

# DNA 酶切及凝胶电泳

## 第一节 概述

### 一. DNA 的限制性内切酶酶切分析

限制性内切酶能特异地结合于一段被称为限制性酶识别序列的 DNA 序列之内或其附近的特异位点上,并切割双链 DNA。

它可分为三类:

I 类和 III 类酶在同一蛋白质分子中兼有切割和修饰(甲基化)作用且依赖于 ATP 的存在。

I 类酶结合于识别位点并随机的切割识别位点不远处的 DNA, 而 III 类酶在识别位点上切割 DNA 分子, 然后从底物上解离。

II 类由两种酶组成: 一种为限制性内切核酸酶(限制酶), 它切割某一特异的核苷酸序列; 另一种为独立的甲基化酶, 它修饰同一识别序列。II 类中的限制性内切酶在分子克隆中得到了广泛应用, 它们是重组 DNA 的基础。绝大多数 II 类限制酶识别长度为 4 至 6 个核苷酸的回文对称特异核苷酸序列(如 EcoR I 识别六个核苷酸序列: 5'- G↓AATTC-3'), 有少数酶识别更长的序列或简并序列。II 类酶切割位点在识别序列中, 有的在对称轴处切割, 产生平末端的 DNA 片段(如 Sma I : 5'-CCC↓GGG-3'); 有的切割位点在对称轴一侧, 产生带有单链突出末端的 DNA 片段称粘性末端, 如 EcoR I 切割识别序列后产生两个互补的粘性末端。

5'...G↓AATTC...3' → 5'... G AATTC

3'...CTTAA↑G...5' → 3'... CTTAA G

DNA 纯度、缓冲液、温度条件及限制性内切酶本身都会影响限制性内切酶的活性。大部分限制性内切酶不受 RNA 或单链 DNA 的影响。当微量的污染物进入限制性内切酶贮存液中时, 会影响其进一步使用, 因此在吸取限制性内切酶时, 每次都要用新的吸管头。如果采用两种限制性内切酶, 必须要注意分别提供各自的最适盐浓度。若两者可用同一缓冲液, 则可同时水解。若需要不同的盐浓度, 则低盐浓度的限制性内切酶必须首先使用, 随后调节盐浓度, 再用高盐浓度的限制性内切酶水解。也可在第一个酶切反应完成后, 用等体积酚/氯仿抽提, 加 0.1 倍体积 3mol/L NaAc 和 2 倍体积无水乙醇, 混匀后置 -70℃ 低温冰箱 30 分钟, 离心、干燥并重新溶于缓冲液后进行第二个酶切反应。

DNA 限制性内切酶酶切图谱又称 DNA 的物理图谱, 它由一系列位置确定的多种限制性

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

内切酶酶切位点组成,以直线或环状图式表示。在 DNA 序列分析、基因组的功能图谱绘制、DNA 的无性繁殖、基因文库的构建等工作中,建立限制性内切酶图谱都是不可缺少的环节,近年来发展起来的 RFLP(限制性片段长度多态性)技术更是建立在它的基础上。构建 DNA 限制性内切酶图谱有许多方法。通常结合使用多种限制性内切酶,通过综合分析多种酶单切及不同组合的多种酶同时切所得到的限制性片段大小来确定各种酶的酶切位点及其相对位置。酶切图谱的使用价值依赖于它的准确性和精确程度。在酶切图谱制作过程中,为了获得条带清晰的电泳图谱,一般 DNA 用量约为 0.5-1 $\mu$ g。限制性内切酶的酶解反应最适条件各不相同,各种酶有其相应的酶切缓冲液和最适反应温度(大多数为 37 $^{\circ}$ C)。对质粒 DNA 酶切反应而言,限制性内切酶用量可按标准体系 1 $\mu$ g DNA 加 1 单位酶,消化 1-2 小时。但要完全酶解则必须增加酶的用量,一般增加 2-3 倍,甚至更多,反应时间也要适当延长。

## 二. 凝胶电泳

琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳是分离鉴定和纯化 DNA 片段的标准方法。该技术操作简便快速,可以分辨用其它方法(如密度梯度离心法)所无法分离的 DNA 片段。当用低浓度的荧光嵌入染料溴化乙啶(Ethidium bromide, E 染色,在紫外光下至少可以检出 1-10ng 的 DNA 条带,从而可以确定 DNA 片段在凝胶中的位置。此外,还可以从电泳后的凝胶中回收特定的 DNA 条带,用于以后的克隆操作。

