



草业科学研究系列专著

# 禾本科牧草基因工程 技术及应用

米福贵 王桂花  
云锦凤 霍秀文 徐春波 逯晓萍 编著



科学出版社  
[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)

草业科学研究系列专著

# 禾本科牧草基因工程技术及应用

米福贵 王桂花

云锦凤 霍秀文 徐春波 逯晓萍 编著

科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本书详细介绍了有关植物基因工程中所应用的工具酶和克隆载体的构建、完整的遗传转化体系的建立、遗传转化方法及转基因植株的检测与鉴定原理和方法；论述了牧草基因工程的发展，牧草病害、虫害及非生物胁迫的种类、防治方法、相应的抗性基因及在牧草育种中的应用；并详细介绍了内蒙古农业大学牧草育种实验室所做的冰草转基因研究工作。

本书可供从事植物生物技术、牧草及草坪草生物技术、草业科学等领域工作的科研人员、专业技术人员及相关大中专院校教师和学生参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

禾本科牧草基因工程技术及应用 / 米福贵等编著. —北京: 科学出版社, 2010

(草业科学研究系列专著)

ISBN 978-7-03-027594-3

I. ①禾… II. ①米… III. ①牧草—基因—遗传工程 IV. ①S540.3

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第088217号

责任编辑: 韩学哲 李晶晶 / 责任校对: 刘亚琦  
责任印制: 钱玉芬 / 封面设计: 耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社编务公司排版制作

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2010年5月第一版 开本: B5(720×1000)

2010年5月第一次印刷 印张: 20 3/4 插页: 2

印数: 1—2 000 字数: 400 000

定价: 70.00元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《草业科学研究系列专著》编辑委员会

主编 云锦凤 韩国栋 王明玖

编委 (以姓氏笔画排序)

于卓 卫智军 王明玖 王忠武 王俊杰

王桂花 云锦凤 石凤翎 付和平 乔光华

米福贵 红梅 李红 李造哲 李德新

张众 武晓东 杨泽龙 金洪 郑淑华

珊丹 赵钢 赵萌莉 侯建华 格根图

贾玉山 高润宏 高翠萍 韩冰 韩国栋

秘书 高翠萍 李治国

本系列专著是内蒙古农业大学草业科学国家重点学科、草地资源教育部重点实验室、草地资源可持续利用科技创新团队、内蒙古草业研究院和内蒙古自治区草品种育繁工程技术研究中心建设项目的成果，并由其资助出版。

## 序 言

《草业科学研究系列专著》是内蒙古农业大学草业科学国家重点学科和草地资源教育部重点实验室等建设项目的重要成果之一。该重点学科和实验室源远流长，底蕴深厚。从1958年建立我国第一个草原专业开始，半个世纪以来，他们立足于内蒙古丰富的草地资源，经过几代人筚路蓝缕，开拓前进。《草业科学研究系列专著》就是他们在草业科学教学和研究的漫长道路上，铢积寸累的厚重成果。

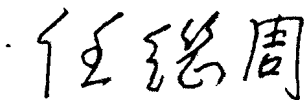
这一系列专著涉及了牧草种质资源与牧草育种，牧草栽培与利用，草产品加工，草地生态系统，草地资源监测、评价和合理利用，草原啮齿类动物防治等众多领域。尤其在牧草远缘杂交、雄性不育、冰草转基因以及草地健康和服务等方面，取得了很大成就，赢得了国内外学界认可。

我国是草地资源大国，草原面积占国土面积的41.7%，居世界第二位。草原与森林共同构成了我国生态屏障的主体。草业“事关国家生态安全和粮食安全，事关资源节约和环境友好型社会建设，事关经济社会全面协调可持续发展”（杜青林，2006，《中国草业可持续发展战略》序言）。这也正是我国新兴的草业科学面临的重大历史任务。

