

**Guia do protocolo
de purificação manual
para utilização com**

prepIT™•L2P

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com

Tel.: +1.613.723.5757
support@dnagenotek.com
sales@dnagenotek.com

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

*Amostras superiores
Desempenho comprovado*



Índice

Utilização prevista/finalidade	4
Estabilidade durante a utilização	4
Características	4
Materiais	4
Avisos e precauções	4
Limitações de utilização do produto	5
Transporte do prepIT•L2P	5
Armazenamento do prepIT•L2P (vida útil)	5
Eliminação	5
Manutenção/reparação	5
Resumo das características de desempenho	5
Apresentações do produto	5
Garantias	6
Resolução de problemas	6
prepIT•L2P laboratory protocol para purificação manual do ADN de:	
500 µL de amostra	7
Amostra completa	11
Quantificação do ADN	18

O prepIT™•L2P protocol está disponível noutros idiomas em www.dnagenotek.com


Assistência técnica disponível de segunda a sexta-feira (das 09:00 às 17:00 ET):

- Linha gratuita (América do Norte): 1.866.813.6354, opção 6
- Todos os outros países: +1.613.723.5757, opção 6
- E-mail: support@dnagenotek.com

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

Responsável no Reino Unido: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL International,
Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

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

 Arazy Group Swiss GmbH
Bruderholzallee 53, 4059 Basileia, Suíça
E-mail: swiss.ara@arazygroup.com

Promotor na Austrália: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street,
Sydney, NSW 2000 Austrália

Utilização prevista/finalidade

Para a purificação de ADN genómico dos kits Oragene™ Saliva Collection Kit e ORAcollect™ Saliva Collection Kit.

Estabilidade durante a utilização

A estabilidade durante a utilização de PT-L2P-5 (5 ml) e PT-L2P-45 (45 ml) é de 30 meses à temperatura ambiente.

Características

- Química otimizada para a recuperação máxima de ADN proveniente de amostras orais colhidas com as linhas de produtos Oragene e ORAcollect.
- Resultados comprovadamente consistentes com ADN de elevado peso molecular.
- Método de purificação escalável para volumes de amostra grandes ou pequenos.
- Fluxo de trabalho prático com apoio técnico completo desde a recolha até à extração.
- Método rentável que requer equipamento mínimo.

Materiais

- PT-L2P-5 (5 ml) e/ou PT-L2P-45 (45 ml)
- Guia do produto prepIT•L2P

Avisos e precauções

- Apenas para utilização em laboratório.
- NÃO ingerir o reagente líquido.
- NÃO utilizar se a embalagem estiver danificada ou se o vedante da tampa/ tampa do funil apresentar danos ou fugas.
- NÃO utilizar prepIT•L2P após a data de validade indicada no frasco do reagente.
- Em caso de contacto do reagente com os olhos ou a pele, lavar abundantemente com água. NÃO ingerir.
- Comunique qualquer incidente grave à DNA Genotek e à autoridade competente no seu país.
- Consulte a Ficha de Dados de Segurança (FDS) do material para uma eliminação segura do reagente inutilizado.
- A FDS está disponível em www.dnagenotek.com.

Limitações de utilização do produto

Utilize o prepIT•L2P apenas conforme indicado no presente guia do produto.

Transporte do prepIT•L2P

O prepIT•L2P pode ser transportado à temperatura ambiente como reagente de laboratório. Não é necessário qualquer manuseamento específico.

Armazenamento do prepIT•L2P (vida útil)

Armazenar à temperatura ambiente. Quando devidamente selados e armazenados à temperatura ambiente, a vida útil do PT-L2P-5 (5 ml) e PT-L2P-45 (45 ml) é de 30 meses.

Eliminação

Elimine os kits não utilizados, danificados ou com fugas, em conformidade com os regulamentos locais, nacionais e federais adequados. Elimine o produto como material residual de laboratório.

Manutenção/reparação

Não aplicável. O prepIT•L2P é um reagente — não necessita de manutenção nem reparação.

