

Sep 18, 2024

## Г Выделение, пробоподготовка и секвенирование тотальной ДНК грибов на Nanopore MinION

DOI

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kxygx3jwkg8j/v1](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kxygx3jwkg8j/v1)



Elena Zvyagina<sup>1</sup>, Nina Filippova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Yugra State University

 Nina Filippova  
Yugra State University

OPEN  ACCESS



DOI: [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kxygx3jwkg8j/v1](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kxygx3jwkg8j/v1)

**Protocol Citation:** Elena Zvyagina, Nina Filippova 2024. Выделение, пробоподготовка и секвенирование тотальной ДНК грибов на Nanopore MinION. [protocols.io https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kxygx3jwkg8j/v1](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kxygx3jwkg8j/v1)

**License:** This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

**Protocol status:** In development

**We are still developing and  
optimizing this protocol**

**Created:** February 27, 2024

**Last Modified:** September 18, 2024

**Protocol Integer ID:** 95808

**Keywords:** metabarcoding, fungi, ITS, bog

**Funders Acknowledgement:**

**Yugra State University**

Grant ID: 075-Г3/X4144/854/4

## Disclaimer

Данный протокол составлен на основе собственного опыта использования различных компонентов и протоколов. Все рекомендации, приведенные в нем Вы можете использовать без каких-либо гарантий.

## Abstract

[EN] Protocols for sampling, sample preparation, and sequencing on the Nanopore MinION platform. The target material is total fungal DNA (amplicons) from soil and other substrates. This protocol includes the sampling conditions and DNA extraction methods for metabarcoding tasks, as well as a more or less literal translation of the protocol for the Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) and the instructions provided on the Nanopore website to Russian. The text has been supplemented with the experience of the laboratory "Molecular Genetic Methods in Biodiversity Studies" in the context of our research objectives.

[RU] Протоколы отбора, подготовки проб и секвенирования на платформе Nanopore MinION. В качестве объекта используется тотальная ДНК (ампликоны) грибов из почвы и других субстратов. Данный протокол содержит условия отбора проб и выделения ДНК для задач метабаркодинга, а также более или менее дословный перевод протокола для Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) и инструкций, размещенных на сайте Nanopore. Текст был дополнен опытом работы лаборатории "Молекулярно-генетических методов в изучении биоразнообразия" в рамках наших исследовательских задач.

## Materials

Основные наборы реактивов, использованные для выделения ДНК и последующей подготовки библиотек

## Protocol materials

-  Qubit dsDNA HS Assay Kit **Thermo Fisher Scientific Catalog #Q32851** In [5 steps](#)
-  NEBNext FFPE DNA Repair Mix **New England Biolabs Catalog #M6630** Step 13
-  NEBNext Quick Ligation Module **New England Biolabs Catalog #E6056** In [2 steps](#)
-  AMPure XP Beads (AXP) **Beckman Coulter Catalog #AXP** In [4 steps](#)
-  EDTA disodium dihydrate **Abblis Catalog #AB1011793** In [2 steps](#)
-  HiPure Soil DNA Kit **Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #D314202** Step 4
-  Выделение ДНК/РНК из почвы на магнитных частицах SileksMagNA **Sileks Catalog #KIRSL0100** Step 4
-  Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-NBD114.24**  
In [3 steps](#)
-  NEB Blunt/TA Ligase Master Mix (M0367) Step 15
-  NEBNext Ultra II End repair/dA-tailing Module **New England Biolabs Catalog #E7546** Step 13
-  NEB Blunt/TA Ligase Master Mix **New England Biolabs Catalog #M0367** Step 13

## Safety warnings

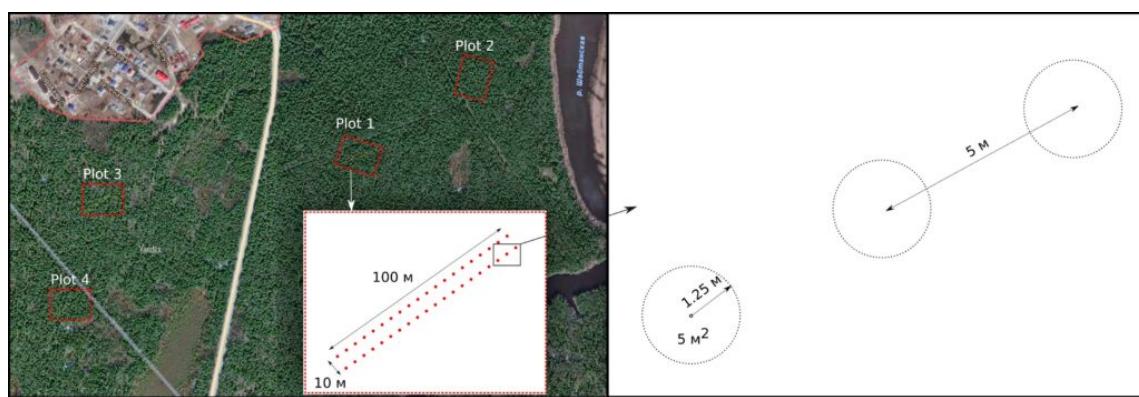
- ❗ При отборе проб на стационаре Мухрино необходимо передвигаться по установленным мосткам. При отборе проб на постоянных пробных площадках необходимо придерживаться площадки и не выходить за ее пределы.

## Ethics statement

Для использования протокола не требуется предварительного согласования с этическими комитетами

## Отбор проб, консервация и хранение

- Для изучения состава и структуры сообщества грибов лесных и болотных почв, отбор проб проводится на репрезентативных участках в основных типах местообитаний. Оптимально, если на тех же участках проводилась ревизия видового состава классическим методом (наблюдение плодовых тел или выделение в культуру). В нашем случае, отбор проб ведется на площадках многолетнего мониторинга в окр. пос. Шапша и на стационаре Мухрино ЮГУ. Схема организации постоянных учетных площадей опубликована нами ранее в протоколе [Sampling macrofungi using fixed-sized plots](#).



Пример отбора проб на площадках в биотопе хвойного леса в окрестностях пос. Шапша. На схеме слева показано размещение 4х площадок (внутри каждой по 1 или 2 линии микро-площадок). Площадка 1 увеличена во вкладке снизу, чтобы показать линии микро-площадок (всего 40 шт). Схема справа показывает фрагмент размещения круглых микро-площадок относительно друг друга. Отбор проводится в каждой второй микро-площадке, так что расстояние между пробами составляет 10 м, всего 5 проб на одной площадке.

В зависимости от выбранного биотопа, определяется тип субстрата для отбора проб, глубина и другие параметры среды, значимые для сообщества. Например, для изучения сообществ грибов лесов, мы отираем пробы в двух горизонтах почвы: подстилка и лежащий под ней гумусовый горизонт. На сфагновых болотах отбор проб торфа происходит с разных глубин: от поверхности до глубоких слоев торфяной залежи, в зависимости от задачи. Отдельной задачей может являться отбор микоризных окончаний растений; отбор опада листвьев разных растений, и др.

- Отбор проб почвы, подстилки или торфа

Для работы в поле **потребуются следующие инструменты:**

A	В	С
Инструмент	Кол-во	Примечание

A	B	C
Рулон стерильной фольги	1	Простерилизовать в автоклаве или сушильном шкафу накануне отбора проб. Фольга может использоваться для заворачивания проб (особенно, если почва очень влажная). Альтернативой являются бумажные пакеты или зип-пакеты. Можно завернуть пробу в фольгу, а затем для прочности положить в зип-пакет.
Стерильные бумажные конверты	n	Конверты из пергаментной бумаги. Удобно делать пакет с четырьмя сгибами, так что его легко можно открыть и достать образец. Пакеты изготавливают заранее, складывают пачками, заворачивают в отдельный лист бумаги, и стерилизуют в автоклаве накануне отбора проб.
Зип-пакеты	n	Зип-пакеты можно использовать для дополнительной упаковки конвертов из бумаги или фольги, а также упаковки серии проб (большие пакеты) с одной площадки.
Перманентный маркер	2	Маркер используется для нумерации конвертов с пробами, а также пакетов с серией проб с одной площадки.
Пульверизатор с перекисью водорода	1	Перекись является наиболее безопасным средством стерилизации. Можно обрабатывать перчатки и нож между отбором. Лучше протереть инструмент влажной салфеткой, а затем обработать перекисью, и дать стечь излишней влаге перед отбором.
Перчатки	1	Для избежания контаминации проб микробиотой кожи, отбор проб ведется в перчатках. Между пробами перчатки обрабатывают перекисью водорода.
Сумка-холодильник с хладагентом для проб	1	Для сохранения интактного сообщества в отобранных пробах, важно организовать временное хранилище во время транспортировки, в котором поддерживается стабильная прохладная температура.
Блокнот и карандаш, или другое устройство для записей	1	В полевом журнале важно отмечать для каждой пробы: место, время и субстрат.
Инструменты для определения физико-химических параметров почвы	n	Важно запланировать заранее параметры среды, которые будут измеряться в поле, например: pH, электропроводность, температура и др.
GPS или другое устройство для определения координат	1	GPS или телефон с включенным геопозиционированием используется для геопривязки каждой извлеченной пробы.

