

Laboratorieprotokoll for manuell rensing av DNA fra 0,5 mL prøve

For rensing av genomisk DNA fra innsamlingssett i seriene Oragene® og ORAcollect®.

Du finner flere språk og protokoller på vårt nettsted, www.dnagenotek.com.

Protokollen nedenfor beskriver trinn for trinn fremgangsmåten for rensing av DNA fra en alikvot på 500 µL av en prøve.

Medfølgende reagenser

- prepIT®•L2P (katalognr.: PT-L2P)

Utstyr og reagenser

- mikrosentrifuge som klarer 15 000 × g
- mikrorør på 1,5 mL (f.eks. Axygen nr. MCT-150-C)
- luft- eller vanninkubator med temperatur på 50 °C
- etanol (95-100 %) med romtemperatur
- etanol (70 %) med romtemperatur
- DNA-lagringsbuffer: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) eller tilsvarende løsning

Fremgangsmåte

Rensetrinn	Merknader
1. Bland prøven i DNA Genotek-settet ved å vende og riste den forsiktig i noen sekunder.	<ul style="list-style-type: none">• Dette sikrer at viskøse prøver blandes ordentlig.
2. Inkuber prøven ved 50 °C i en vanninkubator i minst 1 time eller i en luftinkubator i minst 2 timer. Merk: Det kan være en fordel å bruke en luftinkubator ettersom prøverørene kan flyte i et vannbad. Påse at den delen av røret som inneholder prøven hele tiden er under vann hvis vannbad må brukes.	<ul style="list-style-type: none">• Dette varmebehandlingstrinnet er viktig for å sikre tilstrekkelig frigjøring av DNA og permanent inaktivering av kjerner.• Dette inkuberingsstrinnet kan utføres når som helst etter at prøven er innsamlet og før den renses.• Hele prøven må inkuberes i det opprinnelige innsamlingsrøret før alikvotering for å sikre at prøven blir homogen.• Prøven kan inkuberes ved 50 °C over natten hvis dette er mest praktisk.• Ved bruk av en luftinkubator kreves lengre tid ettersom temperaturutjevningen er langsommere enn i en vanninkubator.
3. Overfør 500 µL av den blandede prøven til et mikrosentrifugerør på 1,5 mL.	<ul style="list-style-type: none">• Resten av prøven kan lagres ved romtemperatur eller fryses (-15 til -20 °C).
4. Tilsett 20 µL PT-L2P i prøven på 500 µL (1/25 del av volumet) i mikrosentrifugerøret og bland på en vortex-mikser i noen sekunder.	<ul style="list-style-type: none">• Prøven blir uklar ettersom urenheter og inhibitorer felles ut.
5. Inkuber på is i 10 minutter.	<ul style="list-style-type: none">• Inkubering ved romtemperatur er mulig, men fjerner urenheter noe mindre effektivt.



Rensetrinn	Merknader
6. Sentrifuger ved romtemperatur i 5 minutter ved $15\,000 \times g$.	<ul style="list-style-type: none"> Lengre sentrifugering (i opptil 15 minutter) kan være fordelaktig for å redusere uklarheten (høy A_{320}) i den ferdige DNA-løsningen.
7. Overfør forsiktig den klare supernatanten til et nytt mikrosentrifugerør med en pipettespiss. Kast pelleten som inneholder urenheter.	<ul style="list-style-type: none"> Pelleten inneholder urenheter. Røret må sentrifugeres på nytt hvis pelleten forstyrres.
8. Tilsett 600 μL romtemperert 95-100 %-etanol i 500 μL supernatant. Bland forsiktig ved å vende 10 ganger.	<ul style="list-style-type: none"> Ved blanding med etanol felles DNA-et ut. Dette kan skje i form av en klump av DNA-fibre eller som et fint bunnfall avhengig av mengden DNA i prøven. Selv om det ikke dannes noen synlig klump, vil DNA felles ut hvis de neste trinnene følges nøye.
9. La prøven stå i romtemperatur i 10 minutter for at DNA-et skal felles fullstendig ut.	<ul style="list-style-type: none"> Inkubering ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ anbefales ikke ettersom urenheter kan felles ut sammen med DNA-et.
10. Plasser røret i mikrosentrifugen i en kjent posisjon. Sentrifuger ved romtemperatur i 2 minutter ved $15\,000 \times g$.	<ul style="list-style-type: none"> Plasser for eksempel røret i mikrosentrifugen slik at hengseldelen på hetten vender bort fra rotorens midtdel. Det er da enkelt å finne pelleten (selv om den er så liten at den er vanskelig å se) - den vil være i tuppen av røret under hengslet.
11. Fjern forsiktig supernatanten med en pipettespiss og kast den. Pass på at du ikke forstyrrer DNA-pelleten.	<ul style="list-style-type: none"> Denne pelleten inneholder DNA. Tap av pellet betyr tap av DNA. Hvis du dreier røret slik at pelleten er på den øvre veggen, kan du føre en pipettespiss trygt langs den nedre veggen og fjerne hele supernatanten. Supernatanten kan inneholde urenheter. Det er derfor viktig å fjerne så mye som mulig av den. Dersom pelleten tørker for mye, kan det være vanskeligere å løse opp DNA-et.
12. Etanolvask: Tilsett forsiktig 250 μL 70 %-etanol. La stå i romtemperatur i 1 minutt. Fjern all etanolen uten å forstyrre pelleten.	<ul style="list-style-type: none"> Det er viktig å fjerne all etanolen fra prøven. Overføring av etanol kan påvirke analysen. Pass på at du ikke forstyrrer DNA-pelleten. DNA-pelleten kan være liten. Hvis pelleten faller fra hverandre, kan du sentrifugere prøven i 5 minutter ved $15\,000 \times g$. Etter fjerning av 70 %-etanol, kan røret sentrifugeres for å fjerne resterende etanol.

