

Nanopore实验指南

基因组DNA连接法建库 (SQK-LSK114)

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

仅供研究使用

Oxford Nanopore Technologies Ltd.

Gosling Building, Oxford Science Park, Edmund Halley Rd, Oxford, OX4 4DQ, United Kingdom

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

实验指南概览

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

实验指南概览

重要信息

本试剂盒为早期试用产品。

如需有关早期试用计划的更多信息, 请参阅[本文](#)了解产品的不同发布阶段。

连接测序试剂盒的特点

我们推荐有以下需求的用户使用该试剂盒:

- 希望原始数据序列准确率众数不低于Q20 (99%)
- 希望通过优化测序实验以提高输出量
- 需要控制读长
- 希望利用上游处理工序(如片段大小选择或全基因组扩增)以获得长读长

重要信息

“试剂盒14”系列仪器和生物信息学技术指南

“试剂盒14”系列为Oxford Nanopore Technologies的新系列产品, 与其配套的数据采集、碱基识别和分析工具不同于常规。

详情请参阅[“试剂盒14”系列仪器和生物信息学技术指南](#)。我们强烈建议您在使用“试剂盒14”系列试剂测序前, 阅读该技术指南。

gDNA连接测序试剂盒V14 (SQK-LSK114) 实验指南简介

本实验指南详细描述了使用连接测序试剂盒V14 (SQK-LSK114) 进行DNA样品测序的操作流程及常见问题的解决方法。为使您尽快熟悉操作流程, 我们强烈建议您在使用样品测序前, 先使用Lambda标准品完成标准对照实验。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

实验指南概览

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

测序工作流程:

准备您的实验

您将需要:

- 提取DNA, 并评估DNA的长度、浓度和纯度

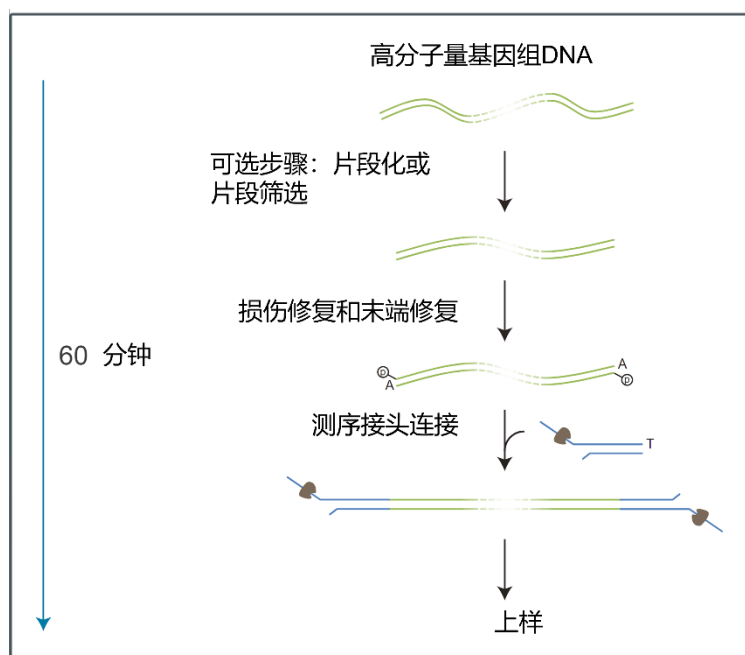
质量评估步骤对确保实验成功至关重要。

- 确保您已准备好测序试剂盒、正确的仪器以及第三方试剂
- 下载数据收集和分析软件
- 检查您的测序芯片上有足够多的活性纳米孔, 以确保测序良好运行

文库制备

您将需要:

- 修复DNA, 并对DNA进行末端修复以便与接头连接
- 将试剂盒中提供的测序接头连接到DNA末端
- 对测序芯片进行预处理, 并将DNA文库加至芯片



基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

仪器及耗材

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

测序和分析

您将需要:

- 使用 MinKNOW 软件运行测序, 该软件将收集由测序仪产出的原始数据并将其识别为碱基序列。

重要信息

实验方案适用性

本实验方案仅适用于与以下产品搭配使用:

- 连接测序试剂盒V14 (SQK-LSK114)
- Lambda标准品扩展包 (EXP-CTL001)
- R10.4.1测序芯片 (FLO-MIN114)
- 测序芯片清洗剂盒 (EXP-WSH004)

仪器及耗材

实验材料	<ul style="list-style-type: none"> • 1 µg (或100-200 fmol) 高分子量gDNA; 如进行DNA片段化: 100ng以上高分子量gDNA • 连接测序试剂盒V14 (SQK-LSK114)
耗材	<ul style="list-style-type: none"> • 供Oxford Nanopore Technologies®连接测序使用的NEBNext®配套模块 (目录号E7180S), 或使用以下三种NEBNext®产品: <ul style="list-style-type: none"> ○ NEBNext FFPE修复混合液 (M6630) ○ NEBNext Ultra II 末端修复/ dA尾添加模块 (E7546) ○ NEBNext 快速连接模块 (E6056) • 1.5 ml Eppendorf DNA LoBind离心管 • 0.2 ml 薄壁PCR管 • 无核酸酶水 (如ThermoFisher, 目录号AM9937) • 新制备的70%乙醇 (用无核酸酶水配制) • Qubit™ 分析管 (ThermoFisher Q32856) • Qubit dsDNA HS Assay (双链DNA高灵敏度检测) 试剂盒 (ThermoFisher Q32851)

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

仪器及耗材

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

器材	<ul style="list-style-type: none"> • Hula混匀仪（低速旋转式混匀仪） • 适用于1.5ml Eppendorf离心管的磁力架 • 迷你离心机 • 涡旋混匀仪 • 盛有冰的冰桶 • 计时器 • 热循环仪 • P1000移液枪和枪头 • P200移液枪和枪头 • P100移液枪和枪头 • P20移液枪和枪头 • P10移液枪和枪头 • P2移液枪和枪头 • Qubit荧光计（或用于质控检测的等效仪器）
可选器材	<ul style="list-style-type: none"> • Agilent生物分析仪（或等效仪器） • Eppendorf 5424 离心机（或等效器材）

根据本实验指南，您将需要1 μg （或100-200 fmol）高分子量基因组DNA。

如您使用高分子量DNA，我们推荐起始用量为1 μg 。

如您使用扩增子DNA，我们推荐起始用量为100-200 fmol。

请确保您使用我们推荐的起始用量为样本建库，以取得最优的DNA产量。

起始DNA

DNA质控

选择符合质量和浓度要求的起始DNA至关重要的。使用过少或过多的DNA，或者质量较差的DNA（如，高度碎片化、含有RNA或化学污染物的DNA）都会影响文库制备。

有关如何对DNA样品进行质控，请参考[起始DNA/RNA质控实验指南](#)。

化学污染物

从原始样本中提取DNA的方法不同，可能会导致经纯化的DNA中所残留的化学污染物不同。这会影
响文库的制备效率和测序质量。请在牛津纳米孔社区的“[Contaminants](#)” (污染物)页面了解更多信息。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

