

EZ-96 DNA甲基化-GOLD试剂盒

(使用说明书 Ver.1.1.0)

产品说明

- ◇ 在不到 3 小时的时间内完成高通量(96 孔)富含 GC 的 DNA 亚硫酸盐转化。
- ◇ 耦合热变性及转化反应步骤简化了将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶的过程。
- ◇ 省略 DNA 回收，DNA 在一个步骤中被纯化和去硫。
- ◇ 洗脱，超纯 DNA 可直接用于后续分子实验及分析

产品货号：

TD5008 (2 x 96次反应)



扫描二维码了解更多产品信息

目录Contents

产品组份	1
注意事项	1
DNA甲基化简述	1
产品特性	2
产品描述	2
溶液制备	3
操作步骤	3
附录	4
FAQ常见问题及解决方法	5
订购信息	6
组件查询	6

产品组份

试剂盒组成	2 x 96次	保存
亚硫酸氢盐干粉	2 瓶	室温
稀释缓冲液	7 ml	室温
溶解缓冲液	1.2 ml	室温
结合液	125 ml	室温
洗涤液	2 x 36 ml	室温
脱硫液	40 ml	室温
洗脱液	8 ml	室温
96 孔深孔纯化板	2块	室温
96 孔 PCR 纯化板	2块	室温
96 孔收集纯化板	2块	室温
96 孔 U 底洗脱纯化板	2块	室温

注意事项

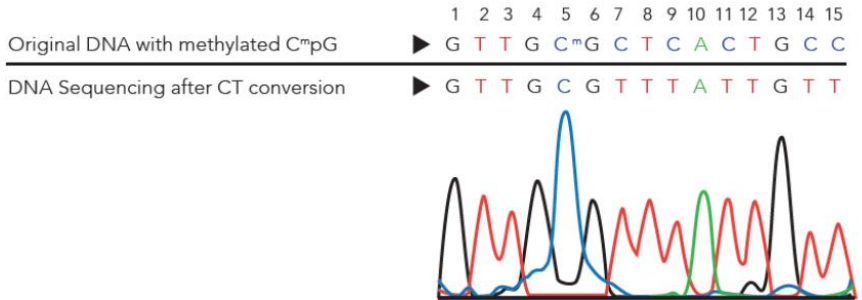
- ◇ 简石生物产品仅供研究使用，并应由专业人员操作。本试剂盒中包含的一些试剂是刺激物。请戴好防护手套和护眼用品。遵循您的研究机构或设施制定的安全准则和规则。
- ◇ 售出后一年内产品可质保。试剂盒已经过大量的常规检测来保证其可操作性。

DNA甲基化简述

DNA甲基化在原核生物和真核生物中都是一个自然发生的事件。在原核生物中，DNA甲基化提供了一种保护宿主DNA免受限制性内切酶消化的方法，而在高等真核生物中，DNA甲基化在基因表达的调节控制中起作用。已经证明，异常DNA甲基化是癌症中普遍存在的现象，可能是肿瘤发生过程中最早发生的变化之一。DNA甲基化也被证明在基因印记中发挥核心作用。胚胎发育、X染色体基因沉默和细胞周期调控。在许多动植物中，DNA甲基化通过甲基转移酶在胞嘧啶嘧啶环的第5个碳位置上添加甲基。哺乳动物中大多数DNA甲基化发生在5' CpG-3'二核苷酸中，但也存在其他甲基化模式。事实上，哺乳动物基因组中约80%的5' -CpG-3'二核苷酸被甲基化，而其余20%未甲基化的大多数位于启动子或基因的第一外显子内。

高效准确地检测和量化DNA甲基化已经成为研究癌症、基因表达、遗传疾病以及生物学许多其他重要方面的必要条件。迄今为止，已经开发了许多方法来检测量化DNA甲基化，包括：高性能毛细管电泳和甲基化敏感的任意引物PCR。然而，目前最常用的技术仍然是亚硫酸盐转化法。该

技术利用亚硫酸盐处理甲基化的DNA，将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶。甲基化的胞嘧啶在转化过程中保持不变。转化完成后，DNA的甲基化谱可以通过PCR扩增和DNA测序来确定。



亚硫酸盐处理后的DNA测序结果。使用EZ DNA甲基化试剂盒处理5号核苷酸位置CmpG甲基化的DNA。回收的DNA经PCR扩增后直接测序。5号位置的甲基化胞嘧啶保持完整，而7、9、11、14和15号位置的未甲基化胞嘧啶经过亚硫酸盐处理后完全转化为尿嘧啶，并通过PCR检测为胸腺嘧啶。

产品特性

- ◇ DNA输入-样品中DNA量应为500 pg - 2μg。为了获得最佳结果，输入DNA的量应在200-500 ng之间。
- ◇ 转化效率- > 99%的非甲基化C残基转化为U;> 99%的甲基化胞嘧啶被保留。
- ◇ DNA回收率- > 75%。

