



*仅用于实验室，不用于诊断和治疗。请随时跟我们索取并使用最新版本的说明书。

Methylamp™ 甲基化DNA捕获(MeDIP)试剂盒

非常适合富集丰富的甲基化DNA且可用于下游的各种实验包括PCR、qPCR和微正列分析(MeDIP-chip)等。

目录号: **A-P-1015-24 (24次)**

A-P-1015-48 (48次)

操作手册

在您收到定购的产品时，请确认操作手册是配套的！

注意：以英文原版说明书为准，本中文说明书仅作参考。

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**

2012年12月，第1版，对应英文第1.1023打印版



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

使用前请通篇阅读使用手册

用法: Methylamp™ 甲基化DNA捕获试剂盒适用于采用高通量的形式选取富含甲基化DNA的片段，使用从各种物种中提取出来的DNA，例如哺乳动物、植物、真菌、细菌，及各种病毒，包括并不局限于培养细胞、新鲜和冷冻组织的病毒。在这个试剂盒中富含丰富的甲基化DNA可用于下游的各种实验包括PCR，qPCR，Southern blot和微正列分析（MeDIP-chip）等。

输入材料: 输入材料是具有较好质量纯化的包含甲基化DNA片段，从各种物种中提取大量的DNA。每次反应DNA的数量应该是0.1 µg（细胞数约是 1×10^4 ）到 1 µg。较为理想的实验反应，DNA的输入量应该为每孔0.5 µg。

剪切DNA: 在进行甲基化免疫共沉淀之前，基因组DNA应该通过超声波处理设备打断或剪切。打断的DNA片段尺寸应该在200-600 碱基对。为了得到较好效果和便利性，我们建议使用EpiSonic™多功能生物处理系统（H5000-1），他可同时声处理1-384个样本，使用密封瓶可处理成您想要的大小（200-600 碱基对）DNA片段。

内部控制: 本试剂盒提供了阴性的(Non-Immune IgG)和阳性的（DNA对照）实验对照。阳性对照DNA是200个碱基对，它包含44个胞嘧啶甲基化片段的。这个试剂盒中包含PCR引物对照可以用来验证甲基化化DNA对照的富集效率。

抗体: 在这个试剂盒中我们使用了兔子的甲基化胞嘧啶多克隆抗体，DNA甲基化片段特异性较强，不论是单链还是双链的，都不会与甲基化和非甲基化DNA片段交叉反应。

预防措施: 为避免交叉污染，请小心吸取样品或者溶液至条管中。使用带滤芯的吸头，在转移不同液体时更换吸头。全程必须带手套，且在接触不同样品时，请立即更换手套。



目录表

产品手册.....	3
试剂盒组成.....	4
运输和保存.....	4
配套器材(自备).....	5
说明.....	5
重点提示.....	5
一般特性.....	5
产品简介.....	6
原理/步骤.....	6
用法.....	8
操作手册.....	8
附录.....	10
疑难解答.....	10
订购信息.....	12
推荐产品.....	13
如何下单.....	14
推荐阅读.....	14

试剂盒组成

组成	24 次 Cat. A-P-1015-24	48 次 Cat. A-P-1015-48	保存条件
MC1 (抗体缓冲液)	8 ml	16 ml	4° C
MC2 (反应缓冲液)	4 ml	8ml	RT
MC3 (清洗缓冲液)	16 ml	2 x16 ml	4° C
MC4 (DNA 释放液)	2 ml	4 ml	RT
CP5 (结合液)	5 ml	8 ml	RT
CP6 (洗脱液)	0.6 ml	1.2 ml	RT
Normal-Mouse IgG (1 mg/ml)*	10 μl	20 μl	4° C
蛋白酶 K (10 mg/ml)*	25 μl	50 μl	4° C
甲基化抗体 (1 mg/ml)*	25 μl	50 μl	4° C
8-联管(带裙边)	3	6	4° C
8 联孔封口膜	3	6	RT
F-离心柱	30	50	RT
F-收集管	30	50	RT
使用手册	1	1	RT

