



第二章 基因工程工具酶和载体

湖南师范大学生命科学学院
袁婁洲



本章目录

- 2.1 工具酶
- 2.2 克隆载体
- 2.3 表达载体



第一节 工具酶

- 限制性核酸内切酶
- DNA连接酶
- DNA聚合酶
- 碱性磷酸酶
- 末端转移酶
- 其他工具酶



一、限制性核酸内切酶

识别双链DNA分子中的特定序列，并切割DNA双链

- 1968年，Smith等人首先从流感嗜血杆菌d株中分离出Hind II和Hind III

主要存在于原核细菌中，细菌的限制与修饰作用，帮助细菌限制外来DNA的入侵



限制性核酸内切酶的命名

属名

种名

株名

Hind III

Haemophilus influenzae d 嗜血流感杆菌d株

名 称	属名(大写)	种名(小写)	株 名	序 数	来 源 菌 株
<i>EcoR I</i>	E	co	R	I	<i>Escherichia coli</i> R 株
<i>Hind III</i>	H	in	d	III	<i>Haemophilus influenzae</i> d 株
<i>Hind II</i>	H	in	d	II	<i>Haemophilus influenzae</i> d 株
<i>Hpa I</i>	H	pa	/	I	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>



限制性核酸内切酶的分类

特性	I型	II型	III型
限制和修饰活性	双功能的酶	核酸内切酶和甲基化酶分开	双功能的酶
酶蛋白分子组成	3种不同的亚基	单一亚基	两种不同的亚基
限制作用所需的辅助因子	ATP、 Mg^{2+}	Mg^{2+}	ATP、 Mg^{2+}
特异性识别位点	非对称序列	回文对称结构	非对称序列
切割位点	在距识别位点至少1000bp的地方随机的切割	位于识别位点上	距识别位点下游24~26bp处
序列特异的切割	不是	是	是
在基因工程中的应用	无用	广泛使用	用处不大



