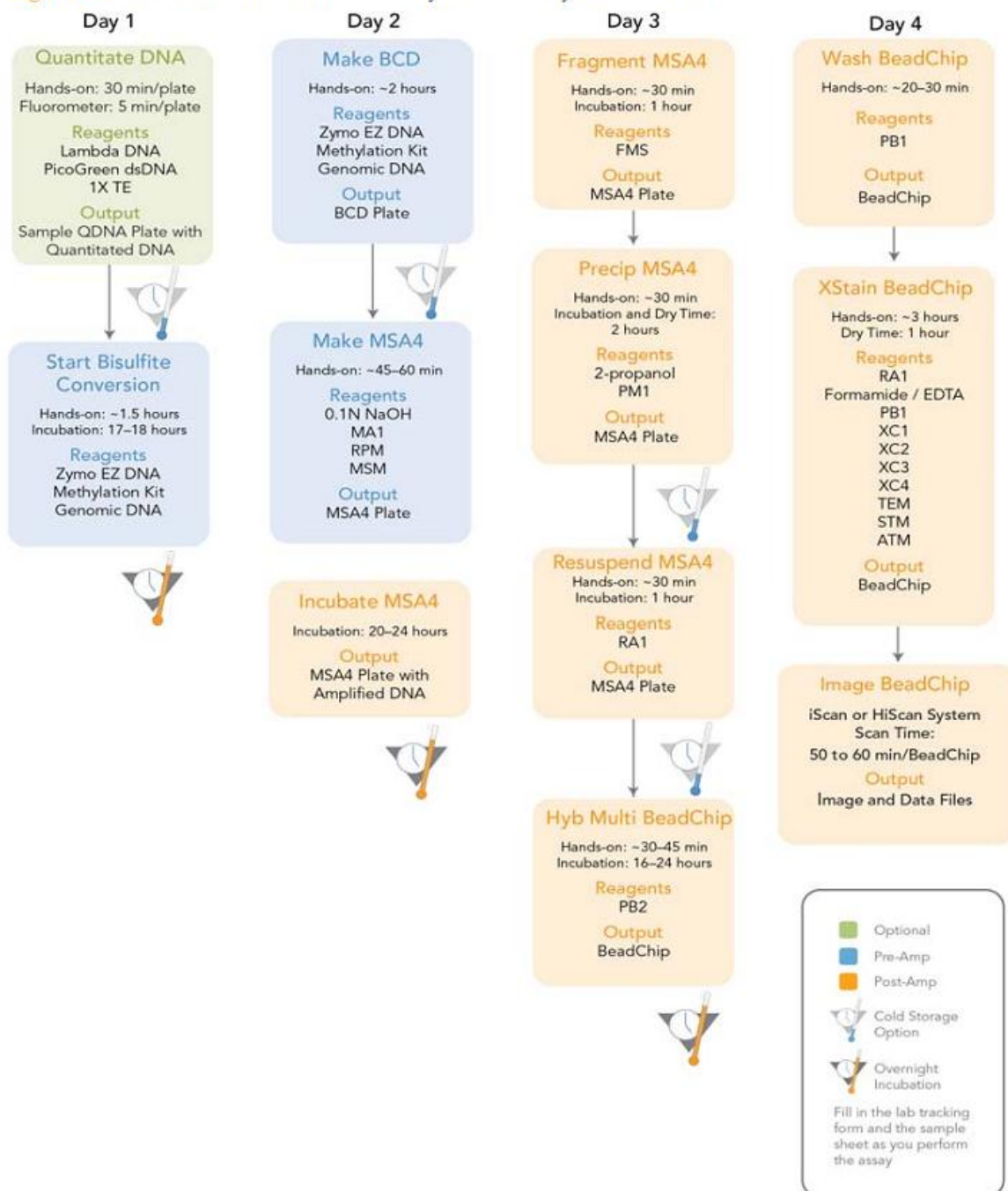


Infinium HD Methylation450K Assay Manual

Figure 12 Illumina Infinium HD Methylation Assay Manual Workflow



Part# 15019519 Rev. A

第一天: (Pre-AMP)

