

**Kézi tisztítási protokoll
kézikönyv a következővel
való használathoz**

prepIT™•L2P

DNagenotek™

www.dnagenotek.com

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

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

*Kiváló minták
Bizonyított teljesítmény*



Tartalomjegyzék

Felhasználás célja/rendeltetés	4
Használat közbeni stabilitás	4
Jellemzők	4
Anyagok	4
Figyelmeztetés és óvintézkedések	4
A termék felhasználási korlátozásai	5
A prepIT•L2P szállítása	5
A prepIT•L2P tárolása (Tárolási idő)	5
Ártalmatlanítás	5
Karbantartás/javítások	5
A teljesítményjellemzők összefoglalása	5
Termékbemutatók	5
Jótállások	6
Hibaelhárítás	6
prepIT•L2P laboratóriumi protokoll a DNS kézi tisztításához a következőből:	
500 µl minta	7
Teljes minta	11
A DNS mennyiségi meghatározása	18


A prepIT™-L2P protokoll további nyelveken is elérhető a www.dnagenotek.com weboldalon


A műszaki támogatás hétfőtől péntekig (9 órától 17 óráig) áll rendelkezésre:

- Ingyenesen hívható (Észak-Amerika): 1.866.813.6354, 6-os opció
- Minden más ország: +1.613.723.5757, 6-os opció
- E-mail: support@dnagenotek.com

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

Az Egyesült Királyságban felelős személy: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360–
UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

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

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

Ausztrál szponzor: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street,
Sydney, NSW 2000 Ausztrália

Felhasználás célja/rendeltetés

Genomiális DNS tisztításához az Oragene™ és ORAcollect™ nyálgyjűtő készletekből.

Használat közbeni stabilitás

A PT-L2P-5 (5 ml) és a PT-L2P-45 (45 ml) 30 hónapos használat közbeni stabilitással rendelkezik szobahőmérsékleten.

Jellemzők

- Optimalizált kémia az Oragene és ORAcollect termékcsaládokkal gyűjtött szájjüregi mintákból történő maximális DNS-kinyeréshez.
- Bizonyítottan konzisztens eredményeket biztosít nagy molekulatömegű DNS esetén.
- Skálázható tisztítási módszer nagy vagy kis mintamennyiségekre.
- Kényelmes munkafolyamat teljes műszaki támogatással a gyűjtéstől az extrakcióig.
- Költséghatékony módszer, amely minimális felszerelést igényel.

Anyagok

- PT-L2P-5 (5 ml) és/vagy PT-L2P-45 (45 ml)
- prepIT-L2P termék kézikönyv

Figyelmeztetés és óvintézkedések

- Kizárólag laboratóriumi használatra.
- NEM szabad lenyelni a folyékony reagenset.
- NEM szabad használni, ha a csomagolás sérült, vagy a tölcser fedelének/kupakjának tömítése eltört vagy szivárgó.
- NE használja a prepIT-L2P-t a reagens flakonján feltüntetett „Felhasználható” dátum után.
- Mossa le vízzel, ha a reagens szembe vagy bőrre kerül. NE nyelje le.
- Minden súlyos incidenst jelentsen a DNA Genotek, illetve az országosan illetékes hatóság felé.
- Olvassa el a biztonsági adatlapot (MSDS) a fel nem használt reagens biztonságos ártalmatlanítására vonatkozóan.
- Az MSDS elérhető a www.dnagenotek.com weboldalon.

A termék felhasználási korlátozásai

A prepIT-L2P-t kizárólag a termék kézikönyvében leírtak szerint használja.

A prepIT-L2P szállítása

A prepIT-L2P laboratóriumi reagensként környezeti hőmérsékleten szállítható. Nincs szükség különleges kezelésre.

A prepIT-L2P tárolása (Tárolási idő)

Szobahőmérsékleten tárolandó. A PT-L2P-5 (5 ml) és a PT-L2P-45 (45 ml) tárolási ideje 30 hónap, ha megfelelően le van zárva és szobahőmérsékleten van tárolva.

