

Amplicon sequencing – Lab protocol

Bead Clean-up

- Tag AmPure beads ud og vent til det er ved stuetemperatur
- Lav 50 mL 80% Ethanol
- Åbenprogrammet Wash_Eluat_mikrobiom V3 (Projekt: Mikrobiom). Dette program er til 2 plader. (Har man 4 plader, gentages steps)
- **Verificer Biblioteker på gel:** Alle plader (eller blot kontroller) verificeres på gel. Brug **2 μ L** fra hver prøve og 1 μ L ladder i 12 μ L dH₂O på en 2% agarose gel.

Normalization

- Kvantificer alle prøver på en pladelæser (Program: Accuclear + Ladder) med ACCUCLEAR ULTRA DS DNA kittet fra køleskabet i rum 126.
- Til **4 plader** med i alt 384 prøver plus 1x standard række, blandes 2x45 mL buffer med 2x450 μ L Accuclear dye i to separate 50 mL Falcon rør.
- Der skal bruges 5 sorte 96-brønds-plader i alt, hvor plade 5 kun skal indeholde standarderne i kolonne 12.
- Tag kittet ud, og vent til alle reagenser er ved stuetemperatur (ca. 20 min).
- Lav en 1:100 fortynding af AccuClear dye (til 4 plader prøver + 8 ladder, laves 90 mL opløsning bestående af 2 x 45 mL buffer + 2 x 450 μ L Accuclear dye*).
- Åbn programmet Konc_mikrobiom_4_plader (Under projekt: Mikrobiom)
- Plade 5 (med standard-rækken) fyldes kun buffer i række 12, og 10 μ L ladder i hver brønd (højeste standard I H12).
- Først måles pladen med standardrækken (Accuclear programmet med "ladder"). (Lav "Max Gain" på brønd H12). Husk: *Force standard through zero*, I "statistics" og åben I excel.
- Noter "Slope" for standarden, - denne findes i ark 2.
- Bestem "Raw absorbance measurements" for alle prøver i MARS programmet (Brug Accuclear 96 programmet for fuld plade).
- Indsæt alle "Raw absorbance measurements" i mikrobiom flow arket og indfør værdien "Slope" for den korte ladder.

OBS: Hvis der måles plader på forskellige tidspunkter, laves nye standard og nye "slope" værdier. Hvis alle plader måles sammen, indsættes samme "Slope" værdi for alle plader.

Pooling

- Indsæt DNA målinger i Mikrobiom Normaliseringsarket. Disse målinger bliver udregnet i forhold til, hvad der skal pooles fra hver prøve.
- Vælg fanen Biomek og indtast en koncentration som de fleste af prøverne kan fortyndes ned til i ExpectedConcentration (sat til 7 i eksempel nendunder). Pooling af prøverne starter med en fortynding for at opnå nogenlunde samme forhold i koncentrationen af alle prøverne. Dette gøres for alle plader.

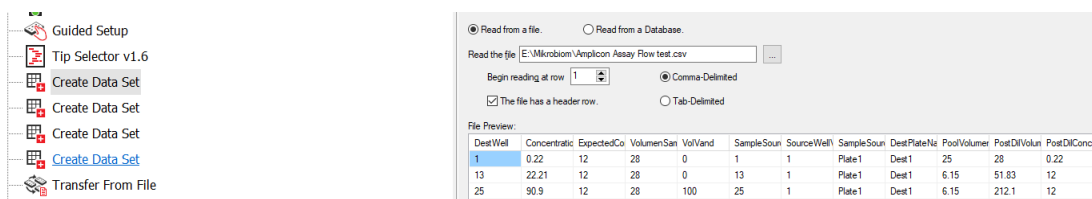
DestWell	Concentration	ExpectedConcentration	VolumenSan	VolVand	SampleSource	SourceWell	SampleSource	DestPlateNo	PoolVolumen	PostDilVolume	PostDilConc.
1	2,42	7	28	0,00	1	1	Plate1	Dest1	25,00	28,00	2,42
13	4,17	7	28	0,00	13	1	Plate1	Dest1	14,68	28,00	4,17
25	21,87	7	28	59,48	25	1	Plate1	Dest1	8,75	87,48	7,00
37	10,35	7	28	13,38	37	1	Plate1	Dest1	8,75	41,38	7,00

Obs: VolVand må maks være på 160uL. Juster i ExpectedConcentration hvis VolVand overstiger 160uL.

