

奈米孔

Operation Manual

修煉手冊

- 1 練氣期
晶片保存
- 2 築基期
樣本品質控制
- 3 金丹期
提高佔孔率
- 4 元嬰期
定序狀況排除
- 5 大乘期
回收文庫
- 6 渡劫期
軟體執行
- 7 飛升期
數據分析



騰達行 0800-211-819

UNIMED





1	練氣期 晶片保存 Flow cell warranty and storage	P. 04
2	築基期 樣本品質控制 DNA/RNA quality	P. 05
3	金丹期 提高佔孔率 Pore occupancy improvement	P. 06
4	元嬰期 定序狀況排除 Bubbles or blocking	P. 08
5	大乘期 回收文庫 Library recovery	P. 10
6	渡劫期 軟體執行 Real-time basecalling	P. 12
7	飛升期 數據分析 EPI2ME workflows	P. 14

晶片保存 Flow cell storage

晶片請置於 2-8°C 保存，避開出風口，絕對不能放冷凍或讓它結冰。

DNA 晶片保固期 Flow cell warranty period

檢測孔洞若小於以下數量，請立即聯絡您的業務。

Flow Cell	最小孔數	保固期
PromethION	5000	12 Weeks
MinION	800	12 Weeks
Flongle	50	4 Weeks

**晶片使用注意事項**

晶片擺放上下方向需正確



晶片使用完畢請聯絡業務回收



圖案面



↑朝上



序號資訊面



↓朝下



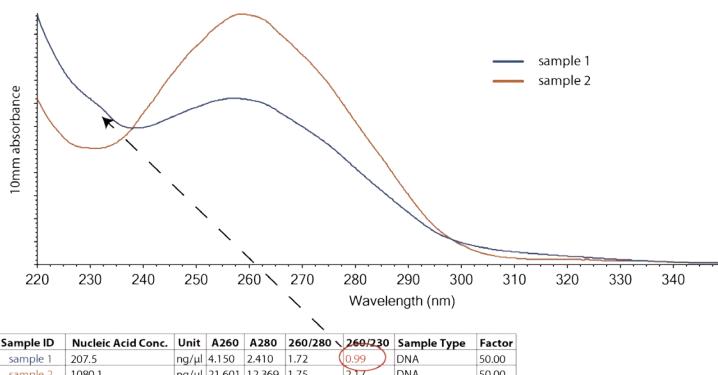
DNA QC

在開始建庫之前，先檢查 Input DNA 的質量。

低分子量、定量錯誤和 / 或受汙染的 DNA (例如鹽、EDTA、蛋白質、有機溶劑) 可能會對下游過程產生重大影響，最終影響定序喔。

檢查事項

- 避免洗滌劑、變性劑、螯合劑和高濃度鹽類等化學雜質，因為這些可能會影響酶步驟的效率
- 其他汙染物，如單鏈 DNA、RNA、蛋白質和染料，也可能降低文庫備步驟效率
- DNA 的質量可以透過 Nanodrop (對於濃度 $>20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 的樣本) 進行評估
- 建議樣本 OD 值： $260/280 \sim 1.80$ 和 $260/230 \sim 2.0-2.2$
- 高於 ~ 1.8 的 $260/280$ 表示 RNA 的存在
- 低於 ~ 1.8 的 $260/280$ 可以表明蛋白質或酚的存在
- 如果 $260/230$ 明顯低於 $2.0-2.2$ ，代表存在汙染物，DNA 需要額外的純化



樣本 1 的 $260/230$ 為 ~ 1.0 ，生成的文庫在定序執行中表現不佳。

如果無法進行額外的淨化，可以透過 PCR 放大來提高清潔度。

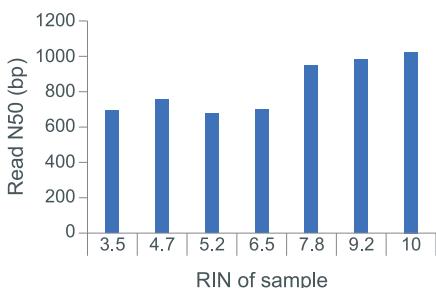
RNA QC

RIN 分配了提取物中 RNA 的降解水平的測量值，從 1 到 10，其中 10 是降解最少的。在進行奈米孔定序文庫準備之前，建議 RNA 提取物的 RIN 為 7 或更高。

