

Klargøring af prøve, sekventering og basecalling med Flongle-flowceller

Indhold

Klargøring af prøve, sekventering og basecalling med Flongle-flowceller.....	1
Tidsforbrug	1
Princip.....	2
Materialer	3
.....	3
Fremgangsmåde	3
A. Klargøring af prøve til sekventering	3
B. Montering af Flongle flowcelle -fælles for hele klassen.....	5
B. Priming af Flongle flowcellen	6
C. Loading af prøve i Flongle flowcelle	7
D. Opsætning af eksperimentet i MinKNOW og start på sekventing	8
E. Skærmapport under sekventering og basecalling.....	10

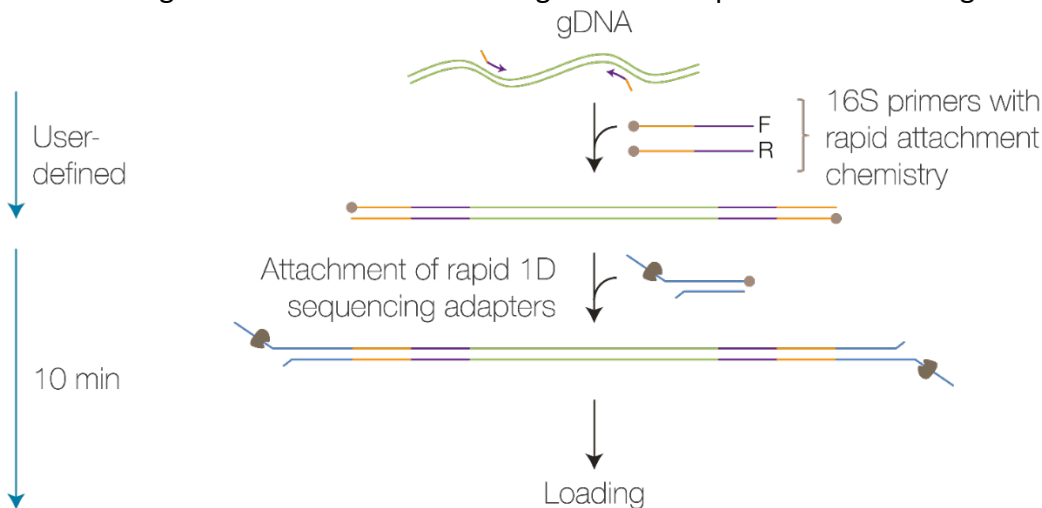
Tidsforbrug

1. Klargøring af prøve: 10 min (prøven kan gemmes 1-2 dage i køleskab)
2. Klargøring og priming af Flongle-flowcelle: 30 min
3. Sekventering: 2-72 timer (fx natten over), afhængigt af DNA-koncentration og -renhed.
4. Basecalling og deling af resultater: 30 min

Princip

Ved PCR-processen blev der benyttet primere, som forsynede hver ende af DNA-sekvensen med en specifik barcode (DNA-stregkode). De kan aflæses som et specifikt nummer for den barcode de enkelte prøver har fået.

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 trækker DNA-sekvensen gennem nanoporen. sekventeringen.



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

RAP har to grene:

- Den ene gren fungerer som forøgning til membranen i Nanopore-flowcellen. Den indeholder et hydrofobt molekyle, som binder DNA-strengen til den membran i nanopore-flowcellen, hvor porerne er placerede.
- Den anden gren indeholder det motorprotein (helicase), som skal bindes til poren, adskiller de to DNA-streng og kører den ene gennem poren, hvor baserækkefølgen aflæses.

Inden sekventeringen blandes de barcodede prøver fra grupperne, tilsættes RAP og loading beads. Flowcellen klargøres og skylles, hvorefter prøven tilsættes.

Når spændingen tilsluttes over flowcellen dannes der en ionstrøm gennem porerne. DNA-sekvenserne i prøven splittes op i enkeltstreng af DNA-helikase og den ene streng vandrer gennem en pore. Det bevirker ændringer i strømmen af ioner gennem poren, som aflæses som spændingsændringer over membranen. Spændingsændringen vil være afhængig af hvilket nucleotid, der passerer gennem poren.

Flowcellen styres fra computeren ved hjælp af programmet MinKnow. På skærmen kan flowcellens status og forløbet af sekventeringen følges.

Under sekventeringens udføres basecalling, dvs. bestemmelse af baser (nucleotider). De elektriske signaler fra nanoporerne hentes over i programmet MinKNOW, hvor der foretages en statistisk behandling, som oversætter spændingsændringerne til en basesekvens. De enkelte barcodes deles ud (demultiplexing) og den mest sandsynlige sekvens bestemmes for hver barcode.

DNA-sekvenserne gemmes i en FASTQ-fil. I programmet Epi2Me kan man efterfølgende foretage en databasesøgning og identificere hvilke bakterier, der er i prøverne. De kan desuden anskueliggøres som et fylogenetisk træ.

