



TaqDNA 聚合酶表达载体的构建及表达条件优化

鞠守勇

(武汉职业技术学院 生物工程学院,湖北 武汉 430074)

摘 要: Taq DNA 聚合酶是基因工程中最重要商业化工具酶之一,对于大量分子克隆的教学实验来说,存在一定的经济成本负担。一般基因工程实验室都有能力自主生产 Taq 酶,这样可以节省大量的科研经费,同时还可以培养学生综合实训能力。研究构建 Taq DNA 聚合酶表达载体,在大肠杆菌 *E.coli* BL21(ED3) 中表达,并成功提取 Taq 酶,检测其活性。PCR 实验表明研究得到的 Taq 酶与商业化 Taq 酶的活力相当,为自主生产 Taq DNA 聚合酶教学实验室和研究实验室提供参考,极大降低实验室 Taq 酶的成本。

关键词: Taq DNA 聚合酶;基因工程;Taq DNA 聚合酶表达

中图分类号: Q55; TQ28

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2022) 05-0106-04

DOI: 10.19899/j.cnki.42-1669/Z.2022.05.017

水生栖热菌(*Thermus aquaticus*, Taq)是分离自美国黄石公园火山温泉中一种革兰氏阴性细菌,其最佳生长温度为 70℃,最大耐受温度 79℃,最低生长温度 40℃,该菌是一种典型的嗜热细菌^[1]。Taq 中的 DNA 聚合酶具有热稳定性,因此应用于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术^[2]。Taq DNA 聚合酶属于 DNA 聚合酶 I 家族,由 832 个氨基酸组成,分子量 94kDa,在 72℃附近具有较好的 DNA 聚合酶的生物学活性,95℃酶的活性仍然可以持续 40 分钟^[3]。一般 Taq DNA 聚合酶都具有 DNA 5' → 3' 聚合酶活性,5' → 3' 核酸外切酶活性和焦磷酸酶活性;此外,还可以在 DNA 3' 端引入一个核苷酸 A^[4]。

Taq DNA 聚合酶已经实现了商品化,大部分实验室都可以从各商业化的试剂公司购置,例如日本宝生物、上海生工、南京诺唯赞、北京全式金等公司。这些年 Taq DNA 聚合酶价格下降了很多,每个单位平均价格在 0.5 元左右,但对于大量分子克隆的教学实验来说,还是有一定的经济成本负担。早在 1989 年,已经克隆到 Taq DNA 聚合酶的基因已在 *E.coli* 中实现了表达^[5],只需要一些常规的设备,一般基因工程实验室都有能力自主生产 Taq DNA 聚合酶,这样可以节省大量的科研经费,同时还可以培养学生综合实训能力。

本研究构建了 Taq DNA 聚合酶表达载体,并在 *E.coli* BL21(ED3) 中表达,并成功提取了

收稿日期: 2022-05-03

基金项目: 2021 年湖北省教育厅科学技术研究指导性项目(B 类项目)“核酸检测用快速 Taq DNA 聚合酶的研制”(项目编号: B2021467);
2021 年武汉职业技术学院校级重点项目“核酸检测用 Taq DNA 聚合酶的研制”(项目编号: 2021YK010)。

作者简介: 鞠守勇(1981—),男,山东泰安人,武汉职业技术学院生物工程学院副教授,博士,研究方向: 基因工程。

Taq DNA 聚合酶,并检测了其活性。本研究获得的 Taq DNA 聚合酶完全可以满足基因工程教学实验室的日常克隆工作,对于自主生产 Taq DNA 聚合酶教学实验室和研究实验室,具有参考价值。

一、材料与方法

(一)材料与仪器

质粒 pET28a(+) 本实验室保存;大肠杆菌 E.coli BL21(ED3) 本实验室保存;一步法克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;蛋白质 Marker 购于上海碧云天生物技术有限公司;氯化钠、Tris 盐酸等常规生化试剂购于国药集团。LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 值 7.0~7.4, 121℃ 灭菌 30 min。标准湿式转膜 美国 Bio-rad 公司; Eppendorf 5415D 离心机 德国 Eppendorf 公司;恒温培养箱 广州医疗器械厂;凝胶成像系统 3Y GAS-2000 美国柯达公司;电泳仪 DYY-11 北京六一仪器厂;恒温恒湿箱 摇床 武汉瑞华仪器设备公司。

