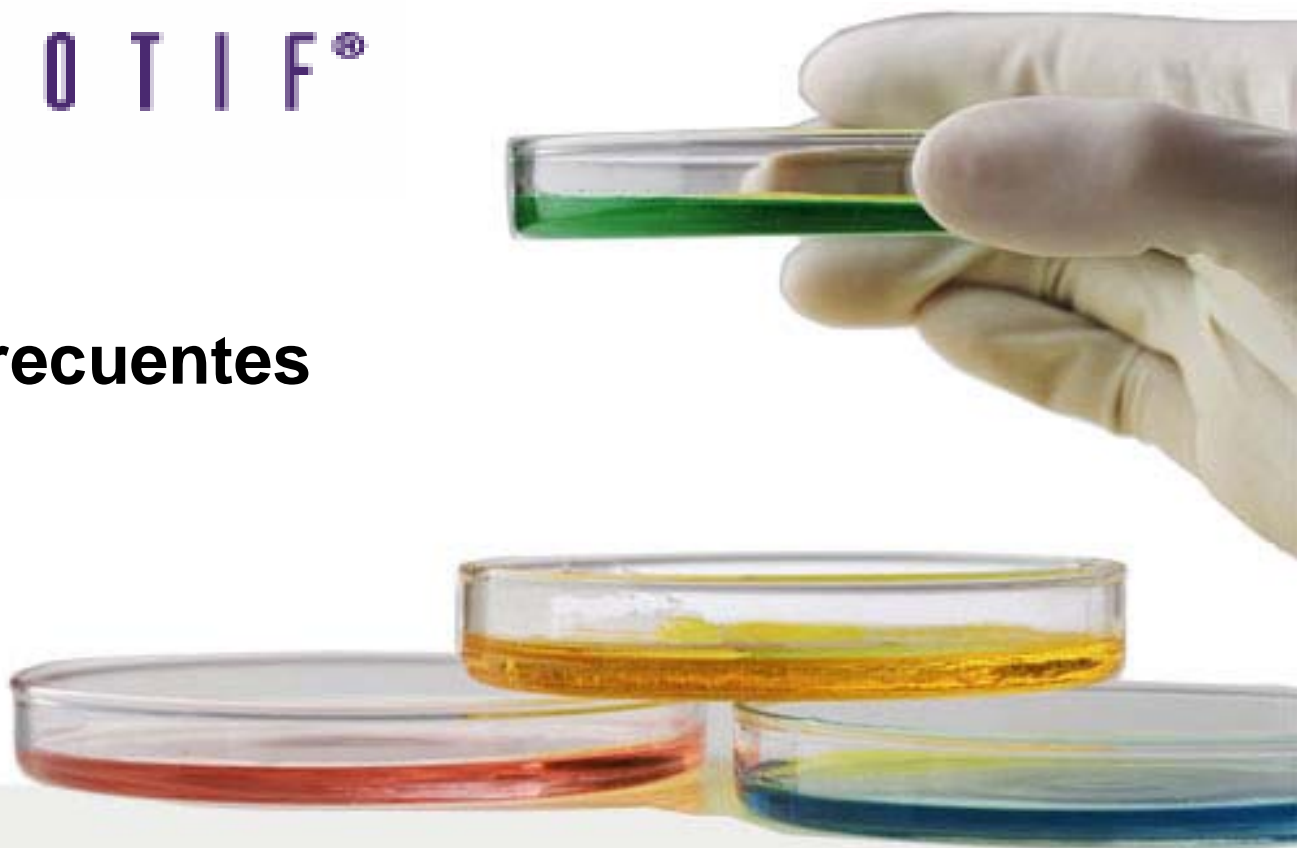


ACTIVE MOTIF®

FAQs – preguntas frecuentes



- 1.- Diferencias entre el MethylDetector y el MethylCollector. [– ir a respuesta –](#)
- 2.- ¿Se puede hacer ChipIT a partir de muestras de tejidos? [– ir a respuesta –](#)
- 3.- A veces se producen incidencias con el ChipIT enzimático. ¿Cuál puede ser el motivo? [– ir a respuesta –](#)
- 4.- ¿En qué consisten los productos relacionados con el Cascade? [– ir a respuesta –](#)
- 5.- ¿Puede el CHARIOT utilizarse para transportar ácidos nucleicos al interior de la célula? [– ir a respuesta –](#)
- 6.- ¿Puede usarse el METHYLDETECTOR para analizar DNA metilado en muestras de plantas? [– ir a respuesta –](#)
- 7.- ¿Es posible utilizar los Kits de ATM para estudiar factores de transcripción en adipocitos de rata y/o humanos? [– ir a respuesta –](#)
- 8.- ¿Para qué sirve un GripNA? ¿Qué se suele utilizar para transfectar Gripnas? ¿Es posible usar la lipofectamina en estos kits? [– ir a respuesta –](#)
- 9.- ¿Qué producto se recomienda para marcar proteínas en células vivas? [– ir a respuesta –](#)
- 10.- ¿Cuál es la diferencia entre el ChipIT y el Co-IP? [– ir a respuesta –](#)

1.- Diferencias entre el MethylDetector y el MethylCollector.

