

BisQuick

Набор для бисульфитной модификации ДНК

Номер по каталогу: EG002

Инструкция по применению

Оглавление

1. Назначение	2
2. Преимущества набора	2
3. Состав набора	2
4. Хранение и транспортировка	2
5. Количество реакций	3
6. Принцип метода.....	3
7. Основные характеристики	4
8. Меры предосторожности	4
9. Необходимое оборудование и дополнительные материалы.....	5
10. Биологический материал.....	5
11. Протокол	6
Приложение.....	9

1. Назначение

Набор BisQuick предназначен для бисульфитной модификации ДНК, выделенной из различных образцов (включая ДНК из FFPE-блоков, тканей, культур клеток).

Модифицированная ДНК пригодна для определения сайтов и статуса метилирования с помощью ПЦР и секвенирования по методу Сэнгера.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

2. Преимущества набора

- Бисульфитная модификация в течение 30 минут, одновременное прохождение денатурации и конверсии ДНК.
- Модифицированная ДНК очищена на колонках.

3. Состав набора

Компонент	Объем/количество
Модифицирующий реагент	3 920 мг (8 x 490 мг)
Модифицирующий раствор	7 мл
Десульфонирующий раствор (концентрат)	6 мл
Связывающий раствор BQ	30 мл
Промывочный раствор (концентрат)	6 мл
Элюирующий раствор	3 мл (2 x 1.5 мл)
Колонки в комплекте с собирательными пробирками	50 шт.
Собирательные пробирки	100 шт. (2 x 50 шт.)

4. Условия хранения и транспортировки

Все компоненты набора хранятся и транспортируются при комнатной температуре в сухом, защищенном от света месте в упаковке производителя.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

5. Количество реакций

Набор рассчитан на модификацию от 8 до 48 образцов. Максимальное количество достигается при одновременной работе с количеством образцов, кратным 6.

Внимание! Каждая пробирка «Модифицирующего реагента» рассчитана для приготовления модифицирующей реакционной смеси в объеме, достаточном для одновременной обработки 6 образцов.

Модифицирующая реакционная смесь и 10М NaOH изготавливаются непосредственно перед их использованием и хранению не подлежат.

6. Принцип метода

Бисульфитная обработка ДНК представляет собой удобный метод модификации последовательности ДНК.

На первом этапе при нагревании ДНК в модифицирующей реакционной смеси происходит сульфонирование неметилированных остатков цитозина (С) с их последующим деаминированием и образованием сульфоната урацила. Метилированный цитозин (^МС) такой модификации не подвергается.

На втором этапе ДНК сорбируется на мембране колонки, где происходит реакция десульфонирования сульфоната урацила с образованием урацила (см. Рисунок 1). Последующие промывки эффективно удаляют оставшиеся на мембране компоненты модифицирующего и десульфонирующего буферов и другие ингибиторы ПЦР.

ДНК, полученная после бисульфитной модификации, представляет собой смесь одноцепочечных фрагментов, в которых цитозины заменены на урацил, а метилцитозины остались без изменений. Анализ модифицированной ДНК возможен методами ПЦР и секвенированием по Сэнгеру (см. Рисунок 2).

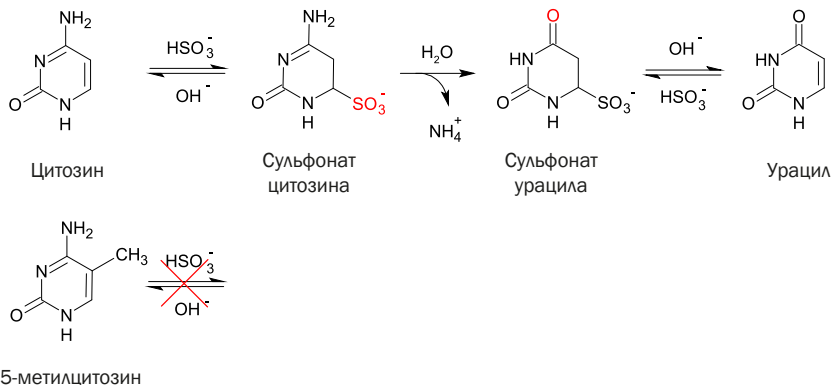


Рисунок 1 – схема бисульфитной модификации остатков цитозина в ДНК.

