

Feb 03, 2025

Fast Track - Nanopore - SSI

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.e6nvwd3n2lmk/v1>



Theis Hass Thorsen¹, Sekventeringsenheden SB¹

¹Department of Sequencing and Bioinformatics

SSI - SB - Sequencing Core Facility
Tech. support email: Sekventeringsenheden@ssi.dk



Sekventeringsenheden SB

Sequencing and Bioinformatics

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.e6nvwd3n2lmk/v1>

Protocol Citation: Theis Hass Thorsen, Sekventeringsenheden SB 2025. Fast Track - Nanopore - SSI. **protocols.io**
<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.e6nvwd3n2lmk/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: Working

We use this protocol and it's working

Created: February 20, 2024

Last Modified: February 03, 2025

Protocol Integer ID: 95462

Keywords: Statens Serum Institut, SSI, Sequencing Core Facility , Sekventeringsenheden, Fast Track, Sekventering , Sequencing, Isolates, Bacterial isolates, DNA sequencing, DNA, MagLEAD, Nanopore, Oxford Nanopore Technologies, GridION, Rapid Barcoding Kit 96 V14, SQK-RBK114.96, nanopore sequencing, maglead system for dna extraction, flow at the sequencing core facility, nanopore, dna extraction, sequencing flow, sequencing core facility, sequencing platform, maglead system, dna, extraction, statens serum institut, ssi protocol, isolate

Funders Acknowledgements:

European Health and Digital Executive Agency (HaDEA)

Grant ID: 101111879

Disclaimer

This method was not developed from scratch at Statens Serum Institut. It is a method composed of methods from Precision System Science (DNA isolation and clean up) and Oxford Nanopore Technologies (Library preparation and sequencing). See under *Protocol References* for links to the original protocols.

Abstract

Protocol for the 'fast track' sequencing flow at the Sequencing Core Facility at Statens Serum Institut (SSI). This method utilises the MagLEAD system for DNA extraction and cleaning followed by the Nanopore sequencing platform for library prep. (Kit: SQK-RBK114-96) and sequencing (GridION w. flow cell type: FLO-MIN114). Both isolates and cleaned up DNA can be used as input material.

Note, this protocol is in **Danish**.

Image Attribution

Statens Serum Institut, www.ssi.dk.

Guidelines

Handler det om modtagelse af **flow celler** - gå til sektionen: Modtagelse af flowceller (trin 1).

Hvis input materialet er **lysater** - gå til sektionen: MagLEAD oprensning (trin 6).

Hvis input materialet er **DNA** - gå til sektionen: Nanopore "library prep." (trin 46).

Materials

Instrumenter:

- Køl/Frys
- Vortex
- Centrifuge (1,5 mL rør, PCR rør/plader)
- Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific (TFS))
- PCR-maskine
- Thermomixer C (Eppendorf)
- Hulamixer sample mixer (TFS)
- magLEAD (Precision System Science (PSS))
- GridION (Oxford Nanopore Technologies (ONT))

Redskaber:

- Pipetter - p10, p100, p1000
- Magnetholder (1,5 mL rør)
- Køleblok (1,5 mL rør)

Forbrugsvarer:

- Flowceller R10.4.1 (ONT)
- "Micro-tube" rør ("magLEAD Consumable Kit" REF: F4430 - PSS)
- "Tip and sheath set" ("magLEAD Consumable Kit" REF: F4430 - PSS)
- 1,5 mL "Lo-bind" rør
- 96-brønds "Lo-bind" PCR-plader
- 8-rør "thin-walled" PCR-strimmel
- Qubit rør (#Q32856, Invitrogen - TFS)
- "Wide bore" pipettespidser - (p10, p100, p1000)
- "Seals"
- Handsker (gerne med høj gennembrudstid)
- Is



Protocol materials

⊗ MagDEA Dx SV **Precision System Science co. ltd Catalog #E1300**

⊗ EtOH

⊗ Nuclease-free Water

⊗ Qubit™ dsDNA BR Assay Kit **Thermo Fisher Scientific Catalog #Q32853**

⊗ Rapid Barcodes (RB01-96) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

⊗ AMPure XP Beads (AXP) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

⊗ Rapid Adapter (RA) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

⊗ Library Beads (LIB) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

⊗ Flow Cell Tether (FCT) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

⊗ Bovine Serum Albumin (BSA) (50 mg/mL) **Fischer Scientific Catalog #AM2616**

⊗ Sequencing Buffer (SB) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

⊗ Flow Cell Flush (FCF) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

⊗ Adapter Buffer (ADB) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

⊗ Elution Buffer (EB) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

⊗ Elution Buffer (EB) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

Safety warnings

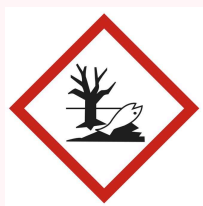
!  MagDEA Dx SV Precision System Science co. ltd Catalog #E1300 er mærket med følgende faremærker:



Sundhedsfare



Brandfarlig



Miljøfare



Kronisk sundhedsfare

Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og "tykke" handsker).



Before start

Handler det om modtagelse af **flow celler** - gå til sektionen: Modtagelse af flowceller (trin 1).

Hvis input materialet er **lysater** - gå til sektionen: MagLEAD oprensning (trin 6).

Hvis input materialet er **DNA** - gå til sektionen: Nanopore "library prep." (trin 46).

Hvis input materialet er **DNA**, start med at bestemme koncentrationen i prøverne.



Modtagelse af flowceller

- 1 Tag alle pakkerne med flowceller R10.4.1 (FLO-MIN114, Oxford Nanopore Technologies (ONT), Oxford, Storbritannien) ud af kassen som de er ankommet i.
- 2 Læg dem i *rum 126 - Amplicon* og lad dem opnå stuetemperatur.
- 3 Lav et "flow cell check" på alle flowcellerne.

