

基于 Phi29 DNA 聚合酶的新酶挖掘及表征

郝梦瑶^{1,2#}, 胡玲玲^{1,2#}, 韩明昊^{1,2}, 李从雨^{1,2}, 常宏^{1,2}, 骆健美¹, 江会锋^{2*}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

郝梦瑶, 胡玲玲, 韩明昊, 李从雨, 常宏, 骆健美, 江会锋. 基于 Phi29 DNA 聚合酶的新酶挖掘及表征[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 427-436.

HAO Mengyao, HU Lingling, HAN Minghao, LI Congyu, CHANG Hong, LUO Jianmei, JIANG Huifeng. Mining and characterization of new enzymes based on Phi29 DNA polymerase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 427-436.

摘要: 近年来, 噬菌体 $\Phi 29$ (Phi29) DNA 聚合酶因其具有恒温高保真扩增的能力, 成为热点关注对象。为了进一步推进这类等温聚合酶的工业化应用, 本研究将已表征的 Phi29 DNA 聚合酶序列针对微生物宏基因组进行新酶挖掘与表征。在植物宿主群体的宏基因组中, 鉴定出一种新酶——Phi29 DNA 聚合酶, 该酶具有更高的链置换活性(与噬菌体 $\Phi 29$ 的相似度达到 59.5%)。实验验证结果表明, 该酶也具备 3'→5'核酸外切酶活性, 其扩增产物可用于进一步的催化反应。Phi29 DNA 聚合酶的挖掘和验证为未来等温扩增酶的工业化应用提供了有益参考。

关键词: 新酶挖掘; Phi29 DNA 聚合酶; 异源表达; 滚环扩增; 核酸外切酶活性

Mining and characterization of new enzymes based on Phi29 DNA polymerase

HAO Mengyao^{1,2#}, HU Lingling^{1,2#}, HAN Minghao^{1,2}, LI Congyu^{1,2}, CHANG Hong^{1,2}, LUO Jianmei¹, JIANG Huifeng^{2*}

1 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: In recent years, the bacteriophage $\Phi 29$ (Phi29) DNA polymerase has garnered increasing attention due to its high-fidelity amplification capacity at constant temperatures. To advance the industrial application of this type of isothermal polymerases, this study mined and characterized

资助项目: 合成生物学海河实验室重大攻关类项目(22HHSWSS00004)

This work was supported by the Major Research Project of Haihe Laboratory of Synthetic Biology (22HHSWSS00004).

[#]These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author. E-mail: jiang_hf@tib.cas.cn

Received: 2024-03-13; Accepted: 2024-05-21; Published online: 2024-06-03

new enzymes from the microbial metagenome based on the known Phi29 DNA polymerase sequence. The results revealed that a new enzyme, Php29 DNA polymerase, was identified in the microbial metagenome with plants as the hosts. This enzyme exhibited higher strand displacement activity, with a 59.5% similarity to bacteriophage Φ 29. Experimental validation demonstrated that the enzyme had 3'→5' exonuclease activity, and its amplification products can serve as substrates for further catalytic reactions. The discovery and validation of Php29 DNA polymerase gives insights into the future industrial application of isothermal polymerases.

Keywords: mining of new enzymes; Phi29 DNA polymerase; heterologous expression; rolling circle amplification; exonuclease activity

噬菌体 Phi29 DNA 聚合酶来自枯草芽孢杆菌噬菌体, 属于 DNA 聚合酶 B 家族^[1-4]。Phi29 DNA 聚合酶因其具有恒温高保真扩增的能力^[5-7], 成为了近年来的热点关注对象。Phi29 DNA 聚合酶能够在单链模板 DNA 上合成较长双链 DNA。该酶的 N 端具备 3'→5'核酸外切酶活性, 这一特性有助于降低 DNA 复制过程中的错误率^[8-10]。因此, Phi29 DNA 聚合酶被广泛应用于滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)和多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)技术中, 为 DNA 分析和研究提供了有效的工具^[11-14]。Phi29 DNA 聚合酶使用末端蛋白作为引物启动 DNA 复制, 具有长时间持续合成能力和链置换能力, 而无需解旋因子的帮助。Phi29 DNA 聚合酶中的链置换活性比其他复制性 DNA 聚合酶(如噬菌体 T4 或 T7 的链置换活性)效果更佳。

Phi29 DNA 聚合酶结构域可以细分为手掌、手指和拇指子域结构^[15-16], 加上特有的 2 个插入结构——末端蛋白区域 TPR1 和 TPR2, 构成其独特的酶学特征^[17-20]。TPR1 亚结构域参与末端蛋白(terminal protein, TP)和 DNA 的相互作用; TPR2 亚结构域、手掌和手指子域结构与核酸外切酶结构域一起形成包裹下游模板链的隧道, 该狭窄隧道排除了与单链 DNA 的结合, 为聚合酶提供链置换能力。

