



*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。

5mC&5hmC双位点定量检测试剂盒（qPCR版） **别名: 甲基化和羟甲基化特定位点qPCR定量检测试剂盒**

非常适合定量检测来自任何样本中特定位点或特定基因区域DNA的5mC和5hmC含量.

目录号: **A-P-1067-48**（48次）
A-P-1067-96（96次）

操作手册

请以配套的英文操作手册为准！

在您收到定购的产品时，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: 1951545998@qq.com

2022年10月，第1版，对应英文第2022.05.06版



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



目录

操作	- 1 -
试剂盒组成	- 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 -
需要的材料（如需单独购买,可咨询微信号:hugasis）	- 9 -
分析手册	- 10 -
附录:问题与对策	- 14 -
订购信息	- 16 -
相关产品	- 17 -
如何下单	- 18 -



操作手册

试剂盒组成

组分内容		型号： A-P-1067-48 (48次)	型号： A-P-1067-96 (96次)	储存温度
CNBF	Conversion Buffer	10ml	20ml	室温
CVRP	Conversion Reagent	3 Vials	6 Vials	室温
DNBB	DNA Binding Buffer	15 ml	30 ml	室温
NAOH	Denaturation Solution	100 ul	200 ul	室温
DNAE	Modified DNA Elution	2 ml	4 ml	室温
Clum	F-离心柱	50	100	室温
Tube	F-收集管	50	100	室温
APOE	APOBEC Enzyme	24 ul	48 ul	-20°C
APOB	10X APOBEC Reaction Buffer	100 ul	200 ul	-20°C
MMIX	Master Mix	1 ml	2 ml	-20°C
MCST	Methylated DNA	5 ul	10 ul	-20°C
HMCS	Hydroxymethylated DNA	5 ul	10 ul	-20°C
MPRF	M-Control Primer-F*	10 ul	20 ul	-20°C
MPRR	M-Control Primer-R*	10 ul	20 ul	-20°C
UNPF	U-Control Primer-F*	10 ul	20 ul	-20°C
UNPR	U-Control Primer-R*	10 ul	20 ul	-20°C
AHDB	AH Dilution Buffer*	4 ml	8 ml	室温

***注意：**在使用各溶液之前，将溶液离心至管底。



运输和保存

该试剂盒分两部分运输:一部分按室温运输;第二部分采用冰袋4°C运输。

一旦收到,根据上面表格的温度来储存各个组分,在合适的保存情况下,所有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:

双位点5mC&5hmC定量检测试剂盒用于识别任何区域的位点或基因特异性甲基化和羟甲基化。试剂盒优化分析手册和组分允许亚毫克DNA用于亚硫酸亚铁和胞嘧啶脱氨酶的联合处理,然后在不到5小时内进行qPCR。

起始材料和DNA输入量:

起始材料可以从各种组织/细胞样本中分离出的基因组DNA,如新鲜和冷冻组织、从烧瓶或微孔板中培养的细胞、显微切割样本、石蜡包埋组织。活体组织、活检、胚胎细胞、血浆/血清样本和体液样本等。从芯片、MeDIP/hMeDIP或外显子捕获等各种富集反应中富集的DNA也可用作起始材料。DNA的输入量为10ng~200 ng。要达到最佳制备,输入量应为50-100 ng。



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。且不同样品之间有接触，应立即更换手套。

一般产品信息

质控:

每批双位点5mC&5hmC定量检测试剂盒按照预定技术规范进行生产检测，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 或添加QQ:1513545070进行咨询。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:

双位点5mC&5hmC定量检测试剂盒是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

知识产权:

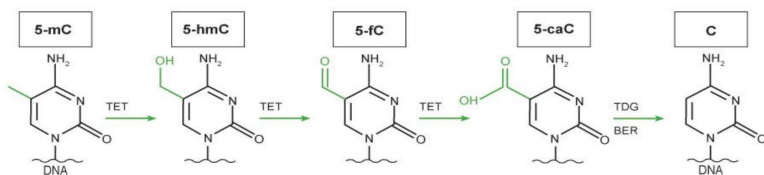
双位点5mC&5hmC定量检测试剂盒中使用的原理和方法，我司有产品专利。

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 甲基化标志物有重要的研究价值。

5-羟甲基胞嘧啶(5-hmC)作为 DNA 的第六碱基的转录调节功能方面在人和小鼠大脑与胚胎干细胞(ES)中大量存在。在哺乳动物中，通过氧化 5mC 可以发生,也可通过第 10-11 转运酶(TET)家族 5mC-羟化酶的介导得到。

