

## **Preparación de bibliotecas para secuenciación**

### **de ADN genómico en MinION**

- ☐ Descongelar a temperatura ambiente, dar un spin de breves segundos en la microcentrífuga, los siguientes reactivos:
  - Barcodes (BC 1-4)
  - Adaptadores rápidos (RA)
  - perlas AMPure(AMP Pure XP Beads, AXP)
  - Buffer de elución (EB)
  - Buffer de adaptación (ADB) (mezclar en vortex)

#### **Preparación de ADN y agregado de barcodes**

- ☐ Transferir 200ng de ADN genómico en un tubo de PCR
- ☐ Ajustar volumen de cada muestra con 10 ul de H<sub>2</sub>O nucleasa free
- ☐ Mezclar golpeando suavemente el tubo
- ☐ Centrifugar brevemente
- ☐ Agregar en el tubo de PCR del punto anterior:  
1,5 ul de barcode correspondiente \*

*\*Cada organismo tiene asignado un barcode particular, debe registrar el mismo.*

- ☐ Homogeneizar golpeando suavemente el tubo
- ☐ Centrifugar brevemente
- ☐ Incubar en equipo de PCR a 30°C por 2 minutos y a 80°C por 2 minutos.

#### **Combinación de muestras y purificación**

- ☐ en un tubo eppendorf 1,5ml LoBind unir muestras correspondientes a 2 organismos diferentes (cada uno con un barcode diferente), medir volumen resultante (aproximadamente 23ul)
- ☐ Resuspender AMPure Beads con vortex
- ☐ Agregar 1 volumen de AMPure Beads
- ☐ Mezclar el contenido del tubo
- ☐ Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente haciendo girar el tubo de forma rotatoria
- ☐ Preparar 2 ml de EtOH 80% en H<sub>2</sub>O nucleasa free
- ☐ Luego de incubar, centrifugar brevemente y colocar en gradilla magnética y dejar precipitar las beads.

- ☐ Sin quitar el tubo del imán, retirar el sobrenadante con una pipeta\*

*\*CUIDADO de no pipetear las beads*

- ☐ Manteniendo el tubo en el imán, agregar 1ml de EtOH 80%
- ☐ Retirar sobrenadante con p200 sin despegar el pellet de beads
- ☐ Repetir el lavado con EtOH 80%
- ☐ Centrifugar brevemente, sacar sobrenadante remanente y dejar secar al aire durante 30 segundos\*

*\*CUIDADO de no secar las beads*

- ☐ Remover el tubo del imán y resuspender las beads en 15 ul de buffer de elución
- ☐ Incubar 10 minutos a Temperatura ambiente
- ☐ Precipitar las beads en el imán, durante al menos 1 minuto, hasta que el eluido se vuelva claro e incoloro
- ☐ Transferir el contenido a un nuevo tubo de 1,5ml LoBind \*

*\*CUIDADO de no arrastrar beads*

#### **Cuantificación por Qubit dsDNA High Sensitivity**

- ☐ Preparar solución de trabajo realizando una dilución 1/200 del reactivo ds HS en buffer ds HS
- ☐ en tubo de Qubit agregar 199ul de solución de trabajo y 1 ul de muestra
- ☐ Cuantificar utilizando Qubit.

#### **Agregado de adaptadores**

- ☐ Transferir 11 ul de la muestra a un tubo de 1,5ml LoBind
- ☐ En el tubo rotulado RA agregar 3,5 ul de ADB y mezclar
- ☐ Agregar al tubo de la muestra 1ul del adaptador preparado en el punto anterior y mezclar. Centrifugar brevemente
- ☐ Incubar 5 minutos a Temperatura ambiente
- ☐ Reservar en hielo hasta cargar la celda

### **Preparación de la celda para secuenciación**

- ☐ Descongelar a temperatura ambiente, mezclar y centrifugar brevemente, los siguientes reactivos:
  - Buffer de secuenciación (SB)
  - Beads de Librería (LIB)
  - Flow Cell Tether (FCT)
  - Flow Cell Flush (FCF)