我们欣慰地看到，《草业科学研究系列专著》由科学出版社组织出版，对这一重大历史任务作出了正面响应。这一系列专著不仅是内蒙古农业大学草业科学国家重点学科和草地资源教育部重点实验室的宝贵成果，也是我国草业学界对祖国崛起的精诚贡献。

我祝贺《草业科学研究系列专著》的出版。衷心祝愿这一系列专著与它所代表的学术集体相偕发展，不断壮大。

中国工程院院士



序于2009年建国60周年端午节

## 前 言

利用基因工程技术,把外源基因导入植物细胞或组织是现代作物遗传育种的重要途径。20世纪90年代,首例转基因烟草的出现,掀起了生物技术的“第二次浪潮”,极大地推动了植物基因工程的研究进程。牧草基因工程的研究始于80年代后期。1985年,Vasil在国际草原学大会上第一次提出利用遗传转化技术将其他来源的特定基因导入牧草的可行性,为利用基因工程技术改良牧草,包括改善牧草饲用品质,提高产量和利用率,增加牧草对逆境的适应能力,增强对各种虫害、病害的抗性奠定了理论基础。与发达国家相比,我国牧草遗传转化的研究起步较晚,但发展迅速,目前已有众多实验室建成自己的技术系统模式,对牧草基因工程进行研究与探索。为推动牧草基因工程的发展,并为相应的基因工程技术提供参考,作者结合多年的科研、教学及实验经验,编写了《牧草基因工程技术》一书。

本书共分四部分,包括植物基因工程技术、牧草基因工程概述、冰草转基因及附录。植物基因工程技术部分在参考有关基因工程及分子育种等参考书基础上,详细介绍了有关植物基因工程中应用的工具酶和克隆载体及载体的构建、完整的遗传转化体系的建立、遗传转化方法及转基因植株的检测与鉴定的原理和方法。牧草基因工程概述部分论述了牧草基因工程的发展及牧草基因工程抗病、抗虫及抗非生物胁迫基因工程育种,阐述了牧草病害、虫害及非生物胁迫的种类、防治方法、相应的抗性基因及其在牧草育种中的应用。冰草转基因部分详细介绍了内蒙古农业大学牧草育种实验室在冰草转基因研究中所做的工作及成果,包括冰草组织培养再生体系的建立、冰草的遗传转化及分子检测、转基因冰草植株的生物学特性及抗性鉴定。附录部分介绍了几种常用抗生素的配制和使用浓度、几种基本培养基的配方及冰草转基因中的部分图片。全书由米福贵策划与统稿,王桂花执笔,云锦凤、霍秀文、徐春波和逯晓萍校订。全书力求融理论性和实用性于一体,可供大中专院校师生及从事植物基因工程,特别是从事牧草基因工程的技术人员参考。

本书在编写过程中参阅了大量的基因工程、分子生物学、分子育种等方面的教材、专著及论文资料,在此一并向有关作者表示谢忱,如有遗漏敬请原谅。由于时间仓促,加之编者水平限制,书中难免有不妥和疏漏之处,恳请读者批评指正。

编 者

2009年3月

# 目 录

序言  
前言

## 第一篇 植物基因工程技术

<b>第一章 基因工程常用的工具酶和克隆载体</b> .....	3
<b>第一节 常用的工具酶</b> .....	3
一、限制性内切核酸酶 .....	3
二、DNA 连接酶 .....	12
三、DNA 聚合酶 .....	14
四、DNA 修饰酶 .....	20
五、单链内切核酸酶 .....	22
六、外切核酸酶 .....	23
<b>第二节 基因工程中常用的克隆载体</b> .....	24
一、质粒克隆载体 .....	25
二、病毒(噬菌体)克隆载体 .....	40
三、染色体定位整合克隆载体 .....	65
四、启动子探针型克隆载体 .....	71
五、诱导型表达克隆载体 .....	72
六、组织特异性表达克隆载体 .....	74
七、含增强子表达克隆载体 .....	75
<b>第二章 遗传转化体系的建立</b> .....	78
<b>第一节 遗传表达载体的构建</b> .....	78
一、外源目的基因的取得 .....	78
二、基因克隆载体的分离提纯 .....	89
三、重组 DNA 分子的形成 .....	91
四、重组 DNA 分子(重组子)的筛选 .....	103
<b>第二节 植物遗传转化受体系统的建立</b> .....	108
一、植物遗传转化受体系统的条件 .....	109
二、用于植物遗传转化受体系统的材料 .....	111
三、植物基因转化受体系统建立的程序 .....	114
<b>第三章 遗传转化方法</b> .....	119
一、以载体为介导的间接转化 .....	119



