

Code No. R100A

研究用

Takara

EpiScope[®] MSP Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● MSP 的原理	1
● 制品内容	1
● 保 存	2
● 试剂盒外必备材料	2
● 使用注意	2
● 操作步骤	2
● 实验例	4
● Troubleshooting	5
● 关联产品	5

● 制品说明

EpiScope MSP Kit 是 MSP (Methylation Specific PCR) 专用 PCR 试剂。本制品使用了 MSP 检测专用酶及最适 Buffer, 对亚硫酸氢盐修饰后含有尿嘧啶的 DNA 进行 MSP 解析时, 与传统试剂相比, 可大幅度提高甲基化与非甲基化序列的识别能力。同时, 本制品中已加入适量的 TB Green[®]染料, 在同样反应条件下可直接用于 Real Time PCR (或半定量 PCR) 及 End-point PCR 检测。

● MSP 的原理

通过硫化处理, CpG 序列根据甲基化与否将有所改变。通过设计甲基化 DNA 检出 Primer (M Primer) 与非甲基化 DNA 检出 Primer (UM Primer), 进行 PCR 扩增。

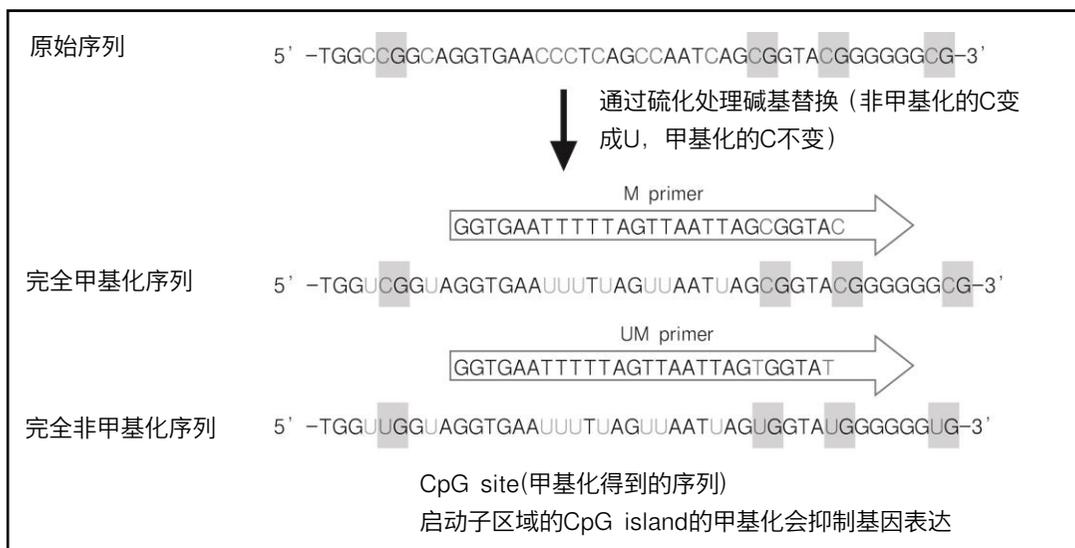


图 1: MSP 原理

● 制品内容 (50 μl 反应 × 200 次)

2X MSP Buffer (Mg ²⁺ plus, dNTP plus) *1	1 ml × 5 支
MSP Enzyme	240 μl
TB Green Solution (X100)	100 μl
ROX Reference Dye (50X conc.) *2	200 μl
ROX Reference Dye II (50X conc.) *2	200 μl

*1 Mg²⁺ 浓度是 4 mM (2X), dNTP 浓度是 400 μM (2X)。

*2 Applied Biosystems 的 Real Time PCR 仪器等校正孔间荧光信号时使用。

◆ 需要使用 ROX Reference Dye (50X) 校正的仪器

- StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ 需要使用 ROX Reference Dye II (50X) 校正的仪器

- Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System
- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ 不需要校正的仪器

- Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
- Thermal Cycler Dice Real Time System III Lite (Code No. TP900/TP960/TP700/TP760: 终卖)
- An ordinary PCR device for electrophoretic analysis

● 保存

-20°C

TB Green Solution (X100) 必须避光保存。

● 试剂盒外必备材料

1. 试剂

-PCR 引物

-灭菌水

2. 材料

-特殊反应管和器材

-移液枪及枪头（高温高压灭菌）

-用于 Real Time PCR 或普通 PCR 的基因扩增系统

● 使用注意

1. 调制反应液时，TB Green Solution (X100) 要室温避光放置，因在冰上会冻结，而其他试剂需放置在冰上。
2. 反应液的配制、分装请一定使用新的（无污染的）枪头、Microtube 等，尽量避免污染。

