prepIT®•L2P

0.5 मिली. नमूने से डीएनए के हाथ से किये गये शुद्धिकरण के लिए प्रयोगशाला प्रोटोकॉल

संग्रह किटों के Oragene® तथा ORAcollect® परिवारों से जीनोमिक डीएनए के शुद्धिकरण के लिए।

किन्हीं अतिरिक्त भाशाओं तथा प्रोटोकॉल के लिए हमारी वेबसाइट www.dnagenotek.com पर जाएँ।

निम्नलिखित कदम ब कदम प्रोटोकॉल इस बात को वर्णित करता है कि नमूने के 500 µL एलिकोट से डीएनए को किस प्रकार से शुद्ध किया जाये।

अभिकर्मक द्रव्यों में शामिल हैं

- prepIT®•L2P (सूची #: PT-L2P)

उपकरण और अभिकर्मक द्रव्य

- 15,000 × *g* पर चलने में समर्थ माइक्रोसेंट्रीफ्यूज
- 1.5 मिली. माइक्रोट्यूब्स (अर्थात एक्सीजेन #MCT-150-C)
- 50 डिग्री सेल्सियस पर हवा या पानी का इनक्यूबेटर
- कमरे के तापमान पर एथनॉल (95 प्रतिशत से 100 प्रतिशत)
- कमरे के तापमान पर एथनॉल (70 प्रतिशत)
- डीएनए भंडारण बफर : टीई (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) अथवा इसी प्रकार का घोल

कार्यविधि

शुद्धिकरण के चरण	टिप्पणियाँ
1. उलटाव के द्वारा डीएनएए जेनेटिक में सैम्पल को मिलायें और थोड़ी देर तक आराम से हिलायें।	• यह इस बात को सुनिश्चित करने के लिए है कि चिपचिपे नमूने ठीक ढंग से मिश्रित हो गये हैं।
2. पानी के इनक्यूबेटर में 50 डिग्री सेल्सियश पर सैम्पल को कम से कम 1 घंटे के लिए इनक्यूबेटर में रखें या वायु इनक्यूबेटर में कम से कम दो घंटों के लिए रखें। **टिप्पणी** : वायु इनक्यूबेटर को तरजीह दी जा सकती है क्योंकि सैम्पल ट्यूब्स पानी के बाथ में तैरने लगती है। अगर आपनी के बाथ का प्रयोग करना ही हुआ तो सुनिश्चित कर लें कि ट्यूब का वह हिस्सा पानी में डूबा रहे जिसमें कि सैम्पल भरा हुआ है।	• यह हीट–ट्रीटमेंट चरण यह सुनिश्चित करने के लिए बेहद जरूरी है कि डीएनए पर्याप्त मात्रा में निःसृत हो जाए और यह कि नाभिक स्थायी रूप से निश्क्रिय हो जाते हैं। • नमूने को जमा कर लिये जाने के बाद और उसे शुद्ध किये जाने से पहले इस इनक्यूबेशन चरण को कभी भी सम्पन्न किया जा सकता है। • सैंपल समरूपता सुनिश्चित करने के लिए एलिकोटिंग से पहले समूचे सैम्पल को मूल संग्रह नली में अव य इन्क्यूबेट किया जाना चाहिए। नमूने की समरूपता को सुनिश्चित करने के लिए अशे ा भाजक से पहले मूल संग्रह नलिका में समूचे नमूने को इनक्यूबेट करना चाहिए। • सैम्पल को रात भर 50 डिग्री सेल्सियश पर इनक्यूबेट किया जा सकता है बशर्ते कि ये ज्यादा सुविधाजनक हो। • हवा के इनक्यूबेटर में ज्यादा लंबे समय की जरूरत होती है क्योंकि पानी के इनक्यूबेटर के मुकाबले में तापमान का इक्वलीब्रेशन धीमा होता है। बाकी बचे हुए सैम्पल को कमरे के तापमान पर स्टोर किया जा सकता है या जमाया जा सकता है (माइनस 15 डिग्री सेल्सियश से माइनस 20 डिग्री सेल्सियश)।
3. 500 µL । मिश्रित सैम्पल को 1.5 मिली माइक्रोसेंट्रीफ्यूज में मिलायें	• बाकी बचे हुए नमूने को कमरे के तापमान पर स्टोर किया जा सकता है या (-15°C to -20°C) पर जमाया जा सकता है।

CE IVD

PD-PR-00235 (HI - Hindi) Issue 1/2012-04
© 2012 डीएनए जैनोटेक इंक., ओरा यूर टैक्नॉलॉजी, इंक., की सहायक कंपनी, सर्वाधिकार सुरक्षितए

