

**Наръчник с протокол
за ръчно пречистване
за употреба с**

prepIT™•L2P

DNagenotek™

www.dnagenotek.com

Тел.: +1.613.723.5757
support@dnagenotek.com
sales@dnagenotek.com

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

*Отлични проби
Доказана ефективност*



Съдържание

Предвидена употреба/предназначение.....	4
Стабилност при употреба.....	4
Характеристики.....	4
Материали.....	4
Предупреждения и предпазни мерки.....	4
Ограничения за употреба на продукта.....	5
Транспортиране на rrepIT•L2P.....	5
Съхранение на rrepIT•L2P (срок на годност).....	5
Изхвърляне.....	5
Поддръжка/ремонт.....	5
Обобщение на експлоатационните характеристики.....	5
Представяне на продуктите.....	5
Гаранции.....	6
Отстраняване на неизправности.....	6

Лабораторен протокол на rrepIT•L2P за ръчно пречистване на ДНК от:

проба от 500 µl.....	7
Цяла проба.....	11
Количествено определяне на ДНК.....	18


Протоколът на rrepIT™•L2P е достъпен на допълнителни езици на адрес www.dnagenotek.com


Техническата поддръжка е на разположение от понеделник до петък (от 9:00 до 17:00 ч. източно време в САЩ):

- Безплатна линия (Северна Америка): 1.866.813.6354, опция 6
- Всички останали държави: +1.613.723.5757, опция 6
- Имейл: support@dnagenotek.com

■ DNA Genotek Inc.
3000 - 500 Palladium Drive
Ottawa, ON, Canada K2V 1C2
Имейл: support@dnagenotek.com

Отговорно лице за Обединеното кралство: Emergo Consulting (UK) Limited
c/o Cr360 - UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

 Novosanis NV, Bijkhoevelaan 32c,
2110 Wijnegem, Belgium
Имейл: EUAR@novosanis.com

 Arazy Group Swiss GmbH
Bruderholzallee 53, 4059 Basel, Schweiz
Имейл: swiss.ar@arazygroup.com

Спонсор в Австралия: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street,
Sydney, NSW 2000 Australia

Предвидена употреба/предназначение

За пречистване на геномна ДНК от комплектите за събиране на слюнка Oragene™ и ORAcollect™.

Стабилност при употреба

PT-L2P-5 (5 ml) и PT-L2P-45 (45 ml) са с 30-месечна стабилност при употреба на стайна температура.

Характеристики

- Оптимизирана химия за максимално възстановяване на ДНК от орални проби, събрани с продуктите линии Oragene и ORAcollect.
- Доказано е, че осигурява постоянни резултати при ДНК с високо молекулно тегло.
- Мащабируем метод на пречистване за големи или малки обеми проби.
- Удобен работен процес с пълна техническа поддръжка от събирането до екстракцията.
- Икономически ефективен метод, който изисква минимално оборудване.

Материали

- PT-L2P-5 (5 ml) и/или PT-L2P-45 (45 ml)
- Наръчник за продукта rgerIT•L2P

Предупреждения и предпазни мерки

- Само за лабораторна употреба.
- НЕ поглъщайте течен реагент.
- НЕ използвайте, ако опаковката е повредена или уплътнението в капака на фунията е счупено или тече.
- НЕ използвайте rgerIT•L2P след изтичане на срока на годност, посочен върху бутилката с реагента.
- Измийте с вода, ако реагентът влезе в контакт с очите или кожата. НЕ поглъщайте.
- Докладвайте за всеки сериозен инцидент на DNA Genotek и на компетентния орган във Вашата страна.
- Вижте информационния лист за безопасност на материала (MSDS) за безопасно изхвърляне на неизползвания реагент.
- MSDS е достъпен на адрес www.dnagenotek.com.

Ограничения за употреба на продукта

Използвайте rgerIT•L2P само съгласно указанията в настоящия наръчник за продукта.

Транспортиране на rgerIT•L2P

rgerIT•L2P може да се транспортира при стайна температура като лабораторен реагент. Не се изисква специално боравене.

