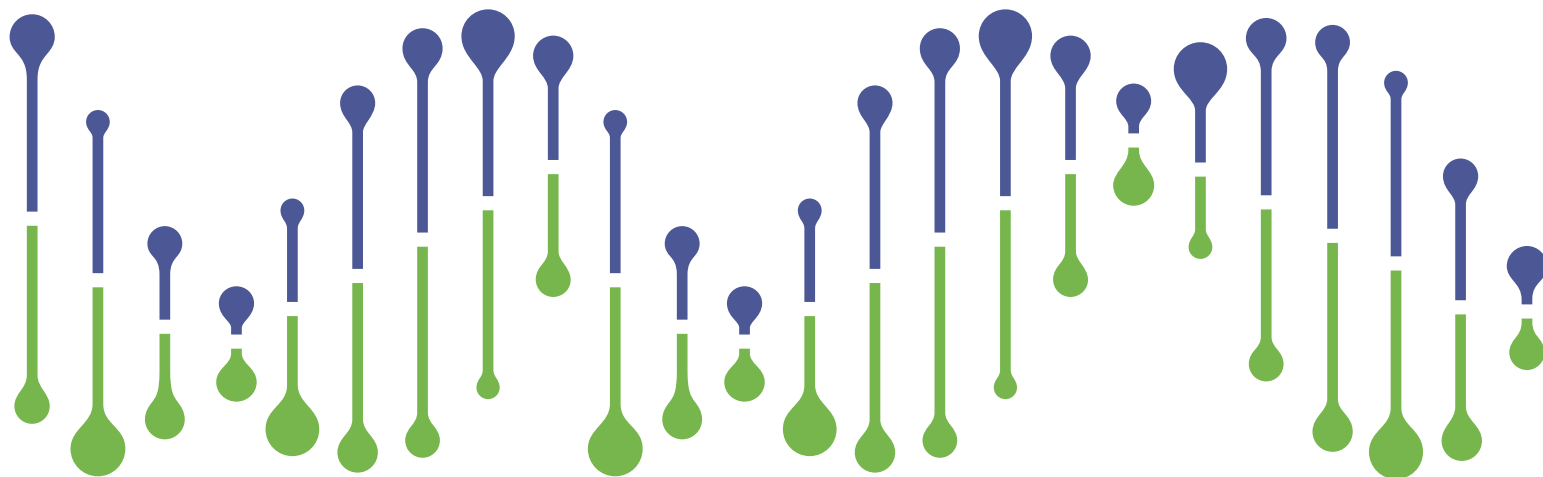


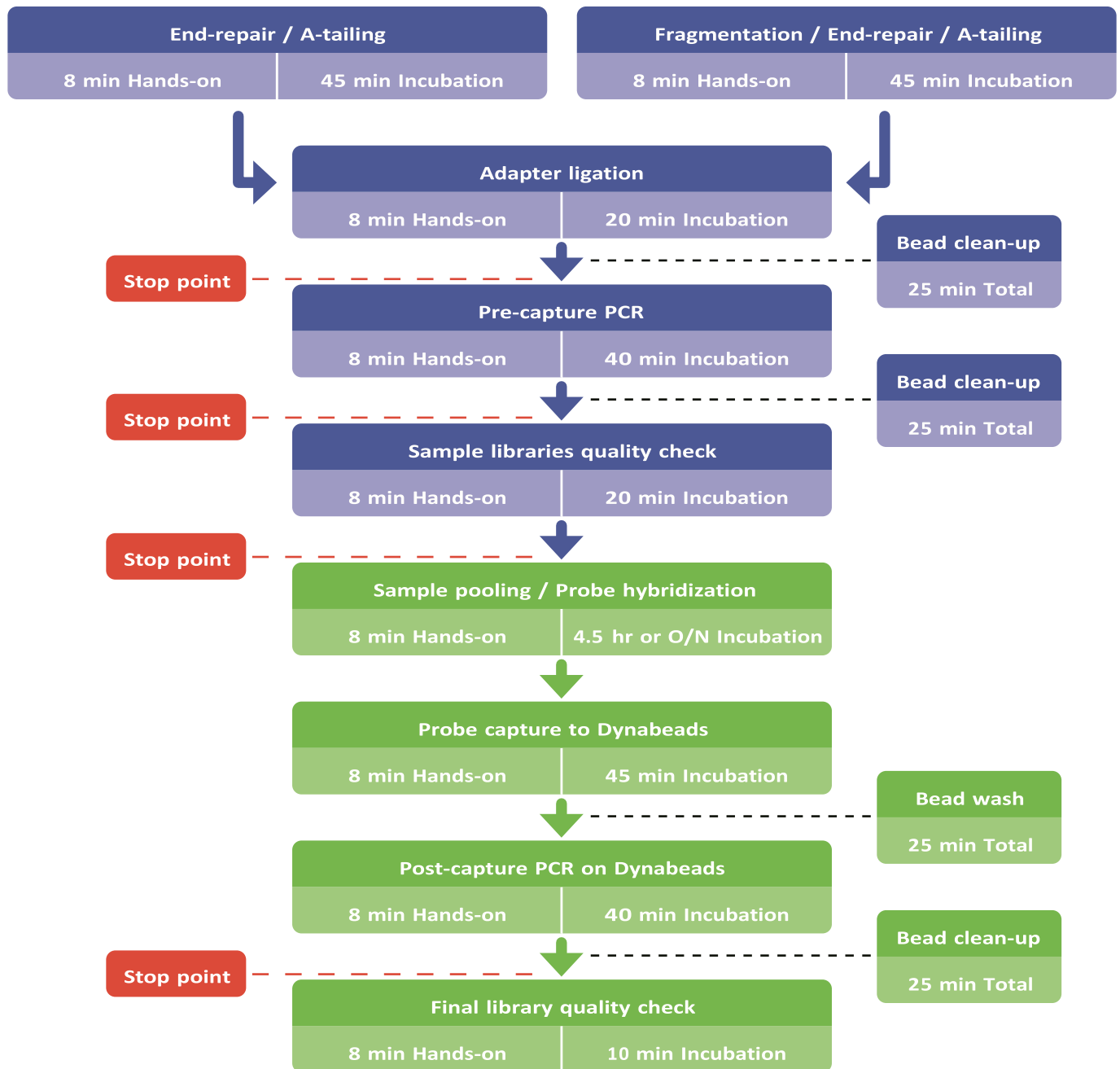
Cell3™ Target Pan cancer panel TMB/MSI



Přehled pracovního postupu

a) pro použití s cf DNA

b) pro použití s genomovou a FFPE DNA



Kapitola 1: Příprava knihovny

Požadavky na vstupní DNA

- Stanovte koncentraci DNA fluorometricky (např. Qubit assay, Invitrogen).
- Eluci proveďte do vody (molecular biology grade) nebo pufru s nízkým obsahem EDTA.
- Doporučené množství DNA pro použití s UMI indexy je **1-100 ng**
- Doporučené množství DNA pro použití s cf DNA je **100-1000 ng**

Doporučení na množství DNA pro vzorky FFPE

Následující tabulka uvádí doporučení pro **FFPE DNA** dle DIN skóre:

Vstupní množství DNA u DNA vzorků izolovaných z FFPE bločků.			
Vstupní parametry DNA	DIN skóre >8	DIN skóre 3-8	DIN skóre <3
Násobné zvýšení ve srovnání s vysoce čistou DNA	Není nutné žádné zvýšení	Zvyšte vstupní množství DNA 1.5-4x	Zvyšte vstupní množství DNA 5-10x

- Minimální vstupní množství **FFPE DNA** bez ohledu na DIN skóre je **10 ng**.

1.A Verze kitu (a): End-repair / A-tailing (bez fragmentace) pro cfDNA

Než začnete

