

Version 1

Cat No. AG11209

# *MethyTect* Taq HS PCR 试剂盒 (用于重亚硫酸盐处理后的基因组 DNA)

# *MethyTect* Taq HS PCR kit (for bisulfite-treated DNA)

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



## ➤ 产品概述

本制品是专门针对重亚硫酸盐修饰后含有尿嘧啶的基因组 DNA 进行 PCR 扩增的产品。经过重亚硫酸盐处理后的基因组 DNA，未甲基化的胞嘧啶（C）转化成尿嘧啶（U），而甲基化的胞嘧啶（5-mC 或 5-hmC）不会发生转化，进而可以通过 PCR 扩增或测序判断出 DNA 甲基化的情况。重亚硫酸盐修饰后的 DNA 有时会影响 PCR 反应性能，本制品对 DNA Polymerase、反应 buffer 进行优化使其适合于重亚硫酸盐修饰后的基因组 DNA 的扩增。对于比较难扩增的目的片段，可通过调整  $Mg^{2+}$  或 dNTP 的浓度来调节扩增效率和反应特异性。

本制品中添加了在常温状态下能够抑制 DNA polymerase 活性的单克隆抗体，可以进行 Hot Start PCR，有效的抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。抗体在 PCR 反应最初的 DNA 变性步骤已变性，在常规的 PCR 反应条件下即可使用。

## ➤ 保存

保存温度：-20°C

运输温度：干冰或者-20°C冰袋

## ➤ 产品组成

组分名称	AG11209 ( 200 rxns / 50 $\mu$ l )
<i>MethyTect</i> Taq HS DNA Polymerase( 5 U/ $\mu$ l )	50 $\mu$ l
10 $\times$ <i>MethyTect</i> PCR Buffer ( $Mg^{2+}$ free )	1 ml
dNTP Mix ( 10 mM each )	300 $\mu$ l
$MgCl_2$ Solution ( 50 mM )	600 $\mu$ l

## ➤ 产品优势

- 1、重亚硫酸盐修饰后的 DNA 有时会影响 PCR 反应性能，本制品对 DNA Polymerase、反应 buffer 进行优化使其适合于重亚硫酸盐修饰后的基因组 DNA 的扩增。
- 2、本制品含有所有必要的用于 PCR 反应的试剂，每个组分单独包装，便于调整  $MgCl_2$  及 dNTPs 的反应浓度，获得最佳的实验结果。
- 3、本品中添加了能够抑制 Taq 酶活性的单克隆抗体，可以进行热启动反应。在进行 PCR 反应前，抗体与酶结合抑制 Taq 酶的活性，有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。

## ➤ 实验原理

### 1. PCR 扩增原理

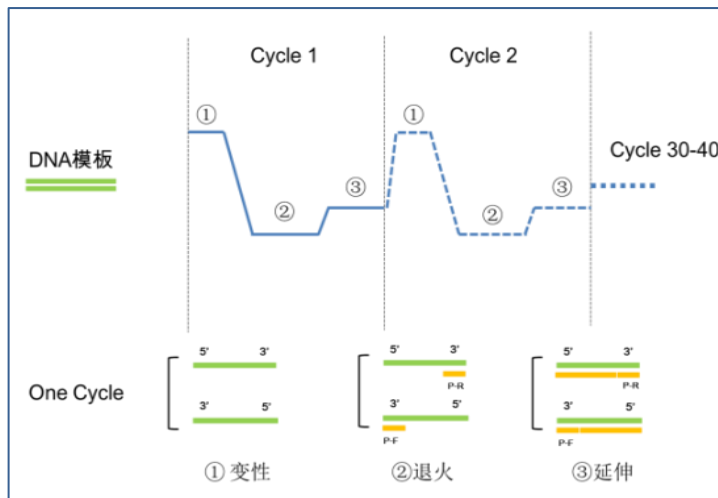
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

