



MODUL PENGANTAR – PELATIHAN SEKUENSING

Integrated Genome Factory (IGF)

Bagian I: Pengecekan Kualitas Hasil Ekstraksi Asam Nukleat

Keberhasilan proses ekstraksi dan isolasi asam nukleat (DNA/RNA) dari suatu sampel dapat ditentukan melalui pengecekan kualitas hasil asam nukleat. Tujuan dari pengecekan tersebut adalah untuk memastikan isolat DNA/RNA hasil ekstraksi memiliki kualitas yang optimal untuk menghasilkan suatu data akurat pada eksperimen lanjutan (*downstream analysis*) yang dilakukan dalam kerangka untuk meminimalisir *error* proses eksperimen dari faktor input sampel. Umumnya, parameter yang diperhatikan dari kualitas hasil asam nukleat adalah konsentrasi, kemurnian asam nukleat dan integritas asam nukleat.

A. Konsentrasi Asam Nukleat

Konsentrasi asam nukleat menjadi salah satu parameter utama dalam penentuan kualitas DNA/RNA. Konsentrasi berkorelasi dengan kuantitas DNA/RNA yang terlarut pada eluent dalam satuan tertentu. Satuan pengukuran yang digunakan biasanya mengacu pada satuan ng/ μ L untuk melambangkan kuantitas DNA/RNA dalam nanogram tiap satuan volume pada suatu larutan homogen. Secara umum, semakin tinggi nilai konsentrasi suatu hasil ekstraksi asam nukleat menunjukkan semakin baik kualitas DNA/RNA yang didapatkan jika telaah berdasarkan tujuan dari proses ekstraksi asam nukleat, yaitu untuk mengekstrak keseluruhan asam nukleat dari sampel, sehingga dapat pula representatif terhadap kondisi sampel. Adapun, pengukuran konsentrasi asam nukleat dapat dilakukan melalui beberapa pendekatan namun diantaranya yang paling umum adalah spektrofotometri dan fluorometri.

Spektrofotometri merupakan suatu teknik yang menganalisis serapan, transmisi, pantulan atau pancaran cahaya oleh suatu molekul sebagai fungsi dari suatu panjang gelombang tertentu. Teknik ini dikembangkan berdasarkan hukum lambert-beer yang menyatakan suatu fungsi untuk mendeskripsikan korelasi melemahnya intensitas cahaya akibat melalui suatu medium tertentu, termasuk korelasinya dengan molekul DNA/RNA. Molekul DNA/RNA memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 260 nm sehingga pengukuran konsentrasi

berdasarkan spektrofotometri dilakukan dengan menembakkan gelombang cahaya 260 nm kemudian nilai serapannya dikalkulasi berdasarkan faktor konversi tertentu menghasilkan nilai konsentrasi DNA/RNA. Proses pengukuran nilai serapan sampel pada panjang gelombang 260 nm dilakukan dengan alat spektrofotometer, secara khusus dalam kaitannya dengan asam nukleat adalah spektrofotometer nanodrop.

Fluorometri merupakan suatu teknik untuk menganalisis eksitasi dan emisi gelombang cahaya dari suatu molekul setelah menyerap suatu panjang gelombang tertentu dan memancarkannya sebagai suatu panjang gelombang tertentu. Kemampuan eksitasi dan nilai emisinya menjadi faktor penentu besaran konsentrasi suatu molekul dengan mengacu pada korelasi semakin besar emisi panjang gelombang maka semakin banyak pula kuantitas molekul pada sampel. Dalam kaitannya dengan pengukuran konsentrasi DNA/RNA, molekul DNA/RNA tidak secara signifikan memancarkan cahaya pada suatu panjang gelombang tertentu setelah menyerap cahaya, sehingga molekul lain (*fluophore*) diperlukan untuk memberikan hasil data pengukuran yang lebih akurat. Molekul lain yang dipilih umumnya memiliki kemampuan eksitasi dan emisi yang spesifik jika berikatan pada molekul asam nukleat, sehingga nilai eksitasi dan emisinya secara spesifik berhubungan pada keberadaan asam nukleat dalam sampel. Salah satu jenis molekul yang umum digunakan pada reagen fluorometri DNA/RNA adalah SYBR yang dapat menyerap panjang gelombang biru (*blue-light wavelength*) kemudian di emisikan pada panjang gelombang maksimum ~520 nm dalam kondisinya berikatan dengan DNA/RNA. Adapun, kondisi eksitasi dan emisi tersebut dihitung dengan menggunakan alat fluorometer.

B. Kemurnian Asam Nukleat

Keberadaan asam nukleat berkaitan erat dengan keberadaan protein dalam sel. Hal tersebut sehubungan dengan komposisi protein pada sel dalam bentuk asam aminonya, dalam komponen-komponen sel, serta ikatan antara protein histon dengan DNA dalam suatu struktur coil. Kondisi tersebut menyebabkan protein juga dapat terkestrak dalam proses ekstraksi dan isolasi asam nukleat. Keberadaan protein ini dapat menghambat proses analisis lanjutan dari DNA/RNA oleh ikatan yang terbentuk diantara keduanya, sehingga nilai kemurnian asam nukleat seringkali dihubungkan

