



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

CiT_i Converter MSP PCR Kit

Zestaw CiTi Converter MSP PCR (methylation-specific) umożliwiający uzyskanie produktów PCR o bardzo wysokiej specyficzności, przeznaczonych do badań i dyskryminacji metylowanej oraz niemetylowanej cytozyny.

wersja 0224

100 reakcji w 50 µl

Nr kat. 1080-100

Zaleca się użycie zestawu CiTi Converter MSP PCR Kit dla matryc DNA po konwersji z użyciem zestawu [CiTi Converter DNA Methylation Kit](#) (nr kat. 027-50, 027-250).

Skład zestawu

Składnik	Ilość
2x CiTi MSP PCR Mix	2 x 1250 µl
CiTi HotStart polimeraza DNA MgCl ₂ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) Tris-HCl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ stabilizatory reakcji PCR	
Woda jałowa (wolna od nukleaz, traktowana DEPC)	2 x 1500 µl

Przechowywać w temp. -20 °C

Mieszaninę można zamrażać i rozmrażać do pięciu razy bez utraty aktywności enzymu i efektywności amplifikacji DNA.

Materiały które nie wchodzą w skład zestawu

1. Matryca DNA
2. Startery

UWAGA:

Przed przystąpieniem do pracy zalecamy oczyszczenie powierzchni roboczej używając produktu LabZAP™ (nr kat. 040-500)

Zestaw przeznaczony wyłącznie do badań naukowo-badawczych.

Firma A&A Biotechnology udziela rocznej gwarancji na niniejszy zestaw. Firma nie gwarantuje poprawnego działania zestawu w wypadku:

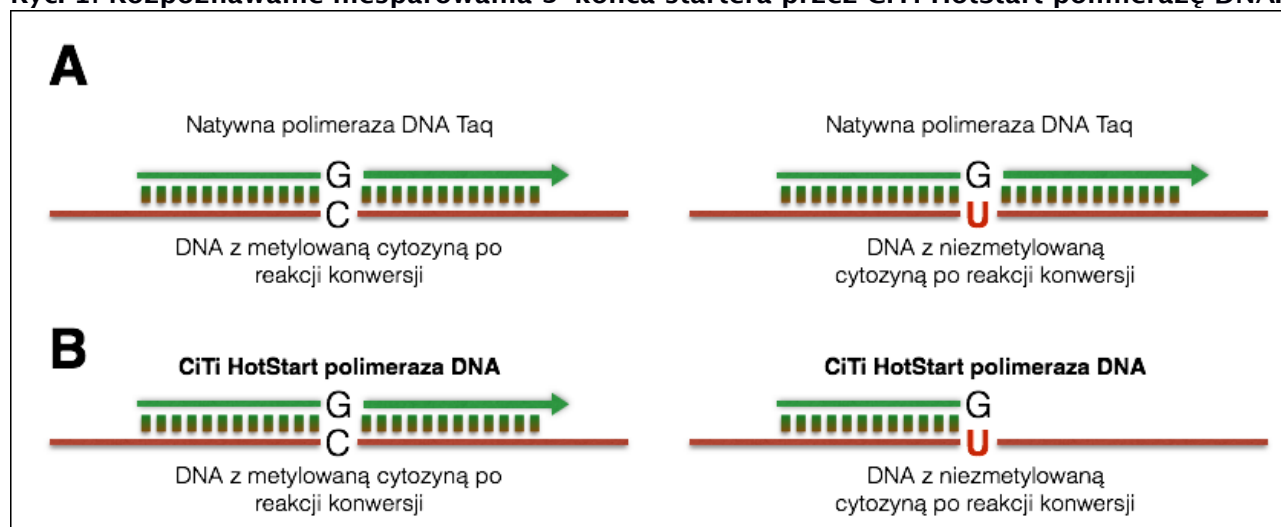
- odstępstwa od dostarczonego wraz z zestawem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład zestawu
- użycia przeterminowanych odczynników

Opis

MSP PCR (methylation-specific) pozwala na uzyskanie produktów PCR z niezwykłą specyficznością w celu badań i dyskryminacji metylowanej oraz niemetylowanej cytozyny w sekwencjach CpG na bazie matrycowego DNA po chemicznej konwersji niemetylowanej cytozyny do uracylu.

CiTi HotStart polimeraza DNA jest zmodyfikowaną polimerazą *Taq*. Modyfikacja ta nie pozwala na wydłużenie startera zawierającego na 3' końcu pojedynczy niekomplementarny do matrycowego DNA nukleotyd (Ryc. 1). Pozwala to na uniknięcie amplifikacji niespecyficznych fragmentów DNA. W efekcie zaprojektowanie odpowiednich specyficznych starterów jest prostsze i pozwala na uzyskanie właściwych produktów amplifikacji w badaniach nad metylacją DNA. Dzięki blokadzie chemicznej, CiTi HotStart polimeraza DNA jest nieaktywna w temp. pokojowej w trakcie nastawiania reakcji PCR, co nie dopuszcza do niespecyficznego wydłużania częściowo komplementarnych do siebie starterów. CiTi HotStart polimeraza DNA jest w pełni aktywowana w 95 °C w trakcie wstępnej denaturacji matrycowego DNA w przeciągu 10 min.