仪器及耗材

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

供Oxford Nanopore Technologies®连接测序使用的NEBNext®配套模块

对于新用户，我们建议购买供Oxford Nanopore Technologies®连接测序的NEBNext® 配套模块（目录号E7180S或E7180L）。该配套模块内包含所有与连接测序试剂盒配套使用的NEB试剂。

第三方试剂

Oxford Nanopore Technologies推荐您使用本实验指南中提及的所有第三方试剂，并已对其加以验证。我们尚未对其它替代试剂进行测试。

我们建议您按制造商说明准备待用的第三方试剂。

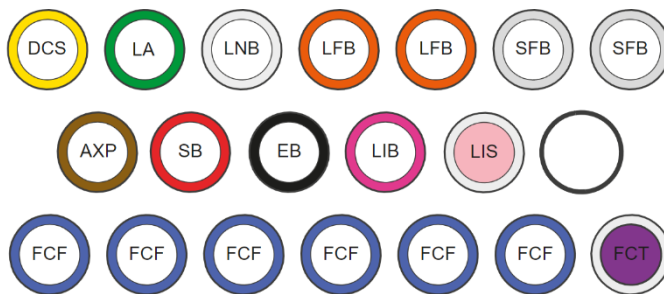
重要信息

本试剂盒所用连接接头（LA）的系绳经过升级，不可与其它测序接头互换使用。

重要信息

尽管我们推荐的第三方（NEB快速连接模块）连接酶也提供配套的缓冲液，但使用连接测序试剂盒中的连接缓冲液（LNB）可以保证更高的连接接头（LA）连接效率。

连接测序试剂盒V14（SQK-LSK114）内容物



DCS : DNA Control Strand
 LA : Ligation Adapter
 LNB : Ligation Buffer
 LFB : Long Fragment Buffer
 SFB : Short Fragment Buffer
 AXP : AMPure XP Beads

SB : Sequencing Buffer
 EB : Elution Buffer
 LIB : Library Beads
 LIS : Library Solution
 FCF : Flow Cell Flush
 FCT : Flow Cell Tether

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

计算机配置要求及软件

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

名称	缩写	管盖颜色	管数	每管溶液体积 (µl)
DNA参照 (DCS)	DCS	黄色	1	35
连接接头	LA	绿色	2	40
Agencourt AMPure XP磁珠	AXP	琥珀色	1	1200
连接缓冲液	LNB	白色	1	200
长片段缓冲液	LFB	橙色	2	1800
短片段缓冲液	SFB	透明	2	1800
测序缓冲液	SB	红色	1	700
洗脱缓冲液	EB	黑色	1	1200
文库颗粒	LIB	粉色	1	600
文库溶液	LIS	白色管盖, 标签上有粉色贴纸	1	600
测序芯片冲洗液	FCF	蓝色	6	1170
测序芯片系绳	FCT	白色管盖, 标签上有紫色贴纸	1	200

请注意: 本产品包含由贝克曼库尔特公司 (Beckman Coulter, Inc) 生产的 AMPure XP 试剂, 并可与试剂盒一起于 -20° C 下储存 (不影响试剂稳定性)。

计算机配置要求及软件

MinION Mk1C的IT配置要求

MinION Mk1C是一款集计算功能和触控屏幕于一体的便携式测序分析仪, 它无需依赖任何额外设备, 即可生成并分析纳米孔测序数据。您可以在[MinION Mk1C的IT配置要求文件](#)中了解更多。

MinION Mk1B的IT配置要求

请为MinION Mk1B配备一台高规格的计算机或笔记本电脑, 或者使用MiniIT设备, 以适配数据采集的速度。您可以在[MinION Mk1B的IT配置要求文件](#)中了解更多。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

DNA损伤及末端修复

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

重要信息

“试剂盒14”系列仪器和生物信息学技术指南

“试剂盒14”系列为Oxford Nanopore Technologies的新系列产品，与其配套的数据采集、碱基识别和分析工具不同于常规。

详情请参阅[“试剂盒14”系列仪器和生物信息学技术指南](#)。我们强烈建议您在使用“试剂盒14”系列试剂测序前，阅读该技术指南。

针对本次产品发布，测序仪将在过孔速度到达 ~400 bps 的温度下运行。

测序芯片质检

我们强烈建议您在开始测序实验前，对测序芯片的活性纳米孔数进行质检。质检需在您收到MinION /GridION /PromethION测序芯片三个月之内进行，或者在您收到Flongle测序芯片四周内进行。Oxford Nanopore Technologies会对活性孔数量少于以下标准的芯片进行替换*：

测序芯片	芯片上的活性孔数确保不少于
Flongle 测序芯片	50
MinION/GridION 测序芯片	800
PromethION测序芯片	5000

*请注意：自收到之日起，芯片须一直贮存于Oxford Nanopore Technologies推荐的条件下。且质检结果须在质检后的两天内递交给我们。请您按照[测序芯片质检文档](#)中的说明进行芯片质检。

DNA 损伤及末端修复

~35 分钟

实验材料	
	<ul style="list-style-type: none">• 溶解于47µl无核酸酶水中的gDNA• DNA参照• AMPure XP 磁珠 (AXP)

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

DNA损伤及末端修复

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

耗材	<ul style="list-style-type: none"> • 无核酸酶水（如赛默飞，目录号AM9937） • NEBNext FFPE修复混合液（M6630） • NEBNext Ultra II 末端修复/ dA尾添加模块（E7546） • 新制备的70%乙醇（用无核酸酶水配制） • 1.5 ml Eppendorf DNA LoBind离心管 • Qubit™ 分析管 (ThermoFisher Q32856) • Qubit dsDNA HS Assay（双链DNA高灵敏度检测）试剂盒 • 0.2 ml薄壁PCR管
器材	<ul style="list-style-type: none"> • P1000移液枪和枪头 • P100移液枪和枪头 • P10移液枪和枪头 • 温度设定在20℃和 65℃的热循环仪 • 迷你离心机 • Hula混匀仪（低速旋转式混匀仪） • 磁力架 • 盛有冰的冰桶 • Qubit荧光计（或用于质控检测的等效仪器）

重要信息

可选步骤: DNA片段化及片段大小筛选

本实验手册不包含DNA片段化步骤。但在某些情况下，将样品片段化可能有助于您的实验。例如，当起始gDNA量较少时（100ng-500ng），将DNA片段化能扩充分子数量，从而提高通量。请参考：牛津纳米孔社区“Extraction methods”（提取方法）板块的“[DNA Fragmentation](#)”（DNA片段化）部分。

我们也提供了一些用于富集DNA样品中长片段的方法，请参考：牛津纳米孔社区“Extraction methods”（提取方法）板块的“[Size Selection](#)”（片段大小筛选）部分。

- 1 将 DNA 参照 (DCS) 于室温下解冻，轻微离心，用移液枪吹打混匀，然后置于冰上。
- 2 根据生产厂家的说明准备 FFPE 修复混合液和 NEBNext 末端修复/ dA 尾添加模块，并置于冰上。

