

\*仅用于实验室，不用于诊断和治疗。请随时跟我们索取并使用最新版本的说明书。

# DNA极速修饰试剂盒

目录号：**A-P-1026-050**（50次）  
**A-P-1026-200**（200次）

适用于MS-PCR，实时定量MS-PCR，以及甲基化微阵列。

## 操作手册

在您收到订购的产品时，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](mailto:tech@aderr.com)

2011年5月，第1版，对应英文第1.1006版



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

## 目录

操作.....	2
试剂盒组成 .....	2
运输和保存 .....	2
产品介绍.....	3
重要说明 .....	3
一般产品信息 .....	4
简述 .....	5
原理和程序 .....	7
用法.....	9
需要的材料（需单买） .....	9
使用步骤 .....	9
附录.....	12
使用甲基化特异性 qPCR .....	12
疑难解答 .....	13
订购信息 .....	17
相关产品 .....	17
如何下单 .....	18
推荐阅读 .....	18

## 操作

### 试剂盒组成

内容	含量
<b>BF1</b> (转换混合溶液)	<b>6ml</b>
<b>BF2</b> (捕获溶液)	<b>15 ml</b>
<b>BF3</b> (脱磺酸溶液) *	<b>60µl</b>
<b>BF4</b> (洗脱溶液)	<b>1ml</b>
<b>BF5</b> (转化强化剂) *	<b>5 瓶</b>
<b>BF6</b> (变性强化剂) *	<b>600 µl</b>
F- 离心柱*	<b>50</b>
F- 收集管	<b>50</b>
使用手册	<b>1</b>

\***注意:** 在将离心柱放入微型离心机之前, 始终将离心柱盖子旋紧盖严。

### 运输和保存

该试剂盒按室温运输。所有组件在室温下 (**15-22°C**) 避光保存。

在合适的保存情况下, 所有的产品组件有效期是一年, 自发货之日算起。

**注意:** 在使用 **BF1** 溶液之前, 请先检查瓶里是否有沉积。如有, 摇晃瓶子使沉积物充分溶解。每次打开使用 **BF1** 之后, 都要旋紧其盖子将其密封好。

## 产品介绍

### 重要说明

#### 使用:

使用该DNA修饰试剂盒修饰后的DNA, 适用于各种下游甲基化分析, 包括常规MS-PCR, 实时定量MS-PCR, MS-HRM, 以及甲基化微阵列。

#### DNA输入量:

每次修饰, DNA用量为**0.2ng—1µg**。为得到最佳修饰, DNA输入量为**200-500ng**。如果您使用该DNA修饰试剂盒做MSP, 并且起始DNA量极其少, 那么PCR循环数就要**高于45**。为得到最佳PCR结果, 被放大的靶区不能少于**250bp**。

亚硫酸氢盐修饰后的DNA纯化率取决于DNA输入量、DNA性质以及起始材料的来源。

使用基因组DNA做亚硫酸氢盐修饰, 事先无需做限制性酶方法。质粒DNA可用来做亚硫酸氢盐处理, 可要也可不要之前的线性化, 因为该试剂盒总能允许DNA变形状态在整个DNA亚硫酸氢盐转换过程中得到保持。

#### 起始材料:

材料包括各种组织或细胞样本, 如细胞培养瓶培养的细胞, 微型板中培养的细胞显微解剖样本, 石蜡包埋组织、血浆/血清样品, 体液样本等等。

**预防措施:**

为了避免交叉污染, 以下预防事项对于指导如何使用F-离心柱是非常必要的:

小心的使用移液器将样本或溶液移入到F-离心柱中。使用气溶胶屏障的移液器枪头, 在使用移液器进行不同样本或溶液的转移时, 要及时不停的更换枪头。在将离心柱放入微型离心机之前, 始终将离心柱盖子旋紧盖严。在整个实验程序中需要戴手套。且不同样品之间的接触, 应立即更换手套。

