

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00371

大肠杆菌表达的 *Taq* DNA 聚合酶的纯化

刘天磊¹, 薛守斌², 王芳¹, 朱琳颖¹, 梁微微¹, 曲圣轩¹, 蔡文博¹

1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013;

2. 兰州大学第二临床医学院, 兰州 730000

摘要: *Taq* DNA聚合酶是分子生物学研究中最常用的热稳定DNA聚合酶之一, 与其他热稳定DNA聚合酶具有相似的特征, 其纯化策略不但有潜在的应用前景, 也对同类聚合酶的分离具有指导意义。已报道的适宜大量制备*Taq*酶的方案所需成本较高, 而文章介绍了一种利用国产阳离子交换树脂廉价制备*Taq*酶的方案。在本方案中, 采用热变性、(NH₄)SO₄沉淀与 724 离子交换层析分离大肠杆菌表达的*Taq*酶, 约 18 g Na型树脂干粉一次可回收比活约 8 131.98 U/mg、总酶活 2.2×10⁵ U、近 27.07 mg *Taq*酶。纯化的产率可达 48.92%, 纯化倍数约 59.35。所制酶SDS-PAGE电泳只检测到 94 kDa单一蛋白条带, 未检测到DNA核酸酶污染, 与商品酶的PCR扩增能力无区别。此纯化方法成本低, 适合实验室一般性的制备和生产应用。

关键词: *Taq* DNA 聚合酶; 724 树脂; 阳离子交换层析

Purification of *Taq* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*

LIU Tian-Lei¹, XUE Shou-Bin², WANG Fang¹, ZHU Lin-Ying¹, LIANG Wei-Wei¹, QU Sheng-Xuan¹, CAI Wen-Bo¹

1. School of Food and Bioengineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. The Second Clinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: *Taq* DNA polymerase is one of the most commonly thermostable DNA polymerases in molecular biological researches, which shares its basic characters with others of the family, thereby its purifying strategy could be used not only in itself production but also in the extraction of the others as a reference. At present, the protocols reported for large scale preparation of *Taq* DNA are high cost, so a cheaper method was described here. In this protocol, by heat denaturation, ammonium sulfate precipitation and cation exchange chromatography of 724 resin, about 18 g powder of Na form resin could recover about 27.07 mg of *Taq* enzyme. The total activity and specific activity were approximately 2.2×10⁵ U and 8131.98 U/mg. The total yield was about 48.92% with 59.35 of purification folds. Analysis of quality of purified enzyme indicated that only one protein 94 kDa was identified against SDS-PAGE and the remnant of DNA nuclease was not detected. For PCR reaction, The amplification ability of purified *Taq* polymerase was not different from that of the commercially available ones. This method reported in the present study is effective and low cost, making it suitable for general purification in

收稿日期: 2011-06-16; 修回日期: 2011-08-25

基金项目: 江苏大学高级人才科研启动基金项目(编号: 10JDG040), 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)和江苏大学百项本科生创新项目(编号: 2010093)资助

作者简介: 刘天磊, 博士, 讲师, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: tianlei_liu@hotmail.com

网络出版时间: 2012-2-21 10:24:51

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120221.1024.001.html>

laboratories or business production.