Ártalmatlanítás

A fel nem használt, sérült vagy szivárgó készleteket a megfelelő helyi, állami és szövetségi előírásoknak megfelelően dobja ki. Laboratóriumi hulladékként dobja ki.

Karbantartás/javítások

Nem alkalmazható. A prepIT-L2P egy reagens— nincs szükség karbantartásra vagy javításra.

A teljesítményjellemzők összefoglalása

Az Oragene és az ORAcollect nyálgyjűtő készletekből származó prepIT-L2P tisztított genomiális DNS kiváló minőségű és mennyiségű DNS-t biztosít, amely elegendő a későbbi alkalmazásokban, például PCR, microarray (DNS-chip) és újgenerációs szekvenálás során történő felhasználáshoz.

Termékbemutatók

A prepIT-L2P több mennyiségben kapható, a szükséges készítmények számától függően. Például:

Termékreferencia/ Katalógusszám	A minta készítmény térfogata	Készítmények száma
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2,000

Jótállások

Az összes DNA Genetek termékre vonatkozó teljes körű feltételek megtalálhatók a <http://www.dnagenetek.com/ROW/terms/index.html> weboldalon.

Hibaelhárítás

Vegye fel a kapcsolatot a DNA Genetek műszaki ügyfélszolgálatával a support@dnagenetek.com e-mail címen, vagy hívja a (613) 723-5757-es telefonszámot, 6-os opció.

prepIT™•L2P laboratóriumi protokoll a DNS kézi tisztítására 500 µL mintából

Az alábbi, lépésről lépésre bemutatott protokoll leírja, hogyan kell DNS-t tisztítani egy 500 µL-es minta alikvot részéből.

A következő reagenseket tartalmazza

prepIT•L2P (Kat. sz. PT-L2P-5 vagy PT-L2P-45)

Felszerelések és reagensek

- 15,000 × g sebességgel működő mikrocentrifuga
- 1,5 ml-es mikrocsovek (pl. Axygen® Kat. sz. MCT-150-C)
- Levegős vagy vizes inkubátor 50°C-on
- Etanol (95-100%) szobahőmérsékleten
- Etanol (70%) szobahőmérsékleten
- DNS-tároló puffer: (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) vagy hasonló oldat

Eljárás

Tisztítási lépések	Megjegyzések
1. Az Oragene/ORAc collect mintát fel-le fordítással vagy néhány másodpercig tartó enyhe rázással keverje össze.	• Ez biztosítja, hogy a vizskózus minták megfelelően elkeveredjenek.

Tisztítási lépések	Megjegyzések
2. Inkubálja a mintát 50°C-on legalább 1 órán keresztül vizes inkubátorban vagy legalább 2 órán keresztül levegős inkubátorban.	<ul style="list-style-type: none"> Ez a hőkezelési lépés elengedhetetlen annak biztosításához, hogy a DNS megfelelően felszabaduljon és a nukleázok tartósan inaktívvá váljanak. Ez az inkubációs lépés a minta gyűjtése után és a tisztítás előtt bármikor elvégezhető. A minta homogenitásának biztosítása érdekében a teljes mintát az eredeti gyűjtőcsőben kell inkubálni, mielőtt a minta eltávolításra kerülne. A minta 50°C-on inkubálható egy éjszakán át, amennyiben ez kényelmesebb. Levegős inkubátorban hosszabb időre van szükség, mivel a hőmérséklet kiegyenlítődése lassabb, mint a vizes inkubátorban. <p>Megjegyzés:A levegős inkubátor használata előnyösebb lehet, mivel az Oragene/ORACollect csövek vízfürdőben lebeghetnek. Ha vízfürdőzést kell használni, gondoskodjon arról, hogy a cső mintát tartalmazó része vízbe merüljön.</p>
3. Vigyen át 500 µl kevert mintát egy 1,5 ml-es mikrocentrifugacsőbe.	<ul style="list-style-type: none"> A minta fennmaradó része szobahőmérsékleten (15°C-25°C) tárolható vagy lefagyasztható. Kívánt esetben a minta fagyasztvá tárolható az Oragene/ORACollect csőben -20°C-on, vagy a minta átvihető egy kriogén fiolába hosszú távú tárolás céljából -80°C-on.
4. Adjon 20 µl (1/25 térfogat) prepIT-L2P-t a mikrocentrifugacsőbe, és néhány másodpercig tartó vortexeléssel keverje össze.	<ul style="list-style-type: none"> A minta zavarossá válik, mivel a szennyeződések és gátlószerek kicsapódnak.
5. Inkubálja 10 percig jégen.	<ul style="list-style-type: none"> A szobahőmérsékletű inkubálás helyettesíthető, de valamivel kevésbé hatékonyan távolítja el a szennyeződések.