Съхранение на rgerIT•L2P (срок на годност)

Съхранявайте на стайна температура. Срокът на годност на PT-L2P-5 (5 ml) и PT-L2P-45 (45 ml) е 30 месеца, когато са добре затворени и се съхраняват при стайна температура.

Изхвърляне

Изхвърлете неизползваните, повредени или протекли комплекти в съответствие с подходящите местни, щатски и федерални разпоредби. Изхвърлете като лабораторен отпадък.

Поддръжка/ремонт

Не е приложимо. rgerIT•L2P е реагент – не се изискват поддръжка или ремонт.

Обобщение на експлоатационните характеристики

Пречистената с rgerIT•L2P геномна ДНК от комплектите за събиране на слюнка Oragene и ORAcollect осигурява ДНК с високо качество и количество, достатъчни за използване в приложения надолу по веригата, като PCR, микроанализ и секвениране от следващо поколение.

Представяне на продуктите

rgerIT•L2P се предлага в различни обеми, в зависимост от броя на необходимите препарати. Например:

Референтен номер на продукта/Каталожен номер	Обем на препарата за проби	Брой препарати
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2000

Гаранции

Пълните правила и условия за всички продукти на DNA Genotek са на адрес <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

Отстраняване на неизправности

Свържете се с техническата поддръжка на DNA Genotek на support@dnagenotek.com или се обадете на +1 (613) 723-5757, опция 6.

Лабораторен протокол на gpreIT™•L2P за ръчно пречистване на ДНК от проба от 500 µl

Следният протокол стъпка по стъпка описва как да се пречисти ДНК от аликвотна част от проба с обем 500 µl.

Включени реагенти

gpreIT•L2P (кат. № PT-L2P-5 или PT-L2P-45)

Оборудване и реагенти

- Микроцентрифуга с възможност за работа с 15 000 × g
- 1,5 ml микроепруветки от 5 ml (напр. Axugen® кат. № MCT-150-C)
- Въздушен или воден инкубатор при 50°C
- Етанол (95% до 100%) при стайна температура
- Етанол (70%) при стайна температура
- Буфер за съхранение на ДНК: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) или подобен разтвор

Процедура

Стъпки за пречистване	Бележки
1. Смесете пробата от Oragene/ORACollect чрез обръщане или леко разклащане за няколко секунди.	• Това се прави, за да се гарантира, че вискозните проби се смесват правилно.

Стъпки за пречистване	Бележки
2. Инкубирайте пробата при 50°C във воден инкубатор минимум 1 час или във въздушен инкубатор минимум 2 часа.	<ul style="list-style-type: none"> • Тази стъпка на топлинна обработка е от съществено значение, за да се гарантира, че ДНК се освобождава адекватно и че нуклеазите са инактивирани перманентно. • Тази стъпка на инкубиране може да се извърши по всяко време след събирането на пробата и преди пречистването ѝ. • Цялата проба трябва да се инкубира в оригиналната епруветка, в която е събрана, преди да се раздели на аликвотни части, за да се осигури хомогенност на пробите. • Ако е по-удобно, пробата може да се инкубира при 50°C за една нощ. • Във въздушен инкубатор е необходимо по-дълго време, тъй като температурното изравняване е по-бавно, отколкото във воден инкубатор. <p>Забележка: Използването на въздушен инкубатор може да е за предпочитане, тъй като епруветките на Oragene/ORACollect могат да плават във водна баня. Ако е наложително да се използва водна баня, уверете се, че частта от епруветката, съдържаща пробата, остава потопена във вода.</p>
3. Прехвърлете 500 µl от смесената проба в микроцентрифужна епруветка с обем 1,5 ml.	<ul style="list-style-type: none"> • Останалата част от пробата може да се съхранява при стайна температура (15°C до 25°C) или да се замрази. • Ако желаете, пробата може да се съхранява замразена в епруветката от Oragene/ORACollect при -20°C или да се прехвърли в криоепруветка за дългосрочно съхранение при -80°C.
4. Добавете 20 µl (1/25 от обема) rrepIT-L2P в микроцентрифужната епруветка и разбъркайте чрез вортексиране няколко секунди.	<ul style="list-style-type: none"> • Пробата ще стане мътна, докато примесите и инхибиторите се утаяват.
5. Инкубирайте върху лед в продължение на 10 минути.	<ul style="list-style-type: none"> • Тази стъпка може да се замести с инкубация при стайна температура, но тя ще бъде малко по-неефективна за отстраняване на примесите.

