Version 1

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)

Code No. AG11209

包装量：	200 rxns / 50 μl
保存温度：	-20 ℃

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 ℃

运输温度：干冰或者-20℃冰袋

产品组成

MethyTect Taq HS DNA Polymerase(5 U/ μl)	50 μl
10 × *MethyTect* PCR Buffer (Mg^{2+} free)	1 ml
dNTP Mix (10 mM each)	300 μl
$MgCl_2$ Solution (50 mM)	600 μl

引物设计

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/)。

实验操作

反应体系（50 μl）

组分名称	反应终浓度	加入量
MethyTect Taq HS DNA Polymerase(5 U/μl) *1	1.25 U	0.25 μl
10 × *MethyTect* PCR Buffer (Mg^{2+} free)	1X	5 μl
$MgCl_2$ Solution (50 mM)	2.5 mM *2	2.5 μl
dNTP Mix (10 mM each)	0.3 mM *2	1.5 μl
Primer F (10 μM)	0.4 μM*2	2 μl
Primer R (10 μM)	0.4 μM*2	2 μl
Template	<100 ng*3	–
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$MgCl_2$、dNTP Mix或引物的浓度以改善扩增结果。如：

$MgCl_2$ 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。

反应条件

Step	温度	时间	Cycles
变性*1	98℃	10 sec	30–40
退火*2	55℃	30 sec	
延伸	72℃	30 sec / 60 sec*3	

*1：变性条件的设定可根据设备进行调整，一般98℃ 5–10 sec 或 94℃ 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$MgCl_2$、dNTP Mix、引物浓度或者反应条件来改善扩增结果。

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。

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

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.