

Тагментация, дальнейшая очистка и амплификация

1. Промаркируйте планшет для ПЦР (или эквивалентный).
2. Добавьте молекулярную воду в лунки.
3. Добавьте образец ДНК в лунки.
4. Смешайте предварительно нагретый BLT на вихревой мешалке в течение 10 секунд.
5. Подготовьте мастер-смесь для тагментации и хорошо перемешайте на вихревой мешалке.
6. Добавьте 20 мкл мастер-смеси (BLT + TB1) в каждую лунку образца.
7. Хорошо перемешайте пипеткой.
8. Запечатйте планшет и инкубируйте на термоциклере (55°C в течение 15 минут, затем выдерживайте при 10°C)
9. Добавьте 10 мкл TSB в лунки для образцов.
10. Осторожно пипетируйте для перемешивания.
11. Запечатйте планшет и инкубируйте на термоциклере (37°C в течение 15 минут, выдерживайте при 10°C).
12. Поместите планшет на магнит на 3 минуты.
13. Удалите и уберите надосадочную жидкость.
14. Снимите с магнита и добавьте 100 мкл TWB.
15. Осторожно пипетируйте, чтобы ресуспендировать гранулы.
16. Поместите обратно на магнит на 3 минуты.
17. Удалите и уберите надосадочную жидкость.
18. Извлеките планшет из магнита и добавьте 100 мкл TWB.
19. Осторожно пипетируйте, чтобы ресуспендировать гранулы.
20. Поместите обратно на магнит не менее чем на 3 минуты.
21. Удалите и уберите надосадочную жидкость.
22. Снимите с магнита и добавьте 100 мкл TWB.
23. Осторожно пипетируйте, чтобы ресуспендировать гранулы.
24. Поместите обратно на магнит не менее чем на 3 минуты.
25. Во время инкубации на магните подготовьте мастер-микс для ПЦР (ЕРМ + вода молекулярного класса)
26. Смешайте на вихревой мешалке и быстро открутите мастер-микс.
27. Уберите TWB с гранул с бусинами.
28. Удалите все излишки TWB с помощью наконечника пипетки меньшего размера.

Очистка после ПЦР и пулинг

1. Центрифугируйте планшет при 280 g в течение 1 минуты
2. Поместите на магнит на 5 минут.
3. Перенесите 45 мкл надосадочной жидкости в новые лунки на планшете для ПЦР (или на планшете Midi).
4. Смешайте исходный раствор IPB на вихревой мешалке.
5. Подготовьте мастер-микс IPB (IPB + вода молекулярного класса).
6. Хорошо перемешайте мастер-микс на вортексе.
7. Снимите планшет с магнита и добавьте 85 мкл мастер-микса IPB к каждому образцу.
8. Пипетируйте не менее 10x для перемешивания.
9. Инкубируйте в течение 5 минут.
10. Поместите на магнит на 3 минуты.
11. Во время инкубации тщательно перемешайте исходный IPB на вихревой мешалке.
12. Перенесите 125 мкл надосадочной жидкости в новые лунки.
13. Снимите с магнита и добавьте 15 мкл исходного раствора IPB к каждому образцу.
14. Пипетируйте не менее 10x для перемешивания.
15. Инкубируйте в течение 5 минут.
16. Подготовьте свежий 80% EtOH
17. Поместите планшет на магнит на 3 минуты.
18. Уберите надосадочную жидкость.
19. Удерживая на магните, добавьте 170 мкл 80% EtOH и инкубируйте в течение 30 секунд.
20. уберите надосадочную жидкость.
21. Удерживая на магните, добавьте 170 мкл 80% EtOH и инкубируйте в течение 30 секунд.
22. Уберите надосадочную жидкость и удалите излишки с помощью наконечника пипетки меньшего объема.
23. Дайте гранулам высохнуть на воздухе 3-5 мин.