

**Manual pentru protocolul
de purificare manuală
pentru utilizare cu**

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

*Probe superioare
Performanță dovedită*



Protocolul prepIT™-L2P este disponibil în limbi adiționale la www.dnagenotek.com

Asistența tehnică este disponibilă de luni până vineri (de la 9:00 la 17:00 ET):

- Număr gratuit (America de Nord): 1.866.813.6354, opțiunea 6
- Toate celelalte țări: +1.613.723.5757, opțiunea 6
- E-mail: support@dnagenotek.com

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

Persoana responsabilă din Marea Britanie: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

 Novosanis NV, Bijkhoevelaan 32c,
2110 Wijnegem, Belgium
E-mail: EUAR@novosanis.com

 Arazy Group Swiss GmbH
Bruderholzallee 53, 4059 Basel, Schweiz
E-mail: swiss.ara@arazygroup.com

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

Conținut

Utilizare/scop prevăzut	4
Stabilitate în timpul utilizării	4
Caracteristici	4
Materiale	4
Avertismente și precauții	4
Limitări privind utilizarea produsului	5
Transportul prepIT•L2P	5
Depozitarea prepIT•L2P (Perioada de valabilitate)	5
Eliminare	5
Întreținere/reparații	5
Rezumatul caracteristicilor de performanță	5
Forme ale produsului	5
Garanții	6
Soluționarea problemelor	6
Protocol de laborator prepIT•L2P pentru purificarea manuală a ADN-ului din:	
probă de 500 µl	7
Toată proba	11
Cuantificarea ADN-ului	18

Utilizare/scop prevăzut

Pentru purificarea ADN-ului genomic din trusele de recoltare a salivei Oragene™ și ORACollect™.

Stabilitate în timpul utilizării

PT-L2P-5 (5 ml) și PT-L2P-45 (45 ml) au 30 de luni de stabilitate în utilizare la temperatura camerei.

Caracteristici

- Chimie optimizată pentru recuperarea maximă a ADN-ului din probele orale recoltate cu ajutorul liniilor de produse Oragene și ORACollect.
- S-a dovedit că oferă rezultate consistente cu ADN-ul cu greutate moleculară mare.
- Metoda de purificare scalabilă pentru volume mari sau mici de probe.
- Flux de lucru convenabil, cu asistență tehnică completă de la recoltare până la extracție.
- Metodă eficientă din punct de vedere al costurilor, care necesită un echipament minim.

Materiale

- PT-L2P-5 (5 ml) și/sau PT-L2P-45 (45 ml)
- Manualul produsului prepIT•L2P

Avertismente și precauții

- Doar pentru utilizare în laborator.
- A NU se ingera reactivul lichid.
- A NU se utiliza dacă ambalajul este deteriorat sau dacă garnitura de etanșare din capac/pâlnie este ruptă sau prezintă scurgeri.
- A NU se utiliza prepIT•L2P după data „Perioadei de valabilitate” indicată pe flaconul reactivului.
- Spălați cu apă dacă reactivul intră în contact cu ochii sau pielea. A NU se ingera.
- Raportați orice incident grav către DNA Genotek și autorității competente din țara dvs.
- Consultați fișa tehnică de securitate a materialelor (MSDS) pentru eliminarea în siguranță a reactivului neutilizat.
- MSDS este disponibilă la www.dnagenotek.com.

Limitări privind utilizarea produsului

Utilizați prepIT•L2P numai conform indicațiilor din acest manual al produsului.

Transportul prepIT•L2P

prepIT•L2P poate fi transportat la temperatura ambientă ca reactiv de laborator. Nu necesită manipulare specială.

Depozitarea prepIT•L2P (Perioada de valabilitate)

A se depozita la temperatura camerei. Perioada de valabilitate pentru PT-L2P-5 (5 ml) și PT-L2P-45 (45 ml) este de 30 de luni, atunci când este închis corespunzător și depozitat la temperatura camerei.

Eliminare

Eliminați kiturile neutilizate, deteriorate sau care prezintă scurgeri în conformitate cu reglementările locale, de stat și federale corespunzătoare. Se elimină ca deșeu de laborator.

