

**Podręcznik dotyczący
protokołu ręcznego
oczyszczania
do użytku z
prepIT™•L2P**

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com

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

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

*Doskonałe próbki
Sprawdzona wydajność*



Spis treści

Przeznaczenie	4
Stabilność podczas użytkowania	4
Właściwości	4
Materiały	4
Ostrzeżenia i środki ostrożności	4
Ograniczenia dotyczące użytkowania produktu	5
Przevożenie prepIT-L2P	5
Przechowywanie prepIT-L2P (okres ważności)	5
Utylizacja	5
Konserwacja/naprawy	5
Podsumowanie charakterystyki działania	5
Prezentacje produktów	5
Gwarancje	6
Rozwiązywanie problemów	6
Protokół laboratoryjny prepIT-L2P dotyczący ręcznego oczyszczania DNA z:	
500 µl próbki	7
Cała próbka	11
Oznaczenie ilościowe DNA	18


Protokół prepIT™-L2P jest dostępny w dodatkowych językach pod adresem www.dnagenotek.com


Pomoc techniczna jest dostępna od poniedziałku do piątku (od 9:00 do 17:00 czasu wschodniego):

- Bezpłatny numer (Ameryka Północna): 1.866.813.6354, opcja 6
- Inne kraje: +1.613.723.5757, opcja 6
- Email: support@dnagenotek.com

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

Osoba odpowiedzialna w Wielkiej Brytanii: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

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

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

Sponsor australijski: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000 Australia

Przeznaczenie:

Do oczyszczania genomowego DNA z zestawów do pobierania śliny Oragene™ i ORAcollect™.

Stabilność podczas użytkowania

PT-L2P-5 (5 ml) i PT-L2P-45 (45 ml) mają 30-miesięczną stabilność w temperaturze pokojowej.

Właściwości

- Zoptymalizowana substancja chemiczna dla maksymalnego odzysku DNA z próbek pobranych z jamy ustnej za pomocą linii produktów Oragene i ORAcollect.
- Udowodniono, że zapewnia spójne wyniki dla DNA o wysokiej masie cząsteczkowej.
- Skalowalna metoda oczyszczania dużych lub małych objętości próbek.
- Wygodny przepływ pracy z pełnym wsparciem technicznym od pobrania przez ekstrakcję.
- Ekonomiczna metoda wymagająca minimalnej ilości sprzętu.

Materiały

- PT-L2P-5 (5 ml) i/lub PT-L2P-45 (45 ml)
- Podręcznik produktu prepIT-L2P

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Wyłącznie do użytku laboratoryjnego.
- NIE połykać płynnego odczynnika.
- NIE używać, jeśli opakowanie jest uszkodzone lub uszczelka w pokrywie lejka jest uszkodzona lub nieszczelna.
- NIE używać prepIT-L2P po upływie daty ważności podanej na butelce odczynnika.
- W przypadku kontaktu odczynnika z oczami lub skórą przemyć wodą. NIE połykać.
- Zgłaszać wszelkie poważne zdarzenia do DNA Genotek oraz do właściwego organu w Twoim kraju.
- Informacje na temat bezpiecznej utylizacji niewykorzystanego odczynnika znajdują się w karcie charakterystyki substancji niebezpiecznej (MSDS).
- Karta MSDS jest dostępna pod adresem www.dnagenotek.com

Ograniczenia dotyczące użytkowania produktu

Preparat prepIT-L2P należy stosować wyłącznie zgodnie z zaleceniami zawartymi w niniejszym podręczniku produktu.

Przewożenie prepIT-L2P

prepIT-L2P może być przewożony w temperaturze otoczenia jako odczynnik laboratoryjny. Nie jest wymagana żadna specjalna obsługa.

Przechowywanie prepIT-L2P (okres ważności)

Przechowywać w temperaturze pokojowej. Okres trwałości dla PT-L2P-5 (5 ml) i PT-L2P-45 (45 ml) wynosi 30 miesięcy, gdy są prawidłowo zamknięte i przechowywane w temperaturze pokojowej.

