

# 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 $\geq 99.5\%$ 。本试剂盒适用的DNA投入量范围为1 ng - 2  $\mu\text{g}$ ，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 $\times$ 5	10 rxns $\times$ 20
E-Binding Beads	500 $\mu\text{l}$	1 ml $\times$ 2
E-Binding Buffer	30 ml	60 ml $\times$ 2
E-Wash Buffer	20 ml	30 ml $\times$ 2
E-Desulphonation Buffer	10 ml	40 ml
E-Elution Buffer	1 ml $\times$ 2	1 ml $\times$ 5

### 【储存条件】

15-25 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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. E-Binding Beads置于室温(15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ )或0 ~ 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ )。
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 $\mu\text{l}$
Input DNA	X $\mu\text{l}$
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	To 150 $\mu\text{l}$

Input DNA体积可由20  $\mu\text{l}$ 增大至50  $\mu\text{l}$ ，CT Conversion Reagent仍为130  $\mu\text{l}$ 。

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 $^{\circ}\text{C}$	ON
95 $^{\circ}\text{C}$	10 min
20 $^{\circ}\text{C}$	Hold (< 20 h)

PCR仪设置的加热体积为 $\geq 100 \mu\text{l}$ 即可。

#### 2. 转化产物纯化

1. 将600  $\mu\text{l}$  E-Binding Buffer，10  $\mu\text{l}$  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 $^{\circ}\text{C}$ )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 $^{\circ}\text{C}$ ，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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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 $^{\circ}\text{C}$ )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  $\mu\text{l}$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。