



*仅供实验室研究使用，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。

总体DNA羟甲基极易定量检测试剂盒（比色法）

此品非常方便的快速定量检测全基因组DNA中5-hmC 的含量，时间短，效率高，应用广！

目录号： **A-P-1032-48**（48次）
A-P-1032-96（96次）

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

2016年3月，第1版，对应英文打印版V16.03.11



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	3
介绍	3
产品特点	3
一般特性	3
产品概述	4
参考文献	6
原理/步骤	7
用法	8
配套器材（自备）	8
操作手册	8
建议条带	11
附录	11
疑难解答	19
订购信息	19
推荐产品	19
如何下单	19
推荐阅读	19

试剂盒组成

产品组件	A-P-1032-48 (48次)	A-P-1032-96 (96次)	储存
WB (10X Wash Buffer)	14 ml	28 ml	4° C
BS (Binding Solution)	5 ml	10 ml	常温
NC (Negative Control , 0% 5-hmC, 50 ug/ml)*	50 ul	100 ul	- 20° C
PC (Positive Control , 1% 5-hmC, 50 ug/ml)*	10 ul	20 ul	- 20° C
hmAb (5-hmC Antibody, 1000X)*	5 ul	10 ul	4° C
SI (Signal Indicator, 1000X)*	5 ul	10 ul	- 20° C
ES (Enhancer Solution, 1000X)*	5 ul	10 ul	- 20° C
DS (Developer Solution)	5 ml	10 ml	4° C
SS (Stop Solution)	5 ml	10 ml	4° C
8-Well Assay Strips (With Frame)	6	12	4° C
操作手册	1	1	常温

*使用前，请将溶液离心至管底！

提示： NC Negative Control 是未经甲基化的DNA，含0%的5-羟甲基胞嘧啶。

PC Positive Control 是羟甲基化的DNA，含1%的5-羟甲基胞嘧啶。

运输和保存 (常温+低温、4° C和 - 20° C)

- 收到后: (1) 将组件**NC, PC, SI** 和 **ES** 避光储存 - 20° C
(2) 将组件**WB, hmAb, DS, SS** 和**8-Well Assay** 避光储存4° C
(3) 将组件**BS** 避光储存 常温

提示： 使用之前检查溶液**WB**(10X Wash Buffer)是否含有盐的沉淀物。

如是，常温或37° C预热，直至盐的沉淀物溶液全部溶解。

介绍

产品特性：

总体DNA羟甲基极易定量检测试剂盒（比色法）检测全基因组DNA羟甲基含量是非常适合的。不论是从哺乳类动物、植物、真菌、细菌、病毒和培养细胞、新鲜与冷冻的组织、石蜡包埋组织、血浆/血清样本、体液等样本。此品尤其适合仅有少量样品在激光显微捕获了的解剖样品和胚胎。不论是单链DNA和双链DNA，片段在200bp到全长都很适用。

DNA输入量：

每次分析DNA的上样量为20 - 200ng。最优DNA的输入量为100 ng,在某些种属中，组织样本间的甲基化的DNA含量一般都小于0.6%的总DNA。

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、新鲜和冷冻组织、石蜡包埋组织、血浆/血清样品、体液样品等。



内控:

此品包含有阳性与阴性DNA对照。一个标准曲线可以进行(范围:0.02%—1%)或单个数量的羟甲基化的DNA可以作为阳性对照。因为全基因组的总体羟甲基化是不同的,从发育到组织,从正常和病变的区域。我们推荐同批样品做二次分析,这样可以保证信号的生成是经过验证的。这个工具可让用户在不同的样本,通过绝对定量或相对定量来确定羟甲基化DNA的水平。

预防措施:

为了避免交叉污染,小心样品或溶液的加入。在使用移液器加入不同液体样本时,要及时更换枪头。在整个实验程序中需要戴手套。且不同样品之间的接触,立即更换手套

一般特性:

质控:

每批总体DNA羟甲基极易定量检测试剂盒(比色法)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QQ: 1951545998,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:

总体DNA羟甲基极易定量检测试剂盒(比色法)是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

知识产权:

总体DNA羟甲基极易定量检测试剂盒(比色法)中使用的原理和方法,我司有产品使用的追索权。

产品概述:

总体 DNA 羟甲基极易定量检测试剂盒(比色法)中含有定量检测全基因组羟甲基化所必需的所有试剂。在检测实验中, DNA 被固定在一种有 DNA 吸附能力的孔上,甲基化的片段会被捕获剂以及检测抗体识别,用酶标仪读取在 450 nm 处的 OD 值来定量。羟甲基化的 DNA 的量与 OD 值成线性关系,可以通过本试剂盒提供的方程来计算两种不同的甲基化 DNA 样品的相对甲基化状态或者通过标准曲线完全定量 5-hmc。基于其工作原理和微孔板模式,本试剂盒可以用于各种物种来源的多种样品形式,包括培养的细胞、新鲜和冷冻的组织、石蜡包埋组织、血浆/血清样品以及体液样品。

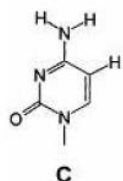
相关知识扩展了解：关于 5-hmC

5-hmC 是近年来在动物组织中发现的, 由胞嘧啶修饰而来。5-hmC 在表观遗传学上的功能可能与 5-甲基化胞嘧啶(5-mC)不同。尽管到现在为止还不确知其功能, 有研究者猜测它在调控基因的表达与关闭过程中起着重要的作用。5-mC 的发现让我们不得不重新评估 DNA 甲基信息, 也不得不监测人类的健康组织和病理组织之间 5-mC 相对分布的差异。在我公司的 DNA 羟甲基化定量检测技术之前, 我们还没有发现任何直接的常规方法来检测 5-hmC, 以及区分 5-hmC 和 5-mC。

5-hmC 和 5-mC 的区别

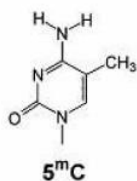
时下常用的 DNA 甲基化分析方法包括限制内切酶酶切和亚硫酸氢盐后的定性定量分析或 MeDIP 介导的 MS-PCR 和测序, 这些技术都不适合用来检测 5-hmC, 因为它与 5-mC 事实上很难用这类方法区分开来。为了解决这个问题, 我司特研制了 DNA 羟甲基化定量检测试剂盒(荧光法)。本试剂盒提供了一种很经济的方法来检测 5-羟甲基化胞嘧啶, 并且区分 5-hmC, 5-mC, 和 C, 使得研究者能够重新评估他们的 DNA 甲基化信息, 也能够在新样品中寻找 DNA 羟甲基化。

最近, 一种新的修正的核苷酸被命名为: 5-hmC, 且在老鼠的大脑和胚胎干细胞中已经发现。在1952年, 5-hmC第一次发现是在噬菌体内。在哺乳动物中, 它是由甲基化胞嘧啶氧化所产生的, 这是一个通过T族酶和DNA甲基转移酶蛋白介导的一个反应。下面是胞嘧啶的甲基化、羟甲基化形式:



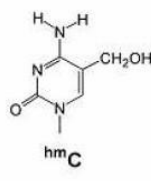
未甲基化 DNA

T-C-G-T-C-G-A-C-G



甲基化 DNA

T-^mC-G-T-^mC-G-A-^mC-G



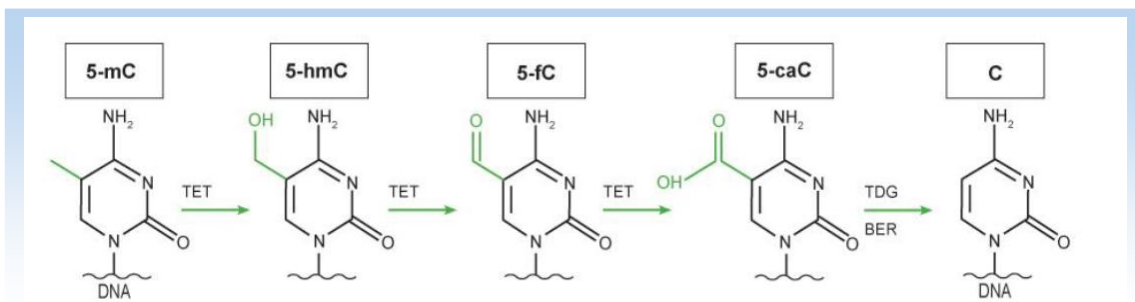
羟甲基化 DNA

T-^{hm}C-G-T-^{hm}C-G-A-^{hm}C-G

目前, 在表观遗传学界 5-hmC 更广泛的功能仍然是一个谜。然而, 一系列的有力证据已经表明在去甲基化、染色体重组和基因表达调节, 尤其是脑的特定部位基因表达调控中 5-hmC 扮演着重要角色。