Стъпки за пречистване	Бележки
6. Центрофугирайте при стайна температура в продължение на 5 минути при 15 000 x g.	<ul style="list-style-type: none"> • По-дългият период на центрофугиране (до 15 минути) може да бъде от полза за намаляване на мътноста (висок A₃₂₀) на крайния разтвор на ДНК.
7. Внимателно прехвърлете бистрата супернатантата с пипета в нова микроцентрифужна епруветка. Изхвърлете пелетата, съдържаща примеси.	<ul style="list-style-type: none"> • Пелетата съдържа мътни примеси. При случайно смущение епруветката трябва да се центрофугира отново.
8. Добавете 600 µl етанол със стайна температура от 95% до 100%. Смесете внимателно чрез обръщане 10 пъти.	<ul style="list-style-type: none"> • По време на смесването с етанол ДНК ще се утаи. В зависимост от количеството ДНК в пробата тя може да се появи като бучка от ДНК влакна или като фина утайка. • Дори и да не се види бучка, ДНК ще бъде възстановена чрез внимателно спазване на следващите стъпки.
9. Оставете пробата да престои на стайна температура в продължение на 10 минути, за да може ДНК да се утаи напълно.	<ul style="list-style-type: none"> • Не се препоръчва инкубиране при -20°C, тъй като примесите може да се утаят заедно с ДНК.
10. Поставете епруветката в микроцентрифужата, като частта с пантата на капачката е насочена противоположно на центъра на ротора. След центрофугиране може да се определи местоположението на пелетата (дори да е твърде малка, за да се види); тя ще бъде в горната част на епруветката под пантата.	<ul style="list-style-type: none"> • Например поставете всяка епруветка в микроцентрифужата, като частта с пантата на капачката е насочена противоположно на центъра на ротора. След центрофугиране може да се определи местоположението на пелетата (дори да е твърде малка, за да се види); тя ще бъде в горната част на епруветката под пантата.
11. Внимателно отстранете супернатантата с пипета и я изхвърлете. Внимавайте да не нарушите състоянието на пелетата с ДНК.	<ul style="list-style-type: none"> • Тази пелета съдържа ДНК. Загубата на пелетата ще доведе до загуба на ДНК. • Завъртането на епруветката така, че пелетата да е на горната стена, ще Ви позволи безопасно да преместите пипетата по продължение на долната стена и да отстраните цялото количество супернатанта. • Супернатантата може да съдържа примеси и трябва да се отстрани възможно най-цялостно.

Стъпки за пречистване	Бележки
12. Промиване с етанол: Внимателно добавете 250 µl 70% етанол. Оставете да престои на стайна температура в продължение на 1 минута. Отстранете напълно етанола, без да нарушавате състоянието на пелетата.	<ul style="list-style-type: none"> Важно е целият етанол да бъде отстранен от пробата. Оставянето на етанол може да повлияе на ефективността на анализа. След отстраняване на 70% етанол епруветката може да се завърти на импулси, за да се отстрани остатъчният етанол. Внимавайте да не нарушите състоянието на пелетата с ДНК; тя може да е малка или невидима. Ако пелетата се отдели, центрофугирайте пробата в продължение на 5 минути при 15 000 × g. Прекаленото изсушаване на пелетата може да затрудни разтварянето на ДНК.
13. Добавете 100 µl TE разтвор (вж. страница 5), за да разтворите пелетата с ДНК. Вортексирайте поне 5 секунди.	<ul style="list-style-type: none"> Ако се желае по-висока концентрация на ДНК, трябва да се използва 50 µl TE.
14. За да се осигури пълна рехидратация на ДНК, инкубирайте при стайна температура за една нощ, последвано от вортексиране, или при 50°C за 1 час с периодично вортексиране.	<ul style="list-style-type: none"> Големите количества ДНК с високо молекулно тегло може да се рехидратират (разтворят) докрай бавно. Непълното рехидриране на ДНК причинява неточност в оценката на концентрацията на ДНК и потенциален неуспех на приложенията надолу по веригата, като например PCR.
15. Възможности за съхранение на напълно рехидрираната ДНК: а) В ТЕ при -20°C за дългосрочно съхранение. Ако желаете, разделете на аликвотни части. б) В ТЕ при 4°C за срок до 2 месеца.	

