

**Manuālās izdalīšanas  
protokola rokasgrāmata  
lietošanai ar**

**prepiT™•L2P**

**DNAGENOTEK™**

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

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

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

*Izcili paraugi  
Pierādīta veikspēja*




prepIT™-L2P protokols papildu valodās ir pieejams  
[www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)


### **Tehniskais atbalsts pieejams no pirmdienas līdz piektdienai (no 9:00 līdz 17:00 ET):**

- Bezmaksas tālruņa līnija (Ziemeļamerikā): 1 866 813 6354, izvēle 6
- Visas citas valstis: +1 613 723 5757, izvēle 6
- E-pasts: [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)

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

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

 Novosanis NV, Bijkhoevelaan 32c,  
2110 Wijnegem, Belģija  
E-pasts: [EUAR@novosanis.com](mailto:EUAR@novosanis.com)

 Arazy Group Swiss GmbH  
Bruderholzallee 53, 4059 Basel, Šveice  
E-pasts: [swiss.ar@arazygroup.com](mailto:swiss.ar@arazygroup.com)

Sponsors Austrālijā: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street,  
Sydney, NSW 2000 Austrālija

## Satura rādītājs

Paredzētā lietošana/mērķis .....	4
Stabilitāte lietošanas laikā .....	4
Funkcijas .....	4
Materiāli .....	4
Brīdinājumi un piesardzības pasākumi .....	4
Produkta lietošanas ierobežojumi .....	5
prepIT•L2P transportēšana .....	5
prepIT•L2P uzglabāšana (derīguma termiņš) .....	5
Utilizācija .....	5
Apkope/remonts .....	5
Efektivitātes raksturojuma kopsavilkums .....	5
Produkta varianti .....	5
Garantijas .....	6
Problēmu novēršana .....	6
<b>prepIT•L2P laboratorijas protokols DNS manuālajai izdališanai no:</b>	
500 µL parauga .....	7
visa parauga .....	11
DNS kvantitatīva noteikšana .....	18

## Paredzētā lietošana/mērķis

Genomiskās DNS izdalīšanai no Oragene™ un ORAcollect™ siekalu savākšanas komplektiem.

## Stabilitāte lietošanas laikā

PT-L2P-5 (5 ml) un T-L2P-45 (45 ml) piemīt 30 mēnešu stabilitāte lietošanas laikā istabas temperatūrā.

## Funkcijas

- Optimizēta ķīmija maksimālai DNS izdalīšanai no paraugiem no mutēs dobuma, kas savākti ar Oragene un ORAcollect produktu līnijām.
- Pierādīts, ka nodrošina saskanīgus rezultātus ar lielmolekulāru DNS.
- Mērogojama izdalīšanas metode lieliem un maziem paraugu tilpumiem.
- Ērta darbplūsmā ar pilnīgu tehnisko atbalstu no savākšanas līdz ekstrahēšanai.
- Rentabla metode, kas prasa minimālu aprīkojumu.

## Materiāli

- PT-L2P-5 (5 ml) un/vai PT-L2P-45 (45 ml)
- prepIT•L2P produkta rokasgrāmata

## Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

- Lietošanai tikai laboratorijā.
- NENORĪT šķidru reagentu.
- NELIETOT, ja ir bojāts iepakojums vai ir salauzts piltuves vāks/vāciņš vai tajā ir noplūde.
- NELIETOT prepIT•L2P pēc "Izlietot līdz" datuma, kas norādīts uz reagenta pudeles.
- Ja reāģents ir nonācis saskarē ar acīm vai ādu, skalojiet to ar ūdeni. NENORĪT!
- Ziņojiet DNA Genotek un savas valsts atbildīgajai iestādei par jebkādu nopietnu incidentu.
- Informāciju par neizmantojot reagenta drošu utilizāciju skatiet materiāla drošības datu lapā (MSDS).
- Materiāla drošības datu lapa (MSDS) ir pieejama [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

## Produkta lietošanas ierobežojumi

Izmantojiet prepIT•L2P tikai tā, kā norādīts šajā produkta rokasgrāmatā.

