



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

*仅用于科研，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甲基化极速修饰试剂盒

非常适合做MSP，实时定量荧光定量PCR即qMSP，MS-HRM，甲基化微阵列，及甲基化测序分析（焦磷酸测序和深度测序）等下游操作。

目录号：**A-P-1026-050**（50次）
A-P-1026-200（200次）

操作手册 中文说明书仅供参考，请以英文为准！

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**

2020年7月，第3版，对应英文第2017.05.12版



扫我收藏分享，还有机会拿红包哦！



艾德科技(北京)有限公司
A&D Technology Corporation

定货热线：+86-0313-5935521 技术支持：1951545998@qq.com



目录

操作.....	- 3 -
试剂盒组成.....	- 3 -
运输和保存.....	- 3 -
产品介绍.....	- 4 -
重要说明.....	- 4 -
一般产品信息.....	- 5 -
简述.....	- 6 -
原理和程序.....	- 8 -
用法.....	- 10 -
另外需要的材料（试剂盒中不提供，可联系 QQ:1951545998 购买）.....	- 10 -
使用步骤.....	- 10 -
附录.....	- 13 -
使用甲基化特异性 qPCR.....	- 13 -
解决问题.....	- 14 -
订购信息.....	- 17 -
DNA 表观遗传相关产品.....	- 17 -
如何下单.....	- 18 -



操作

试剂盒组成

内容	型号：A-P-1026(50次)	型号：A-P-1026(200次)
BF1 （转换混合溶液）	6ml	24ml
BF2 （捕获溶液）	15 ml	60 ml
BF3 （脱磺酸溶液）*	60μl	240μl
BF4 （洗脱溶液）	1ml	4ml
BF5 （转化强化剂）*	5 瓶	20 瓶
BF6 （变性强化剂）*	600 μl	2400 μl
F- 离心柱*	50	200
F- 收集管	50	200
使用手册	1	1

***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。

注意：在使用**BF1**溶液之前，请先检查瓶里是否有沉积。如有，摇晃瓶子使沉积物充分溶解。每次打开使用**BF1**之后，都要旋紧其盖子将其密封好。



产品介绍

重要说明

使用:

使用该DNA甲基化极速修饰试剂盒修饰后的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，MS-HRM，以及甲基化微阵列。

DNA输入量:

每次修饰，DNA用量范围是**0.2ng—1 μ g**。为得到最佳修饰，DNA输入量为**200-500ng**。如果您使用该DNA甲基化极速修饰试剂盒做MSP，并且起始DNA量极其少，那么PCR循环数就要**高于45**。为得到最佳PCR结果，目的基因的片段最好不要超过**250bp**。

亚硫酸氢盐修饰后的DNA纯化率取决于DNA输入量、DNA自然含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，因为该试剂盒总能使DNA得到完整的变性，同时在整个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F-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F-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甲基化极速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:1951545998@qq.com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甲基化极速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甲基化极速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。现在有多种方法可用于 DNA 甲基化状态的分析。但是，只有基因组 DNA 亚硫酸氢盐修饰，紧接着 PCR 扩增，克隆，以及个体 PCR 扩增引物排序，能对个体 DNA 分子上的个体胞嘧啶的甲基化状态提供可靠的信息。通过使用亚硫酸氢盐处理 DNA，胞嘧啶残留物将被脱氨基成尿嘧啶，而 **5**-甲基胞嘧啶则被完整的保留。

	未甲基化 DNA	甲基化 DNA
原始序列	C-C-G-T-C-G-A-C-G-T	C- ^{MC} C-G-T- ^{MC} C-G-A- ^{MC} C-G-T
转化后序列	U-U-G-T-U-G-A-U-G-T	U- ^{MC} C-G-T- ^{MC} C-G-A- ^{MC} C-G-T



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，都要求要进行快速DNA甲基化分析。

我司再接再厉创新研发DNA甲基化极速修饰试剂盒，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**20**分钟之内，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腺嘧啶(<**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。



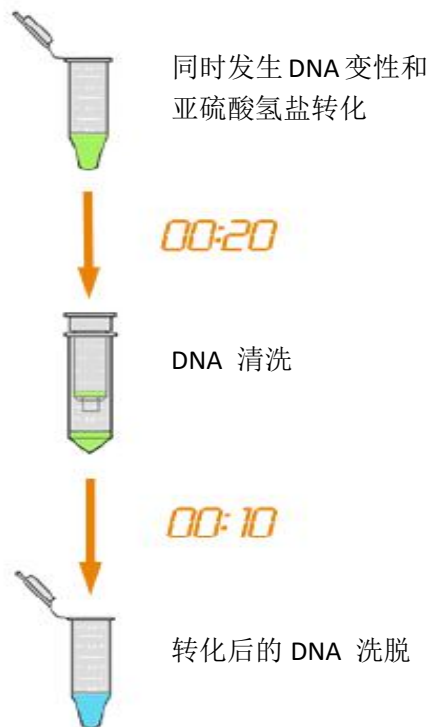
该DNA甲基化极速修饰试剂盒具有以下优势和特点：

- 方便的单一温度孵育。不需要进行单独的DNA变性步骤。
- 最快速最方便的操作步骤，能在**30**分钟左右完成。
- 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。
- 强劲保护DNA不被降解，能保证**90%**的DNA不被损失掉。
- 只需要输入极其少量的DNA进行修饰即可——**0.2 ng**或者 **50**个细胞。
- 简单，可靠，不变的修饰条件。

