

*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

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**）拥有其专有的独特的步骤/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

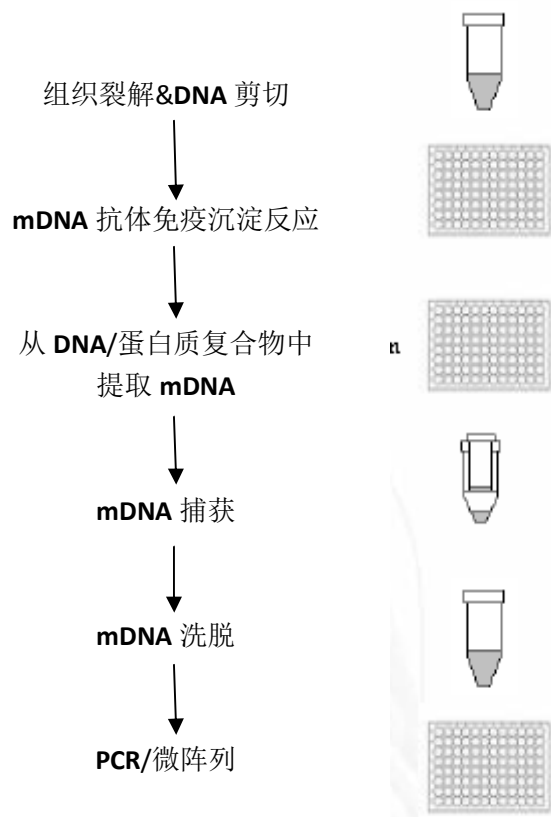
基因组DNA甲基化免疫共沉淀反应。然后，免疫共沉淀甲基化的片段可以用来做标准DNA检测。

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

*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。摇晃或涡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 mm³**）。

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，并间或涡旋。
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**H19ICR**、**LAP** 或 **XIST** 引物，以及未甲基

化的**肌动蛋白 β -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：PCR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 μ 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. PCR条件不正确。	检查是否所有的PCR组件都添加了。增加PCR反应中的DNA量。增加PCR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。
问题：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. PCR循环次数太多	如果使用常规PCR，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PCR扩增阶段中测量到。

订购信息

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

推荐产品

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

如何下单

- 电话, 传真或邮件订购:
电话: **010-52406250**; 传真: **010-52406250**;
邮件: ordering@aderr.com
- 在线定单订购:
<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1771&t=147>

4

推荐阅读

- “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>
- 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 电 邮：tech@aderr.com