



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

#convergen-50

Инструкция по применению

1. Назначение

1.1. Полное название

«Набор реагентов предназначен для бисульфитной модификации ДНК «ConverGen».

1.2. Назначение

Набор реагентов «ConverGen» Raissol[™] предназначен для бисульфитной модификации 50 образцов ДНК.

1.3. Область применения

Набор реагентов «ConverGen» может быть использован в научных лабораторных центрах и институтах, исследовательских лабораториях для бисульфитной модификации ДНК с целью последующего определения метилирования цитозинов с помощью метилчувствительной ПЦР и секвенирования. Только для научных исследований.

1.4. Принцип действия

Бисульфитная модификация ДНК включает в себя денатурацию ДНК и сульфирование неметилованных остатков цитозина. После чего следуют сорбция ДНК на кремниевой мембране спин-колонок, десульфирование, промывка и элюция модифицированных нуклеиновых кислот. В результате модификации получают ДНК, в которой цитозины заменены на урацил, а метилцитозины остались без изменений.

2. Характеристика набора

Компоненты набора являются одноразовыми. Набор реагентов «ConverGen» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1. Состав набора

Набор реагентов «ConverGen» рассчитан на 50 образцов.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	#convergen -50	
			Объем/масса, мл/г	Кол-во, шт.
1	Модифицирующий реагент	Пробирка темного цвета, содержащая навеску мелкокристаллического порошка белого цвета	0,7	5
2	Модифицирующий раствор 1	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость без посторонних примесей и включений, со специфическим запахом	0,35	1
3	Модифицирующий раствор 2	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, без запаха	1,1	1
4	Буфер для разведения	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, без запаха	5	1
5	Связывающий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, со специфическим запахом	20	1
6	Десульфлирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, с резким запахом	10	1
7	Промывочный буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, с резким запахом	30	1
8	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость без посторонних примесей и включений, без запаха, pH=8,9	1,1	1
9	Спин-колонки	Собирательная пробирка объемом 2 мл без крышки, сорбционная колонка объемом 0,75 мл с кремнеземной мембраной ёмкостью до 6 мкг ДНК	–	50

3. Меры предосторожности при работе с набором

Работу проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Потенциальный риск применения набора – класс 2а. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

3.1. Необходимость обучения персонала

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим/средним медицинским или биологическим образованием. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

3.2. Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают при должном использовании.

При работе с набором следует соблюдать стандартные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта компонентов набора с кожей, глазами, слизистыми оболочками и одеждой. При попадании промыть большим количеством воды в течение нескольких минут. При приеме внутрь немедленно обратиться за медицинской помощью.

Десульфидирующий и промывочный буфер содержат легковоспламеняющиеся жидкости. Все работы с легковоспламеняющимися жидкостями должны проводиться с использованием приточно-вытяжной вентиляции, вдали от огня и источников искрообразования, электрооборудование и освещение должно быть взрывобезопасно.

4. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

4.1. Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в боксе для стерильных работ с ДНК-пробами (например, бокс абактериальной воздушной среды БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,8, ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

4.2. Дозирующие устройства

Набор автоматических дозаторов переменного объема на 2-20, 20-200 мкл и 100-1000 мкл.

4.3. Другое используемое оборудование

- Вортекс (например, Biosan Microspin FV-2400);
- скоростная микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин (например, Eppendorf 5418 R);
- твердотельный термостат с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 25-80°C для пробирок объемом 1,5-2 мл (например, Biosan TDB-120);
- амплификатор планшетного типа для пробирок объемом 0,2 мл;

- штатив для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5-2 мл;
- штатив для пробирок объемом 0,2 мл;
- штатив для дозаторов переменного объема;
- морозильная камера -20°C;
- холодильник от +2 до +8°C (для хранения образцов).

4.4. Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и пробирок.

4.5. Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

- Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 или 2 мл;
- пробирки объемом 0,2 мл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл;
- одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;
- комплект средств для обработки рабочего места.

5. Анализируемые пробы

5.1. Требования к используемому биологическому материалу

Для бисульфитной модификации можно использовать от 50 пг до 2 мкг ДНК на реакцию. Тем не менее, для достижения оптимальных результатов лучше использовать 200–500 нг входной ДНК. Большие количества входной ДНК могут привести к неполной бисульфитной модификации в GC- богатых участках ДНК.

Замер концентрации ДНК производится спектрофотометрически при длине волны 260 нм. Установление чистоты образца определяется соотношением A260/A280 и должно соответствовать $\geq 1,7$. После прохождения порога чистоты необходимо развести образец согласно полученным данным замера до концентрации 20-50 нг/мкл с применением TE буфера.

5.2. Условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб

Растворы нуклеиновых кислот могут храниться до 7 дней при температуре от +2°C до +4°C и до двух лет при температуре -20°C.

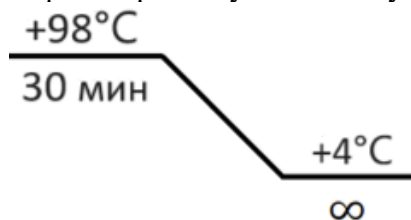
6. Приготовление модифицирующего реагента

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.

7. Бисульфитная модификация ДНК

1. В пробирки объемом 200 мкл внести 20 мкл образца ДНК.
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 $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 12 ч.

8. Десульфирование и очистка ДНК

8.1. 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.

8.2. 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.

8.3. 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.

8.4. Условия хранения модифицированных образцов НК

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.

8.5. Возможные трудности при бисульфитной модификации ДНК

Проблема	Возможная причина	Описание решения
Низкая эффективность бисульфитной модификации ДНК	Неправильные условия бисульфитной модификации	Необходимо четко следовать инструкции по применению
	Несоответствующая чистота образца	Чистота входной ДНК должна быть $\geq 1,7$
	Слишком большое кол-во образца	Для достижения оптимальных результатов лучше использовать 200–500 нг входной ДНК на реакцию
	Неправильное хранение реагентов	Все реагенты набора должны храниться в соответствии с инструкцией по применению
Не проходит ПЦР с модифицированной ДНК	Использована неподходящая полимеразы	Для амплификации бисульфит-модифицированной ДНК не подходят корректирующие полимеразы, чувствительные к урацилам
	Праймеры были разработаны неправильно	Для разработки праймеров необходимо использовать ПО для бисульфит-модифицированной ДНК;
	Дегградация модифицированной ДНК	Необходимо хранить модифицированную ДНК в соответствии с инструкцией по применению

9. Условия хранения, транспортировки и эксплуатации

9.1. Условия хранения

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.

9.2. Условия транспортировки

Транспортировка всех реагентов набора «ConverGen» может производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от +4°C до +25°C.

9.3. Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ШББ собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10. Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу Г, как токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности (СанПиН 2.1.7.2790-10).

9.4. Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортировки, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять на предприятие-изготовитель ООО «Сесана» (107014, г. Москва, ул. Короленко, 8, email: sales@sesana.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и лабораторных работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «Сесана» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.