

基于识别重叠序列特性的限制性内切酶的重组表达策略研究

王睿君^{1,2}, 龚雪梅^{1,2}, 王欣竹^{1,2}, 叶佳琪^{1,2}, 李梦磊^{1,2}, 张坤晓^{*1,2}

(1. 江苏海洋大学 药学院, 江苏 连云港 222005; 2. 江苏海洋大学 江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要: 甲基转移酶可以保护宿主基因组 DNA 免受限制性内切酶的消化, 根据这一特性, 经典的限制性内切酶制备策略是首先通过表达与其配对的甲基转移酶来保护宿主菌株, 然后再共表达限制性内切酶, 即“一对一”的重组表达模式。作者设计了一个新的策略: 通过共表达识别重叠序列的甲基转移酶来保护宿主菌株, 以制备限制性内切酶。首先将识别重叠序列的甲基转移酶转入大肠杆菌 ER2566, 以保护宿主基因组 DNA, 然后将能识别重叠序列的多个限制性内切酶分别转入该宿主菌株, 以进行限制性内切酶的重组表达, 即“一对多”的重组表达模式。根据这一方法, 利用甲基转移酶 *M.EsaDix5 I*、*M.Alu I* 和 *M.Hha I* 实现了识别重叠序列 (TTAA、AGCT 和 GCGC) 的一系列限制性内切酶的重组表达, 还利用甲基转移酶 *M.Alu I* 成功实现了两个新的 *R.Sac I* 同裂酶 *R.EcoSP4ORF25090P* 和 *R.Gma5ORF28P* 的重组表达。该方法简化了对抵抗限制性内切酶消化的宿主菌株的大量筛选工作, 并提供了大规模制备限制性内切酶的能力。这一方法也可用于发现其他微生物中新的同工酶或同裂酶。

关键词: 限制性内切酶; 甲基转移酶; 重叠序列; 同裂酶; 同工酶

中图分类号: Q 783.1 文章编号: 1673-1689(2023)12-0082-08 DOI: 10.12441/spyswjs.20211224002

Recombinant Expression of Restriction Enzymes Based on Recognition of Overlapping Sequence

WANG Ruijun^{1,2}, GONG Xuemei^{1,2}, WANG Xinzhu^{1,2}, YE Jiaqi^{1,2}, LI Menglei^{1,2}, ZHANG Kunxiao^{*1,2}

(1. School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Pharmaceutical Compound Screening, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Methyltransferases can protect the host genomic DNA from digestion by restriction endonucleases. Based on this property, the classical strategy for preparing restriction endonuclease involves first expressing their paired methyltransferases to protect the host strain, followed by co-expression of the restriction endonuclease, i.e. a 'one-to-one' recombinant expression pattern. In this study, we proposed a novel strategy for generating restriction endonucleases by co-expressing a methyltransferase that could recognize overlapping sequences to protect the host strain. Initially, a

收稿日期: 2021-12-24 修回日期: 2022-03-06

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31601191)。

* 通信作者: 张坤晓 (1982—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物医药诊断和药物活性物质筛选研究。

E-mail: 2015000022@jou.edu.cn

methyltransferase recognizing the overlapping sequences was transferred into *E. coli* ER2566 to protect the host genomic DNA. Subsequently, multiple restriction endonucleases capable of recognizing the overlapping sequences were individually transferred into the host strain to achieve the recombinant expression of restriction endonucleases in a 'one-to-many' recombinant pattern. According to this approach, a series of restriction endonucleases recognizing overlapping sequences (TTAA, AGCT and GCGC) were successfully achieved using methyltransferases *M.EsaDix5* I, *M.Alu* I and *M.Hha* I, respectively. Additionally, the recombinant expression of two new *R.Sac* I isozymes, i.e., *R.EcoSP4ORF25090P* and *R.Gma5ORF28P*, was also successfully achieved through methyltransferase *M.Alu* I. This approach simplifies the labor-intensive screening process for host strains resistant to restriction endonuclease digestion, while providing the capability for large-scale preparation of restriction endonucleases. Furthermore, this method can be utilized for the discovery of new isoenzymes or isoschizomers in other microorganisms.