5-hmC 的组织特异性已被证明,在人类大脑组织中培养的细胞系中未知的检测百分比达 0.6%,此外,在另外一些物种中可达总 DNA 量的 8%。在基因分型和基因表达中作为表观遗传修饰中重要的 5hmC 的生物学意义近年来都得到公认。例如: 5hmC 在生物中的总体降低几乎跟所有的癌症都有明显的表现,并且在分子生物学中作为分子标志物和癌症靶基因治疗中也有重要作用。



更为重要的是,与 5mC 通常作为基因抑制标志相比,5hmC 通常是作为 DNA 去甲基化的中间形式并且在基因激活方面伴有基因表达中具有重要作用。像 5mC,5hmC 在亚硫酸盐 C 到 U 转化中保持不变,这样就很难区分 5hmC 与 5mC。正如测序结果中所显示,在实验中采用 MS-PCR 或亚硫酸盐-测序中,所有的 5hmC 全部误读为 5mC。

目前,几种方法如:TET 辅助的亚硫酸盐测序法(TAB-Sec)和亚硫酸盐氧化测序(oxBS-seq)通过使用单碱基分辨率绘制 5hmC 的全基因组图谱。然而,他们都是昂贵且耗时。介于针对 5mC&5hmC 特定位点或特定基因的检测方法较少的背景下,A&D Technology Corporation 联合 EpiGentek 针对这些问题我们特别的研发改进推出一款:双位点 5mC&5hmC 定量



检测试剂盒。

该双位点5mC&5hmC定量检测试剂盒具有以下优势和特点：

- **同步读数：**针对5hmC和5mC进行同步处理制备,容许通过qPCR在特定位点或特定基因并行识别。
- **创新方法：**亚硫酸盐和随后的胞嘧啶脱氨酶(APOBEC)联合处理可使5 mC进行转化，以识别5 hmC。
- **高特异性：**5hmC与C、5mC以及其他经修饰的其它胞嘧啶5fC和5caC不同。
- **灵活性：**可以同时分析24次5hmC反应和24次5mC反应，或者只对5hmC或5mC进行48次反应。
- **快速流线型程序：**从DNA亚硫酸盐处理到PCR产物的完成可以在5小时之内完成。
- **完全转化：**将C完全转化为尿嘧啶(>99%)，5 mC转化为胸腺嘧啶(>95%)。
- **非常适合高通量：**可从各种组织/细胞样本中提取基因组DNA，如新鲜和冷冻组织、从瓶或微孔板培养的细胞、显微解剖样本、石蜡包埋组织。组织、活检、胚胎细胞、血浆/血清样本和体液样本等。从芯片、MeDIP/hMeDIP或外显子捕获等各种富集反应中富集的DNA也可作为起始材料。

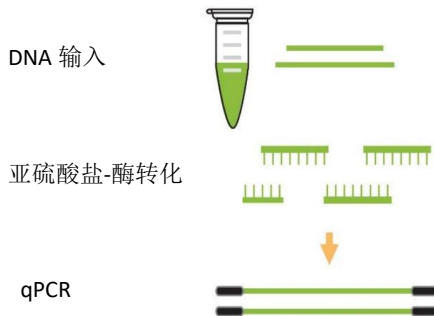
原理和程序

该试剂盒包括成功的qPCR所需的所有试剂，使用从少量输入DNA中生成的转换DNA。在该制备过程中，DNA同时被亚硫酸氢盐修饰和片段化成合适的长度。在亚硫酸氢盐处理

