

## Εργαστηριακό πρωτόκολλο για μη αυτόματο καθαρισμό DNA από δείγμα 0,5 mL

Για τον καθαρισμό γονιδιωματικού DNA από κιτ συλλογής των οικογενειών Oragene® και ORAcollect®.

Για περισσότερες γλώσσες και πρωτόκολλα, μεταβείτε τον ιστότοπό μας [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

Το παρακάτω λεπτομερές πρωτόκολλο περιγράφει τον καθαρισμό DNA από κλάσμα δείγματος 500 µL.

### Περιλαμβάνονται αντιδραστήρια

- prepIT®•L2P (κατάλογος#: PT-L2P)

### Εξοπλισμός και αντιδραστήρια

- Μικροφυγοκέντριση με δυνατότητα λειτουργίας στα 15.000 × g
- Μικροσωλήνες 1,5 mL (π.χ., Axygen #MCT-150-C)
- Κλίβανος επώασης αέρα ή νερού στους 50°C
- Αιθανόλη (95% έως 100%) σε θερμοκρασία δωματίου
- Αιθανόλη (70%) σε θερμοκρασία δωματίου
- Ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ή παρόμοιο διάλυμα

### Διαδικασία

Βήματα καθαρισμού	Σημειώσεις
1. Αναμιξάτε το δείγμα στο κιτ της DNA Genotek, ανατρέποντάς το και ανακινώντας το για μερικά δευτερόλεπτα.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Αυτό γίνεται για να διασφαλιστεί η σωστή ανάμιξη ιξωδών δειγμάτων.</li></ul>
2. Επώαστε το δείγμα στους 50°C σε κλίβανο επώασης νερού για τουλάχιστον 1 ώρα ή σε κλίβανο επώασης αέρα για τουλάχιστον 2 ώρες. <b>Σημείωση:</b> Η χρήση κλιβάνου επώασης αέρα ίσως να είναι η καταλληλότερη, εφόσον οι σωλήνες των δειγμάτων είναι πιθανό να επιπλεύσουν σε υδρόλουτρο. Εφόσον πρέπει να χρησιμοποιηθεί υδρόλουτρο, εξασφαλίστε πως το τμήμα του σωλήνα που περιέχει το δείγμα παραμένει βυθισμένο σε νερό.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Αυτό το βήμα θερμικής επεξεργασίας είναι απαραίτητο για να διασφαλιστεί πως το DNA έχει αποδεσμευτεί επαρκώς και πως οι νουκλεϊνάσες έχουν αδρανοποιηθεί μόνιμα.</li><li>• Αυτό το βήμα επώασης μπορεί να πραγματοποιηθεί ανά πάσα στιγμή, μετά τη συλλογή του δείγματος και πριν τον καθαρισμό του.</li><li>• Ολόκληρο το δείγμα θα πρέπει να επωαστεί στον αρχικό σωλήνα συλλογής, πριν την κλαματοποίηση, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η ομοιογένεια του δείγματος.</li><li>• Το δείγμα μπορεί να επωαστεί στους 50°C κατά τη διάρκεια της νύχτας, εφόσον αυτό εξυπηρετεί καλύτερα.</li><li>• Στον κλίβανο επώασης αέρα απαιτείται περισσότερος χρόνος, επειδή η εξισορρόπηση θερμοκρασίας είναι πιο αργή από ότι στον κλίβανο επώασης νερού.</li></ul>