(二)实验方法

1. 载体的提取

挑取 E.coli DH5 α (pET28a(+)) 单菌落接种到新鲜的卡拉霉素 LB 液体培养基, 37℃, 200 r/min 培养至对数生长期 OD 0.8~1.0, 离心收集菌体, 参照分子克隆实验指南^[6] 提取质粒。

2. PCR 克隆 Taq 基因

以 pUC118-Taq 为模板, PCR 扩增 Taq 基因。反应体系:模板 1 μ L, 引物 1 和 2 (10 μ M) 各 2 μ L, dNTP 2 μ L, Pfu DNA 聚合酶 1 μ L, 总反应体系 50 μ L。反应程序为 94℃ 5 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环, 72℃, 10 min, 25℃ 1 s。

3. 表达菌株 E.coli BL21(ED3) (pET28a(+)-Taq) 的构建

回收 Taq 基因片段, 与载体 pET-28a(+) 按照合适的比例混匀, 50℃, 5 min; 立即置于冰上冷却。再通过 CaCl₂ 转化法转入 E.coli DH5 α 中, 挑取单菌落并提取质粒, 酶切及测序验证。提取质粒 pET28a(+)-Taq 转化表达宿主菌 E.coli BL21(DE3)。构建含有 pET28a(+)-Taq 的表达宿主菌 E.coli BL21(DE3) (pET28a(+)-Taq)。

4. Taq DNA 聚合酶的诱导表达及纯化

在平板上挑取 E.coli BL21(ED3)(pET28a(+)-Taq) 单菌落, 接种 LB(含有卡拉霉素) 液体培养基, 37℃

活化 12 h, 取 1% 加入卡拉霉素 LB 液体培养基, 37℃, 200 r/min 培养至 OD 0.8~1.0, IPTG 诱导, 37℃ 培养 4 h 或 16℃ 培养 12 h; 4℃ 离心收集菌体, 预冷的无菌水洗涤一遍。4℃ 下用 20 mM Tris-HCl Tris 缓冲液(pH=7.9) 重悬菌体, 超声波破碎; 70℃ 处理 0.5 h, 12000r/min 离心 60 分钟, 收集上清液, 得到 Taq DNA 聚合酶。

5. 酶活力的测定

扩增体系为 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2.5 μ L, 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, 质粒模板 5 μ LL。PCR 程序: 95℃ 变性 5 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 循环; 72℃ 延伸 5 min。

二、结果与分析

(一)pET28a(+)-Taq 重组载体的构建

提取 pUC118-Taq 与 pET28a(+) 经 EcoRI, XhoI 酶切, 回收 Taq 基因, 与 pET28a(+) 连接, 转化 E.coli DH5 α 感受态, 挑取单菌落, 提取质粒, 构建重组质粒 pET28a(+)-Taq(如图 1), 经过 EcoRI, XhoI 酶切验证正确(如图 2)。经测序, Taq 基因序列与预期序列完全一致。

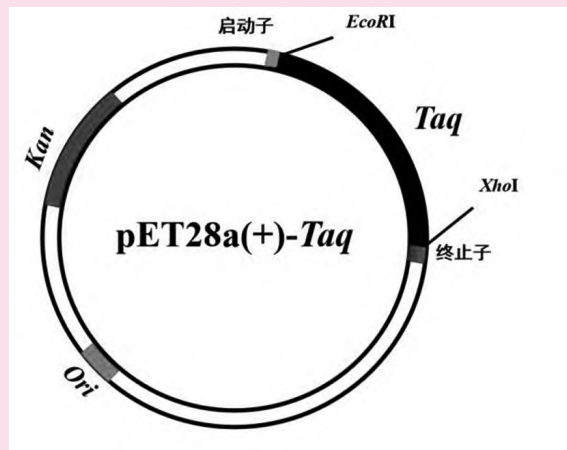
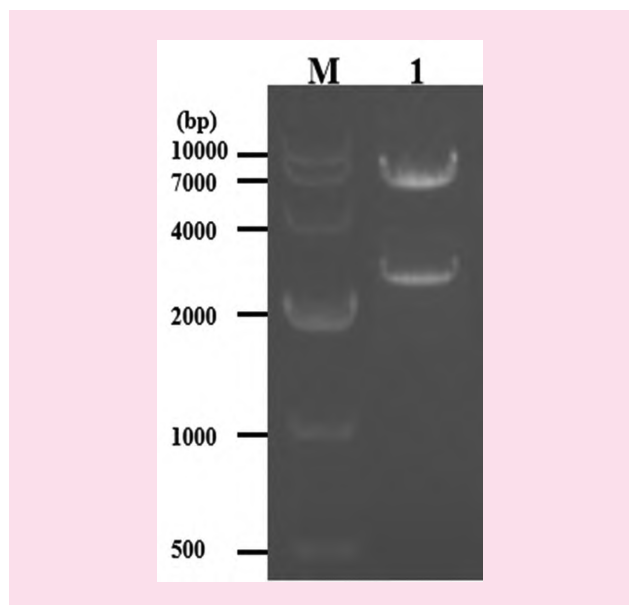


