

# Handboek protocol voor handmatige zuivering voor gebruik met

# prepIT™•L2P

**DNAGENOTEK™**

[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, Canada K2V 1C2

*Superieure monsters  
Bewezen prestaties*




Het prepIT™-L2P-protocol is beschikbaar in andere talen  
op [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)

**Technische ondersteuning is beschikbaar van maandag tot en met vrijdag (9.00 tot 17.00 uur ET):**

- Gratis nummer (Noord-Amerika): 1.866.813.6354, optie 6
- Alle andere landen: +1.613.723.5757, optie 6
- E-mail: [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)

■ DNA Genotek Inc.  
3000 - 500 Palladium Drive  
Ottawa, ON, Canada K2V 1C2  
Email: [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)

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

 Novosanis NV Bijkhoevelaan 32c,  
2110 Wijnegem, België  
E-mail: [EUAR@novosanis.com](mailto:EUAR@novosanis.com)

 Arazy Group Swiss GmbH, Bruderholzallee 53, 4059 Basel, Zwitserland  
E-mail: [swiss.ar@arazygroup.com](mailto:swiss.ar@arazygroup.com)

Australische Sponsor: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street,  
Sydney, NSW 2000 Australië

## Inhoudsopgave

Beoogd gebruik/doel .....	4
Stabiliteit tijdens gebruik .....	4
Eigenschappen .....	4
Materialen .....	4
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen .....	4
Beperkingen voor productgebruik .....	5
Transport van prepIT-L2P .....	5
Opslag van prepIT-L2P (Houdbaarheidsduur) .....	5
Afvoer .....	5
Onderhoud/reparaties .....	5
Samenvatting van prestatiekenmerken .....	5
Productpresentaties .....	5
Garantie .....	6
Problemen oplossen .....	6
<b>prepIT-L2P laboratoriumprotocol voor handmatige zuivering van DNA uit:</b>	
500 µL monster .....	7
Heel monster .....	11
Kwantificering van DNA .....	18

## Beoogd gebruik/doel

Voor de zuivering van genomisch DNA uit de Oragene™ en ORAcollect™ speekselaflamekits.

## Stabiliteit tijdens gebruik

PT-L2P-5 (5 mL) en PT-L2P-45 (45 mL) hebben 30 maanden stabiliteit tijdens gebruik bij kamertemperatuur.

## Eigenschappen

- Geoptimaliseerde chemie voor maximale recuperatie van DNA uit orale monsters die zijn afgenomen met de Oragene- en ORAcollect-productlijnen.
- Bewezen consistente resultaten met DNA met hoge molecuulmassa.
- Schaalbare zuiveringsmethode voor grote en kleine monstervolumes.
- Handige workflow met volledige technische ondersteuning van afname tot extractie.
- Kosteneffectieve methode die minimale apparatuur vereist.

## Materialen

- PT-L2P-5 (5 mL) en/of PT-L2P-45 (45 mL)
- prepIT•L2P producthandboek

## Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

- Alleen voor laboratoriumgebruik.
- GEEN vloeibaar reagens inslikken.
- NIET gebruiken als de verpakking beschadigd is of als de verzegeling in het deksel/de dop van de trechter kapot is of lekt.
- prepIT•L2P NIET gebruiken na de uiterste gebruiksdatum die op de reagensfles staat vermeld.
- Met water wassen als reagens in contact komt met ogen of huid. NIET inslikken.
- Meld elk ernstig incident aan DNA Genotek en de bevoegde autoriteit in uw land.
- Raadpleeg het veiligheidsinformatieblad (VIB) voor veilige verwijdering van ongebruikte reagens.
- VIB is beschikbaar op [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

## Beperkingen voor productgebruik

Gebruik prepIT•L2P alleen zoals aangegeven in deze producthandleiding.

## Transport van prepIT•L2P

prepIT•L2P kan bij kamertemperatuur worden vervoerd als laboratoriumreagens. Er is geen speciale hantering vereist.

