



\*仅用于实验室，不用于诊断。请随时跟我们索取并使用最新版本的说明书。

# Methylamp™总DNA甲基化 定量试剂盒

目录号：**A-P-1014B-48**（48次）  
**A-P-1014B-96**（96次）

## 操作手册

在您收到订购的产品时，请确认操作手册是配套的！  
同时，有翻译不妥的地方还请各位老师批评指正！

反馈信箱：[tech@aderr.com](mailto:tech@aderr.com)

2012年5月，第1版，对应英文第3.1006版



艾德科技（北京）有限公司  
A&D Technology Corporation

---



## 目录表

产品手册 .....	3
试剂盒组成 .....	3
运输和保存 .....	3
配套器材(自备).....	3
说明 .....	3
一般特性 .....	3
产品简介 .....	5
原理/步骤.....	6
用法 .....	7-8
操作手册 .....	7-8
附录 .....	11
疑难解答.....	11
订购信息 .....	11
推荐产品.....	12
如何下单.....	12
推荐阅读.....	12

## 产品手册

### 试剂盒组成

内容	48孔板 A-P-1014B-48	96孔板 A-P-1014B-96	保存条件 收到后
<b>GU1</b> （10X 清洗缓冲液）	<b>15 ml</b>	<b>30 ml</b>	<b>4°C</b>
<b>GU1</b> （DNA 结合溶液）	<b>1.5 ml</b>	<b>3 ml</b>	常温
<b>GU3</b> （阳性对照,100 µg/ml）**	<b>10 µl</b>	<b>20 µl</b>	<b>-20°C</b>
<b>GU4</b> （阻断溶液）	<b>10 ml</b>	<b>20 ml</b>	<b>4°C</b>
<b>GU5</b> （捕获抗体, 1000 ug/ml）*	<b>5 µl</b>	<b>8 µl</b>	<b>4°C</b>
<b>GU6</b> （检测抗体, 400 µg/ml）*	<b>10 µl</b>	<b>20 µl</b>	<b>-20°C</b>
<b>GU7</b> （显影液）	<b>10 µl</b>	<b>20 µl</b>	<b>-20°C</b>
<b>GU8</b> （增强剂）	<b>5 ml</b>	<b>10 ml</b>	<b>4°C</b>
<b>GU9</b> （终止液）	<b>3 ml</b>	<b>6 ml</b>	常温
<b>阴性DNA对照 (50 ng/µl) *</b>	<b>10 µl</b>	<b>20 µl</b>	<b>-20°C</b>
<b>8-联管（带裙边）</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>4°C</b>
使用手册	<b>1</b>	<b>1</b>	常温

\*为了获得产品的最大回收率，在打开瓶盖之前，先解冻并离心至管底。

\*\*这种对照是合成的多核苷酸且在每个5-胞嘧啶处被甲基化。

### 运输和保存

该试剂盒分两部分运输：第一部分在室温下运输，第二部分带冰袋在4°C条件下运输。

到货后：（1）将**GU3, GU6, GU7**和**DNA阴性对照** 在 **-20°C**条件下避光保存；

（2）将**GU1, GU4, GU5, GU8**，以及**8孔联管** 在 **4°C**下避光保存。

（3）其他组件，常温保存。

注意：在合适的保存情况下，所有的产品组件有效期是**6个月**，自发货之日算起。

### 配套器材(自备)

- 荧光分光光度计(可读取450 nm 处的荧光值)
- 移液器及吸头
- **1.5 ml** 离心管



## 说明

### 一般特性

#### 使用:

每批总DNA甲基化超极定量检测试剂盒对于从任何种属中,比如:哺乳动物、植物、真菌、细菌和从培养细胞、新鲜冷冻的组织、石蜡包埋组织、血浆/血清样本和体液样本中各种形式的病毒。

#### 预防措施:

避免交叉污染,小心使用吸头将样本与溶液滴入到 8 联排管中,使用带滤芯的吸头在加入不同的液体时,要不停地更换吸头,整个实验中应带一次性手套和适当的防护眼罩,且在加不同的样本时,应更换一次性手套。

#### 质控:

每批总DNA甲基化超极定量检测试剂盒的生产,对既定的各个组件的生产把控,确保了稳定的产品质量。保证所有产品的性能描述都符合行业的产品标准。

#### 质量保证:

此品如果没有达到您的实验期望,可以给我们的技术发送邮件到:[tech@aderr.com](mailto:tech@aderr.com)。我们也鼓励您随时与我们联系,如果您有任何意见或新的应用领域及产品性能和技术。

