

**Manuale del protocollo
di purificazione manuale
per l'uso con**

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

*Campioni superiori
Efficacia testata*



Il protocollo di prepiT™-L2P è disponibile in altre lingue sul sito www.dnagenotek.com

**L'assistenza tecnica è disponibile da lunedì a venerdì
(dalle 9:00 alle 17:00 ET):**

- Numero verde (Nord America): 1.866.813.6354, opzione 6
- Tutti gli altri Paesi: +1.613.723.5757, opzione 6
- E-mail: support@dnagenotek.com

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

Responsabile per il Regno Unito: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL
International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

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

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

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

Sommario

Destinazione d'uso/uso previsto	4
Stabilità in uso	4
Caratteristiche	4
Materiali	4
Avvertenze e precauzioni	4
Limitazioni d'uso del prodotto	5
Trasporto di prepiT-L2P	5
Conservazione di prepiT-L2P (durata di conservazione)	5
Smaltimento	5
Manutenzione/riparazioni	5
Riepilogo delle caratteristiche prestazionali	5
Presentazioni del prodotto	5
Garanzie	6
Risoluzione dei problemi	6
Protocollo di laboratorio di prepiT-L2P per la purificazione manuale del DNA a partire da:	
500 µl di campione	7
Campione intero	11
Quantificazione del DNA	18

Destinazione d'uso/uso previsto

Per la purificazione del DNA genomico proveniente dai kit di prelievo della saliva Oragene™ e ORAcollect™.

Stabilità in uso

PT-L2P-5 (5 ml) e PT-L2P-45 (45 ml) hanno 30 mesi di stabilità in uso a temperatura ambiente.

Caratteristiche

- Chimica ottimizzata per il massimo recupero del DNA proveniente da campioni orali prelevati con le linee di prodotto Oragene e ORAcollect.
- Ha dimostrato di fornire risultati coerenti con DNA ad alto peso molecolare.
- Metodo di purificazione scalabile per volumi di campioni grandi o piccoli.
- Flusso di lavoro comodo con assistenza tecnica completa dal prelievo fino all'estrazione.
- Metodo conveniente che richiede attrezzature minime.

Materiali

- PT-L2P-5 (5 ml) e/o PT-L2P-45 (45 ml)
- Manuale del prodotto prepIT•L2P

Avvertenze e precauzioni

- Solo per uso in laboratorio.
- NON ingerire il reagente liquido.
- NON utilizzare se la confezione è danneggiata o se il sigillo del tappo dell'imbuto è danneggiato o soggetto a perdite.
- NON usare prepIT•L2P oltre la data "Usare entro il" indicata sul flacone del reagente.
- Lavare con acqua se il reagente entra in contatto con gli occhi o la pelle. NON ingerire.
- Comunicare ogni eventuale incidente grave a DNA Genotek e alle autorità competenti nel vostro Paese.
- Consultare la Scheda dati sulla sicurezza del materiale (MSDS) per uno smaltimento sicuro del reagente inutilizzato.
- La MSDS è disponibile sul sito www.dnagenotek.com.

Limitazioni d'uso del prodotto

Utilizzare prepIT•L2P solo nel modo indicato dal presente manuale del prodotto.

Trasporto di prepIT•L2P

prepIT•L2P può essere trasportato a temperatura ambiente come reagente di laboratorio. Non è richiesta una manipolazione speciale.

Conservazione di prepIT•L2P (durata di conservazione)

Conservare a temperatura ambiente. La durata di conservazione di PT-L2P-5 (5 ml) e PT-L2P-45 (45 ml) è di 30 mesi quando correttamente tappati e conservati a temperatura ambiente.

Smaltimento

Smaltire i kit inutilizzati, danneggiati o soggetti a perdite in conformità alle normative locali, statali e federali vigenti. Smaltire come rifiuto di laboratorio.

Manutenzione/riparazioni

Non applicabile. prepIT•L2P è un reagente — non richiede alcuna manutenzione o riparazione.

