

16S Barcoding Kit (SQK-RAB204)

Caracteristicile kitului de barcodare 16S

Acest kit este recomandat pentru utilizatorii care:

- doresc să multiplexeze probele pentru a reduce prețul pe probă
- doresc să facă secvențierea 16S
- sunt interesați de identificarea bacteriilor la nivel de gen

Introducere în kitul de codare de bare 16S

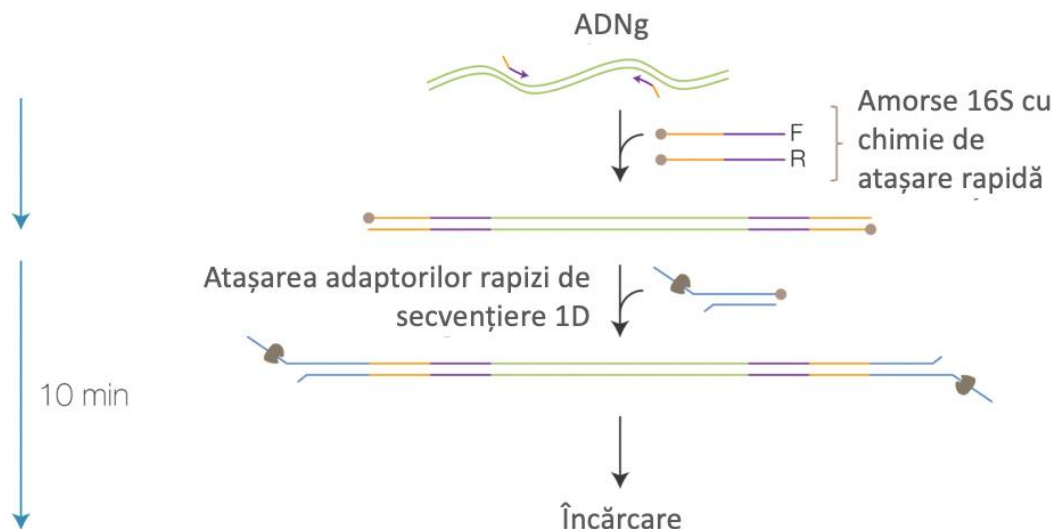
Acest protocol descrie modul de realizare a barcodării rapide a ampliconilor 16S cu ajutorul kitului de SQK-RAB204. Datorită prezenței atât a unor regiuni foarte conservate (adevate pentru primeri universali și analiza filogenetică), cât și a unor regiuni foarte variate (diferite de la o specie la alta), gena 16S ARNr este adesea utilizată pentru identificarea bacteriilor.

Kitul 16S Barcoding Kit permite secvențierea rapidă a 16S pentru identificarea organismelor. Prin restrângerea la o anumită regiune de interes, utilizatorul poate vedea toate organismele din probă fără a secvenția regiuni inutile (pentru identificarea bacteriana) ale genomului, ceea ce face ca testul să fie mai rapid și mai economic. Există 12 coduri de bare unice, ceea ce permite utilizatorului să reunească până la 12 probe diferite într-un singur experiment de secvențiere.

Etapele fluxului de secvențiere:

1. Extragerea ADN bacterian (+ verificare lungime, cantitate și puritate).
2. Verificarea de calitate efectuată în timpul derulării protocolului e esențială pentru succesul experimentului:
 - Verificarea kitului de secvențiere, a echipamentului și a reactivilor de la terți
 - Descărcarea / instalarea software-ului pentru achiziția și analiza datelor
 - Verificarea celulei de flux pentru a vă asigura că are suficienți pori pentru o bună desfășurare a secvențierii
3. Pregătirea librăriiilor cuprinde:
 - Amplificarea gena 16S utilizând codurile de bare furnizate în kit.
 - Curățarea/purificarea librăriiilor cu ajutorul unor bile magnetice
 - Atașarea adaptorilor de secvențiere rapidă
4. Amorsarea (priming-ul) celulei de secvențiere și încărcarea ei cu librăria de ADN
5. Secvențierea propriu-zisă și analiza de date:
 - Rularea secvențierii utilizând software-ul MinKNOW, care va colecta datele brute de la dispozitiv și le va converti în citiri de bază ("basecalled reads")

- Utilizarea software-ului EPI2ME și selectarea fluxului de lucru FASTQ 16S.



Acest protocol trebuie utilizat numai în combinație cu:

- Kitul de barcodare *16S Barcoding Kit* (SQK-RAB204).
- Celule de secvențiere FLO-MIN106 (nu se recomandă FLO-MIN107)
- Fluxul de lucru FASTQ 16S în EPI2ME
- Kitul de spălare a celulelor în flux (EXP-WSH004)

Echipamente și consumabile

Materiale

- 10 ng ADN genomic cu greutate moleculară mare
- Kitul de barcodare *16S Barcoding Kit* (SQK-RAB204).
- Kit de amorsare a celulelor de secvențiere (EXP-FLP002)

Consumabile

- Tuburi Eppendorf DNA LoBind de 1,5 ml
- Tuburi PCR cu pereți subțiri de 0,2 ml
- Apă fără nucleaze (de exemplu, ThermoFisher, nr. De catalog AM9937)
- Bile magnetice: Agencourt AMPure XP beads
- Master Mixul: LongAmp Taq 2X Master Mix (de exemplu, NEB M0287)
- Etanol 70% proaspăt preparat în apă fără nucleaze
- 10 mM Tris-HCl pH 8,0 cu 50 mM NaCl

Echipament

- Cronometru
- Termociclu
- Pipeta și vârful P1000
- Pipeta și vârful P200

- Pipeta și vârful P100
- Pipeta și vârful P20
- Pipeta și vârful P10
- Pipeta și vârful P2

Echipament opțional

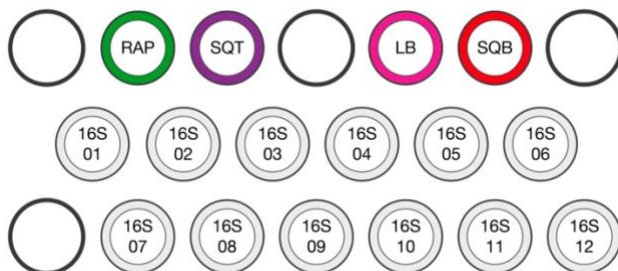
- Bioanalizor Agilent (sau echivalent)
- Fluorometru Qubit (sau echivalent pentru verificarea QC)
- Centrifugă Eppendorf 5424 (sau echivalent).

