

# innuCONVERT Bisulfite-Produktfamilie

## Erfolgreich forschen – Wissen generieren



▪ **Schnell:**

Vollständige Konvertierung von nicht-methyliertem Cytosin zu Uracil in nur 45 Minuten

▪ **Komfortabel:**

Flüssige Konvertierungsreagenzien einfach stabil bei Raumtemperatur lagern

▪ **Kompakt:**

Denaturierung und Konvertierung in einem Arbeitsschritt vereint

▪ **Effizient:**

Hohe Ausbeute an reiner DNA mit signifikant reduzierter DNA-Fragmentierung

▪ **Vielseitig:**

Anwendbar für die unterschiedlichsten Probenotypen

# innuCONVERT Bisulfite-Produktfamilie



## Hintergrundinformation

Um eine Krankheit wie Krebs wirksam zu bekämpfen, muss man sie verstehen. Die Analyse der DNA-Methylierung spielt dabei eine zunehmend wichtigere Rolle, denn sie gibt eher als andere Indikatoren Aufschluss über Tumorentstehung, -progression und -metastasierung. Maligne Tumore zeigen schon sehr früh bei der Krebsentstehung und während der Progression eine aberrante DNA-Methylierung, die sich deutlich vom Methylierungsmuster gesunden Gewebes unterscheidet. Insgesamt nimmt die genomweite Methylierung in Tumorzellen ab (genomweite Hypomethylierung), während einzelne Gene spezifisch hypermethyliert (genspezifische Hypermethylierung) sind. Von der Hypomethylierung sind vor allem repetitive Elemente betroffen, während eine Hypermethylierung häufig in den CpG-Inseln von Tumorsuppressorgenen zu finden ist. Der Durchbruch der Technologie auf klinischer Ebene ist absehbar: Diagnostische Tests, die auf der Messung von methylierter DNA als Biomarker beruhen, sind bereits zugelassen und für die Diagnose am Patienten in Verwendung.

Darüber hinaus sind viele weitere Anwendungen des epigenetischen Mechanismus der DNA-Methylierung möglich. Bei Bakterien dient sie vor allem der Markierung zelleigener DNA für die Verteidigung gegen eindringende Fremdorganismen. Die DNA-Methylierung spielt außerdem bei der Fehlerkorrektur während der DNA-Replikation eine Rolle. Bei Säugtieren dominiert die Methylierung des 5'-Kohlenstoffatoms des Cytosins (5'mC) im CpG-Dinukleotidkontext. Die DNA-Methylierung hat dabei vor allem regulatorische Funktion: Gene, die transkriptionell inaktiv sind, liegen häufig methyliert vor. Die methylierte Form ist dabei wesentlich für fundamental wichtige Prozesse wie Differenzierung, X-Chromosom-Inaktivierung und genetische Prägung (Imprinting). Einen umfassenden Überblick liefert die Übersichtsarbeit von Peter A. Jones aus 2012 [Jones PA (2012); »Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond«. Nat Rev Genet. 13(7):484-92].

Methylcytosin zeigt die gleichen Basenpaarungseigenschaften wie Cytosin und ist daher mit Hybridisierungs-Methoden nicht voneinander zu unterscheiden. Die meisten Methoden zur Bestimmung der DNA-Methylierung basieren auf einer vorhergehenden Bisulfitkonversion der DNA, bei der unmethylierte Cytosine zu Uracil desaminiert werden, während Methylcytosine unverändert bleiben.

Dadurch wird diese epigenetische Information in Sequenzen umgewandelt, die mit Standardmethoden wie z. B. der PCR messbar sind.

## Produktbeschreibung

Die innuCONVERT Bisulfite-Produktfamilie ermöglicht eine komplette Konvertierung von nicht-methyliertem Cytosin zu Uracil in wenigen Stunden. Die Denaturierung der DNA-Probe und die Bisulfidbehandlung erfolgen vereint in einem Reaktionsgefäß. Die gesamte Bearbeitungszeit für die Konvertierungsreaktion und anschließende Aufreinigung, Desulfonierung und Elution der DNA liegt bei unter 2,5 Stunden. Bei Probenotypen, die eine Vorbehandlung (z.B. Zellyse oder Plasmaextraktion) benötigen, verlängert sich die Zeit entsprechend. Anschließend stehen hochreine Nukleinsäuren für unmittelbare Downstream-Anwendungen (z.B. PCR, Sequenzierung) zur Verfügung.

Die Kits beinhalten alle nötigen Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für eine Isolierung der DNA aus diversen Probenmaterialien und die Konvertierung von Cytosin zu Uracil in genomischer DNA (siehe Abb. 1 und Abb. 2).

