

· 工业生物技术 ·

融合大肠杆菌素 DNA 结合域的 *Taq* DNA 聚合酶的性质表征

王亚平*, 平啸寅, 赵艺, 刘阳, 吴林, 马立新

湖北大学生命科学学院 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

王亚平, 平啸寅, 赵艺, 刘阳, 吴林, 马立新. 融合大肠杆菌素 DNA 结合域的 *Taq* DNA 聚合酶的性质表征[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 812-820.

WANG Yaping, PING Xiaoyin, ZHAO Yi, LIU Yang, WU Lin, MA Lixin. Characterization of a *Taq* DNA polymerase fused with a DNA binding domain of *Escherichia coli* colicin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 812-820.

摘要: *Taq* DNA 聚合酶发现自水生热栖菌(*Thermus aquaticus*), 是一种同时具有逆转录酶活性以及 DNA 聚合酶活性的工具酶。Colicin E (简称 CE) 蛋白质是一类以维生素受体 BtuB 为跨膜受体的大肠杆菌素, 其中 CE2、CE7、CE8 和 CE9 是非特异性的 DNase 型大肠杆菌素。*Taq* DNA 聚合酶由 5'→3'核酸外切酶结构域、3'→5'核酸外切酶结构域以及聚合酶结构域组成。缺失 5'→3'核酸外切酶结构域的 *Taq* DNA 聚合酶(Δ *Taq*)具有更高的产量, 但是其进行性很低, 无法扩增长片段。为了提高 Δ *Taq* 的进行性, 本研究融合 dCE 和 Δ *Taq*, 发现 dCE- Δ *Taq* 的进行性相比于 *Taq* DNA 聚合酶和 dCE-*Taq* 显著提升, 并且其逆转录酶活性也比 Δ *Taq* 更高。dCE8- Δ *Taq* 的提升最明显, 不仅能够 1 min 内扩增 8 kb 的 DNA 片段, 并且产量高于其他突变体。综上所述, 本研究通过将 Δ *Taq* DNA 聚合酶和 dCE 进行融合, 提升了 *Taq* DNA 聚合酶的 PCR 效率和逆转录活性, 为改造 *Taq* DNA 聚合酶提供了新的方法, 有望开发出性质更好的 *Taq* DNA 聚合酶。

关键词: *Taq* DNA 聚合酶; CE; PCR 效率; 逆转录活性

资助项目: 武汉东湖新技术开发区“揭榜挂帅”项目(2022KJB001); 省级科技创新专项基金(科技人才服务企业项目: 2023DJC123)

This work was supported by the Wuhan East Lake New Technology Development Zone “Unveiling the List” Project (2022KJB001) and the Provincial-level Science and Technology Innovation Special Fund (Science and Technology Talent Service Enterprise Project: 2023DJC123).

*Corresponding author. E-mail: 20110028@hubu.edu.cn

Received: 2023-07-31; Accepted: 2023-10-09; Published online: 2023-11-02

Characterization of a *Taq* DNA polymerase fused with a DNA binding domain of *Escherichia coli* colicin

WANG Yaping*, PING Xiaoyin, ZHAO Yi, LIU Yang, WU Lin, MA Lixin

State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

Abstract: *Taq* DNA polymerase, which was discovered from a thermophilic aquatic bacterium (*Thermus aquaticus*), is an enzyme that possesses both reverse transcriptase activity and DNA polymerase activity. Colicin E (CE) protein belongs to a class of *Escherichia coli* toxins that utilize the vitamin receptor BtuB as a transmembrane receptor. Among these toxins, CE2, CE7, CE8, and CE9 are classified as non-specific DNase-type colicins. *Taq* DNA polymerase consists of a 5'→3' exonuclease domain, a 3'→5' exonuclease domain, and a polymerase domain. *Taq* DNA polymerase lacking the 5'→3' exonuclease domain (Δ *Taq*) exhibits higher yield but lower processivity, making it unable to amplify long fragments. In this study, we aimed to enhance the processivity of Δ *Taq*. To this end, we fused dCE with Δ *Taq* and observed a significant improvement in the processivity of the resulting dCE- Δ *Taq* compared to *Taq* DNA polymerase and dCE-*Taq*. Furthermore, its reverse transcriptase activity was also higher than that of Δ *Taq*. The most notable improvement was observed in dCE8- Δ *Taq*, which not only successfully amplified 8 kb DNA fragments within 1 minute, but also yielded higher results compared to other mutants. In summary, this study successfully enhanced the PCR efficiency and reverse transcription activity of *Taq* DNA polymerase by fusing Δ *Taq* DNA polymerase with dCE. This approach provides a novel approach for modifying *Taq* DNA polymerase and holds potential for the development of improved variants of *Taq* DNA polymerase.

