

Förberedelser

RNA från SARS-CoV-2 positiva prov med Ct \leq 30 i Alinity M preppas på QIASymphony efter provinaktivering, program 400µl in/ 50µl eluat ut. Eluering i 96-hål plattor eller 1,5 ml rör.

Ladda in 96-håls-elueringsplatta i QIASymphony:

- Ta fram en ny elueringsplatta. Ta bort plasten. Lägg bort locket och ta bort plattan under. Märk locket med dagens datum och numret på arbetslistan.
- Öppna eluat-lådan på QIA-symphonyn, markera rack 1, välj Rack-ID, tryck på rutan och scanna in streckkoden på plattan med handscannern. Sätt plattan i micro-eluat-behållare, in i QIASymphony och skanna eluatlådan.
- Sätt in provrack i QIASymphony. Starta ett i taget och koppla ihop alla med samma eluatrack.
- När körningen är klar, sätt tillbaka plattan på den blå plattan som fanns under i början. Sätt på locket.

Eluaten ska sparas i -70oC, upptining innan sekvensringen bör undvikas.

Reverse transkription

Bakt-PCR labbet

Kontrollera provernas ursprungliga Ct-värden från Alinity M på arbetslistan. Om Ct-värdet är låg, späd eluatet i NF vatten enligt följande:

- Ct ≤ 13: späd provet 1:1000
- 13-15: späd provet 1:100
- Ct 15-18: späd provet 1:10
- 18-30: ospädd

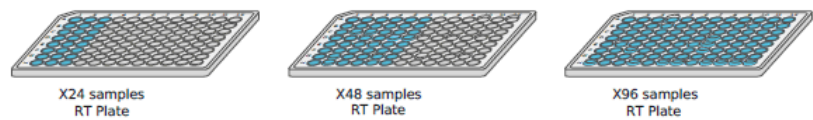
Positivkontroll: egentillverkad kontroll med eluat från 2020

Negativkontroll: NF vatten, 1-X brunnar för att fylla på en kolumn

Renrummet

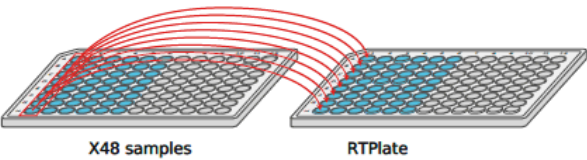
- Sätt en 96-hål PCR-platta (MicroAmp Optical 96-well Reaction plate, REF N8010560, Applied Biosystems; samma modell som passar i QS5 instrumenten) i en 96-PCR kyl-aggregat.
- Pipettera 2 µl LunaScript RT SuperMix (LS RT) i varje brunn som kommer att användas (lodrätta rad, se exempelbilden nedan) .

Plate location	X24 samples	X48 samples	X96 samples
Columns	1-3	1-6	1-12



Bakt- PCR labbet

- Med en pipett, överför 8 µl RNA med rätt spädning från 96 brunn-eluatplattan/eluatrören från QIASymphony:n till varsitt brunn med LunaScript RT SuperMix (LS RT). Blanda försiktigt med pipetten (exempelbild nedan)



- Försegla PCR-plattan med aluminium film (Adhesive PCR plate foil, REF AB0626, Applied Biosystems) OBS! klipp en extra aluminium film i 4 delar och sätt delarna över kanterna, annars dunstar vattnet från brunnarna på kanterna.
- Centrifugera plattan
- Sätt platt i ett konventionellt PCR instrument (MT614042, MT614043) och starta programmet "Midnight RT" (ca. 15min):

Temperatur	Tid
25 °C	2 min
55 °C	10 min
95 °C	1 min
4 °C	Hold

Amplifiering/tiled-PCR

Renrummet

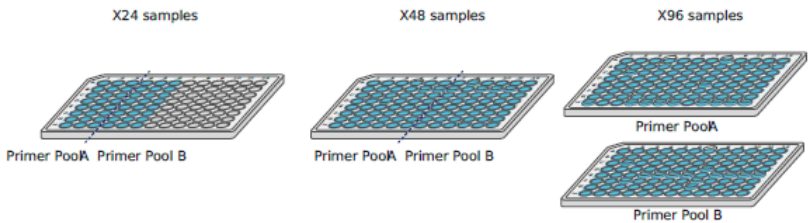
- Medan RT-reaktionen går, blanda två PCR-mastermixar, en för primer-pool A och en för primer-pool B, enligt tabellen nedan (* volymer med 15% inräknat dödsvolym):

