

**Manuaalisen  
puhdistusohjelman käsikirja  
tuotteelle**

**prepiT™·L2P**

**DNagenotek™**

[www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)

Puh.: +1 613 723 5757  
[support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)  
[sales@dnagenotek.com](mailto:sales@dnagenotek.com)

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

*Erinomaiset näytteet  
Todistettu teho*

REF PT-L2P-5

REF PT-L2P-45

CE UK  
CA IVD

prepIT™-L2P-ohjelma on saatavilla muilla kielillä osoitteessa  
[www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)

**Teknistä tukea on saatavilla maanantaista perjantaihin (9.00–17.00 ET):**

- Ilmaisnumero (Pohjois-Amerikka): 1 866 813 6354, valinta 6
- Muut maat: +1 613 723 5757, valinta 6
- Sähköposti: [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)

🏢 DNA Genotek Inc.  
3000 - 500 Palladium Drive  
Ottawa, ON, Kanada K2V 1C2  
Sähköposti: [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)

Vastuuhenkilö Yhdistyneessä kuningaskunnassa: Qarad UK Ltd., 8 Northumberland Ave,  
Westminster, London, WC2N 5BY Yhdistynyt kuningaskunta

**EC REP** Qarad EC-REP BV, Pas 257,  
2440 Geel, Belgia

**CH REP** Qarad Suisse S.A., World Trade Center,  
Avenue Gratta-Paille 2, 1018 Lausanne, Sveitsi

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

# Sisällysluettelo

Käyttötarkoitus .....	4
Käytön aikainen stabiliteetti .....	4
Ominaisuudet .....	4
Materiaalit .....	4
Varoitukset ja varotoimet .....	4
Tuotteen käyttörajoitukset .....	5
prepIT™•L2P-tuotteen kuljetus .....	5
prepIT™•L2P-tuotteen säilytys (säilyvyysaika) .....	5
Hävittäminen .....	5
Huolto/korjaukset .....	5
Tiivistelmä suorituskyvyominaisuuksista .....	5
Tuotetyypit .....	5
Takuut .....	6
Vianmääritys .....	6
<b>prepIT™•L2P-laboratorio-ohjelma DNA:n manuaaliseen puhdistukseen:</b>	
500 mikrolitrasta näytettä .....	7
koko näytteestä .....	11
DNA:n kvantifiointi .....	18

## Käyttötarkoitus

Oragene™- ja ORAcollect™- syljen näytteenottosarjoilla otetun genomisen DNA:n puhdistukseen.

## Käytön aikainen stabiliteetti

PT-L2P-5 (5 ml)- ja PT-L2P-45 (45 ml)- tuotteiden käytön aikainen stabiliteetti on 30 huoneenlämmössä.

## Ominaisuudet

- Optimoitu kemia mahdollisimman kattavaan DNA:n keräämiseen Oragene™- ja ORAcollect™-tuoteperheiden suunnitteista.
- Todettu tuottavan johdonmukaisia tuloksia korkean molekyylipainon DNA:lla.
- Skaalautuva puhdistusmenetelmä suurille tai pienille näytetilavuuksille.
- Sujuva työnkulku ja täysi tekninen tuki näytteenotosta eristämiseen.
- Taloudellinen menetelmä, joka vaatii vain vähän laitteistoa.

## Materiaalit

- PT-L2P-5 (5 ml) ja/tai PT-L2P-45 (45 ml)
- prepIT™•L2P-tuotekäsikirja

## Varoitukset ja varotoimet

- Vain laboratoriokäyttöön.
- Nestemäistä reagenssia EI saa niellä.
- ÄLÄ käytä, jos pakkaus on vaurioitunut tai suppilon kannen/korkin tiiviste on rikki tai vuotaa.
- ÄLÄ käytä prepIT™•L2P-tuotetta reagenssipulloon merkityn viimeisen käyttöpäivän jälkeen.
- Pese vedellä, jos reagenssia joutuu silmiin tai iholle. EI saa niellä.
- Ilmoita kaikista vakavista tapauksista DNA Genotekille ja maasi toimivaltaiselle viranomaiselle.
- Käyttämättömän reagenssin turvallista hävittämistä koskevat ohjeet ovat käyttöturvallisuustiedotteessa.
- Käyttöturvallisuustiedote on saatavana osoitteessa [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

## Tuotteen käyttörajoitukset

Käytä prepIT™•L2P-tuotetta ainoastaan tämän tuotekäsikirjan ohjeiden mukaisesti.

