

## Klargøring af bibliotek ved barcoding og PCR

### Tidsforbrug

1. Klargøring til PCR: 20 min
2. PCR: 90 min
3. Oprensning efter PCR: 30 min
4. Måling af DNA-koncentration (separat vejledning): 20 min

### Princip

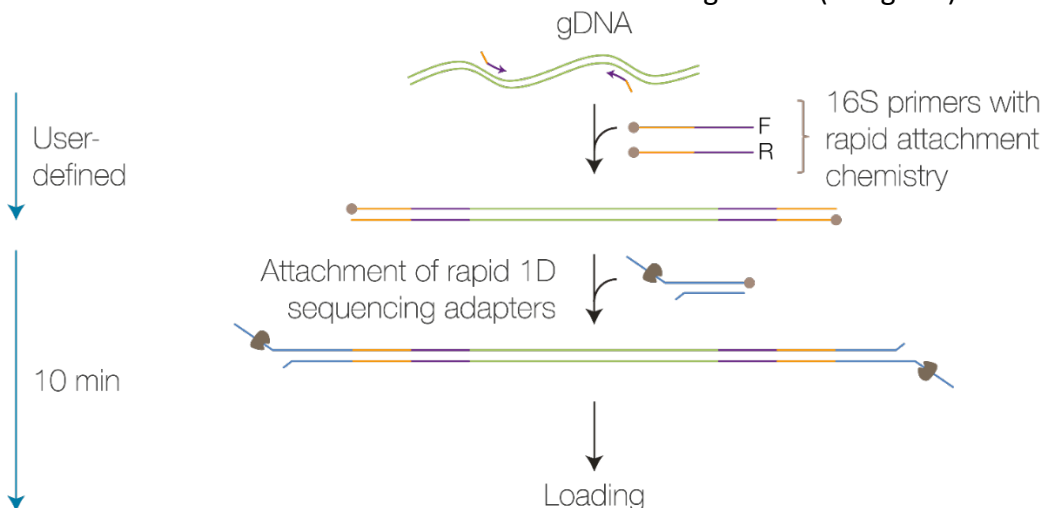
Bakterierne i prøven identificeres ved at sammenligne DNA-sekvensen i et afsnit af deres gen for 16S rRNA. Den valgte DNA-sekvens er 1500 basepar (bp) lang.

Prøverne fra oprensningen kan imidlertid indeholde meget forskelligt genomisk DNA fra både bakterier, svampe, plantemateriale og smådyr.

Derfor opformeres den ønskede sekvens ved PCR. Læs om den normale PCR-proces i en biologibog. Efter PCR renses prøven for andet DNA før sekventering.

Man barcoder prøverne, dvs. at man forsyner dem med en strekkode i form af kort DNA-sekvens, som er specifik for hver prøve /gruppe. Den kan aflæses som et specifikt nummer for den barcode de enkelte prøver har fået. På den måde kan hver gruppe /prøve have sin egen barcode, og selvom prøverne for hele klassen blandes, når man sekventerer, kan de adskilles igen ved den efterfølgende databehandling, og man ved, hvilken gruppe hver sekventeret DNA-streng kommer fra.

PCR-processen slutter med en extension-fase. Dvs. den fase, hvor den modstående DNA-streng dannes. Derfor slutter man med at have dobbeltstrenget DNA (se figur 1).



Figur 1. PCR-processen ved forberedelse af nanopore-bibliotek. Fra Nanoporetech.

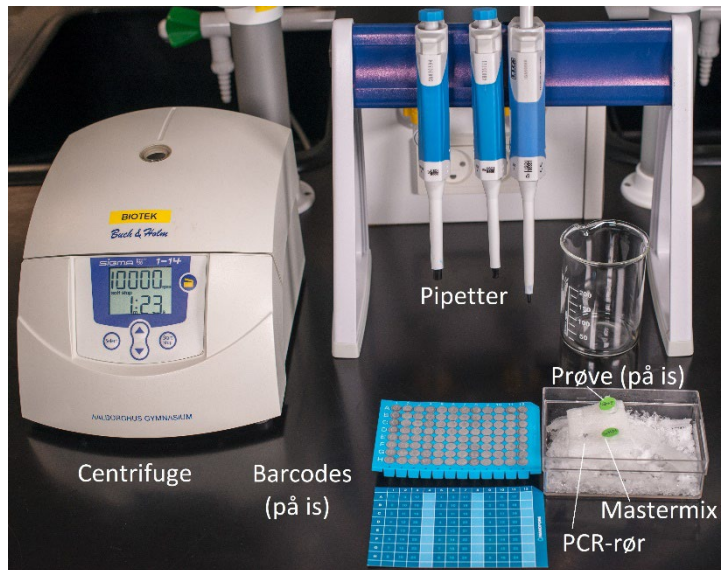
Der benyttes to specifikke primere, en forward (F) og en reverse (R) primer. Primerne indeholder sættets barcodes (DNA "stregkoder").

