

1. Synteza gRNA



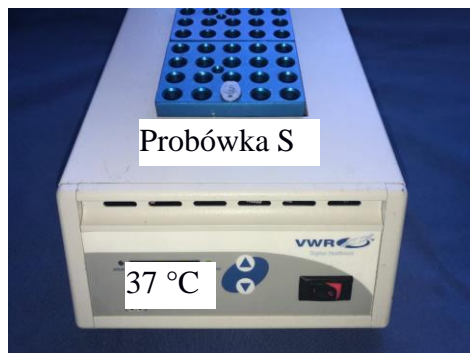
1.1 Przenieś pipetą następujące odczynniki do pustej probówki oznaczonej literą S do syntezy gRNA.

Probówka	Zawartość	Obj
H ₂ O	H ₂ O wolne od nukleaz	16 μ L
NTP	Bufor z NTP	10 μ L
D	dsDNA	2 μ L
T7	Polimeraza T7 RNA	2 μ L
Całkowita objętość w probówce S		30 μL

1.2 Jako negatywną próbę dla syntezy gRNA, przenieś pipetą 5 μ L z probówki do nowej probówki oznaczonej S_{t0} i numerem twojej grupy, po czym włóż ją do lodu.

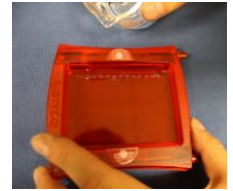


1.3 Inkubuj swoją probówkę S w 37°C



2. Sprawdź syntetyzowane gRNA przez elektroforezę żelową.

2.1 Otwórz kasetę żelową i nawilż studzienki wodą destylowaną.



2.2 Odsącz nadmiar wody przy użyciu ręcznika kuchennego.



2.3 Wprowadź kasetę z gotowym żelem do stacji dokującej.

2.4 Przenieś pipetą 5 μ L z probówki syntezy gRNA (S) do nowej probówki oznaczonej S_{t1} i numerem twojej grupy.

2.5 Dodaj do obu probówek: S_{t0} i S_{t1} 1 μ L buforu obciążającego. (LB).

2.6 Przenieś pipetą, zgodnie z następującym schematem, 6 μ L produktu syntezy gRNA z probówek S_{t1/1} – S_{t1/8} i 2 grup S_{t0} do studzienek.



2.7 Podłącz stację dokującą z gotowym żelem do źródła zasilania i rozpocznij elektroforezę przy 180V.



2.8 Przypatruj się postępowi elektroforezy po włączeniu lampy UV.

Zadanie: Opisz wygląd żelu w odniesieniu do syntezy gRNA.

3. Przecinanie plazmidu pBR322 przy użyciu nukleazy Cas9



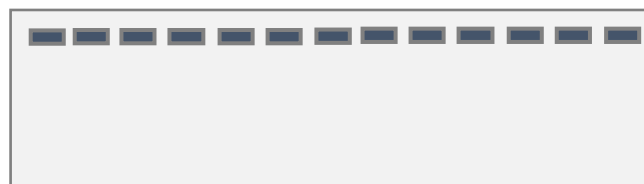
3.1 Przenieś pipetą zawartość próbek 1 – 3 zgodnie z następującą tabelą:

Próbka	1	2	3
	pBR322 super- skręcony	pBR322+ super- skręcony Cas9 (- gRNA)	pBR322 super- skręcony + Cas9 + gRNA
H ₂ O (wolna od nukleaz)	25 µL	24 µL	23 µL
CP (bufor)	3 µL	3 µL	3 µL
S (zsyntetyzowane gRNA)	0 µL	0 µL	1 µL
Nukleaza Cas9	0 µL	1 µL	1 µL
Opukując próbkę wymieszaj roztwór i inkubuj przez 10 minut w temperaturze pokojowej			
P (pBR322su- perskręcony 0,5 µg/µL)	2 µL	2 µL	2 µL
Opukując próbkę wymieszaj roztwór i inkubuj przez 15 minut w 37 °C			
Pojemność całkowita	30 µL	30 µL	30 µL

