

Procedura sekwencjonowania genomów bakteryjnych przygotowana w ramach projektu PLEpiSeq

dr n. med. Tomasz Wołkowicz



Współfinansowane przez
Unię Europejską

„Towards the National Platform for Genomic Surveillance” – Project 101113409 – PLEpiSeq
współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach EU4H Project Grants oraz Ministerstwa Zdrowia.

Wyrażone poglądy i opinie są jednak wyłącznie poglądami autora (autorów) i niekoniecznie odzwierciedlają przepisy Unii Europejskiej. Unia Europejska ani organ przyznający pomoc nie mogą być za nie pociągnięte do odpowiedzialności.

Spis Treści

Wstęp	2
Technologia sekwencjonowania	2
Izolacja DNA	2
Protokół Illumina	3
1. Tagmentacja genomowego DNA	4
2. Oczyszczanie	4
3. Amplifikacja bibliotek	6
4. Oczyszczanie bibliotek	8
5. Pomiary, pulowanie i przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania	9
Protokół Nanopore	11
1. Tagmentacja i indeksowanie DNA	13
2. Oczyszczanie bibliotek	13
3. Nastawianie sekwencjonowania	14

Wstęp

Technologia sekwencjonowania

W poniższej procedurze skupiono się na 2 najczęściej stosowanych technologiach sekwencjonowania: z zastosowaniem urządzeń marki Illumina oraz sekwencjonowaniu nanoporowemu oferowanemu przez firmę Oxford Nanopore Technologies. Jesteśmy świadomi, że na rynku obecne są także inne platformy sekwencjonowania, takie jak PacBio czy IonTorrent, jednakże urządzenia te nie są powszechnie stosowane i nie są dostępne w laboratoriach NIZP PZH – PIB, stąd protokoły laboratoryjne nie mogły być odpowiednio przetestowane i zoptymalizowane do wykonywania odpowiednich analiz.

Dla celów rutynowego sekwencjonowania na potrzeby nadzoru epidemiologicznego optymalne wydaje się stosowanie wysokowydajnej i wystandaryzowanej technologii sekwencjonowania Illumina. W przypadku sekwencjonowania mniejszych ilości próbek lub sekwencjonowania pod presją czasu (np. sekwencjonowanie „alertowe” związane np. z wystąpieniem potencjalnego ogniska zakażeń) racjonalne wydaje się zastosowanie sekwencjonowania nanoporowego lub niskoprzepustowych wersji sekwencjonowania Illumina.

Izolacja DNA

DNA powinno zawsze być izolowane z czystego szczepu przesianego z pojedynczej kolonii.

Konstrukcja bibliotek do sekwencjonowania pełnogenomowego, niezależnie od stosowanej technologii sekwencjonowania, wymaga uzyskania wysoko oczyszczonego DNA, bez obecności inhibitorów. W przypadku większości protokołów niezbędna jest ilość >50 ng DNA. Precyzyjny pomiar ilości DNA powinien być wykonywany z użyciem fluorymetru i barwników interkalujących do pełnowartościowego, dwuniciowego DNA. Pomiar czystości DNA można przeprowadzić na spektrofotometrze, gdzie stosunek absorpcji A_{260}/A_{280} powinien się mieścić w przedziale 1,8-2.

DNA odpowiedniej czystości i ilości można uzyskać z wykorzystaniem powszechnie dostępnych komercyjnych zestawów do izolacji. W przypadku sekwencjonowania z wykorzystaniem urządzeń Illumina można zastosować zarówno izolację na kolumnkach ze złożem krzemionkowym, jak i zestawy wykorzystujące kulki magnetyczne opłaszczone krzemionką. W przypadku sekwencjonowania nanoporowego, szczególnie z wykorzystaniem Ligation Sequencing Kit, lepszym wyborem jest skorzystanie z zestawów wykorzystujących kulki magnetyczne opłaszczone krzemionką, ze względu na mniejszą fragmentację mechaniczną i w rezultacie możliwość izolacji dłuższych nici DNA.

