

## 甲基化技术简介

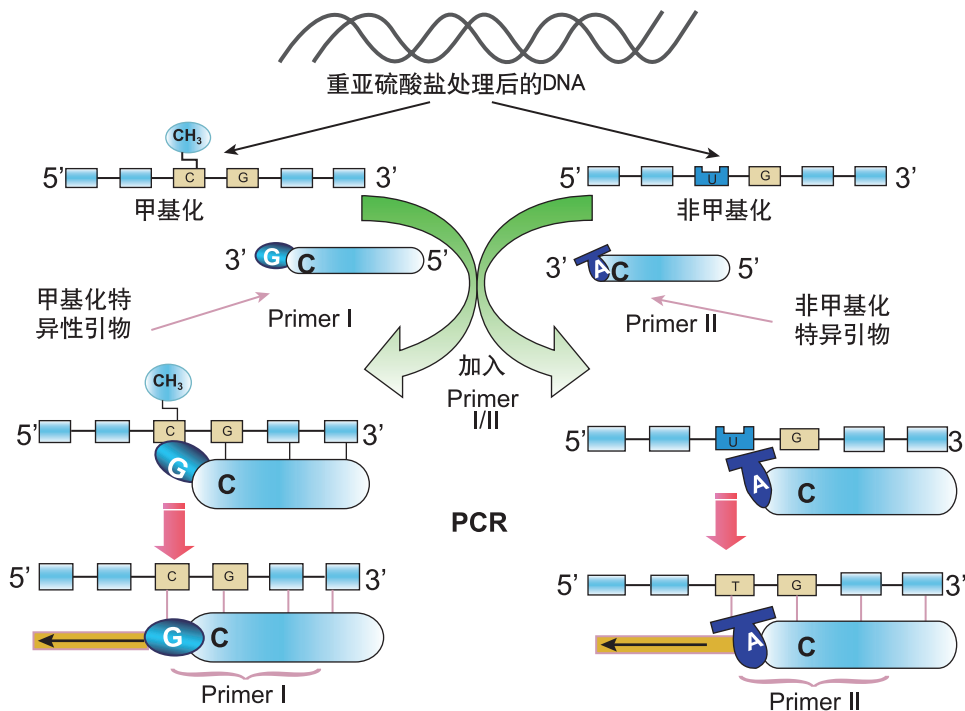
DNA 甲基化是发生在 DNA 碱基序列上的一种共价修饰，可能存在于所有高等生物中。DNA 甲基化能关闭某些基因的活性，去甲基化则诱导了基因的重新活化和表达，从而导致基因表达量的变化。DNA 甲基化在维持正常细胞功能、遗传印记、胚胎发育以及人类疾病发生中起着重要作用。随着对甲基化研究的不断深入，各种各样的甲基化检测方法被开发出来，以满足不同类型研究的要求。这些方法概括起来可分为三类：甲基化整体水平的检测、基因特异位点的甲基化验证和新甲基化位点的寻找。

### 基于 PCR 的常用甲基化检测方法

#### 甲基化特异性 PCR (MSP)

DNA 通过重亚硫酸盐处理后，未甲基化的胞嘧啶将转变为尿嘧啶，甲基化的胞嘧啶则不发生改变。以处理后的产物作为模板进行 PCR，通过测序比对的方法可以获知甲基化的位点 (Bisulfite sequencing PCR, BSP)，而通过特异性引物的 PCR 可以直接在电泳图上判断目的位点的甲基化情况，免去构建载体和测序的时间，这种方法称为甲基化特异性 PCR (Methylation specific PCR, MSP)。

甲基化特异性 PCR 中通常设计两对引物，均需具备以下条件：1. 检测位点需设计在引物上；2. 两对引物分别只能与重亚硫酸盐处理后的两种可能的序列互补配对，即一对结合处理后的甲基化 DNA 链，另一对结合处理后的非甲基化 DNA 链。检测 MS-PCR 扩增产物时，若用针对处理后甲基化 DNA 链的引物能扩增出片段，说明被检测的位点存在甲基化；若用针对处理后非甲基化 DNA 链的引物扩增出片段，说明被检测的位点不存在甲基化。此外，通过定量 PCR 分析可对感兴趣位点的甲基化程度进行准确的定量。



#### 高分辨率熔解分析 (HRM)

高分辨率熔解分析 (High-resolution melting, HRM) 是一种主要根据 DNA 序列在长度，GC 含量以及碱基互补性方面的差异，应用高分辨率的熔解曲线对样品进行分析检测方法，其极高的温度均一性和温度分辨率使其具有极高的分辨率。同许多荧光 PCR 技术一样，HRM 利用了特定染料可以插入 DNA 双链中的特性，通过实时监测升温过程中荧光染料与 PCR 扩增产物的结合情况来记录熔解曲线，对样品进行检测。HRM 使用的染料为饱和染料，使熔解曲线的精度大大提高，可以从曲线形状区分单个碱基差异。

