

**Manuaalse  
puhastusprotokoll  
käsiraamat  
kasutamiseks**

**prepiT<sup>TM</sup>•L2P**

**DNAGENOTEK<sup>TM</sup>**

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

Tel.: +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

*Paremad proovid  
Tõestatud toimivus*



PrepIT™-L2P protokoll on täiendavates keeltes saadaval aadressil  
www.dnagenotek.com


**Tehniline tugi on saadaval esmaspäevast reedeni (9.00–17.00 ET):**

- Maksuvaba (Põhja-Ameerika): 1.866.813.6354, valik 6
- Kõik teised riigid: +1.613.723.5757, valik 6
- E-post: support@dnagenotek.com

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

UK vastutav isik: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

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

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

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

## Sisukord

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Kavandatud kasutusotstarve / eesmärk</b> .....                  | <b>4</b>  |
| <b>Kasutusstabiilsus</b> .....                                     | <b>4</b>  |
| <b>Funktsioonid</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>Materjalid</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>Hoiatused ja ettevaatusabinõud</b> .....                        | <b>4</b>  |
| <b>Toote kasutuspiirangud</b> .....                                | <b>5</b>  |
| <b>PrepIT transport-L2P</b> .....                                  | <b>5</b>  |
| <b>PrepIT hoiustamine-L2P (säilivusaeg)</b> .....                  | <b>5</b>  |
| <b>Utiliseerimine</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>Hooldus/remont</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>Tulemuslikkuse näitajate kokkuvõte</b> .....                    | <b>5</b>  |
| <b>Tootesitlused</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>Garantiid</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>Tõrkeotsing</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>prepIT-L2P laboriprotokoll DNA manuaalse puhastamise kohta:</b> |           |
| <b>500 µl proovist</b> .....                                       | <b>7</b>  |
| <b>Kogu proov</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>DNA kvantifitseerimine</b> .....                                | <b>18</b> |

## Kavandatud kasutusotstarve / eesmärk

Genoomse DNA puhastamiseks Oragene™ ja ORACollect™ süljekogumiskomplektidest.

## Kasutusstabiilsus

PT-L2P-5 (5 ml) ja PT-L2P-45 (45 ml) püsivad 30 kuud toatemperatuuril.

## Funktsioonid

- Optimeeritud keemia, et maksimaalselt taastada Oragene ja ORACollect tootesarjadega kogutud suukaudsetest proovidest saadud DNA-d.
- Tõestatud järjepidevad tulemused suure molekulmassiga DNA korral.
- Skaleeritud puhastusmeetod suurte või väikeste proovimahtude jaoks.
- Mugav töökorraldus täieliku tehnilise toega, seda alates kogumisest kuni ekstraheerimiseni.
- Kulutõhus meetod, mis nõuab minimaalset varustust.

## Materjalid

- PT-L2P-5 (5 ml) ja/või PT-L2P-45 (45 ml)
- prepIT•L2P toote käsiraamat

## Hoiatused ja ettevaatusabinõud

- laboratoorseks kasutamiseks.
- ÄRGE neelake vedelat reaktiivi.
- ÄRGE kasutage, kui pakend on kahjustatud või kui kolvi kaane/korgi tihend on katki või lekib.
- ÄRGE kasutage prepIT-L2P-d pärast reaktiivipudelil märgitud kasutamise lõpptähtaega.
- Reaktiivi sattumisel silma või nahale pesta veega. MITTE alla neelata.
- Teatage igast tõsisest vahejuhtumist DNA Genotekile ja oma riigi pädevale asutusele.
- Kasutamata reaktiivi ohutu kõrvaldamise kohta vt materjali ohutuskaarti (*Material Safety Data Sheet*, MSDS).
- MSDS on saadaval veebilehel [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

## Toote kasutuspiirangud

Kasutage prepIT-L2P-d ainult vastavalt käesolevas toote käsiraamatus toodud juhistele.

## PrepIT transport-L2P

prepIT-L2P-d saab transportida ümbritseval temperatuuril kui laboratoorselt reaktiivi. Erilist käitlemist ei ole vaja.