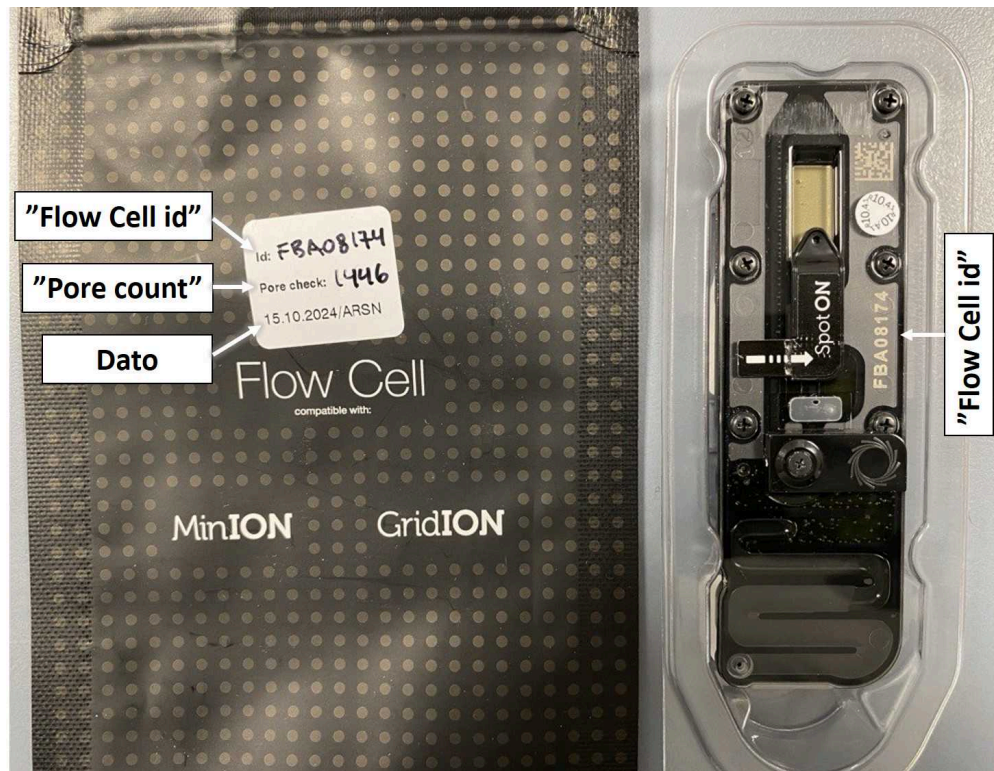
Note

Flowceller R10.4.1 er dækket af en købsgaranti på +800 aktive pore.
Hvilket betyder, at hvis der er under 800 aktive pore på en flowcelle ved første "flow cell check", kan den/de sendes tilbage, og nye vil blive fremsendt kvit og frit.

Vigtigt: flowceller med under 800 aktive porer skal fejlmeldes til Nanopore inden for 2 dage efter første "flow cell check" for at få den/dem refunderet.

- 4 Notér datoen for modtagelse af flowcellerne, antal aktive pore ("pore count") samt "flow cell id" på deres indpakning (se billede 1 nedenfor).





Billede 1: Flowcelle (til højre) af typen R10.4.1 med "flow cell id", samt indpakningen (til venstre) med "flow cell id", "pore count" og dato.

- 5 Put flowcellerne tilbage i deres indpakning og læg dem på køl (opb. på køl i rum 126 - Amplicon).

MagLEAD oprensning

- 6 Hent indleverede lysater i fryseren (SSI nr.: 810978) i rum 134 (Hamilton 1).
- 7 Lad dem tø ved stuetemperatur.

- 8 Find følgende komponenter frem:

Forbrugsvarer

- "Micro-tube" rør
 - findes i "magLEAD Consumable Kit" (REF: F4430, Precision System Science co. Ltd. (PSS), Chiba, Japan) i rum 119.



- "Tip and sheath set"
 - findes i "magLEAD Consumable Kit" (REF: F4430, PSS).

Reagenser

-  MagDEA Dx SV Precision System Science co. ltd Catalog #E1300
 - findes i "Magtration Reagent / MagDEA Dx SV" kassen (REF: E1300, PSS) i rum 119.

Safety information

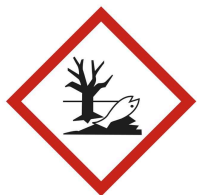
⊗ MagDEA Dx SV Precision System Science co. ltd Catalog #E1300 er mærket med følgende faremærker:



Sundhedsfare



Brandfarlig



Miljøfare

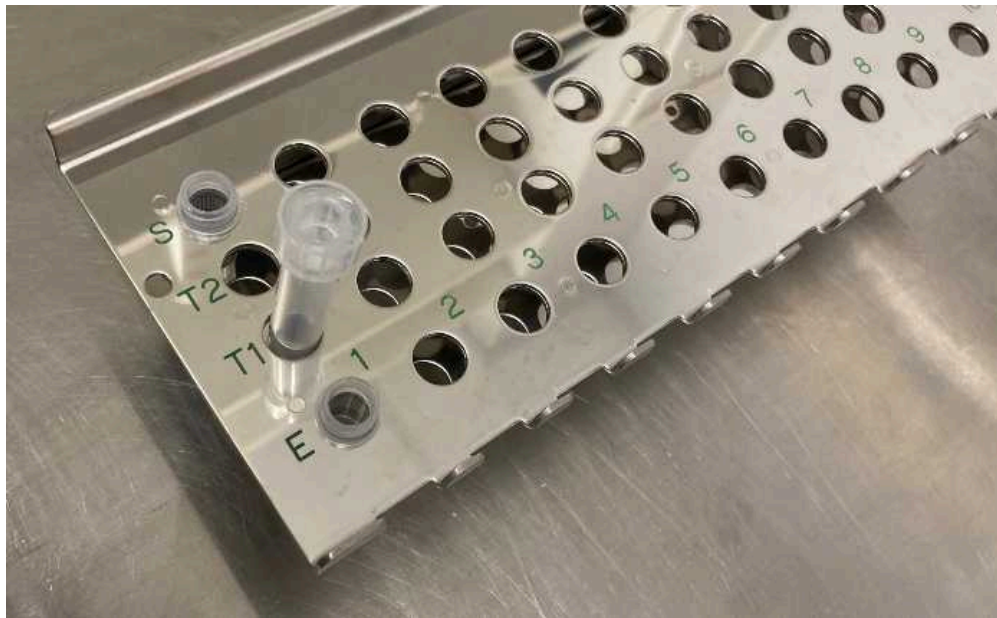


Kronisk sundhedsfare

Arbejd med korrekt personbeskyttelse (kittel, briller og "tykke" handsker).



