天净沙系列

CAT#:220136

常温运输及保存，有三低温成分

天净沙

亚硫酸氢盐修饰 DNA 试剂盒（凝胶法）

Bisulfite-Modified DNA Kit (Embedding Method)

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是基于亚硫酸氢盐修饰 DNA 原理的试剂盒。亚硫酸氢盐修饰 DNA 时要求 DNA 必须呈单链状态，修饰反应还必须在低温进行，但常规的亚硫酸盐修饰试剂盒多在液相进行，而 DNA 单链在液相有杂交形成双链的趋势，保持单链状态非常困难，所以这些试剂盒的修饰效率一般都不高。此外，常规方法还要切换反应液，有多次沉淀步骤，故 DNA 的回收率一般都不超过 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 样品进行所有操作，免去所有沉淀和纯化步骤，极大简化了操作步骤。
2. 免去了 DNA 提取过程，所需实验材料比常规方法更少（最少几个细胞都可以），尤其适用于珍稀材料。
3. 包埋处理后，DNA 一直处于最适合于修饰的单链状态，提高了修饰效率。
4. 包埋块切换反应液非常方便，而且 DNA 不会丢失，所以最终回收率都在 90%以上。
5. 不但适用于纯化好的 DNA 溶液，还适用于实体材料和悬浮细胞。
6. 本试剂盒足够制备 150 个 10 μL 的包埋块（如果用纯化好的 DNA）或 25 个 10 μL 包埋块（如果用悬浮细胞）。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本试剂盒第一部分，编号 220136pt1，小扁盒包装，常温保存和运输

成分	编号	规格	包装
亚硫酸盐修饰溶液 A	220136a	30 mL	30 mL 本色瓶
亚硫酸盐修饰溶液 B 成分一	220136b1	2.3 g×5	10 mL 棕色瓶
亚硫酸盐修饰溶液 B 成分二	220136b2	110 mg×5	1.5 mL 棕色管
石蜡油，PCR 级	220101	25 mL	30 mL 本色瓶
超纯水	210806	10mL	10mL 本色瓶
TE 缓冲液	220138	100 mL	125 mL 本色瓶
使用手册	220136sc	1 份	无

本试剂盒第二部分，编号 220136pt2，塑料袋包装，-20℃保存、低温运输

成分	**产品编号**	**规格**	**包装材料**
包埋液	220136c	1.5 mL	1.5 mL 蓝盖管
包埋块裂解液	220136d	12.5 mL	15 mL 本色瓶
蛋白酶 K 溶液（10 mg/mL）	220137	150 μL	0.5 mL 红盖管

