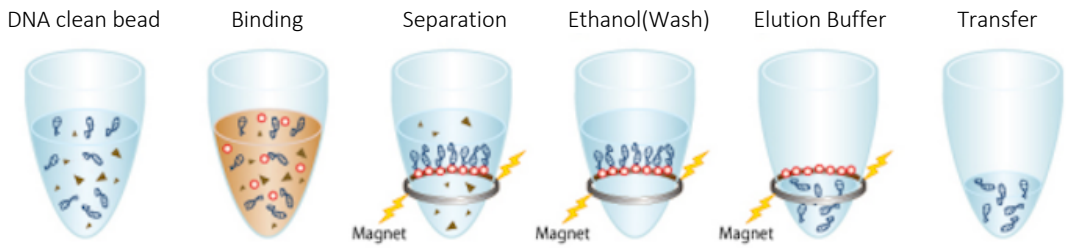
ขั้นตอนการใช้ Bioentist™ VAHTS DNA Clean Bead ในการ Clean-up NGS sample

สิ่งที่ต้องมี:

1. Bioentist™ VAHTS DNA Clean Bead
2. Bioentist™ MagTec™ Magnetic separation stand/rack
3. 70% Ethanol ที่เตรียมใหม่
4. Elution buffer หรือ น้ำ molecular biology grade
5. Vortex
6. Centrifuge (spin down)
7. Autopipette ขนาด 1000 µL และ 20 µL
8. Heat block (optional)



1. Mix reagent ทุกชนิดให้เข้ากันดีก่อนการใช้งานด้วย Vortex

   แนะนำ: ให้นำ VAHTS DNA Clean Beads ออกจากตู้เย็นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ก่อนเริ่มใช้งาน

2. เติม VAHTS DNA Clean Beads ที่ mix ดีแล้ว ปริมาณ 117 µL ลงใน adaptor ligated DNA sample แต่ละตัวอย่าง (ทั้งการใช้ใน 1.5 mL tube หรือ 0.2 mL tube). Mix ด้วยการไปเปตขึ้น-ลง อย่างน้อย 10 ครั้ง
3. บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
4. วางหลอดบน Magnetic stand แล้วรอให้ magnetic bead ถูกดูดติดข้างหลอดจนสารละลายใส (ใช้เวลาประมาณ 3-5 นาที หรืออาจน้อยกว่านั้น)
5. วางหลอดตัวอย่างไว้ใน magnetic stand เช่นเดิม แล้วดูดสารละลายส่วนใสทิ้งอย่างระมัดระวัง ระวังไม่ให้แตะโดน beads
6. วางหลอดตัวอย่างไว้ใน magnetic stand เช่นเดิม แล้วเติม 70% ethanol 500 µL กรณีใช้ 1.5 mL tubes (กรณีใช้ 0.2mL tubes ให้เติม 70% ethanol 200 µL) ลงในแต่ละหลอด (wash 1/2)
7. ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที จากนั้นดูด ethanol ทิ้ง (wash 1/2)
8. วางหลอดตัวอย่างไว้ใน magnetic stand เช่นเดิม แล้วเติม 70% ethanol 500 µL กรณีใช้ 1.5 mL tubes (กรณีใช้ 0.2mL tubes ให้เติม 70% ethanol 200 µL) ลงในแต่ละหลอด (wash 2/2)
9. ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที จากนั้นดูด ethanol ทิ้ง (wash 2/2)

10. ปิดฝา tube หรือ plate แล้วนำออกจาก magnetic stand มาปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายที่เหลือตกลงมาที่ก้นหลอด (ประมาณ 260 x g for 30 วินาที).
11. นำ tube หรือ plate กลับไปวางบน magnetic stand/rack แล้วรอประมาณ 1 นาที
12. ดูด ethanol ที่เหลือออกไปให้ได้มากที่สุด แนะนำให้ใช้ไปเปตขนาด 20 µL โดยระวังไม่ให้ดูดติด magnetic beads มาด้วย
13. ทำให้ตัวอย่างแห้งโดยแนะนำให้วางบน heat block ที่มีอุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 3–5 min หรือจน ethanol ระเหยออกจนหมด

    สิ่งสำคัญที่ต้องระวัง: ห้ามปล่อยให้แห้งเกินไป (สังเกตว่า beads จะมีรอยแยก) เนื่องจากจะทำให้ yield ลดลง

    ข้อสังเกต: Bead ที่แห้งแล้ว พื้นผิวจะออกด้านไม่สะท้อนแสงเหมือนตอนแรก
14. เติมน้ำ 32 µL nuclease-free water ลงไปบน bead โดยตรง แล้ว mix ด้วย pipette ขึ้น-ลง ประมาณ 10 ครั้ง
15. บ่ม 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
16. ปั่นเหวี่ยงระยะเวลาสั้นๆเพื่อให้สารละลายตกลงมาที่ก้นหลอด แล้วนำไปวางบน magnetic stand/rack จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 2–3 นาที หรือจนสารละลายใส
17. ดูดเก็บส่วนใส 30 µL ย้ายลง tube/rack ใหม่ จบขั้นตอนนี้สามารถทิ้ง beads ได้