- PoolVolumen skal helst være over 5uL dette kan justeres under fanen Normalize og Pooling volume (uL)
(Se eksempel nedenfor på 1000uL) (MAKS volumen 1300uL):

Pooling Volume: Pooling Factor * 50 ul pool			
Koncentration (nM):			4
Pooling volume (uL):			1000

- Er der prøver der ikke skal med til pooling taster man her PoolVolumen til 0.
- Når skemaet er klar til pooling gemmer man excel arket i en USB.
- Åbn excelarket i Biomek computeren og vælg fanen Biomek.
- Vælg herefter at gemme som CSV(MS-DOS)
- Åbn programmet Normalization ny (Projekt: Mikrobiom)
- Vælg det gemte skema under alle Create Data Set og Transfer From File



- Start program

Rengøring af PAL “Pooled Amplicon Libraries” (PAL_A, B, C & D)

- Dette skal laves for hver enkelt PAL hvis koncentrationerne ligger under **10ng/uL**:
- Bland 400 ul af hver PAL med 320 ul AMPure XP beads ved stuetemperatur.
- Mix grundigt og Inkuber i 5 minutter og sæt på magnet.
- Vent til alle beads er bundet til siden og fjern supernatant.
- Vask beads 3x med 80 % EtOH.
- Tilsæt 400 µl 80 % EtOH til hvert rør og inkuber i 30 sek.
- Fjern EtOH.
- Fjern resterende EtOH med en p10 µl pipette.
- Lad beads tørre i 2 min (undgå at udtørre).
- Flyt fra magnet og resuspender beads i **60 ul** 10 mM Tris-HCL pH 8.5.
- Flyt tilbage på magnet, vent til beads er bundet og flyt supernatant med amplikons til et nyt 2 mL Eppendorf LoBind rør.

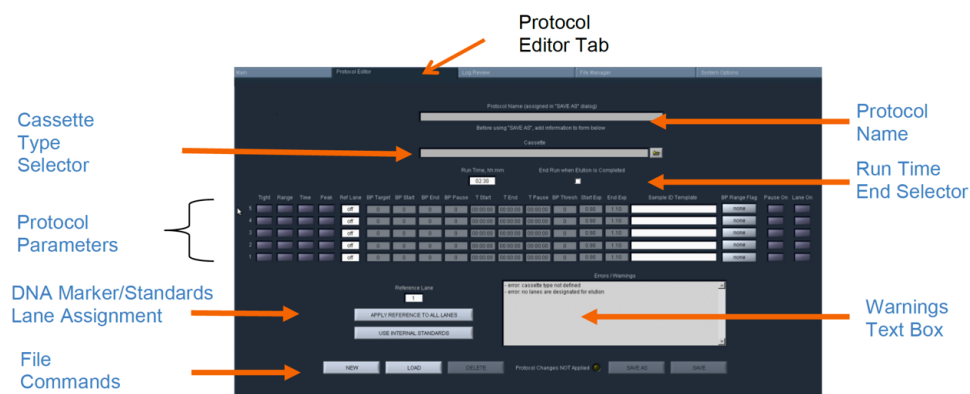
Blue Pippin

Inden start:

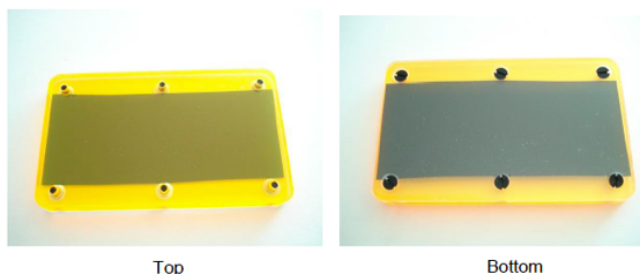
- Prøvemateriale & ”Loading Solution” buffer fra kittet bringes til stuetemperatur.

