

DNA甲基化修饰试剂盒

DNA Bisulfite Conversion Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

货号规格/Catalog Number and Size

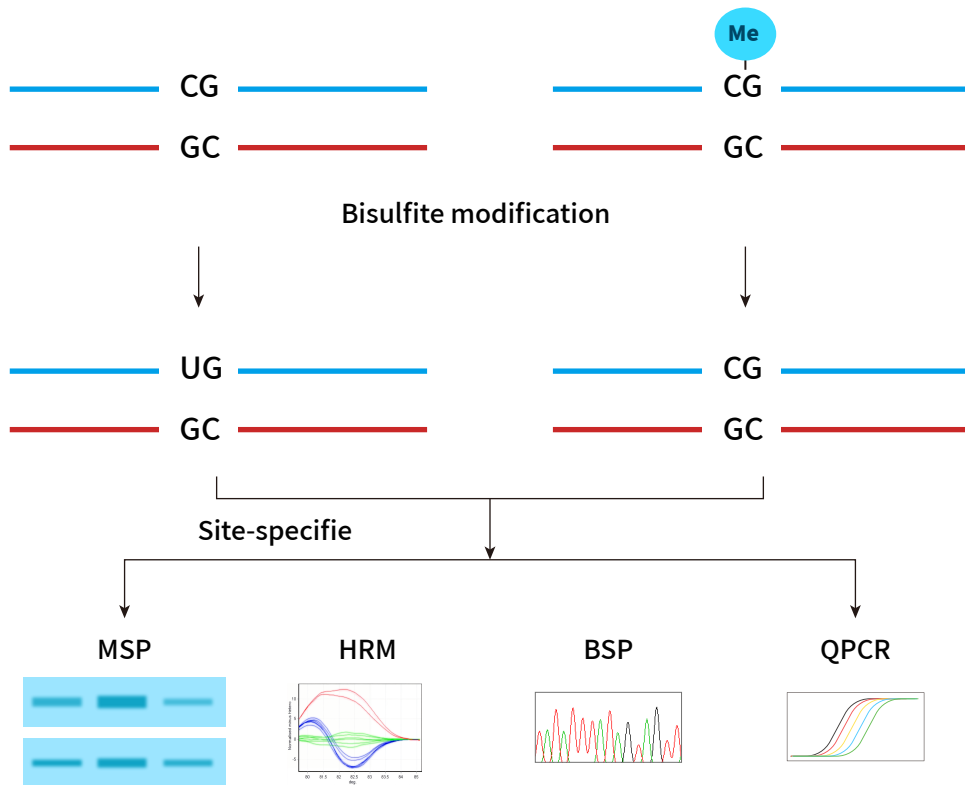
序号	试剂	货号及规格			储存
		IEP007 (6T)	IEP007M (12T)	IEP007L (24T)	
01	DNA 提取缓冲液	5.5 mL	11 mL	22 mL	4°C
02	10%SDS	1 mL	1.5 mL	3 mL	4°C
03	4M NaOH	10 µL	15 µL	30 µL	4°C
04	Hydroquinone	0.6 mL	1.2 mL	2.4 mL	4°C
05	Na ₂ S ₂ O ₅	1 mL	2 mL	4 mL	4°C
06	Binding buffer	4 mL	7.5 mL	15 mL	4°C
07	Washing buffer	2.5 mL	5 mL	10 mL	4°C
08	ddH ₂ O	2 mL	4 mL	8 mL	4°C
09	3M NaAc	1 mL	1.5 mL	3 mL	4°C
10	Proteinase K	60 µL	120 µL	240 µL	-20°C

产品简介/Product Description

生物体内 DNA 的 CpG 位点被亚硫酸氢盐修饰后,其 GC 比例发生改变。基于亚硫酸氢盐修饰, DNA 的甲基化检测方法包括 MSP、BSP、HRM 和 DNA 甲基化芯片等。

本试剂盒采用亚硫酸氢盐修饰基因组 DNA，所有未发生甲基化的胞嘧啶（C）被转化为尿嘧啶（U），而甲基化的胞嘧啶则不变，从而导致基因组 DNA 碱基比例发生改变。

技术路线/Technology mapping



使用流程/Procedure

1. DNA 提取

① 样本预处理

- a. 细胞样本：1×10⁶ 用胰酶消化后，加入 2 mL PBS 洗涤细胞，1000 r/min 室温离心 5 min 收集细胞；
- b. 组织样本：取 0.1~0.5 g 组织，液氮研磨至单细胞状态，转移至离心管中。