Keywords: *Taq* DNA polymerase; 724 resin; cation-exchange chromatography

Taq 酶是第一个分离的热稳定 DNA 聚合酶^[1, 2], 也是第一个用于 PCR 反应的热稳定聚合酶^[3], 采用 *Taq* 酶催化 DNA 体外合成使得 PCR 反应的自动化成为现实^[3~6]。目前已分离出 *Bst*、*Taq*、*Tth*、*Tfl*、*Pfu*、*Pow*、*Vent* 及 *Pab* 等热稳定聚合酶, 能够满足多种 PCR 及 PCR 衍生技术的需求^[7~9]。*Taq* 酶是热稳定 DNA 聚合酶的重要成员, 主要用在常规 PCR、DNA 测序、T-载体克隆时 DNA 片段末端加 A 及各种 PCR 衍生技术, 是分子生物学不可缺少的工具酶^[7~9]。此外, 在群体遗传学、数量遗传学和图位克隆等大批样品基因型分析中 *Taq* 酶用量巨大。*Taq* 酶是分子量为 94 kDa 的热稳定碱性蛋白, 具有 DNA 结合能力^[2, 5, 6], 它的纯化正是基于它的特点设计的。如针对它的热稳定性可采用反复冻融^[10]、热变性^[4, 6, 11, 12]以及热洗脱^[13]进行提纯, 而针对 *Taq* 酶可以和 DNA 与 dNTP 结合的特点设计了亲和纯化^[2, 14], 此外可以利用 *Taq* 酶的解离特性进行离子交换纯化^[2, 4, 5, 15]。成熟的大肠杆菌表达系统也为 *Taq* 酶的表达和纯化提供了新思路, 如对带有 Tag 的重组酶可以选择相应的树脂进行亲和分离^[13, 16, 17]。*Taq* 酶同其他热稳定聚合酶具有相似的特征, 探讨 *Taq* 酶的纯化方法对所有热稳定聚合酶的分离都有借鉴意义。在已报道的方案中只有 Enlgeke 等^[4] 和 Lawyer 等^[5] 的方法适合 *Taq* 酶的大量制备, 前者程序比较繁杂, 后者相对简洁。Enlgeke 等的方法最大特点是选用 BioRex70 树脂, 用较高的 pH(7.9) 进行洗脱。BioRex70 是丙烯酸型弱酸性阳离子交换树脂, 其超大孔径即可通过蛋白分子, 又能有效的移除核酸残存, 故被较多采用。国内外丙烯酸型弱酸性阳离子树脂主要是作为水处理、抗生素、色素、氨基酸、小肽、溶菌酶及细胞色素 C 等小分子纯化的生产用介质, 这类树脂的特点是强度高价格低, 但他们都不具备 BioRex70 超大孔径的物理结构; 因此这类树脂是否能够用来分离分子量达 94 kDa 且保持生物活性的蛋白还未知。本研究选用国产 724 阳离子交换树脂, 辅以热变性和硫酸铵沉淀发展成为有效廉价的 *Taq* 酶抽提方法, 丰富耐

热 DNA 聚合酶的纯化策略。

1 材料和方法

1.1 菌株和试剂

菌株为本实验室保存的 *E. coli* DH1/p*Taq*, 该菌含有受 IPTG 诱导、*Tac* 启动子控制的 *Taq* 基因的质粒, 是氨苄青霉素抗性菌株。氢型 724 树脂直接购于三星公司(www.sxsx.com.cn), HEPES、PMSF、DTT、IPTG、氨苄青霉素和溶菌酶为 Amersco 产品, 胰蛋白胨、酵母粉、Tween 20、NP40、Triton X-100 及无机试剂等为国药产品(www.reagent.com.cn)。

1.2 *Taq* 酶的表达和粗酶制备

在含有 20 mL LB 液体培养基(含 100 μ g/mL 氨苄青霉素)的 100 mL 三角瓶接种一单菌落, 37 $^{\circ}$ C 160 r/min 过夜培养。将 500 μ L 过夜培养菌液转接到含有 250 mL LB 培养基(含 100 μ g/mL 氨苄青霉素)的 500 mL 三角瓶中, 37 $^{\circ}$ C 160 r/min 培养 12 h, 然后再加入 50 mL 2 \times LB 培养基(0.80 mg/mL IPTG, 100 μ g/mL 氨苄青霉素)诱导培养 12 h。将培养物置于冰上冷却, 4 $^{\circ}$ C 4 000 r/min 离心 5 min 收集细菌。用 25 mL 清洗缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 50 mmol/L dextrose, 1 mmol/L EDTA)重悬菌体, 4 $^{\circ}$ C 4 000 r/min 离心 5 min 收集细菌, 重复 1 次。再用 25 mL 清洗缓冲液(含 4 mg/mL 溶菌酶)重悬细菌, 室温放置 20 min 裂菌, 随后加入等体积的变性裂解缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P40), 75 $^{\circ}$ C 保温 1 h, 冰浴冷却, 4 $^{\circ}$ C 15 000 r/min 离心 15 min, 将上清转入灭菌的烧杯, 按 100 mL 上清加入 35 g (NH₄)₂SO₄ 冰浴盐析。4 $^{\circ}$ C 15 000 r/min 离心 15 min, 小心倾去清液并保留膜状漂浮的粗蛋白, 然后 3 500 r/min 离心使粗蛋白沉积于离心管底部, 并用移液枪尽量吸除液体, 保留 *Taq* 粗酶沉淀。用约 4 mL 洗脱缓冲液 I(20 mmol/L HEPES, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Tween 20, 0.5% NP40; pH 7.9)溶解沉淀, 冰上放置 1 h, 4 $^{\circ}$ C 5 000 r/min 离心 10 min, 将上清转

