

# RFLP 片段的定性与定量分析

## MultiNA-001

**摘要：**本文利用 MultiNA 微芯片电泳对 RFLP 片段进行了多次定性与定量分析，并计算了重现性。样品主要片段尺寸约为 304 bp，浓度约为 6.2 ng/ $\mu$ L，另外，就准确度而言：尺寸方面， $\pm 3$  bp；浓度方面， $\pm 30\%$ 。就重现性：尺寸方面，0.65%；浓度方面，14.81%。实验证明：MultiNA 微芯片电泳完全可以对微量 RFLP 片段进行定性与定量分析，可广泛应用于基因突变研究。

**关键词：**MultiNA 微芯片电泳 RFLP 片段 基因突变

RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制性内切酶片段长度多态性) 片段是发展最早的 DNA 标记技术。RFLP 是指基因型之间限制性片段长度的差异，这种差异是由限制性酶切位点上碱基的插入、缺失、重排或点突变所引起的。RFLP 技术主要包括以下基本步骤：DNA 提取 $\rightarrow$ 用限制性内切酶酶切 DNA $\rightarrow$ 用凝胶电泳分开 DNA 片段 $\rightarrow$ 把 DNA 片段转移到滤膜上 $\rightarrow$ 利用放射性标记的探针杂交显示特定的 DNA 片段(Southern 杂交) 和结果分析。RFLP 遍布于低拷贝编码序列，并且非常稳定，但 RFLP 实验操作繁琐，检测周期长，成本高昂，不适于大规模的分子育种，在植物分子标记辅助育种中需要将 RFLP 转换成以 PCR 为基础的标记。RFLP 作为第一代分子生物学标记自问世以来已广泛应用于多门生物学科研究中，但它运用于植物抗性研究还只是近几年的事。RFLP 能对植物的抗性基因进行定位

和分离，利用 RFLP 技术，对于核基因组或叶绿体基因组、尤其是后者，若能提取纯净 DNA，则可直接从酶切后的电泳图谱看出其多态性，利用这一方法可以测定种群内、种群间不同水平的物种在污染环境下抗性分化进化水平上的差异。

与核酸序列分析相比，RFLP 可省去序列分析中许多非常繁琐工序，但相对 RAPD 而言，RFLP 方法更费时、费力，需要进行 DNA 多种酶切、转膜以及探针的制备等多个步骤，仅对基因组单拷贝序列进行鉴定。但 RFLP 又有比 RAPD 优越之处，它可以用来测定多态性是由父本还是母本产生的，也可用来测定由多态性产生的突变类型究竟是由碱基突变或倒位、还是由缺失、插入造成的。

本文利用 MultiNA 微芯片电泳对 RFLP 片段进行了多次定性与定量分析，并计算了重现性。

## 实验部分

### 1.1 仪器

岛津 MultiNA microchip electrophoresis instrument; Eppendorf tube; 1 $\times$ TE Buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)。

### 1.2 分析条件

样品：Alu 序列的某一 RFLP 片段

检测模式：DNA-500 模式

空白对照：1 $\times$ TE Buffer

试剂盒：DNA-500 reagent kit(Shimadzu Inc)

DNA 染料：SYBR Gold Nucleic Acid Stain(Invitrogen)

DNA ladder：25 bp DNA ladder(Invitrogen)

MultiNA microchip：4 块 (Shimadzu Inc)。

## 结果讨论

### 2.1 样品凝胶成像

此 RFLP 片段尺寸约为 304 bp，浓度约为 6.2 ng/μL。

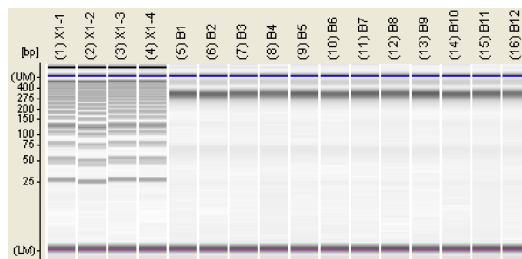


图1 样品凝胶成像

(X1-1, 2, 3, 4均为25 bp DNA ladder; B1-12分别为同一样品连续上样12次)

### 2.2 样品色谱图

从图 2 和图 3 可见 DNA 片段的迁移指数，迁移指数越小，片段尺寸越小，越趋向于 lower marker(LM)；反之，迁移指数越大，片段尺寸越大，越趋向于 upper marker(UM)。

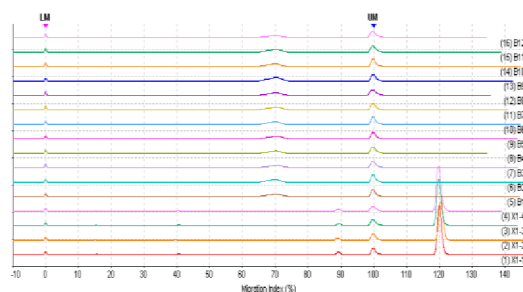


图2 样品Single模式色谱图

(X1 1, 2, 3, 4均为25 bp DNA ladder; B1-12分别为同一样品连续上样12次)

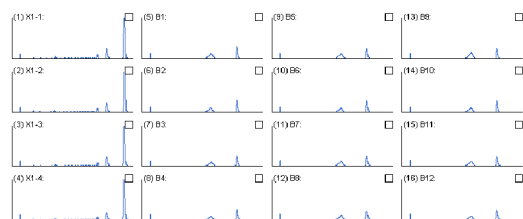


图3 样品Multi模式色谱图

(X1-1, 2, 3, 4均为25 bp DNA ladder; B1-12分别为同一样品连续上样12次)

### 2.3 样品片段尺寸与对应浓度

表1 样品片段尺寸与对应浓度  
(B1-12分别为同一样品连续上样12次)

样品号	尺寸(bp)	浓度(ng/μL)
B1	304	6.75
B2	307	5.8
B3	304	5.73
B4	303	5.17
B5	304	7.21
B6	307	5.51
B7	302	7.09
B8	304	5.74
B9	303	8.09
B10	307	5.94
B11	301	6.58
B12	303	5.05

因为 12 个样品主要片段尺寸约为 304 bp，浓度约为 6.2 ng/μL；

准确度：尺寸方面，±3 bp(最大 307 bp，最小 301 bp)；浓度方面，±30%(最大 8.09 ng/μL，最小 5.05 ng/μL)

重现性：尺寸方面，0.65%(STDEV(B1:B12)/AVERAGE(B1:B12)\*100%)；浓度方面，14.81%(STDEV(B1:B12)/AVERAGE(B1:B12)\*100%)。

## ■ 结论

MultiNA 单次可析 108 个样品，在四芯片平行运作的情况下，分析 12 个样品只需要 5~6 分钟，平均每个样品耗时 75 秒，就准确度而言：尺寸方面，±3 bp；浓度方面，±30%。就重现性：尺寸方面，0.65%；浓度方面，14.81%。结果证明：MultiNA 微芯片电泳完全可以对微量 RFLP 片段进行定性与定量分析，可广泛应用于高通量的基因突变研究。