Protokół Illumina

Poniższy protokół oparty jest o zestaw do konstrukcji bibliotek Illumina DNA Prep. Na rynku dostępnych wiele innych zestawów do konstrukcji bibliotek na platformy Illumina. Wiele z nich zakłada wstępną fragmentację wyizolowanego DNA. Fragmentacja ta może być prowadzona enzymatycznie bądź mechanicznie z zastosowaniem dodatkowych, specjalnych urządzeń. Illumina DNA Prep jest zestawem wykorzystującym tagmentację, czyli fragmentację z użyciem transpozonów, co pozwala w jednym kroku zarówno uzyskać odpowiedniej długości losowe fragmenty DNA, jak i dołączyć do nich odpowiednie adaptory.

Odczynniki do konstrukcji bibliotek zazwyczaj optymalizowane są pod innego rodzaju badania niż sekwencjonowanie mikroorganizmów (takie jak analizy WES czy panele onkologiczne). W przypadku relatywnie niewielkich genomów bakteryjnych, gdzie przed sekwencjonowaniem biblioteki są łączone, możliwe jest ograniczenie stosowanych objętości w celu obniżenia kosztów tego etapu. Należy pamiętać, że w przypadku analiz mikrobiologicznych, to koszt konstrukcji bibliotek stanowi najdroższy element procesu.

Pracochłonny protokół konstrukcji bibliotek Illumina może zostać automatyzowany, co wymaga posiadania dużej automatycznej stacji pipetującej z takimi polami jak: pole grzejne, statyw magnetyczny i wytrząsarka. Alternatywą są urządzenia zoptymalizowane do konstruowania bibliotek Illumina, jednakże takie urządzenia działają w oparciu o gotowe kartridże z odczynnikiem i nie jest możliwa dalsza optymalizacja protokołu lub też wykorzystanie ich do innych badań laboratoryjnych. Optymalizując protokół na automatycznej stacji pipetującej należy zwrócić uwagę na większe objętości martwe, które mogą przekładać się na istotnie większe zapotrzebowanie na odczynniki, a tym samym ich większe straty. W przypadku długich protokołów zawierających etapy podgrzewania i inkubacji należy mieć na uwadze, że procesowane próbki są cały czas otwarte, co przekłada się na zwiększone parowanie, które przy małych objętościach może odgrywać istotne znaczenie uzyskiwanych stężeń reakcyjnych i w efekcie na efektywność procesów.

Poniższy protokół przeznaczony jest dla pipetowania ręcznego, uwzględnia bowiem możliwość precyzyjniejszego pipetowania małych objętości. Jednakże należy mieć na uwadze, że samo ręczne pipetowanie dużej ilości próbek, szczególnie z zastosowaniem pipety wielokanałowej, może być mniej powtarzalne i obarczone większym błędem pipetowania. W związku z powyższym optymalne wydaje się jednoczesne procesowanie do 16 próbek (max 24 próbki), by zmniejszyć prawdopodobieństwo niepowodzeń przy konstrukcji bibliotek.

1. Tagmentacja genomowego DNA

Na tym etapie prowadzona jest tagmentacja DNA, czyli fragmentacja na mniejsze odcinki oraz dołączenie sekwencji adaptorowych.

Odczynnik	Temp. przechowywania	Instrukcja
BLT	2°C do 8°C	Przenieść do temp. pokojowej. Zworteksować, aby dobrze zawiesić kulki magnetyczne. Nie wirować przed pipetowaniem.
TB1	-25°C do -15°C	Przenieść do temp. pokojowej. Zworteksować.

- Przygotować 8 μ l próbki zawierającej docelowo ≈ 50 ng DNA (próbkę dopełnić do 8 μ l wodą).
- Przygotować mieszaninę zawierającą (w przeliczeniu na 1 próbkę z $\approx 10\%$ zapasem):
 - 6 μ l BLT
 - 6 μ l TB1
- Bardzo dobrze zworteksować mieszaninę
- Dodać po 11 μ l mieszaniny do każdej próbki i przepipetować, by dokładnie wymieszać próbki
- Dokładnie zamknąć próbki
- Próbki inkubować przez 15 min w temp 55°C.
W przypadku prowadzenia inkubacji w termobloku należy wybrać opcję „Preheat lid” i ustawić na 100°C, zaś objętość próbki na 25 μ l)

2. Oczyszczanie

Ten krok ma na celu zatrzymanie procesu tagmentacji i oczyszczenie fragmentów DNA. Pocięte fragmenty DNA pozostają związane z kulkami magnetycznymi BLT, co umożliwia usunięcie z mieszaniny pozostałych cząstek DNA nie posiadających przyłączonego adaptera.

