

Priročnik protokola
za ročno čiščenje
za uporabo

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

Vrhunski vzorci
Dokazana zmogljivost




Protokol PrepIT™-L2P je na voljo v dodatnih jezikih na spletnem mestu www.dnagenotek.com

Tehnična podpora je na voljo od ponedeljka do petka (od 9.00 do 17.00 ET):

- Brezplačno (Severna Amerika): 1.866.813.6354, možnost 6
- Vse druge države: +1.613.723.5757, možnost 6
- E-pošta: support@dnagenotek.com

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

Odgovorna oseba v Združenem kraljestvu: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 -
UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9 BZ

 Novosanis NV,
Bijjkhoevelaan 32 c, 2110 Wijnegem, Belgija
E-pošta: EJAR@novosanis.com

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

Imetnik dovoljenja v Avstraliji: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park,
201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000 Avstralija

Kazalo vsebine

Predvidena uporaba/namen	4
Stabilnost med uporabo	4
Značilnosti	4
Materiali	4
Opozorila in previdnostni ukrepi	4
Omejitve uporabe izdelkov	5
Prevoz prepIT-L2P	5
Shranjevanje prepIT-L2P (rok uporabnosti)	5
Odstranjevanje med odpadke	5
Vzdrževanje/popravila	5
Povzetek značilnosti delovanja	5
Oblike izdelkov	5
Garancija	6
Odpravljanje težav	6
Laboratorijski protokol prepIT-L2P za ročno čiščenje DNK iz:	
500 µL vzorca	7
Celoten vzorec	11
Opredelitev DNK	18

Predvidena uporaba/namen

Za čiščenje genomske DNK iz kompletov za odvzem sline Oragene™ in ORACollect™.

Stabilnost med uporabo

PT-L2P-5 (5 ml) in PT-L2P-45 (45 ml) imata 30-mesečno stabilnost pri sobni temperaturi.

Značilnosti

- Optimizirane kemijske lastnosti za maksimalno pridobivanje DNK iz peroralnih vzorcev, odvzetih s proizvodnima linijama Oragene in ORACollect.
- Dokazano zagotavlja dosledne rezultate z DNK z visoko molekularno maso.
- Prilagodljiva metoda čiščenja za velike ali majhne količine vzorcev.
- Priročen potek dela s popolno tehnično podporo od odvzema do ekstrakcije.
- Stroškovno učinkovita metoda z minimalnimi zahtevami glede opreme.

Materiali

- PT-L2P-5 (5 ml) in/ali PT-L2P-45 (45 ml)
- Priročnik za izdelek prepIT•L2P

Opozorila in previdnostni ukrepi

- Samo za laboratorijsko uporabo.
- NE zaužijte tekočega reagenta.
- NE uporabljajte, če je embalaža poškodovana ali če je tesnilo pokrova lijaka poškodovano ali pušča.
- PrepIT•L2P NE uporabljajte po datumu »roka uporabnosti«, ki je naveden na steklenici z reagentom.
- Če reagent pride v stik z očmi ali kožo, jih sperite z vodo. NE zaužiti.
- O vsakem resnem incidentu obvestite družbo DNK Genotek in pristojni organ v vaši državi.
- Za varno odlaganje neuporabljenega reagenta glejte varnostni list (MSDS).
- Varnostni list je na voljo na spletnem mestu www.dnagenotek.com.

Omejitve uporabe izdelka

PrepIT•L2P uporabljajte samo v skladu z navodili iz tega priročnika za izdelek.

Transport izdelka prepIT•L2P

Izdelek prepIT•L2P lahko prevažate pri sobni temperaturi kot laboratorijski reagent. Posebno ravnanje ni potrebno.

Shranjevanje izdelka prepIT•L2P (rok uporabnosti)

Shranjujte pri sobni temperaturi. Rok uporabnosti izdelkov PT-L2P-5 (5 ml) in PT-L2P-45 (45 ml) je 30 mesecev, če sta ustrezno zaprta in shranjena pri sobni temperaturi.

Odstranjevanje med odpadke

Neuporabljene, poškodovane komplete ali komplete, ki puščajo, zavržite v skladu z ustreznimi lokalnimi, državnimi in zveznimi predpisi. Zavržite kot laboratorijske odpadke.

