

國立臺灣大學醫學院
醫學檢驗暨生物技術學系



碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

DNA 聚合酶 I 於引子不同位置配對錯誤鹼基
校正活性分析

The Proofreading Activity of DNA
Polymerase I to Single Mismatches at Different
Sites of the Primer

許博淳

Po-Chen, Hsu

指導教授：方偉宏 博士

Advisor: Woei-Horng Fang, Ph.D.

中華民國一百零二年七月

July, 2013

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

DNA 聚合酶 I 於引子不同位置配對錯誤鹼基校正活性分析

The Proofreading Activity of DNA Polymerase I to Single Mismatches at Different Sites of the Primer

本論文係許博淳君(學號 R00424019)在國立臺灣大學醫學檢驗暨生物技術學系所完成之碩士學位論文，於民國一百零二年七月二十九日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

吳廷宇

楊雅清

許蔚

方偉宏

指導教授：方偉宏 副教授

醫學檢驗暨生物技術研究所所長：鄧麗珍 教授

致謝

首先感謝方偉宏老師，給予我許多實驗方面、學業方面以及做人處事的建議與指導，還有生活經驗的分享並指導我解決問題的方法。感謝許濤老師、楊雅倩老師、蔡芷季老師播空擔任我碩士論文的口試委員，給予我寶貴的意見及修改方向。

感謝實驗室的珈嘉學姊，在我實驗、學業、生活上的經驗分享與指導，讓我可以確立目標並執行。

感謝佩蓉同學與我同甘共苦完成碩士研究，並且聊天出遊解悶。


感謝羿鈴學妹、宇捷學妹在實驗室付出的心力及幫助。感謝騰永學弟、維堯學弟的幫助。

感謝所上的其他同學們，在我遇到困難時給予的幫助。


最後，要感謝我的家人們，不論發生什麼事，總是無條件地給予我支持與鼓勵，讓我可以順利地完成碩士學業。

碩士生涯至此告一段落，希望自己可以善用所學，在將來的道路上有所發揮。

中文摘要

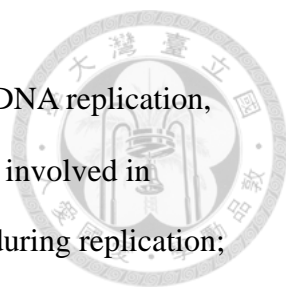


DNA 為生物體之遺傳物質，其高度複製忠誠度 (fidelity) 有助於維持基因穩定性及預防突變發生。DNA 聚合酶主要透過三種方式降低複製錯誤率：鹼基選擇性配對 (base selection)、3 端往 5 端外切酶 (3'→5' exonuclease) 之校正能力 (proofreading activity) 及錯誤配對修復機制 (mismatch repair system)。研究指出 DNA 聚合酶能夠移除引子末端鹼基或末端連續兩個錯誤鹼基。本實驗室發表文獻 (DNA Repair 9: 1073-1079) 指出當 DNA 聚合酶 I 與 DNA 內切酶 V (endonuclease V)、DNA 連接酶 (DNA ligase) 及 dNTP 共同存在下能夠修復 G-dI 的錯誤配對，應是由 DNA 內切酶 V 切斷 dI 上游第二個磷酸雙酯鍵，活化 DNA 聚合酶 I 校正活性導致。本實驗室進一步分析 DNA 聚合酶 I 對斷股上游第二個鹼基為錯誤配對十二種受質之校正活性。發現 DNA 聚合酶 I 可以修復斷股上游第二個錯誤配對 (林千如, 國立臺灣大學 101 學年碩士論文)，顯示斷股上游第二個位置有錯誤配對會活化 DNA 聚合酶 I 的 3 端往 5 端外切酶活性。然而我們對 DNA 聚合酶 I 校正外切酶作用於引子 3' 端上游配對錯誤的整體修復能力仍未全然明瞭，為了探究 DNA 聚合酶 I 的 3 端往 5 端外切酶的活化能力，我們設計一系列含配對錯誤的受質，各受質與引子 3' 端相隔 1 至 8 個正常配對鹼基以檢測聚合酶往 3' 上游配對錯誤的校正活性。配對錯誤受質的的設計，是利用限制酶對於序列具專一性，來偵測所製備的配對錯誤是否被校正。我們將配對錯誤鹼基設計在限制酶作用的位置，然後安排不同的限制酶在配對錯誤鹼基的下游，以利產生 3' 端不同位置的斷股。如此便製備出在斷股上游不同位置有配對錯誤鹼基的核酸受質。我們設計 A-A 及 T-T 兩種具有代表性的配對錯誤進行測試，將各種不同位置配對錯誤受質與 DNA 聚合酶 I 作用，並在含有 0.1 mM dNTPs 的情形下觀察其校正活性。此外，為觀察酵素反應作用初期的反應狀況，我們將不同的核酸受質與 DNA 聚合酶 I 反應，將反應時間設定在 6 分鐘之內，觀察酵素動力學的變化，並比較不同位置的配對錯誤，核酸修復效率與反應速率的差異。實

