

Ghid de izolare și caracterizare a bacteriofagilor

Acest ghid oferă un protocol complet și standardizat pentru izolarea, purificarea și caracterizarea genomică a bacteriofagilor din probe de mediu, specifici microorganismelor multirezistente (ex. *Klebsiella pneumoniae*)

Fiecare etapă include detalii privind formularea reactivilor, condițiile de incubare și durata experimentelor. Manualul integrează metode clasice de microbiologie și tehnici moderne utilizate în cercetarea bacteriofagilor.

1. Introducere și scop

Bacteriofagii (fagii) sunt virusuri care infectează selectiv bacteriile, prezentând un tropism determinat de structura receptorilor de la suprafața gazdei bacteriene.

Din perspectiva ciclului biologic, fagii sunt împărțiți în două categorii majore:

- Fagii litici (virulenți) urmează ciclul litic, în care bacteriile infectate sunt rapid lizate. Această categorie este utilizată în terapia fagică.
- Fagii temperați urmează ciclul lizogenic, integrând materialul genetic viral în genomul bacterian gazdă. Aceștia pot transfera gene de rezistență la antibiotice sau factori de virulență între bacterii, ceea ce îi face inadecvați pentru utilizare terapeutică.

Scopul acestui protocol este izolarea exclusivă a fagilor litici, cu potențial de utilizare în terapia fagică și în programele de supraveghere a rezistenței antimicrobiene.

Nivel de biosiguranță recomandat: BSL-2 pentru materiale de mediu/clinice și gazde bacteriene țintă.

2. Izolarea bacteriofagilor

2.1 Materiale necesare

Soluții de bază

- Tampon SM (SM buffer) pentru stocarea fagilor: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 0,01% gelatină.
- Glicerol
- Optional: CaCl₂ și MgSO₄

Medii de cultură

- LB (Luria–Bertani) broth, LB broth dublu concentrat, LB top agar (TA), LB agar.
- Agar bacteriologic: 1,5% pentru stratul de bază, 0,5–0,7% pentru stratul superior (TA).

Echipamente și Consumabile

- Hotă de siguranță biologică (clasa II).
- Incubator cu agitare (30–37 °C, 160–180 rpm).
- Centrifugă cu răcire (până la 10.000 × g).
- Filtre sterile 0,45 μm și 0,22 μm (PES).
- Tuburi sterile (15/50 mL), pipete și vârfuri sterile.
- Placi sterile de microtitrare de 96 godeuri.
- Spectrofotometru (OD₆₀₀).

2.2 Colectarea probelor de apa

Obiectiv: maximizarea recuperării fagilor viabili. Durată: 30–90 min.

Colectare

- Se alege o sursă unde gazda bacteriană este abundentă (ex. apele uzate ale unităților sanitare sau stațiilor de epurare).
- Se colectează 50–500 mL lichid, în recipiente sterile, păstrate la 4 °C.
- Se procesează în mai puțin de 6 ore.
- Pentru stocare temporară: 4 °C ≤ 24 ore; pentru termen lung: –80 °C.

Reducerea încărcăturii bacteriene:

- Se centrifughează proba de apa la 4.500 rpm pentru 10 min la 4 °C pentru a sedimenta particulele grosiere.

- Supernatantul se filtrează ulterior prin filtre sterile PES de 0,45 μm pentru îndepărtarea suplimentară a bacteriilor.

2.3 Îmbogățirea Fagilor

Principiu: incubarea probei de mediu împreună cu tulpina bacteriană țintă pentru a favoriza multiplicarea fagilor specifici. Durată: 18-24 h.

- Se amestecă 15 mL probă filtrată cu 15 mL LB broth dublu concentrat și 10 μL cultură gazdă pregătită dintr-o cultură overnight.
- Se adaugă opțional CaCl_2 (1–5 mM) și MgSO_4 (10 mM) pentru a favoriza adsorbția fagilor.
- Se incubează la 30–37 $^{\circ}\text{C}$, 160–180 rpm, timp de 18-24 h.
- După incubare, se centrifughează (4.500 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) și se filtrează prin filtre PES sterile de 0,22 μm .

2.4 Testul de liză pe strat Dublu agar (Spot assay)

Principiu: detectarea zonelor de liză produse de bacteriofagi. Durată: 18–24 h.

