

制限酵素

活性単位の定義

1 unit は、反応混合液 50 μ l 中、1 μ g の λ DNA を、60 分間で完全に分解する酵素活性とします。この条件下で活性検査の困難な酵素については、その旨の記載があります。

品質管理

- (1) 夾雑ヌクレアーゼ：20 units の制限酵素と 1 μ g の基質 DNA を 5 時間反応させて (100-fold overdigestion) アガロースゲル電気泳動を行い、短時間の泳動パターンと同じであることを確認している。
- (2) ライゲーション/リカッティング： λ DNA を 4 倍量の unit の制限酵素で 2 時間反応させ切断し、T4 DNA Ligase で結合した後、再び同じ酵素で切断し、結合の前後で泳動パターンに変化がないことを確認している。
- (3) ニッケース：10 ~ 35 units の制限酵素と 1 μ g の適当なスーパーコイル DNA (例えば ϕ X174RF I、pBR322) を、5 時間反応後、form II および III への転換がほとんどないことを確認している。ただし、このチェックは適当なスーパーコイル DNA がある酵素にだけ行っている。
- (4) ホスファターゼ：20 ~ 200 units の制限酵素と *p*-nitrophenyl phosphate を、48 時間反応後、*p*-nitrophenol が遊離されないことを確認している。

添付バッファ―一覧表

制限酵素反応バッファ―は、制限酵素 1 本につき 1 ml (1 本) 添付されています。

添付バッファ―	ラベルの色	組 成	酵 素 名
10 × L Buffer	黄色	100 mmol/l Tris-HCl (pH 7.9 at 25°C) 100 mmol/l MgCl ₂ 10 mmol/l DTT	<i>Alw</i> 44 I (BSA別添付)*, <i>Apa</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Mbo</i> II, <i>Nar</i> I, <i>Nci</i> I, <i>Nsp</i> V, <i>Sac</i> I, <i>Sac</i> II
10 × M Buffer	水色	500 mmol/l NaCl 100 mmol/l Tris-HCl (pH 7.9 at 25°C) 100 mmol/l MgCl ₂ 10 mmol/l DTT	<i>Acc</i> II, <i>Age</i> I, <i>Alu</i> I, <i>Ava</i> I, <i>Ava</i> II, <i>Axy</i> I, <i>Dra</i> I, <i>Eco</i> O109 I, <i>Eco</i> R II, <i>Eco</i> T38 I, <i>Fok</i> I, <i>Hae</i> II, <i>Hae</i> III, <i>Hinc</i> II, <i>Msp</i> I, <i>Nhe</i> I, <i>Pvu</i> II, <i>Rsa</i> I, <i>Sau</i> 3A I, <i>Sau</i> 96 I, <i>Sfi</i> I, <i>Spe</i> I, <i>Stu</i> I, <i>Xba</i> I
10 × H Buffer	赤色	1,000 mmol/l NaCl 500 mmol/l Tris-HCl (pH 7.9 at 25°C) 100 mmol/l MgCl ₂ 10 mmol/l DTT	<i>Ase</i> I, <i>Bcl</i> I, <i>Bgl</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Bst</i> E II, <i>Bst</i> X I, <i>Eco</i> R I, <i>Eco</i> R V, <i>Hinf</i> I, <i>Mlu</i> I, <i>Nco</i> I, <i>Nde</i> I, <i>Not</i> I (Triton X-100別添付)*, <i>Nsi</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Scr</i> F I, <i>Sph</i> I, <i>Sty</i> I, <i>Swa</i> I (BSA別添付)*, <i>Xho</i> I
10 × A Buffer	紫色	500 mmol/l Potassium acetate 200 mmol/l Tris-acetate (pH 7.9 at 25°C) 100 mmol/l Magnesium acetate 10 mmol/l DTT	<i>Acc</i> I, <i>Afl</i> II, <i>Bsp</i> 1286 I, <i>Fsp</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Taq</i> I
10 × B Buffer	灰色	1,000 mmol/l NaCl 100 mmol/l Tris-HCl (pH 8.5 at 25°C) 100 mmol/l MgCl ₂ 10 mmol/l DTT	<i>Acc</i> III (BSA別添付)*, <i>Acy</i> I, <i>Bam</i> H I, <i>Bsm</i> I, <i>Bss</i> H II, <i>Hha</i> I, <i>Hind</i> III, <i>Ssp</i> I
10 × 専用 Buffer	白色	各制限酵素の酵素反応条件の10倍濃度	<i>Bal</i> I, <i>Hpa</i> I, <i>Nde</i> II, <i>Nru</i> I, <i>Sca</i> I

添付の反応バッファ―は酵素反応条件の 10 倍濃度になっており、酵素反応に使用する際には、反応容量の 1/10 量 (反応容量 50 μ l の場合 5 μ l) を添加します。

* *Acc* III、*Alw*44 I および *Swa* I には 1 mg/ml BSA、*Not* I には 0.1% Triton X-100 が別添付されています。酵素反応の際には、反応バッファ―の他に BSA または Triton X-100 を反応容量の 1/10 量添加します。

制限酵素反応バッファー別相対活性一覧表

ニッポンジーンでは、5種類の制限酵素反応バッファー（L、M、H、A、B）の中の1種類（添付反応バッファー*1：■）を用いて制限酵素の活性を測定しています。この酵素活性を100%とした場合の他の反応バッファーによる酵素活性を以下に示しました。（ ）はスター活性などの影響を受けやすい反応バッファーを示しています。

なお、*Bal* I、*Hpa* I、*Nde* II、*Nru* I、*Sca* Iについてはそれぞれの専用バッファー*1を使用しました。また、*Acc* III、*Alw44* I、*Swa* IについてはBSA*2を、*Not* IについてはTriton X-100*3を添加せずに反応を行いました。

