

# DNA 甲基化处理及测定

## 前言

## 实验材料

- 一、实验材料
- 二、主要设备仪器

## 实验方法

- 一、基因组 DNA 准备（天根血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒）
- 二、基因组 DNA bisulfite 处理（zymo research, EZ DNA Methylation-Gold™ Kit）
- 三、PCR 扩增（PCR amplification）
- 四、PCR 产物纯化（天根，普通 DNA 产物纯化试剂盒）
- 五、焦磷酸测序 Pyrosequencing

## 前言

重亚硫酸盐使 DNA 中未发生甲基化的胞嘧啶脱氨基转变成尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶保持不变，用 PCR 扩增(引物设计时尽量避免有 CpG，以免受甲基化因素的影响)所需片段，则尿嘧啶全部转化成胸腺嘧啶。最后，对 PCR 产物进行测序，并且与未经处理的序列比较，判断是否 CpG 位点发生甲基化。是一种可靠性及精确度很高的方法，能明确目的片段中每一个 CpG 位点的甲基化状态。在寻找有意义的关键性 CpG 位点上，有其他方法无法比拟的优点。

## 实验材料

### 1. 实验材料

- 1) 细胞基因组;
- 2) EZ DNA Methylation-Gold™ Kit;
- 3) KAPA DNA 聚合酶;
- 4) DNA 产物纯化试剂盒;

### 2. 实验仪器

- 1) PCR 仪;
- 2) 离心机;
- 3) 移液器;
- 4) 琼脂糖凝胶电泳仪;

## 实验方法

### 一、基因组 DNA 准备（天根血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒）

操作步骤:

使用前请先在缓冲液 GD 和漂洗液 PW 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

#### 1. 处理材料

- a) 如提取材料为血液，可直接使用 200  $\mu$ L 新鲜、冷冻或加入各种抗凝剂的

血液，不足 200  $\mu\text{L}$  可加缓冲液 GA 补足；

注意：如需处理更大体积血液，如 300  $\mu\text{L}$ -1 ml，应按以下步骤操作：在样品中加入 3 倍体积红细胞裂解液（例如，300  $\mu\text{L}$  血液加入 900  $\mu\text{L}$  红细胞裂解液），颠倒混匀，室温放置 5 min，期间再颠倒混匀几次。10000 rpm( $\sim 11,500\times g$ )离心 1 min（若离心机最高转速不允许，可 3000 rpm( $\sim 3,400\times g$ )离心 5 min），吸去上清，留下白细胞沉淀，加 200  $\mu\text{L}$  缓冲液 GA，振荡至彻底混匀。

b) 如果处理血样为禽类、鸟类、两栖类或更低级生物的抗凝血液，其红细胞为有核细胞，因此处理量 5-20  $\mu\text{L}$ ，可加缓冲液 GA 补足 200  $\mu\text{L}$  后进行下面的裂解步骤。

c) 贴壁培养的细胞应先处理为细胞悬液，然后 10,000 rpm( $\sim 11,200\times g$ )离心 1 min，倒尽上清，加 200  $\mu\text{L}$  缓冲液 GA，振荡至彻底悬浮；

d) 动物组织（脾组织用量应少 10 mg）应先打碎处理为细胞悬液，然后 10,000

rpm( $\sim 11,200\times g$ )离心 1 min，倒尽上清，加 200  $\mu\text{L}$  缓冲液 GA，振荡至彻底悬浮。

注意：如果需要去除 RNA，可加入 4  $\mu\text{L}$  RNaseA（100 mg/ml）溶液，振荡 15 sec，室温放置 5 min。

2. 加入 20  $\mu\text{L}$  Proteinase K 溶液，混匀。

a. 提取血液基因组时，只需加入 Proteinase K 混匀，即可继续进行下一步。

b. 提取细胞基因组时，只需加入 Proteinase K 混匀，即可继续进行下一步。

c. 提取组织基因组时，加入 Proteinase K 混匀后，在 56 $^{\circ}\text{C}$ 放置，直至组织溶解，简短离心以去除管盖内壁的水珠，再进行下一步骤。

注意：不同组织裂解时间不同，通常需 1-3 h 即可完成（鼠尾需要消化过夜）。不会影响后续操作。每小时颠倒混合样品 2-3 次，用水浴振荡器也可。

3. 加入 200  $\mu\text{L}$  缓冲液 GB，充分颠倒混匀，70 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min，溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁的水珠。

注意：加入缓冲液 GB 时可能会产生白色沉淀，一般 70 $^{\circ}\text{C}$ 放置时会消失，不会影响

后续实验。如溶液未变清亮，说明细胞裂解不彻底，可能导致提取 DNA 量少和提取出的 DNA 不纯。当血液体积 $\leq 200 \mu\text{L}$  且没有采用红细胞裂解处理，或是样本储存条件不佳，水浴后颜色可能为深褐色，注意溶液中没有团块等沉淀。

4. 加入  $200 \mu\text{L}$  无水乙醇，充分振荡混匀 15 sec，此时可能会出现絮状沉淀，简短离心以去除管盖内壁的水珠。
5. 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 CB3 中（吸附柱放入收集管中）， $12,000 \text{ rpm}$  ( $\sim 13,400\times g$ )离心 30 sec，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放回收集管中。
6. 向吸附柱 CB3 中加入  $500 \mu\text{L}$  缓冲液 GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇）， $12,000 \text{ rpm}$  ( $\sim 13,400\times g$ )离心 30 sec，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放入收集管中。
7. 向吸附柱 CB3 中加入  $600 \mu\text{L}$  漂洗液 PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇）， $12,000 \text{ rpm}$  ( $\sim 13,400\times g$ )离心 30 sec，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放入收集管中。
8. 重复操作步骤 7。
9. 将吸附柱 CB3 放回收集管中， $12,000 \text{ rpm}$  ( $\sim 13,400\times g$ )离心 2 min，倒掉废液。将吸附柱 CB3 置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。

10. 将吸附柱 CB3 转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加  $50-200 \mu\text{L}$  洗脱缓冲液 TE，室温放置 2-5 min， $12,000 \text{ rpm}$  ( $\sim 13,400\times g$ )离心 2 min，将溶液收集到离心管中。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于  $50 \mu\text{L}$ ，体积过小影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用 ddH<sub>2</sub>O 做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在  $-20^\circ\text{C}$ ，以防 DNA 降解。为增加基因组 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再加入吸附柱 CB3 中，室温放置 2 min， $12,000 \text{ rpm}$  ( $\sim 13,400\times g$ )离心 2 min。

## 二、基因组 DNA bisulfite 处理 (zyzo research, EZ DNA Methylation-Gold™)

### Kit)

1. 在盛有 20ulDNA 样品的小管中加入 130ul **CT 转换试剂 (CT Conversion Reagent)**。(如果 DNA 样品不足 20ul, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足。)混匀, 瞬离。
2. 将瞬离后的样品放入 PCR 仪, 设定反应程序如下:
  - 1) 98°C, 10min;
  - 2) 64°C, 2.5h;
  - 3) 4°C, ∞;

注意: 对于某些特殊样品, 设定与上不同的参数亦有良好效果(见附录); 如果你在使用本试剂盒时已采用与上不同的其他程序, 且已取得良好效果, 可以继续使用已用程序。

3. 将 **Zymo 柱 (Zymo-Spin (TM) IC Column)** 放入 **收集管 (Collection Tube)** 中, 在其中加入 600ul **M-结合液 (M-Binding Buffer)**;
4. 在其中加入步骤 2 反应后的样品, 盖紧, 颠倒混匀;
5. 12,000rpm (<10,000g) 离心 30s, 弃下清;
6. 加入 100ul **M-清洗液 (M-Wash Buffer)**, 12,000rpm 离心 30s, 弃下清;
7. 加入 200ul **M-脱磺化液 (M-Desulphonation Buffer)**, 室温 (20~30°C) 静置 15~20min, 12,000rpm 离心 30s, 弃下清;
8. 加入 200ul **M-清洗液 (M-Wash Buffer)**, 12,000rpm 离心 30s, 弃下清; 重复清洗一次;
9. 将柱子移入干净的 1.5ml EP 管中, 在柱子底部加入 10ul **M-溶解液 (M-Elution Buffer)**, 12,000rpm 离心 30s 洗脱 DNA;
10. 收集的 DNA 可以直接进行后续实验也可以短期保存于-20°C; 如果需要长期保存, 应保存于低于-70°C处; 进行后续 PCR 反应时, 我们建议每个反应用 1~4ul 溶解的 DNA, 但是, 如果需要可以每个反应用 10ul; 溶解体积根据后续实验需要可以<10ul, 但是较小的溶解体积会使收集的 DNA 浓度升高。

注意: 括号内黑体字为试剂盒中试剂英文名称!

### 三、PCR 扩增 (PCR amplification)

**Round 1: (外围引物)**

体系: 2x KAPA mix	10ul
DNA	1ul
Primer F	0.5ul
Primer R	0.5ul
H <sub>2</sub> O	up to 20ul

反应条件:

98°C	30s	
98°C	10s	} 30cycle
52°C	30s	
72°C	45s	
72°C	3min	

**Round 2: (内围引物)**

体系: 2x KAPA mix	10ul
DNA	1ul
Primer F	0.5ul
Primer R	0.5ul
H <sub>2</sub> O	up to 20ul

反应条件:

98°C	30s	
98°C	10s	} 30cycle
52°C	30s	
72°C	45s	
72°C	3min	

注意: 由于后续实验需要较多的 DNA 模板, 可根据需要扩大 PCR 体系。

**四、PCR 产物纯化 (天根, 普通 DNA 产物纯化试剂盒)**

1. 柱平衡步骤: 向吸附柱 CB2 中 (吸附柱放入收集管中) 加入 500 μL 的平衡

液 BL, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CB2 重新放回收集管中。(请使用当天处理过的柱子);

2. 估计 PCR 反应液或酶切反应液的体积, 向其中加入 5 倍体积的结合液 PB, 充分混匀(无需去除石蜡油或矿物油)。

注意: 如 PCR 反应体系为 50  $\mu$ L (不包括石蜡油体积), 则加入 250  $\mu$ L 结合液 PB。

3. 将上一步所得溶液加入一个吸附柱 CB2 中(吸附柱放入收集管中), 室温放置 2 min, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CB2 放入收集管中。

注意: 吸附柱容积为 800  $\mu$ L, 若样品体积大于 800  $\mu$ L 可分批加入。

4. 向吸附柱 CB2 中加入 600  $\mu$ L 漂洗液 PW (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CB2 放入收集管中。

注意: 如果纯化的 DNA 是用于盐敏感的实验, 例如平末端连接实验或直接测序, 建议 PW 加入后静置 2-5 min 再离心。

5. 重复操作步骤 4。
6. 将吸附柱 CB2 放回收集管中, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 2 min, 尽量除去漂洗液。将吸附柱 CB2 置于室温放置数分钟, 彻底地晾干, 以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。

注意: 漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应(酶切、PCR 等)实验。

7. 将吸附柱 CB2 放入一个干净的离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加 30-50  $\mu$ L 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2 min。12,000 rpm (~13,400×g) 离心 2 min 收集 DNA 溶液。

注意: 洗脱液的体积不应少于 30  $\mu$ L, 体积过少会影响回收的效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序, 需使用 ddH<sub>2</sub>O 做洗脱液, 并保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率; 且 DNA 产物应保存在 -20°C, 以防 DNA 降解。DNA 也可以用缓冲液(10 mM Tris-Cl, pH8.0) 洗脱。为了提高 DNA 的回收量, 可将离心得到的溶液重新加回离心吸附柱中, 室温放置 2 min, 12,000 rpm (~13,400×g) 离心 2 min, 将 DNA 溶液收集到离心管中。

## 五、焦磷酸测序 Pyrosequencing

PCR 产物用 QIAGEN 的焦磷酸测序仪 (PyroMark Q96ID) 进行测序, 获得该基因的甲基化程度数据。