

**Rankinio gryninimo
protokolo vadovas**
skirtas naudoti su

prepiTTM•L2P

DNagenotekTM

www.dnagenotek.com

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

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

Aukštesnės kokybės mėginiai
Patvirtintas veiksmingumas




prepIT™-L2P protokolas prieinamas daugiau kalbų adresu
www.dnagenotek.com

**Techninė pagalba teikiama nuo pirmadienio iki penktadienio
(9.00-17.00 val. ET):**

- Nemokamas tel. (Šiaurės Amerika): 1.866.813.6354, spauskite 6
- Visos kitos šalys: +1.613.723.5757, spauskite 6
- El. paštas: support@dnagenotek.com

■ DNA Genotek Inc.
3000 - 500 Palladium Drive
Ottawa, ON, Canada K2V 1C2 (Kanada)
El. paštas: support@dnagenotek.com

Atsakingasis asmuo Jungtinėje Karalystėje: Emurgo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL
International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ (Jungtinė Karalystė)

 Novosanis NV, Bijkhoevelaan 32c,
2110 Wijnegem, Belgium (Belgija)
El. paštas: EUAR@novosanis.com

 Arazy Group Swiss GmbH
Bruderholzallee 53, 4059 Basel, Schweiz (Šveicarija) El. paštas: swiss.ar@arazygroup.com

Užsakovas Australijoje: Emurgo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street,
Sydney, NSW 2000 Australia (Australija)

Turinys

Numatytasis naudojimo tikslas / paskirtis	4
Stabilumas naudojant	4
Ypatybės	4
Medžiagos	4
Išpėjimai ir atsargumo priemonės	4
Produkto naudojimo apribojimai	5
prepIT•L2P transportavimas	5
Paruošto prepIT•L2P tirpalo laikymas (tinkamumo laikas) ...	5
Šalinimas	5
Priežiūra / remontas	5
Veikimo charakteristikų santrauka	5
Produkto pristatymai	5
Garantijos	6
Trikčių šalinimas	6
prepIT• L2P laboratorijos protokolas rankiniam DNR gryninimui iš:	
500 µl mėginio	7
Visas mėginys	11
DNR kiekybinis nustatymas	18

Numatytasis naudojimo tikslas / paskirtis

Skirtas gryninti „Oragene“ ir „ORAcollect“ seilių surinkimo rinkinių genominę DNR.

Naudojimo stabilumas

PT-L2P-5 (5 ml) ir PT-L2P-45 (45 ml) yra stabilūs 30 mėnesių kambario temperatūroje.

Ypatybės

- Optimizuota cheminė analizė, skirta maksimaliai išgauti DNR iš burnos ėminių, surinktų naudojant „Oragene“ ir „ORAcollect“ produktų linijas.
- Įrodyta, kad naudojant didelės molekulinės masės DNR gaunami nuoseklūs rezultatai.
- Keičiamo dydžio gryninimo metodas didelio arba mažo tūrio ėminiams.
- Patogi darbo eiga su visa technine pagalba nuo paėmimo iki išskyrimo.
- Ekonomiškas būdas, kuriam reikia minimalios įrangos.

Medžiagos

- PT-L2P-5 (5 ml) ir (arba) PT-L2P-45 (45 ml)
- prepIT•L2P produkto vadovas

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

- Skirta naudoti tik laboratorijoje.
- Nenurykite skysto reagento.
- Nenaudokite, jei pakuotė pažeista arba piltuvėlio dangčio / dangtelio sandariklis sulūžęs arba nesandarus.
- Nenaudokite prepIT•L2P pasibaigus „Tinka iki“ datai, nurodytai ant reagento buteliuko.
- Jei reagento pateko į akis ar ant odos, nuplaukite vandeniu. Nenurykite.
- Apie bet kokią rimtą incidentą praneškite „DNA Genotek“ ir savo šalies kompetentingai institucijai.
- Kaip saugiai šalinti nepanaudotą reagentą, žr. Medžiagų saugos duomenų lapę (MSDL).
- MSDL galima rasti adresu www.dnagenotek.com.