目前用于 RCA 或 MDA 的聚合酶均具有持续性 DNA 合成和链置换功能, 如 Phi29 DNA 聚合酶、*Bst* DNA 聚合酶^[21-22]、*Vent* 聚合酶等^[23-24]。其中 Phi29 DNA 聚合酶链置换功能最强, 扩增速度最快, 而且具有 3'→5'核酸外切的校正功能。Dean 等^[25]使用 Phi29 DNA 聚合酶与修饰的随机六聚体引物扩增 1 ng M13 DNA, 可扩增 10 000 倍, 扩增片段长度可达到 70 kb。Hamidi 等^[26]使用 Phi29 DNA 聚合酶构建了一种灵敏的用于检测 H1N1 流感病毒的等温扩增方法。夏文英等^[27]采用 Phi29 DNA 聚合酶介导的 MDA 以及荧光标记 PCR 技术测试与分析待检测物, 建立了一种高灵敏度、高保真性检测埃博拉病毒的有效方法。此外, Phi29 DNA 聚合酶也被应用于三代测序, 完成长片段 DNA 的精准测序。

尽管 Phi29 DNA 聚合酶具有高保真高灵敏度的等温扩增功能, 但是由于生产工艺复杂与知识产权保护等原因, Phi29 DNA 聚合酶相比于其他高保真 DNA 聚合酶更加昂贵。作为一种能够在长时间恒温条件下连续合成超过 70 kb 长度 DNA 的聚合酶, 它对模板的扩增效率仍然难以满足工业需求。因此, 本研究旨在通过对 Phi29 DNA 聚合酶的序列分析, 针对宏基因组进行新酶挖掘。通过挖掘与分析, 从植物宿主微生物群落的宏基因组中成功鉴定出一种新

酶, 这种酶能在恒温条件下, 持续高效地对单链 DNA 模板进行合成, 实验验证表明其具有高链置换活性。进一步实验结果表明, 该酶同样具有 Phi29 DNA 聚合酶的 3'→5'核酸外切酶活性, 使其扩增产物可以作为后续催化反应的底物。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)、*E. coli* JM109(DE3)、*E. coli* Rosetta(DE3)菌株与 pET-28a(+)、Pg-KJE8、pGro7、pKJE7 质粒由本实验室保存; 含有目标基因的重组质粒 pET28a-A29、pET28a-B29、pET28a-C29、pET28a-D29、pET28a-E29、pET28a-F29、pET28a-Phi29 委托金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.2 培养基

2YT 液体培养基(g/L): 5 g NaCl, 16 g 胰蛋白胨, 10 g 酵母提取物。

1.1.3 试剂

卡那霉素(kanamycin, Kan)购自北京兰博利德商贸有限公司, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)购自北京索莱宝科技有限公司, 高亲和力 Ni-TED 树脂 FF 购自南京金斯瑞生物科技有限公司, SYBR™ 购自赛默飞世尔科技有限公司, VAHTS Universal Plus DNA Library Prep Kit for Illumina V2 购自南京诺唯赞生物科技有限公司, BCA 蛋白测定试剂盒购自 Pierce 公司, TelN 端粒酶购自 NEB 公司。

1.1.4 仪器

Amicon Ultra 离心过滤装置购自 Merck Millipore 公司, 酶标仪购自 Molecular Devices 公司; Mastercycler Personal PCR 仪购自

Eppendorf 公司; QuantumST5 凝胶成像系统购自 Viber 公司; 恒温摇床购自上海知楚仪器有限公司; 高压均质机购自 JNBIO 公司; 全自动荧光图像分析系统购自 Tanon 公司。

1.2 方法

1.2.1 蛋白表达

将含有目标基因的重组质粒转移到大肠杆菌 BL21(DE3)、大肠杆菌 JM109(DE3)感受态细胞中, 使用含卡那霉素琼脂板(Kan⁺, 100 mg/mL)在 37 °C 下过夜获得阳性克隆。将单个菌落接种于 5 mL 2YT 液体培养基(Kan⁺, 100 mg/mL)中, 37 °C、220 r/min 孵育 4–5 h, 加入 IPTG 至终浓度 0.1–0.5 mmol, 16 °C 孵育 14 h, 通过 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

1.2.2 分子伴侣蛋白表达

将含有 Pg-KJE8、pGro7、pKJE7 的质粒分别转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 并将其制备成化学感受态。将含有 A29 基因的质粒转入先前制备的感受态中, 并涂在含有氯霉素(20 μg/mL)和表达质粒选择性生长抗生素(Kan⁺)的平板上培养, 筛选转化体。选择含有融合目标蛋白的单克隆菌, 加入 5 mL 2YT 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 4–5 h, 当 OD₆₀₀ 达到 0.4–0.6 时, 加入 IPTG, 使其终浓度为 0.1–0.5 mmol/L, 然后 30–37 °C 培养 1–4 h, 其中使用 pG-KJE8 伴侣蛋白质粒时, L-arabinose、tetracyclin 需同时选用; 使用 pGro7、pKJE7、pTf16 伴侣蛋白质粒时, 只需选用 L-arabinose, 培养结束后, 根据 SDS-PAGE 电泳、活性测定等结果确认目的产物的表达量及溶解性。

1.2.3 粗酶测活

将含有融合目标蛋白的单克隆菌, 加入 5 mL 2YT 液体培养基(Kan⁺, 100 mg/mL)中, 37 °C、220 r/min 培养 14 h。使用高速离心机收集细

菌并弃上清。加入 B-PER(R)II 型细菌蛋白提取试剂(试剂与培养基的比例为 1:1) 150 μL ; 室温静置 15 min 后, 高速离心机冷冻得到含目的蛋白的上清液, 加入 0.5 μg DNA 底物与蛋白上清液催化反应。30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h 后, 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 停止反应。产物进行 1% 琼脂糖凝胶分析。

