

超嗜热古菌 *Thermococcus eurythermalis* A501 编码 B 家族 DNA 聚合酶的生化特性及 PCR 应用

翁妍, 刘喜朋

上海交通大学 微生物代谢国家重点实验室 生命科学技术学院, 上海 200240

翁妍, 刘喜朋. 超嗜热古菌 *Thermococcus eurythermalis* A501 编码 B 家族 DNA 聚合酶的生化特性及 PCR 应用. 生物工程学报, 2022, 38(2): 807-819.

WENG Y, LIU XP. Characterization of a family B DNA polymerase from *Thermococcus eurythermalis* A501 and its application in PCR. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 807-819.

摘要: DNA 聚合酶广泛应用于 PCR 技术, 在生命科学研究及相关领域发挥重要作用。但目前商业化 DNA 聚合酶仍不能完全满足科研需要, 有必要寻求高性能 DNA 聚合酶。文中克隆表达了超嗜热古菌 (*Thermococcus eurythermalis*) A501 来源的 B 家族 DNA 聚合酶基因 (NCBI 数据库基因登录号为 TEU_RS04875)、表征该重组蛋白的生化特性、评价了其 PCR 应用。将删除 intein 蛋白序列的 DNA 聚合酶 (Teu-PolB) 进行体外重组表达, 经亲和层析和离子交换层析纯化获得 Teu-PolB 蛋白; 利用 5'端带荧光标记的寡核苷酸作为底物, 用尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定 Teu-PolB 的生化特性; 以噬菌体 λ DNA 基因组为模板, 探究 Teu-PolB 的 PCR 应用。结果显示, Teu-PolB 具有 DNA 聚合酶活性和 3'→5'核酸外切酶活性, 该酶在 98 °C 下的半衰期约为 2 h, 热稳定性高。使用 Teu-PolB 进行 PCR 扩增, 最适 PCR 缓冲液为 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mmol/L MgCl₂, 60 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.015% Triton X-100 和 0.01% BSA, 最适延伸温度为 68 °C。此外, Teu-PolB 能在 2 kb/min 条件下成功扩增 4 kb 目的片段, 扩增产量弱于商品化 *Taq* DNA 聚合酶, 优于 *Pfu* DNA 聚合酶, 但扩增速率和保真度优于 *Taq* 和 *Pfu* DNA 聚合酶, 且对盐的耐受性较高。综上所述, 本研究鉴定了一种高保真 DNA 聚合酶 Teu-PolB 的生化特性, 结果表明该酶可应用于 PCR 扩增, 具有热稳定性高、耐盐性能好、扩增速率高、保真度高等特征。

关键词: 超嗜热古菌; DNA 聚合酶; PolB; PCR

Received: January 5, 2021; Accepted: March 26, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFC0310704)

Corresponding author. LIU Xipeng. Tel: +86-21-34204378; E-mail: xpliu@sjtu.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC0310704)

Characterization of a family B DNA polymerase from *Thermococcus eurythermalis* A501 and its application in PCR

WENG Yan, LIU Xipeng

School of Life Sciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: DNA polymerases are widely used in PCR and play important roles in life science research and related fields. Development of high-performance DNA polymerases is of great commercial interest as the current commercial DNA polymerases could not fully satisfy the requirements of scientific research. In this study, we cloned and expressed a family B DNA polymerase (NCBI accession number TEU_RS04875) from *Thermococcus eurythermalis* A501, characterized its enzymatic property and evaluated its application in PCR. The recombinant Teu-PolB was expressed in *E. coli* and purified with affinity chromatography and ion-exchange chromatography. The enzymatic properties of Teu-PolB were characterized using fluorescence-labeled oligonucleotides as substrates. The application potential of Teu-PolB in PCR was evaluated using the phage λ genomic DNA as a template. Teu-PolB has DNA polymerase and 3'→5' exonuclease activities, and is highly thermostable with a half-life of 2 h at 98 °C. The most suitable PCR buffer is consisted of 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mmol/L MgCl₂, 60 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.015% Triton X-100 and 0.01% BSA, and the optimal extension temperature is 68 °C. Under the optimized conditions, a 4 kb target fragment was successfully amplified with an extension rate of 2 kb/min. The yield of the Teu-PolB amplified-DNA was lower than that of *Taq* DNA polymerase, but its extension rate and fidelity was higher than that of *Taq* and *Pfu* DNA polymerases. The biochemical properties of Teu-PolB demonstrate that this enzyme can be used in PCR amplification with high thermostability, good salt tolerance, high extension rate and high fidelity.

Keywords: *Thermococcus eurythermalis*; DNA polymerase B; PolB; PCR

DNA 聚合酶是遗传信息复制、损伤修复过程中的关键酶,广泛存在于细菌、古菌和真核生物三域生命中。DNA 聚合酶一般具有 DNA 聚合酶活性、3'→5'外切酶活性、5'→3'外切酶活性等。聚合酶活性在 DNA 模板指导下,以 dNTPs 作为底物,在引物链的 3'羟基端聚合核苷酸;另外 DNA 聚合酶的 3'外切酶活性会对新合成链进行校对和修复,以确保 DNA 复制的准确性。根据序列相似性、酶学特性以及高级结构的差异,DNA 聚合酶可以分为七大家族,分

别是 A、B、C、D、X、Y 和 RT (reverse transcriptase) 家族^[1-2],这些家族的聚合酶在结构和催化活性上均有自己的特性^[3-4]。

在古菌中,泉古菌 (Crenarchaeota) 只编码 B 家族 DNA 聚合酶,然而在广古菌 (Euryarchaeota) 中存在 2 类 DNA 聚合酶,分别是 B 家族和 D 家族。B 家族 DNA 聚合酶 (PolB) 是一类较为保守的单亚基 DNA 聚合酶,主要参与基因组 DNA 复制以及 DNA 损伤修复;D 家族 DNA 聚合酶 (PolD) 是古菌中特有的一类 DNA 聚合

酶, PolD 由 2 个亚基组成: 具有 3'→5'核酸外切酶活性的小亚基 (DP1)以及具有 5'→3' DNA 聚合酶活性的大亚基 (DP2)^[5]。在古菌中, PolB 可以分为 3 个亚型: (1) PolB1 仅在 TACK (Thaumarchaeota、Aigarchaeota、Crenarchaeota 和 Korarchaeota) 超门中存在。(2) PolB2 是一类独特的 DNA 聚合酶家族,因大多数关键残基突变而失活,并且在古菌谱系中显示出斑片状分布。(3) PolB3 在除 Thaumarchaeota 以外的所有古菌中都存在。PolB1 和 PolB3 都具有 3'→5'核酸外切酶活性和 DNA 聚合酶活性,而 PolB2 的分子量相对较小,且只具有完整的聚合酶结构域,缺少完整的外切酶结构域^[6-9]。