Resumo das características de desempenho

O ADN genómico purificado prepIT•L2P dos kits Oragene Saliva Collection Kit e ORAcollect Saliva Collection Kit fornece ADN de alta qualidade e em quantidades suficientes para utilização em aplicações subsequentes, como PCR, microarray e sequenciação de próxima geração (NGS).

Apresentações do produto

O prepIT•L2P está disponível em múltiplos volumes, dependendo do número de preparações necessário. Por exemplo:

Referência do produto/ número de catálogo	Volume de preparação das amostras	Número de preparações
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2000

Garantias

Os termos e condições integrais aplicáveis a todos os produtos DNA Genotek estão disponíveis em <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

Resolução de problemas

Contacte a assistência técnica da DNA Genotek através do e-mail support@dnagenotek.com ou do número +1 (613) 723-5757, opção 6.

prepIT™•L2P laboratory protocol para purificação manual de ADN a partir de 500 µL de amostra

O protocolo passo a passo que se segue explica como purificar o ADN a partir de uma alíquota de 500 µL de amostra.

Reagentes incluídos

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

Equipamento e reagentes

- Microcentrifuga com rotação a 15 000 × g
- Microtubos de 1,5 ml (p. ex., Axygen® N.º cat. MCT-150-C)
- Incubadora de ar ou água a 50 °C
- Etanol (95% a 100%) à temperatura ambiente
- Etanol (70%) à temperatura ambiente
- Tampão de armazenamento de ADN: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ou solução semelhante

Procedimento

Etapas de purificação	Notas
1. Misture a amostra Oragene/ORACollect por inversão ou por agitação suave durante alguns segundos.	• Este procedimento tem por objetivo garantir que as amostras viscosas são devidamente misturadas.

Etapas de purificação	Notas
2. Incube a amostra a 50 °C numa incubadora de água durante, pelo menos, 1 hora ou numa incubadora de ar durante, pelo menos, 2 horas.	<ul style="list-style-type: none"> Esta etapa de tratamento térmico é essencial para que o ADN seja libertado de forma adequada e as nucleases sejam permanentemente neutralizadas. Esta etapa de incubação pode ser realizada em qualquer altura após a recolha da amostra e antes de esta passar à fase de purificação. Para garantir a homogeneidade da amostra, recomenda-se a incubação da totalidade da amostra no tubo de colheita original antes de se proceder à sua alíquota. Caso se justifique, a amostra pode ser incubada a 50 °C durante a noite. Na incubadora de ar, o tempo necessário é maior porque o equilíbrio da temperatura é mais lento do que numa incubadora de água. <p>Nota: É preferível utilizar uma incubadora de ar, uma vez que os tubos Oragene/ORACollect podem flutuar num banho de água. Caso seja necessário utilizar um banho de água, a parte do tubo que contém a amostra deve permanecer imersa em água.</p>
3. Transfira 500 µL da amostra misturada para um tubo de microcentrifugação de 1,5 ml.	<ul style="list-style-type: none"> A amostra remanescente pode ser armazenada à temperatura ambiente (15 °C a 25 °C) ou congelada. Opcionalmente, a amostra pode ser armazenada congelada no tubo Oragene/ORACollect a -20 °C ou ser transferida para um criotubo para armazenamento a longo prazo a -80 °C.
4. Adicione 20 µL (1/25.º do volume) de prepiT-L2P ao tubo de microcentrifugação e agite em vórtex durante alguns segundos.	<ul style="list-style-type: none"> A amostra tornar-se-á turva à medida que as impurezas e os inibidores são precipitados.
5. Incube em gelo durante 10 minutos.	<ul style="list-style-type: none"> A incubação à temperatura ambiente pode ser substituída, mas será ligeiramente menos eficaz na remoção de impurezas.