Keywords: restriction endonuclease, methyltransferase, overlapping sequence, isoschizomers, isoenzymes

限制性核酸内切酶是切割序列特异性双链 DNA 的酶^[1-5],普遍来源于原核生物。限制性内切酶与其配对的甲基转移酶共同构成的限制-修饰系统^[6-11],是维持细菌基因组完整性的基本机制之一^[4,12-13]。甲基转移酶主要作用是将宿主基因组 DNA 中对应的识别序列进行特殊的甲基化修饰,以防止被配对的限制性内切酶消化,从而达到保护宿主基因组的目的^[6,12,14]。相反,来自侵入性生物(如噬菌体)的外源 DNA 由于没有进行特殊的甲基化修饰,因此可以被细菌表达的限制性内切酶所消化^[10,15-16]。除了免疫功能,限制-修饰系统还参与了重组和转座过程^[17-20]。

大多数限制性内切酶最初是从天然微生物中分离纯化的^[21-22]。然而许多天然微生物难以大规模培养,乃至阻碍了大规模制备限制性内切酶,难以满足现代分子生物学日益增长的需求^[23-25]。目前已鉴定出约 3 000 种识别超过 250 个特定序列的限制性内切酶,其中部分已由生物技术公司(如 New England Biolabs Inc.)实现商业化^[26]。传统限制性内切酶的制备方法是将甲基转移酶和配对的限制性内切酶共转入一个大肠杆菌宿主菌株以实现重组表达。首先,将甲基转移酶转入大肠杆菌宿主菌株,筛选出抵抗限制性内切酶消化的宿主菌株,然后再将配对的限制性内切酶转入该宿主菌株。通过这种限制性内切酶与甲基转移酶共表达的方式,实现了 200 多种限制性内切酶的重组表达并成功实现了商业化^[27]。新型冠状病毒感染暴发后,限制性内切酶也

被广泛用于 mRNA 疫苗的生产过程^[28-30],更加突显了内切酶的重要性,鉴于内切酶生产工艺的复杂性,需要开发一种更加简便的制备方法。

研究表明,即使是非同源配对的甲基转移酶,只要其识别序列与限制性内切酶的识别序列存在重叠部分,即重叠序列,其甲基化修饰的 DNA 序列也存在可以抵抗限制性内切酶消化的特性^[27,31-33]。利用这一特性,作者开发了一种制备限制性内切酶的新策略。首先将识别重叠序列的甲基转移酶 *M.EsaDix5* I、*M.Alu* I 和 *M.Hha* I 转入大肠杆菌 ER2566,通过甲基化修饰宿主基因组 DNA,从而抵抗限制性内切酶消化,然后将可以识别上述重叠序列的一系列限制性内切酶分别转入上述宿主菌株并进行重组表达。此外,利用甲基转移酶 *M.Alu* I 成功实现了 *R.Sac* I 的两个新同裂酶的重组表达。这一方法利用同一个识别重叠序列的甲基转移酶实现了多个限制性内切酶的重组表达,即“一对多”的限制性内切酶重组表达策略。该策略不仅简化了能抵抗限制性内切酶消化的宿主菌株的筛选工作,也可以用于大规模制备限制性内切酶,以及发现其他微生物中新的同工酶或同裂酶。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

所有相关限制性内切酶及甲基转移酶基因序列均从 NCBI 和 REBASE 数据库(<http://rebase.neb.com>)获得。商业化限制性内切酶:New England

Biolabs 公司,并根据制造商的说明进行对应的测试实验;Lambda DNA;Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 DNA 构建

所有基因合成到 pUC57 载体中,使用 *Nde* I 和 *Xho* I 消化,随后进行琼脂糖凝胶回收纯化目标基因。将识别重叠序列的甲基转移酶基因连接到 pACYC184 载体中,将对应的限制性内切酶基因连接到 pBAD/HisA (Invitrogen) 载体中。将连接的 DNA 质粒转入大肠杆菌 DH5 α 和 ER2566,并接种到 LB-氨苄青霉素或 LB-氯霉素平板上。在 37 °C 下生长过夜。挑选单克隆菌落并使其在含有相应抗生素的 LB 培养基中生长过夜,提取质粒并测序。

1.3 筛选抵抗限制性内切酶的宿主菌株

将具有甲基转移酶基因的质粒载体 pACYC184 转化到大肠杆菌 DH5 α 和 ER2566 中,并接种到 LB-氯霉素平板上。提取平板上单克隆的质粒并用所需的限制性内切酶进行消化,将完全抵抗限制性内切酶转化子作为抵抗限制性内切酶消化的宿主菌株,用于限制性内切酶的表达。

1.4 表达与纯化限制性内切酶

将含有限制性内切酶基因的 pBAD/HisA 载体质粒转入对应的宿主菌株中。培养至对数生长期之后,用质量浓度 0.2 g/dL 的 *L*-阿拉伯糖诱导 4~6 h,收集菌体并使用 B-PER 试剂裂解菌体,离心收集

