

**Příručka k protokolu pro
manuální purifikaci
k použití s**

prepiTTM•L2P

DNagenotekTM

www.dnagenotek.com

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

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

*Vynikající vzorky
Osvědčené provedení*



Obsah

Určené použití/účel	4
Stabilita při použití	4
Vlastnosti	4
Materiály	4
Upozornění a bezpečnostní opatření	4
Omezení použití výrobku	5
Přeprava prepIT•L2P	5
Uchování prepIT•L2P (skladovatelnost)	5
Likvidace	5
Údržba/opravy	5
Souhrn údajů o funkčnosti	5
Dodávaná balení přípravku	5
Záruky	6
Řešení problémů	6

prepIT•L2P: laboratorní protokol pro manuální purifikaci DNA ze:

Vzorku o objemu 500 µl	7
Celého vzorku	11
Kvantifikace DNA	18


Protokol k prepIT™•L2P je dostupný v dalších jazycích na webu www.dnagenetek.com

Technická podpora je k dispozici v pondělí až pátek (9:00 až 17:00 východoamerického času):

- Bezplatné telefonní číslo (Severní Amerika): 1.866.813.6354, volba 6
- Ve všech ostatních zemích: +1.613.723.5757, volba 6
- E-mail: support@dnagenetek.com

■ DNA Genetek Inc.
3000 - 500 Palladium Drive
Ottawa, ON, Kanada K2V 1C2
E-mail: support@dnagenetek.com

Odpovědná osoba ve Spojeném království: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

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

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

Australský sponzor: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000 Austrálie

Určené použití/účel

Purifikace genomické DNA z odběrových sad na sliny Oragene™ a ORAcollect™.

Stabilita při použití

PT-L2P-5 (5 ml) a PT-L2P-45 (45 ml) mají v pokojové teplotě stabilitu při použití 30 měsíců.

Vlastnosti

- Optimalizovaný chemický proces k maximálnímu získání DNA ze vzorků z ústní dutiny odebraných s použitím výrobků řady Oragene a ORAcollect.
- Přináší prokázané konzistentní výsledky s vysokomolekulární DNA.
- Škálovatelná purifikační metoda pro velké nebo malé objemy vzorků.
- Snadný pracovní postup a kompletní technická podpora od odběru vzorku po extrakci.
- Nákladově úsporná metoda s minimálními požadavky na vybavení.

Materiály

- PT-L2P-5 (5 ml) a/nebo PT-L2P-45 (45 ml)
- Příručka k prepIT•L2P

Upozornění a bezpečnostní opatření

- Pouze pro laboratorní použití.
- Reagencii NEPOUŽÍVEJTE.
- NEPOUŽÍVEJTE, pokud je balení poškozeno, pokud je na víčku nálevky/uzávěru narušeno zapečetění nebo pokud netěsní.
- NEPOUŽÍVEJTE prepIT•L2P po datu v rubrice „Použitelné do“ na lahvičce reagentie.
- Pokud se reagentie dostane do kontaktu s očima nebo pokožkou, omyjte je vodou. NEPOUŽÍVEJTE.
- Jakékoli závažné problémy nahlaste společnosti DNA Genotek a příslušnému úřadu ve vaší zemi.
- Pokyny k bezpečné likvidaci nespotřebované reagentie uvádí bezpečnostní list.
- Je k dispozici na webu www.dnagenotek.com.

Omezení použití přípravku

Používejte prepIT•L2P pouze v souladu s pokyny v této příručce.

Přeprava prepIT•L2P

prepIT•L2P lze jako laboratorní reagentii přepravovat při teplotě okolního prostředí. Není zapotřebí žádné zvláštní zacházení.

Uchovávání prepIT•L2P (skladovatelnost)

Skladujte při pokojové teplotě. Jsou-li přípravky PT-L2P-5 (5 ml) a PT-L2P-45 (45 ml) správně uzavřeny a skladovány při pokojové teplotě, bude jejich skladovatelnost 30 měsíců.

Likvidace

Zlikvidujte nespotřebované, poškozené nebo netěsnící sady v souladu s příslušnými místními, státními a federálními předpisy. Likvidujte je jako laboratorní odpad.

Údržba/opravy

Není relevantní. prepIT•L2P je reagentie a nevyžaduje žádnou údržbu či opravy.