1976 年人们从 *Thermus aquaticus* 中鉴定了第一个热稳定性的 *Taq* DNA 聚合酶^[10]。随着其他 (超)嗜热微生物的发现以及蛋白重组表达技术的发展,大量热稳定的 DNA 聚合酶得到分离与鉴定。耐热 DNA 聚合酶作为分子生物学技术的重要工具酶被广泛应用,如聚合酶链式反应 (PCR)、基因克隆、基因测序、疾病诊断、基因治疗以及多态性分析等^[11]。虽然 A 家族 *Taq* DNA 聚合酶的发现是 PCR 发展中的一个重大突破,但其 3'→5'核酸外切酶活性的缺失导致其扩增产物的错误率相对较高。超嗜热古菌中的 B 家族 DNA 聚合酶因其显著的热稳定性和 3'→5'核酸外切酶活性引起了人们的极大兴趣。一些 B 家族 DNA 聚合酶已经被鉴定并应用于 PCR,特别是来自广古菌门热球菌科 Thermococcales 的菌株,主要包括火球菌属的 *Pyrococcus furiosus*^[12]、热球菌属的 *Thermococcus litoralis*^[13]、*Thermococcus* 9 N-7^[14]、*Thermococcus kodakarensis*^[15]、*Thermococcus fumicolans*^[16]、*Thermococcus* sp. NA1^[17]、*Thermococcus waiotapuensis*^[18] 及 *Thermococcus barophilus* Ch5^[19]等。

Thermococcus eurythermalis A501 属于广古菌门,分离自瓜伊玛斯盆地 2 006.9 m 深处的一个黑烟囱热液口,是一种严格厌氧的超嗜热古菌,可以在广泛的温度、pH 值和压力范围内生长,最佳生长温度和压力分别为 85 °C 和 20 Mpa; 最适 pH 及盐度分别为 7.0-8.0 和 2.0%^[20]。*Thermococcus eurythermalis* A501 编码 B 家族 (B3 亚型) 和 D 家族 2 类 DNA 聚合酶。在本项工作中,我们克隆了其 PolB 基因,在大肠杆菌 Rosetta(DE3) 中进行了表达。对重组 DNA 聚合酶 Teu-polB 进行了纯化、生化特性表征,并优化了 PCR 扩增反应条件。为 PCR 提供了一种新型的高忠实性 DNA 聚合酶。

1 材料与方法

1.1 材料

Thermococcus eurythermalis A501 菌株基因组 DNA 采用酚氯仿法提取。大肠杆菌 DH5 α 、Rosetta(DE3) 表达菌株、pUC19 质粒及表达载体 pET28a 均为本实验室保存。用于酶学特性分析的寡核苷酸底物和 PCR 引物均合成自生工生物工程 (上海) 股份有限公司,序列详见表 1 和表 2。DNA 聚合酶 PrimSTAR、*Hind* III 和 *Nde* I 限制性内切酶、 λ DNA、dNTPs、DNA Ladder 购自 TaKaRa 公司。*Taq* DNA 聚合酶和 *Pfu* DNA 聚合酶购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。Ni-NTA 蛋白纯化树脂购自 Bio-Rad 公司。ClonExpress II 一步克隆试剂盒购自南京诺唯赞公司。PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、Brandford 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白 Marker 及其余生化试剂均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 表达载体构建

首先以 *Thermococcus eurythermalis* A501 基因组 DNA 为模板,使用 DNA 聚合酶 PrimerSTAR

表 1 *Teu-PolB* 生化特性分析及 PCR 应用的寡核苷酸序列Table 1 Oligodeoxynucleotides used for biochemical characterization and PCR application of *Teu-PolB*

Names	Sequences (5'→3')	Figures
DDC2	*CAGCCAGGTGTCTCACT	2, 3, 4
DDC5	*CAGCCAGGUGUCUCACU	4
DDC7	ACTGTGGCGAGTCGGCTAAGTGAGACACCTGGCTG	2, 3, 4
DD286	*TCCGATAGCCAGATATCTTGACA	4
DD297	*TCCGATAGCCAGATATCTTGACAp	4
DD408	TGCGTGCAGTGCTGTCAAGATATCTGGCTATCGGA	4
λ-F	TTCTCATGCTGAAAACGTGGTGTACC (10 001–10 026)	5, 6, 7, 8
λ-2R (2 kb)	GAGAAGCATGCCGAGCAAATGAGA (11 997–12 021)	5, 6, 7
λ-4R (4 kb)	TGCGGTTATAGCGGTCCGGCTGT (13 972–13 994)	7, 8

*: fluorescent group FAM; p: phosphorylation modification; λ: λDNA; F: forward primer; R: reverse primer.

扩增全长 *Teu-PolB* 基因, 正反向引物序列分别为 XL2380 和 XL2381 (表 2)。PCR 扩增获得全长 *Teu-PolB* 基因 (3 939 bp) 的琼脂糖凝胶电泳结果如图 1A 所示。使用 *Hind* III 和 *Nde* I 双酶切 pET28a 载体, 并用 DNA 产物纯化试剂盒回收酶切产物。用诺唯赞公司的 ClonExpress II 试剂盒的一步克隆法将全长 *Teu-PolB* 基因与双酶切的 pET28a 载体进行同源重组, 具体操作参照试剂盒说明书。DNA 序列测定验证全长 *Teu-PolB* 基因的正确性。

由于 *Teu-PolB* 包含一段 intein 蛋白的编码 DNA 序列 (1 474–3 084), 它的存在很可能会

影响 *Teu-PolB* 蛋白的重组表达。因此为了提高 *Teu-PolB* 的表达产量, 通过重叠引物 PCR 介导的定点突变删除 intein 蛋白编码 DNA 序列 (图 1B), 正反向突变引物序列分别为 XL2530 和 XL2531 (表 2)。DNA 序列检测验证突变位点和序列准确性, 最终获得重组表达载体 pET28a-*Teu-PolB*。

1.3 重组蛋白的诱导表达和纯化

将不含 intein 序列的 DNA 聚合酶 *Teu-PolB* 的原核重组表达载体 pET28a-*Teu-PolB* 转化至大肠杆菌 Rosetta (DE3) 感受态细胞中。挑取单菌落至 20 mL 添加有 50 mg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中培养过夜, 转接至 500 mL 培养基中, 37 °C、200 r/min 条件下培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 在 20 °C、200 r/min 条件下继续培养 16–20 h, 诱导 *Teu-PolB* 蛋白表达。将菌体细胞用 40 mL 裂解缓冲液重悬 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10%甘油, 300 mmol/L NaCl), 进行超声波破碎细胞。超声破碎后于 75 °C 水浴锅中加热 20 min, 失活大肠杆菌自身蛋白。然后在 4 °C 条件下 8 000 r/min 离心 40 min, 收集上清液获得重组蛋白粗液。利用 Ni-NTA 树脂亲和纯化 *Teu-polB*

表 2 本文所用的 PCR 引物序列

Table 2 PCR Primers used in this study

Names	Primer sequences (5'→3')
XL2380	TGCCGCGCGGCAGCC <u><i>CATATG</i></u> ATTCTCGATACCGACTAC
XL2381	TCGAGTGC GGCCGCA <u><i>AAGCTT</i></u> CACTTCTTTCCCTTCGGCT
XL2530	GCGAACAGTTACTACGGCTACTACGG
XL2531	GTAAGTGTTCGCCAGGATTTTGATAG
PUC-1	TACGCCACTGGCCGTCGTTTTACAAC
PUC-2	CCAGTGGCGTAATCATGGTCATAGCT

Bases with underlined italics are restriction enzyme cutting sites.