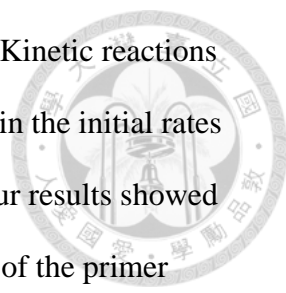


驗結果發現，DNA 聚合酶 I 能夠校正至斷股上游第四個錯誤配對之異雙股 DNA，在不同濃度的 DNA 聚合酶 I 具有不同的校正活性。我們也發現對於不同位置錯誤配對的核酸受質，DNA 聚合酶 I 的校正活性與反應速率也有所差異。利用線性配對錯誤受質與 DNA 聚合酶 I 作用的校正活性，排除 DNA 聚合酶 I 行缺口轉譯 (nick translation) 的可能性後，我們確認 DNA 聚合酶 I 是利用 3' 端往 5' 端外切酶，對斷股上游錯誤配對鹼基進行校正。此結果與先前 X 光晶體繞射研究核酸在 DNA 聚合酶活化位之轉移的推論相符合，這些結果對於 DNA 聚合酶在校正機制 (proofreading) 上的研究，有正面的幫助。另外，本研究也證實，配對錯誤在離斷股 3' 端上游超過 5 個核苷長度時，就不容易被 DNA 聚合酶 I 所移除，這個結果可以作為 site-directed mutagenesis 實驗設計寡核苷酸引子 (oligonucleotide primer) 時的參考。

Abstract



DNA carries genetic information in all living organisms. During DNA replication, it is important to maintain genomic integrity. Three mechanisms are involved in maintaining the high fidelity of genome. The first is base selection during replication; the second is the proofreading activities of DNA polymerases, which can remove the mis-incorporated nucleotide at the primer-template junction. The third is DNA mismatch repair systems. According to previous studies, it is known that terminal mismatch and consecutive two mismatches at the 3' end of the primer can be edited by DNA polymerase I (pol I). Our previous study showed that the proofreading activity of pol I could edit deoxyinosine-containing heteroduplex DNA following the process of endonuclease V which create a strand breakage at the second phosphodiester bond 3' to the deoxyinosine (DNA Repair 9: 1073-9). To figure out how it works, we constructed twelve heteroduplex DNAs containing single mismatch at the penultimate site of the primer and analyzed the proofreading activity. The results showed that all of the twelve heteroduplex DNAs can be edited by proofreading activity of pol I. However, the overall capacity of pol I proofreading exonuclease toward mismatches embedded upstream of the primer is still not fully understood. Therefore, we designed a series of mismatch substrates containing a strand break at 0 to 7 nucleotides 3' to the mismatch, which mimic mismatches embedded in primer template junctions, to study proofreading activity of pol I. Mismatches were designed to interrupt a restriction endonuclease recognition sequence so that proofreading activity can be scored by the restriction endonuclease assay. We also placed several restriction endonucleases sequences at 3' side to the mismatches so that in the same sequence content a series of substrates containing different strand breaks can be prepared. The two mismatches, A-A and T-T, were employed for the proofreading assay. The assay condition was in the presence of 0.1



mM each of the four dNTPs to mimic in vivo replication condition. Kinetic reactions of different substrates were assayed in a 6-min reaction span to obtain the initial rates for the comparison of substrate specificity for pol I proofreading. Our results showed that pol I can actively edit mismatches at -1, -2, -3, and -4 positions of the primer terminus. The correction levels were pol I concentration dependent, and also demonstrated certain degree of substrate specificity. Linearized heteroduplex substrate could also be efficiently proofread by pol I which ruled out the possible interference by non-specific nick translation.

The results of this study is consistent with previous X-ray crystallography study that at least 4 nucleotide from 3' end of the primer were required for transfer from polymerization site to exonuclease active site for editing. In addition, we also found mismatches located more than 5 nucleotides from 3' end were very difficult to remove by proofreading proficient DNA polymerase. The observation could provide a good guidance for designing oligonucleotides for gapped duplex site-directed mutagenesis.