- 9 Overfør  250 μ L fra hver lysat til nye 1,5 mL "micro-tube" rør.
- 10 Tag stativet til rør og spidser (se billede 2 nedenfor)



Billede 2: Stativ til rør og spidser.

ud af

Equipment

magLEAD

NAME

12gC

TYPE

Precision System Science co. Ltd

BRAND

8.11.06

SKU

<https://bioservices.se/en/dna-rna-extraction/extraction-instrument/pss-maglead-12gc-2/>

LINK



- 11 Placér "micro-tube" rørene med lysat i stativet i rækken markeret med "S" ("Sample").
- 12 Find det samme antal "tip and sheath set" og placér dem i række "T1" ("Tip 1") i stativet.
- 13 Placér nye "micro-tube" rør i række "E" ("Elution") i stativet.
- 14 Tag stativet til reagenser (se billede 3 nedenfor) ud af magLEAD'en.



Billede 3: Stativ til reagenser.

- 15 Find et antal  MagDEA Dx SV Precision System Science co. ltd Catalog #E1300 svarende til antallet af lysater og placér dem i stativet til reagenser, startende fra venstre.
- 16 Sæt stativet med reagenser (Billede 3) tilbage på sin plads i magLEAD'en.
- 17 Sæt stativet med rør og spidser (Billede 2) tilbage på sin plads i magLEAD'en.
- 18 Tænd magLEAD'en og lad den initialisere.





- 19 På displayet til venstre på instrumentet, tryk på *Start*.
(Instrumentet initialiserer igen). 
- 20 Tryk på *Enter* (nedadgående pil der drejer til venstre).
(Godkender at initialiseringen er gået fint, og instrumentet kan fortsætte). 
- 21 Ønskes der at skrive batch info for kørslen ind, tryk på *Enter*.
Ellers tryk på *Start*. 
- 22 Tryk på *Enter*.
(Godkender den foreslåede type af "reagent cartridge"). 
- 23 Tryk på *Enter*.
(Stativerne til reagenser og rør og spidser er allerede blevet sat på plads i instrumentet). 
- 24 Tryk på 2.
(Valg af elueringsvolumen - i denne protokol skal den sættes til  100 µL). 
- 25 Tryk på *Enter*.
(Godkender de foreslåede volumener for "sample" og "elution"). 
- 26 Tryk på *Start*.
Herved startes kørslen. Kørslen tager ca.  00:30:00 uafhængigt af antallet af prøver (1-12 stk.).  30m
- 27 Når kørslen er færdig:
- 27.1 Tag eluaterne (de oprensede prøver - står i række "E") ud af instrumentet og sæt dem på is.
- 27.2 Samle de resterende ting (reagenser, rør og spidser) omhyggeligt i en plastpose og bortskaf det hele som affaldsgruppe X (*hvid spand i stinkskaab SSI nr.: 810309 i rum 122*). 

UV-dekontaminering på magLEAD

30m

- 28 Efter endt oprensning, eller når instrumentet tændes, er det muligt at køre en UV-dekontaminering på instrumentet, hvilket gøres på følgende måde:



- 28.1 Skal der køres UV **inden** en kørsel - Tænd for instrumentet.
Skal der køres UV **efter** en kørsel - Følg instrukserne på skærmen indtil startmenuen er nået.
- 28.2 Tryk på 1.
(UV-program).

UV-dekontaminering på magLEAD

30m

- 28.3 Indtast antal minutter UV-programmet skal køre.
(Standard er  00:30:00).

30m

UV-dekontaminering på magLEAD

30m

- 28.4 Tryk på *Enter*.
(Godkender kørselstiden på UV-programmet).
- 28.5 Tryk på *Start*.
(Herved startes UV-programmet).

Sekundær oprensning af DNA-produkt

29

Note

Fra dette punkt foregår arbejdet manuelt.

Find følgende komponenter frem:

-  AMPure XP Beads (AXP) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**
(opbevares på -20°C i rum 126 - Amplicon) - temperér ved stuetemp. og vortex for at re-suspendere "beads".
-  EtOH [M] 80 % (v/v) Friskblandet - 200 µL pr. prøve + 100 µL.
-  Nuclease-free Water - ved stuetemperatur eller ved 55 °C.
-  Qubit™ dsDNA BR Assay Kit **Thermo Fisher Scientific Catalog #Q32853**
(opbevares på køl i rum 126 - Amplicon).



30 Overfør  50 μL DNA-produkt fra hver "micro-tube" rør til nye 1,5 mL "LoBind" rør.

31 Tilsæt  50 μL

 AMPure XP Beads (AXP) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

til rørene (sæt efterfølgende "beads" på is).

Mix og spin rørene kort.

32 Inkubér rørene i  00:05:00 stuetemperatur .

5m

33 Sæt rørene i en magnetholder og inkubér yderligere  00:05:00 , indtil alle "beads" er samlet på indersiden af røret ind mod magneten.

