

Instrukcja

CiTi Converter DNA Methylation Kit

Zestaw do przeprowadzania konwersji i przygotowania DNA do badań metylacji.

numer katalogowy	wielkość
027-50	50 reakcji
027-250	250 reakcji

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Guarantee

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu.

Spis treści

Zalety	3
Opis	3
Skład	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	3
Ważne informacje	4
Przygotowanie odczynnika C/T do konwersji	4
Protokół konwersji DNA	4
Protokół oczyszczania DNA po konwersji	5
Najczęściej zadawane pytania	6
Informacje bezpieczeństwa	7

Zalety

- Wydajna konwersja DNA bogatego w pary GC.
- Otrzymanie ultraczystego DNA gotowego do analizy metylacji.

Opis

CiTi Converter DNA Methylation Kit zawiera zestaw odczynników do przeprowadzenia konwersji bisulfidowej oraz oczyszczania DNA po konwersji. Zestaw został tak zaprojektowany, aby zminimalizować degradację matrycy podawanej konwersji. Zapewnia całkowitą konwersję niemetylowanych reszt cytozyny przy minimalnej utracie DNA na etapie konwersji i oczyszczania.

Skład

składnik	027-50		027-250		przechowywanie
	ilość	nr kat.	ilość	nr kat.	
mikrokolumny z probówkami 2 ml	50 szt.	K-CT-50	250 szt.	K-CT-250	15–25 °C
C/T odczynnik do konwersji	5 szt.	K-C/T-1	25 szt.	K-C/T-1	15–25 °C
D roztwór do rozcieńczania	1.5 ml	K-D-15A	8 ml	K-D-8	15–25 °C
G roztwór wiążący	35 ml	K-G-35	165 ml	K-G-165	15–25 °C
A1 roztwór płuczący	30 ml	K-A1-30	150 ml	K-A1-150	15–25 °C
DS roztwór do desulfonowania	12 ml	K-DS-12	60 ml	K-DS-60	15–25 °C
bufor Tris	2 ml	K-TRIS-2	10 ml	K-TRIS-10	15–25 °C
woda ultraczysta	8 ml	K-WUP-8	40 ml	K-WUP-40	-20–25 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

- sterylne probówki Eppendorf 1,5 ml
- vortex
- mikrowirówka
- termoblok lub termocykler

Ważne informacje

- Odczynnik **C/T** do konwersji jest dostarczony w zestawie w formie substancji stałej (proszku) w ciemnej probówce i jest odczynnikiem wrażliwym na światło! W celu uzyskania najlepszych wyników zaleca się stosowanie odczynnika **C/T** do konwersji bezpośrednio po jego przygotowaniu.

Przygotowanie odczynnika C/T do konwersji

- Do ciemnej probówki zawierającej odczynnik **C/T** dodać **750 µl** wody ultraczystej oraz **210 µl** roztworu **D** do rozcieńczania.

- Wymieszać całość przez worteksowanie lub ciągłe mieszanie przez **10 min** w temp. pokojowej.

Informacja. Każda probówka odczynnika **C/T** umożliwia przeprowadzenie 10 reakcji konwersji DNA.

Informacja. Gotowy odczynnik **C/T** do konwersji może być przechowywany: przez noc w temp. pokojowej, do tygodnia w temp. +4 °C, do miesiąca w temp. -20 °C.

Protokół konwersji DNA

Zestaw umożliwia przeprowadzenie analiz na próbkach zawierających DNA w ilości **500 pg-2 µg**. Optymalna zalecana ilość DNA w próbce **200-500 ng**.

- Do próbek DNA dodać wodę ultraczystą do uzyskania objętości **50 µl**.
Dodać **100 µl** roztworu odczynnika **C/T** do konwersji. Dokładnie wymieszać przez pipetowanie.,

Uwaga. Nie worteksować!

- Inkubować próbki bez dostępu światła przez **10 min** w temperaturze **98 °C** a następnie **2,5 h** w **64 °C**.

- Schłodzić próbki przez **10 min** w lodzie (**0-4 °C**).

Informacja. Próbkki mogą być przechowywane w temp. 4 °C do 20 godzin.

