

SNaPshot 法检测 SNP 实验报告

1. 位点及引物序列:

PCR 扩增: 在位点两侧设计 PCR 引物, 引物用 primer5 设计。

| 序号 | 上游引物 | 下游引物 | PCR 产物长度及 GC 含量 |
|----|-------|-------|---------------------|
| S1 | ----- | ----- | 131bp, GC%: 58. 78% |
| S2 | ----- | ----- | 131bp, GC%: 58. 78% |
| S3 | ----- | ----- | 234bp, GC%: 62. 39% |
| S4 | ----- | ----- | 234bp, GC%: 62. 39% |
| S5 | ----- | ----- | 299bp, GC%: 46. 49% |
| S6 | ----- | ----- | 299bp, GC%: 46. 49% |

2. 实验条件:

引物由上海捷瑞公司合成, Taq 酶、dNTP 为 Fermentas 公司产品

PCR 仪型号为: 东胜•龙(EDC-810)

多重 PCR 反应:

反应体系:

| | |
|--------------------------|---------|
| DNA | 1ul |
| 10*buffer | 1.5ul |
| MgCl ₂ (25mM) | 1.5ul |
| dNTP (10mM) | 0.3ul |
| 引物混合 (10P) | 0.15ul |
| Taq (5U/ul) | 0.3ul |
| H ₂ O | 补至 15ul |

扩增条件:

| | | |
|------|------|-------------------------|
| 95°C | 3min | |
| 94°C | 15s | |
| 60°C | 15s | -0.5°C /Cycles 11cycles |
| 72°C | 30s | |
| 94°C | 15s | |
| 54°C | 15s | 24cycles |
| 72°C | 30s | |
| 72°C | 3min | |

扩增后取 3ul PCR 产物用 ExoI 和 Sap 纯化, 主要是去除反应产物中的引物及 dNTP

| | |
|------------------|--------|
| PCR 产物 | 3ul |
| ExoI | 0.2ul |
| Sap | 0.2ul |
| ExoI buffer | 0.7ul |
| H ₂ O | 补至 7ul |

37°C 45min, 80°C 15min, 纯化好后进行延伸反应, 预先混好延伸引物。

延伸反应:

体系:

| | |
|-----------------|-----|
| PCR 产物 | 2ul |
| SNaPshot Mix 试剂 | 1ul |
| 延伸引物混合 | 2ul |
| 水补至 | 6ul |

96°C 1min

| | | |
|------|-----|----------|
| 96°C | 10s | |
| 52°C | 5s | 30cycles |
| 60°C | 30s | |

3. 在测序仪上检测:

取 1ul 延伸产物, 加 8ul 上样 loading, 95°C 变性 3min, 立即冰水浴。

测序仪型号为 ABI 3730XL。

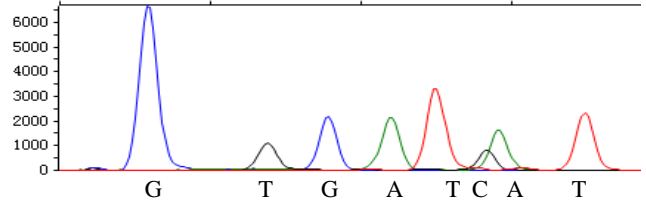
4. 实验结果:

4.1 分型结果 (见 excel 表格)

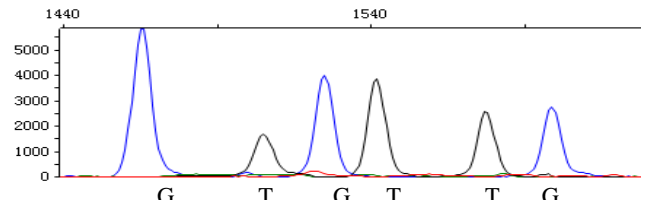
4.2 代表性峰图:

| 序号 | 多态性 | 延伸防向 | 延伸碱基 | 延伸引物长度 | 延伸引物 |
|----|------------|------|------|--------|----------------------|
| S1 | CT[A/G]GG | F | AG | 25 | TTTT----- |
| S2 | GT [A/G]GA | R | CT | 26 | TTTTT----- |
| S3 | GT [C/T]AC | R | AG | 31 | TTTTTTTTTT----- |
| S4 | GC [A/G]GC | R | CT | 32 | TTTTTTTTTT----- |
| S5 | AT [A/C]AA | F | AC | 36 | TTTTTTTTTTTTTT----- |
| S6 | AG [G/T]TG | F | GT | 38 | TTTTTTTTTTTTTTT----- |

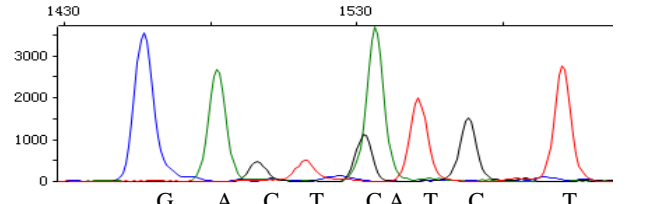
S1: GG S2: CC S3: AG S4: TT S5: AC S6: TT
1435 1535



S1: GG S2: CC S3: GG S4: CC S5: CC S6: GG



S1: GG S2: CT S3: AA S4: CT S5: CC S6: TT



S1: AG S2: TT S3: AA S4: CT S5: CC S6: TT

