

上海交通大学

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

学士学位论文

THESIS OF BACHELOR



论文题目：*Pyrococcus furiosus* B型
DNA聚合酶拇指结构域的重要功能研究

学生姓名：王右

学生学号：5080809159

专 业：生物技术

指导教师：刘喜朋

学院(系)：生物科学与技术学院



Pyrococcus furiosus B 型 DNA 聚合酶拇指结构域的重要功能研究

摘要

B 型 DNA 聚合酶是一类保守的单亚基 DNA 聚合酶，广泛存在于古菌、噬菌体、及部分细菌中，参与细胞 DNA 复制与损伤修复。B 型 DNA 聚合酶一般由 N 端结构域、3'-5'外切酶、聚合酶 3 个结构域构成。聚合酶结构域具有典型的手掌、手指构型，催化 DNA 聚合反应；3'-5'外切酶可以从 3'末端降解单链和双链 DNA，在 DNA 复制中执行错配核苷酸的校正功能。关于 N 端结构域的功能不是很清楚，其中古菌的 B 型 DNA 聚合酶特异性结合 DNA 分子中的 dU 损伤，负责结合 dU 的保守口袋就位于 N 端结构域。然而细菌和噬菌体的 B 型 DNA 聚合酶不具有 dU 结合活性。虽然拇指结构域属于聚合酶结构域，但其与外切酶结构域在空间上距离很近，很可能参与调控聚合酶和外切酶活性。

本文以 *Pyrococcus furiosus* B 型 DNA 聚合酶为例，选取其拇指结构域中的 6 个保守氨基酸残基，进行定点突变研究。通过测定突变体的 dU 结合、外切酶、聚合酶等活性，推测 *Pyrococcus furiosus* B DNA 聚合酶拇指结构域在这三种活性中的具体功能。研究结果表明拇指结构域主要作为结合 DNA 的一个支架，辅助结合 dU 损伤；同时辅助 DNA 分子优先结合在聚合酶结构域上进行 DNA 聚合反应，以及在此状态下进行 DNA 外切反应；当对 DNA 酶切至 17nt 或小于 17nt 时，拇指结构域把 DNA 分子转位到外切酶结构域直接进行酶切。本研究加深了对拇指结构域在 B 型 DNA 聚合酶中具体功能的认识。

关键词：*Pyrococcus furiosus* B 型 DNA 聚合酶，拇指结构域，dU 识别活性，3'-5'DNA 外切活性，DNA 聚合活性



THE IMPORTANT FUNCTIONS OF THUMB DOMAIN IN *PYROCOCCLUS FURIOSUS* B-FAMILY DNA POLYMERASE

ABSTRACT

B-family DNA polymerase has been found in archaea, virus, and some bacteria, which fulfills the various replicative and repair functions within the cell. The B-family DNA polymerase is composed of domains, which are N-terminal, exonuclease and polymerase domain including the palm and fingers subdomains and the thumb domain. The conserved palm and fingers subdomains have the function of DNA polymerization. 3'-5' exonuclease domain hydrolyzes ssDNA or dsDNA from 3' end to proofread the polymerase errors. The N-terminal domain of archaeal B-family DNA polymerase has a conserved uracil-binding pocket, which has the function of dU recognition on the DNA strand. The thumb domain interacts with the exonuclease domain and polymerase domain which indicates that it has some functions in the reaction of DNA hydrolyzation and polymerization.

In this research, we study the thumb domain of *Pyrococcus furiosus* B-family DNA polymerase. The 6 positive amino acids were mutated to study the function of the thumb domain. The results of the dU recognition assay, 3'-5' exonuclease assay and DNA polymerase assay demonstrated that the thumb domain plays important roles in these reactions. We found that the dU recognition was the cooperation of N-terminal domain's uracil binding and thumb domain's DNA binding. We also found that the thumb domain assists the reactions of DNA polymerization and hydrolyzation, and when needed, the thumb domain transfers 3' end of DNA strand from polymerase activity site to the exonuclease activity site. Based on these results, we insight into the function of the thumb domain of B-family DNA polymerase.

Key words: *Pyrococcus furiosus* B-family DNA polymerase, dU recognition, 3' to 5' DNA hydrolyzation, DNA polymerization



目录

目录.....	3
第一章 绪论.....	5
1.1 引言.....	5
1.2 DNA 复制和基因组稳定性.....	5
1.3 B 家族 DNA 聚合酶介绍.....	8
1.4 拇指结构域的调控作用.....	10
1.5 课题研究内容和科学意义.....	12
第二章 PYROCOCCLUS FURIOSUS B 型 DNA 聚合酶拇指结构域突变体蛋白的设计与制备	13
2.1 摘要.....	13
2.2 简介.....	13
2.3 材料与方法.....	13
2.3.1 菌株与质粒.....	13
2.3.2 感受态细菌的制备与质粒转化.....	13
2.3.3 载体构建.....	14
2.3.4 重组蛋白制备.....	17
2.4 结果.....	18
2.4.1 拇指结构域及 DNA 相互作用残基的确定.....	18
2.4.2 表达载体构建.....	18
2.4.3 重组蛋白制备.....	19
2.4.4 野生型 Pfu DNA 聚合酶聚合酶活性测定.....	20
2.5 讨论.....	20
2.6 本章小结.....	21
第三章 PYROCOCCLUS FURIOSUS B 型 DNA 聚合酶拇指结构域的功能研究.....	22
3.1 摘要.....	22
3.2 简介.....	22
3.3 材料与方法.....	22
3.3.1 实验材料.....	22
3.3.2 实验方法.....	23
3.4 结果.....	25
3.4.1 拇指结构域对正常 DNA 和 dU 损伤 DNA 结合活性的影响.....	25
3.4.2 拇指结构域对 3'-5'外切酶活性的影响.....	29
3.4.3 拇指结构域对聚合酶的影响.....	35
3.5 讨论.....	39
3.5.1 拇指结构域对识别结合 dU 损伤的辅助作用.....	39
3.5.2 拇指结构域对外切酶活性的调控.....	39
3.5.3 拇指结构域对聚合酶活性的调控.....	40
3.5.4 外切酶活性与聚合酶活性的转换.....	40
3.5.5 R613 对于聚合活性的重要性.....	41
3.6 本章小结.....	41



第四章 全文总结	43
4.1 主要结论	43
4.2 研究展望	43
参考文献	44
附录 常用试剂配方	48
致谢	50
本科在读期间主要学术成绩	51
英文摘要	52



第一章 绪论

1.1 引言

生命进化的结果使得地球上具有如此丰富多彩的生命世界。生命进化需要两个必要条件：生命遗传和进化动力。生命遗传保证了生命体代代相传，即环境生存优势生命体的繁衍，其分子基础是 DNA 复制；进化动力是产生新的环境生存优势生命体的分子基础，推动了生命体对新环境的适应性进化，其分子基础是基因突变。虽然进化动力也很重要，但各种生命形式得以延续的基础是 DNA 复制。DNA 复制将父代遗传信息 DNA 分子完整的复制一份，然后传递给子代。细胞内众多蛋白参与 DNA 复制过程，在这一过程中各种 DNA 聚合酶起着至关重要的作用，他们负责以父本 DNA 为模板，将核苷三磷酸聚合成与父本 DNA 几乎相同的子代 DNA 分子。下面就 DNA 复制机制和参与 DNA 复制的各种 DNA 聚合酶，尤其是古菌的 B 型 DNA 聚合酶作一介绍。

1.2 DNA 复制和基因组稳定性

遗传信息 DNA 分子从父代向子代忠实性传递的生物化学基础是 DNA 复制。DNA 复制可以将父代遗传信息 DNA 分子以及其准确的方式复制一份，经细胞分裂 DNA 分子传递给子代细胞个体。基因组 DNA 复制是一个及其复杂的高度有序的复杂酶促反应过程，由多达几十种蛋白共同催化完成。基因组复制过程分为复制起始、延伸、终止 3 个阶段。在 DNA 复制起始阶段，一些复制蛋白识别、解链复制起点，组装解螺旋酶和组装复制机器。细菌、古生菌和真核生物种参与 DNA 复制起始的蛋白种类见表 1-1^[1,2]。复制起点的有效识别为复制延伸做好了各种准备，下一步就是处于解链状态的 Y 型 DNA 分子和多种复制延伸蛋白形成超级蛋白-DNA 复合物——DNA 复制体 (replisome)^[3]。复制体的核心蛋白组分是 DNA 聚合酶，其他众多辅助蛋白组分帮助 DNA 聚合酶高速准确的复制 DNA^[3]。

表 1-1 细菌、古生菌、真核生物的复制起始蛋白^[1]

	Bacteria	Eukarya	Archaea
Origin recognition	DnaA (one subunit)	Origin recognition complex (ORC) (six subunits, Orc1-6)	ORC/Cdc6 ^a (one or two subunits)
Helicase loader	DnaC ^b /DnaI ^c (one subunit)	Cdc6 (one subunit) together with ORC	ORC/Cdc6 ^a (one or two subunits)
Replicative helicase	DnaB ^b /DnaC ^c (one subunit)	Minichromosome maintenance (MCM) (six subunits, Mcm2-7)	MCM (one subunit)

细菌的复制过程研究的较为详细，一般认为细菌从基因组一个特定的位点起始复制，10 多个蛋白共同完成基因组 DNA 的复制。这些蛋白在复制起始阶段依次组装，形成完善的复制机器——复制体，复制体延基因组 DNA 双链滑动，持续合成基因组 DNA，直到整个环状的细菌基因组 DNA 被复制完成。复制体各蛋白组分高度协调的分工合作，完成复杂的 DNA 复制^[4]。已经提出了一些模型解释 DNA 复制体蛋白组分及动态变化过程。这些模型并未在实验上得到完全证明。

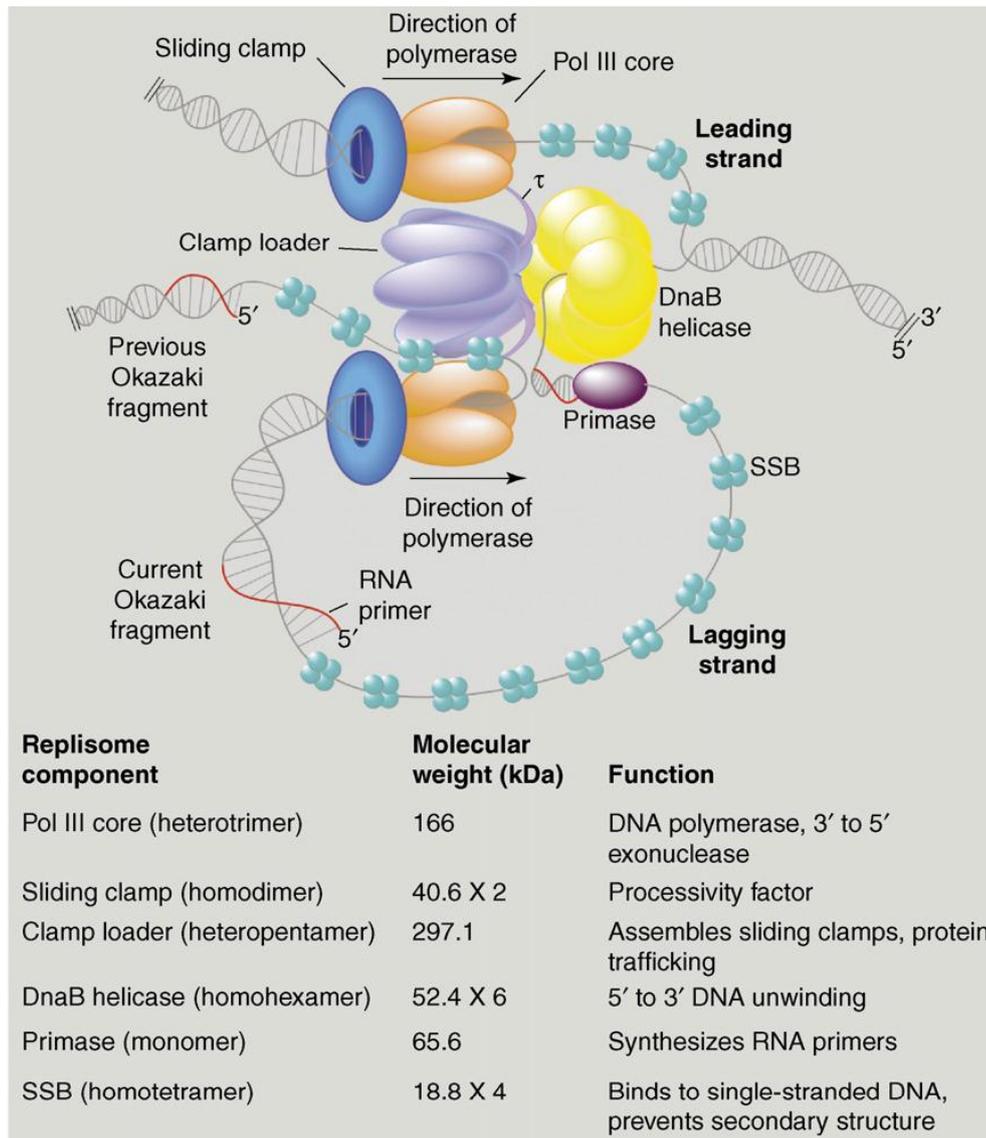


图 1-1 大肠杆菌 DNA 复制工作模式^[5]

表 1-2 大肠杆菌 DNA 复制体亚基组成和构成方式^[6]

Gene	Mass (kDa)	Function	Subassembly	
<i>dnaE</i>	129.9	DNA polymerase] core] PolIII'
<i>dnaQ</i> , <i>mutD</i>	27.5	Proofreading 3'-5' exonuclease		
<i>holE</i>	8.6	Stimulates ϵ exonuclease		
<i>dnaX</i>	71.1	Dimerizes core, DNA-dependent ATPase		
<i>dnaX</i>	47.5	Binds ATP] γ -complex] PolIII*
<i>holA</i>	38.7	Binds to β		
<i>holB</i>	36.9	Cofactor for γ ATPase and stimulates clamp loading		
<i>holC</i>	16.6	Binds SSB		
<i>holD</i>	15.2	Bridge between χ and γ		
<i>dnaN</i>	40.6	Sliding clamp on DNA		



细菌的复制体由 10 多个蛋白构成（图 1.2 和表 1.1）^[5,6]。大肠杆菌的复制体只含有一种 DNA 聚合酶——DNA 聚合酶 III，DNA 聚合酶 III 可以催化核苷酸的聚合反应，形成 DNA 链，细菌基因组前导链和滞后链的复制均由 DNA 聚合酶 III 负责^[6]。

真核生物复制体组成和工作方式与细菌的不尽相同。真核生物的 DNA 复制体构成和主要功能组分见图 1-2^[7]。真核生物 DNA 复制体的 DNA 聚合酶包括 DNA 聚合酶 α 、 ϵ 和 δ ，其中 DNA 聚合酶 δ 负责前导链 DNA 合成，DNA 聚合酶 α 和 ϵ 负责滞后链合成^[8, 9]。DNA 聚合酶 ϵ 和 δ 是多亚基聚合酶，其中聚合酶 ϵ 由 4 个亚基构成，分子量达 300KDa；聚合酶 δ 也由 4 个亚基构成，分子量达 250KDa^[10]。这些亚基分别执行聚合酶、外切酶活性、以及与复制体其他蛋白的相互作用等^[11]。

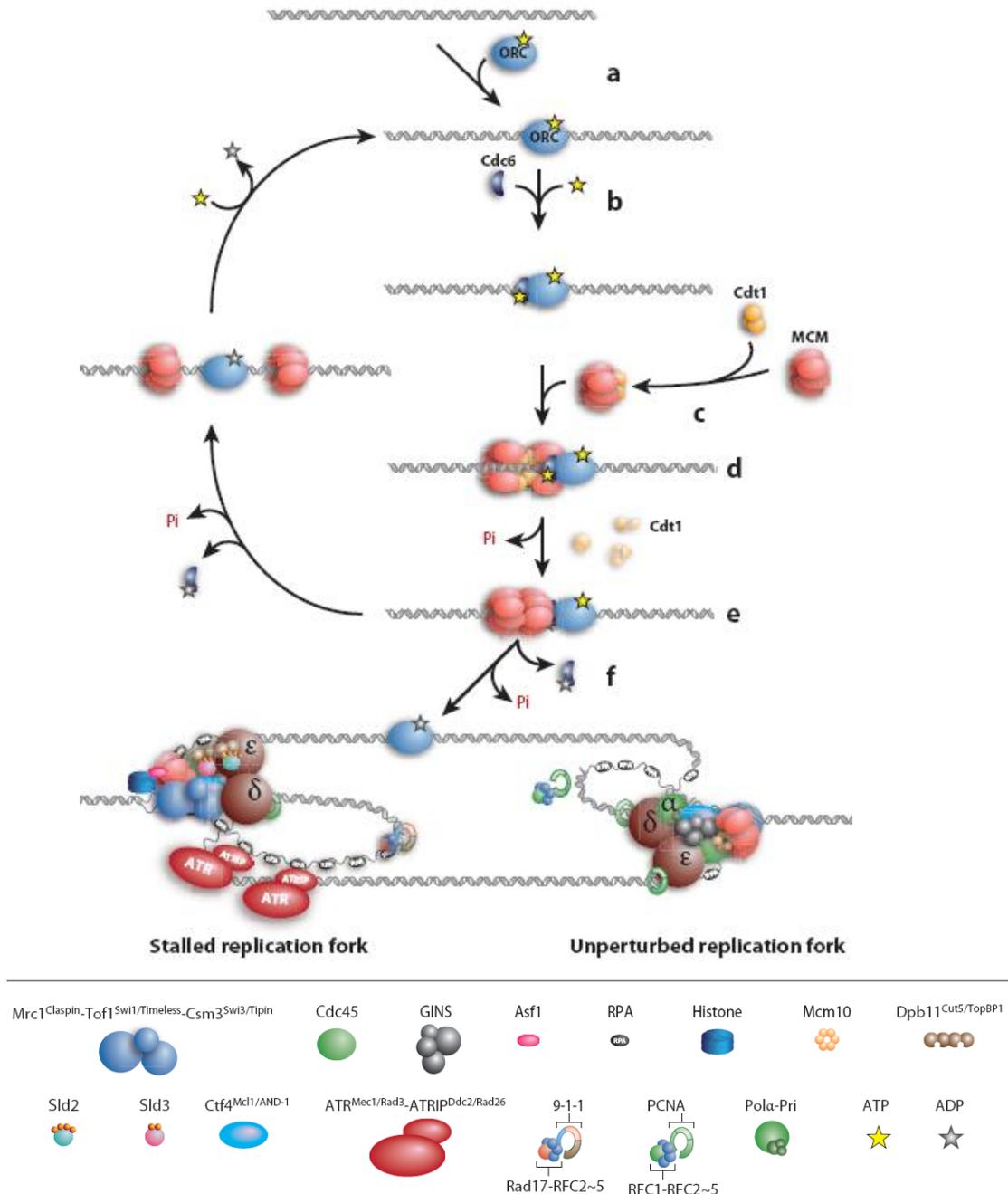


图 1-2 真核细胞 DNA 复制体组成及复制机制^[7]



除催化 DNA 聚合反应的 DNA 聚合酶外, DNA 复制体上还包括其他重要的蛋白组分。其中具有 DNA 3'-5'外切酶活性的校正亚基单位。有的复制体的校正活性是单独的亚基,例如大肠杆菌的复制体的亚基 epsilon 和真核复制体 DNA 聚合酶 δ ^[6,10,11]; 有的复制体的校正活性存在于 DNA 聚合酶亚基上,例如古生菌的 B 型 DNA 聚合酶^[1]。PCNA 是复制体上另一类保守的蛋白亚基,起到让复制沿 DNA 链跨速滑动的功能,防止复制体在复制构成中从 DNA 链上掉下来^[12]。细菌没有 PCNA,而是提供 PCNA 的功能类似物 β 滑动钳实现这一重要功能^[13]。GINS (真核生物和古生菌)是组成复制体的重要亚复合物,负责将复制体中的两个 DNA 聚合酶耦连在一起,使滞后链和前导链的复制同时进行,即使两个 DNA 聚合酶的移动方向相同^[14]。细菌没有 GINS 序列同源物,大肠杆菌的 GINS 功能同源物是 γ & τ 亚基复合物^[15]。

除构成复制体的 DNA 聚合酶外,细胞内还有多种其他的 DNA 聚合酶。其中大肠杆菌还编码 DNA 聚合酶 I、II、IV、V^[16]。真核生物编码 DNA 聚合酶 β , λ 、 μ 、 κ 、 η 、 ζ 、 ϵ 等^[17]。DNA 聚合酶 β 负责 DNA 碱基切除修复中的 DNA 合成, DNA 聚合酶 λ 负责真核生物线粒体 DNA 的复制,而其他的真核生物 DNA 聚合酶负责跨越损伤合成以及与抗体基因的多态性有关。各种 DNA 聚合酶的分子大小差异很大,从只有 39kDa 的 DNA 聚合酶 β ,到由众多亚基构成的大肠杆菌 DNA 聚合酶 III 全酶(其由 20 多个亚基构成,总分子量超过 900kDa)。然而所有的 DNA 聚合酶都有聚合酶活性,除该活性外各种 DNA 聚合酶还带有其他种类酶活性。例如 DNA 聚合酶 I 还具有 DNA 外切酶活性(包括 3'-5'和 5'-3'外切酶活性,其中 3'-5'外切酶活性可以切除错配的核苷酸,提高聚合反应的准确性),RNase H 活性等^[18]。根据 DNA 聚合酶的氨基酸序列和高级结构的异同,众多的 DNA 聚合酶可被归纳为 6 个家族: A、B、C、D、X 和 Y,这些家族在结构和功能上均有自己的特征^[16,17,19]。尽管 DNA 聚合酶有很大的多样性,其核心功能是统一的:催化 dNTP 与 DNA 底物引物链的 3'羟基的连接反应,这种功能上的统一可以反映到活性位点的保守上,比较经典的是聚合酶活性中心的 YxDD 模序^[20]。

1. 3B 家族 DNA 聚合酶介绍

B 家族 DNA 聚合酶广泛存在于古菌、细菌和真核生物三界中,参与细胞的 DNA 复制与修复过程。B 家族 DNA 聚合酶一般由 N 端结构域、3'-5'外切酶结构域、聚合酶结构域和拇指结构域构成,各结构域所具有的功能已从生化实验和晶体结构上得到部分的阐明。然而由于拇指结构域序列上的不保守以及功能上的简单,相关的研究较少。

