*仅用于实验室，不用于诊断。请随时跟我们索取并使用最新版本的说明书。

# A&Direct™ DNA甲基化直接修饰试剂盒

此品非常适合于少量细胞（胚胎和卵母等）与组织（新鲜和冷冻等）的样本，整个实验时间仅需3小时。

**目录号： A-P-1016-40（40次）**

**A-P-1016-80（80次）**

*操作手册*

**在您收到定购的产品时，请确认操作手册是配套的！**

***同时，有翻译不妥的地方还请各位老师批评指正！***

**反馈信箱：tech@aderr.com**

2012年10月，第1版，对应英文第2 . 0706版

艾德科技(北京)有限公司
A&D Technology Corporation

# 目录表

产品手册.....3
试剂盒组成.....3
运输和保存.....2
配套器材(自备).....2
说明.....3
重点提示.....3
一般特性.....3
产品简介.....3
原理/步骤.....8
用法.....3
操作手册.....3
附录.....10
凝难解答.....11
定购信息.....11
推荐产品.....11
如何下单.....11
推荐阅读.....11

# 试剂盒组成

| 内容 | A-P-**1016**-40 | A-P-**1016**-80 | 保存条件 |
|---|---|---|---|
| **W1**（消化粉） | **1 瓶** | **2 瓶** | **–20**°C |
| **W2**（消化液） | **0.1 ml** | **0.2 ml** | **4**°C |
| **W3**（细胞收集缓冲液） | **1 ml** | **2 ml** | 常温 |
| **W4**（DNA修饰粉）* | **4 瓶** | **8 瓶** | 常温 |
| **W5**（DNA修饰液）* | **5 ml** | **10 ml** | 常温 |
| **W6**（平衡缓冲液）* | **0.4 ml** | **0.8 ml** | 常温 |
| **W7**（DNA结合液） | **14 ml** | **28 ml** | 常温 |
| **W8**（DNA洗脱液） | **1 ml** | **2 ml** | 常温 |
| **F-Spin Column** | **40** | **80** | 常温 |
| **F-Cellection Tube** | **40** | **80** | 常温 |
| 使用手册 | **1** | **1** | 常温 |

*为了获得产品的最大回收率，在打开瓶盖之前，先解冻、涡旋2分钟并离心至管底。且制备好的**W4/W5/W6溶液** 应立即使用，或在**–20**°C避光保存一周。

# 运输和保存

该试剂盒常温条件下运输，在您收到产品后应立刻按照操作手册要求进行保存。

注意：在合适的保存情况下，所有的产品组件有效期是**6**个月，自发货之日算起。

# 配套器材(自备)

- 带盖的热循环仪
- 台式离心机（转速可达14000rpm）
- 可调移液器和吸头
- 1.5 ml 离心管
- 0.2 ml PCR管
- 15毫升锥形管
- 乙醇（96-100%）

# 重点提示

**使用必读：**

DNA甲基化直接修饰试剂盒 专门为DNA甲基化的分析而设计，包括在96孔/384孔板培养的细胞，部分组织样本，显微解剖样本，组织活检和早期胚胎细胞和卵母细胞等样本。在进行修饰之前，这些材料可能并不适合进行DNA的提取。

非常适合使用少量的DNA做甲基化特异性PCR的扩增。

DNA甲基化直接修饰试剂盒 非常适合使用少量的细胞和组织增加DNA的得率，节约时间和减少劳力。

使用甲基化直接修饰试剂盒洗脱的DNA非常适合做Real Time MS-PCR。同样，对于下游的甲基化实验，如：MS-PCR，BSP，焦磷酸测序，和甲基化微阵列分析等，非常理想。

若您说使用DNA甲基化直接修饰试剂盒，在做MSP时，PCR的循环数应大于45。每次修饰反应起始材料应该是：100-20000个细胞，或1ug-100ug 组织或0.2-2 $mm^2$部分组织。为了得到最为理想的修饰效果，我们建议的样本量分别是：500-5000个细胞，或5-20 ug组织，或0.5-1$mm^2$部分组织。

对照试剂的加入，可确保PCR引物特异性的结合修饰过的DNA和甲基化的DNA。通过提高引物-亚硫酸氢盐 DNA模板间的退火效率来提高了MS-qPCR的灵敏度和特异性，省时高效。对于亚硫酸氢盐 DNA，特异的加入了一对β-actin引物。可以区分修饰后的DNA和未修饰的DNA。

