

# MeRIP试剂盒

## Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

### 货号规格/Catalog Number and Size

序号	试剂	货号及规格			储存
		IEP006 (6T)	IEP006M (12T)	IEP006L (24T)	
01	TE	3.3 mL	6.6 mL	14 mL	4°C
02	DNA缓冲液	5.5 mL	10.5 mL	21 mL	4°C
03	10% SDS	0.6 mL	1.2 mL	2.4 mL	4°C
04	3M NaAc	1.25 mL	2.5 mL	5 mL	4°C
05	IP buffer	15 mL	30 mL	60 mL	4°C
06	Protein A/G-beads	0.12 mL	0.24 mL	0.48 mL	4°C
07	Block solution	12.5 mL	25 mL	50 mL	4°C
08	TE washing buffer 1	1.2 mL	2.4 mL	5 mL	4°C
09	TE washingbuffer 2	3 mL	6 mL	12 mL	4°C
10	Glycogen	20 μL	20 μL	40 μL	4°C
11	Proteinase K	0.21 mL	0.41 mL	0.82 mL	-20°C
12	RNase A	30 μL	60 μL	120 μL	-20°C
13	IgG Antibody(1 mg/mL)	12 μL	24 μL	48 μL	-20°C

## 产品简介/Product Description

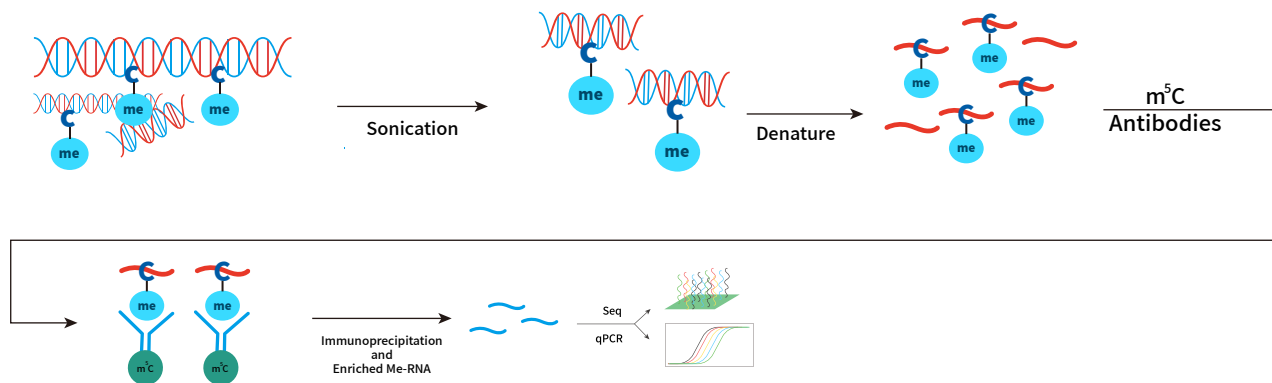
DNA 甲基化免疫共沉淀技术 (Methylated DNA immunoprecipitation, MeDIP 或 mDIP)，是一个大范围的染色体或基因组纯化技术，在分子生物学中被用于富集 DNA 甲基化序列。MeDIP 是通过 5- 甲基胞嘧啶 (5mC) 抗体富集高甲基化的 DNA 片段，富集到发生甲基化的 DNA 片段，并采用下游核酸检测技术检测全基因组范围内的甲基化位点。

MeDIP-Seq (Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing) 测序是针对抗体富集 DNA 进行测序的全基因组甲基化检测技术，可以在全基因组水平上进行高精度的 CpG 密集的高甲基化区域研究。

