

**Manwal tal-protokoll  
tal-purifikazzjoni  
manwali għall-użu ma'**

**prepIT™•L2P**

**DNAGENOTEK™**

[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, IL-Kanada K2V 1C2

*Kampjuni superjuri  
Prestazzjoni pprovata*



Il-protokoll tal-prepIT™-L2P huwa disponibbli f'lingwi addizzjonali fuq [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)

### L-appoġġ tekniku huwa disponibbli mit-Tnejn sal-Ġimgħa (9.00 sa 17.00 ET):

- Bla hlas (l-Amerika ta' Fuq): 1.866.813.6354, għażla 6
- Il-pajjiżi l-oħra kollha: +1.613.723.5757, għażla 6
- Email: [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)

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

Persuna Responsabbli fir-Renju Unit: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

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

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

Sponsor Awstraljan: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000 L-Awstralja

## Werrej

Użu/skop maħsub .....	4
Stabbiltà waqt l-użu .....	4
Karatteristiċi .....	4
Materjali .....	4
Twissijiet u prekawzjonijiet .....	4
Limitazzjonijiet għall-użu tal-prodott .....	5
Trasport ta' prepIT•L2P .....	5
Hażna ta' prepIT•L2P (Żmien kemm idum tajjeb) .....	5
Rimi .....	5
Manutenzjoni/twissijiet .....	5
Sommarju tal-karatteristiċi tal-prestazzjoni .....	5
Prezentazzjonijiet tal-prodotti .....	5
Garanziji .....	6
Troubleshooting .....	6
<b>prepIT-protokoll tal-laboratorju L2P għall-purifikazzjoni manwali ta' DNA minn:</b>	
500 µL ta' kampjun .....	7
Kampjun shiħ .....	11
Kwantifikazzjoni tad-DNA .....	18

## Użu/skop maħsub

Għall-purifikazzjoni tad-DNA ġenomika mill-kits tal-ġbir tal-bżieq Oragene™ u ORAcollect™.

## Stabbiltà waqt l-użu

PT-L2P-5 (5 mL) u PT-L2P-45 (45 mL) għandhom 30 xahar ta' stabbiltà waqt l-użu f'temperatura tal-kamra.

## Karatteristiċi

- Kimika ottimizzata għall-irkupru massimu ta' DNA minn kampjuni orali miġbura mal-linji ta' prodotti Oragene u ORAcollect.
- Ipprova li jipprovi riżultati konsistenti b'DNA ta' piż molekulari għoli.
- Metodu ta' purifikazzjoni skalabbli għal volumi ta' kampjuni kbar jew żgħar.
- Fluss tax-xogħol konvenjenti b'appoġġ tekniku shih mill-ġbir sal-estrazzjoni.
- Metodu kosteffettiv li jtehtieg tagħmir minimu.

## Materjali

- PT-L2P-5 (5 mL) u/jew PT-L2P-45 (45 mL)
- Manwal tal-prodott prepIT•L2P

## Twissijiet u prekawzjonijiet

- Għall-użu fil-laboratorju biss.
- TIBLAX reagent likwidu.
- TUŻAX jekk l-imbagg ikun bil-hsara jew is-sigill fl-għatu/tapp tal-lembut ikun miksur jew qed inixxi.
- TUŻAX prepIT•L2P wara d-"data tal-użu" indikata fuq il-flixkun tar-reagent.
- Aħsel bil-ilma jekk ir-reagent jiġi f'kontatt mal-ġajnejn jew mal-ġilda. TIBLAX.
- Irrapporta kull incident serju lil DNA Genotek u lill-awtorità kompetenti f'pajjiżek.
- Irreferi għall-Iskeda tad-Data tas-Sigurtà tal-Materjal (MSDS) għar-rimi sikur tar-reagent mhux użat.
- L-MSDS huwa disponibbli fuq [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

## Limitazzjonijiet għall-użu tal-prodott

Uża prepIT•L2P biss kif indikat f'dan il-manwal tal-prodott.

## Trasport ta' prepIT•L2P

prepIT•L2P jista' jiġi ttrasportat f'temperatura ambjentali bħala reagent tal-laboratorju. L-ebda mmanigġjar speċjali mhux meħtieġ.

## Hażna ta' prepIT•L2P (Żmien kemm idum tajjeb)

Aħżen f'temperatura tal-kamra. Iz-żmien kemm idum tajjeb għal PT-L2P-5 (5mL) u PT-L2P-45 (45 mL) għandu jkun ta' 30 xahar meta jinżamm bit-tapp f'postu sew u jinħażen f'temperatura ambjentali.