## PrepIT hoiustamine-L2P (säilivusaeg)

Hoiustada toatemperatuuril. PT-L2P-5 (5 ml) ja PT-L2P-45 (45 ml) säilivusaeg on 30 kuud, kui need on nõuetekohaselt suletud ja neid säilitatakse toatemperatuuril.

## Utiliseerimine

Visake kasutamata, kahjustatud või lekkivad komplektid ära vastavalt asjakohastele kohalikele, riiklikele ja föderaalsetele eeskirjadele. Visake ära laborijäätmetena.

## Hooldus/remont

Ei kohaldu. prepIT•L2P on reaktiiv — hooldust ega remonti pole vaja.

## Tulemuslikkuse näitajate kokkuvõte

Oragene ja ORACollect süljekogumiskomplektidest puhastatud prepIT-L2P genoomne DNA annab piisavas koguses kvaliteetset DNA-d, mida saab kasutada sellistes rakendustes, nagu PCR, mikrokiibid ja järgmise põlvkonna sekveneerimine.

## Tooteesitlus

prepIT-L2P on saadaval mitmes mahus, seda sõltuvalt nõutavast preparaadi arvust. Näiteks:

| Toote viide/<br>kataloogi number | Proovi ettevalmistamise<br>maht | Preparaadi arv |
|----------------------------------|---------------------------------|----------------|
| PT-L2P-5                         | 0,5 ml                          | 200            |
| PT-L2P-45                        | 0,5 ml                          | 2000           |

## Garantiid

Kõigi DNA Genoteki toodete täielikud tingimused on aadressil <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

## Törkeotsing

Võtke ühendust DNA Genoteki tehnilise toega aadressil [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com) või helistage numbril +1 (613) 723-5757, valik 6.

# prepIT™•L2P laboriprotokoll DNA manuaalseks puhastamiseks 500 µl proovist

Järgnevalt kirjeldatakse samm-sammult, kuidas puhastada DNA 500 µl proovi alikvoodist.

## Sisalduvad reaktiivid

prepIT•L2P (Cat. No. PT-L2P-5 or PT-L2P-45)

## Seadmed ja reaktiivid

- Mikrotsentrifuug on võimeline töötama kiirusel 15 000 × g
- 1,5 ml mikrokatsutid (nt Axygen® Cat. Nr. MCT-150-C)
- Öhu- või veinkubaator temperatuuril 50 °C
- Toatemperatuuril etanool (95 kuni 100%)
- Toatemperatuuril etanool (70%)
- DNA säilitamise puhver: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) või sarnane lahus

## Toiming

| Puhastussammud   | Märkused   |
|--|--|
| 1. Segage Oragene/ORACollecti proovi mõne sekundi jooksul seda pöörates või õrnalt loksutades. | • Nii tagate, et viskoossed proovid oleks korralikult segatud. |

| Puhastussammud   | Märkused   |
|--|--|
| 2. Inkubeerige proovi veeinkubaatoris 50 °C juures vähemalt 1 tund või õhuinkubaatoris vähemalt 2 tundi.         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• See kuumtöötlemise etapp on oluline, et tagada DNA piisav vabanemine ja nukleaside püsiv inaktiveerimine.</li> <li>• Selle inkubatsioonietapi võib teha mis tahes ajal pärast proovi kogumist ja enne selle puhastamist.</li> <li>• Proovi homogeensuse tagamiseks tuleb kogu proovi inkubeerida esialgses kogumiskatsutis enne proovi kvantifitseerimist.</li> <li>• Kui see on mugavam, siis võib proovi inkubeerida öö läbi temperatuuril 50 °C.</li> <li>• Õhuinkubaatoris on vajalik pikem aeg, sest temperatuuri tasakaalustamine on siis aeglasem kui veeinkubaatoris.</li> </ul> <p><b>Märkus.</b> Eelistatud võib olla õhkingubaatori kasutamine, kuna Oragene/ORACollecti katsutid võivad veevannis hõljuda. Veevanni kasutades tuleb tagada, et proovi sisaldav katsuti osa jääks vette.</p> |
| 3. Pange 500 µl segatud proovi 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutisse.  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ülejäänud proovi võib säilitada toatemperatuuril (15 kuni 25 °C) või külmutada.</li> <li>• Soovi korral võib proovi säilitada külmutatult temperatuuril -20 °C Oragene/ORACollecti katsutis või panna proov pikaajaliseks säilitamiseks temperatuuril -80 °C krüoviaali.</li> </ul>   |
| 4. Lisage 20 µl (1/25 mahust) prepIT-L2P-d mikrotsentrifuugi katsutisse ja segage seda paar sekundit keerutades. | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proov muutub häguseks, kuna lisandid ja inhibiitorid sadestuvad.</li> </ul>   |
| 5. Inkubeerige 10 minutit jääl.  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Toatemperatuuril inkubeerimist võib asendada, kuid see on lisandite eemaldamisel veidi vähem tõhus.</li> </ul>  |