Odczynnik	Temp. przechowywania	Instrukcja
TSB	15°C do 30°C	Jeśli widoczne są precypitaty należy odczynnik ogrzać w 37°C do momentu ich rozpuszczenia
TWB	15°C do 30°C	Należy używać w temp. pokojowej

- a) Do każdej próbki dodać 6 µl TSB i przepipetować by dokładnie wymieszać próbkę.
- b) Dokładnie zamknąć próbki
- c) Próbki inkubować przez 15 min w temp 37°C.
W przypadku prowadzenia inkubacji w termobloku należy wybrać opcję „Preheat lid” i ustawić na 100°C, zaś objętość próbki na 30 µl)
- d) **Ustawić płytkę na statywie magnetycznym** i odczekać ok. 3 minuty aż całość kulek zostanie przyciągnięta przez magnes
- e) Usunąć supernatant
- f) **Płukanie (dwukrotne):**
 - Zdjąć płytkę ze statywu magnetycznego. Dodać powoli (w celu uniknięcia pienienia mieszaniny) 60 µl TWB **bezpośrednio na kulki magnetyczne**
 - Przepipetować powoli każdą próbkę aby dokładnie zawiesić kulki magnetyczne
 - **Ustawić płytkę na statywie magnetycznym** i odczekać ok. 3 minuty aż całość kulek zostanie przyciągnięta przez magnes
 - Usunąć supernatant
 - Powtórzyć płukanie jak powyżej
- g) Płytkę delikatnie zdjąć ze statywu magnetycznego. Dodać powoli (w celu uniknięcia pienienia mieszaniny) 50 µl TWB bezpośrednio na kulki magnetyczne
- h) Przepipetować powoli każdą próbkę aby dokładnie zawiesić kulki magnetyczne
- i) **Ustawić płytkę na statywie magnetycznym** i odczekać ok. 3 minuty aż całość kulek zostanie przyciągnięta przez magnes. Pozostawić na statywie do momentu amplifikacji bibliotek.

UWAGA: Przed kolejnym etapem wyjąć do rozmrożenia EPM (rozmrażanie na lodzie) oraz płytkę z indeksami.

3. Amplifikacja bibliotek

Pofragmentowane DNA wraz z adapterami jest w dalszym ciągu związane z kulkami BLT. W tym etapie następuje amplifikacja tych fragmentów z adapterami oraz dodanie na końcu odpowiednich indeksów umożliwiających późniejszą identyfikację próbki. Reakcja prowadzona jest w więc na kulkach BLT, zaś uzyskane produkty znajdują się w supernatancie.

Odczynnik	Temp. przechowywania	Instrukcja
EPM	-25°C do -15°C	Rozmrażać na lodzie. Wymieszać przez odwrócenie probówki. Zwirować.
Płytki z indeksami	-25°C do -15°C	Wyjąć i rozmrażać w temp. pokojowej. Płytkę z indeksami zwirować przed użyciem.

- Przygotować mieszaninę reakcyjną PCR, zawierającą na każdą próbkę:
 - 11 μ l EPM
 - 11 μ l wody jałowej wolnej od nukleaz
- Używając wielokanałowej pipety usunąć supernatant z płytki na statywie magnetycznym (piana/pęcherzyki pozostałe na ściankach nie wpływają niekorzystnie na jakość bibliotek)
- Płytkę delikatnie zdjąć ze statywu magnetycznego
- Dodać 20 μ l mieszaniny reakcyjnej PCR bezpośrednio na kulki magnetyczne do każdego dołka
- Przepipetować dokładnie mieszaninę do momentu aż kulki magnetyczne zostaną dobrze zawieszone (Opcjonalnie: płytkę wytrząsać na wytrząsarce do mikropłytek przy 1600 rpm przez 1 min)
- Zakleić płytkę i zwirować przy 280 x g przez 3 sekundy
- Do próbek dodać po 5 μ l kolejnego wolnego indeksu (UWAGA: zanotować który indeks znakuje którą próbkę)
- Ustawić pipetę na obj. 20 μ l. Przepipetować 10 krotnie (dokładnie mieszaninę) do momentu aż kulki magnetyczne zostaną dobrze zawieszone (Opcjonalnie: zakleić płytkę i wytrząsać na wytrząsarce do mikropłytek przy 1600 rpm przez 1 min)
- Opcjonalnie: płytkę zwirować przy 280 x g przez 30 s.

j) Próbki wstawić do termocyklera

- Pogram:

68°C - 3 min

98°C - 3 min

(x) cykli:

98°C - 45 s

62°C - 30s

68°C - 2 min

68°C - 1 min

Hold na 10°C

Liczba cykli zależy od ilości i jakości użytego DNA. Zazwyczaj ustawia się 5 lub 6 cykli.