## Rimi

Armi kits mhux użati, bil-hsara jew li jnixxu skont ir-regolamenti lokali, statali u federali xierqa. Armi bħala skart tal-laboratorju.

## Manutenzjoni/tiswija

Mhux applikabbli. prepIT•L2P huwa reagent — l-ebda manutenzjoni jew tiswija meħtieġa.

## Sommarju tal-karatteristiċi tal-prestazzjoni

prepIT•L2P DNA ġenomika purifikata minn kits tal-ġbir tal-bżieq Oragene u ORAcollect tipprovi DNA ta' kwalità għolja u kwantità suffiċjenti għall-użu f'applikazzjonijiet downstream, bħal PCR, microarray u sekwenzar tal-ġenerazzjoni li jmiss.

## Preżentazzjonijiet tal-prodotti

prepIT•L2P huwa disponibbli f'diversi volumi, skont in-numru ta' preparazzjonijiet meħtieġa. Pereżempju:

Referenza tal-prodott/ Numru tal-katalogu	Volum tal-preparazzjoni tal-kampjun	Numru ta' preparazzjonijiet
PT-L2P-5	0.5 mL	200
PT-L2P-45	0.5 mL	2,000

## Garanziji

It-termini u kundizzjonijiet shaħ għall-prodotti kollha tad-DNA Genotek jinsabu fuq <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

## Troubleshooting

Ikkuntattja l-appoġġ tekniku tad-DNA Genotek fuq [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com) jew ċempel fuq +1 (613) 723-5757, għażla 6.

# II-protokoll tal-laboratorju prepIT™•L2P għall-purifikazzjoni manwali tad-DNA minn 500 µL ta' kampjun

Il-protokoll pass pass li ġej jiddeskrivi kif tippurifika d-DNA minn alikwott ta' 500 µL ta' kampjun.

## Reaġenti inkluzi

prepIT•L2P (Nru tal-Kat. PT-L2P-5 jew PT-L2P-45)

## Tagħmir u reaġenti

- Mikrocentrifugu li kapaċi jahdem b'15,000 × g
- Mikrotubi ta' 1.5 mL (eż., Axygen® Nru tal-Kat. MCT-150-C)
- Inkubatur tal-arja jew tal-ilma f'50°C
- Etanol (95% sa 100%) f'temperatura tal-kamra
- Etanol (70%) f'temperatura tal-kamra
- Buffer tal-ħażna tad-DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) jew soluzzjoni simili

## Proċedura

Passi tal-purifikazzjoni	Noti
1. Hallat il-kampjun ta' Oragene/ ORAcollect b'inverżjoni jew billi thawwad bil-mod għal ftit sekondi.	• Dan biex jiġi żgurat li l-kampjuni viskużi jithalltu sew.

Passi tal-purifikazzjoni	Noti
2. Inkuba l-kampjun f'50°C f'inkubatur tal-ilma għal minimu ta' siegħa jew f'inkubatur tal-arja għal minimu ta' sagħtejn.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dan il-pass tat-trattament bi-shana huwa essenzjali biex jiġi żgurati li d-DNA jiġi rilaxxat b'mod adegwat u li n-nukleazji jiġu inattivati b'mod permanenti.</li> <li>Dan il-pass ta' inkubazzjoni jista' jsir fi kwalunkwe hin wara li jingabar il-kampjun u qabel ma jiġi ppurifikat.</li> <li>Il-kampjun kollu għandu jiġi inkubat fit-tubu tal-gbir oriġinali qabel l-alikwota biex tiġi żgurata l-omogeneità tal-kampjun.</li> <li>Il-kampjun jista' jiġi inkubat f'50°C matul il-lejl jekk ikun aktar konvenjenti.</li> <li>Huwa meħtieġ żmien itwal f'inkubatur tal-arja minhabba li l-ekwilibrizzjoni tat-temperatura hija aktar bil-mod milli f'inkubatur tal-ilma.</li> </ul> <p><b>Nota:</b> L-użu ta' inkubatur tal-arja jista' jkun preferibbli peress li t-tubi ta' Oragene/ORAc collect jistgħu jzommu fil-wiċċ f'banjumarja. Jekk irid jintuza banjumarja, kun żgur li l-porzjon tat-tubu li fih il-kampjun jibqa' mgħaddas fl-ilma.</p>
3. Ittrasferixxi 500 µL tal-kampjun imħallat lejn tubu tal-mikrocentrifugu ta' 1.5 mL.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Il-bqija tal-kampjun jista' jinħażen f'temperatura tal-kamra (15°C sa 25°C) jew iffrizati.</li> <li>Jekk mixtieq, il-kampjun jista' jinħażen iffrizati fit-tubu Oragene/ORAc collect f'-20 °C jew il-kampjun jista' jiġi ttrasferit għal krijokunjett għall-ħażna fit-tul f'-80 °C.</li> </ul>
4. Żid 20 µL (1/25 tal-volum) ta' prepIT•L2P mat-tubu tal-mikrocentrifugu u hawwad b'vortex għal ftit sekondi.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Il-kampjun isir imdardar hekk kif l-impuritatiet u l-inibituri jiġu precipitati.</li> </ul>
5. Inkuba fuq is-silġ għal 10 minuti.	<ul style="list-style-type: none"> <li>L-inkubazzjoni tat-temperatura tal-kamra tista' tiġi sostitwita iżda tkun kemxejn inqas effettiva fit-tneħħija tal-impuritatiet.</li> </ul>