扩增详情如下，一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30-40 次。进行 PCR 扩增时，可根据引物的不同调整退火温度，进而获得最优 PCR 扩增反应条件。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

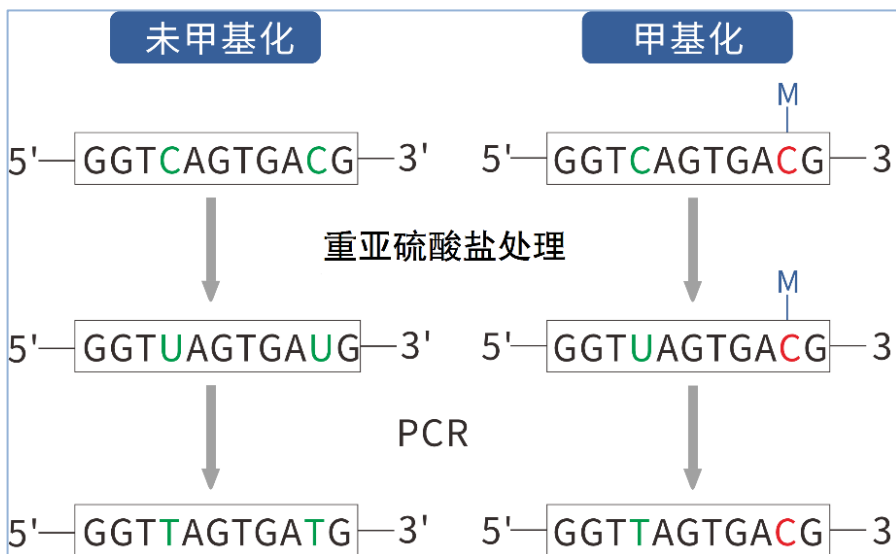
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下延伸，与单链 DNA 形成互补链；



## 2. 重亚硫酸盐处理原理

经过重亚硫酸盐处理后的基因组 DNA，未甲基化的胞嘧啶 (C) 转化成尿嘧啶 (U)，而甲基化的胞嘧啶 (5-mC 或 5-hmC) 不会发生转化，进而可以通过 PCR 扩增及测序判断出 DNA 甲基化的情况。



## ➤ 使用注意事项

1. 产品中 *MethyTect* Taq HS DNA Polymerase 使用前先离心，将所有的溶液收集至离心管底部，然后再进行使用，减少损失；使用时应轻柔混匀（避免起泡），缓慢吸取。
2. 试剂盒中的各组分均需要在-20℃保存，使用前于冰上溶解后，轻柔混匀后再进行使用。

## ➤ 实验前准备

1. PCR 仪（或 37℃水浴和 85℃加热块）
2. RNase free 1.5 ml 离心管、PCR 管
3. 冰浴或冰盒
4. 移液器、枪头（RNase free）

## ➤ 操作

### 1. 按照下表内容进行反应液配制。

组分名称	反应终浓度	加入量
<i>MethyTect</i> Taq HS DNA Polymerase (5 U/μl) <sup>*1</sup>	1.25 U	0.25 μl
10 × <i>MethyTect</i> PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> free)	1X	5 μl
MgCl <sub>2</sub> Solution (50 mM)	2.5 mM <sup>*2</sup>	2.5 μl
dNTP Mix (10 mM each)	0.3 mM <sup>*2</sup>	1.5 μl
Primer F (10 μM)	0.4 μM <sup>*2</sup>	2 μl
Primer R (10 μM)	0.4 μM <sup>*2</sup>	2 μl
Template	<100 ng <sup>*3</sup>	-
RNase free water	-	Up to 50 μl

\*1: 产品中 *MethyTect* Taq HS DNA Polymerase 甘油浓度较高，使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液枪轻轻吸打混匀，过程中尽量避免起泡，然后再进行使用。

\*2: 请先使用上述体系进行 PCR 扩增反应，若无扩增产物或出现非特异性扩增时，可尝试调整 MgCl<sub>2</sub>、dNTP Mix 或引物的浓度以改善扩增结果。如：