蛋白, 得到 DNA 聚合酶 Teu-PolB。

将上一步亲和纯化的 Teu-PolB 洗脱液透析到低盐缓冲液 A (25 mmol/L Tris-HCl pH 7.0, 50 mmol/L NaCl), 然后通过离子交换层析 (Source 15Q 离子树脂) 进行纯化。用缓冲液 A 预先平衡柱子, Teu-PolB 蛋白上样后, 通过缓冲液 B (25 mmol/L Tris-HCl pH 7.0, 1 mol/L NaCl) 梯度提高洗脱液的盐离子浓度, 分管收集洗脱液, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析后, 确定 DNA 聚合酶 Teu-PolB 的洗脱条件。最终将目的蛋白置换至储存溶液: 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L KCl, 0.5% (V/V) Nonidet P40, 0.5% (V/V) Tween 20, 50% (V/V) 甘油 glycerol, 于 -20°C 保存。蛋白浓度经 Bradford 法测定。

1.4 Teu-PolB 的生化特性鉴定

用于鉴定 Teu-PolB 聚合酶活性、外切酶活性及其他生化特性的寡核苷酸片段见表 1, 其中双链底物的配制方法是将模板链和 5'端带荧光标记的引物链接 1.5 : 1.0 的分子数混合入退火缓冲液 (终浓度为 10 mmol/L Tris-HCl

pH 8.0, 50 mmol/L NaCl) 中, 置于 95°C 、水浴 5 min, 自然冷却至室温, 直接进行反应或避光冻存于 -20°C 。Teu-PolB 的 DNA 聚合酶活性测定反应体系 (20 μL) 包括: 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 2 mmol/L MgCl_2 , 30 mmol/L KCl, 2 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% Triton X-100, 0.005% BSA, 100 nmol/L 荧光标记底物, 10 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs 和一定浓度的 Teu-PolB 蛋白。50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后, 加入 20 μL 反应终止液 (100 mmol/L EDTA, 95% 甲酰胺, 0.02% 溴酚蓝, 0.2% SDS)。上述反应体系在不添加 dNTPs 的条件下, 用同样的方法测定 Teu-PolB 的核酸外切酶活性。反应产物在 15% 或 18% 的变性聚丙烯酰胺凝胶 (含 8 mol/L 尿素) 中电泳分离, 使用 Amersham Typhoon RGB 激光成像仪 (GE 公司) 扫描成像。

1.5 Teu-PolB 的 PCR 应用条件优化

PCR 反应缓冲液对于 PCR 反应的效率、灵敏度和保真度非常重要。本研究以 λDNA (NCBI 参考: NC 001416) 为模板进行 PCR, 引物序列见表 1, $\lambda\text{-F}$ 为正向引物, $\lambda\text{-2R}$ 和 $\lambda\text{-4R}$ 分别为扩增 2 kb 和 4 kb 片段的反向引物。50 μL

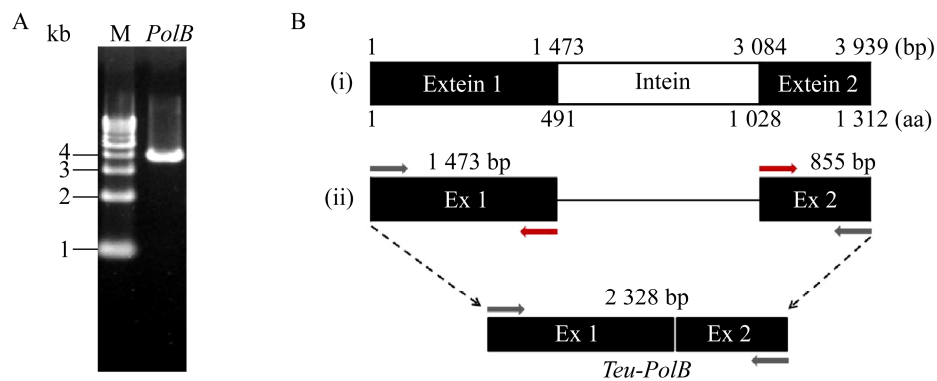


图 1 全长 *Teu-PolB* 基因 PCR 扩增 (A) 和 *Teu-PolB* 的表达载体构建策略 (B)

Figure 1 Amplified full-length *Teu-PolB* gene (A) and Constructing strategy for *Teu-PolB* expression plasmid (B). (i) The full-length *Teu-PolB* gene is split by one intein-coding sequence that forms a continuous open reading frame with the two polymerase-coding exents; (ii) Deletion of intein in the full-length *Teu-PolB* gene through site-directed mutagenesis by overlapping primer PCR.

PCR 反应体系构成如下: 60 ng Teu-PolB, 5 ng λ DNA, 10 pmol 引物, 0.2 mmol/L dNTPs 和 1×PCR 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl 或 50 mmol/L Tricine-KOH, 2 mmol/L $MgCl_2$ 、30 mmol/L KCl, 2 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.01% Triton X-100, 0.005% BSA)。反应条件如下: 95 °C 5 min; 95 °C 0.5 min, 60 °C 0.5 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。为了测试 pH 对 PCR 的影响, 以 λ DNA 为模板在 pH 7.0–9.2 范围内扩增 2 kb 长度的片段, 同时测试不同的 KCl、 $(NH_4)_2SO_4$ 、Triton X-100 和 BSA 浓度对 PCR 的影响。为了测试 $MgCl_2$ 对 PCR 的影响, 按上述方法在 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 中以各种 $MgCl_2$ 浓度扩增 2 kb 的 λ DNA 片段。反应完成后, 取 5 μ L 样品与上样缓冲液混合, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 的扩增效果。

1.6 DNA 聚合酶保真度测定

DNA 聚合酶的保真度测定以 pUC19 质粒 (2 686 bp) 作为模板, 用重叠引物 PCR 介导的定点突变删除多克隆位点序列 (multiple cloning site, MCS、632-688), 正反向突变引物序列分别为 PUC-1 和 PUC-2 (表 2)。随机挑选单菌落抽提质粒, 将 MCS 片段删除成功的质粒克隆进行 DNA 全序列测定分析, 验证 DNA 聚合酶合成 DNA 的准确性。

2 结果与分析

2.1 Teu-PolB 表达纯化及活性鉴定

Teu-PolB 的表达纯化结果如图 2A 所示。在 20 °C 摇床低温诱导过夜后, 经 Ni-NTA 亲和纯化以及离子交换层析, 可以从 1 L 培养液中获得 2.4 mg 的 Teu-PolB 蛋白, SDS-PAGE 凝胶电泳检测表明其纯度达 90% 以上。通过与蛋白分子量标准比较, Teu-PolB 蛋白的单体分子量在 90–100 kDa 之间, 与理论计算值 (90.104 kDa) 相符。

Teu-PolB 含有 3 个结构域: N 末端结构域、聚合酶结构域和 3'→5' 核酸外切酶结构域, 包括古菌 B 家族 DNA 聚合酶高度保守的 3 个 3'→5' 核酸外切酶基序^[21]和 6 个 5'→3' 聚合酶基序^[22-23]。对其进行体外酶学活性鉴定, 于反应体系中加入不同浓度的 Teu-PolB, 50 °C 条件下反应 10 min, 结果表明 Teu-PolB 具有 DNA 聚合酶活性 (图 2B)。当反应体系中不添加 dNTPs 时, Teu-PolB 会将 5' 末端带有标记的寡核苷酸片段切割成不同长度的 DNA, 表明 Teu-PolB 具有 3'→5' 核酸外切酶活性, 且对 dsDNA 和 ssDNA 底物的切割效率没有特异性 (图 2C)。