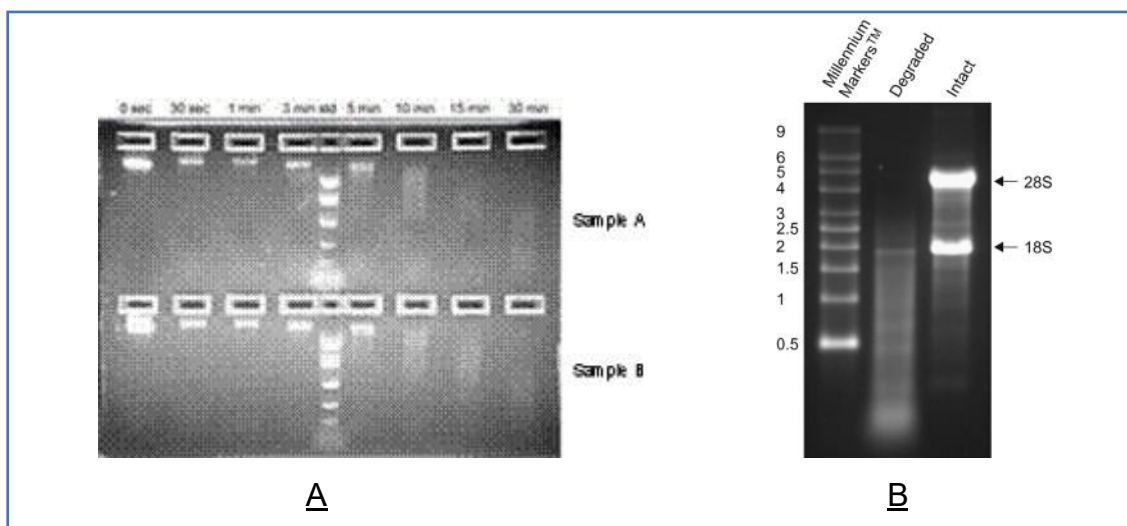
dengan keberadaan protein pada sampel. Adapun, pengukuran nilai kemurnian asam nukleat tersebut dilakukan secara spektrofotometri.

Pengukuran secara spektrofotometri dilakukan pada panjang gelombang 260 nm sebagai panjang gelombang maksimum dari asam nukleat dan pada panjang gelombang 280 nm sebagai panjang gelombang dari protein. Nilai absorbansi dari panjang gelombang 260 nm (A_{260}) dibandingkan dengan nilai absorbansi dari panjang gelombang 280 nm (A_{280}) akan memberikan nilai kemurnian dari asam nukleat. Standar umum yang digunakan untuk menyatakan nilai kemurnian asam nukleat minim keberadaan protein adalah nilai A_{260}/A_{280} berkisar pada 1.8 - 2 dengan isolat DNA cenderung memiliki nilai mendekati 1.8 dan isolat RNA cenderung memiliki nilai mendekati 2. Sebagai tambahan, kemurnian terhadap kontaminan (garam-garam mineral dari reagen ekstraksi, metabolit sekunder, dan molekul lainnya) juga umum dipertimbangkan untuk melihat kualitas kemurnian asam nukleat. Hal tersebut dapat dicabai dengan membandingkan serapan asam nukleat (A_{260}) dengan serapan pada panjang gelombang 230 nm sebagai nilai serapan kontaminan. Standar umum yang digunakan untuk menyatakan nilai kemurnian asam nukleat terhadap kontaminan adalah nilai A_{260}/A_{230} lebih dari 2 ($A_{260}/A_{230} > 2$), dalam rentang umumnya 2-2.2.

C. Integritas Asam Nukleat

Integritas asam nukleat merupakan kondisi asam nukleat sehubungan dengan nilai degradasi dan fragmentasinya. Suatu asam nukleat dapat terdegradasi dan terfragmentasi sehingga satu untai DNA/RNA yang seharusnya dalam sebuah kesatuan untai panjang menjadi terpisah-pisah dalam beberapa untai yang lebih kecil. Kondisi tersebut menyebabkan adanya limitasi analisis lanjutan yang membutuhkan analisis lebih spesifik hingga ke satuan unit basa terkecil atau dalam penyusunan *assembly genome*, sehingga integritas asam nukleat juga menjadi salah satu parameter kualitas hasil ekstraksi DNA/RNA yang perlu dipertimbangkan sesuai dengan peruntukan ujinya. Adapun, integritas asam nukleat dapat dianalisis berdasarkan hasil elektroforesis (elektroferogram) yang nilainya dapat dilihat secara manual dengan mata ataupun dengan menggunakan bantuan alat.

Secara manual, elektroferogram yang tidak terfragmentasi ditandai dengan adanya band elektroforesis yang jelas (tanpa smear) dengan 1 band elektroforesis untuk sampel isolat DNA serta adanya 2 band elektroforesis untuk sampel isolat RNA. Keberadaan 1 band elektroforesis pada ukuran basepair tertentu dari sampel isolat DNA menunjukkan keberadaan *genomic DNA*, sedangkan 2 band elektroforesis pada ukuran basepair 1500-2000 dan ~4000 dari sampel isolat RNA menunjukkan keberadaan 18s dan 28s rRNA pada organisme eukariotik atau 16s dan 23s rRNA dari organisme prokariotik. Sedangkan dengan bantuan alat, elektroferogram dapat ditentukan nilai *DNA Integrity Number (DIN)*/*RNA Integrity Number (RIN)* dari tiap sampel. Nilai DIN dan RIN tersebut disajikan dalam skala 1-10 dengan nilai 1 sebagai nilai asam nukleat yang terfragmentasi dan nilai 10 sebagai nilai asam nukleat yang utuh. Nilai DIN dan RIN tersebut dapat divalidasi berdasarkan kesesuaian hasil elektroferogramnya.



(Source: Thermo Fisher Scientific Inc.)

