

Handbok för manuellt reningsprotokoll för användning med

prepiT™•L2P

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com

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

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

*Utmärkta prover
Bevisad prestanda*




prepiT™-L2P-protokollet är tillgängligt på ytterligare språk på www.dnagenotek.com


Teknisk support är tillgänglig måndag till fredag (kl. 09.00 till 17.00 ET):

- Gratis (Nordamerika): 1.866.813.6354, knappval 6
- Alla övriga länder: +1.613.723.5757, knappval 6
- E-post: support@dnagenotek.com

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

Ansvärig i Storbritannien: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL International,
Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ, Storbritannien

 Novosanis NV, Bijkhoevelaan 32c,
2110 Wijnegem, Belgien
E-post: EUAAR@novosanis.com

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

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

Innehållsförteckning

Avsedd användning/syfte:	4
Stabilitet vid användning	4
Egenskaper	4
Material	4
Varningar och försiktighetsåtgärder	4
Begränsningar för användning	5
Transport av prepiT•L2P	5
Förvaring av prepiT•L2P (Hållbarhet)	5
Avfallshantering	5
Underhåll/repARATION	5
Sammanfattning av prestandaegenskaper	5
Produktpresentationer	5
Garanti	6
Felsökning	6

prepiT•L2P laboratorieprotokoll för manuell rening av DNA från:

500 µl prov	7
Helt prov	11
Kvantifiering av DNA	18

Avsedd användning/syfte

För rening av genomiskt DNA från Oragene™ och ORAcollect™ salivinsamlingskit.

Stabilitet vid användning

PT-L2P-5 (5 ml) och PT-L2P-45 (45 ml) har 30 månaders stabilitet vid användning vid rumstemperatur.

Egenskaper

- Optimerad kemi för maximal utvinning av DNA från orala prover insamlade med produktlinjerna Oragene och ORAcollect.
- Har bevisats ge konsekventa resultat med DNA med hög molekylvikt.
- Skalbar reningsmetod för stora eller små provvolymmer.
- Praktiskt arbetsflöde med komplett teknisk support från insamling till extrahering.
- Kostnadseffektiv metod som kräver minimal utrustning.

Material

- PT-L2P-5 (5 ml) och/eller PT-L2P-45 (45 ml)
- prepIT•L2P produkthandbok

Varningar och försiktighetsåtgärder

- Endast för laboratoriebruk.
- Reagensvätska får EJ förtäras.
- Använd EJ om förpackningen är skadad eller förseglingen av trattlocket är bruten eller läcker.
- Använd EJ prepIT•L2P efter utgångsdatumet som står på reagensflaskan.
- Skölj med vatten om reagens kommer i kontakt med ögon eller hud. Får EJ förtäras.
- Rapportera allvarliga incidenter till DNA Genotek och behörig myndighet i ditt land.
- Se materialsäkerhetsdatabladet (MSDS) för säker avfallshantering av oförbrukat reagens.
- MSDS är tillgängligt på www.dnagenotek.com.

Begränsningar för användning

Använd endast prepIT•L2P enligt anvisningarna i denna produkthandbok.

Transport av prepIT•L2P

prepIT•L2P kan transporteras vid omgivningstemperatur som ett laboratoriereagens. Ingen särskild hantering krävs.

Förvaring av prepIT•L2P (Hållbarhet)

Förvara vid rumstemperatur. Hållbarheten på PT-L2P-5 (5 ml) och PT-L2P-45 (45 ml) ska vara 30 månader vid korrekt förslutning och förvaring i rumstemperatur.

Avfallshantering

Sopsortera oförbrukade, skadade eller läckande kit i enlighet med tillämpliga lokala, statliga/regionala och federala föreskrifter. Sortera som laboratorieavfall.

Underhåll/repairation

Ej tillämpligt. prepIT•L2P är ett reagens – inget underhåll eller reparation krävs.

Sammanfattning av prestandaegenskaper

prepIT•L2P renat genomiskt DNA från Oragene och ORAcollect salivinsamlingskit ger DNA av hög kvalitet och kvantitet som räcker för användning nedströms i flödet, såsom till PCR, mikroanalys och nästa generations sekvensering.