古生菌编码多种 DNA 聚合酶,例如泉古菌 *A. pernix* 和 *Sulfolobus solfataricus* (*S. solfataricus*)均编码 3 种 B 型 DNA 聚合酶 (B1、B2、B3)^[21,22]。其中 B1 和 B3 亚型具有完整的外切酶和聚合酶结构域,而分子量较小的 B2 亚型只有完整的聚合酶结构域(缺少完整的外切酶结构域)。B1 和 B3 亚型 DNA 聚合酶在体外具有聚合酶和外切酶活性^[22-24]。*S. solfataricus* 的复制起点识别蛋白 Orc1 和 B1 亚型 DNA 聚合酶间存在相互作用,且二者一起结合在基因组复制起点位置,很可能负责基因组复制,同时 Orc1 促进 B1 亚型 DNA 聚合酶的聚合酶和外切酶活性^[24]。最近研究表明 *S. solfataricus* 的 B2 和 B3 亚型 DNA 聚合酶体外具有很弱的聚合酶和外切酶活性,两种活性只有 B1 亚型的 1/1000^[21]。除泉古菌编码 3 种 B 型 DNA 聚合酶外,广古菌也编码一种 B 型 DNA 聚合酶,一般是 B3 型^[26]。

古生菌 B1 和 B3 亚型 DNA 聚合酶,除具有 DNA 聚合酶和外切酶活性外,还可以特异性结合 DNA 中的 dU/dI 碱基(dU 的结合力远高于 dI),造成体外 DNA 合成反应停滞在模板 DNA 中 dU/dI 上游 4-6 个核苷酸处^[27]。在跨越 dU/dI 碱基能力方面,体外引物延伸结果显示 *S. solfataricus* 的 B1 亚型不能跨越 dI、dU, B2 亚型可以跨越 dI、dU, B3 亚型可以



跨越 dI^[25]。这一结果也暗示 B1 和 B3 亚型具有 dU 结合活性，而 B2 亚型没有 dU 结合活性。*Pyrococcus furiosus* B 型 DNA 聚合酶（后简称 Pfu DNA 聚合酶）（属于 B3 亚型）N 端的一个 dU 结合袋，已解析的 Tgo DNA 聚合酶与 dU 损伤 DNA 的共结晶三维结构展现了古生菌 B 型 DNA 聚合酶识别 dU 的结构基础（图 1-3）^[27, 28]

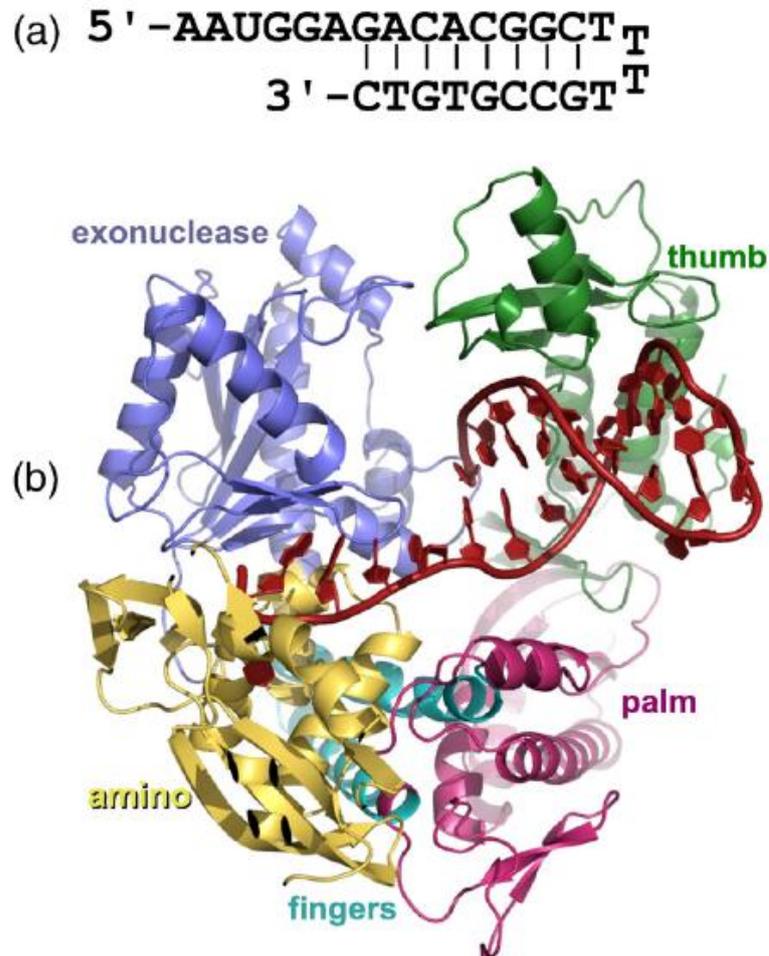


图 1-3 Tgo DNA 聚合酶识别 dU 三维结构图^[28]

主要负责结合 dU 碱基，构成结合袋的保守氨基酸残基（Y7, P36, Y37, P90, V93, R97, I114, F116, R119, D123）的突变会导致 Pfu DNA 聚合酶丧失 dU 结合能力，使其可以跨越 dU 损伤合成 DNA^[28]。推测古菌 B1 和/或 B3 亚型 DNA 聚合酶的 dU 结合特性有着重要的生物学意义^[27, 28]。推测 Pfu DNA 聚合酶的 dU 碱基结合特性可能是已知的所有古菌 B 型（B1 亚型和/或 B3 亚型）DNA 聚合酶的共性，可能负责监测基因组的 dU 损伤，进而与尿嘧啶 DNA 糖苷酶（uracil DNA glycosylase, UDG），内切核酸酶 IV、PCNA 等共同完成 dU 损伤修复^[29, 30]。同时古菌 B 型 DNA 聚合酶的 dU 结合活性还可能起到在模板 DNA 的 dU 损伤未被修复好的情况下，防止在基因组复制过程中掺入 dU/dA 配对碱基，造成突变 G:C-A:T 的功能。

古生菌编码的 DNA 聚合酶除 B 型 DNA 聚合酶外，还包括 D 型 DNA 聚合酶。其中广古菌编码 B 型和 D 型 DNA 聚合酶；泉古菌编码 3 种不同的 B 型 DNA 聚合酶。polB 和 polD 的酶学特征存在很大差异。B 型 DNA 聚合酶的聚合酶和外切酶以及 dU 结合活性存在于一条多肽链，而 D 型 DNA 聚合酶由 2 条异源多肽链构成，大亚基具有聚合酶活性，小亚基具



有外切酶活性，两个亚基共同作用表现出外切酶和聚合酶活性^[31-32]。体外酶学鉴定结果表明 D 型 DNA 聚合酶可以利用 RNA 引物进行 DNA 合成，而 B 型 DNA 聚合酶不能利用 RNA 引物^[32]。鉴于这些数据都是体外生化数据，因此到底哪一个 DNA 聚合酶负责古生菌的基因组 DNA 复制仍然未知。

大肠杆菌 DNA 聚合酶 II 也属于 B 型 DNA 聚合酶，应该是 B 型 DNA 聚合酶的原型，其具有 DNA 聚合酶、DNA 3'-5'外切酶活性^[33]。除了大肠杆菌 DNA 聚合酶外，一些病毒和噬菌体的 DNA 聚合酶也属于 B 型 DNA 聚合酶，例如 T4、RB69、Phi29 等噬菌体^[34-36]，这些噬菌体编码的 B 型 DNA 聚合酶同样具有 DNA 聚合酶和 3'-5'外切酶活性。T4 噬菌体编码的 B 型 DNA 聚合酶主要功能是，与其他辅助蛋白 gp45, gp61 等一起，复制基因组 DNA。T4 噬菌体的 B 型 DNA 聚合酶催化的基因组 DNA 复制过程见图 1-4。

Phi29 噬菌体的基因组是线性 DNA 分子，因此在复制过程中如何保证复制的子代线性 DNA 分子的长度不被缩短是 Phi29 噬菌体必需解决的问题。Phi29 噬菌体通过末端蛋白 (terminal protein) 很好的解决了这一问题^[37]。末端蛋白是一个 Phi29 噬菌体特异性的 DNA 复制辅助蛋白，末端蛋白可以与 Phi29 DNA 聚合酶特异性相互作用，同时该相互作用受 DNA 底物和其他 DNA 复制辅助蛋白的调控，另外末端蛋白的特定 Ser 残基的游离羟基可以引发 DNA 聚合反应。在基因组复制时，Phi29 DNA 聚合酶与末端结合蛋白一起解决基因组末端 DNA 复制问题。在复制起始阶段末端蛋白与 DNA 聚合酶形成复合物，一起结合在线性 DNA 的末端，由末端蛋白 Ser 残基的羟基作为起始基团，在模板链的指导下开始聚合 DNA 分子，然后聚合到 6 个左右核苷酸后，末端蛋白从 DNA 聚合酶催化高前进性 DNA 复制反应，最终合成一条完整的 DNA 子链分子。

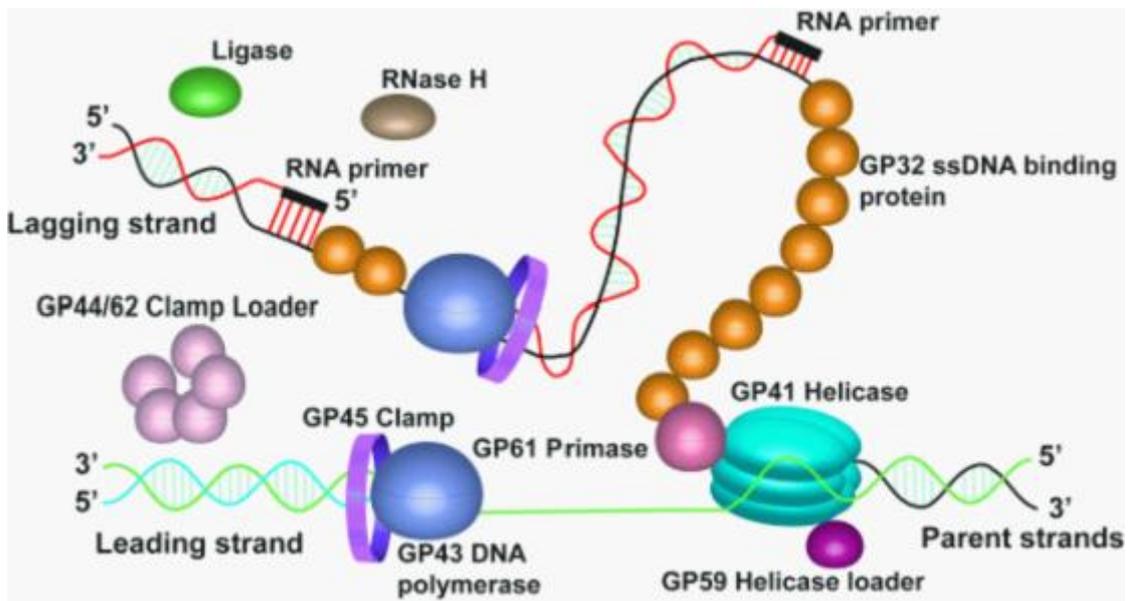


图 1-4 T4 噬菌体的 DNA 复制体组成和工作模式^[64]

1.4 拇指结构域的调控作用

迄今为止，已经解析了众多 DNA 聚合酶的晶体结构和聚合酶-底物共结晶结构^[38-43]。这些晶体结构给我们提示了详细精确的酶促反应机理。基本上所有的聚合酶结构域均采用经典的手指-手掌结构，手指结构结合 dNTP，手掌结构结合 DNA 模板。其中各种 Klenow 片断的晶体结构解析的最早，也最清楚。Klenow 片断属于 A 型 DNA 聚合酶，保留了 DNA 聚



合酶 I 的聚合酶和外切酶结构域，而缺失了 N 端 RNase H 结构域（5'-3'外切酶结构域）。Taq DNA 聚合酶 Klenow 片断的三维结构表明 3 个正电荷残基（Arg659, Lys663, Arg587）和 2 个极性氨基酸残基（His639 and Gln613）负责结合 4 种 dNTP^[38]。TaqDNA 聚合酶全酶结构显示，全酶的 Klenow 片断与大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片断基本上相似，但 Taq DNA 聚合酶的 3'-5'外切酶结构域缺少了两个负电荷氨基酸残基，因此没有外切酶活性；同时 N 端的 5'-3'外切酶结构域具有多个天冬氨酸和谷氨酸残基负责结合二价金属离子^[39]。Taq DNA 聚合酶与 DNA 共结晶结构显示，存在一段同时被外切酶和聚合酶结合的 DNA 共同序列^[40]。DNATaq 同时晶体结构还揭示了 Taq DNA 聚合酶的热稳定性机制^[41]。

已解析的 B 型 DNA 聚合酶的晶体结构种类涵盖各种噬菌体、病毒、古生菌、细菌等。Phi29、T4、RB69 噬菌体的 B 型 DNA 聚合酶及其复制蛋白复合物的晶体结构揭示了噬菌体 DNA 聚合酶高前进性复制基因组的分子机制，特别是 Phi29 的 DNA 复制机制^[44-46]。对古生菌而言，火球菌属的 B 型 DNA 聚合酶的晶体结构被研究的最多，已解析的结构包括 KOD DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶、Tgo DNA 聚合酶、9 N7 DNA 聚合酶等^[47-50]。这些结构解释了古菌 B 型 DNA 聚合酶的聚合酶和外切酶的具体反应机制，关键氨基酸残基的作用机理，以及如何协调聚合酶和外切酶两个结构域间的通讯机制。

B 型 DNA 聚合酶（大肠杆菌 DNA 聚合酶 II）和 A 型 DNA 聚合酶（大肠杆菌 DNA 聚合酶 I）均具有完整的 3'-5'外切酶结构域和聚合酶结构域，而且二者在空间上彼此分离（距离 30-40）。其中外切酶结构域执行 DNA 的 3'-5'水解反应。聚合酶结构域由手指、手掌、拇指三个亚结构域构成（图 1-5）^[38-50]，这一亚结构域组成模式也是大多数复制型 DNA 聚合酶的经典组成方式。其中手指结构负责结合 dNTP 分子，手掌结构结合模板链和新合成链的 3'末端，手指和手掌结构是聚合酶活性的必需结构域，任一结构的破坏都造成聚合酶活性的丧失。然而拇指结构域由于处在整个聚合酶结构域的外侧，形成一个相对独立的结构，因此对聚合酶活性的影响较小。同时可以看出拇指结构域，特别是拇指-2，与外切酶结构域在空间上距离较近。

虽然 B 型 DNA 聚合酶的外切酶和聚合酶结构域在空间上彼此分离，然而众多酶学数据和聚合酶-DNA 共结晶结构数据表明，聚合酶和外切酶结构域的活性是高度耦合的。那么，哪一段氨基酸序列负责聚合酶和外切酶间的通讯呢？现有研究发现处于拇指结构域很可能参与这一调控过程。KOD 晶体结构（图 1-5）显示拇指结构域与外切酶和聚合酶核心结构域（手指和手掌结构）间均存在相互作用残基，这些残基间的相互作用调控 DNA 分子与聚合酶和外切酶结构域的结合模式，从而实现聚合酶和外切酶的协调作用，完成高度忠实的 DNA 复制^[51, 52]。已有数据表明若删除 Phi29 DNA 聚合酶的 C 端拇指结构域（13 个氨基酸）不仅影响聚合酶活性，同时还影响外切酶活性^[53, 54]。这一结果表明拇指结构域参与聚合酶和外切酶两个结构域催化的反应，可能对两种活性起着调控作用。B 型聚合酶的 3'-5'外切酶结构域与 A 型 DNA 聚合酶 N 端的 5'-3'外切酶结构域不同，单独的 3'-5'外切酶结构域不能消化 DNA 分子，而 A 型 DNA 聚合酶的 5'-3'外切酶结构域可以很好的消化 DNA 分子，不依赖于其他两个结构域的存在。A 型 DNA 聚合酶的 5'-3'外切酶结构域与 B 型 DNA 聚合酶的 3'-5'外切酶结构域的这一差别可能是二者在整条 DNA 聚合酶多肽链上的相对位置决定的。A 型 DNA 聚合酶 N 端的 5'-3'外切酶结构域相对独立，因此活性受下游的外切酶和聚合酶结构域的影响较小，而 3'-5'外切酶结构域可能与 N 端结构域和聚合酶结构域距离较近，活性受两侧结构域影响较大。



1.5 课题研究内容和科学意义

为了进一步阐明 B 型 DNA 聚合酶拇指结构域的在外切酶和聚合酶活性中的功能, 以及确定拇指结构域上关键氨基酸残基的贡献程度, 我们计划对 *Pyrococcus furiosus* 的 B 型 DNA 聚合酶 (Pfu DNA 聚合酶) 的拇指结构域作一精细的氨基酸突变分析。通过鉴定突变体蛋白的 dU 结合、外切酶、聚合酶活性, 来阐明拇指结构域在 3 种活性中的具体功能, 加深对 B 型 DNA

聚合酶拇指结构域酶功能的认识。研究结果对其他多功能 DNA 聚合酶 (例如 A 型 DNA 聚合酶) 的活性调控起到借鉴作用。

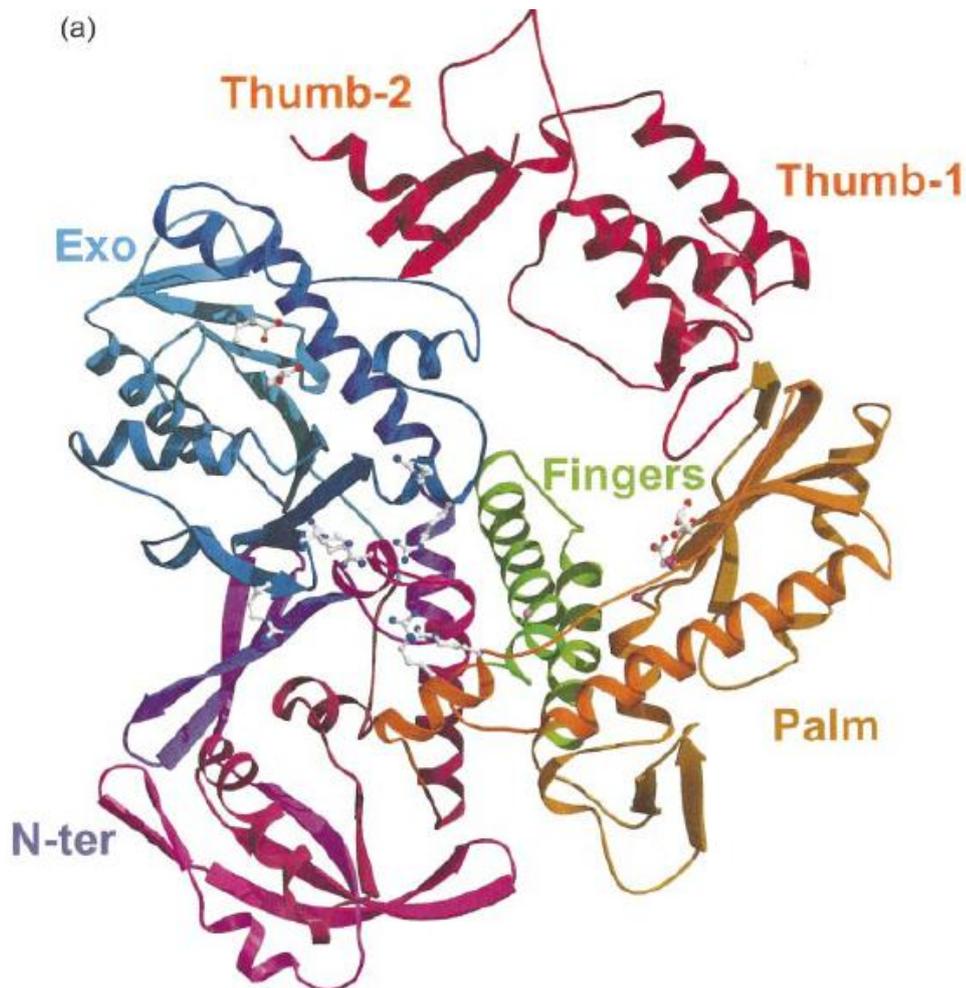


图 1-5 古生菌 KOD DNA 聚合酶的结构和结构域组织方式^[46]



第二章 *Pyrococcus furiosus* B 型 DNA 聚合酶拇指结构域突变体蛋白的设计与制备

2.1 摘要

为了研究拇指结构域在 Pfu DNA 聚合酶中所行使的具体功能,我们参考相关晶体结构,选取了 6 个氨基酸残基作为考察对象,这些氨基酸残基主要是可能参与与 DNA 相互作用的碱性氨基酸残基。利用基因克隆技术,构建了野生型 Pfu DNA 聚合酶和拇指结构域完全缺失的截断突变体,同时利用氨基酸定点突变技术构建了拇指结构域 6 个氨基酸残基的单一点突变和多点组合突变共计 8 个突变体。通过对重组表达和 Ni²⁺亲和纯化的优化,我们最终获得了高纯度的野生型及多种突变体蛋白,蛋白浓度达 1.5mg/ml,野生型蛋白聚合酶活性为 50U/mg。制备的 Pfu DNA 聚合酶,特别是突变体蛋白,为进一步的拇指结构域功能研究提供了材料基础。

2.2 简介

Pfu DNA 聚合酶首次发现于 *Pyrococcus furiosus* 体内^[55],之后由于其良好的热稳定性以及 DNA 聚合过程的高保真性,其被应用于 PCR 及多种 PCR 衍生技术^[55, 56]。并且在该聚合酶的基础上,通过工程改造已获得多种具有良好特性的新型 DNA 聚合酶,如 PfuUltra 等。

基于 Pfu DNA 聚合酶的经济价值,如何获得大量高纯度高活性的 Pfu DNA 聚合酶一直是值得探究的问题。在原核表达过程中,一般会遇到蛋白对宿主造成的毒性以及由于自身密码子偏好而造成的表达量低的问题,针对这些问题,各种表达菌株被开发出来,例如 BL21 (DE3) pLysS、Rosetta (DE3) 等。然而由于蛋白表达的复杂性,在进行原核表达过程中仍会出现表达量低与不稳定的情况存在。

为了对 Pfu DNA 聚合酶的拇指结构域进行探究,能够稳定表达该蛋白的方案是进行之后研究的前提。在本章中,我们探究了进行原核表达 Pfu DNA 聚合酶的诱导条件和纯化条件,最终获得了一套稳定的表达纯化方案,使得同一批制备过程能够获得基本相同的大量的蛋白,为下一章的实验提供基本的实验材料。

