Code No. R100A

研究用

TaKaRa

EpiScope® MSP Kit

说明书

v202206Da

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。

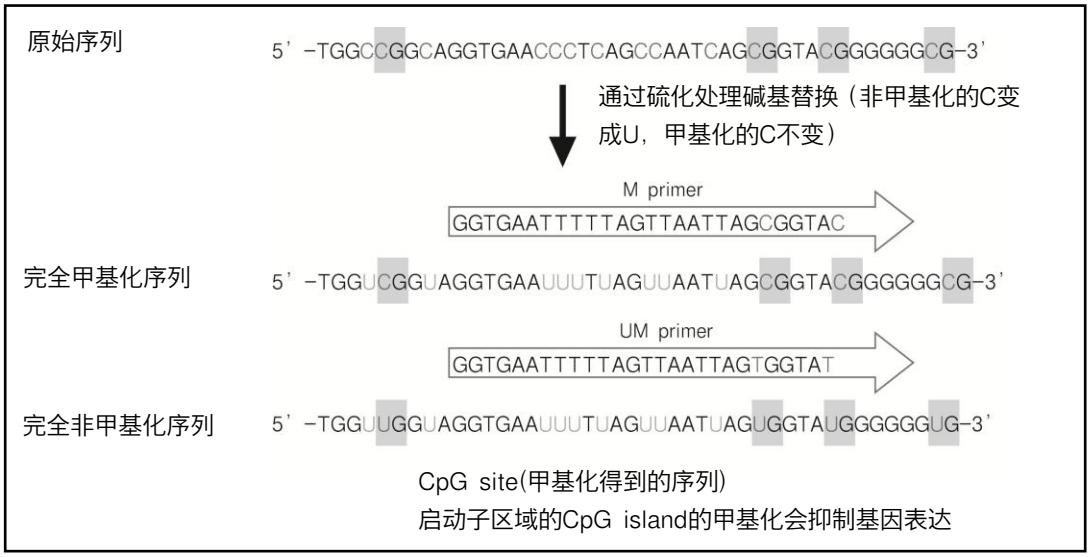


图 1：MSP 原理

● 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 Mg^{2+}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℃

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

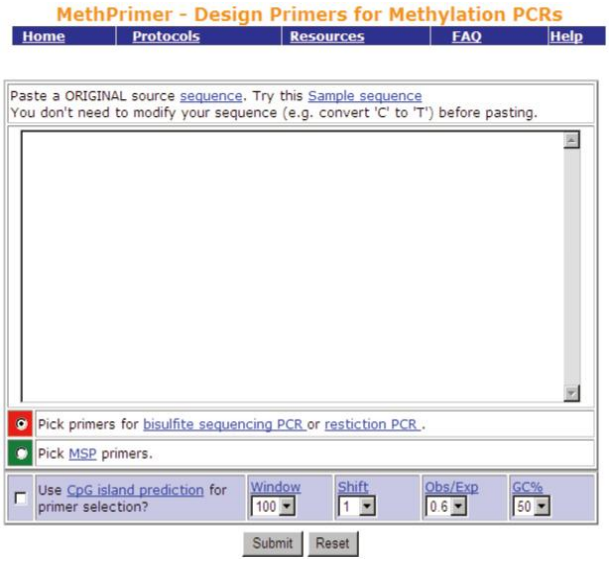
1. 关于 Primer 设计

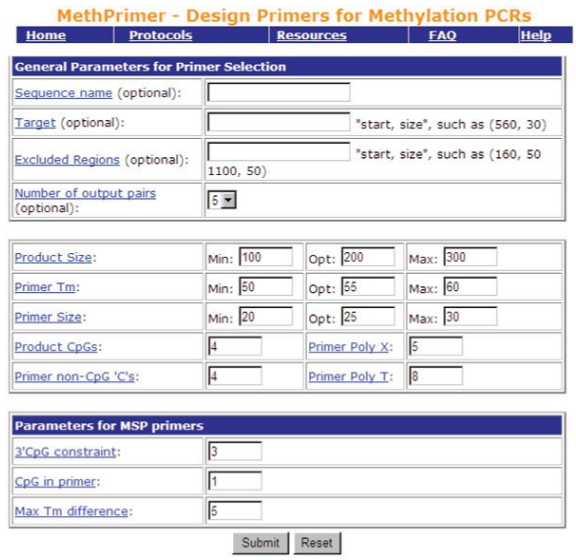
经硫化处理的序列建议使用专用的 Primer 设计软件进行设计。以下设计软件登录简单，使用方便（详细的操作方法请参照各软件的 Help 等）。