Întreținere/reparații

Nu este cazul. prepIT•L2P este un reactiv - nu necesită întreținere sau reparații.

Rezumatul caracteristicilor de performanță

ADN-ul genomic purificat prepIT•L2P din kiturile de recoltare a salivei Oragene și ORACollect oferă ADN de înaltă calitate și în cantitate suficientă pentru a fi utilizat în aplicațiile ulterioare, cum ar fi PCR, microarray și secvențierea de generație următoare.

Forme ale produsului

prepIT•L2P este disponibil în mai multe volume, în funcție de numărul de pregătiri necesare. De exemplu:

Referință produs / Număr de catalog	Volumul de pregătire a probei	Număr de pregătiri
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2.000

Garanții

Termenii și condițiile complete pentru toate produsele DNA Genotek sunt disponibile la <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

Soluționarea problemelor

Contactați serviciul de asistență tehnică DNA Genotek la support@dnagenotek.com sau apelați +1 (613) 723-5757, opțiunea 6.

Protocol de laborator prepIT™•L2P pentru purificarea manuală a ADN-ului din probă de 500 μl

Următorul protocol pas cu pas descrie modul de purificare a ADN-ului dintr-o porțiune a probei de 500 μl.

Reactivi incluși

prepIT•L2P (Nr. catalog PT-L2P-5 sau PT-L2P-45)

Echipament și reactivi

- Microcentrifugă capabilă să funcționeze la $15.000 \times g$
- 1,5 ml microtuburi (de ex., Axygen® Nr. catalog MCT-150-C)
- Incubator cu aer sau apă la 50 °C
- Etanol (95% până la 100%) la temperatura camerei
- Etanol (70%) la temperatura camerei
- Tampon de stocare a ADN-ului: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) sau o soluție similară

Procedură

Etape de purificare	Note
1. Se amestecă proba Oragene/ ORACollect prin inversiune sau prin agitare ușoară timp de câteva secunde.	• Acest lucru se face pentru a se asigura că probele vâscoase sunt amestecate corespunzător.

Etape de purificare	Note
<p>2. Se incubează proba la 50 °C într-un incubator cu apă pentru cel puțin 1 oră sau într-un incubator cu aer pentru cel puțin 2 ore.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Această etapă de tratare termică este esențială pentru a se asigura că ADN-ul este eliberat în mod corespunzător și că nucleazele sunt inactivate permanent. Această etapă de incubare poate fi efectuată în orice moment după ce proba este recoltată și înainte de a fi purificată. Întreaga probă trebuie să fie incubată în tubul de recoltare original înainte de divizare pentru a asigura omogenitatea probei. Proba poate fi incubată la 50 °C peste noapte, dacă este mai convenabil. Este necesar un timp mai îndelungat într-un incubator cu aer, deoarece echilibrarea temperaturii este mai lentă decât într-un incubator cu apă. <p>Notă: Utilizarea unui incubator cu aer poate fi preferabilă, deoarece tuburile Oragene/ORACollect pot pluti în baie de apă. În cazul în care trebuie folosită o baie de apă, asigurați-vă că porțiunea tubului care conține proba rămâne scufundată în apă.</p>
<p>3. Se transferă 500 μl de probă amestecată într-un tub al microcentrifugii de 1,5 ml.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Restul probei poate fi depozitat la temperatura camerei (între 15 °C și 25 °C) sau congelat. Dacă se dorește, proba poate fi depozitată înghețată în tubul Oragene/ORACollect la -20 °C sau poate fi transferată într-un criovial pentru depozitare pe termen lung la -80 °C.
<p>4. Se adaugă 20 μl (1/25 din volum) de prepIT-L2P în tubul microcentrifugii și se amestecă prin agitare în vortex timp de câteva secunde.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Proba va deveni tulbure pe măsură ce impuritățile și inhibitorii sunt precipitați.
<p>5. Se incubează la gheață timp de 10 minute.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Incubarea la temperatura camerei poate fi înlocuită, dar nu va fi atât de eficientă în eliminarea impurităților.