- Nechte rozmraznout **End-repair / A-tailing Buffer (10x)** (červené víčko) a **Ligation Buffer (5x)** (modré víčko) vortexujte, krátce centrifugujte, **udržujte na ledu**.
- Promíchejte **End-repair / A-tailing Enzyme Mix (5x)** (červené víčko) a **DNA Ligase Enzyme** (modré víčko) **poklepáním na zkumavku**, krátce centrifugujte, **udržujte na ledu**.

Postup

1. Nastavte program.

Krok	Teplota	Čas
1	4°C	Hold
2	20°C	30 min
3	65°C	30 min
4	4°C	Hold

Čas v cycleru 1 hod.

Nastavte vyhřívání víka na **70°C**, objem reakce na **50 µl** a **spusťte**.

Připravte **na ledu** master mix, **vortexujte a krátce centrifugujte**.

Složka	Objem pro 1 reakci
End-repair / A-tailing Buffer (10x)	5 µl
Vzorek DNA	X µl (max. 35ul)
Nuclease-free voda	(35 – X) µl
Celkem	40 µl

2. Přidejte **10 µl of End-repair / A-tailing Enzyme Mix (5x)** na celkový objem **50 µl**. **Vortexujte a krátce centrifugujte**.
3. Přeneste do předchlazeného cycleru (4°C) a **přeskočte "skip" na další krok**.
4. Hotové reakce vložte **na led**. **Okamžitě pokračujte následujícím krokem ligace (1.C)**.

1.B Verze kitu (b): Fragmentation a end-repair / A-tailing pro gDNA a FFPE DNA

- U vstupního množství DNA nižšího než **50 ng**, přidejte **Fragmentation Enhancer**.