*为了获得产品的最大使用率，在打开瓶盖之前，先解冻并离心至管底。

运输和保存

本试剂盒分二部分进行运输：

第一部分室温保存，第二部分4°C冰袋运输。

签收后：

(1) **MC1, MC3, Normal-Mouse IgG**，**甲基化抗体**，**蛋白酶K**和**8-孔联管** 4°C避光保存；

(2) 剩下组件 室温避光保存；

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。

注意：检查一下清洗缓冲液，在使用前检查**MC3**中是否含有盐的沉淀物。如有，加热（室温或37°C）并摇晃直至盐沉淀再次溶解。

配套器材(自备)

- 带可调温度的恒温水浴箱或孵化器
- 涡旋混合仪
- 台式离心机（可达14000 rpm）
- 超声波处理设备
- 定轨振荡器或摇床
- 单道可调移液器和多通道移液器
- 带滤芯移液吸头
- 1.5ml 离心管
- TE 缓冲液（pH 8.0）
- 乙醇（96-100%）

一般产品信息

质控:

每批Methylamp™ 甲基化DNA捕获试剂盒的生产,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。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:

A&D Technology Corporation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:

Methylamp™ 甲基化DNA捕获试剂盒是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

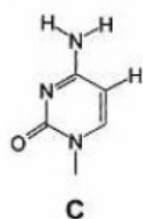
知识产权:

Methylamp™ 甲基化DNA捕获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

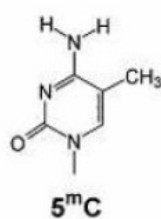
当胞嘧啶环的5-Carbon处的甲基组共价时, 产生5-甲基胞嘧啶, DNA就发生甲基化。这些甲基组投入DNA深沟中, 并抑制转录。在人类DNA中, 5-甲基胞嘧啶占DNA全基因组大约1.5%, 主要在CpG处。0.3 至0.2 kb DNA段中CpG簇, 称之为CpG岛, 这些CpG岛典型性的出现在基因的第一个启动子区域者在其附近, 在该处转录开始。在大量基因组DNA中, 大部分CpG段都被重度甲基化。然而, 在处于萌芽阶段的组织及正常体细胞的启动子中, CpG岛仍然保持未被甲基化, 可以产生基因表达。当CpG岛在基因启动子区已经甲基化了, 该基因的表达就被抑制。这种抑制起因于直接抑制特异转录因子结合, 及间接充实甲基-CpG-结合蛋白及其相关抑制染色质重组装活动。除对基因转录的影响外, DNA甲基化还影响到染色质结构域的形成和基因组印记, 该印记引用亲本基因的原特异表达式。

高度特异的DNA甲基化的富集应该提供一个优势且方便, 可以综合识别的甲基化状态的正常和病变细胞, 例如癌细胞, 这可能导致开发新的诊断和治疗癌症的方法。几个方法已用于富集甲基化DNA, 包括甲基GpG结合域(MBD), 来建立甲基化DNA亲和柱和免疫沉淀反应。然而, 到目前为止这些方法相当耗时, 耗力、低产量, 尤其是, 需要净化DNA为原料。下面是胞嘧啶的甲基化、甲基化化形式:



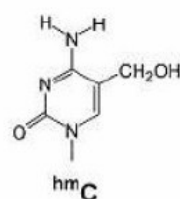
未甲基化 DNA

T-C-G-T-C-G-A-C-G



甲基化 DNA

T-^mC-G-T-^mC-G-A-^mC-G



羟甲基化 DNA

T-^{hm}C-G-T-^{hm}C-G-A-^{hm}C-G

Methylamp™ 甲基化DNA捕获试剂盒使用了恰当且唯一的程序来富集甲基化的DNA。在这个实验中, 一个特异性较强的抗体专门结合甲基化的胞嘧啶来沉淀甲基化的基因组DNA。沉淀后甲基化的DNA就可以进行标准的DNA检测了。Methylamp™ 甲基化DNA捕获试剂盒具有如下特点:

- 高效率富集甲基化的DNA: >98%
- 最快速可操作的步骤, 仅需 3 小时即可完成。
- 微孔板的设计使实验更加灵活: 方便了手动或高通量。
- 包含的柱子可以纯化DNA: 节约时间和劳力。
- 兼容所有以DNA为基础的扩增实验。
- 简单、可信和实验条件始终如一。

1原理/步骤

Methylamp™ 甲基化 DNA 捕获试剂盒包含所有所需组件可用于从 DNA 样本中成功地沉淀甲基化 DNA。尤其是，此试剂盒包含一个芯片级的甲基化抗体和一个阴性对照是正常的小鼠的 IgG。剪切的 DNA，并使用抗体来固化添加到微孔板中的 DNA。从抗体固化的 DNA 混合物中释放 DNA 并采用特异性较强的柱子纯化。洗脱好的 DNA 可用于下游的各种实验程序。



Methylamp™ 甲基化 DNA 捕获试剂盒原理程序

参考文献

- 1.Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *J Exp Bot.* Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *J Exp Bot.*
- 2.Yu, F. *et. al.* (January 2012). MicroRNA 34c Gene Down-regulation via DNA Methylation Promotes Self-renewal and Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Tumor-initiating Cells. *J.Biol Chem.* **287** (1):465-73.
- 3.Zhou, FC. *et. al.* (April 2011). Alcohol alters DNA methylation patterns and inhibits neural stem cell differentiation. *Alcohol Clin Exp Res.* **35**(4):735-46.

用法

操作手册

为得到最好的结果，请开始实验前通读本操作手册。

注意：在将离心柱放入离心机前，需要把离心柱的盖子盖紧！

开始实验时，执行如下操作

准备如下的溶液（不提供，可单买）：**90%乙醇**。

确保所有的缓冲液是清澈的。如有沉淀需要适当的抖动或涡旋。

1. 预估您实验所需联管的数量。小心确保从板架上移走不需要的联管并把他们放回袋子（轻轻合上袋子并储存在4°C）。

2. 每孔添加 100 μ l 的 **MC1** 并加入如下的抗体：加1 μ l 的**Normal-Mouse IgG** 作为阴性对照和加1 μ l 的**甲基化抗体**到样本孔。使用保鲜膜(胶套膜或石蜡封口膜)紧紧密封条板，避免蒸发并在室温孵育60分钟。同时，按照如下步骤中的描述从细胞中制备DNA片段。

3. 添加 0.5-1 μ l 到 每100 μ l 的 **MC2**（每个瓶的最大体积是500 μ l）中并采用声处理设备剪切DNA。通常，通过使用布兰德的微型探针二级每次设置10-12秒 3个脉冲，紧跟着每次脉冲间歇 30-40秒。（DNA剪切的条件要根据细胞和声处理设备来选择的。如有必要，拿出5 μ l 的声处理细胞裂解物要进行琼脂糖凝胶电泳分析。剪切的DNA大小应该是在 200-1000 bp。当然A&D Technology可以提供环保的凝胶检测设备供您选择。）。

4. 在95°C下孵育声处理的DNA 2分钟并立刻置于冰上。

5. 转移 5 μ l 稀释的声处理DNA溶液到0.5ml 瓶中。贴上标签“输入DNA”，并放置在冰上。

6. 转移孵育的抗体溶液并使用移液器 添加 150 μ l 的 **MC1** 清洗孔一次并使用移液器 添加 150 μ l 的 **MC3** 清洗孔一次。

7. 添加100 μ l 声处理的DNA溶液到每个孔中。使用保鲜膜(胶套膜或石蜡封口膜)紧紧密封条板，避免蒸发并在摇摆的平台（50-100 rpm）上室温（22-25° C）孵育90-120分钟。