2.2 温度对 Teu-PolB 活性的影响及其热稳定性

首先对 Teu-PolB 聚合酶和外切酶活性的最适酶反应温度进行了检测。考虑到本研究所用 dsDNA 底物在 55 °C 以上会解链成单链 DNA, 聚合酶活性反应温度为 30–55 °C, 结果显示该酶在 55 °C 时聚合酶活性最高 (图 3A)。利用 2 种 DNA 底物 (dsDNA 和 ssDNA) 测定 Teu-PolB 外切酶活性的最适温度, 结果显示 3'→5' 核酸外切酶活性最适温度均为 65 °C (图 3B)。鉴于外切酶活性最适温度为 65 °C, 因此聚合酶活性的最适温度很可能也是 65 °C 左右。

为了探究 Teu-PolB 的热稳定性, 我们首先将酶在反应缓冲液中 (酶浓度为 3 nmol/L) 于 80 °C、85 °C、90 °C、95 °C、98 °C 下分别加热 0、30、60、90、120、180 min, 然后加入底物, 在 55 °C 下反应 10 min, 终止反应, 电泳检测剩余酶活性, 并通过 ImageQuant TL 8.1 软件定量分析加热处理后的剩余活性。以加热 0 min 的聚合酶活性作为 100%, 绘制热稳定性曲线。90 °C、95 °C、98 °C 的热失活曲线见图 3C (Teu-PolB 在 80 °C 或 85 °C 下处理 3 h 剩余聚合酶活性均在 98% 以上, 故未在图中标明)。Teu-PolB 在 90 °C

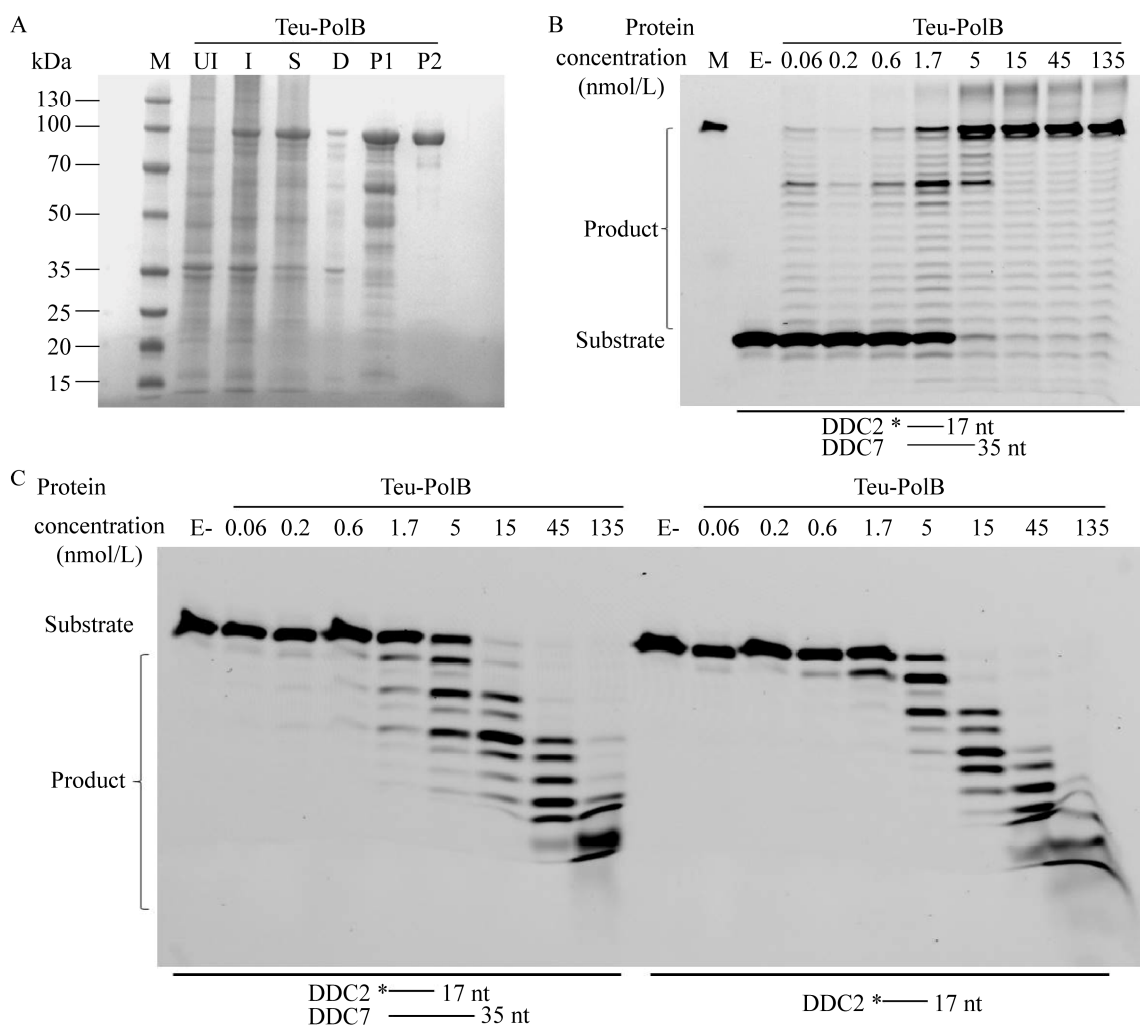


图 2 Teu-PolB 的表达纯化及酶活性测定

Figure 2 Expression, purification and activity titration of Teu-PolB. (A) 15% SDS-PAGE analysis of Teu-PolB protein expression and purification process. Lane M: molecular weight marker; lanes UI and I: the total proteins in *E. coli* before and after induction; lanes S and D: supernatant and pellet of cell lysate after centrifugation; lane P1 and P2: the Teu-PolB purified by Ni-NTA column, and ion-exchange column, respectively. (B) Polymerase activity titration of Teu-PolB. (C) Exonuclease activity titration of Teu-PolB. Lane M: 35 nt oligodeoxynucleotides; lane E-: the reaction without the enzyme.

和 95 °C 处理 3 h 后酶活小幅下降, 剩余酶活分别为 93.7% 和 85.4%; 98 °C 加热使酶活显著下降, 3 h 后剩余酶活为 33.4%, 98 °C 的热失活半衰期约为 2 h。该结果表明 Teu-PolB 具有良好的热稳定性。

2.3 引物末端基团与引物类型对 Teu-PolB 活性的影响

利用 3'-OH 和 3'-磷酸化的引物作为底物,

检测 3'末端基团磷酸化对 Teu-PolB 活性的影响。如图 4A 所示, 3'末端的磷酸基团显著抑制 Teu-PolB 的 3'→5'核酸外切酶活性, 从而阻碍其聚合酶活性。DNA 聚合酶延伸反应需要引物核酸 (DNA 或 RNA) 序列, 在引物的 3'-OH 持续添加新的核苷酸, 从而进行延伸反应。细胞的染色体 DNA 复制反应以 RNA 作为引物来合

