

Instrukcja

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.

numer katalogowy	wielkość
1080-100	100 reakcji w 50 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 wchodzi w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

EvaGreen® jest zarejestrowanym znakiem towarowym Biotium Inc.

Spis treści

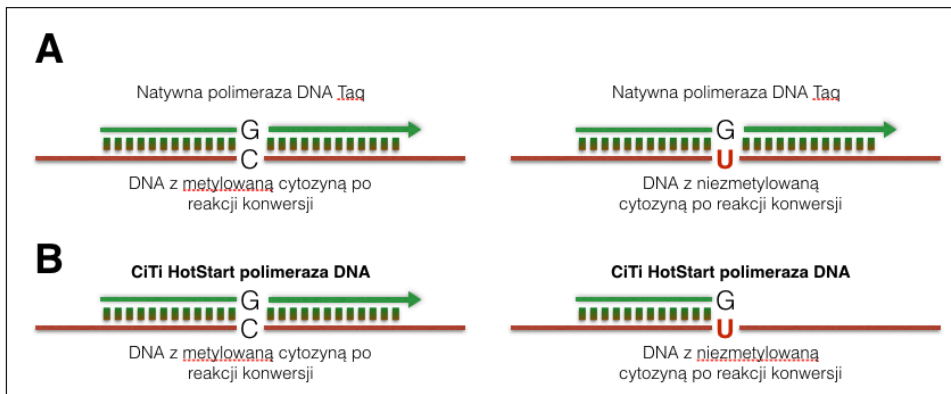
Opis	3
Skład	4
Skład mieszaniny CiTi MSP PCR Mix	4
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	4
Ważne informacje	4
Proponowany protokół reakcji PCR	5
Przed rozpoczęciem nastawienia reakcji:	5
Nastawienie reakcji z użyciem CiTi Converter MSP PCR Kit:	6

Opis

CiTi MSP PCR Mix jest gotową, dwukrotnie stężoną mieszaniną do real-time w technice Hot-Start PCR. 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.

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 niespecyficznego fragmentu 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 wydłużyć startera, którego niesparowany koniec 3' nie pasuje do matrycy (B). W efekcie prowadzi to do powstawania wyłącznie specyficznych produktów PCR.

Skład

	1080-100	przechowywanie
CiTi MSP PCR Mix	2 x 1,25 ml	-20 °C
woda ultraczysta	2 x 1,5 ml	-20-25 °C

Skład mieszaniny CiTi MSP PCR Mix

składnik	ilość
CiTi HotStart polimeraza DNA	0,1 U/ μ l
MgCl ₂	4 mM
dNTPs	0,5 mM każdego z dNTP
2x bufor reakcyjny, stabilizatory reakcji	

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

- matryca DNA
- startery
- termocykler
- worteks
- mikrowirówka

Ważne informacje

- Przed użyciem wszystkie składniki należy całkowicie rozmrozić w lodzie, delikatnie zworteksować i krótko zwirować.
- Cykliczne, 5-krotne rozmrażanie i zamrażanie nie wpływa na wydajność i aktywność produktu.
- 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).

Proponowany protokół reakcji PCR

Przed rozpoczęciem nastawienia reakcji:

1. Zaleca się użycie DNA poddanego konwersji przy użyciu zestawu A&A Biotechnology:
 - CiTi Converter DNA Methylation Kit ([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 Mg²⁺ co daje dobre wyniki amplifikacji DNA. Jednak jeśli DNA jest zawieszona w buforach zawierających EDTA (np. bufor TE), należy liczyć się z potrzebą uzupełnienia jonów Mg²⁺ i dodatkiem roztworu np. 25 mM MgCl₂ do końcowego stężenia 2,5 mM.
4. W celu uniknięcia kontaminacji, należy nastawiać reakcję PCR w miejscu oddzielonym 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 składniki zestawu w lodzie, a następnie delikatnie zworteksować, krótko zwirować i wstawić ponownie do lodu.
2. Umieścić próbówki reakcyjne PCR w lodzie i dodać kolejno:

składnik	objętość reakcji PCR
	50 μ l
CiTi MSP PCR Mix	25 μ l
starter A*	0,3-0,4 μ M*
starter B*	0,3-0,4 μ M*
matryca DNA	>3 ng
woda ultraczysta	do 50 μ l

* końcowe stężenie w mieszaninie reakcyjnej

3. Mieszaninę reakcyjną delikatnie zworteksować i krótko zwirować.

4. Probówki umieścić w termocyklerze i uruchomić program. Proponowany profil PCR:

etap	temperatura	czas
wstępna denaturacja	95 °C	10 min
35-40 cykli	95 °C	15 s
	50 - 55 °C	30 s
	72 °C	30-60 s*
końcowe wydłużanie	72 °C	5 min
schłodzenie reakcji	10 °C	

* dla produktów powyżej 500 pz należy stosować czas wydłużania 1 min



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

wersja 2025-1

