

# Příručka k protokolu pro manuální purifikaci k použití s

**prepIT<sup>TM</sup>•L2P**

**DNAgenotek<sup>TM</sup>**

[www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)

Tel.: +1.613.723.5757  
[support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)  
[sales@dnagenotek.com](mailto:sales@dnagenotek.com)

3000 - 500 Palladium Drive  
Ottawa, ON, Kanada K2V 1C2

*Vynikající vzorky  
Osvědčené provedení*

[REF] PT-L2P-5

[REF] PT-L2P-45

CE UK CA IVD

Protokol k prepIT™•L2P je dostupný v dalších jazycích na webu [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)

**Technická podpora je k dispozici v pondělí až pátek**

**(9:00 až 17:00 východoamerického času):**

- Bezplatné telefonní číslo (Severní Amerika): 1.866.813.6354, volba 6
- Ve všech ostatních zemích: +1.613.723.5757, volba 6
- E-mail: support@dnagenotek.com

■ DNA Genotek Inc.  
3000 - 500 Palladium Drive  
Ottawa, ON, Kanada K2V 1C2  
E-mail: support@dnagenotek.com

Odpovědná osoba pro Spojené království: Qarad UK Ltd., 8 Northumberland Ave,  
Westminster, Londýn, WC2N 5BY Spojené království

**[EC REP]** Qarad EC-REP BV, Pas 257,  
2440 Geel, Belgie

**[CH REP]** Qarad Suisse S.A., World Trade Center,  
Avenue Gratta-Paille 2, 1018 Lausanne, Švýcarsko

Australský sponzor: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street,  
Sydney, NSW 2000 Austrálie

## **Obsah**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Určené použití/účel .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>Stabilita při použití .....</b>                                       | <b>4</b>  |
| <b>Vlastnosti .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>Materiály .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>Upozornění a bezpečnostní opatření .....</b>                          | <b>4</b>  |
| <b>Omezení použití výrobku .....</b>                                     | <b>5</b>  |
| <b>Přeprava prepIT™•L2P .....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Uchovávání prepIT™•L2P (skladovatelnost) .....</b>                    | <b>5</b>  |
| <b>Likvidace .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>Údržba/opravy .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>Souhrn údajů o funkčnosti .....</b>                                   | <b>5</b>  |
| <b>Dodávaná balení přípravku .....</b>                                   | <b>5</b>  |
| <b>Záruky .....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>Řešení problémů .....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>prepIT™•L2P: laboratorní protokol pro manuální purifikaci DNA ze:</b> |           |
| <b>Vzorku o objemu 500 µl.....</b>                                       | <b>7</b>  |
| <b>Celého vzorku.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>Kvantifikace DNA.....</b>   | <b>18</b> |

## **Určené použití/účel**

Purifikace genomické DNA z odběrových sad na sliny Oragene™ a ORAcollect™.

## **Stabilita při použití**

PT-L2P-5 (5 ml) a PT-L2P-45 (45 ml) mají v pokojové teplotě stabilitu při použití 30 měsíců.

## **Vlastnosti**

- Optimalizovaný chemický proces k maximálnímu získání DNA ze vzorků z ústní dutiny odebraných s použitím výrobků řady Oragene™ a ORAcollect™.
- Přináší prokázané konzistentní výsledky s vysokomolekulární DNA.
- Škálovatelná purifikační metoda pro velké nebo malé objemy vzorků.
- Snadný pracovní postup a kompletní technická podpora od odběru vzorku po extrakci.
- Nákladově úsporná metoda s minimálními požadavky na vybavení.

## **Materiály**

- PT-L2P-5 (5 ml) a/nebo PT-L2P-45 (45 ml)
- Příručka k prepIT™•L2P

## **Upozornění a bezpečnostní opatření**

- Pouze pro laboratorní použití.
- Reagencii NEPOŽÍVEJTE.
- NEPOUŽÍVEJTE, pokud je balení poškozeno, pokud je na víčku nálevky/ uzávěru narušeno zapečetění nebo pokud netěsní.
- NEPOUŽÍVEJTE prepIT™•L2P po datu v rubrice „Použitelné do“ na lahvičce reagencie.
- Pokud se reagencie dostane do kontaktu s očima nebo pokožkou, omyjte je vodou. NEPOŽÍVEJTE.
- Jakékoli závažné problémy nahlaste společnosti DNA Genotek a příslušnému úřadu ve vaší zemi.
- Pokyny k bezpečné likvidaci nespotřebované reagencie uvádí bezpečnostní list.
- Bezpečnostní list (SDS) je k dispozici na webu [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

## **Omezení použití přípravku**

Používejte prepIT™•L2P pouze v souladu s pokyny v této příručce.

