*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。

Methylamp™ MS-qPCR试剂盒

此品非常适合于少量甲基化DNA的实时定量扩增实验，整个实验时间仅需要70分钟。

目录号： A-P-1028-100（100次）

A-P-1028-200（200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5月，第1版，对应英文第1.1005版

目录表

产品手册.....2
试剂盒组成.....2
运输和保存.....2
配套器材(自备).....2
说明.....4
重点提示.....4
一般特性.....4
产品简介.....4
原理/步骤.....5
用法.....4
操作手册.....4
附录.....7
凝难解答.....7
定购信息.....7
推荐产品.....7
如何下单.....7
推荐阅读.....7

试剂盒组成

内容	A-P-**1028**-100	A-P-**1028**-200	**保存条件** 收到后
Master Mix （2X）*	**1瓶（每管1.2ml）**	**2瓶（每管1.2ml）**	**–20**°C
DNA/RNA-free Water （双蒸水）	**1瓶（每管1.5ml）**	**2瓶（每管1.5ml）**	**–20**°C
对照引物 （β-actin）*			
上游引物 （100 μM）*	**8 μl**	**20 μl**	**–20**°C
下游引物 （100 μM）*	**8 μl**	**20 μl**	**–20**°C
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，先解冻并离心至管底。

运输和保存

该试剂盒带冰袋在**4**°C条件下运输，在您收到产品后应立刻在**–20**°C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)

- 实时荧光定量PCR仪
- PCR反应板和薄壁PCR管
- 可调移液器和吸头

重点提示

使用:

Methylamp™ MS-qPCR试剂盒非常适合使用少量的DNA做甲基化特异性PCR的扩增。

在使用Methylamp™ MS-qPCR试剂盒对于在MS-qPCR中少至50pg的DNA，对于PCR循环数应大于45。

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:

为了降低在 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Methylamp™ MS-qPCR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:

Methylamp™ MS-qPCR试剂盒是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

知识产权:

Methylamp™ MS-qPCR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,对于基因序列检测与甲基化的检测开发了很多的方法。其中MS-PCR是最常用的。通过亚硫酸氢盐将胞嘧啶转化成尿嘧啶，能够特异性的与甲基化的引物结合并扩增。

能否特异性的扩增甲基化的DNA就成为一个很大的挑战。因原始序列中富含GC的胸腺嘧啶冗长，对于使用聚合酶来识别就变的很难。因此，扩增是很难的，因为特异性的扩增和在化学转化后减少引物的结合时间，这需要花费很长时间。

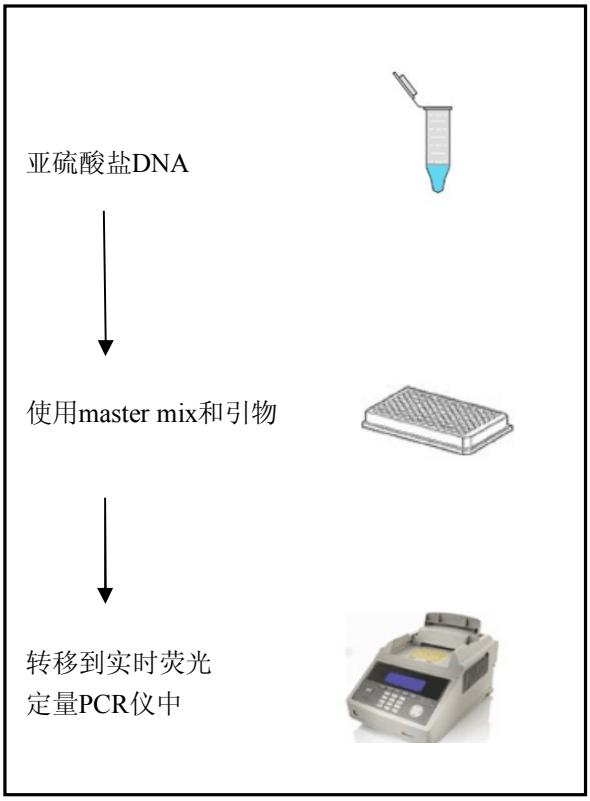
我司提供的Methylamp™ MS-qPCR试剂盒提供了一整套试剂和方法，来解决以上遇到的问题。这个试剂盒可进行甲基化特异定量PCR,操作简便，快捷，灵敏度高，可重复利用。试剂盒中新型的热启动DNA聚合酶可以减少MS-qPCR所需的循环数，使实验过程从近2·5小时缩短到不超过70分钟。本试剂盒适用于使用痕量的DNA进行快速甲基化特异性定量PCR。试剂盒通过提高引物-亚硫酸氢盐 DNA模板间的退火效率来提高了MS-qPCR的灵敏度和特异性，省时高效。这个结果可以保证在很长时间内储存并更高效地进行MS-qPCR。

