



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111269963 B

(45) 授权公告日 2021.07.13

(21) 申请号 201911418010.6

(22) 申请日 2019.12.31

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111269963 A

(43) 申请公布日 2020.06.12

(73) 专利权人 广东凯普生物科技股份有限公司  
地址 521000 广东省潮州市湘桥区经济开发  
发区试验区北片高新区D5-3-3-4小区  
专利权人 广州凯普医药科技有限公司  
潮州凯普生物化学有限公司

(72) 发明人 李菲 葛毅媛 谢龙旭 孔琪  
李真

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限  
公司 44102  
代理人 孙凤侠

(51) Int. Cl.  
C12Q 1/6806 (2018.01)

(56) 对比文件  
CN 107988205 A, 2018.05.04  
CN 109022417 A, 2018.12.18

CN 103205418 A, 2013.07.17

CN 109486809 A, 2019.03.19

CN 109385464 A, 2019.02.26

CN 106755391 A, 2017.05.31

CN 105462960 A, 2016.04.06

US 2013196322 A1, 2013.08.01

US 2008070240 A2, 2008.03.20

WO 2006024541 A2, 2006.03.09

US 2006024676 A1, 2006.02.02

Sam Kint 等. Evaluation of bisulfite kits for DNA methylation profiling in terms of DNA fragmentation and DNA recovery using digital PCR.《PLoS One》. 2018, 第13卷 (第6期),

叶松山 等. DNA甲基化检测中亚硫酸氢盐修饰方法的改进与评价.《中国实验血液学杂志》. 2016, 第24卷 (第2期),

何纯刚 等. 亚硫酸氢盐修饰方法在DNA甲基化检测中的研究进展.《实用医学杂志》. 2014, 第30卷 (第6期),

审查员 颜泉梅

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

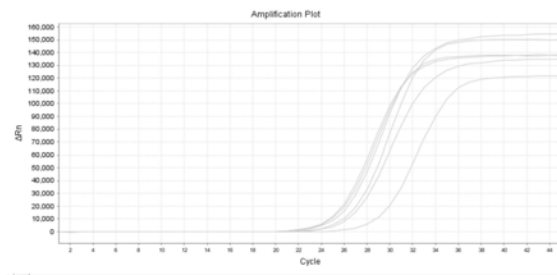
(54) 发明名称

一步法核酸提取转化试剂盒及其使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一步法核酸提取转化试剂盒及其使用方法。所述试剂盒包括裂解缓冲液、蛋白酶K、转化剂、DNA保护剂、结合液、脱磺基液、漂洗液、洗脱液和磁珠悬液。该方法巧妙的将核酸提取和转化过程合二为一，省去了原核酸提取过程中的纯化过程，并结合简便的磁珠法对转化DNA进行纯化，大大节省了时间和材料，能够快速得到高转化率、高质量及高纯度的DNA，通过提取与转化工艺的调控，克服了转化步骤需高温完成的缺陷，可在温和恒定条件下进行转化，有利于甲基化检测的自动化和标准化，有利于后续细胞样本中的DNA的甲基化水平分析。

CN 111269963 B



1. 一种适用于细胞样本的一步法核酸提取转化试剂盒,包括如下组分:裂解缓冲液、蛋白酶K、转化剂、DNA保护剂、结合液、脱磺基液、漂洗液、洗脱液和磁珠悬液,其特征在于,其使用方法包括以下步骤:

(1) 裂解:取细胞样本,加入裂解缓冲液、蛋白酶K、异丙醇和磁珠悬液进行裂解,涡旋振荡,60~70℃孵育15~20min,离心吸去上清液;

(2) 洗脱:加入洗脱液I;

(3) 转化:向步骤(2)所得混合液中加入转化剂和DNA保护剂,于60~68℃孵育45~90min;

(4) 结合:向步骤(3)转化后的溶液中加入结合液,涡旋振荡,再加入磁珠悬液,涡旋振荡混匀后静置10~20min,期间每5min混匀颠倒1次,离心后置于磁性分离器上至溶液澄清,吸去上清液;

(5) 纯化:

(51) 漂洗:向步骤(4)产物中加入漂洗液对磁珠进行洗涤,涡旋振荡,离心,置于磁性分离器上至溶液澄清,吸去上清液;

(52) 脱磺基:向步骤(51)产物中加入脱磺基液,旋涡振荡1~3min,室温静置15~20min,离心,置于磁性分离器上至溶液澄清,吸去上清液;

(53) 漂洗:重复步骤(51);

(54) 干燥:室温静置10~15min待磁珠干燥;

(55) 洗脱:加入洗脱液II,然后56℃、1000~1500rpm孵育10~15min,离心,将其置于磁力架2-5min,所得洗脱液即为纯化的DNA溶液;

其中,所述裂解缓冲液成分为0.03-0.06M的SDS、0.01-0.03M的乙二胺四乙酸二钠、0.02-0.04M的尿素、2-4M的盐酸胍、0.05-0.15M的三羟甲基氨基甲烷;

