

版本号:260410

DNA Bisulfite Conversion Kit**DNA重亚硫酸盐转化试剂盒**

目录号: DN54

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (DN5401)	100 次 (DN5402)
重亚硫酸盐粉	室温	10 次/管×5 支	10 次/管×10 支
缓冲液 BM	室温	5 ml	10 ml
缓冲液 DP	室温	0.5 ml	1 ml
平衡液	室温	5 ml	5 ml
结合液 BB	室温	30 ml	60 ml
缓冲液 DB	4°C	10 ml	20 ml
		第一次使用前按瓶子标签说明加无水乙醇	
漂洗液 WB	室温	13 ml	25 ml
		第一次使用前按瓶子标签说明加无水乙醇	
洗脱缓冲液 EB	室温	10 ml	10 ml
超微量 DNA 离心柱和收集管	室温	50 套	100 套

本试剂盒除低温组分在室温储存 12 个月不影响使用效果。

缓冲液 DP 于-20°C 下保存, 缓冲液 DB 加入无水乙醇后于 4°C 下保存。

储存事项:

1. 所有的溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 此时不应该直接使用, 可在 37°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。使用前应该恢复到室温。
2. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 产品介绍：

DNA 甲基化是重要的表观遗传修饰，在基因表达调控、细胞分化及疾病发生发展中发挥关键作用。重亚硫酸盐转化是甲基化研究的经典金标准方法，可特异性将未甲基化胞嘧啶转化为尿嘧啶，甲基化胞嘧啶保持不变，从而实现甲基化位点的精准区分。

本试剂盒采用改良重亚硫酸盐反应体系，可高效完成基因组 DNA 的变性、磺化、脱氨基及脱磺酸纯化全过程。体系添加 DNA 保护剂稳定性强，有效减少 DNA 降解，转化效率高、片段回收率好，兼容组织、细胞、全血、FFPE 等多种样本。转化纯化后的 DNA，可直接用于 MSP、BSP、焦磷酸测序、qPCR、高通量测序等下游甲基化检测实验，操作简便、重复性好，满足各类表观遗传科研需求。

❖ 产品特点：

1. 甲基化 DNA 一般只有 1 μg ，传统小量离心柱很难高效回收，本制品采用特殊超微量离心柱设计可以减少黏附损失，同时可以最低 5 μl 洗脱，确保高效回收高浓度 DNA。特殊无垫圈离心柱设计确保离心后无液体残留和污染。保证了回收 DNA 高纯度。
2. 采用直接柱上脱磺酸的方法，使得整个操作流程更为简便流畅。
3. 采用独特的 DNA 保护剂组分，显著减少 DNA 断裂，提高转化后 DNA 的质量和回收率。
4. 转化率高：DNA 样品中未甲基化胞嘧啶转化为尿嘧啶的转化率高达 99% 以上。
5. 反应灵敏：本试剂盒可处理少至 500 pg ，多至 2.5 μg 的 DNA 样品。

❖ 注意事项

1. DNA 浓度及纯度检测 经过重亚硫酸盐处理后的基因组 DNA，由于其中非甲基化的“C”会转化为“U”，所以回收后的 DNA 会是一种“A”，“T”和“U”占大部分的核酸分子，而且当初的碱基配对形式也不复存在，取而代之的是主要以单链形式和非特异性配对形式存在的特殊核酸形态，这种形态的核酸在 OD260 处的吸光值与 RNA 更为相似，所以纯化后基因组 DNA 的 OD260 值为 1 时，则相当于大约 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的核酸浓度。另外，基于处理后核酸状态的特殊性，其 OD230 测值会出现异常现象，可能导致 OD260/OD230 比值不稳定，实验表明这种情况不会影响后续的 PCR

反应。OD260/OD280 比值应为 1.7-1.9, 如果洗脱时不使用洗脱缓冲液, 而使用 ddH₂O, 比值会偏低, 因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值, 但并不表示纯度低。

❖ 操作步骤

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 WB 瓶和缓冲液 DB 瓶中按照标签指示加入无水乙醇, 加入后请及时打钩标记已加入乙醇, 以免多次加入!