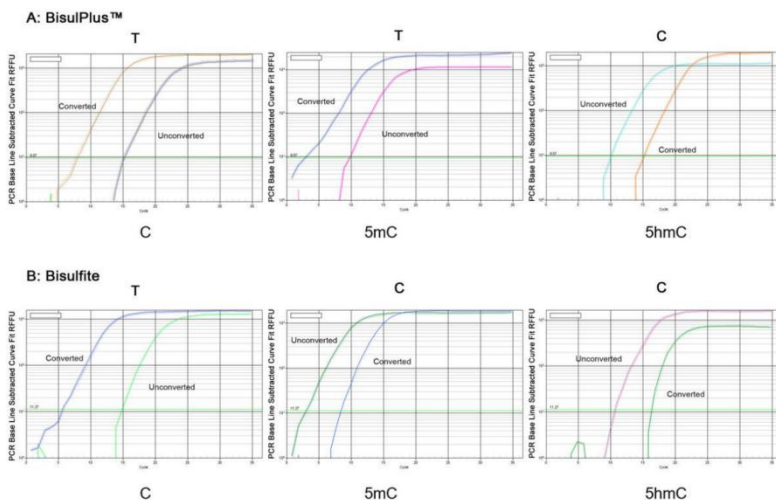
期间，未修饰的胞嘧啶(C)被转化为尿嘧啶(U)，并且将在测序中被读出为T。5-甲基胞嘧啶(5mC)保持相同与5-羟基甲基Cytosine(5hmC)形成胞嘧啶5-亚甲基磺酸盐(CMS)。亚硫酸氢盐修饰的DNA进一步用特异性APOBEC去氨基酶处理，其将5mC转化为T 不仅可以区别于C、5mC,而且也不同于其他修饰的胞嘧啶如:5fC和5caC区分开来。(见表1)。亚硫酸氢盐酶转换的dna可以用于qPCR，用于5mC和5hmC的基因座特异性检测。

表一:双位点5mC&5hmC定量检测试剂盒的原理

		C	5mC	5hmC	5fC	5caC
Reference		C	C	C	C	C
试剂盒	亚硫酸氢盐转化	T	C	C	T	T
	<i>APOBEC</i> 处理	T	T	C	T	T



图一:双位点 5mC&5hmC 定量检测试剂盒流程



图二:5 hmC与胞嘧啶和5 mC的qPCR 鉴别:采用双位点5 mC&5 hmC 定量检测试剂盒,与未经修饰的、甲基化的和羟甲基化的DNA 标准品进行亚硫酸盐-酶处理。PCR 试剂盒,然后使用针对 CpG 转化或未转化序列的目标引物进行实时荧光定量扩增: A: BisulPlus™; B: 亚硫酸氢钠。扩增曲线高度可视化。

用法

需要的材料 (如需单独购买,可咨询微信号:hugasis)

- 涡旋混合仪
- 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 (转速可达**14,000 rpm**)



- 移液器和移液枪头
- PCR管或PCR板
- 1.5 ml微型离心机管
- 100%乙醇
- DNA/RNA-free Water
- DNA样品

分析手册

为得到最好的结果，在实验开始前，请全面仔细地阅读本分析手册。

起始材料

DNA输入量：DNA数量可以从2ng~200ng/反应。DNA最佳量是**10~100 ng/反应**。起始DNA可放在水或是缓冲液中例如TE。DNA应该是高质量且相对无RNA。RNase I可以用来去除RNA。

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提取试剂盒方便您选择使用（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。



1. 亚硫酸氢盐DNA转化

a. 添加1ml 的 **Conversion Buffer** 到 1管 **Conversion Reagent** 来制备**Modification Solution**.通过持续倒置和摇晃3-4分钟来混匀(微量未溶解的**Conversion Reagent**可能仍然存在,这是正常的,因为**Conversion Reagent**在溶液中是饱和的)。

b. 针对每个0.2 ml PCR管, 添加150 μ l 混合的**Modification Solution**, 紧接着添加1-10 μ l你自己准备的样本DNA (最佳量是: 20~100 ng) 。

注: 检查样品DNA体积是否大, 如果浓度小于5ng/ μ l。如是这样,我们建议您在亚硫酸盐处理之前,先采用我们的货号是:A-P-1006(DNA浓缩试剂盒)来浓缩DNA。

