

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: X200326007

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

Taq DNA 聚合酶的改造及应用

Modification and applications of Taq DNA polymerase

林 晴

指导教师姓名: 李 庆 阁 教授

专 业 名 称: 医学细胞生物学

论文提交日期: 2007 年 7 月 16 日

论文答辩时间: 2007 年 8 月 1 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: 章晓波 研究员

评 阅 人: 卢圣栋 张贺秋

2007 年 8 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

摘要

本论文对 Taq DNA 聚合酶展开了研究，从 Taq DNA 聚合酶表达载体出发，对其进行定向改造，分别用于探针检测 PCR 体系和焦磷酸水解激活的聚合酶反应 (PAP) 技术，最后制备其抗体达到热启动 PCR 的目的。

第一章，概述了 Taq DNA 聚合酶在 PCR 中的应用，普通 Taq DNA 聚合酶虽然得到广泛使用，但是仍然存在不足。各个实验室针对 Taq DNA 聚合酶的不足进行了不同形式的改造，以降低或消除酶的 5'→3'核酸外切酶活性，提高酶的续进性、忠实性、特异性和耐热性等。

第二章，我们也通过定点突变和缺失突变的方法在基因水平对 Taq DNA 聚合酶进行改造，以消除酶的 5'→3'核酸外切酶活性和降低 Taq DNA 聚合酶对 ddNTP 的抵抗，并对改造后的酶蛋白进行表达纯化。

第三章，将改造的酶进行了各方面的应用。第一，应用于探针检测实时 PCR 体系。在各种基于探针检测的实时 PCR 体系中，使用普通的 Taq DNA 聚合酶，有时看不到 S 型信号升起，在 PCR 循环的开始，探针的荧光信号本底就很高。我们将改造后的酶应用于探针检测，发现可以很好地解决这一问题，同时也进一步验证了初始荧光信号本底高是由于探针的荧光基团被具有 5'→3'核酸外切酶活性的 Taq DNA 聚合酶酶切造成。第二，应用于 PAP 技术。PAP 技术即焦磷酸水解激活的聚合酶反应技术。在 PAP 反应体系中，应用普通的 Taq DNA 聚合酶无法进行突变的检测，我们改造后的 Taq-FS DNA 聚合酶，可以成功地解决这一问题，进行稀有突变的检测，可以区分单碱基的差异。第三，酶抗体应用实现热启动 PCR。在 PCR 反应中，由于 Taq DNA 聚合酶在低温下也具有活性，在 PCR 反应开始之前容易产生非特异性的扩增以及产生引物二聚体，为了解决这个问题，我们制备了酶的抗体，在低温下形成抗原抗体复合物使酶失去活性，只有在较高的温度下酶才得以释放发挥活性。极大的提高了 PCR 反应的特异性和灵敏度。

关键词：Taq DNA 聚合酶；实时 PCR；PAP；热启动 PCR

Abstract

This dissertation consists of three parts. It focuses on modification and applications of Taq DNA polymerase. Starting from complete sequence of Taq DNA polymerase, we made a variety of modified Taq DNA polymerases and applied them to real-time PCR, pyrophosphorolysis-activated polymerization (PAP) and hot-start PCR.

In chapter 1, we reviewed the wide applications of Taq DNA polymerase in PCR. Because natural Taq DNA polymerase has some deficiencies and thus many researcher had modifies Taq DNA polymerase to achieve higher fidelity, processivity, and specificity. Also, Taq DNA polymerase was modified to achieve hot-start PCR by using physical, chemical as well as antibody methods.

In chapter 2, we first reduced or deleted the 5'-nuclease activity of Taq DNA polymerase by introducing G46D mutation and by deleting the 5'-nuclease domain. We also prepared and purified Taq-FS DNA polymerase that has no incorporation discrimination against different type of dNTPs.

In chapter 3, we applied the modified Taq DNA polymerase in three different areas. Firstly, we used mutated Taq DNA polymerase in displacing probe-based real-time PCR. We found that the modified Taq DNA polymerase could avoid the false signal caused by 5' to 3' exonuclease activity of Taq DNA polymerase. Secondly, we used Taq-FS in PAP that could greatly improve the efficiency of PAP for rare mutation detection. Thirdly, we used prepared antibodies against Taq DNA polymerase to achieve hot-start PCR. Rabbit antibodies of Taq DNA polymerase could inhibit the activity of Taq DNA polymerase at low temperature. By heating at high temperature, the antibody was denaturalised and the activity of Taq DNA polymerase was recovered. The result showed that much higher sensitivity and speciality were achieved using such hot-start PCR.