原理和程序

作为下一代亚硫酸氢盐转化工具，DNA修饰试剂盒包含所有组件对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。



DNA 甲基化极速修饰试剂盒流程图



用法

另外需要的材料（试剂盒中不提供，可联系 QQ:1951545998 购买）

- 热循环仪带加热盖*。
**由于亚硫酸氢盐反应不用矿物油，只有带加热盖的热循环仪比较适合这个步骤。*
- 台式离心机（高达**14,000 rpm**）
- 移液器和移液枪头
- **0.2 ml PCR管**
- **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操作手册。

起始材料

DNA输入量： DNA量范围在**200 pg ~1 μg/反应**。最为理想的量是：**50–200 ng/反应**。起始DNA可放在水中或缓冲液例如TE中。

DNA提取： 您可以使用自己的方法进行DNA提取。我公司同时提供一系列配套的全基因组DNA提取试剂盒供您选择（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。

定货热线：+86-0313-5935521 技术支持：1951545998@qq.com



亚硫酸氢盐DNA转化

1. 将**1 ml BF1**添加到一瓶**BF5**中。手动或使用涡旋仪混合瓶子**2**分钟使溶液充分混合。将**80 μ l BF6**添加到瓶中，倒转摇晃瓶子**3**分钟使溶液混合。(微量的未溶解的**BF5**可能残留，这是正常的，因为**BF5**在溶液中已经达到饱和)。
2. 往每一个**0.2 ml**的PCR管子中加入**110 μ l BF1/BF5/BF6**混合溶液，紧接着加入**1-5 μ l DNA**溶液。
注意：检查(1)在将BF1加入到瓶中之前，BF1溶液瓶中是否有沉积。如果有，要换一下瓶子使其再次充分溶解。(2)如果DNA体积大，并且浓度低于10ng/ μ l，在进行亚硫酸氢盐处理之前，推荐使用我司DNA浓缩试剂盒(Cat. No. A-P-1006，也可以联系QQ:1951545998询问其他纯化方案)。配置好的BF1/BF5/BF6溶液可以储存在室温条件下两周，不会显著的降低功效。为得到最好的结果，混合溶液建议及配及用。
3. 把PCR管拧紧，并将它们放到带热盖的热循环仪中，温度设定为**95°C**，放**20**分钟。

注：如果DNA模板含有高GC含量区域或二级结构，对于测序来说，可采用如下程序来代替。最理想且强化的测序程序见下：

95°C 4 min

65°C 30 min

95°C 4 min

65°C 30 min

95°C 4 min

65°C 60 min

Hold 18-20°C up to 6 h

同时，根据实验需要，将一定数量的F-离心柱(此后称“柱子”)插入F-收集管中(此后称“收集管”)。

定货热线：+86-0313-5935521 技术支持：1951545998@qq.com



修饰后DNA的洗脱

4. 将**250μl BF2**添加到每一个柱子中。然后将样本从每一个PCR管子中（第二步）转移到每一个含有**BF2**的柱子中。在**12, 000rpm**下离心**30秒**（据情况可延长到**1分钟**）。从收集管中移走柱子，弃废液。然后将柱子放回到收集管中。
5. 将**200μl 90%** 的乙醇溶液添加到每一个柱子中，**12, 000rpm**下离心**20秒**。
6. 每**1 ml 90%** 乙醇中填加**12μl**的**BF3**，混合，配制最终的脱磷酸缓冲液。往每一个柱子中填加**60 μl**最终的脱磷酸缓冲液（**BF3**和**90%**乙醇混合液）。将每一个柱子在室温下放**8分钟**，然后**12, 000rpm**下离心**20秒**。从收集管中移走柱子，弃废液。然后将柱子放回到收集管中。
7. 将**200μl 90%** 的乙醇溶液添加到每一个柱子中，在**12, 000rpm**下离心**20秒**。从收集管中移走柱子，弃废液。然后将柱子放回到收集管中。再次将**200μl 90%** 的乙醇溶液添加到每一个柱子中，在**12, 000rpm**下离心**30秒**。
8. 将每一个柱子插入到新的**1.5 ml**管子中。往每一个柱子的过滤膜上直接填加**10-20μl BF4**，在**12, 000rpm**下离心**30秒**，洗脱转化后的DNA。