Na tym etapie można przerwać procedurę przygotowania bibliotek i przechowywać próbki w temperaturze 2-8°C do 3 dni.

4. Oczyszczanie bibliotek

Na tym etapie produkty amplifikacji (biblioteki) znajdują się w supernatancie. Docelowe fragmenty bibliotek przeznaczone do sekwencjonowania na platformie Illumina powinny być stosunkowo krótkie. Dlatego we wczesnych etapach oczyszczania usuwa się dłuższe cząsteczki DNA (poprzez oczyszczanie z użyciem rozcieńczonych kulek magnetycznych), natomiast dopiero w końcowym etapie właściwe fragmenty bibliotek są wiązane do kulek i następnie płukane.

Odczynnik	Temp. przechowywania	Instrukcja
IPB	2°C do 8°C	Wyjąć odczynnik IPB i ogrzewać w temp. pokojowej przez min. 30 min. Kulki IPB mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej. Przed użyciem należy je bardzo dobrze wymieszać.
RSB	-25°C do -15°C	Wyjąć RSB. Rozmrażać na lodzie. Przed użyciem zworteksować.

- Zwirować płytkę, następnie umieścić ją na statywie magnetycznym i odczekać ok. 5 minut, aż wszystkie kulki zostaną przyciągnięte przez magnes
- Przenieść 25 µl supernatantu do nowych, czystych dołków. **Nie wylewać supernatantu!**
- Dobrze wymieszać kulki IPB
- Przygotować rozcieńczone kulki IPB, mieszając 25 µl wody z 28 µl kulek IPB na każdą próbkę
- Do każdego dołka z supernatantem dodać 45 µl mieszaniny rozcieńczonych kulek
- Wymieszać przez pipetowanie (10 krotne)
- Inkubować 5 min
- Ustawić płytkę na statywie magnetycznym i odczekać ok. 5 minut aż całość kulek zostanie przyciągnięta przez magnes
- W czasie inkubacji zworteksować ponownie bardzo dokładnie IPB i odpipetować po 10 µl IPB do nowych czystych dołków
- Przenieść po 70 µl supernatantu do dołków zawierających 10 µl IPB
- Zdjąć płytkę ze statywu magnetycznego
- Wymieszać przez pipetowanie (10 krotne) próbki
- Inkubować 5 min

- n) Umieścić płytkę na statywie magnetycznym i inkubować przez ok. 5 minut, aż wszystkie kulki zostaną przyciągnięte przez magnes
- o) Ostrożnie usunąć supernatant, nie naruszając peletu kulek magnetycznych
- p) Dodać 120 μ l świeżego 80% etanolu, nanosząc go po przeciwnej ścianie studzienki niż znajduje się pelet kulek
- q) Inkubować ok. 30 sekund
- r) Odciągnąć całość alkoholu
- s) Powtórzyć płukanie 80 % alkoholem (obj. 120 μ l)
- t) Dokładnie odciągnąć resztki alkoholu. Płytkę zostawić do przeschnięcia w celu odparowania resztek alkoholu (do 5 min.)
- u) Płytkę delikatnie zdjąć ze statywu magnetycznego
- v) Osad zawiesić w 22 μ l RSB
- w) Całość wymieszać (można przepipetować)
- x) Inkubować 2 min
- y) Płytkę ustawić na statywie magnetycznym i inkubować (ok. 2 min) aż całość kulek zostanie przyciągnięta przez magnes
- z) Delikatnie przenieść 20 μ l supernatantu do nowej probówki.

Biblioteki mogą być przechowywane do sekwencjonowania krótkoterminowo w lodówce, bądź w zamroźniku (-25°C do -15°C) do 30 dni.

