

\*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。

# 组织DNA甲基化免疫共沉淀 反应试剂盒 (TMDIP)

目录号: **A-P-2020-24 (24次)**  
**A-P-2020-48 (48次)**

适用于从各种哺乳动物组织中提取甲基化DNA

## 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！

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)

2011年5月，第1版，对应英文第2.08707版



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

## 目录

产品介绍	2
原理及步骤	3
产品使用信息	5
试剂盒组成	6
运输和保存	7
需要的材料 (需单买)	7
步骤	8
疑难解答	12
订购信息	14
推荐产品	14
如何下单	15
推荐阅读	15

## 产品介绍

基因组DNA表观遗传学改变的核心机制是**CpG**岛在特异性基因中的过甲基化以及总体DNA低甲基化。特异性区域DNA甲基化主要发生在启动子中的**5'-CpG-3'** 二核苷酸上，或在基因的第一个外显子上，这是抑制疾病细胞中基因转录的一个重要的途径。全基因组DNA低甲基化极有可能是由不同环境影响导致的甲基缺乏引起。

已经证明，DNA甲基化改变与各种疾病具有联系，尤其是癌症。高度专一性的甲基化DNA提取可以给正常或患有疾病的细胞提供更具优势、方便快捷以及全面的甲基化状态识别，例如癌细胞，从而推动发展癌症新的诊断和治疗方法。现在已经有多种方法获得浓缩的甲基化DNA，包括甲基—CpG结合域（MBD）基于甲基化DNA亲和柱和甲基化DNA免疫共沉淀反应。然而迄今为止，这些方法都相当的耗费时间，耗费劳力，低产出，更糟的是，还需要纯化的DNA作为起始材料。

我司组织DNA甲基化免疫共沉淀反应试剂盒（**TMDIP**）拥有其专有独特的步骤/构成，从各种哺乳动物组织中提取甲基化DNA。在实验中，甲基胞嘧啶特异性抗体被使用来做全

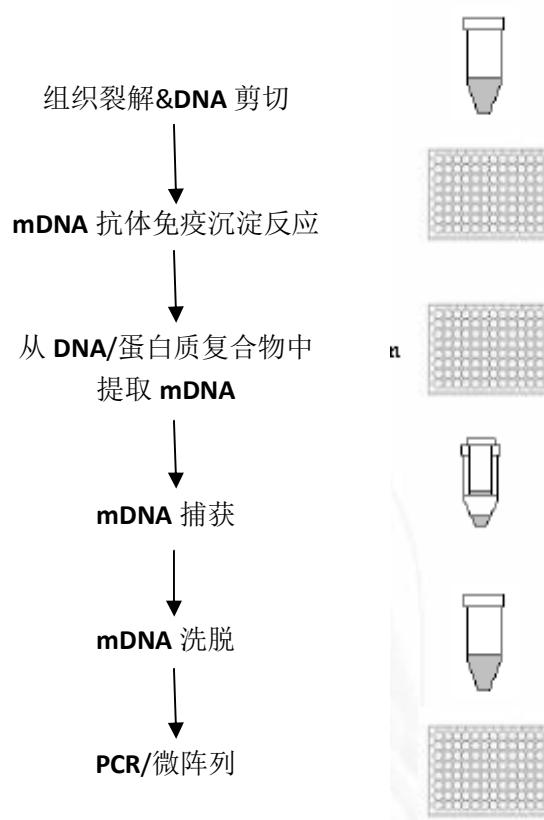
基因组DNA甲基化免疫共沉淀反应。然后，免疫共沉淀甲基化的片段可以用来做标准DNA检测。

我司组织DNA甲基化免疫共沉淀反应试剂盒具有以下特点：

- 直接对组织裂解物DNA甲基化片段做免疫共沉淀
- 高效获得浓缩甲基化DNA **> 95%**。
- 最快的操作步骤，仅需**3.5**小时。
- 联管孔板设计使实验更灵活：手动，高产出。
- DNA纯化柱设计：省时省力。
- 兼容后续所有采用不同方法的PCR扩增实验
- 简单，可信，实验条件始终如一。

## 原理及步骤

该组织 DNA 甲基化免疫共沉淀反应试剂盒包含成功进行哺乳组织甲基化 DNA 免疫共沉淀实验所需要的全部组件。特别的是，该试剂盒包含 **ChIP** 级 5-甲基胞嘧啶抗体，阴性对照正常小鼠免疫球蛋白 **G (IgG)**。细胞中的 DNA 萃取、修剪并添加到微孔中使用抗体固化。DNA 从抗体-DNA 复合物中释放，通过特殊设计的 **F**-离心柱纯化。洗脱的 DNA 即可用于多种下游应用。