#### 安全:

对于实验人员工作时,实验室应配备安全的外套,一次性手套,和适当的防护眼罩

#### 产品更新:

艾德科技有权更改或修改任何产品,以提高其性能和设计。这个操作指南的信息是可能随时变更,恕不另行通知。因此,此使用指南仅为提供此品用户时配套使用。

#### 使用限制:

总DNA甲基化超极定量试剂盒是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

#### 知识产权:

总DNA甲基化超极定量试剂盒中使用的原理和方法,我司有产品使用的追索权。

## 产品简介

基因组DNA的表观遗传变更，在许多人类重要疾病中扮演着极为重要的角色，尤其在癌症方面。基因组DNA表观遗传变化的核心机制是特定基因中CpG岛过甲基化，以及全基因组DNA低甲基化。CpG岛甲基化包含了一个过程，DNA甲基转移酶（Dnmts）将腺苷蛋氨酸中甲基转移到胞嘧啶的第五个碳位置上。特定区域的DNA甲基化主要发生在启动子里的5'-CpG-3'二核苷酸上，或者在基因的第一个外显子上，这是用来抑制疾变细胞的基因转录的重要通道。全基因组DNA低甲基化很可能是由各种环境变化影响导致的甲基不足所引起，并且已经被提议作为多个生物进程中的一个分子标记，例如癌症。我们已经得到很好的证明，全基因组DNA甲基化减少是癌症最重要的特征之一。因此，在癌细胞中，对全基因组DNA甲基化进行定量，对于癌症这种疾病的检验分析提供非常有用的信息。

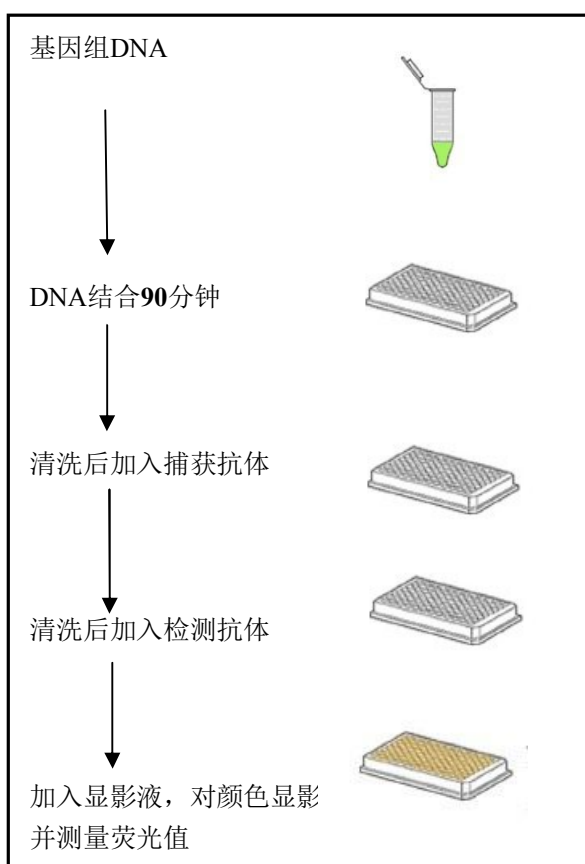
总DNA甲基化的检测已经有多种方法得到实现，例如，放射性甲基参入法，以及高性能离心法。但是，这些方法都太耗时耗力，产能弱，倒是能产生很多的放射性废物。艾德科技的**总DNA甲基化超极定量试剂盒**使用一种独特的步骤来给全基因组DNA甲基化定量，很好的规避了以上方法的不足。

总DNA甲基化超极定量试剂盒具有以下特点：

- 步骤非常简单快捷，不到四个小时就能完成。
- 比色定量，不需要使用放射性，抽提萃取，色谱分析。
- 条状微型联管设计使实验非常灵活：手工或高通量分析。
- 高灵敏性，检测下限可至0.2ng甲基化的DNA。
- 通用型的阳性对照的提供可定量来自任何种属中甲基化的DNA。
- 简单，可靠，实验条件一致。

