

Příprava metagenomické knihovny

Amplifikace

- 1 **Izolace DNA** dle typu vzorku
- 2 Kvantifikace DNA (optional)
- 3 Sestavení **PCR** reakce

Master mix	1×	×
Polymeráza 2×	10,0 µl	
FW primer 2,5 µM	2,0 µl	–
REV primer 2,5 µM	2,0 µl	–
DEPC-H ₂ O	9,0 µl	
Vzorek DNA	2,0 µl	–

- 4 **Amplifikace** dle programu (nastav ramp rate annealingu 60%)

Program cyklu	Teplota	Čas
Iniciální denaturace	95 °C	3 min
Denaturace	95 °C	45 s
Annealing	52 °C	60 s
Extenze	72 °C	90 s
Finální extenze	72 °C	5 min
	12 °C	Hold

Purifikace

- 1 Připrav si čerstvý **80% EtOH** (0,5 ml na každý vzorek)
- 2 **AMPure beads musí mít RT**
- 3 Vortexuj AMPure beads **60 vteřin**
- 4 Přepipetuj si **25 µl PCR** reakce do 1,5ml eppendorfky
- 5 Přidej **20 µl AMPure beads** a směs propipetuj nebo zvortexuj
- 6 Inkubuj **5 min při RT**
- 7 Dej na magnet na **2 minuty** při RT
- 8 Nech na magnetu a odstraň supernatant
- 9 Přidej **200 µl 80% EtOH na 30 vteřin** a poté EtOH odstraň
- 10 Přidej znovu **200 µl 80% EtOH na 30 vteřin** a znovu EtOH odstraň
- 11 Odstraň zbytky EtOH a nech zbytek odpařit. **Pelety nesmí vyschnout.**
- 12 Sundej zkumavku z magnetu
- 13 Přidej **eluční pufr** podle očekávané koncentrace (15–30 µl).
- 14 Propipetuj nebo vortexuj.
- 15 Inkubuj **5 min při RT**
- 16 Dej znovu **na magnet na 2 min** při RT
- 17 **Odeber supernatant s přečištěnou DNA**

Kvantifikace, kvalita & pooling

- 1 **Změř koncentraci** pomocí HS dsDNA reagentu pro Qubit na **LightCycleru**

Master mix	4×	×
Dye	1,0 µl	
Pufr	199,0 µl	–

- 2 Nařed' vzorek na **domluvenou koncentraci** (Nejnižší rozumná koncentrace podle vzorků)
- 3 Smíchej naředěné vzorky dohromady po skupinách po **6–8 vzorcích (pooling)**
- 4 Smíchej pooly vzorků do finální knihovny
- 5 Připrav běh na **FragmentAnalyzeru** podle návodu na počítači (analyzuj všechny pooly a finální knihovnu)
- 6 Nařed' pooly a knihovnu **1000× a 10000×**
- 7 Připřav **qPCR** reakci

Master mix	1×
NEBNext Quant MM	16,0 µl
Vzorek / standard	4,0 µl

- 8 Vypočítej **molární** koncentraci knihovny
- 9 Připrav sekvenační běh dle návodu

