



# **XCeloSeq™ Targeted RNA Enrichment Protokol s UDI indexy**

**FOR RESEARCH USE ONLY**

**Skladujte při -20°C**

**IFU1049 Verze 2.0 – Listopad 2020**



## 5 GeneFirst XCeloSeq Targeted RNA Enrichment Kit Reagencie

XCeloSeq Targeted RNA Enrichment Kity se skládají ze dvou krabiček:

- První krabička obsahuje XCeloSeq Targeted RNA Core Reagents – obecné reagencie univerzální pro všechny XCeloSeq Targeted RNA kity.
- Druhá krabička obsahuje XCeloSeq Targeted RNA Enrichment Primers – reagencie specifické pro daný panel genů.

### 5.1 XCeloSeq Targeted RNA Core Reagents (GF031)

The XCeloSeq Targeted RNA Core Reagents krabička obsahuje následující reagencie:

Reagencie	Barva zkumavky	Barva víčka	Skladován	Kat. číslo
FS Mix	Čirá	Hnědá	-20°C	PC0038
SS Enzyme	Čirá	Žlutá	-20°C	PC0039
ATO	Čirá	Modrá	-20°C	PC0040
ATO Reaction Mix	Čirá	Zelená	-20°C	PC0041
Amplification One Mix	Čirá	Čirá	-20°C	PC0042
Primers	Čirá	Červená	-20°C	PC0043
Master Mix	Čirá	Fialová	-20°C	PC0044



Pozor, reagencie nejsou zaměnitelné mezi různými XCeloSeq kity.

### 5.2 XCeloSeq Targeted RNA Enrichment Primery

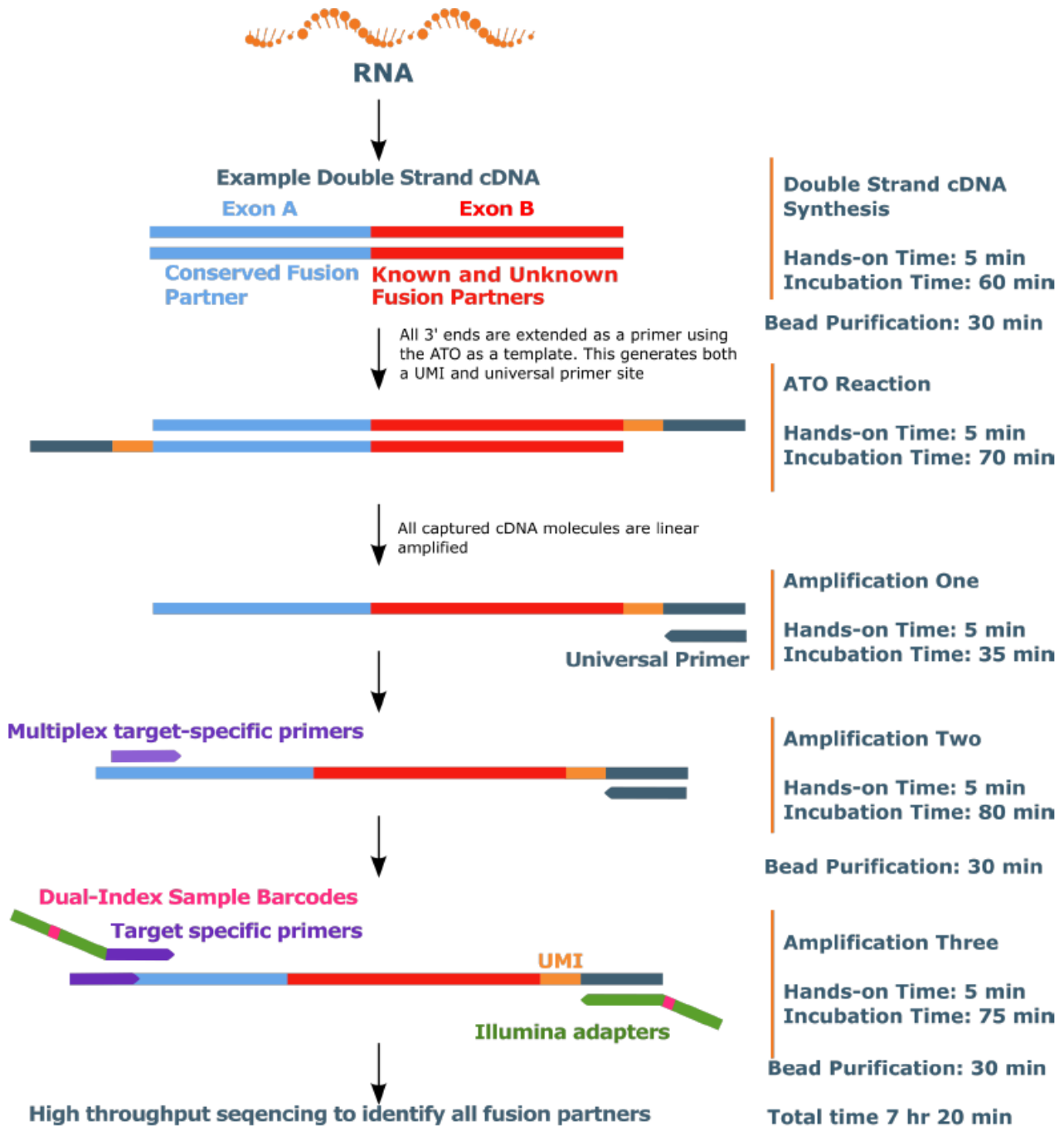
Reagencie	Barva zkumavky	Barva víčka	Skladování
Outer Pool	Čirá	Oranžová	-20°C
Inner Pool	Čirá	Černá	-20°C