4. Udawadnianie cięcia Plazmidu (pBR322_{lin}) przez Cas9 przy użyciu elektroforezy

- 4.1 Przenieś pipetą po 8.5 µL z każdej próbki 1 – 3 do 3 nowych probówek i oznacz je ponownie cyframi 1, 2, 3.
- 4.2 Dodaj do każdej z 3 nowych probówek po 1.5 µL buforu obciążającego (LB) i zmieszaj przez pstrykanie w probówkę.
- 4.3 Otwórz kasetę z żelem i zwilż welle przy użyciu H₂O_{dest.}
- 4.4 Odsącz nadmiar wody przy użyciu ręcznika kuchennego.
- 4.5 Wstaw kasetę z gotowym żelem do stacji dokującej.
- 4.6 Przenieś pipetą, zgodnie z poniższym schematem, do studzienek z twoich kaset żelowych
 - 4 µL markera (M),
 - 10 µL z twoich próbek 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 Podłącz stację dokującą do zasilania i rozpocznij elektroforezę przy napięciu 180 V.
- 4.8 Włącz lampę UV stacji i obserwuj proces elektroforezy.

Zadanie: Oceń wygląd swojego żelu w odniesieniu do cięcia nukleazą Cas9.

5. Przygotowywanie biblioteki DNA

Odczynniki w Rapid Barcoding Kit RBK004:

Nazwa	Skrót	Kolor zaty-czki	Probówka	Obj. (µL)
Fragmen-tation Mix	RB01-RB12	bezbar-wna	12	20
Rapid Adapter	RAP	zielona	1	10
Loading Beads	LB	różo-waw	1	360
Bufor do sek-wencjono-wania	SQB	czer-wona	1	300

5.1 Przenieś pipetą 7,5 µL plazmidu-DNA

przeciętego przez CRISPR/Cas9 z podejścia testowego 3 do 1,5 mL probówki oznaczonej B (B oznacza barcoding).


5.2 Dodaj do probówki B 2,5 µL roztworu z jednej z 12 mieszanin fragmentacyjnych (RB01-12) i wymieszaj przez pipetowanie w dół i w górę.
5.3 Na czas barcodingu inkubuj probówkę B przez 1 minutę w 30 °C, co jest optymalną 30 °C temperaturą dla enzymu transpozazy.
5.4 W celu denaturacji transpozazy inkubuj probówkę B w 80 °C przez 1 minutę.
5.5 Ochładzaj probówkę B przez 3 minuty w lodzie.
5.6 Zbierz po 10 µL płynu od każdej z grup do jednej 1,5 mL probówki oznaczonej literą P (z ang. pool).
Tylko jedna grupa ma to zrobić:
5.7 Przenieś pipetą 10 µL z probówki (P) do nowej 1,5 mL probówki L (L oznacza biblioteka).
5.8 Dodaj 1 µL rapid adapter (RAP) do 10 µL barcode DNA w probówce L i wymieszaj je przez pipetowanie w górę i w dół. (Obj. = 11 µL).
5.9 Inkubuj probówkę L przez 5 minut w 20 °C i zmierz zagęszczenie DNA przy użyciu fluoro-metra.
6. Mierzenie koncentracji Biblioteki DNA (L)
6.1 Do 0,5 mL probówki przenieś pipetą 200 µL QuantiFluor®ONE dsDNA Dye i 1 µL Biblioteki DNA (L).
6.2 Po 5 minutowej inkubacji w ciemności, stężenie DNA w 0,5 mL musi być zmierzone fluoro-metrem. Zmień ustawienia fluoro-metra:

- Obj. próbki 200 µL
- Jednostki ng/µL

Zmierzone stężenie DNA powinno wynosić 10 – 400 ng/µL.


