



May 17, 2022

Nanopore (without barcode)

Hsin-Mao Wu¹¹Kaohsiung Medical College

protocol .



Hsin-Mao Wu

Nanopore

Hsin-Mao Wu 2022. Nanopore (without barcode). **protocols.io**
<https://protocols.io/view/nanopore-without-barcode-b9a2r2ge>



protocol ,

May 13, 2022

May 17, 2022

62522

1. 含DNA禁止pipetting, vortex
2. 含DNA用輕彈、輕輕spin-down
3. 使用filter tip
4. 多個樣本請放在水域槽或保冷孔盤

1. 上機前先用QBIT測量DNA含量
2. 多樣本用Nanopore (with barcode) protocol
3. 依樣本數數據量決定是否加barcode

Step 1 End-prep.

- 1 上NEBicalculator計算DNA用量
並取出計算好用量的DNA

50µl 中含有100fmol DNA之DDW

ds:mass↔moles

0.2

0.3 moles→mass

0.4 輸入DNA片段長度及DNA fmol
輸出DNA mass(ng)
 $\text{mass}/\text{conc.}=\text{DNA用量}(\mu\text{l})$

- 1 加入DDW至 **50 μL**
- 2 依序加入 **7 μL** End Repair & A-Tailing Buffer, **3 μL** End Repair & A-Tailing Enzyme Mix
- 3 加完後vortex、離心數秒
- 4 放進水浴槽：

1h

Veriti 96-Well Thermal Cycler
Applied Biosystems 4375786 [↗](#)

[nanopore_step1]
sample要均分2管(每管30 μl) 放在機器裡正中間的槽
[edit]確認流程
[run]之前改sample量

Step 2 Adapter Ligation

- 5 取Step 1之 **60 μL** 產物
- 6 依序加入 **5 μL** AMX, **5 μL** DI Water, **30 μL** Ligation Buffer, **10 μL** DNA Ligase

Ligation Buffer 輕彈至完全混合
DNA Ligase先不要拿

7 放進水浴槽：

20m

Veriti 96-Well Thermal Cycler

Applied Biosystems 4375786 [↗](#)

[Nanopore_step2]
sample均分2管(每管55μl)
[edit]確認流程
[run]之前改sample量

Step 3 DNA library clean-up

5m

8 取Step 2之  110 μL 產物

9 加入  44 μL AMPure XP Beads

在9F 4度冰箱使用前先搖均勻

10 靜置  00:05:00

5m

11 離心數秒

12 放置於磁座上，等待磁鐵吸附Beads

13 移除上清液

從液面開始吸，以免吸到beads；要吸乾淨，先用大的pipette再用小的

14 加入  250 µL LFB

15 持續輕彈離心管  00:03:00

3m

小心不要噴到頂部

16 放在磁座上 等待磁鐵吸附beads

17 移除上清液，7~9步驟再重複一次

Wash兩次；Wash掉未帶有adapter再純化一次

18 加入  15 µL Elution Buffer

19 輕彈將磁珠彈離管壁

20 離心數秒；放置磁座上

放較上面一些，因sample量較少

等待磁鐵吸附beads

21 靜置  00:10:00 至  Room temperature

10m

22 取  1 μ L 測QBIT

Step 4 Priming and loading

23