所述蛋白酶K的浓度为10-30mg/ $\mu$ L;

所述的磁珠悬液为含浓度40-60mg/ml纳米磁性颗粒的水溶液,具体为超顺四氧化三铁,且颗粒外表有表面修饰有羟基的二氧化硅包被;

所述洗脱液I成分为8-12mM的Tris-HCl缓冲液,pH8.0;

所述转化剂为5-7M的亚硫酸氢钠和0.6-0.9M的亚硫酸氢铵,pH在pH5.0~5.5;

所述DNA保护剂为25-35mM的对苯二酚;

所述结合液为6-8M的盐酸胍;

所述的漂洗液为0.05-0.2M的三羟甲基氨基甲烷和70-75%的无水乙醇,pH7~8;

所述的脱磺基液成分为0.4-0.6M的氢氧化钠和40-50%的无水乙醇;

所述洗脱液II成分为0.8-1.5M的Tris-HCl缓冲液和0.4-0.6M EDTA溶液,pH8.0 $\pm$ 0.1。

2. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,

所述裂解缓冲液成分为0.05M的SDS、0.02M的乙二胺四乙酸二钠、0.03M的尿素、3M的盐酸胍、0.1M的三羟甲基氨基甲烷;

所述蛋白酶K的浓度为20mg/ $\mu$ L;

所述的磁珠悬液为含浓度50mg/ml纳米磁性颗粒的水溶液,具体为超顺四氧化三铁,且颗粒外表有表面修饰有羟基的二氧化硅包被;

所述洗脱液I成分为10mM的Tris-HCl缓冲液,pH8.0;

所述转化剂为6M的亚硫酸氢钠和0.8M的亚硫酸氢铵，pH在pH5.0~5.5；

所述DNA保护剂为30mM的对苯二酚；

所述结合液为7M的盐酸胍；

所述的漂洗液为0.1M的三羟甲基氨基甲烷和70%的无水乙醇，pH7~8；

所述的脱磺基液成分为0.5M的氢氧化钠和40%的无水乙醇；

所述洗脱液II成分为1M的Tris-HCl缓冲液和0.5M EDTA溶液，pH8.0±0.1。

3. 根据权利要求1所述试剂盒，其特征在于，步骤(1)中细胞样本、裂解缓冲液、蛋白酶K、异丙醇和磁珠悬液的体积比为300-500:150-250:20-40:150-250:20-40。

4. 根据权利要求1所述试剂盒，其特征在于，步骤(1)中细胞样本、裂解缓冲液、蛋白酶K、异丙醇和磁珠悬液，步骤(2)中洗脱液I，步骤(3)中转化剂和DNA保护剂，步骤(4)中结合液和磁珠悬液，以及步骤(51)中漂洗液，步骤(52)中脱磺基液，步骤(55)中洗脱液II，其体积比为300-500:150-250:20-40:150-250:20-40:40-80:80-120:15-25:500~800:30~40:600~800:400~600:40~80。

5. 根据权利要求1所述试剂盒，其特征在于，步骤(3)中，孵育条件为64℃孵育60min。

6. 根据权利要求1所述试剂盒，其特征在于，步骤(1)中涡旋振荡的时间为20-40s；步骤(1)中离心为1000-1500rpm离心2-5min。

7. 根据权利要求1所述试剂盒，其特征在于，步骤(4)中，涡旋振荡的时间为20~40s；步骤(4)中，涡旋振荡混匀后静置15min。

## 一步法核酸提取转化试剂盒及其使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子生物技术领域。更具体地,涉及一步法核酸提取转化试剂盒及其使用方法。

### 背景技术

[0002] 表观遗传学在肿瘤发生中的作用逐渐受到人们的重视。其主要表现形式有DNA甲基化、组蛋白修饰、基因组印记、母体效应及RNA编辑等。DNA甲基化是表观遗传学的主要表现形式,是调节基因功能的重要机制,与维持细胞正常功能、遗传印记、基因沉默、生物胚胎发育调节及肿瘤的发生密切相关。DNA甲基化并不影响基因序列,但使基因表达受到一定影响,是转录抑制的主要机制。近年来的大量研究表明,DNA异常甲基化与肿瘤的发生、发展、细胞癌变有着密切的联系。

[0003] DNA甲基化是将S-腺苷甲硫氨酸(SAM)供给的甲基通过DNA甲基转移酶(DNMTs)作用添加到胞嘧啶(C)的5号碳原子上,胞嘧啶转化为5-甲基化胞嘧啶。DNA发生甲基化的主要位点是在基因启动子的CpG岛。癌症基因组中CpG岛内局部高甲基化及全局基因组低甲基化现象是肿瘤细胞甲基化水平改变的主要表现。CpG岛局部高甲基化常引起调控细胞周期相关基因等抑癌基因和修复基因表达降低,而全局基因组低甲基化则是由于肿瘤细胞中DNA甲基化酶活性异常增高,或未甲基化的CpG岛局部掩护机制被毁坏,使5-甲基胞嘧啶脱失,激活原癌基因及转座子,增加染色体不稳定性,导致癌症发生。

