

# N3 DNA 之限制酶分析

王愛玉

**Restriction endonuclease** (限制內切酶，以下簡稱限制酶) 為一種對 DNA 序列具專一性的核酸分解酵素 (nuclease)，是分子生物及生物技術上的重要工具。在這個實驗中，我們是以細菌質體 (plasmid) DNA 為材料，來練習限制酶的使用。此外，亦將以限制酶來檢定 N2 之 PCR 產物是否為 *lacZ* 基因片段。本實驗另一個目的是藉由膠體電泳分析限制酶作用後的 DNA，學習如何由 DNA 片段在膠體中的泳動率來估計 DNA 大小，以及體認不同分子量、不同構形的 DNA 在膠體電泳的泳動差異。

## 3.1 背景知識

### 3.1.1 限制酶

- a) 限制酶的生理功能：細菌中存在一種 restriction-modification 系統，對於防禦嗜菌體 (bacteriophage) 的感染扮演關鍵角色。限制酶與 DNA methylases 是這個系統中的兩個主角，前者可以辨認 DNA 上特定的序列，並水解 phosphodiester bonds；後者則對限制酶辨認的序列進行甲基化 (methylation) 修飾，一旦序列上有甲基化修飾，限制酶即無法對其作用。DNA methylases 可對細菌染色體 DNA 上的特定序列進行甲基化修飾，保護染色體 DNA 不會受到細菌自己的限制酶水解，但入侵的噬菌體 DNA 由於不具有甲基化修飾或甲基化修飾形式不同，細菌的限制酶可將之水解，使其複製與增殖受到限制。
- b) 限制酶的種類：目前分離出之限制酶主要可分為 Type I、Type II 及 Type III 三大類。
  - 1) Type I 及 Type III：通常是由數個次單元體組成，同時具有 endonuclease 及 methylase 的活性。這兩類酵素對 phosphodiester bond 水解的位置（以下簡稱為切位）與辨識的序列不同。Type I 酵素需要 ATP 的參與，ATP 提供酵素由辨識區移動到距離 1 ~ 10kb 之處作用所需的能量；Type III 酵素則不需要 ATP 參與反應，其辨識序列與切位通常相距 100 bp 以內。
  - 2) Type II：這類酵素僅具有 endonuclease 活性，不具 methylation 的作用。大部分的 Type II 限制酶對 DNA 之切位就在辨識序列上，不需要 ATP 參與反應，但通常需要二價金屬離子  $Mg^{2+}$  作為 cofactor。三類限制酶中以此類最具實際應用價值。
- b) 限制酶之命名：依據其來源細菌命名，由三至四個英文字母及一個羅馬數字組成，前三個字母依序為來源細菌屬名的第一個字母及種名的前兩個字母，第四

個字母來自菌株 (strain) 名，羅馬數字則代表在同一菌種中被發現的順序。例

如，*EcoRI*: *E* = genus *Escherichia*

*co* = species *coli*

*R* = strain RY13

*I* = first endonuclease identified

*BglII* : *B* = genus *Bacillus*

*gl* = species *globigii*

*II* = second endonuclease identified

- c) **Type II 限制酶** 作用模式：限制酶水解核苷酸間的 **phosphodiester bonds** 後，使 DNA 的 5' 端帶 **phosphate group**，3' 端帶 **OH group**。如同其他酵素，限制酶對於反應基質亦具專一性，並有一定的反應機制。**Type II** 限制酶辨認的 DNA 序列通常具對稱性（兩股由 5' 至 3' 的方向，可讀得相同序列），在辨識序列上作用的位置隨酵素而易，有些酵素切出來的 DNA 片段末段帶有單股序列 (**sticky end**)，有些酵素則由序列之對稱中心作用，將 DNA 切成具有平整末端 (**blunt end**) 的片段。