上清液用于测试限制性内切酶活性。

1.5 限制性内切酶活性测定

通过梯度稀释的方法,根据底物消化量检测限制性内切酶活性,将一个单位的限制性内切酶定义为:在适当的温度下使用 CutSmart® Buffer (50 mmol/L 乙酸钾、20 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-乙酸盐、10 mmol/L 乙酸镁、100 mg/L BSA,pH 7.9,25 °C),60 min 内完全消化 1 μ g 底物 DNA 的酶量。

2 结果与分析

2.1 制备限制性内切酶的新策略

制备限制性内切酶的传统策略(见图 1)包括以下过程:1)将甲基转移酶转入菌株;2)筛选抵抗限制性内切酶消化的菌株作为宿主菌株;3)将配对的限制性内切酶基因转入上述宿主菌株;4)重组表达限制性内切酶并筛选活性^[34-36]。与这种传统的“一对一”表达策略相比,作者采用了一种“一对多”的限制性内切酶重组表达策略,包括以下过程:1)将识别重叠序列的甲基转移酶转入大肠杆菌;2)筛选可以抵抗多种识别重叠序列的限制性内切酶消化的菌株作为宿主菌株;3)将对应的限制性内切酶基因分别转入上述宿主菌株;4)实现限制性内切酶的重组表达。

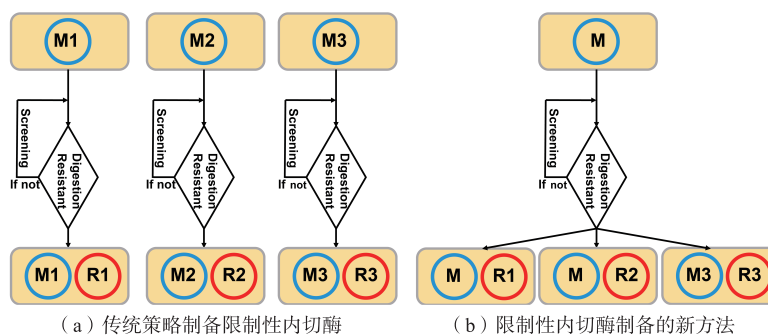


图 1 限制性内切酶制备流程比较

Fig. 1 Comparison of preparation procedures of restriction enzyme

2.2 筛选含有识别重叠序列的甲基转移酶的宿主菌株

根据识别重叠序列的甲基转移酶修饰的 DNA 序列也可以抵抗限制性内切酶消化的特性,将现有大部分商业化内切酶进行分类,发现大部分识别 6~8 个碱基的内切酶,除了能识别与其配对的甲基转移酶外,也基本存在识别 4 碱基重叠序列的甲基转移

酶。根据识别重叠序列的不同,大致可以将其分为 16 种甲基转移酶,其中 TATA 和 ATAT 没有发现对应的甲基转移酶和限制性内切酶(见图 2)。根据这一分类结果,作者认为可以利用这些识别重叠序列的甲基转移酶来实现限制性内切酶的重组表达,即“一对多”的重组表达模式。

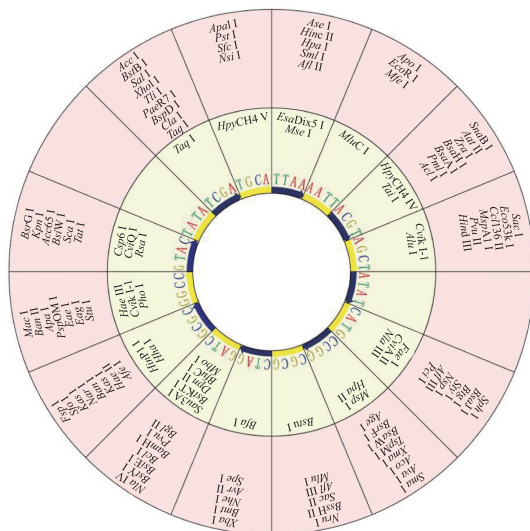


图2 限制性内切酶识别重叠序列统计图

Fig. 2 Restriction enzyme recognition overlapping sequence statistics diagram

为了验证该策略的有效性,设计了3种识别重叠序列(TTAA、AGCT、GCGC)的甲基转移酶M.EsaDix5 I、M.Alu I和M.Hha I及与其对应的一系

列限制性内切酶进行实验(见表1和表2)。考虑到质粒不相容原理,为了在一个宿主菌株中共表达限制性内切酶和甲基转移酶,将pACYC184载体改造成组成型表达载体,其中新的核糖体结合位点序列GAAGGAG和新的启动子(GI:M88256.1)分别插入pACYC184载体用于表达识别重叠序列的甲基转移酶(见图3)。同时,为了能够最大限度降低限制性内切酶对宿主DNA的消化能力,选用具有极低本底表达水平的pBAD/HisA作为限制性内切酶的诱导型表达载体。利用这一双质粒的共表达体系,实现“一对多”的限制性内切酶重组表达。