Antal reaktioner	x1	x8	x16	x24	x32	x40	x48	x56	x64	x72	x80	x88	x96
NF vatten	3,7	34	68	102	136	170	204	238	272	306	340	374	408
Primer (A eller B)	0,05	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
Q5 HS Master Mix	6,25	58	115	173	230	288	345	403	460	518	575	633	690
Totalt	10	92,5	184	276,5	368	460,5	552	644,5	736	828,5	920	1012,5	1104

- Pipettera 10 µl mastermix med primer-pool A eller primer pool B i olika brunnar av en 96-hål PCR-platta (MicroAmp Optical 96-well Reaction plate, REF N8010560, Applied Biosystems; samma modell som passar i QS5 instrumenten)
- Om totalt ≤ 48 reaktioner ska köras parallellt kan PCR-reaktionerna köras på samma PCR-plattan, enligt exempel-bilden nedan:

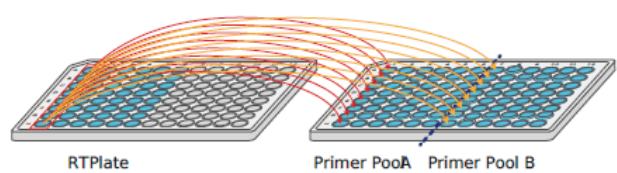
Plate location	X24 samples	X48 samples	X96 samples
Columns	Pool A: 1-3 Pool B: 4-6	Pool A: 1-6 Pool B: 7-12	Pool A: 1-12 Pool B: 1-12

Note: For X96 samples, Pool A is a separate plate to Pool B.



Bakt-PCR labbet (i PCR bänken, slå på UV ljus efter arbetet)

- Centrifugera ner PCR-plattan
- Perforera aluminiumfilmen på RT plattan med en 8-kanal pipett och överför 2,5 µl cDNA från RT-plattan i sina korresponderande brunnar med PCR mastermix med primer poolA och primer pool B (dvs att cDNA blir templat för två olika PCR reaktioner; exempelbild för x48 rxns nedan).
- Blanda genom att pipettera upp och ner några gånger.



- Försegla PCR-plattan med aluminiumfilm (Adhesive PCR plate foil, REF AB0626, Applied Biosystems)
- Centrifugera plattan
- Sätt plattan i ett konventionellt PCR instrument (MT614042, MT614043) och starta programmet "Midnight PCR" (ca 3:30h):

Steg	Temperatur	Tid	Cykler
Denaturering	98 °C	30 sek	1x
Denaturering	98 °C	15 sek	\
Anneal/Ext	65 °C	5 min	35x
Hold	4 °C	Hold	Hold

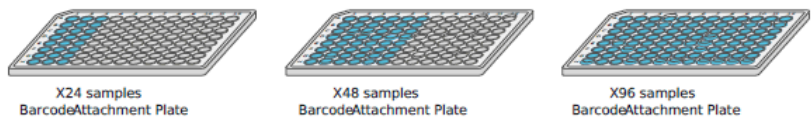
Vid behov kan analysen pausas här. PCR plattorna ska då sparas över natt i kyl på 4 °C.

Barcoding

Renrummet

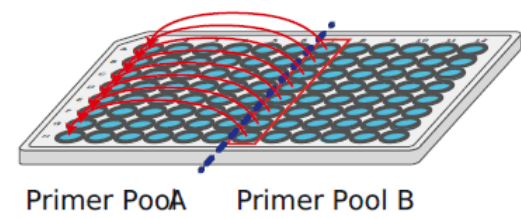
- Tina 96-hålplattan med rapid barcodes (s.k. Rapid Barcode Plate; RB-platta) och centrifugera den
- Ta fram en ny 96-hål platta (s.k. Barcode Attachment platta, BA-platta; MicroAmp Optical 96-well Reaction plate, REF N8010560, Applied Biosystems; samma modell som passar i QS5 instrumenten) och pytsa 2,5 µl NF vatten i en brunn för varje prov.