Etape de purificare	Note
<p>6. Se centrifughează la temperatura camerei timp de 5 minute la 15.000 × g.</p>	<ul style="list-style-type: none"> O perioadă mai lungă de centrifugare (până la 15 minute) poate fi benefică pentru a reduce nivelul de turbiditate (A₃₂₀ ridicat) al soluției finale de ADN.
<p>7. Se transferă cu grijă supernatantul împede cu un vârf de pipetă într-un nou tub al microcentrifugii. Se aruncă peletul care conține impurități.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Peletul conține impurități tulburi. Dacă este deranjat din greșeală, tubul trebuie să fie recentrifugat.
<p>8. Se adaugă 600 μl de etanol 95% până la 100% la temperatura camerei. Se amestecă ușor prin inversiune de 10 ori.</p>	<ul style="list-style-type: none"> În timpul amestecării cu etanol, ADN-ul va fi precipitat. Acesta poate apărea ca un cheag de fibre de ADN sau ca un precipitat fin, în funcție de cantitatea de ADN din probă. Chiar dacă nu se observă niciun cheag, ADN-ul va fi recuperat urmând cu atenție etapele următoare.
<p>9. Se lasă proba să stea la temperatura camerei timp de 10 minute pentru a permite ADN-ului să se precipite complet.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Nu se recomandă incubarea la -20 °C, deoarece impuritățile se pot co-precipita cu ADN-ul.
<p>10. Se plasează tubul în microcentrifugă într-o orientare cunoscută. Centrifugare la temperatura camerei timp de 2 minute la 15.000 × g.</p>	<ul style="list-style-type: none"> De exemplu, așezați fiecare tub în microcentrifugă, cu porțiunea de articulație a capacului îndreptată spre centrul rotorului. După centrifugare, poziția peletului poate fi localizată (chiar dacă este prea mică pentru a fi vizibilă); acesta se va afla la vârful tubului, sub articulație.
<p>11. Se îndepărtează cu grijă supernatantul cu un vârf de pipetă și se aruncă. Aveți grijă să evitați să deranjați peletul de ADN.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Acest pelet conține ADN. Pierderea peletului va duce la pierderea ADN-ului. Rotirea tubului astfel încât peletul se află pe peretele superior va permite să deplasați în siguranță un vârf de pipetă de-a lungul peretelui inferior și să îndepărtați tot supernatantul. Supernatantul poate conține impurități și trebuie eliminat cât mai complet posibil.

Etapă de purificare	Note
<p>12. Spălare cu etanol: Se adaugă cu grijă 250 µl de etanol 70%. Se lasă să stea la temperatura camerei timp de 1 minut. Se îndepărtează complet etanolul fără a deranja peletul.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Este important să se elimine tot etanolul din probă. Transmiterea etanolului poate avea un impact asupra performanței testului. • După îndepărtarea etanolului 70%, tubul poate fi centrifugat pentru a permite îndepărtarea etanolului rezidual. • Aveți grijă să nu deranjați peletul de ADN; acesta poate fi mic sau invizibil. • Dacă peletul se desprinde, centrifugați proba timp de 5 minute la $15.000 \times g$. • Uscarea excesivă a peletului poate face ca ADN-ul să se dizolve mai greu.
<p>13. Se adaugă 100 µl de soluție TE (consultați pagina 5) pentru a dizolva peletul de ADN. Se agită în vortex timp de cel puțin 5 secunde.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Dacă se dorește o concentrație mai mare de ADN, se utilizează 50 µl de TE.
<p>14. Pentru a asigura rehidratarea completă a ADN-ului, se incubează la temperatura camerei peste noapte, urmată de agitare în vortex sau la 50°C timp de 1 oră, cu agitare ocazională în vortex.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cantitățile mari de ADN cu greutate moleculară mare pot fi lente în a se rehidrata (dizolva) complet. • Rehidratarea incompletă a ADN-ului este o cauză a inexactității în estimarea concentrației de ADN și a potențialului eşec al aplicațiilor ulterioare, cum ar fi PCR.
<p>15. Opțiuni pentru depozitarea ADN-ului complet rehidratat: a) În TE la -20 °C pentru depozitare pe termen lung. Dacă se dorește, se divizează. b) În TE la 4 °C pentru perioade până la 2 luni.</p>	

Protocol de laborator prepIT•L2P pentru purificarea manuală a ADN-ului din probă întreagă

Notă: Acest protocol necesită utilizarea unei centrifuge (fie cu unghi fix, fie cu rotor cu cupă oscilantă) capabilă să genereze cel puțin $3.500 \times g$ pentru a obține rezultate optime.

