

Handbuch des manuellen Aufreinigungsprotokolls für die Verwendung mit

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

*Überlegene Proben
Bewährte Leistung*



Das prepIT™-L2P-Protokoll ist in weiteren Sprachen unter www.dnagenotek.com verfügbar.

**Technischer Support ist verfügbar von Montag bis Freitag
(9:00 bis 17:00 Uhr Eastern Time):**

- Gebührenfrei (Nordamerika): 1.866.813.6354, Option 6
- Alle anderen Länder: +1.613.723.5757, Option 6
- E-Mail: support@dnagenotek.com

Verantwortlicher in Großbritannien: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 –
UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

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

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

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

Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	4
Anbruchstabilität.....	4
Leistungsmerkmale	4
Materialien	4
Warn- und Vorsichtshinweise.....	4
Einschränkungen zur Produkthanwendung	5
Transport von prepIT•L2P	5
Lagerung von prepIT•L2P (Haltbarkeit)	5
Entsorgung	5
Wartung/Reparaturen	5
Zusammenfassung der Leistungsmerkmale	5
Produktpräsentationen	5
Garantien	6
Fehlerbehebung.....	6
prepIT-Laborprotokoll für die manuelle Aufreinigung von DNA aus:	
500 µl der Probe.....	7
Gesamtprobe	11
Quantifizierung von DNA	18

Verwendungszweck

Zur Aufreinigung genomischer DNA aus den Speichelentnahmekits Oragene™ und ORAcollect™.

Anbruchstabilität

Die Anbruchstabilität von PT-L2P-5 (5 ml) und PT-L2P-45 (45 ml) bei Raumtemperatur beträgt 30 Monate.

Leistungsmerkmale

- Optimierte Chemie für maximale Rückgewinnung von DNA aus oralen Proben, die mit den Produktlinien Oragene und ORAcollect entnommen wurden.
- Liefert nachweislich konsistente Ergebnisse mit DNA mit hohem Molekulargewicht.
- Skalierbare Aufreinigungsmethode für große oder kleine Probenvolumina.
- Bequemer Arbeitsablauf mit vollständiger technischer Unterstützung von der Entnahme bis zur Extraktion.
- Kostengünstige Methode, die nur minimale Ausrüstung erfordert.

Materialien

- PT-L2P-5 (5 ml) und/oder PT-L2P-45 (45 ml)
- prepIT•L2P Produkthandbuch

Warn- und Vorsichtshinweise

- Nur für Laborzwecke.
- Flüssiges Reagenz NICHT verschlucken.
- NICHT verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder das Siegel im Trichterdeckel/in der Kappe beschädigt oder undicht ist.
- prepIT•L2P NICHT über das auf der Reagenzflasche angegebene „Verwendbar bis“-Datum hinaus verwenden.
- Augen oder Haut, die mit dem Reagenz in Kontakt gekommen sind, mit Wasser spülen. NICHT verschlucken.
- Melden Sie schwerwiegende Vorkommnisse an DNA Genotek und die zuständige Behörde in Ihrem Land.
- Informationen zur sicheren Entsorgung unbenutzter Reagenzien finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.
- Das Sicherheitsdatenblatt ist verfügbar unter www.dnagenotek.com.

Einschränkungen zur Produktanwendung

Verwenden Sie prepIT•L2P nur wie in diesem Produkthandbuch beschrieben.

Transport von prepIT•L2P

prepIT•L2P kann als Laborreagenz bei Raumtemperatur transportiert werden. Es ist keine besondere Handhabung erforderlich.

Lagerung von prepIT•L2P (Haltbarkeit)

Bei Raumtemperatur lagern. Wenn ordnungsgemäß verschlossen und bei Lagerung bei Raumtemperatur beträgt die Haltbarkeit von PT-L2P-5 (5 ml) und PT-L2P-45 (45 ml) 30 Monate.

Entsorgung

Unbenutzte, beschädigte oder undichte Kits gemäß den entsprechenden geltenden Vorschriften entsorgen. Als Laborabfall entsorgen.