[0004] 检测DNA甲基化水平的方法很多,其中最常见的方法均基于DNA亚硫酸盐转化技术。通过重亚硫酸盐处理可将DNA中未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶保持不变,从而区分甲基化DNA与非甲基化DNA。再通过MSP、BSP、NGS等方法分析待检的DNA序列的哪些甲基化位点发生了甲基化。

[0005] 目前市面上的大多数的重亚硫酸盐转化试剂盒的转化体系是一种高盐,高温和低pH值的条件,需要经过氢氧化钠变性、亚硫酸盐高温转化及脱磺酸基和脱盐等才能将DNA中未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶。在此过程中,会导致DNA片段化以及发生严重的降解,导致转化后的PCR及后续分析技术的灵敏度降低。如专利CN201610013476.8、CN201010286647.7。并且大多商品化的试剂盒采用离心柱法进行产物纯化,部分试剂盒还需要carrier RNA,需要进行多次洗涤过程,造成DNA损耗高、回收效率下降,且难以实现自动化操作,限制了甲基化水平的研究和检测的应用。另外专利CN201711139273公开一种血浆DNA边提取边转化的方法,但是其同样没有克服需要高温转化这一问题。

### 发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是克服上述现有技术的缺陷和不足,旨在开发一种将核酸提取过程和转化过程合二为一的高效、快速的实现核酸提取和转化的试剂盒。本发明巧妙的将核酸提取和转化过程合二为一,省去了原核酸提取过程中的纯化过程,并结合简便的磁珠法对转化DNA进行纯化,大大节省了时间和材料,能够快速得到高转化率、高质量及

高纯度的DNA,通过提取与转化工艺的调控,克服了转化步骤需高温完成的缺陷,可在温和恒定反应条件下进行转化,为提高DNA甲基化分析准确性提供有效方法。

[0007] 本发明的目的是提供一种一步法核酸提取转化试剂盒及其使用方法。

[0008] 本发明另一目的是提供所述试剂盒的使用方法。

[0009] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0010] 一步法核酸提取转化试剂盒,包括如下组分:裂解缓冲液、蛋白酶K、转化剂、DNA保护剂、结合液、脱磺基液、漂洗液、洗脱液和磁珠悬液;

[0011] 其中,所述裂解缓冲液成分为0.03-0.06M的SDS、0.01-0.03M的乙二胺四乙酸二钠、0.02-0.04M的尿素、2-4M的盐酸胍、0.05-0.15M的三羟甲基氨基甲烷;

[0012] 所述蛋白酶K的浓度为10-30mg/ $\mu$ L;

[0013] 所述的磁珠悬液为含浓度40-60mg/ml纳米磁性颗粒的水溶液,具体为超顺四氧化三铁,且颗粒外表有表面修饰有羟基的二氧化硅包被;

[0014] 所述洗脱液I成分为8-12mM的Tris-HCl缓冲液,pH8.0;

[0015] 所述转化剂为5-7M的亚硫酸氢钠和0.6-0.9M的亚硫酸氢铵,pH在pH5.0~5.5;

[0016] 所述DNA保护剂为25-35mM的对苯二酚;

[0017] 所述结合液为6-8M的盐酸胍;

[0018] 所述的漂洗液为0.05-0.2M的三羟甲基氨基甲烷和70-75%的无水乙醇,pH7~8;

[0019] 所述的脱磺基液成分为0.4-0.6M的氢氧化钠和40-50%的无水乙醇;

[0020] 所述洗脱液II成分为0.8-1.5M的Tris-HCl缓冲液和0.4-0.6M EDTA溶液,pH8.0 $\pm$ 0.1。

[0021] 优选地,所述试剂盒中个组分的组成如下:

[0022] 所述裂解缓冲液成分为0.05M的SDS、0.02M的乙二胺四乙酸二钠、0.03M的尿素、3M的盐酸胍、0.1M的三羟甲基氨基甲烷;

[0023] 所述蛋白酶K的浓度为20mg/ $\mu$ L;

[0024] 所述的磁珠悬液为含浓度50mg/ml纳米磁性颗粒的水溶液,具体为超顺四氧化三铁,且颗粒外表有表面修饰有羟基的二氧化硅包被;

[0025] 所述洗脱液I成分为10mM的Tris-HCl缓冲液,pH8.0;

[0026] 所述转化剂为6M的亚硫酸氢钠和0.8M的亚硫酸氢铵,pH在pH5.0~5.5;

[0027] 所述DNA保护剂为30mM的对苯二酚;

[0028] 所述结合液为7M的盐酸胍;

[0029] 所述的漂洗液为0.1M的三羟甲基氨基甲烷和70%的无水乙醇,pH7~8;

[0030] 所述的脱磺基液成分为0.5M的氢氧化钠和40%的无水乙醇;