Următorul protocol pas cu pas descrie modul de purificare a ADN-ului din întreaga probă (1 ml-4 ml volum total al probei). Volumele indicate trebuie ajustate în funcție de volumul efectiv recoltat.

Reactivi incluși

prepIT•L2P (Nr. catalog PT-L2P-5 sau PT-L2P-45)

Echipment și reactivi

- Centrifugă care acceptă tuburi de 15 ml și este capabilă să genereze cel puțin $3.500 \times g$ (consultați Tabelul 2)
- Tuburi conice din polipropilenă de 15 ml (de ex., BD Falcon® Nr. de catalog 352196)
- Microcentrifugă capabilă să funcționeze la $15.000 \times g$ (opțional)
- 1,5 ml microtuburi (de ex., Axygen® Nr. catalog MCT-150-C)
- Incubator cu aer sau apă la 50 °C
- Etanol (95% până la 100%) la temperatura camerei
- Etanol (70%) la temperatura camerei
- Tampon de stocare a ADN-ului: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) sau o soluție similară

Opțional: Verificare pre-purificare (se aplică numai pentru probele Oragene; nu este necesară pentru probele ORACollect)

Se cântărește proba pentru a estima cantitatea de salivă furnizată de donator (consultați Tabelul 1). Cantitatea de salivă recoltată este direct proporțională cu cantitatea de ADN recuperată. De exemplu, dacă un donator a furnizat mai puțin de 2 ml de salivă, ar trebui să vă așteptați să recuperați un randament total mai mic din această probă.

Greutatea kitului (fără probă)

Odată ce o probă ajunge la laborator, vă sugerăm să cântăriți proba pentru a estima dacă donatorul a furnizat cantitatea potrivită de salivă. Vă puteți aștepta la o anumită variabilitate între donatori. Este furnizată greutatea medie a unui kit gol (Tabelul 1). Pentru a estima cantitatea de probă recoltată (presupunând 1 g/ml), efectuați următorul calcul:

Greutatea kitului care conține proba - greutatea kitului fără probă

Cantitatea de probă recoltată

Tabelul 1


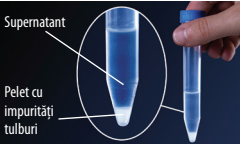
Nr. produs	Greutatea kitului fără probă
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

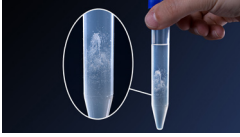
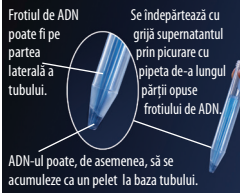
Procedură


Etape de purificare	Note
1. Se amestecă proba Oragene/ORACollect prin inversiune sau prin agitare ușoară timp de câteva secunde.	<ul style="list-style-type: none">Acest lucru se face pentru a se asigura că probele vâscoase sunt amestecate corespunzător.
2. Se incubează proba la 50 °C într-un incubator cu apă pentru cel puțin 1 oră sau într-un incubator cu aer pentru cel puțin 2 ore.	<ul style="list-style-type: none">Această etapă de tratare termică este esențială pentru a maximiza producția de ADN și pentru a se asigura că nucleazele sunt inactivate permanent.Proba poate fi incubată la 50 °C, peste noapte, dacă este mai convenabil.Această etapă de incubare poate fi efectuată în orice moment după ce proba este recoltată și înainte de ca ADN-ul să fie purificat.Este necesar un timp mai îndelungat într-un incubator cu aer, deoarece echilibrarea temperaturii este mai lentă decât într-un incubator cu apă. <p>Notă: Utilizarea unui incubator cu aer poate fi preferabilă, deoarece tuburile Oragene/ORACollect pot pluti în baie de apă. În cazul în care trebuie folosită o baie de apă, asigurați-vă că porțiunea tubului care conține proba rămâne scufundată în apă.</p>
3. Se transferă întreaga probă într-un tub al centrifugii de 15 ml (Figura 1). Se notează volumul probei.	<ul style="list-style-type: none">Transferul poate fi efectuat fie prin turnare, fie prin pipetare cu o pipetă de sticlă sau de plastic.



