

实验六、 限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

一、实验目的

学习和掌握限制性片段长度多态性 (RFLP) 遗传标记的基本原理和检测方法。

二、实验原理

第一代分子遗传标记 RFLP 是根据不同品种 (个体) 基因组的限制性内切酶的酶切位点碱基发生突变, 或酶切位点之间发生了碱基的插入、缺失、重排等, **导致酶切片段大小发生了变化**, 这种变化可以通过 PCR, 酶切及琼脂糖凝胶电泳进行检测, 从而可比较不同品种 (个体) 的 DNA 水平的差异 (即多态性), RFLP 已被广泛用于基因组遗传图谱构建、基因定位以及生物进化和分类、遗传多样性等研究。

三、仪器、材料与试剂

(一) 仪器: 电热恒温水浴锅, 琼脂糖凝胶电泳及检测系统

(二) 材料与试剂: *Hind* III 限制性内切酶, 10×M Buffer, 待分析的 PCR 产物, DL2000 DNA Marker, 6×Loading Buffer (上样缓冲液), 灭菌双蒸水, 1.5%琼脂糖凝胶 (**注意: 含溴化乙锭 EB, 致癌, 请带手套操作**), 0.5%TBE (电泳缓冲液)。

四、实验步骤

1、*Hind* III 限制性内切酶酶切

反应体积 (10μl), 在 0.2ml Eppendorf 管中依次加样:

10xM buffer	1 μL
ddH ₂ O	5.5 μL
<i>Hind</i> III	0.5 μL
PCR 产物	3 μL

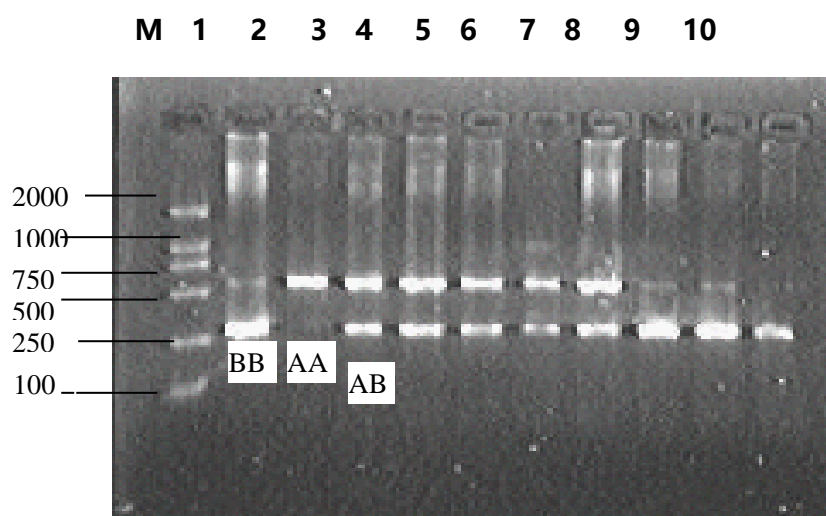
37°C水浴消化 2h，消化产物全部用于琼脂糖检测。

2、琼脂糖凝胶电泳

配置 1.5%琼脂糖凝胶，取 10μl 酶切产物+1μl 上样缓冲液,180V 恒压电泳。DNA 带负电荷，电泳时 DNA 从负极向正极泳动。待泳动至凝胶的 1/2~2/3 位置时，停止电泳，紫外检测仪下观察。

五、作业

写出本实验的具体操作过程并描述你所观察到的结果。(画图)



Hind III内切酶识别位点: A↓AGCTT

TTCGA↑A