

甲基化检测样本前处理试剂盒 (金典版 磁珠法)

(使用说明书 Ver.1.0.0)

产品说明

- ✧ 针对高GC样本DNA，整个亚硫酸盐转化过程可在不到3小时内完成。
- ✧ 热变性/转化反应步骤整合为一步反应，简化了非甲基化胞嘧啶转化为尿嘧啶的过程。
- ✧ 高通量（96孔），自动脱硫和回收亚硫酸盐处理后的DNA。
- ✧ 洗脱得到的超纯DNA可用于下游各种分子生物学实验。

产品货号：

JSR5042 (4X96次)

JSR5043 (8X96次)



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甲基化简介	1
产品描述	2
产品特性	2
操作步骤	3
试剂准备	3
亚硫酸盐转化	3
附录	5
FAQ常见问题及解决方法	6
组件查询	7

产品组份

试剂盒组成	JSR5042 (4X96次)	JSR5043 (8X96次)	保存
亚硫酸氢盐干粉	4瓶	8瓶	室温
稀释缓冲液	2 x 7 ml	4 x 7 ml	室温
溶解缓冲液	2 x 1.2 ml	4 x 1.2 ml	室温
结合液	250 ml	2 x 250 ml	室温
洗涤液(未添加乙醇)	2 x 72 ml	4 x 72 ml	室温
脱硫液	80 ml	2 x 80 ml	室温
洗脱液	2 x 8 ml	40 ml	室温
磁珠	8 ml	16 ml	室温
96孔PCR纯化板	4 块	8块	室温
96孔收集纯化板	6块	10块	室温
96孔U底洗脱纯化板	4块	8块	室温

注意事项

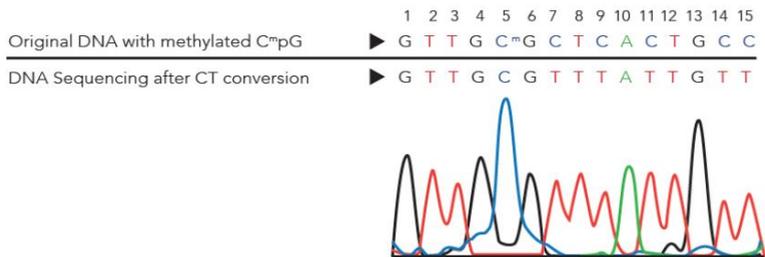
- ✧ 本产品自售出之日起提供一年质量保证。所有试剂均通过严格质量检测，确保性能稳定可靠。
- ✧ 本产品仅供专业研究人员在受控环境下使用。操作人员须佩戴防护手套及护目装置等个人防护装备，并严格遵守所在机构的安全操作规程。请注意，部分试剂可能具有刺激性，使用时需特别谨慎。
- ✧ 避免试剂长时间暴露于空气中，以防挥发、氧化或pH值变化，使用后请立即盖紧瓶盖，并按照说明书要求妥善储存。

DNA甲基化简介

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、胚胎发育、X染色体基因沉默和细胞周期调控等过程中发挥核心作用。在许多动植物中，DNA甲基化通过甲基转移酶在胞嘧啶啉啉环的第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，而未甲基化的其余20%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。

产品描述

EZ-96 DNA甲基化转化试剂盒将DNA变性和亚硫酸盐转化过程集成为一步，与基于磁珠的纯化回收相结合，用于高通量甲基化分析。

在之前版本的试剂盒中，该过程是用温度变性代替氢氧化钠的化学变性来实现的。此外，该试剂盒已简化了DNA亚硫酸盐转化后的回收过程。转化后DNA的脱硫和回收是通过EZ-甲基化磁珠进行的。该试剂盒旨在最大限度地减少模板DNA的降解，减少在处理和回收过程中的DNA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，微阵列等。

产品特性

- ✧ DNA输入：可兼容500 pg-2μg的DNA。为了获得最佳结果，推荐输入DNA的量应在200-500 ng之间。
- ✧ 转化效率：99%的非甲基化胞嘧啶残基转化为尿嘧啶；99%的甲基化胞嘧啶被保护。
- ✧ 所需额外设备：磁力支架，96孔板加热元件。

操作步骤

试剂准备

A. CT转化试剂制备

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
2. 和3ml 稀释缓冲液加入到一瓶亚硫酸氢盐干粉中。
3. 在室温下搅拌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转换试剂溶液必须加热到37°C，然后在使用前混匀。

B. 洗涤液制备

使用前向72 ml洗涤液中加入288 ml 100%无水乙醇。

亚硫酸盐转化

1. 在 96 孔 PCR 纯化板中加入 130 μ l CT 转化试剂到 20 μ l DNA 样品中。上下移液混合样品。

注：如果DNA的体积小于20 μ l，用水补偿。

注：对于DNA体积>20 μ l，在制备CT转化试剂时需要进行调整。DNA样品体积每增加10 μ l，水的用量减少1ml。例如，对于40 μ l的DNA样品，加入7 ml的水制成CT转化试剂。加入到样品中的CT转化试剂的体积也必须随着样品的增加而减少，总反应体积保持150 μ l。每个转化反应使用的最大DNA样本量为45 μ l。不要调整溶解缓冲液或稀释缓冲液的体积。