*1 添付反応バッファーおよび専用バッファーの組成は、各制限酵素の酵素反応条件の10倍濃度です。

*2 反応バッファーとは別添付のBSA溶液を最終濃度0.1 mg/mlになるように添加して反応を行った場合の相対活性は100%です。

*3 反応バッファーとは別添付のTriton X-100を最終濃度0.01%になるように添加して反応を行った場合の相対活性は100%です。

制限酵素	L	M	H	A	B	専用	制限酵素	L	M	H	A	B	専用
<i>Acc</i> I	50	75	<5	100	<5	—	<i>Hpa</i> I	(25)	(75)	25	(50)	(100)	100
<i>Acc</i> II	(75)	100	10	100	50	—	<i>Kpn</i> I	100	50	<5	100	<5	—
<i>Acc</i> III	<5	10	50	(5)	75	—	<i>Mbo</i> II	100	75	25	75	25	—
<i>Acy</i> I	<5	10	25	<5	100	—	<i>Mlu</i> I	10	25	100	10	50	—
<i>Afl</i> II	50	50	5	100	25	—	<i>Msp</i> I	100	100	25	100	50	—
<i>Age</i> I	(75)	100	10	75	25	—	<i>Nar</i> I	100	5	<5	100	<5	—
<i>Alu</i> I	100	100	25	150	25	—	<i>Nci</i> I	100	50	<5	100	<5	—
<i>Alw44</i> I	75	50	<5	50	25	—	<i>Nco</i> I	(75)	(100)	100	(100)	(150)	—
<i>Apa</i> I	100	10	<5	50	<5	—	<i>Nde</i> I	10	25	100	25	100	—
<i>Ase</i> I	(10)	(50)	100	(25)	100	—	<i>Nde</i> II	5	5	25	5	5	100
<i>Ava</i> I	10	100	10	25	50	—	<i>Nhe</i> I	(150)	100	5	(200)	10	—
<i>Ava</i> II	(75)	100	5	(75)	50	—	<i>Not</i> I	5	25	50	10	50	—
<i>Axy</i> I	(100)	100	50	(100)	50	—	<i>Nru</i> I	<5	5	75	5	25	100
<i>Bal</i> I	25	10	<5	25	<5	100	<i>Nsi</i> I	75	100	100	(75)	100	—
<i>Bam</i> HI	(75)	(100)	75	(75)	100	—	<i>Nsp</i> V	100	50	<5	150	<5	—
<i>Bcl</i> I	(100)	(200)	100	(100)	200	—	<i>Pst</i> I	(200)	(150)	100	(150)	50	—
<i>Bgl</i> I	(10)	(50)	100	(10)	25	—	<i>Pvu</i> II	(50)	100	5	(50)	5	—
<i>Bgl</i> II	(10)	(75)	100	(50)	(150)	—	<i>Rsa</i> I	200	100	5	200	50	—
<i>Bsm</i> I	(25)	(75)	50	(75)	100	—	<i>Sac</i> I	100	75	10	100	10	—
<i>Bsp</i> 1286 I	75	50	10	100	10	—	<i>Sac</i> II	100	50	5	100	5	—
<i>Bss</i> H II	(50)	50	75	(50)	100	—	<i>Sal</i> I	<5	<5	100	<5	5	—
<i>Bst</i> E II	(25)	(100)	100	(75)	100	—	<i>Sau</i> 3AI	(100)	100	25	150	50	—
<i>Bst</i> X I	<5	75	100	25	100	—	<i>Sau</i> 96I	75	100	50	75	150	—
<i>Dra</i> I	75	100	10	50	75	—	<i>Sca</i> I	(5)	(25)	25	(5)	(100)	100
<i>Eco</i> 0109 I	(100)	100	10	100	50	—	<i>Scr</i> F I	(75)	(100)	100	(100)	(150)	—
<i>Eco</i> R I	—	—	100	—	(150)	—	<i>Sfi</i> I	25	100	5	75	5	—
<i>Eco</i> R II	<5	100	75	75	100	—	<i>Sma</i> I	75	10	<5	100	<5	—
<i>Eco</i> R V	(10)	75	100	25	150	—	<i>Spe</i> I	(75)	100	10	(75)	75	—
<i>Eco</i> T38 I	150	100	5	150	75	—	<i>Sph</i> I	(100)	(200)	100	(100)	100	—
<i>Fok</i> I	(200)	100	<5	(200)	100	—	<i>Ssp</i> I	(<5)	(75)	10	(50)	100	—
<i>Fsp</i> I	25	100	5	100	50	—	<i>Stu</i> I	100	100	50	100	100	—
<i>Hae</i> II	100	100	25	75	50	—	<i>Sty</i> I	(10)	(75)	100	25	(75)	—
<i>Hae</i> III	75	100	100	100	100	—	<i>Swa</i> I	<5	25	75	5	75	—
<i>Hha</i> I	(75)	75	25	(100)	100	—	<i>Taq</i> I	25	50	25	100	100	—
<i>Hinc</i> II	50	100	50	100	50	—	<i>Xba</i> I	50	100	25	150	25	—
<i>Hind</i> III	(<5)	75	10	(25)	100	—	<i>Xho</i> I	10	50	100	25	150	—
<i>Hinf</i> I	10	75	100	50	150	—							

制限酵素

制限酵素活性に対する塩濃度の影響

制限酵素活性に対する塩濃度 (KCl および NaCl) の影響を、相対活性として以下に示しました。この試験の酵素反応条件は、10 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l DTT, KCl または NaCl です。ただし、EcoR I はこの条件ではスター活性が生じ易いため、スター活性の生じない反応条件 [100 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 7 mmol/l MgCl₂, 7 mmol/l 2-Mercaptoethanol, KCl または NaCl] を使用しました。