Produkto naudojimo apribojimai

Naudokite prepIT•L2P tik taip, kaip nurodyta šiame produkto vadove.

prepIT•L2P transportavimas

prepIT•L2P galima transportuoti aplinkos temperatūroje kaip laboratorijos reagentą. Specialaus tvarkymo nereikia.

prepIT•L2P laikymas (tinkamumo laikas)

Laikyti kambario temperatūroje. Tinkamai uždarytų ir kambario temperatūroje laikomų PT-L2P-5 (5 ml) ir PT-L2P-45 (45 ml) tinkamumo laikas yra 30 mėnesių.

Šalinimas

Nepanaudotus, pažeistus ar nesandarius rinkinius šalinkite laikydamiesi atitinkamų vietos, valstijos ir federalinių taisyklių. Šalinkite kaip laboratorijos atliekas.

Priežiūra / remontas

Netaikoma. prepIT•L2P yra reagentas — jam nereikia jokios priežiūros ar remonto.

Veikimo savybių santrauka

prepIT•L2P išgryninta genomine DNR iš „Oragene“ ir „ORAcollect“ seilių surinkimo rinkinių užtikrina aukštos kokybės ir kiekybinę DNR, kurios pakanka tolesniam naudojimui, pvz., PGR, mikromasyvų ir naujos kartos sekos nustatymui.

Produkto pristatymas

prepIT•L2P galima įsigyti kelių tūrių, priklausomai nuo reikalingų preparatų skaičiaus. Pavyzdžiui:

Produkto nuoroda / katalogo numeris	Mėginio preparato tūris	Preparatų skaičius
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2000

Garantijos

Išsamios visų „DNR Genetek“ produktų naudojimo sąlygos pateikiamos adresu <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

Trikčių šalinimas

Kreipkitės į „DNA Genetek“ techninės pagalbos skyrių adresu support@dnagenotek.com arba skambinkite +1 (613) 723-5757, spauskite 6.

„prepIT™“ • L2P laboratorijos protokolas rankiniam DNR grynimui iš 500 µl ėminio

Toliau pateiktame nuosekliame protokole aprašoma, kaip išvalyti DNR iš 500 µl ėminio alikvotinės dalies.

Pridedami reagentai

prepIT•L2P (kat. Nr. PT-L2P-5 arba PT-L2P-45)

Įranga ir reagentai

- Mikrocentrifuga, galinti veikti 15 000 × g
- 1,5 ml mikromėgintuvėliai (pvz., „Axygen“; kat. Nr. MCT-150-C)
- Oro arba vandens inkubatorius 50 °C temperatūroje
- Etanolis (95 % - 100 %) kambario temperatūroje
- Etanolis (70 %) kambario temperatūroje
- DNR laikymo buferis: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) arba panašus tirpalas

Procedūra

Gryninimo veiksmai	Pastabos
1. Sumaišykite „Oragene“ / „ORACollect“ mėginį apversdami arba švelniai purtydami kelias sekundes.	• Taip klampūs mėginiai bus tinkamai sumaišyti.