Exempelbild nedan



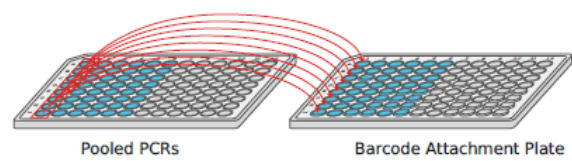
Sekvensering-/ post-PCR labbet (i post-PCR bänken, slå på UV-ljus efter arbetet)

- Centrifugera PCR-plattan/plattorna
- Poola båda PCR-reaktionerna (från primer-pool A och primer pool B) genom att perforera aluminiumfilmen på brunnarna med PCR B med hjälp av en 8-kanals pipett. Tar upp hela volymen (ca 12,5 µl) från brunnarna med PCR B och överför den till respektive brunn med PCR A. Bland försiktigt genom att pipettera upp och ner (exempelbild för 48 rxns nedan):



- Överför 5 µl poolad PCR-produkt till respektive brunn på BA-plattan med hjälp av en 8-kanal pipett.

Exempelbild för 48 rxns nedan:



(Här måste vi lägga in ett sätt hur vi dokumenterar vilket prov är kopplat till vilken barcode! Essentiellt för demultiplexing)

- Försegla BA-plattan med aluminiumfilm (Adhesive PCR plate foil, REF AB0626, Applied Biosystems)
- Centrifugera BA-plattan
- Sätt BA-plattan i ett konventionellt PCR instrument (MT614042, MT614043) och starta programmet "Midnight Barcoding" (ca 5min):

Temperatur Tid

30 °C	2 min
80 °C	2 min
4 °C	Hold

Pooling och library clean-up

Sekvensering-/ post-PCR labbet (i post-PCR bänken, slå på UV-ljus efter arbetet)

- Ta ut BA-plattan ur PCR-instrumentet och centrifugera den
- Poola alla barcodade prover: med en 8-kanal pipette, överför först materialet från brunnarna i kolumnen 2-12 till brunnarna i kolumn 1 genom att perforera silverfolien. Sedan överför allt material från kolumn 1 i ett rent 1,5 ml Eppendorf DNA LoBind rör.
- Förväntad slut volym: 24 rxns ~240 µl, 48 rxns ~480 µl, 96 rxns ~960 µl.
- Blanda kort genom att vortexa, sedan centrifugera ner poolen
- Överför hälften av poolen i ett rent 1,5 ml Eppendorf DNA LoBind rör (24 rxns 120 µl, 48 rxns 240 µl, 96 rxns 480 µl). Andra hälften kan sparas i -20oC.
- Resuspendera magnetkulorna (SPRI beads) genom att vortexa
- Överför en lika volym magnetkolor (SPRI beads) till poolen och blanda genom att pipettera upp och ner
- Inkuberar röret med poolen och magnetkulorna på Hula mixern i 5 min
- Tillverka minst 3 ml färskt 80% EtOH med NF-vatten
- Försiktigt centrifugera ner magnetkulorna och ställ röret på en magnethållare för att få en pellet
 - (rör står kvar i magnethållaren) med hjälp av en pipett, ta bort supernatanten utan att röra pelleten med pipettspetsen
 - (rör står kvar i magnethållaren) försiktigt pytsa 1 ml 80% EtOH i röret (på motsatta sidan pelleten) utan att lösa eller röra pelleten med magnetkulorna
 - (rör står kvar i magnethållaren) med hjälp av en pipett, ta bort 80% EtOH utan att röra pelleten med pipettspetsen

Upprepa steg b. och c. en gång till.