试剂盒曾经对来自小鼠大脑和海拉细胞系的样品成功地进行了 5-hmC 的定量, 所得到的结果与用 HPLC 和 LC-MS 的方法相当。通过使用本试剂盒, 研究者们首次在正常人类脑部组织和结肠组织中发现了高丰度的 5-hmC。同时, 研究结果还显示, 正常人类脑部组织和结肠组织中 5-hmC 分别占总甲基化胞嘧啶(5-mC 和 5-hmC 的总和)的 32%和 16%。相反, 在结肠癌细胞系(HCT116)和宫颈癌细胞系(HeLa)中, 5-hmC 的比率很低, 几乎没有。

一些核苷酸的修饰改变, 5-羟甲基胞嘧啶, 5-甲酰基胞嘧啶, 5-羧基胞嘧啶, 已经被发现在人类和小鼠的组织以及胚胎干细胞中。在哺乳动物中, 这些修饰的核苷酸可通过 5-甲基胞嘧啶的氧化反应得到, 中间伴随有 TET 酶家族介导的反应。



这条技术路线图表明：胞嘧啶的不同存在形式在调节基因功能中发挥着关键的作用，其中 DNA 羟甲基的结构和模式尤为重要。

精确和便利的检测 5-hmC 水平，对于 DNA 在不同的生理和病理过程中的变化，变得非常重要，尤其是癌症。基于色谱分析技术比如：HPLC 和质谱分析法；TLC 来检测 5-hmC。但是，这些方法耗时，通量低，高成本。为了解决这些问题，我们的技术团队提供了一系列羟甲基化 DNA 定量检测的方法来定量检测 5-hmC 或羟甲基化的 DNA 和更为深入的改变羟甲基化 DNA 实验，优化出了：总体 DNA 羟甲基极易定量检测试剂盒（比色法）。

本试剂盒有以下优点和特性：

- **快速：**减少的步骤，整个操作仅需要 2 小时；
- **稳定性：**优化的试剂盒组分，允许在做复孔时，有更大的“触发信号”，尽量减少变化；
- **方便性：**固定的低背景噪音，从而消除了 DNA 变性和板孔的限定性；
- **灵敏度：**检测下限低至 0.01% 的羟甲基化 DNA，输入量在 100ng；
- **特异性：**高效特异结合 5-hmC，在复孔的浓度范围内，对于未甲基化的胞嘧啶和羟甲基的胞嘧啶无特异性反应，仅对羟甲基化 DNA（5-hmC）进行高度专一的检测；
- **通用型：**阳性与阴性对照，对于任何种属的羟甲基化 DNA 状态进行定量检测是非常理想的；
- **精确性：**标准的阳性对照可以得到标准曲线，可以与 HPLC-MS 相媲美，用时短，效率高。
- **灵活性：**微孔板（96 孔）的设计使实验更灵活，无论对于手动还是高通量分析简单、可信和检测实验条件恒始终如一。

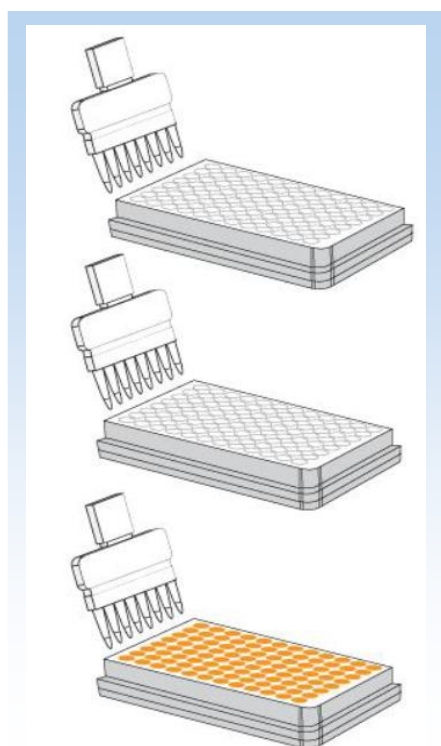
注：基于同一样本分 2 份来测定。

参考文献：

1. Kim, J.E. et. al. (May 2012). Epigenetic changes of Arabidopsis genome associated with altered DNA methyltransferase and demethylase expressions after gamma irradiation. [PDF](#)
2. Quadros, E. et. al. (May 2012). Vitamin B12 deficiency in the brain leads to DNA hypomethylation in the TCblR/CD320 knockout mouse. Nutr Metab. 9:41. [PDF](#)
3. Li, W. et. al. (2011). Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. J Nucleic Acids. 2011:870726. [PubMed Abstract](#)

原理/程序:

总体DNA羟甲基极易定量检测试剂盒（比色法）包含全基因组 DNA 羟甲基化定量检测的所有试剂。在此实验中，经特殊处理且具有高亲和性的DNA必定会结合在微孔板上。在检测实验中，DNA被固定在一种有DNA吸附能力的孔上，羟甲基化的片段会被捕获抗体以及检测抗体识别，然后使用酶标仪测出 450 nm 处的吸光值，对其进行比色法定量。羟甲基化DNA的量同测量的OD值成比例。

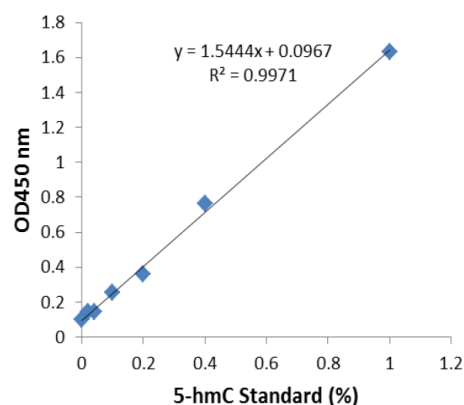


DNA 结合微孔板

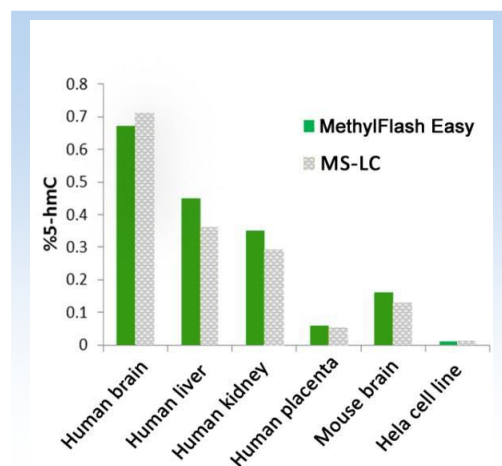
洗脱孔，然后加入检测抗体混合溶液

洗涤并加入显色剂进行比色法定量，然后测量吸光值。

演示：采用总体 DNA 羟甲基极易定量检测试剂盒（比色法）步骤。



采用 5-羟甲基胞嘧啶标准品，举例绘制理想的标准曲线。



使用总体 DNA 羟甲基极易定量检测试剂盒（比色法）精确量来自不同种属的不同 DNA 样图。与 HPLC-MS 获得的结果几乎一致，甚至更好更快。

用法

配套器材（自备，试剂盒中不提供，也联系 QQ:1951545998 购买）

- ✓ 8 通道可调移液器
- ✓ 各型号塑料枪头
- ✓ 酶标仪（可读取 450nm 处的吸光值）
- ✓ 1.5ml 微型离心管
- ✓ 37° C 孵育器材
- ✓ 板密封材料和石蜡封口膜
- ✓ 双蒸馏水
- ✓ 1 X TE buffer pH 7.5 to 8.0
- ✓ 感兴趣且提取好的 DNA
- ✓ 其它相关

操作手册

为了得到更理想的实验结果，请您在实验开始前认真地阅读整个的操作手册。

起始材料

DNA 输入的质量和数量： 输入的 DNA 相对纯度，260/280 比率>1.6；可以使用水或 TE 缓冲液来稀释。每次反应 DNA 量从 20ng 到 200ng。但是，为了得到理想的结果，我们推荐 DNA 的最佳量是 100ng/反应。

DNA 提取： 您可以采用自己的方法来提取 DNA。我公司也提供一系列配套的基因组 DNA 提取试剂盒，主要采用离心柱和磁珠法，以供参考。 (看 14 页“订购须知”下面)。

DNA 保存： 提取的基因组 DNA 在使用前可保存于 4°C（短期）或-20°C (长期) 直至使用。

1. 准备 1X 清洗缓冲液（wash buffer）

48 次反应试剂盒： 将 13 ml WB 10X 清洗缓冲液加入到 117 ml 蒸馏水中，并调整 pH 7.2-7.5。

96 次反应试剂盒： 将 26 ml WB 10X 清洗缓冲液加入到 234 ml 蒸馏水中，并调整 pH 7.2-7.5。

注： 稀释的 WB 清洗缓冲液现在可以储存在 4°C 的条件下长达 6 个月。

按照下表中的反应设置，预估所需试剂的近似体积。

Reagents	1 well	8 wells (1 strip)	16 wells (2 strips)	48 wells (6 strips)	96 wells (12 strips)
Diluted WB	2.5 ml	20 ml	40 ml	120 ml	240 ml
BS	100 µl	800 µl	1600 µl	4800 µl	9600 µl
5-hmC Detection Complex	50 µl	400 µl	800 µl	2400 µl	4800 µl
DS	0.1 ml	0.8 ml	1.6 ml	4.8 ml	9.6 ml
SS	0.1 ml	0.8 ml	1.6 ml	4.8 ml	9.6 ml
NC	N/A	2 µl	2 µl	4 µl	8 µl
PC	N/A	N/A	Optional	4 µl	8 µl