1. Methyl Detector. Método por conversión de Bisulfito:

- 1.- El DNA de interés es desnaturalizado por calor en el termociclador en presencia de bisulfito.
- 2.- Luego se baja la temperatura y se realiza la reacción de conversión por la que las citosinas no metiladas se sustituyen por uracilos.
- 3.- Las citosinas metiladas permanecen sin cambios.
- 4.- Se amplifica el DNA por PCR y se analiza por secuenciación o digestiones con enzimas de restricción.
- 5.- Se puede crear un perfil de la muestra comparando la secuencia de DNA tratado con el DNA sin tratar.

El DNA eluido por la columna de purificación estará ya listo para la reacción de PCR.

El kit incluye:

- Columnas para la desulfonación tras la reacción de conversión.
- Primers para el control positivo de PCR que pueden ser usados para medir si el proceso de conversión del bisulfito se ha realizado correctamente antes de la secuenciación del DNA. (Estos primers sólo anillan en DNA humano).

[– ir a índice –](#)

Unmethylated DNA

gaa g^cg gac c^cg



gaa g^ug gau u^ug



gaa g^tg gat t^tg

Sodium bisulfite
modification

PCR / Sequencing

Methylated DNA

gaa g^{c^m}g gac c^mg^c



gaa g^{c^m}g gau c^mg^u



gaa g^{c^m}g gat c^mg^t

Methylation specific PCR

- Methylation specific primer sets
- Unmethylation specific primer sets

+

Sequencing data analysis

BLASTS

– ir a índice –

2. MethylCollector™: Kit para aislar de forma específica el DNA metilado

- Extracción de DNA metilado de células y muestras de tejidos.
- Óptima para analizar los niveles de metilación en células y tejidos. Incluso es posible comparar los niveles de metilación de diferentes muestras extraídas en las mismas condiciones.

Proceso simple:

- Fragmentación enzimática o por sonicación del ADN
- Interacción con “His-tagged recombinant MBD2b protein”, específica a los fragmentos DNA metilado
- Captura de los complejos Proteína/ADN-Methyl mediante Nickel coated magnetic beads.
- Purificación y elución.

Ventajas:

- Protocolo rápido y fácil (4 horas)
- Protocolo flexible. Es posible trabajar desde 5 ng hasta 1 µg of DNA
- El ADN extraído no sufre ninguna modificación química.
- Incluye Control positivo de DNA y primers para la PCR primers, lo cual asegura que todo el proceso se realiza correctamente.

[– ir a índice –](#)

2.- ¿Se puede hacer ChipIT a partir de muestras de tejidos?

Sí.

Active Motif propone un protocolo para adaptar las muestras de tejido al protocolo del [ChipIT](#).

[– ir a índice –](#)

3.- A veces se producen incidencias con el ChIPIT enzimático. ¿Cuál puede ser el motivo?

A pesar de que siempre se dice que la fragmentación de la cromatina por el método de digestión enzimática es más sencillo que el método de sonicación, hay algunas excepciones en el que este proceso es muy complicado.

Para evitar estos problemas, hay que tener en cuenta unos cuantos detalles:

1. Reducir el tiempo de fijación de las células a 5 - minutos, en lugar de los 10 minutos iniciales.
2. Durante la digestión enzimática vortear cada minuto para ayudar a que la cromatina se separe mejor.
3. Extender el tiempo de incubación a 65°C durante más de 4 horas (incluso toda la noche) es algo que ayuda mucho a conseguir una buena fragmentación de la cromatina.