## Opslag van prepIT•L2P (houdbaarheidsduur)

Bewaar bij kamertemperatuur. De houdbaarheid van PT-L2P-5 (5 mL) en PT-L2P-45 (45 mL) is 30 maanden, mits goed afgesloten en bewaard bij kamertemperatuur.

## Verwijdering

Voer ongebruikte, beschadigde of lekkende kits af in overeenstemming met de toepasselijke lokale, provinciale en federale voorschriften. Afvoeren als laboratoriumafval.

## Onderhoud/reparaties

Niet van toepassing. prepIT•L2P is een reagens — geen onderhoud of reparatie vereist.

## Samenvatting van prestatiekenmerken

prepIT•L2P gezuiverd genomisch DNA uit Oragene en ORAcollect speekselaflamekits levert DNA van hoge kwaliteit en kwantiteit dat kan worden gebruikt in downstream-toepassingen, zoals PCR, microarray en next-generation sequencing.

## Productpresentaties

prepIT•L2P is verkrijgbaar in meerdere volumes, afhankelijk van het aantal benodigde preparaten. Bijvoorbeeld:

Productreferentie/ Catalogusnummer	Volume monsterpreparaat	Aantal preparaten
PT-L2P-5	0,5 mL	200
PT-L2P-45	0,5 mL	2000

## Garanties

De volledige voorwaarden voor alle DNA Genotek-producten vindt u op <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

## Problemen oplossen

Neem contact op met de technische ondersteuning van DNA Genotek via [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com) of bel +1 (613) 723-5757, optie 6.

# prepIT™•L2P laboratoriumprotocol voor handmatige zuivering van DNA uit 500 µL monster

Het volgende stapsgewijze protocol beschrijft hoe u DNA kunt zuiveren uit een hoeveelheid van 500 µL monster.

## Reagentia inbegrepen

prepIT•L2P (Cat. No. PT-L2P-5 of PT-L2P-45)

## Apparatuur en reagentia

- Microcentrifuge die kan draaien op 15.000 × g
- 1,5 mL microbuisjes (bijv. Axygen® Cat. No. MCT-150-C)
- Lucht- of waterincubator bij 50 °C
- Ethanol (95% tot 100%) op kamertemperatuur
- Ethanol (70%) op kamertemperatuur
- DNA-opslagbuffer: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) of vergelijkbare oplossing

## Procedure

Zuiveringsstappen	Opmerkingen
1. Meng het Oragene/ORAcollect-monster door het een paar seconden om te keren of zachtjes te schudden.	• Dit is om ervoor te zorgen dat viskeuze monsters goed worden gemengd.

Zuiveringsstappen	Opmerkingen
2. Incubeer het monster bij 50 °C in een waterincubator gedurende minimaal 1 uur of in een luchtincubator gedurende minimaal 2 uur.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Deze warmtebehandelingsstap is essentieel om ervoor te zorgen dat DNA voldoende wordt vrijgegeven en dat nucleasen permanent worden geïnactiveerd.</li> <li>Deze incubatiestap kan op elk moment worden uitgevoerd nadat het monster is afgenomen en voordat het wordt gezuiverd.</li> <li>Het volledige monster moet in het oorspronkelijke verzamelbuisje worden geïncubeerd voordat verdeling plaatsvindt om de homogeniteit van het monster te waarborgen.</li> <li>Het monster kan 's nachts bij 50 °C worden geïncubeerd als dat handiger is.</li> <li>In een luchtincubator is meer tijd nodig omdat het verkrijgen van temperatuur evenwicht langer duurt dan in een waterincubator.</li> </ul> <p><b>Let op:</b> Gebruik van een luchtincubator kan de voorkeur hebben, omdat de Oragene/ORAc collect-buisjes in een waterbad kunnen gaan drijven. Als een waterbad moet worden gebruikt, zorg er dan voor dat het monsterbevattende deel van het buisje ondergedompeld blijft in water.</p>
3. Breng 500 µL van het gemengde monster over in een microcentrifugebuis van 1,5 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>De rest van het monster kan worden bewaard bij kamertemperatuur (15 °C tot 25 °C) of worden ingevroren.</li> <li>Indien gewenst kan het monster ingevroren worden bewaard in het Oragene/ORAc collect-buisje bij -20 °C of kan het monster worden overgebracht naar een cryobuisje voor langdurige opslag bij -80 °C.</li> </ul>
4. Voeg 20 µL (1/25e volume) prepIT-L2P toe aan het microcentrifugebuisje en meng een paar seconden door te vortexen.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Het monster wordt troebel naarmate onzuiverheden en remmers neerslaan.</li> </ul>
5. Incubeer op ijs gedurende 10 minuten.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incubatie op kamertemperatuur kan een vervanging zijn, maar zal iets minder effectief zijn bij het verwijderen van onzuiverheden.</li> </ul>