1.2.4 蛋白纯化

为了测定等温扩增酶的体外活性, 在大肠杆菌中进行表达和纯化。将重组质粒 pET-28a-29 转移到大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 使用卡那霉素琼脂板(Kan^+ , 100 mg/mL) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜获得阳性克隆。将单个菌落接种于 5 mL 2YT 液体培养基(Kan^+ , 100 mg/mL) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 孵育 4–5 h, 然后转入 800 mL 2YT 培养基(Kan^+ , 100 mg/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至 OD_{600} 达到 0.6–0.8。加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 16 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h 诱导蛋白表达。5 500 r/min 离心 15 min, 收获细胞, -80°C 保存待用。将细菌悬浮在 35 mL 缓冲液 A (50 mmol/L KH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT, 10 mmol/L 咪唑, pH 7.0) 中进行蛋白纯化, 并在高压均质机的 1 200 bar 压力下, 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 2 次。然后将细胞裂解液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 60 min, 去除细胞碎片。随后用 4 mL 高亲和力 Ni-TED 树脂 FF 填充柱, 用 10 mL 缓冲液 A 平衡。上清通过柱 2 次以有效结合。用含有 50 mmol/L 咪唑的 50 mL 缓冲液 A 洗涤柱去除杂蛋白, 用 20 mL 洗脱缓冲液 [200 mmol/L 咪唑+缓冲液 B (50 mmol/L KH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT, 10% 甘油, pH 7.0)] 收集目的蛋白。洗脱后的蛋白用 Amicon Ultra 离心过滤装置用缓冲液 A 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 400 r/min 透析, 孔径为 30 kDa。使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋

白浓度, 等分液用液氮快速冷冻并保存在 -80°C 。

1.2.5 等温扩增反应

将 2 ng 质粒 DNA 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 6N 随机引物、10 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs、10 \times buffer [500 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L MgCl_2 , 100 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 40 mmol/L DTT, pH 7.0] 混合均匀, 将混合后样品置于 98 $^{\circ}\text{C}$ 恒温金属浴孵育 5 min, 立即放置冰上 5 min。然后在冰上将 0.1 pmol Php29 DNA 聚合酶与 Phi29 DNA 聚合酶分别加入反应体系, 混匀后置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温金属浴上反应 16 h, 随后加 1% SDS 终止反应, 最后将样品进行 1% 琼脂糖凝胶验证。

1.2.6 3'→5'核酸外切酶功能验证

将 2 μL 的 10 $\mu\text{mol/L}$ Oligo 单链与 buffer 混合均匀, 将 0.1 pmol Php29 DNA 聚合酶与 Phi29 DNA 聚合酶分别加入反应体系, 混匀后置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温金属浴孵育 10 min, 随后加 1% SDS 终止反应, 最后将样品通过 20% 尿素聚丙烯酰胺凝胶进行可视化验证。

1.2.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳

PAGE 分析使用 8 mol/L 尿素和 20% 丙烯酰胺。PAGE 凝胶用 SYBRTM 核酸凝胶染料染色 20 min, 用全自动荧光图像分析系统扫描。

1.2.8 酶切反应

将纯化后扩增样品加入 TelN 端粒酶, 用无菌水补充至 20 μL 总反应体系, 将混匀后的样品放置在 PCR 仪器中 (30 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 75 $^{\circ}\text{C}$ 5 min)。随后将样品进行 1% 琼脂糖凝胶验证。

1.2.9 扩增产物二代测序

将扩增样品通过 VAHTS Universal Plus DNA Library Prep Kit for Illumina V2 建库试剂盒中的 FEA Enzyme Mix V2 酶进行片段化, 使用 Rapid Ligation V2 酶将片段加接头后用 VAHTS DNA Clean Beads 纯化, 纯化后的样品

加入 PCR Primer Mix3 和 VAHTS HiFi Amplification Mix 扩大样品浓度,最后采用磁珠纯化后上 MiSeq 二代测序仪器。将得到的结果去除低质量的 reads 和污染序列,通过比对结果,统计出检测样本中的单核苷酸正确率。

2 结果与分析

2.1 新酶挖掘

为了鉴定更具应用价值的等温扩增酶,查询 NCBI 非冗余蛋白数据库中所有包含 Phi29 DNA 聚合酶等温扩增功能域(PfamID: PF03175)的序列。利用类似的方法,搜索微生物宏基因组学数据库 MGnify (<https://www.ebi.ac.uk/metagenomics>)。综合 2 类搜索,共获得 14 191 条具有该功能域的蛋白序列;进一步以 KEGG 数据库中的 Podoviridae DNA Polymerase [EC 2.7.7.7] (KO: K21237)为目标库,进行局部 BLASTP 检索,获得 775 条等温扩增酶候选序列。然后以 90% 相似度为标准,对这些序列进行聚类,获得 653 条相似度在 90% 以下的等温扩增酶候选序列;最后,以文献报道中的已知的功能性 Phi29 DNA 聚合酶为靶序列,筛选出 6 条与靶序列相似度大于 55% 的代表性基因,分别将重组蛋白命名为 A29-F29 (图 1),为了进行验证,合成了这 6 个候选基因,其表达的蛋白大小均在 64–68 kDa 之间。

为了证明蛋白能够正确折叠表达,将候选基因克隆到细菌表达质粒 pET-28a 的 *Xho* I 和 *Nde* I 中,然后将重组质粒转入可异源表达蛋白的大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,并用 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导受 Lac 操作子控制基因表达蛋白。观察到候选酶只有 E29 成功表达,其余蛋白未见明显表达(图 2A)。随后,将质粒转入同样适合异源表达的大肠杆菌工程菌株 JM109(DE3)中,并降低 IPTG 的浓度,进一步减少包涵体存在的可能性。B29、C29、D29、