Wartung/Reparaturen

Nicht zutreffend. prepIT•L2P ist ein Reagenz – keine Wartung oder Reparatur erforderlich.

Zusammenfassung der Leistungsmerkmale

Mit prepIT•L2P aufgereinigte genomische DNA aus den Speichelentnahmekits Oragene™ und ORAcollect™ liefert DNA in hoher Qualität und einer Menge, die für die Verwendung in nachgelagerten Anwendungen wie PCR, Microarray und Next-Generation-Sequenzierung ausreicht.

Produktpräsentationen

prepIT•L2P ist in mehreren Volumen erhältlich, je nach Anzahl der erforderlichen Vorbereitungen. Beispiel:

Produktreferenz/ Katalognummer	Probenvorbereitungsvolumen	Anzahl der Vorbereitungen
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2.000

Garantien

Vollständige Geschäftsbedingungen für alle DNA Genotek-Produkte sind zu finden unter <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

Fehlerbehebung

Wenden Sie sich an den technischen Support von DNA Genotek unter support@dnagenotek.com, oder rufen Sie die Nummer +1 (613) 723-5757, Option 6, an.

prepIT™-Laborprotokoll für die manuelle Aufreinigung von DNA aus 500 µl einer Probe

Das folgende Schritt-für-Schritt-Protokoll beschreibt, wie DNA aus einem 500 µl-Aliquot der Probe aufgereinigt wird.

Mitgelieferte Reagenzien

prepIT•L2P (Katalog-Nr. PT-L2P-5 oder PT-L2P-45)

Geräte und Reagenzien

- Mikrozentrifuge, die mit 15.000 × g betrieben werden kann
- 1,5-m-Mikroröhrchen (z. B. Axygen®, Katalog-Nr. MCT-150-C)
- Luft- oder Wasserinkubator bei 50 °C
- Ethanol (95 % bis 100 %) bei Raumtemperatur
- Ethanol (70 %) bei Raumtemperatur
- DNA-Speicherpuffer: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) oder ähnliche Lösung

Verfahren

Aufreinigungsschritte	Hinweise
1. Die Oragene/ORAcollect-Probe durch Umdrehen oder leichtes Schütteln einige Sekunden lang mischen.	• Damit wird sichergestellt, dass viskose Proben ordentlich vermischt sind.

Aufreinigungsschritte	Hinweise
<p>2. Die Probe mindestens 1 Stunde lang bei 50 °C in einem Wasserinkubator oder mindestens 2 Stunden lang in einem Luftinkubator inkubieren.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Dieser Hitzebehandlungsschritt ist unerlässlich, um sicherzustellen, dass DNA ausreichend freigesetzt wird und Nukleasen dauerhaft inaktiviert werden. • Dieser Inkubationsschritt kann jederzeit nach der Entnahme und Aufreinigung der Probe durchgeführt werden. • Die gesamte Probe muss vor dem Aliquotieren im Original-Sammelröhrchen inkubiert werden, um die Homogenität der Probe sicherzustellen. • Die Probe kann über Nacht bei 50 °C inkubiert werden, wenn dies praktischer ist. • In einem Luftinkubator ist eine längere Inkubationszeit erforderlich, da der Temperatureausgleich langsamer ist als in einem Wasserinkubator. <p>Hinweis: Möglicherweise ist die Verwendung eines Luftinkubators vorzuziehen, da die Oragene/ ORAcollect-Röhrchen im Wasserbad schwimmen können. Wenn ein Wasserbad verwendet werden muss, ist sicherzustellen, dass der Röhrchenteil mit der Probe in Wasser eingetaucht bleibt.</p>
<p>3. 500 µl der gemischten Probe in ein 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen übertragen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Der Rest der Probe kann bei Raumtemperatur (15 °C bis 25 °C) gelagert oder eingefroren werden. • Nach Wunsch kann die Probe im Oragene/ORAcollect-Röhrchen bei -20 °C eingefroren gelagert oder zur Langzeitlagerung bei -80 °C in ein Kryoröhrchen übertragen werden.
<p>4. 20 µl (1/25stel Volumen) von prepIT•L2P in das Mikrozentrifugenröhrchen geben und einige Sekunden lang durch Vortexen mischen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Die Probe wird trüb, wenn Verunreinigungen und Inhibitoren ausgefällt werden.
<p>5. 10 Minuten lang auf Eis inkubieren.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Eine Inkubation bei Raumtemperatur ist möglich, ist jedoch etwas weniger effektiv bei der Entfernung von Verunreinigungen.