Zuiveringsstappen	Opmerkingen
6. Centrifugeer bij kamertemperatuur gedurende 5 minuten bij 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Langer centrifuger (tot 15 minuten) kan gunstig zijn om de troebelheid te verminderen (hoog A<sub>320</sub>) van de uiteindelijke DNA-oplossing.</li> </ul>
7. Breng het heldere supernatant voorzichtig met een pipetpunt over in een nieuw microcentrifugebuisje. <b>Gooi de pellet met onzuiverheden weg.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>De pellet bevat troebele onzuiverheden. Als deze per ongeluk wordt verstoord, moet het buisje opnieuw worden gecentrifugeerd.</li> </ul>
8. Voeg 600 µL 95% tot 100% ethanol op kamertemperatuur toe. Meng 10 keer voorzichtig door omkeren.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tijdens het mengen met ethanol zal het DNA neerslaan. Dit kan zichtbaar zijn als een klontje DNA-vezels of als een fijne neerslag, afhankelijk van de hoeveelheid DNA in het monster.</li> <li>Zelfs als er geen stolsel zichtbaar is, wordt het DNA teruggewonnen door de volgende stappen zorgvuldig te volgen.</li> </ul>
9. Laat het monster gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur staan om ervoor te zorgen dat het DNA volledig kan neerslaan.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incubatie bij -20 °C wordt niet aanbevolen omdat onzuiverheden samen met het DNA kunnen neerslaan.</li> </ul>
10. Plaats de buis in de microcentrifuge in een bekende richting. Centrifugeer bij kamertemperatuur gedurende 2 minuten op 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plaats bijvoorbeeld elk buisje in de microcentrifuge, met het scharniergedeelte van de dop weg van het midden van de rotor gericht. Na het centrifuger kan de positie van de pellet worden bepaald (zelfs als deze te klein is om zichtbaar te zijn); deze bevindt zich aan het uiteinde van het buisje onder het scharnier.</li> </ul>
11. Verwijder het supernatant voorzichtig met een pipetpunt en gooi het weg. Zorg ervoor dat u de DNA-pellet niet verstoort.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Deze pellet bevat DNA. Verlies van de pellet leidt tot verlies van het DNA.</li> <li>Door het buisje zo te draaien dat de pellet zich op de bovenwand bevindt, kunt u veilig met een pipetpunt langs de onderwand al het supernatant verwijderen.</li> <li>Het supernatant kan onzuiverheden bevatten en moet zo volledig mogelijk worden verwijderd.</li> </ul>