用 HRM 方法检测目的区域内的甲基化，可检测低至 0.1% 的甲基化程度；并根据已知甲基化程度的标准曲线对未知样品的甲基化百分比进行测定。HRM 是一种高灵敏度的甲基化检测方法，其高度的重复性和低成本将对肿瘤的研究和临床应用有很大帮助。

# DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒

## DNA Bisulfite Conversion Kit

—可在 2 h 内完成转化和纯化过程，转化率高达 99% 以上

| 目录号      | 包装   | 价格     |
|----------|------|--------|
| DP215-02 | 50 次 | 1980 元 |

### 产品包装

| 试剂盒组成                         | 50 次           |
|-------------------------------|----------------|
| 亚硫酸盐干粉                        | 10 次 / 管 × 5 支 |
| 缓冲液 BM                        | 5 ml           |
| 缓冲液 DB                        | 10 ml          |
| 缓冲液 DP                        | 0.5 ml         |
| 平衡液 BL                        | 30 ml          |
| 结合液 PB                        | 30 ml          |
| 漂洗液 PW                        | 2 × 15 ml      |
| Carrier RNA                   | 310 µg         |
| RNase-Free ddH <sub>2</sub> O | 1 ml           |
| 洗脱缓冲液 EB                      | 15 ml          |
| 吸附柱 CB1                       | 50 个           |
| 收集管 (2 ml)                    | 50 个           |

### 自备试剂

无水乙醇

### 保存条件

室温 (15-25℃) 保存

### 产品简介

本产品是特别针对 DNA 甲基化研究中的 DNA 重亚硫酸盐转化所开发的试剂盒。试剂盒可以在 2 h 内完成对 DNA 样品的处理，其中未甲基化胞嘧啶转化为尿嘧啶的转化率高达 99% 以上。同时，本试剂盒采用独特的 DNA 保护剂组分，使得转化后 DNA 的质量和回收率都有很大的保障，另外，本试剂盒还采用了柱上去亚硫酸基团的方法，使得整个操作流程更为简便。

### 产品特点

- 简单快速：转化和纯化流程可在 2 h 内完成，对仪器设备要求较低，适于各级研究机构对 DNA 样品进行重亚硫酸盐转化。
- 转化率高：DNA 样品中未甲基化胞嘧啶转化为尿嘧啶的转化率达 99% 以上。
- 反应灵敏：本试剂盒可处理少至 500 pg，多至 2.5 µg 的 DNA 样品。

### 下游应用

本试剂盒处理后的 DNA 样品适合于甲基化特异性 PCR/qPCR，测序法及芯片法等后续甲基化分析方法。

### 实验例

表 1：未甲基化的“C”转化为“U”的比率

|         | 样品初始处理量 (ng) | 回收样品量 (ng) | 转化样品量 (ng) | 回收率 (%) | 转化率 (%) |
|---------|--------------|------------|------------|---------|---------|
| A 公司    | 1350.0       | 862.1      | 856.9      | 63.9    | 99.4    |
| B 公司    | 1350.0       | 880.5      | 878.7      | 65.2    | 99.8    |
| TIANGEN | 1350.0       | 878.2      | 876.4      | 65.1    | 99.8    |

以人类基因组为实验材料，经本试剂盒处理，样品回收率可达 65%，未甲基化的“C”转化为“U”的比率达 99% 以上。

### 注意事项

- 若处理的 DNA 样品少于 100 ng，那么强烈建议将 Carrier RNA 加入到结合液 PB 中，至终浓度为 10 µg/ml。

# 甲基化特异性 PCR 试剂盒

## Methylation-specific PCR(MSP)Kit

—甲基化特异性 PCR 专用检测试剂盒

| 目录号      | 包装    | 价格    |
|----------|-------|-------|
| EM101-01 | 400 U | 680 元 |

### 产品包装

#### 试剂盒组成

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| MSP DNA Polymerase (2.5 U/μl) | 400 U |
| 10×MSP PCR Buffer             | 1 ml  |
| dNTPs (2.5 mM)                | 1 ml  |