相対活性表示  : 100 ~ 70%  : 70 ~ 40%  : 40 ~ 0%

制限酵素	塩	濃度 (mmol/l)												
		0	20	40	60	80	100	120	140	160	180			
Acc I	KCl													
	NaCl													
Acc II	KCl													
	NaCl													
Acc III	KCl													
	NaCl													
Acy I	KCl													
	NaCl													
Afl II	KCl													
	NaCl													
Age I	KCl													
	NaCl													
Alu I	KCl													
	NaCl													
Alw 44 I	KCl													
	NaCl													
Apa I	KCl													
	NaCl													
Ase I	KCl													
	NaCl													
Ava I	KCl													
	NaCl													
Ava II	KCl													
	NaCl													
Axy I	KCl													
	NaCl													
Bal I	KCl													
	NaCl													
BamH I	KCl													
	NaCl													
Bcl I	KCl													
	NaCl													
Bgl I	KCl													
	NaCl													
Bgl II	KCl													
	NaCl													
Bsm I	KCl													
	NaCl													
Bsp 1286 I	KCl													
	NaCl													
BssH II	KCl													
	NaCl													
BstE II	KCl													
	NaCl													
BstX I	KCl													
	NaCl													
Dra I	KCl													
	NaCl													
EcoO109 I	KCl													
	NaCl													
EcoR I	KCl													
	NaCl													
EcoR II	KCl													
	NaCl													
EcoR V	KCl													
	NaCl													
EcoT38 I	KCl													
	NaCl													
Fok I	KCl													
	NaCl													
Fsp I	KCl													
	NaCl													
Hae II	KCl													
	NaCl													
Hae III	KCl													
	NaCl													
Hha I	KCl													
	NaCl													
Hinc II	KCl													
	NaCl													

制限酵素	塩	濃度 (mmol/l)									
		0	20	40	60	80	100	120	140	160	180
<i>Hind</i> III	KCl										
	NaCl										
<i>Hinf</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Hpa</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Kpn</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Mbo</i> II	KCl										
	NaCl										
<i>Mlu</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Msp</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Nar</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Nci</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Nco</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Nde</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Nde</i> II	KCl										
	NaCl										
<i>Nhe</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Not</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Nru</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Nsi</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Nsp</i> V	KCl										
	NaCl										
<i>Pst</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Pvu</i> II	KCl										
	NaCl										
<i>Rsa</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Sac</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Sac</i> II	KCl										
	NaCl										
<i>Sal</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Sau</i> 3A I	KCl										
	NaCl										
<i>Sau</i> 96 I	KCl										
	NaCl										
<i>Sca</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Scr</i> F I	KCl										
	NaCl										
<i>Sfi</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Sma</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Spe</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Sph</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Ssp</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Stu</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Sty</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Swa</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Taq</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Xba</i> I	KCl										
	NaCl										
<i>Xho</i> I	KCl										
	NaCl										

制限酵素

ライゲーション/リカッティング効率品質規準

ニッポンジーンの制限酵素はライゲーション/リカッティング試験において、以下の表の品質規準を満たしています。ライゲーションの基質として、λDNA を使用していますが、*Nar* I、*Sac* I についてはφ105 DNA を、*Not* I、*Sfi* I、*Spe* I については Ad2 DNA を、*Swa* I については M13mp19DNA を、また、*Xba* I については T7 DNA を使用しています。

制限酵素	ライゲーション効率 (%)	リカッティング効率 (%)	制限酵素	ライゲーション効率 (%)	リカッティング効率 (%)	制限酵素	ライゲーション効率 (%)	リカッティング効率 (%)
<i>Acc</i> I	90	100	<i>EcoR</i> I	95	100	<i>Nsi</i> I	90	100
<i>Acc</i> II	90	100	<i>EcoR</i> II	95	100	<i>Nsp</i> V	95	100
<i>Acc</i> III	95	100	<i>EcoR</i> V	90	100	<i>Pst</i> I	95	100
<i>Acy</i> I	90	100	<i>EcoT38</i> I	95	100	<i>Pvu</i> II	90	100
<i>Afl</i> II	60	100	<i>Fok</i> I	90	100	<i>Rsa</i> II	90	100
<i>Age</i> I	95	100	<i>Fsp</i> I	80	100	<i>Sac</i> I	90	100
<i>Alu</i> I	90	100	<i>Hae</i> II	90	100	<i>Sac</i> II	95	100
<i>Alw44</i> I	95	100	<i>Hae</i> III	90	100	<i>Sal</i> I	80	100
<i>Apa</i> I	95	100	<i>Hha</i> I	90	100	<i>Sau3A</i> I	90	100
<i>Ase</i> I	80	100	<i>Hinc</i> II	80	90	<i>Sau96</i> I	90	100
<i>Ava</i> I	90	100	<i>Hind</i> III	90	100	<i>Sca</i> I	90	100
<i>Ava</i> II	90	100	<i>Hinf</i> I	90	100	<i>ScrF</i> I	60	95
<i>Axy</i> I *	—	—	<i>Hpa</i> I	90	100	<i>Sfi</i> I	80	100
<i>Bal</i> I	90	100	<i>Kpn</i> I	90	100	<i>Sma</i> I	90	100
<i>BamH</i> I	90	100	<i>Mbo</i> II	95	100	<i>Spe</i> I	80	100
<i>Bcl</i> I	95	100	<i>Mlu</i> I	90	100	<i>Sph</i> I	95	100
<i>Bgl</i> I	90	100	<i>Msp</i> I	90	100	<i>Ssp</i> I	90	95
<i>Bgl</i> II	90	100	<i>Nar</i> I	95	100	<i>Stu</i> I	80	100
<i>Bsm</i> I	90	100	<i>Nci</i> I *	—	—	<i>Sty</i> I	95	100
<i>Bsp1286</i> I	95	100	<i>Nco</i> I	90	100	<i>Swa</i> I	75	75
<i>BssH</i> II	95	100	<i>Nde</i> I	90	100	<i>Taq</i> I	90	100
<i>BstE</i> II	95	100	<i>Nde</i> II	90	100	<i>Xba</i> I	90	100
<i>BstX</i> I	90	100	<i>Nhe</i> I	90	100	<i>Xho</i> I	80	100
<i>Dra</i> I	90	100	<i>Not</i> I	90	100			
<i>EcoO109</i> I	80	100	<i>Nru</i> I	90	100			