Tisztítási lépések	Megjegyzések
6. Centrifugálja szobahőmérsékleten 5 percig 15 000 × g sebességgel.	<ul style="list-style-type: none"> A hosszabb ideig tartó centrifugálás (akár 15 percig) előnyös lehet a végleges DNS-oldat zavarosságának (magas A₃₂₀) csökkentésében.
7. A tiszta felülúszót pipettahegy segítségével óvatosan töltsé át egy új mikrocentrifugacsőbe. Dobja ki a szennyeződések tartalmazó pelletet.	<ul style="list-style-type: none"> A pellet zavaros szennyeződések tartalmaz. Ha véletlenül megbolygatják, a csövet újra kell centrifugálni.
8. Adjon hozzá 600 µL szobahőmérsékletű 95-100%-os etanol. Óvatosan keverje össze 10-szeres inverzióval.	<ul style="list-style-type: none"> Az etanolos keverés során a DNS kicsapódik. Ez a DNS-szálak csomójaként vagy finom üledékként jelenhet meg, attól függően, hogy mennyi DNS van a mintában. Ha nem látható csomó, a DNS akkor is kinyerhető a következő lépések gondos betartásával.
9. Hagyja a mintát 10 percig szobahőmérsékleten állni, hogy a DNS teljesen kicsapódjon.	<ul style="list-style-type: none"> A -20 °C-on történő inkubálás nem ajánlott, mert a szennyeződések a DNS-sel együtt kicsapódhatnak.
10. Helyezze a csövet a mikrocentrifugába ismert tájolással. Centrifugálja szobahőmérsékleten 2 percig 15 000 × g sebességgel.	<ul style="list-style-type: none"> Például helyezzen minden egyes csövet a mikrocentrifugába úgy, hogy a kupak csuklós része a rotor középtől távolabbra mutasson. A centrifugálás után a pellet helyét meg lehet határozni (még ha túl apró is ahhoz, hogy látható legyen); a cső csukló alatti csúcsán lesz.
11. Óvatosan távolítsa el a felülúszót egy pipettahegy segítségével, és dobja ki. Ügyeljen arra, hogy a DNS-pelletet ne bolygassa meg.	<ul style="list-style-type: none"> Ez a pellet DNS-t tartalmaz. A pellet elvesztése a DNS elvesztését eredményezi. Ha úgy forgatja a csövet, hogy a pellet a felső falon legyen, akkor a pipettahegyet biztonságosan mozgathatja az alsó fal mentén, és eltávolíthatja az összes felülúszót. A felülúszó tartalmazhat szennyeződések, ezért azt a lehető legteljesebben kell eltávolítani.

