



DNA 甲基化定量检测试剂盒 (比色法)

P-1034-48 (48次) & P-1034-96 (96次)

为方便客户使用试剂盒，善意将其翻译成中文。

操作手册，请以试剂盒中配套的英文版为准！

对于由本说明书中不当翻译所造成的损失，概不负责！

作者翻译水平有限，如有错误，欢迎指正！

本说明书对应英文版 (2014-06-19 版本)

试剂盒组成：

组成	P-1034-48 (48次)	P-1034-96 (96次)	储存
ME1 (10X Wash Buffer)	14 ml	28 ml	4°C
ME2 (Binding Solution)	5 ml	10 ml	RT
ME3 (Negative Control , 20 ug/ml)*	10 µl	20 µl	-20°C
ME4 (Positive Control , 20 ug/ml)*	10 µl	20 µl	-20°C
ME5 (Capture Antibody, 1000 ug/ml*)	4 µl	8 µl	4°C
ME6 (Detection Antibody, 400 ug/ml)*	8ul	16ul	-20°C
ME7 (Enhancer Solution)*	8ul	16ul	-20°C
ME8 (Developer Solution)	5ml	10ml	4°C
ME9 (Stop Solution)	5ml	10ml	RT
8-Well Assay Strips (With Frame)	6	12	4°C
操作手册	1	1	RT





***使用前，请将溶液离心至管底！**

注意: ME3 Negative Control 是未甲基化的多核苷酸，含 50%的胞嘧啶.

ME4 Positive Control 是甲基化的多核苷酸，含 50%的 5-甲基胞嘧啶.

运输和保存

本试剂盒分为 2 个部分：一部分室温运输，另一部分 4°C 运输.

收到试剂盒后：

- 1) ME3, ME4, ME6 和 ME7 避光储存-20°C
- 2) ME1, ME5, ME8, 和 8-Well Assay Strips 避光储存 4°C
- 3) ME2 和 ME9 避光储存 常温

- 注意：本试剂盒自发货之日起，保存状态良好的情况下，保质期为 6 个月！
- 使用之前检查溶液 **ME1**(10X Wash Buffer)是否含有盐的沉淀物.如是，置于常温或 37°C 摇晃，直至盐的沉淀物溶液全部溶解.

使用手册：(使用前，请通读本用户手册)

使用：

此 DNA 甲基化定量检测试剂盒（比色法）非常适合检测全基因组 DNA 甲基含量.DNA 样品可以来源于哺乳类动物，植物，真菌，细菌，病毒和培养细胞，新鲜与冷冻的组织，石蜡包埋组织，血浆/血清样本，体液样本.

DNA 上样量：

每次 DNA 的上样量为 50 - 200ng. 最优 DNA 的输入量为 100 ng,在某些种属中甲基化的 DNA 一般都小于 1%的总 DNA.





材料：

材料包括各种组织或细胞试样如细胞培养瓶或酶细胞、新鲜和冷冻组织、石蜡包埋组织、血浆/血清样品、体液样品等。

内控：

本试剂盒提供阳性与阴性 DNA 对照。一个标准曲线可以进行(范围:1 - 10 ng)或单个数量的甲基化的 DNA 可以作为阳性对照。因为全基因组甲基化是从组织到组织,从正常和病变的区域,建议确保运行复制样品信号的生成是经过验证的。这个工具可以让用户以量化的绝对数量或相对数量来确定甲基化的 DNA。

