



\*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。

## 超级MeDIP试剂盒(超级DNA甲基化免疫沉淀试剂盒)

此品非常适合从各种微量细胞、微量组织、哺乳动物、真菌、细菌、植物、血浆和血清等样本中提取的DNA，进行特定基因的DNA甲基化各种定性和定量分析，如：MeDIP-PCR分析，MeDIP-chip分析或MeDIP-Seq分析等等，整个实验时间仅需不到3个小时。主要检测仪器：实时荧光定量PCR仪。

目录号： A-P-1052 (24次、48次)



扫我收藏分享，还有机会拿红包哦！

**操作手册**      **英文操作手册为准！中文为辅！**

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)

2017年02月，第1版，对应英文第14 .03.03版



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



## 目录表

试剂盒组成 .....	3
运输和保存 .....	3
配套器材(自备).....	4
重点提示 .....	4
说明.....	5
一般特性 .....	5
产品简介 .....	6
原理/步骤 .....	7
用法.....	9
操作手册 .....	9
为了得到最好的实验结果，在实验开始前，请通读这个操作手册。	9
凝难解答 .....	11
附录.....	12
订购信息 .....	14
推荐产品 .....	14
相关产品 .....	15
如何下单 .....	15

## 试剂盒组成

内容	A-P-1052-24 (24次)	A-P-1052-48 (48次)	保存条件
<b>WB</b> (Wash Buffer)	<b>15 ml</b>	<b>30 ml</b>	4° C
<b>MeDIP Buffer</b>	<b>4 ml</b>	<b>8 ml</b>	常温
<b>DRB</b> (DNA Release Buffer)	<b>14 ml</b>	<b>28 ml</b>	常温
<b>DBS</b> (DNA Binding Buffer)	<b>7 ml</b>	<b>14 ml</b>	常温
<b>BS</b> (Blocker Solution) *	<b>200 ul</b>	<b>400 ul</b>	4° C
<b>DEB</b> (DNA Elution Buffer)	<b>1 ml</b>	<b>2 ml</b>	常温
<b>Non-Immune IgG</b> *	<b>10 ul</b>	<b>20 ul</b>	4° C
<b>5-mC Antibody</b> *	<b>25 ul</b>	<b>50 ul</b>	4° C
<b>Proteinase K</b> (10mg/ml) *	<b>28 ml</b>	<b>56 ml</b>	4° C
<b>Control unDNA</b> (200 ng/ml) *	<b>5 ul</b>	<b>10 ul</b>	-20° C
<b>Control mDNA</b> (200 ng/ml) *	<b>5 ul</b>	<b>10 ul</b>	-20° C
<b>Control Primer-Forward</b> (20um) *	<b>5 ul</b>	<b>10 ul</b>	4° C
<b>Control Primer-Reverse</b> (20um) *	<b>5 ul</b>	<b>10 ul</b>	4° C
离心柱	<b>30</b>	<b>50</b>	常温
收集管	<b>30</b>	<b>50</b>	常温
条状8联管	<b>3条</b>	<b>6条</b>	4° C
条状8联管盖	<b>3条</b>	<b>6条</b>	常温
粘性封口膜	<b>3</b>	<b>6</b>	常温
使用手册	<b>1</b>	<b>1</b>	常温

\*在使用之前将溶液离心至管底。

## 运输和保存

该试剂盒分二部分运输，第一部分是在室温环境下；第二部分需在4° C加冰袋运输。

当您收到产品后：1) 需将**Control unDNA**和 **Control mDNA** 在-20° C下保存；**WB**、**BS**、**Non-Immune IgG**、**5-mC Antibody**、**Proteinase K**、**Control Primer-Forward**、**Control Primer-Reverse**和**8联管**在4° C避光保存；2) 剩余的组件室温避光保存。



**注意：**在使用前检查Wash buffer, WB, 是否包含盐的沉淀物。若是，室温或37°C加热并晃动溶液直至溶液再次溶解。

## 配套器材(自备)

- ✓ 可变温度的恒温水槽或孵育箱
- ✓ 带48-和96模块的热循环仪
- ✓ 超声处理设备
- ✓ 定轨摇床
- ✓ 可调移液器和多通道可调移液器
- ✓ 带滤芯的枪头
- ✓ 封口膜 M
- ✓ 0.2ml或0.5ml PCR管子
- ✓ 1X TE buffer, pH8.0
- ✓ 感兴趣的微量DNA提取试剂盒（我公司有配套的，请咨询QQ: 1951545998或微信号: hugasis）
- ✓ 90%的乙醇