8. 转移上清液。使用 150 μ l 的**MC3**清洗孔三次。

9. 添加 1 μ l 的**蛋白酶K** 到每 60 μ l 的 **MC4** 中并混合。添加 60 μ l 包含**蛋白酶K**的 **MC4** 到样本孔（包含“输入DNA”瓶）。使用保鲜膜(胶套膜或石蜡封口膜)紧紧密封条板，避免蒸发并在水浴下 65° C 孵育 60 分钟。

10. 将柱子放置在一个新 2ml 的收集管中。添加 200 μ l 的 90%的 **MC5** 到柱子中。添加 180 μ l 的 100%的 乙醇 到样本和混合物中。转移混合液到包含 **MC5** 的柱子中。以12000rpm 离心20秒。



11.从收集管转移柱子并弃废液。将柱子放置在一个新的收集管中。再次添加 200 μ l 的 90%的乙醇到柱子中，以12000rpm 离心20秒。

12.从收集管转移柱子并弃废液。将柱子放置在一个新的收集管中。再次添加 200 μ l 的 90%的乙醇到柱子中，以12000rpm 离心35秒。

13.放置柱子到新的1.5 ml 瓶中。直接添加 20 μ l 的 **MC6** 到柱基质中并以12000rpm 全速离心20秒来洗脱纯化的DNA。

现在甲基化DNA可以使用了，或在 -20° C储存。

注意：如对于PCR中的阳性对照（甲基化）和阴性对照（非甲基化），对于高甲基化的H191CR、LAP或XIST基因序列引物和未甲基化的 β -actin或GAPDH序列引物可以分别用来使用的。为了方便PCR，想得到更好地的PCR结果很有必要调整PCR的循环数。

对于实时PCR分析，我们建议从20 μ l PCR反应液中取1-2 μ l 洗脱的DNA。在适当地稀释之后，输入的DNA可以直接加入到一个PCR反应中。对于终点法PCR，为了得到更好地PCR结果，PCR的循环数需要适当地调整。一般来讲，在“Normal-Mouse IgG ”和“甲基化抗体”间不同扩增的循环数可能会有3-8循环的差别，当然要取决于实验的条件。对于MeDIP-chip，可能需要额外地添加DNA纯化与浓缩和全基因组扩增（WGA）步骤。为了您的方便，对于DNA的纯化和浓缩A&D Technology Corporation提供了DNA浓缩试剂盒（Cat No.A-P-1006）

附录

疑难解答

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
很少或没有 PCR 产物	不足的起始 DNA 量	确保起始的 DNA 来那个是足够的。（如：1 μ g /每个反应）。
	不足或太多的声处理	按照操作手册中描述恰当的获取 DNA 尺寸。在声处理过程中保证样本都是在冰上操作的。
	不正确的温度/不足的 DNA 释放时间	遵循操作手册的导引恰当的设置温度和时间。
	不正确 PCR 反应条件	检查所有的组件是否添加。增加 PCR 反应中 DNA 的数量。增加 PCR 反应的循环数。
	不正确或坏的引物	确认您设计的引物是特异性的识别目的基因的序列的。
	柱子不是被 90%的乙醇清洗	确保清洗液是 90%的乙醇。
	DNA 没有被完全洗脱下来	据操作手册增加第 10-13 步将离心时间到 1 分钟。



	每步孔清洗不足	根据操作手册检查每一步是否按照我们建议的步骤操作。
在阴性对照和样本中无产物或很少有不同的产物	对于阴性对照孔中添加抗体是错误的	确保抗体被正确的添加到孔中。
	PCR 循环数太多	如果使用便利的 PCR，根据恰当的循环数减少循环。大量的起始 DNA 差异可以通过在指数 PCR 扩增阶段测量。

PCR 相关分析

荧光定量 PCR

引物设计

引物设计应该满足实时PCR的标准。例如,转化后的原始序列长度应该是在 50-150bp。在引物的3'端应该避免设计G/C。

PCR反应

实时 PCR 可以使用您自己已经证明的方法来执行。为了您的便利和更好的结果, A&D Technology 提供了 EpiQuik™ 定量 PCR 快速试剂盒 (A-P-1029), 这款产品是专门为快速的 qPCR 反应而设计的。作为一个例子, 以下是我们呈递的操作手册:

准备PCR反应

解冻所有的产品组件包括master mix, DNA/RNA free water, primer solution and DNA template。使用涡旋仪简单混合。在使用时, 保证所有组件均在冰上操作, 并在使用完后立刻放在 - 20°C 保存。根据下面的步骤加每个组件到孔中。

Component	Size (μl)	Final Concentration
Methylamp Master Mix (2X)	10 μl	1X
Forward Primer	1 μl	0.4-0.5 μM
Reverse Primer	1 μl	0.4-0.5 μM
DNA Template	1-2 μl	50 pg-0.1 μg
DNA/RNA-free H ₂ O	6-7 μl	
Total Volume	20 μl	

对于阴性对照, 使用DNA/RNA-free water 代替DNA模版。

设置 PCR 反应程序

将反应板子放入 PCR 仪中并按如下设置 PCR 的反应条件：

Cycle Step	Temp	Time	Cycle
Activation	95°C	7 min	1
Cycling	95°C 55°C 72°C	10 sec 10 sec 8 sec	40-45
Final Extension	72°	1 min	1

对于阴性对照，使用DNA/RNA-free water 代替DNA模版。

引物设计

折叠浓缩（FE）可以通过成倍比例的Chip芯片在免疫球蛋白（non-immune IgG）扩增简单的计算，通过RNA聚合酶II成倍的扩增可以作为一个阳性对照。

$$FE \% = 2^{(IgG\ CT - Sample\ CT)} \times 100\%$$

例如，如果对于 IgG 的 CT 值是 38 和样本的是 34、然后....

$$FE \% = 2^{(38 - 34)} \times 100\% = 1600\%$$

终点法 PCR

引物设计

引物设计需要满足终点法下的PCR。例如，转化后的原始序列长度应该是在 100-400bp。PCR引物设计工具（如，Primer3 Plus）可以用来帮助选择适当的引物对。

PCR反应

终点法 PCR 可以使用您自己已经证明的方法来执行。在指数期停止 PCR 反应是非常重要的，为了从不同芯片反应得到一个可信且浓缩效率较高的，需要建立一个适当数量的 PCR 周期。因此，理想的 PCR 循环数量应该取决于实际的情况。

PCR产品分析

终点 PCR 产品可以通过在 1-2%的琼脂糖凝胶后，然后使用溴化乙锭和 UV 灯照射扩增的产物来分析。也可以采用 A&D Technology Corporation 的可见光凝胶成像系统来进行检测。



订购信息

货号	品名	规格
A-P-1015-24	Methylamp™ 甲基化DNA捕获 (MeDIP)试剂盒	24 次
A-P-1015-48		48 次

推荐产品

DNA 样本的制备:

货号	品名
D-P-0002-1	EpiQuik™ Nuclear Extraction Kit
A-D1801	全血基因组 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-D7111	石蜡包埋组织基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱）

DNA 甲基化修饰试剂盒:

货号	品名
A-P-1026	DNA 甲基化极速修饰试剂盒（二步法）
A-P-1016	A&Direct™ DNA 甲基化直接修饰试剂盒（一步法）

DNA 甲基化定量检测试剂盒:

货号	品名
A-P-1025	DNA 甲基化阳性套装
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 甲基化定量检测试剂盒(比色法)
A-P-1037	DNA 甲基化定量检测试剂盒(荧光法)

DNA 甲基化 PCR 扩增试剂盒

货号	品名
A-P-1028	Methylamp™ MS-qPCR 试剂盒
A-P-1029	EpiQuik™ Quantitative PCR Fast Kit

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

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>

4. 艾德科技教你如何在线设计甲基化的引物！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=2566&t=3623&id=24445>



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 Email:tech@aderr.com