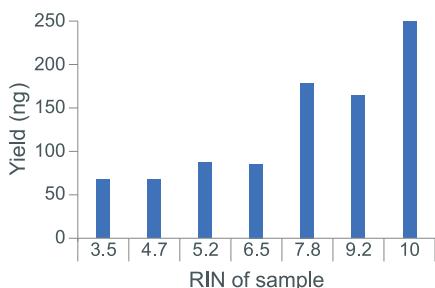
檢查事項

- 應避免洗滌劑、變性劑、螯合劑和高濃度鹽類等化學雜質，因為這些可能會影響酶步驟的效率
- 其他汙染物，如 DNA、蛋白質和染料，也可能降低庫製備步驟的效率
- RNA 的質量可以透過 Nanodrop（對於濃度 $>20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 的樣品）進行評估
- 建議樣本 OD 值： $260/280 \sim 2.0$ 和 $260/230 \sim 2.0 \sim 2.2$
- 低於 ~ 2.0 的 $260/280$ 表示 DNA 的存在
- 低於 ~ 1.8 的 $260/280$ 可以表明蛋白質或酚的存在
- 如果 $260/230$ 明顯低於 $2.0 \sim 2.2$ ，代表存在汙染物，RNA 需要額外的純化
- 評估 RIN 值

RIN 值下降，N50 長度下降



RIN 值下降，文庫產出下降



佔孔率是指正在定序的孔洞佔所有可定序孔洞的百分比。佔孔率大於 90%，可以收集更多 data，低於 80% 佔孔率的客戶，收的 data 明顯比較少。佔孔率越低，孔洞死的越快。在定序的第一個小時內低於 70% 的話，不太可能隨著時間的推移而改善。要得到最佳結果，請停止定序並準備更多 Library，重新上機。



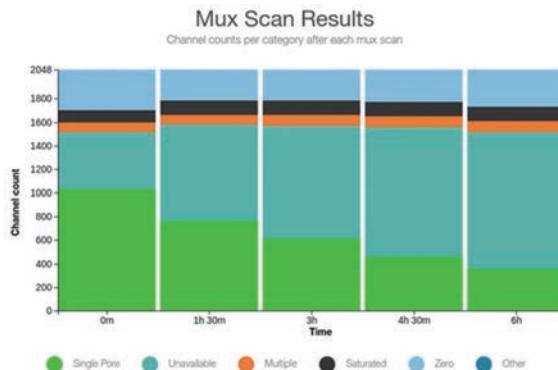
長度與分子數對照表 (50 fmol 分子數對應的樣本量)(Qubit 定量)

DNA 片段長度	1kb	2kb	5 kb	10 kb	15 kb	20 kb	25 kb	50 kb
樣本量	33 ng	66 ng	165 ng	330 ng	495 ng	660 ng	825 ng	1650 ng

塞孔

定序過程若有塞孔狀況，系統會自動反轉電位來清除阻塞，大部分會成功，但少部份無法排除時，軟體會出現不可用（ unavailable ）孔洞。

如下圖，注意橘色與綠色中間的青綠色區塊



系統無法排除的阻塞，隨著時間增加，不可用的奈米孔數量會持續增加，這可能跟樣本萃取，文庫製備，或 DNA 長度有關。如果遇到這種情況，並希望恢復失去一些可用的奈米孔，可使用 Wash kit 幫助去除纏住孔洞的物質，恢復一些孔洞。

