

**Εγχειρίδιο πρωτοκόλλου  
για μη αυτόματο καθαρισμό  
για χρήση με το**

**prepIT™·L2P**

**DNAGENOTEK™**

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

Τηλ.: +1.613.723.5757  
[support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)  
[sales@dnagenotek.com](mailto:sales@dnagenotek.com)

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

*Ανώτερα δείγματα  
Αποδεδειγμένη  
αποτελεσματικότητα*

CE 

## Πίνακας περιεχομένων

Προοριζόμενη χρήση/σκοπός	4
Σταθερότητα κατά τη χρήση	4
Χαρακτηριστικά	4
Υλικά	4
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	4
Περιορισμοί στη χρήση του προϊόντος	5
Μεταφορά του preriT•L2P	5
Αποθήκευση του preriT•L2P (διάρκεια ζωής)	5
Απόρριψη	5
Συντήρηση/επισκευές	5
Σύνοψη των χαρακτηριστικών απόδοσης	5
Τύποι προϊόντος	5
Εγγυήσεις	6
Επίλυση προβλημάτων	6
<b>preriT•L2P Εργαστηριακό πρωτόκολλο για μη αυτόματο καθαρισμό DNA από:</b>	
<b>Δείγμα 500 μλ</b>	<b>7</b>
<b>Ολικό δείγμα</b>	<b>11</b>
<b>Ποσοτικό προσδιορισμό του DNA</b>	<b>18</b>


Το πρωτόκολλο του preriT™•L2P διατίθεται και σε άλλες γλώσσες στην ηλ. διεύθυνση [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)


### Η τεχνική υποστήριξη διατίθεται Δευτέρα με Παρασκευή (9:00 - 17:00 ET):

- Τηλέφωνο χωρίς χρέωση (Βόρεια Αμερική): 1.866.813.6354, επιλογή 6
- Υπόλοιπες χώρες: +1.613.723.5757, επιλογή 6
- Email: [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)

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

Αρμόδιο άτομο στο Ηνωμένο Βασίλειο: Emergo Consulting (UK) Limited  
c/o Cr360 - UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

 Novosanis NV, Bijkhoevelaan 32c,  
2110 Wijnegem, Βέλγιο  
Email: [EUAR@novosanis.com](mailto:EUAR@novosanis.com)

 Arazy Group Swiss GmbH  
Bruderholzallee 53, 4059 Basel, Ελβετία  
Email: [swiss.ar@arazygroup.com](mailto:swiss.ar@arazygroup.com)

Αυστραλός χορηγός: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street,  
Sydney, NSW 2000 Αυστραλία

## Προοριζόμενη χρήση/σκοπός

Για τον καθαρισμό γονιδιωματικού DNA από τα κιτ συλλογής σιέλου Oragene™ και ORAcollect™.

## Σταθερότητα κατά τη χρήση

Η σταθερότητα κατά τη χρήση των PT-L2P-5 (5 mL) και PT-L2P-45 (45 mL) έχει καταδειχτεί για 30 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου.

## Χαρακτηριστικά

- Βελτιστοποιημένη χημεία για μέγιστη ανάκτηση του DNA από δείγματα εκ του στόματος που συλλέχθηκαν με προϊόντα των σειρών Oragene και ORAcollect.
- Αποδεδειγμένο ότι παρέχει σταθερά αποτελέσματα με DNA υψηλού μοριακού βάρους.
- Κλιμακούμενη μέθοδος καθαρισμού για μεγάλους ή μικρούς όγκους δείγματος.
- Άνετη ροή εργασίας με πλήρη τεχνική υποστήριξη από τη συλλογή έως την εκχύλιση.
- Οικονομικά αποδοτική μέθοδος που απαιτεί ελάχιστο εξοπλισμό.

## Υλικά

- PT-L2P-5 (5 mL) ή/και PT-L2P-45 (45 mL)
- Εγχειρίδιο του προϊόντος prepIT•L2P

## Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

- Μόνο για εργαστηριακή χρήση.
- ΜΗΝ καταπίνετε το υγρό αντιδραστήριο.
- ΜΗΝ το χρησιμοποιήσετε εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά ή η σφραγίδα στο καπάκι/πώμα της χοάνης είναι σπασμένη ή παρουσιάζει διαρροή.
- ΜΗΝ χρησιμοποιείτε το prepIT•L2P πέρα από την «Ημερομηνία λήξης» που αναγράφεται στη φιάλη του αντιδραστήριου.
- Πλύνετε με νερό εάν το αντιδραστήριο έρθει σε επαφή με τα μάτια ή το δέρμα. ΜΗΝ καταπίνετε.
- Πρέπει να αναφέρετε όλα τα σοβαρά περιστατικά στην DNA Genotek και στην αρμόδια αρχή στη χώρα σας.
- Ανατρέξτε στο Δελτίο δεδομένων ασφάλειας υλικού (MSDS) για την ασφαλή απόρριψη του αχρησιμοποίητου αντιδραστήριου.
- Το MSDS διατίθεται στην ηλ. διεύθυνση [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

## Περιορισμοί στη χρήση του προϊόντος

Χρησιμοποιείτε το prepIT•L2P μόνο σύμφωνα με τις οδηγίες του παρόντος εγχειριδίου προϊόντος.