Βήματα καθαρισμού	Σημειώσεις
3. Μεταφέρετε 500 μL του αναμειγμένου δείγματος σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα 1,5 mL.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Το υπόλοιπο δείγμα μπορεί να αποθηκευθεί σε θερμοκρασία δωματίου ή κατεψυγμένο (-15°C έως -20°C).</li> </ul>
4. Για 500 μL προσθέστε 20 μL (1/25ο του όγκου) PT-L2P στο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και αναμίξτε με στροβιλισμό μερικών δευτερολέπτων.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Το δείγμα θα γίνει θολό κατά την καθίζηση των ακαθαρσιών και των αναστολέων.</li> </ul>
5. Επώαστε σε πάγο για 10 λεπτά.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η επώαση μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε θερμοκρασία δωματίου, ωστόσο θα είναι ελαφρώς λιγότερο αποτελεσματική κατά την απομάκρυνση των ακαθαρσιών.</li> </ul>
6. Φυγοκεντρήστε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά σε 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ο αυξημένος χρόνος φυγοκέντρωσης (έως και 15 λεπτά) θα μπορούσε να συμβάλει στη μείωση της θολότητας (υψηλό A<sub>320</sub>) του τελικού διαλύματος DNA.</li> </ul>
7. Μεταφέρετε προσεκτικά το καθαρό υπερκείμενο υγρό με τη βοήθεια της άκρης ενός σιφωνίου σε έναν καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. <b>Απορρίψτε το σφαιρίδιο που περιέχει ακαθαρσίες.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Το σφαιρίδιο περιέχει θολές ακαθαρσίες. Σε περίπτωση τυχαίας ανατάραξης, ο σωλήνας θα πρέπει να φυγοκεντρωθεί εκ νέου.</li> </ul>
8. Στα 500 μL του υπερκείμενου υγρού, προσθέστε 600 μL αιθανόλης 95% έως 100% σε θερμοκρασία δωματίου. Αναμίξτε ελαφρά, ανατρέποντας 10 φορές.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Κατά τη διάρκεια της ανάμειξης με αιθανόλη, το DNA θα υποστεί καθίζηση. Αυτό είναι πιθανό να εμφανιστεί ως πήγμα ινών DNA ή ως λεπτό ίζημα, ανάλογα με την ποσότητα του DNA στο δείγμα.</li> <li>• Ακόμη κι αν δε φαίνεται κάποιο πήγμα, το DNA θα ανακτηθεί με την προσεκτική εκτέλεση των παρακάτω βημάτων.</li> </ul>
9. Αφήστε το δείγμα να παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, έτσι ώστε να κατακαθίσει πλήρως το DNA.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η επώαση στους -20°C δε συνιστάται, εφόσον είναι πιθανό να κατακαθίσουν οι ακαθαρσίες μαζί με το DNA.</li> </ul>
10. Τοποθετήστε το σωλήνα στη συσκευή μικροφυγοκέντρωσης με γνωστή φορά. Φυγοκεντρήστε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά σε 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Για παράδειγμα, τοποθετήστε κάθε σωλήνα στη συσκευή μικροφυγοκέντρωσης, με το σημείο άρθρωσης του καπακιού να δείχνει στην αντίθετη κατεύθυνση από αυτή του κέντρου του ρότορα. Μετά τη φυγοκέντρωση, η θέση του σφαιριδίου μπορεί να εντοπιστεί (ακόμη κι αν είναι πολύ μικρό για να διακριθεί εύκολα), εφόσον θα βρίσκεται στην ακμή του σωλήνα, κάτω από την άρθρωση.</li> </ul>