## prepIT™•L2P-tuotteen kuljetus

prepIT™•L2P-tuotetta voi kuljettaa huoneenlämpötilassa laboratorioreagenssina. Erityiskäsittelyä ei tarvita.

## prepIT™•L2P-tuotteen säilytys (säilyvyysaika)

Säilytä huoneenlämpötilassa. PT-L2P-5 (5ml)- ja PT-L2P-45 (45 ml) -tuotteiden säilyvyysaika on 30 kuukautta huoneenlämpötilassa, kun ne on suljettu asianmukaisesti.

## Hävittäminen

Hävitä käyttämättömät, vaurioituneet tai vuotavat sarjat asianmukaisten paikallisten, osavaltion ja valtiotason säännösten mukaisesti. Hävitä laboratoriojätteenä.

## Huolto/korjaukset

Ei sovelleta. prepIT™•L2P on reagenssi, eikä edellytä huoltoa tai korjausta.

## Tiivistelmä suorituskykyominaisuuksista

Oragene™- ja ORAcollect™- syljen näytteenottosarjoilla otettu prepIT™•L2P-puhdistettu genominen DNA tuottaa runsaasti korkealaatuista DNA:ta, joka riittää myöhempisiin sovelluksiin, kuten PCR-analyysiin, mikrosiruanalyysiin ja massiiviparalleelisekvensointiin.

## Tuotetyypit

prepIT™•L2P-tuotetta on saatavilla useita eri tilavuuksia riippuen tarvitusta valmistaiden lukumäärästä. Esimerkiksi:

Tuotteen viitenumero / Luettelonumero	Näytevalmisteen tilavuus	Valmistaiden lukumäärä
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2 000

## **Takuut**

Kaikkien DNA Genotek -tuotteiden ehdot ovat saatavilla kokonaisuudessaan osoitteessa <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

## **Vianmääritys**

Ota yhteys DNA Genotek -yhtiön tekniseen tukeen osoitteessa [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com) tai soita numeroon +1 (613) 723-5757, valinta 6.

# prepIT™•L2P-laboratorio-ohjelma DNA:n manuaaliseen puhdistukseen 500 mikrolitrasta näytettä

Seuraavassa vaiheittaisessa ohjelmassa kuvaillaan, miten voit puhdistaa DNA:n 500 mikrolitran osanäytteestä.

## Pakkauksen reagenssit

prepIT™•L2P (luettelonro PT-L2P-5 tai PT-L2P-45)

## Laitteisto ja reagenssit

- Mikrosentrifugi, joka voi pyöriä voimalla 15 000 × g
- 1,5 ml:n mikroputkia (esim. Axygen®, luettelonro MCT-150-C)
- 50°C:n lämpöinen ilma- tai vesi-inkubaattori
- Huoneenlämpöistä etanolia (95–100 %)
- Huoneenlämpöistä etanolia (70 %)
- DNA:n säilytyspuskuria: TE (10 mm Tris-HCl, 1 mm EDTA, pH 8,0) tai vastaavaa liuosta

## Toimenpide

Puhdistusvaiheet	Huomiot
1. Sekoita Oragene™-/ORAclect™-näyte kääntelemällä putkea ylösalaisin tai ravistamalla sitä hellävaroen muutaman sekunnin ajan.	• Näin varmistat, että viskoosiset näytteet sekoittuvat hyvin.