二、DNA 直接转化法	126
三、种质系统介导基因转化	132
四、植物转基因方法评价	135
<b>第四章 转基因植株的检测与鉴定</b>	<b>137</b>
<b>第一节 外源基因转化的鉴定</b>	<b>137</b>
一、标记基因的检测	137
二、PCR 检测	142
三、分子标记	144
四、Southern 杂交	145
<b>第二节 外源基因表达的检测</b>	<b>148</b>
一、外源基因表达在转录水平的检测	148
二、外源基因表达的蛋白质水平的检测	152
三、生理生化检测法	161
四、生物鉴定法	161

## 第二篇 牧草基因工程概述

<b>第一章 牧草基因工程的兴起与发展</b>	<b>165</b>
一、豆科牧草转基因研究进展	165
二、禾本科牧草和草坪草基因工程研究进展	170
<b>第二章 牧草基因工程育种的目标与存在的问题</b>	<b>175</b>
<b>第一节 牧草基因工程抗病育种</b>	<b>175</b>
一、牧草病害的种类	176
二、牧草病害的防治办法	177
三、牧草抗病基因工程育种	179
<b>第二节 牧草基因工程抗虫育种</b>	<b>191</b>
一、牧草虫害的种类	191
二、虫害的防治	192
三、牧草抗虫害基因工程	194
<b>第三节 抗非生物胁迫基因工程育种</b>	<b>200</b>
一、抗除草剂基因工程育种	200
二、抗逆基因工程育种	207
<b>第四节 品质改良</b>	<b>221</b>
一、消化率	221
二、蛋白质	224
三、可溶性碳水化合物	224
四、抗营养因子	225
<b>第五节 牧草转基因存在的问题</b>	<b>226</b>

### 第三篇 冰草转基因

<b>第一章 冰草转基因研究的历史背景与意义</b> .....	231
一、冰草转基因研究的历史背景 .....	231
二、冰草转基因研究的意义 .....	232
<b>第二章 冰草组织培养再生体系的建立</b> .....	233
<b>第一节 以幼穗为外植体的冰草属植物组织培养再生体系的建立</b> .....	233
一、材料与方法 .....	233
二、结果与分析 .....	235
三、结论 .....	241
<b>第二节 以成熟胚为外植体的冰草属植物组织培养再生体系的建立</b> .....	241
一、以蒙农杂种冰草成熟胚组织培养再生体系的建立 .....	241
二、四种冰草成熟胚组织培养再生体系的建立 .....	246
<b>第三节 冰草愈伤组织细胞悬浮培养初探</b> .....	249
一、材料与方法 .....	249
二、结果与分析 .....	250
三、结论 .....	251
<b>第三章 冰草的遗传转化及分子检测</b> .....	253
<b>第一节 冰草遗传转化体系的建立</b> .....	253
一、目的基因 .....	253
二、遗传表达载体的构建 .....	253
三、冰草的遗传转化 .....	257
<b>第二节 转基因冰草植株的分子检测</b> .....	258
一、材料与方法 .....	258
二、结果与分析 .....	265
<b>第四章 转基因冰草植株的生物学特性及抗性鉴定</b> .....	271
<b>第一节 转基因冰草植株的生物学特性</b> .....	271
一、材料与方法 .....	271
二、结果与分析 .....	272
三、结论 .....	274
<b>第二节 转 <i>p5CS</i> 基因冰草植株的抗旱性鉴定</b> .....	274
一、材料与方法 .....	274
二、结果与分析 .....	278
三、结论 .....	285
<b>第三节 转 <i>p5CS</i> 基因冰草植株的耐盐性鉴定</b> .....	285
一、材料与方法 .....	285
二、结果与分析 .....	285
三、结论 .....	290