| Puhastussammud  | Märkused  |
|---|---|
| 6. Tsentrifugeerige 5 minutit toatemperatuuril kiirusega 15 000 × g.  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pikem tsentrifugeerimise aeg (kuni 15 minutit) võib olla kasulik lõpliku DNA-lahuse hägususe (kõrge A<sub>320</sub>) vähendamiseks.</li> </ul>   |
| 7. Viige selge supernatant ettevaatlikult pipetiotsikuga uude mikrotsentrifuugi katsutisse. <b>Visake lisandeid sisaldav graanul ära.</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Graanulid sisaldavad häguseid lisandeid. Kui seda kogemata segatakse, tuleb see uuesti tsentrifugeerida.</li> </ul>  |
| 8. Lisage 600 µl toatemperatuuril olevat 95 kuni 100% etanooli. Segage ettevaatlikult 10 korda pöörates.                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Etanooliga segamise ajal DNA sadestub. Sõltuvalt DNA kogusest proovis võib see ilmuda DNA-kiududest koosneva trombi või peene sademena.</li> <li>• Isegi kui trombi ei ole näha, saab DNA taastada, kui järgida hoolikalt järgmisi samme.</li> </ul>   |
| 9. Laske proovil seista 10 minutit toatemperatuuril, et DNA saaks täielikult sadestuda.   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inkubeerimine temperatuuril -20 °C ei ole soovitatav, sest lisandid võivad koos DNA-ga sadestuda.</li> </ul>   |
| 10. Asetage katsuti mikrotsentrifuugis kindlasse asendisse. Tsentrifugeerige 2 minutit toatemperatuuril kiirusega 15 000 × g.             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Näiteks asetage iga katsuti mikrotsentrifuugi nii, et korgi liigendatud osa oleks rootori keskkohast eemal suunatud. Pärast tsentrifugeerimist saab graanuli asukoha kindlaks teha (isegi kui see on liiga väike, et seda näha): see on katseklaasi otsas, mis asub liigendi all.</li> </ul>   |
| 11. Eemaldage supernatant ettevaatlikult pipetiotsikuga ja visake ära. Olge ettevaatlik, et vältida DNA graanuli segamist.                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• See graanul sisaldab DNA-d. Graanuli kadu põhjustab ka DNA kao.</li> <li>• Katsuti pööramine nii, et graanulid oleks katsuti n-õ ülemisel seinal, võimaldab teil ohutult liigutada pipeti otsa mööda alumist seina ja eemaldada kogu supernatant.</li> <li>• Supernatant võib sisaldada lisandeid ja seda tuleks eemaldada nii palju, kui võimalik.</li> </ul> |