Tisztítási lépések	Megjegyzések
12. Etanolos mosás: Óvatosan adjon hozzá 250 µl 70%-os etanol. Hagyja állni szobahőmérsékleten 1 percig. Teljesen távolítsa el az etanol anélkül, hogy megbolygatná a pelletet.	<ul style="list-style-type: none"> Fontos, hogy az összes etanol eltávolítsa a mintából. Az etanol áthaladása befolyásolhatja a vizsgálat teljesítményét. A 70%-os etanol eltávolítása után a csövet impulzusszerűen meg lehet pörgetni, hogy a maradék etanol eltávolítható legyen. Vigyázzon, hogy ne bolygassa meg a DNS-pelletet; az kicsi vagy láthatatlan lehet. Ha a pellet leválik, centrifugálja a mintát 5 percig 15 000 × g sebességgel. A pellet túlzott szárítása megnehezítheti a DNS feloldását.
13. Adjon hozzá 100 µl TE-oldatot (lásd az 5. oldalt) a DNS-pellet feloldásához. Vortexelje legalább 5 másodpercig.	<ul style="list-style-type: none"> Ha nagyobb DNS-koncentrációra van szükség, 50 µl TE-oldatot kell használni.
14. A DNS teljes rehidratálásának biztosítása érdekében inkubálja szobahőmérsékleten egy éjszakán át, majd vortexelje vagy 50 °C-on 1 órán át, időnkénti vortexeléssel.	<ul style="list-style-type: none"> Nagy mennyiségű, nagy molekulatömegű DNS lassan tud teljesen rehidratálódni (feloldódni). A DNS nem teljes rehidratációja a DNS-koncentráció becslésének pontatlanságát és a későbbi alkalmazások, például a PCR esetleges meghibásodását okozza.
15. A teljesen rehidratált DNS tárolására vonatkozó lehetőségek: a) TE-ben -20°C-on hosszú távú tárolás céljából. Amennyiben szükséges, ossza fel alikvot részekre. b) TE-ben 4°C-on legfeljebb 2 hónapig.	

prepIT-L2P laboratóriumi protokoll a DNS kézi tisztításához teljes mintából

Megjegyzés: Ez a protokoll olyan centrifuga használatát igényli (akár fix szögű, akár lengővödrös rotorral), amely legalább 3500 × g előállítására képes az optimális eredmények eléréséhez.

Az alábbi, lépésről-lépésre bemutatott protokoll leírja, hogyan kell a DNS-t a teljes mintából (1 mL–4 mL teljes mintatérfogat) megtisztítani. A feltüntetett térfogatokat a ténylegesen gyűjtött térfogathoz kell igazítani.

A következő reagenseket tartalmazza

prepIT•L2P (Kat. sz. PT-L2P-5 vagy PT-L2P-45)

Felszerelések és reagensek

- Centrifuga, amely 15 ml-es csövek befogadására alkalmas, és legalább 3500 × g sebesség előállítására képes (lásd a 2. táblázatot).
- 15 ml-es kúpos polipropilén csövek (pl. BD Falcon® Kat. sz. 352196).
- 15,000 × g (opcionális) sebességgel működő mikrocentrifuga
- 1,5 ml-es mikrocsövek (pl. Axygen® Kat. sz. MCT-150-C)
- Levegős vagy vizes inkubátor 50°C-on
- Etanol (95–100%) szobahőmérsékleten
- Etanol (70%) szobahőmérsékleten
- DNS-tároló puffer: (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) vagy hasonló oldat

Opcionális: Tisztítás előtti ellenőrzés (csak az Oragene mintákra alkalmazható; az ORAcollect minták esetében nem szükséges)

Mérje le a mintát a donor által adott nyál mennyiségének becsléséhez (lásd az 1. táblázatot). A begyűjtött nyál mennyisége egyenesen arányos a kinyert DNS mennyiségével. Például, ha a donor kevesebb mint 2 ml nyálat adott, akkor alacsonyabb teljes hozamra kell számítani ebből a mintából.