- Centrifugera röret och ställ tillbaka den i magnethållaren. Ta bort rester av EtOH med hjälp av en pipett
- Låt pelleten torka ui rumstemperatur med öppet lock i ca 30 sek (pelleten får inte få "sprickor")
- Ta röret ur magnethållaren och resuspendera pelleten i 15 µl elution buffer (EB) genom att pytsa upp och ner
- Inkubera i rumstemperatur i 10 min med lock på röret
- Ställ röret i magnethållaren och vänta tills alla magnetkolor har samlats i botten av röret;
- Ta upp supernatanten (ca 15 µl) som innehåller det barcodade biblioteket av alla prover och överför den i ett rent 1,5 ml Eppendorf DNA LoBind rör
- OBS! Håll biblioteket kyl tills den laddas för sekvensering

Kvantifiering av DNA-biblioteket med Qubit

Sekvensering-/ post-PCR labbet (i post-PCR bänken, slå på UV-ljus efter arbetet)

- DNA-mängden i biblioteket mäts på Qubit (MT 614459) med Qubit dsDNA BR Assy kitet (Cat No. Q32850, ThermoFisher),
- Blanda 199 μ l Qubit dsDNA buffer med 1 μ l bibliotek i ett Qubit-rör
- Inkubera röret i 2 min i rumstemperatur
- Välj rätt program och rätt provvolym instrumentet och mät koncentrationen; notera koncentrationen (den ska ligga mellan 140-200 ng/ μ l)

Rapid adapter

Sekvensering-/ post-PCR labbet (i post-PCR bänken, slå på UV-ljus efter arbetet)

- Överför 800 ng barcodad bibliotek i ett rent 1,5 ml Eppendorf DNA LoBind rör. Om <11 µl av biblioteket används fyll upp till 11 µl med elution buffer (EB)
- Pyttsa 1 µl Rapid Adapter F (RAP F) till 11 µl barcodad bibliotek
- Inkubera röret i rumstemperatur i 5 min

Biblioteket är nu klart för att laddas i MinION flödescellen. Spara Eppendorf-röret med biblioteket i en kylblock i kylan (4 °C) under tiden du förbereda MinION instrumentet och flödescellen!

MinION Hardware Check och Flow Cell Check

Logga in

- Starta MinKNOW mjukvara. Logga in med:

Användare mikro.ont@regionvasterbotten.se

Lösenord Baktlab1

- Hämta en ny flödescellen från kylan och låt den värma upp till rumstemperatur. OBS! Släng inte förpackningen och vad som finns i den, materialet behövs för returnering av flödescellen till Oxford Nanopore!
- Tina Sequencing buffer II (SBII), Loading beads II (LBII), Flush Tether (FLT) och Flush Buffer (FB) i rumstemperatur.

Sekvensering-/ post-PCR labbet (i post-PCR bänken, slå på UV-ljus efter arbetet)

HW/FC Check

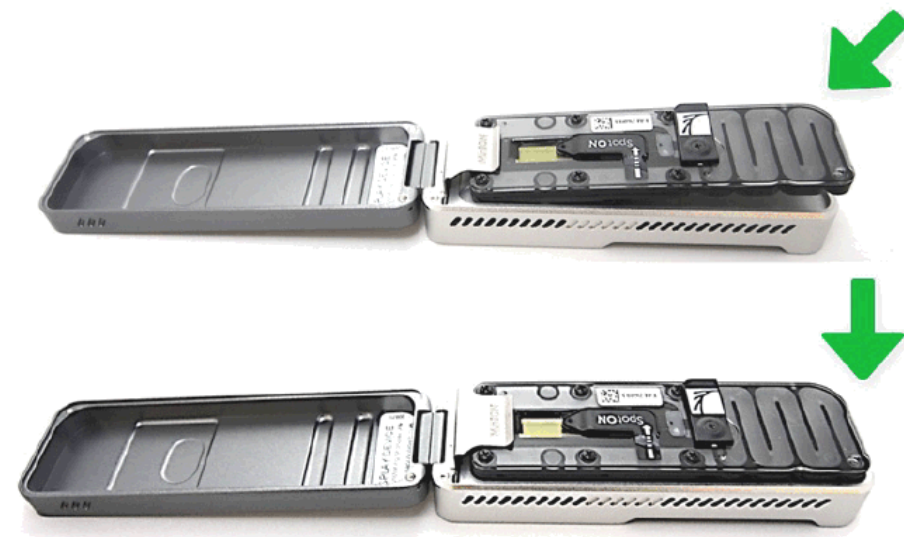
Innan sekvenseringen startas ska (I) ett Hardware check och (II) ett Flow Cell Check utföras.