Produktpresentationer

prepIT•L2P är tillgängligt i flera volymer beroende på antalet prepareringar som krävs. Till exempel:

Produktreferens/ Katalognummer	Provprepareringsvolym	Antal prepareringar
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2 000

Garanti

Fullständiga villkor för alla DNA Genotek-produkter finns på <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

Felsökning

Kontakta DNA Genoteks tekniska support på support@dnagenotek.com eller ring +1 (613) 723-5757, knappval 6.

prepIT™•L2P laboratorieprotokoll för manuell rening av DNA från 500 µl prov

Följande stegvisa protokoll beskriver hur DNA renas från ett 500 µl provalikvot.

Reagenser som ingår

prepIT•L2P (Kat.nr PT-L2P-5 eller PT-L2P-45)

Utrustning och reagenser

- Mikrocentrifug med kapacitet att köras vid 15 000 × g
- 1,5 ml mikroprovror (t.ex. Axygen® Kat.nr MCT-150-C)
- Luft- eller vatteninkubator vid 50 °C
- Rumstempererad etanol (95 % till 100 %)
- Rumstempererad etanol (70 %)
- DNA-lagringsbuffert: TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0) eller liknande lösning

Tillvägagångsätt

Reningssteg	Anmärkningar
1. Blanda Oragene/ORAcollect-provet genom att vända det upp och ned eller skaka försiktigt i några sekunder.	• Detta säkerställer att viskösa prover blandas ordentligt.

Reningssteg	Anmärkningar
2. Inkubera provet vid 50 °C i vatteninkubator i minst 1 timme eller i luftinkubator i minst 2 timmar.	<ul style="list-style-type: none"> • Detta värmebehandlingssteg är avgörande för att säkerställa att DNA frisätts adekvat och att nukleaser permanent inaktiveras. • Inkuberingssteget kan utföras när som helst efter att provet har tagits och innan det renas. • Hela provet måste inkuberas i det ursprungliga insamlingsröret före alikvotering för att säkerställa homogent prov. • Provet kan inkuberas vid 50 °C över natten om det är mer praktiskt. • Längre tid behövs i luftinkubator då temperaturutjämningen går långsammare än i en vatteninkubator. <p>Anmärkning: Användning av luftinkubator kan vara att föredra då Oragene/ORACollect-rör kan flyta i vattenbad. Om ett vattenbad måste användas är det viktigt att se till att den del av röret som innehåller provet förblir nedsänkt i vatten.</p>
3. För över 500 µl av det blandade provet till ett 1,5 ml mikrocentrifugeringsrör.	<ul style="list-style-type: none"> • Återstoden av provet kan förvaras vid rumstemperatur (15–25 °C) eller frysas. • Om så önskas kan provet förvaras fryst i Oragene/ORACollect-röret vid -20 °C. Alternativt kan provet föras över till en kryoflaska för långvarig lagring vid -80 °C.
4. Lägg till 20 µl (1/25 av volymen) prepIT-L2P till mikrocentrifugeringsröret och blanda genom att virvelblanda i några sekunder.	<ul style="list-style-type: none"> • Provet kommer att bli grumligt när föroreningar och hämmare fallts ut.
5. Inkubera på is i 10 minuter.	<ul style="list-style-type: none"> • Inkubation i rumstemperatur kan användas som alternativ men kommer vara något mindre effektivt för avlägsnande av föroreningar.

Reningssteg	Anmärkningar
6. Centrifugera vid rumstemperatur i 5 minuter vid 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Längre centrifugeringstid (upp till 15 minuter) kan vara fördelaktigt för att minska grumligheten (högt A₃₂₀) på den slutliga DNA-lösningen.
7. För försiktigt med pipettspets över den klara supernatanten till ett nytt mikrocentrifugeringsrör. Kasta kulan med föroreningar.	<ul style="list-style-type: none"> • Kulan innehåller grumliga föroreningar. Om röret oavsiktligt rubbas måste det centrifugeras om.
8. Lägg till 600 µl 95- till 100-procentig rumstempererad etanol. Blanda försiktigt genom att vända upp och ned 10 gånger.	<ul style="list-style-type: none"> • DNA:t fallts ut vid blandningen med etanol. Beroende på mängden DNA i provet kan det se ut som en klump av DNA-fibrer eller som en fin utfällning. • Även om det inte bildas en klump kommer DNA kunna utvinnas genom att noggrant följa följande steg.
9. Låt provet stå i rumstemperatur i 10 minuter för att låta DNA:t fallas ut helt.	<ul style="list-style-type: none"> • Inkubering vid -20 °C rekommenderas inte då föroreningar kan fallas ut tillsammans med DNA:t.
10. Placera röret i mikrocentrifugen i känd riktning. Centrifugera vid rumstemperatur i 2 minuter vid 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> • Till exempel kan varje rör placeras i mikrocentrifugen med lockets gångjärn i riktning bort från rotorns mitt. Efter centrifugeringen kan kulans position lokaliseras (även om den är för liten för att vara synlig); den kommer vara vid rörets spets nedanför gångjärnet.
11. Avlägsna försiktigt supernatanten med en pipettspets och kassera den. Var noga med att inte rubba DNA-kulan.	<ul style="list-style-type: none"> • Denna kula innehåller DNA. Om kulan går förlorad går DNA:t förlorat. • Genom att rotera röret så att kulan är på den övre väggen kan du föra pipettspetsen på ett säkert sätt längs den lägre väggen och avlägsna all supernatant. • Supernatanten kan innehålla föroreningar och bör avlägsnas så fullständigt som möjligt.