| Puhastussammud  | Märkused   |
|---|--|
| 12. Etanoolpesu: lisage ettevaatlikult 250 µl 70% etanooli. Laske sellel 1 minut toatemperatuuril seista.<br><b>Eemaldage etanool täielikult ja ilma graanulit segamata.</b>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Oluline on eemaldada proovist kogu etanool. Etanooli ülekandumine võib mõjutada analüüsi tulemuslikkust.</li> <li>• Pärast 70%-lise etanooli eemaldamist võib katsutit pulseerivalt tsentrifuugida, et eemaldada etanooli jäägid.</li> <li>• Olge ettevaatlik, et mitte segada DNA-graanuleid; need võivad olla väikesed või nähtamatud.</li> <li>• Kui graanulid eralduvad, siis tsentrifuugige proovi 5 minutit kiirusel 15 000 × g.</li> <li>• Graanuli liigne kuivatamine võib DNA lahustamist raskendada.</li> </ul> |
| 13. Lisage DNA-graanulite lahustamiseks 100 µl TE lahust (vt lehekülj 5). Pöörlemine vähemalt 5 sekundit.   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kui soovitakse suuremat DNA kontsentratsiooni, tuleks kasutada 50 µl TE-d.</li> </ul>   |
| 14. DNA täieliku rehüdreerimise tagamiseks inkubeeritakse toatemperatuuril üleöö, millele järgneb pöörlemine või tund aega 50 °C juures aeg-ajalt pöörelemist.                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Suur kogus suure molekulmassiga DNA-d võib täielikult lahustuda (rehüdreeruda) aeglaselt.</li> <li>• DNA ebatäielik rehüdreerimine põhjustab ebatäpsust DNA kontsentratsiooni hindamisel ja võimalikku ebaõnnestumist rakendustes, näiteks PCR-is.</li> </ul>   |
| 15. Valikud rehüdreeritud DNA hoiustamiseks:<br>a) TE pikaajaliseks hoiustamiseks temperatuuril -20°C. Soovi korral jagada alikvootidesse.<br>b) TE temperatuuril 4 °C kuni 2 kuud. |  |

## prepIT-L2P laboriprotokoll koguproovist manuaalseks DNA puhastamiseks

**Märkus.** See protokoll nõuab optimaalsete tulemuste saamiseks tsentrifuugi kasutamist (kas fikseeritud nurgaga või kiik-ämbrisega rootorit), mis suudab optimaalsete tulemuste saamiseks saavutada vähemalt 3500 × g.

Järgnevas samm-sammulises protokollis kirjeldatakse, kuidas puhastada DNA kogu proovist (proovi kogumaht 1 ml – 4 ml). Näidatud mahud peaksid olema kohandatud tegeliku kogutud mahu järgi.

### Sisalduvad reaktiivid

prepIT•L2P (Cat. No. PT-L2P-5 or PT-L2P-45)

### Seadmed ja reaktiivid

- Tsentrifuug, mis mahutab 15 ml katsuteid ja on võimeline saavutama kiiruse vähemalt 3500 × g (vt tabel 2)
- 15 ml koonilised polüpropüleenist katsutid (nt BD Falcon® kat. nr 352196)
- Mikrotsentrifuug, mis on võimeline töötama kiirusel 15 000 × g (valikuline)
- 1,5 ml mikrokatsutid (nt Axygen® Cat. Nr. MCT-150-C)
- Öhu- või veeinkubaator temperatuuril 50 °C
- Toatemperatuuril etanool (95 kuni 100%)
- Toatemperatuuril etanool (70%)
- DNA säilitamise puhver: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) või sarnane lahus

**Valikuline: puhastuseelne kontroll (kohaldatakse ainult Oragene'i proovide korral; ORAcollecti proovidega ei ole see nõutav)**

Kaaluge proov, et hinnata doonori antud sülje kogust (vt tab 1). Kogutud sülje kogus on otseselt proportsionaalne kogutud DNA kogusega. Näiteks kui doonor on andnud vähem kui 2 ml sülje, siis peaksite eeldama, et selle proovi kogusaagis on väiksem.