至新灭菌离心管, -80°C 贮存备用。

1.3 724 色谱柱的准备和离子交换层析

将 724 树脂用 5 倍体积 dH_2O (去离子水) 清洗 5 次, 6 倍体积的 1 mol/L 的 NaOH 浸泡 4 h, 然后用 dH_2O 反复清洗除去 NaOH; 抽滤, 再用 5 倍体积 1 mol/L HCl 浸泡 4 h, dH_2O 多次清洗除去 HCl, 再次抽滤, 然后重复进行 NaOH 处理。碱处理的树脂 (Na 型) 用 HCl 调节 pH 至 7.9 左右, 然后用 5 倍体积洗脱缓冲液 I (20 mmol/L HEPES, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Tween 20, 0.5% NP40; pH 7.9) 平衡, 间或搅拌, 并用 NaOH 或 HCl 调节 pH, 直至 pH 稳定为 7.9。取已平衡树脂装填直径为 15 mm 的层析柱, 约 230 mL 自然沉降树脂 (18.80 ± 0.07 g Na 型干粉)。用 600 mL 洗脱缓冲液 I、40 mL 含 0.5 mmol/L PMSF 的洗脱缓冲液 I 再次平衡树脂 (流速为 3 mL/min)。

加载 3 mL 粗酶液 (约 4.5×10^5 U), 分别用约 300 mL 洗脱液 I 和洗脱液 II (20 mmol/L HEPES, 200 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Tween 20, 0.5% NP40; pH 7.9) 洗柱, 流速 3 mL/min, 按 4 mL 体积收集洗出液, 4°C 储存以备检测。将检测到有 *Taq* 酶活性的洗出液回收。用截流量为 14 kDa 的透析袋对 10 倍体积的浓缩脱盐缓冲液 (20 mmol/L HEPES, pH 7.9, 100 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF, 1 mmol/L dithiothreitol, 20% glycerol) 进行 12 h 的冰浴透析, 然后再对 10 倍体积储存缓冲液 (20 mmol/L HEPES, pH 7.9, 100 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF, 1 mmol/L dithiothreitol, 50% glycerol) 进行 12 h 透析, 透析完成后将制备的 *Taq* 酶合并混匀, -80°C 保存。

1.4 *Taq* 酶的检测

以质粒 pBI121 中的 CaMV35S 启动子为靶序列, 正反向引物分别为 5'-AAGGTACCAGGTCCCCAGATTAGCC-3' 和 5'-TAGGTACCGTCGACCCCCGTGTTCTCTCCAAATG-3', 利用 PCR 检测 *Taq* 酶。反应体系为 20 μL (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mmol/L MgSO_4 , 0.1% Triton X-100, 0.01% BSA), 4 种脱氧核糖核酸三磷酸 (dNTP) 终浓度均为 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 10 ng 模板 pBI121 质粒, 引物终浓度均为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。正对照选用某公司 *Taq* 聚合酶, 20 μL 体系用酶为 2.5 U。取 1.0 μL 洗脱液、合适体积的稀释细菌悬液、稀释裂解液上清、

稀释 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀上清及最终制备 *Taq* 酶作为待测样品。PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 复性 1 min, 72°C 延伸 90 s, 1 个循环; 94°C 变性 30 s, 55°C 复性 30 s, 72°C 延伸 1 min, 24 个循环; 最后再 72°C 延伸 7 min, 4°C 保存。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖胶电泳检测。*Taq* 酶活测定采用 PCR 滴度法^[4,10,11,15], PCR 扩增为 20 个循环, 反应体系与程序等如上所述。

1.5 蛋白含量测定和 SDS-PAGE 电泳检测

首先对细胞裂解液、热变性上清和粗酶液进行透析, 然后测定蛋白含量或制备 SDS-PAGE 电泳样品。对离子交换回收酶液先用聚乙二醇 20000 浓缩、透析, 然后用于测定蛋白含量或用于 SDS-PAGE 样品制备。蛋白含量测定用 Bradford 法^[18]。垂直电泳采用 Bio-Rad Mini-Protein 电泳槽, 0.75 mm 厚、12% 的分离胶和 4% 的浓缩胶, 按照 Laemmli 方法进行^[19], 电泳结束后用 0.25% 考马斯亮蓝 R250 甲醇乙酸溶液 (甲醇 冰乙酸 水 = 5 1 4) 染色 4 h 以上, 甲醇乙酸溶液脱色并照相记录。

1.6 DNA 核酸酶检测

参照 Chieu 和 Lawyer 方法^[2,5] 加以改进, 选用反应体系为 50 μL (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mmol/L MgSO_4 , 0.1% Triton X-100, 0.01% BSA), 含 20 U *Taq* 酶和 4 μg λ DNA/*EcoR* + *Hind* Marker (SM0197, Fermentas), 而对照加入 20 μg BSA (B14, Fermentas) 替代 *Taq* 酶。样品混匀后于 74°C 保温 1 h, 然后冰上冷却, 分别取 3、6、9 与 12 μL 用 1% 琼脂糖胶电泳检测。

