

製品コード R100A

研究用

---

**Takara**

**EpiScope<sup>®</sup> MSP Kit**

---

説明書

v202202Da

EpiScope MSP Kit は MSP (Methylation Specific PCR) 解析専用の PCR 試薬です。MSP 解析では、バイサルファイト処理により CpG 配列のメチル化状態に応じて配列が変わる塩基部位に、メチル化 DNA 検出用プライマー (M Primer) と非メチル化 DNA 検出用プライマー (UM Primer) を設計して PCR を行い、増幅の有無によりメチル化または非メチル化を識別します。

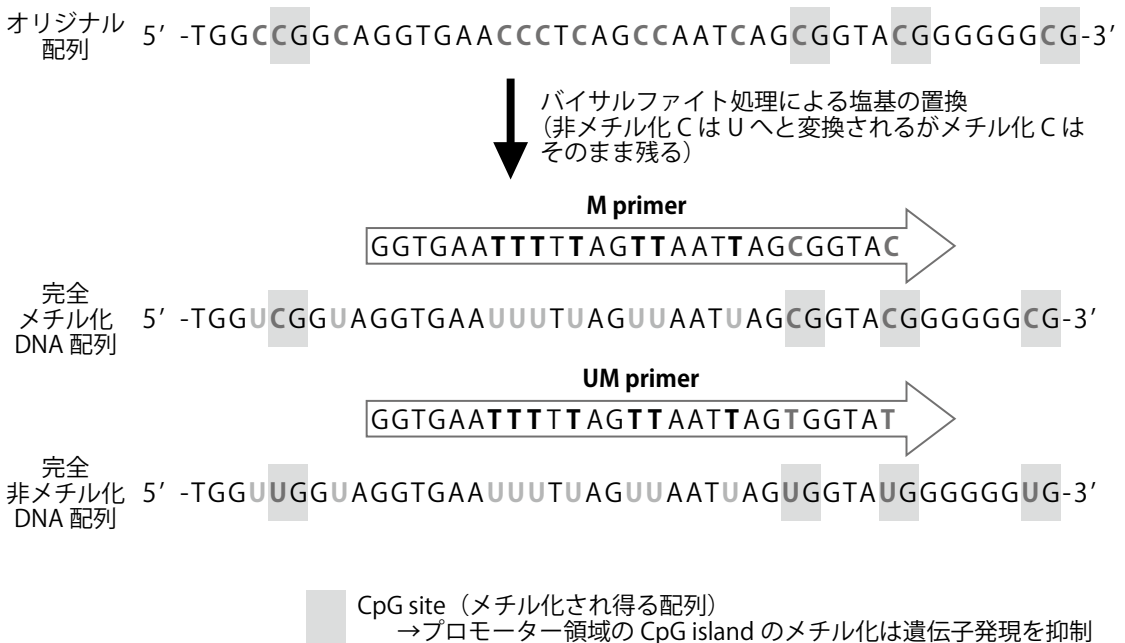
本製品は、MSP 用の専用酵素と最適化された組成のバッファーにより、バイサルファイト処理されたウラシルを含む DNA を鋳型として、従来の PCR 試薬に比べ DNA メチル化/非メチル化配列の識別能が大幅に向上した MSP 解析を行うことができます。

リアルタイムモニタリングに適した濃度のインターカレーター (TB Green<sup>®</sup>) を含んだ状態で反応系が最適化されており、リアルタイム PCR 検出 (半定量的な解析も可能)、エンドポイント検出 (電気泳動で増幅を確認) の両方を同じ反応条件で行うことができます。

【注意】バイサルファイト処理済み DNA を鋳型として、バイサルファイトシーケンスや COBRA 法のための PCR 増幅を行う場合は、TaKaRa EpiTaq<sup>™</sup> HS (for bisulfite-treated DNA) (製品コード R110A/B) の使用を推奨します。

## I. MSP の原理

バイサルファイト処理により CpG 配列のメチル化状態に応じて配列が変わる塩基部位に、メチル化 DNA 検出用プライマー (M Primer) と非メチル化 DNA 検出用のプライマー (UM Primer) を設計し、PCR 増幅を行います。



---

## II. 内容 (200 回分、50 $\mu$ l 反応系)

2 $\times$ MSP Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus, dNTP plus) *1	1 ml $\times$ 5
MSP Enzyme	240 $\mu$ l
TB Green Solution ( $\times$ 100)	100 $\mu$ l
ROX Reference Dye (50 $\times$ conc.) *2	200 $\mu$ l
ROX Reference Dye II (50 $\times$ conc.) *2	200 $\mu$ l

\* 1 : Mg<sup>2+</sup> 濃度は 4 mM (2  $\times$ )、dNTP 濃度は 400  $\mu$ M (2  $\times$ ) です。

\* 2 : Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

- ◆ ROX Reference Dye (50  $\times$ ) を添加する機種
  - StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- ◆ ROX Reference Dye II (50  $\times$ ) を添加する機種
  - Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System
  - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- ◆ 添加の必要がない機種
  - Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズ (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990、TP900/TP960/TP700/TP760 : 終売)
  - CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
  - CronoSTAR Portable Real-Time PCR System (製品コード 640245/640247/640249)
  - 電気泳動による解析を行う通常の PCR 装置