2.3 材料与方法

2.3.1 菌株与质粒

实验中基因克隆使用本实验室的 DH5 α 菌株,蛋白表达使用的表达载体 pET28a 及表达菌株 BL21(DE3) pLysS 购自于 Novagen。

2.3.2 感受态细菌的制备与质粒转化

(1) 感受态细菌的制备

- 1) 细菌活化。取冻存的菌株于 LB 平板上划线,37°C 恒温箱中倒置过夜培养;
- 2) 挑取划线平板上的单菌落,接种于 100ml LB 培养基中 37°C 摇床 120rpm 振荡培养至 OD₆₀₀ 约 4.0 左右,冰浴 15min;
- 3) 4°C, 5000rpm 离心收集菌体;
- 4) 用预冷灭菌的 50mM CaCl₂ 20ml 重悬菌体,于冰上静置 20min;



- 5) 4°C, 5000rpm 离心收集菌体;
- 6) 用预冷灭菌的 50mM CaCl₂ 10%甘油 5ml 重悬菌体, 以每管 100ul 分装, 每 100ul 感受态可做一次化学转化。

(2) 质粒转化

- 1) 取冻存的质粒和感受态于冰上解冻;
- 2) 取适量的质粒溶液加入感受态细胞中, 轻微混匀后冰上静置 30min;
- 3) 将感受态细胞置于 37°C 水浴 2min 后立即取出置于冰上静置 5min;
- 4) 加入 1ml 新鲜的 LB 培养基, 于 37°C 水浴 1h;
- 5) 8000rpm 离心 3min 收集菌体, 弃上清约 900ul 后重悬菌体, 取适量的菌液涂布于带有相应抗性的 LB 平板上正放 1h, 待培养基表面液体吸收后倒置放置于 37°C 恒温箱中培养 12h-16h。

2.3.3 载体构建

(1) 基本技术

A 质粒的小量提取

使用天根质粒小提试剂盒 (DP104) 进行提取, 步骤如下:

- 1) 柱平衡步骤: 向吸附柱 CP3 中 (吸附柱放入收集管中) 加入 500ul 的平衡液 BL, 12000rpm 离心 1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中;
- 2) 取 1-5ml 过夜培养的菌液加入离心管中, 12000 离心 1min, 尽量吸除上清;
- 3) 向留有菌体的离心管中加入 250ul 溶液 P1, 悬浮菌体;
- 4) 向离心管中加入 250ul 溶液 P2, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解;
- 5) 向离心管中加入 350ul 溶液 P3, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀, 此时出现白色絮状沉淀。12000rpm 离心 10min, 将上清移至吸附柱中, 避免吸起沉淀;
- 6) 12000 离心 1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中;
- 7) 向吸附柱中加入 600ul 漂洗液 PW, 12000rpm 离心 1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中;
- 8) 重复步骤 (7);
- 9) 将吸附柱放回收集管中, 12000rpm 离心 2min 去除残留液体;
- 10) 将吸附柱置于干净的离心管中, 向吸附柱中心滴加 50ul 灭菌水, 静置 2min 后 12000rpm 离心 2min。

B PCR 扩增片段、鉴定及点突变

- 1) 按如下配制体系

10x KOD Buffer (Mg ²⁺ free)	5ul
MgSO ₄ (25mM)	5ul
dNTPs (2.5mM)	5ul
KOD plus (1U/ul)	1ul
模板 (基因组、质粒或菌液)	1ul
引物 F	10pmol
引物 R	10pmol
加灭菌水至	50ul

在配置好的反应体系中加入适当的石蜡油液封;



2) 设置循环:

94°C	5min	} 30 循环
94°C	30sec	
Tm-5°C	30sec	
68°C	30sec/kb	
68°C	5min	
22°C	10min	

反应结束后可按照 2.3.3 (1) C 所述进行纯化、加入 10ul 6xDNA loading buffer 后电泳或加入 1ul DpnI 消化模板质粒。

C DNA 纯化

使用天根 DNA 纯化试剂盒 (DP204) 进行提取, 步骤如下:

- 1) 柱平衡步骤: 向吸附柱 CP3 中 (吸附柱放入收集管中) 加入 500ul 的平衡液 BL, 12000rpm 离心 1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中;
- 2) 估计 DNA 溶液体积, 加入 5 倍体积结合液 PB, 充分混匀;
- 3) 将上一步所得溶液加入吸附柱中, 静置 2min 后 12000rpm 离心 1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中;
- 4) 向吸附柱中加入 600ul 漂洗液 PW, 12000rpm 离心 1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中;
- 5) 重复步骤 (4);
- 6) 将吸附柱放回收集管中, 12000rpm 离心 2min 去除残留液体;
- 7) 将吸附柱置于干净的离心管中, 向吸附柱中心滴加适量灭菌水, 静置 2min 后 12000rpm 离心 2min。

D 酶切反应

- 1) 按如下描述配制体系

10x FastDigest Buffer	5ul
DNA 溶液	40ul
FastDigest Enzyme	1-2ul
加灭菌水至	50ul

将反应体系置于 37°C 水浴 6h;

- 2) 按照 2.3.3 (1) C 中所述纯化酶切产物, 最终溶于 40ul 灭菌水中。

E 连接反应

- 1) 按如下描述配制体系

10x T4 ligase Buffer	1.5ul
50%PEG4000	1.5ul
DNA 片段	4ul
质粒骨架片段	2ul
T4 DNA ligase	1ul
加灭菌水至	15ul



将反应体系置于 22℃ 水浴 3h;

- 2) 按照 2.3.2 (2) 所述将连接产物全部转化 DH5α 感受态细胞;
- (2) Pfu DNA 聚合酶野生型及截断突变体表达载体构建
 - 1) 按照 2.3.3.1.2 所述使用引物: F 5'-CCCCCCATATGATTTTAGATGTGGATTAC-3'
R 5'-CCCCCCTCGAGTCAGGATTTTTTAATGTTAAGC-3' (扩增野生型全长)
/5'-CCCCCCTCGAGCTACTCTAAACCACGAGTAATG-3' (扩增截断体) 从 *Pyrococcus furiosus* 基因组上扩增编码 Pfu DNA 聚合酶的基因 PF0212 及其截断体, 片段根据 2.3.3(1)C 所述纯化后按照 2.3.3(1)D 使用 NdeI 和 XhoI (Fastdigest®, Fermentas) 酶切后再次纯化备用;
 - 2) 按照 2.3.3 (1) A 所述提取质粒 pET28a, 之后按照 2.3.3 (1) D 使用 NdeI 和 XhoI (Fastdigest®, Fermentas) 酶切后再次纯化备用;
 - 3) 按照 2.3.3 (1) E 所述连接片段 PF0212 及骨架 pET28a, 使用 Kana 抗性 LB 平板筛选正确克隆;
 - 4) 按照 2.3.3 (1) B 对平板上克隆进行菌液 PCR 鉴定, 结果通过电泳确定是否有目标条带, 鉴定正确的质粒进行测序。
- (3) 拇指结构域点突变体表达载体的构建
 - 1) 根据 2.3.3 (1) A 所述提取带有 PF0212 片段的质粒, 按照 2.3.3 (1) B 所述使用如下引物 (表 2-1) 进行 PCR 反应, 突变相应位点;

表 2-1 点突变所使用引物

引物序列	突变描述
5'-GGTTTAGAGATAGTTGCGAGAGATTGGAGT-3'	613Arg 突变为 Ala
5'-ACTCCAATCTCTCGCAACTATCTCTAAACC-3'	
5'-TATGAGCAGATAACAGCGCCATTACATGAGTAT-3'	669Arg 突变为 Ala
5'-ATACTCATGTAATGGCGCTGTTATCTGCTCATA-3'	
5'-CCATTACATGAGTATGCGGCGATAGGTCC-3'	675Lys 突变为 Ala
5'-GGACCTATCGCCGCATACTCATGTAATGG-3'	
5'-TCCAGCGGTACTTTCGATATTGGAGGGAT-3'	744Arg 突变为 Ala
5'-ATCCCTCCAATATCGCAAGTACCGCTGGA-3'	
5'-AGGGATTTGGATACGCGCGGAAGACCTCAGA-3'	752Arg, 753Lys 突变为 Ala
5'-TCTGAGGTCTTCCGCCGCGTATCCAAATCCCT-3'	

- 2) 反应结束后在体系中加入 1ul DpnI (Fermentas) 37℃ 消化 5h;
- 3) 取消化后的体系 10ul 按照 2.3.2 (2) 所述转化 DH5α 感受态细胞, 使用 Kana 抗性 LB 平板筛选克隆;
- 4) 按照 2.3.3 (1) A 所述提取上一步中长出的克隆的质粒, 按照 2.3.3 (1) B 进行 PCR 鉴定, 确定带有 PF0212 全长片段后, 进行测序确定突变是否成功;



- 5) 在上一步构建成功的质粒基础上，重复步骤（1）-（4）至以下几个多点突变构建成功：R669A 和 K675A、R613A 和 R744A 的双点突变体，以及 4 个氨基酸残基的全点突变体。

2.3.4 重组蛋白制备

（1）蛋白的诱导表达

- 1) 按照 2.3.2（2）所述转化 2.3.3 中构建成功的质粒于 BL21（DE3）pLysS 菌株感受态细胞，以 Kana 和 Cm 抗性 LB 平板筛选阳性克隆；
- 2) 挑取上一步的阳性克隆接种于 100ml 含 Kana 和 Cm 抗生素的 LB 培养基中 37℃ 培养过夜（OD 大于 2）；
- 3) 将上一步菌液全部接种于 400ml 新鲜的 LB 培养基中，加入 IPTG 至终浓度 0.5mM，37℃ 诱导 3h-5h；
- 4) 8000rpm 离心 5min 收集上一步菌体，收集好的菌体置于 -80℃ 冰箱冻存备用。

（2）带 His 标签 Pfu DNA 聚合酶亲和纯化

- 1) 将 -80℃ 冻存的菌体置于冰上解冻，解冻后用 20mM Tris-HCl pH 8.0, 300mM NaCl, 20% 甘油的裂解液重悬；
- 2) 将重悬菌液超声破碎至菌液澄清，11000rpm 离心 1h 后保留上清；
- 3) 将上一步上清置于 75℃ 水浴中 30min，11000rpm 离心 15min 除去变性蛋白，保留上清；
- 4) 将上清过使用裂解液平衡过 1h 的 Ni-NTA 柱进行亲和层析；
- 5) 用成分为 20mM Tris-HCl pH 8.0, 300mM NaCl, 5mM 咪唑, 20% 甘油的洗涤液 40ml 对柱体进行洗涤；
- 6) 用成分为 20mM Tris-HCl pH 8.0, 300mM NaCl, 200mM 咪唑, 20% 甘油的洗脱液洗脱结合在柱子上的蛋白；
- 7) 将洗脱的蛋白置于透析袋中于 20mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM KCl, 50% 甘油的储存液中透析 5h，透析后的蛋白溶液置于 -20℃ 进行保存。

（3）SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度

- 1) 使用干净的玻璃板置入夹具中夹紧，并放置于置胶架上，加入一定量的水确保底部密封后倒尽加入的水；
- 2) 按如下体积配制 12% 分离胶 8.0 ml，混匀；

ddH ₂ O	2.6ml
1M Tris-HCl pH 8.8	2.1ml
30% Acryl:Bis 29:1	3.2ml
10% SDS	80ul
10% AP	56ul
TEMED	6ul

- 3) 向玻璃板间灌制分离胶，立即覆一层重蒸水，大约 20 min 后胶即可聚合；

- 4) 按如下体积配制 6% 浓缩胶 3.0 ml，混匀；

ddH ₂ O	2ml
1M Tris-HCl pH 6.8	400ul
30% Acryl:Bis 29:1	600ul
10% SDS	36ul
10% AP	24ul
TEMED	4ul



- 5) 将上层重蒸水倾去，滤纸吸干，灌制浓缩胶，插入样品梳；
- 6) 装好电泳系统，加入电极缓冲液，上样 10 ul；
- 7) 稳压 200V，溴酚蓝刚跑出分离胶时，停止电泳，约需 45 min~1hr；
- 8) 卸下胶板，剥离胶放入染色液中，室温染色 1~2 hr；加入脱色液，置于 80 rpm 脱色摇床上，每 20 min 更换一次脱色液（10 ml 冰乙酸；45 ml 乙醇；45 ml 蒸馏水）至完全脱净。

(4) 野生型 Pfu DNA 聚合酶聚合活性测定

利用 Fermentas 公司的商品 Pfu DNA 聚合酶作为阳性对照，倍比稀释商品酶和我们制备的 Pfu DNA 聚合酶，按照 2.3.3 (1) B 所述用引物 F 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3' R 5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'，pET28a 作为模板进行 PCR 反应扩增 T7 操纵子。通过对比扩增产量，以商品酶作为参照，确定纯化的野生型 Pfu DNA 聚合酶的聚合酶比活性。

2.4 结果

2.4.1 拇指结构域及 DNA 相互作用残基的确定

以 B family 的 E.coli DNA 聚合酶 II 的晶体结构为模板^[33]，与 Pfu DNA 聚合酶相对比^[48]，如图 2-1 所示，确定 Pfu DNA 聚合酶 C 端的 611-775 残基构成其拇指结构域。

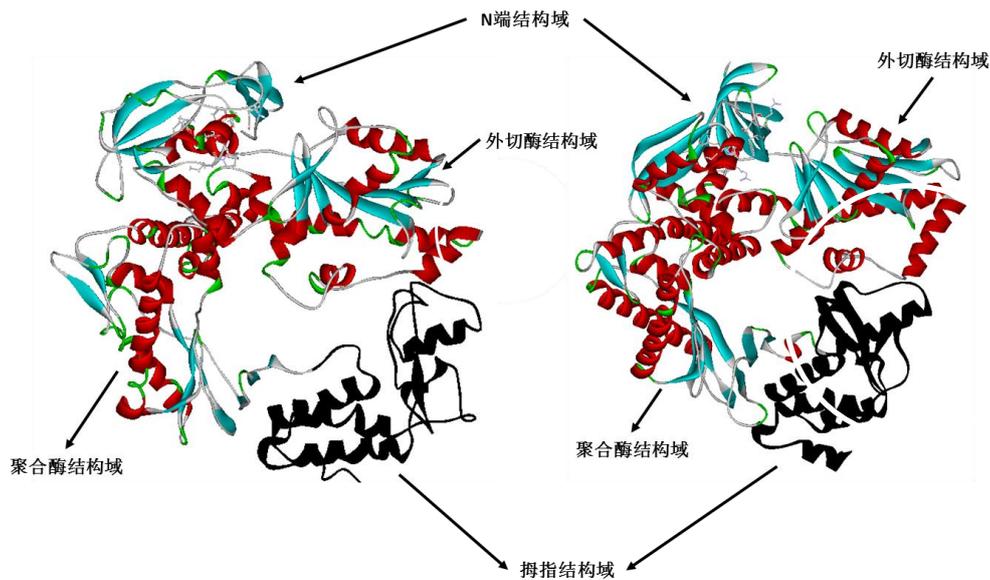


图 2-1 B 型 DNA 聚合酶三维结构图

右图所示为 E. coli DNA 聚合酶 II (PDB ID: 3K57)，左图所示为 *Pyrococcus furiosus* DNA 聚合酶 (PDB ID: 3A2F)，图中箭头所示各结构域，黑色部分所示为 C 端拇指结构域。

同样以 B family 的 E.coli DNA 聚合酶 II 与双链 DNA 共结晶结构^[33]作为模板，与 Pfu DNA 聚合酶相对比，如图 2-2 所示。

通过对 E. coli 和 Pfu DNA 聚合酶三维结构，DNA 共结晶数据的比对，确定了 Pfu DNA 聚合酶拇指结构域上可能参与 DNA 相互作用的主要氨基酸残基(表 2-2)。

2.4.2 表达载体构建

使用经典的限制性酶切和 DNA 连接反应技术，PCR 定点突变技术，成功构建了用以表达以下蛋白的表达质粒：野生型 Pfu DNA 聚合酶、C 端缺失 165 个残基的拇指结构域截断突变体，R613A、R669A、K675A、R744A 的单点突变体，R752A 和 K753A、R669A 和 K675A、



R613A 和 R744A 的双点突变体，以及 4 个氨基酸残基的全点突变体。经 DNA 测序表明野生型、截短体、点突变的表达载体的基因序列和读码框架正确。构建正确的表达质粒名称与所表达的蛋白如表 2-2 中所示。

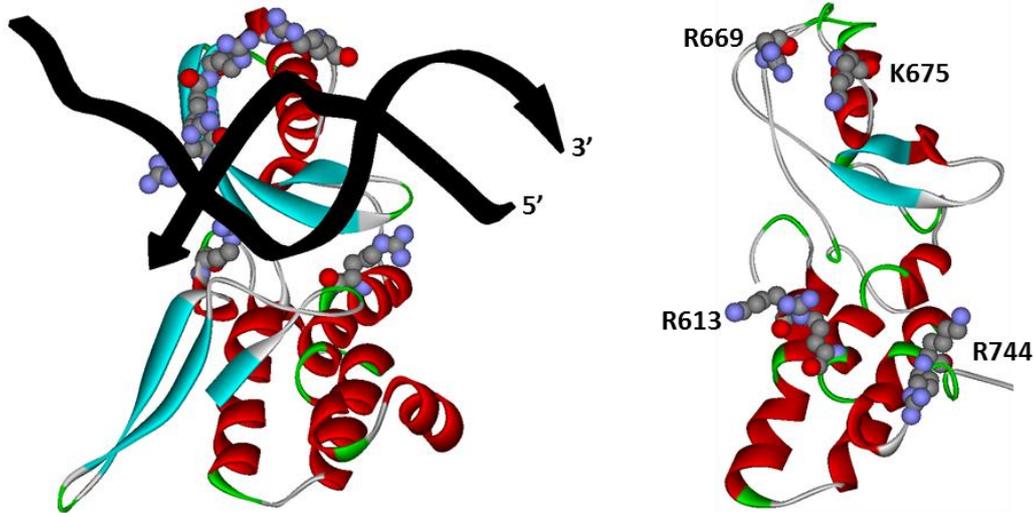


图 2-2 B 型 DNA 聚合酶和 DNA 相互作用结构图

左侧图所示为 *E. coli* DNA 聚合酶 II (PDB ID: 3K57) C 端拇指结构域与双链 DNA 共结晶结构，黑色部分为 DNA 双螺旋结构箭头所示为 5' 至 3' 方向，图中以球棍模型所示为与 DNA 相互作用的残基；右侧图为 *Pyrococcus furiosus* DNA 聚合酶 (PDB ID: 3A2F) 的 C 端拇指结构域，图中以球棍模型所示为可能与 DNA 相互作用的残基。

表 2-2 表达质粒名称及所表达蛋白描述

表达质粒名称	蛋白描述
pET-WT	野生型 Pfu DNA 聚合酶
pET-ΔC-165	C 端缺失 165 个残基
pET-R613A	613Arg 突变为 Ala
pET-R669A	669Arg 突变为 Ala
pET-K675A	675Lys 突变为 Ala
pET-R744A	744Arg 突变为 Ala
pET-R752A-K753A	752Arg, 753Lys 突变为 Ala
pET-R613A-R744A	613, 744Arg 突变为 Ala
pET-R669A-K675A	669Arg, 675Lys 突变为 Ala
pET-R613A-R669A-K675A-R744A	613Arg, 669Arg, 675Lys, 744Arg 突变为 Ala

2.4.3 重组蛋白制备

首先将构建的表达质粒转化表达菌株 BL21 (DE3) pLysS，挑取单克隆进行扩大培养，并通过 IPTG 诱导目的蛋白表达。由于构建的蛋白均带有 6xHis 标签，因此使用 Ni-NTA 进行亲和纯化，获得了高纯度的目的蛋白。通过 SDS-PAGE 鉴定其纯度和浓度，如图 2-3 所示，测得其浓度均为 1.5mg/ml。

制备的高纯度蛋白经透析到保存液 (20mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM KCl, 50% 甘油) 后，保存在 -20 度，用于之后多种酶活性的测定。

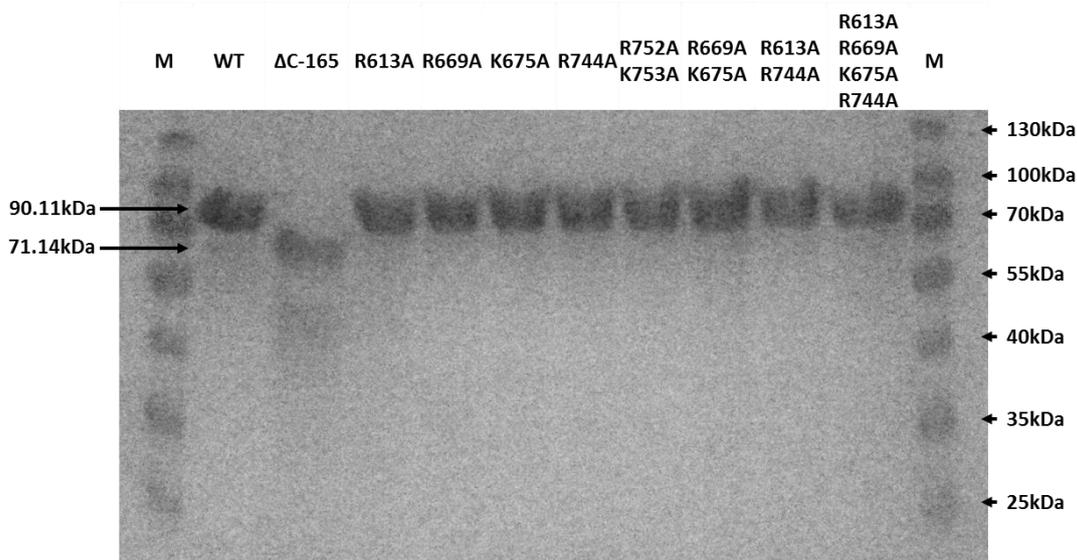


图 2-3 实验所需各蛋白 SDS-PAGE 图

取透析后的蛋白加入蛋白上样 buffer 经处理后进行 SDS-PAGE 电泳, 图中上部标示出各甬道样品名称, 箭头指示出相应条带大小。

2.4.4 野生型 Pfu DNA 聚合酶聚合酶活性测定

由于突变体的多种酶活性质尚未确定, 因此通过对同批次纯化的野生型 Pfu DNA 聚合酶的聚合酶活性进行测定, 以确定制备的蛋白的活性。使用 Fermentas 公司出品的商品 Pfu DNA 聚合酶作为阳性对照, 对纯化的野生型 Pfu DNA 聚合酶经不同倍数稀释后, 进行 PCR 反应, 测得该批次纯化获得的野生型 Pfu DNA 聚合酶的聚合酶为 50U/mg。该结果表明制备的蛋白可用于进一步的外切酶、聚合酶、dU 结合活性等测定。

