

*仅用于实验室，不用于诊断和治疗。

96孔DNA甲基化极速修饰试剂盒(磁珠法)

目录号: **A-P-1050-096** (96次)

A-P-1050-192 (192次)

适用于MS-PCR, 实时定量MS-PCR, 以及甲基化微阵列。

操作手册

请以试剂盒中配套的英文手册为准!

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**

2014年8月, 第1版, 对应英文第1.0821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.....	16
相关产品.....	17
如何下单.....	18
推荐阅读.....	18



操作

试剂盒组成

组件	96次	192次	储存温度
	A-P-1050-096	A-P-1050-192	
BisulFlash Conversion Mix (转换混合溶液)	4 ml	8 ml	室温
DNA Binding Solution (DNA结合液)	15 ml	30 ml	室温
Desulfonation Buffer (脱磺酸溶液)	0.6 ml	1.2 ml	室温
Elution Buffer (洗脱液)	2 ml	4 ml	室温
Binding Beads (磁珠结合)	0.5 ml	1 ml	4°C
Mag-96 Well Plate (96孔磁珠分选板)	1	2	室温
Adhesive Cover Film (封口膜)	1	2	室温
使用手册	1	1	室温

***注意：**在使用前，将各溶液离心至管底。

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**。其中，**Binding Beads** 在4°C 储存。

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。



产品介绍

重要说明

使用：

使用该96孔DNA甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）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即qMSP法，MS-HRM，以及甲基化微阵列等等。

DNA输入量：

每次修饰反应，DNA用量为**0.1ng—1 μ g**。为得到最佳修饰效果，DNA输入量为**100ng**。如果您使用该DNA修饰试剂盒做MSP或是qMSP，并且起始DNA量极其少（如：<10ng），那么PCR循环数就要**高于45**。

亚硫酸氢盐修饰后的DNA纯化率取决于DNA输入量、DNA质量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离心管和瓶子是非常必要的：

小心的使用移液器将样本或溶液移入到离心管和瓶子中。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96孔DNA甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）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。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，和适当的防护眼罩。



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:

96孔DNA甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

知识产权:

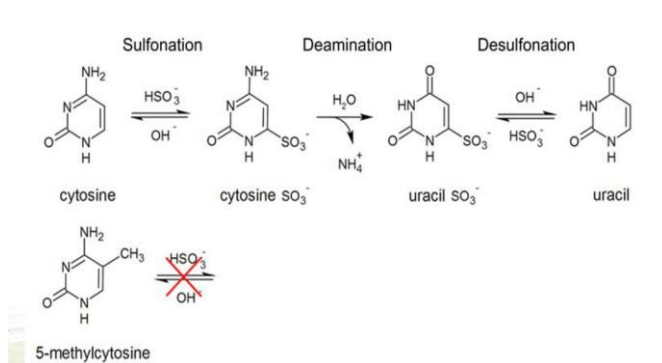
96孔DNA甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）中使用的原理和方法，我司有产品专利。

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。DNA 甲基化在几乎所有的生物中都是存在着的，包括发展、生长和进化。异常的 DNA 甲基化与疾病的发生有关，如：癌症、自身免疫性疾病、精神分裂症。因此，基因/区域或全基因组 DNA 甲基化分析 5-甲基胞嘧啶（5-mC）可以提供有价值的信息，开发出的表观遗传标志物对于疾病诊断、治疗和潜在目标非常有益的。

亚硫酸氢盐修饰的基因组 DNA，经过 PCR 扩增、克隆测序或全基因组测序是目前被认为是最可靠的方式，对于评估单个分子 DNA 甲基化状态的也是如此。通过亚硫酸氢盐修

饰处理后，5-胞嘧啶位点被转化成尿嘧啶而 5-甲基胞嘧啶保持不变。



然而，目前使用的 DNA 亚硫酸氢盐转化方法仍然有不足之处，特别是在速度、便利化和通量方面。为了解决这一问题，我公司继续创新的开发了 96 孔 DNA 甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）。按照流程和组件优化，这款产品可以在 1.2 小时内可以制备出修饰好的 DNA 样本。

该96孔DNA甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）具有以下优点和特性：

- **极速：**完成整个实验步骤仅需要1.2个小时，就可以得到96个修饰好的样本。平均每个样本仅需50秒钟。
- **便利：**预备好的转化混合液可以简单地直接加入到DNA样本中，无需预先制备转化试剂。
- **创新性：**目前在DNA变性过程和C到T的转化步骤，无需