### 5.3 Další vybavení a reagentie, které nejsou dodávány s kitem

- Reagentie a vybavení pro extrakci RNA
- Voda (molecular biology grade)
- 10 mM Tris-HCl pH 8.0 (molecular biology grade)
- 100% ethanol (molecular biology grade)
- DNase and RNase-free špičky s filtrem
- DNase and RNase-free PCR zkumavky
- AMPure® XP magnetic beads
- Magnet
- Pipety
- Vortex
- Microcentrifuga
- Standardní PCR Cycler
- Indexační kit s unikátními indexy (UDI index kit), který vystačí na 128 vzorků.

Product Name	Product Code
XCelSeq UDI Set 1-01 for Illumina	IDX1-01
XCelSeq UDI Set 1-02 for Illumina	IDX1-02
XCelSeq UDI Set 1-03 for Illumina	IDX1-03
XCelSeq UDI Set 1-04 for Illumina	IDX1-04
XCelSeq UDI Set 1-05 for Illumina	IDX1-05
XCelSeq UDI Set 1-06 for Illumina	IDX1-06
XCelSeq UDI Set 1-07 for Illumina	IDX1-07
XCelSeq UDI Set 1-08 for Illumina	IDX1-08
XCelSeq UDI Set 1-09 for Illumina	IDX1-09
XCelSeq UDI Set 1-10 for Illumina	IDX1-10
XCelSeq UDI Set 1-11 for Illumina	IDX1-11
XCelSeq UDI Set 1-12 for Illumina	IDX1-12

## 6 Protokol Overview



## 7 Než začnete

Lze použít FFPE RNA nebo celkovou (high-quality) RNA případně cell-free RNA nebo celková cell-free nukleové kyseliny (DNA /RNA), ačkoli u cell-free RNA lze očekávat nižší sešitivitu pro fúze vzhledem k nízké koncentraci.

### **Doporučená koncentrace FFPE RNA je 5-200 ng.**

U nízkokvalitní RNA (RIN skóre nižší než 8) doporučujeme použít 200ng RNA.

U kvalitní RNA (RIN skóre vyšší než 8) doporučujeme použít 100ng RNA.

Vyndejte AMPure XP beads z ledničky

Nařed'te si 80% EtOH.