Passi tal-purifikazzjoni	Noti
6. Iċċentrifuga f'temperatura tal-kamra għal 5 minuti fi 15,000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Perjodu itwal ta' ċentrifugazzjoni (sa 15-il minuta) jista' jkun ta' benefiċċju fit-tnaqqis tat-turbidità (A<sub>320</sub>għoli) tas-soluzzjoni finali tad-DNA.</li> </ul>
7. Ittrasferixxi bir-reqqa s-supernatant ċar b'ponta tal-pipetta go tubu tal-mikrocentrifugu ġdid. <b>Armi l-pellet li jkun fih l-impuritatiet.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Il-pellet fih impuritatiet imdardra. Jekk aċċidentalment jiġi disturbat, it-tubu għandu jerga' jiġi ċentrifugat.</li> </ul>
8. Żid 600 µL ta' 95% sa 100% etanol f'temperatura tal-kamra. Hallat bil-mod b'inverzjoni 10 darbiet.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Waqt it-taħlit mal-etanol, id-DNA jiġi precipitat. Dan jista' jidher b'ħala embolu ta' fibri tad-DNA jew b'ħala precipitat fin, skont l-ammont ta' DNA fil-kampjun.</li> <li>Anke jekk ma jidher l-ebda embolu, id-DNA jiġi rkuprat billi ssegwi bir-reqqa l-passi li jmiss.</li> </ul>
9. Halli l-kampjun joqgħod f'temperatura tal-kamra għal 10 minuti biex tippermetti lid-DNA jipprecipita għalkollox.	<ul style="list-style-type: none"> <li>L-inkubazzjoni f'-20°C mhix rakkomandata minhabba li l-impuritatiet jistgħu jikkoprecipitaw mad-DNA.</li> </ul>
10. Poġġi t-tubu fil-mikrocentrifugu f'orientazzjoni magħrufa. Iċċentrifuga f'temperatura tal-kamra għal 2 minuti fi 15,000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Perezempju, poġġi kull tubu fil-mikrocentrifugu, bil-porzjon taċ-ċappetta tal-għatu tipponta 'l bogħod miċ-ċentru tar-rotor. Wara ċ-ċentrifugazzjoni, il-pożizzjoni tal-pellet tista' tinstab (anke jekk tkun ċkejna wisq biex tkun viżibbli); se jkun fil-ponta tat-tubu taħt iċ-ċappetta.</li> </ul>
11. Nehħi b'attenzjoni s-supernatant b'tarf ta' pipetta u armih. Oqgħod attent li tevita li diddisturba l-pellet tad-DNA.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dan il-pellet fih id-DNA. It-telf tal-pellet jirriżulta f'telf tad-DNA.</li> <li>Billi ddawwar it-tubu b'tali mod li l-pellet ikun fuq il-ħajt ta' fuq, tkun tista' tmexxi b'mod sikur punta tal-pipetta tul il-ħajt t'isfel u tneħħi s-supernatant kollu.</li> <li>Is-supernatant jista' jkun fih impuritatiet u għandu jitneħħa kemm jista' jkun.</li> </ul>