1.7 PCR 扩增能力检测

选用 *EGFP*、*GUS* 和 35S+*GUS* 3 个长度分别为 749、1 931 以及 2 772 bp 的 DNA 片段进行 PCR 扩增以检测新制备 *Taq* 酶的扩增能力, 反应体系同 CaMV35S 启动子的扩增, 其中商品酶和自制酶用量均为 2.5 U。*EGFP* 基因扩增模板为质粒 pEGFP-N2, 正反向引物分别是 5'-CCGGGATCCCCGGGTTCCA TGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3' 和 5'-ATCGAGCT CTATTACTTGACAGCTCGTCCAT-3'。*GUS* 和 35S+*GUS* 片段扩增模板都是 pBI121 质粒, 其中 *GUS* 扩增的正反向引物分别是 5'-AGAGAACACGGGGGA

CTCTA-3'和 5'-TCGAGCTCACTAGTCGTACGGTA GCAATTCCCGAGGCT-3'; 35S+GUS 片段扩增的正向引物与扩增 CaMV35S 启动子正向引物相同, 反向引物为 GUS 基因扩增的反向引物。EGFP、GUS 和 35S+GUS 扩增程序为: 94℃预变性 3 min, 94℃变性 30 s, 72℃延伸; 循环扩增的程序分别是: 对 EGFP 先做 1 个循环的 52℃复性 1 min、90 s 的延伸, 然后进行 24 个循环的 54℃复性 40 s、1 min 的延伸; 对 GUS 扩增先做 1 个循环的 54℃复性 40 s、2 min 30 s 的延伸, 再做 24 个循环的 56℃复性 40 s 和 2 min 的延伸; 对片段 35S+GUS 先进行 1 个循环的 52℃复性 1 min 与 3 min 30 s 的延伸, 然后进行 24 个循环的 54℃复性 30 s 和 3 min 的延伸。循环结束后 3 个扩增均再做 1 个循环的 72℃延伸 5 min, 然后 4℃保存。PCR 产物用 1.2%琼脂糖电泳检测。

2 结果与分析

2.1 724 树脂离子交换层析

加载 3 mL粗酶液(约 4.5×10^5 U), 分别用约 300 mL 洗脱液I和洗脱液II层析, 每 4 mL收集样品。PCR检测显示洗脱液I洗脱的 1~70 号样品未检测到任何扩增条带(数据未显示)。更换洗脱液II后在 36 号样品首次检测到微弱扩增条带, 39~46 扩增条带强烈, 47~64 号样扩增条带较弱, 洗脱峰托尾明显(图 1)。当用不含Tween20 和NP40 的洗脱液I、洗脱液II

洗脱时, 在洗脱液I的 16~23 号洗出样品检测到 280 nm的吸收峰, 而洗脱液II全部 70 个洗脱样品在 280 nm均未检测到吸收峰(数据未显示)。回收洗脱液II洗脱 36~64 号样品, 可得约 120 mL含有Taq酶的稀溶液。

2.2 Taq 酶的 SDS-PAGE 检测

SDS-PAGE 电泳显示 IPTG 可有效诱导 Taq 酶表达, 但 Taq 酶表达丰度较低(图 2 白色箭头)。热变性可有效去除大量杂蛋白, 但一分子量约 50 kDa 的蛋白不能去除且在热变性上清中含量比 Taq 酶高, 该蛋白还是 Taq 酶的硫酸铵共沉淀组分(图 2 中的*号)。离子交换可有效移除粗酶液中杂质蛋白, 经离子交换纯化后的蛋白上样量 60~30 μg 电泳检测只有唯一一条带(图 2 黑色箭头)。

2.3 DNA 核酸酶检测

用λ DNA/EcoRI+HindIII Marker(SM0197, Fermentas)降解程度检测纯化 Taq 酶 DNA 核酸酶残存时, 对照组和实验组 21 kb 的条带未见明显差异, 锯齿状边缘可能是掺入的蛋白干扰造成的(图 3)。泳道 1~2 中对照组和实验组 3.5~5.1 kb 条带清晰未见带型改变(图 3)。对 1.3~2.0 kb 的条带, 对照组和实验组全部泳道中的 DNA 带型清晰未见差异。同样, 在 2~4 泳道中 0.8、0.9 和 0.5 kb DNA 带型的对照和处理也未检测到差异(图 3)。