!!Pentru acest protocol, este nevoie de 10 ng de ADN genomic cu greutate moleculară mare.

Controlul calității și cantității ADN bacterian

Este important ca ADN folosit să îndeplinească cerințele de cantitate și calitate. Folosirea unei cantități scăzute/insuficiente (sau prea mari) de ADN sau a unui ADN de calitate proastă (de exemplu, ADN foarte fragmentat sau care conține ARN sau contaminanți chimici) poate afecta pregătirea librăriei și calitatea secvențierii.

Conținutul kitului de codare de bare 16S



RAP: adaptorii 16S	16S 05: Amorsa 16S cu cod de bare 05 (16S barcode primer 05)
SQT: Tether de secvențiere (Sequencing tether)	16S 06: Amorsa 16S cu cod de bare 06 (16S barcode primer 06)
LB: Bile de încărcare (loading beads)	16S 07: Amorsa 16S cu cod de bare 07 (16S barcode primer 07)
SQB: Soluție Tampon de secvențiere (Sequencing buffer)	16S 08: Amorsa 16S cu cod de bare 08 (16S barcode primer 08)
16S 01: Amorsa 16S cu cod de bare 01 (16S barcode primer 01)	16S 09: Amorsa 16S cu cod de bare 09 (16S barcode primer 09)
16S 02: Amorsa 16S cu cod de bare 02 (16S barcode primer 02)	16S 10: Amorsa 16S cu cod de bare 10 (16S barcode primer 10)
16S 03: Amorsa 16S cu cod de bare 03 (16S barcode primer 03)	16S 11: Amorsa 16S cu cod de bare 11 (16S barcode primer 11)
16S 04: Amorsa 16S cu cod de bare 04 (16S barcode primer 04)	16S 12: Amorsa 16S cu cod de bare 12 (16S barcode primer 12)

Continut	Descriere	Nr. de tuburi
RAP (capac verde)	Adaptori rapizi	1
SQT (capac violet)	Conține adaptori cu proteina motor încărcată	1

LB (capac roz)	Bile de încărcare (loading beads)	1
SQB (capac roșu)	Soluție Tampon de secvențiere (Sequencing buffer)	1
16S 01-12 (capace albe)	Amorsa 16S cu cod de bare (16S barcode primer) 10 uM	12

Tubul SQT NU va fi utilizat în acest protocol. Acesta este furnizat în kit pentru o potențială compatibilitate viitoare a produsului.

Conținutul kitului de amorsare a celulelor de secvențiere (EXP-FLP002)



FLB: Soluție tampon de spălare

FLT: Soluție tether de spălare

Cerințe informatice și software

Cu excepția cazului în care folosiți un dispozitiv MinIT, secvențierea pe un MinION Mk1B necesită un computer sau un laptop de înaltă performanță pentru a ține pasul cu rata de achiziție a datelor.

Software pentru secvențierea cu nanopore

- **MinKNOW**

Software-ul MinKNOW controlează dispozitivul de secvențiere cu nanopori, colectează datele de secvențiere în timp real și le procesează în basecalls. Veți utiliza MinKNOW pentru fiecare experiment de secvențiere. MinKNOW poate, de asemenea, să de-multiplexeze citirile în funcție de codul de bare și să facă basecall/demultiplexare a datelor după finalizarea unui ciclu de secvențiere. Pentru instrucțiuni privind modul de funcționare a software-ului MinKNOW, consultați secțiunea relevantă din protocolul MinKNOW.

- **EPI2ME (opțional)**

Platforma EPI2ME, bazată pe cloud, efectuează analize suplimentare ale datelor de bază, de exemplu alinierea la genomul Lambda, coduri de bare sau clasificarea taxonomică. Veți utiliza platforma EPI2ME numai dacă doriți o analiză suplimentară a datelor dumneavoastră după basecalling. Pentru instrucțiuni privind modul de creare a unui cont EPI2ME și de instalare a platformei EPI2ME, consultați Protocolul EPI2ME.

- **Guppy (opțional)**

Software-ul de linie de comandă Guppy poate fi utilizat pentru basecalling și demultiplexarea citirilor în funcție de codul de bare, în loc de MinKNOW. Îl puteți utiliza dacă doriți să reanalizați

date vechi sau să integrați basecalling în conducta dvs. de analiză. Dacă doriți să utilizați software-ul Guppy, vă rugăm să consultați protocolul Guppy.

VERIFICAREA CELULEI DE SECVENȚIERE

Este recomandat să se verifice numărul de pori din celula de secvențiere înainte de a începe un nou experiment. Acest lucru ar trebui făcut în termen de trei luni de la achiziționare pentru celulele MinION/GridION/PromethION sau în termen de patru săptămâni de la achiziționare pentru celulele Flongle.

! Oxford Nanopore Technologies va înlocui orice celulă de secvențiere cu un număr de pori mai mic decât cel din tabelul de mai jos, atunci când rezultatul este raportat în termen de două zile de la efectuarea verificării celulei de curgere și când au fost respectate recomandările de depozitare. Pentru a efectua verificarea celulei de flux, instrucțiunile se regăsesc în documentul Flow Cell Check (Verificarea celulei de flux).

Celula de secvențiere	Numărul minim de pori activi acoperiți de garanție
Celula Flongle	50
Celula MinION/GridION	800
Celula PromethION	5000

PREGĂTIREA LIBRĂRIILOR

Materiale

- 10 ng de ADN genomic cu greutate moleculară mare
- 16S Barcodes (16S BC, 10 μ M)
- Adaptor rapid (RAP)
- Apă fără nucleaze (de exemplu, ThermoFisher, nr. de cat. AM9937)
- Master Mix: LongAmp Taq 2X Master Mix (de exemplu, NEB M0287)

Consumabile

- Tuburi Eppendorf DNA LoBind de 1,5 ml
- Bile magnetice: Agencourt AMPure XP beads
- Etanol 70% proaspăt preparat în apă fără nucleaze
- 10 mM Tris-HCl pH 8,0 cu 50 mM NaCl
- Tuburi PCR cu pereți subțiri de 0,2 ml

Echipamente

- Termociclu
- Mixer Hula (mixer cu rotație ușoară)
- Separator magnetic, potrivit pentru tuburi Eppendorf de 1,5 ml

- Recipient cu gheață.