Utylizacja

Niewykorzystane, uszkodzone lub nieszczelne zestawy należy utylizować zgodnie z odpowiednimi przepisami lokalnymi, stanowymi i federalnymi. Wyrzucić jako odpady laboratoryjne.

Konserwacja/naprawa

Nie dotyczy. prepIT-L2P jest odczynnikiem — nie wymaga konserwacji ani napraw.

Podsumowanie charakterystyki działania

Oczyszczone genomowe DNA prepIT-L2P z zestawów do pobierania śliny Oragene i ORAcollect zapewnia wysoką jakość i ilość DNA wystarczającą do wykorzystania w dalszych zastosowaniach, takich jak PCR, mikromacierze i sekwencjonowanie nowej generacji.

Prezentacje produktów

prepIT-L2P jest dostępny w wielu objętościach, w zależności od liczby wymaganych preparatów. Na przykład:

Numer referencyjny/ katalogowy produktu	Objętość preparatów próbki	Liczba preparatów
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2000

Gwarancje

Pełny regulamin dla wszystkich produktów DNA Genetek znajduje się na stronie <http://www.dnagenetek.com/ROW/terms/index.html>.

Rozwiązywanie problemów

Skontaktować się z pomocą techniczną DNA Genetek pod adresem support@dnagenetek.com lub zadzwoń pod numer +1 (613) 723-5757, opcja 6.

Protokół laboratoryjny prepIT-L2P™ dotyczący ręcznego oczyszczania DNA z 500 µl próbki

Poniższy protokół opisuje krok po kroku sposób oczyszczania DNA z 500 µl porcji próbki.

Odczynniki w zestawie

prepIT-L2P (nr kat. PT-L2P-5 lub PT-L2P-45)

Sprzęt i odczynniki

- Mikrowirówka zdolna do pracy z prędkością $15\ 000 \times g$
- Mikroprobówki o pojemności 1,5 ml (np. Axygen® nr kat. MCT-150-C)
- Inkubator powietrzny lub wodny o temperaturze 50°C
- Etanol (95% do 100%) w temperaturze pokojowej
- Etanol (70%) w temperaturze pokojowej
- Bufor do przechowywania DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) lub podobny roztwór

Procedura

Etapy oczyszczania	Notatki
1. Wymieszać próbkę Oragene/ORACollect, odwracając lub delikatnie wstrząsając przez kilka sekund.	• Ma to na celu zapewnienie prawidłowego wymieszania lepkich próbek.

Etapy oczyszczania	Notatki
2. Inkubować próbkę w temperaturze 50°C w inkubatorze wodnym przez co najmniej 1 godzinę lub w inkubatorze powietrznym przez co najmniej 2 godziny.	<ul style="list-style-type: none"> Ten etap obróbki cieplnej jest niezbędny, aby zapewnić odpowiednie uwolnienie DNA i trwałą inaktywację nukleaz. Ten etap inkubacji można przeprowadzić w dowolnym momencie po pobraniu próbki i przed jej oczyszczeniem. Cała próbka musi być inkubowana w oryginalnej probówce przed podzieleniem na porcje, aby zapewnić jednorodność próbek. Próbkę można inkubować w temperaturze 50°C przez noc, jeśli jest to wygodniejsze. W inkubatorze powietrznym wymagany jest dłuższy czas, ponieważ wyrównanie temperatury jest wolniejsze niż w inkubatorze wodnym. <p>Uwaga: Użycie inkubatora powietrznego może być lepszą opcją, ponieważ próbki Oragene/ORACollect mogą pływać w kąpieli wodnej. Jeśli konieczne jest użycie kąpieli wodnej, upewnić się, że część próbki zawierająca próbkę będzie zanurzona w wodzie.</p>
3. Przenieść 500 µl wymieszanej próbki do próbki mikrowirówki o pojemności 1,5 ml.	<ul style="list-style-type: none"> Pozostała część próbki może być przechowywana w temperaturze pokojowej (od 15°C do 25°C) lub zamrożona. W razie potrzeby próbkę można przechowywać zamrożoną w probówce Oragene/ORACollect w temperaturze -20°C lub przenieść do krioprobówki w celu długoterminowego przechowywania w temperaturze -80°C.
4. Dodać 20 µl (1/25 objętości) „prepiT-L2P” do próbki do mikrowirówki i mieszać przez wortekosowanie przez kilka sekund.	<ul style="list-style-type: none"> Próbka stanie się mętna, ponieważ zanieczyszczenia i inhibitory zostaną wytrącone.
5. Inkubować na lodzie przez 10 minut.	<ul style="list-style-type: none"> Można zastąpić inkubację w temperaturze pokojowej, ale będzie ona nieco mniej skuteczna w usuwaniu zanieczyszczeń.