Key word: Taq DNA polymerase; Real-time PCR; PAP; Hot-start PCR

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
第一章 Taq DNA 聚合酶研究进展.....	5
§ 1.1 提高 Taq DNA 聚合酶的续进性.....	8
§ 1.2 提高 Taq DNA 聚合酶的忠实性.....	9
§ 1.3 提高 Taq DNA 聚合酶的耐热性	10
§ 1.4 通过点突变降低 Taq DNA 聚合酶 5'→3'外切酶活性.....	10
§ 1.5 降低 Taq DNA 聚合酶对 ddNTP 的抵抗.....	10
§ 1.6 提高 Taq DNA 聚合酶最适反应温度实现热启动 PCR.....	11
参考文献.....	12
第二章 Taq DNA 聚合酶的改造.....	19
第一节 引言.....	19
第一节 材料和方法.....	20
第三节 结果.....	29
§ 3.1 扩增引物验证 G46D 突变结果.....	29
§ 3.2 扩增引物验证 G46D+F667Y 突变结果.....	30
§ 3.3 双酶切验证 KlenTaq 的制备结果	32
§ 3.4 双酶切验证 Taq-N 的制备结果	32
§ 3.5 酶纯化和活性验证	33
第四节 讨论.....	35
参考文献.....	37
第三章 改造后 Taq DNA 聚合酶的应用.....	39
第一节 引言.....	39
第二节 材料与方法.....	41
第三节 结果.....	47
§ 3.1 在探针检测 PCR 体系中的应用.....	47
§ 3.2 在 PAP 技术中的应用.....	49
§ 3.3 酶抗体的应用实现热启动 PCR.....	53
第四节 讨论.....	56
参考文献.....	58
总结.....	62
致谢.....	63

CONTENTS

Abstract(In Chinese)	1
Abstract(In English)	3
Chapter I The Progress of Research about Taq DNA polymerase	5
§1.1 Increasing processivity of Taq DNA polymerase.....	8
§1.2 Increasing fidelity of Taq DNA polymerase.....	9
§1.3 Increasing heat resistance of Taq DNA polymerase.....	10
§1.4 Reducing the 5' nuclease activity of Taq DNA polymerase by point mutation.....	10
§1.5 Reducing the selectivity against ddNTPs of Taq DNA polymerase.....	10
§1.6 Increasing the reaction temperature of Taq DNA polymerase to achieve hot-start PCR.....	11
References	12
Chapter II Modification of Taq DNA polymerase	19
Section I Introduction	19
Section II Materials and Methods	20
Section III Results	29
§3.1 Preparation of G46DY mutant Taq DNA polymerase	29
§3.2 Preparation of G46D+F667Y mutant Taq DNA polymerase	30
§3.3 Preparation of KlenTaq.....	32
§3.4 Preparation of Taq-N.....	32
§3.5 Purification and verification of mutant Taq DNA polymerase.....	33
Section IV Discussion	35
References	37
Chapter III Application of modified Taq DNA polymerase	39
Section I Introduction	39
Section II Materials and Methods	41
Section III Results	47
§3.1 Application in Real-time PCR.....	47
§3.2 Application in PAP.....	49
§3.3 Achieving hot-start PCR using antibodies against Taq DNA polymerase..	53
Section IV Discussion	56

CONTENTS

References	58
Conclusion	62
Acknowledgment	63

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第二章 Taq DNA 聚合酶的改造

第一节 引言

为了消除Taq DNA 聚合酶5'→3'外切酶活性对PCR反应带来的不利影响,以及降低聚合酶对ddNTP的抵抗,我们也尝试采取基因突变的方法对Taq DNA 聚合酶进行改造。

80年代以后人们利用分子克隆技术建立了体外点突变的方法,并利用这种方法在已知的序列中增删或转换核苷酸,特异地产生实验所设计的突变。而定点突变技术是改造、优化基因常用的手段,也是研究蛋白质结构和功能之间复杂关系的有效方法,在医学上还可用于基因治疗等。