**一般产品信息****质控:**

每批DNA修饰试剂盒按照预定技术规范进行检测, 以确保稳定的产品质量。我司保证所有产品的性能跟说明书中的描述一致。

**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](mailto:tech@aderr.com)。如果您有任何意见或新的应用领域及产品性能和技术, 我们也鼓励您随时与我们联系。

**安全防护:**

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, 和适当的防护眼镜。

**产品更新:**

我司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修饰试剂盒中使用的原理和方法, 我司有产品专利。

**简述**

胞嘧啶环中 5-碳上的甲基若具备共有原子价的条件, 就能引发 DNA 的甲基化, 产生 5-甲基胞嘧啶。现在有多种方法可用于 DNA 甲基化状态的分析。但是, 只有基因组 DNA 亚硫酸氢盐修饰, 紧接着 PCR 扩增, 克隆, 以及个体 PCR 扩增引物排序, 能对个体 DNA 分子上的个体胞嘧啶的甲基化状态提供可靠的信息。通过使用亚硫酸氢盐处理 DNA, 胞嘧啶残留物将被脱氨基成尿嘧啶, 而 5-甲基胞嘧啶则被完整的保留。

	<u>Unmethylated DNA</u>	<u>Methylated DNA</u>
<i>Original Sequence</i>	C-C-G-T-C-G-A-C-G-T	C- <sup>M</sup> C-G-T- <sup>M</sup> C-G-A- <sup>M</sup> C-G-T
<i>After Bisulfite Conversion</i>	U-U-G-T-U-G-A-U-G-T	U- <sup>M</sup> C-G-T- <sup>M</sup> C-G-A- <sup>M</sup> C-G-T

传统的亚硫酸氢盐转化方法需要**12-16**个小时进行亚硫酸氢盐处理，DNA严重降解（>**80%**），高不相称的甲基胞嘧啶脱氨基（>**3.5%**），低胞嘧啶转化率（<**95%**）。在**2005**年三月份，我司成为第一个研发快速DNA亚硫酸氢盐修饰方法的公司，我司的方法克服了其他方法所存在的一系列问题——将亚硫酸氢盐过程从**16**小时缩短至只需要**1.5**小时，显著的提高了胞嘧啶转化效率（>**99.9%**），并有效的防止了修饰后的DNA降解。

为了有效的配备转化后的DNA用于各种下游分析，一种理想的亚硫酸氢盐修饰方法应该具备（**1**）高度精确允许胞嘧啶完全转化为尿嘧啶（正确的转化）而不会产生甲基胞嘧啶脱氨基成为胸腺嘧啶（不正确的转化）；（**2**）极速，使亚硫酸氢盐过程尽可能的缩短，因为对于基础研究，特别是临床应用，都要求要进行快速DNA甲基化分析。

我司再接再厉创新研发DNA修饰试剂盒，完美的演绎了DNA亚硫酸氢盐修饰方法，从而取得更好的DNA甲基化分析。该试剂盒极大的改进了目前所使用的DNA亚硫酸氢盐修饰试剂盒。具备新颖且能最大利用的亚硫酸氢盐合成物，该DNA修饰试剂盒能够使DNA修饰步骤缩短在**20**分钟之内，并获得胞嘧啶完全充分的转化结果。更重要的是，它能极大的减少**5-甲基胞嘧啶**不正确转化为胸胞嘧啶（<**0.1%**）。该DNA修饰试剂盒适用于MS-PCR，实时定量MS-PCR，以及甲基化微阵列。

