

# 甲基化检测样本前处理试剂盒说明书

## 【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。

## 【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)	50 $\mu$ l	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	500 $\mu$ l	1	1.5 ml	1	7 ml	1
增溶缓冲液	900 $\mu$ l	1	4.5ml	1	18 ml	1
反应缓冲液	200 $\mu$ l	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：产品应贮存在 4~35 $^{\circ}$ C 环境中。

有效期：产品有效期为 12 个月，请在有效期内使用。

## 【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  $1 \times 10^3 - 8 \times 10^4$  个细胞。

DNA：每次转化 DNA 量在 500 pg~2  $\mu$ g 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（JSM520-10）。

1.1 添加 24ml 无水乙醇到 6ml 的洗涤液中（JSM520-50）。

1.2 添加 96ml 无水乙醇到 24ml 的洗涤液中（JSM520-200）。

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 790 $\mu$ l 增溶缓冲液和 300 $\mu$ l 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 160 $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C 存储一周，或在 -20 $^{\circ}$ C 存储 1 个月。使用前，将冻存的转化试剂溶液在 37 $^{\circ}$ C 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 0.5 $\mu$ l 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 2.5 $\mu$ l 全血，消化缓冲液（2x）使用量为 50 $\mu$ l、蛋白酶 K 溶液 5 $\mu$ l 和 42.5 $\mu$ l 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）	10 $\mu$ l
细胞（ $\leq 2 \times 10^3$ 细胞）	最大 9 $\mu$ l
蛋白酶 K 溶液	1 $\mu$ l
无菌水	补足至 20 $\mu$ l

**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）	13 $\mu$ l
细胞（ $\leq 1 \times 10^5$ 细胞）	最大 12 $\mu$ l
蛋白酶 K 溶液	1 $\mu$ l
无菌水	补足至 26 $\mu$ l

2、将样品在 50 $^{\circ}$ C 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 20 $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C 下保存数月。

## II、亚硫酸氢盐转化 DNA

1. 在 PCR 管中加入 20 $\mu$ l 步骤 3 中的样品到 130 $\mu$ l 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 130 $\mu$ l 亚硫酸氢盐转化液中加入最多 20 $\mu$ l 的 DNA，如果 DNA 的体积小于

---

20 $\mu$ l, 则需要用水补足至 20 $\mu$ l。

2. 把上述 PCR 管置于 PCR 仪器上运行以下程序:

① 98 $^{\circ}$ C 8 minutes

② 64 $^{\circ}$ C 3.5 hours

③ 4 $^{\circ}$ C 20h (可选)

3. 将 1 号 C 纯化柱套在收集管中, 添加 600 $\mu$ l 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  $\geq 10,000 \times g$  离心 1 分钟, 弃滤液。

6. 添加 100 $\mu$ l 制备好的洗涤液到 1 号 C 纯化柱中,  $\geq 10,000 \times g$  离心 1 分钟。

7. 添加 200 $\mu$ l 脱硫液到 1 号 C 纯化柱中, 室温 (20~30 $^{\circ}$ C) 放置 15-20 分钟, 在  $\geq 10,000 \times g$  离心 1 分钟。

8. 添加 200 $\mu$ l 制备好的洗涤液到 1 号 C 纯化柱中, 在  $\geq 10,000 \times g$  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 10 $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C 或更低温度下 (-80 $^{\circ}$ C) 储存以备后用。我们建议每次 PCR 使用 1-4 $\mu$ l 洗脱的 DNA, 最多可以使用 10 $\mu$ l。

洗脱体积可以  $>10\mu$ l, 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, 应仔细阅读说明书。
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 OD<sub>260/280</sub> 在 1.8~2.0 之间, 否则会影响转化效率。
3. DNA 量大于 20 $\mu$ l 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。

---

**【基本信息】**

**【生产企业】** 简石生物技术（浙江）有限公司

住 所：浙江省余姚市中意宁波生态园兴舜路 36 号 11 幢

生产地址：浙江省余姚市中意宁波生态园兴舜路 36 号 11 幢

网 址：[www.jianshibio.com](http://www.jianshibio.com) 邮政编码：315400

**【医疗器械生产备案凭证编号】** 浙甬食药监械生产备 20220001 号

**【医疗器械备案凭证编号/产品技术要求编号】** 浙甬械备 20230071

**【说明书批准及修改日期】** 2023 年 3 月 31 日