Materialer

- Nanopore MinION
- Nanopore flongle-celle adaptor
- Nanopore flongle-celle
- Computer med programmerne MinION og Epi2Me
- Eppendorfrør
- Mikropipetter: 1-200 μL
- DNase frit vand
- 16S barcoding kit (SQK 16S024). Reagenser:
 - a. RAP (Rapid Adaptor – helicase-enzym, som deler dsDNA og trækker ssDNA gennem porerne),
 - b. LB (Loading Beads)
 - c. SQB (Sequencing Buffer)
- Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP002). Reagenser:
 - a. FB (Flush Buffer – indholder ioner som trækkes gennem porerne)
 - b. FLT (Flush Tether – tøjrer DNA til membranen)



Fotos: Andreas Vedel

Fremgangsmåde

A. Klargøring af prøve til sekventering

Før sekventeringen er det nødvendigt at kende koncentrationen af DNA i prøverne. Den måles vha. Qubit4-fluorimeter.

Prøverne skal derefter blandes i en fælles prøve til sekventering, så koncentrationen af DNA er omtrent ens fra alle prøverne. Der skal i alt være 50-100 fmol (10^{-15} mol) DNA. Mol angiver antallet af molekyler her af DNA-streng. Når der er tale om sekvenser på ca. 1500 bp, svarer det til ca. 50-100 ng DNA, som skal opløses i et volumen på 10 μL . Fortynd evt. med DNase-frit vand.

Notér prøvernes koncentrationer:

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Barcode nr.								
Koncentration (ng/ μL)								

For hver ens prøve udvælges den gruppes prøve, som har højst DNA-koncentration.

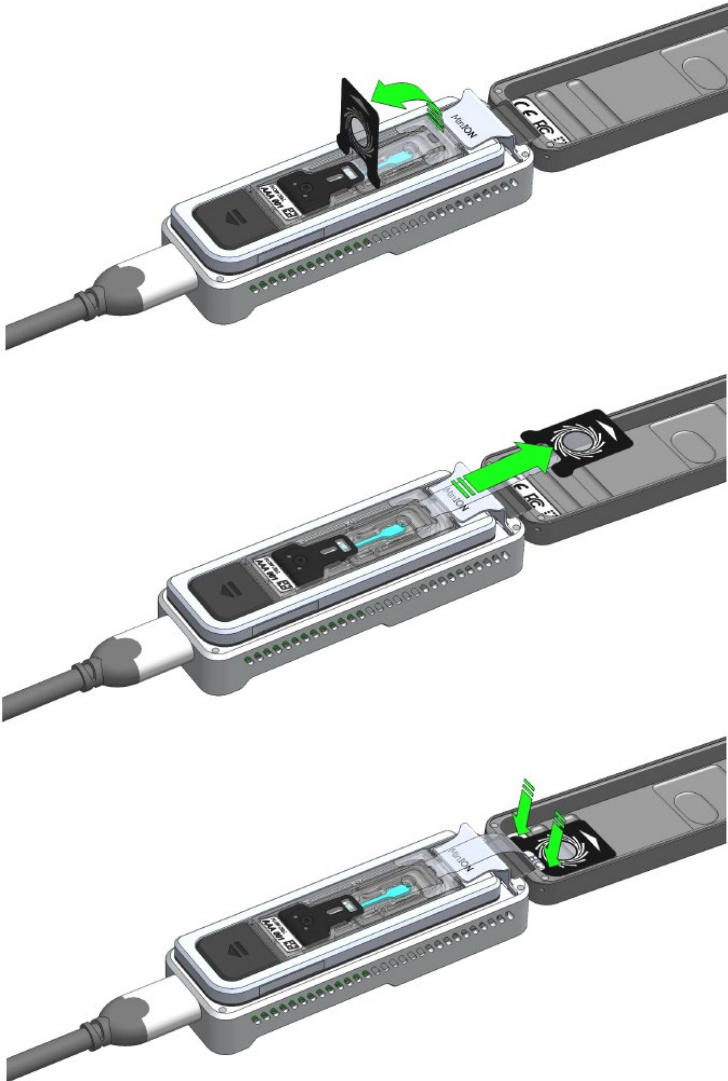
1. Fremstil en opløsning af hver gruppes prøver, så koncentrationen fra hver gruppes prøver er omtrent lige høj, og hvor koncentrationen af DNA er mindst 5 ng/ μL .
2. Afpipetter 1-10 μL DNA-prøve fra opløsningen til et fælles eppendorfrør, så der overføres 50-100 ng DNA (dvs. så der overføres 12-25 ng fra hver af de fire grupper).
3. Tilsæt den resterende volumen DNase-frit vand til et volumen på 10 μL
4. Tilsæt 1 μL RAP til prøven, så det totale volumen er 11 μL .