## 8 Návod

### 8.1 Syntéza prvního vlákna cDNA

- Na ledu napipetujte do 0,2 ml zkumavky **4  $\mu$ l FS Mix (Hnědé víčko)** a přidejte **16  $\mu$ l** vzorku **RNA**, zvortexujte a centrifugujte.
- Vložte do předehřátého PCR cycleru: víko  $\geq 100$  °C, objem vzorku je 20  $\mu$ l

Krok	Teplota	čas
1	65 °C	5 minut
2	4 °C	2 minut
3	25 °C	2 minut
4	55 °C	10 minut
5	4 °C	Hold

Doba v cycleru 20 minut

### 8.2 Syntéza druhého vlákna cDNA

- Na ledu ke vzorku přidejte **1.5  $\mu$ l SS Enzyme (Žluté víčko)**, vortextujte a centrifugujte.
- Vložte do předehřátého PCR cycleru: víko  $\geq 100$  °C, objem vzorku je 21.5  $\mu$ l

Krok	Teplota	čas
1	22 °C	30 minut
2	4 °C	Hold

Doba v cycleru 30 minut

### 8.3 Přečištění na kuličkách

- 1) Přidejte ke vzorku 28.5 µl vody.
- 2) Přidejte **100 µl** AMPure XP beads ke vzorkům, propipetujte 15x pipetou.
- 3) Nechte **5 minut** stát při RT.
- 4) Vložte vzorky na magnet na 3 minuty nebo dokud se kuličky nepřichytí na stěnu zkumavky.
- 5) Odsajte a **vyhodte supernatant**.
- 6) Ponechte zkumavky v magnetu a přidejte **150 µl 80% ethanolu**.
- 7) Inkubujte 30 sekund nebo dokud se kuličky nepřichytí na stěnu zkumavky.
- 8) Odsajte a **vyhodte supernatant**.
- 9) Zopakujte promytí ethanolom **ještě jednou**.
- 10) Vzorky centrifugujte, vraťte na magnet a opatrně odsajte zbytek ethanolu.
- 11) Sušte vzorky s otevřeným víčkem 3 minuty při RT. **Nepřesušte**.
- 12) Peletu rozpustte v **15 µl** vody.
- 13) Inkubujte **5 minut**.
- 14) Vložte vzorky na 3 minuty na magnet nebo dokud se kuličky nepřichytí na stěnu zkumavky.
- 15) Odsajte **13 µl** supernatantu do čisté 0,2 ml zkumavky.



#### 8.4 ATO Reakce – Krok 1: ATO a cDNA směs

- K vzorkům přidejte **2 µl ATO** (**Blue Cap**), vortexujte a centrifugujte.
- Vložte do předehřátého PCR cycleru: víko  $\geq 100$  °C, objem vzorku je 15 µl

Krok	Teplota	čas
<b>1</b>	65 °C	2.5 minut
<b>2</b>	10 °C	1 minut
<b>3</b>	10 °C	Hold

Doba v cycleru 4 minuty

#### 8.5 ATO Reakce – Krok 2: Přidání ATO Reakčního mixu

- Ke vzorkům přidejte **5 µl ATO Reaction Mix (Green Cap)**.
- Vložte do přechlazeného (4°C) PCR cycleru: víko  $\geq 100$  °C, objem vzorku je 20 µl

Krok	Opakování	Teplota	čas
<b>1</b>	-	4 °C	Hold/Pause
<b>2</b>	1x	10 °C	1 minuta
<b>3</b>	1x	26 °C	6 minut
<b>4</b>		30 °C	<b>10 minut</b>
<b>5</b>		65 °C	1 minuta
<b>6</b>		10 °C	1 minuta
<b>7</b>		26 °C	6 minut
<b>8</b>		30 °C	<b>10 minut</b>
<b>9</b>		2x	65 °C
<b>10</b>	10 °C		1 minuta
<b>11</b>	26 °C		6 minut
<b>12</b>	30 °C		<b>5 minut</b>
<b>13</b>	-	4 °C	Hold

Doba v cycleru 1:05 hod

## 8.6 První amplifikace

- Ke vzorkům přidejte **27 µl ATO Amplification One Mix (Čiré víčko)** a **1.0 µl Primers (Červené víčko)**, vortexujte a centrifugujte.
- Vložte do předehřátého PCR cycleru: víko  $\geq 100$  °C, objem vzorku je 48 µl.

Krok	Opakování	Teplota	čas
1	1x	37 °C	10 minut
2	1x	98 °C	30 sekund
3	10x	98 °C	5 sekund
4		60 °C	1 minuta
5		72 °C	1 minuta
6	1x	72 °C	2 minut
7	-	4 °C	Hold

Doba v cycleru 45 min



Po PCR reakci lze vzorky skladovat -20°C maximálně 24 hodin.