成子代 DNA 链。因此, 能够延伸 RNA 引物的 DNA 聚合酶具有染色体 DNA 复制功能, 而不能延伸 RNA 引物的 DNA 聚合酶一般只负责 DNA 修复过程的 DNA 合成反应。为了检测 Teu-PolB 是否具有染色体 DNA 复制功能, 利

用相同长度的单链 DNA 和 RNA 作为引物, 检测 Teu-PolB 在体外的引物选择性。结果显示, Teu-PolB 能够有效延伸 2 种引物, 但对 DNA 引物链的延伸作用更强 (图 4B), 表明 Teu-PolB 可以在细胞内负责染色体 DNA 的合成。

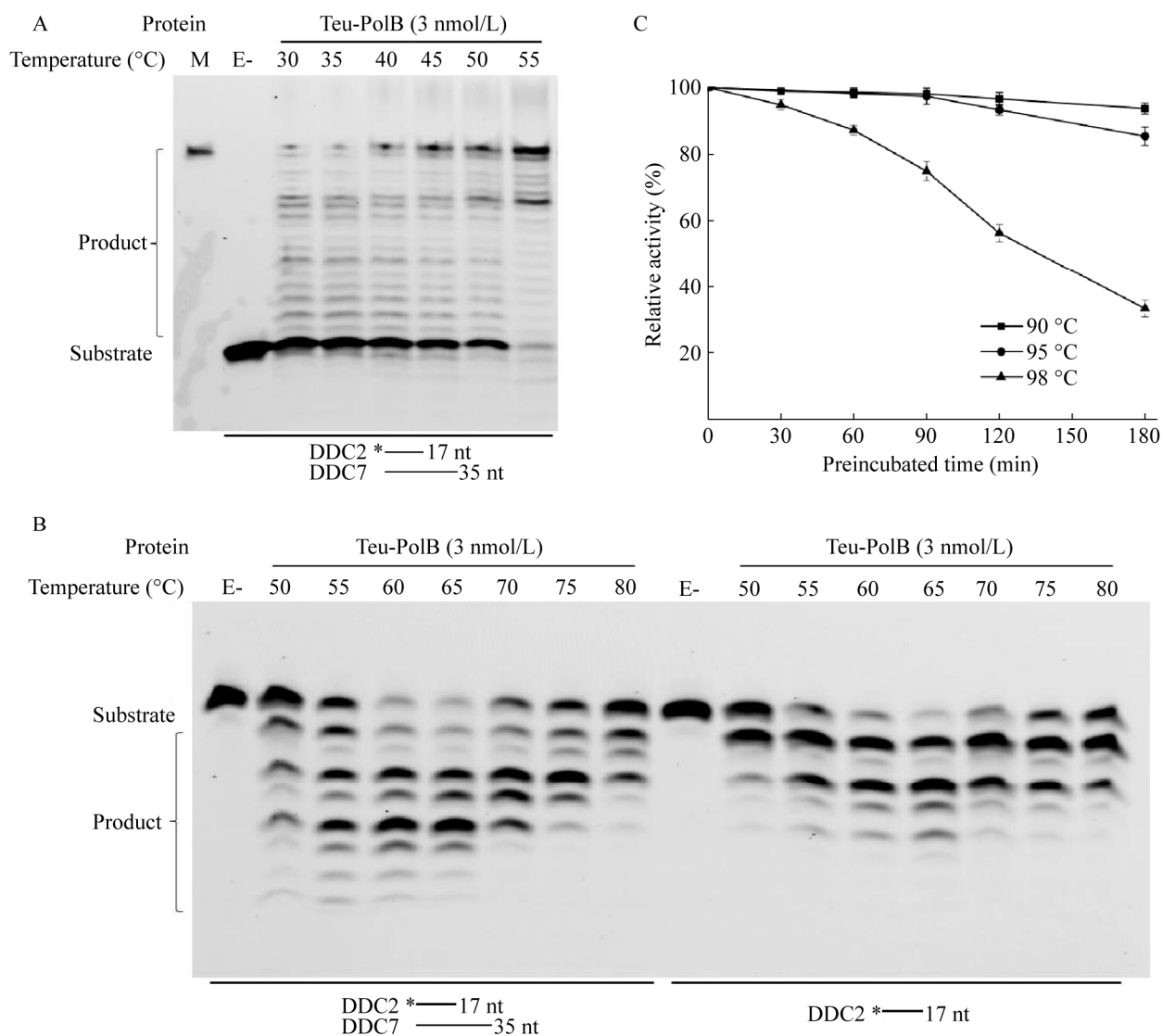


图 3 温度对 Teu-PolB 活性的影响及其热稳定性

Figure 3 The effect of temperature on Teu-PolB activity and the thermostability of polymerase activity of Teu-PolB. (A) Effect of temperature on polymerase activity of Teu-PolB. (B) Effect of temperature on exonuclease activity of Teu-PolB. Lane M: 35 nt oligodeoxynucleotides; lane E-: the reaction without the enzyme. (C) The thermostability of polymerase activity of Teu-PolB. The enzyme activity without heat treatment is used as control and set as 100%, and the measured values of remained enzyme activity of various heat treatments are the percentages relative to the control.

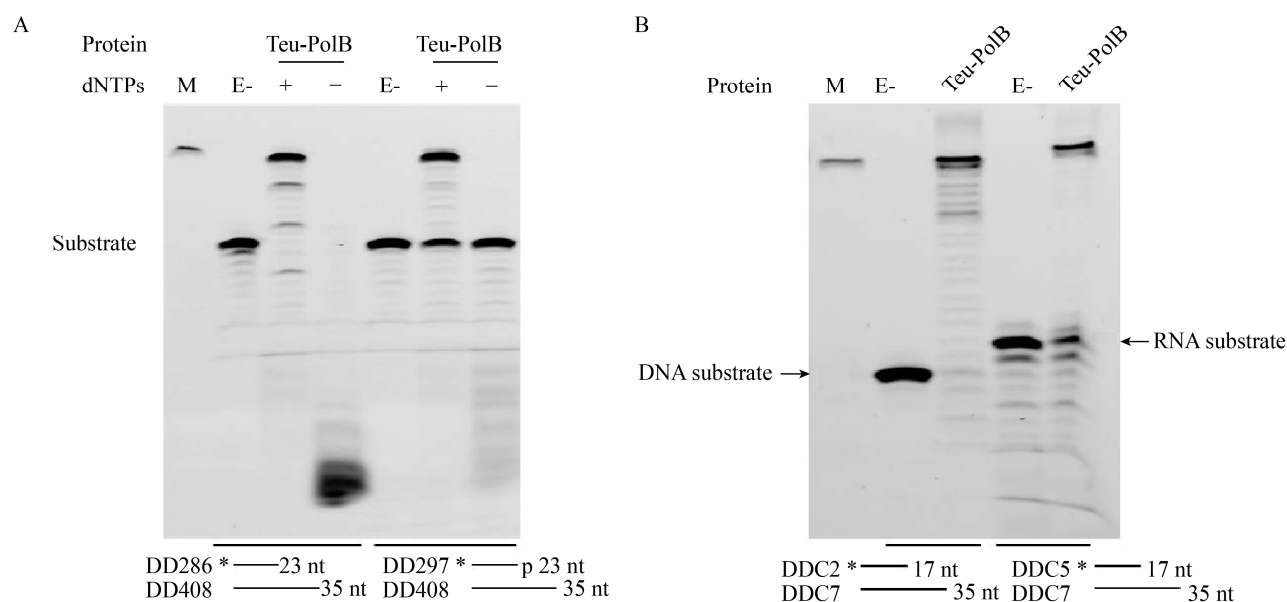


图 4 RNA 引物及引物 3'端磷酸基团对 Teu-PolB 活性的影响

Figure 4 The effects of 3'-terminal phosphate group (A) and RNA primers (B) on Teu-PolB activity. The reactions were performed with different substrate at 55 °C for 10 min. Lane M: 35 nt oligodeoxynucleotides; lane E-: the reaction without the enzyme.