## Μεταφορά του prepIT•L2P

Το prepIT•L2P μεταφέρεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ως εργαστηριακό αντιδραστήριο. Δεν απαιτείται ειδικός χειρισμός.

## Αποθήκευση του prepIT•L2P (διάρκεια ζωής)

Αποθηκεύστε το σε θερμοκρασία δωματίου. Η διάρκεια ζωής των PT-L2P-5 (5mL) και PT-L2P-45 (45 mL) είναι 30 μήνες όταν είναι κατάλληλα σφραγισμένα και αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου.

## Απορρίψη

Απορρίψτε τα κιτ που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί, έχουν υποστεί ζημιά ή παρουσιάζουν διαρροές σύμφωνα με τους ισχύοντες τοπικούς, πολιτειακούς και ομοσπονδιακούς κανονισμούς. Απορρίψτε ως εργαστηριακά απόβλητα.

## Συντήρηση/επισκευές

Δεν ισχύει. Το prepIT•L2P είναι αντιδραστήριο και, ως εκ τούτου, δεν απαιτείται συντήρηση ή επισκευή.

## Σύνοψη των χαρακτηριστικών απόδοσης

Το καθαρισμένο με prepIT•L2P γονιδιωματικό DNA από τα κιτ συλλογής σιέλου Oragene και ORAcollect παρέχει υψηλής ποιότητας DNA και σε ποσότητα που επαρκεί για χρήση κατάντη σε εφαρμογές, όπως η PCR, η μικροσυστοιχία DNA και η αλληλούχιση επόμενης γενιάς.

## Τύποι προϊόντος

Το prepIT•L2P διατίθεται σε διάφορους όγκους, ανάλογα με τον αριθμό των απαιτούμενων παρασκευασμάτων. Για παράδειγμα:

Κωδικός προϊόντος / Αριθμός καταλόγου	Όγκος για την προετοιμασία του δείγματος	Αριθμός παρασκευασμάτων
PT-L2P-5	0,5 mL	200
PT-L2P-45	0,5 mL	2.000

## Εγγυήσεις

Για τους όρους και τις προϋποθέσεις όλων των προϊόντων της DNA Genotek, επισκεφθείτε τον ιστότοπο <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

## Επίλυση προβλημάτων

Επικοινωνήστε με την τεχνική υποστήριξη της DNA Genotek στέλνοντας email στο [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com) ή καλώντας το +1 (613) 723-5757, επιλογή 6.

## Εργαστηριακό πρωτόκολλο του prepIT™•L2P για μη αυτόματο καθαρισμό DNA από δείγμα 500 μL

Το παρακάτω λεπτομερές πρωτόκολλο περιγράφει τον τρόπο καθαρισμού DNA από κλάσμα δείγματος 500 μL.

### Περιλαμβάνονται τα αντιδραστήρια

prepIT•L2P (Αρ. καταλ. PT-L2P-5 ή PT-L2P-45)

### Εξοπλισμός και αντιδραστήρια

- Μικροφυγόκεντρος με δυνατότητα λειτουργίας στα 15.000 × g
- Μικροσωλήνες 1,5 mL (π.χ., Axygen® Αρ. καταλ. MCT-150-C)
- Κλίβανος επώασης αέρα ή νερού στους 50°C
- Αιθανόλη (95% έως 100%) σε θερμοκρασία δωματίου
- Αιθανόλη (70%) σε θερμοκρασία δωματίου
- Ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ή παρόμοιο διάλυμα

### Διαδικασία

Βήματα καθαρισμού	Σημειώσεις
1. Αναμιξτε το δείγμα Oragene/ORACollect ανατρέποντάς το ή ανακινώντας το ελαφρά για μερικά δευτερόλεπτα.	• Αυτό γίνεται για να διασφαλιστεί η σωστή ανάμιξη ιξωδών δειγμάτων.