**Komplekti kaal (ilma proovita)**

Kui proov saabub laborisse, siis soovitage proovi kaaluda, et hinnata, kas doonor andis õige koguse sülje. Doonoritelt võib oodata mõningaid erinevusi. Esitatud on tühja komplekti keskmine kaal (vt tabel 1). Kogutud proovi koguse hindamiseks (eeldusel, et see on 1 g/ml) tehke järgmine arvutus:

$$\frac{\text{proovi sisaldava komplekti kaal} - \text{ilma proovita komplekti kaal}}{\text{kogutud proovi hulk}}$$

**Tabel 1**


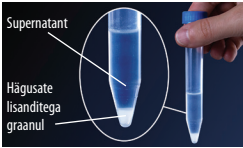
| Toode #                | Komplekti kaal ilma proovita |
|------------------------|------------------------------|
| OG-500/OGD-500/OGR-500 | 6,81 g                       |
| OG-510/OGD-510         | 5,83 g                       |
| OG-575/OGD-575/OGR-575 | 5,66 g                       |
| ON-500                 | 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                       |

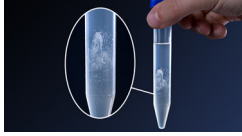

**Toiming**

| Puhastussammud  | Märkused  |
|---|---|
| 1. Segage Oragene/ORACollecti proovi mõne sekundi jooksul seda pöörates või õrnalt loksutades.          | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nii tagate, et viskoossed proovid oleks korralikult segatud.</li> </ul>  |
| 2. Inkubeerige proovi veinkubaatoris 50 °C juures vähemalt 1 tund või õhuinkubaatoris vähemalt 2 tundi. | <ul style="list-style-type: none"> <li>See kuumtöötlemise etapp on oluline, et tagada DNA piisav vabanemine ja nukleasaaside püsiv inaktiveerimine.</li> <li>Kui see on mugavam, siis võib proovi inkubeerida õõ läbi temperatuuril 50 °C.</li> <li>Selle inkubatsioonietapi võib teha mis tahes ajal pärast proovi kogumist ja enne selle puhastamist.</li> <li>Õhuinkubaatoris on vaja pikemat aega, sest temperatuuri tasakaalustamine on aeglasem kui veinkubaatoris.</li> </ul> <p><b>Märkus.</b> Eelistatud võib olla õhkinkubaatori kasutamine, kuna Oragene/ORACollecti katsutid võivad veevannis hõljuda. Veevanni kasutades tuleb tagada, et proovi sisaldav katsuti osa jääks vette.</p> |
| 3. Viige kogu proov 15 ml tsentrifuugikatsutisse (vt joonis 1). Pange tähele proovi mahtu.              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Ülekandmine võib toimuda kas valamise või klaas- või plastpipetiga pipeteerimisega.</li> </ul>   |



**Joonis 1.** Enne sammuga 4 jätkamist veenduge, et kogu proov oleks inkubeeritud ja viidud uude 15 ml tsentrifuugikatsutisse nii, nagu näidatud.

| Puhastussammud  | Märkused  |
|---|---|
| <p>4. Lisage 1/25 mahtu prepIT-L2P-i ja segage paar sekundit seda pöörates (vt joonis 2).</p>  <p><i>Joonis 2. Pärast PT-L2P lisamist ja 10 minutit jääl inkubeerimist ei ole proov enam selge, vaid pigem hägune lahus.</i></p>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Näiteks lisage 4 ml proovile 160 µl prepIT-L2P.</li> <li>Proov muutub häguseks, kuna lisandid ja inhibiitorid sadestuvad.</li> </ul>   |
| <p>5. Inkubeerige 10 minutit jääl.</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Toatemperatuuril inkubeerimist võib asendada, kuid see on lisandite eemaldamisel veidi vähem tõhus.</li> </ul>   |
| <p>6. Tsentrifugeerige toatemperatuuril 10 minutit võimalikult suurel kiirusel. Minimaalselt 3500 × g.</p>  <p><i>Joonis 3. Pärast tsentrifugeerimist koguneb katsuti põhja hägune materjal. Supernatant peaks olema selgesti nähtav.</i></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Suurem tsentrifugaaljõud vähendab puhastatud DNA-sse kanduva hägususe hulka (vt joonis 3). Enne jätkamist tuleks kontrollida katsuti tootjalt, kas 15 ml tsentrifugeerimiskatsutid suudavad tsentrifugaaljõudu taluda.</li> <li>Pikem tsentrifugeerimise aeg (kuni 20 minutit) võib olla vajalik lõpliku DNA-lahuse hägususe (kõrge A<sub>260</sub>) vähendamiseks.</li> </ul> |
| <p>7. Viige selge supernatant ettevaatlikult pipetiotsikuga uude 15 ml mikrotsentrifugeerimiskatsutisse. <b>Visake graanulid ära.</b></p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Jätke väike kogus supernatanti, et vältida graanulite segamist.</li> <li>Graanulid sisaldavad häguseid lisandeid. Kui seda kogemata segatakse, siis tuleb see uuesti tsentrifugeerida.</li> </ul>  |