A készlet tömege (minta nélkül)

Miután a minta megérkezik a laboratóriumba, javasoljuk, hogy mérje le a mintát, hogy megbecsülje, megfelelő mennyiségű nyálat adott-e a donor. A donorok között némi eltérésre lehet számítani. Az üres készlet átlagos tömegét a táblázat tartalmazza (1. táblázat). A begyűjtött minta mennyiségének becsléséhez (1 g/ml-t feltételezve) végezze el a következő számítást:

A mintát tartalmazó készlet tömege- A minta nélküli készlet tömege

A gyűjtött minta mennyisége


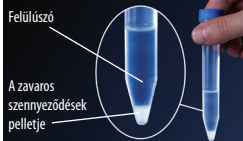
1. táblázat	
Termék #	A minta nélküli készlet tömege
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

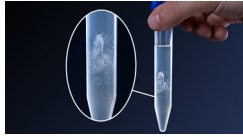
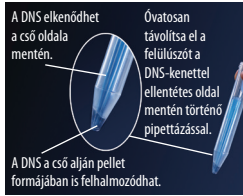
Eljárás

Tisztítási lépések	Megjegyzések
1. Az Oragene/ORAcollect mintát fel-le fordítással vagy néhány másodpercig tartó enyhe rázással keverje össze.	<ul style="list-style-type: none">• Ez biztosítja, hogy a vizskózus minták megfelelően elkeveredjenek.
2. Inkubálja a mintát 50°C-on legalább 1 órán keresztül vizes inkubátorban vagy legalább 2 órán keresztül levegős inkubátorban.	<ul style="list-style-type: none">• Ez a hőkezelési lépés elengedhetetlen annak biztosításához, hogy a DNS megfelelően felszabaduljon és a nukleázok tartósan inaktiválódnak.• A minta 50°C-on inkubálható egy éjszakán át, amennyiben ez kényelmesebb.• Ez az inkubációs lépés a minta gyűjtése után és a tisztítás előtt bármikor elvégezhető.• Levegős inkubátorban hosszabb időre van szükség, mivel a hőmérséklet kiegyenlítődése lassabb, mint a vizes inkubátorban. <p>Megjegyzés: A levegős inkubátor használata előnyösebb lehet, mivel az Oragene/ORAcollect csövek vízfürdőben lebeghetnek. Ha vízfürdőt kell használni, gondoskodjon arról, hogy a cső mintát tartalmazó része vízbe merüljön.</p>
3. A teljes mintát vigye át egy 15 ml-es centrifugacsöbe (1. ábra). Jegyze fel a minta térfogatát.	<ul style="list-style-type: none">• Az átvitel történhet kiöntéssel vagy üveg- vagy műanyag pipettával történő pipettázással.



1. ábra: A 4. lépés előtt győződjön meg arról, hogy a teljes mintát inkubálta, és a képen látható módon egy új, 15 ml-es centrifugacsöbe helyezte át.

Tisztítási lépések	Megjegyzések
<p>4. Adjon hozzá 1/25 térfogatnyi preplT-L2P-t, és keverje össze néhány másodpercig tartó vortexeléssel (2. ábra).</p>  <p>2. ábra: A PT-L2P hozzáadása és 10 perces jégen történő inkubálás után a minta már nem tiszta, hanem zavaros oldat lesz.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Például egy 4 ml-es mintához adjon 160 µL preplT-L2P-t. • A minta zavarossá válik, mivel a szennyeződések és gátlószerek kicsapódnak.
<p>5. Inkubálja 10 percig jégen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A szobahőmérsékleten történő inkubálás helyettesíthető, de kevésbé hatékony a szennyeződések eltávolításában.
<p>6. Centrifugálja szobahőmérsékleten 10 percig a lehető legnagyobb fordulatszámon. Minimum 3,500 × g.</p>  <p>3. ábra: A centrifugálás után a cső alján zavaros anyag halmozódik fel. A felüliszónak láthatóan tisztának kell lennie.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A nagyobb centrifugálási erő minimalizálja a tisztított DNS-be kerülő zavaros anyag mennyiségét (3. ábra). A folytatás előtt ellenőrizze a csövek gyártójánál, hogy a 15 ml-es centrifugacsövek bírják-e a centrifugális erőt. • A hosszabb ideig tartó centrifugálás (akár 20 percig) előnyös lehet a végleges DNS-oldat zavarosságának (magas A₃₂₀) csökkentésében.
<p>7. A tiszta felüliszót egy pipettával óvatosan vigye át egy friss 15 ml-es centrifugacsőbe. Dobja ki a pelletet.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hagyjon hátra egy kis mennyiséget a felüliszóból, hogy ne bolygassa meg a pelletet. • A pellet zavaros szennyeződésekert tartalmaz. Ha véletlenül megbolygatják, a csövet újra kell centrifugálni.

