简石生物
GENSTONE BIOTECH

甲基化检测样本前处理试剂盒

（使用说明书 Ver.1.0.2）

产品说明

- ✧ 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。

产品货号：

JSR520-10（10次反应） JSR520-50（50次反应）

JSR520-200（200次反应）

扫描二维码了解更多产品信息

目录Contents

产品组份 1

注意事项 1

储存条件 2

样品要求 2

试剂制备 2

操作步骤 2

Ⅰ 样品前处理 2

Ⅱ 亚硫酸氢盐转化DNA 3

组件查询 4

产品组份

试剂盒组成	10次反应	50次反应	200次反应	保存
蛋白酶 K	/	5mg	20mg	-20℃
蛋白酶 K 保存液	/	500μl	1.2ml	-20℃
蛋白酶 K 溶液（20 mg/ml）	50μl	/	/	-20℃
亚硫酸氢盐干粉	10反应×1个	10反应×5个	10反应×20个	室温
消化缓冲液（2X）	1ml	4ml	15ml	室温
稀释缓冲液	500μl	1.5ml	7ml	室温
增溶缓冲液	900μl	4.5ml	18ml	室温
反应缓冲液	200μl	1ml	4ml	室温
结合液	7ml	30ml	125ml	室温
洗涤液（未添加乙醇）	2ml	6ml	24ml	室温
脱硫液	3ml	10ml	40ml	室温
洗脱液	1ml	1ml	4ml	室温
1号C纯化柱	10个	50个	50个×4	室温
收集管	10个	50个	200个	室温

注意事项

- ✧ 此产品仅供研究使用，并应由专业人员操作。
- ✧ 试剂盒中包含的一些试剂是刺激物，请带好手套和防护眼镜。
- ✧ 售出后一年内产品可质保，试剂盒已经过大量的常规检测来保证其可操作性。
- ✧ 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。
- ✧ DNA纯度需满足OD260/280在1.8～2.0之间，否则会影响转化效率。
- ✧ DNA量大于20μl需要分管操作。
- ✧ 推荐后续使用热启动Taq DNA聚合酶进行扩增。

储存条件

✧ 产品应贮存在4～35℃环境中。

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10-105 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50 pg～2 μg范围之间，最佳投入量为200ng～500 ng 。

试剂制备

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）添加8ml无水乙醇到2ml的洗涤液中（JSM520-10）。

2）添加24ml无水乙醇到6ml的洗涤液中（JSM520-50）。

3） 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：

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） 室温下涡旋混匀10分钟直至全部溶解。

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）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。

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。

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 103 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 105 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。

组件查询

组件名称	货号	规格	保存
蛋白酶 K 溶液（20mg/ml）	TD3001-2	50μl	-20℃
蛋白酶 K	TD3001-2-A	5mg	-20℃
	TD3001-2-B	20mg	
蛋白酶 K 保存液	TD3001-2-C	500μl	-20℃
	TD3001-2-D	1.2ml	
亚硫酸氢盐干粉	TD5003-1	15ml	室温
消化缓冲液（2X）	TD5020-9-1	1ml	室温
	TD5020-9-4	4ml	
	TD5020-9-15	15ml	
稀释缓冲液	TD5005-2-0.5	500μl	室温
	TD5005-2-1.5	1.5ml	
	TD5005-2-7	7ml	
增溶缓冲液	TD5020-7-0.9	900μl	室温
	TD5020-7-4.5	4.5ml	
	TD5020-7-18	18ml	
反应缓冲液	TD5020-8-0.2	200μl	室温
	TD5020-8-1	1ml	
	TD5020-8-4	4ml	
结合液	TD5005-3-7	7ml	室温
	TD5005-3-30	30ml	
	TD5005-3-125	125ml	
洗涤液（未添加乙醇）	TD5001-4-2	2ml	室温

	TD5001-4-6	6ml	
	TD5001-4-24	24ml	
脱硫液	TD5001-5-3	3ml	室温
	TD5001-5-10	10ml	
	TD5001-5-40	40ml	
洗脱液	TD5001-6-1	1ml	室温
	TD5001-6-4	4ml	
1号C纯化柱	TC1004-10	10个/包	室温
	TC1004-50	50个/包	
2ml收集管	TC1001-10	10个	室温
	TC1001-50	50个	
	TC1001-200	200个	