| Puhastussammud   | Märkused  |
|--|---|
| <p>8. Lisage selgele ülejäänud vedelikule 1,2-kordne maht toatemperatuuril olevat 95 kuni 100% etanooli. Segage ettevaatlikult 10 korda pöörates.</p>  <p><i>Joonis 4. Pärast etanooli lisamist sadestub DNA, mille tulemusena võib olla näha kiudude kogum.</i></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Etanooliga segamise ajal DNA sadestub.</li> <li>Sõltuvalt DNA kogusest proovis võib see ilmuda DNA-kiududest koosneva trombi (vt joonis 4) või peene sademena.</li> </ul>  |
| <p>9. Laske proovil seista toatemperatuuril 10 minutit, et DNA saaks täielikult sadestuda.</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Inkubeerimine temperatuuril -20 °C ei ole soovitatav, sest lisandid võivad koos DNA-ga sadestuda.</li> </ul>   |
| <p>10. Tsentrifugeerige toatemperatuuril võimalikult suurel kiirusel 10 minutit. Minimaalselt kiirusel 3500 × g.</p>   |   |
| <p>11. Eemaldage supernatant ettevaatlikult klaas- või plastpipetiga ja visake see ära. Olge ettevaatlik, et vältida DNA-graanulite segamist.</p>  <p><i>Joonis 5. Pipetiotsikuga ettevaatlikult piki katsuti sisekülge kraapides võib ilmuda DNA-laik.</i></p>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Supernatant võib sisaldada lisandeid ja seda tuleks eemaldada nii palju, kui võimalik.</li> <li>Sadestunud DNA-d leidub graanulina katsuti põhjas ja võimalik, et laiguna ka katseklaasi küljel (vt joonis 5).</li> <li>DNA-laik võib asuda katsuti küljel, mis on tsentrifugeerimise keskkoht eemale suunatud.</li> <li>Laigu võib tuvastada kraapetesti abil. DNE-laigu olemasolu saate kontrollida, kui kraabite pipetiotsikuga katsuti sisemust. Nähtavale võib tulla joonisel 5 näidatud laik.</li> </ul> |