## 重点提示

### 使用必读：

**使用：**超级MeDIP试剂盒专门为收集包含5-甲基胞嘧啶而设计的。高灵敏性和特异性设计可以用于从各物种中提取的DNA。使用这款试剂盒富集到的甲基化的DNA可以用于各种下游实验程序包括定量和定量PCR(MeDIP-PCR)，芯片分析（MeDIP-chip）和尤其是测序分析（MeDIP-seq）。其中总RNA可以是来自哺乳动物，植物，真菌，细菌和病毒等样本中得到的，但不仅限于此，培养细胞、新鲜和冷冻的组织、血浆/血清样本和体液等样本。

**起始材料和DNA输入量：**起始材料应该是高质量纯化的DNA。对于每次实验的DNA输入量是50(约为10,000个细胞)-500 ng。最为理想的DNA的输入量应该是每孔100-200 ng，正如我们所知，在某些种属中RNA中的5-mC通常不到总RNA的0.1%。

**DNA剪切：**在开始MeDIP实验前，通过使用超声波来剪切基因组DNA。剪切的DNA片段大小应该在100-600碱基对。为了您方便和更好的实验结果，我们推荐使用EpiSonic Multi-Functional Bioprocessor 1100 处理系统。容许同时处理多个密封管子里面的样本，并可以完成渴望得到的DNA片段大小范围（100-600碱基对）。

**内控：**这个试剂盒中包括了特异的阴性对照(non-immune IgG)。特异性的对照是200碱基对DNA片段，包含44胞嘧啶位点，它们是甲基化（mDNA）和未甲基化的（unDNA）。这



个试剂盒同样包含了对照PCR引物，它可以用来验证富集的效率 and 特异性的DNA对照。

**抗体：**在这个试剂盒中使用5-甲基胞嘧啶抗体高度特异性针对甲基化的DNA片段，包括单链和双链的，且不会与羟甲基化和未甲基化的DNA片段发生交叉反应。这个抗体可以捕获>50%的DNA片段少至2个5-mCs和富集所有的包含4个或更多的5-mCs的DNA片段。

**甲基化DNA产量：**在甲基化的DNA产量大概是4ng，针对100ng的DNA输入量（4%），这与预期的百分比（4-5%）是一致的。针对富集的高灵敏度和特异性的甲基化DNA通过重亚硫酸盐测序演示所得预期百分比。

#### 预防措施：

为了避免交叉污染，小心的吸取样本或将溶液添加到微孔板中。使用带滤芯的吸头，并且在不同溶液的转移中，要及时的更换枪头。在整个实验操作过程中，建议戴上手套。如果手套与样本有接触，应该立即更换新的手套。

## 说明

### 一般特性

#### 质控：

每批超级MeDIP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。A&D Technology Corporation保证所有的产品组件达到如说明书中所描述的功能。

#### 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：

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：

超级MeDIP试剂盒是为研究用途，不适合诊断或治疗的应用。

#### 知识产权：

超级MeDIP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 的表观遗传变化的核心机制是 CpG 岛在特定基因的过度甲基化和总体 DNA 超甲基化。特定区域的 DNA 甲基化在基因转录表达中扮演着非常重要的作用并且在启动子的 5'-CG-3' 二核苷酸和基因的第一个外显子上发现。总体 DNA 的超甲基化通常是由各种外部环境的影响造成的。这种甲基化的变化，通常伴随许多的疾病，尤其是癌症。

高度特异提取的甲基化 DNA 结合 NGS (二代测序) 针对更为广泛的甲基化分析提供了更为便利和可行的甲基化数据，包括正常和疾病细胞的，比如：癌症细胞。【3】这种分析的需求更好的提取甲基化的 DNA 来获取较少的背景为了完成更高的特异性 (>98%) 来识别真实存在的甲基化区域。全基因组甲基化数据的富集最主要的方法是通过甲基化 DNA 免疫沉淀 (MeDIP) 来富集甲基化的 DNA。【4】然而，目前采用 MeDIP 方法，由大多数商业化的试剂盒取代，这些产品有着显而易见的劣势比如：包含高的非特异性的富集 (富集 DNA 的数量是 >75% 的 DNA 输入量)。【5】耗时，费力和低通量。为此，高效和特异性的捕获甲基化的 DNA 对于二代测序分析非常重要，一款理想的 MeDIP 方法：采用最小的背景水平拥有高灵敏度的试剂盒应用而生。A&D Technology Corporation 的**超级 MeDIP 试剂盒**的研发解决了这些不足。并且拥有最大限度的灵敏度和最小的非特异性的背景信号。