[0031] 所述洗脱液II成分为1M的Tris-HCl缓冲液和0.5M EDTA溶液,pH8.0 $\pm$ 0.1。

[0032] 具体地,本发明上述试剂盒尤其适用于细胞样本的核酸提取转化。

[0033] 另外,优选地,所述试剂盒的使用方法包括以下步骤:

[0034] (1) 裂解:取细胞样本,加入裂解缓冲液、蛋白酶K、异丙醇和磁珠悬液进行裂解,涡旋振荡,60~70 $^{\circ}$ C孵育15~20min,离心吸去上清液;

[0035] (2) 洗脱:加入洗脱液I;

[0036] (3) 转化:向步骤(2)所得混合液中加入转化剂和DNA保护剂,于60~68 $^{\circ}$ C孵育45~

90min;

[0037] (4) 结合:向步骤(3)转化后的溶液中加入结合液,涡旋振荡,再加入磁珠悬液,涡旋振荡混匀后静置10~20min,期间每5min混匀颠倒1次,离心后置于磁性分离器上至溶液澄清,吸去上清液;

[0038] (5) 纯化:

[0039] (51) 漂洗:向步骤(4)产物中加入漂洗液对磁珠进行洗涤,涡旋振荡,离心,置于磁性分离器上至溶液澄清,吸去上清液;

[0040] (52) 脱磺基:向步骤(51)产物中加入脱磺基液,旋涡振荡1~3min,室温静置15~20min,离心,置于磁性分离器上至溶液澄清,吸去上清液;

[0041] (53) 漂洗:重复步骤(51);

[0042] (54) 干燥:室温静置10~15min待磁珠干燥;

[0043] (55) 洗脱:加入洗脱液II,然后56℃、1000~1500rpm孵育10~15min,离心,将其置于磁力架2-5min,所得洗脱液即为纯化的DNA溶液。

[0044] 其中,优选地,步骤(1)中细胞样本、裂解缓冲液、蛋白酶K、异丙醇和磁珠悬液的体积比为300-500:150-250:20-40:150-250:20-40。

[0045] 更优选地,步骤(1)中细胞样本、裂解缓冲液、蛋白酶K、异丙醇和磁珠悬液的体积比为400:200:30:200:30。

[0046] 优选地,步骤(1)中细胞样本、裂解缓冲液、蛋白酶K、异丙醇和磁珠悬液,步骤(2)中洗脱液I,步骤(3)中转化剂和DNA保护剂,步骤(4)中结合液和磁珠悬液,以及步骤(51)中漂洗液,步骤(52)中脱磺基液,步骤(55)中洗脱液II,其体积比为300-500:150-250:20-40:150-250:20-40:40-80:80-120:15-25:500~800:30~40:600~800:400~600:40~80。

[0047] 更优选地,步骤(1)中细胞样本、裂解缓冲液、蛋白酶K、异丙醇和磁珠悬液,步骤(2)中洗脱液I,步骤(3)中转化剂和DNA保护剂,步骤(4)中结合液和磁珠悬液,以及步骤(51)中漂洗液,步骤(52)中脱磺基液,步骤(55)中洗脱液II,其体积比为400:200:30:200:30:40:100:20:600:35:700:500:60。

[0048] 优选地,步骤(3)中,孵育条件为64℃孵育60min。

[0049] 优选地,步骤(1)中涡旋振荡的时间为20-40s;步骤(1)中离心为1000-1500rpm离心2-5min。

[0050] 更优选地,步骤(1)中涡旋振荡的时间为20s。

[0051] 优选地,步骤(4)中,涡旋振荡的时间为20~40s;步骤(4)中,涡旋振荡混匀后静置15min。

[0052] 优选地,步骤(51)和(52)中涡旋振荡时间为1~3min。

[0053] 优选地,步骤(55)中离心后的产物置于磁力架3min。

[0054] 本发明上述方法所得到的DNA可用于甲基化检测分析。

[0055] 本发明具有以下有益效果:

[0056] (1) 本发明巧妙的将提取和转化的过程合二为一,细胞中的DNA裂解释放后就开始转化,不需要进行提取后纯化的过程,降低了DNA的损失。同时结合简便的磁珠处理,显著减少后续转化试剂的使用量。

[0057] (2) 本发明设计的甲基化转化试剂,不同于先有的转化方法,不需要对核酸进行前

期的氢氧化钠的变性处理,在60~68℃温和恒定反应条件下进行,避免DNA在高温强碱环境中片段化而降解,提高了转化后DNA质量,提高了核酸的回收率。

[0058] (3) 本发明设计的磁珠法适用于DNA甲基化转化处理后的纯化,增加了转化后单链DNA与磁珠的结合能力。利用高盐低pH进行核酸的分离纯化,再通过低盐高pH进行洗脱,具有高纯度、高回收率的特点。

[0059] (4) 本发明设计的DNA提取、亚硫酸盐转化及纯化的方法,将核酸提取到恒温转化以及磁珠法纯化有效结合,简化了操作步骤,大大减少了时间和材料,降低的DNA的损失,有利于甲基化研究的自动化和标准化。

