

CAT#:211206-150

常温运输及保存，有三低温成分

BINGENE

DNA 甲基化修饰试剂盒（凝胶法）

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	DNA 甲基化分析中的关键步骤是亚硫酸氢盐修饰 DNA，此反应要求 DNA 必须处于单链状态，反应还必须在低温进行。由于常规的修饰反应都在液相进行，在低温下让液相中的 DNA 保持单链状态非常棘手，故修饰效率很低。此外，修饰反应要多次切换反应液，有多个沉淀步骤，故 DNA 回收率一般都不高于 50%。为克服这些缺点，本公司开发出了此产品，它具有下列特点： 1. 用包埋的 DNA 进行所有操作，免去所有沉淀和纯化步骤，极大简化了操作。 2. 免去了 DNA 提取过程，所需实验材料更少，最少几个细胞都可以，极大地节约了宝贵材料，尤其适用于珍稀材料。 3. 包埋中的 DNA 在整个操作过程中都处于单链状态，提高了修饰效率。 4. DNA 包埋在包埋块中，切换反应液不但非常方便，而且 DNA 回收率都在 90%以上。 5. 既适用于实体材料和悬浮细胞，也适用于纯化好的 DNA 样品。 6. 本试剂盒足够制备 150 多个 10uL 包埋块（如果用纯化好的 DNA）或 25 个 10uL 包埋块（如果用悬浮细胞）。																																											
规格及成分	本产品使用小扁盒包装 <table><tr><th>成分</th><th>产品编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>DNA 甲基化修饰溶液 A</td><td>211206a</td><td>30 mL</td><td>30 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>包埋液</td><td>211206b</td><td>1.5 mL</td><td>2.0 mL 蓝盖、低温成分</td></tr><tr><td>包埋块裂解液</td><td>220985a</td><td>12.5 mL</td><td>15 mL 低温成分</td></tr><tr><td>分子生物学级石蜡油</td><td>220101</td><td>25 mL</td><td>30 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>蛋白酶 K 溶液（10mg/mL）</td><td>220137</td><td>150 uL</td><td>2.0 mL 红盖，低温成分</td></tr><tr><td>DNA 甲基化修饰溶液 B 成分一</td><td>211206b1</td><td>2.3 g×5</td><td>5mL 棕色瓶</td></tr><tr><td>DNA 甲基化修饰溶液 B 成分二</td><td>211206b2</td><td>110 mg×5</td><td>1.5mL 棕色离心管</td></tr><tr><td>TE 缓冲液，pH 8.0</td><td>220138</td><td>125 mL</td><td>125 mL 本色瓶</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>211206sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>				成分	产品编号	规格	包装材料	DNA 甲基化修饰溶液 A	211206a	30 mL	30 mL 本色瓶	包埋液	211206b	1.5 mL	2.0 mL 蓝盖、低温成分	包埋块裂解液	220985a	12.5 mL	15 mL 低温成分	分子生物学级石蜡油	220101	25 mL	30 mL 本色瓶	蛋白酶 K 溶液（10mg/mL）	220137	150 uL	2.0 mL 红盖，低温成分	DNA 甲基化修饰溶液 B 成分一	211206b1	2.3 g×5	5mL 棕色瓶	DNA 甲基化修饰溶液 B 成分二	211206b2	110 mg×5	1.5mL 棕色离心管	TE 缓冲液，pH 8.0	220138	125 mL	125 mL 本色瓶	使用手册	211206sc	1 份	无
成分	产品编号	规格	包装材料																																									
DNA 甲基化修饰溶液 A	211206a	30 mL	30 mL 本色瓶																																									
包埋液	211206b	1.5 mL	2.0 mL 蓝盖、低温成分																																									
包埋块裂解液	220985a	12.5 mL	15 mL 低温成分																																									
分子生物学级石蜡油	220101	25 mL	30 mL 本色瓶																																									
蛋白酶 K 溶液（10mg/mL）	220137	150 uL	2.0 mL 红盖，低温成分																																									
DNA 甲基化修饰溶液 B 成分一	211206b1	2.3 g×5	5mL 棕色瓶																																									
DNA 甲基化修饰溶液 B 成分二	211206b2	110 mg×5	1.5mL 棕色离心管																																									
TE 缓冲液，pH 8.0	220138	125 mL	125 mL 本色瓶																																									
使用手册	211206sc	1 份	无																																									
自备试剂	超纯水																																											
运输及保存	常温运输及保存。蛋白酶 K 溶液（10mg/mL）、包埋液、包埋块裂解液需低温运输，-20℃保存。有效期一年。																																											
使用方法	一、准备试剂 1. 在装有 2.3g 天净沙甲基化修饰溶液 B 成分一干粉的棕色瓶中加入 3.9 mL 水和 0.9 mL 天净沙甲基化修饰溶液 A，摇晃溶解得到 4.8 mL 溶液 B 成分一。																																											

2. 在装有 110mg 溶液 B 成分二干粉的离心管中加入 1 mL 50℃预热的超纯水，摇晃溶解，得到溶液 B 成分二。
3. 将 0.6 mL 溶液 B 成分二加入到 4.8 mL 溶液 B 成分一中，得到 5.4 mL 溶液 B 工作液，冰上放置待用。未用完的溶液 B 工作液不得再使用。
4. 每次实验前，将装有 1.5 mL 包埋液的离心管在沸水浴上放置数分钟直到变成溶液，然后放 80℃待用。