Než začnete

- Nechte rozmraznout **Fragmentation Buffer (10x)** (červené víčko), **Ligation Buffer (5x)** (modré víčko) a **Fragmentation Enhancer** (oranžové víčko) (pro vzorky s méně než 50ng) vortexujte, krátce centrifugujte, **udržujte na ledu**.
- Promíchejte **Fragmentation Enzyme Mix (5x)** (červené víčko) a **DNA Ligase Enzyme** (modré víčko) poklepáním na zkumavku, krátce centrifugujte, **udržujte na ledu**.

Postup

- Nastavte program.

Krok	Teplota	Čas
1	4°C	Hold
2	32°C	30 min
3	65°C	30 min
4	4°C	Hold

Čas v cycleru 1 hod.

Nastavte vyhřívání víka na **70°C**, objem reakce na **50 µl** a **spusťte**.

- Pracujte **na ledu**, reagentie před použitím zvortexujte a krátce centrifugujte.

Složka	Objem pro 1 reakci (DNA ≥ 50 ng)	Objem pro 1 reakci (DNA < 50 ng)
Fragmentation Buffer (10x)	5 µl	5 µl
Vzorek DNA	X µl (max. 35 ul)	X µl (max. 32,5 ul)
Fragmentation Enhancer	-	2.5 µl
Nuclease-free voda	(35 – X) µl	(32.5 – X) µl
Celkem	40 µl	40 µl

- Přidejte **10 µl Fragmentation Enzyme Mix (5x)** na celkový objem **50 µl**. **Dobře zvortexujte** a krátce centrifugujte.
- Přeneste do předchlazeného cycleru (4°C) a **přeskočte “skip”** na další krok.
- Hotové reakce vložte **na led**. **Okamžitě pokračujte následujícím krokem ligace (1.C)**.

1.C Ligace Illumina UMI adaptorů

Než začnete

Vyndejte z lednice **XP AMPure beads** a nechte je alespoň 20-30 minut při laboratorní teplotě. Nechte rozmrazit v **ledničce** Illumina UMI Adapters, **pozor, ať je nevysypete!**

Postup

1. Nastavte program

Krok	Teplota	Čas
1	4°C	Hold
2	20°C	15 min

Čas v cycleru 15 min

Nastavte vyhřívání víka na **nevyhřívát (off)** (nebo nechte víko otevřené), objem reakce na **100 µl** a **spusťte**.

- Použijte naředěné **1.5 µM pro vstupní DNA < 50ng** (ředění 1:10)
 - **Pro vstupní DNA ≥50ng** použijte neředěné UMI (15 µM).
2. **Pipetujte na ledu.** Ke vzorkům z předchozího kroku přidejte **5 µl Illumina UMI adapterů** tak, že si uděláte malou špičkou díрку do alobalu a poté odeberete 5ul.
 3. Ke každému vzorku přidejte zvortexované a stočené reagenty dle tabulky níže.

Složka	Objem pro 1 reakci
Ligation Buffer (5x)	20 µl
DNA Ligase Enzyme	10 µl
Nuclease-free voda	15 µl
Celkem	45 µl

4. Vortexujte a krátce centrifugujte.
5. Vložte do předchlazeného cycleru (4°C) a **přeskočte "skip"** na další krok.

Přečištění

1. Do **100 µl vzorku** z předchozího kroku přidejte **90 µl AMPure XP NGS clean-up beads** a promíchejte pipetou 15-20x.
2. Inkubujte **5 minut** při RT.
3. Připravte si **čerstvý roztok 80% ethanolu** (800 µl na jeden vzorek).
4. Vložte vzorek na magnet a nechte vyčeřit **5 minut**.
5. **Odsajte a vyhodte supernatant** nedotýkejte se kuliček.
6. Přidejte **200 µl 80% ethanolu** a inkubujte **30 sekund**.
7. Nechte zkumavky na magnetu a opatrně **odsajte a vyhodte supernatant**.
8. Zopakujte kroky 14-15 **ještě jednou**.
9. Zkumavku krátce centrifugujte a odsajte zbytek ethanolu 10 µl špičkou.
10. Nechte vzorky na magnetu a inkubujte **při RT** s otevřenými víčky **5 minut nebo dokud není peleta suchá. Nepřesušte peletu.**
11. Vyndejte zkumavky z magnetu a přidejte **27 µl pufru EB nebo vody (molecular biology grade)** a pipetou rozpusťte peletu.
12. Inkubujte **2 minuty** při RT.
13. Vložte zkumavky na magnet na **2 minuty** při RT.
14. Odsajte **22,5 µl supernatantu** do čistých 0,2 ml zkumavek.