Souhrn údajů o funkčnosti

Genomická DNA z odběrových sad na sliny Oragene a ORAcollect, purifikovaná s použitím prepIT•L2P, poskytuje vysokou kvalitu dostačující množství DNA k použití v downstream aplikacích, jako je PCR, microarray analýza a sekvenování nové generace.

Dodávaná balení přípravku

prepIT•L2P je k dispozici v různých objemech, v závislosti na požadovaném počtu preparátů. Příklad:

Referenční/katalogové číslo produktu	Objem vzorkového preparátu	Počet preparátů
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2 000

Záruky

Plné znění podmínek a ustanovení pro všechny produkty společnosti DNA Genetek naleznete na adrese <http://www.dnagenetek.com/ROW/terms/index.html>.

Řešení problémů

Obráťte se na technickou podporu společnosti DNA Genetek na adrese support@dnagenetek.com nebo telefonicky na číslo +1 (613) 723-5757, volba 6.

prepIT™•L2P: laboratorní protokol pro manuální purifikaci DNA ze vzorku o objemu 500 µl

Následující podrobný protokol popisuje jednotlivé kroky purifikace DNA z alikvotního vzorku o objemu 500 µl.

Dodané reagensie

prepIT•L2P (kat. č. PT-L2P-5 nebo PT-L2P-45)

Vybavení a reagensie

- Mikrocentrifuga schopná dosáhnout odstředivé síly 15 000 × g
- 1,5ml mikrozkušavky (např. Axygen® kat. č. MCT-150-C)
- Vzduchový nebo vodní inkubátor s teplotou 50 °C
- Ethanol (95% až 100%) v pokojové teplotě
- Ethanol (70%) v pokojové teplotě
- Pufr pro skladování DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) nebo podobný roztok

Postup

Kroky purifikace	Poznámky
1. Míchejte vzorek ze sady Oragene/ORACollect po několika sekundách převrácením nebo jemným protřepáváním.	• Zajistěte tak řádné promíchání viskózních vzorků.

Kroky purifikace	Poznámky
2. Inkubujte vzorek při teplotě 50 °C ve vodním inkubátoru nejméně 1 hodinu, nebo ve vzduchovém inkubátoru nejméně 2 hodiny.	<ul style="list-style-type: none"> • Tento krok zahřívání je nezbytný k zajištění adekvátního uvolnění DNA a trvalé deaktivace nukleáz. • Inkubaci lze provést kdykoli po odebrání vzorku před jeho purifikací. • K zajištění homogenity je nutno celý vzorek inkubovat v původní odběrové zkumavce před jeho rozdělením na alikvotní části. • Pokud vám to lépe vyhovuje, můžete vzorek inkubovat při 50 °C přes noc. • Inkubace ve vzduchovém inkubátoru se musí provádět déle, protože vyrovnání teploty je pomalejší než u vodního inkubátoru. <p>Poznámka: Může být vhodnější použít vzduchový inkubátor, protože zkumavky Oragene/ORACollect mají tendenci ve vodní lázni plavat na hladině. Pokud musíte použít vodní lázeň, zajistěte, aby část zkumavky obsahující vzorek zůstala ponořená ve vodě.</p>
3. Přeneste 500 µl promíchaného vzorku do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.	<ul style="list-style-type: none"> • Zbytek vzorku můžete skladovat při pokojové teplotě (15 °C až 25 °C) nebo zmrazený. • Podle potřeby lze vzorek uchovávat ve zmrazené zkumavce Oragene/ORACollect při teplotě -20 °C, nebo jej přenést do kryozkumavky k dlouhodobému uskladnění při teplotě -80 °C.
4. Přidejte do mikrocentrifugační zkumavky 20 µl (1/25 objemu) roztoku prepIT-L2P a promíchejte vortexováním po několik sekund.	<ul style="list-style-type: none"> • Vzorek se zakalí v důsledku vysrážení nečistot a inhibitorů.
5. Inkubujte na ledu po dobu 10 minut.	<ul style="list-style-type: none"> • Můžete namísto toho inkubovat vzorek při pokojové teplotě, ale odstranění nečistot tak bude poněkud méně efektivní.