總目次



誌謝	I
中文摘要	II
英文摘要	IV
圖目次	VIII
表目次	IX
附錄目次	X
縮寫表	XI
前言	1
一、緒論	1
1.1 DNA 複製忠誠度與 DNA 聚合酶之關係	1
1.2 DNA 聚合酶 I 之立體結構與聚合反應	2
1.3 DNA 聚合酶之校正反應	3
二、研究目的與動機	5
2.1 研究動機	5
2.2 研究目的	6
三、實驗設計與結果	6
3.1 實驗設計	6
3.2 實驗結果	6
材料與方法	8
一、菌株 (bacteria strain)	8
二、載體 (vector)	8
三、酵素	8
四、突變噬菌體 f1PM mutant 之建構	8
五、f1PM mutant 複製型雙股核酸之製備	10
六、f1PM mutant 單股核酸之製備	11
七、不同位置配對錯誤異雙股核酸之製備	11
八、配對錯誤受質對鑑定用限制酶之敏感性分析	12
九、DNA 聚合酶 I 於配對錯誤受質之校正活性測定	12
十、DNA 聚合酶 I 於線性配對錯誤受質之校正活性測定	13
十一、Klenow fragment 於配對錯誤受質之校正活性測定	13
實驗結果	14
一、f1PM 嵌入變種噬菌體之選殖	14

二、配對錯誤受質對鑑定用限制酶之敏感性分析	14
三、DNA 聚合酶 I 對配對錯誤受質之校正活性測定	15
四、DNA 聚合酶 I 對配對錯誤受質校正活性之反應速率分析	16
五、DNA 聚合酶 I 於線性配對錯誤受質之校正活性測定	16
六、以 Klenow fragment 取代 DNA 聚合酶 I 測試其修復反應	17
討論	18
圖	22
表	41
附錄	43
參考文獻	46



圖目次



圖一：突變噬菌體 f1PM mutant 之建構	22
圖二：錯誤配對受質之製備與純化示意圖	26
圖三：DNA 聚合酶 I 之校正活性分析	27
圖四：比較 DNA 聚合酶 I 之校正反應與缺口轉譯	28
圖五(1)：AA 種類配對錯誤受質對鑑定用限制酶之敏感性分析	29
圖五(2)：TT 種類配對錯誤受質對鑑定用限制酶之敏感性分析	30
圖六(1)：不同濃度之 DNA 聚合酶 I 對 A-A 配對錯誤受質之校正活性測定	31
圖六(2)：不同濃度之 DNA 聚合酶 I 對 A-A 配對錯誤受質之校正活性測定	32
圖六(3)：不同濃度之 DNA 聚合酶 I 對 A-A 配對錯誤受質之校正活性測定	33
圖六(4)：不同濃度之 DNA 聚合酶 I 對 T-T 配對錯誤受質之校正活性測定	34
圖七(1)：DNA 聚合酶 I 於不同位置錯誤配對受質之反應速率分析	35
圖七(2)：DNA 聚合酶 I 於不同位置錯誤配對受質之反應速率分析	36
圖八：線形錯誤配對核酸受質 T-T-1 經 DNA 聚合酶 I 作用後之修復情況	37
圖九(1)：不同濃度之 kleonw fragment 對 A-A 配對錯誤受質之校正活性測定	38
圖九(2)：不同濃度之 kleonw fragment 對 A-A 配對錯誤受質之校正活性測定	39
圖十：不同濃度之 kleonw fragment 對 T-T 配對錯誤受質之校正活性測定	40

表目次

表一：24 個鹼基對之人工合成寡鏈核苷酸建構

表二：DNA 聚合酶 I 對不同位置配對錯誤受質之反應速率分析



41

42

附錄目次

附錄一：DNA 聚合酶 I 之結構及示意圖	43
附錄二：引子末端錯誤鹼基引發的四個核苷酸溶解	44
附錄三：T7 DNA 聚合酶 I 之酵素動力學分析	45



縮寫表



A	adenine
A ₅₉₀	absorbance at 590nm
Arg	arginine
Asn	asparagine
Asp	aspartic acid
ATP	adenosine triphosphate
BND	benzoylated naphthoylated diethylaminoethyl
BSA	bovine serum albumin
C	cytosine
DNA	deoxyribonucleic acid
dNMP	deoxyribonucleoside monophosphate
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate
dI	deoxyinosine
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
HAP	hydroxyapatite
kD	kilo Dalton
KPi	potassium phosphate buffer
G	guanine
Gln	glutamine
Glu	glutamic acid
Lys	lysine
M.O.I.	multiplicity of infection
PEG	polyethylene glycol
Phe	phenylalanine
Pol I	DNA polymerase I
R	arginine
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolution per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
T	thymine
TBE	tris-borate-EDTA
TPE	tris-phosphate-EDTA
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tyr	tyrosine
Y	tyrosine