Лабораторен протокол на prepIT•L2P за ръчно пречистване на ДНК от цяла проба

Забележка: Този протокол изисква използването на центрофуга (ротор или с фиксиран ъгъл, или с въртяща се кофа), която може да генерира поне 3500 × g, за да се получат оптимални резултати.

Следният протокол описва стъпка по стъпка как да се пречисти ДНК от цяла проба (общ обем на пробата 1 ml - 4 ml). Посочените обеми трябва да се коригират за действителния събран обем.

Включени реагенти

prepIT•L2P (кат. № PT-L2P-5 или PT-L2P-45)

Оборудване и реагенти

- Центрофуга, която побира 15 ml епруветки и може да генерира поне 3500 × g (вж. Таблица 2)
- Конични полипропиленови епруветки от 15 ml (напр. BD Falcon® кат. № 352196)
- Микроцентрофуга с възможност за работа с 15 000 × g (по избор)
- 1,5 ml микроепруветки от 5 ml (напр. Аxygen® кат. № MCT-150-C)
- Въздушен или воден инкубатор при 50°C
- Етанол (95% до 100%) при стайна температура
- Етанол (70%) при стайна температура
- Буфер за съхранение на ДНК: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) или подобен разтвор

По избор: Проверка преди пречистване (приложимо само за проби от Oragene; не се изисква за проби от ORAcollect)

Претеглете пробата, за да оцените количеството слюнка, предоставено от донора (вж. Таблица 1). Количеството събрана слюнка е пряко пропорционално на количеството възстановена ДНК. Например, ако донорът е предоставил по-малко от 2 ml слюнка, трябва да очаквате, че от тази проба ще получите по-нисък общ добив.

Тегло на комплекта (без проба)

След като пробата пристигне в лабораторията, препоръчваме да я претеглите, за да прецените дали донорът е предоставил необходимото количество слюнка. Можете да очаквате известни разлики при различните донори. Предоставили сме средното тегло на празен комплект (Таблица 1). За да изчислите количеството на събраната проба (при допускане на 1 g/ml), направете следното изчисление:

Тегло на комплекта, съдържащ проба – Тегло на комплекта без проба

Количество на събраната проба

Таблица 1


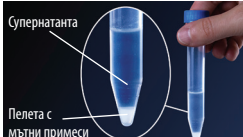
Продукт №	Тегло на комплекта без проба
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

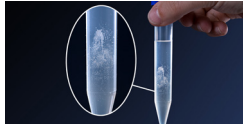

Процедура

Стъпки за пречистване	Бележки
1. Смесете пробата от Oragene/ORAcollect чрез обръщане или леко разклащане за няколко секунди.	<ul style="list-style-type: none">• Това се прави, за да се гарантира, че вискозните проби се смесват правилно.
2. Инкубирайте пробата при 50°C във воден инкубатор минимум 1 час или във въздушен инкубатор минимум 2 часа.	<ul style="list-style-type: none">• Тази стъпка на топлинна обработка е от съществено значение за постигане на максимален добив на ДНК и гарантиране на перманентно инактивиране на нуклеазите.• Ако е по-удобно, пробата може да се инкубира при 50°C за една нощ.• Тази стъпка на инкубиране може да се извърши по всяко време след събирането на пробата и преди пречистването на ДНК.• Във въздушен инкубатор е необходимо по-дълго време, тъй като температурното изравняване е по-бавно, отколкото във воден инкубатор. <p>Забележка: Използването на въздушен инкубатор може да е за предпочитане, тъй като епруветките на Oragene/ORAcollect могат да плават във водна баня. Ако е наложително да се използва водна баня, уверете се, че частта от епруветката, съдържаща пробата, остава потопена във вода.</p>
3. Прехвърлете цялата проба в 15 ml центрофужна епруветка (Фигура 1). Отбележете обема на пробата.	<ul style="list-style-type: none">• Прехвърлянето може да се извърши или чрез изливане, или чрез пипетиране със стъклена или пластмасова пипета.