Gryninimo veiksmai	Pastabos
2. Mėginį inkubuokite 50 °C temperatūroje vandens inkubatoriuje mažiausiai 1 valandą arba oro inkubatoriuje mažiausiai 2 valandas.	<ul style="list-style-type: none"> • Šis terminio apdorojimo etapas yra būtinas norint užtikrinti, kad DNR būtų tinkamai atpalaiduota, o nukleazės visam laikui inaktyvuotos. • Šį inkubavimo etapą galima atlikti bet kuriuo metu po mėginio paėmimo ir prieš jį išgryninant. • Prieš alikvotavimą visą mėginį reikia inkubuoti originaliame paėmimo mėgintuvėlyje, kad būtų užtikrintas mėginio homogeniškumas. • Jei patogiau, mėginį galima inkubuoti 50 °C temperatūroje per naktį. • Oro inkubatoriuje reikalingas ilgesnis laikas, nes temperatūros pusiausvyrą yra lėtesnė nei vandens inkubatoriuje. <p>Pastaba: rekomenduojama naudoti oro inkubatorių, nes „Oragene“ / „ORACollect“ mėgintuvėliai gali plūduriuoti vandens vonelėje. Jei reikia naudoti vandens vonelę, mėgintuvėlio dalis, kurioje yra mėginys, turi likti panardinta į vandenį.</p>
3. Perkelkite 500 µl sumaišyto mėginio į 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlį.	<ul style="list-style-type: none"> • Likusią mėginio dalį galima laikyti kambario temperatūroje (nuo 15 °C iki 25 °C) arba užšaldyti. • Mėginį galima laikyti užšaldytą „Oragene“ / „ORACollect“ mėgintuvėlyje -20 °C temperatūroje arba perkelti į kriobuteliuką ilgalaikiam laikymui -80 °C temperatūroje.
4. Įpilkite 20 µl (1/25 tūrio) prepIT• L2P į mikrocentrifugos mėgintuvėlį ir maišykite centrifuguodami keletą sekundžių.	<ul style="list-style-type: none"> • Mėginys taps drumstas, nes nusodinamos priemonės ir inhibitoriai.
5. Inkubuokite ant ledo 10 minučių.	<ul style="list-style-type: none"> • Galima naudoti inkubaciją kambario temperatūroje, bet ji bus šiek tiek mažiau veiksminga šalinant priemaišas.

Gryninimo veiksmai	Pastabos
6. Centrifuguokite kambario temperatūroje 5 minutes 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Ilgesnis centrifugavimo laikotarpis (iki 15 minučių) gali būti naudingas mažinant galutinio DNR tirpalo drumstumą (didelis A₃₂₀).
7. Atsargiai pipetės antgaliu perkelkite skaidrų supernatantą į naują mikrocentrifugos mėgintuvėlį. Atskirkite granules, kuriose yra priemaišų.	<ul style="list-style-type: none"> • Granulėje yra drumstų priemaišų. Jei netyčia tirpalas buvo sudrumstas, mėgintuvėlį reikia centrifuguoti iš naujo.
8. Įpilkite 600 µl kambario temperatūros etanolio (95 % - 100 %). Švelniai išmaišykite apversdami 10 kartų.	<ul style="list-style-type: none"> • Maišant su etanoliumi, DNR nusėda. Tai gali atrodyti kaip DNR skaidulų krešulys arba smulkios nuosėdos, priklausomai nuo DNR kiekio mėginyje. • Net jei krešulio nematyti, DNR bus išgauta kruopščiai atliekant tolesnius veiksmus.
9. Palikite mėginį 10 minučių kambario temperatūroje, kad DNR visiškai nusėstų.	<ul style="list-style-type: none"> • Nerekomenduojama inkubuoti -20 °C temperatūroje, nes priemaišos gali nusėsti kartu su DNR.
10. Įdėkite mėgintuvėlį į mikrocentrifugą žinoma kryptimi. Centrifuguokite kambario temperatūroje 2 minutes 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Pavyzdžiui, mėgintuvėlį įdėkite į mikrocentrifugą taip, kad dangtelio lanksto dalis būtų nukreipta nuo rotoriaus centro. Po centrifugavimo galima nustatyti granulės padėtį (net jei ji per maža, kad būtų matoma); ji bus mėgintuvėlio gale po lankstu.
11. Atsargiai pašalinkite supernatantą pipetės antgaliu ir jį išmeskite. Stenkitės nejudinti DNR granulės.	<ul style="list-style-type: none"> • Šioje granulėje yra DNR. Praradus granule, bus prarasta ir DNR. • Pasukę mėgintuvėlį taip, kad granulės būtų ant viršutinės sienelės, galėsite saugiai perkelti pipetės antgalį išilgai apatinės sienelės ir pašalinti visą supernatantą. • Supernatante gali būti priemaišų, todėl jį reikėtų visą pašalinti.