II 型限制性核酸内切酶的基本特性

- ① 识别双链DNA分子中4 - 8对碱基的特定序列
- ② 识别切割序列呈典型的旋转对称型回文结构
- ③ 大部分酶的切割位点在识别序列内部或两侧



回文诗及回文对联

- 湖北咸丰县有一首《万柳堤即景》回文诗：

春城一色柳垂新， 色柳垂新自爱人。

人爱自新垂柳色， 新垂柳色一城春。

- 回文对联

雨滋春树碧连天； 天连碧树春滋雨。

- 回文绝句

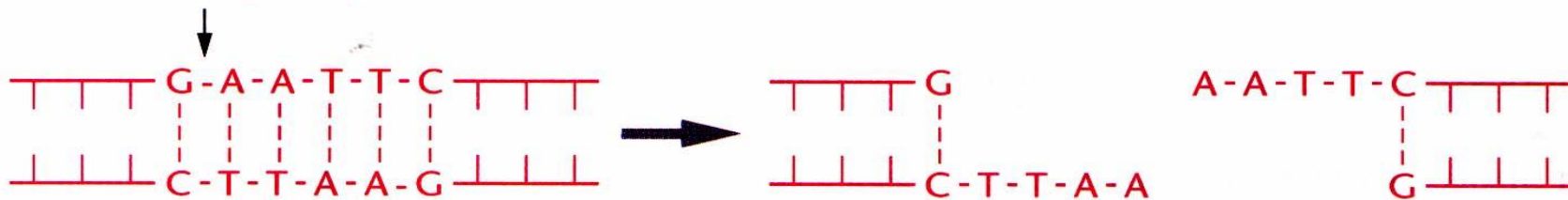
明德昭远道， 远道化德明；

明德化道远， 道远昭德明

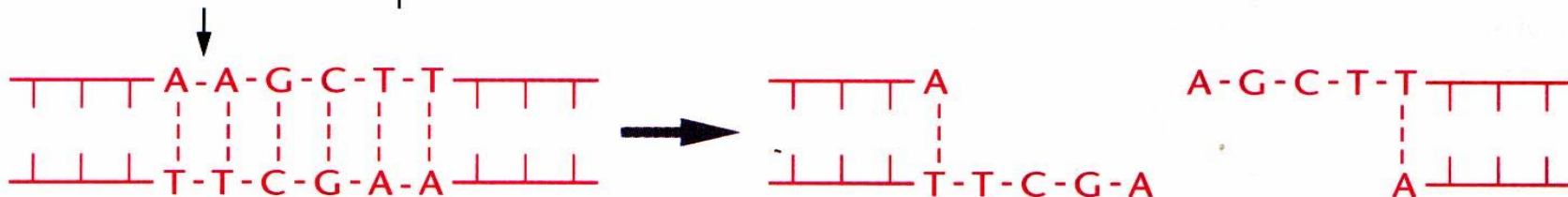
Enzyme

Recognition, cleavage sequence

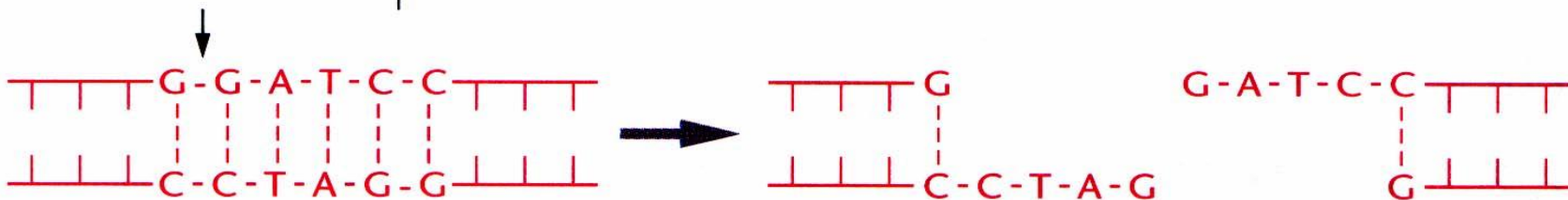
EcoRI



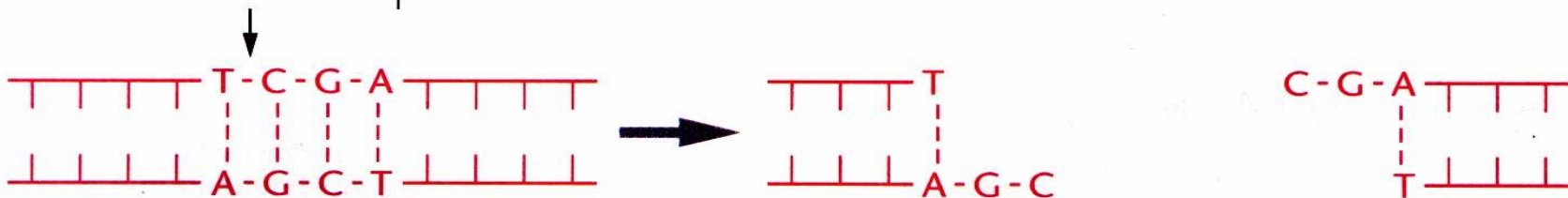
HindIII



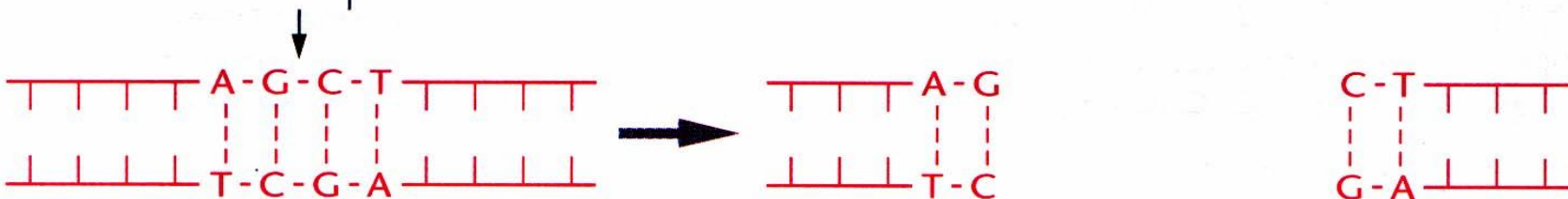
BamHI



TaqI

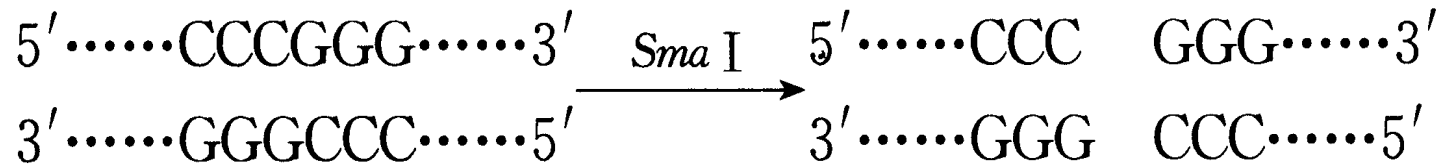
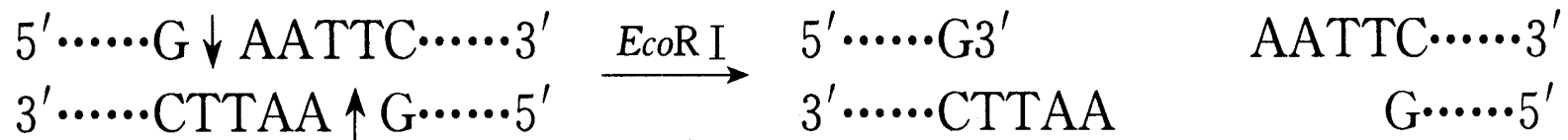
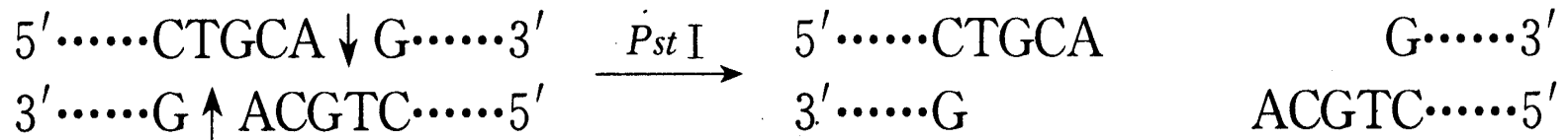


AluI





*Pst*I等产生3' 粘性末端, *Eco*RI等产生5' 粘性末端
*Sma*I等产生平头末端



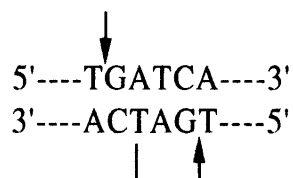


同位酶、同尾酶、同裂酶

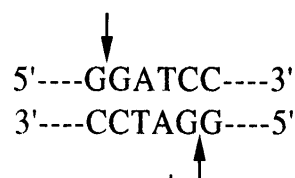
- **同位酶**，即识别相同的序列但切割位点不一样。如*Sma* I和*Xma* I，识别的序列相同，都为CCCGGG，而切割位置不同，*Sma* I为错切C↓CCGGG，而*Xma* I为平切CCC↓GGG。
-
- **同尾酶**，即识别位点不同但切出的DNA片段具有相同的末端序列。如*Mbo* I/ *Bgl* II/*Bcl* I/*Bam*H I，它们的识别位点分别为GATC/AGATCT/TGATCA/GGATCC，但切出相同的DNA末端5' ...GATC...3' 和5' ...CTAG...3'。
- **同裂酶**，即识别位点和切割位点均相同的酶。如*Bam*H I/*Bst* I，识别序列和切割位点都相同：G↓GATTC。

同尾酶的应用

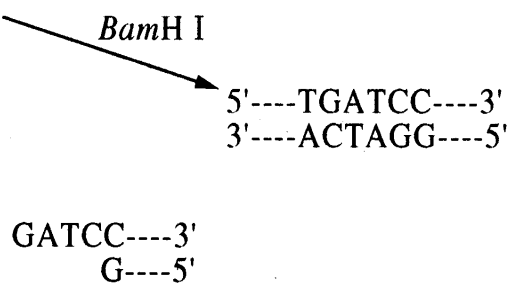
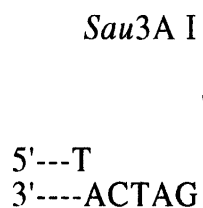
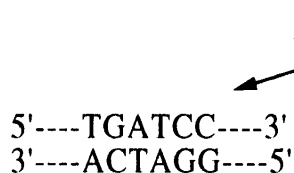
Bcl I 识别序列及切割位点



*Bam*H I 识别序列及切割位点



杂交位点





影响限制性核酸内切酶活性的因素

- 1) **温度**：大部分限制性核酸内切酶最适反应温度为 37°C ，但也有例外，如 *Sma* I 的反应温度为 25°C 。降低最适反应温度，会导致只产生切口，而不是切断双链DNA。
- 2) **盐离子浓度**：不同的限制性核酸内切酶对盐离子强度 (Na^+) 有不同的要求，一般按离子强度不同分为低 (0mmol/L)、中 (50mmol/L)、高盐 (100mmol/L) 三类。 Mg^{2+} 也是限制性核酸内切酶酶切反应所需的。双酶切或多酶切时，一般先用低盐浓度的酶切，再用高盐浓度的酶切。
- 3) **缓冲体系**：限制性核酸内切酶要求有稳定的pH环境，这通常由 $\text{Tris}\cdot\text{HCl}$ 缓冲体系来完成。另外保持限制性核酸内切酶稳定和活性一般使用DTT。



影响限制性核酸内切酶活性的因素

- 4) **反应体积和甘油浓度**：商品化的限制性核酸内切酶均加50%甘油作为保护剂，一般在-20℃下贮藏。在进行酶切反应时，加酶的体积一般不超过总反应的10%，若加酶的体积太大，甘油浓度过高，则会影响酶切反应。
- 5) **限制性核酸内切酶反应的时间**：通常为1h，但大多数酶活性可维持很长的时间，进行大量DNA酶解反应时，一般让酶解过夜。
- 6) **DNA的纯度和结构**：一个酶单位定义为在1h内完全酶解1 μg λ 噬菌体DNA所需的酶量。DNA样品中所含蛋白质、有机溶剂及RNA等杂质均会影响酶切反应的速度和酶切的完全程度，酶切的底物一般是双链DNA，DNA的甲基化位置会影响酶切反应。

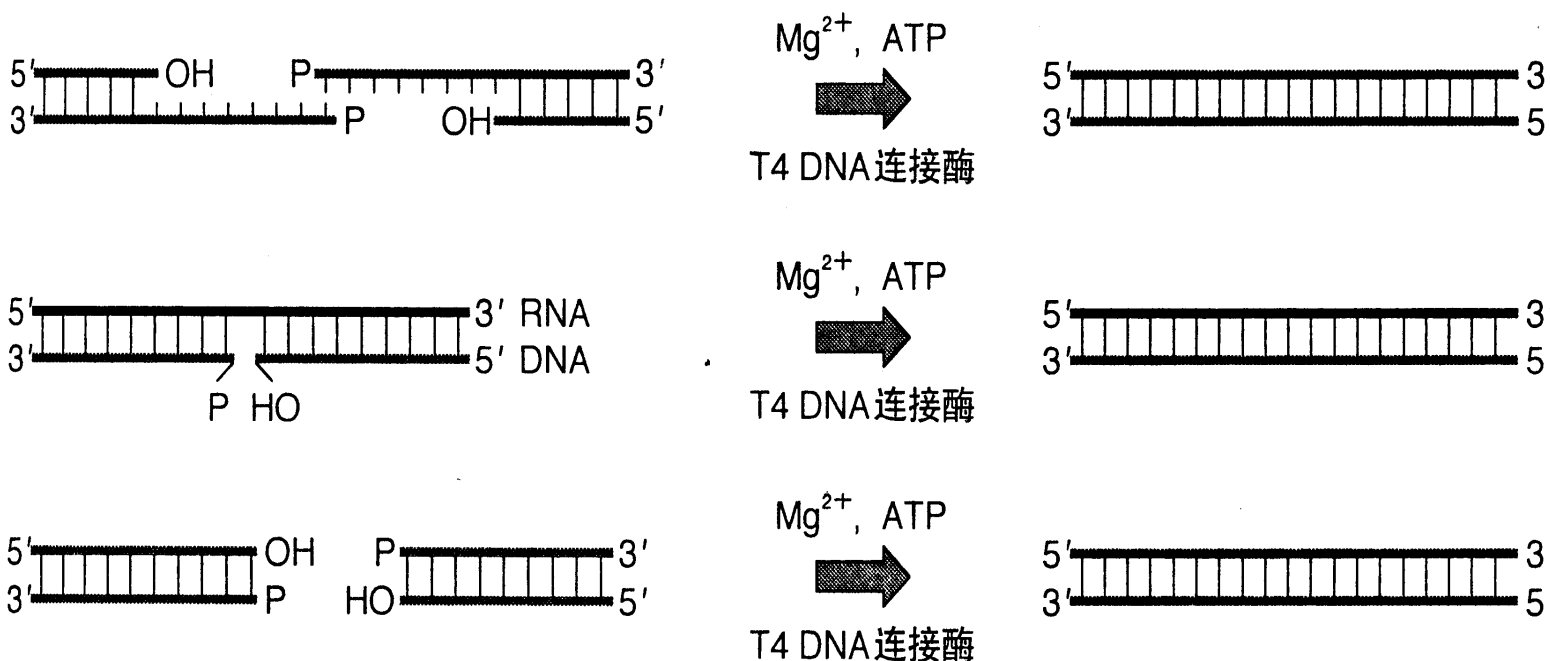
限制性核酸内切酶的多酶联合酶解

对盐浓度要求不同的酶，可采取下列方法：

- 使用较贵的酶的盐浓度，加大便宜酶的用量，同时酶解
- 低盐酶先切，然后补加盐，高盐酶再切
- 一种酶先切，然后更换缓冲液，另一种酶再切

二、DNA连接酶

- 作用：负责双链DNA中相邻3'-OH与5'-磷酸基团之间的磷酸二酯键的形成。



平头双链DNA片段的连接操作

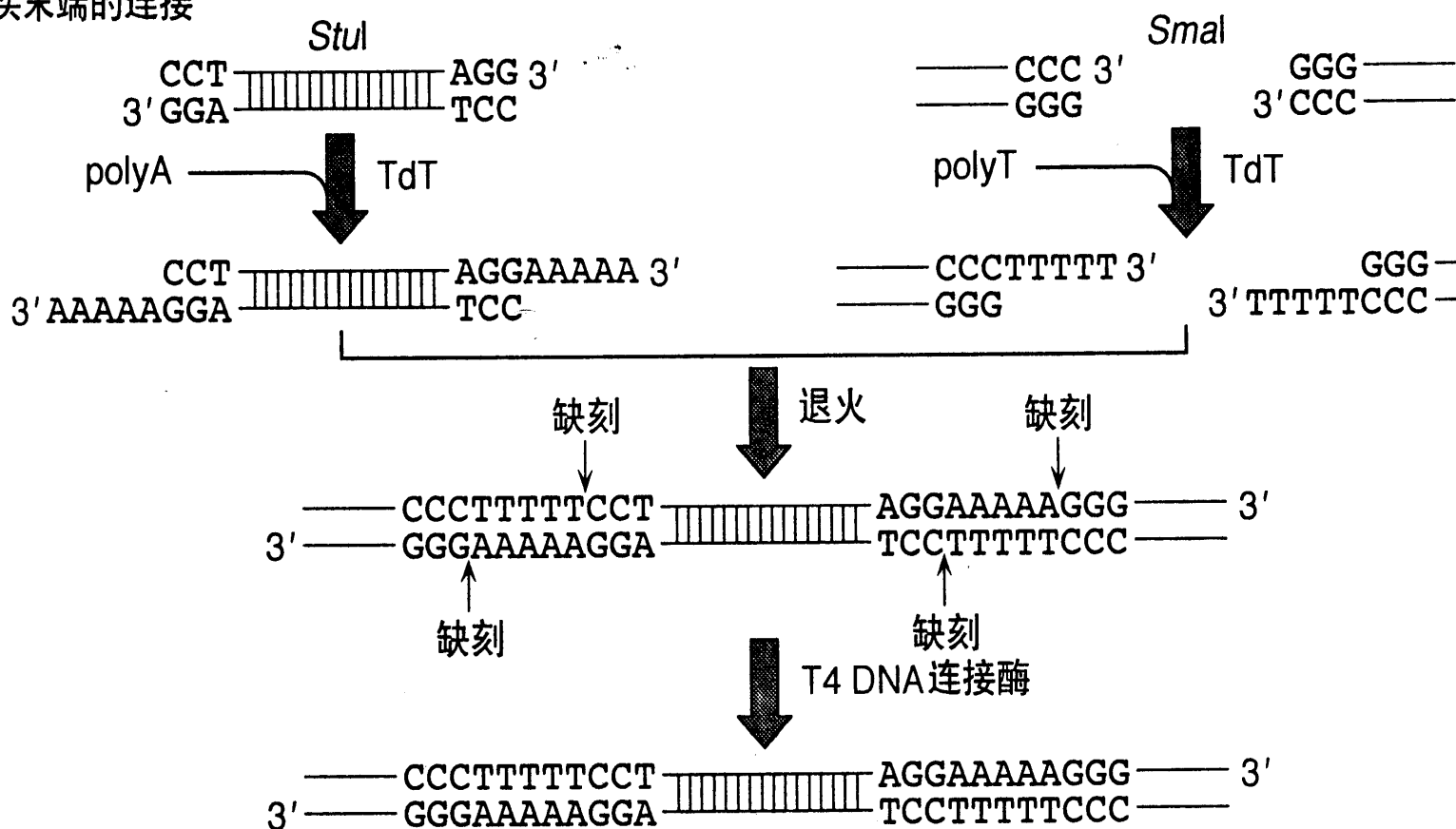
- 粘性末端的连接属于分子内部的连接
- 平头末端的连接则属于分子间的连接
- 提高平头末端连接效率的方法包括：

加大平头末端底物的浓度，增加分子间碰撞机会

加大连接酶用量（10倍大于粘性末端的连接）

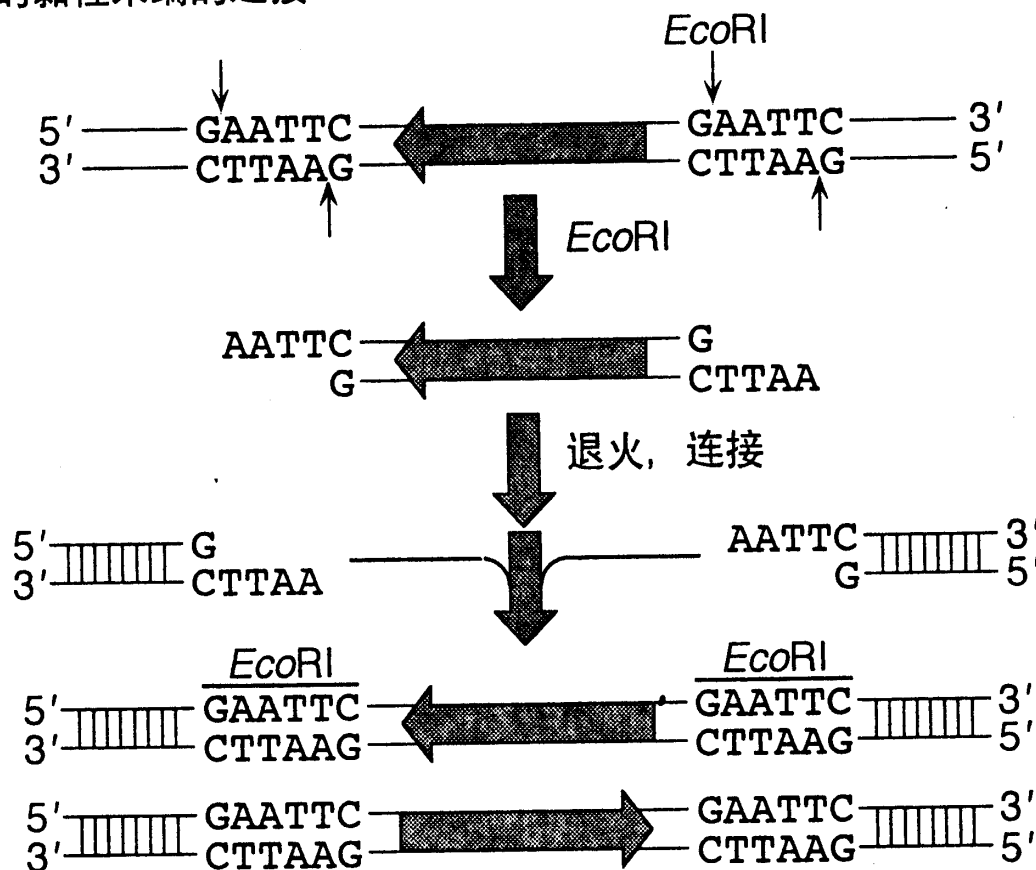
平头末端人工粘性末端的连接

C 平头末端的连接



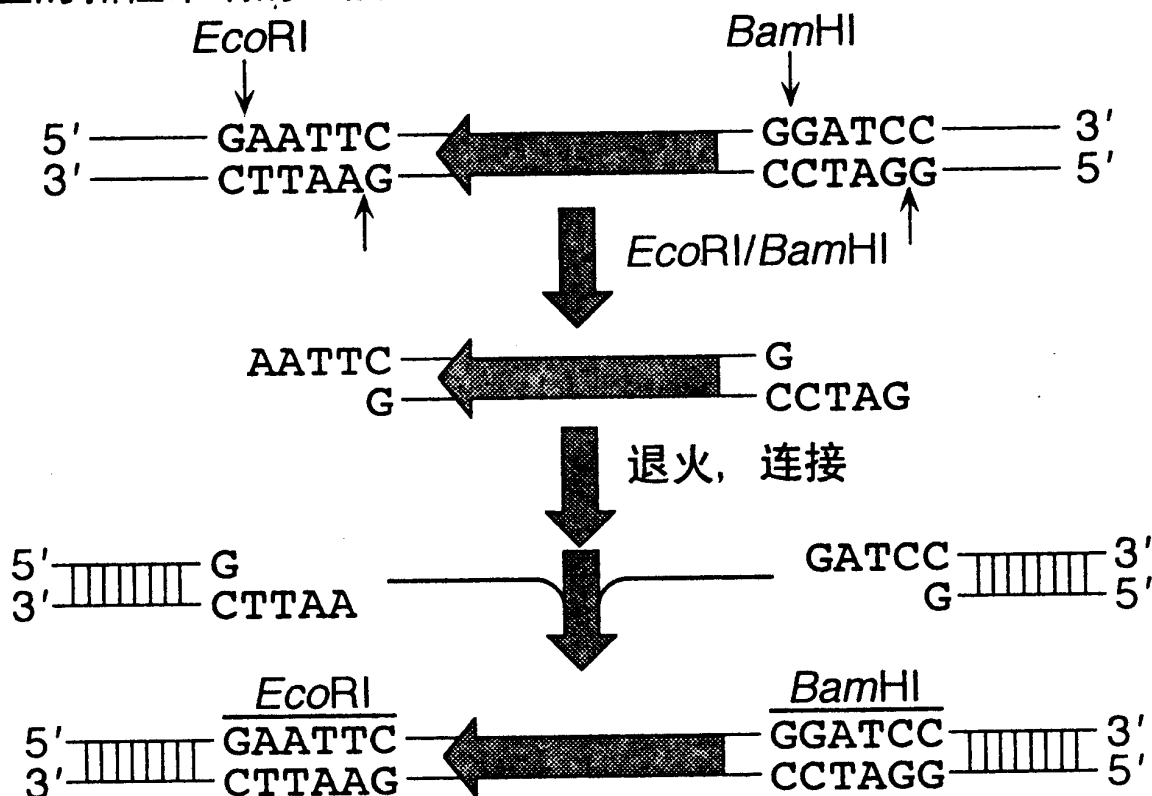
同种内切酶生产的粘性末端的连接

同种酶产生的黏性末端的连接

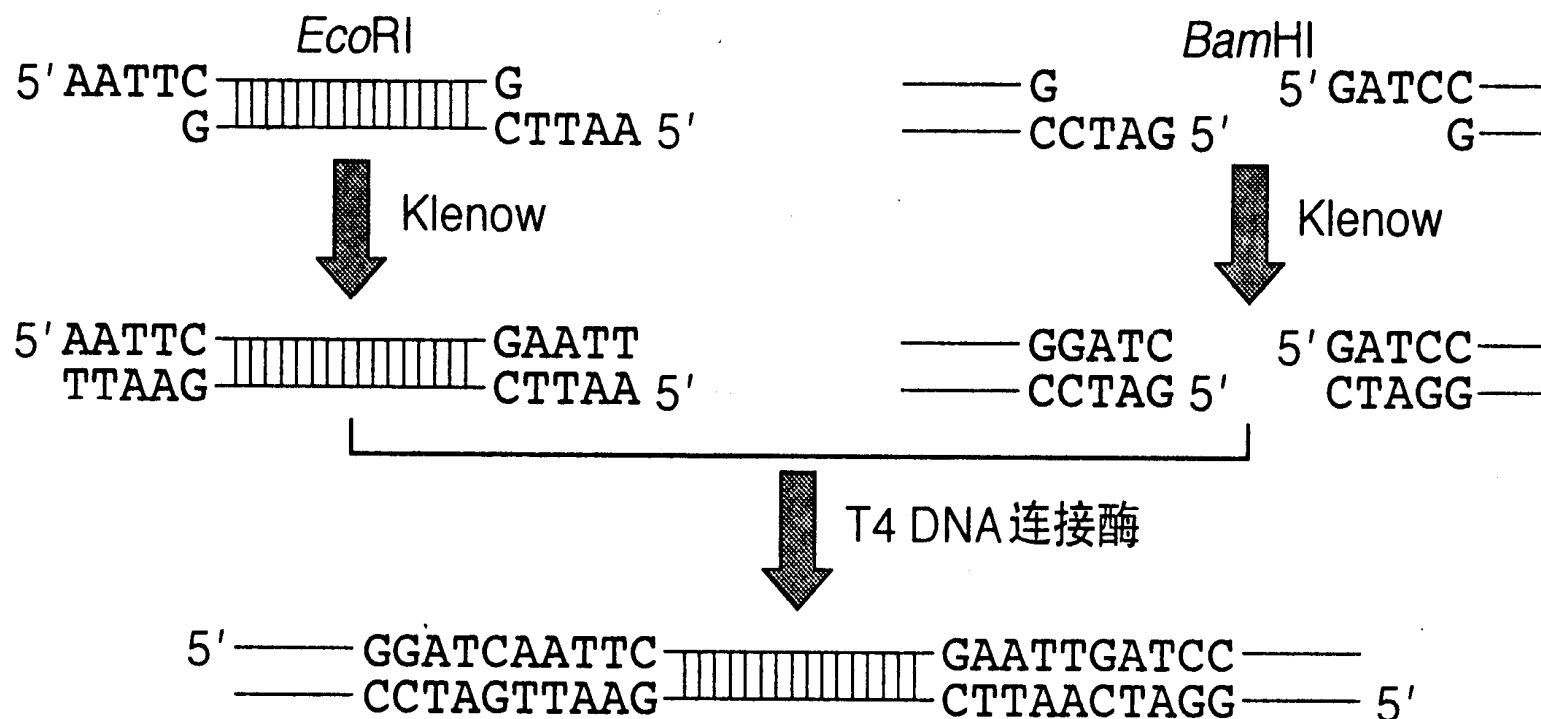


同尾酶生产的粘性末端的连接

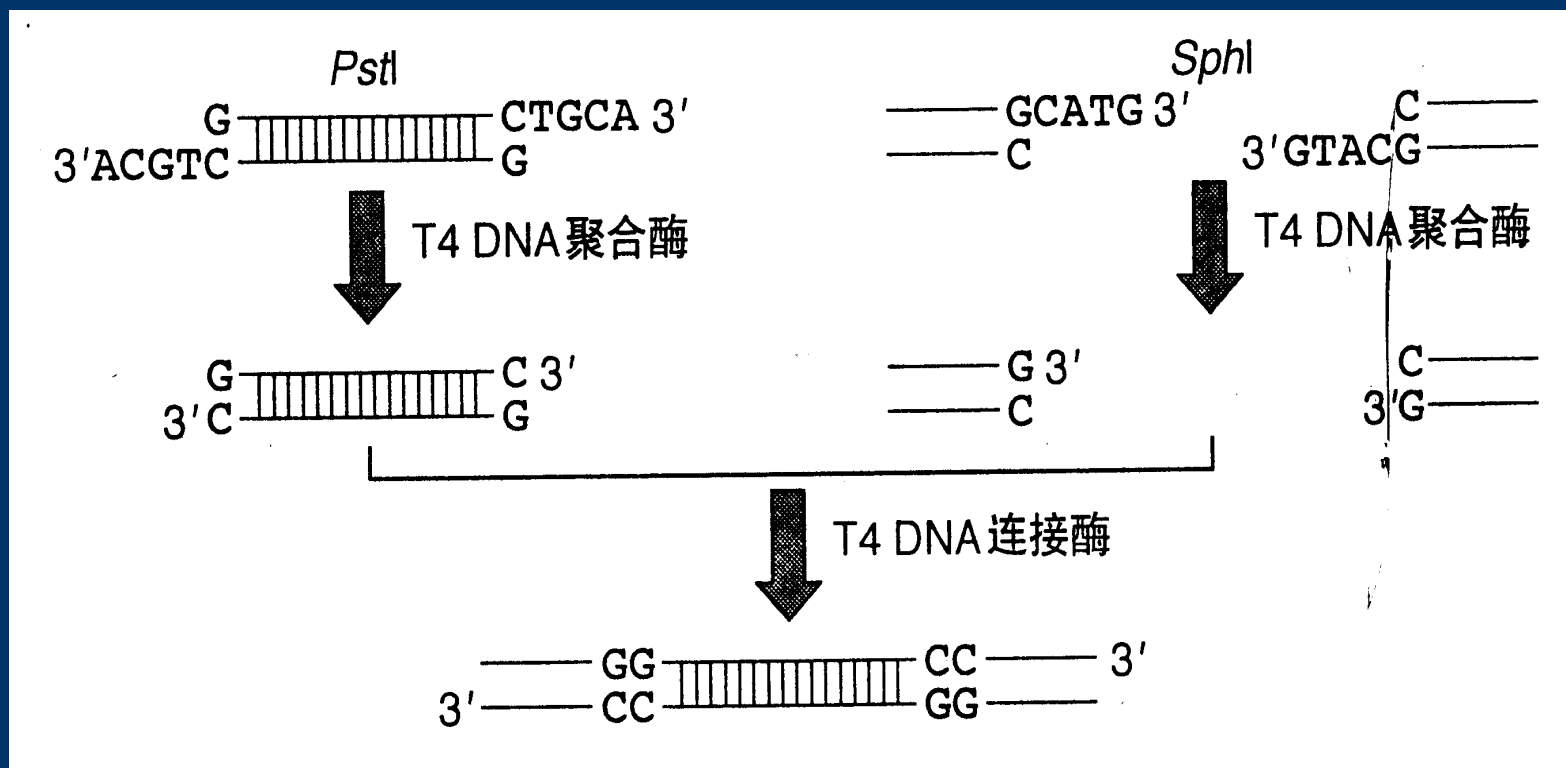
不同种酶产生的黏性末端的连接



不同5'粘性末端的连接



不同3'粘性末端的连接





DNA连接酶的反应条件：

连接酶连接切口DNA的最适反应温度是37° C。但是这个温度下，粘性末端之间退火形成的氢键结合是不稳定的。

一般粘末端连接反应的最适温度认为4~15° C比较合适。但是温度越低，连接反应速度越慢，效率越低，通常使用的连接反应温度16° C。

如需要用4° C连接，则往往过夜。



三、大肠杆菌DNA聚合酶 I

大肠杆菌DNA聚合酶 I 的基本性质：

5' → 3' 的DNA聚合酶活性

5' → 3' 的核酸外切酶活性

3' → 5' 的核酸外切酶活性

大肠杆菌DNA聚合酶 I 的基本用途：

缺口前移标记法

制备³²P标记的探针

大肠杆菌DNA聚合酶 I 大片段 (Klenow)

- **Klenow酶的基本性质：**

大肠杆菌DNA聚合酶I经枯草杆菌蛋白酶处理，获得N端三分之二的大肽段，即为Klenow酶。

Klenow酶仍拥有5'→3'的DNA聚合酶活性和3'→5'的核酸外切酶活性，但失去了5'→3'的核酸外切酶活性

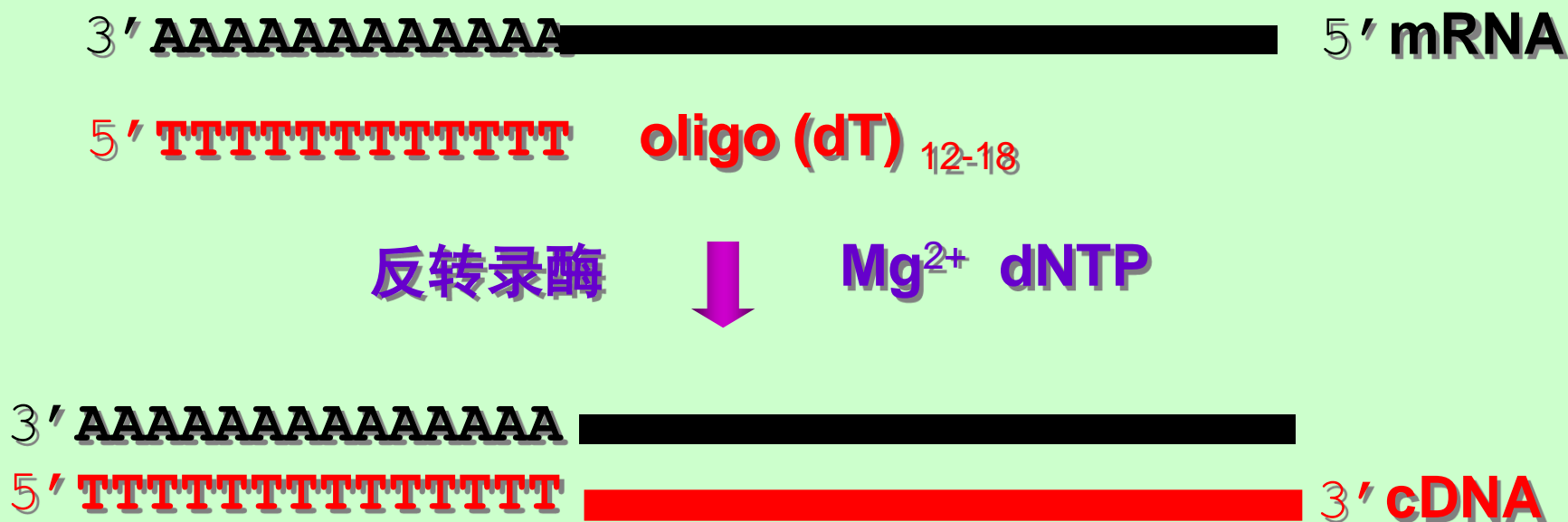


Klenow酶的基本用途

- 补平由核酸内切酶产生的5'粘性末端
- DNA片段的同位素末端标记
- cDNA第二链的合成
- 双脱氧末端终止法测定DNA序列

四、反转录酶

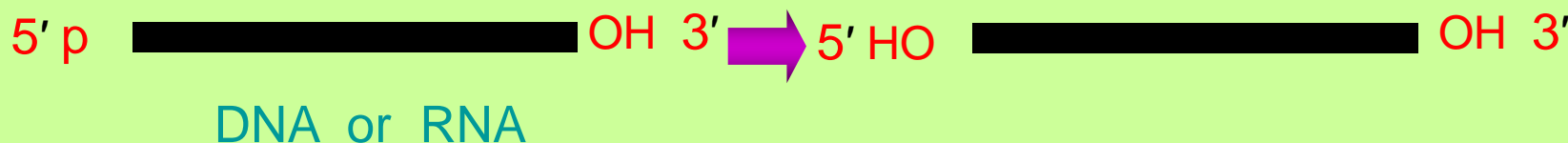
- 反转录酶的基本特性：以RNA为模板聚合cDNA链



五、碱性磷酸酶