Фигура 1: Преди да пристъпите към стъпка 4 се уверете, че цялата проба е инкубирана и прехвърлена в нова 15 ml центрофужна епруветка, както е показано.

Стъпки за пречистване	Бележки
<p>4. Добавете 1/25 от обема на rpreIT-L2P и смесете чрез вортексиране в продължение на няколко секунди (Фигура 2).</p>  <p>Фигура 2: След като добавите RT-L2P и инкубирате върху лед в продължение на 10 минути, пробата вече няма да изглежда бистра, а по-скоро мътна.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Например към проба от 4 ml добавете 160 µl rpreIT-L2P. • Пробата ще стане мътна, докато примесите и инхибиторите се утаяват.
<p>5. Инкубирайте върху лед в продължение на 10 минути.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Тази стъпка може да се замени с инкубация при стайна температура, но тя ще бъде по-неефективна за отстраняване на примесите.
<p>6. Центрофугирайте при стайна температура в продължение на 10 минути с възможно най-висока скорост. Минимум 3500 × g.</p>  <p>Фигура 3: След центрофугиране в основата на епруветката се натрупва мътна материя. Супернатантата трябва да е видимо бистра.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • По-голямата центробежна сила свежда до минимум количеството на мътния материал, който ще се пренесе в пречистената ДНК (Фигура 3). Преди да пристъпите към работа, трябва да проверите при производителя на епруветките дали 15 ml центрофужни епруветки могат да издържат на центробежната сила. • По-дългият период на центрофугиране (до 20 минути) може да бъде от полза за намаляване на мътноста (висока A₃₂₀) на крайния разтвор на ДНК.
<p>7. Внимателно прехвърлете бистрата супернатанта с пипета в нова 15 ml центрофужна епруветка. Изхвърлете пелетата.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Оставете малък обем от супернатантата, за да не нарушите състоянието на пелетата. • Пелетата съдържа мътни примеси. При случайно смущение епруветката трябва да се центрофугира отново.

Стъпки за пречистване	Бележки
<p>8. Добавете към бистрата супернатанта количество 95% до 100% етанол със стайна температура, равно на 1,2 пъти по обема ѝ. Смесете внимателно чрез обръщане 10 пъти.</p>  <p>Фигура 4: След добавянето на етанол ДНК ще се утаи, което може да доведе до видими бучки от влакна.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • По време на смесването с етанол ДНК ще се утаи. • В зависимост от количеството ДНК в пробата утаената ДНК може да изглежда като бучка от ДНК влакна (Фигура 4) или като фина утайка.
<p>9. Оставете пробата да престои на стайна температура в продължение на 10 минути, за да може ДНК да се утаи напълно.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Не се препоръчва инкубиране при -20°C, тъй като примесите може да се утаят заедно с ДНК.
<p>10. Центрофугирайте при стайна температура в продължение на 10 минути с възможно най-висока скорост. Минимум 3500 × g.</p>	
<p>11. Внимателно отстранете супернатантата със стъклена или пластмасова пипета и я изхвърлете. Внимавайте да не нарушите състоянието на пелетата с ДНК.</p>  <p>Фигура 5: Използването на пипета за внимателно одраскване на вътрешността на епруветката може да разкрие наличието на намазка с ДНК.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Супернатантата може да съдържа примеси и трябва да се отстрани възможно най-цялостно. • Утаената ДНК ще се намира под формата на пелета на дъното на епруветката или евентуално като намазка отстрани на епруветката (Фигура 5). • Намазката с ДНК може да се намира от страната на епруветката, обръната противоположно на центъра на центрофугата. • Намазката може да бъде открита с помощта на теста „одраскване“. Можете да проверите за наличие вътрешността на епруветката с пипета. Възможно е да има видима намазка, както е показано на Фигура 5.