## 8.7 Druhá amplifikace, Target Specifická PCR

- Ke vzorkům přidejte **2.0 µl Outer Pool (Oranžové víčko)**, vortexujte a centrifugujte.
- Vložte do přehřátého PCR cycleru: víko  $\geq 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , objem vzorku je 50.0 µl

Krok	Opakování	Teplota	čas
1	1x	98 °C	30 sekund
2	14x	98 °C	5 sekund
3		65 °C	5 minut
4		72 °C	30 sekund
5	1x	72 °C	2 minut
6	-	4 °C	Hold

Doba v cycleru 1:32

## 8.8 Přečištění na kuličkách

- 1) Přidejte **90 µl** AMPure XP beads ke vzorkům, propipetujte 15x pipetou.
- 2) Nechte **5 minut** stát při RT.
- 3) Vložte vzorky na magnet na 3 minuty nebo dokud se kuličky nepřichytí na stěnu zkumavky.
- 4) Odsajte a **vyhodte supernatant**.
- 5) Ponechte zkumavky v magnetu a přidejte **150 µl 80% ethanolu**.
- 6) Inkubujte 30 sekund nebo dokud se kuličky nepřichytí na stěnu zkumavky.
- 7) Odsajte a **vyhodte supernatant**.
- 8) Zopakujte promytí ethanolom **ještě jednou**.
- 9) Vzorky centrifugujte, vraťte na magnet a opatrně odsajte zbytek ethanolu.
- 10) Sušte vzorky s otevřeným víčkem 3 minuty při RT. **Nepřesušte**.
- 11) Peletu rozpustíte v **23 µl** vody.
- 12) Inkubujte **5 minut**.
- 13) Vložte vzorky na 3 minuty na magnet nebo dokud se kuličky nepřichytí na stěnu zkumavky.
- 14) Odsajte **21 µl** supernatantu do čisté 0,2 ml zkumavky.



Po purifikaci lze vzorky skladovat při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 8.9 Třetí amplifikace, Nested Target Specifická PCR

- Součástí kitu jsou dva indexy: i7-001 a i5-001, které **není nutné ředit**.
- Indexing kit i7, který je nutno objednat zvlášť obsahuje i7 indexy, které **je nutno naředit** index dilution bufferem v poměru 1:4 (1  $\mu$ l i7 indexu + 4  $\mu$ l index dilution bufferu)
- Indexing kit i5, který je možné objednat zvlášť obsahuje i5 indexy, které **není nutno ředit** a lze je použít přímo do reakce.
- Přidejte ke vzorkům reagentie dle následující tabulky:

Reagentie	Barva víčka	Objem ( $\mu$ l)
<b>Inner Pool</b>	<b>Black</b>	2.0
<b>Master Mix</b>	<b>Lilac</b>	25.0
UDI indexy	Bílá	2.0

- Vortexujte a centrifugujte.
- Vložte do předehřátého PCR cycleru: víko  $\geq 100$  °C, objem vzorku je 50.0  $\mu$ l

Krok	Opakování	Teplota	čas
<b>1</b>	1x	98 °C	30 sekund
<b>2</b>	Viz tab. níže	98 °C	5 sekund
<b>3</b>		65 °C	5 minut
<b>4</b>		72 °C	30 sekund
<b>5</b>	1x	72 °C	2 minuty
<b>6</b>	-	4 °C	Hold

Doba v cycleru 1:13

Množství RNA	Doporučený počet cyklů
<b>5 ng</b>	<b>14-15x</b>
<b>10 ng</b>	<b>13-14x</b>
<b>25 ng</b>	<b>12-13x</b>
<b>50 ng</b>	<b>11-12x</b>
<b>100-200 ng</b>	<b>10-11x</b>