## 附图说明

[0060] 图1是实施例1中样本的BisACTB检测曲线图。

[0061] 图2是实施例1中样本的ACTB检测曲线图。

[0062] 图3是对比例1中本发明所述的磁珠法核酸提取转化DNA的BisACTB检测曲线图和市售的核酸提取试剂盒、核酸甲基化转化试剂盒转化的DNA的BisACTB检测曲线图。

## 具体实施方式

[0063] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0064] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0065] 实施例1试剂盒

[0066] 一步法核酸提取转化试剂盒,包括如下组分:裂解缓冲液、蛋白酶K、转化剂、DNA保护剂、结合液、脱磺基液、漂洗液、洗脱液和磁珠悬液。

[0067] 其中,所述裂解缓冲液成分为0.05M的SDS、0.02M的乙二胺四乙酸二钠、0.03M的尿素、3M的盐酸胍、0.1M的三羟甲基氨基甲烷。

[0068] 所述的裂解缓冲液的配制方法为:精密称取SDS、乙二胺四乙酸二钠、尿素、盐酸胍、三羟甲基氨基甲烷,加入去离子水溶解,用浓盐酸调节混合液的pH至7~8,最后用去离子水定容至1000mL。

[0069] 所述蛋白酶K的浓度为20mg/ $\mu$ L。

[0070] 所述的磁珠悬液为含浓度50mg/ml纳米磁性颗粒的水溶液,具体为超顺四氧化三铁,且颗粒外表有表面修饰有羟基的二氧化硅包被。

[0071] 所述洗脱液I成分为10mM的Tris-HCl缓冲液,pH8.0。

[0072] 所述转化剂为6M的亚硫酸氢钠和0.8M的亚硫酸氢铵,pH在pH5.0~5.5。

[0073] 所述的转化剂的配制方法为:精密称取亚硫酸氢钠、亚硫酸氢铵,溶于去离子水,氢氧化钠调节pH为5.0~5.5,最后用去离子水定容至1000mL。

[0074] 所述DNA保护剂为30mM的对苯二酚。配制方法为:精密称取对苯二酚,加去离子水溶解,最后定容至1000mL。

[0075] 所述结合液为7M的盐酸胍。配制方法为:称取盐酸胍500~800g,加去离子水溶解,最后定容至1000mL。

- [0076] 所述的漂洗液为0.1M的三羟甲基氨基甲烷和70%的无水乙醇,pH7~8。
- [0077] 所述的漂洗液的配制方法为:精密称取无水乙醇、三羟甲基氨基甲烷,溶解于去离子水,用浓盐酸调节pH至7~8,最后用去离子水定容至1000mL。
- [0078] 所述的脱磺基液成分为0.5M的氢氧化钠和40%的无水乙醇。
- [0079] 所述的脱磺基液的配制方法为:精密称取无水乙醇、氢氧化钠,溶解于去离子水,最后用去离子水定容至1000mL。
- [0080] 所述洗脱液II成分为1M的Tris-HCl缓冲液和0.5M EDTA溶液,pH8.0±0.1。
- [0081] 实施例2试剂盒使用方法
- [0082] 以1份HeLa细胞系样本和5份宫颈脱落细胞样本,进行提取、转化及纯化。
- [0083] 具体实施步骤如下:
- [0084] (1)裂解:400μLHeLa细胞系样本中加入200μL裂解缓冲液、30μL蛋白酶K,200μL异丙醇和30μL的磁珠悬液。涡旋振荡20s,将离心管置于70℃恒温振荡孵育器中20min。之后1500rpm离心3min,置于磁性分离器上至溶液澄清,吸去上清液。
- [0085] (2)洗脱:离心管移至无磁力架上;加入40μL洗脱液I。
- [0086] (3)转化:向步骤(2)所得混合液中加入100μL的转化剂和20μL的DNA保护剂。将离心管置于64℃恒温振荡孵育器中60min。
- [0087] (4)结合:将步骤(3)转化后的溶液转移至1.5mL离心管,加入结合液600μL,涡旋振荡20s,再加入磁珠悬液35μL,涡旋振荡混匀后静置15min,期间每5min混匀颠倒1次。之后离心管短暂离心,置于磁性分离器上至溶液澄清,吸去上清液。
- [0088] (5)纯化:
- [0089] (51)漂洗:将离心管从磁力架取下,加入700μL的漂洗液对磁珠进行洗涤,涡旋振荡1~3min,之后离心管短暂离心,置于磁性分离器上至溶液澄清,吸去上清液。
- [0090] (52)脱磺基:将离心管从磁力架取下,加入500μL的脱磺基液,旋涡振荡1~3min,室温静置15~20min。之后离心管短暂离心,置于磁性分离器上至溶液澄清,吸去上清液。
- [0091] (53)漂洗:重复步骤(51)漂洗磁珠。之后离心管短暂离心,置于磁性分离器上至溶液澄清,尽量去除残留液体。
- [0092] (54)干燥:将离心管置于磁力架上,室温静置10~15min待磁珠干燥(打开离心管管盖,不要震荡);
- [0093] (55)洗脱:步骤(54)离心管加入60μL洗脱液II;盖好离心管;涡旋混匀重悬磁珠;将离心管放入恒温振荡孵育器中,56℃,1000~1500rpm,孵育10~15min;之后离心管短暂离心,将其置于磁力架3min,将洗脱液转移至新的1.5mL离心管中,放置于-20℃保存备用。
- [0094] 实施例3
- [0095] 为验证实施例2纯化后DNA的质量,需要通过实时荧光定量PCR(TaqMan探针)法进行检测。
- [0096] 选择人的内参基因ACTB作为检测对象,根据未转化的DNA的序列,设计内参基因ACTB的正向引物ACTB-F、反向引物ACTB-R和探针ACTB-P。同时根据重亚硫酸盐转化后的内参基因(bisACTB)序列,设计正向引物ACT-F、反向引物ACT-R和探针ACT-P。引物探针序列如表1和表2所示:
- [0097] 表1 ACTB引物和探针序列