琼脂糖和聚丙烯酰胺可以制成各种形状、大小和孔隙度。琼脂糖凝胶分离 DNA 片段大小范围较广,不同浓度琼脂糖凝胶可分离长度从 200bp 至近 50kb 的 DNA 片段。琼脂糖通常用水平装置在强度和方向恒定的电场下电泳。聚丙烯酰胺分离小片段 DNA(5-500bp)效果较好,其分辨力极高,甚至相差 1bp 的 DNA 片段就能分开。聚丙烯酰胺凝胶电泳很快,可容纳相对大量的 DNA,但制备和操作比琼脂糖凝胶困难。聚丙烯酰胺凝胶采用垂直装置进行电泳。目前,一般实验室多用琼脂糖水平平板凝胶电泳装置进行 DNA 电泳。

琼脂糖主要在 DNA 制备电泳中作为一种固体支持基质,其密度取决于琼脂糖的浓度。在电场中,在中性 pH 值下带负电荷的 DNA 向阳极迁移,其迁移速率由下列多种因素决定:

### 1、DNA 的分子大小:

线状双链 DNA 分子在一定浓度琼脂糖凝胶中的迁移速率与 DNA 分子量对数成反比,分子越大则所受阻力越大,也越难于在凝胶孔隙中爬行,因而迁移得越慢。

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

## 2、琼脂糖浓度

一个给定大小的线状 DNA 分子,其迁移速度在不同浓度的琼脂糖凝胶中各不相同。DNA 电泳迁移率的对数与凝胶浓度成线性关系。凝胶浓度的选择取决于 DNA 分子的大小。分离小于 0.5kb 的 DNA 片段所需胶浓度是 1.2-1.5%,分离大于 10kb 的 DNA 分子所需胶浓度为 0.3-0.7%, DNA 片段大小介于两者之间则所需胶浓度为 0.8-1.0%。

## 3、DNA 分子的构象

当 DNA 分子处于不同构象时,它在电场中移动距离不仅和分子量有关,还和它本身构象有关。相同分子量的线状、开环和超螺旋 DNA 在琼脂糖凝胶中移动速度是不一样的,超螺旋 DNA 移动最快,而线状双链 DNA 移动最慢。如在电泳鉴定质粒纯度时发现凝胶上有数条 DNA 带难以确定是质粒 DNA 不同构象引起还是因为含有其他 DNA 引起时,可从琼脂糖凝胶上将 DNA 带逐个回收,用同一种限制性内切酶分别水解,然后电泳,如在凝胶上出现相同的 DNA 图谱,则为同一种 DNA。

## 4、电源电压

在低电压时,线状 DNA 片段的迁移速率与所加电压成正比。但是随着电场强度的增加,不同分子量的 DNA 片段的迁移率将以不同的幅度增长,片段越大,因场强升高引起的迁移率升高幅度也越大,因此电压增加,琼脂糖凝胶的有效分离范围将缩小。要使大于 2kb 的 DNA 片段的分辨率达到最大,所加电压不得超过 5v/cm。

## 5、嵌入染料的存在

荧光染料溴化乙啶用于检测琼脂糖凝胶中的 DNA,染料会嵌入到堆积的碱基对之间并拉长线状和带缺口的环状 DNA,使其刚性更强,还会使线状 DNA 迁移率降低 15%。

## 6、离子强度影响

电泳缓冲液的组成及其离子强度影响 DNA 的电泳迁移率。在没有离子存在时(如误用蒸馏水配制凝胶),电导率最小,DNA 几乎不移动,在高离子强度的缓冲液中(如误加 10×电泳缓冲液),则电导很高并明显产热,严重时会引起凝胶熔化或 DNA 变性。

对于天然的双链 DNA,常用的几种电泳缓冲液有 TAE[含 EDTA (pH8.0)和 Tris-乙酸],TBE(Tris-硼酸和 EDTA),TPE(Tris-磷酸和 EDTA),一般配制成浓缩母液,储于室温。