| Puhastussammud  | Märkused   |
|---|--|
| <p>12. Etanoolpesu:<br/>lisage ettevaatlikult 1 ml 70% etanooli katsutisse ilma laiku või graanuleid segamata. Laske sellel 1 minut toatemperatuuril seista. <b>Keerake ettevaatlikult ja eemaldage täielikult etanool, segamata graanuleid ja laiku.</b></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Oluline on eemaldada proovist kogu etanool. Etanooli ülekandumine võib mõjutada analüüsi tulemuslikkust.</b></li> <li>• Olge ettevaatlik, et vältida DNA-graanuli või laigu segamist.</li> <li>• Lühike tsentrifuugimine (vähem kui 1 minut) võib hõlbustada supernatandi täielikku eemaldamist.</li> <li>• Kui graanulid eralduvad pärast etanoolipesu, siis tsentrifuugige proovi 5 minutit võimalikult suurel kiirusel. Minimaalselt kiirusel <math>3500 \times g</math>.</li> </ul>  |
| <p>13. Oragene'i proovide korral rehüdreerige DNA, lisades 0,2 ml – 1 ml TE lahust ja keerutades proovi 30 sekundit.</p> <p>ORACollecti proovide korral rehüdreerige DNA, lisades 0,2 ml TE-lahust ja keerutades proovi 30 sekundit.</p>                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kui soovitakse suuremat DNA kontsentratsiooni, võib TE mahtu vähendada. Kasutama peaks minimaalselt 200 µl TE-lahust.</li> <li>• Graanulite liigne kuivatamine (&gt; 10 minutit) ja vähem kui 500 µl TE-lahuse kasutamine võib raskendada DNA rehüdreerimist (lahustamist) ja vähendada saagist või raskendada kvantifitseerimist.</li> <li>• Sadestunud DNA-d leidub graanulina katsuti põhjas ja võimalik, et ka laiguna katseklaasi küljel.</li> <li>• DNA maksimaalse taastamise tagamiseks tuleb proovi pärast DNA-lahusti lisamist pöörata (TE-lahus). Pöörlemine tagab, et katsuti küljele kinnitunud DNA saadakse tagasi (vt joonis 6).</li> <li>• Pöörlemine ei kahjusta DNA-d.</li> </ul> |
|  <p>Joonis 6. Proovi 30 sekundi jooksul pööramine võimaldab koguda katsuti küljes olevat DNA-d. DNA säilitab kõrgmolekulaarse kaalu.</p>                                      |  |
| <p>14. DNA täieliku rehüdreerimise tagamiseks inkubeeritakse toatemperatuuril üleöö, millele järgneb pöörlemine või 50 °C juures tund aega aeg-ajalt pöörlemine.</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA ebatäielik rehüdreerimine põhjustab ebatäpsust DNA kontsentratsiooni hindamisel ja võimaliku ebaõnnestumist rakendustes, nagu PCR-is.</li> </ul>  |

| Puhastussammud   | Märkused   |
|--|--|
| <p>15. Viige rehüdreeritud DNA säilitamiseks 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutisse.</p>  |  |
| <p>Valikuline samm:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Tsentrifuugige rehüdreeritud DNA-d toatemperatuuril 15 minutit kiirusel <math>15\,000 \times g</math>.</li> <li>Paigutage supernatant värskesse 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutisse ilma graanulit segamata.</li> </ol> | <p>Pange tähele, et graanul sisaldab lahustumatut, hägust materjali.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA taastamise maksimeerimiseks veenduge, et DNA oleks enne seda tsentrifuugimise etappi täielikult rehüdreeritud (samm 14).</li> <li>• See tsentrifuugimisetapp tagab, et DNA-proovist eemaldatakse kõik allesjäänud hägune materjal.</li> <li>• Selge supernatandi ülekandmisel uude katsutisse tuleb jälgida, et graanuleid ei segataks.</li> </ul> |
| <p>16. Valikud rehüdreeritud DNA hoiustamiseks:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>TE pikaajaliseks hoiustamiseks temperatuuril -20°C. Soovi korral jagatud alikvootidesse.</li> <li>TE temperatuuril 4 °C kuni 2 kuud.</li> </ol>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Puhastatud DNA külmutamine TE-s võib põhjustada DNA sadestumist. Külmutatud puhastatud DNA üles sulatamisel pöörake hoolikalt tähelepanu rehüdreerimisele, nagu on kirjeldatud sammus 14.</li> </ul>  |

## DNA kvantifitseerimine

### Fluorestsentsmeetodid

Kui tegemist on topeltahelalise DNA (dsDNA) kogusega DNA proovis, siis on fluorestsentsete värvainete abil tehtavad analüüsid kvantifitseerimisel spetsiifilisemad kui 260 nm neeldumise mõõtmine. Soovitame kasutada selliseid laialdaselt kättesaadavaid komplekte, nagu Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) või QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Enne DNA kvantifitseerimisanalüüsi kasutamist võib olla vajalik seda lahjendada TE-ga vahekorras kuni 1:50.