图解组织DNA甲基化免疫共沉淀反应试剂盒 (TMDIP) 使用过程

## 产品使用信息

甲基化DNA免疫共沉淀反应试剂盒 (TMDIP) 可用于广泛物种的甲基化DNA免疫共沉淀反应，包括人类，大鼠，老鼠等。

该试剂盒适用于特异性结合甲基化DNA免疫共沉淀，**PCR**定性与定量，印记杂交，以及**DNA**微阵列。

我司保证所有产品的性能跟说明书中的描述一致。我司产品已在美国申请专利，我司保留改变或修改任何产品以增进其性能和设计的权力。

甲基化DNA免疫共沉淀反应试剂盒 (TMDIP) 只用于科研，不用于诊断和治疗的目的。

## 试剂盒组成

内容	24次 A-P-2020-24	48次 A-P-2020-48
<b>CP1 wash buffer</b> (洗涤缓冲液)	<b>28ml</b>	<b>2 x 28 ml</b>
<b>CP 2 antibody buffer</b> (抗体缓冲液)	<b>15ml</b>	<b>30ml</b>
<b>CP 3 lysis buffer</b> (裂解缓冲液)	<b>2ml</b>	<b>2x2ml</b>
<b>CP 4 ChIP dilution buffer</b> (ChIP稀释缓冲液)	<b>2ml</b>	<b>2x2ml</b>
<b>CP 5 DNA release buffer</b> (DNA释放缓冲液)	<b>1ml</b>	<b>2ml</b>
<b>CP 6 reverse buffer</b> (逆向缓冲液)	<b>1ml</b>	<b>2ml</b>
<b>CP 7 binding buffer</b> (结合缓冲液)	<b>5ml</b>	<b>8ml</b>
<b>CP 8 elution buffer</b> (洗脱缓冲液)	<b>0.6ml</b>	<b>1.2ml</b>
<b>Homogenizing buffer</b> (均质化缓冲液)	<b>5ml</b>	<b>10ml</b>
<b>Normal mouse IgG (1 mg/ml)*</b> 正常鼠免疫球蛋白G (1 mg/ml) *	<b>10μl</b>	<b>10μl</b>
<b>Anti-5-methylcytosine (1mg/ml)*</b> 抗-5-甲基胞嘧啶 (1 mg/ml) *	<b>25μl</b>	<b>50μl</b>
<b>Proteinase K (10 mg/ml)*</b> 蛋白酶K (10mg/ml) *	<b>25μl</b>	<b>50μl</b>
<b>8-well assay strips (with frame)</b> 8联管 (带裙边的)	<b>3</b>	<b>6</b>
<b>8-well strip caps</b> 8联管盖	<b>3</b>	<b>6</b>
<b>F- 离心柱*</b>	<b>30</b>	<b>50</b>
<b>F- 收集管</b>	<b>30</b>	<b>50</b>
使用手册	<b>1</b>	<b>1</b>

\*注意: \*使用溶液前, 将溶液离心至管底。

## 运输和保存

以下组件**4°C**保存:

**Normal mouse IgG (1 mg/ml)\***正常鼠免疫球蛋白G (1 mg/ml) \*  
**Anti-5-methylcytosine (1mg/ml)\***抗-5-甲基胞嘧啶 (1 mg/ml) \*  
**Proteinase K (10 mg/ml)\***蛋白酶K (10mg/ml) \*  
**8-well assay strips (with frame)**8联管 (带裙边的)

其他组件在室温下保存。

在合适的保存条件下, 该试剂盒有效期自发货之日起一年。

## 需要的材料 (需单买)

各种温度的恒温水槽  
 蜗旋搅拌器  
 台式离心机 (可达**14,000 rpm**)  
 杜恩斯匀化器  
 超声波仪  
 震荡器 (或摇床)  
 移液器和移液枪头  
**1.5 ml** 微型离心机管  
**15 ml** 锥形管  
**TE** 缓冲液 (**pH 8.0**)  
 乙醇 (**96-100%**)

## 步骤

在开始前, 请先准备以下事项:

1. 准备以下所需溶液 (试剂盒中未带): **90%** 乙醇; **70%** 乙醇; **1X TE缓冲液 (pH 8.0)**。
2. 确保所有的缓冲液都是清洁的溶液。摇晃或蜗旋看这些溶液是否有沉积。