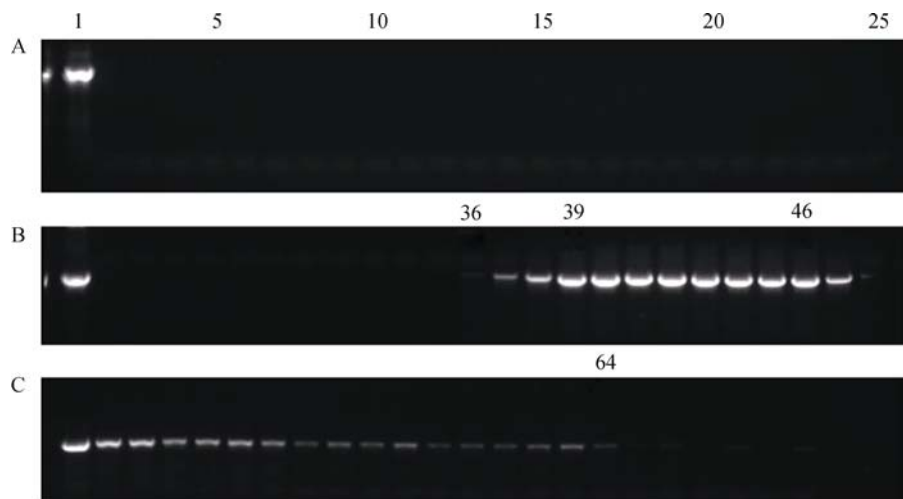


图 1 724 树脂层析洗脱液 II 洗脱样品 PCR 检测

1: 正对照; 2~25: 顺序收集洗脱液 II 洗脱样品 PCR 产物; 36: Taq 酶初始检出样品; 39~46: Taq 酶高活检测区; 36~64: Taq 酶回收区。

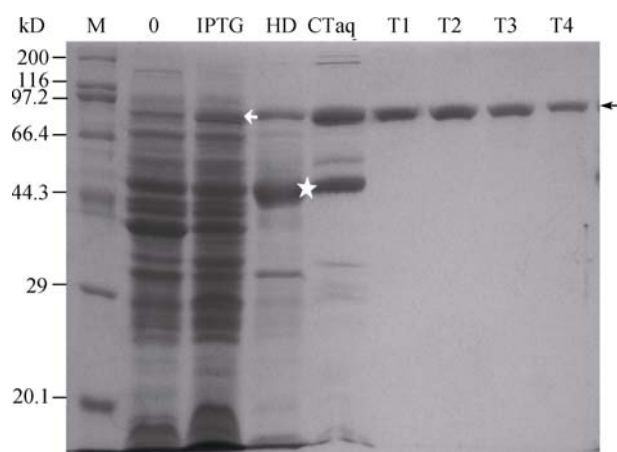


图 2 *Taq* 酶纯化 SDS-PAGE 检测

M: 宽分子量标准(TaKaRa, D532A); 0: 未加 IPTG 诱导细胞样品; IPTG: 加 IPTG 诱导细胞样品; HD: 热变性离心上清; CTaq: 硫酸铵沉淀制备的粗酶液; T1-4: 离子交换纯化样品(上样量依次是 60、50、40 及 30 μ g); 白色箭头: IPTG 诱导表达分子量 94 kDa 的 *Taq* 酶; 黑色箭头: *Taq* 酶; 星号: 热稳定同 *Taq* 酶硫酸铵共沉淀蛋白。

2.4 *Taq* 酶扩增能力检测

选用 *EGFP*、*GUS* 和 35S+*GUS* 3 个 DNA 片段进行 PCR 反应, 自制酶和商品酶都能扩增长度分别 749、1 931 与 2 772 bp 的 DNA 片段, 电泳检测时发现扩增条带都很清晰(图 4)。自制酶和商品酶在 20 μ L 反应体系用量均为 2.5 U, 电泳图谱中自制酶 3 个扩增条带强于对应商品酶的扩增条带(图 4)。

2.5 *Taq* 酶纯化的效率

热变性-硫酸铵沉淀-724 离子交换纯化*Taq*酶的过程中, 热变性、硫酸铵沉淀和离子交换的纯化倍数分别约为 7.48、3.7 和 2.15, 产率介于 76%~80%(表 1)。该方法的总纯化倍数约为 59.35, 效率 48.92%, 一次可制备比活约 8131.98 U /mg、总活力约 2.15×10^5 U 近 27.07 mg 酶(表 1)。

3 讨论

最初热稳定 DNA 聚合酶是直接来自嗜热菌 *Thermus aquaticus* 分离的^[1, 2], 后来 Lawyer 等克隆了 *Taq pol I* 全基因, 证明该基因编码 94 kDa 蛋白(*Taq* 酶)^[6]。*Thermus aquaticus* 中 *Taq* 酶丰度较低, *Taq* 酶大肠杆菌表达的成功奠定了大量制备的基础^[4-6, 11]。该酶具有热稳定性、DNA 结合能力以及可容忍较大范围的 pH 变化等特点^[2, 5, 6], 重组酶的纯化常采用的热变性、沉淀与色谱层析 3 个步骤就是根据这些特点设计的。此外, *Taq* 酶主要用于 PCR 等, 避免核酸酶、核酸片段和二价金属离子污染是关键。二价金属离子污染可通过试剂和水的质量得到有效控制, 消除核酸酶和核酸片段是纯化方案首先要考虑的。