Stop point: přečištěné adapter ligované knihovny lze skladovat při **-20°C**

1.D Amplifikace knihoven

Než začnete

- Nechte rozmrazit **PCR Master Mix (2x)** (zelené víčko) a **Primer Mix (10 µM)** (černé víčko) v ledničce. Vortexujte a krátce centrifugujte.

Postup

1. Nastavte následující program.

Krok	Teplota	Čas	Cykly
1	98°C	Hold	1
2	98°C	2 min	1
3	98°C	20 sec	11
4	60°C	30 sec	
5	72°C	30 sec	
6	72°C	1 min	1
7	4°C	Hold	1

Čas v cycleru cca 30-40 min

Nastavte vyhřívané víko na **105°C**, objem reakce na **50 µl** a spusťte.

Ke každému vzorku přidejte reagentie dle následující tabulky.

Složka	Objem na 1 reakci
PCR Master Mix (2x)	25 µl
Primer Mix (10 µM)	2.5 µl
Celkem	27.5 µl

2. **Vortexujte** a krátce centrifugujte.
3. Vložte do předehřátého cycleru (**98°C**) a **přeskočte „ skip“** na další krok.
4. Vyndejte vzorky z cycleru a **pokračujte okamžitě přečištěním**.

Přečištění amplifikovaných knihoven

1. Do **50 µl vzorku** přidejte **50 µl AMPure XP NGS clean-up beads** a promíchejte pipetou 15-20x.
2. Inkubujte **5 minut** při RT.
3. Vložte vzorek na magnet a nechte vyčeřit **5 minut**.
4. **Odsajte a vyhodte supernatant** nedotýkejte se kuliček.
5. Přidejte **200 µl 80% ethanolu** a inkubujte **30 sekund**.
6. Nechte zkumavky na magnetu a opatrně **odsajte a vyhodte supernatant**.
7. Zopakujte kroky 13-14 **ještě jednou**.
8. Zkumavku krátce centrifugujte a odsajte zbytek ethanolu 10 µl špičkou.
9. Nechte vzorky na magnetu a inkubujte **při RT** s otevřenými víčky **5 minut nebo dokud není peleta suchá. Nepřesušte peletu**.
10. Vyndejte zkumavky z magnetu a přidejte **32,5 µl pufru EB nebo vody (molecular biology grade)** a pipetou rozpustíte peletu.
11. Inkubujte **2 minuty** při RT.
12. Vložte zkumavky na magnet na **2 minuty** při RT.
13. Odsajte **30 µl supernatantu** do čistých 0,2 ml zkumavek.

Stop point: Přečištěné knihovny lze skladovat při 4°C přes noc nebo při -20°C dlouhodobě.

1.E Kvantifikace knihoven

- Změřte koncentraci DNA (ng/μl) fluorometricky (např. dsDNA BR assay kit, Invitrogen **Qubit**).

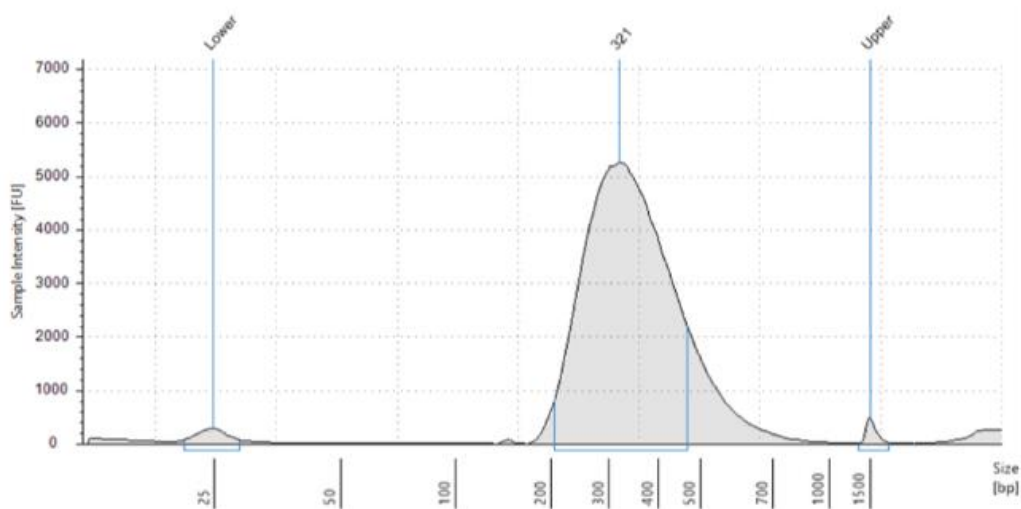
Koncentrace se obvykle pohybuje v rozmezí 5-50 ng/μl.

