

余彦, 李程勋, 陈树清, 等. 一种采用阴离子交换柱快速纯化 *Taq* DNA 聚合酶的方法 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (7): 734-738.
YU Y, LI C-X, CHEN S-Q, et al. Rapid Purification of *Taq* DNA Polymerase Using Anion-exchange Column [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (7): 734-738.

一种采用阴离子交换柱快速纯化 *Taq* DNA 聚合酶的方法

余彦, 李程勋, 陈树清, 叶长亮, 黄力坤, 许铁城, 林文雄

(福建农林大学生命科学学院农业生态研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 通过 37℃ 恒温振荡培养含有 *Taq* DNA 聚合酶基因的 *E. coli* 菌株, 并用 IPTG 诱导该基因表达获得 *Taq* DNA 聚合酶蛋白, 利用 40% 硫酸铵沉淀该蛋白后溶解于 storage buffer 中。此法获得的 *Taq* DNA 聚合酶带负电荷, 因此采用阴离子交换柱纯化蛋白。试验结果表明, 此法与传统的透析方法相比能快速地去除生物小分子杂质, 同时去除透析方法无法除去的杂蛋白; 既能保证 *Taq* DNA 聚合酶的生物学活性, 同时能缩短纯化时间、提高 *Taq* DNA 聚合酶的纯度。以土壤微生物 DNA、水稻 cDNA 为模板进行 PCR 扩增并对扩增产物进行测序, 结果显示纯化后的 *Taq* DNA 聚合酶具有较高的扩增效率和保真性。

关键词: *Taq* DNA 聚合酶; 硫酸铵; 阴离子交换柱

中图分类号: Q 784

文献标识码: A

Rapid Purification of *Taq* DNA Polymerase Using Anion-exchange Column

YU Yan, LI Cheng-xun, CHEN Shu-qing, YE Chang-liang, HUANG Li-kun, XU Tie-cheng, LIN Wen-xiong

(Institute of Agroecology/School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University,

Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: In this study, the *Escherichia coli* strain contains the gene encoding *Taq* DNA Polymerase was shaking-cultured in constant temperature incubator shaker at 37℃ for synthesizing of the Polymerase, using IPTG as an inducer. The enzyme was then precipitated by 40% ammonium sulfate. *Taq* DNA Polymerase obtained in this way was negatively charged, and anion-exchange column was used to purify the protein. It was found that this performance can remove the unneeded small biological molecules more quickly than the traditional method of dialysis; meanwhile, it not only keeps biological activities of *Taq* DNA Polymerase, but also shortens time of purification and improves pure degree of *Taq* DNA Polymerase. The rice cDNA, rice genomic DNA and soil microorganism DNA were used as template to PCR amplification and the PCR products were sequenced. The results showed that the polymerase had great activity and fidelity.

Key words: *Taq* DNA polymerase; ammonium sulfate; anion-exchange column

DNA 聚合酶是完成 PCR 过程的关键性因子, 目前已有 100 多个 DNA 聚合酶的相关基因被克隆和测序。1969 年 BROCK^[1] 从 *Thermus aquaticus* YT-1 分离出 *Taq* DNA 聚合酶, *Thermus aquaticus* 是一种水生嗜热菌, 从该菌中分离出的 DNA 聚合酶 (*Taq* DNA 聚合酶) 具有催化以 DNA 为模板合成 DNA 的功能。1988 年 Saiki^[2] 从另外一个 *Thermus aquaticus* YT-1 菌株分离出一种新的 *Taq* DNA 聚合酶, *Taq* DNA 聚合酶的发

现使得 PCR 能被广泛的使用, 虽然 *Taq* DNA 聚合酶已经商品化生产多年, 且该酶的晶体结构及作用机理也比较清楚^[3-4], 但为了提高该蛋白在大肠杆菌中的表达量, 简化纯化工艺的尝试一直没有停止。目前国内外已有多家实验室将 *Taq* DNA 聚合酶基因转至大肠杆菌进行了表达并纯化了该蛋白, Lawyer 等^[5] 利用 Lac 启动子表达了该蛋白, 但表达量很低。Engelke 等^[6] 从 *T. aquaticus* 中克隆了 *Taq* DNA 聚合酶基因, 重组到 pTTQ18 质粒中,