Etape în prepararea librărilor

1. Se decongelează codurile de bare 16S la temperatura camerei, se amestecă (prin pipetare în sus și în jos) și se centrifughează scurt. Până când vor fi folosite, codurile de bare vor fi păstrate pe gheață.
2. Se pregătește soluția de ADN (de concentrație corespunzătoare) în apă fără nucleaze.
 - Se transferă 10 ng de ADN genomic într-un tub de ADN LoBind.
 - Se ajustează volumul la 10 μ l cu apă fără nuclează
 - Se amestecă bine (prin răsturnarea tubului), pentru a evita ruperea ADN
 - Se centrifughează scurt.
3. Într-un tub PCR cu pereți subțiri de 0,2 ml, se amestecă următoarele:

Reactiv	Volum (uL)
Apă fără nucleaze	14
AND (10 ng)	10
16S Barcode de 10 uM	1
LongAmp Taq 2X Master Mix	25
TOTAL	50

Observație! Dacă calitatea de material de intrare este alterată, este posibil să fie necesară ajustarea numărului de cicluri PCR pentru a obține același randament.

4. Se amestecă ușor (prin răsturnarea tubului) și se centrifughează.
5. Se realizează amplificarea folosind următoarele condiții:

Etapa ciclu	Temperatura	Timp	Numar de cicluri
Denaturare inițială	95°C	1 min	1
Denaturare	95°C	20 sec	25
Hibridizare amorse primeri	55°C	30 sec	25
Extensie	65°C	2 min	25
Extensie finala	65°C	5 min	1
Așteptare	4°C	∞	

6. Se transferă proba într-un tub Eppendorf DNA LoBind curat, de 1,5 ml.
7. Se resuspendă bilele magnetice, Agencourt AMPure XP beads, prin vortexare.

8. Se adăugă 30 μ l de bile magnetice Agencourt AMPure XP beads (resuspendate în prealabil) în reacție și se amestecă prin pipetare.
9. Se incubează pe un mixer Hula (mixer rotativ) timp de 5 minute la temperatura camerei.
10. Se prepară 500 μ l de etanol proaspăt 70% etanol în apă fără nucleaze.
11. Se centrifughează ușor proba pentru a aduce întreg conținutul în partea inferioară a tubului și se pune pe un suport magnetic. Se menține tubul pe suportul respectiv și se aspira / pipetează supernatantul, care va fi aruncat.
12. Se păstrează tubul pe magnet și se spală bilele magnetice cu 200 μ l de etanol 70% proaspăt preparat, fără a tulbura sedimentul. Se va îndepărta etanolul cu ajutorul unei pipete și se arunca.
13. Se repetă pasul anterior.
14. Se centrifughează scurt pentru a aduce conținutul în partea inferioară a tubului și se pune tubul înapoi pe magnet. Se îndepărtează cu pipeta orice etanol rezidual. Se lasă să se usuce timp de ~30 de secunde, fără însă a usca sedimentul până la punctul de fisurare.
15. Se îndepărtează tubul de pe suportul magnetic și se resuspendă sedimentul în 10 μ l de 10mM Tris-HCl pH 8.0 cu 50mM NaCl. Se incubează timp de 2 minute la temperatura camerei.
16. Se pune tubul pe un suport magnetic până când se obține un supernatant incolor.
17. Se îndepărtează și se păstrează 10 μ l eluat (supernatant) într-un tub Eppendorf DNA LoBind de 1,5 ml.
 - Îndepărtați și păstrați eluatul care conține ADN într-un tub nou Eppendorf DNA LoBind de 1,5 ml
 - Bilele magnetic/sedimentul pot fi aruncate.
 - Se cuantifică 1 μ l de probă eluată cu ajutorul unui fluorometru Qubit.
18. Se pun în comun toate librăriile barcodate în raportul dorit, cu un total de 50-100 fmoli în 10 μ l de 10mM Tris-HCl pH8.0 cu 50mM NaCl. Pentru ampliconii 16S de ~1500 bp, 50-100 fmoli echivalează cu ~50-100 ng.
19. Adăugați 1 μ l de RAP la librăria de ADN barcodată.
20. Se amestecă ușor (prin răsturnarea tubului) și se centrifughează scurt pentru a aduce conținutul în partea inferioară a tubului.
21. Se incubează timp de 5 minute la temperatura camerei.

Librăria pregătită este utilizată pentru a fi încărcată în celula de flux MinION.
Păstrați librăria pe gheață până când este gata de încărcare!

Amorsarea și încărcarea celulei de secvențiere

~10 minute

Materiale

- Kit de amorsare a celulelor de secvențiere (EXP-FLP002)
- Soluție tampon de secvențiere – sequencing buffer- SQB
- Bile de încărcare – loading beads - LB

Consumabile

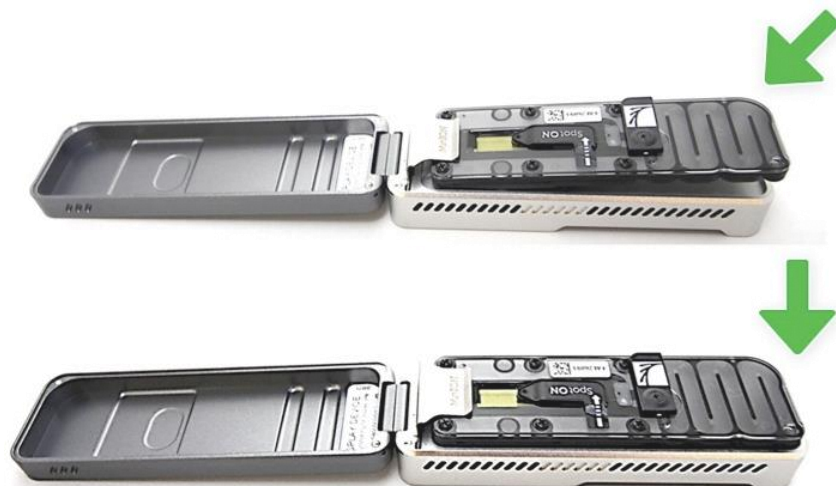
- Tuburi Eppendorf DNA LoBind de 1,5 ml
- Apă fără nucleaze (de exemplu, ThermoFisher, nr. De catalog AM9937)