7. Finalizacja Biblioteki DNA (L) przez ładowanie go do Flongle Flow Cell
7.1 Homogenizuj loading beads (LB) do Rapid Barcoding Kit RBK004 przez wirowanie.
7.2 Przenieś pipetą następujące reagenty do 1,5 mL probówki oznaczonej ponownie jako L (biblioteka DNA) i wymieszaj je przez pipetowanie w górę i w dół.

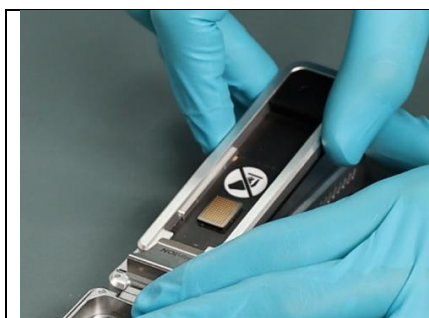
Reagenty	Kolor zaty-czki	Objętość
Bufor do sek-wencjono-wania	czerwony	15 µL
Loading Beads	różowy	10 µL
DNA-Library	L	5 µL
Całkowita Obj.	L	30 µL

MinkNOW powinno już trwać, Flongle Flow Cell check i priming powinno być zakończone.
7.3 Zdejmij naklejkę z Flongle Flow Cell i przenieś pipetą, aby uniknąć bąbelków powietrza w primed array, tylko 25 µL z 30 µL library L do określonego miejsca (loading port) w Flongle Flow Cell.
7.4 Wejdź w ustawienia sekwencjonowania w MinkNOW i rozpocznij sekwencjonowanie.

Protokół CRISPR + Sekwencjonowanie Nanoporowe

Przygotowanie Flongle Flow Cell i Flow Cell Check

1. Wstaw Adapter Flongle do MinION (Założ rękawiczki by uniknąć zanieczyszczeń!)
Otwórz MinION i wyjmij komórkę testową konfiguracji (CTC).



Zdejmij osłonkę CTC z adaptera Flongle.

Wepchnij adapter Flongle pod klips ze stali nierdzewnej, by umieścić go na właściwym miejscu. Usłyszysz kliknięcie.

Kliknij na obrazek, żeby zobaczyć procedurę.



2. Połącz MinION z PC



Połącz PC z MinION za pomocą kabla USB.

→ gdy MinION ma dostęp do elektryczności, lampka LED świeci się na czerwono.

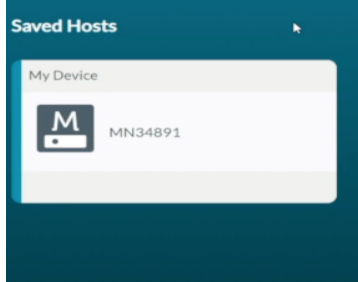
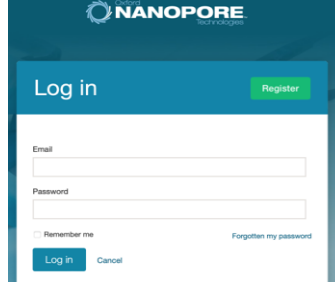
3. Wstaw Flongle Flow Cell do Adaptera Flow Cell



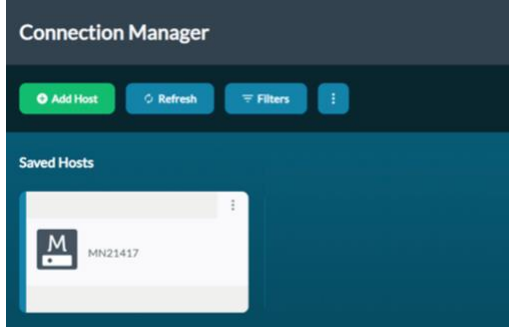
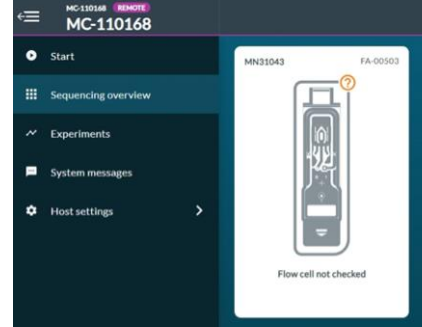
Wepchnij Flongle Flow Cell zgodnie z kierunkiem wskazanym przez strzałki pod klips ze stali nierdzewnej MinION i przyciśnij po drugiej stronie.
→ gdy Flongle Flow Cell znajdzie się we właściwym miejscu, usłyszysz kliknięcie.