表1 甲基转移酶与限制性内切酶的识别序列分析

Table 1 Recognition sequence analysis of methyltransferase and restriction endonuclease

重叠序列	甲基转移酶	限制性内切酶
TTAA	<i>EsaDix5 I</i>	<i>Mse I</i> 、 <i>Dra I</i> 、 <i>Hpa I</i> 、 <i>Ase I</i> 、 <i>Pac I</i>
AGCT	<i>Alu I</i>	<i>Alu I</i> 、 <i>Pvu II</i> 、 <i>Hind III</i> 、 <i>Sac I</i>
GCGC	<i>Hha I</i>	<i>Hha I</i> 、 <i>Sfo I</i> 、 <i>Fsp I</i> 、 <i>PluT I</i> 、 <i>Afe I</i> 、 <i>HinP1 I</i> 、 <i>Nar I</i>

表2 限制性内切酶的诱导表达和亲和纯化

Table 2 Expression and purification methods of restriction enzyme

质粒	基因编号	诱导条件	内切酶纯化方式
pACYC184-M.EsaDix5 I	来自 REBASE	—	—
pACYC184-M.Alu I	QDP76584.1	—	—
pACYC184-M.Hha I	P05102	—	—
pBAD-R.Mse I	ABC86982.1	26 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	肝素亲和层析、阴离子交换层析
pBAD-R.Hpa I	P29537	37 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	肝素亲和层析、阴离子交换层析
pBAD-R.Pac I	QQG33572.1	26 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	Ni ²⁺ 亲和层析、阴离子交换层析、肝素亲和层析
pBAD-R.Dra I	ADZ31431.1	30 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	肝素亲和层析、阴离子交换层析
pBAD-R.Ase I	ADO24186.1	26 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	肝素亲和层析、阴离子交换层析
pBAD-R.Alu I	QDP76585.1	30 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	肝素亲和层析、阴离子交换层析
pBAD-R.Sac I	AAC97119.1	26 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 6 h	Ni ²⁺ 亲和层析、阴离子交换层析、肝素亲和层析
pBAD-R.Hind III	AAC23040.1	37 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	阴离子交换层析、肝素亲和层析
pBAD-R.Pvu II	P23657.1	37 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	肝素亲和层析、阴离子交换层析
pBAD-R.Hha I	QEN11223.1	37 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	阴离子交换层析、肝素亲和层析
pBAD-R.Fsp I	ADX97311.1	26 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	Ni ²⁺ 亲和层析、阴离子交换层析、肝素亲和层析
pBAD-R.HinP1 I	AAW33811.1	37 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	阴离子交换层析、肝素亲和层析
pBAD-R.Afe I	来自 REBASE	30 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	肝素亲和层析、阴离子交换层析
pBAD-R.Plut I	CAE12894.1	37 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	肝素亲和层析、Ni ²⁺ 亲和层析、阴离子交换层析
pBAD-R.Nar I	来自 REBASE	26 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	肝素亲和层析、阴离子交换层析
pBAD-R.Sfo I	ADZ31418.1	26 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	肝素亲和层析、阴离子交换层析
pBAD-R.EcoSP4ORF25090P	PQV17384.1	30 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	Ni ²⁺ 亲和层析、阴离子交换层析
pBAD-R.Gma5ORF28P	AEU34387.1	30 ℃, 质量分数 0.2% L-ara, 16 h	Ni ²⁺ 亲和层析、阴离子交换层析

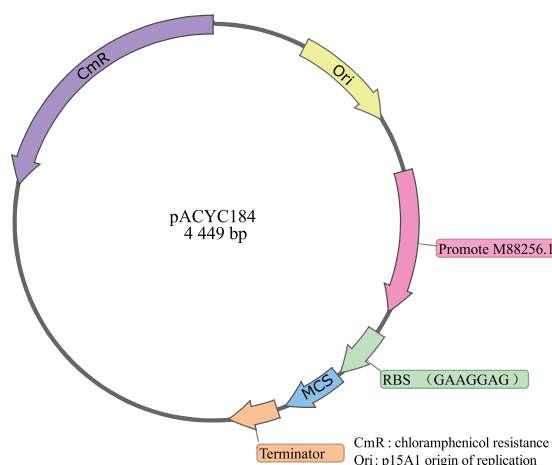


图3 改造的 pACYC184 组成型表达载体图谱

Fig. 3 Schematic of the modified constitutive expression vector pACYC184

通常,宿主菌的内源甲基化修饰系统会抑制外源表达的甲基转移酶行使功能。为了测试不同宿主菌株对内切酶表达体系的影响,选择了两种不同基因型的大肠杆菌 DH5 α 和 ER2566, 以确定最优的宿主菌株, 其中 DH5 α 含有内源甲基化修饰系统, 而 ER2566 则为内源甲基化修饰系统缺陷型菌株。