亚硫酸盐处理 gDNA:

试剂: Zymo EZ DNA Methylation kit (includes bisulfate-conversion reagent, dilution buffer, desulphonation buffer, elution buffer), 样品基因组 DNA(gDNA, ≥ 500 ng)

仪器: Thermocycler, 96 孔 skirted microplate(0.2 ml)

准备工作:

- [] 1. 根据试剂盒要求准备 conversion reagent, 注意避光, 现配现用
- [] 2. 根据试剂盒要求准备 wash buffer

实验操作:

- [] 1. 将每个新 96 孔 skirted microplate(0.2 ml)粘贴 BCD barcode label 做标记
- [] 2. 根据 EZ DNA Methylation Kit 要求, 将 gDNA 变性, 然后加入 conversion reagent
- [] 3. Thermocycler 中过夜孵育, 以下条件, 16 个循环:
 - 95°C --- 30 秒
 - 50°C --- 1 小时
 - 4°C --- for ever
- [] 4. 循环结束后, Thermocycler 温度保持在 4°C, gDNA 放置于其中待用

第二天: (Pre-AMP)

制备 BCD:

试剂: Zymo EZ DNA Methylation kit (includes bisulfate-conversion reagent, dilution buffer, desulphonation buffer, elution buffer)

仪器: Thermocycler, 96 孔 skirted microplate(0.2 ml)

实验操作:

- [] 1. 根据试剂盒要求
 - [] a. 洗涤去除 conversion reagent
 - [] b. 室温下 desulphonation buffer 中孵育 15 min
 - [] c. 洗涤去除 desulphonation buffer
 - [] d. 加入 elution buffer
- [] 2. 离心洗脱 gDNA
- [] 3. 将亚硫酸盐处理的 gDNA 转移入 BCD plate 中
- [] 4. 封闭的 BCD 冻存待用, -15° ~ -25°

制备 MSA4: 碱变性-基因组全扩增

试剂: NaOH, MA1, RPM, MSM, 亚硫酸盐处理的 gDNA

仪器: 杂交炉, 新 MIDI plate, 振荡器, 室温离心机

准备工作:

- [] 1. 配置 **1 M** NaOH, 分装后 **-20°** 冻存待用。
每次使用前解冻, 10 倍稀释为 **0.1 M** NaOH
- [] 2. 打开杂交炉, 预热至 **37°**
- [] 3. 取出 MA1, RPM, MSM 解冻, 融为液体后 **280 xg** 离心待用;
取出亚硫酸盐处理的 gDNA 解冻

实验操作:

- [] 1. 将新 MIDI plate 粘贴 MSA4 barcode label 做标记
- [] 2. **20 µl** MA1 加入 MSA4 plate wells
- [] 3. **4 µl** 亚硫酸盐处理的 DNA sample 加入 MSA4 plate wells, 在 lab tracking form 上记录 MSA4 plate wells 中对应的样品 ID
- [] 4. **4 µl 0.1M** NaOH 加入 MSA4 plate wells, 盖上 96 孔板 cap mat (注意覆盖时的字母方向正确, 盖紧, 防止飞溅挥发和污染)
- [] 5. 振荡器上 **1600 rpm**, 混匀 **1 min**; 离心机中 **280 xg** 离心 **1 min**
- [] 6. 室温孵育, 静置 **10 min**
- [] 7. **68 µl** RPM 加入 MSA4 plate wells
- [] 8. **75 µl** MSM 加入 MSA4 plate wells
- [] 9. 重新盖上 cap mat
- [] 10. 将盖好的 MSA4 上下颠倒翻转至少 **10** 次, 充分混匀
- [] 11. 离心机中 **280 xg** 离心 **1 min**
- [] 11. 杂交炉中孵育, **37° 22 小时过夜 (20-24 hours)**

第二天: (Post -AMP)

断裂-沉淀-重悬-杂交:

试剂: FMS, PM1, 100% 异丙醇, RA1, PB2, 100% 乙醇, XC4

仪器: 杂交炉, 振荡器, 室温离心机, heat block, 4° 离心机, tube rack, heat sealer, foil heat seal 金属箔, 芯片, Hyb Chambers 杂交盒, Hyb Chamber gaskets 杂交盒衬垫, Hyb Chamber inserts

断裂

一. 准备工作:

- [] 1. 打开 heat block, 预热至 **37°**
- [] 2. 取出 FMS, RA1 (晶体难溶解)解冻, 融为液体后 **280 xg** 离心待用

实验操作：

- [] 1. 取出 MSA4, **50 xg** 离心 **1 min**
- [] 2. **50 µl** FMS 加入 MSA4 plate wells, 重新盖上 cap mat
- [] 3. 振荡器上 **1600 rpm**, 混匀 **1 min**; 离心机中 **50 xg** 离心 **1 min**
- [] 4. **37°** heat block 中孵育, **1 小时**
- [] 5. 以下步骤选择
 - (1) 继续实验
 - (2) 封闭的 MSA4 冻存待用, **-15° ~ -25°**

沉淀

二. 准备工作：

- [] 1. 打开 heat block, 预热至 **37°** ; 准备好 **4°** 离心机待用
- [] 2. 取出 PM1 置于室温--**280 xg** 离心待用, 取出 **100%** 异丙醇
- [] 3. 若是冻存的 MSA4, 则取出解冻, **50 xg** 离心

实验操作：

- [] 1. 掀开 MSA4 的 cap mat, **100 µl** PM1 加入 MSA4 plate wells, 重新盖上
- [] 2. 振荡器上 **1600 rpm**, 混匀 **1 min**
- [] 3. **37°** heat block 中孵育, **5 min**
- [] 4. 离心机中 **50 xg** 离心 **1 min**
- [] 5. **300 µl** 100%异丙醇加入 MSA4 plate wells, 重新盖上新的干燥 cap mat
- [] 6. 将盖好的 MSA4 上下颠倒翻转至少 **10** 次, 充分混匀
- [] 7. **4°** 冰箱孵育 **30 min**
- [] 8. **4°** 离心机中 **3,000 xg** 离心 **20 min**; 然后立即将 MSA4 取出离心机, 弃除 cap mat, 立即翻转去除上清液, 水平倒扣在吸水纸上方轻叩至没有水印, 时间约 **1 min** 即可, 不要使蓝色沉淀移动, MSA4 一直保持倒扣状态。
(若是离心结束后有时间延误未能及时去除上清, 则需要重新离心 **20 min**)
- [] 9. MSA4 保持倒扣状态放置于 tube rack 上, **1 小时** 空气干燥
- [] 10. 以下步骤选择
 - (1) 继续实验
 - (2) 封闭好 MSA4 冻存待用, **-15° ~ -25°**

重悬

三. 准备工作：

- [] 1. 打开杂交炉, 预热至 **48°** ; 打开 heat sealer
- [] 2. 观察 RA1 是否透明, 没有晶体存在

实验操作：

- [] 1. **46 µl** RA1 加入 MSA4 plate wells, RA1 使用完毕即冻存
- [] 2. 金属箔覆盖 MSA4 后, heat sealer 下作用 **5 秒**, 然后将 MSA4 上下顺序

改变后再作用 5 秒，继而将金属箔稍微掀起验证封口的效果

- [] 3. 将封口的 MSA4 放入 **48°** 杂交炉，孵育 **1 小时**
- [] 4. 振荡器上 **1800 rpm**，混匀 **1 min**；离心机中 **280 xg** 离心 **1 min**
若是冻存的 MSA4，则需要反复振荡离心直到蓝色沉淀彻底重悬
- [] 5. 以下步骤选择
 - (1) 继续实验
 - (2) 封闭的 MSA4 冻存待用，**-15° ~ -25°**，若要超过 24 小时使用，则 **-80°** 冻存

