

# 限制酶切割DNA和瓊膠電泳分析

劉佩芬老師

高雄醫學大學  
生物醫學暨環境生物學系

# 實驗背景介紹

# 何謂限制酶

**Restriction-modification** systems allow the bacterium to distinguish self from **non-self DNA**

**Restriction:** bacterial endonucleases cleave both strands of foreign DNA at **specific** recognition sites

**Modification:** bacteria protect their own DNA by adding a methyl group to the recognition sites in their own DNA

在原核生物細胞中，多存在有核酸內切酶 (restriction endonucleases)，簡稱限制酶。它們組成限制—修飾系統(restriction – modification system) 一方面標記自體DNA，一方面將侵入細菌細胞的外來DNA切掉，但不會切已“標記”(例如甲基化)的自體DNA。因其對DNA序列的認知具有專一性，而成為在生物技術上的一項重要工具。



Electron micrograph by Graham Colm of bacteriophage infecting a bacterium

# 限制酶的發現

- ▶ Werner Arber, Hamilton Smith and Daniel Nathans shared the 1978 Nobel prize for Medicine and Physiology for their discovery of restriction enzymes



Werner Arber   Daniel Nathans   Hamilton Smith

**Werner Arber** – discovered restriction enzymes

**Daniel Nathans** - pioneered the application of restriction for the construction of genetic maps

**Hamilton Smith** - showed that restriction enzyme cuts DNA in the middle of a specific sequence

# 限制酶的命名

- ▶ the **type** of bacteria in which the enzyme is found
- ▶ the **order** in which the restriction enzyme was identified and isolated.

**EcoRI** for example

**R strain** of ***E. coli*** bacteria

**I** as it is was the first *E. coli* restriction enzyme to be discovered.

限制酶之命名

限制酶命名是以其來源的細菌之學名簡稱而得，例如EcoRI

是由Escherichia coli RI 而來

Table 13.1 Types of restriction endonucleases and their target sequences

	Name of restriction systems	Target sequence	Type of DNA end
1.	Bam HI ( <i>Bacillus amyloliquifaciens</i> )	G↓GATCC	5' sticky end
2.	EcoRI ( <i>Escherichia coli</i> )	G↓AATTC	5' sticky end
3.	Hae III ( <i>Haemophilus aegypticus</i> )	GG↓GC	Blunt end
4.	Sma I ( <i>Serratia marcescense</i> )	CCC↓GGG	Blunt end
5.	Pst I ( <i>Providentia stuartii</i> )	CTGCA↓G	3' sticky end
6.	Hind III ( <i>Haemophilus influenzae</i> )	A↓AGCTT	5' sticky end
7.	Alu I ( <i>Arthrobacter luteus</i> )	A↓GCT	5' sticky end

# 限制酶的種類

Type I- **multi-subunit**, both endonuclease and methylase activities, cleave at random up to 1000 bp from recognition sequence

**Type II- single subunit (most)**, cleave DNA within recognition sequence

Type III- **multi-subunit**, endonuclease and methylase about 25 bp from recognition sequence

	Cleavage site	Location of methylase	Examples
<b>Type I</b>	<b>Random</b> Around 1000bp away from recognition site	Endonuclease and methylase located on a single protein molecule	EcoK I EcoA I CfrA I
<b>Type II</b>	<b>Specific</b> Within the recognition site	Endonuclease and methylase are separate entities	EcoR I BamH I Hind III
<b>Type III</b>	<b>Random</b> 24-26 bp away from recognition site	Endonuclease and methylase located on a single protein molecule	EcoP I Hinf III EcoP15 I

依對DNA序列的認知及切割部位不同，可將限制酶分成I、II、III等三型。

第I型其認知序列與切割部位相距至少1000 bp以上；

第II型限制酶可在其認知序列中，很準確地切在特定的位置，所以此型限制酶常被用於生物技術的分子選殖上。通常其認知的序列為4 ~ 6個鹼基；

第III型其切割部位在認知序列附近幾十個鹼基。

**Type II REs are widely used in molecular biology:**  
enzymes cleave, but do not modify, their specific recognition sites

# 限制酶的產物

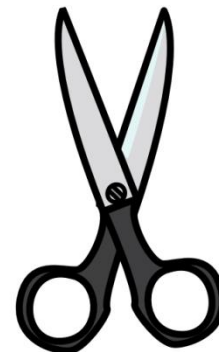
有些限制酶在其認知的序列中，將對稱的雙股交互的切開，使DNA片段的3'和5'端形成黏著端(sticky end)，有些則會在對稱軸上將認知位置切開形成平頭端(blunt end)。

## (1) the blunt ends-Hae III

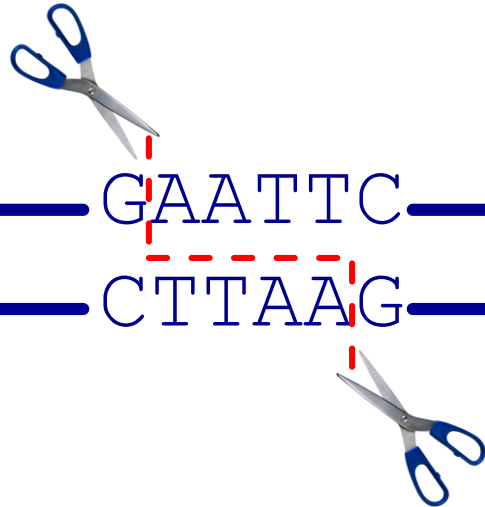
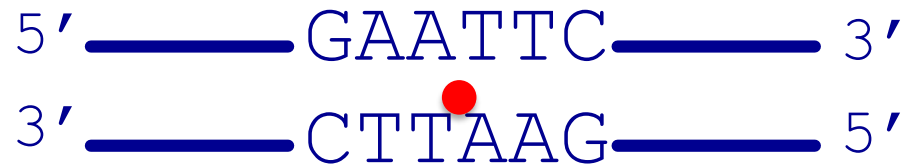
HaeIII is a restriction enzyme that searches the DNA molecule until it finds this sequence of **four nitrogen bases**.

Once the recognition site was found HaeIII could go to work cutting (cleaving) the DNA

These cuts produce what scientists call "**blunt ends**"



## (2) the sticky ends-EcoRI



EcoRI recognition site is a palindrome with an axis of symmetry

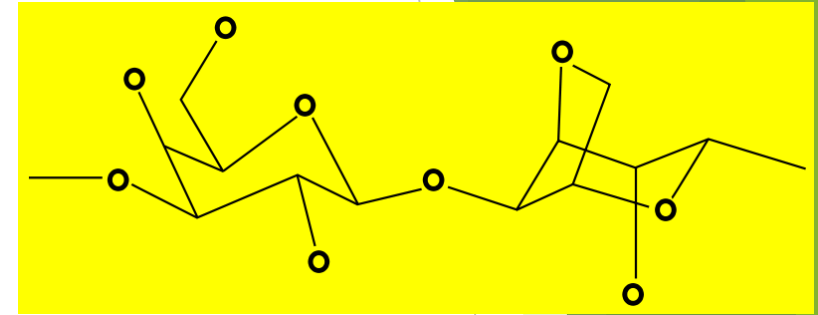
EcoRI dimer binds sequence and catalyzes double-strand cleavage

Products have “sticky ends”: unpaired hydrogen bonds on nitrogen bases



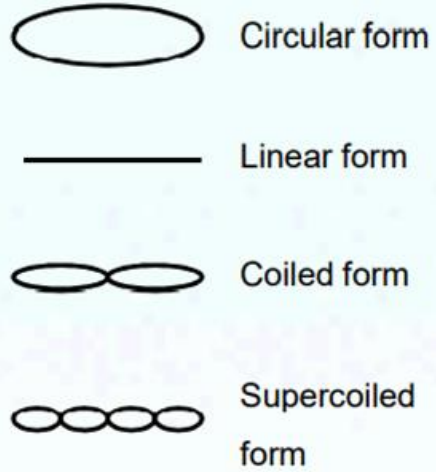
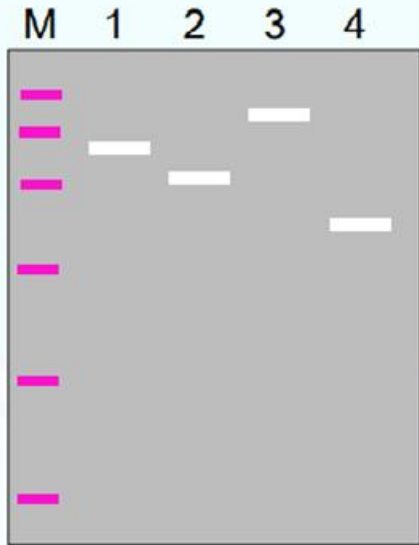
# 瓊膠電泳

- ▶ 瓊膠電泳是將agarose溶解於TAE緩衝溶液(緩衝液減少電場引起的pH變化影響DNA和RNA的電荷)，冷卻後agarose會以氫鍵形成凝膠，通常用於分辨大小範圍在50-20,000 bp之間的DNA片段。
- ▶ 在電場影響下使帶負電的DNA分子向陽極移動，移動速度依分子大小而定，分子愈大移動愈慢，可按照實驗需求調整瓊膠濃度。
- ▶ 一般而言，在某範圍內DNA片段的大小其移動距離的對數(log)與凝膠濃度成直線相關，因此必須選擇一個適當的濃度，才能有效地將DNA片段分開。例如0.8% (w/v)濃度適度分離0.5~10 kb的線狀DNA。用已知的DNA片段為標誌，可用來決定未知長短的DNA片段大小。
- ▶ 在瓊膠電泳上也可測定DNA的純度和完整性，被RNA污染會造成低分子量位置的band模糊不清。利用限制酶切割所產生的DNA片段，可測試質體圖譜是否正確？



Agarose (galactose)

<u>% Agarose</u>	<u>Size of linear DNA (kb)</u>
0.3	5.0 - 60.0
0.6	1.0 - 20.0
0.7	0.8 - 10.0
0.9	0.5 - 7.0
1.2	0.4 - 6.0
1.5	0.2 - 4.0
2.0	0.1 - 3.0



### 二〇一〇年國際生物奧林匹亞競賽國手選拔初賽

Q:下列那種處理最不會影響DNA片段在電泳膠體內之泳動速率?

