

易感十项套餐实验流程报告

1. SNP 位点上下游核酸序列信息获取及引物设计

(1) 在 SNP 位点查询网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> 可以查询到特定的 SNP 位点上下游序列信息。

(2) 将查到的目的序列复制粘贴进 Geneious 软件，利用此软件来设计引物，设计引物除了按照常规普通 PCR 引物设计原则外，一组多重 PCR 中的每对引物扩增的目的片段大小要有差异，大小相邻的目的片段之间的长度差异最好不要低于 40bp，以便于电泳检测。

(3) 多重 PCR 检测最终分组及引物信息如下：

	位点	引物
结直肠癌	CASC8-rs6983267	HS-BVC-YW250/251
肾癌	EPAS1-rs7579899	HS-BVC-YW209/210
鼻咽癌	GABBR1-rs29232	HS-BVC-YW237/242
肾癌	LOC102724265-rs7105934	HS-BVC-YW213/214
鼻咽癌	TNFRSF19-rs9510787	HS-BVC-YW263/216
痛风	ABCG2-rs2231142	HS-BVC-YW243/244
结直肠癌	COLCA2-rs3802842	HS-BVC-YW219/220
胰腺癌	Intergenic-rs9543325	HS-BVC-YW233/234
胰腺癌	NR5A2-rs3790844	HS-BVC-YW223/224
痛风	SLC2A9-rs12498742	HS-BVC-YW225/226

2. 引物稀释

(1) 引物在稀释前，最好短暂离心。

(2) 按照说明将引物稀释为 100uM 母液，之后取部分母液稀释为 10uM 的工作液。

3. 普通 PCR 检测引物的有效性

(1) 使用 2X Taq mix 来 10ulPCR 反应体系检测引物的有效性，反应体系如下：

2X Taq mix	5ul
Primer1	0.5ul
Primer2	0.5ul
template	0.2ul (浓度: 100ng/ul)
dH2O	3.8ul

PCR 程序:

94℃ 2min, (94℃ 30s, 60℃ 30s, 68℃ 45s) 30cycle, 68℃ 5min, 4℃

(2) 1.5%凝胶, 电压 120–160V 电泳检测。

对于 GC 含量高的目的片段 (例如: rs1801253), 可以加入适量的 GC buffer, 来优化 PCR 效果。

4. 多重 PCR

(1) 首先将引物按照同等比例混匀为 primer mix, 10ulPCR 反应检测体系如下:

2X Taq mix	5ul
primer mix	1.2ul
template	0.2ul (浓度: 100ng/ul)
dH2O	3.6ul

PCR 程序:

94℃ 2min, (94℃ 30s, 60℃ 30s, 68℃ 45s) 35cycle, 68℃ 5min, 4℃

(2) 1.5%凝胶, 电压 120–160V 电泳检测。

若片段之间的条带亮度差异太大, 适当降低较亮目的片段的引物比例。最好使各目的片段的亮度接近。

(3) 将优化好的多重 PCR 以 50ul PCR 反应体系扩增, 优化后各组反应体系如下:

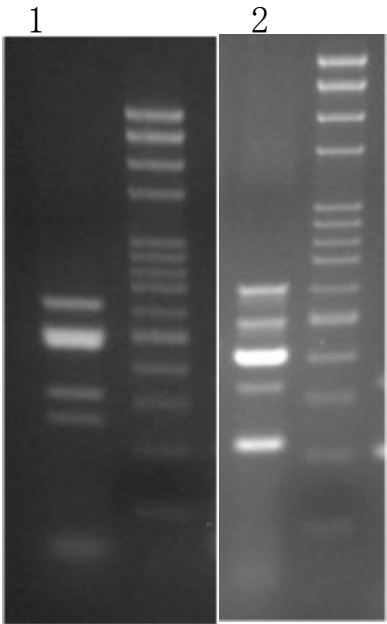
每组反应引物的比例以及用量:

	位点	引物	大小	用量	混合引物用量
结直肠癌	CASC8-rs6983267	HS-BVC-YW250/251	637	4	10ul
肾癌	EPAS1-rs7579899	HS-BVC-YW209/210	322	4	
鼻咽癌	GABBR1-rs29232	HS-BVC-YW237/242	425	2	
肾癌	LOC102724265-rs7105934	HS-BVC-YW213/214	517	4	
鼻咽癌	TNFRSF19-rs9510787	HS-BVC-YW263/216	187	2	
痛风	ABCG2-rs2231142	HS-BVC-YW243/244	237	2	10ul
结直肠癌	COLCA2-rs3802842	HS-BVC-YW219/220	332	4	
胰腺癌	Intergenic-rs9543325	HS-BVC-YW233/234	410	1.5	
胰腺癌	NR5A2- rs3790844	HS-BVC-YW223/224	507	6	
痛风	SLC2A9-rs12498742	HS-BVC-YW225/226	611	8	

PCR 程序:

温度	时间	循环数
94	2min	1
94	30sec	
60	30sec	40
68	45sec	
68	5min	1
4	for ever	1

取 10ul 反应产物做电泳检测，若条带图谱符合预期，则对产物进行磁珠纯化。



5. 多重 PCR 产物纯化

- (1) 采用磁珠纯化 PCR 产物，20ulddH2O 洗脱目的片段。
- (2) 分装 10ul，送样测序。

6. 测序引物

(1) 选择正向或反向引物之一作为测序引物，若测序效果不理想，更换 PCR 中另一引物测序，也可以重新设计测序引物，选择或设计的测序引物距离检测的 SNP 位点不要太近。

测序引物见下表：

	位点	测序引物	评价
结直肠癌	CASC8-rs6983267	HS-BVC-YW250	OK
肾癌	EPAS1-rs7579899	HS-BVC-YW209	OK
鼻咽癌	GABBR1-rs29232	HS-BVC-YW242	OK
肾癌	LOC102724265-rs7105934	HS-BVC-YW213	OK
鼻咽癌	TNFRSF19-rs9510787	HS-BVC-YW215	OK
痛风	ABCG2-rs2231142	HS-BVC-YW244	OK
结直肠癌	COLCA2-rs3802842	HS-BVC-YW219	OK
胰腺癌	Intergenic-rs9543325	HS-BVC-YW233	OK
胰腺癌	NR5A2- rs3790844	HS-BVC-YW223	OK
痛风	SLC2A9-rs12498742	HS-BVC-YW225	OK