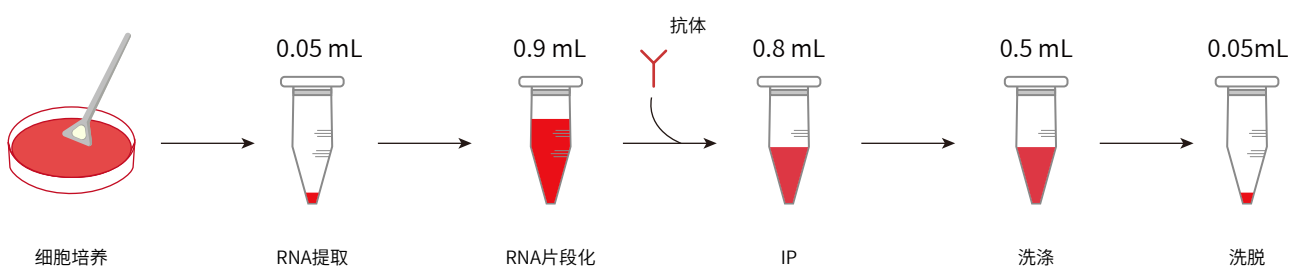
MeDIP-qPCR 是将实时定量 PCR 技术与 MeDIP 技术完美结合。首先通过 MeDIP 技术富集甲基化的 DNA 片段，然后利用实时定量 PCR 技术进行检测，最后经过数据分析处理得到检测的生物样品中特定位点的甲基化水平的精确数值。

## 技术路线/Technology mapping

### 1. 原理流程图



### 2. 实验操作流程图



## 使用流程/Procedure

### 1. 细胞 / 组织样品前处理

#### (1) 贴壁细胞收集

- ①贴壁细胞  $2 \times 10^7$  用胰酶消化后，1000 r/min 室温离心 5 min 收集；
- ②细胞重悬于冰冷的  $1 \times$  PBS 漂洗，1000 r/min 室温离心 5 min 收集；
- ③重复步骤②一次，收集细胞沉淀；

#### (2) 新鲜或冰冻组织细胞样品制备

- ①将 0.2 g 组织块剪碎成 0.3~0.5 cm<sup>3</sup> 大小;
- ②加入 1 mL TE, 转移到匀浆器中匀浆;
- ③1000 r/min 室温离心 5 min 收集细胞沉淀。

注意: 每次实验细胞用量  $2\sim 5\times 10^7$ , 组织 0.2~0.4g。

## 2. DNA 提取

- ①细胞沉淀加入 1.74 mL DNA 提取缓冲液, 重悬细胞, 转移至 2 mL 离心管中;
- ②加入 200  $\mu$ L 10% SDS 及 60  $\mu$ L Proteinase K 混匀;
- ③55°C 消化 3 h 或过夜消化裂解, 过程中不时颠倒混匀反应液;
- ④加入 10  $\mu$ L RNase A, 37°C 温育消化 30 min, 中间间隔摇动混匀;
- ⑤加等体积 (~2 mL) 苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1), 剧烈混匀 2 min 至不明显分层, 12,000g、4°C 离心 10 min, 取上层水相到新的离心管中 (~1.7 mL);
- ⑥(选做) 加等体积氯仿, 轻轻混匀, 12,000 g、4°C 离心 10 min, 取上层水相;
- ⑦加 1/10 体积的 3M NaAc 和 2 倍体积预冷的无水乙醇, 轻轻倒置混匀;
- ⑧待絮状物出现后, 12,000 g、4°C 离心 10 min, 弃上清液;
- ⑨沉淀用 1 mL 80% 乙醇洗涤, 12,000 g、4°C 离心 5 min, 弃上清液;
- ⑩室温风干 10 min, 挥发乙醇;
- ⑪加 100  $\mu$ L TE 溶解 DNA。

注意:

1. 苯酚为 Tris 饱和酚;

2. 步骤⑤⑥⑦可根据实际需要将样品均分为 4 管后再加入试剂, 更易操作。

## 3. 超声

- ①DNA 样品加入 1.7 mL IP buffer;
- ②非接触式全自动超声波破碎仪高功率、(30 s + 30 s) 超声 15~30 cycles, 或接触式超声仪 30% 功率、(2 s + 5 s) 超声破碎 DNA 1~5 min; ;
- ③超声后溶液 13,000 g、4°C 离心 10 min, 将上清转移到新的离心管中;
- ④取 5  $\mu$ L 样本 2.5% 琼脂糖凝胶 120 V 恒压电泳 15 min 检测超声破碎 DNA 片段大小, 要求 DNA 片段范围为 300~700 bp。

注意:

1. 使用至少 4  $\mu$ g 片段 DNA 进行标准 MeDIP 测定;