产品描述

EZ DNA甲基化-金典版试剂盒是在EZ DNA甲基化试剂盒基础上进行升级的版本。EZ DNA甲基化-金典版试剂盒将DNA变性和亚硫酸盐转化过程集成为一步。在以前的方案中，此步骤用温度变性代替氢氧化钠的化学变性来完成的。

此外，该试剂盒已简化了DNA亚硫酸盐转化后的高产量回收。这两种试剂盒都是基于胞嘧啶和亚硫酸氢钠之间的三步反应过程，导致胞嘧啶转化为尿嘧啶。EZ DNA甲基化-金典版和EZ DNA甲基化试剂盒共用新型的柱内脱硫技术，消除了繁琐的DNA沉淀步骤，同时为研究人员提供一致的结果。该试剂盒旨在最大限度地减少模板降解，在处理和清理过程中DNA的损失，并提供未甲基化胞嘧啶的完全转化。回收的DNA可直接用于PCR扩增下游分析，包括内切酶消化，测序，微阵列分析等应用。

溶液制备：

- ◇ CT转换试剂的制备

本试剂盒中提供的亚硫酸氢盐干粉是固体混合物，必须在首次使用前准备好。准备如下：

1. 将 9ml 水，500 μ l 溶解缓冲液和 3ml 稀释缓冲液加入到一瓶亚硫酸氢盐干粉中。
2. 在室温下混匀 15 分钟，并经常旋转或摇晃。

注意:在CT转化试剂中看到微量未溶解试剂是正常的。每瓶CT转化试剂设计用于96个单独的DNA处理

储存:CT转化试剂是光敏的，所以应尽量减少暴露在光线下。为获得最佳效果，应在制备后立即使用CT转化试剂。如果不立即使用，CT转化试剂溶液可以在室温下保存一夜，在4°C下保存一周，或在-20°C下保存一个月。储存的CT转化试剂溶液必须加热到37°C，然后在使用前旋转混匀后，方可继续使用。

◇ 洗涤缓冲液的制备

使用前向36 ml 洗涤液中加入144 ml 100%乙醇。

操作步骤:

样本处理

1. 在 96 孔 PCR 纯化板中加入 130 μ l CT 转化试剂到每 20 μ l 的 DNA 样品中。如果 DNA 样品的体积小于 20 μ l，则用水补足。上下移液混合样品。
2. 用所提供的薄膜密封孔板。将 96 孔 PCR 纯化板转移到热循环器中，并执行以下步骤：
 - 1) 98°C 加热 10 分钟。
 - 2) 64°C 2.5 小时
 - 3) 4°C 储存长达 20 小时

注:4°C的存储步骤是可选的。对于某些样本，替代参数可能会产生更好的结果(见附录)。如果您使用本试剂盒在不同的反应条件下取得了更好的结果，您可以继续使用相同的条件进行。

3. 将600 μ l结合液加入到安装在96孔收集纯化板上的96孔深孔纯化板的孔中。

注: 96孔深孔纯化板每孔容量为1.1 ml，96孔收集纯化板每孔容量为800 μ l。必要时需清空96孔收集纯化板，以防止滤液污染96孔深孔纯化板。

4. 将样品从转化板(步骤2)转移到96孔深孔纯化板的孔中。吹吸混合均匀。
5. $\geq 3000 \times g$ (最大5000 $\times g$)离心5分钟。弃掉滤液。
6. 每孔加入400 μ l洗涤液。 $\geq 3000 \times g$ 离心5分钟。
7. 每孔加入200 μ l 脱硫液，室温(20-30°C)静置15-20分钟。孵育后， $\geq 3000 \times g$ 离心5分钟。弃掉滤液。
8. 每孔加入400 μ l洗涤液。 $\geq 3000 \times g$ 离心5分钟。弃掉滤液。再加入400 μ l洗涤液，离心10分钟。
9. 将96孔深孔纯化板置于96孔U底洗脱纯化板上。每孔直接加入15 μ l洗脱液。5分钟后， $\geq 3000 \times g$ 离心3分钟，洗脱DNA。

注:如果您的实验需要，也可以用水或TE (pH \geq 6.0)进行洗脱。

DNA可以立即进行下游分析实验，也可以在-20°C或以下储存以供以后使用。如需长期储存，请在-70°C或以下储存。我们建议每次PCR使用1-4 μ l洗脱的DNA，但如果需要，最多可使用15 μ l。根据您的实验要求，洗脱体积可以 $> 15 \mu$ l，但较小的洗脱体积将产生浓度更高的DNA。

附录:

亚硫酸盐转化及PCR优化

1. 反应条件:步骤 2 中给出的反应条件将对易转化与难转化的模板 DNA(包括富含 GC 的模板 DNA)产生一致的结果。然而,下面提供的两种方案(备选 1 和 2)可能在较长 DNA 片段的 PCR 扩增中产生更好的结果。然而,如果 DNA 模板的 GC 组成大于 80%,则这些条件可能导致模板胞嘧啶到尿嘧啶的不完全转化。

