

实验报告书

项目名称：标准品定量甲基化程度

客户姓名：■

报告时间：2014年1月28日

报告人：李顺杰

HIBIO 赫贝科技 Hibio Technologies

1 试剂与仪器

甲基化标准品 EpiTect PCR Control DNA Set(100) Cat.No-59695, QIAGEN;

普通 PCR 即用型 Taq 酶 PCR 试剂盒, GK8006, 上海捷瑞生物工程有限公司;

PCR-HRM 试剂 SsoFast-EvaGreen, # 172-5201AP, Bio-Rad;

定性 PCR 仪为 XP 基因扩增仪 TC-XP-D, 杭州博日;

定量 PCR 仪为 CFX connect Real-Time PCR System, 配套使用的分析软件为 BIO-RAD Precision Melt Analysis System。

2 引物

由于 DNA 样本经过重亚硫酸盐修饰之后序列的特异性大大降低, 故而对这类 DNA 的 PCR 其特异性程度大大降低。若要利用标准曲线对甲基化程度进行相对定量, 需要特异性较好的 PCR 反应。针对修饰之后 DNA 样本, 单纯依靠 PCR 条件的优化很难达到要求。

本实验采用巢式 PCR 方法, 首先涉及包括整个 CpG 岛的引物进行扩增, 将需要检测到序列大量复制之后再用品长度合适的引物进行检测。

第一对引物 (目的产物 813bp, 包含整个 CpG 岛):

SYK-CpG-F: TTGGGTAGTTATAGAAGTTAT

SYK-CpG-R: AAAATATTCTAACTCCAAAAT

第二对引物 (目的产物 261bp, 包含 29 个 CpG 位点)

HomoSYKHRMForward: GGGTAGTTTTATTTTTTTTGTGTTG

HomoSYKHRMReverse: ACTCTTCCTCATTTTAAACAACACTTCC

3 实验步骤

3.1 第一步扩增

1) 标准品准备, 将经过重亚硫酸盐修饰的 100% 甲基化 DNA 序列和 0% 甲基化 DNA 序列, 按比例进行配比混合, 形成甲基化程度 100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、0% 十一个梯度标准品。

2) 使用普通 PCR 扩增仪进行, 20 μ l 反应体系:

| | |
|------------------------------|-------------|
| 2 \times Taq PCRmix | 10 μ l |
| SYK-CpG-F primer, 10 μ M | 1.0 μ l |
| SYK-CpG-R primer, 10 μ M | 1.0 μ l |

Template 8.0 μ l/10ng

3) qPCR 实验参数

95 $^{\circ}$ C 预变性 10min; 95 $^{\circ}$ C 10s, 52 $^{\circ}$ C 20s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

3.2 第二步扩增

1) 使用荧光定量 PCR 仪进行扩增, 20 μ l 反应体系:

| | |
|--------------------------------------|-------------|
| SsoFast Eva Green Supermix | 10 μ l |
| HomoSYKHRMForward primer, 10 μ M | 0.8 μ l |
| HomoSYKHRMReverse primer, 10 μ M | 0.8 μ l |
| Template | 8.4 μ l |

2) qPCR 实验参数

- 1: 98.0 $^{\circ}$ C for 2:00
- 2: 98.0 $^{\circ}$ C for 0:02
- 3: 55.0 $^{\circ}$ C for 0:05 Plate Read
- 4: GOTO 2, 35 more times
- 5: Melt Curve 70 $^{\circ}$ C to 90 $^{\circ}$ C : Increment 0.2 $^{\circ}$ C for 0:05 Plate Read