[0098]	名称	序列
	ACTB-F	CGAGCACGGCATCGTCACCAA

[0099]	ACTB-R	AAGAGGTAGCGGGCCACTCACC
	ACTB-P	AATCTGGCACCACACCTTC

[0100] 表2 bisACTB引物和探针序列

[0101]	名称	序列
	ACT-F	ATGAGTTGCGTGTGGTTTTTC
	ACT-R	CGACCACCAAAAAAAAAATAACG
	ACT-P	TATTTGCGTGTGTGATCGAGGTTT

[0102] 反应体系和反应程序如表3和表4所示：

[0103] 表3 反应体系

[0104]	组分	体积
	2×PCR Mix	10μL
	F/R/P	各1μL
	BisDNA	2μL
	灭菌注射用水	5μL
	总体积	20μL

[0105] 表4 PCR反应程序

步骤	描述	温度	时间	循环数	荧光信号收集	
[0106]	阶段 1	预变性	95℃	10min	1	
	阶段 2	变性	95℃	20s	45 cycle	
		退火	58℃	15s		
		延伸	72℃	15s		收集荧光
	阶段 3	最终延伸	72℃	5min	1	

[0107] 以实施例2获得的bisDNA为模板，分别采用ACTB和BisACTB的引物探针，按照上述的反应体系和反应程序进行甲基化检测。检测结果如图1-2和表5。

[0108] 表5 荧光定量结果

模板	检测序列	Ct 值
[0109]	ACTB	Undet
	BisACTB	29.95
	ACTB	Undet

[0110]		BisACTB	25.84
	宫颈脱落细胞样本 2 获得的 BisDNA	ACTB	Undet
		BisACTB	26.02
	宫颈脱落细胞样本 3 获得的 BisDNA	ACTB	Undet
		BisACTB	27.07
	宫颈脱落细胞样本 4 获得的 BisDNA	ACTB	Undet
BisACTB		26.32	
宫颈脱落细胞样本 5 获得的 BisDNA	ACTB	Undet	
	BisACTB	27.42	

[0111] 对比例1

[0112] 用广州凯普生物的提取和纯化试剂盒(离心柱法BSPC-D-M型)提取宫颈脱落细胞DNA,再用Zymo Research公司的EZ DNA Methylation-Gold™ kit(货号D5005)试剂盒转化提取的DNA。

[0113] 实验选取10例宫颈脱落细胞样本,分别采用实施例2的方法进行核酸提取转化,以及对比例1中的市售核酸提取试剂盒(广州凯普生物)和核酸甲基化转化试剂盒(EZ DNA Methylation-Gold™ kit)进行处理,具体步骤严格按照试剂盒说明书操作。

[0114] 经本发明和市售产品转化的核酸经微量紫外分光光度计测定浓度后统一稀释到20ng/μL,然后对转化后DNA的BisACTB基因进行荧光定量PCR检测,检测方法同实施例3。

[0115] 结果如图3所示,所有样本都得到了标准的S型扩增曲线,两组的检测结果统计如表6所示。

[0116] 表6

模板	检测 BisACTB 的 Ct 值	
	本发明	市售试剂盒(广州凯普生物、Zymo Research)
宫颈脱落细胞样本 1 获得的 BisDNA	27.66	27.98
宫颈脱落细胞样本 2 获得的 BisDNA	27.28	27.3

[0118]	宫颈脱落细胞样本 3 获得的 BisDNA	27.77	27.85
	宫颈脱落细胞样本 4 获得的 BisDNA	27.14	27.29
	宫颈脱落细胞样本 5 获得的 BisDNA	27.85	27.81
	宫颈脱落细胞样本 6 获得的 BisDNA	26.37	26.58
	宫颈脱落细胞样本 7 获得的 BisDNA	27.79	27.94
	宫颈脱落细胞样本 8 获得的 BisDNA	26.57	26.59
	宫颈脱落细胞样本 9 获得的 BisDNA	27.34	27.4
	宫颈脱落细胞样本 10 获得的 BisDNA	28.87	28.78