5. Mix ved at knipse let på røret, og spin prøven ned i centrifuge.
6. Inkuber i 5 min. ved stuetemperatur.

Halvdelen af prøven (5,5 μ L) anvendes til sekventering. Resten gemmes som backup. Prøven kan gemmes i køleskab 1-2 dage.

Øveopgave: Load prøver i brugte flongle-flowceller

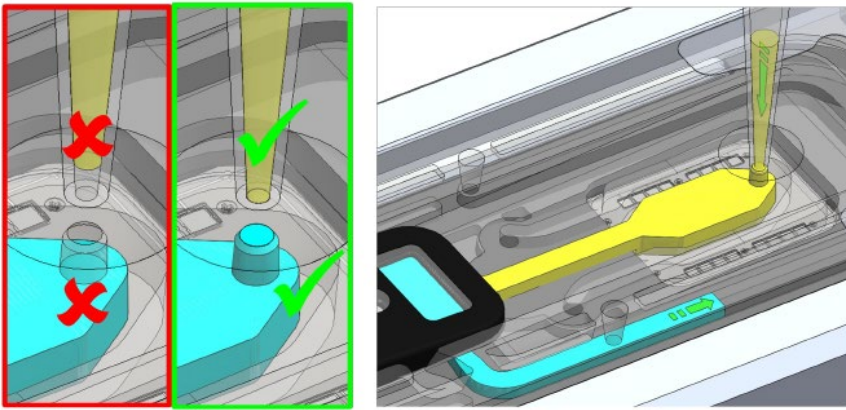
1. Løft forseglingen af flowcellen, træk den tilbage og fastgør den til låget af MinION-apparatet med tape-felterne. Nu er prøve-porten synlig.



Figurer: Nanoporetech

2. De 120 μ L demineraliseret vand afpipetteres langsomt direkte ned i prøveporten.

Det er meget vigtigt, at der ikke kommer luftbobler med. Det undgår ved at bufferen suges op i pipetten, volumenknappen skrues mod mindre volumen, så der ikke er luft i pipettespidsen og der afpipetteres kun til første trin på pipetten. Det er vigtigt, at pipettespidsen placeres præcist lodret ned i prøveporten. Se evt. instruktionsvideo i online-protokollen på Nanopore Community.



Figurer: Nanoporetech

B. Montering af Flongle flowcelle -fælles for hele klassen
Særligt ved klargøring af flowcellen kan man med fordel følge den engelske online protokol på Nanopore Community. Her er der flere instruktionsvideoer, som uddyber afpipettering ol.

3. Monter flonglecellen i MinION-devicen. Undgå at røre ved kontaktpunkterne:

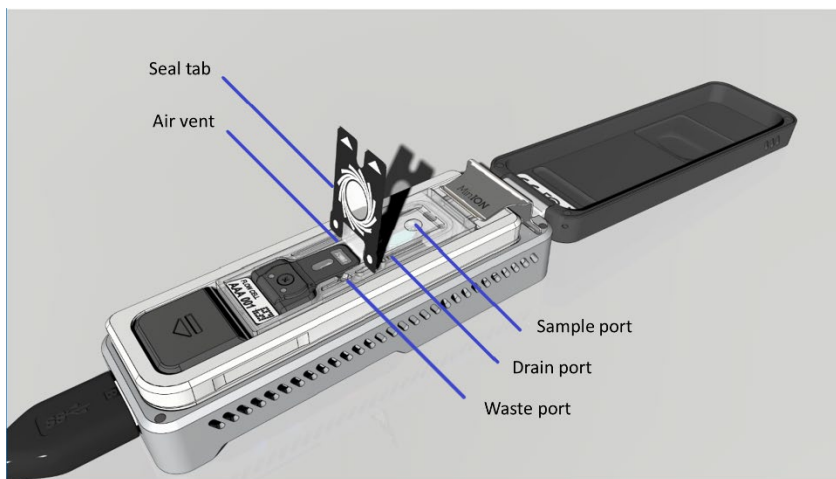


Figurer: Nanoporetech

4. Monter Flongle-flowcellen i adapteren. Den skal klippes på plads under klipsen.



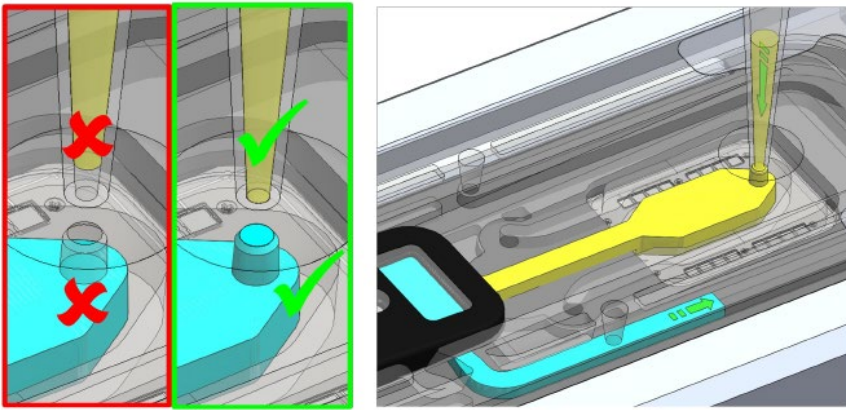
5. Orienter dig på flongecellen: Når forseglingen løftes kan man se "sample port", hvor buffer og prøve afpipetteres



