

DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D0068S	DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒	50次
D0068M	DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒	200次

产品简介:

- 碧云天生产的DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒(DNA Bisulfite Conversion Kit), 也称DNA亚硫酸氢盐修饰试剂盒、DNA重亚硫酸盐转化试剂盒、DNA甲基化转化试剂盒或DNA甲基化试剂盒, 是一种操作简单、快速、高效的基于亚硫酸氢盐转化DNA中胞嘧啶(cytosine, C)并最终转变为U并使用纯化柱对其进行纯化回收的试剂盒。DNA经本试剂盒转化处理后未甲基化的C转化为U, 而5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)不会转化, 这样就可以用于后续的PCR或高通量测序检测, 以确定特定位点的C是否发生了甲基化修饰。
- DNA甲基化是一种重要的表观遗传修饰方式, 主要是基因组DNA上的胞嘧啶第5位碳原子和甲基间的共价结合, 胞嘧啶由此被修饰为5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)[1]。在真核生物基因组DNA中, 5-甲基胞嘧啶是最普遍的化学性修饰碱基, 而且CpG双核苷酸是基因组中最主要的甲基化位点[2]。
- DNA甲基化在调控基因表达、维持染色质结构、基因印记、X染色体失活以及胚胎发育等生物学过程中发挥着重大的作用[3], 在衰老与疾病的发生及发展进程中有着深远的影响[4]。目前已证明DNA甲基化与多种疾病存在密切的关系, 如肿瘤、精神疾病、代谢性疾病、自身免疫疾病等[5]。DNA甲基化可作为分子标志物或靶点为疾病精准诊断和治疗提供帮助[4]。
- 亚硫酸氢盐转化法具有高转化率(>99%)和高度可重复性, 是DNA甲基化分析的金标准。使用亚硫酸氢盐处理DNA, 未甲基化的胞嘧啶C通过一系列的磺化、脱氨、脱盐和脱磺化反应, 最终将未甲基化的胞嘧啶C转化为尿嘧啶U, 而甲基化的胞嘧啶C在转化过程中保持不变, 反应原理如图1所示。

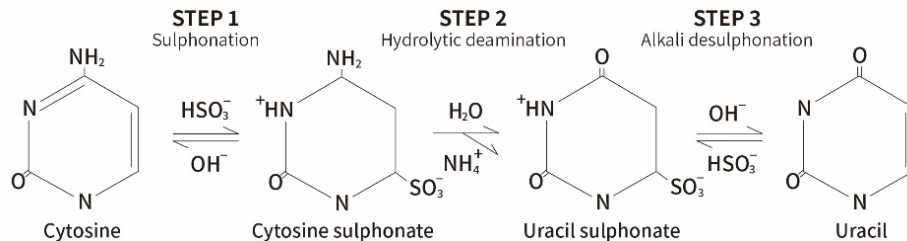


图1. DNA中胞嘧啶(Cytosine)发生亚硫酸氢盐转化的原理示意图。

- 本试剂盒采用热变性与亚硫酸氢盐转化相结合的方式处理DNA样本, 随后使用纯化柱对样本进行纯化, 将脱盐和脱磺化反应整合在柱纯化过程中, 使实验流程更便捷, 操作更简单, 3小时内即可完成。本试剂盒操作流程如图2所示。

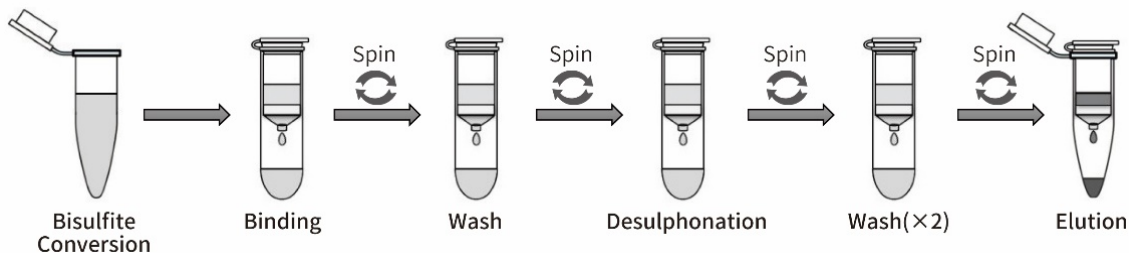


图2. 碧云天DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒(D0068)操作流程示意图。

- 本试剂盒处理后的甲基化DNA可用于各种下游甲基化分析, 如甲基化特异性PCR (Methylation-specific PCR, MSP)、亚硫酸氢盐修饰后PCR扩增产物测序(Bisulfite sequencing PCR, BSP)、高通量测序、限制性内切酶分析等。
- 本试剂盒转化率高、回收率好。DNA样本起始量的适用范围为500pg-2μg (图3), 0.1-1μg效果更佳, 最少可以使用100pg样品。

