

Этапы выделения	Примечания
4. Для 500 мкл образца добавьте 20 мкл (1/25-я часть объема) реактива РТ-L2Р в пробирку микроцентрифуги и смешайте, встряхивая в течение нескольких секунд.	<ul style="list-style-type: none"> Образец станет мутным из-за выпадения в осадок примесей и ингибиторов.
5. Инкубируйте на льду в течение 10 минут.	<ul style="list-style-type: none"> Инкубация при комнатной температуре возможна, но она будет немного менее эффективной в плане удаления примесей.
6. Центрифугируйте при комнатной температуре в течение 5 минут при 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> Более длительное центрифугирование (до 15 минут) может быть полезным для сокращения мутности (высокое значение A_{320}) конечного раствора ДНК.
7. Пипеткой аккуратно перенесите надосадочную жидкость в чистую пробирку. Выбросите осадок, содержащий примеси.	<ul style="list-style-type: none"> Осадок содержит мутные примеси. Если случайно их задеть, пробирку следует повторно центрифугировать.
8. К 500 мкл надосадочной жидкости добавьте 600 мкл 95% или 100% этилового спирта комнатной температуры. Аккуратно перемешайте, переворачивая пробирку 10 раз.	<ul style="list-style-type: none"> Во время смешивания с этиловым спиртом ДНК выпадет в осадок. Он может выглядеть как сгусток волокон ДНК или как мелкий осадок, в зависимости от количества ДНК в образце. Даже если сгустка не видно, ДНК будет обнаружена при точном соблюдении следующих пунктов.
9. Дайте образцу постоять при комнатной температуре в течение 10 минут, чтобы полностью осадить ДНК.	<ul style="list-style-type: none"> Инкубация при -20°C не рекомендуется, поскольку примеси могут выпасть в осадок вместе с ДНК.
10. Поместите пробирку в микроцентрифугу, заметив её ориентацию. Центрифугируйте при комнатной температуре в течение 2 минут при 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> Например, поместите каждую пробирку в микроцентрифуге, чтобы шарнирная часть колпачка указывала в направлении от центра ротора. После центрифугирования можно обнаружить положение осадка (даже если его слишком мало), он будет на кончике пробирки под шарнирной частью.
11. Осторожно удалите пипеткой надосадочную жидкость и вылейте ее. Следите за тем, чтобы не задеть осажденную ДНК.	<ul style="list-style-type: none"> Этот осадок содержит ДНК. Потеря осадка приведет к потере ДНК. Вращение пробирки таким образом, чтобы осадок оказался на верхней стенке, позволит безопасно перемещать кончик пипетки вдоль нижней стенки и удалить всю надосадочную жидкость. Надосадочная жидкость может содержать примеси и ее следует удалить полностью, насколько это возможно. Чрезмерное высушивание осадка может привести к тому, что ДНК будет труднее растворить.

Этапы выделения	Примечания
12. Промывание этиловым спиртом: Осторожно добавьте 250 мкл 70%-ного этилового спирта. Выдержите при комнатной температуре в течение 1 минуты. Полностью удалите этиловый спирт, не задевая осадок.	<ul style="list-style-type: none"> • Важно удалить весь этиловый спирт из образца. Остатки этилового спирта могут повлиять на результат анализа. • Следите за тем, чтобы не задеть осадок с ДНК. • Осадок с ДНК может быть маленьким. • Если осадок разделится, процентрифугируйте образец в течение 5 минут при 15 000 × g. • После удаления 70% этилового спирта можно подвергнуть пробирку вращению с вибрацией, чтобы удалить остатки этилового спирта.
13. Добавьте 100 мкл раствора ТЭ (см. стр. 1), чтобы растворить осажденную ДНК. Встряхивайте в течение, как минимум, 5 секунд.	<ul style="list-style-type: none"> • Если необходима большая концентрация ДНК, следует использовать 50 мкл ТЭ. • Примечание: полная гидратация (растворение) большого количества ДНК с большим молекулярным весом может протекать медленно. • Неполная гидратация ДНК ведет к неточной оценке концентрации ДНК и неудачной амплификации, например ПЦР.
14. Для обеспечения полной регидратации ДНК инкубируйте в течение ночи при комнатной температуре с встряхиванием или при 50°C в течение 1 часа с периодическим встряхиванием.	<ul style="list-style-type: none"> • Неполная регидратация ДНК ведет к неточной оценке концентрации ДНК и, возможно, к неудачной амплификации, например ПЦР.
15. Варианты хранения полностью регидратированной ДНК: а) Рекомендовано в ТЭ, в аликвотах при -20°C для длительного хранения или б) в ТЭ при 4°C для хранения до 2 месяцев.	<ul style="list-style-type: none"> • Замораживание выделенной ДНК в ТЭ приведет к выпадению ДНК в осадок. При оттаивании образца замороженной выделенной ДНК внимательно следите за регидратацией, как описано в 14 пункте.

Количественное определение ДНК

Методом флуоресценции

Анализы с использованием флуоресцентных красителей более точны, чем измерение оптической плотности при 260 нм для количественного определения двухцепочечных ДНК (дцДНК) в образце ДНК. Мы рекомендуем использовать флуоресцентные красители, такие как PicoGreen® или SYBR® Green I для количественного определения дцДНК, поскольку они приводят к меньшей РНК-интерференции. Недорогой протокол с использованием SYBR Green I описан в PD-PR-075, *Количественное определение ДНК с использованием красителя SYBR Green I планшет-ридера*¹. В качестве альтернативы можно использовать имеющиеся в продаже наборы, например, Invitrogen's Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (арт. Q-33130). Для любого из протоколов мы рекомендуем разводить выделенную ДНК в пропорции 1:50 в растворе ТЭ и использовать 5 мкл для количественного определения.

Методом измерения оптической плотности

Если вы выберете количественное определение ДНК с помощью измерения оптической плотности, мы рекомендуем сначала обработать образец с выделенной ДНК РНКазой, чтобы расщепить примеси РНК и затем удалить фрагменты РНК путем осаждения ДНК этиловым спиртом. Подробный протокол описан в PD-PR-040, *Удаление РНК с помощью двойного расщепления РНКазой*². Пожалуйста, примите во внимание, что ДНК из образца, взятого во рту, обычно содержит значительно больше РНК, чем в образцах крови. Прежде чем измерять оптическую плотность, проследите за тем, чтобы ДНК, осажденная спиртом, полностью растворилась.

Переводной коэффициент: Оптическая плотность 1,0 при 260 нм соответствует концентрации 50 нг/мкл (50 мкг/мл) чистой дцДНК.

Проследите за тем, чтобы значения оптической плотности находились в линейной области спектрофотометра. Заново растворите и измерьте образцы, не попадающие в линейную область. Для более подробной информации см. документацию к инструменту.

Метод:

1. Разбавьте 10 мкл аликвота выделенной и обработанной РНКазой ДНК в 90 мкл ТЭ (разбавление 1/10). Аккуратно смешайте, перемещая с помощью пипетки вверх и вниз. Подождите, пока не исчезнут пузырьки.
2. Используйте ТЭ в контрольной (чистой) клетке.
3. Измерьте оптическую плотность при 320 нм, 280 нм и 260 нм.
4. Рассчитайте скорректированные значения A_{280} и A_{260} путем вычитания оптической плотности при 320 нм (A_{320}) из значений A_{280} и A_{260} .
5. Концентрация ДНК в мг/мкл = скорректированное значение $A_{260} \times 10$ (коэффициент разбавления) $\times 50$ (переводной коэффициент).
6. Соотношение A_{260}/A_{280} : разделите скорректированное значение A_{260} на скорректированное значение A_{280} .

Пример

1. Предположим, что измеренные значения $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ и $A_{260} = 0,295$
2. Концентрация ДНК неразбавленного образца составит:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [коэффициент разбавления] $\times 50$ [переводной коэффициент]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135$ нг/мкл или 135 мкг/мл
3. Скорректированное соотношение A_{260}/A_{280} составит:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

Ссылки

- ¹ Количественное определение ДНК с использованием анализа флуоресценции/ДНКазы (Ф/Д). Заменено количественным определением ДНК с использованием красителя SYBR Green I и планшет-ридера. DNA Genotek. PD-PR-075.
- ² Удаление РНК с помощью двойного расщепления РНКазой. DNA Genotek. PD-PR-040.

Техническая поддержка работает с понедельника по пятницу (с 9.00 до 17.00 – время Восточного побережья США):

- Бесплатно (Северная Америка): 1.866.813.6354, доб. 6
- Все другие страны: 613.723.5757, доб. 6
- Email: support@dnagenotek.com

OraGene®-DNA и ORACollect®-DNA недоступны для продажи в Соединенных Штатах Америки.

OraGene®-DISCOVER предназначен только для исследований, и не предназначен для использования в диагностических процедурах.

Некоторые продукты компании DNA Genotek могут не быть представлены во всех географических регионах.

*OraGene, prepIT и ORACollect являются зарегистрированными торговыми знаками компании DNA Genotek Inc.

Все другие торговые марки и названия, содержащиеся в настоящем протоколе, являются собственностью их соответствующих владельцев.

Все протоколы компании, технические описания и указания по применению DNA Genotek можно найти в разделе поддержки на нашей страничке по адресу: www.dnagenotek.com.

Краткое справочное руководство:

Лабораторный протокол ручного выделения ДНК из 0,5 мл образца

Этапы выделения
1. Смешайте образец в наборе DNA Genotek kit, переворачивая и осторожно встряхивая его в течение нескольких секунд.
2. Инкубируйте образец в водяном термостате при 50°C в течение, как минимум, 1 часа или в воздушном термостате в течение, как минимум, 2 часов.
3. Перенесите 500 мкл образца в пробирку микроцентрифуги.
4. Добавьте 20 мкл реактива РТ-L2P и смешайте, встряхивая в течение нескольких секунд.
5. Инкубируйте на льду в течение 10 минут.
6. Центрифугируйте при комнатной температуре (КТ) в течение 5 минут при 15 000 × g.
7. С помощью пипетки аккуратно перенесите большую часть чистой надосадочной жидкости в чистую пробирку микроцентрифуги. Выбросите осадок.
8. Добавьте 600 мкл 95%-100% этилового спирта комнатной температуры, чтобы очистить надосадочную жидкость. Аккуратно перемешайте, переворачивая пробирку 10 раз.
9. Выдержите образец при комнатной температуре в течение 10 минут, чтобы полностью осадить ДНК.
10. Поместите пробирку в центрифугу заметив её ориентацию. Центрифугируйте при комнатной температуре в течение 2 минут при 15 000 × g.
11. Аккуратно соберите пипеткой надосадочную жидкость и вылейте ее. Следите за тем, чтобы не задеть осажденную ДНК.
12. Добавьте 250 мкл 70% этилового спирта и дайте постоять при комнатной температуре в течение 1 минуты. Полностью удалите этиловый спирт, не задевая осадок.
13. Добавьте 100 мкл раствора ТЭ и встряхивайте образец в течение, как минимум, 5 секунд.
14. Инкубируйте на протяжении ночи при комнатной температуре или при 50°C в течение 1 часа, периодически встряхивая.
15. Хранение: в аликвотах при -20°C для длительного хранения (рекомендовано) или при 4°C для хранения до 2 месяцев.