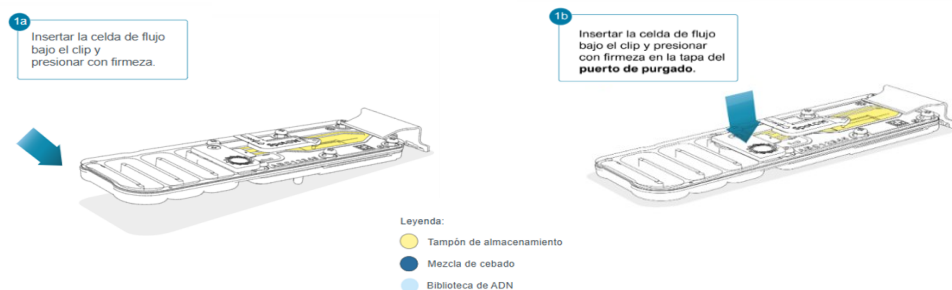
Mantener en hielo

En el tubo rotulado FCF\*, agregar:

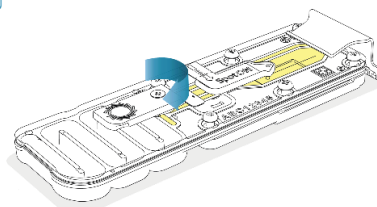
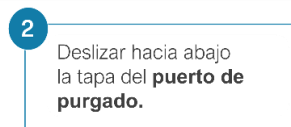
- ☐ 5 ul de BSA 50 mg/ml
- ☐ 30ul de FCT

\*el tubo rotulado FCF ya contiene el volumen necesario para realiza el mix.

- ☐ Abrir el dispositivo y colocar la celda en el dispositivo



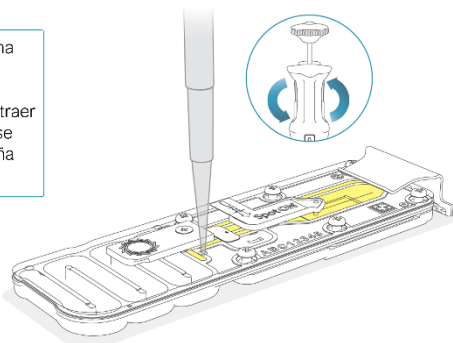
- ☐ Abrir el puerto de cebado deslizando la cubierta en sentido horario



- ☐ Comprobar si hay una burbuja de aire bajo la tapa. Retirar una pequeña cantidad para quitar las burbujas:
- ☐ Ajustar una pipeta P1000 a 200 ul
- ☐ Introducir la punta en el puerto de purgado

- ☐ Girar la rueda hasta que el indicador de volumen marque 220-230  $\mu\text{l}$  (y así retirar 20-30  $\mu\text{l}$ ) o girar la rueda hasta que se pueda ver una pequeña cantidad de solución entrar en la punta de la pipeta.

**3** Insertar la punta de una pipeta P1000 en el **puerto de purgado**. Girar la rueda para extraer 20-30  $\mu\text{l}$  o hasta que se vea entrar una pequeña cantidad de solución.



#### **CUIDADOS:**

✓ *Chequear visualmente que haya un flujo continuo de buffer desde el puerto de cebado través del sensor.*

✓ *Al retirar buffer de la celda, no retirar más de 20-30  $\mu\text{l}$ . Asegurarse que la matriz de poros esté siempre cubierta por el buffer. La introducción de burbujas de aire en la matriz puede dañar irreversiblemente los poros.*

- ☐ Cargar 800ul del mix conteniendo FCF, FCT y BSA
- ☐ Incubar 5 minutos

#### **Preparación de librería para carga en el dispositivo**

En el tubo rotulado LIB\*, agregar:

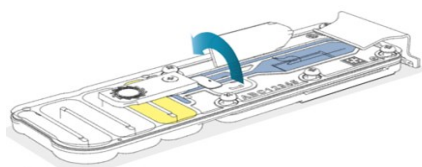
- ☐ 37,5ul de buffer de secuenciación (SB)
- ☐ 12ul de librería de ADN genómico

\*el tubo rotulado LIB ya contiene el volumen necesario para realiza el mix.

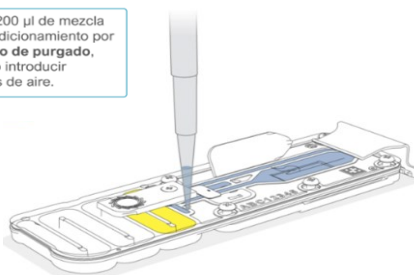
Completar la preparación de la celda

- ☐ Levantar suavemente la tapa del puerto de carga SpotON.
- ☐ Cargar 200 ul de solución acondicionadora en el puerto de purgado (no en el puerto SpotON), evitando introducir burbujas de aire.