Vzdrževanje/popravila

Ni smiselno. Izdelek prepIT•L2P je reagent – vzdrževanje ali popravilo ni potrebno.

Povzetek značilnosti delovanja

Prečiščena genomska DNK iz kompletov za odvzem sline Oragene in ORACollect prepIT•L2P zagotavlja DNK visoke kakovosti in količine, ki zadostuje za uporabo v nadaljnjih aplikacijah, kot so PCR, mikro epruvete in sekvenciranje naslednje generacije.

Oblike izdelkov

Izdelek prepIT•L2P je na voljo v več količinah, odvisno od števila potrebnih pripravkov. Na primer:

Referenca izdelka/ kataloška številka	Količina za pripravo vzorca	Število priprav
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2.000

Garancije

Splošni pogoji za vse izdelke družbe DNK Genetek so na voljo na spletnem mestu <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

Odpravljanje težav

Obrnite se na tehnično podporo družbe DNK Genetek na e-poštni naslov support@dnagenotek.com ali pokličite +1 (613) 723-5757, možnost 6.

prepIT™•L2P laboratorijski protokol za ročno čiščenje DNK iz 500 µl vzorca

Naslednji protokol po korakih opisuje, kako očistite DNK iz 500 µl alikvota vzorca.

Uporabljeni reagenti

prepIT•L2P (kat. št. PT-L2P-5 ali PT-L2P-45)

Oprema in reagenti

- Mikrocentrifuga, ki lahko deluje pri $15.000 \times g$
- 1,5-ml mikropruvete (npr. Axygen® kat. št. MCT-150-C)
- Zračni ali vodni inkubator pri 50 °C
- Etanol (95-odstotni do 100-odstotni) pri sobni temperaturi
- Etanol (70-odstotni) pri sobni temperaturi
- Pufer za shranjevanje DNK: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ali podobna raztopina

Postopek

Koraki čiščenja	Opombe
1. Vzorec odvzet z Oragene/ ORACollect nekaj sekund mešajte z inverzijo ali rahlim stresanjem.	• To zagotavlja, da so viskozni vzorci pravilno premešani.

Koraki čiščenja	Opombe
2. Vzorec inkubirajte pri 50 °C v vodnem inkubatorju najmanj 1 uro ali v zračnem inkubatorju najmanj 2 uri.	<ul style="list-style-type: none"> • Ta korak toplotne obdelave je bistvenega pomena za zagotovitev, da se DNK ustrezno sprosti in da so nukleaze trajno inaktivirane. • Ta inkubacijska faza se lahko izvede kadar koli po odvzemu vzorca in pred prečiščevanjem. • Celoten vzorec morate inkubirati v originalni epruveti za odvzem, preden se alikvotira, da se zagotovi homogenost vzorca. • Vzorec se lahko inkubira pri 50 °C čez noč, če je to bolj primerno. • V zračnem inkubatorju je potreben daljši čas, ker je uravnavanje temperature počasnejše kot v vodnem inkubatorju. <p>Opomba: Bolje je uporabiti zračni inkubator, saj lahko epruvete Oragene/ ORACollect plavajo v vodni kopeli. Če je treba uporabiti vodno kopel, zagotovite, da del epruvete, ki vsebuje vzorec, ostane potopljen v vodi.</p>
3. 500 µl mešanega vzorca prenesemo v 1,5 ml epruveto za mikrocentrifugiranje.	<ul style="list-style-type: none"> • Preostanek vzorca lahko shranite pri sobni temperaturi (15 °C do 25 °C) ali zamrznete. • Po želji lahko vzorec shranite zamrznjen v epruveti Oragene/ ORACollect pri –20 °C ali pa ga prenesete v kriovialo za dolgoročno shranjevanje pri –80 °C.
4. Dodajte 20 µl (1/25. volumen) prepIT-L2P v epruveto za mikrocentrifugo in nekaj sekund mešajte z centrifugiranjem.	<ul style="list-style-type: none"> • Vzorec bo postal moten, ker se bodo nečistoče in inhibitorji oborili.
5. Inkubirajte na ledu 10 minut.	<ul style="list-style-type: none"> • Namesto tega lahko uporabite inkubacijo pri sobni temperaturi, vendar bo nekoliko manj učinkovita pri odstranjevanju nečistoč.