Kroky purifikace	Poznámky
6. Centrifugujte 5 minut při pokojové teplotě při 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Delší doba centrifugace (až 15 minut) může být přínosná pro snížení zakalenosti (vysoká hodnota A₃₂₀) konečného roztoku DNA.
7. Opatrně přeneste pipetovací špičkou čirý supernatant do nové mikrocentrifugační zkumavky. Peletu obsahující nečistoty zlikvidujte.	<ul style="list-style-type: none"> • Peleta obsahuje kalné nečistoty. Pokud ji nechtěně narušíte, je zapotřebí zkumavku centrifugovat znovu.
8. Přidejte 600 µl 95% až 100% ethanolu v pokojové teplotě. Opatrně promíchejte tak, že zkumavku 10krát převrátíte dnem vzhůru.	<ul style="list-style-type: none"> • DNA se bude během mísení s ethanolem srážet. Může se jevit jako chomáček vláken DNA nebo jako jemná sráženina, podle toho, kolik DNA vzorek obsahuje. • I když chomáček nebude viditelný, lze DNA vytěžit pečlivým provedením dalších kroků.
9. Nechejte vzorek po 10 minut stát při pokojové teplotě, aby se DNA plně vysrážela.	<ul style="list-style-type: none"> • Nedoporučujeme inkubaci při -20 °C, protože nečistoty se mohou srážet spolu s DNA.
10. Vložte zkumavku do mikrocentrifugy a povšimněte si, v jaké je poloze. Centrifugujte 2 minuty při pokojové teplotě při 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Například umístěte každou zkumavku do mikrocentrifugy tak, aby úchyt víčka směřoval ven od středu rotoru. Po centrifugaci pak lze zjistit, kde se nachází peleta (i když bude příliš malá, než aby byla viditelná) – bude na vršku zkumavky pod úchytem víčka.
11. Opatrně odeberte peletu pipetovací špičkou a zlikvidujte ji. Dejte pozor, abyste nenarušili peletu DNA.	<ul style="list-style-type: none"> • Tato peleta obsahuje DNA. Její ztráta způsobí ztrátu DNA. • Když otočíte zkumavku tak, aby byla peleta u její horní stěny, budete moci bezpečně pohybovat pipetovací špičkou podél dolní stěny a odstranit všechny supernatant. • Supernatant může obsahovat nečistoty a je nutno jej odstranit co možná neúplněji.

Kroky purifikace	Poznámky
12. Promývání ethanolem: Opatrně přidejte 250 µl 70% ethanolu. Nechejte stát při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Opatrně odstraňte ethanol a nenarušte přitom peletu.	<ul style="list-style-type: none"> • Je důležité odstranit ze vzorku všechny ethanol. Zbytek ethanolu může ovlivnit výsledky analýzy. • Po odstranění 70% ethanolu pomůže pulzní centrifugace zkumavky odstranit jeho zbytky. • Dejte však pozor, aby nebyla narušena peleta DNA, která může být malá nebo i neviditelná. • Jestliže se peleta oddělí, centrifugujte vzorek po 5 minut při 15 000 × g. • Nadměrné vysušení pelety může ztížit rozpouštění DNA.
13. Rozpusťte peletu DNA přidáním 100 µl roztoku TE (viz str. 5). Vortexujte nejméně po dobu 5 sekund.	<ul style="list-style-type: none"> • Pokud potřebujete vyšší koncentraci DNA, použijte 50 µl roztoku TE.
14. Abyste zajistili kompletní rehydrataci DNA, inkubujte při pokojové teplotě přes noc a pak vortexujte, nebo inkubujte při teplotě 50 °C po dobu 1 hodiny s občasným vortexováním.	<ul style="list-style-type: none"> • Úplná rehydratace (rozpuštění) velkých množství vysokomolekulární DNA může probíhat pomalu. • Neúplná rehydratace DNA je příčinou nepřesných odhadů koncentrace DNA a potenciální neúspěšnosti downstream aplikací, jako je PCR.
15. Možnosti uchování plně rehydrované DNA: a) Dlouhodobé uskladnění v roztoku TE při teplotě -20 °C. Podle potřeby rozdělte na alikvotní části. b) Po dobu až 2 měsíců v roztoku TE při teplotě 4 °C.	

prepIT•L2P: laboratorní protokol

pro manuální purifikaci DNA z celého vzorku

Poznámka: Tento protokol vyžaduje pro dosažení optimálních výsledků použití centrifugy (s rotorem s fixním úhlem nebo se závěsy) schopné dosahovat odstředivé síly nejméně 3 500 × g.