热变性能有效的除去宿主的大量杂质蛋白^[4, 5, 10-12, 15, 20], 75℃ 乃至更高温度的保温还可使 DNA 核酸酶和蛋白酶得到有效灭活, 因此大多 *Taq*

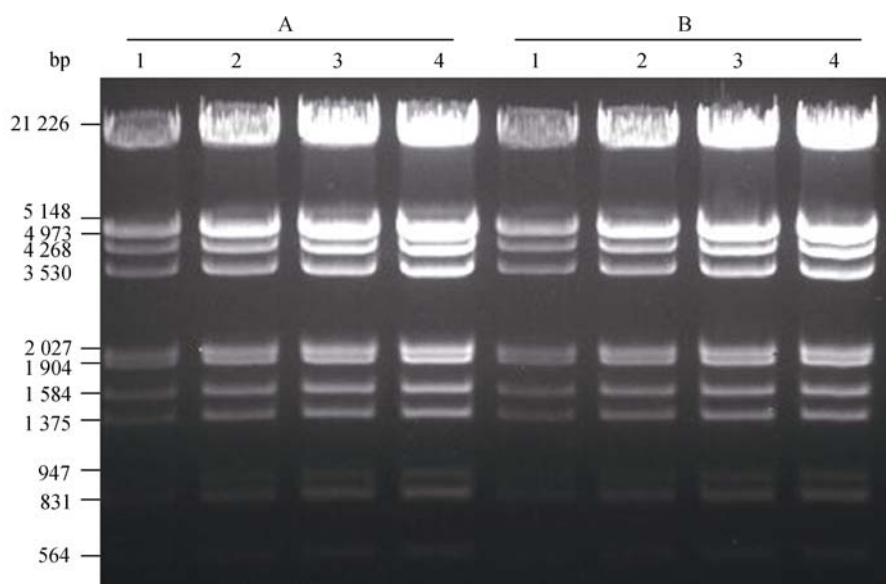


图 3 纯化 *Taq* 酶样品残存 DNA 核酸酶检测

A: 含 20 μ g BSA 对照组; B: 含 20 U *Taq* 酶实验组。1~4: 上样量分别为 3、6、9 和 12 μ L。

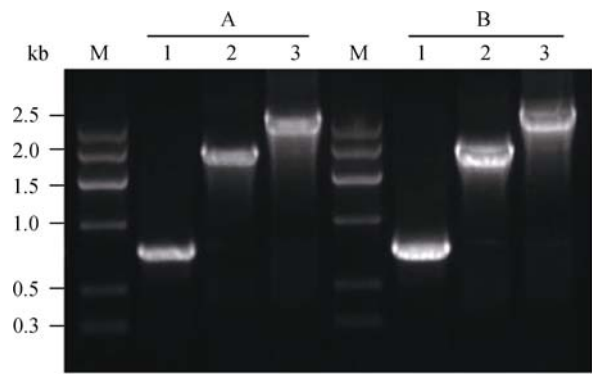


图 4 纯化 *Taq* 酶的扩增能力
A : 某公司 *Taq* 酶; B : 本实验纯化 *Taq* 酶; M : DNA Marker G(GM341,BBI); 1 : *EGFP* 片段(749 bp); 2 : *GUS* 片段(1 931 bp); 3 : 35S+*GUS* 片段(2 772 bp)。

粗酶的制备优先选择热变性^[4, 6, 11, 12], 甚至有学者直接用热变性-硫酸铵沉淀-透析的产物作为*Taq*酶制剂用于PCR^[11]。采用 75℃保温 1 h, *Taq*酶的回收效率为 79.32%, 丢失近 20%的酶活, 但可确保有效清除*Taq*酶中DNA核酸酶和大多杂蛋白。按本文描述制备的*Taq*酶未检测到残存的DNA核酸酶, 这与热变性处理不无关系(表 1、图 3)。*Taq*酶本身具 5'→3'外切酶活性, 仅在掺有寡核苷酸变性退火的混合DNA中才能检测到, 对于双链DNA(dsDNA)即使采用同位素标记也不能检测到外切酶的活性^[5], 事实上我们实验的灵敏度也不足以检测*Taq*酶的外切活性。热变性的提纯效率很高, 纯化倍数 7.48(表 1), SDS-PAGE电泳HD泳道和IPTG泳道相比多数蛋白得以清除, 同以上结果相一致(图 2)。