Etapas de purificação	Notas
6. Centrifugue à temperatura ambiente durante 5 minutos a 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> O prolongamento do período de centrifugação (até 15 minutos) pode ser útil para reduzir a turvação (A₃₂₀ elevado) da solução final de ADN.
7. Transfira cuidadosamente o sobrenadante límpido com uma ponta de pipeta para um novo tubo de microcentrifugação. Elimine o sedimento com impurezas.	<ul style="list-style-type: none"> O sedimento contém impurezas turvas. Se acidentalmente perturbado, o tubo deve ser novamente centrifugado.
8. Adicione 600 µL de etanol a 95% a 100% à temperatura ambiente. Misture delicadamente por inversão 10 vezes.	<ul style="list-style-type: none"> Durante a mistura com etanol, o ADN precipitar-se-á. Dependendo da quantidade de ADN na amostra, este pode manifestar-se como um coágulo de fibras de ADN ou como um precipitado fino. Mesmo não se verificando a presença de um coágulo, o ADN pode ser recuperado seguindo cuidadosamente os passos seguintes.
9. Deixe a amostra repousar à temperatura ambiente durante 10 minutos para obter a precipitação total do ADN.	<ul style="list-style-type: none"> Não é recomendado incubar à temperatura de -20 °C, uma vez que as impurezas podem coprecipitar com o ADN.
10. Coloque o tubo na microcentrifuga numa orientação conhecida. Centrifugue à temperatura ambiente durante 2 minutos a 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> Por exemplo, coloque cada tubo na microcentrifuga, com a parte da dobradiça da tampa a apontar na direção contrária ao centro do rotor. Após a centrifugação, é possível localizar a posição do sedimento (mesmo que muito pequeno para ser visível); este encontrar-se-á na extremidade do tubo, sob a dobradiça.
11. Remova cuidadosamente o sobrenadante com uma ponta de pipeta e elimine-o. Tenha atenção para não perturbar o sedimento de ADN.	<ul style="list-style-type: none"> Este sedimento contém ADN. A perda do sedimento resultará na perda do ADN. A rotação do tubo de forma que o sedimento permaneça na parede superior permitirá deslocar com segurança uma ponta de pipeta ao longo da parede inferior e remover todo o sobrenadante. O sobrenadante pode conter impurezas, pelo que deverá ser removido com a maior eficiência possível.

Etapas de purificação	Notas
<p>12. Lavagem com etanol: adicione cuidadosamente 250 µL de etanol a 70%. Deixe repousar à temperatura ambiente durante 1 minuto. Remova por completo o etanol sem perturbar o sedimento.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • É importante remover todos os resíduos de etanol da amostra. A transferência de etanol pode afetar o desempenho do ensaio. • Após a remoção do etanol a 70%, recomenda-se a agitação do tubo por pulsação para remover qualquer resíduo remanescente de etanol. • Evite perturbar o sedimento de ADN; o sedimento em questão pode não ser visível ou ser muito pequeno. • Se o sedimento se separar, centrifugue a amostra durante 5 minutos a 15 000 × g. • A secagem excessiva do sedimento pode dificultar a dissolução do ADN.
<p>13. Adicione 100 µL de solução TE (consulte a página 5) para dissolver o sedimento de ADN. Agite no vórtex durante, pelo menos, 5 segundos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Para obter uma maior concentração de ADN, devem ser utilizados 50 µL de solução TE.
<p>14. Para assegurar a reidratação completa do ADN, incube à temperatura ambiente durante a noite, seguido de agitação no vórtex, ou a 50 °C, durante 1 hora, agitando ocasionalmente no vórtex.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Quando em grande quantidade, o ADN de elevado peso molecular pode demorar a reidratar-se (dissolver-se) completamente. • A reidratação parcial do ADN é uma causa de imprecisão na estimativa da concentração de ADN e de potenciais falhas nas aplicações subsequentes, como é o caso da PCR.
<p>15. Opções para o armazenamento de ADN totalmente reidratado:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) Em TE a -20 °C para armazenamento a longo prazo. Divida em alíquotas, consoante a opção. b) Em TE a 4 °C durante um período máximo de 2 meses. 	

prepIT•L2P laboratory protocol para purificação manual de ADN de amostras inteiras

Nota: Este protocolo requer a utilização de uma centrífuga (rotor de ângulo fixo ou de cuba oscilante) capaz de gerar uma velocidade igual ou superior a 3500 × g para obter os melhores resultados.