Hver primer er desuden forsynet med en koblingssekvens (rapid attachment sequence). Her kan man inden sekventeringen binde Rapid Adapters (RAP), dvs. de molekyler, som ved sekventeringen opdeler DNA-strengen i enkeltstreng, og trækker den ene enkeltstreng gennem nanoporen under sekventeringen.

## Materialer og udstyr

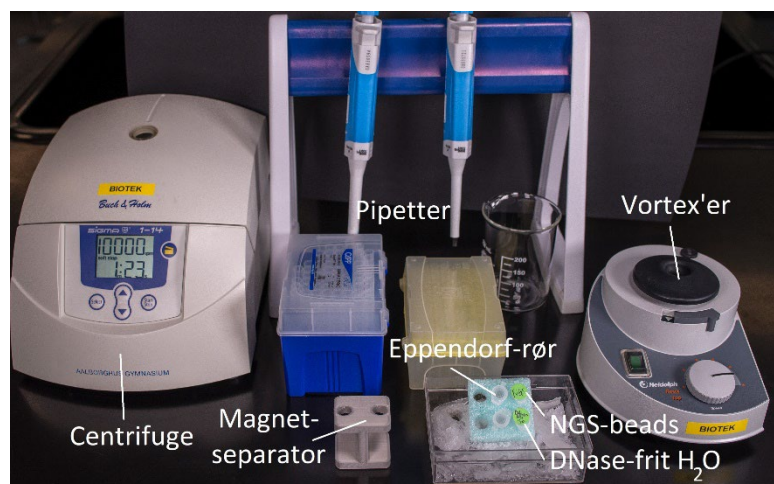
### Barcoding og PCR

- Prøve (volumen indeholdende 10 ng DNA)
- 16S Barcode-rør (1-24) (Opbevares i fryser indtil brug. Indeholder de barcodede primere)
- DNase-frit vand
- Taq 2X Master Mix (indeholder taq-DNA-polymerase og nucleotider)
- Isbad
- Microcentrifuge
- Mikropipetter med spidser til følgende volumener: 5, 10, 15, 40, 200, 500 µL
- 1 stk. 0.2 ml PCR-rør per prøve. Mærkes med prøvens barcode.
- Termocycler (PCR-maskine)



### Rensning af DNA efter PCR (tages frem fra fryseren efter PCR)

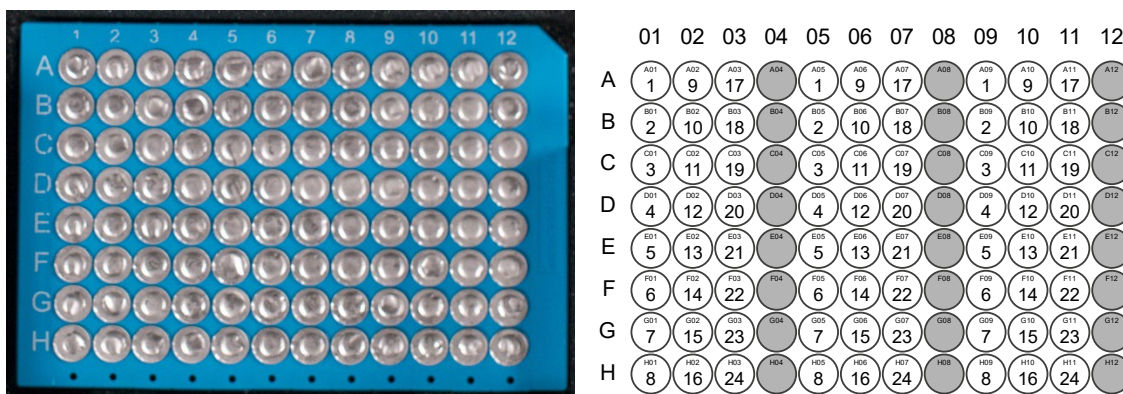
- 2 stk. 1,5 ml Eppendorfrør per prøve. Mærkes med prøvens barcode.
- CleanNGS beads (magnetiserbare kugler, som er coatede med carboxyl-grupper, der kan binde DNA)
- 80% ethanol i DNase-frit vand (forberedes umiddelbart før brug, fx mens prøverne vendes. Er koncentrationen under 70 % sker der en udvaskning af DNA ved skylning)
- Evt. Hula mixer (rotationsmixer) – alternativt gøres det med håndkraft.
- Magnetseparator til 1.5 ml Eppendorfrør



### Fremgangsmåde

**Generelt: Brug handsker og skift pipettespidser mellem hver afpipettering, så prøven eller rørene ikke forurennes. Hold orden på arbejdspladsen og opsaml pipettespidser ol. i affaldsglasset.**

Til hver prøve vælges en unik 16S barcode. Det gøres ved at brække og klippe et rør af pladen med de 96 rør til hver prøve. Det er vigtigt at notere nummeret (1-24) på den barcode, den enkelte prøve tildeles. Nummeret kan ses på nedenstående figur (også vedlagt i kassen):