Reningssteg	Anmärkingar
12. Etanolsköljning: Tillsätt försiktigt 250 µl 70-procentig etanol. Låt stå i rumstemperatur i 1 minut. Avlägsna etanolen helt utan att rubba kulan.	<ul style="list-style-type: none"> • Det är viktigt att avlägsna all etanol från provet. Rester av etanol kan påverka analysens prestanda. • Efter att den 70-procentiga etanolen avlägsnats kan röret pulsköras för att få bort etanolrester. • Var noga med att inte rubba DNA-kulan; den kan vara liten eller osynlig. • Om kulan skulle lossna kan provet centrifugeras i 5 minuter vid $15\,000 \times g$. • Om kulan får torka för mycket kan det göra DNA:t svårslösligare.
13. Tillsätt 100 µl TE-lösning (se sidan 5) för att lösa upp DNA-kulan. Virvelblanda i minst 5 sekunder.	<ul style="list-style-type: none"> • Använd 50 µl TE om högre koncentration DNA önskas.
14. För att säkerställa komplett rehydrering av DNA:t ska det inkuberas vid rumstemperatur över natten och därefter virvelblandas eller inkuberas vid 50 °C i 1 timme med virvelblandning då och då.	<ul style="list-style-type: none"> • Det kan gå långsamt att rehydrera (lösa upp) stora mängder DNA med hög molekylvikt fullständigt. • Ofullständig rehydrering av DNA:t är en felkälla vid uppskattning av DNA-koncentration och kan potentiellt orsaka fel på användningsområden längre ned i flödet, såsom PCR.
15. Förvaringsalternativ för fullständigt rehydrerat DNA: a) 1 TE vid -20 °C för långtidsförvaring. Dela upp i aliquoter om så önskas. b) 1 TE vid 4 °C i upp till 2 månader.	

prepIT•L2P laboratorieprotokoll för manuell rening av DNA från helprov

Anmärkning: Det här protokollet kräver att en centrifug (med rotor i antingen fixerad vinkel eller av svängande skop-typ) med kapacitet att generera minst $3\,500 \times g$ används för optimala resultat.

Följande stegvisa protokoll beskriver hur DNA renas från hela provet (1–4 ml total provvolym). Volymerna som visas bör justeras för den faktiska insamlade volymen.

Reagenser som ingår

prepIT•L2P (Kat.nr PT-L2P-5 eller PT-L2P-45)

Utrustning och reagenser

- Centrifug med plats för 15 ml-rör och kapacitet att generera minst $3\,500 \times g$ (se Tabell 2)
- 15 ml koniska polypropylenrör (t.ex. BD Falcon® Kat.nr 352196)
- Mikrocentrifug med kapacitet att köras vid $15\,000 \times g$ (valfritt)
- 1,5 ml mikroprovrör (t.ex. Axygen® Kat.nr MCT-150-C)
- Luft- eller vatteninkubator vid 50 °C
- Rumstempererad etanol (95 % till 100 %)
- Rumstempererad etanol (70 %)
- DNA-lagringsbuffert: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) eller liknande lösning

Valfritt: Kontroll före rening (gäller endast Oragene-prover; krävs ej för ORAcollect-prover)

Väg provet för att beräkna mängden saliv som provgivaren lämnat (se Tabell 1). Mängden saliv som samlas in står i direkt proportion till mängden DNA som utvinns. Om en provgivare till exempel lämnat mindre än 2 ml saliv bör du förvänta dig att utvinna ett lägre totalt utbyte från provet.