◆ 另有一群歸屬於 **Type IIS** 的限制酶，辨識序列並不具對稱性，並且切位不在辨識序列上，通常切位距辨識序列 20 bp 以內。

- d) **限制酶的應用**：限制酶的應用相當廣泛，例如重組 DNA (**recombinant DNA**) 的建構、DNA 的檢定等都可以利用限制酶來進行。

1) **重組 DNA 分子的建構**：利用適當的限制酶將兩種不同的 DNA 作用成 **sticky ends**，使彼此的 5' 與 3' 端序列互補而能黏合在一起，再用 **DNA ligase** 將缺口的 **phosphodiester bonds** 補起來；或是以限制酶將兩種 DNA 作用成 **blunt ends**，再以 **DNA ligase** 將兩種 DNA 末端接合而形成重組 DNA。

2) **DNA 的檢定**：在 DNA 上，限制酶能夠作用的位置及次數隨 DNA 序列不同而不同，有時兩種 DNA 僅存在 1 bp 的差異，但就足以造成限制酶作用結果的不同，因此可以利用限制酶作為檢定 DNA 的工具及建立 DNA 的 **physical map**（稱為限制圖譜，**restriction map**）。

### 3.1.2 建立 DNA 之限制圖譜

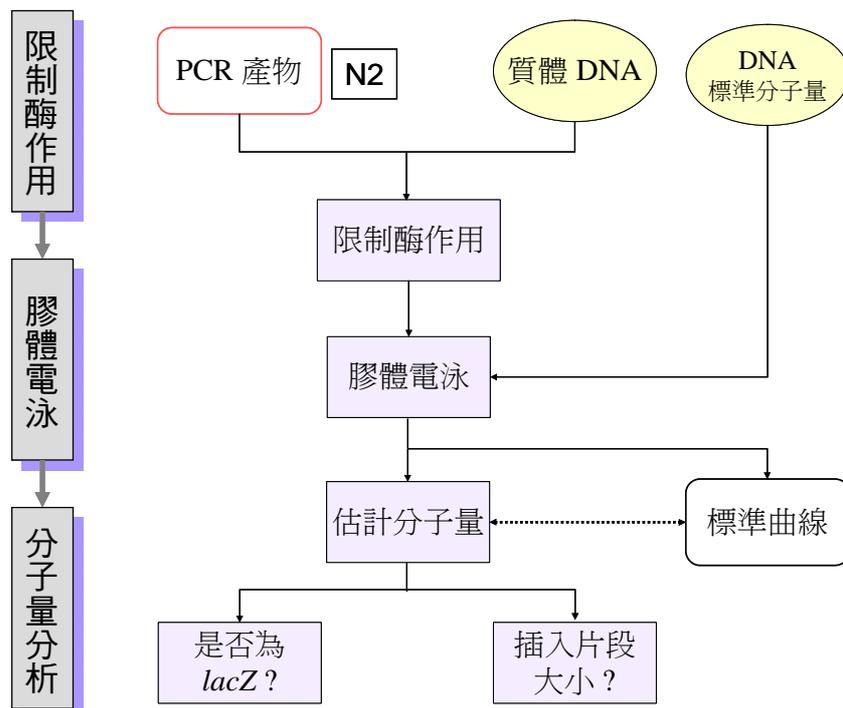
依據不同限制酶在 DNA 上作用的次數及位置而排列出之圖譜，稱為限制圖譜。建立限制圖譜通常需要經過下列步驟：

- a) **以不同限制酶作用 DNA**：除了以不同限制酶分別對 DNA 進行作用（稱為 **single digest**）外，還需要以不同組合之兩種限制酶同時對 DNA 進行反應（稱為 **double digest**），必要時，還需以兩種以上之限制酶同時進行反應。