2.1 На площадке выбирается от 3 до 5 точек, расположенных равноудаленно друг от друга. В каждой точке ножом или большой ложкой отбирается равный объем (вес или объем может определяться условиями эксперимента) субстрата. Вынутый из трех-пяти точек субстрат складывается в общий конверт (таким образом обеспечивается охват разнообразных микро-условий в пределах одной площадки). Если отбор ведется с

разных глубин, то отбор повторяется несколько раз на разных глубинах. Конверт подписывают номером площадки, микро-площадки и типом субстрата. Во время полевой работы образцы в конвертах хранят в сумке с хладагентом.

- 2.2 В лаборатории образцы помещают на длительное хранение в морозильную камеру. Перед отправкой в морозильную камеру, нужно убедиться в надежности этикеток на конвертах и общих пакетах. Перед началом выделения тотальной ДНК пробы размораживают и сушат, подвергают лиофильной сушке, или выделяют из мокрого состояния, в зависимости выбранной стратегии.
- 2.3 Альтернативным способом заморозке является лиофильная сушка. Пробы упаковывают в бумажные (пергаментные) пакеты и помещают в камеру лиофильной сушилки, где происходит сначала их заморозка до  $-40^{\circ}\text{C}$ , а затем возгонка воды в вакууме. Процесс сушки может занять до нескольких суток, в зависимости от объема.

2d



Пример сушки образцов почвы в лиофилизаторе (на верхней полке в бумажных конвертах)

- 2.4 Еще один альтернативный способ - консервация сушкой в термошкафу. Образцы помещают в стерильные бумажные конверты (или собирают пробы сразу в них) и сушат при температуре до  $40^{\circ}\text{C}$  в течении двух суток.

2d

## Подготовка проб почвы для выделения тотальной ДНК

- 3 Выделение тотальной ДНК ведется из небольших объемов субстрата (в стандартных наборах для выделения  500 mg), что может препятствовать полноценному отбору всего сообщества и гомогенности его распределения. Альтернативным способом является вымывание внеклеточной тотальной ДНК с помощью фосфатного буфера (Taberlet et al., 2018) или использование специальных наборов для увеличенного объема субстрата. Если используется стандартная навеска  500 mg, важно на этапе подготовки пробы к выделению обеспечить гомогенизацию и измельчение отобранного субстрата, чтобы обеспечить максимально равномерный охват сообщества.

### CITATION

Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E. (2018). Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring.

LINK

<https://doi.org/10.1093/oso/9780198767220.001.0001>

### Оборудование:

Гомогенизатор со сменными стаканами объемом 250 мл

Увлажнитель воздуха или гепа-фильтр

Пинцет большой

Спиртовка или инфракрасный стерилизатор

### Материалы:

Фольга в рулоне

Спирт

Перекись водорода

Перчатки

Карандаш

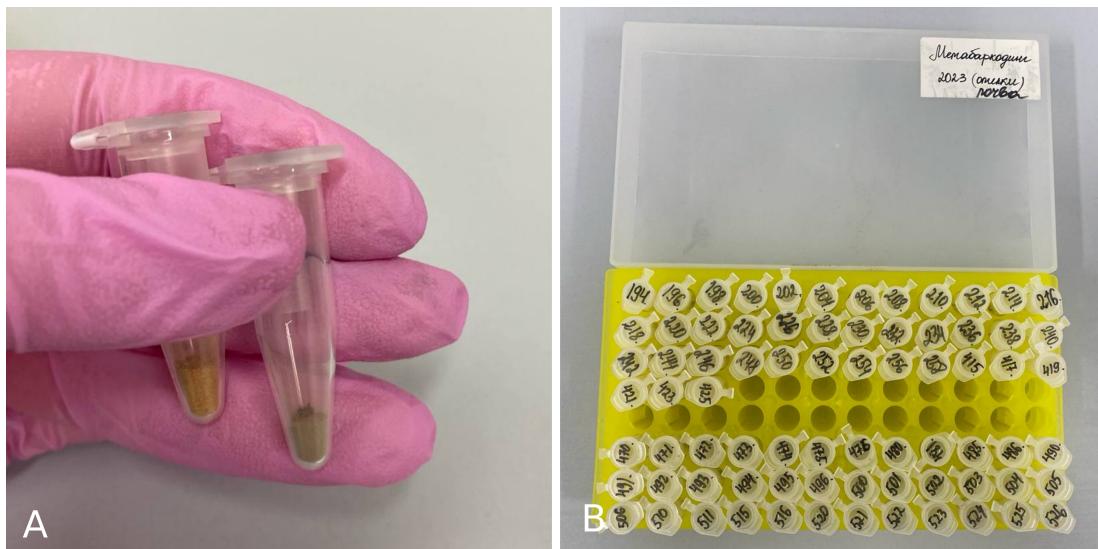
Пробирки 1,5 мл

Ершик для промывания стакана

## Note

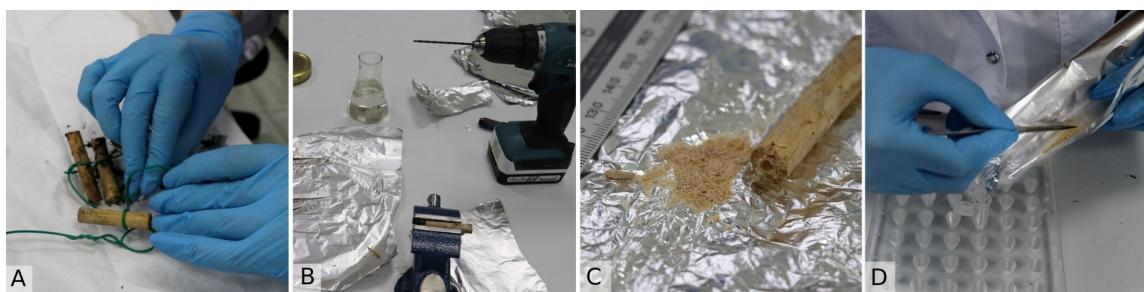
Работу проводят в маске и с использованием увлажнителя воздуха или гепа-фильтра, поскольку при измельчении в воздух попадает тонкодисперсная пыль

- 3.1 Подготавливаются поверхность для работы: стол стерилизуют, рядом включают фильтр или увлажнитель, ставят корзину для мусора и лоток с образцами, подготавливают раковину для мытья стаканов; на соседнем столе располагают штатив с пробирками, пинцет и стерилизатор
- 3.2 Сухой образец почвы, подстилки или торфа помещают в стакан гомогенизатора, накрывают стерильным куском фольги (чтобы избежать сильного пыления), закрывают крышкой и измельчают до образования пыли. После остановки ждут несколько секунд для оседания пыли. Пробу пересыпают в тот же конверт или заворачивают в кусок фольги, подписывают номером образца и складывают в лоток.
- 3.3 Стакан гомогенизатора промывают под проточной водой с использованием ершика, стерилизуют перекисью водорода, и высушивают с помощью чистой бумажной салфетки и спирта. Процедуру повторяют со следующим образцом. При наличии нескольких стаканов удобно работать в паре (один человек занимается измельчением, другой чисткой и стерилизацией стаканов).
- 3.4 Образцы с измельченной до пылеватого состояния пробой переносят в микропробирки. Для этого на чистой поверхности стерильным узким шпателем из нескольких мест пробы отбирается объем (около 500 мг). Шпатель стерилизуется между образцами. Можно использовать стерильные носики, отирая гомогенизат обратной стороной 5-10 раз. Пробирки подписывают номерами проб и хранят в замороженном виде до выделения.



Результат измельчения проб почвы и подстилки, собранных на площадках в лесных экосистемах: А. образец подстилки и почвы в пробирках. В. Пример образцов опилок и почвы, подготовленных для выделения.

3.5 Альтернативными вариантами измельчения и гомогенизации разных субстратов может быть использование ступок и пестиков, а для древесных субстратов использование дрели (приготовление опилок). На рисунках показаны этапы измельчения, гомогенизации и отбора проб разных субстратов для метабаркодинга подстилки, торфа и древесины соответственно.



Приготовление субстрата для выделения из древесины: А. очистка древесины от внешнего мусора. В, С. высверливание опилок из древесины. Д. отбор пробы в пробирки.