● 操作步骤

1. 关于 Primer 设计

经硫化处理的序列建议使用专用的 Primer 设计软件进行设计。以下设计软件登录简单，使用方便（详细的操作方法请参照各软件的 Help 等）。

扩增产物的适宜大小为 80~150 bp（可扩增到 200 bp）。

MethPrimer

<https://www.urogene.org/methprimer/index1.html>

MethPrimer - Design Primers for Methylation PCRs

Home Protocols Resources FAQ Help

Paste a ORIGINAL source [sequence](#). Try this [Sample sequence](#)
You don't need to modify your sequence (e.g. convert 'C' to 'T') before pasting.

Pick primers for [bisulfite sequencing PCR](#) or [restriction PCR](#).

Pick [MSP](#) primers.

Use [CpG island prediction](#) for primer selection?

Window: 100 Shift: 1 Obs/Exp: 0.6 GC%: 50

Submit Reset

MethPrimer - Design Primers for Methylation PCRs

Home Protocols Resources FAQ Help

General Parameters for Primer Selection

Sequence name (optional):

Target (optional): *start, size, such as (560, 30)

Excluded Regions (optional): *start, size, such as (160, 50)
1100, 50)

Number of output pairs (optional): 5

Product Size: Min: 100 Opt: 200 Max: 300

Primer Tm: Min: 50 Opt: 55 Max: 60

Primer Size: Min: 20 Opt: 25 Max: 30

Product CpGs: 4 Primer Poly X: 5

Primer non-CpG 'C's': 4 Primer Poly T: 8

Parameters for MSP primers

3'CpG constraint: 3

CpG in primer: 1

Max Tm difference: 5

Submit Reset

BiSearch

https://bisearch.enzim.hu/?m=mSP

2. PCR 反应液组成 (50 μ l 反应体系)

Real Time PCR 与普通 PCR 的反应组分相同。

注意：为确保普通 PCR 结果，需在反应混合液中加入 TB Green Solution (X100)。

试剂	使用量	终浓度
2X MSP Buffer	25 μ l	1X
PCR Forward Primer	15 pmol	0.3 μ M
PCR Reverse Primer	15 pmol	0.3 μ M
TB Green Solution (X100)	0.5 μ l	1X
MSP Enzyme	1.2 μ l	
ROX Reference Dye (50X) or ROX Reference Dye II (50X)	1 μ l	1X ^{*1}
DNA 模板	<5 μ l	
灭菌水	Up to 50 μ l ^{*2}	

*1 Applied Biosystems 的 Real Time PCR 仪器等在校正孔间荧光信号时使用。StepOnePlus 使用 ROX Reference Dye, 7500 及 7500 Fast Real-Time PCR System 使用 ROX Reference Dye II, Thermal Cycler Dice Real Time System series 不需要使用。另外，普通 PCR(电泳检出确认)也不需要。

*2 反应体系按照各 PCR 仪器的推荐体系设定。

3. PCR 条件

Real Time PCR 与普通 PCR (电泳确认) 都是相同的反应条件。

95°C 30 sec

↓

98°C 5 sec

55°C 30 sec

72°C 1 min (up to 200 bp)

} 40 ~ 45 Cycles

↓

融解曲线分析 (Real Time PCR 时进行)

注: 本制品中使用的 MSP Enzyme 是利用抗 *Taq* 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶, 与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比, 不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。

如果高温处理时间过长, 会使酶的活性下降, 其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性, 通常设定为 95°C、30 秒。

反应结束后, Real Time PCR 需要进行必要的分析, 普通 PCR 进行琼脂糖凝胶电泳确认, 电泳胶通常使用 EB 等进行染色。

● 实验例

对 *CDH1*、*CDKN2A*、*MLH1* 基因的启动子区域进行 MSP 分析。

方法: 使用硫化处理的 Methylated HeLa genome DNA 及 Native HeLa genome DNA 作为模板 (都是 30 ng/25 μ l 反应体系), 对 *CDH1*、*CDKN2A*、*MLH1* 基因的启动子区域进行 MSP 分析。