Tisztítási lépések	Megjegyzések
<p>8. A tiszta felüliszóhoz adjon hozzá 1,2x térfogatnyi szobahőmérsékletű 95%-os vagy 100%-os etanolt. Óvatosan keverje össze 10-szeres inverzióval.</p>  <p>4. ábra: Az etanol hozzáadása után a DNS kicsapódik, amely látható szálcsomót eredményezhet.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Az etanolos keverés során a DNS kicsapódik. • A kicsapódott DNS a mintában lévő DNS mennyiségétől függően DNS-szálak csomójaként (4. ábra) vagy finom üledékként (4. ábra) jelenhet meg.
<p>9. Hagyja a mintát 10 percig szobahőmérsékleten állni, hogy a DNS teljesen kicsapódjon.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A -20 °C-on történő inkubálás nem ajánlott, mert a szennyeződések a DNS-sel együtt kicsapódhatnak.
<p>10. Centrifugálja szobahőmérsékleten 10 percig a lehető legnagyobb fordulatszámon. Minimum 3,500 × g.</p>	
<p>11. Óvatosan távolítsa el a felüliszót egy üveg- vagy műanyag pipettával, és dobja ki. Ügyeljen arra, hogy a DNS-pelletet ne bolygassa meg.</p>  <p>5. ábra: Ha a pipetta hegyével óvatosan végigkarcolja a cső belsejét, felfedezheti a DNS-kenet jelenlétét.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A felüliszó tartalmazhat szennyeződésekert, ezért azt a lehető legteljesebben kell eltávolítani. • A kicsapódott DNS pelletként található a cső alján, és esetleg keneként a cső oldalán (5. ábra). • A DNS-kenet a csőnek a centrifuga középpontjától távolabb eső oldalán található. • A kenet a „karcolósos” teszt segítségével lokalizálható. A DNS-kenet jelenlétét úgy ellenőrizheti, hogy a cső belsejét egy pipettahegy segítségével megkarcolja. Az 5. ábrán látható kenet látható lehet.