Rensetrinn	Merknader
13. Tilsett 100 µL TE-løsning (se side 1) for å løse opp DNA-pelletten. Rist på en vortex-mikser i minst 5 sekunder.	<ul style="list-style-type: none"> Hvis du vil ha en høyere konsentrasjon av DNA, bruker du 50 µL TE-løsning. Merk: Det kan ta lang tid å hydratisere (løse opp) store mengder DNA med høy molekylær vekt fullstendig. Ufullstendig hydratisering av DNA kan forårsake unøyaktigheter ved bestemmelse av DNA-konsentrasjon og feil ved etterfølgende analyser, for eksempel PCR.
14. For å sikre fullstendig rehydratisering av DNA-et (pellet og smear) inkuber ved romtemperatur over natten og rist på en vortex-mikser, eller inkuber ved 50 °C i 1 time og rist på en vortex-mikser innimellom.	<ul style="list-style-type: none"> Ufullstendig rehydratisering av DNA kan forårsake unøyaktigheter ved bestemmelse av DNA-konsentrasjon og feil ved etterfølgende analyser, for eksempel PCR.
15. Oppbevaring av fullstendig rehydratisert DNA: <ul style="list-style-type: none"> a) I alikvoter i TE ved -20 °C for langtidslagring (anbefales). b) I TE ved 4 °C i opptil 2 måneder. 	<ul style="list-style-type: none"> Frysing av rensed DNA i TE vil medføre at DNA utfelles. Påse at DNA-et er fullstendig rehydratisert (jamfør trinn 14) ved tining av en frosset prøve med rensed DNA.

Kvantifisering av DNA

Med fluorescensmetoden

Analyser med fluorescerende farger er mer spesifikke enn måling av absorbans ved 260 nm for å bestemme mengden av dobbeltrådet DNA (dsDNA) i en DNA-prøve. Vi anbefaler å bruke fluorescerende farger som PicoGreen® eller SYBR® Green I til å kvantifisere dsDNA ettersom dette gir mindre forstyrrelser på grunn av kontaminerende RNA. En prisgunstig protokoll med SYBR Green I er beskrevet i PD-PR-075, *DNA quantification using SYBR Green I Dye and a micro-plate reader*¹. Alminnelig tilgjengelige sett som Invitrogens Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (kat.nr. Q-33130) kan også brukes. For begge protokollene anbefaler vi at det rensede DNA-et fortynnes 1:50 med TE-løsning, og at det brukes 5 µL i kvantifiseringsanalysen.

Med absorbansmetoden

Hvis du velger å kvantifisere DNA ved hjelp av absorbansmetoden, anbefaler vi at du først behandler den rensede prøven med RNase for å løse opp kontaminerende RNA og deretter fjerne RNA-fragmentene ved hjelp av etanolfelling av DNA-et. En detaljert protokoll er beskrevet i PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*². Merk at DNA fra en oral prøve vanligvis inneholder betydelig mer RNA enn en blodprøve. Påse at alkoholutfelt DNA er fullstendig oppløst før du leser av absorbansen.

Omregningsfaktor: En absorbans på 1,0 ved 260 nm tilsvarer en konsentrasjon på 50 ng/µL (50 µg/mL) for rent dsDNA.