Wash kit 可使用在 MinION 和 PromethION Flow cell 上，含 nuclease，能去除 99.9% 的原始 library。

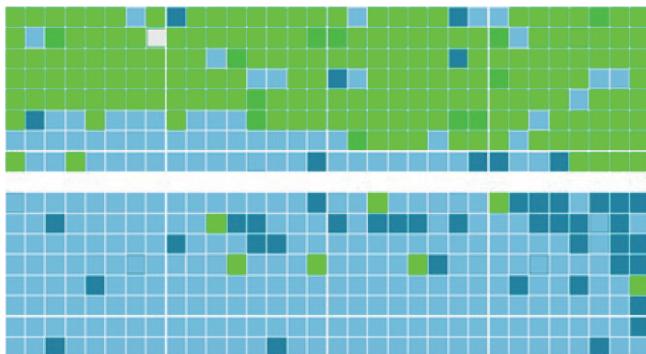
出現微小氣泡

定序後期出現微小的氣泡是正常的，這是由於熱量和化學反應的緣故，這些氣泡不會到達奈米孔而造成損害。



Minknow 出現大片藍色區域

表示上樣時導入氣泡，此為不可逆，但其他沒有區域的部分還是可以定序。

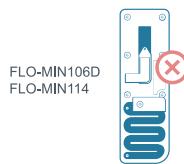




晶片無法使用，需將文庫取出放到新晶片

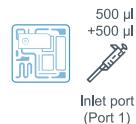
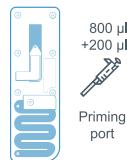
在 MinKNOW 按停止定序

Stop sequencing for
the original flow cell



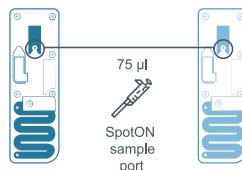
Priming 第二張晶片備用

Prime a second flow cell



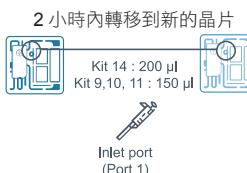
依圖示從原本晶片中取出文庫

3 Remove the library from the original flow cell
and transfer it directly to the second flow cell



開始新的定序

4 Start sequencing for
the second flow cell





晶片無法使用，且文庫需再純化，並將文庫取出放到新晶片

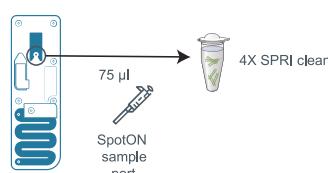
在 MinKNOW 按停止定序

- 1 Stop sequencing for the **original flow cell**

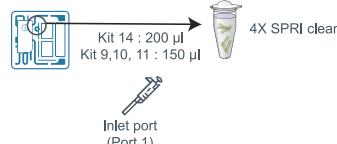


依圖示從原本晶片中取出文庫

- 2 Remove the library from the **original flow cell** and SPRI clean before storage

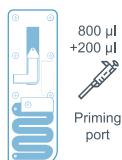


使用磁珠純化文庫



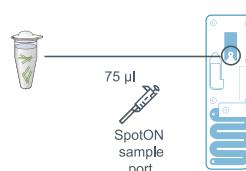
Priming 第二張晶片備用

- 3 Prime a second flow cell



轉移文庫到新的晶片

- 4 Transfer the library to the **second flow cell**

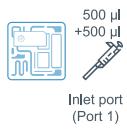


開始新的定序

- 5 Start sequencing for the **second flow cell**



2 小時內轉移到新的晶片





將文庫取出，晶片清洗後放回定序

在 MinKNOW 按暫停定序

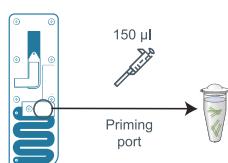
- 1 Pause sequencing for the flow cell

FLO-MIN106D
FLO-MIN114



依圖示從晶片中取出文庫

- 2 Remove the library from the flow cell

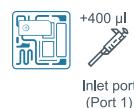
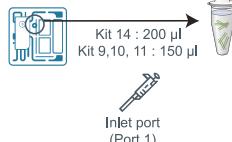