**5** Abrir suavemente la tapa del puerto de muestra SpotON.

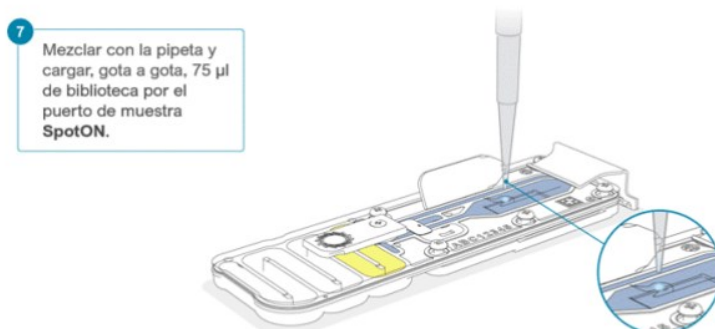


**6** Cargar 200  $\mu\text{l}$  de mezcla de acondicionamiento por el puerto de purgado, evitando introducir burbujas de aire.

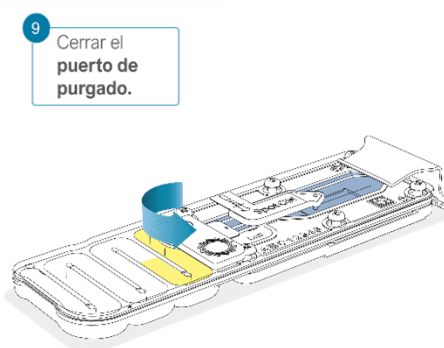
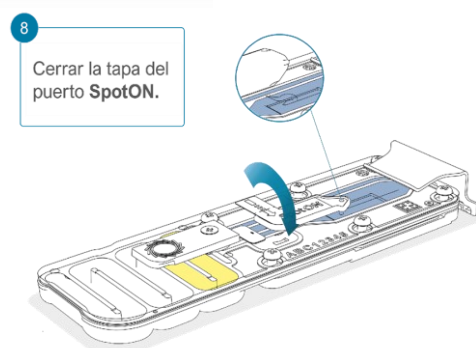


### **Cargado de la biblioteca en el dispositivo**

- ☐ Mezclar la biblioteca suavemente con la pipeta justo antes de cargarla
- ☐ Añadir 75 µl de biblioteca preparada, gota a gota, en el puerto SpotON. Esperar a que cada gota fluya hacia el interior del puerto antes de añadir la siguiente.

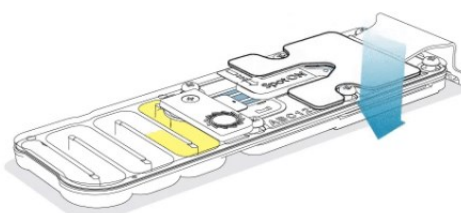
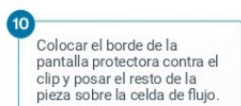


- ☐ Volver a colocar con cuidado la tapa del puerto SpotON, asegurándose de que el tapón encaje en el agujero y cerrar el puerto de purgado



Colocar la pantalla protectora en la celda de flujo:

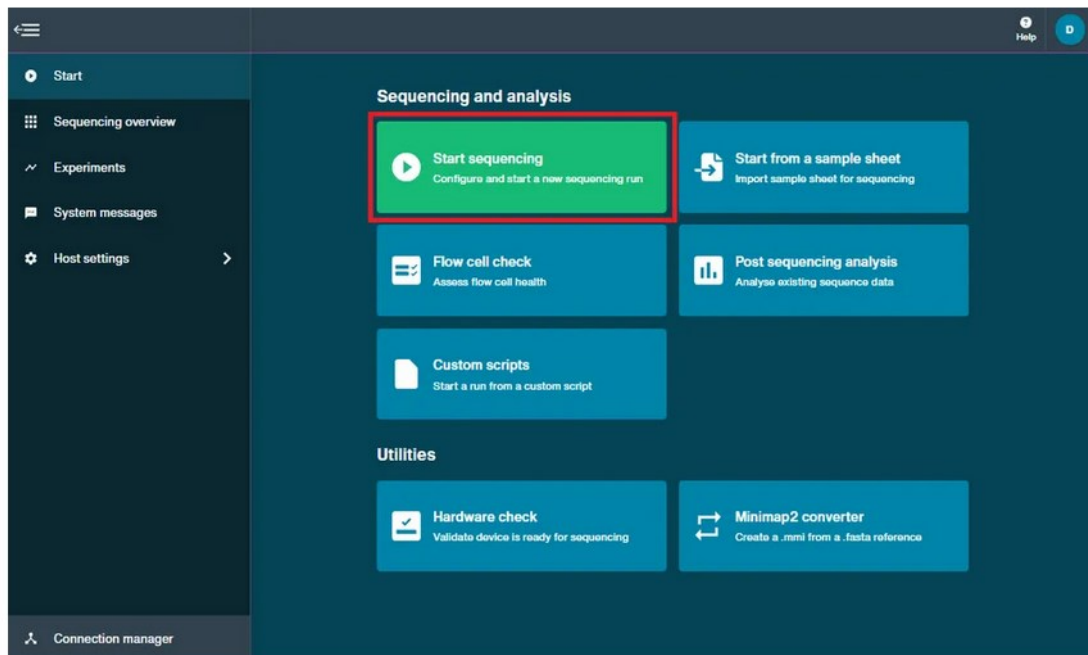
- ☐ Apoyar con cuidado el borde delantero de la pantalla contra el clip. No forzar la pieza para que pase por debajo del clip
- ☐ Apoyar la pantalla sobre la celda de flujo. Debería ajustar alrededor de la tapa SpotON y cubrir por completo la sección superior de la celda de flujo



- ☐ Cerrar la tapa del dispositivo y ajustar los parámetros de la corrida de secuenciación en MinKNOW

## Set up a sequencing run

1. Navigate to the Start page and click **Start Sequencing**.



2. In the Positions tab, fill in the experiment name, sample ID, and select the flow cell type. Click **Continue to kit selection**.

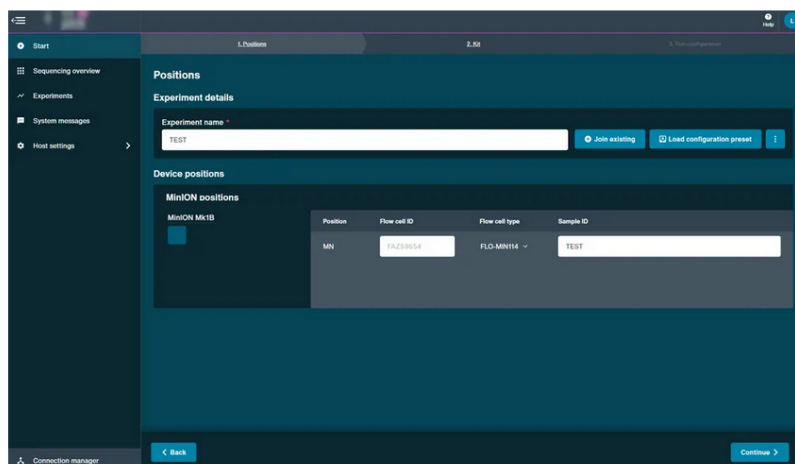
### 2 Type in the experiment name, sample ID and choose flow cell type from the drop down menu.

Ensure the experiment name and sample ID does not contain any personally identifiable information.

**Note:** If sample ID is not filled in, there will be no sample ID in the folder structure.

To use previously saved settings, please see the "Save sequencing run settings" page of this protocol.

Select **Continue** to move to the Kit Selection page.



3. Select the kit and any expansion(s) used to prepare the library. Click **Continue to run options**.

### 3 Select the kit and expansion(s) used to prepare the library.

One sequencing kit can be selected as well as one or more expansions. If a sequencing kit does not have any associated expansions, no expansion options will appear.

The filter options may be used to find the kit used. For example, click **DNA** to filter for DNA sequencing kits.

Click **Continue** to navigate to the run configuration page.