Zuiveringsstappen	Opmerkingen
<p>12. Wasen met ethanol: Voeg voorzichtig 250 µL 70% ethanol toe. Laat 1 minuut op kamertemperatuur staan. <b>Verwijder de ethanol volledig zonder de pellet te verstoren.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Het is belangrijk om alle ethanol uit het monster te verwijderen. Overdracht van ethanol kan van invloed zijn op de testprestaties.</li> <li>• Na het verwijderen van de 70% ethanol kan het buisje ronddraaiend gepulseerd worden om de resterende ethanol te verwijderen.</li> <li>• Pas op dat u de DNA-pellet niet verstoort; deze kan klein of onzichtbaar zijn.</li> <li>• Als de pellet loskomt, centrifugeer het monster dan gedurende 5 minuten op 15.000 × g.</li> <li>• Overmatig drogen van de pellet kan ertoe leiden dat het DNA moeilijker oplost.</li> </ul>
<p>13. Voeg 100 µL TE-oplossing toe (zie pagina 5) om de DNA-pellet op te lossen. Vortexen gedurende ten minste 5 seconden.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Als een hogere concentratie DNA gewenst is, moet 50 µL TE worden gebruikt.</li> </ul>
<p>14. Om volledige rehydratatie van het DNA te verzekeren, incubeer een nacht op kamertemperatuur gevolgd door vortexen of op 50 °C gedurende 1 uur met af en toe vortexen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grote hoeveelheden DNA met een hoge molecuulmassa kunnen veel tijd nodig hebben om volledig te rehydrateren (op te lossen).</li> <li>• Onvolledige rehydratatie van het DNA kan leiden tot onnauwkeurigheid bij het schatten van de DNA-concentratie en mogelijk falen van downstream-toepassingen zoals PCR.</li> </ul>
<p>15. Opties voor opslag van het volledig gerehydrateerde DNA:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>In TE bij -20 °C voor langdurige opslag. Verdeel indien gewenst in aliquots.</li> <li>In TE bij 4 °C gedurende maximaal 2 maanden.</li> </ol>	

## prepIT•L2P laboratoriumprotocol voor handmatige zuivering van DNA uit een heel monster

**Opmerking:** Dit protocol vereist het gebruik van een centrifuge (ofwel rotor met vaste hoek of met zwenkemer) die ten minste 3500 × g kan genereren om optimale resultaten te verkrijgen.

Het volgende stapsgewijze protocol beschrijft hoe DNA uit het hele monster (1 ml - 4 ml totaal monstervolume) kan worden gezuiverd. De getoonde volumes moeten worden aangepast aan het werkelijk afgenomen volume.

### Reagentia inbegrepen

prepIT•L2P (Cat. No. PT-L2P-5 of PT-L2P-45)

### Apparatuur en reagentia

- Centrifuge die plaats biedt aan buisjes van 15 ml en in staat is om minimaal 3500 × g te genereren (zie Tabel 2)
- Conische polypropyleenbuisjes van 15 ml (bijv. BD Falcon® Cat. No. 352196)
- Microcentrifuge die kan draaien op 15.000 × g (optioneel)
- 1,5 mL microbuisjes (bijv. Axygen® Cat. No. MCT-150-C)
- Lucht- of waterincubator op 50 °C
- Ethanol (95% tot 100%) op kamertemperatuur
- Ethanol (70%) op kamertemperatuur
- DNA-opslagbuffer: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) of vergelijkbare oplossing

### Optioneel: Voorzuiveringscontrole (alleen van toepassing op Oragene-monsters; niet vereist voor ORAcollect-monsters)

Weeg het monster om de hoeveelheid speeksel van de donor te schatten (zie tabel 1). De hoeveelheid afgenomen speeksel is recht evenredig met de hoeveelheid teruggewonnen DNA. Als een donor bijvoorbeeld minder dan 2 ml speeksel heeft afgegeven, kunt u een lagere totale opbrengst uit dit monster verwachten.

#### Gewicht van kit (zonder monster)

Zodra een monster in het laboratorium aankomt, raden we aan het monster te wegen om te bepalen of de donor de juiste hoeveelheid speeksel heeft afgegeven. U kunt enige variatie tussen donoren verwachten. Het gemiddelde gewicht van een lege kit wordt gegeven (tabel 1). Voer de volgende berekening uit om de hoeveelheid afgenomen monster te schatten (uitgaande van 1 g/ml):

$$\frac{\text{Gewicht van kit met monster} - \text{Gewicht van kit zonder monster}}{\text{Hoeveelheid afgenomen monster}}$$