Koraki čiščenja	Opombe
6. Centrifugirajte pri sobni temperaturi 5 minut pri 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Daljše obdobje centrifugiranja (do 15 minut) je lahko koristno pri zmanjševanju motnosti (visoke A₃₂₀) končne raztopine DNK.
7. Bister supernatant s konico pipete previdno prenesite v svežo epruveto za mikrocentrifugo. Pelete, ki vsebujejo nečistoče, zavrzite.	<ul style="list-style-type: none"> • Pelet vsebuje motne nečistoče. Če epruveto po pomoti stresete, jo morate ponovno centrifugirati.
8. Dodajte 600 µl 95-odstotnega do 100-odstotnega etanola pri sobni temperaturi. Nežno premešajte z inverzijo 10-krat.	<ul style="list-style-type: none"> • Med mešanjem z etanolom se DNK obori. To se lahko pojavi kot strdek DNK vlaken ali kot drobna oborina, odvisno od količine DNK v vzorcu. • Tudi če ne opazite strdka, boste pridobili DNK s skrbnim upoštevanjem naslednjih korakov.
9. Vzorec pustite stati 10 minut pri sobni temperaturi, da se DNK popolnoma obori.	<ul style="list-style-type: none"> • Inkubacija pri –20 °C ni priporočljiva, ker se nečistoče lahko oborijo z DNK.
10. Epruveto postavite v mikrocentrifugo v znani smeri. Centrifugirajte pri sobni temperaturi 2 minuti pri 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Na primer, vsako epruveto postavite v mikrocentrifugo tako, da je del tečajja pokrova obrnjen stran od središča rotorja. Po centrifugiranju je mogoče določiti položaj peleta (tudi če je premajhen, da bi bil viden); bo na konici epruvete pod tečajem.
11. Supernatant previdno odstranite s konico merilne kapalke in ga zavrzite. Pazite, da ne boste stresli peleta DNK.	<ul style="list-style-type: none"> • Ta pelet vsebuje DNK. Izguba peleta povzroči izgubo DNK. • Z vrtenjem epruvete tako, da je pelet na zgornji steni, boste lahko varno premikali konico pipete vzdolž spodnje stene in odstranili ves supernatant. • Supernatant lahko vsebuje nečistoče, ki jih je treba čim bolj odstraniti.

Koraki čiščenja	Opombe
<p>12. Pranje z etanolom: Previdno dodajte 250 µL 70-odstotnega etanola. Pustite stati na sobni temperaturi 1 minuto. Popolnoma odstranite etanol, ne da bi tem premaknili pelet.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pomembno je, da iz vzorca odstranite ves etanol. Prenos etanola lahko vpliva na učinkovitost testa. • Po odstranitvi 70 % etanola lahko epruveto pulzno centrifugirate, da omogočite odstranitev ostanka etanola. • Pazite, da ne poškodujete peleta DNK; lahko je majhen ali neviden. • Če se pelet odlepi, vzorec centrifugirajte 5 minut pri $15.000 \times g$. • Prekomerno sušenje peleta lahko povzroči, da se DNK težje raztopi.
<p>13. Dodajte 100 µl raztopine TE (glejte stran 5), da raztopite pelet DNK. Centrifugirajte vsaj 5 sekund.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Če želite povečati koncentracijo DNK, morate uporabiti 50 µl TE.
<p>14. Da zagotovite popolno rehidracijo DNK, inkubirajte pri sobni temperaturi čez noč, ki ji sledi centrifugiranje ali 1 uro pri 50°C z občasnim centrifugiranjem.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Velike količine DNK z visoko molekularno maso se lahko počasi popolnoma rehidrirajo (raztapljajo). • Nepopolna rehidracija DNK je vzrok za netočnost pri ocenjevanju koncentracije DNK in morebitno neuspeh nadaljnjih aplikacij, kot je PCR.
<p>15. Možnosti za shranjevanje popolnoma rehidrirane DNK: a) V TE pri -20°C za dolgoročno shranjevanje. Po želji jih razdelite na alikvote. b) V TE pri 4°C za do 2 meseca.</p>	

prepIT•L2P laboratorijski protokol za ročno čiščenje DNK iz

Opomba: Ta protokol zahteva uporabo centrifuge (rotorja s fiksnim kotom ali rotorja nihajne žlice), ki lahko ustvari vsaj $3.500 \times g$ za doseganje optimalnih rezultatov.