收稿日期: 2012-01-12 初稿; 2012-05-19 修改稿

作者简介: 余彦 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物生物化学与分子生物学

通讯作者: 林文雄 (1957-), 男, 博士生导师, 研究方向: 作物生理与分子生态学 (E-mail: lwx@fjau.edu.cn)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31271670)

转化到大肠杆菌中表达,但产量较低,且纯化步骤要通过热变性杂蛋白、聚乙烯亚胺(PEI)沉淀,再经 Bio Rex 70 离子交换层析获得重组 Taq DNA 聚合酶纯品,整个过程用时需 8~10 h。基因工程 Taq DNA 聚合酶表达载体的构建便利了该酶的纯化。但是,在制备过程中,宿主菌中的大量杂蛋白的存在大大降低了 Taq DNA 聚合酶的纯度。因此,纯化和分离具有生物活性的 Taq DNA 聚合酶至关重要。

目前,阴离子交换柱已成为纯化具有生物活性的蛋白的一种重要工具。与离子交换剂结合力小的负电基团先被置换出来,而与离子交换剂结合力强的需要较高的离子强度才能被置换出来,这样不同负电基团就会按其离子交换剂结合力从小到大的顺序逐步被洗脱下来,从而达到分离目的。

本研究通过先制备 Taq DNA 聚合酶^[7],并采用 AKTA 蛋白纯化系统中的阴离子交换柱纯化该蛋白,建立了一种高效、快速的 Taq DNA 聚合酶纯化方法,为室内快速制备高纯度的 Taq DNA 聚合酶提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验器材

AKTA purifier 蛋白纯化仪、HiTrap Q FF 阴离子交换柱均购自 GE 公司(美国)。

1.2 试验方法

1.2.1 Taq DNA 聚合酶在宿主菌中的表达 挑取阳性克隆菌株到 5 mL LB(Amp 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)液体试管 37℃, 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 12 h。取 0.1 mL 此培养物到 500 mL 液体 LB(Amp 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)中, 37℃, 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 6.5 h, 加入 1 mL IPTG (1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 37℃, 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 14 h 使 Taq DNA 聚合酶基因能表达。

1.2.2 Taq DNA 聚合酶的提取 将菌液 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4℃ 离心 5 min 收集菌体, 弃上清, 加入 20 mL 溶液 A (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH7.9, 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA) 悬浮细胞; 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4℃ 离心 5 min 收集菌体, 加入 20 mL 溶液 B (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH7.9, 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ lysezyme) 悬浮细胞, 室温放置 15 min, 加入 20 mL 裂解缓冲液 (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH7.9, 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF, 5% Tween20, 0.5% Nonidet P40), 75℃ 孵育 60 min, 4℃

15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 转移上清液至新的离心管中, 加入 15 g 硫酸铵, 室温迅速混匀。12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 将蛋白沉淀物重新悬浮至 30 mL storage buffer (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH7.9, 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF) 中。

1.2.3 Taq DNA 聚合酶的纯化 所有溶液必须采用双蒸水配置, 并用 0.45 μm 的滤膜过滤, 配好的溶液应存储在 4℃ 冰箱中, 采用 HiTrap Q FF 阴离子交换柱, 先用 5 倍柱体积的 start buffer (20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH8.0) 洗掉柱子内的防腐剂, 5 倍柱体积的 elution buffer (20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl pH8.0) 洗柱。最后再用 5 倍柱体积的 start buffer (20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH8.0) 平衡柱子。柱子处理结束后, 用 Pumb A 上样, 上样结束后, 用 5 倍柱体积的 start buffer (20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH8.0) 洗掉不能与阴离子交换柱结合的蛋白, 接着用 30% 的 elution buffer 洗掉与阴离子交换柱结合能力较弱的蛋白, 然后用 50% 的 elution buffer 将与阴离子交换柱结合的 Taq DNA 聚合酶洗脱下来。

2 结果与分析

2.1 透析袋纯化 Taq DNA 聚合酶

传统的透析方法能除去大部分生物小分子杂质, 但无法除去大分子蛋白(图 1), 导致制备的 Taq DNA 聚合酶中含有较多的杂蛋白, Taq DNA 聚合酶纯度不高, 进而可能影响后续的 PCR 扩增试验。