शुद्धिकरण के चरण	टिप्पणियाँ
4. 500 µL सैम्पल के लिए पीटी–एल2पी का 20 µL (एक बटे 25वां भाग) माइक्रोसेंट्रीफ्यूज नली में मिलायें और कुछ सेकेंड तक हिलाकर अच्छी तरह से मिला लें	• सैम्पल गंदले बन सकते हैं क्योंकि अशुद्धियाँ और इनहिबिटर्स तलहटी में बैठ जाते हैं।
5. बर्फ को 10 मिनटों के लिए इनक्यूबेट करें।	• कमरे के तापमान पर इनक्यूबेशन का स्थानापन्न हो सकता है लेकिन यह अशुद्धियों को हटाने में थोड़ा कम प्रभावी होगा।
6. 15,000 × *g* पर पाँच मिनट के लिए कमरे के तापमान पर सेंट्रीफ्यूज करें।	• सेंट्रीफ्यूगेशन की लंबी अवधि (15 मिनट तक की) अंतिम डीएनए समाधान की गंदगी (high A_{320}) को कम करने में लाभदायक हो सकती है।
7. ताजी माइक्रोसेंट्रीफ्यूज नली में पिपेट की टोंटी के साथ स्वच्छ सुपरनेटेंट को सावधानीपूर्वक हस्तांतरित करें। **अशुद्धियों वाली गोलियों को निकाल कर फेंक दें।**	• गोली में गंदगी की अशुद्धियाँ भरी होती हैं। अगर दुर्घटनावश यह अव्यवस्थित हो जाये तो नली को फिर से सेंट्रीफ्यूज किया जाना चाहिए।
8. सतह पर तैरने वाले 500 µL में कमरे के 95 प्रतिशत से 100 प्रतिशत तापमान का 600 µL मिलायें। दस बार हिलाकर आराम से इसे मिश्रित करें।	• एथेनॉल के साथ मिश्रित होने के दौरान डीएनए नीचे बैठ जाएगा। यह डीएनए रेशों के थक्के के रूप में नजर आ सकता है अथवा महीन जमाव के रूप में और यह सैम्पल में डीएनए की मात्रा पर निर्भर करता है।
9. सैम्पल को 10 मिनट के लिए कमरे के तापमान पर बने रहने दें जिससे कि डीएनए पूरी तरह से नीचे बैठ जाये।	• –20 डिग्री सेल्सियश पर इन्क्यूबेशन की अनुशंसा नहीं की जाती है क्योंकि अशुद्धियाँ डीएनए के साथ एक साथ तलहटी में बैठ सकती हैं।
10. ज्ञात दिशा में नली को माइक्रोसेंट्रीफ्यूज में रखें। 15,000 × *g* पर दो मिनट के लिए कमरे के तापमान पर सेंट्रीफ्यूज करें।	• उदाहरण के लिए, माइक्रोसेंट्रीफ्यूज में हरेक नली को रखें और कैप का चूल वाला हिस्सा रोटोर के मध्य से दूर जा रहा हो। सेंट्रीफ्यूगेशन के बाद गोली की स्थिति का पता लगाया जा सकता है, (फिर वह चाहे इतनी छोटी ही क्यों न हो कि आसानी से नजर ही नहीं आए), यह चूल के नीचे नली की टिप पर होगी।
11. नली की टोंटी के साथ सतह पर तैरने वाली चीज को सावधानीपूर्वक निकालें। ध्यान रखें कि डीएनए की गोली अव्यवस्थित नहीं हो।	• गोली में डीएनए होता है। गोली के खो जाने का अर्थ होगा डीएनए का खो जाना। • नली को इस प्रकार से घुमाने से कि गोली ऊपरी दीवार पर हो आप सुरक्षित ढंग से निचली दीवार के साथ–साथ नली की टिप को सुरक्षित ढंग से ले जा सकते हैं और तैरने वाली सभी चीजों को निकाल सकते हैं। • सुपरनेटेंट में अशुद्धियाँ हो सकती हैं और उन्हें जहाँ तक संभव हो निकाला जाना चाहिए। • गोली को अत्यधिक सुखाने से डीएनए घुलने में ज्यादा मुश्किल हो सकता है।
12. एथनॉल से धुलाई : 70 प्रतिशत एथनॉल का 250 µL सावधानीपूर्वक मिलायें। 1 मिनट के लिए कमरे के तापमान पर पड़े रहने दें। **गोली का अव्यवस्थित किये बिना एथेलॉल को पूरी तरह से निकालें।**	• **सैंपल में से समस्त एथनॉल का निकाला जाना जरूरी है। बचा हुआ एथनॉल परख के नि पादनको प्रभावित कर सकता ह।** • इस बात का ध्यान रखें कि डीएनए की गोली में व्यवधान उत्पन्न नहीं हो। • डीएनए की गोली छोटी हो सकती है • गोली अगर अलग हो जाती है तो 15,000 × *g* पर पाँच मिनट के लिए सैम्पल को सेंट्रीफ्यूज करें। • एथनॉल 70 प्रतिशत को निकालने के बाद नली बाकी बचे एथेनॉल को निकालने के लिए पल्स–स्पन की जा सकती है।

