

# 实验八 聚合酶链式反应-限制酶 片段长度多态 (PCR-RFLP)



# 一、目的要求

- 1、掌握PCR-RFLP技术的原理。
- 2、熟悉PCR-RFLP技术步骤。
- 3、了解PCR-RFLP应用及意义。

## 二、试剂

- 1、人DNA、PRMT6上下游引物、  
Taq DNA聚合酶Mix反应体系(Taq酶、dNTP、 $Mg^{2+}$ 、buffer)、ddH<sub>2</sub>O、限制性内切酶Taq<sup>a</sup> I、  
酶切反应缓冲液、琼脂糖、1×TBE、6×DNA上样缓冲液、DNA Marker。
- 2、微量加样器、PCR自动热循环仪。

# 三、实验原理

## 1、PCR-RLFP

### 2、选用人的蛋白质精氨酸甲基转移酶-6

(PRMT6) 作为PCR扩增的对象，以扩增产物中rs12097821 SNP位点[G/T]，通过限制酶TaqI 切割位点的有无来区别野生型与突变型样本。

本实验的引物序列：

上游引物

F5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACACAATATTT  
ATGCTAATTGTCTTATTTTTACAAATGTAAATC 3'

下游引物

R5' ATGTGTCTGGTGCTTGAGGT 3';

PCR产物的长度为373bp;

酶Taqal 酶切位点：TCGA,

GG：酶切为307bp和66bp；

TT：不切，大小为373bp；

GT：酶切为373bp、307bp和66bp。



人PRMT6 rs12097821 SNP位点 PCR-RFLP

# 四、实验步骤

## 1、PCR反应

50ul反应体系成分如下：

- |                             |      |
|-----------------------------|------|
| 1) 模板DNA (100 ng/ml)        | 2ul  |
| 2) Taq DNA聚合酶mix            | 25ul |
| 3) PRMT6上下游引物               | 各2ul |
| 4) ddH <sub>2</sub> O 加至终体积 | 19ul |

## PCR反应循环参数：

98°C 1min30s;

98°C 5s  
54°C 5s  
72°C 5s

} 共34个循环;

72°C 10s。

反应结束后，置4°C保存。

# 五、琼脂糖凝胶电泳

- (1) 称取2.5克琼脂糖，置于锥形瓶内，加入100 ml 1×TAE，瓶口用保鲜膜封盖，在微波炉中加热直至琼脂糖全部溶解，得到2.5%琼脂糖凝胶液，待其冷却至60℃左右，加入goldview。小心混匀并倒在有机玻璃内槽中，控制灌胶速度，使胶液缓慢展开，避免产生气泡，直到在整个有机玻璃板表面形成均匀的胶层。
- (2) 室温下静置30min左右，待胶凝固完全后，轻轻拔出梳子，在胶板上即形成相互隔开的样品槽。

- (3) 将凝胶放入电泳槽中，加入恰好没过胶面1 mm 深的足够电泳缓冲液，预电泳10 min。
- (4) 每份限制酶切产物取10  $\mu$ l，加2  $\mu$ l 6 $\times$ 上样缓冲液，混匀后加入到样品孔中，以100 V 电泳50分钟。
- (5) 断电后取出凝胶，放在紫外透射仪中观察并记录PCR结果。

## 六、PCR产物的限制性酶切

20  $\mu$ l酶切反应体系成分如下：

- |                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| 1) 10 $\times$ 酶切反应缓冲液             | 3 $\mu$ l  |
| 2) PCR扩增产物                         | 25 $\mu$ l |
| 3) Taq <sup>a</sup> I内切酶 (10 U/ml) | 1 $\mu$ l  |
| 4) ddH <sub>2</sub> O 加至终体积        | 1 $\mu$ l  |

置65 $^{\circ}$ C水浴中消化2h。

# 七、琼脂糖凝胶电泳

# 八、凝胶成像系统观察

## 结果判断

观察并记录琼脂糖凝胶上的DNA带

纯合子GG：酶切为307bp和66bp；

纯合子TT：不切，大小为373bp；

杂合子GT：酶切为373bp、307bp和66bp



人PRMT6 rs12097821 SNP位点 PCR-RFLP

## 应用

DNA碱基突变、SNP多态的检测，遗传病的分子诊断，连锁分析等。

## 注意事项

- 1、根据碱基突变位点的分析，选择适当的限制性内切酶进行切割。
- 2、根据目的片段酶切后分子的大小来选择适当浓度的琼脂糖，以达到最佳分离效果。

## 布置作业

判断基因型、书写实验报告

## 引物

F5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACACAATATTTATGCTAATTGTCTTATTTTAC  
AAATGTAAATC 3'

R5' ATGTGTCTGGTGCTTGAGGT 3'