## III. 保存

– 20°C

TB Green Solution (  $\times$  100) は必ず遮光してください。

## IV. 操作上の注意

- (1) 反応液調製時には、TB Green Solution (  $\times$  100) 以外の試薬を氷上に置いてください。TB Green Solution (  $\times$  100) は氷上では凍結してしまうため、遮光して室温に置いてください。
- (2) 反応液の調製、分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

## V. プライマー設計について

バイサルファイト処理後の配列に対するプライマー設計は専用の設計ツールを利用されることをお勧めします。以下の設計ツールは、オンラインで無料で使用できます。(操作方法の詳細は、各ツールの Help 等でご確認ください。)  
増幅産物のサイズは 80 ~ 150 bp が最適です (200 bp まで増幅可能)。

MethPrimer

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

MethPrimer - Design Primers for Methylation PCRs

Home Protocols Resources FAQ Help

Paste a ORIGINAL source sequence. Try this sample sequence. You don't need to modify your sequence (e.g. convert 'C' to 'T') before pasting.

Pick primers for bisulfite sequencing PCR or restriction PCR.

Pick MSP primers.

Use CpG island prediction for primer selection?

Submit Reset

MethPrimer - Design Primers for Methylation PCRs

Home Protocols Resources FAQ Help

General Parameters for Primer Selection

Sequence name (optional):

Target (optional): "start, size", such as (500, 30)

Excluded Region (optional): "start, size", such as (100, 50)

Number of output pairs (optional):

Product size: Min: 700 Opt: 200 Max: 500

Primer Tm: Min: 50 Opt: 55 Max: 60

Primer Size: Min: 50 Opt: 25 Max: 30

Product CpGs: Primer Poly. G: Primer Poly. T:

Primer near CpG/CpA: Primer Poly. G: Primer Poly. T:

Parameters for MSP primers

CpG constraint:

CpG in primer:

Max Tm difference:

Submit Reset

BiSearch

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

Primer Design and Search Tool

Menu

Primer list

Primer score

Simple search

Primer search, aPCR

Primer design

MSP design

Parameters

Help

Manual

FAQ

Manuscripts

ChangeLog

Genome builds

Comments

Statistics

Search Methylated Specific Primers

Sequence

Baufix: Use  5' bases or  3' adenosine start.

Set search region for:

Max length of PCR:

Min tm diff:

CpG sites: let only in one  or both  primers.

Search primers Clear input

Parameters

Primer melting temperature

Primer conc: 1.0 micromol / Glycerol conc: 0.8 %

Potassium conc: 50.0 mM / Biflyen glycol conc: 0.8 %

Magnesium conc: 1.5 mM / Formamide conc: 0.8 %

Primer scoring values

Help

Search the best primer pairs for PCR a sequence.

Online help system

The dynamic Online help system informs you about each input field. Move the mouse over the input field you would like to edit, and read the help text.

※ プライマーの合成サービスをご案内しています。  
弊社ウェブサイトにてご注文を承ります。

## VI. 一般的な PCR 反応組成 (50 $\mu$ l 反応系)

リアルタイム PCR、電気泳動で増幅の有無を確認するエンドポイント PCR とともに同じ反応液組成です。エンドポイント PCR の場合にも TB Green Solution (  $\times$  100) は必ず添加してください。

試薬	使用量	最終濃度
2 $\times$ MSP Buffer	25 $\mu$ l	1 $\times$
PCR forward primer	15 pmol	0.3 $\mu$ M
PCR reverse primer	15 pmol	0.3 $\mu$ M
TB Green Solution ( $\times$ 100)	0.5 $\mu$ l	1 $\times$
MSP Enzyme	1.2 $\mu$ l	
(ROX Reference Dye (50 $\times$ ) *1 or Dye II (50 $\times$ ) *1)	1 $\mu$ l	1 $\times$
Template	< 5 $\mu$ l	
滅菌精製水	up to 50 $\mu$ l*2	

\* 1 : Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。StepOnePlus には ROX Reference Dye を、7500 および 7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を用いてください。

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズでは必要ありません。また、電気泳動によるエンドポイント検出の場合も必要ありません。

\* 2 : 反応 volume は各 PCR 装置の推奨 volume に従って適宜変更してください。

## VII. PCR 条件

リアルタイム PCR 検出、電気泳動で増幅の有無を確認するエンドポイント検出とも同じ PCR 条件です。

95°C	30 sec.	} 40 ~ 45 cycles
↓		
98°C	5 sec.	
55°C	30 sec.	
72°C	1 min. (up to 200 bp)	
↓		

融解曲線分析 (リアルタイム PCR の場合)

注：本製品の MSP Enzyme はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 用酵素で必要な PCR 反応前の 95°C (5 ~) 15 min. の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率に影響を及ぼす傾向があります。鋳型の初期変性としても通常 95°C 30 sec. で十分です。

反応終了後、リアルタイム PCR の場合は必要な解析を、エンドポイント PCR の場合はアガロースゲル電気泳動を行ってください。電気泳動後のゲルは、通常通りエチジウムブロマイドなどで染色を行ってください。

