

DNA 亚硫酸氢盐修饰和纯化操作步骤

修饰设计：使用 CpGenome™kit 使胞嘧啶转化为尿嘧啶的步骤如下。中等温度碱性 pH 下使 DNA 变性成为单链形式暴露出碱基。**试剂一**，一种包含亚硫酸氢根的钠盐，可使未甲基化的胞嘧啶磺化和水解脱氨，产生一种尿嘧啶磺酸盐中间产物。然后 DNA 在另一种盐（**试剂二**）存在的条件下与一种微粒载体（**试剂三**）结合，并通过重复离心和在 70% 的乙醇中重悬浮脱盐。向尿嘧啶的转化是通过在 90% 的乙醇中反复碱性脱磺酸基作用和脱盐完成的。DNA 最终在 TE 缓冲液中通过加热从载体上洗脱下来。

第一步：试剂准备

(1) 3 M NaOH 原料（用前现配）

把 1g 干 NaOH 片剂溶解在 8.3mL 水中。使用此类腐蚀性碱，注意小心谨慎和实验操作。

(2) 20 mM NaOH/90% EtOH（用前现配）

配制 1mL 该溶液需：900μl 100% 的乙醇，93.4μl 水，6.6μl 3M 的氢氧化钠。

(3) 溶解试剂 I（用前现配）

打开前将试剂瓶加温至室温。对每份待修饰的样本，称取 0.227g DNA 修饰试剂 I 加入 0.571mL 水中。充分涡旋振荡混合。使用该试剂时要小心谨慎，因为它对呼吸系统和皮肤有刺激性。用大约 20μl 3M NaOH 调整 pH 至 5.0，用 pH 试纸检测 pH 值。试剂 I 避光保存以免分解。为了最佳效果，试剂应在配置后立即使用。

(4) 溶解试剂 II

打开前将试剂瓶加温至室温。将 1μl β-巯基乙醇加入 20mL 去离子水中。每份待修饰的 DNA 样本需将 750μl 该溶液加入到 1.35g DNA 修饰 II。充分混合确保完全溶解。过量的试剂可用箔纸包裹的容器、2°C-8°C、避光保存长达 6 周。

第二步：DNA 修饰程序

1、在带有螺旋形瓶盖的 1.5-2.0mL 的微量离心管中：将 7.0μl 3M NaOH 加入到含有 1.0 μg DNA 的 100μl 水中（10ng/μl），混匀。

注意：如果样本含有的 DNA 量不到 1.0μg，就向样本 DNA 中加入 2 μl DNA 修饰试剂 IV 并加水至总体积 100μl。再加入 7.0μl 3M NaOH 并混匀。

2、50°C DNA 孵育 10 分钟（加热块或水浴）

3、加入 550 μl 新鲜配制的 DNA 修饰试剂 I 并涡旋振荡。

4、加热块或水浴 50°C 避光孵育 4-16 小时。

第三步：初步脱盐

1、强力涡旋振荡悬浮 DNA 修饰Ⅲ。用 10x 的 1mL 塑料移液管枪头来回吸排悬液以分散仍存在的凝块。

2、向含 DNA 溶液的管中加入 5 μl 充分悬浮的 DNA 修饰试剂Ⅲ。

3、加入 750 μl DNA 修饰试剂Ⅱ并充分混匀。

4、室温孵育 5-10 分钟。

5、5000 X g 离心 10 秒使 DNA 试剂Ⅲ成颗粒状。（应出现一种白色的小颗粒。）弃去上清。

6、加入 1.0mL 70%的乙醇，涡旋振荡，5000 X g 离心 10 秒，弃去上清。该步骤重复进行，共 3 次。

7、将第三次上清弃去后，离心管高速离心 2 分钟，用塑料移液管枪头移去剩余上清。

第四步：完成 DNA 修饰（脱磺酸基作用），再次脱盐，并洗脱。

1、适量样本加入 50 μl 20 mM NaOH/90% EtOH 溶液。

2、充分涡旋振荡悬浮颗粒，再室温孵育 5 分钟。

3、5000 X g 离心以移除管顶所有成分。加入 1.0mL 90%的乙醇并涡旋振荡洗脱颗粒。再旋转，除去上清。再次重复该步骤。

4、第二次洗脱除去上清后，高速离心样本 3 分钟。

5、用塑料移液管头除去所有剩余上清。试管室温晾干 10-20 分钟（必须除去酒精气味）。

6、加入 TE 缓冲液。注意：加入 TE 的量取决于起始 DNA 的量和目的用途所需的加入浓度。例如，如果加入 25 μl TE，基于完全恢复 1 μg DNA 的最终浓度应为 40ng/ μl 。快速强力涡旋振荡直到颗粒完全悬浮。用手轻打或轻敲内容物至管顶（但是不要离心）。

7、50-60°C 下样本孵育 15 分钟以洗脱 DNA。

8、高速离心 2-3 分钟并用塑料移液管头转移样本（上清）到新管。

9、进行 MSP 或测序，或 -15 ~ -25°C 可保存达 2 个月，-80°C 可保存 6 个月。避免重复融化和解冻；可分量储存。不要将 DNA 存储在自动除霜冰箱。

10、 当从一管中转移已解冻的 DNA 以备用时, 避免将试剂皿转移到 PCR 反应管中。
通常首先将管充分离心, 使残留的试剂皿固体成颗粒状。

三、MSP

(1) 引物合成

运用特别设计的针对甲基化和非甲基化序列的引物, 引物由上海生物工程有限公司合成。见

表1

表1 甲基化引物序列及扩增条件

hMLH1引物	引物序列(5' ~ 3')	产物长度	温度
甲基化(M) 正义	ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC	115 bp	55°C
甲基化(M) 反义	CCTCATCGTAACTACCCGCG	115 bp	55°C
非甲基化(U) 正义	TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT	124 bp	55°C
非甲基化(U) 反义	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	124 bp	55°C

(2) PCR反应条件

a 反应体系: 10×PCR 缓冲液 5μl, 2.5mmol/LdNTP4μl, 甲基化上下游引物和去甲基化上下游引物分别为 1μl, 甲基化模板 DNA5μl, Taq 酶 0.25μl, 加水至总体积 50μl。

b 循环条件:

程序	温度	时间
预变性	95°C	60 sec
变性	95°C	30 sec
退火	55°C	30 sec
终末延伸	72°C	60 sec

共 35 个循环

(3) PCR 产物结果判定: 琼脂糖凝胶电泳

a 甲基化阳性: 甲基化特异性引物扩增出相应长度的片段, 但非甲基化特异性引物未扩增出相应长度的片段, 则判断基因启动子区 5' CpG 岛甲基化阳性。

b 甲基化阴性：非甲基化特异性引物扩增出相应长度的片断，但甲基化特异性引物未扩增出相应长度的片断。则判断基因启动子区 5' CpG 岛甲基化阴性。