- (A) 將DNA片段上所帶的負電加以中和
- (B) 增加DNA片段的長度
- (C) 將DNA片段的序列改變
- (D) 將DNA片段上的胞嘧啶加以甲基化
- (E) 將DNA片段縮短

解答:



# 實驗材料與步驟介紹

# 儀器設備

- ▶ 水平迷你瓊膠電泳系統
- ▶ 微波爐
- ▶ 桌上型離心機
- ▶ 水浴槽
- ▶ 照像系統
- ▶ Ethidium bromide 染劑容器
- ▶ 玻璃瓶
- ▶ 1.5 ml 離心管
- ▶ 微量吸管尖
- ▶ 塑膠平板
- ▶ 漂浮墊

# 藥品試劑

- 實驗一所製備的質體DNA
- 瓊膠( agarose )
- Ethidium bromide ( EtBr ; 10 mg/ml )
- Restriction enzymes : *Bgl* I , *Hind* III
- Restriction enzymes reaction buffer (10 x)
- purified BSA 1mg/ml (100x)
- DNA ladder (50ng/ml)
- DNA loading dye (6x)
- 無菌水
- TAE buffer (1M Tris, 15mM EDTA, 125mM sodium acetate, pH=7.8)
- 蠟紙( parafilm )
- 熱感應相紙
- RNase (10 mg/ml)

ethidium bromide use in DNA gels and running buffer.

## EZ Vision® DNA Dye

EZ-Vision® is a non-toxic, non-mutagenic DNA visualization dye that eliminates hazardous ethidium bromide use in DNA gels and running buffer.

- Fluorescent DNA dye supplied in convenient 6X loading buffer
- Non-mutagenic and non-toxic alternative for ethidium bromide
- Visualize DNA instantly with a standard UV transilluminator
- Requires no post-electrophoresis staining or destaining

## DNA loading dye (6x) 製備

- ▶ 0.25% bromophenol blue
- ▶ 0.25% xylene cyanol FF
- ▶ 30%甘油溶於水中

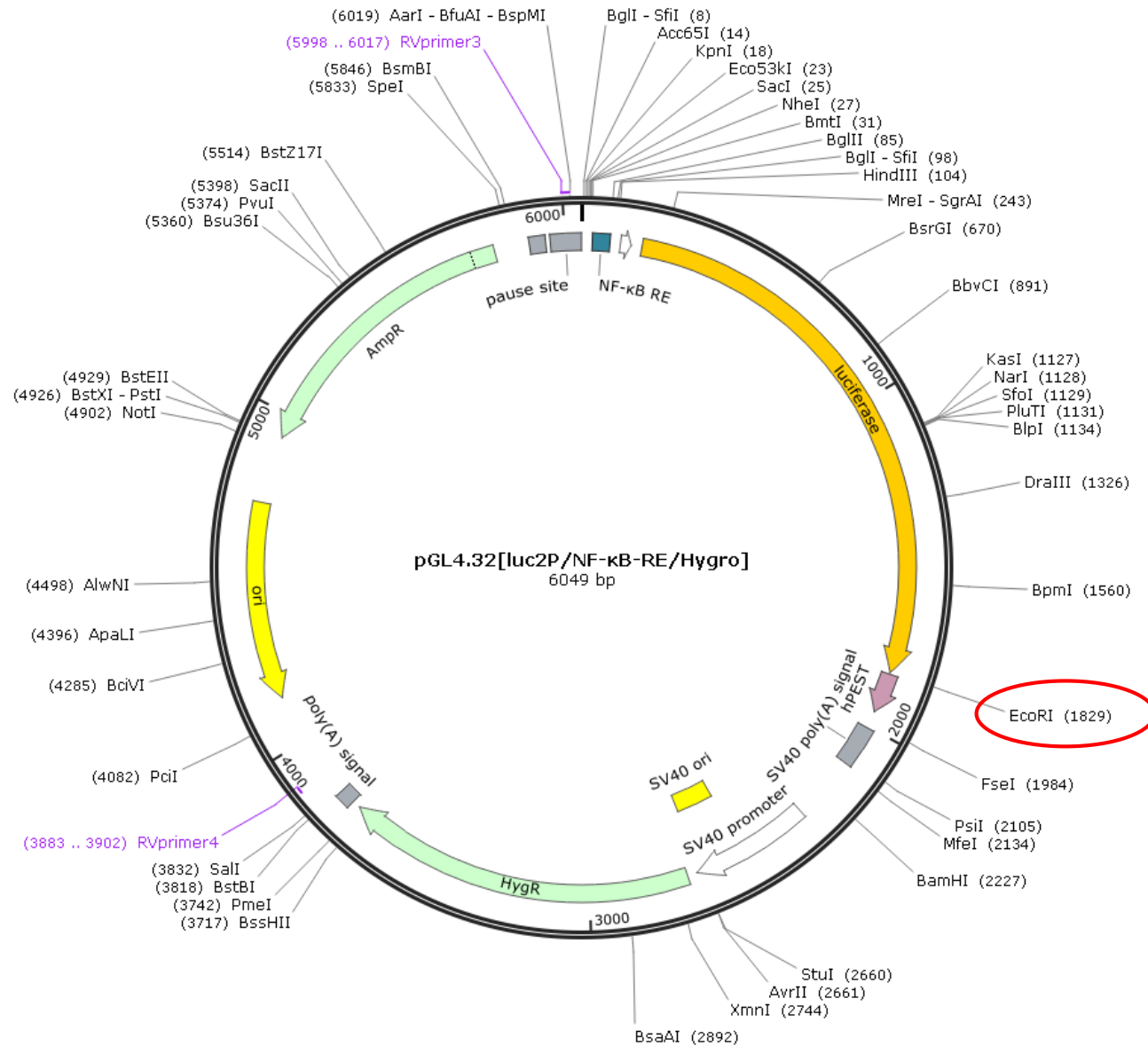
## ethidium bromide

## TAE 緩衝液 ( 25x ) 製備方法

將121g Tris base, 10.25g sodium acetate及18.6g EDTA溶於750ml蒸餾水中，再用冰醋酸調整至pH = 7.8，加水調整體積至1000ml。

# 質體示意圖及multiple cloning site限制酶切位

Created with SnapGene®



# 實驗步驟

10x EcoRI buffer	<u>2</u> $\mu\text{l}$
Double distilled water (DDW)	<u>7</u> $\mu\text{l}$
20U/ $\mu\text{l}$ EcoRI	<u>1</u> $\mu\text{l}$
DNA (你抽出來的)	<u>10</u> $\mu\text{l}$

---

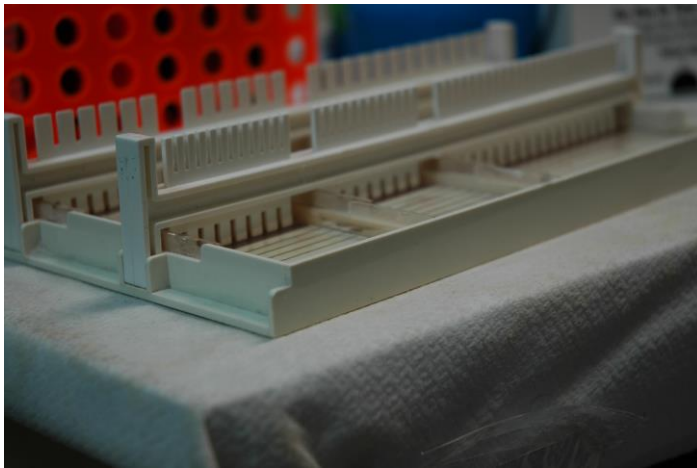
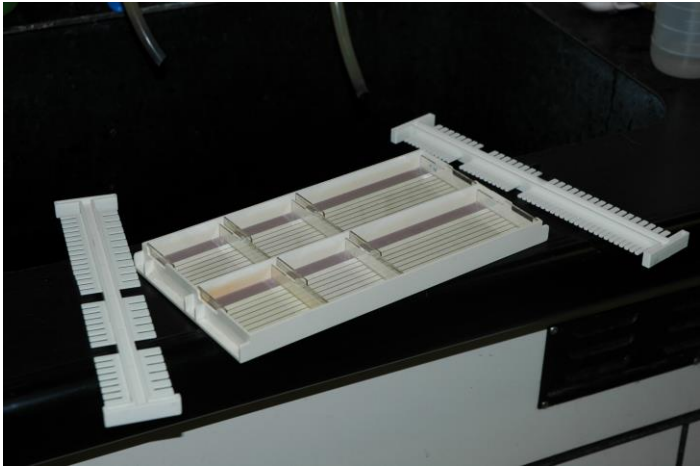
全部體積 20  $\mu\text{l}$