Gambar 1. Elektroferogram; A: Elektroferogram DNA; B: Elektroferogram RNA

WORKSHEET – Pengecekan Kualitas Hasil Ekstraksi Asam Nukleat

1. Cara Kerja

a. Penggunaan Nanodrop Spectrophotometer

- ☐ Siapkan buffer elusi ekstraksi asam nukleat, *pipette tips* 10 μL , *micropipette* 10 μL , *Nuclease Free Water* (NFW) dan tisu serat halus.
- ☐ Nyalakan nanodrop dengan menekan saklar ON/OFF pada bagian belakang alat dan tunggu hingga inialisasi alat selesai.
- ☐ Tekan tab menu DNA dari 6 pilihan pengujian.
- ☐ Matikan pilihan “Auto Blank” dan “Auto-Measure”.
- ☐ Tentukan nama folder dan nama pengujian untuk pelacakan hasil data.
- ☐ Buka *nanodrop arms*.
- ☐ Bersihkan sensor dengan memindahkan 2 μL NFW ke sensor bawah menggunakan *micropipette*.
- ☐ Tutup *nanodrop arms*.
- ☐ Buka kembali *nanodrop arms* dan bersihkan sensor atas dan bawah dengan meletakkan tisu serat halus pada sensor.
- ☐ Lakukan kalibrasi blanko dengan memindahkan 2 μL buffer elusi ke sensor bawah menggunakan *micropipette*.
- ☐ Tutup *nanodrop arms* dan tekan menu “Blank”.
- ☐ Buka kembali *nanodrop arms* dan bersihkan sensor atas dan bawah dengan meletakkan tisu serat halus pada sensor.
- ☐ Bersihkan sensor dengan memindahkan 2 μL NFW ke sensor bawah menggunakan *micropipette*.
- ☐ Tutup *nanodrop arms*.
- ☐ **Buka kembali *nanodrop arms* dan bersihkan sensor atas dan bawah dengan meletakkan tisu serat halus pada sensor.**
- ☐ **Lakukan pengujian sampel dengan memindahkan 2 μL sampel ke sensor bawah menggunakan *micropipette*.**
- ☐ **Tutup *nanodrop arms* dan tekan menu “Measure”.**
- ☐ **Buka kembali *nanodrop arms* dan bersihkan sensor atas dan bawah dengan meletakkan tisu serat halus pada sensor.**
- ☐ **Bersihkan sensor dengan memindahkan 2 μL NFW ke sensor bawah menggunakan *micropipette*.**
- ☐ **Tutup *nanodrop arms*.**
- ☐ Ulangi langkah bercetak **bold** untuk sampel lainnya.
- ☐ Jika selesai, kembali ke menu awal dan matikan alat nanodrop dengan menekan saklar ON/OFF.
- ☐ Opsi: Hasil dapat diprint dengan menekan menu “Print”.

- b. Penggunaan Qubit Fluorometer 4.0 dengan kit Equalbit 1x dsDNA HS Assay
- ☐ Siapkan kit Equalbit 1x dsDNA HS Assay, tube 0.5 mL, *pipette tips* 10 μ L, *micropipette* 10 μ L, *pipette tips* 200 μ L, dan *micropipette* 200 μ L.
 - ☐ Nyalakan alat dengan Qubit Fluorometer 4.0 dengan memasukkan adapter pada stop-kontak.
 - ☐ Siapkan larutan standar 1 dengan mencampur 190 μ L Working Solution + 10 μ L Standar 1 pada tube 0.5 mL dengan *micropipette*.
 - ☐ Siapkan larutan standar 2 dengan mencampur 190 μ L Working Solution + 10 μ L Standar 2 pada tube 0.5 mL dengan *micropipette*.
 - ☐ *Quick vortex* tube standar 1 dan standar 2 serta inkubasi selama 2 menit dalam suhu ruang (jika perlu dapat *spin-down* tube standar).
 - ☐ Pilih menu assay "DNA" untuk kelompok uji DNA.
 - ☐ Pilih menu reagent "1x dsDNA High Sensitivity Assay".
 - ☐ Pilih menu "run standard" untuk membuat kurva standar baru.
 - ☐ Letakkan tube standar 1 pada *sample chamber* saat layar *touchscreen* menunjukkan "Insert standar 1" dan tutup kembali *sample chamber*.
 - ☐ Pilih menu "read standard" untuk membaca konsentrasi DNA pada standar 1.
 - ☐ Letakkan tube standar 2 pada *sample chamber* saat layar *touchscreen* menunjukkan "Insert standar 2" dan tutup kembali *sample chamber*.
 - ☐ Pilih menu "read standard" untuk membaca konsentrasi DNA pada standar 2.
 - ☐ Siapkan larutan sampel dengan mencampur 199 μ L Working Solution + 1 μ L sampel pada masing-masing tube 0.5 mL dengan *micropipette* untuk seluruh sampel yang akan diuji.
 - ☐ *Quick vortex* tube sampel dan inkubasi selama 2 menit dalam suhu ruang (jika perlu dapat *spin-down* tube standar).
 - ☐ Pilih menu input sampel 1 μ L dan satuan output ng/ μ L.
 - ☐ **Letakkan tube sampel 1 pada *sample chamber* saat layar *touchscreen* dan tutup kembali *sample chamber*.**
 - ☐ **Pilih menu "read tube" untuk membaca konsentrasi DNA pada sampel 1.**
 - ☐ Ulangi langkah bercetak **bold** untuk sampel lainnya.
 - ☐ Jika selesai, kembali ke menu awal dan matikan alat.