2. 准备标准曲线

添加 9µl 的 NC 来稀释 1µl 的 PC 来制备稀释的 PC。充分混合。根据如下的表格，结合 PC，稀释的 PC

【艾德科技】定货热线：+86-10-52406250

技术支持：tech@aderr.com

和 NC 来制备 6 个浓度点。混合好，保证每个浓度的精确性。

Control		PC (2.0%)		Diluted PC (0.2%)		NC
0.02% PC/well	=	0.0 μ l	+	1.0 μ l	+	9.0 μ l
0.04% PC/well	=	0.0 μ l	+	1.0 μ l	+	4.0 μ l
0.10% PC/well	=	0.0 μ l	+	3.0 μ l	+	3.0 μ l
0.20% PC/well	=	1.0 μ l	+	0.0 μ l	+	9.0 μ l
0.40% PC/well	=	1.0 μ l	+	0.0 μ l	+	4.0 μ l
1.00% PC/well	=	3.0 μ l	+	0.0 μ l	+	3.0 μ l

注：以上的体积足够绘制一条标准曲线，建议做复孔。（总数是 12 孔）

3. DNA 键合

检查微孔板的设置，以下是 48 次分析中的标准曲线设计（对于 96 孔的设计，7-12 条孔是作为样本）。
样本和对照我们建议测量双份，加样要垂直加入，不要水平加样。

Well #	Strip 1	Strip 2	Strip 3	Strip 4	Strip 5	Strip 6
A	NC	0.20%PC	Sample 2	Sample 6	Sample 10	Sample 14
B	NC	0.20%PC	Sample 2	Sample 6	Sample 10	Sample 14
C	0.02%PC	0.40%PC	Sample 3	Sample 7	Sample 11	Sample 15
D	0.02%PC	0.40%PC	Sample 3	Sample 7	Sample 11	Sample 15
E	0.04%PC	1%PC	Sample 4	Sample 8	Sample 12	Sample 16
F	0.04%PC	1%PC	Sample 4	Sample 8	Sample 12	Sample 16
G	0.10%PC	Sample 1	Sample 5	Sample 9	Sample 13	Sample 17
H	0.10%PC	Sample 1	Sample 5	Sample 9	Sample 13	Sample 17

- 预先确定好实验的条孔数量。小心的从座架上拿走不需要的条孔，将其放回到包中（密封好包，存于 4°C 下）。
- 对于阴性对照孔：添加 100 μ l **BS** 和 2 μ l **NC**。
- 对于阳性对照孔：在不同的浓度点（0.02%-1%）添加 100 μ l **BS** 和 2 μ l **PC** 来绘制标准曲线（看下面的注释）。
- 对于样本孔：添加 100 μ l **BS** 和 100ng 的你的样本 DNA（2-4 μ l）。

注意： (1) 为了减少交叉污染，根据上图中板孔位置，垂直加入各种液体。(2) 对于阳性对照，在不同的甲基化百分比（0.02%, 0.04%, 0.1%, 0.20%, 0.40%, 和 1%）中，每孔的 DNA 总量是：100ng。阳性对照分析与样本分析应该放在同一条中进行实验并且每次分析实验中建议绘制新的标准曲线。(3) 为得到最佳结合并减少移液器的误差，样本 DNA 的体积应该在 2 μ l 或更多，但是不要超过 5 μ l。如果样本 DNA 每孔不到 100ng，根据等值的原理，通过调整阳性对照 DNA 的数量，与样本 DNA 的数量，应该相等，目的是精确定量 5-hmC。(4) 为了确保 **NC, PC** 和样本 DNA 完全添加到孔中，在使用之前将 DNA 样本混好并将移液器枪头放在 **BS** 溶液孔中，吹打 1-2 次。当添加样本时，保证添加到每孔中的样本体积量精确，并每次都更换新枪头。