[0119] 通过实施例和对比例1的对比,从检测结果来看结果相当,但本发明的试剂能将提取和转化过程合二为一,避免了提取后纯化的过程,而且本发明的试剂能在恒温作用下进行转化,结合磁珠法进行纯化,降低了转化后DNA的损失,该方法具有操作方便、快捷、提取效率高等优点,有利于甲基化研究的自动化和标准化。

[0120] 对比例2

[0121] 参照实施例2的方法对宫颈脱落细胞样本1进行核酸提取、转化及纯化,不同之处在于:改变转化剂的配方:用亚硫酸氢钠全部替换亚硫酸氢铵,或增加加入0.2M尿素。各组分如表7。

[0122] 表7 转化剂

[0123]	组别	成分
	实施例2	亚硫酸氢钠+亚硫酸氢铵
	对照组1	亚硫酸氢钠
	对照组2	亚硫酸氢钠+亚硫酸氢铵+尿素

[0124] 然后按照实施例3的方法分别进行检测。检测结果如表8。

[0125] 表8 荧光定量结果

	模板	检测序列	Ct 值
[0126]	实施例 2	ACTB	Undet
		BisACTB	25.84
	对照组 1	ACTB	Undet
		BisACTB	27.12
[0127]	对照组 2	ACTB	Undet
		BisACTB	28.36

[0128] 对比例3

[0129] 参照实施例2的方法对宫颈脱落细胞样本1进行核酸提取、转化及纯化,不同之处在于:改变保护剂的配方:分别用二硫苏糖醇、四氢呋喃糠醇、四氢嘧啶替换对苯二酚。各组

成分如表9。

[0130] 表9 保护剂

[0131]	组别	成分
	实施例2	对苯二酚
	对照组1	二硫苏糖醇
	对照组2	四氢呋喃糠醇
	对照组3	四氢嘧啶

[0132] 然后按照实施例3的方法进行检测。检测结果如表10。

[0133] 表10 荧光定量结果

	模板	检测序列	Ct 值
[0134]	实施例 2	ACTB	Undet
		BisACTB	25.84
	对照组 1	ACTB	Undet
		BisACTB	28.09
	对照组 2	ACTB	Undet
		BisACTB	28.67
对照组 3	ACTB	Undet	
	BisACTB	27.99	

[0135] 对比例4

[0136] 参照实施例2的方法对宫颈脱落细胞样本1进行核酸提取、转化及纯化,不同之处在于:步骤(1)的裂解中,不加磁珠悬液。

[0137] 然后按照实施例3的方法进行检测。检测结果如表11。

[0138] 表11 荧光定量结果

	模板	检测序列	Ct 值
[0139]	实施例 2	ACTB	Undet
		BisACTB	25.84
	对照组 (步骤(1)的裂解中, 不加磁珠悬液)	ACTB	34.08
		BisACTB	Undet

[0140] 对比例5

[0141] 参照实施例2的方法对宫颈脱落细胞样本1进行核酸提取、转化及纯化,不同之处在于:省去步骤(2)洗脱。

[0142] 然后按照实施例3的方法进行检测。检测结果如表12。

[0143] 表12 荧光定量结果

	模板	检测序列	Ct 值
[0144]	实施例 2	ACTB	Undet
		BisACTB	25.84
	对照组 (省去步骤 (2) 洗脱)	ACTB	Undet
		BisACTB	Undet

[0145] 对比例6

[0146] 参照实施例2的方法对宫颈脱落细胞样本1进行核酸提取、转化及纯化,不同之处在于:省去步骤(3)中的DNA保护剂。

[0147] 然后按照实施例3的方法进行检测。检测结果如表13。

[0148] 表13 荧光定量结果

	模板	检测序列	Ct 值
[0149]	实施例 2	ACTB	Undet
		BisACTB	25.84
	对照组 (省去步骤 (3) 中的 DNA 保护剂)	ACTB	Undet
		BisACTB	30.27

[0150] 对比例7

[0151] 参照实施例2的方法对宫颈脱落细胞样本1进行核酸提取、转化及纯化,不同之处在于:省去步骤(53)的重复漂洗。

[0152] 然后按照实施例3的方法进行检测。检测结果如表14。

[0153] 表14 荧光定量结果

	模板	检测序列	Ct 值
[0154]	实施例 2	ACTB	Undet
		BisACTB	25.84
	对照组 (省去步骤 (53) 的重复漂洗)	ACTB	Undet
		BisACTB	27.19