目前有许多突变的方法,有聚核苷酸介导的定点突变法、双引物定点突变法以及盒式突变法等。而基于PCR的定点突变技术由于其突变效率高,操作简单,耗时短,成本低廉等优点而倍受瞩目。有重叠延伸PCR(overlapping extension PCR, OE-PCR)法^[1-5]、大引物PCR法(megaprimer PCR)^[6, 7]、以及一些位于特殊位点的碱基可以通过设计含有酶切位点的引物,扩增后进行酶切连接达到定点突变目的的方法^[8-10]。重叠延伸PCR法通过设计两个PCR反应以产生两个含突变位点的DNA片段,随后将上述两个PCR产物混合,二者通过末端互补区结合,并在适宜的温度下互为引物延伸得到完整的含突变的基因。该技术可以实现基因定点突变,还能便利地实现大片段的插入及删除。但是反应需要两对引物和3次PCR,并且需对中间产物进行纯化。相对而言步骤较烦琐,不经济;产物得率很低,还可能产生非预期的移码突变。后来虽然有许多学者对该技术进行了改进^[11-13],但操作仍较烦琐,成本偏高。大引物PCR法的基本原理是设计一个PCR反应,产生一个含突变的DNA片段,然后再以此DNA片段作为引物与原模板退火进行PCR扩增得到含突变的完整的基因。只需三个引物,两个PCR反应,而且无需中间产物纯化等步骤^[14]。但该方法操作仍较烦琐。而对于特殊位点碱基的定点突变,需要在突变位点附近含有唯一的酶切位点或者突变位点位于基因的末端,所以该方法的运用受到很大的限制,不具有普适性。

我们则采用扩增环状质粒全长的方法进行定点突变,经过1次PCR反应、

1次酶解和1次转化，即完成了基因的定点突变。

第二节 材料与方法

§ 2.1 材料

含 Taq DNA 聚合酶基因的质粒，pSE380，DH5 α 及 BL21（均为本实验室保存）；扩增引物，测序引物，突变引物（均为上海 Sangon 公司合成）；Taq DNA 聚合酶（上海 Sangon 公司产品）；溶菌酶、各种限制性内切酶、连接酶、dNTPs（TaKaRa 大连宝生物工程有限公司）；质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒（OMEGA）；Pfu DNA 聚合酶（Stratagene）；其它化学试剂均为国产分析纯。

§ 2.2. 方法

§ 2.2.1 定点突变方法

方法包括如下步骤：1) 根据酶基因设计突变引物；2) 互补引物和质粒结合，在 Pfu 酶作用下延伸成具有一个缺口的环形质粒；3) 在 *Dpn* I 作用下消化掉原来未突变的模板；4) 消化完全的 PCR 产物转化到感受态细胞中并修复缺口。

Taq DNA 聚合酶基因：

```

ATGCTGCCCTCTTTGAGCCCAAGGGCCGGGTCCTCCTGGTGGACGGCCACCAC
CTGGCCTACCGCACCTTCCACGCCCTGAAGGGCCTCACCACCAGCCGGGGGGAG
CCGGTGCAGGCGGTCTACGGCTTCGCCAAGAGCCTCCTCAAGGCCCTCAAGGAG
GACGGGGACGCGGTGATCGTGGTCTTTGACGCCAAGGCCCTCCTTCCGCCAC
GAGGCCTACGGGGGTACAAGGCGGGCCGGGCCCCACGCCGGAGGACTTTCCC
CGGCAACTCGCCCTCATCAAGGAGCTGGTGGACCTCCTGGGGCTGGCGCGCCTC
GAGGTCCC GGGCTACGAGGCGGACGACGTCCTGGCCAGCCTGGCCAAGAAGGC
GGAAAAGGAGGGCTACGAGGTCCGCATCCTCACCGCCGACAAAGACCTTTACCA
GCTCCTTTCCGACCGCATTACGTCCTCCACCCCGAGGGGTACCTCATCACCCCG
GCCTGGCTTTGGGAAAAGTACGGCCTGAGGCCCGACCAGTGGGCCGACTACCGG
GCCCTGACCGGGGACGAGTCCGACAACCTTCCCGGGGTCAAGGGCATCGGGGA
  
