

## ◆生物技术◆

重组 Pol D DNA 聚合酶的纯化及其功能初步研究<sup>\*</sup>张雪松<sup>1</sup>, 李德凤<sup>1</sup>, 薛姜珊<sup>1</sup>, 陈孜孟<sup>2</sup>, 李卓<sup>2</sup>, 蒙健宗<sup>3\*\*</sup>

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005; 2. 自然资源部第三海洋研究所, 福建厦门 361000; 3. 广西农业职业技术大学食品药品研究院, 广西南宁 530007)

**摘要:**为研究古菌 Pol D DNA 聚合酶两个亚基的功能及其相互作用, 对重组超嗜热硫还原古菌 *Thermococcus* sp. 4557 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 和大亚基 DP2 进行柱层析纯化, 采用荧光标记核酸结合聚丙烯酰胺凝胶电泳实验对两个亚基体外功能进行研究。结果表明, DP2 具有 DNA 复制延伸活性, DP1 具有 3'→5' 外切核酸酶活性; DP1 在与 DP2 的浓度比高于 0.3 : 1 时可降解 DP2 的延伸产物; DP2 对 DP1 的外切核酸酶活性有促进作用, Sld5 和 Psf1 蛋白复合体(Sld5 and Psf1 Complex, GINS 51)对 DP1 的外切核酸酶活性有抑制作用。古菌 Pol D DNA 聚合酶大小亚基的功能及其相互作用对 DNA 复制机制的进一步认识有借鉴意义。

**关键词:**古菌 Pol D DNA 聚合酶 亚基 延伸活性 外切酶活性

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2022)06-1086-08

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20230110.008

DNA 复制在生命领域中是必不可少的生物学过程, DNA 聚合酶在 DNA 复制过程中起着十分关键的作用, 它确保了遗传信息的准确复制和传递。迄今报道的 DNA 聚合酶家族有 7 个, 根据对其氨基酸序列和结构的分析可划分为 A、B、C、D、E、X 和 Y 家族<sup>[1-7]</sup>, 其中 D 家族(Pol D) DNA 聚合酶是在古菌中被发现的, 并且只存在于古菌中<sup>[5]</sup>。1997 年 Uemori 等<sup>[8]</sup>从超嗜热古菌 *Pyrococcus furiosus* 中克隆出 Pol D DNA 聚合酶基因, 该聚合酶由 DP1 和 DP2 两个亚基组成, 大小分别为 69 294 Da 和 143 161 Da, 且两亚基需要共表达或混合存在时才会各自表现出

较强的活性; 1998 年 Ishino 等<sup>[5]</sup>从古菌 *Methanococcus jannaschii* 中克隆表达了与 *P. furiosus* DNA 聚合酶同源的聚合酶蛋白, 并发现其 DP1 亚基有 3'→5' 外切核酸酶活性; 同时发现, 相比于双链 DNA, DP1 更容易降解单链 DNA。研究发现大部分古菌中存在 B 家族(Pol B)与 Pol D 两种 DNA 聚合酶, 若将细胞内的 Pol B DNA 聚合酶基因敲除, 古菌依旧可以存活; 若将细胞内的 Pol D DNA 聚合酶基因敲除, 则古菌无法存活<sup>[9]</sup>。由此可见 Pol D DNA 聚合酶在古菌 DNA 复制过程中的重要性。相比于 Pol A、Pol

收稿日期: 2021-02-23

修回日期: 2021-03-26

<sup>\*</sup> 十三五海洋经济创新发展示范项目(海洋工具酶的开发与产业化子课题)资助。

【作者简介】

张雪松(1994-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事生化与分子生物学研究。

【\*\*通信作者】

蒙健宗(1972-), 男, 研究员, 主要从事生物工程研究, E-mail: meng\_jz@163.com。

【引用本文】

张雪松, 李德凤, 薛姜珊, 等. 重组 Pol D DNA 聚合酶的纯化及其功能初步研究[J]. 广西科学, 2022, 29(6): 1086-1093.

ZHANG X S, LI D F, XUE J S, et al. Primary Study on Purification and Function of Recombinant Pol D DNA Polymerase [J]. Guangxi Sciences, 2022, 29(6): 1086-1093.