## (一) 限制酶切割DNA實驗

- 取欲切割的DNA(約0.5~1  $\mu\text{g}$ )，置入1.5ml離心管中。
- 計算切割DNA所需限制酶的量(參考廠商提供的相關資料)。一個限制酶的單位(1 unit)定義為在50  $\mu\text{l}$ 的反應體積中，作用60分鐘，可切割1 $\mu\text{g}$  DNA。
- 取適當的反應體積，使甘油含量小於5% (w/v)，並計算須加入多少10x緩衝液，使其反應混合物中的最終濃度達到1x。緩衝液的使用須參考廠商提供的說明(低、中、高鹽類之緩衝液)。
- 加入適量的蒸餾水達到最後的反應體積。(此次實驗反應體積請參閱P.16實驗結果2 ---限制酶切割DNA實驗)
- 在離心機高速離心5秒，以減少管壁少量液體的附著。
- 將反應物放入37°C水浴槽(或乾浴)作用20分鐘-1小時。(在此一小時的等待時間內，另外著手進行瓊膠的製備。)

## (二) 瓊膠的製備

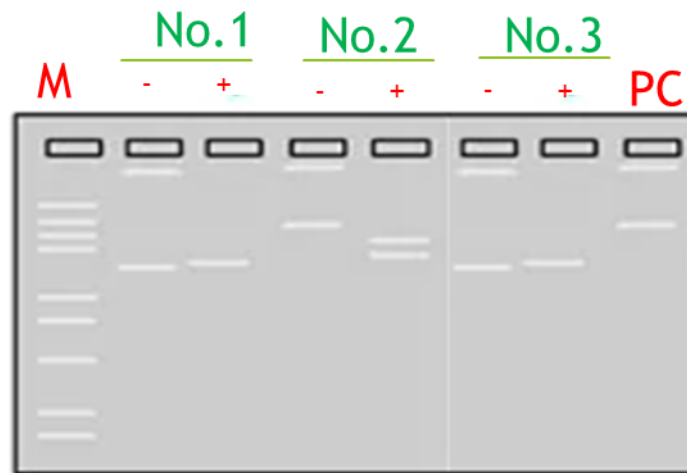
- 依照儀器說明將迷你膠體電泳組件組合起來。
- 將25x TAE緩衝液用蒸餾水稀釋成1x TAE。稱取0.375g agarose溶於25ml的1x TAE緩衝液中(製備成1.5%的瓊膠)，用微波爐加熱使溶解，待冷卻至45°C左右，將其倒入膠體製備槽中，厚度約7.5 mm，並立刻插入梳板(comb)。(應避免氣泡產生，並注意液面是否平整、厚度是否一致。)
- 在室溫下冷卻凝固約20分鐘，輕輕的將梳板移開，瓊膠的製備即完成。  
(製膠時可以事先加入利用安全核酸染料，照膠時就不需要額外再染)





### (三) 膠體電泳

- 將凝膠連同鑄膠皿置入電泳槽中，再倒入1x TAE緩衝液蓋過凝膠，達電泳槽內側的刻記處。
- 剪下一段蠟紙，吸取2 $\mu$ l的DNA loading dye (6x)於蠟紙上，再吸取10 $\mu$ l經限制酶消化的樣品與其混合，用微量吸管將混合液加到凝膠凹槽(well)中。事先與DNA loading dye 染好的DNA ladder (DNA marker) 注入凹槽中，以做為DNA樣品大小之判斷標準。
- 連接電源插頭，將開關開到 “ON”，設定電壓100 volt，電泳方向為負極往正極泳動。(DNA帶何種電荷?)
- 在此條件下進行電泳約23分鐘，直到bromophenol blue 染劑移動到距離凝膠底部約1.5公分處，即停止電泳，將開關切至” OFF”，拔除電源。
- 用塑膠平板取出凝膠，利用ethidium bromide或安全核酸染料染膠（若核酸與核酸染料事先混合則省略此步驟），置於照相系統的透射光源板上，開啟藍燈，於紫外光下觀察並拍照紀錄結果。



M: DNA ladder

-: 未經限制酶切樣品

+: 有經限制酶切樣品

PC: positive control

# 注意事項

- 電泳使用的電力為高壓電(⚡)，在通電後切勿碰觸電泳儀器。
- 用微量吸管將各成分加入1.5ml離心管時，每加入一種成分就須更換新的無菌吸管，以避免交叉污染。
- 進行限制酶切割DNA實驗時，限制酶應放在-20°C下，直到使用前才取出，而且要最後加入。

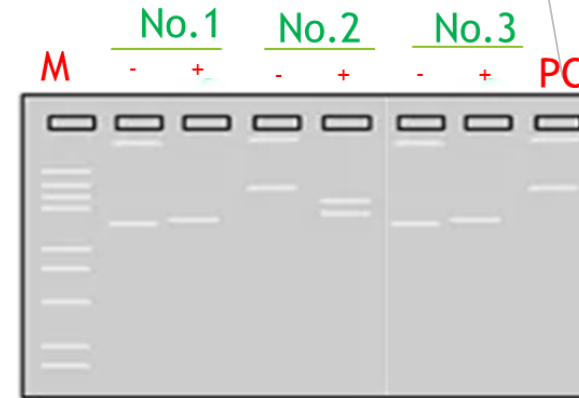
# 課後作業(實驗報告)

# 實驗報告格式

10x EcoRI buffer	<u>2</u> $\mu\text{l}$
Double distilled water (DDW)	<u>7</u> $\mu\text{l}$
20U/ $\mu\text{l}$ EcoRI	<u>1</u> $\mu\text{l}$
DNA (你抽出來的)	<u>10</u> $\mu\text{l}$

全部體積 20  $\mu\text{l}$

- ▶ **簡介**：介紹實驗目的。
- ▶ **方法和材料**：所用到的材料與實驗方法步驟。
- ▶ **結果**：電泳圖結果並標示說明DNA切完的大小
- ▶ **討論**：實驗中發生的情況、充分討論和解釋結果、你學到什麼、你的結果有沒有錯誤、可以改進實驗的任何內容...等。
- ▶ **引用資料**：所引用到的任何資料(網站、書籍、文獻)。



# 補充資料

# 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, pcr)

## 目的

本實驗的目的在使學習者熟悉PCR的基本原理及操作技術，如何自植物樣本中抽取DNA，並利用瓊膠電泳來分析PCR產物。

## 背景

### PCR原理

聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)是美國Cetus公司的K. B. Mullis於1984年所發明的一種在細胞外(*in vitro*)複製DNA的技術。此技術將一段特定的DNA，與DNA polymerase作用，在短時間內經denaturation – annealing – extension等步驟重複反應，使產物以 $2^n$ 的速率急速增加，即使原本只有picogram (pg,  $10^{-12}$ g)的DNA，快速增加至microgram ( $\mu$ g,  $10^{-6}$ g)。此技術不論在學術研究或生物科技之應用上均有劃時代之意義，因此Mullis於1993年榮獲諾貝爾化學獎。

PCR的原理，即是利用DNA聚合反應(DNA polymerization)，重複地進行DNA的合成。主要包括下列三個步驟：

### 1. DNA模板之變性(DNA template denaturation)

利用高溫(一般約 $94 \sim 95^\circ\text{C}$ )使雙股DNA變性，打開成單股DNA。

### 2. 引子的煉合(primers annealing)

降低溫度(一般約 $50 \sim 60^\circ\text{C}$ )使具有對DNA模板序列互補的引子與DNA模板煉合。此時單股DNA也可能再度結合成雙股。但由於引子的濃度遠超過DNA模板的濃度，所以單股DNA再度結合成雙股的機會不大。

### 3. 引子的延伸(primers extension)

將溫度升高至DNA聚合酶反應的適當條件(一般為 $72^\circ\text{C}$ )，使其以引子為開端，依據DNA模板序列，進行延伸作用，合成出互補股的DNA片段。

PCR反應不斷重複此三個步驟，產物得以幾何級數迅速地增加，顯著地提高實驗的靈敏度並降低工作的困難度，現已成為分析DNA的利器，並廣泛被應用在基礎分子生物、醫學診斷、刑事科學、考古學等方面。

# The Nobel Prize in Chemistry 1993

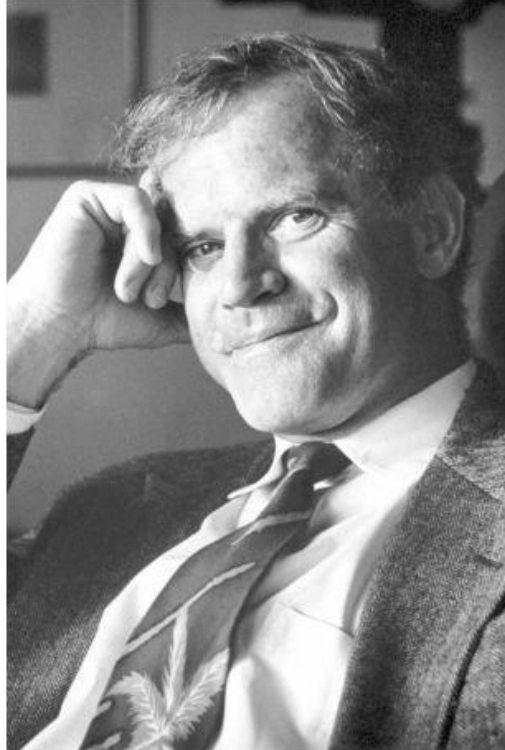


Photo from the Nobel Foundation archive.

**Kary B. Mullis**

Prize share: 1/2



Photo from the Nobel Foundation archive.

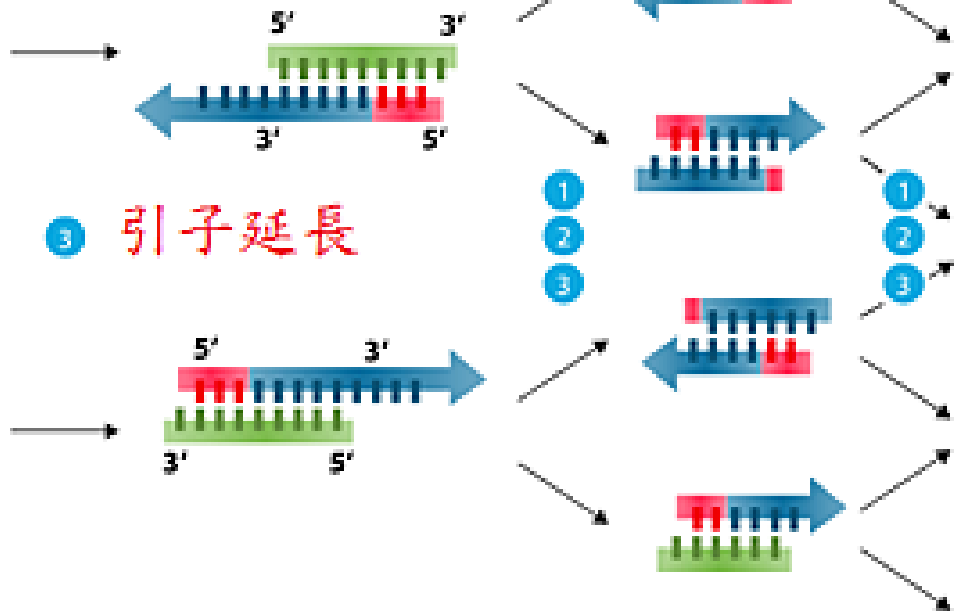
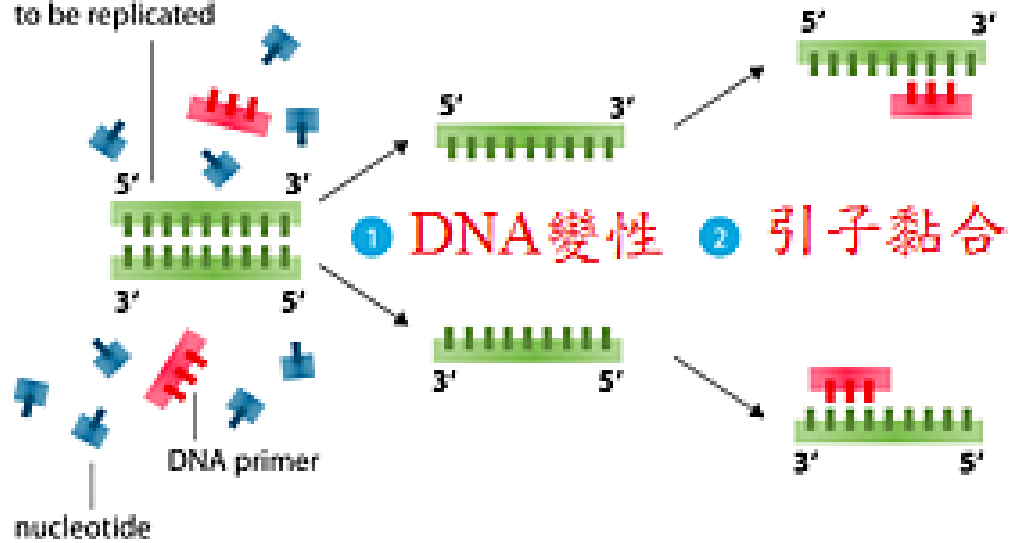
**Michael Smith**

Prize share: 1/2

Kary B. Mullis: for his invention of the **polymerase chain reaction (PCR) method**.

Michael Smith: for his fundamental contributions to the **establishment of oligonucleotide-based, site-directed mutagenesis and its development for protein studies**.

original DNA  
to be replicated



- 1 Denaturation at 94-96°C
- 2 Annealing at ~68°C
- 3 Elongation at ca. 72°C

<https://upload.wikimedia.org>



## 材料與設備

### 儀器設備

DNA 溫度循環機

PCR反應試管(0.2 ml)

微量吸管 (P20、P200 pipetman，可吸取20  $\mu$ l、200  $\mu$ l)

無蓋的離心管(1.5 ml)

微量吸管尖

桌上型離心機

震盪器(vortex)

### 材料

模板DNA

引子

*Taq* DNA polymerase

*Taq* polymerase buffer (10x)

dNTP 混合液 (各dNTP的濃度為2.5 mM)

無菌去離子水

## 實驗步驟

1. 取一 0.2 ml PCR 反應試管，依下列用量加入反應物，完成後置入 DNA 溫度循環機中。**注意 *Taq polymerase* 要最後才加入**。並於加入所有反應物後，用手指輕敲試管使其混合均勻。可用無蓋的 1.5 ml 離心管托住 PCR 反應試管，置於離心機中離心數秒鐘，使反應物集中於底部。把 PCR 反應試管置入溫度循環機之前，**將試管立於碎冰上**。

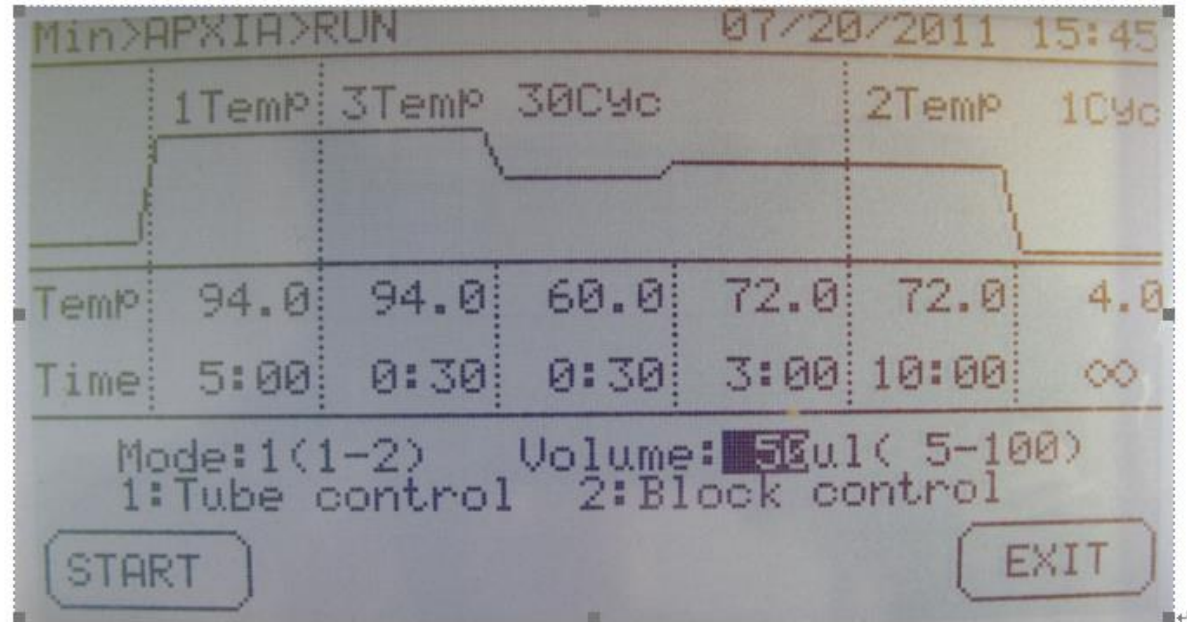
Template DNA	1 $\mu$ l
dNTP mix (2.5 mM)	4 $\mu$ l
forward primer (10 $\mu$ M)	4 $\mu$ l (1 $\mu$ l)
reverse primer (10 $\mu$ M)	4 $\mu$ l (1 $\mu$ l)
<i>Taq polymerase</i> buffer (10 X)	5 $\mu$ l
<i>Taq polymerase</i>	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	31 $\mu$ l (37 $\mu$ l)
total	50 $\mu$ l

2. 設定溫度循環機(圖二)的程式(圖三)如下：



圖二 PCR 溫度循環機

94°C	5 min (3 min)	} 25 ~ 30 cycles (20 cycles)
94°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	3 min (1 min)	
72°C	10 min (5 min)	
4°C	∞	



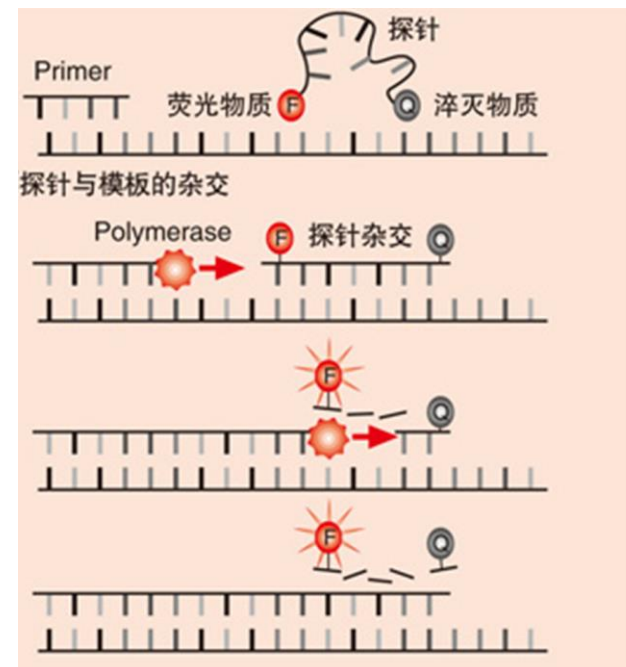
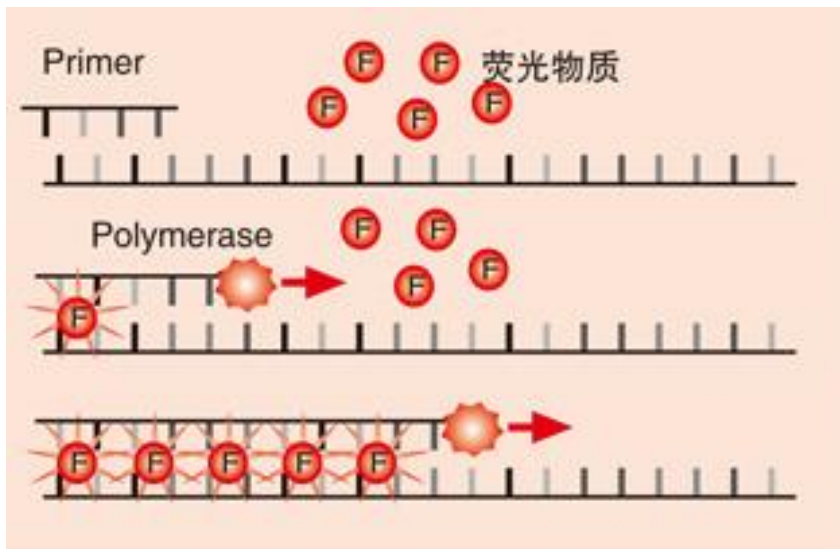
圖三 PCR 程式設定

- 設定完成後，按下 START 鍵，即可進行反應。反應約需 2~3 小時。
- 反應完畢，取出樣品進行電泳分析。

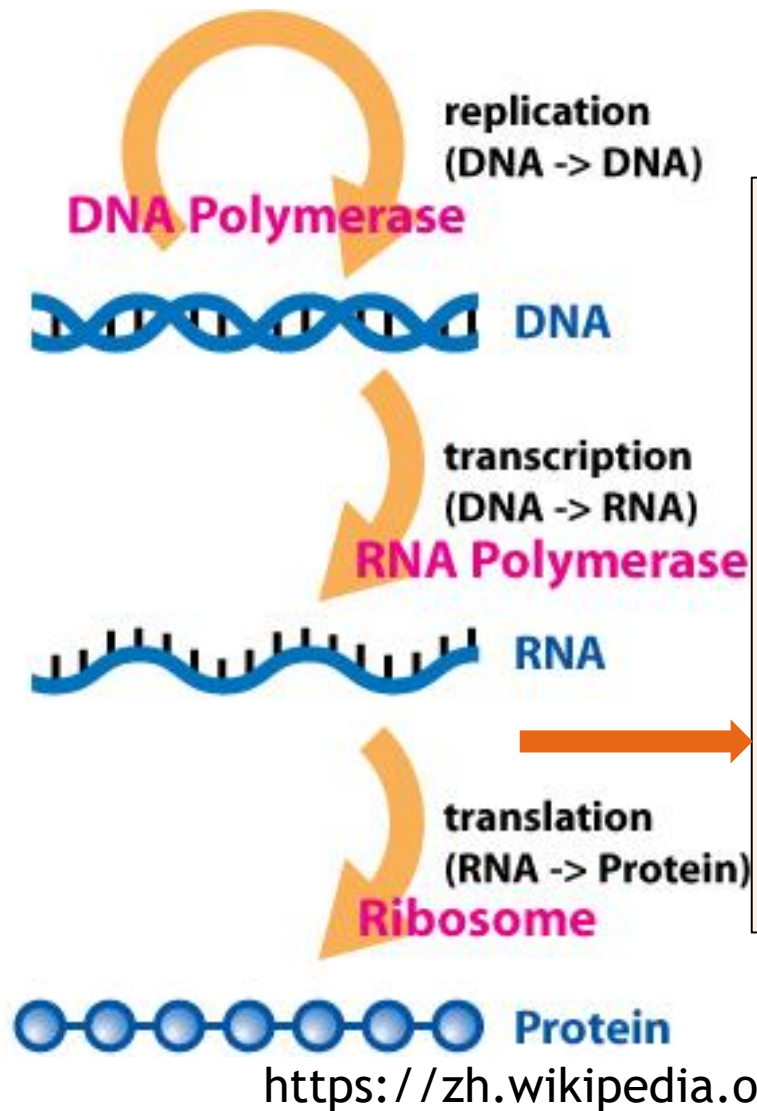
# Q-PCR 原理



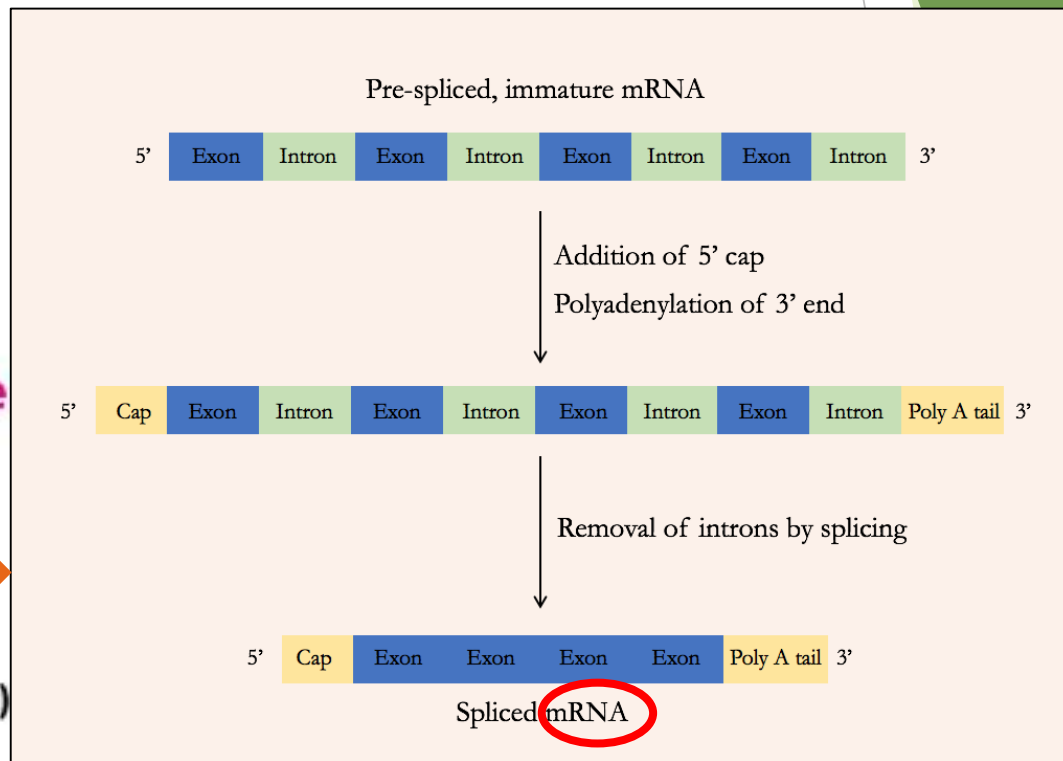
- ▶ 這是一種基於聚合酶鏈反應(pcr) 的技術。
- ▶ 將反應放入機器中，該機器使用相機或檢測器實時監測觀察並螢光反應檢。
- ▶ 檢測分子產生的螢光，隨著反應的進行，該分子增加。
- ▶ 可以定量相對少量的PCR產物。