Prøve forberedelse:

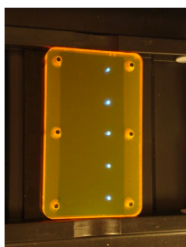
- Find sterile LoBind Eppendorf rør, or marker hvilke rør indeholder de forskellige PAL (A, B C, D) - Der kan max køres 5 prøver på samme kassette.
- I separate sterile eppendorf rør blandes:
- 30 ul DNA prøve (PAL).
- 10 ul loading solution marker.
- Vortex og spin alle prøver ned på en bordcentrifuge.
- Tænd **BluePippin** instrumentet ved at tilslutte strømmen bag på **BluePippin** og tænd på knappen.
- Åben ”Protocol editor”, find “load” knappen I bunden, og åben protokollen ”Amplicon Selection 300-900 (4 lanes)”.
- Denne protokol har 4 aktive lanes, én for hver PAL-rør.



- Kalibrer **Bluepippin**

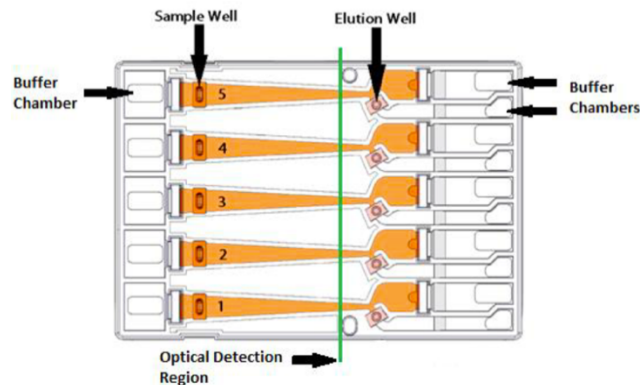


- Tryk på ”Main Tab” øverst i menuén.
- Find den orange ”Optics fixture” og placer den ovenpå de optiske læsere i **Bluepippin**.
- Læg denne fixture på instrumentet, så det sorte dækker for LED lysene for hele rækken.

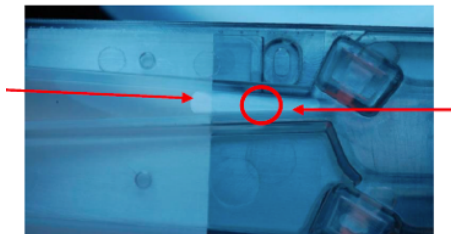


- Luk instrumentet med skydelågen.
- Tryk på ”Calibrate”, og vent et par sekunder til alle brønde at tjekket og OK.
- Der skal gerne stå 0.60 i Photocurrent, mA.
- Hvis alle er lanes er OK, står der under Calibration status: Calibration OK

- Tryk på "Exit", for at lukke kalibrerings-programmet.

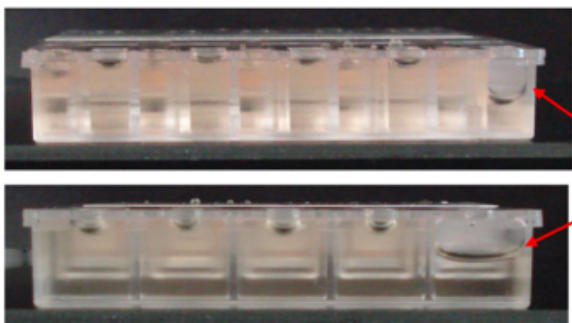


- Find en ny kassette frem og tjek for luftbobler, revner og andre uregelmæssigheder i bunden af kassetten ved agarose-gelen.



OBS: Brug kun brønde der er intakte i regionen omkring detektionsregionen (Rød cirkel).