[0155] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

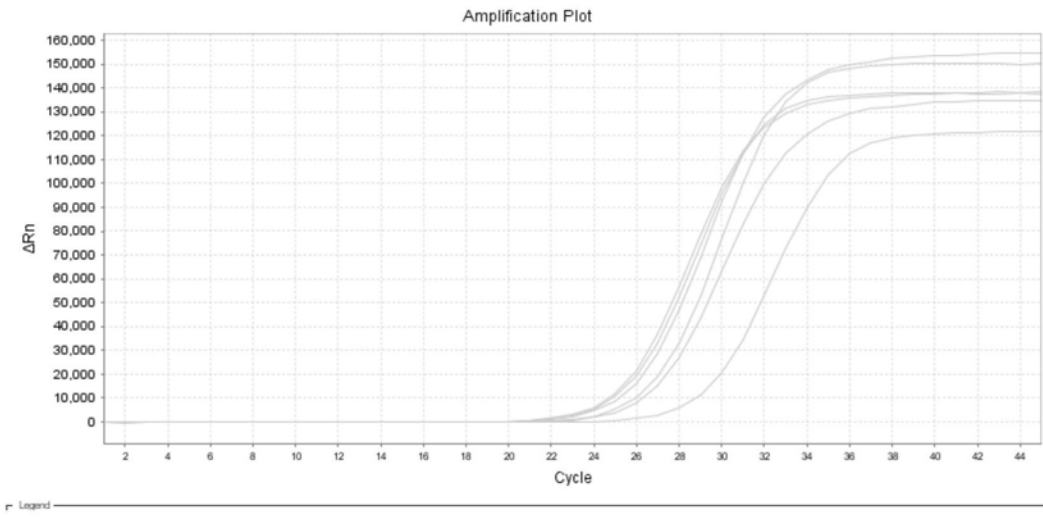


图1

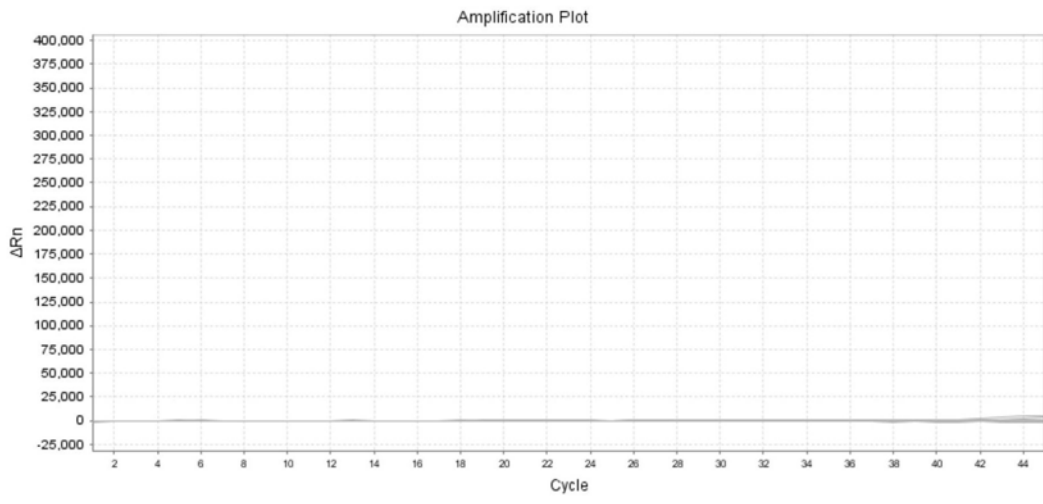


图2

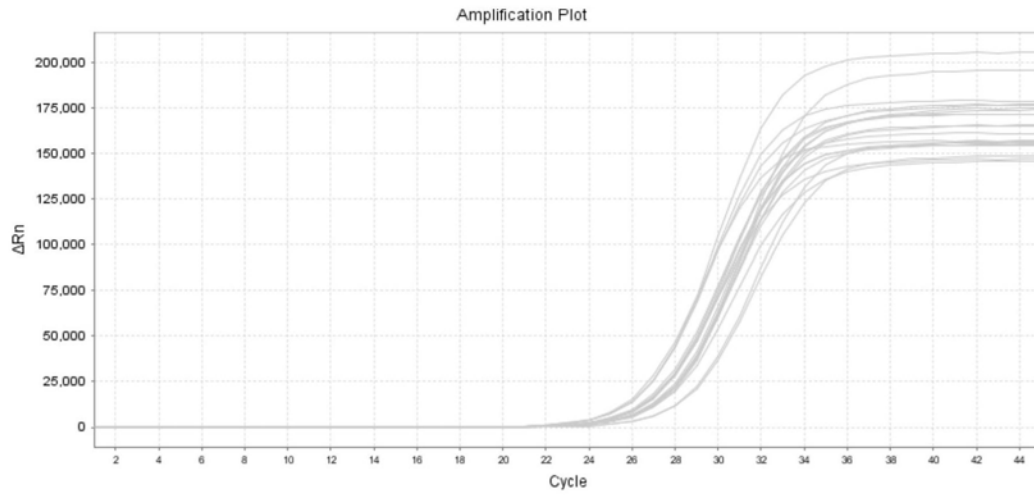


图3