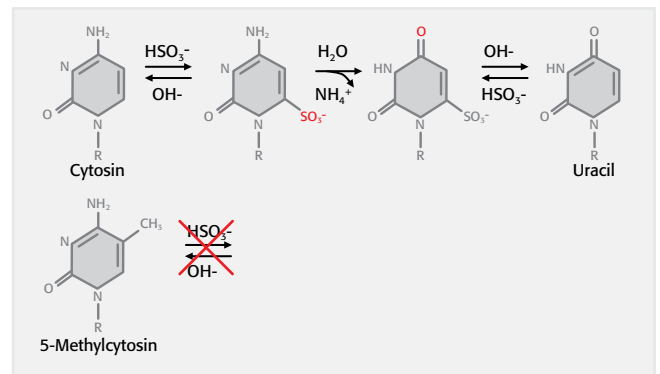


Abb. 1: Konvertierung des unmethylierten Cytosins zu Uracil

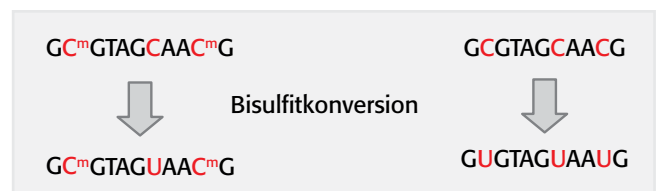


Abb. 2: Auswirkung der Bisulfidbehandlung auf die DNA-Sequenz

## Produktspezifikationen

### Ausgangsmaterial:

- Isolierte DNA (500 pg - 10 µg)
- Zellen (max. 5 x 10<sup>5</sup> Zellen)
- Gewebe, frisch (max. 1 mg)
- FFPE-Gewebe:
  - Schnitte (1 – 3, max. 10 µm) & Stanzen (max. 10 mg)
- Blutplasma- und Serum
- Urin, Aszites und Pleuraerguss
- Zytologische Proben: Urinsediment, sowie die zellulären Anteile von Bronchialaspiraten, Sputum, Abstrichen, Aszites und Pleuraergüssen

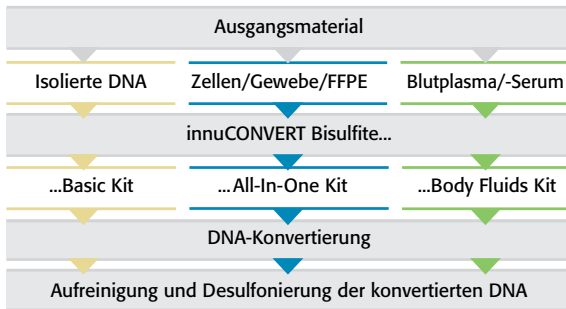
### Aufreinigungsdauer:

Probenvorbereitung: Je nach Ausgangsmaterial

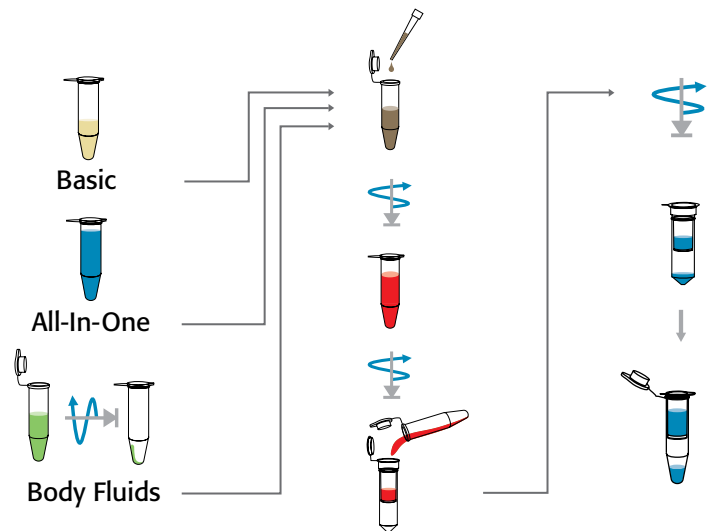
DNA-Konvertierung: ca. 45 min

Aufreinigung, Desulfonierung, Elution: ca. 45 min

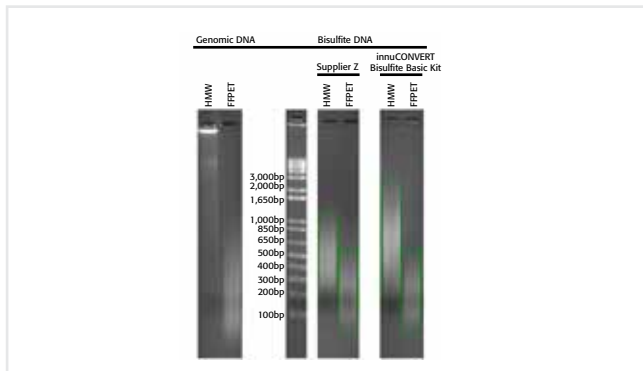
## Ablaufschema



0. Abhängig vom Ausgangsmaterial: spezifische Vorbehandlung (Lyse, Anreicherung)
1. Zugabe der Probe zum Konvertierungsreagenz
2. DNA-Konvertierung (ca. 45 min)
3. Aufreinigung und Desulfonierung der DNA auf der Säule (ca. 45 min)
4. Elution der DNA