**预防措施:**

为了降低后续 PCR 扩增过程中的风险，在构建 PCR 反应时，我们建议实验人员应带一次性干净的手套和使用带滤芯的吸头。

# 说明

## 一般特性

**质控:**

每批DNA甲基化直接修饰试剂盒的生产,对既定的各个组件的生产把控,确保了稳定的产品质量。保证所有产品的性能描述都符合行业的产品标准。

**质量保证:**

此品如果没有达到您的实验期望,可以给我们的技术发送邮件到:***tech@aderr.com***。我们也鼓励您随时与我们联系,如果您有任何意见或新的应用领域及产品性能和技术。

**安全:**

对于实验人员工作时,实验室应配备安全的外套,一次性手套,和适当的防护眼罩

**产品更新:**

艾德科技有权更改或修改任何产品,以提高其性能和设计。这个操作指南的信息是可能随时变更,恕不另行通知。因此,此使用指南仅为提供此品用户时配套使用。

**使用限制:**

DNA甲基化直接修饰试剂盒是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

**知识产权:**

DNA甲基化直接修饰试剂盒中使用的原理和方法,我司有产品使用的追索权。

# 产品简介

在很多的课程中都有涉及到DNA甲基化的知识，众所周知DNA甲基转移酶[DNA methyltransferases(DNMTs)]从S-adenosyl-L-methionine传递一个甲基群到第五碳位置的胞核嘧啶。 异常DNA甲基化主要发现在5’-CPG-3”dinucleotides引起的人内或在第一个外显子的基因,在癌细胞基因转录中是一个重要的研究途径。基因表达、肿瘤发生、其他遗传和表观遗传疾病中，DNA甲基化扮演着极为重要的角色。尤其在癌症方面。因此,在一些基因检测甲基化病变的细胞中可以提供非常有用的信息。

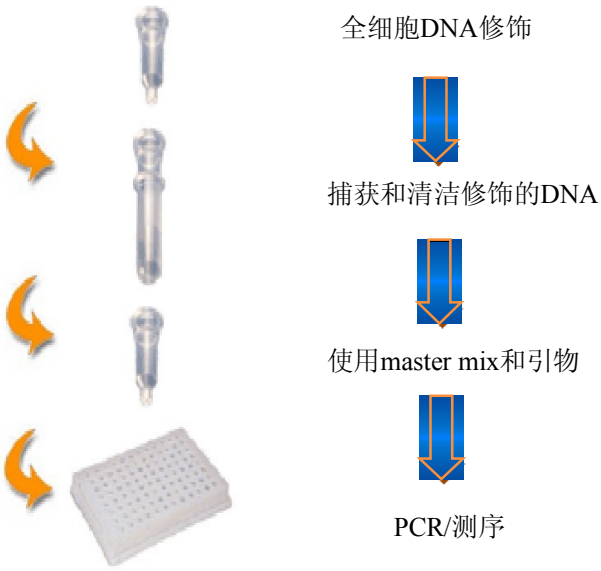
在最近几年，有许多方法来检测DNA甲基化。其中MS-PCR是最常用的。他们中的大多数需要基于亚硫酸氢盐开始前DNA甲基化改性实验如MSP,测序,限制分析,和其他等。基于亚硫酸氢盐的DNA修饰用于区分胞嘧啶和甲基胞胞嘧啶,在单链DNA亚硫酸氢盐处理时胞嘧啶转换尿嘧啶,而被甲基化的胞嘧啶是不变的。所有当前方法进行DNA修饰都需要提取DNA作为起始材料,在微量的组织或细胞样本中，导致无法获得足够的可修饰的DNA。尤其是在生物医学研究、高通量生物标志物/药物筛选、病理诊断中使用少量的组织或细胞样本进行研究，是非常普遍的。这些类型的样本可能包括活检组织,显微解剖样本,含细胞的体液,在96孔和384孔板中培养的细胞,和早期胚胎细胞/卵母细胞等等。因此,直接从整个细胞DNA修改或组织中给出一个更好方案变得盛为迫切,这样可以更高效地利用这些类型的样本。这样还可得到更大的产量,因为在亚硫酸氢盐处理之前我们避免了在DNA分离/纯化中所造成的损失。为了解决这个问题,**A&Direct™ DNA甲基化直接修饰试剂盒** 是专门处理在细胞与组织水平直接进行DNA修饰的有效工具。采用这个试剂盒修饰到的DNA可进行下游的相关实验，如：甲基化特异定量PCR即MSP，BSP，焦磷酸测序分析，甲基化微阵列分析和荧光定量PCR分析等等。操作简便，快捷，灵敏度高，可重复利用。