MgCl<sub>2</sub> 浓度可在 2.0 mM ~ 3.0 mM 范围内调整；

dNTP Mix 浓度可在 0.2 mM ~ 0.4 mM 范围内调整；

引物浓度可在 0.2 μM ~ 1 μM 范围内调整。

\*3: 通常模板添加量少于 100 ng。

## 2. 反应条件

Step	温度	时间	Cycles
变性 <sup>*1</sup>	98°C	10 sec	} 30-40
退火 <sup>*2</sup>	55°C	30 sec	
延伸	72°C	30 sec / 60 sec <sup>*3</sup>	

\*1: 变性条件的设定可根据设备进行调整, 一般 98°C 5-10 sec 或 94°C 20-30 sec。

\*2: 退火温度可根据扩增情况进行调整, 如出现非特异性扩增或者有 Smear, 可尝试提高退火温度, 如无片段扩增可尝试降低退火温度。

\*3: 请根据扩增片段大小设定 PCR 反应条件: 扩增片段小于 500 bp 时, 延伸时间设定为 30 sec; 扩增片段为 500 bp ~ 1 kb 时, 延伸时间设定为 1 min; 大于 1 kb 时, 可设置为 1min / kb; 但如果无扩增产物或者扩增效率差时可增加延伸的时间。

**注意:** 重亚硫酸盐修饰后的模板 DNA 损伤严重, 扩增片段过长会降低扩增效率。建议扩增产物不超过 1 kb, 若扩增片段大于 1 kb, 可考虑通过调整 MgCl<sub>2</sub>、dNTP Mix、引物浓度或者反应条件来改善扩增结果。

## 3. 结果检测

- 1) PCR 产物可进行琼脂糖凝胶电泳检测;
- 2) PCR 产物纯化后可进行测序及克隆 (本制品可进行 T 载体克隆), 用于后续甲基化分析。

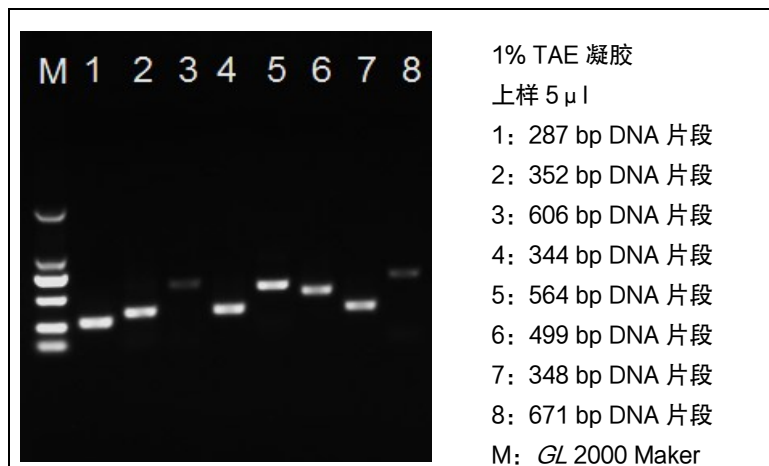
## ➤ 实验例

1. 以重亚硫酸盐处理后的鸡心 gDNA 为模板, 用本试剂盒扩增不同长度的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	} 35
55°C	30 sec	
72°C	1 min	

电泳结果如下图所示:

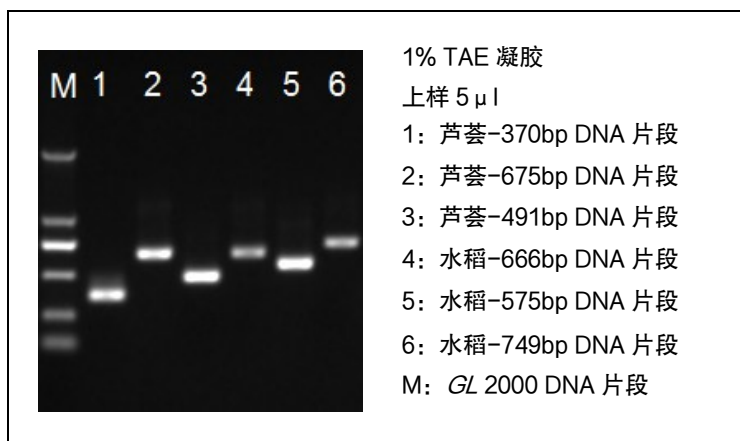


2. 以重亚硫酸盐处理后的水稻、芦荟 gDNA 为模板，用本试剂盒扩增不同长度的 DNA 片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	} 35
55°C	30 sec	
72°C	1 min	

电泳结果如下图所示：

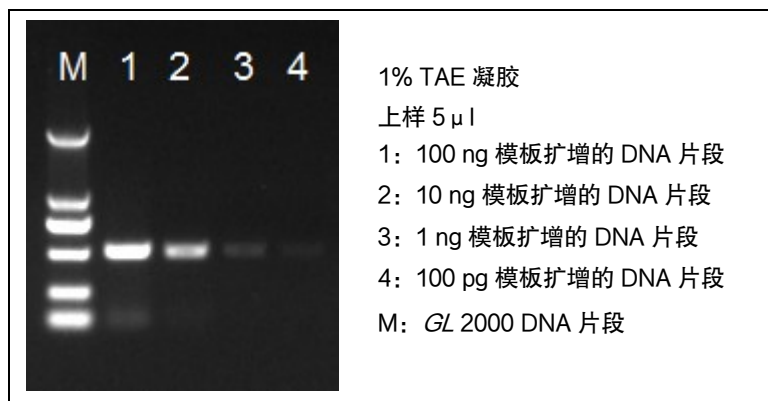


3. 以重亚硫酸盐处理后的 HL60 gDNA 为模板，用本试剂盒扩增 522 bp 的 DNA 片段，模板加入量为 100 ng、10 ng、1 ng、100 pg。

反应程序：

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	} 35
55°C	30 sec	
72°C	1 min	

电泳结果如下图所示：

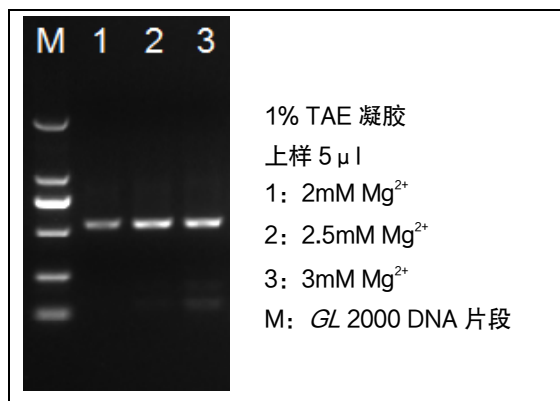


4. 以重亚硫酸盐处理后的 HL60 gDNA 为模板, 添加不同的  $Mg^{2+}$  浓度, 用本试剂盒扩增 548 bp DNA 片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	} 35
55°C	30 sec	
72°C	1 min	

电泳结果如下图所示：

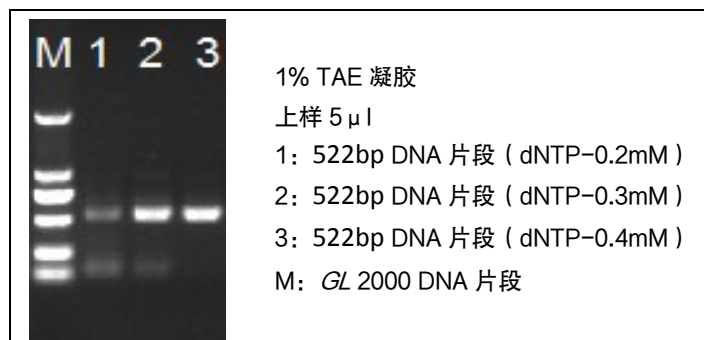


5. 以重亚硫酸盐处理后的 gDNA 为模板, 添加不同的 dNTPs 浓度, 用本试剂盒扩增 522bp 的 DNA 片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	} 35
55°C	30 sec	
72°C	1 min	