酶Taq<sup>a</sup>I 酶切位点: TCGA

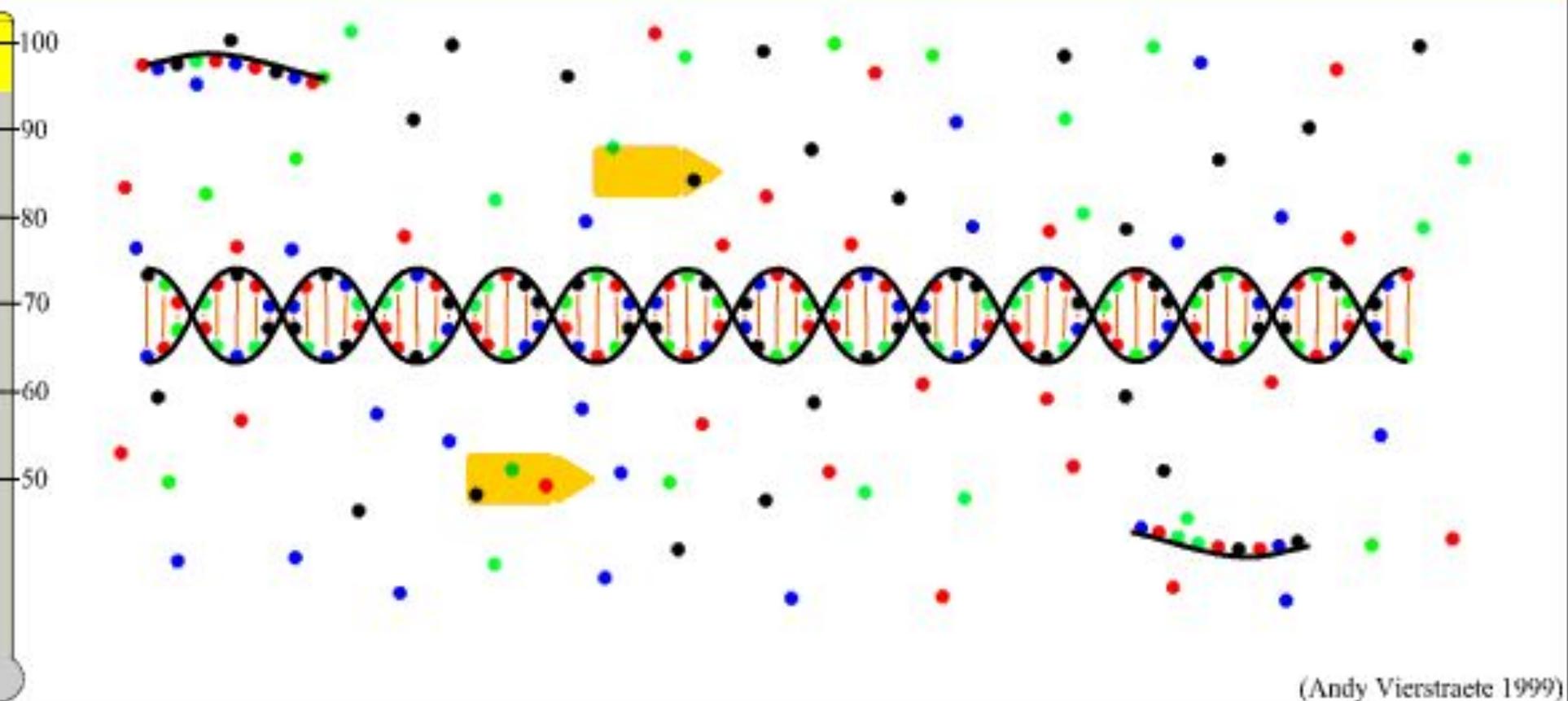
扩增片段 373bp GG: 酶切为307bp和66bp TT: 不切, 大小为373bp

GT: 酶切为373bp、307bp和66b

AACCATCTTATGGGTAATTTACTAACATCATCCCTATTTTATAGGTGATTCAACAAATCCACAG  
AAATGTGCAATAACTTGTTC AAGGTTACATTACATAGCTCATAAGTGGAAAACTGGGATTCA  
AACTCAGGCAGTTGTATACTTATGCACTGAGCTATAATAAGAGTGAGATGGCCAGAACTCACC  
ATTATGTGAAATTGACAGGTCATTGAACAATATTTATGCTAATTGTCTTATTTTACAAATGTA  
AA■CG/TACAATGAAAGAGTGAGTAGAACAAAATCAAGAGTGAAGAAAGGAAATGAGGCA  
ATCTAAAACCTCTCTGGCACATCCCCAACTAATTACAGAAAACATTAAATTGTGTTTGGGAAGAT  
GCAACATTCTGAAAGTTC ACTAAAGCACTTGGCTCTCTCTGAAATGCCCTTCAGCTGGTAAG  
AGAAGATCATTTCATATCCCCTCTACTGATCCGCTTGATTGCATGTCAGCTCTATTAGGCAGTT  
GCTTCTCACTAATCCAAGCTGACTTTTTATTAGCCACTTAGACCTCAAGCACCCAGACACAT  
AATTTTAAGGTTTAAAAGCTGCCCTCAGTTAGATCTAAACAGAACTTAGATCTTAGCTATGAC  
CGAAATACATCATTAGAATTTGAAGTTTAACTTAACAGAGTGCACTATTGTTTCAGATTCTTTG  
CTTTTTACTAGTGGCTTTTAAATTATGTAAGGAGAAAACCTATGGAGAATGAAACAAATCAAGTG

PCR :

Denaturation 94°C



(Andy Vierstraete 1999)

# EcoRI等产生的5'粘性

末端



EcoRI 37

°C