2. Hasil

Keterangan Sampel

- Jenis sampel:
- Kit Ekstraksi:
- Hasil Pengecekan Kualitas:

Jenis Pengujian		Intepretasi
Nanodrop Spectrophotometer	Konsentrasi (ng/ μ L)	
	A260/A280	
	A260/A230	
Qubit Fluorometer 4.0	Konsentrasi (ng/ μ L)	

Keterangan Sampel

- Jenis sampel:
- Kit Ekstraksi:
- Hasil Pengecekan Kualitas:

Jenis Pengujian		Intepretasi
Nanodrop Spectrophotometer	Konsentrasi (ng/ μ L)	
	A260/A280	
	A260/A230	
Qubit Fluorometer 4.0	Konsentrasi (ng/ μ L)	

Keterangan Sampel

- Jenis sampel:
- Kit Ekstraksi:
- Hasil Pengecekan Kualitas:

Jenis Pengujian		Intepretasi
Nanodrop Spectrophotometer	Konsentrasi (ng/ μ L)	
	A260/A280	
	A260/A230	
Qubit Fluorometer 4.0	Konsentrasi (ng/ μ L)	

Keterangan Sampel

- Jenis sampel:
- Kit Ekstraksi:
- Hasil Pengecekan Kualitas:

Jenis Pengujian		Intepretasi
Nanodrop Spectrophotometer	Konsentrasi (ng/ μ L)	
	A260/A280	
	A260/A230	
Qubit Fluorometer 4.0	Konsentrasi (ng/ μ L)	

Bagian II: Oxford Nanopore Technologies (ONT) Sequencing

Sekuensing asam nukleat merupakan teknik pembacaan urutan basa nitrogen dari asam nukleat untuk menentukan urutan basa suatu untai DNA/RNA tertentu dalam mendukung suatu analisis biologis. Salah satu teknik sekuensing modern saat ini memungkinkan pembacaan sekuen asam nukleat dalam jumlah besar dan dalam waktu yang relatif cepat menggunakan teknologi *high-throughput Next Generation Sequencing*, seperti *Oxford Nanopore Technologies Sequencer*.

A. Nanopore Sequencing Technologies

Nanopore sequencing yang diluncurkan oleh Oxford Nanopore Technologies (ONT) adalah teknologi sekuensing generasi ketiga yang berbasis protein *nanopore*. Protein *nanopore* yang dikembangkan oleh ONT dapat dilewati oleh untai DNA/RNA dan memengaruhi arus listrik pada *nanopore*. Arus listrik yang dihasilkan oleh setiap basa nukleotida (adenin, guanin, sitosin dan timin) bersifat unik sehingga untai basa nukleotida dari asam nukleat dapat identifikasi. Mekanisme tersebut memungkinkan analisis sekuen DNA/RNA *native* (tanpa amplifikasi) yang panjang (*long-read*) secara *real-time*. ONT juga menyediakan instrumen-instrumen pembacaan (*sequencer*) yang didesain khusus untuk digunakan di luar laboratorium (MinION, Flongle) dan di dalam laboratorium dengan skala besar (GridION, PromethION). Oleh karena versatilitasnya, *nanopore sequencing* telah diaplikasikan secara luas untuk berbagai sampel biologis dalam bermacam-macam bidang, seperti riset kanker, mikrobiologi, lingkungan, hewan, tumbuhan, dan lain-lain. Adapun, komponen utama dalam membaca sekuen DNA dengan ONT Sequencer adalah *Flowcells* dan Input DNA (*Library*)

B. Flowcells

Komponen instrumen sekuensing yang berfungsi untuk membaca untai DNA dalam bentuk *Library* disebut sebagai *flowcells*. Suatu *flowcells* terdiri atas *nanopore*, *microscaffold array*, *sensor chips*, dan Application-Specific Integrated Circuit (ASIC). *Nanopore* merupakan subunit protein yang tersusun dengan celah pada suatu polimer

membran tahan listrik yang membentuk jalur lintasan DNA dengan kondisi ionik tertentu. *Microscaffold array* merupakan struktur penguat membran *nanopore*. *Sensor chip* merupakan komponen sensor pendeteksi perubahan arus listrik berdasarkan kondisi ionik *nanopore* yang terhubung dengan elektroda *microscaffold*. Sedangkan, ASIC merupakan penghubung antar *channel nanopore* dan berfungsi sebagai komponen pengontrol yang memungkinkan terjadinya analisis paralel antar *channel nanopore*.

C. Library Preparation

Suatu asam nukleat perlu dipersiapkan terlebih dahulu agar dapat dibaca dengan *ONT Sequencer*. Untai asam nukleat tersebut perlu dipasangkan komponen berupa “adapter” pada bagian sekuennya. Adapter *ONT* merupakan sebuah motor protein yang memungkinkan asam nukleat bergerak melewati *nanopore*. Penempelan adapter tersebut terjadi melalui proses enzimatis menggunakan yang akan menyatukan untaian DNA/RNA dengan motor protein dalam satu rangkaian. Proses penyiapan untaian DNA disebut dengan istilah proses *Library Preparation* dan hasilnya disebut sebagai *Library*, yang merujuk pada untaian DNA yang telah memiliki adapter dan siap untuk dibaca dengan instrumen *sequencer* *ONT*.