电泳结果如下图所示：



## ➤ 产品注意事项

### 1. 合适的模板

- ❖ 由于重亚硫酸盐转化的 DNA 链中，大部分是 A、T、U，双链不再是互补的，这种 DNA 主要以单链或非特异性配对形式存在，类似于 RNA。重亚硫酸盐转化的 DNA 浓度测量时，吸光度  $A_{260\text{nm}} = 1.0$  时浓度值大约是  $40\ \mu\text{g/ml}$ 。
- ❖ 本产品反应体系中，推荐的模板浓度范围是  $<100\ \text{ng}$ 。模板加入量降低时，扩增效率降低，产物量减少，扩增特异性升高；模板加入量升高时，扩增效率升高，扩增特异性降低；可根据实际情况调整模板加入量。
- ❖ 确保重亚硫酸盐处理的模板 DNA 保存在正确的温度下。经重亚硫酸盐处理后的 DNA 模板极易降解，建议保存在  $-20^\circ\text{C}$ 。若无产物扩出，可能是模板降解，建议重新处理模板，再次实验。

### 2. 合适的引物

- ❖ 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸。
- ❖ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
- ❖ 反应体系中合适的引物终浓度为  $0.2 \sim 1.0\ \mu\text{M}$ 。引物浓度降低时，扩增效率降低，反应特异性升高。引物浓度升高时，扩增效率升高，反应特异性降低，可能发生非特异性扩增及出现 Smear 现象。
- ❖ 经重亚硫酸盐转化之后的 DNA 正义链与反义链不互补，设计引物时需注意与一般引物设计有所不同，推荐使用专用引物设计软件，如 MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>)。

### 3. dNTPs 浓度

- ❖ 本产品的反应体系中，推荐的 dNTPs 终浓度  $0.3\ \text{mM}$ 。可以在  $0.2\ \text{mM} \sim 0.4\ \text{mM}$  范围内调整。
- ❖ dNTPs 会与  $\text{Mg}^{2+}$  结合，浓度过高时，可能影响 DNA 聚合酶活性。



- ❖ dNTPs 浓度过低，扩增特异性可能会降低，产生 smear 带。

#### 4. $Mg^{2+}$ 浓度

- ❖  $Mg^{2+}$  是 DNA 聚合酶的辅助因子，调整其浓度对于获得尽可能高的扩增效率很重要。本制品较理想的  $Mg^{2+}$  浓度是 2.5 mM，也可根据实验具体情况在 2.0 mM ~ 3.0 mM 范围内调整以获得理想的结果。
- ❖  $Mg^{2+}$  浓度降低，可能影响 PCR 扩增效率，但可能会增加扩增特异性，导致 PCR 产物产量低；
- ❖ 浓度升高，会改善扩增效率，但可能会降低 PCR 的特异性。

#### 5. 合适的变性温度及时间

- ❖ 由于经亚硫酸盐处理的 DNA 模板结构不稳定，极易降解，变性时间不宜过长。长时间的加热易导致 DNA 降解，扩增效率降低。

#### 6. 合适的退火温度及时间

- ❖ 退火温度越高，扩增特异性越高，但一定程度上扩增效率会降低。
- ❖ 退火温度过低，可能导致反应特异性不好，并且可能会出现引物二聚体。

#### 7. 扩增循环数

- ❖ 一般推荐 35 个循环。如果扩增的片段较长，较难扩增，则可以考虑增加循环数至 40 个循环。

#### 8. 防止污染措施

- ❖ 配制反应液与添加 DNA 模板的区域最好分开，避免交叉污染。
- ❖ 每次实验设置不添加模板的阴性对照，以检查是否存在污染。