2.4 Teu-PolB 应用于 PCR 的缓冲液条件优化

古菌 B 家族的 DNA 聚合酶被广泛应用于 PCR^[24]。上述结果表明 Teu-PolB 具备良好的 PCR 应用前景。PCR 扩增效果与反应缓冲液组分密切相关,因此我们首先对 Teu-PolB 的 PCR 缓冲液组分进行了优化,结果如图 5 所示。在 50 mmol/L Tris-HCl 或 50 mmol/L Tricine-KOH 缓冲液中, Teu-PolB 均能在广泛的 pH 值范围内扩增出 2 kb 的 λ DNA 片段; Tris-HCl 缓冲液明显优于 Tricine-KOH 缓冲液,且在 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲体系中活性最高(图 5A)。Teu-PolB 是 Mg^{2+} 依赖性酶,其催化活性对 Mg^{2+} 浓度敏感,结果显示 $MgCl_2$ 浓度在 2.5 mmol/L 时能最大限度地激活 Teu-PolB 的活性(图 5B)。此外,离子强度优化结果表明 KCl 和 $(NH_4)_2SO_4$ 的最佳浓度分别为 60 mmol/L(图 5C) 和 10 mmol/L(图 5D)。Triton X-100 和 BSA 的最佳浓度分别为 0.015%

(图 5E) 和 0.01%(图 5F)。最后确定 Teu-PolB 的最佳 PCR 缓冲液组成为 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 60 mmol/L KCl, 10 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.015% Triton X-100 和 0.01% BSA。

2.5 Teu-PolB 的 PCR 灵敏度及耐盐性能

以 λ DNA 为模板,在最佳缓冲液中扩增 2 kb 片段,确定扩增灵敏度。分别在 50 μ L 体系中加 0.1、0.2、0.5、1、2 和 5 ng 的 λ DNA,发现 λ DNA 的量高于 0.5 ng 时, Teu-PolB 均能有效地扩增出目的片段(图 6A)。DNA 聚合酶(包括商用的 PCR 酶)通常对盐敏感,并且活性随反应体系中 NaCl 浓度的增加而降低。为了研究 Teu-PolB 的耐盐性,在其他条件不变的情况下,分别在 50 μ L 反应体系中另外加入 0、30、60、90、120、150 和 180 mmol/L NaCl,扩增 2 kb 片段。由图 6B 所示,在盐浓度为 0–120 mmol/L 的范围内, Teu-PolB 均能扩增出目的片段,NaCl 耐受性与来自 *Aeropyrum pernix* 的 ApePolB3 相当^[25],

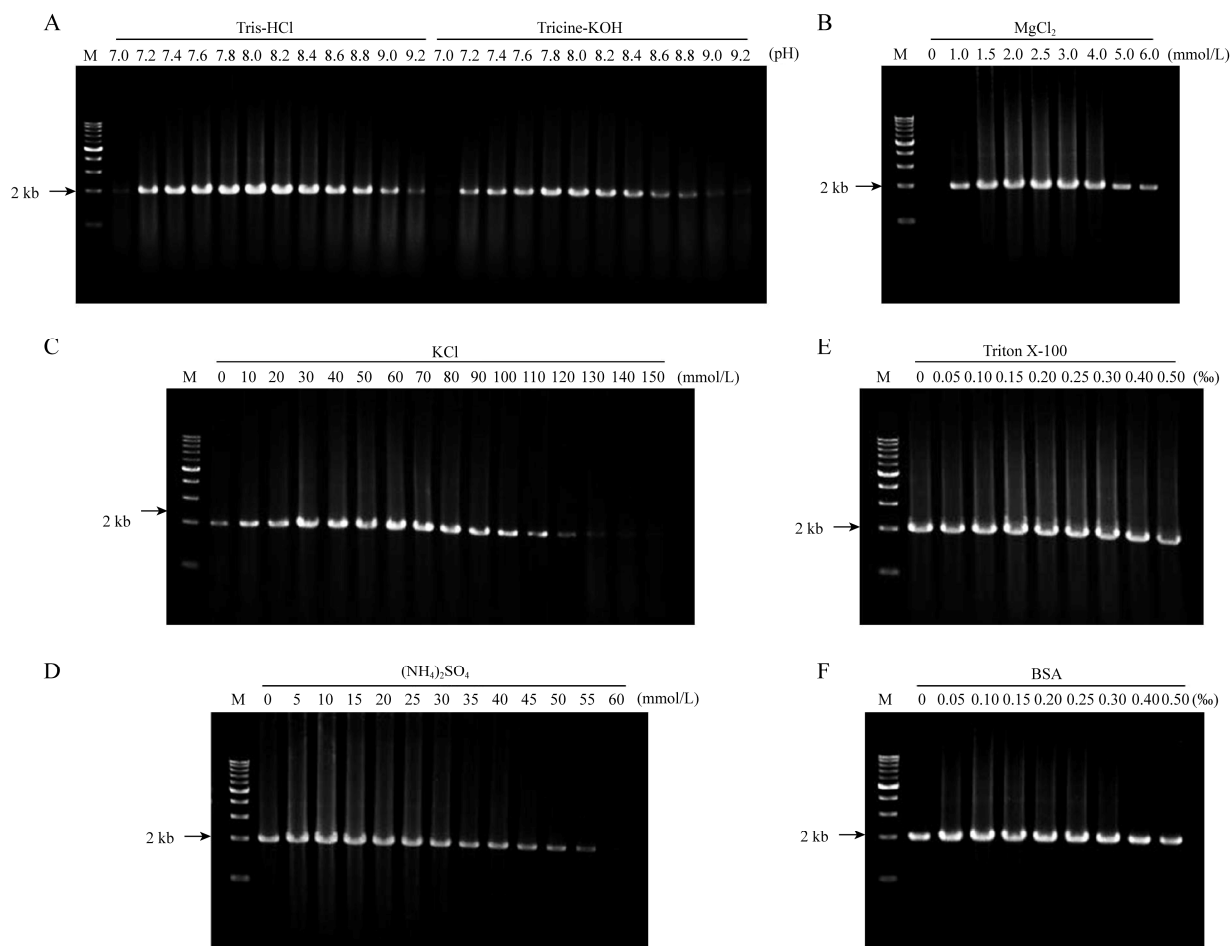


图5 Teu-PolB的PCR缓冲液优化

Figure 5 PCR optimization with Teu-PolB DNA polymerase. Effect of pH (A), $MgCl_2$ (B), KCl (C), $(NH_4)_2SO_4$ (D), Triton X-100 (E) and BSA (F) on PCR amplification of a 2 kb λ DNA fragment with Teu-PolB DNA polymerase. Lane M contains DNA molecular size markers (1 kb DNA Ladder Dye Plus, TaKaRa # 3426A).