将含有识别重叠序列的甲基转移酶的 pACYC184 质粒分别转入 ER2566 和 DH5 α , 然后挑选单克隆菌株并在含 50 mg/L 氯霉素的 LB 培养基中培养, 提取质粒用于后续测试。将 200 ng pACYC184 重组质粒与 CutSmart[®] 缓冲液混合, 向其中加入 1 U 对应的商业化限制性内切酶, 并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。使用 1 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测限制性内切酶的消化效果。结果表明, 在大肠杆菌 ER2566 菌株中表达的识别重叠序列的甲基转移酶, 可以甲基化修饰基因组 DNA, 从而抵抗限制性内切酶的消化, 而在 DH5 α 菌株中则不能 (见图 4)。这一结果表明, 利用识别重叠序列的甲基转移酶代替专一配对甲基转移酶的表达策略, 可以抵抗识别序列中含有重叠序列的限制性内切酶的消化, 因此, 这种“一对多”的限制性内切酶重组表达模式具有可实现性。该实验结果也表明内源甲基化修饰系统会抑制外源甲基转移酶的功能, 因此相比于 DH5 α 菌株, 缺失内源甲基化修饰系统的大肠杆菌 ER2566 菌株更适合作为重组表达限制性内切酶的宿主菌株。

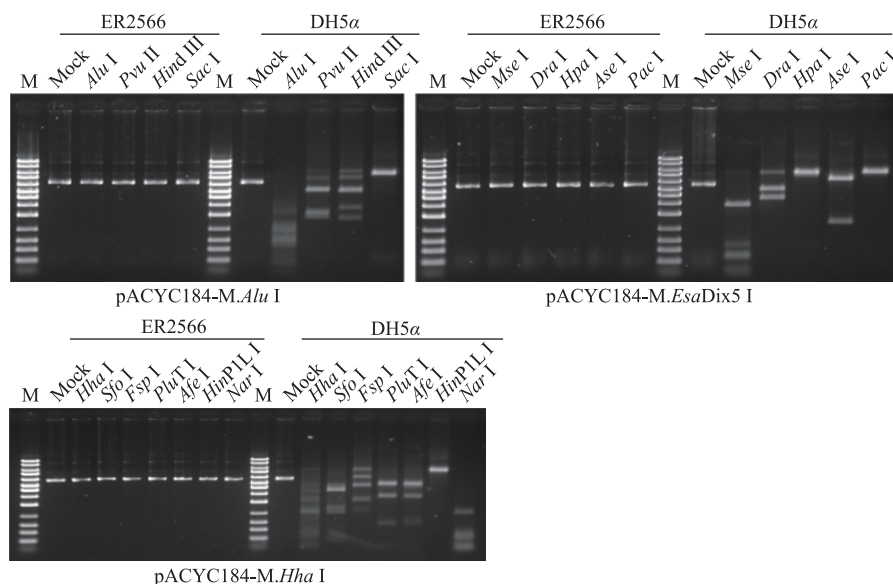


图4 筛选抵抗限制性内切酶消化的宿主菌株

Fig. 4 Screening restriction enzyme digestion-resistant host strain

2.3 “一对多”策略重组表达限制性内切酶

将表 1 中含有可以识别重叠序列 (TTAA、AGCT、GCGC) 的一系列限制性内切酶 (*R.Mse* I、*R.Dra* I、*R.Hpa* I、*R.Ase* I、*R.Pac* I、*R.Alu* I、*R.Pvu* II、*R.Hind* III、*R.Sac* I、*R.Hha* I、*R.Sfo* I、*R.Fsp* I、*R.Plut* I、*R.Afe* I、*R.HinP1* I 和 *R.Nar* I) 的 pBAD/HisA 质粒分别转入

ER2566 宿主菌株, 并挑取单克隆菌株用于限制性内切酶的重组表达, 在收获细菌后, 利用 Ni²⁺亲和层析、阴离子交换层析或肝素亲和层析等对其进行简易纯化并用于后续的验证实验。按照商业化内切酶的操作流程, 对重组表达的限制性内切酶进行了酶切活性检测, 并用商业限制性内切酶作为阳性对照