Gryninimo veiksmas	Pastabos
12. Etanolio plovimas: atsargiai įpilkite 250 µl 70 % etanolio. Palikite kambario temperatūroje 1 minutę. Visiškai pašalinkite etanolį, neliesdami granulių.	<ul style="list-style-type: none"> • Svarbu iš mėginio pašalinti visą etanolį. Etanolio pernaša gali turėti įtakos tyrimo rezultatams. • Pašalinus 70 % etanolį, mėgintuvėlių galima maišyti naudojant impulsinį maišymą, kad būtų galima pašalinti etanolio likučius. • Būkite atsargūs, kad netrikdytumėte DNR granulės; ji gali būti maža arba nematoma. • Jei granulės atsiskirtų, centrifuguokite mėginį 5 minutes 15 000 × g. • Dėl per didelio granulės džiovinimo gali būti sunkiau ištirpinti DNR.
13. Įpilkite 100 µl TE tirpalo (žr. 5 psl.), kad ištirptų DNR granulė. Maišykite ne mažiau kaip 5 sekundes.	<ul style="list-style-type: none"> • Jei norima didesnės DNR koncentracijos, reikėtų naudoti 50 µl TE.
14. Siekiant užtikrinti visišką DNR rehidraciją, inkubuokite kambario temperatūroje per naktį, po to 1 valandą maišykite arba 50 °C temperatūroje, retkarčiais maišydami.	<ul style="list-style-type: none"> • Dideli didelės molekulinės masės DNR kiekiai gali lėtai visiškai rehidratuotis (ištirpti). • Dėl nebaigto DNR rehidratavimo atsiranda netikslumų vertinant DNR koncentraciją ir gali nepavykti atlikti tolesnių tyrimų, pvz., PGR.
15. Visiškai rehidratuotos DNR laikymo galimybės: a) TE esant -20°C temperatūrai ilgalaikiam saugojimui. Galima padalyti į lygias dalis. b) TE 4 °C temperatūroje nuo iki 2 mėnesių.	

prepIT•L2P laboratorijos protokolas DNR iš viso mėginio valymui rankiniu būdu

Pastaba: norint gauti optimalius rezultatus, šiam protokolui reikia naudoti centrifugą (fiksuo kampo arba su besisukančiu rotoriumi), galinčią generuoti ne mažiau kaip 3500 × g.

Toliau pateiktame nuosekliame protokole nurodyta, kaip išvalyti DNR iš viso mėginio (1–4 ml bendro mėginio tūrio). Rodomi tūriai turi būti pakoreguoti pagal faktinį paimtą tūrį.

Pridedami reagentai

prepIT•L2P (kat. Nr. PT-L2P-5 arba PT-L2P-45)

Įranga ir reagentai

- Centrifuga, kurioje telpa 15 ml mėgintuvėliai ir kuri gali generuoti ne mažiau kaip 3500 × g (žr. 2 lentelę)
- 15 ml kūginiai polipropileno mėgintuvėliai (pvz., „BD Falcon“[®], kat. Nr. 352196)
- Mikrocentrifuga, galinti veikti 15 000 × g (pasirinktinai)
- 1,5 ml mikromėgintuvėliai (pvz., „Axygen“[®], kat. Nr. MCT-150-C)
- Oro arba vandens inkubatorius 50 °C temperatūroje
- Etanolis (95 % - 100 %) kambario temperatūroje
- Etanolis (70 %) kambario temperatūroje
- DNR laikymo buferis: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) arba panašus tirpalas

Pasirinktina: išankstinio gryninimo patikra (taikoma tik „Oragene“ ėminiams; nereikalaujama „ORACollect“ ėminiams)

Pasverkite ėminį, kad įvertintumėte donoro seilių kiekį (žr. 1 lentelę). Surinktu seilių kiekis yra tiesiogiai proporcingas išgautam DNR kiekiui. Pavyzdžiui, jei donoras davė mažiau nei 2 ml seilių, bus gauta mažesnė bendra šio ėminio išeiga.