独立的DNA变性转化试剂。

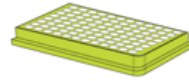
- **完全转化：**完全的将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶（>99.99%），不合适的和错误的甲基胞嘧啶转化为胸腺嘧啶极其微小（<0.1%），可以忽略。强劲保护DNA不被降解，能保证90%的DNA不被断裂损失掉。
- **灵活性：**不论选择a)根据手册每次单个反应；还是b)每次高通量做96次反应，使得实验非常灵活。
- **稳定性好：**简单，可靠，不变的修饰条件，容易遵循并且产量较高。

原理和程序

作为下一代新型亚硫酸氢盐转化工具，96孔DNA甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）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。

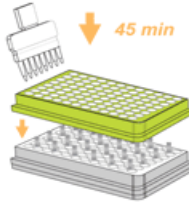
因此，这种新颖的磁珠设计方法可以单个操作，也可实现高通量转化。获得高效转化的DNA并可以用作后续如：PCR，芯片和下一代测序分析等等实验程序。

同时发生 DNA 变性
 和亚硫酸氢盐转化

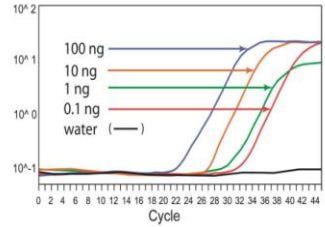
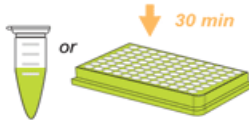


45 min

DNA 清洗

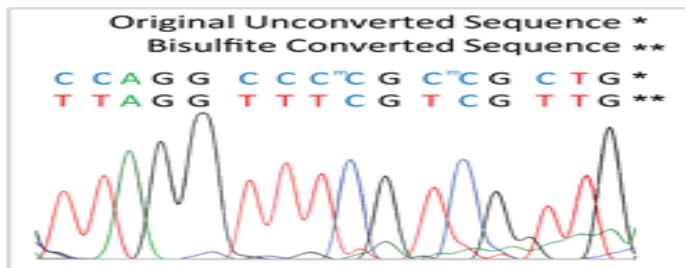


转化后的
 DNA 洗脱



使用 96 孔 DNA 甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）转化不同数量的人类基因组 DNA。使用快速 MS-qPCR 试剂盒扩增修饰后的 DNA（货号：A-P-1028）

图解：96 孔 DNA 甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）



使用 96 孔 DNA 甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）精确转化 DNA。通过采用甲基转移酶对 100ng 的基因组 DNA 中所有的 CpG 岛进行甲基化处理，然后使用经过多重扩增包括 CpG 岛的启动子区域进行实时荧光定量扩增分析，并直接测序。在非-CpG 岛位点 100%的 C 转化成 T；在 CpG 岛位点 100%的 C 仍然是 C。



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。*
- 移液器和移液枪头
- **0.2 ml PCR管和PCR板**
- 磁珠分选装置（A-Q10002）
- **1.5 ml微型离心管**
- **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手册。

起始材料

DNA输入量：最佳DNA量是**100 ng/反应**。起始DNA可放在水中或者缓冲液中，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。

对于捕获结合磁珠的平台，我们建议使用我公司的磁珠分选器（货号：A-Q10002），它有着非常强劲的磁力和已经被证明的快速而高效的提取能力。在各种96孔板中，磁珠均可结合DNA，并且特别适合在这个试剂盒中使用这个96磁珠分选器。

DNA亚硫酸氢盐转化

1. 对于PCR板或0.2 ml PCR管的每个孔，添加30 ul 转化混合液，然后再添加1-4 ul 的DNA样本（最佳量是：100ng）。
2. 把PCR板子/管子盖紧，并且将它们放到热循环仪中，温度为80°C，放45分钟。

纯化修饰后的DNA

1. 添加120μl **DNA结合液**到每一个PCR板子/管子中。然后添加5 ul 的结合磁珠，使用移液器来进行混合，时间控制在8-10分钟；然后从每一个PCR板子/管子中将混合的样本转移到96孔磁珠分选器的孔中。室温孵育10分钟。

注：未使用的条孔需要用这个试剂盒中的封口膜，封好孔。



2. 放置板子在一个96孔磁珠分选器上或是一个恰当的磁珠平台直到溶液澄清(大约需要2分钟)。仔细移走并丢弃上清液(**提示: 仔细地不要搅浑或丢弃包含DNA的磁珠**)。
3. 添加**200 ul 90% 乙醇**到每个孔中并重新重悬磁珠。放置板子在磁力平台2分钟或直至溶液澄清。移走并丢弃上清液。
4. 重复步骤3一次, 总计: 2次清洗。
5. 准备脱磺酸溶液, 通过添加**25 ul**的脱磺酸溶液即 **Desulfonation Buffer** 到每个**1 ml 90% 乙醇**并混合。添加**200 ul** 终浓度的脱磺酸溶液到每个孔并重新重悬磁珠。室温孵育**15分钟**, 然后放置板子在磁力平台2分钟或直至溶液澄清。移走并丢弃上清液。
6. 添加**200ul 90% 乙醇**溶液到每个孔中并重新重悬磁珠。放置板子在磁力平台2分钟或直至溶液澄清。移走并丢弃上清液。
7. 重复步骤6一次, 总计: 2次清洗。在最后一次清洗后, 务必保证乙醇完全去除。
8. 室温下放置**3-4分钟**, 风干磁珠。在磁力架上的板子要保证乙醇所有的痕迹都需去除。



