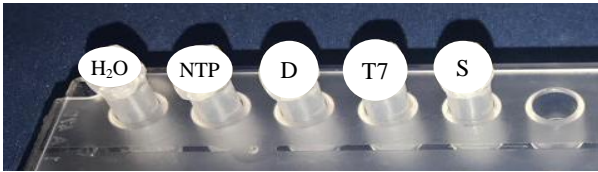


## 1. Syntéza - gRNA



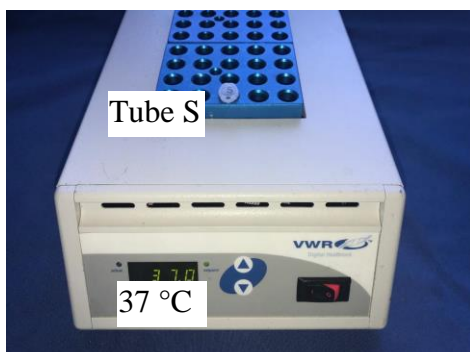
1.1 Napipetujte činidlá do prázdnej skúmavky S na syntézu gRNA

skúmavka	obsah	Vol.
H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O bez nukleáz	16 $\mu$ L
NTP	NTP buffer mix	10 $\mu$ L
D	DNA Duplex	2 $\mu$ L
T7	T7 RNA Polymeráza	2 $\mu$ L
<b>Celkový obsah v skúmavke S</b>		<b>30 <math>\mu</math>L</b>

1.2 Na kontrolu, napipetujte 5  $\mu$ L zo skúmavky S do prázdnej skúmavky S<sub>10</sub>, označte ju číslom skupiny a vložte ju do ľadu

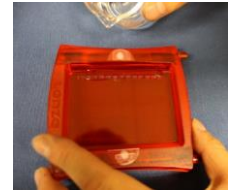


1.3 Inkubujte skúmavku S pri 37°C po dobu jednej hodiny.



## 2. Overenie vyprodukovanej gRNA gélovou elektroforézou

2.1 Otvorte novú gélovú kazetu a zvlhčte jamky H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>



2.2 Odsajte prebytočnú vodu papierovou utierkou.



2.3 Vložte gélovú kazetu do vyvíjača elektroforézy.

2.4 Napipetujte 5  $\mu$ L gRNA zo skúmavky S do novej skúmavky S<sub>11</sub> a označte ju číslom skupiny.

2.5 Do skúmaviek S<sub>10</sub> a S<sub>11</sub> pridajte 1  $\mu$ L (LB).

2.6 Pipetujte podľa nasledujúcej schémy, 6  $\mu$ L gRNA(S<sub>11</sub>) skupín 1-8 a S<sub>10</sub> dvoch skupín do jamiek v géli:



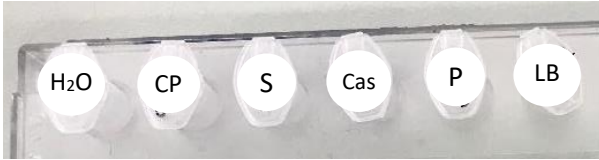
2.7 Pripojte elektroforézu ku zdroju, nastavte ho na 180V a spustite.



2.8 Pozorujte priebeh elektroforézy pod UV svetlom

**Úloha: Zhodnoťte výsledky elektroforézy týkajúce sa syntézy gRNA**

### 3. Štiepenie plazmidu pBR322 Cas9 nukleázou



3.1 Napipetujte vzorky 1-3 podľa tabuľky:

vzorka	1	2	3
	pBR322 supercoiled	pBR322+ supercoiled Cas9 (- gRNA)	pBR322 supercoiled + Cas9 + gRNA
<b>H<sub>2</sub>O</b> (bez nukleáz)	25 µL	24 µL	23 µL
<b>CP</b> (tímivý roztok)	3 µL	3 µL	3 µL
<b>S</b> (nasyn- tetizovan á gRNA)	0 µL	0 µL	1 µL
Cas9 Nukleáza	0 µL	1 µL	1 µL
<b>Premiešajte obsah skúmaviek jemných túkaním skúmaviek a inkubujte 10 min. pri laborátornej teplote</b>			
<b>P</b> (pBR322 super- coiled 0,5 µg/µL)	2 µL	2 µL	2 µL
<b>Premiešajte obsah skúmaviek jemných túkaním skúmaviek a inkubujte 15 min. pri 37°C</b>			
<b>Celkový objem vzorky</b>	<b>30 µL</b>	<b>30 µL</b>	<b>30 µL</b>

