



## qMSP(定量甲基化特异性 PCR)实验报告

### 一、实验器材及试剂

#### 1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
电子天平	幸运	FA2204
S10 手持式高速匀浆机	上海菲桐仪器有限公司	S202404047
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
干式恒温器	申花	SH-G100
实验室超纯水机	砾鼎	MT-VF-20
涡旋混匀仪	JOANLAB	VM-500S
复合转子离心机	申花	SH-Mini7KS
全自动雪花制冰机	常熟市雪科电器有限公司	IMS-40
PCR 仪	杭州龙扬科学仪器有限公司	SC-96G
实时荧光定量 PCR 仪	杭州晶格科学仪器有限公司	CG-05
超微量分光光度计	NanoDrop	ND-1000

#### 2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
KT AntiQ qPCR SYBR Green Fast Mix	科兔	KQ410
1.5mL 离心管	科兔	KTL-15-P
2mL 研磨管	Servicebio	HT-200-M
2.5μL 移液器	Eppendorf	P07160M
10μL 移液器	Eppendorf	Q02880M
100μL 移液器	Eppendorf	N26824L
10μL 移液排枪	Eppendorf	Q54923L
DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒	客户提供	

## 二、实验原理

待测 DNA 样品首先经过亚硫酸氢盐处理，在这个过程中，未甲基化的胞嘧啶（C）会被转化为尿嘧啶（U），而甲基化的胞嘧啶保持不变。这样，经过处理的 DNA 中，原本的 CpG 位点会根据其甲基化状态不同，分别变为 UpG 或 CpG。设计针对亚硫酸氢盐处理后的 DNA 序列，设计两对特异性引物：一对用于扩增甲基化的 DNA 片段（M 引物），另一对用于扩增未甲基化的 DNA 片段（U 引物）。这些引物的设计需要确保它们只能与特定甲基化状态的 DNA 序列结合，从而实现对其甲基化状态的特异性检测。根据 PCR 产物的荧光信号强度，可以准确计算出待测 DNA 样品中特定 CpG 位点的甲基化程度。

## 三、实验步骤

### (一) 从血浆中提取 DNA

### (二) DNA 重亚硫酸盐转化

1. 将待处理的基因组 DNA 从冰箱中取出解冻，备用。
2. 根据自己的实验要求，配制 Bisulfite Mix。配制时，每管干粉中需加入 850  $\mu\text{L}$  缓冲液 BM，震荡混匀直至干粉完全溶解，整个过程约耗时 5 min。
3. 在 200  $\mu\text{L}$  离心管中配制重亚硫酸盐反应体系：

组成成分	使用量
DNA 样品	X $\mu\text{L}$ (最佳 DNA 处理量为 500-1000 ng)
ddH <sub>2</sub> O	20-X $\mu\text{L}$ (DNA 与 ddH <sub>2</sub> O 的最大体积为 20 $\mu\text{L}$ )
缓冲液 DP	10 $\mu\text{L}$
Bisulfite Mix	90 $\mu\text{L}$
Total	120 $\mu\text{L}$

4. 反应体系配制好以后，在 PCR 仪等可设置温度变化程序的仪器上进行重亚硫酸盐转化，整个过程约耗时 1 h：

温度	时间
95°C	10min
64°C	30min
4°C	保持

注意：若初始处理 DNA 量小于 500 ng，只需 64°C 处理 30 min 即可，若初始处理 DNA 量大

于 500 ng，则需 64°C处理 60 min。另外，处理过程中应保证盖紧 EP 管的帽子，并进行热盖处理。

### （三）重亚硫酸盐处理后的 DNA 纯化

1.柱平衡步骤：向吸附柱 CB1 中(吸附柱放入收集管中)加入 500 $\mu$ L 的平衡液 BL，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中 (请使用当天处理过的柱子)。

2.重亚硫酸盐处理程序结束后,经过简短离心将管中反应体系转移至干净的 1.5 ml 离心管中。

3.转移好以后，向其中加入 5 倍体积 (600 $\mu$ L) 的结合液 PB，充分混匀。

4.将上一步所得溶液加入吸附柱 CB1 中 (吸附柱放入收集管中)，室温放置 2 min，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB1 放入收集管中。

注意：吸附柱容积为 800 $\mu$ L，若样品体积大于 800 $\mu$ L 可分批加入。

5. 向吸附柱 CB1 中加入 600 $\mu$ L 漂洗液 PW (使用前请先检查是否已加入无水乙醇)，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB1 放入收集管中。

6. 向吸附柱 CB1 中加入 600 $\mu$ L 溶液 DB，室温(15-25°C)放置 15min，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB1 放入收集管中。

7. 向吸附柱 CB1 中加入 600 $\mu$ L 漂洗液 PW，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液。

8. 重复操作步骤 7。

9. 将吸附柱 CB1 放入收集管中，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心 2 min，尽量除去漂洗液。将吸附柱置于室温放置数分钟，彻底地晾干，以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的 PCR 实验。

10. 取出吸附柱 CB1，放入一个干净的离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加 20 $\mu$ L 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 min。12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心 2 min，收集 DNA 溶液。

### 11. 超微量紫外分光光度计测 OD 值定量 DNA 浓度

样本名称	A260/A280	c (ng/ $\mu$ L)	样本名称	A260/A280	c (ng/ $\mu$ L)
N92	2.61	11.1	G12	2.37	11.2
N93	2.27	10.2	G13	2.39	9.6
N96	2.37	9.6	G14	2.26	11.0
N97	2.59	10.6	G27	2.19	10.8



---

N98	1.87	11.8	G32	2.55	12.2
N99	2.55	11.8	G33	2.51	11.0
N100	2.32	11.7	G38	2.05	9.8
N101	2.16	11.8	G41	2.5	10.8
N102	2.26	11.0	G42	2.63	12.5
N103	2.12	10.6	G56	2.19	11.7

---

(四) qMSP

1.引物序列

---

例: XXX-MSP(M)-H-L

TGTTAGGAATTTGGTTTTAATTCGT



## 2.按下表配制 qMSP 反应体系（冰上配制）

组分	20μL 体系
2×KT qPCR SYBR Fast Mix(Universal)	10μL
引物(50 nM)	1μL
ddH <sub>2</sub> O	8μL
修饰后 DNA	1μL
总体积	20μL

## 3. 设置 qMSP 程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	10min	1
变性	95°C	15s	40 cycles
退火	58°C	1min	

注:熔解曲线使用仪器默认程序即可。

## 4.qMSP 结果分析

以亚硫酸氢盐修饰后的β-actin 作为内参，每组样本重复实验 3 次，利用循环阈值 Ct 值计算样本的甲基化水平，公式为  $2^{\Delta Ct(\beta\text{-actin}) - \Delta Ct(\text{target})}$ 。

仅供科研用途，不可用于临床诊断！