

SteadyPure 重亚硫酸盐转化试剂盒

SteadyPure Bisulfite Conversion Kit

Code No. AG21045

包装量: 50 rxns

保存温度: 室温(15 ~ 30°C)

产品概述

本产品旨在提供一种针对 DNA 甲基化研究中 DNA 重亚硫酸盐转化的方法。在重亚硫酸盐转化反应中，未甲基化的胞嘧啶（C）会转化为尿嘧啶（U），在下游的 PCR 反应中，则会变成胸腺嘧啶（T），其中未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶的转化效率高达 99%。本产品可转化 50 pg–3 μg 的 DNA 样本，转化时采用独特的 DNA 保护剂，使得转化后的 DNA 质量高，转化获得的 DNA 样本再通过柱纯化获得高纯度、高收量的 DNA 样本。使用本产品转化的 DNA 可直接用于 PCR、qPCR、及 NGS 建库等。

安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂，实验操作开始前请穿戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套，然后再进行实验操作。

【注意：使用后溶液需要收集在废液桶中专门处理。】

如果 Modification Solution I、Modification Solution II、Binding Buffer 或 Desulfonation Buffer 不小心溅出，请立刻用清水冲洗。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

产品组成

Modification Reagent	5 pcs
Modification Solution I	1 ml
Modification Solution II	300 μl
Binding Buffer	20 ml
Wash Buffer *1	10 ml
Desulfonation Buffer *2	3.5 ml
RNase Free Water	8 ml
Elution Buffer	5 ml
DNA Micro Columns	50 sets
Collection tubes	50 pcs

*1: Wash Buffer 在首次使用前，请添加 40 ml 的无水乙醇（Wash Buffer 与无水乙醇体积比为 1 : 4），混合均匀后在瓶子上做好标记，室温保存。

*2: Desulfonation Buffer 在首次使用前，请添加 10 ml 的无水乙醇（Desulfonation Buffer 与无水乙醇体积比为 7 : 20），混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。

保存及运输

保存温度: 室温（15–30°C）保存

运输温度: 室温（15–30°C）运输

实验前准备

1. 自备: PCR 仪、无水乙醇、1.5 ml 离心管、PCR 管。
2. Wash Buffer 在首次使用前，请添加 40 ml 的无水乙醇（Wash Buffer 与无水乙醇体积比为 1 : 4），混合均匀后在瓶子上做好标记，室温保存。
3. Desulfonation Buffer 在首次使用前，请添加 10 ml 的无水乙醇（Desulfonation Buffer 与无水乙醇体积比为 7 : 20），混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。

► 注意事项

1. Modification Reagent 需避光保存，配制好的重亚硫酸盐转化液可在 4℃ 保存一周，-20℃ 保存一个月。
2. 每个转化体系中样本加入量为 20 μ l，若样本不足 20 μ l 时应使用灭菌水补足 20 μ l，若样本起始量超过 20 μ l，请分成多个体系进行转化。
3. 一个转化体系可处理的 DNA 量为 50 pg~3 μ g，最佳的 DNA 处理量为 500 ng~2 μ g，若需要处理的 DNA 量超过 3 μ g，建议使用多个转化体系进行转化。
4. 经过重亚硫酸盐处理后的基因组 DNA 主要以单链形式和非特异性配对形式存在，这种形态的核酸在 OD_{260nm} 处与 RNA 更为相似，所以纯化后基因组 DNA 的 OD_{260nm} 值为 1 时，就约等于 40 μ g/ml 的核酸浓度。
5. 纯化过程中，DNA Micro Columns 的吸附柱需竖直从 Collection tubes 或 1.5 ml 的离心管中取出（或放入），避免吸附柱柱头触碰管壁，造成污染。

► 操作流程

重亚硫酸盐转化液配制

1. 在 Modification Reagent 棕色管中配制重亚硫酸盐转化液，上下颠倒或振荡混匀 5 min~10 min 直至干粉完全溶解，具体配制体系如下：

组成成分	添加量
Modification Reagent	1 pc
RNase Free Water	900 μ l
Modification Solution I	200 μ l
Modification Solution II	60 μ l

【注：配制的重亚硫酸盐转化液体积约为 1200 μ l，可供处理 10 个样品，建议现配现用，若无法一次性全部使用，可 4℃ 避光保存一周，-20℃ 避光保存一个月。】

转化步骤（冰上操作）

1. 取 1~20 μ l 待处理的 DNA 样本至 PCR 管中，若 DNA 样本不足 20 μ l，请用 RNase Free Water 补足至 20 μ l。

【注：① 若样本起始量不足 20 μ l，请用 RNase Free Water 补足至 20 μ l 进行转化；若样本起始量超过 20 μ l，建议使用多个转化体系进行转化。

② 一个转化体系可处理的 DNA 量为 50 pg~3 μ g，最佳的 DNA 处理量为 500 ng~2 μ g，若需要处理的 DNA 量超过 3 μ g，建议使用多个转化体系进行转化。】

2. 向上述 DNA 样本中加入 120 μ l 重亚硫酸盐转化液，用移液器吹打混匀。

【注：重亚硫酸盐转化液使用前需上下颠倒 10 次或使用涡旋混匀仪充分振荡使其复溶。】

3. 将上述混合液置于 PCR 仪等可设置温度变化程序的仪器上进行转化反应，具体反应程序如下表所示：

温度	时间
热盖 105℃	On
98 °C	10 min
60 °C	60~150 min
4°C	hold

【注：① 若初始 DNA 处理量小于 500 ng，可将 60℃ 的处理时间设置至 60 min；若初始 DNA 处理量在 500 ng~2 μ g，可将 60℃ 的处理时间设置至 90 min；若初始 DNA 处理量在 2 μ g~3 μ g，可将 60℃ 的处理时间设置至 150 min。

② 使用 PCR 仪进行转化反应时，建议进行热盖处理。

③ 使用 PCR 仪进行转化反应时，设置的加热体积需 $\geq$ 100 μ l。】

➤ 操作流程

纯化步骤

1. 在 DNA Micro Column 中加入 400 μ l Binding Buffer，将转化好的 140 μ l DNA 样品转移至 DNA Micro Column，用移液器吹打混匀，室温静置 1 min，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。
 2. 向 DNA Micro Column 中加入 200 μ l 的 Wash Buffer，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。
【注：请确认 Wash Buffer 中已经加入了指定体积的无水乙醇。】
 3. 向 DNA Micro Column 中加入 200 μ l 的 Desulfonation Buffer，室温静置 20 min，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。
【注：请确认 Desulfonation Buffer 中已经加入了指定体积的无水乙醇。】
 4. 向 DNA Micro Column 中加入 200 μ l 的 Wash Buffer，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。
 5. 重复步骤 4 一次。
 6. 将 DNA Micro Column 安置于新的 2.0 ml Collection Tube 中，12,000 rpm 室温离心 2 min。
 7. 将 DNA Micro Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管中，在吸附膜的中央处加入 10~20 μ l Elution Buffer，室温静置 1 min，然后 12,000 rpm 室温离心 1 min 洗脱 DNA。洗脱获得的 DNA 产物可直接用于后续检测或放入 -20°C 中保存。
-