```

第 46 位
氨基酸

GAAGACGGCGAGGAAGCTTCTGGAGGAGTGGGGGAGCCTGGAAGCCCTCCTCA
AGAACCTGGACCGGCTGAAGCCCGCCATCCGGGAGAAGATCCTGGCCCACATGG
ACGATCTGAAGCTCTCCTGGGACCTGGCCAAGGTGCGCACCGACCTGCCCTGG
AGGTGGACTTCGCCAAAAGGCGGGAGCCCGACCGGGAGAGGCTTAGGGCCTTTC
TGGAGAGGCTTGAGTTTGGCAGCCTCCTCCACGAGTTCGGCCTTCTGGAAAGCC
CCAAGGCCCTGGAGGAGGCCCCCTGGCCCCCGCCGGAAGGGGCCTTCGTGGGCT
TTGTGCTTTCCCGCAAGGAGCCCATGTGGGCCGATCTTCTGGCCCTGGCCGCCGC
CAGGGGGGGCCGGGTCCACCGGGCCCCGAGCCTTATAAAGCCCTCAGGGACCT
GAAGGAGGCGCGGGGGCTTCTCGCAAAGACCTGAGCGTTCTGGCCCTGAGGG
AAGGCCTTGGCCTCCCGCCCGGCGACGACCCCATGCTCCTCGCCTACCTCCTGGA
CCCTTCCAACACCACCCCGAGGGGGTGGCCCGGCGCTACGGCGGGGAGTGGAC
GGAGGAGGCGGGGAGCGGGCCGCCCTTTCGAGAGGCTCTTCGCCAACCTGTG
GGGAGGCTTGAGGGGGAGGAGAGGCTCCTTTGGCTTTACCGGGAGGTGGAGA
GGCCCTTTCGCTGTCTGGCCACATGGAGGCCACGGGGGTGCGCCTGGACG
TGGCCTATCTCAGGGCCTTGTCCTGGAGGTGGCCGAGGAGATCGCCCGCCTCGA
GGCCGAGGTCTTCCGCCTGGCCGGCCACCCCTTCAACCTCAACTCCCGGGACCA
GCTGGAAAGGGTCTCTTTGACGAGCTAGGGCTTCCCGCCATCGGCAAGACGGA
GAAGACCGGCAAGCGCTCCACCAGCGCCGCGTCCTGGAGGCCCTCCGCGAGG
CCCACCCATCGTGGAGAAGATCCTGCAGTACCGGGGGCTCACCAAGCTGAAGA
GCACCTACATTGACCCCTTGCCGGACCTCATCCACCCAGGACGGGCCGCCTCCA
CACCCGCTTCAACCAGACGGCCACGGCCACGGGCAGGCTAAGTAGCTCCGATCC
CAACCTCCAGAACATCCCCGTCCGCACCCCGCTTGGGCAGAGGATCCGCCGGGC
CTTCATCGCCGAGGAGGGGTGGCTATTGGTGGCCCTGGACTATAGCCAGATAGAG
CTCAGGGTGCTGGCCCACCTCTCCGGCGACGAGAACCTGATCCGGGTCTTCCAG
GAGGGGCGGGACATCCACACGGAGACCGCCAGCTGGATGTTTCGGCGTCCCCCGG
GAGGCCGTGGACCCCTGATGCGCCGGCGCGGCAAGACCATCAACTTCGGGGTCTC
CTCTACGGCATGTGCGGCCACCGCCTCTCCAGGAGCTAGCCATCCCTTACGAGG
AGGCCAGGCCTTCATTGAGCGCTACTTTCAGAGCTTCCCCAAGGTGCGGGCCTG
GATTGAGAAGACCCTGGAGGAGGGCAGGAGGCGGGGTACGTGGAGACCCTCT
TCGGCCCGCCCGCTACGTGCCAGACCTAGAGGCCCGGGTGAAGAGCGTGCGGG

第 667 位
氨基酸

AGGCGGCCGAGCGCATGGCCTTCAACATGCCCGTCCAGGGCACCGCCGCCGACC
TCATGAAGCTGGCTATGGTGAAGCTCTTCCCCAGGCTGGAGGAAATGGGGGCCA
GGATGCTCCTTCAGGTCCACGACGAGCTGGTCCTCGAGGCCCAATAGAGAGGG
CGGAGGCCGTGGCCCGGCTGGCCAAGGAGGTCATGGAGGGGGTGTATCCCCTGG
CCGTGCCCTGGAGGTGGAGGTGGGGATAGGGGAGGACTGGCTCTCCGCCAAGG
AGTGA