2. 用所提供的封板膜密封 96 孔 PCR 纯化板。将 96 孔 PCR 纯化板转移到热循环器中，并执行以下步骤：

- a) 98 °C 10 分钟
- b) 64 °C 2.5 小时
- c) 4 °C 可存放20小时

注：4°C的存储步骤是可选的。对于某些样本，其他转化条件可能会产生更好的结果（见附录）。如果您使用本试剂盒在其他不同的反应条件下取得了良好的结果，您可以继续使用此条件。

3. 将另外的金属浴（或其他加热设备）预热至 55°C。

注：另外，根据相应加热设备达到指定温度所需的时间，此步骤可以在步骤10之前的任何时间执行。

4. 在 96 孔收集纯化板的每孔中加入 600 μ l 结合液和 10 μ l EZ-甲基化磁珠。

注意：EZ-甲基化磁珠沉降非常快，确保磁珠在加入96孔收集纯化板时保持均匀的悬浮状态。

5. 将样品从 96 孔 PCR 纯化板转移到含有结合液和 EZ-甲基化磁珠的 96 孔收集纯化板。通过上下移液 3-6 次混合，如果可以的话，以 1300 - 1500rpm 的速度混匀 30 秒（例如 Tecan - Te-Shake™）。

注意：转移可以通过刺穿或去除封板膜来完成。如果使用96孔收集纯化板作为96孔PCR纯化板的支架，则可能是必须使用盖板上的卡舌将板固定在一起，以防止抬起96孔PCR纯化板。

6. 将 96 孔收集纯化板放置在室温下静置 5 分钟，然后将 96 孔收集纯化板转移到磁力支架上再静置 5 分钟或直到磁珠被完全聚集吸附。取出上清并丢弃。

注意：有些磁珠会粘在96孔板孔壁上。慢慢去除上清液，让这些磁珠在液位降低时被磁力架吸附聚集。

7. 从磁力支架上取下 96 孔收集纯化板，向每孔中加入 400 μ l 洗涤液。通过上下移液或以 1300 - 1500rpm 的速度混匀 30 秒，重新悬浮磁珠。将板子放在磁力支架上静置 3 分钟或直至磁珠完全吸附聚集。取出上清并丢弃。

8. 向每孔中加入 200 μ l 脱硫液。通过上下移液或摇晃平板 30 秒来重新悬浮磁珠。在室温下（20°C-30°C）静置 15-20 分钟。孵育后，将板放在磁力支架上 3 分钟或直至磁珠完全吸附聚集。取出上清并丢弃。

注意：将整个处理过程（包括吹吸重悬的过程）的时间计入总孵育时间。根据需要调整时间，确保没有样品在脱硫液中停留超过20-25分钟。

9. 向每孔中加入 400 μ l 洗涤液。通过上下移液或摇晃平板 30 秒来重新悬浮磁珠。将板子放在磁力支架上静置 3 分钟或直至磁珠完全吸附聚集。取出上清并丢弃。重复这个洗涤步骤。

注意：在最后一次洗涤后，尽可能将洗涤液去除干净液，以帮助磁珠干燥。

10. 将 96 孔收集纯化板转移到 55°C 的金属浴或其他加热设备上放置 20-30 分钟，干燥磁珠，去除残留的洗涤液。

注意：磁珠的外观会从潮湿时的光滑黑色变为完全干燥时的暗棕色。

11. 向每孔带有干燥磁珠的 96 孔板中加入 25 μ l 洗脱液，吹吸或摇板 30 秒使磁珠重新悬浮。在 55°C 下加热 4 分钟，然后将板转移到磁力支架上 1 分钟直至磁珠完全吸附聚集。取出上清，将

上清转移到干净的 96 孔 U 底洗脱纯化板上。

注意：为彻底去除洗脱液中的磁珠，建议缓慢地上下移液一到两次，这样将使它们完全被磁力架吸附。

注意：如果您的实验需要，也可以用水或TE (pH≥6.0) 进行洗脱。

回收的DNA可直接用于下游实验，或可在-20°C储存以供以后使用。如需长期储存，请在低于-70°C条件下储存。我们建议每次PCR使用1-4μl洗脱的DNA，但如果需要，最多可使用25μl。根据您的实验要求，洗脱体积可以达到>25μl，但小的洗脱体积会产生更高浓度的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' -CTGGCAAGGTCCAGGTCGTCACGCGA-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' -GATCGTTTTAGGTTTAGTAGTGC~~CGTT~~-3'
Primers: Reverse: 3' -ATCATCACRCAA-5' R= G/A
: Forward: 5' -GATYGT~~TTTTAGGT~~-3' Y= C/T

注意: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 pg。每次亚硫酸盐处理的最佳 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 扩增在亚硫酸氢盐处理的 DNA 为模版时相对常见,由于其 AT 丰富的性质。强烈推荐使使用“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: 可能的原因和推荐的解决方案
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试剂盒中包含的不同板材的。其中深孔和浅孔结合板可适应大多数转子和微孔板载体，因此设置了不同编号以满足不同需求。

组件查询

组件名称	货号	规格	储存条件
亚硫酸氢盐干粉	TD5003-1	1瓶	室温
稀释缓冲液	TD5005-2-7	7 ml	室温
溶解缓冲液	TD5005-6-1.2	1.2 ml	室温
结合液	TD5005-3-250	250 ml	室温
洗涤液(未添加乙醇)	TD5001-4-72	72 ml	室温
脱硫液	TD5001-5-80	80 ml	室温
洗脱液	TD5001-6-8	8 ml	室温
	TD5001-6-40	40ml	
磁珠	TD4100-5-8	8 ml	室温
	TD4100-5-16	16ml	
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