

## Laboratoriemetod för att manuellt rena DNA från ett prov på 0,5 mL

För att rena genomiskt DNA från insamlingsseter tillhörande Oragene® och ORAcollect®-familjerna.

Besök vår hemsida, [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com), för information på andra språk samt för ytterligare metoder.

Följande steg-för-steg-metod beskriver hur DNA renas fram från en fraktion av ett prov på 500 µL.

### Inkluderade reagenser

- prepIT®-L2P (katalog #: PT-L2P)

### Utrustning och reagenser

- Mikrocentrifug med en kapacitet på 15000 × g
- 1,5 mL mikrorör (dvs. Axygen #MCT-150-C)
- Luft- eller vatteninkubator vid 50°C
- Rumstempererad etanol (95-100%)
- Rumstempererad etanol (70%)
- DNA-lagringsbuffert: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) eller liknande lösning

### Metod

Reningssteg	Anvisningar
1. Blanda provet i DNA Genotek-satsen genom att vända och skaka den försiktigt i några sekunder.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Det är för att säkerställa att viskösa prov blandas ordentligt.</li></ul>
2. Inkubera provet vid 50°C i en vatten-inkubator i minst 1 timme eller i en luft-inkubator i minst 2 timmar. <b>Obs!</b> Använd företrädesvis en luft-inkubator eftersom provrören kan flyta i ett vattenbad. Om ett vattenbad används, se till att den del av provröret som innehåller provet är fullständigt nedsänkt i vattnet.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Detta värmebehandlingssteg är nödvändigt för att säkerställa att DNA frigörs helt och att nukleaserna blir permanent inaktiverade.</li><li>• Detta inkubationssteg kan genomföras när som helst efter att provet har insamlats och innan det har renats.</li><li>• Hela provet måste inkuberas i det ursprungliga insamlingsröret före fraktioneringen för att säkerställa att provet är homogent.</li><li>• Provet kan inkuberas vid 50°C under natten om det är lämpligare.</li><li>• Inkubering i luft kräver längre tid eftersom temperaturutjämningen är långsammare än vid inkubering i vatten.</li></ul>
3. Överför 500 µL av provet till ett 1,5 mL mikrocentrifugrör.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Återstoden av provet kan förvaras i rumstemperatur eller frysas in (-15 till -20 °C).</li></ul>
4. För 500 µL, tillsätt 20 µL (1/25-dels volym) PT-L2P till mikrocentrifugröret och blanda genom att vortexa röret i några sekunder.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Provet kommer att bli grumligt eftersom föroreningar och inhibitorer faller ut.</li></ul>

Reningssteg	Anvisningar
5. Inkubera på is under 10 minuter.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inkubering i rumstemperatur kan ersätta inkubering på is, men kommer att vara något mindre effektiv för att eliminera föroreningar.</li> </ul>
6. Centrifugera i rumstemperatur i 5 minuter vid $15000 \times g$ .	<ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifugering under en längre tid (upp till 15 minuter) kan vara mer fördelaktig för att reducera DNA- lösningens grumlighet (hög <math>A_{320}</math>).</li> </ul>
7. Överför försiktigt den klara supernatanten till ett nytt mikrocentrifugrör med hjälp av pipett. <b>Ta bort pelleten med föroreningar.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eftersom pelleten innehåller grumliga föroreningar måste röret omcentrifugeras om pelleten råkar rubbas.</li> </ul>
8. Tillsätt 600 $\mu\text{L}$ rumstempererad 95-100 % etanol till 500 $\mu\text{L}$ supernatant. Blanda genom att vända röret försiktigt 10 gånger.	<ul style="list-style-type: none"> <li>När supernatanten blandas med etanol fälls DNA ut. Det kan se ut som en klump av DNA-fibrer eller som en finkornig fällning, beroende på hur mycket DNA som finns i provet.</li> <li>Även om det inte syns en klump, kommer DNA att kunna utvinnas genom att noggrant följa följande steg.</li> </ul>
9. Låt provet stå i rumstemperatur i 10 minuter för att DNA ska fällas ut helt och hållet.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inkubering vid <math>-20\text{ }^\circ\text{C}</math> rekommenderas inte eftersom föroreningar kan fällas ut samtidigt med DNA.</li> </ul>
10. Placera röret i mikrocentrifugen så att orienteringen går att identifiera. Centrifugera i rumstemperatur i 2 minuter vid $15000 \times g$ .	<ul style="list-style-type: none"> <li>Placera till exempel varje rör i mikrocentrifugen med fästet på locket pekande bort från rotorcentrum. Efter centrifugering kan pelleten lokaliseras (även om den är för liten för att vara synlig) vid rörets spets under fästet.</li> </ul>
11. Ta försiktigt bort supernatanten med pipett och släng den. Var försiktig och undvik att rubba DNA-pelleten.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Denna pellet innehåller DNA. Om pelleten förloras, förloras även DNA.</li> <li>Om röret roteras så att pelleten finns på den övre väggen kan all supernatant tas bort säkert genom att föra pipettens spets längs den nedre väggen.</li> <li>Supernatanten kan innehålla föroreningar och ska tas bort så fullständigt som möjligt.</li> <li>Överdriven torkning av pelleten kan medföra att DNA är svårare att lösa upp.</li> </ul>
12. Etanoltvätt: Tillsätt försiktigt 250 $\mu\text{L}$ 70 % etanol. Låt stå i rumstemperatur i 1 minut. <b>Ta bort etanolen helt och hållet utan att rubba pelleten.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Det är viktigt att ta bort all etanol från provet. Kvarbliven etanol kan påverka utförandet av analysen.</b></li> <li>Var försiktig med att inte rubba DNA- pelleten.</li> <li>DNA-pelleten kan vara liten.</li> <li>Om pelleten skulle lossna, centrifugera provet i 5 minuter vid <math>15000 \times g</math>.</li> <li>Efter att den 70 % etanolen tagits bort, kan röret pulscentrifugeras för att underlätta borttagandet av överflödig etanol.</li> </ul>

Reningssteg	Anvisningar
13. Tillsätt 100 µL TE-lösning (se sidan 1) för att lösa upp DNA-pelleten. Vortexa i minst 5 sekunder.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Om en högre DNA-koncentration behövs, använd 50 µL TE.</li> <li>• <b>OBS!</b> Stora mängder av DNA med hög molekylvikt kan vara långsamma att lösas upp helt och hållet.</li> <li>• Ofullständig hydrering av DNA kan leda till bristande tillförlitlighet i att estimera DNA-koncentrationen och till att fortsätta procedurer, t.ex. PCR, misslyckas.</li> </ul>
14. För att säkerställa total rehydrering av DNA (pellet och utstryksprov) inkubera i rumstemperatur under natten följt av vortexing eller vid 50°C i 1 timme med vortexing då och då.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ofullständig rehydrering av DNA är en orsak till bristande tillförlitlighet i att estimera DNA-koncentrationen och till att fortsätta procedurer, t.ex. PCR, potentiellt misslyckas.</li> </ul>
15. Möjligheter att lagra fullständigt rehydrerat DNA a) <b>Rekommenderas</b> i TE, i fraktioner vid -20°C under långtidsförvaring b) I TE vid 4°C i upp till 4 månader	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infrysning av renad DNA i TE kommer att orsaka att DNA fälls ut. När ett prov av fryst och renad DNA tinas, var noga med att rehydrera (se steg 14).</li> </ul>

## Kvantifiering av DNA

### Genom fluorescensmetoden

Analyser där fluorescerande färgämne används är mer specifika än absorbanter vid 260 nm för att kvantifiera dubbelsträngat DNA (dsDNA) i ett DNA-prov. Vi rekommenderar fluorescerande färgämne såsom PicoGreen® eller SYBR® Green I för att kvantifiera dsDNA, eftersom det förekommer mindre interferens av kontaminerande RNA. En billig procedur, i vilken SYBR Green I används, beskrivs i PD-PR-075, "DNA-kvantifiering genom att använda SYBR Green I färgämne och en mikroplattläsare<sup>1</sup>". Alternativt kan kommersiellt tillgängliga satser, såsom Invitrogen's Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Analys sats (Cat. No. Q-33130) användas. För båda procedurerna rekommenderar vi att renad DNA späds 1:50 med TE-lösning och att 5 µL användes i kvantifierings-analysen.

### Genom absorbansmetoden

Om du väljer att kvantifiera DNA genom absorbans, rekommenderar vi att du först behandlar det renade provet med RNase för att bryta ner det kontaminerande RNA och därefter tar bort RNA-fragmenten genom att fälla ut DNA med etanol. En detaljerad procedur beskrivs i PD-PR-040, "RNA-eliminering genom dubbel-RNase-nedbrytning<sup>2</sup>". Vänligen observera att DNA från ett oralt prov vanligtvis innehåller uppskattningsvis mer RNA än vad som hittas i blodprover. Säkerställ att det alkoholutfällda DNA är helt upplöst innan absorbansen läses av.

**Omvandlingsfaktor:** En absorbans på 1,0 vid 260 nm motsvarar en koncentration av 50 ng/µL (50 µg/mL) av rent dsDNA.

Säkerställ att absorbansvärdena ligger inom det linjära spektrometerintervallet. Späd ut och mät om de prover som hamnar utanför det linjära intervallet. För ytterligare information: Se instrumentdokumentationen.

