第 20 卷第 1 期
2001 年 1 月

无锡轻工大学学报
Journal of Wuxi University of Light Industry

Vol.20,No.1
Jan.,2001

文章编号:1009 – 038X(2001)01 – 0029 – 03

DNA 聚合酶基因 *pfu* 的克隆及初步表达

唐雪明, 方惠英, 沈 微, 王正祥, 王 武, 诸葛健
(无锡轻工大学生物工程学院,江苏无锡 214036)

摘 要:通过分子克隆技术从嗜热极端微生物 *Pyrococcus furiosus* 中克隆出高热稳定性的 *pfu* DNA 聚合酶基因,琼脂糖凝胶电泳显示基因片段的长度为 2.3 kb,将其转化入大肠杆菌中并获得初步表达.重组酶成功地扩增了 800 bp 的 DNA 片段.

关键词:*pfu* DNA 聚合酶;分子克隆;聚合酶链式反应
中图分类号:Q 785　　**文献标识码**:A

Cloning and Primary Expression of the Gene Encoding *pfu* DNA Polymerases

TANG Xue-ming, FANG Hui-ying, SHEN Wei, WANG Zheng-xiang, WANG Wu, ZHUGE Jian
(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract: The gene encoding the *Pyrococcus furiosus* hyperthermophilic DNA polymerases (*pfu*) was cloned and primarily expressed in *Escherichia coli* by the molecular cloning technology. The gene showed a 2.3 kb fragment in agarose gel electrophoresis. The recombinant enzyme amplified an 800 bp DNA fragment successfully.

Key words: *pfu* DNA polymerases; molecular cloning; polymerases chain reaction

DNA 聚合酶(EC 2.7.7.7)是 DNA 复制时的关键酶.目前有 100 多个从各种微生物中包括嗜热极端细菌和古细菌发现的 DNA 聚合酶的相关基因已经被克隆和测序,几种天然的和重组的 DNA 聚合酶已被纯化鉴定[1].近 10 年分子生物学研究领域中最重要的进步之一就是聚合酶链式反应(PCR)技术的问世和发展.在 PCR 技术中,DNA 聚合酶起着关键性的作用,*Taq* 酶是从栖热菌 *Thermus aquaticus* 中分离纯化而得到的第一个应用于 PCR 的高热稳定性 DNA 聚合酶.然而 *Taq* 酶有 5′—3′的外切活性,但没有 3′—5′的外切活性,因此该酶不能很好地保证 PCR 产物的保真性.来自 *Pyrococcus furiosus* 的 *pfu* DNA 聚合酶是具高保真性的高热稳定性 DNA 聚合酶,该酶具有 3′—5′外切核酸酶活性,与 *Taq* 酶相比,它使 PCR 产物的错配率下降了 10 倍左右.特别是进行 2 Kb 以内的 DNA 片段的扩增,快速精确,效率极高,有 *Taq* 酶无法比拟的优越性[2].

作者通过分子克隆技术从嗜热极端微生物 *Pyrococcus furiosus* 中克隆出高热稳定性的 DNA 聚合酶基因,并在大肠杆菌中获得初步表达.

收稿日期:2000 – 04 – 27;修订日期:2000 – 11 – 21.
基金项目:高等学校骨干教师资助项目.
作者简介:方惠英(1970 –),男,湖南道县人,生物工程博士研究生,讲师.

1 材料和方法

1.1 材料

细菌菌株和质粒 *Pyrococcus furiosus* 及实验宿主菌 *Escherichia coli* DH5α：R^-，M^-，Amp^s，Tc^s 为本校工业微生物中心保藏菌种，克隆载体 pUC19 为华美生物工程公司产品（上海）；限制酶 BamHI 、PCR 纯化试剂盒、PCR 标准扩增模板均购自华美生物工程公司（上海）；*Taq* DNA 聚合酶和 T4DNA 连接酶及 CIAP 磷酸酶均购自美国 PROMEGA 公司.