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

## 第二节 材料、设备及试剂

### 一、材料

$\lambda$ DNA: 购买或自行提取纯化; 重组 pBS 质料或 pUC19 质粒; EcoRI 酶及其酶切缓冲液: 购买成品; HindIII酶及其酶切缓冲液: 购买成品;琼脂糖(Agarose): 进口或国产的电泳用琼脂糖均可。

### 二、设备

水平式电泳装置,电泳仪,台式高速离心机, 恒温水浴锅, 微量移液枪, 微波炉或电炉,紫外透射仪,

照相支架, 照相机及其附件。

### 三、试剂

- 1、 5×TBE 电泳缓冲液: 配方见第一章。
- 2、 6×电泳载样缓冲液: 0.25% 溴粉蓝, 40%(w/v) 蔗糖水溶液, 贮存于 4℃。
- 3、 溴化乙锭(E 溶液母液:将 EB 配制成 10mg/ml,用铝箔或黑纸包裹容器,储于 室温即可。

## 第三节 操作步骤

### 一、DNA 酶切反应

1、 将清洁干燥并经灭菌的 eppendorf 管(最好 0.5ml)编号,用微量移液枪分别加入 DNA 1 $\mu$ g 和相应的限制性内切酶反应 10×缓冲液 2 $\mu$ l,再加入重蒸水使总体积为 19 $\mu$ l,将管内溶液混匀后加入 1 $\mu$ l 酶液,用手指轻弹管壁使溶液混匀,也可用微量离心机甩一下,使溶液集中在管底。此步操作是整个实验成败的关键,要防止错加,漏加。使用限制性内切酶时应尽量减少其离开冰箱的时间,以免活性降低。

2、 混匀反应体系后,将 eppendorf 管置于适当的支持物上(如插在泡沫塑料板上),37℃水浴保温 2-3 小时,使酶切反应完全。

3、 每管加入 2 $\mu$ l 0.1mol/L EDTA(pH8.0),混匀,以停止反应,置于冰箱中保存备用。

### 二、DNA 分子量标准的制备

采用 EcoR I 或 HindIII酶解所得的  $\lambda$ DNA 片段来作为电泳时的分子量标准。 $\lambda$ DNA 为长度约

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

50kb 的双链 DNA 分子,其商品溶液浓度为 0.5mg/ml,酶解反应操作如上述。HindIII 切割 DNA 后得到 8 个片段,长度分别为 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, 0.56 和 0.12kb。EcoRI 切割 IDNA 后得到 6 个片段,长度 分别为 21.2, 7.4, 5.8, 5.6, 4.9 和 2.5kb。

### 三、 琼脂糖凝胶的制备

- 1、 取 5×TBE 缓冲液 20ml 加水至 200ml,配制成 0.5×TBE 稀释缓冲液,待用。
- 2、 胶液的制备: 称取 0.4g 琼脂糖,置于 200ml 锥形瓶中,加入 50ml 0.5×TBE 稀释缓冲液,放入微波炉里(或电炉上)加热至琼脂糖全部熔化,取出摇匀,此为 0.8%琼脂糖凝胶液。加热过程中要不时摇动,使附于瓶壁上的琼脂糖颗粒进入溶液。加热时应盖上封口膜,以减少水份蒸发。
- 3、 胶板的制备: 将有机玻璃胶槽两端分别用橡皮膏(宽约 1cm)紧密封住。将封好的胶槽置于水平支持物上,插上样品梳子,注意观察梳子齿下缘应与胶槽底面保持 1mm 左右的间隙。向冷却至 50-60℃的琼脂糖胶液中加入溴化乙锭(E 溶液使其终浓度为 0.5μg/ml(也可不把 EB 加入凝胶中,而是电泳后再用 0.5μg/ml 的 EB 溶液浸泡染色)。用移液器吸取少量融化的琼脂糖凝胶封橡皮膏内侧,待琼脂糖溶液凝固后将剩余的琼脂糖小心地倒入胶槽内,使胶液形成均匀的胶层。倒胶时的温度不可太低,否则凝固不均匀,速度也不可太快,否则容易出现气泡。待胶完全凝固后拨出梳子,注意不要损伤梳底部的凝胶,然后向槽内加入 0.5×TBE 稀释缓冲液至液面恰好没过胶板上表面。因边缘效应样品槽附近会有一些隆起,阻碍缓冲液进入样品槽中,所以要注意保证样品槽中应注满缓冲液。
- 4、 加样: 取 10μl 酶解液与 2μl 6×载样液混匀,用微量移液枪小心加入样品槽中。若 DNA 含量偏低,则可依上述比例增加上样量,但总体积不可超过样品槽容量。每加完一个样品要更换 tip 头,以防止互相污染,注意上样时要小心操作,避免损坏凝胶或将样品槽底部凝胶刺穿。
- 5、 电泳: 加完样后,合上电泳槽盖,立即接通电源。控制电压保持在 60-80V,电流在 40mA 以上。当溴酚蓝条带移动到距凝胶前沿约 2cm 时,停止电泳。
- 6、 染色: 未加 EB 的胶板在电泳完毕后移入 0.5μg/ml 的 EB 溶液中,室温下染色 20-25 分钟。
- 7、 观察和拍照: 在波长为 254nm 的长波长紫外灯下观察染色后的或已加有 EB 的电泳胶板。DNA 存在处显示出肉眼可辨的桔红色荧光条带。紫光灯下观察时应戴上防护眼镜或有