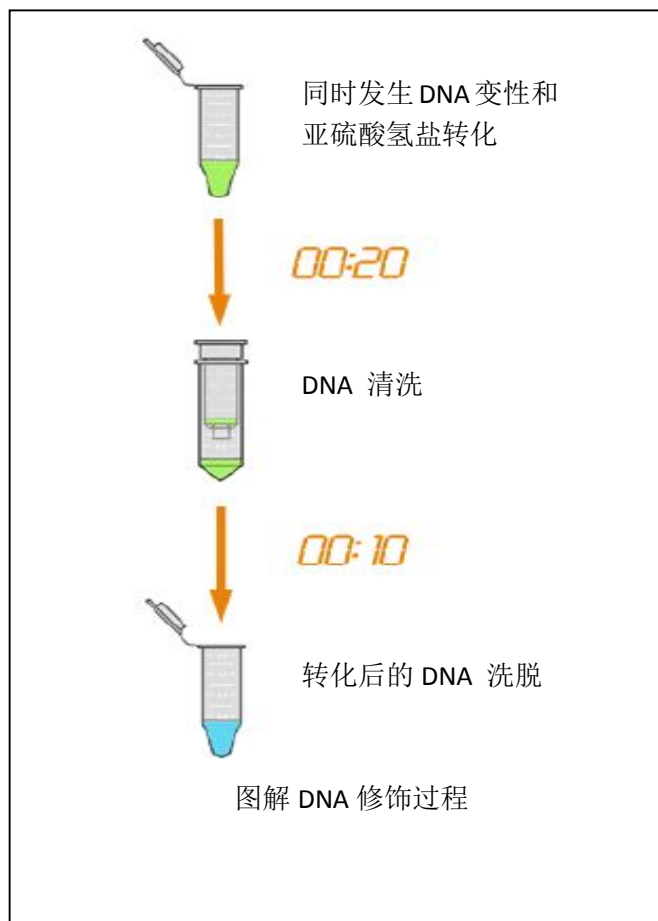
该DNA修饰试剂盒具有以下优势和特点:

- 方便的单一温度孵育。不需要进行单独的DNA变性步骤。
- 最快速最方便的操作步骤，能在**30**分钟左右完成。
- 完全的将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶（>**99.99%**），不合适的和错误的转化甲基胞嘧啶转化为胸腺嘧啶极其微小（<**0.1%**），可以忽略。
- 强劲保护DNA不被降解，能保证**90%**的DNA不被损失掉。
- 只需要输入极其少量的DNA进行修饰即可——**0.2 ng**或者 **50**个细胞。
- 简单，可靠，不变的修饰条件。

## 原理和程序

作为下一代亚硫酸氢盐转化工具，DNA修饰试剂盒包含所有组件对DNA样本进行超快的亚硫酸氢盐转化。由于独特的转化混合溶液包含功效强大的DNA保护试剂，在整个亚硫酸氢盐DNA转化过程中，DNA的变性状态都能得到保持，因此，能使**100%**的DNA在单链的形态下得到修饰，而不会进行化学降解和嗜热降解。

因此，这种新颖的方法能加速使胞嘧啶转化为尿嘧啶，产生可以忽略不计的甲基胞嘧啶脱氨基作用。无毒的DNA捕获溶液使DNA紧密的吸附在柱基质上，因此DNA净化就能在柱子上进行，并有效的去除残留的亚硫酸氢盐和盐分。



## 用法

### 需要的材料（需单买）

- 热循环仪带加热盖\*。  
\*由于亚硫酸氢盐反应不用矿物油，只有热循环仪带加热盖比较适合这个步骤。
- 台式离心机（高达**14,000 rpm**）
- 移液器和移液枪头
- **0.2 ml PCR管**
- **1.5 ml微型离心机管**
- **90%乙醇**