注：不要过度风干磁珠点（过度风干磁珠会出现破解），这样可能会显著降低洗脱的效率。

洗脱修饰后的DNA

- 1.在20 ul 的洗脱液中，重新重悬磁珠；并室温孵育2分钟来释放磁珠上的DNA。
- 2.通过放置板子在磁力平台上2分钟来捕获磁珠或直至溶液完全澄清。
- 3.转移19-20 ul 的上清液到一个新的0.2 ml PCR板子，在密封PCR板后，并立刻储存在-20℃进行保存。

附录

使用甲基化特异性 qPCR

当做MS-qPCR即我们通常说的qMSP方法时，我们推荐使用快速MS-qPCR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 ₂ O	6-7 µl	
Total Volume	20 µl	

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
<i>Activation</i>	95°C	7 min	1
<i>Cycling</i>	95°C	10 sec	40-45
	55°C	10 sec	
	72°C	8 sec	
<i>Final Extension</i>	72°	1 min	1

疑难解答

问题	可能的原因	建议
DNA修饰不完全	DNA质量不好（DNA严重降解）。	检查样本 DNA 260/280 比率是 否在 1.6-1.9 之间；



		通过电泳跑胶看DNA是否降解。
太少的DNA 或者太多的DNA (例如 < 100pg 或 > 1 µg)。		添加或减少DNA输入量,使其达到正常的范围。或用最佳的量 100 ng 。
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。		确保在洗脱转化后的DNA中的第5步, 25 µl 脱磺酸溶液添加到每 1ml 90%乙醇 中。
在每一步清洗和脱磺酸步骤中,磁珠重新重悬。		在每一步清洗和脱磺酸步骤中,确保磁珠重新完全重悬。
转化混合溶液 是否被其它的化学试剂或长期暴露在空气受到污染和影响。		检查 转化混合溶液 有任何颜色的变化(深黄或褐色)或不容的沉淀物。如有,请使用并订购新的 转化混合溶液 。
试剂盒储存或者使用不当。		将所有组件保存在室温下。每次打开或使用后,旋紧 磁珠和



		转化混合溶液 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）。	通过电泳跑胶看DNA是否降解。
	DNA结合液没有足够添加到样本中。	确保在纯化修饰后的DNA第1步中 <u>DNA结合液</u> 被加入。
	作为DNA清洗的乙醇溶液的浓度不正确。	使用 90% 乙醇为DNA清洗。
	在DNA结合步骤或清洗风干步骤，DNA没有完全的结合到磁珠上。	确保在纯化修饰DNA第1步孵育时间足够（ 10分钟 ），第 8步 磁珠没有过度被风干。
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条带。	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 >40 ）。
		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MS-PCR。
		确保PCR中使用的模板DNA量足够。



	显著产生非特异性 PCR 条带	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。
		引物和探针不是特异的来识别修饰处理后的DNA或者目标基因。检查引物和探针设计是否正确。

订购信息

货号	产品名称	规格
A-P-1050-096	96孔DNA甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）	96次
A-P-1050-192		192次



相关产品

DNA样本准备	
货号	产品名称
A-P-1003	通用型组织切片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	石蜡包埋组织切片DNA提取试剂盒
A-P-1017	尿液 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	产品名称
A-P-1002	双链 DNA提取&修饰试剂盒
A-P-1008	96孔DNA修饰试剂盒
A-P-1016	全细胞亚硫酸氢盐直接修饰试剂盒
DNA甲基化分析	
货号	产品名称
A-P-1005	PCR纯化试剂盒
A-P-1011	通用甲基化DNA对照试剂盒
A-P-1019	通用甲基化DNA制备试剂盒
A-P-1028	快速 MS-qPCR 试剂盒
A-Q10002	96 孔磁珠分选板



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

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. 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>

4. 艾德科技教你如何在线设计甲基化的引物！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=2566&t=3623&id=24445>

5. RNA 甲基化修饰和定量？惊呆了我和小伙伴们！！！！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=30829>

6. 组蛋白甲基化和去甲基化神器在手，小伙伴们发文章马上飞起来！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=32209>



艾德科技（北京）有限公司
一站式采购 www.aderr.com 实验室好伙伴



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 电 邮：tech@aderr.com