- Se efectuează diluțiile seriate 10^{-1} – 10^{-7} ale filtratului obținut anterior în placi sterile de microtitrare de 96 de godeuri.
- Se toarnă 15 mL LB-agar 1,5% (stratul de bază) în plăci Petri ($\varnothing$ 90 mm).
- Se pregătește agar moale (TA, 0,5–0,7%), menținut la 45 $^{\circ}\text{C}$ pentru a preveni solidificarea.
- Se adaugă 400 μL cultură bacteriană la 4 mL TA topit, se omogenizează și se toarnă uniform peste stratul de bază.
- Se lasă 10 min pentru solidificare.
- Se aplică 10 μL din fiecare diluție pe suprafața celor 2 straturi de agar.
- Se incubează la 30–37 $^{\circ}\text{C}$ timp de 18–24 h.

2.5 Interpretarea plăcilor de liză

Plăcile de liză bine delimitate și transparente sunt, de obicei, asociate cu fagi predominant litici, în timp ce plăcile tulburi pot sugera prezența unor fagi temperați. Confirmarea naturii strict litice necesită caracterizare genomică ulterioară, pentru excluderea genelor asociate cu lizogenia, virulența sau rezistența antimicrobiană.

3. Purificarea

Obiectiv: obținerea unui lizat fagic pur. Durată: 2–4 zile.

- Se amestecă 10 mL LB cu 200 μ L cultură gazdă (provenită din cultura overnight) și se incubează la 37 °C, 160 rpm, până la atingerea unui $OD_{600} = 0,5-0,7$.
- Se selectează plăci de liză izolate, bine delimitate și clare, obținute în pasul anterior prin tehnica stratului dublu de agar.
- Se recoltează materialul cu un vârf de pipetă steril (200 μ L sau 1.000 μ L) și se inoculează în amestecul de LB și cultura gazdă.
- Se incubează la 37 °C, 160 rpm, timp de 4–5 h, pentru multiplicare fagilor.
- Apoi cultura se centrifughează la 4.500 rpm, timp de 10 minute, la 4 °C
- Supernatantul se filtrează printr-un filtru steril de 0,22 μ m pentru obținerea lizatului fagic purificat.
- Din lizatului fagic obținut se realizează diluții seriate $10^{-1}-10^{-7}$, care sunt testate din nou prin metoda stratului dublu de agar pentru verificarea purității.
- Se repetă procedura de purificare de cel puțin 3 ori pentru o purificare completă.

Lizatului fagic final este ideal să atingă o concentrație cuprinsă între 10^8 și 10^{10} PFU/mL, pentru o stabilitate bună, reproductibilitate experimentală și utilizarea ulterioară în experimente de caracterizare, testare a spectrului de gazdă sau stocare pe termen lung.

3.1 Calculul concentrației fagilor PFU/mL (Unități Formatoare de Plăci)

- Se folosește următoarea formulă de calcul:

$$\text{Titrul (PFU/mL)} = \frac{\text{Numarul de placi de liza}}{\text{Factorul de dilutie} \times \text{Volumul insamantat}}$$

- Pentru factorul de diluție, se consideră ultima diluție care prezintă > 30 plăci distincte de liză.
- Volumul inoculat: 10 μ l = 0,01 mL.

3.2 Conservare fagilor

- Pe termen scurt (≤ 3 luni): 4 °C în LB lichid sau tampon SM.
- Pe termen lung: -80 °C în SM buffer + 10% glicerină

4. Caracterizarea genomică a fagilor

4.1 Izolarea ADN-ului fagic

Protocol adaptat după Norgen Phage DNA Isolation Kit, Insert PI46800-9

Principiu:

Izolarea ADN-ului reprezintă etapa esențială în caracterizarea genomică a bacteriofagilor. Kitul Norgen utilizează cromatografie pe coloană (spin-column) și permite purificarea rapidă a ADN-ului total, fără utilizarea fenolului, cloroformului sau a gradientului de CsCl.