Βήματα καθαρισμού	Σημειώσεις
2. Επλώστε το δείγμα στους 50°C σε κλίβανο επώασης νερού για τουλάχιστον 1 ώρα ή σε κλίβανο επώασης αέρα για τουλάχιστον 2 ώρες.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Αυτό το βήμα θερμικής επεξεργασίας είναι απαραίτητο για να διασφαλιστεί ότι το DNA έχει αποδεδμευτεί επαρκώς και ότι οι νουκλεάσες έχουν αδρανοποιηθεί μόνη.</li> <li>Αυτό το βήμα επώασης μπορεί να πραγματοποιηθεί ανά πάσα στιγμή, μετά τη συλλογή του δείγματος και πριν τον καθαρισμό του.</li> <li>Ολόκληρο το δείγμα θα πρέπει να επωαστεί στον αρχικό σωλήνα συλλογής, πριν την κλασματοποίηση, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η ομοιογένεια του δείγματος.</li> <li>Το δείγμα μπορεί να επωαστεί στους 50°C κατά τη διάρκεια της νύχτας, εφόσον αυτό εξυπηρετεί καλύτερα.</li> <li>Στον κλίβανο επώασης αέρα απαιτείται περισσότερος χρόνος, επειδή η εξισορρόπηση θερμοκρασίας είναι πιο αργή από ό,τι στον κλίβανο επώασης νερού.</li> </ul> <p><b>Σημείωση:</b> Η χρήση κλίβανου επώασης αέρα ίσως να είναι η καταλληλότερη, εφόσον οι σωλήνες Oragene/ORAcollect είναι πιθανό να επιπλεύσουν σε υδατόλουτρο. Εφόσον πρέπει να χρησιμοποιηθεί υδατόλουτρο, εξασφαλίστε ότι το τμήμα του σωλήνα που περιέχει το δείγμα παραμένει βυθισμένο σε νερό.</p>
3. Μεταφέρετε 500 μL του αναμεμιγμένου δείγματος σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα 1,5 mL.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Το υπόλοιπο δείγμα μπορεί να αποθηκευθεί σε θερμοκρασία δωματίου (15°C έως 25°C) ή στην κατάψυξη.</li> <li>Εάν είναι επιθυμητό, το δείγμα μπορεί να αποθηκευτεί κατεψυγμένο στον σωλήνα Oragene/ORAcollect στους -20°C ή το δείγμα μπορεί να μεταφερθεί σε κρυοφιαλίδιο για μακροπρόθεσμη αποθήκευση στους -80°C.</li> </ul>
4. Προσθέστε 20 μL (1/25ο του όγκου) prepIT-L2P στο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και αναμίξτε με στροβιλισμό μερικών δευτερολέπτων.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Το δείγμα θα γίνει θαλό κατά την καθίζηση των ακαθαρσιών και των αναστολέων.</li> </ul>
5. Επλώστε σε πάγο για 10 λεπτά.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Η επώαση μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε θερμοκρασία δωματίου, ωστόσο θα είναι ελαφρώς λιγότερο αποτελεσματική κατά την απομάκρυνση των ακαθαρσιών.</li> </ul>

Βήματα καθαρισμού	Σημειώσεις
6. Φυγοκεντρήστε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά στα 15.000 x g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ο αυξημένος χρόνος φυγοκέντρησης (έως και 15 λεπτά) θα μπορούσε να συμβάλει στη μείωση της θολότητας (υψηλό A<sub>320</sub>) του τελικού διαλύματος DNA.</li> </ul>
7. Μεταφέρετε προσεκτικά το καθαρό υπερκείμενο υγρό με τη βοήθεια του άκρου ενός σιφωνίου σε έναν καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. <b>Απορρίψτε το σφαιρίδιο που περιέχει ακαθαρσίες.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Το σφαιρίδιο περιέχει θολές ακαθαρσίες. Σε περίπτωση τυχαίας ανατάραξης, ο σωλήνας θα πρέπει να υποβληθεί εκ νέου σε φυγοκέντρηση.</li> </ul>
8. Προσθέστε 600 μL αιθανόλης 95% έως 100% σε θερμοκρασία δωματίου. Αναμίξτε ελαφρά, ανατρέποντας 10 φορές.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Κατά τη διάρκεια της ανάμιξης με αιθανόλη, το DNA θα υποστεί καθίζηση. Αυτό είναι πιθανό να εμφανιστεί ως πήγμα ινών DNA ή ως λεπτό ίζημα, ανάλογα με την ποσότητα του DNA στο δείγμα.</li> <li>Ακόμη κι αν δεν φαίνεται κάποιο πήγμα, το DNA θα ανακτηθεί με την προσεκτική εκτέλεση των παρακάτω βημάτων.</li> </ul>
9. Αφήστε το δείγμα να παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, έτσι ώστε να κατακαθίσει πλήρως το DNA.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Η επώαση στους -20°C δεν συνιστάται, εφόσον είναι πιθανό να κατακαθίσουν οι ακαθαρσίες μαζί με το DNA.</li> </ul>
10. Τοποθετήστε τον σωλήνα στη μικροφυγοκέντρο με γνωστή φορά. Φυγοκεντρήστε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στα 15.000 x g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Για παράδειγμα, τοποθετήστε κάθε σωλήνα στη μικροφυγοκέντρο, με το σημείο άρθρωσης του πώματος να δείχνει στην αντίθετη κατεύθυνση από αυτή του κέντρου του ρότορα. Μετά τη φυγοκέντρηση, η θέση του σφαιριδίου μπορεί να εντοπιστεί (ακόμη κι αν είναι πολύ μικρό για να διακριθεί εύκολα), εφόσον θα βρίσκεται στην ακμή του σωλήνα, κάτω από την άρθρωση.</li> </ul>
11. Αφαιρέστε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό με τη βοήθεια του άκρου ενός σιφωνίου και απορρίψτε το. Φροντίστε να μην αναταράξετε το σφαιρίδιο DNA.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Αυτό το σφαιρίδιο περιέχει DNA. Η απώλεια του σφαιριδίου συνεπάγεται την απώλεια του DNA.</li> <li>Η περιστροφή του σωλήνα, έτσι ώστε το σφαιρίδιο να βρίσκεται στο επάνω τοίχωμα, θα διευκολύνει την ασφαλή μετακίνηση του άκρου ενός σιφωνίου κατά μήκος του κάτω τοιχώματος και την απομάκρυνση όλου του υπερκείμενου υγρού.</li> <li>Το υπερκείμενο υγρό είναι πιθανό να περιέχει ακαθαρσίες, οπότε θα πρέπει να απομακρύνεται όσο το δυνατόν πληρέστερα.</li> </ul>