前言



一、緒論

1.1 DNA 複製忠誠度與 DNA 聚合酶之關係

DNA 儲存著生物體之遺傳訊息，其完整性甚為重要，高度的複製忠誠度對於維持基因穩定性、預防突變、癌症的發生扮演著重要角色 (Goldsby et al. 2002)。DNA 聚合酶主要透過三種方式降低複製錯誤率：首先由鹼基選擇性配對 (base selection) 將複製錯誤率降低至 10^{-5} - 10^{-6} ，其次透過 3' 端往 5' 端外切酶 ($3' \rightarrow 5'$ exonuclease) 之校正能力 (proofreading) 將複製錯誤率降至 10^{-7} - 10^{-8} ，若複製過程中仍出現錯誤配對，則啟動錯誤配對修復機制 (mismatch repair system) 將複製錯誤率降低至 10^{-10} (Schaaper 1993)。

已知的原核生物 DNA 聚合酶有五種，1957 年 Arthur Kornberg 等在大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 中首次發現了分子量為 103kDa 的 DNA 聚合酶，稱為 DNA 聚合酶 I (Lehman et al. 1958)。此聚合酶分子經蛋白酶水解 (protease digestion) 後，可區分為對蛋白酶敏感的 35kDa 的 N 端片段及 68kDa 的 C 端片段，後者又稱為 Klenow fragment (Klenow et al. 1970; Lehman et al. 1973)。Klenow fragment 具有 5' 端往 3' 端聚合酶活性 ($5' \rightarrow 3'$ DNA polymerase activity) 主要負責 DNA 延遲股 (lagging strand) 複製及當 DNA 損傷時進行空隙填補 (gap filling) (Friedberg 1995)；另一酵素活性為 3' 端往 5' 端外切酶 ($3' \rightarrow 5'$ exonuclease activity) 具有校正能力，修復錯誤鹼基以提高複製的忠誠度 (Joyce et al. 1982)。N 端片段具有 5' 端往 3' 端外切酶活性 ($5' \rightarrow 3'$ DNA exonuclease activity) 主要功能為移除引子 (primer removal) 以及 DNA 損傷時進行缺口轉譯 (nick translation)。原核生物中，其他種類之 DNA 聚合酶如 DNA 聚合酶 III，負責前進股 (leading strand) 的複製，為其主要複製染色體的聚合酶 (Nusslein et al. 1971)。DNA 聚合酶 II、IV 及 V 與 DNA 修復相關 (Napolitano et al. 2000)。真核生物中的 DNA 聚合酶種類繁多，至少有 15 種，其中較為研究的包括 DNA 聚合酶 α ，可合成引子並

且往下延伸數十個鹼基 (Bell et al. 2002) 。DNA 聚合酶 δ 主要作用於接續引子後之延遲股的複製 (Garg et al. 2004) ；前進股之複製主要由 DNA 聚合酶 ϵ 進行 (Pursell et al. 2007) ；兩者為真核生物中最主要之 DNA 聚合酶；DNA 聚合酶 β 主要與鹼基切除修復 (base excision repair) 有關 (Matsumoto et al. 1995) ；DNA 聚合酶 γ 與粒線體 DNA 之複製有關 (Kaguni 2004) ；DNA 聚合酶 ζ 與 DNA 損傷時進行 translesion synthesis 有關 (Woodgate 1999) 。本篇研究著重於聚合酶之校正活性，目前已知原核生物中之 DNA 聚合酶 I、II、III 及真核生物中 DNA 聚合酶 γ 、 δ 、 ϵ 具有 3'端往 5'端外切酶之校正能力，文獻指出當缺乏 3'端往 5'端外切酶活性之 DNA 聚合酶 δ ，將提高 20~30 倍的突變率 (Simon et al. 1991) ，相關機制陸續被探討。

1.2 DNA 聚合酶 I 之立體結構與聚合反應

對於 DNA 聚合酶 I 中的 Klenow fragment 的立體結構研究，目前可知由 F 及 G helix 分界，區分為靠近 C 端的較大 domain，約 400 個胺基酸 (residues 521-928) 的及靠近 N 端的較小 domain，約 200 個胺基酸 (residues 324-517) (Ollis et al. 1985; Freemont et al. 1986; Freemont et al. 1988) 。C 端的較大 domain 內有聚合酶活化位 (polymerase active site)，呈半開右手形狀 (half-open right hand)，主要由 α -helix 組成其立體結構：拇指 (thumb)、手掌 (palm) 及指頭 (fingers) (附錄一)。拇指結構為兩個長 helix，H 及 I，手掌含有雙股 DNA 結合位，由 6 個 anti-parallel β -sheet 組成底部，J 及 K helix 突出於側壁，形成寬約 20-24Å 深約 25-35Å 的裂縫 (cleft)，供雙股 DNA 結合。當雙股 DNA 結合上後，拇指產生結構上的改變，位移 12 Å 約 17° 轉向 3'端往 5'端外切酶的活化位，H 及 I helix 頂端約 50 個胺基酸 (residues 558-637) 旋轉靠近 DNA (Beese et al. 1993; Li et al. 1998) ，形成圓柱狀般將 DNA 網住，此結構可降低 DNA 的解離率 (Patel et al. 1991) ，以利聚合反應進行。長約 50Å 的指頭與單股之模板股作用，側鏈 O helix 上 Arg754、Lys758、Phe762 等胺基酸主要與 dNTP 結合 (Astatke et al. 1998) ，當結合新進入的 dNTP，指頭會由 opened form 變成 closed form，使 O-helix 旋轉