Naslednji protokol po korakih opisuje, kako očistite DNK iz celotnega vzorca (1 ml–4 ml skupnega volumna vzorca). Prikazane količine morate prilagoditi glede na dejansko odvzeto količino.

Uporabljeni reagenti

prepIT•L2P (kat. št. PT-L2P-5 ali PT-L2P-45)

Oprema in reagenti

- Centrifuga, ki sprejme 15-ml epruvete in lahko proizvede vsaj $3.500 \times g$ (glejte tabelo 2)
- 15-ml stožčaste polipropilenske epruvete (npr. BD Falcon® kat. št. 352196)
- Mikrocentrifuga, ki lahko deluje pri $15.000 \times g$ (izbirno)
- 1,5-ml mikroeprevete (npr. Axygen® kat. št. MCT-150-C)
- Zračni ali vodni inkubator pri 50°C
- Etanol (95-odstotni do 100-odstotni) pri sobni temperaturi
- Etanol (70-odstotni) pri sobni temperaturi
- Pufer za shranjevanje DNK: TE (10 mm Tris-HCl, 1 mm EDTA, pH 8,0) ali podobna raztopina

Izbirno: Kontrola pred prečiščevanjem (velja samo za vzorce Oragene; ni potrebno za vzorce ORACollect)

Vzorec stehamo, da ocenimo količino slin, odvzete darovalcu (glejte tabelo 1). Količina odvzete slin je neposredno sorazmerna s količino DNK. Na primer, če je bilo darovalcu odvzeto manj kot 2 ml slin, morate pričakovati, da boste iz tega vzorca dobili manjši skupni donos.

Teža kompleta (brez vzorca)

Ko vzorec prispe v laboratorij, priporočamo, da ga stehate in ocenite, ali je bila darovalcu odvzeta ustrežna količina slin. Lahko pričakujete nekaj razlik med darovalci. Navedena je povprečna teža praznega kompleta (tabela 1). Za oceno količine zbranega vzorca (ob predpostavki 1 g/ml) opravite naslednji izračun:

Teža kompleta, ki vsebuje vzorec – teža kompleta brez vzorca

Količina zbranega vzorca

Tabela 1


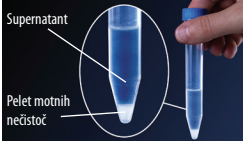
Št. izdelka	Teža kompleta brez vzorca
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

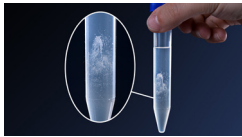
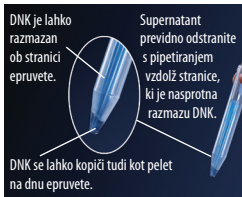
Postopek


Koraki čiščenja	Opombe
1. Vzorec odvzet z Oragene/ORACollect nekaj sekund mešajte z inverzijo ali rahlim stresanjem.	<ul style="list-style-type: none">• To zagotavlja, da so viskozni vzorci pravilno premešani.
2. Vzorec inkubirajte pri 50 °C v vodnem inkubatorju najmanj 1 uro ali v zračnem inkubatorju najmanj 2 uri.	<ul style="list-style-type: none">• Ta korak toplotne obdelave je bistvenega pomena za zagotovitev, da se DNK ustrezno sprosti in da so nukleaze trajno inaktivirane.• Vzorec lahko inkubirate pri 50 °C čez noč, če je to bolj primerno.• Ta korak inkubacije lahko izvedete kadar koli po odvzemu vzorca in pred prečiščevanjem DNK.• V zračnem inkubatorju je potreben daljši čas, ker je uravnavanje temperature počasnejše kot v vodnem inkubatorju. <p>Opomba: Bolje je uporabiti zračni inkubator, saj lahko epruvete Oragene/ORACollect plavajo v vodni kopeli. Če je treba uporabiti vodno kopel, zagotovite, da del epruvete, ki vsebuje vzorec, ostane potopljen v vodo.</p>
3. Celoten vzorec prenesemo v 15-ml epruveto za centrifugo (slika 1). Zabeležite količino vzorca.	<ul style="list-style-type: none">• Prenos se lahko izvede z nalivanjem ali s pipetiranjem s stekleno ali plastično pipeto.



