



**A&A BIOTECHNOLOGY**  
innovating life science

# CiTi Converter DNA Methylation Kit

Zestaw do przeprowadzania konwersji i przygotowania DNA  
do badań metylacji.

wersja 0517

50 reakcji, 250 reakcji

Nr kat. 027-50, 027-250

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

## Skład zestawu

Składnik	50 reakcji	250 reakcji	Temp. Przechowywania
Mikrokolumny wraz z probówkami 2 ml	50 szt.	250 szt.	Temp. Pok.
Probówki elucyjne 1,5 ml	50 szt.	250 szt.	Temp. Pok.
C/T odczynnik do konwersji	5 szt.	25 szt.	Temp. Pok.
D roztwór do rozcieńczania	1,5 ml	8 ml	Temp. Pok.
A1 roztwór płuczący	30 ml	150 ml	Temp. Pok.
G roztwór wiążący	20 ml	100 ml	Temp. Pok.
DS roztwór do desulfonowania	12 ml	60 ml	Temp. Pok.
Bufor elucyjny	2 ml	10 ml	Temp. Pok.
Woda jałowa (wolna od nukleaz, traktowana DEPC)	8 ml	40 ml	od -20 °C do +20 °C

## Wyposażenie i materiały niezbędne do przygotowania DNA w badaniach metylacji, które nie wchodzi w skład zestawu

1. Próby DNA
2. Mikrowirówka
3. Wortex – opcjonalnie
4. Lód do inkubacji próbek

### UWAGA:

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

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

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

## Przygotowanie odczynnika C/T do konwersji

1. Do ciemnej próbki zawierającej odczynnik C/T do konwersji dodać po:  
750  $\mu\text{l}$  wody jałowej,  
210  $\mu\text{l}$  roztworu D do rozcieńczania.

Uwaga:

odczynnik C/T do konwersji jest dostarczony w zestawie w formie substancji stałej (proszku) w ciemnej próbce i jest odczynnikiem wrażliwym na światło!

W celu uzyskania najlepszych wyników zaleca się stosowanie odczynnika C/T do konwersji C/T bezpośrednio po jego przygotowaniu.

2. Następnie wymieszać całość przez worteksowanie lub ciągłe mieszanie przez 10 min w temp. pokojowej.
3. 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

1. Do próbek DNA dodać po 5  $\mu\text{l}$  roztworu D do rozcieńczania, a następnie uzupełnić objętość próbek do 50  $\mu\text{l}$  wodą jałową. Całość wymieszać przez pipetowanie.

Zestaw umożliwia przeprowadzenie analiz na próbkach zawierających DNA w ilości 500 pg–2  $\mu\text{g}$ . Optymalna zalecana ilość DNA w próbce 200–500 ng.

np. do 20  $\mu\text{l}$  próbki DNA dodać po 5  $\mu\text{l}$  roztworu D do rozcieńczania, a następnie po 25  $\mu\text{l}$  wody jałowej.

2. Inkubować 15 min w temp. 37 °C.
3. Po inkubacji dodać po 100  $\mu\text{l}$  roztworu odczynnika C/T do konwersji i dokładnie wymieszać przez pipetowanie.

Nie worteksować !

4. Inkubować próbki bez dostępu światła 12–16 godzin w temp. 50 °C.

5. Inkubować próbki przez 10 min na lodzie (temp. 0–4 °C).
6. Po inkubacji dodać do próbek po 400 µl roztworu wiążącego G. Następnie wymieszać próbki przez pipetowanie lub kilkakrotne odwracanie probówek.
7. Całość nanieść na mikrokolumny. Zamknąć wieczka.
8. Wirować 30–60 s przy 10–15 000 RPM ( $\geq 10\ 000 \times g$ ).
9. Wyjąć mikrokolumny z probówek, wylać przesącz i ponownie włożyć mikrokolumny do tych samych probówek.
10. Nanieść na mikrokolumny po 100 µl roztworu płuczającego A1. Zamknąć wieczka.
11. Wirować 30–60 s przy 10–15 000 RPM ( $\geq 10\ 000 \times g$ ).
12. Nanieść na mikrokolumny po 200 µl roztworu do desulfonowania DS. Inkubować mikrokolumny 10 min w temp. pokojowej.
13. Wirować 30–60 s przy 10–15 000 RPM ( $\geq 10\ 000 \times g$ ).
14. Wyjąć mikrokolumny z probówek, wylać przesącz i ponownie włożyć mikrokolumny do tych samych probówek.
15. Nanieść na mikrokolumny po 200 µl roztworu płuczającego A1. Zamknąć wieczka.
16. Wirować 30–60 s przy 10–15 000 RPM ( $\geq 10\ 000 \times g$ ).
17. Ponownie nanieść na mikrokolumny po 200 µl roztworu płuczającego A1. Zamknąć wieczka.
18. Wirować 2 min przy 10–15 000 RPM ( $\geq 10\ 000 \times g$ ).

19. Osuszone mikrokolumny umieścić w probówkach elucyjnych 1,5 ml (w zestawie). Do złoza znajdującego się na dnie mikrokolumny dodać po 15–30  $\mu$ l buforu elucyjnego. Zamknąć wieczka.

W momencie dodawania buforu elucyjnego należy zwrócić uwagę, aby płyn całkowicie pokrył złoże. Powinno się go dodawać na środek mikrokolumny. Jeżeli część płynu elucyjnego pozostanie na ściankach mikrokolumny, to elucja będzie mniej wydajna.

Elucja w 30  $\mu$ l zalecana jest dla fragmentów o długości powyżej 2000 bp.