O protocolo passo a passo que se segue explica como purificar o ADN de toda a amostra (1 ml a 4 ml de volume total de amostra). Os volumes indicados devem ser ajustados em função do volume real colhido.

Reagentes incluídos

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

Equipamento e reagentes

- Centrífuga que comporta tubos de 15 ml e é capaz de gerar uma rotação igual ou superior a 3500 × g (consultar a Tabela 2)
- Tubos cónicos de polipropileno de 15 ml (por exemplo, BD Falcon® N.º cat. 352196)
- Microcentrifuga com rotação a 15 000 × g (opcional)
- Microtubos de 1,5 ml (p. ex., Axygen® N.º cat. MCT-150-C)
- Incubadora de ar ou água a 50 °C
- Etanol (95% a 100%) à temperatura ambiente
- Etanol (70%) à temperatura ambiente
- Tampão de armazenamento de ADN: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ou solução semelhante

Opcional: controlo da pré-purificação (aplicável apenas a amostras Oragene; dispensável para amostras ORAcollect)

Pesar a amostra para estimar a quantidade de saliva fornecida pelo dador (consultar a Tabela 1). A quantidade de saliva colhida é diretamente proporcional à quantidade de ADN recuperado. Por exemplo, se um dador tiver fornecido menos de 2 ml de saliva, o volume total da amostra será mais baixo.

Peso do kit (sem amostra)


Uma vez recebida a amostra no laboratório, recomendamos a sua pesagem para avaliar se o dador forneceu a quantidade adequada de saliva. São expectáveis algumas disparidades entre os dadores. O peso médio de um kit vazio é fornecido (Tabela 1). Para calcular a quantidade de amostra colhida (pressupondo 1 g/ml), realize o seguinte cálculo:



$$\frac{\text{Peso do kit com amostra} - \text{Peso do kit sem amostra}}{\text{Quantidade de amostra colhida}}$$

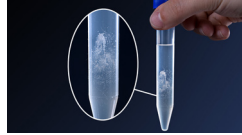
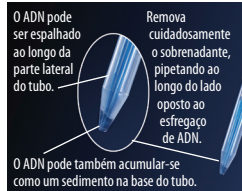
Quantidade de amostra colhida

Tabela 1	
Produto n.º	Peso do kit sem amostra
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

Procedimento

Etapas de purificação	Notas
1. Misture a amostra Oragene/ ORAcollect por inversão ou por agitação suave durante alguns segundos.	<ul style="list-style-type: none">Este procedimento tem por objetivo garantir que as amostras viscosas são devidamente misturadas.
2. Incube a amostra a 50 °C numa incubadora de água durante, pelo menos, 1 hora ou numa incubadora de ar durante, pelo menos, 2 horas.	<ul style="list-style-type: none">Esta etapa de tratamento térmico é essencial para maximizar o rendimento do ADN e garantir a neutralização permanente das nucleases.Caso se justifique, a amostra pode ser incubada a 50 °C durante a noite.Esta etapa de incubação pode ser realizada em qualquer altura após a recolha da amostra e antes de esta passar à fase de purificação.Na incubadora de ar, o tempo necessário é maior porque o equilíbrio da temperatura é mais lento do que numa incubadora de água. <p>Nota: É preferível utilizar uma incubadora de ar, uma vez que os tubos Oragene/ ORAcollect podem flutuar num banho de água. Caso seja necessário utilizar um banho de água, a parte do tubo que contém a amostra deve permanecer imersa em água.</p>
3. Transfira a totalidade da amostra para um tubo de centrifugação de 15 ml (Figura 1). Observe o volume da amostra.	<ul style="list-style-type: none">A transferência pode ser realizada por vazamento ou pipetagem com uma pipeta de vidro ou de plástico.  <p><i>Figura 1: Antes de avançar para o passo 4, o utilizador deve certificar-se de que a totalidade da amostra foi incubada e transferida para um novo tubo de centrifugação de 15 ml, conforme ilustrado.</i></p>