F29 成功表达。鉴于 A29 没有表达出蛋白,尝试加入不同分子伴侣质粒,增加可溶性蛋白质的回收率,最终在加入 pGro7 伴侣质粒后成功将 A29 蛋白诱导表达(图 2B)。至此所有候选酶都成功实现了异源表达(表 1)。随后,采用粗酶液快速检测候选酶的活性,发现有 4 个候选酶均表现出等温扩增的活性(图 2C),其中来自植物寄居种群微生物宏基因组的 F29 表现最优(宏基因组 ID: ERZ781244),根据其微生物宏基因组来源的英文缩写,将其命名为 Php29 DNA 聚合酶。

2.2 新酶 Php29 DNA 聚合酶性能表征

由于纯化出来的 Php29 DNA 聚合酶存在蛋白析出与蛋白浓度低的问题,严重影响了纯酶催化活性的测定^[28]。为了解决蛋白析出的问题,在蛋白质缓冲液中添加了强还原剂二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT),以保护和还原蛋白质中的二硫键和半胱氨酸残基,并添加了甘油以稳定蛋白质构象。经过多次测试,Php29 DNA 聚合酶在体外纯化实验中基本无蛋白析出,纯化后蛋白浓度也有明显提高。

进一步测试了 pH 值与缓冲液对 Php29 DNA 聚合酶的活性影响,发现当 pH 值为 7.0 时,该酶的活性达到最高,当 pH 值升高至 8.5 左右时,蛋白扩增活性不足 1/3。不同缓冲液对酶的活性也有影响。如同样在 pH 为 7.0 时,在 PBS 缓冲液中该酶的活性比在 Tris 缓冲液中的略高(图 3A)。

进一步测试了温度对酶活的影响,发现随着反应温度的升高,酶的活性逐渐增强再减弱,当温度为 30 °C 时,酶活性最高。随着温度继续升高,酶的活性迅速降低,当温度为 45 °C 时,Php29 DNA 聚合酶的活性仅为最高活性的 1/4 左右。由此可确定,Php29 DNA 聚合酶的最适反应 pH 为 7.0,最适反应温度为 30 °C (图 3B)。

