

Code No. R110Q

研究用

TaKaRa

TaKaRa EpiTaq™ HS
(for bisulfite-treated DNA)

说明书

目 录

| 内 容 | 页 码 |
|-------------------|-----|
| ● 制品说明 | 1 |
| ● 制品内容 | 1 |
| ● 保 存 | 1 |
| ● PCR 反应液的配制 | 1 |
| ● PCR 反应条件 | 1 |
| ● 扩增产物的电泳 | 2 |
| ● 扩增产物说明 | 2 |
| ● 引物设计说明 | 2 |
| ● 实验例 | 3 |
| ● Troubleshooting | 4 |
| ● 关联产品 | 4 |

● 制品说明

TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA) 是用于亚硫酸氢盐修饰后含有尿嘧啶的模板DNA进行PCR扩增时所需的最佳DNA聚合酶。亚硫酸氢盐修饰后的DNA有时会影响PCR反应性能，本制品中的镁离子及dNTP浓度经调整后可调节扩增效率和反应特异性，能够很好地扩增难扩增的目的片段。

本制品适用于Hot Start PCR，高温加热前，抗*Taq*单克隆抗体与*Taq*酶结合，抑制聚合酶的活性，从而抑制低温条件下由引物的非特异性退火或引物二聚体引起的非特异性扩增。抗体在PCR反应最初的DNA变性步骤已变性，因此无需特殊变性，在常规的PCR反应条件下即可使用。

● 制品内容

| | |
|---|--------|
| 1. TaKaRa EpiTaq HS (5 U/μl) | 50 U |
| 2. 10×EpiTaq PCR Buffer (Mg ²⁺ free) | 200 μl |
| 3. dNTP Mixture (各 2.5 mM) | 240 μl |
| 4. 25 mM MgCl ₂ | 240 μl |

● 保存： -20℃。

● PCR 反应液的配制

按下列组分配制 PCR 反应液 (50 μl 反应体系)

| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
|--|-------------|--------------|
| TaKaRa EpiTaq HS (5 U/μl) | 0.25 μl | 1.25 U/50 μl |
| 10 × EpiTaq PCR Buffer (Mg ²⁺ free) | 5 μl | 1 × |
| 25 mM MgCl ₂ | 5 μl | 2.5 mM |
| dNTP Mixture (各 2.5 mM) | 6 μl | 0.3 mM |
| Template | <100 ng | |
| Primer 1 | 20 pmol | 0.4 μM |
| Primer 2 | 20 pmol | 0.4 μM |
| 灭菌水 | Up to 50 μl | |

请先尝试使用上述体系进行 PCR 扩增反应，无扩增产物或出现非特异性扩增时，对 MgCl₂、dNTP Mixture 及引物浓度进行调整可改善扩增结果。具体请参照“Troubleshooting”。PCR 反应液的配制可以在室温下进行，但 DNA 聚合酶等各试剂在配制前请于冰上放置。

● PCR 反应条件

98℃ 10 sec.*¹

55℃ 30 sec.

72℃ 30 sec. (~500 bp) 或 1 min. (500 bp~1 kb) *²

} 30~40 Cycles

*¹ 变性条件请根据 PCR 仪及反应管的种类设定，一般变性条件为 98℃ 5~10 sec. 或 94℃ 20~30 sec.。

*² 请根据扩增片段大小设定 PCR 反应条件：扩增片段小于 500 bp 时，延伸时间设定为 30 sec.；扩增片段为 500 bp~1 kb 时，延伸时间设定为 1 min；扩增片段大于 1 kb 时，延伸时间设定为 1 min./kb。

注意：亚硫酸氢盐修饰后的模板 DNA 受到损伤时，扩增片段过大会降低扩增效率。

● 扩增产物的电泳

PCR 反应结束后, 取 5~10 μ l 反应液加入 1/5 量的 6 \times Loading Buffer 后进行 Agarose 电泳, 根据 DNA 片段大小选择 Agarose Gel 种类及浓度。电泳结束后将 Gel 在 1.0 μ g/ml 的溴化乙锭溶液或者 GelStar[®] 及 SYBR[®] Green I 溶液 (使用 TBE Buffer 或 TAE Buffer 稀释 10,000 倍) 中放置 20~30min. 染色, 紫外线照射下确认 DNA 电泳带。

● 扩增产物说明

使用本制品扩增得到的 PCR 产物 3' 端几乎都附有一个 “A” 碱基, 可直接克隆于 T-Vector (例如 pMD20(Code No. 3270)或 pMD19(Simple)(Code No. 3271)) 中, 并且 PCR 产物经末端平滑化及磷酸化后也可克隆于平滑末端载体中。

