

Pürifikasyon adımları	Notlar
6. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 15.000 × g devirde santrifüje tabi tutun.	<ul style="list-style-type: none"> Nihai DNA çözeltisinin bulanıklığının (yüksek A₃₂₀) azaltılması için daha uzun (15 dakikaya varan) bir santrifüj işlemi yararlı olabilir.
7. Şeffaf süzüntüyü bir pipetin ucuyla yeni bir mikrosantrifüj tüpüne dikkatlice aktarın. Safsızlıkları içeren pelleti atın.	<ul style="list-style-type: none"> Pellet bulanık safsızlıklar içerir. Kazara etkilenmesi durumunda, tüpün yeniden santrifüje tabi tutulması gerekir.
8. 500 µL'lik süzüntüye oda sıcaklığındaki 600 µL %95 ila %100'lük etanol çözeltisi ekleyin. 10 defa ters çevirerek nazik şekilde karıştırın.	<ul style="list-style-type: none"> Etanolla karıştırma sırasında DNA çökler. Bu durum, numunedeki DNA miktarına bağlı olarak DNA fiberleri pıhtısı olarak veya ince bir çökelti olarak görünebilir. Pıhtı görülmesi dahi DNA sonraki adımlar dikkatlice takip edilerek kazanılır.
9. DNA'nın tam olarak çökmesi için numunenin oda sıcaklığında 10 dakika kalmasını sağlayın.	<ul style="list-style-type: none"> Safsızlıklar DNA ile birlikte çökebileceğinden -20°C'de inkübasyon önerilmez.
10. Tüpü mikrosantrifüje belirli bir yönde yerleştirin. Oda sıcaklığında 2 dakika boyunca 15.000 × g devirde santrifüje tabi tutun.	<ul style="list-style-type: none"> Örneğin; her bir tüpü mikrosantrifüje kapağın menteşe bölümü rotor merkezinin aksi yönüne bakacak şekilde yerleştirebilirsiniz. Böylece santrifüj sonrası pelletin konumu belirlenebilir (kolayca görülemeyecek kadar küçük olsa dahi); menteşenin altında, tüpün ucunda bulunacaktır.
11. Süzüntüyü bir pipet ucuyla dikkatlice alın ve atın. DNA pelletinin etkilenmemesine dikkat edin.	<ul style="list-style-type: none"> Bu pellet DNA içerir. Pellet kaybı, DNA kaybına yol açar. Tüpün pellet üst duvarda olacak şekilde döndürülmesi, pipet ucunu alt duvar boyunca güvenli şekilde hareket ettirmenize ve tüm süzüntüleri toplamanıza imkan verir. Süzüntü, safsızlıklar içerebilir ve bu nedenle mümkün olduğunca tamamı temizlenmelidir. Pelletin aşırı kurutulması, DNA'nın daha zor çözünmesine neden olabilir.
12. Etanolla yıkama: 250 µL %70'lik etanol çözeltisini dikkatlice ekleyin. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletin. Pelletin etkilenmemesine dikkat ederek etanolü tamamen alın.	<ul style="list-style-type: none"> Numunedeki tüm etanolün temizlenmesi önemlidir. Etanol artıkları, test (assay) performansını etkileyebilir. DNA pelletinin etkilenmemesine dikkat edin. DNA pelleti küçük olabilir. Pelletin ayrılması durumunda, numuneyi 5 dakika boyunca 15.000 × g devirde santrifüje tabi tutun. %70'lik etanol çözeltisini temizledikten sonra, artık etanolün temizlenmesi için tüpü yüksek devirde çevirebilirsiniz.

Pürifikasyon adımları	Notlar
13. DNA pelletinin çözünmesi için 100 µL TE çözeltisi (bkz. Sayfa 1) ilave edin. En az 5 saniye boyunca vorteks yaparak karıştırın.	<ul style="list-style-type: none"> Daha yüksek bir DNA konsantrasyonu isteniyorsa, 50 µL TE kullanılmalıdır. Not: daha fazla miktarda yüksek moleküler ağırlıklı DNA'nın tamamen hidre olması (çözünmesi) yavaş olabilir. DNA'nın yetersiz hidrasyonu, DNA konsantrasyonu tahmininde hatalara ve PCR vb. gibi downstream uygulamalarda başarısızlıklara neden olabilir.
14. DNA'nın (pellet ve simir) tamamen rehidrasyonunu sağlamak için oda sıcaklığında gece boyunca inkübe ettikten sonra vorteks yapın veya 50°C'de kesikli vorteks yöntemiyle 1 saat boyunca inkübe edin.	<ul style="list-style-type: none"> DNA'nın yetersiz rehidrasyonu DNA konsantrasyonu tahmininde hatalara ve PCR vb. gibi downstream uygulamalarda olası başarısızlıklara neden olabilir.
15. Tamamen hidre edilen DNA için saklama seçenekleri: a) Uzun süreli saklama amacıyla -20°C'deki numune bölümleri için TE içerisinde saklanması önerilir veya b) TE içerisinde 4°C'de 2 aya kadar.	<ul style="list-style-type: none"> Pürifiye edilen DNA'nın TE içerisinde dondurulması, DNA'nın çökmesine neden olur. Dondurulmuş pürifiye DNA numunesi çözülürken, adım 14'te açıklandığı gibi rehidrasyona çok dikkat edin.

