



*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甲基化极易修饰试剂盒

目录号： **A-P-1054-050**（50次）
A-P-1054-200（200次）

适用于MS-PCR，实时定量MS-PCR，以及甲基化微阵列等下游实验分析。

操作手册

请以配套的英文操作手册为准！

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11月，第1版，对应英文第1.1.0.6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 -
解决问题.....	- 13 -
订购信息.....	- 16 -
相关产品.....	- 16 -
如何下单.....	- 17 -



操作

试剂盒组成

内容	Cat no.A-P-1054-50 (50次)	储存温度
转换混合溶液	8ml	室温
DNA结合液	20 ml	室温
脱硫液	0.5ml	室温
洗脱液	2ml	室温
离心柱*	50	室温
收集管	50	室温
使用手册	1	室温

*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。



产品介绍

重要说明

使用：

DNA甲基化极易修饰试剂盒修饰使用一种独特的溶液配方和基于离心柱纯化修饰的DNA，以快速，可信和便利为设计。每个试剂盒包括足够的组件可以使用50次反应。高得率，转化后的DNA可以适用于各种下游甲基化分析，包括常规MS-PCR，芯片分析，实时定量MS-PCR，MS-HRM，在post-bisulfite adaptor ligation后的NGS分析，以及甲基化微阵列。

DNA输入量：

每次修饰，DNA用量为**0.1—1µg**。为得到最佳修饰，DNA输入量为**100ng**。如果您使用该DNA甲基化极易修饰试剂盒做MSP，并且起始DNA量极其少(比如：<10ng)，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。

起始材料：

材料包括各种组织或细胞样本，如细胞培养瓶或微孔板培养的细胞，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柱是非常必要的:

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甲基化极易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。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:

DNA甲基化极易修饰试剂盒是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

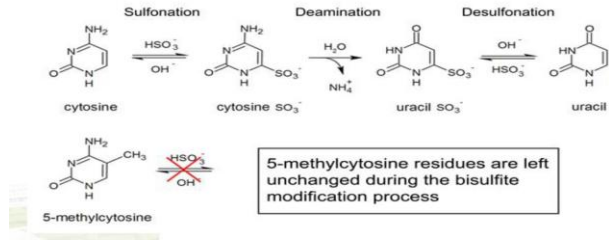
知识产权:

DNA甲基化极易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 (5-mC)**。在生物进化,发展,生长和变异方面,对于基因的表达的调节与 DNA 甲基化有着潜在的联系。异常的甲基化变化通常伴随这疾病的发生,如:癌症,自身免疫的失常和精神分裂症。因此,基因/特定基因区域或全基因组的 DNA 甲基化分析,对于疾病诊断和治疗目标基因区域的开发 DNA 甲基化标志物。

重亚硫酸氢盐修饰的基因组 DNA 通过 PCR 扩增,克隆-测序或全基因组测序是评估单个 DNA 分子胞嘧啶的甲基化是当前最为可信的方法。使用重亚硫酸氢盐处理 DNA,使得胞嘧啶脱硫后转化未尿嘧啶,然而 5-甲基胞嘧啶完整保留。



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，都要求进行快速DNA甲基化分析。

我公司再接再厉,在DNA甲基化极速修饰试剂盒



（A-P-1026）的基础上，创新研发DNA甲基化极易修饰试剂盒（A-P-1054），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1个小时之内，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，二代测序等等下游实验。

该DNA甲基化极易修饰试剂盒具有以下优势和特点：

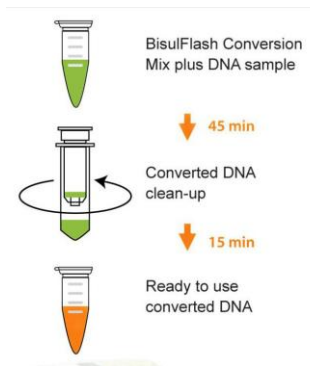
- **操作快速：**整个操作步骤可在1个小时内完成。
- **流线型：**热变性和C到T的转化步骤同步进行，无需单独的DNA变性步骤。
- **完整转化：**完全的将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶（ $>99.99\%$ ），不合适的和错误的转化甲基胞嘧啶转化为胸腺嘧啶极其微小（ $<0.1\%$ ），可以忽略。
- **稳定性好：**简单，可信和实验条件始终如一。容易遵循的操作手册和高得率。

原理和程序

作为下一代亚硫酸氢盐转化工具，DNA甲基化极易修饰试剂盒包含所有组件，对DNA样本进行超简便的亚硫酸氢盐转化。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。高得率，转化的DNA非常适合下游的实验程序，如：PCR分析，芯片分析和二代测序（NGS分析）。



