

**Håndbog til manuel
oprensingsprotokol
til brug med**

prepIT™•L2P

DNagenotek™

www.dnagenotek.com

Tlf.: +1.613.723.5757
support@dnagenotek.com
sales@dnagenotek.com

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

*Prøver i særklasse
Underbygget resultat*



prepIT™-L2P-protokollen er tilgængelig på flere sprog på
www.dnagenotek.com

Teknisk support er tilgængelig mandag til fredag (9.00 til 17.00):

- Gebyrfrit (Nordamerika): 1.866.813.6354, mulighed nr. 6
- Alle andre lande: +1.613.723.5757, mulighed nr. 6
- E-mail: support@dnagenotek.com

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

UK-ansvarlig person: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL International,
Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

 Novosanis NV, Bijkhoevelaan 32c,
2110 Wijnegem, Belgien
E-mail: EUAR@novosanis.com

 Arazy Group Swiss GmbH
Bruderholzallee 53, 4059 Basel, Schweiz
E-mail: swiss.ar@arazygroup.com

Australsk sponsor: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street,
Sydney, NSW 2000 Australien

Indholdsfortegnelse

Tilsigtet brug/formål	4
Stabilitet under brug	4
Funktioner	4
Materialer	4
Advarsler og forholdsregler	4
Begrænsninger i produktbrug	5
Transport af prepIT-L2P	5
Opbevaring af prepIT-L2P (holdbarhed)	5
Bortskaffelse	5
Vedligeholdelse/reparationer	5
Sammenfatning af ydeevnekarakteristika	5
Produktpræsentationer	5
Garantier	6
Fejlfinding	6

prepIT-L2P-laboratorieprotokol til manuel oprensning af DNA fra:

500 µL prøve	7
Hel prøve	11
Kvantificering af DNA	18

Tilsigtet brug/formål

Til oprensning af genomisk DNA fra Oragene™- og ORAcollect™-spsytopsamlingsæt.

Stabilitet under brug

PT-L2P-5 (5 mL) og PT-L2P-45 (45 mL) har 30 måneders stabilitet under brug ved stuetemperatur.

Funktioner

- Optimeret kemi til maksimal genvinding af DNA fra orale prøver opsamlet med Oragene- og ORAcollect-produktserierne.
- Dokumenterede ensartede resultater med højmolekylært DNA.
- Skalerbar oprensningmetode til store eller små prøvevolumener.
- Praktisk workflow med komplet teknisk support fra opsamling til ekstraktion.
- Omkostningseffektiv metode, der kræver minimalt brug af udstyr.

Materialer

- PT-L2P-5 (5 mL) og/eller PT-L2P-45 (45 mL)
- prepIT•L2P-produkthåndbog

Advarsler og forholdsregler

- Kun til laboratoriebrug.
- Indtag IKKE flydende reagens.
- Må IKKE bruges, hvis emballagen er beskadiget eller forseglingen i fragtlåget/hætten er brudt eller utæt.
- Brug IKKE prepIT•L2P efter "Sidste anvendelsesdato" angivet på reagensflasken.
- Skyl med vand, hvis reagenset kommer i kontakt med øjne eller hud. Må IKKE indtages.
- Indberet enhver alvorlig hændelse til DNA Genotek og den kompetente myndighed i dit land.
- Se materialesikkerhedsdatabladet (MSDS) for sikker bortscaffelse af ubrugt reagens.
- MSDS'et er tilgængeligt på www.dnagenotek.com.

Begrænsninger i produktbrug

Brug kun prepIT•L2P som anvist i denne produkthåndbog.

Transport af prepIT•L2P

prepIT•L2P kan transporteres som et laboratoriereagens ved omgivelsestemperatur. Der kræves ingen særlig håndtering.

Opbevaring af prepIT•L2P (holdbarhed)

Opbevares ved stuetemperatur. Holdbarheden for PT-L2P-5 (5 mL) og PT-L2P-45 (45 mL) bør være 30 måneder, når de er korrekt lukkede og opbevaret ved stuetemperatur.