Echipament

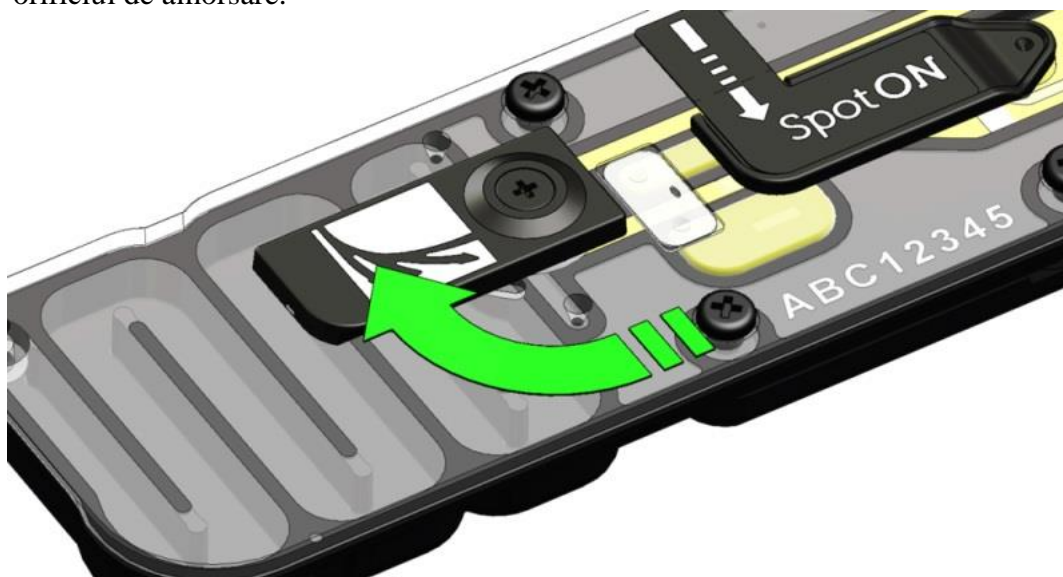
- MinION Mk1B/C
- Celula de secvențiere SpotON
- Pipeta și vârful P1000
- Pipeta și vârful P200
- Pipeta și vârful P100
- Pipeta și vârful P20
- Pipeta și vârful P10
- Pipeta și vârful P2

Tubul SQT NU va fi utilizat în acest protocol. Acesta este furnizat în kit pentru o potențială compatibilitate viitoare a produsului.

1. Se dezgheța tamponul de secvențiere (SQB), bilele de încărcare (LB), Flush Tether (FLT) și un tub de soluție tampon de spălare (FB) la temperatura camerei.
2. Se amesteca tuburile de Sequencing Buffer (SQB), Flush Tether (FLT) și Flush Buffer (FB) prin vortexare și centrifugare la temperatura camerei.
3. Se deschide capacul MinION Mk1B și glisați celula de curgere sub clemă. Apăsați ferm pe celula de debit pentru a asigura un contact termic și electric corect.



4. Se glisează capul orificiului de amorsare în sensul acelor de ceasornic pentru a deschide orificiul de amorsare.



Cum se amorsează și se încarcă celula de secvențiere în portul SpotON

Librăria se încarcă picătură cu picătură fără introducerea fermă a vârfului de pipetă în port. Aveți grijă să evitați introducerea de aer în timpul pipetării!

Observație! Aveți grijă când trageți înapoi soluția tampon din celula de flux. Nu scoateți mai mult de 20-30 μ l și asigurați-vă că matricea de pori este imersată/acoperită în permanență de tampon. Introducerea de bule de aer în matrice poate deteriora ireversibil porii.

5. După ce ați deschis portul de amorsare, verificați dacă există o mică bulă de aer sub capac.
 - Trageți înapoi un volum mic pentru a elimina eventualele bule (câțiva μ l):
 - Reglați o pipetă P1000 la 200 μ l
 - Introduceți vârful în portul de amorsare

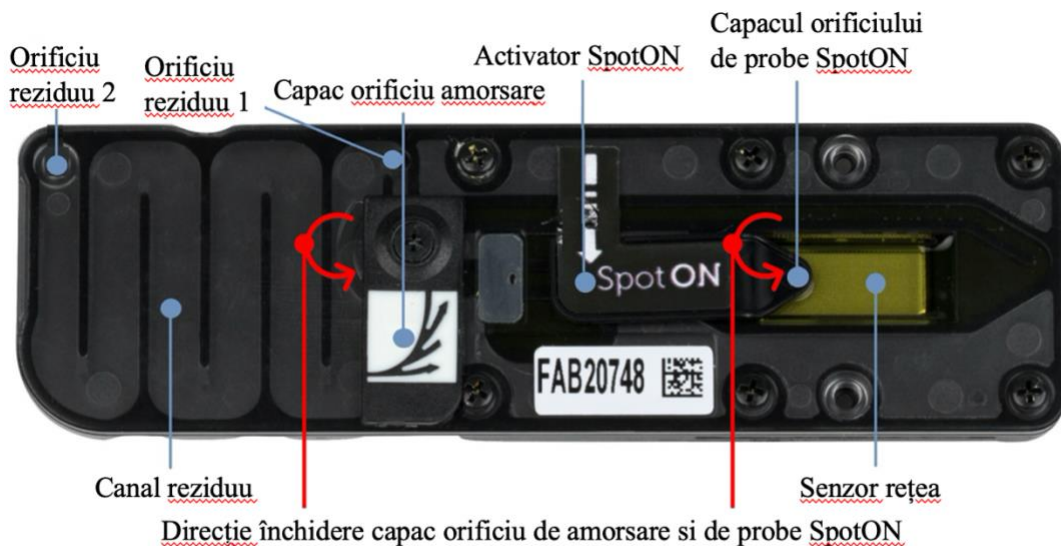
- Rotiți până când cadranul indică 220-230 μ l sau până când puteți vedea un mic volum de tampon care intră în vârful pipetei
Verificați vizual dacă există un continuu de tampon între portul de amorsare și matricea de senzori.
6. Pentru a pregăti amestecul de amorsare a celulei de flux, adăugați 30 μ l de Flush Tether (FLT) decongelat și amestecat direct în tubul de Flush Buffer (FB) decongelat, amestecat și omogenizat prin vortexare la temperatura camerei.
 7. Se încarcă 800 μ l din amestecul de amorsare în celula de secvențiere prin portul de amorsare, evitând introducerea bulelor de aer. Așteptați timp de 5 minute. În acest timp, pregătiți librăria pentru încărcare, urmând pașii de mai jos.
 8. Amestecați energic conținutul tuburilor cu bile de încărcare (LB) prin vortexare.

