

## M5 DNA Methylation Kit 甲基化 DNA 检测试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 DNA Methylation Kit 甲基化 DNA 检测试剂盒	50T	MF319-01

### 【储存条件】

室温保存。

### 【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。

### 【产品组份】

CT Conversion Reagent	50 T
M-Dissolving Buffer	50 T
M-Dilution Buffer	2 ml
M-Buffer PA	60 ml
M-Wash Buffer (concentrate)	10 ml
M-Elution Buffer	10 ml
Buffer PS	15 ml
Spin Columns DS with Collection Tubes	50



### 【自备实验材料】：

无水乙醇、75%乙醇。

### 【实验前准备及重要注意事项】

#### 1. 产品配用方法：

50 次包装配制方法：CT Conversion Reagent、M-Dissolving Buffer 均固体混合物，一定要在首次使用前制备好。将 5 ml 无菌水加入到 M-Dissolving Buffer 中震荡溶解，待固体全部溶解后将 M-Dissolving Buffer 管中溶液全部转移至 CT Conversion Reagent 管中同时补加 5.5 ml 无菌水。再将 1.5 ml M-Dilution Buffer 加入到 CT Conversion Reagent 管中。在 55°C 溶解并震荡直至全部溶解。在使用之前将 CT Conversion Reagent 溶液在室温(20°C -30°C)下避光保存。每管的 CT Conversion Reagent 是针对 50 次 DNA 处理设计的，为了得到较好的结果，CT Conversion Reagent 应当在制备后立即使用，如果不立即使用，可将 CT Conversion Reagent 溶液在 -20°C 存储 1 周，使用前，请务必将存储的 CT Conversion Reagent 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，CT Conversion Reagent 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-Wash Buffer 中加入无水乙醇。

**【操作步骤】**

每次制备的 DNA 范围在 1 ng-4  $\mu$ g 之间，最佳量为 500 ng-2 $\mu$ g。

1. 取 20  $\mu$ l DNA 样品，加入到离心管（自备）中，如果样品量不足，用水补至 20 $\mu$ l。
2. 向 DNA 样品中加入 2.2  $\mu$ l 的 M-Dilution Buffer，混匀样品。
3. 42 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟。
4. 向上步得到的样品中，加入 220  $\mu$ l 配制好的 CT Conversion Reagent 溶液，混匀，80 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中避光孵育 60 分钟。
5. 向上步溶液中加入 480  $\mu$ l M- Buffer PA，温和上下颠倒混匀。
6. 柱平衡：向已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DS）中加入 200  $\mu$ l Buffer PS，12,000 rpm（ $\sim$ 13,400 $\times$ 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，12,000 rpm 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  $\mu$ l，若样品体积大于 750  $\mu$ l 可分批加入。**

8. 向吸附柱中加入 500  $\mu$ l M- Buffer PA，12,000 rpm 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  $\mu$ l M-Wash Buffer（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 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. 12,000 rpm 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  $\mu$ l M-Elution Buffer（pH 8.5），室温放置 2 分钟。12,000 rpm 离心 1 分钟收集 DNA 溶液。
12. 向收集的 20  $\mu$ l DNA 中加入 2.2  $\mu$ l M-Dilution Buffer，室温静置 30 分钟。
13. 向溶液中加入 500  $\mu$ l 预冷的无水乙醇后颠倒混匀，并将溶液置于-20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 分钟（过夜沉淀效果更好）。
14. 12,000 rpm 离心 15 分钟，轻轻倒掉上清。
15. 加入 75%乙醇，12,000 rpm 离心 1 分钟，倒掉上清，室温下待乙醇挥发后，加入 20  $\mu$ l M-Elution Buffer 溶解，DNA 置于-20 $^{\circ}$ C 保存。此步收集的 DNA 可以用于后续相关实验。

**【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。