Dostatečnou koncentraci jednotlivých vzorků spočítáte takto:

$1000/\text{počet vzorků}/30 = \text{minimální koncentrace vzorků pro použití do poolu pro hybridizaci.}$

Pokud je koncentrace příliš nízká, je možné se vrátit k amplifikaci (bod 1.D) a vzorek doamplifikovat. V tomto případě stačí maximálně 3-4 cykly v PCR cycleru. Poté znovu přečistit a znovu změřit koncentraci na Qubitu.

- Doporučujeme analýzu knihovny fragmentační analýzou (např. **TapeStation**) pro zjištění délky fragmentu.



Příklad jak by měla vypadat dobře fragmentovaná knihovna

Kapitola 2: Hybridizace sond a Capture Enrichment

Než začnete

Pokud nemáte vakuový lyofilizační koncentrátor, lze pro zakocentrování poolovaných knihoven použít AMPure XP clean-up beads. Mějte však na paměti, že tento postup zavádí malý GC bias do výsledků.

Rozmrazte při RT **Hybridization Buffer (2x)** (modré víčko), **Hybridization Enhancer** (hnědé víčko), **Universal Blockers** (oranžové víčko), **COT-1 Human DNA** (červené víčko) a TMB/MSI Panel (čiré víčko). Vortexujte a krátce centrifugujte.

Poznámka: ověřte, že **Hybridization Buffer (2x)** (modré víčko) nezkrystalizoval. Pokud ano, ohřejte zkumavku na 65°C vortexujte každých pár minut dokud se krystaly nerozpustí (ohřev může trvat i 30-60 minut).

Ekvilibrujte **AMPure XP clean-up beads** při RT alespoň 20-30 minut.

Postup pro případ, kdy není dostupná vakuová odparka

1. Nastavte program

Krok	Teplota	Čas	Cykly
1	95°C	Hold	1
2	95°C	30 sec	1
3	65°C	4 hours	1
4	65°C	Hold	1

Nastavte vyhřívání víka na **100°C**, objem reakce na **17 µl** a spusťte run.

2. Připravte hybridizační master mix na ledu.

Složka	Objem na 1 reakci
Hybridization Buffer (2x)	9.5 µl
Hybridization Enhancer	3 µl
Universal Blockers	2 µl
Cell3™ Target: Probe Set	4,5 µl
Celkem	19 µl

3. Vortexujte a uložte do lednice k pozdějšímu použití.

4. Smíchejte stejný objem od každé knihovny tak, aby výsledný pool měl **1000 ng**.

Příklad: Pokud máte 5 vzorků, tak každého je třeba přidat $1000\text{ng}/5 = 200\text{ng}$.

vzorek	Koncentrace Qubit	Množství do poolu
1	19,1 ng/µl	$200/19,1 = 10,5 \mu\text{l}$
2	25,5 ng/µl	$200/25,5 = 7,8 \mu\text{l}$
3	26,5 ng/µl	$200/26,5 = 7,5 \mu\text{l}$
4	25,9 ng/µl	$200/25,9 = 7,7 \mu\text{l}$
5	33,7 ng/µl	$200/33,7 = 5,9 \mu\text{l}$
Pool pro hybridizaci		$10,5+7,8+7,5+7,7+5,9 = 39,4 \mu\text{l}$

5. Přidejte **7,5 µl COT-1 Human DNA** do poolu. Vortexujte a krátce centrifugujte.

6. Přidejte **1,8x** objemu **AMPure XP clean-up beads** promíchejte pipetou 15-20x.
Vycházíme-li z příkladu výše tak: $(39,4 \text{ pool} + 7,5 \text{ COT}) * 1,8 = 84,4 \mu\text{l AMPure XP clean-up beads}$.
7. Inkubujte **10 minut při RT**.
8. Vložte vzorek na magnet a nechte vyčeřit **5 minut**.
9. Odsajte a vyhodte **supernatant** nedotýkejte se kuliček.
10. Přidejte **200 μl** 80% ethanolu a inkubujte **30 sekund**.
11. Nechte zkumavky na magnetu a opatrně odsajte a **vyhodte supernatant**.
12. Zopakujte kroky 10-11 **ještě jednou**.
13. Zkumavku krátce centrifugujte a odsajte zbytek ethanolu 10 μl špičkou.
14. Nechte vzorky na magnetu a inkubujte **při RT** s otevřenými víčky **5 minut nebo dokud není peleta suchá. Nepřesušte peletu**.
15. Vyndejte zkumavky z magnetu a přidejte **19 μl pufru hybridizačního master mixu** a pipetou rozpustte peletu.
16. Inkubujte **5 minut při RT**.
17. Vložte zkumavky na magnet na **5 minut při RT**.
18. Odsajte **17 μl supernatantu** do čisté 0,2 ml zkumavky a vložte ji do předehřátého cycleru (95°C) a přeskočte „skip“ na další krok .