Slika 1: Preden nadaljujete s 4. korakom, se prepričajte, da je bil celoten vzorec inkubiran in prenesen v svežo 15-ml epruveto za centrifugo, kot je prikazano.

Koraki čiščenja	Opombe
<p>4. Dodajte 1/25. volumna prepiT-L2P in nekaj sekund mešajte s centrifugiranjem (slika 2).</p>  <p><i>Slika 2: Po dodajanju PT-L2P in inkubaciji na ledu 10 minut vzorec ne bo več jasen, temveč bo motna raztopina.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Na primer, v 4 ml vzorca dodajte 160 µL prepiT-L2P. • Vzorec postane moten, ko se obarvajo nečistoče in inhibitorji.
<p>5. Inkubirajte na ledu 10 minut.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Namesto tega lahko uporabite inkubacijo pri sobni temperaturi, vendar bo nekoliko manj učinkovita pri odstranjevanju nečistoč.
<p>6. Centrifugirajte pri sobni temperaturi 10 minut pri čim večji hitrosti. Najmanj 3.500 × g.</p>  <p><i>Slika 3: Po centrifugiranju se na dnu epruvete nabere motni material. Supernatant mora biti vidno jasen.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Večja centrifugalna sila zmanjša količino motnega materiala, ki se prenese v prečiščeno DNK (slika 3). Pred nadaljevanjem morate pri proizvajalcu epruvete preveriti, ali lahko 15-ml epruvete za centrifugo prenesejo centrifugalno silo. • Daljše obdobje centrifugiranja (do 20 minut) je lahko koristno pri zmanjševanju motnosti (visoke A_{320}) končne raztopine DNK.
<p>7. Bister supernatant s pipeto previdno prenesite v svežo 15-ml epruveto za centrifugo. Pelet zavržite.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pustite majhno količino supernatanta, da se izognete motnjam peleta. • Pelet vsebuje motne nečistoče. Če epruveto po pomoti stresete, jo morate ponovno centrifugirati.

Koraki čiščenja	Opombe
<p>8. Dodajte 1,2-kratni volumen 95-odstotnega do 100-odstotnega etanola pri sobni temperaturi v prozoren supernatant. 10-krat nežno premešajte z inverzijo.</p>  <p><i>Slika 4: Po dodajanju etanola se bo DNK oborila, kar lahko povzroči viden strdek vlaken.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Med mešanjem z etanolom se DNK obori. • Oborjena DNK je lahko videti kot strdek vlaken DNK (slika 4) ali kot drobna oborina, odvisno od količine DNK v vzorcu.
<p>9. Vzorec pustite stati 10 minut pri sobni temperaturi, da se DNK popolnoma obori.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Inkubacija pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ni priporočljiva, ker se nečistoče lahko oborijo z DNK.
<p>10. Centrifugirajte pri sobni temperaturi 10 minut pri čim višji hitrosti. Najmanj 3.500 × g.</p>	
<p>11. Supernatant previdno odstranite s stekleno ali plastično pipeto in ga zavržite. Pazite, da ne boste stresali peleta DNK.</p>  <p><i>Slika 5: DNK je lahko razmazan ob strani epruvete. Supernatant previdno odstranite s pipetiranjem vzdolž stranice, ki je nasprotna razmazu DNK. DNK se lahko kopiči tudi kot pelet na dnu epruvete.</i></p> <p><i>Slika 5: Uporaba konice pipete za nežno praskanje po notranji strani cevi lahko razkrije prisotnost brisa DNK.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Supernatant lahko vsebuje nečistoče in ga je treba čim bolj odstraniti. • Oborina DNK bo na dnu epruvete in morda kot bris po strani epruvete (slika 5). • Razmaz DNK se lahko nahaja na strani epruvete, obrnjeni stran od središča centrifuge. • Razmaz je mogoče locirati s testom »praskanja«. Prisotnost razmaza DNK lahko preverite tako, da s konico pipete opraskate notranjost epruvete. Lahko je viden razmaz, kot je prikazano na sliki 5.