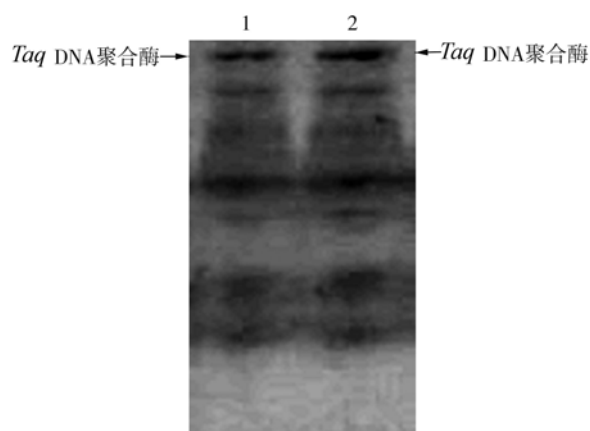


图1 透析袋纯化前后的 Taq DNA 聚合酶

Fig. 1 Purification of Taq DNA Polymerase using dialysis bag

注: 泳道 1 是未经纯化的蛋白; 泳道 2 是用透析袋纯化后的 Taq DNA 聚合酶。

2.2 阴离子交换柱纯化 *Taq* DNA 聚合酶

由于 *Taq* DNA 聚合酶的等电点为 6 左右,缓冲液的 pH 为 7.8,故 *Taq* DNA 聚合酶带负电荷,当 *Taq* DNA 聚合酶和宿主菌的杂蛋白一起通过阴离子交换柱时,带正电荷的蛋白由于无法跟阴离子交换柱结合而直接被洗脱下来,带负电荷的蛋白可以与阴离子交换柱结合,不同负电荷的蛋白结合能力随着洗脱盐浓度的增加,与离子交换柱结合能力较强的蛋白会逐渐被洗脱下来。因此,利用 AKTA 蛋白自动纯化系统的阴离子交换柱结合蛋白,进而采用盐浓度梯度洗脱蛋白;先用 30% 的 elution buffer 将与阴离子交换柱结合能力较弱的部分杂蛋白洗脱下来,再用 50% 的 elution 将 *Taq* DNA 聚合酶蛋白洗脱下来。应用此法完成一次纯化,不仅大大缩短了纯化时间,同时还提高了纯化效率(图 2)。

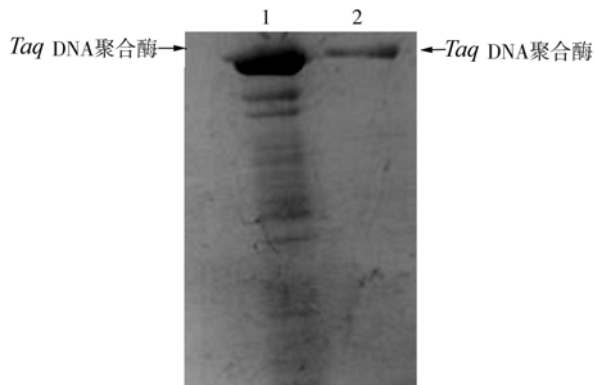


图 2 阴离子交换柱纯化前后的 *Taq* DNA 聚合酶

Fig. 2 Purification of *Taq* DNA Polymerase using anion-exchange column

注:泳道 1 是未经纯化的蛋白;泳道 2 是用阴离子交换柱纯化后的 *Taq* DNA 聚合酶蛋白。

2.3 *Taq* DNA 聚合酶的扩增效率分析

为了检测阴离子交换柱纯化的 *Taq* DNA 聚合酶的扩增效率,本研究分别以土壤微生物 DNA 和水稻 cDNA 为模板进行扩增。

如图 3 所示,用纯化后的 *Taq* DNA 聚合酶分别对水稻、甘蔗、地黄根际土壤微生物的 16srDNA 的进行扩增,结果显示,纯化后 *Taq* DNA 聚合酶具有较高的扩增效率,能用于土壤微生物 DNA 的 T-RFLP 分析。

进一步以水稻 cDNA 和基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增反应。结果显示,通过阴离子交换柱纯化的 *Taq* DNA 聚合酶对不同基因片段大小的扩增效果较好(图 4、5),适用于实验室日常 PCR 扩增试验。