Sample type	PCR-free	Multiplexing	Control
<input type="radio"/> DNA	<input type="radio"/> PCR	<input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> Control
<input type="radio"/> RNA	<input type="radio"/> PCR-free	<input type="radio"/> No	<input type="radio"/> Control

Reset filters

Sequencing Kit	Kit ID	Selected
Ligation Sequencing Kit	SOK-LSK114	<input type="radio"/>
Native Barcoding Sequencing Kit 96	SOK-NB0114-96	<input checked="" type="radio"/>
PCR cDNA Barcoding Kit - 24	SOK-PCB114-24	<input type="radio"/>
Rapid PCR Barcoding Kit	SOK-RPB114-24	<input type="radio"/>
Ligation Sequencing Kit	SOK-LSK114-3L	<input type="radio"/>
Ultra-Long DNA Sequencing Kit	SOK-ULK114	<input type="radio"/>
16S Barcoding Kit	SOK-16S114-24	<input type="radio"/>
Rapid Sequencing Kit	SOK-RAD114	<input type="radio"/>
Native Barcoding Sequencing Kit 24	SOK-NB0114-24	<input checked="" type="radio"/>
Multiplex Ligation Sequencing Kit XL	SOK-MLK114-96-3L	<input type="radio"/>
Rapid Barcoding Kit 24	SOK-RBK114-24	<input type="radio"/>

Select expansion pack

Expansion Pack	Expansion ID	Selected
Cas9 Barcoding Expansion	EXP-CB0001	<input checked="" type="radio"/>

Back Continue

4. Specify the sequencing run length and minimum read length or keep the default settings. Click **Continue to analysis**.

5. Choose your basecaller model and select any available barcoding and alignment options or keep the default settings. Click **Continue to output**.

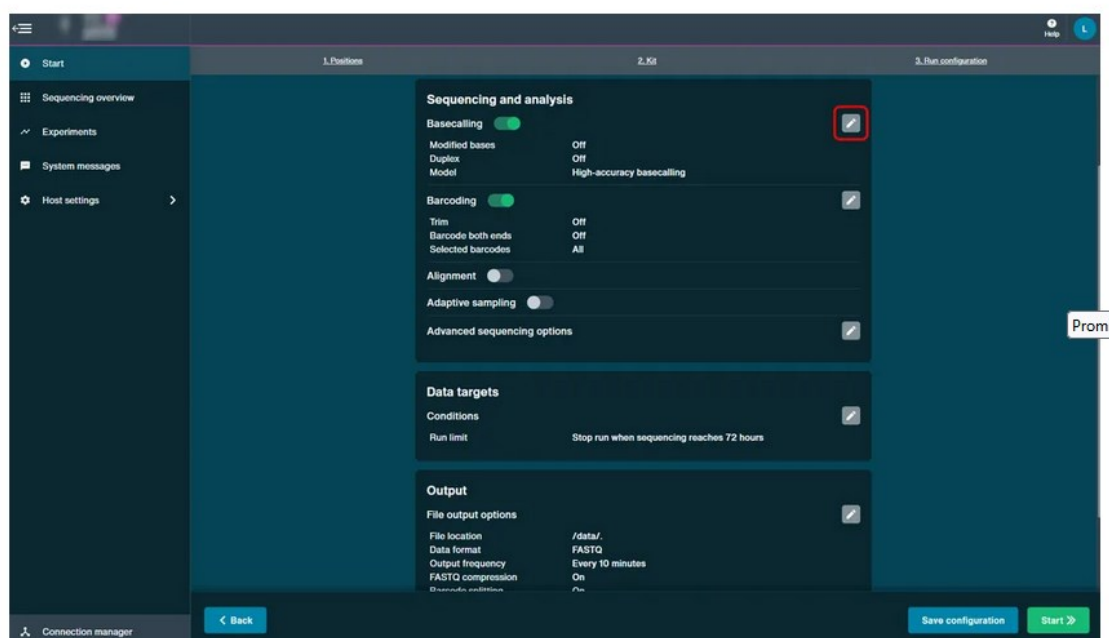
### 5 Choose your basecalling options:

The basecalling option is on by default to perform real-time basecalling. This can be switched off and basecalling performed post-sequencing.

**Note:** If basecalling is disabled, barcoding and alignment will not be performed during sequencing.

Modified bases is off by default. This can be switched on to use the CpG context models and basecall 5mC and 5hmC.