Tisztítási lépések	Megjegyzések
<p>12. Etanolos mosás: Óvatosan adjon 1 ml 70%-os etanolt a csöbe anélkül, hogy megbolygatná a kenetet vagy a pelletet. Hagyja szobahőmérsékleten állni 1 percig. Óvatosan keverje össze és távolítsa el teljesen az etanolt anélkül, hogy a pelletet és a kenetet megbolygatná.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Fontos, hogy az összes etanol eltávolítsa a mintából. Az etanol áthaladása befolyásolhatja a vizsgálat teljesítményét. • Ügyeljen arra, hogy a DNS-pelletet vagy a kenetet ne bolygassa meg. • Rövid centrifugálás (kevesebb mint 1 perc) végezhető a felülúszó teljes eltávolításának megkönnyítése érdekében. • Ha a pellet az etanolos mosási lépés után leválik, centrifugálja a mintát 5 percig a lehető legnagyobb fordulatszámon. Minimum $3,500 \times g$.
<p>13. Az Oragene minták esetében rehidratálja a DNS-t 0,2 ml-1 ml TE-oldat hozzáadásával, és 30 másodpercig vortexelje a mintát.</p> <p>Az ORAcollect minták esetében rehidratálja a DNS-t 0,2 ml TE-oldat hozzáadásával, és 30 másodpercig vortexelje a mintát.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ha nagyobb DNS-koncentrációra van szükség, a TE térfogata csökkenthető. Legalább 200 μl TE-oldatot kell használni. • A pellet túlzott szárítása (>10 perc) és 500 μl-nél kevesebb TE-oldat használata megnehezítheti a DNS rehidratálását (feloldását), és csökkentheti a hozamot vagy megnehezítheti a mennyiségi meghatározást. • A kicsapódott DNS pelletként található a cső alján, és esetleg kenetként a cső oldalán. • A maximális DNS-kinyerés biztosítása érdekében a mintát a DNS-oldószer (TE-oldat) hozzáadása után vortexelni kell. A vortexelés biztosítja, hogy a cső oldalára kenődött DNS-t visszanyerje (6. ábra). • A vortexelés nem nyírja el a DNS-t.
 <p>6. ábra: A minta 30 másodpercig tartó vortexelése lehetővé teszi a cső oldalára kenődött DNS visszanyerését. A DNS nagy molekulatömegű marad.</p>	
<p>14. A DNS teljes rehidratálásának biztosítása érdekében inkubálja szobahőmérsékleten egy éjszakán át, majd vortexelje vagy 50 °C-on 1 órán át, időnkénti vortexeléssel.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A DNS nem teljes rehidratálása a DNS-koncentráció becslésének pontatlanságát és a későbbi alkalmazások, például a PCR esetleges meghibásodását okozza.

Tisztítási lépések	Megjegyzések
<p>15. Tárolás céljából a rehidratált DNS-t vigye át egy 1,5 ml-es mikrocentrifugacsöbe.</p> <p>Opcionális lépés:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) Centrifugálja a rehidratált DNS-t szobahőmérsékleten 15 percig $15,000 \times g$ sebességgel. b) Vigye át a felülúszót a pellet megbolygatása nélkül egy új, 1,5 ml-es mikrocentrifugacsöbe. 	<p>Vegye figyelembe, hogy a pellet oldhatatlan, zavaros anyagot tartalmaz.</p> <ul style="list-style-type: none"> • A DNS visszanyerésének maximalizálása érdekében gondoskodjon arról, hogy a DNS teljesen rehidratált legyen (14. lépés) a centrifugálási lépés elvégzése előtt. • Ez a centrifugálási lépés biztosítja, hogy a fennmaradó zavaros anyagot eltávolítsa a DNS-mintából. • Ügyelni kell arra, hogy a pellet ne sérüljön meg, amikor a tiszta felülúszót egy új csöbe helyezi át.
<p>16. A teljesen rehidratált DNS tárolására vonatkozó lehetőségek:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) TE-ben -20°C-on hosszú távú tárolás céljából. Amennyiben szükséges, ossza fel alikvot részekre. b) TE-ben 4°C-on legfeljebb 2 hónapig. 	<ul style="list-style-type: none"> • A tisztított DNS TE-ben történő fagyasztása a DNS kicsapódását okozhatja. A fagyasztott tisztított DNS felolvasztáskor gondosan ügyeljen a rehidratálásra, amint azt a 14. lépésben tárgyaljuk.

A DNS mennyiségi meghatározása

Fluoreszcens módszerel

A fluoreszcens festékeket használó vizsgálatok specifikusabbak, mint a 260 nm-es abszorbanca a kettős szálú DNS (dsDNS) mennyiségének számszerűsítésére egy DNS mintában. Javasoljuk a kereskedelemben kapható készletek, például a Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) vagy a QuantiFluor™ dsDNA System (Promega) használatát. Előfordulhat, hogy a DNS-t a mennyiségi meghatározási vizsgálatban való felhasználás előtt akár 1:50 arányban is hígítani kell TE-vel.