2.5 讨论

已有的多种 B 家族 DNA 聚合酶与 DNA 的共结晶结果, 直接揭示了聚合酶结合 DNA 状态下的构象以及与 DNA 相互作用的氨基酸残基^[33, 35, 37, 44]。然而比较这些结构可以发现拇指结构域上与 DNA 相互作用的氨基酸残基并不保守, 因此我们在选取拇指结构域上的突变位点时直接关注的是氨基酸的空间位置与其带电情况。大肠杆菌 DNA 聚合酶 II 同样属于 B 家族 DNA 聚合酶, 虽然在序列上与 Pfu DNA 聚合酶的同源性不高, 但由晶体结构图 2-1 和 2-2 中可以看出, 其空间结构与 Pfu DNA 聚合酶有着极高的相似性。参照大肠杆菌 DNA 聚合酶 II 与 DNA 的共结晶结构, 我们在 Pfu DNA 聚合酶拇指结构域的对应该位置寻找与 DNA 相互作用的相关氨基酸残基, 考虑到相关残基很可能与 DNA 骨架上带负电荷的磷酸基团相互作用, 我们选取了 R613、R669、K675、R744、R752 和 K753 等带正电荷的氨基酸残基进行突变。

为了探讨 Pfu DNA 聚合酶的拇指结构域所行使的功能, 获得高纯度的各种目的蛋白是进一步实验的基础。Pfu DNA 聚合酶虽已成功商品化, 但如何提升其表达量一直是值得探讨的问题。在野生型 Pfu DNA 聚合酶重组表达工艺摸索的过程中, 发现其存在表达量低、表达不稳定的现象。对其基因序列分析后发现, 其编码精氨酸的密码子多为 AGG 或 AGA, 由于这两个密码子为大肠杆菌中使用频率最低的两个密码子, 同时 Pfu DNA 聚合酶又带有较多的精氨酸以与 DNA 相互作用, 因此猜测这些稀有密码子的存在, 以及其本身对宿主 DNA 的作用导致了其表达效率低下。



导致带有稀有密码子 AGG 或 AGA 的基因表达水平下降的原因是，表达识别该稀有密码子的 tRNA^{Arg} (CCU) 基因 argU (dnaY) 受到严格调控^[57]，argU 表达受严格调控的生物功能是通过控制目的基因中精氨酸的翻译速度来控制与复制相关的蛋白质如 DNA 聚合酶等在细胞体内的量，从而精确调控 DNA 的复制速度，以最终控制细胞的分裂速度^[57, 58]。因此，大量诱导表达带有 AGG 或 AGA 密码子的蛋白将会快速消耗带有精氨酸的 tRNA^{Arg} (CCU) 而使得基因翻译受阻^[58, 59, 60]。为解决这一问题，已经开发了一系列共表达有 tRNA^{Arg} (CCU) 等能够补充识别稀有密码子的 tRNA 的表达菌株，如 Novagen 公司的 Rosetta (DE3) 系列等。实验证明使用这类表达菌株的确可以大幅度提高带有稀有密码子的蛋白的表达水平^[60]。然而，已有的实验结果显示，过表达 tRNA^{Arg} (CCU) 直接导致与宿主分裂相关的蛋白的量增加，会抑制大肠杆菌的生长速度。因此推测，过量的 DNA 聚合酶与 DNA 的相互作用同样是造成 Pfu DNA 聚合酶表达量低下的原因。

结合这两点推断，我们设计了新的表达方案。选取了能控制表达量的表达菌株 BL21 (DE3) pLysS 进行表达，在将其扩大培养至对数末期后，以 20% 的接种量接种于新鲜的 LB 培养基中直接进行诱导。该方案的目的是利用对数末期分裂减慢，tRNA^{Arg} (CCU) 的量不再由宿主大量消耗，此状态会提供足量的 tRNA^{Arg} (CCU) 给质粒上重组基因的翻译过程；同时利用对数末期分裂减慢的生理状态，减轻表达的 Pfu DNA 聚合酶对宿主 DNA 的不利影响，从而缓解其对重组表达的抑制作用。由多次实验结果表明，该方法可以稳定的表达大量高纯度高活性的野生型 Pfu DNA 聚合酶，这为下一步的实验提供了基础材料，同时为表达类似的 DNA 聚合酶或 DNA 相关蛋白提供了一种有效的表达方案。

2.6 本章小结

为探究 Pfu DNA 聚合酶拇指结构域的功能，获得大量高纯度高活性的相关蛋白是进行探究的基础。在本章中，我们通过分析了可能导致 Pfu DNA 聚合酶表达量较低且不稳定的原因，并针对其对诱导过程进行了改进，之后对纯化过程进行了优化，最终获得了大量高纯度高活性的实验所需蛋白，为之后的实验提供了基本实验材料。



第三章 *Pyrococcus furiosus* B 型 DNA 聚合酶拇指结构域的功能研究

3.1 摘要

利用第二章中制备的 Pfu DNA 聚合酶的截断突变体及点突变体,通过测定不同的 DNA 底物对这些突变体的 DNA 结合活性、dU 识别活性、外切酶活性、聚合酶活性进行了测定。实验结果显示,这些突变体的各种活性均有所降低。并获得以下结论:dU 的识别过程由 N 端 dU 识别口袋和拇指结构域共同完成;行使 3'-5'外切酶活性需要拇指结构域的辅助,尤其是对于切割短于 17nt 的片段,并且拇指结构域参与到酶切底物省余 17nt 时的转换过程;辅助 DNA 聚合过程,牵定底物使其处于聚合活性状态并将引物链的 3'端稳定在聚合活性中心,以保证聚合过程的准确与快速。由以上结论揭示出拇指结构域在 Pfu DNA 聚合酶不同活性中所行使的不同的功能。

3.2 简介

Pfu DNA 聚合酶所属的 B 家族 DNA 聚合酶,广泛存在于细菌域、古菌域和真核域的生物体内,参与细胞的 DNA 复制与损伤修复过程。该家族的聚合酶一般由 N 端结构域、3'-5'外切酶结构域,聚合酶结构域和拇指结构域组成,分别行使相应的功能。N 端结构域负责结合模板的单链 DNA,对于古生菌的 B1 和 B3 DNA 聚合酶其 N 端存在保守的 dU 识别口袋^[27, 28],能够识别模板链单链上的 dU。3'-5'外切酶结构域在氨基酸序列上位于 N 端结构域与聚合酶结构域之间,在空间上与 N 端结构域和拇指结构域相互作用,与聚合酶结构域相距 30Å-40Å^[62],其具有 3'-5'DNA 外切酶活性,用以切除在聚合过程中出现的错配,行使校正功能。聚合酶结构域是 B 家族 DNA 聚合酶的主要活性域,其带有 YxDD 的催化模序,通过利用两个 Mg²⁺来完成 dNTPs 与引物链 3'末端相连的催化反应^[20]。拇指结构域位于 C 端,根据已有的晶体结构与相关实验可以推测其通过对 DNA 的相互作用参与到聚合酶各活性中,但具体细节尚未明了。

现已有一些工作揭示了 B 家族 DNA 聚合酶拇指结构域的功能,其首先是结合引物-模板结构底物的双链,辅助 DNA 聚合过程^[38-43],其次与外切酶结构域相互作用,直接或间接参与到 DNA 外切过程中^[47, 53, 54]。在本章中,我们通过一系列实验对 Pfu DNA 聚合酶行使不同活性时拇指结构域的功能进行了探究,揭示了其在 Pfu DNA 聚合酶中的具体功能。

3.3 材料与方法

3.3.1 实验材料

实验所使用的各突变体蛋白由第二章所述制备,所使用的底物由 invitrogen 公司合成列于表 3-1 中,反应所使用试剂购自于 Fermentas 公司。

表 3-1 实验所使用 DNA 底物

序列	修饰	底物示意图
5'-TCCGATAGCCAGATATCTTGACA-3'	5'FAM	* ————— 17/23nt ————— 3'
5'-TCCGATAGCCAGATATC-3'	5'FAM	



续表 3-1

5'-AGCTCAGTAATGCGTGCAGTGTGTCAAGATATCTGGCT ATCGGA-3'		
5'-AGCTCAGTAATGCGTGCAGTGTGTCAAGATATCTGGC TATCGGA-3'		
5'-AGCTCAGTAATGCGTGCAGTGCAGTCAAGATATCTGGC TATCGGAGGATGTATAGGCAC-3'		
5'-TACGTACTCAGCGCTGDUAGGAAATCGATATCAAGCG TCCGTGGCA-3'	3'FAM	
5'-TGCCACGGACGCTTGATATCGATTT-3'		
5'-TCCGATAGCCAGATATCTTGTGAGCGTGGG-3'	5'FAM	
5'-AGCTCAGTAATGCGTGCAGTGCAGTCAAGATATCTGGC TATCGGA-3'	5'FAM	
5'-TCCGATAGCCAGATATCTTACTGCACTGCACGCATTA CTGAGCT-3'		
5'-CCCACGCTCACAAGATATCTGGCTATCGGA-3'		

3.3.2 实验方法

(1) 凝胶阻滞分析

- 1) 制作凝胶模具。将表面干净的玻璃板、两侧 1mm 厚边条按顺序叠好，用透明胶带封住两侧及底部；
- 2) 配制凝胶。量取 10ml 30% 丙烯酰胺 (Acryl:Bis 19:1) 0.5xTBE，加入 20ml 0.5xTBE、280ul 10% 过硫酸铵溶液和 28ul TEMED，充分混匀后灌入准备好的凝胶模具中，避免气泡的产生，插上 26 孔 1mm 厚梳子用夹具夹紧两侧，水平放置模具待凝胶形成；
- 3) 凝胶形成后，拔出梳子，撕去封底的透明胶带，将凝胶板置于垂直电泳仪上，在 0.5xTBE 缓冲液中，于 10V/cm 电场强度下预电泳 1h，之后可直接上样电泳或取下后用保鲜膜包好置于 4℃ 保存备用。

(2) DNA 变性凝胶电泳

- 1) 制作凝胶模具。与 3.3.2.1 (1) 中所述步骤相同。
- 2) 配制凝胶。量取 35ml 20% 丙烯酰胺 (Acryl:Bis 19:1) 0.5xTBE 8M Urea，加入 280ul 10% 过硫酸铵溶液和 28ul TEMED，充分混匀后灌入准备好的凝胶模具中，避免气泡的产生，插上 26 孔 1mm 厚梳子用夹具夹紧两侧，水平放置模具待凝胶形成；
- 3) 凝胶形成后，拔出梳子，撕去封底的透明胶带，将凝胶板置于垂直电泳仪上，在 0.5xTBE 缓冲液中，于 17V/cm 电场强度下预电泳 5h，之后可直接上样电泳或取下后用保鲜膜包好置于 4℃ 保存备用。

(3) DNA 结合能力分析

- 1) 准备预反应体系。按如下配制预反应体系：



10x Pfu Buffer (Mg ²⁺ free)	1ul
荧光标记底物	0.5pmol
模板链	1.5pmol
50%蔗糖	1ul
加灭菌水至	9ul

- 2) 将配制好的预反应体系置于 95℃ 中水浴 5min, 停止加热待水浴冷却至室温取出预反应体系直接进行反应或避光冻存于 -20℃;
- 3) 使用 Pfu DNA 聚合酶储存 buffer 将制备好的蛋白稀释一倍至浓度为 8.3uM。每种蛋白设置两个浓度进行反应, 在预反应体系中加入相应浓度蛋白 1ul 混匀后置于 37℃ 反应 20min;
- 4) 将反应好的体系全部上样于制备好的凝胶上样空中, 于 10V/cm 的电场中电泳, 在空泳道中加入 6xDNA 上样 buffer 作为指示剂, 待溴酚蓝条带电泳至凝胶底部时停止电泳;
- 5) 将电泳完成的凝胶放置于 FLA-5000 (Fujifilm, 日本) 进行扫描, 结果以图片形式保存。

(4) dU 识别能力分析

- 1) 准备预反应体系。按如下配制预反应体系:

10x Pfu Buffer (Mg ²⁺ free)	1ul
荧光标记底物	0.25pmol
模板链/单链反应用水补齐	0.75pmol
50%蔗糖	1ul
加灭菌水至	9ul

- 2) 将配制好的预反应体系置于 95℃ 中水浴 5min, 停止加热待水浴冷却至室温取出预反应体系直接进行反应或避光冻存于 -20℃;
- 3) 使用 Pfu DNA 聚合酶储存 buffer 将制备好的蛋白稀释成 8.3uM、4.2uM 和 2.1uM 三种浓度。每种蛋白设置三个浓度进行反应, 在预反应体系中加入相应浓度蛋白 1ul 混匀后置于 37℃ 反应 20min;
- 4) 步骤同 3.3.2.3 (3) - (5)。

(5) 外切酶活性测定

- 1) 准备反应体系。按如下配制预反应体系:

10x Pfu Buffer (Mg ²⁺ free)	1ul
MgSO ₄ (25mM)	1ul
荧光标记底物	0.5pmol
模板链/单链反应用水补齐	1.5pmol
加灭菌水至	9ul

- 2) 将配制好的预反应体系置于 95℃ 中水浴 5min, 停止加热待水浴冷却至室温取出预反应体系直接进行反应或避光冻存于 -20℃;



- 3) 每种蛋白设置 0min、1min、2min、4min、8min、16min、32min 7 个时间点终止反应，在预反应体系中加入原蛋白溶液 1ul 混匀后置于 65°C 反应至相应时间点加入反应终止液 10ul 混匀；
 - 4) 将反应好的体系全部上样于制备好的凝胶上样空中，于 17V/cm 的电场中电泳，在空泳道中加入 6xDNA 上样 buffer 作为指示剂，待溴酚蓝条带电泳至凝胶底部时停止电泳；
 - 5) 将电泳完成的凝胶放置于 FLA-5000 (Fujifilm, 日本) 进行扫描，结果以图片形式保存。
- (6) 聚合酶活性测定及聚合酶-外切酶平衡态测定
- 1) 准备反应体系。按如下配制预反应体系：

10x Pfu Buffer (Mg ²⁺ free)	1ul
MgSO ₄ (25mM)	1ul
dNTPs (2.5mM)	1ul
(根据实验要求或再加入 dATP, dGTP, dTTP 或 dCTP (2.5mM))	3ul
荧光标记底物	1pmol
模板链	3pmol
加灭菌水至	9ul

- 2) 将配制好的预反应体系置于 95°C 中水浴 5min，停止加热待水浴冷却至室温取出预反应体系直接进行反应或避光冻存于 -20°C；
- 3) 根据实验每种蛋白设置多个时间点终止反应，在预反应体系中加入原蛋白溶液 1ul 混匀后置于 65°C 反应至相应时间点加入反应终止液 10ul 混匀；
- 4) 将反应好的体系全部上样于制备好的凝胶上样空中，于 17V/cm 的电场中电泳，在空泳道中加入 6xDNA 上样 buffer 作为指示剂，待溴酚蓝条带电泳至凝胶底部时停止电泳；
- 5) 将电泳完成的凝胶放置于 FLA-5000 (Fujifilm, 日本) 进行扫描，结果以图片形式保存。

3.4 结果

3.4.1 拇指结构域对正常 DNA 和 dU 损伤 DNA 结合活性的影响

(1) 正常 DNA 结合能力

在前人的工作中，已经揭示出拇指结构域参与引物-模板结构 DNA 中双链部分的结合^[38-43]。通过对拇指结构域截断突变体及点突变体的 DNA 结合活性进行测定，我们进一步确认这一结论并具体确定了参与结合的几个关键碱性氨基酸残基。

图 3-1 显示了各拇指结构域突变体和野生型蛋白对 DNA 底物的结合情况，我们可以观测到野生型 Pfu DNA 聚合酶具有 DNA 结合活性，同时各突变体基本丧失了对 DNA 的结合能力，这一结果显示在聚合过程中拇指结构域负责 DNA 底物的牵定作用，确定参与牵定的残基主要包括残基 R613、R669、K675、R744、R752 和 K753。

(2) dU 识别活性

古生菌的 B 家族 DNA 聚合酶具有特殊的性质，其 N 端结构域存在一个保守的 dU 结合口袋，可以结合带有 dU 的 DNA 底物^[27, 28]。我们同样对拇指结构域各突变体的 dU 识别



活性进行了测定。我们使用了带有 dU 的单链 DNA 底物，以及模板单链区含有 dU 损伤的引物-模板结构底物进行了凝胶阻滞实验，其电泳结果如图 3-2 所示。

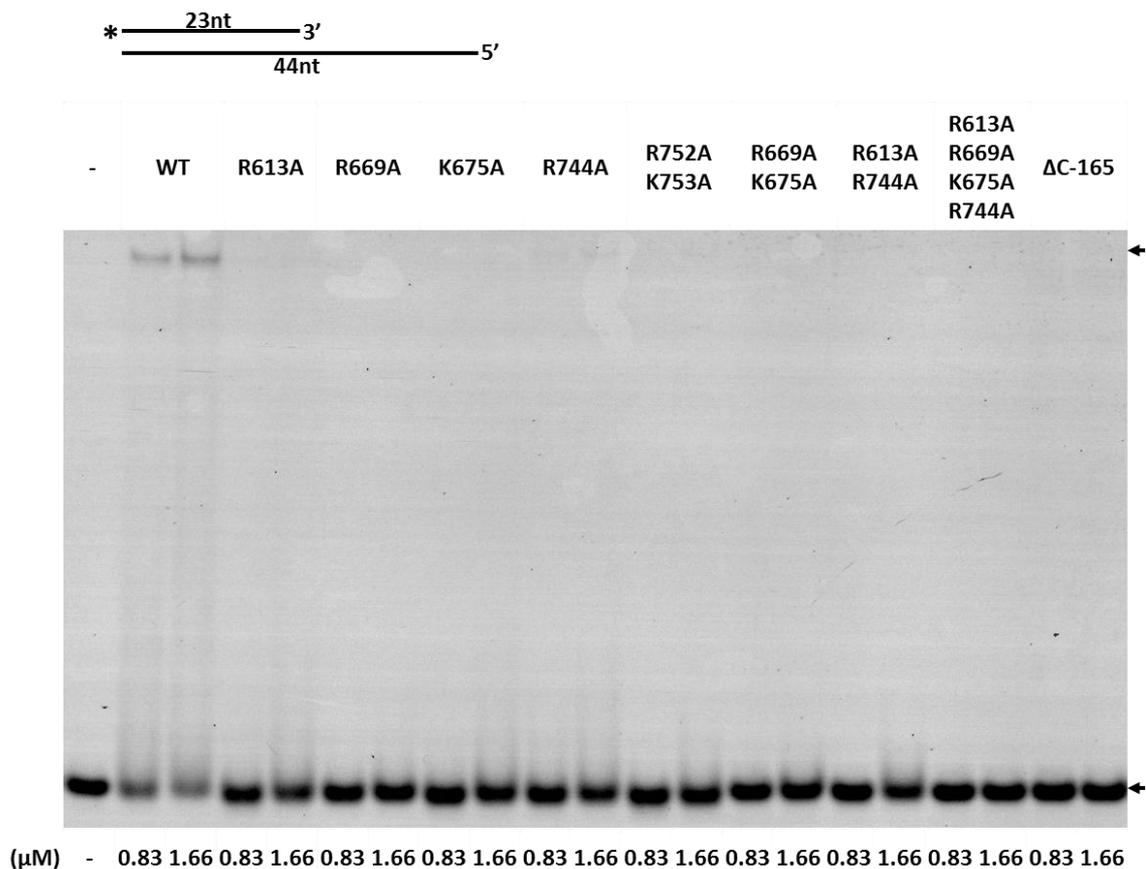


图 3-1 凝胶阻滞分析各蛋白对引物-模板结构底物的结合情况

图中上部标示了所使用的底物，“*”表示 FAM 荧光标记 DNA 链。实验通过凝胶阻滞分析了各蛋白 0.83μm 和 1.66μm 两个浓度下对 0.05um 底物的结合情况。上箭头所指条带表示蛋白与底物结合的条带，下箭头所指条带表示为结合蛋白的底物条带。图中显示野生型具有对底物的结合能力，各单点突变和双点突变电泳条带出现拖带现象，说明其存在较弱的相互作用，全点突变及截断突变体没有检测到结合条带。

可以观测到各点突变对 dU 的识别活性有所降低，而全点突变和截断体突变基本丧失了 dU 的识别活性。进一步对其结合活性进行了定量分析，以野生型蛋白的结合活性作为 100%，对除截断突变体外的各突变体的结合活性进行了标定，其结果以柱状图 3-3 显示。

该定量结果显示了突变体对 dU 识别活性不同程度的降低，同时比较对单链 DNA 底物及引物-模板结构底物，显示了不同突变体对引物-模板结构底物的结合力要强于单链底物，这一结果符合引物-模板结构底物为其最适底物的报道^[27, 28]。

然而，当我们对截断突变体进行测定时发现，其对引物结构的底物的结合力低于对单链的结合力。为证实这一结果，我们做了更加细致的蛋白浓度梯度来测定其 dU 识别活性，其结果如图 3-4 所示。

由图中所示，截断突变体对带有 dU 的单链底物的识别活性高于引物-模板结构底物。该结果说明对于 dU 的识别活性，截断突变体对引物-模板结构底物的影响大于单链底物，这从反面验证了拇指结构域的主要功能是牟定引物-模板结构的双链结构部分。