* *Axy* I、*Nci* I 切断フラグメントは T4 DNA Ligase でほとんど結合しない。

制限酵素による染色体 DNA (*Saccharomyces cerevisiae*) の切断条件一覧表

制限酵素でアガロースゲルに包埋された巨大 DNA を切断する場合、完全分解には大量の酵素を必要とすることが多くなります。そこで、真核生物である酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* *¹) の染色体 DNA を用い、各制限酵素について、酵素量を変えて 5 時間および 20 時間反応させ、パルスフィールド電気泳動を行い、完全分解に必要な酵素の最少量を測定しました。反応系は p.453 に従いました。

制限酵素	認識配列 * ²	反応液	反応温度 (°C)	完全分解必要酵素量 (unit)	
				5 時間反応	20 時間反応
<i>Bgl</i> I	GCCNNNNNGGC	H	37	5	5
<i>BssH</i> II	GCGCGC	B	50	5	5
<i>Dra</i> I	TTTAAA	M	37	25	25
<i>Fsp</i> I	TGCGCA	A	37	5	5
<i>Mlu</i> I	ACGCGT	H	37	5	5
<i>Nhe</i> I	GCTAGC	M	37	50	10
<i>Not</i> I	GCGGCCGC	H + Triton * ³	37	20	20
<i>Nru</i> I	TCGCGA	専用	37	50	20
<i>Nsp</i> V	TTCGAA	L	37	5	5
<i>Sal</i> I	GTCGAC	H	37	5	5
<i>Sma</i> I	CCCGGG	A	30	> 50	> 50
<i>Spe</i> I	ACTAGT	M	37	100	100
<i>Ssp</i> I	AATATT	B	37	5	5
<i>Xba</i> I	TCTAGA	M	37	50	50
<i>Xho</i> I	CTCGAG	H	37	5	5

*¹ *Saccharomyces cerevisiae* の分子量の範囲は 245~2,500 kbp である

*² N は A、C、G、T の内のいずれかの塩基であることを表す

*³ *Not* I は反応液中に 0.01% Triton X-100 を添加する

制限酵素の熱失活条件一覧表

制限酵素の反応を停止する目的で、熱処理がよく行われます。下表は、制限酵素を 65℃で 30 分間、または 70℃で 30 分間インキュベートした後の残存活性を示したものです。反応液 40 μ l 中で、適当な基質 DNA 2 μ g と、制限酵素 30 units とを 1 時間反応させた後、65℃で 30 分間、または 70℃で 30 分間インキュベートしました。このうち 20 μ l の DNA 溶液に 1 μ g の DNA を加えて、さらに 150 分間反応させ、アガロースゲル電気泳動にて残存活性を調べました。

－：残存活性 < 5% +：残存活性 \geq 5%

制限酵素	65℃ 30 分間	70℃ 30 分間	制限酵素	65℃ 30 分間	70℃ 30 分間	制限酵素	65℃ 30 分間	70℃ 30 分間
Acc I	+	+	EcoR I	+	－	Nsi I	－	－
Acc II	+	－	EcoR II	－	－	Nsp V	+	+
Acc III	+	+	EcoR V	+	+	Pst I	+	+
Acy I	+	－	EcoT38 I	－	－	Pvu II	+	+
Afl II	－	－	Fok I	－	－	Rsa I	+	+
Age I	－	－	Fsp I	－	－	Sac I	－	－
Alu I	－	－	Hae II	－	－	Sac II	－	－
Alw44 I	－	－	Hae III	+	－	Sal I	－	－
Apa I	－	－	Hha I	+	－	Sau3A I	－	－
Ase I	－	－	Hinc II	－	－	Sau96 I	+	－
Ava I	－	－	Hind III	+	+	Sca I	+	－
Ava II	－	－	Hinf I	+	－	ScrF I	－	－
Axy I	－	－	Hpa I	－	－	Sfi I	+	+
Bal I	－	－	Kpn I	－	－	Sma I	－	－
BamH I	－	－	Mbo II	－	－	Spe I	+	－
Bcl I	+	+	Mlu I	+	+	Sph I	－	－
Bgl I	－	－	Msp I	+	－	Ssp I	－	－
Bgl II	+	+	Nar I	－	－	Stu I	+	+
Bsm I	+	+	Nci I	－	－	Sty I	－	－
Bsp1286 I	－	－	Nco I	－	－	Swa I	－	－
BssH II	－	－	Nde I	－	－	Taq I	+	+
BstE II	+	+	Nde II	－	－	Xba I	－	－
BstX I	－	－	Nhe I	－	－	Xho I	+	+
Dra I	+	－	Not I	－	－			
Eco0109 I	－	－	Nru I	+	－			

酵素により耐熱性が異なり、DNA 変性温度を考慮すると、熱処理だけでは完全失活できない場合もあります。確実に完全失活させるためにはフェノール処理をお奨めします。なお、70℃で 30 分間熱処理を行っても残存活性が 5%以上ある酵素については、熱処理では不活性化されないため、フェノール処理が必要です。