## **Přeprava prepIT™•L2P**

prepIT™•L2P lze jako laboratorní reagencii přepravovat při teplotě okolního prostředí. Není zapotřebí žádné zvláštní zacházení.

## **Uchovávání prepIT™•L2P (skladovatelnost)**

Skladujte při pokojové teplotě. Jsou-li přípravky PT-L2P-5 (5 ml) a PT-L2P-45 (45 ml) správně uzavřeny a skladovány při pokojové teplotě, bude jejich skladovatelnost 30 měsíců.

## **Likvidace**

Zlikvidujte nespotřbované, poškozené nebo netěsnící sady v souladu s příslušnými místními, státními a federálními předpisy. Likvidujte je jako laboratorní odpad.

## **Údržba/opravy**

Není relevantní. prepIT™•L2P je reagencie a nevyžaduje žádnou údržbu či opravy.

## **Souhrn údajů o funkčnosti**

Genomická DNA z odběrových sad na sliny Oragene™ a ORAcollect™, purifikovaná s použitím prepIT™•L2P, poskytuje vysokou kvalitu a dostačující množství DNA k použití v downstream aplikacích, jako je PCR, microarray analýza a sekvenování nové generace.

## **Dodávaná balení přípravku**

prepIT™•L2P je k dispozici v různých objemech, v závislosti na požadovaném počtu preparátů. Příklad:

| Referenční/katalogové číslo produktu | Objem vzorkového preparátu | Počet preparátů |
|--------------------------------------|----------------------------|-----------------|
| PT-L2P-5                             | 0,5 ml                     | 200             |
| PT-L2P-45                            | 0,5 ml                     | 2 000           |

## **Záruky**

Plné znění podmínek a ustanovení pro všechny produkty společnosti DNA Genotek naleznete na adrese <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

## **Řešení problémů**

Obratce se na technickou podporu společnosti DNA Genotek na adrese support@dnagenotek.com nebo telefonicky na čísle +1 (613) 723-5757, volba 6.

# **prepIT™•L2P: laboratorní protokol pro manuální purifikaci DNA ze vzorku o objemu 500 µl**

Následující podrobný protokol popisuje jednotlivé kroky purifikace DNA z alikvotního vzorku o objemu 500 µl.

## **Dodané reagencie**

prepIT™•L2P (kat. č. PT-L2P-5 nebo PT-L2P-45)

## **Vybavení a reagencie**

- Mikrocentrifuga schopná dosáhnout odstředivé síly  $15\ 000 \times g$
- 1,5 ml mikrozkumavky (např. Axygen® kat. č. MCT-150-C)
- Vzduchový nebo vodní inkubátor s teplotou 50 °C
- Ethanol (95% až 100%) v pokojové teplotě
- Ethanol (70%) v pokojové teplotě
- Pufr pro skladování DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) nebo podobný roztok

## **Postup**

| Kroky purifikace   | Poznámky  |
|--|---|
| 1. Míchejte vzorek ze sady Oragene™/ORACollect™ po několik sekund převracením nebo jemným protřepáváním. | <ul style="list-style-type: none"><li>• Zajistíte tak řádné promíchání viskózních vzorků.</li></ul> |