Keywords: *Taq* DNA polymerase; colicin E; PCR efficiency; reverse transcriptase activity

PCR 技术操作简单、反应迅速,是目前实验室里使用最广泛的核酸扩增方法,具有特异性强、灵敏度高和重复性好的优点^[1-3]。短短十几年,PCR 技术就被广泛应用于定点诱变、基因分型、DNA 测序、体外诊断、产前诊断、病毒携带者检测,以及 DNA 多态性研究等医学和生物学的各个方面的研究。目前市场上最常见的 PCR 反应的催化酶是 *Taq* DNA 聚合酶,而聚合酶的效率在 PCR 反应中是一个非常关键的影响要素,如何获得效率更高、错配更低的聚合酶,就成了发展 PCR 工艺的重要研究目标。

Taq DNA 聚合酶具有以下几个主要的性质^[4-7]:

(1) 热稳定性。*Taq* DNA 聚合酶能够耐受高温,并在高温下保持其酶活性,这使得它能够承受 PCR 反应中高温变性和退火步骤的要求。(2) 5'→3' DNA 聚合酶活性。*Taq* DNA 聚合酶能够在 DNA 模板上以 5'→3'方向合成新的 DNA 链。(3) 缺乏 3'→5'外切酶活性。*Taq* DNA 聚合酶缺乏 3'→5'外切酶活性,这意味着它不能修复 DNA 链上的错误碱基。(4) 碱基特异性。*Taq* DNA 聚合酶对于 DNA 模板上的碱基具有特异性,只在配对的碱基存在时才能进行 DNA 链的合成。*Taq* DNA 聚合酶除具有 DNA 聚合酶的活性外,还具有逆转录酶的活性。

大肠杆菌素是含有大肠杆菌素 pCOL 的大肠杆菌所分泌的一种具有毒性的蛋白质,最初于 1925 年被 Gratia 发现,并于 1946 年命名为大肠杆菌素(colicin)^[8-10]。大肠杆菌素能够破坏被感染的细胞。以维生素 BtuB 为易位受体的大肠杆菌素被称为 E 组大肠杆菌素(colicin E, CE),包括 CE1-CE9,其中 CE2、CE7、CE8 和 CE9 具有 DNase 活性。本实验室改造了 dCE 系列标签^[11-13],并对其进行了各个方面性质的探索,最终发现 dCE 蛋白标签是一种能够耐受高温,且具有 DNA 结合能力的蛋白质,具体表现为:(1) dCE2、dCE7、dCE8 和 dCE9 均具有与线性单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)、线性双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA)、质粒 DNA 和 RNA 结合能力;(2) 与质粒 DNA 结合能力的强弱顺序为 dCE9>dCE8>dCE7>dCE2;与线性 dsDNA 结合能力的强弱顺序为 dCE8>dCE9>dCE2>dCE7;(3) 与线性 ssDNA 结合能力的强弱顺序为 dCE9>dCE7>dCE2>dCE8;(4) 与 RNA 结合能力的强弱顺序为 dCE9>dCE2>dCE8>dCE7;(5) 融合 dCE7 蛋白的 *Pfu* 和 KOD DNA 聚合酶的进行性显著提升。

Taq DNA 聚合酶同时具有逆转录活性和催化 PCR 反应的 DNA 聚合酶活性,一直以来都是研究的热点,研究人员花了大量的时间和精力对 *Taq* DNA 聚合酶进行改造。本研究将 *Taq* 和 Δ *Taq* 与 dCE2、dCE7、dCE8、dCE9 融合,找出融合后效率最高的突变体,最终得到 PCR 活性和逆转录效率都获得提升的优良突变体。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要生化试剂

PCR 酶 PrimeStar Max、DNA Marker DL 2000 和 DL 1 kb 购自 TaKaRa 公司;Page RulerTM

Prestained Protein Ladder、Ribo Lock RNase inhibitor、Purple loading dye 和 T5 Exonuclease 购自 Thermo Fisher Scientific; Plasmid Miniprep Kit 和 Gel Extraction Kit 购自天根生化科技(北京)有限公司; Bradford Protein Concentration Assay Kit 购自碧云天公司。

1.1.2 菌株和质粒

本研究使用 pET23a 载体作为源表达载体,通过将目的基因片段克隆到 pET23a 载体上,实现对目的基因的高效表达。 Δ *Taq*、dCE2、dCE7、dCE8 和 dCE9 序列数据 NMDCX0000232 存储在国家微生物科学数据中心(National Data Center for Microbial Sciences, NMDC),链接为 <https://nmdc.cn/resource/genomics/attachment/detail/NMDCX0000232>。其中单基因采用双酶切(*Not* I/*Sac* I), T4 DNA 连接的方式克隆到载体上,融合蛋白则通过搭桥 PCR 构建,然后同样的用双酶切(*Not* I/*Sac* I), T4 DNA 连接的方式克隆到表达载体上。本实验中的大肠杆菌表达菌株为 *Escherichia coli* BL21(DE3)大肠杆菌感受态细胞,由本实验室保藏。本实验所用大肠杆菌克隆菌株为 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,由本实验室保藏。本实验所涉及的质粒如表 1 所示。