Riepilogo delle caratteristiche prestazionali

prepIT•L2P per il DNA genomico purificato proveniente dai kit di prelievo della saliva Oragene e ORAcollect fornisce DNA di alta qualità e quantità sufficiente per l'uso in applicazioni downstream, come PCR, microarray e sequenziamento di prossima generazione.

Presentazioni del prodotto

prepIT•L2P è disponibile in più volumi, a seconda del numero di preparazioni richieste. Ad esempio:

Riferimento di prodotto/ Numero di catalogo	Volume di preparazione del campione	Numero di preparazioni
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2.000

Garanzie

I termini e le condizioni complete di tutti i prodotti DNA Genotek sono disponibili sul sito <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

Risoluzione dei problemi

Contattare l'assistenza tecnica di DNA Genotek all'indirizzo support@dnagenotek.com oppure chiamare il numero +1 (613) 723-5757, opzione 6.

Protocollo di laboratorio di prepIT™•L2P per la purificazione manuale del DNA da 500 µl di campione

Il seguente protocollo descrive passo dopo passo come purificare il DNA da un'aliquota di 500 µl di campione.

Reagenti inclusi

prepIT•L2P (N. cat. PT-L2P-5 o PT-L2P-45)

Attrezzature e reagenti

- Microcentrifuga in grado di centrifugare a $15.000 \times g$
- Microprovette da 1,5 ml (ad es. Axygen® N. cat. MCT-150-C)
- Incubatore ad aria o ad acqua a 50 °C
- Etanolo (da 95% a 100%) a temperatura ambiente
- Etanolo (70%) a temperatura ambiente
- Buffer di conservazione del DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) o soluzione simile

Procedura

Passaggi di purificazione	Note
1. Mescolare il campione Oragene/ ORAcollect per inversione e agitare delicatamente per qualche secondo.	<ul style="list-style-type: none">• Questo serve per assicurare che i campioni viscosi• vengano mescolati correttamente.

Passaggi di purificazione	Note
2. Incubare il campione a 50 °C in un incubatore ad acqua per un minimo di 1 ora o in un incubatore ad aria per un minimo di 2 ore.	<ul style="list-style-type: none"> Questo trattamento termico è indispensabile per garantire che il DNA venga rilasciato in modo adeguato e che le nucleasi vengano disattivate permanentemente. È possibile effettuare questo passaggio d'incubazione in qualsiasi momento purché successivo al prelievo del campione e antecedente alla sua purificazione. Per garantire l'omogeneità del campione, è necessario incubare l'intero campione nel contenitore originale prima di aliquotarlo. In alternativa il campione può essere incubato a 50 °C di notte, se è più comodo. L'uso di un incubatore ad aria richiede un tempo maggiore perché per equilibrare la temperatura occorre più tempo rispetto all'uso di un incubatore ad acqua. <p>Nota: può essere preferibile utilizzare un incubatore ad aria, perché le provette Oragene/ORAc collect nel bagnetto termostato potrebbero galleggiare. Se è necessario utilizzare il bagnetto termostato, fare in modo che la porzione di provetta contenente il campione resti immersa in acqua.</p>
3. Trasferire 500 µl del campione mescolato in una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml.	<ul style="list-style-type: none"> Ciò che resta del campione può essere conservato a temperatura ambiente (da 15 °C a 25 °C) o congelato. Se si desidera, il campione può essere conservato congelato nella provetta Oragene/ORAc collect a -20 °C, oppure il campione può essere trasferito in una provetta criogenica per la conservazione a lungo termine a -80 °C.
4. Aggiungere 20 µl (volume 1/25 ^o) di prepIT-L2P alla provetta per microcentrifuga e mescolare vorticando per alcuni secondi.	<ul style="list-style-type: none"> Il campione diventerà torbido a causa della precipitazione di impurità e inibitori.
5. Incubare in ghiaccio per 10 minuti.	<ul style="list-style-type: none"> Si può effettuare anche un'incubazione a temperatura ambiente, ma sarà un po' meno efficace nel rimuovere le impurità.