Приготовление субстрата для выделения из торфа. А. Образец, подвергнутый лиофильной сушке. В. Гомогенизация в ступке. С. Образцы в пробирках.



Приготовление субстрата для выделения из опада растений. А. Субстрат листьев *Er. vaginatum* в стакане гомогенизатора. В. Образец после измельчения. С. Образцы в пробирках.

## Выделение тотальной ДНК

- 4 Выделению тотальной ДНК должна предшествовать гомогенизация субстрата на микро-уровне (разрушение тканей и клеточных стенок) физическим и химическим путем. В зависимости от плотности структур, могут использоваться следующие параметры:
1. Предварительное замачивание в лизис-буфере на несколько часов (с нагревом на термостате при  $60^{\circ}\text{C}$ )
  2. Гомогенизация микро-пестиком в микро-пробирке вручную или с использованием ручного гомогенизатора. К субстрату могут быть добавлены измельчающие частицы (шарики), согласно инструкциям в наборе для выделения.
  3. Гомогенизация с использованием шариков в гомогенизаторе.

**Оборудование и реактивы:**

- Гомогенизатор ручной для микро-пробирок
- Гомогенизатор для микропробирок на 24 пробирки
- Микро-пестики для микропробирок
- Термостат

 HiPure Soil DNA Kit Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #D314202

 Выделение ДНК/РНК из почвы на магнитных частицах SileksMagNA Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #KIRSL0100

- 4.1 Образцы замачивают в лизис-буфере и оставляют на несколько часов на термостате при  60 °C
- 4.2 В зависимости от субстрата выбирают ручной способ гомогенизации (микро-пестик) или гомогенизатор для микро-пробирок; также выбирают измельчающие частицы или шарики для растирания в пробирке

**Note**

Эффективность гомогенизации может быть повышена периодическим замораживанием и размораживанием пробирок

- 4.3 Далее выделение ДНК проводят по протоколу производителя набора для выделения. Выделенная ДНК хранится в морозильной камере  -40 °C в микро-пробирках в штативах с маркировкой от нескольких дней до нескольких месяцев.

## Подготовка ампликонов

### 5 ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

**Набор для флуориметра:**

 Qubit dsDNA HS Assay Kit Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #Q32851

**Оборудование:**

- Флуориметр Qubit 4.0
- Амплификатор
- Центрифуга

- Микроцентрифуга
- Вортекс
- Дозаторы объемов 2, 10, 20, 100, 1000  $\mu\text{l}$

#### **Расходные материалы:**

- Микропробирки 1.5 мл и 0.2 мл
- Тонкостенные пробирки на 0.5 мл без делений для измерений концентрации на флуориметре
- Рабочий раствора для флуориметра Qbit dS DNA HS Kit
- Наконечники для дозаторов 2, 10, 20, 100, 1000  $\mu\text{l}$
- Праймеры
- Готовая смесь с полимеразой
- Безнуклеазная вода

#### Note

Для расчета необходимого объема воды для разбавления спирта можно воспользоваться калькулятором: <https://c2h5-oh.ru/calc2>

## 6 Измерение концентраций выделенной ДНК

1. В тонкостенные пробирки на  $\text{5 mL}$  разлить про  $\text{198 }\mu\text{L}$  рабочего раствора Qbit dS DNA HS Kit одним наконечником
2. В каждую пробирку добавить  $\text{2 }\mu\text{L}$  выделенной ДНК разными наконечниками
3. Интенсивно перемешать на вортексе
4. Измерить концентрацию на флуориметре Qubit
5. Внести результаты измерения в базу данных, для последующего расчета нормирования

## 7 Нормализация концентраций ДНК

Для нормализации концентрации ДНК во всех пробирках, требуется рассчитать необходимый объем раствора исходной ДНК и воды как показано в таблице:

**Note**

На реакцию ПЦР требуется около 10-12 ng ДНК в объеме  $\Delta$  2.5  $\mu\text{L}$  (т.е. концентрация 5 ng/ $\mu\text{L}$ ). Если концентрация ДНК в образце ниже, то такие образцы на этом этапе удаляют из дальнейшей пробоподготовки. Можно повторить выделение ДНК, используя параметры для увеличения концентрации выделяемой ДНК.

A	B	C	D	E
C matr ng/ $\mu\text{l}$	<b>V matr = VP X CP / C matr</b>	Cp ng/ $\mu\text{l}$	Vp $\mu\text{l}$	<b>Vv=Vp-Vmatr</b>
22.9	<b>21.8=100*5/22.9</b>	5	100	<b>78.2=100-21.8</b>
13.0	<b>38.5=100*5/13.0</b>	5	100	<b>61.5=100-13.0</b>
42.3	<b>11.8=100*5/42.3</b>	5	100	<b>88.2=100-42.3</b>

**C matr** - начальная концентрация ДНК

**C p** - конечная концентрация ДНК

**V matr** - объем раствора с начальной концентрацией ДНК

**V p** - конечный объем раствора

**V v** - объем воды, который нужно добавить для получения конечной концентрации

- 7.1 Подготовьте серию свежих пробирок 0.2 мл по числу проб для нормализованной ДНК.  
Подпишите маркером номера как на исходных пробирках с ДНК
- 7.2 Переносите последовательно необходимые объемы ДНК и воды в каждую пробирку, пользуясь таблицей с рассчитанными значениями. Для каждой новой пробы ДНК и воды используйте новые носики!

**Note**

На этом шаге удобно работать в паре: один пипетирует, другой зачитывает значения из таблицы

**8 Постановка ПЦР**

## Note

**Поставьте серию ампликонов (повторности ПЦР для каждой пробирки)**

Для компенсации стохастический явлений во время ПЦР и в целях сохранения редких последовательностей, можно ставить от 2 и более повторностей ПЦР для каждого образца. После прохождения реакции перед началом следующего этапа эти дубли сливаются в общую пробирку и перемешиваются.

Для приготовления ПЦР смешать компоненты смеси из расчета на число пробирок:

Реагент	Концентрация	Объем на пробирку	Объем на N пробирок !
H <sub>2</sub> O		16,9 µl	16 * N
Pr F	10 pM	0,3 µl	<b>0,3 * N</b>
Pr R	10 pM	0,3 µl	0,3 * N
Полимераза	5X	5 µl	5 * N
Образец ДНК	5 ng/µl	2,5 µl	2,5 µl
Всего		25 µl	

**Pr F** праймер форвард

**Pr R** праймер реверс

**N** число пробирок

! при числе пробирок >=16 необходимо увеличить N на 1 для компенсации ошибки пипетирования

- 8.1 Подготовьте серию свежих пробирок 吸取器 0.2 mL по числу проб (плюс K+ и K-) и подпишите маркером номера проб
- 8.2 Перенесите по 吸取器 22.5 µL смеси в каждую пробирку одним носиком
- 8.3 Добавьте по 吸取器 2.5 µL нормализованной ДНК в каждую пробирку
- 8.4 Сбросьте капли на центрифуге и установите пробирки в ПЦР машину с параметрами амплификации как в таблице:
- 8.5 Программа амплификации региона ITS1-5.8S-ITS2 грибов для праймеров ITS1F (Gardes and Bruns, 1993) и ITS4 (White et al., 1990)

A	B	C	D	E	F
I	II			III	
Денатураци я	Денатурация	Отжиг	Элонгация	Элонгация	Хранение
95 °C	94°C	54°C	72°C	72°C	4°C
0:05:00	0:00:30			0:10:00	бесконечнос ть
1x	25x			1x	$\infty$

## Note

**Программа ПЦР реакции** определяется несколькими параметрами:

- 1) температура отжига согласно праймерам (примерная формула  $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ )
- 2) температура и время денатурации согласно паспорту полимеразы
- 3) время элонгации согласно длине фрагмента
- 4) число циклов не более 25 (Tedersoo et al., 2022)

## CITATION

Gardes M. & Bruns T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118..

LINK

<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>

## CITATION

Tedersoo L, Bahram M, Zinger L, Nilsson RH, Kennedy PG, Yang T, Anslan S, Mikryukov V (2022). Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results..

LINK

<https://doi.org/10.1111/mec.16460>

## CITATION

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. and Taylor, J.W. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, New York, 315-322..