### 将抗体吸附到孔板中

1. 决定需要多少个联管。将这些联管放在板框架中 (将不用的联管放回到包中。将包口密封紧, 放在**4°C**下保存) 清洗联管一次, 使用**CP1溶液 150 μl**。
2. 加入**CP2溶液 100 μl**到每一个联管中, 然后加入抗体: **1 μl正常鼠免疫球蛋白G**作为阴性对照, **0.5-1 μl抗-5-甲基胞嘧啶**为样本。
3. 将联管的用石蜡封口膜**M**盖上, 在室温下孵育**60**分钟。同时, 按照下一步所描述, 准备细胞提取物

### 细胞收集和裂解

#### 组织裂解:

1. 将组织样本放入**60或100mm**的器皿中。将不需要的组织

移走, 例如: 脂肪, 样本坏死物质。样本称重, 并使用手术刀或剪刀将其切割成小块 (**1-2 mm<sup>3</sup>**)。

2. 将组织小块转移到杜恩斯匀化器中。在每**200mg**组织中加入**1 ml**均质缓冲液, 进行**10-30**次击打, 将组织块裂解。
3. 将均质化混合物转移到**15ml**的锥形管中, 在**4°C, 3000 rpm**下离心**5**分钟。如果所有的混合物体积少于**2ml**, 将混合物转移到**2ml**的小瓶中, 在**4°C, 5000 rpm**下离心**5**分钟。移走上清。

### 组织裂解和DNA剪切

1. 加入 **CP3** 使裂解的组织球状颗粒悬浮 (**100 μl/20 mg** 组织)。将溶液转移至 **1.5ml** 瓶中 (每瓶最多 **500 μl**), 室温孵育 **10** 分钟, 并间或蜗旋。
2. 使用超声波降解法剪切DNA。通常, 调到二级, **4-5**脉冲, 每次**15-20**秒, 使用布兰森超微探针, 然后在每次脉冲间, 放在冰上停留**30-40**秒。 ( DNA剪切条件基于细胞以及超声设备, 使用好的细胞和超声设备能使条件最优化。若需要, 将超声处理好的细胞裂解物**5 μl**进行琼脂糖凝胶分析。剪切的DNA长度应在**200-1000 bp**之间。)
3. 在**14,000 rpm**下将球状的细胞碎片离心**10**分钟。

### DNA甲基化免疫共沉淀反应

1. 将澄清的上清转移到新的**1.5ml**的瓶子里（在这一步中，上清可以保存在**-80°C**条件下）。使用**CP4**以**1:1**的比例稀释所需容量的上清（例如：在**100 μl**上清中加入**100 μl CP4**）。
2. 将稀释后的上清取出**5 μl**，放入**0.5ml**的瓶中。在瓶上贴好标签“输入DNA”然后放在冰上。
3. 将孵育的抗体溶液移出，用移液器取**150 μl CP2**清洗联管三次。
4. 往每一个联管中加入**100 μl**稀释后的上清。使用石蜡封口膜**M**盖住联管。将其放在震荡器上（**50-100 rpm**），在室温下（**22-25°C**）孵育**90-120**分钟。
5. 移走上清。使用**150 μl CP1**清洗联管六次。每次清洗时，将其放在震荡器上（**50-100 rpm**）**2**分钟。再使用**150 μl 1X TE**缓冲液清洗联管（**2**分钟）一次。

### DNA甲基化提取/纯化

1. 将**1 μl**蛋白酶**K**加入到**40 μl CP5**中混合。在样本（包括贴有“输入DNA”标签的瓶子）中加入该混合液。将装有样本的联管盖上盖子，**65°C**下放在恒温水槽中孵育**15**分钟。

2. 加入**40 μl CP6**到样本中，混合，再用联管盖盖上，**65°C**下放在恒温水槽中孵育**30**分钟。同样，也将**40 μl CP6**加入到含有上清的瓶里（输入DNA），混合并**65°C**放在恒温水槽中孵育**30**分钟。
3. 将离心柱放入**2ml**收集管中。加入**150 μl CP7**到样本中，将混合溶液加到柱子中。**12,000 rpm**下离心**20**秒。
4. 将**200 μl 70%**乙醇加入到柱子中，在**12,000 rpm**下离心**20**秒。从收集管中移走柱子，扔掉溢流道。
5. 将柱子放回到收集管中。加入**200 μl 90%**乙醇到柱子中，在**12,000 rpm**下离心**20**秒。
6. 将柱子移走，弃废液。将柱子放回到收集管中，再次使用**200 μl 90%**乙醇清洗柱子，在**12,000 rpm**下离心**35**秒。
7. 将柱子放入**1.5ml**的离心管中。将**10-20 μl CP8**直接加入到柱基质中，在**12,000 rpm**下离心**20**秒，纯化好的DNA以备下游使用。