Kitets vikt (utan prov)

När ett prov anländer till laboratoriet föreslår vi att det vägs för att beräkna om rätt mängd saliv lämnats av provgivaren. Du kan förvänta dig viss variation mellan provgivare. Medelvikten på ett tomt kit anges (Tabell 1). För att uppskatta mängden insamlat prov (vi utgår från 1 g/ml) genomför du följande beräkning:

$$\frac{\text{Kitets vikt med prov} - \text{Kitets vikt utan prov}}{\text{Insamlad provmängd}}$$


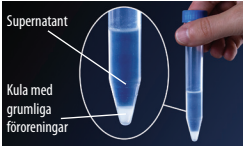
Tabell 1	
Produkt nr	Kitets vikt utan prov
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

Tillvägagångssätt

Reningssteg	Anmärkingar
1. Blanda Oragene/ORAcollect-provet genom att vända det upp och ned eller skaka försiktigt i några sekunder.	• Detta säkerställer att viskösa prover blandas ordentligt.
2. Inkubera provet vid 50 °C i vatteninkubator i minst 1 timme eller i luftinkubator i minst 2 timmar.	• Detta värmebehandlingssteg är avgörande för att maximera DNA-utbytet och se till att nukleaser permanent inaktiveras. • Om det är mer praktiskt kan provet inkuberas vid 50 °C över natten. • Inkuberingssteget kan utföras när som helst efter att provet har tagits och innan DNA renas. • Längre tid behövs i luftinkubator då temperaturutjämningen går långsammare än i en vatteninkubator. Anmärkning: Användning av luftinkubator kan vara att föredra då Oragene/ORAcollect-rör kan flyta i vattenbad. Om ett vattenbad måste användas är det viktigt att se till att delen av röret som innehåller provet förblir nedsänkt i vatten.
3. För över hela provet till ett 15 ml centrifugeringsrör (Figur 1). Notera provvolymen.	• Överföringen kan göras antingen genom att hälla eller genom att pipettera med glas- eller plastpipett.



Figur 1: Innan du fortsätter till steg 4 ska du se till att hela provet har inkuberats och överförts till ett nytt 15 ml centrifugeringsrör, som visat.

Reningssteg	Anmärkningar
<p>4. Tillsätt 1/25 av volymen av prepIT-L2P och blanda genom att virvelblanda i några sekunder (Figur 2).</p>  <p><i>Figur 2: Efter att PT-L2P har tillsatts och provet inkuberats på is i 10 minuter kommer det inte längre att se klart ut, utan snarare vara en grumlig lösning.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> Tillsätt t.ex. 160 µl prepIT-L2P till 4 ml prov. Provet kommer att bli grumligt när föroreningar och hämmare fälls ut.
<p>5. Inkubera på is i 10 minuter.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Inkubation i rumtemperatur kan användas som alternativ men kommer vara mindre effektivt för avlägsnande av föroreningar.
<p>6. Centrifugera i rumtemperatur i 10 minuter på högsta möjliga hastighet. Min 3 500 × g.</p>  <p><i>Figur 3: Efter centrifugering kommer grumligt material att ha ansamlats i rörets botten. Supernatanten bör vara synbart klar.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> Högre centrifugalkraft minimerar mängden grumligt material som överförs till det reade DNA:t (Figur 3). Innan du fortsätter bör du kontrollera med provrörstillverkaren att centrifugeringsrören på 15 ml håller för centrifugalkraften. Längre centrifugeringstid (upp till 20 minuter) kan vara fördelaktigt för att minska grumligheten (högt A₃₂₀) på den slutliga DNA-lösningen.
<p>7. För med pipettspets försiktigt över den klara supernatanten till ett nytt 15 ml centrifugeringsrör. Kassera kulan.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Lämna en liten volym av supernatanten kvar för att undvika att rubba kulan. Kulan innehåller grumliga föroreningar. Om röret oavsiktligt rubbas måste det centrifugeras om.

