

时间安排

- 1、讲解SNP基因分型实验步骤（10分钟）；
- 2、讲解western blotting配制聚丙烯酰胺凝胶步骤（20分钟）；
- 3、配制聚丙烯酰胺凝胶之分离胶（15分钟）；
- 4、讲解DNA甲基化实验步骤（25分钟）；
- 5、DNA亚硫酸盐转化实验操作（35分钟）；
- 6、配制聚丙烯酰胺凝胶之浓缩胶（15分钟）；
- 7、讲解western blotting电泳、转膜、封闭、孵育一抗及二抗等实验步骤；（15分钟）
- 8、western blotting结果扫描及分析（25分钟）。

SNP (单核苷酸多态性) 基因分型



SNP基因分型技术

TaqMan探针

SNP基因分型步骤

SNP分型技术

1

基于电泳的检测方法

PCR-RFLP
PCR-SSCP
AS-PCR

2

基于荧光定量PCR
的检测方法

TaqMan探针法
HRM

3

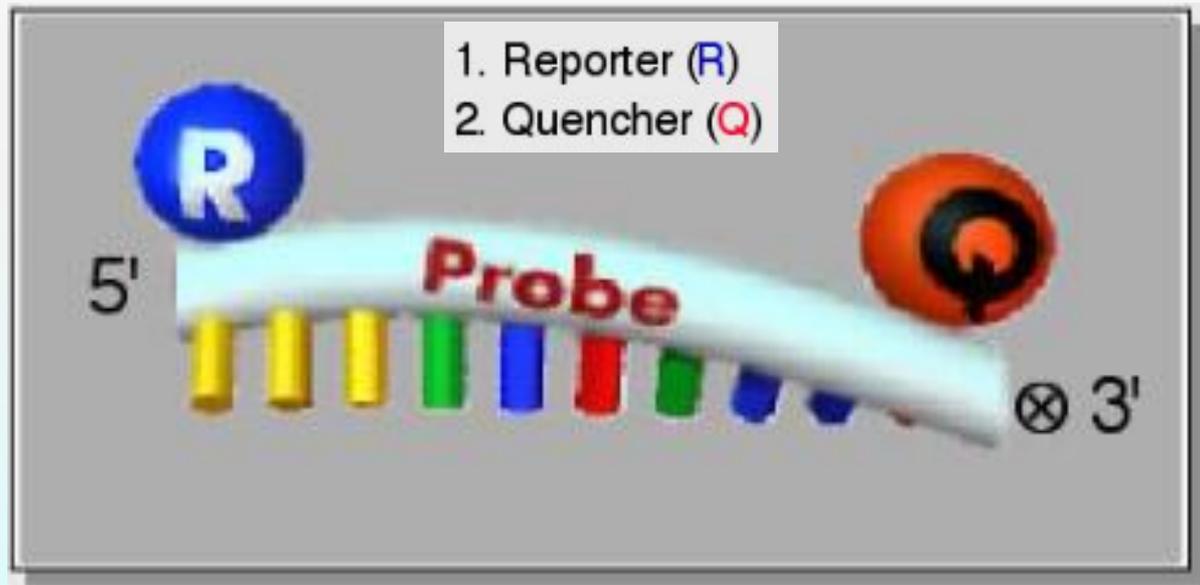
直接测序法

4

其他检测方法

质谱分析
SNaPshot
LDR

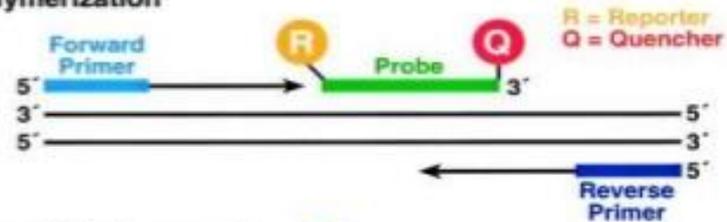
TaqMan 荧光探针是一种寡核苷酸探针，荧光基团连接在探针的5' 末端，而淬灭剂则在3' 末端。针对染色体上的不同SNP位点分别设计PCR引物和TaqMan探针，通常用于少量SNP位点分析。