明显强于商用 *Pfu* DNA 聚合酶 (40 mmol/L)。对盐的高耐受性表明 Teu-PolB 可从高盐样品扩增目的片段。

2.6 Teu-PolB 的 PCR 最适延伸温度

在最适反应缓冲液中,选择 65 °C、68 °C、70 °C 和 72 °C 的延伸温度扩增 2 kb 和 4 kb 的 λ DNA 片段。结果表明,4 个延伸温度下均能扩增出相应的 DNA 片段,其中 68 °C 时产物量相对最高,故最适延伸温度为 68 °C (图 7A)。为了

测试 Teu-PolB 的 PCR 扩增速率,选择不同延伸时间进行 4 kb 的 λ DNA 片段扩增,反应条件如下: 95 °C 5 min; 95 °C 0.5 min, 60 °C 0.5 min, 68 °C (2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 min), 30 个循环, 72 °C 5 min。结果显示,延伸时间为 2 min 时就能成功扩增 4 kb 的 λ DNA 片段,且扩增产物与延伸 4 min 时的产物条带亮度相当,故 Teu-PolB 的延伸速率为 2 kb/min 以上 (图 7B),高于 *Taq* DNA 酶的 1 kb/min。

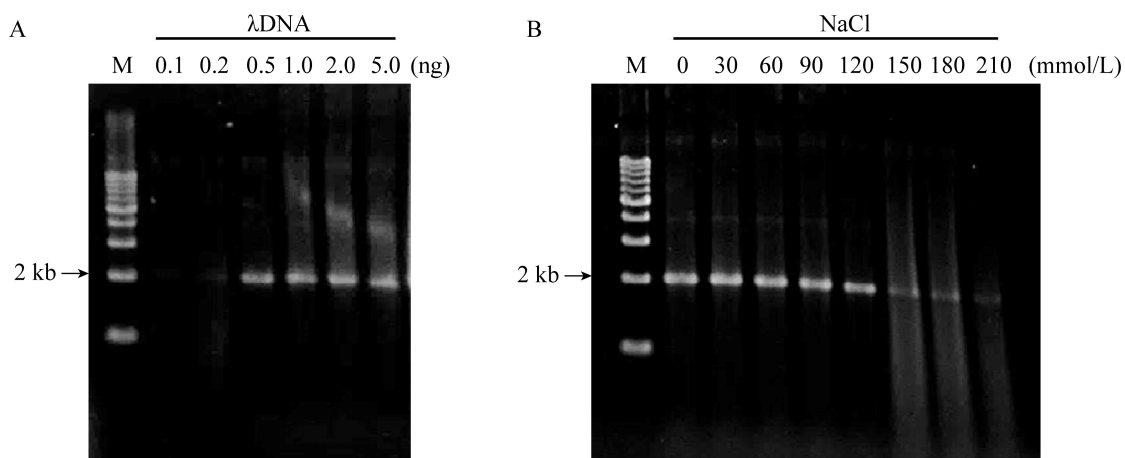


图 6 Teu-PolB 应用于 PCR 的灵敏度及耐盐性能的测定

Figure 6 Determination of the sensitivity and salt tolerance of Teu-PolB in PCR. PCR was performed to amplify a 2 kb λ DNA fragment using optimal reaction buffer with different amounts of λ DNA (A) or different salt concentrations (B). Lane M contains DNA molecular size markers (1 kb DNA Ladder Dye Plus, TaKaRa # 3426A).

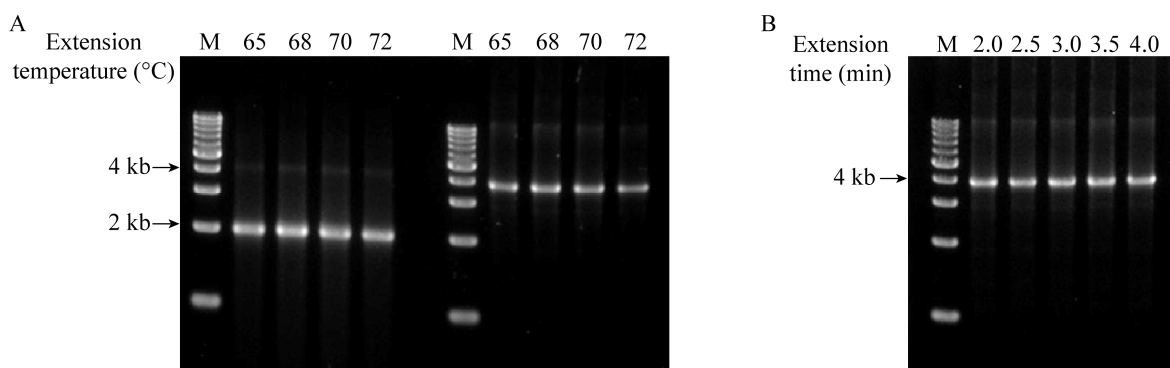


图 7 Teu-PolB 的 PCR 最适延伸温度与延伸速率

Figure 7 Determination of the optimum extension temperature and extension efficiency for Teu-PolB. (A) PCR was performed to amplify a 2 kb or 4 kb λ DNA fragment using optimal reaction buffer. (B) PCR was performed to amplify a 4 kb λ DNA fragment under optimum extension temperature and optimal reaction buffer. Lane M contains DNA molecular size markers (1 kb DNA Ladder Dye Plus, TaKaRa # 3426A).

2.7 Teu-PolB 与商品化 DNA 聚合酶的 PCR 性能比较

选取商品化 *Taq*、*Pfu* DNA 聚合酶与 Teu-PolB 在不同 λ DNA 浓度下 (0.2、0.5、2.0、5.0 ng) 扩增 4 kb 片段, 反应在最佳反应缓冲液或厂家提供的缓冲液中进行, 以检测 PCR 反应性能。结果如图 8, 相同时间内 *Taq* DNA

聚合酶的 PCR 扩增产量明显强于 Teu-PolB 和 *Pfu* DNA 聚合酶, Teu-PolB 的扩增产量略高于 *Pfu* DNA 聚合酶。由于 *Pfu* DNA 聚合酶的保真度比 *Taq* 酶高 8 倍, 因此本研究选取保真度高的 *Pfu* DNA 聚合酶和 Teu-PolB 对比 PCR 保真度。测序结果见表 3, 在 10 个删除 MCS 序列的质粒中 (来自 DNA 聚合酶扩增产物), Teu-PolB

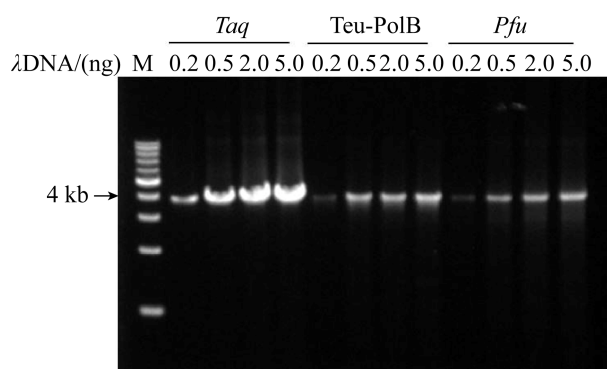


图8 Teu-PolB与商品化Taq、Pfu DNA聚合酶的PCR延伸效果对比

Figure 8 Comparison of PCR extension efficiency with Teu-PolB, Taq and Pfu DNA polymerases. PCR was performed to amplify a 4 kb λ DNA fragment under optimal reaction buffer or the buffer supplied by the manufactures. Lane M contains DNA molecular size markers (1 kb DNA Ladder Dye Plus, TaKaRa # 3426A).