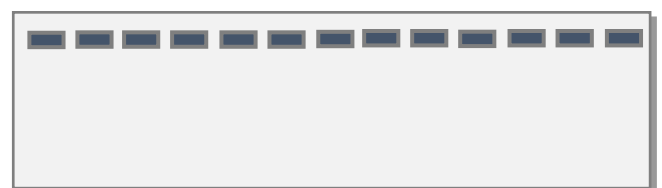
### 4. Overenie štiepenia Cas9 v plazmide (pBR322<sub>in</sub>) pomocou elektroforézy

- 4.1 Napipetujte po 8.5 µL zo vzoriek 1- 3 do 3 nových skúmaviek a znova ich označte číslami 1, 2 a 3.
- 4.2 Do každej z troch nových skúmaviek pridajte 1.5 µL vyvíjajúceho roztoku a premiešajte (túkaním o podložku).
- 4.3 Otvorte novú gélovú kazetu a navlhčte jamky H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
- 4.4 Odsajte prebytočnú vodu papierovou utierkou.
- 4.5 Vložte navlhčenú kazetu do vyvíjača elektroforézy.
- 4.6 Pipetujte podľa nasledujúcej schémy do každej jamky v gélovej kazete
  - 4 µL marker (M),
  - 10 µL vašich vzoriek 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 Pripojte elektroforetickú kazetu s gélom ku zdroju, nastavte ho na 180V a spustite ju.
- 4.8 Pozorujte priebeh elektroforézy pod UV svetlom

**Úloha: Zhodnoťte výsledky štiepenia Cas9 nukleázou získané elektroforézou**

## 5. Príprava DNA - knižnice

Činidlá v Rapid Barcoding Kit RBK004:

názov	skratka	Farba vrchnáka	skúmavky	Vol. (µL)
Fragmen-tation Mix	RB01-RB12	bez-farebný	12	20
Rapid Adapter	RAP	zelený	1	10
Loading Beads	LB	ružový	1	360
Se-quencing Buffer	SQB	červený	1	300

5.1 Pipetujte **7,5 µL štiepeného DNA plazmidu (z úlohy 3)** do 1,5 mL skúmavky označenej B (B - Barcoding).

5.2 Do skúmavky B pridajte **2,5 µL jednej z 12 fragmentačných zmesí (RB01-12)** a premiešajte pipetovaním.

5.3 Pre čiarové kódovanie inkubujte skúmavku B pri 30°C (optimálna teplota pre enzým transpozázu) na 1 min.



30 °C

5.4 Na denaturáciu transpozázy inkubujte skúmavku B pri 80°C, 1 minútu.

5.5 Schladte skúmavku B na ľade, 3 min.

5.6 **Každá skupina napipetuje 10 µL zmesi zo skúmavky B do spoločnej 1,5 mL skúmavky P (P - Pool).**

### Práca/návod pre 1 skupinu:

5.7 Napipetujte **10 µL zo skúmavky P do novej 1,5 mL skúmavky L (L - Library).**

5.8 Pridajte **1 µL rapid adapter (RAP) 10 µL DNA (čiarovo kódovaná) do skúmavky L** a premiešajte pipetovaním (Vol. = 11 µL).

5.9 Inkubujte skúmavku L pri 20°C, 5 min. a zmerajte koncentráciu DNA fluorometrom.

## 6. Meranie koncentrácie DNA-Library (L)

6.1 Do 0,5 mL skúmavky napipetujte **200 µL farbivo QuantiFluor®ONE dsDNA** a **1 µL z DNA-Library (L).**

6.2 Po 5 min. inkubácie **v tme** zmerajte v 0,5 mL skúmavke koncentráciu DNA fluorometrom.

Na fluorometri nastavte:

- objem vzorky 200 µL

- jednotky ng/µL

**Nameraná koncentrácia DNA by mala dosahovať hodnoty 10 – 400 ng/µL.**



## 7. Finalizácia DNA-Library (L) pred prenesením do Flongle Flow Cell

7.1 Homogenizujte loading beads (LB) v Rapid Barcoding Kit RBK004 premiešaním v laboratórnom vortexe.

7.2 Napipetujte nasledujúce činidlá do 1,5 mL skúmavky, opäť označenej L (pre DNA-Library) a premiešajte pipetovaním:

Reagenty	Vrchnák skúmavky	Volume
Sequencing buffer	červený	15 µL
Loading Beads	ružový	10 µL
DNA-Library	L	5 µL
<b>Celkový objem</b>	<b>L</b>	<b>30 µL</b>



**MinKNOW by už mal pracovať, Flongle Flow Cell by mala byť skontrolovaná a priming hotový.**

7.3 Odstráňte nálepku z Flongle Flow Cell a **pipetujte tak, aby ste predišli vzniku vzduchových bublín vnútri v prípravnom poli, napipetujte iba 25 µL z 30 µL library L** do loading portu Flongle Flow Cell.