40°朝向手掌位置 (Patel et al. 2001) ，位於手掌上的聚合酶活化位由 Asp705、Asp882、Glu883 圍繞以催化聚合反應 (Joyce et al. 1994) ，使 dNTP 嵌入模板。

關於 DNA 聚合反應，必須有兩個二價金屬離子參與，主要為鎂離子。第一個金屬離子會促使五碳糖上 3' O-攻擊新進入的 dNTP 之 α -phosphate 為主要的催化活性；第二個金屬離子負責穩定結構，與焦磷酸鹽 (pyrophosphate) 結合以穩定五個共價鍵的短暫鍵結。最後，新的磷酸雙酯鍵形成，聚合反應完成 (Steitz 1998) (Steitz 1998) 。

1.3 DNA 聚合酶之校正反應

3'端往 5'端外切酶活化位位於較小的 subdomain 中，主要為 parallel β -sheet，具有可與單股 DNA 結合的特性 (Ollis, Brick et al. 1985; Freemont, Ollis et al. 1986; Freemont, Friedman et al. 1988) 。當引子末端出現錯誤配對時，引子與模板不穩定的氫鍵鍵結造成約八個鹼基對的位移，伴隨末端至少四個核苷酸溶解 (melting) 成單股 DNA (Freemont, Friedman et al. 1988; Cowart et al. 1989) ，這段單股引子會進入 3'端往 5'端外切酶活化位，進而切除引子末端的錯誤鹼基 (Brutlag et al. 1972) 。（附錄二）若是引子與模板在無法在四個鹼基對內有溶解現象，則無法產生校正活性。校正機制可概簡述為：在聚合酶活化位辨認出錯誤配對，將錯誤配對之引子末端約四個核苷酸溶解，此四個單股核苷酸由聚合酶活化位轉移到 3'端往 5'端外切酶活化位，切除末端錯誤鹼基，校正完畢後再轉移回聚合酶活化位繼續行 DNA 聚合反應。

兩個活化位間的距離約 25-30Å，僅靠四個溶解末端鹼基如何有效的在兩個活化位中轉移，並且藉由彼此間的酵素活性及 DNA 聚合酶結構上的改變達成高度的複製忠誠度被廣泛研究 (Ollis, Brick et al. 1985; Catherine et al. 1987) 。文獻指出 DNA 次要凹槽 (minor groove) 與某些特定胺基酸側鏈間形成不尋常的氫鍵 (Seeman et al. 1976; Mullen et al. 1989; Tom Brown 1992) 作為 DNA 聚合酶感應錯誤配對的方式，研究顯示當 DNA 聚合酶 O helix 側鏈胺基酸 Tyr766 產生突變，會使之裝錯鹼基之機率提高，在模板 G 對面裝上 T 的機率會上升至六十倍

(Bell et al. 1997)。文獻也指出 Asn675、Arg835、Arg836 或 Arg461 可偵測錯誤配對鹼基 (Thompson et al. 2002)，而 Arg668、Asn845 則與偵測正確配對鹼基有關。DNA 與胺基酸側鏈的交互作用影響著 DNA 及聚合酶間的結合緊密程度。另外，Asp705、Glu710、Tyr766 等胺基酸會影響 DNA 聚合酶及 dNTP 的親和力，將前述胺基酸突變後，DNA 聚合酶 I 與 dNTP 的親和力增加了約五到三十倍；突變 Arg668、Gln849、Asp705、Asp882 將使 DNA 聚合酶 I 聚合效率大幅降低一百至一千倍，聚合效率的降低將提升引子與模板的解離率，與轉移至 3'端往 5'端外切酶活化位的可能。(Polesky et al. 1990; Polesky et al. 1992)，由此可知 DNA 聚合酶之胺基酸側鏈具有其重要性。