1.2 方 法

1.2.1 测试 PCR 速率

将 dCE2- Δ *Taq*、dCE7- Δ *Taq*、dCE8- Δ *Taq* 和 dCE9- Δ *Taq* 配制 dCE-*Taq* PCR 反应体系,反应体系: lambda-FN, 0.3 μ L (10 μ mol/L); lambda-RN, 0.3 μ L (10 μ mol/L); Lambda DNA, 1 ng; PCR 酶 PrimeStar Max, 1 μ L (5 U); dNTPs, 0.1 μ L (2.5 mmol/L); 10 \times reaction buffer, 1 μ L; ddH₂O, 补齐至 10 μ L。引物序列和扩增产物的大小见表 2。首先将延伸时间设定为 20 s,初步测试 dCE- Δ *Taq* 的延伸速率。

表 1 本实验中所用的质粒

Table 1 The plasmids used in the experiment

Plasmid name	Characteristic
pET30- <i>Taq</i>	T7 promoter, AmpR, C-His
pET23a	T7 promoter, AmpR
pET23a- <i>Taq</i>	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a-dCE2- <i>Taq</i>	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a-dCE7- <i>Taq</i>	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a-dCE8- <i>Taq</i>	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a-dCE9- <i>Taq</i>	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a-dCE2- Δ <i>Taq</i>	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a-dCE7- Δ <i>Taq</i>	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a-dCE8- Δ <i>Taq</i>	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a-dCE9- Δ <i>Taq</i>	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a-dCE2	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a-dCE7	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a-dCE8	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a-dCE9	T7 promoter, AmpR, N-His
pET23a- <i>Taq</i> -dCE2	T7 promoter, AmpR, C-His
pET23a- <i>Taq</i> -dCE7	T7 promoter, AmpR, C-His
pET23a- <i>Taq</i> -dCE8	T7 promoter, AmpR, C-His
pET23a- <i>Taq</i> -dCE9	T7 promoter, AmpR, C-His
pET23a- Δ <i>Taq</i> -dCE2	T7 promoter, AmpR, C-His
pET23a- Δ <i>Taq</i> -dCE7	T7 promoter, AmpR, C-His
pET23a- Δ <i>Taq</i> -dCE8	T7 promoter, AmpR, C-His
pET23a- Δ <i>Taq</i> -dCE9	T7 promoter, AmpR, C-His

表 2 反应所用引物

Table 2 The primers used in the experiment

Primers	Sequences (5'→3')	Length (bp)
Lambda-F1	AGTGTGGAAGAGACAGCGAAG	200
Lambda-R1	CGATGCTGAGTACAGAAGGTT	200
Lambda-F2	GCGTGTAACACGACGGCCAG	500
Lambda-R2	CACAGACACCCAGGCTTTTC	500
Lambda-F3	TGGCGAGTCTCAGGAGTTCG	1 000
Lambda-R3	ATGACCGGCTCACGAGAGTT	1 000
Lambda-F4	AGACCGCTATCGTTCTCGAG	2 000
Lambda-R4	GTTGCTTCCGGGCTTCAGTG	2 000
Lambda-F5	CGTCTGTCAGCGTCAGTCTG	4 000
Lambda-R5	TTGTGCTGTAGGTGCCAGTT	4 000

本次测试采用两步法 PCR, 反应程序如下: 95 °C 预变性 1 min; 95 °C 变性 20 s, 72 °C 退火加延伸 20 s, 20 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 12 °C 保存。反应结束后, 取等量 PCR 产物, 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

将延伸时间延长至 1 min, 进一步测试 dCE- Δ *Taq* 的 PCR 速率, 确定 PCR 速率最快的突变体, 本次测试仍然采用两步法 PCR, 反应程序除 72 °C 退火加延伸 1 min 外, 其他程序同上, 反应完成后进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 测试谷氨酸钾浓度和 Mg²⁺ 浓度对延伸速率的影响

向配制好的 dCE-*Taq* PCR 反应体系中分别加入终浓度为 0、2、4、6、8、10、12、14、16 mmol/L 的谷氨酸钾溶液, 混合后进行两步法 PCR 扩增; 向配制好的 dCE-*Taq* PCR 反应体系中分别加入终浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mmol/L 的 MgCl₂, 混合后进行 PCR 扩增。取等量 PCR 产物, 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 测试温度对逆转录效率的影响