第四节 转 <i>CBF4</i> 基因冰草植株的抗旱性鉴定 .....	290
一、材料与方 法 .....	290
二、结果与分析 .....	290
三、结 论 .....	296
<b>主要参考文献</b> .....	297
<b>附录</b> .....	314
附录一 常用抗生素的配制和使用浓度 .....	314
附录二 常用培养基的配制 .....	315
附录三 野生型 $\lambda$ DNA 上限制性内切核酸酶的识别位点 .....	317

# 第一篇 植物基因工程技术

基因工程(gene engineering)通常称为重组 DNA 技术(DNA recombination), 又称为基因克隆(gene cloning)或分子克隆(molecular cloning)。它是 20 世纪 70 年代初期在分子遗传学基础上发展起来的一个崭新领域, 是人工方法将外源基因与 DNA 载体结合形成重组 DNA, 然后引入某一受体细胞中, 使外源基因复制并产生相应的基因产物, 从而获得生物新品种的一种崭新育种技术。

植物基因工程(plant genetic engineering)是基因工程技术在植物上的应用, 是利用分子生物学技术, 把经过分离或人工构建的基因, 通过适当的基因转化方法插入植物基因组中, 得到基因产物和生物活性的表达, 并能遗传至后代的一种技术方法。

植物基因工程的建立得益于植物分子遗传学的发展, 特别是基因的分离和结构的研究、基因及其产物蛋白质的序列分析、基因表达与调控、基因表达载体的研究以及植物转化技术的发展。



# 第一章 基因工程常用的工具酶和克隆载体

## 第一节 常用的工具酶

### 一、限制性内切核酸酶

限制性内切核酸酶(restriction endonuclease), 简称限制酶, 是一类能够识别双链 DNA 分子中的某种特定核苷酸序列, 并由此切割 DNA 双链结构的内切核酸酶, 是在基因的分离、DNA 结构分析、载体的改造及体外重组中均起着重要作用的一类酶。

限制性内切核酸酶主要是从原核生物中分离纯化出来的。1952 年 Luria 和 Human 在研究 T 偶数噬菌体及 1953 年 Bertani 和 Weigle 在研究 $\lambda$ 和 P2 噬菌体的宿主范围时发现, 当一个噬菌体从其天然宿主(如 *E. coli* 品系 A)转到另一个品系 B 细胞中时往往不能生长。但是大量感染, 有时也可能出现个别的幸存者, 将其子代再感染品系 B 时, 则能大量繁殖, 他们把此现象称为宿主控制性限制现象。1962 年 Arber 等对 $\lambda$ 噬菌体在大肠杆菌不同菌株上的平板效应研究中, 发现原核生物体内存在着寄生控制的限制(restriction)和修饰(modification)系统。并指出限制修饰系统中限制作用是指一定类型的细菌可以通过限制酶的作用, 破坏入侵的外源 DNA(如噬菌体 DNA 等), 使得外源 DNA 对生物细胞的入侵受到限制; 而修饰作用是指生物细胞(如宿主)自身的 DNA 分子合成后, 通过修饰酶的作用, 在碱基中特定的位置上发生了甲基化而得到修饰, 可免遭自身限制酶的破坏。1968 年 Meselson 和 Yuan 最早从大肠杆菌 K<sub>12</sub>的限制和修饰系统中分离到限制性内切核酸酶, 后来被定义为 I 型限制性内切核酸酶。1970 年 Smith 和 Wilcox 分离纯化了第一个 II 型限制性内切核酸酶, Arber 等的假说完全被证实了。到目前为止, 已从 350 种不同的微生物中, 发现了大约 400 种限制酶。