| Kroky purifikace   | Poznámky  |
|--|---|
| 2. Inkubujte vzorek při teplotě 50 °C ve vodním inkubátoru nejméně 1 hodinu, nebo ve vzduchovém inkubátoru nejméně 2 hodiny.     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Tento krok zahřívání je nezbytný k zajištění adekvátního uvolnění DNA a trvalé deaktivace nukleáz.</li> <li>Inkubaci lze provést kdykoli po odebrání vzorku před jeho purifikací.</li> <li>K zajištění homogeneity je nutno celý vzorek inkubovat v původní odběrové zkumavce před jeho rozdělením na alikvotní části.</li> <li>Pokud vám to lépe vyhovuje, můžete vzorek inkubovat při 50 °C přes noc.</li> <li>Inkubace ve vzduchovém inkubátoru se musí provádět déle, protože vyrovnání teploty je pomalejší než u vodního inkubátoru.</li> </ul> <p><b>Poznámka:</b> Může být vhodnější použít vzduchový inkubátor, protože zkumavky Oragene™/ORACollect™ mají tendenci ve vodní lázni plavat na hladině. Pokud musíte použít vodní lázeň, zajistěte, aby část zkumavky obsahující vzorek zůstala ponořená ve vodě.</p> |
| 3. Přeneste 500 µl promíchaného vzorku do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky.  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Zbytek vzorku můžete skladovat při pokojové teplotě (15 °C až 25 °C) nebo zmražený.</li> <li>Podle potřeby lze vzorek uchovávat ve zmražené zkumavce Oragene™/ ORACollect™ při teplotě -20 °C, nebo jej přenést do kryozkumavky k dlouhodobému uskladnění při teplotě -80 °C.</li> </ul>   |
| 4. Přidejte do mikrocentrifugační zkumavky 20 µl (1/25 objemu) roztoku prepIT™•L2P a promíchejte vortexováním po několik sekund. | <ul style="list-style-type: none"> <li>Vzorek se zakalí v důsledku vysrážení nečistot a inhibitorů.</li> </ul>  |
| 5. Inkubujte na ledu po dobu 10 minut.   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Můžete namísto toho inkubovat vzorek při pokojové teplotě, ale odstranění nečistot tak bude poněkud méně efektivní.</li> </ul>   |

| Kroky purifikace  | Poznámky   |
|---|--|
| 6. Centrifugujte 5 minut při pokojové teplotě při $15\,000\times g$ .   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Delší doba centrifugace (až 15 minut) může být přínosná pro snížení zakalenosti (vysoká hodnota <math>A_{320}</math>) konečného roztoku DNA.</li> </ul>   |
| 7. Opatrně přeneste pipetovací špičkou čirý supernatant do nové mikrocentrifugační zkumavky. <b>Peletu obsahující nečistoty zlikvidujte.</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Peleta obsahuje kalné nečistoty. Pokud ji nechtěně narušíte, je zapotřebí zkumavku centrifugovat znovu.</li> </ul>  |
| 8. Přidejte 600 $\mu l$ 95% až 100% ethanolu v pokojové teplotě. Opatrně promíchejte tak, že zkumavku 10krát převrátíte dnem vzhůru.          | <ul style="list-style-type: none"> <li>DNA se bude během mísení s ethanolem srážet. Může se jevit jako chomáček vláken DNA nebo jako jemná sraženina, podle toho, kolik DNA vzorek obsahuje.</li> <li>I když chomáček nebude viditelný, lze DNA vytěžit pečlivým provedením dalších kroků.</li> </ul>  |
| 9. Nechejte vzorek po 10 minut stát při pokojové teplotě, aby se DNA plně vysrážela.  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nedoporučujeme inkubaci při <math>-20^{\circ}C</math>, protože nečistoty se mohou srážet spolu s DNA.</li> </ul>  |
| 10. Vložte zkumavku do mikrocentrifugy a povšimněte si, v jaké je poloze. Centrifugujte 2 minuty při pokojové teplotě při $15\,000\times g$ . | <ul style="list-style-type: none"> <li>Například umístěte každou zkumavku do mikrocentrifugy tak, aby úchytní víčka směřovaly ven od středu rotoru. Po centrifugaci pak lze zjistit, kde se nachází peleta (i když bude příliš malá, než aby byla viditelná) – bude na vršku zkumavky pod úchytem víčka.</li> </ul>  |
| 11. Opatrně odeberte peletu pipetovací špičkou a zlikvidujte ji. Dejte pozor, abyste nenarušili peletu DNA.                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Tato peleta obsahuje DNA. Její ztráta způsobí ztrátu DNA.</li> <li>Když otočíte zkumavku tak, aby byla peleta u její horní stěny, budete moci bezpečně pohybovat pipetovací špičkou podél dolní stěny a odstranit všechny supernatant.</li> <li>Supernatant může obsahovat nečistoty a je nutno jej odstranit co možná nejúplněji.</li> </ul> |