- 从一边到另外一边轻揉的混合溶液或轻轻摇晃板子几次来混合，确保溶液覆盖住板子的全部底部。使用板密封盖或者用封口膜 **M** 覆盖条孔板并在 37°C 下，孵育 60 分钟。
- 在样本孵育的最后 10 分钟过程中，准备 **5-hmC** 的检测混合溶液：每 1ml 稀释的 **WB** 添加 1 μ l 的 **hmAb**，混合然后添加 1 μ l 的 **SI** 和 1 μ l **ES**。混合。

g. 在 60 分钟的孵育后，将 **BS** 结合溶液从每个孔中移走。每次使用 150 μ l 稀释的 **WB** 清洗缓冲液清洗每一个孔，每次都要清洗三遍。可以采用移液器吸取稀释的 **WB**，吹打的方式来清洗。

4. 羟甲基化 DNA 捕获和信号检测

- 添加 50 μ l 的 **5-hmC** 的检测混合溶液到每孔中，然后室温下密封和孵化达 50 分钟。
- 从每孔移走 **5-hmC** 的检测混合溶液。
- 每次使用 150 μ l 稀释的 **WB** 清洗缓冲液清洗每一个孔，每次都要清洗五遍。
- 以列添加 50 μ l 的 **DS** 到每个孔中，不是行；同时，使用多通道的移液器为了实验同步进行。轻柔的摇晃板子 5-10 秒并室温孵育 3-4 分钟。监看样本孔和对照孔中颜色变化。再过几分钟，**DS** 慢慢变蓝，保证有足够的甲基化 DNA。一般来说，**NC** 中的颜色是不发生变化的。
- 当 1% **PC** 孔中颜色变成深蓝色时，按照列每孔中添加 100 μ l **SS** 来终止酶活反应，不是行；同时，使用多通道的移液器为了实验同步进行。轻柔的摇晃板子并等待 1-2 分钟，等显色反应完全终止。在加入 **SS** 后，颜色变成黄色，在 2-15 分钟内，应使用酶标仪在 450 nm 条件下，测量并读取吸光值。
注：1) 显色反应的时间在 1-10 分钟，可能会有不同，要看颜色变化的速度，不仅仅是看有代表性的 3-4 分钟。2) 如果条孔不适合微孔板读取仪，转移溶液到 96 微孔板中。

5. 5-hmC%计算

为了计算羟甲基化DNA的百分比，首先要绘制一个标准曲线并绘制一个OD值与PC在不同浓度点的百分比。其次，使用线性回归确定标曲的斜率（OD/1%）并最相关的线性部分（包括0，至少还需要4个浓度点）的标曲斜率来计算。最后，确定两种不同DNA样本的相对羟甲基化状态，可以通过以下公式计算羟甲基化DNA中百分比：

$$5\text{-hmC}\% = \frac{\text{Sample OD} - \text{NC OD}}{\text{Slope} \times S} \times 100\%$$

S 代表DNA样本的输入量 单位：ng.

计算举例：

NC中平均 OD450 是0.065

样本中平均 OD450 是0.305

斜率是 OD/1%

S 是 100 ng

$$5\text{-hmC}\% = \frac{0.195 - 0.075}{1.2 \times 100} \times 100\% = 0.1\%$$

注：1) 计算出的5-hmC%=5-hmC/总DNA (A+G+C+T) .如果5-hmC%作为5-hmC/(5-hmC+C) 存在，简单地除法计算出5-hmC%，如果人类的胞嘧啶含量是有效的。例如：在人类DNA中，胞嘧啶的含量是：

【艾德科技】定货热线：+86-10-52406250

技术支持：tech@aderr.com

21%，因此， $5\text{-hmC} / (5\text{-hmC} + \text{C})$ 是 $0.1\% \div 0.21 = 0.048\%$ 。2) 如果标曲是平的因高Ods从最低的%PC，或因过长的显色时间和过饱和的信号强度；这个5-hmC%的计算可以通过对数或多项式二次回归，另外（看附录）。