## prepIT•L2P transportēšana

prepIT•L2P var transportēt apkārtējās vides temperatūrā kā laboratorijas reagentu. Īpaša apstrāde nav nepieciešama.

## prepIT•L2P uzglabāšana (derīguma termiņš)

Uzglabāt istabas temperatūrā. Pienācīgi aiztaisītu un istabas temperatūrā uzglabātu PT-L2P-5 (5 ml) un PT-L2P-45 (45 ml) derīguma termiņš ir 30 mēneši.

## Utilizācija

Izmetiet neizmantotus, bojātus komplektus vai komplektus ar noplūdes pazīmēm saskaņā ar vietējiem, valsts un federālajiem noteikumiem. Izmetiet kā laboratorijas atkritumus.

## Apkope/remonts

Neattiecas. prepIT•L2P ir reāģents – apkope vai remonts nav nepieciešams.

## Efektivitātes raksturojuma kopsavilkums

Ar prepIT•L2P izdalīta genomiskā DNS no Oragene un ORAcollect siekalu savākšanas komplektiem nodrošina augstas kvalitātes un kvantitātes DNS, kas ir pietiekama izmantošanai pakārtotos lietojumos, piemēram, PĶR, mikromatricas tehnoloģijā un nākamās paaudzes sekvencēšanā.

## Produkta varianti

prepIT•L2P ir pieejams vairākos tilpumos atkarībā no nepieciešamo preparātu skaita. Piemēram:

Produkta atsaucis/ kataloga numurs	Parauga sagatavošanas tilpums	Preparātu skaits
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2000

## Garantijas

Pilni DNA Genotek produktu noteikumi un nosacījumi ir pieejami <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

## Problēmu novēršana

Sazinieties ar DNA Genotek tehnisko atbalstu, rakstot uz e-pastu [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com) vai zvanot uz +1 (613) 723-5757, izvēle 6.

# prepIT™•L2P laboratorijas protokols DNS manuālajai izdalīšanai no 500 µl parauga

Šajā pakāpeniskajā protokolā aprakstīts, kā izdalīt DNS no parauga 500 µl alikvotās daļas.

## Iekļautie reaģenti

prepIT•L2P (kat. Nr. PT-L2P-5 vai PT-L2P-45)

## Aprīkojums un reaģenti

- Mikrocentrifūga, kas spēj darboties ar ātrumu 15 000 × g
- 1,5 ml mikrostobrīni (piem., Axygen® kat. Nr. MCT-150-C)
- Gaisa vai ūdens inkubators 50 °C temperatūrā
- Etanols (95-100%) istabas temperatūrā
- Etanols (70%) istabas temperatūrā
- DNS uzglabāšanas buferšķīdums: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) vai līdzīgs šķīdums

## Procedūra

Izdalīšanas soļi	Piezīmes
1. Sajauciet Oragene/ORACollect paraugu, apgriežot to otrādi vai viegli kratot dažas sekundes.	• Šādā veidā tiek nodrošināta viskozo paraugu pareiza sajaukšana.