Bortscaffelse

Kassér ubrugte, beskadigede eller utætte sæt i overensstemmelse med relevante lokale og nationale regler. Bortscaffes som laboratorieaffald.

Vedligeholdelse/reparationer

Ikke relevant. prepIT•prepIT•L2P er et reagens — ingen vedligeholdelse eller reparation påkrævet.

Sammenfatning af ydeevnekaraktistika

prepIT•L2P oprenset genomisk DNA fra Oragene- og ORAcollect-spsytopsamlingsæt giver en stor mængde DNA i høj kvalitet, der er tilstrækkelig til brug i nedstrømsapplikationer, såsom PCR, microarray og næste generations sekventering.

Produktpræsentationer

prepIT•L2P er tilgængelig i flere volumener, afhængigt af antallet af nødvendige forberedelser. For eksempel:

Produktreference/ katalognummer	Prøveforberedelsesvolumen	Antal forberedelser
PT-L2P-5	0,5 mL	200
PT-L2P-45	0,5 mL	2.000

Garantier

Fuldstændige vilkår og betingelser for alle DNA Genotek-produkter findes på <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

Fejlfinding

Kontakt DNA Genoteks tekniske support på support@dnagenotek.com eller ring +1 (613) 723-5757, vælg mulighed nr. 6.

prepIT™•L2P-laboratorieprotokol til manuel oprensning af DNA fra 500 µL prøver

Den følgende trin-for-trin protokol beskriver, hvordan man oprensner DNA fra en 500 µL alikvot prøve.

Reagenser inkluderet

prepIT•L2P (kat.- nr. PT-L2P-5 eller PT-L2P-45)

Udstyr og reagenser

- Mikrocentrifuge, der kan køre ved $15.000 \times g$
- 1,5 mL mikrorør (f.eks. Axygen® kat.- nr. MCT-150-C)
- Luft- eller vandinkubator ved 50 °C
- Ethanol (95% til 100%) ved stuetemperatur
- Ethanol (70%) ved stuetemperatur
- DNA-lagringsbuffer: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) eller lignende opløsning

Procedure

Oprensningstrin	Bemærkninger
1. Bland Oragene/ORAclect-prøven ved at vende den om eller forsigtig omryste den i et par sekunder.	• Dette gøres for at sikre, at viskøse prøver blandes korrekt.

Oprensningstrin	Bemærkninger
2. Inkuber prøven ved 50 °C i en vandinkubator i mindst 1 time eller i en luftinkubator i mindst 2 timer.	<ul style="list-style-type: none"> • Dette varmebehandlingstrin er afgørende for at sikre, at DNA frigives tilstrækkeligt, og at nukleaser inaktiveres permanent. • Dette inkubationstrin kan udføres på et hvilket som helst tidspunkt efter prøven er opsamlet, og før den er oprenset. • Hele prøven skal inkuberes i det originale opsamlingsrør for alikotering for at sikre prøvehomogenitet. • Prøven kan inkuberes ved 50 °C natten over, hvis det er nemmere. • Der kræves længere tid i en luftinkubator, da temperaturudligningen er langsommere end i en vandinkubator. <p>Bemærk: Brugen af en luftinkubator kan være at foretrække, da Oragene/ORACollect-rørene kan flyde i et vandbad. Hvis der skal bruges et vandbad, skal det sikres, at den prøveholdige del af røret forbliver nedsænket i vand.</p>
3. Overfør 500 µL af den blandede prøve til et 1,5 mL mikrocentrifugerør.	<ul style="list-style-type: none"> • Resten af prøven kan opbevares ved stuetemperatur (15°C til 25°C) eller fryses ned. • Hvis det ønskes, kan prøven opbevares nedfrosset i Oragene/ORACollect-røret ved -20°C, eller prøven kan overføres til et kryohætteglas til langtidsopbevaring ved -80°C.
4. Tilsæt 20 µL (1/25. volumen) prepIT-L2P til mikrocentrifugerøret og bland ved at omryste i nogle få sekunder.	<ul style="list-style-type: none"> • Prøven bliver uklar, når urenheder og inhibitorer udfældes.