Βήματα καθαρισμού	Σημειώσεις
<p>11. Αφαιρέστε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό με τη βοήθεια της άκρης ενός σιφωνίου και απορρίψτε το. Φροντίστε να μη φθαρεί το σφαιρίδιο DNA.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αυτό το σφαιρίδιο περιέχει DNA. Α απώλεια του σφαιριδίου συνεπάγεται την απώλεια του DNA.</li> <li>• Η περιστροφή του σωλήνα, έτσι ώστε το σφαιρίδιο να βρίσκεται στο επάνω τοίχωμα, θα διευκολύνει την ασφαλή μετακίνηση της άκρης ενός σιφωνίου κατά μήκος του κάτω τοιχώματος και την απομάκρυνση όλου του υπερκείμενου υγρού.</li> <li>• Το υπερκείμενο υγρό είναι πιθανό να περιέχει ακαθαρσίες, οπότε και θα πρέπει να απομακρύνεται πλήρως.</li> <li>• Το υπερβολικό στέγνωμα του σφαιριδίου είναι πιθανό να δυσχεράνει τη διάλυση του DNA .</li> </ul>
<p>12. Πλύση αιθανόλης: Προσθέστε προσεκτικά 250 μL αιθανόλης 70%. Αφήστε το διάλυμα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. <b>Αφαιρέστε πλήρως την αιθανόλη, χωρίς να επηρεάσετε το σφαιρίδιο.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Είναι σημαντικό να απομακρυνθεί η αιθανόλη πλήρως από το δείγμα. Η μεταφορά αιθανόλης είναι πιθανό να επηρεάσει τη απόδοση της έκθεσης.</b></li> <li>• Φροντίστε να μη φθαρεί το σφαιρίδιο DNA.</li> <li>• Το σφαιρίδιο DNA είναι πιθανό να είναι μικρό.</li> <li>• Σε περίπτωση αποκόλλησης του σφαιριδίου, φυγοκεντρήστε το δείγμα για 5 λεπτά σε 15.000 × g.</li> <li>• Μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης 70% ο σωλήνας μπορεί να περιστραφεί παλμικά για την απομάκρυνση της υπολειμματικής αιθανόλης.</li> </ul>
<p>13. Προσθέστε 100 μL διαλύματος TE (βλ. Σελίδα 1) για τη διάλυση του σφαιριδίου DNA. Στροβιλίστε για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αν επιθυμείτε μεγαλύτερη συγκέντρωση DNA, χρησιμοποιήστε 50 μL διαλύματος TE.</li> <li>• <b>Σημείωση:</b> Οι μεγάλες ποσότητες DNA υψηλού μοριακού βάρους μπορούν να επιβραδύνουν την πλήρη ενύδρωση (διάλυση).</li> <li>• Η ατελής ενύδρωση του DNA οδηγεί σε ανακρίβεια κατά την εκτίμηση της συγκέντρωσης DNA και στην αποτυχία μεταγενέστερων εφαρμογών, όπως PCR.</li> </ul>
<p>14. Για τη διασφάλιση της πλήρους επανενυδάτωσης του DNA (σφαιρίδιο και επίστρωση), επώαστε με στροβιλισμό σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της νύχτας ή στους 50°C για 1 ώρα με περιστασιακό στροβιλισμό.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η ατελής επανενυδάτωση του DNA οδηγεί σε ανακρίβεια κατά την εκτίμηση της συγκέντρωσης DNA και στη δυνητική αποτυχία μεταγενέστερων εφαρμογών, όπως PCR.</li> </ul>
<p>15. Επιλογές αποθήκευσης του πλήρως επανενυδατωμένου DNA: α) <b>Συνιστώμενη</b> σε TE, σε κλάσματα στους -20°C για μακροπρόθεσμη αποθήκευση, ή β) Σε TE στους 4°C για έως και 2 μήνες.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η κατάψυξη καθαρισμένου DNA σε TE θα προκαλέσει καθίζηση του DNA. Κατά την απόψυξη ενός δείγματος κατεψυγμένου και καθαρισμένου DNA, δώστε ιδιαίτερη προσοχή στην επανενυδάτωση, σύμφωνα με το βήμα 14.</li> </ul>

## Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

### Με τη μέθοδο φθορισμού

Οι δοκιμασίες που χρησιμοποιούν βαφές φθορισμού είναι πιο ακριβείς από ότι η απορρόφηση σε 260 nm για τον ποσοτικό προσδιορισμό του δίκλωνου DNA (dsDNA) σε ένα δείγμα DNA. Συνιστούμε τη χρήση βαφών φθορισμού, όπως PicoGreen® ή SYBR® Green I, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των dsDNA, εφόσον υπάρχει λιγότερη παρεμβολή κατά την επιμόλυνση RNA. Ένα οικονομικό πρωτόκολλο με χρήση SYBR Green I περιγράφεται στο PD-PR-075, ποσοτικός προσδιορισμός DNA με χρήση βαφής SYBR Green I Dye και συσκευή ανάγνωσης μικρο-πλακών<sup>1</sup>. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κιτ που διατίθενται στο εμπόριο, όπως το Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (Κωδ. καταλόγου Q-33130) της Invitrogen. Σε κάθε πρωτόκολλο συνιστούμε τη διάλυση του καθαρισμένου DNA σε διάλυμα TE 1:50 και τη χρήση 5 μL στη δοκιμασία ποσοτικού προσδιορισμού.

### Με τη μέθοδο απορρόφησης

Αν επιλέξετε τον ποσοτικό προσδιορισμό DNA με απορρόφηση, τότε συνιστούμε την αρχική επεξεργασία του καθαρισμένου δείγματος με ριβονουκλεάση (RNase) για τη σύννοψη της επιμόλυνσης RNA και στη συνέχεια την απομάκρυνση των θραυσμάτων RNA με κατακρήμνιση αιθανόλης του DNA. Ένα λεπτομερές πρωτόκολλο περιγράφεται στο PD-PR-040, απομάκρυνση RNA με σύννοψη διπλής RNase<sup>2</sup>. Παρακαλούμε, σημειώστε πως το DNA από δείγμα εκ του στόματος περιέχει κατά κανόνα περισσότερο RNA από ότι τα δείγματα αίματος. Διασφαλίστε πως το DNA με καθίζηση αλκοόλης έχει διαλυθεί πλήρως, πριν διαπιστώσετε την απορρόφηση.