修饰好的DNA现在可以使用。或可储存在**-20°C**或低于该温度的条件下，可以存放六个月。我们推荐每次做实时荧



光定量qPCR时，使用**1–2µl DNA**；终点PCR，**2–4µl DNA**。

您可以使用自己成功的方法来做甲基化特异性-实时荧光定量 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（货号：**A-P-1028**，更多技术问题加 QQ:1951545998 咨询），能充分利用于快速甲基化特异性 qPCR 反应，**70 分钟**就能完成（请看第 **12 页**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扩增的时间。在**2X**浓度下，提供多功能混合液，只需添加引物和模板，更易于准备PCR反应体系。如果采用该试剂盒，MS-qPCR即qMSP仅需**70分钟**就可完成。

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	

定货热线：+86-0313-5935521 技术支持：1951545998@qq.com



对于阴性对照，使用不含DNA/RNA的水代替DNA样本即可。
设计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）。	检查看样本 DNA260/280 比率是否在 1.6-1.9 之间，是否由于电泳胶造成DNA降解。
	太少的DNA 或者太多的DNA（例如 < 100pg 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 50-200 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 清洗不足。	确保在第五步中 12 μ l BF3 加入到每 1ml 90% 乙醇中。
	BF1 溶液含沉积。	加入到管中之前，先检查 BF1 瓶子上是否有沉积。如果有，摇晃瓶子使其溶解。
	BF1 溶液受到其他化学品污染，或者由于长期暴露在空气中而受到影响。	检查 BF1 溶液颜色是否有变化（深黄色或者褐色）或者是否又不能溶解的沉积。如果有，使用/订购新的 BF1 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 BF1 溶液的盖子。
洗脱液含有很少或无DNA。	放入的DNA质量不行（降解）。	检查是否由于电泳胶造成DNA降解。
	缓冲液 BF2 （捕获溶液）没有加入到样本中。	确保在第三步中 BF2 被加入。
	作为DNA清洗的乙醇溶液的浓度不正确。	使用 90% 乙醇作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产品。	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MSPCR，被放大靶区少于 250 bps 。
		确保PCR中使用的模板DNA量足够。
	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	品名	规格
A-P-1026-050	DNA甲基化极速修饰试剂盒	50次
A-P-1026-200	DNA甲基化极速修饰试剂盒	200次

DNA 表观遗传相关产品

DNA样本准备	
货号	品名
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	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/RNA 甲基化修饰试剂盒	
货号	品名
A-P-1002	双链 DNA提取&修饰试剂盒
A-P-1008	96DNA修饰试剂盒
A-P-1016	全细胞亚硫酸氢盐修饰试剂盒
A-P-1050	96 孔 DNA 甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）
A-P-1054	DNA 甲基化极易修饰试剂盒
A-D5005	EZ DNA Methylation-Gold™ Kit
A-P-9003	RNA 甲基化修饰试剂盒

定货热线: +86-0313-5935521 技术支持: 1951545998@qq.com



DNA/RNA甲基化定量分析	
货号	品名
A-P-1030	总体DNA甲基化极易定量检测试剂盒(比色法)
A-P-1032	总体DNA羟甲基化极易定量检测试剂盒(比色法)
A-P-1034	DNA甲基化定量检测试剂盒(比色法)
A-P-1036	DNA羟甲基化定量检测试剂盒(比色法)
A-P-9005	M6A RNA甲基化定量检测试剂盒(比色法)
A-P-1028	快速 MS-qPCR 试剂盒---qMSP 专用配套酶
A-E2003	ZymoTaq™ PreMix---MSP 专用配套酶
Lnc RNA 产品相关	
A-17-10520	Magna 细胞核交联(RIP)抽提试剂盒
A-17-1010	Magna ChIP-Seq 染色质免疫沉淀和二代测序文库制备试剂盒
A-17-611	Magna 染色质免疫沉淀 G 试剂盒
A-17-10460	Magna ChIP™染色质免疫沉淀试剂盒
A-17-10078	EZ Magna ChIP 96 高通量染色质免疫沉淀试剂盒
A-17-10499	Magna RNA 甲基化免疫沉淀 m6A 试剂盒
A-P-9018	m6A RNA 甲基化片段富集试剂盒(qPCR版)

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>

定货热线: +86-0313-5935521 技术支持: 1951545998@qq.com



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. LncRNA 和 m6A RNA 甲基化最新研究工具!
<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1345&t=10178>
8. 厉害了!!! 我的 m6A!!!
<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=54012>
9. 利器在手! 无问西东!!把失去的都抢回来!!!
<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=54012>



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 米艾德院（102206）

电 话：010-52406250 传 真：010-52406250

网 址：www.aderr.com 电 邮：tech@aderr.com

定货热线：+86-0313-5935521 技术支持：1951545998@qq.com