#### (一) 限制性内切核酸酶的命名

限制性内切核酸酶的命名法, 是在 1973 年由 H. O. Smith 和 D. Nathans 提出来的。他们建议命名原则如下(在实际应用上已作了简化):

(1) 以寄主微生物属名的第一个字母(大写)和种名的前两个字母(小写), 组成 3 个字母的略语表示寄主菌的物种名称。如大肠杆菌(*Escherichia coli*)用 *Eco* 表示;

流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)用 *Hin* 表示。

(2) 菌株名加在这三个字母的后面, 如 *Bam*HI。如果限制与修饰体系在遗传上是由病毒或质粒引起的, 则在缩写的寄主菌的种名后附加一个字母, 表示此染色体外的成分, 如 *Eco*RI。

(3) 若一种特殊的寄主菌株, 具有几个不同的限制与修饰体系时, 则以罗马数字加以区分。例如, 流感嗜血菌 *Rd* 菌株的几个限制与修饰体系分别表示为 *Hind*I、*Hind*II、*Hind*III。*Hind*I 是特异性甲基化酶; *Hind*II 的切割位点是  $GTP_Y \downarrow P_UAG$ ; *Hind*III 的酶切位点是  $A \downarrow AGCTT$ 。

## (二) 限制性内切核酸酶的分类与作用特性

根据限制性内切核酸酶的限制和修饰活性、相对分子质量大小、酶蛋白结构、切割位点及限制作用所需的辅助因子等, 把限制性内切核酸酶分为三种不同的类型, 即 I 型酶、II 型酶和 III 型酶。这三种不同类型的限制酶具有不同的作用特性。

### 1. I 型限制性内切核酸酶

I 型限制酶是早期提取的酶类, 一般都是大型的多亚基蛋白质复合物。酶蛋白分子质量大, 在 30 万 Da 左右, 由不同的亚基组成, 其中特异性亚基, 具有特异性识别 DNA 序列的活性, 修饰亚基具有甲基化酶的活性, 限制亚基具有内切核酸酶活性, 是一类复杂的多功能酶。起作用时需要  $Mg^{2+}$ 、ATP 和 SAM(S-腺苷甲硫氨酸)作为催化反应的辅助因子, 在降解 DNA 时, 伴有 ATP 的水解。

I 型酶的显著特点是能够识别 DNA 分子中特定的核苷酸序列, 但没有固定的切割位点, 一般在离切割位点 2kb 到几千碱基对的地方随机切割, 不产生特异性片段, 在基因克隆中没有实用价值。该类酶对 DNA 分子的切割方式是十分奇特的, 它结合在识别位点以滚环形式沿着 DNA 分子转位, 而后, 从距识别位点 5' 端一侧数千碱基处随机切割 DNA 分子。例如, Linn 和 Arber 从大肠杆菌 K 株和 B 株中分离得到的限制性内切核酸酶 *Eco*K 和 *Eco*B 是 I 型酶的两个代表。*Eco*K 酶分子包含三类亚基, 全酶结构为  $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ , 相对分子质量( $M_w$ )约为 400 000。其中亚基  $\alpha$  的  $M_w$  为 135 000, 亚基  $\beta$  和  $\gamma$  的  $M_w$  分别为 62 000 和 52 000, 可以识别特异的碱基序列 A—A—C—N<sub>6</sub>—G—T—G—C(图 1-1)。

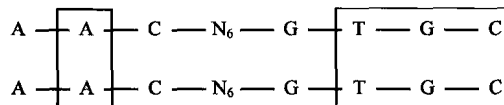


图 1-1 *Eco*K 酶识别的碱基序列(齐义鹏, 1988)

*Eco*B 也由三种亚基组成,  $M_w$  与 *Eco*K 接近。但全酶有不同的聚合体, 相对分子质量为 450 000~750 000, 主要的结构形态是  $\alpha_2\beta_4\gamma_2$ 。其修饰酶和限制酶可以