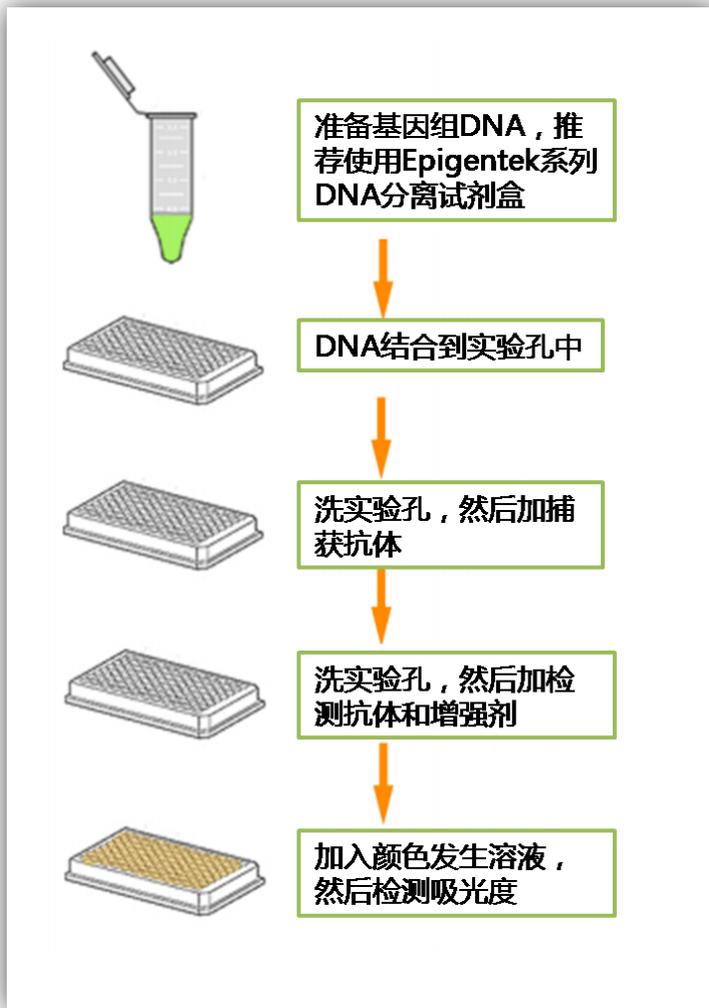
预防措施：

为了避免交叉污染,小心样品或溶液的加入。在使用移液器进行加不同液体样本时,要及时更换枪头。在整个实验程序中需要戴手套。且不同样品之间的接触,立即更换手套。(推荐使用:气溶胶屏障吸头/枪头)。

原理和流程：

DNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)包含全基因组 DNA 甲基化定量的所有试剂。在此试验中, DNA 被固定在一种有 DNA 吸附能力的孔上,甲基化的片段会被捕获剂以及检测抗体识别,然后使用酶标仪/分光光度计读检测 OD 值。甲基化的 DNA 的量同测量的 OD 值成比例。





操作手册

为了得到更理想的实验结果, 请您在实验开始前认真地阅读整个的操作手册。

起始材料:

DNA 输入量: 每次反应 DNA 量从 50ng 到 200ng 不等. 最佳的量是 100ng/反应。起始 DNA 可以是在水中也可以是在缓冲液中例如: TE。

DNA 提取: 实验者可以采用多种方法进行 DNA 提取。我司提供一系列基因组 DNA 提取试剂盒, 以供参考。

DNA 保存: 提取的基因组 DNA 在使用前可保存于 4°C (短期) 或 -20°C (长期)。





1. 准备 1X 清洗缓冲液 (ME1) : (稀释的 ME1 即为 1X ME1 溶液)

48 Assays Kit: 将 13 ml **ME1 10X** 清洗缓冲液加入到 117 ml 蒸馏水中 (pH 7.2-7.5).

96 Assay Kit: 将 26 ml **ME1 10X** 清洗缓冲液加入到 234 ml 蒸馏水中 (pH 7.2-7.5).

注意 : 稀释的 **ME1 1X** 清洗缓冲液可以储存在 4°C 的条件下长达 6 个月。所有的其他稀释的溶液在整个实验过程中都应置于冰上, 如果当天没有用完, 应丢弃。

2. 准备稀释的阳性对照 (ME4) :

单点对照准备: 使用 **1X TE** 缓冲液将 **ME4** 阳性对照稀释到 5 ng/μl (1μl **ME4** + 3μl **TE** 缓冲液).

推荐标准曲线对照准备 : 首先稀释 **ME4** 到 10 ng/μl (5 μl **ME4** + 5 μl **1X TE** 缓冲液). 然后, 依照下面的稀释表, 使用 10 ng/μl 稀释的 **ME4** 和 **1X TE** 配置以下浓度溶液 : 0.5 , 1.0 , 2.0 , 5.0 , and 10 ng/μl.