Tabel 1


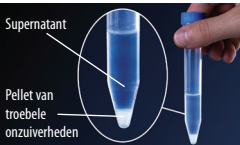
Product #	Gewicht van kit zonder monster
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

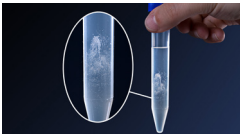

### Procedure

Zuiveringsstappen	Opmerkingen
1. Meng het Oragene/ORAcollect-monster door het een paar seconden om te keren of zachtjes te schudden.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dit is om ervoor te zorgen dat viskeuze monsters goed worden gemengd.</li></ul>
2. Incubeer het monster bij 50 °C in een waterincubator gedurende minimaal 1 uur of in een luchtincubator gedurende minimaal 2 uur.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Deze warmtebehandelingsstap is essentieel om de DNA-opbrengst te maximaliseren en ervoor te zorgen dat nucleasen permanent worden geïnactiveerd.</li><li>• Het monster kan 's nachts bij 50 °C worden geïncubeerd als dat handiger is.</li><li>• Deze incubatiestap kan op elk moment worden uitgevoerd nadat het monster is afgenomen en voordat DNA wordt gezuiverd.</li><li>• In een luchtincubator is meer tijd nodig omdat het verkrijgen van temperatuurevenwicht langer duurt dan in een waterincubator.</li></ul> <p><b>Let op:</b> Gebruik van een luchtincubator kan de voorkeur hebben, omdat de Oragene/ORAcollect-buisjes in een waterbad kunnen gaan drijven. Als een waterbad moet worden gebruikt, zorg er dan voor dat het monsterbevattende deel van het buisje ondergedompeld blijft in water.</p>
3. Breng het volledige monster over in een centrifugebuisje van 15 mL (Afbeelding 1). Let op het volume van het monster.	<ul style="list-style-type: none"><li>• De overdracht kan worden uitgevoerd door te gieten of door te pipetteren met een glazen of plastic pipet.</li></ul>



**Afbeelding 1:** Voordat u doorgaat met stap 4, moet u ervoor zorgen dat het volledige monster is geïncubeerd en overgebracht naar een nieuw centrifugebuisje van 15 ml, zoals afgebeeld.

Zuiveringsstappen	Opmerkingen
<p>4. Voeg 1/25e volume prepIT-L2P toe en meng door enkele seconden te vortexen (Afbeelding 2).</p>  <p><i>Afbeelding 2: Nadat de PT-L2P is toegevoegd en 10 minuten op ijs is geïncubeerd, ziet het monster er niet meer helder uit, maar is het eerder een troebele oplossing.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Voeg bijvoorbeeld aan een monster van 4 ml 160 µl prepIT-L2P toe.</li> <li>• Het monster wordt troebel als onzuiverheden en remmers neerslaan.</li> </ul>
<p>5. Incubeer op ijs gedurende 10 minuten.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incubatie op kamertemperatuur kan een vervanging zijn, maar zal minder effectief zijn bij het verwijderen van onzuiverheden.</li> </ul>
<p>6. Centrifugeer bij kamertemperatuur gedurende 10 minuten op een zo hoog mogelijke snelheid. Minimum 3500 × g.</p>  <p><i>Afbeelding 3: Na het centrifugeren zal zich troebel materiaal ophopen aan de onderkant van de buis. Het supernatant moet zichtbaar helder zijn.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Een grotere centrifugale kracht zorgt voor minder troebel materiaal dat wordt overgedragen naar het gezuiverde DNA (Afbeelding 3). Voordat u verder gaat dient u bij de fabrikant van de buisjes na te gaan of de centrifugebuisjes van 15 mL bestand zijn tegen de centrifugale kracht.</li> <li>• Langer centrifugeren (tot 20 minuten) kan gunstig zijn om de troebelheid te verminderen (hoog <math>A_{320}</math>) van de uiteindelijke DNA-oplossing.</li> </ul>
<p>7. Breng het heldere supernatant voorzichtig met een pipet over in een nieuw centrifugebuisje van 15 mL. <b>Gooi de pellet weg.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Laat een kleine hoeveelheid van het supernatant achter om te voorkomen dat de pellet wordt verstoord.</li> <li>• De pellet bevat troebele onzuiverheden. Als deze per ongeluk wordt verstoord, moet het buisje opnieuw worden gecentrifugeerd.</li> </ul>