Materiale necesare:

Reactiv	Volum / Cantitate
Lysis Buffer B	40 mL
Wash Solution A	38 mL
Elution Buffer B	8 mL
Coloane Spin	50
Tuburi de colectare	50
Tuburi de eluție (1,7 mL)	50

Consumabile și echipamente:

- Microcentrifugă
- Bloc termic sau baie de apă la 65 °C
- Etanol 96–100%
- Izopropanol
- Proteinase K (20 mg/mL) – opțional
- DNase I – recomandat pentru eliminarea ADN-ului bacterian
- Tuburi sterile de 5 mL sau 15 mL

Specificații Kit	
Capacitate de legare a coloanei	50 µg
Volum maxim de încărcare pe coloană	650 µl
Mărimea ADN-ului purificat	Toate dimensiunile
Cantitate maximă de material de pornire	1×10^{10} PFU/mL fagi îmbogățiți
Randament mediu*	3–15 µg ADN din 10^8 – 10^{10} PFU/mL fagi îmbogățiți
Timp pentru 10 purificări	45 minute

Recomandări generale

- Toate soluțiile toate soluțiile utilizate sunt aduse la temperatura camerei înainte de începerea procedurii.
- Wash Solution A se pregătește prin adăugarea a 90 mL etanol 96–100% (volum final 128 mL).

- Se preîncălzește un bloc termic la 65 °C.
- Cantitatea maximă de lizat fagic: 1 mL lizat fagic cu până la 1×10^{10} PFU.
- Concentrația minimă recomandată pentru un randament bun: $\geq 10^8$ PFU/mL.

A. Protocolul de extracție a ADN-ului

- Transferați 1 mL lizat fagic ($>10^8$ PFU/mL) într-un tub de 5–15 mL

Tratament opțional (recomandat) cu DNase I pentru a elimina ADN-ul liber al gazdei:

- a. Adăugați 10 μ L DNase I (≈ 20 unități)
 - b. Incubați 15 min la temperatura camerei
 - c. Urmărit de inactivarea cu DNase I 5 min la 75 °C
- Adăugați 500 μ L Lysis Buffer B, vortexați 10 secunde.

Pas opțional pentru creșterea randamentului: adăugați 4 μ L Proteinase K (20 mg/mL) și incubați la 55°C, 30 minute.

- Incubați la 65 °C timp de 15 minute
- Adăugați 320 μ L izopropanol, vortex scurt pentru omogenizare.

B. Fixarea ADN-ului pe coloana de purificare

- Atașați coloana pe tubul de colectare
- Încărcați până la 650 μ L din lizatul obținut
- Centrifugați 1 min la $6.000 \times g$ (~ 8.000 rpm)
- Aruncați eluatul și reatașați coloana
- Repetați până ce întregul volum de lizate a fost procesat

C. Spălarea coloanei

- Adăugați 400 μ L Wash Solution A, centrifugați 1 min la $6.000 \times g$
- Aruncați fluxul și repetați aceeași procedură de încă două ori (în total 3 spălări)
- Uscați complet matricea coloanei prin centrifugare 2 min la $14.000 \times g$

D. Eluția ADN-ului

- Transferați coloana într-un tub nou de 1,7 mL
- Adăugați 75 μ L Elution Buffer B

- Centrifugați 1 min la $6.000 \times g$

Eluție opțională: o a doua eluție într-un tub separat poate crește randamentul cu 20–30%.

E. Stocarea ADN-ului

- Stocare pe termen scurt: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Stocare pe termen lung: $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.2 Cuantificarea materialului genetic

Protocol adaptat după instrucțiunile producătorului pentru kitul: Qubit™ dsDNA HS

Principiul metodei

Fluorimetrul Qubit 2.0 este un instrument dedicat determinării cantitative a ADN-ului, ARN-ului și proteinelor, bazat pe metode fluorimetrice cu sensibilitate și precizie ridicate. Aparatul utilizează coloranți specifici pentru ADN, ARN și proteine, astfel încât influența potențialilor contaminanți din probă asupra rezultatului de cuantificare este minimizată.

Determinarea acizilor nucleici prin această abordare este semnificativ mai exactă decât spectroscopia UV-VIS, deoarece coloranții fluorescenți se leagă selectiv de biomoleculele de interes. Pentru cuantificarea ADN-ului bacterian extras din probe de fecale sau spută se utilizează kitul Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (interval de concentrație ADN în probă: 0,005–120 ng/μL).

Protocol Qubit

Pentru măsurători se folosesc tuburi de 0,5 mL, transparente și cu pereți subțiri, de tip Qubit™ Assay Tubes sau Axygen PCR-05-C.

