

学校编码: 10384

分类号__密级__

学号: 21620131152513

UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

超嗜热古菌 *Palaeococcus pacificus*

DY20341 DNA 复制酶性质及功能的研究

Characterization and function analysis of DNA replication
enzymes from Hyperthermophilic archaea *Palaeococcus*
pacificus DY20341

赵文昭

指导教师姓名: 邵宗泽教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2016年04月

论文答辩时间: 2016年05月

学位授予日期: 2016年 月

答辩委员会主席: __

评阅人: __

2016年05月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈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其它个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

符号说明

Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素

Bp: Base pair, 碱基对

BSA: Bovine serum albumin, 牛血清白蛋白

Cdc: Cell division control protein, 细胞分裂控制蛋白

Chl: Chloramphenicol, 氯霉素

Da: Dalton, 道尔顿

dNTP: Deoxynucleotide triphosphate, 脱氧核糖核苷三磷酸

dsDNA: Double-stranded DNA, 双链脱氧核糖核酸

DP1: PolD 小亚基

DP2: PolD 大亚基

EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, 乙二胺四乙酸

Exo III: Exonuclease III, 核算外切酶 III

Fen1: Flap endonuclease 1

GAN: GINS associated nuclease, 与 GINS 相关核酸外切酶

GINS: Sld5, Psf1, Psf2 and Psf3 complex,

His₆-tag: 六组氨酸编码标签

IPTG: Isopropyl β-D-Thiogalactoside, 异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷

LIC: Ligation independent cloning, 不需要连接的克隆方式

MCM: Minichromosome maintenance, 微染色体维持蛋白

OBP: origin binding proteins, 起始结合蛋白

ORC: Origin recognition complex, 原点识别复合物

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen, 增殖细胞核抗原

PCR: Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链式反应

PNK: Polynucleotide Kinase, 多聚核苷酸激酶

pol: polymerase, 聚合酶

PolB: DNA polymerase B, B 家族 DNA 聚合酶

PolC: DNA polymerase C, C 家族 DNA 聚合酶

PolD: DNA polymerase D, D 家族 DNA 聚合酶

PolX: DNA polymerase X, X 家族 DNA 聚合酶

PolY: DNA polymerase Y, Y 家族 DNA 聚合酶

P. pacificus: *Palaeococcus pacificus* DY20341T

PPA: 来自 *P. pacificus* 的 PolB

Primase(L): 引发酶大亚基

Primase(S): 引发酶小亚基

RFC: Replication factor C, 复制因子 C

RPA: Replication protein A, 复制蛋白 A

SDS: Sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠

SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, 聚丙烯酰胺凝胶电泳

SSB: Single strand DNA binding protein, 单链 DNA 结合蛋白

ssDNA: Single stranded DNA, 单链 DNA

Skew analyses: 斜交分析法

Taq: 来自 *T. kodakarensis* 的 PolB

T. kodakarensis: *Thermococcus kodakarensis*

T. sp4557: *Thermococcus* sp. 4557

TIP : *Thermococcales* inhibitor of PCNA

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, N,N,N',N'-四甲基乙二胺

摘要	I
Abstract.....	II
第一章 嗜热古菌 <i>P. paificus</i> DNA 复制酶表达载体库的构建..	1
1.引言	1
1.1 古菌的概况.....	1
1.1.1 古菌的发现和分布	1
1.1.2 古菌的分类	2
1.1.3 本文研究的嗜热古菌	4
1.2 古菌的 DNA 复制机制	6
1.2.1 DNA 复制起点	7
1.2.2 复制起始阶段	8
1.2.3 复制延生阶段	8
1.2.4 冈崎片段的成熟	9
1.3 研究嗜热古菌 DNA 复制的意义	10
1.4 本文的研究目标和研究路线.....	11
1.4.1 研究目标	11
1.4.2 研究路线	12
2.实验材料和方法	13
2.1 实验材料	13
2.1.1 药品试剂	13
2.1.2 常用酶和试剂盒	13

2.1.3 主要实验仪器	14
2.1.4 培养基的配置	14
2.1.5 实验引物	14
2.1.6 常用分析软件	16
2.1.7 常用网址	17
2.1.8 菌种来源	17
2.2 带 His₆-tag 重组表达载体的构建方法.....	17
2.2.1 嗜嗜热古菌 <i>P.pacificus</i> 的培养.....	17
2.2.2 嗜嗜热古菌基因组的提取	18
2.2.3 目的基因的扩增和回收	19
2.2.4 线性载体的制备	21
2.2.5 LIC 反应.....	22
2.2.6 感受态细胞的制备	23
2.2.7 外源 DNA 的转化.....	23
2.2.8 转化子的筛选与鉴定	24
2.2.9 大肠杆菌质粒的提取	24
2.3 带 His₆-tag 重组蛋白的表达与纯化	25
2.3.1 重组蛋白的诱导表达	25
2.3.2 Ni-NTA 亲和树脂的制备	26
2.3.3 重组蛋白的亲和纯化	26
2.3.4 考马斯亮蓝定量	27
2.3.5 SDS-PAGE 胶的配制.....	28
2.3.6 蛋白样品的处理和上样	28

