■ SARS-CoV-2 sekventeringsinstruks.md

Instruktioner til opsætning af sekventering på sekventerings-workstations

Når biblioteket er færdiglavet, og flowcellen skal til at pakkes ud, kan denne opskrift bruges til at starte selve sekventeringen. Hvis der opstår problemer, eller computeren opfører sig sært, kontakt da Carl på tlf. 5117 5719 eller carkob@rm.dk

- 1. Inden biblioteket loades på flowcellen udføres et flow-cellecheck.
 - i. Log in på en ledig ontseq-workstation; login-oplysningerne står på en seddel som hænger på skærmen.
 - ii. Åbn MinKNOW, ved at klikke på ikonet i venstre side af skærmen, eller tryk på windows-tasten og søg efter minknow.
 - a. Hvis MinKNOW beder om et login, så brug det som står på den seddel der hænger på skærmen.
 - iii. Inde i MinKNOW åbnes nu **Start**, og herefter vælges **Flow cell check**. Denne process tager noget tid, og skulle gerne rapportere antallet af aktive porer på cellen.
- 2. Efter et successfuldt flow-cellecheck, skal flow-cellen nu loades.
 - i. Følg instruktionerne omkring loading i "den anden" manual.
 - ii. Indsæt flowcellen i en Minion-sekvenator.
- 3. Når flow-cellen er loadet med bibliotek skal sekventeringen sættes i gang.
 - i. Tilkobl sekvenatoren med et micro-USB3 til USB3-A kabel.
 - a. Verificer, at USB3-A enden er isat i et "SuperSpeed" (SS) stik i computeren.
 - ii. Åbn MinKNOW igen, som vi tidligere brugte til at lave flow-cellecheck med.
 - iii. Vælg Start og derefter Start sequencing.
 - a. På side 1. Positions skrives YYYY-MM-DD (fx 2021-03-15) i Experiment name-feltet.
 - a. Da det tager mindst et døgn at gennemføre en sekventeringskørsel, er der ikke fare for duplikater, og det er derfor tilstrækkeligt at bruge datoen alene, som batch-identifikation.
 - b. Verificer at der i Positions-tabellen står "FLO-MIN106" under Flow cell type
 - c. Feltet Sample ID skal forblive tomt.
 - d. Tryk på **Load saved settings** og vælg "ontseqX SARS-CoV-2" hvor X er maskinens ID ("a" eller "z"). Maskinens navn kan ses på det klistermærke der står på skærmen. Tryk på **Load**.
 - a. Der kommer en pop-up som spørger om du ønsker at loade kit "SQK-LSK109", vælg Yes.
 - e. Vælg **Skip to end >>** og tjek at alle instillingerne er som på den printede seddel som hænger på skærmen (TODO: ikke printet i skrivende stund.)
 - f. Tryk til sidst på Start-knappen nede i højre hjørne.
 - g. Gå nu ind i Experiments (venstre menu) og hold øje med Run state for den startede kørsel.
 - h. Du vil se meddelelserne: "Heating to N degrees" efterfulgt af "Performing MUX scan".
 - i. Gå ind i **System messages (venstre menu)** og tjek at der ikke er nogle advarsler eller fejlmeddelelser. Hvis du ser en advarselsmeddelelse, er du meget velkommen til at skrive en mail til carkob@rm.dk om problemet.
 - j. Når Run state viser "Active", kan du klikke ind på kørslens undersider. Her kan du se generelle statistikker omkring kørslen, og få en ide om hvor mange porer der er aktive. Tjek eventuelt at Read length histogram viser en nogenlunde symmetrisk fordeling omkring 540b. Under siden Barcode hits kan du se fordelingen af reads på de forskellige barcodes. Denne fordeling skulle gerne følge prøvernes CT-værdier eller Qubit-DNA-mængder.
 - iv. Hvis du er tilfreds med kørslens statistikker, kan du starte **Pappenheim**-pipelinen. Pappenheim mapper de sekventerede reads til et SARS-CoV-2 referencegenom, således at vi på længere sigt kan kalde varianter. Pappenheim startes i terminalen og er udelukkende tekstbaseret.
 - a. Før du starter pappenheim, skal du have et *sample sheet* i xlsx-format klar. Dette *sample sheet* skal som minimum indeholde to kolonner: **Barcode** og **Sample ID**. Det er ligemeget hvilken rækkefølge kolonnerne er i, og det er også ligemeget hvilke andre kolonner der er tilstede i dit *sample sheet*. Det eneste der er vigtigt er, at pappenheim får mulighed for at regne ud hvilke barcodes der passer sammen med hvilke prøver. Du kan overføre dit *sample sheet* til computeren enten ved at bruge et USB-stik eller ved at sende dig selv en mail og hente den via webmail i computerens browser. Når du har dit *sample sheet* klar på computeren, er du klar til at fortsætte til næste trin:

1 of 2 4/7/21, 13:31

b. Åbn et **Terminal**-vindue ved at klikke på **Terminal**-ikonet i venstre side af skærmen. Ikonet skulle gerne ligge lige under MinKNOW-ikonet. Hvis ikke du kan finde dette ikon, så tryk på windows-tasten (på tastaturet) og søg efter *terminal*.

Hvis der opstår

2 of 2 4/7/21, 13:31