### Method:

1. Späd en 10 µL fraktion av renat RNase-behandlat DNA med 90 µL TE (1/10 spädning). Blanda genom att försiktigt pipettera upp och ned. Vänta till dess att bubblorna försvunnit.
2. Använd TE i referenscellen. (tom)
3. Mät absorbansen vid 320 nm, 280 nm och 260 nm.
4. Beräkna korrigerade  $A_{280}$ - och  $A_{260}$ -värden genom att subtrahera absorbansen vid 320 nm ( $A_{320}$ ) från  $A_{280}$ - och  $A_{260}$ -värdena.
5. DNA koncentration i ng/µL = korrigerad  $A_{260} \times 10$  (spädningsfaktor)  $\times 50$  (omvandlingsfaktor).
6.  $A_{260}/A_{280}$ -förhållande: Dividera korrigerat  $A_{260}$  med korrigerat  $A_{280}$ .

### Exempel

1. Antag att det uppmätta  $A_{320}=0,025$ ,  $A_{280}=0,175$  och  $A_{260}=0,295$
2. DNA-koncentrationen av det utspädda provet blir:  
 $(A_{260}-A_{320}) \times 10$  [spädningsfaktor]  $\times 50$  [omvandlingsfaktor]  
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$   
 $= 0,270 \times 10 \times 50$   
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{L}$  eller  $135 \mu\text{g}/\text{mL}$
3. Det korrigerade  $A_{260}/A_{280}$  förhållandet blir  
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$   
 $= (0,296 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$   
 $= 0.270 \div 0.150$   
 $= 1,80$

### Referenser

- <sup>1</sup> DNA-kvantifiering genom att använda Fluorescence/DNase (F/D) analys. Ersatt av DNA-kvantifiering genom att använda SYBR Green I färgämne och en mikroplattläsare. DNA Genotek. PD-PR-075.
- <sup>2</sup> RNA-eliminering genom dubbel-RNase-nedbrytning. DNA Genotek. PD-PR-040.

### Teknisk support är tillgänglig måndag till fredag (9:00 till 17:00 EST):

- Avgiftsfritt (USA och Kanada): 1-866-813-6354, alternativ 6
- Övriga länder: 613-723-5757, alternativ 6
- E-post: support@dnagenotek.com

Oragene®-DNA och ORAcollect®-DNA är inte tillgängliga för försäljning i USA.

Oragene®-DISCOVER är endast tillgängligt för forskning, inte för användning inom diagnostik.

Vissa DNA Genotek-produkter är kanske inte tillgängliga i alla delar av världen.

\*Oragene, preplT och ORAcollect är registrerade varumärken för DNA Genotek Inc. Alla andra nämnda märken och namn tillhör sina respektive ägare.

Alla DNA Genotek-metoder, vitböcker och ansökningsanvisningar finns tillgängliga på vår support sida via [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

## Snabbreferensguide:

### Laboratoriemetod för att manuellt rena DNA från ett 0,5 mL prov.

Reningssteg
1. Blanda provet i DNA Genotek-satsen genom att vända och skaka den försiktigt i några sekunder.
2. Inkubera provet vid 50°C i en vatten-inkubator i minst 1 timme eller i en luft-inkubator i minst 2 timmar.
3. Överför 500 µL av provet till ett mikrocentrifugrör på 1,5 mL.
4. Tillsätt 20 µL PT-L2P och blanda genom att vortexa röret i några sekunder.
5. Inkubera på is under 10 minuter.
6. Centrifugera i rumstemperatur (RT) i 5 minuter vid 15000 × g.
7. Överför försiktigt huvuddelen av den klara supernatanten till ett nytt mikrocentrifugrör med pipett. <b>Släng pelleten.</b>
8. Tillsätt 600 µL RT 95-100 % etanol till den klara supernatanten. Blanda genom att vända röret försiktigt 10 gånger.
9. Låt provet stå i RT i 10 minuter för att DNA ska fällas ut helt och hållet.
10. Placera röret i mikrocentrifugen så att orienteringen går att identifiera Centrifugera vid RT i 2 minuter vid 15000 × g.
11. Ta försiktigt bort supernatanten med pipett och släng den. Var försiktig och undvik att rubba DNA-pelleten.
12. Tillsätt 250 µL 70 % etanol och låt stå i RT i 1 minut. <b>Ta bort etanolen helt och hållet utan att rubba pelleten.</b>
13. Tillsätt 100 µL TE-lösning och vortexa provet i minst 5 sekunder.
14. Inkubera under natten i RT eller vid 50°C i 1 timme, vortexa då och då.
15. Lagring: I fraktioner vid -20°C under långtidsförvaring (rekommenderas) eller vid 4°C i upp till 4 månader.