B 等家族的 DNA 聚合酶,国内外对 Pol D DNA 聚合酶的研究仍然较少,多种古菌中 Pol D DNA 聚合酶的理化性质和功能仍处于未知状态。

我国自然资源部第三海洋研究所从采集的海底热液口样品中分离得到一株超嗜热古菌 *Thermococcus* sp. 4557 (CGMCC 1.5172), 该菌是一种严格厌氧的超嗜热硫还原古菌<sup>[10]</sup>, 前期已克隆表达其小亚基 DP1 和大亚基 DP2, 并研究了 DP1 与 Sld5 和 Psf1 蛋白复合物 (Sld5 and Psf1 Complex, GINS 51)、GINS 关联核酸酶 (GINS-Associated Nuclease, GAN) 等相关蛋白的体外相互作用<sup>[11]</sup>, 但还未研究该 Pol D DNA 聚合酶大、小两个亚基的功能及其相互作用, 以及 GINS 51 蛋白对小亚基外切酶活性的影响等。本研究分别纯化重组表达 *Thermococcus* sp. 4557 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 和大亚基 DP2, 并利用荧光标记核酸对其体外功能进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 表达质粒与重组蛋白

分别用于表达超嗜热硫还原古菌 *Thermococcus* sp. 4557 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 和大亚基 DP2 的表达质粒 pET21a/His-PolD-(S)、pET21a/His-PolD-(L)<sup>[11]</sup>, 以及纯化的重组表达 *Thermococcus* sp. 4557 GINS 51 蛋白, 均由自然资源部第三海洋研究所提供。

#### 1.1.2 试剂

Ni-NTA 树脂、Q 阴离子层析树脂、DEAE 树脂和 Butyl 树脂购自 GE Healthcare Life Sciences, 牛血清白蛋白 (BSA) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, dNTP 购自 New England Biolabs, Triton X-100 购自 Takara Bio Group。

单链 DNA 模板 ZXS001 序列: 5'-GTAACGC-CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAA-CGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGC-AGGTGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCG-AGC-3'。

荧光引物 Cy3-ZXS002 序列: 5'-GCTCGGTAC-CCGGGGATCCTCTAGAGTCGA-3'。

荧光底物 Cy5-0A01 序列: 5'-GGGGCGAGTC-CAGGTCAGGACCTTGCGGGG-3'。

荧光引物和荧光底物均从深圳华大基因股份有限公司订购合成。

### 1.1.3 仪器

AKTA avant 25 蛋白纯化系统 (GE Healthcare Life Sciences), Typhoon 扫描仪 (GE Healthcare Life Sciences), 垂直电泳仪 Mini-PROTEAN R Tetra Handcast System [伯乐生命医学产品(上海)有限公司], JS-3000 凝胶成像仪 (上海培清科技有限公司), Nano Drop 微量核酸蛋白测定仪 (ThermoFisher Scientific), 恒温摇床 (上海知楚仪器有限公司), Biosafe 超声破碎仪 [赛飞(中国)有限公司], 高压均质机 [永联生物科技(上海)有限公司], 100 L 自控式发酵罐 (镇江格瑞生物工程有限公司), Avanti J-26 冷冻离心机 (Beckman coulter)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 重组蛋白表达

表达质粒用热激法转化 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 转化液涂布到含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 的 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$  倒置培养过夜。

Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 重组菌的表达: 挑取单菌落在 LB/Amp 液体培养基中培养两级种子, 以 2% 的接种量转接到 3 瓶 2.5 L 的 LB/Amp 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床培养 6-8 h, 待其  $OD_{600}$  值达 1.0 时, 加入终浓度为 50 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 8-10 h, 离心收集菌体, -80 $^{\circ}\text{C}$  冻存。

Pol D DNA 聚合酶大亚基 DP2 重组菌的表达: 由于 DP2 表达量较低, 因而采用发酵罐进行大量培养; 挑取单菌落在 LB/Amp 液体培养基中培养三级种子, 以 1% 的接种量转接到 100 L LB/Amp 液体培养基的发酵罐中, 在温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 120 r/min、通气量为 0.5 vvm、罐压 0.05 MPa 的条件下发酵培养, 待其  $OD_{600}$  值达到 1.0 时, 加入终浓度为 50 mmol/L 的 IPTG 继续培养 8-10 h 诱导蛋白表达, 用管式离心机离心收集菌体, -80 $^{\circ}\text{C}$  冻存。

### 1.2.2 重组蛋白纯化

#### (1) Ni-NTA 柱层析。

取 10 g 表达 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 的菌泥重悬于 50 mL Ni-NTA Binding Buffer, 置 70 $^{\circ}\text{C}$  水浴热处理 20 min, 使大部分非耐热蛋白失活沉淀; 用超声波破碎仪破碎菌体后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 40 min, 收集上清; 取 160 g 表达 Pol D DNA 聚合酶大亚基 DP2 的菌泥重悬于 500 mL Ni-NTA Binding Buffer, 置 70 $^{\circ}\text{C}$  水浴热处理 20 min 后, 用高