Puhdistusvaiheet	Huomiot
<p>2. Inkuboi näytettä 50°C:n lämpötilassa vesi-inkubaattorissa vähintään 1 tunti tai ilmainkubaattorissa vähintään 2 tuntia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tämä lämpökäsittelyvaihe on erittäin tärkeä ja varmistaa, että DNA:ta vapautuu riittävästi ja että nukleaasit inaktivoituvat pysyvästi.</li> <li>• Voit tehdä tämän inkubaatiovaiheen milloin tahansa näytteen ottamisen ja sen puhdistuksen välillä.</li> <li>• Varmista näytteen homogeenisyys inkuboimalla koko näytettä alkuperäisessä näyteputkessa ennen osanäytteen ottoa.</li> <li>• Voit inkuboida näytettä 50°C:n lämpötilassa yön yli, jos se on kätevää.</li> <li>• Ilmainkubaattori edellyttää pidemmän ajan, koska se saavuttaa lämpötasapainon vesi-inkubaattoria hitaammin.</li> </ul> <p><b>Huomio:</b> Voi olla parempi käyttää ilmainkubaattoria, koska Oragene™./ORACollect™-putket saattavat kellua vesikylyssä. Jos sinun on käytettävä vesikylyä, varmista, että putken näytettä sisältävä osa pysyy veden alla.</p>
<p>3. Siirrä 500 mikrolitraa sekoitettua näytettä 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Voit säilyttää loput näytteestä huoneenlämpötilassa (15–25°C) tai jäädytettynä.</li> <li>• Halutessasi voit säilyttää näytteen jäädytettynä Oragene™./ORACollect™-putkessa -20°C:n lämpötilassa tai siirtää näytteen kryoputkeen pitkäaikaista säilytystä varten -80°C:n lämpötilassa.</li> </ul>
<p>4. Lisää 20 mikrolitraa (1/25 tilavuudesta) prepIT™•L2P-tuotetta mikrosentrifugiputkeen ja sekoita ravistelemalla sekunnin ajan.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Näyte muuttuu sameaksi, kun epäpuhtaudet ja estäjät saostuvat.</li> </ul>
<p>5. Inkuboi jäässä 10 minuuttia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Voit inkuboida näytettä myös huoneenlämmössä, mutta silloin epäpuhtauksia poistuu hieman vähemmän tehokkaasti.</li> </ul>



Puhdistusvaiheet	Huomiot
6. Sentrifugoi 5 minuuttia huoneenlämmössä voimalla $15\,000 \times g$ .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pidempi sentrifugointi (korkeintaan 15 minuuttia) voi vähentää lopullisen DNA-liuoksen sameutta (korkea <math>A_{320}</math>).</li> </ul>
7. Siirrä puhdas supernatantti varovasti pipettikärjellä uuteen mikrosentrifugiputkeen. <b>Hävitä epäpuhtauksia sisältävä pelletti.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pelletti sisältää sameita epäpuhtauksia. Jos kosket putkeen epähuomioissa, sentrifugoi se uudelleen.</li> </ul>
8. Lisää 600 mikrolitraa huoneenlämpöistä 95–100 % etanolia. Sekoita hellävaroen kääntelemällä putki ylösalaisin 10 kertaa.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA saostuu, kun sekoitat sen etanoliin. Tämä saattaa näkyä DNA-säikeiden hyytymänä tai hienona saostumana riippuen DNA:n määrästä näytteessä.</li> <li>• Vaikka et näkisi hyytymää, voit kerätä DNA:n noudattamalla huolellisesti seuraavia vaiheita.</li> </ul>
9. Anna näytteen olla huoneenlämmössä 10 minuuttia, jotta DNA saostuu kokonaan.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Emme suosittele ikubointia <math>-20^{\circ}\text{C}</math>:n lämpötilassa, koska epäpuhtaudet saattavat saostua DNA:han.</li> </ul>
10. Aseta putki mikrosentrifugiin tiettyyn asentoon. Sentrifugoi 2 minuuttia huoneenlämmössä voimalla $15\,000 \times g$ .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Voit esimerkiksi asettaa jokaisen putken mikrosentrifugiin niin, että korkin saranaosuus osoittaa pois päin roottorin keskustasta. Näin tiedät pelletin sijainnin sentrifugoinnin jälkeen (vaikka se olisi liian pieni nähtäväksi) – se on putken kärjessä saranan alapuolella.</li> </ul>
11. Poista supernatantti varovasti pipettikärjellä ja hävitä se. Varo koskemasta DNA-pellettiin.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pelletti sisältää DNA:ta. Jos menetät pelletin, menetät myös DNA:n.</li> <li>• Jos kierrät putkea niin, että pelletti on seinämän yläosassa, voit viedä pipettikärjen turvallisesti seinämän alaosa pitkin ja poistaa kaiken supernatantin.</li> <li>• Supernatantti saattaa sisältää epäpuhtauksia, ja se on poistettava mahdollisimman täydellisesti.</li> </ul>