Etapas de purificação	Notas
<p>4. Adicione 1/25.º volume de prePT•L2P e agite no vórtex durante alguns segundos (Figura 2).</p>  <p><i>Figura 2: Depois de adicionar o PT-L2P e incubar em gelo durante 10 minutos, a amostra já não terá um aspeto limpo, assumindo antes a forma de uma solução turva.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ex., para uma amostra de 4 ml, adicione 160 µL de prePT•L2P. • A amostra tornar-se-á turva à medida que as impurezas e os inibidores são precipitados.
<p>5. Incube em gelo durante 10 minutos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A incubação à temperatura ambiente pode ser substituída, mas será menos eficaz na remoção de impurezas.
<p>6. Centrifugue à temperatura ambiente durante 10 minutos à velocidade mais alta possível. Mínimo 3500 × g.</p>  <p><i>Figura 3: Após a centrifugação, haverá uma acumulação de material turvo na base do tubo. O sobrenadante deve apresentar um aspeto visivelmente limpo.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Uma força centrífuga mais alta minimizará a quantidade de material turvo que será transportado para o ADN purificado (Figura 3). Antes de avançar, convém consultar o fabricante dos tubos para verificar se os tubos de centrifugação de 15 ml têm capacidade para suportar a força centrífuga. • O prolongamento do período de centrifugação (até 20 minutos) pode ser útil para reduzir a turbacção (A₃₂₀ elevado) da solução final do ADN.
<p>7. Transfira cuidadosamente o sobrenadante limpo com uma pipeta para um novo tubo de centrifugação de 15 ml. Elimine o sedimento.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Para evitar perturbar o sedimento, o utilizador deverá deixar um pequeno volume do sobrenadante. • O sedimento contém impurezas turvas. Se acidentalmente perturbado, o tubo deve ser novamente centrifugado.

Etapas de purificação	Notas
<p>8. Adicione 1,2x de volume de etanol a 95% a 100% à temperatura ambiente ao sobrenadante limpo. Agite delicadamente por inversão 10 vezes.</p>  <p><i>Figura 4: Após a adição de etanol, o ADN precipitará, podendo resultar num coágulo visível de fibras.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Durante a mistura com etanol, o ADN precipitar-se-á. • Dependendo da quantidade de ADN na amostra, o ADN precipitado pode manifestar-se como um coágulo de fibras de ADN (Figura 4) ou precipitado fino.
<p>9. Deixe a amostra repousar à temperatura ambiente durante 10 minutos para obter a precipitação total do ADN.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Não é recomendado incubar à temperatura de -20 °C, uma vez que as impurezas podem coprecipitar com o ADN.
<p>10. Centrifugue à temperatura ambiente durante 10 minutos à velocidade mais alta possível. Mínimo 3500 × g.</p>	
<p>11. Remova cuidadosamente o sobrenadante com uma pipeta de vidro ou de plástico, e elimine-o. Tenha atenção para não perturbar o sedimento de ADN.</p>  <p><i>Figura 5: A utilização de uma ponta de pipeta para raspar suavemente o interior do tubo pode revelar a presença de um esfregaço de ADN.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • O sobrenadante pode conter impurezas, pelo que deverá ser removido com a maior eficiência possível. • O ADN precipitado será encontrado sob a forma de um sedimento no fundo do tubo e possivelmente como um esfregaço na parte lateral do tubo (Figura 5). • O esfregaço de ADN pode ser colocado na parte lateral do tubo que se encontra afastada do centro da centrifugadora. • Um esfregaço pode ser localizado através do teste de "raspagem". A presença de um esfregaço de ADN pode ser verificada raspando o interior do tubo com uma ponta de pipeta. Poderá ser visível um esfregaço, tal como ilustrado na Figura 5.

