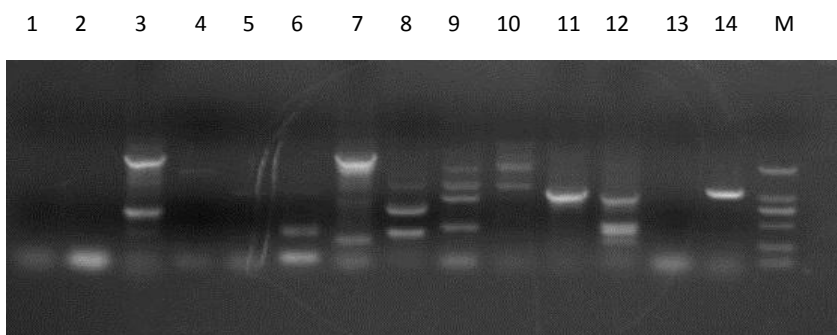


12 个外显子扩增实验进展报告

合同号: PG1-1601005

1. 根据所提供引物序列及文献相对应反应条件, 我们以其中一个模板 (1 号样品) 进行扩增预实验, 结果如下:



相应顺序对应的引物如下:

1: PIK3CA-9	2: PIK3CA-20	3: KRAS-2	4: KRAS-3
5: BRAF-11	6: BRAF-15	7: EGFR-19 α	8: EGFR-19 β
9: EGFR-21 α	10: EGFR-21 β	11: P53-EXOD5	12: P53-EXOD6
13: P53-EXOD7	14: P53-EXOD8		

2. 采用 Taq 酶重新进行扩增, 依然有非特异性条带扩出且无与预期目的片段大小相符的条带出现, 初步怀疑为文献的可信度不高, 重复性差导致的。
3. 根据数据库中英文文献重新进行筛选, 引物信息如下:

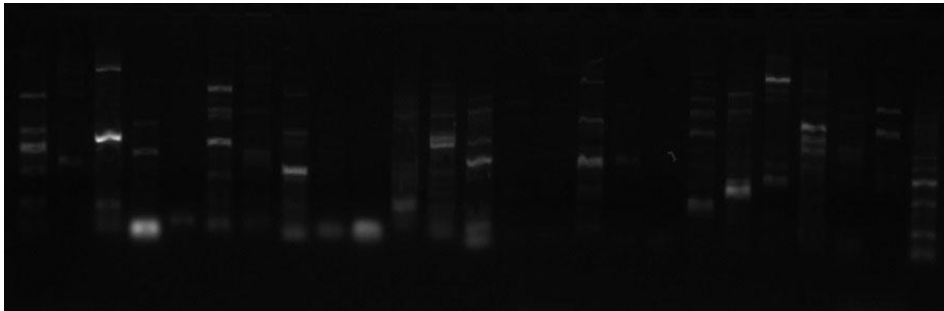
Primer	Sequence
PIK3CA-9-F	GCGAAAAATATGACAAAGAAAGC
PIK3CA-9-R	CTGAGATCAGCCAAATTCAGTT
PIK3CA-20-F	CTCAATGATGCTTGGCTCTG
PIK3CA-20-R	TGGAATCCAGAGTGAGCTTTC



KRAS-2-α-F	GGTGGAGTATTGATAGTGATTAACC
KRAS-2-α-R	AGAATGGTCCTGCACCAGTAA
KRAS-2-β-F	CTGAAAATGACTGAATATAAACTTGT
KRAS-2-β-R	ATATGCATATTAACAAGATTTACC
KRAS-3-F	CCAGACTGTGTTTCTCCCTTCTCAGG
KRAS-3-R	AGAAAGCCCTCCCCAGTCCTCA
BRAF-11-F	TTCTGTTTGGCTTGACTTGACTT
BRAF-11-R	ACTTGTCACAATGTCACCTT
BRAF-15-F	TACCTAAACTCTTCATAATGCTTGC
BRAF-15-R	GTAACCTCAGCAGCATCTCAGGG
EGFR-19-F	GATGAAATGATCCACACGGACTTTA
EGFR-19-R	GAACATTTAGGATGTGGAGATGAGC
EGFR-21-F	GCCTTTCCATTCTTTGGATCAGTAG
EGFR-21-R	GGAGAGACTGAAACCTAACATTTGC
P53-5-F	TCCTTCCTCTTCCTACAG
P53-5-R	ACCCTGGGCAACCAGCCCTGT
P53-6-F	ACAGGGCTGGTTGCCCAGGGT
P53-6-R	AGTTGCAAACCAGACCTCAGGCG
P53-7-F	TCCTAGGTTGGCTCTGACTGT
P53-7-R	AGTGGCCCTGACCTGGAGTCT
P53-8-F	GGGACAGGTAGGACCTGATTTCCTT
P53-8-R	ATCTGAAGGCATAACTGCACCCCTTGG