Reningssteg	Anmärkningar
<p>8. Tillsätt 1,2 × volymen rumstempererad 95- till 100-procentig etanol till den klara supernatanten. Blanda försiktigt genom att vända upp och ned 10 gånger.</p>  <p><i>Figur 4: Efter att etanol tillsatts kommer DNA:t fällas ut, vilket kan leda till en synlig klump av fibrer.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> DNA:t fälls ut vid blandningen med etanol. Beroende på mängden DNA i provet kan utfällt DNA se ut som en klump av DNA-fibrer (Figur 4) eller som en fin utfällning.
<p>9. Låt provet stå i rumtemperatur i 10 minuter för att låta DNA:t fällas ut helt.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Inkubering vid -20 °C rekommenderas inte då föroreningar kan fällas ut tillsammans med DNA:t.
<p>10. Centrifugera i rumtemperatur i 10 minuter på högsta möjliga hastighet. Minst 3 500 × g.</p>	
<p>11. Avlägsna försiktigt supernatanten med glas- eller plastpipett och kassera den. Var noga med att undvika att rubba DNA-kulan.</p>  <p><i>Figur 5: Använd en pipettspets för att försiktigt skrapa längs rörets insida och eventuellt hitta förekomst av DNA-avsmetning.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> Supernatanten kan innehålla föroreningar och bör avlägsnas så fullständigt som möjligt. Utfällt DNA återfinns som en kula i botten på röret och möjligen som en avsmetning längs rörets sida (Figur 5). DNA-avsmetningen kan sitta på den sida av röret som är vänd bort från centrifugens mitt. En avsmetning kan hittas genom att använda "skrap"-testet. Du kan kontrollera förekomsten av DNA-avsmetning genom att skrapa på insidan av röret med en pipettspets. En avsmetning, som visas i Figur 5, kan vara synlig.

Reningssteg	Anmärkningar
<p>12. Etanolsköljning: Tillsätt försiktigt 1 ml 70-procentig etanol till röret utan att rubba avsmetningen eller kulan. Låt stå i rumstemperatur i 1 minut. Snurra försiktigt på röret och avlägsna etanolen helt utan att rubba kulan och avsmetningen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Det är viktigt att avlägsna all etanol från provet. Rester av etanol kan påverka analysens prestanda. • Var noga med att undvika att rubba DNA-kulan eller avsmetningen. • En kort centrifugering (mindre än 1 minut) kan utföras för att underlätta fullständigt avlägsnande av supernatanten. • Om kulan skulle lossna efter etanolsköljningen kan provet centrifugeras i 5 minuter på högsta möjliga hastighet. Minst 3 500 × g.
<p>13. Med Oragene-prover rehydreras DNA:t genom att 0,2–1 ml TE-lösning tillsätts och att provet virvelblandas i 30 sekunder.</p> <p>Med ORAcollect-prover rehydreras DNA:t genom att 0,2 ml TE-lösning tillsätts och att provet virvelblandas i 30 sekunder.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Om en högre koncentration DNA önskas kan volymen TE minskas. Minst 200 µl TE-lösning ska användas. • Överdriven uttorkning av kulan (> 10 minuter) och att använda mindre än 500 µl TE-lösning kan göra det svårt att rehydrera (lösa upp) DNA:t och kan minska utbytet eller försvåra kvantifiering. • Utfällt DNA återfinns som en kula i botten på röret och möjligen som en avsmetning längs rörets sida. • För att säkerställa maximal utvinning av DNA måste provet virvelblandas efter tillsats av DNA-lösningsmedel (TE-lösning). Virvelblandning säkerställer att DNA:t som smetats av på sidan av röret utvinns (Figur 6). • Virvelblandningen kommer inte att klippa av DNA:t.
 <p><i>Figur 6: Att virvelblanda provet i 30 sekunder gör det möjligt att utvinna DNA som smetats längs sidan av röret. DNA:t bibehåller hög molekylvikt.</i></p>	
<p>14. För att säkerställa komplett rehydrering av DNA:t ska det inkuberas vid rumstemperatur över natten och därefter virvelblandas eller inkuberas vid 50 °C i 1 timme med virvelblandning då och då.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ofullständig rehydrering av DNA:t är en felkälla vid uppskattning av DNA-koncentration och kan potentiellt orsaka fel på användningsområden längre ned i flödet, såsom PCR.

Reningssteg	Anmärkningar
<p>15. För över det rehydrerade DNA:t till ett 1,5 ml mikrocentrifugeringsrör för förvaring.</p>	
<p>Valfritt steg:</p> <ol style="list-style-type: none"> Centrifugera det rehydrerade DNA:t vid rumstemperatur i 15 minuter vid 15 000 × g. För över supernatanten till ett nytt 1,5 ml mikrocentrifugeringsrör utan att rubba kulan. 	<p>Observera att kulan innehåller olösligt grumligt material.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se till att DNA:t är fullständigt rehydrerat (steg 14) innan centrifugeringssteget genomförs för att maximera utvinningen av DNA. • Detta centrifugeringssteg säkerställer att eventuella rester av grumligt material avlägsnas från DNA-provet. • Var noga med att undvika att rubba kulan när den klara supernatanten överförs till ett nytt rör.
<p>16. Förvaringsalternativ för fullständigt rehydrerat DNA:</p> <ol style="list-style-type: none"> ITE vid -20 °C för långtidsförvaring. Dela upp i alikvoter om så önskas. ITE vid 4 °C i upp till 2 månader. 	<ul style="list-style-type: none"> • Infrysning av renat DNA i TE kan leda till att DNA:t faller ut. När nedfryst renat DNA tinas ska du vara särskilt uppmärksam på rehydrering, såsom beskrivs i steg 14.