© 2012 डीएनए जैनोटेक इंक., ओरा यूर टैक्नॉलॉजी, इंक., की सहायक कंपनी, सर्वाधिकार सुरक्षितए

शुद्धिकरण के चरण	टिप्पणियाँ
13. डीएनए गोली को घोलने के लिए टीई घोल का 100 µL मिलायें (कम से पाँच सेकेंड तक हिलायें–डुलायें)।	• अगर डीएनए का ज्यादा ऊंचा संकेंद्रण चाहिए तो टीई का 50 µL उपयोग में लाया जाना चाहिए। • **ध्यान दें : नोट** : उच्च आणविक वजन की अधिक मात्रा का डीएनए पूरी तरह से जलयोजित (घुलने) होने में धीमा हो सकता है। • डीएनए का अधूरा जलयोजन डीएनए सांद्रता के आकलन में गलती और पीसीआर जैसे डाउनस्ट्रीम अनुप्रयोगों की संभावित विफलता का कारण है।
14. डीएनए (गोली तथा चिपके हुए दाग–धब्बे) का पूर्ण जलयोजन सुनिश्चित करने के लिए सारी रात कमरे के तापमान पर इनक्यूबेट करने के बाद भँवरदार घुमाएँ अथवा 500 से. पर यदा–कदा भँवरदार घुमाने के साथ 1 घंटे के लिए इनक्यूबेट करें।	• डीएनए का अधूरा पुनर्जल–योजन डीएनए सांद्रता के आँकलन में त्रुटि और पीसीआर जैसे डाउनस्ट्रीम अनुप्रयोगों की संभावित विफलता का कारण है।
15. पूरी तरह से पुनः जलयोजित डीएनए के भंडारण के लिए विकल्प : ए) टीई में **अनुशंसित**, एलिकोट्स में दीर्घावधि भंडारण के लिए 20 डिग्री सेल्शिसय पर, या बी) टीई में चार डिग्री सेल्शिसय पर दो महीनों तक के लिए।	• टीई में शुद्ध किये गये डीएनए को जमाने से डीएनए नीचे बैठ जाएगा। जब हिमीकृत शुद्ध किये गये डीएनए को पिघलता देखें तो रिहाइड्रेशन पर ध्यानपूर्वक निगाह डालें जैसा कि चरण 14 में चर्चा की गयी है।

डीएनएन का मात्रा–निर्धारण

फ्लूओरसेंस पद्धति द्वारा

डीएनए सैम्पल में डबल स्टैंडर्ड डीएनए (डीएसडीएनए) मात्रा निर्धारण के लिए फ्लूओरसेंट डाइज का प्रयोग करने वाली कसौटी 260 एनएम पर एब्जार्वेंस के मुकाबले ज्यादा विशि ट होती है। हम PicoGreen® या SYBR® Green I की तरह की फ्लूओरसेंट डाइज के उपयोग की अनुशंसा करते हैं क्योंकि उनमें आरएनए के संदू ाण से कम हस्तक्षेप होता है।

एसवाईबीआर ग्रीन 1 का उपयोग करने वाले सस्ते प्रोटोकॉल का वर्णन PD-PR-075 में किया गया है, एसवाईबीआर ग्रीन 1 डाई एवं माइक्रो–प्लेट रीडर1 का उपयोग करने वाला मात्रा–निर्धारण। वैकल्पिक रूप से बाजार में किटें उपलब्ध हैं जैसे कि इनविट्रोजन की Quant-iT™ PicoGreen dsDNA।

अस्से किट (श्रेणी संख्या क्यू 33130) का उपयोग किया जा सकता है। किसी भी प्रोटोकॉल के लिए हम इस बात की अनुशंसा करते हैं कि शुद्ध किये गये डीएनए को तनु बनाया जाये।