Figura 1: Înainte de a trece la etapa 4, asigurați-vă că întregul eșantion a fost incubat și transferat într-un tub al centrifugii nou de 15 ml, după cum se arată.

Etapă de purificare	Note
<p>4. Se adaugă 1/25 volum de preplT-L2P și se agită în vortex timp de câteva secunde (Figura 2).</p>  <p><i>Figura 2: După adăugarea PT-L2P și incubarea la gheață timp de 10 minute, proba nu va mai avea un aspect limpede, ci mai degrabă va fi o soluție tulbură.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • De ex. la o probă de 4 ml, se adaugă 160 μl de preplT-L2P. • Proba va deveni tulbură pe măsură ce impuritățile și inhibitorii sunt precipitați.
<p>5. Se incubează la gheață timp de 10 minute.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Incubarea la temperatura camerei poate fi înlocuită, dar nu va fi atât de eficientă în eliminarea impurităților.
<p>6. Se centrifughează la temperatura camerei timp de 10 minute la o viteză cât mai mare posibil. Minimum $3.500 \times g$.</p>  <p><i>Figura 3: După centrifugare, va exista o acumulare de material tulbură la baza tubului. Supernatantul trebuie să fie vizibil limpede.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • O forță centrifugă mai mare reduce la minimum cantitatea de material tulbură care va fi transportat în ADN-ul purificat (Figura 3). Înainte de a continua, ar trebui să verificați cu producătorul tuburilor că tuburile de centrifugare de 15 ml pot rezista la forța centrifugă. • O perioadă mai lungă de centrifugare (până la 20 minute) poate fi benefică pentru a reduce nivelul de turbiditate (A_{320} ridicat) al soluției finale de ADN.
<p>7. Se transferă cu grijă supernatantul limpede cu un vârf de pipetă într-un nou tub al microcentrifugii. Se aruncă peletul.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se lasă un volum mic de supernatant pentru a evita deranjarea peletului. • Peletul conține impurități tulburi. Dacă este deranjat din greșeală, tubul trebuie să fie recentrifugat.

Etapă de purificare	Note
<p>8. La supernatantul limpede se adaugă 1,2 volum de etanol 95% până la 100% la temperatura camerei. Se amestecă ușor prin inversiune de 10 ori.</p>  <p><i>Figura 4: După adăugarea etanolului, ADN-ul se va precipita, ceea ce poate rezulta într-un cheag vizibil de fibre.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • În timpul amestecării cu etanol, ADN-ul va fi precipitat. • ADN-ul precipitat poate apărea ca un cheag de fibre de ADN (Figura 4) sau ca un precipitat fin, în funcție de cantitatea de ADN din probă.
<p>9. Se lasă proba să stea la temperatura camerei timp de 10 minute pentru a permite ADN-ului să se precipite complet.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Nu se recomandă incubarea la $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, deoarece impuritățile se pot co-precipita cu ADN-ul.
<p>10. Se centrifughează la temperatura camerei timp de 10 minute la o viteză cât mai mare posibil. Minimum $3.500 \times g$.</p>	
<p>11. Se îndepărtează cu grijă supernatantul cu o pipetă de sticlă sau de plastic și se aruncă. Aveți grijă să evitați să deranjați peletul de ADN.</p>  <p><i>Figura 5: Folosirea unui vârf de pipetă pentru a zgâria ușor de-a lungul interiorului tubului poate evidenția prezența unui frotiu de ADN.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Supernatantul poate conține impurități și trebuie eliminat cât mai complet posibil. • ADN-ul precipitat se va găsi sub formă de pelet la baza tubului și, eventual, sub formă de frotiu pe o parte laterală a tubului (Figura 5). • Frotiul de ADN poate fi localizat pe partea tubului care nu este orientată spre centrul centrifugei. • Un frotiu poate fi localizat cu ajutorul testului „zgârierării”. Puteți verifica prezența unui frotiu de ADN zgâriind interiorul tubului cu ajutorul unui vârf de pipetă. Așa cum se arată în Figura 5, poate fi vizibil un frotiu.