20. Inkubować mikrokolumny 3 min w temp. pokojowej.
21. Wirować 1 min przy 10 000–15 000 RPM ( $\geq 10\ 000 \times g$ ).
22. Mikrokolumny usunąć. Oczyszczone i zmodyfikowane DNA znajdujące się w probówkach przechowywać w zakresie temp. +4 °C do +8 °C do czasu dalszych analiz.

Probówka elucyjna połączona jest długim, elastycznym łącznikiem z wieczkiem. Zamykając probówkę po usunięciu kolumny należy zwrócić uwagę by zamykanie wieczka rozpocząć od strony łącznika. Kliknięcie świadczy o prawidłowym zamknięciu probówki. Inny sposób zamykania może spowodować samoczynne otwieranie probówki.

## Modyfikacja warunków konwersji – nr 1

W przypadku niskiej wydajności konwersji DNA zalecamy poniższe zmiany:

1. Do próbek DNA dodać po 5  $\mu$ l roztworu do rozcieńczania D, a następnie uzupełnić objętość próbek do 50  $\mu$ l wodą jałową. Całość wymieszać przez pipetowanie.

Zestaw umożliwia przeprowadzenie analiz na próbkach zawierających DNA w ilości 500 pg–2  $\mu$ g. Optymalna zalecana ilość DNA w próbce 200–500 ng.

np do 20  $\mu$ l próbki DNA dodać po 5  $\mu$ l roztworu D do rozcieńczania, a następnie po 25  $\mu$ l wody jałowej.

2. Inkubować próbki 30 min w temp. 42 °C.

Dalej postępować zgodnie z „Protokołem konwersji DNA” od pkt 3.

## Modyfikacja warunków konwersji – nr 2

W przypadku braku poprawy wydajności konwersji DNA po zastosowaniu protokołu „Modyfikacji warunków konwersji – nr 1” zalecamy poniższe zmiany:

### Przygotowanie odczynnika C/T do konwersji

1. Do ciemnej próbówki zawierającej odczynnik C/T do konwersji dodać po:  
750  $\mu\text{l}$  wody jałowej,  
185  $\mu\text{l}$  roztworu D do rozcieńczenia.

Uwaga:

odczynnik C/T do konwersji jest dostarczony w zestawie w formie substancji stałej (proszku) w ciemnej próbówce i jest odczynnikiem wrażliwym na światło!

W celu uzyskania najlepszych wyników zaleca się stosowanie odczynnika C/T do konwersji C/T bezpośrednio po jego przygotowaniu.

2. Następnie wymieszać całość przez worteksowanie lub ciągłe mieszanie przez 10 min w temp. pokojowej.
3. 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

1. Do próbek DNA dodać po 7,5  $\mu\text{l}$  roztworu D do rozcieńczenia, a następnie uzupełnić objętość próbek do 50  $\mu\text{l}$  wodą jałową. Całość wymieszać przez pipetowanie.

np. do 20  $\mu\text{l}$  próbki DNA dodać po 7,5  $\mu\text{l}$  roztworu D do rozcieńczenia, a następnie po 22,5  $\mu\text{l}$  wody jałowej.

2. Inkubować próbki 15 min w temp. 37 °C.
3. Po inkubacji dodać po 97,5  $\mu\text{l}$  roztworu odczynnika C/T do konwersji i dokładnie wymieszać przez pipetowanie.

Nie worteksować !

Dalej postępować zgodnie z „Protokołem konwersji DNA” od pkt 4.

## Informacje dodatkowe

- Jaka ilość DNA potrzebna jest do wydajnej konwersji DNA?

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.

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

Ponad 99% niezmetylowanych reszt cytozyny [C] ulega konwersji do reszty uracylu [U], przy jednoczesnej >99% ochronie zmetylowanych reszt cytozyny.

- Jaka jest wydajność oczyszczania DNA po konwersji?

Zestaw CiTi Converter Methylation Kit umożliwia odzysk analizowanego DNA ze średnią wydajnością ok. 80%.

- Jaka polimeraza DNA jest zalecana do amplifikacji skonwertowanego DNA?

Zalecamy dwa rodzaje gotowych mieszanin odczynników do wykonywania reakcji PCR, które są oferowane przez A&A Biotechnology:

A/ w przypadku matryc DNA z niską i średnią zawartością par GC zalecana jest mieszanina PCR Mix Plus (nr kat. 2005–100P, 2005–1000P),

B/ w przypadku matryc z dużą zawartością par GC zalecana jest mieszanina PCR Mix Plus HGC (nr kat. 2005–100G, 2005–1000G).

## Produkty powiązane

### Gotowe mieszaniny do reakcji PCR

Nazwa zestawu	Ilość	Nr kat.
PCR Mix	200 / 2000 reakcji w 25 µl	2005-100 2005-1000
PCR Mix Plus	200 / 2000 reakcji w 25 µl	2005-100P 2005-1000P
PCR Mix Plus HGC	200 / 2000 reakcji w 25 µl	2005-100G 2005-1000G
StartWarm HS-PCR Mix	200 / 2000 reakcji w 25 µl	2017-100 2017-1000

### Zestawy do oczyszczania fragmentów DNA po reakcjach enzymatycznych

Nazwa zestawu	Ilość	Nr kat.
Clean-Up	250 izolacji	021-250
	50 izolacji	021-50
Clean-Up Concentrator	250 izolacji	021-250C
	50 izolacji	021-50C
Clean-Up AX	50 izolacji	026-50
Clean-Up Maxi	10 izolacji	028-10

## 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

#### 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.