Zuiveringsstappen	Opmerkingen
<p>8. Voeg 1,2x volume 95% tot 100% ethanol op kamertemperatuur toe aan het heldere supernatant. Meng voorzichtig 10 maal door omkeren.</p>  <p><i>Afbeelding 4: Na toevoeging van ethanol zal het DNA neerslaan, wat kan resulteren in een zichtbaar vezelklontje.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tijdens het mengen met ethanol zal het DNA neerslaan.</li> <li>• Neergeslagen DNA kan zichtbaar worden als een klontje DNA-vezels (Afbeelding 4) of als een fijne neerslag, afhankelijk van de hoeveelheid DNA in het monster.</li> </ul>
<p>9. Laat het monster gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur staan om ervoor te zorgen dat het DNA volledig kan neerslaan.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incubatie bij -20 °C wordt niet aanbevolen omdat onzuiverheden samen met het DNA kunnen neerslaan.</li> </ul>
<p>10. Centrifugeer bij kamertemperatuur gedurende 10 minuten op een zo hoog mogelijke snelheid. Minimum 3500 × g.</p>	
<p>11. Verwijder het supernatant voorzichtig met een glazen of plastic pipet en gooi het weg. Zorg ervoor dat u de DNA-pellet niet verstoort.</p>  <p><i>Afbeelding 5: Door met een pipetpunt voorzichtig langs de binnenkant van het buisje te gaan, kunt u de aanwezigheid van een DNA-veeg aan het licht brengen.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Het supernatant kan onzuiverheden bevatten en moet zo volledig mogelijk worden verwijderd.</li> <li>• Neergeslagen DNA is zichtbaar als een pellet op de bodem van het buisje en mogelijk als een veeg langs de zijkant van het buisje (Afbeelding 5).</li> <li>• De DNA-veeg bevindt zich mogelijk aan de kant van het buisje die van het midden van de centrifuge af is gericht.</li> <li>• Een veeg kan worden gelokaliseerd met behulp van de "kras"-test. U kunt controleren of een DNA-veeg aanwezig is door met een pipetpunt langs de binnenkant van het buisje te gaan. Er kan een veeg zichtbaar zijn, zoals weergegeven in Afbeelding 5.</li> </ul>