5m

34 Fjern og kassér supernatanten med en p100 pipette.

35 Vask "beads" **2 gange** på følgende måde:

35.1 Lad rørene blive på magneten og tilsæt  100 μL frisk  80 % (v/v)  EtOH til hvert rør.

35.2 Vent  00:00:30 .

30s

35.3 Fjern og kassér supernatanten.
(Efter **1. vask**  [go to step #35.1](#))

36 Fjern omhyggeligt alle rester af ethanol med en p10 pipette.

37 Lad rørene tørre i  00:00:30 , men undgå at "pellet" tørrer ud.

30s





38 Tilsæt  50 μ L  Nuclease-free Water (stuetemperatur/55°C) til rørene og opløs pellet ved forsigtigt at resuspendere prøverne med en p100 pipette.

39 Mix og spin ned.

40 Inkubér rørene i  00:05:00 stuetemperatur .

5m

41 "Pellet" prøverne på magnetholderen i ~  00:05:00 indtil eluatet er klart og uden farve.

5m

42 Udtag herefter  45 μ L eluat til nye 1,5 mL "LoBind" rør.

43 Bestem DNA koncentrationen i prøverne på en

Equipment

Qubit 4

NAME

Fluorometer

TYPE

Invitrogen

BRAND

Q33238

SKU

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33238>^{LINK}



med  Qubit™ dsDNA BR Assay Kit Thermo Fisher Scientific Catalog #Q32853 (Mål på  2 μ L).

Note

Hvordan man måler på Qubit (2 μL prøve)

- Tag et antal Qubit-rør (#Q32856, Invitrogen - Thermo Fisher) frem matchende antallet af prøver + 2 mere til standarder.
- Pipetter følgende volumener af "working solution" til de to typer af rør: 198 μL til alle prøverør samt 190 μL til de to rør til standarder.
- Tilføj 10 μL af hhv. standard #1 og #2 til hvert sit rør til standarderne med "working solution" (den totale volumen skal være 200 μL).
- Tilføj 2 μL fra hver prøve til hvert sit prøverør med "working solution" (den totale volumen skal være 200 μL).
- Vortex alle rør og inkubér dem i 00:02:00 ved stuetemperatur. Tjek at der ikke er nogle bobler i væsken.
- Fra forsiden på instrumentet vælg *dsDNA* og derefter *1x dsDNA Broad Range*.
- Vælg *Read Standards* og følg anvisningerne.
- Efter begge standarder er målt, vælg *Run samples* og sørg for at "original sample volume" er sat til **2 μL** , samt at "output sample units" er sat til **ng/ μL** .
- Sæt den første prøve i instrumentet og vælg *Read tube*. Notér koncentrationen.
- Forsæt med de resterende prøver.

- 44 Skriv koncentrationerne ind i det klargjorde sample sheet (FT_WGS_xx - xx er kørselsnummeret) på den første fane *Sample_sheet* i kolonnen *ConcentrationOfExtraction_ng_per_ul*.
- 45 Hvis prøverne **ikke** skal bruges med det samme - Sæt prøverørene på -20 °C. Hvis prøverne **skal** bruges med det samme - Gå videre til næste trin.

Nanopore "library prep."

54m

- 46 Find følgende komponenter frem:
- Nuclease-free Water
 - EtOH 1.2 mL 80 % (v/v) Friskblandet
 - 1000 μL 99.9 % (v/v) EtOH + 237 μL Nuclease-free Water
 - Qubit™ dsDNA BR Assay Kit Thermo Fisher Scientific Catalog #Q32853 (opb. på køl).
 - AMPure XP Beads (AXP) Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96 (opb. på -20°C i rum 126 - Amplicon, eller er taget frem tidligere).



-  Elution Buffer (EB) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**
(opb. på -20°C i rum 126 - Amplicon).
-  Flow Cell Flush (FCF) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**
(opb. på -20°C i rum 126 - Amplicon).
- Flowcell R10.4.1 (FLO-MIN114, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Storbritannien) (opb. på køl i rum 126 - Amplicon).

Lad komponenterne tøj/temperere ved stuetemperatur.

Når reagenserne fra frys er tøj op, stil dem på is.

Note

Er det lang tid siden at flowcellerne blev modtaget, er det en god idé at lave et ekstra "flow cell check", for at se om de stadig har nok pore.

47 Tænd for

Equipment

Thermomixer C

NAME

5382

TYPE

Eppendorf

BRAND

5382000015

SKU

<https://www.eppendorf.com/dk-en/Products/Temperature-Control-and-Mixing/Instruments/Eppendorf-ThermoMixerC-p-PF-19703>

LINK



Sæt  0 rpm, 56°C og start instrumentet (giver instrumentet lov til at varme op til 56 °C).

- 48 Fortynd hver enkel prøve til  400 ng genomisk DNA i  20 µL som angivet i FT_WGS_xx, i den anden fane *Dilution sheet*, kolonne I + J.



(Hvis prøven har en for lav koncentration fortsættes med  20 µL ufortyndet prøve).

(Fortynd prøverne i 0,2 mL "thin-walled" PCR rør eller en 96-brønds "LoBind" PCR-plade).

49 Bland hver enkel prøve ved forsigtigt at pipettere op og ned 10-15 gange.

50 Spin kortvarigt prøverne ned.

51 Find



Rapid Barcodes (RB01-96) Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96

frem fra frys (opbevares på -20°C i rum 126 - Amplicon) og sæt dem i en køleblok.

! Det er vigtigt at Rapid Barcodes (RB01-96) hele tiden holdes på en køleblok, imens de er uden for fryseren. Så snart de er brugt, skal de åbne brønde tapes til og sættes tilbage på frys !

52 Tilsæt  3 µL (pr. 400 ng prøve)



Rapid Barcodes (RB01-96) Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96

til hver prøve som angivet i *FT_WGS_xx*, i den anden fane *Dilution sheet*, kolonne *E*, *F* og *K*.