Figurer: Nanoporetech

B. Priming af Flongle flowcellen

6. Optø Sekventeringsbufferen (SQB), loading beads (LB), Flush buffer (FB) og Flush Tether (FLT) ved stuetemperatur. Placer dem på is, når de er optøede. Bufferen er på fast form til lige under stuetemperatur.
7. Vortex SQB, FB og FLT og spin dem ned i en centrifuge.
8. Bland 117 μL FB med 3 μL FLT i et rent 1,5 mL eppendorfrør. Mix med pipetten. Dette er primingbufferen.
9. Løft forseglingen af flowcellen, træk den tilbage og fastgør den til låget af MinION-apparatet med tapefelterne, som da du øvede loading. Nu er prøve-porten synlig.
10. De 120 μL primingbuffer afpipetteres langsomt direkte ned i prøveporten.
HUSK: Det er meget vigtigt, at der ikke kommer luftbobler med. Det undgår ved at bufferen suges op i pipetten, volumenknappen skrues mod mindre volumen, så der ikke er luft i pipettespidsen og der afpipetteres kun til første trin på pipetten.



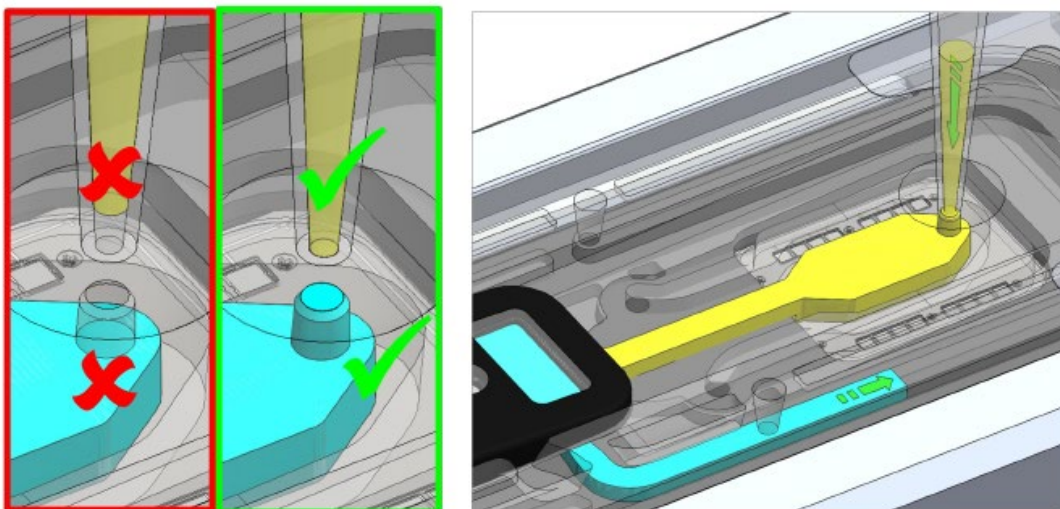
Figurer: Nanoporetech

C. Loading af prøve i Flongle flowcelle

11. Mix loading beads (LB) ved at pipettere op og ned et par gange, og forbered straks prøven som vist i skemaet. Perlerne i LB falder hurtigt til bunds i røret.

Reagens	Volumen
Sekventeringsbuffer (SQB)	13,5 μL
Loading beads (LB) -netop mixede	11 μL
DNA-bibliotek	5,5 μL
I alt	30 μL

12. Afpipetter de 30 μL prøve i prøveporten. Undgå luft ved at følge samme procedure som beskrevet for priming-bufferen: Skru eventuel luftboble ud af pipetten, afpipetter direkte i prøveporten.



13. Monter igen forseglingen over prøveporten:

14. Noter Flongle flowcellens ID-nummer. Det er angivet på cellen.



15. Luk låget på MinION-enheden. Nu er du klar til sekventering.

D. Opsætning af eksperimentet i MinKNOW og start på sekventing

16. Tilslut flowcellen til computeren. Den vil nu lyse op og ventilatoren kan høres.



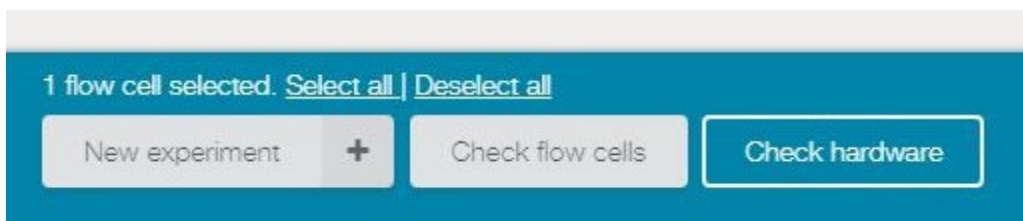
17. Start programmet MinKNOW GUI. Flowcelleikonet kan ses.