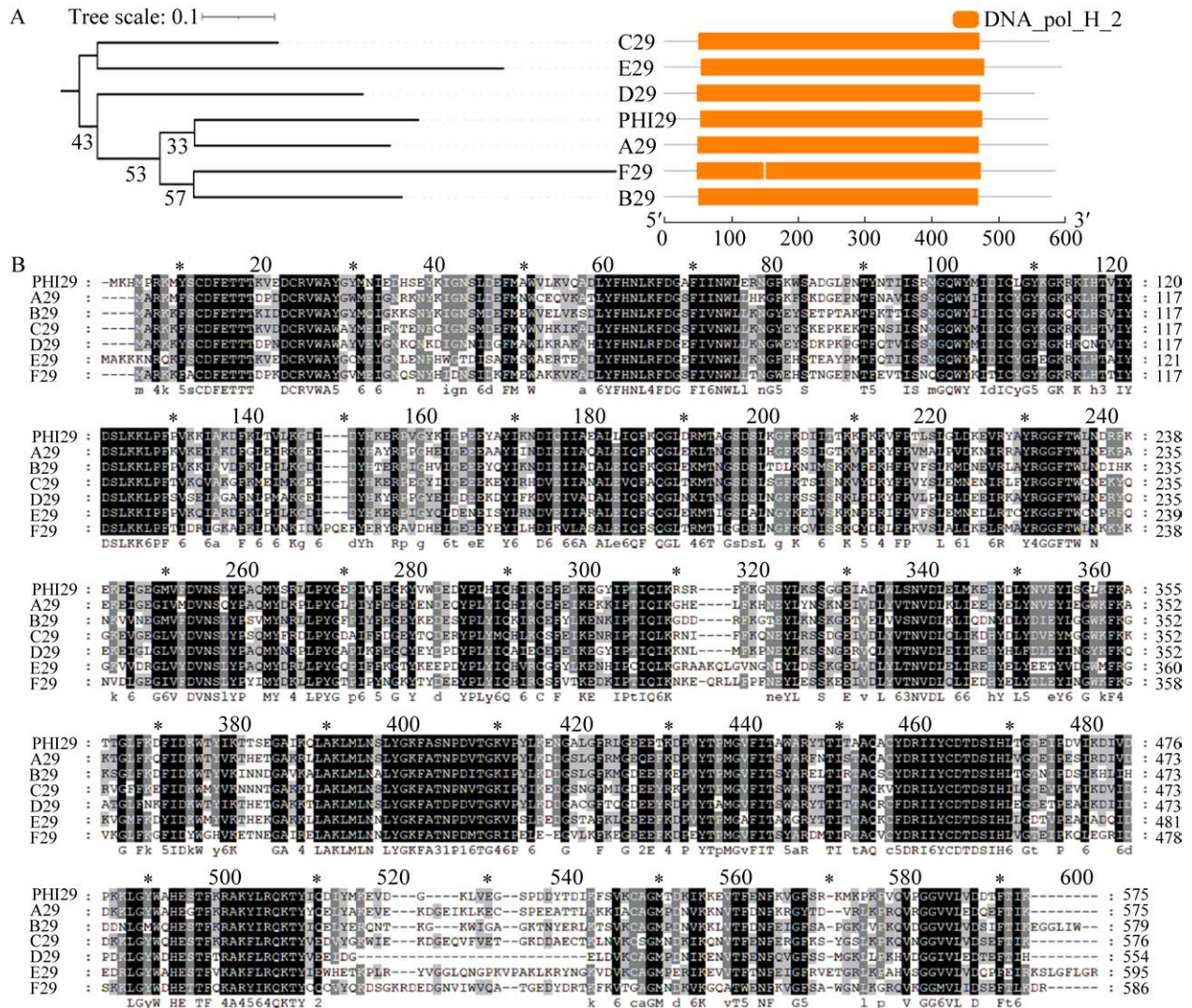


图 1 基于 Phi29 DNA 聚合酶新酶挖掘到的 6 条基因序列系统进化树及蛋白序列比对
Figure 1 Phylogenetic tree of six gene sequences and protein sequence alignment based on Phi29 DNA polymerase. A: Six gene sequences were analyzed in the Phi29 DNA polymerase evolutionary tree and divided into functional regions. Orange part represents the functional structure region of DNA polymerase group B. B: Six gene sequences were compared in the Phi29 DNA polymerase protein sequence map.

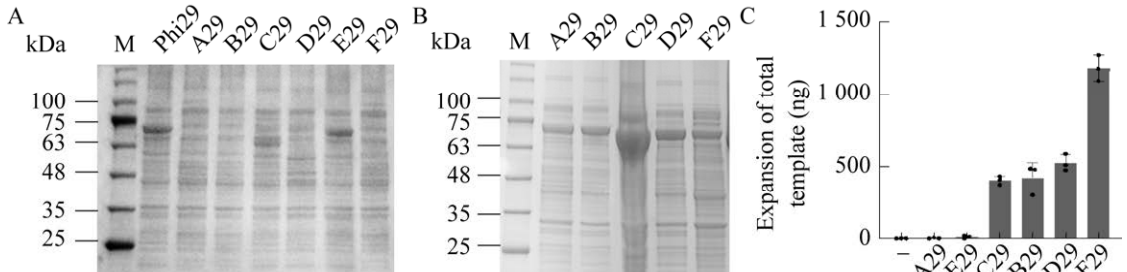


图 2 六条基因序列可溶性表达与粗酶活性验证
Figure 2 The soluble expression and crude enzyme activity of six gene sequences were verified. A: SDS-PAGE analysis of protein expression induced by transfer of recombinant plasmid into BL21 receptor cells, 0.5 mmol/L IPTG before optimization. B: SDS-PAGE analysis of protein expression induced by transfer of recombinant plasmid into JM109 receptor after optimization. C: Crude protein enzyme activity test chart.

2.3 Php29 DNA 聚合酶扩增验证

在最适合条件下将 Php29 DNA 聚合酶纯酶用于体外扩增反应, 发现其反应后扩增 DNA

表 1 新酶异源表达汇总

Table 1 Summary of heterologous expression of new enzymes

| Protein name | Host bacteria | IPTG concentration (mmol/L) | Molecular weight (kDa) |
|--------------|---------------|-----------------------------|------------------------|
| A29 | BL21, pGro7 | 0.5 | 67.17 |
| B29 | JM109 | 0.1 | 67.66 |
| C29 | JM109 | 0.1 | 67.10 |
| D29 | BL21 | 0.1 | 67.75 |
| E29 | BL21 | 0.5 | 66.28 |
| F29 | JM109 | 0.5 | 68.39 |

的浓度比 Phi29 DNA 聚合酶有明显提升(图 4A)。进一步研究新酶 Php29 DNA 聚合酶与 Phi29 DNA 聚合酶不同时间梯度的扩增效果, 通过测量扩增后 DNA 浓度并计算 dNTPs 消耗量判断活性效果。结果表明, 1 h 后 Php29 DNA 聚合酶对 dNTPs 消耗量是 Phi29 DNA 聚合酶的近 1.2 倍, 4 h 后 Php29 DNA 聚合酶消耗的 dNTP 是 Phi29 DNA 聚合酶的 1.5 倍以上(图 4B)。由此可知, 随着时间的延长, 新酶 Php29 DNA 聚合酶对模板的聚合延伸效率显著提升, 具有更强的潜在扩增活性。

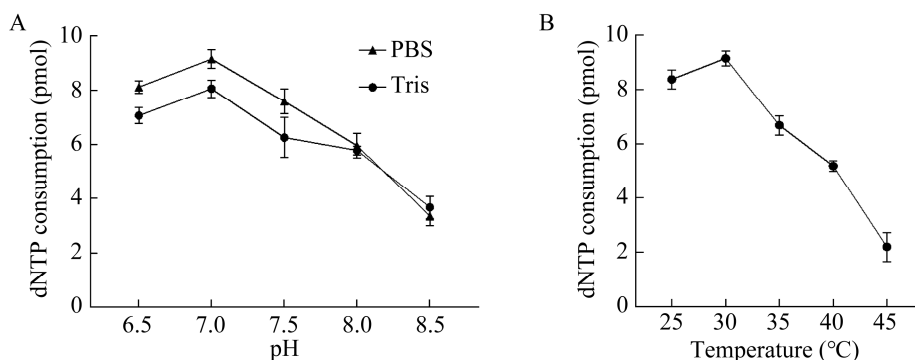


图 3 Php29 DNA 聚合酶的最适 pH 及温度测定图

Figure 3 Diagram for determining the optimum pH and temperature of Php29 DNA polymerase.