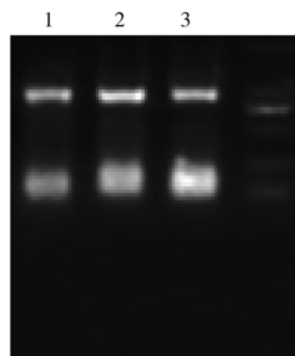


图 3 土壤微生物 16srDNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 3 Amplification of 16srDNA from rice, sugarcane and *Rehmannia glutinosa* rhizospheric soil DNA

注:泳道 1、2、3 分别是水稻、甘蔗、地黄根际土壤微生物 16srDNA 的扩增结果。

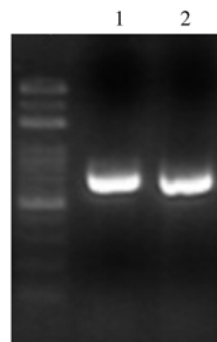


图 4 水稻 627bp MYB 基因 PCR 扩增结果

Fig. 4 Amplification of a 627 bp rice MYB

注:泳道 1、2 是均是以水稻 cDNA 为模板扩增得到的 MYB 基因片段。

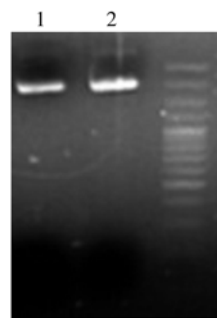


图 5 水稻 2000bp PAL 启动子的 PCR 扩增结果

Fig. 5 Amplification of 2000 bp rice PAL promoter

注:泳道 1、2 是以水稻基因组 DNA 为模板扩增得到的基因片段。

2.4 *Taq* DNA 聚合酶的保真性分析

对以水稻 cDNA 为模板扩增获得的 MYB 基因进行序列分析,并在生物学数据库 NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行同源性比对 (图 6), 结果显示, 获得的 672 bp 的 MYB 基因序列与数据库中对应的基因的相似度为

100%, 说明阴离子交换柱纯化得到的 Taq DNA 聚合酶具有较好的保真性。

```
>[emb] CT829537.1 [U] Oryza sativa (indica cultivar-group) cDNA clone:OSIGCSA012K2
full insert sequence
Length=1376
Score=1158 bits (627), Expect=0.0
Identities=627/627(100%), Gaps=0/627(0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1 ATGGACGGAGCAGGAGGACGTCCAACCTGGTTTGAAGCGCACAGGCAAGAGCTGCCGTCTC 60
      |||
Sbjct 318 ATGGACGGAGCAGGAGGACGTCCAACCTGGTTTGAAGCGCACAGGCAAGAGCTGCCGTCTC 377
Query 61 CGGTGGGTGAACTACCTCCACCCCGGCCTCAAGCGCGGCCGCATCACCGCCGACGAGGAG 120
      |||
Sbjct 378 CGGTGGGTGAACTACCTCCACCCCGGCCTCAAGCGCGGCCGCATCACCGCCGACGAGGAG 437
Query 121 CGCCTCATCCTCCACCTCCACTCCAGTGGGGCAGCCGCTGGTCCCGCATCGCCCGCAGC 180
      |||
Sbjct 438 CGCCTCATCCTCCACCTCCACTCCAGTGGGGCAGCCGCTGGTCCCGCATCGCCCGCAGC 497
Query 181 CTCCCCGGCCGACCCGACAACGAGATCAAGAATTCTGGCGAACCCACATGCGCAAGATC 240
      |||
Sbjct 498 CTCCCCGGCCGACCCGACAACGAGATCAAGAATTCTGGCGAACCCACATGCGCAAGATC 557
Query 241 GCCCACCACGCAAGAAGAAGACCAATTCAACATCGCCGGCGCCGACGACCTCCTCCGGT 300
      |||
Sbjct 558 GCCCACCACGCAAGAAGAAGACCAATTCAACATCGCCGGCGCCGACGACCTCCTCCGGT 617
Query 301 TCCTTGTCCTCCTCGCTCACCACGGCGACGACGACGATGGCGACGGCTGCGGCGCTGCAA 360
      |||
Sbjct 618 TCCTTGTCCTCCTCGCTCACCACGGCGACGACGACGATGGCGACGGCTGCGGCGCTGCAA 677
Query 361 GAAAGCAGCAGCTGCGGCGGGCAGCAGCAGGCGCTCGACCAGCTGGTGGCGGCGGCCACC 420
      |||
Sbjct 678 GAAAGCAGCAGCTGCGGCGGGCAGCAGCAGGCGCTCGACCAGCTGGTGGCGGCGGCCACC 737
Query 421 ACGCCGGCGAGCCAGCTGCTGACGATGGACTACACCATGGACCAGCTCTGGAACGACATC 480
      |||
Sbjct 738 ACGCCGGCGAGCCAGCTGCTGACGATGGACTACACCATGGACCAGCTCTGGAACGACATC 797
Query 481 GCGGCGGGCGGAAGCCGATACGAGCTGCTACGACGCGGCGGCGATGGCCTCGCCGCCGTG 540
      |||
Sbjct 798 GCGGCGGGCGGAAGCCGATACGAGCTGCTACGACGCGGCGGCGATGGCCTCGCCGCCGTG 857
Query 541 CCGGTCTGGGAATTCTGCACCGACTACTCGCTGTGGAGGATCGACGACGAGGAGTACTAC 600
      |||
Sbjct 858 CCGGTCTGGGAATTCTGCACCGACTACTCGCTGTGGAGGATCGACGACGAGGAGTACTAC 917
Query 601 AAGAAGATGCTCGATGCCTCGCAATAG 627
      |||
Sbjct 918 AAGAAGATGCTCGATGCCTCGCAATAG 944
```