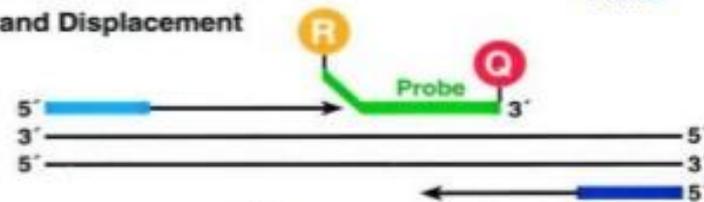
PCR扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针，探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；PCR扩增时，Taq酶的5'-3'外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条DNA链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与PCR产物形成完全同步。

TaqMan probe :-

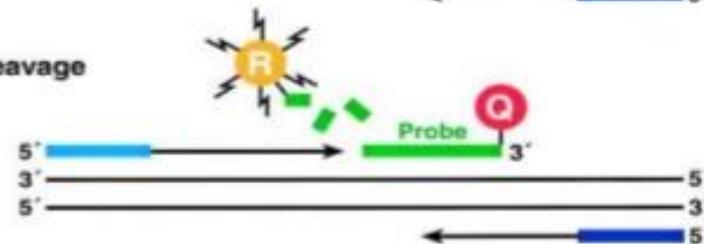
Polymerization



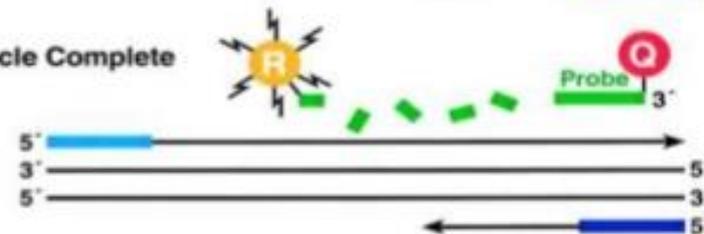
Strand Displacement



Cleavage



Cycle Complete



常用的荧光基团是FAM, TET, VIC, HEX。而新型TaqMan-MGB探针使该技术既可进行基因定量分析, 又可分析基因突变 (SNP), 有望成为基因诊断和个体化用药分析的首选技术平台。

- TaqMan探针检测的是积累荧光。当探针完整的时候, 由于3'端的荧光淬灭基团在吸收5'端报告基团所发射的荧光能量, 本身会发射波长不同的荧光而导致本底高;
- MGB探针的淬灭基团采用非荧光淬灭基团, 本身不产生荧光, 可以大大降低本底信号的强度。同时探针上还连接有MGB修饰基团, 可以将探针的 T_m 提高 10°C 左右。因此为了获得同样的 T_m 值, MGB探针可以比普通TaqMan探针设计得更短, 既降低了合成成本, 也使得探针设计的成功率大为提高——因为在模板的DNA碱基组成不理想的情况下, 短的探针比长的更容易设计。实验证明, TaqMan MGB探针对于富含A/T的模板可以区分得更为理想。