*Taq*酶可用硫酸铵^[11]或聚乙烯亚胺进行沉淀^[5, 10, 15], 硫酸铵沉淀是廉价而有效的方法, 本方法的硫酸铵沉淀收率达 76.73%, 纯化倍数大约 3.7(表 1); 电泳数据也显示硫酸铵沉淀能提高*Taq*酶的丰度(图 2)。

用硫酸铵沉淀蛋白可引起溶液pH降低, 可以通过加入三乙醇胺或者调节pH得到改善以提高回收率。此外, 采用PCR反应缓冲体系是含有 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄和 2 mmol/L MgSO₄, 那么通过离子交换和透析后*Taq*酶制品即使仍有痕量的铵离子和硫酸根离子对PCR反应也不足以产生影响。

*Taq*酶的粗制品可通过阴离子交换(DEAE-Sephadex^[2])、阳离子交换(磷酸纤维素^[2]与BioRex70^[4, 15])、疏水(phenyl-Sepharose^[5])与亲和层析(heparin-Sepharose^[5, 15]、Ni²⁺亲和^[13]、DNA纤维素^[2]、HAS-Sepharose^[13]以及模拟dNTP亲和^[14])等一种或几种组合进行精制。在这些纯化方案中Engelke等和Lawyer等的方法影响较大, 都适合进行大量制备。前者采用BioRex70 进行一步纯化而后者采用疏水-亲和层析(phenyl-Sepharose/heparin-Sepharose)两步层析。在较高pH (8.0)和低盐的洗脱条件下阳离子交换树脂层析可有效清除带负电荷DNA片段, 而有关DNA 污染也仅在Engelke的实验中被测定过, 或许这也是很多研究者选用阳离子层析进行一步精制*Taq*酶的原因。我们选用 724 弱酸性丙烯酸型阳离子交换树脂是国产生用经典树脂之一, 该树脂强度高价格低。层析中洗脱液I和洗脱液II用量分别约 300 mL, 洗脱液II洗脱的 36 号样(约 140 mL洗脱体积)是酶活检测初始位置, 酶活检测峰值为 39~46 号样, 而可检测酶活持续到 64 号样(近 100 mL回收液), 洗脱峰托尾明显(图 1), 通过提高洗脱液II的KCl浓度可使托尾现象得到改善。当采用不含Tween20 和NP40 的洗脱液I洗脱时, 280 nm紫外吸收峰在 17~29 号样之间(68~116 mL)且此区间未检测到*Taq*酶活, 表明杂质蛋白洗出体积在 68~116 mL之间, 采用 300 mL左右的洗脱液I和洗脱液II进行层析可满足纯化(数

表 1 *Taq* 酶热变性-硫酸铵沉淀-724 树脂纯化

步骤	测定项目				
	蛋白含量(mg)	酶活(×10 ⁵ U)	比活(U/mg)	纯化倍数	产率(%)
细胞裂解液	3288.07±253.57	4.5±0.1	137.31±9.08	/	/
热变性上清	349.6±29.44	3.57±0.15	1022.94±51.47	7.48±0.69	79.32±4.69
沉淀粗酶液	72.47±7.45	2.73±0.21	3779.25±129.9	3.7±0.22	76.73±6.61
724 树脂纯化	27.07±1.22	2.2±0.1	8131.98±314.19	2.15±0.11	80.77±6.62
总计	/	/	/	59.35±3.64	48.92±2.88

据未显示)。我们的层析耗时约 3 h, 产率约 80.77%, 每克Na型树脂可制可制备比活近 8131.98 U/mg约 1.17×10^4 U的*Taq*酶(表 1)。

经热变性-硫酸铵沉淀-724 层析制备的 *Taq* 酶产率近 50%, SDS-PAGE 检测为均一蛋白, 未检测到 DNA 核酸酶残存, 与商品化的酶 PCR 扩增能力无区别等都表明该方案制备的 *Taq* 酶是切实可行的。此外, 热变性、硫酸铵沉淀与层析损失的酶活均近 20%, 可以通过缩短热变性处理时间、提高硫酸铵饱和度、改善层析缓冲液得到改善, 因此热变性-硫酸铵沉淀-724 层析制备 *Taq* DNA 聚合酶还有提高的潜力。

在*Taq*酶的大量制备研究中, Lawyer等方法获得*Taq*酶的比活是迄今为止最高的(290 kU/mg), 考虑到其超声波细胞裂解液也有高达 2.45 kU/mg的比活(45 kU/18.4 mg), 推断这种现象部分是表达系统自身特性引起的。另外, 该方法的总纯化倍数近 120, 高纯度是酶高比活的重要原因。Engelke等制备酶的比活为 5 300 U/mg, 相对于热变性上清的纯化倍数为 6.36。我们的方法可概括为‘热变性-硫酸铵沉淀-724 离子交换’, 成品酶比活 8131.98 U/mg, 总纯化倍数为 59.35(相对于热变性上清纯化倍数为 7.79), 成品酶质量和纯化效果介于上述两种方法之间。本研究的离子交换回收率和Engelke等的方法接近(85%), 低于Lawyer等的方法(>90%)。操作中硫酸铵沉淀的效率低于Engelke等的 100% 和Lawyer等方法的 93%, 损失约 20%的酶活, 因此在沉淀方法上仍有改进的空间。在耗费上, 由于廉价树脂的选用使整个费用低于上述两个方案。总之, 本研究提供的*Taq*酶纯化方案法成本低, 适合实验室常规制备, 对生产也有指导意义。