3.实验结果	28
3.1 嗜热古菌的培养和基因组提取.....	28
3.2 目的基因的克隆和回收.....	29
3.3 pET-21a 线性载体的扩增和回收.....	34
3.4 重组载体的构建.....	35
3.5 重组蛋白的诱导表达.....	37
4 小结与讨论	41
4.1 小结.....	41
4.2 讨论.....	43
第二章 嗜热古菌 <i>P. pacificus</i> DNA 复制酶性质及功能的体外研究	48
1.引言	48
1.1 Tip 与 PCNA 的互作以及复合体结构的研究.....	48
1.2 参与 DNA 复制的一些蛋白互作关系的探索.....	49
1.3 二价离子对 GAN 蛋白外切酶活性的影响.....	50
1.4 <i>P.pacificus</i> 与 <i>T.kodakarensis</i> B 型 DNA 聚合酶保真性的比较研究...52	
1.5 本研究的意义和技术路线.....	52
1.5.1 研究意义.....	52
1.5.2 技术路线.....	53
2.材料和方法	53
2.1 材料.....	53
2.1.1 主要试剂药品.....	53

2.1.2 核酸引物	54
2.1.3 载体	56
2.2 Tip 和 PCNA 重组载体的改造方法.....	56
2.2.1 PCR 扩增法获得线性化重组载体	56
2.2.2 连接反应	56
2.3 重组蛋白的诱导表达和纯化.....	57
2.4 体外研究蛋白互作的方法	57
2.4.1 Pull-Down 实验鉴定蛋白互作.....	57
2.4.2 分子筛实验鉴定蛋白互作	58
2.5 Tip 抑制 PCNA 依赖的 Fen1 酶活性实验	59
2.5.1 Fen1 酶核酸底物的制备.....	60
2.5.2 Fen1 酶活性实验.....	61
2.6 二价离子对 GAN 外切酶活性的影响.....	61
2.6.1 GAN 酶核酸底物的制备	61
2.6.2 GAN 酶活性实验	61
2.7 <i>P. pacificus</i> 与 <i>T. kodakarensis</i> B 型聚合酶保真性的研究方法.....	62
2.7.1 <i>PolB</i> 基因的扩增与回收	62
2.7.2 <i>POLB</i> 重组表达载体的构建以及蛋白的诱导表达纯化.....	63
2.7.3 保真性实验	64
3.结果与分析.....	64
3.1 Tip 和 PCNA 重组表达载体的改造结果	64
3.1.1 不带 His ₆ -tag 的 PCNA 重组载体的构建.....	64
3.1.2 TiP 突变型重组表达载体的构建	65

3.2 Tip 及其突变型与 PCNA 互作研究	68
3.2.1 蛋白的诱导表达	68
3.2.2 Pull-Down 实验.....	69
3.2.3 分子筛验证 TIP-20 与 PCNA 的互作	72
3.2.4 TIP 抑制 PCNA 依赖的 Fen1 活性实验	76
3.3 分子筛实验探索参与 DNA 复制的相关蛋白间的互作	78
3.3.1 TK0887 与 PCNA 互作研究	78
3.3.2 PCNA 与 PoID 互作研究.....	80
3.3.3 PolB 和 MCM 互作研究	83
3.3.4 PolB 和 GAN 互作研究.....	84
3.3.5 POLB 和 GINS51 互作研究.....	85
3.3.6 POLB 和 GINS23 互作研究.....	86
3.3.7 MCM 和 GAN 互作研究	87
3.3.8 MCM 和 GINS51 互作研究.....	88
3.3.9 MCM 和 GINS23 互作研究.....	89
3.4 镁离子和锰离子对 GAN 外切酶活性的影响	90
3.5 聚合酶保真性的研究方法	91
3.5.1 PolB 基因的扩增结果	91
3.5.2 PolB 表达载体的构建以及蛋白的表达纯化	93
3.5.3 保真性实验结果	94
4.小结与讨论	99
4.1 TIP 与 PCNA 互作以及复合体结构的研究	100
4.2 PCNA 和 TK0887	101

4.3 PCNA 和 PolD	102
4.4 GAN 外切酶活性的多样性	103
4.5 聚合酶的保真性	104
第三章 展望	105
附录	108
参考文献	118
致谢	124

Concents

Chinese Abstract.....	I
English abstract	II
Chapter 1 Construction of an expression vector library of DNA replication enzymes from Hyperthermophilic archaea <i>P. pacificus</i>	1
1. Introduction.....	1
1.1 An overview of archaea	1
1.1.1 Discovery and distribution of archaea	1
1.1.2 Classification of archaea	2
1.1.3 Hyperthermophilic archaea of this study	4
1.2 Mechanisms of archaeal DNA replication.....	6
1.2.1 Archaeal origins of replication	7
1.2.2 The initiation phase	8
1.2.3 The elongation phase.....	8
1.2.4 Okazaki Fragment Maturation	9
1.3 Implications for studying archaeal DNA replication	10
1.4 Objectives and Directions of this study	11
1.4.1 Objectives.....	11
1.4.2 Directions	12
2. Materials and Methods.....	13
2.1 Materials.....	13