Passaggi di purificazione	Note
6. Centrifugare a temperatura ambiente per 5 minuti a 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> Un periodo di centrifugazione più lungo (fino a 15 minuti) potrebbe essere utile a ridurre la torbidità (elevata A₃₂₀) della soluzione finale di DNA.
7. Trasferire con cautela il surnatante limpido con la punta di una pipetta in una provetta per microcentrifuga pulita. Smaltire il pellet contenente le impurità.	<ul style="list-style-type: none"> Il pellet contiene impurità torbide. Se urtata o agitata accidentalmente, la provetta deve essere nuovamente centrifugata.
8. Aggiungere 600 µl di etanolo dal 95% al 100% a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente per inversione 10 volte.	<ul style="list-style-type: none"> Durante la miscelazione con l'etanolo, il DNA precipiterà. In base alla quantità di DNA presente nel campione, esso potrà apparire come grumo di fibre di DNA o come precipitato fine. Anche se non dovesse essere visibile alcun grumo, il DNA sarà recuperato seguendo attentamente i passaggi successivi.
9. Lasciare il campione a temperatura ambiente per 10 minuti per consentire al DNA di precipitare completamente.	<ul style="list-style-type: none"> L'incubazione a -20 °C non è consigliata in quanto, oltre al DNA, potrebbe fare precipitare anche le impurità.
10. Posizionare la provetta nella microcentrifuga con un determinato orientamento. Centrifugare a temperatura ambiente per 2 minuti a 15.000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> Ad esempio, inserire ogni provetta nella microcentrifuga con la cerniera del cappuccio rivolta in direzione opposta rispetto al centro del rotore. Dopo la centrifugazione, la posizione del pellet è individuabile (anche se troppo piccolo per essere facilmente visibile): sarà in cima alla provetta, sotto alla cerniera.
11. Rimuovere con cautela il surnatante con la punta di una pipetta e quindi smaltirlo. Prestare attenzione a non disturbare il pellet di DNA.	<ul style="list-style-type: none"> Questo pellet contiene DNA. La perdita del pellet comporta la perdita del DNA. Ruotando la provetta in modo tale che il pellet sia sulla parete superiore, sarà possibile muovere senza problemi la punta di una pipetta lungo la parete inferiore e rimuovere tutto il supernatante. Il surnatante può contenere delle impurità e deve essere rimosso il più possibile.

Passaggi di purificazione	Note
12. Lavaggio con etanolo: facendo attenzione, aggiungere 250 µl di etanolo al 70%. Lasciare in verticale a temperatura ambiente per 1 minuto. Rimuovere completamente l'etanolo senza disturbare il pellet.	<ul style="list-style-type: none"> • È importante rimuovere tutto l'etanolo dal campione. Un eventuale residuo di etanolo può influire sull'efficacia dell'analisi. • Dopo la rimozione dell'etanolo al 70%, la provetta può essere centrifugata a impulsi per consentire la rimozione dell'etanolo residuo. • Prestare attenzione a non disturbare il pellet di DNA; potrebbe essere piccolo o invisibile. • In caso di distacco del pellet, centrifugare il campione per 5 minuti a 15.000 × g. • Un'eccessiva essiccazione del pellet può rendere più difficile la dissoluzione del DNA.
13. Aggiungere 100 µl di soluzione TE (vedere pagina 5) per dissolvere il pellet di DNA. Vorticare per almeno 5 secondi.	<ul style="list-style-type: none"> • Se si desidera una concentrazione più elevata di DNA, è opportuno utilizzare 50 µl di TE.
14. Per assicurare la completa reidratazione del DNA (pellet e striscio), incubare a temperatura ambiente durante la notte, quindi vorticare oppure incubare a 50 °C per 1 ora vorticando di tanto in tanto.	<ul style="list-style-type: none"> • Grandi quantitativi di DNA a elevato peso molecolare possono richiedere molto tempo per idratarsi (dissolversi) completamente. • Un'idratazione incompleta del DNA è causa di inesattezze nelle stime della concentrazione del DNA e di errori nelle applicazioni downstream come la PCR.
15. Opzioni per la conservazione del DNA completamente reidratato: a) In soluzione TE a -20 °C per la conservazione a lungo termine. Se si desidera, suddividere le aliquote. b) In soluzione TE a 4 °C per un massimo di 2 mesi.	