Observație! Tubul cu bile de încărcare (LB) este o suspensie care se depune foarte repede. Este esențial ca acestea să fie amestecate imediat înainte de utilizare.

9. Într-un tub nou, pregătiți librăria pentru încărcare după cum urmează:

Reactiv	Volum (uL)
Soluție tampon de secvențiere (SQB)	34
Bile de încărcare (LB) - amestecate imediat înainte de folosire	25.5
Apă fără nucleaze	4.5
Librăria de ADN	11
TOTAL	75

10. Finalizați amorsarea celulei de flux:
 - Ridicați ușor capacul portului SpotON pentru a face accesibil orificiul pentru încărcat proba SpotON.
 - Încărcați 200 μ l din amestecul de amorsare în celula de flux prin portul de amorsare (nu prin portul de proba SpotON!), evitând introducerea de bule de aer.
11. Amestecați cu grijă librăria pregătită prin pipetare în sus și în jos chiar înainte de încărcare.
12. Adăugați, picătură cu picătură, 75 μ l de probă în celula de flux prin portul de probă SpotON. Asigurați-vă că fiecare picătură curge în port înainte de a adăuga următoarea.
13. Închideți ușor capacul portului de probe SpotON, asigurându-vă că bontul intră în portul SpotON, închideți portul de amorsare și capacul MinION Mk1B/C.



Ambele porturi sunt prezentate în poziție închisă

Achiziționarea datelor și citirilor de baze/baza (basecalling)

Cum să începeți secvențierea

Controlul dispozitivului de secvențiere, achiziția de date și basecalling în timp real sunt efectuate de software-ul MinKNOW. Se presupune că ați instalat deja MinKNOW pe computerul dumneavoastră sau că utilizați dispozitivul MinIT pentru achiziția de date și basecalling. Există trei opțiuni pentru modul de realizare a secvențierii:

1. Achiziționarea datelor și basecalling în timp real utilizând MinKNOW pe un computer. Urmăți instrucțiunile din protocolul MinKNOW începând de la secțiunea "Starting a sequencing run" până la sfârșitul secțiunii "Completing a MinKNOW run".
2. Achiziționarea datelor și basecalling în timp real cu ajutorul dispozitivului MinION Mk1C. Urmăți instrucțiunile din protocolul MinION Mk1C.
3. Achiziționarea datelor și basecalling în timp real cu ajutorul dispozitivului MinIT. Urmăți instrucțiunile din protocolul MinIT.
4. Achiziționarea de date utilizând MinKNOW pe un computer și basecalling la un moment ulterior utilizând Guppy. Urmăți instrucțiunile din protocolul MinKNOW începând de la secțiunea "Starting a sequencing run" până la sfârșitul secțiunii "Completing a MinKNOW run". Atunci când setați parametrii experimentului, setați fila Basecalling (Apelare de bază) la OFF (Dezactivat). După finalizarea experimentului de secvențiere, urmați instrucțiunile din protocolul Guppy începând de la secțiunea " Quick Start Guide for Guppy ".

Analiza ulterioara

Analiză ulterioară basecalling. Există mai multe opțiuni pentru analiza ulterioară a datelor de bază:

1. Platforma EPI2ME

Platforma EPI2ME este un serviciu de analiză a datelor bazat pe cloud dezvoltat de Metrichor Ltd., o filială a Oxford Nanopore Technologies. Platforma EPI2ME oferă o serie de fluxuri de lucru pentru analiză, de exemplu pentru identificarea metagenomică, coduri de bare, aliniere și apelarea/identificarea variantelor structurale. Analiza nu necesită echipamente suplimentare sau putere de calcul suplimentară și oferă un raport cu rezultate ușor de interpretat. Pentru instrucțiuni privind modul în care se execută un flux de lucru de analiză în EPI2ME, vă rugăm să urmați instrucțiunile din protocolul EPI2ME, începând cu etapa "Starting an EPI2ME workflow" (Pornirea unui flux de lucru EPI2ME).

2. Tutoriale de bioinformatică

Pentru o analiză mai aprofundată a datelor, Oxford Nanopore Technologies oferă o serie de tutoriale de bioinformatică, care sunt disponibile în secțiunea Bioinformatics resource (Resurse de bioinformatică) din Comunitate. Tutorialele îl ghidează pe utilizator prin instalarea și rularea unor platforme de analiză predefinite, care generează un raport cu rezultate. Tutorialele se adresează biologilor care doresc să analizeze datele fără ajutorul unui bioinformatician dedicat și care sunt familiarizați cu folosirea liniilor de cod.

3. Instrumente de analiză a cercetării

Divizia de cercetare a Oxford Nanopore Technologies a creat o serie de instrumente de analiză, care sunt disponibile în rețeaua Oxford Nanopore GitHub. Instrumentele sunt destinate utilizatorilor avansați și conțin instrucțiuni de instalare și de rulare a software-ului. Ele sunt furnizate ca atare, cu un suport minim.

4. Instrumente de analiză dezvoltate de comunitate

Dacă o metodă de analiză a datelor pentru întrebarea dvs. de cercetare nu este furnizată de niciuna dintre resursele de mai sus, vă rugăm să consultați instrumentele de analiză a datelor dezvoltate de comunitate. Numeroși membri ai Comunității Nanopore și-au dezvoltat propriile instrumente și platforme de analiză a datelor de secvențiere nanopore, majoritatea fiind disponibile pe GitHub. Vă rugăm să aveți în vedere că aceste instrumente nu sunt susținute de Oxford Nanopore Technologies și nu se garantează că sunt compatibile cu cea mai recentă configurație de chimie/software.

Încheierea experimentului

Aveți nevoie de kitul de spălare a celulelor de secvențiere (EXP-WSH004)

1. După finalizarea experimentului de secvențiere, dacă doriți să reutilizați celula de flux, urmați instrucțiunile kitului de spălare și depozitați celula de flux spălată la 2-8°C, SAU

(Protocolul kitului de spălare a celulei de flux este disponibil în comunitatea Nanopore)

2. Urmați procedura de returnare prin spălarea celulei de flux pentru a o trimite înapoi la Oxford Nanopore.

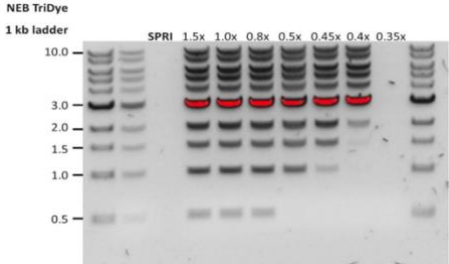
I. Probleme în timpul extracției ADN/ARN și al pregătirii librăriilor

Mai jos aveți o listă a celor mai des întâlnite probleme, cu unele cauze și soluții sugerate. Dacă ați încercat soluțiile sugerate și problema persistă, contactați Asistența tehnică prin e-mail (support@nanoporetech.com) sau prin LiveChat în comunitatea Nanopore.