53 Bland hver enkel prøve ved forsigtigt at pipettere op og ned et par gange og spin dem ned.

54 Inkubér prøverne ved:

	Temp.	Tid
	30 °C	00:02:00
	80 °C	00:02:00
	10 °C	∞

Varmeprogram

55 Put prøverne kortvarigt på en køleblok for at blive kølet ned.





56 "Pool" alle de 'barkodede' prøver ( 23 µL pr. prøve) i et nyt 1,5 mL "LoBind" rør, og notér den totale volumen i røret (gang 23 µL med antallet af prøver).

57 Re-suspendér



AMPure XP Beads (AXP) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

ved at vortexe røret.

58 Tilsæt



AMPure XP Beads (AXP) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

i forholdet 1:0,5 (prøvevolumen:"beads") til røret med de pooled prøver.

59 Bland prøven ved at "flicke"/flippe røret.

60 Inkubér prøven i  00:10:00 stuetemperatur på en

10m

Equipment

Hulamixer sample mixer

NAME

V.3A01

TYPE

Invitrogen

BRAND

15920D

SKU

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15920D>^{LINK}



61 Spin prøven ned og "pellet" den på en magnetholder i ~  00:04:00 indtil prøven er klar og uden farve.

4m

62 Hold røret på magnetholderen og pipettér supernatanten fra.



63 Tilsæt  600 μ L  80 % (v/v) friskblandet  EtOH uden at forstyrre "pellet".

64 Fjern ethanolen efter  00:00:30 med en pipette.

30s

65 Tilsæt igen  600 μ L  80 % (v/v) friskblandet  EtOH uden at forstyrre "pellet".

66 Fjern ethanolen efter  00:00:30 med en pipette.

30s

67 Spin kortvarigt prøven ned og sæt røret tilbage på magnetholderen.

68 Efter  00:00:30 , fjern resterne af ethanol med en pipette.

30s

69 Lad prøven tørre i  00:00:30 , men **undgå** at "pellet" tørrer ud.

30s

70 Fjern røret fra magnetholderen og re-suspendér prøven i  15 μ L (pr. 24 prøver)
 Elution Buffer (EB) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96** .

71 Inkubér prøven ved  0 rpm, 56°C, 00:10:00 på

12m

Equipment

Thermomixer C

NAME

5382

TYPE

Eppendorf

BRAND

5382000015

SKU

<https://www.eppendorf.com/dk-en/Products/Temperature-Control-and-Mixing/Instruments/Eppendorf-ThermoMixerC-p-PF-19703>

LINK



I løbet af inkubationstiden, tag prøven op og "flick" den hvert  00:02:00 .

72 Find følgende komponenter frem:

-  Bovine Serum Albumin (BSA) (50 mg/mL) **Fischer Scientific Catalog #AM2616**
-  Sequencing Buffer (SB) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**
-  Library Beads (LIB) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**
-  Flow Cell Tether (FCT) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

(alle ovenstående komponenter opb. på -20°C i rum 126 - Amplicon).

Lad dem tø ved stuetemperatur, mix og spind ned.

73 "Pellet" prøven på magnetholderen i ~  00:01:00 indtil eluatet er klart og uden farve.

1m

74 Bestem DNA koncentrationen i prøven på et

Equipment

Qubit 4

NAME

Fluorometer

TYPE

Invitrogen

BRAND

Q33238

SKU

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33238>^{LINK}

med et  Qubit™ dsDNA BR Assay Kit Thermo Fisher Scientific Catalog #Q32853
(Mål på  1 µL).

Note

Hvordan man måler på Qubit (1 µL prøve)

- Tag et antal Qubit-rør (#Q32856, Invitrogen - Thermo Fisher) frem matchende antallet af prøver + 2 mere til standarder.
- Pipetter følgende volumener af "working solution" til de to typer af rør:  199 µL til alle prøverør samt  190 µL til de to rør til standarder.
- Tilføj  10 µL af hhv. standard #1 og #2 til hvert sit rør til standarderne med "working solution" (den totale volumen skal være 200µL).
- Tilføj  1 µL fra hver prøve til hvert sit prøverør med "working solution" (den totale volumen skal være 200µL).
- Vortex alle rør og inkubér dem i  00:02:00 ved stuetemperatur. Tjek at der ikke er nogle bobler i væsken.
- Fra forsiden på instrumentet vælg *dsDNA* og derefter *1x dsDNA Broad Range*.
- Vælg *Read Standards* og følg anvisningerne.
- Efter begge standarder er målt, vælg *Run samples* og sørg for at "original sample volume" er sat til **1µL**, samt at "output sample units" er sat til **ng/µL**.
- Sæt den første prøve i instrumentet og vælg *Read tube*. Notér koncentrationen.
- Forsæt med de resterende prøver.

- 75 Overfør [M] 2000 ng DNA prøve af eluatet til et nyt 1,5 mL DNA "LoBind" rør og tilføj Nuclease-free Water til en endelig volumen på 11 µL .
- Hvis der ikke er nok DNA i prøven overføres bare 11 µL af eluatet.

Note**Beregning på hvor meget af eluatet der skal overføres**

$$\text{Volumen der skal overføres} = \frac{2000 \text{ ng}}{\text{Målt konc. af prøven i ng/uL}} = X \text{ uL}$$

Eks.:

$$\text{Volumen der skal overføres} = \frac{2000 \text{ ng}}{200 \text{ ng/uL}} = 10 \text{ uL}$$

- 76 Bland følgende i et nyt 1,5 mL DNA "LoBind" rør:

- 3.5 µL

Adapter Buffer (ADB) Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96

(opb. på -20°C i rum 126 - Amplicon).

- 1.5 µL

Rapid Adapter (RA) Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96

(opb. på -20°C i rum 126 - Amplicon).

Stil dette reagens på frys igen så snart det er brugt.

Bland ved pipettering.

- 77 Tilføj 1 µL **fortyndet**

Rapid Adapter (RA) Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96 til

de 11 uL prøve med 'barkodede' DNA.

- 78 Bland ved forsigtigt at "flicke"/flippe røret og spin det ned.