(见图 5)。结果表明,使用“一对多”策略重组表达的限制性内切酶表现出与商业限制性内切酶相同的

消化能力,说明这一策略可以用于限制性内切酶的重组表达,代替现有限制性内切酶的制备模式。

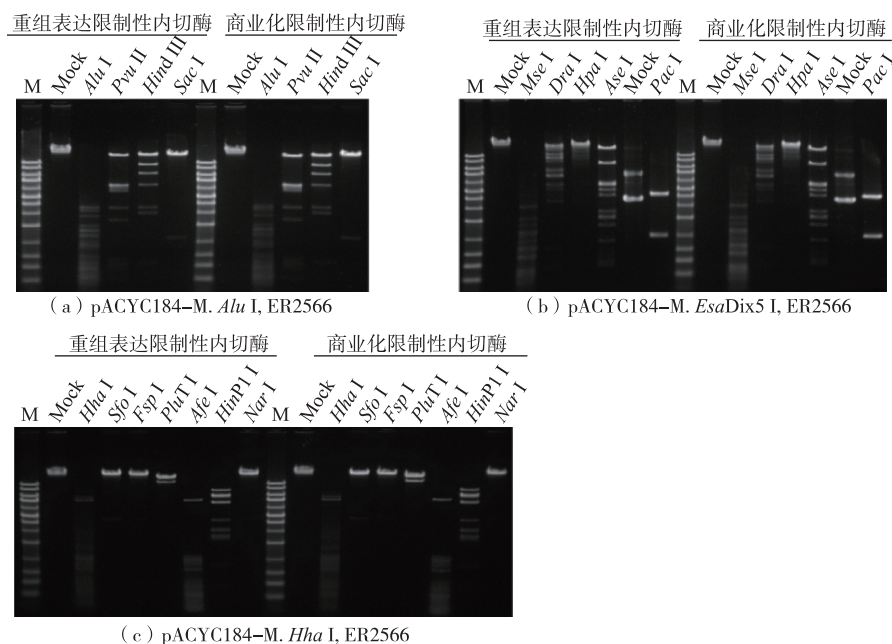


图 5 “一对多”策略重组表达限制性内切酶的活性筛选

Fig. 5 Activity screening of restriction enzymes recombinantly expressed in an ‘on-to-many’ strategy

2.4 R.Sac I 同裂酶的重组表达

进一步测试新的重组表达策略是否可用于发现新的限制性内切酶。选取 REBASE 数据库中预测的 R.Sac I 同裂酶: R.EcoSP4ORF25090P 和 R.Gma5ORF28P(见表 2)进行后续的验证实验。预测 R.EcoSP4ORF25090P 和 R.Gma5ORF28P 的识别序列为 AAGCTT,但是与其配对的甲基转移酶的基因序列还不清楚,因此无法按照传统模式进行重组表达。根据“一对多”的重组表达策略,利用其识别序列与 Alu I 识别序列重叠的特性,将这两个预测的限制性内切酶重组质粒分别转入含有 pACYC184-M.Alu I 重组质粒的 ER2566 宿主菌株,并通过镍亲和纯化对其进行简单纯化以用于后续的内切酶活性检测。提纯的 R.EcoSP4ORF25090P 和 R.Gma5ORF28P 在 37℃下与 500 ng λDNA 共同孵育 30 min,然后用质量浓度 1 g/dL 的琼脂糖凝胶进行电泳,测定其内切酶活性(见图 6)。结果表明,这两个新的 R.Sac I 同裂酶表现出与预测识别序列相同的消化效果,表明这一新的重组表达策略可用于发现和制备新的限制性内切酶,特别是新的同工酶或同裂酶。

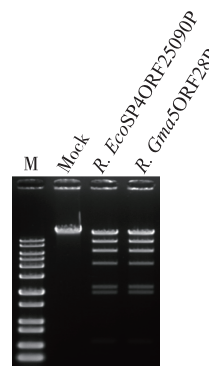


图 6 限制性内切酶 R.Sac I 同源酶的活性验证

Fig. 6 Restriction enzyme activity of restriction endonuclease R.Sac I isoschizomers

3 结 语

自从流感嗜血杆菌的限制-修饰系统中发现 R.Hind II 以来,人们对数百种识别不同序列的限制性内切酶的结构和功能进行了广泛研究,其相关基因已被克隆和表达,并进行了商业化推广,使其成为进行分子克隆的关键工具,被广泛用于 DNA 分析和基因工程实验室。但是,传统的限制性内切酶重组表达策略需要完整配对的限制-修饰系统,且