LINK

<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

- 9 Поставьте гель-электрофорез для визуальной оценки результатов ПЦР, в базе данных отметьте положительный и отрицательный результат, а также чистоту контролей
- 10 Объедините пцр-продукт из одной пробы ДНК  
Для этого в соответствующие пробирки слейте ПЦР продукт из двух или более пробирок с одинаковым номерами (серии ампликонов)

## Очистка ампликонов

- 11 **Оборудование:**
  - Центрифуга
  - Магнитный штатив на пробирки  1.5 mL
  - Вортекс
  - Дозаторы объемов 2, 10, 20, 100, 1000 µl

### Реактивы:

 AMPure XP Beads (AXP) Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #AXP

- Безнуклеазная вода
- Свежеприготовленный 80% спирт в безнуклеазной воде

### Note

Объем приготовленного 80% спирта рассчитывается из следующего:

- Всего в протоколе 2 этапа очистки отдельных образцов и 1 этап очистки пулированных образцов
- На очистку отдельных образцов требуется 500 мкл спирта на пробирку на один этап (всего 1000 мкл \* число пробирок)
- На очистку пулированных образцов требуется всего 2000 мкл спирта (независимо от числа проб)
- Например, для 24 образцов нам понадобится  $500*24*2 + 2000 = 26$  мл спирта 80%

### Note

Регулируйте длину фрагментов селекцией очистки. Для равновероятной очистки всех длин фрагментов используйте соотношение AmPure:DNA **1:1**, для увеличения концентрации длинных фрагментов, уменьшайте объем AmPure

- 11.1 Установите на обычный штатив серию пробирок по числу проб и подпишите маркером

11.2 В соответствующие пробирки слейте ПЦР продукт из двух или более пробирок с одинаковым номерами (серии ампликонов)

(примечание к след редакции протокола ФНВ: какой должен быть общий общем ПЦР продукта? если взяли несколько серий ампликонов, то затем отбираем только часть общего объема?)

11.3 Для очистки ампликонов ITS добавьте **0,8** объема AmPure, тщательно пипетируйте и инкубируйте  00:05:00

5m

11.4 Установите на магнитный штатив и дождитесь, пока частицы полностью осядут на магнит и раствор станет прозрачным

11.5 Отберите супернатант

11.6 Добавьте соответствующий объем свежеприготовленного **80%** спирта до краев пробирки, отберите и слейте спирт

11.7 Повторите предыдущий шаг

11.8 Тщательно отберите спирт, сбросьте капли со стенок пробирки на центрифуге

11.9 Снова поместите пробирки на магнитный штатив, тонким носиком отберите остатки жидкости

11.10 Просушите до  00:01:00, не давайте осадку растрескиваться. Просушенный осадок перестает блестеть

1m

11.11 Добавьте  20  $\mu\text{L}$  безнуклеазной воды, инкубируйте до  00:05:00 для растворения ДНК

5m

11.12 Установите пробирки на штатив, дождитесь оседания частиц на магнит

11.13 Подготовьте серию чистых пробирок и отберите ДНК в чистую пробирку

## Нормализация концентраций ампликонов для подготовки библиотек

### 12 Оборудование:

Флуориметр Qubit

#### Реактивы:

Набор для флуориметра:

 Qubit dsDNA HS Assay Kit Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #Q32851

#### Note

##### Оптимизация библиотек для дуплекс-байсколлинга

Для того, чтобы дуплекс-байсколлинг был эффективным необходимо:

1. Следовать протоколу, обеспечивающему успешное лигирование адаптеров к двум концам фрагментов ДНК;
2. Соблюдать рекомендации по степени загрузки ячейки. Недогрузка ячейки приводит к низкому связыванию адаптеров с ячейкой и меньшему выходу секвенирования. Перегрузка увеличивает конкуренцию молекул за пору и снижает вероятность секвенирования обратной цепи.

Образцы с **широкой** представленностью длин фрагментов, например, геномной ДНК

- начинают с **1 µg** материала для подготовки библиотек с использованием Ligation Sequencing Kit или 400 ng для подготовки библиотек с использованием Rapid Sequencing Kit.

Для библиотек из коротких фрагментов, например, **ампликонов** или к-ДНК используют **100-200 fmol** материала.

Подробный протокол подготовки ДНК к загрузке читайте на [сайте Nanopore](#)

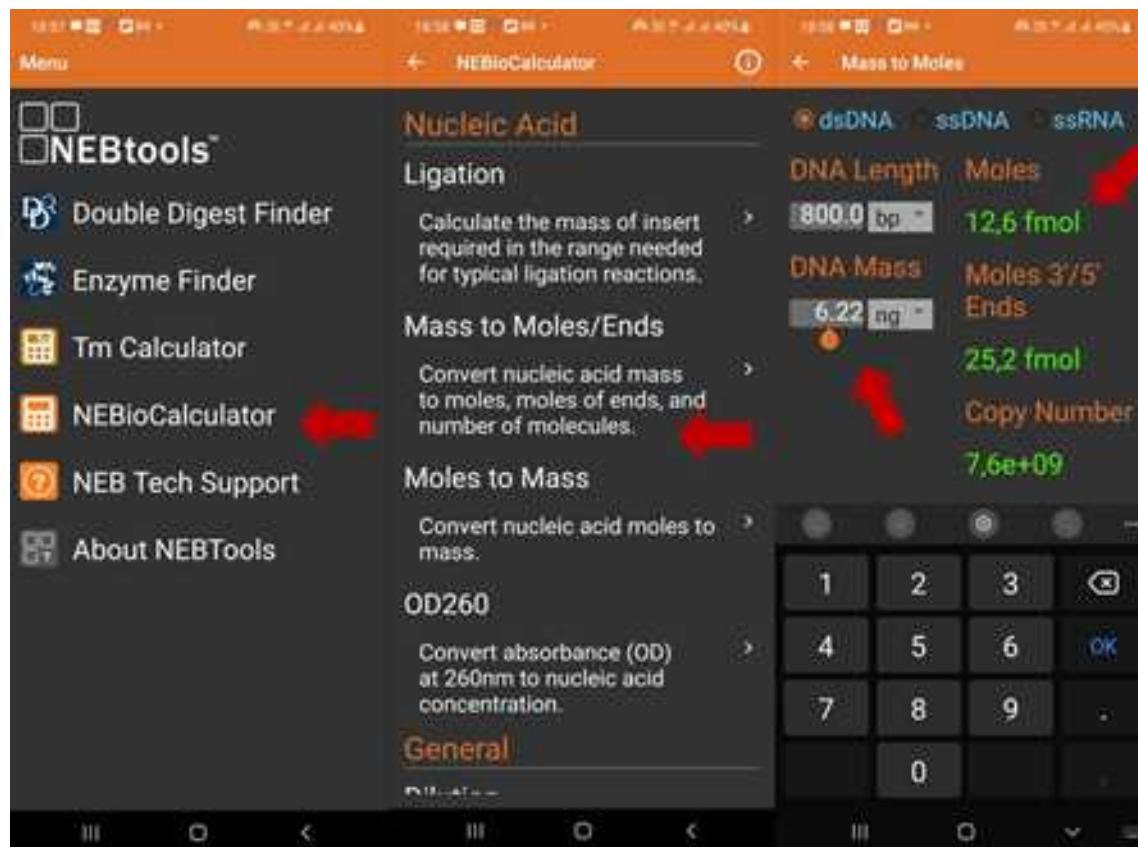
#### Note

В реакцию подготовки библиотек со средней длиной фрагмента 800 bp рекомендуется взять по 200 fMol (  $\Delta$  100 ng в  $\Delta$  12.5  $\mu$ L ) ампликонной ДНК. Для этого концентрацию ДНК каждого ампликона нормализовать до 200 fMol.

12.1 Установите на штатив серию пробирок по числу проб и подпишите маркером

12.2 Измерьте концентрацию ампликонов на флуориметре Qbit (размерность в ng/μl)

12.3 Рассчитайте молярную массу ДНК, воспользовавшись [NEBCalculator](#)



Пример расчета молярной массы ДНК в мобильном приложении [NEBCalculator](#)



The screenshot shows the NEBioCalculator interface with the 'dsDNA: Mass to/from Moles Converter' tool selected. On the left, there's a sidebar with various calculation options like Ligation, ss: Mass ⇌ Moles, and OD<sub>260</sub>. The main form has fields for 'DNA sequence [optional]', 'DNA length' (set to 800 bp), and 'DNA mass' (set to 14.4 ng). To the right, results are shown: 'Moles of DNA' (29.22 fmol, highlighted with a red arrow), 'Moles of DNA 3'/5' ends' (58.44 fmol), 'DNA Copy Number' (1.760e+10), and 'DNA Molecular Weight' (492788.04 g/mol). Below the form, a formula is provided:

moles dsDNA (mol) = mass of dsDNA (g)/(length of dsDNA (bp) x 615.96 g/mol/bp) + 36.04 g/mol  
moles of dsDNA ends = moles dsDNA (mol) x 2  
DNA copy number = moles of dsDNA x 6.02e23 molecules/mol

Note: nucleic acid MW calculations were revised to assume deprotonated phosphate hydroxyl.