Стъпки за пречистване	Бележки
<p>12. Промиване с етанол: Внимателно добавете 1 ml 70% етанол в епруветката, без да нарушавате състоянието на намазката или пелетата. Оставете го да престои на стайна температура в продължение на 1 минута. Внимателно завъртете и отстранете етанола напълно, без да нарушавате състоянието на пелетата и намазката.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Важно е целият етанол да бъде отстранен от пробата. Оставянето на етанол може да повлияе на ефективността на анализа. Внимавайте да не нарушите състоянието на пелетата или намазката с ДНК. Може да се извърши кратко центрофугиране (по-малко от 1 минута), за да се улесни пълното отстраняване на супернатантата. Ако след етапа на промиване с етанол пелетата се отдели, центрофугирайте пробата в продължение на 5 минути при възможно най-висока скорост. Минимум 3500 x g.
<p>13. За проби от Oragene рехидрирайте ДНК, като добавите 0,2 ml-1 ml ТЕ разтвор и вортексирате пробата 30 секунди.</p> <p>За проби от ORAcollect рехидрирайте ДНК, като добавите 0,2 ml ТЕ разтвор и вортексирате пробата 30 секунди.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Ако се желае по-висока концентрация на ДНК, обемът на ТЕ може да се намали. Трябва да се използват минимум 200 µl ТЕ разтвор. Прекомерното изсушаване на пелетата (> 10 минути) и използването на по-малко от 500 µl ТЕ разтвор може да затрудни рехидратирането (разтварянето) на ДНК и да намали добива или да затрудни количественото определяне. Утаената ДНК ще се намира под формата на пелета на дъното на епруветката или евентуално като намазка от страни на епруветката. За да се осигури максимално възстановяване на ДНК, пробата трябва да се разбърка чрез вортексирание след добавянето на разтворителя за ДНК (ТЕ разтвор). Вортексирането ще гарантира, че намазката с ДНК от страни на епруветката ще бъде възстановена (Фигура 6). Вортексирането няма да разкъса ДНК.



Фигура 6: Вортексирането на пробата 30 секунди ще Ви позволи да възстановите ДНК от намазката от страни на епруветката. ДНК ще остане с високо молекулно тегло.

Стъпки за пречистване	Бележки
<p>14. За да се осигури пълна рехидратация на ДНК, инкубирайте при стайна температура за една нощ, последвано от вортексирание, или при 50°C за 1 час с периодично вортексирание.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Непълното рехидратиране на ДНК причинява неточност в оценката на концентрацията на ДНК и потенциален неуспех на приложението надолу по веригата, като например PCR.
<p>15. Прехвърлете рехидратираната ДНК в 1,5 ml микроцентрифужна епруветка за съхранение.</p> <p>Допълнителна стъпка:</p> <ol style="list-style-type: none"> Центрофугирайте рехидратираната ДНК на стайна температура 15 минути при 15000 x g. Прехвърлете супернатантата в нова 1,5 ml микроцентрифужна епруветка, без да нарушавате състоянието на пелетата. 	<p>Обърнете внимание, че пелетата съдържа неразтворим, мътен материал.</p> <ul style="list-style-type: none"> За да се постигне максимално възстановяване на ДНК, преди да се извърши тази стъпка на центрофугиране, се уверете, че ДНК е напълно рехидрирана (стъпка 14). Този етап на центрофугиране гарантира отстраняването на всякакви останали мътни материали от ДНК пробата. Трябва да се внимава да не се наруши състоянието на пелетата при прехвърляне на бистрата супернатанта в нова епруветка.
<p>16. Възможности за съхранение на напълно рехидратираната ДНК:</p> <ol style="list-style-type: none"> В ТЕ при -20°C за дългосрочно съхранение. Ако желаете, разделете на аликвотни части. В ТЕ при 4°C за срок до 2 месеца. 	<ul style="list-style-type: none"> Замразяването на пречистена ДНК в ТЕ може да доведе до утаяване на ДНК. Когато размразявате замразена пречистена ДНК, обърнете специално внимание на рехидратирането, както е описано в стъпка 14.