Aufreinigungsschritte	Hinweise
6. 5 Minuten lang bei Raumtemperatur und 15.000 x g zentrifugieren.	<ul style="list-style-type: none"> • Eine längere Zentrifugationsdauer (bis zu 15 Minuten) kann vorteilhaft sein, um die Trübung (hohes A₃₂₀) der endgültigen DNA-Lösung zu verringern.
7. Den klaren Überstand vorsichtig mit einer Pipettenspitze in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen übertragen. Das verunreinigte Pellet entsorgen.	<ul style="list-style-type: none"> • Das Pellet enthält trübe Verunreinigungen. Bei versehentlicher Störung muss das Röhrchen erneut zentrifugiert werden.
8. 600 µl 95 %- bis 100 %iges Ethanol bei Raumtemperatur hinzufügen. Durch 10-maliges Umdrehen vorsichtig mischen.	<ul style="list-style-type: none"> • Beim Mischen mit Ethanol wird die DNA ausgefällt. Dies kann je nach DNA-Menge in der Probe als Gerinnsel aus DNA-Fasern oder als feine Ausfällung erscheinen. • Selbst wenn kein Gerinnsel zu sehen ist, wird die DNA durch sorgfältige Befolgung der folgenden Schritte zurückgewonnen.
9. Die Probe 10 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen lassen, damit die DNA vollständig ausfallen kann.	<ul style="list-style-type: none"> • Eine Inkubation bei -20 °C wird nicht empfohlen, da Verunreinigungen zusammen mit der DNA ausgefällt werden können.
10. Das Röhrchen in einer bekannten Ausrichtung in die Mikrozentrifuge legen. 2 Minuten lang bei Raumtemperatur und 15.000 x g zentrifugieren.	<ul style="list-style-type: none"> • Beispielsweise jedes Röhrchen so in die Mikrozentrifuge stellen, dass das Gelenkstück der Kappe von der Mitte des Rotors weg zeigt. Nach der Zentrifugation kann die Position des Pellets lokalisiert werden (auch wenn es zu klein ist, um sichtbar zu sein); es befindet sich an der Spitze des Röhrchens unter dem Gelenkstück.
11. Den Überstand vorsichtig mit einer Pipettenspitze entfernen und entsorgen. Darauf achten, das DNA-Pellet nicht zu stören.	<ul style="list-style-type: none"> • Dieses Pellet enthält DNA. Der Verlust des Pellets führt zum Verlust der DNA. • Wenn das Röhrchen so gedreht wird, dass sich das Pellet an der oberen Wand befindet, kann eine Pipettenspitze sicher entlang der unteren Wand bewegt und der gesamte Überstand entfernen werden. • Der Überstand kann Verunreinigungen enthalten und muss möglichst vollständig entfernt werden.

