

本操作手册适用于对基因组 DNA 进行超快速、高效的亚硫酸氢盐转化。

试剂盒组分表：

Kit Contents

EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit	(50)	(200)
Catalog no.	59824	59826
Number of preps	50	200
Bisulfite Solution	3 x 1.5 ml	12 x 1.5 ml
DNA Protect Buffer	1.9 ml	4 x 1.9 ml
RNase-Free Water	1.9 ml	4 x 1.9 ml
MinElute® DNA Spin Columns	50	200
Collection Tubes (2 ml)	100	400
Buffer BL*	31 ml	3 x 31 ml
Buffer BW (concentrate)	2 x 13 ml	2 x 52 ml
Buffer BD (concentrate)	3 ml	4 x 3 ml
Buffer EB	1 ml	4 x 1 ml
Carrier RNA	310 µg	3 x 310 µg
Quick Start Protocol	2	2

保存方式：

MinElute DNA spin columns, DNA Protect Buffer, Buffer BD 在 2–8°C 下保存。室温下的短期储存（不超过 4 周）不会影响实验的结果。包括 Bisulfite Solution 在内的其他 buffer 室温保存，可以至少 6 个月保持稳定。

Carrier RNA在室温下可以保存1年。Carrier RNA只能溶解于RNase-free water。溶解的carrier RNA需要立即加入到Buffer BL。 Buffer BL–carrier RNA 需新鲜配置，该Buffer 可在2–8°C 下可保存至多48小时。未使用的配成溶液的 Buffer BL–carrier RNA分装后-20°C储存，可以保存至多1年。

本操作手册仅限内部学习使用！如有任何疑问，请联系：王淇（021 3856 7855）

注意事项:

DNA 的产量和大小

经过亚硫酸氢盐转化的 DNA 产量根据 DNA 的量以及提取样本的不同而有变化。可以从 FFPE 组织（厚度为 10 μm ），0.5-20 μl 血液，或者 10-105 细胞中提取 DNA。本 kit 适合 1 ng~2 μg 样本量。

模板 DNA 的片段大小可以在 500 bp~30 kb 之间。从血清，尿，或者是 FFPE 组织提取的 DNA 的片段大小可以小于 500bp。

如果从非常少量的样本或者非常破碎的样本（e.g. 或组织检查或者 FFPE 组织），我们强烈建议加入 carrier RNA 到 Buffer BL（参考后面的准备事项）。

纯化的样品里面会含有较多的 carrier RNA. Carrier RNA 不会影响下游应用。

起始样本

亚硫酸氢盐转化效率也和起始样本的 DNA 特性有关系。基因组 DNA 应该在没有任何限制性内切酶消化前处理的情况下进行亚硫酸氢盐处理。如果是质粒 DNA，由于在变性处理后单链 DNA 会有非常快的重退火过程，在转化处理前要先进行质粒 DNA 线性处理。

MinElute DNA spin columns 的使用

为了避免交叉污染，需要遵循以下事项：

1. 小心地将样品或溶液移入 MinElute spin column，避免弄湿 column 的边缘。避免枪头和 MinElute spin column 膜接触。
2. 液体转移的过程中总是更换枪头。我们建议使用防气泡的枪头。
3. 一次打开一个 MinElute spin column，小心避免产生气泡。
4. 在整个操作过程中戴实验手套。一旦手套和样品接触，请马上更换。

离心

MinElute spin column 适合标准的 1.5~2 ml 离心管。在干式离心这步我们提供了一系列的 2ml 的收集管。所有的离心步骤都要在室温下进行。在将 MinElute spin column 放入离心机前始终保持将 column 封闭。

准备事项

Buffer BW

添加 30 ml 乙醇（90%~100%）到 13 ml 的 Buffer BW，室温保存。实验开始前倒置混合几次。

Buffer BD

添加 27 ml 乙醇（90%~100%）到 Buffer BD，室温保存。实验开始前倒置混合几次，使用后马上关闭瓶子。在储存一段时间之后可能会在 Buffer BD-乙醇溶液中产生白色沉淀物。这些沉淀物不会 Buffer BD 的使用效果。但是要避免将沉淀物加入到 Column 中。