### 使用步骤

为得到最好的结果，在实验开始前，请全面仔细地阅读本使用步骤。

### 起始材料

输入DNA量： DNA 量范围**200 pg ~1 μg**/反应。也可以**50–200 ng**/反应。起始DNA可放在水中或者缓冲液例如TE。

DNA提取：您可以使用自己的方法进行DNA提取。我公司提

供一系列全基因组DNA提取试剂盒方便您的使用（看第 16 页“订购信息”下面）。

DNA保存：提取好的全基因组DNA，在使用前可保存在 4°C 或者 -20°C 条件下。

### 亚硫酸氢盐DNA转化

1. 将1 ml **BF1**加入到一瓶**BF5**中。倒转摇晃瓶子2分钟使溶液混合。将80 µl**BF6**加入到瓶中，倒转摇晃瓶子3分钟使溶液混合。（微量的未溶解的**BF5**可能残留，这是正常的，因为**BF5**在溶液中是饱和的）。
2. 往每一个0.2 ml 的PCR 管子中加入110 µl **BF1/BF5/BF6** 混合溶液，然后加入1-5 µl DNA溶液。  
*注意：检查（1）在将 **BF1**加入到瓶中之前，**BF1**溶液中是否有沉积。如果有，要换一下瓶子使其溶解。（2）如果DNA体积大，并且浓度低于10ng/µl，在进行亚硫酸氢盐处理之前，推荐使用我司DNA浓缩试剂盒（Cat. No. A-P-1006）。配置好了**BF1/BF5/BF6**溶液可以储存在室温条件下两周，不会显著的降低功效。为得到最好的结果，混合溶液应该尽快使用。*
3. 把PCR管子盖紧，并且将它们放到 热循环仪中，温度为 95°C，放20分钟。同时，根据实验需要，将F-离心柱（此后称“柱子”）插入F-收集管中（此后称“收集管”）。

### 修饰后的DNA洗脱

4. 将250µl **BF2**加入到每一个柱子中。然后将样本从每一个PCR管子中（第二步）转移到每一个含有**BF2**的柱子中。在12, 000rpm下离心30秒。从收集管中移走柱子，弃废液。然后将柱子放回到收集管中。
5. 将200µl 90% 的乙醇溶液加入到每一个柱子中，在12, 000rpm下离心20秒。
6. 每1 ml 90% 乙醇中加入12µl**BF3**，混合，配制最终的脱磺酸缓冲液。往每一个柱子中加60 µl最终的脱磺酸缓冲液（**BF3**和90%乙醇混合液）。将每一个柱子在室温下放8分钟，然后在12, 000rpm下离心20秒。从收集管中移走柱子，弃废液。然后将柱子放回到收集管中。
7. 将200µl 90% 的乙醇溶液加入到每一个柱子中，在12, 000rpm下离心20秒。从收集管中移走柱子，弃废液。然后将柱子放回到收集管中。将200µl 90% 的乙醇溶液加入到每一个柱子中，在12, 000rpm下离心30秒。
8. 将每一个柱子插入到新的1.5 ml管子中。往每一个柱子的过滤膜中直接加入10-20µl **BF4**，在12, 000rpm下离心30秒，洗脱修饰后的DNA。

修饰好了的DNA现在可以使用了。或者也可储存在-20°C或低于该温度的条件下，可以存放六个月。我们建议每次实时qPCR使用1-2µl DNA，终点PCR 2-4µl DNA。

您可以使用自己成功的方法来做甲基化特异性-实时PCR。为您方便，以及得到更好的结果，我司提供MS-qPCR快速试剂盒，能充分利用于快速甲基化特异性qPCR反应，70分钟就能完成（请看第12页下面“使用甲基化特异性qPCR”）

## 附录

### 使用甲基化特异性qPCR

当做MS-qPCR时，我们推荐使用MS-qPCR快速试剂盒（Cat. No. A-P-1028），它包含热启动聚合酶系统，并且能极大的减少全部甲基化特异性qPCR扩增时间。在2X浓度下，提供多功能混合液，只要多加一些引物和模板，更易于准备PCR反应。如果使用该试剂盒，MS-qPCR能缩短在70分钟之内完成。

### 准备PCR反应

Component	Size (µl)	Final Concentration
Methylamp Master Mix (2X)	10 µl	1X
Forward Primer	1 µl	0.4-0.5 µM
Reverse Primer	1 µl	0.4-0.5 µM
DNA Template	1-2 µl	50 pg-0.1 µg
DNA/RNA-free H <sub>2</sub> O	6-7 µl	
<b>Total Volume</b>	<b>20 µl</b>	

作为阴性对照，使用不含DNA/RNA的水代替DNA样本。

### 设计PCR反应

Cycle Step	Temp	Time	Cycle
Activation	95°C	7 min	1
Cycling	95°C	10 sec	40-45
	55°C	10 sec	
	72°C	8 sec	
Final Extension	72°	1 min	1