Исходная последовательность ДНК	5' C T A ^M G C C C A T ^M C G T T A C C 3'
Последовательность ДНК после бисульфитной обработки	5' U T A ^M C G U U A T ^M C G T T A U U 3'
Последовательность ДНК после бисульфитной обработки и ПЦР	3' A A T G C A A T A G C A A T A A 5' 5' T T A C G T T A T C G T T A T T 3'

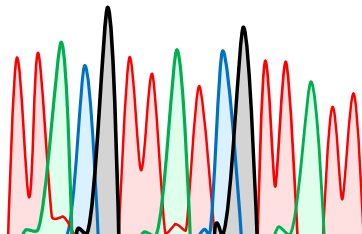


Рисунок 2 — результат секвенирования последовательности ДНК после бисульфитной модификации и ПЦР.

После бисульфитной модификации неметилированные остатки цитозина (C) заменяются на остатки урацила, а метилированные остатки цитозина (^MC) остаются без изменений.

В ходе ПЦР ДНК-полимераза распознает остатки урацила как тиминовые и в комплементарную цепь встраивает дезоксиаденозинмонофосфат (dAMP), а метилированный цитозин распознает как цитозин и в комплементарную цепь встраивает дезоксигуанозинмонофосфат (dGMP).

На хроматограмме синие пики будут соответствовать исходно метилированным цитозинам (остатки цитозина в ПЦР-продукте), а красные пики — неметилированным цитозинам и тиминам в исходной последовательности ДНК (остатки тимина в ПЦР-продукте).

7. Основные характеристики

Характеристика	Значение
Эффективность модификации ДНК	>99% цитозина конвертируется в урацил >99.9% метилированного цитозина не подвергается модификации
Предел обнаружения (минимальное количество ДНК)	50 нг

8. Меры предосторожности

Компоненты набора реагентов («Модифицирующий реагент», «Модифицирующий раствор» и «Десульфонирующий раствор») содержат вещества, требующие обеспечения специальных мер безопасности:

- Хранить в плотно закрытой таре.
- Не допускать проглатывания, попадания на слизистые и кожу.
- После нагревания «Модифицирующего реагента» не вдыхать пары.
- При попадании компонентов набора на кожу или слизистые оболочки место контакта следует промыть большим количеством воды.
- При работе необходимо использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами.

9. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

Необходимое оборудование

- Амплификатор.
- Настольная центрифуга для пробирок с ускорением от 11 000 g.
- Миницентрифуга-вортекс.
- Автоматические дозаторы на 20, 200 и 1 000 мкл.

Дополнительные материалы

- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл.
- Пробирки для ПЦР объемом 0.2 мл, совместимые с амплификатором.
- Наконечники для дозатора с фильтрами.
- NaOH сухой.
- Этанол 96%.

10. Биологический материал

ДНК, выделенная из различных образцов, в том числе из FFPE-блоков, тканей, культур клеток.

Например, для выделения ДНК можно использовать наборы:

- ExtractDNA FFPE, кат. # BC103, Евроген;
- ExtractDNA Blood&Cells, кат. ## BC111M, BC111T, Евроген.

Для проведения бисульфитной модификации требуется 20 мкл ДНК с концентрацией от 2.5 до 100 нг/мкл.

11. ПРОТОКОЛ

Общее время работы 60–70 минут.

11.1. Подготовка растворов

Перед первым использованием набора

- 1.1. Добавьте 6 мл этанола (96%) к «Десульфонирующему раствору». Перемешайте переворачиванием и поставьте отметку на крышке флакона.
- 1.2. Добавьте 26 мл этанола (96%) к «Промывочному раствору». Перемешайте переворачиванием и поставьте отметку на крышке флакона.

Перед каждым использованием набора

ВНИМАНИЕ! Каждая пробирка «Модифицирующего реагента» рассчитана для приготовления Модифицирующей реакционной смеси в объеме, достаточном для одновременной обработки 6 образцов.

Модифицирующая реакционная смесь и 10М NaOH изготавливаются непосредственно перед их использованием и хранению не подлежат.

- 1.3. Приготовьте не менее 70 мкл 10М NaOH (например, к 120 мг NaOH добавьте 280 мкл деионизированной воды).
- 1.4. Приготовьте модифицирующую реакционную смесь:
 - добавьте 760 мкл «Модифицирующего раствора» в пробирку с «Модифицирующим реагентом»;
 - полученную смесь прогрейте в течение 5 минут при 65 °С, периодически перемешивая на вортексе до полного растворения осадка;
 - остудите пробирку со смесью до комнатной температуры;
 - добавьте к смеси 65 мкл 10М NaOH. Перемешайте на вортексе до полного растворения осадка.

11.2. Бисульфитная модификация ДНК

ВНИМАНИЕ! Все центрифугирования проводятся при 11 000 g (13 000 об/мин для настольной центрифуги Eppendorf Minispin) при комнатной температуре.