为获得最优表现，NEB 建议如下：

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

DNA损伤及末端修复

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

1. 于冰上解冻所有试剂。
2. 轻弹并/或翻转各管，确保各试剂充分混匀。
3. 同一日内首次打开一管试剂前，请务必先将该管试剂瞬时离心。
4. Ultra II 末端修复缓冲液和 FFPE DNA 修复缓冲液内可能出现少量沉淀。待此两管液体回复至室温后，使用移液枪上下吹打数次，打散沉淀；然后涡旋振荡数秒，以确保试剂充分混合。
5. FFPE DNA 修复缓冲液可能轻微泛黄，不影响使用。

重要信息

请勿涡旋振荡NEBNext FFPE修复混合液或NEBNext Ultra II 末端修复酶混合物。

重要信息

请务必涡旋振荡NEBNext FFPE修复缓冲液及NEBNext Ultra II末端修复反应缓冲液，以充分混匀。

查看是否有残留沉淀。涡旋振荡至少30秒以溶解所有沉淀。

3 用无核酸酶水稀释 DNA

- 将 1 μg (或 100-200 fmol) 基因组 DNA 转移至一支 1.5ml Eppendorf DNA LoBind 离心管中。
- 如不足 47 μl ，请加入无核酸酶水补足。
- 轻弹离心管以充分混匀。
- 使用迷你离心机快速离心。

4 在一支 0.2ml 的薄壁 PCR 管中，混合以下试剂：

每添加一样试剂后，请吹打混匀 10-20 次，再添加下一样试剂。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

DNA损伤及末端修复

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

试剂	体积
DNA参照	1 μ l
DNA	47 μ l
NEBNext FFPE修复缓冲液	3.5 μ l
NEBNext FFPE修复混合液	2 μ l
NEBNext Ultra II末端修复反应缓冲液	3.5 μ l
NEBNext Ultra II末端修复酶混合物	3 μ l
总体积	60 μ l

- 5 上下吹打 PCR 管内容物以充分混匀，并轻微离心。
- 6 使用热循环仪，在 20°C下孵育 5 分钟，然后在 65°C下孵育 5 分钟。
- 7 涡旋振荡以重悬 AMPure XP 磁珠 (AXP)。
- 8 将 DNA 样本转至干净的 1.5 ml Eppendorf DNA LoBind 离心管中。
- 9 将 60 μ l 重悬的 AMPure XP 磁珠 (AXP) 加入 DNA 末端修复反应体系中，轻弹试管以充分混合。
- 10 将离心管置于 Hula 混匀仪 (低速旋转式混匀仪) 上室温孵育 5 分钟。
- 11 准备 500 μ l 新制备的 70%乙醇 (用无核酸酶水配制)。
- 12 将样品轻微离心，并静置于磁力架上待磁珠和液相分离。保持离心管在磁力架上不动，用移液枪吸去清液。
- 13 保持离心管在磁力架上不动，以 200 μ l 新鲜制备的 70%乙醇洗涤磁珠。小心不要吹散磁珠。用移液枪将乙醇吸走并弃掉。
- 14 重复上述步骤。
- 15 将离心管轻微离心后置于磁力架上。用移液枪吸走残留的乙醇。让磁珠在空气中干燥约 30 秒，但不要干至表面开裂。
- 16 将离心管从磁力架上移开。将磁珠重悬于 61 μ l 无核酸酶的水中。室温下孵育 2 分钟。
- 17 将离心管静置于磁力架上至少一分钟，直到磁珠和液相分离，且洗脱液澄清无色。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

接头连接及纯化

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

18 将 61µl 洗脱液转移至一支新的 1.5ml Eppendorf DNA LoBind 管中。

取 1µl 经过末端修复的 DNA, 用 Qubit 定量。

步骤结束

经过末端修复的DNA可用于稍后的接头连接。如需要, 您也可以此时将样品置于4℃储存过夜。

接头连接及纯化

~20 分钟

实验材料	<ul style="list-style-type: none"> • 连接接头 (LA) • 连接缓冲液 (LNB) • 长片段缓冲液 (LFB) • 短片段缓冲液 (SFB) • Oxford Nanopore试剂盒中的洗脱缓冲液 (EB) • AMPure XP 磁珠 (AXP)
耗材	<ul style="list-style-type: none"> • NEBNext快速连接模块 (E6056) • 1.5 ml Eppendorf DNA LoBind离心管 • Qubit™ 分析管 (Q32856) • Qubit dsDNA HS Assay (双链DNA高灵敏度检测) 试剂盒 (ThermoFisher Q32851)
器材	<ul style="list-style-type: none"> • 磁力架 • 迷你离心机 • 涡旋混匀仪 • P1000移液枪和枪头 • P100移液枪和枪头 • P20移液枪和枪头 • P10移液枪和枪头 • Qubit荧光计 (或用于质检检测的等效仪器)

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

接头连接及纯化

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

重要信息

尽管我们推荐的第三方（NEB快速连接模块）连接酶也提供配套的缓冲液，但使用连接测序试剂盒中的连接缓冲液（LNB）可以保证更高的连接接头（LA）连接效率。

- 1 轻微离心连接接头（LA）和快速 T4 DNA 连接酶（Quick T4 Ligase），置于冰上。
- 2 于室温下解冻连接缓冲液（LNB），解冻后轻微离心，并用移液枪吹打混匀。该缓冲液的黏度较高，涡旋振荡会很难混匀。解冻并混匀后，请立即置于冰上。
- 3 将洗脱缓冲液（EB）于室温下解冻，涡旋振荡混匀后，再轻微离心，置于冰上。

重要信息

接头连接后的纯化步骤，可通过选择不同缓冲液，按需富集大于3kb的DNA片段（LFB），或均等纯化所有大小的片段（SFB）。

- 如若富集3kb或更长的DNA片段，请使用长片段缓冲液（LFB）
 - 如需保留所有大小的DNA片段，请使用短片段缓冲液（SFB）
- 4 请在室温下按需解冻一管长片段缓冲液（LFB）或短片段缓冲液（SFB），涡旋振荡混合，轻微离心后置于冰上。
 - 5 在一支 1.5ml Eppendorf DNA LoBind 离心管内，将所有试剂按以下顺序混合：
每添加一样试剂后，请吹打混匀 10-20 次，再添加下一样试剂。

试剂	体积
前一步骤所得DNA样品	60 μ l
连接缓冲液（LNB）	25 μ l
NEBNext快速T4 DNA连接酶	10 μ l
连接接头（LA）	5 μ l
总体积	100 μ l