需要大量的克隆构建和筛选工作,因此真正实现商业化生产限制性内切酶的公司相对较少,限制了其应用推广。

作者通过共表达识别重叠序列的甲基转移酶保护宿主菌株,以制备限制性内切酶。首先将识别重叠序列的甲基转移酶转入大肠杆菌以保护宿主基因组 DNA,然后将能识别重叠序列的一系列限制性内切酶分别转入该宿主菌株,以进行限制性内切酶的重组表达,即“一对多”的表达模式。与传统方法相比,该方法能够大幅度简化抵抗限制性内切酶

消化的宿主菌株的筛选过程,简化了限制性内切酶的重组表达模式,也利于限制性内切酶的简易制备和广泛使用。

此外,该策略也可用于发现更多新的限制性内切酶,尤其是新的同工酶或同裂酶。利用这一重组表达策略,可以加速发现新的限制性内切酶,也将助力深入研究限制性内切酶底物识别特异性的作用机制或开拓新的应用场景,也更希望这种“一对多”的限制性内切酶重组表达模式能助力国内生物试剂公司早日实现限制性内切酶的国产商业化。

参考文献:

- [1] YUAN R, MESELSON M. A specific complex between a restriction endonuclease and its DNA substrate[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1970, 65(2):357-362.
- [2] DANNA K, NATHANS D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae* [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1971, 68(12):2913-2917.
- [3] MIDDLETON J H, EDGELL M H, HUTCHISON C A. Specific fragments of phi X174 deoxyribonucleic acid produced by a restriction enzyme from *Haemophilus aegyptius*, endonuclease Z[J]. **Journal of Virology**, 1972, 10(1):42-50.
- [4] MESELSON M, YUAN R. DNA restriction enzyme from *E. coli* [J]. **Nature**, 1968, 217(5134):1110-1114.
- [5] SEARS A, PEAKMAN L J, WILSON G G, et al. Characterization of the type III restriction endonuclease *Pst* II from *Providencia stuartii* [J]. **Nucleic Acids Research**, 2019, 47(21):11477-11479.
- [6] BOYER H W, CHOW L T, DUGAICZYK A, et al. DNA substrate site for the *EcoR* II restriction endonuclease and modification methylase [J]. **Nature: New Biology**, 1973, 244(132):40-43.
- [7] VOVIS G F, HORIUCHI K, ZINDER N D. Kinetics of methylation of DNA by a restriction endonuclease from *Escherichia coli* B [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1974, 71(10):3810-3813.
- [8] GRONENBORN B, MESSING J. Methylation of single-stranded DNA *in vitro* introduces new restriction endonuclease cleavage sites [J]. **Nature**, 1978, 272(5651):375-377.
- [9] HUANG X J, LU H L, WANG J W, et al. High-throughput sequencing of methylated cytosine enriched by modification-dependent restriction endonuclease *MspJ* I [J]. **BMC Genetics**, 2013, 14:1-10.
- [10] MANKAI H D, WENDE W, SLAMA N, et al. Biochemical and molecular characterization of a restriction endonuclease *Tvu2H* I from *Thermoactinomyces vulgaris* 2H and study of its R-M system [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, 164:3105-3113.
- [11] 颜鸿飞. 新型分子探针的设计及其在甲基化酶和限制性内切酶实时分析及药物筛选中的应用[D]. 长沙:湖南大学, 2005.
- [12] ARBER W, LINN S. DNA modification and restriction [J]. **Annual Review of Biochemistry**, 1969, 38:467-500.
- [13] BOYER H W, ROULLAND-DUSSOIX D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli* [J]. **Journal of Molecular Biology**, 1969, 41(3):459-472.
- [14] 王智新, 王昌留. 限制性核酸内切酶及其显带研究进展 [J]. 鲁东大学学报(自然科学版), 2011, 27(2):154-157.
WANG Z X, WANG C L. Progress of restriction endonuclease and its application in chromosome banding [J]. **Ludong University Journal (Natural Science Edition)**, 2011, 27(2):154-157. (in Chinese)
- [15] CINCO M, BANFI E, BALANZIN D, et al. Restriction endonuclease analysis of four *Borrelia burgdorferi* strains [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1989, 47(8):511-514.
- [16] MANDAL S C, MAGANTI L, MONDAL M, et al. Microscopic insight to specificity of metal ion cofactor in DNA cleavage by restriction endonuclease *EcoR* V [J]. **Biopolymers**, 2020, 111(10):e23396.
- [17] CARVIN C D, DHASARATHY A, FRIESENHAHN L B, et al. Targeted cytosine methylation for *in vivo* detection of protein-DNA interactions [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2003, 100(13):7743-7748.