Izdalīšanas soļi	Piezīmes
2. Inkubējiet paraugu 50 °C temperatūrā ūdens inkubatorā vismaz 1 stundu vai gaisa inkubatorā vismaz 2 stundas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Šis termiskās apstrādes solis ir būtisks, lai nodrošinātu, ka DNS tiek pienācīgi izdalīta un nukleāzes tiek neatgriezeniski inaktivētas.</li> <li>• Šo inkubācijas soli var veikt jebkurā laikā pēc parauga savākšanas un pirms tā izdalīšanas.</li> <li>• Viss paraugs pirms alikvotēšanas ir jāinkubē sākotnējā savākšanas stobriņā, lai nodrošinātu parauga viendabīgumu.</li> <li>• Ja tā ir ērtāk, paraugu var inkubēt 50 °C temperatūrā pa nakti.</li> <li>• Gaisa inkubatorā nepieciešams ilgāks laiks, jo temperatūras izlīdzināšanās notiek lēnāk nekā ūdens inkubatorā.</li> </ul> <p><b>Piezīme.</b> Var būt vēlāma gaisa inkubatora izmantošana, jo ūdens vannā Oragene/ORAclect stobriņi var peldēt. Ja jāizmanto ūdens vanna, nodrošiniet, lai paraugu saturošā stobriņa daļa paliktu iegremdēta ūdenī.</p>
3. 500 μl sajauktā parauga pārnesiet uz 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņu.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atlikušo parauga daļu var uzglabāt istabas temperatūrā (no 15 °C līdz 25 °C) vai sasaldēt.</li> <li>• Ja nepieciešams, paraugu var uzglabāt sasaldētu Oragene/ORAclect stobriņā -20 °C temperatūrā vai arī paraugu var pārnest uz krioflaku ilgstošai glabāšanai -80 °C temperatūrā.</li> </ul>
4. Mikrocentrifūgas stobriņā pievienojiet 20 μl (1/25 tilpuma) prepIT•L2P un maisiet dažas sekundes, vorteksējot.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nogulsnējoties piemaisījumiem un inhibitoriem, paraugs kļūs duļķains.</li> </ul>
5. Inkubējiet uz ledu 10 minūtes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inkubāciju istabas temperatūrā var aizstāt, bet tā būs nedaudz mazāk efektīva piemaisījumu likvidēšanā.</li> </ul>

Izdalīšanas soļi	Piezīmes
6. Centrifugējiet istabas temperatūrā 5 minūtes ar ātrumu 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ilgāks centrifugēšanas periods (līdz 15 minūtēm) var palīdzēt samazināt galīgā DNS šķīduma duļķainumu (augsts A<sub>320</sub>).</li> </ul>
7. Dzidro supernatantu ar pipetes uzgali uzmanīgi pārnesiet svaigā mikrocentrifūgas stobriņā. <b>Izmetiet nogulsnes, kas satur piemaisījumus.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nogulsnes satur duļķainus piemaisījumus. Ja tās tiek nejauši izjauktas, stobriņš ir atkārtoti jācentrifugē.</li> </ul>
8. Pievienojiet 600 μl istabas temperatūras 95-100% etanola. Viegli samaisiet, 10 reizes apgriežot otrādi.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sajaucot ar etanolu, DNS nogulsnesies. Atkarībā no DNS daudzuma paraugā tas var parādīties kā DNS šķiedru receklis vai kā smalkas nogulsnes.</li> <li>• Pat ja receklis nav redzams, DNS tiks izdalīta, rūpīgi sekojot nākamajiem soļiem.</li> </ul>
9. Ļaujiet paraugam 10 minūtes pastāvēt istabas temperatūrā, lai DNS pilnībā nogulsnetos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inkubācija -20 °C temperatūrā nav ieteicama, jo kopā ar DNS var nogulsneties piemaisījumi.</li> </ul>
10. Ievietojiet stobriņu mikrocentrifūgā, pagriežot to zināmā veidā. Centrifugējiet istabas temperatūrā 2 minūtes ar ātrumu 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Piemēram, katru stobriņu ievietojiet mikrocentrifūgā, pagriežot vāciņa eņģes daļu prom no rotora centra. Pēc centrifugēšanas var atrast nogulšņu pozīciju (pat ja tās ir pārāk sīkas, lai būtu redzamas); tās atradīsies stobriņa galā zem eņģes.</li> </ul>
11. Uzmanīgi ar pipetes uzgali izņemiet supernatantu un izmetiet to. Uzmanieties, lai neizjauktu DNS nogulsnes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Šis nogulsnes satur DNS. Pazaudējot nogulsnes, tiks pazaudēta arī DNS.</li> <li>• Pagriežot stobriņu tā, lai nogulsnes atrastos uz augšējās sienas, būs iespējams droši pārvietot pipetes uzgali gar apakšējo sienu un izņemt visu supernatantu.</li> <li>• Supernatants var saturēt piemaisījumus, un tas pēc iespējas pilnībā jāizņem.</li> </ul>