目前已知藉由拇指位移 12 Å 以及 J-helix 的結構轉換，DNA 聚合酶 I 可將配對錯誤的 DNA 轉移至 3'端往 5'端外切酶活化位。當 DNA 聚合酶 I 感應到配對錯誤的鹼基，J-helix 的結構由 helix form 轉換成 coil form，將配對錯誤 DNA 轉移至 3'端往 5'端外切酶活化位後，J-helix 轉換回 helix form (Tuske et al. 2000)。在 DNA 轉移過程中 J-helix 上的 RRRY motif (821-824 residues) 提供穩定單股模板的結構，加速鹼基的溶解，並使之轉移至 3'端往 5'端外切酶活化位，並切除錯誤配對。若使 RRRY motif 突變，會抑制 DNA 在兩個活化位轉移，導致 3'端往 5'端外切酶活性降低高達二十九倍 (Kukreti et al. 2008)。3'端往 5'端外切酶活性倚靠兩個二價金屬離子，可能為鎂離子、錳離子或鋅離子。第一個金屬離子幫助結合且定位單股 DNA 受質及 pKa 較低的 attacking water，聚合酶 I 的 Tyr497 促使水分子釋放 OH⁻ 攻擊末端鹼基與倒數第二個鹼基間的磷酸雙酯鍵，第二個金屬離子當作 Lewis acid 穩定帶負電之殘留的 DNA 3' O⁻。兩者共同幫助穩定五個共價鍵的短暫鍵結，催化外切酶反應將末端鹼基切除 (Freemont, Friedman et al. 1988; Derbyshire et al. 1991; Brautigam et al. 1999)。

研究 Klenow fragment 與 DNA 之引子-模板股的結合發現，和正確配對的 DNA 相比，斷股上游帶有錯誤配對的引子-模板股受質，結合於至 3'端往 5'端外切酶活化位的常數較大。顯示具有校正活性的 DNA 聚合酶，可以感應到斷股上

游的錯誤配對，並利用 3'端往 5'端外切酶進行切除。(Bailey et al. 2004; Bailey et al. 2007)

由酵素動力學角度探討校正機制之研究發現，當DNA與聚合酶結合後，正確配對的引子-模板股會進行快速的聚合作用。先前的研究顯示T7 DNA聚合酶對於正確配對的引子-模板股繼續進行聚合反應的速率常數為 300 s^{-1} (Patel, Wong et al. 1991)，將DNA從聚合酶活化位轉移至 3'端往 5'端外切酶活化位的速率常數為 0.16 s^{-1} (Donlin et al. 1991)，聚合酶與DNA的解離速率常數也為 0.2 s^{-1} 。因此DNA聚合酶傾向在正確配對的引子-模板股後繼續聚合DNA，並且每秒可裝 300-500 個鹼基；然而，錯誤配對的引子-模板股與T7 DNA聚合酶結合後，繼續進行聚合反應的速率常數降低至 0.01 s^{-1} (Wong et al. 1991)，解離速率常數為 0.4 s^{-1} ，而將DNA從聚合酶活化位轉移至 3'端往 5'端外切酶活化位的速率常數上升為 2.3 s^{-1} ，因此錯誤配對的引子-模板股傾向轉移至 3'端往 5'端外切酶活化位。3'端往 5'端外切酶移除錯誤鹼基的速率非常快，校正完畢後轉移回聚合酶活化位的速率常數也大於 700 s^{-1} (附錄三)。因此，根據酵素動力學可知，當引子末端出現錯誤鹼基時，DNA聚合酶傾向先往回修復錯誤鹼基再繼續聚合反應 (Brutlag and Kornberg 1972)。有研究顯示T4 DNA 聚合酶於引子末端出現錯誤鹼基時，聚合酶往回修復錯誤鹼基之機率高達 80% (Reddy et al. 1992)。

二、研究目的與動機

2.1 研究動機

先前文獻探討 DNA 聚合酶之校正活性皆顯示 DNA 聚合酶能將引子末端的錯誤鹼基切除 (Brutlag and Kornberg 1972)。有文獻研究 T4 DNA 聚合酶校正活性，發現 T4 DNA 聚合酶能夠將引子末端以及引子末端連續兩個錯誤鹼基切除，但無法有效切除引子末端連續三個錯誤鹼基，推測與 3'端往 5'端外切酶之活化位可容納的鹼基數有關 (Reddy, Weitzel et al. 1992)。本實驗室先前發表的文獻顯示 DNA 聚合酶I與 DNA 內切酶 V(endonuclease V)、DNA 連接酶(DNA ligase) 及 dNTPs 共同存在的條件下能夠修復 G-dI 的錯誤配對 (Lee et al. 2010)。DNA

內切酶 V 在 dI 股下游第二個磷酸雙酯鍵製造斷股 (nick)，DNA 聚合酶 I 辨認此訊號利用 3' 端往 5' 端外切酶的活性校正斷股上游第二個鹼基 dI，校正完畢由 5 端往 3 端聚合酶嵌入正確鹼基，再由 DNA 連接酶黏合，完成修復動作。由本實驗室陳怡安、林千如論文中結果顯示，DNA 聚合酶 I 對於位在 3' 端斷股上游第二個位置之錯誤鹼基具有校正活性。(陳怡安 2011; 林千如 2012)