7.4 Vstúpte do nastavení MinKNOW a iniciujte sekvenovanie.

## Príprava Flongle Flow Cell a kontrola Flow Cell

1. Vložte Flongle adaptér do MinION (**Použite rukavice, aby nedošlo ku kontaminácii!**)  
Otvorte MinION a vyberte konfiguračnú testovaciu bunku (configuration test cell - CTC).

		<p>Odstráňte CTC ochranu z Flongle adaptéra.</p> <p>Vložte Flongle adaptér pod kovový klip kým úplne nezapadne do vyčleneného priestoru.</p>
---	--	--


Kliknite na obrazok a pozrite si video ohľadom tohto postupu →

**Alternatíva:** Otvorte nasledujúci link vo vašom internetovom prehliadači



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



2. Pripojte MinION k PC

	<p>Pripojte PC ku MinION USB káblom.</p> <p>→ MinION zapojením do elektrickej siete, LED začne svietiť na červeno.</p>
---	--

3. Vložte Flongle Flow Cell do Flow Cell adaptéra

		<p>Zatlačte Flongle Flow Cell v smere šípok pod nerezový kryt MinION-u a pritlačte ju na druhej strane → Po cvaknutí, Flongle Flow Cell pevne drží v MinION-e.</p>
---	--	--

4. Dvojitým kliknutím na MinKNOW sa program spustí. Prihláste sa so svojim Nanopore účtom (e-mail a heslo).

	<p>Kliknite na následný link, aby ste sa dostali na domovská stránku Nanopore :</p> <p><a href="https://community.nanoporetech.com/support">https://community.nanoporetech.com/support</a></p> <p>Prihláste sa do vášho účtu vašim e-mailom a heslom.</p>	
--	---	--

5. Vo vašom PC v pripojených zariadeniach vyberte sekvenčný hardvér, ktorý používate.

		<p>V sekvenčnom prehľade je zobrazená Flonge Flow Cell</p>
--	--	--

6. Prejdite na start a vyberte „Flow Cell Check“

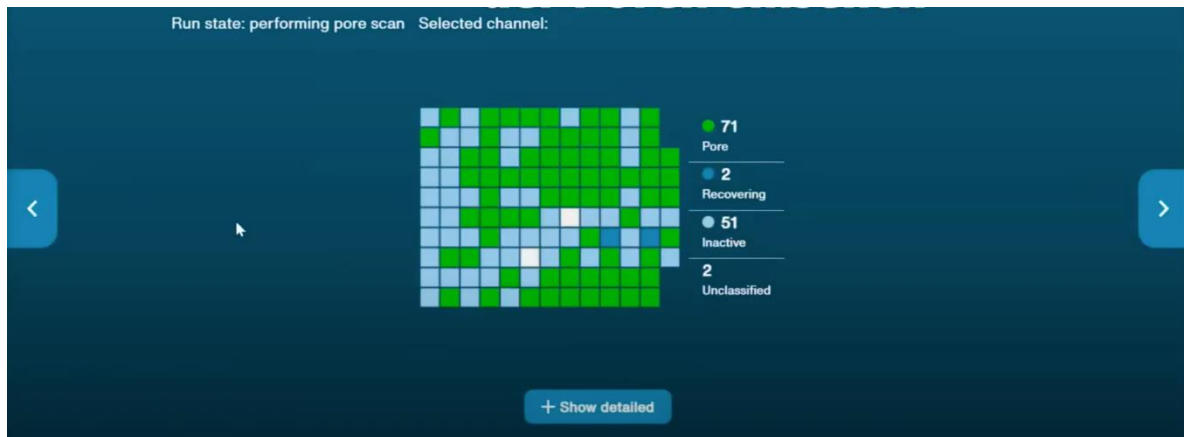
		<p>Kliknite na tlačidlo Flow Cell Check.</p>
--	--	--

## 7. Pridajte Flongle Flow Cell ID a vyberte Flow Cell Type FLO-FLG001.

		<p>Pridajte Flongle Flow Cell ID (3 písmena a 3 čísla bez medzery) Vyberte typ <b>FLO-FLG001</b>. Kliknite na <b>start</b> Flow Cell Check.</p>
--	--	---

Flow Cell Check trvá pár minút.

