

基于酶切方法的 SNP 基因分型

王磊, 符德保, 欧阳亦聃*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: diana1983941@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 王磊, 符德保, 欧阳亦聃. (2018). 基于酶切方法的 SNP 基因分型. *Bio-101* e1010109. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010109.

实验原理: SNP 差异是在实验过程中经常遇到的基因型多态性类型, 传统方法可以通过 dCAPS 或者测序的方法进行鉴定, 但不是每一个 SNP 位点都能设计出 dCAPS 引物, 而测序成本太高, 难以进行规模化鉴定。来自芹菜的核酸酶 CEL I 可以特异识别 DNA 中的错配碱基而切割 DNA, 基于此, 可以通过设计跨 SNP 位置的引物经 PCR 扩增后通过 CEL I 酶切跑胶检测来确定基因型。杂合基因型 AB 的 PCR 产物, 会形成有碱基错配的异源双链 DNA, 可被 CEL I 识别并切割, 跑胶会出现两条带。野生基因型 AA 和突变基因型 BB 在进行 PCR 扩增时加入一个已知亲本(A)的 DNA 到所有 DNA 中, 然后 PCR 扩增, 创造人工杂合基因型, 如果此时可以被 CEL I 切割, 则表明这份检测样品的基因型为 BB, 如果依然不能被 CEL I 切割, 则表明此份 DNA 为 AA 基因型, 因此通过两轮 PCR(不加亲本 A 和加亲本 A 的 DNA)结合 CEL I 酶切, 可以准确的鉴定 3 种基因型。

实验目的: SNP 基因分型

关键词: SNP, 基因分型, 异源双链

材料与试剂

1. HEPES
2. KCl
3. MgSO₄
4. Triton X-100
5. BSA

6. 核酸酶 CEL I (来自芹菜) 或者 SURVEYOR[®] Nuclease Kits (Transgenomic, catalog number: 706020)

注: 如果使用 CEL I 则需要自己制备酶的粗提物 (Till 等, 2006)。

7. CEL I 酶粗提物缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. PCR 仪
2. 电泳仪

实验步骤

1. 设计 PCR 引物, 使得扩增产物跨越待检测的 SNP 位点, 按常规体系和方法进行 PCR 反应。在普通扩增 PCR 程序后面加上一步变性-退火步骤以便 SNP 位点异源双链 DNA 的形成: 99 °C, 10 min; 70 °C, 20 s (70 次循环, 每次降温 0.3 °C); 降到 15 °C 保存。
2. 为了鉴定基因型, 每个样品需要进行两次 PCR, 一次正常操作 (不加已知亲本), 另一次混入等量的一个已知亲本的 DNA 再进行 PCR。

3. CEL I 酶切检测 PCR 产物

PCR 产物	9 µl
CEL I	0.3 µl
Buffer	1.5 µl
ddH ₂ O	4.2 µl

45 °C 反应 15 min, 加入 3 µl, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 终止反应

4. 常规琼脂糖电泳检测酶切产物, 按照实验原理所述进行基因型判断。

溶液配方

1. CEL I 酶粗提物 10x 缓冲液

0.1 M HEPES pH 7.5

0.1 M KCl

0.1 M MgSO₄

0.02% Triton X-100

0.002 mg/ml BSA

致谢

感谢中国科学院植物研究所刘春明研究员对本方法体系建立所提供的帮助。

参考文献

1. Till, B. J., Zerr, T., Comai, L. and Henikoff, S. (2006). [A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals](#). *Nat Protoc* 1(5): 2465-2477.