

超高忠实性 PCR 用 DNA 聚合酶^①

袁晓东, 李晶泉, 王红伟, 姜明, 汤敏谦

(宝生物工程(大连)有限公司, 大连 116600)

The DNA Polymerase of High Fidelity for PCR

YUAN Xiao-dong, LI Jing-quan, WANG Hong-wei, JIANG Ming, TANG Min-qian

(TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd, Dalian 116600, China)

中国分类号: Q751 文献标识码: A 文章编号: 0253-9772(1999)06-0047-48

PCR (Polymerase Chain Reaction) 法已在生物工程领域得到了广泛的应用, 而 PCR 法的推广完全得益于 *Taq* 耐热性 DNA 聚合酶。近年来, PCR 法的应用除生物工程领域外, 已应用至工业、农业、医学、制药等与人们生活息息相关的各个领域。随着 PCR 法的不断推广, 人们对 DNA 聚合酶的忠实性(Fidelity)要求越来越高, 一般来说, *Taq* DNA 聚合酶在进行 PCR 延伸反应过程中的错配率为 0.5% 左右。TaKaRa 公司独自研制成功的 *Pyrobest* DNA 聚合酶是一种来源于 *Pyrococcus sp.* 的超耐热性 DNA 聚合酶^(1, 2), 具有比一般 *Taq* DNA 聚合酶高出 10 倍以上的忠实性。并具有同 *Taq* DNA 聚合酶相同的 DNA 扩增性能。

1 *Pyrobest* DNA 聚合酶和 *Taq* DNA 聚合酶的延伸性能比较

对 *Pyrobest* DNA 聚合酶和 *Taq* DNA 聚合酶的酶活性在温度上作了探讨, 在 30℃~80℃ 的区域内对两种酶的活性进行了测定。进行酶活性测定时, 以 M13 ssDNA 作为模板, 以 *Bca*BEST Primer M13-47 (TaKaRa Dalian, Code No. 3887 CA) 作为引物, 测定了 [α -³²P]dCTP 在各温度时的摄取量, 然后把最大酶活性作为 100, 计算出各温度时的相对活性, 结果见图 1。 *Taq* DNA 聚合酶在 70℃ 附近, *Pyrobest* DNA 聚合酶在 75℃ 附近显示最高活性。 *Pyrobest* DNA 聚合酶在 65℃ 以下时, 和 *Taq* DNA 聚合酶相比活性较低, 65℃ 以上活性急速上升。

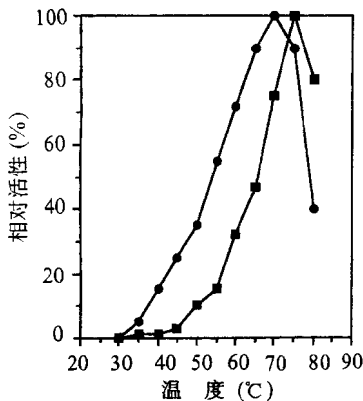


图1 *Pyrobest* DNA 聚合酶和 *Taq* DNA 聚合酶的相对活性比较
—■— *Pyrobest* DNA 聚合酶;
—●— *Taq* DNA 聚合酶。

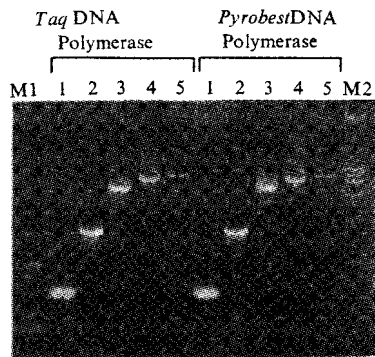


图2 *Pyrobest* DNA 聚合酶和 *Taq* DNA 聚合酶的 PCR 扩增性能比较
M1. DL 2 000 DNA Marker; 1. 0.5 kbp DNA 片段; 2. 2.0 kbp DNA 片段; 3. 6.0 kbp DNA 片段; 4. 8.0 kbp DNA 片段; 5. 10.0 kbp DNA 片段; M2. DL 15 000 DNA Marker.