表3 Teu-PolB与商品化Pfu DNA聚合酶的PCR保真度对比

Table 3 Comparison of Teu-PolB and Pfu DNA polymerase fidelities using DNA sequencing method

DNA polymerase	Teu-PolB	Pfu
MCS deletion	10 clones	10 clones
Total reading size (nt)	26 290	26 290
Mismatch (nt)	4	5
Insertion or deletion (nt)	0	1
Error rate ^a	1.52×10^{-4}	2.28×10^{-4}

^a: error rate=error nucleotide (nt)/total (nt).

扩增的片段只突变了4个核苷酸位点,保真度优于Pfu DNA聚合酶的5个核苷酸位点突变。

3 讨论

在本研究中,我们克隆、表达并纯化了*Thermococcus eurythermalis* A501的B家族DNA聚合酶,并对其酶学特性与PCR应用进行研究。结果表明,Teu-PolB同时具有DNA

聚合酶和3'→5'核酸外切酶活性,与其他热球菌科的B家族DNA聚合酶类似。该酶在98℃时的半衰期约为2h,耐热性优良,可应用于PCR扩增DNA。

合适的反应体系能够最大限度地发挥酶的活力,所以反应缓冲液组成是PCR高效扩增的关键条件之一。除此之外DNA模板浓度、延伸温度以及抑制剂等诸多因素也会影响到DNA聚合酶的催化能力。本研究发现缓冲液中pH值和Mg²⁺是影响Teu-PolB聚合酶活性的最重要因素。其中pH主要从模板状态和酶活性两个方面影响PCR反应^[26]。Teu-PolB的PCR最适pH为8.0。第二个关键因素是Mg²⁺,该离子是DNA聚合酶活性的依赖性离子,当反应体系中不添加MgCl₂时,PCR反应不能正常进行。在标准PCR反应中,Mg²⁺的浓度一般为0.5–2.5 mmol/L,Teu-PolB的最适Mg²⁺浓度为2.5 mmol/L。相较于现有的商品化DNA聚合酶,Teu-PolB的高耐热性、低模板量需求、高耐盐、高保真度和高扩增速率等特点更具吸引力。Teu-PolB的最适延伸温度为68℃,且可在模板量为0.5 ng λ DNA下成功扩增出2 kb目的片段,盐耐受度达到120 mmol/L的NaCl,保真度略高于Pfu DNA聚合酶且有较高的延伸速率,能以2 kb/min扩增出4 kb的目的片段,具有良好的应用潜力。

REFERENCES

- [1] Burgers PMJ, Koonin EV, Bruford E, et al. Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J Biol Chem*, 2001, 276(47): 43487-43490.
- [2] Garforth SJ, Domaoal RA, Lwatura C, et al. K65R and K65A substitutions in HIV-1 reverse transcriptase enhance polymerase fidelity by decreasing both dNTP misinsertion and mispaired primer extension efficiencies. *J Mol Biol*, 2010, 401(1): 33-44.
- [3] Hübscher U, Ebrary I. DNA polymerases discovery, characterizations and functions in cellular DNA transactions. *Agric Biol Chem*, 2010, 53(12): 3251-3256.

- [4] Langhorst BW, Jack WE, Reha-Krantz L, et al. Polbase: a repository of biochemical, genetic and structural information about DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(D1): D381-D387.
- [5] Sarmiento F, Long F, Cann I, et al. Diversity of the DNA replication system in the archaea domain. *Archaea*, 2014, 2014: 675946.
- [6] Guy L, Ettema TJ. The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends Microbiol*, 2011, 19(12): 580-587.
- [7] Martijn J, Ettema TJ. From archaeon to eukaryote: the evolutionary dark ages of the eukaryotic cell. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(1): 451-457.
- [8] Rogozin IB, Makarova KS, Pavlov YI, et al. A highly conserved family of inactivated archaeal B family DNA polymerases. *Biol Direct*, 2008, 3: 32.
- [9] Makarova KS, Krupovic M, Koonin EV. Evolution of replicative DNA polymerases in archaea and their contributions to the eukaryotic replication machinery. *Front Microbiol*, 2014, 5: 354.
- [10] Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*, 1976, 127(3): 1550-1557.
- [11] Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, et al. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(5): 253-260.
- [12] Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MWW, et al. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, 1991, 108(1): 1-6.
- [13] Kong H, Kucera RB, Jack WE. Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea *Thermococcus litoralis*. Vent DNA polymerase, steady state kinetics, thermal stability, processivity, strand displacement, and exonuclease activities. *J Biol Chem*, 1993, 268(3): 1965-1975.
- [14] Southworth MW, Kong H, Kucera RB, et al. Cloning of thermostable DNA polymerases from hyperthermophilic marine archaea with emphasis on *Thermococcus* sp. 9 degrees N-7 and mutations affecting 3'→5' exonuclease activity. *PNAS*, 1996, 93(11): 5281-5285.
- [15] Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, et al. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(11): 4504-4510.
- [16] Cambon-Bonavita MA, Schmitt P, Zieger M, et al. Cloning, expression, and characterization of DNA polymerase I from the hyperthermophilic archaea *Thermococcus fumicolans*. *Extremophiles*, 2000, 4(4): 215-225.
- [17] Kim YJ, Lee HS, Bae SS, et al. Cloning, purification, and characterization of a new DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. NA1. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(7): 1090-1097.
- [18] Cho SS, Kim KP, Lee KK, et al. Characterization and PCR application of a new high-fidelity DNA polymerase from *Thermococcus waiotapuensis*. *Enzym Microb Technol*, 2012, 51(6/7): 334-341.
- [19] Kwon KM, Kang SG, Sokolova TG, et al. Characterization of a family B DNA polymerase from *Thermococcus barophilus* Ch5 and its application for long and accurate PCR. *Enzyme Microb Technol*, 2016, 86: 117-126.
- [20] Zhao WS, Xiao X. Complete genome sequence of *Thermococcus eurythermalis* A501, a conditional piezophilic hyperthermophilic archaeon with a wide temperature range, isolated from an oil-immersed deep-sea hydrothermal chimney on Guaymas Basin. *J Biotechnol*, 2015, 193: 14-15.
- [21] Blanco L, Bernad A, Blasco MA, et al. A general structure for DNA-dependent DNA polymerases. *Gene*, 1991, 100: 27-38.
- [22] Braithwaite DK, Ito J. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(4): 787-802.
- [23] Wong SW, Wahl AF, Yuan PM, et al. Human DNA polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. *EMBO J*, 1988, 7(1): 37-47.
- [24] Zhang LK, Kang MY, Xu JJ, et al. Archaeal DNA polymerases in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(16): 6585-6597.
- [25] Daimon K, Ishino S, Imai N, et al. Two family B DNA polymerases from *Aeropyrum pernix*, based on revised translational frames. *Front Mol Biosci*, 2018, 5: 37.
- [26] Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 1993, 362(6422): 709-715.

(本文责编 陈宏宇)