管子	ME4(10ng/ul)	1X TE 缓冲液	ME4 终浓度
1	1.0 μl	19.0ul	0.5ng/ul
2	1.0 μl	9.0ul	1.0ng/ul
3	1.0 μl	4.0ul	2.0ng/ul
4	2.5ul	2.5ul	5.0ng/ul
5	4.0ul	0ul	10.0ng/ul

3. DNA 结合 (包被):

- 预先确定好实验的条孔数量。小心的从座架上拿走不需要的条孔, 将其放回到包中 (密封, 存于 4°C)。
- 在每个孔中加入 80 μl **ME2** 结合溶液。





- c. 参照 **表 1** 或 **表 2** , 加入 1 μ l **ME3**, 1 μ l **稀释的 ME4**(看下面“注意”), 100 ng 您的 DNA 样品(1-8 μ l) 到指定的孔中。微微的左右倾斜或慢慢地晃动板子几次, 使溶液混合, 并确保溶液均匀的覆盖孔底。

注意: (1).对于单点对照, 加入 1ul 在第二步中准备好的 5ng/ul 的 **ME4** ;

对于标准曲线对照, 加入 1ul 第二步中准备好的从 0.5-10ng/ul 的各个浓度的 **ME4** , 使其最终
的量为 : 0.5,1,2,5,10ng/孔。

(2).为了最佳的结合效果, DNA 样品体积不应超过 8ul。

(3).确保 **ME3** , **稀释的 ME4** , **样品 DNA** 被完全加入到相应的孔中, 将枪头插到 **ME2** 液面下, 重复吸入/排出步骤 1-2 次。

(4).按照表 1 和表 2 中建议, 重复上样。

- d. 在 37°C 下, 用板密封盖或者用封口膜 M 覆盖条带板和孵化物 90 分钟。

- e. 移除每孔中的结合反应溶液。使用稀释的 **1X ME1** 溶液 150ul 洗涤每孔, **3 次**。洗孔时, 用枪缓慢加入稀释的 **1X ME1** 溶液至孔中, 缓慢摇晃使液体均匀覆盖孔底, 然后继续用枪吸出, 舍弃。整个过程避免用枪头刮到孔底。

4. 甲基化 DNA 捕获 :

- a. 按照 1:1000 比例, 使用**稀释的 ME1** 来稀释 **ME5**。
- b. 每孔加入 50 μ l **稀释的 ME5** , 然后密封, 在室温条件下, 孵化 60 分钟。
- c. 移除每孔中**稀释的 ME5** 溶液。
- d. 使用**稀释的 ME1** 清洗每孔, 3 遍。
- e. 按照 1:2000 比例, 使用**稀释的 ME1** 来稀释 **ME6**。
- f. 每孔加入 50ul **稀释的 ME6** , 然后密封, 在室温条件下, 孵育 30 分钟。
- g. 移除每孔中**稀释的 ME6** 溶液。
- h. 使用**稀释的 ME1** 清洗每孔, 4 遍。





- i. 按照 1:5000 比例，使用**稀释的 ME1** 来稀释 **ME7**。
- j. 每孔加入 50ul **稀释的 ME7**，然后密封，在室温条件下，孵育 30 分钟。
- k. 移除每孔中**稀释的 ME7**。
- l. 使用**稀释的 ME1** 清洗每孔，5 遍。

5. 信号检测：

- a. 每孔加入 100ul **ME8**，并于室温条件下避光孵育 1-10 分钟。开始监测样品孔和对照孔中的颜色变化。
当存在丰富的甲基化 DNA 时，**ME8** 溶液将会变蓝。
- b. 当阳性对照组孔中颜色变为中蓝色时，每孔加入 100ul **ME9** 溶液以终止颜色反应。轻轻的摇动框架使溶液混匀并等待 1-2 分钟，使颜色反应彻底终止。当加入 **ME9 溶液**后，孔内颜色将会变黄。请在 2-15 分钟内，使用酶标仪或者分光光度计检测 450nm 处的吸光度。
注意：如果条带孔框与分析仪不相匹配，请将溶液转移到 96 孔板上。

6. 5-mC 计算：

相对定量：为了检测两种不同 DNA 样品的相对甲基化状态，总 DNA 中 5-mC 的百分比可以使用如下公式进行计算：

$$5\text{-mC } \% = \frac{(\text{Sample OD} - \text{ME3 OD}) \div S}{(\text{ME4 OD} - \text{ME3 OD}) \times 2^* \div P} \times 100\%$$

S：DNA 样品的上样量，单位为 ng。

P：阳性对照 ME4 的加入量，单位为 ng。

*2 是一个因数，用来标准化 5-mC 在阳性对照中的百分比至 100，因为阳性对照中仅含有 50%的 5-mC。

举例如下：





ME3 中平均 OD450 是 0.075

ME4 中平均 OD450 是 0.675

样本中平均 OD450 是 0.475

S 是 100 ng

P 是 5 ng

$$5\text{-mC } \% = \frac{(0.475 - 0.075) \div 100}{(0.6750 - 0.075) \times 2 \div 5} \times 100\% = 1.67\%$$