2. 超声过程中, 每超声 1 min 取 5  $\mu$ L 样本检测 DNA 片段大小, 直至大小符合实验要求。

## 4. 免疫沉淀

- ①将超声样品按照 0.1 mL (Input)、0.8 mL (IP)、0.8 mL (IgG) 分成三份, Input 组先置于 -20°C 保存备用;
- ②IP、IgG 组 DNA 置于 95°C 变性 3 min, 迅速置于冰上冷却, 分别加入 4  $\mu$ g 5-methylcytosine(5-mC) 抗体和 4  $\mu$ L IgG Antibody, 置于垂直混匀器 4°C 孵育 6 h 或过夜。

## 5. 准备 Protein A/G 磁珠

- ①取 40  $\mu$ L Protein A/G-beads 到 1.5 mL 离心管中;
- ②加入 1 mL Block solution, 颠倒混匀 10~15 次后, 磁力架收集磁珠去上清;
- ③重复步骤②一次;
- ④加入 40  $\mu$ L Block solution 重悬磁珠, 平均分为两管: IP 组和 IgG 组。

## 6. Protein A/G 与抗体结合

- ①IP 组和 IgG 组分别加入准备好的 20  $\mu$ L Protein A/G-beads, 垂直混匀器 4°C 孵育 1 h;
- ②磁力架上吸附磁珠, 弃上清, 分别加入 500  $\mu$ L IP buffer, 颠倒混匀, 共洗涤 3 次;

## 6. 准备 Protein A/G 磁珠

③磁力架上吸附磁珠，弃上清，分别加入 200  $\mu\text{L}$  TE washing buffer 1 洗脱 DNA，65°C水浴 15 min，每 2 min 颠倒混匀一次；

④磁力架上吸附磁珠，转移上清至新的无酶 EP 管中，磁珠分别加入 200  $\mu\text{L}$  TE washing buffer 2 洗脱 DNA，65°C水浴 15 min，每 2 min 颠倒混匀一次，两次洗脱液转移到同一管中；

⑤向 IP 组和 IgG 组洗脱液中分别加入 4  $\mu\text{L}$  Proteinase K，55°C温浴 2 h。

**注意：如使用水浴锅进行消化，每隔 5 min 轻轻晃动 EP 管，重悬磁珠。**

## 7. 沉淀 DNA

①取出 Input 组，加入 300  $\mu\text{L}$  TE washing buffer 2；

②向 Input 组、IP 组和 IgG 组洗脱液中分别加入 400  $\mu\text{L}$  苯酚：氯仿：异戊醇 (25:24:1)，颠倒混匀 10~15 次后，13,000 g 室温离心 10 min，转移上层水相到新离心管中；

③Input 组、IP 组和 IgG 组分别加入 1/10 体积的 (40  $\mu\text{L}$ ) 3M NaAc、1  $\mu\text{L}$  Glycogen 和 2 倍体积 (800  $\mu\text{L}$ ) 预冷的无水乙醇，-20°C沉淀样品 0.5~2 h；

④16,000 g、4°C离心 30 min，去上清；

⑤每管加入 1 mL 80% 乙醇洗涤沉淀，16,000 g、4°C离心 30 min，去上清，室温风干乙醇；

⑥每管加入 50  $\mu\text{L}$  灭菌 ddH<sub>2</sub>O，溶解 DNA 沉淀。

**注意：苯酚为 Tris 饱和酚；**

## 8. DNA 检测与验证 (PCR、qPCR)

①Input 组、IP 组及 IgG 组 NanoDrop 检测 DNA 浓度；

②取 5  $\mu\text{L}$  样本 2.5% 琼脂糖凝胶 120V 恒压电泳 15 min，检测 DNA 片段大小；

③参考 PCR 试剂盒配置反应体系进行 PCR，取 3~5  $\mu\text{L}$  PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果；

④参考 2 $\times$ SYBR Green qPCR Mix 试剂盒说明书配置 20  $\mu\text{L}$  反应体系进行 qPCR，然后进行数据分析，得到富集效率。

## 9. DNA Analysis (Seq)

①取 20  $\mu\text{L}$  DNA 样品，高通量测序技术检测 DNA 序列。

**注意：因不同蛋白结合的 DNA 量以及不同公司对 DNA 样品测序浓度和总量的要求不同，如果浓度和总量未达到测序要求，可以根据测序要求量提高实验细胞数量，按照本说明书中规定的细胞数量与试剂的比例重复实验。**

## 注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