对于细胞与组织，**A&Direct™ DNA甲基化直接修饰试剂盒** 具有以下特点：

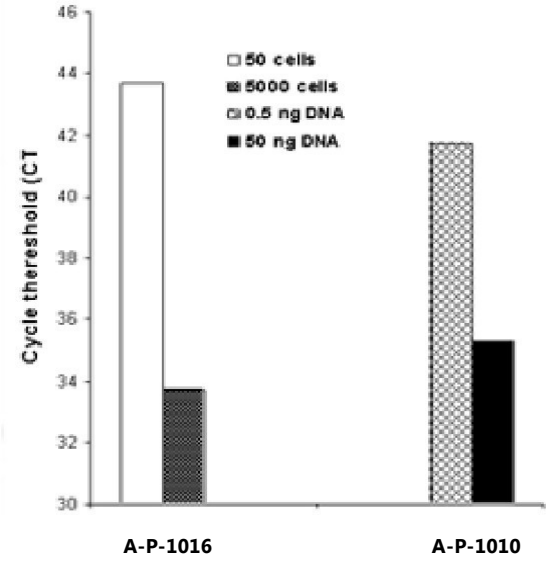
- 快速获得结果：从细胞和组织到修饰好的DNA，流线型的设计仅需3小时。
- 完全将胞嘧啶转化成尿嘧啶：DNA修饰率>99.5%。
- 最少的DNA降解：独特的DNA保护液有效地保护了超过90%的DNA不被降解。
- 方便的混合缓冲液模式使得配置反应体系更加简单。
- 操作简便、结果可靠、统一的分析条件。

# 原理/步骤

DNA甲基化直接修饰试剂盒 提供了预混好的酶系统，包括了热启动DNA聚合酶，dNTPs，一个MS-PCR增强剂，优化的缓冲液系统和预装的绿色染料。这个预混系统容许为了方便与简便进行设置的。独特的热启动DNA聚合酶的活性是需要在95˚C下花几分钟来重新激活，这样很容易地通过热循环仪来集成。热启动DNA聚合酶结合优化缓冲液系统保证了定量聚合反应的特异性和灵敏度。绿色染料允许进行DNA检测和分析，无需再使用特异性的探针。




图示：DNA甲基化直接修饰试剂盒的使用步骤




分别使用 DNA 甲基化直接修饰试剂盒（A-P-1016）和一步法 DNA 甲基化修饰试剂盒（A-P-1010）对于 MCF-7 的细胞或从 MCF-7 细胞中提取的 DNA 进行的修饰比较；10ul 修饰好的 DNA 和 2ul 用于 real time PCR。在甲基化和非甲基化中设计一对引物和一个探针进行扩增，可得到 β-actin 的等位基因

# 用法

## 操作手册

**提示：在放置如下中的柱子到离心管中是，一定要将盖子盖上。**

**在开始实验前，准备如下要求的溶液（试剂盒不包括），70%乙醇；90%乙醇和 100%乙醇。**

1. 将50ul 的**W2**加入到**W1**中（A-P-1016-40）或将100ul 的**W2**加入到**W1**中（A-P-1016-80）制备**W1/W2溶液**。涡旋直至溶液澄清。
2. 收集样本：