备选 1:

- 1) 98°C for 10 minutes
 - 2) 53°C for 30 minutes
 - 3) 53°C for 6 minutes
 - 4) 37°C for 30 minutes
 - 5) 4°C storage
- } 8 cycles

备选 2:

- 1) 98°C for 10 minutes
- 2) 53°C for 4 hours
- 3) 4°C storage

2. 双链 DNA 模板的亚硫酸转化。下图说明了亚硫酸盐转化过程中 DNA 模板变化情况。

Template: **A:** 5' -GACCGTTCCAGGTCCAGCAGTGCGCT-3'
 B: 3' -CTGGCAAGGTCCAGGTCGTCACGCA-5'

Bisulfite Converted: **A:** 5' -GATCGTTTTAGGTTTAGTAGTGCGTT-3'
 B: 3' -TTGGCAAGGTTTAGGTTGTTATGCGA-5'

注意:甲基化的“C”在示例中下划线。

注意:亚硫酸盐转化后,两链不再互补。

3. PCR 引物设计。通常,引物长 26 -32 个碱基,用于扩增亚硫酸盐转化 DNA。一般来说,所有的 C 都应该被当作 T 来对待,除非它们是在 CpG 环境中。参见下面的示例。

Bisulfite Converted: **A:** 5' -GATCGTTTTAGGTTTAGTAGTGCGTT-3'
Primers: Reverse: 3' -ATCATCACRCAA-5' **R= G/A**
 : Forward: 5' -GATYGTTTAGGT-3' **Y= C/T**

注:只有一条链(A)被给定引物扩增。只有反向引物与转化的DNA结合,正向引物将与反向引物产生的链结合。如果引物中含有甲基化状态不确定的CpG二核苷酸,则可以使用C和T(或G和A)兼并碱

基。通常，每个引物的兼并碱基不应超过一个，并且应位于引物的5'端。不建议在引物的3'端放置兼并碱基。

4. 亚硫酸盐转化所需的 DNA 量。亚硫酸盐处理和随后的 PCR 扩增所需的人类或小鼠基因组 DNA 的最小量为 100 µg。每次亚硫酸盐处理的 DNA 量为 200-500 ng。虽然最多可以处理 2µg 的 DNA，但应该注意的是，高水平的 DNA 输入可能导致一些富含 GC 的区域亚硫酸盐转化不完全。

5. PCR 条件。通常，亚硫酸盐转化 DNA 的成功 PCR 扩增需要 35-40 个循环。最佳扩增子在 150-300 bp 之间；然而，更大的扩增子(高达 1kb)可以通过优化 PCR 条件产生。退火温度通常在 55-60°C 之间。

6. 由于大多数非甲基化胞嘧啶残基转化为尿嘧啶，亚硫酸盐处理的 DNA 通常富含 AT，GC 组成低。非特异性 PCR 扩增在亚硫酸盐处理的 DNA 为模板时相对常见，由于其 AT 丰富的性质。强烈推荐使用“热启动”聚合酶扩增亚硫酸盐处理过的 DNA。

FAQ常见问题及解决方法

Q: 问题	A: 可能的原因和建议的解决方案
在转化之前，输入DNA是否应溶解在TE、水或其他缓冲液中？	水、TE或改性TE缓冲液可用于溶解DNA，且不干扰转化过程。
对于转化DNA的PCR扩增，您推荐使用哪种Taq聚合酶？	我们推荐“热启动”DNA聚合酶(例如:ZymoTaq™DNA聚合酶)
为什么EZ-96 DNA甲基化™试剂盒有两个不同的目录编号？	这两个不同的目录编号是用来区分套件中包含的不同板材的。深孔和浅孔结合板可容纳大多数转子和微孔板载体。

订购信息

Product Description	Catalog No.	Size
EZ DNA 甲基化-金典版 试剂盒	TD5005	50 次
	TD5006	200 次
EZ-96 DNA 甲基化-金典版 试剂盒 (浅孔板)	TD5007	2 x 96 次
EZ-96 DNA 甲基化-金典版 试剂盒 (深孔板)	TD5008	2 x 96 次
EZ-96 DNA 甲基化-金典版 试剂盒 (磁珠法)	TD5046	4 x 96 次.
	TD5047	8 x 96 次.

组件查询

组件名称	货号	规格	规格
亚硫酸氢盐干粉	TD5003-1	1 瓶	室温
稀释缓冲液	TD5005-2	7 ml	室温
溶解缓冲液	TD5005-6	1.2 ml	室温
结合液	TD5005-3	125 ml	室温
洗涤液	TD5001-4	2 x 36 ml	室温
脱硫液	TD5001-5	40 ml	室温
洗脱液	TD5001-6	8 ml	室温
96孔深孔纯化板	TC2004	2块/包	室温
96孔PCR纯化板	TC2005	2块/包	室温
96孔收集纯化板	TC2002	2块/包	室温
96孔U底洗脱纯化板	TC2003	2块/包	室温