Methylamp™ MS-qPCR试剂盒 具有以下特点：

- 极其快速的试剂盒，70分钟内完成反应。
- 高扩增效率获得丰富的产物。
- 高精确度和对MSP的特异性，降低假阳性概率。
- 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。
- 可用于所有基于模块的实时PCR设备。

原理/步骤

Methylamp™ MS-qPCR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：Methylamp™ MS-qPCR试剂盒的使用步骤

用法

操作手册

PCR 反应的准备

1. 解冻所有的产品组件包括master mix, DNA/RNA free water,proimer solution and DNA template。使用涡旋仪简单混合。在使用时，保证所有组件均在冰上操作，并在使用完后立刻放在–20˚C保存。
2. 根据下面的步骤加每个组件到孔中。

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_2O	6-7 µl	
Total Volume	**20 µl**	

提示：对于阴性对照，使用 DNA/RNA-free water 代替 DNA 模板即可。

PCR 反应的程序

3. 将反应板子放入PCR仪中。

4. 使用如下表来设置PCR的反应条件：

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

附录

凝难解答

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
较少或没有扩增产物	引物不正确	检查引物设计是否正确。按照操作手册中规定的顺序来添加试剂，是否程序中的某些步骤被忽略了。
	引物降解或引物浓度不理想	按照每增加 0.1 uM 增量，使用不同的引物浓度重复 PCR。
	亚硫酸氢处理 的 DNA 较少或是 DNA 的输入量不够	检查试剂盒中的 PCR 引物的特异性和β-actin 对照的可信性。增加 DNA 的输入量。如有必要使用新的亚硫酸氢处理 的 DNA，并用新模板重复 PCR 的步骤。
	DNA 降解了	使用前检查 DNA 是否解冻或 DNA 是否被修饰。
	不正确的 PCR 程序设置包括变性、退火/扩增、时间/温度和 PCR 的周期数不足。	检查变性、退火/扩增、时间/温度、是正确的。增加 PCR 的循环数。
	热启动酶没有被激活	起始温度是在 95˚C 下，7-9 分钟来激活酶。
	移液器错误或漏加试剂	检查试剂的浓度和储存条件，包括引物 。 确 保 master mix 与 primer-templates 的比是 1:1.
	仪器和 PCR 板子的问题	检查荧光定量 PCR 的电源是否打开和 PCR 板子是否在仪器中放好。
非特异性扩增	PCR 的循环数太多	通过减少循环数来消除非特异性扩增。
	模板的浓度太高	在扩增亚硫酸盐处理的 DNA 时，在反应中模板的初始浓度的混合物不应超过 100ng 每 20 µl 的反应体积。
	亚硫酸盐处理的 DNA 不足	检查试剂盒中的 PCR 引物的特异性和β-actin 对照的可信性。增加 DNA 的输入量。如有必要使用新的亚硫酸氢处理 的 DNA，并用新模板重复 PCR 的步骤。
	引物设计不理想	检查引物设计。是否专门为亚硫酸盐处理后的 DNA 而设计，需要确认准确的序列信息。根据 MS-PCR 引物或使用 Methyl Primer 的指引来重新设计引物

定购信息

货号	品名	规格
A-P-1028-100	Methylamp™ MS-qPCR 试剂盒	100 次
A-P-1028-200		200 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-1029	EpiQuick™ Quantitative PCR Fast Kit
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