Carrier RNA

添加 310 μ l 的 RNase-free water 到冻干的 carrier RNA (310 μ g) 来获得 1 μ g/ μ l 的溶液。通过涡旋完全溶解 carrier RNA。当平行处理 50 个样品时，将全部的 carrier RNA 加入到 Buffer BL，检查瓶盖标签盒。如果是处理较少的样品，将溶解后的 carrier RNA 分装（e.g. 50 μ l）后-20°C 保存至多 1 年。如果在 2 周的时间有少于 50 次的转化，只需要制备足够的 Buffer BL-carrier RNA 溶液即可(参考 table.1)。当样品中仅含有少量目标分子的时候 Carrier RNA 能促进 DNA 和 spin column 膜的结合。如果样本 DNA 大于 100 ng 则没有必要使用 carrier RNA。

将溶解的 carrier RNA 加入到 Buffer BL 中。计算处理样品所需要的 Buffer BL 和 carrier RNA 的体积。如果 Buffer BL 里面含有沉淀物，可以轻微加热（不大于 70°C）搅拌溶解。

Table 1. Buffer BL and Carrier RNA volumes

Number of samples	Volume of Buffer BL*	Volume of carrier RNA solution†
1	350 μ l	3.5 μ l
5	1.75 ml	17.5 μ l
10	3.5 ml	35 μ l
15	5.25 ml	52.5 μ l
25	8.75 ml	87.5 μ l
50	17.5 ml	175 μ l

* The volumes given contain a 10% surplus for pipetting inaccuracies.

† Resulting in a final concentration of 10 μ g/ml carrier RNA in Buffer BL.

操作步骤:

适用于DNA量为1 ng~2 µg,样本体积不超过20 µl (高浓度), 或者DNA量为1~500 ng, 样本体积最大为20 µl (低浓度)的亚硫酸氢盐转化。高浓度或者是低浓度DNA样品的转化只在亚硫酸氢盐转化的建立步骤有所不同(参照table 2),其他的操作步骤完全相同。

操作前的注意点

- 加入DNA-亚硫酸氢盐混合溶液到DNA protect buffer后, 颜色要由绿色完全转化为蓝色, 表示充分混合并且PH适合。
- 所有的离心步骤都要在室温下进行。

操作前的准备

- 按照前面准备事项所述准备好反应试剂。
- 将样品和buffer平衡到室温。

操作过程

DNA亚硫酸氢盐转化

1. 解冻需要转化的DNA, 确保亚硫酸氢盐溶液完全溶解。

Note: 如果有必要, 加热亚硫酸氢盐溶液到60°C, 振荡直至所有的沉淀物都重新溶解。

Note: 不要把亚硫酸氢盐溶液放到冰上。

2. 参照table 2. 在200 µl PCR管(未提供)里准备亚硫酸氢盐反应, 按照表里所列的顺序依次添加反应成分。

Note: 对于高浓度DNA样本要保证DNA和RNase-free water的总体积为20 µl; 对于低浓度DNA样本要保证DNA和RNase-free water的总体积为40 µl。

Table 2. Bisulfite reaction components

Component	High-concentration samples (1 ng–2 µg)	Low-concentration samples (1–500 ng)
	Volume per reaction (µl)	Volume per reaction (µl)
DNA	Variable* (maximum 20 µl)	Variable† (maximum 40 µl)
RNase-free water	Variable*	Variable†
Bisulfite Solution	85	85
DNA Protect Buffer	35	15
Total volume	140	140

* The combined volume of DNA and RNase-free water must total 20 µl.

† The combined volume of DNA and RNase-free water must total 40 µl.