①收稿日期: 1999-06-14; 修回日期: 1999-09-09

作者简介: 袁晓东(1968-), 男, 汉族, 辽宁省大连市人, 学士学位, 专业方向: 生物化学。

2 *Pyrobest* DNA 聚合酶和 *Taq* DNA 聚合酶的扩增忠实性比较

以 λ DNA 为模板, 用 *Pyrobest* DNA 聚合酶和 *Taq* DNA 聚合酶扩增 0.5、2、6、8、10 kbp 的 DNA 片段, 比较两者的 PCR 扩增性能。进行 PCR 扩增时使用的酶量各为 $1^{-} 25\text{U}/50\mu\text{l}$, 扩增的 PCR 条件为: 94°C , 30sec; 68°C , 5min; 30cycles。PCR 反应后, 取 $5\mu\text{l}$ PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳(图 2), 结果显示, *Pyrobest* DNA 聚合酶与 *Taq* DNA 聚合酶具有相同的 DNA 扩增性能。使用 Kunkel 等的方法^[3], 对聚合酶的 DNA 扩增忠实性进行了比较, 具体方法如下(参考图 3):

(1) 调制在 pUC118 质粒 DNA 的 *lacZ* region 具有单链缺失片段(Gap)的质粒 DNA; (2) 用 DNA 聚合酶合成 *lacZ* region; (3) 转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞, 然后在含有 X-Gal、IPTG 及 Amp 的琼脂平板培养基上涂板生长, 形成单菌落; (4) 计数平板培养基上的蓝色、白色菌落。其中蓝色菌落为正常体(Wild colony); 白色菌落为变异体(Mutant colony)。比较结果(图 4), 以 *Taq* DNA 聚合酶的忠实性作为 1, 比较 *Pyrobest* DNA 聚合酶的忠实性。结果显示, *Pyrobest* DNA 聚合酶具有 *Taq* DNA 聚合酶 10 倍以上的 DNA 合成忠实性。

3 结 论

Pyrobest DNA 聚合酶和 *Taq* DNA 聚合酶在 PCR 的性能上基本没有差别。我们曾用 *Pyrobest* DNA 聚合酶成功地扩增了 5kbp 的人体染色体 DNA 和 2kbp 的 λ DNA。并且, *Pyrobest* DNA 聚合酶在 75°C 附近显示最高活性(*Taq* DNA 聚合酶为 70°C), 并和 *Taq* DNA 聚合酶相比, 65°C 以下时活性较低, 从 65°C 开始活性急速上升(见图 1)。为此, 使用 *Pyrobest* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增可以抑制非特异性带的产生。

Taq DNA 聚合酶在 PCR 扩增过程中的错配率一直被视为 PCR 技术的一种缺陷, 而 *Pyrobest* DNA 聚合酶的高忠实性扩增(图 4), 能对 PCR 技术的进一步推广起到决定性作用, 为正确克隆 PCR 或 RT-PCR 产物带来了方便。相信 *Pyrobest* DNA 聚合酶的出现, 会使 PCR 技术在根本上发生质的飞跃。

参 考 文 献:

- (1) Uemori T, Ishino Y, Toh H, Asada K, Kato I. Organization and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from the archaeon *Pyrococcus furiosus*[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 259~265.
- (2) Cline J, Braman J C, Hogrefe H H. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 3546~3551.
- (3) Kunkel T A. The mutational specificity of DNA polymerases—alpha and—gamma during in vitro DNA synthesis[J]. *J Biol Chem*, 1985, 260: 12866~12874.

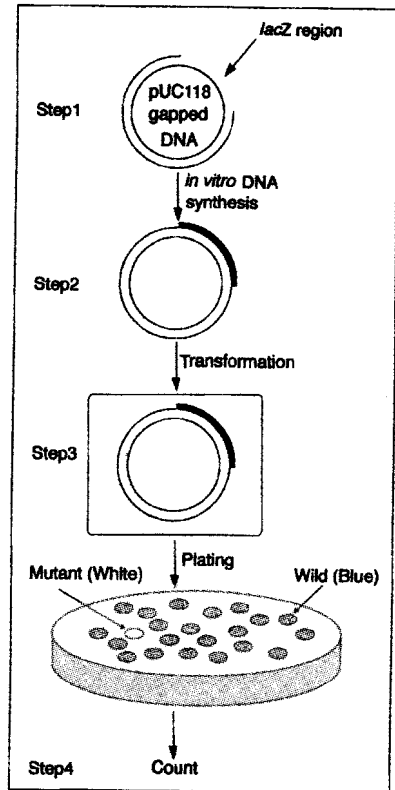


图 3 DNA 聚合酶忠实性检讨实验示意图

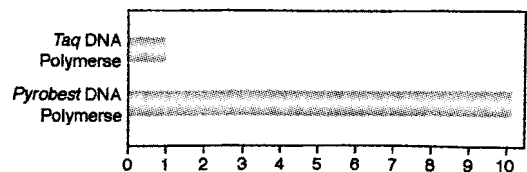


图 4 *Pyrobest* DNA 聚合酶和 *Taq* DNA 聚合酶的忠实性比较