3.3 HRM 分析

利用 BIO-RAD Precision Melt Analysis System 对 qPCR 文件进行分析, 并生成 HRM 分析文件。

4 实验结果

4.1 标准品分型

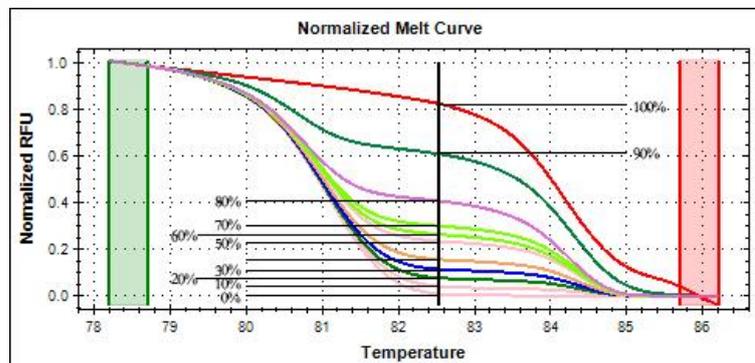
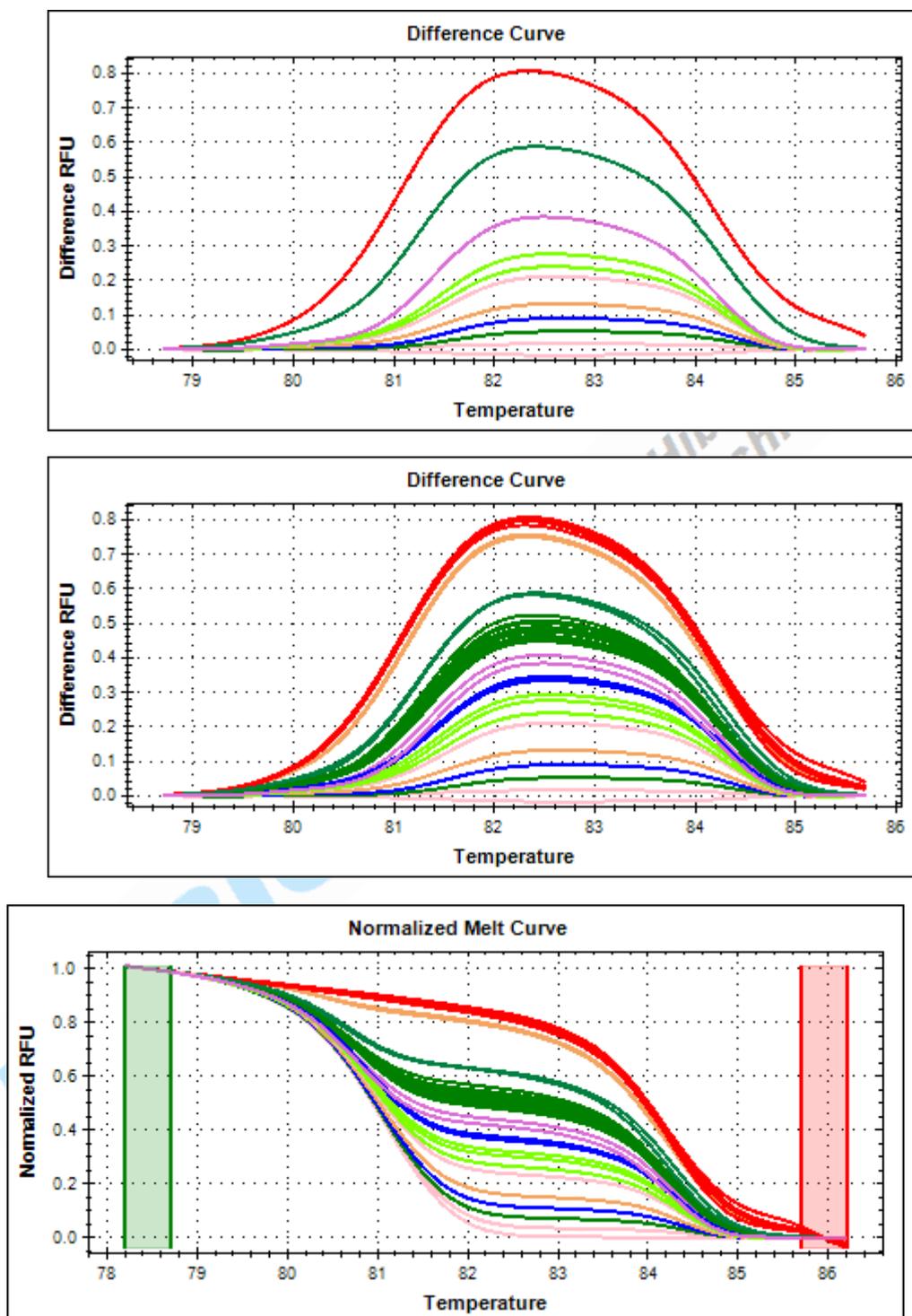


图 1.标准品分型结果

4.2 样本分型



4.3 各样本分型结果（略）