疑难解答

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
阳性对照与样品均无信号	不正确的试剂添加	在操作手册中任何一步可能被忽略了，检查试剂是否按照顺序被添加到恰当的位置，或漏加。
	在加入 DNA 结合缓冲液之前，孔被不恰当地清洗	在加入阳性对照和样本之前确保孔没有被清洗。
	孔底部并没有完全被组件 BS（结合溶液）所覆盖。	通过微微的左右倾斜或慢慢地晃动板子几次，确保溶液覆盖孔的底面
	孵育时间和温度不正确	确保孵育时间和温度是正确的按照操作手册来设置的
	起始材料较少或不足	确保注入到条孔中的阳性对照和样本量充足
	不正确的吸光度读数	检查是否采用合适的吸光值波段（450 nm）
	组件没有存储或得到适当的处理	确认所有的组件是被恰当的温度储存，并在每次使用完溶液后，须将瓶盖拧紧。
仅阳性对照无信号或微弱信号	在第 3c 步中 PC（阳性对照）DNA 加入量不够	确保加入了足够的阳性对照 DNA
	组件 PC（阳性对照）因不恰当的储存而降解	组件 PC（阳性对照）确保按照本操作手册中第三页的运输与储存条件
阴性对照中存在高背景	孔洗脱不净	检查是否严格按照操作手册中的每一步清洗次数进行的实验
	阳性对照或样品 DNA 被污染	在加入样本或阳性对照时，确保孔不被污染或意外地使用污染的吸头，
	孵育时间太长	在第 4a 步时的孵育时间不应超过 2 小时
	显色过度	在第 4e 步加入 SS（终止液）前，减少在 4d 步中的显影时间
复孔间差异很大	水平加样引起的不一致，延迟加样和试剂加入	在第 2 步中，提供的试剂遵循垂直加样。使用多通道移液器确保装载的试剂同样是按照垂直的顺序加入，尤其是在第 4 步加入 DS（Developer Solution）和 SS（Stop Solution）时。
	因不一样的加样时间或体积，导致显色反应不是均匀的停下来	在复孔或另外的试剂加入时，确保 DS（Developer Solution）和 SS（Stop Solution）同时加入。确保每次移液器枪头吸走的溶液是等量的。在加入任何溶液时确保溶液等量。确保溶液，尤其是小体积的量（比如：1ul）完全被加入到孔中。特别要注意加入 DNA 样本步骤和 5-hmC 检测混合溶液。
复孔间差异很大	因添加溶液的顺序不一致，显色反应不是均匀的停下来。	确保所有的溶液，特别是 DS（Developer Solution）和 SS（Stop Solution）每次是同时按序被加入的。另外的溶液需要注意顺序。
	一些孔中残留着洗脱液	在每一步的洗脱步骤中，确保洗脱液是完全被移走。

	溶液或抗体没有被实际加入到孔中	不容许移液器触碰孔的外部边缘或内侧，防止溶液粘住表面。
	在第 4d 和 4e 步中，没有足够的摇晃孔中的溶液	轻柔并均匀的水平摇动板子为了更好的使孔中的溶液均匀的分布。不要搅拌。
	在整个实验中，不要使用同样的移液器装置	在整个实验中，使用同样的多通道移液器，正如不同的移液装置在性能方面会略有变化。
	在孔中试剂飞溅	仔细吸液反对触碰孔的边缘，避免飞溅。
	温度变化超过板子	在孵育步骤环境中，确保板子均匀并充分进行孵育，避免巨变。
仅样本复孔差异很大	在加入到孔前，DNA 样本是沉淀物或不均匀的	在将它们加入到孔前，充分地混合你的 DNA 样本并均匀的加入。
hmAb(5-hmC 抗体) 瓶是空的或体积不够	由于非常小的体积，溶液蒸发，导致抗体浓度过高	添加 1X PBS 缓冲液到 hmAb(5-hmC 抗体) 瓶中，直至还原正确的体积，参考试剂盒目录，和操作手册中的描述。在使用前，混合并离心。

附录

方法一：使用对数二次回归计算5-hmC%

Use this method when the standard curve is flat due to high ODs starting from the lowest %PC.

- Plot the average OD value on the Y-axis versus the known 5-hmC percentage of each **PC** point on the X-axis.
- Graph the second order logarithmic curve* (also see "Example Calculation" below) and obtain second order logarithmic regression equation:

$$Y = a \ln(X) + b$$

Here, $X = 5\text{-hmC}\%$; $Y = \text{Sample OD}$; a is Slope and b is Y-intercept, respectively.

* Microsoft Excel's logarithmic regression function can be used for easy and convenient calculation of 5-mC%.

- Calculate 5-hmC% of the samples based on the following equation, derived from the above equation

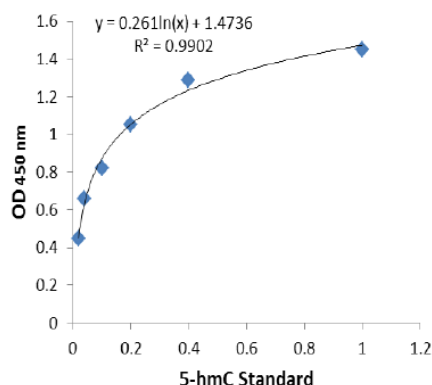
$$5\text{-hmC}\% = e^{[(Y-b)/a]} \div S \times 100\%$$

Here, S is the amount of input sample DNA in ng.