79 Inkubér prøven i 00:05:00 stuetemperatur (10 minutter hvis reaktionen er viskøs).

5m

Sæt efterfølgende prøven på is / en køleblok.

80 Bland følgende komponenter for at forberede "flow cell priming mix" med BSA:

- 1170 μL

- Flow Cell Flush (FCF) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

- 30 μL

- Flow Cell Tether (FCT) **Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96**

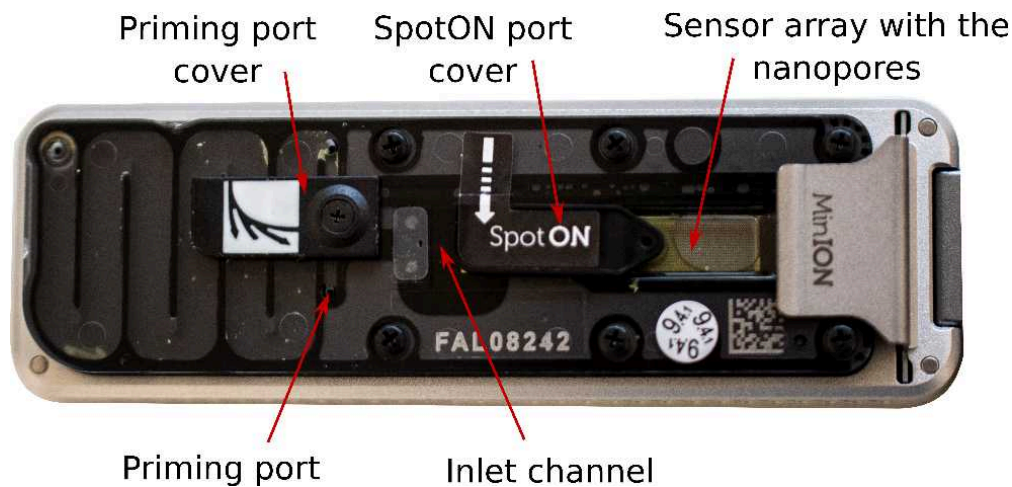
- 5 μL

- Bovine Serum Albumin (BSA) (50 mg/mL) **Fischer Scientific Catalog #AM2616**

Vend røret nogle gange for at blande det.

81 Hent flowcellen (R10.4.1), tag plastkassen ud af indpakningen og tag låget af kassen. Lad flowcellen sidde i kassen for at give mere stabilitet.

82



Billede 4: Nanopore flowcelle i en MinION holder.

Skub "flow cell priming port cover" (se billede 4 ovenfor) med uret 90° for at åbne til "priming port".

83 Efter at der er åbnet til "priming port", tjek da for små luftbobler under låget. Træk herefter en lille volumen ud, for at fjerne potentielle luftbobler, på følgende måde:



83.1 Sæt en p1000 pipette til  200 μL .

83.2 Sæt en pipettespids på pipetten og sæt pipettespidsen lodret i "priming port".

83.3 Drej hjulet på pipetten "op" (øg volumen) indtil en lille smule buffer (er gul) kommer op i pipettespidsen.



! Det er vigtigt at der under dette stadig er buffer hele vejen fra "priming port" hen over "sensor array" (se billede 4). Hvis der introduceres luftbobler ind til "sensor array", kan det ødelægge porerne i flowcellen !

83.4 Fjern pipetten og smid pipettespidsen ud.

84 Pipetter  800 μL "priming mix" til flowcellen via. "priming port" på følgende måde:

84.1 Undgå at introducere luftbobler ved at pipettere en lille dråbe på flowcellen ved side af "priming port" for efterfølgende at "skubbe" pipettespidsen sammen med dråben hen i "priming port".



84.2 Pipetter  800 μL "priming mix" til flowcellen.



Stop lige inden at pipettespidsen er helt tømt, fjern pipetten og smid pipettespidsen ud.

85 Inkubér flowcellen i  00:05:00 stuetemperatur .

5m

86 Imens kan biblioteket gøres klar til sekventering.



Tilsæt følgende til røret med DNA-biblioteket (prøven):

-  37.5 μL

 Sequencing Buffer (SB) Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96

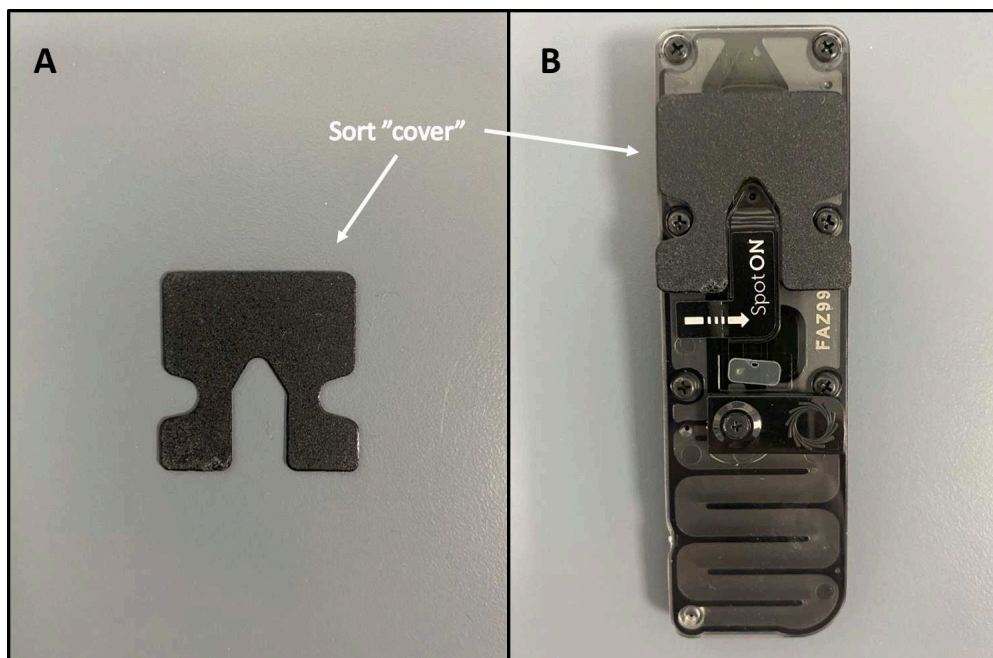
-  25.5 μL

 Library Beads (LIB) Oxford Nanopore Technologies Catalog #SQK-RBK114.96

Mix røret med "beads" lige inden der overføres.