Izdalīšanas soļi	Piezīmes
12. Skalošana ar etanolu. Uzmanīgi pievienojiet 250 µl 70% etanola. Ļaujiet 1 minūti pastāvēt istabas temperatūrā. <b>Pilnībā izņemiet etanolu, neizjaucot nogulsnes.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ir svarīgi no parauga izņemt visu etanolu. Etanola pārmešana var ietekmēt testa rezultātus.</li> <li>• Pēc 70% etanola izņemšanas stobriņus var pagriezt ar impulsiem, lai varētu izņemt atlikušo etanolu.</li> <li>• Uzmanieties, lai neizjauktu DNS nogulsnes; tās var būt nelielas vai neredzamas.</li> <li>• Ja nogulsnes atdalās, centrifugējiet paraugu 5 minūtes ar ātrumu 15 000 × g.</li> <li>• Pārmērīga nogulšņu žāvēšana var apgrūtināt DNS izšķīšanu.</li> </ul>
13. Lai izšķīdinātu DNS nogulsnes, pievienojiet 100 µl TE šķiduma (sk. 5. lpp.). Vorteksējiet vismaz 5 sekundes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ja nepieciešama lielāka DNS koncentrācija, jāizmanto 50 µl TE.</li> </ul>
14. Lai nodrošinātu pilnīgu DNS rehidratāciju, pa nakti inkubējiet istabas temperatūrā un pēc tam vorteksējiet vai laiku pa laikam vorteksējiet 1 stundu 50 °C temperatūrā.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liela daudzuma lielmolekulāras DNS rehidratācija (izšķīšana) var būt lēna.</li> <li>• Nepilnīgas DNS rehidratācijas rezultātā DNS koncentrācijas novērtēšana var būt neprecīza un pakārtoto lietojumu, piemēram, PqR, izpilde var būt neveiksmīga.</li> </ul>
15. Pilnībā rehidrētās DNS uzglabāšanas iespējas: a) TE -20 °C temperatūrā ilgstošai uzglabāšanai. Ja nepieciešams, sadaliet alikvotās daļās. b) TE 4°C temperatūrā līdz 2 mēnešiem.	

## prepIT•L2P laboratorijas protokols DNS manuālajai izdalīšanai no visa parauga

**Piezīme.** Šajā protokolā ir nepieciešams izmantot centrifūgu (fiksēta leņķa vai ar rotoru ar šupojošo kausu), kas spēj ģenerēt vismaz 3500 × g optimālu rezultātu sasniegšanai.

Šajā pakāpeniskajā protokolā aprakstīts, kā izdalīt DNS no visa parauga (1 ml-4 ml kopējā parauga tilpuma). Parādītie tilpumi jākorrigē atbilstoši faktiskajam savāktajam tilpumam.

### Iekļautie reaģenti

prepIT•L2P (kat. Nr. PT-L2P-5 vai PT-L2P-45)

### Aprīkojums un reaģenti

- Centrifūga, kurā var ievietot 15 ml stobriņus un kas spēj sasniegt ātrumu vismaz 3 500 × g (sk. 2. tabulu)
- 15 ml koniskie polipropilēna stobriņi (piem., BD Falcon® kat. Nr. 352196)
- Mikrocentrifūga, kas spēj darboties ar ātrumu 15 000 × g (papildu)
- 1,5 ml mikrostoibriņi (piem., Axygen® kat. Nr. MCT-150-C)
- Gaisa vai ūdens inkubators 50 °C temperatūrā
- Etanols (95-100%) istabas temperatūrā
- Etanols (70%) istabas temperatūrā
- DNS uzglabāšanas buferšķīdums: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) vai līdzīgs šķīdums

## Nav obligāti: pirmsizdališanas pārbaude (piemērojama tikai Oragene paraugiem; nav nepieciešama ORACollect paraugiem)

Nosveriet paraugu, lai novērtētu donora nodrošināto siekalu daudzumu (sk. 1. tabulu). Savākto siekalu daudzums ir tieši proporcionāls izdalītajam DNS daudzumam. Piemēram, ja donors ir nodrošinājis mazāk par 2 ml siekalu, jāreķinās, ka no šī parauga tiks izdalīts mazāks kopējais daudzums.