5. Pomiary, pulowanie i przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania

Pomiary ilości DNA prowadzić z użyciem fluorymetru przyjmując za użyteczne do sekwencjonowania próbki, posiadające > 2 ng/ μ l DNA. Pomiary z użyciem TapeStation czy BioAnalyzer'a są wskazane przed producenta, jednakże w kontekście sekwencjonowań mikrobiologicznych wydają się stanowić kosztowny i pracochłonny dodatkowy etap. Jeśli tego typu urządzenie jest na wyposażeniu laboratorium racjonalnym wydaje się weryfikacja tylko losowych próbek, bądź sprawdzanie próbek o niskiej ilości DNA.

Obliczyć stężenie molowe próbek używając poniższego wzoru:

$$\frac{X \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 10^6}{660 \frac{\text{ng}}{\text{mol}} \times \text{średnia wielkość biblioteki (bp)}} = \text{Molarność (nM)}$$

Przyjąć średnią długość biblioteki równą 600 bp (w przypadku innych odczynników od konstrukcji bibliotek może to być inna wartość, która powinna być podana w instrukcji producenta zestawu).

W zależności od posiadanego sekwenatora może być potrzebne rozcieńczenie bibliotek do stężenie 4 nM bądź 2 nM. Do rozcieńczania bibliotek stosujemy bufor RSB.

Rozcieńczone biblioteki, które będą sekwencjonowane w czasie jednej reakcji, należy połączyć w jedną mieszaninę (pulowanie). W przypadku pulowania bibliotek uzyskanych dla różnych gatunków bakterii warto uwzględnić teoretyczne wielkości genomów i pulować biblioteki w odpowiedniej proporcji, by uzyskać w efekcie odpowiednie proporcje ilości danych z sekwencjonowania. Na przykład, łącząc biblioteki uzyskane dla gatunków bakterii, takich jak *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* oraz *Campylobacter sp.* można zastosować proporcję 5,5 µl : 5 µl : 1,7 µl (szacując wielkości genomów wymienionych gatunków odpowiednio na 5,5 Mpz, 5 Mpz i 1,7 Mpz).

Ilość bibliotek, które można połączyć w jednej mieszaninie zależy od posiadanego modelu sekwenatora oraz ilości danych, jakie można uzyskać z danej chemii do sekwencjonowania. Optymalne sekwencjonowanie genomów bakteryjnych zakłada uzyskanie średniego pokrycia genomu na poziomie >50x. W celu oszacowania ilości próbek należy zastosować poniższy wzór:

$$\text{maksymalna ilość próbek} = \frac{\text{output}}{\text{wielkość genomu} * \text{minimalne średnie pokrycie}}$$

Dalsze kroki wykonywać zgodnie z instrukcją producenta posiadanego aparatu i stosowanej chemii do sekwencjonowania.

Protokół Nanopore

Poniższy protokół oparty jest o zestaw do konstrukcji bibliotek Rapid Barcoding Kit V14. Tak jak napisano we wstępie, technologia sekwencjonowania nanoporowego może być funkcjonalnym uzupełnieniem sekwencjonowania rutynowego na sekwenatorach Illumina, szczególnie w sytuacjach sekwencjonowania alertowego. Zastosowanie odczynników Rapid Barcoding Kit V14 pozwala przygotować biblioteki i nastawić sekwencjonowanie < 1 godziny, bez widocznego spadku jakości generowanych odczytów czy wydajności sekwencjonowania. Zestaw ten, we wstępnym etapie konstrukcji bibliotek wykorzystuje opisaną we wcześniejszym protokole reakcję tagmentacji, co pozwoliło skrócić i uprościć całość protokołu. Ponadto, próbki po pierwszym etapie są już zindeksowane, co umożliwia ich połączenie i wspólne oczyszczanie w jednej próbówce. Takie rozwiązanie pozwala znacząco ograniczyć zużycie plastików laboratoryjnych oraz zmniejsza pracochłonność procedury. Ubocznym skutkiem wstępnego etapu tagmentacji jest pewne pofragmentowanie DNA, co kłóci się z ideą długoodczytowego sekwencjonowania nanoporowego. Powstające fragmenty, w dużej mierze długości kilku tysięcy par zasad (kzp) pozwalają na wysokiej jakości złożenia genomów i analizy i są zdecydowanie wystarczające na potrzeby nadzoru epidemiologicznego. Jedyną istotną wadą stosowania zestawu Rapid Barcoding Kit jest fakt pulowania próbek po pierwszym etapie, co może przekładać się na duże różnice w ilości uzyskiwanych danych dla poszczególnych próbek. Stąd też ważna jest precyzja na etapie wstępnej kwantyfikacji ilości DNA używanego do konstrukcji bibliotek.