Passi tal-purifikazzjoni	Noti
12. Aħsel bl-etanol: Żid bir-reqqa 250 µL ta' 70% etanol. Hallih joqgħod f'temperatura tal-kamra għal minuta. <b>Nehħi kompletament l-etanol mingħajr ma tfikkel il-pellet.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Huwa importanti li jitneħħa l-etanol kollu mill-kampjun. It-trasferiment tal-etanol jista' jkollu impatt fuq il-prestazzjoni tal-assaġġ.</li> <li>• Wara li tneħħi s-70% etanol, it-tubu jista' jiġi mibrum mill-polz biex jippermetti t-tneħħija ta' etanol residwu.</li> <li>• Oqgħod attent li ma tiddisturbax il-pellet tad-DNA; jista' jkun żgħir jew invizibbli.</li> <li>• Jekk il-pellet jinqala', iċċentrifuga l-kampjun għal 5 minuti f'15,000 × g.</li> <li>• Tnixxif eċċessiv tal-pellet jista' jagħmel id-DNA aktar diffiċli biex tinħall.</li> </ul>
13. Żid 100 µL ta' soluzzjoni TE (ara paġna 5) biex tholl il-pellet tad-DNA. Wettaq vortex għal mill-inqas 5 sekondi.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jekk tkun mixtieqa konċentrazzjoni oġhla ta' DNA, għandhom jintuzaw 50 µL ta' TE.</li> </ul>
14. Biex tiżgura r-riidratazzjoni sħiħa tad-DNA, inkuba f'temperatura tal-kamra matul il-lejl segwit minn vortexing jew f'50°C għal siegħa b'vortex okkażjonali.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ammonti kbar ta' DNA ta' piż molekulari għoli jistgħu jdumu biex jerġgħu jiġu idratati (jinħallu) kompletament.</li> <li>• Ir-riidratazzjoni inkompleta tad-DNA hija kawża ta' ineżattezza fl-istima tal-konċentrazzjoni tad-DNA u falliment potenzjali ta' applikazzjonijiet downstream bħal PCR.</li> </ul>
15. Għażliet għall-ħażna tad-DNA kompletament reidratat: a) F' TE f' -20°C għal ħażna fit-tul. Aqşam f'alikwoti jekk mixtieq. b) F' TE f' 4°C sa xahrejn.	

## Il-protokoll tal-laboratorju prepIT•L2P għall-purifikazzjoni manwali tad-DNA minn kampjun sħiħ

**Nota:** Dan il-protokoll jehtieġ l-użu ta' ċentrifuga (jew rotor b'angolu fiss jew b'armil li jixxengel) li kapaci jiġġenera mill-inqas 3,500 × g biex jinkisbu riżultati ottimali.

Il-protokoll pass pass li ġej jiddeskrivi kif tippurifika d-DNA mill-kampjun kollu (volum totali tal-kampjun 1 mL-4 mL). Il-volumi murija għandhom jiġu aġġustati għall-volum attwali miġbur.

### Reaġenti inkluzi

prepIT•L2P (Nru tal-Kat. PT-L2P-5 jew PT-L2P-45)

### Tagħmir u reaġenti

- Ċentrifugu li jakkomoda tubi ta' 15 mL u kapaci jiġġenera mill-inqas 3,500 × g (ara Tabella 2)
- Tubi tal-polypropylene konikali ta' 15 mL (eż., BD Falcon® Nru tal-Kat. 352196)
- Mikroċentrifugu li kapaci jaħdem b'15,000 × g (mhux obligatorju)
- Mikrotubi ta' 1.5 mL (eż., Axygen® Nru tal-Kat. MCT-150-C)
- Inkubatur tal-arja jew tal-ilma f'50°C
- Etanol (95% sa 100%) f'temperatura tal-kamra
- Etanol (70%) f'temperatura tal-kamra
- Buffer tal-ħażna tad-DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) jew soluzzjoni simili

**Fakultattiv: Kontroll ta' qabel il-purifikazzjoni (applikabbli biss għal kampjuni Oragene; mhux meħtieġ għal kampjuni ORAcollect)**

Iżen il-kampjun biex jiġi smat l-ammont ta' b'żieq ipprovdut mid-donatur (ara Tabella 1). L-ammont ta' b'żieq miġbur huwa direttament proporzjonali għall-ammont ta' DNA rkuprat. Bħala eżempju, jekk donatur ipprova inqas minn 2 mL ta' b'żieq, għandek tistenna li tirkupra rendiment totali aktar baxx minn dan kampjun.

**Piż tal-kit (mingħajr kampjun)**

Ladarba kampjun jasal fil-laboratorju, nissuggerixxu li tiżen il-kampjun biex tistma jekk kienx ipprovdut l-ammont korrett ta' b'żieq mid-donatur. Tista' tistenna xi varjabbiltà bejn id-donaturi. Il-piż medju ta' kit vojta huwa pprovdut (Tabella 1). Biex tistma l-ammont ta' kampjun miġbur (jekk wiehed jassumi 1 g/mL), wettaq il-kalkolu li ġej:

$$Piż\ tal\ kit\ li\ fih\ il\ kampjun - Piż\ tal\ kit\ mingħajr\ kampjun$$

$$Ammont\ ta'\ kampjun\ miġbur$$

**Tabella 1**


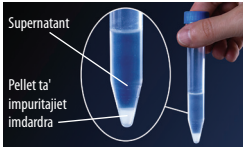
# tal-Prodott	Piż tal-kit mingħajr kampjun
OG-500/OGD-500/OGR-500	6.81 g
OG-510/OGD-510	5.83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5.66 g
ON-500	6.47 g
ON-600	6.86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7.26 g
OG-610/OGD-610	6.28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6.00 g

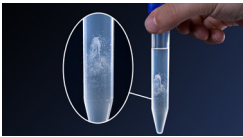
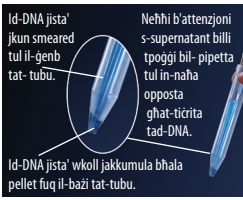
**Proċedura**

Passi tal-purifikazzjoni	Noti
1. Hallat il-kampjun ta' Oragene/ ORAcollect b'inverżjoni jew billi tħawwad bil-mod għal f'rit sekondi.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dan biex jiġi żgurat li l-kampjuni viskużi jithalltu sew.</li> </ul>
2. Inkuba l-kampjun f'50°C f'inkubatur tal-ilma għal minimu ta' siegħa jew f'inkubatur tal-arja għal minimu ta' sagħtejn.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dan il-pass tat-treatment bis-shana huwa essenzjali biex jiġi massimizzat ir-rendiment tad-DNA u jiġi żgurat li n-nukleazji jiġu inattivati b'mod permanenti.</li> <li>Il-kampjun jista' jiġi inkubat f'50°C matul il-lejl jekk ikun aktar konvenjenti.</li> <li>Dan il-pass ta' inkubazzjoni jista' jsir fi kwalunkwe hin wara li l-kampjun ikun miġbur u qabel ma jiġi ppurifikat id-DNA.</li> <li>Huwa meħtieġ żmien itwal f'inkubatur tal-arja minhabba li l-ekwilibrizzjoni tat-temperatura hija aktar bil-mod milli f'inkubatur tal-ilma.</li> </ul> <p><b>Nota:</b> L-użu ta' inkubatur tal-arja jista' jkun preferibbli peress li t-tubi tal-Oragene/ORACollect jistgħu jżommu fil-wiċċ f'banjumarija. Jekk irid jintuża banjumarija, kun żgur li l-porzjon tat-tubu li fih il-kampjun jibqa' mgħaddas fl-ilma.</p>
3. Ittrasferixxi l-kampjun kollu għal tubu taċ-ċentrifugu ta' 15 mL (Figura 1). Innota l-volum tal-kampjun.	<ul style="list-style-type: none"> <li>It-trasferiment jista' jsir jew bit-tferriġ jew bil-pipetta tal-ħgieġ jew tal-plastik.</li> </ul>



*Figura 1: Qabel ma tipproċedi għall-pass 4, kun żgur li l-kampjun kollu gie inkubat u trasferit għal tubu taċ-ċentrifugu frisk ta' 15 mL, kif muri.*

Passi tal-purifikazzjoni	Noti
<p>4. Żid 1/25 volum ta' prepIT-L2P u hllat billi thawwad għal ftit sekondi (Figura 2).</p>  <p><i>Figura 2: Wara li żżid il-PT-L2P u tinkuba fuq is-silġ għal 10 minuti, il-kampjun ma jibqax jidher ċar, iżda pjuttost se jkun soluzzjoni m'cajpra.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eż, għal kampjun ta' 4 mL, žid 160 µL ta' prepIT-L2P.</li> <li>Il-kampjun isir imdardar hekk kif l-impuritàjiet u l-inibituri jiġu precipitati.</li> </ul>
<p>5. Inkuba fuq is-silġ għal 10 minuti.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>L-inkubazzjoni tat-temperatura tal-kamra tista' tiġi sostitwita iżda tkun inqas effettiva fit-tnehhija tal-impuritàjiet.</li> </ul>
<p>6. Iċċentrifuga f'temperatura ambjentali għal 10 minuti b'veloċità għolja kemm jista' b'volum 3,500 x g.</p>  <p><i>Figura 3: Wara ċ-ċentrifugazzjoni, se jkun hemm akkumulazzjoni ta' materjal imdardar fil-baži tat-tubu. Is-supernatant għandu jkun ċar b'mod viżibbli.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Forza ċentrifugali ogħla timminimizza l-ammont ta' materjal imdardar li se jingarr fid-DNA purifikat (Figura 3). Qabel ma tipproċedi, għandek tivverifika mal-manifattur tat-tubu li t-tubi ċentrifugi ta' 15 mL jistgħu jifilhu l-forza ċentrifugali.</li> <li>Perjodu itwal ta' ċentrifugazzjoni (sa 20-il minuta) jista' jkun ta' benefiċċju fit-tnaqqis tat-turbidità (A<sub>320</sub>għoli) tas-soluzzjoni finali tad-DNA.</li> </ul>
<p>7. Itrasferixxi bir-reqqa s-supernatant ċar b'pipetta ġo tubu tal-mikroċentrifugu ġdid ta' 15 mL. <b>Armi l-pellet.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Halli volum żgħir tas-supernatant lura biex tevita li tfixxkel il-pellet.</li> <li>Il-pellet fih impuritàjiet imdardra. Jekk aċċidentalment disturbat, it-tubu għandu jerġa' jiġi ċentrifugat.</li> </ul>