Oprensningstrin	Bemærkninger
5. Inkuber på is i 10 minutter.	<ul style="list-style-type: none"> • Inkubation ved stuetemperatur kan være et alternativ, men vil være en smule mindre effektiv til at fjerne urenheder.
6. Centrifuger ved stuetemperatur i 5 minutter ved 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • En længere periode med centrifugering (op til 15 minutter) kan være gavnlig til at reducere turbiditeten (høj A₃₂₀) af den endelige DNA-opløsning.
7. Overfør forsigtigt den klare supernatant med en pipettespids til et nyt mikrocentrifugerør. Kassér pelleten, der indeholder urenheder.	<ul style="list-style-type: none"> • Pelleten indeholder uklare urenheder. Hvis røret ved et uheld forstyrres, skal det centrifugeres igen.
8. Tilsæt 600 µL prøve med en stuetemperatur på 95 % til 100 % ethanol. Bland forsigtigt ved at vende 10 gange.	<ul style="list-style-type: none"> • DNA'et vil blive udfældet under blandingen med ethanol. Dette kan fremstå som en klump af DNA-fibre eller som et fint bundfald, afhængigt af mængden af DNA i prøven. • Selv hvis der ikke ses nogen klump, vil DNA kunne genvindes ved omhyggeligt at følge de næste trin.
9. Lad prøven stå ved stuetemperatur i 10 minutter, så DNA'et kan udfældes helt.	<ul style="list-style-type: none"> • Inkubation ved -20 °C anbefales ikke, da urenheder kan udfældes sammen med DNA'et.
10. Placer røret i mikrocentrifugen i en kendt retning. Centrifuger ved stuetemperatur i 2 minutter ved 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Placer f.eks. hvert rør i mikrocentrifugen med hængseldelen af hættens pegende væk fra midten af rotoren. Efter centrifugering kan pelletens position lokaliseres (selvom den er for lille til at være synlig); det vil være i spidsen af røret under hængslet.

Oprensningstrin	Bemærkninger
11. Fjern forsigtigt supernatanten med en pipettespids og kassér den. Pas på ikke at ødelægge DNA-pelleten.	<ul style="list-style-type: none"> • Denne pellet indeholder DNA. Tab af pellet vil resultere i tab af DNA. • Når røret roteres, så pelleten er på den øvre væg, kan du føre en pipettespids sikkert langs den nederste væg og fjerne al supernatanten. • Supernatanten kan indeholde urenheder og bør fjernes så fuldstændigt som muligt.
12. Ethanol-vask: Tilsæt forsigtigt 250 µL 70 % ethanol. Lad stå ved stuetemperatur i 1 minut. Fjern ethanolen fuldstændigt uden at forstyrre pelleten.	<ul style="list-style-type: none"> • Det er vigtigt at fjerne al ethanol fra prøven. Overførsel af ethanol kan påvirke analysens ydeevne. • Efter fjernelse af 70% ethanol, kan røret pulscentrifugeres for at tillade fjernelse af resterende ethanol. • Pas på ikke at forstyrre DNA-pelleten; den kan være lille eller usynlig. • Hvis pelleten løsner sig, skal prøven centrifuges i 5 minutter ved 15.000 × g. • Overdreven tørring af pelleten kan gøre DNA'et sværere at opløse.
13. Tilsæt 100 µL TE-opløsning (se side 5) for at opløse DNA-pelleten. Omryst i mindst 5 sekunder.	<ul style="list-style-type: none"> • Hvis der ønskes en højere koncentration af DNA, skal der anvendes 50 µL TE.
14. For at sikre fuldstændig rehydrering af DNA'et, skal der inkuberes ved stuetemperatur natten over efterfulgt af omrystning eller ved 50 °C i 1 time med lejlighedsvis omrystning.	<ul style="list-style-type: none"> • Store mængder DNA med høj molekylvægt kan være længe om at rehydrere (opløses) fuldstændigt. • Ufuldstændig rehydrering af DNA'et er en årsag til unøjagtighed i estimering af DNA-koncentration og potentiel fejl i nedstrømsapplikationer såsom PCR.
15. Muligheder for opbevaring af det fuldt rehydrerede DNA: a) I TE ved -20°C til langtidsopbevaring. Opdel i alikvoter, hvis det ønskes. b) I TE ved 4°C i op til 2 måneder.	

prepIT•L2P-laboratorieprotokol til manuel oprensning af DNA fra hele prøven

Bemærk: Denne protokol kræver brug af en centrifuge (enten rotor med fast vinkel eller svingende spand), der er i stand til at generere mindst $3.500 \times g$ for at opnå optimale resultater.