Etapy oczyszczania	Notatki
6. Wirować w temperaturze pokojowej przez 5 minut z prędkością 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> Dłuższy okres wirowania (do 15 minut) może być korzystny w zmniejszaniu zmętnienia (wysokie A320₃₂₀) końcowego roztworu DNA.
7. Ostrożnie przenieść klarowny supernatant za pomocą końcówki pipety do świeżej próbki mikrowirówki. Odrzucić osad zawierający zanieczyszczenia.	<ul style="list-style-type: none"> Osad zawiera mętne zanieczyszczenia. Jeśli zostanie przypadkowo naruszony, próbkę należy ponownie odwirować.
8. Dodać 600 µl etanolu w temperaturze pokojowej o stężeniu 95% do 100%. Delikatnie wymieszać, odwracając 10 razy.	<ul style="list-style-type: none"> Podczas mieszania z etanolem, DNA zostanie wytrącone. Może to wyglądać jako skrzep włókien DNA lub jako drobny osad, w zależności od ilości DNA w próbce. Nawet jeśli nie widać skrzepu, DNA można odzyskać, postępując ostrożnie zgodnie z kolejnymi krokami.
9. Pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej przez 10 minut, aby umożliwić pełne wytrącenie DNA.	<ul style="list-style-type: none"> Nie zaleca się inkubacji w temperaturze -20°C ponieważ zanieczyszczenia mogą ulec wytrąceniu wraz z DNA.
10. Umieścić próbkę w mikrowirówce w znanej orientacji. Wirować w temperaturze pokojowej przez 2 minuty z prędkością 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> Na przykład umieść każdą próbkę w mikrowirówce, tak aby zawias zakrętki był skierowany od środka rotora. Po wirowaniu będzie można zauważyć położenie osadu (mimo tego, że jego ilość jest zbyt mała, aby był widoczny); będzie on znajdował się na końcu próbki poniżej zawiasu.
11. Ostrożnie usunąć supernatant za pomocą końcówki pipetą i wyrzucić. Zachować ostrożność aby nie naruszyć osadu DNA.	<ul style="list-style-type: none"> Osad ten zawiera DNA. Utrata osadu spowoduje utratę DNA. Obracanie próbki tak, że osad znajduje się na górnej ściance, pozwoli bezpiecznie przesunąć końcówkę pipety wzdłuż dolnej ścianki i usunąć supernatant. Supernatant może zawierać zanieczyszczenia i powinien zostać usunięty najdokładniej jak to możliwe.