DNA ölçümü

Floresan yöntemiyle

Bir DNA numunesindeki çift zincirli DNA (dsDNA) miktarının belirlenmesinde floresan boyalar kullanılan testler, 260 nm'de absorbans ölçülen analizlerden daha spesifiktir. Kirlenmiş RNA'ya daha az maruziyet söz konusu olduğundan dsDNA ölçümü için PicoGreen® veya SYBR® Green I vb. gibi bir floresan boya kullanılmasını öneririz. SYBR Green I'nın kullanıldığı düşük maliyetli bir protokol, "PD-PR-075, SYBR Green I Boya ve bir mikro plakalı okuyucu kullanılarak DNA ölçümü" başlığı altında açıklanmıştır.¹ Alternatif olarak, örneğin Invitrogen'in Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Test Kiti (Kat. No. Q-33130) gibi piyasada satın kitler de kullanılabilir. Her iki protokol için de, pürifikasyona tabi tutulmuş DNA'nın TE çözeltisi ile 1:50 oranında seyreltilmesini ve ölçüm testinde 5 µL kullanılmasını öneririz.

Absorbans yöntemiyle

DNA miktarını absorbans yöntemiyle ölçmek isterseniz öncelikle kirlenmiş RNA'nın sindirilmesi için pürifiye numunenin RNase ile muamele edilmesini ve ardından RNA parçacıklarının DNA etanol çöktürme işlemiyle giderilmesini öneririz. "PD-PR-040, RNA'nın çift RNase sindirimiyle giderilmesi" başlığı altında ayrıntılı bir protokol açıklanmıştır. Lütfen, bir oral numuneden elde edilen DNA'nın tipik olarak kan numunelerinde bulunan RNA miktarına kıyasla çok daha fazla miktarda RNA içereceğine dikkat edin. Absorbans değeri okunmadan önce, alkolle çöktürülen DNA'nın tamamen çözüldüğünden emin olun.

Çevirme faktörü: 260 nm'de 1,0 değerindeki absorbans, saf dsDNA için 50 ng/µL'lik (50 µg/mL) bir konsantrasyona karşılık gelir.

Absorbans değerlerinin spektrofotometrenin doğrusal aralığı içerisinde kaldığından emin olun. Doğrusal aralığın dışında kalan numuneleri yeniden seyreltin ve yeniden ölçün. Daha fazla bilgi için cihazınızla birlikte verilen kılavuzlara bakın.

Yöntem:

1. RNase ile muamele edilen purifiye DNA'nın 10 µL'lik bölümünü 90 µL TE (1/10 seyreltme) ile seyreltin. Pipetle çekip bırakarak nazikçe karıştırın. Kabarcıkların kaybolmasını bekleyin.
2. Referans (boş) hücresinde TE kullanın.
3. Absorbans değerini 320 nm, 280 nm ve 260 nm'de ölçün.
4. 320 nm'deki (A_{320}) absorbans değerini A_{280} ve A_{260} değerlerinden çıkartarak, düzeltilmiş A_{280} ve A_{260} değerlerini hesaplayın.
5. ng/µL cinsinden DNA konsantrasyonu = düzeltilmiş $A_{260} \times 10$ (seyreltme faktörü) $\times 50$ (çevirme faktörü).
6. A_{260}/A_{280} oranı: Düzeltilmiş A_{260} değerini düzeltilmiş A_{280} değerine bölün.

Örnek

1. Ölçülen $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ ve $A_{260} = 0,295$ olduğunu varsayalım.
2. Seyreltilmemiş numunenin DNA konsantrasyonu şu şekilde hesaplanır:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [seyreltme faktörü] $\times 50$ [çevirme faktörü]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng/}\mu\text{L}$ veya $135 \text{ }\mu\text{g/mL}$
3. Düzeltilmiş A_{260}/A_{280} oranı:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,296 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

Referanslar

- 1 DNA quantification using the Fluorescence/DNase (F/D) assay. Replaced by DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader. DNA Genotek. PD-PR-075.
- 2 RNA removal by double-RNase digestion. DNA Genotek. PD-PR-040.

Pazartesi ve Cuma günleri arasında (09:00 - 17:00 EST) teknik destek alınabilir:

- Ücretsiz (Kuzey Amerika): 1.866.813.6354, seçenek 6
- Diğer tüm ülkeler: 613.723.5757, seçenek 6
- E-posta: support@dnagenotek.com

Oragene®-DNA ve ORAclect®-DNA, Amerika Birleşik Devletleri'nde satılmamaktadır.

Oragene®-DISCOVER yalnızca araştırma amaçlı kullanım içindir, teşhis prosedürlerinde kullanılmamalıdır.

Bazı DNA Genotek ürünleri bazı coğrafi bölgelerde bulunmayabilir.

*Oragene, prepliT ve ORAclect, DNA Genotek Inc. şirketinin tescilli ticari markalarıdır. Burada söz edilen diğer tüm markalar ve adlar ilgili hak sahiplerinin mülkiyetindedir.

Tüm DNA Genotek protokollerine, raporlarına ve uygulama notlarına www.dnagenotek.com web sitesindeki destek bölümünden erişilebilir.