压均质机在 4℃ 下高压研磨破碎菌体约 10 min, 4℃、13 000 r/min 离心 40 min, 收集上清。

在 AKTA avant25 蛋白纯化系统上进行 Ni-NTA 柱层析纯化, 将细胞破碎液上清与 5 mL 平衡好的 Ni-NTA 树脂结合, 采用 3 倍柱体积的 Binding Buffer 清洗后, 用咪唑浓度为 0 - 250 mmol/L 的线性梯度液进行洗脱, 洗脱液按 20 mL/管进行收集并置 4℃ 冰箱暂存; 取少量洗脱液进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并用 ImageJ 软件分析计算每管洗脱液中目的蛋白条带的占比, 根据电泳结果选取含有目的蛋白的样品, 用强阴离子吸附柱进一步纯化。

#### (2) 强阴离子吸附柱(Q柱)层析。

将经 Ni-NTA 纯化后的含有目的蛋白的组分混合, 用含 25 mmol/L Tris (pH 值为 8.0) 溶液进行降盐透析 24 h, 每 6 h 换一次透析液, 使样品中 NaCl 浓度降至 10 mmol/L 以下; 取透析完成的样品与 5 mL Q 阴离子交换树脂结合, 用 NaCl 线性梯度洗脱液进行升浓度梯度洗脱, NaCl 线性梯度液浓度为 0 - 1 000 mmol/L, 洗脱液按 10 mL/管收集并置 4℃ 暂存; 取少量洗脱液样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 根据电泳结果选取含有目的蛋白的样品, 分别用 DEAE 柱 (DEAE 树脂) 或疏水柱 (Butyl 树脂) 进一步纯化。

#### (3) 弱阴离子交换柱层析

将经 Q 柱纯化后的含有重组 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 的样品混合, 按 (2) 的方法透析; 取透析完成的样品与 5 mL DEAE 阴离子交换树脂结合, 用 NaCl 线性梯度洗脱液进行升浓度梯度洗脱, NaCl 梯度液浓度为 0 - 1 000 mmol/L, 洗脱液按 5 mL/管收集并置 4℃ 冰箱暂存; 取少量洗脱液样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

#### (4) 疏水柱层析。

将 Q 柱纯化后含有重组 Pol D DNA 聚合酶大亚基 DP2 的样品组分混合, 计算并加入 5 mol/L NaCl 溶液, 使样品中 NaCl 浓度达到 3.5 mol/L; 将此样品溶液与用 3.5 mol/L NaCl 溶液平衡过的 5 mL Butyl 树脂结合, 用 NaCl 线性梯度洗脱液进行降浓度梯度洗脱, NaCl 梯度液浓度为 3 500 - 0 mmol/L, 洗脱液按 5 mL/管收集并置 4℃ 暂存; 取少量洗脱液样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

#### (5) 蛋白的透析与保存。

将纯化后的目的蛋白样品混合, 用含 25 mmol/L Tris (pH 值为 8.0)、0.1 mmol/L EDTA、2.00

mmol/L KCl、1 mmol/L DTT 和 50% 甘油的 Storage Buffer 在 4℃ 透析 18 h, 每 6 h 换一次 Storage Buffer, 透析完毕用微量核酸蛋白测定仪测定蛋白质浓度, 置 -20℃ 保存。

#### 1.2.3 重组 Pol D DNA 聚合酶大小亚基的功能实验

(1) 重组 Pol D DNA 聚合酶大亚基 DP2 的延伸活性。

根据单链 DNA 模板 ZXS001 的序列设计和合成带有 5'-Cy3 荧光标记的引物 Cy3-ZXS002, 配制荧光引物-模板混合物 (100 pmol Cy3-ZXS002、200 pmol ZXS001、7 mmol/L pH 值为 8.0 的 Tris、50 mmol/L NaCl、7 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 沸水浴 5 min 后自然冷却至室温, 使荧光引物互补配对结合到单链 DNA 模板; 配制 10 μL 延伸反应体系: 20 mmol/L pH 值为 8.0 的 Tris、10 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、10 mmol/L KCl、10 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1% Triton X-100、0.5 mmol/L dNTP、0.8 μL 荧光引物-模板混合物、1 μL 不同浓度 (0 pmol、0.1 pmol、0.2 pmol、0.5 pmol、1.5 pmol、5 pmol、15 pmol、40 pmol) 的 DP2 或 DP2 与 DP1 的混合物, 在 70℃ 孵育 2 min 使荧光引物发生 DNA 复制延伸反应; 加入等体积的 2× Stop Buffer (90% 甲酰胺、10 mmol/L EDTA、10% TBE) 终止反应, 接着煮沸 5 min, 冰水浴使其快速冷却, 此时未经过延伸的荧光引物会与单链 DNA 模板分离, 游离于体系内; 延伸反应物在含 8 mol/L 尿素的 TBE 溶液中进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 最后用 GE Typhoon 扫描仪 Cy3 频段扫描检测。