- b) 進行膠體電泳分析：選擇適當的膠體濃度及膠體系統，將限制酶作用後的樣品以及直鏈型的 DNA 標準分子量一起進行電泳分析。
- c) 估計 DNA 片段大小：在 N1 中，我們已經知道，DNA 在膠體中的泳動率會受到分子量及構形的影響，當構形相同時，分子量愈大，泳動率愈慢。泳動率與 DNA 分子量（或 bp 數目）之  $\log$  值間存在線性關係，因此可將 DNA 標準分子量各片段之泳動距離對其 bp 數的  $\log$  值作圖，得到標準曲線後，即可由限制酶水解片段的泳動距離估算出其大小。
- d) 拼圖：將各個限制酶反應所得的 DNA 片段數目及大小進行排列組合，即可得知各限制酶在此 DNA 上作用的位置。

### 3.1.3 實驗大綱

#### N3 DNA之限制酶分析



## 3.2 實驗操作

### 3.2.1 儀器設備

- a) 微量離心機
- b) 37°C 水浴鍋或培養箱
- c) 65°C 水浴鍋
- a) 迷你電泳槽及鑄膠器 (Mupid II)
- b) UV transilluminator 及膠片影像分析系統
- c) 防護面罩

### 3.2.2 藥品試劑

- a) 質體 DNA : pB3bh
- b) N2 之 PCR 產物 : 取 A, B, C 三管進行反應。
- c) 限制酶 : *EcoRV* 及 *EcoRI* (BioLabs)
- d) 5×反應液 : 250 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl, 5 mM dithiothreitol, 5 mg/ mL bovin serum albumin, pH 7.9。
- e) 瓊脂糖粉末 : agarose, Low EEO
- f) 1×TAE 電泳緩衝液 : 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0。
- g) 10×追蹤染劑 : 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 0.1 M EDTA, 50% glycerol
- h) Ethidium bromide (EtBr) stock solution : 500 µg/mL, 裝於滴瓶中, 每 50 mL 膠體溶液加一滴 (最終濃度為 0.5 µg/mL)
- i) λ DNA/*Hind*III Fragments 標準分子量 : 包含 8 個片段, 23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0, 0.56, 0.125 Kb, 濃度為 0.5 µg/µL, 以下簡稱 λMr。
- j) 100-bp ladder 標準分子量 : 包含 100 bp ~ 2000 bp 共 12 個片段
- k) 無菌水

### 3.2.3 操作步驟

限制酶反應 :

- 1) 質體 pB3bh 部分 : 取 3 支微量離心管, 依下表所列體積 (以 µL 為單位) 依序加於管壁不同位置上 :

【請注意! 每次吸取限制酶時, 請換一支新的微量吸管頭以避免造成污染。】

反應組成份	編號		
	#1	#2	#3
pRSus1B	5	5	5
5×反應液	4	4	4
dH <sub>2</sub> O	11	10	10
<i>EcoRI</i>	0	1	0
<i>EcoRV</i>	0	0	1

總體積為 20  $\mu\text{L}$ ，短暫離心後，以 tip 輕輕混合，#1 置冰浴中，其餘各管置於 37°C 反應 1 小時。

- 2) PCR 產物部分：取 10 支乾淨微量離心管，依下表標示清楚，並依下表所列體積 (以  $\mu\text{L}$  為單位) 依序加於管壁不同位置上：

反應組成份	編號									
	P	A	B	C	S	T	#A+E	#B+E	#C+E	#S+E
PCR (P)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR (A)	-	10	-	-	-	-	10	-	-	-
PCR (B)	-	-	10	-	-	-	-	10	-	-
PCR (C)	-	-	-	10	-	-	-	-	10	-
PCR (S)	-	-	-	-	10	-	-	-	-	10
PCR (T)	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-
5×反應液	-	-	-	-	-	-	4	4	4	4
dH <sub>2</sub> O	10	10	10	10	10	10	5	5	5	5
<i>EcoRV</i>	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1

總體積為 20  $\mu\text{L}$ ，短暫離心後，以 tip 輕輕混合，A+E、B+E、C+E、S+E 四管置於 37°C 反應 1 小時，其餘各管暫置冰浴中。