- Se vor pregăti două tuburi destinate standardelor (S1 și S2) și câte un tub separat pentru fiecare probă.
- Reactivul de lucru se obține prin diluarea Qubit™ dsDNA HS Reagent în Qubit™ dsDNA HS Buffer în raport 1:200, conform tabelului de mai jos:

Reactiv	Volum per probă
Qubit™ dsDNA HS Reagent	1 μl
Qubit™ dsDNA HS Buffer	199 μl
Total	200 μl

- Reactivul de lucru obținut, standardele și probele se pipetează conform tabelului:

Reactiv	Volum Standarde	Volum Probe
Reactiv de lucru	190 μ l	180-199 μ l
Standard	10 μ l	-
Probă	-	1-20 μ l
Total	200 μ l	200 μ l

- Toate tuburile se vortexează timp de 2–3 secunde.
- Se lasă la incubat la întuneric, la temperatura camerei, pentru aproximativ 2 minute.
- Tuburile cu standarde se introduc în fluorimetru și se efectuează citirile de calibrare.
- Ulterior se introduc tuburile care conțin probele și se realizează măsurătorile pentru acestea

4.3 Secvențierea long-read nanopore

Protocol adaptat după kitul Rapid Barcoding 24 respectiv 96 V14 (SQK-RBK114.24 or SQK-RBK114.96)

A. Pregătirea librăriei de secvențiere

- Se setează termociclul astfel: 30 °C pentru 2 minute, urmate de 80 °C pentru 2 minute.
- Componentele kitului se lasă să ajungă la temperatura camerei, apoi se centrifughează scurt și se amestecă prin pipetare, conform tabelului:

Reactiv	Dezgheață la temperatura camerei	Centrifughează scurt	Amestecă bine prin pipetare sus-jos
Rapid Barcodes (RB01–24) or Rapid Barcode Plate (RB01–96)	Nu este înghețat	✓	✓
Rapid Adapter (RA)	Nu este înghețat	✓	✓
AMPure XP Beads (AXP)	✓	✓	Amestecă prin pipetare/vortexare înainte de utilizare
Elution Buffer (EB)	✓	✓	✓
Adapter Buffer (ADB)	✓	✓	Amestecă prin vortexare

- ADN-ul se pregătește în apă fără nucleaze:

- Transferați 200 ng de ADN genomic per probă în tuburi PCR cu pereți subțiri de 0,2 ml sau într-o placă PCR Eppendorf twin.tec® 96 LoBind.
 - Se ajustează volumul fiecărei probe la 10 μ l cu apă fără nuclează.
 - Amestecați conținutul tuburilor prin pipetare de 10-15 ori
 - Centrifugați scurt
- În tuburile PCR de 0,2 mL sau în placa twin.tec® se adaugă:

Reactiv	Volum per proba
ADN genomic (200 ng, de la pasul anterior)	10 μ l
Rapid Barcodes (RB01–24 or RB01–96, câte unul/probă)	1.5 μ l
Total	11.5 μl

- Se verifică omogenizarea prin pipetare și se centrifughează scurt.
- Se incubă la 30 °C timp de 2 minute, apoi la 80 °C timp de 2 minute, după care tuburile sau placa se așază pe gheață pentru răcire.
- Se centrifughează scurt pentru a colecta conținutul la baza tuburilor.
- Toate probele marcate cu coduri de bare se combină într-un tub Eppendorf DNA LoBind curat de 2 mL, iar volumul total se notează:

Număr probe	1 probă	4 probe	12 probe	24 probe	48 probe	96 probe
Volum total	11.5 μ l	46 μ l	138 μ l	276 μ l	552 μ l	1,104 μ l

- AMPure XP Beads (AXP) se resuspendă prin vortexare.
- Se adaugă un volum egal de AMPure XP la eșantionul total cu cod de bare, amestecând prin agitarea tubului:

Număr probe	1 probă	4 probe	12 probe	24 probe	48 probe	96 probe
Volum AMPure XP Beads (AXP)	11.5 μ l	46 μ l	138 μ l	276 μ l	552 μ l	1,000 μ l

- Tubul se plasează pe un mixer rotator (Hula mixer) pentru 10 minute la temperatura camerei.
- Se pregătesc cel puțin 2 mL etanol 80% proaspăt în apă fără nucleaze.
- Amestecul se centrifughează scurt și se pune pe un stativ magnetic; supernatantul se îndepărtează prin pipetare.
- Fără a disloca peleta, se spală cu 1 mL etanol 80% proaspăt, apoi etanolul se îndepărtează complet.
- Această spălare se repetă o a doua oară.
- Se centrifughează scurt și tubul se așază din nou pe magnet.
- Urmele de etanol se aspiră cu atenție, iar peleta se lasă la uscat ~30 secunde, evitând uscarea excesivă.