Etapy oczyszczania	Notatki
<p>12. Płukanie etanolem: Ostrożnie dodać 250 µl 70% etanolu. Odstawić na 1 minutę w temperaturze pokojowej. Całkowicie usunąć etanol nie naruszając osadu.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ważne jest, aby usunąć cały etanol z próbki. Pozostałości etanolu mogą wpływać na wydajność testu. • Po usunięciu 70% etanolu próbówka może wirować impulsowo, co umożliwi usunięcie pozostałości etanolu. • Należy uważać, aby nie naruszyć osadu DNA; osad może być mały lub niewidoczny. • Jeśli osad się oddzieli, wirować próbkę przez 5 minut z prędkością 15 000 × g. • Nadmierne wysuszenie osadu może utrudnić rozpuszczenie DNA.
<p>13. Dodać 100 µl roztworu TE (patrz strona 5) w celu rozpuszczenia osadu. Worteksować przez co najmniej 5 sekund.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Jeśli pożądane jest wyższe stężenie DNA, należy użyć 50 µl TE.
<p>14. Aby zapewnić pełną rehydratację DNA, inkubować w temperaturze pokojowej przez noc worteksując lub w temperaturze 50°C przez 1 godzinę worteksując od czasu do czasu.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Duże ilości DNA o wysokiej masie cząsteczkowej mogą powoli ulec pełnej rehydratacji (rozpuszczeniu). • Niepełna rehydratacja DNA jest przyczyną niedokładności w szacowaniu stężenia DNA i potencjalnego niepowodzenia dalszych zastosowań, takich jak PCR.
<p>15. Opcje przechowywania w pełni zrehydratowanego DNA: a) W TE w temperaturze -20°C do długotrwałego przechowywania. Podzielić na porcje, jeśli jest taka potrzeba. b) W TE w temperaturze 4°C do maksymalnie dwóch miesięcy.</p>	

Protokół laboratoryjny prepIT-L2P dotyczący ręcznego oczyszczania DNA z całej próbki:

Uwaga: Protokół ten wymaga użycia wirówki (rotor o stałym kącie nachylenia lub z wahadłowym koszem) zdolnej do generowania co najmniej 3500 × g w celu uzyskania optymalnych wyników.

Poniższy protokół krok po kroku opisuje sposób oczyszczania DNA z całej próbki (1 ml-4 ml całkowitej objętości próbki). Pokazane objętości powinny być skorygowane o rzeczywistą zebraną objętość.

Odczynniki w zestawie

prepIT-L2P (nr kat. PT-L2P-5 lub PT-L2P-45)

Sprzęt i odczynniki

- Wirówka mieszcząca próbówki o pojemności 15 ml i zdolna do wytworzenia co najmniej 3500 × g (patrz Tabela 2)
- Stożkowe próbówki polipropylenowe o pojemności 15 ml (np. BD Falcon® nr kat. 352196)
- Mikrowirówka zdolna do pracy z prędkością 15 000 × g (optionalnie)
- Mikropróbówki o pojemności 1,5 ml (np. Axygen® nr kat. MCT-150-C)
- Inkubator powietrzny lub wodny o temperaturze 50°C
- Etanol (95% do 100%) w temperaturze pokojowej
- Etanol (70%) w temperaturze pokojowej
- Bufor do przechowywania DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) lub podobny roztwór

Opcjonalnie: kontrola przed oczyszczeniem (dotyczy tylko próbek Oragene; nie jest wymagana dla próbek ORAcollect)

Zważyć próbkę, aby oszacować ilość śliny dostarczonej przez dawcę (patrz Tabela 1). Ilość pobranej śliny jest wprost proporcjonalna do ilości odzyskanego DNA. Na przykład, jeśli dawca dostarczył mniej niż 2 ml śliny, należy spodziewać się niższej całkowitej wydajności takiej próbki.