Abszorpciós módszerrel

Ha úgy dönt, hogy a DNS-t abszorbanciával számszerűsíti, javasoljuk, hogy a tisztított mintát először kezelje RNázal a szennyező RNS emésztése érdekében, majd a DNS etanolos kicsapódásával távolítsa el az RNS-fragmentumokat. A részletes protokollt az *RNS eltávolítása kettős RNáz emésztéssel című fejezetben találja*.¹ Kérjük, vegye figyelembe, hogy a szájüregi mintákból származó DNS jellemzően jelentősen több RNS-t tartalmaz, mint a vérminták. Az abszorbanca leolvasása előtt győződjön meg arról, hogy az alkoholban kicsapódott DNS teljesen feloldódott.

Átváltási tényező: Az 1,0 abszorbanca 260 nm-en 50 ng/μl (50 μg/ml) koncentrációnak felel meg tiszta, kettős szálú DNS esetében.

Győződjön meg arról, hogy az abszorbanca értékek a spektrofotométer lineáris tartományán belül vannak. Hígítsa fel és mérje újra a lineáris tartományon kívül eső mintákat. További információkért tekintse meg a készülék dokumentációját.

Referenciák

¹ RNS eltávolítása kettős RNáz emésztéssel. PD-PR-040. DNA Genotek.

Módszer











1. Hígítson fel egy 10 μl-es alikvot részt a tisztított RNázal kezelt DNS-ből 90 μl TE-vel (1/10 hígítás). Óvatos fel-le pipettázással keverje össze. Várja meg, amíg a buborékok eltűnnek.
2. Használjon TE-t a referencia (üres) cellában.
3. Mérje az abszorbanciát 320 nm-en, 280 nm-en és 260 nm-en.
4. Számítsa ki a korrigált A_{280} és A_{260} értékeket úgy, hogy az A_{280} és A_{260} értékekből kivonja a 320 nm-en mért abszorbanciát (A_{320}).
5. DNS-koncentráció ng/μl-ben = korrigált $A_{260} \times 10$ (hígítási tényező) $\times 50$ (átváltási tényező).
6. A_{260}/A_{280} arány: Ossa el a korrigált A_{260} értéket a korrigált A_{280} értékkel.

Példa

1. Tegyük fel, hogy a mért $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ és $A_{260} = 0,295$
2. A hígítatlan minta DNS-koncentrációja a következő lesz:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [hígítási tényező] $\times 50$ [átváltási tényező]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng/}\mu\text{L}$ vagy $135 \mu\text{g/mL}$.
3. A korrigált A_{260}/A_{280} aránya a következő lesz:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

Az Oragene•DNA és az ORAcollect•DNA nem kapható az Egyesült Államokban.
Az Oragene•DISCOVER kizárólag kutatási célra szolgál, nem használható diagnosztikai eljárásokban.
Előfordulhat, hogy egyes DNA Genotek termékek nem minden földrajzi régióban állnak rendelkezésre.
Az Oragene, a prepiT, az ORAcollect és a DNA Genotek a DNA Genotek Inc. védjegyei.
Minden más itt szereplő márka és név a megfelelő tulajdonosok tulajdonát képezi.
Az összes DNA Genotek protokoll, fehér könyv és alkalmazási megjegyzés elérhető weboldalunk támogatási részében a www.dnagenotek.com weboldalon.

Címke jelmagyarázata:

	In vitro orvosdiagnosztikai eszköz
	Katalógusszám
	CE-jelölés
	Gyártó
	Olvassa el a használati útmutatót
	Hivatalos európai képviselő
	Hivatalos svájci képviselő
	Tételszám
	Egyedi készülékazonosító
	Használat közbeni stabilitás
15°C / 30°C 59°F / 86°F	Tárolási utasítások

Szabadalom (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-36 (HU - Hungarian) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., az OraSure Technologies, Inc. leányvállalata,
minden jog fenntartva.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com