2.2 研究目的

雖然經我們得知 DNA 聚合酶 I 可以校正引子 3' 端斷股上游第二個位置之錯誤鹼基，對於 DNA 聚合酶 I 校正引子 3' 端上游不同位置錯誤鹼基的能力我們仍充滿著好奇，因此，本篇研究的目的為探討 DNA 聚合酶 I 對於引子 3' 端斷股上游之校正範圍。

三、實驗設計與結果

3.1 實驗設計

我們製備了 3' 端斷股上游帶有不同位置錯誤配對鹼基的核酸受質，其長度有 6674 個鹼基對，分子量約為 6.7kb。錯誤配對的 DNA 經 DNA 聚合酶 I 修復完成後可能為 A-T 或 T-A 分別由限制酶 NcoI、StyI 辨認切位 (表一)，與 AlwNI 進行雙酶切 (double digestion)，產生 3.7 及 3.0 kD 兩個片段。可得知 DNA 聚合酶 I 之 3' 端往 5' 端外切酶的校正活性是否能修復斷股上游不同位置之錯誤鹼基，並且比較其校正活性。

3.2 實驗結果

本篇研究中製備出八種含有不同位置 nick 之錯誤配對異雙股核酸受質 (A-A-1、A-A-2、A-A-3、A-A-4、A-A-5、A-A-8、T-T-1、T-T-2)，其中 A-A-2、T-T-2 異雙股 DNA 可與實驗室先前研究相比較。本篇研究比較 DNA 聚合酶 I 對於斷股上游不同位置錯誤配對之校正活性差異以及對錯誤配對受質之親和力及催化效率。我們首先確認所有配對錯誤受質在未與 DNA 聚合酶 I 反應下，不會被欲鑑定之限制酶所水解，或其 star activity 在扣除背景數值後仍有足夠數據供我們分析。我們利用序列稀釋之 DNA 聚合酶 I 對不同位置錯誤配對 DNA 於 37

°C 反應 3 min，再選定適當單位數之 DNA 聚合酶 I 與不同位置錯誤配對 DNA 於 37°C 反應 0 到 6 min，每兩分鐘為間隔之反應速率分析。我們發現 DNA 聚合酶 I 能夠校正至斷股上游第四個錯誤配對之異雙股 DNA，在不同濃度的 DNA 聚合酶 I 以及下具有不同的校正活性。我們也發現對於不同位置錯誤配對的核酸受質，DNA 聚合酶 I 的校正活性與反應速率也有所差異。此結果與先前對於核酸在 DNA 聚合酶活化位之移動研究相符合，這些結果對於 DNA 聚合酶在校正機制 (proofreading) 上的研究，有正面的幫助。

在以 gapped 雙股 DNA 及寡核苷酸鏈進行 site-directed mutagenesis 實驗時 (Kramer et al. 1984)，一般的經驗是不會將配對錯誤設計太靠近 3' 端，以避免配對錯誤被 Klenow fragment 中的 3' 端往 5' 端外切酶所切除，然而過去並沒有任何研究指出配對錯誤可以多靠近 3' 端而不被移除；本研究以試管中實驗的方法證實，配對錯誤在離 3' 端超過 5 個核苷長度時，就不容易被 DNA 聚合酶 I 所移除，這個結果可以作為 site-directed mutagenesis 實驗設計寡核苷酸引子 (oligonucleotide primer) 時作為參考。

材料與方法



一、菌株 (bacteria strain)

本實驗使用大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 菌株 NM522, 其基因型為 *SupE*, *thi*, $\Delta(lac-proAB)$, *hsd5(r-, m-)*, $F'[proAB, lacI^q, lacZ \Delta M15]$

二、載體 (vector)

f1MR1-PM (f1PM) 共 6647 個鹼基對, 含不同限制酶切位。以人工合成之寡鏈核苷酸序列 (oligonucleotides) 接合至 HindIII(5815) 與 XbaI(5839) 切位之間。接合成功將帶有 StyI 或 NcoI 限制酶切位。配合載體上 AlwNI 切位 (2192) 可供後續實驗鑑定。

三、酵素

限制酶 XbaI、HindIII、AlwNI、XcmI、PflMI、EcoRI、Acc65I、KpnI、PvuII、StyI、NcoI、NcoI-HF, DNA polymerase I、Klenow fragment、RecBCD 及 T4 DNA ligase 均購自 New England Biolabs。

