

Bisulfitová konverze

- Poznámka:** Epi proColon Bisulfite Solution je citlivý na vystavení kyslíku! Používejte pouze neotevřené zkumavky s Epi proColon Bisulfite Solution, všechny zbytky vyhodte.
- Přidejte následující reagenty do 2 ml zkumavek s eluátem DNA:
150 µl Epi proColon Bisulfite Solution
25 µl Epi proColon Protection Buffer
- Zavřete zkumavku a zvortexujte.
- Krátce centrifugujte zkumavku, abyste odstranili kapky z víčka.
- Vložte zkumavky do thermobloku a inkubujte 45 ± 5 min při 80 ± 2°C **bez** třepání.
- Poznámka:** Vyjměte zkumavky **okamžitě** po uplynutí 45 min, dobu **neprodlužujte!**

Navázání

- Krátce centrifugujte zkumavku, abyste odstranili kapky z víčka.
- Přidejte následující reagenty do 2 ml zkumavek:
1000 µl Epi proColon Wash A Buffer
20 µl Epi proColon Magnetic Beads (čerstvě zvortexované)
- Uzavřete zkumavky a zvortexujte je po dobu 5 - 10 s.
- Vložte zkumavky do termotřepačky.
- Inkubujte při 23 ± 2 °C po dobu 45 ± 5 min s třepání při 1,000 ± 100 rpm.
- Krátce centrifugujte zkumavku, abyste odstranili kapky z víčka.
- Vložte zkumavky do magnetického stojánu DynaMag-2 na 4 min.
- Ponechte zkumavky v magnetickém stojánu a pomocí jednorázové plastové pipety odsajte co nejvíce roztoku ze zkumavek. Dejte pozor, abyste neodsály magnetické částice!

První promytí

- Přendejte zkumavky do nemagnetického stojánu a přidejte:
800 µl Epi proColon Wash A Buffer.
- Resuspendujte peletku vortexováním. Krátce centrifugujte zkumavku, abyste odstranili kapky z víčka.
- Vložte zkumavky do magnetického stojánu DynaMag-2 na 4 min.
- Ponechte zkumavky v magnetickém stojánu a pomocí jednorázové plastové pipety odsajte co nejvíce roztoku ze zkumavek. Dejte pozor, abyste neodsály magnetické částice!

Druhé promytí

- Přendejte zkumavky do nemagnetického stojánu a přidejte:
800 µl Epi proColon Wash B Buffer.
- Resuspendujte peletku vortexováním. Krátce centrifugujte zkumavku, abyste odstranili kapky z víčka.
- Vložte zkumavky do magnetického stojánu DynaMag-2 na 4 min.
- Ponechte zkumavky v magnetickém stojánu a pomocí jednorázové plastové pipety odsajte co nejvíce roztoku ze zkumavek. Dejte pozor, abyste neodsály magnetické částice!

Třetí promytí

- Přendejte zkumavky do nemagnetického stojánu a přidejte:
400 µl Epi proColon Wash B Buffer.
- Resuspendujte peletku vortexováním. Krátce centrifugujte zkumavku, abyste odstranili kapky z víčka.
- Vložte zkumavky do magnetického stojánu DynaMag-2 na 4 min.
- Ponechte zkumavky v magnetickém stojánu a pomocí jednorázové plastové pipety odsajte co nejvíce roztoku ze zkumavek. Dejte pozor, abyste neodsály magnetické částice!
- Krátce centrifugujte zkumavky, aby se zbytek tekutiny stáhl na dno zkumavky.
- Vložte zkumavky do magnetického stojánu DynaMag-2 na 4 min.
- Ponechte zkumavky v magnetickém stojánu a pomocí automatické pipety se špičkou odsajte zbytek roztoku ze dna zkumavky. Dejte pozor, abyste neodsály magnetické částice!

Sušení

- Vložte **otevřené** zkumavky do termotřepačky.
- Inkubujte po dobu 10 ± 1 min při 23 ± 2 °C **bez** třepání.
- Poznámka: Neprodužujte čas nebo délku sušení, protože přesušení může snížit množství bisDNA!**

Eluce

- Přeneste zkumavky do nemagnetického stojánu a přidejte:
60 µl Epi proColon Elution Buffer
- Resuspendujte peletku vortexováním.
- Inkubujte v termotřepačce po dobu 10 ± 1 min při 23 ± 2 °C při 1,000 ± 100 rpm.
- Krátce centrifugujte zkumavky po dobu 10 - 20 s při 1000 ± 150 rcf.
- Vložte zkumavky do magnetického stojánu DynaMag-2 na 4 min.
- Ponechte zkumavky v magnetickém stojánu a přeneste kompletní eluát (~60 µl roztoku s DNA) do čisté popsané zkumavky.