制限酵素によるプラスミドの切断条件一覧表

制限酵素でスーパーコイルのプラスミドを切断する場合、一般に λ DNA のような鎖状の DNA を切断するよりも多量の酵素を必要とする場合が多くなります。下表は、クローニングによく用いられる制限酵素について、1 μ g の pBR322 DNA および pUC19 DNA をニッポンジーン制限酵素反応条件にて完全分解するのに必要な unit 数を示しました。

pBR322

制限酵素	切断箇所数	完全分解必要酵素量 (unit)	制限酵素	切断箇所数	完全分解必要酵素量 (unit)	制限酵素	切断箇所数	完全分解必要酵素量 (unit)
Ase I	1	1	Nru I	1	> 10	Fsp I	2	3
Ava I	1	1	Pst I	1	1	Hinc II	2	7
Bal I	1	> 10	Pvu II	1	1	Alw44 I	3	10
BamH I	1	1	Sal I	1	6	Bgl I	3	2
Bsm I	1	1	Sca I	1	1	Dra I	3	1
EcoR I	1	2	Sph I	1	1	Rsa I	3	2
EcoR V	1	2	Ssp I	1	1	Nar I	4	1
Hind III	1	1	Sty I	1	5	Eco0109 I	4	3
Nde I	1	1	Acc I	2	1			
Nhe I	1	2	EcoT38 I	2	2			

pUC19

制限酵素	切断箇所数	完全分解必要酵素量 (unit)	制限酵素	切断箇所数	完全分解必要酵素量 (unit)	制限酵素	切断箇所数	完全分解必要酵素量 (unit)
Acc I	1	1	Nar I	1	> 10	Bgl I	2	2
Ava I	1	2	Nde I	1	1	Pvu II	2	1
BamH I	1	2	Sac I	1	3	Acy I	3	1
Eco0109 I	1	5	Sal I	1	9	Alw44 I	3	> 10
EcoR I	1	3	Sca I	1	2	Ase I	3	1
EcoT38 I	1	1	Sma I	1	2	Dra I	3	3
Hinc II	1	5	Sph I	1	2	Hae II	3	2
Hind III	1	2	Ssp I	1	1	Rsa I	3	1
Kpn I	1	> 10	Xba I	1	1	Fsp I	4	10
Pst I	1	1	Ava II	2	1	Taq I	4	1

制限酵素

認識塩基配列による制限酵素の分類表

I 4、5、6 塩基のパリンドロームを認識するもの

	AATT	ACGT	AGCT	ATAT	CATG	CCGG	CGCG	CTAG	GATC	GCGC	GGCC	GTAC	TATA	TCGA	TGCA	TTAA
▽○○○○									Sau3AI NdeII							
○▽○○○		MaeII				MspI HpaII		MaeI		SciNI				TaqI		
○○▽○○			AluI				AccII		DpnI		HaeIII	RsaI				
○○○▽○										HhaI						
○○○○▽					NlaIII											
▽○○N○○												(MaeIII)				
○▽ON○○								(DdeI)	(HinfI)		(Cfr13I) (Sau96I)					
○○▽N○○						(ScrFI)				(Fnu4HI)						
○○N▽○○																
○○N○▽○																
○○N○○▽																
▽○○ ^A ○○						(EcoRII)										
○▽○ ^A ○○											(AvaII)					
○○ ^A ○○						(BstNI) (MvaI)					(Eco47I)					
○○ ^A ○▽○																
○○ ^A ○○▽																
▽○○ ^G ○○																
○▽○ ^G ○○																
○○ ^G ○○						(NciI)										
○○ ^G ○▽○						(BanI)										
○○ ^G ○○▽																
A▽○○○○T			HindIII		(AflIII)	AgeI	(AflIII) MluI	SpeI	(BglII) (XhoII)							
A○▽○○○T														BanIII ClaI		AseI
A○○▽○○T				SspI						Eco47III	AatI HaeI SfuI	ScaI				
A○○○▽○T																
A○○○○▽T					(NspI)					(HaeII)					AvaII EcoI22I NsiI	
C▽○○○○G					NcoI	(AvaI) XmaI		AvrII			(CfrI) Eco52I XmaII		(AvaI) XhoI			AflII
C○▽○○○G				NdeI												
C○○▽○○G		PmaCI	(NspBII) PvuII			SmaI	(NspBII)							SciI		
C○○○▽○G							SacII SstII		PvuI XorII							
C○○○○▽G																PstI
G▽○○○○C	EcoRI					(Cfr10I)	BssHII	NheI	BamHI BstI (XhoII)	(BanI)	Asp718I (BanI)		SalI		Alw44I	
G○▽○○○C		(AcyI)								(AcyI) NarI			(AccI)	(AccI)		
G○○▽○○C				EcoRV		NaeI								(HincII)		(HincII) HpaI
G○○○▽○C																
G○○○○▽C		AatII	(EcoI38I) (HgaI) SacI		(NspI) SphI					BbeI (HaeII)	ApaI (EcoI38I)	KpnI			(HgiAI)	
T▽○○○○A						(AccIII) MroI		XbaI	BclI		(CfrI)					
T○▽○○○A														NspV		
T○○▽○○A		SnaBI					NruI			FspI	BalI (HaeI)					DraI
T○○○▽○A																
T○○○○▽A																

()内の酵素は複数の塩基配列を認識する。 □はニッポンジーンで発売している。

II 7、8塩基のパリンドロームを認識するもの

CCTNAGG	Axy I	Eco81 I
CGG(↑)CCG	Rsr II	
GCTNAGC	Esp I	
GGTNACC	BstE II	
PuGG(↑)CCPy	PpuMI	
PuGGNCCPy	EcoO109I	
CGGCGCCG	Not I	

