

Fast DNA Methylation Bisulfite Kit

使用说明书

【产品名称】

Fast DNA Methylation Bisulfite Kit

【货号/规格】

KE004-A (50 rxns) ; KE004-B (200 rxns)

【产品简述】

Fast DNA Methylation Bisulfite Kit是升级版甲基化转化试剂盒，全预混型转化试剂，无需粉末配制，操作方便，10分钟完成亚硫酸氢盐转化，未甲基化的胞嘧啶转化效率≥99.5%。本试剂盒适用的DNA投入量范围为1 ng - 2 μ g，转化后的产物通过离心柱纯化后可用于PCR、qPCR、内切酶消化和NGS建库测序等，并且可与高通量自动化仪器配套使用。

【组成成分】

组分	KE004-A	KE004-B
CT Conversion Reagent	10 rxns × 5	10 rxns × 20
E-Binding Buffer	30 ml	120 ml
E-Wash Buffer	8 ml	30 ml
E-Desulphonation Buffer	10 ml	40 ml
E-Elution Buffer	1 ml	1 ml × 4
DNA Column	50 pcs	50 pcs × 4

【储存条件】

DNA Column于4°C保存，其余组分于15-25°C保存。

【适用范围】

适用于动物、植物、微生物的细胞或组织提取的DNA, cfDNA (cell-free DNA)等不同来源的DNA模板的甲基化转化。

【注意事项】

1. CT Conversion Reagent有少量结晶析出为正常现象，可60°C加热或者涡旋直至所有结晶完全溶解，平衡至室温后使用，不影响试剂盒效果。
2. CT Conversion Reagent使用后需将管盖严格拧紧。
3. DNA Column于4°C保存，每次使用前均需平衡至室温。
4. E-Wash Buffer使用前需要加入指定体积无水乙醇(KE004-A每瓶加入32 ml无水乙醇；KE004-B每瓶加入120 ml无水乙醇)。

5. E-Desulphonation Buffer含易挥发有机溶剂，需将瓶盖严格拧紧，防止挥发。

【实验流程】

1. 亚硫酸氢盐转化

1. 将CT Conversion Reagent涡旋混匀，于Nuclease-free PCR管中配制如下反应：

试剂	体积
CT Conversion Reagent	130 μ l
Input DNA	X μ l
RNase-free ddH ₂ O	To 150 μ l

Input DNA体积可由20 μ l增大至50 μ l, CT Conversion Reagent仍为130 μ l。

2. 涡旋或者吹打混匀后短暂离心，将反应液收集至管底。

3. 将PCR管置于PCR仪中，进行如下反应：

温度	时间
热盖 105°C	ON
95°C	10 min
20°C	Hold (< 20 h)

PCR仪设置的加热体积为≥100 μ l即可。

2. 转化产物纯化

1. 将600 μ l E-Binding Buffer加入至DNA Column，将转化后的反应产物转移至DNA Column。温和地上下颠倒混匀6 - 8次，使反应产物与E-Binding Buffer完全混匀，12,000 rpm (13,400 \times g)离心2 min。
上下颠倒混匀即可，勿剧烈混匀。颠倒混匀过程中可能会出现絮状物(为柱膜加工中的浮絮)，可以正常进行后续操作，不影响实验结果。

2. 弃滤液，将DNA Column重新放回2 ml Collection Tube中，沿管壁加入100 μ l E-Wash Buffer (已加入无水乙醇)至DNA Column, 12,000 rpm (13,400 \times g) 离心1 min。
3. 沿管壁加入200 μ l E-Desulphonation Buffer至吸附柱，室温(15 ~ 25°C)下静置反应15 min, 12,000 rpm (13,400 \times g)离心1 min。

反应时间最长不要超过20 min。

4. 沿管壁加入200 μ l E-Wash Buffer (已加入无水乙醇)至DNA Column, 12,000 rpm (13,400 \times g)离心1 min。
5. 重复步骤4，弃滤液，将DNA Column重新放回2 ml Collection Tube中，12,000 rpm (13,400 \times g)空柱离心2 min。
6. 将DNA Column转移至新的1.5 ml Nuclease-free 离心管中，加入10 - 15 μ l E-Elution

Buffer至吸附柱膜中央。室温静置1 - 2 min, 12,000 rpm (13,400 × g)离心2 min。

7. 弃DNA Column, DNA产物保存于-20°C, 长期保存需放置于-80°C, 以防降解。