配制 dCE-*Taq* 逆转录反应体系: 20nt-F (CGAAAACGGCATTATATGAT), 0.3 μ L; 10 \times reaction buffer, 1 μ L; 51nt-RNA, 1 ng; *Taq*, 1 μ L; dNTPs, 0.1 μ L; DTT, 1 μ L; RI, 1 μ L; DEPC Water, 补足至 10 μ L。其中 51nt-RNA 的序列为 CGAA AACGGCAUUAUAUGAUGC AUUCCGAGAA GGUCAUGGAAGUUGGAC。

将配制好的 dCE-*Taq* 逆转录反应体系分别放置在 PCR 仪中设定了不同温度梯度的槽位中, 进行 2 min 的恒温逆转录反应, PCR 温度梯度分别设置为: 54、56、59、61、63、66、68、69、70 °C; 然后取等量逆转录产物, 加入 0.5 μ L 的 RNaseA, 37 °C 消化 10 min, 以去除体系内的 RNA 模板; 最后将体系与 2 μ L 6 \times RNA loading 混合, 进行聚丙烯酰胺变性凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel

electrophoresis, SDS-PAGE)检测。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体的构建

委托武汉金开瑞公司进行了 ΔTaq 的全基因合成,并进一步构建了2种融合重组蛋白的表达载体,见图1。第一种载体将dCE系列蛋白与 ΔTaq 的N端(DLPLEVDFAKRR)融合,分别命名为pET23a-dCE2- ΔTaq 、pET23a-dCE7- ΔTaq 、pET23a-dCE8- ΔTaq 和pET23a-dCE9- ΔTaq 。第2种载体将dCE系列蛋白与 ΔTaq 的C端(GIGEDWLSAKE)融合,分别命名为pET23a- ΔTaq -dCE2、pET23a- ΔTaq -dCE7、pET23a- ΔTaq -dCE8和pET23a- ΔTaq -dCE9。经过构建和测序验证,以上载体被成功转化到大肠杆菌BL21菌株中。

2.2 重组蛋白的表达和验证

将BSA浓度梯度与融合了dCE的 ΔTaq DNA聚合酶共同进行SDS-PAGE检测,检测结果如图2所示。

重组Taq DNA聚合酶纯度良好,大于80%,

可用于后续的实验。同时结果显示:C端融合dCE标签的重组Taq DNA聚合酶的表达量要明显高于N端融合dCE标签的重组Taq DNA聚合酶,但在初步的蛋白活性测试中,C端融合dCE标签的蛋白的酶活性与野生型蛋白相比无明显提高,因此后续实验中不再研究C端融合dCE标签的重组蛋白。

2.3 融合dCE蛋白质的 ΔTaq 的PCR速率

将纯化后的dCE2- ΔTaq DNA聚合酶、dCE7- ΔTaq DNA聚合酶、dCE8- ΔTaq DNA聚合酶和dCE9- ΔTaq DNA聚合酶,以lambda DNA为模板,延伸时间为10 s,延伸温度72 °C,反应21个循环,分别PCR扩增大小为200、500、1 000、2 000、4 000 bp的片段,扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图3所示。

由图3可知,与未融合dCE标签的 ΔTaq 相比,dCE2- ΔTaq DNA聚合酶、dCE7- ΔTaq DNA聚合酶、dCE8- ΔTaq DNA聚合酶和dCE9- ΔTaq DNA聚合酶的逆转录检测条带中有比 ΔTaq 更长的扩增产物,说明融合了dCE标签的 ΔTaq 蛋白具有更快的PCR速率。