Aufreinigungsschritte	Hinweise
<p>12. Ethanolwäsche: Vorsichtig 250 µl 70%iges Ethanol hinzufügen. 1 Minute bei Raumtemperatur stehen lassen. Das Ethanol vollständig entfernen, ohne das Pellet zu stören.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Es ist wichtig, das gesamte Ethanol aus der Probe zu entfernen. Eine Verschleppung von Ethanol kann die Leistung des Assays beeinträchtigen. • Nach dem Entfernen des 70%igen Ethanols kann das Röhrchen impulsgeschleudert werden, um restliches Ethanol zu entfernen. • Darauf achten, das DNA-Pellet nicht zu stören; möglicherweise ist es klein oder unsichtbar. • Sollte sich das Pellet lösen, die Probe 5 Minuten lang bei 15.000 × g zentrifugieren. • Übermäßiges Trocknen des Pellets kann das Auflösen der DNA erschweren.
<p>13. 100 µl TE-Lösung hinzufügen (siehe Seite 5), um das DNA-Pellet aufzulösen. Mindestens 5 Sekunden lang vortexen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Wenn eine höhere DNA-Konzentration gewünscht wird, sollten 50 µl TE verwendet werden.
<p>14. Um eine vollständige Rehydrierung der DNA zu gewährleisten, über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend vortexen oder 1 Stunde bei 50 °C mit gelegentlichem Vortexen inkubieren.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Große Mengen hochmolekularer DNA können langsam vollständig rehydriert (aufgelöst) werden. • Eine unvollständige Rehydrierung der DNA ist eine Ursache für Ungenauigkeiten bei der Schätzung der DNA-Konzentration und potenzielles Versagen nachgelagerter Anwendungen wie PCR.
<p>15. Möglichkeiten zur Lagerung der vollständig rehydrierten DNA:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) In TE bei -20 °C für die Langzeitlagerung. Auf Wunsch in Aliquote aufteilen. b) In TE bei 4 °C für bis zu 2 Monate. 	

prepIT-Laborprotokoll

für die manuelle Aufreinigung von DNA aus der Gesamtprobe

Hinweis: Dieses Protokoll erfordert die Verwendung einer Zentrifuge (entweder Festwinkel- oder Ausschwingrotor), die in der Lage ist, mindestens $3.500 \times g$ zu erzeugen, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

Das folgende Schritt-für-Schritt-Protokoll beschreibt, wie DNA aus der Gesamtprobe (1 ml bis 4 ml Gesamtvolumen) aufgereinigt wird. Die angegebenen Volumina sollten an das tatsächlich entnommene Volumen angepasst werden.

Mitgelieferte Reagenzien

prepIT•L2P (Katalog-Nr. PT-L2P-5 oder PT-L2P-45)

Geräte und Reagenzien

- Zentrifuge, die 15-ml-Röhrchen aufnimmt und mindestens $3.500 \times g$ erzeugen kann (siehe Tabelle 2)
- Konische 15-ml-Polypropylenröhrchen (z. B. BD Falcon® Katalog-Nr. 352196)
- Mikrozentrifuge, die mit $15.000 \times g$ betrieben werden kann (optional)
- 1,5-ml-Mikroröhrchen (z. B. Axygen®, Katalog-Nr. MCT-150-C)
- Luft- oder Wasserinkubator bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$
- Ethanol (95 % bis 100 %) bei Raumtemperatur
- Ethanol (70 %) bei Raumtemperatur
- DNA-Speicherpuffer: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) oder ähnliche Lösung

Optional: Prüfung vor der Aufreinigung (gilt nur für Oragene-Proben; nicht erforderlich für ORAcollect-Proben)

Die Probe wiegen, um die vom Spender abgegebene Speichelmenge abzuschätzen (siehe Tabelle 1). Die entnommene Speichelmenge ist direkt proportional zur gewonnenen DNA-Menge. Wenn ein Spender beispielsweise weniger als 2 ml Speichel abgegeben hat, ist von einer geringeren Gesamtausbeute aus dieser Probe auszugehen.

Gewicht des Kits (ohne Probe)

Es wird empfohlen, Proben sofort nach dem Eintreffen im Labor zu wiegen, um abzuschätzen, ob der Spender die richtige Speichelmenge bereitgestellt hat. Eine gewisse Variabilität zwischen den Spendern ist zu erwarten. Das durchschnittliche Gewicht eines leeren Kits ist angegeben (Tabelle 1). Die folgende Berechnung durchführen, um die entnommene Probenmenge abzuschätzen (unter der Annahme von 1 g/ml):