图 6 水稻 MYB 基因的同源性比对结果

Fig. 6 Result of sequence similarity comparison on rice MYB

3 讨论与结论

由于 Taq DNA 聚合酶在 PCR 中的广泛应用, 有关该酶的制备技术一直在不断地优化提高。Taq DNA 聚合酶表达载体的构建则方便了该酶的纯化。尽管如此, 从细菌培养物中纯化的方法仍很繁琐, 需要进行选择性沉淀。然而, 多步骤、长时间的分离纯化不但提高酶制品的成本, 而且不利于酶的活性。为了不断提高该酶的特异性、表达量和酶活力, 目前主要是针对酶基因本身, 表达载体的构建, 分离纯化方法的研究。其中, 对酶本身的研究主要是对酶基因进行一些修饰, 如季朝能等^[8]对 Taq DNA 聚合酶进行了 N 端的定点诱变缺失和 C 端的连续缺失, 对 Taq DNA 聚合酶的活性区域进行了系统的定位。可以通除去或增加一到几个额外碱基对基因进行修饰。在构建重组表达质粒载体

时, 可以选择强的启动子, 也可以添加一个增强子, 使酶基因能高水平表达。为保证酶的纯度和有更高的酶活力, 需要采用更简便、更有效的分离纯化方法。因此, 本研究利用培养含有 Taq DNA 聚合酶基因的工程菌株, 在优化其表达条件的基础上, 主要使用硫酸铵沉淀法对其进行分离纯化, 采用溶菌酶裂解细菌, 硫酸铵沉淀, 通过离子交换层析纯化蛋白, 提高了纯化效率, 降低了制备成本。纯化后的 Taq DNA 聚合酶具有较高的活性以及保真性。

参考文献:

- [1] BROCK T D. The value of basic research: discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles [J]. *Genetics*, 1997, 146 (4): 1207-1210.
- [2] SAIKI R K, GELFAND D H, STOFTEL S, et al. Primer-

- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase [J]. *Science*, 1988, 239 (1): 487—491.
- [3] KIM Y, EOM S H, WANG J, et al. Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase [J]. *Nature (London)*, 1995, 376 (6541): 612—616.
- [4] KOROLEV S, NAYAL M, BARNES W M, et al. Crystal structure of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase resolution: structural basis for thermostability [J]. *Natl Acad Sci*, 1995, 92 (20): 9264—9268.
- [5] LAWYER F C, STOFFEL S, SAIKI R K, et al. Characterization and expretion in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus* [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264 (11): 6427—6437.
- [6] ENGELKE DR, KRIKOS A, BRUCK ME, et al. Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli* [J]. *Anal Biochem*, 1990, 191 (2): 396—400.
- [7] 秦川, 杨献军, 杨瑞, 等. 2 种制备 *Taq* DNA 聚合酶方法的比较 [J]. *新乡医学院学报*, 2008, 5 (25): 496—471.
- [8] 季朝能, 杜汉森, 郑佐华, 等. *Taq* DNA 聚合酶功能区域的定位 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15 (3): 432—435.

(责任编辑: 柯文辉)