- Tjek at der er ens mængde buffer i alle kar (de skal være næsten helt fyldte)



- Tjek at der ikke er bobler bag "elutions well" (prøv at "tappe" kassetten lidt, for at komme af med bobler).
- Læg kassetten i instrumentet. Sørg for at holde den højre side lidt oppe når du lægger kassetten i instrumentet, så der ikke kommer bobler ind bag "elutions wells".
- Når kassetten ligger i korrekt i instrumentet, fjernes tapen langsomt fra kassetten.
- Find en pippette med gule sartorius spidser, og pipetter alt buffer ud fra aktive "Elution Wells". Fjern resterende buffer med en 10 ul pipette.
- Fyld alle aktive "Elution wells" med 40 ul frisk Electrophoresis buffer fra kittet.
- Dæk alle "Elution Wells" med nyt tape.
- Tjek at alle "Samples Wells" er helt fyldte med buffer (fyld med dem helt op med Electrophoresis buffer, hvis de ikke allerede fyldte). Test at der er strøm til kassetten:

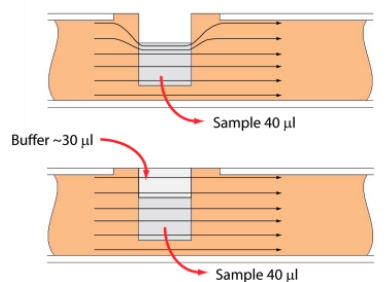
- Luk lågen mens kassetten ligger i instrumentet.
- Laver en test, ved at trykke på "test" i "Main Tap".
- Tjek både "Separation" og "Elution" for fejl.
- Hvis der er fejl i "Separation", så brug en anden Lane
- Hvis der er fejl i "Elution", så skift bufferen ud med 40 ul frisk Electrophoresis buffer og lav test igen.
- Load Prøver:
- Tjek buffer niveau i alle "Sample wells".

OBS: Alle "Sample Well" brønde skal være helt fyldte med buffer (ca. 70 ul).

- Med en Gul Sartorius spids fjernes 40 ul fra alle aktive "Sample Well" brønde.

OBS: Der er agarose gel på alle sider omkring åbningen og i bunden af brønden, så pas på ikke at ødelægge gelen.

- Load langsomt alle 40 ul PAL+loading solution marker fra alle prøver, til hver deres brønd.



OBS: Solution markeren får DNA'et til hurtigt at synke mod bunden, så det gør ikke noget, bufferen flyder over.

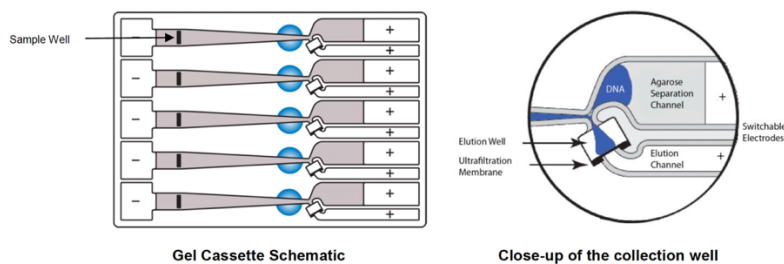
- Kør BluePippin programmet:
- For at starte programmet, gå til "Main Tap", og tryk på "Start" ☺
- Følg programmet imens det kører:



Grøn → Gelen køres

Orange → Prøven elueres

- Når alle brønde med prøver er færdige, skifter den til "Idle" (Grå).
- Programmet kan slukkes, selvom tiden ikke er løbet ud.
- Husk dine prøver:
- Fjern langsomt tape fra "Elution Well" brønde.
- Med en gul sartorius spids, flyttes alle 40 ul fra "Elution Wells" til nye Lobind eppendorf rør. Husk at markere dem.



Smid kassetten ud, og sluk for instrumentet ved at tage stikket ud af kontakten.

OBS: Der kan maksimalt køres 5 prøver/gel ad gangen. Det er også muligt at køre færre ad gangen og gemme de ubrugte brønde, men så kan man ikke lave "test" inden kørsel, og man skal huske at fravælge de ubenyttede brønde i "Protocol Editor".

