

Rai**sol**TM
Bio

**Набор реагентов для бисульфитной модификации ДНК
«ConverGen»**

#convergen-50

Набор реагентов предназначен для бисульфитной модификации ДНК. В набор включены все необходимые реагенты:

1. Модифицирующий реагент – сульфирование неметилированных остатков цитозина;
2. Модифицирующий раствор 1 – приготовление модифицирующего реагента;
3. Модифицирующий раствор 2 – приготовление модифицирующего реагента;
4. Буфер для разведения – разведение реагентов и образцов ДНК;
5. Связывающий буфер – для повышения сорбции НК на фильтре колонки;
6. Промывочный буфер – для промывки нуклеиновых кислот;
7. Десульфлирующий буфер – для удаления сульфогруппы;
8. Элюирующий буфер – для элюции и хранения НК, pH=8,9;
9. Спин-колонки – для сорбции НК.

Все реагенты набора «ConverGen» могут храниться при температуре от +4°C до +25°C в течение 12 месяцев с даты выпуска изготовителя. В случае наличия осадка при минимальных температурах хранения, растворы следует нагреть до комнатной температуры.

! После приготовления **модифицирующий реагент** следует хранить не более месяца при температуре от -20°C до -15°C.

Необходимые материалы и оборудование: пробирки объемом 0,2 мл; микроцентрифужные пробирки объемом 1,5-2 мл; штатив для пробирок объемом 0,2 мл; штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл; автоматические дозаторы переменного объема на 2-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл и соответствующие одноразовые наконечники; спин-колонки с собирательными пробирками (идут в комплекте); вортекс; твердотельный термостат с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 25-80°C для пробирок объемом 1,5-2 мл; амплификатор; скоростная микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин.

ConverGen

Приготовление модифицирующего реагента

1. В пробирку с модифицирующим реагентом добавить 900 мкл буфера для разведения и 60 мкл модифицирующего раствора 1. Интенсивно перемешать пробирку на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Инкубировать пробирку в термостате при 65°C в течение 30 минут, периодически перемешивая на вортексе.
3. Сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Инкубировать пробирку при комнатной температуре в течение 3-5 минут до полного остывания.
5. Добавить в пробирку 200 мкл модифицирующего раствора 2. Интенсивно перемешать пробирку на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

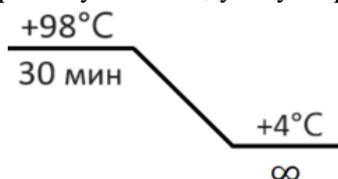
Примечание: возможно выпадение осадка, случайный захват которого не влияет на эффективность бисульфитной модификации.

Бисульфитная модификация ДНК

1. В пробирки объемом 200 мкл внести 20 мкл образца ДНК.

Примечание: для бисульфитной модификации можно использовать от 50 пг до 2 мкг ДНК на реакцию. Оптимальная концентрация образца ДНК составляет 20-50 нг/мкл. Чистота образца ДНК по соотношению показателей поглощения A260/A280 должна быть $\geq 1,7$.

2. Добавить в пробирки 120 мкл модифицирующего реагента. Перемешать пробирки на вортексе, сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
3. Поместить пробирки в амплификатор и запустить следующую программу:



Примечание: модифицированную ДНК можно хранить при +4°C в течение 12 ч.

Десульфирование и очистка ДНК

Сорбция НК

1. В спин-колонок внести 400 мкл связывающего буфера и добавить весь объем образца после бисульфитной конверсии. Перемешать смесь с помощью переворачивания спин-колонок.
2. Центрифугировать колонки в течение 30 секунд при 10-12 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.

Десульфирование и промывка НК

1. Добавить в колонки 200 мкл промывочного буфера.
2. Центрифугировать колонки в течение 30 секунд при 10-12 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.
3. Добавить в колонки 200 мкл десульфировющего буфера.
4. Инкубировать спин-колонок при комнатной температуре 20 минут.
5. Центрифугировать колонки в течение 30 секунд при 10-12 тыс. об/мин. Удалить фильтрат из собирательных пробирок.
6. Дважды повторить пункты 1-2.
7. Центрифугировать пустые спин-колонок в течение 1 минуты при 10-12 тыс. об/мин.
8. Перенести спин-колонок в новые пробирки объемом 1,5-2 мл. Собирательные пробирки утилизировать.

Элюция НК

1. Добавить на центр мембраны спин-колонок 22 мкл элюирующего буфера. Инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре.
2. Центрифугировать колонки в течение 1 минуты при 10-12 тыс. об/мин.
3. Утилизировать спин-колонок.

Опционально: для повышения выхода НК необходимо повторно нанести фильтрат на мембрану колонки.

Полученные растворы модифицированных нуклеиновых кислот могут храниться до 2 дней при температуре от +2°C до +4°C и до года при температуре -20°C.