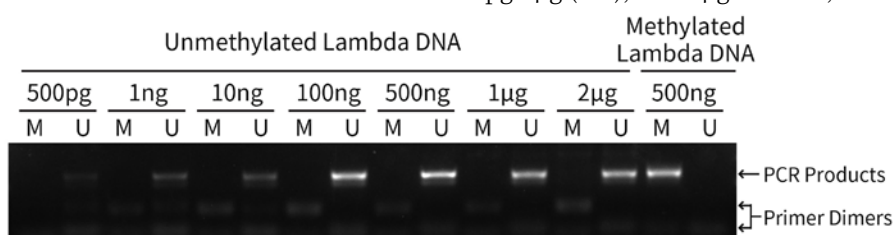


图3. 碧云天DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒(D0068)转化和回收的效果图。分别使用500pg、1ng、10ng、100ng、500ng、1μg、2μg未甲基化的lambda DNA, 或者500ng甲基化的lambda DNA作为样品, 按照本试剂盒的使用说明对样本进行亚硫酸氢盐转化和柱纯化回收处理, 甲基化特异性PCR (MSP)技术验证确认本产品具有高转化效率。U代表使用非甲基化特异性引物进行PCR扩增(上游引物: 5'-ATGTTTCAAATGTTTGTGTAATGT-3', 下游引物: 5'-TATTATTTATTGCCCTAAACACAAT-3'), 扩增产物长度为139bp; M代表使用甲基化特异性引物进行PCR扩增(上游引物: 5'-TACGTTTCAAACGTTTGTGTAAC-3', 下游引物: 5'-AATATTATTTATTCCCCTAAACGCG-3'), 扩增产物长度为135bp。实际检测结果会因样品、检测仪器等的不同而存在差异, 图中检测结果仅供参考。

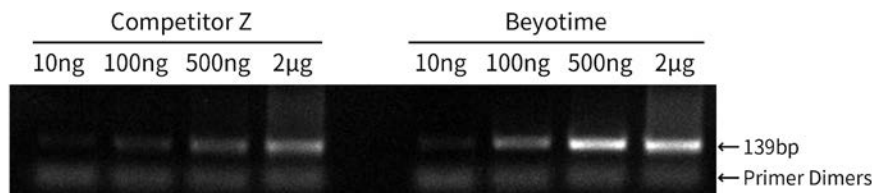


图4. 碧云天DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒(D0068)和国外Z公司同类产品回收效果对比图。分别使用10ng、100ng、500ng和2μg未甲基化的lambda DNA作为模板, 严格按照试剂盒的使用说明进行转化、纯化和回收, 分别得到20μl的洗脱产物, 使用半定量PCR反应对回收产物进行非甲基化特异性PCR扩增(扩增片段大小为139bp), 并进行电泳检测。从上图的检测效果来看, 碧云天DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒的回收效果优于国外Z公司的同类产品。实际检测结果会因样品、检测仪器等的不同而存在差异, 图中检测结果仅供参考。

➤ 本试剂盒的小包装和中包装分别可用于50个和200个DNA样本的亚硫酸氢盐转化及柱纯化回收。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0068S-1	转化液粉末	5管
D0068S-2	溶液I (保护液)	550μl
D0068S-3	溶液II (反应液)	9ml
D0068S-4	溶液III (结合液)	32ml
D0068S-5	溶液IV (洗涤液, 首次使用前加入80ml无水乙醇)	20ml
D0068S-6	溶液V (洗脱液)	1.5ml
D0068S-7	纯化柱及废液收集管	50套
-	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0068M-1	转化液粉末	20管
D0068M-2	溶液I (保护液)	2ml
D0068M-3	溶液II (反应液)	36ml
D0068M-4	溶液III (结合液)	125ml
D0068M-5	溶液IV (洗涤液, 首次使用前加入320ml无水乙醇)	80ml
D0068M-6	溶液V (洗脱液)	6ml
D0068M-7	纯化柱及废液收集管	200套
-	说明书	1份