III 中断したパリンドロームを認識するもの

CACNNNGTG	Dra III
CCNNGG	Sec I
CCANNNNNTGG	BstXI
GAANNNTTC	Xmn I
GACNNNGTC	Tth111 I
GCCNNNNNGGC	Bgl I
GGNNCC	NlaIV
GGCCNNNNNGGCC	Sfi I

IV パリンドロームでない塩基配列を認識するもの

ACCTGC(N) ₄	BspMI	CTCCAG(N) ₁₄	Gsu I	GACGC(N) ₅	Hga I	GGATC(N) ₄	Bin I
TGGACG(N) ₈		GAGGTC(N) ₁₀		CTGCG(N) ₁₀		CCTAG(N) ₅	
CAAPuCA(N) ₄	Tth111II	GAAGA(N) ₈	Mbo II	GCAGC(N) ₈	Bbv I	GGATG(N) ₉	Fok I
GTPyGT(N) ₉		CTTCT(N) ₇		CGTCG(N) ₁₂		CCTAC(N) ₁₃	
CCTC(N) ₇	MnlI	GAATGCN	Bsm II	GCATC(N) ₅	SfaNI	GGTGA(N) ₈	HphI
GGAG(N) ₇		CTTACGN		CGTAG(N) ₉		CCTACT(N) ₇	

V 複数の塩基配列を認識するもの

ACACGT	AflIII	AGGACCT	EcoO109I	CAGCGG	BspB II	GAGCAC	Bsp1286I
ACATGT		AGGACCC	(Dra II)	CAGCTG		GAGCCC	
ACGCGT		AGGCCCT		CCGCGG		GAGCTC	
ACGTGT		AGGCCCC		CCGCTG		GGGCAC	
		AGGGCCT				GGGCCC	
ACATGC	NspCI	AGGGCCC		CCAAGG	StyI	GGGCTC	
ACATGT		AGGTCCT		CCATGG		GTGCAC	
GCATGC		AGGTCCC		CCTAGG		GTGCCC	
GCATGT		GGGACCT		CCTTGG		GTGCTC	
		GGGACCC					
AGATCC	XhoII	GGGCCCT		CCCGAG	Ava I	GAGCCC	EcoT38I
AGATCT		GGGCCCC		CCCGGG		GAGCTC	(Ban II)
GGATCC		GGGGCCT		CTCGAG		GGGCCC	
GGATCT		GGGGCCC		CTCGGG		GGGCTC	
		GGGTCCT					
AGCGCC	Hae II	GGGTCCC		CGGCCA	Cfr I	GGCACC	Ban I
AGCGCT				CGGCCG		GGCGCC	
GGCGCC		AGGACCT	PssI	TGGCCA		GGTACC	
GGCGCT		AGGACCC		TGGCCG		GGTGCC	
		AGGCCCT					
AGGCCA	Hae I	AGGCCCC		CGGCCG	Gdi II	GTAGAC	Acc I
AGGCCCT		AGGGCCT		TGGCCG		GTATAC	
TGGCCA		AGGGCCC				GTCGAC	
TGGCCT		AGGTCCT		GACGCC	Acy I	GTCTAC	
		AGGTCCC		GACGTC			
AGGACCT	PpuMI	AGGACCT		GGCGCC		GTCAAC	Hinc II
AGGACCC		AGGACCC		GGCGTC		GTCGAC	
AGGTCCT		AGGCCCT				GTTAAC	
AGGTCCC		AGGCCCC		GAGCAC	HgiA I	GTTGAC	
GGGACCT		AGGGCCT		GAGCTC			
GGGACCC		AGGGCCC		GTGCAC			
GGGTCCT		AGGTCCT		GTGCTC			
GGGTCCC		AGGTCCC					

はニッポンジーンで発売している。

制限酵素

DNA のメチル化と制限酵素の反応性一覧表

Escherichia coli には、DNA の特異的な部位を認識してメチル化を行うメチラーゼが 2 種類存在します。ひとつは dam メチラーゼで、“GATC”を認識してアデニンの N⁶ をメチル化します。もうひとつは dcm メチラーゼで“CC (A) GG”を認識して内側のシトシンの C⁵ をメチル化します。従って、*Escherichia coli* より調製したプラスミドなどの DNA は、この 2 種類のメチラーゼによってメチル化されています。認識部位がこれらのメチラーゼの認識部位と一致あるいは重なるような制限酵素は、これらのメチラーゼによってメチル化された DNA を切断できません。しかしながら、これらのメチル化は完全ではないので、ある程度の DNA は切断されることになり、部分分解パターンが得られます。