Пример расчета молярной массы ДНК в браузерной версии **NEBCalculator**

## 12.4 Рассчитайте необходимый объем ДНК ампликонов и воды для подготовки библиотек по таблице:

C amp ng/mkl	M fmol	V(amp) для 200 fmol, mkl	VH2O, mkl
C	M	V(amp)=200/M	VH2O=12.5-V(amp)
9.63	19.5	200/19.5=10.3	12.5-10.3=2.2
8.2	16.6	200/16.6=12	12.5-12=0.5

Пример расчета соотношения объемов ДНК ампликонов и воды

### Note

поскольку максимальный объем ДНК в реакцию 12.5 mkl, в нем должно быть не менее 200 fmol  
пробы с меньшей концентрацией не пригодны для подготовки библиотек

## Репарация ДНК и подготовка липких концов

20m

## 13 ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

### Реактивы NEB:

☒ NEBNext FFPE DNA Repair Mix Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #M6630

☒ NEBNext Ultra II End repair/dA-tailing Module Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #E7546

☒ NEB Blunt/TA Ligase Master Mix Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #M0367

☒ NEBNext Quick Ligation Module Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #E6056

#### Набор для флуориметра:

☒ Qubit dsDNA HS Assay Kit Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #Q32851

#### Набор для очистки продукта:

☒ AMPure XP Beads (AXP) Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #AXP

#### А также:

- DNA Control Sample (DCS)
- Концентрированный этанол (для приготовления раствора 80%)
- Безнуклеазная вода

#### Оборудование:

- Флуориметр Qubit 4.0
- Амплификатор
- Центрифуга
- Микроцентрифуга
- Вортекс
- Магнитный штатив на 1.5 или 0.2 мл в зависимости от объема
- Дозаторы объемов 2, 10, 20, 100, 1000 µl
- Холодный штатив

#### Расходные материалы:

- Микропробирки 1.5 мл или 0.2 мл
- Тонкостенные пробирки на 0.5 мл без делений для измерений концентрации на флуориметре
- Наконечники для дозаторов 2, 10, 20, 100, 1000 µl

#### Note

Чтобы не ломались длинные фрагменты гДНК, можно использовать наконечники с широким носиком для пипетирования.

- 13.1 Разморозьте AMPure XP Beads (AXP) и DNA Control Sample (DCS) до комнатной температуре и перемешайте на вортексе

### Note

AMPure XP Beads (AXP) можно оставить при комнатной температуре. DNA Control Sample (DCS) поставить на лед.

## 13.2 Подготовьте NEBNext FFPE DNA Repair Mix и NEBNext Ultra II End Repair / dA-tailing Module в соответствии с рекомендациями производителя

### Note

- Рекомендуется размораживать все реагенты на льду
- **НЕ** рекомендуется перемешивать **энзимы** FFPE DNA Repair Mix или Ultra II End Prep Enzyme Mix на вортексе. Можно перемешивать переворачиванием или встряхиванием.
- Наоборот, **буферы** имеют тенденцию к **образованию осадка**. Нагрейте растворы до комнатной температуры и пипетируйте несколько раз до растворения осадка, затем встряхните на вортексе в течение 30 сек
- Перед первым открыванием пробирок с энзимами и буферами в течении дня рекомендуется делать сброс капель на микро-центрифуге
- Буфер FFPE DNA Repair Buffer может приобрести слегка желтый оттенок, это нормально

## 13.3 Растворите контрольный образец ДНК (DCS) добавив $\Delta$ 105 $\mu\text{L}$ Elution Buffer (EB) прямо в пробирку DCS

### Note

- Одной пробирки DCS хватает на 140 образцов. Остаток можно хранить при -20°C в морозильной камере.
- Рекомендуется использовать DCS для положительного контроля при подготовке библиотек. Однако, этот шаг можно пропустить и использовать вместо него дополнительные  $\Delta$  1  $\mu\text{L}$  ДНК образца.

## 13.4 Подготовьте образцы ДНК в чистых тонкостенных пробирках на $\Delta$ 0.2 mL или 96-луночной плашке

## Note

- ! Объем ДНК на образец смотри на предыдущем шаге  go to step #12.4

- 13.5 Доведите каждый образец до  11  $\mu\text{L}$  безнуклеазной водой, аккуратно перемешайте пипетированием и коротко прокрутите на центрифуге  
Если не используете DCS, увеличьте объем ДНК до 12,5 мкл
- 13.6 Для приготовления мастер-микса, рассчитайте необходимое количество реагентов и приготовьте смесь:

## Note

Если число пробирок превышает 8, увеличить N на ошибку пипетирования.

A	В	С
Реагент	Объем на 1 пробирку	Объем на N пробирок
Образец ДНК	11 $\mu\text{l}$	11 $\mu\text{l}$
Растворенный DCS	1 $\mu\text{l}$	1 * N
NEBNest FFPE DNA Repair Buffer	0.875 $\mu\text{l}$	0.875 * N
Ultra II End-prep Reaction Buffer	0.875 $\mu\text{l}$	0.875 * N
Ultra II End-prep Enzyme Mix	0.75 $\mu\text{l}$	0.75 * N
NEBNext FFPE DNA Repair Mix	0.5 $\mu\text{l}$	0.5 * N
<b>Всего</b>	<b>15 <math>\mu\text{l}</math></b>	

#### Расчет мастер-смеси для репарации и подготовки липких концов тотальной ДНК

- 13.7 Разлейте по  3  $\mu\text{L}$  мастер-смеси в каждую пробирку с подготовленной ДНК

### Note

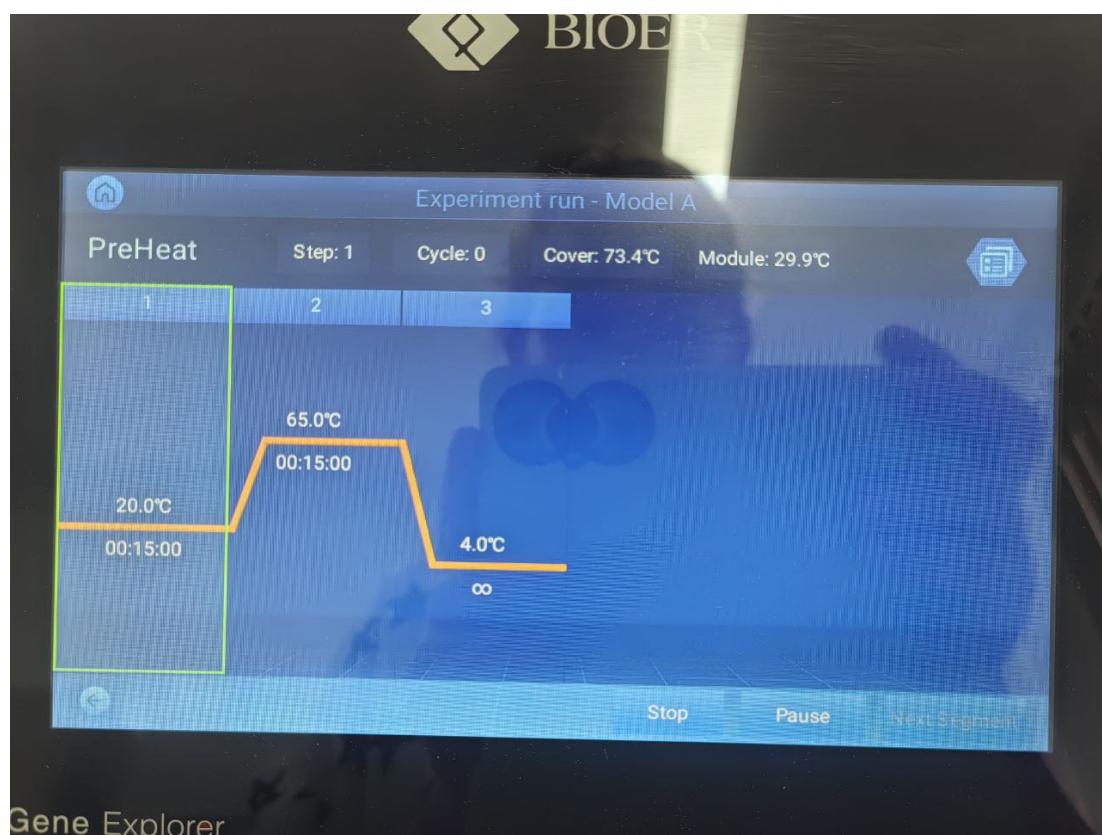
Каждый раз после добавления пипетировать 10-20 раз

### 13.8 Сбросьте капли при помощи микро-центрифуги

### 13.9 Инкубируйте при $20^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин и $65^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин в термоцикльере.

