

耐热 DNA 聚合酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达

金城 刘宏迪 杨寿钧 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 用 PCR 法从水生栖热菌菌株 YT-1 中扩增耐热 DNA 聚合酶基因, 得到 2.5kb 的 DNA 片段, 扩增片段重组到 pUC18 中测序证实为 Taq DNA 聚合酶基因, 将该片段重组到 pBV221 温控表达质粒中, 在大肠杆菌中表达出 94kDa 的重组蛋白, 100ml 培养物的细胞产酶为 1.5×10^5 u, 表达的蛋白能催化 PCR 反应的进行。

关键词 Taq DNA 聚合酶, PCR, 表达

PCR 是近年发展十分迅速的分子生物学技术, 已广泛应用于分子生物学、医学诊断、动植物检疫及法医学鉴定等领域, 其优点在于快速、准确。PCR 的关键试剂是 DNA 聚合酶。1976 年 Chien 等首先从水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*) YT-1 中分离出耐热 DNA 聚合酶^[1], 随后 Cetus 公司又从 YT-1 中分离纯化了适用于 PCR 的 94kDa 的 Taq DNA 聚合酶。由于以 Taq DNA 聚合酶取代 Klenow 片段进行 PCR 扩增, 因此在 PCR 反应中无需在每个循环添加新酶, 反应特异性也大大提高^[2]。

PCR 的广泛应用使 Taq DNA 聚合酶的消耗量与日剧增, 但 YT-1 菌株培养难, 而且酶产量也低, 靠大量培养纯化的方法既不经济, 又难以满足需要。为此 Lawyer 等将 Taq DNA 聚合酶基因从 YT-1 中钓出并测定了基因全序列, 在大肠杆菌中得到表达, 表达量与 YT-1 相当^[3]。Engelke 等亦从 YT-1 中克隆了酶基因, 重组到 pTTQ18 中, 在大肠杆菌中得到高效表达, 发展了一个快速简便的方法初步纯化表达产物^[4]。复旦大学曾报道了一个耐热 DNA 聚合酶——FD DNA 聚合酶^[5], 但 Taq DNA 聚合酶的基因工程研究国内尚未见报道, 因此 Taq DNA 聚合酶工程菌的研究开发可提供酶的来源, 满足国内应用和研究的需要。

我们根据 Taq DNA 聚合酶基因序列设计了两个引物, 用 PCR 法从 *Thermus aquaticus* YT-1 中扩增酶基因, 然后进行了酶基因的表达研究。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株和质粒

Thermus aquaticus YT-1 为 ATCC 菌种。实验中使用的宿主菌为 *Escherichia coli* DH5 α (BRL 公司)。测序质粒使用 pUC18, 温控表达质粒 pBV221 为侯云德教授惠赠^[6]。

1.2 酶

限制酶及 T4 DNA 连接酶均购自美国 Promega 公司。Taq DNA 聚合酶购自美国 Perkin Elmer Cetus 公司。PCR Kit A、B、C 为华美生物技术公司产品。

1.3 生化试剂

低熔点琼脂糖购自 BRL 公司, 琼脂糖、Nonidet-P40 (NP-40)、Phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF)、Tris 和 SDS 均购自 Serva 公司, Polyethyleneimine (PEI) 购自 Aldrich 公司, 丙烯酰胺及双丙烯酰胺购自 Fluka 公司, Tween-20 购自 Sigma 公司, 二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Promega 公司, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP 购自 Amershem 公司。

1.4 DNA 操作

1.4.1 DNA 的限制酶酶解、连接反应按 Promega 公司提供的方法进行。

1.4.2 PCR 扩增、DNA 片段分离、转化、质粒的抽提、琼脂糖凝胶电泳均按文献〔7〕的方法进行。

1.4.3 大肠杆菌感受态的制备按文献〔7〕要求进行。

1.5 其它分析方法

酶活测定按 Lawyer 等的方法进行〔3〕。酶活单位定义为在 75℃ 时反应 30 min, 掺入 10nmol 的 dNTP 所需的酶量为 1 单位 (u)。

SDS-PAGE 分析按 Sambrook 等〔7〕的方法进行。

2 结 果

2.1 基因的体外扩增

根据 Taq DNA 聚合酶基因的序列〔3〕我们用计算机辅助设计了两个引物, 两段引物分别位于基因的两端, 并在引物的 5' 端分别加上 EcoR I 和 Sal I 的识别位点:

Primer 1 5'-ACGAATTCATGCTGCCCCCTCTTTGAGCCCA-3',

Primer 2 5'-TTGTCGACTCACTCCTTGGCGGAGAGCC-3'。

以 *Thermus aquaticus* YT-1 菌株的总 DNA 为模板, 加入引物在 Tamard PCR90AD 型水浴 PCR 仪上反应 36 个循环 (94℃:1min; 56℃:1min; 72℃:4min)。从 YT-1 中扩增出 2.5kb 的 DNA 片段 (见图 1)。

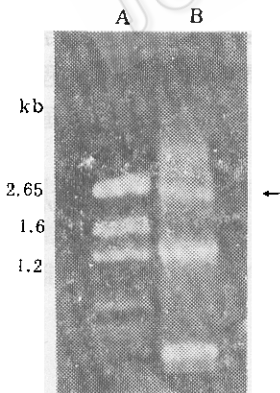


图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Pattern of agarose gel electrophoresis of PCR products

A. pGEM DNA Marker, B. PCR amplified DNA fragment *Thermus aquaticus* YT-1

2.2 重组质粒的构建

将 PCR 扩增的产物以等体积的氯仿抽提后, 加 EcoR I 和 Sal I 双酶消化, 然后在低熔点琼脂糖上回收扩增片段; 质粒 pUC18 以 EcoR I 和 Sal I 消化后, 在低熔点琼脂糖上回收大片段。将酶消化后的质粒与酶消化后的 2.5kb 扩增片段混合, 加 T4 DNA 连接酶, 在 15℃ 保温过夜, 转化 *E. coli* DH5 α , 在氨苄平板 (含氨苄青霉素 50 μ g/ml, 0.5mmol/L IPTG 和 40 μ g/ml X-Cal) 上筛选白色转化菌株, 然后用小量快提法提取质粒并作酶切鉴定。经鉴定重组质粒 pUCT183 带有来自 YT-1 的 2.5kb 的 DNA 片段。

2.3 重组质粒的鉴定

将重组质粒作酶切图谱分析, pUCT183 所带的外

源 DNA 酶切图谱与 Taq DNA 聚合酶基因的酶切图谱相同 (见图2)。

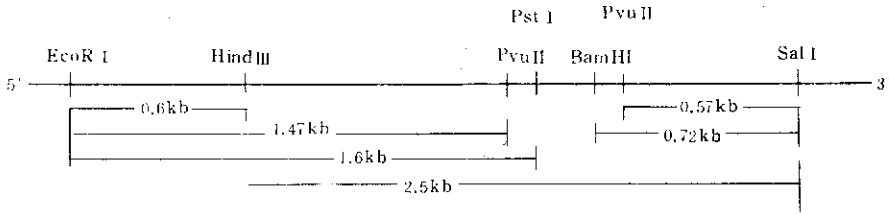


图2 克隆 DNA 片段的限制酶切图谱

Fig. 2 Restriction maps of the cloned DNA fragments in the recombinant plasmid

为进一步鉴定克隆的 DNA 片段,我们以 Sanger 双脱氧终止法在 370A DNA Sequencer 上测定了 pUCT183 克隆片段的全序列。pUCT183 的插入 DNA 片段被亚克隆到 pUC18 上 (图3), 亚克隆测序结果表明 pUCT183 中的克隆片段就是 Taq DNA 聚合酶基因, 酶基因全长为 2490bp (图4)。

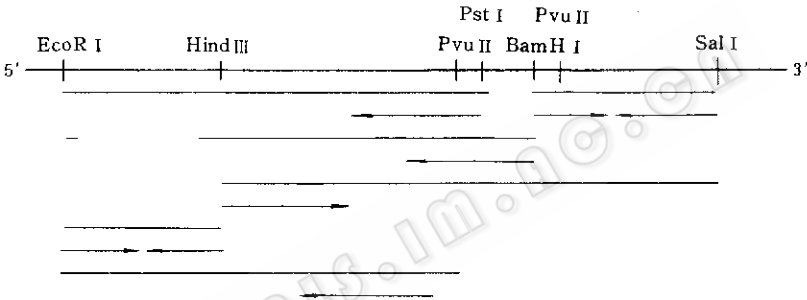


图3 克隆片段的 DNA 序列测定策略

Fig. 3 DNA sequencing strategy of cloned fragment in pUCT138

Arrows indicate sequence obtained in the sense (→) or antisense (←) direction

--- subclone fragment from pUCT183

2.4 表达质粒的构建

pUCT183 经 EcoR I 和 Sal I 消化后, 分离 2.5kb 片段; pBV221 以 EcoR I 和 Sal I 消化后分离 3.6kb 的大片段。将两个片段混合, 加 T4 DNA 连接酶, 15℃ 保温过夜, 转化大肠杆菌 DH5 α , 在氨苄平板 (含 50 μ g/ml 氨苄青霉素) 上筛选转化菌株, 经提取质粒和酶切分析得到重组质粒 pBVT14 (图5)。