Puhdistusvaiheet	Huomiot
<p>12. Etanolihuuhtelu: Lisää varovasti 250 mikrolitraa 70 % etanolia. Anna olla huoneenlämmössä 1 minuutin ajan. <b>Poista kaikki etanoli koskematta pellettiin.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>On tärkeää poistaa kaikki etanoli näytteestä. Näytteeseen jäänyt etanoli voi vaikuttaa määrittelyn suorituskykyyn.</b></li> <li>• Kun olet poistanut 70 % etanolin, voit poistaa näytteeseen jääneen etanolin pyörittämällä putkea pulssitoiminnolla.</li> <li>• Varo koskemasta DNA-pellettiin – se voi olla pieni tai näkymätön.</li> <li>• Jos pelletti irtoaa, sentrifugoi näytettä 5 minuuttia voimalla 15 000 × g.</li> <li>• Jos pelletti kuivuu liikaa, DNA:n liukeneminen voi vaikeutua.</li> </ul>
<p>13. Liuota DNA-pelletti lisäämällä 100 mikrolitraa TE-liuosta (ks. sivu 5). Ravistele vähintään 5 sekuntia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jos haluat korkeamman DNA-pitoisuuden, käytä 50 mikrolitraa TE-liuosta.</li> </ul>
<p>14. Varmista DNA:n täydellinen rehydraatio inkuboimalla huoneenlämmössä yön yli ja sitten ravistelemalla tai inkuboimalla 50°C:n lämpötilassa 1 tunti ja ravistelemalla toisinaan.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suuren korkean molekyylipainon DNA-määrän täydellinen rehydraatio (liukeneminen) voi olla hidasta.</li> <li>• Riittämätön DNA:n rehydraatio aiheuttaa epätarkkuutta DNA-pitoisuuden arvioinnissa ja saattaa aiheuttaa häiriöitä myöhemmissä sovelluksissa, kuten PCR-analysissa.</li> </ul>
<p>15. Täydellisesti rehydratoidun DNA:n säilytysvaihtoehtoja:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>a) Pitkäaikainen säilyttäminen TE:ssä -20°C:n lämpötilassa. Jaa halutessasi osanäytteiksi.</li> <li>b) Korkeintaan 2 kuukautta TE:ssä 4°C:n lämpötilassa.</li> </ol>	

# prepIT™•L2P-laboratorio-ohjelma

## DNA:n manuaaliseen puhdistukseen koko näytteestä

**Huomio:** Käytä tässä ohjelmassa parhaan tuloksen saadaksesi sellaista sentrifugia (joko kiinteä kiertokulma tai heiluva kauharoottori), joka pystyy tuottamaan vähintään voiman  $3\,500 \times g$ .

Seuraavassa vaiheittaisessa ohjelmassa kuvaillaan, miten voit puhdistaa DNA:n koko näytteestä (näytteen kokonaistilavuus 1–4 ml). Mukauta mainitut tilavuudet vastaamaan todellista kerättyä tilavuutta.

### Pakkauksen reagenssit

prepIT™•L2P (luettelonro PT-L2P-5 tai PT-L2P-45)

### Laitteisto ja reagenssit

- Sentrifugi, joka käyttää 15 ml:n putkia ja tuottaa vähintään voiman  $3\,500 \times g$  (ks. Taulukko 2)
- 15 ml:n kartiomaisia polypropeeniputkia (esim. BD Falcon®, luettelonro 352196)
- Mikrosentrifugi, joka voi pyöriä voimalla  $15\,000 \times g$  (valinnainen)
- 1,5 ml:n mikroputkia (esim. Axygen®, luettelonro MCT-150-C)
- 50°C:n lämpöinen ilma- tai vesi-inkubaattori
- Huoneenlämpöistä etanolia (95–100 %)
- Huoneenlämpöistä etanolia (70 %)
- DNA:n säilytyspuskuria: TE (10 mm Tris-HCl, 1 mm EDTA, pH 8,0) tai vastaavaa liuosta

**Valinnainen: puhdistusta edeltävä tarkistus (vain Oragene™-näytteet; ei tarpeen ORAcollect™-näytteille)**

Punnitse näyte ja arvioi luovuttajan antaman syljen määrä (ks. Taulukko 1). Kerätty syljen määrä on suoraan verrannollinen kerätyn DNA:n määrään. Jos esimerkiksi luovuttajan antaman syljen määrä on alle 2 ml, voit odottaa saavasi näytteestä kaikkiaan vähemmän DNA:ta.