晶片以 Wash Mix 清洗

- 3 Wash the flow cell



FLO-PRO002
FLO-PRO114M



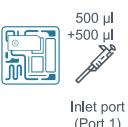
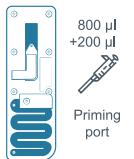
定序時，螢幕似乎凍結或缺少功能？

按 Ctrl + R 重新整理，若失敗，請重新關機與開機 (包含電源關閉)

Device	Fast model No. of keep-up flow cells				
	Basecalling only	Native Barcoding 96 demultiplexing	Alignment	Basecalling only	Native Barcoding 96 demultiplexing
PromethION 48 A-series	48	48	48	48	48
PromethION 2 Integrated	2	2	2	2	2
PromethION 2 Solo running on GridION	2	2	2	2	2
GridION	4.8	5	4.8	4.9	5
MinION Mk1C	0.8	0.7	0.9	0.2	0.2
Standalone MinKNOW on Apple M3 (MinION Flow Cells)	1	1	1	1	1

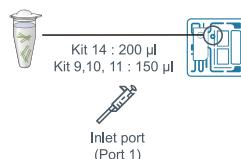
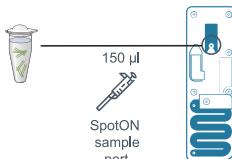
Reprime 晶片

- 4 Prime the washed flow cell



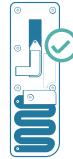
Reload 文庫

- 5 Transfer the library to the washed flow cell



按 Resume 恢復定序

- 6 Restart sequencing the washed flow cell



同時間有多少片晶片可以進行 real time basecall ?

包括三種 basecall 模式：Fast, High Accuracy (HAC), Super Accuracy (SUP)，與修飾偵測

HAC model

No. of keep-up flow cells

SUP model

No. of keep-up flow cells

Alignment	Mod bases 5mC + 5hmC (CpG context)	Mod bases 5mC + 5hmC with alignment	Basecalling only	Native Barcoding 96 demultiplexing	Alignment	Mod bases 5mC + 5hmC (CpG context)
48	48	46.2	12.6	11.4	11.9	11.5
2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	0.8	0.8	0.8	0.8
4.8	4.9	4.8	2.4	2.7	2.4	2.3
0.4	0.2	0.2	N/A	N/A	N/A	N/A
1	1	1	0.2	0.2	0.2	0.2



開放式分析平臺
獨立桌面應用程式

預打包了 > 15 個 open-source
workflows (Nextflow 框架)

可安裝在電腦、PromethION
或 GridION 上使用

直觀的介面或 command line
兩種選擇免費使用

與 macOS、Windows
和 Linux 相容

可在本地或雲端中運行

The screenshot shows the EPI2ME software interface. On the left, there is a vertical navigation bar with icons for Home, Launch, Results, and Settings. The main area is titled 'Workflows' and displays a list of available workflows:

- Alignment**: Align Nanopore reads and visualize mapping statistics. Tags: alignment, mapping, minimap2.
- Bacterial Genomes**: Assembly, variant calling, and annotation of bacterial genomes. Tags: denovo, alignment, mosdepth.
- 16S**: Identification of the origin of single reads from 16S/ITS amplicon sequencing. Tags: metagenomics, metabarcoding, 16s.
- AAV-QC**: AAV plasmid quality control workflow. Tags: aav, gene therapy, quality control.
- Amplicon**: Analyse Nanopore reads generated by amplicon sequencing. Tags: amplicon.
- Artic**: Run the ARTIC SARS-CoV-2 methodology on multiplexed MiniON, Grid... Tags: sars-cov-2, covid, artic.
- Basecalling**: Helper workflow for basecalling ONT reads. Tags: basecalling, utility.
- Cas-9**: Summarise the results of Cas9 enrichment sequencing. Tags: quality control.

下載連結 →
<https://labs.epi2me.io/downloads/>