杂交

三. 准备工作：

- [] 1. 打开 heat block，预热至 **95°**；打开杂交炉，预热至 **48°**，调节转速为 **5**
- [] 2. 准备杂交盒，杂交盒衬垫，Hyb Chamber inserts

实验操作：

- [] 1. 打开杂交盒，杂交盒衬垫放入杂交盒中，**400 µl PB2** 加入杂交盒上下小凹槽中(上下小凹槽对应一张芯片)，马上关闭杂交盒防止挥发，按照对角线方向扣住，室温放置待用
- [] 2. 重悬后封口的 MSA4，放入 **95°** heat block 中变性 **20 min**
- [] 3. 取出芯片放置室温，不要打开
- [] 4. 变性后的 MSA4 室温冷却 **30 min**，然后离心机中 **280 xg** 离心 **1 min**
- [] 5. 将芯片在盒中取出，小心将其取出包装，不能碰到芯片加样品的位置，对应 barcode 位置放于 Hyb Chamber inserts 中
- [] 6. **15 µl DNA** 样品按照芯片样品区顺序加入芯片加样区，注意缓缓流入过程中不要产生气泡，同时记录样品和芯片对应号
- [] 7. 将带有芯片的 Hyb Chamber inserts 对应 barcode 位置放于杂交盒中，关闭杂交盒
- [] 8. 杂交炉中孵育，**48° 18 小时过夜 (16-24 hours)**
- [] 9. **330 ml 100% 乙醇**加入 XC4 中，剧烈混匀 15 秒，室温过夜待用

第三天：(Post -AMP)

洗涤-延伸-染色-扫描：

试剂：PB1, RA1, XC1, XC2, TEM, XC3, STM, ATM, XC4, 95%甲酰胺/1 mM EDTA, (Alconox Powder Detergent, 乙醇)

仪器：Multi-Sample BeadChip Alignment Fixture, Te-Flow, Flow-Through Chambers (with black frames, spacers, glass back plates, and clamps), Wash Dish, Wash Rack, staining rack, tube rack, 真空泵, Kimwipes, iScan

一. 准备工作：

- [] 1. 在杂交炉中取出杂交盒，不要打开，杂交盒室温冷却 **25 min**

- [] 2. **200 ml** PB1 加入 1 个 Wash Dish (共 2 个)
- [] 3. **150 ml** PB1 充满 BeadChip Alignment Fixture
- [] 4. 准备 clear plastic spacers 和 glass back plates, 安装好 Wash Rack
- [] 5. 取出 RA1, XC1, XC2, TEM, STM, ATM 解冻, **3000 xg** 离心 **1 min** 待用
- [] 6. 配置 95%甲酰胺/1 mM EDTA: 1 ml/1 张芯片
- [] 7. 打开 Te-Flow, 驱赶气泡, 调节温度并且稳定在 **44°**

实验操作:

- [] 1. Wash Rack 放置于第一个 Wash Dish 中, 并且完全被 PB1 浸没
- [] 2. 在杂交盒中取出带有芯片的 Hyb Chamber inserts, 将芯片取出 inserts, 掀掉 IntelliHyb Seal, 立刻将芯片放置于 Wash Rack 中
- [] 3. 将带有芯片的 Wash Rack 上下提拉 **1 min**, 注意缓慢轻柔, 每次都要离开液面
- [] 4. 将带有芯片的 Wash Rack 放置于第二个 Wash Dish 中, 同上步上下提拉 **1 min**
- [] 5. 装配 Flow-Through Chamber: 将 black frame 放置于 BeadChip Alignment Fixture 中, 将芯片放置于 black frame 中(注意芯片完全被 PB1 浸没), 然后正确放置 clear plastic spacer, 再将 Alignment bar 置于 Fixture 上方, 然后正确放置干净的 glass back plate(斜面对应芯片 barcode, 并且和芯片之间没有气泡), 再将 clamps 正确放置于两端, 和上下边缘相差 **5 mm**
- [] 6. 取出 Flow-Through Chamber, 剪掉多余的 spacer, 水平放置 Flow-Through Chamber 直到进行下一步
- [] 7. Te-Flow 温度稳定在 **44°**, 将 Flow-Through Chamber 正确放置于 Chamber Rack 上, 芯片 barcode 在上方
 - 8. Glass back plate 的斜面中按照以下顺序依次加入
 - [] [] (1) **150 µl** RA1, 孵育 **30** 秒, 重复 **5** 次
 - [] (2) **450 µl** XC1, 孵育 **10 min**
 - [] (3) **450 µl** XC2, 孵育 **10 min**
 - [] (4) **200 µl** TEM, 孵育 **15 min**
 - [] [] (5) **450 µl** 95%甲酰胺/1 mM EDTA, 孵育 **1 min**, 重复 **1** 次
 - [] (6) 再孵育 **5 min**
 - [] (7) Te-Flow 温度调节在 **32°** (与 STM 要求温度一致)
 - [] [] (8) **450 µl** XC3, 孵育 **1 min**, 重复 **1** 次
 - [] (9) 等待 Te-Flow 温度稳定在 **32°**
- [] 9. 打开 iScan
- 10. Glass back plate 的斜面中按照以下顺序依次加入
 - [] (1) **250 µl** SEM, 孵育 **10 min**
 - [] [] (2) **450 µl** XC3, 孵育 **1 min**, 重复 **1** 次, 再孵育 **5 min**
 - [] (1) **250 µl** ATM, 孵育 **10 min**
 - [] [] (2) **450 µl** XC3, 孵育 **1 min**, 重复 **1** 次, 再孵育 **5 min**
 - [] (1) **250 µl** SEM, 孵育 **10 min**
 - [] [] (2) **450 µl** XC3, 孵育 **1 min**, 重复 **1** 次, 再孵育 **5 min**

- [] (1) **250 µl** ATM, 孵育 **10 min**
- [] (2) **450 µl** XC3, 孵育 **1 min**, 重复 **1 次**, 再孵育 **5 min**
- [] (1) **250 µl** SEM, 孵育 **10 min**
- [] (2) **450 µl** XC3, 孵育 **1 min**, 重复 **1 次**, 再孵育 **5 min**
- [] 11. 将 Flow-Through Chamber 在 Chamber Rack 上取出, 水平放置
- [] 12. **310 ml** PB1 加入第 1 个 wash dish, 将 staining rack 置于其中
- [] 13. 拆除 Flow-Through Chamber, 取出芯片, 放置于 staining rack 中(注意芯片 barcode 背向实验员, staining rack 的 locking arm 面向实验员)
- [] 14. 将带有芯片的 staining rack 上下提拉 **10 次**, 注意缓慢轻柔, 每次都要离开液面, 然后浸泡 **5 min**
- [] 15. 剧烈振摇 XC4 后, **310 ml** XC4 加入第 2 个 wash dish, 将 staining rack 在第 1 个 wash dish 中取出再置于第 2 个 wash dish
- [] 16. 将带有芯片的 staining rack 上下提拉 **10 次**, 注意非常缓慢轻柔, 每次都要离开液面, 然后浸泡 **5 min**
- [] 17. 将带有芯片的 staining rack 取出后, 立刻芯片正面向上水平放置于 tube rack 上
- [] 18. 将芯片在 staining rack 中取出, 芯片 barcode 正面向上水平放置于 tube rack 上
- [] 19. **508 mmHg (0.68bar)** 真空泵中干燥芯片 **50-55 min**
- [] 20. Kimwipes 将芯片背面及两侧干燥的 XC4 擦干净, 保证芯片背面平整
- [] 21. 以下步骤选择
 - (1) 继续实验, iScan 扫描
 - (2) 将芯片放置于原包装中, 室温条件下放置于真空泵中, **72 小时之内** iScan 扫描
- [] 22. 启动软件 iScan 扫描芯片
 - (1) 预先下载芯片解码文件(.dmap)
 - (2) 预先下载芯片 manifest 文件(.bpm)
 - (3) 扫描约需要时间: **1 小时**