



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—201×

DNA 甲基化的测定 焦磷酸测序法

Determination of DNA methylation—Pyrosequencing

××××-××-×× 发布

××××-××-×× 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：河北医科大学、中国标准化研究院、河北省食品检验研究院、中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心、河北师范大学。

本标准主要起草人：吕品、马爱进、张岩、林浩、李永鹏、李东明、黄芸、杨宏超。

DNA 甲基化的测定 焦磷酸测序法

1 范围

本标准规定了用焦磷酸测序法测定 DNA 甲基化的方法。
本标准适用于动植物组织或体外培养细胞 DNA 甲基化测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

DNA 甲基化 DNA methylation

在 DNA 甲基转移酶的催化下,以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将甲基转移至碱基特定结构上的过程。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。
DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)
PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

4 原理

DNA 经重硫酸盐硫化处理后,DNA 双链中未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,通过 PCR 将尿嘧啶转化为胸腺嘧啶,根据 PCR 产物中相应甲基化位点的胞嘧啶和胸腺嘧啶的比例进行定量。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

- 5.1 水:GB/T 6682,二级。
- 5.2 动物基因组 DNA 提取试剂盒。
- 5.3 植物基因组 DNA 提取试剂盒。
- 5.4 20 pmol/ μ L 焦磷酸测序用引物。
- 5.5 PCR 试剂盒。

- 5.6 DNA 重亚硫酸盐快速转化试剂盒。
- 5.7 焦磷酸测序试剂盒。
- 5.8 70%(体积分数)乙醇。取 70 mL 无水乙醇加水稀释定容至 100 mL。
- 5.9 溴化乙锭溶液。称取 1 g 溴化乙锭加水稀释定容至 100 mL,磁力搅拌至完全溶解,然后将溶液保存于棕色瓶中,室温保存。
- 5.10 50×电泳缓冲液。称取 242 g Tris 溶于 800 mL 蒸馏水中,加入 57.1 mL 冰乙酸和 100 mL 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸溶液(pH 8.0),再加蒸馏水定容至 1 000 mL,室温保存,稀释 50 倍使用。
- 5.11 2%(质量分数)琼脂糖凝胶。称取 2 g 琼脂糖置于烧瓶中,加入 100 mL 电泳缓冲液,加热使琼脂糖充分溶解,适当冷却,然后加入 7 μL 溴化乙锭溶液,混匀,将其缓慢地倒入放有梳子的制胶槽中,室温放置待琼脂糖凝固后拔下梳子,取出凝胶,4 ℃密封保存备用。
- 5.12 6×电泳加样缓冲液。称取 0.25 g 溴酚蓝、40 g 蔗糖置于 100 mL 烧杯中,加蒸馏水至完全溶解后定容至 100 mL。
- 5.13 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸溶液。称取 18.61 g 乙二胺四乙酸二钠二水合物,加入 80 mL 水,充分搅拌,用氢氧化钠调 pH 至 8.0,然后定容至 100 mL。
- 5.14 标准相对分子质量 DNA(100 bp~2 000 bp)。

6 仪器设备

- 6.1 分析天平:感量 0.001 g。
- 6.2 离心管:1.5 mL 和 2 mL。
- 6.3 PCR 仪。
- 6.4 水平电泳槽。
- 6.5 电泳仪。
- 6.6 低温离心机:最大离心力 25 910g。
- 6.7 凝胶成像系统。
- 6.8 核酸检测仪。
- 6.9 焦磷酸测序仪。
- 6.10 PCR 管。

7 测定步骤

7.1 DNA 提取

按照动物或植物基因组 DNA 提取试剂盒说明进行提取。

7.2 DNA 重亚硫酸盐转化

按照 DNA 重亚硫酸盐快速转化试剂盒说明进行操作。

7.3 甲基化 PCR 扩增目的片段

7.3.1 PCR 反应体系

配制 50 μL PCR 反应体系:以 10 ng~20 ng 重亚硫酸盐转化后的 DNA 溶液为模板,按照 PCR 试剂盒说明加入试剂,再加入焦磷酸测序引物对中的上下游引物各 0.5 μL,用水补足体积至 50 μL。在 PCR 仪上扩增。

7.3.2 PCR 扩增产物电泳检测

在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过琼脂糖凝胶;将 3 μL~6 μL PCR 扩增产物分别和适量 6×电泳加样缓冲液混合,点样;以标准相对分子质量 DNA 做对照;9 V/cm 恒压电泳,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部;用凝胶成像系统观察电泳结果并记录;电泳检测合格的 PCR 产物用于测序。

7.4 焦磷酸测序

利用焦磷酸测序仪及焦磷酸测序试剂盒进行以下操作:在焦磷酸测序仪配套软件中生成运行程序,加载运行前试剂耗材和程序,将上样圆盘放入机器,按程序在相应的孔位加入 10 μL 含生物素标记的 PCR 产物和 3 μL 焦磷酸测序测序仪配套的磁珠,运行焦磷酸测序仪程序,导出结果。

8 结果分析

使用焦磷酸测序仪将运行后的数据拷贝到电脑中,打开软件并载入运行后的文件,选择 CpG 模式,对每个样本的焦磷酸测序结果进行分析,结果中所测位点处显示的百分数即为该位点甲基化的比例。