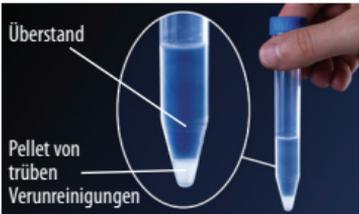
$$\frac{\text{Gewicht des Kits mit Probe} - \text{Gewicht des Kits ohne Probe}}{\text{Menge der entnommenen Probe}}$$

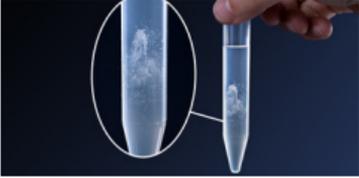
Produkt-Nr.	Gewicht des Kits (ohne Probe)
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

Verfahren

Aufreinigungsschritte	Hinweise
1. Die Oragene/ORAcollect-Probe durch Umdrehen oder leichtes Schütteln einige Sekunden lang mischen.	<ul style="list-style-type: none">• Damit wird sichergestellt, dass viskose Proben ordentlich vermischt sind.
2. Die Probe mindestens 1 Stunde lang bei 50 °C in einem Wasserinkubator oder mindestens 2 Stunden lang in einem Luftinkubator inkubieren.	<ul style="list-style-type: none">• Dieser Hitzebehandlungsschritt ist unerlässlich, um die DNA-Ausbeute zu maximieren und sicherzustellen, dass Nukleasen dauerhaft inaktiviert werden.• Die Probe kann über Nacht bei 50 °C inkubiert werden, wenn dies praktischer ist.• Dieser Inkubationsschritt kann jederzeit nach der Entnahme und Aufreinigung der Probe durchgeführt werden.• In einem Luftinkubator ist eine längere Inkubationszeit erforderlich, da der Temperatureausgleich langsamer ist als in einem Wasserinkubator. <p>Hinweis: Möglicherweise ist die Verwendung eines Luftinkubators vorzuziehen, da die Oragene/ORAcollect-Röhrchen im Wasserbad schwimmen können. Wenn ein Wasserbad verwendet werden muss, ist sicherzustellen, dass der Röhrchenteil mit der Probe in Wasser eingetaucht bleibt.</p>
3. Die gesamte Probe in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen übertragen (Abbildung 1). Die Probenmenge notieren. 	<ul style="list-style-type: none">• Die Übertragung kann entweder durch Ausgießen oder durch Pipettieren mit einer Glas- oder Kunststoffpipette erfolgen.

Abbildung 1: Vor dem Fortfahren mit Schritt 4 sicherstellen, dass die gesamte Probe wie abgebildet inkubiert und in ein frisches 15-ml-Zentrifugenröhrchen übertragen wurde.

Aufreinigungsschritte	Hinweise
<p>4. 1/25stel Volumen prepIT•L2P hinzufügen und durch Vortexen mehrere Sekunden lang mischen (Abbildung 2).</p>  <p><i>Abbildung 2: Nach dem Hinzufügen von PT-L2P und 10-minütiger Inkubation auf Eis sieht die Probe nicht mehr klar aus, sondern wie eine trübe Lösung.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Beispiel: Zu einer 4-ml-Probe 160 µl prepIT•L2P hinzufügen. • Die Probe wird trüb, wenn Verunreinigungen und Inhibitoren ausgefällt werden.
<p>5. 10 Minuten lang auf Eis inkubieren.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Eine Inkubation bei Raumtemperatur ist möglich, ist jedoch etwas weniger effektiv bei der Entfernung von Verunreinigungen.
<p>6. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur und möglichst hoher Drehzahl zentrifugieren. Mindestens 3.500 × g.</p>  <p><i>Abbildung 3: Nach dem Zentrifugieren bildet sich am Boden des Röhrchens eine Ansammlung von trübem Material. Der Überstand sollte sichtbar klar sein.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Eine höhere Zentrifugalkraft minimiert die Menge an trübem Material, das in die gereinigte DNA übertragen wird (Abbildung 3). Bevor Sie fortfahren, sollten Sie sich beim Röhrchenhersteller erkundigen, ob die 15-ml-Zentrifugenröhrchen der Zentrifugalkraft standhalten können. • Eine längere Zentrifugationsdauer (bis zu 20 Minuten) kann vorteilhaft sein, um die Trübung (hohes A_{320}) der endgültigen DNA-Lösung zu verringern.
<p>7. Den klaren Überstand vorsichtig mit einer Pipette in ein frisches 15-ml-Zentrifugenröhrchen übertragen. Das Pellet entsorgen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Eine kleine Menge des Überstands zurücklassen, um das Pellet nicht zu stören. • Das Pellet enthält trübe Verunreinigungen. Bei versehentlicher Störung muss das Röhrchen erneut zentrifugiert werden.