图 1 重组质粒 pET28a(+)-Taq 示意图

(二)Taq DNA 聚合酶的诱导表达

重组质粒 pET28a(+)-Taq 通过 CaCl₂ 转化法转入到大肠杆菌 E.coli BL21(DE3) 菌株中, 构建 Taq DNA 聚合酶表达菌株 E.coli BL21(DE3) (pET28a(+)-Taq)。按照方法 4, 37℃ 活化菌株, 培养至 OD 0.8~1.0, 加入 0.2 μ M IPTG 诱导, 37℃ 培养 4 h 或 16℃ 培养 12 h。随后收集菌体, 破碎细胞, 提取 Taq DNA 聚合酶, SDS-PAGE 检测其表达量, 如图 3 所

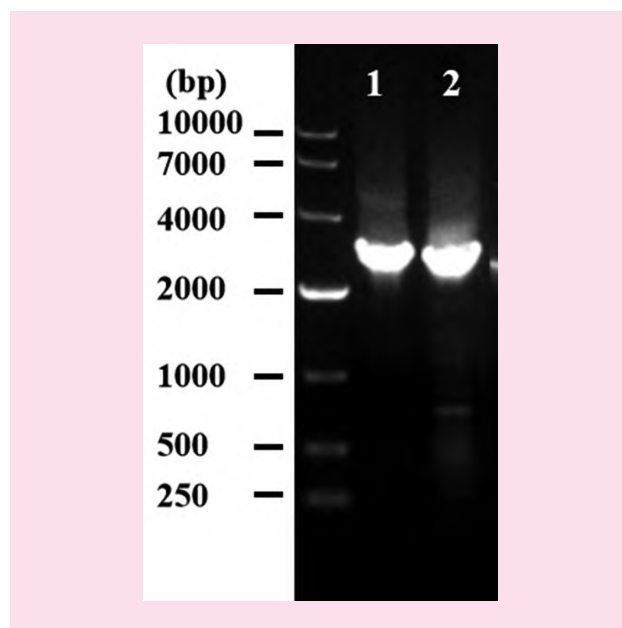
示,在 94Kda 位置上有一个主带,大小符合预期,表明 Taq DNA 聚合酶在 37℃ 和 16℃ 都有表达,且表达量相近(图 3)。



M 是 DNA 分子量标准,1 是 pET28a(+)-Taq 用 EcoRI, XhoI 酶切片段

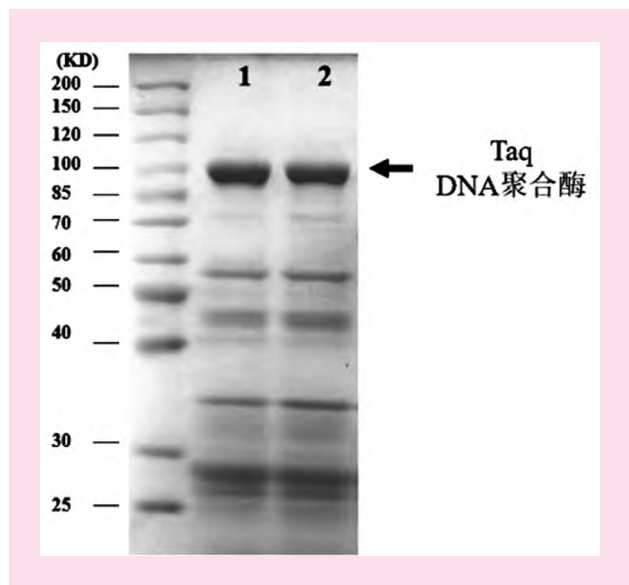
图 2 pET28a(+)-Taq 用 EcoRI, XhoI 酶切片段

本研究提取的 Taq DNA 聚合酶扩增结果。结果表明本研究诱导表达提取的 Taq DNA 聚合酶与商业化 Taq DNA 聚合酶亮度接近,酶活相当完(图 4)。