§ 2.2.1.1 G46D mutation

§ 2.2.1.1.1 Taq DNA 聚合酶质粒的提取

为了将酶基因的第 46 位氨基酸甘氨酸突变为天冬氨酸。本实验中以 Taq DNA 聚合酶基因作为模板进行定点突变。首先,将转化了含有 Taq DNA 聚合酶基因质粒的大肠杆菌划平板后挑单菌落,接种于 5mL LB 液体培养基(含氨苄 100 μ g/mL)中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。然后按照质粒提取试剂盒的步骤提取质粒。最后用 TE 溶液(10mmol/L Tris-HCl pH8.0,2.0mmol/L MgCl₂)溶解质粒并稀释到终浓度约为 50ng/ μ L -20 $^{\circ}$ C 储存备用。

§ 2.2.1.1.2 *E. coli* DH5 α 感受态细胞的制备

挑取单菌落至 2mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡过夜。取 500 μ L 过夜培养的菌液,接种于 50mL LB 液体培养基中,培养至 OD₆₀₀=0.3 左右,转移到 50mL 灭过菌的离心管中,冰浴 30min 后,在 4 $^{\circ}$ C 条件下 4,000rpm 离心 10min。弃去上清,加入 30mL 0.1mol/L MgCl₂-CaCl₂ 溶液悬浮沉淀,冰浴 5min,在 4 $^{\circ}$ C 条件下 4,000rpm 离心 10min。弃上清,加入 2mL 含 15%甘油的 CaCl₂(浓度为 0.1mol/L)溶液悬浮细胞,每管按 200 μ L 分装,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

§ 2.2.1.1.3 Taq DNA 聚合酶质粒的定点突变

将提好的含有酶基因的质粒,进行 PCR 扩增。合成的扩增引物即突变引物,包含了需要突变的位点,且已经替换了所需要突变的碱基。扩增后,利用酶消化原来的母板,即作为初始模板的未突变的酶基因模板。将 PCR 的产物,即含有突变后的酶基因的质粒转化到感受态细胞中(图 2-1)。挑克隆即可得到含突变型酶基因的质粒。

50 μ L PCR 反应体系: 10 \times buffer(100mmol/L KCl,100mmol/L

(NH₄)₂SO₄, 200mmol/L Tris-HCl pH8.8, 20mmol/L MgSO₄, 1% TritonX-100, 1mg/mL BSA)5μL, 10mmol/L dNTP 0.5μL, 突变引物各125ng, 1U pfu酶, 含50ng质粒模板1μL, 加ddH₂O至50μL。

反应条件: 95℃变性30s, 循环周期为95℃ 30s, 55℃ 1min, 68℃ 14min, 25个循环。PCR反应结束后立即将反应管放在冰上使其温度≤37℃。然后加入1μL的限制性内切酶 *Dpn* I 放置在37℃的恒温箱中酶解1小时, 消化掉原来未突变的模板, 最后将消化后的PCR产物转化到感受态细胞中。

引物设计规则: 引物中必须包含突变的位点, 其它序列和原基因序列完全互补, 且设计时引物长度控制在25-45bp, 尽量使得退火温度≥78℃. 使得引物可以很好的和Taq DNA 聚合酶基因结合, 并且可以减少引物二聚体的形成。

突变引物:

forward : 5'-GTG CAG GCG GTC TAC GAC TTC GCC AAG AGC CTC-3'

reverse : 5'-GAG GCT CTT GGC GAA GTC GTA GAC CGC CTG CAC-3'