Rinkinio svoris (be ėminio)

Kai ėminys atvyksta į laboratoriją, siūlome jį pasverti ir įvertinti, ar donoras pateikė reikiamą seilių kiekį. Skirtingų donorų ėminių kiekis gali skirtis. Pateiktas vidutinis tuščio rinkinio svoris (1 lentelė). Norėdami įvertinti ėminio kiekį (darant prielaidą, kad 1 g/ml), atlikite šiuos skaičiavimus:

Rinkinio, kuriame yra ėminys, svoris – tai rinkinio svoris be ėminio

Ėminio kiekis


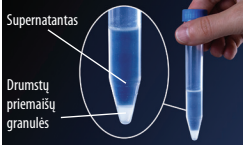
1 lentelė	
Produkto Nr.	Rinkinio svoris be ėminio
OG-500 / OGD-500 / OGR-500	6,81 g
OG-510 / OGD-510	5,83 g
OG-575 / OGD-575 / OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600 / OGD-600 / OGR-600	7,26 g
OG-610 / OGD-610	6,28 g
OG-675 / OGD-675 / OGR-675	6,00 g

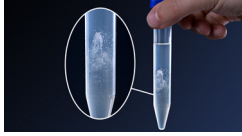

Procedūra


Gryninimo veiksmai	Pastabos
1. Sumaišykite „Oragene“ / „ORACollect“ mėginį apversdami arba švelniai purtydami kelias sekundes.	<ul style="list-style-type: none">• Taip klampūs mėginiai bus tinkamai sumaišyti.
2. Mėginį inkubuokite 50 °C temperatūroje vandens inkubatoriuje mažiausiai 1 valandą arba oro inkubatoriuje mažiausiai 2 valandas.	<ul style="list-style-type: none">• Šis terminio apdorojimo etapas yra būtinas norint maksimaliai padidinti DNR išeigą ir užtikrinti, kad nukleazės būtų visam laikui inaktyvuotos.• Jei patogiau, mėginį per naktį galima inkubuoti 50 °C temperatūroje.• Šį inkubavimo etapą galima atlikti bet kuriuo metu po mėginio paėmimo ir prieš išgryninant DNR.• Oro inkubatoriuje reikalingas ilgesnis laikas, nes temperatūros pusiausvyra yra lėtesnė nei vandens inkubatoriuje. <p>Pastaba: rekomenduojama naudoti oro inkubatorių, nes „Oragene“ / „ORACollect“ mėgintuvėliai gali plūduriuoti vandens vonelėje. Jei reikia naudoti vandens vonelę, mėgintuvėlio dalis, kurioje yra mėginys, turi likti panardinta į vandenį.</p>
3. Perkelkite visą mėginį į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį (1 pav.). Užsirašykite mėginio tūrį.	<ul style="list-style-type: none">• Perkėlimas gali būti atliekamas pilant arba lašinant stikline ar plastike pipete.



1 pav. Prieš pereidami prie 4 veiksmo, patikrinkite, ar visas mėginys buvo inkubuotas ir perkeltas į naują 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kaip parodyta.