结果: Real Time PCR 与普通 PCR (电泳确认) 得到同样的结果。Real Time PCR 与普通 PCR 结果比较。

HeLa 基因组中的 *CDH1* 出现甲基化, 而 *CDKN2A* 和 *MLH1* 未出现甲基化。

1. 使用 Thermal Cycler Dice Real Time System // (终卖) Real Time PCR 仪进行检出。

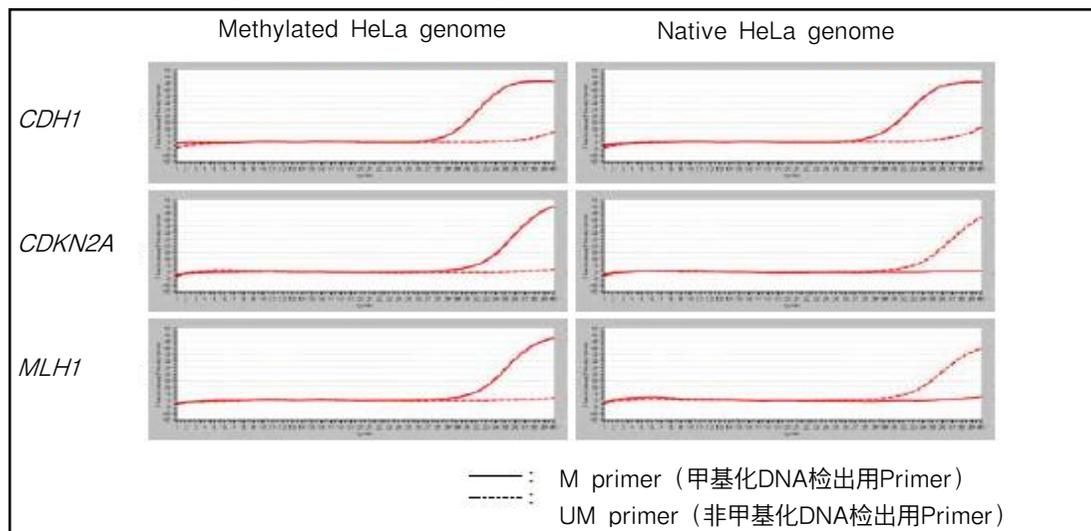


图 2: Thermal Cycler Dice Real Time System 检测结果

2. 片段检出 (电泳确认)

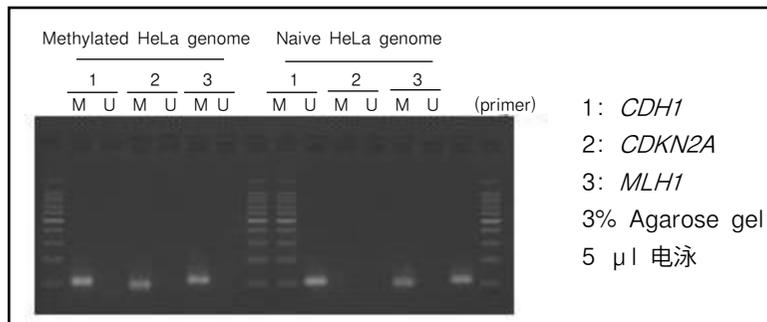


图 3: 普通 PCR (电泳确认) 结果

● Troubleshooting

本制品在推荐的条件下应有较高的反应性能及甲基化/非甲基化的识别能力, 结果不好时要从 Primer 浓度或 PCR 反应条件进行研讨。下面是针对一些问题的解决办法。

<没有扩增, 反应性能差>

- 增加 Primer 浓度
- 降低退火温度
- 循环圈数增加到 45 cycles

<甲基化 / 非甲基化识别不好, 非特异性扩增明显>

- 降低 Primer 浓度
- 提高退火温度
- 减少循环圈数

● 关联产品

EpiScope[®] Methylated HeLa gDNA (Code No. 3520)

EpiScope[®] Methylated HCT116 gDNA (Code No. 3522)

EpiScope[®] Unmethylated HCT116 DKO gDNA (Code No. 3521)

TaKaRa EpiTaq[™] HS (for bisulfite-treated DNA) (Code No. R110A/B)*¹

Thermal Cycler Dice[™] Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)

* 1 : 本酶适合以经硫化处理的含有尿嘧啶的DNA作为模板时进行的PCR反应。

TB Green and EpiScope are registered trademarks of Takara Bio Inc.

Thermal Cycler Dice and EpiTaq are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>