

PCR-SSCP 实验步骤

一. 样品制备

1. PCR 扩增并检测。根据不同的引物挑选适合的退火温度进行 PCR 扩增。扩增产物用 2-2.5% 的琼脂糖胶跑水平电泳检测，上样量 3-5ul。PCR 产物为 10ng/ul 左右为最佳。

2. PCR 产物与变性 buffer 混合。在干净的 PCR 管底部加入 5ul SSCP 上样缓冲液（变性缓冲液，同《分子克隆》中的测序缓冲液），然后在缓冲液中央加入 PCR 扩增产物。按照经验，扩增效果在琼脂糖胶上能看出比较亮的带的样品加 1ul，效果很好加 0.5ul，如果不太好就适当增加 1.5、2 或 3 不等，同时加大上样缓冲液的量，比如加 3ul 的 PCR 产物，缓冲液加到 8ul 变性效果更好。

3. PCR 产物变性。加好的样品进行离心，使样品集中在管底。PCR 仪上 95℃变性 10 分钟，立即取出 PCR 产物连同架子一同置于冰上静置 5min，以免变性的产物复性。

注：3 和 4 步可以在制 SSCP 胶第四步后，等胶凝的过程中进行。

二. 制胶

1. 装板。在所要进行实验的每一副玻璃板先用自来水冲洗，然后使用 ddH₂O 冲洗，然后使用吸水纸将玻璃板擦拭干，然后再玻璃板上涂抹无水酒精，待 2-3min 酒精挥发。将玻璃板组装好放入凝胶架子中，两边及底部固定好，两玻璃板保持水平，然后将发条拧紧。（可用无水乙醇测试是否漏胶）。

2. 配胶。

甘油浓度 50%的几种浓度大板胶（10ml 下层胶，5ml 浓缩胶）配方（两块胶 1.0mm）：

	8%	6%
30%PAGE	2.7ml	1ml
10×TBE	1ml	0.5ml
50%甘油	1ml	0.5ml
ddH ₂ O	5ml	3ml

APS	70ul	70ul
TEMED	12ul	8ul
Total	10ml	5ml

甘油浓度 50%的几种浓度小板胶（15ml 下层胶，10ml 浓缩胶）配方（两块胶 1.5mm）

	8%	6%
30%PAGE (4°C)	4.05ml	2 ml
10×TBE	1.5ml	1m
50%甘油	1.5m	1m
ddH ₂ O	7.5ml	6ml
APS	105ul	70 ul
TEMED	12ul	12ul
Total	15ml	10ml

3. 灌胶。配好胶后搅匀，灌入装好的玻璃板中，注意不能产生气泡，如果产生气泡把板立起，轻轻敲打可使气泡升出胶面，胶面与凹板上沿大约差 0.5cm 时插上梳子，要保证梳子齿和液面接触处没有气泡，一旦产生要拔出重插。

4. 静置。灌好的胶平放或与水平成一比较小的角度（10° 以下）静置水平桌面上 30min 左右使之充分聚合。

注：此时可以进行 PCR 样品变性，即第一部分的 3、4 步。

二. 上样

1. 安板。PAGE 聚合好后要及时拔出梳子（时间耽搁长后会很难拔出），拔梳子时要用力均匀以保持胶孔的整齐。用夹子把胶板固定在电泳槽上，凹槽的一面朝里，安板时首先使板的底边一端先接触电泳液，再缓慢地过度到另一端，以免产生大气泡（产生大气泡会使电泳条带弯曲）。

2. 预电泳。从底槽把一些电泳液 1×TBE 吸到上槽，使液面高出玻璃板矮边 1cm 以上，并确保上槽不漏液。打开电源，大槽电压调到 140-150V，小槽 110-120V，预电泳 10min 左右。

(0.1W/cm, 10°C, 1-3h)

3. 点样。用微量进样器把准备好的样品按顺序加到胶孔中。由于边缘效应带型不整齐，每块板中最边上的两个孔最好不要点样。

4. 电泳。大槽电压 140-150V，小槽 110-120V，温度在 10-15℃，恒温电泳 10 个小时以上。

三. 染色

1. 固定。把胶卸下，做好起始记号，放入 70%乙醇中在摇床上固定 15min。固定好后乙醇回收（可以重复使用 5 次左右），蒸馏水洗两遍，每遍 3min 左右。若同时染两块胶固定和洗脱都要适当增加时间。