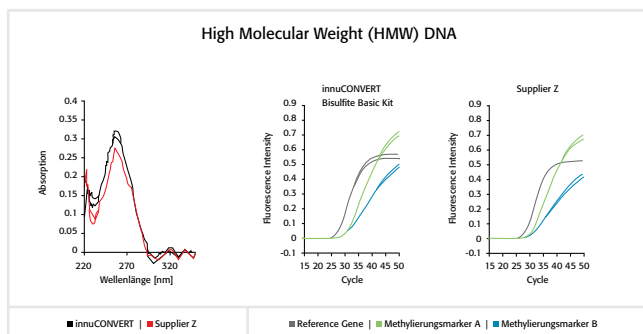
## Applikationsbeispiel: innuCONVERT Bisulfite Basic Kit



### Abb. 3: DNA Integrität

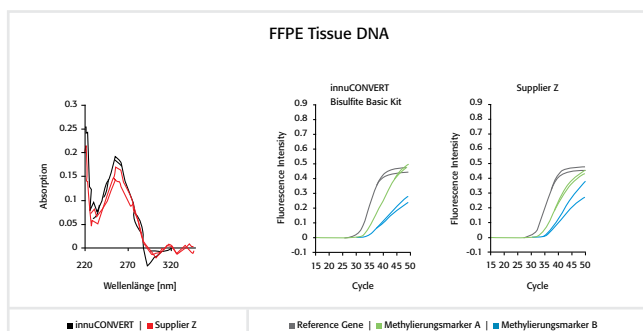
Bisulfit-umgewandelte DNA wurde mittels innuCONVERT Bisulfite Basic Kit und des kommerziell erhältlichen Kits eines Mitbewerbers präpariert. Fragmentierte genomische DNA aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Geweben sowie hochmolekulare (HMW) genomische DNA aus Frischgewebe wurden als Startmaterial eingesetzt. Die Integrität (Fragmentierung) der Bisulfit-umgewandelten DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese ermittelt. Der Vergleich fällt eindeutig zugunsten des Analytik Jena-Produkts aus: Die Bisulfit-Umwandlung von HMW-DNA mittels innuCONVERT Bisulfite Basic Kit lieferte höhermolekulare DNA.

Die Bisulfitumwandlung von bereits degradiert genomischer DNA aus FFPE-Geweben resultierte unabhängig vom verwendeten Kit in vergleichbarer Fragmentierung.



### Abb. 4: Kit-Performance-Vergleich (hochmolekulare DNA)

Performance des innuCONVERT Bisulfite Basic Kit im Vergleich zum kommerziell verfügbaren Produkt eines Mitbewerbers. Hochmolekulare DNA (2 µg) aus humaner Plazenta wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen und in beide Kits eingesetzt. Die Bisulfit DNA-Ausbeute, Reinheit und Verwendbarkeit für Downstream-Analysen wurde mittels UV-Spektroskopie und qPCR ermittelt. Die Verwendung beider Kits führte zu vergleichbaren Ergebnissen.



### Abb. 5: Kit-Performance-Vergleich (DNA aus FFPE Geweben)

Performance des innuCONVERT Bisulfite Basic Kit im Vergleich zum kommerziell verfügbaren Kit eines Mitbewerbers. Degradierete DNA (2 µg) aus Formalin-fixierter und Paraffin-eingebetteter humaner Plazenta wurde mittels Proteinase K Lyse und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen und in beide Kits eingesetzt. Die Bisulfit-DNA-Ausbeute, Reinheit und Verwendbarkeit für Downstream-Analysen wurde mittels UV-Spektroskopie und qPCR ermittelt. Die Verwendung beider Kits führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