超级MeDIP试剂盒有如下优势和特点：

- ✓ 极速：整个操作步骤仅需不到 3 小时（从样本输入到制备好的甲基化 DNA）。非常快速且方便的操作，而且包含了不到 20 分钟的最少的处理时间。
- ✓ 专一性：最佳的溶液和操作说明容许最小的背景克服了因非特异富集的劣势。
- ✓ 特异性：试剂盒中高特异性的 5-mC 单克隆抗体可强的结合 2 或更多的 5-mCs 的单链和双链的 DNA 片段，高灵敏度的富集甲基化的 DNA 特异性可达 >99%。
- ✓ 纯化功能：离心柱和收集管方便了 DNA 纯化步骤。
- ✓ 超灵敏：要求非常低的 DNA 输入量，每次反应至少 50ng(10,000 个细胞)。
- ✓ 灵活性：96 孔可拆卸板模式使研究人员能根据自己需要选择手工单个单管或是高通量模式操作。
- ✓ 稳定性：使用预先设置好的 MeDIP 条件，高度可再现。
- ✓ 应用广：与各种下游实验分析相兼容。包括、MeDIP-PCR 和 MeDIP-chip 和特异性的 MeDIP-Seq。

此外，推荐您扩展阅读如下内容：

众所周知，在真核生物中，m6A (N6-methyladenosine) 是在 RNA 分子中最常见的和丰富存在的。这种修饰是由 m6A 催化甲基转移酶复杂 METTL3 和最近发现的 m6A RNA 去甲基转移酶如 FTO 和 ALKBH5，这种 m6A RNA 去甲基是以  $\alpha$ -ketoglutarate m6A ( $\alpha$ -KG)-和 Fe<sup>2+</sup> 方式进行的。结果表明，在许多生物过程中，如从生命发展和代谢生育，METTL3, FTO 和 ALKBH5 扮演着重要角色。超过 80% 的 m6A 是以 RNA 甲基化的形式存在于不同的物种。m6A 主要分布在 mRNA 和也发生在非编码 RNA (ncRNA) 如 tRNA, rRNA 和 snRNA。相对丰富的 m6A 在 mRNA 转录时已经表明影响核糖核酸代谢过程，如拼接，核出口，翻译能力和稳定性，RNA 转录。异常甲基化水平的 m6A 诱导缺陷甲基化酶和 m6A RNA 去甲基酶可能导致 RNA 功能障碍的和疾病发生。例如，异常低水平在正常 m6A 目标由于增加患者 FTO 活动、FTO 基因突变，通过迄今还未通路，导致了肥胖和相关疾病的发作。动态和可逆化学 m6A 修饰，在 RNA 中也可以作为一种新颖的表观遗传标记的生物学，意义深远可以预见。因此，更多的有用的信息，更好地理解 m6A RNA 甲基化水平和分布对 RNA 转录、诊断和治疗疾病非常有益。



该产品中,总RNA必将结合在微孔板上,使用一种高特异性的RNA溶液方案。使用特异性较强的捕获抗体和检测抗体来分析m6A。检测产生的增强信号,然后通过读取在微型板分光光度计波长为450 nm处吸光度进行比色定量。m6A的数量与测量的OD值强度是成正比的。在这个试剂盒中包括阳性和阴性对照。绘制标准曲线(范围:0.02到1 ng的m6A)或单点对照的m6A可以用作阳性对照。因为m6A的含量,在不同的组织,正常和病变的部位,或在处理过以及未处理的条件下,我们建议运行2份样品,以确保信号生成的可信心性。这套解决方案将允许研究人员选择定量一个绝对数量的m6A或确定相对m6A RNA甲基化状态的两个不同的RNA样品。