制备的**Modification Solution**可在-20°C保存最长2周, 且无明显的效率损失。为取得最佳效果, 应立即使用混合溶液。

c. 紧紧地盖上PCR管, 并将它们放置在一个带有加热盖子的热循环仪中。按以下步骤编程并运行热循环仪。

95°C 30秒

65°C 45分

95°C 30秒

65°C 45分

Hold 18~20 最长到 6 小时

同时, 根据您的实验需要, 将**F-Spin Columns**的数量插入**F-Collection Tubes**管中。



2.转化后DNA洗脱

- a. 添加**300 μl**的**DNA Binding Buffer**到每个离心柱中。然后将每个PCR管（从步骤1）中的样本转移到装有**DNA Binding Buffer**离心柱中。12,000转rpm离心45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。
- b. 添加**250 μl** 90%乙醇到每个离心柱中。12,000转rpm离心45秒。
- c. 通过添加**10 μl** 的**Denaturation Solution**到每1 ml 90%乙醇，并混合。来制备最终的脱硫溶液。将**100μl** 终浓度**Denaturation Solution**（**Denaturation Solution**和90%乙醇混合）到每一个柱子中。允许柱在室温下放置**10**分钟，然后在**12, 000rpm**下离心**45**秒。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。
- d. 添加**250μl** 90%乙醇到每一个离心柱中。在**12, 000rpm**下离心**45**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**250μl** 90%乙醇到每一个离心柱中。在**12, 000rpm**下离心**45**秒。
- e. 将离心柱插入到一个**新的**1.5ml 管子中。直接添加**12.5μl** **Modified DNA Elution**到柱基质上。在**12, 000rpm**下离心**60**秒来洗脱转化后的DNA。

3.酶DNA转化

- a. 根据表2在0.2 ml PCR管中制备酶DNA Conversion reaction。



表2 酶DNA Conversion

组分	体积
Bisulfite DNA(从步骤2)	12ul(10-50ng 输入DNA)
10X APOBEC Reaction Buffer	2ul
APOBEC Enzyme	1ul
AH Dilution Buffer	5ul
Total volume	20ul

注:如果处理多个反应, 可以制备反应组分的主要混合物。

b.在37° C的无加热盖子的热循环仪中混合并孵育90分钟(确保将盖子温度设置为25° C), 然后72° C孵育10分钟。。

注:在此步骤之后, 样品可在4° C下过夜保存。

4.实时荧光定量PCR分析

1. 引物设计

a) 设计的引物应符合实时PCR的标准。例如, 转化序列区域的长度应为50-150 bp。应避免在引物的3'端进行G/C延伸。

b) 所设计的引物可用于亚硫酸盐转化基甲基化特异性PCR(MSP)或亚硫酸盐基因组测序PCR反应(BSP)。在使用时, 保证所有组件均在冰上操作, 并在使用完后立刻放在-20°C保存。

2. 制备PCR反应

a)解冻所有反应组分, 包括**Master Mix**、DNA/RNA-free



水、**Primer solutions**、**甲基化DNA**、**羟甲基化DNA**和**DNA模板**。通过简单的涡旋混合。保持组分在冰上等待使用，使用后立即放回到-20° C。

b) 按照以下步骤在每个孔中添加组件。

组分	体积	终浓度
MasterMix(2X)	10 ul	1X
Forward Primer	1 ul	0.4-0.5uM
Reverse Primer	1 ul	0.4-0.5uM
DNA Template	1-2ul	100pg-0.1ug
DNA/RNA-free H ₂ O	6-7ul	
Total Volume	20ul	

注:对于阴性对照, 使用DNA/RNA-free水代替DNA模板。

3. 设置PCR反应程序

a.将反应板放置在仪器中。

b.按以下方式设置PCR条件:

Cycle Step	温度	时间	循环
Activation	95°C	60秒	1
Cycling	95°C	15秒	40~45
	60°C	30秒	
Melt Cure	60-95°C	可调的	1