### 保存条件

-20°C 保存

### 下游应用

■ 适用于甲基化特异性 PCR (MSP) 方法分析基因组 DNA 的甲基化特点。

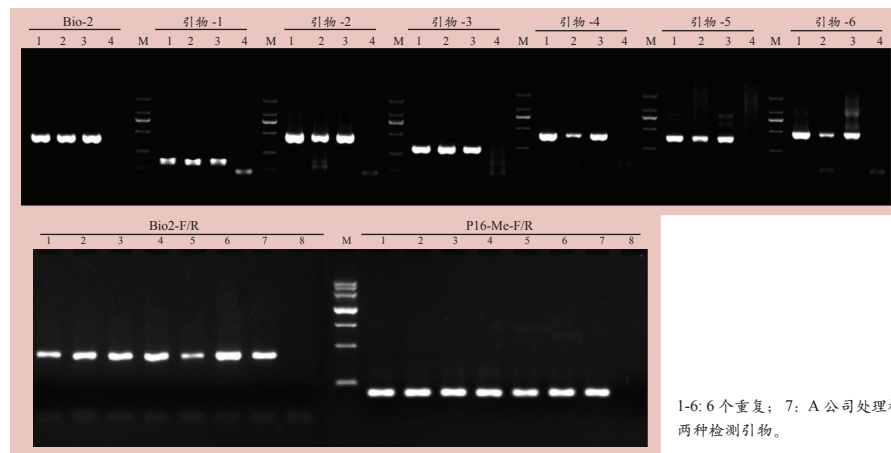
### 产品简介

本产品是特别针对通过 PCR 方法研究基因组 DNA 甲基化特点的客户所开发的试剂盒。试剂盒组分简单, 包含 MSP DNA Polymerase, 10×MSP PCR Buffer 和 dNTPs。其中, MSP DNA Polymerase 是采用抗体修饰的耐热聚合酶, 10×MSP PCR Buffer 是特别为 MSP 反应所优化的 PCR 缓冲液。适于与 TIAN-GEN 重亚硫酸盐处理试剂盒 (DP215-02) 搭配使用。

### 产品特点

■ 本产品具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点。

### 实验例



1:A 公司处理的样品; 2:B 公司处理的样品;  
3: TIANGEN 处理的样品; 4: NTC; M: D2000

1-6: 6 个重复; 7: A 公司处理样品; 8: NTC; Bio2-F/R 和 P16-Me-F/R:  
两种检测引物。

1. 使用甲基化特异性 PCR 试剂盒, 以重亚硫酸盐处理后的基因组 DNA 为模板, 扩增 400 bp 的片段, 反应体系为 20 μl。

反应体系配置

| 组成成分                          | 体积       |
|-------------------------------|----------|
| Template                      | < 500 ng |
| Primer 1 (10 μM)              | 1 μl     |
| Primer 2 (10 μM)              | 1 μl     |
| dNTPs (2.5 mM)                | 1.6 μl   |
| MSP DNA Polymerase (2.5 U/μl) | 1 U      |
| 10×MSP PCR Buffer             | 2 μl     |
| ddH <sub>2</sub> O            | 补至 20 μl |

2. PCR 反应循环的设置:

|      |        |             |
|------|--------|-------------|
| 95°C | 5 min  | } 35 cycles |
| 94°C | 20 sec |             |
| 60°C | 30 sec |             |
| 72°C | 20 sec |             |
| 72°C | 5 min  |             |

### 注意事项

反复冻融的 DNA 模板会影响扩增, 尽量不要反复冻融 DNA 模板; 如需多次实验, 可分装后进行冻存, 减少冻融次数。

# HRM 分析试剂盒 (EvaGreen) HRM Analysis Kit (EvaGreen)

——高分辨率熔解分析的专业试剂

| 目录号      | 包装            | 价格     |
|----------|---------------|--------|
| FP210-01 | 20 μl × 125 次 | 720 元  |
| FP210-02 | 20 μl × 500 次 | 2480 元 |

## 产品包装

| 试剂盒组成                                     | 125 次<br>(20 μl 体系) | 500 次<br>(20 μl 体系) |
|---|---------------------|---------------------|
| 2x HRM Analysis PreMix<br>(with EvaGreen) | 1.25 ml             | 4 × 1.25 ml         |
| 50 × ROX Reference Dye                    | 250 μl              | 1 ml                |
| RNase-Free ddH <sub>2</sub> O             | 2 × 1 ml            | 5 × 1 ml            |

## 下游应用

- 已知 SNP 分型。
- 未知 SNP 筛选。
- 未知突变基因扫描。
- 甲基化 PCR 分析。

## 保存条件

-20°C 避光保存

## 产品简介

本产品结合了饱和染料 EvaGreen 和抗体酶的优点，是一款适用于高分辨率熔解 (High Resolution Melting, HRM) 分析的专业试剂盒。本品是一种 2 × PreMix，PCR 反应液配制十分简单方便；具有分辨率高和模板高度适应性等特点。

与 SYBR Green 不同，EvaGreen 在高浓度情况下不会抑制 PCR 反应，可以使双链 PCR 产物的结合量达到饱和状态，所以称为“饱和染料”，EvaGreen 不会产生 SYBR Green 的“染料重排”现象，能够很好的区分扩增产物之间单个碱基的差异。本产品可用于已知 SNP 分析，未知 SNP 筛选，以及未知突变基因扫描和甲基化 PCR 分析等研究。

## 产品特点

- 高分辨率：采用 Eva Green 饱和染料，在饱和状态下具有很高的溶解曲线分辨率，可以区分单个碱基的变异。
- 高特异性：采用抗体修饰的热启动 DNA 聚合酶，降低非特异性扩增，提高特异性。
- 高稳定性：精心优化 Buffer 体系，增加了溶解曲线的稳定性，提高结果可信度。
- ROX 校正：单独包装的 ROX 染料，使用更灵活，结果更准确。

## 实验例

使用 DP318 提取 100 μl 人类血液样本，上样量 50 ng，根据 NCBI SNP 数据库，选取 FEN1 基因的已知 SNP (rs174538) 使用 Roche LightCycle480 检测，结果如下：