2.5 重组质粒在大肠杆菌中的表达

将带有重组质粒 pBVT14 的 DH5 α 菌种以 SOC 培养基 30℃ 摇床培养过夜, 按 1:100 接入 100ml SOC 培养基中, 30℃ 摇床培养至对数中期, 转为 42℃ 培养 4~6 h。5000r/min 离心 5min (4℃) 收集菌体, 以 Buffer A (50mmol/L Tris-HCl, pH7.9, 50mmol/L dextrose, 1mmol/L EDTA) 重悬后离心收集菌体, 菌体悬浮于 4ml Buffer A 中, 以溶菌酶 (5mg/ml) 在室温作用 15min, 加入等体积的 Buffer B (10mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 50mmol/L KCl, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF, 0.5% Tween-20, 0.5% NP-40), 然后于 75℃ 保温 1 h, 10000r/min 离心 5min, 上清液移入新管后以 10% PEI 逐滴加入至终浓度 0.2%, 室温放置 10min 离心收集沉淀, 沉淀溶于 2ml Buffer C (20mmol/L HEPES, pH7.9, 1mmol/L KCl), 离心除去不溶物, 用 Buffer C 预平衡的 Sephadex G-100 柱 (1.5 \times

GAATTC

```

ATGCTGCCCC TCTTTGAGCC CAAGGGCCGG GTCTCCTGG TGGACGGCCA
CCACCTGGCC TACCGCACTT TCCACGCCCT GAAGGGCCTC ACCACCAGCC
GGCGGGAGCC GGTGCAGGCG GTCTACGGCT TCGCCAAGAG CCTCCTCAAG
GCCCTCAAGG AGGACGGGGA CGCGGTGATC GTGGTCTTTG ACGCCAAGGC
CCCCCTCTTC CGCCACGAGG CCTACGGGGG GTACAAGGCG GGGCCGGCCC
CCACGCCGGA GGACTTTCCC CGGCAACTCG CCCTCATCAA GGAGCTGGTG
GACCTCTGGG GGCTGGCGCG CCTCGAGGTC CCGGGTACC AGGCGGACGA
CGTCTGGGCC AGCCTGGCCA AGAAGGGCGA AAAGGAGGGC TACGAGTCC
GCATCTCAC CGCCGACAAA GACCTTACC AGCTCCTTTC CGACCCGATC
CACGTCCTCC ACCCGAGGG GTACCTCATC ACCCCGGCCT GGCTTTGGGA
AAAGTACGGC CTGAGGCCCG ACCAGTGGGC CGACTACCGG GACTTCGGCC
GGGACGAGTC CGACAACCTT CCCGGGGTCA AGGGCATCGG GGAGAAGACG
GGCAGGAAGC TTCTGGAGGA GTGGGGGACC CTGGAAGCCC TCCTCAAGAA
CCTGGACCCG CTGAAGCCCG CCATCCGGGA GAAGATCCTG GCCACATGG
ACGATCTGAA GCTCTCTGGG GACCTGGCCA AGGTGCGCAC CGACCTGCCC
CTGGAGGTGG ACTTCGCCAA AAGGCGGGAG CCCGACCGGG AGAGGCTTAG
GGCCTTTCTG GAGAGCCTTG AGTTTGGCAG CCTCCTCCAC GAGTTCGGCC
TTCTGGAAG CCCAAGGCC CTGGAGGAGG CCCCCTGGCC CCCGCCGAA
GGGGCCTTCG TGGGCTTTGT GCTTTCCTCG AAGGAGCCCA TGTGGGCCGA
