

DNA 甲基化试剂盒

项目号: D665729

储存条件: 室温。

产品内容:

Component	D665729 10preps	D665729 50preps
CTConversionReagent	10reactions	50reactions
M-DissolvingBuffer	10reactions	50reactions
M-DilutionBuffer	400 μ l	2ml
M-BufferPA	15ml	60ml
M-WashBuffer (concentrate)	2ml	10ml
M-ElutionBuffer	1ml	10ml
BufferPS	5ml	15ml
SpinColumnsDS withCollectionTubes	10	50

产品简介:

本试剂盒基本原理为 DNA 经亚硫酸氢钠处理后, 可使未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶不变。并采用独创高温处理方法, 极大的缩短了转变时间, 提高了转变效率, 转变效率可达到 99% 以上。同时采用硅基质膜式纯化柱通过简单的结合-洗涤-洗脱步骤, 可从甲基化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、连接和转化、酶切、标记、显微注射、PCR 和体外转录等各种分子生物学实验。

自备试剂: 无水乙醇、75%乙醇。

实验前准备及重要注意事项

1. 产品配制方法:

(1) 10 次包装配制方法: CTConversionReagent 是固体混合物, 一定要在首次使用前制备好。将 2ml 无菌水、100 μ l M-DissolvingBuffer 和 300 μ l M-DilutionBuffer 加入到 CTConversionReagent 管中。在 55° C 溶解并震荡直至全部溶解。在使用之前将 CTConversionReagent 溶液在室温 (20° C-30° C) 下避光保存。每管的 CTConversionReagent 是针对 10 次 DNA 处理设计的, 为了得到较好的结果, 配置好的 CTConversionReagent 应当立即使用, 如果不立即使用, 可将 CTConversionReagent 溶液在 -20° C 存储 1 周, 使用前, 请务必将存储的 CTConversionReagent 溶液在室温下解冻, 并且通过振动或颠倒 2 分钟以充分混匀, CTConversionReagent 对光很敏感, 所以要尽量减少在光下的暴露。

(2) 50 次包装配制方法: CTConversionReagent、M-DissolvingBuffer 均固体混合物, 一定要在首次使用前制备好。将 5ml 无菌水加入到 M-DissolvingBuffer 中震荡溶解, 待固体全部溶解后将 M-DissolvingBuffer 管中溶液全部转移至 CTConversionReagent 管中同时补加 5.5ml 无菌水。再将 1.5ml M-DilutionBuffer 加入到 CTConversionReagent 管中。在 55° C 溶解并震荡直至全部溶解。在使用之前将 CTConversionReagent 溶液在室温 (20° C-30° C) 下避光保存。每管的 CTConversionReagent 是针对 50 次 DNA 处理设计的, 为了得到较好的结果, CTConversionReagent 应当在制备后立即使用, 如果不立即使用, 可将 CTConversionReagent 溶液在 -20° C 存储 1 周, 使用前, 请务必将存储的 CTConversionReagent 溶液在室温下解冻, 并且通过振动或颠倒 2 分钟以充分混匀, CTConversionReagent 对光很敏感, 所以要尽量减少在光下的暴露。

2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在 M-WashBuffer 中加入无水乙醇。

操作步骤

每次制备的 DNA 范围在 1ng-4 μg 之间, 最佳量为 500ng-2 μg。

1. 取 20 μl DNA 样品, 加入到离心管 (自备) 中, 如果样品量不足, 用水补至 20 μl。
2. 向 DNA 样品中加入 2.2 μl 的 M-DilutionBuffer, 混匀样品。
3. 42° C 水浴 30 分钟。
4. 向上步得到的样品中, 加入 220 μl 配制好的 CTConversionReagent 溶液, 混匀, 80° C 恒温水浴锅中避光孵育 60 分钟。

5. 向上步溶液中加入 480 μl M-BufferPA, 温和上下颠倒混匀。

6. 柱平衡: 向已装入收集管的吸附柱 (SpinColumnsDS) 中加入 200 μl BufferPS, 12,000rpm (~13,400×g) 离心 2 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

7. 将步骤 5 所得溶液全部加入到吸附柱 (已装入收集管) 中, 室温放置 2 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

注意: 吸附柱最大容量为 750 μl, 若样品体积大于 750 μl 可分批加入。

8. 向吸附柱中加入 500 μl M-BufferPA, 12,000rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

9. 向吸附柱中加入 650 μl M-WashBuffer (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

10. 12,000rpm 离心 2 分钟, 倒掉废液, 将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。

注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余乙醇去除, 乙醇残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。

11. 将吸附柱放入一个新的离心管 (自备) 中, 向吸附膜中间位置悬空滴加 20 μl M-Elution

Buffer (pH8.5), 室温放置 2 分钟。12,000rpm 离心 1 分钟收集 DNA 溶液。12. 向收集的 20 μl DNA 中加入 2.2 μl M-DilutionBuffer, 室温静置 30 分钟。

13. 向溶液中加入 500 μl 预冷的无水乙醇后颠倒混匀, 并将溶液置于 -20° C 沉淀 30 分钟 (过夜沉淀效果更好)。

14. 12,000rpm 离心 15 分钟, 轻轻倒掉上清。

15. 加入 75%乙醇, 12,000rpm 离心 1 分钟, 倒掉上清, 室温下待乙醇挥发后, 加入

20 μ 1M-ElutionBuffer 溶解，DNA 置于-20℃保存。此步收集的 DNA 可以用于后续相关实验。