## 原理/步骤

总DNA甲基化超极定量试剂盒包含用于全基因组DNA甲基化定量检测的所有试剂。在这个试验中，DNA被固定在联管中，这些联管已经被处理过，具备高DNA亲和力。DNA甲基化的部分能够通过5-甲基胞嘧啶抗体辨识并通过ELISA（酶联免疫吸附试验）之类反应进行定量。DNA甲基化的量同OD强度成一定比例。



图示：总DNA甲基化超极定量试剂盒的使用步骤

## 用法

### 操作手册

为了得到更好地实验结果，在开始实验前，请您仔细阅读整个操作手册。

1. 使用操作者自己成功的方法来制备DNA。为了方便操作者操作以及得到最好的结果，我司提供一系列DNA提取试剂盒，该试剂盒能从培养细胞、组织、体液以及石蜡切片中最大充分的提取DNA。
2. A. 决定需要多少个联管。将这些联管放在板框里（不用的联管可以放回到包里面，将包密封紧并保存在4°C条件下）。  
B. 预先安排样本孔，阳性对照孔和阴性对照板子孔的位置，  
C. 使用蒸馏水（pH 7.2-7.5）以1:10比例稀释GU1（举例：1 ml GU1+9ml蒸馏水）。
3. A. **样品**：加入28μl的GU2溶液到DNA样本孔（DNA样本是2μl，溶质DNA是100-200ng）中。  
B. **阳性对照--单点对照**：以1:20比例的GU2稀释GU3（如：1μl的GU3+19μl的GU2）。加入28μl的GU2溶液到阳性对照的样本孔〔稀释的GU3溶液（10ng/孔）是2μl〕中。  
**阳性对照--标准曲线**：使用GU2独立地稀释GU3到0.2-10ng/μl。加入28μl的GU2溶液到阳性对照的样本孔〔稀释的GU3溶液（10ng/孔）是2μl〕中，生成一个标准曲线（制作4-6点，例如0.4, 1, 2, 5, 10和20ng/孔）。或  
C. **阴性对照\***：加入28μl的GU2溶液和2ul 阴性对照DNA到样本孔中。  
\*要求的背景，不容许使用DNA-free control来代替的。  
D. 轻轻的摇晃板子让溶液全部覆盖每个孔底的表面。  
E. 在37° C下孵育孔（没有湿度）40分钟；其次，在60° C下孵育孔（没有湿度）持续35-40分钟来蒸发溶液并且使孔干燥。  
*注意：没有蒸发的溶液可能会沿着边缘聚集在孔底部。为确保孔都干透了，请轻轻的倾斜孔板，并用P-10 或者P-20的移液管在孔底边缘吸气。如果依然有溶液残留，延长孵化时间5-10分钟左右，在60°C的条件下，以确保孔干透。*
4. 加入150 μl GU4到每一个干的孔里面。在37°C 条件下孵育 30分钟。
5. 用150μl稀释了的GU1抽吸并且清洗每一个孔三次。
6. 使用稀释了的GU1将GU5稀释到(以 1:1000 比例) 1 μg/ml。加入50 μl 稀释了的GU5到每一个孔中，在室温的情况下孵育60分钟。
7. 用150μl稀释了的GU1抽吸并且清洗每一个孔四次。
8. 使用稀释了的GU1将GU6稀释(以 1:1000 比例)。加入50 μl 稀释了的GU6到每一个孔中，在室温的情况下孵育30分钟。



9. 用150µl稀释了的GU1抽吸并且清洗每一个孔五次。
10. 使用稀释了的GU1稀释GU7(以 1:5000 到 1:100,00 的比例) 。加入50 µl 稀释的GU7到每一个孔中，在室温下避光孵育30分钟。
11. 加入150 µl GU1到每一个孔中，抽吸并且清洗每一个孔五次。
12. 加入100 µl GU8到每一个孔中，在室温下避光孵育1-5分钟。开始监控样本以及对照孔（蓝色）中的显色。
13. 加入50 µl GU9到每一个孔中阻止酶反应，当标准孔中的对照的颜色变成蓝色.颜色开始变成黄色并且应在 450nm 处使用荧光分光光度计在2-15分钟内读取荧光值。

对于DNA甲基化的简单计算，要使用以下公式进行（阳性对照是10ng并且DNA样本是100ng）：

$$\text{Methylation \%} = \frac{(\text{Sample OD} - \text{Negative Control OD}) / X^*}{(\text{Positive Control OD} - \text{Negative Control OD}) \times 10} \times 100\%$$