SNP基因分型

SNP位点
的确定

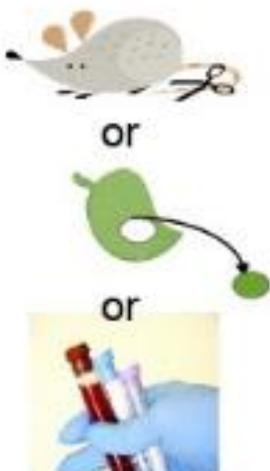
探针订
购

组织
RNA的
提取

QPCR

结果分析



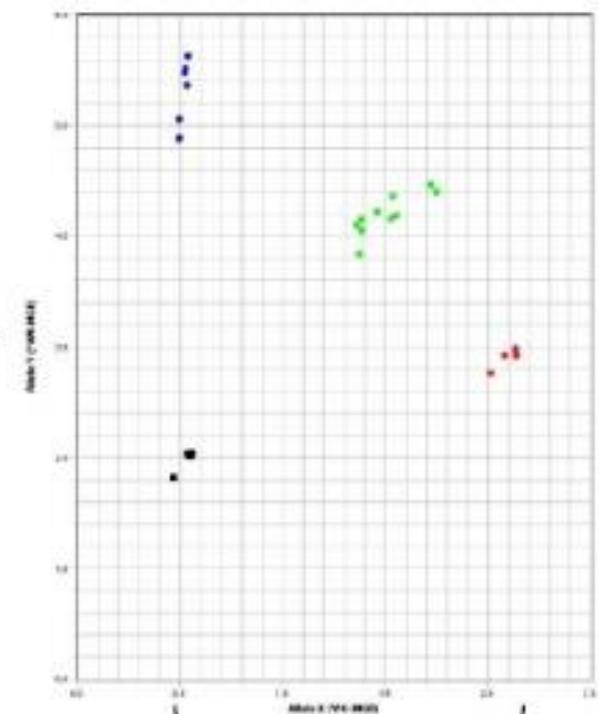


or

or



or



Sample Prep:
5 minutes;
Multiple sample types

PCR
About 60 minutes

Analysis
(Actual genotyping data
from crude lysate from
whole blood)

SNP位点的确定

dbSNP Home Page - Microsoft Internet Explorer

文件(F) 编辑(E) 查看(V) 收藏(A) 工具(T) 帮助(H)

地址: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/

NCBI Single Nucleotide Polymorphism

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PopSet Taxonomy OMIM Books SNP

Search SNP for Go

dbSNP Search Options

Entrez SNP	ID Numbers	Submission Info	Batch	Locus Info	Between Markers
------------	------------	-----------------	-------	------------	-----------------

ANNOUNCEMENT

- 10/26/2005: Accessioned Haplotype Content Now Available in dbSNP
- 10/20/2005: Schema Changes
- 10/31/2005: 1 or 0 Based Mapping Position

Search by IDs

Note: rs# and ss# must be prefixed with "rs" or "ss", respectively (i.e. rs25, ss25)

Reference cluster ID(rs#)

Search Reset

Submission Information

- By Submitter
- New Batches
- Method
- Population
- Detail (Description, Handle, and ID)
Class (Based on geographic location)

BUILD 125

GENERAL

- Contact Us
- dbSNP Home page
- SNP Science Primer
- Announcements
- dbSNP Summary
- FTP Download
- Server
- Getting Started
- Build History
- Handle Request

DOCUMENTATION

- Build Release Note
- FAQ
- General
- Search Archive
- dbSNP Handbook
- Overview
- How to Submit
- RefSNP Summary Info
- Schema
- Database

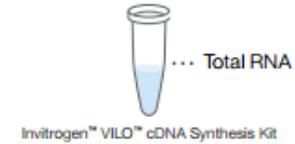
基因组多态性
数据库(SNPs)