2.1.1 Reagents.....	13
2.1.2 Enzymes and Kits	13
2.1.3 Instruments.....	14
2.1.4 Preparation of mediums	14
2.1.5 Primers	14
2.1.6 Analysis software	16
2.1.7 Useful Links	17
2.1.8 Sample source.....	17
2.2 Methods of adding a His₆-tag to construct expression vectors	17
2.2.1 Hyperthermophilic archaea <i>P.pacificus</i> Culture.....	17
2.2.2 Genome extraction of hyperthermophilic archaea	18
2.2.3 Gene amplification and Recycling.....	19
2.2.4 Preparation of a linearized vector.....	21
2.2.5 LIC method.....	22
2.2.6 Preparation of competent cells.....	23
2.2.7 Transformation.....	23
2.2.8 Screening and identification of transformants	24
2.2.9 Plasmid Extraction.....	24
2.3 Expression and purification of recombinant proteins added His₆-tag .25	
2.3.1 Inducible expression of recombinant proteins	25
2.3.2 Preparation of Ni-NTA affinity resin	26
2.3.3 Affinity purification of Recombinant protein	26
2.3.4 Coomassie Blue quantitative	27
2.3.5 Preparation of SDS-PAGE gel.....	28

2.3.6 Processing and loading the protein samples	28
3. Results	28
3.1 Genome of <i>P.pacificus</i>	28
3.2 Cloning and recycling of target gene	29
3.3 Obtain the linearized pET-21a	34
3.4 The recombinant expression vector	35
3.5 Recombinant proteins	37
4 Summary and discussion	41
4.1 Summary.....	41
4.2 Discussion	43
Chapter 2 Characterization and function analysis in vitro of DNA replication enzymes from Hyperthermophilic archaea <i>P.pacificus</i>	48
1. Introduction.....	48
1.1 Interrelationships between PCNA and Tip.....	48
1.2 Interaction relationships among proteins involved Archaeal DNA replication.....	49
1.3 Effect of divalent ions on the activity of GAN.....	50
1.4 <i>Comparative study of fidelity of PolB from P.pacificus and T.kodakarensis</i>	52
1.5 Significance and Directions of this study	52
1.5.1 Significance	52
1.5.2 Directions	53
2. Materials and Methods.....	53

2.1 Materials.....	53
2.1.1 Reagents.....	53
2.1.2 Primers	54
2.1.3 Plasmids	56
2.2 Method of reconstruction the expression vectors of Tip and PCNA....	56
2.2.1 PCR amplification to obtain a linearized recombinant vector	56
2.2.2 Ligation reaction	56
2.3 Expression and purification of target proteins	57
2.4 Research methods of protein interaction in vitro.....	57
2.4.1 Pull-Down.....	57
2.4.2 Size Exclusion Chromatography	58
2.5 Tip inhibits PCNA-dependent Fen1 activity	59
2.5.1 Preparation of substrates for Fen1 nuclease assay.....	60
2.5.2 Fen1 nuclease assay	61
2.6 Effect of divalent ions on the activity of GAN	61
2.6.1 Preparation of substrates for GAN Exonuclease assay.....	61
2.6.2 GAN Exonuclease assay.....	61
2.7 Research methods of fidelity with PolB	62
2.7.1 Amplification and Recycling of gene coding PolB	62
2.7.2 Construction expression vector and Inducing expression of PolB	63
2.7.3 PolB fidelity assay.....	64
3. Results and analysis	64
3.1 Results of reconstruction expression vector of Tip and PCNA	64

3.1.1 Reconstruction of a PCNA expression vector deleted His ₆ -tag.....	64
3.1.2 Expression vector of mutant forms Tip.....	65
3.2 Exploring the interrelationships between PCNA and mutant forms TIP	68
.....
3.2.1 Results of protein expression.....	68
3.2.2 Results of Pull-down.....	69
3.2.3 Results of Size Exclusion Chromatography.....	72
3.2.4 Results of Fen1 nuclease assay	76
3.3 Interaction relationships among proteins involved Archaeal DNA replication	78
.....
3.3.1 Interaction relationships between TK0887 and PCNA.....	78
3.3.2 Interaction relationships between PCNA and POLD	80
3.3.3 Interaction relationships between POLB and MCM	83
3.3.4 Interaction relationships between POLB and GAN	84
3.3.5 Interaction relationships between POLB and GINS51	85
3.3.6 Interaction relationships between POLB and GINS23	86
3.3.7 Interaction relationships between MCM and GAN.....	87
3.3.8 Interaction relationships between MCM and GINS51	88
3.3.9 Interaction relationships between MCM and GINS23	89
3.4 Effect of divalent ions on the activity of GAN	90
3.5 Results of PolB fidelity assay	91
3.5.1 Amplification results of gene coding <i>PolB</i>	91
3.5.2 Protein expression and extraction of PolB.....	93
3.5.3 Comparative study of fidelity of PolB	94

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.