

Kresten Cæsar Torp

## Nanopore – bestilling, software-download, community og gode råd til lærerforberedelsen

### Indhold

Nanopore – bestilling, software-download, community og gode råd til lærerforberedelsen.....	1
Bestilling af devices og flowceller.....	2
Ressourcer i Nanopore Community .....	3
Login I Nanopore Community.....	3
Software-download .....	3
Online protokoller .....	4
Tips til forberedelse af laboratoriet.....	6
1C. Oprensning af DNA med DNeasy Power Soil Kit .....	6
1D. Måling af DNA-koncentration med Qubit 4-fluorimeter .....	6
1E. Barcoding og PCR.....	6
1F. Sekventering .....	6

Kresten Cæsar Torp

### Bestilling af devices og flowceller

Da vi benytter os af et start-pakke-tilbud, må hver skole bestille deres ordre selv. Det gøres på:

<https://nanoporetech.com/products>

En start kan fx være:

- 1 stk. MinION Basic Starter Pack (inkluderer 1x MinION-device, 2x flowceller, adgang til Nanopore Community, 1x vaskekit til flowcellerne og der kan vælges 1x sekventeringskit (anvendes foreløbigt ikke i projektet, men fx kan SQK-RAD004 anvendes til genomisk DNA)).
- 1 stk. 16S Barcoding Kit 1-24 SQK-16S02 (Inkluderer: Barcodes og flow celle priming kit) – vælges ved et af trinnene under bestilling af MinION Basic Starter Pack.
- 1 stk. Flongle Intro Pack (Inkluderer: 1x Flongle adapter, 12x Flongle flowceller). Man kan sagtens undvære Flongle-pakken i første omgang, og i stedet anvende MinION-flowcellerne først. Se noter nedenfor.

Vær opmærksomme på at angive leveringen enten under bestillingen eller efterfølgende ved mail til [support@nanoporetech.com](mailto:support@nanoporetech.com). Der kan være ventetid på levering, særligt af Flongle Flow-cellerne, som er et nyt produkt.

Flowcellerne har begrænset holdbarhed, særligt Flongle. Vores erfaring er dog at holdbarheden i køleskab er noget længere end de angiver. Det kan dog være en ide at dele leveringen på to datoer, så man ikke brænder inde med for mange celler. Alternativt kan fælles bestilling med andre skoler være en fordel.

#### Lidt uddybning:

I vil kunne lave sekventeringer med MinION-flowcellerne og behøver altså strengt taget ikke Flongle-cellerne. I skal så bare følge vejledningerne på Nanopore Community, når det gælder priming af flowcellerne og sekventeringen. MinION-flowcellerne kan genbruges ved at vaske dem med vaskekittet, så med to flowceller og vask, er der til en del klasser.

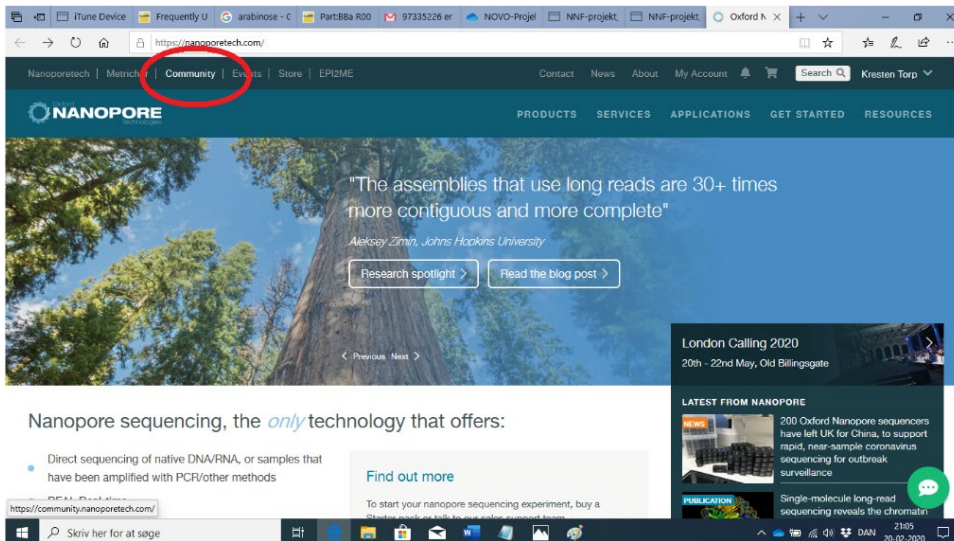
Når vi alligevel har valgt også at inddrage Flongle-cellerne i projektet, er det fordi vi formoder, de på sigt vil være den rigtige løsning for gymnasier. De er billige pr styk, engangs, og helt tilstrækkelige til det vi skal med dem. Med starterkittet får I flowceller til 12 sekventeringer, lidt afhængigt af antal grupper, altså til en del klasser. Ved lidt koordinering mellem skoler kan man måske låne sig til en ekstra adaptor og device, så man kan dele klassens prøver i to samtidige kørsler.