运输及保存

第一部分常温运输和保存；第二部分低温运输，-20℃保存。有效期一年。

自备试剂

样品。

使用方法	**准备：提前将水浴或金属浴调到 50℃，并将装有 1.5 mL 包埋液的离心管在沸水浴上放置 5 分钟直到变成溶液，然后放 80℃待用。** **一、准备试剂** 1. 在装有 2.3 g 亚硫酸盐修饰溶液 B 成分一干粉的瓶中加入 3.9 mL 超纯水和 0.9 mL 亚硫酸盐修饰溶液 A，摇晃溶解得到 4.8 mL 溶液 B 成分一。 2. 在装有 110 mg 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 上步得到的溶液 B 成分二加入到第 1 步得到的 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 工作液下次不得使用。 **二、对微量组织材料（如果用纯化好的 DNA，直接进入第三步操作）** 4. 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/μL 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/μL）。注：本试剂盒不含本步所需相关试剂，如胰酶消化液和 PBS。 5. 在一个自备的 2 mL 离心管中加入 3 μL 上步所得细胞悬液(含 180 个左右的细胞)，再迅速滴加 7 μL 在 80℃预热的包埋液。注: 不需要吹打混匀以免混合液在抢头里面凝固。 6. 加入 500 μL 分子生物学级石蜡油，短暂离心后将离心管在沸冰浴中放 20 分钟。 7. 将离心管转移到冰上放置 30 分钟，包埋液和细胞混合液将在石蜡油下凝固成 10 μL 的包埋块，包埋块中将包含细胞的基因组 DNA 和蛋白质组份。 8. 在离心管中加入 500 μL 包埋块裂解液和 5 μL 蛋白酶 K 溶液（10 mg/mL），短暂离心后所加液体将沉入到石蜡油下层（包埋块所在位置），37℃保温过夜。此步将降解包埋块中的蛋白质组份。 9. 用移液抢吸弃包埋块之外的所有溶液（包括石蜡油），然后加入 1 mL TE 缓冲液，室温浸泡包埋块 2 次，每次 15 分钟。此步可去除残留的包埋块裂解液和蛋白酶 K。 10. 酶切包埋块中的基因组 DNA：选定不识别 PCR 靶片段的内切酶（本试剂不提供该相关试剂），加入 100 μL 跟此酶兼容的 1×酶切缓冲液，室温液浸泡包埋块 15 分钟，吸弃酶切缓冲液后再加入 100 μL 1×酶切缓冲液和 50U 选定的内切酶,37℃保温 2 小时酶切。吸弃内切酶反应液。 11. 加入 500 μL 新鲜配制处理液 A（配制方法：100 μL 亚硫酸盐修饰溶液 A+400 μL 超纯水），室温浸泡包埋块 15 分钟。 12. 重复上步一次。

	13. 吸弃处理液 A，用 1 mL 新鲜配制的处理液 B（注：不是溶液 B，配制方法：50 μL 亚硫酸盐修饰溶液 A+950 μL 超纯水），室温浸泡包埋块 5 分钟。 14. 吸弃处理液 B 后，加入 750 μL 石蜡油，然后沸水浴 20-30 秒，使 DNA 变性。 15. 将离心管转移到冰上放置 30 分钟使包埋块重新在石蜡油下凝固，单链 DNA 将固化。 16. 在离心管中加入 1 mL 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。 17. 将离心管转移到 50℃水浴或金属浴中放置 3.5 小时。 18. 吸弃溶液 B 工作液，用 1 mL TE 缓冲液常温洗涤包埋块 2 次，每次 15 分钟。 19. 吸弃 TE 缓冲液，用 500 μL 新鲜配制的处理液 C（50 μL 亚硫酸盐修饰溶液 A+450 μL 超纯水）常温洗涤包埋块 2 次，每次 15 分钟。 20. 吸弃处理液 C，用 1 mL TE 缓冲液常温洗涤包埋块 3 次，每次 10 分钟. 21. 吸弃 TE 缓冲液，所得包埋块含有经过亚硫酸盐修饰的 DNA，它可以在 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 100 μL 体系甲基化 PCR 的模板。 **三、对纯化好的 DNA** 22. 如果是纯化好的 DNA，直接选用不识别 PCR 靶片段的合适内切酶酶切纯化的 DNA（本试剂不提供所需试剂），总体积不超过 20 μL，DNA 不超过 700 ng。 23. 酶切结束后，沸水浴 5-10 分钟灭活内切酶并变性 DNA。 24. 冰上放置并短暂离心数秒后，再加入 4 μL 亚硫酸盐修饰溶液 A，50℃保温 15 分钟。 25. 迅速加入 50 μL 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。 26. 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 750 μL 石蜡油，短暂离心后将离心管放冰上预冷。 27. 迅速取 80℃保温的混合液 10 μL（第 25 步），用在空中滴加的方式加到上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。 28. 再重复上步操作 6 次，共可以得到 7 个包埋块（约含 100 ng DNA）。 29. 将离心管（含 7 个包埋块）继续放冰上 30 分钟进行修饰。 30. 后续操作同第 13-17 步。
关联产品	甲基化 PCR 试剂盒