टीई घोल के साथ 1:50 और यह कि मात्रा–निर्धारण परख में 5 µL का उपयोग किया जाएगा।

अवशो ाक पद्धति के द्वारा

अगर आप अवशो ाण के द्वारा डीएनए की मात्रा निर्धारित करने का चयन करते हैं तो हमारी सिफारिश है कि आप सबसे शुद्ध सैम्पल को सबसे RNase के साथ उपचारित करें ताकि संदू ित आरएनए पच जाये और इसके बाद डीएनए के एथनाल जमाव के द्वारा आरएनए खंडों को निकाल लें।

PD-PR-040 में विस्तृत ब्योरा प्रदान किया गया है, डबल–आरएनेज पाचन2 के द्वारा आरएनए निकासी। कृपया ध्यान दें कि मौखिक सैम्पल के डीएनए में ठेठ तौर पर उससे कहीं अधिक आरएनए पाया जाता है जितना कि रक्त के नमूने में पाया जाता है। सुनिश्चित करें कि अल्कोहल में नीचे जमा बैठा डीएनए पूरी तरह से घुल गया है और इसके बाद अवशो ाण की रीडिंग लें।

रूपांतरण कारक :260 एनएम पर 1.0 का अवशो ाण शुद्ध dsDNA के लिए 50 ng/µL (50 µg/mL) के संकेंद्रण के अनुरूप है।

सुनिश्चित करें कि अवशो ाक मान स्पेक्ट्रोफोटोमीटर की रेखीय रेंज के भीतर हैं। रेखीय रेंज के बाहर पड़ने वाले नमूनों को फिर से तनु करें और फिर से मापें। और अधिक जानकारी के लिए अपने उपकरण का प्रलेखन देखें।

© 2012 डीएनए जैनोटेक इंक., ओरा यूर टैक्नॉलॉजी, इंक., की सहायक कंपनी, सर्वाधिकार सुरक्षितए

पद्धति :

1. ुद्ध किये गये आरनेस–उपचारित डीएनए के 10 μL को टीई के 90 μL के साथ मिलायें (1 ⁄ 10 विलयन)। पिपेट को ऊपर–नीचे करते हुए आराम से मिलाएँ। बुलबुलों के छँटने का इंतजार करें।
2. संदर्भ (खाली) सेल में टीई का उपयोग करें।
3. 320 एनएम, 280 एनएम और 260 एनएम पर अवशो ाण को मापें।
4. $ए_{280}$ और $ए_{260}$ मानों से 320 एनएम ($ए_{320}$) पर अवशो ाण को घटाकर ठीक किये गये $ए_{280}$ और $ए_{260}$ मानों की गणना कीजिए।
5. ng/μL में डीएनए सांद्रता = ठीक किया गया $ए_{260}$ × 10 (तनुकरण गुणक) × 50 (रूपांतरण गुणक)।
6. A_{260}/A_{280} अनुपात रू ठीक किए गए A_{260} को ठीक किए गए A_{280} से विभाजित करें।

उदाहरण

1. मापन को इस प्रकार से मान कर चलते हैं
   A_{320}= 0.025, A_{280}= 0.175 और A_{260}= 0.295
2. तनु नहीं बनाये गये सैम्पल का डीएनए सांद्रता होगा :
   $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [तनुकरण कारक] × 50 [रूपांतरण कारक]
   $= (0.295 - 0.025) \times 10 \times 50$
   $= 0.270 \times 10 \times 50$
   = 135 ng/μL or 135 μg/mL
3. ठीक किया गया A_{260}/A_{280} अनुपात होगा रू
   $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
   $= (0.296 - 0.025) \div (0.175 - 0.025)$
   $= 0.270 \div 0.150$
   $= 1.80$

संदर्भ

1 फ्लुओरेसेंस ⁄ डीनेज (एफ ⁄ डी) कसौटी (ऐसे) का उपयोग करके डीएनए मात्रा–निर्धारण। एसवाईबीआर ग्रीन 1 डाय और माइक्रो–प्लेट रीडर का उपयोग करके डीएनए मात्रा–निर्धारण द्वारा बदला (रिप्लेस किया) गया। डीएनए जेनोटेक च्क.च्ट.075 ।

2 दोहरे–आरनेज पाचप के द्वारा आरएनए की निकासी क्छ। ळमदवजमाण च्क.च्ट.040 ।

तकनीकी सहायता सोमवार से ुक्रवार (प्रातः 9:00 घंटे से सायं 17:00 घंटे ईएसटी) तक उपलब्ध हैः