| Kroky purifikace  | Poznámky  |
|---|---|
| 12. Promývání ethanolem:<br>Opatrně přidejte 250 µl 70% ethanolu. Nechejte stát při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. <b>Opatrně odstraněte ethanol a nenarušte přitom peletu.</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Je důležité odstranit ze vzorku všechn ethanol. Zbytek ethanolu může ovlivnit výsledky analýzy.</li> <li>Po odstranění 70% ethanolu pomůže pulzní centrifugace zkumavky odstranit jeho zbytky.</li> <li>Dejte však pozor, aby nebyla narušena peleta DNA, která může být malá nebo i neviditelná.</li> <li>Jestliže se peleta oddělí, centrifugujte vzorek po 5 minut při <math>15\,000 \times g</math>.</li> <li>Nadměrné vysušení pelety může ztížit rozpouštění DNA.</li> </ul> |
| 13. Rozpustěte peletu DNA přidáním 100 µl roztoku TE (viz str. 5). Vortexujte nejméně po dobu 5 sekund.   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pokud potřebujete vyšší koncentraci DNA, použijte 50 µl roztoku TE.</li> </ul>   |
| 14. Abyste zajistili kompletní rehydrataci DNA, inkubujte při pokojové teplotě přes noc a pak vortexujte, nebo inkubujte při teplotě 50 °C po dobu 1 hodiny s občasným vortexováním.  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Úplná rehydratace (rozpouštění) velkých množství vysokomolekulární DNA může probíhat pomalu.</li> <li>Neúplná rehydratace DNA je přičinou nepresných odhadů koncentrace DNA a potenciální neúspěšnosti downstream aplikací, jako je PCR.</li> </ul>  |
| 15. Možnosti uchovávání plně rehydrované DNA: <ol style="list-style-type: none"> <li>Dlouhodobé uskladnění v roztoku TE při teplotě -20 °C. Podle potřeby rozdělte na alikvotní části.</li> <li>Po dobu až 2 měsíců v roztoku TE při teplotě 4 °C.</li> </ol> |   |

# **prepIT™•L2P: laboratorní protokol**

## **pro manuální purifikaci DNA z celého vzorku**

**Poznámka:** Tento protokol vyžaduje pro dosažení optimálních výsledků použití centrifugy (s rotorem s fixním úhlem nebo se závěsy) schopné dosahovat odstředivé síly nejméně  $3\ 500\times g$ .

Následující podrobný protokol popisuje jednotlivé kroky purifikace DNA z celého vzorku (o celkovém objemu 1 ml až 4 ml). Uvedené objemy je nutno upravit podle skutečného odebraného objemu.

### **Dodané reagencie**

prepIT™•L2P (kat. č. PT-L2P-5 nebo PT-L2P-45)

### **Vybavení a reagencie**

- Centrifuga, do níž se vejdují 15 ml zkumavky a která je schopna dosahovat odstředivé síly nejméně  $3\ 500\times g$  (viz tabulka 2)
- 15 ml kónické polypropylenové zkumavky (např. BD Falcon® kat. č. 352196)
- Mikrocentrifuga schopná dosahovat odstředivé síly  $15\ 000\times g$  (volitelná možnost)
- 1,5 ml mikrozkumavky (např. Axygen® kat. č. MCT-150-C)
- Vzduchový nebo vodní inkubátor s teplotou  $50\ ^\circ C$
- Ethanol (95% až 100%) v pokojové teplotě
- Ethanol (70%) v pokojové teplotě
- Pufr pro skladování DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) nebo podobný roztok

**Volitelná možnost: Kontrola před purifikací (to se týká jen vzorků ze sady Oragene™, nevyžaduje se pro vzorky z ORAcollect™)**

Zvažte vzorek, abyste mohli odhadnout množství slin získaných od dárce (viz tabulka 1). Množství odebraných slin je přímo úměrné množství získané DNA. Jestliže například bylo od dárce získáno méně než 2 ml slin, můžete předpokládat, že celkově vám tento vzorek poskytne menší množství DNA.

**Hmotnost sady (bez vzorku)**

Po doručení vzorku do laboratoře doporučujeme vzorek zvážit, abyste odhadli, zda bylo od dárce získáno správné množství slin. Můžete předpokládat, že tato množství budou u různých dárců odlišná. Uvádíme zde průměrnou hmotnost prázdné sady (tabulka 1). Množství odebraného vzorku (za předpokladu 1 g/ml) odhadnete pomocí tohoto výpočtu:

*Hmotnost sady obsahující vzorek – Hmotnost sady bez vzorku*

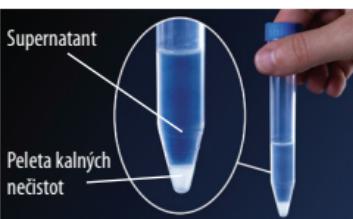
*Množství odebraného vzorku*

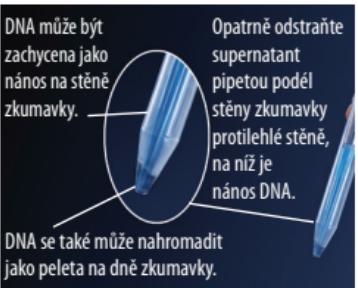
**Tabulka 1**

| Výrobek č.             | Hmotnost sady bez vzorku |
|------------------------|--------------------------|
| OG-500/OGD-500/OGR-500 | 6,81 g                   |
| OG-510/OGD-510         | 5,83 g                   |
| OG-575/OGD-575/OGR-575 | 5,66 g                   |
| ON-500                 | 6,47 g                   |
| ON-600                 | 6,86 g                   |
| OG-600/OGD-600/OGR-600 | 7,26 g                   |
| OG-610/OGD-610         | 6,28 g                   |
| OG-675/OGD-675/OGR-675 | 6,00 g                   |

## Postup

| Kroky purifikace  | Poznámky   |
|---|--|
| <p>1. Míchejte vzorek ze sady Oragene™/ORACollect™ po několik sekund převracením nebo jemným protřepáváním.</p>                     | <ul style="list-style-type: none"><li>Zajistíte tak řádné promíchání viskózních vzorků.</li></ul>  |
| <p>2. Inkubujte vzorek při teplotě 50 °C ve vodním inkubátoru nejméně 1 hodinu, nebo ve vzduchovém inkubátoru nejméně 2 hodiny.</p> | <ul style="list-style-type: none"><li>Tento krok zahřívání je nezbytný k získání maximálního množství DNA a zajištění trvalé deaktivace nukleáz.</li><li>Pokud vám to lépe vyhovuje, můžete vzorek inkubovat při 50 °C přes noc.</li><li>Inkubaci lze provést kdykoli po odebrání vzorku před purifikací DNA.</li><li>Inkubace ve vzduchovém inkubátoru se musí provádět déle, protože vyrovnání teploty je pomalejší než u vodního inkubátoru.</li></ul>  |
| <p>3. Přeneste celý vzorek do 15 ml centrifugační zkumavky (obr. 1). Poznamenejte si jeho objem.</p>                                | <p><b>Poznámka:</b> Může být vhodnější použít vzduchový inkubátor, protože zkumavky Oragene™/ORACollect™ mají tendenci ve vodní lázni plavat na hladině. Pokud musíte použít vodní lázeň, zajistěte, aby část zkumavky obsahující vzorek zůstala ponořená ve vodě.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>Můžete vzorek přelít nebo jej přemístit skleněnou nebo plastovou pipetou.</li></ul>  <p><b>Obr. 1:</b> Než přejdete ke kroku č. 4, ujistěte se, že byl celý vzorek inkubován a přenesen do nové 15 ml centrifugační zkumavky, jak ukazuje ilustrace.</p> |

| Kroky purifikace   | Poznámky  |
|--|---|
| 4. Přidejte do zkumavky 1/25 objemu roztoku prepIT™•L2P a promíchejte vortexováním po několik sekund (obr. 2).   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Např. ke 4 ml vzorku přidejte 160 µl roztoku prepIT™•L2P.</li> <li>Vzorek se zakalí v důsledku srážení nečistot a inhibitorů.</li> </ul>   |
|  <p>Obr. 2: Po přidání PT-L2P a inkubování na lednu po dobu 10 minut již vzorek nebude čirý, ale bude to spíše zakalený roztok.</p> |   |
| 5. Inkubujte na lednu po dobu 10 minut.  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Můžete namísto toho inkubovat vzorek při pokojové teplotě, ale odstranění nečistot tak bude méně efektivní.</li> </ul>   |
| 6. Centrifugujte 10 minut při pokojové teplotě s použitím co nejvyšších otáček. Minimální odstředivá síla je $3\,500\times g$ .  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Vyšší odstředivá síla snižuje množství kalného materiálu, který bude přenesen do purifikované DNA (obr. 3). Než budete pokračovat, měli byste ověřit u výrobce zkumavek, že 15 ml centrifugační zkumavky jsou vůči této odstředivé síle odolné.</li> <li>Delší doba centrifugace (až 20 minut) může být přínosná pro snížení zakalenosti (vysoká hodnota <math>A_{320}</math>) konečného roztoku DNA.</li> </ul> |
|  <p>Obr. 3: Po centrifugaci se na dně zkumavky nahromadí kalný materiál. Supernatant má být viditelně čirý.</p>                    |   |
| 7. Opatrně přeneste pipetou čirý supernatant do nové 15 ml centrifugační zkumavky.<br><b>Zlikvidujte peletu.</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nechejte ve zkumavce malé množství supernatantu, abyste nenarušili peletu.</li> <li>Peleta obsahuje kalné nečistoty. Pokud ji nechtěně narušíte, je zapotřebí zkumavku centrifugovat znova.</li> </ul>   |

| Kroky purifikace   | Poznámky  |
|--|---|
| <p>8. Přidejte do čirého supernatantu 1,2x objemu 95% až 100% ethanolu v pokojové teplotě. Opatrně promíchejte tak, že zkumavku 10krát převrátíte dnem vzhůru.</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA se bude srážet během mísení s ethanolem.</li> <li>• Sražená DNA se může jevit jako chomáček vláken DNA (obr. 4) nebo jako jemná sraženina, v závislosti na obsahu DNA ve vzorku.</li> </ul>  |
| <p>9. Nechejte vzorek po 10 minut stát při pokojové teplotě, aby se DNA plně vysrážela.</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nedoporučujeme inkubaci při -20 °C, protože nečistoty se mohou srážet spolu s DNA.</li> </ul>  |
| <p>10. Centrifugujte 10 minut při pokojové teplotě na co nejvyšší možnou rychlosť. Minimální odstředivá síla je <math>3\ 500 \times g</math>.</p>  |   |
| <p>11. Opatrně odeberte supernatant skleněnou nebo plastovou pipetou a zlikvidujte jej. Dejte pozor, abyste nenarušili peletu DNA.</p>                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Supernatant může obsahovat nečistoty a je nutno jej odstranit co možná nejúplněji.</li> <li>• Vysrážená DNA se bude nacházet v podobě pelety na dně zkumavky a možná jako nános na stěně zkumavky (obr. 5).</li> <li>• Nános DNA může být na stěně zkumavky, která je vzdálenější od středu centrifugy.</li> <li>• Nános můžete nalézt zkusem „poškrabáním“. Přítomnost nánosu DNA můžete zjistit poškrabáním pipetovací špičkou po vnitřní stěně zkumavky. Může zde být viditelný nános, jak ukazuje obr. 5.</li> </ul> |