DNA 甲基化极易修饰试剂盒流程图

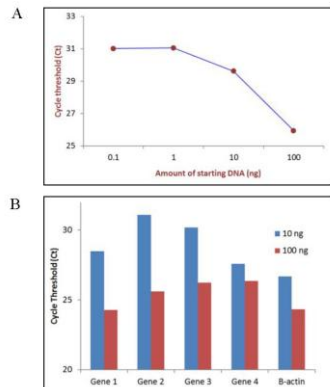


图 A：使用 DNA 甲基化极易修饰试剂盒对 HeLa 基因组 DNA 进行修饰转化。采用 **荧光 MS-qPCR 试剂盒 (A-P-102B)** 对转化后的 DNA 进行扩增实验。针对 β -actin 的等位基因，将已经设计好的甲基化和非甲基化引物，按照 DNA 输入的不同数量，进行实时荧光定量 PCR，所得 Ct 均值。图 B：针对转化后的 DNA 不用目标基因的 Ct 值。同时也显示了内参 β -actin 的 Ct 值。



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管或PCR板**
- **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

DNA输入量： DNA最佳量是**100 ng/反应**。起始DNA可放在水或者缓冲液中例如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。

亚硫酸氢盐DNA转化

1. 针对PCR板的每个孔或0.2 ml PCR管，添加**150 µl 转换混合溶液**，紧接着添加**2-15 µl**你自己样本DNA（最佳量是：**100 ng**）。
2. 把PCR管子盖紧，并且将它们放到带盖的热循环仪中，设置并执行温度为**80°C**，放置**45**分钟。

修饰后DNA洗脱

1. 将离心柱放置在**2 ml**的收集管中。添加**300 µl**的DNA结合液到每个离心柱中。然后将每个PCR管（亚硫酸氢盐步骤**2**）中的样本转移到离心柱中。**12,000转rpm**离心**30**秒。从收集管中移走离心柱并弃废液。从新将离心柱放入收集管中。
2. 添加**200 µl 90%**的乙醇溶液到每个离心柱中。**12,000转rpm**离心**30**秒。



3. 通过添加25 μl 的**脱硫液**到每1 ml 90%乙醇，并混合来制备最终的脱硫溶液。将**150 μl 终脱硫液**到每一个柱子中。然后将离心柱从收集管中拿出并弃废液。从新将离心柱放入收集管中。
4. 添加**200 μl 90%** 的乙醇溶液到每一个离心柱中。在**12, 000rpm**下离心**30秒**。然后将离心柱从收集管中拿出并弃废液。从新将离心柱放入收集管中。再次添加**200 μl 90%** 的乙醇溶液到每一个离心柱中。在**12, 000rpm**下离心**45秒**。
5. 将离心柱插入到一个新的1.5ml 管子中。直接添加**10-20 μl 洗脱液**到柱基质上。在**12, 000rpm**下离心**30秒**来洗脱转化后的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，可以存放至少六个月。我们推荐每次实时qPCR时，使用**1–2 μl DNA**；终点法PCR电泳检测，建议使用**2-4 μl 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，我司提供配套的快速 MS-qPCR 试剂盒（A-P-1028），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，只需加引物和模板，更易于准备PCR反应。如果采用该试剂盒，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。

设置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



解决问题

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DNA样本 260/280 比率是否在 1.6-1.9 之间，通过跑电泳看DNA是否降解。
	太少的DNA 或者太多的DNA（例如 < 100 pg 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 100 ng 。
	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 5-10 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转化混合液被污染或是长时间暴露在空气中受到影响。	检查DNA转化混合液有任何颜色变化（深褐色或棕色）或不能溶解的沉淀物。如果是这样的话，建议订购新的DNA转化混合液或试剂盒。



	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 DNA转化混合液 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）。	通过跑电泳来检查DNA是否降解。
	DNA结合液没有足够的加入到样本中。	确保在转化后DNA洗脱步骤中的第1步中 DNA结合液 被加入。
	作为DNA清洗的乙醇溶液的浓度不正确。	使用 90% 的乙醇用作DNA清洗。
	样本没有完全通过柱子上的过滤膜。	在 12,000 rpm 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结果不好	即便在阳性对照中，很少或者没有PCR产物。	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。确保引物和探针适合于做MS-PCR。



		确保PCR中使用的模板DNA量足够。
	DNA纯化不足	在转化后DNA的洗脱步骤中，第3步，每1ml 90%的乙醇中确保添加了25ul的脱硫液。
	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-1054-050	DNA 甲基化极易修饰 试剂盒	50次
A-P-1054-200		200次

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	石蜡包埋组织切片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-1001	DNA修饰试剂盒
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	全细胞亚硫酸氢盐修饰试剂盒
A-P-1026	DNA 甲基化极速修饰试剂盒
A-P-1050	96 孔 DNA 甲基化极速修饰试剂盒(磁珠法)



DNA甲基化/羟甲基化定量检测试剂盒	
货号#	描述
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）
A-E3317S	EpiMark 5-hmC和5-mC 分析试剂盒---热销
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	快速 MS-qPCR 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

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>
7. ChIP 来袭，最后一波！！！！赶快购！购！！购！！！！(染色质免疫沉淀，组蛋白甲基化，组蛋白乙酰化)！
<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=37826>



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

【艾德科技】定货热线：+86-10-52406250

技术支持：tech@aderr.com