



# 甲基化检测样本前处理试剂盒 说明书

## 【产品名称】

甲基化检测样本前处理试剂盒

## 【包装规格】

型号I：50测试/盒、200测试/盒

型号II：50测试/盒、200测试/盒

## 【预期用途】

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。

## 【检验原理】

DNA经亚硫酸氢盐处理后，可使未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不变。本试剂盒将DNA变性和亚硫酸氢盐转化过程集为一步，极大的缩短了转化时间而不影响其转化效率，转化效率可达到99.5%以上。

本试剂盒通过转化产物与磁珠（型号I）/纯化柱（型号II）结合，从亚硫酸氢盐修饰的溶液中回收DNA，回收的DNA纯度高，完整性好，可直接用于测序、甲基化PCR等下游实验。此外，型号I可与高通量自动化仪器配套使用，能极大减少实验人员的工作。

## 【主要组成成分】

### 1. 试剂盒中包含的试剂组份

型号I

试剂名称	50测试/盒		200测试/盒	
	规格	数量	规格	数量
转化液CR	1 mL/支	5支	1mL/支	20支
缓冲液ND	250 $\mu$ L/支	1支	1mL/支	1支
缓冲液NP	1.5mL/支	1支	5mL/瓶	1瓶
缓冲液CL	30mL/瓶	1瓶	120mL/瓶	1瓶
漂洗液WB (浓缩液)	10mL/瓶	1瓶	40mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液1 (浓缩液)	13mL/瓶	1瓶	52mL/瓶	1瓶
缓冲液DB	10mL/瓶	1瓶	40mL/瓶	1瓶
洗脱液	4mL/瓶	1瓶	15mL/瓶	1瓶
磁珠BQ	0.8mL/支	1支	3mL/瓶	1瓶

型号II

试剂名称	50测试/盒		200测试/盒	
	规格	数量	规格	数量
转化液CR	1 mL/支	5支	1mL/支	20支
缓冲液ND	250 $\mu$ L/支	1支	1mL/支	1支
缓冲液NP	1.5mL/支	1支	5mL/瓶	1瓶
缓冲液CL	30mL/瓶	1瓶	120mL/瓶	1瓶
柱平衡液PS	10mL/瓶	1瓶	40mL/瓶	1瓶
漂洗液WB (浓缩液)	10mL/瓶	1瓶	40mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液1 (浓缩液)	13mL/瓶	1瓶	52mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液2 (浓缩液)	15mL/瓶	1瓶	50mL/瓶	1瓶
缓冲液DB	10mL/瓶	1瓶	40mL/瓶	1瓶
洗脱液	4mL/瓶	1瓶	15mL/瓶	1瓶
吸附柱DF	50个/包	1包	50个/包	4包
收集管	50个/包	1包	50个/包	4包

### 2. 产品不包含，需自备的试剂和仪器

仪器类：恒温混匀仪、台式离心机、移液器（规格：10 $\mu$ L、100 $\mu$ L、200 $\mu$ L、1000 $\mu$ L）

试剂耗材类：实验需要但试剂盒中不包含的有无水乙醇、带滤芯枪头（规格：10 $\mu$ L、100 $\mu$ L、200 $\mu$ L、1000 $\mu$ L）、1.5mL离心管、2mL离心管，磁棒套，96深孔板。

## 【储存条件及有效期】

1. 吸附柱DF冰袋运输，其余试剂均可室温运输，运输时间建议不超过7天。
2. 吸附柱DF2-8℃保存，其余组分15-30℃保存。试剂盒有效期12个月。

注：转化液对光敏感，需避光保存，减少暴露在光线下。

## 【适用仪器】

1. 手动：磁力架，建议使用磁力架DynaMag™-2 (Cat. No. 12321D)
2. 自动：可匹配多款全自动核酸提取仪，建议使用江苏康为世纪生物科技股份有限公司核酸提取仪。

## 【样本要求】

本试剂盒适用于粪便、血液、组织、体液等提取纯化后的DNA，cfDNA溶液，单次转化的DNA投入量约为100pg-2μg之间，其中10ng-2μg效果更佳。

## 【检验方法】

1. 使用前准备：新开封的试剂盒，按照试剂瓶标签的说明预先在漂洗液WB、漂洗缓冲液1及漂洗缓冲液2中加入对应量的无水乙醇，并且使用前检查漂洗液是否加入了无水乙醇，加无水乙醇后将瓶盖严格拧紧，防止无水乙醇挥发。