Pooling af 4 PAL rør til ét Sekvenserings PAL (SPAL) rør

- De forskellige PAL-rør skal nu samles i et Sekvenserings PAL rør (SPAL).
- Alle PAL-rør måles med 5 µl og fortyndes ned til 2 – 6 ng/µl.
- Hvis PAL-rør er blevet fortyndet, måles igen på 5 µl inden pooling.
- Herefter laves en samlet pool (SPAL) bestående af 20 µl ved at blande alle individuelle pools sammen som det fremgår af Pool Normalization arket i Amplicon Assay Flow Template.
- Der foretages en koncentrationsmåling af den endelig pool, dette noteres i Amplicon Assay Flow Template arket, og der fortyndes yderligere ned med resuspension buffer hvis nødvendigt.
- Den endelige pool skal måles og ligge indenfor +/- 0,1 ng/µl før der fortsættes med Denaturering og Sekvensering.

Nomalisering	Aureuome
Koncentration (4 nM)	1,65 ng/µl

- Denaturering og Sekventering på Mi-Seq
- På dagen for sekventering optøes MiSeq kittet (PE600) så det er klar til brug.
- Forbered først 4 nM PhiX ved at blande:
- 2 µl af et 10 nM PhiX library.
- 3 µl af et 10 nM Tris-Cl (pH 8,5) + 0.1% Tween 20.

Dette resulterer i en 4 nM PhiX bibliotek som skal denatureres sideløbende med Amplikon biblioteket.

Rør A	SPAL
Amplikon bibliotek (4 nM)	5 µl
Frisklavet 0.2 N NaOH	5 µl
Rør B	PhiX
PhiX (4 nM)	5 µl
Frisklavet 0.2 N NaOH	5 µl

- Vortex både denatureret SPAL (Rør A) og PhiX (Rør B) og centrifuger ved 280xg i 1 min.

- Lad begge prøver stå ved stuetemperatur i 5 min, for at sikre at bibliotekerne er helt denaturerede.
- Tilsæt 990 µl koldt HT1 (hybridization buffer) til begge rør:
- 10 µl denatureret SPAL for at nå en koncentration på 20 pM.
- 10 µl denatureret PhiX for at nå en koncentration på 20 pM.

Amplikon Type	PhiX	PhiX (20 pM)	SPAL (20 pM)
Mikrobiom	20 %	120 µl	480 µl

- Følg skemaet for at finde ud af, hvor meget **PhiX** der skal blandes i **SPAL**:
- Eksempel for kombineret Mikrobiom & Staphylo:
- Tilføj 20% PhiX ved at blande 120 µl af en 20 pM denatureret PhiX med 480 µl 20 pM Amplikon bibliotek, til et endeligt volumen på 600 µl fortyndet denatureret Sekventerings PAL (SPAL).
- Fortynd SPAL & PhiX blanding ned til 12 pM, ved at blande 360 µl SPAL (20 pM) med 240 µl HT1 buffer.

Final dilution

Sample Sheet til MiSeq (Local Run Manager)

- Før sekventering sættes over, laves der Sample Sheet i LRC.
- Åbn programmet LRC ved at indtaste IP-adressen til Miseq1 - <https://10.11.1.21/> i en webbrowser. Vælg *Avanceret* og derefter *Fortsæt til Ip adresse (usikkert)*.
- Vælg Create Run
- Herefter udfyldes: **Sample Sheet til MiSeq (Illumina Experiment Manager)**
- Før sekventering sættes over, laves Sample Plates i Illumina Experiment Manager.
- Åben Illumina Experiment Manager, vælg: Create Sample plate.
- Vælg det Nextera XT v2 index Kit (A, B, C, eller D) der blev brugt til at indekserer pladen.
- Giver pladen et navn
- Vælg Dual Indexing.
- Angiv: Sample ID, Sample Name, Index1 (I7) & Index2 (I5).
- Tryk "Finish" og gem "Sample Plate"

Sample Sheet

- Åben Illumina Experiment Manager Vælg: Create Sample Sheet.
- Vælg MiSeq Instrumentet.
- Select Category: Other -> FASTQ Only
- Under "Library Prep Workflow", vælges: Nextera XT (*.nexxtv2*.28.plt)
- Under "Index Adaptors", vælges: Nextera XT v2 Index Kit
- Cycles read 1 = 301 & Cycles read 2 = 301
- Flueben ved "Adaptor Trimming".
- Tryk "Finish" og gem "Sample Plate"
- Navngiv Sample Sheets