T_m=77.35℃

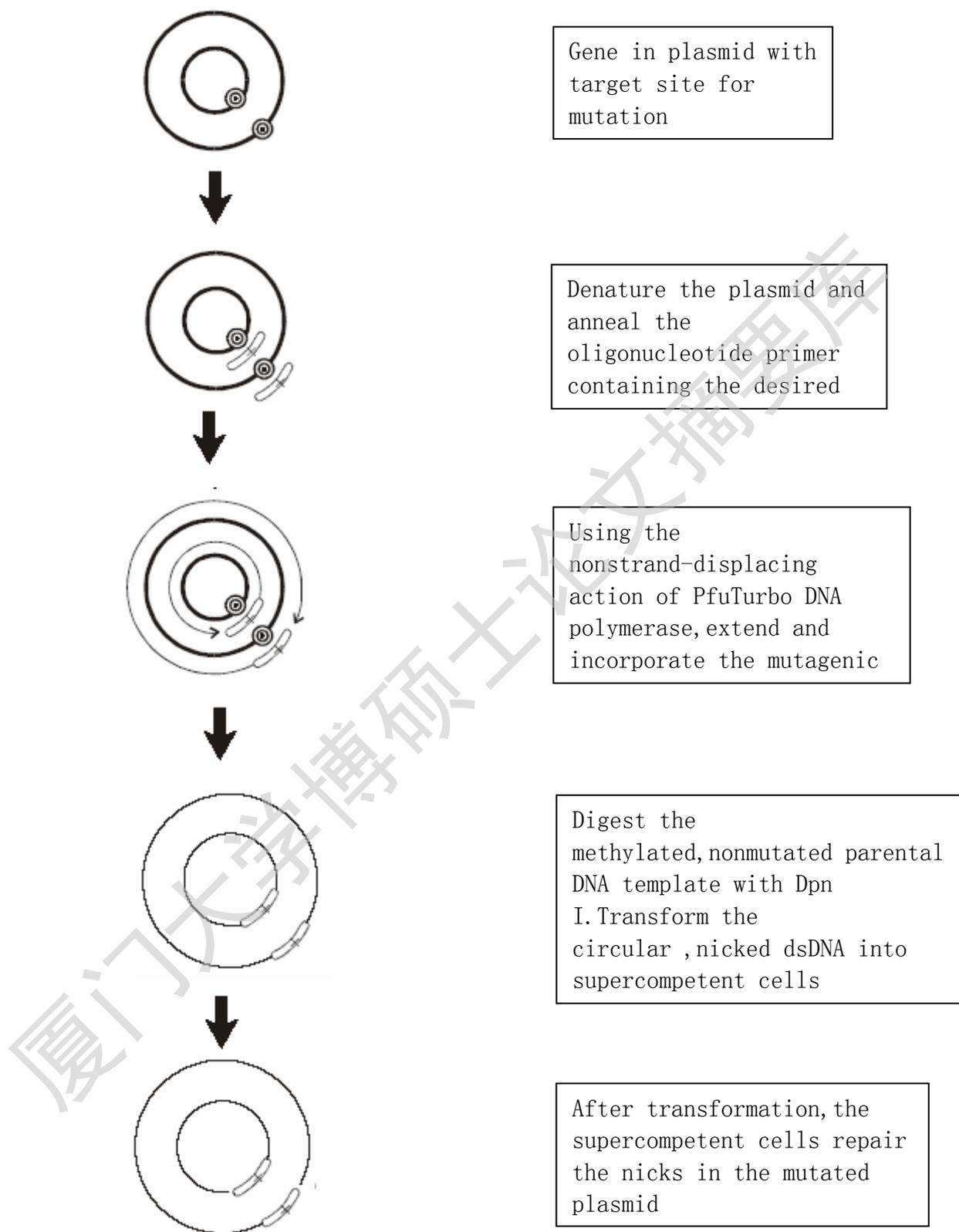


Figure 2-1 site-directed mutagenesis method.

§ 2. 2. 1. 2 G46D+F667Y mutation

突变的方法同上, 在第一次突变的基础上再进行 667 位点的突变。将酶基因第 667 位点的苯丙氨酸突变为酪氨酸。

突变引物:

forward: 5'-GCG GCC AAG ACC ATC AAC TAC GGG GTC CTC TAC GGC-3';

reverse: 5'-GCC GTA GAG GAC CCC GTA GTT GAT GGT CTT GGC CGC-3'

$T_m=78.78^\circ\text{C}$

§ 2.2.2 KlenTaq 的制备

§ 2.2.2.1 KlenTaq 缺失突变的引物设计及 KlenTaq 片段扩增

KlenTaq 缺少肽链 N 端的 278 个氨基酸, 降低酶的 5'→3'端核酸外切酶活性, 我们在酶基因第 829 碱基处设计上游引物, 在酶基因的末端设计下游引物, 并在引物的 5'端分别添加上两个限制性内切酶 *Nco* I 和 *Bgl* II 的酶切位点。通过 PCR 反应体系以酶基因为模板对酶基因 KlenTaq 基因片段进行扩增。扩增片段约为 1.7kb, 扩增产物放置于 4℃ 备用。

25μL 反应体系: 10×buffer 2.5μL, 2mmol/L MgCl₂, 0.4μmol/L 引物, 200μmol/L dNTPs, 1U Pfu 酶, 模板 5μL。

