



实验五

限制性酶切与连接

郝军莉
2015-5-18

- 
- 实验目的
 - 实验原理
 - 实验仪器、材料与试剂
 - 实验步骤
 - 实验结果及讨论

实验目的

- 掌握**DNA**酶切和连接的基本原理
- 学习和了解限制性内切酶和**DNA**连接酶的功能和使用方法

DNA的限制性酶切实实验原理

- 核酸限制性内切酶是一类能识别双链DNA中特定碱基顺序的**核酸水解酶**，这些酶都是从原核生物中发现，功能犹似高等动物免疫系统，用于抗击外来DNA侵袭。
- 限制性内切酶以**内切方式**水解核酸链中的磷酸二酯键，产生的DNA片段5'端为P，3'端为OH。

限制性内切酶的类型

- 根据限制酶的识别切割特性， 催化条件及是否具有修饰酶活性可分为 I、II、III型三大类。

第一类（I型）限制性内切酶能识别专一核苷酸顺序，在识别位点很远的地方任意切割DNA链，切割核苷酸顺序没有专一性，随机。这类限制性内切酶在DNA重组技术或基因工程中用处不大，无法用于分析DNA结构或克隆基因。这类酶如EcoB、EcoK等。

限制性内切酶的类型

第三类（III型）限制性内切酶也有专一的识别顺序，在识别顺序旁边几个核苷酸对的固定位置上切割双链。但这几个核苷酸对也不是特异性的。因此，这种限制性内切酶切割后产生的一定长度DNA片段，具有各种单链末端。因此也不能应用于基因克隆。

限制性内切酶的类型

- 第二类（II型）限制性内切酶就是通常指的DNA限制性内切酶。
 - 它们能识别双链DNA的特定顺序，并在这个顺序内进行切割，产生特定的DNA片段；
 - II型酶分子量较小，仅需 Mg^{2+} 作为催化反应的辅助因子，识别顺序一般为4～6个碱基对的回文结构；
 - II型内切酶切割双链DNA产生3种不同的切口——5'端突出、3'端突出和平末端。
 - 限制性的内切酶的发现和应用，才使得人们能在体外有目的地对遗传物质DNA进行改造，从而极大地推动了分子生物学的兴旺和发展。

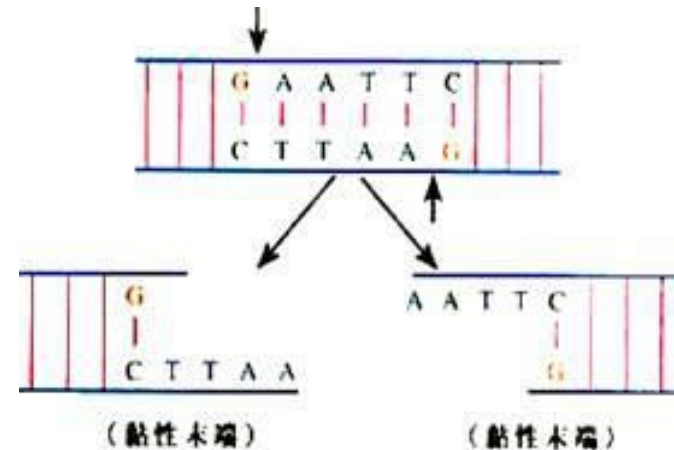
限制性内切酶	酶分子	识别位点	切割位点	限制作用是否需用ATP
I 类	三 亚 基 双 功能酶	二分非对称	至少在识别 位 点 外 1000bp	Yes
II 类	内切酶与甲 基化酶分子 不在一起	4-6bp, 大多 数为回文对 称结构	在识别位点 中或靠近识 别位点有特 异性	No
III类	二亚基双功 能酶	5-7 bp 非对 称	在识别位点 下 游 24- 26bp	Yes

粘性末端： 是交错切割，结果形成两条单链末端，这种末端的核苷酸顺序是互补的，可形成氢键，所以称为粘性末端。

如*Eco*RI的识别顺序为：

5'..... G | AATTC3'

3'..... CTTAA | G 5'



在双链上交错切割的位置切割后生成

5'.....G AATTC.....3'

3'.....CTTAA G.....5'

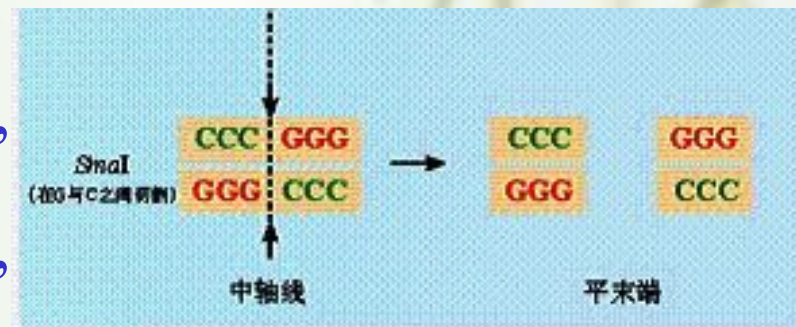
各有一个单链末端，二条单链是互补的，其断裂的磷酸二酯键以及氢键可通过DNA连接酶的作用而“粘合”。

平头末端:

II型酶切割方式的另一种是在同一位置上切割双链，产生平头末端。例如*EcoRV* 的识别位置是：

5'..... GAT | ATC 3'

3'..... CTA | TAG 5'



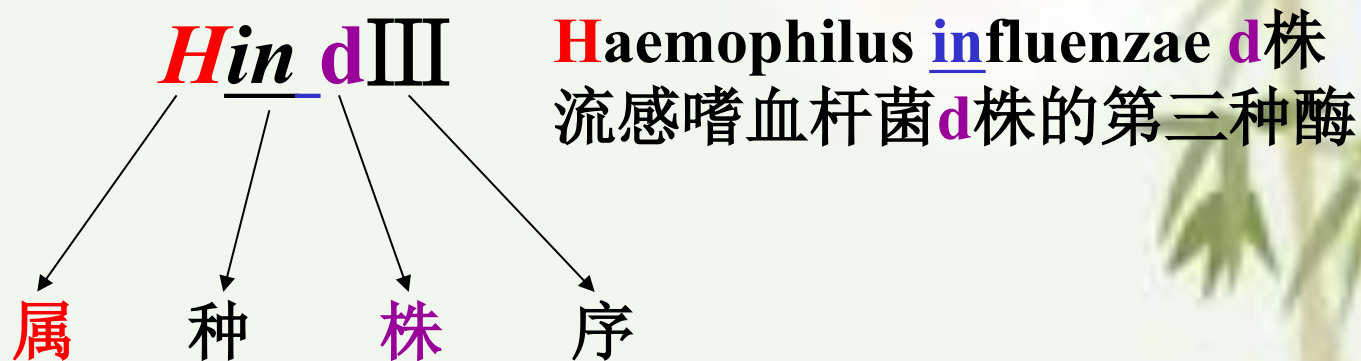
切割后形成

5'..... GAT ATC 3'

3'..... CTA TAG 5'

这种末端同样可以通过DNA连接酶连接起来。

限制性核酸内切酶的命名法



第一个字母取自产生该酶的细菌属名，用大写；
第二、第三个字母是该细菌的种名，用小写；
第四个字母代表株；
用罗马数字表示发现的先后次序。

星活性

所谓星活性又称**Star**活性。是指由于反应条件不同而产生的切断与原来认识序列**不同的位点**的现象，也就是说产生**Star**活性后，不但可以切断特异性的识别位点，还可以切断非特异性的位点。

低离子强度，pH值高，和高（> 5%体积/体积）甘油的浓度，有机溶剂的存在

双酶切buffer的选择 ■ Takara

Enzyme	<i>Acc</i> I	<i>Bam</i> H I	<i>Bgl</i> II	<i>Cla</i> I	<i>Eco</i> R I	<i>Eco</i> R V	<i>Hinc</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Kpn</i> I	<i>Nco</i> I	<i>Nde</i> I
<i>Acc</i> I	1×M	0.5×K	1×T	1×M	1×M	0.5×K	1×M	1×M	1×M	1×M+BSA	1×T
<i>Bam</i> H I	0.5×K	1×K	1×K	1×K	1×K	1×K	0.5×K	1×K	0.5×K	1×K+BSA	1×K
<i>Bgl</i> II	1×T	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	2×K	1×K	1×T	1×K+BSA	1×H
<i>Cla</i> I	1×M	1×K	1×H	1×M	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K+BSA	1×H
<i>Eco</i> R I	1×M	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K+BSA	1×H
<i>Eco</i> R V	0.5×K	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	2×T	1×K	0.5×K	1×K+BSA	1×H
<i>Hinc</i> II	1×M	0.5×K	2×K	1×M	1×M	2×T	1×M	1×M	1×M	1×M+BSA	1×T
<i>Hind</i> III	1×M	1×K	1×K	1×M	1×M	1×K	1×M	1×M	1×M	1×K+BSA	1×K
<i>Kpn</i> I	1×M	0.5×K	1×T	1×M	1×M	0.5×K	1×M	1×M	1×L	0.5×K+BSA	1×T
<i>Nco</i> I	1×M+BSA	1×K+BSA	1×K+BSA	1×K+BSA	1×K+BSA	1×K+BSA	1×M+BSA	1×K+BSA	0.5×K+BSA	1×K+BSA	1×K+BSA
<i>Nde</i> I	1×T	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	1×T	1×K	1×T	1×K+BSA	1×H
<i>Not</i> I	0.5×K+BSA	0.5×K+BSA	1×H+BSA	1×H+BSA	1×H+BSA	1×H+BSA	0.5×K+BSA	0.5×K+BSA	0.5×K+BSA	0.5×K+BSA	1×H+BSA
<i>Pst</i> I	1×M	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K+BSA	1×H
<i>Pvu</i> I	0.5×K	1×K	1×K	1×K	1×K	1×K	0.5×K	1×K	0.5×K	1×K+BSA	1×K
<i>Sac</i> I	1×M	0.5×K	0.5×K	1×M	1×M	0.5×K	1×M	1×M	1×L	0.5×K+BSA	1×T
<i>Sal</i> I	1.5×T	1.5×T	1×H	1×H	1×H	1×H	1.5×K	1.5×K	1.5×T+BSA	1.5×T+BSA	1×H
<i>Sma</i> I	1×T+BSA	0.5×T+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA	0.5×K+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA
<i>Spe</i> I	1×M	1×K	1×H	1×M	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K+BSA	1×H
<i>Sph</i> I	0.5×K	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	2×T	1×K	0.5×K	1×K+BSA	1×H
<i>Xba</i> I	1×M	0.5×K	2×T	1×M	1×M	2×T	1×M	1×M	1×M	1×M+BSA	1×T
<i>Xho</i> I	1×M	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K	1×H

注意事项——限制性内切酶酶切

1. 内切酶:

- 不应混有其它杂蛋白特别是其它内切酶或外切酶的污染。
- 内切酶的用量：根据内切酶单位和DNA用量而定，通常1u指在适当条件下，1小时内完全酶解1ug特定DNA底物所需要的限制性内切酶量，使用中一般以 1 ug DNA对 2 — 3 u酶短时间为宜。
- 同时内切酶体积不能超过反应体系10%，因内切酶中含50%甘油，体系中甘油超过5%会抑制内切酶活力。
- 内切酶操作应在**低温**下进行（冰上）；使用时防止操作中对内切酶的污染。

注意事项——限制性内切酶酶切

2. DNA:

- 作为内切酶底物，DNA应该具备一定的纯度，其溶液中不能含酚、氯仿、乙醚、SDS、EDTA、高盐浓度、酒精等，这些因素的存在均不同程度影响限制性内切酶的活力。
- 这种抑制可通过：
 - 增加酶作用单位数（ $10 \sim 20 \text{U}/\mu\text{g DNA}$ ）、
 - 增大反应体积以稀释可能的抑制剂
 - 或延长反应时间加以克服。

连接反应---连接酶（ligase）

ligase

又称合成酶，能催化两个分子连接成一个分子或把一个分子的首尾相连接的酶。此反应与ATP的分解反应相偶联。在把两分子相连接的同时发生三磷酸腺苷（ATP）的高能磷酸键的断裂如DNA连接酶等

连接酶的催化反应过程需要Mg离子

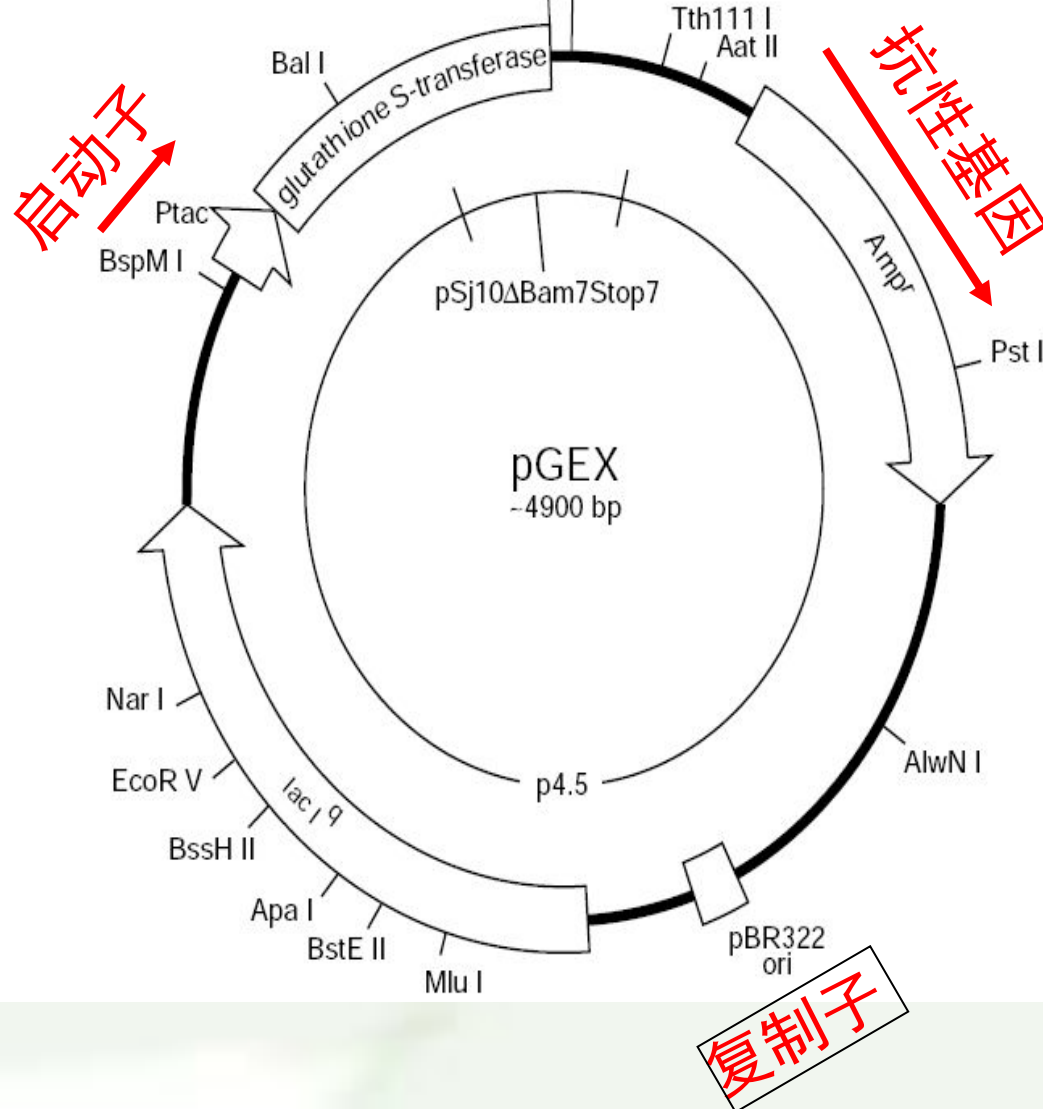
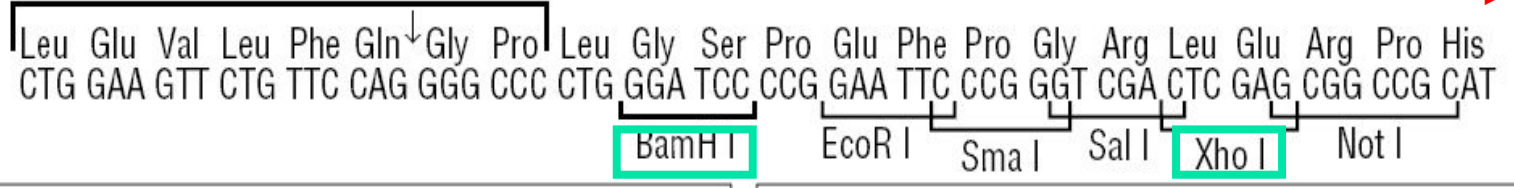
连接反应---T4连接酶

- ◆ DNA 分子的体外连接（重组）：
是指外源DNA 片段和载体 DNA 分子在体外通过DNA 连接酶共价连接。
- ◆ DNA酶切片段的连接是两DNA片段相邻的5'磷酸和3'羟基间可由连接酶催化形成磷酸二酯键，即能完成连接反应。

(二) 材料及仪器

- 模板质粒DNA (pGEX-6p-1)
- PCR目的片段
- 高速离心机, 微波炉, 电泳仪, 制胶槽, 电泳槽, 梳子, 锥形瓶, 量筒, 移液枪, 冰盒, 枪头, **Ep**管, 手套, 记号笔, **TBE**电泳缓冲液(5×), 琼脂糖

多克隆位点



结构的三大要素:

- 多克隆位点
- 选择标记（耐药性、LacZ）
- 独立的复制单位

双酶切体系

实验步骤

管 1

质粒	5 μ L
<i>Bam</i> H1	1 μ L
<i>Xho</i> 1	1 μ L
10x缓冲液	2 μ L
无菌水	11 μ L
总计	20 μ L

管 2

目的片段	10 μ L
<i>Bam</i> H1	1 μ L
<i>Xho</i> 1	1 μ L
10x缓冲液	2 μ L
无菌水	6 μ L
总计	20 μ L

混匀离心，37℃水浴3h，跑电泳

连接反应体系

10×T4连接酶 Buffer	2 μ L
载体	3 μ L
目的片段	9 μ L
T ₄ DNA连接酶	2 μ L
无菌水	4 μ L
共20 μ L 混匀离心，16℃ 4h或4℃ 过夜	

注意事项——T₄ DNA连接酶连接

- 10xLigation Buffer含有ATP，使用前应在室温放置至融化或用手掌温度辅助融化，然后置于冰上。不要加热融化以免ATP降解。
- T4 DNA Ligase对热敏感，容易失活。使用时请放置冰上，用后立即置冰箱中冷冻保存。
- 如需在连接反应后灭活T4 DNA Ligase，可于65℃孵育10min即可。

基因操作的基本步骤

上一步

重播

下一步

实验结果和讨论

- 构建重组载体时，如何选择酶切位点，有哪些注意事项？
- 若载体构建时只能选用单酶切，**1)** 如何保证插入片段的方向性？**2)** 如何减小载体和片段的自连，增加获得重组载体的机会？