1:商品化 Taq DNA 聚合酶扩增结果,
2:本研究提取 Taq DNA 聚合酶扩增结果

图 4 琼脂糖凝胶电泳检验 Taq DNA 聚合酶酶活



1:37℃诱导,2:16℃诱导

图 3 SDS-PAGE 检测诱导表达的 Taq DNA 聚合酶

(三) Taq DNA 聚合酶酶活力的检测

Taq DNA 聚合酶主要应用于 PCR 扩增 DNA 片段,在 PCR 扩增体系中,使用不同 Taq DNA 聚合酶,其他体系不变,PCR 扩增出来的 DNA 片段数量(琼脂糖电泳亮度)与酶活力成正相关。如图 4 所示,条带 1 为商业化 Taq DNA 聚合酶扩增结果,条带 2 为

三、结果与讨论

大肠杆菌因为具有生长快、培养成本低、基因操作方便、适宜大规模生产等特点,已经成为基因工程中异源表达蛋白最常用的宿主^[7]。Taq DNA 聚合酶是基因工程中最重要工具酶之一,目前该酶最常用的生产方式是通过大肠杆菌进行诱导表达,再通过 Taq DNA 聚合酶上自带的标签,通过亲和层析分离提取^[8]。由于亲和层析相应的填料相对昂贵,大大增加了 Taq DNA 聚合酶的生产成本。本研究构建了 Taq DNA 聚合酶表达载体,并在大肠杆菌 E.coli BL21(ED3)中表达,并成功提取了 Taq DNA 聚合酶,并检测了其活性。PCR 实验表明本研究得到的 Taq 酶与商业化 Taq 酶的活力相当,完全可以满足基因工程教学实验室的日常克隆工作。

本研究为了降低成本,只对诱导表达的 Taq 聚合酶进行了初步纯化,其中含有一定量的大肠杆菌的基因组 DNA,所以如图 4 中,PCR 扩增片段 2 中有非目标杂带,且有一定的拖尾现象。随后的研究中将对 Taq 聚合酶进行进一步的提纯,去除体系中的大肠杆菌的基因组 DNA 片段,将改善拖尾和非特异性扩增的现象。本研究构建的 Taq DNA 聚合酶

表达载体和初步提纯步骤,将为自主生产 Taq DNA 聚合酶教学实验室和研究实验室,提供重要参考,从而极大降低实验室 Taq DNA 聚合酶的成本。

参考文献:

- [1] Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile.[J]. *Journal of Bacteriology*, 1969(1):97-289.
- [2] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. [J]. *Science*, 1988(4839):91-487.
- [3] 郭佳. Taq DNA聚合酶的结构修饰与表征[D].厦门:厦门大学,2014:23-25.
- [4] 伊丽娜.新型DNA聚合酶的基因工程改造及应用研究.[D].南京:南京理工大学,2012:17-21.
- [5] Lawyer FC, Stoffel S, Saiki R-K, et al. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*.1989(11):6427-6437.
- [6] 萨姆布鲁克,拉塞尔.分子克隆实验指南.[M]北京:科学出版社,2007:159-278.
- [7] Porowińska Dorota, Wujak Magdalena, Roszek Katarzyna, et al. Prokaryotic expression systems. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*, 2013(24):29-119.
- [8] 孙梅,葛丽娜,谢龙,等.不同DNA聚合酶突变体与野生型检测性能的比较分析[J].*分子诊断与治疗杂志*,2022(2):97-200.

[责任编辑:董巍]

Construction of Taq DNA Polymerase Expression Vector and Optimization of Expression Conditions

JU Shou-yong

(School of Bioengineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan 430074, China)

Abstract: Taq DNA polymerase is one of the most important commercial tool enzymes in genetic engineering. There is a certain economic cost burden for the teaching experiment of a large number of molecular cloning. General genetic engineering laboratories have the ability to independently produce Taq enzyme, which can save a lot of scientific research funds and cultivate students' comprehensive practical training ability. In this study, Taq DNA polymerase expression vector was constructed and expressed in *E.coli* BL21 (ED3). Taq enzyme was successfully extracted and its activity was examined. The PCR experiments showed that the activity of Taq enzyme in this study is equivalent to that of commercial Taq enzyme, which provides an important reference for the teaching laboratory and research laboratory of independent production of Taq DNA polymerase, thus greatly reducing the cost of laboratory Taq enzyme.

Keywords: Taq DNA polymerase; genetic engineering; Taq DNA polymerase expression