Koraki čiščenja	Opombe
<p>12. Pranje z etanolom: Previdno dodajte 1 ml 70-odstotnega etanola, ne da bi pri tem vplivali na razmaz ali pelet. Pustite, da stoji na sobni temperaturi 1 minuto. Nežno zavrtite in popolnoma odstranite etanol, ne da bi poškodovali pelet in razmaz.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pomembno je, da iz vzorca odstranite ves etanol. Prenos etanola lahko vpliva na učinkovitost testa. • Pazite, da ne boste stresali peleta DNK ali razmaza. • Za popolno odstranitev supernatanta lahko izvedete kratko centrifugiranje (manj kot 1 minuto). • Če se pelet po pranju z etanolom odlepi, vzorec centrifugirajte 5 minut pri čim višji hitrosti. Najmanj $3.500 \times g$.
<p>13. Za vzorce Oragene rehidrirajte DNK tako, da dodate 0,2 ml do 1 ml raztopine TE in vzorec vrtinite 30 sekund.</p> <p>Za vzorce ORAcollect ponovno hidrirajte DNK z dodatkom 0,2 ml raztopine TE in 30 sekund mešajte vzorec.</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Če je zaželen višja koncentracija DNK, se lahko volumen te zmanjša. Uporabiti morate najmanj 200 μl raztopine TE. • Prekomerno sušenje peleta (> 10 minut) in uporaba manj kot 500 μl raztopine TE lahko oteži rehidracijo (raztapljanje) DNK in lahko zmanjša donos ali oteži kvantifikacijo. • Oborina DNK bo na dnu epruvete in morda kot bris po stranici epruvete (slika 5). • Za zagotovitev maksimalnega izkoristka DNK morate vzorec mešati po dodatku DNK topila (raztopina TE). Mešanje zagotavlja ponovno pridobivanje DNK, razmazane na stranici epruvete (slika 6). • Mešanje ne bo vplivalo na DNK.
<p>14. Da zagotovite popolno rehidracijo DNK, inkubirajte pri sobni temperaturi čez noč, ki ji sledi centrifugiranje ali 1 uro pri 50°C z občasnim mešanjem.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Nepopolna rehidracija DNK je vzrok za netočnost pri ocenjevanju koncentracije DNK in morebitno neuspeh nadaljnjih aplikacij, kot je PCR.

Koraki čiščenja	Opombe
<p>15. Rehidrirano DNK prenesite v 1,5 ml epruveto za mikrocentrifugo.</p>	
<p>Izbirni korak:</p> <ol style="list-style-type: none"> Rehidrirano DNK centrifugirajte pri sobni temperaturi 15 minut pri $15.000 \times g$. Prenesite supernatant v svežo 1,5 ml epruveto za mikrocentrifugo, ne da bi pri tem vplivali na pelet. 	<p>Upošteвайте, da pelet vsebuje netopne, motne snovi.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Da bi povečali obnavljanje DNK, zagotovite, da je DNK popolnoma rehidrirana (korak 14) pred izvedbo tega koraka centrifugiranja. • Ta korak centrifugiranja zagotavlja, da se morebitni preostali motni material odstrani iz vzorca DNK. • Paziti je treba, da pri prenosu bistrega supernatanta v svežo epruveto ne vplivate na pelet.
<p>16. Možnosti za shranjevanje popolnoma rehidrirane DNK:</p> <ol style="list-style-type: none"> V TE pri -20°C za dolgoročno shranjevanje. Po želji jih razdelite na alikvote. V TE pri 4°C za do 2 meseca. 	<ul style="list-style-type: none"> • Zamrznitev prečiščene DNA v te lahko povzroči, da se DNK obori. Pri odtajanju zamrznjene prečiščene DNK bodite pozorni na rehidracijo, kot je opisano v 14. koraku.

Kvantifikacija DNK

S fluorescenčno metodo

Analize, ki uporabljajo fluorescentna barvila, so bolj specifične kot absorbanca pri 260 nm za količinsko opredelitev količine dvojne vezave DNK (dsDNA) v vzorcu DNK. Predlagamo uporabo komercialno dostopnih kompletov, kot sta Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) ali QuantiFluor® dsDNA System (Promega). DNK boste morda morali razredčiti do 1:50 s TE, preden jo uporabite v kvantifikacijskem testu.