2. 手动DNA转化：

### 2.1 柱式法：

- 2.1.1 根据需处理的DNA样本数量，计算需要的转化液CR、缓冲液ND、缓冲液NP体积，以下表为例，如果处理1个样本，分别取100μL转化液CR、5μL缓冲液ND、25μL缓冲液NP，加到一个新的EP管中，颠倒混匀，瞬时离心。

样本数量	转化液CR (μL)	缓冲液ND (μL)	缓冲液NP (μL)
1	100	5	25
2	200	10	50
3	300	15	75
..	..	..	..
N	100N	5N	25N

注：转化液CR、缓冲液ND、缓冲液NP混合若呈乳白色的浑浊状态，为正常现象，不影响试剂效果。

2.1.2 取20 $\mu$ L待测样本加入至新的PCR管中，加入130 $\mu$ L上述转化液混合物，混匀后放入PCR仪，开始转化。转化程序如下：

90 °C	10min
54 °C	1h
4 °C	hold

- 2.1.3 向已装入收集管的吸附柱中加入200 $\mu$ L柱平衡液PS，12000rpm离心1min，弃掉废液，将吸附柱放回收集管。
- 2.1.4 加入600 $\mu$ L缓冲液CL，将步骤2.1.2中反应得到的转化后产物转移到缓冲液CL中，上下颠倒3-5次，室温静置10min。
- 2.1.5 12000rpm离心1min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
- 2.1.6 加入500 $\mu$ L漂洗缓冲液1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12000rpm离心1min，不用弃废液。
- 2.1.7 加入200 $\mu$ L的缓冲液DB，室温静置10-15min，然后12000rpm离心1min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
- 2.1.8 加入500 $\mu$ L漂洗缓冲液2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12000rpm离心1min，不用弃废液。
- 2.1.9 加入200 $\mu$ L漂洗液WB（使用前检查是否已加入无水乙醇），12000rpm离心1min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
- 2.1.10 将弃去废液的收集管连同吸附柱12000rpm离心2min。
- 2.1.11 轻轻的将吸附柱转移（在转移的过程中不要碰到收集管内壁，防止粘上乙醇）到干净的收集管中，打开盖子，晾干3min。
- 2.1.12 加入20 $\mu$ L的洗脱液到吸附柱中间膜上（注意枪头不要戳到吸附柱的膜，加入不同样本要换枪头），盖紧冠盖，室温放置2min。然后12000rpm离心1min，收集转化后的DNA，备用。

注：1. 如果要提高回收效率，洗脱液可在65-70 $^{\circ}$ C预热。

2. 亚硫酸氢盐修饰后的DNA建议立即检测，否则请于-20  $^{\circ}$ C以下保存，保存时间不超过1个月，长期保存需置于-70 $^{\circ}$ C或以下，并应避免反复冻融。

## 2.2 磁珠法：

2.2.1 根据需处理的DNA样本数量，计算需要的转化液CR、缓冲液ND、缓冲液NP体积，以下表为例，如果处理1个样本，分别取100 $\mu$ L转化液CR、5 $\mu$ L缓冲液ND、25 $\mu$ L缓冲液NP，加到一个新的EP管中，颠倒混匀，瞬时离心。

样本数量	转化液CR (μL)	缓冲液ND (μL)	缓冲液NP (μL)
1	100	5	25
2	200	10	50
3	300	15	75
..	..	..	..
N	100N	5N	25N

注：转化液CR、缓冲液ND、缓冲液NP混合若呈乳白色的浑浊状态，为正常现象，不影响试剂效果。

2.2.2 取20μL待测样本加入至新的PCR管中，加入130μL上述转化液混合物，混匀后放入PCR仪，开始转化。转化程序如下：

90 °C	10min
54 °C	1h
4 °C	hold

2.2.3 取新的离心管，加入600μL缓冲液CL，将步骤2.2.2中反应得到的转化后产物转移到缓冲液CL中。

2.2.4 将吹打混匀的磁珠BQ 15μL加入到步骤2.2.3中的混合液，涡旋震荡混匀后，在恒温混匀仪上1700rpm震荡10min。

注：使用磁珠前，一定要混匀，磁珠沉降速度较快，多个样本的加入磁珠的时候中间一定要经过几次摇匀，推荐先加缓冲液CL及转化后产物，最后再加磁珠BQ，以免磁珠沉降。

2.2.5 将步骤2.2.4的离心管瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后吸弃废液。

2.2.6 加入500μL漂洗液WB（使用前检查是否已加入无水乙醇），用移液枪吹打或震荡混匀。瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后吸弃废液。