② 加入 890 μL DNA 提取缓冲液，重悬细胞，转移至 2 mL 离心管中；

③ 加入 100 μL 10% SDS 及 10 μL 蛋白酶 K 混匀；

④ 55°C 消化 3 h 或过夜消化裂解，过程中不时颠倒混匀反应液；

⑤ 加等体积 (~1 mL) 苯酚：氯仿：异戊醇 (25:24:1)，剧烈混匀 2 min 至不明显分层，室温 12,000g 离心 10 min，取上层水相到新的离心管中 (~0.9 mL)；

⑥ (选做) 加等体积氯仿，轻轻混匀，室温 12,000 g 离心 10 min，取上层水相；

⑦ 加 1/10 体积的 3M NaAc 和 2 倍体积预冷的无水乙醇，轻轻倒置混匀；

⑧ 待絮状物出现后，室温 12,000 g 离心 10 min，弃上清液；

⑨ 沉淀用 1 mL 80% 乙醇洗涤，室温 7,500 g 离心 5 min，弃上清液；

⑩ 室温风干 10 min，挥发乙醇，加 50~100 μL ddH₂O 溶解 DNA。

注意：苯酚为 Tris 饱和酚 (PH=7.7~8.1)

2. DNA 浓度检测

- ①260/280 介于 1.9~2.1 范围标准，低于该范围表明有蛋白质污染；
- ②260/230 介于 1.9~2.1 范围标准，低于该范围表明有污染；

3. DNA 修饰

- ①24 μL 基因组 DNA 100°C沸水变性 5 min；
- ②加入 1 μL 4M NaOH，37°C变性 15 min；
- ③取 250 μL Bisulfite reagent(现配现用：84 μL Hydroquinone 溶液加 166 μL Na₂S₂O₅ 溶液) 与 25 μL 变性样品混合，50°C修饰 16 h (过夜)。

注意：

1. Bisulfite reagent 50°C温浴 10min 促进溶解；
2. 每次修饰 DNA 要求为不低于 10 ng，不高于 1 μg 。

4. DNA 收集

- ①275 μL 修饰 DNA 加入 600 μL Binding buffer，充分颠倒混匀，室温 6000 rpm 离心 1 min，收集上清液于新的 1.5 mL EP 管；
- ②将吸附柱置于收集管内，转移 875 μL DNA Binding buffer 体系到吸附柱内；
- ③室温 1000 rpm 离心 1 min，弃去收集管废液；
- ④用 600 μL Washing buffer (使用前需加入异丙醇) 溶液洗涤吸附柱每次 1000 rpm 离心 1 min；
- ⑤重复步骤④2 次；
- ⑥弃去收集管废液，将吸附柱套回收集管，空管 12000 g 离心 1 min 以去除多余的 Washing buffer 溶液，弃去收集管；
- ⑦将收集管的柱头取出，置于 1.5 mL EP 管，室温放置 5 min；
- ⑧吸附柱头中心加入 100 μL ddH₂O，室温静置 5 min，7000g 室温离心 2 min 收集 DNA，转移至新管；
- ⑨重复步骤⑧一次，合并获得 200 μL 洗脱液；
- ⑩向 200 μL 洗脱液加入 20 μL 3M NaAc 溶液和 400 μL 无水乙醇，-20°C冰箱放置 2 h 或者过夜；
- ⑪16,000g, 4°C离心样品 30 min，去除上清，用 80% 乙醇溶液洗涤沉淀，16,100 g, 4°C离心样品 15 min，去除上清，室温静置 15 min 至乙醇挥发完全；
- ⑫加 30 μL ddH₂O 溶解沉淀用于后续实验。

注意：

1. Bisulfite reagent 添加 Binding buffer 后会有部分盐析出需要通过离心方式去除；
2. 为防止 DNA 降解，请尽量避免反复冻融 DNA；
3. 请配套使用 PROMEGA 品牌的 Wizard DNA Clean-Up System 吸附柱；
4. Washing Buffer 使用前需加入 20 mL 异丙醇。

5. PCR

- ①设计 BSP 或 MSP 扩增引物；
- ②参考 PCR 试剂盒配置反应体系，PCR 扩增条件为 95°C预变性 5 min，30 循环 (95°C变性 10 s、56~58°C退火 15 s、72°C延伸 15 s Ramp time 20°C/s)；72°C延伸 10 min；
- ③PCR 产物取 3~5 μL 3% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果；

注意：

1. 推荐设计巢式引物，开展巢式 PCR。
2. Outer primers, 产物 ~400 bp; inner primers, 产物 ~200 bp。

6. MSP

- ①选择一：参考 qPCR 试剂盒配置反应体系，开展 U primer、M primer 扩增并做数据分析；

②选择二：参考 PCR 试剂盒配置反应体系，开展 U primer、M primer 扩增并结合 3% 琼脂糖凝胶电泳；

7. BSP

①BSP PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收；

②回收片段经 TA 克隆、PCR 鉴定后开展一代测序，最后根据核苷酸序列检测甲基化位点，以及分析多样本甲基化比率；

注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