Waga zestawu (bez próbki)

Po dostarczeniu próbki do laboratorium sugerujemy zważenie próbki w celu oszacowania czy dawca dostarczył odpowiednią ilość śliny. Można spodziewać się różnic między dawkami dostarczonymi przez dawców. Średnia waga pustego zestawu jest podana (Tabela 1). Aby oszacować ilość pobranej próbki (przy założeniu 1 g/ml), wykonać następujące obliczenia:

Waga zestawu zawierającego próbkę – Waga zestawu bez próbki

Ilość pobranej próbki


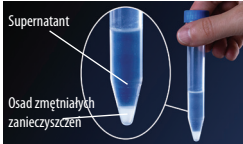
Tabela 1	
Nr produktu	Waga zestawu bez próbki
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

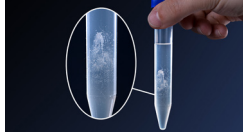
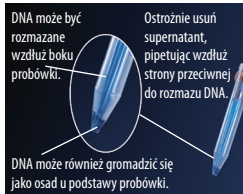
Procedura


Etapy oczyszczenia	Notatki
1. Wymieszać próbkę Oragene/ORAcollect, odwracając lub delikatnie wstrząsając przez kilka sekund.	<ul style="list-style-type: none">Ma to na celu zapewnienie prawidłowego wymieszania lepkich próbek.
2. Inkubować próbkę w temperaturze 50°C w inkubatorze wodnym przez co najmniej 1 godzinę lub w inkubatorze powietrznym przez co najmniej 2 godziny.	<ul style="list-style-type: none">Ten etap obróbki cieplnej jest niezbędny, aby zapewnić odpowiednie uwolnienie DNA i trwałą inaktywację nukleaz.Próbkę można inkubować w temperaturze 50°C przez noc, jeśli jest to wygodniejsze.Ten etap inkubacji można przeprowadzić w dowolnym momencie po pobraniu próbki i przed oczyszczeniem DNA.W inkubatorze powietrznym wymagany jest dłuższy czas, ponieważ wyrównanie temperatury jest wolniejsze niż w inkubatorze wodnym. <p>Uwaga: Użycie inkubatora powietrznego może być lepszą opcją, ponieważ próbki Oragene/ORAcollect mogą pływać w kąpeli wodnej. Jeśli konieczne jest użycie kąpeli wodnej, upewnić się, że część próbki zawierająca próbkę będzie zanurzona w wodzie.</p>
3. Przenieść całą próbkę do 15 ml próbki wirówkowej (ilustracja 1). Zanotować objętość próbki.	<ul style="list-style-type: none">Przenoszenie można przeprowadzić przez przelewanie lub pipetowanie za pomocą szklanej lub plastikowej pipetą.



Ilustracja 1: Przed przejściem do kroku 4, upewnić się, że cała próbka została inkubowana i przeniesiona do świeżej 15 ml próbki wirówkowej, jak pokazano na ilustracji.

Etapy oczyszczania	Notatki
<p>4. Dodać 1/25 objętości prepiT-L2P i wymieszać, worteksując przez kilka sekund (ilustracja 2).</p>  <p>Ilustracja 2: Po dodaniu PT-L2P i inkubacji na lodzie przez 10 minut, próbka nie będzie już wyglądać klarownie, ale będzie raczej mętnym roztworem.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Np. do próbki o objętości 4 ml dodać 160 µl prepiT-L2P. Próbka stanie się mętna, ponieważ zanieczyszczenia i inhibitory zostaną wytrącone.
<p>5. Inkubować na lodzie przez 10 minut.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Można zastąpić inkubację w temperaturze pokojowej, ale będzie to mniej skuteczne w usuwaniu zanieczyszczeń.
<p>6. Wirować w temperaturze pokojowej przez 10 przy możliwie najwyższej prędkości. Minimum 3500 × g.</p>  <p>Ilustracja 3: Po odwirowaniu nastąpi nagromadzenie mętnego materiału u podstawy probówki. Supernatant powinien być wyraźnie klarowny.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Wyższa siła odśrodkowa minimalizuje ilość mętnego materiału, który zostanie przeniesiony do oczyszczonego DNA (ilustracja 3). Przed kontynuowaniem, należy sprawdzić u producenta probówki że probówki wirówkowe 15 ml mogą wytrzymać siłę odśrodkową. Dłuższy okres wirowania (do 20 minut) może być korzystny w zmniejszaniu zmętnienia (wysokie A320₃₂₀) końcowego roztworu DNA.
<p>7. Ostrożnie przenieś klarowny supernatant za pomocą pipety do świeżej probówki wirówkowej o pojemności 15 ml. Odrzucić osad.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Pozostawić niewielką objętość supernatantu, aby nie doprowadzić do naruszenia osadu. Osad zawiera mętne zanieczyszczenia. Jeśli osad zostanie przypadkowo naruszony, probówkę należy ponownie odwirować.