| Kroky purifikace  | Poznámky   |
|---|--|
| <p>12. Promývání ethanolem:<br/>Opatrně přidejte do zkumavky 1 ml 70% ethanolu tak, abyste nenarušili nános nebo peletu. Nechejte stát při pokojové teplotě po dobu 1 minuty.</p> <p><b>Opatrně zkumavku pomíchejte krouživým pohybem a odstraňte všechn ethanol tak, aby se přitom nenarušili nános nebo peletu.</b></p>                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Je důležité odstranit ze vzorku všechn ethanol. Zbytek ethanolu může ovlivnit výsledky analýzy.</li> <li>Dejte však pozor, aby nebyla narušena peleta nebo nános DNA.</li> <li>K usnadnění úplného odstranění supernatantu můžete provést krátkou centrifugaci (méně než 1 minutu).</li> <li>Pokud se po promývání ethanolem peleta oddělí, centrifugujte vzorek po 5 minut s použitím co možná nejvyšších otáček. Minimální odstředivá síla je 3 500 × g.</li> </ul>   |
| <p>13. U vzorků ze sady Oragene™ provedte rehydrataci DNA přidáním 0,2 ml až 1 ml roztoku TE a vortexujte vzorek po dobu 30 sekund.</p> <p>U vzorků ze sady ORAcollect™ provedte rehydrataci DNA přidáním 0,2 ml roztoku TE a vortexujte vzorek po dobu 30 sekund.</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pokud potřebujete vyšší koncentraci DNA, můžete použít menší objem roztoku TE. Je nutno použít nejméně 200 µl roztoku TE.</li> <li>Nadměrné vysušení pelety (&gt; 10 minut) a použití méně než 500 µl roztoku TE může ztížit rehydrataci (rozpuštění) DNA a snížit tak její získané množství nebo způsobit, že bude kvantifikace obtížná.</li> <li>Vysrážená DNA se bude nacházet v podobě pelety na dně zkumavky a možná jako nános na stěně zkumavky.</li> <li>Abyste zajistili získání maximálního množství DNA, je nutno po přidání rozpouštědla DNA (roztoku TE) vortexovat vzorek. Vortexování zajistí získání DNA zachycené jako nános na stěně zkumavky (obr. 6).</li> <li>Vortexování nezpůsobí stříhání DNA.</li> </ul> |
| <p>14. K zajištění kompletní rehydratace DNA inkubujte při pokojové teplotě přes noc a pak vortexujte, nebo inkubujte při teplotě 50 °C po dobu 1 hodiny s občasným vortexováním.</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Neúplná rehydratace DNA je přičinou nepresných odhadů koncentrace DNA a potenciální neúspěšnosti downstream aplikací, jako je PCR.</li> </ul>   |

| Kroky purifikace   | Poznámky  |
|--|---|
| <p>15. Rehydrovanou DNA přeneste do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky k uskladnění.</p> <p>Volitelný krok:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Centrifugujte rehydrovanou DNA při pokojové teplotě po dobu 15 minut při <math>15\,000 \times g</math>.</li> <li>b) Přeneste supernatant do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky, aniž byste přitom narušili peletu.</li> </ul> | <p>Povšimněte si, že peleta obsahuje nerozpustný kalný materiál.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Abyste získali maximální množství DNA, zajistěte před tímto krokem centrifugace úplnou rehydrataci DNA (krok č. 14).</li> <li>• Tento krok centrifugace zajistí odstranění veškerých zbytků kalného materiálu ze vzorku DNA.</li> <li>• Při přenášení čirého supernatantu musíte postupovat opatrně, abyste nenarušili peletu.</li> </ul> |
| <p>16. Možnosti uchovávání plně rehydrované DNA:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Dlouhodobé uskladnění v roztoku TE při teplotě <math>-20\text{ }^{\circ}\text{C}</math>. Podle potřeby rozdělte na alikvotní části.</li> <li>b) Po dobu až 2 měsíců v roztoku TE při teplotě <math>4\text{ }^{\circ}\text{C}</math>.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zmražení purifikované DNA v roztoku TE může způsobit srážení DNA. Při rozmrázování zmražené purifikované DNA venujte pečlivou pozornost rehydrataci, jak popisuje krok č. 14.</li> </ul>   |

# Kvantifikace DNA

## Fluorescenční metodou

Z hlediska kvantifikace množství dvouvláknové DNA (dsDNA) ve vzorku DNA jsou analýzy používající fluorescenční barviva specifickější, než měření absorbance při záření o vlnové délce 260 nm. Navrhujeme používat komerčně dostupné soupravy, jako je Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) nebo QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Před použitím DNA v kvantifikační analýze ji možná budete muset zředit roztokem TE v poměru 1:50.

## Metodou měření absorbance

Pokud se rozhodnete kvantifikovat DNA měřením absorbance, doporučujeme, abyste nejdříve použili v purifikovaném vzorku RNázu ke štěpení kontaminující RNA, a pak odstranili fragmenty RNA vysrážením DNA s použitím ethanolu. Podrobný protokol je popsán v materiálu PD-PR-040, *Odstranní RNA dvojím štěpením RNázou*.<sup>1</sup> Pamatujte, že DNA ze vzorku z ústní dutiny zpravidla obsahuje znatelně více RNA, než kolik se jí nachází ve vzorcích krve. Než budete načítat hodnoty absorbance, ujistěte se, že je alkoholem srážená DNA plně rozpuštěná.