**Συντελεστής μετατροπής:** Η απορρόφηση 1,0 στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 ng/μL (50 μg/mL) καθαρού dsDNA.

Βεβαιωθείτε πως οι τιμές απορρόφησης βρίσκονται εντός γραμμικής περιοχής του φασματοφωτομέτρου. Διαλύστε μετρήστε εκ νέου τα δείγματα που βρίσκονται εκτός της γραμμικής περιοχής. Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. τεκμηρίωση εξοπλισμού.

### Μέθοδος:

1. Διαλύστε ένα κλάσμα 10 μL καθαρισμένου DNA μέσω RNase σε 90 μL TE (1/10 διάλυμα). Αναμίξτε σε σιφώνιο ανακινώντας επάνω-κάτω. Περιμένετε, μέχρι να εξαλειφθούν οι φυσαλίδες.
2. Χρησιμοποιήστε TE στο κελί αναφοράς (κενό).
3. Μετρήστε την απορρόφηση στα 320 nm, 280 nm και 260 nm.
4. Υπολογίστε τις διορθωμένες τιμές  $A_{280}$  και  $A_{260}$  αφαιρώντας την απορρόφηση στα 320 nm ( $A_{320}$ ) από τις τιμές  $A_{280}$  και  $A_{260}$ .
5. Συγκέντρωση DNA σε ng/μL = διορθωμένο  $A_{260} \times 10$  (παράγοντας διάλυσης)  $\times 50$  (παράγοντας μετατροπής).
6. Δείκτης  $A_{260}/A_{280}$ : Διάρθρωση διορθωμένου  $A_{260}$  προς διορθωμένο  $A_{280}$ .

## Παράδειγμα

1. Υποθέτουμε πως έχουν μετρηθεί  $A_{320}= 0,025$ ,  $A_{280}= 0,175$  και  $A_{260}= 0,295$
2. Η συγκέντρωση DNA στο αδιάλυτο δείγμα θα είναι:  
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$  [παράγοντας διάλυσης]  $\times 50$  [παράγοντας μετατροπής]  
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$   
 $= 0,270 \times 10 \times 50$   
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{L}$  ή  $135 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$
3. Ο διορθωμένος δείκτης  $A_{260}/A_{280}$  θα είναι:  
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$   
 $= (0,296 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$   
 $= 0,270 \div 0,150$   
 $= 1,80$

## Βιβλιογραφία

1. Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με χρήση της δοκιμασίας φθορισμού/DNase (F/D). Αντικαταστάθηκε από ποσοτικό προσδιορισμό DNA με χρήση βαφής SYBR Green I Dye και συσκευή ανάγνωσης μικρο-πλακών. DNA Genotek. PD-PR-075.
2. Απομάκρυνση RNA με σύνοψη διπλής RNase. DNA Genotek. PD-PR-040.

## Η τεχνική υποστήριξη διατίθεται Δευτέρα με Παρασκευή (09:00-17:00 EST):

- Τηλέφωνο επικοινωνίας ατελώς (Βόρεια Αμερική): 1.866.813.6354, επιλογή 6
- Άλλες χώρες: 613.723.5757, επιλογή 6
- E-mail: [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)

Τα Oragene®-DNA και ORAcollect®-DNA δε διατίθενται προς πώληση στις Ηνωμένες Πολιτείες.

Το Oragene®-DISCOVER προορίζεται αποκλειστικά για ερευνητική χρήση και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διαδικασίες διάγνωσης.

Ορισμένα προϊόντα της DNA Genotek είναι πιθανό να μη διατίθενται σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές.

Τα \*Oragene, prepiT και ORAcollect αποτελούν καταχωρημένα εμπορικά σήματα της DNA Genotek Inc.

Όλα τα υπόλοιπα εμπορικά σήματα ή ονομασίες που περιέχονται στο παρόν αποτελούν ιδιοκτησία των αντίστοιχων ιδιοκτητών τους.

Όλα τα πρωτόκολλα, λευκές βιβλίοι και σημειώσεις εφαρμογών της DNA Genotek διατίθενται στην ενότητα υποστήριξης του ιστότοπού μας, στο [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