Βήματα καθαρισμού	Σημειώσεις
12. Πλύση αιθανόλης: Προσθέστε προσεκτικά 250 μL αιθανόλης 70%. Αφήστε το διάλυμα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. <b>Αφαιρέστε πλήρως την αιθανόλη, χωρίς να αναταράξετε το σφαιρίδιο.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Είναι σημαντικό να απομακρυνθεί η αιθανόλη πλήρως από το δείγμα. Η μεταφορά αιθανόλης είναι πιθανό να επηρεάσει την απόδοση της δοκιμασίας.</li> <li>Μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης 70% ο σωλήνας μπορεί να περιστραφεί παλμικά για την απομάκρυνση της υπολειπόμενης αιθανόλης.</li> <li>Φροντίστε να μην αναταράξετε το σφαιρίδιο DNA. Είναι πιθανό να είναι μικρό ή να μην φαίνεται.</li> <li>Σε περίπτωση αποκόλλησης του σφαιριδίου, φυγοκεντρήστε το δείγμα για 5 λεπτά στα 15.000 × g.</li> <li>Το υπερβολικό στέγνωμα του σφαιριδίου είναι πιθανό να δυσχεράνει τη διάλυση του DNA.</li> </ul>
13. Προσθέστε 100 μL διαλύματος TE (βλ. σελίδα 5) για τη διάλυση του σφαιριδίου DNA. Στροβιλίστε για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Εάν επιθυμείτε μεγαλύτερη συγκέντρωση DNA, χρησιμοποιήστε 50 μL διαλύματος TE.</li> </ul>
14. Για τη διασφάλιση της πλήρους επανυδάτωσης του DNA, επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της νύχτας και, στη συνέχεια, στροβιλίστε, ή στους 50°C για 1 ώρα με περιστασιακό στροβιλισμό.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Οι μεγάλες ποσότητες DNA υψηλού μοριακού βάρους μπορούν να επιβραδύνουν την πλήρη επανυδάτωση (διάλυση).</li> <li>Η ατελής επανυδάτωση του DNA αποτελεί αιτία ανακρίβειας κατά την εκτίμηση της συγκέντρωσης DNA και δυνητικής αποτυχίας κατάντη εφαρμογών, όπως η PCR.</li> </ul>
15. Επιλογές αποθήκευσης του πλήρως επανυδατωμένου DNA: a) Σε TE στους -20°C για μακροπρόθεσμη αποθήκευση. Διαχωρίστε σε κλάσματα, εάν το επιθυμείτε. b) Σε TE στους 4°C για έως 2 μήνες.	

## Εργαστηριακό πρωτόκολλο του prepIT•L2P για μη αυτόματο καθαρισμό DNA από ολικό δείγμα

**Σημείωση:** Για βέλτιστα αποτελέσματα, το παρόν πρωτόκολλο απαιτεί τη χρήση φυγόκεντρου (είτε με ρότορα σταθερής γωνίας είτε με περιστρεφόμενο κάδο) με δυνατότητα να παράγει τουλάχιστον 3.500 × g.

Το παρακάτω λεπτομερές πρωτόκολλο περιγράφει τον τρόπο καθαρισμού DNA από ολικό δείγμα (1 mL–4 mL συνολικός όγκος δείγματος). Οι όγκοι που αναφέρονται θα πρέπει να προσαρμόζονται ανάλογα με τον πραγματικό συλλεχθέντα όγκο.

### Περιλαμβάνονται τα αντιδραστήρια

prepIT•L2P (Αρ. καταλ. PT-L2P-5 ή PT-L2P-45)

### Εξοπλισμός και αντιδραστήρια

- Φυγόκεντρος που δέχεται σωλήνες των 15 mL και έχει δυνατότητα να παράγει τουλάχιστον 3.500 × g (βλ. Πίνακα 2)
- Σωλήνες 15 mL κωνικού σχήματος από πολυπροπυλένιο (π.χ., BD Falcon® Αρ. καταλ. 352196)
- Μικροφυγόκεντρος με δυνατότητα λειτουργίας στα 15.000 × g (προαιρετικά)
- Μικροσωλήνες 1,5 mL (π.χ., Axygen® Αρ. καταλ. MCT-150-C)
- Κλιβανός επώασης αέρα ή νερού στους 50°C
- Αιθανόλη (95% έως 100%) σε θερμοκρασία δωματίου
- Αιθανόλη (70%) σε θερμοκρασία δωματίου
- Ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ή παρόμοιο διάλυμα

### Προαιρετικά: Έλεγχος πριν από τον καθαρισμό (ισχύει μόνο για τα δείγματα Oragene, δεν απαιτείται για τα δείγματα ORAcollect)

Ζυγίστε το δείγμα για να εκτιμήσετε την ποσότητα σιέλου που παρείχε ο δότης (βλ. Πίνακα 1). Η ποσότητα σιέλου που συλλέγεται είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα DNA που ανακτάται. Ενδεικτικά, εάν ένας δότης παρείχε λιγότερα από 2 mL σιέλου, θα πρέπει να αναμένετε να ανακτήσετε χαμηλότερη συνολική απόδοση από αυτό το δείγμα.