2.2.7 加入200μL的缓冲液DB，在恒温混匀仪上1700rpm震荡混匀10-15min。瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后吸弃废液。

2.2.8 加入500μL漂洗缓冲液1（使用前检查是否已加入无水乙醇），用移液枪吹打或震荡混匀。瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后吸弃废液。

2.2.9 加入500μL漂洗液WB（使用前检查是否已加入无水乙醇），用移液枪吹打或震荡混匀。瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后吸弃废液。

注：吸弃废液后可将离心管瞬时离心，并置于磁力架上，用10μL移液枪将残留的液体弃尽。

2.2.10 室温干燥5-10min，肉眼观察磁珠表面变成哑光且磁珠无干裂时，加入20μL洗脱液，用移液枪吹打或震荡混匀。瞬时离心后置于恒温混匀仪上65 °C 1700rpm震荡10min。

2.2.11 将步骤2.2.10的离心管瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后转移洗脱液至新的离心管中，备用。

注：亚硫酸氢盐修饰后的DNA建议立即检测，否则请于-20°C以下保存，保存时间不超过1个月，长期保存需置于-70°C或以下，并应避免反复冻融。

3. 自动化转化:

3.1 根据需处理的DNA样本数量, 计算需要的转化液CR、缓冲液ND、缓冲液NP体积, 以下表为例, 如果处理1个样本, 分别取100 $\mu$ L转化液CR、5 $\mu$ L缓冲液ND、25 $\mu$ L缓冲液NP, 加到一个新的EP管中, 颠倒混匀, 瞬时离心。

样本数量	转化液CR ( $\mu$ L)	缓冲液ND ( $\mu$ L)	缓冲液NP ( $\mu$ L)
1	100	5	25
2	200	10	50
3	300	15	75
..	..	..	..
N	100N	5N	25N

注: 转化液CR、缓冲液ND、缓冲液NP混合若呈乳白色的浑浊状态, 为正常现象, 不影响试剂效果。

3.2 取20 $\mu$ L待测样本加入至新的PCR管中, 加入130 $\mu$ L上述转化液混合物, 混匀后放入PCR仪, 开始转化。转化程序如下:

90 °C	10min
54 °C	1 h
4 °C	hold

3.2 按下表向深孔板中加入相应试剂:

匹配32通道提取仪

位置	试剂及用量
1&7列	缓冲液CL: 600 $\mu$ L 转化后产物: 150 $\mu$ L 磁珠BQ: 15 $\mu$ L
2&8列	漂洗液WB: 500 $\mu$ L
3&9列	缓冲液DB: 200 $\mu$ L
4&10列	漂洗缓冲液1: 500 $\mu$ L
5&11列	漂洗液WB: 500 $\mu$ L
6&12列	洗脱液: 40-80 $\mu$ L

匹配96通道提取仪

位置	试剂及用量
样本板1	缓冲液CL: 600 $\mu$ L 转化后产物: 150 $\mu$ L 磁珠BQ: 15 $\mu$ L
漂洗板2	漂洗液WB: 500 $\mu$ L
脱磺基板3	缓冲液DB: 200 $\mu$ L
漂洗板4	漂洗缓冲液1: 500 $\mu$ L
漂洗板5	漂洗液WB: 500 $\mu$ L
洗脱板6	洗脱液: 40-80 $\mu$ L

3.3 将加入样品的深孔板放入仪器中, 运行程序。程序运行结束之后将洗脱后的产物转移到新的离心管中, 备用 (最好立即检测, 如不立即进行下游检测, 请将洗脱后的产物放入-20 °C以下保存)

## 【注意事项】

1. 经甲基化修饰的DNA一般以单链或非特异性配对形式存在。当纯化后的基因组DNA OD260为1时，相当于约40 $\mu$ g/mL的核酸浓度。
2. 基于处理后核酸状态的特殊性，其OD230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ddH<sub>2</sub>O，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。
3. 甲基化转化过程中，转化时间过久会引起甲基化的C部分变成U，导致假阴性，请严格按照操作说明书进行操作。
4. 缓冲液DB中含有挥发性有机试剂，使用后须拧紧，防止试剂挥发。
5. 本试剂盒仅用于体外诊断，使用前请仔细阅读说明书并严格按照说明书进行操作。
6. 应由具备专业经验或经培训合格的人员进行操作。
7. 有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。
8. 不要使用超过有效期的试剂，不同批次的产品不能混用。