Etapas de purificação	Notas
<p>12. Lavagem com etanol: adicione cuidadosamente 1 ml de etanol a 70% ao tubo sem perturbar o esfregaço ou sedimento. Deixe repousar à temperatura ambiente durante 1 minuto. Agite delicadamente e remova por completo a solução de etanol sem perturbar o sedimento e o esfregaço.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • É importante remover todos os resíduos de etanol da amostra. A transferência de etanol pode afetar o desempenho do ensaio. • Tenha atenção para não perturbar o sedimento de ADN ou o esfregaço. • Para facilitar a eliminação total do sobrenadante, o utilizador pode realizar uma centrifugação curta (inferior a 1 minuto). • Caso o sedimento se solte após a etapa de lavagem com etanol, centrifugue a amostra durante 5 minutos à velocidade mais alta possível. Mínimo 3500 × g.
<p>13. Para amostras Oragene, reidratar o ADN adicionando 0,2 ml a 1 ml de solução TE e agitar a amostra no vórtex durante 30 segundos.</p> <p>Para amostras ORACollect, reidratar o ADN adicionando 0,2 ml de solução TE e agitar a amostra no vórtex durante 30 segundos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Para obter uma maior concentração de ADN, a quantidade de TE deverá ser reduzida. Deve ser utilizado um mínimo de 200 µL de solução TE. • A secagem excessiva do sedimento (> 10 minutos) e a utilização de uma quantidade inferior a 500 µL de solução TE podem dificultar a reidratação (dissolução) do ADN e diminuir o rendimento ou dificultar a sua quantificação. • O ADN precipitado será encontrado sob a forma de um sedimento no fundo do tubo e, possivelmente, como um esfregaço na parte lateral do tubo. • Para garantir a máxima recuperação do ADN, a amostra deve ser agitada no vórtex após a adição do solvente de ADN (solução TE). A agitação no vórtex fará com que o ADN presente na parte lateral do tubo possa ser recuperado (Figura 6). • A agitação no vórtex não irá provocar a clivagem do ADN.



Figura 6: Se agitar a amostra no vórtex por 30 segundos, poderá recuperar o ADN presente na parte lateral do tubo. O ADN continuará a ter um peso molecular elevado.

Etapas de purificação	Notas
<p>14. Para assegurar a reidratação completa do ADN, incube à temperatura ambiente durante a noite, seguido de agitação no vórtex, ou a 50 °C durante 1 hora, agitando ocasionalmente no vórtex.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A reidratação parcial do ADN é uma causa de imprecisão na estimativa da concentração de ADN e de potenciais falhas nas aplicações subsequentes, como é o caso da PCR.
<p>15. Transfira o ADN reidratado para um tubo de microcentrifugação de 1,5 ml para armazenamento.</p>	
<p>Etapa opcional:</p> <ol style="list-style-type: none"> Centrifugue o ADN reidratado à temperatura ambiente durante 15 minutos a 15 000 × g. Transfira o sobrenadante para um novo tubo de microcentrifugação de 1,5 ml sem perturbar o sedimento. 	<p>Atenção: o sedimento contém material insolúvel e turvo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Para maximizar a recuperação do ADN, assegure-se de que o ADN está totalmente reidratado (passo 14) antes de efetuar esta etapa de centrifugação. • Esta etapa de centrifugação tem por objetivo garantir a eliminação de qualquer material turvo remanescente da amostra de ADN. • Ao transferir o sobrenadante límpido para um novo tubo, tenha o cuidado de não perturbar o sedimento.
<p>16. Opções para o armazenamento de ADN totalmente reidratado:</p> <ol style="list-style-type: none"> Em TE a -20 °C para armazenamento a longo prazo. Divida em alíquotas, consoante a opção. Em TE a 4 °C durante um período máximo de 2 meses. 	<ul style="list-style-type: none"> • O congelamento do ADN purificado em TE pode conduzir à precipitação do ADN. Ao descongelar o ADN purificado congelado, preste muita atenção à reidratação, tal como abordado no passo 14.