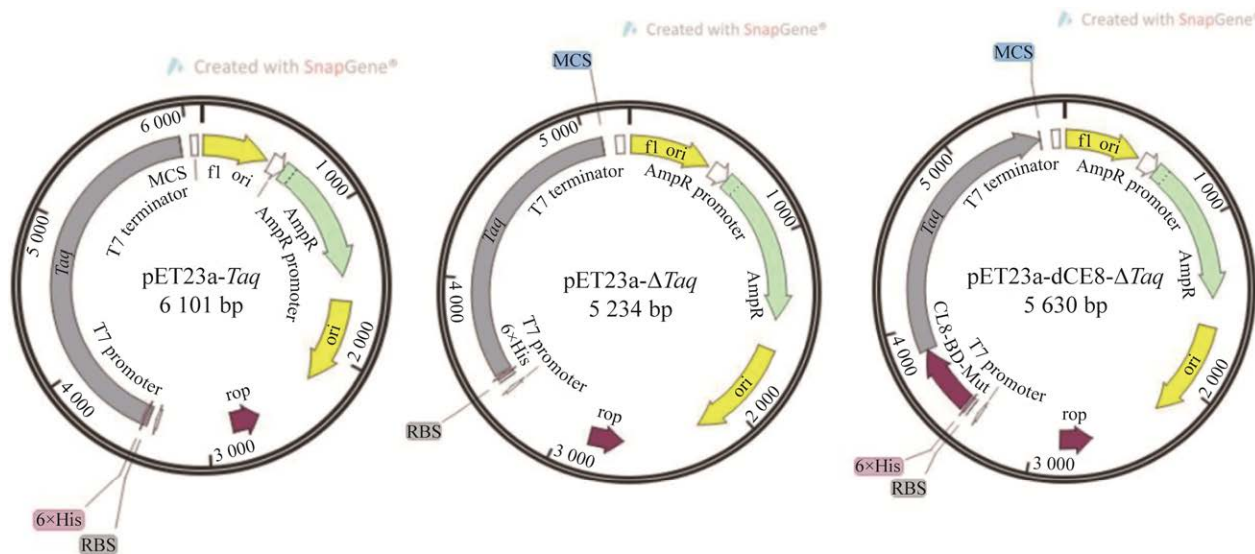


图1 pET23a-*Taq* 及其突变体的载体构建

Figure 1 Constructing pET23a vectors harboring *Taq* and its mutants.

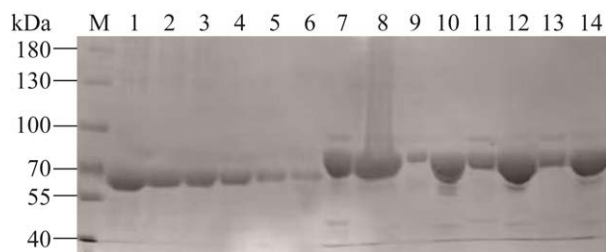


图2 SDS-PAGE 检测蛋白纯度

Figure 2 SDS-PAGE measuring protein's purity. Lanes 1–6: BSA 1.5/1.0/0.75/0.5/0.25/0.125 mg/mL; Lane 7: dCE2- Δ Taq; Lane 8: Δ Taq-dCE2; Lane 9: dCE7- Δ Taq; Lane 10: Δ Taq-dCE7; Lane 11: dCE8- Δ Taq; Lane 12: Δ Taq-dCE8; Lane 13: dCE9- Δ Taq; Lane 14: Δ Taq-dCE9.

为了进一步验证效率提升最高的重组蛋白组合, 延长延伸时间至 1 min, 来观察其延伸长度的极限, 如图 4 所示。dCE8- Δ Taq 展示出了更好的 PCR 活性, 在 1 min 的延伸时间内, dCE8- Δ Taq 延伸出了最大的片段, 其大小约为 8 kb, 因此, 认为 dCE8- Δ Taq 拥有更高的延伸速度。此外, 目标产物测序结果显示 dCE8- Δ Taq 的碱基突变率为 7.7×10^{-6} , 与原始的 *Taq* 碱基突变率(8.0×10^{-6})相近。

2.4 谷氨酸钾浓度对 dCE8- Δ Taq 的 PCR 效率的影响

使用 lambda DNA 作为模板, 将谷氨酸钾溶液加入体系内, 稀释至 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18 mmol/L 的终浓度, 进行两步法 PCR, 其中延伸时间为 10 s, 延伸温度为 72 °C, 反应进行 21 个循环, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 5。

如图 5 所示, 谷氨酸钾浓度为 0 mmol/L 时条带的亮度和产物大小相比谷氨酸钾为 2、4、6、8、10、12、14、16、18 mmol/L 时的 PCR 效率并无明显变化, 表明体系内谷氨酸钾的浓度对于 dCE8- Δ Taq DNA 聚合酶的活性没有明显的影响。因此, 在后续实验中, 未向反应体系中添加谷氨酸钾。

2.5 Mg^{2+} 浓度对 dCE8- Δ Taq 的 PCR 效率的影响

以 lambda DNA 为模板, 在体系内分别加入终浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mmol/L 的 $MgCl_2$, 进行两步法 PCR, 延伸时间为 10 s, 延伸温度为 72 °C, 反应 21 个循环。用琼脂糖凝胶电泳对反应结果进行检测, 结果见图 6。

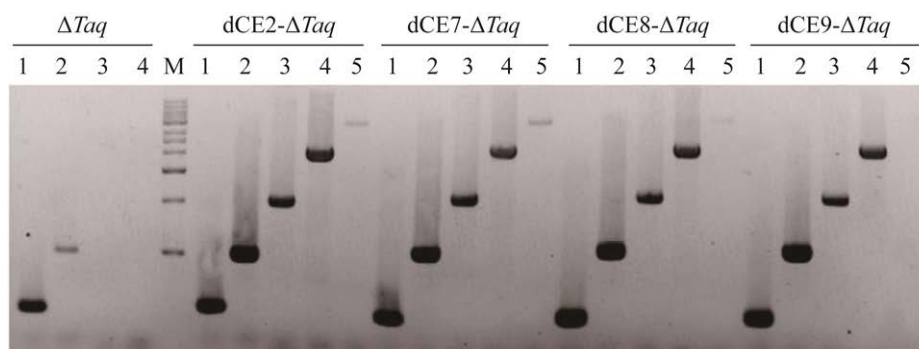


图3 dCE- Δ Taq 的 PCR 效率(10 s)