### 疑难解答

问题	可能的原因	建议
DNA修饰不良	DNA质量不好（DNA严重降解）。	检查样本DNA260/280比率是否在1.6-1.9之间，是



		否由于电泳胶造成DNA降解。
	太少的DNA 或者太多的DNA（例如 < 100pg 或者 >1 µg）。	添加或者减少DNA量，使其达到正常的范围。或者达到最佳的量范围 <b>50-200 ng</b> 。
	模版含太高GC区或二级结构。	延长第二步热循环仪程序时间 <b>5-10</b> 分钟。
	温度和热循环仪条件不对。	检查并调整到合适的温度和热循环仪条件。
	DNA 清洗不足。	确保在第五步中 <b>12µl BF3</b> 加入到每 <b>1ml 90%</b> 乙醇中。
	<b>BF1</b> 溶液含沉积。	加入到管中之前，先检查 <b>BF1</b> 瓶子上是否有沉积。如果有，摇晃瓶子使其溶解。
	<b>BF1</b> 溶液受到其他化学品污染，或者由于长期暴露在空气中而受到影响。	检查 <b>BF1</b> 溶液颜色是否有变化（深黄色或者褐色）或者是否又不能溶解的沉积。如果有，使用/订购新的 <b>BF1</b> 溶液。
	试剂盒储存或者使用	将所有组件保存在

	不当。	室温下。每次打开或使用后，旋紧 <b>BF1</b> 溶液的盖子。
洗脱液含有很少或者不含有DNA。	放入的DNA质量不行（降解）。	检查是否由于电泳胶造成DNA降解。
	缓冲液 <b>BF2</b> （捕获溶液）没有加入到样本中。	确保在第三步中 <b>BF2</b> 被加入。
	作为DNA清洗的乙醇溶液的浓度不正确。	使用 <b>90%</b> 乙醇作DNA清洗。
	样本没有完全通过柱子上的过滤膜。	在 <b>12,000 rpm</b> 条件下离心一分钟，直到整个样本都通过过滤膜。
下游甲基化特异性PCR结果不良	即便在阳性对照中，很少或者没有PCR产品。	确保所有的PCR组件都加入了，并且使用了合适的PCR程序（PCR循环应 > <b>40</b> ）。
		PCR 引物和探针设计不合适或不正确。确保引物和探针合适于做MSPCR，被放大靶区少于 <b>250</b>



		bps。
		确保PCR中使用的模板DNA量足够。
	显著产生非特异性PCR产品	亚硫酸氢盐转化失败。确保所有修饰和清洗步骤都按照说明书中执行，并且输入DNA量也是在推荐的范围内。
		引物和探针不是专门用来处理修饰后的DNA或者目标基因。检查引物和探针的设计是否正确。

## 订购信息

货号#	描述	规格
A-P-1026-050	DNA极速修饰试剂盒	50次反应
A-P-1026-200	DNA极速修饰试剂盒	200次反应

## 相关产品

DNA样本准备	
货号#	描述
A-P-1003	常规组织切片DNA提取试剂盒
A-P-1004	血浆/血清DNA提取试剂盒
A-P-1006	DNA 浓缩试剂盒
A-P-1007	凝胶DNA提取试剂盒
A-P-1009	蜡包埋组织切片DNA提取试剂盒
A-P-1017	尿脱氧核糖核酸(DNA)提取试剂盒
A-P-1018	血液和培养细胞 DNA 抽提试剂盒
DNA亚硫酸氢盐修饰	
货号#	描述
A-P-1002	双链 DNA提取&修饰试剂盒
A-P-1008	96DNA修饰试剂盒
A-P-1016	全细胞亚硫酸氢盐修饰试剂盒
DNA甲基化分析	
货号#	描述
A-P-1005	PCR清洗试剂盒

A-P-1011	通用甲基化DNA修饰试剂盒
A-P-1019	通用甲基化DNA配备试剂盒
A-P-1028	MS—qPCR 快速试剂盒

### 如何下单

1. 电话，传真或邮件订购:

电话: 010-52406250; 传真: 010-52406250;

邮件: [ordering@aderr.com](mailto:ordering@aderr.com)

2. 在线定单订购:

<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. 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](http://www.aderr.com) 电邮: [tech@aderr.com](mailto:tech@aderr.com)