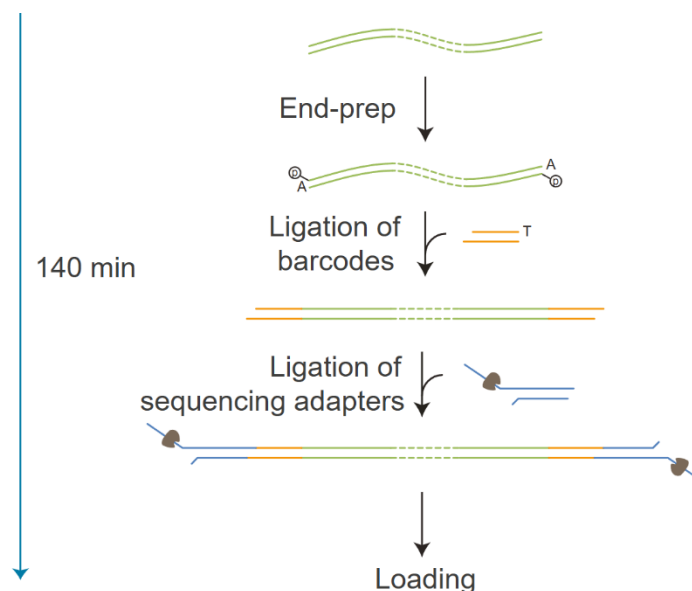
Secara khusus dalam kasus sekuensing dengan sampel lebih dari 1, suatu asam nukleat dari sampel yang berbeda dapat dilakukan pembacaan dalam satu kali proses yang sama (multiplexing). Proses tersebut dimungkinkan melalui penambahan komponen berupa “Barcode”. Barcode merupakan untaian DNA yang telah didesain secara spesifik untuk dipasangkan pada untaian DNA sampel, sehingga masing-masing untaian DNA dari suatu sampel memiliki kode spesifik yang berbeda dari kode untaian DNA dari sampel lainnya seperti barcode. Proses penempelan barcode pada sekuens DNA sampel termasuk dalam proses *Library Preparation* dan terjadi melalui proses enzimatis yang dilakukan sebelum tahap penempelan adapter.

Proses enzimatis yang terjadi pada tahapan penempelan barcode maupun adapter bergantung pada jenis pendekatan kimiawi yang dilakukan. *ONT* memiliki 2 *chemistry* pendekatan kimiawi dalam tahapan *Library Preparation*, yaitu *Native* dan *Rapid*. Pendekatan *native* akan menggunakan enzim ligase untuk menempelkan barcode dan adapter pada untaian asam nukleat sampel. Sedangkan, pendekatan *rapid*

akan menggunakan transposase untuk fragmentasi untai asam nukleat bersamaan dengan penempelan barcode dan adapter sebagai sebuah transposon dalam suatu reaksi yang lebih cepat. Adapun, tahapan proses *Library Preparation* bergantung pada jenis sekuensing yang dilakukan DNA vs RNA, Native atau Rapid, serta dengan atau tanpa barcode, Kombinasi ketiganya dijelaskan secara lebih lanjut pada masing-masing protokol *library preparation* yang dapat ditemukan pada website ONT.

D. Protokol Native Barcoding for Genome DNA

Protokol *library preparation* untuk sekuensing DNA bakteri yang dilakukan dalam pelatihan ini dilakukan dengan protokol Ligation sequencing gDNA - Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24). Kata “gDNA” merujuk pada sekuensing dilakukan untuk input DNA dalam bentuk genom (tanpa *enrichment PCR*), “Native” merujuk pada pendekatan enzimatis yang dilakukan dan “Barcoding Kit 24” menunjukkan adanya penggunaan barcode 24 jenis untuk *sample multiplexing*. Berdasarkan kombinasi tersebut, tahapan dalam *library preparation* yang dilakukan adalah: DNA repair dan end-prep; Barcoding ligation; serta Adapter ligation dan clean-up.



Gambar 2. Overview workflow Nanopore Sequencing

Pada tahap pertama, genom DNA hasil ekstraksi dan isolasi asam nukleat akan diperbaiki jika terdapat kerusakan DNA genom akibat pengaruh tertentu, seperti deaminasi, oksidasi basa, *blocked 3'* ends, atau *nicks and gaps*. Hal tersebut

dilakukan secara bersamaan dengan proses pengubahan blunt-end DNA menjadi sticky-end DNA dengan menambahkan satu adenin pada ujung sekuen 3' untai DNA. Proses perbaikan DNA dilakukan dengan enzim NEBNext FFPE DNA Repair Mix dalam NEBNext FFPE DNA Repair Buffer dengan proses end-prep dilakukan dengan enzim Ultra II End-prep Enzyme Mix dan Ultra II End-prep Reaction Buffer.

Pada tahap kedua, barcode akan ditempelkan pada sekuen DNA difasilitasi oleh sticky end Adenin dan enzim ligase (Blunt/TA Ligase Master Mix). Setiap sampel akan ditempelkan dengan 1 barcode berbeda sebagai pembeda sekuen antar sampel. Dalam kasus pelatihan ini, barcode yang digunakan diambil dari kit 24 barcode, sehingga dapat dilakukan *multiplexing* hingga 24 sampel.

Pada tahap ketiga, adapter sekuensing (Native Adapter) ditempelkan pada setiap ujung blunt-end barcode dengan enzim ligase (Quick T4 DNA Ligase). dilakukan pula pembersihan atau purifikasi dengan beads. Native adapter merupakan sekuens pendek dengan motor protein yang ditempelkan pada barcode, sedangkan Quick T4 DNA Ligase merupakan enzim ligase yang memfasilitasi ligase blunt-end DNA secara efisien. Adapun, NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5X) digunakan untuk memberikan lingkungan enzimatis optimal untuk mempercepat proses reaksi.

E. Sampel Loading pada *Flowcell* dan Sekuensing

Library yang telah siap akan dimasukkan ke dalam *flowcell* untuk proses sekuensing. Proses tersebut dilakukan dengan proses *priming flowcells* dan *library mix*. Proses *priming* merupakan proses penyiapan flowcells dengan menempelkan tether pada area membran sekitar *nanopore* dengan memasukkan reagen Flow Cell Tether (FCT) dalam Flow Cell Flush (FCF) pada *flowcell*. Tether tersebut berfungsi sebagai pengait DNA pada bagian adapter motor protein untuk dapat masuk ke dalam *nanopore*. Sedangkan, proses library mix merupakan proses penambahan buffer sekuensing (SB) dan Library Beads (LIB) / Library Solutions (LIS) pada larutan *library* yang telah disiapkan. Proses tersebut berfungsi sebagai tahap pengkondisian lingkungan *flowcell* untuk katalis sekuensing pada *flowcell* serta memudahkan DNA masuk dalam *flowcell*.