Figure 3 PCR efficiency of dCE- Δ Taq (10 s). Lanes 1–5 represent the products of the target PCR with sizes of 200, 500, 1 000, 2 000 and 4 000 bp, respectively. On the left side of the marker is the unlabeled Δ Taq control group, and on the right side are four groups consisting of dCE2- Δ Taq DNA polymerase, dCE7- Δ Taq DNA polymerase, dCE8- Δ Taq DNA polymerase, and dCE9- Δ Taq DNA polymerase. The template for PCR is lambda DNA.

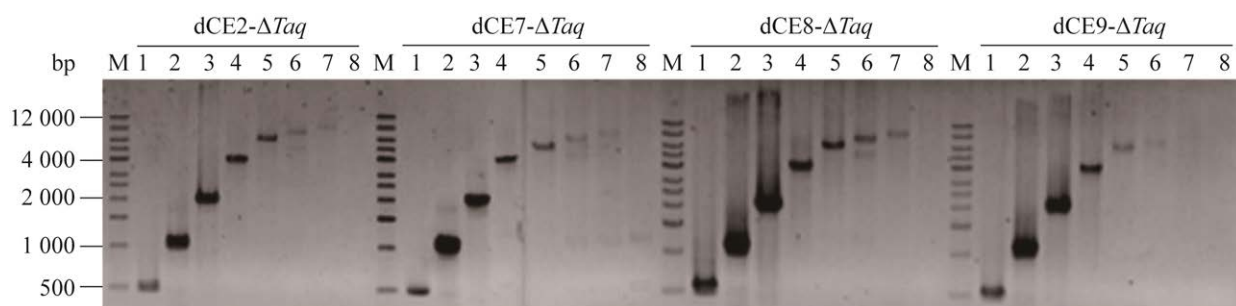


图4 dCE- Δ Taq 的 PCR 效率(1 min)

Figure 4 PCR efficiency of dCE- Δ Taq (1 min). Lanes 1–8 represent the sizes of the target PCR products 500, 1 000, 2 000, 4 000, 6 000, 7 000, 8 000 and 10 000 bp, respectively. The four groups on the right represent dCE2- Δ Taq DNA polymerase, dCE7- Δ Taq DNA polymerase, dCE8- Δ Taq DNA polymerase, and dCE9- Δ Taq DNA polymerase. The template for PCR is lambda DNA.

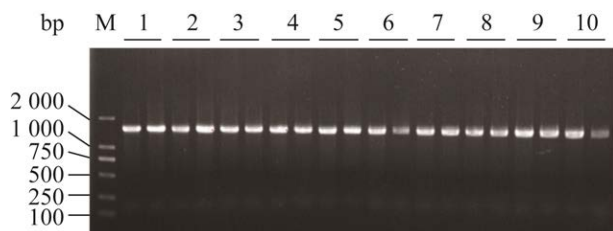


图5 谷氨酸钾浓度对 dCE8- Δ Taq 的 PCR 效率影响

Figure 5 The effect of potassium glutamate's concentration on the efficiency of PCR using dCE8- Δ Taq. Lanes 1–10 represent the concentrations of potassium glutamate in the PCR reaction system: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 mmol/L.

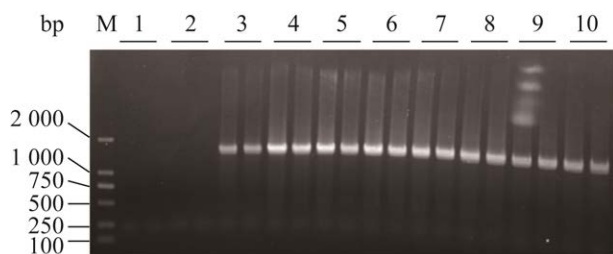


图6 Mg^{2+} 浓度对 dCE8- Δ Taq 的 PCR 速率的影响

Figure 6 The effect of Mg^{2+} concentration on the PCR efficiency using dCE8- Δ Taq. Lanes 1–10 represent the concentrations of Mg^{2+} in the PCR reaction system: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mmol/L.

