



DNA Methylation Kit

DNA甲基化试剂盒

Cat. No. CW2140M (50 preps)

产品简介

本试剂盒基本原理为DNA经亚硫酸氢盐处理后，可使未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶，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-2μg的DNA、cfDNA。

保存条件：吸附柱DF 2-8°C保存，其余组分室温（15-30°C）保存。

产品内容

Component	CW2140M 50preps
转化液CR	5×1mL
缓冲液CL	30mL
缓冲液MD	0.4mL
缓冲液DB	10mL
漂洗液WB (浓缩液)	10mL
漂洗缓冲液1 (浓缩液)	13mL
漂洗缓冲液2 (浓缩液)	15mL
洗脱液	4mL
柱平衡液PS	10mL
吸附柱DF	50Pcs
收集管	50Pcs

自备仪器试剂: 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:
 - 2.1 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。
 - 2.2 转化液对光敏感, 应避光保存, 避免暴露在光线下。
 - 2.3 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

1. PCR管中加入20 μ L待测样本以及5 μ L缓冲液MD，混匀并短暂离心后放入PCR仪中，37 $^{\circ}$ C 孵育15min。
2. 加入100 μ L转化液CR，混匀并短暂离心后放入PCR仪中，54 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C Hold。
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

Q: 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?

A: 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。

Q: 甲基化转化时间可以延长吗?

A: 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。

Q: 亚硫酸氢盐处理的DNA定量需要注意什么?

A: 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的值。

Q: 处理后核酸检测OD值异常是什么原因?

A: 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。

Q: 后续的PCR扩增条件建议是什么?

A: 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°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。

注: 康为世纪CW3332: FastStar Probe Kit (for bisDNA) 主要应用于以亚硫酸氢盐处理的DNA为模板的探针荧光定量PCR。其中的SuperFastStar DNA Polymerase是一种经双单克隆抗体修饰的、全新高效热启动酶。