# 中心法則

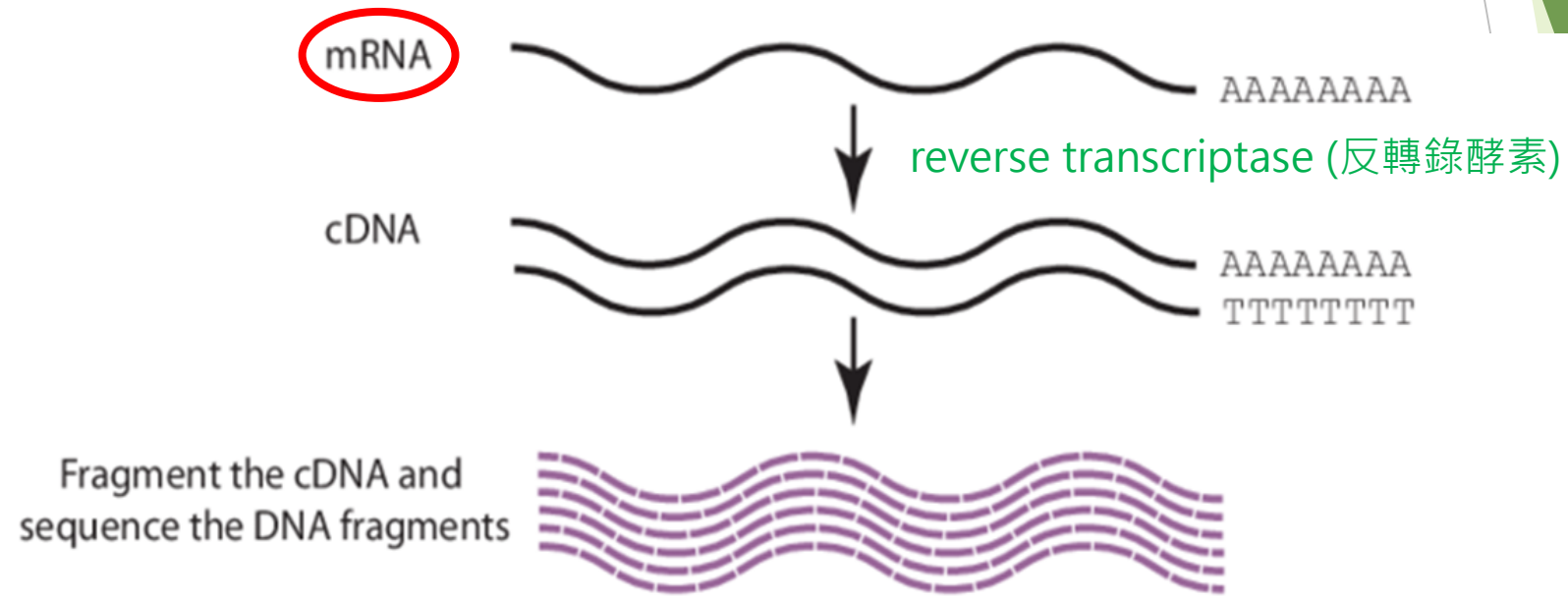


## 成熟RNA修飾

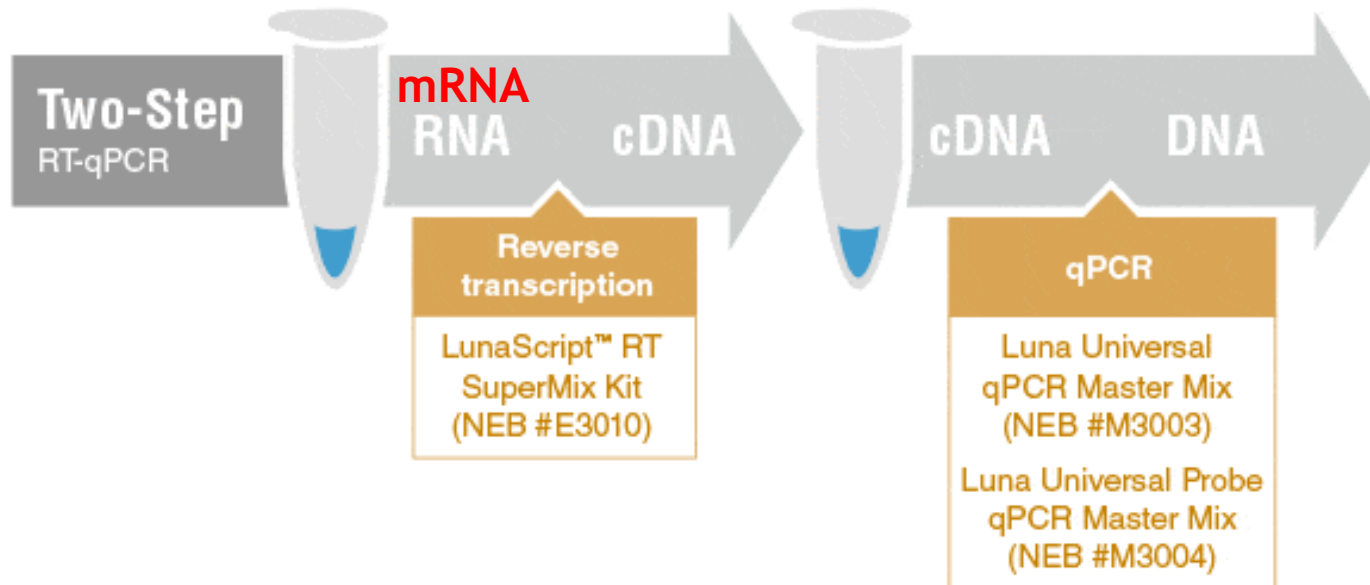
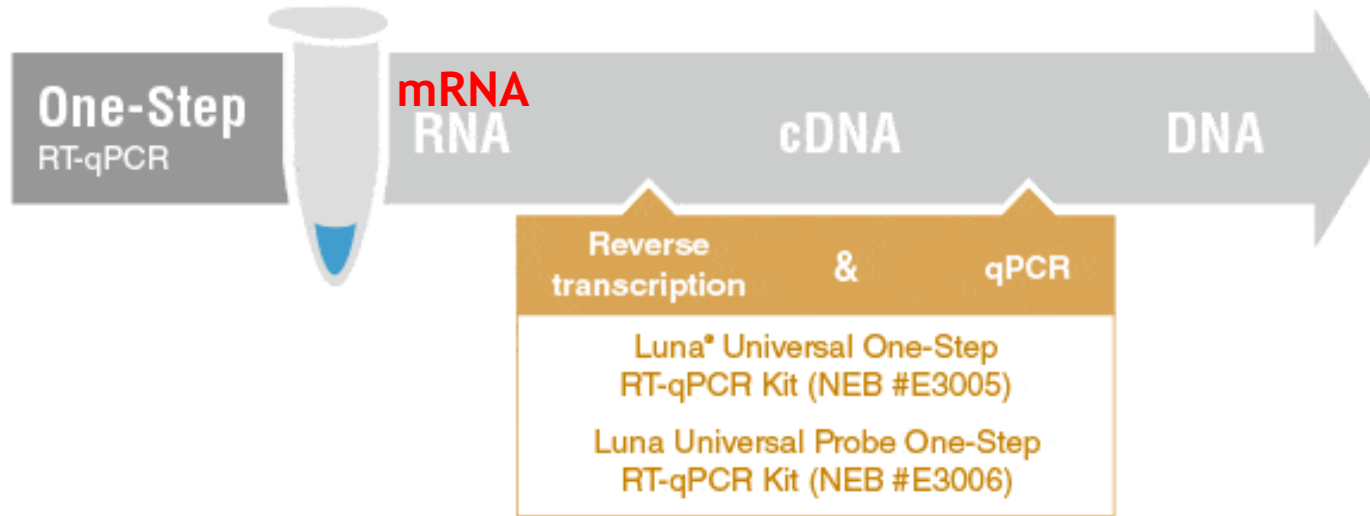