06
制限酵素

制限酵素	認識塩基配列	影響を及ぼすメチラーゼとその認識塩基配列	切断阻害を受ける塩基配列	制限酵素	認識塩基配列	影響を及ぼすメチラーゼとその認識塩基配列	切断阻害を受ける塩基配列		
Acc I	GT ↓ (A) (T) AC	M.Taq I TCG ^m Ä	GTCG ^m ÄC	Hind III	A ↓ AGCTT	M.Hind III ÄAGCTT	ÄAGCTT		
Acc III	T ↓ CCGGA	dam GÄTC	TCCGGÄTC	Hinf I	G ↓ ANTC	M.Taq I TCG ^m Ä	GANTCG ^m Ä		
Alu I	AG ↓ CT	M.Alu I AG ^m CT M.Pst I CTGC ^m ÄG	AG ^m CT CTGC ^m ÄGCT	Hpa I	GTT ↓ AAC	M.Hpa I GTTA ^m ÄC	GTTA ^m ÄC		
Apa I	GGGCC ↓ C	M.Hae III GG ^m CC	GGG ^m CCC	Nde II	↓ GATC	dam GÄTC	GÄTC		
Apy I	CC ↓ (A) GG	dcm CC (A) GG	CC (A) GG			M.Cla I ATCG ^m ÄT	ATCG ^m ÄTC		
Ava I	C ↓ (T) CG (A) G	M.Taq I TCG ^m Ä M.Hpa II CCGG	CTCG ^m ÄG CCCGGG	Mbo II	GAAGAN ₈ ↓	dam GÄTC	GAAG ^m ÄTC		
Ava II	G ↓ G (A) CC	dcm CC (A) GG M.Hpa II CCGG	GG (A) CC (A) GG GG (A) CCGG	Mil I	(A) ↓ GATC (T)	dcm GÄTC	(A) GÄTC (T)		
Bal I	TGG ↓ CCA	M.Hae III GG ^m CC	TGG ^m CCA	Msp I	C ↓ CGG	M.Msp I CCGG	CCGG		
BamH I	G ↓ GATCC	M.BamH I GGAT ^m CC M.Msp I CCGG	GGAT ^m CC GGAT ^m CCGG			M.Hae III GG ^m CC	GG ^m CC	GG ^m CCGG	
Ban II	G (A) GC (T) ↓ C	M.Alu I AG ^m CT M.Hae III GG ^m CC	GAG ^m CTC GGG ^m CCC	Nci I	CC ↓ (A) GG	M.Bcn I CC (A) GG	CC (A) GG		
				Nco I	C ↓ CATGG	M.Hae III GG ^m CC	GG ^m CC	GG ^m CCATGG	
Bcl I	T ↓ GATCA	dam GÄTC	TGÄTCA	Nru I	TCG ↓ CGA	dcm GÄTC	TCGCGÄTC		
				Sal I	G ↓ TCGAC	M.Taq I TCG ^m Ä	GTCG ^m ÄC		
Bcn I	CC (A) ↓ GG	M.Bcn I CC (A) GG	CC (A) GG	Sau3A I	↓ GATC	M.Msp I CCGG	GAT ^m CCGG		
		M.Msp I CCGG	C ^m CGG			M.BamH I GGAT ^m CC	GGAT ^m CC		
		M.Hpa II CCGG	C ^m CGGG			dcm CC (A) GG	GGNC ^m (A) GG		
Bgl I	GCCN ₄ ↓ NGGC	M.Hae III GG ^m CC	GGCCN ₃ GG ^m CC	Sau96 I	G ↓ GNCC	M.Hpa II CCGG	GGNC ^m CGG		
Bsp1286 I	G (A) GC (T) ↓ C	M.Alu I AG ^m CT M.Hae III GG ^m CC	GAG ^m CTC GGG ^m CCC			M.Hae III GG ^m CC	GGG ^m CC	M.Msp I CCGG	GGNC ^m CGG
						M.Hpa II CCGG	GGNC ^m CGG	GGNC ^m CGG	GGNC ^m CGG
Cfr13 I	G ↓ GNCC	dcm CC (A) GG	GGNC ^m (A) GG	ScrF I	CC ↓ NGG	M.Hpa II CCGG	C ^m CGGG		
		M.Hpa II CCGG	GGNC ^m CGG			M.Msp I CCGG	C ^m CGG		
		M.Msp I CCGG	GGNC ^m CGG			M.Hpa II CCGG	C ^m CGGG		
Cla I	AT ↓ CGAT	M.Cla I ATCG ^m ÄT	ATCG ^m ÄT	Stu I	AGG ↓ CCT	dcm CC (A) GG	AGGC ^m CTGG		
		M.Taq I TCG ^m Ä	ATCG ^m ÄT			M.Taq I TCG ^m Ä	TCG ^m Ä		
		dam GÄTC	ATCG ^m ÄTC			dam GÄTC	TCG ^m ÄTC		
Dde I	C ↓ TNAG	M.Alu I AG ^m CT	AG ^m CTNAG	Taq I (ThHB8 I)	T ↓ CGA	M.Cla I ATCG ^m ÄT	ATCG ^m ÄT		
Dpn I	GA ↓ TC	dam GÄTC	GÄTC			Xba I	T ↓ CTAGA	dam GÄTC	TCTAG ^m ÄTC
Dpn II	GA ↓ TC	M.Cla I ATCG ^m ÄT	ATCG ^m ÄTC	Xho I	C ↓ TCGAG	M.Taq I TCG ^m Ä	CTCG ^m ÄG		
		M.Taq I TCG ^m Ä	TCG ^m ÄTC			Xho II	(A) ↓ GATC (T)	M.Msp I CCGG	(A) GAT ^m CCGG
		dam GÄTC	GÄTC					Xma I	C ↓ CCGGG
Eae I	(T) ↓ GGCC (A)	dcm CC (A) GG M.Hap II CCGG	(T) GGCC ^m AGG (T) GGCC ^m CGG	Xma III	C ↓ GGCCG	M.Hae III GG ^m CC	CGG ^m CCG		
Eco0109 I	PuG ↓ GNCCPy	dcm CC (A) GG	PuGGNC ^m CTGG			M.Msp I CCGG	CGG ^m CCGG		
EcoR I	G ↓ AATTC	M.EcoR I GAÄTTC M.Msp I CCGG	GAÄTTC GAÄT ^m CCGG	Xmn I	GAAN ₂ ↓ N ₂ TTC	M.Taq I TCG ^m Ä	TCG ^m ÄAN ₄ TTC		
EcoR II	↓ CC (A) GG	dcm CC (A) GG	CC (A) GG						
EcoR V	GAT ↓ ATC	M.Taq I TCG ^m Ä	TCG ^m ÄTATC						
Hae II	(A) GCGC ↓ (T)	M.Hha I GCGC	(A) GCGC ^m (T)						
Hae III	GG ↓ CC	M.Hae III GG ^m CC	GG ^m CC						
		M.Msp I CCGG	GG ^m CCGG						
Hha I	GCG ↓ C	M.Hha I GCG ^m C	GCG ^m C						
		M.Msp I CCGG	GCG ^m CCGG						
Hinc II	GT (T) ↓ (A) AC	M.Hind II GC (T) (A) ÄC M.Taq I TCG ^m Ä	GT (T) (A) ÄC GTCG ^m ÄC						

m : メチル化されていなければ切断されない
 * : メチル化により阻害を受ける
 ↓ : 切断部位
 M : メチル化される塩基
 メチル化により影響を受ける配列は、一方の DNA 鎖の塩基配列のみを示しています。
 例えば、Alu I -M.Pst I の場合、5'...CTGCAGCT...3' 以外に 5'...AGCTGCAG...3' の配列も含まれます。