(2) 重组 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 外切酶活性。

合成 5'-Cy5 荧光标记的单链 DNA 底物 Cy5-0A01, 构建 20 μL 降解反应体系: 50 mmol/L pH 值为 8.0 的 Tris、4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、100 μg BSA、2 pmol Cy5-0A01、1 μL 不同浓度 (0 pmol、1.562 5 pmol、3.125 pmol、6.25 pmol、12.5 pmol、25 pmol、50 pmol、100 pmol) 的 DP1 或 DP1 与 DP2 的混合物或 DP1 与 GINS 51 的混合物, ddH<sub>2</sub>O 补足到 20 μL。反应体系在 70℃ 孵育一定时间 (0 s、30 s、1 min、2 min、5 min、10 min、15 min、20 min) 后加入等体积的 2× Stop Buffer 中止反应, 煮沸 5 min, 待其冷却后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 最后用 GE Typhoon 扫描仪 Cy5 频段进行扫描检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组 Pol D DNA 聚合酶大小亚基的纯化

重组 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 先后经过 Ni-NTA 柱、Q 柱和 DEAE 柱层析纯化,DP1 在每次层析的收集组分中的占比依次增加。收集合并 DEAE 柱层析中 DP1 占比分别为 77.9%、95.3% 和 98.6% 的第 5-7 管组分,经 Storage Buffer 透析后收得含 DP1 蛋白溶液 22.5 mL,微量核酸蛋白测定仪测定其蛋白质浓度为 1.49 mg/mL。

重组 Pol D DNA 聚合酶大亚基 DP2 先后经过 Ni-NTA、Q 柱和 Butyl 疏水柱层析纯化,DP2 在每次层析的收集组分中的占比依次增加。收集合并 Butyl 疏水层析后 DP2 占比分别为 70.5%、82.4%、81.2%、91.5%、90.6%、79.0% 的第 11-16 管组分,经 Storage Buffer 透析后收得含 DP2 蛋白溶液 11 mL,微量核酸蛋白测定仪测定其蛋白质浓度为 0.56 mg/mL。

将以上较高纯度的 DP1 蛋白和 DP2 蛋白用于研究其功能。

### 2.2 重组 Pol D DNA 聚合酶大小亚基的功能

#### 2.2.1 重组 Pol D DNA 聚合酶大亚基 DP2 的延伸活性

在延伸反应体系中分别加入 0-40 pmol 的 DP2 蛋白反应 2 min 后,其聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 1 所示。由图 1 可知,含有 DP2 蛋白的实验样品完成了荧光核酸引物的复制延伸,DP2 蛋白为零的对照样品未完成荧光核酸引物的复制延伸,说明重组 Pol D DNA 聚合酶大亚基 DP2 具有核酸复制延伸活性,且延伸活性较强,在用量低至 0.1 pmol 时仍可完成荧光核酸引物的复制延伸。

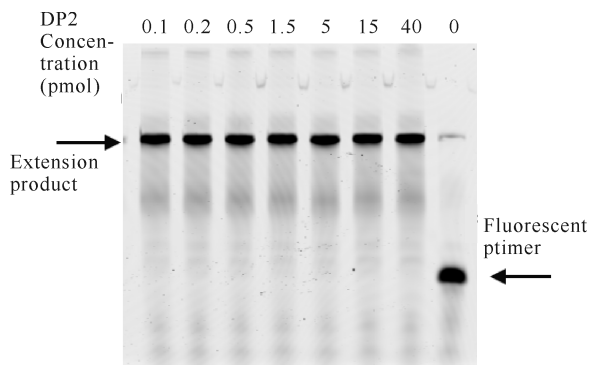


图 1 DP2 浓度对其延伸活性的影响

Fig. 1 Effect of DP2 concentration on its extension activity

#### 2.2.2 重组 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 的外切酶活性

在降解反应体系中分别加入 0-100 pmol 的 DP1 蛋白降解反应 15 min 后,其聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 2 所示。由图 2 可知,加入 DP1 蛋白后荧光核酸底物被降解而逐渐变短,且在相同反应时间内,随着 DP1 用量的增加,荧光核酸底物被降解得更短,表明 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 具有 3'→5' 外切核酸酶活性。