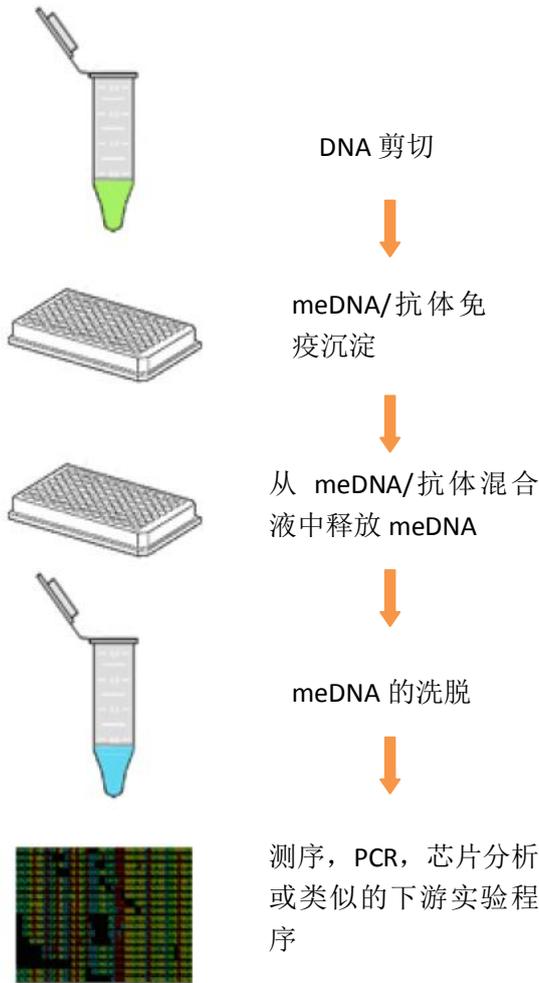
该款产品拥有一套完整的优化缓冲液和试剂体系,可以采用比色或荧光法来定量总RNA中的 m6A (N6-methyladenosine)。对于总RNA(从哺乳动物,各种组织或细胞样本如像培养瓶和培养皿培养的细胞,新鲜和冷冻的组织,石蜡包埋组织,血液,体液,植物,真菌,细菌和病毒等任何样本中提取的)中m6A直接定量检测甲基化状态是非常理想的。更多信息猛戳产品名称: [m6A RNA甲基化定量检测试剂盒\(比色法\)](#)

#### 相关参考文献:

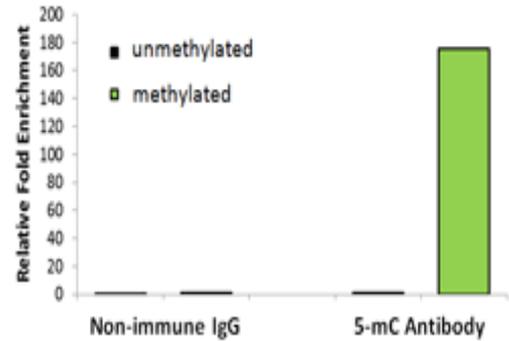
1. Tan K *et al.* (July 2016). [Dynamic integrated analysis of DNA methylation and gene expression profiles in in vivo and in vitro fertilized mouse post-implantation extraembryonic and placental tissues.](#) *Mol Hum Reprod.* **22(7)**:485-98.
2. Ren L *et al.* (December 2015). [Dynamic comparisons of high-resolution expression profiles highlighting mitochondria-related genes between in vivo and in vitro fertilized early mouse embryos.](#) *Hum Reprod.* **30(12)**:2892-911.
3. Ruike Y *et al:* *BMC Genomics*, 11: 137, 2010.
4. Weber M *et al:* *Nature Genetics*, 37: 853-862, 2005.
5. Brebi-Mieville P *et al:* *Epigenetics*, 7: 106-112, 2012

## 原理/步骤

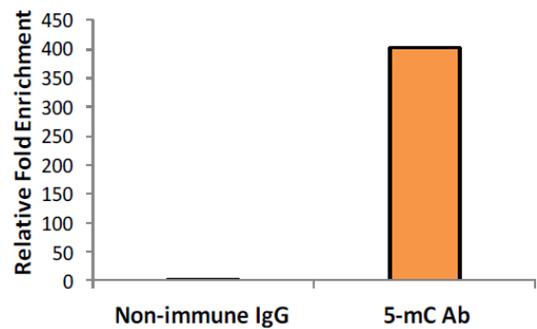
超级MeDIP试剂盒包括了所有必须的试剂,来进行成功的MeDIP步骤,使用从哺乳动物细胞或组织样本提取的DNA。这款试剂盒包括了甲基化的DNA(mDNA)对照和未甲基化的DNA(unDNA)对照,一个阴性对照non-immune IgG和对照引物,使用对照DNA来证明甲基化DNA富集的效率 and 特异性。阳性对照DNA包含5-mC只能通过5-mC抗体免疫沉淀而不会被non-immune IgG免疫。在这个MeDIP中,免疫沉淀反应得到富集的5-mC DNA片段是在微孔板中处理在最佳的反应条件下,以高效率在3个小时内完成MeDIP成为可能。然后免疫沉淀反应得到的甲基化DNA清洗,释放,和洗脱。洗脱的DNA可以被用来进行各种下游实验程序包括PCR(MeDIP-PCR)和芯片分析(MeDIP-chip),和尤其是适合MeDIP-Seq。