扩增产物的适宜大小为 80～150 bp（可扩增到 200 bp）。

MethPrimer

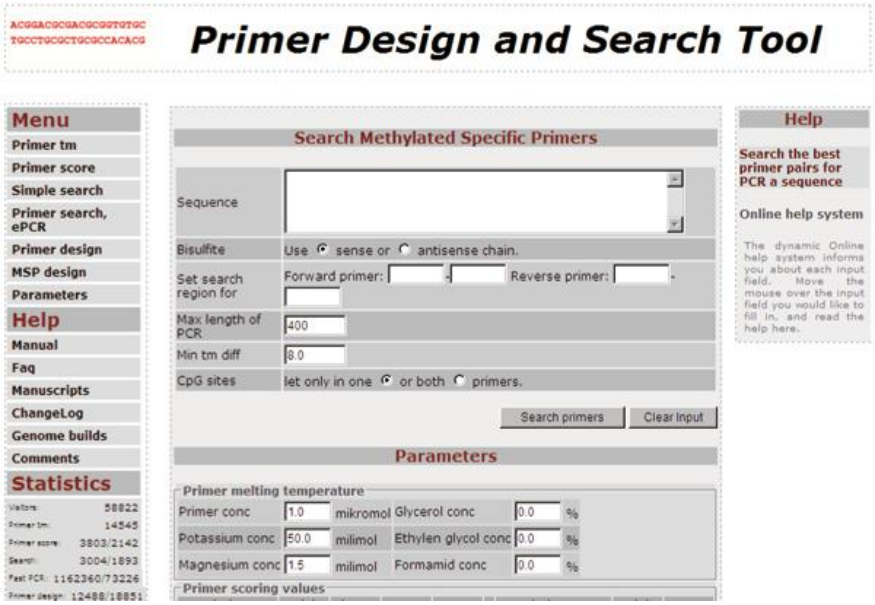
https://www.urogene.org/methprimer/index1.html





BiSearch

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



2. PCR 反应液组成（50 μl 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 μl	1X
PCR Forward Primer	15 pmol	0.3 μM
PCR Reverse Primer	15 pmol	0.3 μM
TB Green Solution（X100）	0.5 μl	1X
MSP Enzyme	1.2 μl	
ROX Reference Dye（50X）or ROX Reference Dye II（50X）	1 μl	1X*1
DNA 模板	＜5 μl	
灭菌水	Up to 50 μl*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)也不需要使用。

*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℃　30 sec
↓
98℃　5 sec
55℃　30 sec　　40 ～ 45 Cycles
72℃　1 min（up to 200 bp）
↓
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℃、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℃、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 μl 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 Ⅱ（终卖）Real Time PCR 仪进行检出。

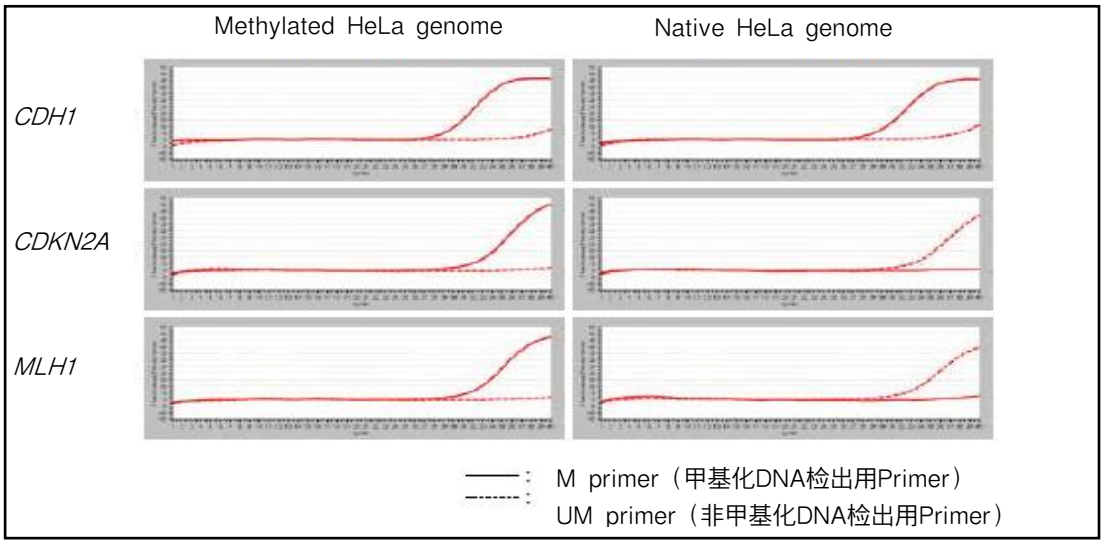


图 2：Thermal Cycler Dice Real Time System 检测结果

2. 片段检出（电泳确认）

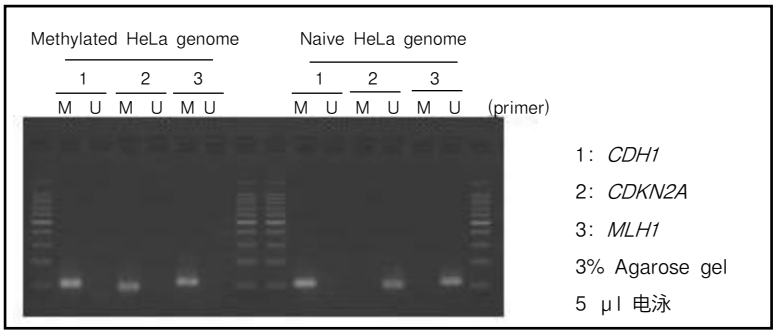


图 3：普通 PCR（电泳确认）结果

● 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

v202206Da