对于DNA甲基化精确计算，要绘制OD值同GU3的量对比，决定斜率为delta OD/ng，然后使用以下公式计算甲基化DNA的量：

$$\text{Methylated DNA (ng)} = \frac{\text{Sample OD} - \text{Negative Control}}{\text{Slope}}$$

$$\text{Methylation \%} = \frac{\text{Methylated DNA Amount} / X^*}{\text{Sample DNA Amount Added}} \times 100\%$$

\*X是不同种属DNA的GC构成（例如：人类的全基因组是由含41%的GC构成；对于小鼠与大鼠是42%；拟南芥是35%；酵母是38%构成的；等等）



## 附录

### 疑难解答

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
阳性对照与样品均无信号	没有正确的加入试剂	检查是否按照操作手册中规定的顺序来添加试剂，是否程序中的某些步骤被忽略了。
	孔没有干透	确保孔在孵化的过程不含湿度，在加入阻断缓冲液之前完全是干的。
	在放入 DNA 之前，孔被不正确的清洗了	确保在加入对照 DNA 之前，孔不能被清洗。
	预热时间和温度不正确	确保孵育时间和温度是正确的按照操作手册来设置的
仅阳性对照无信号或微弱信号	在第 3B 步骤中，阳性对照或样品 DNA 加入不够	再将对照 DNA 加入孔中之前，应将其充分的混合。确保足够的对照 DNA 被加入到孔中。
	GU3 阳性对照 DNA 由于不正确的储存，阳性对照或样品 DNA 分解	确保 GU3 阳性对照 DNA 按照说明书中的规定正确的保存并且没有过期。
阴性对照中存在高背景	洗脱不净	检查每一步的清洗是否按照操作手册来做的。
	阳性对照或样品 DNA 被污染	在加入样本或阳性对照时，确保孔不被污染或意外地使用污染的吸头，
	不足或阻塞	在第 4A 步中使用 GU4 阻断液，确保孔是被恰当地阻断。
	显影过度	在第 12 步加入 GU9 阻断液前，减少第 11 步中的显影时间。

## 订购信息

货号	品名	规格
A-P-1014B-48	总 DNA 甲基化超级定量试剂盒	48 次
A-P-1014B-96		96 次

## 推荐产品

### DNA 样本的制备:

货号	品名
A-D1801	全基因组 DNA 极速提取试剂盒（离心柱）
A-D1901	细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱）
A-D3111	新型极速植物基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱）
A-D6201	酵母基因组 DNA 试剂盒（离心柱）
A-D7111	石蜡包埋组织基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱）

### 全基因组DNA甲基化定量试剂盒:

货号	品名
A-P-1026	DNA 甲基化极速修饰试剂盒
A-P-1034	DNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)
A-P-1035	DNA 甲基化定量检测试剂盒(荧光法)
A-P-1036	DNA 羟甲基化定量检测试剂盒(比色法)
A-P-1037	DNA 羟甲基化定量检测试剂盒(荧光法)

### 其它产品:

货号	品名
A-R1201	A&D TRIpure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒（离心柱型）
A-R4001	A&D 血液总 RNA 快速提取试剂盒（液体样本,离心柱型）
A-R3301	A&D 通用植物总 RNA 提取试剂盒（离心柱型）
A-R5901	A&D血液（液体样本）microRNA快速提取试剂盒（柱型）
A-R5311	A&D 石蜡包埋组织 microRNA 快速提取试剂盒（柱型）



## 如何下单

1. 电话，传真或邮件订购：

电话：010—52406250； 传真：010—52406250；

邮件：[ordering@aderr.com](mailto:ordering@aderr.com)

2. 在线定单订购：

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1771&t=1474>

## 推荐阅读

1. “新四大碱基”的确定，对于生物学研究者的几点启示！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=2566&t=3623&id=21290>

2. 科学家发现新型 DNA-microDNA！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=20763>

3. 艾德科技为您提供“一站式”的产品与服务！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=20739>



**艾德科技（北京）有限公司**  
**A&D Technology Corporation**

---

地 址：北京昌平区中关村生命科学园东 60 米（102206）

电 话：010-52406250

传 真：010-52406250

网 址：[www.aderr.com](http://www.aderr.com)

Email:[tech@aderr.com](mailto:tech@aderr.com)