Protocollo di laboratorio di prepIT•L2P per la purificazione manuale del DNA di un campione intero

Note: questo protocollo richiede l'uso di una centrifuga (con rotore ad angolo fisso o a cestello basculante) in grado di generare almeno 3.500 × g per ottenere risultati ottimali.

Il seguente protocollo descrive passo dopo passo come purificare il DNA dal campione intero (volume totale del campione 1 ml-4 ml). I volumi mostrati devono essere regolati in base al volume effettivamente raccolto.

Reagenti inclusi

prepIT•L2P (N. cat. PT-L2P-5 o PT-L2P-45)

Attrezzature e reagenti

- Centrifuga in grado di contenere provette da 15 ml e di generare almeno 3.500 × g (vedere la Tabella 2)
- Provette con fondo conico in polipropilene da 15 ml (ad es. BD Falcon® N. cat. 352196)
- Microcentrifuga in grado di centrifugare a 15.000 × g (facoltativa)
- Microprovette da 1,5 ml (ad es. Axygen® N. cat. MCT-150-C)
- Incubatore ad aria o ad acqua a 50 °C
- Etanolo (da 95% a 100%) a temperatura ambiente
- Etanolo (70%) a temperatura ambiente
- Buffer di conservazione del DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) o soluzione simile

Facoltativo: controllo di pre-purificazione (applicabile solo ai campioni Oragene; non necessario per i campioni ORAcollect)

Pesare il campione per stimare la quantità di saliva fornita dal donatore (vedere la Tabella 1). La quantità di saliva raccolta è direttamente proporzionale alla quantità di DNA recuperato. Ad esempio, se un donatore ha fornito meno di 2 ml di saliva, la resa totale di questo campione sarà inferiore.

Peso del kit (senza il campione)

Non appena il campione giunge presso il laboratorio, consigliamo di pesare il campione per stimare se il donatore ha fornito la giusta quantità di saliva. Considerare una certa variabilità tra i donatori. Viene fornito il peso medio di un kit vuoto (Tabella 1). Per stimare la quantità di campione raccolto (presumendo 1 g/ml), effettuare il calcolo seguente:

Peso del kit contenente il campione - Peso del kit senza il campione

Quantità di campione raccolto

Tabella 1

N. prodotto	Peso del kit senza il campione
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

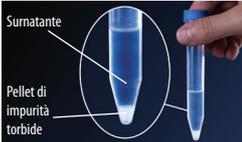
Procedura

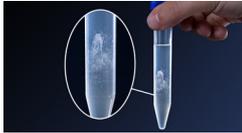
Passaggi di purificazione	Note
1. Mescolare il campione Oragene/ ORAcollect per inversione e agitare delicatamente per qualche secondo.	<ul style="list-style-type: none"> • Questo serve per assicurare che i campioni viscosi • vengano mescolati correttamente.

Passaggi di purificazione	Note
2. Incubare il campione a 50 °C in un incubatore ad acqua per un minimo di 1 ora o in un incubatore ad aria per un minimo di 2 ore.	<ul style="list-style-type: none"> • Questo passaggio di trattamento al calore è essenziale per garantire che il DNA venga adeguatamente rilasciato e che la nucleasi sia permanentemente inattivata. • Se risulta più comodo, il campione può essere incubato a 50 °C per tutta la notte. • Questo passaggio di incubazione può essere eseguito in qualsiasi momento dopo il prelievo del campione e prima della sua purificazione. • L'uso di un incubatore ad aria richiede un tempo maggiore perché per equilibrare la temperatura occorre più tempo rispetto all'uso di un incubatore ad acqua. <p>Nota: può essere preferibile utilizzare un incubatore ad aria, perché le provette Oragene/ORACollect nel bagnetto termostato potrebbero galleggiare. Qualora sia necessario utilizzare un bagnetto termostato, assicurarsi che la porzione della provetta contenente il campione resti immersa in acqua.</p>
3. Trasferire l'intero campione in una provetta per centrifuga da 15 ml (Figura 1). Prendere nota del volume del campione di sangue.	<ul style="list-style-type: none"> • Il trasferimento può essere effettuato versando o pipettando con una pipetta di vetro o di plastica.