如图6所示, 4–7 mmol/L Mg^{2+} 的条带亮度最高, 7 mmol/L Mg^{2+} 后的条带逐渐变弱, 而 1 mmol/L Mg^{2+} 、2 mmol/L Mg^{2+} 对应的泳道未观察到目的产物的条带, 这说明当体系内 Mg^{2+} 浓度较低时(1 mmol/L 和 2 mmol/L), 体系内几乎没有 PCR 产物, 而 4–7 mmol/L Mg^{2+} 对应的条带最亮, 后续随着体系内的 Mg^{2+} 浓度升高, 条带变弱则说明 PCR 产物的量有所减少, 由此可以得出结论: Δ dCE8- Δ Taq 的活性并不呈随着 Mg^{2+} 浓度的增加而增加的线性关系, 而是 Mg^{2+} 浓度在 4–7 mmol/L 时酶的活性最好。

因此可以推断:(1) 二价金属离子是反应中不可或缺的成分, 缺少二价金属离子不能进行正常的聚合酶催化反应;(2) 反应体系中 Mg^{2+} 的最适浓度约为 4–7 mmol/L, Mg^{2+} 浓度过高或过低都会降低 dCE8- Δ Taq 的 PCR 产量。

2.6 dCE8- Δ Taq 在逆转录反应中的延伸温度

为了测试 dCE8- Δ Taq DNA 聚合酶的逆转录活性及最适反应温度, 以 51 nt RNA 为模板, 设定引物延伸的温度梯度为 54、56、59、61、63、66、68、69、70 °C, 延伸 2 min, 用核酸 PAGE 对扩增产物进行检测, 观察改造的 Taq DNA 聚合酶的最适反应温度, 所得结果见图 7。

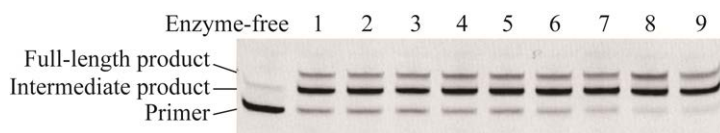


图7 温度对 dCE8- Δ Taq 的逆转录效率的影响

Figure 7 The effect of temperature on the reverse transcription efficiency of dCE8- Δ Taq. Lanes 1–10 represent the extension temperatures for primer extension reaction: 54, 56, 59, 61, 63, 66, 68, 69, 70 °C. The template is a 51 nt RNA.

如图7所示,泳道1–9中均有对应中间产物以及全长产物的明显条带,且全长产物所对应条带的亮度随温度梯度的升高而变高。结果表明改造后的 *Taq* DNA 聚合酶在 54–70 °C 的区间内均有良好的逆转录活性,并且越接近 70 °C,逆转录活性越好。逆转录产物有 2 条条带,可能是发生了副反应,产生了额外的中间产物,属于部分逆转录产物。

3 讨论与结论

Taq DNA 聚合酶是实验室中常用且应用量较大的工具酶,提高其效率可以提高分子生物学以及生物化学实验的效率。此外,*Taq* DNA 聚合酶由于其本身所具有的聚合酶活性以及逆转录酶活性,在核酸检测中有很大的应用空间^[14-17]。目前,实时 PCR 是临床环境中最常用的核酸检测工具,已经有研究人员描述了一种被称为 MeltArray 的方法,它具有多样性、多功能性、简单性和可访问性的综合优点,也许可以在临床环境中广泛应用。因此,此方向的研究对于分子生物学学科的研究以及日常生活中的医疗诊断、法医鉴定等方面均有重要意义,更快速的 RT-PCR 在核酸检测中的应用将提高核酸检测的效率,减轻医疗保障体系的负担。

本研究通过总结前人研究的结果,找到了新的研究道路,拓宽了研究思路。对 *Taq* DNA 聚合酶进行了两个方面的改造。首先,将 *Taq* DNA 聚合酶改造为 Δ *Taq* DNA 聚合酶。即根据前人

已有的研究,将 *Taq* DNA 聚合酶的 5'→3'外切酶结构域去除,得到了 Δ *Taq* DNA 聚合酶。其次,通过融合标签来对 Δ *Taq* DNA 聚合酶进行进一步的改造,使其获得更好的酶学活性。将核酸结合蛋白 dCE 系列标签与 Δ *Taq* DNA 聚合酶相融合,利用 dCE 的核酸结合能力使 Δ *Taq* DNA 聚合酶的 PCR 效率提高,同时使其逆转录酶活性得到了提升,并发现其中效果提升最大的融合蛋白是 dCE8- Δ *Taq*。

本文对 *Taq* DNA 聚合酶进行了一系列的改造,提高了 *Taq* DNA 聚合酶的 PCR 效率以及逆转录效率,然而此改造对活性影响的机制尚不明确。后续的研究可以着手于研究点突变改造对 *Taq* DNA 聚合酶活性发生影响的机制原理,阐明 dCE 结合 DNA 时的构象,其在逆转录或是 PCR 反应中所扮演的角色,承担何种功能,以及是否可以将这些原理系统化,更高效地对蛋白质进行改造,从而更准确、更高效地提高蛋白质的活性,并将 *Taq* DNA 聚合酶改造为更加优良的聚合酶和逆转录活性的工具酶。