图示：超级 MeDIP 试剂盒操作流程



使用超级 MeDIP 试剂盒可选富集甲基化 DNA。50pg 的未甲基化或甲基化的 DNA 每次加入标准的片段化的人的基因组 DNA (100ng)。使用试剂盒中包括的 5-mC 单克隆抗体和 non-immune IgG 来处理, 并进行 MeDIP。使用试剂盒中的对照引物采用实时荧光定量 PCR 方法来对洗脱的 DNA 进行分析, 并检测标准对照 DN 的百分比。倍数富集代表了再次回收对照 DNA 的数量和基于实时荧光定量 PCR Ct 值的估算。



通过 MeDIP-qPCR 方法来检测特定基因高灵敏的检测。完全甲基化的 HeLa DNA 采用超声波系统被片段化成 100-500bps。使用超级 MeDIP 试剂盒从片段化的 DNA 富集甲基化的 DNA。在启动子区域使用特异性的 MLH1 测序引物来分析洗脱的 DNA。结果表明 5-mC 抗体的特异性和对于 non-immune IgG 的低背景。倍数富集代表了再次回收对照 DNA 的数量和基于实时荧光定量 PCR Ct 值的估算。

## 用法

### 操作手册

为了得到最好的实验结果，在实验开始前，请通读整个操作手册。

#### **起始材料：**

**DNA输入数量：**输入的DNA数量范围是从50ng到500ng 每次反应。每次反应的最佳数量是：100ng。

**DNA提取：**您可以使用自己的办法来提取DNA。当然，本手册后附有DNA提取的相关产品。或加技术QQ：1951545998 咨询或加微信号：hugasis。

**DNA储存：**提取好的基因组DNA可以储存在-20° C（短期）或是在-20° C（长期）直到使用为止。

#### **1. 基因组DNA的剪切：**

为了得到最好的结果，DNA应该被片段化通过适当的超声波方法处理。

##### **恒温水槽超声波处理方法：**

较好的结果，采用EpiSonic Multi-Functional Bioprocessor 1100系统超声处理DNA。使用 30ul 提取的DNA溶液（从100ng最大3ug）每个 0.2ml PCR管子或每个PCR孔板。在冷冻条件下剪切60个循环，30秒开，30秒关，在120-130目标瓦。为了获得更多使用的信息，请参考使用EpiSonic Multi-Functional Bioprocessor 1100系统的手册。如果使用另外的水浴超声设备，请参考供应商的说明书。

##### **基于探针的超声波处理方法：**

使用 300ul 提取的DNA溶液每个 1.5ml 离心管。例如：使用带集成电路连接的 布兰森 450 sonifier 执行超声波处理，设置成25% 的功率输出。每次10-15秒，超声3-4个脉冲，紧接着每次脉冲需要在冰上歇30-40秒。DNA剪切条件应该是基于超声波处理设备来调整实验条件。

**注：**当基于探针的超声波执行时，如果在DNA样本溶液中形成过多的泡沫，可能会影响超声的效果。如果存在这种情况，中断继续超声并在12,000rpm 4° C下离心3分钟来移走气泡。

提取好的DNA同样也可以采用各种基于酶的方法来超声处理。理想的剪切条件，比如：酶浓缩和孵育时间，这些都是基于酶法处理的必要条件。

DNA溶液现在可以立即使用或在-80° C在恰当的等分后分管冻存，直至使用为止。尽量避免多次反复冻融。

**注：**在开始免疫沉淀反应步骤前，超声DNA的大小就被确认。使用10ul (>500ng)片段化的DNA分析，同步采用DNA marker 在1-2%琼脂糖凝胶中；使用溴化乙锭作为染料或恰当的荧光染料针对DNA并形象化在紫外灯下观察。

剪切的DNA长度应该在100-600bps 峰值出现在 250bps。

## 2. MeDIP反应的制备:

a. 通过添加1ul 的对照mDNA或对照unDNA到3ul 的 **MeDIP Buffer**。稀释对照mDNA和unDNA到50ng/ml (50pg/ul)。使用**MeDIP Buffer**稀释您的样本DNA到10ug/ml(10ng/ul)。根据如下表通过添加恰当的试剂到每个相应的0.5ml 管中来设置MeDIP反应。