## VIII. トラブルシューティング

本製品は推奨条件において高反応性、高いメチル/非メチル識別能を発揮するよう反応系を設定していますが、良好な結果が得られない場合には下記の要領でプライマー濃度やPCR条件の検討を行ってください。

<増幅しない、反応性が悪い>

- ・プライマー濃度を上げる
- ・アニーリング温度を下げる
- ・サイクル数を最大 45 cycles まで増やす

<メチル/非メチル識別が悪い、非特異的増幅が著しい>

- ・プライマー濃度を下げる
- ・アニーリング温度を上げる
- ・サイクル数を減らす

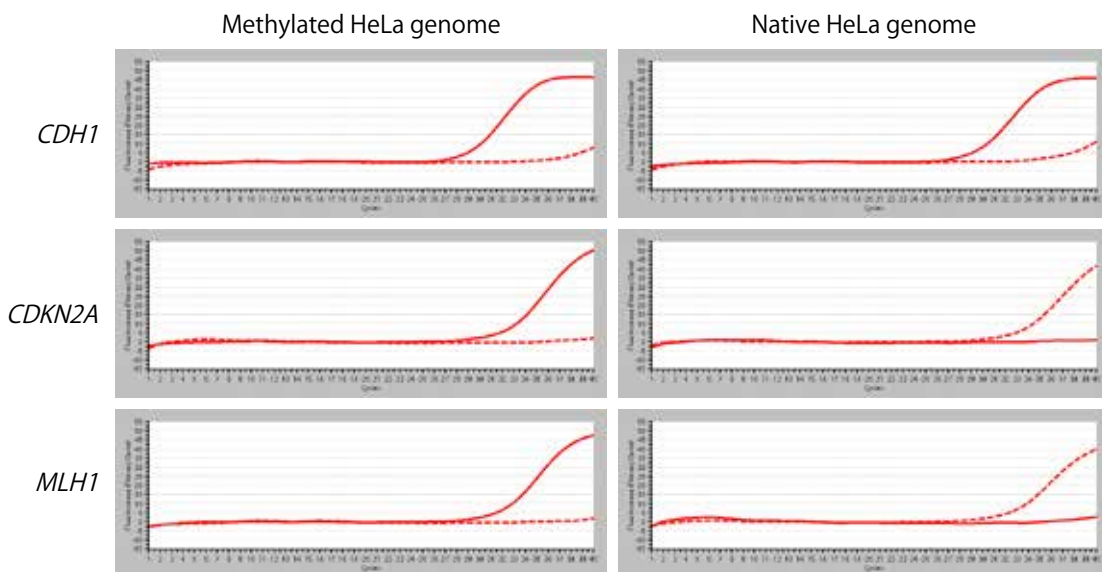
## IX. 反応例

バイサルファイト処理済み Methylated HeLa genome および Native HeLa genome を鋳型として (それぞれ 30 ng/25  $\mu$ l 反応系)、*CDH1*、*CDKN2A*、*MLH1* 各遺伝子のプロモーター領域で MSP を行った。

<結果>

リアルタイム PCR 検出、エンドポイント検出で同等の結果が得られました。

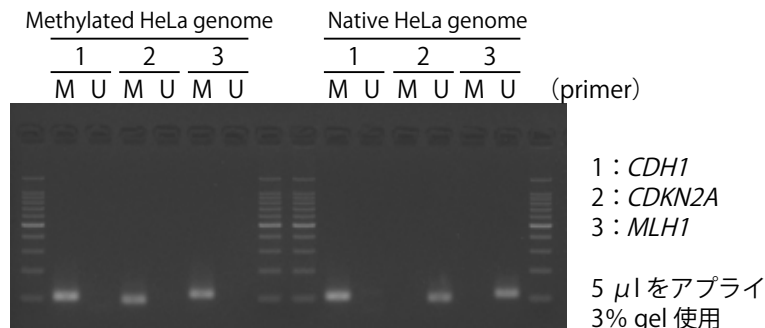
(1) リアルタイム PCR 装置 Thermal Cycler Dice Real Time System II (終売) を用いて検出



—— : M primer (メチル化 DNA 検出用プライマー)  
----- : UM primer (非メチル化 DNA 検出用プライマー)

※ Native HeLa genome では、*CDH1* の CpG 領域はメチル化されているが、*CDKN2A*、*MLH1* の CpG 領域はメチル化されていない。

(2) エンドポイント検出 (PCR 後、アガロースゲル電気泳動で確認)



## X. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)  
CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)  
CronoSTAR™ Portable Real-Time PCR System (製品コード 640245/640247/640249)  
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)  
EpiScope® Methylated HeLa gDNA (製品コード 3520)  
EpiScope® Methylated HCT116 gDNA (製品コード 3522)  
EpiScope® Unmethylated HCT116 DKO gDNA (製品コード 3521)  
TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA) (製品コード R110A/B)

## XI. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・EpiScope、TB Green、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。EpiTaq、CronoSTAR はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

**タカラバイオ株式会社**