18. Vælg "FLO-FLG106" fra drop-down-menuen.

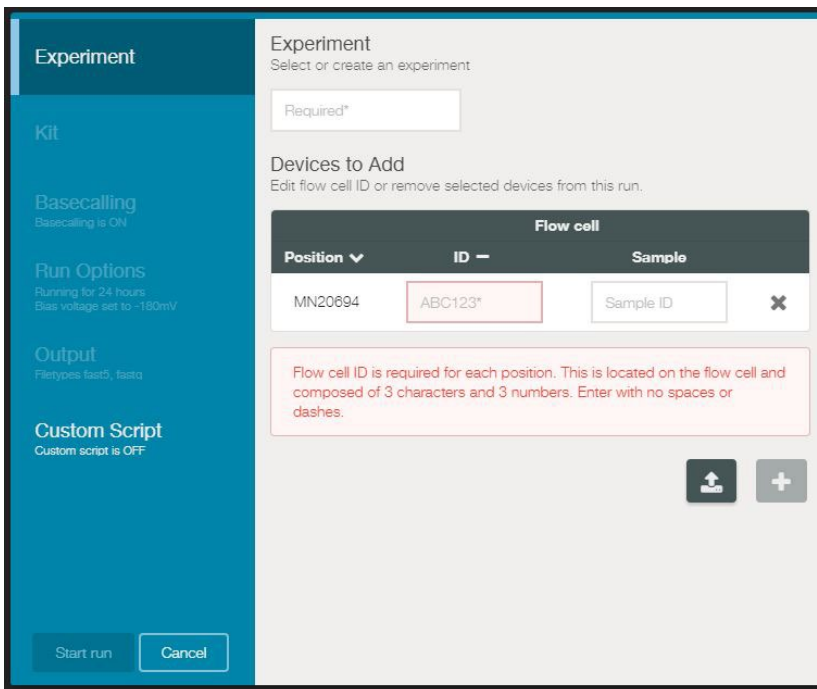


19. Sæt flueben ved "available"

20. Tryk på "New experiment"-knappen foruden på siden:



Dette åbner et vindue, hvor eksperimentets navn og flowcellens ID skrives ind, kit-type vælges, og forskellige eksperiment-parametre kan indstilles.



Experiment
Select or create an experiment

Required*

Devices to Add
Edit flow cell ID or remove selected devices from this run.

Position	ID	Sample
MN20694	ABC123*	Sample ID

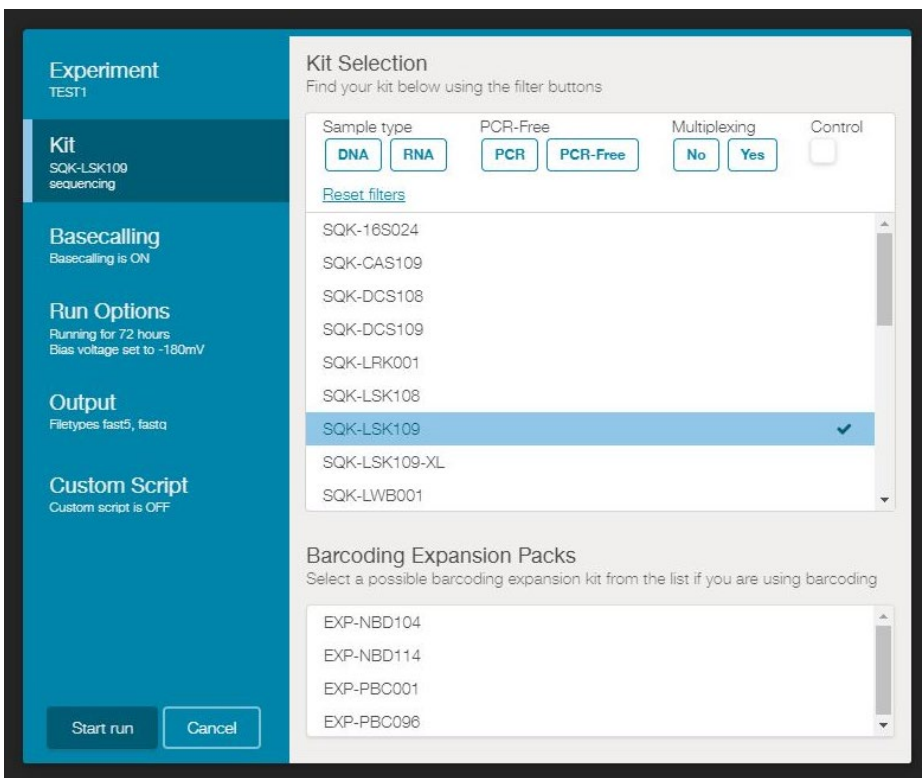
Flow cell ID is required for each position. This is located on the flow cell and composed of 3 characters and 3 numbers. Enter with no spaces or dashes.