分开，修饰酶的亚基与限制酶的β和γ亚基相同， $M_w$ 为 105 000，亚基组成为 $\beta_4\gamma_1$ 。全酶能够识别的特异序列为 T—G—A—N<sub>8</sub>—T—G—C—T，并可能对第 3 个和第 9 个碱基进行甲基化(图 1-2)。

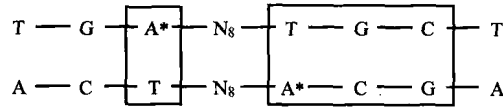


图 1-2 *EcoB* 酶识别的碱基序列(齐义鹏, 1988)

\*表示甲基化

## 2. II 型限制酶

通常说的限制酶就是指的 II 型限制酶，只有一种多肽，并通常以同源二聚体形式存在，相对分子质量较小，为 2 万~10 万，是简单的单功能酶，作用时无需辅助因子或只需镁离子。II 型酶没有 I 型酶的那些异常特性，其内切核酸酶活性和甲基化作用是分开的。它能识别双链 DNA 上特异的核苷酸序列，底物作用的专一性强，而且其识别序列与切割序列相一致，切割后形成一定长度和顺序的分离的 DNA 片段。因而，II 型酶对于 DNA 操作是极为重要的。

1970 年，科学家们从流感嗜血菌 Rd 株中分离纯化出第一个 II 型酶 *HindII*，是迄今公认的一种典型 II 型限制性内切核酸酶。后来，越来越多的 II 型酶陆续被发现和纯化。几乎所有细菌的属、种中都发现至少有一种 II 型限制酶，有的一个属就有好几种，同一品系的菌株中也常有识别不同序列的两种酶。至今，已发现和分离成功的 II 型限制酶有 2000 多种，其中有些已商品化。

### 1) II 型限制酶的特性

(1) II 型限制性内切核酸酶能够专一地识别不同的特异核苷酸序列。

II 型限制性内切核酸酶能够专一地识别不同的特异核苷酸序列。一般 II 型限制性内切核酸酶识别长度为 4、5 或 6 个核苷酸且呈二重轴对称的特异序列。如 *MboI* 识别 4 个核苷酸序列 5'-GATC-3'; *AsuI* 识别 5'-GGNCC-3'; *EcoRII* 识别 5'-CCA(T)GG-3' 5 个核苷酸序列; *EcoRI* 识别 5'-GAATTC-3' 严格而独特的 6 核苷酸序列; 而 *HaeI* 则可以识别在其序列中的某些部位有不同程度变化的 6 个核苷酸 5'-A(T)GGCCA(T)-3'。有少数酶可以识别更长的序列或简并序列。如 *NofI* 识别的是由 8 个核苷酸组成的序列 5'-GCGGCCGC-3'。还有些限制酶(如 *Sau3A*)识别的一种 4 核苷酸序列(GATC)是包含在另一种限制酶(如 *BamHI*)识别的 6 核苷酸序列(GGATCC)之内。此外，有一类限制酶能识别多种核苷酸序列，例如，*HindII*，它识别下列 4 种核苷酸序列：5'-CTPyPuAC-3' (Py 表示嘧啶碱基 C 或 T，Pu 表示嘌呤碱基 A 或 G，后同)。具体限制酶的识别序列见表 1-1。