- [18] EISENSCHMIDT K, LANIO T, SIMONCSITS A, et al. Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage[J]. **Nucleic Acids Research**, 2005, 33(22): 7039-7047.
- [19] CARLSON K, KOSTURKO L D. Endonuclease II of coliphage T4: a recombinase disguised as a restriction endonuclease?[J]. **Molecular Microbiology**, 1998, 27(4): 671-676.
- [20] 孙微微, 贾怀杰, 景志忠, 等. 甲基化修饰对病毒潜伏感染的调控作用研究进展[J]. 病毒学报, 2021, 37(3): 764-770.
SUN W W, JIA H J, JING Z Z, et al. Research advances in the role of methylation in latent viral infections[J]. **Chinese Journal of Virology**, 2021, 37(3): 764-770. (in Chinese)
- [21] ROBERTS R J, WILSON G A, YOUNG F E. Recognition sequence of specific endonuclease *Bam*H I from *Bacillus amyloliquefaciens* H[J]. **Nature**, 1977, 265(5589): 82-84.
- [22] RA S R, KIM M S, KIM T R, et al. Restriction endonuclease T. *Smu*451 I with new cleavage specificity-neoschizomer of T. *Asu* I [J]. **Folia Microbiologica**, 2021, 66(4): 651-657.
- [23] GREENE P J, HEYNEKER H L, BOLIVAR F, et al. A general method for the purification of restriction enzymes[J]. **Nucleic Acids Research**, 1978, 5(7): 2373-2380.
- [24] TSAI M H, LIN L C, HSU J F, et al. Rapid identification of invasive fungal species using sensitive universal primers-based PCR and restriction endonuclease digestions coupled with high-resolution melting analysis[J]. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2019, 52(5): 728-735.
- [25] SMITH M, SMITH K, OLSTEIN A, et al. Restriction endonuclease-based assays for DNA detection and isothermal exponential signal amplification[J]. **Sensors**, 2020, 20(14): 3873.
- [26] 程艺, 马超, 陈晓雨, 等. 限制性内切酶 *Nco* I 的高效重组表达、硒代与结晶条件初步筛选[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(7): 81-88.
CHENG Y, MA C, CHEN X Y, et al. High efficient recombinant expression of endonuclease *Nco* I selenoprotein and preliminary screening of protein crystallization conditions [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2021, 40(7): 81-88. (in Chinese)
- [27] XU S Y, XIAO J P, ETTWILLER L, et al. Cloning and expression of the *Apa*L I, *Nsp* I, *Nsp*H I, *Sac* I, *Sca* I, and *Sap* I restriction-modification systems in *Escherichia coli*[J]. **Molecular and General Genetics MGG**, 1998, 260(2): 226-231.
- [28] MARUGGI G, ZHANG C L, LI J W, et al. mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases[J]. **Molecular Therapy**, 2019, 27(4): 757-772.
- [29] CHAUDHARY N, WEISSMAN D, WHITEHEAD K A. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation[J]. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2021, 20(11): 817-838.
- [30] DOLGIN E. Unlocking the potential of vaccines built on messenger RNA[J]. **Nature**, 2019, 574(7778): 10-12.
- [31] STIER I, KISS A. The type II restriction endonuclease *Mva* I has dual specificity[J]. **Nucleic Acids Research**, 2010, 38(22): 8231-8238.
- [32] BITINAITE J, MANELIENE Z, MENKEVICIUS S, et al. *Alw*26 I, *Eco*31 I and *Esp*3 I-type IIs methyltransferases modifying cytosine and adenine in complementary strands of the target DNA[J]. **Nucleic Acids Research**, 1992, 20(19): 4981-4985.
- [33] BITINAITE J, MITKAITE G, DAUKSAITE V, et al. Evolutionary relationship of *Alw*26 I, *Eco*31 I and *Esp*3 I, restriction endonucleases that recognise overlapping sequences[J]. **Molecular Genetics and Genomics**, 2002, 267(5): 664-672.
- [34] ZHAO Z H, YUNG M H, CUI T, et al. Restriction endonuclease from thermophilic bacterial species IV. Isolation and characterization of *Bpu*B5 I[J]. **Nucleic Acids Research**, 1992, 20(5): 1156.
- [35] KANG Y K, LEE H B, NOH M J, et al. Different effects of base analog substitutions in *Bam*H I restriction site on recognition by *Bam*H I endonuclease and *Bam*H I methylase [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1995, 206(3): 997-1002.
- [36] BOZIC D, GRAZULIS S, SIKSNYS V, et al. Crystal structure of *Citrobacter freundii* restriction endonuclease *Cfr*10 I at 2.15 Å resolution[J]. **Journal of Molecular Biology**, 1996, 255(1): 176-186.