WORKSHEET – Protokol Library Preparation

Workflow:

Ligation sequencing gDNA - Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) with modification.

Tahap 1: DNA Repair & End-Prep

Persiapan Reagen

1. Ultra II End Prep Enzyme Mix dan NEBNext FFPE DNA Repair Mix
 - a. Thawing pada isofreeze atau kotak es.
 - b. Flick (jangan vortex) dan spin down.
 - c. Simpan pada isofreeze atau kotak es.
2. Ultra II End Prep Reaction Buffer dan NEBNext FFPE DNA Repair Buffer
 - a. Thawing pada suhu ruangan.
 - b. Vortex
 - c. Simpan pada isofreeze atau kotak es.
3. AMPure XP Beads (AXP):
 - a. Thawing dan diamkan pada temperatur ruangan.
 - b. Vortex
 - c. Simpan pada suhu ruangan.

No	Steps	Notes
1 <input type="checkbox"/>	Persiapkan sampel dalam PCR tube 0.1 mL dengan konsentrasi 400 ng per sampel.	
2 <input type="checkbox"/>	Tambahkan NFW hingga campuran mencapai 12 µL. Campurkan dengan pippeting dan spin down.	

3 <input type="checkbox"/>	<p>Campurkan reagen dalam tube DNA</p> <table><tr><th>Reagent</th><th>Volume</th></tr><tr><td>DNA sample</td><td>12 μL</td></tr><tr><td>NEBNext FFPE DNA Repair Buffer</td><td>0.875 μL</td></tr><tr><td>Ultra II End-prep Reaction Buffer</td><td>0.875 μL</td></tr><tr><td>Ultra II End-prep Enzyme Mix</td><td>0.75 μL</td></tr><tr><td>NEBNext FFPE DNA Repair Mix</td><td>0.5 μL</td></tr><tr><td>TOTAL</td><td>15 μL</td></tr></table> <p>Mix dengan pipetting dan spin down</p>	Reagent	Volume	DNA sample	12 μ L	NEBNext FFPE DNA Repair Buffer	0.875 μ L	Ultra II End-prep Reaction Buffer	0.875 μ L	Ultra II End-prep Enzyme Mix	0.75 μ L	NEBNext FFPE DNA Repair Mix	0.5 μ L	TOTAL	15 μL	
Reagent	Volume															
DNA sample	12 μ L															
NEBNext FFPE DNA Repair Buffer	0.875 μ L															
Ultra II End-prep Reaction Buffer	0.875 μ L															
Ultra II End-prep Enzyme Mix	0.75 μ L															
NEBNext FFPE DNA Repair Mix	0.5 μ L															
TOTAL	15 μL															
4 <input type="checkbox"/>	<p>Inkubasi pada suhu 20°C selama 30 menit dilanjutkan dengan suhu 65°C selama 5 menit dengan thermal cycler.</p>															
5 <input type="checkbox"/>	<p>Pindahkan sampel pada 2 mL Eppendorf DNA LoBind tube</p>															
6 <input type="checkbox"/>	<p>Resuspend AMPure XP Beads (AXP) dengan vortex</p>															
7 <input type="checkbox"/>	<p>Tambahkan 15 μL resuspended AMPure XP Beads (AXP) pada LoBind tube dan flick lalu spindown.</p>															
8 <input type="checkbox"/>	<p>Inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang dengan alat Hula mixer (rotator mixer).</p>															
9 <input type="checkbox"/>	<p>Siapkan 80% ethanol dalam tube 2 mL dengan mencampurkan 800 μL ethanol dalam 200 μL NFW.</p>															

10 <input type="checkbox"/>	Spin down LoBind tube setelah proses rotator mixer dan letakkan pada magnetic rack hingga eluet bening. Buang supernatant.	
11 <input type="checkbox"/>	Dengan LoBind masih berada pada magnetic rack, masukkan 200 μ L etanol 80% ke dalam tube dengan hati-hati tanpa menyentuh pelet coklat. Kemudian, ambil kembali ethanol tersebut dan buang.	
12 <input type="checkbox"/>	Ulangi langkah 11	
13 <input type="checkbox"/>	Spin down LoBind dan letakkan kembali pada magnetic rack. Pipet sisa-sisa ethanol di dasar tube dan buang. Keringkan pelet selama sekitar 30 detik dengan keadaan tutup tube terbuka dan masih diletakkan pada magnetic rack.	
14 <input type="checkbox"/>	Pindahkan LoBind pada rak biasa dan resuspensi pelet dengan 10 μ L NFW dengan flick. Spin down dan inkubasi selama 2 menit pada suhu ruangan.	
15 <input type="checkbox"/>	Pindahkan Lobind pada rak magnetik hingga bening dan pindahkan eluet ke LoBind tube yang baru	
16 <input type="checkbox"/>	Kuantifikasi dengan Qubit Fluorometer sebanyak 1 μ L sampel dalam 199 μ L reaction buffer.	

Tahap 2: Barcoding Ligation

Persiapan Reagen:

1. NEB Blunt/TA Ligase Master Mix dan Native Barcodes (NB01-24)
 - a. Thawing pada suhu ruangan dan spin down.
 - b. Flick (jangan vortex).
 - c. Simpan pada isofreeze atau es.
2. EDTA
 - a. Thawing pada suhu ruangan.
 - b. Vortex dan spin down.
 - c. Simpan pada isofreeze atau es.
3. AMPure XP Beads (AXP):
 - a. Thawing dan diamkan pada temperatur ruangan.
 - b. Vortex.
 - c. Simpan pada suhu ruangan.