二、对微量组织材料（如果材料足够，可先纯化 DNA，再直接进入第三步）

5. 用常规的胰酶消化法处理动物实体组织或培养细胞，得到浓度不超过 60 个细胞/uL 的单细胞 PBS 悬液。如果实验材料已经是单细胞悬浮液（如卵细胞），则 PBS 洗涤后直接离心沉淀，再重悬在 PBS 中（浓度不超过 60 个细胞/uL）。注：本试剂盒不含本步所需相关试剂，如胰酶消化液和 PBS。
6. 在一个自备的 2 mL 离心管中加入 3 uL 上步所得细胞悬液，再迅速滴加 7 uL 在 80℃预热的包埋液，共得 10uL 包埋液-细胞混合液。注：不需要吹打混匀以免混合液在枪头里面凝固。
7. 加入 500 uL 分子生物学级石蜡油确保后续处理过程中溶液不会蒸发。短暂离心确保 10uL 包埋液-细胞混合液沉到管底。
8. 将离心管在沸水浴中放 20 分，此步可将 DNA 分子变性成单链。
9. 将离心管转移到冰上放置 30 分钟，包埋液-细胞混合液将凝固成 10uL 的包埋块，包埋块中将包含细胞的基因组 DNA 和蛋白质组份。
10. 在包埋块中加入 500 uL 包埋块裂解液和 5 uL 蛋白酶 K 溶液（10mg/mL），短暂离心后 37℃保温过夜。此步将降解包埋块中的蛋白质组份。
11. 吸弃包埋块之外的所有溶液（包括石蜡油）后，分别用 1mL TE 缓冲液室温浸泡包埋块 2 次，每次 15 分钟。此步可去除残留在包埋块中的裂解液和蛋白酶 K。
12. 酶切包埋块中的基因组 DNA：选定不识别 PCR 靶片段的内切酶（本试剂不提供该试剂），再用此酶对应的 100 uL 1×酶切缓冲液室温浸泡包埋块 15 分钟，吸弃该缓冲液后再加入 100 uL 1×酶切缓冲液和 50U 选的内切酶，37℃保温 2 小时后吸弃内切酶反应液。
13. 加入 500uL 新鲜配制的处理液 A，室温放置 15 分钟后吸弃处理液 A。处理液 A 配制方法：100 uL DNA 甲基化修饰溶液 A +400 uL 超纯水。
14. 重复上步一次。此时 DNA 将呈单链。
15. 加入 1 mL 新鲜配制的处理液 B（不是溶液 B），室温浸泡包埋块 5 分钟后吸弃处

	理液 B。处理液 B 配制方法：50uL DNA 甲基化修饰溶液 A +950 uL 超纯水。 16.加入 750uL 石蜡油，然后沸水浴 30 秒，使 DNA 变性。 17.将离心管转移到冰上放置 30 分钟使包埋块重新凝固，单链 DNA 将固化。 18.在离心管中加入 1mL 在第 3 步预冷的溶液 B 工作液，短暂离心后继续在冰上放置 30 分钟。此步用于修饰固化的单链 DNA。 19.将离心管转移到 50℃放置 3.5 小时后吸弃溶液 B 工作液。 20.分别用 1mL TE 缓冲液常温洗涤包埋块 2 次，每次 15 分钟，吸弃 TE 缓冲液。 21.分别用 500 uL 新鲜配制的处理液 C（50 uL DNA 甲基化修饰溶液 A +450 uL 超纯水）常温洗涤包埋块 2 次，每次 15 分钟，然后吸弃处理液 C。 22.用 1 mL TE 缓冲液常温洗涤包埋块 3 次，每次 10 分钟，然后吸弃 TE 缓冲液。 23.所得包埋块可以在 4℃保存数月待用，也可以用超纯水洗涤两次（每次 15 分钟）后直接用做 100uL 体系甲基化 PCR 的模板。 三、对纯化好的 DNA 溶液 24.如果样本是纯化好的 DNA 溶液，先用不识别 PCR 靶片段的合适内切酶酶切 DNA，总体积不超过 20uL，DNA 不超过 700 ng。本试剂盒不提供所需内切酶。 25.酶切结束后，沸水浴 10 分钟灭活内切酶并变性 DNA。 26.冰上放置并短暂离心数秒后，再加入 4 uL DNA 甲基化修饰溶液 A，50℃保温 15 分钟。 27.迅速加入 50 uL 在 80℃预热的包埋液，用手指快速弹击管底混匀溶液并继续放 80℃待用。不要吹打混匀以避免包埋液在移液枪头中凝固。 28.在一个新的 2 mL 离心管中，加入 1 mL 第 3 步预冷的溶液 B 工作液，再加上 750 uL 石蜡油，短暂离心后将离心管放冰上预冷。 29.迅速取 80℃保温的混合液 10uL（第 27 步），用在空中滴加的方式加到第 28 步准备的预冷离心管中，滴加的混合液遇冷将迅速在石蜡油中形成一个包埋块。注意：不要将枪头浸入到预冷的溶液中，否则包埋液将迅速在枪头内凝固。如果包埋块没有沉到管底，可以用枪头将其拨到石蜡层下面的液相中。 30.再重复上步操作 6 次，共可以得到 7 个包埋块（每块约含 100ng DNA）。 31.将离心管（含 7 个包埋块）继续放冰上 30 分钟进行修饰。 32.后续操作同第 19-23 步。
关联产品	人甲基化/非甲基化 DNA 标准品