Gryninimo veiksmiai	Pastabos
<p>4. Įpilkite 1/25 tūrio prepIT-L2P ir maišykite centrifuguodami keletą sekundžių (2 pav.).</p>  <p>2 pav. Pridėjus PT-L2P ir inkubuojant ant ledo 10 minučių, mėginys bus ne skaidrus, o bus drumstas tirpalas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pvz., į 4 ml mėginį įpilkite 160 µl prepIT-L2P. • Mėginys taps drumstas, nes nusodinamos priemonės ir inhibitoriai.
<p>5. Inkubuokite ant ledo 10 minučių.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Galima naudoti inkubaciją kambario temperatūroje, tačiau ji bus mažiau veiksminga šalinant priemaišas.
<p>6. Centrifuguokite kambario temperatūroje 10 minučių kuo didesniu greičiu. Mažiausiai 3500 × g.</p>  <p>3 pav. Po centrifugavimo mėgintuvėlio apačioje susikaups drumstas medžiaga. Viršutinis sluoksnis turi būti skaidrus.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Didesnė išcentrinė jėga sumažina drumstos medžiagos kiekį, kuris bus pernešamas į išgrynintą DNR (3 pav.). Prieš tęsdami, pasikonsultuokite su mėgintuvėlių gamintoju, ar 15 ml centrifugos mėgintuvėliai gali atlaikyti išcentrinę jėgą. • Ilgesnis centrifugavimo laikotarpis (iki 20 minučių) gali būti naudingas mažinant galutinio DNR tirpalo drumstumą (didelis A320).
<p>7. Atsargiai pipete perpilkite skaidrų supernatantą į naują 15 ml centrifugos mėgintuvėlį. Pašalinkite granulę.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Palikite nedidelį kiekį supernatanto, kad netrikdytumėte nuosėdų. • Granulė yra drumstų priemaišų. Jei netyčia tirpalas buvo sudrumstas, mėgintuvėlį reikia centrifuguoti iš naujo.

Gryninimo veiksmiai	Pastabos
<p>8. Į skaidrų supernatantą įpilkite 1,2 tūrio kambario temperatūros 95–100 % etanolio. Švelniai sumaišykite apversdami 10 kartų.</p>  <p>4 pav. Pridėjus etanolio, DNR nusėda, o tai gali sukelti matomą skaidulų krešulį.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Maišant su etanolio, DNR nusėda. • Priklausomai nuo DNR kiekio mėginyje, nusėdusi DNR gali atrodyti kaip DNR skaidulų krešulys (4 pav.) arba smulkios nuosėdos.
<p>9. Palikite mėginį 10 minučių kambario temperatūroje, kad DNR visiškai nusėstų.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Nerekomenduojama inkubuoti -20 °C temperatūroje, nes priemaišos gali nusėsti kartu su DNR.
<p>10. Centrifuguokite kambario temperatūroje 10 minučių kuo didesniu greičiu. Mažiausiai 3500 × g.</p>	
<p>11. Atsargiai išimkite supernatantą stikline ar plastike pipete ir pašalinkite. Stenkitės nejudinti DNR granulės.</p>  <p>5 pav. Pipetės antgaliu švelniai braižant mėgintuvėlio vidų galima aptikti DNR tepinėlius.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Supernatante gali būti priemaišų, todėl jį reikėtų visą pašalinti. • Nusodinta DNR bus granulės pavidalo mėgintuvėlio apačioje ir galbūt kaip tepinėlis mėgintuvėlio šone (5 pav.). • DNR tepinėlis gali būti mėgintuvėlio centro. • Tepinėlių galima rasti naudojant „braižymo“ testą. Galite patikrinti, ar nėra DNR tepinėlio, pipetės antgaliu braižydami mėgintuvėlio vidų. Tepinėlis gali būti matomas, kaip parodyta 5 pav.