Den følgende trin-for-trin protokol beskriver, hvordan man oprensner DNA fra hele prøven (1 mL-4 mL samlet prøvevolumen). De viste mængder skal tilpasses til den faktiske opsamlede mængde.

Reagenser inkluderet

prepIT•L2P (kat.- nr. PT-L2P-5 eller PT-L2P-45)

Udstyr og reagenser

- Centrifuge, der rummer 15 mL rør og er i stand til at generere mindst $3.500 \times g$ (se tabel 2)
- 15 mL koniske polypropylenrør (f.eks. BD Falcon® kat.- nr. 352196)
- Mikrocentrifuge, der kan køre ved $15.000 \times g$ (valgfrit)
- 1,5 mL mikrorør (f.eks. Axygen® kat.- nr. MCT-150-C)
- Luft- eller vandinkubator ved 50 °C
- Ethanol (95% til 100%) ved stuetemperatur
- Ethanol (70%) ved stuetemperatur
- DNA-lagringsbuffer: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) eller lignende opløsning

Valgfrit: Kontrol forud for oprensning (gælder kun for Oragene-prøver; ikke påkrævet for ORAcollection-prøver)

Vej prøven for at estimere mængden af spyt leveret af donoren (se tabel 1). Mængden af opsamlet spyt er direkte proportional med mængden af genvundet DNA. Hvis en donor f.eks. har givet mindre end 2 mL spyt, skal man forvente at få et lavere samlet udbytte fra denne prøve.

Sættets vægt (uden prøven)

Når en prøve ankommer til laboratoriet, foreslår vi, at prøven vejes for at vurdere, om den rigtige mængde spyt er blevet leveret af donoren. Der kan forventes en vis variation på tværs af donorer. Den gennemsnitlige vægt af et tomt sæt er angivet (i tabel 1). For at estimere mængden af opsamlet prøve (forudsat 1 g/ml), udfør følgende beregning:


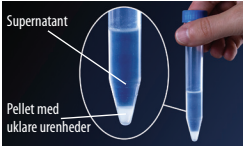
$$\frac{\text{Sættets vægt indeholdende prøve} - \text{Sættets vægt uden prøve}}{\text{Mængden af opsamlet prøve}}$$

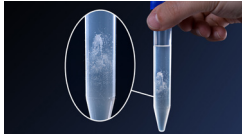

Mængden af opsamlet prøve

Tabel 1	
Produkt #	Sættets vægt uden prøve
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

Procedure

Oprensningstrin	Bemærkninger
1. Bland Oragene/ORAcollection-prøven ved at vende den om eller forsigtig omryste den i et par sekunder.	<ul style="list-style-type: none">• Dette gøres for at sikre, at viskøse prøver blandes korrekt.
2. Inkuber prøven ved 50 °C i en vandinkubator i mindst 1 time eller i en luftinkubator i mindst 2 timer.	<ul style="list-style-type: none">• Dette varmebehandlingstrin er afgørende for at maksimere DNA-udbyttet og sikre, at nukleaser inaktiveres permanent.• Prøven kan inkuberes ved 50 °C natten over, hvis det er nemmere.• Dette inkubationstrin kan udføres på et hvilket som helst tidspunkt efter prøven er opsamlet, og før DNA'et er oprenset.• Der kræves længere tid i en luftinkubator, da temperaturudligningen er langsommere end i en vandinkubator. <p>Bemærk: Brugen af en luftinkubator kan være at foretrække, da Oragene/ORAcollection-rørene kan flyde i et vandbad. Hvis der skal bruges et vandbad, skal det sikres, at den prøveholdige del af røret forbliver nedsænket i vand.</p>
3. Overfør hele prøven til et 15 mL centrifugerør (figur 1). Vær opmærksom på prøvens volumen.	<ul style="list-style-type: none">• Overførslen kan udføres enten ved hældning eller ved pipettering med en glas- eller plastpipette. <div data-bbox="771 773 1016 899" data-label="Image"></div> <p><i>Figur 1: Før der fortsættes til trin 4, skal det sikres, at hele prøven er blevet inkuberet og overført til et frisk 15 mL centrifugerør som vist.</i></p>