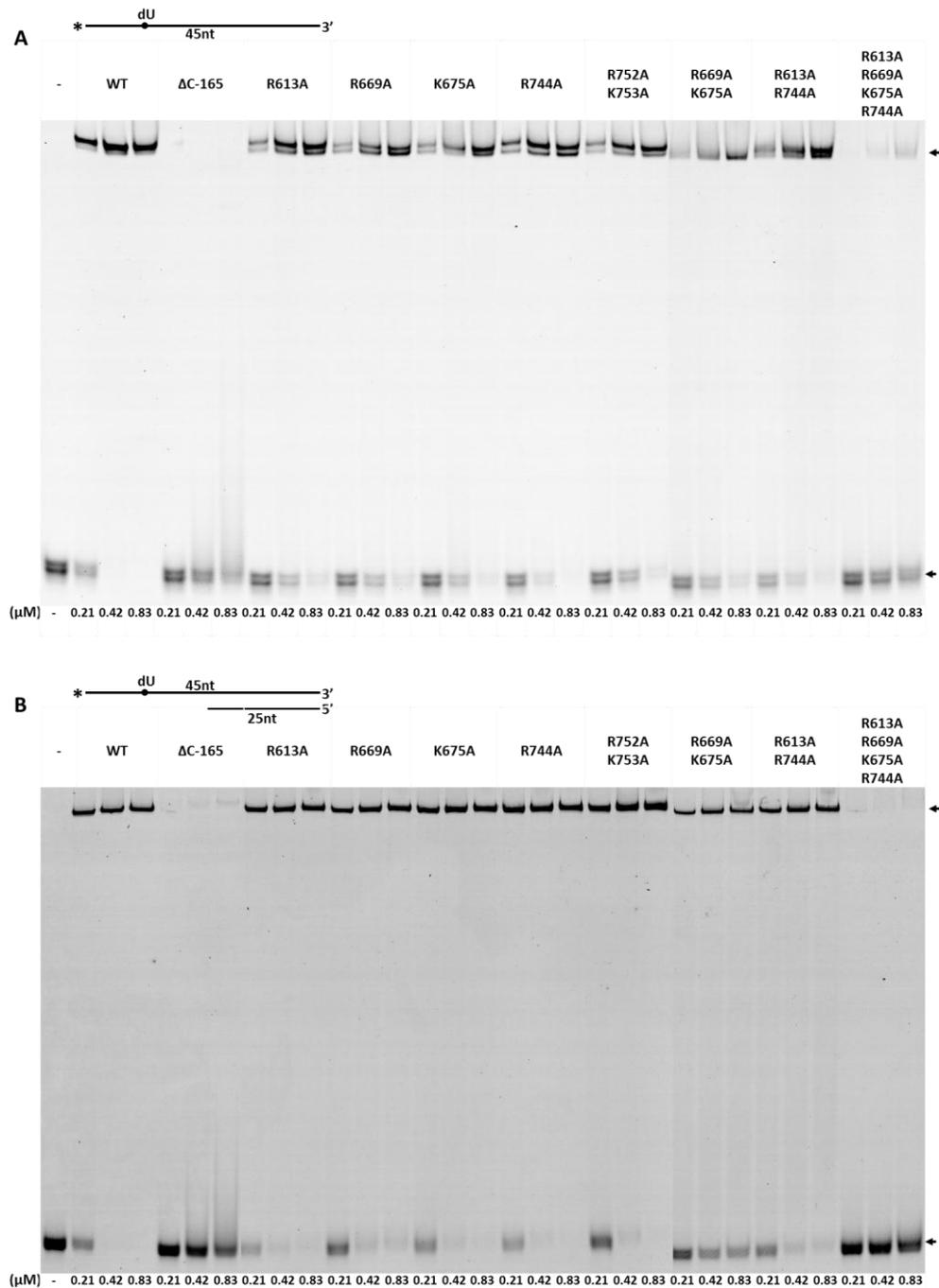


图 3-2 凝胶阻滞分析各蛋白对未配对链上带有 dU 的不同形式 DNA 底物的结合情况
A、B 图上部标示了各实验中所使用的底物，“*”表示 FAM 荧光标记 DNA 链。实验通过凝胶阻滞分析了各蛋白 0.83μM、0.42μM 和 0.21 三个浓度下对 0.025μM 底物的结合情况。各图上箭头所指条带表示蛋白与底物结合的条带，下箭头所指条带表示为结合蛋白的底物条带。图中显示野生型具有对底物的结合能力，各单点突变和双点突变底物带位置上仍有条带，说明其相互作用减弱，全点突变及截断突变体没有检测到结合条带。



3.4.2 拇指结构域对 3'-5'外切酶活性的影响

在 DNA 复制过程中, DNA 聚合酶的高保真性是保证遗传物质正确传递的最主要因素, 其中 DNA 聚合酶通过行使所具有的 3'-5'外切酶活性来对聚合过程中出现的错配进行校正。拇指结构域位于 Pfu DNA 聚合酶的 C 端, 但在空间上与接近 N 端的外切酶结构域有相互作用^[48], 这种空间上的位置关系导致拇指结构域参与外切酶的 3'-5'外切反应。

为了分析拇指结构域在 3'-5'外切反应中所起到的功能, 我们首先测定各点突变体的外切反应速率。使用 30nt 的单链 DNA 底物以及引物链为 23nt 的引物-模板结构底物进行实验, 所测得的酶切速率见图 3-5。由图中可以看出, 拇指结构域的各点突变均导致酶切速率有不同程度的下降。由于所使用的酶量大大超过底物的量, 因此从宏观上可以认为由于对 DNA 底物结合力下降所导致的酶切速率降低的可能在该实验中可以忽略, 即可以认为该结果真实反映了外切酶活性。进一步比较对单链底物与引物-模板结构底物的酶切速率, 我们可以发现对引物-模板结构底物的酶切速率普遍低于单链底物的酶切速率。此外, 从图中可以看出, 酶切过程在底物的 17nt 至 12nt 间的条带并不明显, 说明酶切过程在此处发生了快速的跳跃, 导致外切反应快速的从 17nt 进行到 12nt。进一步的实验解释了这两个现象产生的机理。

我们使用了 30nt、23nt、17nt 的单链 DNA 底物测定了截断突变体和全点突变体的酶切活性, 结果如图 3-6 所示。由图中可以看出, 酶切过程在进行至 17nt 时发生了停滞, 这说明酶切过程从底物长度长于 17nt 的状态 1 转换至短于 17nt 的状态 2, 而拇指结构域介导了该转换过程, 并且拇指结构域对酶切短于 17nt 的底物起到了重要的辅助作用。进一步比较不同长度底物的酶切过程, 我们可以发现, 对于长于 23nt 的底物, 酶切过程在 17nt 至 12nt 间出现了快速的跳跃, 而直接使用 17nt 的底物可以看出, 这种跳跃现象消失, 我们观测到了从 17nt 至 12nt 间的过渡状态, 进一步的实验证实了也这一点, 其结果如图 3-7 所示。该结果表明, 从状态 1 转换至状态 2 的过程是一个有利于酶切的过程, 即说明在拇指结构域的辅助下, 短于 17nt 的底物将直接被递送至外切酶结构域进行酶切。

对于状态 1 的探究, 我们首先使用引物长度为 23nt 的引物-模板结构底物测定了截断突变体和全点突变体的酶切活性, 结果如图 3-8 所示。比较 23nt 引物-模板结构底物与单链底物的酶切过程, 我们可以发现, 截断体对这两种底物的酶切过程基本相同, 而全点突变体的酶切速率受到了抑制, 同时从状态 1 至状态 2 的转换过程消失。该结果表明, 拇指结构域的存在抑制了引物-模板结构底物的酶切过程, 这与图 3-5 (A) 与图 3-5 (B) 的比较结果相符, 说明拇指结构域负责稳定长于 17nt 的引物-模板结构底物处于状态 1。根据引物-模板结构底物的特性, 我们推测状态 1 为有利于聚合过程的状态, 即对于长于 17nt 的引物-模板结构底物, 拇指结构域将底物牢固定在聚合状态。进一步的实验证明了这一观点。我们使用了 3'突出 14nt 的模板与 23nt 的引物配成引物-模板结构底物, 测定各突变体的外切酶活性 (图 3-9)。

该结果与图 3-8 (B) 结果相似, 但 R613A 突变体出现了不同的结果, 如图 3-9 所示。由图中我们可以看到 R613A 突变体的酶切速率大于了 R669A, 而在图 3-5 (B) 中所示, 结果相反。比较这两种底物可知, 模板链 3'突出的引物-模板结构底物更有利于发生聚合反应, 而这一酶切结果证实了拇指结构域上的 R613 在将底物固定在聚合状态中起到了明显的作用, 该点所起到的关键作用将在聚合酶活性分析中进一步阐明。此外, 我们使用双链 DNA 底物进行酶切更进一步证实了聚合酶-DNA 复合物状态 1 为聚合状态。我们选取了丧失了聚合酶活性同时仍具有良好外切酶活性的 R613A 和 R675A 双点突变体进行了实验, 其结果如图 3-10 所示。

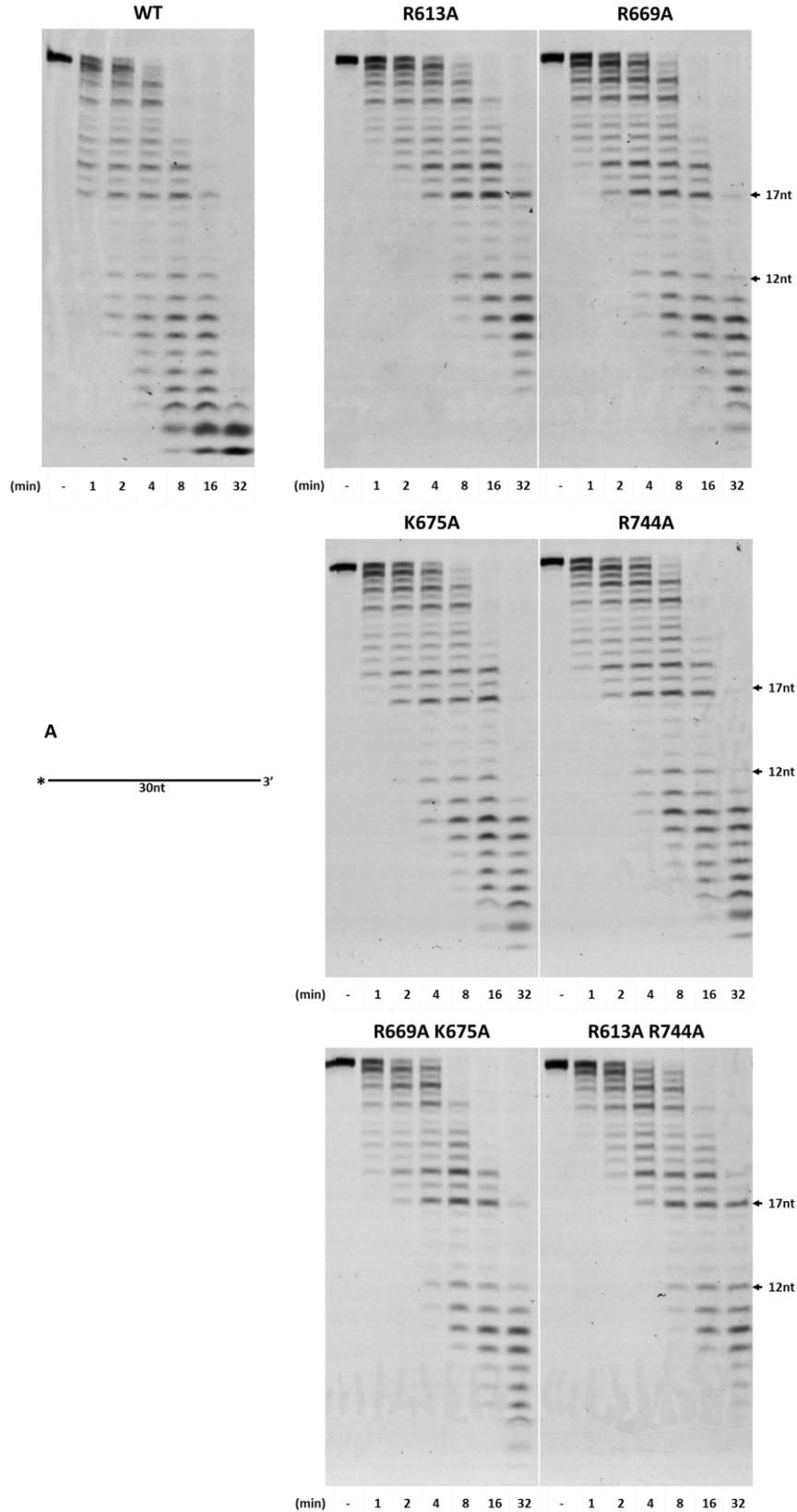


图 3-5 A 各点突变体对 30nt DNA 酶切产物变性凝胶电泳

图中标示了各实验中所使用的底物，“*”表示 FAM 荧光标记 DNA 链。实验测定了各点突变体在 65°C 下反应 1min、2min、4min、8min、16min 和 32min 后对底物的酶切结果。图中箭头标示出了 17nt 和 12nt 条带的位置。

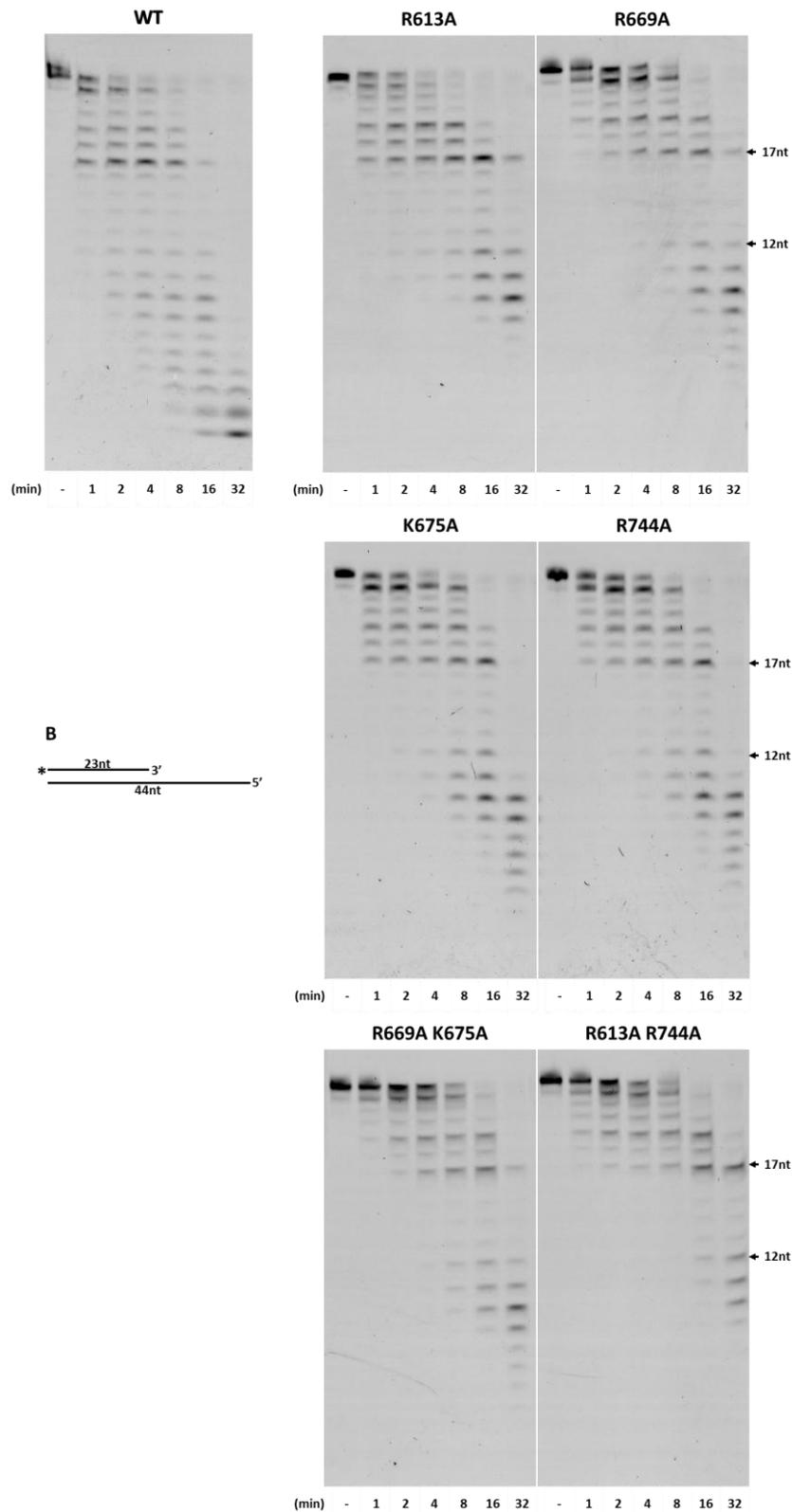


图 3-5 B 各点突变体对 23nt 引物底物 DNA 酶切产物变性凝胶电泳

图中标示了各实验中所使用的底物，“*”表示 FAM 荧光标记 DNA 链。实验测定了各点突变体在 65°C 下反应 1min、2min、4min、8min、16min 和 32min 后对底物的酶切结果。图中箭头标示出了 17nt 和 12nt 条带的位置。

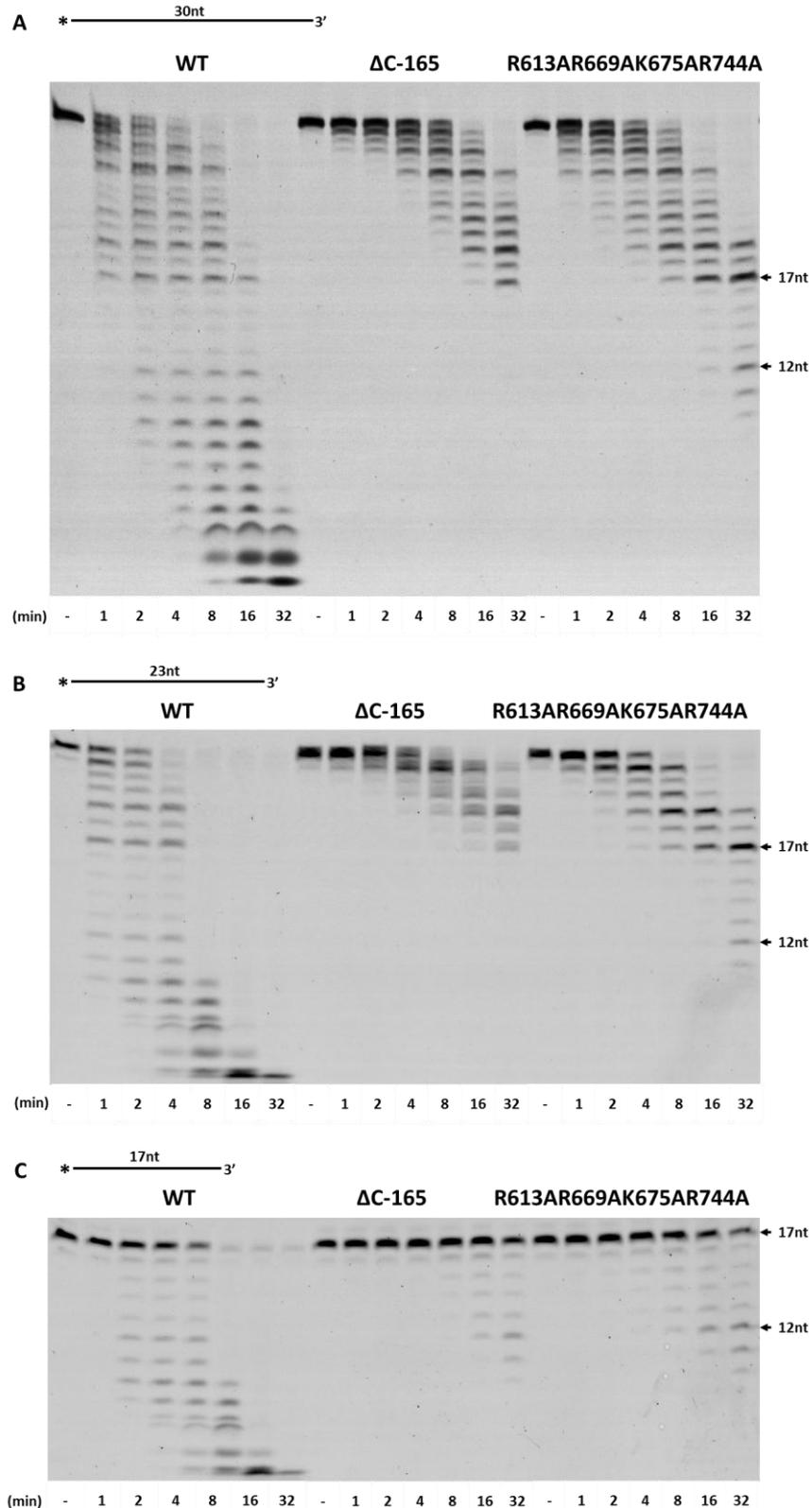


图 3-6 截断突变体和全点突变体对不同长度单链 DNA 酶切产物变性凝胶电泳

A、B、C 图中标示了各实验中所使用的底物，“*”表示 FAM 荧光标记 DNA 链。实验测定了截断突变体和全点突变体在 65°C 下反应 1min、2min、4min、8min、16min 和 32min 后对 30nt、23nt 和 17nt 单链 DNA 底物的酶切结果。图中箭头标示出了 17nt 和 12nt 条带的位置。



R613AR669AK675AR744A

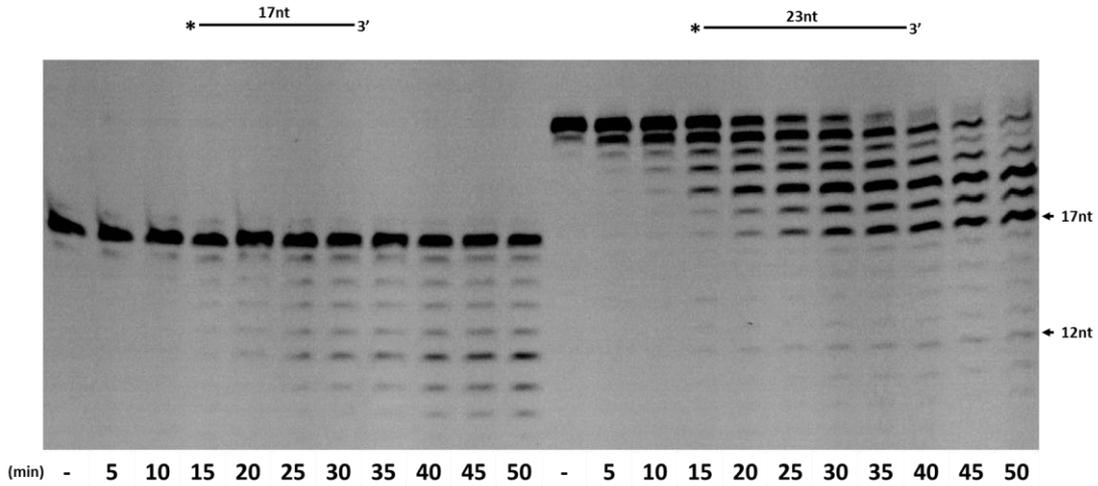


图 3-7 全点突变体对不同长度单链 DNA 酶切产物变性凝胶电泳

图中标示了各实验中所使用的底物，“*”表示 FAM 荧光标记 DNA 链。实验测定了全点突变体在 65°C 下反应 5min、10min、15min、20min、25min、30min、35min、40min、45min 和 50min 后对 23nt 和 17nt 单链 DNA 底物的酶切结果。图中箭头标示出了 17nt 和 12nt 条带的位置。