Následující podrobný protokol popisuje jednotlivé kroky purifikace DNA z celého vzorku (o celkovém objemu 1 ml až 4 ml). Uvedené objemy je nutno upravit podle skutečného odebraného objemu.

Dodané reagensie

prepIT•L2P (kat. č. PT-L2P-5 nebo PT-L2P-45)

Vybavení a reagensie

- Centrifuga, do níž se vejdou 15 ml zkumavky a která je schopna dosahovat odstředivé síly nejméně 3 500 × g (viz tabulka 2)
- 15 ml kónické polypropylenové zkumavky (např. BD Falcon® kat. č. 352196)
- Mikrocentrifuga schopná dosahovat odstředivé síly 15 000 × g (volitelná možnost)
- 1,5 ml mikrozkumavky (např. Axygen® kat. č. MCT-150-C)
- Vzduchový nebo vodní inkubátor s teplotou 50 °C
- Ethanol (95% až 100%) v pokojové teplotě
- Ethanol (70%) v pokojové teplotě
- Pufr pro skladování DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) nebo podobný roztok

Volitelná možnost: Kontrola před purifikací (to se týká jen vzorků ze sady Oragene, nevyžaduje se pro vzorky z ORACollect)

Zvažte vzorek, abyste mohli odhadnout množství slin získaných od dárce (viz tabulka 1). Množství odebraných slin je přímo úměrné množství získané DNA. Jestliže například bylo od dárce získáno méně než 2 ml slin, můžete předpokládat, že celkově vám tento vzorek poskytne menší množství DNA.

Hmotnost sady (bez vzorku)

Po doručení vzorku do laboratoře doporučujeme vzorek zvážit, abyste odhadli, zda bylo od dárce získáno správné množství slin. Můžete předpokládat, že tato množství budou u různých dárců odlišná. Uvádíme zde průměrnou hmotnost prázdné sady (tabulka 1). Množství odebraného vzorku (za předpokladu 1 g/ml) odhadnete pomocí tohoto výpočtu:


$$\frac{\text{Hmotnost sady obsahující vzorek} - \text{Hmotnost sady bez vzorku}}{\text{Množství odebraného vzorku}}$$


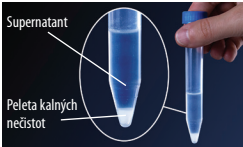
Množství odebraného vzorku

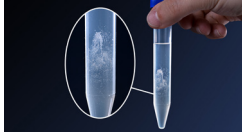

Tabulka 1

Výrobek č.	Hmotnost sady bez vzorku
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

Postup

Kroky purifikace	Poznámky
1. Míchejte vzorek ze sady Oragene/ORACollect po několik sekund převrácením nebo jemným protřepáváním.	<ul style="list-style-type: none">• Zajistíte tak řádné promíchání viskózních vzorků.
2. Inkubujte vzorek při teplotě 50 °C ve vodním inkubátoru nejméně 1 hodinu, nebo ve vzduchovém inkubátoru nejméně 2 hodiny.	<ul style="list-style-type: none">• Tento krok zahřívání je nezbytný k získání maximálního množství DNA a zajištění trvalé deaktivace nukleáz.• Pokud vám to lépe vyhovuje, můžete vzorek inkubovat při 50 °C přes noc.• Inkubaci lze provést kdykoli po odebrání vzorku před purifikací DNA.• Inkubace ve vzduchovém inkubátoru se musí provádět déle, protože vyrovnání teploty je pomalejší než u vodního inkubátoru. <p>Poznámka: Může být vhodnější použít vzduchový inkubátor, protože zkumavky Oragene/ORACollect mají tendenci ve vodní lázni plavat na hladině. Pokud musíte použít vodní lázeň, zajistíte, aby část zkumavky obsahující vzorek zůstala ponořená ve vodě.</p>
3. Přeneste celý vzorek do 15 ml centrifugační zkumavky (obr. 1). Poznamenejte si jeho objem.	<ul style="list-style-type: none">• Můžete vzorek přelit nebo jej přemístit skleněnou nebo plastovou pipetou.  <p><i>Obr. 1: Než přejdete ke kroku č. 4, ujistěte se, že byl celý vzorek inkubován a přenesen do nové 15 ml centrifugační zkumavky, jak ukazuje ilustrace.</i></p>