反应条件为: 95℃ 3min, 94℃ 20s, 55℃ 20s, 72℃ 20s, 30 个循环。

扩增引物:

PSE278-1: 5'-GGAACCATGG (*Nco* I) GCCTCCTCCACGAGTTCGGCC-3'

PSE278-2: 5'-CCTTAGATCT (*Bgl* II) CGACTCTAGA GGATCTATCACTCCTTGG-3'

§ 2.2.2.2 KlenTaq 片段的回收

KlenTaq DNA 片段用胶回收试剂盒回收。切下含 DNA 的琼脂块 (尽可能小), 放入 1.5mL Eppendorf 管中。按每 100mg 琼脂糖加入 300μL S1 溶液的比例加入 S1 溶液, 放置于 55℃ 水浴 10min, 每 2min 颠倒混匀一次。若琼脂糖重量小于 100mg, 用 ddH₂O 补充至 100mg。务必确保琼脂糖块完全溶化, 高浓度的 Agarose 胶 (>2%) 及一些特殊的胶需要增加 S1 溶液的使用量。加入 1/3 S1 溶液体积的异丙醇, 混匀, 55℃ 水浴 1min。(总体积此时为 500μL) 将溶化后的 Agarose 溶液移入吸附柱, 高速离心 1min, 倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。在吸附柱中加入 450μL W1 溶液, 静置 1min 后, 高速离心 30s。倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管

中。再在吸附柱中加入 450 μ L W1 溶液, 高速离心 30s。倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。高速离心 1min, 将吸附柱放入一个干净 1.5ml 的离心管中, 在吸附膜中央加入 30 μ L T1 溶液, 静置 1min 后, 高速离心 1min, 将回收的 DNA 于 1.5mL 离心管贮存于-20 $^{\circ}$ C。(若室温低于 20 $^{\circ}$ C, 静置时间延长至 5min, 或者在 50 $^{\circ}$ C 水浴静置 1min, 以确保 DNA 完全溶解并洗脱下来。)

§ 2. 2. 2. 3 载体和 KlenTaq 片段双酶切连接

pSE380 质粒载体多克隆位点上存在 *Nco* I 和 *Bgl* II 的酶切位点, 将载体和回收产物进行双酶切后再次胶回收后连接, 构建含有 KlenTaq 片段的质粒。将连接好的质粒转化到感受态细胞。

30 μ L 酶切体系: 10 \times buffer 3 μ L, 质粒或外源片段 5 μ L, *Nco* I 及 *Bgl* II 各 1 μ L, 加入 ddH₂O 至 30 μ L, 37 $^{\circ}$ C 酶切 1.5h 后胶回收。

连接: 用紫外分光光度计测量, 载体及 KlenTaq 片段使用等摩尔量, 然后加入等量的高效连接液 16 $^{\circ}$ C 连接 2h 后进行转化。

转化: 先加入连接好的产物 20 μ L, 冰上静置 30min, 然后 42 $^{\circ}$ C 热击 45s 后立即冰上放置 2min, 加入 NZY 培养基 500 μ L, 37 $^{\circ}$ C 摇床摇培 45min。接着将菌液涂氨苄板, 正放 10min 后倒置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养 16h。最后挑菌验证, 并保存阳性克隆菌株。

§ 2. 2. 3 Taq-N 的制备

§ 2. 2. 3. 1 Taq-N 缺失突变的引物设计及 Taq-N 片段扩增

Taq-N 即 Taq DNA 聚合酶 C 端 510 个氨基酸缺失, 仅具有酶的 5' \rightarrow 3' 外切酶活性。同样通过 PCR 方法进行缺失突变。以酶基因作为模板, 在酶基因的起点设计上游引物, 第 966 位点设计下游引物, 对 Taq DNA 聚合酶的 N 端进行扩增。在引物的 5' 端分别插入两个限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xba* I 的酶切位点。然后用同样的方法进行回收、酶切、连接、转化。

25 μ L 反应体系: 10 \times buffer 2.5 μ L, 2mmol/L MgCl₂, 0.4 μ mol/L 引物, 200 μ mol/L dNTPs, 1U Pfu 酶, 模板 5 μ L。

反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 3min, 94 $^{\circ}$ C 20s, 55 $^{\circ}$ C 20s, 72 $^{\circ}$ C 20s, 30 个循环。扩增的片段大小为 966bp。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库