Figura 1: prima di procedere al passaggio 4, assicurarsi che l'intero campione sia stato incubato e trasferito in una provetta per centrifuga pulita da 15 ml, come mostrato.

Passaggi di purificazione	Note
<p>4. Aggiungere 1/25° di volume di prepIT-L2P e mescolare vorticoando per alcuni secondi (Figura 2).</p>  <p><i>Figura 2: dopo l'aggiunta del PT-L2P e l'incubazione in ghiaccio per 10 minuti, il campione non sarà più limpido, bensì sarà una soluzione torbida.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ad es. a un campione da 4 ml aggiungere 160 µl di prepIT-L2P. • Il campione diventerà torbido a causa della precipitazione di impurità e inibitori.
<p>5. Incubare in ghiaccio per 10 minuti.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Si può effettuare anche un'incubazione a temperatura ambiente, ma sarà un po' meno efficace nel rimuovere le impurità.
<p>6. Centrifugare a temperatura ambiente per 10 minuti alla velocità più alta possibile. Minimo 3.500 × g.</p>  <p><i>Figura 3: dopo la centrifugazione, vi sarà un accumulo di materiale torbido alla base della provetta. Il surnatante dovrebbe apparire limpido.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Una forza centrifuga maggiore riduce al minimo la quantità di materiale torbido che verrà trasportato nel DNA purificato (Figura 3). Prima di procedere, verificare presso il produttore della provetta che le provette per centrifuga da 15 ml possano sopportare la forza centrifuga. • Un periodo di centrifugazione più lungo (fino a 15 minuti) potrebbe essere utile a ridurre la torbidità (elevata A₃₂₀) della soluzione finale di DNA.
<p>7. Trasferire con cautela il surnatante limpido con una pipetta in una provetta per microcentrifuga pulita da 15 ml. Saltire il pellet.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Lasciare un volume limitato di surnatante per evitare di disturbare il pellet. • Il pellet contiene impurità torbide. Se urtata o agitata accidentalmente, la provetta deve essere nuovamente centrifugata.

Passaggi di purificazione	Note
<p>8. Aggiungere 1,2x volume di etanolo dal 95% al 100% a temperatura ambiente al surnatante limpido. Mescolare delicatamente per inversione 10 volte.</p>  <p><i>Figura 4: dopo l'aggiunta dell'etanolo, il DNA precipiterà, il che potrebbe provocare un grumo visibile di fibre.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Durante la miscelazione con etanolo, il DNA precipiterà. • In base alla quantità di DNA presente nel campione, esso potrà apparire come grumo di fibre di DNA (Figura 4) o come precipitato fine.
<p>9. Lasciare il campione a temperatura ambiente per 10 minuti per consentire al DNA di precipitare completamente.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • L'incubazione a -20 °C non è consigliata in quanto, oltre al DNA, potrebbe fare precipitare anche le impurità.
<p>10. Centrifugare a temperatura ambiente per 10 minuti alla velocità più alta possibile. Minimo 3.500 × g.</p>	
<p>11. Rimuovere con cautela il surnatante con una pipetta di vetro o plastica e quindi smaltirlo. Prestare attenzione a non disturbare il pellet di DNA.</p>  <p><i>Figura 5: utilizzare la punta di una pipetta per grattare delicatamente lungo l'interno della provetta potrebbe rivelare la presenza di uno striscio di DNA.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Il surnatante può contenere impurità e deve essere rimosso il più completamente possibile. • Il DNA precipitato si manifesterà come un pellet in fondo alla provetta e probabilmente come uno striscio lungo la parete della provetta (Figura 5). • Lo striscio di DNA può trovarsi sulla parete della provetta rivolto in direzione opposta rispetto al centro della centrifuga. • Per individuare uno striscio si può usare un test di "graffiatura". È possibile verificare la presenza di uno striscio di DNA graffiando l'interno della provetta con la punta di una pipetta. Potrebbe essere visibile uno striscio, come mostrato nella Figura 5.