Kvantifiering av DNA

Med fluoresceringsmetod

Analysmetoder som använder fluorescerande färgning är mer specifika än absorbans vid 260 nm för kvantifiering av mängden dubbelsträngat DNA (dsDNA) i ett DNA-prov. Vi föreslår att kommersiellt tillgängliga kit som Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) eller QuantiFluor® dsDNA System (Promega) används. DNA:t kan behöva spädas upp till 1:50 med TE innan det används i kvantifieringsanalysen.

Med absorbansmetod

Om du väljer att kvantifiera DNA med absorbans rekommenderar vi att du först behandlar det renade provet med RNAs för att bryta ned förorenande RNA och därefter avlägsnar RNA-fragmenten genom etanolutfällning av DNA:t. Detaljerad metod beskrivs i PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*.¹ Observera att DNA från oralt prov vanligtvis innehåller betydligt mer RNA än blodprover. Se till att det alkoholutfällda DNA:t helt har lösts upp innan absorbansen avläses.

Omvandlingsfaktor: En absorbans på 1,0 vid 260 nm motsvarar en koncentration på 50 ng/μl (50 μg/ml) för rent, dubbelsträngat DNA.

Se till att absorbansvärden ligger inom spektrofotometerens linjära intervall. Späd och mät om proverna som faller utanför det linjära intervallet. Se dokumentationen för instrumentet för mer information.

Referenser

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

Metod












- Späd en 10 μl alikvot renat RNAs-behandlat DNA med 90 μl TE (1/10 spädning). Blanda genom att försiktigt pipettera upp och ned. Vänta tills bubblorna försvinner.
- Använd TE i referenscellen (tom).
- Mät absorbansen vid 320 nm, 280 nm och 260 nm.
- Beräkna korrigerade A_{280} - och A_{260} -värden genom att dra ifrån absorbansen vid 320 nm (A_{320}) från A_{280} - och A_{260} -värdena.
- DNA-koncentration i ng/μl = korrigerad $A_{260} \times 10$ (spädningsfaktor) $\times 50$ (omvandlingsfaktor).
- A_{260}/A_{280} -förhållande: Dela korrigerad A_{260} med korrigerad A_{280} .

Exempel

- Anta uppmätt $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ och $A_{260} = 0,295$
- DNA-koncentrationen i outspätt prov kommer att vara:
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [spädningsfaktor]} \times 50 \text{ [omvandlingsfaktor]}$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng/}\mu\text{l eller } 135 \mu\text{g/ml}$$
- Det korrigerade A_{260}/A_{280} -förhållandet kommer att vara:
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$
$$= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$$
$$= 0,270 \div 0,150$$
$$= 1,80$$

Oragene•DNA och ORAcollect•DNA är inte tillgängliga för försäljning i USA.
Oragene•DISCOVER är endast avsett för användning i forskningssyfte, ej för användning i diagnostik.
Vissa produkter från DNA Genotek är eventuellt inte tillgängliga i alla geografiska regioner.
Oragene, prepIT, ORAcollect och DNA Genotek är varumärken som tillhör DNA Genotek Inc.
Alla övriga märken och namn som omnämns i detta dokument tillhör sina respektive ägare.
Samtliga DNA Genotek-protokoll, vitböcker och appliceringsanteckningar är tillgängliga i supportavsnittet på vår webbplats www.dnagenotek.com.

Etiketter:

	Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	CE-märkning
	Tillverkare
	Läs bipacksedeln
	Auktoriserad europeisk representant
	Auktoriserad schweizisk representant
	Batchnummer
	Unik produktidentifiering
	Stabilitet vid användning
	Förvaringsanvisningar

15 °C / 30 °C
59 °F / 86 °F

Patent (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-47 (SV - Swedish) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., ett dotterbolag till OraSure Technologies, Inc., med ensamrätt.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com