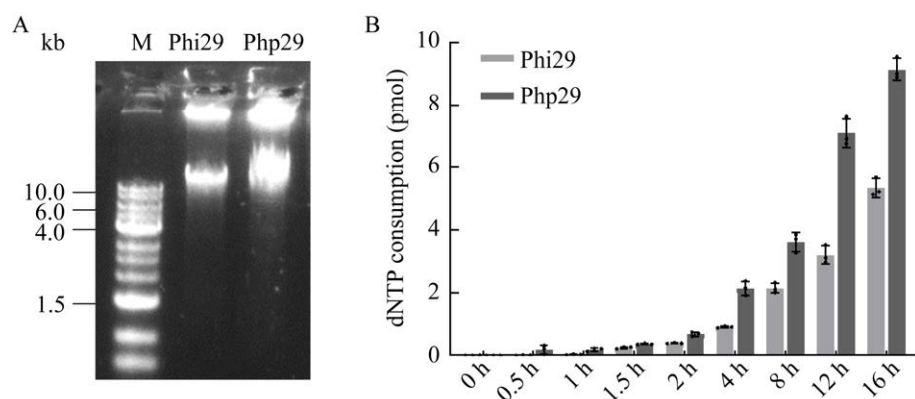


图 4 Php29 DNA 聚合酶功能验证

Figure 4 Verification of Php29 DNA polymerase function. A: Comparison of Phi29 DNA polymerase and Php29 DNA polymerase isothermal at 30 °C for 16 h. B: Consumption of dNTPs by Phi29 DNA polymerase versus Php29 DNA polymerase after incubation at 30 °C for 0.5, 1.5, 2, 4, 8, 12 and 16 h respectively comparison.

等温扩增酶的另一个特点是具有 3'→5'核酸外切酶活性的 N 端结构域, 可有效保证在合成过程中对错误碱基进行纠正。为了验证 Phi29 DNA 聚合酶等温扩增后的 DNA 同样具有 3'→5'核酸外切酶活性, 设计了 3 种不同单链底物, 分别为无修饰的 Oligo A、3'端 2 个碱基硫代化修饰的 Oligo B 和 5'端 2 个碱基硫代化修饰的 Oligo C, 分别将不同单链底物与 Phi29 DNA 聚合酶和 Pph29 DNA 聚合酶进行孵育。结果表明, 3'端未被硫代化修饰的 Oligo A 与 Oligo C 被降解, 而 3'端硫代化修饰的 Oligo B 底物仅出现了少部分降解, 可能是因为硫代化碱基较少, 没有完整的保护末端结构。由于 2 组实验结果相同(图 5A), 这也证明了 Pph29 DNA

聚合酶同样具有 3'→5'核酸外切酶活性。

为了进一步验证其扩增产物的准确性, 设计了 2 个 TelN 端粒酶酶切位点插入 pET-28a 质粒(6.7 kb), 将质粒分割成 5.4 kb 和 1.3 kb。将质粒 DNA 通过新酶 Pph29 DNA 聚合酶扩增与纯化, 将纯化样品与 TelN 端粒酶孵育催化, 随着 Pph29 DNA 聚合酶扩增时间的增加, 扩增出的大片段 DNA 可被端粒酶识别并催化(图 5B)。与此同时, 将扩增了 Pph29 DNA 聚合酶质粒后的产物进行二代测序分析, 结果显示单碱基准确率均超过 99%, 进一步验证了该酶扩增的高准确性(图 5C)。这表明 Pph29 DNA 聚合酶扩增产物与原模板具有一致性, 可作为底物进行下一步催化。