Passaggi di purificazione	Note
<p>12. Lavaggio in etanolo: aggiungere con cautela 1 ml di etanolo al 70% alla provetta senza disturbare lo striscio o il pellet. Lasciare a temperatura ambiente per 1 minuto. Ruotare con delicatezza e rimuovere completamente l'etanolo senza disturbare il pellet e lo striscio.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • È importante rimuovere tutto l'etanolo dal campione. Un eventuale residuo di etanolo può influire sull'efficacia dell'analisi. • Prestare attenzione a non disturbare il pellet o lo striscio di DNA. • È possibile eseguire una breve centrifugazione (meno di 1 minuto) per facilitare la rimozione completa del surnatante. • Qualora il pellet si distacchi dopo il passaggio di lavaggio in etanolo, centrifugare il campione per 5 minuti alla velocità più alta possibile. Minimo $3.500 \times g$.
<p>13. Per i campioni Oragene, reidratare il DNA aggiungendo 0,2 ml-1 ml di soluzione TE e vorticare il campione per 30 secondi.</p> <p>Per i campioni Oragene, reidratare il DNA aggiungendo 0,2 ml di soluzione TE e vorticare il campione per 30 secondi.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Qualora si desideri una maggiore concentrazione di DNA, è possibile ridurre il volume di TE. Utilizzare un minimo di 200 μl di soluzione TE. • Un'eccessiva essiccazione del pellet (> 10 minuti) e l'uso di meno di 500 μl di soluzione TE può rendere difficile la reidratazione (dissoluzione) del DNA e può ridurre la resa o rendere difficile la quantificazione. • Il DNA precipitato si manifesterà come un pellet in fondo alla provetta e probabilmente come uno striscio lungo la parete della provetta. • Per assicurare il massimo recupero del DNA, il campione deve essere vorticato dopo l'aggiunta del solvente di DNA (soluzione TE). La vorticazione garantirà il recupero dello striscio di DNA lungo la parete della provetta (Figura 6). • La vorticazione non spezzerà il DNA.
 <p>Figura 6: vorticare il campione per 30 secondi consentirà di recuperare lo striscio di DNA sulla parete della provetta. Il DNA resterà ad alto peso molecolare.</p>	
<p>14. Per assicurare la completa idratazione del DNA (pellet e striscio), incubare a temperatura ambiente durante la notte, quindi vorticare oppure incubare a 50 °C per 1 ora vorticando di tanto in tanto.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Un'idratazione incompleta del DNA è causa di inesattezze nelle stime della concentrazione del DNA e di errori nelle applicazioni downstream come la PCR.

Passaggi di purificazione	Note
<p>15. Trasferire il DNA reidratato in una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml per la conservazione.</p>	
<p>Passaggio facoltativo:</p> <ol style="list-style-type: none"> Centrifugare il DNA reidratato a temperatura ambiente per 15 minuti a $15.000 \times g$. Trasferire il surnatante in una provetta per microcentrifuga pulita da 1,5 ml senza disturbare il pellet. 	<p>Tenere presente che il pellet contiene materiale torbido insolubile.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Per massimizzare il recupero del DNA, assicurarsi che sia completamente reidratato (passaggio 14) prima di eseguire questo passaggio di centrifugazione. • Questo passaggio di centrifugazione assicura che l'eventuale materiale torbido restante venga rimosso dal campione di DNA. • Prestare attenzione a non disturbare il pellet durante il trasferimento del surnatante limpido in una nuova provetta.
<p>16. Opzioni per la conservazione del DNA completamente reidratato:</p> <ol style="list-style-type: none"> In soluzione TE a -20 °C per la conservazione a lungo termine. Se si desidera, suddividere le aliquote. In soluzione TE a 4 °C per un massimo di 2 mesi. 	<ul style="list-style-type: none"> • Il congelamento del DNA purificato in soluzione TE può far precipitare il DNA. Nello scongelamento del campione di DNA purificato congelato, occorre prestare la massima attenzione all'idratazione, come spiegato al passaggio 14.