(I) Hardware check

- Anslut MinION instrumentet (MT 613986) med USB-kabeln till datorn
- kontrollera att den "Configuration Test cell" sitter i instrumentet
- Starta datorn och logga in
- Starta MinKNOW mjukvaran
- klicka bort information om uppdateringar
- Gå till "Start" --> "Hardware Check" --> "Start"
- Under "System messages" ska stå resultatet "Hardware Check has completed successfully"

(II) Flow cell check

- Lyfta locket på MinION instrumentet och försiktigt lyfta den vita "Configurational Test Cell" ur instrumentet
- Sätt in flödescellen; tryck ner flödescellen försiktigt för att säkerställa att den sitter rätt:

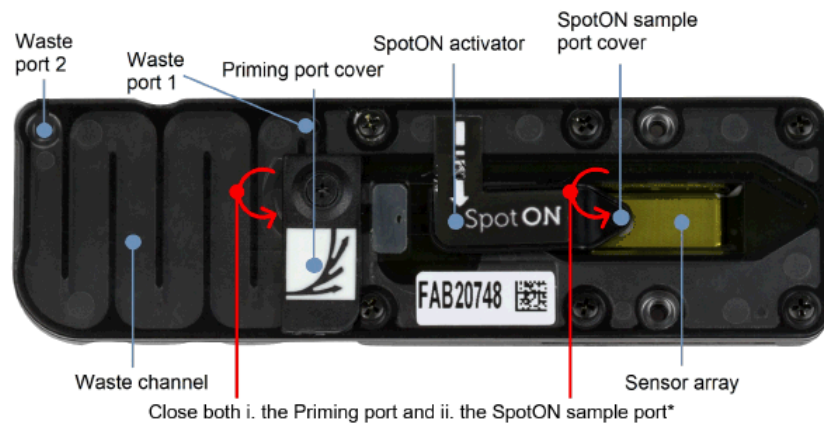


- I MinKNOW, gå till "Start" --> "Flow cell check", kontrollera att Flow Cell ID:n (detekteras automatiskt) stämmer överens med ID:n på flödescellen och tryck start
- Under fliken "Experiments" kan man följa hur flödescellen kontrolleras
- När Flow Cell Check är klar hittar man resultatet under "System messages", t.ex "Flow Cell FARXXXXXX has XXXX pores available for sequencing"

OBS! Flödesceller med <800 porer ska reklameras till Oxford Nanopore Technologies!

Priming och laddning av flödescellen

- Exempelbild av en MinION flödescell nedan; det är viktigt att komma ihåg vart Priming Porten och SpotON Sample porten sitter!



- Vortexa Sequencing buffer II (SBII), Flush Buffer (FB och Flush Tether (FLT).
- Centrifugera Sequencing Buffer II (SBII) och Flush Tether (FLT) ner i rumstemperatur
- Öppna Priming Porten på flödescellen genom att försiktigt rotera det svarta locket medsols:



- Ta bort luftbubblor som sitter i priming porten: ta en 1000 µl pipett inställd på 200 µl, sätt pipettspetsen försiktig i hålet (som är Priming Porten) och justera pipetten till 220-230 µl så att en liten volym vätskan sugts upp.
- Kontrollera att det finns buffer i flödescellen hela vägen från Priming Porten till Sensor Arrayn
- Tillverka ny Flow Cell Priming Mix genom att bland 30 µl Flush Tether (FLT) med 1170 µl Flush Buffer (FB); blanda genom att vortexa
- Pyttsa 800 µl Priming Mix i Priming Porten utan att introducera luftbubblor; låt instrumentet/flödescellen stå i 5 min och fortsätt med nästa stegen under tiden
- Blanda Loading BEads II (LBII) emulsionen med hjälp av en pipett och överför 25,5 µl LBII i ett rent 1,5 ml Eppendorf DNA LoBind rör Förbered biblioteket genom att blanda komponenterna enligt nedan:

Reagens	Mängd
Sequencing Buffer II (SBII)	37,5 µl
Loading Beads II (LBII)	25,5 µl
DNA bibliotek	12 µl
Totalt:	75 µl

- Öppna SpotON Sample Porten genom att försiktigt lyfter upp locket som sitter över den
- Pipettera 200 µl Priming mix i Priming Porten (OBS! INTE I SpotON SAMPLE PORTEN!) utan att introducera luftbubblor
- Blanda biblioteket genom att försiktig pyttsa den upp och ner precis innan den ska laddas i flödescellen
- Pipettera 75 µl bibliotek i SpotOn Sample porten genom att försiktigt låta droppa den i öppningen. Låt varje droppe rinna ner i öppningen först innan du låter den nästa droppa ner. Gå inte ner i öppningen med pipettspetsen och undvik introducera luftbubblor.
- Försiktigt stäng (1.) locket till SpotON Sample Port, (2.) Priming Port och (3.) MinION Mk1b locket.
- I MinKNOW, gå till "Start" --> "Start sequencing"
- Skriv in dagens datum (ÅÅ-MM-DD) samt experiment (Covid-seq) och signatur under "Experiment name"
- Gå vidare till "Kit selection" och välj "Rapid barcoding kit SQK-RBP004" från menyn
- Gå vidare till "Run options", kontrollera att sekvenseringstiden är inställd på 72h
- Gå vidare till "Basecalling", inaktivera "Basecalling"
- Gå vidare till "Output"; gör en ny pärm under D://ONT med dagens datum och Covid (ÅÅMMDD-Covid)
- Gå vidare till "Final review", kontrollera alla uppgifter
- Tryck start.

Sekvenseringen går under 1-2 dygn.

Postsekvensering

Avsluta sekvenseringen och analys av sekvenserna

- Tryck på "Stop", sedan konfirmera att du vill avsluta
- Viktigt!!! Spara en rapport: tryck på "Export PDF" (höger om stopp knappen), välj dagens experiment och spara rapporten under "D://Nanopore rapport".
- Stäng MinKNOW mjukvaran och kasta ut MinION instrumentet från USB-porten
- Ta ut flödescellen ur MinION-instrumentet och sätt tillbaka den vita "Configuration Test Cell"
- Sätt MinION-instrumentet och kabeln tillbaka i förpackningen
- Logga ut från datorn (OBS! Stäng inte av datorn")

Tvätta och returnera flödescellen

OBS! Vid spill måste PCR-hooden rengöras med Virkon och UV-behandlas i några timmar, annars finns risk för kontamination. Vätska från waste-kanalen samlas i ett Falcon-rör som sedan slängs i en gul låda.

- i post-PCR-hooden, lägg flödescellen på ett pappersduk; SpotOn-porten ska vara stängt
- Öppna primingporten och pipettera ca 2x 1 ml NF-vatten i den
- OBS! Stäng primingproten
- Töm waste-kanalen ("tjocktarmen") via wasteporten med hjälp av en pipett.
- Upprepa stegen ovan med ytterligare 2x 1 ml NF-vatten
- Torka bort vätska på flödescellen med ett pappersduk
- Sätt flödescellen tillbaka i plastskalet den skickades i
- Försegla plastskalet med folien som finn i förpackningen
- Lägg det förseglade plastskalet med flödescellen i tillbaka i sin förpackning
- Använda, tvättade flödesceller sparas i kyl tills de returneras

Postlådor för returnering av upp till 10/20/80 flödesceller kan beställas på <https://community.nanoporetech.com/support/returns>. Följ beskrivningen för att boka upphämtning av flödescellerna.