Zuiveringsstappen	Opmerkingen
<p>12. Met ethanol wassen: Voeg voorzichtig 1 mL 70% ethanol toe aan het buisje zonder de veeg of de pellet te verstoren. Laat 1 minuut op kamertemperatuur staan. <b>Voorzichtig rondraaien en de ethanol volledig verwijderen zonder de pellet en de veeg te verstoren.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Het is belangrijk om alle ethanol uit het monster te verwijderen. Overdracht van ethanol kan van invloed zijn op de testresultaten.</b></li> <li>• Zorg ervoor dat u de DNA-pellet of de veeg niet verstoort.</li> <li>• U kunt kort centrifugeren (minder dan 1 minuut) om de volledige verwijdering van het supernatant te vergemakkelijken.</li> <li>• Als de pellet loskomt na de wasstap met ethanol, centrifugeer het monster dan 5 minuten op een zo hoog mogelijke snelheid. Minimum <math>3500 \times g</math>.</li> </ul>
<p>13. Voor Oragene-monsters rehydrateert u het DNA door 0,2 ml-1 ml TE-oplossing toe te voegen en het monster gedurende 30 seconden te vortexen.</p> <p>Voor ORAcollect-monsters rehydrateert u het DNA door 0,2 ml TE-oplossing toe te voegen en het monster gedurende 30 seconden te vortexen.</p>  <p><b>Afbeelding 6:</b> Door het monster gedurende 30 seconden te vortexen, kunt u het op de zijkant van de buis uitgesmeerde DNA terugwinnen. Het DNA behoudt een hoge molecuulmassa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Als een hogere DNA-concentratie gewenst is, kan minder TE worden gebruikt. Er moet minimaal 200 <math>\mu\text{L}</math> TE-oplossing worden gebruikt.</li> <li>• Overmatig drogen van de pellet (&gt; 10 minuten) en het gebruik van minder dan 500 <math>\mu\text{L}</math> TE-oplossing kan het moeilijk maken om het DNA opnieuw te hydrateren (op te lossen) en kan de opbrengst verminderen of kwantificering moeilijk maken.</li> <li>• Neergeslagen DNA is zichtbaar als een pellet op de bodem van het buisje en mogelijk als een veeg langs de zijkant van het buisje.</li> <li>• Om maximale DNA-recuperatie te garanderen, moet u het monster vortexen na toevoeging van DNA-oplosmiddel (TE-oplossing). Vortexen zorgt ervoor dat het DNA dat op de zijkant van het buisje zit wordt teruggewonnen (Afbelding 6).</li> <li>• Vortexen zal het DNA niet beschadigen.</li> </ul>
<p>14. Om volledige rehydratatie van het DNA te verzekeren, incubeert u het een nacht op kamertemperatuur gevolgd door vortexen of op <math>50^\circ\text{C}</math> gedurende 1 uur met af en toe vortexen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Onvolledige rehydratatie van het DNA kan leiden tot onnauwkeurigheid bij het schatten van de DNA-concentratie en mogelijk falen van downstream-toepassingen zoals PCR.</li> </ul>

Zuiveringsstappen	Opmerkingen
<p>15. Breng het gerehydrateerde DNA over naar een microcentrifugebuisje van 1,5 mL voor opslag.</p>	
<p>Optionele stap:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Centrifugeer gerehydrateerd DNA op kamertemperatuur gedurende 15 minuten bij <math>15.000 \times g</math>.</li> <li>Breng het supernatant over naar een nieuw microcentrifugebuisje van 1,5 mL zonder de pellet te verstoren.</li> </ol>	<p>De pellet bevat onoplosbaar, troebel materiaal.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Voor optimale DNA-recuperatie moet u ervoor zorgen dat het DNA volledig is gerehydrateerd (stap 14) voordat u deze centrifugatiestap uitvoert.</li> <li>• Deze centrifugatiestap zorgt ervoor dat eventueel achtergebleven troebel materiaal uit het DNA-monster wordt verwijderd.</li> <li>• Zorg ervoor dat de pellet niet wordt verstoord bij het overbrengen van het heldere supernatant naar een nieuw buisje.</li> </ul>
<p>16. Opties voor opslag van het volledig gerehydrateerde DNA:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>In TE bij <math>-20^\circ\text{C}</math> voor langdurige opslag. Verdeel indien gewenst in aliquots.</li> <li>In TE bij <math>4^\circ\text{C}</math> gedurende maximaal 2 maanden.</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bevriezing van gezuiverd DNA in TE kan ertoe leiden dat het DNA neerslaat. Let bij het ontdooien van bevroren gezuiverd DNA goed op rehydratatie, zoals besproken in stap 14.</li> </ul>

## Quantificering van DNA

### Door fluorescentiemethode

Tests die fluorescerende kleurstoffen gebruiken zijn specifiekier dan absorptie bij 260 nm voor het kwantificeren van de hoeveelheid dubbelstrengig DNA (dsDNA) in een DNA -monster. We raden het gebruik van in de handel verkrijgbare kits aan, zoals de Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) of het QuantiFluor® dsDNA System (Promega). DNA moet mogelijk worden verdund tot 1:50 met TE voordat het wordt gebruikt in de kwantificeringstest.