## Komplekta svars (bez parauga)

Kad laboratorijā nonāk paraugs, iesakām paraugu nosvērt, lai novērtētu, vai donors nodrošinājis pareizo siekalu daudzumu. Dažādiem donoriem daudzums var būt dažāds. Norādīts tukša komplekta vidējais svars (1. tabula). Lai novērtētu savāktā parauga daudzumu (pieņemot, ka tas ir 1 g/ml), veiciet šādu aprēķinu:

*Komplekta ar paraugu svars - Komplekta svars bez parauga*

*Savāktā parauga apjoms*


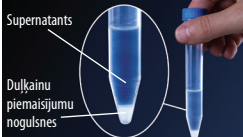
1. tabula	
Produkta Nr.	Komplekta svars bez parauga
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

## Procedūra

Izdališanas soļi	Piezīmes
1. Sajauciet Oragene/ORACollect paraugu, apgriežot to otrādi vai viegli kratot dažās sekundes.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Šādā veidā tiek nodrošināta viskozo paraugu pareiza sajaukšana.</li></ul>
2. Inkubējiet paraugu 50 °C temperatūrā ūdens inkubatorā vismaz 1 stundu vai gaisa inkubatorā vismaz 2 stundas.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Šīs termiskās apstrādes solis ir būtisks, lai līdz maksimumam palielinātu DNS daudzumu un nodrošinātu, ka nukleāzes tiek neatgriezeniski inaktivētas.</li><li>• Ja tā ir ērtāk, paraugu var inkubēt 50 °C temperatūrā pa nakti.</li><li>• Šo inkubācijas soli var veikt jebkurā laikā pēc parauga savākšanas un pirms DNS izdališanas.</li><li>• Gaisa inkubatorā nepieciešams ilgāks notiek lēnāk nekā ūdens inkubatorā.</li></ul> <p><b>Piezīme.</b> Var būt vēlama gaisa inkubatora izmantošana, jo ūdens vannā Oragene/ORACollect stobriņi var peldēt. Ja jāizmanto ūdens vanna, nodrošiniet, lai paraugu saturošā stobriņa daļa paliktu iegremdēta ūdenī.</p>
3. Pārnesiet visu paraugu uz 15 ml centrifūgas stobriņu (1. attēls). Atzīmējiet parauga tilpumu.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Pārņemšanu var veikt, lejot vai pipetējot ar stikla vai plastmasas pipeti.</li></ul>




1. attēls. Pirms turpināt ar 4. soli, pārliedziet, vai viss paraugs tika inkubēts un pārņemts uz svaigu 15 ml centrifūgas stobriņu, kā parādīts.

Izdališanas soli	Piezīmes
<p>4. Pievienojiet 1/25 prepIT-L2P tilpuma un maisiet dažas sekundes, vorteksējot (2. attēls).</p>  <p>2. attēls. Pēc PT-L2P pievienošanas un inkubēšanas uz ledu 10 minūtes paraugs vairs neizskatās dzidrs, bet drīzāk būs duļķains šķīdums.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Piemēram, 4 ml paraugam pievienojiet 160 <math>\mu</math>l prepIT-L2P.</li> <li>Nogulsnējoties piemaisījumiem un inhibitoriem, paraugs kļūs duļķains.</li> </ul>
<p>5. Inkubējiet uz ledu 10 minūtes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inkubāciju istabas temperatūrā var aizstāt, bet tā būs mazāk efektīva piemaisījumu likvidēšanā.</li> </ul>
<p>6. Centrifugējiet istabas temperatūrā 10 minūtes ar vislielāko iespējamo ātrumu. Vismaz 3 500 <math>\times</math> g.</p>  <p>3. attēls. Pēc centrifūģēšanas stobriņa pamatnē uzkrāsies duļķains materiāls. Supernatantam jābūt redzami dzidram.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lielāks centrālās spēks samazina duļķainā materiāla daudzumu, kas tiks pārnesti izdalītajā DNS (3. attēls). Pirms turpināt, kopā ar stobriņa ražotāju jāpārbauda, vai 15 ml centrifūģas stobriņi spēj izturēt šo centrālās spēku.</li> <li>Ilgāks centrifūģēšanas periods (līdz 20 minūtēm) var palīdzēt samazināt galīgā DNS šķīduma duļķainumu (augsts A<sub>320</sub>).</li> </ul>
<p>7. Dzidro supernatantu ar pipeti uzmanīgi pārnesiet svaigā 15 ml centrifūģas stobriņā. <b>Izmētiēt nogulsnes.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Atstājiet nelielu daudzumu supernatanta, lai neizjauktu nogulsnes.</li> <li>Nogulsnes satur duļķainus piemaisījumus. Ja tās tiek nejausi izjauktas, stobriņš ir atkārtoti jācentrifūģē.</li> </ul>

Izdališanas soli	Piezīmes
<p>8. Dzidrajam supernatantam pievienojiet 1,2 x tilpumu istabas temperatūras 95-100% etanola. Viegli samaisiet, 10 reizes apgriežot otrādi.</p>  <p>4. attēls. Pēc etanola pievienošanas DNS nogulsnes, kā rezultātā var veidoties redzams šķiedru rečklis.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sajaucot ar etanolu, DNS nogulsnesies.</li> <li>Atkarībā no DNS daudzuma paraugā nogulsnējusies DNS var parādīties kā DNS šķiedru (4. attēls) rečklis vai kā smalkas nogulsnes.</li> </ul>
<p>9. Ļaujiet paraugam 10 minūtes pastāvēt istabas temperatūrā, lai DNS pilnībā nogulsnētos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inkubācija -20 °C temperatūrā nav ieteicama, jo kopā ar DNS var nogulsnēties piemaisījumi.</li> </ul>
<p>10. Centrifūģējiet istabas temperatūrā 10 minūtes ar vislielāko iespējamo ātrumu. Vismaz 3 500 <math>\times</math> g.</p>	
<p>11. Uzmanīgi ar stikla vai plastmasas pipeti izņemiet supernatantu un izmetiet to. Uzmanieties, lai neizjauktu DNS nogulsnes.</p>  <p>5. attēls. Ar pipetes uzgali viegli skrāpējot stobriņa iekšpusi var konstatēt DNS traipa klātbūtni.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Supernatants var saturēt piemaisījumus, un tas pēc iespējas pilnībā jāizņem.</li> <li>Nogulsnējusies DNS atradīsies kā nogulsnes stobriņa dibenā un, iespējams, kā traips stobriņa sānos (5. attēls).</li> <li>DNS traips var atrasties stobriņa sānos, kas vērsti prom no centrifūģas centra.</li> <li>Traipu var atrast, izmantojot "skrāpējuma" testu. DNS traipa klātbūtni var pārbaudīt, ar pipetes uzgali paskrāpējot stobriņa iekšpusi. Var būt redzams traips, kā parādīts 5. attēlā.</li> </ul>



Izdališanas soli	Piezīmes
<p>12. Skalošana ar etanolu. Uzmanīgi pievienojiet stobriņā 1 ml 70% etanola, neizjaucot uztriepi vai traipu. Ļaujiet tam 1 minūti pastāvēt istabas temperatūrā. <b>Viegli sakratiet un pilnībā izņemiet etanolu, neizjaucot nogulsnes un traipu.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ir svarīgi <b>no parauga izņemt visu etanolu. Etanola pārņemšana var ietekmēt testa rezultātus.</b></li> <li>• Uzmanieties, lai neizjauktu DNS nogulsnes vai traipu.</li> <li>• Lai atvieglotu pilnīgu supernatanta izņemšanu, var veikt īsu centrifugēšanu (mazāk par 1 minūti).</li> <li>• Ja nogulsnes pēc skalošanas ar etanolu šķīdumā, centrifugējiet paraugu 5 minūtes ar vislielāko iespējamo ātrumu. Vismaz 3 500 × g.</li> </ul>
<p>13. Oragene paraugiem rehidrējiet DNS, pievienojot 0,2 ml – 1 ml TE šķīduma, un vorteksējiet paraugu 30 sekundes.</p> <p>ORACollect paraugiem rehidrējiet DNS, pievienojot 0,2 ml TE šķīduma, un vorteksējiet paraugu 30 sekundes.</p>  <p>6. attēls. Parauga vorteksēšana 30 sekunžu laikā ļaus atgūt stobriņa sānos izsmērēto DNS. DNS joprojām būs lielmolekulāra.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ja nepieciešama lielāka DNS koncentrācija, TE tilpumu var samazināt. Jāizmanto vismaz 200 µl TE šķīduma.</li> <li>• Pārmērīga nogulšņu žāvēšana (&gt; 10 minūtes) un mazāk nekā 500 µl TE šķīduma lietošana var apgrūtināt DNS rehidratāciju (izšķīšanu) un var samazināt daudzumu vai apgrūtināt kvantitatīvo noteikšanu.</li> <li>• Nogulsņusies DNS atradīsies kā nogulsnes stobriņa dibenā un, iespējams, kā traips stobriņa sānos.</li> <li>• Lai nodrošinātu maksimālu DNS izdališanu, pēc DNS šķīdinātāja (TE šķīduma) pievienošanas paraugs jāvorteksē. Vorteksēšana nodrošinās stobriņa sānos esošā DNS traipa izdališanu (6. attēls).</li> <li>• Vorteksēšanas rezultātā DNS netiks sagriezts.</li> </ul>
<p>14. Lai nodrošinātu pilnīgu DNS rehidratāciju, pa nakti inkubējiet istabas temperatūrā un pēc tam vorteksējiet vai laiku pa laikam vorteksējiet 1 stundu 50 °C temperatūrā.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nepilnīgas DNS rehidratācijas rezultātā DNS koncentrācijas novērtēšana var būt neprecīza un pakārtoto lietojumu, piemēram, PQR, izpilde var būt neveiksmīga.</li> </ul>

Izdališanas soli	Piezīmes
<p>15. Pārnesiet rehidrēto DNS uz 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņu uzglabāšanai.</p> <p>Neobligāts solis.</p> <p>a) Centrifugējiet rehidrēto DNS istabas temperatūrā 15 minūtes ar ātrumu 15 000 × g.</p> <p>b) Pārnesiet supernatantu svaigā 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņā, neizjaucot nogulsnes.</p>	<p>Ņemiet vērā, ka nogulsnes satur nešķīstošu, duļķainu materiālu.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lai maksimāli palielinātu DNS izdališanu, pirms centrifugēšanas šķīduma veikšanas pārliecinieties, vai DNS ir pilnībā rehidrēta (14. solis).</li> <li>• Šīs centrifugēšanas solis nodrošina visa atlikušā duļķainā materiāla izņemšanu no DNS parauga.</li> <li>• Pārvietojot dzidro supernatantu uz svaigu stobriņu, jāuzmanās, lai neizjauktu nogulsnes.</li> </ul>
<p>16. Pilnībā rehidrētās DNS uzglabāšanas iespējas:</p> <p>a) TE -20 °C temperatūrā ilgstošai uzglabāšanai. Ja nepieciešams, sadaliet alikvotās daļās.</p> <p>b) TE 4 °C temperatūrā līdz 2 mēnešiem.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Izdalītās DNS sasaldēšana TE var izraisīt DNS nogulsnes veidošanos. Atkausējot sasaldētu izdalītu DNS, pievērsiet rūpīgu uzmanību rehidratācijai, kā aprakstīts 14. solī.</li> </ul>

## DNS kvantitatīva noteikšana

### Ar fluorescences metodi

Testi, kuros izmanto fluorescejošās krāsvielas, ir specifiskāki nekā absorbcija pie 260 nm, lai kvantitatīvi noteiktu divpavedienu DNS (dsDNS) daudzumu DNS paraugā. Iesakām izmantot komerciāli pieejamus komplektus, piemēram, Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) vai QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Pirms DNS izmantošanas kvantitatīvās noteikšanas testā to var būt nepieciešams atšķaidīt ar TE līdz 1:50.

### Ar absorbcijas metodi

Ja izvēlaties DNS kvantitatīvi noteikt absorbcijas ceļā, ieteicams izdalīto paraugu vispirms apstrādāt ar RNāzi, lai saskaldītu piesārņojošo RNS, un pēc tam atdalīt RNS fragmentus, izgulsnējot DNS ar etanolu. Detalizēts protokols ir aprakstīts PD-PR-040, *RNS izņemšana ar divpavedienu RNāzes saskaldīšanu*.<sup>1</sup> Lūdzu, ņemiet vērā, ka DNS no parauga, kas ņemts no mutes dobuma, parasti satur ievērojami vairāk RNS nekā asins paraugi. Pirms absorbcijas nolaišanas pārļiecinieties, vai ar spirtu nogulsnētā DNS ir pilnībā izšķīdusi.

**Pārreķina koeficients:** tīras, divpavedienu DNS absorbcija 1,0 pie 260 nm atbilst koncentrācijai 50 ng/μl (50 μg/ml).

Pārļiecinieties, vai absorbcijas vērtības atrodas spektrofotometra lineārajā diapazonā. Atšķaidiet paraugus, kas neietilpst lineārajā diapazonā, un veiciet mērījumu vēlreiz. Plašāku informāciju skatiet iekārtas dokumentācijā.

### Atsauces

- <sup>1</sup> RNS izņemšana ar divpavedienu RNāzes saskaldīšanu. PD-PR-040. DNA Genotek.

### Metode












1. Atšķaidiet izdalītās ar RNāzi apstrādātas DNS 10 μl alikvoto daļu ar 90 μl TE (atšķaidījums 1/10). Samaisiet, viegli pipetējot uz augšu un uz leju. Uzgaidiet, līdz pazūd burbuļi.
2. Izmantojiet TE atsaucēs (tukšajā) šūnā.
3. Veiciet absorbcijas mērījumus pie 320 nm, 280 nm un 260 nm.
4. Aprēķiniet koriģētās  $A_{280}$  un  $A_{260}$  vērtības, no  $A_{280}$  un  $A_{260}$  vērtībām atņemot absorbciju pie 320 nm ( $A_{320}$ ).
5. DNS koncentrācija ng/μl = koriģētā  $A_{260} \times 10$  (atšķaidīšanas koeficients)  $\times 50$  (pārreķina koeficients).
6.  $A_{260}/A_{280}$  attiecība: Daliet koriģēto  $A_{260}$  ar koriģēto  $A_{280}$ .

### Piemērs

1. Pieņemiet, ka izmērītā  $A_{320} = 0,025$ ,  $A_{280} = 0,175$  un  $A_{260} = 0,295$
2. Neatšķaidītā parauga DNS koncentrācija būs:  
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [atšķaidīšanas koeficients]} \times 50 \text{ [pārreķina koeficients]}$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng/}\mu\text{l vai } 135 \text{ }\mu\text{g/ml}$$
3. Koriģētā  $A_{260}/A_{280}$  attiecība būs:  
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$
$$= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$$
$$= 0,270 \div 0,150$$
$$= 1,80$$

Oragene•DNA un ORACollect•DNA nav pieejami pārdošanai Amerikas Savienotajās Valstīs. Oragene•DISCOVER ir paredzēts tikai pētījumiem, nevis diagnostikas procedūrām. Daži DNS Genotek produkti var nebūt pieejami visos ģeogrāfiskajos reģionos. Oragene, prepIT, ORACollect un DNA Genotek ir DNA Genotek Inc. preču zīmes. Visi pārējie šeit ietvertie zīmoli un nosaukumi ir to attiecīgo īpašnieku īpašums. Visi DNA Genotek protokoli, baltās grāmatas un lietošanas piezīmes ir pieejamas mūsu tīmekļa vietnes [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com) klientu atbalsta sadaļā.

### Marķējuma apzīmējumi:

	In vitro diagnostikas medicīnas ierīce
	Kataloga numurs
	CE marķējums
	Ražotājs
	Skat. lietošanas pamācību
	Pilnvarotais pārstāvis Eiropā
	Pilnvarotais pārstāvis Šveicē
	Partijas numurs
	Ierīces unikālais identifikators
	Stabilitāte lietošanas laikā
	Uzglabāšanas norādes

15 °C / 30 °C  
59 °F / 86 °F

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

PD-HB-39 (LV - Latvian) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., uzņēmuma "OraSure Technologies, Inc."  
meitasuzņēmums, visas tiesības aizsargātas.

**DNAGENOTEK™**

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