**对于结合力较强的培养细胞：**可通过离心收集。将10ul的**W3**加到重新复苏的细胞中并转移到干净的0.2 ml PCR管中。

**对于体液：**像脑脊液、ascite、唾液、尿液、可通过离心简单收集细胞。将10ul的**W3**加到重新复苏的细胞中并转移到干净的0.2 ml PCR管中。

**对于活检组织：**将10ul的**W3**加到干净的0.2 ml PCR管中，然后直接收集细胞并加到包含**W3**的PCR管中。

**对于早期胚胎细胞和卵母细胞：**将10ul的**W3**加到干净的0.2 ml PCR管中，然后直接收集细胞并加到包含W3的PCR管中。

**对于部分新鲜的组织：**将10ul的**W3**加到干净的0.2 ml PCR管中。从载波片（0.2－2mm$^2$，假如是5μm厚，约有200 - 2000个细胞）上移走您的组织样本并直接收集这些细胞加到包含**W3**的PCR管中。

**对于石蜡包埋的组织和固定的组织：**根据你自己成功的方法如石蜡去除剂，首先将石蜡去除，或您也可以采用如下的方法来进行：

1）.把载波片放到100%二甲苯中，室温放置5分钟。重复一次新的二甲苯。

2）.把载波片放到100%的乙醇中, 95%的乙醇, 和70%乙醇各5分钟。风干载波片。

从载波片（0.2－2mm$^2$）上切下您需要的组织并直接将它加到包含10 ul **W3**的PCR管中。

**对于新鲜或冷冻组织的显微解剖样本：**将3－5 ul的**W3**加到干净的0.5 ml 带盖的PCR管中，把收集到的显微解剖组织和细胞（100－100 0细胞）放到PCR管中。转移PCR管并将它放置在含**10 ul W3**的PCR管中。（注意：如果盖子是干的,需添额外添加一个**3 - 5μl W3**到管中,然后将它回到PCR管）。12000 rpm，离心30秒,将细胞溶液离心到管中。转移包含细胞溶液到一个新的0.2 毫升PCR管。

**对于从福尔马林固定、石蜡包埋组织中的显微解剖样本：**根据你自己成功的方法如石蜡去除剂，首先将石蜡去除，或您也可以采用如上的方法来进行。将3－5 ul的**W3**加到干净的0.5 ml 带盖的PCR管中，把收集到的显微解剖组织和细胞（400－1000 细胞）放到PCR管中。转移PCR管并将它放置在含**10 ul W3**的PCR管中。（注意：如果盖子是干的,需添额外添加一个**3 - 5μl W3**到管中,然后将它回到PCR管）。12000 rpm，离心30秒,将细胞溶液离心到管中。转移包含细胞溶液到一个新的0.2 毫升PCR管。

3. 加1 ul的 混合液**W1/W2溶液**到每个包含样本的PCR管中并将管子放置到带盖子的热循环仪上，设置程序65°C持续45分钟。同时，加1 ml的 **W5** 到1瓶**W4**中，接下来加入60ul的**W6**，制备**W4/W5/W6溶液**。涡旋直至溶液澄清或饱和（大约是2分钟）。

4. 加110ul的 混合液**W4/W5/W6溶液**到每个包含样本的PCR管中。将管子放置到带盖子的热循环仪上并按照如下步骤设置运行程序：

| | |
|---|---|
| 99°C | 20分钟 |
| 65°C | 90分钟 |
| 99°C | 10分钟 |

修饰的DNA可以在25 °C中的热循环仪中长达4个小时无任何的损失。

5. 放置柱子到新的2ml的收集管中。加200ul的**W7**到柱子中。转移样本（第4步）到包含**W7**的柱子中，接下来加入100%的异丙醇到柱子中。室温放置2分钟并12000rpm离心20秒。将柱子从收集管中取出，并丢弃废液。重新放回柱子到收集管中。
6. 加200ul的 70% 乙醇到柱子中，12000rpm离心25秒。
7. 加10 ul的**W6**到1ml的90% 乙醇并混合制备**W6/乙醇溶液**。加50 ul的混合的**W6/乙醇溶液**到1ml的90% 乙醇并混合制备**W6/乙醇溶液（DNA清洁溶液）柱子**中。室温放置10分钟，然后12000rpm离心20秒。
8. 加200 ul的 90% 乙醇到柱子中，12000rpm离心20秒。将柱子从收集管中取出，并丢弃废液。重新放回柱子到收集管中。再加200 ul的 90% 乙醇到柱子中，12000rpm离心40秒。
9. 放置柱子到新的1.5ml的离心管中。根据起始样本的量，加入8-18ul的**W8，**直接加到柱基质上。12000rpm离心20秒并洗脱修饰好的DNA。