Protokół CRISPR + Sekwencjonowanie Nanoporowe

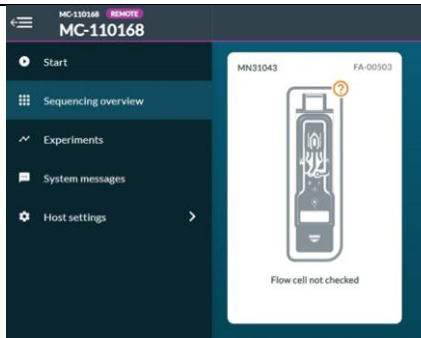
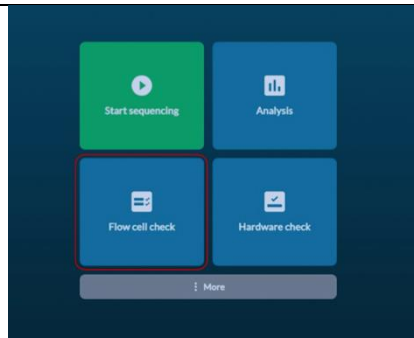
4. Po podwójnym kliknięciu program MinKNOW uruchamia się. Zaloguj się za pomocą swojego konta (Email i hasło).

	<p>Kliknij poniższy link by zalogować się na stronę główną Nanopore:</p> <p>https://community.nanoporetech.com/support</p> <p>Zaloguj się za pomocą swojego e-maila oraz hasła.</p>	
---	--	---

5. W Connection Manager wybierz urządzenie sekwencjonujące podłączone do twojego komputera.

		<p>W sequencing overview Flongle Flow Cell jest widoczny.</p>
--	---	---

6. Najedź kursorem na pole Start i wybierz „Flow Cell Check“

		<p>Kliknij przycisk Flow Cell Check.</p>
---	--	--

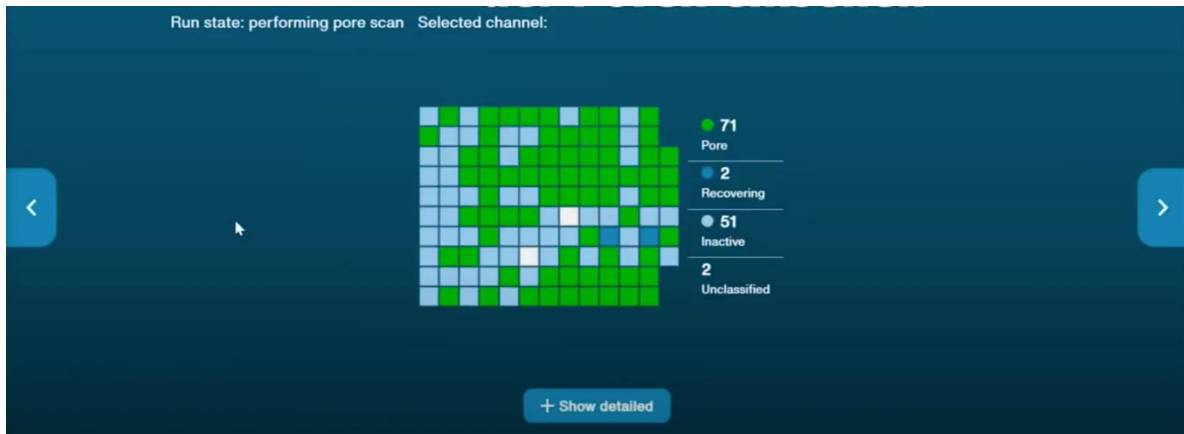
Protokół CRISPR + Sekwencjonowanie Nanoporowe