**Sarjan paino (ilman näytettä)**

Suosittellemme punnitsemaan näytteen, kun se saapuu laboratorioon, ja arvioimaan, onko luovuttaja antanut sopivan määrän sylkeä. Odota jonkinasteista vaihtelua luovuttajien välillä. Tässä on annettu tyhjän sarjan keskimääräinen paino (Taulukko 1). Arvioi kerätyn näytteen määrä (oletuksena 1 g/ml) seuraavalla laskutoimituksella:

*Näytteen sisältävän sarjan paino - Sarjan paino ilman näytettä*

*Kerätyn näytteen määrä*

Taulukko 1	
Tuotenumero	Sarjan paino ilman näytettä
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-5757	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

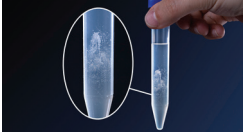

## Toimenpide


Puhdistusvaiheet	Huomiot
1. Sekoita Oragene™-/ORAcollect™-näyte kääntelemällä putkea ylösalaisin tai ravistamalla sitä hellävaroen muutaman sekunnin ajan.	<ul style="list-style-type: none"><li>Näin varmistat, että viskoosiset näytteet sekoittuvat hyvin.</li></ul>
2. Inkuboi näytettä 50°C:n lämpötilassa vesi-inkubaattorissa vähintään 1 tunti tai ilmainkubaattorissa vähintään 2 tuntia.	<ul style="list-style-type: none"><li>Tämä lämpökäsittelyvaihe on erittäin tärkeä, jotta DNA:ta vapautuisi mahdollisimman paljon ja jotta nukleasit inaktivoituisivat pysyvästi.</li><li>Voit inkuboida näytettä 50°C:n lämpötilassa yön yli, jos se on käytännöllisempää.</li><li>Voit tehdä tämän inkubaatiovaiheen milloin tahansa näytteen ottamisen ja DNA:n puhdistuksen välillä.</li><li>Ilmainkubaattori edellyttää pidemmän ajan, koska se saavuttaa lämpötasapainon vesi-inkubaattoria hitaammin.</li></ul> <p><b>Huomio:</b> Voi olla parempi käyttää ilmainkubaattoria, koska Oragene™-/ORAcollect™-putket saattavat kellua vesikylvyssä. Jos sinun on käytettävä vesikylpyä, varmista, että putken näytettä sisältävä osa pysyy veden alla.</p>
3. Siirrä koko näyte 15 ml:n sentrifugiputkeen (Kuva 1). Huomioi näytteen tilavuus.	<ul style="list-style-type: none"><li>Voit tehdä siirron joko kaatamalla tai pipetoimalla lasi- tai muovipipetillä.</li></ul>



*Kuva 1: Ennen kuin jatkat vaiheeseen 4, varmista, että olet inkuboinut koko näytteen ja siirtänyt sen uuteen 15 ml:n sentrifugiputkeen tässä kuvatussa tavalla.*

Puhdistusvaiheet	Huomiot
<p>4. Lisää 1/25 prepIT™•L2P-tuotteen tilavuudesta ja sekoita ravistelemalla muutaman sekunnin ajan (Kuva 2).</p>  <p><i>Kuva 2: Kun olet lisännyt PT-L2P-tuotteen ja inkuboinut jäässä 10 minuuttia, näyte ei näytä enää kirkaalta. Sen sijaan se on samea liuos.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esim. lisää 160 mikrolitraa prepIT™•L2P-tuotetta 4 millilitraan näytettä.</li> <li>• Näyte muuttuu sameaksi, kun epäpuhtaudet ja estäjät saostuvat.</li> </ul>
<p>5. Inkuboi jäässä 10 minuuttia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Voit inkuboida näytettä myös huoneenlämmössä, mutta silloin epäpuhtauksia poistuu vähemmän tehokkaasti.</li> </ul>
<p>6. Sentrifugoi 10 minuuttia huoneenlämmössä mahdollisimman suurella nopeudella vähintään voimalla 3 500 × g.</p>  <p><i>Kuva 3: Sentrifugoinnin jälkeen putken pohjalle on kerääntynyt sameaa materiaalia. Supernatantin pitäisi olla selvästi kirkasta.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mitä suurempi keskipakovoima on, sitä vähemmän sameaa materiaalia siirtyy puhdistettuun DNA:han (Kuva 3). Ennen kuin jatkat, varmista putken valmistajalta, että 15 ml:n sentrifugiputket kestävät keskipakovoiman.</li> <li>• Pidempi sentrifugointi (korkeintaan 20 minuuttia) voi vähentää lopullisen DNA-liuoksen sameutta (korkea A<sub>320</sub>).</li> </ul>
<p>7. Siirrä puhdas supernatantti varovasti pipetillä uuteen 15 ml:n sentrifugiputkeen. <b>Hävitä pelletti.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jätä putkeen pieni määrä supernatanttia, jotta osuisi pellettiin.</li> <li>• Pelletti sisältää sameita epäpuhtauksia. Jos kosket putkeen epähuomiossa, sentrifugoi se uudelleen.</li> </ul>