根据 EMBL 和 DDBJ 公开的 *Pyrococcus furiosus* 基因组 DNA 序列和方法获得的 N-端氨基酸序列设计合成了 PCR 所需的引物 A 和引物 B.

引物 A：5′-TGAAGGATCCCCCAGTCGCT GTAACC-3′

引物 B：5′-CTGGTGGATCCTGCTCAGTT GTTCTTTCA-3′

LB 培养基：NaCl 10 g，胰蛋白胨 10 g，酵母提取物 5 g，琼脂 2 g，用 5 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至 7.0，加去离子水至终体积 1 L，高压灭菌. 其它试剂均为进口或国产分析纯.

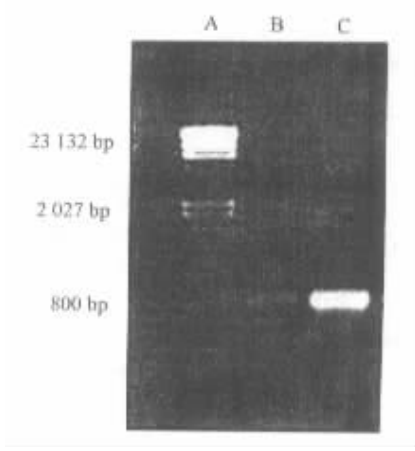
1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 在 0.5 mL Eppendorf 管中按以下顺序分别加入各试剂：10 倍 PCR 缓冲液 10 μL，1.25 mmol/L 的 $MgCl_2$ 5 μL，2.5 mmol/L dNTPs 10 μL，10 μmol/L 引物 A 和引物 B 各 2 μL，加双蒸水至 100 μL，95 ℃变性 10 min 后加入 *Taq* DNA 聚合酶，稍离心沉降，加石蜡油 1～2 滴进行 PCR 扩增（94 ℃ 50 s，54℃ 90 s，72 ℃ 3 min），经 35 个循环后，在 72 ℃ 延伸 10 min.

1.2.2 克隆及阳性转化子筛选 pUC19 载体用 *Bam*HI 酶切再用 CIAP 磷酸化，PCR 扩增产物经 PCR 纯化试剂盒纯化后，再用 BamHI 酶切，以 1∶2 的比例连接后转化大肠杆菌 DH5α. 筛选阳性重组子后，经 BamHI 酶切，有 2.3 Kb 插入片段. 质粒的抽提、DNA 片段分离、*E. coli* 感受态细胞的制备、转化、琼脂糖凝胶电泳、α-互补鉴定筛选阳性转化子等具体方法见文献[3].

1.2.3 重组质粒在大肠杆菌中的初步表达及重组酶的粗提[4] 将阳性转化子划平板（培养过夜），单菌落接种于 20 mL 的 LB 氨苄青霉素液体培养基中，37 ℃摇床振荡培养 12 h. 取 300 μL 加入含 30 mL LB 氨苄青霉素液体培养基的试管中，加入 IPTG 30 μL，37 ℃诱导培养 4 h 后，5 000 *g* 离心 10 min，将细菌沉淀重悬于 300 μL 的 pH 值为 8 的 Tris-HCl 缓冲液中，加入溶菌酶（100 mg/mL）和 Triton X-100（0.1%）各 30 μL，室温下静止 30 min，将细胞裂解物上清转移至另一 EP 管中，80 ℃温育 30 min，置于冰浴 5 min 后，在 4 ℃条件下以 10 000 *g* 离心 10 min，将上清转移另一 EP 管备用（－20℃）.

1.2.4 阳性转化子表达产物的鉴定 以10 μL的重组酶扩增 PCR 试剂盒标准模板，扩增出 800 bp 的片段见图 1，说明含重组质粒的菌株所表达的酶可催化 PCR 反应.