- Tubul se îndepărtează de pe magnet și peleta se resuspendă în tampon de eluție (EB), folosind 15 μ L EB pentru 24 coduri de bare:

Număr probe	24 barcodes	48 barcodes	72 barcodes	96 barcodes
Volum Elution Buffer (EB)	15 μ l	30 μ l	45 μ l	60 μ l

- Se lasă la incubat 10 minute la temperatura camerei.
- Tubul se așază din nou pe stativul magnetic până când eluatul devine clar și incolor (cel puțin 1 minut).
- Întregul volum de eluat se transferă într-un tub curat de 1,5 mL Eppendorf DNA LoBind.

Punct de control

- Se cuantifică 1 μ L din eluat cu fluorimetrul Qubit.
- Se transferă 11 μ L din probă într-un alt tub Eppendorf DNA LoBind de 1,5 mL.
- Într-un tub nou de 1,5 mL se diluează adaptorul rapid (RA) astfel:

Reactiv	Volum
Rapid Adapter (RA)	1.5 μ l
Adapter Buffer (ADB)	3.5 μ l
Total	5 μ l

- Din această diluție se adaugă 1 μ L RA la soluția de ADN cu cod de bare.
- Tubul se amestecă delicat prin inversare și se centrifughează scurt.
- Amestecul se incubă 5 minute la temperatura camerei.

SFÂRȘITUL ETAPEI

Librăria obținută este gata pentru încărcarea în celula de flux. Până la încărcare, se păstrează pe gheață.

B. Amorsarea și încărcarea minion flow cell

- Sequencing Buffer (SB), Library Beads (LIB), Flow Cell Tether (FCT) și Flow Cell Flush (FCF) se lasă la temperatura camerei pentru dezghețare, apoi se amestecă prin vortexare, se centrifughează scurt și se păstrează pe gheață.
- Pentru amestecul de amorsare al celulei de flux, cu Bovine Serum Albumin (BSA), se combină următoarele într-un tub de 1,5 mL Eppendorf DNA LoBind și se amestecă prin răsturnare:

Reactiv	Volum
Flow Cell Flush (FCF)	1,170 μ l
Bovine Serum Albumin (BSA) at 50 mg/ml	5 μ l
Flow Cell Tether (FCT)	30 μ l
Total	1,205 μl

- Capacului dispozitivului MinION se deschide, iar celula de flux se glisează sub clemă, asigurându-se prin apăsare fermă contactul termic și electric.
- Portul de amorsare se deschide prin glisarea capacului în sensul acelor de ceasornic.
- După deschiderea portului, se verifică prezența unei mici bule de aer sub capac; aceasta se elimină retrăgând un mic volum:
 - Pipeta P1000 se setează la 200 μ L.
 - Vârful se introduce în orificiul de amorsare.
 - Volumul se ajustează la 220–230 μ L pentru a retrage ~20–30 μ L sau până când un mic volum de tampon intră în vârf.

Notă: se verifică vizual ca matricea de senzori să fie complet acoperită cu soluție.

- Se încarcă 800 μ L din amestecul de amorsare în celula de flux prin portul de amorsare, evitând formarea de bule. Se lasă în repaus 5 minute.
- Între timp, conținutul Library Beads (LIB) se amestecă bine prin pipetare.
- Pentru pregătirea amestecului final de încărcare, într-un tub Eppendorf DNA LoBind de 1,5 mL se adaugă:

Reactiv	Volum
Sequencing Buffer (SB)	37.5 μ l
Library Beads (LIB) omogenizat imediat înainte de utilizare sau Library Solution (LIS), în cazul în care se folosește	25.5 μ l
DNA library	12 μ l
Total	75 μl

- Pentru finalizarea amorsării:
 - Capacului portului SpotON se ridică ușor pentru a avea acces la portul de eșantionare.