Gryninimo veiksmai	Pastabos
<p>12. Etanolio plovimas: atsargiai įpilkite 1 ml 70 % etanolio į mėgintuvėlį, nejudindami tepinėlio ar nuosėdų. Palikite kambario temperatūroje 1 minutę. Švelniai pajudinkite ir visiškai pašalinkite etanolį, nejudindami granulių ir tepinėlio.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Svarbu iš mėginio pašalinti visą etanolį. Etanolio pertekšus gali turėti įtakos tyrimo rezultatams. • Būkite atsargūs, kad nesujudintumėte DNR granuliu ar tepinėlio. • Kad būtų lengviau visiškai pašalinti supernatantą, galima atlikti trumpą centrifugavimą (trumpiau nei 1 minutę). • Jei granulės atsiskiria po etanolio plovimo etapo, mėginį centrifuguokite 5 minutes kiek įmanoma didesniu greičiu. Mažiausiai $3500 \times g$.
<p>13. „Oragene“ mėginiams rehidratuoti DNR pridėdami 0,2-1 ml TE tirpalo ir 30 sekundžių maišyti.</p> <p>Rinkdami „ORA mėginis“, rehidratuokite DNR įpildami 0,2 ml TE tirpalo ir maišykite mėginį 30 sekundžių.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Jei norima didesnės DNR koncentracijos, TE tūris gali būti sumažintas. Reikia naudoti mažiausiai 200 μl TE tirpalo. • Pernelyg didelis granulės džiovinimas (> 10 minučių) ir mažesnis nei 500 μl TE tirpalo kiekio naudojimas gali pasunkinti DNR rehidraciją (ištirpinimą) ir sumažinti išėigą arba pasunkinti kiekybinį vertinimą. • Nusodinta DNR bus randama kaip granulė mėgintuvėlio dugne ir galbūt kaip tepinėlis mėgintuvėlio šone. • Norint maksimaliai atkurti DNR, įpyles DNR tirpiklio (TE tirpalo), mėginį sumaišyti. Maišant bus atkurta ant mėgintuvėlio šonų ištepta DNR (6 pav.). • Maišant DNR neatsiskirs.
 <p>6 pav. 30 sekundžių maišydami mėginį maišyklėje galėsite atkurti ant mėgintuvėlio šonų išteptą DNR. DNR išliks didelės molekulinės masės.</p>	
<p>14. Kad DNR būtų visiškai rehidratuota, inkubuokite kambario temperatūroje per naktį, o po to sumaišykite arba inkubuokite 1 valandą 50 °C temperatūroje, retkarčiais maišydami.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Dėl nebaigto DNR rehidratavimo atsiranda netikslumų vertinant DNR koncentraciją ir gali nepavykti atlikti tolesnių tyrimų, pvz., PGR.

Gryninimo veiksmai	Pastabos
<p>15. Perkelkite rehidratuotą DNR į 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlį laikymui.</p>	
<p>Papildomas etapas:</p> <ol style="list-style-type: none"> Centrifuguokite rehidratuotą DNR kambario temperatūroje 15 minučių $15,000 \times g$. Perkelkite supernatantą į naują 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlį, nesujudindami nuosėdų 	<p>Atkreipkite dėmesį, kad granulėje yra netirpios, drumstos medžiagos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Norėdami maksimaliai padidinti DNR atkūrimą, prieš atlikdami šį centrifugavimo veiksmą įsitikinkite, kad DNR yra visiškai rehidratuota (14 veiksmas). • Šis centrifugavimo veiksmas užtikrina, kad likusi drumsta medžiaga bus pašalinta iš DNR mėginio. • Perkeliant skaidrų supernatantą į naują mėgintuvėlį, reikia būti atsargiems, kad nesujudintumėte granuliu.
<p>16. Visiškai rehidratuotos DNR laikymo galimybės:</p> <ol style="list-style-type: none"> TE esant -20°C temperatūrai ilgalaikiam saugojimui. Jei norite, padalykite į lygias dalis. TE 4 °C temperatūroje iki 2 mėnesių. 	<ul style="list-style-type: none"> • Išgrynintos DNR užšaldymas TE gali sukelti DNR nuosėdų susidarymą. Atšildydami užšaldytą išgrynintą DNR, atidžiai stebėkite rehidraciją, kaip aptarta 14 veiksmo.

DNR kiekybinis nustatymas

Fluorescencijos metodu

Tyrimai, kuriuose naudojami fluorescenciniai dažikliai, yra specifiškesni nei absorbcija esant 260 nm bangos ilgiui, nustatant dvigrandės DNR (dsDNR) kieki DNR mėginyje. Siūlome naudoti rinkoje parduodamus rinkinius, pvz., „Quant-iT™ PicoGreen™“ dsDNA tyrimo rinkinį („Thermo Fisher Scientific“) arba „QuantiFluor™“ dsDNA sistemą („Promega“). Prieš atliekant kiekybinį tyrimą, DNR gali tekti praskiesti TE tirpalu santykiu 1:50.