Epi proColon 2.0 CE

epigenomics

Příprava reagensí

- Přidejte **60 ml** Absolutního **Ethanolu** do lahvičky s Epi proColon **Wash A Concentrate**. Promýchejte lahvičku obrácením 5x dnem vzhůru.
- Přidejte **40 ml** Absolutního **Ethanolu** do lahvičky s Epi proColon **Wash B Concentrate**. Promýchejte lahvičku obrácením 5x dnem vzhůru.
- Označte lahvičky datem smíchání a zathněte "Ethanol added".

Rozmrazení plasmy a kontrol

- Rozmrazte Epi proColon **Positive Control** a Epi proColon **Negative Control** po dobu 30 min při teplotě 15°C až 30°C. Rozmrazte vzorek plasmy po dobu 30 min při 15°C až 30°C.

Lyzace

- Poznámka:** Nezačínajte s lyzací dříve než po 60 min po rozmrazení!
- Přidejte následující roztoky do 15 ml zkumavky:
3.5 ml vzorku plasmy (ne Epi proColon Positive Control nebo Epi proColon Negative Control)
3.5 ml Epi proColon Lysis Binding Buffer
- Uzavřete zkumavku s vortexujete.
- Inkubujte zkumavky při 15 až 30 °C po dobu 10 min ± 1min.

Navázání DNA

- Poznámka:** Vortexujte Epi proColon Magnetic Beads před použitím a ujistěte se, že ve zkumavce není žádný sediment! Před pipetováním se ujistěte se, že je roztok homogenní.
- Přidejte následující roztoky do 15 ml zkumavky:
90 µl Epi proColon Magnetic Beads (čerstvě vortexované)
2.5 ml Absolutní Ethanol
- Uzavřete zkumavky a promíchejte obrácením 5-6x dnem vzhůru. Inkubujte v rotátoru při laboratorní teplotě po dobu 45 ± 5 min při cca 10 - 20 rpm.

První promytí

- Poznámka:** Nastavte thermostřepačku na 80 ± 2°C pro pozdější použití.
- Vložte 15 ml zkumavky do magnetického stojánu DynaMag-15 po dobu 8 min, magnetické kuličky vytvoří peletu na stěně zkumavky. Odsajte supernatant. Dejte pozor, abyste neodsály magnetické částice!
- Přidejte **1.5 ml Epi proColon Wash A Buffer**.
- Resuspendujte peletku vortexováním.
- Přeneste maximum objemu roztok magnetických kuliček pomocí jednorázové pipety do 2 ml zkumavky.
- Vložte jednorázovou pipetu zpět do back into 15 ml tubes to collect remaining magnetic particles and mül zkumavky a přeneste všechny zbytky roztoku do 2 ml zkumavky.
- Vložte zkumavky do magnetického stojánu DynaMag-2 na 4 min.
- Ponechte zkumavky v magnetickém stojánu a pomocí jednorázové plastové pipety odsajte co nejvíce roztoku ze zkumavek. Dejte pozor, abyste neodsály magnetické částice!
- Krátce centrifugujte.
- Vložte zkumavky do magnetického stojánu DynaMag-2 na 4 min a odsajte zbytek pufru pomocí automatické pipety se špičkou.

Eluce

- Přeneste zkumavky do nemagnetického stojánu.
- Přidejte **100 µl Epi proColon Elution Buffer** do každé zkumavky.
- Resuspendujte peletku vortexováním.
- Vložte zkumavky do thermostřepačky a inkubujte při 80 ± 2 °C po dobu 10 ± 1 min při 1,000 ± 100 rpm .
- Krátce centrifugujte.
- Vložte zkumavky do magnetického stojánu DynaMag-2 na 4 min.
- Ponechte zkumavky v magnetickém stojánu a přeneste kompletní eluát do čisté popsané zkumavky.
- Poznámka:** Nastavte thermostřepačku na 23 ± 2 °C pro pozdější použití.

Skladování DNA

- Poznámka:** Pokud není extrahovaná DNA použita okamžitě, je možné tuto DNA skladovat při 2 - 8 °C maximálně 24 hodin.
Nezamrazujte extrahovanou DNA!