Oprensningstrin	Bemærkninger
<p>4. Tilsæt 1/25 volumen af preplT-L2P og bland ved at omryste i nogle få sekunder (figur 2).</p>  <p><i>Figur 2: Efter tilsætning af PT-L2P og inkubation på is i 10 minutter, vil prøven ikke længere se klar ud, men vil snarere være en uklar opløsning.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> Til en 4 mL prøve tilsættes f.eks. 160 µL preplT-L2P. Prøven bliver uklar, når urenheder og inhibitorer udfældes.
<p>5. Inkuber på is i 10 minutter.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Inkubation ved stuetemperatur kan være et alternativ, men vil være mindre effektiv til at fjerne urenheder.
<p>6. Centrifuger ved stuetemperatur i 10 minutter ved så høj hastighed som muligt. Minimum 3.500 × g.</p>  <p><i>Figur 3: Efter centrifugering vil der være en ophobning af uklart materiale i bunden af røret. Supernatanten skal være synligt klar.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> Højere centrifugalkraft minimerer mængden af uklart materiale, der vil blive overført til det oprensede DNA (figur 3). Før der fortsættes, bør det bekræftes af rørproducenten, at 15 ml centrifugerene kan modstå centrifugalkraften. En længere periode med centrifugering (op til 20 minutter) kan være gavnlig til at reducere uklarheden (høj A₃₂₀) i den endelige DNA-opløsning.
<p>7. Overfør forsigtigt den klare supernatant med en pipette til et frisk 15 mL centrifugerør. Kassér pelleten.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Efterlad en lille mængde af supernatanten for at undgå at forstyrre pelleten. Pelleten indeholder uklare urenheder. Hvis røret ved et uheld forstyrres, skal det centrifugeres igen.

Oprensningstrin	Bemærkninger
<p>8. Tilsæt 1,2 x volumen 95 % til 100 % ethanol med en stuetemperatur til den klare supernatant. Bland forsigtigt ved at vende 10 gange.</p>  <p><i>Figur 4: Efter tilsætning af ethanol vil DNA'et udfældes, hvilket kan resultere i en synlig klump af fibre.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> DNA'et vil blive udfældet under blandingen med ethanol. Udfældet DNA kan fremstå som en klump af DNA-fibre (figur 4) eller som et fint bundfald, afhængigt af mængden af DNA i prøven.
<p>9. Lad prøven stå ved stuetemperatur i 10 minutter, så DNA'et kan udfældes helt.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Inkubation ved -20 °C anbefales ikke, da urenheder kan udfældes sammen med DNA'et.
<p>10. Centrifuger ved stuetemperatur i 10 minutter ved så høj hastighed som muligt. Minimum 3.500 × g.</p>	
<p>11. Fjern forsigtigt supernatanten med en glas- eller plastpipette, og kassér den. Pas på ikke at forstyrre DNA-pelleten.</p>  <p><i>Figur 5: At bruge en pipettespids til forsigtigt at kradsse langs indersiden af røret kan afsløre tilstedeværelsen af en DNA-udstrygning.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> Supernatanten kan indeholde urenheder og bør fjernes så fuldstændigt som muligt. Udfældet DNA vil blive fundet som en pellet i bunden af røret og muligvis som en belægning ned ad siden af røret (figur 5). DNA-belægningen kan sidde på den side af røret, der vender væk fra midten af centrifugen. En belægning kan lokaliseres ved hjælp af "kradsse"-testen. Man kan kontrollere tilstedeværelsen af en DNA-belægning ved at kradsse indersiden af røret ved hjælp af en pipettespids. En belægning, som vist i figur 5, kan være synlig.