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

接头连接及纯化

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

- 6 轻弹离心管以充分混合，并轻微离心。
- 7 室温下孵育 10 分钟。
- 8 涡旋振荡以重悬 AMPure XP 磁珠 (AXP) 。
- 9 将 40ul 重悬的 AMPure XP 磁珠加入反应体系中，轻弹离心管以充分混合。
- 10 将离心管置于 Hula 混匀仪 (低速旋转式混匀仪) 上室温孵育 5 分钟。
- 11 将样品轻微离心，并静置于磁力架上待磁珠和液相分离。保持离心管在磁力架上不动，用移液枪吸去上清液。
- 12 用 250µl 的长片段缓冲液 (LFB) 或 250µl 的短片段缓冲液 (SFB) 洗涤磁珠。轻弹离心管将磁珠混匀后，将离心管轻微离心，再放回磁力架，静置待磁珠和液相分离。保持离心管在磁力架上不动，用移液枪吸去清液。
- 13 重复上述步骤。
- 14 将离心管轻微离心后置于磁力架上。用移液枪吸走残留的上清液。让磁珠在空气中干燥约 30 秒，但不要干至表面开裂。
- 15 将离心管从磁力架上移开。将磁珠重悬于 15µl 洗脱缓冲液中 (EB) 。轻微离心，然后在室温下孵育 10 分钟。对于高分子量的 DNA，在 37°C 下孵育可以提高长片段的回收率。
- 16 将离心管静置于磁力架上至少一分钟，直到磁珠和液相分离，且洗脱液澄清无色。
- 17 将此 15µl 洗脱液转移至一支新的 1.5ml Eppendorf DNA LoBind 管中。

将磁珠丢弃。

取 1µl 经过接头连接及码扩展 DNA，用 Qubit 定量。

重要信息

我们建议使用 5-10 fmol 此最终制备的文库上样。

DNA 上样量超过 20 fmol 会降低互补链序列的捕获率。如有需要，可用洗脱缓冲液稀释文库。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

SpotON测序芯片的预处理及上样

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

步骤结束

构建好的文库即可用于测序芯片上样。在上样前，请将文库置于冰上保存。

小贴士

文库保存建议

若为**短期**保存或重复使用（例如在清洗芯片后再次上样），我们建议将文库置于Eppendorf LoBind 离心管中**4℃**保存。

若为一次性使用且储存时长**超过3个月**，我们建议将文库置于Eppendorf LoBind 离心管中**-80℃**保存。

SpotON 测序芯片的预处理及上样

~10 分钟

实验材料	<ul style="list-style-type: none"> • 测序芯片冲洗液（FCF） • 测序芯片系绳（FCT） • 测序缓冲液（SB） • 文库颗粒（LIB） • 文库溶液（LIS）
耗材	<ul style="list-style-type: none"> • 1.5 ml Eppendorf DNA LoBind 离心管 • 无核酸酶水（如ThermoFisher, 目录号AM9937）
器材	<ul style="list-style-type: none"> • SpotON 测序芯片 • MinION测序仪 • P1000移液枪和枪头 • P100移液枪和枪头 • P20移液枪和枪头 • P10移液枪和枪头

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

SpotON测序芯片的预处理及上样

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

重要信息

请注意: 本试剂盒仅兼容R10.4.1测序芯片。

小贴士

MinION测序芯片的预处理及上样

我们建议所有新用户首次运行测序芯片前, 观看视频[测序芯片的预处理及上样](#)。

使用文库溶液

对大多数测序实验, 我们建议您使用文库颗粒 (LIB) 给测序芯片上样。但若您在以前实验的对应步骤中使用水作为文库上样时的载体, 则请务必在此步骤中将水替换为上文库溶液 (LIS)。请注意: 在特殊情况下, 当向测序芯片中加入较粘稠的文库时, 不借助文库颗粒反而会使操作更容易。

- 1 于室温下解冻测序缓冲液 (SB)、文库颗粒 (LIB) 或文库溶液 (LIS)、测序芯片系绳 (FCT) 和一管测序芯片冲洗液 (FCF)。完全解冻后, 涡旋振荡混匀, 然后轻微离心。
- 2 制备测序芯片的预处理液: 将 30 μ l 已解冻并混匀的测序芯片系绳 (FCT) 加入一整管解冻并混匀的测序芯片冲洗液 (FCF) 中, 室温下涡旋混匀。
- 3 打开 MinION 或 GridION 测序仪的盖子, 将测序芯片插入金属固定夹的下方。用力向下按压芯片, 以确保正确的热、电接触。

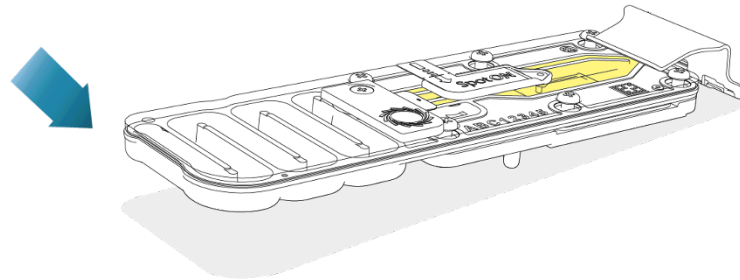
基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

SpotON测序芯片的预处理及上样

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

1a

将测序芯片插入金属固定夹的下方。用力向下按压芯片。

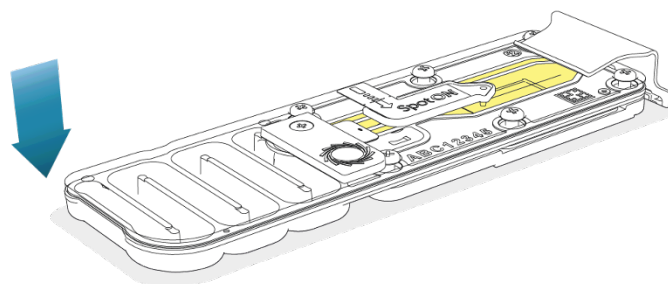


溶液:

 储存缓冲液 预处理液 DNA 文库

1b

将测序芯片插入金属固定夹的下方。用力向下按压芯片。



可选操作

为文库上样前，完成测序芯片检测，查看可用孔数目。

如此前已对测序芯片进行过质检，则此步骤可省略。

更多信息，请查看 MinKNOW 实验手册的[测序芯片质检部分](#)。

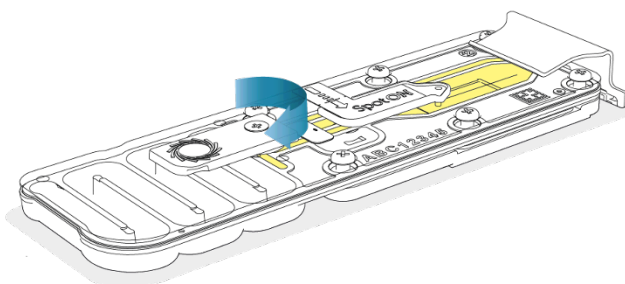
基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

SpotON测序芯片的预处理及上样

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

4 顺时针转动预处理孔孔盖，使预处理孔显露出来。

2 顺时针转动预处理孔孔盖，使预处理孔显露出来。

**重要信息**

从测序芯片中反旋排出缓冲液。请勿吸出超过20-30 μ l的缓冲液，并确保芯片上的纳米孔阵列一直有缓冲液覆盖。将气泡引入阵列会对纳米孔造成不可逆转地损害。

5 将预处理孔打开后，检查孔周围是否有小气泡。请按照以下方法，从孔中排出少量液体以清除气泡（几微升即可）：

- 1) 将P1000移液枪转至200 μ l刻度。
- 2) 将枪头垂直插入预处理孔中。
- 3) 反向转动移液枪量程调节转扭，直至移液枪刻度在220-230 μ l之间，或直至您看到有少量缓冲液进入移液枪枪头。