● 引物设计说明

建议使用专用引物设计软件设计亚硫酸氢盐修饰后 DNA 引物。下图使用的引物设计软件为免费的 online tool (具体操作方法请参照各软件的说明)。

为确保能够很好地扩增亚硫酸氢盐修饰后的 DNA, 建议设计引物时扩增片段小于 300 bp。本公司可扩增 1 kb 的亚硫酸氢盐修饰后的 DNA (参见实验例)。

MethPrimer

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



BiSearch

<http://bisearch.enzim.hu/?m=msp>

| MethPrimer - Design Primers for Methylation PCRs | | | |
|--|--------------------------------------|--|---------------------------------------|
| Home | Protocols | Resources | FAQ Help |
| General Parameters for Primer Selection | | | |
| Sequence Name (optional): | <input type="text"/> | | |
| Target (optional): | <input type="text"/> | | *start, size, such as (560, 30) |
| Excluded Regions (optional): | <input type="text"/> | | *start, size, such as (160, 50) |
| Number of output pairs (optional): | <input type="text" value="5"/> | | |
| Product Size: | Mn: <input type="text" value="100"/> | Opt: <input type="text" value="200"/> | Max: <input type="text" value="300"/> |
| Primer Tm: | Mn: <input type="text" value="50"/> | Opt: <input type="text" value="55"/> | Max: <input type="text" value="60"/> |
| Primer Size: | Mn: <input type="text" value="20"/> | Opt: <input type="text" value="25"/> | Max: <input type="text" value="30"/> |
| Product CpGs: | <input type="text" value="4"/> | Primer Pcty. G): <input type="text" value="5"/> | |
| Primer (methylated/unmethylated): | <input type="text" value="4"/> | Primer (methylated/unmethylated): <input type="text" value="5"/> | |

● 实验例

以亚硫酸氢盐修饰后的 HeLa 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增反应的实验例。

【方法】

- ① 使用 MethylEasy™ *Xceed* Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (Code No.ME002) 进行亚硫酸氢盐修饰，然后进行 PCR 扩增反应。

目的基因：*CDH1*、*MLH1*、*BRCA1* gene 上游的 CpG 岛区域。

扩增片段大小：153 bp (*CDH1*)、297 bp (*CDH1*)、136 bp (*MLH1*)、292 bp (*MLH1*)、613 bp (*BRCA1*)、1,017 bp (*BRCA1*)。

- ② 按下列组成配制 PCR 反应液。

| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
|--|------------------|-------------------|
| 亚硫酸氢盐修饰后的 HeLa 基因组 DNA (50 ng/ μ l) | 2 μ l | 100 ng/50 μ l |
| 10 × EpiTaq PCR Buffer (Mg ²⁺ free) | 5 μ l | 1 × |
| 25 mM MgCl ₂ | 5 μ l | 2.5 mM |
| dNTP Mixture (各 2.5 mM) | 6 μ l | 0.3 mM |
| Sense Primer (20 μ M) | 1 μ l | 0.4 μ M |
| Antisense Primer (20 μ M) | 1 μ l | 0.4 μ M |
| TaKaRa EpiTaq HS (5 U/ μ l) | 0.25 μ l | 1.25 U/50 μ l |
| 灭菌水 | up to 50 μ l | |

- ③ PCR 反应条件

98°C 10 sec.

55°C 30 sec.

72°C 30 sec. [30 sec./~500 bp、1 min./500 bp~]

