简石生物
GENSTONE BIOTECH

操作手册

甲基化检测样本前处理试剂盒说明书

Catalog No. JSR520-10 (10 次反应)
JSR520-50 (50 次反应)
JSR520-200 (200 次反应)

【产品名称】

甲基化检测样本前处理试剂盒

【包装规格】

10 次/盒；50 次/盒 ；200 次/盒

【预期用途】

用于核酸的亚硫酸氢盐转化修饰、提取、富集、纯化步骤。其处理后的产物用于临床基因检测。

Ver.1.0.0

【产品组成】

组分	10 次规格	数量	50 次规格	数量	200 次规格	数量
亚硫酸氢盐干粉	10 反应/管	1	10 反应/管	5	10 反应/管	20
蛋白酶 K 溶液（20mg/ml）	50μl	1	5 mg	1	20 mg	1
消化缓冲液（2x）	1 ml	1	4 ml	1	15 ml	1
稀释缓冲液	500μl	1	1.5 ml	1	7 ml	1
增溶缓冲液	900μl	1	4.5ml	1	18 ml	1
反应缓冲液	200μl	1	1 ml	1	4 ml	1
结合液	7 ml	1	30 ml	1	125 ml	1
洗涤液	2 ml	1	6 ml	1	24 ml	1
脱硫液	3 ml	1	10 ml	1	40 ml	1
洗脱液	1 ml	1	1 ml	1	4 ml	1
1 号 C 纯化柱	10 个/包	1	50 个/包	1	50 个/包	4
收集管	10 个/包	1	50 个/包	1	200 个/包	1

【储存条件及有效期】

储存条件：内有蛋白酶 K 溶液（需低温-20° 保存）其它组件常温保存 。

【样品要求】

细胞：兼容固体组织、培养细胞、全血、活检组织、LCM（激光捕获显微切割）和 FFPE 样品。细胞量在 10-10^5 范围之间，最佳细胞量为 1 x 10^3 - 8 x 10^4 个细胞。

DNA：每次转化 DNA 量在 500 pg～2 μg 范围之间，最佳投入量为 200ng～500 ng 。

【试剂准备】

1. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在洗涤液中加入无水乙醇，加入后请及时在方框打钩标记，以免多次加入。

1.1 添加 8ml 无水乙醇到 2ml 的洗涤液中（JSR520-10）。

1.1 添加 24ml 无水乙醇到 6ml 的洗涤液中（JSR520-50）。

1.2 添加 96ml 无水乙醇到 24ml 的洗涤液中（JSR520-200）。

2. 亚硫酸氢盐转化液制备

本试剂盒中提供的转换试剂是一种固体混合物，必须在首次使用前制备好。制备方法如下：

2.1 在亚硫酸氢盐干粉中加入 790μl 增溶缓冲液和 300μl 稀释缓冲液。

2.2 室温下涡旋混匀 10 分钟直至全部溶解。

2.3 加入 160μl 反应缓冲液，然后混匀 1 分钟。

注意： 在转化试剂中看到微量的未溶解的试剂是正常现象。每管转化试剂可用 10 次的 DNA 处理。转化试剂对光敏

感，所以要尽量减少其暴露在光线下。为获得最佳效果，转化试剂应在制备后立即使用。如果不立即使用，转化试剂溶液可以在室温下存储过夜，在 4℃存储一周，或在 -20℃存储 1 个月。使用前，将冻存的转化试剂溶液在 37℃下迅速解冻，涡旋充分混匀。

【操作步骤】

I、样品前处理

如果使用纯化或提取好的 DNA 则直接进入第 II 部分。

1、蛋白酶 K 消化样品

1.1 细胞样品

单层细胞和悬浮细胞都可以直接在收集后进行处理。少量的细胞培养基不会对处理过程产生不利影响，但应尽量减少。理想情况下在蛋白酶 K 消化前，细胞应悬浮在 PBS 或 Tris 缓冲溶液中。如果液体的成分不“确定”，可通过离心法收集细胞，并去除上清液。细胞重悬于 PBS 或 Tris 缓冲溶液中。一般来说，体液中的细胞可以直接用于蛋白酶 K 的消化。