- टोल–फ्री (उत्तरी अमेरिका): 1-866-813-6354, विकल्प 6
- अन्य सभी दे ाः 613-723-5757, विकल्प 6
- ई–मेलः support@dnagenotek.com

Oragene® .डीएनए तथा ORAcollect®.डीएनए संयुक्त राज्य अमेरिका में विक्रय के लिए उपलब्ध नहीं हैं।
Oragene®.डिस्कवर केवल अनुसंधान उपयोग के लिए है, नैदानिक प्रक्रिया मे उपयोग के लिए नहीं।
कुछ डीएनए जैनोटेक उत्पाद सभी भौगौलिक क्षेत्रों में उपलब्ध नहीं हो सकते हैं।
Oragene, prepIT और ORAcollect डीएनए जैनोटेक इंक., के पंजीकृत ट्रेडमार्क हैं। यहाँ समाहित अन्य सभी ब्राण्ड तथा नाम उनसे संबंधित स्वामियों की सम्पत्ति हैं।
डीएनए जेनोटेक के सभी प्रोटोकॉल्स, वेत पत्र और अनुप्रयोग टिप्पणियाँ हमारी वेबसाइट www.dnagenotek.com के सहायता खंड में उपलब्ध हैं।

© 2012 डीएनए जैनोटेक इंक., ओरा यूर टैक्नॉलॉजी, इंक., की सहायक कंपनी, सर्वाधिकार सुरक्षितण

त्वरित संदर्भ गाइड :

0.5 mL के नमूने से डीएनए के हाथ से शुद्धिकरण के लिए प्रयोगशाला प्रोटोकॉल

शुद्धिकरण के चरण
1. नमूने को डीएनए जेनोटेक किट में उलट कर तथा कुछ क्षणों तक हलके से हिला कर मिश्रित करें।
2. नमूने को जल के इनक्युबेटर में 50° सेंटीग्रेट. पर न्यूनतम 1 घंटे के लिए अथवा वायु के इनक्युबेटर में 2 घंटें के लिए इनक्यूबेट करें।
3. नमूने के 500 µL को माइक्रोसेंट्रिफ्यूज नली में स्थानान्तरित करें।
4. PT-L2P की 20 µL मात्रा मिलाएँ और कुछ क्षणों तक भँवरदार घुमाकर मिश्रित करें।
5. बर्फ पर 10 मिनट के लिए इनक्युबेट करें।
6. कमरे के तापमान (आरटी) पर 15,000 × *g* पर 5 मिनट के लिए सेंट्रिफ्यूज करें।
7. अधिकांश स्वच्छ सुपरनेटेंट को पिपेट के साथ सावधानीपूर्वक किसी ताजी माइक्रोसेंट्रिफ्यूज नली में स्थानान्तरित करें। **गोली को फेंक दें।**
8. 95 प्रतिशत से 100 प्रतिशत एथनॉल की आरटी 600 µL को स्वच्छ सुपरनेटेंट में मिलाएँ। उलट कर 10 बार हल्के से मिश्रित करें।
9. डीएनए को पूरी तरह से तलछट बनने देने के लिए नमूने को 10 मिनट के लिए आरटी पर पड़ा रहने दें।
10. ज्ञात झुकाव के साथ नली को सेंट्रिफ्यूज में रखें। आरटी पर 15,000 × *g* पर 2 मिनट के लिए सेंट्रिफ्यूज करें।
11. सुपरनेटेंट को सावधानीपूर्वक पिपेट द्वारा बाहर निकालें और उसे फेंक दें। डीएनए गोली को अव्यवस्थित होने से बचाने के लिए सावधानी रखें।
12. 250 µL 70 प्रतिशत एथनॉल मिलाएँ और 1 मिनट के लिए आरटी पर पड़ा रहने दें। **गोली को अव्यवस्थित किए बिना, एथनॉल को पूरी तरह से निकालें।**
13. टीई विलयन का 100 µL मिलाएँ और नमूने को कम से कम 5 सेकंड के लिए भँवरदार घुमाएँ।
14. आरटी पर सारी रात अथवा 50° से. पर 1 घंटे के लिए यदा–कदा भँवरदार घुमा कर इनक्युबेट करें।
15. भण्डारण : एलिकोट्स में –20° से. पर दीर्घावधि के लिए भण्डारण (संस्तुत) अथवा 4° से. पर 2 महीने तक के लिए।

© 2012 डीएनए जैनोटेक इंक., ओरा यूर टैक्नॉलॉजी, इंक., की सहायक कंपनी, सर्वाधिकार सुरक्षितए