肉眼检查，确保从预处理孔到传感器阵列的缓冲液连续且无气泡。

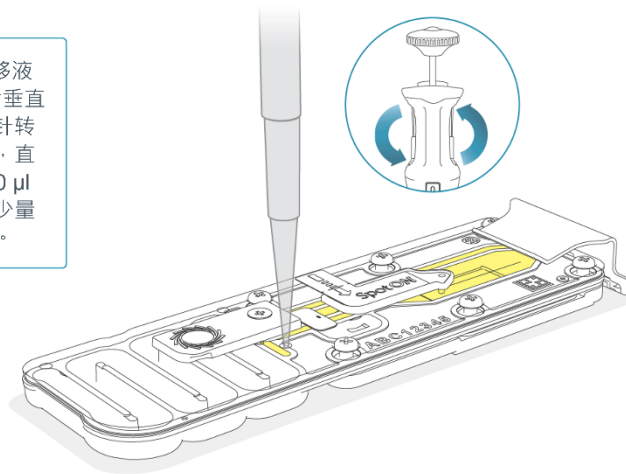
基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

SpotON测序芯片的预处理及上样

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

3

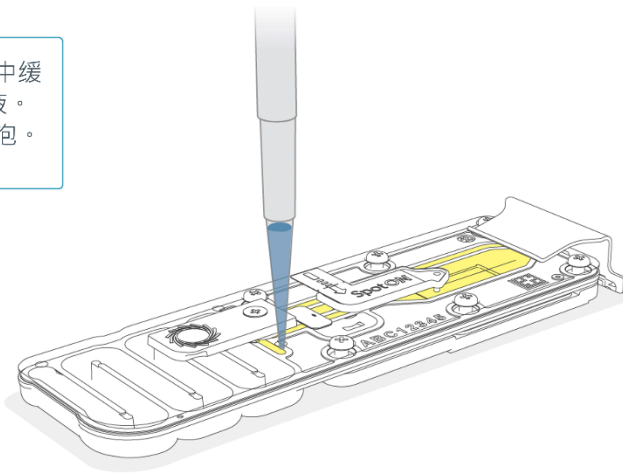
将连有空枪头的P1000移液枪转至200 μ l刻度，然后垂直插入预处理孔中。逆时针转动移液枪量程调节转纽，直至移液枪刻度在220-230 μ l之间，或直至您看到有少量缓冲液进入移液枪枪头。



- 6 通过预处理孔向芯片中加入 800 μ l 预处理液，避免引入气泡。等待 5 分钟。在此期间，请按照以下步骤准备用于上样的 DNA 文库。

4

通过预处理孔向芯片中缓缓加入800 μ l预处理液。请确保枪头内没有气泡。



等待五分钟再进行下一步操作。

- 7 将含有文库颗粒的 LIB 管用移液枪吹打混匀。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

SpotON测序芯片的预处理及上样

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

重要信息

LIB管内的文库颗粒分散于悬浮液中。由于这些颗粒的沉降速度非常快，所以在混匀颗粒后，要即刻使用。

8 在一支新的 1.5ml Eppendorf LoBind 离心管中，按下表所示准备上样文库：

试剂	体积
测序缓冲液 (SB)	37.5 μ l
文库颗粒 (LIB)，使用前即时混匀；或文库溶液 (LIS)	25.5 μ l
DNA文库	12 μ l
总体积	75 μl

请注意：加入测序缓冲液 (SB) 后，测序接头即开始消耗缓冲液内的能量，因此请在加入测序缓冲液 (SB) 和文库颗粒 (LIB) 后，尽快为测序芯片上样。

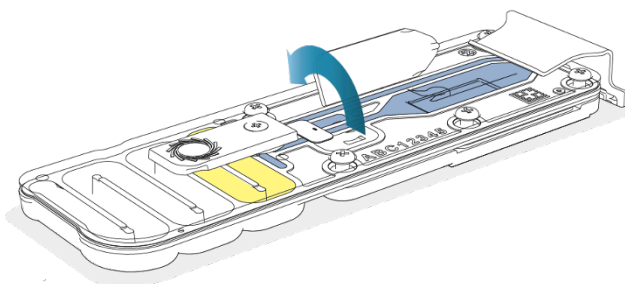
9 完成测序芯片的预处理：

- 1) 轻轻地翻起SpotON上样孔盖，使SpotON上样孔显露出来。
- 2) 通过预处理孔（而非SpotON加样孔）向芯片中加入**200 μ l**预处理液，避免引入气泡。

请注意：请在此步骤后尽快将文库上样。

5

轻轻翻起SpotON上样孔盖，
使SpotON上样孔显露出来。



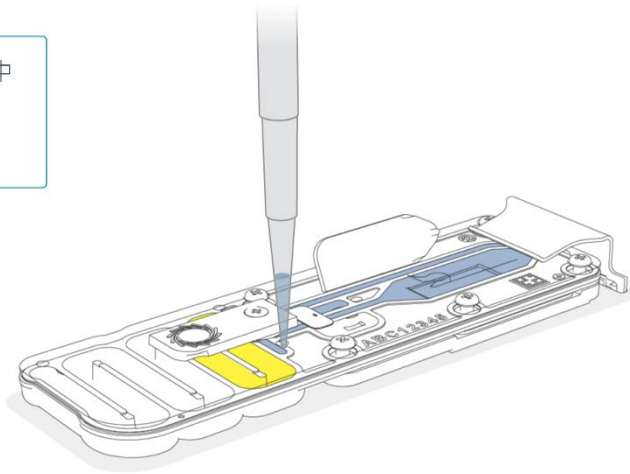
基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