## Applikationsbeispiel: innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit

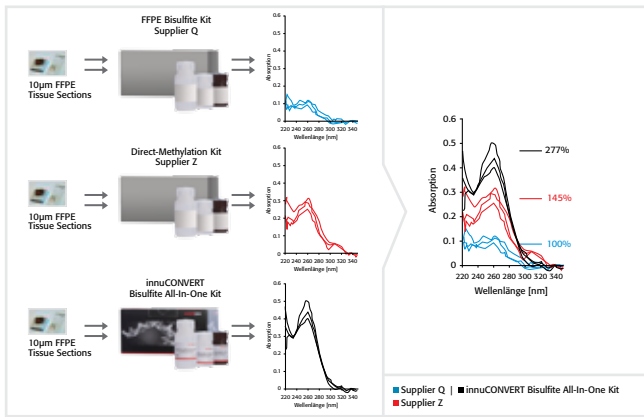


Abb. 6: Direkte Gewinnung von Bisulfid-DNA aus FFPE-Geweben  
Schnitte von Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Geweben (Plazenta) wurden direkt – ohne vorhergehende Behandlung – in das innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit sowie zwei kommerziell erhältliche Kits eingesetzt. Die Ausbeute und Reinheit der Bisulfid-DNA wurde mittels UV-Spektroskopie ermittelt. Die höchsten Ausbeuten wurden mit dem innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit erreicht.

## Applikationsbeispiel: innuCONVERT Bisulfite Body Fluids Kit

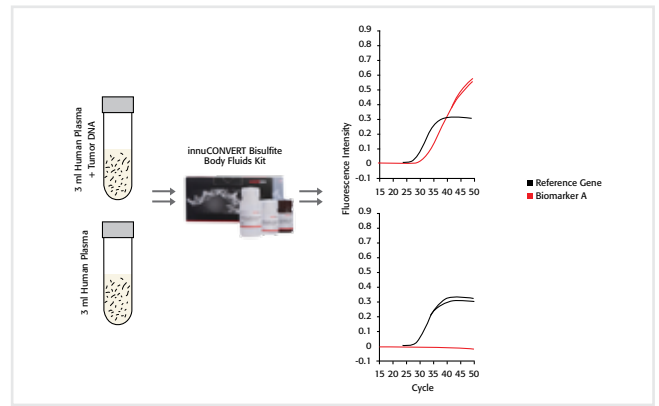


Abb. 7: Bisulfid-Umwandlung von zellfreier DNA aus hohen Volumina humanen Plasmas  
Humanes Blutplasma und humanes Plasma mit DNA aus einer kolorektalen Tumorzelllinie (positiv für den Krebs-spezifischen Biomarker A) wurde mittels des innuCONVERT Bisulfite Body Fluids Kit prozessiert. Die Gesamtausbeute an zellfreier DNA und des Tumor-spezifischen Biomarkers A wurde mittels qPCR bestimmt. Das Kit ermöglicht die Bisulfid-Umwandlung und anschließende Aufreinigung von zellfreier DNA aus hohen Volumina humanen Plasmas. Die Bisulfid-umgewandelte DNA ist für die sensitive Detektion von DNA-Methylierungstumormarkern geeignet.

## Produktübersicht/Bestellinformationen

Die innuCONVERT-Familie besteht aus folgenden verschiedenen Produkten:

Bestellnummer	Menge
<b>innuCONVERT Bisulfite Basic Kit</b>	
845-IC-1000008	8 Reaktionen
845-IC-1000040	40 Reaktionen
845-IC-1000080	80 Reaktionen
<b>innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit</b>	
845-IC-2000008	8 Reaktionen
845-IC-2000040	40 Reaktionen
845-IC-2000080	80 Reaktionen
<b>innuCONVERT Bisulfite Body Fluids Kit</b>	
845-IC-3000008	8 Reaktionen
845-IC-3000040	40 Reaktionen
845-IC-3000080	80 Reaktionen

## Ergänzende Produkte

Bestellnummer	Menge
<b>innuPREP DNA Mini Kit</b>	
845-KS-1040010	10 Reaktionen
845-KS-1040050	50 Reaktionen
845-KS-1040250	250 Reaktionen

## Ergänzende Produkte

Bestellnummer	Menge
<b>blackPREP FFPE DNA Kit</b>	
845-BP-0020010	10 Reaktionen
845-BP-0020050	50 Reaktionen
845-BP-0020250	250 Reaktionen
<b>innuMIX qPCR MasterMix Probe</b>	
845-AS-1200100	100 Reaktionen
845-AS-1200200	200 Reaktionen
<b>innuMIX qPCR MasterMix SyGreen</b>	
845-AS-1300100	100 Reaktionen
845-AS-1300200	200 Reaktionen
<b>innuTaq HOT-A DNA Polymerase [5 U/µl]</b>	
845-EZ-3000500	500 Units
<b>innuTaq UltraPure DNA Polymerase [5 U/µl]</b>	
845-EZ-6000500	500 Units
<b>50 x inNucleotide Mix (12,5 mM)</b>	
845-AS-9000100	2 x 0,5 ml
<b>inNucleotide Set (100 mM)</b>	
845-AS-1100250	4 x 0,25 ml
<b>PCR-grade H<sub>2</sub>O</b>	
845-AS-1800002	2,0 ml
845-AS-1800010	5 x 2,0 ml