

Instrukcja

Sensitive CiTi Mix EvaGreen®

Gotowa dwukrotnie stężona mieszanina o podwyższonej czułości do real-time w technice hot-start PCR z EvaGreen®. Zoptymalizowana do analiz epigenetycznych techniką HRM.

numer katalogowy	wielkość
2017CT-200	200 reakcji w 20 µl

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

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

EvaGreen® jest zarejestrowanym znakiem towarowym Biotium Inc.

Spis treści

Opis	3
Skład	4
Skład mieszaniny Sensitive CiTi Mix EvaGreen®	4
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	4
Ważne informacje	4
Proponowany protokół reakcji PCR	5
Zalecane mieszaniny ROX	6

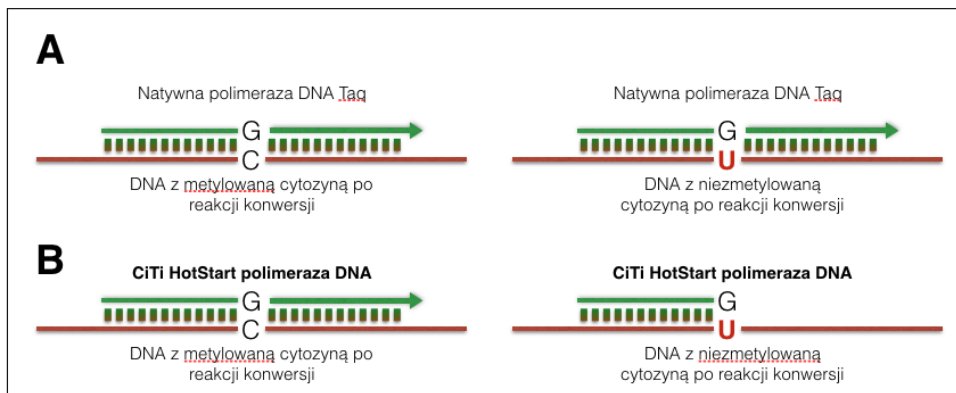
Opis

Sensitive CiTi Mix EvaGreen® jest gotową, dwukrotnie stężoną mieszaniną o podwyższonej czułości do real-time w technice Hot-Start PCR. Mieszanina została zoptymalizowana do analiz epigenetycznych przeprowadzanych techniką HRM. **Sensitive CiTi Mix EvaGreen®** zawiera wszystkie składniki niezbędne do przeprowadzenia reakcji qPCR, poza matrycą DNA i starterami.

HRM PCR (ang. *high resolution melt PCR*) to odmiana reakcji real-time PCR, służąca do analizy wariantów genetycznych oraz epigenetycznych za pomocą niewielkich różnic we wzorze krzywej topnienia produktów PCR.

MSP PCR (ang. *methylation-specific PCR*) 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*, blokową chemicznie. 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 zapobiega niespecyficznemu wydłużaniu 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 niekomplementarnego 3' końca startera przez CiTi HotStart polimerazę DNA.

Jeśli starter zakończony będzie na 3' końcu guaniną, to łącząc się z matrycą po konwersji, gdzie niemetylowana cytozyna ulega konwersji do uracylu, będzie posiadał niesparowany z matrycą koniec 3'. 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 wyłącznie specyficznych produktów PCR.

Skład

	2017CT-200	przechowywanie
Sensitive CiTi Mix EvaGreen®	2 x 1 ml	-20 °C, chronić przed światłem
woda ultraczysta	2 x 1,5 ml	-20–25 °C

Skład mieszaniny Sensitive CiTi Mix EvaGreen®

składnik	ilość
CiTi HotStart polimeraza DNA	0,1 U/μl
MgCl ₂	4 mM
dNTPs	0,5 mM każdego z dNTP
2x bufor reakcyjny z EvaGreen®	

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

- MagnifiQ™ 16 CiTi Converter DNA Methylation instant kit ([nr kat. 027A-16U-64](#)); MagnifiQ™ CiTi Converter DNA Methylation kit ([nr kat. 027MB-50](#)); CiTi Converter DNA Methylation Kit ([nr kat. 027-50](#))
- wortex
- mikrowirówka
- termocykler

Ważne informacje

- Przed użyciem wszystkie składniki należy całkowicie rozmrozić w lodzie, delikatnie zworteksować i krótko zwirować.
- Cykliczne, 3-krotne rozmrażanie i zamrażanie nie wpływa na wydajność i aktywność produktu.

Proponowany protokół reakcji PCR

1. W reakcji zaleca się użycie DNA poddanego konwersji przy użyciu zestawu A&A Biotechnology:
 - MagnifiQ™ 16 CiTi Converter DNA Methylation instant kit ([nr kat. 027A-16U-64](#))
 - MagnifiQ™ CiTi Converter DNA Methylation kit ([nr kat. 027MB-50](#))
 - CiTi Converter DNA Methylation Kit ([nr kat. 027-50](#))
2. Rozmrozić składniki zestawu w lodzie, a następnie delikatnie zworteksować, krótko zwirować i wstawić ponownie do lodu.
3. Umieścić probówki reakcyjne PCR w lodzie i dodać kolejno:

składnik	objętość reakcji PCR	
	10 µl	20 µl
Sensitive CiTi Mix EvaGreen®	5 µl	10 µl
starter 1**	0,1-1 µM*	0,1-1 µM*
starter 2**	0,1-1 µM*	0,1-1 µM*
matryca DNA	3 ng-1 µg	3 ng-1 µg
woda ultraczysta	do 10 µl	do 20 µl

* zalecane dla standardowego qPCR

** końcowe stężenie w mieszaninie reakcyjnej

4. Mieszaninę reakcyjną delikatnie zworteksować i krótko zwirować.
5. Probówki umieścić w termocyklerze i uruchomić program. Proponowany profil PCR:

etap	temperatura	czas
wstępna denaturacja	95 °C	10 min
25-45 cykli	95 °C	15 - 30 s
	50 - 68 °C	30 - 60 s
	72 °C	15 - 60 s*

* w zależności od długości produktu PCR

Zalecana jest analiza temperatury topnienia produktu PCR.

Zalecane mieszaniny ROX

HiROX (0,6-1 μ l na 50 μ l całkowitej objętości reakcji): Applied Biosystems: 7000, 7300, 7700, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus.

LoROX (0,6-1 μ l na 50 μ l całkowitej objętości reakcji): Applied Biosystems 7500, Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000P.



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