Quantificação do ADN

Através do método por fluorescência

Os ensaios que utilizam corantes fluorescentes são mais específicos do que a absorvância a 260 nm para quantificar a quantidade de ADN de cadeia dupla (dsADN) numa amostra de ADN. É sugerida a utilização de kits disponíveis no mercado, por exemplo, Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) ou QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Antes de ser utilizado no ensaio de quantificação, o ADN pode ter de ser diluído com TE até 1:50.

Através do método por absorvância

Se o utilizador optar por quantificar o ADN por absorvância, é recomendável começar por tratar a amostra purificada com RNase para digerir o ARN contaminante e, em seguida, remover os fragmentos de ARN por precipitação do ADN com etanol. Um protocolo pormenorizado é descrito no PD-PR-040, *Remoção de ARN por digestão com dupla RNase*.¹ É de salientar que o ADN de uma amostra oral contém normalmente muito mais ARN do que o encontrado em amostras de sangue. Antes de proceder à leitura da absorvância, verifique se o ADN precipitado com álcool está totalmente dissolvido.

Fator de conversão: uma absorvância de 1,0 a 260 nm corresponde a uma concentração de 50 ng/μL (50 μg/ml) para ADN puro de cadeia dupla.

Verifique se os valores de absorvância se encontram dentro do intervalo linear do espectrofotómetro. Dilua e meça novamente as amostras que se encontrem fora do intervalo linear. Consulte os documentos do instrumento para mais informações.

Referências

- ¹ Remoção de ARN por digestão de RNase dupla. PD-PR-040. DNA Genotek.

Método

1. Dilua uma alíquota de 10 μL de ADN purificado e tratado com RNase em 90 μL de TE (diluição a 1/10). Agite, pipetando delicadamente para cima e para baixo. Aguarde até que as bolhas se dissipem.
2. Utilize solução TE na célula de referência (em branco).
3. Meça a absorvância a 320 nm, 280 nm e 260 nm.
4. Calcule os valores de A_{280} e A_{260} corrigidos, subtraindo a absorvância a 320 nm (A_{320}) dos valores de A_{280} e A_{260} .
5. Concentração de ADN em ng/μL = A_{260} corrigido \times 10 (fator de diluição) \times 50 (fator de conversão).
6. Razão A_{260}/A_{280} : dividir A_{260} corrigido por A_{280} corrigido.

Exemplo

1. Assumir os valores $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ e $A_{260} = 0,295$ medidos.
2. A concentração de ADN da amostra não diluída será:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [fator de diluição] \times 50 [fator de conversão]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ou $135 \text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$
3. A razão A_{260}/A_{280} corrigida será:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$











Oragene•DNA e ORAcollect•DNA não estão disponíveis para venda nos Estados Unidos. Oragene•DISCOVER destina-se exclusivamente para efeitos de investigação científica, não sendo destinado à utilização em procedimentos de diagnóstico.

Alguns produtos da DNA Genotek podem não estar disponíveis em todas as regiões geográficas.

Oragene, prepIT, ORAcollect e DNA Genotek são marcas comerciais da DNA Genotek Inc. Todas as outras marcas e nomes aqui mencionados são propriedade dos seus respetivos proprietários.

Todos os protocolos, livros brancos e notas de aplicação da DNA Genotek estão disponíveis na secção de apoio do nosso site www.dnagenotek.com.

Legenda do rótulo:

	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Marcação CE
	Fabricante
	Consultar o folheto informativo
	Representante autorizado na Europa
	Representante autorizado na Suíça
	Número de lote
	Identificador único do dispositivo
	Estabilidade durante a utilização
15 °C / 30 °C 59 °F / 86 °F	Instruções de armazenamento

Patente (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-43 (PT - Portuguese) Issue 1/2023-10

© 2023 DNA Genotek Inc., uma subsidiária da OraSure Technologies, Inc.

Todos os direitos reservados.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com