No	Steps	Notes										
1 <input type="checkbox"/>	<p>Siapkan reagen mix berikut dalam tube 0.2 μL</p> <table><tr><th>Reagent</th><th>Volume</th></tr><tr><td>End-prepped DNA</td><td>7.5 μL</td></tr><tr><td>Native Barcode (NB01-24)</td><td>2.5 μL</td></tr><tr><td>Blunt/ TA Ligase Master Mix</td><td>10 μL</td></tr><tr><td>Total</td><td>20 μL</td></tr></table> <p>Mix dengan pipetting, dan spin down</p>	Reagent	Volume	End-prepped DNA	7.5 μL	Native Barcode (NB01-24)	2.5 μL	Blunt/ TA Ligase Master Mix	10 μL	Total	20 μL	
Reagent	Volume											
End-prepped DNA	7.5 μL											
Native Barcode (NB01-24)	2.5 μL											
Blunt/ TA Ligase Master Mix	10 μL											
Total	20 μL											
2 <input type="checkbox"/>	<p>Inkubasi for 20 menit pada suhu 37°C dengan heat block.</p>											
3 <input type="checkbox"/>	<p>Tambahkan 2 μl EDTA (clear cap) pada tube 0.2 μl dan campurkan dengan pipetting, lalu spindown</p>											
4 <input type="checkbox"/>	<p>Campurkan seluruh sampel dalam satu LoBind tube 2mL</p>											

5 <input type="checkbox"/>	Resuspend AMPure XP Beads (AXP) dengan vortexing	
6 <input type="checkbox"/>	Tambahkan sebanyak 0.4x dari total volume AMPure XP Beads (AXP) pada tube dan campurkan dengan pippeting	
7 <input type="checkbox"/>	Inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang dengan alat Hula mixer (rotator mixer).	
8 <input type="checkbox"/>	Siapkan 80% ethanol dalam tube 2 mL dengan mencampurkan 1600 μ L ethanol dalam 400 μ L NFW	
9 <input type="checkbox"/>	Spin down LoBind tube setelah proses rotator mixer dan letakkan pada magnetic rack hingga eluet bening. Buang supernatant	
10 <input type="checkbox"/>	Dengan LoBind masih berada pada magnetic rack, masukkan 700 μ L etanol 80% ke dalam tube dengan hati-hati tanpa menyentuh pelet coklat. Kemudian, ambil kembali ethanol tersebut dan buang.	
11 <input type="checkbox"/>	Ulangi langkah STEP 10.	
12 <input type="checkbox"/>	Spin down LoBind dan letakkan kembali pada magnetic rack. Pipet sisa-sisa ethanol di dasar tube dan buang. Keringkan pelet selama sekitar 30 detik dengan keadaan tutup tube terbuka dan masih diletakkan pada magnetic rack	
13 <input type="checkbox"/>	Pindahkan LoBind pada rak biasa dan resuspensi pelet dengan 35 μ L NFW dengan flick.	

14 <input type="checkbox"/>	Inkubasi selama 10 menit dengan suhu 37°C pada heat block. Flick tube setiap interval 2 menit.	
15 <input type="checkbox"/>	Pindahkan Lobind pada rak magnetik hingga bening dan pindahkan eluet ke 2 mL LoBind tube yang baru	
16 <input type="checkbox"/>	Kuantifikasi dengan Qubit Fluorometer sebanyak 1 µL sampel dalam 199 µL reaction buffer.	

Tahap 3: Adapter Ligation

Persiapan Reagen:

1. Quick T4 DNA Ligase dan Native Adapter (NA)
 - a. Thawing pada suhu ruangan dan spin down.
 - b. Mix up and down.
 - c. Simpan pada isofreeze atau es.
2. NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5X), Elution Buffer (EB), dan Long Fragment Buffer (LFB) atau Short Fragment Buffer (SFB).
 - a. Thawing pada suhu ruangan.
 - b. Vortex dan spin down.
 - c. Simpan pada isofreeze atau es.
3. AMPure XP Beads (AXP):
 - a. Thawing dan diamkan pada temperatur ruangan.
 - b. Vortex.
 - c. Simpan pada suhu ruangan.

Protocol:

No	Steps	Notes
1 <input type="checkbox"/>	Pada 2 mL Eppendorf LoBind tube, campurkan reagen berikut:	

	<table><tr><th>Reagent</th><th>Volume</th></tr><tr><td>Pooled barcoded sample</td><td>30 μL</td></tr><tr><td>Native Adapter (NA)</td><td>5 μL</td></tr><tr><td>NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer 5X</td><td>10 μL</td></tr><tr><td>Quick T4 DNA Ligase</td><td>5 μL</td></tr><tr><td>Total</td><td>50 μL</td></tr></table> <p>Mix dengan flicking dan spindown</p>	Reagent	Volume	Pooled barcoded sample	30 μ L	Native Adapter (NA)	5 μ L	NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer 5X	10 μ L	Quick T4 DNA Ligase	5 μ L	Total	50 μL	
Reagent	Volume													
Pooled barcoded sample	30 μ L													
Native Adapter (NA)	5 μ L													
NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer 5X	10 μ L													
Quick T4 DNA Ligase	5 μ L													
Total	50 μL													
2 <input type="checkbox"/>	Inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang													
3 <input type="checkbox"/>	Resuspend AMPure XP Beads (AXP) dengan vortex.													
4 <input type="checkbox"/>	Tambahkan 20 μ L resuspended AMPure XP Beads (AXP) pada LoBind Tube dan flick.													
5 <input type="checkbox"/>	Inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang dengan alat Hula mixer (rotator mixer).													
6 <input type="checkbox"/>	Spin down LoBind tube setelah proses rotator mixer dan letakkan pada magnetic rack hingga eluet bening. Buang supernatant													
7 <input type="checkbox"/>	Dengan LoBind tube masih berada pada magnetic rack, masukkan 125 μ L LFB atau SFB ke dalam tube. Flick hingga pelet ter-resuspensi, spin down, lalu letakkan tube kembali pada magnetic rack. Tunggu selama 2-3 menit hingga eluet kembali bening, lalu buang supernatan dengan pipet.													
8 <input type="checkbox"/>	Ulangi the STEP 8 (simpan LFB/SFB dalam 0.2 mL PCR tube berbeda)													