Prepare the cDNA sample

Prepare the total RNA

Perform reverse transcription

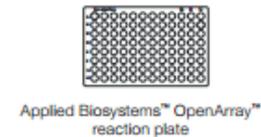
Evaluate the cDNA



Prepare the reaction mix and load the plate

Prepare the PCR reaction mix

Load the plate



Run the real-time PCR reaction

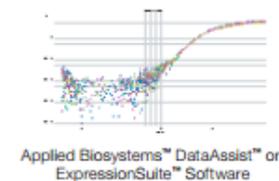
Create the plate document/experiment

Run the plate



Analyze the results

Refer to the user guide for your
real-time PCR instrument



QPCR

试剂：TaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG

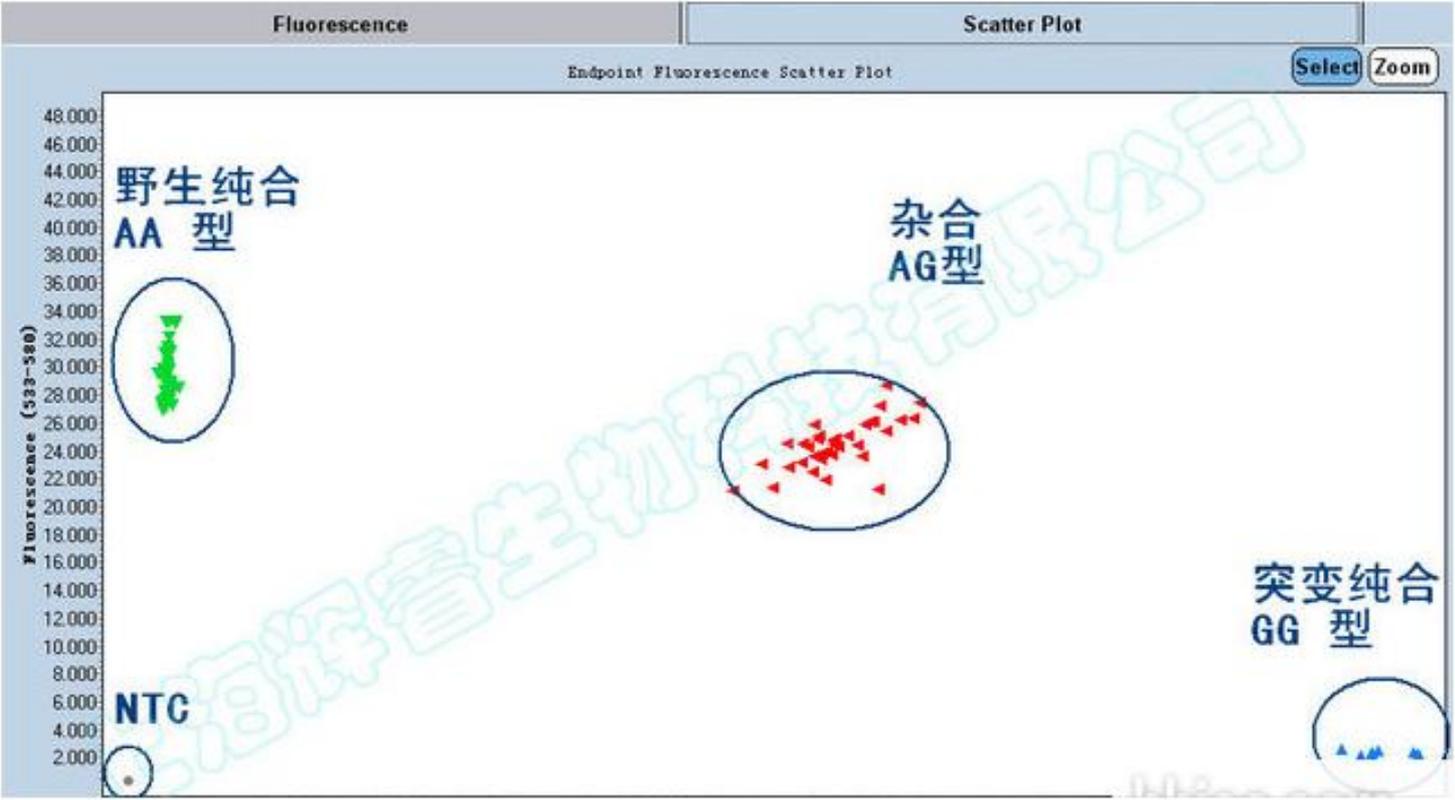


程序

Step	UDG incubation	Enzyme activation	PCR	
	HOLD	HOLD	Cycle (40 cycles)	
			Denature	Anneal/extend
Temp. (°C)	50	95	95	60
Time (mm:ss)	2:00	10:00	0:15	1:00
Volume (μL)	20 or 50 [‡]			

‡ Select appropriate volume for reaction plate.

结果分析



Thank you!