- 2.1. Подготовьте и промаркируйте пробирки объемом 0.2 мл по числу образцов.
- 2.2. В каждую пробирку внесите по 130 мкл свежеприготовленной модифицирующей реакционной смеси.
- 2.3. Внесите по 20 мкл ДНК исследуемых образцов в соответствующие пробирки. Закройте крышки, перемешайте содержимое на вортексе и сбросьте капли.

- 2.4. Проведите инкубацию:
95 °С — 30 минут;
4 °С — 2 минуты.
- Опция:** на этом этапе можно сделать паузу, увеличив время инкубации при 4 °С на срок до 12 часов.
- 2.5. Во время инкубации подготовьте и промаркируйте необходимое количество колонок с собирательными пробирками.
- 2.6. В каждую колонку внесите по 600 мкл «Связывающего раствора BQ» и 150 мкл смеси, полученной после инкубации.
Закройте крышки колонок и перемешайте аккуратным переворачиванием, не вынимая колонку из собирательной пробирки.
- 2.7. Центрифугируйте колонки с собирательными пробирками в течение 15 секунд.
Перенесите колонки в новые собирательные пробирки. Собирательные пробирки с фильтратами утилизируйте.
- 2.8. Внесите по 200 мкл «Промывочного раствора» в каждую колонку, центрифугируйте в течение 15 секунд. Оставьте колонки в тех же собирательных пробирках.
- 2.9. Тщательно перемешайте «Десульфолирующий раствор». Внесите по 200 мкл «Десульфолирующего раствора» в каждую колонку, закройте крышки. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре («Десульфолирующий раствор» может полностью протечь через колонку в собирательную пробирку).
- 2.10. Внесите по 200 мкл «Промывочного раствора» в каждую колонку, центрифугируйте в течение 15 секунд.
Перенесите колонки в новые собирательные пробирки. Собирательные пробирки с фильтратами утилизируйте.
- 2.11. Внесите в колонки по 200 мкл «Промывочного раствора», центрифугируйте в течение 1 минуты.
- 2.12. Промаркируйте необходимое количество пробирок объемом 1.5 мл. Перенесите колонки в промаркированные пробирки. Собирательные пробирки с фильтратами утилизируйте.
- 2.13. Нанесите в центр мембраны колонок по 40 мкл «Элюирующего раствора», центрифугируйте в течение 1 минуты.
Элюат содержит очищенную модифицированную ДНК, пригодную для ПЦР-анализа. Очищенная ДНК хранится при температуре от –25 до –15 °С до 1 года.
Использованные колонки и остатки свежеприготовленных 10M NaOH и модифицирующей реакционной смеси утилизируйте.