Aufreinigungsschritte	Hinweise
<p>8. Die 1,2-fache Menge von 95%- bis 100%igem Ethanol bei Raumtemperatur zum klaren Überstand hinzufügen. Durch 10-maliges Umdrehen vorsichtig mischen.</p>  <p><i>Abbildung 4: Nach Zugabe von Ethanol fällt die DNA aus, was zu einem sichtbaren Faserklumpen führen kann.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Beim Mischen mit Ethanol wird die DNA ausgefällt. • Ausgefällte DNA kann je nach DNA-Menge in der Probe als Gerinnsel aus DNA-Fasern (Abbildung 4) oder als feine Ausfällung erscheinen.
<p>9. Die Probe 10 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen lassen, damit die DNA vollständig ausgefällt werden kann.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Eine Inkubation bei -20 °C wird nicht empfohlen, da Verunreinigungen zusammen mit der DNA ausgefällt werden können.
<p>10. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur und möglichst hoher Drehzahl zentrifugieren. Mindestens 3.500 × g.</p>	
<p>11. Den Überstand vorsichtig mit einer Glas- oder Kunststoffpipette entfernen und entsorgen. Darauf achten, das DNA-Pellet nicht zu stören.</p>  <p><i>Abbildung 5: Durch vorsichtiges Reiben mit einer Pipettenspitze entlang der Innenseite des Röhrchens kann das Vorhandensein eines DNA-Abstrichs sichtbar werden.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Der Überstand kann Verunreinigungen enthalten und muss möglichst vollständig entfernt werden. • Ausgefällte DNA wird als Pellet am Boden des Röhrchens und möglicherweise als Abstrich an der Seite des Röhrchens zu finden sein (Abbildung 5). • Der DNA-Abstrich kann sich auf der von der Mitte der Zentrifuge abgewandten Seite des Röhrchens befinden. • Mit dem „Scratch“-Test kann ein Abstrich lokalisiert werden. Um auf Vorhandensein eines DNA-Abstrichs zu überprüfen, mit einer Pipettenspitze an der Innenseite des Röhrchens kratzen. Möglicherweise ist ein Abstrich, wie in Abbildung 5 gezeigt, sichtbar.

Aufreinigungsschritte	Hinweise
<p>12. Ethanolwäsche: Vorsichtig 1 ml 70%iges Ethanol zum Röhrchen hinzufügen, ohne den Abstrich oder das Pellet zu stören. 1 Minute bei Raumtemperatur stehen lassen. Das Ethanol vorsichtig schwenken und vollständig entfernen, ohne das Pellet und den Abstrich zu stören.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Es ist wichtig, das gesamte Ethanol aus der Probe zu entfernen. Eine Verschleppung von Ethanol kann die Leistung des Assays beeinträchtigen. • Darauf achten, das DNA-Pellet oder den Abstrich nicht zu stören. • Eine kurze Zentrifugation (weniger als 1 Minute) kann durchgeführt werden, um die vollständige Entfernung des Überstands zu erleichtern. • Sollte sich das Pellet nach dem Waschschrift mit Ethanol lösen, die Probe 5 Minuten lang bei möglichst hoher Drehzahl zentrifugieren. Mindestens $3.500 \times g$.
<p>13. Bei Oragene-Proben die DNA rehydrieren; dazu 0,2 bis 1 ml TE-Lösung hinzufügen und die Probe 30 Sekunden lang vortexen.</p> <p>Bei ORAcollect-Proben die DNA rehydrieren; dazu 0,2 ml TE-Lösung hinzufügen und die Probe 30 Sekunden lang vortexen.</p>  <p><i>Abbildung 6: Durch Vortexen der Probe für 30 Sekunden kann an der Seite des Röhrchens verschmierte DNA zurückgewonnen werden. Die DNA bleibt hochmolekular.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Wenn eine höhere DNA-Konzentration erwünscht ist, kann die TE-Menge reduziert werden. Mindestens 200 μl TE-Lösung sollte verwendet werden. • Übermäßiges Trocknen des Pellets (> 10 Minuten) und die Verwendung von weniger als 500 μl TE-Lösung kann die Rehydrierung (Auflösung) der DNA erschweren und die Ausbeute verringern oder die Quantifizierung erschweren. • Ausgefällte DNA wird als Pellet am Boden des Röhrchens und möglicherweise als Abstrich an der Seite des Röhrchens zu finden sein. • Um eine maximale DNA-Rückgewinnung zu gewährleisten, muss die Probe nach der Zugabe des DNA-Lösungsmittels (TE-Lösung) gevortext werden. Vortexen stellt sicher, dass die an der Seite des Röhrchens verschmierte DNA zurückgewonnen wird (Abbildung 6). • Vortexen wird die DNA nicht verschmieren.
<p>14. Um eine vollständige Rehydrierung der DNA zu gewährleisten, über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend vortexen oder 1 Stunde bei 50 °C mit gelegentlichem Vortexen inkubieren.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Die unvollständige Rehydrierung der DNA ist eine Ursache für Ungenauigkeiten bei der Schätzung der DNA-Konzentration und potenzielles Versagen nachgelagerter Anwendungen wie PCR.

Aufreinigungsschritte	Hinweise
<p>15. Die rehydrierte DNA zur Aufbewahrung in ein 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen übertragen.</p>	
<p>Optionaler Schritt:</p> <ol style="list-style-type: none"> Die rehydrierte DNA bei Raumtemperatur 15 Minuten lang bei $15.000 \times g$ zentrifugieren. Den Überstand in ein frisches 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen übertragen, ohne das Pellet zu stören. 	<p>Es ist zu beachten, dass das Pellet unlösliches, trübes Material enthält.</p> <ul style="list-style-type: none"> Zur Maximierung der DNA-Rückgewinnung sicherstellen, dass die DNA vollständig rehydriert ist (Schritt 14), bevor dieser Zentrifugationsschritt durchgeführt wird. Dieser Zentrifugationsschritt stellt sicher, dass alle verbleibenden Trübstoffe aus der DNA-Probe entfernt werden. Es sollte darauf geachtet werden, das Pellet nicht zu stören, wenn der klare Überstand in ein frisches Röhrchen übertragen wird.
<p>16. Möglichkeiten zur Lagerung der vollständig rehydrierten DNA:</p> <ol style="list-style-type: none"> In TE bei -20 °C für die Langzeitlagerung. Nach Wunsch in Aliquote aufteilen. In TE bei 4 °C für bis zu 2 Monate. 	<ul style="list-style-type: none"> Das Einfrieren aufgereinigter DNA in TE kann dazu führen, dass die DNA ausfällt. Beim Auftauen von gefrorener aufgereinigter DNA sorgfältig auf die Rehydrierung achten, wie in Schritt 14 beschrieben.

Quantifizierung von DNA

Mithilfe der Fluoreszenzmethode

Assays, die Fluoreszenzfarbstoffe zur Quantifizierung der Menge an doppelsträngiger DNA (dsDNA) in einer DNA-Probe verwenden, sind spezifischer als die Absorption bei 260 nm. Wir empfehlen die Verwendung handelsüblicher Kits wie des Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA-Assay-Kits (Thermo Fisher Scientific) oder des QuantiFluor® dsDNA-Systems (Promega). Die DNA muss möglicherweise bis zu 1:50 mit TE verdünnt werden, bevor sie im Quantifizierungsassay verwendet wird.