2. 染色。染色液（200ml 染色液含 3.6%的 NaOH4.2ml、20%AgNO₃3.6ml、氨水 2ml）染色 30min，同时染两块胶要适当增加时间，需 40min 左右。倒掉染色液，洗 3 遍，每遍 3min，同时染两块胶要适当增加时间。

3. 显色。显色液（200ml 显色液包含 1%柠檬酸钠 1ml，甲醛 100ul）至清晰。倒掉显色液，加蒸馏水洗脱 3 次停显。

(也可将凝胶浸在含 0.5ug/ml 溴化锭的 1×TBE 缓冲液中染色 10min，在紫外灯下观察)

附录

1. 甘油浓度 50%的几种浓度大板胶（10ml 下层胶，5ml 浓缩胶）配方（两块胶 1.0mm）：

	8%	6%
30%PAGE	2.7ml	1ml
10×TBE	1ml	0.5ml
50%甘油	1ml	0.5ml
ddH ₂ O	5ml	3ml
APS	70ul	70ul
TEMED	12ul	8ul
Total	10ml	5ml

2. 甘油浓度 50%的几种浓度小板胶（15ml 下层胶，10ml 浓缩胶）配方（两块胶 1.5mm）

	8%	6%
30%PAGE	4.05ml	2 ml
10×TBE	1.5ml	1m
50%甘油	1.5m	1m
ddH ₂ O	7.5ml	6ml
APS	105ul	70 ul
TEMED	12ul	12ul
Total	15ml	10ml

3. 10×TBE 的配方:

108g Tris 碱、55g 硼酸、40ml 0.5mol/lEDTA(pH8.0)定容 1L

4.变性 buffer 的配方

98%去离子甲酰胺、10mmol/lEDTA(pH8.0)、0.025%二甲苯青 FF、0.025%溴酚蓝

注意事项:

①重复性.影响 SSCP 重复性的主要因素为电泳的电压和温度.这两个条件保持不变, SSCP 图谱可保持良好的重复性.一般 SSCP 图谱是二条单链 DNA 带,但有时有的 DNA 片段 可能只呈现一条 SSDNA 带,或者三条以上,这主要是由于两条单链 DNA 之间存在相似的立体构象.有时三条以上的 SSCP 图谱是由于野型 DNA 片段和突变型 DNA 片段共同存在的结果.

②靶 DNA 序列长度的影响在实验中发现 SSCP 对短链 DNA 或 RNA 的点突变检出率要比长链的高,这可能是由于长链 DNA 和 RNA 分子中单个碱基的改变在维持立体构象中起的作用较小的缘故.而有人认为在 DNA 链较短的(400bp 以下)情况下, DNA 的长度不会影响 SSCP 的效果.

③电泳电压和温度的影响:为了使单链 DNA 保持一定的稳定立体构象, SSCP 应在较低温 度下进行(一般 4℃-15℃之间).在电泳过程中除环境温度外,电压过高也是引起温度升高的主要原因,因此,在没有冷却装置的电泳槽上进行 SSCP 时,开始的 5min 应用较 高的电压(250V),以后用 100V 左右电压进行电泳.这主要是由于开始的高电压可以使不同立体构象的单链 DNA 初步分离,而凝胶的温度不会升高.随后的低电压电泳可以使 之进一步分离.在实验中应根据具体实验

条件确定电泳电压.

④SSCP的结果断定:由于在SSCP分析中非变性PAG电泳不是根据单链DNA分子和带电量的大小来分离的,而是以单链DNA片段空间构象的立体位阻大小来实现分离的,因此,这种分离不能反映出分子量的大小.有时正常链与突变链的迁移率很接近,很难看出两者之间的差别.因此一般要求电泳长度在16--18cm以上,以检测限为指标来判定结果.检测限是指突变DNA片段与正常DNA片段可分辨的电泳距离差的最小值.大于检测限则判定链的迁移率有改变,说明该DNA序列有变化,小于检测限则说明链之间无变化.例如,一般检测限定为3mm,那么当两带间距离在3mm以上,则说明两链之间有改变.另外检测限不能定的太低,否则主观因素太大,易造成假阳性结果.另外,SSCP分析中其它条件,如PCR产物的上样量,PAG的交联度、以及胶的浓度等,都应根据具体实验进行选择确定.