试剂	样本管	针对样本的阴性对照管	对照mDNA管	对照unDNA管
<b>MeDIP Buffer</b>	84ul	84ul	93 ul	93 ul
样本DNA(10ng/ul)	10ul	10ul	0	0
对照DNA(50pg/ul)	0	0	2.0 ul	1ul
<b>BS(Bolcker Solution)</b>	5ul	5ul	5ul	5ul
<b>5-mC Ab</b>	1ul	2.0 ul	1ul	1ul
<b>Non-Immune IgG</b>	0	1ul	0	0

b. 盖上管子并室温孵育60分钟在旋转器上点对点或滚动的摇床持续1个小时。

c. 根据您的实验预先取出所需要的条孔数量。从板上拿走暂时不用的条孔并将它们装回袋子中(紧紧的合上袋子并在4° C储存)。

d. 从每个管子中转移反应液到条孔板中。小心使用封口膜密封条孔。在定规摇床(100rpm)上室温孵育60分钟。

e. 小心剥开封口膜避免每个孔间的污染。

## 3. 反应孔的清洗:

a. 每个孔通过移液器小心移走并丢弃溶液。

b. 每次使用200ul WB 清洗液清洗每个孔三次。这个过程可以通过移液器简单的吸取WB到孔中, 然后从孔中移走。

c. 每次使用1X TE Buffer 200ul 清洗每个孔。

## 4. DNA的释放和纯化:

a. 每个样本, 通过添加1ul 的**Proteinase K** 到 39ul 的**DRB**中来制备**DRB-PK Solution**。混合。

b. 每个孔中添加40ul 的 **DRB-PK Solution**。使用条孔盖紧并在60° C下孵育20分钟。

c. 从每个孔转移 DNA 溶液到一个 0.2ml 条孔 PCR 管中。盖上 PCR 管子。

d. 在热循环仪中 95° C 孵育包含 DNA 溶液的 PCR 管 5 分钟。

e. 室温放置 PCR 管子。如果收集的液体在盖子里面有残留, 简单的离心液体到管底。洗脱下来的 DNA 现在可以直接被用来 PCR。另外, 在 MeDIP 测序中继续接下来操作第 4f 步的纯化步骤。



f. 放置一个离心柱到一个 2ml 的收集管中。每个样本中添加 250ul 的 DBS DNA Binding Solution 并转移溶液到柱子中。在 12,000rpm 下离心 30 秒。

g. 添加 200ul 90%的乙醇到离心柱中；在 12,000rpm 离心 30 秒。从收集管中移走离心柱并丢弃滤出液。

h. 放置离心柱到收集管中。添加 200ul 的 90% 的乙醇到离心柱中。在 12,000rpm 离心 30 秒。

i. 移走离心柱并丢弃滤出液。放置离心管到到收集管中并使用 200ul 90%的乙醇在 12,000rpm 下清洗离心柱 1 分钟。

j. 放置离心柱到一个 1.5ml 的管子中。直接添加 20ul **DEB** DNA Elution Buffer 到离心柱的柱基质上并在 12,000rpm 离心 30 秒。

纯化后的 DNA 现在可以用于 PCR, MeDIP-chip, 和 MeDIP-seq, 或在 -20° C 储存。

**注：**对于实时荧光定量PCR分析，我们推荐使用1ul 洗脱的DNA在一个 20ul PCR反应中。对于断点PCR，为得到更好的PCR结果需要调整理想的PCR循环数。

一般来说，在正常IgG对照和5-mC富集DNA之间扩增数不同，可能也就是3-8循环数，取决于实验条件。在mDNA对照和unDNA对照之间的不同的扩增数一般是>7%循环数（特异性>99%）。

对于MeDIP-Seq，如果测序是在MiSeq, HiSeq 1000, HiSeq 2000, HiSeq2500, HiscanSQ, 或基因分析仪，使用Illumina ChIP-seq DNA样本制备试剂盒来构建ChIP DNA 文库。对于测序采用另外的测序平台，根据这些平台提到的使用方法来选择恰当的制备方法。

一般来说，对于甲基化的DNA文库构建至少需要10ng 的 MeDIPed DNA。我们推荐合并使用MeDIP反应来自几个孔中的DNA溶液，且样本是同一个样本，来得到10ng 或更高的DNA浓度。我们同样推荐演示qPCR时，要确认MeDIPed DNA的质量。