Kroky purifikace	Poznámky
<p>4. Přidejte do zkumavky 1/25 objemu roztoku prepIT-L2P a promíchejte vortexováním po několik sekund (obr. 2).</p>  <p>Obr. 2: Po přidání PT-L2P a inkubování na ledu po dobu 10 minut již vzorek nebude čirý, ale bude to spíše zakalený roztok.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Např. ke 4 ml vzorku přidejte 160 µl roztoku prepIT-L2P. Vzorek se zakalí v důsledku srážení nečistot a inhibitorů.
<p>5. Inkubujte na ledu po dobu 10 minut.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Můžete namísto toho inkubovat vzorek při pokojové teplotě, ale odstranění nečistot tak bude méně efektivní.
<p>6. Centrifugujte 10 minut při pokojové teplotě s použitím co nejvyšších otáček. Minimální odstředivá síla je 3 500 × g.</p>  <p>Obr. 3: Po centrifugaci se na dně zkumavky nahromadí kalný materiál. Supernatant má být viditelně čirý.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Vyšší odstředivá síla snižuje množství kalného materiálu, který bude přenesen do purifikované DNA (obr. 3). Než budete pokračovat, měli byste ověřit u výrobce zkumavek, že 15 ml centrifugační zkumavky jsou vůči této odstředivé síle odolné. Delší doba centrifugace (až 20 minut) může být přínosná pro snížení zakalenosti (vysoká hodnota A₃₂₀) konečného roztoku DNA.
<p>7. Opatrně přeneste pipetou čirý supernatant do nové 15 ml centrifugační zkumavky. Zlikvidujte peletu.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Nechejte ve zkumavce malé množství supernatantu, abyste nenarušili peletu. Peleta obsahuje kalné nečistoty. Pokud ji nechcete narušit, je zapotřebí zkumavku centrifugovat znovu.

Kroky purifikace	Poznámky
<p>8. Přidejte do čirého supernatantu 1,2x objemu 95% až 100% ethanolu v pokojové teplotě. Opatrně promíchejte tak, že zkumavku 10krát převrátíte dnem vzhůru.</p>  <p>Obr. 4: Po přidání ethanolu se bude srážet DNA, což může vést ke vzniku viditelného chomáčku vláken.</p>	<ul style="list-style-type: none"> DNA se bude srážet během mísení s ethanolem. Sražená DNA se může jevit jako chomáček vláken DNA (obr. 4) nebo jako jemná sraženina, v závislosti na obsahu DNA ve vzorku.
<p>9. Nechejte vzorek po 10 minut stát při pokojové teplotě, aby se DNA plně vysrážela.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Nedoporučujeme inkubaci při -20 °C, protože nečistoty se mohou srážet spolu s DNA.
<p>10. Centrifugujte 10 minut při pokojové teplotě na co nejvyšší možnou rychlost. Minimální odstředivá síla je 3 500 × g.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Supernatant může obsahovat nečistoty a je nutno jej odstranit co možná neúplněji. Vysrážená DNA se bude nacházet v podobě pelety na dně zkumavky a možná jako nános na stěně zkumavky (obr. 5). Nános DNA může být na stěně zkumavky, která je vzdálenější od středu centrifugy. Nános můžete nalézt zkusným „poškrabáním“. Přítomnost nánosu DNA můžete zjistit poškrábáním pipetovací špičkou po vnitřní stěně zkumavky. Může zde být viditelný nános, jak ukazuje obr. 5.
<p>11. Opatrně odeberte supernatant skleněnou nebo plastovou pipetou a zlikvidujte jej. Dejte pozor, abyste nenarušili peletu DNA.</p>  <p>Obr. 5: Pipetovací špičkou můžete opatrně poškrabat po vnitřní stěně zkumavky, abyste zjistili přítomnost nánosu DNA.</p>	<ul style="list-style-type: none"> DNA může být zachycena jako nános na stěně zkumavky. Opatrně odstraňte supernatant pipetou podél stěny zkumavky protilehlé stěně, na níž je nános DNA. DNA se také může nahromadit jako peleta na dně zkumavky.