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

机玻璃面罩,以免损伤眼睛。经照相机镜头加上近摄镜片和红色滤光片后将相机固定于照相架上,采用全色胶片,光圈 5.6,曝光时间 10-120 秒(根据荧光条带的深浅选择)。

8、DNA 分子量标准曲线的制作:在放大的电泳照片上,以样品槽为起点,用卡尺测量  $\lambda$ DNA 的 EcoR I 和 HindIII 酶切片段的迁移距离,以厘米为单位。以核苷酸数的常用对数为纵坐标,以迁移距离为横坐标,在坐标纸上绘出连结各点的平滑曲线,即为该电泳条件下 DNA 分子量的标准曲线。

9、DNA 酶切片段大小的测定:在放大的电泳照片上,用卡尺量出 DNA 样品各片段的迁移距离,根据此数值,在 DNA 分子量标准曲线上查出相应的对数值,进一步计算出各片段的分子量大小(若用单对数坐标纸来绘制标准曲线,则可根据迁移距离直接查出 DNA 片段的大小)。反之,若已知 DNA 片段的大小亦可由标准曲线上查出它预计的迁移距离。

10、DNA 酶切片段排列顺序的确定:根据单酶切,双酶切和多酶切的电泳分析结果,对照 DNA 酶切片段大小的数据进行逻辑推理,然后确定各酶切片段的排列顺序和各酶切位点的相对位置。以环状图或直线图表示,即成该 DNA 分子的限制性内切酶图谱。

[注意] 1.酶切时所加的 DNA 溶液体积不能太大,否则 DNA 溶液中其他成分会干扰酶反应。

2、酶活力通常用酶单位(U)表示,酶单位的定义是:在最适反应条件下,1 小时完全降解 1mg DNA 的酶量为一个单位,但是许多实验制备的 DNA 不象 IDNA 那样易于降解,需适当增加酶的使用量。反应液中加入过量的酶是不合适的,除考虑成本外,酶液中的微量杂质可能干扰随后的反应。

3、市场销售的酶一般浓度很大,为节约起见,使用时可事先用酶反应缓冲液(1 $\times$ )进行稀释。另外,酶通常保存在 50%的甘油中,实验中,应将反应液中甘油浓度控制在 1/10 之下,否则,酶活性将受影响。

4、观察 DNA 离不开紫外透射仪,可是紫外光对 DNA 分子有切割作用。从胶上回收 DNA 时,应尽量缩短光照时间并采用长波长紫外灯(300-360nm),以减少紫外光切割 DNA。

5、EB 是强诱变剂并有中等毒性,配制和使用时都应戴手套,并且不要把 EB 洒到桌面或地面上。

凡是沾污了 EB 的容器或物品必须经专门处理后才能清洗或丢弃。

6、当 EB 太多,胶染色过深,DNA 带看不清时,可将胶放入蒸馏水冲泡,30 分钟后再观察。

**免责声明:** 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。