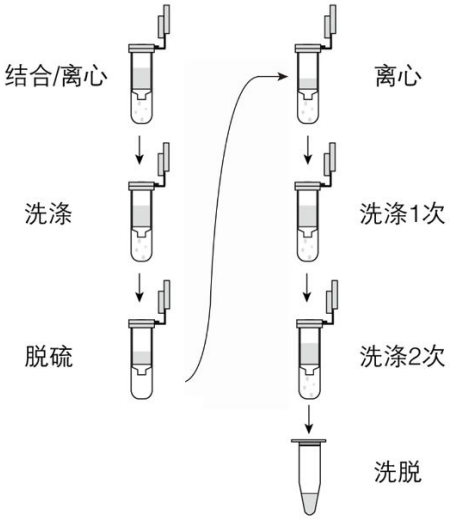
8. 再添加 200 µl M-Wash Buffer 到柱中，10,000 x g 离心 60 秒。
9. 将纯化柱转移到 1.5 ml Collection Tube 管中，直接添加 20 µl 的 M- Eluent 到纯化柱膜中央，室温孵育 1 min，10,000 x g 离心 60 秒洗脱 DNA。
10. DNA 可立即进行分析或储存于-20°C。建议 PCR 实验中，每 25µl 体系使用 2- 4 µl 洗脱的 DNA 作为模板。

**对于扩增片段小于300bp的实验，可采用更快速的转化程序：
1. 在 PCR 管中加入 20 µl 待修饰 DNA。
2. 加入已经制备好的转化液 130µl，置于 90°C 水浴 10min，冷却后进行上述第 3 步操作。

**如待修饰样本起始量较低(200pg-50ng),可通过以下任一方法提高转化产物的得率:
a. 在待修饰样本中加入终浓度0.5mg/ml的牛血清白蛋白(BSA)。
b. 用M-Binding Buffer溶解carrier RNA（自备），使carrier RNA的终浓度达到 10 µg/ml，这一溶液应新鲜配制，在4°C保存＜48 h。

修饰后DNA的纯化流程



Miozyme

Catalog No：AF102-01(50 rxns)/02(200 rxns)

EpiFlash™ DNA甲基化快速修饰试剂盒

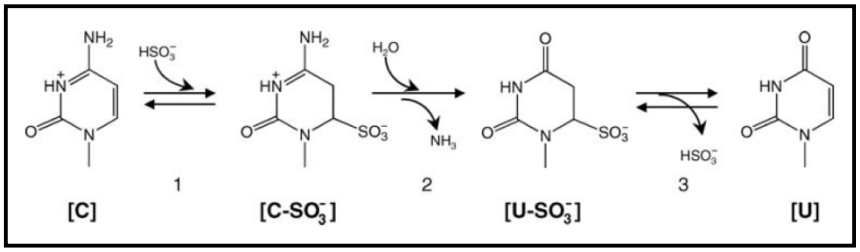
说明书

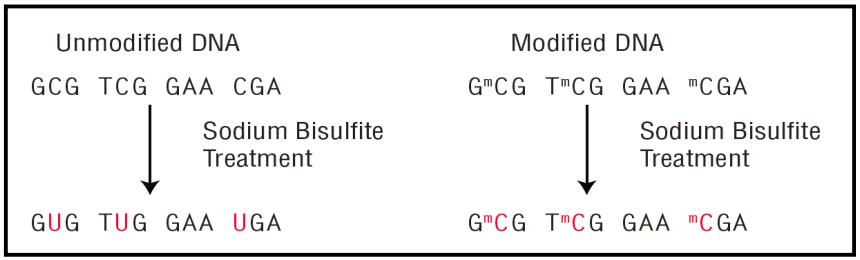
上海妙聚生物科技有限公司

产品简介

EpiFlash™ DNA亚硫酸盐快速修饰试剂盒是用于DNA亚硫酸盐转化处理的专用试剂，整个操作过程的时间被缩短到1小时，转化效率可达到99.5%以上，灵敏度可达500 pg，修饰后的产物可用于各种甲基化分析。

产品原理





产品内容

EpiFlash™ Kit	AF102-01 (50 rxns.)	AF102-02 (200 rxns.)
Conversion Powder	5 tubes	20 tubes
Conversion reagent-1	5 ml	20 ml
Conversion reagent-2	2 ml	8 ml
M-Binding Buffer	30 ml	24 ml
M-Wash Buffer	6 ml	24 ml
M-Eluent	2 ml	4 ml
Spin Columns	50 ct.	200 ct.
2 ml Centrifuge Tubes	50 ct.	200 ct.
1.5 ml Collection Tubes	50 ct.	200 ct.

试剂制备

转化液的制备

向Conversion Powder通过添加1 ml Conversion reagent-1 和350 µl的Conversion reagent-2。置于70°C水浴中5分钟，手工摇动即可溶解。每管的转化液是针对10次DNA处理设计的。为了得到较好的结果，转化液应最好在制备后立即使用。如果不立即使用，可以在室温存储2周。在下次使用前若有晶体析出，需置于70°C水浴并配合手摇直至溶解。转化液对光敏感，要尽量减少在光下的暴露。

M-Wash Buffer的制备

添加24 ml乙醇到M-Wash Buffer中制备工作液。(对于AF102-02应添加乙醇96 ml)

3 M NaOH溶液配制

称取3 g NaOH固体，加入25 ml ddH_2O溶解，即得到3 M NaOH溶液。

脱硫液的制备

采用NaOH与乙醇混合配制脱硫液（0.3 M NaOH，90% 乙醇），根据每次待转化的样本数量现配现用。

操作步骤

1. 在 PCR 管中加入 20 µl 待修饰 DNA(最佳用量为 0.4-1 µg)。再加入 2.2 µl 3M NaOH 原液（如果 DNA 样品的体积小于 20 µl，NaOH 溶液也相应减少体积），置于 37°C 孵育 15 分钟。
2. 加入已经制备好的转化液 130 µl，置于 70°C 水浴孵育 40 min，冷却至室温。
3. 将 Spin Column 置于 2 ml Centrifuge Tube 中，添加 600 µl 的 M-Binding Buffer 到 Spin Column，再加入上一步的样品，盖紧离心管轻轻颠倒 3 次以混合。
4. 10,000x g 离心 30 秒，倒掉流出液。
5. 添加 200 µl M-Wash Buffer 到柱中，10,000x g 离心 60 秒。
6. 添加 200 µl 脱硫液到柱中，在室温下(15-25°C) 下静置 10 分钟，10,000x g 离心 30 秒。
7. 添加 200 µl M-Wash Buffer 到柱中，10,000x g 离心 30 秒，倒掉滤液。