TCTTCTGGCC CTGGCCGCCG CCAGGGGGGG CCGGGTCCAC CGGGCCCCG
AGCCTATAA AGCCCTCAGG GACCTGAAG AGGCGGGGG GCTTCTCGCC
AAAGACCTGA CGGTCTGGC CCTGAGGGAA GGCCTTGGCC TCCCCCCGG
CGACGACCCG ATGCTCCTCG CCTACCTCCT GGACCTTCC AACACACCC
CCGAGGGGGT GGCCCGGGCG TACGGCGGGG AGTGGACGGA GGAGCCGGGG
GAGCGGGCCG CCTTPTCCGA GAGGCTCTTC GCCAACCTGT GGGGGAGGT
TGAGGGGGAG GAGAGGCTCC TTTGGCTTTA CCGGGAGGTG GAGAGGCCCC
TTTCCGCTGT CCTGGCCAC ATGGAGGCCA CGGGGGTGG CCTGGAGTG
GCCTATCTCA GGGCCTTGTC CCTGGAGGTG GCCGAGGAGA TCGCCCGCT
CGAGGCCGAG GTCTTCCGCC TGGCCGGCCA CCCCTCAAC CTCACTCCC
GGGACCAAGCT GGAAGGGTC CTCTTTGACG AGCTAGGGCT TCCCCCATC
GGCAAGACGG AGAAGACCG CAAGCGCTCC ACCAGCGCCG CCGTCTGGA
GGCCCTCCG GAGGCCACC CCATCGTGA GAAGATCCTG CAGTACCGG
AGCTCACCAA GCTGAAGAG ACCTACATTG ACCCCTTGG GCCACCTATC
CACCCACAGG CGGGCCGCT CCACACCGCT CTCAACAGA CGGCCACGGC
CACGGCCAGG CTAAGTAGCT CCGATCCCAA CCTCCAGAAC ATCCCCGTC
GCACCCCGT TGGGCAGAGG ATCCGCGGGG CCTTCACTCG CGAGGAGGG
TGGCTATTGG TGGCCCTGGA CTATAGCCAG ATAGAGCTCA GGGTGTGCG
CCACCTCTCC GGGCAGGAGA ACCTGATCCG GGTCTTCCAG GAGGGCGGG
ACATCCACAC GGAGACCGCC AGCTGGATGT TCGGGCTCCC CCGGAGGCC
GTGGACCCCC TGATGCGCCG GCGGCCAAG ACCATCAACT TCGGGTCTC
CTAGGGCATG TCGGCCACC GCCTCTCCA GGAGCTAGCC AACCCPTACG
AGGAGGCCCA GGCCTTCATT GAGCGCTACT TTCAGAGCTT CCCCAGGTG
CGGGCCTGGA TTGAGAAGAC CCTGGAGGAG GGCAGGAGGC GGGGGTACGT
GGAGACCCCT TTCGGCCGCC GCCGCTACGT GCCAGACCTA GAGGCCGGG
TGAAGAGCGT GCGGGAGGCG GCCGAGCGCA TGGCCTTCAA CATGCCGTC
CAGGGCACCG CCGCCGACCT CATGAAGCTG GCTATCGTGA AGCTCTTCCC
CAGGCTGGAG GAAATGGGGG CCAGGATGCT CCTTCAGGTG CACGACGAG
TGGTCTCGA GGCCCAAAA GAGAGGCGG AGGCCGTGCC CCGGCTGGCC
AAGGAGGTCA TGGAGGGGGT GTATCCCCTG GCCGTGCCCC TGGAGTGGGA
GGTGGCGATA GGGGAGGACT GGCTCTCCG CAAGGAGTGA GTCGACTGCC
AGGCATGCAA C