Etapy oczyszczania	Notatki
<p>8. Dodać 1,2x objętość temperatury pokojowej 95% do 100% etanolu do klarownego supernatantu. Delikatnie wymieszać, odwracając 10 razy.</p>  <p>Ilustracja 4: Po dodaniu etanolu, DNA wytrąci się, co może może skutkować widocznym skrzepem włókien.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Podczas mieszania z etanolem, DNA zostanie wytrącone. Wytrącone DNA może pojawić się jako skrzep włókien DNA (ilustracja 4) lub jako drobny osad, w zależności od ilości DNA w próbce.
<p>9. Pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej przez 10 minut, aby umożliwić pełne wytrącenie DNA.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Nie zaleca się inkubacji w temperaturze -20°C ponieważ zanieczyszczenia mogą ulec wytrąceniu wraz z DNA.
<p>10. Wirować w temperaturze pokojowej przez 10 przy możliwie najwyższej prędkości. Minimum 3500 × g.</p>	
<p>11. Ostrożnie usunąć supernatant przez pipetowanie wzdłuż strony przeciwnej do DNA. Zachować ostrożność aby nie naruszyć osadu DNA.</p>  <p>Ilustracja 5: Użycie końcówki pipety do delikatnego delikatnie drapac wzdłuż wnętrza probówki może ujawnić obecność rozmazu DNA.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Supernatant może zawierać zanieczyszczenia i powinien zostać usunięty najdokładniej jak to możliwe. Wytrącone DNA osadzi się na dnie probówki i ewentualnie jako będzie widoczne pod postacią rozmazu wzdłuż ścianki probówki (ilustracja 5). Rozmaz DNA może znajdować się na bocznej ściance probówki odwróconej od środka wirówki. Rozmaz można złokalizować za pomocą testu „zdrapki”. Można sprawdzić obecność rozmazu DNA, drapiąc wewnątrz probówki za pomocą końcówki pipety. Może być widoczny rozmaz, jak pokazano na ilustracji 5.