Kresten Cæsar Torp

## Ressourcer i Nanopore Community

Login I Nanopore Community

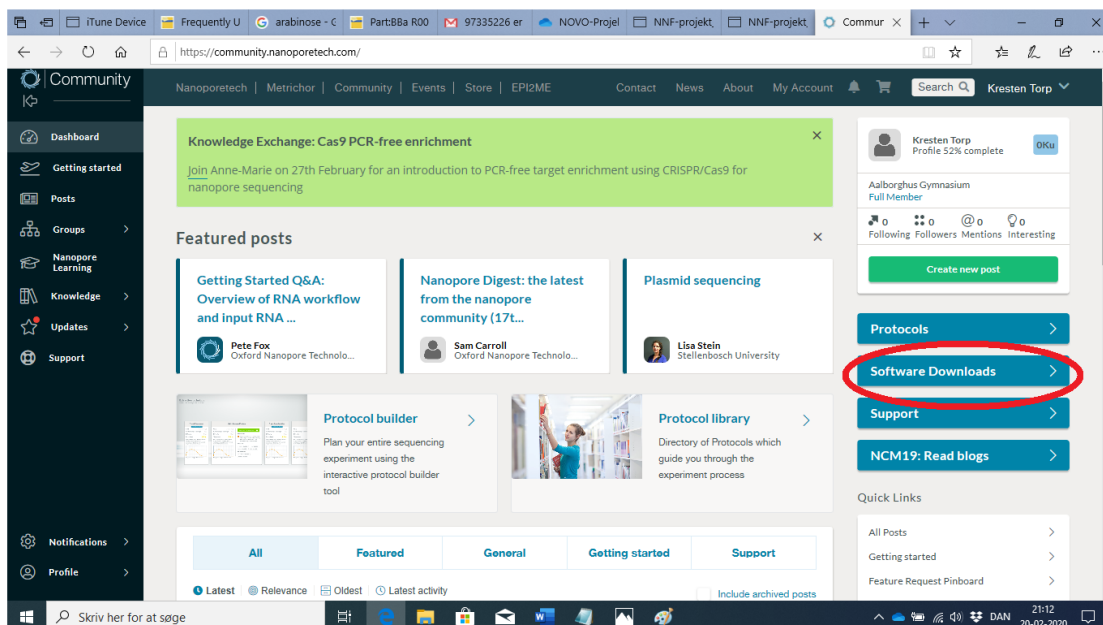
Vælg 'Community'. Log ind (eller opret profil, hvis første gang).



## Software-download

Log ind i Nanopore-community.

Vælg 'Software Downloads'



Download og installer:

- MinION Software

Computational Thinking og biologiske systemer

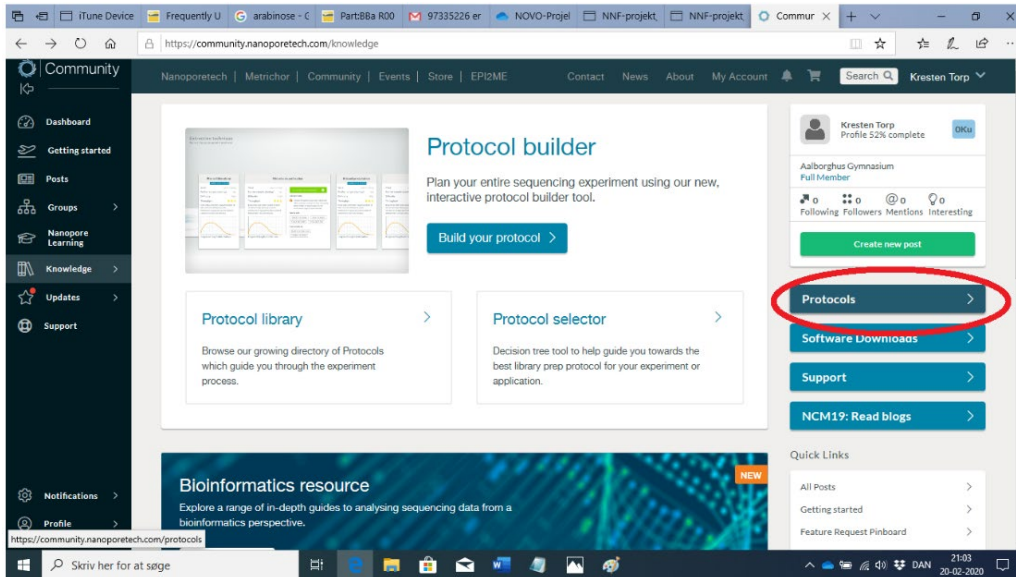
Kresten Cæsar Torp

- EPI2ME Desktop Agent

Online protokoller

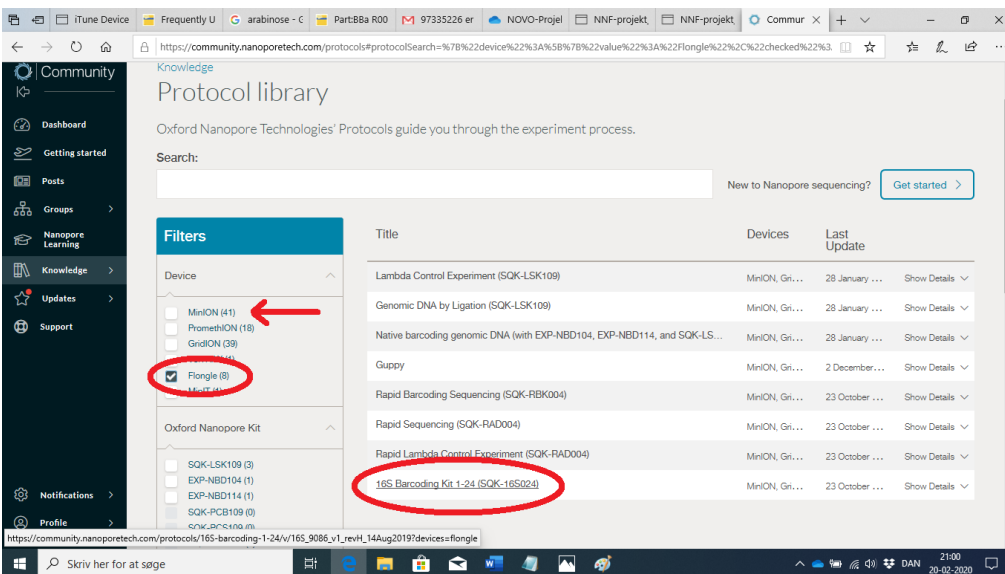
Log ind i Nanopore community

Vælg 'Protocols'



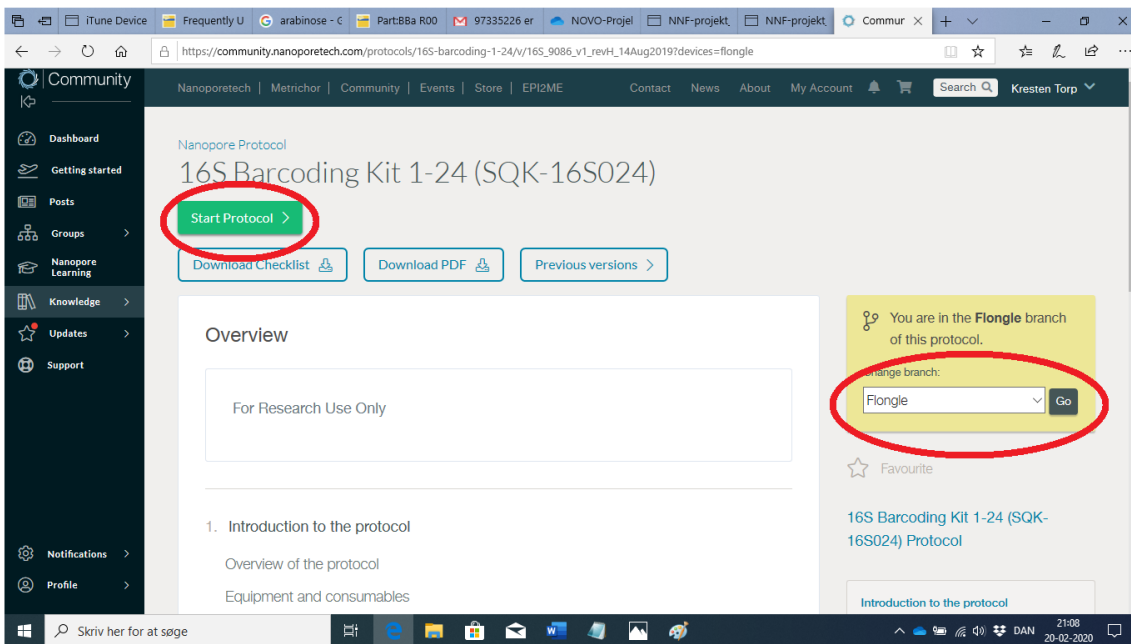
Vælg device (Flongle, alternativt MinION (Rød pil))