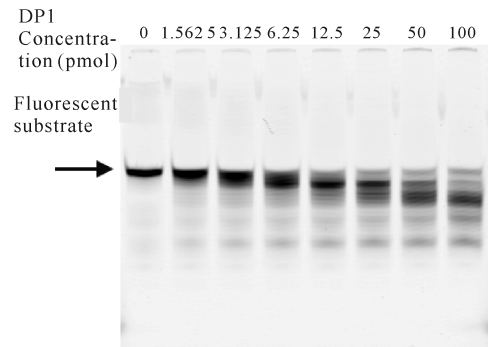


图 2 DP1 浓度对其 3'→5' 外切核酸酶活性的影响

Fig. 2 Effect of DP1 concentration on its 3'→5' exonuclease activity

在降解反应体系中 DP1 蛋白用量为 50 pmol 的条件下,经不同降解反应时间后,其聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 3 所示。由图 3 可知,随着反应时间的增加,DP1 对荧光核酸底物的降解程度逐渐增大。

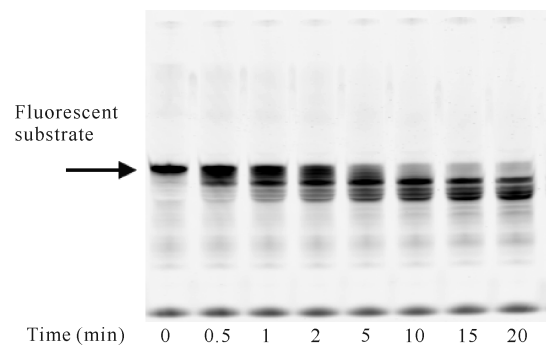


图 3 DP1 反应时间对 DP1 降解核酸底物的影响

Fig. 3 Effect of DP1 reaction time on degradation of nucleic acid substrate by DP1

#### 2.2.3 重组 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 对大亚基 DP2 延伸活性的影响

在延伸反应体系中 DP2 蛋白用量为 5 pmol 的条件下,分别加入 0-40 pmol 的 DP1 蛋白,延伸反应 2 min 后,其聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 4 所示。由图 4 可知,在 DP1 含量较低时,DP2 的延伸活性仍可以使 DNA 链正常复制延伸,但 DP1 用量达到

1.5 pmol时(第4泳道)已开始导致延伸链被降解,出现游离的荧光分子;当DP1与DP2的量相当时(第5泳道),DP2延伸的DNA开始明显被降解,但仍有完整的延伸链保留;当DP1用量大于DP2时(第6,7泳道),体系内延伸复制的DNA和荧光引物都被降解。因此可以推测,至少在细胞外体系中,在Pol D DNA聚合酶执行复制功能时,复制效率达到最高时的小亚基DP1与大亚基DP2的最佳浓度比低于0.3:1,并且至少在DP1的量提高到与DP2的量相当时(即1:1),就有必要使用其他的功能蛋白来抑制小亚基DP1的外切酶活性。

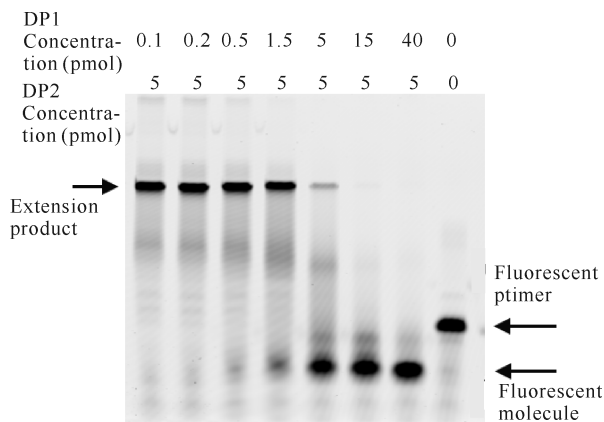


图4 DP1浓度对DP2延伸活性的影响

Fig. 4 Effect of DP1 concentrations on the extension activity of DP2

#### 2.2.4 重组 Pol D DNA 聚合酶大亚基 DP2 对小亚基 DP1 外切酶活性的影响

在降解反应体系中 DP1 蛋白用量为 20 pmol 的条件下,分别加入 0-100 pmol 的 DP2 蛋白,降解反应 2 min 后,其聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 5 所示。由图 5 可知,在无 DP1 的情况下,DP2 自身不存在外切核酸酶活性,但 DP2 对 DP1 的外切核酸酶活性有影响,在相同反应时间内,随着 DP2 的增加,DP1 对荧光核酸底物的降解更彻底,说明 DP2 对 DP1 的外切核酸酶活性具有促进作用。

在降解反应体系中 DP1 蛋白用量为 50 pmol 的条件下,添加 50 pmol 的 DP2 蛋白,经不同降解反应时间后,其聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 6 所示。图 6 与图 3 比较可知,在 DP2 存在时 DP1 降解荧光核酸底物所需的时间明显缩短,10-15 min 已基本降解完毕,也进一步表明 DP2 具有促进 DP1 外切核酸酶活性的作用。