Passi tal-purifikazzjoni	Noti
<p>8. Żid 1.2x volum tat-temperatura tal-kamra 95% sa 100% etanol mas-supernatant ċar. Hallat bil-mod b' inverżjoni 10 darbiet.</p>  <p><i>Figura 4: Wara ż-żieda ta' etanol, id-DNA se jiprecipita, li 'jista' jirriżulta f'embolu viżibbli ta' fibri.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Waqit it-tahlit mal-etanol, id-DNA se jiġi precipitat.</li> <li>DNA precipitat jista' jidher bħala embolu ta' fibri tad-DNA (Figura 4) jew bħala precipitat fin, skont l-ammont ta' DNA fil-kampjun.</li> </ul>
<p>9. Halli l-kampjun joqgħod f'temperatura tal-kamra għal 10 minuti biex thalli d-DNA jiprecipita għalkollox.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>L-inkubazzjoni f'-20°C mhix rakkomandata minhabba li l-impuritàjiet jistgħu jikkoprecipitaw mad-DNA.</li> </ul>
<p>10. Iċċentrifuga f'temperatura tal-kamra għal 10 minuti b'veloċità għolja kemm jista' jkun. Minimu 3,500 x g.</p>	
<p>11. Nehħi b'attenzjoni s-supernatant b'pipetta tal-ħġieġ jew tal-plastik u armih. Oqgħod attent li tevita li tfixxkel il-pellet tad-DNA.</p>  <p><i>Figura 5: Bl-użu ta' punta tal-pipetta li tobrox bil-mod tul ġewwa tat-tubu tista' tiżvela l-preżenza ta' smear tad-DNA.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Is-supernatant jista' jkun fih impuritàjiet u għandu jitneħħa kemm jista' jkun kompletament.</li> <li>DNA precipitat se jinstab bħala pellet fil-qiegħ tat-tubu u possibbilment bħala smear 'l isfel mill-ġenb tat-tubu (Figura 5).</li> <li>Id-DNA smear tista' tkun fuq in-naħa tat-tubu li thares 'il bogħod miċ-ċentru taċ-ċentrifuga.</li> <li>Smear jista' jinstab bl-użu tad-test "tal-brix". Tista' tiċċekkja għall-preżenza ta' smear tad-DNA billi tobrox in-naħa ta' ġewwa tat-tubu b'ponta ta' pipetta. Smear, kif muri fil-Figura 5, jista' jkun viżibbli.</li> </ul>