本研究虽然对 *Taq* DNA 聚合酶进行改造使其获得了更加优良的性能,但仍有许多拓展方向有待探索,除了提高 *Taq* DNA 聚合酶的酶学活性之外,后续对 *Taq* DNA 聚合酶仍有许多可行的改造方向,如可以对 dCE 的点突变位点进行探索,以找到转录速度更快、拥有能延伸更长的 DNA 链的逆转录活性的新型 *Taq* DNA 聚合酶;或是对 *Taq* DNA 聚合酶进行改造,使

Taq DNA 聚合酶的热稳定性进一步提高, 以满足在更高温度条件下长时间进行 PCR 或逆转录工作的需求; 也可以向提高抗逆性的方向进行改造, 使 *Taq* DNA 聚合酶可以适应各种极端的工作环境, 如强酸、强碱、毒性(如甲酰胺等)环境, 或高浓度的盐离子环境等, 使 *Taq* DNA 聚合酶可以适应更多的应用环境。

REFERENCES

- [1] SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase[J]. *Science*, 1988, 239(4839): 487-491.
- [2] MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction[J]. *Methods in Enzymology*, 1987, 155: 335-350.
- [3] CUSI MG, CIOÉ L, ROVERA G. PCR amplification of GC-rich templates containing palindromic sequences using initial alkali denaturation[J]. *BioTechniques*, 1992, 12(4): 502-504.
- [4] SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia[J]. *Science*, 1985, 230(4732): 1350-1354.
- [5] WRIGHT PA, WYNFORD-THOMAS D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research[J]. *The Journal of Pathology*, 1990, 162(2): 99-117.
- [6] BHADRA S, MARANHAO AC, PAIK I, ELLINGTON AD. One-enzyme reverse transcription qPCR using *Taq* DNA polymerase[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(49): 4638-4645.
- [7] GIBSON DG. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments[J]. *Methods in Enzymology*, 2011, 498: 349-361.
- [8] VANKEMMELBEKE M, SHEA PO, JAMES R, PENFOLD CN. Interaction of nuclease colicins with membranes: insertion depth correlates with bilayer perturbation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46656.
- [9] JAMES R, PENFOLD CN, MOORE GR, KLEANTHOS C. Killing of *E. coli* cells by E group nuclease colicins[J]. *Biochimie*, 2002, 84(5/6): 381-389.
- [10] VASSYLYEVA MN, KLYUYEV S, VASSYLYEV AD, WESSON H, ZHANG Z, RENFROW MB, WANG HB, CHOW LT, VASSYLYEV DG. Efficient, ultra-high-affinity chromatography in a one-step purification of complex proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(26): E5138-E5147.
- [11] 倪静. 融合 CL7 的 *Taq* DNA 聚合酶的酶学性质及应用研究[D]. 武汉: 湖北大学硕士学位论文, 2019. NI J. Characterization and application of *Taq* DNA polymerase fused with a CL7 protein[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University, 2019 (in Chinese).
- [12] 杨军. 基于大肠杆菌素 DNA 酶及其抑制物的蛋白质支架系统的构建及表征[D]. 武汉: 湖北大学硕士学位论文, 2021. YANG J. Construction and characterization of a protein scaffold system based on DNA enzymes and their inhibitors derived from *Escherichia coli*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University, 2021 (in Chinese).
- [13] 李霞. 失去 DNase 活性的大肠杆菌素结合核酸的性质研究[D]. 武汉: 湖北大学硕士学位论文, 2022. LI X. Study on the properties of *Escherichia coli* binding nucleic acid without DNase activity[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University, 2022 (in Chinese).
- [14] LIM Y, PARK IH, LEE HH, BAEK K, LEE BC, CHO G. Modified *Taq* DNA polymerase for allele-specific ultra-sensitive detection of genetic variants[J]. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 2022, 24(11): 1128-1142.
- [15] SAUTER KBM, MARX A. Evolving thermostable reverse transcriptase activity in a DNA polymerase scaffold[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45(45): 7633-7635.
- [16] BLATTER N, BERGEN K, NOLTE O, WELTE W, DIEDERICHS K, MAYER J, WIELAND M, MARX A. Structure and function of an RNA-reading thermostable DNA polymerase[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(45): 11935-11939.
- [17] WANG Y, PROSEN DE, MEI L, SULLIVAN JC, FINNEY M, VANDER HORN PB. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(3): 1197-1207.

(本文责编 郝丽芳)