

DNA 甲基化修饰试剂盒

产品货号：26384

产品规格：50T

产品简介：

本试剂盒基本原理为 DNA 经亚硫酸氢钠处理后，可使未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不变。

本试剂盒采用碱变性的处理方法，能够在温和条件下使 DNA 双链变性，保证 DNA 完整性的同时提高转化效率，转化效率可达到 99.5% 以上。同时通过转化产物与吸附柱结合，从亚硫酸氢盐修饰后的溶液中回收纯化 DNA，回收的 DNA 纯度高，完整性好，可直接用于测序、甲基化 PCR 检测、芯片分析等下游实验。

产品优势：

1. 高转化效率：未甲基化的胞嘧啶转化效率大于 99.5%。
2. 高核酸完整性：对核酸的损伤小，有利于下游检测。
3. 高回收率：回收率大于 80%。
4. 高样本兼容性：可兼容投入量范围为 100pg-2 μg 的 DNA、cfDNA。

试剂组成：

产品名称	50T	保持条件
转化液 CR	5ml	室温，避光
缓冲液 CL	30ml	室温
缓冲液 MD	0.4ml	室温
缓冲液 DB	10ml	室温
漂洗液 WB（浓缩液）	10ml	室温
漂洗缓冲液 1（浓缩液）	13ml	室温
漂洗缓冲液 2（浓缩液）	15ml	室温
洗脱液	4ml	室温
柱平衡液 PS	10ml	室温
吸附柱 DF	50Pcs	2-8℃
收集管	50Pcs	室温

自备试剂：无水乙醇、PCR 管、EP 管、离心机。

实验前准备及重要注意事项：

1. 实验前准备：新开封的试剂盒，按照试剂瓶标签的说明预先在漂洗液 WB、漂洗缓冲液 1 及漂洗缓冲液 2 中加入对应量的无水乙醇，并且使用前检查是否加入了无水乙醇，加无水乙醇后须将瓶盖拧紧，防止挥发。
2. 注意事项：
 - 1) 在实验前，应仔细阅读说明书，实验操作应由具有专业经验和经过培训的人员进行。
 - 2) 转化液对光敏感，应避光保存，避免暴露在光线下。
 - 3) 本试剂盒适用于粪便、血液、组织、体液等提取纯化后的 DNA、cfDNA 溶液，单次转化的 DNA 投入量约为 100pg-2μg 之间，其中 10ng-2μg 效果更佳。同时 DNA 应满足 A260/280 在 1.8~2.0 之间。但应注意：高投入量的 DNA 可能会导致某些高 GC 区域或高度结构化的 DNA 转化不完全，应根据样本特殊性适当减少投入量。

操作步骤（仅供参考）：

1. PCR 管中加入 20μL 待测样本以及 5μL 缓冲液 MD，混匀并短暂离心后放入 PCR 仪中，37℃ 孵育 15min。
2. 加入 100μL 转化液 CR，混匀并短暂离心后放入 PCR 仪中，54℃ 孵育 90min。

注：孵育结束后若不能及时进行下一步实验，可设置 4℃ Hold。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

3. 向已装入收集管的吸附柱中加入 200 μ L 柱平衡液 PS, 12000rpm 离心 1min, 弃掉废液, 将吸附柱放回收集管。
4. 加入 600 μ L 缓冲液 CL, 将步骤 2 中反应得到的转化后产物转移到吸附柱中, 上下颠倒 3-5 次, 室温静置 10min。
5. 12000rpm 离心 1min, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。
6. 加入 500 μ L 漂洗缓冲液 1(使用前检查是否已加入无水乙醇), 12000rpm 离心 1min, 不用弃废液。
7. 加入 200 μ L 缓冲液 DB, 室温静置 10-15min, 12000rpm 离心 1min, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。
8. 加入 500 μ L 漂洗缓冲液 2(使用前检查是否已加入无水乙醇), 12000rpm 离心 1min, 不用弃废液。
9. 加入 200 μ L 漂洗液 WB(使用前检查是否已加入无水乙醇), 12000rpm 离心 1min, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。
10. 将弃去废液的收集管连同吸附柱 12000rpm 离心 2min。
11. 将吸附柱转移(在转移的过程中不要碰到收集管内壁, 防止粘上乙醇) 至干净的收集管中, 打开盖子, 晾干 3min。
12. 加入 20 μ L 洗脱液至吸附柱中间膜上(注意枪头不要戳到吸附柱的膜, 加入不同样本要换枪头), 盖紧冠盖, 室温孵育 2min, 12000rpm 离心 1min, 收集 DNA 溶液, 备用。

注: 1. 如果要提高回收效率, 洗脱液可在 65-70 $^{\circ}$ C 预热。

2. 亚硫酸氢盐修饰后的 DNA 建议立即检测, 否则请于 -20 $^{\circ}$ C 以下保存, 保存时间不超过 1 个月, 长期保存需置于 -70 $^{\circ}$ C 或以下, 并应避免反复冻融。

常见问题:

1. 输入的 DNA 在转化之前是否应该溶解在 TE、水或其他缓冲液中?
水、TE 或改良的 TE 缓冲液可用于溶解 DNA, 并且不会干扰转化过程。
2. 甲基化转化时间可以延长吗?
甲基化转化过程中, 转化时间过久会引起甲基化的 C 部分变成 U, 导致假阴性, 请严格按照操作说明书进行操作。
3. 亚硫酸氢盐处理的 DNA 定量需要注意什么?
对基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐处理后, 因为非甲基化的胞嘧啶残基转化为尿嘧啶, 所以原始碱基配对不再存在, 回收的 DNA 通常富含 A、U 和 T, 并且在室温下为单链, 具有有限的非特异性碱基配对。260nm 处的吸收系数与 RNA 的吸收系数相似。建议当检测经亚硫酸氢盐处理后的 DNA 浓度时, $A_{260}=1.0$ 使用 40 μ g/mL 的值。
4. 处理后核酸检测 OD 值异常是为什么?
基于处理后核酸状态的特殊性, 其 OD₂₃₀ 会出现异常现象, 可能导致 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值不稳定, 实验表明这种情况不影响后续的 PCR 反应。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应为 1.7-1.9。如果洗脱时不使用洗脱缓冲液, 而使用 ddH₂O, 比值会偏低, 因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值, 但并不表示纯度低。
5. 后续的 PCR 扩增条件建议是什么?
通常, 亚硫酸氢盐转化的 DNA 需要 35 至 40 个循环才能成功进行 PCR 扩增, 最佳扩增子大小应在 150-300bp 之间, 但是通过优化 PCR 条件可以生成更大的扩增子(高达 1kb), 55-60 $^{\circ}$ C 之间的退火温度通常效果良好。由于大多数非甲基化胞嘧啶残基会转化为尿嘧啶, 因此亚硫酸氢盐处理的 DNA 通常富含 AT, 也正因为这样, 非特异性 PCR 扩增也会相对常见, 强烈建议使用“热启动”聚合酶进行亚硫酸氢盐处理后 DNA 的 PCR 扩增。

保存: 吸附柱 DF 2-8 $^{\circ}$ C 保存, 其余组分室温(15-30 $^{\circ}$ C) 保存。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com