Ryc. 1. Rozpoznawanie niesparowania 3' końca startera przez CiTi HotStart polimerazę DNA.



Jeśli starter zakończony będzie na 3' końcu guaniną, to łącząc się z matrycą po konwersji, gdzie metylowana cytozyna ulega konwersji do uracylu, będzie posiadał niesparowany koniec 3' z matrycą. Natywna polimeraza DNA *Taq* wydłuża efektywnie tego typu strukturę (A), co prowadzi do powstawania produktów niespecyficznych. CiTi HotStart polimeraza DNA dzięki wprowadzonej modyfikacji nie potrafi efektywnie wydłużać startera, którego niesparowany koniec 3' nie pasuje do matrycy (B). W efekcie prowadzi to do powstawania jedynie specyficznych produktów PCR.

Mieszanina 2x CiTi MSP PCR Mix jest dwukrotnie stężona i zawiera wszystkie składniki potrzebne do przeprowadzenia reakcji PCR z wyjątkiem matrycowego DNA oraz starterów. Zawiera optymalne stężenie jonów soli oraz magnezu, dlatego w wypadku optymalizacji reakcji PCR należy jedynie wstępnie optymalizować warunki reakcji przez: ilość dodawanej matrycy, stężenia starterów oraz modyfikację profilu temperaturowo-czasowego reakcji PCR.

Protokół nastawienia reakcji PCR z użyciem CiTi Converter MSP PCR Kit

Przed rozpoczęciem nastawienia reakcji należy:

1. Zaleca się użycie matrycowego DNA po konwersji z użyciem zestawu **CiTi Converter DNA Methylation Kit** (nie ma w zestawie, nr kat. 027-50, 027-250).
2. Należy pamiętać, że CiTi HotStart polimeraza DNA wymaga aktywacji w 95 °C w ciągu 10 min, co trzeba uwzględnić w profilu temperaturowo-czasowym reakcji PCR.
3. Mieszanina CiTi MSP PCR zawiera optymalne stężenie jonów Mg^{2+} co daje dobre wyniki amplifikacji DNA. Jednak jeśli DNA jest zawieszone w buforach zawierających EDTA (np. bufor TE), należy liczyć się z potrzebą uzupełnienia jonów Mg^{2+} i dodatkiem roztworu np. 25 mM $MgCl_2$ do końcowego stężenia 2,5 mM.
4. W celu uniknięcia kontaminacji, należy nastawiać reakcję PCR w miejscu oddzielnym od przestrzeni laboratoryjnej, w której analizowane są produkty reakcji PCR. Dodatkowo zaleca się używanie pipet z końcówkami zawierającymi filtry.

Nastawienie reakcji z użyciem CiTi Converter MSP PCR Kit:

1. Rozmrozić 2x CiTi MSP PCR Mix, wodę jałową oraz startery i matrycowe DNA.
2. Wymieszać wszystkie roztwory przez worteksowanie, następnie w razie konieczności krótko zwirować i rozporcjować do probówek PCR (tabela nr 1).

składnik	ilość
2x CiTi MSP PCR Mix	25 µl
Starter A	x µl (stężenie końcowe 0,3–0,4 µM)
Starter B	x µl (stężenie końcowe 0,3–0,4 µM)
Matryca DNA	x µl (> 3 ng na reakcję)
Woda jałowa	dopełnić do końcowej objętości 50 µl

Tab. 1. Składniki reakcji z użyciem CiTi Converter MSP PCR Kit.

3. W wypadku użycia termocyklera bez pokrywy grzejnej, należy dodać do probówki około 50 µl oleju mineralnego w celu przeciwdziałania parowaniu wody z mieszaniny reakcyjnej.
4. Po wymieszaniu składników, próbki odwirować.
5. Zaprogramować termocykler według zaleceń producenta, według następującego przykładowego profilu temperaturowo-czasowego (tabela nr 2).

krok reakcji	profil	opis
Wstępna denaturacja	95 °C – 10 min	Następuje aktywacja CiTi HotStart polimerazy DNA i denaturacja matrycowego DNA
Zasadnicza reakcja 3 – kroki Ilość cykli 35–40	95 °C – 15 s	Okolo 5–8 °C poniżej wyliczonej temperatury przyłączania starterów Dla produktów powyżej 500 pz należy stosować czas wydłużania 1 min
	50–55 °C – 30 s 72 °C – 30 s	
Końcowe wydłużanie	72 °C – 5 min	
Schłodzenie reakcji	10 °C	

Tab. 2. Przykładowy profil temperaturowo-czasowy reakcji dla CiTi Converter MSP PCR Kit.

6. Po zakończeniu reakcji, produkt PCR należy przechowywać w temp 4–8 °C lub w temp. –20 °C w wypadku długich okresów przechowywania.

Informacje bezpieczeństwa

Żaden ze składników tego zestawu nie jest niebezpieczny

Notatki:

