

# 识别序列为非回纹对称结构限制核酸酶的正确切割位点

颜炳学<sup>1</sup>, 李 宁<sup>1</sup>, 吴常信<sup>2</sup>

(1. 中国农业大学农业生物技术国家实验室, 北京 100094; 2. 中国农业大学动物科学技术学院, 北京 100094)

**摘要:**限制性内切核酸酶的切割识别序列分为回纹对称和非回纹对称结构两类, 由于 DNA 是互补双链, 所以对于识别序列为回纹对称结构的限制酶, 其识别序列在 DNA 的两条链上是一致的, 可以写为一个, 但对于识别序列为非回纹对称结构的限制酶来说, 其识别序列应为两个, 而一些工具书、参考书中仅写为一个。本文通过一个酶切实验证明其识别序列为两个。同时希望通过本文, 敦促一些工具书、参考书更正其错误。

**关键词:**非回纹对称结构; 限制性内切酶; 识别序列; *Aci* I

中图分类号: Q556<sup>+</sup>.4

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)04-0420-03

## The True Recognizing Sequence of the Restriction Enzyme Whose Recognizing Sequence is Nonpalindromic

YAN Bing-xue<sup>1</sup>, LI Ning<sup>1</sup>, WU Chang-xin<sup>2</sup>

(1. National Laboratories for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The recognizing sequence of restriction enzyme includes palindrome and nonpalindromic, and DNA is double helix complementary strands. So the recognizing sequences of palindrome enzyme in two strands of DNA were identical, and can be considered of one sequence. But for nonpalindromic restriction enzyme, the recognizing sequences of two strands of DNA were not identical. Therefore the true recognizing sequences are not only one. In this experiment, an enzyme cleavage reaction was carried out which confirmed that the true recognizing sites/sequences of nonpalindromic enzyme are two instead of one.

**Key words:** nonpalindromic; restriction enzyme; recognizing sequence; *Aci* I

限制性内切核酸酶是分子生物学中常用的一种工具酶。它能识别双链 DNA 中的特异序列, 并在该特定位置进行特异性的切割。每种酶都有其各自特异的识别序列, 而且大多数酶的识别序列都是一种回纹对称结构, 即识别序列的第一个碱基与最后一个碱基互补, 第二个碱基与倒数第二个碱基互补, 如内切酶 *Taq* I, 其识别序列为 5'.....TCGA.....

3', T 与 A 互补, C 与 G 互补, 但是也有一些限制酶的识别序列为非回纹对称结构, 如 *Aci* I, 识别序列为 5'.....CCGC.....3', 是一种非回纹对称结构。

因为 DNA 是互补双链, 又由于大多数限制酶的识别序列为回纹对称结构, 所以对于大多数酶来说, 在 DNA 一条链上的识别序列与其互补链上的识别序列是相同的, 可以略写为一个。但是对于类

收稿日期: 2001-07-10; 修回日期: 2001-11-04

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目资助(编号: G20000161)

作者简介: 颜炳学(1974-), 男, 黑龙江人, 硕士, 专业方向: 生化与分子生物学。E-mail: bingxueyan@sohu.com

通讯作者: 李 宁(1962-), 男, 江西人, 教授, 博导。E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

似 *Aci* I 这类识别序列为非回纹对称结构的限制酶来说,情况就不一样了,由于识别序列是非回纹对称结构,所以其切割的 DNA 两条链上的识别序列是不同的,如一条链上的识别序列为 5'……CCGC……3',则其互补链上的识别序列为 5'……GCGG……3'。由于这种情况的存在就导致了 *Aci* I 的识别序列实际为两个(在 DNA 的一条链上)。即 5'……CCGC……3'和 5'……GCGG……3',而不仅仅是 5'……CCGC……3'。但是现在的一些工具书,如《分子克隆实验指南》《精编分子生物学实验指南》,一些限制酶产品使用说明书以及生物学技术应用软件上,给出类似的识别序列为非回纹对称结构限制酶的酶切识别序列仅为其中之一,这种写法很明显是错误的。本文通过一个酶切实验证明该类限制酶(以 *Aci* I 为例)的酶切识别序列为两个,而且希望通过本文敦促相应的工具书,生物学技术应用软件将其错误进行更正。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

基因组 DNA 由明星肉鸡外周血红细胞中提取,明星肉鸡由中国农业大学动物科技学院小牧场提供。PCR 引物由上海生工生物公司合成,限制酶 *Aci* I 由北京友谊中银公司从 Biolab 公司进口。

### 1.2 方 法

采用酚-氯仿抽提法提取鸡外周血红细胞中的基因组 DNA,作为 PCR 反应的模板。根据 GenBank 数据库中鸡类胰岛素生长因子 II(*IGF II*)基因的碱基序列设计一对引物:

上游为: 5'……GAAAGAGGAGAAAAGG-GAAACCA……3' 下游为: 5'……TCATTGCT-GCTCGCCCATTTTAC……3'

进行 PCR 扩增,反应条件为: 95℃ 预变性 5min; 95℃, 40s; 60℃, 40s; 72℃, 40s; 30 个循环, 72℃, 7min。之后对 PCR 产物直接进行酶切反应,反应条件如下:

10× buffer	2μl
PCR 产物	5μl
水	12μl
内切酶( <i>Aci</i> I)	1μl

37℃ 3h,取 10μl 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳(2%的琼脂糖胶)

## 2 结果与讨论

PCR 反应扩增出与预期长度(约 640bp)相等的片段,如图 1:

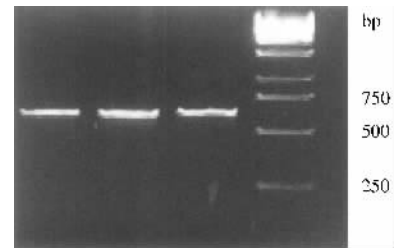


图 1 PCR 产物结果

Fig. 1 The result of PCR

酶切反应将 PCR 产物切为约 300~400bp 之间的两个片段,如图 2:

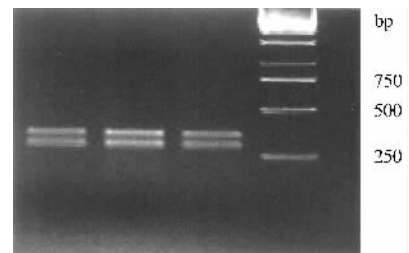


图 2 *Aci* I 酶切结果

Fig. 2 The result of enzyme cleavage of *Aci* I

鸡的 *IGF II* 基因序列如图 3:

引物上游对应于鸡的 *IGF II* 基因序列中约 210~230 区段,引物下游对应于约 830~850 区段。根据 *Aci* I 产品使用说明书上写的酶切识别序列(5'……CCGC……3')及鸡的 *IGF II* 基因序列可知,PCR 产物上没有 *Aci*I 酶切位点,同时应用生物技术应用软件 GENE TYX MAC Version8. 5,对鸡 *IGF II* 基因进行酶切位点搜索,同样在 PCR 产物区段显示没有酶切位点,与实验结果不相符。

由于 *Aci* I 的酶切识别序列为非回纹对称结构,又由于 DNA 是互补双链,*Aci* I 在 DNA 一条链上的识别序列为 5'……CCGC……3',则其互补链上的识别序列为 5'……GCGG……3'。由于这种情况的存在就导致了 *Aci* I 的识别序列实际上为两个(在 DNA 的一条链上)即 5'……CCGC……3'和 5'……GCGG……3',根据 PCR 引物及鸡的 *IGF II* 基因序列可知在 PCR 产物上有一个酶切位点 5'

```

1 ccctacaggt agaccagtg gacgaaataa caggaggatc aaccgtggca ttgtggagga
61 gtgctgcttt cggagctgtg acctggctct gctggaaacc tactgtgcca agtccgtcaa
121 gtcagagcgt gacctctccg ccacctcctt cgcgggcctc ccagccctca acaaggtagg
181 gctcgactcg ggctgctagc tccctgaagc aagaaagagg agaaaaggga aaccattggt
241 gggggaggac tgctgggtgc tctatgatct gctgctctg cagcccaagg caggaatgaa
301 gagccttgaa gtgtaataag ctgttgagga agccaaagaa attgcaagaa aaccaaactt
361 ctaactgttt gaatcataag aacaatttgg gtgggaagag ctccctagtg attactttgt
421 ccatcctccc accatgggca gggacacatc ccaactctat gteatgttgc ccaaaagccc
481 atccagcctg gtcttgatgc ctccagagag cgggcaacca cagctcctct ggacagcctg
541 tcccagatc ttgccacttt gttgtggaaa acttctctct tatgtgcaat ttcttcage
601 ttaaaacat tgcccctgg cctgtcceta cagtttggat aaaaaggttt actccagctg
661 tagtatatac tgcaaagctg cagcaaggtc tccctggaac cttttccacg ctcaagtacc
721 ccaactctcc ctgctttccc tcatagaaga ggtgttccag cttgctaata attcttggg
781 cttttctctg tccactctct ccttgtgctg gggaccaat agaactgtta aaatgggcca
841 gcagcaatga gtagagggaag cccagggcag tgtcagtaac ccactgtgtg ttgacactgt
901 gttgttctcc ctcccagg agagcttcca gaagccatct cagccaagt actccaagta
961 caactgtggc cagaagaaga gctcgacgag gctcgacggg gaggtgccag gcatcctcgg
1021 tgcccgtcgg taccgggtgc agcgaggagg gctgcaagca gctgaggaag ccaggcgcat
1081 gcatgttccc ctcatctctc tgcccagtc ggcgcccaca gcgccgggg catcccctga
1141 agcgaccggt cccaggaat gaactgtgac cagccggctc gatttggat ctctgggga
1201 gagactggcg agactcggcc ccctgagcc cctccgtccc cgagccgagg agcggggcgg
1261 caggaccat cacgccctc cgcccacaac caaacaactg acacaagcaa ggagggggtgg
1321 cagcagcctg gtgcagctc ctcttttgg ggtggggggg aggggtgttt cgtttcccag
1381 gctgttttg tttcctcgc gcaccagta ttttcaagc cttgtactta cgaagggaca
1441 gttgggcact tgaactttt gctccgggc gctgtgtgac atcccagtg ccaacactag
1501 aagacaaaag aaa

```

图 3 鸡 IGF II 基因 DNA 序列

Fig. 3 DNA sequence of chicken IGF II gene

……GCGG……3′, 将 PCR 产物切为约 300bp 和 340bp 两个片段, 与酶切结果相吻合, 如图 4:



图 4 酶切图示

Fig. 4 Chart example of enzyme cleavage

在 PCR 扩增的 DNA 片段中, 如果仅有 5′……GCGG……3′ 的碱基序列, 则用其互补链的碱基序列同样可顺利地找出 *Aci*I 的正确酶切位点; 但是在 PCR 扩增的 DNA 片段中, 有 5′……CCGC……GCGG……3′ 或 5′……GCGG……CCGC……3′ 的碱基序列, 则无论用 DNA 的哪条链的碱基序列寻找酶切位点, 都容易将另一个酶切位点漏掉。所以该酶的识别序列的正确写法应为 5′……CCGC……3′ 及 5′……GCGG……3′。类似识别序列为非回文对称结构的限制酶还有 *Bsm* I、*Bspm* I……等至少十多种, 但一些工具书列出其识别序列仅为两个识别序列之一, 如《分子克隆实验指南》、《精编分子生物学实验指南》中限制酶 *Bsm* I 的识别序列为 5′……GAATGC……3′, *Bspm* I 的识别序列为 5′

……ACCTGC……3′, 一些产品使用说明书, 如 Bio-lab 公司 *Aci* I 的使用说明书以及生物学技术应用软件 GENE TYX—MAC, version 8.5 中搜索酶切位点部分, 给出 *Aci* I 的识别序列仅为 5′……CCGC……3′, 其互补链上识别序列不被认为是酶切位点, 所以希望通过本文敦促一些工具书、产品使用说明书及相应的应用软件上将其错误进行更正, 同时提醒广大相关的科技工作者的注意, 避免产生不应有的错误, 影响实验进程。

### 参考文献 (References):

- [1] J. 萨姆不鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著 (金冬雁, 黎孟枫, 等译). 分子克隆实验指南 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1992, 237 ~ 261.
- [2] F. 奥斯伯, R. E. 金斯顿, R. 布伦特, 等著 (颜子颖, 王海林, 译). 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998, 72 ~ 79.
- [3] Darling D C, Brickell P M. Nucleotide sequence and genomic structure of the chicken insulin-like growth factor-II coding region [J]. Gen and Comp Endo, 1996, 102(3): 283 ~ 287.