Quantificazione del DNA

Con metodo a fluorescenza

Le analisi che usano coloranti fluorescenti sono più specifiche rispetto all'assorbanza a 260 nm per misurare la quantità di DNA a doppio filamento (dsDNA) in un campione di DNA. Raccomandiamo l'uso di coloranti fluorescenti come Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) o QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Potrebbe essere necessario diluire il DNA fino a 1:50 con soluzione TE prima di poterlo impiegare nell'analisi di quantificazione.

Con metodo ad assorbanza

Se si sceglie di quantificare il DNA mediante assorbanza, raccomandiamo il trattamento preliminare del campione purificato con RNasi per digerire l'RNA contaminante, quindi la rimozione dei frammenti di RNA mediante precipitazione di etanolo del DNA. Una descrizione del protocollo dettagliato si trova in PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*.¹ Tenere presente che il DNA ottenuto da un campione orale in genere contiene una quantità sensibilmente maggiore di RNA rispetto ai campioni ematici. Accertarsi che il DNA precipitato in alcol si sia disciolto completamente prima di effettuare la lettura dell'assorbanza.

Fattore di conversione: un'assorbanza di 1,0 a 260 nm corrisponde a una concentrazione di 50 ng/μl (50 μg/ml) per il DNA puro a doppio filamento (dsDNA) in un campione.

Assicurarsi che i valori di assorbanza siano compresi nel range lineare dello spettrofotometro. Diluire e rimisurare i campioni che non rientrano nel range lineare. Per maggiori informazioni si prega di consultare la documentazione relativa allo strumento.

Bibliografia

¹ RNA removal by double-RNase digestion. PD-PR-040. DNA Genotek.

Metodo

1. Diluire un'aliquota di 10 μl di DNA trattato con RNasi purificato con 90 μl di TE (diluizione 1/10). Mescolare pipettando delicatamente su e giù. Aspettare che si dissolvano eventuali bolle.
2. Utilizzare la TE nella cella di riferimento (vuota).
3. Misurare l'assorbanza a 320 nm, 280 nm e 260 nm.
4. Calcolare i valori corretti di A_{280} e A_{260} sottraendo l'assorbanza a 320 nm (A_{320}) dai valori di A_{280} e A_{260} .
5. Concentrazione di DNA in ng/μl = $A_{260} \times 10$ corretto (fattore di diluizione) $\times 50$ (fattore di conversione).
6. Rapporto A_{260}/A_{280} : dividere l' A_{260} corretto per l' A_{280} corretto.

Esempio

1. Poniamo i seguenti valori misurati: $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ e $A_{260} = 0,295$
2. La concentrazione di DNA nel campione non diluito sarà:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [fattore di diluizione] $\times 50$ [fattore di conversione]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{l}$ o $135 \mu\text{g}/\text{ml}$
3. Il rapporto A_{260}/A_{280} corretto sarà:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

Oragene•DNA e ORAcollect•DNA non sono in vendita negli Stati Uniti d'America.
Oragene•DISCOVER è destinato solo a scopi di ricerca, non è da utilizzare in procedure diagnostiche.

Alcuni prodotti DNA Genotek potrebbero non essere disponibili in tutte le aree geografiche.
Oragene, prepIT, ORAcollect e DNA Genotek sono marchi registrati di DNA Genotek Inc.

Ogni altro marchio o nome qui menzionato appartiene al rispettivo proprietario.

Tutti i protocolli, white paper e documenti applicativi di DNA Genotek sono reperibili nella sezione Support del nostro sito Internet www.dnagenotek.com.

Legenda dell'etichetta:

	Dispositivo medico-diagnostico per diagnosi in vitro
	Numero di catalogo
	Contrassegno CE
	Produttore
	Consultare l'inserito della confezione
	Rappresentante autorizzato per l'Europa
	Rappresentante autorizzato per la Svizzera
	Numero di lotto
	Identificatore di dispositivo univoco
	Stabilità in uso
15 °C / 30 °C 59 °F / 86 °F	Istruzioni per la conservazione

Brevetto (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-38 (IT - Italian) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., una filiale di OraSure Technologies, Inc., tutti i diritti riservati.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com