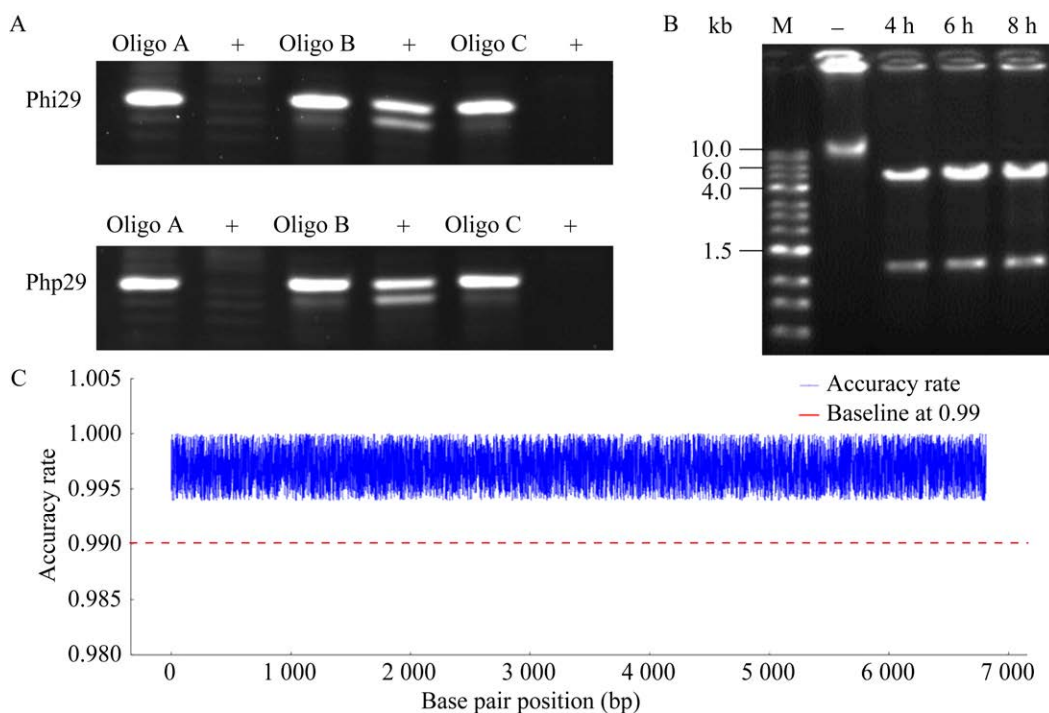


图 5 Pph29 DNA 聚合酶外切酶活性与保真度验证

Figure 5 Pph29 DNA polymerase exonuclease activity and fidelity verification. A: Phi29 DNA polymerase and Pph29 DNA polymerase were incubated in Oligo A, Oligo B and Oligo C substrates at a constant temperature of 30 °C for 10 min and the results of the incubation were analyzed by polyacrylamide gels. "Oligo A, Oligo B, Oligo C" represent the substrate negative control and "+" represents the addition of isothermal amplification enzyme. B: The products of isothermal incubation at different times were purified from magnetic beads and incubated with TelN enzyme at 30 °C for 30 min, and the results were analyzed by 1% agarose gels. C: Statistical graph of the single base accuracy of second-generation sequencing of the template DNA amplification enzyme.

3 讨论与结论

Phi29 DNA 聚合酶作为高保真性的 RCA 或 MDA 的主要工具酶,多用于生物和医学领域^[29],例如古代 DNA 分析、环境样本分析和单细胞测序^[30]、开发新型的分子诊断方法,包括癌症、遗传疾病和传染病的早期检测等^[31-32]。虽然 *Bst* DNA 聚合酶和 *Bsu* DNA 聚合酶也被用于 RCA 或 MDA,但由于这些酶不具有 3'→5'外切酶校正活性,因此保真度较低。相比之下,Phi29 DNA 聚合酶因其高保真性而更容易获得广泛应用。在生物医学研究中,虽然 Phi29 DNA 聚合酶具有同类酶无可替代的优势,但作为工具酶的价格较为昂贵,如果可以挖掘到一种与 Phi29 DNA 聚合酶功能类似的同工酶,可以进一步降低 RCA 或 MDA 应用的成本。

本研究通过微生物宏基因挖掘到了 6 个与 Phi29 DNA 聚合酶序列相似度大于 70% 的候选基因序列。将重组质粒转入可异源表达蛋白的大肠杆菌感受态细胞中,通过优化异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导浓度,验证了蛋白可溶性表达并进行粗酶活性验证,发现 4 个具有等温扩增活性的基因,其中 *F29* 活性最高,将其命名为 Phi29 DNA 聚合酶。采用 PBS 缓冲液对 Phi29 DNA 聚合酶进行体外纯化,与目前已表征的等温扩增的 Phi29 DNA 聚合酶相比,其对模板的聚合延伸能力更强。同时验证其 N 端具有与 Phi29 DNA 聚合酶相同的 3'→5'核酸外切酶活性结构域,因此扩增产物可作为底物进行下一步催化。

由于 Phi29 DNA 聚合酶具有更强的扩增能力,未来可被用于全基因组扩增和临床诊断。这种高扩增活性可以缩短从样本收集到结果输出的时间,有助于更快速地做出诊断。然而,在实验过程中,发现 Phi29 DNA 聚合酶与

Phi29 DNA 聚合酶一样,存在明显的高温不耐受的问题,提升反应温度可以为实验带来更高的精度和效率,适用于更广泛的应用场景。因此,需要对该酶进行热稳改造,例如通过关键氨基酸的定点突变,或通过优化蛋白质的二级结构,以提高其耐热性。综上所述,Phi29 DNA 聚合酶的表征为研究具有链置换功能的酶提供了全新的选择,有望进一步促进生物医学、环境监测和分子生物学等领域的创新和发展。

REFERENCES

- [1] FRANKLIN MC, WANG J, STEITZ TA. Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase[J]. *Cell*, 2001, 105(5): 657-667.
- [2] HOPFNER KP, EICHINGER A, ENGH RA, LAUE F, ANKENBAUER W, HUBER R, ANGERER B. Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(7): 3600-3605.
- [3] ZHAO Y, JERUZALMI D, MOAREFI I, LEIGHTON L, LASKEN R, KURIYAN J. Crystal structure of an archaeobacterial DNA polymerase[J]. *Structure*, 1999, 7(10): 1189-1199.
- [4] ZHU WG, ITO J. Family A and family B DNA polymerases are structurally related: evolutionary implications[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(24): 5177-5183.
- [5] SAKATANI Y, ICHIHASHI N, KAZUTA Y, YOMO T. A transcription and translation-coupled DNA replication system using rolling-circle replication[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10404.
- [6] BLANCO L, BERNAD A, LÁZARO JM, MARTÍN G, GARMENDIA C, SALAS M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(15): 8935-8940.
- [7] BLANCO L, BERNAD A, ESTEBAN JA, SALAS M. DNA-independent deoxynucleotidylation of the phi 29 terminal protein by the phi 29 DNA polymerase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(2): 1225-1230.
- [8] BLANCO L, BERNAD A, SALAS M. Evidence favouring the hypothesis of a conserved 3'-5' exonuclease active site in DNA-dependent DNA polymerases[J]. *Gene*, 1992, 112(1): 139-144.
- [9] DERBYSHIRE V, GRINDLEY ND, JOYCE CM. The 3'-5' exonuclease of DNA polymerase I of *Escherichia coli*: contribution of each amino acid at the active site to the reaction[J]. *The EMBO Journal*, 1991, 10(1): 17-24.
- [10] ESTEBAN JA, SOENGAS MS, SALAS M, BLANCO

