|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 样品编号 | 样品名称 | 样品类型 |
| 13640 | 张子涵 | 血液 |
| 13641 | 张子涵母 | 血液 |
| 13642 | 张子涵妹 | 血液 |
| 13769 | 张子涵父 | 血液 |
| 13906 | 张子涵父 | 精液细胞 |
| 13914 | 张子涵父 | 口腔黏膜 |
| 13915 | 张子涵母 | 口腔黏膜 |
| 13945 | 张子涵父 | 毛发 |
| 13946 | 张子涵母 | 毛发 |

1. 将患者血液DNA用正常人血液DNA进行梯度稀释1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128，再加上患者血液DNA和正常人血液DNA，共9个DNA作标曲

2、设计引物检测突变位点KRT6A：[NM\_005554.3](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/126273584) c.1385T>A.p.Ile462Asn

F：TTCCTCTTCCAGTGCGCCAA

R：AGCTGTTGAAGGAGKTCGTGT

aaataaccagccaggtttagtctcctctggaagaccggatgacaagtttcttctattcctttcctcttccagtgcgccaacctgcaggccgccattgctgatgctgagcagcgtggggagatggccctcaaggatgccaagaacaagctggaagggctggaggatgccctgcagaaggccaagcaggacctggcccggctgctgaaggagtaccaggagctgatgaatgtcaagctggccctggacgtggagatcgccacctaccgcaagctgctggagggtgaggagtgcaggtgggtaactgacacgaactccttcaacagctgagtccatcttcaaggttcctggcactgagcacaactttaaggtgcactgcccatggccataattgctcttcctg

3、合成融合引物如下：

F1：ACACGACGCTCTTCCGATCTTTCCTCTTCCAGTGCGCCAA

R1：TTCCTTGGCACCCGAGAATTCCAAGCTGTTGAAGGAGKTCGTGT

4、第一轮PCR

3min96°C; 15 cycles of 30 seconds 96°C; 30 seconds 60°C; 30 seconds 72°C. End with 5 min incubation at 72°C; pause at 10°C.

5、纯化后进行第二轮PCR（NNNNNN用于区分不同样品）

F2：AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

R2-x：CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATNNNNNNGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAAT

3min96°C; 10 cycles of 15 seconds 96°C; 30 seconds 60°C; 30 seconds 72°C. End with 5 min incubation at 72°C; pause at 10°C.

1. 将步骤5中PCR产物纯化后进行Illumina Hiseq测序，分析每个样品的总reads中，在待测位点分别为T和A的数目

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品 | Ref | Alt |  | Ref reads数 | Alt reads数 | Total | alt检测比例（X） | alt实际比例（Y） |
| 正常人血液DNA | T | A |  | 197672 | 292 | 199995 | 0.15% | 0.0000% |
| 1/128患者血液DNA | T | A |  | 194603 | 917 | 197485 | 0.46% | 0.3906% |
| 1/64患者血液DNA | T | A |  | 196612 | 1569 | 199991 | 0.78% | 0.7813% |
| 1/32患者血液DNA | T | A |  | 194615 | 3474 | 199991 | 1.74% | 1.5625% |
| 1/16患者血液DNA | T | A |  | 191660 | 6312 | 199989 | 3.16% | 3.1250% |
| 1/8患者血液DNA | T | A |  | 184529 | 13443 | 199985 | 6.72% | 6.2500% |
| 1/4患者血液DNA | T | A |  | 171172 | 26830 | 199994 | 13.42% | 12.5000% |
| 1/2患者血液DNA | T | A |  | 143448 | 54167 | 199980 | 27.09% | 25.0000% |
| 患者血液DNA | T | A |  | 99010 | 98434 | 199990 | 49.22% | 50.0000% |

作标曲如下：

1. 用同样的方法将患者妹妹、父母等样品进行测序，按Y=1.0007x-0.0036计算结果如下

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品 | Ref | Alt |  | ref | alt | total | alt检测比例（X） | Alt计算比例（Y） |
| 患者妹妹 | T | A |  | 99254 | 98266 | 199990 | 49.14% | 48.8099% |
| 患者父亲血液 | T | A |  | 197737 | 226 | 199986 | 0.11% | -0.2469% |
| 患者母亲血液 | T | A |  | 192109 | 5917 | 199992 | 2.96% | 2.6007% |
| 患者父亲口腔 | T | A |  | 141449 | 162 | 143068 | 0.11% | -0.2467% |
| 患者母亲口腔 | T | A |  | 197106 | 961 | 199988 | 0.48% | 0.1209% |
| 患者父亲毛发 | T | A |  | 13098 | 47 | 13265 | 0.35% | -0.0054% |
| 患者母亲毛发 | T | A |  | 181637 | 11293 | 195019 | 5.79% | 5.4348% |
| 患者父亲精液 | T | A |  | 171327 | 187 | 173214 | 0.11% | -0.2520% |