### Βάρος του κιτ (χωρίς το δείγμα)

Μόλις φτάσει το δείγμα στο εργαστήριο, προτείνουμε να το ζυγίσετε για να εκτιμήσετε αν ο δότης παρείχε τη σωστή ποσότητα σιέλου. Αναμένετε έναν βαθμό μεταβλητότητας μεταξύ των δοτών. Αναφέρεται το μέσο βάρος ενός κενού κιτ (Πίνακας 1). Για να υπολογίσετε την ποσότητα του συλλεχθέντος δείγματος (υποθέτοντας 1 g/mL), χρησιμοποιήστε την παρακάτω εξίσωση:

*Βάρος του κιτ που περιέχει το δείγμα - Βάρος του κιτ χωρίς το δείγμα*

*Ποσότητα συλλεχθέντος δείγματος*

Πίνακας 1



Κωδ. προϊόντος	Βάρος του κιτ χωρίς το δείγμα
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

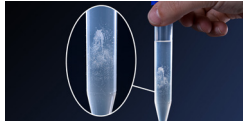
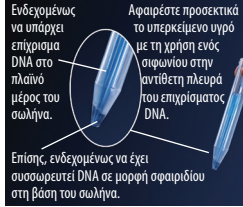
### Διαδικασία

Βήματα καθαρισμού	Σημειώσεις
1. Αναμίξτε το δείγμα Oragene/ORAcollect ανατρέποντάς το ή ανακινώντας το ελαφρά για μερικά δευτερόλεπτα.	<ul style="list-style-type: none"><li>Αυτό γίνεται για να διασφαλιστεί η σωστή ανάμιξη ιζωδών δειγμάτων.</li></ul>
2. Επώστε το δείγμα στους 50°C σε κλίβανο επώασης νερού για τουλάχιστον 1 ώρα ή σε κλίβανο επώασης αέρα για τουλάχιστον 2 ώρες.	<ul style="list-style-type: none"><li>Αυτό το βήμα θερμικής επεξεργασίας είναι απαραίτητο για να μεγιστοποιηθεί η απόδοση του DNA και να διασφαλιστεί ότι οι νουκλεάσες έχουν αδρανοποιηθεί μόνιμα.</li><li>Το δείγμα μπορεί να επωαστεί στους 50°C κατά τη διάρκεια της νύχτας, εφόσον αυτό εξυπηρετεί καλύτερα.</li><li>Αυτό το βήμα επώασης μπορεί να πραγματοποιηθεί ανά πάσα στιγμή, μετά τη συλλογή του δείγματος και πριν από τον καθαρισμό του DNA.</li><li>Στον κλίβανο επώασης αέρα απαιτείται περισσότερος χρόνος, επειδή η εξισορρόπηση θερμοκρασίας είναι πιο αργή από ό,τι στον κλίβανο επώασης νερού.</li></ul> <p><b>Σημείωση:</b> Η χρήση κλίβανου επώασης αέρα ίσως να είναι η καταλληλότερη, εφόσον οι σωληνίτες Oragene/ORAcollect είναι πιθανό να επιπλεύσουν σε υδατόλουτρο. Εφόσον πρέπει να χρησιμοποιηθεί υδατόλουτρο, εξασφαλίστε ότι το τμήμα του σωληνίου που περιέχει το δείγμα παραμένει βυθισμένο σε νερό.</p>
3. Μεταφέρετε ολόκληρο το δείγμα σε έναν φυγοκεντρικό σωληνία 15 mL (Εικόνα 1). Σημειώστε τον όγκο του δείγματος.	<ul style="list-style-type: none"><li>Η μεταφορά μπορεί να γίνει είτε με έγκυση ή χρησιμοποιώντας γυάλινο ή πλαστικό σιφώνιο.</li></ul>




*Εικόνα 1: Προτού συνεχίσετε στο βήμα 4, διασφαλίστε ότι ολόκληρο το δείγμα έχει επωαστεί και μεταφερθεί σε καθαρό φυγοκεντρικό σωληνία 15 mL, όπως απεικονίζεται.*

Βήματα καθαρισμού	Σημειώσεις
<p>4. Προσθέστε 1/250 του όγκου του rpreIT-L2P και αναμίξτε με στροβιλισμό για λίγα δευτερόλεπτα (Εικόνα 2).</p>  <p><b>Εικόνα 2:</b> Μετά την προσθήκη του rpreIT-L2P και την επώαση σε πάγο για 10 λεπτά, το δείγμα δεν θα είναι πλέον διαυγές, αλλά θολό.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Π.χ., σε δείγμα 4 mL, προσθέστε 160 µL rpreIT-L2P.</li> <li>• Το δείγμα θα γίνει θολό κατά την καθίζηση των ακαθαρσιών και των αναστολέων.</li> </ul>
<p>5. Επώαστε σε πάγο για 10 λεπτά.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η επώαση μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε θερμοκρασία δωματίου, ωστόσο θα είναι λιγότερο αποτελεσματική κατά την απομάκρυνση των ακαθαρσιών.</li> </ul>
<p>6. Φυγοκεντρήστε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά στη μεγαλύτερη δυνατή ταχύτητα. Στα 3.500 × g κατ' ελάχιστο.</p>  <p><b>Εικόνα 3:</b> Μετά τη φυγοκέντρηση, θα υπάρξει συσσώρευση θολού υλικού στη βάση του σωλήνα. Το υπερκείμενο υγρό θα πρέπει να ορατά διαυγές.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η μεγαλύτερη φυγόκεντρος δύναμη ελαχιστοποιεί την ποσότητα θολού υλικού που μεταφέρεται στο καθαρισμένο DNA (Εικόνα 3). Προτού συνεχίσετε, επαληθεύστε με τον κατασκευαστή του σωλήνα ότι οι φυγοκεντρικοί σωλήνες 15 mL αντέχουν τη φυγόκεντρο δύναμη.</li> <li>• Ο αυξημένος χρόνος φυγοκέντρησης (έως και 20 λεπτά) θα μπορούσε να συμβάλει στη μείωση της θολότητας (υψηλό A<sub>320</sub>) του τελικού διαλύματος DNA.</li> </ul>
<p>7. Μεταφέρετε προσεκτικά το καθαρό υπερκείμενο υγρό με τη βοήθεια ενός σιφωνίου σε έναν καθαρό φυγοκεντρικό σωλήνα 15 mL. <b>Απορρίψτε το σφαιρίδιο.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αφήστε έναν μικρό όγκο υπερκείμενου υγρού για να αποφύγετε την ανατάραξη του σφαιριδίου.</li> <li>• Το σφαιρίδιο περιέχει θολές ακαθαρσίες. Σε περίπτωση τυχαίας ανατάραξης, ο σωλήνας θα πρέπει να υποβληθεί εκ νέου σε φυγοκέντρηση.</li> </ul>