! Производитель рекомендует 5 мин каждого шага, но время необходимо увеличить для более эффективного лигирования

30m



Программа для подготовки липких концов в термоцикльере

### Очистка продуктов репарации

20m

## 14 Очистка продукта с помощью AMPure XP beads (AXP)

- 14.1 Ресуспендируйте AXP beads на вортексе
- 14.2 Добавьте  $\text{15 } \mu\text{L}$  AXP в каждую пробирку с ДНК и перемешайте встряхиванием пробирки
- 14.3 Инкубируйте при комнатной температуре в течении  $\text{00:05:00}$ , периодически перемешивая встряхиванием пробирки 5m
- 14.4 Приготовьте свежий 80% этанол в безнуклеазной воде исходя из  $\text{400 } \mu\text{L}$  на образец с небольшим запасом
- 14.5 Прокрутите пробирки с образцами на центрифуге и поставьте на магнитный штатив. Удалите супернатант.
- 14.6 Не снимая пробирки с магнитного штатива, промойте пробирки  $\text{200 } \mu\text{L}$  свежеприготовленного этанола не задевая магнитные частицы. Удалите спирт пипеткой. Если задели магнитные частицы, подождите, пока они оседут на магнит и удалите спирт.
- 14.7 Повторите промывку.
- 14.8 Коротко прокрутите на микроцентрифуге и поставьте обратно на магнитный штатив. Дайте осесть частицам на магнит и удалите остатки этанола.
- 14.9 Просушите  $\text{00:00:30}$ , но не пересушивайте до растрескивания. 30s
- 14.10 Снимите пробирки с магнитного штатива и ресуспендируйте магниты в  $\text{8 } \mu\text{L}$  безнуклеазной воды. Если дозатор не точный, рекомендуется смывать  $\text{10 } \mu\text{L}$  воды. Инкубируйте  $\text{00:05:00}$  для растворения ДНК. 5m
- 14.11 Поставьте пробирки на магнитный штатив и дайте частицам осесть на магнит.

14.12 Отберите  7.5  $\mu\text{L}$  элюата в чистую пробирку на  1.5 mL.

При приготовлении более чем 1 образца перенести в пробирки на  0.2 mL.

#### Note

Полученные образы можно оставить в холодильнике на ночь

## Лигирование баркодов

1h

### 15 ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

#### Реактивы:

 Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #SQK-NBD114.24

 EDTA disodium dihydrate Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #AB1011793

 NEB Blunt/TA Ligase Master Mix (M0367) Magen Biotechnology Co., Ltd

#### Набор для флуориметра:

 Qubit dsDNA HS Assay Kit Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #Q32851

#### Набор для очистки продукта:

 AMPure XP Beads (AXP) Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #AXP

#### А также:

- DNA Control Sample (DCS)
- Концентрированный этанол (для приготовления раствора 80%)
- Безнуклеазная вода

#### Оборудование:

- Флуориметр Qubit 4.0
- Амплификатор
- Центрифуга
- Микроцентрифуга
- Вортекс
- Ротатор

- Магнитный штатив на 1.5 или 0.2 мл в зависимости от объема
- Дозаторы объемов 2, 10, 20, 100, 1000 µl
- Холодный штатив

**Расходные материалы:**

- Микропробирки 1.5 мл или 0.2 мл
- Тонкостенные пробирки на 0.5 мл без делений для измерений концентрации на флуориметре
- Наконечники для дозаторов 2, 10, 20, 100, 1000 µl

A	B	C
Номер	Прямая	Обратная
NB01	CACAAAGACACCGACAACCTTCTT	AAGAAAGTTGTCGGTGTCTTGTG
NB02	ACAGACGACTACAAACGGAATCGA	TCGATTCCGTTGTAGCGTCTGT
NB03	CCTGGTAACTGGGACACAAGACTC	GAGTCTTGTGTCCCAGTTACCAAGG
NB04	TAGGGAAACACGATAGAATCCGAA	TTCGGATTCTATCGTGTCCCTA
NB05	AAGGTTACACAAACCCCTGGACAAG	CTTGTCCAGGGTTGTGTAACCTT
NB06	GACTACTTCTGCCTTGCAGAGAA	TTCTCGCAAAGGCAGAAAGTAGTC
NB07	AAGGATTCACTCCCACGGTAACAC	GTGTTACCGTGGGAATGAATCCTT
NB08	ACGTAACTTGGTTGTCCCTGAA	TTCAGGGAACAAACCAAGTTACGT
NB09	AACCAAGACTCGCTGCGCTAGTT	AACTAGGCACAGCGAGTCTGGTT
NB10	GAGAGGACAAAGGTTAACGCTT	AAGCGTTGAAACCTTGTCCCTC
NB11	TCCATTCCCTCCGATAGATGAAAC	GTTTCATCTATCGGAGGGAAATGGA
NB12	TCCGATTCTGCTTCTTCTACCTG	CAGGTAGAAAAGAAGCAGAACGGA
NB13	AGAACGACTCCATACTCGTGTGA	TCACACGAGTATGGAAGTCGTTCT
NB14	AACGAGTCTCTGGGACCCATAGA	TCTATGGGTCCTAACAGAGACTCGTT
NB15	AGGTCTACCTCGCTAACACCACG	CAGTGGTGTAGCGAGGTAGACCT
NB16	CGTCAACTGACAGTGGTCGTACT	AGTACGAACCACTGTCAGTTGACG
NB17	ACCCCTCAGGAAAGTACCTCTGAT	ATCAGAGGTACTTCTGGAGGGT
NB18	CCAAACCCAACAACCTAGATAGGC	GCCTATCTAGGTTGGGGTTGG
NB19	GTTCCCTCGTGCAGTGTCAAGAGAT	ATCTCTTGACACTGCACGAGGAAC
NB20	TTGCGTCCTGTTACGAGAACTCAT	ATGAGTTCTCGTAACAGGACGCAA
NB21	GAGCCTCTCATTGTCCGTTCTA	TAGAGAACGGACAATGAGAGGCTC
NB22	ACCACTGCCATGTATCAAAGTACG	CGTACTTGTACATGGCAGTGGT
NB23	CTTACTACCCAGTGAACCTCCTCG	CGAGGAGGTTCACTGGGTAGTAAG
NB24	GCATAGTTCTGCATGATGGGTTAG	CTAACCCATCATGCAGAACTATGC

**Расшифровка последовательностей баркодов из набора Native Barcoding Kit 24 v14**

## 15.1 Подготовьте NEB Blunt/TA Ligase Master Mix

## Note

- Разморозьте реактивы при комнатной температуре
- Сбросьте капли с пробирок на микро-центрифуге
- Перемешайте пипетированием 10 раз

15.2 Разморозьте и перемешайте на вортексе EDTA. Сбросьте капли на центрифуге и поставьте на холодный штатив.

15.3 Разморозьте баркоды (NB01-24) по числу образцов, перемешайте, сбросьте капли на центрифуге и поместите на холодный штатив.

15.4 Запишите уникальные баркоды для каждого образца, которые будут запущены вместе в одной проточной ячейке. В одном запуске можно закодировать до 24 образцов.

## Note

! Используется по одному баркоду на образец (нельзя использовать по два баркода с разных сторон).

15.5 В пробирки на  0.2 mL добавьте реактивы в следующем порядке и тщательно перемешайте подготовленную смесь пипетированием:

A	B
Реактив	Объем
ДНК, подготовленная на предыдущем этапе	7.5 µl
Native Barcode (NB01-24)	2.5 µl
Blunt/TA Ligase Master Mix	10 µl
<b>Всего</b>	<b>20 µl</b>

15.6 Инкубируйте при комнатной температуре 20 минут. Или оставьте на  +4 °C на ночь.  
Есть рекомендации по продлению лигирования до одного часа.

20m

- 15.7 Добавьте соответствующий Вашему набору объем EDTA в каждую пробирку, тщательно перемешайте и сбросьте капли на центрифуге. Избегайте избытка ЭДТА и следите за тем, чтобы в пробирке с ЭДТА не образовывались кристаллы

#### Note

A	B
Цвет крышки пробирки EDTA	Объем EDTA на пробирку
Бесцветная крышка	2 $\mu$ l
Синяя крышка	4 $\mu$ l

- 15.8 **Пулирование (сливание баркодированных образцов вместе).** Перенесите все баркодированные образцы в одну пробирку на 1.5 мл. Объем каждого образца и результирующий объем показаны в таблице:

A	Объем на образец	На 6 образцов	На 12 образцов	На 24 образца
Общий объем образца для EDTA с бесцветной крышкой	22 $\mu$ l	132 $\mu$ l	264 $\mu$ l	528 $\mu$ l
Общий объем образца для EDTA с синей крышкой	24 $\mu$ l	144 $\mu$ l	288 $\mu$ l	576 $\mu$ l

## 16 Очистка продукта с помощью AMPure XP beads (AXP)

- 16.1 Ресуспендируйте AMPure XP Beads (AXP) на вортексе
- 16.2 Добавьте 0.4X AMPure XP Beads (AXP) в пулированную библиотеку и перемешайте пипетированием
- 16.3 Инкубируйте с перемешиванием на ротаторе 10 мин при комнатной температуре

- 16.4 Сделайте 2 мл раствора свежего 80% спирта на безнуклеазной воде
- 16.5 Сбросьте капли в пробирке с библиотекой на центрифуге и поместите на ее магнитный штатив
- 16.6 Подержите на магнитном штативе до достижения прозрачного раствора и удалите супернатант
- 16.7 Не снимая с магнитного штатива, добавьте  700  $\mu\text{L}$  свежеприготовленного 80% спирта. Удалите спирт.