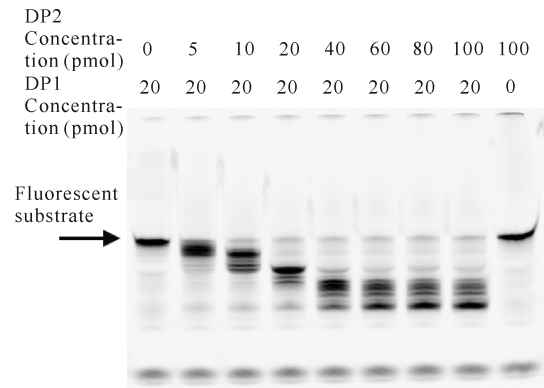


图5 DP2浓度对DP1降解核酸底物的影响

Fig. 5 Effect of DP2 concentrations on the degradation of nucleic acid substrate by DP1

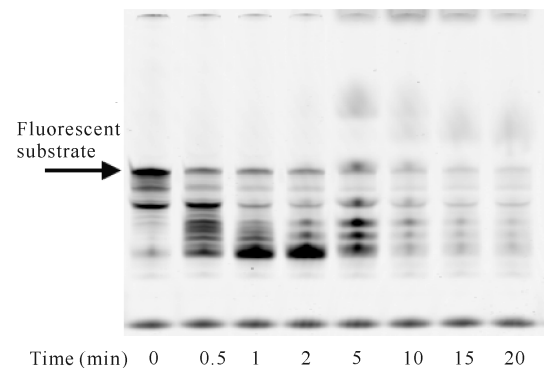


图6 DP2存在时反应时间对DP1降解核酸底物的影响

Fig. 6 Effect of reaction time on the degradation of nucleic acid substrate by DP1 in the presence of DP2

#### 2.2.5 GINS 51 蛋白对重组 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 外切酶活性的影响

古菌的 GINS 四聚体会与 Cdc45、MCM (Minichromosome Maintenance)、Pol D、PCNA 等蛋白发生相互作用<sup>[12-15]</sup>,是古菌细胞存活必需的蛋白复合物。在降解反应体系中 DP1 蛋白用量为 5 pmol 的条件下,分别加入 0-80 pmol 的 *Thermococcus* sp. 4557 GINS 51 蛋白,降解反应 2 min 后,其聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 7 所示。由图 7 可知,在无 DP1 的情况下,GINS 51 自身不存在外切核酸酶活性,但 GINS 51 对 DP1 的外切核酸酶活性有影响,在相同反应时间内,随着 GINS 51 的增加,DP1 对荧光核酸底物的降解呈减弱趋势,说明 GINS 51 对 DP1 的外切核酸酶活性有抑制作用。

在降解反应体系中 DP1 蛋白用量为 50 pmol 的条件下,添加 50 pmol 的 GINS 51 蛋白,经不同降解反应时间后,其聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 8 所示。图 8 与图 3 比较可知,相同反应时间内,加入 GINS 51 后 DP1 降解核酸底物的条带略有减少,也

说明 GINS 51 对 DP1 的外切核酸酶活性有一定抑制作用。

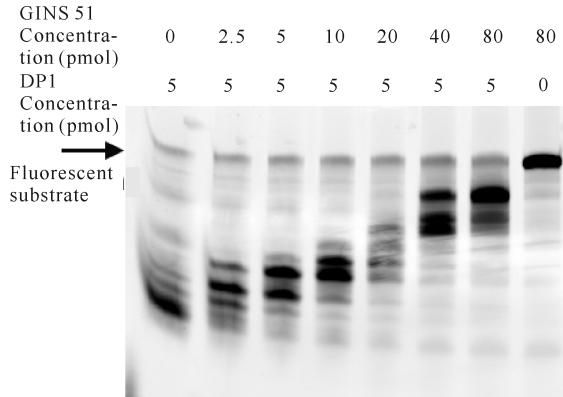
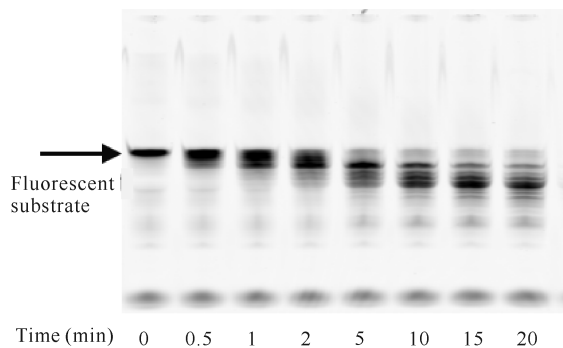


图 7 GINS 51 浓度对 DP1 降解核酸底物的影响

Fig. 7 Effect of GINS 51 concentrations on the degradation of nucleic acid substrate by DP1