SpotON测序芯片的预处理及上样

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

6

通过预处理孔向芯片中加入200 μ l预处理液，避免引入气泡。

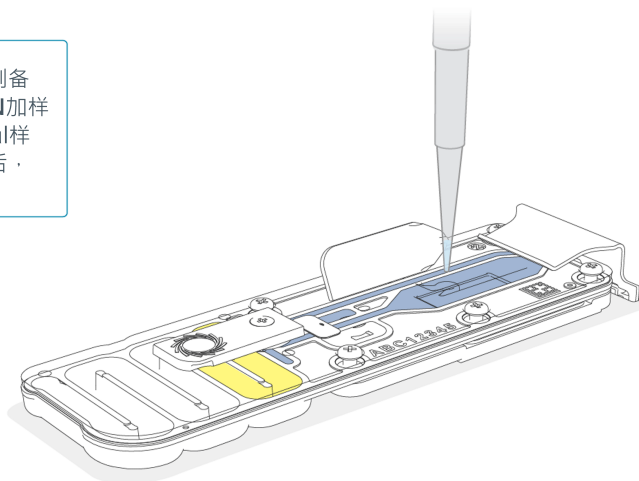


10 临上样前，用移液枪轻轻吹打混匀制备好的文库。

11 通过 SpotON 加样孔向芯片中逐滴加入 75 μ l 样品。确保液滴流入孔内后，再加下一滴。

7

用移液枪轻轻吹打混匀制备好的文库。通过SpotON加样孔向芯片中逐滴加入75 μ l样品。确保液滴流入孔内后，再加下一滴。



基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

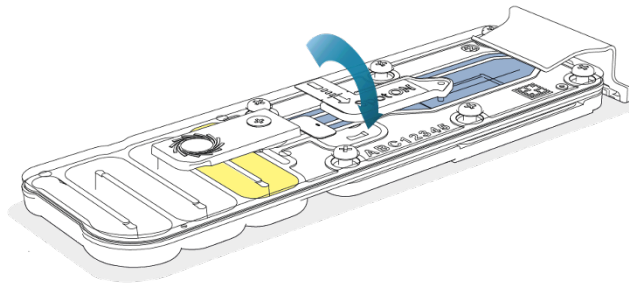
数据采集和碱基识别

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

12 轻轻合上 SpotON 加样孔孔盖，确保塞头塞入加样孔内。逆时针转动预处理孔孔盖，盖上预处理孔。最后合上 MinION 测序仪的上盖。

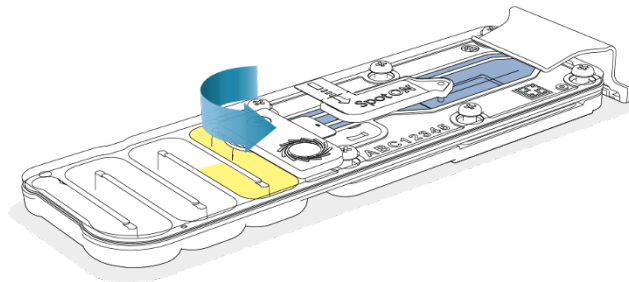
8

轻轻合上
SpotON加样孔
孔盖。



9

逆时针转动预处
理孔孔盖，盖上
预处理孔。



基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

数据采集和碱基识别

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

数据采集和碱基识别

纳米孔数据分析概览

有关纳米孔数据分析的完整概述，包括碱基识别和次级分析，请参阅[数据分析文档](#)。

如何开始测序

MinKNOW软件负责仪器控制，数据采集和实时碱基识别。如您已在计算机上安装MinKNOW，则可选择以下三种途径开展测序：

1. 使用计算机上的MinKNOW进行实时数据采集和碱基识别

请按照[MinKNOW使用指南](#)中的说明：从“开始测序”部分起，到“MinKNOW运行结束”部分止。

2. 使用GridION进行实时数据采集和碱基识别

请参照[GridION用户手册](#)中的说明。

3. 使用MinION Mk1C测序仪进行实时数据采集和碱基识别

请参照[MinION Mk1C使用指南](#)中的说明。

4. 使用计算机上的MinKNOW进行数据采集，过后再用Guppy进行碱基识别

请按照[MinKNOW使用指南](#)中的说明：从“开始测序”部分起，到“MinKNOW运行结束”部分止。当您设置实验参数时，请将“Basecalling”（碱基识别）选项设为“关（Off）”。测序实验结束后，请按照[MinKNOW实验指南](#)的[Post-run analysis](#)（本地分析）部分操作；或按照[Guppy使用指南](#)，从“Guppy快速入门指南”部分开始进行操作。

cDNA直接测序试剂盒 (SQK-LSK114)

下游分析

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

下游分析

下游分析

您可以选择以下几个途径来进一步分析经过碱基识别的数据:

1. EPI2ME平台

EPI2ME平台是由Oxford Nanopore Technologies有限公司的子公司Metrichor有限公司开发的一项基于云端的数据分析服务。EPI2ME平台提供了一系列的分析工作流程, 包括宏基因组识别、条形码拆分、序列比对和结构变异识别。进行这些分析无需额外的设备或计算能力; 并且可直接生成易于解读的分析报告。有关如何在EPI2ME上运行分析工作流程, 请参考EPI2ME使用指南, 从“Starting data analysis”(开始数据分析)部分开始操作。

2. EPI2ME Labs 教程及工作流程

Oxford Nanopore Technologies通过EPI2ME Labs平台提供了一系列针对高阶数据分析的生物信息学教程和工作流程。上述资源汇总于纳米孔社区 (community) 的EPI2ME Labs板块。该平台通过描述性文字、生物信息学代码和示例数据, 具象化地展示出我们的研究和应用团队发布在GitHub上的工作流程。

3. 科研分析工具

Oxford Nanopore Technologies的研发部门开发了许多分析工具, 您可在Oxford Nanopore的[GitHub资料库](#)中找到。这些工具面向有一定经验的用户, 并包含如何安装和运行软件的说明。工具是以源代码的形式提供的, 因此我们仅提供有限的技术支持。

4. 纳米孔社区用户开发的分析工具

如果以上工具仍无法为您提供解决研究问题的分析方法, 请参考[资源中心的生物信息学板块](#)。该板块汇总了各种第三方用户开发、且在Github上开源的、针对纳米孔数据的生信分析工具。请注意, Oxford Nanopore Technologies不为这些工具提供支持, 也不能保证它们与测序所用的最新的化学试剂/软件配置兼容。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

结束实验

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

结束实验

实验材料	<ul style="list-style-type: none">测序芯片清洗试剂盒 (EXP-WSH004)
------	--

- 1 完成测序实验后，如您希望再次使用测序芯片，请按照“清洗试剂盒” (Wash Kit) 的说明进行操作，并将清洗后的芯片置于 2-8 °C 保存。

您可在纳米孔社区获取“[测序芯片清洗试剂盒实验指南](#)”。

小贴士

我们建议您在停止测序实验后尽快清洗测序芯片。如若无法实现，请将芯片留在测序设备上，于下一日清洗。

- 2 请按照“回收程序”清洗好芯片，以便送回 Oxford Nanopore。

您可在此[处](#)找到回收测序芯片的说明。

重要信息

如果您遇到问题或对测序实验有疑问，请参阅本实验指南在线版本中的“疑难解答指南”一节。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

DNA/RNA提取和文库制备过程中可能出现的问题

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

DNA/RNA 提取和文库制备过程中可能出现的问题

以下表格列出了在DNA/RNA提取和文库制备过程中的常见问题，以及可能的原因和解决方法。

我们还在 [Nanopore 社区的“Support” 板块](#)提供了常见问题解答（FAQ）。

如果以下方案仍无法解决您的问题，请通过电邮（support@nanoporetech.com）或微信公众号在线支持（NanoporeSupport）联系我们。

低质量样本

现象	可能原因	措施及备注
低纯度DNA（Nanodrop测定的DNA吸光度比值260/280<1.8, 260/230<2.0-2.2）	用户所使用的DNA提取方法未能达到所需纯度	您可在 污染物专题技术文档 中查看污染物对后续文库制备和测序实验的影响。请尝试其它不会导致污染物残留的 提取方法 。 请考虑将样品再次用磁珠纯化。
RNA完整度低（RNA完整值（RIN）<9.5, 或rRNA在电泳凝胶上的条带呈弥散状）	RNA在提取过程中降解	请尝试其它 RNA提取方法 。您可在 RNA完整值专题技术文档 中查看更多有关RNA完整值（RIN）的介绍。
RNA的片段长度短于预期	RNA在提取过程中降解	请尝试其它 RNA提取方法 。您可在 RNA完整值专题技术文档 中查看更多有关RNA完整值（RIN）的介绍。 我们建议用户在无RNA酶污染的环境中操作，并确保实验设备没有受RNA酶污染。

