**实验四 酶切**

**一、实验目的**

学习利用限制性内切酶切割DNA的方法，为下一步的连接作准备

**二、实验原理**

目前已发现三类不同的限制性内切酶即I型、II型和III型。其中II型能专一识别碱基顺序，并在该处切断双链DNA，因而在基因工程中得到广泛应用。DNA经限制性内切酶作用产生两种断裂状态：粘性末端或平末端。

酶切反应需Mg2+及其它一些辅助离子和一定的盐离子浓度，不同内切酶对盐离子有不同的要求，如盐离子浓度使用不当或甘油含量过高(>5%)，会使酶的识别位点发生改变，产生星活性(star activity)。绝大多数酶的反应温度37℃，也有个别要求在50 ~ 65℃。

**三、实验材料及仪器用具**

1. 实验材料

PCR产物，包括gfp基因、hhl1基因、光敏启动子；质粒DNA

2. 实验试剂

限制酶（*EcoRI, XbaI, SpeI, PstI, HindIII*）待定，根据质粒和PCR决定

3. 实验仪器

恒温培养箱、移液枪、EP管

**四、实验步骤**

1. 酶切：

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 加样量 |
| DNA | 4-5 µg |
| 10×缓冲液 | 10 µl |
| 限制酶 | 40 U |
| 加ddH2O至总体积 | 100 µl |

混匀，37℃保温1.5 ~ 3小时，电泳前在4℃保存。

2. 酶切产物检测

取酶切产物3-10 µl进行电泳检测

**五、注意事项**

1. 用紫外分光光度法测DNA含量时，对纯度不高的DNA测定结果往往不准确(偏高)，且测定所用DNA量较多。用琼脂糖凝胶法电泳(与已知浓度的DNA标准系列对照)定量更为可靠。

2. 酶切的DNA应具备一定的纯度，其中不能含迹量的酚、氯仿、SDS等。

3. 反应总体积中甘油的浓度要小于5％，即内切酶的体积应小于10%反应总体积(购来的酶含50％甘油)。

4. 内切酶从-20℃冰箱取出后，应放入冰浴中，在其它试剂加完后最后加。

5. 每次取酶必须使用新的灭菌吸管头，1个吸管头不能反复使用，更不能交叉使用。

6. 注意混匀，可用用手指轻弹管壁，使酶切体系所有成分混匀，然后短暂离心，使管壁液滴沉入管底。