Hybridizaci lze nechat jet i přes noc.

Postup pro případ, kdy je dostupná vakuová odparka

Než začnete

Rozmrazte při RT **Hybridization Buffer (2x)** (modré víčko), **Hybridization Enhancer** (hnědé víčko), **Universal Blockers** (oranžové víčko), **COT-1 Human DNA** (červené víčko) a TMB/MSI Panel (čiré víčko). Vortexujte a krátce centrifugujte.

Poznámka: ověřte, že **Hybridization Buffer (2x)** (modré víčko) nezkrystalizoval. Pokud ano, ohřejte zkumavku na 65°C vortexujte každých pár minut dokud se krystaly nerozpustí (ohřev může trvat i 30-60 minut).

Postup

1. Nastavte program

Krok	Teplota	Čas	Cykly
1	95°C	Hold	1
2	95°C	30 sec	1
3	65°C	4 hours	1
4	65°C	Hold	1

Nastavte vyhřívání víka na **100°C**, objem reakce na **17 μl** a spusťte run.

1. Smíchejte stejný objem od každé knihovny tak, aby výsledný pool měl **1000 ng**.

Příklad: Pokud máte 5 vzorků, tak každého je třeba přidat $1000\text{ng}/5 = 200\text{ng}$.

vzorek	Koncentrace Qubit	Množství do poolu
1	19,1 ng/ μl	$200/19,1 = 10,5 \mu\text{l}$
2	25,5 ng/ μl	$200/25,5 = 7,8 \mu\text{l}$
3	26,5 ng/ μl	$200/26,5 = 7,5 \mu\text{l}$
4	25,9 ng/ μl	$200/25,9 = 7,7 \mu\text{l}$
5	33,7 ng/ μl	$200/33,7 = 5,9 \mu\text{l}$
Pool pro hybridizaci		$10,5+7,8+7,5+7,7+5,9 = 39,4 \mu\text{l}$

2. Přidejte **5 µl COT-1 Human DNA** a **2 µl Universal blockers** do poolu. Vortexujte a krátce centrifugujte.
3. Vložte s otevřeným víčkem do vakuové odparky vyhřáté na 70°C nebo nižší a nechte kompletně odpařit.

Stop point: Odpařený pool lze skladovat při 4°C přes noc.

4. Připravte hybridizační master mix do zkumavky s **odpařeným poolem**.

Složka	Objem na 1 reakci
Hybridization Buffer (2x)	8.5 µl
Hybridization Enhancer	2,7 µl
Cell3™ Target: Probe Set	4 µl
Voda	1,8 µl
Celkem	17 µl

5. Propipetujte 10x, krátce centrifugujte a **inkubujte 10 minut při RT**.
6. Přepipetujte celý objem do 0,2 ml zkumavky a vložte do předehřátého PCR cycleru a přeskočte skip na další krok programu.
7. Inkubujte **4-16 hodin** případně přes noc.

2.B Probe capture na Streptavidinových kuličkách a přečištění

Než začnete

- Ekvilibrujte **Dynabeads® M-270 Streptavidin** při **RT 30 minut**.
- Rozmrazte **Wash Buffers (S, 1, 2, 3, B)** při **RT**, **vortexujte** je a krátce centrifugujte.
- Ohřejte v suchém bloku Wash Buffer 1 při 65°C v případě že zkrystalizoval.
- Nastavte v PCR cycleru run 65°C forever, s víčkem vyhříváním na 70°C, objem vzorku 100ul a spusťte

Příprava wash bufferů

1. Naředěte pufrý do 1,5 ml zkumavky dle tabulky níže:

Složka	Zásobní roztok	Nuclease-free voda	Celkem
Stringent Wash Buffer (10x)	40 µl	360 µl	400 µl
Wash Buffer 1 (10x)	30 µl	270 µl	300 µl
Wash Buffer 2 (10x)	20 µl	180 µl	200 µl
Wash Buffer 3 (10x)	20 µl	180 µl	200 µl
Bead Wash Buffer (2x)	250 µl	250 µl	500 µl

2. **Vortexujte** a krátce centrifugujte.
3. Napipetujte **100 µl 1x Wash Buffer 1** do čisté 0.2 ml PCR zkumavky a vložte do PCR cycleru vyhřátého na 65°C.
4. Do dvou 0,2 ml zkumavek napipetujte **200 µl 1x Stringent Wash Buffer** a vložte je do předehřátého PCR cycleru na 65°C.
5. **200 µl 1x Wash Buffer 1** a **zbytek wash bufferů** ponechte **při RT**.