Note

Спирт добавляется не задевая магнитные частицы на стенках пробирки. Если частицы взмутились, подождите пока они оседут на магнит, затем удалите спирт.

- 16.8 Повторите предыдущий шаг.
- 16.9 Прокрутите на центрифуге для сброса капель и магнитов, поместите обратно на магнитный штатив, удалите остатки спирта и дайте просохнуть около  00:00:30 не давая пересохнуть до трещин.  
Если за 30 сек не перестало блестеть, дождаться того, чтобы осадок перестал блестеть, но не растрескался.
- 16.10 Снимите пробирку со штатива и добавьте  35  $\mu\text{L}$  безнуклеазной воды. Перемешайте легкими щелчками
- 16.11 Инкубируйте  00:10:00 при 37°C, каждые  00:02:00 встряхивайте щелчками для улучшения растворения ДНК
- 16.12 Поставьте пробирку на магнитный штатив до достижения раствором прозрачности

30s

10m

16.13 Отберите и перенесите  30  $\mu\text{L}$  элюата в новую **0.2 мл пробирку** (в протоколе пробирка 1.5 мл, однако мы уменьшили объем пробирки для улучшения качества промывки на следующем этапе)

## Лигирование адаптеров

50m

### 17 Реактивы:

 Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #SQK-NBD114.24

 EDTA disodium dihydrate Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #AB1011793

 NEBNext Quick Ligation Module Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #E6056

#### Набор для флуориметра:

 Qubit dsDNA HS Assay Kit Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #Q32851

#### Набор для очистки продукта:

 AMPure XP Beads (AXP) Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #AXP

#### А также:

- DNA Control Sample (DCS)
- Концентрированный этанол (для приготовления раствора 80%)
- Безнуклеазная вода

#### Оборудование:

- Флуориметр Qubit 4.0
- Амплификатор
- Центрифуга
- Микроцентрифуга
- Вортекс
- Ротатор
- Магнитный штатив на 1.5 или 0.2 мл в зависимости от объема
- Дозаторы объемов 2, 10, 20, 100, 1000  $\mu\text{l}$
- Холодный штатив

#### Расходные материалы:

- Микропробирки 1.5 мл или 0.2 мл
- Тонкостенные пробирки на 0.5 мл без делений для измерений концентрации на флуориметре
- Наконечники для дозаторов 2, 10, 20, 100, 1000  $\mu\text{l}$

## 17.1

**Note**

- Адаптер с моторным белком (The native adapter NA) не взаимозаменяется с другими адаптерами для секвенирования
- В зависимости от буфера (LFB or SFB), очистка после лигирования адаптера **предназначена для обогащения библиотек** фрагментами длиннее 3 kb или очистке без селекции длины фрагмента:
  1. Для обогащения библиотек фрагментами 3 kb или длиннее, используйте Long Fragment Buffer (LFB)
  2. Для сохранения фрагментов всех длин используйте Short Fragment Buffer (SFB)

**17.2** Подготовьте реактивы NEBNext Quick Ligation Reaction Module согласно инструкции производителя и поставьте на холодный штатив:

- Long Fragment Buffer (LFB)
- Short Fragment Buffer (SFB)
- Elution Buffer (EB)
- Native Adapter (NA)
- NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5x)

**Note**

1. Разморозьте реактивы при комнатной температуре
2. Сбросьте жидкость с крышечек коротким центрифугированием
3. Перемешайте реактивы пипетированием
4. **НЕ рекомендуется** встраивать на вортексе фермент Quick T4 DNA Ligase
5. NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5x) **может иметь осадок**. Дайте раствору достигнуть комнатной температуры и пипетируйте буфер несколько раз, чтобы растворить осадок, встрахните на вортексе несколько секунд чтобы убедиться, что раствор полностью перемешался
6. Разморозьте Long Fragment Buffer (LFB) или Short Fragment Buffer (SFB) до комнатной температуры, перемешайте на вортексе. Потом сбросьте жидкость с крышки на центрифуге и поставьте реактивы на холодный штатив.
7. Для увеличения концентрации длинных фрагментов (>3kb) используйте Long Fragment Buffer (LFB)  
Для того чтобы сохранить фрагменты всех длин используйте Short Fragment Buffer (SFB)

**17.3** В пробирке на 1.5 мл подготовьте реакционную смесь в следующем порядке:

A	B
Реактив	Объем
Образец ДНК (пулированный), подготовленный на предыдущем этапе	30 µl
Native Adapter (NA)	5 µl
NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5X)	10 µl

A	B
Quick T4 DNA Ligase	5 µl
<b>Всего</b>	50 µl

17.4 Хорошо перемешайте реакционную смесь аккуратным пипетированием и сбросьте капли коротким центрифугированием

17.5 Инкубируйте при комнатной температуре от  00:20:00 до  01:00:00

1h 20m

Очистка продукта с помощью AMPure XP beads (AXP) с буферами фрагментов вместо спирта

18

Note

! На следующих шагах очистки вместо спирта используется Long Fragment Buffer (LFB) или Short Fragment Buffer (SFB)

18.1 Ресуспендируйте AMPure XP Beads (AXP) на вортексе

18.2 Добавьте  20 µL AMPure XP Beads (AXP) и перемешайте пипетированием

18.3 Инкубируйте  00:10:00 с периодическим перемешиванием пощелкиванием

10m

18.4 Сбросьте капли коротким центрифугированием и поставьте пробирку на магнитный штатив. Не снимая пробирку со штатива удалите супернатант

18.5 Промойте магнитные частицы в  125 µL Long Fragment Buffer (LFB) или Short Fragment Buffer (SFB). Снимите пробирку с магнитного штатива и встряхните, сбросьте капли на центрифуге, верните пробирку на магнитный штатив и дайте частицам осесть на магнит

18.6 Повторите предыдущий шаг

- 18.7 Снимите пробирку с магнитного штатива и добавьте  15  $\mu\text{L}$  Elution Buffer (EB), после чего встряхните
- 18.8 Сбросьте центрифугированием и инкубируйте  00:10:00 при 37°C. Каждые  00:02:00 встряхивайте содержимое пробирки легким щелчком для облегчения смыва ДНК с частиц 12m
- 18.9 Оставьте на магнитном штативе пока элюат не станет прозрачным
- 18.10 Отберите и перенесите  15  $\mu\text{L}$  элюата, содержащего ДНК библиотеки, в 1.5 ml пробирку. Пробирку с микрочастицами можно выкинуть.
- 18.11 Подготовленная библиотека используется для загрузки в проточную ячейку. Библиотеку до загрузки храните на холодном штативе или в холодильнике.