Kroky purifikace	Poznámky
<p>12. Promývání ethanolom: Opatrně přidejte do zkumavky 1 ml 70% ethanolu tak, abyste nenarušili nános nebo peletu. Nechejte stát při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Opatrně zkumavku pomíchejte krouživým pohybem a odstraňte všechny ethanol tak, abyste přitom nenarušili nános nebo peletu.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Je důležité odstranit ze vzorku všechen ethanol. Zbytek ethanolu může ovlivnit výsledky analýzy. • Dejte však pozor, aby nebyla narušena peleta nebo nános DNA. • K usnadnění úplného odstranění supernatantu můžete provést krátkou centrifugaci (méně než 1 minutu). • Pokud se po promývání ethanolom peleta oddělí, centrifugujte vzorek po 5 minut s použitím co možná nejvyšších otáček. Minimální odstředivá síla je 3 500 × g.
<p>13. U vzorků ze sady Oragene proveďte rehydrataci DNA přidáním 0,2 ml až 1 ml roztoku TE a vortexujte vzorek po dobu 30 sekund.</p> <p>U vzorků ze sady ORAcollect proveďte rehydrataci DNA přidáním 0,2 ml roztoku TE a vortexujte vzorek po dobu 30 sekund.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pokud potřebujete vyšší koncentraci DNA, můžete použít menší objem roztoku TE. Je nutno použít nejméně 200 µl roztoku TE. • Nadměrné vysušení pelety (> 10 minut) a použití méně než 500 µl roztoku TE může ztížit rehydrataci (rozpuštění) DNA a snížit tak její získané množství nebo způsobit, že bude kvantifikace obtížná. • Vysrážená DNA se bude nacházet v podobě pelety na dně zkumavky a možná jako nános na stěně zkumavky. • Abyste zajistili získání maximálního množství DNA, je nutno po přidání rozpouštědla DNA (roztoku TE) vortexovat vzorek. Vortexování zajistí získání DNA zachycené jako nános na stěně zkumavky (obr. 6). • Vortexování nezpůsobí stříhání DNA.
 <p>Obr. 6: Vortexování vzorku po dobu 30 sekund vám umožní získat DNA zachycenou jako nános na stěně zkumavky. DNA si udrží vysokou molekulární hmotnost.</p>	
<p>14. K zajištění kompletní rehydratace DNA inkubujte při pokojové teplotě přes noc a pak vortexujte, nebo inkubujte při teplotě 50 °C po dobu 1 hodiny s občasným vortexováním.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Neúplná rehydratace DNA je příčinou nepřesných odhadů koncentrace DNA a potenciální neúspěšnosti downstream aplikací, jako je PCR.

Kroky purifikace	Poznámky
<p>15. Rehydrovanou DNA přeneste do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky k uskladnění.</p>	
<p>Volitelný krok:</p> <ol style="list-style-type: none"> Centrifugujte rehydrovanou DNA při pokojové teplotě po dobu 15 minut při 15 000 × g. Přeneste supernatant do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky, aniž byste přitom narušili peletu. 	<p>Povšimněte si, že peleta obsahuje nerozpuštěný kalný materiál.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abyste získali maximální množství DNA, zajistěte před tímto krokem centrifugaci úplnou rehydrataci DNA (krok č. 14). • Tento krok centrifugace zajistí odstranění veškerých zbytků kalného materiálu ze vzorku DNA. • Při přenášení čirého supernatantu musíte postupovat opatrně, abyste nenarušili peletu.
<p>16. Možnosti uchování plně rehydrované DNA:</p> <ol style="list-style-type: none"> Dlouhodobé uskladnění v roztoku TE při teplotě -20 °C. Podle potřeby rozdělte na alikvotní části. Po dobu až 2 měsíců v roztoku TE při teplotě 4 °C. 	<ul style="list-style-type: none"> • Zmrazení purifikované DNA v roztoku TE může způsobit srážení DNA. Při rozmrazování zmrazené purifikované DNA věnujte pečlivou pozornost rehydrataci, jak popisuje krok č. 14.