7. Dodaj Flongle Flow Cell ID i wybierz Typ Flow Cell FLO-FLG001.

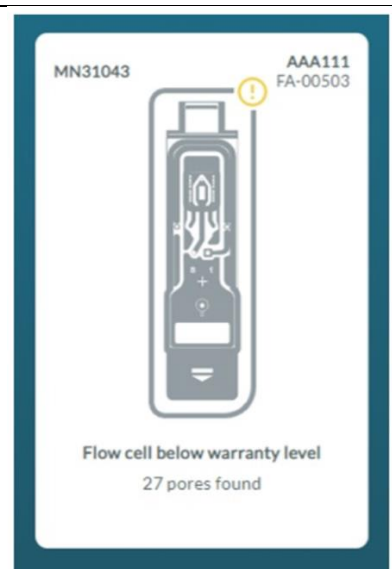
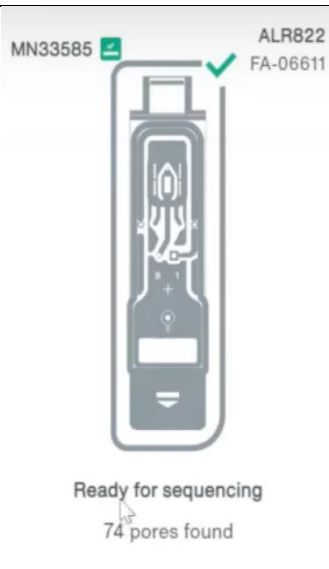
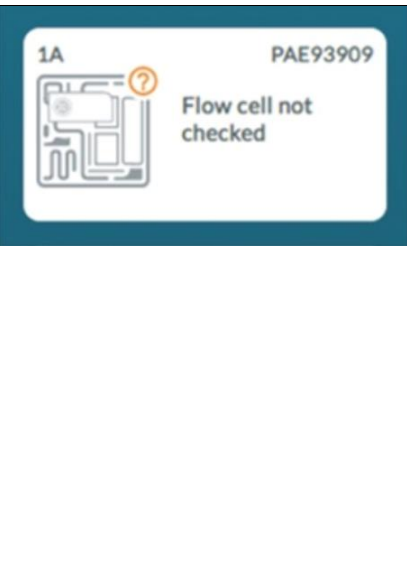
		<p>Dodaj Flongle Flow Cell ID (3 litery oraz 3 cyfry bez odstępu). Wybierz typ FLO-FLG001. Kliknij start Flow Cell Check.</p>
---	--	---

Zajmie to kilka minut.

Naciśnij na **Experiments** oraz **current Flow Cell Check**, aby zobaczyć parametry podczas sprawdzania:



Pod koniec Flow Cell Check pojawi się jeden z 3 następujących wyników:

		
---	---	--

Zielona strzałka oznacza „Ready for sequencing”

Jeżeli Flongle Flow wykryje więcej niż 50 porów urządzenie jest gotowe do użycia.



Flongle Flow Cell Priming

Zaraz po Flongle Flow Cell bufor gromadzący, znajdujący się we Flongle musi zostać zastąpiony buforem do sekwencjonowania. Powinno to zostać zrobione tuż przed rozpoczęciem sekwencjonowania.

