

单核苷酸多态性 (SNP) 实验

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)即单核苷酸多态性，是由于单个核苷酸改变而导致的核酸序列多态性(Polymorphism)。据估计，在人类基因组中，大约每千个碱基中有一个 SNP，无论是比较于度多态性(RFLP)分析还是微卫星标记(STR)，都要广泛得多。

实验方法原理：

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)即单核苷酸多态性，是由于单个核苷酸改变而导致的核酸序列多态性(Polymorphism)。据估计，在人类基因组中，大约每千个碱基中有一个 SNP，无论是比较于限制性片段长度多态性(RFLP)分析还是微卫星标记(STR)，都要广泛得多。SNP 是我们考察遗传变异的最小单位,据估计，人类的所有群体中大约存在一千万个 SNP 位点。一般认为，相邻的 SNPs 倾向于一起遗传给后代。于是，我们把位于染色体上某一区域的一组相关联的 SNP 等位位点称作单体型 (haplotype)。大多数染色体区域只有少数几个常见的单体型（每个具有至少 5%的频率），它们代表了一个群体中人与人之间的大部分多态性。一个染色体区域可以有很多 SNP 位点，但是我们一旦掌握了这个区域的单体型，就可以只使用少数几个标签 SNPs(tagSNP)来进行基因分型，获取大部分的遗传多态模式。

实验材料：

组织样品

试剂、试剂盒：

液氮、PBS、GA 缓冲液、GB 缓冲液、蛋白酶 K、无水乙醇、蛋白液、漂洗液等

仪器、耗材：

离心管、离心机、废液收集管、吸附柱、水浴锅、分光光度计、低温冰箱等

实验步骤：

一、DNA 抽提

1. 取新鲜肌肉组织约 100 mg, PBS 漂洗干净, 置于 1.5 ml 离心管中, 加入液氮, 迅速磨碎。
2. 加 200 μ l 缓冲液 GA, 震荡至彻底悬浮。加入 20 μ l 蛋白酶 K (20 mg/ml) 溶液, 混匀。
3. 加 220 μ l 缓冲液 GB, 充分混匀, 37°C 消化过夜, 溶液变清亮。加 220 μ l 无水乙醇, 充分混匀, 此时可能会出现絮状沉淀。
4. 将上述一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 CB 中, (吸附柱放入废液收集管中) 12 000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
5. 加入 500 μ l 去蛋白液 GD (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12 000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
6. 加入 700 μ l 漂洗液 GW (使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12 000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 GW, 12 000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。将吸附柱 CB 放回废液收集管中, 12 000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液。
7. 将吸附柱 CB 转入一个干净的离心管中, 加入 100 μ l 洗脱缓冲液 (洗脱缓冲液应在 60-70°C 水浴预热), 混匀, 室温放置 15 分钟, 12 000 rpm 离心 30 秒。洗脱第二次, 将洗脱缓冲液 50 μ l 加入吸附柱中, 室温放置 15 分钟, 12 000 rpm 离心 30 秒。
8. 采用 Beckman DU 640 spectrophotometer 检测提取到的基因组 DNA 浓度, 在 OD260 处有显著吸收峰。同时检测纯度, OD260/280 的值应约为 1.7-1.9。
9. 从原液中取出相应体积 DNA 溶液, 稀释至 50 ng/ μ l, 原液置于 -70°C 保存, 稀释液置于 -20°C 保存。

二、PCR 扩增目的片段

1. 按相关的试剂说明在标准反应管中准备反应体系，典型的 PCR 反应体系如下（20 ul 体系）：

| | |
|-----------|--------|
| 10×Buffer | 2ul |
| Taq酶 | 1ul |
| dNTP | 0.5ul |
| 上游引物 | 0.5ul |
| 下游引物 | 0.5ul |
| 无菌水 | 14.5ul |
| DNA模板 | 1ul |

2. 向左扳动仪器盖子上的手柄，揭开仪器盖子，小心放置样品管于仪器的相应样品孔中，轻轻盖上盖子，将顶部的旋钮慢慢旋紧，让热盖紧密接触样品管，样品放置完毕。

三、 在 T1 型 PCR 仪上编辑一个程序

1. 按[C programs]进入编辑模式。要在主目录中创建一个程序请按[D enter]。要进入一个子目录，用→键将光标向右移动，然后用↑↓键选择一个子目录。按[D enter]进入选择的子目录。
2. 输入程序中要求的温度：用[D enter]确认温度。为其输入时间，用小数点来间隔。顺序为 h.m.s.用[D enter]确认时间设置, 或者用光标键移动到下一个区域。# 表示循环的次数。设定循环值=总循环值-1，即，总循环数为 30 时应输入 “29”。用[C pgm ok]来储存一个完整的程序。程序数据永久的储存在记忆中。

四、 运行程序

按[B start/stop]选择一个程序。用→↑↓键选择一个子目录，或者用[D enter]进入主目录。输入您想要启动的程序的号码。或者，按[A list]在该子目录中的所有程序的列表选择一个程序。用↑↓键在列表中滚动选择。用[D enter]确认用强光突出的程序。按[D start]启动程序。

五、 控制测试过程

运行过程中，按 A 按钮，可以获得程序剩余的时间信息。运行完成后，按 STOP 按钮终止实验，按 YES 确认终止。小心旋开热盖，按照放置样品的操作顺序，打开盖子，取出实验样品，再盖上盖子，关闭电源，本次实验结束。

六、PCR 产物测序

由专门负责测序的服务公司完成。

七、数据分析

少量可人工读取，大量可软件读取。比对发现的 SNP 在基因组中的位置：重点是启动子区、外显子区域（包括编码区的 cSNP 及 5' 及 3' UTR）、剪切边界等，密码子的改变是否导致氨基酸的改变：错义突变、无义突变、终止突变。

注意事项：

1. 为保证待测目的区域测序真实可靠，引物设计应该使待测目的区域边界距离上下游引物至少各 50 bp；
2. 引物设计建议使用在线方式，以保证成功率；
3. 为保证测序敏感性，PCR 产物片段大小应在 250 bp - 650 bp 范围；
4. 为方便实验，建议引物合成时分装成 1 o.d/管，方便将 PCR 与测序的引物分开；
5. 为保证引物的特异性，建议引物设计后在 NCBI 上 blast 确认；
6. 为防止降解，PCR 产物应尽快测序，否则应该保存在 -20℃，且时间不宜过长；
7. 为保证结果真实性，建议对关键点进行反向测序确认。