- b. Se încarcă 200 μL din amestecul de amorsare în portul de amorsare (nu în SpotON), evitând bulele de aer.
- Librăria se amestecă ușor prin pipetare imediat înainte de încărcare.
 - Cei 75 μL de librărie se aplică treptat, „picătură cu picătură”, în portul SpotON, având grijă ca fiecare picătură să fie absorbită complet înainte de a o adăuga pe următoarea.
 - La final, capacul portului SpotON se închide cu grijă, precum și portul de amorsare.

C. Spălarea minion flow cell

- Tubul cu Wash Mix (WMX) se păstrează pe gheață, fără vortexare.
- Un tub de Wash Diluent (DIL) se lasă la temperatura camerei pentru dezghețare.
- Conținutul DIL se omogenizează prin vortex, se centrifughează scurt și se pune pe gheață.
- Într-un tub Eppendorf DNA LoBind de 1,5 mL se pregătește amestecul de spălare:

Reactiv	Volum
Wash Mix (WMX)	2 μ l
Wash Diluent (DIL)	398 μ l
Total	400 μl

- Amestecul se omogenizează prin pipetare și se păstrează pe gheață, fără vortexare.
- În MinKNOW se oprește sau se pune pe pauză rularea de secvențiere, lăsând celula conectată în dispozitiv.
- Soluția reziduală se îndepărtează astfel:
 - a. Portul de amorsare și capacul SpotON se închid.
 - b. pipetă P1000 se introduce în portul de deșeurii 1 și se aspiră lichidul rezidual.
Notă: fiind ambele porturi închise, lichidul nu trebuie să părăsească zona matricei de senzori.
- Portul de amorsare se redeschide prin glisarea capacului în sensul acelor de ceasornic.
- După deschiderea orificiului de amorsare, verificați dacă există o mică bulă de aer sub capac.
- Trageți înapoi un volum mic pentru a îndepărta orice bule:
 - a. Setați o pipetă P1000 la 200 μ l.
 - b. Introduceți vârful în orificiul de amorsare a celulei.
 - c. Rotiți roata până când cadranul arată 220-230 μ l sau până când puteți vedea un volum mic de tampon/lichid care intră în vârful pipetei.
Nota: Verificați vizual dacă matricea de senzori este acoperită complet cu soluție.
- Încărcați încet 200 μ l de amestec de spălare a celulei (pregătit anterior) în orificiul de amorsare, după cum urmează:
 - a. Folosind o pipetă P1000, luați 200 μ l de amestec de spălare
 - b. Introduceți vârful pipetei în orificiul de amorsare, asigurându-vă că nu există bule în vârf
 - c. Răsuciți încet roata pipetei în jos pentru a încărca celula sau împingeți pistonul în jos foarte încet, lăsând un volum mic de tampon în vârful pipetei.
 - d. Setați un cronometru pentru o incubăție de 5 minute
- Odată ce incubăția de 5 minute este finalizată, încărcați cu grijă restul de 200 μ l din amestecul de spălare a celulei de curgere pregătit în orificiul de amorsare, după cum urmează:
 - a. Folosind o pipetă P1000, luați restul de 200 μ l din amestecul de spălare

- b. Introduceți vârful pipetei în orificiul de amorsare, asigurându-vă că nu există bule în vârf
 - c. Răsuciți încet roata pipetei în jos pentru a încărca celula sau împingeți pistonul în jos foarte încet, lăsând un volum mic de tampon în vârful pipetei.
- Închideți portul de amorsare și așteptați 1 oră.
 - Îndepărtați soluția de deșeuri, după cum urmează:
 - a. Asigurați-vă că portul de amorsare și capacele portului de probă SpotON sunt închise,
 - b. Introduceți o pipetă P1000 în orificiul de deșeuri 1 și scoateți soluția reziduală

D. STOCAREA MINION FLOW CELL PENTRU UTILIZARE ULTERIOARĂ

- Dezghețați un tub de tampon de stocare (S) la temperatura camerei.
 - Se amestecă bine conținutul prin pipetare și se centrifughează scurtă
 - Glisați capacul portului de amorsare a celulei în sensul acelor de ceasornic pentru a se deschide.
 - După deschiderea orificiului de amorsare, verificați dacă există o mică bulă de aer sub capac. Trageți înapoi un volum mic pentru a îndepărta orice bule:
 - a. Setati o pipetă P1000 la 200 µl.
 - b. Introduceți vârful în orificiul de amorsare a celulei
 - c. Rotiți roata până când cadranul arată 220-230 µl sau până când puteți vedea un volum mic de tampon/lichid care intră în vârful pipetei.
- Nota: Verificați vizual dacă matricea de senzori este acoperită complet cu soluție.