1. Przygotowywanie Flongle Flow Cell Priming Buffer [bufor] (FLB)

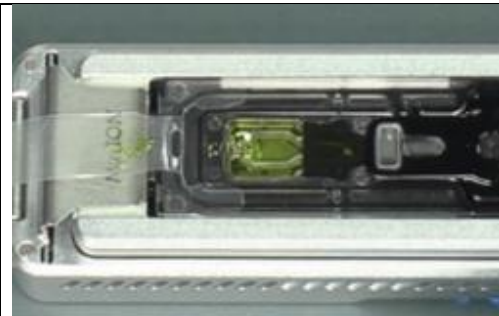
Przenieś za pomocą pipety z Flow Cell Priming Kit (EXT-FLP002) do probówki 1,5 mL:
117 μ l Flush Buffer (FB) + 3 μ l Flush Tether (FLT) = 120 μ l FLB

Wideo o Flongle Flow Cell Priming

Naciśnij na zdjęcie →

Możesz również kliknąć w podany link:

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



2. Priming Flongle Flow Cell

2.1 Zdejmij naklejkę z Flongle Flow Cell



Zdejmij naklejkę



Port do ładowania (loading port) jest otwarty

Zdejmij naklejkę z Flongle Flow Cell w kierunku oznaczonym przez strzałki i umieść naklejkę w środku pokrywy MinION.

2.2 Zastąpienie zgromadzonego buforu w Flongle Flow Cell przez FLB

Nabierz 120 μ l FLB bez bąbelków powietrza do swojej pipety.

Umieść końcówkę pipety w porcie ładującym (loading port) Flongle Flow Cell, tak aby pasowała do jego wnętrza. Przenieś pipetą 110 ze 120 μ l FLB bez bąbelków powietrza.



Końcówka pipety bez bąbelków powietrza



umieszczanie 110 μ l FLB w porcie ładującym Flongle



Reszta płynu FLB (około 5 – 10 μ l)

Uwaga:

- Tylko 110 μ l FLB jest potrzebne do uzupełnienia odpowiedniego miejsca we Flongle Flow Cell!
- Aby uniknąć bąbelków w tym miejscu we Flongle Flow Cell, reszta płynu musi pozostać w końcówce pipety.

Flongle Flow Cell jest teraz gotowe do użycia przez załadowanie Biblioteki DNA (zobacz strona 3; 7.3) i rozpoczęcia sekwencjonowania.

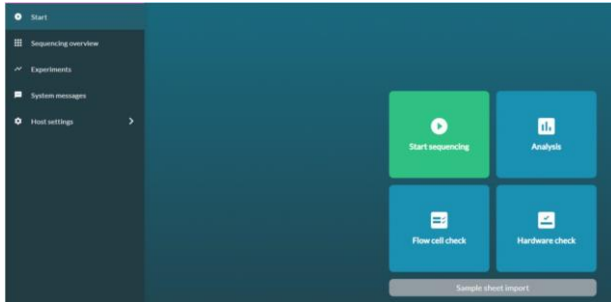
Rozpocznij sekwencjonowanie

Program MinKNOW jest ciągle uruchomiony, a Flow Cell Priming powiodło się.

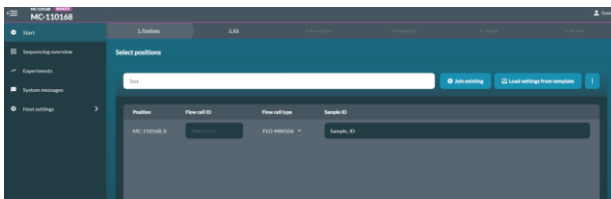
Program MinKNOW kontroluje MinION Flow Cell, surowy zapis danych, basecalling i demultipleksowanie barcode.