保存条件:

室温保存, 至少一年有效。

注意事项:

- 转化液建议即用即配, 每管转化液粉末溶解后可进行10次实验。未用完的转化液可室温或4°C保存一天, 或者-20°C保存一个月。
- 用户需自备无水乙醇, 溶液IV (洗涤液)第一次使用前需加80ml无水乙醇并混匀, 后续注意拧紧瓶盖并在瓶上做好标记。
- 转化液粉末和溶液I (保护液)对人体有害或有刺激性, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 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。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 转化液的配制

取1管转化液粉末加入100μl溶液I (保护液)和1.4ml溶液II (反应液), 室温涡旋或上下颠倒至转化液粉末完全溶解。每管转化液可用于10次实验, 用户可根据反应数量的需求进行配制。

注：未用完的转化液可室温或4°C保存一天，或者-20°C保存一个月。

2. 转化反应

a. 取500pg-2μg样本DNA加入PCR管/板孔中，体积不可超过20μl。不足20μl的部分，请用超纯水补足。

注：优先推荐的用量为0.1-2μg，通常样品量大，操作会比较容易，后续的检测也会比较方便；但如果样品量确实非常少，可以使用低至0.1-1ng的样品量，但后续的检测效果等会有所下降。超纯水推荐使用BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。

b. 向PCR管/板孔中加入130μl配制的转化液，振荡或吹打混匀。

c. 约1,000-10,000×g离心5秒，将管/板孔壁上的混合液离心至管底。

d. 将PCR管/板置于PCR仪中，按照下表进行反应。

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial	95°C	3min	1
Denaturation	95°C	30sec	12
Conversion	70°C	10min	
Hold	4°C	forever	1

3. 纯化柱结合

a. 加入600μl溶液III (结合液)至纯化柱中。

b. 将150μl转化反应产物转移至纯化柱中，盖好管盖，颠倒数次混匀。

c. 12,000-14,000×g离心1分钟，丢弃收集管内的液体。

d. 加入500μl溶液IV (洗涤液)至纯化柱中。

注：溶液IV (洗涤液)第一次使用请加入80ml无水乙醇，混匀并做好标记。

e. 12,000-14,000×g离心1分钟，丢弃收集管内的液体。

4. 脱磺反应

a. 按照每20μl溶液II (反应液)加入180μl无水乙醇的比例，配制脱磺反应溶液。可根据实际反应数量适量进行配制。

b. 将200μl脱磺反应溶液加入纯化柱中，室温静置20分钟。

c. 12,000-14,000×g离心1分钟，丢弃收集管内的液体。

5. 洗涤

a. 向纯化柱加入500μl溶液IV (洗涤液)，12,000-14,000×g离心1分钟，丢弃收集管内的液体。

b. 重复步骤5a一次。

c. 12,000-14,000×g再次离心1分钟，丢弃收集管内的液体。

d. 将纯化柱转移至1.5ml离心管中，开盖室温干燥2分钟。

6. 洗脱

a. 在纯化柱膜中央加入20μl溶液V (洗脱液)，室温静置2分钟。如果加入30μl洗脱液，洗脱下来的DNA总量会有所增加，但DNA的浓度会有所下降。

b. 12,000-14,000×g离心1分钟，收集离心管内的DNA溶液。

c. 将DNA样本保存于-20°C，长期保存建议放置于-80°C。

参考文献：

1. Razin A and Riggs AD. Science. 1980. 210(4470):604-10.
2. Bird AP. Nature. 1986. 321(6067):209-13.
3. Smith ZD and Meissner A. Nat Rev Genet. 2013. 14(3):204-20.
4. Horvath S and Raj K. Nat Rev Genet. 2018. 19(6):371-384.
5. Dor Y and Cedar H. The Lancet. 2018. 392(10149):777-786.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
D0061	哺乳动物基因组DNA抽提试剂盒	50次
D0063	基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型，离心柱式)	50次
D0038-1ml	BeyoMag™ DNA长度分选磁珠	1ml
D0038-5ml	BeyoMag™ DNA长度分选磁珠	5ml
D0068S	DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒	50次
D0068M	DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒	200次
D0069S	BeyoMag™磁珠法DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒	96次
D0069M	BeyoMag™磁珠法DNA亚硫酸氢盐转化试剂盒	4×96次
ST876-100ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml

ST876-500ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	500ml
-------------	---	-------

Version 2023.05.11