#### Note

Рекомендации **по хранению** библиотек:

- Рекомендуется хранить библиотеки в пробирках при 4°C в течении короткого времени
- Для длительного хранения (более 3 месяцев) рекомендуется хранить библиотеки при -80°C

Рекомендация **по разведению**:

- Если концентрация библиотеки позволяет, ее можно развести в Elution Buffer (EB) для разделения на несколько ячеек
- В зависимости от того, на какое количество ячеек будут разделены библиотеки, может понадобиться больше Elution Buffer (EB), чем доступно в наборе

- 18.12 Измерьте концентрацию на флуориметре

## Note

! Если концентрация библиотеки ниже указанных значений, загрузите всю библиотеку

Рекомендуется **загружать следующее количество** материала:

1. Для хорошего выхода симплексных данных, загружайте 35-50 fmol финальной библиотеки (в этом случае загрузка пор достигнет >95%)
2. Для дуплексных данных, загружайте 10-20 fmol финальной библиотеки. Загрузка большей, чем 20 fmol концентрации, может уменьшить частоту захвата дуплексных ридов
3. Формула расчета загрузки [на сайте Nanopore](#)

## Прайминг ячейки и загрузка библиотек

## 19 Основное оборудование:

## Equipment

## SpotON Flow Cell

NAME

Проточная ячейка для нанопорового секвенирования R10.4.1<sup>TYPE</sup>

FLO-MIN114

BRAND

FLO-MIN114

SKU



## Equipment

MinION	NAME
Sequencer	TYPE
Oxford Nanopore Technologies	BRAND
MinION 1B / MinION 1C	SKU

## Реактивы:

 Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) Magen Biotechnology Co., Ltd Catalog #SQK-NBD114.24

## А именно из этого набора:

- Flow Cell Flush (FCF)
- Flow Cell Tether (FCT)
- Library Solution (LIS)
- Library Beads (LIB)
- Sequencing Buffer (SB)
- Bovine Serum Albumin (BSA)

## Note

- Для большинства экспериментов рекомендуется использовать **Library Beads** (LIB) для загрузки библиотек на ячейку (и в нашем случае)
- Однако, если вы ранее использовали **воду** для загрузки библиотек, вам необходимо использовать Library Solution (LIS) вместо воды
- Некоторые пользователи отмечают, что густые библиотеки лучше загружаются без Library Beads (LIB)
- Для оптимальной работы секвенатора рекомендуется добавить **Bovine Serum Albumin** (BSA) в финальной концентрации в миксе 0.2 mg/ml
- Не рекомендуется использовать другие типы альбумина, например рекомбинантный человеческий альбумин

## А также:

- Безнуклеазная вода
- Дозаторы объемов 2, 10, 20, 100, 1000 µl
- Вортекс
- Микроцентрифуга
- Холодный штатив

**Расходные материалы:**

- Микропробирки 1.5 мл или 0.2 мл
- Наконечники для дозаторов 2, 10, 20, 100, 1000  $\mu\text{l}$

19.1 Рекомендуется посмотреть видео демонстрации прайминга и загрузки ячейки перед первым использованием прибора [на сайте Nanopore](#)

**Note**

- При необходимости проведите проверку ячейки, чтобы получить представление о доступных порах перед загрузкой библиотек
- Инструкция по проверке ячейки [на сайте Nanopore](#)

20 Подготовьте концентрацию библиотеки 35-50 fmol для симплексных данных или 10-20 fmol для дуплексных данных в объеме  12  $\mu\text{L}$

A	B	C	D
C (lib), ng/mkL	M, fmol	$V(\text{amp})=20/M$	$V(\text{EB})=12-V(\text{amp})$
38.9	78.7	0.25	11.75
17.8	36.1	0.55	11.45

**C (lib)** - концентрация ДНК в библиотеке

**V (lib)** - объем библиотеки, который нужно взять для разведения

**V (EB)** - объем Elution Buffer

Для расчета молярной массы M используйте в мобильном приложении

[NEBCalculator](#) или в браузерной версии [NEBCalculator](#)

20.1 Разморозьте Sequencing Buffer (SB), Library Beads (LIB) или Library Solution (LIS) (см. примечание в начале раздела), Flow Cell Tether (FCT) и одну пробирку Flow Cell Flush (FCF) при комнатной температуре, размешайте на вортексе, сбросьте на центрифуге и поставьте на холодный штатив

20.2 Для приготовления прайминговой смеси с BSA, смешайте Flow Cell Flush (FCF) и Flow Cell Tether (FCT) как указано ниже:

**Note**

Производитель на этапе перехода от формата одноразовых пробирок к формату многоразовых флаконов с реагентами. Необходимо следовать инструкциям, соответствующим Вашему формату набора.

**Пробирочный формат прайминговой смеси.** Добавьте 5 µL Bovine Serum Albumin (BSA) концентрации 50 mg/ml и 30 µL Flow Cell Tether (FCT) непосредственно в пробирку с Flow Cell Flush (FCF).

**Флаконный формат.** В соответствующей пробирке смешайте реагенты по схеме:

A	B
Реактив	Объем
Flow Cell Flush (FCF)	1 170
Bovine Serum Albumin (BSA) в концентрации 50 мг/мл	5 µl
Flow Cell Tether (FCT)	30 µl
<b>Общий объем</b>	1 205 µl

В протоколах без Bovine Serum Albumin (BSA), объем FCF = 1 175 мкл (если используется пробирочный формат, то объемом BSA пренебрегаем)

- 20.3 Откройте крышку секвенатора MinION или GridION и задвиньте проточную ячейку до щелчка. Прижмите ячейку, чтобы убедиться в хорошем электрическом контакте.
  
- 20.4 Сдвиньте крышку праймингового порта по часовой стрелке. После открытия порта проверьте наличие мелких пузырьков воздуха под крышкой. Вытяните пипеткой небольшое количество буфера, чтобы удалить пузырьки из праймингового порта следующим образом:
  1. Установите пипетку объемом 1000 µl на 200 µl
  2. Поставьте пипетку на прайминговый порт
  3. Вращайте счетчик объема пипетки на увеличение пока счетчик не покажет 220-230 µl, чтобы отобрать 20-30 µl буфера, или пока не появится небольшое количество желтого буфера в кончике пипетки
  4. Проверьте визуально наличие буфера на протяжении от праймингового порта до сенсорной панели пор

## Note

Будьте осторожны при удалении буфера из проточной ячейки. Не удаляйте более чем 20-30  $\mu\text{L}$  и убедитесь, что все поры покрыты буфером. **Пузырьки воздуха необратимо повреждают поры.**

- 20.5 Загрузите  $\Delta$  800  $\mu\text{L}$  прайминговой смеси через прайминговый порт, стараясь не допустить попадания воздуха. Подождите 5 минут. В это время подготовьте библиотеку к загрузке, следуя инструкции:

- 20.6 Тщательно размешать пипетированием содержимое Library Beads (LIB)

## Note

Library Beads (LIB) содержит суспензию шариков, они очень быстро оседают, поэтому  
! очень важно перемешивать их непосредственно перед использованием

- 20.7 В новой пробирке объемом  $\Delta$  1.5 mL подготовить библиотеку следующим образом:

Реагент	Объем на одну ячейку
<b>Реагент</b>	<b>б</b>
Sequencing Buffer (SB)	37.5 $\mu\text{l}$
LIB ! размешать непосредственно перед использованием	25.5 $\mu\text{l}$
Библиотека ДНК	12 $\mu\text{l}$
<b>Всего</b>	<b>75 <math>\mu\text{l}</math></b>

- 20.8 Аккуратно отогните крышку SpotON sample port

- 20.9 Загрузите через каплю  $\Delta$  200  $\mu\text{L}$  прайминговой смеси в прайминговый порт (! **не в SpotON sample port**), избегая попадания пузырьков

При правильной загрузке наблюдается выделение и обратное всасывание жидкости через **SpotON sample port**

- 20.10 Перемешайте библиотеку пипетированием прямо перед загрузкой

20.11 Добавьте  75  $\mu\text{L}$  подготовленной библиотеки в ячейку через каплю в SpotON sample port

21 плотно закройте прайминговый порт и SpotON порт, отберите примерно 1000 мкл жидкости из порта для отходов

## Запуск секвенирования

22 Установите ячейку в секвенатор до упора, убедитесь в примыкании вертикальных контактов

22.1 Запустите MinKnow, ячейка определится автоматически

22.2 В меню Start выбрать кнопку Sequencing

22.3 Выбрать на последующих вкладках название и место записи результатов секвенирования, соответствующий кит для подготовки библиотек, быстрый базеколлинг Fast basecalling и запустить секвенирование

22.4 После запуска проверить состояние ячейки

! хорошо работающая ячейка в программе залита ярко-зеленым полем

! увеличение площади темно-зеленого поля говорит об увеличении числа не секвенирующих доступных пор

! увеличение площади голубого поля говорит об увеличении числа недоступных ячеек

22.5 При возникновении указанных проблем нужно

1. Остановить секвенирование

2. Вынуть и вставить заново ячейку

3. Проверить температуру прибора: двойным щелчком по строке с обзором секвенирования вызвать обзорный экран, справа в середине будет отображена температура, она не должна превышать  36 °C

## Использованные ресурсы

23 Данный протокол содержит более или менее дословный перевод протоколов и инструкций, размещенных на сайте Nanopore. Текст был также дополнен опытом нашей работы в рамках наших исследовательских задач.

## Protocol references

- Gardes M. & Bruns T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Zinger, L., Nilsson, R. H., Kennedy, P. G., Yang, T., Anslan, S., & Mikryukov, V. (2022). Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. *Molecular Ecology*, 31, 2769–2795. <https://doi.org/10.1111/mec.16460>.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. and Taylor, J.W. (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, New York, 315-322. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L. and Coissac, E., 2018. *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press.

## Citations

### Step 3

Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E.. Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring  
<https://doi.org/10.1093/oso/9780198767220.001.0001>