Start run Cancel

21. Skriv Flowcellens ID ind med store bogstaver og uden mellemrum. Flowcellens ID kan findes på flowcellen:



22. Vælg 'DNA' og kit, "SQK16S024". 'Vælg. Der vælges ikke under 'PCR-free' eller 'multiplexing'.



Experiment
TEST1

Kit
SQK-LSK109 sequencing

Basecalling
Basecalling is ON

Run Options
Running for 72 hours
Bias voltage set to -180mV

Output
Filetypes fast5, fastq

Custom Script
Custom script is OFF

Start run Cancel

Kit Selection
Find your kit below using the filter buttons

Sample type: DNA (selected), RNA
PCR-Free: PCR, PCR-Free
Multiplexing: No, Yes
Control:

Reset filters

- SQK-16S024
- SQK-CAS109
- SQK-DCS108
- SQK-DCS109
- SQK-LRK001
- SQK-LSK108
- SQK-LSK109** ✓
- SQK-LSK109-XL
- SQK-LWB001

Barcoding Expansion Packs
Select a possible barcoding expansion kit from the list if you are using barcoding

- EXP-NBD104
- EXP-NBD114
- EXP-PBC001
- EXP-PBC096

23. Under "Output" vælges en destinationsmappe til resultatfilerne. Vær opmærksom på placeringen, den skal hentes frem senere i programmet Epi2Me!

24. Klik på 'Start Run'.

De øvrige indstillinger kan justeres, men det er ikke nødvendigt i første omgang. Justeringerne er uddybede i den engelske vejledning.

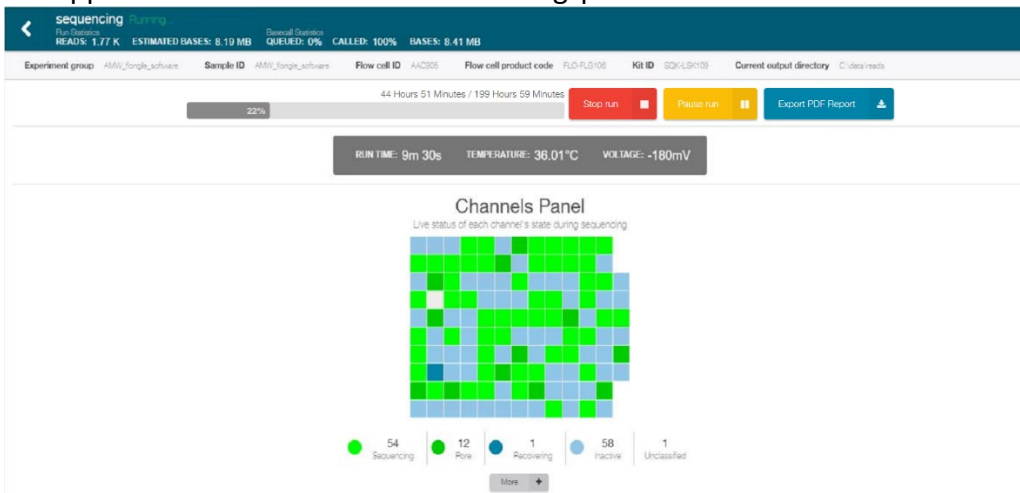
25. Når prøven er klar, klippes på "jump to run". Flowcelleikonet bliver gråt.



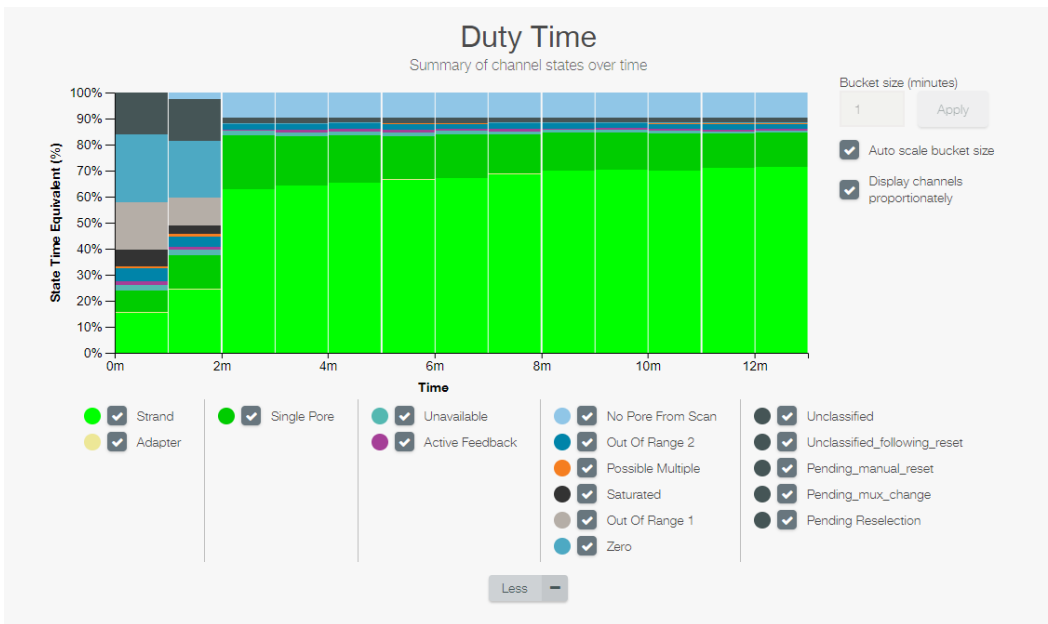
E. Skærmsrapport under sekventering og basecalling