Etapy oczyszczania	Notatki
<p>12. Płukanie etanolem: Ostrożnie dodaj 1 ml 70% etanolu do próbki, nie naruszając rozmazu ani osadu. Pozostać na 1 minutę w temperaturze pokojowej. Delikatnie zawirować i całkowicie usunąć etanol, nie naruszając osadu i rozmazu.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ważne jest, aby usunąć cały etanol z próbki. Pozostałości etanolu mogą wpływać na wydajność testu. • Zachować ostrożność aby nie naruszyć osadu lub rozmazu DNA. • Krótkie wirowanie (poniżej 1 minuty) może być wykonane w celu ułatwić całkowite usunięcie supernatantu. • Jeśli osad oddzieli się po etapie płukania etanolem, wirować próbkę przez 5 minut przy możliwie najwyższej prędkości. Minimum 3500 × g.
<p>13. Dla próbek Oragene przeprowadzić rehydratację DNA przez dodanie 0,2 ml-1 ml roztworu TE i worteksować próbkę przez 30 sekund.</p> <p>Dla próbek ORAcollect przeprowadzić rehydratację przez dodanie 0,2 ml roztworu TE i worteksować próbkę przez 30 sekund.</p>  <p>Ilustracja 6: Worteksowanie próbki przez 30 sekund pozwoli odzyskać rozmaz DNA na bocznej ściance próbki. DNA zachowa wysoką masę cząsteczkową.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Jeśli pożądaną jest wyższe stężenie DNA, objętość TE może się zmniejszyć. Należy użyć co najmniej 200 µl roztworu TE. • Nadmierne suszenie osadu (> 10 minut) i użycie mniej niż 500 µL roztworu TE może utrudnić ponowną rehydratację (rozpuszczenie) DNA i może zmniejszyć wydajność lub utrudnić kwantyfikację. • Wytrącone DNA osadzi się na dnie próbki i ewentualnie jako będzie widoczne pod postacią rozmazu wzdłuż ścianki próbki. • Aby zapewnić maksymalny odzysk DNA, próbka musi być worteksowana po dodaniu rozpuszczalnika DNA (roztwór TE). Dzięki worteksowaniu można odzyskać rozmaz DNA na bocznej ściance próbki (ilustracja 6). • Worteksowanie nie spowoduje ścinania DNA.
<p>14. Aby zapewnić pełną rehydratację DNA, inkubować w temperaturze pokojowej przez noc a następnie worteksować lub w temperaturze 50°C przez 1 godzinę, worteksując od czasu do czasu.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Niepełna rehydratacja DNA jest przyczyną niedokładności w szacowaniu stężenia DNA i potencjalnego niepowodzenia dalszych zastosowań, takich jak PCR.

Etapy oczyszczania	Notatki
<p>15. Przenieść zrehydratowane DNA do próbki mikrowirówki o pojemności 1,5 ml w celu przechowywania.</p>	
<p>Kroki opcjonalne:</p> <ol style="list-style-type: none"> Wirować zrehydratowane DNA w temperaturze pokojowej przez 15 minut z prędkością 15 000 × g. Przenieść supernatant do świeżej 1,5 ml próbki mikrowirówki bez naruszania osadu. 	<p>Należy pamiętać, że osad zawiera nierozpuszczalny, mętny materiał.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aby zmaksymalizować odzysk DNA, należy zadbać o to, aby przed wykonaniem tego etapu wirowania, DNA zostało w pełni zrehydratowane (krok 14). • Ten etap wirowania zapewnia, że reszta mętnego materiału zostanie usunięta z próbki DNA. • Należy zachować ostrożność, aby nie naruszyć osadu podczas przenoszenia klarownego supernatantu do świeżej próbki.
<p>16. Opcje przechowywania w pełni zrehydratowanego DNA:</p> <ol style="list-style-type: none"> W TE w temperaturze -20°C do długotrwałego przechowywania. Podziel na porcje, jeśli jest taka potrzeba. W TE w temperaturze 4°C do maksymalnie dwóch miesięcy. 	<ul style="list-style-type: none"> • Zamrożenie oczyszczonego DNA w TE może spowodować wytrącenie się DNA. Podczas rozmrażania zamrożonego oczyszczonego DNA należy zwrócić szczególną uwagę na rehydratację, jak to omówiono w kroku 14.

Kwantyfikacja DNA

Metoda fluorescencyjna

Testy wykorzystujące barwniki fluorescencyjne są bardziej specyficzne niż absorbancja przy długości fali 260 nm do ilościowego określenia ilości dwuniciowego DNA (dsDNA) w próbce DNA. Sugerujemy użycie dostępnych na rynku zestawów, takich jak Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) lub QuantiFluor® dsDNA System (Promega). DNA może wymagać rozcieńczenia z TE do 1:50 przed użyciem go podczas testu kwantyfikacji.