Klikni na **Experiments** a **current Flow Cell Check**, aby ste videli parametre počas kontroly:



Na konci Flow Cell Check sa vám ukáže jeden z troch nasledujúcich výsledkov:

--	--	--

Zelené šípky ukazujú „Pripravené na sekvencovanie“

Výsledok Flongle Flow Cell check s viac ako 50 nájdenými pórmami je dobrý.

## Flongle Flow Cell Priming

Potom čo Flongle Flow Cell skontroluje storage buffer vnútri Flongle musí byť nahradený sequencing buffer. Toto môže byť hotové hneď pred začiatkom sekvencovania.

### 1. Príprava Flongle Flow Cell Priming Buffer (FLB)

Napipetujte z Flow Cell Priming Kit (EXT-FLP002) do 1,5 mL skúmavky:

**117  $\mu$ l Flush Buffer (FB) + 3  $\mu$ l Flush Tether (FLT) = 120  $\mu$ l FLB**

<p>Video o Flongle Flow Cell Priming</p> <p>Kliknite na obrázok →</p> <p>Alebo použite tento link:</p> <p><a href="https://www.youtube.com/watch?v=ExTMvDuOGK4">https://www.youtube.com/watch?v=ExTMvDuOGK4</a></p>	
---	--

### 2. Priming of Flongle Flow Cell

#### 2.1 Odlepte nálepku z Flongle Flow Cell



 <p>Odlepte nálepku</p>	 <p>Loading port je otvorený</p>	<p>Odlepte nálepku z Flongle Flow Cell v smere šípok a nalepte na vnútornú stranu krytu.</p>
--	--	--

#### 2.2 Nahradíte tlmivý roztok (storage buffer) v Flongle Flow Cell Priming Buffer-om (FLB)

Napipetujte 120  $\mu$ l priming buffer (FLB) bez vzduchových bublín.

Umiestnite špičku pipety do loading portu Flongle Flow Cell. Skontrolujte či špička pipety sedí v loading porte.

Napipetujte do Flongle Flow Cell array 110  $\mu$ l FLB z 120  $\mu$ l, ale bez vzduchových bublín.

 <p>Špička pipety naplnená 120 <math>\mu</math>l FLB bez bublín</p>	 <p>Pridajte 110 <math>\mu</math>l FLB do loading portu Flonglu</p>	 <p>Zvyšok FLB kvapaliny (môže byť 5 – 10 <math>\mu</math>l)</p>	<p><b>POZOR:</b></p> <p>Je potrebných len 110<math>\mu</math>l priming-buffer-u (FLB) na naplnenie oblasti Flongle Flow Cell-u!</p> <p>Zvyšok tekutiny zostane v špičke pipety, aby sme sa vyhli bublinám v oblasti Flongle Flow Cell</p>
--	--	--	---

Flongle Flow Cell je pripravený na pridanie DNA-library (pozrite strany 3; 7.3) a začnite sekvenovať.

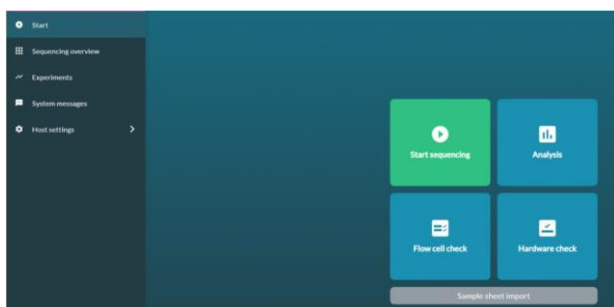
## Začiatok sekvenovania

Program MinKNOW stále pracuje a Flow Cell Priming bolo úspešné.

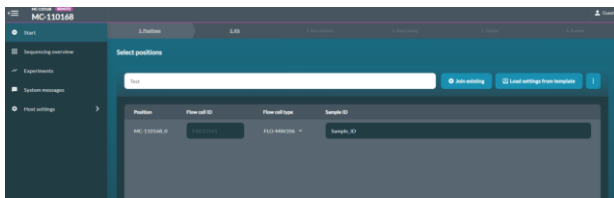
Program MinKNOW controls the MinION Flow Cell, the raw data record, the basecalling and the barcode demultiplexing.