87 Åben forsigtigt "SpotON port cover" (se billede 4) på flowcellen for at åbne "SpotON sample port".

- 88 Pipetter  200 μL "priming mix" til flowcellen via. "**priming port**" (**ikke** "SpotON sample port").
Undgå at introducere luftbobler (se trin 84.1).
- 89 Bland det forberedte bibliotek (prøven) ved forsigtigt at pipettere prøven op og ned med en pipette lige inden det skal overføres til flowcellen.
- 90 Overfør  75 μL prøve til flowcellen via. "**SpotON sample port**" én dråbe ad gangen.
- Hvordan:**
Hold pipetten lodret ~ 1 cm over "SpotON sample port" og lad én dråbe ad gangen falde ned på "bakken" til "SpotON sample port". Sørg for at dråben er trukket ned igennem porten før den næste tilføjes.
- 91 Luk forsigtigt "SpotON port cover" og sikre at den er lukket ordentligt.
- 92 Luk for "priming port".
- 93 Læg herefter det sorte "cover" over "sensor array" på flowcellen (se billede 5) for at beskytte det mod lys.



Billede 5: A: Sort "cover". B: Sort "cover" der dækker "sensor array" på en flowcelle.

94 Placér flowcellen i en ledig position (se billede 6) på

15m

Equipment

GridION	NAME
X5 - GRD-X5B003	TYPE
Oxford Nanopore Tech.	BRAND
GRD-MK1	SKU
https://store.nanoporetech.com/eu/gridion.html	LINK



og lad herefter flowcellen henstå i 00:15:00 inden sekventeringen påbegyndes.



Billede 6: Flowcelle placeret i position X2 på en GridION.

Opsætning på GridION

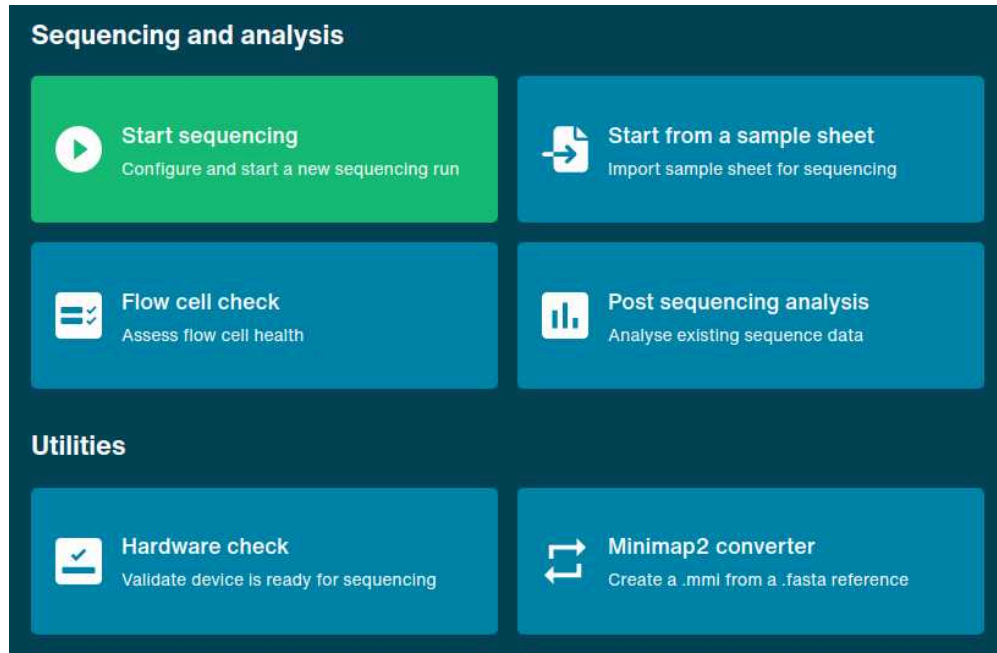
95 Åben software MinkNOW.



96 Vælg *Start* i øverste venstre hjørne.

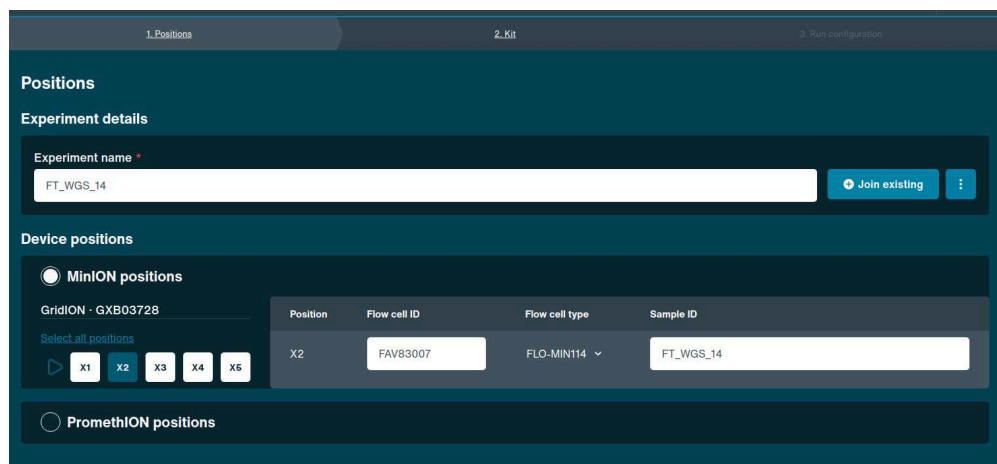


97 Vælg *Start sequencing* (se billede 7).



Billede 7: Opsætning af et run i MinkNOW.