### Door absorptiemethode

Als u ervoor kiest om DNA te kwantificeren op basis van absorptie, raden we u aan het gezuiverde monster eerst te behandelen met RNase om verontreinigend RNA te verteren en vervolgens de RNA-fragmenten te verwijderen door ethanolprecipitatie van het DNA. Een gedetailleerd protocol wordt beschreven in PD-PR-040, *RNA-verwijdering door dubbele RNase-digestie*.<sup>1</sup> Houd er rekening mee dat DNA uit een oraal monster doorgaans aanzienlijk meer RNA bevat dan in bloedmonsters wordt aangetroffen. Zorg ervoor dat met alcohol neergeslagen DNA volledig is opgelost voordat u de absorptie afleest.

**Conversiefactor:** Een absorptie van 1,0 bij 260 nm komt overeen met een concentratie van 50 ng/μL (50 μg/mL) voor zuiver, dubbelstrengig DNA.

Controleer of de absorptiewaarden binnen het lineaire bereik van de spectrofotometer liggen. Verdun en hermeet monsters die buiten het lineaire bereik vallen. Raadpleeg uw instrumentdocumentatie voor meer informatie.

### Verwijzing

<sup>1</sup> RNA-verwijdering door dubbele RNase-digestie. PD-PR-040. DNA Genotek.

### Methode












1. Verdun een hoeveelheid van 10 μL gezuiverd en met RNase behandeld DNA met 90 μL TE (1/10 verdunning). Meng door voorzichtig op en neer te pipetteren. Wacht tot de bellen zijn verdwenen.
2. Gebruik TE in de (lege) referentiecel.
3. Meet de absorptie bij 320 nm, 280 nm en 260 nm.
4. Bereken gecorrigeerde  $A_{280}$ - en  $A_{260}$ -waarden door de absorptie bij 320 nm ( $A_{320}$ ) af te trekken van de  $A_{280}$ - en  $A_{260}$ -waarden.
5. DNA-concentratie in ng/μL = gecorrigeerd  $A_{260} \times 10$  (verduunningsfactor)  $\times 50$  (conversiefactor).
6.  $A_{260}/A_{280}$ -ratio: Deel gecorrigeerde  $A_{260}$  door gecorrigeerde  $A_{280}$ .

### Voorbeeld

1. Ga uit van het gemeten  $A_{320} = 0,025$ ,  $A_{280} = 0,175$  en  $A_{260} = 0,295$
2. De DNA-concentratie van het onverdunde monster is:  
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 [\text{verduunningsfactor}] \times 50 [\text{conversiefactor}]$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng}/\mu\text{L} \text{ of } 135 \mu\text{g}/\text{mL}$$
3. De gecorrigeerde  $A_{260}/A_{280}$ -ratio is:  
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$
$$= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$$
$$= 0,270 \div 0,150$$
$$= 1,80$$

Oragene•DNA en ORACollect•DNA zijn niet te koop in de Verenigde Staten.  
Oragene•DISCOVER is alleen voor onderzoeksdoeleinden, niet voor gebruik bij diagnostische procedures.  
Sommige DNA Genotek-producten zijn mogelijk niet in alle geografische regio's verkrijgbaar.  
Oragene, prepIT, ORACollect en DNA Genotek zijn handelsmerken van DNA Genotek Inc.  
Alle andere merken en namen die hierin voorkomen, zijn het eigendom van de respectievelijke eigenaren.  
Alle DNA Genotek-protocollen, witboeken en toepassingsnotities zijn beschikbaar in het ondersteuningsgedeelte van onze website op [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

### Legenda etiket:

	In-vitro diagnostisch medisch hulpmiddel
	Catalogusnummer
	CE-markering
	Fabrikant
	Raadpleeg de bijsluiter
	Europese geautoriseerde vertegenwoordiger
	Zwitsers geautoriseerd vertegenwoordiger
	Partijnummer
	Unieke apparaat-ID
	Stabiliteit tijdens gebruik
	Aanwijzingen voor opslag
15 °C / 30 °C	
59 °F / 86 °F	

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

PD-HB-32 (NL - Dutch) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., een dochteronderneming van  
OraSure Technologies, Inc., alle rechten voorbehouden.

**DNAGENOTEK™**

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