- L. 3'→5' exonuclease active site of phi 29 DNA polymerase. Evidence favoring a metal ion-assisted reaction mechanism[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(50): 31946-31954.
- [11] FIRE A, XU SQ. Rolling replication of short DNA circles[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(10): 4641-4645.
- [12] YUE SZ, LI YW, QIAO ZJ, SONG WL, BI S. Rolling circle replication for biosensing, bioimaging, and biomedicine[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(11): 1160-1172.
- [13] XU LL, DUAN JX, CHEN JM, DING SJ, CHENG W. Recent advances in rolling circle amplification-based biosensing strategies: a review[J]. Analytica Chimica Acta, 2021, 1148: 238187.
- [14] LASKEN RS. Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method[J]. Biochemical Society Transactions, 2009, 37(Pt 2): 450-453.
- [15] JOYCE CM, STEITZ TA. Function and structure relationships in DNA polymerases[J]. Annual Review of Biochemistry, 1994, 63: 777-822.
- [16] BRAUTIGAM CA, STEITZ TA. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1998, 8(1): 54-63.
- [17] PÉREZ-ARNAIZ P, LONGÁS E, VILLAR L, LÁZARO JM, SALAS M, de VEGA M. Involvement of phage ϕ 29 DNA polymerase and terminal protein subdomains in conferring specificity during initiation of protein-primed DNA replication[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(21): 7061-7073.
- [18] ZABALLOS A, SALAS M. Functional domains in the bacteriophage phi 29 terminal protein for interaction with the phi 29 DNA polymerase and with DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17(24): 10353-10366.
- [19] PEÑALVA MA, SALAS M. Initiation of phage phi 29 DNA replication *in vitro*: formation of a covalent complex between the terminal protein, p3, and 5'-dAMP[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1982, 79(18): 5522-5526.
- [20] TRUNIGER V, LÁZARO JM, ESTEBAN FJ, BLANCO L, SALAS M. A positively charged residue of ϕ 29 DNA polymerase, highly conserved in DNA polymerases from families A and B, is involved in binding the incoming nucleotide[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(7): 1483-1492.
- [21] HAFNER GJ, YANG IC, WOLTER LC, STAFFORD MR, GIFFARD PM. Isothermal amplification and multimerization of DNA by *Bst* DNA polymerase[J]. BioTechniques, 2001, 30(4): 852-856, 858, 860 passim.
- [22] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [23] GARDNER AF, JOYCE CM, JACK WE. Comparative kinetics of nucleotide analog incorporation by vent DNA polymerase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(12): 11834-11842.
- [24] HIKIDA Y, KIMOTO M, HIRAO I, YOKOYAMA S. Crystal structure of Deep Vent DNA polymerase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 483(1): 52-57.
- [25] DEAN FB, NELSON JR, GIESLER TL, LASKEN RS. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification[J]. Genome Research, 2001, 11(6): 1095-1099.
- [26] HAMIDI SV, GHOURCHIAN H, TAVOOSIDANA G. Real-time detection of H₅N₁ influenza virus through hyperbranched rolling circle amplification[J]. Analyst, 2015, 140(5): 1502-1509.
- [27] 夏文英, 郑夔, 黄吉城, 伊怀文. 埃博拉病毒检测基因芯片的制备初探[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2011, 34(3): 150-154.
- XIA WY, ZHENG K, HUANG JC, YI HW. Preliminary preparation of microarray for detecting Ebola virus[J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2011, 34(3): 150-154 (in Chinese).
- [28] LÁZARO JM, BLANCO L, SALAS M. [5] purification of bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase[M]//Methods in Enzymology. Amsterdam: Elsevier, 1995: 42-49.
- [29] ORDÓÑEZ CD, REDREJO-RODRÍGUEZ M. DNA polymerases for whole genome amplification: considerations and future directions[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(11): 9331.
- [30] ZHANG X, CHEN JJ, JIANG PF, XU HL, ZHANG Q, ZHANG H, HAN XH, CHEN ZL. A Phi29-based unbiased exponential amplification and genotyping approach improves pathogen detection in tick samples[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9: 1025911.
- [31] ZHANG J, SU XL, WANG YF, WANG XH, ZHOU SQ, JIA H, JING XY, GONG YH, WANG JC, XU J. Improved single-cell genome amplification by a high-efficiency phi29 DNA polymerase[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1233856.
- [32] ZHAO NN, LIU YZ, ZHANG LF, LIU WJ, ZOU XR, XU QF, ZHANG CY. Construction of multiple DNazymes driven by single base elongation and ligation for single-molecule monitoring of FTO in cancer tissues[J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(34): 12974-12981.