98 Skriv kørsels ID'et (FT_WGS_xx) ind under "Experiment name" og "Sample ID" (se billede 8).



Billede 8: Opsætning af et run i MinkNOW.



99 Under "Device positions" vælg type samt de positioner hvor der er installeret en eller flere flowceller.



100 Tryk på *Continue* (nedre højre hjørne).



101 Markér *DNA*, *PCR-free* og *Yes* øverst på skærmen (se billede 9).



Kit selection			
Sample type: ☒ DNA ☐ RNA ☐ PCR ☐ PCR-free Multiplexing: ☒ Yes ☐ No ☐ Control Reset filters			
Ligation Sequencing Kit SQK-LSK114	☐	Ligation Sequencing Kit SQK-LSK114-3L	☐
Native Barcoding Sequencing Kit 96 SQK-NBD114-96	☐	Multiplex Ligation Sequencing Kit XL SQK-MLK114-96-3L	☐
		Rapid Barcoding Kit 96 SQK-RBK114-96	☐
		Rapid Barcoding Kit 24 SQK-RBK114-24	☐
		Native Barcoding Sequencing Kit 24 SQK-NBD114-24	☐

Billede 9: Opsætning af et run i MinKNOW.

102 Vælg herefter *Rapid Barcoding Kit 96*.



103 Tryk på *Continue* (nedre højre hjørne).



104 Under "Basecalling" (se billede 10), tryk på det grå ikon til højre og vælg *Super-accurate basecalling* i drop-down menuen under "Basecalling model".



Run configuration

Load configuration

Experiment name

Sample ID

Flow cell type

Sequencing kit

FT_WGS_14

FT_WGS_14

FLO-MIN114

Rapid Barcoding Kit 96 (SQK-RBK114-96)

Sequencing and analysis

Basecalling

Modified bases

Duplex

Model

Off

Off

Super-accurate basecalling

Barcoding

Trim

Selected barcodes

On

All

Alignment

Adaptive sampling

Advanced sequencing options

Billede 10: Opsætning af et run i MinKNOW.

105 Under "Barcoding", tryk på det grå ikon til højre og vælg *Trim barcodes* til.



106 Under "File output options" (se billede 11), tryk på det grå ikon til højre og vælg *FAST5* under "Raw reads output".



The screenshot shows the MinKNOW configuration interface. It has a dark blue background with white text. The interface is divided into three main sections: 'Data targets', 'Output', and 'Filtering'. Each section has a title, a list of settings, and a pencil icon for editing. The 'Data targets' section has a 'Conditions' setting with the value 'Stop run when sequencing reaches 72 hours'. The 'Output' section has 'File output options' with a 'File location' of '/data/' and a progress bar showing '2 TB used - 1.2 TB free'. It also lists 'Data format' as 'FASTQ', 'Output frequency' as 'Every 10 minutes', 'FASTQ compression' as 'On', 'Barcode splitting' as 'On', and 'Raw reads' as 'FAST5'. The 'Filtering' section has a toggle switch turned on, and lists 'Min read length' as '200 b' and 'Min Q score' as '12'.

Section	Setting	Value
Data targets	Conditions	Stop run when sequencing reaches 72 hours
	Run limit	
Output	File output options	
	File location	/data/
		2 TB used - 1.2 TB free
	Data format	FASTQ
	Output frequency	Every 10 minutes
	FASTQ compression	On
	Barcode splitting	On
Filtering	Raw reads	FAST5
	Filtering	☒
	Min read length	200 b
	Min Q score	12

Billede 11: Opsætning af et run i MinKNOW.

107 Under "Filtering", tryk på det grå ikon til højre og sæt:

- "Min. read length" til at være 200 b
- "Min. Q score" til at være 12



108 Gennemgå at alt er som det skal være.



109 Tryk på *Start* (nedre højre hjørne).



Efter kørslen er sat i gang

110 Tilføj følgende informationer på den første fane *Sample_sheet* i sample sheet arket (FT_WGS_xx):



110.1 Tilføj "**flow_cell_id**" i kolonnen *flow_cell_id* (kolonne M).

110.2 Tilføj "**kit**" **type** i kolonnen *kit* (kolonne N).

- 110.3 Tilføj **"flow_cell_product_code"** i kolonnen *flow_cell_product_code* (kolonne T).
- 110.4 Tilføj **plade ID / MagLEAD dato** i kolonnen *PlateName* (kolonne V).
- 110.5 Tilføj **nanopore barkoder / brøndposition** i kolonnen *WellPositionInDNAPlate* (kolonne W).
- 110.6 Tilføj **dato for hvornår prøverne (nanopore prøver) oprenses** i kolonnen *BatchRunDate* (kolonne Z).
- 110.7 Tilføj **dato for hvornår prøverne/biblioteket sekventeres** i kolonnen *SequenceRunDate* (kolonne AA).

Protocol references

DNA-oprensningen er baseret på protokollen "magLEAD 12gC User Manual" version 1.3 af Precision System Science:

<https://www.pssbio.com/wp-content/uploads/2021/09/12gC-Manual.pdf>

Klargøring af bibliotek og opsætning af sekventering er baseret på protokollen "Rapid sequencing DNA V14 - barcoding (SQK-RBK114.24 or SQK-RBK114.96)" fra Oxford Nanopore Technologies:

https://community.nanoporetech.com/docs/prepare/library_prep_protocols/rapid-sequencing-gdna-barcoding-sqk-rbk114/v/rbk_9176_v114_rev_m_27nov2022?devices=gridion

Acknowledgements

This activity is supported by co-funding from the European Union's EU4Health programme under Grant Agreement Nr 101111879 SSI-Seq and Statens Serum Institut (SSI).