Inną istotną kwestią podczas stosowania sekwencjonowania nanoporowego jest kwestia wydajności płytki do sekwencjonowania. Dużą zaletą sekwencjonowania nanoporowego jest możliwość wielokrotnego stosowania tej samej płytki. Pozwala to na sekwencjonowanie nawet pojedynczych próbek i kończenie procesu sekwencjonowania w momencie uzyskania odpowiedniej ilości danych do analiz. Po zakończeniu procesu sekwencjonowania płytkę do sekwencjonowania można przepłukać i zachować do ponownego użycia, do sekwencjonowania kolejnych próbek. Istotną wadą jest jednak zmienna ilość danych jaką można uzyskać z różnych płytek do sekwencjonowania, wynikającą ze zmiennej ilości początkowo aktywnych porów na matrycy oraz ich różnej żywotności.

Teoretycznie na matrycy płytki MinION znajduje się 512 kanałów, a w każdym z nich może być maksymalnie 4 pory, co daje łącznie maksymalną liczbę 2048 porów. W praktyce jednak, nowa płytka posiada przeciętnie 1200-1500 aktywnych porów. Jeśli liczba ta jest mniejsza niż 800, producent deklaruje nieodpłatne przesłanie nowej płytki. Niestety liczba aktywnych porów zmniejsza się również w trakcie sekwencjonowania, przy czym tempo tego spadku jest różne dla różnych płytek, a na jego tempo wpływa nie tylko jednostkowa właściwość danej płytki, jak również jakość sekwencjonowanej biblioteki, długość fragmentów czy ilość niezwiązanych

adapterów. W efekcie trudno jednoznacznie oszacować ilość uzyskanych danych, a tym samym np. ilość szczepów, które można maksymalnie sekwencjonować na pojedynczej płycie.



1. Tagmentacja i indeksowanie DNA

Przed rozpoczęciem konstruowania bibliotek zaleca się wyjęcie płytki do sekwencjonowania w celu jej ogrzania i sprawdzenia kondycji matrycy (Flow Cell Check)

Na tym etapie prowadzona jest tagmentacja DNA, czyli fragmentacja na mniejsze odcinki oraz dołączenie sekwencji adaptorowych wraz z indeksami.

- a) Przygotować 10 μ l próbki zawierającej 50ng DNA (uzupełnić do 10 μ l wodą).
- b) Dodać 1 μ l indeksu (barcode)
- c) Wstawić próbki do termobloku lub termocyklera
 - Pogram:
 - 30°C - 2 min
 - 80°C - 2 min
- d) Po inkubacji próbki schłodzić i zwirować.

2. Oczyszczanie bibliotek

Na tym etapie biblioteki są już oznakowane odpowiednimi indeksami oraz posiadają adaptory niezbędne w reakcji sekwencjonowania. Wszystkie etapy mieszania najlepiej wykonywać ręcznie albo przez przepipetowywanie.

- a) Połączyć wszystkie próbki w jednej próbówce 1,5ml. Mieszaninę dobrze wymieszać i zwirować.
- b) Do próbki z próbkami **dodać równą objętość kulek AXP** (kulki muszą być dobrze wymieszane)
- c) **Inkubować** przez **5 min** w temp. pokojowej, delikatnie mieszając przy użyciu Hula-mixera.
- d) **Inkubować 5 min na statywie magnetycznym** do całkowitego wyklarowania roztworu
- e) Przygotować świeży 80% r-r Et-OH
- f) **Odciągnąć supernatant**
- g) **2 x przepłukać kulki 1,5ml 80% etanolu** nie uszkadzając peletu (płukanie prowadzić na statywie magnetycznym)
- h) Dokładnie usunąć etanol