Βήματα καθαρισμού	Σημειώσεις
<p>8. Προσθέστε 1,2 x του όγκου αιθανόλης 95% έως 100% σε θερμοκρασία δωματίου στο διαυγές υπερκείμενο υγρό. Αναμίξτε ελαφρά, ανατρέποντας 10 φορές.</p>  <p><b>Εικόνα 4:</b> Μετά την προσθήκη της αιθανόλης, το DNA θα υποστεί καθίζηση, στο οποίο <b>μπορεί</b> να οδηγήσει στον σχηματισμό ενός ορατού πηγμάτος ινών.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Κατά τη διάρκεια της ανάμιξης με αιθανόλη, το DNA θα υποστεί καθίζηση.</li> <li>• Το DNA που έχει υποστεί καθίζηση είναι πιθανό να εμφανιστεί ως πήγμα ινών DNA (Εικόνα 4) ή ως λεπτό ίζημα, ανάλογα με την ποσότητα του DNA στο δείγμα.</li> </ul>
<p>9. Αφήστε το δείγμα να παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, έτσι ώστε να κατακαθίσει πλήρως το DNA.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η επώαση στους -20°C δεν συνιστάται, εφόσον είναι πιθανό να κατακαθίσουν οι ακαθαρσίες μαζί με το DNA.</li> </ul>
<p>10. Φυγοκεντρήστε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά στη μεγαλύτερη δυνατή ταχύτητα. Στα 3.500 × g κατ' ελάχιστο.</p>	
<p>11. Αφαιρέστε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό με τη βοήθεια ενός γυάλινου ή πλαστικού σιφωνίου και απορρίψτε το. Φροντίστε να μην αναταράξετε το σφαιρίδιο DNA.</p>  <p><b>Εικόνα 5:</b> Χρησιμοποιώντας το άκρο ενός σιφωνίου για να ξύσετε απαλά κατά μήκος του εσωτερικού του σωλήνα, μπορεί να αποκαλύψετε την παρουσία επιχρίσματος DNA.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Το υπερκείμενο υγρό είναι πιθανό να περιέχει ακαθαρσίες, οπότε θα πρέπει να απομακρύνεται όσο το δυνατόν πληρέστερα.</li> <li>• Το DNA που έχει υποστεί καθίζηση βρίσκεται σε μορφή σφαιριδίου στον πυθμένα του σωλήνα και ενδεχομένως ως επιχρίσμα στο πλάι του μέρους του σωλήνα (Εικόνα 5).</li> <li>• Το επιχρίσμα DNA μπορεί να βρίσκεται στην πλευρά του σωλήνα που είναι στραμμένη στην αντίθετη κατεύθυνση από το κέντρο της φυγόκεντρος.</li> <li>• Μπορείτε να ελέγξετε αν υπάρχει επιχρίσμα DNA ξύνοντας το εσωτερικό του σωλήνα με το άκρο ενός σιφωνίου. Το επιχρίσμα ενδέχεται να είναι ορατό, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 5.</li> </ul>