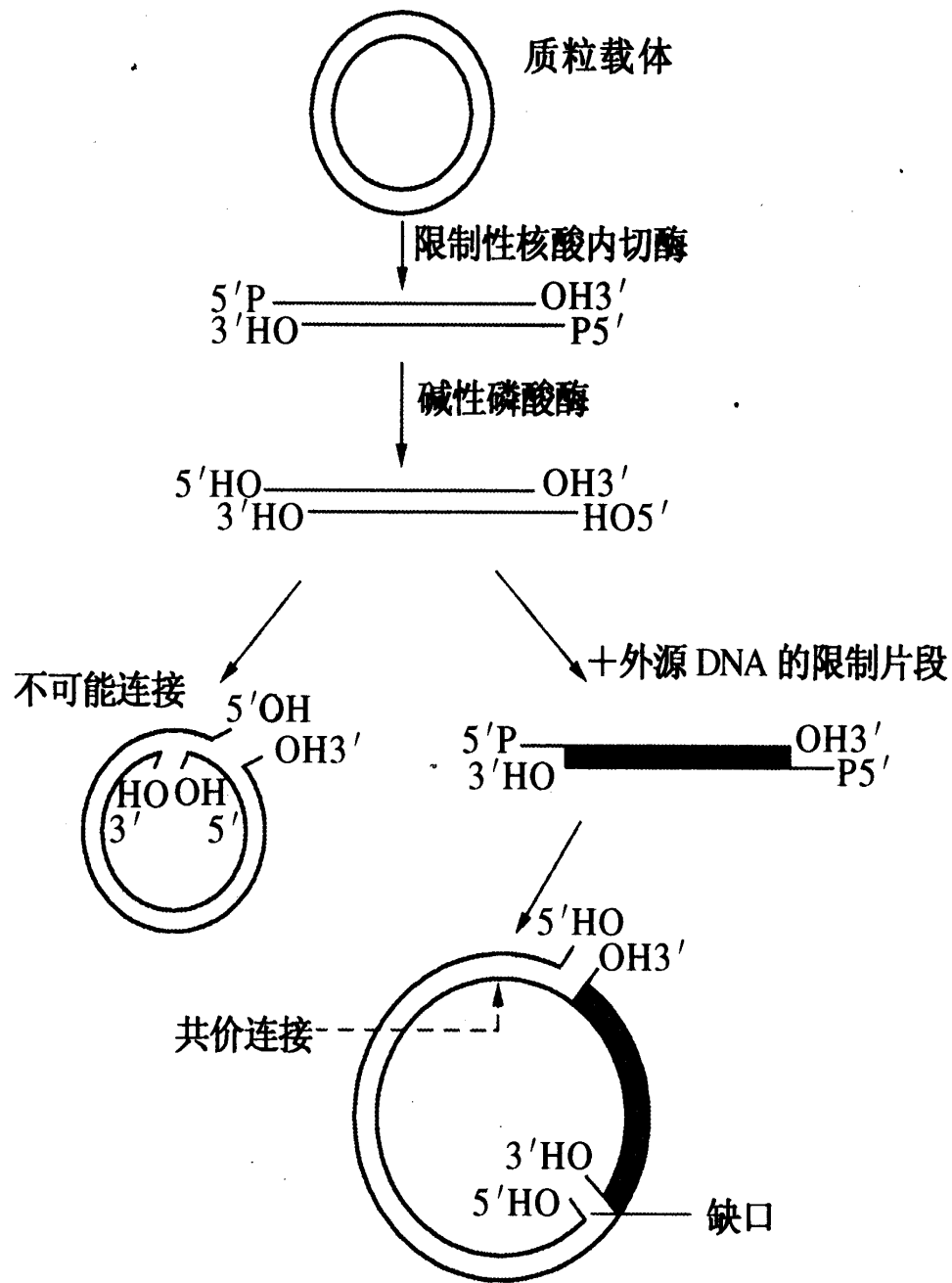
从DNA或RNA的三磷酸核苷酸上除去5'磷酸根残基

- 来自小牛胸腺的碱性磷酸单酯酶（CIP）
- 来自大肠杆菌的碱性磷酸单酯酶（BAP）



- 用于5'端标记³²P
- 用于防止载体的粘性末端的自连

防止载体的粘性末端的自连





T4-多核苷酸磷酸激酶 (T4-PNP)

T4-PNP的基本特性：在DNA、RNA的5'-OH上加上磷酸基团

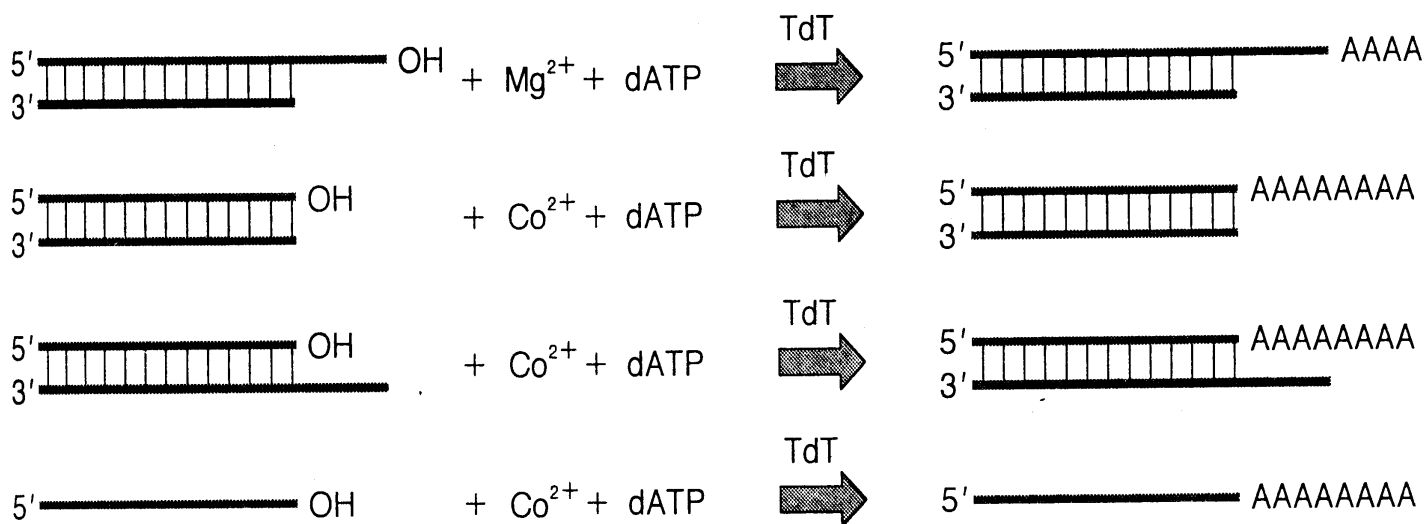
用于探针的末端同位素标记



六、末端转移酶 (TdT)

TdT的基本特性：不需要模板的DNA聚合酶，随机掺入

用于人工接头及探针标记





七、S1单链核酸酶

S1核酸酶的基本反应：
内切单链DNA或RNA