此时，修饰好的DNA可用于甲基化特异性扩增或储存在 $-20°C$ 达2个月。

# 附录

## 凝难解答

| 出现的问题 | 可能的原因 | 建议解决方法 |
|---|---|---|
| 修饰的 DNA 较少 | 细胞/组织裂解不完全 | 增加在第 3 步中孵育的时间到 60-90 分钟。 |
| | 模板包含高 GC 区和二级结构 | 增加在第 4 步中亚硫酸盐修饰反应的时间（65°C）到 120 分钟。 |
| | 热循环仪设置不正确 | 根据操作手册提供的条件检查热循环仪的设置是否正确。 |
| | 亚硫酸盐修饰反应的组件被不正确的混合 | 确保 **W6** 是否足够的加入了 90%的乙醇。 |
| | DNA 澄清不足 | 确保加入了足够的 W6 到 90%的乙醇中。 |
| | 不正确的储存 **W4/W5/W6** 溶液。 | 确保 **W4/W5/W6** 溶液在－20° C 储存不到 2 周。 |
| 洗脱后无或很少的 DNA | 贫瘠的起始材料数量（如：FFPE 样品包含 DNA 片段） | 检查其实材料的质量是否是好的。 |
| | 起始材料太少（如：少于 50 个细胞） | 增加起始材料。 |
| | **W7** DNA 结合液没有被加入到样本中 | 确保 **W7** 按照第 5 步中描述的加入了。 |
| | 操作手册中第 7 步的清洁液没有正确准备 | 确保加入的 **W6** 是 90%的乙醇。 |
| | 柱子没有使用 90%的乙醇清洗 | 确保清洗液是 90%的乙醇。 |
| | 样本没有完全通过柱基质 | 增加第 5-9 步的离心时间到 1 分钟。 |
| 洗脱后包含未被修饰的和已经修饰的 DNA | 使用的细胞/组织的数量超出了建议的范围 | 按照建议的范围调整细胞/组织起始材料的数量。 |
| | 富含高 GC 的模板 | 增加在第 4 步中亚硫酸盐反应的时间（65°C）到 120 分钟。 |
| 很少的 MS-PCR 产品 | PCR 组件是不足的 | 检查所有的 PCR 组件是否已经加入了。 |

# 定购信息

| 货号 | 品名 | 规格 |
|---|---|---|
| A-P-1016-40 | A&Direct™ DNA 甲基化直接修饰试剂盒 | 40 次 |
| A-P-1016-80 | | 80 次 |

# 推荐产品

**DNA 样本的制备:**

| 货号 | 品名 |
|---|---|
| A-D1801 | 全基因组 DNA 极速提取试剂盒（离心柱） |
| A-D1901 | 细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱） |
| A-D3111 | 新型极速植物基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱） |
| A-D6201 | 酵母基因组 DNA 试剂盒（离心柱） |
| A-D7111 | 石蜡包埋组织基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱） |

**全基因组DNA甲基化定量试剂盒:**

| 货号 | 品名 |
|---|---|
| A-P-1026 | DNA 甲基化极速修饰试剂盒 |
| A-P-1028 | 快速 MS-qPCR 试剂盒 |
| A-P-1029 | Epiquick qPCR 快速试剂盒 |
| A-P-1034 | DNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法) |
| A-P-1035 | DNA 甲基化定量检测试剂盒(荧光法) |
| A-P-1036 | DNA 羟甲基化定量检测试剂盒(比色法) |
| A-P-1037 | DNA 羟甲基化定量检测试剂盒(荧光法) |

**其它产品：**

| 货号 | 品名 |
|---|---|
| A-R1201 | A&D TRIpure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒（离心柱型） |
| A-R4001 | A&D 血液总 RNA 快速提取试剂盒（液体样本,离心柱型） |
| A-R3301 | A&D 通用植物总 RNA 提取试剂盒（离心柱型） |
| A-R5901 | A&D血液（液体样本）microRNA快速提取试剂盒（柱型） |
| A-R5311 | A&D 石蜡包埋组织 microRNA 快速提取试剂盒（柱型） |

**如何下单**

1. 电话，传真或邮件定购:

电话：010－52406250；传真：010－52406250；

邮件： ordering@aderr.com

2. 在线定单定购:

**http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1771&t=1474**

**推荐阅读**

1. “新四大碱基”的确定，对于生物学研究者的几点启示!
http://www.aderr.com/cn/main.php?m=2566&t=3623&id=21290

2. 科学家发现新型 DNA-microDNA！
http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=20763

3. 艾德科技为您提供“一站式”的产品与服务！
http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=20739

艾德科技（北京）有限公司
A&D Technology Corporation

地 址：北京昌平区中关村生命科学园东 60 米（102206)
电 话：010-52406250 传真：010-52406250
网 址：www.aderr.com Email:tech@aderr.com