Βήματα καθαρισμού	Σημειώσεις
<p>12. Πλύση αιθανόλης: Προσθέστε προσεκτικά 1 mL αιθανόλης 70% στον σωλήνα χωρίς να αναταράξετε το επίχρισμα ή το σφαιρίδιο. Αφήστε το διάλυμα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. <b>Ανακινήστε απαλά και αφαιρέστε πλήρως την αιθανόλη, χωρίς να αναταράξετε το σφαιρίδιο και το επίχρισμα.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Είναι σημαντικό να απομακρυνθεί η αιθανόλη πλήρως από το δείγμα. Η μεταφορά αιθανόλης είναι πιθανό να επηρεάσει την απόδοση της δοκιμασίας.</li> <li>• Φροντίστε να μην αναταράξετε το σφαιρίδιο και το επίχρισμα DNA.</li> <li>• Μπορεί να πραγματοποιηθεί σύντομη φυγοκέντρηση (λιγότερο από 1 λεπτό) για να διευκολυνθεί η πλήρης απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.</li> <li>• Σε περίπτωση αποκόλλησης του σφαιριδίου μετά την πλύση αιθανόλης, φυγοκentrήστε το δείγμα για 5 λεπτά στη μεγαλύτερη δυνατή ταχύτητα. Στα 3.500 x g κατ' ελάχιστο.</li> </ul>
<p>13. Για δείγματα Oragene, επανυδατώστε το DNA προσθέτοντας 0,2 mL-1 mL διαλύματος TE και στροβιλίστε το δείγμα για 30 δευτερόλεπτα.</p> <p>Για δείγματα ORAcollect, επανυδατώστε το DNA προσθέτοντας 0,2 mL διαλύματος TE και στροβιλίστε το δείγμα για 30 δευτερόλεπτα.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Εάν επιθυμείτε μεγαλύτερη συγκέντρωση DNA, μπορείτε να μειώσετε τον όγκο του διαλύματος TE. Πρέπει να χρησιμοποιείται τουλάχιστον 200 μL διαλύματος TE.</li> <li>• Το υπερβολικό στέγνωμα του σφαιριδίου (&gt; 10 λεπτά) και η χρήση λιγότερο από 500 μL διαλύματος TE μπορεί να δυσχεράνει την επανυδάτωση (διάλυση) του DNA, και μπορεί να μειώσει την απόδοση ή να δυσχεράνει τον ποσοτικό προσδιορισμό.</li> <li>• Το DNA που έχει υποστεί καθίζηση βρίσκεται σε μορφή σφαιριδίου στον πυθμένα του σωλήνα και ενδεχομένως ως επίχρισμα στο πλαϊνό μέρος του σωλήνα.</li> <li>• Για να διασφαλιστεί η μέγιστη ανάκτηση του DNA, το δείγμα πρέπει να στροβιλιστεί μετά την προσθήκη διαλύτη DNA (διάλυμα TE). Αυτό θα διασφαλίσει την ανάκτηση του επιχρίσματος DNA από το πλαϊνό μέρος του σωλήνα (Εικόνα 6).</li> <li>• Ο στροβιλισμός δεν θα διαλύσει το DNA.</li> </ul>
 <p><b>Εικόνα 6:</b> Στροβιλίζοντας το δείγμα για 30 δευτερόλεπτα θα μπορέσετε να ανακτήσετε το επίχρισμα DNA από το πλαϊνό μέρος του σωλήνα. Το DNA θα εξακολουθεί να έχει υψηλό μοριακό βάρος.</p>	
<p>14. Για τη διασφάλιση της πλήρους επανυδάτωσης του DNA, επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της νύχτας και, στη συνέχεια, στροβιλίστε, ή στους 50°C για 1 ώρα με περιστασιακό στροβιλισμό.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η ατελής επανυδάτωση του DNA αποτελεί αιτία ανακρίβειας κατά την εκτίμηση της συγκέντρωσης DNA και δυνητικής αποτυχίας κατάντη εφαρμογών, όπως η PCR.</li> </ul>

Βήματα καθαρισμού	Σημειώσεις
<p>15. Μεταφέρετε το επανυδατωμένο DNA σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα 1,5 mL για αποθήκευση.</p> <p>Προαιρετικό βήμα:  a) Φυγοκentrήστε το επανυδατωμένο DNA σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά στα 15.000 x g.  b) Μεταφέρετε το υπερκείμενο υγρό σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωλήνα 1,5 mL χωρίς να αναταράξετε το σφαιρίδιο.</p>	<p>Το σφαιρίδιο περιέχει αδιάλυτο, θολό υλικό.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Για να μεγιστοποιήσετε την ανάκτηση του DNA, βεβαιωθείτε ότι το DNA έχει επανυδατωθεί πλήρως (βήμα 14) πριν από την εκτέλεση αυτού του βήματος φυγοκέντρησης.</li> <li>• Αυτό το βήμα φυγοκέντρησης διασφαλίζει την απομάκρυνση οποιουδήποτε εναπομείναντος θολού υλικού από το δείγμα DNA.</li> <li>• Φροντίστε να μην αναταράξετε το σφαιρίδιο κατά τη μεταφορά του διαυγούς υπερκείμενου υγρού σε καθαρό σωλήνα.</li> </ul>
<p>16. Επιλογές αποθήκευσης του πλήρως επανυδατωμένου DNA:  a) Σε TE στους -20°C για μακροπρόθεσμη αποθήκευση. Διαχωρίστε σε κλάσματα, εάν το επιθυμείτε.  b) Σε TE στους 4°C για έως 2 μήνες.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η κατάψυξη του καθαρισμένου DNA σε TE μπορεί να προκαλέσει καθίζηση του DNA. Κατά την απόψυξη του κατεψυγμένου καθαρισμένου DNA, δώστε ιδιαίτερη προσοχή στην επανυδάτωση, όπως αναφέρεται στο βήμα 14.</li> </ul>

## Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

### Με τη μέθοδο φθορισμού

Οι δοκιμασίες που χρησιμοποιούν βαφές φθορισμού είναι πιο ακριβείς από ό,τι η απορρόφηση σε 260 nm για τον ποσοτικό προσδιορισμό του δίκλωνου DNA (dsDNA) σε ένα δείγμα DNA. Συνιστούμε τη χρήση kit που διατίθενται στο εμπόριο, όπως το Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) ή το QuantiFluor™ dsDNA System (Promega). Το DNA μπορεί να χρειαστεί να αραιωθεί έως και 1:50 με διάλυμα TE προτού χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία ποσοτικού προσδιορισμού.

