

I. Bevezetés:

A protokoll az Oxford Nanopore **SQK-MAB114.24 Kit** szekvenálókészletet alkalmaz, amelyet az Oxford Nanopore Minion **R10.4.1** folyamcellákhoz optimalizáltak .

II. Anyagok és eszközök (0. nap)

- Oxford Nanopore MinION szekvenáló.
- Vortex
- Oxford Nanopore Minion **R10.4.1** flow cell
- Oxford Nanopore **SQK-MAB114.24 Kit**
- Pipetták (autómata): P1000, P100
- Néhány 1,5 ml-es LoBind cső
- Hűtőblokk 0,5 és 1,5 ml-es csövekhez

III. Könyvtárkészítés (0. nap):

Az első lépés a könyvtárkészítés. Több leállási pont is van. A laboratóriumi gyakorlat előtt a könyvtárkészítésnek el kell jutnia az AMPure gyöngyökkel végzett összevonásig és végső tisztításig. Az eluált minta (11 µl) lefagyasztható a következő napra!

IV. Reagensek előkészítése (0. nap)

Végezze el ezeket a lépéseket a fő laborban, majd helyezze a csöveket azonnal a **500 µl chilled block** és tegye be a fagyasztóba egy éjszakára.

1. Reagens alikvotálás

Használjon precíz P2 pipettát és **DNA LoBind 500 µl tubes** a következők elkészítéséhez:

- **Tube A (Rapid Adapter - RA):** Pipetázzon pontosan **1.5 µl** RA-t (zöld kupak) a cső aljának közepébe.
- **Tube B (Adapter Buffer - ADB):** Pipetázzon **3.5 µl** ADB-t (átlátszó kupak).
- **Tube C (DNA Library):** Vigyen át **11 µl** összevont, eluált DNS-t a -20°C -os fagyasztóból.
- **Tube D (Sequencing Auxiliaries):** Az idő megtakarítása érdekében előre alikvotálhat **37.5 µl** szekvenálási puffert (SB) egy friss csőbe.

Tip: Ha van mikrofuga, adjon A csőnek egy 5 másodperces centrifugálást az alikvotálás után, hogy a 1,5 µl a cső alján legyen, ezzel minimalizálva a párolgást szállítás közben.

V. Szekvenálás (0. nap)

1. Rapid Adapter rögzítése (10 perc)

- **Hígított RA készítése:** Pipettázza a **3.5 µl of ADB** (B cső) az **Tube A** (1,5 µl RA). Keverje össze 10-szeri fel-le pipettázással.
- **Kombinálja a könyvtárral:** Add **1 µl** of this newly diluted RA to **Tube C** (11 µl DNA).
- **Inkubálás:** Mix gently by flicking, spin down, and incubate at room temperature for **5 minutes**.

2. Folyamcella előkészítése (20 perc)

- **Előkészítő keverék:** Combine **1,197 µl** Flow Cell Flush (FCF) and **3 µl** Flush Tether UL (FTU). Jól keverje el.
- **Levegőtelenítés:** Nyissa ki az előkészítő portot, és szívjon vissza **20-30 µl** puffert, amíg folyadékot nem lát a pipettahegybe.
- **Első előkészítés:** Lassan töltse be **800 µl** előkészítő keveréket az előkészítő portba. Wait **5 minutes**.

3. Végső könyvtárbetöltés (5 perc)

- **Végső keverék:** Adja hozzá a következőket a **Tube D** (amelyben már benne van a 37,5 µl SB):
 - **25.5 µl** Library Beads (LIB) — **Vortex LIB immediately before pipetting!**
 - **12 µl** Adapted DNA library (from Tube C).
- **Második előkészítés:** Töltse be a maradék **200 µl** előkészítő keveréket az előkészítő portba.
- **SpotON betöltés:** Nyissa ki a SpotON portot, és pipettázza be a **75 µl** könyvtárat cseppenként.
- **Lezárás:** Zárja le a portokat és helyezze fel a **light shield**.

Ne feledje:

- **LIB leülepedése:** A Library Beads (LIB) másodpercek alatt leülepszik. Ha nem vortexeli és nem pipettázza azonnal, az adatmennyiség jelentősen csökken.

- **Légbuborékok:** Gondoskodjon arról, hogy ne kerüljenek légbuborékok a SpotON portba, mivel azok visszafordíthatatlanul károsíthatják az érzékelőtömböt.