## 疑难解答

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
样本中很少或没有 PCR 产物	因不足的细胞数，提取或讲解等因素导致 DNA 数量稀少	为了获得最好的结果，每次 MeDIP 的 DNA 数量应该是在 50-500ng, 260/280 比率>1.6。
	不恰当的 DNA 剪切条件	DNA 片段化大小应该是在 100-600bp。过度的 DNA 片段化可能减少通过抗体来达到目标 DNA 的捕获，过小的 DNA 片段可能减少 PCR 效率。

	在 DNA 释放过程汇总，不正确的温度或不足的时间	确保孵育的时间和温度是正确的按照说明书中设置的。
	不恰当的 PCR 条件设置	确保 PCR 设置是正确的。
	不恰当的 PCR 反应溶液	如果使用自制的 PCR 反应溶液检查每个组件是否正确混合。如果使用一个 PCR 试剂盒，检查是否适合您的 PCR 实验。
	不恰当的引物	确保种属适合您的引物。引物的设计应该能覆盖短的测序区域（70-150bp），对于扩增目标 DNA 的提取和区域更为有效。
	不恰当的样本储存	DNA 样本应该储存在 -20° C（3-6 个月）。
阴性对照和阳性对照信号强度没有不同	清洗孔不足	在每步，检查清洗条件是否按照说明书来操作。如果信号强度在阴性对照中仍然很高，强烈按照如下操作来清洗： 1. 在每次清洗步骤增加清洗时间；在添加 <b>WB</b> 后，让 <b>WB</b> 在孔中持续 2-3 分钟后，再移走。 2. 增加额外的一个或二个清洗步骤。 <b>WB</b> 的体积对于每次样本的二次清洗步骤是足够的。
	过多的 PCR 循环数	在平台扩增阶段，过多的 PCR 循环数可能模糊了在阴性对照和阳性对照之间的信号强度。在指数平台扩增减少 PCR 循环数（ex:32-35 循环）将会降低高背景在断点 PCR 中。容许不同存在。在这种情况下，实时荧光定量 PCR 是另外一种选择。
在对照 DNA 和对照 unDNA 间信号强度没有不同	添加到 PCR 反应对照数量是太高	确保对照 mDNA 和对照 unDNA 的终浓度是 <0.01pg/20ul PCR 反应溶液的。
	不足清洗孔	检查在每步推荐的清洗步骤是否按照说明书来执行。如果在阴性对照中信号强度仍然很高，按照如下来增加清洗的强度： 1. 在每次清洗步骤增加清洗时间；在添加 <b>WB</b> 后，让 <b>WB</b> 在孔中持续 2-3 分钟后，再移走。 2. 增加额外的一个或二个清洗步骤。 <b>WB</b> 的体积对于每次样本的二次清洗步骤是足够的。

## 附录

### 实时荧光PCR



**引物设计:**

引物设计应该参考标准的实时荧光定量PCR。例如，覆盖测序区域应该在50-150bp 的长度。G/C配对在3'端的引物，应该尽量避免。

**PCR反应:**

实时荧光PCR可以采用您自己已经证明的方法来演示。为了您的便利和较好的实验结果，A&D Technology Corporation提供了 [EpiQuik定量PCR快速试剂盒 \(A-P-1029\)](#)，可以用来做快速的qPCR反应。

例如，下面可见操作步骤:

**PCR反应的准备:**

解冻所有反应组件包括预混液，DNA/RNA free water，引物溶液和DNA模板。简单使用旋转仪来混合。在使用时保证组件放置在冰上，并在使用完后立刻放回到-20° C以备下次使用。根据如下表格来添加组件到每个孔:

Component	Size(ul)	Final Concentration
Methylamp Master Mix(2X)	10ul	1X
Forward Primer	1ul	0.4-0.5uM
Reverse Primer	1ul	0.4-0.5uM
DNA Template	1-2ul	50pg-0.1ug
DNA/RNA-free H <sub>2</sub> O	6-7ul	
<b>Total Volume</b>	<b>20ul</b>	

对于阴性对照，使用DNA/RNA-free water 代替DNA模板。

**设置PCR反应的条件:**

放置反应板在仪器中并设置PCR反应的条件按照如下表:

Cycle Step	Temp	Time	Cycle
Activation	95° C	2min	1
Denature	95° C	5min	
Cycling	95° C	10sec	40
	55° C	10sec	
	72° C	10sec	
Final Extension	72° C	1min	1

**倍数富集计算:**

倍数富集 (FE) 通过简单的使用MeDIP样本的扩增效率跟non-immune IgG的关系。

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

例如：如果对于IgG的CT是：38和样本的CT是：34，然后...

