

【产品组成】

| 组分 | 10次 规格 | 数 量 | 50次 规格 | 数 量 | 100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 | 10 | 10反应/管 | 20 |
| 稀释缓冲液 | 400 μ l/管 | 1 | 1.5ml/管 | 1 | 3.5ml/管 | 1 | 7ml/瓶 | 1 |
| 溶解缓冲液 | 60 μ l/管 | 1 | 500 μ l/管 | 1 | 1ml/管 | 1 | 1.2ml/管 | 1 |
| 结合液 | 7ml/瓶 | 1 | 30ml/瓶 | 1 | 65ml/瓶 | 1 | 125ml/瓶 | 1 |
| 洗涤液 | 2ml/瓶 | 1 | 6ml/瓶 | 1 | 12ml/瓶 | 1 | 24ml/瓶 | 1 |
| 脱硫液 | 3ml/瓶 | 1 | 10ml/瓶 | 1 | 20ml/瓶 | 1 | 40ml/瓶 | 1 |
| 洗脱液 | 1ml/管 | 1 | 1ml/管 | 1 | 1ml/管 | 2 | 4ml/瓶 | 1 |
| 1号C纯化柱 | 10个/包 | 1 | 50个/包 | 1 | 50个/包 | 2 | 50个/包 | 4 |
| 收集管 | 10个/包 | 1 | 50个/包 | 1 | 50个/包 | 2 | 200个/包 | 1 |

【储存条件】

产品应贮存在15~25°C环境中。

【样品要求】

血浆、组织、粪便、细胞、血液等样本提取的基因组DNA，核酸内切酶消化的DNA，线性化质粒DNA等。

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

【试剂准备】

1. 亚硫酸氢盐转化试剂制备

本试剂盒中提供的转化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：

(1) 在亚硫酸氢盐干粉中加入900 μ l 无酶水、300 μ l 稀释缓冲液和50 μ l 溶解缓冲液。

(2) 室温下涡旋震荡直至全部溶解。

注意：在转化试剂中观察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，转化试剂溶液在室温下保存过夜，在4°C下保存一周，-20°C保存1个月。使用前，将冻存的转化试剂溶液在37°C下迅速解冻，涡旋充分混匀。

2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签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) 添加 8ml 无水乙醇到 2ml 的洗涤液中 (JSR505-10)。

(2) 添加 24ml 无水乙醇到 6ml 的洗涤液中 (JSR505-50)。

(3) 添加 48ml 无水乙醇到 12ml 的洗涤液中 (JSR505-100)。

(4) 添加 96ml 无水乙醇到 24ml 的洗涤液中 (JSR505-200)。

【操作步骤】

1. 取130μl亚硫酸氢盐转化液加入含有 20μl DNA样品的PCR管中混匀，短暂离心确保管盖和管壁上没有残留液体。

注意：如果 DNA 的体积小于 20μl，则需要用水补足至20μl。对于 DNA 体积大于 20μl，在制备转化试剂时需要进行调整，DNA 样品量每增加 10μl，水的用量减少100μl。例如，对于 40μl DNA样品，需加入700μl无酶水来制备转化试剂。加入到样品中的转化试剂的体积也必须随着样品的增加而减少相同的体积，总反应体积仍为 150μl，每个转化反应的最大 DNA 样品量为 50μl。请不要调整溶解缓冲液或稀释缓冲液的用量。

2. 把上述 PCR 管置于 PCR 仪器上运行以下程序：

(1) 98°C 10 minutes

(2) 64°C 2.5 hours

(3) 4°C 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 $\geq 10,000 \times g$ 离心 1 分钟，弃滤液。

6. 添加 100 μ 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 μ 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 μ 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 μ l 洗脱液直接加入到柱基质中。室温放置 3-5 分钟后全速离心 1 分钟洗脱 DNA。

注意：DNA 可以立即进行分析，也可以在 -20 $^{\circ}$ C 或更低温度（-80 $^{\circ}$ C）储存以备后用。建议每次 PCR 使用 1- 4 μ l 洗脱的 DNA，最多可以使用 10 μ 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。实验操作应由具有专业经验和经过培训的人员进行。
2. DNA 纯度需满足 OD_{260/280} 在 1.8~2.0 之间，否则会影响转化效率。
3. 推荐后续使用热启动 Taq DNA 聚合酶进行扩增。
4. 实验操作时请戴一次性 PE 或橡胶手套。