A. λDNA /Hind Ⅲ 对照；B. 重组酶扩增 DNA 片段；C. *Taq* 酶扩增 DNA 片段

图 1 PCR 产物的凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR product

2 实验结果

2.1 *pfu* 基因的体外扩增

经 PCR 扩增，有 2.3 kb 的 DNA 片段，因 *pfu* 基因序列较长，在正式扩增前在 95 ℃下使模板链充分变性，并提高扩增的效率，减少 PCR 物的非特异性条带.

2.2 重组质粒的构建

将 BamHI 消化后的质粒和 2.3 kb 扩增片段加 DNA 连接酶（15 ℃保温 12 h）转化 *Ecoli* DH5α，在氨苄平板（含氨苄青霉素 50 μg/mL，0.5 mmol/L IPTG 和 40 μg X-gal）上筛选白色转化菌株，然后用小量快提法提质粒并作酶切鉴定，经鉴定重组质粒带有 2.3 kb 的 DNA 片段.

2.3 重组质粒在大肠杆菌中的初步表达产物鉴定

以 10 μL 粗提重组酶扩增 PCR 标准模板，同时以 *Taq* 酶作对照，扩增出 2.3 kb 的片段（图 1），说明含重组质粒的菌株所表达的酶可以催化 PCR 反应，为 DNA 聚合酶，可以初步确定已克隆到聚合酶基

万方数据

因,并成功地进行了初步表达.

3 讨　论

作者用 *Taq* 酶扩增了 *pfu* 酶基因,并用 *pfu* 重组酶扩增了 800 bp 的 DNA 片段,但从电泳结果分析,*pfu* 重组酶的扩增效率并不高,有可能是 *Taq* 酶的低保真性使个别 *pfu* 碱基发生错读,导致 *pfu* 基因序列的保真性降低,但并没有影响重组酶具有扩增 DNA 片段的活性(活性可能降低),*pfu* 重组酶基因的阅读框架应该是正确的.另外,实验用 pUC19 为常用克隆载体,而非高表达载体,这也将导致 *pfu* 重组酶的低表达.为了进一步得到 *pfu* 酶的高表达,作者正在进行 *pfu* 基因的序列分析,并将 *pfu* 亚克隆到高表达载体 pKK-233 中进行表达.

诸多研究表明,嗜热微生物可以提供具有独特生物学活性的高热稳定性 DNA 聚合酶[1].然而,在工业上进行 DNA 聚合酶的大规模生产,必须考虑到产品的成本和利润,选择最为经济有效的方法.将编码极端酶的基因在天然微生物宿主中进行表达并非易事,嗜热微生物的培养条件苛刻,*Pyrococcus furiosus* 须在 100 ℃以上才能生长,且生长缓慢,产酶量低,还需要特殊的培养设备,这势必导致产品成本的提高,也极大地制约了高热稳定性 DNA 聚合酶的生产.特别是用极端微生物作表达宿主,目前还缺乏有效的基因转移体系,对于古细菌尤其如此.若将编码极端酶的基因在异源普通宿主菌如大肠杆菌中进行表达,酶产量高且易于纯化,是非常经济的,已有许多来自嗜热微生物的基因能在中温菌中表达,表达的这些蛋白质大多数都能维持原来的热稳定性,它们通常在低温下折叠,并不被宿主的蛋白酶水解,因此可以通过热变性的方法除去宿主蛋白而进行纯化.

致谢　日本京都大学刘吉泉博士对本文的完成给予了热情的支持和帮助,在此深表谢意!

参考文献:

[1] CLINE J, BRAMAN J, HOREFE H. PCR fidelity of *pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases[J]. **Nucleic Acids Res**, 1996,24:3546 ~ 3551.

[2] TAKAGI M, NISHIOKA M, KAKIHARA H, *et al*. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus sp*. Strain KOD1 and its application to PCR[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1997,63:4504 ~ 4510.

[3] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning:A laboratory Manual[M]. New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.

[4] GUO Qiang - dong, CLAIRE VIEILLE, ALEXEI SAVCHENKO, *et al*. Cloning,sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme [J]. **Appl Environ Microbiol**,1997,63:3569 ~ 3576.

(责任编辑:朱　明)

万方数据