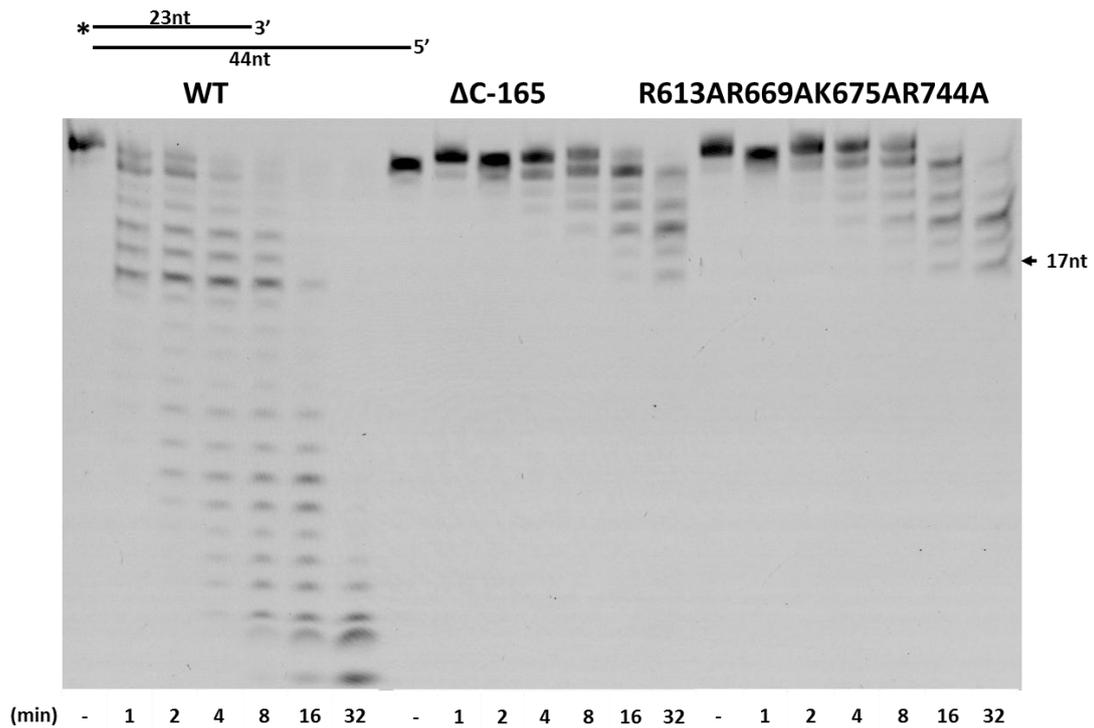


图 3-8 截断突变体和全点突变体对引物-模板结构 DNA 酶切产物变性凝胶电泳

图中上部标示了实验中所使用的底物，“*”表示 FAM 荧光标记 DNA 链。实验测定了截断突变体和全点突变体在 65°C 下反应 1min、2min、4min、8min、16min 和 32min 后对引物长为 23nt 引物-模板结构 DNA 底物中标记有荧光的引物的酶切结果。图中箭头标示出了 17nt 条带的位置。

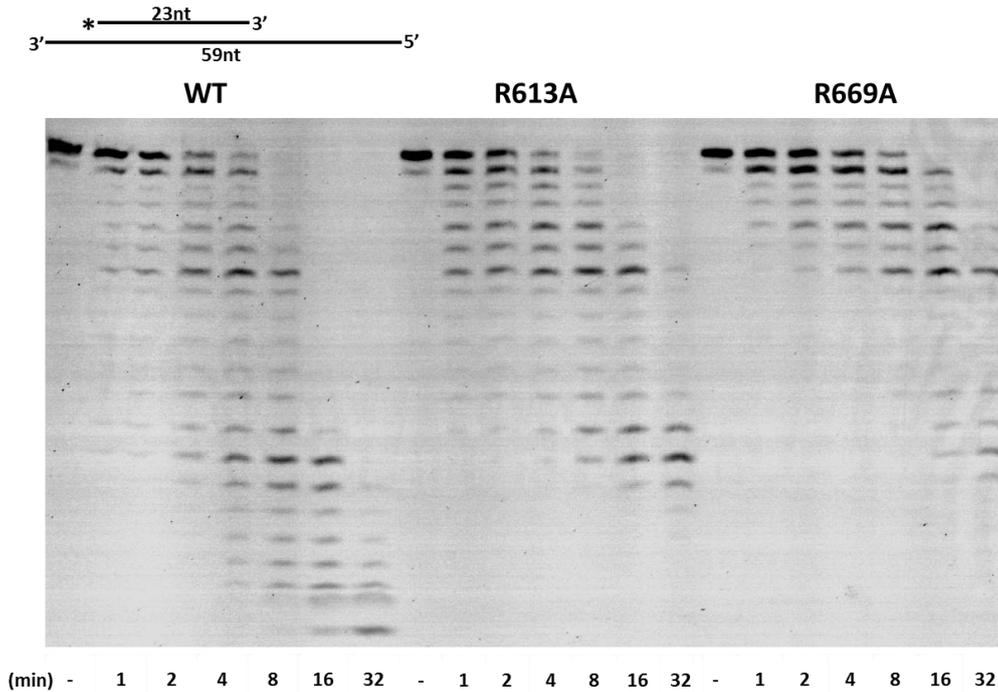


图 3-9 截断突变体和全点突变体对引物-模板结构 DNA 酶切产物变性凝胶电泳
图中标示了实验中所使用的底物，其模板链 3' 突出形成单链，“*”表示 FAM 荧光标记 DNA 链。实验测定了截断突变体和全点突变体在 65°C 下反应 1min、2min、4min、8min、16min 和 32min 后对引物长为 23nt 引物-模板结构 DNA 底物中标记有荧光的引物的酶切结果。

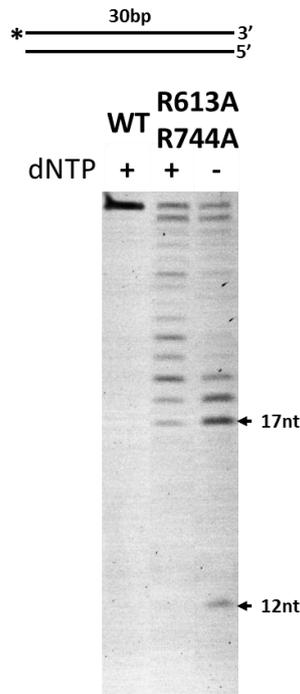


图 3-10 R613A 和 R744A 双点突变体在不同体系中对双链 DNA 酶切产物变性凝胶电泳
图中上部标示了实验中所使用的双链底物，“*”表示 FAM 荧光标记 DNA 链。实验测定了 R613A 和 R744A 双点突变体在 65°C 下于含有和不含有 0.25mM dNTPs 的反应体系中反应 30min 后对长为 30bp 的 DNA 底物中标记有荧光的 DNA 链的酶切结果。



对于酶切过程中未加入 dNTP 的结果与之前的结果类似,发生了从状态 1 至状态 2 的转变,而加入 dNTP 的结果显示该转换过程消失。由于聚合活性丧失,该结果表明 dNTP 的存在稳定了底物处于状态 1,而由此说明了状态 1 是聚合活性状态。

以上结果表明,在 Pfu DNA 聚合酶行使外切酶和聚合酶两种活性的过程中,拇指结构域首先起到的是稳定引物-模板结构底物处于聚合活性状态。对于短于 17nt 的底物,拇指结构域介导了从聚合活性转换至有利于行使外切酶活性的状态,并辅助完成短于 17nt 片段的酶切过程。

3.4.3 拇指结构域对聚合酶的影响

聚合酶活性是 DNA 聚合酶最主要的活性,而在空间上与之相接近的拇指结构域参与到 DNA 聚合过程中也是显而易见的。为了分析拇指结构域在 DNA 聚合过程中所行使的功能,我们首先测定了各拇指结构域突变体的 DNA 聚合速率。使用引物长度为 23nt 及 17nt 的引物-模板结构底物进行了实验,同样实验中使用了大大过量的酶测定活性,结果可真实反映突变体对聚合反应的影响,其结果如图 3-11 所示。由该结果可知,各拇指结构域单点突变均导致聚合活性的下降。而对于拇指结构域指根的双点突变 R613A 和 R744A,以及全点突变和截断突变,其聚合活性丧失。该结果说明,拇指结构域对聚合活性起到了重要的辅助作用,其中拇指结构域上指根处的 R613 和 R744 残基在该辅助作用中起主要作用,而指头处的 R669 和 K675 残基起到次要作用。对引物长为 23nt 及 17nt 的底物-模板结构底物进行比较发现,突变体对于 17nt 引物的聚合活性弱于 23nt 引物,这反映了突变体起始聚合反应能力的减弱,说明了拇指结构域对于起始聚合过程的重要功能。此外,从图 3-11 中可以看到,R613A 突变体除聚合活性大幅度降低外还具有特殊的聚合现象,其聚合过程在 18nt、19nt、26nt、33nt 处出现了停滞。为解释这一现象,我们进一步进行了实验。

我们使用了额外插入一个碱基的 DNA 作为模板链,将该模板与 23nt 和 17nt 引物配成引物-模板结构底物,测定突变体对其进行的聚合反应,结果如图 3-12 所示。由图中我们可以看到,18nt 和 19nt 的停滞位置没有发生变化,而原 26nt 用与 33nt 处的停滞变为了 27nt 与 34nt 的停滞,由于插入的碱基位于 19nt 与 26nt 之间,因此该结果表明,这种停滞现象与模板链有关。对模板链序列进行分析后,我们推测这种停滞现象是由于碱基错配造成的。为验证这一推断,我们在聚合反应体系中分别将各碱基的量增加到 1mM,其结果如图 3-13 所示。从图中我们可以看到,与 dNTP 均匀的对照组相比,增加 dATP 及 dTTP 的实验组聚合过程发生了变化。比较对照组及 dATP 组和 dTTP 组的第 5min 聚合情况,可以发现增加 dATP 使聚合过程受阻。比较这三组的 26nt, 33nt, 36nt 处的条带可以发现, dATP 组的 26nt 条带逐渐增粗,同时 33nt 的条带较弱,说明增加 dATP 导致 26nt 处的停滞增强;同时 dTTP 组的 36nt 处的基本消失条带,且与对照组相比 33nt 以及 26nt 处的条带浓度降低,说明聚合过程中在该处受到的阻碍降低。该结果表明, R613A 突变导致了聚合过程中模板链上在 dA 处的错配率增加。

为进一步分析 R613 的功能,我们使用不同长度的双链底物,在聚合反应体系中测定其活性(图 3-14)。从图中可以看到,对于双链底物, R613A 突变体首先行使的是 3'-5'外切酶活性,但当 5'端暴露出 5nt 碱基后外切反应发生了停滞,说明在此处出现了聚合活性与外切活性的平衡态,相较野生型则没有这一现象。该结果表明, R613A 突变体将引物-模板结构底物稳定在聚合活性状态的能力明显降低,从而使其更容易进行外切反应,这也印证了外切酶活性测定中图 3-9 所出现的现象;而 5nt 长度的单链模板使引物-模板结构底物可以有效的结合并稳定在聚合活性状态。总之,该实验揭示了在聚合过程中, 5'端伸出 5nt 以上的单链足以保证聚合酶结合引物-模板结构底物时处于聚合活性结合状态,并且 R613 在聚合活性结合状态中起着关键作用,单链模板和 R613 的共同作用将底物稳定在聚合活性状态。

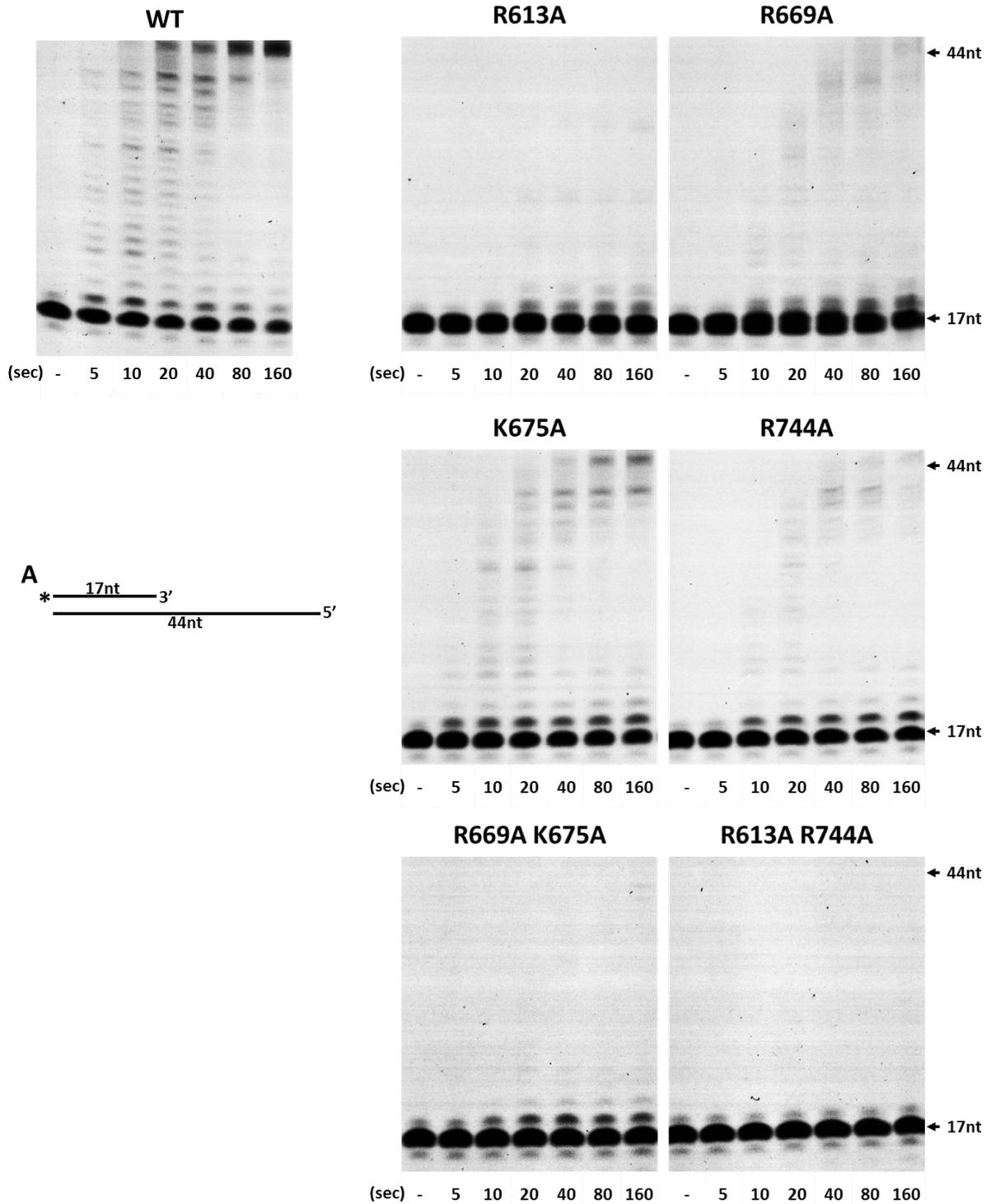


图 3-11 A 各点突变体对 17nt 引物引物-模板 DNA 聚合反应产物变性凝胶电泳

图中标示了各实验中所使用的底物，“*”表示 FAM 荧光标记引物 DNA 链。实验测定了各点突变体在 65°C 下反应 5sec、10sec、20sec、40sec、80sec 和 160sec 后聚合生成的 DNA 产物。图中箭头标示出了 17nt 引物条带以及产物 44nt 的位置。

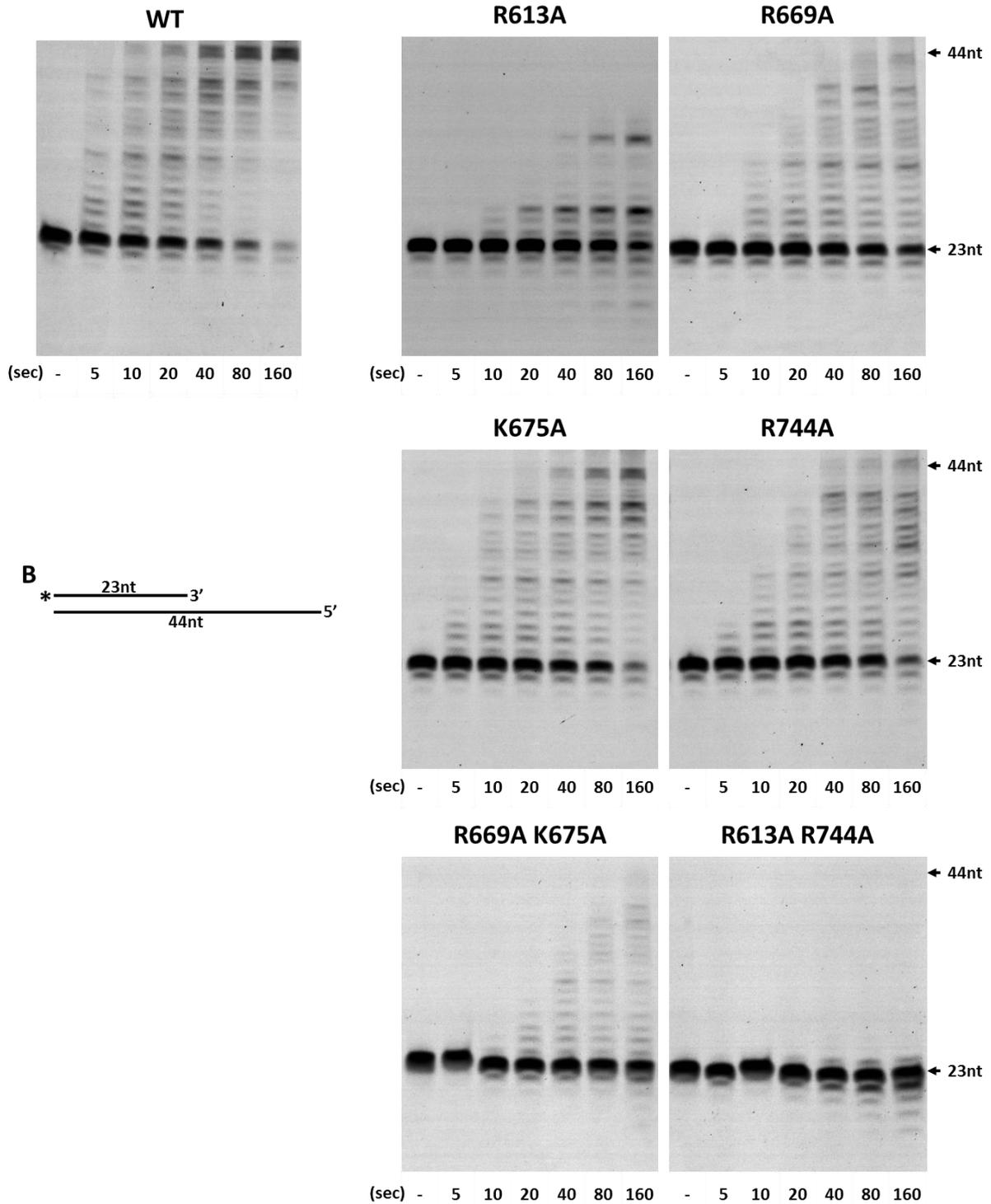


图 3-11 B 各点突变体对 23nt 引物引物-模板 DNA 聚合反应产物变性凝胶电泳

图中标示了各实验中所使用的底物，“*”表示 FAM 荧光标记引物 DNA 链。实验测定了各点突变体在 65°C 下反应 5sec、10sec、20sec、40sec、80sec 和 160sec 后聚合生成的 DNA 产物。图中箭头标示出了 23n 引物条带以及产物 44nt 的位置。

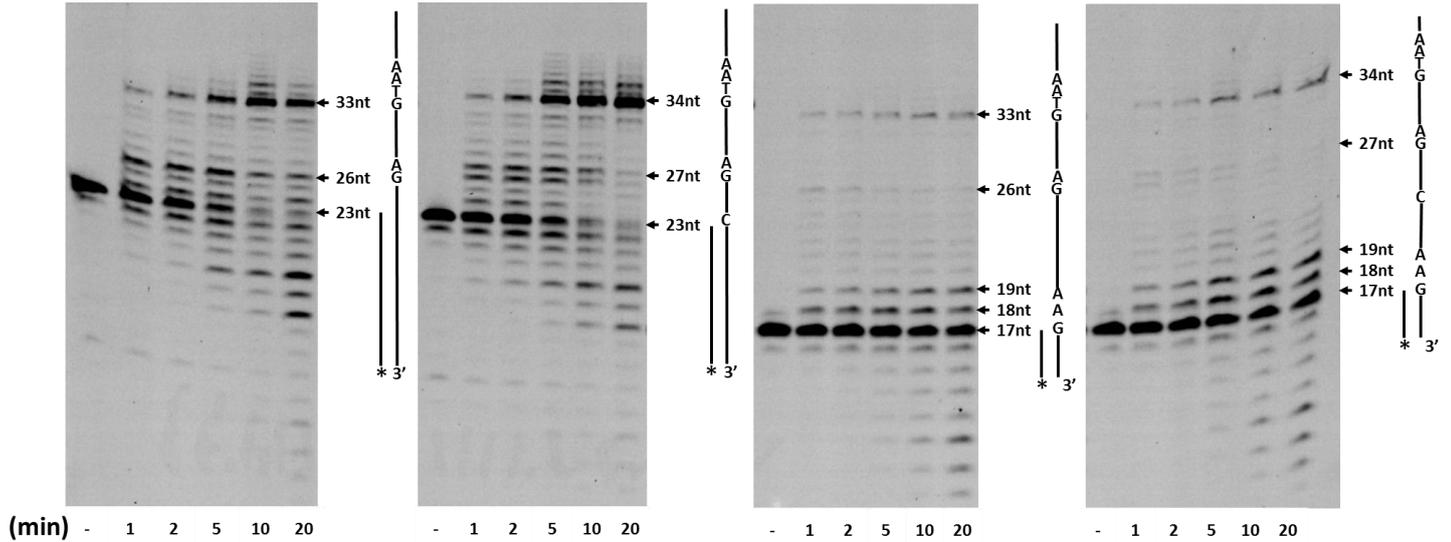


图 3-12 R613A 突变体对不同引物-模板 DNA 底物聚合反应产物变性凝胶电泳

各电泳图右侧标示了各实验中所使用的底物，并标示出模板链上几个位点的碱基成分，“*”表示 FAM 荧光标记引物 DNA 链。实验测定了 R613A 突变体在 65°C 下对不同底物反应 1min、2min、5min、10min 和 20min 后聚合生成的 DNA 产物。图中箭头标示出了 33nt/34nt、26nt/27nt、18nt 和 19nt 的反应滞后所产生的条带以及引物 23nt 和 17nt 的条带位置。