Příprava Dynabeads® M-270 Streptavidin

6. Vortexujte **RT Dynabeads® M-270 Streptavidin 15 sekund**.
7. Napipetujte **50 µl of Dynabeads® M-270 Streptavidin** do 1.5 ml zkumavky.
8. Vložte 1.5 ml zkumavku na magnet a inkubujte **20-30 sekund**.
9. Odsajte a **vyhodte supernatant**.
10. Přidejte **200 µl 1x Bead Wash Buffer** a vortexujte **10 sekund**.
11. Vložte 1.5 ml zkumavku na magnet a inkubujte **20-30 sekund**.

12. Odsajte a **vyhodte supernatant**.
13. Opakujte promytí 1x Bead wash bufferem **ještě jednou**.
14. Přidejte 100 µl **1x Bead Wash Buffer** a vortexujte.
15. Přeneste **100 µl rozpuštěných kuliček do čisté 0,2 ml zkumavky**.
16. Vložte zkumavku na magnet a inkubujte **1-2 minuty** nebo dokud se kuličky neusadí.
17. Odsajte a vyhodte **supernatant** a **pokračujte ihned dalším krokem**.
18. Napipetujte **vzorek (hybridizační reakci)** do zkumavky s peletou kuliček **Dynabeads® M-270 Streptavidin** a promíchejte pipetou 10x.
19. Vložte do předehřátého (**65°C**) cycleru a inkubujte **45 minut**. **Každých 15 minut** během inkubace zkumavku zvortexujte **3 sekundy**.
20. Vyndejte zkumavku z cycleru a přidejte **100 µl předehřátého 1x Wash Buffer 1**.
21. Propipetujte **10x** a vložte na magnet na **10-15 sekund**.
22. Odsajte a **vyhodte supernatant**.
23. Sundejte zkumavku z magnetu a přidejte **200 µl předehřátého 1x Stringent Wash Buffer**
24. Propipetujte **10x**.
25. Přeneste do cycleru (**65°C**) a inkubujte **5 minut**.
26. Vyndejte zkumavku z cycleru a vložte na magnet na **10-15 sekund**.
27. Odsajte a **vyhodte supernatant**.
28. Sundejte zkumavku z magnetu a přidejte **200 µl předehřátého 1x Stringent Wash Buffer**
29. Propipetujte **10x**.
30. Přeneste do cycleru (**65°C**) a inkubujte **5 minut**.
31. Vyndejte zkumavku z cycleru a vložte na magnet na **10-15 sekund**.
32. Odsajte a **vyhodte supernatant**.
33. Vyndejte zkumavku z magnetu a přidejte **200 µl 1x Wash Buffer 1 (nepředehřátý)**.
34. **Vortexujte 2 minuty** a krátce centrifugujte.
35. Vložte zkumavku na magnet na **20-30 sekund**.
36. Odsajte a **vyhodte supernatant**.
37. Vyndejte zkumavku z magnetu a přidejte **200 µl 1x Wash Buffer 2**.
38. **Vortexujte 1 minutu** a krátce centrifugujte.
39. Vložte zkumavku na magnet na **20-30 sekund**.
40. Odsajte a **vyhodte supernatant**.
41. Vyndejte zkumavku z magnetu a přidejte **200 µl 1x Wash Buffer 3**.
42. **Vortexujte 30 sekund** a krátce centrifugujte.
43. Vložte zkumavku na magnet na **1-2 minuty**.
44. Odsajte a **vyhodte supernatant**. **Nesušte!**
45. Vyndejte zkumavku z magnetu a rozpustte peletu kuliček ve **22,5 µl nuclease-free vody** pipetováním **10-15x**.

2.C Captured library amplifikace a clean-up

Než začnete

- Rozmrzte v ledničce **PCR Master Mix (2x)** (zelené víčko) a **Primer Mix (10 µM)** (černé víčko) vortexujte, krátce centrifugujte.
- Ekvilibrujte **AMPure XP clean-up beads** při RT alespoň **20-30 minut**.
- Připravte si 80% Ethanol (400 µl na vzorek)

Postup

1. Nastavte program.

Krok	Teplota	Čas	Cykly
1	98°C	Hold	1
2	98°C	2 min	1
3	98°C	20 sec	12
4	60°C	30 sec	
5	72°C	30 sec	
6	72°C	1 min	1
7	4°C	Hold	1

Čas v cycleru cca 30min

Nastavte vyhřívané víko na **105°C**, objem reakce na **50 µl** a spusťte.

2. K 22,5 µl vzorku s kuličkami přidejte reagentie dle tabulky:

Složka	Objem na 1 reakci
PCR Master Mix (2x)	25 µl
Primer Mix (10 µM)	2.5 µl
Celkem	27.5 µl

3. Propipetujte **10-15x**.
4. Vložte do předehřátého cycleru (**98°C**) a přeskočte „skip“ na další krok.
5. Vyndejte zkumavku z cycleru a **pokračujte ihned na přečištění AMPure clean-up beads**.