<https://commons.wikimedia.org/>

## 信使RNA (mRNA) 反轉錄成為互補 DNA (cDNA) 的流程



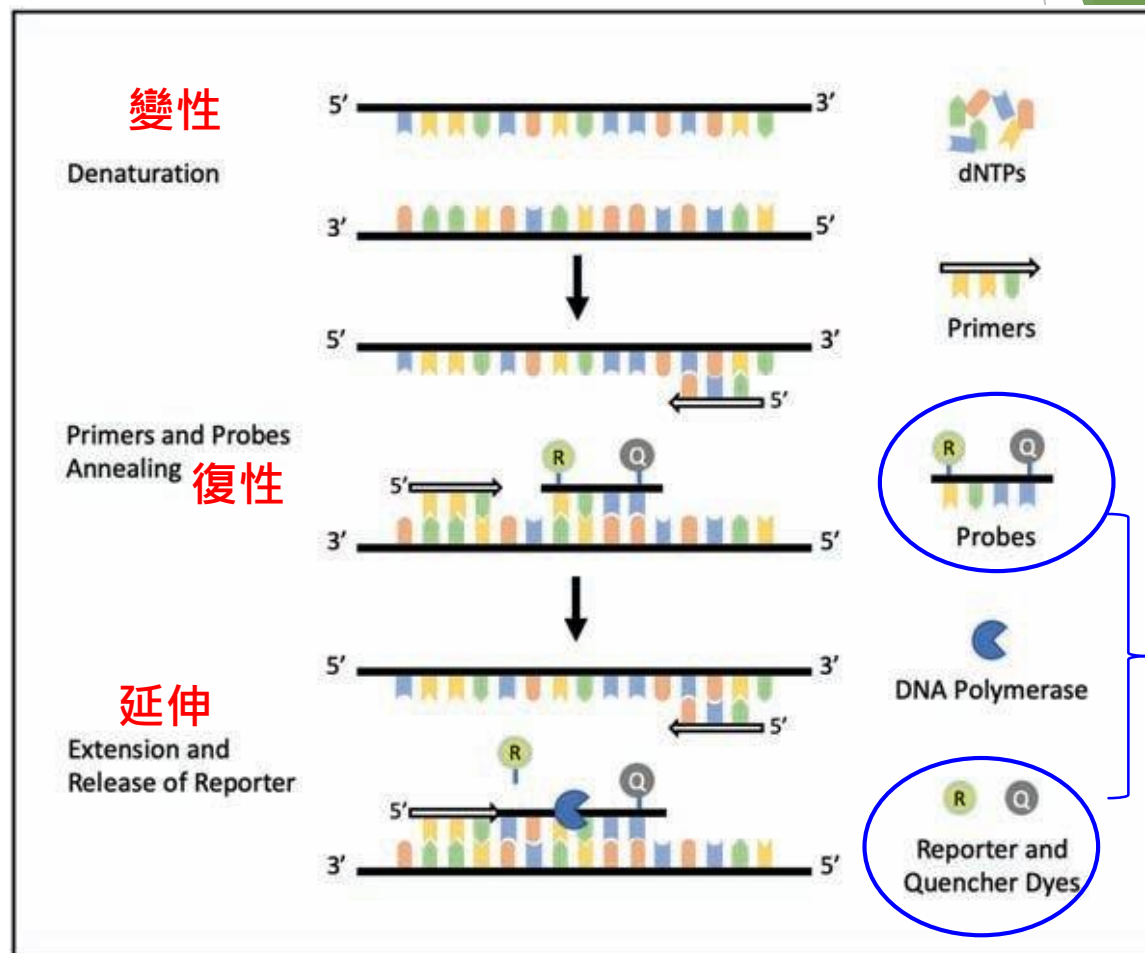
# Q-PCR步驟



**a. 變性**-高溫用於將雙鏈DNA「熔化」成單鏈，並鬆動單鏈DNA中的二級結構。通常使用DNA聚合酶可以承受的最高溫度（通常為95°C）。如果範本GC含量高，可以增加變性時間。

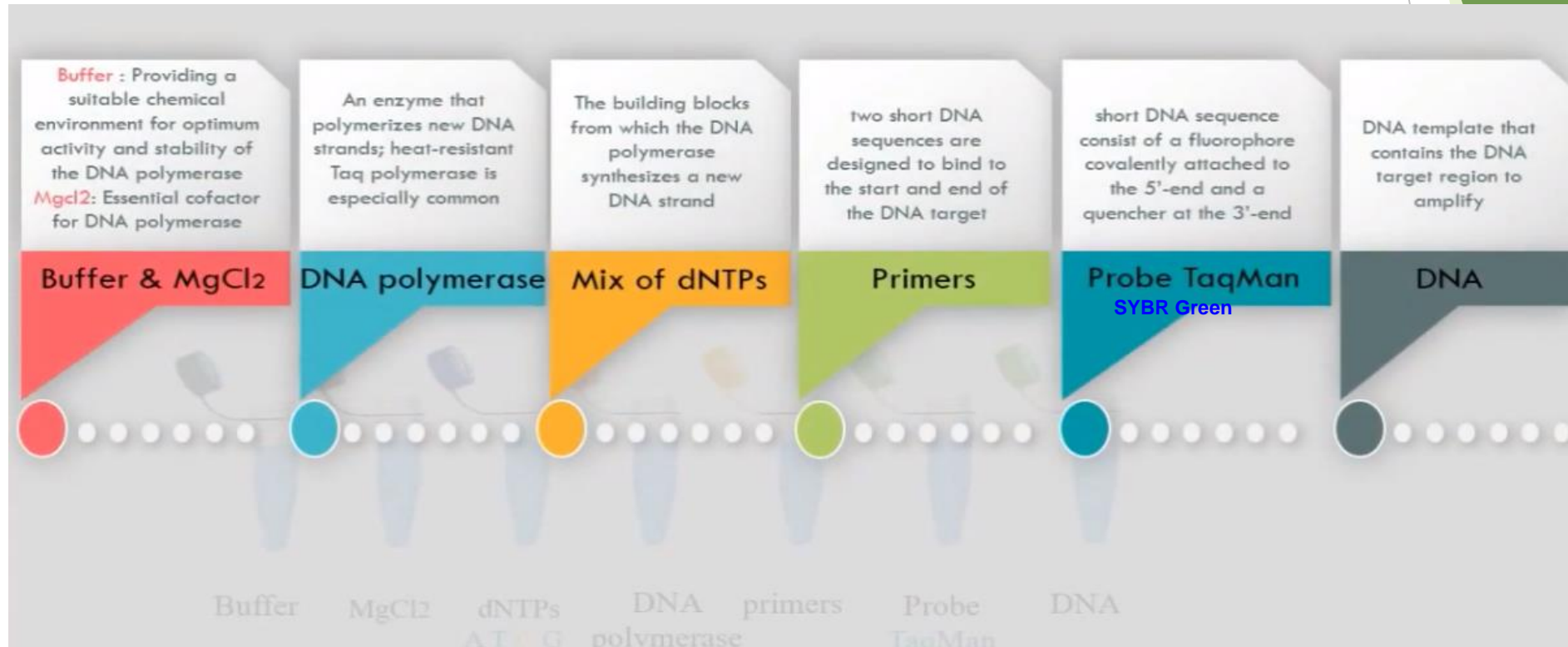
**b. 復性**-在復性過程中，互補序列有機會雜交，因此使用基於引物的計算熔融溫度（ $T_m$ ）的適當溫度（低於引物 $T_m$ 的5°C）。

**c. 延伸**-在70-72°C時，DNA聚合酶的活性是最佳的，引物延伸以高達每秒100個鹼基的速率發生。當即時熒光定量PCR中的擴增子很小時，該步驟通常與使用60°C作為溫度的復性步驟相結合。





# Q-PCR反應混合物

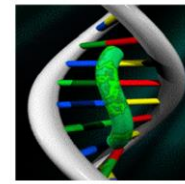


## TaqMan Probe(探針)& SYBR Green(染料)

- ▶ 每個q-PCR 都包含一個螢光分子（例如 TaqMan® 探針或 SYBR® Green染料），用於監測 PCR 產物的積累。
- ▶ 隨著標靶基因擴增數量的增加，螢光團發出的螢光量也隨之增加。
- ▶ 為使用q-PCR 進行基因表達研究而開發的兩種類型的化學物質是：