甲基化 DNA现已经配置好可以使用，也可在保存在**-20°C**。

注意：做**PCR** 阳性对照（甲基化）以及阴性对照（未甲基化），可以分别使用高度甲基化序列**H19/CR**、**LAP** 或 **XIST** 引物，以及未甲基

化的**肌动蛋白**  $\beta$ -actin 或 **GAPDH** 序列的引物。做常规 **PCR**, **PCR** 循环数有待优化, 以便得到更好的 **PCR** 结果。

参考: Weber M et al: Nature Genetics, 37: 853-862, 2005.

## 疑难解答

问题: <b>PCR</b> 产物少或没有	
可能的原因	建议
1. 组织不足。	增加组织量 (例如: >20 mg组织/反应)。
2. 组织裂解不完全。	按照步骤来操作。检查组织裂解, 通过在显微镜下观察5 $\mu$ l组织裂解物。
3. 声波降解不足/过足。	按照步骤来操作, 得到合适大小的DNA。在声波处理中, 要将样本放在冰上。
4. DNA释放温度不对/时间不足。	按照步骤在正确的温度和时间下操作。
5. <b>PCR</b> 条件不正确。	检查是否所有的 <b>PCR</b> 组件都添加了。增加 <b>PCR</b> 反应中的DNA量。增加 <b>PCR</b> 反应循环数。
6. 错误的或变质的引物。	确保引物可以特异性结合目标序列。
7. 柱子不是用90% 乙醇清洗。	确保清洗液是 90% 乙醇。

8. DNA 没有完全通过过滤膜。	将第三步~第七步中“甲基化DNA提取/纯化”的离心时间增加至1分钟。
<b>问题:</b> 样本与阴性对照的扩增差异很少或没有。	
1. 可能的原因。	建议
2. 每一步中的清洗不到位。	按照步骤正确清洗。
3. 抗体被错误的加入到放阴性对照的联管中。	确保抗体被加入到正确的联管中。
4. <b>PCR</b> 循环次数太多	如果使用常规 <b>PCR</b> , 减少循环至合适的次数。起始DNA量之间的差别大体上可以在线性 <b>PCR</b> 扩增阶段中测量到。

## 订购信息

货号#	描述	规格
<b>A-P-2020-24</b>	组织DNA甲基化免疫共沉淀反	<b>24次</b>
<b>A-P-2020-48</b>	应试剂盒 (TMDIP)	<b>48次</b>

## 推荐产品

DNA样本准备	
货号#	描述
<b>A-P-2002</b>	染色体免疫共沉淀 ( <b>CHIP</b> ) 试剂盒
<b>A-P-2003</b>	组织染色体免疫共沉淀 ( <b>CHIP</b> ) 试剂盒
<b>A-P-2006</b>	甲基-组蛋白 <b>H3-K9 CHIP</b> 试剂盒
<b>A-P-2007</b>	甲基-组蛋白 <b>H3-K4 CHIP</b> 试剂盒
<b>A-P-2008</b>	组织甲基-组蛋白 <b>H3-K9 CHIP</b> 试剂盒
<b>A-P-2009</b>	组织甲基-组蛋白 <b>H3-K4 CHIP</b> 试剂盒
<b>A-P-2010</b>	乙酰-组蛋白 <b>H3 CHIP</b> 试剂盒
<b>A-P-2011</b>	乙酰-组蛋白 <b>H4 CHIP</b> 试剂盒
<b>A-P-2012</b>	组织乙酰-组蛋白 <b>H3 CHIP</b> 试剂盒
<b>A-P-2013</b>	组织乙酰-组蛋白 <b>H4 CHIP</b> 试剂盒
<b>A-P-2015</b>	乙酰-组蛋白 <b>H3-K27 CHIP</b> 试剂盒
<b>A-P-2016</b>	组织乙酰-组蛋白 <b>H3-K27 CHIP</b> 试剂盒
<b>A-P-2019</b>	甲基化DNA免疫共沉淀试剂盒
<b>A-P-1038</b>	DNA羟甲基化免疫共沉淀试剂盒 (hMeDIP)

## 如何下单

1. 电话, 传真或邮件定购:

电话: **010-52406250**; 传真: **010-52406250**;

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

2. 在线定单定购:

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1771&t=147>

**4**

## 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. 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) 电 邮: [tech@aderr.com](mailto:tech@aderr.com)