Time (min) 0 0.5 1 2 5 10 15 20

图 8 GINS 51 存在时反应时间对 DP1 降解核酸底物的影响

Fig. 8 Effect of reaction time on the degradation of nucleic acid substrate by DP1 in the presence of GINS 51

### 3 讨论

本研究发现,纯化的重组 *Thermococcus* sp. 4557 Pol D DNA 聚合酶大亚基 DP2 蛋白具有 DNA 复制延伸活性,小亚基 DP1 蛋白具有 3'→5' 外切核酸酶活性,这与此前人们对 Pol D DNA 聚合酶的认识一致<sup>[16]</sup>。在 DNA 复制过程中,DNA 聚合酶会对复制错误的片段进行降解,以保证 DNA 复制的准确性。有研究表明 Pol D DNA 聚合酶是由小亚基 DP1 和大亚基 DP2 以 1:1 形成的二聚体<sup>[17]</sup>,本研究发现 *Thermococcus* sp. 4557 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 的 3'→5' 外切核酸酶活性较强,在与大亚基 DP2 以 1:1 的比例结合时,大亚基 DP2 复制延伸的 DNA 被明显降解,表明单独按 1:1 形成的小亚基 DP1 和大亚基 DP2 二聚体无法完成 DNA 的复制延伸;由于 GINS 51 对小亚基 DP1 的外切核酸酶活性有抑制作用,因此推测 Pol D DNA 聚合酶完成 DNA

的复制延伸功能时可能有 GINS 51 参与调控小亚基 DP1 的外切核酸酶活性。Lu 等<sup>[18]</sup>对 *Thermococcus* sp. 4557 Pol D DNA 聚合酶与 GINS、GAN 等蛋白进行了分子筛互作分析,并提出了名为 Pol D-GINS-GAN 的古菌 DNA 复制复合体模型;该研究表明,单独的 Pol D DNA 聚合酶大亚基 DP2 与 GINS、GAN 等蛋白不发生互作,而单独的 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 可以与 GINS 51 发生互作,并且单独的 GINS 51 与 GAN 发生互作,因此大亚基 DP2 需要借助小亚基 DP1 才能与复制叉上的复制复合体连接。结合本研究结果,可以进一步推测 Pol D DNA 聚合酶在 DNA 复制过程中的功能与机理;GINS 51 与小亚基 DP1 结合在一起,通过 DP1 再与大亚基 DP2 连接;大亚基 DP2 与 DNA 底物结合并行使复制延伸功能;GINS 51 通过抑制小亚基 DP1 的 3'→5' 外切核酸酶活性来保证大亚基 DP2 可以顺利进行新链的复制延伸;同时,当大亚基 DP2 正在合成的新链出现错配时,小亚基 DP1 的 3'→5' 外切核酸酶活性被激活,迅速切除错配片段,从而保证 DNA 复制顺利进行。DNA 复制错配发生时 GINS 51 对小亚基 DP1 的 3'→5' 外切核酸酶活性的抑制作用如何解除,复制过程中 GAN、PCNA、SSB 等其他复制因子、调控因子如何结合并参与调控,仍然有待进一步研究。

### 4 结论

利用荧光标记核酸引物进行的 DNA 复制延伸实验和荧光标记核酸底物进行的 DNA 降解实验表明,纯化的重组 *Thermococcus* sp. 4557 Pol D DNA 聚合酶大亚基 DP2 蛋白具有 DNA 复制延伸活性;纯化的重组 *Thermococcus* sp. 4557 Pol D DNA 聚合酶小亚基 DP1 蛋白具有 3'→5' 外切核酸酶活性。DP2 蛋白的延伸活性受到 DP1 蛋白的影响,若 DP1 与 DP2 浓度比例小于 0.3:1 时,DP2 能完成荧光核酸引物的延伸;DP1 提高到与 DP2 含量相当(1:1)时,出现明显的延伸产物和荧光引物降解现象;DP1 与 DP2 的浓度比进一步提高到 3:1 时,可将延伸产物和荧光引物完全降解。*Thermococcus* sp. 4557 的 DP2 蛋白和复制相关蛋白 GINS 51 对 DP1 蛋白的外切核酸酶活性有不同的作用,DP2 蛋白对 DP1 蛋白的外切核酸酶活性有促进作用,而 GINS 51 对 DP1 蛋白的外切核酸酶活性有抑制作用。