To specify your basecall model and modified bases, click the **Edit** icon to open basecalling options dialogue box.



## Basecall models

Basecalling models can be selected at two stages in the MinKNOW software:

- **Real-time basecalling:** A basecalling model can be selected when setting up a sequencing run on the "Run configuration" page of MinKNOW. This enables basecalling of the sequencing run in real-time.
- **Post-run basecalling:** Basecalling can be set up post-sequencing run on MinKNOW. Instructions can be found in the "[Post-run basecalling](#)" section of this protocol.

Dorado is the basecaller server in MinKNOW which provides multiple models for basecalling nanopore data.

There are three options for model selection in the drop down menu:

**1. High-accuracy basecalling (HAC)** - This is our default recommended basecalling model that provides a high single-molecule accuracy. It is currently 5-8 times more computationally-intensive than the Fast model, so users should ensure their data transfer and device utilisation is scaled appropriately for this.

**2. Super-accurate basecalling (SUP)** - The Super accurate model has an even higher single-molecule accuracy, and is ~3 times more intensive than the HAC model.

**3. Fast basecalling** - This model is able to keep up with a high-throughput sequencing experiment on a MinION, GridION or PromethION.

Note: GPU devices will basecall in near real-time; CPU devices, like a standard laptop for MinION Mk1B/Mk1D, will not maintain real-time basecalling.



6. Choose your barcoding option

**6 Choose your barcoding options:**

Barcoding options are only available when a barcoding sequencing kit or expansion has been selected. Barcoding can be switched off and performed post-sequencing.



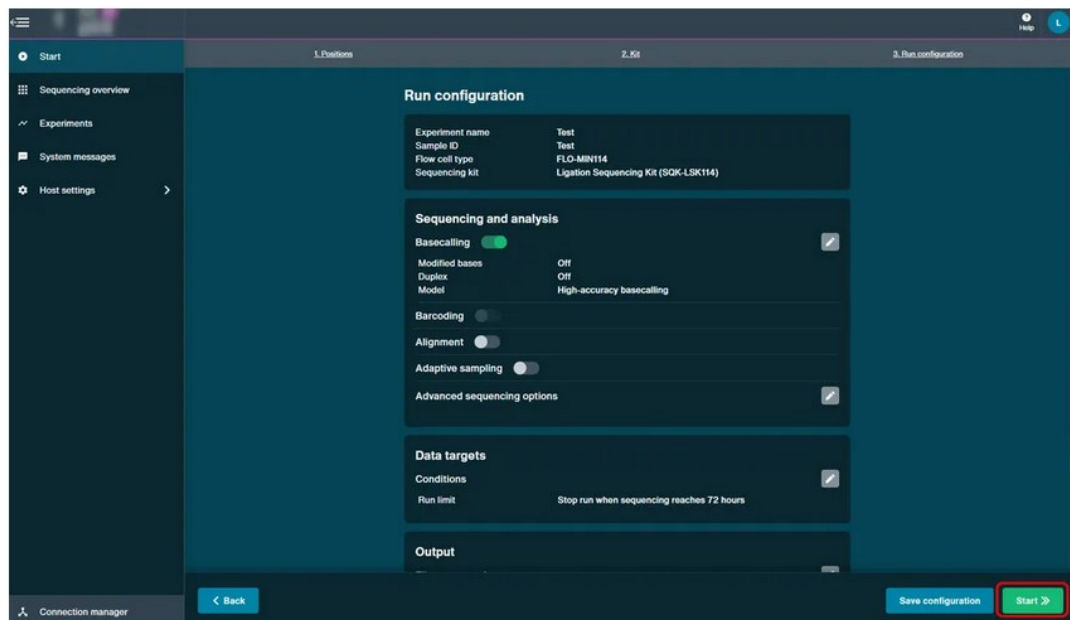
To specify the barcoding options, click the **Edit** icon to open the barcoding options dialogue box. From here, barcode trimming and custom barcode selection can be defined.

By default, barcoding trimming is off. This can be enabled to remove barcodes from demultiplexed reads. Please note, some primer sequences may also be trimmed together with the barcodes.

By default, custom barcode selection is off. This can be enabled to only select for specified barcodes used in your library preparation for the current sequencing run.

7.

Specify your output data location, format and filtering options or keep the default settings. Click **Continue to final review**.



8. Click **Start**.