

Magnetic DNA Methylation Bisulfite Kit

使用说明书

【产品名称】

Magnetic DNA Methylation Bisulfite Kit

【货号/规格】

KE003-A (50 rxns) ; KE003-B (200 rxns)

【产品简述】

Magnetic DNA Methylation Bisulfite Kit是磁珠法甲基化转化试剂盒，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 μg，转化后的产物可用于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	KE003-A	KE003-B
CT Conversion Reagent	10 rxns × 5	10 rxns × 20
E-Binding Beads	500 μl	1 ml × 2
E-Binding Buffer	30 ml	60 ml × 2
E-Wash Buffer	20 ml	30 ml × 2
E-Desulphonation Buffer	10 ml	40 ml
E-Elution Buffer	1 ml × 2	1 ml × 5

【储存条件】

15-25℃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℃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. E-Binding Beads置于室温(15 ~ 25℃)或0 ~ 4℃保存，每次使用前均需平衡至室温且充分振荡混匀。请勿将E-Binding Beads冷冻保存(-30 ~ -15℃)。
4. E-Wash Buffer使用前需要加入指定体积无水乙醇(KE003-A每瓶加入80 ml无水乙醇；

KE003-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 μl
Input DNA	X μl
RNase-free ddH ₂ O	To 150 μl

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

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℃	ON
95℃	10 min
20℃	Hold (< 20 h)

PCR仪设置的加热体积为≥100 μl即可。

2. 转化产物纯化

1. 将600 μl E-Binding Buffer，10 μl E-Binding Beads和上一步转化产物加入至1.5 ml

Nuclease-free离心管(自备)中，用移液器吹打6 - 8次或者低速涡旋30 sec以充分混匀，室温(15 ~ 25℃)下静置孵育10 min (推荐于混匀仪上震荡孵育)。

若E-Binding Beads保存于0 ~ 4℃，每次使用前均需平衡至室温。由于E-Binding Beads易沉降，每次使用前均应充分振荡混匀。

2. 将1.5 ml Nuclease-free离心管瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约3 min)，小心移除上清。

3. 将400 μl E-Wash Buffer (已加入指定体积的无水乙醇)加入至1.5 ml Nuclease-free离心管中，用移液器吹打6 - 8次或者低速涡旋30 sec以充分混匀。瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约3 min)，小心移除上清。

4. 将200 μl E-Desulphonation Buffer加入至1.5 ml Nuclease-free离心管中，用移液器吹打6 - 8次或者低速涡旋30 sec以充分混匀。室温(15 ~ 25℃)下静置反应15 min(推荐于混匀仪上震荡反应)。瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约3 min)，小心移除上清。

样品在E-Desulphonation Buffer中停留不要超过25 min，停留时间包括重悬磁珠、孵育及去除上清的时间。

5. 将400 μl E-Wash Buffer (已加入指定体积的无水乙醇)加入至1.5 ml Nuclease-free离心管中，

用移液器吹打6 - 8次或者低速涡旋30 sec以充分混匀。瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约3 min)，小心移除上清。

6. 重复步骤5操作一次，弃尽上清，总计漂洗两次。

可使用10 μ l移液器将残留液体弃尽，缩短干燥时间。

7. 55°C干燥5 - 15 min或室温干燥20 - 30 min，充分去除管内残留的液体，干燥至磁珠表面无反光。

8. 加入25 μ l的E-Elution Buffer，用移液器吹打6 - 8次或者低速涡旋30 sec以充分重悬磁珠，55°C孵育4 min，瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约3 min)，转移上清至新的1.5 ml Nuclease-free离心管(自备)中。

9. 转化产物保存于-30 ~ -15°C，长期保存需放置于-85 ~ -65°C，同时应避免反复冻融。