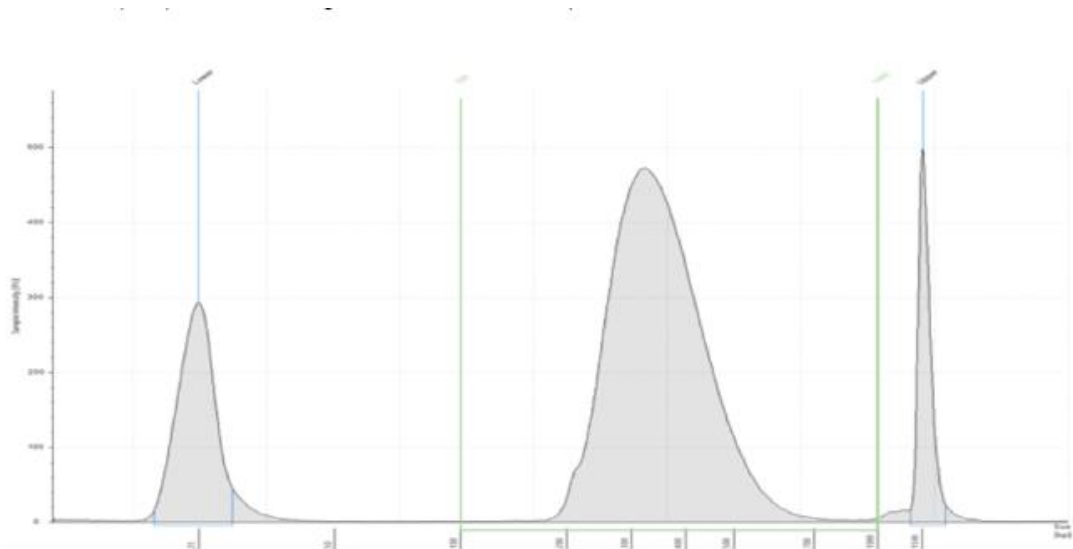
Přečištění amplifikované knihovny

6. Přidejte k **50 µl** vzorku **75 µl AMPure XP clean-up beads** a propipetujte 15-20x,
7. **Inkubujte 5 minut** při RT.
8. Vložte zkumavku na magnet na **5 minut** při RT.
9. Odsajte a **vyhodte supernatant**.
10. Přidejte **200 µl 80% ethanolu** do zkumavky na magnetu a inkubujte při RT **30 sekund**.
11. Odsajte a **vyhodte supernatant**.
12. Opakujte krok 10-11 **ještě jednou**.
13. Krátce centrifugujte a **10 µl pipetou** odsajte zbytek tekutiny.
14. Nechte vzorky na magnetu a inkubujte **při RT** s otevřenými víčky **5 minut nebo dokud není peleta suchá. Nepřesušte peletu**.
15. Vyndejte zkumavku z magnetu a přidejte **32,5 µl pufru EB nebo 10mM TRIS pH 8.0** a pipetou rozpusťte peletu.
16. Inkubujte **2 minuty** při RT.
17. Vložte zkumavku na magnet na **2 minuty** při RT.
18. Odsajte **30 µl supernatantu** do čisté zkumavky.

Stop point: knihovnu můžete skladovat při **-20°C**.

2.D Kvantifikace knihovny

- Změřte koncentraci DNA (ng/μl) fluorometricky (např. dsDNA HS assay kit, Invitrogen **Qubit**).
Koncentrace se pochybuje v rozmezí 1-20 ng/μl.
- Doporučujeme analýzu knihovny fragmentační analýzou (např. **TapeStation HS kit**) pro zjištění délky fragmentu.



Příklad jak by měla vypadat knihovna, velikost fragmentu se pohybuje kolem **300-400bp**.

Výpočet koncentrace poolu v nM

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

Příklad: $(8,7 \text{ ng/ul} * 10^6) / (660 * 325\text{bp}) = 40,56 \text{ nM}$

Pro sekvenování si pool naředěte na 4nM a naředěný pool přeměřte na Qubitu. Naředěný pool skladujte maximálně 24 hodin při -20°C.

Kapitola 3: Denaturace knihovny a příprava na sekvenování

Než začnete

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, že budete vzorky Nonacus spojovat s jinými knihovnami, počítejte, prosím, že potřebujete 10M čtení na 1 vzorek Pan cancer panelu.

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.

Nastavení sekvenace

- Insert read1 = 101, read2 = 101bp
- Index read i5 = 8bp
- Index read i7 = 17bp

www.nonacus.com

NONACUS
Advancing Non-Invasive Healthcare