

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		18 RXN	50 RXN
Conversion Reagent	RM30514	1.5 mL × 3	1.5 mL × 7
Clean Beads	RM30515	300 µL	850 µL
Binding Buffer	RM30545	10 mL	28 mL
Wash Buffer	RM30516	5 mL	14 mL
Desulphonation Buffer	RM30517	4 mL	11 mL
Elution Buffer	RM30518	1 mL	1.8 mL

产品说明

本产品可以快速地将 DNA 样品中的未甲基化胞嘧啶转化成尿嘧啶而甲基化胞嘧啶维持不变。双链 DNA 经过高温亚硫酸氢盐处理后，双链 DNA 解链变成单链，在 HSO_3^- 作用下，导致胞嘧啶残基发生脱氨基反应并将它们转化为尿嘧啶，甲基化修饰的残基保持不变。进而在后续 PCR 扩增过程中，尿嘧啶会被胸腺嘧啶(T)取代。

保存条件

Conversion Reagent 组分 4~25 °C 避光保存（建议冷藏），其他组分需在 15 ~ 25°C（室温）保存。

样本要求

- ❖ 样本类型：未经过 CT 转化的 DNA 样本，通常包括脱落细胞、石蜡包埋组织的基因组 DNA；以及血浆的游离 DNA。
- ❖ 进样量：200 pg ~ 2 ug；推荐使用纯度指标 A260 / A280 比值在 1.7 ~ 1.9 之间的 DNA 样本进行转化。

试剂准备

- ❖ 不同批次的试剂，不建议混用；Conversion Reagent / Desulphonation Buffer 在使用时避免接触皮肤及眼睛，若不慎接触皮肤或眼睛候，需立刻擦干并用大量清水冲洗。本试剂盒未提供无水乙醇，需用户自行准备。
- ❖ 18 RXN: Wash Buffer 需在使用时加入 20 mL 的无水乙醇。加入后颠倒混匀，此时应将瓶盖拧紧，防止乙醇挥发影响试剂使用。
- ❖ 50 RXN: Wash Buffer 需在使用时加入 56 mL 的无水乙醇。加入后颠倒混匀，此时应将瓶盖拧紧，防止乙醇挥发影响试剂使用。

操作说明

实验开始前，提前准备以下试剂和耗材：1.5 mL Nuclease-free 离心管、Nuclease-free 枪头、Nuclease-free Water、无水乙醇、0.5 mL PCR 管。

1. 亚硫酸氢盐转化

1.1 根据需要实验的样本数量，准备相应的无菌 PCR 管，并按照下表制备转化反应体系：

组分	体积
Input DNA	200 pg - 2 ug
Conversion Reagent	180 µL
Nuclease-free Water	Up to 200 µL
Total	200 µL

1.2 用移液器将上述体系吹打混匀或短暂涡旋混匀 5s，短暂离心，将反应液离心至 PCR 管底。

1.3 执行以下转化程序：

温度	时间
热盖 105°C	On
98°C	7 min
4°C	Hold

2. 转化产物纯化

2.1 在使用前将 Clean Beads 充分震荡混匀；

2.2 将 15 μ L Clean Beads 和上一步的转化产物加入至 1.5 mL Nuclease-free 离心管中，再加入 500 μ L Binding Buffer，用移液器吹打或者低速涡旋 30s 以充分混匀，室温下静置孵育 10 min；

2.3 将离心管瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后，小心移除上清；

注意：使用移液器将上清充分去除干净。

2.4 将 400 μ L Wash Buffer（已加入指定体积的无水乙醇）加入至离心管中，用移液器吹打或者低速涡旋 30s 以充分混匀。瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后，小心移除上清；

注意：尽快加入 Wash Buffer，避免影响磁珠状态。

2.5 将 200 μ L Desulphonation Buffer 加入至离心管中，用移液器吹打或者低速涡旋 30s 以充分混匀。室温下静置反应 10 min。瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后，小心移除上清；

2.6 将 400 μ L Wash Buffer（已加入指定体积的无水乙醇）加入至离心管中，用移液器吹打或者低速涡旋 30s 以充分混匀。瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后，小心移除上清；

2.7 重复步骤 2.6 一次，弃尽上清，总共漂洗两次；

注意：可使用 10 μ L 移液器吸尽残液。

2.8 55°C 干燥 5 ~ 10 min 或室温干燥 10 ~ 20 min，充分去除管内残余液体，干燥至磁珠表面无反光；

2.9 加入 30 μ L 的 Elution Buffer，用移液器吹打或者低速涡旋 30s 以充分重选磁珠，常温孵育 5 min，瞬时离心后置于磁力架上，待溶液澄清后，转移上清至新的 1.5 mL Nuclease-free 离心管中；

2.10 转化产物可保存于 -30 ~ -15°C，长期保存需放于 -85 ~ -65°C，同时应避免反复冻融。

注意事项

本试剂盒仅用于科学研究，开始实验前，应仔细阅读此说明书。

为保证下游实验的顺利进行，推荐使用 Qubit 3.0 或 Qubit 4.0 对投入 DNA 进行定量。

Conversion Reagent, Wash Buffer, Desulphonation Buffer 含有挥发性组分，使用完毕后，应及时拧紧瓶盖，避光储存。Conversion Reagent 建议冷藏保存。

确保试剂使用时仍处于有效期内。