### Imendumismeetod

Kui otsustate DNA-d kvantifitseerida neeldumisega, siis soovitame puhastatud proovi esmalt töödelda RNasega, et lagundada saastav RNA, ja seejärel eemaldada RNA-fragmendid DNA etanooliga sadestamise teel. Üksikasjalik protokoll on kirjeldatud dokumendis PD-PR-040, *RNA eemaldamine topelt-RNase lagundamisega*.<sup>1</sup> Pange tähele, et suust võetud proovi DNA sisaldab tavaliselt märgatavalt rohkem RNA-d kui vereproovist võetud DNA. Veenduge, et alkoholiga sadestatud DNA oleks enne neeldumise mõõtmist täielikult lahustunud.

**Konversioonitegur: puhta, kahesuunalise DNA korral vastab 1,0 neelduvus 260 nm juures kontsentratsioonile 50 ng/μl (50 μg/ml).**

Veenduge, et neeldumiseväärtused jääksid spektrofotomeetri lineaarsesse vahemikku. Lahjendage ja mõõtku uuesti väljaspoole lineaarset vahemikku jäävaid proove. Lisateavet leiate oma seadme dokumentidest.

### Viited

<sup>1</sup> RNA eemaldamine topelt-RNase abil. PD-PR-040. DNA Genotek.

### Meetod











1. Lahjendage 10 μl puhastatud RNasega töödeldud DNA alikvooti 90 μl TE-ga (tris-EDTA puhver) (1/10 lahendus). Segage õrnalt üles ja alla pipeteerides. Oodake, kuni mullid kaovad.
2. Kasutage TE-d referentsi (tühjas) lahtris.
3. Mõõtku imavust 320 nm, 280 nm ja 260 nm juures.
4. Arvutage korrigeeritud  $A_{280}$  ja  $A_{260}$  väärtused, lahutades  $A_{280}$  ja  $A_{260}$  väärtustest neeldumiseväärtus 320 ( $A_{320}$ ).
5. DNA sisaldus ng/μl = korrigeeritud  $A_{260} \times 10$  (lahjendustegur)  $\times 50$  (konversioonitegur).
6.  $A_{260}/A_{280}$  suhe: jagage korrigeeritud  $A_{260}$  korrigeeritud  $A_{280}$ -ga.

### Näide

1. Eeldage, et mõõdetud  $A_{320} = 0,025$ ,  $A_{280} = 0,175$  and  $A_{260} = 0,295$
2. Lahjendamata proovi DNA sisaldus on:  
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [lahjendustegur]} \times 50 \text{ [konversioonitegur]}$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng/}\mu\text{l või } 135 \text{ }\mu\text{g/ml}$$
3. Korrigeeritud  $A_{260}/A_{280}$  suhe 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 ei ole Ameerika Ühendriikides müügil.  
Oragene-DISCOVER on mõeldud ainult teadusuuringuteks, mitte diagnostilisteks protseduurideks.  
Mõned DNA Genoteki tooted ei pruugi olla kõigis geograafilistes piirkondades saadaval.  
Oragene, prepIT, ORAcollect ja DNA Genotek on DNA Genotek Inc. kaubamärgid.  
Kõik muud siin sisalduvad kaubamärgid ja nimed on nende vastavate omanike omand.  
Kõik DNA Genoteki protokollid, lühiülevaated ja rakendusteatised on meie veebisaidi tugiosas  
aadressil [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

### Sildi selgitus:

|  |   |
|--|---|
|  | <i>In vitro</i> diagnostiline meditsiiniseade |
|  | Kataloogi number                              |
|  | CE-märgistus                                  |
|  | Tootja  |
|  | Tutvuge pakendi sisuga                        |
|  | Euroopa volitatud esindaja                    |
|  | Šveitsi volitatud esindaja                    |
|  | Partii number                                 |
|  | Seadme tunnusnumber                           |
|  | Kasutusstabiilsus                             |
| 15 °C / 30 °C<br>59 °F / 86 °F   | Säilitamisjuhised                             |

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

PD-HB-33 (ET - Estonian) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., OraSure Technologies Inc. tütarettevõtte, kõik õigused kaitstud.

**DNAGENOTEK™**

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