计算举例：

The example positive control ODs are as follows:

PC%	Mean OD
0.02	0.45
0.04	0.66
0.1	0.82
0.2	1.05
0.4	1.29
1.0	1.45



▲ The average **NC** OD is 0.06 and the sample OD is 0.591.

▲ Standard curve generated with use of the positive controls.

Data was graphed using a Standard Scatter (XY) Chart in Microsoft Excel. In the figure above, $a = 0.261$, $b = 1.4736$, $Y = 0.591$. Input DNA amount was 100 ng.

5-hmC% of the sample was calculated accordingly:

$$5\text{-hmC}\% = e^{[(0.591-1.4736) / 0.261]} \div 100 \times 100\% = 0.03\%$$

方法二：使用多项式二次回归计算5-hmC%

Use this method when the standard curve is flat due to a saturated signal intensity at high %PCs.

- Plot the delta OD values (the ODs after subtracting **NC** ODs) in the Y-axis versus the known 5-hmC percentage of each **PC** point in the X-axis.
- Graph the second order polynomial curve* (also see example calculation below) and obtain second order polynomial regression equation:

$$Y = aX^2 + bX$$

Here $X = 5\text{-hmC}\%$, $Y = \text{sample OD} - \text{NC OD}$, a and b is known slope1 and slope 2, respectively.

*Microsoft Excel's polynomial regression function could be used for easy and convenient calculation of 5-hmC%.

- Calculate 5-hmC% of the samples based on the following equation, derived from the above equation.

$$5\text{-hmC}\% = \frac{(b^2 + 4aY)^{0.5} - b}{2a} \div S \times 100\%$$

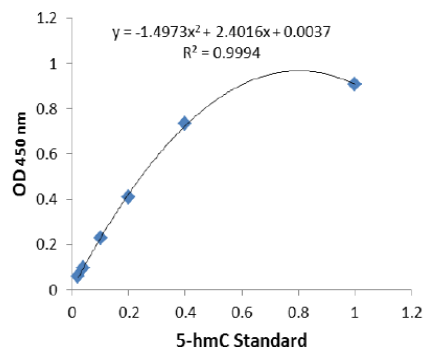
计算举例：

Example Calculation:

The example positive control ODs are as follows:

PC%	Mean OD	Delta OD
0.02	0.119	0.059
0.04	0.155	0.096
0.1	0.288	0.228
0.2	0.470	0.410
0.4	0.794	0.734
1.0	0.967	0.907

▲ The average NC OD is 0.06 and the sample OD is 0.262.



▲ Standard curve generated with use of the positive controls.

Data was graphed using a Standard Scatter (XY) Chart in Microsoft Excel. In the figure above, $a = -1.4973$, $b = 2.4016$, $Y = (0.262 - 0.06) = 0.202$

5-hmC% of the sample was calculated accordingly:

$$5\text{-hmC}\% = \frac{[(2.4016)^2 + (4 \times -1.4973 \times 0.202)]^{0.5} - 2.4016}{2 \times -1.4973} \div 100 \times 100\% = 0.09\%$$

订购信息

货号	品名	规格
A-P-1032-48	总体 DNA 羟甲基极易定量检测试剂盒(比色法)	48 次
A-P-1032-96		96 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- DNA 甲基化荧光定量专用酶带内参
A-P-1029	EpiQuick™ Quantitative PCR Fast Kit
A-E2050	QuestTaq™ PreMix-DNA 羟甲基化 PCR 预混专用酶
A-E2054	ZymoTaq™ qPCR Premix-DNA 甲基化荧光定量专用酶
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)



其它表现热销产品：

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）
货号	品名
A-P-9003	RNA 甲基化修饰试剂盒-带内参引物
A-R5001	EZ RNA 甲基化修饰试剂盒
A-P-9005	m6A RNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)
A-17-10499	Magna RNA 甲基化免疫沉淀 m6A 试剂盒
A-17-10520	Magna 细胞核交联（RIP）抽提试剂盒

如何下单

1. 电话，传真或邮件订购：

电话：010—52406250、57225208；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. 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>

5. RNA 甲基化修饰和定量？惊呆了我和小伙伴们！！!--new

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



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