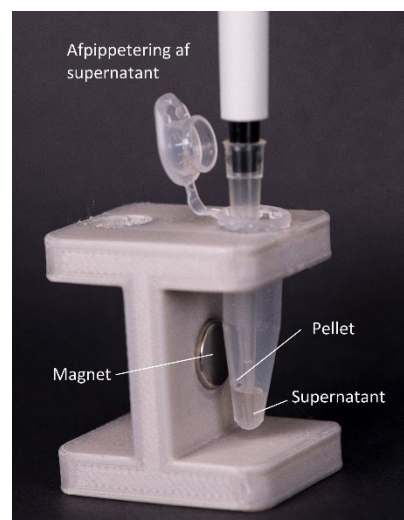
1. Tø barcoderøret op, tjek, at væsken er i bunden af røret, ellers "dap" det derved. Anbring det straks på is.
2. Tø Mastermix op, centrifuger det kortvarigt ned i en centrifuge, så væsken samles i bunden, mix med en pipette og anbring den på is.
3. Mærk for hver prøve et PCR-rør med nummeret på prøvens barcode. Noter hvilken prøve, der har hvilken barcode.
4. Der skal overføres 10 ng DNA til PCR-røret. Der kan max. overføres 15  $\mu$ L. Beregn ud fra DNA-koncentrationsmålingen, hvor mange  $\mu$ L prøve der skal bruges. Det kan være nødvendigt at fortynde prøven.
5. Overfør de 10 ng DNA til et 0,2 mL PCR-rør.
6. Tilsæt DNase-frit vand, så volumen af prøve og vand bliver 15  $\mu$ L. Mix ved at knipse på røret. Spin det kortvarigt ned i centrifuge
7. Tilsæt 25  $\mu$ L Mastermix. Mix ved at knipse på røret. Spin kortvarigt ned på en centrifuge.
8. Tilsæt 10  $\mu$ L barcode til prøven. Tjek først, at barcode-opløsningen er i bunden af røret. Overfør ved at prikke pipettespidser gennem folien der dækker barcoden.
9. Overfør barcoden, og mix ved at pipettere op og ned 10 gange.
10. Luk låget godt til, så det klikker på plads.
11. Mærk rørene med gruppe og barcodenummer, og anbring dem på is, indtil alle grupper er klar til PCR.
12. Anbring klassens prøver i PCR-maskinen.
13. Start maskinen på følgende program:

Trin	Temperatur (°C)	Tid (min)	Antal cykler
Indledende denatuering	95	1 min	1
Denaturering (adskillelse af strengene))	95	20 sek	}25
Annealing (binding af primere)	55	30 sek	
Extension (dannelse af den modstående streng)	65	2 min	
Afsluttende extension	65	5 min	1
Standby	4	∞	

**Prøven kan opbevares i fryseren efter PCR, indtil den renses.**

**Efter PCR renses prøven:**

14. Mærk to 1,5 mL eppendorfrør med prøvens nummer
15. Overfør prøven til det ene eppendorfrør.
16. Resuspender CleanNGS-beads ved at vortexe dem kortvarigt. Tjek at de er godt opblandede.
17. Tilsæt 30 µL beads til hver prøve.
18. Vend eppendorfrøret med prøven i roligt tempo i 5 min ved håndkraft (vend side hvert sekund). Prøvens DNA skal binde sig til NGS-beadsene, men må ikke rystes, så DNA rives i stykker.
19. Spin prøven kortvarigt ned i centrifuge.
20. Anbring prøverne i en magnetholder. Magneten vil få perlerne med DNA til at samles som en pellet på siden af røret.
21. Afpipetter supernatanten fra bunden af røret, mens den sidder i magnetholderen. Supernatanten kasseres. Røret med prøven bibeholdes i magnetholderen.
22. Tilsæt 200 µL 80 % ethanol til bunden af røret for at skylle pellet. Pellet skal blive siddende på rørets side, men skal dækkes af ethanol.
23. Vent 30 sekunder.
24. Fjern ethanolen fra bunden af røret med pipetten.
25. Tilsæt igen 200 µL ethanol. Fjern ethanolen med pipetten.
26. Spin prøven ned og anbring røret tilbage i magnetholderen.
27. Afpipeter forsigtigt overskydende ethanol og lad prøven tørre i præcist 30 sek med åbent låg.
28. Fjern røret fra magnetholderen.
29. Resuspender pellet i 10 µL DNase-frit vand.
30. Inkuber 2 min ved stuetemperatur.
31. Anbring røret på magnetholderen. Vent til supernatanten er klar og farveløs.
32. Overfør supernatanten, der indeholder det færdige DNA-produkt, til det andet mærkede (rene) eppendorfrør.
33. Hold prøven på is.



***Prøven indeholder nu de opformede og barcodede kopier af 16S rRNA gen sekvenser fra bakterierne. Hver gruppes prøver har med barcoden fået en unik DNA-sekvens i enden, og de kan derfor blandes i samme prøve ved sekventeringen. Den unikke sekvens kan bagefter bruges til at adskille data fra hver enkelt prøve igen ved databehandlingen. Det er vigtigt at have noteret hvilken barcode, der hører til hvilken gruppe.***

***Mål DNA-koncentrationen med Qubit fluorimeter. Koncentrationen skal anvendes til at bestemme, hvor meget prøve, der skal tilsættes ved sekventeringen.***