Protokół oczyszczania DNA po konwersji

1. Do próbek dodać **600 µl** roztworu wiążącego **G**.
Wymieszać przez pipetowanie lub kilkakrotne odwracanie próbek.
2. Całość nanieść na **mikrokolumny**.
Zamknąć wieczka.
3. Wirować **30-60 s** przy **10 000-15 000 RPM** ($\geq 10\,000 \times g$).
4. Wyjąć mikrokolumny z próbek, wylać przesącz i ponownie włożyć mikrokolumny do **tych samych** próbek.
5. Nanieść na mikrokolumny po **100 µl** roztworu płuczącego **A1**.
Zamknąć wieczka.
6. Wirować przez **30-60 s** przy **10 000-15 000 RPM** ($\geq 10\,000 \times g$).
7. Nanieść na mikrokolumny po **200 µl** roztworu do desulfonowania **DS**.
Inkubować **10 min** w **temp. pokojowej**.
8. Wirować przez **30-60 s** przy **10 000-15 000 RPM** ($\geq 10\,000 \times g$).
9. Wyjąć mikrokolumny z próbek, wylać przesącz i ponownie włożyć mikrokolumny do **tych samych** próbek.
10. Nanieść na mikrokolumny po **200 µl** roztworu płuczącego **A1**.
Zamknąć wieczka.
11. Wirować przez **30-60 s** przy **10 000-15 000 RPM** ($\geq 10\,000 \times g$).
12. Nanieść na mikrokolumny po **200 µl** roztworu płuczącego **A1**.
Zamknąć wieczka.
13. Wirować **2 min** przy **10 000-15 000 RPM** ($\geq 10\,000 \times g$).
14. **Uwaga.** W momencie dodawania buforu elucyjnego należy zwrócić uwagę, aby płyn całkowicie pokrył złożę. Powinno się go dodawać na środek mikrokolumny. Jeżeli część płynu elucyjnego pozostanie na ściankach mikrokolumny, to elucja będzie mniej wydajna.

Osuszone mikrokolumny umieścić w sterylnych probówkach **1,5 ml** (nie ma w zestawie).
Na złożę znajdującego się na dnie mikrokolumn nanieść od **15 do 30 µl** buforu **Tris** lub wody ultraczystej.
Zamknąć wieczka.

15. Inkubować mikrokolumny **3 min** w **temp. pokojowej**.

16. Wirować **1 min** przy **10 000-15 000 RPM** ($\geq 10\,000 \times g$).

17. Usunąć mikrokolumny.

Informacja. Oczyszczone i zmodyfikowane DNA znajdujące się w probówkach przechowywać w zakresie temp. +4 °C do +8 °C do czasu dalszych analiz.

Najczęściej zadawane pytania

Pytanie: Jaka ilość DNA potrzebna jest do wydajnej konwersji DNA?

Odpowiedź: Optymalna ilość DNA na próbkę powinna zawierać się w granicach 200-500 ng. Zestaw CiTi Converter Methylation Kit umożliwia przeprowadzenie analizy na próbkach zawierających DNA w ilości od 500 pg do 2 µg.

Pytanie: Jaka jest wydajność chemicznej konwersji DNA dzięki zastosowaniu zestawu CiTi Converter Methylation Kit?

Odpowiedź: Ponad 99% niemetylowanych reszt cytozyny [C] ulega konwersji do reszty uracylu [U], przy jednoczesnej >99% ochronie metylowanych reszt cytozyny.

Pytanie: Jaka jest wydajność oczyszczania DNA po konwersji?

Odpowiedź: Zestaw CiTi Converter Methylation Kit umożliwia odzysk skonwertowanego DNA ze średnią wydajnością ok. 80%.

Pytanie: Jaka polimeraza DNA jest zalecana do amplifikacji skonwertowanego DNA?

Odpowiedź: Zalecamy produkt A&A Biotechnology: Sensitive RT HS-PCR Mix EvaGreen® ([nr kat. 2017-100GM, 2017-1000GM](#)).

Informacje Bezpieczeństwa



NIEBEZPIECZEŃSTWO

A1 roztwór płuczący

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania par.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



UWAGA

C/T odczynnik do konwersji

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 P201 Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
 P264 Dokładnie umyć ciało po użyciu.
 P270 Nie jeść, nie pić i nie palić podczas używania produktu.
 P280 Stosować ochronę oczu / ochronę twarzy.
 P301+P312 W przypadku połknięcia: W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc / lekarzem.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
 P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: Zasięgnąć porady / zgłosić się pod opiekę lekarza.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

D roztwór do rozcieńczania

H290 Może powodować korozję metali.
 H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.
 P260 Nie wdychać pyłu.
 P280 Stosować rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / ochronę twarzy.
 P303+P361+P353 W przypadku kontaktu ze skórą (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody.
 P304+P340+P310 W przypadku wdychania: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. Natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
 P310 Natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.

DS roztwór do desulfonowania



NIEBEZPIECZEŃSTWO

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H290 Może powodować korozję metali.
 H314+H319 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania pyłu.
 P280 Stosować rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / ochronę twarzy.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
 P310 Natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.



UWAGA

G roztwór wiążący

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.
 H315 Działa drażniąco na skórę.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

