera) dabar yra paruošta DNR "duombazei" (žr. psl. 3; 7.3) ir sekoskaitos pradėjimui.

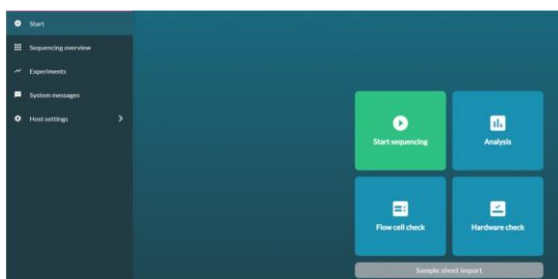
Sekoskaitos pradžia

Programa MinKNOW vis dar veikia ir Flow Cell paruošimas buvo sėkmingas

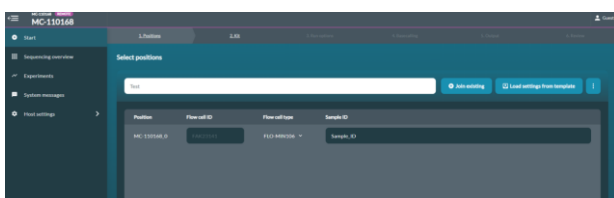
Programa MinKNOW valdo MinION Flow Cell, neapdirbtos informacijos įrašymą, bazių identifikaciją ir barkodinių demultipliksavimą.

Pasirinkite veikimo nustatymus

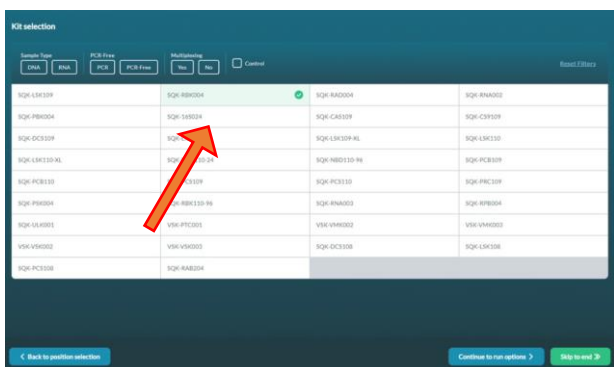
1. Paairinkite Flongle Flow cell sujungtą su kompiuteriu ir paspauskite mygtuką **start**, kad patektumėte į sekoskaitos pradžios parinktį.



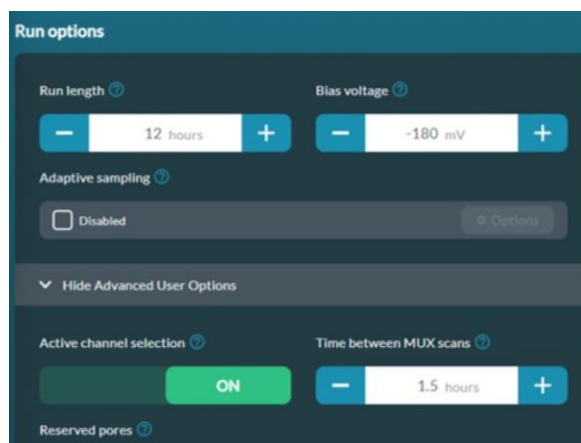
2. Pasirinkite pozicijas Pasirinkite „1. Positions“. Įrašykite bandymo pavadinimą ir pasirinkite prieigos numerį.



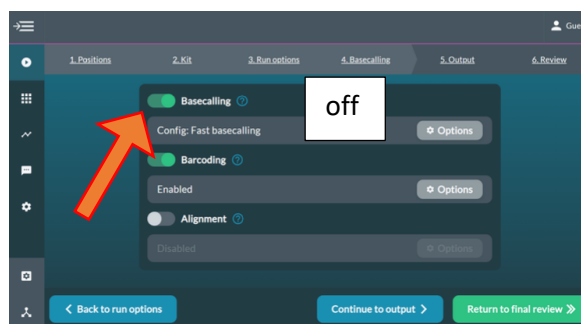
3. Spustelėkite mygtuką „Continue to kit selection“ Kit selection (Rinkinio pasirinkimo) lentelėje paspauskite **SQK-RBK004**.



4. Paspauskite mygtuką „Continue to run options“ Veikimo nustatymai jau įrašyti → jų nekeisti!
 - run length(veikimo trukmė): 24 h
 - active channel selection(aktyvaus kanalo pasirinkimas): on

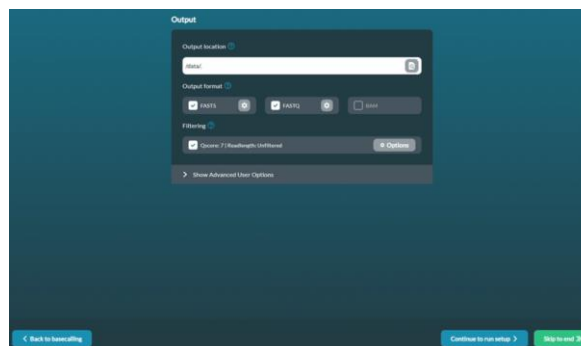


5. Paspauskite mygtuką “Continue to basecalling



Pasirinkus „Continue to Basecalling“ basecalling privalo būti išjungtas (pilkas). Priešingu atveju įrašytų duomenų apimtis kompiuteriui yra per didelė.

6. Spustelėkite mygtuką „Continue to output“ Kompiuteryje pasirinkite, kur turėtų būti išsaugoti duomenų paketai (pvz.: C:/data/ + name)



7. Patikrinkite savo sekoskaitos nustatymus pagal pateiktą lentelę. → Paspauskite mygtuką: **Start** Praėjus 15 min. pirmas neapdorotos informacijos paketas su 1000 nuskaitytų bazių bus išsaugotas c/data/. kaip Fast5 dokumentas.