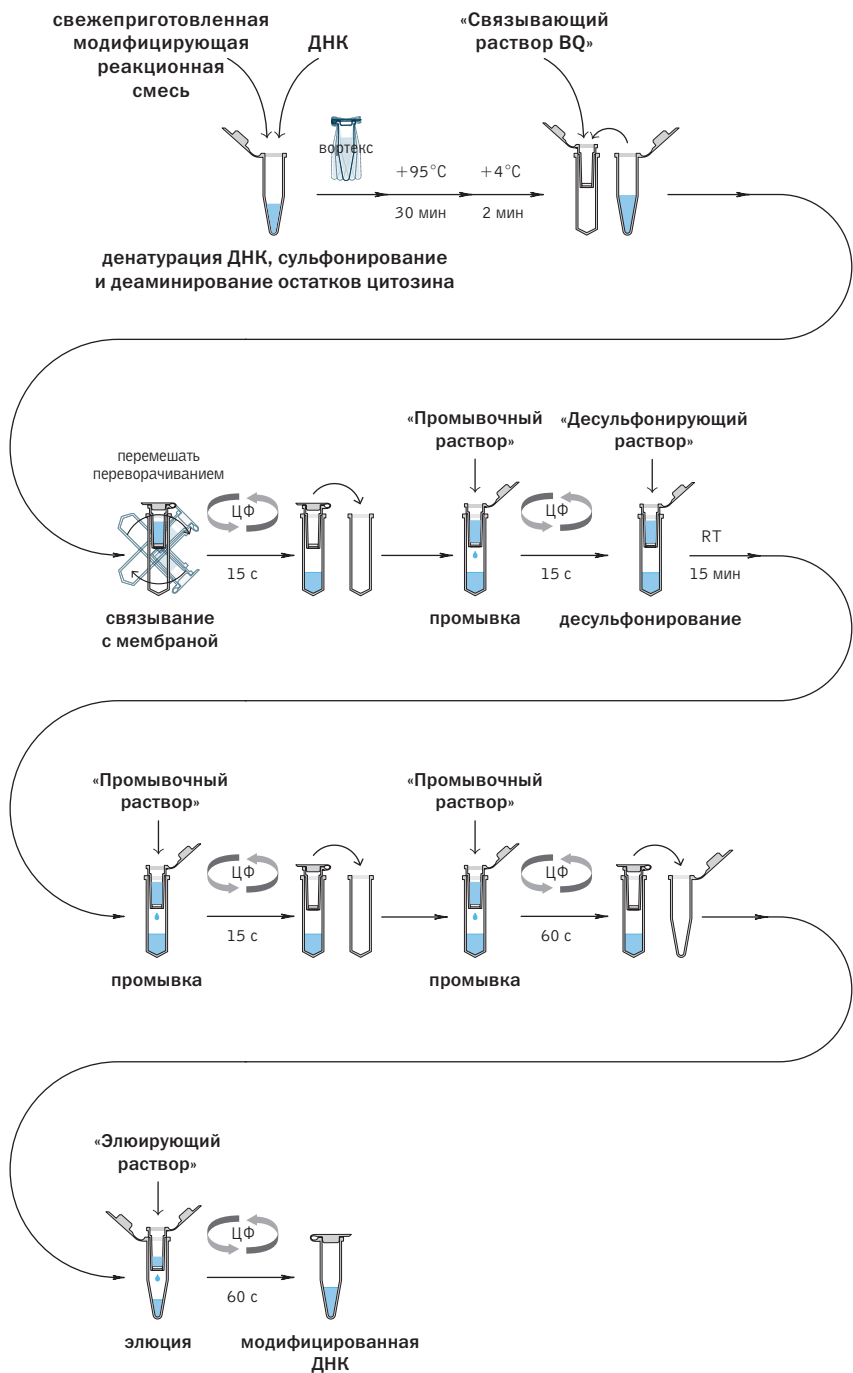


Рисунок 3 – схема бисульфитной модификации ДНК.

Приложение

Определение концентрации модифицированной ДНК

Бисульфитная обработка приводит к некоторым изменениям физико-химических свойств ДНК: так 1 о.е. поглощения при 260 нм соответствует концентрации конвертированной ДНК 40 мкг/мл, а не 50 мкг/мл, как у исходной неконвертированной ДНК.

Рекомендации для проведения анализа модифицированной ДНК методом ПЦР

Подбор праймеров

1. Для анализа ДНК после бисульфитной обработки необходимо подобрать три пары праймеров:
 - праймеры (**UnMet**), комплементарные неметилированному модифицированному участку ДНК;
 - праймеры (**Met**), комплементарные метилированному модифицированному участку ДНК;
 - праймеры (**Wt**), комплементарные немодифицированному участку ДНК (вне зависимости от статуса метилирования исходной последовательности). Пара праймеров Wt служит контролем степени модификации ДНК: образование продукта в реакциях с модифицированной ДНК говорит о ее контаминации немодифицированной ДНК или о неполной модификации.
2. Все праймеры:
 - подбираются на одну цепь ДНК, т.к. после бисульфитной модификации ДНК одноцепочечная, цепи друг другу некомплементарны;
 - должны содержать, как минимум один CpG сайт в своей последовательности и несколько цитозинов, не входящих в CpG сайт.
3. Праймеры UnMet и Met должны содержать те же CpG сайты, но могут незначительно отличаться по длине.

Подбор фермента и реакционной смеси

- ДНК-полимераза должна быть с «горячим стартом» и без 3'-5' экзонуклеазной активности (например, HS Taq, кат. ## PK017S/L/M/H, Евроген).
- Не использовать ПЦР смеси, содержащие урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ).

Наборы и сервисы Евроген

Н – наборы

С – сервисы

Выделение и очистка нуклеиновых кислот **Н**

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **Н**

Синтез и амплификация кДНК **Н С**

Клонирование ДНК **Н С**

Выявление контаминации микоплазмой **Н**

Оценка ДНК **Н**

Нормализация кДНК **Н С**

Практикум по генной инженерии **Н**

Генотипирование **Н**

Синтез олигонуклеотидов и зондов **С**

Секвенирование по Сэнгеру **С**

NGS секвенирование **С**

Синтез генов **С**

Сайт-направленный мутагенез **С**

Синтез органических соединений **С**

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

**Подробную информацию о наших продуктах и сервисах
можно получить на сайте www.evrogen.ru**

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru