



PCR产物的酶切
及琼脂糖凝胶电泳回收



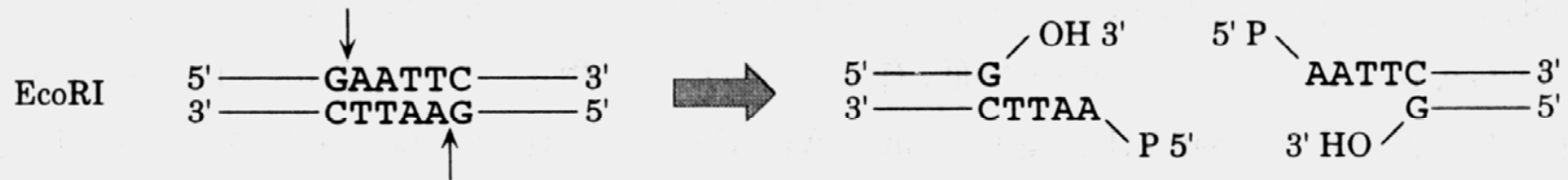
限制性内切核酸酶消化DNA

- ❖ 限制性内切核酸酶（restriction enzyme）是一类识别DNA上3-8个特定核苷酸序列并产生切割反应的内切核酸酶(endonuclease)的总称。在基因操作中，这些酶作为“剪刀”对DNA起剪切作用，是分子生物学研究中不可缺少的酶之一。

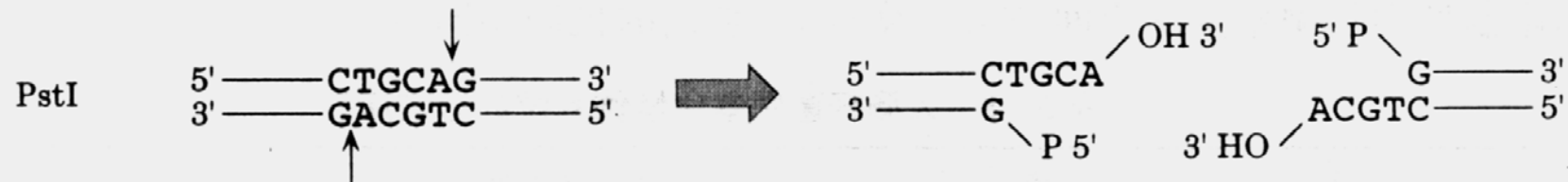
限制内切酶切出的三种断口

出末端酶、3' 突出末端酶以及平头末端酶三大类(图 3-9)。除后者外,任何一种 II 类酶产生

(1) 5'粘性末端酶



(2) 3'粘性末端酶



(3) 平头末端酶

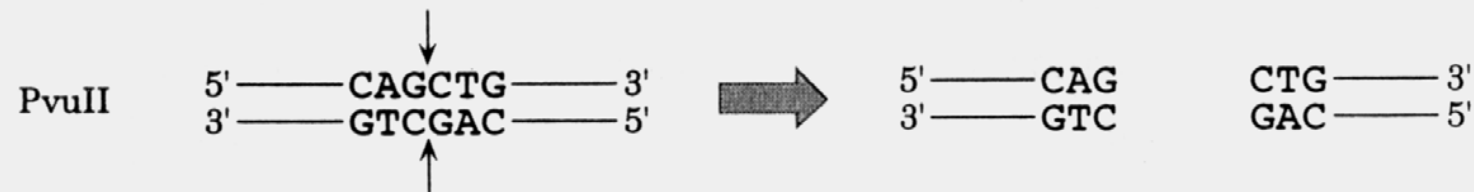


图 3-9 DNA 经限制性内切酶作用后呈现的三种断口

在酶切实验中：

- ❖ 如果用同一种酶切割载体和插入DNA两者能正确连接，但不能确定方向。
 - ❖ 如果用同的限制酶切割，所得的单链突起能互补，则两者能正确连接。但也不能确定其方向。
 - ❖ 若限制酶切割所得的片段是平末端，虽能连接，但效率低，而且不能确定其方向。
 - ❖ 用两种不同的限制酶共同切割载体和插入片断，而且所得两末端结构不同，连接后就能确定其方向。
- 因此，运用两种不同的限制酶的模式被广泛应用。

- ❖ 在我们今天的实验中，用到两种限制性酶分别是**BamH I** 和**Hind III**，这两种酶切割后产生的片段都具有粘性末端，可以保证酶切产物与载体正确的连接。

限制酶

TAKARA

*Bam*H I



G|G A T C C
C C T A G|G

D1010A	2,000 U	120 元
D1010B (A×5)	10,000 U	500 元
D1010C (A×10)	20,000 U	900 元
D1010AH (高浓度)	20,000 U	900 元

- 酶浓度 8 ~ 20 U/μl (高浓度 30 ~ 60 U/μl)
- 附带缓冲液
反应缓冲液 K
反应停止液 10×Loading Buffer
- 反应温度 30°C

- 起源 *Bacillus amyloliquefaciens* H
- 活性测定用底物 λ DNA
- 甲基化的影响 不受 dam methylase、CG methylase、dcm methylase (根据识别序列的后续序列) 的影响。
- Star**活性 高甘油浓度、Mn²⁺存在、低离子强度条件下, 识别序列会发生变化。
- 使用上的注意 37°C反应也表现出相同的活性, 但不如30°C时稳定。

Hind III



A|A G C T T
T T C G A|A

D1060A	3,000 U	120 元
D1060B (A×5)	15,000 U	550 元
D1060C (A×10)	30,000 U	1,000 元
D1060AH (高浓度)	30,000 U	1,000 元

- 酶浓度 8 ~ 20 U/μl (高浓度 30 ~ 60 U/μl)
- 附带缓冲液
反应缓冲液 M
反应停止液 10×Loading Buffer
- 反应温度 37°C

- 起源 *Haemophilus influenzae* Rd
- 活性测定用底物 λ DNA
- Star**活性 Mn²⁺存在条件下, 识别序列会发生变化。

Double Digestion (双酶切反应) 时的Universal Buffer (通用缓冲液) 的使用表

说明

使用二种酶同时进行DNA切断反应 (Double Digestion) 时, 为了节省反应时间, 通常希望在同一反应体系内进行。TaKaRa采用Universal Buffer表示系统, 并对每种酶表示了在各Universal Buffer中的相对活性。尽管如此, 在进行Double Digestion时, 有时还会难以找到合适的Universal Buffer。

本表以在pUC系列载体的多克隆位点处的各限制酶为核心, 显示了在Double Digestion可使用的最佳Universal Buffer条件。在本表中, 各Universal Buffer之前表示的 [数字×] 是指各Universal Buffer的反应体系中的最终浓度。TaKaRa销售产品中添附的Universal Buffer全为10倍浓度的缓冲液。终浓度为0.5×时反应体系中的缓冲液则稀释至20倍, 1×时稀释至10倍, 2×时稀释至5倍进行使用。

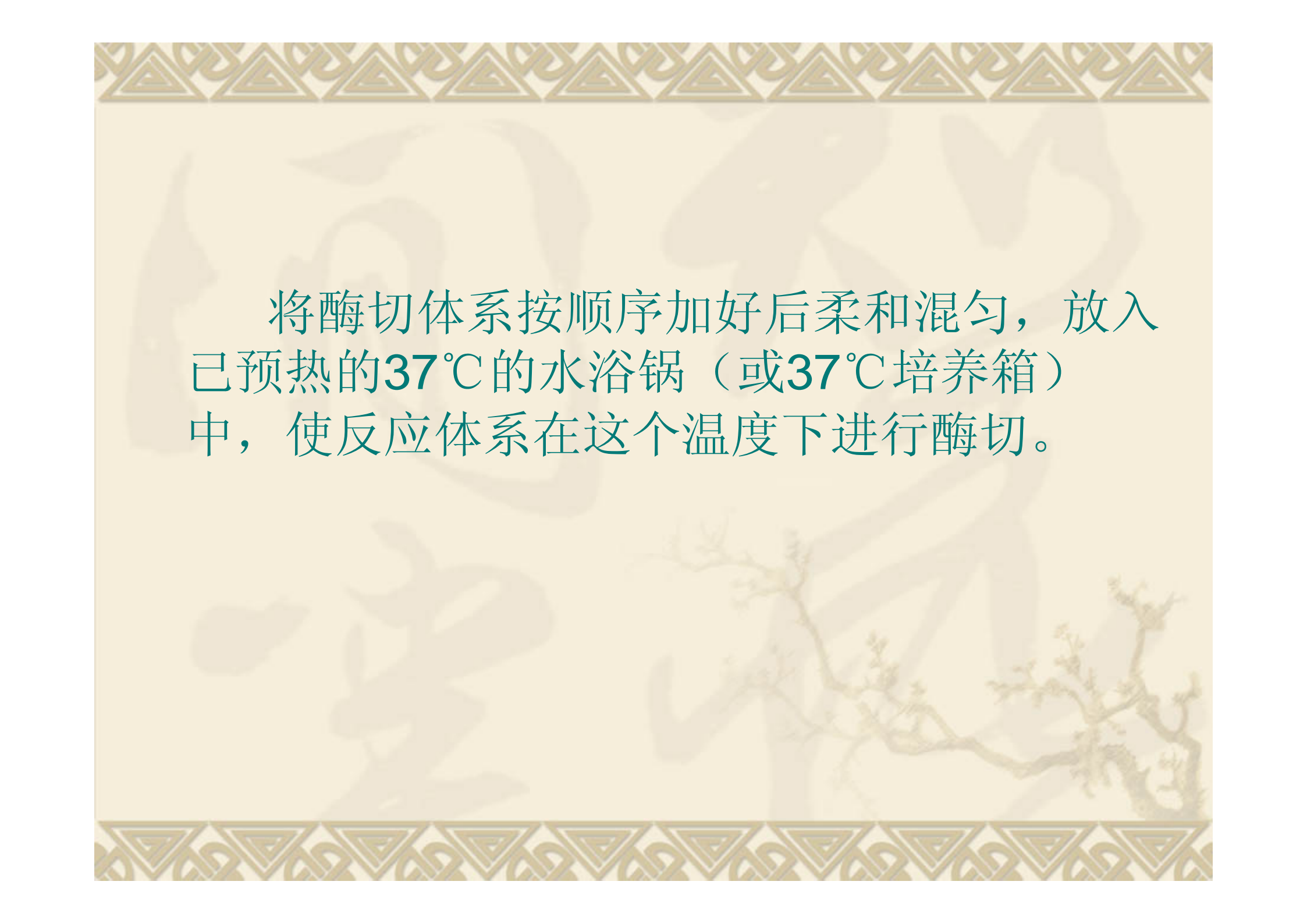
注意

- 1 μg DNA中添加10 U的限制酶, 在50 μl的反应体系中, 37°C下反应1小时可以完全降解DNA。
- 为防止Star活性的产生, 请将反应体系中的甘油含量, 尽量控制在10%以下。
- 根据DNA的种类, 各DNA的立体结构的差别, 或当限制酶识别位点邻接时, 有时会发生Double Digestion不能顺利进行的可能。

Enzyme	Acc I	BamH I	Bgl II	Cla I	EcoR I	EcoR V	Hinc II	Hind III	Kpn I	Nco I	Nde I
Acc 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
BamH 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
Bgl II	1×T	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	2×K	1×K	1×T	1×K+BSA	1×H
Cla I	1×M	1×K	1×H	1×M	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K+BSA	1×H
EcoR I	1×M	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K+BSA	1×H
EcoR 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
Hinc 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
Hind III	1×M	1×K	1×K	1×M	1×M	1×K	1×M	1×M	1×M	1×K+BSA	1×K
Kpn 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
Nco 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
Nde I	1×T	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	1×T	1×K	1×T	1×K+BSA	1×H
Not 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
Pst I	1×M	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K+BSA	1×H
Pvu 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
Sac 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
Sal 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
Sma 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
Spe I	1×M	1×K	1×H	1×M	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K+BSA	1×H
Sph 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
Xba 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
Xho I	1×M	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K	1×H

酶切体系

❖ PCR产物		0.5 μ g
❖ Buffer K (10X)		5 μ l
❖ ddH ₂ O	加至	48 μ l
❖ BamH I (20U/ μ l)		1 μ l
❖ Hind III (20U/ μ l)		1 μ l
<hr/>		
总体积		50 μ l

The background features a decorative border at the top and bottom with a repeating geometric pattern. The main area has a light beige background with faint, large-scale calligraphic characters in a traditional style, possibly '道法自然' (Tao Te Ching), and a small illustration of a tree branch in the lower right corner.

将酶切体系按顺序加好后柔和混匀，放入已预热的**37℃**的水浴锅（或**37℃**培养箱）中，使反应体系在这个温度下进行酶切。

在酶切实验中需要注意的事项

- 1 反应Buffer
- 2 酶切位点的保护碱基
- 3 酶切反应温度
- 4 酶切体系的体积

- ❖ 每一种酶都具有相应的反应缓冲液，反应缓冲液可能相同也可能不同。一般同一公司的酶的缓冲液可以通用，不同公司的一般不相同。
- ❖ 若不同酶使用相同的缓冲液，则可同时加入，若使用不同的缓冲液，则只能在第一个酶切完成后，进行酚抽提，乙醇沉淀，再进行另一个酶的消化。

限制酶 **TaKaRa**

Double Digestion (双酶切反应) 时的Universal Buffer (通用缓冲液) 的使用表

说明

使用二种酶同时进行DNA切断反应 (Double Digestion) 时，为了节省反应时间，通常希望在同一反应体系内进行。TaKaRa采用Universal Buffer表示系统，并对每种酶表示了在各Universal Buffer中的相对活性。尽管如此，在进行Double Digestion时，有时还会难以找到合适的Universal Buffer。

本表以在pUC系列载体的多克隆位点处的各限制酶为核心，显示了在Double Digestion时使用的最佳Universal Buffer条件。在本表中，各Universal Buffer之前表示的 [数字×] 是指各Universal Buffer的反应体系中的最终浓度。TaKaRa销售产品中添附的Universal Buffer全为10倍浓度的缓冲液。终浓度为0.5×时反应体系中的缓冲液则稀释至20倍，1×时稀释至10倍，2×时稀释至5倍进行使用。

注意

- 1 μg DNA中添加10 U的限制酶，在50 μl的反应体系中，37℃下反应1小时可以完全降解DNA。
- 为防止Star活性的产生，请将反应体系中的甘油含量，尽量控制在10%以下。
- 根据DNA的种类，各DNA的立体结构的差别，或当限制酶识别位点邻接时，有时会发生Double Digestion不能顺利进行的可能。

Enzyme	Acc I	BamH I	Bgl II	Cla I	EcoR I	EcoR V	Hinc II	Hind III	Kpn I	Nco I	Nde I
Acc 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
BamH 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
Bgl II	1×T	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	2×K	1×K	1×T	1×H+BSA	1×H
Cla I	1×M	1×K	1×H	1×M	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×H+BSA	1×H
EcoR I	1×M	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×H+BSA	1×H
EcoR V	0.5×K	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	2×T	1×K	0.5×K	1×H+BSA	1×H
Hinc 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
Hind III	1×M	1×K	1×K	1×M	1×M	1×K	1×M	1×M	1×M	1×H+BSA	1×K
Kpn I	1×M	0.5×K	1×T	1×M	1×M	0.5×K	1×M	1×M	1×L	0.5×H+BSA	1×T
Nco I	1×H+BSA	1×K+BSA	1×H+BSA	1×H+BSA	1×H+BSA	1×H+BSA	1×M+BSA	1×H+BSA	0.5×H+BSA	1×H+BSA	1×K+BSA
Nde I	1×T	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	1×T	1×K	1×T	1×H+BSA	1×H
Not I	0.5×H+BSA	0.5×H+BSA	1×H+BSA	1×H+BSA	1×H+BSA	1×H+BSA	0.5×H+BSA	0.5×H+BSA	0.5×H+BSA	0.5×H+BSA	1×H+BSA
Pst I	1×M	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×H+BSA	1×H
Pvu I	0.5×K	1×K	1×K	1×K	1×K	1×K	0.5×K	1×K	0.5×K	1×H+BSA	1×K
Sac I	1×M	0.5×K	0.5×K	1×M	1×M	0.5×K	1×M	1×M	1×L	0.5×H+BSA	1×T
Sal 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
Sma I	1×T+BSA	0.5×T+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA	0.5×H+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA
Spe I	1×M	1×K	1×H	1×M	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×H+BSA	1×H
Sph I	0.5×K	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	2×T	1×K	0.5×K	1×H+BSA	1×H
Xba 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
Xho I	1×M	1×K	1×H	1×H	1×H	1×H	1×M	1×M	1×M	1×K	1×H

Enzyme	Not I	Pst I	Pvu I	Sac I	Sal I	Sma I	Spe I	Sph I	Xba I	Xho I
Acc I	0.5×H+BSA	1×M	0.5×K	1×M	1.5×T	1×T+BSA	1×M	0.5×K	1×M	1×M
BamH I	0.5×H+BSA	1×K	1×K	0.5×K	1.5×T	0.5×T+BSA	1×K	1×K	0.5×K	1×K
Bgl II	1×H+BSA	1×H	1×K	0.5×K	1×H	1×T+BSA	1×H	1×H	2×T	1×H
Cla I	1×H+BSA	1×H	1×K	1×M	1×H	1×T+BSA	1×M	1×H	1×M	1×H
EcoR I	1×H+BSA	1×H	1×K	1×M	1×H	1×T+BSA	1×H	1×H	1×M	1×H
EcoR V	1×H+BSA	1×H	1×K	0.5×K	1×H	0.5×H+BSA	1×H	1×H	2×T	1×H
Hinc II	0.5×H+BSA	1×M	0.5×K	1×M	1.5×K	1×T+BSA	1×M	2×T	1×M	1×M
Hind III	0.5×H+BSA	1×M	1×K	1×M	1.5×K	1×T+BSA	1×M	1×K	1×M	1×M
Kpn I	0.5×H+BSA	1×M	0.5×K	1×L	1.5×T+BSA	1×T+BSA	1×M	0.5×K	1×M	1×M
Nco I	0.5×H+BSA	1×K+BSA	1×K+BSA	0.5×H+BSA	1.5×T+BSA	1×T+BSA	1×K+BSA	1×K+BSA	1×M+BSA	1×K+BSA
Nde I	1×H+BSA	1×H	1×K	1×T	1×H	1×T+BSA	1×H	1×H	1×T	1×H
Not I	1×H+BSA / 100×	1×H+BSA	2×K+BSA	0.5×H+BSA	1×H+BSA	0.5×T+BSA	1×H+BSA	1×H+BSA	0.5×H+BSA	1×H+BSA
Pst I	1×H+BSA	1×H	1×K	1×M	1×H	0.5×T+BSA	1×H	1×H	1×M	1×H
Pvu I	2×K+BSA	1×K	1×K +BSA	0.5×K	1.5×H+BSA	1×K+BSA	1×K	1×K	0.5×K	1×K
Sac I	0.5×H+BSA	1×M	0.5×K	1×L	1.5×T+BSA	1×T+BSA	1×M	0.5×K	1×M	1×M
Sal I	1×H+BSA	1×H	1.5×H+BSA	1.5×T+BSA	1×H	1.5×T+BSA	1×H	1×H	1.5×T	1×H
Sma I	0.5×T+BSA	0.5×T+BSA	1×K+BSA	1×T+BSA	1.5×T+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA	0.5×T+BSA	1×T+BSA	1×T+BSA
Spe I	1×H+BSA	1×H	1×K	1×M	1×H	1×T+BSA	1×M	1×H	1×M	1×H
Sph I	1×H+BSA	1×H	1×K	0.5×K	1×H	0.5×T+BSA	1×H	1×H	2×T	1×H
Xba I	0.5×H+BSA	1×M	0.5×K	1×M	1.5×T	1×T+BSA	1×M	2×T	1×M+BSA	1×M
Xho I	1×H	1×H	1×K	1×M	1×H	1×T	1×H	1×H	1×M	1×H



保护碱基

限制性内切酶的酶切位点两侧的保护碱基是在设计PCR的引物时加入的。

BamH I 的保护碱基

❖ **ATT**GGATCCATGGCGAATTCCGGCGAAGA

Hind III 的保护碱基

❖ **ACC**AAGCTTGATGGTGGGAAGGAGC

PCR产物末端限制酶切位点的切断情况

克隆PCR产物的方法之一，是在PCR产物两端设计一定的限制酶切位点，经酶切后克隆至用相同酶切的载体中。但实验证明，大多数限制酶对裸露的酶切位点不能切断。必须在酶切位点旁边加上一个至几个保护碱基，才能使所定的限制酶对其识别位点进行有效切断。

下表列举了15种限制酶，分别比较了各种限制酶在其酶切位点旁边分别加0、1、2、3个保护碱基后的切断情况。表中的：(-) 为不能切断；(±) 为不能完全切断；(+) 为能完全切断。

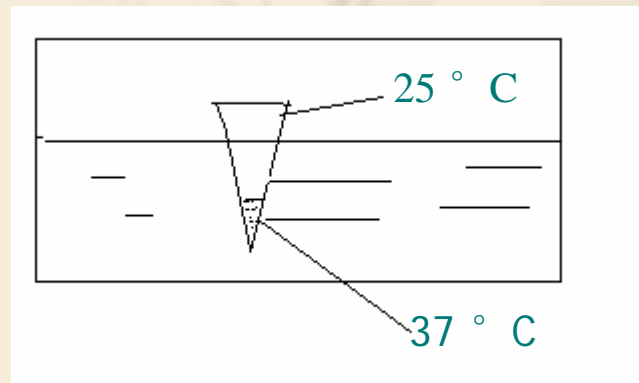
结果显示，基本上所有限制酶，在其酶切位点旁边加上3个以上的保护碱基后，可以对其酶切位点进行有效切断。

Enzyme	Base Pairs from Terminus			
	0	1	2	3
<i>Aat</i> II	-	+	+	+
<i>Apa</i> I	-	-	±	+
<i>Bam</i> H I	-	±	+	+
<i>Bgl</i> II	-	-	±	+
<i>Bst</i> X I	-	±	+	+
<i>Cla</i> I	-	±	+	+
<i>Eco</i> R I	-	±	+	+
<i>Eco</i> R V	-	+	+	+
<i>Hind</i> III	-	-	-	+
<i>Kpn</i> I	-	-	+	+
<i>Nco</i> I	-	-	+	+
<i>Nhe</i> I	-	+	+	+
<i>Not</i> I	-	-	+	+
<i>Pst</i> I	-	-	±	+
<i>Sac</i> I	-	±	+	+
<i>Sal</i> I	+	+	+	+
<i>Sma</i> I	-	±	+	+
<i>Spe</i> I	+	+	+	+
<i>Sph</i> I	-	-	+	+
<i>Xba</i> I	-	±	+	+
<i>Xho</i> I	-	-	±	+



酶切反应温度

- ❖ 37°C 对于大多数酶来说是最佳反应温度。
- ❖ 实验中应注意反应的温度。在我们的实验中使用水浴锅提供酶反应的温度，但是由于水浴锅中离心管底部的温度与管顶的温度不同，易造成反应体系的蒸发，这样会造成酶反应条件的改变，可能会造成酶产生星活力。因此，如酶反应时间较短，在两小时左右，可在水浴锅内进行，如时间较长，最好在培养箱内进行反应，可避免水分蒸发和凝结。



酶切体系的体积

- ❖ 我们今天的酶切体系是 $50\ \mu\text{l}$ 。在反应中加入的酶量不能超过总体积的十分之一。
- ❖ 并不是在酶切中加入的酶越多越好，因为在酶的储存液中含有甘油，甘油可以保护酶，防止酶结冰，失去活性。而当甘油达到一定的浓度，（在反应体系中） 10% ），就会影响酶，产生星活力，切割出我们不需要的片段。



星号活力

- ❖ 又称为第二活力，是指改变了酶切反应条件后特意序列的识别特性降低的一种现象。由于识别特异性降低，可能对原识别序列相似的序列也产生切割。如EcoR I 的典型识别序列为 **GAATTC**，条件改变后，其识别序列由原来的六核苷酸降为四核苷酸 **AATT**。高浓度甘油、高PH、低离子强度、**DMSO**、 β -巯基乙醇、 Mn^{2+} 等的存在可能导致酶产生星活力。

2. 相关基础知识

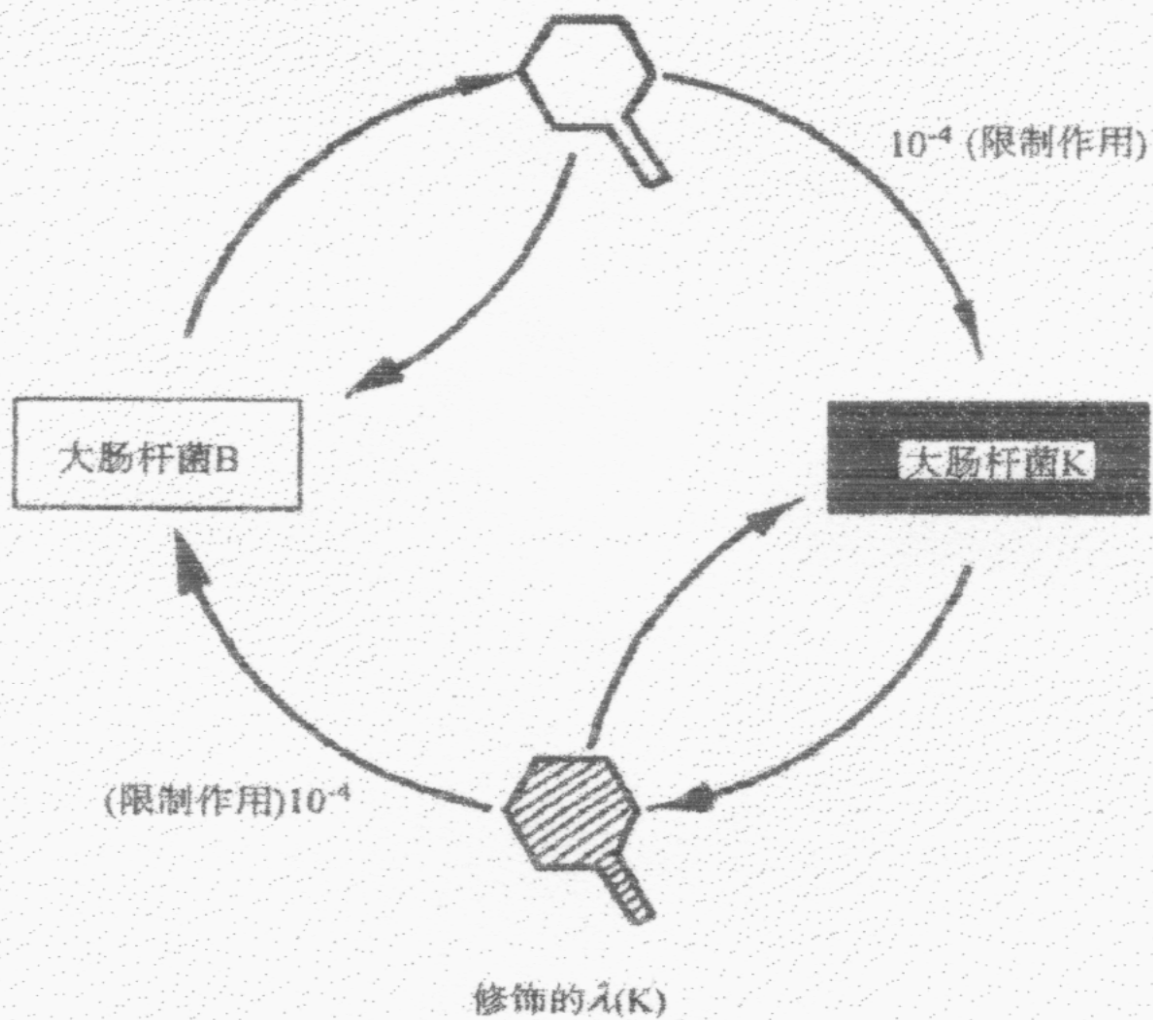
限制性核酸内切酶：是一类能识别双链DNA分子特异性核酸序列的DNA水解酶。它是基因工程中用于体外剪切基因片段的重要工具酶。

上世纪七十年代，当人们在对噬菌体的宿主特异性的限制-修饰现象进行研究时，首次发现了限制性内切酶。首批被发现的限制性内切酶包括来源于大肠杆菌的 *EcoR* I 和 *EcoR* II，以及来源于流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 的 *Hind* II 和 *Hind* III。这些酶可在特定位点切开DNA，产生可体外连接的基因片段。研究者很快发现内切酶是研究基因组成、功能及表达非常有用的工具。

1) 寄主控制的限制与修饰现象

限制与修饰系统是细菌细胞的一种防卫手段。各种细菌都能合成一种或几种能够切割DNA双链的核酸内切酶，它们以此来限制外源DNA存在于自身细胞内，但合成这种酶的细胞自身的DNA不受影响，因为这种细胞还合成了一种修饰酶，对自身的DNA进行了修饰，限制性酶对修饰过的DNA不能起作用。这种现象被称为寄主控制的限制与修饰现象。

修饰的 λ (B)



大肠杆菌B

大肠杆菌K

修饰的 λ (K)

2)限制性核酸内切酶的类型及特性

按限制酶的亚基组成和切断核酸情况的不同，分为三类：

I 型

II 型*

III型

第一类（I型）限制性内切酶能识别专一的核苷酸顺序，它们在识别位点很远的地方任意切割DNA链，其切割的核苷酸顺序没有专一性，是随机的。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。

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。

第二类(II型)限制性内切酶能识别专一的核苷酸顺序,并在该顺序内的固定位置上切割双链。由于这类限制性内切酶的识别和切割的核苷酸都是专一的。因此,这种限制性内切酶是DNA重组技术中最常用的工具酶之一。

这种酶识别的专一核苷酸顺序最常见的是4个或6个核苷酸,少数也有识别5个核苷酸以及7个、8个、9个、10个和11个核苷酸的。这种酶的切割可以有两种方式:

粘性末端:

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。

如 *EcoRI* 的识别顺序为:

5' G | AATTC 3'

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。

3) II类限制修饰酶命名规则:

生物体属名的第一大写字母和种名前两个小写构成基本名称

基本名称 + 菌株名的字母 + 罗马字母 (发现顺序)