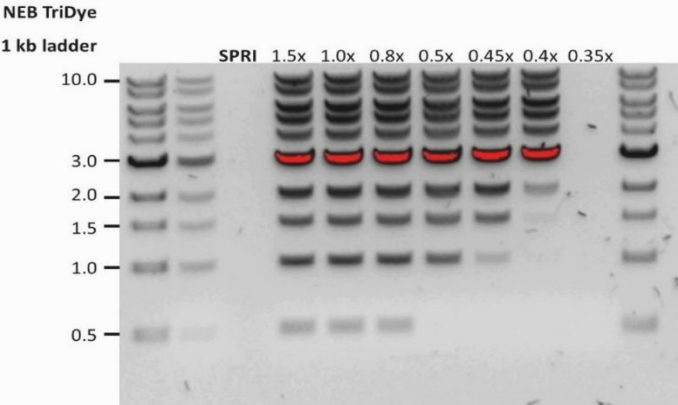
经AMPure磁珠纯化后的DNA回收率低

现象	可能原因	措施及备注
低回收率	AMPure磁珠量与样品量的比例低于预期，导致DNA因未被捕获而丢失	1. AMPure磁珠的沉降速度很快。因此临加入磁珠至样品前，请确保将磁珠重悬充分混匀。 2. 当AMPure磁珠量与样品量的比值低于0.4:1时，所有的DNA片段都会在纯化过程中丢失。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

DNA/RNA提取和文库制备过程中可能出现的问题

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

现象	可能原因	措施及备注
低回收率	DNA片段短于预期	<p>AMPure磁珠量与样品量的比值越低，针对短片段的筛选就越严格。每次实验时，请先使用琼脂糖凝胶（或其他凝胶电泳方法）确定起始DNA的长度，并据此计算出合适的AMPure磁珠用量。</p> 
末端修复后的DNA回收率低	清洗步骤所用乙醇的浓度低于70%	当乙醇浓度低于70%时，DNA会从磁珠上洗脱下来。请确保使用正确浓度的乙醇。

VoITRAX在文库制备未完成的情况下提前终止运行

现象	可能原因	措施及备注
绿灯熄灭， 或 VoITRAX USB-C的电缆通过适配器与计算机连接。	VoITRAX的供电不足	亮起的绿色LED指示灯表明仪器此时的供电电流为3安培。此为VoITRAX V2设备满负荷运作时所需电流。请选用能满足 VoITRAX V2操作指南 中所列出的配置要求的计算机。

VoITRAX软件上显示的已加载试剂量不正确

现象	可能原因	措施及备注
VoITRAX软件上显示的已加载试剂量不正确	所用移液枪枪头与VoITRAX制备板上的加样孔不匹配	与制备板上的加样孔相匹配的枪头包括Rainin 20或30 μ l枪头及Gilson 10、20、或30 μ l枪头。其中最匹配的是规格为20 μ l的Rainin移液枪头。
	移液枪向制备板中加入试剂时的角度不对	当向制备板中加入试剂时，移液枪的角度应略大于加样孔入口的角度。加样前，请观看VoITRAX软件中包含的演示视频。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

测序过程中可能出现的问题

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

测序过程中可能出现的问题

以下表格列出了在测序过程中的常见问题，以及可能的原因和解决方法。

我们还在 [Nanopore 社区的“Support” 板块](#)提供了常见问题解答（FAQ）。

如果以下方案仍无法解决您的问题，请通过电邮（support@nanoporetech.com）或微信公众号在线支持（NanoporeSupport）联系我们。

Mux扫描在测序起始时报告的活性孔数少于芯片质检时报告的活性孔数

现象	可能原因	措施及备注
MinKNOW Mux 扫描在测序起始时报告的活性孔数少于芯片质检时报告的活性孔数	纳米孔阵列中引入了气泡	在对通过质控的芯片进行预处理之前，请务必排出预处理孔附近的气泡。否则，气泡会进入纳米孔阵列对其造成不可逆转地损害。视频中演示了避免引入气泡的最佳操作方法。
	测序芯片没有正确插入测序仪	停止测序，将芯片从测序仪中取出，再重新插入测序仪内。请确保测序芯片被牢固地嵌入测序仪中，且达到目标温度。如用户使用的是GridION/PromethION测序仪，也可尝试将芯片插入仪器的其它位置进行测序。
	文库中残留的污染物对纳米孔造成损害或堵塞	在测序芯片质检阶段，我们用芯片储存缓冲液中的质控DNA分子来评估活性纳米孔的数量。而在测序开始时，我们使用DNA文库本身来评估活性纳米孔的数量。因此，活性纳米孔的数量在这两次评估中会有约10%的浮动。 如测序开始时报告的孔数明显降低，则可能是由于文库中的污染物对膜结构造成了损坏或将纳米孔堵塞。用户可能需要使用其它的DNA/RNA提取或纯化方法，以提高起始核酸的纯度。您可在污染物专题技术文档中查看污染物对测序实验的影响。请尝试其它不会导致污染物残留的提取方法。

MinKNOW脚本失败

现象	可能原因	措施及备注
MinKNOW显示 "Script failed" (脚本失败)		重启计算机及MinKNOW。如问题仍未得到解决，请收集MinKNOW日志文件并联系我们的技术支持。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

测序过程中可能出现的问题

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

纳米孔利用率低于40%

现象	可能原因	措施及备注
纳米孔利用率 <40%	测序芯片中的文库量不够	我们建议使用5-50fmol的优质文库进行上样。请在上样前对文库进行定量, 并使用“Promega Biomath Calculator”等工具中的“dsDNA: μg to pmol”功能来计算DNA分子的摩尔量。
纳米孔利用率接近0	使用连接测序试剂盒, 但接头并未与DNA成功相连	请确保您在“测序接头连接”步骤中使用的是NEBNext快速连接模块(E6056), 以及SQK-LSK114试剂盒中的连接缓冲液(LNB)。同时, 请确保每种试剂的用量正确。您可通过制备Lambda对照文库来检验第三方试剂的可用性。
	使用连接测序试剂盒; 但在接头连接后的纯化步骤中并未使用洗涤缓冲液(LFB或SFB)洗涤, 而是使用了酒精	酒精可导致测序接头上的马达蛋白变性。请确保在测序接头连接后使用洗涤缓冲液(LFB或SFB)。
	测序芯片中无系绳	测序系绳(FLT)是随着预处理液加至芯片的。请确保在制备预处理液时, 加入测序系绳(FLT)。