参考文献(References):

- [1] Kaledin AS, Slyusarenko AG, Gorodetskiĭ SI. Isolation and properties of DNA polymerase from extreme thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* YT-1. *Biokhimiia*, 1980, 45(4): 644–651. DOI
- [2] Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*, 1976, 127(3): 1550–1557. DOI
- [3] Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987, 155: 335–350. DOI
- [4] Engelke DR, Krikos A, Bruck ME, Ginsburg D. Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem*, 1990, 191(2): 396–400. DOI
- [5] Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Res*, 1993, 2(4): 275–287. DOI
- [6] Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem*, 1989, 264(11): 6427–6437. DOI
- [7] Abu Al-Soud W, Rådström P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(10): 3748–3753. DOI
- [8] Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev AI. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(5): 253–260. DOI
- [9] Rittié L, Perbal B. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *J Cell Commun Signal*, 2008, 2(1–2): 25–45. DOI
- [10] Grimm E, Arbuthnot P. Rapid purification of recombinant *Taq* DNA polymerase by freezing and high temperature thawing of bacterial expression cultures. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4518–519. DOI
- [11] Pluthero FG. Rapid purification of high-activity *Taq* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(20): 4850–4851. DOI
- [12] Yang ZG, Ding YM, Zhang YH, Liu FH. Rapid purification of truncated *Taq* DNA polymerase Stoffel fragment by boiling lysis of bacterial expression cultures. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, 50(2): 71–75. DOI
- [13] Gräslund T, Nilsson J, Lindberg AM, Uhlén M, Nygren PÅ. Production of a thermostable DNA polymerase by site-specific cleavage of a heat-eluted affinity fusion protein. *Protein Expr Purif*, 1997, 9(1): 125–132. DOI
- [14] Melissis S, Labrou NE, Clonis YD. One-step purification of *Taq* DNA polymerase using nucleotide-mimetic affinity chromatography. *Biotechnol J*, 2007, 2(1): 121–132. DOI
- [15] Brandis JW, Johnson KA. High-cell density shake-flask expression and rapid purification of the large fragment of

- Thermus aquaticus* DNA polymerase I using a new chemically and temperature inducible expression plasmid in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2009, 63(2): 120–127. [DOI](#)
- [16] Kim YJ, Lee HS, Bae SS, Jeon JH, Lim JK, Cho Y, Nam KH, Kang SG, Kim SJ, Kwon ST, Lee JH. Cloning, purification, and characterization of a new DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. NA1. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(7): 1090–1097. [DOI](#)
- [17] Moreno R, Haro A, Castellanos A, Berenguer J. High-level overproduction of His-tagged *Tth* DNA polymerase in *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(1): 591–593. [DOI](#)
- [18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1–2): 248–254. [DOI](#)
- [19] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685. [DOI](#)
- [20] Roayaei M, Galehdari H. Cloning and expression of *Thermus aquaticus* DNA polymerase in *Escherichia coli*. *Jundishapur J Microbiol*, 2008, 1(1): 1–5. [DOI](#)

•综合信息•

图解微生物实验指南

J.P.哈雷编著

科学出版社出版

书号: 978-7-03-033147-2 定价: 65 元

本书中的实验均用于说明和演示普通微生物学的基本原理,涵盖了微生物学学科概论及其分支。本书的特色在于有很多引人入胜的图片和独立的习题,适合不同大专院校的师生使用。本书分为十一个部分,分别为显微镜技术、细菌形态和染色、基础实验室培养技术、细菌的生化活性、快速多参数检测系统、未知微生物鉴定、影响微生物生长的环境因子、环境和食品微生物、精选真核微生物概述、微生物遗传学和基因组学、科学调查。每个实验均包括安全注意事项、实验材料、学习目标、原理、实验步骤,以及提示与警告和复习题,旨在培养学生的实验操作技能和实验思考技能。

本书适用于大专院校生命科学领域微生物学专业的师生参考使用。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

科学出版社 科学销售中心 联系人:周文宇

电话:010-64022646 010-64017321

<http://shop.sciencepress.cn/>

E-mail: zhouwenyu@mail.sciencepress.com