- 1) Přidejte **60 µl** AMPure XP beads ke vzorkům, propipetujte 15x pipetou.
- 2) Nechte **5 minut** stát při RT.
- 3) Vložte vzorky na magnet na 3 minuty nebo dokud se kuličky nepřichytí na stěnu zkumavky.
- 4) Odsajte a **vyhodte supernatant**.
- 5) Ponechte zkumavky v magnetu a přidejte **150 µl 80% ethanolu**.
- 6) Inkubujte 30 sekund nebo dokud se kuličky nepřichytí na stěnu zkumavky.
- 7) Odsajte a **vyhodte supernatant**.
- 8) Zopakujte promytí ethanolem **ještě jednou**.
- 9) Vzorky centrifugujte, vraťte na magnet a opatrně odsajte zbytek ethanolu.
- 10) Sušte vzorky s otevřeným víčkem 3 minuty při RT. **Nepřesušte**.
- 11) Peletu rozpustíte v **32 µl** vody.
- 12) Inkubujte **5 minut**.
- 13) Vložte vzorky na 3 minuty na magnet nebo dokud se kuličky nepřichytí na stěnu zkumavky.
- 14) Odsajte **30 µl** supernatantu do čisté 0,2 ml zkumavky.

### 8.11 Kvantifikace knihoven

Změřte koncentraci jednotlivých vzorků pomocí Qubit dsDNA HS Assay kit. Koncentrace se obvykle pohybují mezi 0,5-20 ng/ul.

Doporučujeme analýzu vzorků na TapeStation High sensitivity DNA chipu. Obvykle získáme pík s velikosti 200-300bp.



### Výpočet koncentrace knihoven v nM a pooling

Vypočítejte koncentraci (nM) vzorků dle vzorce:  $\frac{\text{koncentrace poolu (ng/ul)} * 10^6}{(660 * \text{délka fragmentu z tapestation})}$

Příklad:  $(3,09 \text{ ng/ul} * 10^6) / (660 * 230\text{bp}) = \mathbf{20,36 \text{ nM}}$

Pro sekvenování si vzorky naředte na 4nM, poté napipetujte do 1,5 ml zkumavky **10ul od každého 4nM vzorku** a vytvořte tím **4nM pool**. Naředěný pool skladujte maximálně 24 hodin při -20°C.

## 8.12 Denaturace knihovny a příprava na sekvenování

Nechte rozmrazit sekvenační cartridge při RT nebo ve vodní lázni a pufr HT1 v lednici. Připravte si čerstvý **0,2M NaOH**.

### Postup

- Do 1,5 ml zkumavky napipetujte **5µl 4nM** poolu, přidejte **5µl 0,2M NaOH**, vortexujte a krátce centrifugujte.
- Inkubujte při RT **5 minut**.
- Přidejte **5ul 200mM Tris-HCL**, pH 7, vortexujte a krátce centrifugujte
- Přidejte **985µl HT1**, vortexujte, krátce centrifugujte a vložte do ledu. Tímto jste získali 20pM pool.
- Smíchejte **97 µl 20pM poolu** a **1203 µl HT1**, lehce zvortexujte a a centrifugujte.

#### V případě nutnosti lze přidat 1% PhiX:

- Do 1,5 ml zkumavky napipetujte **2 µl 10nM PhiX**, přidejte **3 µl pufru RSB** a **5 µl 0,2M NaOH**, vortexujte a krátce centrifugujte.
- Inkubujte při RT **5 minut**.
- Přidejte **5ul 200mM Tris-HCL**, pH 7, vortexujte a krátce centrifugujte
- Přidejte **985 µl HT1**, vortexujte a krátce centrifugujte. Tímto jste získali 20pM PhiX.
- Do nové 1,5 ml zkumavky napipetujte **97 µl 20pM PhiX** a přidejte **1203 µl HT1**. Vortexujte, krátce centrifugujte a vložte do ledu. Tímto jste získali 1,5 pM PhiX.
- Do nové 1,5 ml zkumavky napipetujte 1287µl 1,5pM poolu a přidejte 13µl 1,5pM PhiX. Vortexujte a krátce centrifugujte.
- Těchto 1300µl napipetujte do sekvenační cartridge.

V případě, že budete vzorky Genefirst spojovat s jinými knihovnami, počítejte, prosím, že potřebujete **3M čtení na 1 vzorek Genefist Fusion reseach panelu**.

Sequencing Stage	Read Length
<b>(R1) Read 1</b>	<b>151</b>
<b>(I1) Index Read 1</b>	<b>8</b>
<b>(I2) Index Read 2</b>	<b>8</b>
<b>(R2) Read 2</b>	<b>151</b>