读长短于预期

现象	可能原因	措施及备注
读长短于预期	DNA样本降解	<p>读长反映了起始DNA片段的长度。起始DNA在提取和文库制备过程中均有可能被打断。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 请查阅纳米孔社区中的“提取方法”以获得最佳DNA提取方案。 2. 在进行文库制备之前, 请先跑电泳, 查看起始DNA片的长度分布。  <p>在上图中, 样本1为高分子量DNA, 而样本2为降解样本。</p> <ol style="list-style-type: none"> 3. 在制备文库的过程中, 请避免使用吹打或/和涡旋振荡的方式来混合试剂。轻弹或上下颠倒离心管即可。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

测序过程中可能出现的问题

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

大量纳米孔处于“Recovering”（正在恢复）状态

现象	可能原因	措施及备注
大量纳米孔处于“Recovering”（正在恢复）状态（在通道面板和运行时间图上以深蓝色表示）	样本中含有污染物	<p>使用MinKNOW中的“Unblocking”（疏通）功能，可对一些污染物进行清除。如疏通成功，纳米孔的状态会变为“single pores”（单个孔）。若疏通后，状态为“recovering”（正在恢复）的纳米孔的比例仍然很高甚至增加（在扩展视图中，孔状态会显示为“unavailable”<不可用>），则：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 用户可进行一次核酸酶冲洗操作，或 2. 使用PCR扩增目标片段，以稀释可能导致问题的污染物。 <div style="text-align: center;"> <p>Duty Time Summary of channel states over time</p> <p>Bucket size (minutes): 5 Apply</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Auto scale bucket size</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Display channels proportionally</p> <p>Legend: <input checked="" type="checkbox"/> Sequencing <input checked="" type="checkbox"/> Pore <input checked="" type="checkbox"/> Recovering <input checked="" type="checkbox"/> Inactive <input checked="" type="checkbox"/> Unclassified</p> <p>More +</p> </div> <p>上方的运行时间图显示：状态为“Recovering”（正在恢复）的纳米孔的比例随着测序进程而不断增加。</p>

大量纳米孔处于“Inactive”（失活）状态

现象	可能原因	措施及备注
大量纳米孔处于“Inactive”（失活）状态（在通道面板和运行时间图上以浅蓝色表示膜结构或纳米孔遭受不可逆转地损伤）	测序芯片中引入了气泡	在芯片预处理和文库上样过程中引入的气泡会对纳米孔带来不可逆转地损害。请观看 测序芯片的预处理及上样视频 了解最佳操作方法。
大量纳米孔处于“Inactive”（失活）状态	文库中存在与DNA共纯化的化合物	与植物基因组DNA相关的多糖通常能与DNA一同纯化出来。 <ol style="list-style-type: none"> 1. 请参考植物叶片DNA提取方法。 2. 使用QIAGEN PowerClean Pro试剂盒进行纯化。 3. 利用QIAGEN REPLI-g试剂盒对原始gDNA样本进行全基因组扩增。
	样本中含有污染物	您可在 污染物专题技术文档 中查看污染物对测序实验的影响。请尝试其它不会导致污染物残留的提取方法。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

测序过程中可能出现的问题

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

运行过程中过孔速度和数据质量 (Q值) 降低

现象	可能原因	措施及备注
运行过程中过孔速度和数据质量 (Q值) 降低	当测序芯片的上样量过多时 (推荐的文库使用量为~5-50 fmol), 能量消耗通常会加快	请按照 MinKNOW使用指南 中的说明为测序芯片补充能量。请在后续实验中减少测序芯片的上样量。

温度波动

现象	可能原因	措施及备注
温度波动	测序芯片和仪器接触不良	检查芯片背面的金属板是否有热垫覆盖。重新插入测序芯片, 用力向下按压, 以确保芯片的连接器引脚与测序仪牢固接触。如问题仍未得到解决, 请联系我们的技术支持。

未能达到目标温度

现象	可能原因	措施及备注
MinKNOW显示“未能达到目标温度” (测序芯片质检: 37°C; 使用MinION Mk1B/PromethION芯片测序: 34°C; 使用Flongle芯片测序: 35°C)	测序仪所处环境低于标准室温, 或通风不良 (以致芯片过热)	MinKNOW会限定测序芯片达到目标温度的时间。当超过限定时间后, 系统会显示出错误信息, 但测序实验仍会继续。值得注意的是, 在错误温度下测序可能会导致通量和数据质量 (Q值) 降低。请调整测序仪的摆放位置, 确保其置于室温下、通风良好的环境中后, 再在MinKNOW中继续实验。有关MinION MK1B温度控制的更多信息, 请参考此 FAQ (常见问题) 文档。

Guppy: 未找到.fast5输入文件或.fast5文件未被碱基识别

现象	可能原因	措施及备注
未找到.fast5输入文件或.fast5文件未被碱基识别	<code>input_path</code> (输入路径) 并未指向 .fast5文件路径	请务必于 <code>--input_path</code> 后输入需要碱基识别的.fast5文件的完整路径。且该路径须可通过本地或SSH (安全外壳协议) 远程访问。
	.fast5文件位于 <code>input_path</code> 路径下的子文件夹中	如果需要Guppy查看子文件夹, 请在命令中添加 <code>--recursive</code> 递归标志。

Guppy: 碱基识别后没有创建Pass (通过) 或Fail (未通过) 文件夹

现象	可能原因	措施及备注
碱基识别后没有创建Pass (通过) 或Fail (未通过) 文件夹	命令中未包含 <code>--qscore_filtering</code> (数据质量过滤) 标志	通过使用 <code>--qscore_filtering</code> 标志, 序列会依据其数据质量而被分配到输出文件夹内的Pass (通过) 或Fail (未通过) 文件夹中。当在MinKNOW上进行实时碱基识别时, 质量阈值 (Q值) 默认为7 (相当于碱基识别准确率为80%)。

基因组DNA连接法建库(SQK-LSK114)

测序过程中可能出现的问题

版本: GDE_9161_V114_REVC_29JUN2022

Guppy: 在GPU计算机上的处理速度异常缓慢

现象	可能原因	措施及备注
在GPU计算机上的处理速度异常缓慢	命令中未包含 <code>--device</code> (设备) 标志	<code>--device</code> (设备) 标志表明用户将使用GPU设备以加速碱基识别。若命令中未包含此标志, GPU将不被启用。GPU从0开始编号。例如: 当指定使用两个GPU时, Guppy命令写为: <code>--device cuda:0 cuda:1</code> 。

Oxford Nanopore Technologies

电邮地址 sales@nanoporetech.com
电话号码 +44 (0)845 034 7900
电邮地址 sales@nanoporetech.com
推特账号 @nanopore
微信公众号 nanoporetechnologies
微信在线支持 nanoporesupport



www.nanoporetech.com

Oxford Nanopore Technologies、飞轮图标、EPI2ME、Flongle、GridION、Metrichor、MinION、MinIT、MinKNOW、PromethION、SmidgION 和 VolTRAX 都是 Oxford Nanopore Technologies 在各个国家的注册商标。© 2008 - 2022 Oxford Nanopore Technologies。版权所有。注册办事处：英国牛津 OX4 4GA，牛津科学园|注册号 05386273 |隐私政策