Absorbcijos metodu

Jei nuspręsite kiekybiškai įvertinti DNR pagal absorbciją, rekomenduojame išgrynintą mėginį pirmiausia apdoroti RNaze, kad suvirškintumėte užterštą RNR, o tada pašalinti RNR fragmentus nusodinant DNR etanoliumi. Išsamus protokolas aprašytas PD-PR-040, *RNR pašalinimas dvigubos RNase virškinimo būdu*.¹ Atkreipkite dėmesį, kad DNR iš burnos mėginio paprastai turi pastebimai daugiau RNR nei kraujo mėginiuose. Prieš nuskaitydami absorbciją patikrinkite, ar alkoholio nusodinta DNR yra visiškai ištirpusi.

Konversijos koeficientas: 1,0 optinis tankis esant 260 nm atitinka 50 ng/μl (50 μg/ml) grynos, dviejų grandinių DNR koncentraciją.

Patikrinkite, ar optinio tankio vertės patenka į spektrofotometro linijinį diapazoną. Atskieskite ir pakartotinai išmatuokite mėginius, kurie nepatenka į linijinį diapazoną. Daugiau informacijos rasite prietaiso dokumentacijoje.

Nuorodos

- ¹ RNR pašalinimas dvigubos RNase virškinimo būdu. PD-PR-040. „DNA Genotek“.

Metodas











- 10 μl išgrynintos RNaze apdorotos DNR alikvotinės dalies praskieskite 90 μl TE (1/10 praskiedimo). Sumaišykite švelniai pipete įlašindami į viršų ir į apačią. Palaukite, kol burbuliukai išnyks.
- Etaloniniame (tuščiame) langelyje naudokite TE.
- Išmatuokite absorbciją esant 320 nm, 280 nm ir 260 nm.
- Apskaičiuokite pataisytas A_{280} ir A_{260} vertes, atimdami absorbciją esant 320 nm (A_{320}) iš A_{280} ir A_{260} verčių.
- DNR koncentracija ng/μL = koreguota $A_{260} \times 10$ (skiedimo koeficientas) \times 50 (konversijos koeficientas).
- A_{260}/A_{280} santykis: padalinkite pataisytą A_{260} iš pataisytos A_{280} .

Pavyzdys

- Tarkime, kad išmatuota $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ ir $A_{260} = 0,295$
- Neatskiesto mėginio DNR koncentracija bus:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [skiedimo koeficientas] \times 50 [konversijos koeficientas]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng/}\mu\text{l}$ arba $135 \text{ }\mu\text{g/ml}$
- Koreguotas A_{260}/A_{280} santykis bus:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

„Oragene-DNR“ ir „ORACollect •DNR“ nėra parduodami Jungtinėse Amerikos Valstijose.
„Oragene-DISCOVER“ skirtas tik moksliniams tyrimams, o ne diagnostinėms procedūroms.
Kai kurie „DNR Genotek“ produktai gali būti prieinami ne visuose geografiniuose regionuose.
„Oragene“, „PrepIT“, „ORACollect“ ir „DNA Genotek“ yra „DNA Genotek Inc.“ prekių ženklai.
Visi kiti čia nurodyti prekių ženklai ir pavadinimai yra jų atitinkamų savininkų nuosavybė.
Visi „DNR Genotek“ protokolai, techniniai dokumentai ir taikymo pastabos yra pateiktos mūsų svetainės www.dnagenotek.com pagalbos skiltyje.

Etiketės paaiškinimas:

	In vitro diagnostikos medicinos prietaisais
	Katalogo numeris
	CE ženklas
	Gamintojas
	Žr. pakuotės lapelį
	Igaliojasis atstovas Europoje
	Igaliojasis atstovas Šveicarijoje
	Partijos numeris
	Unikalus prietaiso identifikatorius
	Stabilumas naudojant
15 °C ↕ 30 °C	Laikymo instrukcijos
59 °F ↕ 86 °F	

Patentas (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-40 (LT - Lithuanian) Issue 1/2024-01

leid. © „DNA Genotek Inc.“, įmonės „OraSure Technologies, Inc.“ filialas, 2024. Visos teisės saugomos.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com