- Adăugați încet 500 µl de tampon de stocare (S) prin orificiul de amorsare a celulei.
- Închideți portul de amorsare.
- Îndepărtați tot lichidul din canalul de deșeuri prin orificiul de deșeuri 1 folosind o pipetă P1000.
- Celula de flux se poate stoca la 4–8 °C pentru utilizări ulterioare.

E. RULAREA SECVENȚIERII

MinKNOW gestionează toate dispozitivele de secvențiere Oxford Nanopore, inclusiv achiziția datelor, analiza în timp real, basecalling-ul și transmiterea (streamingul) datelor.

MinION Mk1B și MinION Mk1D

MinION Mk1B și MinION Mk1D sunt dispozitive portabile pentru analiza ADN-ului sau ARN-ului. Modelul Mk1D reprezintă o versiune îmbunătățită a Mk1B, cu o disipare termică mai eficientă, ceea ce crește performanța de secvențiere și permite analize de mare acuratețe într-o

varietate mai mare de condiții. Ambele dispozitive sunt compatibile cu celule de flux MinION, adaptor Flongle și celule Flongle. Ele se conectează la un computer și sunt controlate prin software-ul MinKNOW, care coordonează funcționarea dispozitivului și a celulelor, colectează datele de secvențiere și efectuează basecalling.

Descărcați și instalați software-ul MinKNOW

- Se descarcă software-ul MinKNOW corespunzător pentru MinION Mk1B/D. Configurați MinION Mk1B/Mk1D cu un computer gazdă

Configurarea MinION cu un computer gazdă

- Dispozitivul se conectează la computer prin cablul USB furnizat, conform instrucțiunilor din manualul utilizatorului.

Conectarea la MinKNOW

- Faceți dublu clic pe pictograma MinKNOW de pe desktop.
- Faceți clic pe Conectați-vă cu contul dvs.
- Introduceți adresa de e-mail și parola Nanopore.
- Managerul de conexiuni se va deschide, iar dispozitivul va fi cardul din colțul din stânga sus.
- Faceți clic pe cardul Dispozitivul meu pentru a-l accesa și controla.

Verificarea celulei de flux

Înainte de fiecare experiment se efectuează o verificare a celulei de flux pentru a evalua numărul de pori activi:

- Deschideți dispozitivul și glisați celula de flux sub clemă. Apăsați ferm pe celula de curgere. Pentru Flongle, glisați adaptorul Flongle sub clemă și introduceți o celulă de flux Flongle.
- Navigați la pagina Start și faceți clic pe Verificare celulă flux.
- MinKNOW va recunoaște tipul și ID-urile celulei de flux MinION. Notă: Pentru Flongle, completați manual ID-ul celulei de flux.
- Faceți clic pe Start și va începe verificarea celulei de flux.

Configurați o execuție de secvențiere

Amorsați și încărcați celula de flux cu ADN sau ARN urmând un protocol de pregătire a bibliotecii și configurați o secvențiere, după cum urmează:

- Navigați la pagina Start și faceți clic pe Start Sequencing.
- În fila Poziții, completați numele experimentului, ID-ul eșantionului și selectați tipul de celulă de flux. Faceți clic pe Continuați la selecția kitului. Notă: Pentru Flongle, completați manual ID-ul celulei de flux.
- Selectați kitul și orice extensie (extensii) utilizată pentru a pregăti biblioteca. Faceți clic pe Continuare pentru a rula opțiunile.
- Specificați lungimea de secvențiere și lungimea minimă de citire sau păstrați setările implicite. Faceți clic pe Continuați analiza.
- Alegeți modelul basecaller și selectați orice opțiuni de cod de bare și aliniere disponibile sau păstrați setările implicite. Faceți clic pe Continuare pentru a ieși.
- Specificați locația, formatul și opțiunile de filtrare a datelor de ieșire sau păstrați setările implicite. Faceți clic pe Continuați la revizuirea finală.
- Faceți clic pe Start.