Hind III

Haemophilus influenzae d株中的第三个酶

EcoR I

基因位于**Escherichia coli** 抗药性**R**质粒上

E	co	R	I
细菌属名	细菌种名种	菌株类型	有几种限制酶

同裂酶和同尾酶：

同裂酶： 有时两种限制性内切酶的识别核苷酸顺序和切割位置都相同，称为同裂酶（同切酶或异源同工酶）。

同裂酶差别只在于当识别顺序中有甲基化的核苷酸时，一种限制性内切酶可以切割，另一种则不能。例如*Hpa* II 和*Msp* I 的识别顺序都是

$$5' \dots G \mid CG \ G \dots 3'$$
$$3' \dots G \ GC \ \mid G \dots 5'$$

如果其中有5'-甲基胞嘧啶，则只有*Hpa* II 能够切割。

同尾酶:

有时两种酶切割序列不完全相同，但却能产生相同的粘性末端，这类酶被称为同尾酶

同尾酶的切割产物可以通过DNA连接酶将这类末端连接起来，但原来的酶切位点将被破坏。

如 *Bam*HI 和 *Bg*III:

5'...G | GATCC...3'

3'...CCTAG | G...5'

5'...A | GATCT...3'

3'...TCTAG | A...5'

5'...G GATCC...3'

3'...CCTAG G...5'

5'...A GATCT...3'

3'...TCTAG A...5'

5'...GGATCT...3'

3'...CCTAGA...5'

这些粘性末端连接后，*Bam*HI和*Bg*III酶将不能再切割，但可以利用*Bfa*1 (酶切识别位点为GATC) 来进行再切割。

3. 酶切反应的设计一般应注意问题：

- ① 大多数限制酶贮存在50%甘油溶液中，以避免在-20℃条件下结冰。当最终反应液中甘油浓度过高时，某些限制酶的识别特异性降低，从而抑制酶活性。
- ② 酶切底物DNA应具备一定的纯度，其溶液中不能含有微量酚、氯仿、乙醇，大于10mM的EDTA，SDS以及过量的盐离子浓度，否则会不同程度地影响限制酶的活性。
- ③ 反应混合物中基因组DNA底物的浓度不宜太大，小体积中过高浓度的基因组DNA会形成粘性DNA溶液,从而抑制酶的扩散，并降低酶活性。
- ④ 反应混合液中加入浓度为0.1mg/ml的BSA，可维持酶的稳定性。
- ⑤ 当要用两种或两种以上限制酶切割DNA时，必须选择好通用缓冲液，则两种酶才可同时切割。

4. 酶切实验中的注意事项:

- 1) 反应取酶时应使用无菌吸头, 以免污染酶液, 同时应尽量缩短酶在室温的放置时间。
- 2) 反应混合物混匀时, 应避免强烈振荡以保证不使内切酶变性及DNA大分子的完整。
- 3) 反应前的低速离心是必要的, 这可因混匀吸附于管壁上的液滴全部沉至管底。
- 4) 终止酶反应可根据需要采用不同的方法:
 - ①酶切后不需进行下一步反应, 可加入含EDTA的终止液终止反应。
 - ②若需进一步反应(如连接, 切割等), 可将反应管置65℃保温20-30分钟, 以灭活酶, 终止反应。
 - ③可用酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀。

从琼脂糖凝胶中回收DNA

- ❖ 在酶切的过程中，除产生我们所需要的目的片段外，还会产生一些小片段，这些小片段具有和目的片断同样的黏性末端，也可能会与载体连接，从而产生干扰，去除这些小片段的最好的方法就是进行琼脂糖凝胶电泳。

离心柱法回收凝胶中的DNA

1. 紫外灯下仔细切下含待回收DNA的胶条，将切下的胶条置于1.5ml离心管中；
2. 加入3体积溶胶液，50~60℃数分钟直至无可见凝胶块；
3. 冷却至室温；
4. 加入到离心吸附柱中，室温放置1min后，5000~10000rpm 1~5min使液体滤过；倒掉离心管中液体；（可以重复一次）
5. 向离心柱中加入600ul漂洗液，10000rpm 2min洗涤一次；倒掉离心管中液体
6. 向离心柱中加入600ul漂洗液，10000rpm 2min洗涤一次；倒掉离心管中液体；
7. 将离心柱放入离心管中12000rpm 2min；
8. 将离心柱放入新的1.5ml离心管中，向离心柱中滤膜上加入20~30ul洗脱液，室温放置5min，12000rpm离心3min，液体中即为回收的核酸。

注意事项

- ❖ 电泳所用的胶的浓度为0.7%，易于回收核酸。
- ❖ 溴化乙锭染色后的DNA易受紫外光破坏，故尽量放置于暗室，切带时应使用长波长紫外灯，切胶时间尽量短。
- ❖ 在切胶时，要注意尽量沿目的片段的边缘切下，使其所带的琼脂糖尽量少。这样琼脂糖不会影响后面的提纯。