绝对定量 :为了精确计算甲基化 DNA 的绝对量,首先需根据不同浓度的 ME4,绘制出标准曲线。然后,使用线性回归(可使用 Microsoft Exel 中线性回归计算功能)确定标准曲线的斜率(OD/ng),及标准曲线最线性的部分(包含至少 4 个浓度点),从而得到最佳的斜率计算。现在就可以使用如下公式来计算甲基化 DNA (5-mC) 在总 DNA 中的含量和百分比:

$$5\text{-mC (ng)} = \frac{\text{Sample OD} - \text{ME3 OD}}{\text{Slope} \times 2^*}$$

$$5\text{-mC } \% = \frac{5\text{-mC Amount (ng)}}{S} \times 100\%$$

S : DNA 样品的上样量,单位为 ng。

*2 是一个因数,用来标准化 5-mC 在阳性对照中的百分比至 100,因为阳性对照中仅含有 50%的 5-mC。

举例如下:

ME3 中平均 OD450 是 0.075

样本中平均 OD450 是 0.475

斜率是 0.12 OD/ng





S 是 100 ng

$$5\text{-mC (ng)} = \frac{0.475 - 0.075}{0.12 \times 2} = 1.67 \text{ ng}$$

$$5\text{-mC \%} = \frac{1.67}{100} \times 100\% = 1.67\%$$

建议的条带孔设置：

表 1. 单点阳性对照. 推荐如下表，在 48 孔板（若为 96 孔板，其中条 7 至 12 可设置样本）中设置您的单点阳性对照，建议同时检测两份的标准品与样品。

Well #	Strip 1	Strip 2	Strip 3	Strip 4	Strip 5	Strip 6
A	ME3	ME3	Sample 7	Sample 11	Sample 15	Sample 19
B	ME4	ME4	Sample 7	Sample 11	Sample 15	Sample 19
C	Sample 1	Sample 4	Sample 8	Sample 12	Sample 16	Sample 20
D	Sample 1	Sample 4	Sample 8	Sample 12	Sample 16	Sample 20
E	Sample 2	Sample 5	Sample 9	Sample 13	Sample 17	Sample 21
F	Sample 2	Sample 5	Sample 9	Sample 13	Sample 17	Sample 21
G	Sample 3	Sample 6	Sample 10	Sample 14	Sample 18	Sample 22
H	Sample 3	Sample 6	Sample 10	Sample 14	Sample 18	Sample 22

表 2. 标准曲线. 推荐如下表，在 48 孔板（若为 96 孔板，其中条 7 至 12 可设置样本）中设置您的标准曲线，建议同时检测两份的标准品与样品。

Well #	Strip 1	Strip 2	Strip 3	Strip 4	Strip 5	Strip 6
A	ME3	ME3	Sample 3	Sample 7	Sample 11	Sample 15
B	ME4 0.5 ng	ME4 0.5 ng	Sample 3	Sample 7	Sample 11	Sample 15
C	ME4 1.0 ng	ME4 1.0 ng	Sample 4	Sample 8	Sample 12	Sample 16
D	ME4 2.0 ng	ME4 2.0 ng	Sample 4	Sample 8	Sample 12	Sample 16
E	ME4 5.0 ng	ME4 5.0 ng	Sample 5	Sample 9	Sample 13	Sample 17
F	ME4 10.0 ng	ME4 10.0 ng	Sample 5	Sample 9	Sample 13	Sample 17
G	Sample 1	Sample 2	Sample 6	Sample 10	Sample 14	Sample 18
H	Sample 1	Sample 2	Sample 6	Sample 10	Sample 14	Sample 18





推荐相关产品：

DNA 样品准备：

- P-1003 常规组织切片 DNA 提取试剂盒
- P-1004 血浆/血清 DNA 提取试剂盒
- P-1006 DNA 浓缩试剂盒
- P-1007 DNA 凝胶回收试剂盒
- P-1009 石蜡组织切片 DNA 提取试剂盒
- P-1017 尿液 DNA 提取试剂盒
- P-1018 血液和培养细胞 DNA 抽提试剂盒

DNA 甲基化定量：

- P-1035 DNA 甲基化定量试剂盒(荧光法)
- P-1036 羟甲基化 DNA 定量试剂盒(比色法)
- P-1037 羟甲基化 DNA 定量试剂盒(荧光法)