制限酵素のスター活性一覧表

ある種の制限酵素では、それらの定まった認識塩基配列と似ているが同一でない塩基配列を切断することが知られています。この認識部位の特異性のゆらぎをスター活性といいます。一般的にスター活性は反応条件の変化、たとえば基質に対して大過剰の酵素の使用、異なる金属イオンの存在、低い塩濃度、標準より高いpH、Glycerol または DMSO のような有機溶媒の添加などによって引き起こされます。比較的よく知られているスター活性について表に示します。

制限酵素	通常の認識塩基配列	スター活性の際の認識塩基配列	原因	文献	制限酵素	通常の認識塩基配列	スター活性の際の認識塩基配列	原因	文献
Ava I	C↓PyCGPuG		酵素過剰 Glycerol 濃度の増加	1	SaI I	G↓TCGAC		酵素過剰 Glycerol 濃度の増加 DMSO の添加	4
BamH I	G↓GATCC	GGNTCC GGANCC GPuATCC	酵素過剰 Glycerol 濃度の増加 Mg ²⁺ と Mn ²⁺ の置換 塩濃度の低下	1、2、 3、4	Sau3A I	↓GATC	GAGC CATC	酵素過剰 Glycerol 濃度の増加	16
Bst I	G↓GATCC	NGATCN	酵素過剰 Glycerol 濃度の増加	5	Sca I	AGT↓ACT			—
BsuR I	GG↓CC	NGCN	酵素過剰 Glycerol 濃度の増加 高い pH	6	Sst I	GAGCT↓C		酵素過剰 Glycerol 濃度の増加 DMSO の添加	4
Dde I	C↓TNAG		高い pH 塩濃度の低下	7	Sst II	CCGC↓GG		酵素過剰 Glycerol 濃度の増加	1
EcoR I	G↓AATTC	NAATTN	酵素過剰 Glycerol 濃度の増加 Mg ²⁺ と Mn ²⁺ の置換 高い pH 塩濃度の低下	4、8、 9、10、 11	Tth111 I	GACN↓NNGTC	NACNNGTC GACNNNTC GACNNGNC	Mg ²⁺ と Mn ²⁺ の置換 高い pH 塩濃度の上昇	17
EcoR V	GAT↓ATC	PuATATC GNTATC GANATC GATNTC GATANC GATNPy	DMSO の添加	12	Xba I	T↓CTAGA		酵素過剰 Glycerol 濃度の増加 DMSO の添加	1、4
Hae III	GG↓CC		酵素過剰 Glycerol 濃度の増加	1					
Hha I	GCG↓C		酵素過剰 Glycerol 濃度の増加 DMSO の添加	4					
Hind III	A↓AGCTT	PuAGCTT A(⁶ ↓)GCTT AA(⁹ ↓)CTT AAGCNT AAGCTPy	Mg ²⁺ と Mn ²⁺ の置換 DMSO の添加	10、13					
Hpa I	GTT↓AAC		酵素過剰 Glycerol 濃度の増加	1					
Kpn I	GGTAC↓C			—					
PaeR7	C↓TCGAG		Glycerol 濃度の増加 塩濃度の低下	14					
Pst I	CTGCA↓G		酵素過剰 Glycerol 濃度の増加 DMSO の添加	1、4					
Pvu II	CAG↓CTG	CCGCTG CATCTG CAGATG CAGGTG CAGCGG	酵素過剰 Glycerol 濃度の増加 DMSO の添加	15					

文献:

- 1) Nath, K. and Azzolina, B. A. : *in Gene Amplification and Analysis*, Vol. 1, 113(1981)
- 2) George, J. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **255**, 6521(1980)
- 3) George, J. and Chirikjian, J. G. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2432(1982)
- 4) Malyguine, E. *et al.* : *Gene*, **8**, 163(1980)
- 5) Clarke, C. M. and Hartley, B. S. : *Biochem. J.*, **177**, 49(1979)
- 6) Heininger, K. *et al.* : *Gene*, **1**, 291(1977)
- 7) Makula, R. A. and Meagher, R. B. : *Nucleic Acids Res.*, **8**, 3125(1980)
- 8) Polisky, B. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3310(1975)
- 9) Tikchonenko, T. I. *et al.* : *Gene*, **4**, 195(1978)
- 10) Hsu, M. and Berg, P. : *Biochemistry*, **17**, 131(1978)
- 11) Woodbury, C. P. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **255**, 11534(1980)
- 12) Halford, S. E. *et al.* : *Gene*, **41**, 173(1986)
- 13) Nasri, M. and Thomas, D. : *Nucleic Acids Res.*, **14**, 811(1986)
- 14) Gingeras, T. R. and Brooks, J. E. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 402(1983)
- 15) Nasri, M. *et al.* : *FEBS Letters*, **185**, 101(1985)
- 16) Pech, M. *et al.* : *Cell*, **18**, 883(1979)
- 17) Shinomiya, T. *et al.* : *J. Biochem.*, **92**, 1823(1982)