- Sekventeringen kan til enhver tid sættes på pause med "Pause run". Hermed sænkes spændingen over flowcellen, og ionstrømmen nedsættes
- Rapporten fra skærmen kan gemmes i pdf med knappen "Export PDF Report".

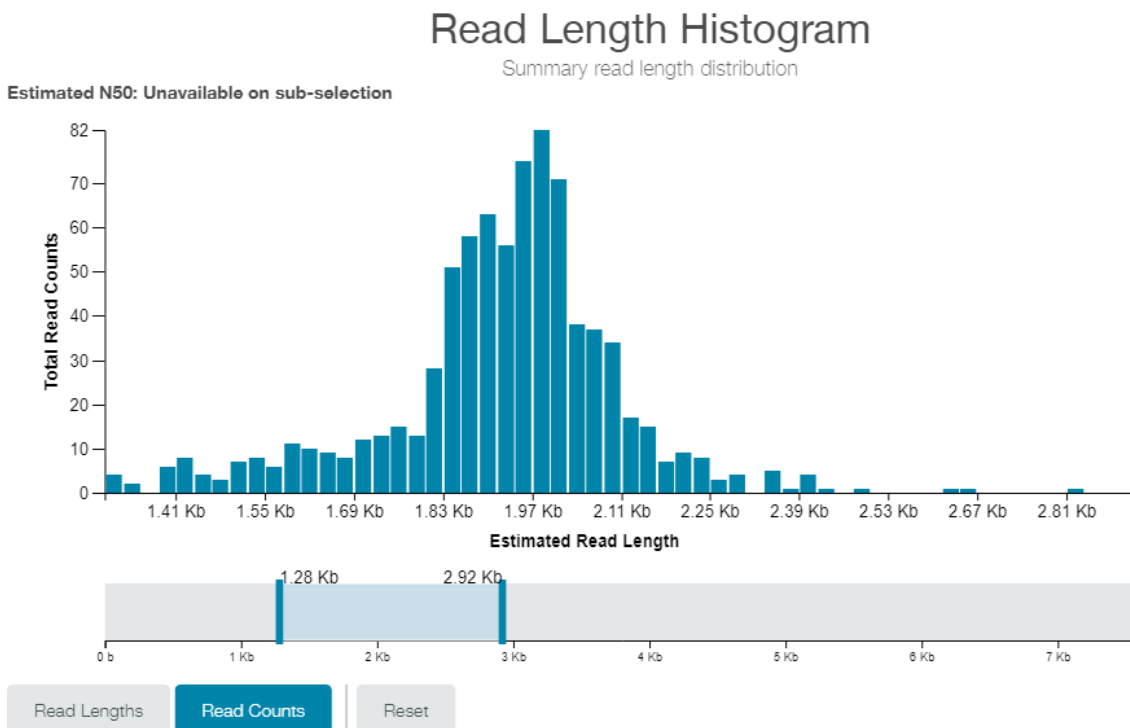
Sekventeringen kan følges på skærmen i Minknow. Her kan det ses, hvilke porer, der sekventerer, hvilke der er aktive, hvilke der er under gendannelse og hvilke der er ude af drift. Porer kan tilstoppes af urenheder under sekventeringsprocessen.



Scrolles der nedad kan porernes status følges tidsmæssigt i et diagram.



Længdehistogrammet viser længden af de sekventerede DNA-streng. I 16S-eksperimentet er det særligt interessant, om der kommer reads ud med længden 1.5 kbp, idet det er længden af PCR-produktet. Med barren nedenfor histogrammet kan der zoomes ind på bestemte afsnit af grafen.