4. 以重新筛选的引物，分别以 6 号及 7 号样品进行扩增检测，结果如下：

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



注：相应顺序对应的引物如下,左边 1-12 为 6 号样品对应的 12 对引物检测结果，右边 13-24 为 7 号样品对应的 12 对引物

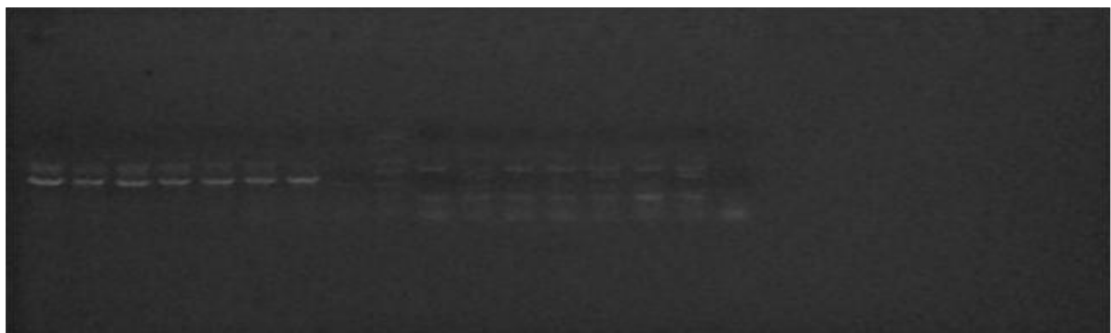
1: PICK3CA-9	2: PICK3CA-20	3: KRAS-2	4: KRAS-3
5: BRAF-11	6: BRAF-15	7: EGFR-19	8: EGFR-19
9: P53-EXOD5	10: P53-EXOD6	11: P53-EXOD7	12: P53-EXOD8

5. 重新筛选的引物扩增 6 号及 7 号样品，仍有非特异性条带扩出且无所预想的条带，为找出原因，我们将从文献中筛选出的引物进行软件检测，检测结果发现文献中所给出的引物位置基本上都是在所需扩增的外显子序列的两端，由于序列的 GC 含量较低，因此导致所筛选的引物上下游序列的 GC 含量相差较大，考虑到可能是这方面的原因，我们下一步的思路为：

分别查找 12 个外显子所对应的序列信息，在外显子附件较合适的，适宜于引物设计的位置进行引物的设计，采用设计引物扩增得到测序结果后，通过比对将所需要的 12 个外显子序列截取下来，进行突变分析。

6. 采用自己设计引物，我们先拿其中的两对引物，以全部的样品进行测试，PCR 扩增后检测结果如下：

1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 13 14



注：1-7：以 P53-EXON-5-6 引物，1-7 号样品进行扩增后检测结果，可以看到出现与预期

大小相同且较亮的条带

8-14: 以 P53-EXON-7-8 号引物, 1-7 号样品进行扩增后检测结果, 可以看到在 700bp 附近处有与预期大小相符的条带出现

7. 分别将与预期大小相符的目的条带进行切胶回收, 送测序, 等待测序结果的验证。

从实验的尝试结果来看, 我们首先逐步排除引物的问题, 连续进行两次相关文献的查收选择引物, 但都重复不出来文献上的结果, 为排除是否是因为引物的 GC 含量太低导致扩增效果不好的原因, 我们在 NCBI 上分别找到 PIK3CA、KRAS、EGFR 及 P53 基因序列并对应查找到相应的外显子位置及其序列信息, 在特定外显子附近端比较适合设计引物的位置, 重新进行引物的设计, 并在 Primer-blast 上进行引物的比对, 确保引物的特异性, 从检测结果来看, 虽然有目的条带出现, 证实引物没有问题, 但是从检测结果中我们仍然发现有杂带的干扰。在排除了引物的问题之后, 我们怀疑是样品不纯, 有干扰, 导致连续换了 3 次引物都出现非特异性条带的结果。