Kontroller at absorbansverdiene er innenfor det lineære området til spektrofotometeret. Prøver som faller utenfor det lineære området, fortynnes og måles på nytt. Du finner mer informasjon i dokumentene som følger med instrumentet.

Metode:

1. Fortynn en alikvot på 10 µL av rensset RNase-behandlet DNA med 90 µL TE (1/10 løsning). Bland ved å pipettere forsiktig opp og ned. Vent til luftboblene er forsvunnet.
2. Bruk TE i referansebrønnen (klar).
3. Mål absorbansen ved 320, 280 og 260 nm.
4. Beregn korrigererte A_{280} - og A_{260} -verdier ved å trekke absorbansen ved 320 nm (A_{320}) fra A_{280} - og A_{260} -verdiene.
5. DNA-konsentrasjon i ng/µL = korrigert $A_{260} \times 10$ (fortynningsfaktor) $\times 50$ (omregningsfaktor).
6. Forhold mellom A_{260} og A_{280} : Divider korrigert A_{260} med korrigert A_{280} .

Eksempel

1. Anta at målt $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ og $A_{260} = 0,295$.
2. DNA-konsentrasjonen til den ufortynnede prøven vil være:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [fortynningsfaktor] $\times 50$ [omregningsfaktor]
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$
 $= 0,270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng/}\mu\text{L}$ eller $135 \text{ }\mu\text{g/mL}$
3. Det korrigererte forholdet mellom A_{260} og A_{280} vil være:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0,296 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$
 $= 0,270 \div 0,150$
 $= 1,80$

Referanser

- ¹ DNA quantification using the Fluorescence/DNase (F/D) assay. Erstattet med DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader. DNA Genotek. PD-PR-075.
- ² RNA removal by double-RNase digestion. DNA Genotek. PD-PR-040.

Teknisk støtte fås fra mandag til fredag (09.00 til 17.00 EST):

- gratis (Nord-Amerika): 1.866.813.6354, valg 6
- alle andre land: 613.723.5757, valg 6
- e-post: support@dnagenotek.com

Oragene®-DNA og ORAclect®-DNA selges ikke i USA.

Oragene®-DISCOVER er kun for bruk i forskning og må ikke brukes i diagnostiske prosedyrer.

Enkelte DNA Genotek-produkter er ikke tilgjengelige i alle geografiske områder.

*Oragene, preplT og ORAclect er registrerte varemerker som tilhører DNA Genotek Inc. Alle andre varemerker og navn i dette dokumentet tilhører sine respektive eiere.

Du finner alle våre protokoller, rapporter og informasjonsblader under fanen Support på nettstedet vårt, www.dnagenotek.com.

Hurtigveiledning:

Laboratorieprotokoll for manuell rensing av DNA fra 0,5 mL prøve

Rensetrinn
1. Bland prøven i DNA Genotek-settet ved å vende og riste den forsiktig i noen sekunder.
2. Inkuber prøven ved 50 °C i en vanninkubator i minst 1 time eller i en luftinkubator i minst 2 timer.
3. Overfør 500 µL av prøven til et mikrosentrifugerør.
4. Tilsett 20 µL PT-L2P og bland på en vortex-mikser i noen sekunder.
5. Inkuber på is i 10 minutter.
6. Sentrifuger ved romtemperatur (RT) i 5 minutter ved 15 000 × g.
7. Overfør forsiktig størstedelen av den klare supernatanten til et nytt mikrosentrifugerør med en pipette. Kast pelleten.
8. Tilsett 600 µL romtemperert 95-100 %-etanol i den klare supernatanten. Bland forsiktig ved å vende 10 ganger.
9. La prøven stå ved RT i 10 minutter for at DNA-et skal felles fullstendig ut.
10. Plasser røret i sentrifugen i en kjent posisjon. Sentrifuger ved RT i 2 minutter ved 15 000 × g.
11. Pipetter forsiktig opp supernatanten og kast den. Pass på at du ikke forstyrrer DNA-pelleten.
12. Tilsett 250 µL 70 %-etanol og la stå ved RT i 1 minutt. Fjern all etanolen uten å forstyrre pelleten.
13. Tilsett 100 µL TE-løsning og rist prøven på en vortex-mikser i minst 5 sekunder.
14. Inkuber over natten ved RT, eller inkuber ved 50 °C i 1 time og rist på en vortex-mikser innimellom.
15. Lagring: I alikvoter ved -20 °C for langtidslagring (anbefales) eller ved 4 °C i opptil 2 måneder.