Kvantifikace DNA

Fluorescenční metodou

Z hlediska kvantifikace množství dvouvláknové DNA (dsDNA) ve vzorku DNA jsou analýzy používající fluorescenční barviva specifitější, než měření absorbance při záření o vlnové délce 260 nm. Navrhujeme používat komerčně dostupné soupravy, jako je Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) nebo QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Před použitím DNA v kvantifikační analýze ji možná budete muset zředit roztokem TE v poměru 1:50.

Metodou měření absorbance

Pokud se rozhodnete kvantifikovat DNA měřením absorbance, doporučujeme, abyste nejdříve použili v purifikovaném vzorku RNázu ke štěpení kontaminující RNA, a pak odstranili fragmenty RNA vysrážením DNA s použitím ethanolu. Podrobný protokol je popsán v materiálu PD-PR-040, *Odstranění RNA dvojitým štěpením RNázou*.¹ Pamatujte, že DNA ze vzorku z ústní dutiny zpravidla obsahuje znatelně více RNA, než kolik se jí nachází ve vzorcích krve. Než budete načítat hodnoty absorbance, ujistěte se, že je alkoholem srážená DNA plně rozpuštěná.

Faktor konverze: Hodnota absorbance 1,0 při vlnové délce 260 nm odpovídá koncentraci 50 ng/μl (50 μg/ml) čisté, dvouvláknové DNA.

Ujistěte se, že hodnoty absorbance jsou v lineárním rozsahu spektrofotometru. Vzorky mimo lineární rozsah rozředte a změřte je znovu. Bližší informace naleznete v dokumentaci ke svému přístroji.

Odkazy

¹ Odstranění RNA dvojitým štěpením RNázou. PD-PR-040. DNA Genotek.

Metoda

1. Rozředte 10 μl alikvotní vzorek purifikované DNA zpracovaný RNázou s použitím 90 μl roztoku TE (1/10 zředění). Promíchejte nasáváním a vypouštěním obsahu pipetou. Počkejte, až zmizí bublinky.
2. Použijte roztok TE v kontrolní (prázdné) buňce.
3. Měřte absorbanci při vlnových délkách 320 nm, 280 nm a 260 nm.
4. Vypočítejte opravené hodnoty A_{280} a A_{260} odečtením hodnoty absorbance při vlnové délce 320 nm (A_{320}) od hodnot A_{280} a A_{260} .
5. Koncentrace DNA v ng/μl = opravená hodnota $A_{260} \times 10$ (faktor ředění) $\times 50$ (faktor konverze).
6. Poměr A_{260}/A_{280} : Vydělte opravenou hodnotu A_{260} opravenou hodnotou A_{280} .

Příklad

1. Předpokládejme, že naměřená hodnota $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ a $A_{260} = 0,295$
2. Koncentrace DNA neředěného vzorku bude:
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [faktor ředění]} \times 50 \text{ [faktor konverze]}$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng/}\mu\text{l neboli } 135 \mu\text{g/ml}$$
3. Poměr opravených hodnot A_{260}/A_{280} bude:
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$
$$= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$$
$$= 0,270 \div 0,150$$
$$= 1,80$$

Oragene•DNA a ORAcollect•DNA nejsou na prodej ve Spojených státech amerických.

Oragene•DISCOVER slouží pouze k použití ve výzkumu, nikoli k diagnostickým postupům.











Některé produkty společnosti DNA Genotek nemusí být dostupné ve všech geografických oblastech.

Oragene, prepIT, ORAcollect a DNA Genotek jsou ochranné známky společnosti DNA Genotek Inc.

Všechny ostatní zde uvedené značky a názvy jsou majetkem jejich příslušných vlastníků.

Veškeré protokoly společnosti DNA Genotek, její bílé knihy a poznámky k aplikaci jsou k dispozici v sekci podpory na našich webových stránkách www.dnagenotek.com.

Legenda ke štítku:

	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Katalogové číslo
	Označení CE
	Výrobce
	Přečtěte si příbalovou informaci
	Pověřený zástupce v Evropě
	Pověřený zástupce ve Švýcarsku
	Číslo šarže
	Jedinečný identifikátor prostředku
	Stabilita při použití
15 °C / 30 °C 59 °F / 86 °F	Pokyny k uchování

Patent (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-30 (CZ - Czech) Issue 1/2023-10

© 2023 DNA Genotek Inc., dceřiná společnost OraSure Technologies, Inc.

Všechna práva vyhrazena.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com