Passi tal-purifikazzjoni	Noti
<p>12. Aħsel bl-etanol:            Żid bir-reqqa 1 mL ta' 70% etanol mat-tubu mingħajr ma tfixkel l-ismear jew il-pellet. Hallih joqgħod f' temperatura tal-kamra għal minuta. <b>Dawwar bil-mod u nehhi kompletament l-etanol mingħajr ma tfixkel il-pellet u l-ismear.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Huwa importanti li jitneħħa l-etanol kollu mill-kampjun. It-trasferiment tal-etanol jista' jkollu impatt fuq il-prestazzjoni tal-assaġġ.</b></li> <li>• Oqgħod attent li tevita li tiddisturba l-pellet tad-DNA jew l-ismear.</li> <li>• Tista' ssir ċentrifugazzjoni qasira (inqas minn 1 minuta) biex tiffaċilita t-tneħħija sħiha tas-supernatant.</li> <li>• Jekk il-pellet jinqala' wara l-pass tal-ħasi bil-etanol, iċċentrifuga l-kampjun għal 5 minuti b'veloċità għolja kemm jista' jkun. Minimu 3,500 × g.</li> </ul>
<p>13. Għal kampjuni ta' Oragene, idrata mill-ġdid id-DNA billi żżid 0.2 mL-1 mL ta' soluzzjoni TE u twettag vortex tal-kampjun għal 30 sekonda.</p> <p>Għal kampjuni ORAcollect, iddrata mill-ġdid id-DNA billi żżid 0.2 mL ta' soluzzjoni TE u hawwad il-kampjun għal 30 sekonda.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jekk tkun mixtieqa koncentrazzjoni oghla ta' DNA, il-volum ta' TE jista' jittnaqqas. Għandu jintuża minimu ta' 200 µL soluzzjoni TE.</li> <li>• Tnixxi eċċessiv tal-pellet (&gt; 10 minuti) u l-użu ta' inqas minn 500 µL ta' soluzzjoni TE jista' jagħmilha diffiċli biex id-DNA jerga' jiġi idratat (imdewweb) u jista' jnaqqas ir-rendiment jew jagħmel il-kwantifikazzjoni diffiċli.</li> <li>• DNA preċipitat se jinstab bħala pellet fil-qiegħ tat-tubu u possibbilment bħala smear 'l isfel mill-ġenb tat-tubu.</li> <li>• Biex jiġi żgurat l-irkupru massimu tad-DNA, il-kampjun għandu jiġi vortexed wara ż-żieda tas-solvent tad-DNA (soluzzjoni TE). Vortexing se jiżgura li d-DNA smeared fuq in-naħa tat-tubu jiġi rkuprat (Figura 6).</li> <li>• Vortexing mhux se tgaħqaq id-DNA.</li> </ul>
<p>14. Biex tiżgura r-riidratazzjoni sħiha tad-DNA, inkuba f' temperatura tal-kamra matul il-lejl segwit minn vortexing jew f' 50°C għal siegħa b'vortexing okkażjonali.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ir-riidratazzjoni inkompleta tad-DNA hija kawża ta' inezattezza fl-istima tal-koncentrazzjoni tad-DNA u falliment potenzjali ta' applikazzjonijiet downstream bħal PCR.</li> </ul>



**Figura 6:** Il-vortexing tal-kampjun għal 30 sekonda jippermettitek tirkupra DNA m'assapsa fuq in-naħa tat-tubu. Id-DNA se jibqa' ta' piz molekulari għoli.

Passi tal-purifikazzjoni	Noti
<p>15. Ittrasferixxi d-DNA idratat mill-ġdid għal tubu tal-mikrocentrifugu ta' 1.5 mL għall-ħażna.</p>	
<p>Pass mhux obligatorju:</p> <p>a) Iċċentrifuga d-DNA idratat mill-ġdid f' temperatura tal-kamra għal 15-il minuta f' 15,000 × g.</p> <p>b) Ittrasferixxi s-supernatant għal tubu tal-mikrocentrifugu ġdid ta' 1.5 mL mingħajr ma tiddisturba l-pellet.</p>	<p>Innota li l-pellet fih materjal li ma jinħallx u mdardar.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biex timmassimizza l-irkupru tad-DNA, kun żgur li d-DNA jiġi kompletament reidratat (pass 14) qabel ma ttwettaq dan il-pass taċ-ċentrifugazzjoni.</li> <li>• Dan il-pass taċ-ċentrifugazzjoni jiżgura li kwalunkwe materjal imdardra li jkun fadal jitneħħa mill-kampjun tad-DNA.</li> <li>• Għandha tingħata attenzjoni biex ma tiġix iddisturbata l-pellet meta tittrasferixxi s-supernatant ċar għal tubu ġdid.</li> </ul>
<p>16. Għażliet għall-ħażna tad-DNA kompletament riidratat:</p> <p>a) FTE f' -20°C għal ħażna fit-tul. Aqsam f' alikwoti jekk mixtieq.</p> <p>b) F' TE f' 4°C sa xahrejn.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L-iffriżar tad-DNA purifikat f' TE jista' jikkawża li d-DNA jippreċipita. Meta tħoll DNA purifikat iffriżat, agħti attenzjoni bir-reqqa għar-riidratazzjoni, kif diskus fil-pass 14.</li> </ul>

## Kwantifikazzjoni tad-DNA

### Permezz tal-metodu tal-fluorexxenza

Assays li jużaw żebgha fluorexxenti huma aktar speċifiċi mill-assorbiment f'260 nm għall-kwantifikazzjoni tal-ammont ta' double-stranded DNA (dsDNA) f' kampjun tad-DNA. Nissuġġerixxu l-użu ta' kits disponibbli kummerċjalment bħall- Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) jew QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Jista' jkun hemm bżonn li d-DNA jiġi dilwit sa 1:50 b'TE qabel ma jintuża fl-assaġġ ta' kwantifikazzjoni.