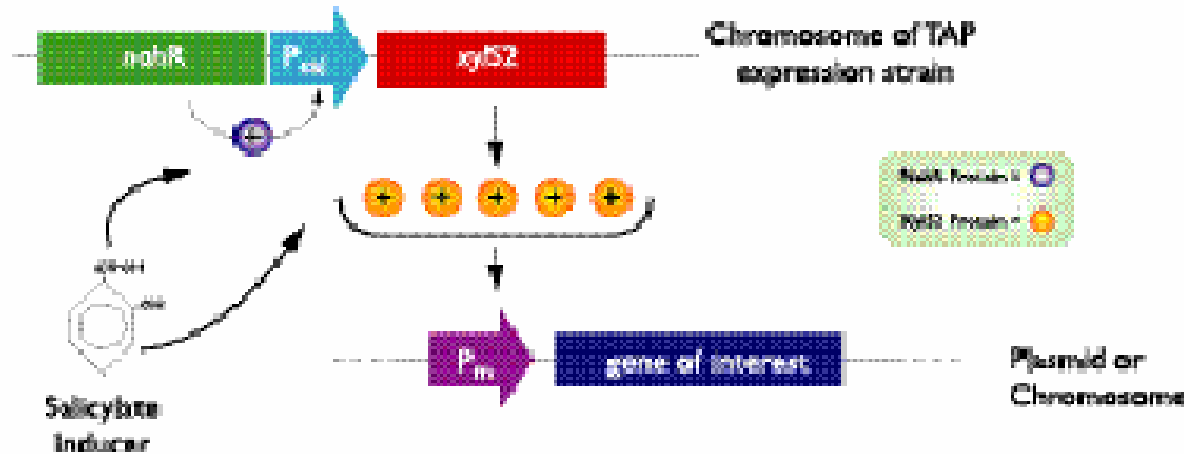
[– ir a índice –](#)

4.- ¿En qué consisten los productos relacionados con el Cascade?

The Cascade Expression System*:

El Cascade es un sistema de expresión de proteínas en bacterias que produce altos niveles de expresión cuando esta se induce, pero bajos niveles antes de la inducción. Este sistema hace uso de los circuitos ligados a la regulación para amplificar la expresión del gen.

Fig. 1 Cascade Expression system



Ventajas:

1. Cascade es un sistema de expresión fuertemente regulado. Los niveles de expresión son comparables con los del sistema T7, pero con niveles de background significativamente reducidos.
2. El inductor salicilato es aproximadamente 1000 veces más barato que el IPTG. Esto reduce significativamente el coste a gran escala de la producción de proteínas
3. Este sistema reduce al máximo la posibilidad de mutación de los genes.
4. No necesita el uso de antibióticos para la selección de estos sistemas, lo cual reduce también el coste para el usuario.

[– ir a índice –](#)

5.- ¿Puede el CHARIOT utilizarse para transportar ácidos nucleicos al interior de la célula?

No. El CHARIOT es un transportador de proteínas, anticuerpos, péptidos, pero no de DNA o RNA.

[- ir a índice -](#)

6.- ¿Puede usarse el METHYLDETECTOR para analizar DNA metilado en muestras de plantas?

Sí.

El kit puede ser utilizado para analizar metilaciones de DNA en muestras de plantas.

Sin embargo, los primers control que incluye el kit METHYLDETECTOR están diseñados para p16 locci, por lo que el cliente debería diseñar sus propios primers control si fuese necesario.

[- ir a índice -](#)

7.- ¿Es posible utilizar los Kits de ATM para estudiar factores de transcripción en adipocitos de rata y/o humanos?

Sí. De hecho hay una publicación en la que se especifica haber utilizado el [kit TransAM Ppar](#) para estudiar ciertos procesos metabólicos en rata.

El inconveniente de trabajar con adipocitos es la dificultad de la extracción de las proteínas por la presencia de los ácidos Lipídicos.

Por eso lo mejor es que en la extracción con el [Nuclear Extract kit](#), durante los pasos que incluyen el buffer hipotónico, se use más volumen de este buffer que el especificado en el protocolo, y también se incremente la concentración del detergente (2x por ejemplo).

También es importante que durante el proceso de precipitación de los núcleos formando un pellet, se utilice una velocidad de centrifugación menor que la especificada.

[– ir a índice –](#)

8.- ¿Para qué sirve un GripNA? ¿Qué se suele utilizar para transfectar Gripnas? ¿Es posible usar la lipofectamina en estos kits?

Los Gripnas son moléculas formadas por Péptidos –ácidos Nucleicos, con cargas negativas en sus esqueletos (PNAs).

En base a esta característica, Active Motif diseña los **GRipNA**, y crea un servicio de síntesis de sondas para silenciar genes alternando varios ratios de **HypNA y fosfoPNA**. Esta combinación mantiene muchas de las características deseables de las moléculas individuales, pero también juega con la gran especificidad de la secuencia.