Calitatea scăzută a probelor

Observații	Posibile cauze	Sugestii
Puritate scăzută a ADN (citirea Nanodrop pentru ADN valoarea $A_{260/280}$ este $<1,8$ și $A_{260/230}$ este $<2,0-2,2$)	Metoda de extracție a ADN nu asigură puritatea necesară	Efectele contaminanților sunt prezentate în secțiunea "Contaminanți - know-how". Vă rugăm să încercați o metodă alternativă de extracție care nu duce la antrenarea contaminanților. Luați în considerare efectuarea unei etape suplimentare de curățare cu bile magnetice SPRI.
Integritate scăzută a ARN (numărul de integritate a ARN $<9,5$ RIN, sau banda de ARNr este prezentată ca o pată pe gel).	ARN s-a degradat în timpul extracției	Încercați o altă metodă de extracție a ARN. Pentru mai multe informații despre RIN, vă rugăm să consultați articolul RNA Integrity Number Know-how.
ARN are o lungime a fragmentului mai mică decât cea așteptată	ARN s-a degradat în timpul extracției	Încercați o altă metodă de extracție a ARN. Pentru mai multe informații despre RIN, vă rugăm să consultați articolul RNA Integrity Number Know-how. Vă recomandăm să lucrați într-un mediu fără RNaze și să păstrați echipamentul de laborator fără RNaze atunci când lucrați cu ARN.

Recuperare scăzută a ADN după curățarea perlelor de AMPure

Observații	Posibile cauze	Sugestii
Recuperare scăzută	Pierderi de ADN datorate unui raport mai mic decât cel preconizat între bilele magnetice AMPure și eșantioane/probe	<p>1. Bilele magnetice AMPure se depun rapid, așa că asigurați-vă că sunt bine resuspendate înainte de a le adăuga la probă.</p> <p>2. Atunci când raportul dintre mărgelile AMPure și probă este mai mic de 0,4:1, fragmente de ADN de orice dimensiune se vor pierde în timpul curățării.</p>
Recuperare scăzută	Fragmentele de ADN sunt mai scurte decât cele așteptate	<p>Cu cât este mai mic raportul dintre bilele magnetice AMPure și eșantion, cu atât este mai strictă selecția împotriva fragmentelor scurte. Vă rugăm să determinați întotdeauna lungimea ADN de intrare pe un gel de agaroză (sau alte metode de electroforeză pe gel) și apoi să calculați cantitatea adecvată de bile magnetice AMPure care trebuie utilizată.</p> 
Recuperare scăzută după pregătirea end-prep	În etapa de spălare s-a folosit etanol <70%.	ADN va fi eluat de pe bile atunci când se utilizează etanol <70%. Asigurați-vă că utilizați procentul corect.

II. Probleme în timpul ciclului de secvențiere

Mai jos aveți o listă a celor mai des întâlnite probleme, cu unele cauze și soluții sugerate. Dacă ați încercat soluțiile sugerate și problema persistă, contactați Asistența tehnică prin e-mail (support@nanoporetech.com) sau prin LiveChat în comunitatea Nanopore.

Mai puțini pori la început de secvențiere decât după verificarea celulelor de flux

Observații	Posibile cauze	Sugestii
MinKNOW a raportat un număr mai mic de pori la începutul secvențierii decât cel raportat de Flow Cell Check	O bulă de aer a fost introdusă în rețeaua de nanopori.	După verificarea celulei de flux, este esențial să se elimine orice bule de aer din apropierea orificiului de amorsare înainte de amorsarea celulei de debit. Dacă nu sunt îndepărtate, bulele de aer se pot deplasa spre rețeaua de nanopori și pot deteriora ireversibil nanoporii care au fost expuși la aer.
MinKNOW a raportat un număr mai mic de pori la începutul secvențierii decât cel raportat de Flow Cell Check	Celula de flux nu este introdusă corect în dispozitiv	Opriiți execuția de secvențiere, scoateți celula de flux din dispozitivul de secvențiere și introduceți-o din nou, verificând dacă celula este bine așezată în dispozitiv și dacă a atins temperatura necesară. Dacă este cazul, încercați o poziție diferită pe dispozitiv (GridION/PromethION).
MinKNOW a raportat un număr mai mic de pori la începutul secvențierii decât cel raportat de Flow Cell Check	Contaminările din librărie au deteriorat sau blocat porii	Numărarea porilor în timpul verificării celulelor de flux se realizează cu ajutorul moleculelor de ADN QC prezente în tamponul de stocare a celulelor de flux. La începutul secvențierii, librăria însăși este utilizată pentru a estima numărul de pori activi. Din acest motiv, se așteaptă o variabilitate de aproximativ 10% a numărului de pori. Un număr de pori semnificativ mai mic raportat la începutul secvențierii se poate datora contaminanților din librărie care au deteriorat membranele sau au blocat porii. Este posibil să fie necesare metode alternative de extracție sau de purificare a ADN/ARN pentru a îmbunătăți puritatea materialului de intrare. Efectele contaminanților sunt prezentate în materialul Contaminants Know-how. Vă rugăm să încercați o metodă alternativă de extracție care să nu aibă ca rezultat antrenarea contaminanților.

Scriptul MinKNOW a eșuat

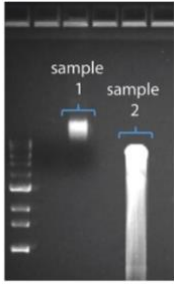
Observații	Posibile cauze	Sugestii
MinKNOW indica „Script failed”		Reporniți calculatorul și apoi reporniți MinKNOW. Dacă problema persistă, vă rugăm să colectați fișierele jurnal/log files MinKNOW și să contactați asistența tehnică.