Etape de purificare	Note
<p>12. Spălare cu etanol: Se adaugă cu grijă 1 ml de etanol 70% în tub, fără a deranja frotili sau peletul. Se lasă să stea la temperatura camerei timp de 1 minut. Se agită ușor și se îndepărtează complet etanolul fără a deranja peletul și frotilul.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Este important să se elimine tot etanolul din probă. Transmiterea etanolului poate avea un impact asupra performanței testului. • Aveți grijă să evitați să deranjați peletul sau frotilul de ADN. • Se poate efectua o centrifugare scurtă (mai puțin de 1 minut) pentru a facilita eliminarea completă a supernatantului. • Dacă peletul se desprinde după etapa de spălare cu etanol, centrifugați proba timp de 5 minute la o viteză cât mai mare posibil. Minimum $3.500 \times g$.
<p>13. Pentru probele Oragene, rehidrați ADN-ul adăugând 0,2 ml-1 ml de soluție TE și agitați în vortex proba timp de 30 secunde.</p> <p>Pentru probele ORAcollect, rehidrați ADN-ul adăugând 0,2 ml de soluție TE și agitați în vortex proba timp de 30 secunde.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • În cazul în care se dorește o concentrație mai mare de ADN, volumul de TE poate fi redus. Trebuie utilizat un minim de 200 μl de soluție TE. • Uscarea excesivă a peletului (> 10 minute) și utilizarea a mai puțin de 500 μl de soluție TE poate îngreuna rehidratarea (dizolvarea) ADN-ului și poate scădea randamentul sau poate îngreuna cuantificarea. • ADN-ul precipitat se va găsi sub formă de pelet la baza tubului și posibil sub formă de frotili pe o parte laterală a tubului. • Pentru a asigura o recuperare maximă a ADN-ului, proba trebuie să fie agitată în vortex după adăugarea solventului ADN (soluție TE). Agitarea în vortex va asigura recuperarea frotilui de ADN de pe partea laterală a tubului (Figura 6). • Agitarea în vortex nu va secționa ADN-ul.
 <p>Figura 6: Agitarea probei în vortex timp de 30 secunde vă va permite să recuperați frotili de ADN de pe partea laterală a tubului. ADN-ul va avea în continuare o greutate moleculară ridicată.</p>	
<p>14. Pentru a asigura rehidratarea completă a ADN-ului, se incubează la temperatura camerei peste noapte, urmată de agitare în vortex sau la 50°C timp de 1 oră, cu agitare ocazională în vortex.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Rehidratarea incompletă a ADN-ului este o cauză a inexactității în estimarea concentrației de ADN și a potențialului eșec al aplicațiilor ulterioare, cum ar fi PCR.

Etape de purificare	Note
<p>15. Se transferă ADN-ul rehidratat într-un tub al microcentrifugiei de 1,5 ml pentru depozitare.</p>	
<p>Etapă opțională:</p> <ol style="list-style-type: none"> Se centrifughează ADN-ul rehidratat la temperatura camerei timp de 15 minute la $15.000 \times g$. Se transferă supernatantul într-un tub de 1,5 ml nou al microcentrifugiei, fără a deranja peletul. 	<p>Observați că peletul conține material insolubil, turbure.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pentru a maximiza recuperarea ADN-ului, asigurați-vă că ADN-ul este complet rehidratat (etapa 14) înainte de a efectua această etapă de centrifugare. • Această etapă de centrifugare asigură eliminarea din proba de ADN a oricărui material turbure rămas. • Trebuie să se aibă grijă să nu se deranjeze peletul atunci când se transferă supernatantul limpede într-un tub nou.
<p>16. Opțiuni pentru depozitarea ADN-ului complet rehidratat:</p> <ol style="list-style-type: none"> În TE la -20°C pentru depozitare pe termen lung. Dacă se dorește, se divizează. În TE la 4°C pentru perioade până la 2 luni. 	<ul style="list-style-type: none"> • Congelarea ADN-ului purificat în TE poate provoca precipitarea ADN-ului. La decongelarea ADN-ului purificat congelat, acordați o atenție deosebită rehidratării, așa cum s-a discutat la etapa 14.