9 <input type="checkbox"/>	Spin down LoBind dan letakkan kembali pada magnetic rack. Pipet sisa-sisa ethanol di dasar tube dan buang. Keringkan pelet selama sekitar 30 detik dengan keadaan tutup tube terbuka dan masih diletakkan pada magnetic rack	
10 <input type="checkbox"/>	Pindahkan LoBind pada rak biasa dan resuspensi pelet dengan 25 μ L Elution Buffer (EB) dengan flick.	
11 <input type="checkbox"/>	Inkubasi selama 30 menit dengan suhu 37°C di heat block. Flick tube setiap interval 5 menit.	
12 <input type="checkbox"/>	Pindahkan Lobind pada rak magnetik hingga bening dan pindahkan eluet ke 2 mL LoBind tube yang baru	
14 <input type="checkbox"/>	Kuantifikasi dengan Qubit Fluorometer sebanyak 1 μ L sampel dalam 199 μ L reaction buffer.	
15 <input type="checkbox"/>	Siapkan hasil Library dalam LoBind tube berbeda dengan konsentrasi 462 ng dalam 32 μ L Elution Buffer (EB):	

Tahap 4: Priming & Loading Flowcell

Persiapan Reagen dan Flow Cell (PromethION)

1. Flow Cell Tether (FCT), Flow Cell Flush (FCF)
 - a. Thawing pada suhu ruangan.
 - b. Vortex dan spin down.
 - c. Simpan pada isofreeze atau es.
2. Sequencing Buffer (SB) dan Library Beads (LIB)
 - a. Thawing pada suhu ruangan.
 - b. Vortex dan spin down.
 - c. Simpan pada isofreeze atau es.

3. Flow Cell PromethION

- a. Keluarkan flow cell dari fridge dan thawing selama sekitar 30 menit.
- b. Pasang flow cell pada PromethION24.

No	Steps	Notes										
1.	<div>Campurkan reagen berikut dalam 2 mL LoBind tube</div> <div><div><div></div></div><table><tr><th>Reagent Priming Mix</th><th>Volume</th></tr><tr><td>Flow Cell Flush (FCF)</td><td>1170 µL</td></tr><tr><td>Flow Cell Tether (FCT)</td><td>30 µL</td></tr><tr><td>TOTAL</td><td>1200 µL</td></tr></table>Mix dengan vortex, lalu spin down.</div>	Reagent Priming Mix	Volume	Flow Cell Flush (FCF)	1170 µL	Flow Cell Tether (FCT)	30 µL	TOTAL	1200 µL			
Reagent Priming Mix	Volume											
Flow Cell Flush (FCF)	1170 µL											
Flow Cell Tether (FCT)	30 µL											
TOTAL	1200 µL											
2.	<div>Campurkan reagen berikut dalam 2 mL LoBind tube</div> <div><div><div></div></div><table><tr><th>Reagent Library Mix</th><th>Volume</th></tr><tr><td>Sequencing Buffer (SB)</td><td>100 µL</td></tr><tr><td>Library Beads (LIB) à mix by pipetting before hand</td><td>68 µL</td></tr><tr><td>DNA Library</td><td>32 µL</td></tr><tr><td>TOTAL</td><td>200 µL</td></tr></table>Mix dengan vortex, lalu spin down.</div>	Reagent Library Mix	Volume	Sequencing Buffer (SB)	100 µL	Library Beads (LIB) à mix by pipetting before hand	68 µL	DNA Library	32 µL	TOTAL	200 µL	
Reagent Library Mix	Volume											
Sequencing Buffer (SB)	100 µL											
Library Beads (LIB) à mix by pipetting before hand	68 µL											
DNA Library	32 µL											
TOTAL	200 µL											
3.	<div>Diamkan flowcell pada suhu ruang selama dan masukkan flowcell pada PromethION24.</div> <div>Buka aplikasi MinKNOW, jalankan “FLOW CELL CHECK”</div>											
4.	<div>Slide inlet port cover searah jarum jam.</div> <div></div>											

5.	Check bubble dengan pipet P1000 pipette dengan <input type="checkbox"/> pengaturan skala 500.	
6.	Loading 500 μ L priming mix secara perlahan ke <input type="checkbox"/> dalam flowcell dari inlet port. Hindari bubble dan sisakan sedikit larutan pada ujung tip.	
7.	Tunggu 5 menit <input type="checkbox"/>	
8.	Loading 500 μ L priming mix secara perlahan ke <input type="checkbox"/> dalam flowcell dari inlet port. Hindari bubble dan sisakan sedikit larutan pada ujung tip.	
9.	Campurkan loading mix dengan pippeting dan <input type="checkbox"/> Loading 200 μ L priming mix secara perlahan ke dalam flowcell dari inlet port. Hindari bubble dan sisakan sedikit larutan pada ujung tip.	
10.	Tutup inlet port dan tunggu 30 menit <input type="checkbox"/>	
11.	Buka aplikasi MinKnow > klik Start > klik Start <input type="checkbox"/> Sequencing > setting parameter sesuai kebutuhan > klik Start > sequencing akan berjalan dan dapat dipantau pro-gresnya pada interface MinKnow.	