Oprensningstrin	Bemærkninger
<p>12. Ethanol-vask: Tilsæt forsigtigt 1 ml 70 % ethanol til røret uden at forstyrre belægningen eller pelleten. Lad det stå ved stuetemperatur i 1 minut. RØR forsigtigt rundt og fjern ethanolen helt uden at forstyrre pelleten og belægningen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Det er vigtigt at fjerne al ethanol fra prøven. Overførsel af ethanol kan påvirke analysens ydeevne. • Pas på ikke at forstyrre DNA-pelleten eller belægningen. • En kort centrifugering (mindre end 1 minut) kan udføres for at gøre det lettere fuldstændig at fjerne supernatanten. • Skulle pelleten løse sig efter ethanolvaskeretten, skal prøven centrifuges i 5 minutter ved så høj en hastighed som muligt. Minimum 3.500 × g.
<p>13. For Oragene-prøver skal DNA'et rehydreres ved at tilføje 0,2 mL-1 mL TE-opløsning og prøven omrystes i 30 sekunder.</p> <p>For ORAclect-prøver skal DNA'et rehydreres ved at tilføje 0,2 mL TE-opløsning og prøven omrystes i 30 sekunder.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hvis der ønskes en højere koncentration af DNA, kan mængden af TE reduceres. Der skal bruges mindst 200 µL TE-opløsning. • Overdreven tørring af pelleten (> 10 minutter) og brug af mindre end 500 µL TE-opløsning kan gøre det vanskeligt at rehydrere (opløse) DNA'et og kan reducere udbyttet eller gøre kvantificering vanskelig. • Udfældet DNA vil blive fundet som en pellet i bunden af røret og muligvis som en belægning ned ad siden af røret. • Prøven skal omrystes efter tilsætning af DNA-opløsningsmidlet (TE-opløsning) for at sikre maksimal DNA-genvinding. • At omryste prøven vil sikre, at det DNA, der sidder på siden af røret, udvindes (figur 6). • At omryste prøven vil ikke forminske DNA'et.



Figur 6: At omryste prøven i 30 sekunder vil give mulighed for at genvinde DNA, der er sidder på siden af røret. DNA'et vil forblive højmolekylært.

Oprensningstrin	Bemærkninger
<p>14. For at sikre fuldstændig rehydrering af DNA'et, skal der inkuberes ved stuetemperatur natten over efterfulgt af omrystning eller ved 50 °C i 1 time med lejlighedsvis omrystning.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ufuldstændig rehydrering af DNA'et er en årsag til unøjagtighed i estimering af DNA-koncentration og potentielle fejl i nedstrømsapplikationer såsom PCR.
<p>15. Overfør det rehydrerede DNA til et 1,5 ml mikrocentrifugerør til opbevaring.</p>	
<p>Valgfrit trin:</p> <ol style="list-style-type: none"> Centrifuger det rehydrerede DNA ved stuetemperatur i 15 minutter ved 15.000 × g. Overfør supernatanten til et frisk 1,5 mL mikrocentrifugerør uden at forstyrre pelleten. 	<p>Bemærk, at pelleten indeholder uopløseligt, uklart materiale.</p> <ul style="list-style-type: none"> • For at maksimere DNA-gendannelse skal det sikres, at DNA'et er fuldstændigt rehydreret (trin 14), før man udfører dette centrifugeringstrin. • Dette centrifugeringstrin sikrer, at eventuelt resterende uklart materiale fjernes fra DNA-prøven. • Sørg for at passe på ikke at forstyrre pelleten, når den klare supernatant overføres til et frisk rør.
<p>16. Muligheder for opbevaring af det fuldt rehydrerede DNA:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 TE ved -20°C til langtidsofopbevaring. Opdel i alikvoter, hvis det ønskes. 1 TE ved 4°C i op til 2 måneder. 	<ul style="list-style-type: none"> • Frysning af oprenset DNA i TE kan få DNA'et til at præcipitere. Ved optøning af frosset, oprenset DNA skal man være meget opmærksom på rehydrering, som omtalt i trin 14.