Para la introducción del péptido en las células de mamíferos se propone usar el **Chariot II**, pero también se puede hacer mediante lipofección (aunque se ha demostrado que aumenta la citotoxicidad de las células) y scraping celular (pero necesita más cantidad de gripNa por transporte).

El Chariot II es una formulación especial del **Chariot** que está específicamente diseñado para el transporte del gripNa a través de la membrana.

[– ir a índice –](#)

9.- ¿Qué producto se recomienda para marcar proteínas en células vivas?

El LAVACELL™

LavaCell es un tinte fluorescente celular natural (Hongo *Epicoccum nigrum*) que permite la tinción de membranas de células vivas o muertas. LavaCell **emite un pico verde fluorescente en agua (520 nm)** que **cambia a rojo (610 nm)** después de reaccionar con grupos amino primarios.

1. Es permeable en las células.
2. No afecta al crecimiento celular.
3. Reacciona provocando un gran cambio de color.
4. El tinte que no se une a una proteína no emite fluorescencia.

Se puede excitar a 405, 488 y 532 nm, por lo que se puede usar cualquier aparato de láser común.

La tinción es rápida (la membrana se tiñe en 2 minutos, y el citoplasma en unos 15 min).

El tinte **no tiene efecto citotóxico** y no inhibe el crecimiento celular a concentraciones de 5 µM durante 24 horas.

Ya que la fluorescencia es mucho más brillante cuando se une a una proteína que cuando no, hay muy poco background y los pasos de lavado a menudo no son necesarios.

[– ir a índice –](#)

LavaCell™

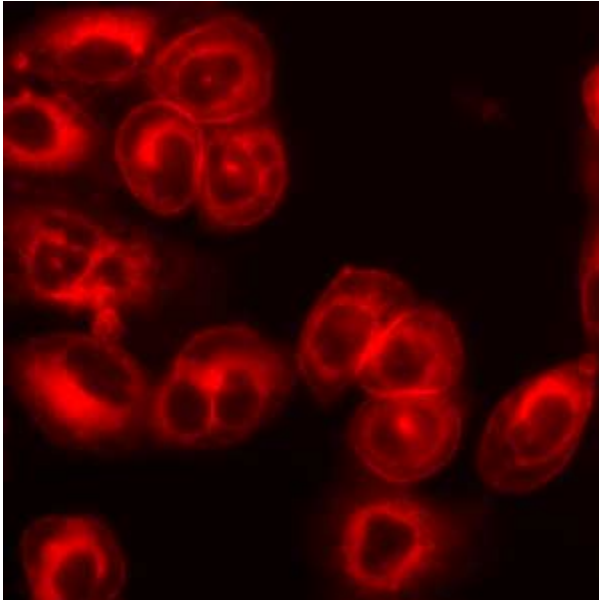


Figure: Staining of live CHO cells with LavaCell.

- LavaCell stains the plasma membrane and internal membranes, such as those of the nucleus, Golgi and ER. CHO cells were plated in 96-well plates cells and treated with 6 μ M LavaCell (diluted in complete medium) for 30 minutes at 37°C. After loading, the dye containing DMEM was removed and cells were washed once in PBS. Cells were imaged in PBS using a fluorescent microscope with a 540-580 nm excitation filter and a 600-660 nm emission filter (exposure time 10 seconds, 40X objective).

[– ir a índice –](#)

10.- ¿Cuál es la diferencia entre el ChIPIT y el Co-IP?

La Co-Immunoprecipitación (Co-IP) es un método poderoso para estudiar las interacciones proteína / proteína.

El [Kit Co-IP](#) simplifica el proceso de precipitación de los complejos de proteínas nucleares gracias a la alta calidad de los reactivos tanto de la extracción nuclear, como de la preparación e inmunoprecipitación de estos complejos.

El proceso de extracción de este kit ofrece un método simple y efectivo para obtener y mantener los complejos de proteínas presentes en el núcleo de la célula, especialmente los complejos que estaban unidos al DNA.

La versatilidad de los reactivos de este kit concede flexibilidad para variar la astringencia del buffer, permitiendo el estudio de cada proteína presente en el complejo proteico de interés.

El [ChIPIT](#) es para inmunoprecipitar complejos DNA-proteína, pero lo que interesa en este caso, no son las proteínas, sino el DNA que esté unido a ellas.

Gracias a este sistema se puede conocer las secuencias de DNA a las que se unen las proteínas moleculares.

[– ir a índice –](#)