### Permezz tal-metodu ta' assorbiment

Jekk tagħzel li tikkwantifika d-DNA bl-assorbiment, nirrakkomandaw li l-ewwel tittratta l-kampjun purifikat b'RNase biex tiddegerixxi l-RNA li jikkontamina u mbagħad tneħhi l-frammenti tal-RNA permezz tal-precipitazzjoni tal-etanol tad-DNA. Protokoll dettaljat huwa deskritt f'PD-PR-040, *tneħhija ta' RNA permezz ta' diġestjoni*.<sup>1</sup> ta' double-RNase Jekk jogħġbok innota li d-DNA minn kampjun orali tipikament fih notevolment aktar RNA milli misjub fil-kampjuni tad-dem. Kun żgur li d-DNA precipitat bl-alkohol jinhall għal kollox qabel ma taqra l-assorbiment.

**Fattur ta' konverżjoni:** Assorbanza ta' 1.0 f'260 nm tikkorrispondi għal konċentrazzjoni ta' 50 ng/μL (50 μg/mL) għal DNA pur, b'filament doppju.

Żgura li l-valuri tal-assorbanza jkunu fil-medda lineari tal-ispetrofotometru. Iddilwa u erġa' kejjel kampjuni li jaqgħu barra mill-medda lineari. Ara d-dokumentazzjoni tal-istrument tiegħek għal aktar informazzjoni.

### Referenzi

- <sup>1</sup> Tneħhija ta' RNA permezz ta' diġestjoni ta' double-RNase. PD-PR-040. DNA Genotek.

### Metodu













- Iddilwa alikwott ta' 10 μL ta' DNA purifikat trattat b'RNase b'90 μL ta' TE (dilwizzjoni 1/10). Hallat bil-pipetta 'l fuq u' l isfel. Stenna li l-bzieżaq jiċċaraw.
- Uża TE fiċ-ċellula ta' referenza (vojta).
- Kejjel l-assorbiment fi 320 nm, 280 nm u 260 nm.
- Ikkalkula l-valuri  $A_{280}$  u  $A_{260}$  korretti billi tnaqqas l-assorbenza fi 320 nm ( $A_{320}$ ) mill-valuri  $A_{280}$  u  $A_{260}$ .
- Konċentrazzjoni tad-DNA f'ng/μL = ikkoreġut  $A_{260} \times 10$  (fattur ta' dilwizzjoni)  $\times 50$  (fattur ta' konverżjoni).
- Proporzjon  $A_{260}/A_{280}$ : Aqsam  $A_{260}$  korrett b' $A_{280}$  korrett.

### Eżempju

- Assumi l- $A_{320}$  mkejjla = 0.025,  $A_{280}$  = 0.175 u  $A_{260}$  = 0.295
- Il-konċentrazzjoni tad-DNA tal-kampjun mhux dilwit se tkun:  
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$  [fattur ta' dilwizzjoni]  $\times 50$  [fattur ta' konverżjoni]  
=  $(0.295 - 0.025) \times 10 \times 50$   
=  $0.270 \times 10 \times 50$   
= 135 ng/μL jew 135 μg/mL
- Il-proporzjon  $A_{260}/A_{280}$  ikkoreġut se jkun:  
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$   
=  $(0.295 - 0.025) \div (0.175 - 0.025)$   
=  $0.270 \div 0.150$   
= 1.80

Oragene•DNA u ORAcollect•DNA mhumiex disponibbli għall-bejgħ fl-Istati Uniti. Oragene• DISCOVER huwa għall-użu tar-riċerka biss, mhux għall-użu fi proċeduri dijanjostiċi. Xi prodotti DNA Genotek jistgħu ma jkunux disponibbli fir-reġjuni ġeografiċi kollha. Oragene, prepIT, ORAcollect u DNA Genotek huma trademarks ta' DNA Genotek Inc. Il-marki u l-ismijiet l-oħra kollha li jinsabu hawnhekk huma proprjetà tas-sidien rispettivi tagħhom. Il-protokoll, white papers u noti tal-applikazzjonijiet kollha ta' DNA Genotek huma disponibbli fit-taqsim tal-appoġġ tas-sit web tagħna fuq [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

### Didaskalja tat-tikketta:

	Apparat mediku dijanjostiku in vitro
	Numru tal-katalgu
	Marka CE
	Manifattur
	Ikkonsulta l-fuljett ta' tagħrif
	Rappreżentant Awtorizzat Ewropew
	Rappreżentant Awtorizzat Żvizzeru
	Numru tal-lott
	Identifikatur Uniku tal-Apparat
	Stabbiltà waqt l-użu
	15°C / 30°C
	59°F / 86°F
	Istruzzjonijiet tal-ħżin

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

PD-HB-41 (MT - Maltese) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., sussidjarja ta' OraSure Technologies, Inc., id-drittijiet kollha riżervati.

**DNAGENOTEK™**

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