Gradul de ocupare a porilor < 40%

Observații	Posibile cauze	Sugestii
------------	----------------	----------

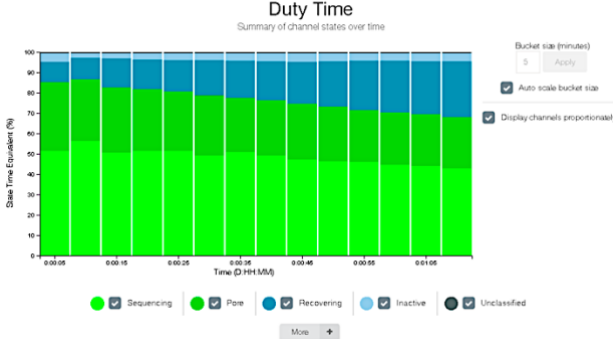
Gradul de ocupare a porilor <40%	Nu a fost încărcată suficientă librărie pe celula de flux	5-50 fmol de bibliotecă de bună calitate pot fi încărcate într-o celulă de flux MinION Mk1B/GridION. Vă rugăm să cuantificați librăria înainte de încărcare și să calculați molii utilizând instrumente precum Promega Biomath Calculator, alegând "dsDNA: μg to pmol"
Gradul de ocupare a porilor aproape de 0	A fost utilizat kitul Ligation Sequencing Kit, iar adaptorii de secvențiere nu s-au legat la ADN.	Asigurați-vă că utilizați NEBNext Quick Ligation Module (E6056) și Oxford Nanopore Technologies Ligation Buffer (LNB, furnizat în kitul SQK-LSK109) la etapa de ligare a adaptorului și că utilizați cantitatea corectă din fiecare reactiv. Se poate pregăti o librărie de control Lambda pentru a testa integritatea reactivilor de la terți.
Gradul de ocupare a porilor aproape de 0	S-a utilizat kitul Ligation Sequencing Kit, iar la etapa de spălare, de după legarea adaptorului, s-a folosit etanol în loc de LFB sau SFB.	Etanolul poate denatura proteina motor de pe adaptoari. Asigurați-vă că s-a utilizat tamponul LFB sau SFB după ligarea adaptorilor de secvențiere.
Gradul de ocupare a porilor aproape de 0	Nici o moleculă ancoră/tether pe celula de debit	Moleculele ancoră/tether se adaugă în timpul amorsării celulei de debit (tub FLT). Asigurați-vă că FLT a fost adăugat la FB înainte de amorsare.

Lungime de citire mai mică decât cea așteptată

Observații	Posibile cauze	Sugestii
Lungime de citire mai mică decât cea așteptată	Fragmentarea nedorită a probei de ADN	<p>Lungimea citită reflectă lungimea fragmentului ADN proba. ADN poate fi fragmentat în timpul extracției și al pregătirii librăriei.</p> <ol style="list-style-type: none"> Vă rugăm să consultați Extraction Methods (Metode de extracție) din comunitatea Nanopore pentru cele mai bune practici de extracție. Vizualizați distribuția lungimii fragmentelor ADN de intrare pe un gel de agaroză înainte de a trece la pregătirea librăriei.  <p>În imaginea de mai sus, proba 1 are o greutate moleculară mare, în timp ce proba 2 a fost fragmentată.</p> <ol style="list-style-type: none"> În timpul pregătirii librăriei, evitați pipetarea și vortexarea atunci când amestecați reactivii. Este suficient să mișcați sau să răsturnați tubul.

Proporție mare de pori de recuperare

Observații	Posibile cauze	Sugestii
------------	----------------	----------

<p>Proporție mare de pori care se recuperează (reprezențați cu albastru închis în panoul de canale și în graficul timpului de funcționare)</p>	<p>Contaminanții sunt prezenți în eșantion</p>	<p>Unii contaminanți pot fi eliminați din pori prin funcția de deblocare încorporată în MinKNOW. Dacă această operațiune reușește, starea porilor se va schimba în "pori unici". Dacă porțiunea de pori care se recuperează (pori indisponibili în vizualizarea extinsă) rămâne mare sau crește:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Se poate efectua o spălare cu nucleaze sau 2. Executați mai multe cicluri de PCR pentru a încerca să diluați orice contaminanți care ar putea cauza probleme.  <p>Graficul timpului de funcționare de mai sus arată o proporție din ce în ce mai mare de pori "care se recuperează" pe parcursul unui experiment de secvențiere.</p>
--	--	---

Proporție mare de pori inactivi

Observații	Posibile cauze	Sugestii
<p>Proporție mare de pori inactivi (reprezențați în albastru deschis în panoul de canale și în graficul timpului de funcționare. Pori sau membranele sunt deteriorate ireversibil)</p>	<p>Au fost introduse bule de aer în celula de flux</p>	<p>Bulele de aer introduse prin amorsarea celulei de flux și încărcarea librăriei pot deteriora ireversibil porii. Urmăriți videoclipul Priming and loading your flow cell (Amorsarea și încărcarea celulei de flux) pentru cele mai bune practici</p>
<p>Proporție mare de pori inactivi</p>	<p>Anumiți compuși co-purificați cu ADN</p>	<p>Compuși cunoscuți, inclusiv polizaharidele, se asociază de obicei cu ADN genomic al plantelor.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Vă rugăm să consultați metoda de extragere a ADN din frunzele plantelor. 2. Curățați cu ajutorul kitului QIAGEN PowerClean Pro. 3. Efectuați o amplificare a întregului genom cu proba originală de ADNg cu ajutorul kitului QIAGEN REPLI-g.
<p>Proporție mare de pori inactivi</p>	<p>Contaminanții sunt prezenți în eșantion</p>	<p>Efectele contaminanților sunt prezentate în secțiunea "Cunoașterea contaminanților". Vă rugăm să încercați o metodă alternativă de extracție care să nu aibă ca rezultat antrenarea contaminanților.</p>

Reducerea vitezei de secvențiere și a q-score mai târziu în timpul secvențierii

Observații	Posibile cauze	Sugestii
Reducerea vitezei de secvențiere și a q-score mai târziu în timpul secvențierii	Consumul rapid de reactivi se observă de obicei atunci când celula este supraîncărcată cu librării (se recomandă ~5-50 fmol de librării).	Adăugați o cantitate mai mare de reactivi în celula de flux urmând instrucțiunile din protocolul MinKNOW. În experimentele viitoare, încărcați cantități mai mici de librării în celula de flux.