Z metodo absorbance

Če se odločite za količinsko opredelitev DNK z absorbanco, priporočamo, da očiščen vzorec najprej obdelate z RNazo, da razgradi kontaminirano RNA in nato fragmente RNA odstranite z obarjanjem DNA z etanolom. Podroben protokol je opisan v PD-PR-040, *odstranjevanje RNA z razgradnjo z dvojno RNazo*.¹ Upoštevajte, da DNK iz peroralnega vzorca običajno vsebuje znatno več RNA, kot jo najdemo v vzorcih krvi. Pred odčitavanjem absorbance se prepričajte, da je z alkoholom oborjena DNK popolnoma raztopljena.

Faktor pretvorbe: Absorbanca 1,0 pri 260 nm ustreza koncentraciji 50 ng/μL (50 μg/mL) za čisto, dvovertično DNK.

Prepričajte se, da so vrednosti absorbance znotraj linearnega obsega spektrofotometra. Razredčite in ponovno izmerite vzorce, ki so izven linearnega obsega. Za več informacij glejte dokumentacijo instrumenta.

Reference

- ¹ Odstranjevanje RNA z razgradnjo z dvojno RNazo. PD-PR-040. DNA Genotek.

Metoda

1. Razredčite 10 μl alikvota očiščene DNA, obdelane z RNazo, z 90 μL TE (razredčitev 1/10). Mešajte z nežnim pipetiranjem gor in dol. Počakajte, da mehurčki izginejo.
2. Uporabite TE za referenčno (prazno) celico.
3. Izmerite absorbanco pri 320 nm, 280 nm in 00260.
4. Izračunajte korigirane vrednosti A_{280} in A_{260} z odštevanjem absorbance pri 320 nm (A_{320}) od vrednosti A_{280} in A_{260} .
5. Koncentracija DNA v ng/μL = korigirana vrednost $A_{260} \times 10$ (faktor redčenja) $\times 50$ (faktor pretvorbe).
6. Razmerje A_{260}/A_{280} : delite korigirano vrednost A_{260} s korigirano vrednostjo A_{280} .

Primer

1. Predpostavimo, da je izmerjena $A_{320} = 0.025$, $A_{280} = 0.175$ and $A_{260} = 0.295$
2. Koncentracija DNK nerazredčenega vzorca bo:
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10$$
 [faktor redčenja] $\times 50$ [faktor pretvorbe]
$$= (0.295 - 0.025) \times 10 \times 50$$

$$= 0.270 \times 10 \times 50$$

$$= 135 \text{ ng/}\mu\text{l ali } 135 \text{ }\mu\text{g/ml}$$
3. Popravljen razmerje A_{260}/A_{280} bo:
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$











$$= (0.295 - 0.025) \div (0.175 - 0.025)$$

$$= 0.270 \div 0.150$$

$$= 1.80$$

Oragene•DNA in ORACollect•DNA nista na voljo za prodajo v Združenih državah. Oragene•DISCOVER je samo za raziskovalno uporabo, ne za uporabo v diagnostičnih postopkih. Nekateri izdelki DNK Genotek morda niso na voljo v vseh geografskih regijah. Oragene, prepIT, ORACollect in DNA Genotek so blagovne znamke družbe DNA Genotek Inc. Vse druge blagovne znamke in imena, ki jih vsebuje, so last njihovih zadevnih lastnikov. Vsi protokoli DNA Genotek, bele knjige in opombe o aplikaciji so na voljo v razdelku za podporo na našem spletnem mestu www.dnagenotek.com.

Legenda oznake:

	diagnostični medicinski pripomoček in vitro
	Kataloška številka
	Oznaka CE
	Proizvajalec
	Glejte navodila v paketu
	Evropski pooblaščen zastopnik
	Švicarski pooblaščen zastopnik
	Številka serije
	Edinstveni identifikator naprave
	Stabilnost med uporabo
15 °C / 30 °C	navodila za shranjevanje
59 °F / 86 °F	

Patent (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-46 (SL - Slovenian) Issue 1/2024-01

© 2024 DNK Genotek Inc., hčerinska družba OraSure Technologies, Inc., vse pravice pridržane.

DNagenotek™

www.dnagenotek.com