Kvantificering af DNA

Ved fluorescensmetode

Assays, der bruger fluorescerende farvestoffer, er mere specifikke end absorbans ved 260 nm til at kvantificere mængden af dobbeltstrengt DNA (dsDNA) i en DNA-prøve. Vi foreslår brugen af kommercielt tilgængelige sæt såsom Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) eller QuantiFluor® dsDNA System (Promega). DNA skal muligvis fortyndes op til 1:50 med TE, før det bruges i kvantificeringsassayet.

Ved brug af absorbansmetoden

Hvis man vælger at kvantificere DNA ved absorbans, anbefaler vi, at man først behandler den oprensede prøve med RNase for at fordøje kontaminerende RNA og derefter fjerner RNA-fragmenterne vha. ethanolpræcipitation fra DNA'et. En detaljeret protokol er beskrevet i PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*.¹ Bemærk, at DNA fra en oral prøve typisk indeholder betydeligt mere RNA end DNA fra blodprøver. Sørg for, at alkoholudfældet DNA er helt opløst, før absorbansen aflæses.

Konverteringsfaktor: En absorbans på 1,0 ved 260 nm svarer til en koncentration på 50 ng/μL (50 μg/mL) for rent, dobbeltstrengt DNA.

Sørg for, at absorbansværdierne er inden for spektrofotometerets lineære område. Fortynd og mål de prøver igen, der falder uden for det lineære område. Se dokumentationen til dit instrument for mere information.

Referencer

¹ RNA-fjernelse ved dobbelt-RNase-fordøjelse. PD-PR-040. DNA Genotek.

Metode












1. Fortynd en 10 μL alikvot af oprenset RNase-behandlet DNA med 90 μL TE (1/10 fortynding). Bland ved forsigtigt at pipettere op og ned. Vent på, at boblerne forsvinder.
2. Brug TE i referencecellen (tom).
3. Mål absorbans ved 320 nm, 280 nm og 260 nm.
4. Beregn korrigerede A_{280} og A_{260} -værdier ved at fratække absorbansen ved 320 nm (A_{320}) fra A_{280} - og A_{260} -værdierne.
5. DNA-koncentration i ng/μL = korrigeret $A_{260} \times 10$ (fortyndingsfaktor) $\times 50$ (konverteringsfaktor).
6. A_{260}/A_{280} forhold: Divider korrigeret A_{260} med korrigeret A_{280} .

Eksempel

1. Antag den målte $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ og $A_{260} = 0,295$
2. DNA-koncentrationen af den ufortyndede prøve vil være:
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [fortyndingsfaktor]} \times 50 \text{ [konverteringsfaktor]}$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng/}\mu\text{L eller } 135 \mu\text{g/mL}$$
3. Det korrigerede A_{260}/A_{280} -forhold vil være:
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$
$$= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$$
$$= 0,270 \div 0,150$$
$$= 1,80$$

Oragene•DNA og ORAcollect•DNA sælges ikke i USA.
Oragene•DISCOVER er kun til forskningsbrug og må ikke anvendes til diagnostiske procedurer.
Nogle DNA Genotek-produkter er muligvis ikke tilgængelige i alle geografiske områder.
Oragene, prepIT, ORAcollect og DNA Genotek er varemærker tilhørende DNA Genotek Inc.
Alle andre mærker og navne indeholdt heri tilhører deres respektive ejere.
Alle DNA Genotek-protokoller, whitepapers og ansøgningsnotater er tilgængelige i supportsektionen på vores websted på www.dnagenotek.com.

Mærkatforklaring:

	Medicinsk udstyr til in vitro diagnose
	Katalognummer
	CE-mærkning
	Producent
	Læs indlægssedlen
	Autoriseret repræsentant i Europa
	Autoriseret repræsentant i Schweiz
	Lotnummer
	Unik udstyrsidentifikation
	Stabilitet under brug
	Opbevaringsvejledning
15 °C ↕ 30 °C 59 °F ↕ 86 °F	

Patent (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-31 (DA - Danish) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., et datterselskab tilhørende
OraSure Technologies, Inc., alle rettigheder forbeholdes.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com