**Faktor konverze:** Hodnota absorbance 1,0 při vlnové délce 260 nm odpovídá koncentraci 50 ng/µl (50 µg/ml) čisté, dvouvláknové DNA.

Ujistěte se, že hodnoty absorbance jsou v lineárním rozsahu spektrofotometru. Vzorky mimo lineární rozsah rozřeďte a změřte je znova. Bližší informace naleznete v dokumentaci ke svému přístroji.

## Odkazy

<sup>1</sup> Odstranění RNA dvojím štěpením RNázou. PD-PR-040. DNA Genotek.

## **Metoda**

1. Rozředte 10  $\mu\text{l}$  alikvotní vzorek purifikované DNA zpracovaný RNázou s použitím 90  $\mu\text{l}$  roztoku TE (1/10 zředění). Promíchejte nasáváním a vypouštěním obsahu pipetou. Počkejte, až zmizí bublinky.
2. Použijte roztok TE v kontrolní (prázdné) buňce.
3. Měřte absorbanci při vlnových délkách 320 nm, 280 nm a 260 nm.
4. Vypočítejte opravené hodnoty  $A_{280}$  a  $A_{260}$  odečtením hodnoty absorbance při vlnové délce 320 nm ( $A_{320}$ ) od hodnot  $A_{280}$  a  $A_{260}$ .
5. Koncentrace DNA v  $\text{ng}/\mu\text{l}$  = opravená hodnota  $A_{260} \times 10$  (faktor ředění)  $\times 50$  (faktor konverze).
6. Poměr  $A_{260}/A_{280}$ : Vydejte opravenou hodnotu  $A_{260}$  opravenou hodnotou  $A_{280}$ .

## **Příklad**

1. Předpokládejme, že naměřená hodnota  $A_{320} = 0,025$ ,  $A_{280} = 0,175$  a  $A_{260} = 0,295$
2. Koncentrace DNA neředěného vzorku bude:  
$$\begin{aligned}(A_{260} - A_{320}) \times 10 & [\text{faktor ředění}] \times 50 [\text{faktor konverze}] \\&= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50 \\&= 0,270 \times 10 \times 50 \\&= 135 \text{ ng}/\mu\text{l} \text{ nebo } 135 \mu\text{g}/\text{ml}\end{aligned}$$
3. Poměr opravených hodnot  $A_{260}/A_{280}$  bude:  
$$\begin{aligned}(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320}) \\&= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025) \\&= 0,270 \div 0,150 \\&= 1,80\end{aligned}$$

Oragene•DNA a ORAcollect•DNA nejsou na prodej ve Spojených státech amerických.  
Oragene•DISCOVER slouží pouze k použití ve výzkumu, nikoli k diagnostickým postupům.  
Některé produkty společnosti DNA Genotek nemusí být dostupné ve všech geografických oblastech.  
Oragene, prepIT, ORAcollect a DNA Genotek jsou ochranné známky společnosti DNA Genotek Inc.  
Všechny ostatní zde uvedené značky a názvy jsou majetkem jejich příslušných vlastníků.  
Veškeré protokoly společnosti DNA Genotek, její bílé knihy a poznámky k aplikaci jsou k dispozici v sekci podpory na našich webových stránkách [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

### Legenda ke štítku:

|                            |   |
|----------------------------|---|
|                            | Označení UKCA                                       |
|                            | Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro       |
|                            | Katalogové číslo                                    |
|                            | Označení CE   |
|                            | Pozor   |
|                            | Výrobce   |
|                            | Přečtěte si elektronický návod k použití            |
|                            | Pověřený zástupce v Evropě                          |
|                            | Pověřený zástupce ve Švýcarsku                      |
|                            | Číslo šarže   |
|                            | Jedinečný identifikátor prostředku                  |
|                            | Použitelné do / stabilita při použití               |
|                            | Počet jednotek v balení                             |
| 15°C ÷ 30°C<br>59°F ÷ 86°F | Pokyny k uchovávání                                 |
|                            | Vyrobeno v USA ze zahraničních a domácích materiálů |