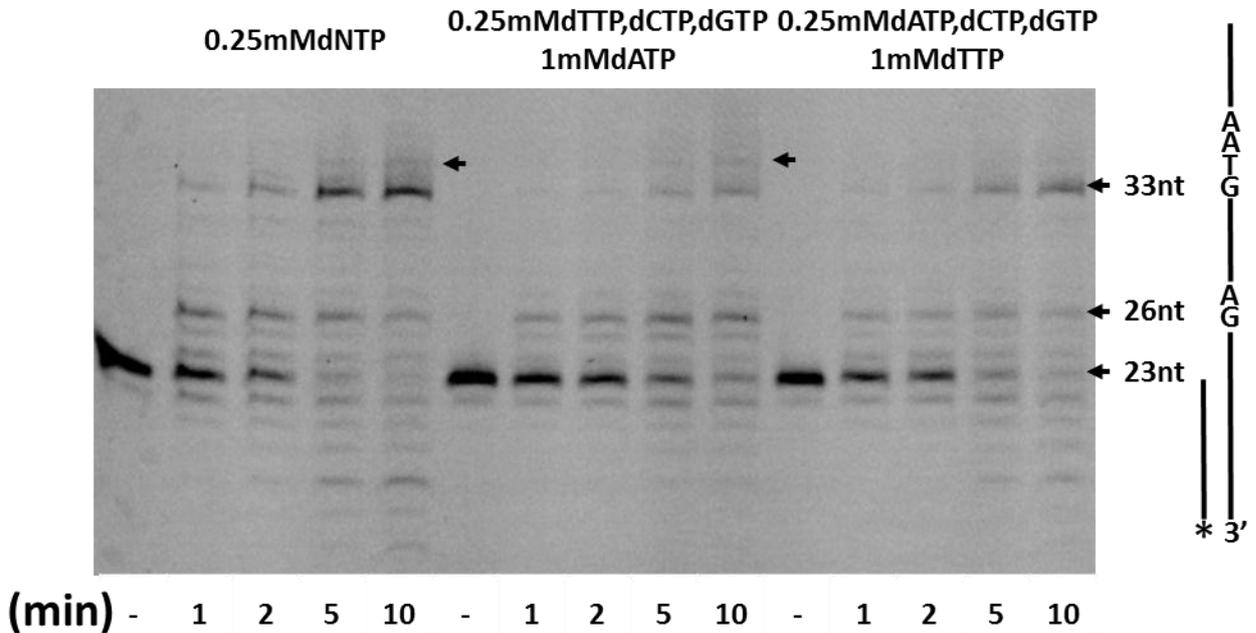


图 3-13 R613A 突变体在不同反应体系中聚合反应产物变性凝胶电泳

电泳图右侧标示各实验中所使用的底物，并标示出模板链上几个位点的碱基成分，“*”表示 FAM 荧光标记引物 DNA 链。实验测定了 R613A 突变体在 65°C 在含有不同 dNTPs 浓度配比的反应体系中反应 1min、2min、5min 和 10min 后聚合生成的 DNA 产物。图中箭头标示出了 33nt、26nt 的反应滞后所产生的条带，引物 23nt 条带位置以及不同体系中产生变化的条带位置。

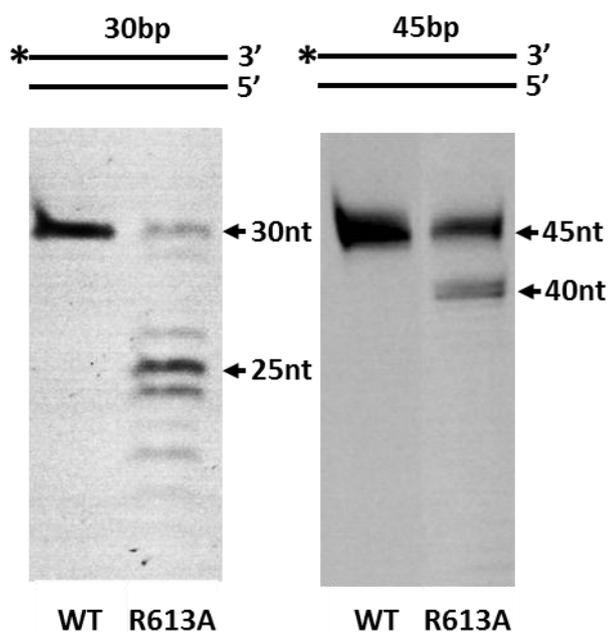


图 3-14 R613A 突变体对不同长度双链底物反应产物变性凝胶电泳

电泳图上部标示各实验中所使用的底物，“*”表示 FAM 荧光标记引物 DNA 链。实验测定了 R613A 突变体在 65°C 对不同长度双链 DNA 在聚合反应体系中反应 30min 后的 DNA 产物。图中箭头标示出了原底物长度 30nt 和 45nt 以及外切活性和聚合活性平衡产生的反应停滞条带 25nt 和 40nt 的条带位置。

综合外切反应和聚合反应结果，拇指结构域的重要功能是将引物—模板结构底物稳定在聚合活性状态，其中 R613 在该过程中起到了最主要的作用，该点的功能是将引物—模板结构 DNA 底物稳定在聚合活性状态，并将 3'端准确对准聚合反应活性中心，以保证聚合过程的准确进行。

3.5 讨论

3.5.1 拇指结构域对识别结合 dU 损伤的辅助作用。

基于拇指结构域的结构特征及其和其它结构域的空间位置关系^[38-50]，我们推测其对 Pfu DNA 聚合酶的各种酶活性起辅助调控作用。对于古生菌 B 家族 DNA 聚合酶所特有的 dU 识别活性而言，我们首次发现了拇指结构域的辅助作用对该活性的重要意义。对古生菌 dU 识别活性已有诸多详细的研究，N 端保守的 dU 结合口袋与 dU 的相互作用机制在结构水平也得到了阐明^[28]。然而我们先前研究发现，只有 dU 结合口袋的 N 端结构域截断体和只有 N 端结构域与外切酶结构域的截断体，均丧失了对带有 dU 损伤的 DNA 底物的结合能力，这说明单独的 dU 结合口袋只起到对 dU 的识别作用以及贡献了部分的结合作用，完成对带有 dU 的 DNA 底物的结合过程需要其他结构域的辅助。之后通过测定拇指结构域的各个突变体的 dU 识别活性，我们发现参与结合 dU 的辅助结构域确为拇指结构域。如实验结果所示，从拇指结构域的单点突变到多点突变和截断突变，dU 的识别活性急剧减弱，直至几乎丧失该活性。该结果表明拇指结构域与 N 端 dU 识别口袋的共同作用完成对带有 dU 损伤的 DNA 底物的识别结合反应。

3.5.2 拇指结构域对外切酶活性的调控

Patricia Pe ez-Arnaiz 等人的工作表明，拇指结构域上与外切酶相互作用的一些残基间接参与外切反应，同时拇指结构域上一些与 DNA 相互作用的残基突变后导致的外切酶活性



变化^[53]。我们进行的单点突变也得到类似的结果。通过一系列实验，我们进一步发现拇指结构域在外切酶反应中行使了与 dU 识别过程中类似的支架功能，即固定 DNA 底物使外切反应顺利进行。拇指结构域截断突变体与全点突变体导致的在剩余 17nt 处外切反应的停滞现象，说明拇指结构域的这种辅助功能在短片段的酶切反应起着重要作用。这一功能可以推广至其他 B 家族 DNA 聚合酶，推测不同的聚合酶需要的拇指结构域辅助片段的长度会有所不同，其长度可能与聚合酶活性中心与外切酶活性中心的距离相关，这一点将在之后进一步解释。此外，Patricia Pe érez-Arnaiz 等人的工作报道了几个点突变后酶切活性增加的现象^[53]，而在我们所选取的点中未发现该现象。通过比较 Phi29 DNA 聚合酶、KOD DNA 聚合酶和 Pfu DNA 聚合酶相似空间位置上与 DNA 相互作用的氨基酸残基的带电情况，我们发现在 Phi29 DNA 聚合酶与 KOD DNA 聚合酶的拇指结构域上分布着较少的正电荷残基，而 Pfu DNA 聚合酶则有着较多的强正电荷残基，由此推测 Pfu DNA 聚合酶拇指结构域对外切酶活性的辅助作用较大，因此突变后对其活性所产生的负面影响较明显。而在 Phi29 DNA 聚合酶和 KOD DNA 聚合酶中可能有其他结构起到了类似的辅助作用，而其拇指结构域对 DNA 的结合反而成为了酶切反应的阻碍作用，当拇指结构域的相应残基突变为其他氨基酸时减弱了这种阻碍作用而使得外切活性增加，这也与 KOD 高比活的外切活性导致聚合反应保真度较高相一致。

3.5.3 拇指结构域对聚合酶活性的调控

拇指结构域对于聚合酶活性的辅助作用是其最主要的功能，我们的实验主要阐明了拇指结构域会将引物—模板结构底物牢固定在聚合活性状态，以保证聚合酶主要行使聚合反应。将 DNA 底物固定在聚合活性状态应该由对模板单链的结合和拇指结构域对引物—模板结构中双链的结合共同完成。我们的结果也显示至少拇指结构域对双链的结合功能在聚合反应中是不可或缺的，通过突变体导致 17nt 引物的起始能力下降的结果可知，拇指结构域的辅助作用对于短引物的聚合反应有着更重要的作用，这一点类似于拇指结构域对短片断 DNA 的酶切活性的贡献。在聚合过程由来源于两个结构域的蛋白—DNA 相互作用共同完成对底物的牢固定的前提下，对比 KOD DNA 聚合酶与 Pfu DNA 聚合酶拇指结构域上的正电荷氨基酸，不难发现二者存在明显的残基数量差异。因此我们推测，相较 KOD DNA 聚合酶，Pfu DNA 聚合酶拇指结构域所提供的 DNA 结合活性对聚合反应过程牢固定底物的辅助作用力高于 KOD DNA 聚合酶，而这种由拇指结构域所提供的强结合活性在一定程度上反而降低了 Pfu DNA 聚合酶的聚合反应速率，这可能是 KOD DNA 聚合酶聚合反应速度高于 Pfu DNA 聚合酶较快的原因。

拇指结构域虽然在序列上不具有较高的保守性，但其空间结构较为保守^[38-50]。鉴于我们的结果表明拇指结构域对于 DNA 聚合酶活性的重要辅助作用，推测这种辅助作用可能是其他拥有类似拇指结构域的 DNA 相互作用的蛋白所存在的共性，正是这种基于拇指结构域的底物相互作用的存在帮助蛋白完成对底物的结合以及反应的顺利进行。

3.5.4 外切酶活性与聚合酶活性的转换

众多参与到细胞 DNA 复制与损伤修复过程的 DNA 聚合酶均具有 3'-5'外切酶活性用以校正发生在聚合过程中发生的碱基错配现象^[20]。DNA 聚合酶同时具有 5'-3'的 DNA 聚合活性和 3'-5'的 DNA 降解活性，导致这两种活性会出现抗衡，同时也会出现两种活性间的转换^[53, 62, 63]。在 Pfu DNA 聚合酶的研究中，Nishida H 等人的工作提出由 PCNA 介导的 Pfu DNA 聚合酶在聚合活性状态与外切活性状态间的转换^[63]，而我们的实验旨在讨论拇指结构域所介导的 Pfu DNA 聚合酶的聚合酶活性与外切酶活性之间的转换关系。

通过测定拇指结构域各突变体的外切酶反应活性，我们发现外切反应在底物剩余 17nt 时存在明显的状态转换过程。进一步实验证实，对长于 17nt 的底物的酶切状态类似于聚合



状态，即对于长于 17nt 的底物，拇指结构域会将其牢固定在有利于聚合活性的状态。由相关的晶体结构可以推断很可能是拇指结构域紧紧卡住 DNA 的一种状态^[38-43]，从实验中可以看出这种状态对于双链或单链底物均存在，而这种有利于聚合活性的状态从空间结构上讲并不利于外切酶反应的进行。正是这种对外切酶不利的状态，使我们观测到对引物-模板结构底物的酶切速率低于单链底物，而这种速率差异正是由于拇指结构域将引物-模板结构底物固定于聚合状态的能力强于单链底物。这种对聚合活性的偏向是为了保证聚合活性始终在 DNA 复制过程中占主导地位，即使出现错配也会以利于聚合活性的状态完成基于外切酶的校正过程，从而使得 DNA 能够高效的进行复制。

对于彻底由聚合活性状态转换到外切活性状态的情况，我们认为是在外切酶反应中当底物剩余 17nt 时所出现的聚合酶结合 DNA 方式的转换。由于这种转换是从利于聚合反应的状态转换至利于外切反应的状态，因而出现了底物从剩余 17nt 至 12nt 的跳跃式快速酶切。通过对 Tgo 的晶体结构和大肠杆菌 DNA 聚合酶 II 的晶体结构进行比较^[28, 33]，我们推测在底物剩余 17nt 时，拇指结构域由卡住 DNA 的状态转换为打开状态，而此时 DNA 以拇指结构域为支架直接与外切酶活性中心相作用，即有利于外切活性的状态。基于此推断，由聚合酶活性中心至拇指结构域的距离决定了出现状态转换时的底物长度，而拇指结构域打开时与外切酶活性中心的距离决定了出现转换后快速跳跃式酶切后的剩余底物长度，而这里两个长度的差即是跳跃式酶切的长度，对于 Pfu DNA 聚合酶，这几个结构域之间的距离可以印证这一说法^[48]。

对于同时存在两种活性的 Pfu DNA 聚合酶，的确存在两种状态间的抗衡以及在一定情况下的状态转换，但在 DNA 复制过程中，为了保证聚合状态的主导地位，DNA 外切过程是在有利于聚合活性的状态下完成的，而拇指结构域的主要功能即是稳定这种状态的存在。

3.5.5R613 对于聚合活性的重要性

对于拇指结构域稳定 DNA 处于聚合反应状态的过程，我们发现 R613 发挥着主要作用。结合 R613A 的外切酶反应和聚合酶反应实验结果，我们证实 R613 具有将 DNA 底物固定在聚合活性状态，并将引物的 3'端准确的对准聚合酶活性中心的功能。将该点突变会导致聚合酶活性和 DNA 复制忠实度的降低，这一点通过聚合反应中模板链上 dA 导致的错配比例增加的结果得以支持，这一点表明了聚合过程中对 DNA 固定的稳定性为聚合酶的保真性做出了贡献。同样在 Patricia Pérez-Arnaiz 的工作中报道了 Phi29 DNA 聚合酶也有类似的残基 K555^[53]，由这一相似处可以推断尽管拇指结构域的序列保守性不高但结构上的保守导致了功能上的保守，这一点可以推广至其他 B 家族 DNA 聚合酶。

R613 的突变在另一方面表现为，在一定情况下突变体对底物的结合更有利于酶切的进行，例如图 3-9 与图 3-14 所示的结果。我们认为，R613A 突变体拇指结构域对底物的结合状态并非导致拇指从由利于聚合活性转变为利于外切活性，而是在利于聚合活性的状态下出现了 3'端的摆动，而对模板 5'端突出单链的结合抑制了这种摆动从而使聚合活性重新占据主导，通过图 3-14 所得到的结果可以支持这一推论。基于以上推论，R613 作为拇指结构域的一个重要位点，在 DNA 聚合反应中对底物的稳定与复制的忠实性均做出了贡献。

3.6 本章小结

本章实验发现，突变拇指结构域上点，R613、R669、K675、R744、R752 和 K753 会导致 Pfu DNA 聚合酶对 DNA 底物的结合能力大大减弱，验证其与 DNA 存在相互作用。

之后利用这些突变体对拇指结构域的功能进行了深入的探究，结果显示了 Pfu DNA 聚合酶对带有未配对的 dU 的 DNA 链的结合需要 N 端 dU 识别口袋与拇指结构域共同结合底



物完成; 3'-5'外切酶活性需要拇指结构域作为支架辅助其完成酶切, 这一功能特别是对于短于 17nt 底物的酶切过程十分重要; 聚合活性需要拇指结构域完成将底物固定于利于聚合活性的状态同时将引物 3'端置于聚合活性中心, 以保证聚合活性的高效与准确; 拇指结构域的功能主要是为了将底物固定于利于聚合活性的状态, 对于大于 17nt 的底物, 酶切过程也在此状态下完成, 当底物剩余 17nt 时, 拇指结构域介导了从有利于聚合活性状态至有利于外切活性状态的转换过程。

综上所述, 拇指结构域参与到 Pfu DNA 聚合酶的各活性中, 并行使不同的不可或缺的功能。



第四章 全文总结

4.1 主要结论

B 家族 DNA 聚合酶拇指结构域看似功能简单，实际上参与了聚合酶行使各活性的过程中，起到了不可或缺的作用。本文通过考察 Pfu DNA 聚合酶的晶体结构，构建了表达拇指结构域缺失及相关 6 个氨基酸的点突变的表达载体，通过原核表达获得了大量突变体蛋白。通过对这些突变体的 dU 识别活性、DNA 外切酶活性和 DNA 聚合酶活性进行测定，我们获得了如下结果：

- 1、证实了拇指结构域参与到 DNA 结合过程中，并确定了残基 R613、R669、K675、R744、R752 和 K753 确实参与与 DNA 的相互作用。
- 2、首次发现古生菌 B 家族 DNA 聚合酶的 dU 识别过程需要拇指结构域的辅助，确定 dU 识别过程是由 N 端 dU 识别口袋和拇指结构域对 DNA 的结合作用共同完成的，二者缺一不可。
- 3、证实了拇指结构域与 DNA 的相互作用辅助 3'-5' 外切酶的活性，在对 DNA 酶切过程中，拇指结构域扮演支架的角色帮助酶切的进行，这种功能特别是对于短于 17nt 的底物尤为重要。对于长于 17nt 的底物，外切过程是在底物被结合至聚合状态下进行的，当酶切至底物剩余 17nt 时，拇指结构域介导了底物由被结合至聚合活性状态至被直接送至外切活性中心的状态转换过程。
- 4、证实了拇指结构域参与 DNA 聚合过程，其对 DNA 底物的结合是进行 DNA 聚合的重要步骤之一。并且发现拇指结构域的首要功能是将 DNA 底物稳定在聚合活性状态并将底物引物的 3' 端对准 DNA 聚合活性中心以保证聚合过程高效而准确的进行，对这种状态的保持在进行外切过程依然如此。

4.2 研究展望

本文对 B 家族 DNA 聚合酶 Pfu DNA 聚合酶的拇指结构域进行了考察，揭示了其在 dU 识别活性、DNA 外切活性和 DNA 聚合活性中行使的一些功能，但仍有一些问题值得探讨：

- 1、我们发现了在 DNA 外切过程中针对不同长度底物出现的不同酶切状态，并通过一系列实验验证了各状态下的底物与酶的关系，然而具体在不同状态下的酶切过程依然未知，需要进一步通过晶体结构和分子动力学模拟来揭示该过程是如何进行的。
- 2、R613 是参与了 DNA 底物稳定的重要残基，但是其突变后导致的错配率增加以及掺入错误 dATP 的原因尚未明确，需要结合 DNA 聚合酶活性来揭示该现象的产生机理。
- 3、本实验中进行的均为体外实验，是否能较好地反映体内的过程尚未确定，由于在体内有众多与 Pfu DNA 聚合酶相互作用的蛋白，这些蛋白是否影响了或参与了拇指结构域行使功能的过程，这需要进一步体外与体内的实验验证。



参考文献

- [1] Grabowski B, Kelman Z. Archeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context[J].
- [2] Annu Rev Microbiol, 2003;57:487-516. Aves SJ. DNA replication initiation[J]. Methods Mol Biol, 2009;521:3-17.
- [3] Franco AA, Lam WM, Burgers PM, Kaufman PD, Perumal SK, Yue H, Hu Z, Spiering MM, Benkovic SJ. Single-molecule studies of DNA replisome function[J]. Biochim Biophys Acta, 2010 May;1804(5):1094-112.
- [4] Hamdan SM, Richardson CC. Motors, switches, and contacts in the replisome[J]. Annu Rev Biochem, 2009;78:205-43.
- [5] Pomerantz RT, O'Donnell M. Replisome mechanics: insights into a twin DNA polymerase machine[J]. Trends Microbiol, 2007 Apr;15(4):156-64.
- [6] Kelman Z, O'Donnell. Polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine[J]. Annu Rev Biochem, 1995;64:171-200
- [7] Masai H, Matsumoto S, You Z, Yoshizawa-Sugata N, Oda M. Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? [J]. Annu Rev Biochem, 2010;79:89-130.
- [8] Pursell ZF, Isoz I, Lundström EB, Johansson E, Kunkel TA. Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication[J]. Science, 2007 Jul 6;317(5834):127-30.
- [9] Nick McElhinny SA, Gordenin DA, Stith CM, Burgers PM, Kunkel TA. Division of labor at the eukaryotic replication fork[J]. Mol Cell, 2008 Apr 25;30(2):137-44.
- [10] Hubscher U, Maga G, Spadari S. Eukaryotic DNA polymerases[J]. Annu Rev Biochem, 2002;71:133-63.
- [11] Fazlieva R, Spittle CS, Morrissey D, Hayashi H, Yan H, Matsumoto Y. Proofreading exonuclease activity of human DNA polymerase delta and its effects on lesion-bypass DNA synthesis[J]. Nucleic Acids Res, 2009 May;37(9):2854-66.
- [12] Beattie TR, Bell SD. Molecular machines in archaeal DNA replication[J]. Curr Opin Chem Biol, 2011 Oct;15(5):614-9.
- [13] Stukenberg PT, Studwell-Vaughan PS, O'Donnell M. Mechanism of the sliding beta-clamp of DNA polymerase III holoenzyme. J Biol Chem. 1991 Jun 15;266(17):11328-34.
- [14] MacNeill SA. Structure and function of the GINS complex, a key component of the eukaryotic replisome[J]. Biochem J, 2010 Jan 15;425(3):489-500.
- [15] Gawel D, Jonczyk P, Fijalkowska IJ, Schaaper RM. DNA X36 Mutator of *Escherichia coli*: effects of the τ subunit of the DNA polymerase III holoenzyme on chromosomal DNA replication fidelity[J]. J Bacteriol, 2011 Jan;193(1):296-300.
- [16] Maor-Shoshani A, Hayashi K, Ohmori H, Livneh Z. Analysis of translesion replication across an abasic site by DNA polymerase IV of *Escherichia coli*[J]. DNA Repair (Amst), 2003 Nov 21;2(11):1227-38.
- [17] Prakash S, Johnson RE, Prakash L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function[J]. Annu Rev Biochem, 2005;74:317-53.