重亚硫酸盐转化

1. 将待处理的基因组 DNA 从冰箱中取出解冻, 备用。
2. 配制重亚硫酸盐转化液: 每管干粉中需加入 1 ml 缓冲液 BM, 震荡混匀直至干粉完全溶解, 整个过程约耗时 5 min。
▲ 溶解后的重亚硫酸盐转化液的体积约为 1 ml, 可供处理 10 个样品, 未用完的转化液可在-20°C 下保存 1 个月。
3. 在 200 μ l PCR 管中配制重亚硫酸盐反应体系, 具体配制体系如下表所示:

组成成分	使用量
DNA 样品 X μ l	(最佳 DNA 处理量为 500-1000 ng)
ddH ₂ O	20-X μ l (DNA 与 ddH ₂ O 的最大体积为 20 μ l)
缓冲液 DP	10 μ l
重亚硫酸盐转化液	90 μ l
Total	120 μ l

4. 反应体系配制好以后, 在 PCR 仪等可设置温度变化程序的仪器上进行重亚硫酸盐转化, 整个过程约耗时 1 h, 具体的程序如下表所示:

温度	时间
95°C	10 min
64°C	60-90 min
4°C	保持

注意: 标准/普通样本: 64°C 60 min (平衡效率与时间)。珍贵/难转化/FFPE/高 GC: 64°C 90 min。或者根据具体实验结果调整 64°C 孵育时间。另外, 处理过程中应保证盖紧 PCR 管的盖子, 并进行热盖处理。

重亚硫酸盐处理后的 DNA 纯化回收

5. **柱平衡**: 向超微量 DNA 离心柱中加入 50 μl 平衡液, 13,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 备用。
 - ▲ 平衡液可以增强硅胶膜的吸附核酸能力, 请使用当天处理的吸附柱。
6. 重亚硫酸盐处理程序结束后, 经过简短离心将管中反应体系转移至干净的 1.5 ml 离心管中。向其中加入 5 倍体积 (600 μl) 的结合液 BB, 充分混匀。
7. 将上一步所得溶液加入超微量离心柱中 (离心柱放入收集管中), 室温放置 2 min, 13,000 rpm 离心 30-60 sec, 弃滤液。
 - ▲ 如果总体积超过 750 μl , 可分两次将溶液加入同一个离心柱中。
 - ▲ 过滤下的结合液和收集管内残存的强碱性平衡液混合后, 结合液可能会从黄色变成橘红甚至紫色, 此为酚红 pH 指示剂碱性条件下的正常颜色变化。
8. 加入 400 μl 漂洗液 WB (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 13,000 rpm 离心 30 sec, 弃滤液。
9. 加入 600 μl 缓冲液 DB (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 室温 (15-25 $^{\circ}\text{C}$) 放置 15 min, 13,000 rpm 离心 30 sec, 弃滤液。
10. 加入 400 μl 漂洗液 WB (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 13,000 rpm 离心 30 sec, 弃滤液。
11. 重复步骤 10 一遍。
12. 将超微量离心柱放回收集管中, 13,000 rpm 离心 2 min。
 - ▲ 空甩作用是尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
13. 小心将移液器吸头对准超微量离心柱吸附膜的中间部位 (不要加到管壁上) 加 10 μl (5 μl -20 μl) 洗脱缓冲液 EB (洗脱缓冲液事先在 80 $^{\circ}\text{C}$ -90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热可提高产量), 室温放置 1 min, 13,000 rpm 离心 1 min, 弃吸附柱。
 - ▲ 洗脱体积越大, 洗脱效率越高, 如果需要 DNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是需注意体积过小降低 DNA 洗脱效率, 减少产量 (最小不应少于 5 μl)。
 - ▲ 处理后的 DNA 如果短时内即使用, 建议保存在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 中, 如需保存更长时间则建议保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 中。