Количествено определяне на ДНК

Чрез флуоресцентен метод

Анализите, при които се използват флуоресцентни багира, са по-специфични от абсорбцията при 260 nm за количествено определяне на количеството двойноверижна ДНК (dsDNA) в ДНК проба. Предлагаме да се използват налични в търговската мрежа комплекти, като Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) или QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Може да се наложи ДНК да се разрези до 1:50 с ТЕ, преди да се използва в анализа за количествено определяне.

По метода на абсорбцията

Ако решите да определяте количествено ДНК чрез абсорбция, препоръчваме Ви първо да обработите пречистената проба с рибонуклеаза, за да разградите замърсяващата РНК, и след това да отстраните фрагментите РНК чрез утаяване на ДНК с етанол. Подробен протокол е описан в PD-PR-040, *Отстраняване на РНК чрез двойно разграждане с рибонуклеаза*.¹ Моля, обърнете внимание, че ДНК от орална проба обикновено съдържа значително повече РНК, отколкото в кръвните проби. Уверете се, че утаената в алкохол ДНК е напълно разтворена, преди да отчетете абсорбцията.

Коефициент на преобразуване: Абсорбция от 1,0 при 260 nm съответства на концентрация от 50 ng/µl (50 µg/ml) за чиста двойноверижна ДНК.

Уверете се, че стойностите на абсорбцията са в линейния диапазон на спектрофотометъра. Разрежете и измерете отново пробите, които попадат извън линейния диапазон. За повече информация вижте документацията на Вашия инструмент.

Препратки

- ¹ Отстраняване на РНК чрез двойно разграждане с рибонуклеаза. PD-PR-040. DNA Genotek.

Метод











1. Разрежете аликвотна част от 10 µl от пречистената ДНК, третирана с рибонуклеаза, с 90 µl ТЕ (разреждане 1/10). Разбъркайте с пипета чрез внимателни движения нагоре-надолу. Изчакайте мехурчетата да изчезнат.
2. Използвайте ТЕ в референтната (празна) клетка.
3. Измерете абсорбцията при 320 nm, 280 nm и 260 nm.
4. Изчислете коригираните стойности A_{280} и A_{260} , като извадите абсорбцията при 320 nm (A_{320}) от стойностите A_{280} и A_{260} .
5. Концентрация на ДНК в ng/µl = коригирана $A_{260} \times 10$ (коефициент на разреждане) $\times 50$ (коефициент на преобразуване).
6. Съотношение на A_{260}/A_{280} : Разделете коригираната A_{260} на коригираната A_{280} .

Пример

1. Да приемем, че измерените стойности са $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ и $A_{260} = 0,295$
2. Концентрацията на ДНК в неразредената проба ще бъде:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [коефициент на разреждане] $\times 50$ [коефициент на преобразуване]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng/}\mu\text{l}$ или $135 \text{ }\mu\text{g/ml}$
3. Кorigираното съотношение A_{260}/A_{280} ще бъде:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

Oragene•DNA и ORAcollect•DNA не са налични за продажба в Съединените щати. Oragene•DISCOVER е предназначен само за научноизследователска употреба, а не за използване в диагностични процедури. Някои продукти на DNA Genotek може да не са налични във всички географски региони. Oragene, prepIT, ORAcollect и DNA Genotek са търговски марки на DNA Genotek Inc. Всички други марки и имена, съдържащи се в този документ, са собственост на съответните им притежатели. Всички протоколи на DNA Genotek, бели книги и бележки за приложение са достъпни в раздела за поддръжка на нашия уебсайт на адрес www.dnagenotek.com.

Легенда на етикета:

	Медицинско изделие за инвитро диагностика
	Каталожен номер
	Маркировка CE
	Производител
	Консултирайте се с листовката в опаковката
	Европейски упълномощен представител
	Швейцарски упълномощен представител
	Номер на партидата
	Уникален идентификатор на устройството
	Стабилност при употреба
15°C / 30°C 59°F / 86°F	Инструкции за съхранение

Патент (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-28 (BG - Bulgarian) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., дъщерно дружество на OraSure Technologies, Inc., всички права запазени.

DNAGENOTEK™
www.dnagenotek.com