Cuantificarea ADN-ului

Prin metoda fluorescenței

Testele care utilizează coloranți fluorescenți sunt mai specifice decât absorbția la 260 nm pentru cuantificarea cantității de ADN dublu catenar (dsADN) într-o probă de ADN. Sugerăm utilizarea kiturilor disponibile în comerț, cum ar fi kitul de analiză Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) sau QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Este posibil să fie necesar ca ADN-ul să fie diluat până la 1:50 cu TE înainte de a fi utilizat în testul de cuantificare.

Prin metoda absorbției

Dacă alegeți să cuantificați ADN-ul prin absorbție, vă recomandăm să tratați mai întâi proba purificată cu RNază pentru a digera ARN-ul contaminant și apoi să eliminați fragmentele de ARN prin precipitarea ADN-ului cu etanol. Un protocol detaliat este descris în PD-PR-040, eliminarea *ARN-ului prin digestie cu dublă RNază*.¹ Vă rugăm să rețineți că ADN-ul dintr-o probă orală conține de obicei mult mai mult ARN decât cel găsit în probele de sânge. Asigurați-vă că ADN-ul preparat în alcool este complet dizolvat înainte de citirea absorbției.

Factor de conversie: O absorbție de 1,0 la 260 nm corespunde unei concentrații de 50 ng/μl (50 μg/ml) pentru ADN pur, bicatenar.

Asigurați-vă că valorile absorbției se încadrează în intervalul liniar al spectrofotometrului. Diluați și măsurați din nou probele care nu se încadrează în intervalul liniar. Consultați documentația instrumentului dvs. pentru mai multe informații.

Referințe

- ¹ Eliminarea ARN-ului prin digestie cu dublă RNază. PD-PR-040. DNA Genotek.

Metodă

- Diluati o porțiune de 10 μl de ADN purificat tratat cu RNază cu 90 μl de TE (diluție 1/10). Se amestecă prin picurare ușoară cu pipeta în sus și în jos. Așteptați ca bulele să dispară.
- Utilizați TE în celula de referință (goală).
- Măsurați absorbția la 320 nm, 280 nm și 260 nm.
- Calculați valorile A_{280} și A_{260} corectate prin scăderea absorbției la 320 nm (A_{320}) din valorile A_{280} și A_{260} .
- Concentrația de ADN în ng/μl = $A_{260} \times \text{corectat } 10$ (factor de diluție) $\times 50$ (factor de conversie).
- Raportul A_{260}/A_{280} : Se împarte A_{260} corectat la A_{280} corectat.

Exemplu

- Să presupunem că am măsurat $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ și $A_{260} = 0,295$
- Concentrația de ADN din proba nediluată va fi:
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [factor de diluție]} \times 50 \text{ [factor de conversie]}$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng/}\mu\text{l sau } 135 \text{ }\mu\text{g/ml}$$
- Raportul corectat A_{260}/A_{280} va fi:
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$
$$= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$$
$$= 0,270 \div 0,150$$
$$= 1,80$$

Oragene•DNA și ORAcollect•DNA nu sunt disponibile spre vânzare în Statele Unite.

Oragene•DISCOVER este destinat exclusiv cercetării, nu este utilizat în cadrul procedurilor de diagnosticare.











Este posibil ca unele produse DNA Genotek să nu fie disponibile în toate regiunile geografice.

Oragene, prepIT, ORAcollect și DNA Genotek sunt mărci înregistrate DNA Genotek Inc.

Toate celelalte mărci și denumiri conținute în prezentul document aparțin proprietarilor respectivi.

Toate protocoalele DNA Genotek, cărțile albe și notele de aplicare sunt disponibile în secțiunea de asistență a site-ului nostru la adresa www.dnagenotek.com.

Legenda etichetei:

	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro
	Număr de catalog
	Marcaj CE
	Producător
	Consultați prospectul
	Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană
	Reprezentant autorizat în Elveția
	Număr lot
	Identificator unic al dispozitivului
	Stabilitate în timpul utilizării
15 °C / 30 °C 59 °F / 86 °F	Instrucțiuni de depozitare

Brevet (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-44 (RO - Romanian) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., o filială a OraSure Technologies, Inc., toate drepturile rezervate.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com