Mithilfe der Absorptionsmethode

Wenn DNA durch Absorption quantifiziert werden soll, wird empfohlen, die aufgereinigte Probe zuerst mit RNase zu behandeln, um kontaminierende RNA zu verdauen, und dann die RNA-Fragmente durch Ethanol-fällung der DNA zu entfernen. Ein detailliertes Protokoll ist in PD-PR-040, *RNA-Entfernung durch Doppel-RNase-Verdau*, zu finden.¹ Es ist zu beachten, dass DNA aus einer oralen Probe typischerweise deutlich mehr RNA enthält als DNA aus Blutproben. Sicherstellen, dass die mit Alkohol ausgefällte DNA vollständig aufgelöst ist, bevor die Absorption gemessen wird.

Umrechnungsfaktor: Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 ng/µl (50 µg/ml) für reine, doppelsträngige DNA.

Sicherstellen, dass die Absorptionswerte innerhalb des linearen Bereichs des Spektralphotometers liegen. Außerhalb des linearen Bereichs liegende Proben verdünnen und erneut messen. Weitere Informationen sind der Instrumentendokumentation zu entnehmen.

Literatur

¹ RNA-Entfernung durch Doppel-RNase-Verdau. PD-PR-040. DNA Genotek.

Methode

1. Ein 10- μ l-Aliquot mit aufgereinigter RNase-behandelter DNA mit 90 μ l TE verdünnen (1/10-Verdünnung). Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen. Warten, bis sich die Blasen aufgelöst haben.
2. TE in der (leeren) Referenzzelle verwenden.
3. Die Absorption bei 320 nm, 280 nm und 260 nm messen.
4. Die korrigierten A_{280} - und A_{260} -Werte berechnen; dazu die Absorption bei 320 nm (A_{320}) von den A_{280} - und A_{260} -Werten subtrahieren.
5. DNA-Konzentration in ng/ μ l = korrigierter A_{260} -Wert \times 10 (Verdünnungsfaktor) \times 50 (Umrechnungsfaktor).
6. A_{260}/A_{280} -Verhältnis: Korrigierten A_{260} -Wert durch den korrigierten A_{280} -Wert dividieren.

Beispiel

1. Angenommene Messwerte: $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ und $A_{260} = 0,295$
2. Die DNA-Konzentration der verdünnten Probe wird wie folgt sein:
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [Verdünnungsfaktor]} \times 50 \text{ [Umrechnungsfaktor]}$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng}/\mu\text{l oder } 135 \mu\text{g/ml}$$
3. Das korrigierte A_{260}/A_{280} -Verhältnis wird wie folgt sein:
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$
$$= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$$
$$= 0,270 \div 0,150$$
$$= 1,80$$

Oragene•DNA und ORAcollect•DNA sind in den Vereinigten Staaten nicht erhältlich.
Oragene•DISCOVER ist nur für Forschungszwecke bestimmt, nicht für diagnostische Verfahren.
Einige DNA Genotek-Produkte sind möglicherweise nicht in allen Regionen verfügbar.
Oragene, prepIT, ORAcollect und DNA Genotek sind Marken von DNA Genotek Inc.
Alle anderen hier aufgeführten Marken und Namen sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.
Alle DNA Genotek-Protokolle, Whitepaper und Anwendungshinweise sind im Supportabschnitt
unserer Website unter www.dnagenotek.com verfügbar.

Etikettenlegende:

	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	CE-Kennzeichnung
	Hersteller
	Packungsbeilage beachten
	EU-Bevollmächtigter
	Schweizer Bevollmächtigter
	Losnummer
	Einmalige Produktkennung
	Anbruchstabilität
15 °C ↕ 30 °C 59 °F ↕ 86 °F	Lagerungshinweise

Patent (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-00026 (DE - German) Issue 1/2022-09

© 2022 DNA Genotek Inc., eine Tochtergesellschaft von OraSure Technologies, Inc.,
alle Rechte vorbehalten.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com