Puhdistusvaiheet	Huomiot
<p>8. Lisää kirkkaaseen supernatanttiin 1,2-kertainen määrä huoneenlämpöistä 95–100 % etanolia. Sekoita hellävaroen kääntelemällä putki ylösalaisin 10 kertaa.</p>  <p><i>Kuva 4: Kun olet lisännyt etanolin, DNA saostuu, mikä saattaa tuottaa näkyvän säiehyytymän.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA saostuu, kun sekoitat sen etanoliin.</li> <li>• Saostunut DNA saattaa näkyä DNA-säikeiden hyytymänä (Kuva 4) tai hienona saostumana riippuen DNA:n määrästä näytteessä.</li> </ul>
<p>9. Anna näytteen olla huoneenlämmössä 10 minuuttia, jotta DNA saostuu kokonaan.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Emme suosittele ikubointia <math>-20^{\circ}\text{C}</math>:n lämpötilassa, koska epäpuhtaudet saattavat saostua DNA:han.</li> </ul>
<p>10. Sentrifugoi 10 minuuttia huoneenlämmössä mahdollisimman suurella nopeudella vähintään voimalla <math>3\,500 \times g</math>.</p>	
<p>11. Poista supernatantti varovasti lasi- tai muovipipetillä ja hävitä se. Varo koskemasta DNA-pellettiin.</p>  <p><i>Kuva 5: Jos raavit putken sisäpintaa hellävaroen pipettikärjellä, saatat nähdä DNA-tahrn.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Supernatantti saattaa sisältää epäpuhtauksia, ja se on poistettava mahdollisimman täydellisesti.</li> <li>• Saostunut DNA on pellettinä putken pohjalla ja mahdollisesti tahrana putken kyljessä (Kuva 5).</li> <li>• DNA-tahra voi olla putken siinä kyljessä, joka osoitti poispäin sentrifugin keskustasta.</li> <li>• Voit paikallistaa tahrn "raavinta"-kokeella. Voit etsiä DNA-tahrn raapimalla putken sisäpintaa pipettikärjellä. Saatat nähdä kuvan 5 mukaisen tahrn.</li> </ul>