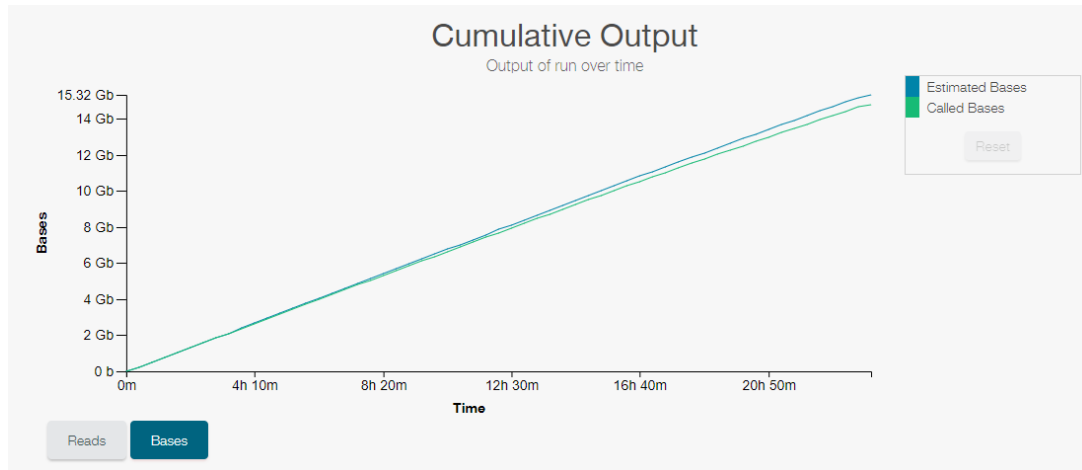


Her kan det fx undersøges, hvordan resultaterne er fordelt omkring de forventede længder, fx 1.5 kbp.

Opgave:

- Forklar, hvordan du vil forvente at søjlerne i histogrammet er fordelt omkring 1,5 kbp.

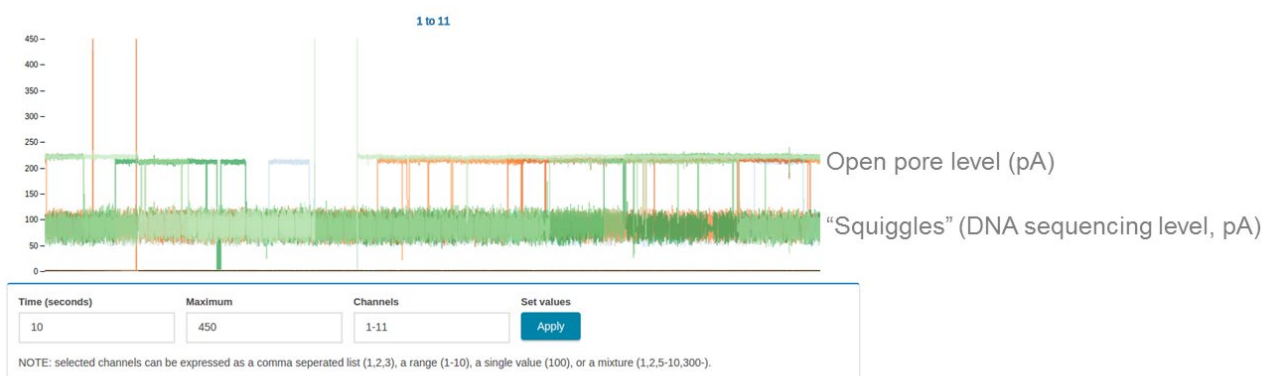
Med grafen "Cumulative output" kan man følge hvor mange nye reads der kommer til som funktion af tid. Når kurven flader ud, må det antages, at sekventeringen er til ende og sekventeringen kan stoppes på "Stop run". Alternativt kan man lade sekventeringen køre færdigt til næste dag. Grafen viser en situation med meget høj succes. Typiske værdier for kumulerede output for flongle-celler vil være på op til 1 Gbp.



"Trace Viewer" viser de enkelte porers aktivitet. Det giver samtidig et billede af det elektriske signal (pico-ampere) som fremkommer ved sekventeringsmetoden. Når der kører DNA gennem poren, blokeres poren og strømmen af ioner gennem poren falder. Dette signal afhænger af hvilke baser, der blokerer poren og kaldes "squiggles" i modsætning til "open". De enkelte baser på DNA-strengen blokerer poren i forskellige grad pga. deres størrelse (puriner (A og G) vs. pyrimidiner (C og T)) og deres polaritet. Det ses på grafen som udsvingene under "Squiggles".

Opgave:

- Slå de fire DNA-basers molekylstruktur op i bogen, og repeter ud fra strukturerne, hvordan deres størrelse og polaritet er forskellig.



Med den valgte indstilling foretages basecalling sideløbende med sekventeringen. Basecalling fortsætter indtil denne afbrydes på "Stop basecalling".

Efter sekventeringen kan resultaterne findes som FASTQ-filer i destinationsmappen på computeren.

Resultaterne kan nu hentes ind i programmet Epi2Me og bakterierne kan identificeres.