- można lekko zwirować próbki, odstawić na statyw magnetyczny i usunąć resztki alkoholu cienkim tipsem
- i) **Przesuszyć pelet** przez 30 sekund (nie przesuszyć do momentu spękania peletu)
- j) Zdjąć probówkę ze statywu magnetycznego
- k) **Zawiesić pelet w 12µl Elution Buffer (EB)**
- l) **Inkubować 10 min** w temp. 35°C z delikatnym wytrząsaniem
 - Możliwa jest inkubacja w temperaturze pokojowej
- m) **Inkubować na statywie magnetycznym** do całkowitego wyklarowania roztworu
- n) W nowej probówce typu DNA Lo-Bind (najlepiej 0,2ml) przygotować mieszaninę adaptera:
 - 1µl Rapid Adapter (RA)
 - 2,3 µl Adapter Buffer (ADB)
- o) 1 µl przygotowanej mieszaniny adaptera przenieść do nowej probówki (najlepiej 0,2ml)
- p) **Przenieść 11 µl eluatu** do probówki zawierającej 1 µl adaptera
- q) Mieszaninę wymieszać i zwirować
- r) **Inkubować 5 min w temperaturze pokojowej**
- s) Do bibliotek dodać:
 - 37,5 µl Sequencing Buffer (SB)
 - 25,5 µl Library Beads (LIB)

Biblioteki są gotowe do naniesienia na przygotowaną do sekwencjonowania płytkę (patrz punkt 3). Biblioteki nanieść dopiero przed samym rozpoczęciem sekwencjonowania.

3. Nastawianie sekwencjonowania

Poniższe etapy płukania płytki do sekwencjonowania można prowadzić równolegle do końcowych etapów oczyszczania bibliotek.

- a) Ogrzaną do temperatury pokojowej płytkę umieścić w sekwenatorze
- b) Uruchomić program „Flow Cell Check” (czas trwania około 15 min)
- c) Przygotować mieszaninę do płukania. Końcowa objętość 1000 µl jest obliczona na wypłukanie jednej flow-celli.
 - 975 µl Flow Cell Flush
 - 25 µl Flow Cell Tether
- d) Mieszaninę wymieszać i zwirować

- e) Otworzyć pokrywę dołka „Priming Port” i pipetą z nałożonym tipsem na 1000 μ l usunąć powietrze z kanałów kręcąc pokrętką nastawy pipety **do momentu zaciągnięcia do tipsa odrobiny(!) żółtej cieczy** z flow-celli. Nie doprowadzać do opróżnienia płytki z cieczy, szczególnie uważając na stałe zanurzenie w cieczy matrycy flow-celli.
- f) Nanieść poprzez dołek „Priming Port” 800 μ l mieszaniny do płukania płytki do sekwencjonowania uważając, by nie wprowadzić na matrycę pęcherzyków powietrza.
- Pipetę należy trzymać pionowo, by nie zaciągać zbędnego powietrza.
 - Po nabraniu 800 μ l mieszaniny warto zweryfikować, czy na końcu tipsa nie zebrało się powietrze. A takiej sytuacji usunąć powietrze przekręcając nastawę pipety.
 - Pipetowanie cieczy powinno się odbywać poprzez tips 1000 μ l zakotwiczony w dołku „Priming Port”.
- g) Odczekać 5 minut.
- h) Z „Priming Port” odciągnąć pipetą z nałożonym tipsem na 1000 μ l powietrze kręcąc pokrętką nastawy pipety do momentu zaciągnięcia do tipsa odrobiny(!) cieczy.
- i) Otworzyć pokrywę dołka „SpotOn”.
- j) Delikatnie nanieść pozostałe 200 μ l mieszaniny do płukania do dołka „Priming Port” uważając, by nie wprowadzić pęcherzyków powietrza.
- W dołku „SpotOn” będzie pojawiać się ciecz, która grawitacyjnie ma wrócić do na matrycę płytki.
- k) Przepipetować mieszaninę bibliotek i całość nanieść na płytkę do sekwencjonowania poprzez dołek „SpotOn”.
- l) Zamknąć „SpotOn” oraz „Priming Port”.
- m) Uruchomić sekwencjonowanie wprowadzając odpowiednie parametry.
- Warto zmienić ilość odczytów po których generowany jest plik FASTQ, by uzyskać najlepiej 1 plik zawierający wszystkie odczyty.

Przebieg sekwencjonowania można monitorować w czasie rzeczywistym. Sekwencjonowanie można zakończyć w momencie, kiedy najstarsza z sekwencjonowanych próbek osiągnie satysfakcjonujący poziom ilości danych. Na przykład, w przypadku sekwencjonowania *Escherichia coli*, przyjmując teoretyczną wielkość genomu za 5 Mbp (milionów par zasad) ilość danych dla danej próbki powinna przekroczyć 250 Mbp (licząc wyłącznie odczyty „pass”).