Fluctuația temperaturii

Observații	Posibile cauze	Sugestii
Fluctuația temperaturii	Celula de flux a pierdut conexiunea cu dispozitivul	Verificați dacă există un tampon termic care acoperă placa metalică de pe spatele celulei de flux. Reintroduceți celula și apăsați-o pentru a vă asigura că pinii conectorului sunt în contact ferm cu dispozitivul. Dacă problema persistă, contactați Serviciul tehnic.

Nu a reușit să atingă temperatura **țintă**/necesara

Observații	Posibile cauze	Sugestii
MinKNOW afișează Failed to reach target temperature "Nu a reușit să atingă temperatura țintă " (37°C pentru verificarea celulei, 34°C pentru secvențierea pe celule MinION Mk 1B/PromethION și 35°C pentru secvențierea pe Flongle).	Instrumentul a fost amplasat într-o locație care este mai rece decât temperatura normală a camerei sau într-o locație cu ventilație slabă (ceea ce duce la supraîncălzirea celulelor)	MinKNOW are un interval de timp prestabilit pentru ca celula să ajungă la temperatura necesară. Odată depășit intervalul de timp, va apărea un mesaj de eroare și experimentul de secvențiere va continua. Cu toate acestea, secvențierea la o temperatură incorectă poate duce la o scădere a randamentului și la scoruri q mai mici. Vă rugăm să ajustați locația dispozitivului de secvențiere pentru a vă asigura că acesta este plasat la temperatura camerei cu o bună ventilație, apoi reporniți procesul în MinKNOW. Vă rugăm să consultați acest FAQ pentru mai multe informații despre controlul temperaturii MinION Mk 1B.

Guppy - nicio intrare .fast5 nu a fost găsită sau citita de bază/basecalled

Observații	Posibile cauze	Sugestii
Nicio intrare .fast5 nu a fost găsită sau basecalled	<i>input_path</i> nu a punctat la locația fișierului .fast5	Ruta <i>--input_path</i> trebuie să fie urmată de calea completă a fișierelor .fast5 care urmează să fie apelate, iar locația trebuie să fie accesibilă fie local, fie de la distanță prin SSH.
Nicio intrare .fast5 nu a fost găsită sau citita de bază	Fișierele .fast5 se aflau într-un subfișier la locația <i>input_path</i>	Pentru a permite lui Guppy să se aiba acces în subfișiere, adăugați stegulețul <i>--recursive</i> la comanda.

Guppy - nu au fost generate dosare Pass sau Fail după basecalling


Observații	Posibile cauze	Sugestii
------------	----------------	----------

Nu au fost generate dosare Pass sau Fail după basecalling	Indicatorul <code>--qscore_filtering</code> nu a fost inclus în comandă	Indicatorul <code>--qscore_filtering</code> permite filtrarea citirilor în dosarele Pass și Fail din cadrul dosarului de ieșire, pe baza scorului q. Atunci când se efectuează live basecalling în MinKNOW, se utilizează un q-score de 7 (care corespunde unei precizii de basecall de ~80%) pentru a separa citirile în dosare Pass și Fail.
---	---	--

Guppy - procesare neobișnuit de lentă pe un computer cu GPU

Observații	Posibile cauze	Sugestii
Procesare neobișnuit de lentă pe un computer cu GPU	Indicatorul <code>--device</code> nu a fost inclus în comandă	Indicatorul <code>--device</code> specifică un dispozitiv GPU care trebuie utilizat pentru accelerarea apelării de bază/basecalling. Dacă nu este inclus în comandă, nu se va utiliza GPU. GPU sunt numărate de la zero. Un exemplu este <code>--device cuda:0 cuda:1</code> , atunci când se specifică utilizarea a 2 GPU prin comanda Guppy.

MinIT - interfața MinKNOW nu este afișată în browserul web

Observații	Posibile cauze	Sugestii
Interfața MinKNOW nu este afișată în browserul web	Problema de compatibilitate a browserului	Utilizați întotdeauna Google Chrome ca browser pentru a vizualiza MinKNOW. Alternativ, în loc să tastați <code>//mt-xxxxxx</code> (x este un număr) în bara de adrese, tastați adresa IP generică, 10.42.0.1, care identifică routerul Wi-Fi MinIT.
Interfața MinKNOW nu este afișată în browserul web	Wi-Fi-ul MinIT nu a fost utilizat pentru conectarea la computer sau la dispozitivul mobil	Asigurați-vă că computerul sau dispozitivul mobil utilizează Wi-Fi MinIT. Acesta ar trebui să fie afișat ca MT-xxxxxx (x este un număr) pe eticheta inferioară de pe  MinIT: Dezactivați conexiunea Ethernet de pe computer sau de pe dispozitivul mobil, după cum este necesar. Dacă este necesar, contactați departamentul IT pentru a determina dacă Wi-Fi-ul MinIT este blocat (IP generic MinIT: 10.42.0.1). Vă rugăm să introduceți MinIT pe lista albă, după cum este necesar
Interfața MinKNOW nu este afișată în browserul web	MinIT nu se afla în aceeași rețea la care era conectat calculatorul.	Asigurați-vă că prizele de perete utilizate de cablurile Ethernet de la MinIT și de la computer aparțin aceleiași rețele locale.

MinIT - software-ul MinIT nu poate fi actualizat

Observații	Posibile cauze	Sugestii
Software-ul MinIT nu poate fi actualizat	Firewall-ul blochează IP-urile pentru actualizare	Vă rugăm să vă consultați cu departamentul IT, deoarece software-ul MinIT necesită acces la următoarele intervale

		IP AWS. De asemenea, este necesar accesul la următoarele adrese IP: 178.79.175.200 96.126.99.215
Software-ul MinIT nu poate fi actualizat	Dispozitivul are deja cea mai recentă versiune de software	Ocazional, pagina de administrare a software-ului MinIT afișează "actualizări disponibile" chiar și atunci când software-ul este deja actualizat. Vă rugăm să comparați versiunea afișată pe pagina de administrare cu cea de pe pagina Descărcări software. Alternativ, intrați în MinIT prin SSH Client (de exemplu, Bitvise sau Putty, așa cum este descris în protocolul MinIT) pe un computer Windows sau în fereastra terminalului pe un Mac, rulați comanda <code>dpkg -l / grep minit</code> , pentru a afla versiunea software-ului MinIT și <code>sudo apt update</code> dacă este necesară o actualizare. În cazul în care problema persistă, vă rugăm să contactați Serviciul tehnic cu detalii despre eroare.