表 1-1 常用限制酶的特性

原型酶	识别序列 <sup>1)</sup>	商品化的同裂酶 <sup>2)</sup>	匹配末端 <sup>3)</sup>
(a)产生 5'凸出端的限制酶			
<i>Acc</i> I	GT↓MKAC	<i>Nsp</i> III	
<i>Ava</i> I	G↓YCGRG	<i>Eco</i> 471 <i>Sim</i> I	
<i>Ava</i> II	G↓GWCC	<i>Bst</i> I	<i>Bcl</i> I, <i>Bgl</i> I, <i>Mbo</i> I, <i>Xho</i> II
<i>Bam</i> H	G↓GATCC		<i>Bam</i> H I, <i>Bgl</i> II, <i>Mbo</i> I, <i>Xho</i> II
<i>Bcl</i> I	T↓GATCA		<i>Bam</i> H I, <i>Bcl</i> I, <i>Mbo</i> I, <i>Xho</i> II
<i>Bgl</i> II	A↓GATCT		<i>Acy</i> I, <i>Asu</i> II, <i>Hin</i> pl I
<i>Bst</i> E II	G↓GTNACC	<i>Asp</i> A I	
<i>Cla</i> I	AT↓CGAT	<i>Ban</i> III	
<i>Dde</i> I	C↓TNAG		<i>Taq</i> I, <i>Hpa</i> II, <i>Mae</i> II, <i>Nar</i> I
<i>Eco</i> R I	G↓AATTC		
<i>Eco</i> R II	↓CCWGG	<i>Apy</i> I, <i>Bst</i> N I <i>Mva</i> I (CC↓WGG)	
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT		
<i>Hinf</i> I	G↓ANTC		<i>Acy</i> I, <i>Asu</i> I, <i>Cla</i> I, <i>Taq</i> I
<i>Hpa</i> II	C↓CGG	<i>Hap</i> II, <i>Mop</i>	<i>Hin</i> pl I, <i>Mae</i> II, <i>Nar</i> I
<i>Mbo</i> I	↓GATC	<i>Nbe</i> II, <i>Sau</i> 3A I	<i>Bam</i> H I, <i>Bcl</i> I, <i>Bgl</i> I, <i>Xho</i> I
<i>Nar</i> I	GC↓CGCC	<i>Nun</i> II	<i>Acy</i> I, <i>Asu</i> II, <i>Cla</i> I, <i>Tag</i> I
		<i>Bbe</i> I (GGCGC↓C)	<i>Hin</i> pl I, <i>Hpa</i> II, <i>Mae</i> II
<i>Nco</i> I	C↓CATGG		<i>Bsp</i> H I
<i>Nde</i> I	CA↓TATG		<i>Mae</i> I, <i>Msc</i> I, <i>Vsp</i> I
<i>Sal</i> I	G↓TCGAC		<i>Xho</i> I
<i>Taq</i> I	T↓CGA	<i>Tth</i> HB81	<i>Acy</i> I, <i>Asu</i> II, <i>Cla</i> I, <i>Nar</i> I
			<i>Hin</i> Pl I, <i>Hpa</i> II, <i>Mae</i> II
<i>Xba</i> I	T↓CTAGA		<i>Avi</i> I, <i>Nbe</i> I, <i>Spe</i> I
<i>Xho</i> I	C↓TCGAG	<i>Pae</i> R71	<i>Sal</i> I
<i>Xma</i> II	C↓GGCCG	<i>Eag</i> I, <i>Eco</i> 521	<i>Cfr</i> I, <i>Not</i> I
(b)产生 3'凸出末端的限制酶			
<i>Hae</i> II	RGCGC↓Y		<i>Bbe</i> I
<i>Hha</i> I	GCG↓C	<i>Clo</i> I	
<i>Kpn</i> I	GGTAC↓C		
<i>Pst</i> I	CTGCA↓G		
<i>Pvu</i> I	CGAT↓CG	<i>Xor</i> II	
<i>Sph</i> I	GCATG↓C		<i>Nla</i> II, <i>Nsp</i> I
(c)产生平齐末端的限制酶			
<i>Alu</i> I	AG↓CT		平端
<i>Bal</i> I	TGG↓CCA		平端
<i>Eco</i> RV	GAT↓ATC		平端
<i>Hae</i> II	GG↓CC	<i>Bsu</i> R I, <i>Pal</i> I	平端
<i>Hpa</i> I	GTT↓AAC		平端