**MiNION R.9 Flow Cell\_HTT *Cas9 Enrichment Sequencing***

Hedef genler için 2şerli olarak tasarlanan crRNAlar eşit molarda karıştırıldıktan sonra aşağıdaki gibi 0.2 ml tüp içerisinde karıştırılarak 95°C’de 5 dk bekletildekten sonra oda sıcaklığına getirildi.

8  µl Duplex Buffer(IDT)

1  µl crRNA havuzu (100 µM, eşmolar)

1  µl tracrRNA

Daha sonra RNP kompleksini oluşturmak için,

39.6 µl  Nükleaz içermeyen su

5 µl Reaksiyon Buffer(RB)

5 ul crRNA+tracrRNA havuzu

0.4 µl hifi Cas9 (31 µM)(IDT;1072532)

 Bir tüp içerisinde karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.

24  µl 5-6 µg gDNA 3 µl  Reaksiyon Buffer(RB) ve 3 µl PHOS(phosphatase ile 37°C’de 10 dk, 80°C’de 2dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına getirilen DNA

30 µl Defosforile edilmiş gDNA

10 µl Cas9 RNP

1 µl dATP

1 µl TAQ Polimeraz ile 37°C’de 35 dk ,72°C’de 5 dk inkübe edildi.

Daha sonra bu aşamadan gelen 42 µl reaksiyon aşağıdaki bileşenler ile karıştırılarak 10dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

20 µl Ligasyon Buffer(LNB)

3 µl Nükleaz içermeyen su

10 µl T4 Ligaz(LIG)

5 µl Adapter Mix(AMX)

Inkübasyondan sonra total 80 µl reaksiyonun üzerine 80 µl SPRI dilüsyon buffer(SDB)

eklenerek seyreltildi. 160 µl seyreltilmiş örneğin üzerine 48 µl AMPure XP boncuklar eklenerek tüpteki reaksiyon ile hafifçe karıştırıldı. Oda sıcaklığında Hula mikser ile 5 dk inkübe edildi. Karışım mıknatısa bağlanarak berrak hale gelen supernatant uzaklaştırıldı. Boncuklar ,boyutu 3kb ve daha uzun olan fragmanları tutacak ve kısa fragmanları uzaklaştırmak için tasarlanan, 250 µl LFB (Long fragment buffer) ile 2 kez yıkandı. Temizlelen boncuklar 13 µl EB(Elution Buffer) ile çözülerek 37°C'’de 10 dk inkübe edildi. Boncuklar mıknatısa bağlanarak berraklaşan elute başka bir tüpe alındı.

MinION R9 Flow cell Mk1B cihazına yerleştirilerek Minknow Software ile bilgisayara bağlandı ve aktif pore taraması (flow cell check) yapıldı. Daha sonra priming port kapağı açılarak flow cell içerisinden 20-30 µl sıvı geri çekildi (kanalda kalabilecek hava kabarcığını önlemek için).Kit içerisinden çıkan 1 Flush Buffer (FB) tüpü içerisine 30 µl Flush Tether (FLT) karışımı eklendi. Bu karışımdan 800 µl priming port kısmından flow cell’e yavaşça yüklendi. 5 dk beklenildikten sonra SpotON Sample port açılarak 200 µl daha aynı karışımdan priming port kısmından yüklendi. SpotON port açıklığından hafifçe bir sıvı çıkışı gözlemlendikten sonra kütüphane aşağıdaki gibi hazırlandı.

12 µl Kütüphane

37.5 µl Sequencing Buffer (SQB)

25.5 µl Loading Beads (LB)

Bütün portlar açık şekildeyken damla damla SpotON port kısmından flow cell’e yüklendi. SpotON ve priming port kapatılarak sekanslama başlatıldı.