### Με τη μέθοδο απορρόφησης

Εάν επιλέξετε τον ποσοτικό προσδιορισμό DNA με απορρόφηση, τότε συνιστούμε την αρχική επεξεργασία του καθαρισμένου δείγματος με ριβονουκλεάση (RNase) για την πέψη του μολυσμένου RNA και, στη συνέχεια, την απομάκρυνση των θραυσμάτων RNA με καθίζηση αιθανόλης του DNA. Ένα λεπτομερές πρωτόκολλο περιγράφεται στο PD-PR-040, *απομάκρυνση RNA με διπλή πέψη RNase*.<sup>1</sup> Παρακαλούμε, σημειώστε ότι το DNA από δείγμα εκ του στόματος περιέχει κατά κανόνα περισσότερο RNA από ό,τι τα δείγματα αίματος. Διασφαλίστε ότι το DNA με καθίζηση αλκοόλης έχει διαλυθεί πλήρως, προτού διαπιστώσετε την απορρόφηση.

**Συντελεστής μετατροπής:** Η απορρόφηση 1,0 στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 ng/μL (50 μg/mL) καθαρού, δίκλωνου DNA.

Βεβαιωθείτε ότι οι τιμές απορρόφησης βρίσκονται εντός γραμμικής περιοχής του φασματοφωτομέτρου. Διαλύστε και μετρήστε εκ νέου τα δείγματα που βρίσκονται εκτός της γραμμικής περιοχής. Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. τεκμηρίωση εξοπλισμού.

### Παραπομπή

<sup>1</sup> RNA removal by double-RNase digestion [Απομάκρυνση RNA με διπλή πέψη RNase]. PD-PR-040. DNA Genotek.

### Μέθοδος

1. Διαλύστε ένα κλάσμα 10 μL καθαρισμένου DNA μέσω RNase σε 90 μL TE (1/10 διάλυμα). Αναμίξτε σε σιφώνιο ανακινώντας απαλά επάνω-κάτω. Περιμένετε μέχρι να εξαλειφθούν οι φυσαλίδες.
2. Χρησιμοποιήστε TE στο κελί αναφοράς (κενό).
3. Μετρήστε την απορρόφηση στα 320 nm, 280 nm και 260 nm.
4. Υπολογίστε τις διορθωμένες τιμές  $A_{280}$  και  $A_{260}$  αφαιρώντας την απορρόφηση στα 320 nm ( $A_{320}$ ) από τις τιμές  $A_{280}$  και  $A_{260}$ .
5. Συγκέντρωση DNA σε ng/μL = διορθωμένο  $A_{260} \times 10$  (παράγοντας διάλυσης)  $\times 50$  (παράγοντας μετατροπής).
6. Αναλογία  $A_{260}/A_{280}$ : Διάρθρωση διορθωμένου  $A_{260}$  προς διορθωμένο  $A_{280}$ .

### Παράδειγμα

1. Υποθέτουμε ότι έχουν μετρηθεί  $A_{320} = 0,025$ ,  $A_{280} = 0,175$  και  $A_{260} = 0,295$
2. Η συγκέντρωση DNA στο αδιάλυτο δείγμα θα είναι:  
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$  [παράγοντας διάλυσης]  $\times 50$  [παράγοντας μετατροπής]  
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$   
 $= 0,270 \times 10 \times 50$   
 $= 135 \text{ ng/}\mu\text{L ή } 135 \text{ }\mu\text{g/mL}$
3. Η διορθωμένη αναλογία  $A_{260}/A_{280}$  θα είναι:  
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$   
 $= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$   
 $= 0,270 \div 0,150$   
 $= 1,80$

Τα Oragene•DNA και ORAcollect•DNA δεν είναι διαθέσιμα για πώληση στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το Oragene•DISCOVER προορίζεται αποκλειστικά για ερευνητική χρήση και δεν προορίζεται για χρήση σε διαγνωστικές διαδικασίες.












Ορισμένα προϊόντα DNA Genotek ενδέχεται να μην είναι διαθέσιμα σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές.

Τα Oragene, prepIT, ORAcollect και DNA Genotek είναι εμπορικά σήματα της DNA Genotek Inc.

Όλες οι υπόλοιπες εμπορικές ονομασίες και τα ονόματα που περιέχονται στο παρόν αποτελούν ιδιοκτησία των αντίστοιχων κατόχων τους.

Όλα τα πρωτόκολλα, οι λευκές βίβλοι και οι σημειώσεις εφαρμογής της DNA Genotek διατίθενται στην ενότητα με τις πληροφορίες υποστήριξης του ιστοτόπου μας στη διεύθυνση [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

### Υπόμνημα ετικέτας:

	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Αριθμός καταλόγου
	Σήμανση CE
	Κατασκευαστής
	Συμβουλευτείτε το ένθετο συσκευασίας
	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρώπη
	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ελβετία
	Αριθμός παρτίδας
	Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	Σταθερότητα κατά τη χρήση
	Οδηγίες αποθήκευσης

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

PD-HB-35 (EL -Greek) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., θυγατρική της OraSure Technologies, Inc.,  
με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

**DNAGENOTEK™**

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