} 40 Cycles

【结果】

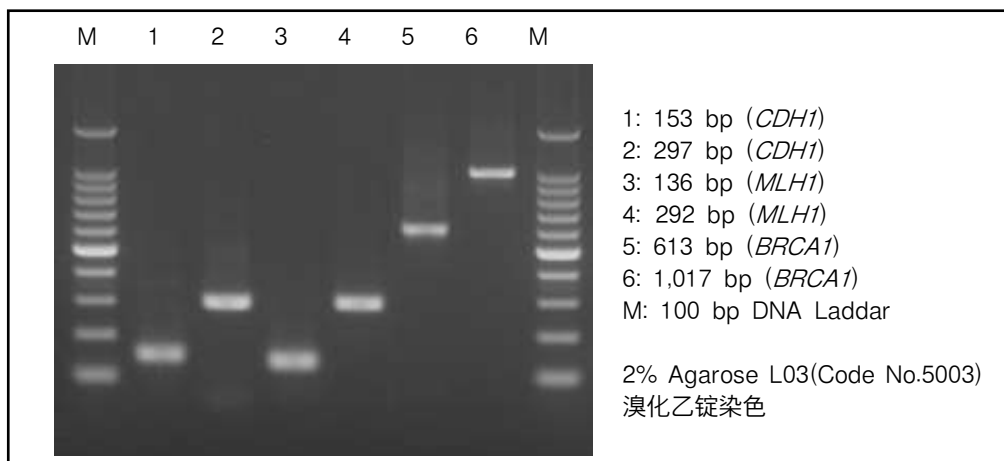


图 1: 亚硫酸氢盐修饰后的 HeLa 基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增结果

● Troubleshooting

| 现象 | 问题点 | 对策 |
|--------------------------|-----------------------|---|
| 无扩增片段 或扩增效率不良 | Mg ²⁺ 浓度过低 | 提高 Mg ²⁺ 浓度: Mg ²⁺ 浓度在 2.5 mM~3 mM 范围内进行研讨 (参考图 2)。 |
| | dNTP 浓度过高 | 降低 dNTP 浓度: dNTP 浓度在 0.2 mM~0.3 mM 范围内进行研讨。 |
| | 退火温度过高 | 退火温度从 55°C开始 2°C间隔递减。 |
| | Extension 时间过短 | Extension 时间从 30 sec.提高至 1 min.、再从 1 min.提高至 2 min.。 |
| | 引物浓度过低 | 增加引物浓度: 引物浓度在 0.4 μM~1 μM 范围内进行研讨。 |
| | 亚硫酸氢盐修饰使模板 DNA 片段化 | 再次提取亚硫酸氢盐修饰后的模板 DNA。 |
| 发生非特异性扩增 及出现 Smear 现象 | Mg ²⁺ 浓度过高 | 减少 Mg ²⁺ 浓度: Mg ²⁺ 浓度在 2 mM~2.5 mM 范围内进行研讨。 |
| | dNTP 浓度过低 | 增加 dNTP 浓度: dNTP 浓度在 0.3 mM~0.4 mM 范围内进行研讨。 |
| | 退火温度过低 | 退火温度从 55°C开始 2°C间隔递增。 |
| | 引物浓度过高 | 降低引物浓度: 引物浓度在 0.2 μM~0.4 μM 范围内进行研讨。 |

- * 降低 Mg²⁺浓度可提高反应特异性, 增加 Mg²⁺浓度可提高扩增效率及延伸性。
增加 dNTP 浓度可提高反应特异性, 降低 dNTP 浓度可提高扩增效率及延伸性。

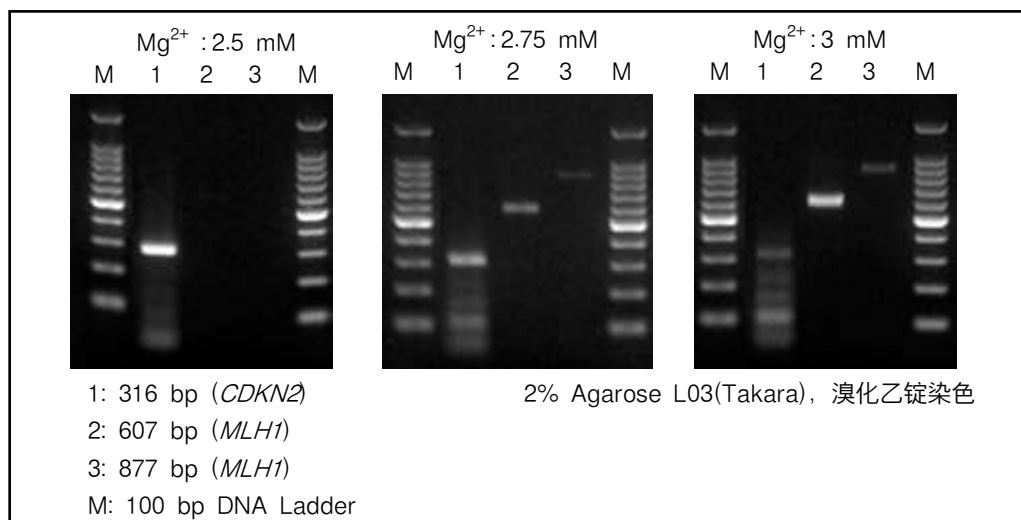


图 2: 不同 Mg²⁺浓度的 PCR 反应结果的实验例

● 关联产品

MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (Code No.ME002)

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.takara-bio.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: <http://www.takarabiomed.com.cn>

v201702Da