## Vyberte z ponuky

1. Vyberte the Flongle Flow cell prepojený s PC a kliknite na tlačidlo start a vstúpte do sekvenovacích nastavení.

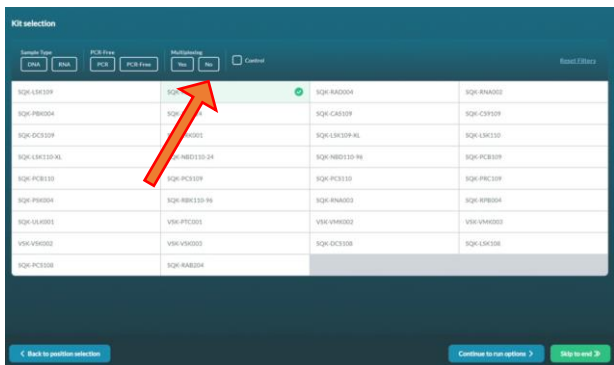


2. Vyberte pozície: Select „1. pozícia“. Pomenujte váš experiment a vyberte prístupové číslo.



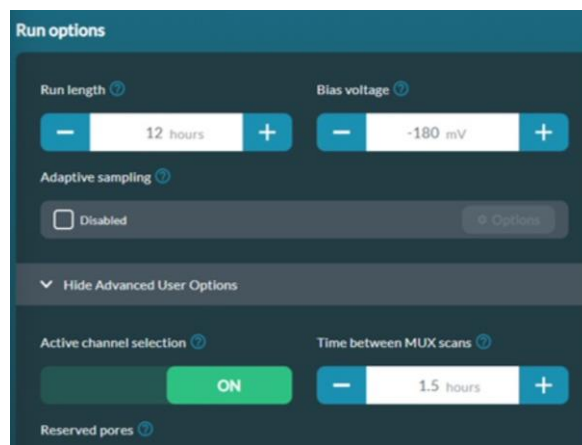
3. Kliknite na tlačidlo „Continue to kit selection“

V tabuľke *Kit selection table* kliknite na **SQK-RBK004**.

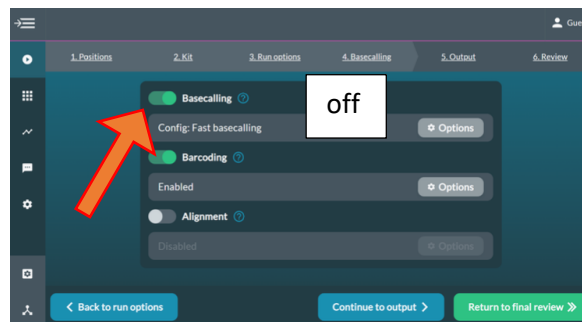


4. Kliknite na tlačidlo „Continue to run options“  
Bežiacé možnosti sú pevne nastavené → **NEMEŇTE ICH!**  
- Doba trvania: 24 h

- aktivujte tlačidlo “channel selection”: on

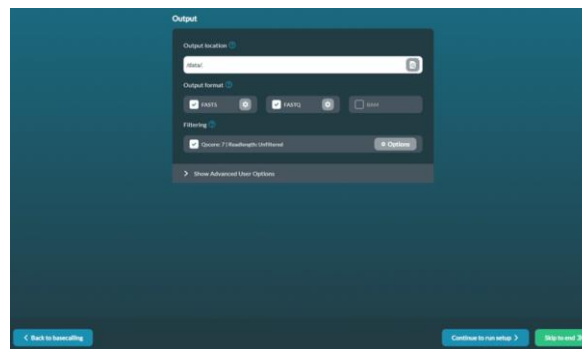


5. Kliknite na tlačidlo “Continue to basecalling”



Pod ponukou „Continue to Basecalling“ basecalling musí byť aktívne – off (musí byť sivé). Ak OFF nebude aktívne, množstvo dát bude pre PC príliš veľké.

6. Kliknite na tlačidlo „Continue to output“  
Vyberte v PC dátové súbory (e.g.: C:/data/ + name)



7. Skontrolujte vaše sekvenovacie nastavenia podľa zobrazenej tabuľky.  
→ Kliknite na tlačidlo: **Start**  
Po 15 min. prvý súbor dát s 1000 načítaní bude uložený v c:/data/.. as a Fast5 file.