

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

MSP 甲基化检测实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
医用离心机	湖南凯达科学仪器有限公司	TGL-18M
PCR 仪	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	
数字恒温振荡器	金坛市城西崢嵘实验仪器长	SHZ-82
数显恒温水浴锅	上海力辰邦西仪器科技有限 公司	ZBRTD-211
超净工作台	上海力辰邦西仪器科技有限 公司	SW-CJ-1D
电泳仪	北京六一仪器厂	DYY-7C
紫外仪	北京六一仪器厂	WD-9403F
优普系列超纯水机	四川优普超纯科技有限公司	UPH-III-20T

2、主要试剂及货号

名称	厂家	货号
Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒	上海生工	B518251
Methylation-Gold Kit	ZYMO	D5005S(10)
Hotstart PCR mix	Promega	M5122
琼脂糖	擎科生物	TSJ001
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	10009218
1.5ml 离心管 (无酶)	Servicebio	EP-150-M
Gold view	北京艾德莱生物科技有限公司	EP0601
Trans2K® Plus II DNA Marker	北京全式金生物技术股份有限 公司	BM121-01

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

二、实验步骤

2、实验步骤

2.1 组织基因组 DNA 提取

2.1.1 样本前处理

2.1.1.1 动物组织: 取约 25 mg 动物组织用液氮研磨成粉末加到 1.5 mL 离心管中, 加入 180 μ l Buffer ACL, 再加入 20 μ l Proteinase K 溶液, 震荡混匀。56° C 水浴至细胞完全裂解。在水浴后加入 20 μ l RNase A (10 mg/mL), 室温放置 2-5 min。

2.1.1.2 贴壁培养细胞: 弃尽培养液, 每 10 cm² 细胞加入 200 μ l Buffer PBS 和 20 μ l Proteinase K, 轻轻晃动培养瓶, 收集细胞转移至新的离心管中, 再加入 200 μ l Buffer CL, 震荡混匀, 56° C 水浴 10 min。在水浴后加入 20 μ l RNase A (10 mg/mL), 室温放置 2-5 min。继续步骤 3~8。

2.1.1.3 悬浮培养细胞: 收集细胞, 离心去除培养液, 加入 200 μ l Buffer PBS 和 20 μ l Proteinase K, 混匀。再加入 200 μ l Buffer CL, 震荡混匀, 56° C 水浴 10 min。在水浴后加入 20 μ l RNase A (10 mg/mL), 室温放置 2-5 min。继续步骤 3~8。

2.1.2 加入 200 μ l Buffer CL, 充分颠倒混匀。加入 Buffer CL 后, 如有沉淀产生, 可 70° C 水浴 10 min。

2.1.3 加入 200 μ l 的无水乙醇, 充分颠倒混匀。加入无水乙醇后可能会产生半透明纤维状悬浮物, 不影响 DNA 的提取和应用。

2.1.4 将吸附柱放入收集管中, 用移液器将溶液和半透明纤维状悬浮物全部加入吸附柱中, 静置 2 min, 再 10,000 rpm 室温离心 1 min, 倒掉收集管中废液。

2.1.5 将吸附柱放回收集管中, 向吸附柱中加入 500 μ l CW1 Solution, 10,000 rpm 离心 30 s, 倒掉收集管废液。使用前注意溶液中是否按比例加入无水乙醇。

2.1.6 将吸附柱放回收集管中, 向吸附柱中加入 500 μ l CW2 Solution, 10,000 rpm 离心 30 s, 倒掉收集管废液。使用前注意溶液中是否按比例加入无水乙醇。

2.1.7 将吸附柱重新放回收集管中, 于 12,000 rpm 室温离心 2 min, 离去残留的 CW2 Solution。将吸附柱打开盖子于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残留的 CW2 Solution, CW2 Solution 的残留会影响基因组 DNA 的产量和后续的实验。

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

2.1.8 取出吸附柱，放入一个新的 1.5 mL 离心管中，加入 50-200 μ l CE Buffer 静置 3 min，12,000 rpm 室温离心 2 min，收集 DNA 溶液。提取的 DNA 琼脂糖电泳检测，主带清晰无明显降解可立即进行下一步实验或-20° C 保存。

2.2 重亚硫酸盐处理 DNA

2.2.1 CT 转换液配制：取一支 CT conversion Reagent 加入 900 μ L 水、300 μ L M-Dilution Buffer、50 μ LM-Dissolving Buffer，室温避光震荡 15 分钟（37°C 摇床进行）。（CT 转化液用 200ul 离心管分装至-80°C 保存）

2.2.2 取约 200-500ngDNA 至 PCR 管中，用水补齐至 20 μ L，加入 130 μ L CT 转换液。混匀后在 PCR 仪上进行 CT 转换。反应程序为 98°C 10min，64°C 2.5h，4°C 保存。

2.2.3 在 Zymo-Spin™ IC Column 中加入 600 μ LM-Binding Buffer，并将 Zymo-Spin™ IC Column 放在 Collection Tube 中。

2.2.4 将第二步的产物加入到 Zymo-Spin™ IC Column 中，室温震荡 30min（37°C 摇床进行）后 12,000g 离心 30 秒。

2.2.5 加入 100 μ L M-Wash Buffer，12,000g 离心 30 秒。

2.2.6 加入 200 μ L M-Desulphonation Buffer，室温放置 20 分钟后，12,000g 离心 30 秒。

2.2.7 加入 200 μ L M-Wash Buffer，12,000g 离心 30 秒。重复步骤 7。

2.2.8 将 Zymo-Spin™ IC Column 放入灭菌的 1.5ml 离心管中，加入 25 μ L 70°C 水浴温浴的 M-Elution Buffer。12,000g 离心 30 秒。将离心收集的液体重新放回 Zymo-Spin™ IC Column 中，12,000g 离心 30 秒，离心管中收集到的即为转换后的 DNA。

2.3 PCR 扩增

2.3.1 PCR 体系（20 μ L 体系）

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

Composition	Volume (μL)
模板 (CT转换产物)	2.0
引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	上下游引物各1
Hotstart PCR mix (promega)	10
H2O	6
Total	20

2.3.2 PCR扩增程序:

甲基化引物扩增程序

Temperature	Time	
94°C	5min	
94°C	30s	35Cycles
53°C	30s	
72°C	30s	
72°C	5min	
4°C	∞	

非甲基化引物扩增程序

Temperature	Time	
94°C	5min	
94°C	30s	35Cycles
50°C	30s	
72°C	30s	
72°C	5min	
4°C	∞	

2.4 电泳检测: 1 \times TAE, 2.0% agarose, 4V/cm