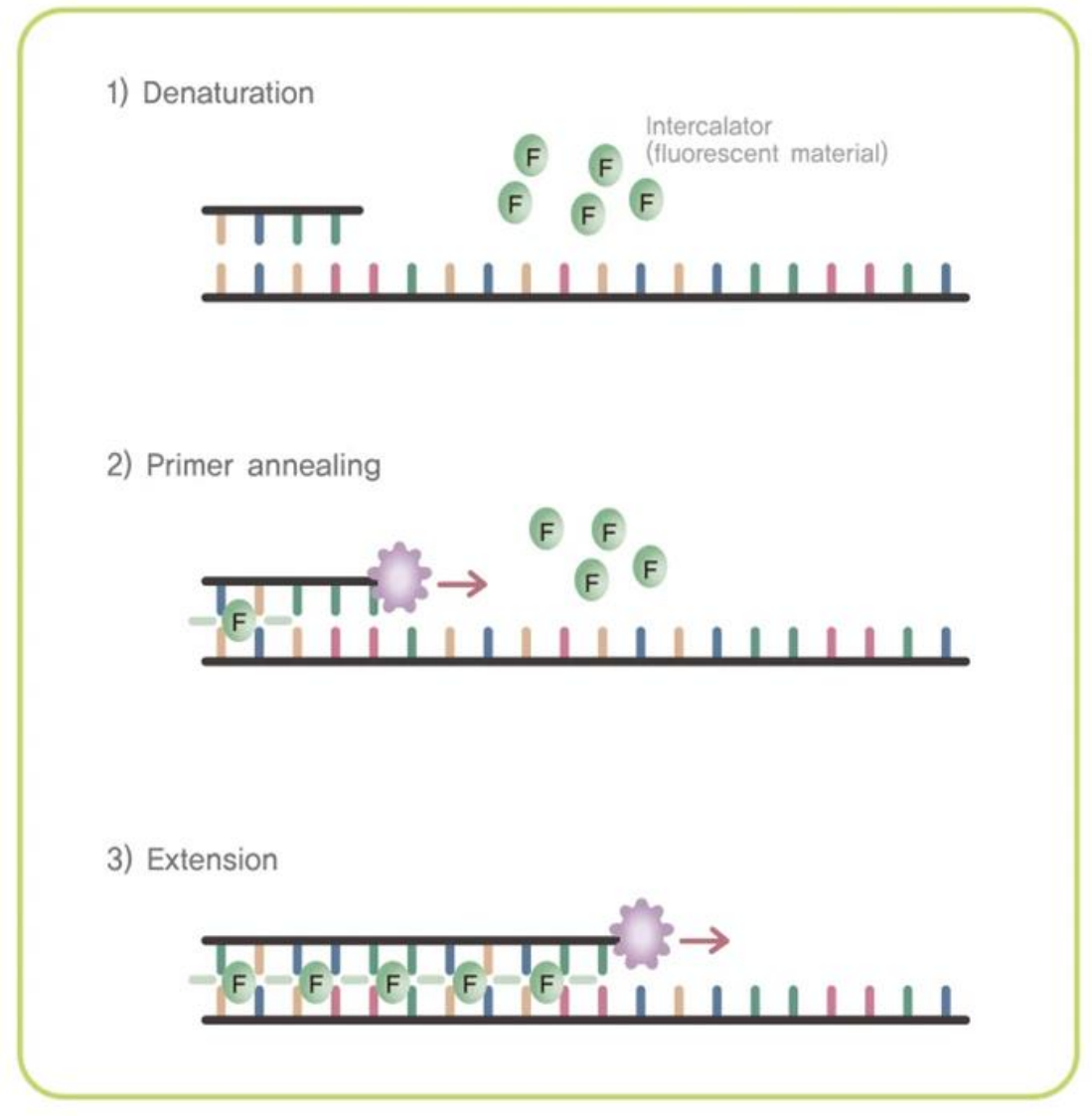
**(1) SYBR Green 染料**

**(2) TaqMan Probe 探針**

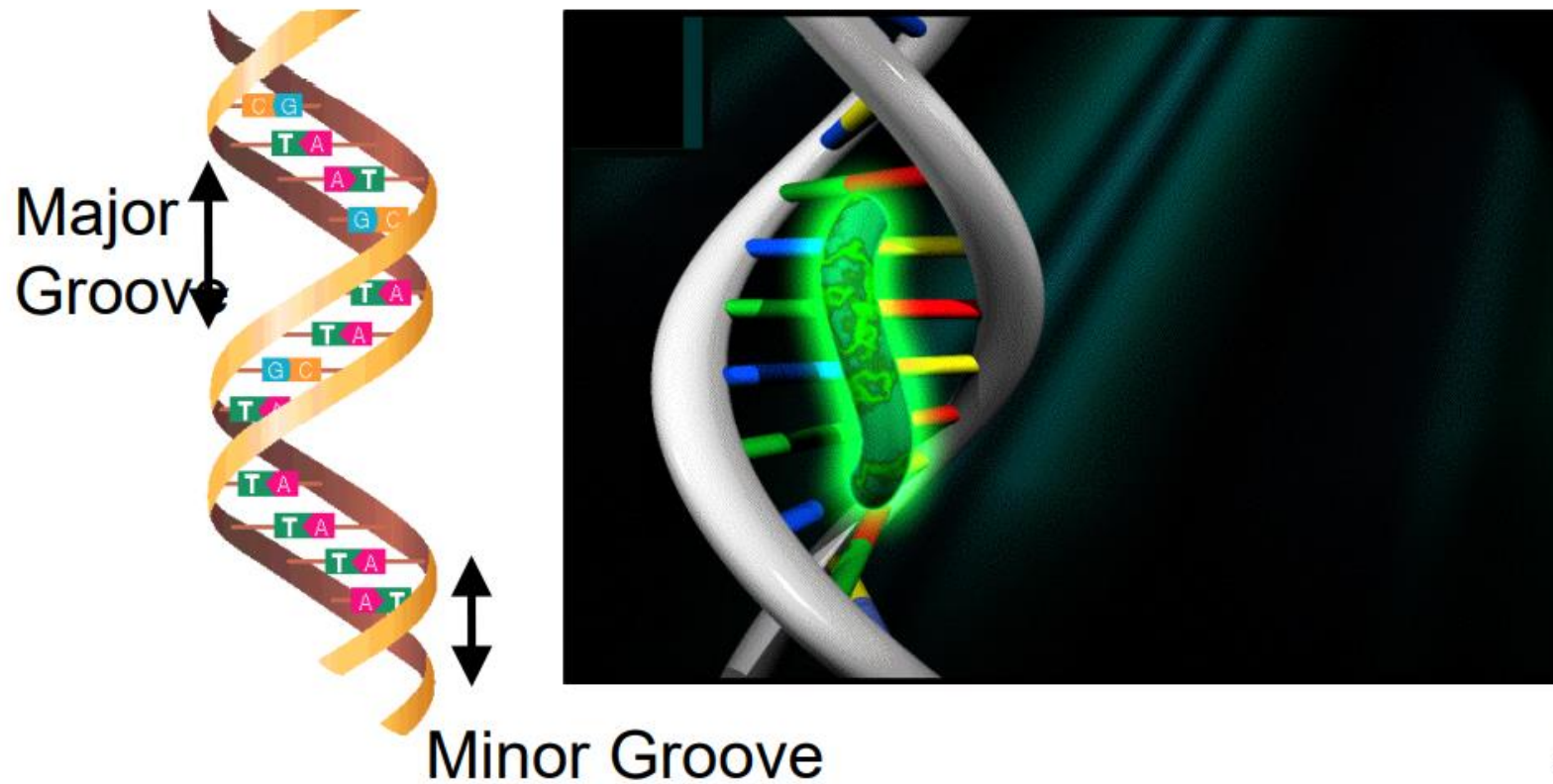


## (1) SYBR Green 染料

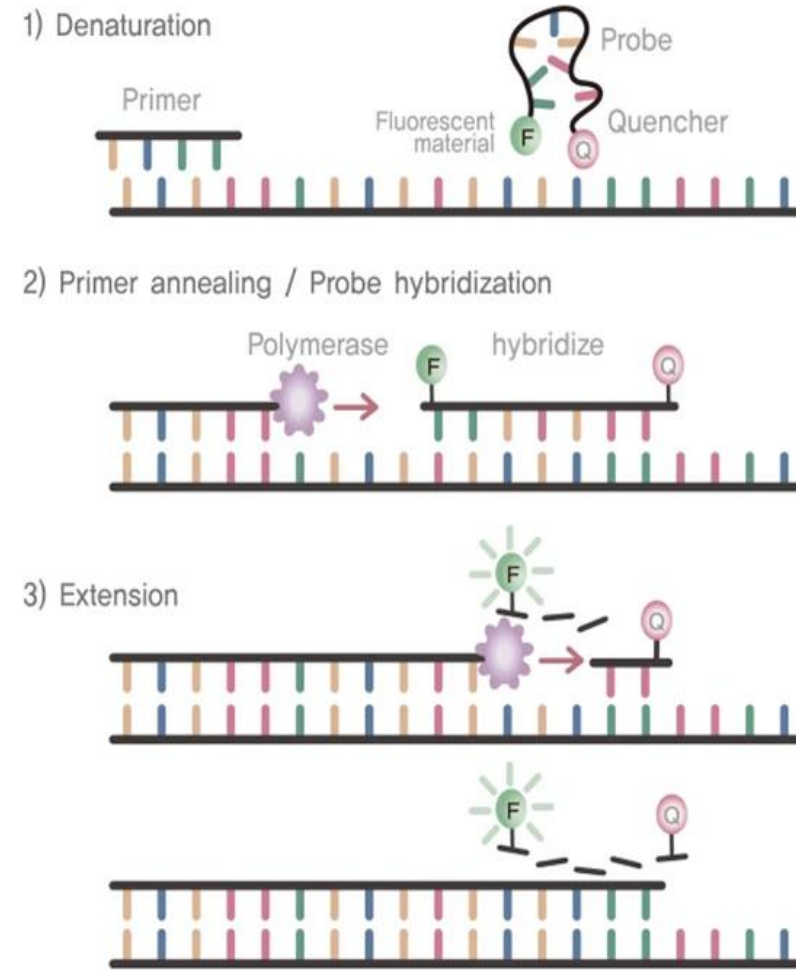
- ▶ 這是一種染料，當它在DNA的微小凹槽處**非特異性結合**時，會發出突出的螢光信號。
- ▶ 也可以使用其他螢光染料，如**溴化乙錠(EtBr)**或**吡啶橙(Acridine Orange)**，但**SYBR Green**更適合用於其**更高**的信號強度。
- ▶ SYBR Green比TaqMan Probe更受歡迎，因為它可以提供有關每個擴增周期的資訊以及有關TaqMan Probe無法獲得的**融化溫度**的資訊。
- ▶ 然而，與TaqMan Probe相比，其缺點是**缺乏特異性**。



- A 'minor groove'-binding molecule specific to the minor groove of double-stranded DNA
- Fluoresces at an increased intensity when bound

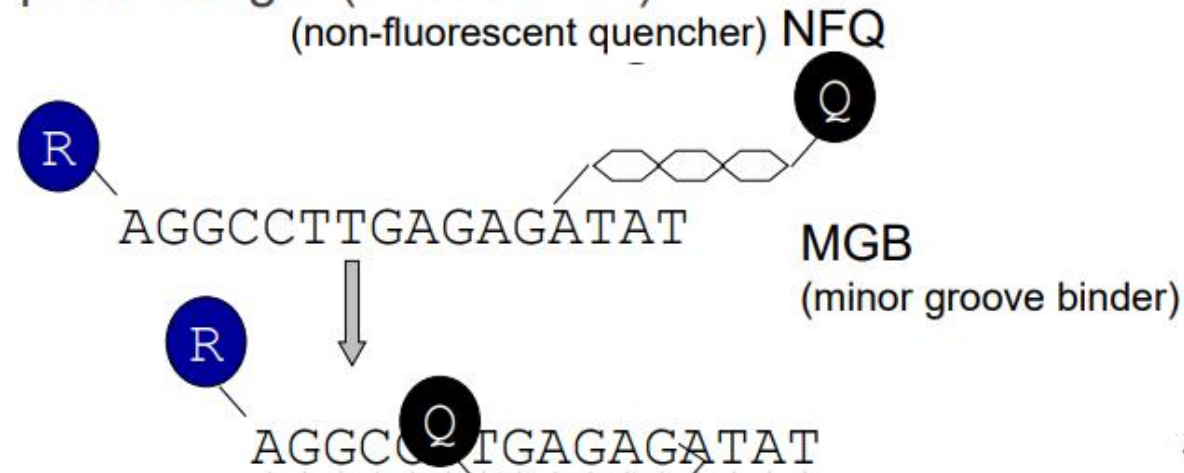


- ▶ 它是一種水解探針，帶有染料，通常在其5端有螢光素 (FAM)，並且在寡核苷酸的3端附著一個淬滅劑 (non-fluorescent quencher)。
- ▶ 在正常情況下，探針保持盤繞在自身上，使螢光染料靠近淬滅劑，從而抑制或淬滅染料的螢光信號。
- ▶ 當聚合酶在延伸階段開始合成新的DNA鏈時，它通過5'末端核酸酶活性導致探針降解，螢光素與淬滅劑分離，從而產生螢光信號。
- ▶ 隨著該過程的繼續，在每個迴圈中，信號分子的數量增加，導致螢光的增加，這與靶標的擴增呈正相關。



# TaqMan® Probe: TaqMan® MGB/NFQ Probes

- Minor Groove Binder (MGB)
  - Small molecule that fits snugly into minor groove of duplex DNA
  - Stabilizes probe annealing
- Non-fluorescent Quencher (NFQ)
  - “Dark” quencher acts as energy transfer acceptor that doesn’t emit a detectable fluorescent signal
  - MGB probe design uses a special algorithm in Primer Express® Software
- Shorter probe length (13-25-mers)



life  
technolog

ThermoFisher  
SCIENTIFIC

GCTACACAGTCCGGA ACTCTCTATAGCATCACAC



<https://www.youtube.com/watch?v=ob3teCrgpxY>

## TaqMan<sup>®</sup> Probe



### Specificity

- Highly specific
- Probe Hybridization

### Sensitivity

- Very High

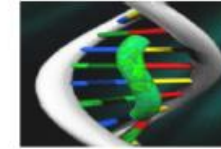
### Flexibility

- Multiplex PCR
- SNP detection
- +/- application

### Optimization

- Ready to use 20x primer/probe mix - no need to optimize
- Gold standard for MAQC
- PCR efficiency 100% ±10%

## SYBR<sup>®</sup> Green 1 Dye



- Less specific

- Very High

- No Probe is required
- Screening tool

- Need to optimize PCR program
- Need to check primer-dimer info
- Need to check PCR efficiency