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



## 订购信息

货号	品名	规格
A-P-1052	超级 MeDIP 试剂盒	24 次、48 次
A-P-9009	总体 RNA 甲基化极易定量检测试剂盒(荧光法)	48 次、96 次
A-P-9007	EpiNext RNA 甲基化极易测序试剂盒 (Illumina)	12 次、24 次
A-P-9005	m6A RNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 次
A-R5001	EZ RNA 甲基化修饰试剂盒	50 次
A-R5002	EZ RNA 甲基化修饰试剂盒	200 次
A-P-9003	RNA 甲基化修饰试剂盒	50 次、100 次

## 推荐产品

### RNA 和 microRNA 样本的制备:

货号	品名	规格
A-R1202	A&D TRIpure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒 (离心柱)	50 次、100 次
A-RH110	细胞/组织总 RNA 提取试剂盒 (离心柱)	50 次、200 次
A-R5311	石蜡包埋组织 microRNA 快速提取试剂盒 (离心柱)	50 次、100 次
A-R4002	A&D 血液总 RNA 快速提取试剂盒 (液体样本,离心柱)	50 次、100 次
A-RH710	血液总 RNA 小量提取试剂盒 (离心柱)	50 次、200 次
A-R5908	血液 (液体样本) microRNA 快速提取试剂盒 III 型 (柱型)	50 次、100 次
A-R3202	多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒 (离心柱)	50 次、100 次
A-R3302	A&D 通用植物总 RNA 提取试剂盒 (离心柱型)	50 次、100 次
A-RH130	植物总 RNA 提取试剂盒 (离心柱)	50 次、200 次
A-R5331	通用植物 microRNA 快速提取试剂盒 (柱型)	50 次、100 次

### 特定基因 DNA 甲基化定性定量试剂盒和全基因组 DNA 甲基化定量试剂盒:

货号	品名	规格
A-P-1016	DNA 甲基化直接修饰试剂盒---无需提取 DNA	40 次、80 次
A-P-1026	DNA 甲基化极速修饰试剂盒---需要提取 DNA	50 次、100 次
A-P-1050	96 孔 DNA 甲基化极速修饰试剂盒 (磁珠法)	96 次、192 次
A-P-1054	DNA 甲基化极易修饰试剂盒	50 次、100 次
A-P-1064	游离环状 DNA 提取试剂盒 (磁珠法)	25 次、50 次
A-P-1028	快速 MS-qPCR 试剂盒	100 次、200 次
A-P-1029	Epiquick qPCR 快速试剂盒	100 次、200 次
A-P-1030	DNA 甲基化极易定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 次
A-P-1032	DNA 羟甲基化极易定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 次
A-P-1034	DNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 次
A-P-1035	DNA 甲基化定量检测试剂盒(荧光法)	48 次、96 次
A-P-1036	DNA 羟甲基化定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 次
A-P-1037	DNA 羟甲基化定量检测试剂盒(荧光法)	48 次、96 次



## 相关产品

货号	品名	规格
A-BC121	DNase I(RNase-free)(2 U/ul)	2000U、10000U
A-RH113	总 RNA 提取试剂盒	50 次、200 次
A-RQ110	A&D Pur-zol™ Reagent	100ml、200ml
A-E2001	ZymoTaq DNA Polymerase	50 次、200 次

## 如何下单

1. 电话，传真或邮件订购：

技术电话：010—57225208；传真：010—52406250；订购电话：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. RNA 甲基化修饰和定量？惊呆了我和小伙伴们!!!

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=30829>

2. A&D Technology Corporation 解码神秘的 RNA 第 5 个碱基---m6A(N6-methyladenosine)

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=30227>

3. 艾德科技史上最全表观遗传学产品线与服务，让你的研究冰爽一“夏”！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=27858>

4.“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>

5. 科学家发现新型 DNA-microDNA！

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

6. 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>

7. A&D Technology Corporation 长期供应下一代超高敏测序系列产品！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=30108>

8. 【表观遗传-m6A 深度研究】绝招在身，走遍天下！掌握表观遗传学前沿产品研究工具！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=49286>



公众号：AD-Bio



订阅号：Bio-888



艾德科技（北京）有限公司  
一站式采购 [www.aderr.com](http://www.aderr.com) 实验室好伙伴

---



**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 米艾德园（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)