Puhdistusvaiheet	Huomiot
<p>12. Etanolihuuhtelu: Lisää putkeen varovasti 1 ml 70 % etanolia koskematta tahraan tai pellettiin. Anna putken olla huoneenlämmössä 1 minuutin ajan. <b>Pyörittele hellävaroen ja poista kaikki etanoli koskematta pellettiin tai tahraan.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>On tärkeää poistaa kaikki etanoli näytteestä. Näytteeseen jäänyt etanoli voi vaikuttaa määrittelyn suorituskykyyn.</b></li> <li>• Varo koskemasta DNA-pellettiin tai tahraan.</li> <li>• Voit sentrifugoida näytettä lyhyesti (alle 1 minuutin), jotta kaiken supernatantin poistaminen olisi helpompaa.</li> <li>• Jos pelletti irtoaa etanolihuuhteluvaiheen jälkeen, sentrifugoi näytettä 5 minuuttia mahdollisimman suurella nopeudella. vähintään voimalla <math>3\ 500 \times g</math>.</li> </ul>
<p>13. Jos käytät Oragene™ näytteitä, rehydratoi DNA lisäämällä 0,2–1 ml TE-liuosta ja ravistelemalla näytettä 30 sekuntia.</p> <p>Jos käytät ORAcollect™ näytteitä, rehydratoi DNA lisäämällä 0,2 ml TE-liuosta ja ravistelemalla näytettä 30 sekuntia.</p>  <p><i>Kuva 6: Jos ravistelet näytettä 30 sekuntia, voit ottaa talteen putken kylkeen tarttuneen DNA:n. DNA:n molekyylipaino pysyy korkeana.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jos haluat korkeamman DNA-pitoisuuden, käytä pienempää määrää TE-liuosta. Käytä vähintään 200 mikrolittraa TE-liuosta.</li> <li>• Jos pelletti kuivuu liikaa (&gt; 10 minuuttia) ja käytät alle 500 mikrolittraa TE-liuosta, DNA:n rehydratointi (liukeneminen) voi vaikeutua, saatu määrä voi vähentyä ja kvantifiointi voi vaikeutua.</li> <li>• Saostunut DNA on pellettinä putken pohjalla ja mahdollisesti tahrana putken kyljessä.</li> <li>• Varmista mahdollisimman suuri DNA:n määrä ravistelemalla näytettä DNA-liuottimen lisäämisen jälkeen (TE-liuos). Ravisteleminen varmistaa, että putken kylkeen tarttunut DNA kerätään talteen (Kuva 6).</li> <li>• Ravisteleminen ei katko DNA-säikeitä.</li> </ul>
<p>14. Varmista DNA:n täydellinen rehydraatio inkuboimalla huoneenlämmössä yön yli ja sitten ravistelemalla tai inkuboimalla 50°C:n lämpötilassa 1 tunti ja ravistelemalla toisinaan.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Riittämätön DNA:n rehydraatio aiheuttaa epätarkkuutta DNA-pitoisuuden arvioinnissa ja saattaa aiheuttaa häiriöitä myöhemmissä sovelluksissa, kuten PCR-analyyseissä.</li> </ul>



Puhdistusvaiheet	Huomiot
<p>15. Siirrä rehydratoitu DNA 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen säilytettäväksi.</p>	
<p>Valinnainen vaihe:</p> <p>a) Sentrifugoi rehydratoitua DNA:ta 15 minuuttia huoneenlämmössä voimalla 15 000 × g.</p> <p>b) Siirrä supernatantti uuteen 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen koskematta pellettiin.</p>	<p>Huomioi, että pelletissä on liukenematonta sameaa materiaalia.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Varmista mahdollisimman suuri DNA:n määrä varmistamalla DNA:n täydellinen rehydraatio (vaihe 14) ennen tätä sentrifugointivaihetta.</li> <li>• Tämä sentrifugointivaihe poistaa varmasti kaiken DNA-näytteessä edelleen olevan samean materiaalin.</li> <li>• Varo koskemasta pellettiä, kun siirät kirkkaan supernatantin uuteen putkeen.</li> </ul>
<p>16. Täydellisesti rehydratoidun DNA:n säilytysvaihtoehtoja:</p> <p>a) Pitkäaikainen säilyttäminen TE:ssä -20°C:n lämpötilassa. Jaa halutessasi osanäytteiksi.</p> <p>b) Korkeintaan 2 kuukautta TE:ssä 4°C:n lämpötilassa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puhdistetun DNA:n jäädyttäminen voi saada sen saostumaan. Kun sulatat jäädytettyä puhdistettua DNA:ta, kiinnitä huomiota erityisesti rehydraatioon, kuten vaiheessa 14 mainittiin.</li> </ul>

## DNA:n kvantifiointi

### Fluoresenssimenetelmällä

Fluoresoivia väriaineita hyödyntävät määrytykset ovat 260 nm:n kohdalla absorbanssia tarkempia kaksisäikeisen DNA:n (dsDNA) kvantifiointissa DNA-näytteestä. Suosittelemme käyttämään kaupallisesti saatavia sarjoja, kuten Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) tai QuantiFluor® dsDNA System (Promega). DNA voi olla tarpeen laimentaa TE-liuoksella korkeintaan suhteessa 1:50 ennen käyttöä kvantifiointimäärityksessä.

### Absorbanssimenetelmällä

Jos päätät kvantifioida DNA:ta absorbanssin perusteella, suosittelemme käsittelemään puhdistetun näytteen ensin ribonukleaasilla, joka pilkkoo kontaminoivaa RNA:ta, ja poistamaan sitten RNA-fragmentit saostamalla DNA:n etanolilla. Ohjelma on kuvattu tarkemmin asiakirjassa PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*.<sup>1</sup> Huomioi, että suunäytteen DNA:ssa on tyypillisesti huomattavasti enemmän RNA:ta kuin verinäytteissä. Varmista, että alkoholilla saostettu DNA on täysin liuennut, ennen kuin luet absorbanssituloksen.