1.2 全血样品

每次最多使用 0.5µl 全血样品（程序 A 或 B），为了方便处理样品，也可以按比例调整体系。例如，要消化 2.5µl 全血，消化缓冲液（2x）使用量为 50µl、蛋白酶 K 溶液 5µl 和 42.5µl 无菌水。

1.3 固体组织（新鲜或冷冻）及 FFPE 样品

按照标准程序（程序 A 或 B）最多使用 0.1mg 固体组织样品。石蜡包埋组织在使用前必须脱蜡处理，可以参照传统的二甲苯脱蜡方法。蛋白酶 K 消化必须从 20 分钟延长到 4 小时。

程序 A

消化缓冲液（2x）	10µl
细胞（≤ 2 x 10^3细胞）	最大 9µl
蛋白酶 K 溶液	1µl
无菌水	补足至 20µl

注意：“难以消化”的样品应按照程序 B 进行处理。

程序 B

消化缓冲液（2x）	13µl
细胞（≤ 1 x 10^5细胞）	最大 12µl
蛋白酶 K 溶液	1µl
无菌水	补足至 26µl

2、将样品在 50℃下消化 20 分钟。

注意：上述蛋白酶 K 为推荐使用量，如果消化不完全可将蛋白酶 K 使用量增加 5 倍左右；FFPE、LCM 和其它固体组织

样本有一定的难度和复杂性，消化时间调整为 4 小时。

3、如果按照程序 A，直接进入第 II 部分，如果按照程序 B，彻底混合反应物，然后在 10,000xg 下离心 5 分钟。吸取 20μl 上清液进行亚硫酸氢盐转化，详见第 II 部分。

注意：蛋白酶 K 消化后的样品可在-20℃下保存数月。

II、亚硫酸氢盐转化 DNA

1. 在 PCR 管中加入 20μl 步骤 3 中的样品到 130μl 亚硫酸氢盐转化液中，混匀，短暂离心确保管盖和管壁上没有残留液体。

注意：如果使用纯化后的 DNA，在 130μl 亚硫酸氢盐转化液中加入最多 20μl 的 DNA，如果 DNA 的体积小于 20μl，则需要用水补足至 20μl。

2. 把上述 PCR 管置于 PCR 仪器上运行以下程序：

① 98℃ 8 minutes

② 64℃ 3.5 hours

③ 4℃ 20h（可选）

3. 将 1 号 C 纯化柱套在收集管中，添加 600μl 的结合液至 1 号 C 纯化柱中。
4. 将步骤 2 中的全部反应液直接添加到 1 号 C 纯化柱中与结合液混匀，盖盖后颠倒混匀纯化柱。
5. 在≥10，000 x g 离心 1 分钟，弃滤液。
6. 添加 100μl 制备好的洗涤液到 1 号 C 纯化柱中，≥10，000 x g 离心 1 分钟。
7. 添加 200μl 脱硫液到 1 号 C 纯化柱中，室温（20～30℃）放置 15-20 分钟，在≥10，000 x g 离心 1 分钟。
8. 添加 200μl 制备好的洗涤液到 1 号 C 纯化柱中，在≥10，000 x g 离心 1 分钟。
9. 重复步骤 8。
10. 将 1 号 C 纯化柱转移至一个干净的 1.5ml 离心管中，吸取 10μl 洗脱液直接加入到柱基质中。全速离心 1 分钟以洗脱 DNA。

注： DNA 可以立即进行分析，也可以在-20℃或更低温度下（-80℃）储存以备后用。我们建议每次 PCR 使用 1-4μl 洗脱的 DNA，最多可以使用 10μl。

洗脱体积可以>10μl，具体取决于您的实验要求，但较小的洗脱体积会产生更高的 DNA 浓度。

【注意事项】

1. 在实验前，应详细阅读说明书。
2. 细胞数量超过推荐的最大值，可能会导致 DNA 的亚硫酸氢盐转化不完全。
3. DNA 纯度需满足 OD260/280 在 1.8～2.0 之间，否则会影响转化效率。
3. DNA 量大于 20μl 需要分管操作。
4. 推荐后续使用热启动 Taq DNA 聚合酶进行扩增。
5. 实验操作时请戴一次性 PE 或橡胶手套。