附录:问题与对策

问题	可能的原因	建议
DNA修饰不完全	DNA质量差（DNA严重降解）。	检查DNA样本 260/280 比率是否在 1.8-1.9 之间，通过跑电



		泳看DNA是否降解。确保RNA通过RNase处理去除。
	太少的DNA 或者太多的DNA（例如 < 5pg 或 >200ng）。	添加或者减少DNA量，使其达到正常的范围。或达到最佳的量范围50~100 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。
	添加大量的转化试剂，包括亚硫酸盐和APOBEC酶是不够的。	确保在反应中加入足够的转化试剂。
洗脱液含有很少或不含有DNA。	输入的DNA质量差（降解）。	通过跑电泳来检查DNA是否降解。
	DNA Binding Buffer没有足够的加入到样本中。	确保在第2a步中DNA Binding Buffer被加入。
	作为DNA清洗的乙醇溶液的浓度不正确。	使用 <u>90%乙醇</u> 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。
扩增产物少或无扩增产物	引物添加不正确。	检查引物设计。如果它是专为亚硫酸氢钠处理的DNA，确认序列信息的准确性。根据MS-PCR引物设计的指导重新设计引物。或用MethPrimer软件设计。
	引物降解或引物浓度不是	在不同引物浓度下重复PCR，



	最佳	扩增倍数为0.1uM。检查引物在变性聚丙烯酰胺凝胶上可能降解的可能性。
	不正确的PCR程序包括变性不足、退火和延伸时间/温度以及循环次数不足。	检查变性、退火和延伸时间/温度规划是否正确。增加循环次数。
非特异性扩增	模板浓度太高。	当扩增亚硫酸盐DNA时，反应混合物中模板的初始浓度不应超过每20ul反应体积100 ng。
	DNA转化不足	用试剂盒中包含的 β -actin引物检查PCR的特异性和可靠性。如有必要，制备新的转化DNA和重复PCR。
	引物设计不理想	检查引物设计。如果它是专为亚硫酸盐处理的DNA，确认序列的准确性。根据MS-PCR引物设计的指导重新设计引物或用MethPrimer软件设计。

订购信息

货号#	描述	规格
A-P-1067-48	5mC&5hmC双位点定量检测试剂盒 (qPCR版)	48次
A-P-1067-96	5mC&5hmC双位点定量检测试剂盒 (qPCR版)	96次



相关产品

DNA样本准备		
货号#	描述	规格
A-P-1003	常规组织切片DNA提取试剂盒	200次、100次
A-P-1004	血浆/血清DNA提取试剂盒	100次、50次
A-P-1006	DNA 浓缩试剂盒	100次、50次
A-P-1007	凝胶DNA提取试剂盒	100次、50次
A-P-1009	石蜡包埋组织切片DNA提取试剂盒	100次、50次
A-P-1017	尿脱氧核糖核酸(DNA)提取试剂盒	100次、50次
A-P-1018	血液和培养细胞 DNA 抽提试剂盒	100次、50次
DNA亚硫酸氢盐修饰		
货号#	描述	
A-P-1001	DNA修饰试剂盒	100次、50次
A-P-1002	双链 DNA提取&修饰试剂盒	100次、50次
A-P-1008	96孔DNA修饰试剂盒	192次、96次
A-P-1016	全细胞亚硫酸氢盐修饰试剂盒	80次、40次
A-P-1026	DNA 甲基化极速修饰试剂盒	200次、50次
A-P-1050	96孔 DNA 甲基化极速修饰试剂盒（磁珠法）	192次、96次
DNA甲基化/羟甲基化定量检测试剂盒		
货号#	描述	
A-P-1030	DNA甲基化极易定量检测试剂盒（比色法）	96次、48次
A-P-1035	DNA甲基化定量检测试剂盒（荧光法）	96次、48次
A-P-1032	DNA羟甲基化极易定量检测试剂盒（比色法）	96次、48次
A-P-1037	DNA羟甲基化定量检测试剂盒（荧光法）	96次、48次



A-E3317S	5-hmC和5-mC分析试剂盒	40次、20次
A-P-1011	通用甲基化DNA修饰试剂盒	20次、10次
A-P-1019	通用甲基化DNA配备试剂盒	100次、50次
A-P-1028	快速 MS-qPCR 试剂盒	200次、100次

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>



公众号: AD-Bio



订阅号: Bio-888



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