Wybierz opcje startowe

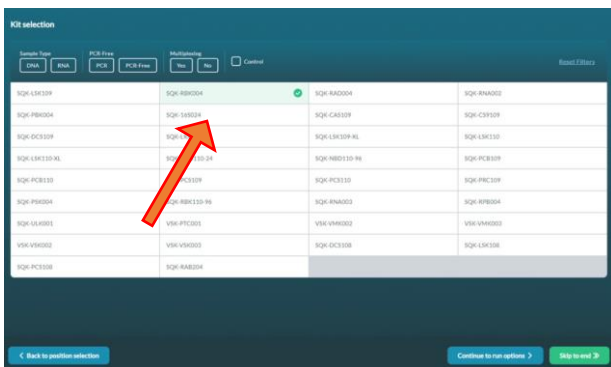
1. Wybierz Flongle Flow Cell połączone z komputerem i naciśnij przycisk, aby wejść w ustawienia sekwencjonowania.



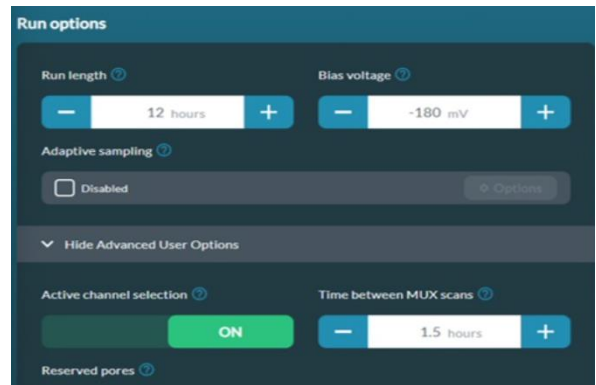
2. Wybierz pozycję
Wybierz „1. Positions“.
Nazwij swój eksperyment i wybierz numer podejścia.



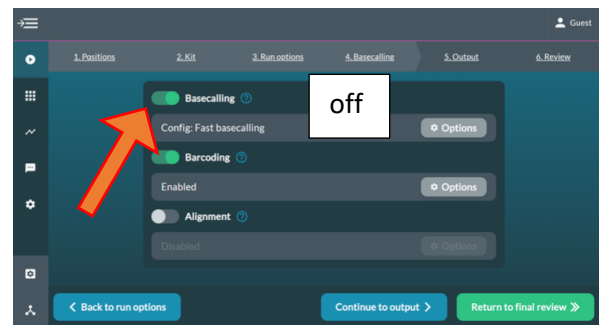
3. Naciśnij przycisk „Continue to kit selection“.
W tabeli doboru zestawu wciśnij **SQK-RBK004**.



4. Naciśnij przycisk „Continue to run options“
opcje uruchamiania są przygotowane → nie zmieniaj ich!
- run length: 24 h
- active channel selection: on

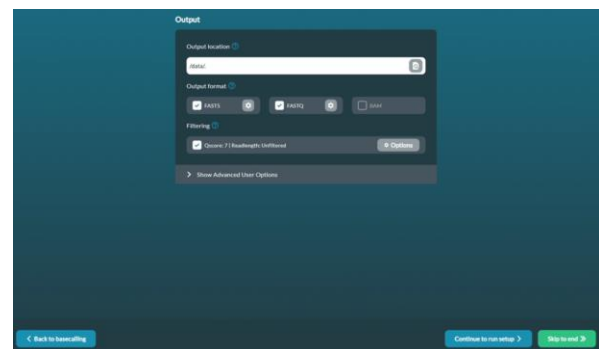


5. Naciśnij przycisk „Continue to basecalling“



Poniżej „Continue to Basecalling“ basecalling musi zostać wyłączony (musi być szary).
Jeśli tak się nie stanie objętość zapisanych danych podczas basecallingu będzie zbyt duża dla urządzenia.

6. Naciśnij przycisk „Continue to output“
Wybierz na komputerze w którym miejscu dane mają zostać przechowane (np.: C:/data/ + name)



7. Powtórz swoje ustawienia sekwencjonowania zgodnie z poniższą tabelą.
→ Naciśnij przycisk: **Start**
Po pierwszych 15 minutach pierwsza paczka surowych danych z 1000 odczytów zostanie przechowana w c:/data/.. jako plik Fast5.