### 参考文献

[1] DELARUE M, POCH O, TORDO N, et al. An attempt

- to unify the structure of polymerases [J]. *Protein Engineering*, 1990, 3(6): 461-467.
- [2] BRAITHWAITE D K, ITO J. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases [J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(4): 787-802.
- [3] JOYCE C M, STEITZ T A. Function and structure relationships in DNA polymerases [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1994, 63: 777-822.
- [4] CANN I K, KOMORI K, TOH H, et al. A heterodimeric DNA polymerase: evidence that members of euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95: 14250-14255.
- [5] ISHINO Y, KOMORI K, CANN I K, et al. A novel DNA polymerase family found in *Archaea* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(8): 2232-2236.
- [6] OHMORI H, FRIEDBERG E C, FUCHS R P, et al. The Y-family of DNA polymerases [J]. *Molecular Cell*, 2001, 8(1): 7-8.
- [7] LIPPS G, RÖTHER S, HART C, et al. A novel type of replicative enzyme harbouring ATPase, primase and DNA polymerase activity [J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(10): 2516-2525, 2003.
- [8] UEMORI T, SATO Y, KATO I, et al. A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression, and characterization [J]. *Genes to Cells*, 1997, 2(8): 499-512.
- [9] ČUBOŇOVÁ L, RICHARDSON T, BURKHART B W, et al. Archaeal DNA polymerase D but not DNA polymerase B is required for genome replication in *Thermococcus kodakarensis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(10): 2322-2328.
- [10] WANG X N, GAO Z M, XU X, et al. Complete genome sequence of *Thermococcus* sp. strain 4557, a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent area [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(19): 5544-5545.
- [11] 陈孜孟. 超嗜热古菌 *Thermococcus* sp. 4557 中 DNA 聚合酶调控机制及应用研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- [12] LI Z, SANTANGELO T J, ČUBOŇOVÁ L, et al. Affinity purification of an archaeal DNA replication protein network [J]. *Marine Biotechnology*, 2010, 1(5): 221-231.
- [13] MARINSEK N, BARRY E R, MAKAROVA K S, et al. GINS, a central nexus in the archaeal DNA replication fork [J]. *EMBO Reports*, 2006, 7(5): 539-545.
- [14] MACNEILL S A. Protein-protein interactions in the archaeal core replisome [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39: 163-168.
- [15] PLUCHON P-F, FOUQUEAU T, CREZÉ C, et al. An extended network of genomic maintenance in the archaeon *Pyrococcus abyssi* highlights unexpected associations between eucaryotic homologs [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79707.
- [16] RAI A P, CARRONI M, HENRY E, et al. Structure of the DP1 – DP2 PolD complex bound with DNA and its implications for the evolutionary history of DNA and RNA polymerases [J]. *PLoS Biology*, 2019, 17(1): e3000122.
- [17] TAKASHIMA N, ISHINO S, OKI K, et al. Elucidating functions of DP1 and DP2 subunits from the *Thermococcus kodakarensis* family D DNA polymerase [J]. *Extremophiles*, 2019, 23: 161-172.
- [18] LU S H, ZHANG X S, CHEN K Y, et al. The small subunit of DNA polymerase D (DP1) associates with GINS-GAN complex of the thermophilic archaea in *Thermococcus* sp. 4557 [J]. *Microbiology Open*, 2019, 8(9): e848.

# Primary Study on Purification and Function of Recombinant Pol D DNA Polymerase

ZHANG Xuesong<sup>1</sup>, LI Defeng<sup>1</sup>, XUE Jiangshan<sup>1</sup>, CHEN Zimeng<sup>2</sup>, LI Zhuo<sup>2</sup>,  
MENG Jianzong<sup>3\* \* \*</sup>

(1. College of Life Science & Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China; 2. Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen, Fujian, 361000, China; 3. Institute of Food & Pharmaceutical Science, Guangxi Agricultural Vocational University, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**Abstract:** In order to study the function and interaction of the two subunits of Archaeal Pol D DNA polymerase, the small subunit DP1 and large subunit DP2 of recombinant hyperthermophilic archaeal *Thermococcus* sp. 4557 Pol D DNA polymerase were purified by column chromatography. The function of the two subunits *in vitro* was studied by fluorescence labeling nucleic acid combined with polyacrylamide gel electrophoresis experiments. The results showed that DP2 had DNA replication elongation activity, and DP1 had 3'→5' exonuclease activity. When the concentration ratio of DP1 to DP2 is higher than 0.3 : 1, the extended product of DP2 can be degraded. DP2 promoted the exonuclease activity of DP1, while Sld5 and Psf1 Complex (GINS 51) had an inhibitory effect on DP1 exonuclease activity. The function and interaction of the large and small subunits of Archaeal Pol D DNA polymerase have reference significance for further understanding of DNA replication mechanism.

**Key words:** Archaea; Pol D DNA polymerase; subunit; extension activity; exonuclease activity

责任编辑:陆雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>