```

图4 克隆片段的 DNA 序列

Fig. 4 DNA sequence of cloned fragment in pUCT138

Sequencing data was obtained with ABI 370A DNA sequencer. Dye-terminator was used

80cm) 纯化, 收集酶峰对 600~1000ml Storage Buffer (20mmol/L HEPES, pH7.9, 100mmol/L KCl, 0.1mmol/L EDTA, 0.5mmol/L PMSF, 1mmol/L DTT, 50% glycerol) 透析, 换两次缓冲液。酶液储存于-20℃。

以 [α-³²P] dCTP 测定酶活, 100ml 培养液的细胞可产酶 1.5×10⁵u。

2.6 克隆菌株表达产物的鉴定

克隆菌株表达产物的 SDS-PAGE 分析表明产物为 94kDa 的 TaqDNA 聚合酶 (图6)。

以 2u 的重组酶扩增 PCR Kit B、C 的标准模板, 扩增出了 673bp 和 1003bp 的片段 (图7), 说明含重组质粒 pBVT14 的 DH5α 菌株所表达的酶可以催化 PCR 反应。

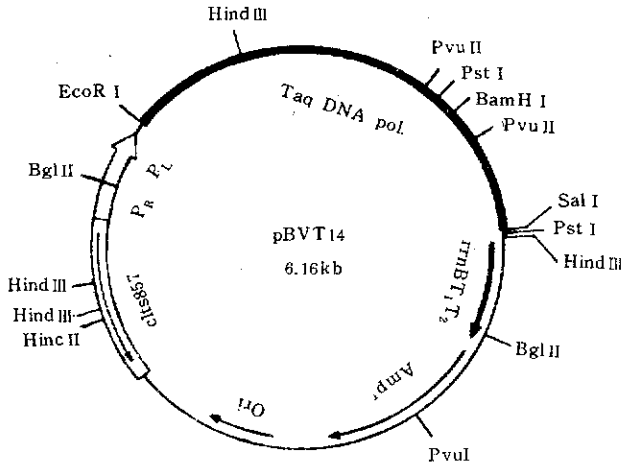


图5 重组表达质粒 pBVT14
Fig. 5 Plasmid pBVT14

The 6.16kb plasmid contains a 2.5kb segment of insert DNA of the plasmid vector pUCT183. The bold line indicates the 2.5kb Taq DNA polymerase coding sequence. Expression of Taq DNA polymerase is controlled by the P_RP_L promoter. Construction of the plasmid was performed as described in the text.



图6 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the expression product

A. 5 μl PEI precipitate (in buffer C) of cell lysate of DH5a containing pBVT14, B. 5 μl PEI precipitate (in buffer C) of cell lysate of DH5a containing pBV221, C. 10u Taq DNA polymerase (PE), D. 2 μl MMW protein marker (Promega)

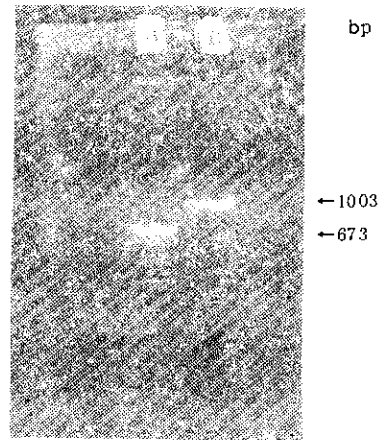


图7 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 7 Agarose gel electrophoresis of PCR products

PCR was catalyzed by 2u recombinant Taq DNA polymerase (in storage buffer) in 50 μl reaction volume. DNA template and primers in PCR Kits (SABC) were used in these analyses. A. PCR Kit B, B. PCR Kit C.

3 讨 论

耐热酶在常温菌中的克隆表达,不仅可以解决原始菌产量较低的问题,而且因为常温宿主菌的蛋白不耐热,因此可以利用热变性除去大部分的宿主菌蛋白,大大简化了表达蛋白的纯化步骤。Chien 等从 16 L YT-1 培养物的细胞裂解液中得到 2080u 的酶^[1]。Lawyer 等克隆了 Taq DNA 聚合酶基因,在大肠杆菌中表达,表达量与 YT-1 相当^[3]。Engelke 等构建的重组质粒在大肠杆菌中得到高效表达,从 12 L 培养物的细胞裂解后可释放出 7×10^6 u 的酶,表达量是 YT-1 的 4500 倍^[4],但他们构建的工程菌需要 IPTG 诱导。我们构建的重组质粒 pBVT 14 在大肠杆菌中表达,由于使用了温控表达载体,所以不用 IPTG 诱导,降低了成本;而且从 100ml 培养物的细胞裂解液中可得到 1.5×10^5 u 的酶,其表达量是 YT-1 的 1.154 万倍,也高于 Engelke 构建的工程菌的表达量,可作 Taq DNA 聚合酶的生产菌种。

参 考 文 献

- [1] Chien A, Edgar D B, Trela J M *et al.* J Bacteriol., 1976, **127**: 1550~1557.
- [2] 朱 平 主编.《PCR 基因扩增实验操作手册》,北京:中国科学技术出版社,1992.
- [3] Lawyer F C, Stoffel S, Saiki R K *et al.* J Biol Chem, 1989, **264**: 6427~6437.
- [4] Engelke D R, Krikos A, Bruck M E *et al.* Anal Biochem, 1990, **191**: 396~400.
- [5] 毛裕民,盛祖嘉等.科学通报,1990, **2**: 81~83.
- [6] 张智清,姚立红,侯云德等.病毒学报,1990, **6**: 111~115.
- [7] Sambrook J Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Laboratory Press, 1989.

Cloning and Expression of Thermostable DNA Polymerase Gene in *Escherichia coli*

Jin Cheng Liu Hongdi Yang Shoujun Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Thermostable DNA polymerase gene had been amplified from *Thermus aquaticus* YT-1 using PCR technique. The amplified 2.5kb DNA fragment was inserted into pUC18 and confirmed to be thermostable DNA polymerase gene by restriction mapping and DNA sequencing. The insert fragment was then combined into an expression vector, pBV221. This recombinant plasmid overexpressed a 94kDa of recombinant protein in *E. coli*. 100ml of *E. coli* culture could yield 1.5×10^5 units of Taq DNA polymerase, which could be applied in the PCR.

Key words Taq DNA polymerase, PCR, expression