天净沙系列

CAT#:240516-2

常温运输及保存，有四个低温成分

天净沙

甲基化 DNA 修饰及 PCR 扩增试剂盒（染料法）

Methylated DNA Modification and PCR Kit（SYBR）

使用手册 V0.5

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

本产品是甲基化 DNA 修饰及 PCR 扩增试剂盒它具有下列特点：

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. 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。
3. DNA 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。
4. 既适用于实体材料和悬浮细胞，也适用于纯化好的 DNA 样品。
5. 本试剂盒足够制备 150 多个 10 μL 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）。
6. 本试剂盒足够进行 50 次 20 μL 体系的后续 pcr 验证。
7. 本产品仅适用于科研。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成分	产品编号	规格	包装
DNA 甲基化修饰溶液 A	211206a	30 mL	30 mL 本色瓶
2×SYBR qPCR MasterMix	990408	0.5 mL	0.5 mL 本色管
包埋液	211206b	1.5 mL	2.0 mL 蓝盖
包埋块裂解液	220985a	12.5 mL	15 mL 本色瓶
分子生物学级石蜡油	220101	25 mL	30 mL 本色瓶
10 mg/mL 蛋白酶 K 溶液	220137	150 μL	2.0 mL 红盖
DNA 甲基化修饰溶液 B 成分一	211206b1	2.3 g×5	5 mL 棕色瓶
DNA 甲基化修饰溶液 B 成分二	211206b2	110 mg×5	1.5 mL 棕色管
TE 缓冲液，pH 8.0	220138	125 mL	125 mL 本色瓶
使用手册	240516-2sc	1 份	无

运输及保存

常温运输及保存。2×SYBR qPCR MasterMix、10 mg/mL 蛋白酶 K 溶液、包埋液、包埋块裂解液需低温运输，-20℃保存。有效期一年。

自备试剂

样品、基因特异性甲基化 DNA PCR 引物、基因特异性非甲基化 DNA PCR 引物。

使用方法

1. 在装有 2.3 g 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 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 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。 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/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。 6. 在一个自备的 2 mL 离心管中加入 3 μL 上步所得细胞悬液，再迅速滴加 7 μL 在 80℃预热的包埋液，共得 10 μL 包埋液-细胞混合液。注：不需要吹打混匀以免混合液在抢头里面凝固。 7. 加入 500 μL 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 10 μL 包埋液-细胞混合液沉到管底。 8. 将离心管在沸冰浴中放 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 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。 10. 在包埋块中加入 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 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 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 靶片段的自备内切酶，再用此酶对应的 100 μL 1×酶切缓冲室温液浸泡包埋块 15 分钟，吸弃该缓冲液后再加入 100 μL 1×酶切缓冲和 50 U 的内切酶，37℃保温 2 小时后吸弃内切酶反应液。 13. 加入 500 μL 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 μL DNA 甲基化修饰溶液 A 加 400 μL 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：50 μL DNA 甲基化修饰溶液 A 加 950 μL 超纯水。 16. 加入 750 μL 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 1 mL 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 1 mL 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 μL 新鲜配制的处理液 C（50 μL DNA 甲基化修饰溶液 A 加 450 μL 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 20 μL 体系甲基化 PCR 的模板。
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 20 μL，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，加 4 μL DNA 甲基化修饰溶液 A，50℃保温 15 分钟。
27. 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。
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 μL 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 10 μL（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 100 ng 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。
33. 按下表加入各成份:

成分	甲基化管	非甲基化管
2×SYBR qPCR MasterMix	10 μL	10 μL
10 μM 甲基化 DNA PCR 引物	2 μL	不加
10 μM 非甲基化 DNA PCR 引物	不加	2 μL
待测 DNA 样本	7 μL	7 μL
超纯水	补至 20 μL	补至 20 μL

34. 设置 PCR 程序 95℃预变性 10 分钟; (95℃变性 45 秒、x℃ 45 秒、72℃退火 45 秒) 35 次循环;最后 72℃延伸 10 分钟。退火温度与引物有关，可根据实际引物的 Tm 值设置。在退火步骤采集 SYBR 通道的荧光信号。

溶解曲线分析，按 qPCR 仪器手册执行。

关联产品 人甲基化/非甲基化 DNA 标准品