Vælg 16S Barcoding Kit 1-24



Vælg 'Start protocol'. Vær undervejs opmærksom på at du stadig er i den rigtige 'branch', nemlig 'Flongle' (eller minION)

Kresten Cæsar Torp



Følg protokollen. Her findes bl.a. gode video-demonstrationer.

Kresten Cæsar Torp

### Tips til forberedelse af laboratoriet

I vejledningerne er der fotos af elevernes arbejdsplads. De kan anvendes til at indrette laboratoriet.

Eleverne må inden laboratoriearbejdet introduceres til anvendelse af følgende udstyr:

- Mikropipetter: Nøjagtig afpipettering af små volumener og afsætning af dem i rørene. Mix med pipette, skift af pipettespidser, lodret opbevaring i holdere, affaldsglas.
- Eppendorfrør: Pellet og supernatant
- Centrifuger: Fordeling af rør, mærkning af rør
- Thermocycler

Afhængigt af hvor mange vortex-mixere og centrifuger skolen råder over kan det være nødvendigt at koordinere trinnene for klassens grupper.

Tjek nøjagtigheden af skolens mikropipetter. Det kan gøres ved at afpipettere vand på en vægt. Kalibrer evt. pipetterne. Det kan forhindre, at en enkelt gruppe bruger hele klassens reagens...

### 3b. Oprensning af DNA med DNeasy Power Soil Kit

Der er mange trin, og man kører let vild i hvor mangt man er kommet! Print evt. protokollerne og lad eleverne krydse punkterne af, efterhånden som de kommer frem.

Fordel reagenserne i eppendorfrør til hver gruppe – ellers bliver processen let uoverskuelig. Vær opmærksom på en **fejl på fotoet i protokollen**: Det er nødvendigt med 2 rør med C4!

Vortexer og adaptor: Anvend en rundhovedet pen, så gummihovedet på adaptoren ikke skades, flere grupper kan ryste i samme adaptor, bare de holder øje med tiden.

### 3c. Måling af DNA-koncentration med Qubit 4-fluorimeter

En Qubit 4 er dyr at anskaffe (ca. 20.000 kr). Overvej at koordinere indkøb med en naboskole. Der findes alternativer, fx Nanodrop, som dog ikke er billigere.

### 3d. Barcoding og PCR

Fotoet i protokollen viser hvad grupperne har brug for. Ved at afpipettere mastermix til hver gruppe undgås, at én gruppe tømmer klassens fælles rør.

Eleverne introduceres til magnetseparatorerne.

I punkt 16 anvendes en bord-mixer eller prøven vendes i hånden. Gør eleverne opmærksomme på at det IKKE er vortex'eren der skal anvendes! Den er for hård ved DNA'et.

Det er muligt at stoppe undervejs, umiddelbart efter PCR. Koncentrationsmåling kan udføres umiddelbart efter rensningen, hvis tiden passer til dette.

### 3e. Sekventering

Når eleverne har målt DNA-koncentration på deres prøver, fortsætter arbejdet fælles for klassen. Det fungerer bedst, hvis computeren tilsluttes en projektor.

Beregningen af hvor meget prøve der skal tilsættes på baggrund af DNA-koncentrationen kan være lidt langhåret. Nogle grupper vil givetvis have meget lave koncentrationer af DNA, og nogle prøver må måske sorteres fra. De resterende kan evt. fordeles i to sekventeringer, idet der jo er to devices.

Kresten Cæsar Torp

Første gang anbefales det at planlægge, så man som lærer kan få ro til denne beregning derhjemme...

Proceduren kan pauses et par dage mellem klargøring af prøven og selve sekventeringen.