膠片製備：

- 3) 每組製備一片 17-well 1% agarose gel (大片 Mupid II 膠片約需 40 mL)，方法請見 N1 實驗。
- ◆ 此部分請每大組之 TA 統一製備四組的膠體。
  - ◆ 鑄膠及電泳等步驟請戴手套操作。EtBr 為突變劑，請小心！

終止限制酶反應：

- 5) 各樣品 DNA 加入 2  $\mu\text{L}$  10×追蹤染劑。
- 6) 各樣品 DNA 及  $\lambda\text{Mr}$  置 65°C 水浴 10 分鐘後，立即置冰浴中。(注意：100-bp

ladder 標準分子量不要加熱)

電泳分析：

- 7) 小心拔開齒模，將膠片置於電泳槽中，倒入 1×TAE，直至溶液蓋過膠片。
- 6) 各個 DNA 樣品取 15 μL 注入樣品槽中，蓋上電泳槽之透明蓋。進行電泳，待追蹤染劑 bromophenol blue 行進至膠體三分之二處時，關閉電源，取出膠片，以 UV transilluminator box 觀察色帶位置，並記錄結果。

### 3.3 結果與報告

#### 3.3.1 結果報告：

PCR 增殖 DNA：

- a) 說明 N2 實驗所用引子序列與 *E. coli lacZ* 序列比對結果以及寫出 PCR 產物預期大小。
- b) 以預測限制酶切位之軟體分析 *EcoRV* 在 *lacZ* 序列上作用的位置及次數，說明 *EcoRV* 是否會作用在 PCR 引子所增殖出之 DNA 片段上？
- c) 說明 PCR 反應的結果，包括 PCR 產物的大小、由電泳膠片上色帶的亮度估計 PCR 產物的量、限制酶作用的結果，以及是否符合預期等等。

質體 pRSus1B 之限制酶分析：

- d) 說明限制酶作用的結果。

#### 3.3.2 問題與討論

- a) 說明在 PCR 操作過程及限制酶使用過程中應注意的事項。
- b) 實驗過程中，是否觀察到一些特殊現象？
- c) 說明在實驗過程中你遇到的問題，並請提出可能的解決方法。
- d) PCR 反應循環 30 次後，於 72°C 反應 10 min 之目的為何？
- e) N2 實驗理論上可得到多少量的 DNA？請討論影響產物生成量的因素。
- f) pB3bh 上有幾處 *EcoRV* 及 *EcoRI* 切位？請電泳結果估計各片段的大小。
- g) 說明質體構形對泳動率的影響。

### 3.4 參考文獻：

Micklos DA, Freyer GA (2003) DNA Science: A First Course, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Switzer RL, Garrity LF (1999) Experimental Biochemistry, 3<sup>rd</sup> ed, W. H. Freeman and Company, New York.

<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

<http://www.restrictionmapper.org>

# N2/N3 以 PCR 增殖 DNA 及限制酶分析 實驗報告

班次：\_\_\_\_\_ 組別：\_\_\_\_\_ 姓名：\_\_\_\_\_ 學號：\_\_\_\_\_

## I. 實驗目的：

(簡要列出兩實驗之目的)

## II. 材料與方法：

(列出主要實驗材料及主要方法)

◆ I、II 兩項敘述以一頁為限。

## II. 實驗結果：

PCR 增殖 DNA：

a) PCR 引子序列與 *E. coli lacZ* 序列比對結果及 PCR 產物預期大小：

b) *EcoRV* 在 *lacZ* 序列上作用的位置及次數：

c) *E. coli lacZ* 基因片段增殖結果：

(說明並附上電泳圖)

質體 pB3bh 之限制酶分析：

d) 限制酶作用的結果：

(說明並附上電泳圖)

## IV. 問題與討論：

回答第 6 頁所列的問題。