**Muutokerroin:** Absorbanssi 1 260 nm:n kohdalla vastaa puhtaan kaksisäikeisen DNA:n pitoisuutta 50 ng/mikrol (50 mikrog/ml).

Varmista, että absorbanssiarvot ovat spektrofotometrin lineaarisella alueella. Laimenna ja mittaa uudelleen näytteet, jotka jäävät lineaarisen alueen ulkopuolelle. Lisätietoja on laitteesi asiakirjoissa.

### Viitteet

<sup>1</sup> RNA removal by double-RNase digestion. PD-PR-040. DNA Genotek.

## Menetelmä

1. Laimenna 10 mikrolitran osanäyte puhdistettua ribonukleaaasikäsiteltyä DNA:ta 90 mikrolitralla TE-liuosta (laimennos 1/10). Sekoita pipetoimalla hellävaroen ylös ja alas. Odota, että kuplat katoavat.
2. Käytä TE-liuosta (tyhjässä) viitesolussa.
3. Mittaa absorbanssi kohdissa 320 nm, 280 nm ja 260 nm.
4. Laske korjatut  $A_{280}$ - ja  $A_{260}$ -arvot vähentämällä absorbanssi kohdassa 320 nm ( $A_{320}$ ) arvoista  $A_{280}$  ja  $A_{260}$ .
5. DNA-pitoisuus ng/mikrol = korjattu  $A_{260} \times 10$  (laimennossuhde)  $\times 50$  (muuntokerroin).
6.  $A_{260}/A_{280}$ -suhde: Jaa korjattu  $A_{260}$ -arvo korjatulla  $A_{280}$ -arvolla.

## Esimerkki

1. Oletetaan, että mitattu  $A_{320} = 0,025$ ,  $A_{280} = 0,175$  ja  $A_{260} = 0,295$
2. Laimentamattoman näytteen DNA-pitoisuus on:  
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [laimennossuhde]} \times 50 \text{ [muuntokerroin]}$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng/mikrol tai } 135 \text{ mikrog/ml}$$
3. Korjattu  $A_{260}/A_{280}$ -suhde on:  
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$
$$= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$$
$$= 0,270 \div 0,150$$
$$= 1,80$$

Oragene-DNA ja ORAcollect DNA eivät ole myynnissä Yhdysvalloissa.

Oragene DISCOVER on ainoastaan tutkimuskäyttöön, ei käytettäväksi diagnostisissa toimenpiteissä.















Joitakin DNA Genotek -tuotteita ei välttämättä ole saatavilla kaikilla maantieteellisillä alueilla.

Oragene, prepIT, ORAcollect ja DNA Genotek ovat DNA Genotek Inc. -yhtiön tavaramerkkejä.

Kaikki muut tässä mainitut brändit ja nimet ovat omistajiensa omaisuutta.

Kaikki DNA Genotek -yhtiön ohjelmat, tekniset tiedotteet ja sovellusta koskevat huomautukset ovat saatavilla verkkosivustomme tukiosassa osoitteessa [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

### Etiketin teksti:

	UKCA-merkintä
	Diagnostinen lääketieteellinen In vitro -laite
	Luettelonumero
	CE-merkintä
	Huomio
	Valmistaja
	Lue sähköiset käyttöohjeet
	Euroopan valtuutettu edustaja
	Sveitsin valtuutettu edustaja
	Eränumero
	Yksilöllinen laitetunniste
	Viimeinen käyttöpäivä/käytön aikainen stabiileetti
	Yksikköjen määrä pakkausta kohti
15°C ↕ 30°C 59°F ↕ 86°F	Säilytysohjeet
	Valmistettu Yhdysvalloissa ulkomaisista ja kotimaisista materiaaleista

Patentti ([www.dnagenotek.com/legalnotices](http://www.dnagenotek.com/legalnotices))

PD-HB-34 (FI - Finnish) v2/2024-12

© 2024 DNA Genotek Inc., OraSure Technologies, Inc.

-yhtiön tytäryhtiö, kaikki oikeudet pidätetään.

**DNAGENOTEK™**

[www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)