Metoda absorbancji

Jeśli zdecydujesz się na oznaczenie ilościowe DNA metodą absorbancji, zalecamy najpierw poddać oczyszczoną próbkę działaniu RNazy w celu trawienia zanieczyszczającej RNA, a następnie usunąć fragmenty RNA przez wytrącenie DNA etanolem. Szczegółowy protokół został opisany w PD-PR-040: *Usuwanie RNA przez trawienie podwójną RNazą*.¹ Należy pamiętać, że DNA z próbki jamy ustnej zazwyczaj zawiera znacznie więcej RNA niż jest ich w próbkach krwi. Upewnić się, że DNA wytrącone alkoholem jest całkowicie rozpuszczone przed odczytaniem absorbancji.

Współczynnik konwersji: Absorbancja 1,0 przy 260 nm odpowiada stężeniu 50 ng/μl (50 μg/ml) dla czystego, dwuniciowego DNA.

Upewnić się, że wartości absorbancji mieszczą się w zakresie liniowym spektrofotometru. Próbkę wykraczającą poza zakres liniowy należy rozcieńczyć i ponownie zmierzyć. Więcej informacji urządzenia, aby uzyskać więcej informacji.

Referencje

- ¹ Usuwanie RNA przez trawienie podwójną RNazą. PD-PR-040. DNA Genotek.

Metoda

- Rozcieńczyć porcję 10 μl oczyszczonego DNA poddanego działaniu RNazy w 90 μl TE (rozcieńczenie 1/10). Wymieszać delikatnie pipetując w górę i w dół. Poczekać, aż znikną pęcherzyki powietrza.
- Użyć TE w referencyjnej (pustej) komórce.
- Zmierzyć absorbancję przy 320 nm, 280 nm i 260 nm.
- Obliczyć skorygowane wartości A_{280} i A_{260} odejmując absorbancję przy 320 nm (A_{320}) od wartości A_{280} i A_{260} .
- Stężenie DNA w ng/μl = skorygowane $A_{260} \times 10$ (współczynnik rozcieńczenia) $\times 50$ (współczynnik konwersji).
- Stosunek A_{260}/A_{280} A_{260}/A_{280} : Podzielić skorygowane A_{260} przez skorygowane A_{280} .

Przykład

- Przyjmijmy, że zmierzony $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ i $A_{260} = 0,295$
- Stężenie DNA nierozcieńczonej próbki będzie wynosić:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [współczynnik rozcieńczenia] $\times 50$ ($A_{260} - A_{320}$)
 $\times 10 \times 50$ [współczynnik konwersji]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng/}\mu\text{l}$ or $135 \mu\text{g/ml}$
- Skorygowany stosunek A_{260}/A_{280} będzie wynosił:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$











Oragene•DNA i ORAcollect•DNA nie są dostępne w sprzedaży w Stanach Zjednoczonych. Oragene•DISCOVER jest przeznaczony wyłącznie do użytku badawczego, nie do użytku w procedurach diagnostycznych.

Niektóre produkty DNA Genotek mogą nie być dostępne we wszystkich regionach geograficznych.

Oragene, prepIT, ORAcollect i DNA Genotek są znakami towarowymi firmy DNA Genotek Inc. Wszystkie inne marki i nazwy zawarte w niniejszym dokumencie są własnością ich odpowiednich właścicieli.

Wszystkie protokoły DNA Genotek, białe książki i noty aplikacyjne są dostępne w sekcji wsparcia na naszej stronie internetowej www.dnagenotek.com.

Legenda etykiety:

	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Oznaczenie CE
	Producent
	Zapoznać się z ulotką dołączoną do opakowania
	Europejski autoryzowany przedstawiciel
	Autoryzowany przedstawiciel w Szwajcarii
	Numer partii
	Unikalny identyfikator urządzenia
	Stabilność podczas użytkowania
15°C ↕ 30°C 59°F ↕ 86°F	Instrukcje dotyczące przechowywania

Patent (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-42 (PL - Polish) Issue 1/2023-10

© 2023 DNA Genotek Inc., spółka zależna OraSure Technologies, Inc.,
wszelkie prawa zastrzeżone.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com