- [18]Xu Y, Derbyshire V, Ng K, Sun XC, Grindley ND, Joyce CM. Biochemical and mutational studies of the 5'-3' exonuclease of DNA polymerase I of *Escherichia coli*[J]. *J Mol Biol*, 1997 May 2;268(2):284-302.
- [19]Lehman IR. Discovery of DNA polymerase[J]. *J Biol Chem*, 2003 Sep 12;278(37):34733-8.
- [20]Joyce CM, Steitz TA. Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:777-822.
- [21]Choi JY, Eoff RL, Pence MG, Wang J, Martin MV, Kim EJ, Folkmann LM, Guengerich FP. Roles of the four DNA polymerases of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* and accessory proteins in DNA replication[J]. *J Biol Chem*, 2001;286: 31180-31193.
- [22]Cann IK, Ishino S, Nomura N, Sako Y, Ishino Y. Two family B DNA polymerases from *Aeropyrum pernix*, an aerobic hyperthermoPhilic crenarchaeote[J]. *J Bacteriol*, 1999;181: 5984-5992.
- [23]Zhang L, Lou H, Guo L, Zhan Z, Duan Z, Guo X, Huang L. Accurate DNA synthesis by *Sulfolobus solfataricus* DNA polymerase B1 at high temperature[J]. *ExtremoPhiles*, 2010;14: 107-117.
- [24]Lou H, Duan Z, Sun T, Huang L. Cleavage of double-stranded DNA by the intrinsic 3'-5' exonuclease activity of DNA polymerase B1 from the hyperthermoPhilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* at high temperature[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004;231: 111-117.
- [25]Zhang L, Zhang L, Liu Y, Yang S, Gao C, Gong H, Feng Y, He ZG. Archaeal eukaryote-like Orc1/Cdc6 initiators physically interact with DNA polymerase B1 and regulate its functions[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009;106: 7792-7797.
- [26]Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996 Sep 15;24(18):3546-51.
- [27]Greagg MA, Fogg MJ, Panayotou G, Evans SJ, Connolly BA, Pearl LH. A read-ahead function in archaeal DNA polymerases detects promutagenic template-strand uracil[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999;96: 9045-9050.
- [28]Firbank SJ, Wardle J, Heslop P, Lewis RJ, Connolly BA. Uracil recognition in archaeal DNA polymerases captured by X-ray crystallography[J]. *J Mol Biol*, 2008;381: 529-539.
- [29]Kiyonari S, Uchimura M, Shirai T, Ishino Y. Physical and functional interactions between uracil-DNA glycosylase and proliferating cell nuclear antigen from the euryarchaeon *Pyrococcus furiosus*[J]. *J Biol Chem*, 2008;283: 24185-24193.
- [30]Schomacher L, Chong JP, McDermott P, Kramer W, Fritz HJ. DNA uracil repair initiated by the archaeal ExoIII homologue Mth212 via direct strand incision[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009;37: 2283-2293.
- [31]Gueguen Y, Rolland JL, Lecompte O, Azam P, Le Romancer G, Flament D, Raffin JP, Dietrich J. Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermoPhilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*[J]. *Eur J Biochem*, 2001;268: 5961-5969.
- [32]Henneke G, Flament D, Hübscher U, Querellou J, Raffin JP. The hyperthermoPhilic euryarchaeota *Pyrococcus abyssi* likely requires the two DNA polymerases D and B for DNA replication[J]. *J Mol Biol*, 2005;350: 53-64.
- [33]Wang F, Yang W. Structural insight into translesion synthesis by DNA Pol II[J]. *Cell*, 2009 Dec 24;139(7):1279-89.

[34]Li V, Hogg M, Reha-Krantz LJ. Identification of a new motif in family B DNA polymerases by mutational analyses of the bacteriophage t4 DNA polymerase[J]. J Mol Biol, 2010 Jul 16;400(3):295-308.

[35]Sun S, Shamoo Y. Biochemical characterization of interactions between DNA polymerase and single-stranded DNA-binding protein in bacteriophage RB69[J]. J Biol Chem, 2003 Feb 7;278(6):3876-81.

[36]Fidalgo da Silva E, Reha-Krantz LJ. DNA polymerase proofreading: active site switching catalyzed by the bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Nucleic Acids Res, 2007;35(16):5452-63.

[37]Kamtekar S, Berman AJ, Wang J, Lázaro JM, de Vega M, Blanco L, Salas M, Steitz TA. The Phi29 DNA polymerase:protein-primer structure suggests a model for the initiation to elongation transition[J]. EMBO J, 2006 Mar 22;25(6):1335-43.

[38]Li Y, Kong Y, Korolev S, Waksman G. Crystal structures of the Klenow fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I complexed with deoxyribonucleoside triphosphates[J]. Protein Sci, 1998 May;7(5):1116-1123.

[39]Eom SH, Wang J, Steitz TA. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site[J]. Nature, 1996 Jul 18;382(6588):278-281.

[40]Kim Y, Eom SH, Wang J, Lee DS, Suh SW, Steitz TA. Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase[J]. Nature, 1995 Aug 17;376(6541):612-616.

[41]Korolev S, Nayal M, Barnes WM, Di Cera E, Waksman G. Crystal structure of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I at 2.5-Å resolution: structural basis for thermostability[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Sep 26;92(20):9264-9268.

[42]Beese LS, Steitz TA. Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism[J]. EMBO J, 1991 Jan;10(1):25-33.

[43]Beese LS, Derbyshire V, Steitz TA. Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA[J]. Science, 1993 Apr 16;260(5106):352-5.

[44]Kamtekar S, Berman AJ, Wang J, Lázaro JM, de Vega M, Blanco L, Salas M, Steitz TA. Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage Phi29[J]. Mol Cell, 2004 Nov 19;16(4):609-18.

[45]Wang J, Sattar AK, Wang CC, Karam JD, Konigsberg WH, Steitz TA. Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69[J]. Cell, 1997 Jun 27;89(7):1087-99

[46]Wang J, Yu P, Lin TC, Konigsberg WH, Steitz TA. Crystal structures of an NH2-terminal fragment of T4 DNA polymerase and its complexes with single-stranded DNA and with divalent metal ions[J]. Biochemistry, 1996 Jun 25;35(25):8110-9

[47]Hashimoto H, Nishioka M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T, Inoue T, Kai Y. Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermoPhilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1[J]. J Mol Biol, 2001 Feb 23;306(3):469-77.

[48]Kim SW, Kim DU, Kim JK, Kang LW, Cho HS. Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*[J]. Int J Biol Macromol, 2008 May 1;42(4):356-61.

[49]Hopfner KP, Eichinger A, Engh RA, Laue F, Ankenbauer W, Huber R, Angerer B. Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999 Mar 30;96(7):3600-5.



[50]Rodriguez AC, Park HW, Mao C, Beese LS. Crystal structure of a pol alpha family DNA polymerase from the hyperthermoPhilic archaeon Thermococcus sp. 9 degrees N-7[J]. J Mol Biol, 2000 Jun 2;299(2):447-62.

[51]Ibarra B, Chemla YR, Plyasunov S, Smith SB, Lázaro JM, Salas M, Bustamante C. Proofreading dynamics of a processive DNA polymerase[J]. EMBO J, 2009 Sep 16;28(18):2794-802

[52]Datta K, Johnson NP, LiCata VJ, von Hippel PH. Local conformations and competitive binding affinities of single- and double-stranded primer-template DNA at the polymerization and editing active sites of DNA polymerases[J]. J Biol Chem, 2009 Jun 19;284(25):17180-93.

[53]Pérez-Arnaiz P, Lázaro JM, Salas M, de Vega M. Involvement of Phi29 DNA polymerase thumb subdomain in the proper coordination of synthesis and degradation during DNA replication[J]. Nucleic Acids Res, 2006 Jun 6;34(10):3107-15

[54]Truniger V, Lázaro JM, Salas M. Function of the C-terminus of Phi29 DNA polymerase in DNA and terminal protein binding[J]. Nucleic Acids Res, 2004 Jan 16;32(1):361-70.

[55]Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*[J]. Gene, 1991 Dec 1;108(1):1-6.

[56]Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases[J]. Nucleic Acids Res, 1996 Sep 15;24(18):3546-51.

[57]Garcia GM, Mar PK, Mullin DA, Walker JR, Prather NE. The *E. coli* dnaY gene encodes an arginine transfer RNA. Cell, 1986 May 9;45(3):453-9.

[58]Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. Gene, 1989 Dec 21;85(1):109-14.

[59]Hill AM, Cane DE, Mau CJ, West CA. High level expression of *Ricinus communis* casbene synthase in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. Arch Biochem Biophys, 1996 Dec 15;336(2):283-9.

[60]Kleber-Janke T, Becker WM. Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. Protein Expr Purif. 2000 Aug;19(3):419-24.

[61]Ibarra B, Chemla YR, Plyasunov S, Smith SB, Lázaro JM, Salas M, Bustamante C. Proofreading dynamics of a processive DNA polymerase. EMBO J. 2009 Sep 16;28(18):2794-802. Epub 2009 Aug 6.

[62]Joyce CM. How DNA travels between the separate polymerase and 3'-5'-exonuclease sites of DNA polymerase I (Klenow fragment). J Biol Chem. 1989 Jun 25;264(18):10858-66.

[63]Nishida H, Mayanagi K, Kiyonari S, Sato Y, Oyama T, Ishino Y, Morikawa K. Structural determinant for switching between the polymerase and exonuclease modes in the PCNA-replicative DNA polymerase complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 8;106(49):20693-8. Epub 2009 Nov 23.

[64]Mueser TC, Hinerman JM, Devos JM, Boyer RA, Williams KJ. Structural analysis of bacteriophage T4 DNA replication: a review in the Virology Journal series on bacteriophage T4 and its relatives[J]. Virol J. 2010 Dec 3;7:359.



附录 常用试剂配方

LB	蛋白胨	10g
	酵母粉	5g
	NaCl	8g
	加水至	1L
10xTBE	Tris	108g
	硼酸	55g
	EDTA	9.3g
	加水至	1L
裂解液	Tris	1.21g
	NaCl	8.766g
	甘油	100ml
	加水至	500ml (pH8.0)
洗涤液	Tris	1.21g
	NaCl	8.766g
	咪唑	0.17g
	甘油	100ml
	加水至	500ml (pH8.0)
洗脱液	Tris	1.21g
	NaCl	8.766g
	咪唑	6.808g
	甘油	100ml
	加水至	500ml (pH8.0)
30% 丙烯酰胺 (Acryl:Bis 29:1)	丙烯酰胺 (Acryl)	290g
	甲叉双丙烯酰胺 (Bis)	10g
	加水至	1L
脱色液	醋酸	100ml
	乙醇	50ml
	加水至	1L



考马斯亮蓝染液	考马斯亮蓝	1g
	异丙醇	250ml
	醋酸	100ml
	加水至	1L
30% 丙烯酰胺 (Acryl:Bis 29:1)	丙烯酰胺 (Acryl)	285g
	甲叉双丙烯酰胺 (Bis)	15g
	10xTBE	50ml
	加水至	1L
20% 丙烯酰胺 (变性 Acryl:Bis 29:1)	丙烯酰胺 (Acryl)	190g
	甲叉双丙烯酰胺 (Bis)	10g
	10xTBE	50ml
	尿素	480g
	加水至	1L
6xLoading Buffer	EDTA	4.4g
	溴芬蓝	250mg
	二甲苯青	250mg
	甘油	180ml
	加水至	500ml
5xSDS-PAGE Loading Buffer	1M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25ml
	SDS	0.5g
	溴芬蓝	25mg
	甘油	2.5ml
	β -巯基乙醇	250ul
	加水至	5ml
10xTris-Glycine Buffer	Tris	30g
	Glycine	188g
	SDS	10g
	加水至	1L
反应终止液	甲酰胺	9ml
	EDTA	0.29g
	SDS	0.1g
	加水至	10ml



致谢

感谢我的指导老师刘喜朋副教授在我毕设期间给予我的细心指导,我今后会更加努力地投入到科研当中,以回报刘老师对我的全部帮助。

感谢梁如冰老师和马钢老师曾给与我的建议和帮助。

感谢全体 2011 IGEM 成员:李春莹、张凯思、阮云凤、马晓盼、赵斌、张博、赵希文。

感谢我四年来的所有老师、同学、朋友以及曾经帮助过我的人们。

感谢我的父母,自始至终对我选择的支持和鼓励。



本科在读期间主要学术成绩

1 参与论文

You Wang, Chunying Li, Md. Rezaul Islam Khan, Yunfeng Ruan, Bin Zhao, Bo Zhang, Xiaopan Ma, Kaisi Zhang, Xiwen Zhao, Guan hao Ye, Yushu Wang, Guoyin Feng, Xizhi Guo, Lin He, Gang Ma. Codon Switching: Devices Using Rare Codon and Stop Codon Regulating Gene Expression in *E.coli*. (in submitting).

You Wang, Xipeng Liu, Jianhua Liu. The thumb domain of *Pyrococcus furiosus* B-family DNA polymerase plays important roles in the reactions of Uracil recognition, 3' to 5' DNA hydrolyzation and DNA polymerization. (in submitting).

Lu Z, Hou J, **Wang Y**, Liu J. Involvement of Ser94 in RNase HIII from *Chlamydomonas reinhardtii* in the recognition of a single ribonucleotide misincorporated into double-stranded DNA. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Apr 26;1824(7):859-865.

2 学术竞赛

International Genetically Engineered Machine Competition (iGEM)

Gold Medal

Top 16 in 143 Teams

Special Prize: the Best New Biobrick Part or Device, Engineered

团队成员（从左至右）：阮云凤、张博、赵希文、赵斌、叶冠豪、王右、李春莹、马晓盼、张凯思、指导老师马钢





THE IMPORTANT FUNCTIONS OF THUMB DOMAIN IN *PYROCOCCLUS FURIOSUS* B-FAMILY DNA POLYMERASE

DNA replication is the molecular base for the transfer of genetic information to next generation. Replication of chromosomal DNA is a highly complicated biochemical reaction related to many proteins. The whole DNA replication process can be divided into three stage: replication initiation, elongation, and termination. During the initiation stage of chromosomal DNA replication, some protein recognize the origin sequence of replication, bind/melt the original replication double-stranded DNA, then recruit other proteins to assemble the replication initiation complex. After the complete assembly of a replisome, the DNA polymerase synthesize the new DNA strand using the melted mother single-stranded DNA as a template.

In all organisms, DNA replication is a complex event involving dozens of proteins and enzymes to ensure the accurate and timely duplication of genetic information. The process that underlies DNA replication is functionally (and often structurally) conserved in all life forms. The process starts at a specific sequence called an origin of replication, at which origin-binding proteins (OBP) bind and locally unwind the duplex DNA. Additional proteins interact with the OBP-DNA complex and participate in the assembly of the helicase around the DNA. The helicase utilizes ATP hydrolysis to melt the duplex, resulting in formation of a replication bubble that expands away from the origin. The exposed single-stranded (ss) DNA in the replication bubble is coated with ssDNA-binding protein (SSB). DNA primase, polymerase (Pol), and the rest of the replication machinery are recruited to the SSB-ssDNA nucleofilament to initiate bidirectional DNA synthesis. Owing to the antiparallel nature of DNA and the unidirectionality of the polymerase, one strand of the chromosome is synthesized continuously (leading strand) and the other is copied discontinuously (lagging strand) as a series of Okazaki fragments.

DNA replication is achieved by a DNA-dependent DNA polymerase that uses ssDNA as a template to synthesize the complementary strand. Most organisms possess several DNA polymerases that differ in their polypeptide compositions and catalytic properties such as processivity, fidelity, and rate of chain extension. Different polymerases are used for replication, repair, recombination, and in cellular organelles. On the basis of their amino acid sequences, DNA polymerases can be classified into at least six distinct groups [family A, B, C, D, X, and Y]. Polymerases have been the most extensively studied component in archaeal DNA replication. A large number of DNA polymerases from many species have been identified, purified, and biochemically characterized. The B- and D-type enzymes are thought to be involved in archaeal chromosomal DNA replication.

One to three members of family B (PolB) have been identified in all archaeal species examined to date. These proteins have similar amino acid sequences, domain organization, and overall structure, and all possess a potent 3'-5' exonuclease proofreading activity and DNA polymerase. DNA polymerases are required for chromosomal replication as well as for recombination and repair. Thus, an important question is whether members of family B are the



archaeal replicative enzyme or are needed for other processes. In Crenarchaea the answer is simple, as only the B-type enzyme has been identified. It is difficult to give a definite answer to this question to chromosomal replication in Euryarchaea, as another putative replicative enzyme (PolD) has been identified in this kingdom.

A function for PolB as the replicative enzyme can be inferred, however, from a number of observations. Archaeal PolB 1 and B3 contain potent 3'-5' proofreading activity. In addition, one of the hallmarks of a replicative polymerase in eukarya and bacteria is the stimulation of polymerase activity by the accessory proteins, the sliding clamp, and the clamp loader. The activity of PolB from several *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota* are stimulated by the cognate PCNA and RFC. The stimulation of the polymerase by these factors suggests that the B-type enzymes are likely to function as the replicative polymerases in archaea.

In *Euryarchaeota* the PolB may be the sole replicative enzyme, or it may work in conjunction with PolD at the replication fork. PolD, a euryarchaeal-specific polymerase identified in all species studied, is a heterodimer of a small DP1 and a large DP2 subunit. The large subunit is catalytic and that DP1 serves as an accessory factor. DP1 shows homology to the small (noncatalytic) subunits of the eukaryal replicative polymerases, Pol α , pol δ , and pol ϵ . DP2, with some similarity to the amino acid sequence of other polymerases, and alone contains limited polymerase activity, while the dimeric polymerase possesses strong polymerase and 3'-5' exonuclease proofreading activities. The stimulation of the polymerase by PCNA and RFC also supports that PolD is the replicative enzyme in *Euryarchaeotathis*. PolD and PolB may jointly replicate the euryarchaeal chromosome. In such cases, one enzyme may replicate the leading strand while the other replicates the lagging strand. Further studies are needed, however, to elucidate whether PolB, PolD, or both are the replicative enzymes in *Euryarchaeota*.

The three-dimensional structures of several archaeal polymerases have revealed similar structures. Their topology is also similar to the structure of gp43, a B-type enzyme from bacteriophage RB69. An interesting structural feature identified in the archaeal enzyme is a putative RNA-binding domain at the N terminus. This domain, superimposable on the three-dimensional structures of several RNA-binding domains, was also identified, on the basis of sequence similarity, in all archaeal PolB polymerases. However, whether this region indeed binds RNA and is biologically significant for polymerase activity are not yet clear.

The crystal structure of *Pfu* DNA polymerase, the family B DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* is highly similar to that of KOD DNA polymerase. The structure of *Pfu* DNA polymerase elucidates the electron density of the interface between the exonuclease and thumb domains, which has not been previously observed in the KOD1 structure. The interaction of these two domains is known to coordinate the proofreading and polymerization activity of DNA polymerases, especially via H147 that is present within the loop (residues 144–158) of the exonuclease domain. E148 rather than H147 is located at better position to interact with the thumb domain.

Although the important thumb domain locates between exonuclease and polymerase, the intrinsic function of thumb domain is still unclear. From the crystal structure of several family B DNA polymerases, including *pfu* DNA polymerase and *E. coli* polymerase II, we identified six conserved positively-charged amino acid residues, R613, R669, K675, R744, R752, and K753, for potential DNA binding in thumb domain of *pfu* DNA polymerase, a family B DNA polymerase from *P. furiosus*. In sum, 8 mutants of thumb domain were constructed by site-directed mutation,



ie, four single-residues mutants of R613A, R669A, K675A, and R744A, three double-residues mutants of R752A+K753A, R669A+K675A, R613A+R744A, one four-residues mutant and one thumb-deleted mutant. After expression in *E. coli* and purification by Ni-NTA resin, recombinant proteins (about 1.5 mg/ml, 34000U/mg) were obtained. These thumb mutants were used to characterize the three activities of pfu DNA polymerase, dU-binding capacity, exonuclease and polymerase activities.

After assay of 10 pfu DNA polymerase, including eight site-mutants, one thumb-truncated mutant, and wt enzymes, on dU binding, exonuclease, and polymerase activity, we draw the conclusion that thumb domain plays important function in three activities as a support to binding the DNA outside of the above three domains. First, the bindings of wt and mutant pfu DNA polymerase to normal and dU-carrying DNA, demonstrated by gel-shift, show that all mutants almost lost the DNA binding capability, meanwhile the binding ability to dU damaged DNA is sharply decreased. We also found that the truncated mutant decreases more binding of dU-carrying primer-template than that to single-stranded dU-damaged DNA. These results suggest that the thumb functionalizes in DNA binding as an accessory supports of double-stranded DNA.

Although as a domain outside of exonuclease, the mutation of residues involved in the binding of double-stranded DNA results largely decrease of exonuclease activity. Meanwhile during the process of digestion of a long ss DNA, the digestion pattern changed when the remaining ss DNA is 17nt long, where a fast digestion of four nucleotides happened followed by a slow digestion of the remained shorter ss DNA. These results suggest that the thumb functions as a support of the undigested terminal of ds and ss DNA substrate in the binding mode prior to polymerization reaction, and a change happens to the binding mode prior to hydrolyzing reaction when the possessive digestion proceed to a remained 17-18nt DNA. This binding mode guarantees the pfu DNA polymerase catalyzes the two reactions in a form of prior to polymerization reaction. The DNA length initiating binding mode transfer is consistent the distance of from thumb to the polymerase activity centre; and that after transfer is also consistent to the distance from thumb to exonuclease activity centre. The length difference of from thumb to polymerase/exonuclease results in the fast digestion during transfer of binding mode.

Comparison of the polymerization reaction catalyzed by wt and thumb-mutated pfu DNA polymerase shows that the thumb domain is especially important for the elongation of primer shorter than 17nt, which is similar to that of exonuclease. The truncated mutant expresses more serious decrease in the polymerization activity for 17nt primer in comparison with 23nt primer. Among the six residues, the R613 residue plays a key function in binding the primed DNA to fulfill the extension of primer. When R613 is mutated to Alanine residue, the fidelity of polymerization reaction is sharply decreased, shown by the accumulation of shorter extended fragments mainly on before the A template that results in the A:A mismatch. These results suggest that the R613 residue functions in position the 3' nucleotide of a primer exactly in the activity centre of polymerase. If this positive-charged residue is mutated to a neutral alinine residue, the interaction between thumb and DNA molecule is strong destroyed, resulting in the failure of exact position of 3' end of a primer. An inexactly-positioned primer end results in swaying of 3' nucleotide, then the formation frequency of an error base-pair largely increased, where mainly presented as a A:A mismatched nucleotide. When a mismatch formed, the exonuclease activity is activated, which leads to the digestion of mismatched nucleotides and the cease of elongation of a primer. So the R613 residue in thumb plays a key role in guaranteeing the fidelity of



polymerization reaction via exactly positioning the 3' nucleotide of primer into the activity center by the strong interaction between R613 and double-stranded DNA.

In summary, in this study we elucidate deeply the function of thumb domain in three activities of pfu DNA polymerase, i.e. dU-binding activity, exnuclease activity, and polymerase activity. The relatively separate thumb domain takes part in all three activities of family B DNA polymerase. We propose that the thumb domain is possibly responsible for the regulation of binding mode of DNA during DNA polymerization and hydrolyzation reaction, and the exact positioning of the 3' terminal nucleotide of a primer into the activity center during polymerization reaction.