3. 合上PCR管，均匀混合上述反应物，室温（15~25°C）保存PCR管。

Note: 加入DNA-亚硫酸氢盐混合溶液到DNA protect buffer后，颜色要由绿色完全转化为蓝色，表示充分混合并且PH合适。

4. 使用thermal cycler进行亚硫酸氢盐转化，参照Table 3.设置thermal cycler。

完整的反应循环大概是30分钟。

Optional: 在有些情况下或许需要将60°C的incubate时间延长到20分钟来实现完全的转化。

Note: 如果使用的是无法输入反应体积(140 µl)的thermal cycler，则设置为最大反应体积。

Table 3. Bisulfite conversion thermal cycler conditions

Step	Time	Temperature
Denaturation	5 min	95°C
Incubation	10 min*	60°C
Denaturation	5 min	95°C
Incubation	10 min*	60°C
Hold	Indefinite [†]	20°C

5. 将含有各亚硫酸氢盐转化反应物的PCR管放入thermal cycler，启动热循环反应。

Important: 只能使用有热加热盖子的thermal cyclers进行亚硫酸氢盐转化反应。要将PCR管的盖子盖紧。

转化后的DNA可以在thermal cycler中过夜，不会影响反应效率。

亚硫酸氢盐转化后DNA的回收

6. 转化反应完成后，将含有反应物的PCR管简单离心，然后转移反应物到干净的1.5 ml离心管中。

溶液中沉淀物质的转移不会影响反应效率和产量。

7. 向每个样品中加入carrier RNA浓度为10 µg/ml 的新鲜配置的Buffer BL 310 µl。通过涡旋振荡充分混合，简单离心。

Note: DNA量大于100 ng 时不需要加入carrier RNA。

8. 向每个样品中加入250 µl 乙醇 (96~100%)。涡旋振荡15秒充分混合，简单离心来去除管壁上残留的液滴。

9. 准备必要数量的MinElute DNA spin columns和收集管，将步骤8的混合物全部转移到spin column。

10. 用最大速度离心spin columns 1分钟。去除液体，将spin column重新放回到收集管。

11. 向每个spin column中加入500 µl Buffer BW (wash buffer)，最大速度离心1分钟。去除液体，将spin column重新放回到收集管。

12. 向每个spin column中加入500 µl Buffer BD，室温（15~25°C）放置15分钟。

如果在Buffer BD里面有沉淀物，避免将沉淀物转移到spin column。

Important: 装有Buffer BD的瓶子在使用后要立即关紧，避免和空气中的二氧化碳接触。

Note: 在室温放置前要关上spin column的盖子。

13. 用最大速度离心spin columns 1分钟。去除液体，将spin column重新放回到收集管。

14. 向每个spin column中加入500 µl Buffer BW，最大速度离心1分钟。去除液体，将spin column重新放回到收集管。

15. 重复步骤14一次。

16. 向每个spin column中加入250 µl 乙醇 (96~100%)，最大速度离心1分钟。

17. 把spin column放到新的2 ml 收集管，最大速度离心1分钟，除去任何残留液体。

Optional: 将spin column 保持盖子打开的状态放入干净的1.5 ml 离心管(未提供)，60°C加热5分钟，可以保证残留液体完全蒸发。

18. 把spin column放到干净的1.5 ml 离心管（未提供）中。向每个spin column膜中央直接加入15 µl Buffer EB (elute buffer)，小心合上column的盖子。

19. 室温下放置spin columns 1分钟。

20. 15,000 x g (12,000 rpm) 转速下离心1分钟来洗脱DNA。

Note: 如果是高浓度DNA样品的话，用10 µl Buffer EB 就可以进行洗脱，但是产量会减少大约20%。不要使用少于10 µl 的Buffer EB进行洗脱，因为spin column膜不能被充分湿润。

Note: 建议在2~8°C的条件下存储纯化的DNA不超过24h。要是纯化DNA的存储时间长于24h，建议在-20°C条件保存。