四、突變噬菌體 f1PM mutant 之建構

將 10 μ g (約 2.3pmol) 之 f1PM 載體以限制酶 XbaI、HindIII 在 37 $^{\circ}$ C 水解 1.5 hr, 將第 5815 至 5839 處切開後, 經酚萃取與酒精沉澱回收線形 f1PM 載體。為合成不同位置配對錯誤的異雙股 DNA, 設計了二對互補含 24 個鹼基的寡鏈核苷酸, 分別為

組一:

5'-AGCTGAATTCCATTCCX₁X₂GGATGG-3' 及

5'-CTAGCCATCCY₂Y₁GGAATGGAATTC-3' (X₁、X₂、Y₁、Y₂為A或T)

組二:

5'-AGCTCAGCTGGGTACCX₁X₂GGATGG-3' 及


5'-CTAGCCATCCY₂Y₁GGTACCCAGCTG-3' (X₁、X₂、Y₁、Y₂為A或T)

以上兩組寡鏈核苷酸購自 Purigo Biotech。將互補之兩條寡鏈核苷酸利用熱

黏合方式(70°C處理 10 min後，自然冷卻至室溫)產生雙股寡鏈核苷酸。隨後將線形f1PM載體與雙股寡鏈核苷酸以莫爾數 1:4 的比例，利用 2U之T4 DNA ligase於 16°C作用 16 hr，讓雙股寡鏈核苷酸得以接合至線形f1PM載體，再以 70°C作用 10 min去除T4 DNA ligase之活性以中止反應。若雙股寡鏈核苷酸成功接合將破壞f1PM載體 XbaI與HindIII切位，因此反應結束後利用 XbaI或HindIII配合載體上AlwNI限制酶切位進行雙酶切確認。欲接合之寡鏈核苷序列中我們設計了StyI或NcoI切位，當成功接合後除了破壞XbaI切位，將呈現StyI或NcoI切位，配合載體上AlwNI切位進行雙酶切，作為進一步確認用。

我們將此接合產物進行轉形作用 (transformation) 進入勝任細胞 (competent cell)，挑選單一溶菌斑 (single plaque) 後以鹼水解 (alkaline lysis minipreparation) 方式製備複製型雙股DNA (replicative-form DNA) 再以前述限制酶確認。將飽和NM522 菌液以 1:50 比例加入 2xTY (1.6% peptone、1% yeast extract、0.5% NaCl及 1mM NaOH) 於迴盪式培養箱中以 37°C，200rpm 培養至 $A_{590}=0.3\sim 0.4$ 。離心 (3000 rpm、10 min、4°C) 後移除上清液。取得沉澱之細胞後，以 100mM冰CaCl₂溶液回溶至原體積之一半。置於冰上 20 min，以改變細菌的細胞壁，並增加其細胞膜的通透性。然後再次離心，以 100mM冰CaCl₂溶液回溶至原體積之百分之一並置於冰上，即可作為勝任細胞備用。將接合產物以 1:8 的比例與 40μl的勝任細胞混合後置於冰上 30 min。利用 42°C熱休克 (heat shock) 方法進行轉形作用，40 s後置於冰上 2 min，加入 400μl 2xTY於迴盪式培養箱中以 37°C，200rpm培養 10 min後，取 100μl加入 200μl NM522 當作飼養細胞 (feeding cell) 以及 4ml軟性瓊脂 (0.7% agar)，混勻後平鋪於瓊脂培養基 (1.5% agar) 上，凝固置於 37°C 培養 12~16 hr。在瓊脂培養基上挑選單一溶菌斑於 1ml 2xTY培養 5 個小時後，經離心 (14000 rpm，5 min，室溫) 取得細菌。以鹼液分解方式抽取少量複製型雙股DNA，再以限制酶水解及核酸定序確認。

五、f1PM mutant 複製型雙股核酸之製備



我們利用液態培養(liquid culture)方法製備複製型雙股核酸 (Fang et al. 1997)。首先以maleness test方法篩選NM522 中具有性絨毛 (sex pili) 的雄性菌株，來擔任宿主細胞 (host cell)。以飽和雄性NM522 細菌液以 1:40 比例接種至含 20% glucose之 800ml 2xTY, 37°C、180rpm培養至 $A_{590}=0.8\sim 1.0$ 。隨後以M.O.I. (multiplicity of infection) =10 的比例加入噬菌體感染 6 hr，以利噬菌體在宿主細胞內複製。離心 18 min(4350rpm in Sorvall RC-3C HA6000 rotor, 4°C)取得被感染之細胞後，以 16ml TE/Glucose(50mM glucose、25mM Tris-Cl pH7.6、10mM EDTA)回溶。加入 4ml 的 25mg/ml溶菌酶(lysozyme)於室溫反應 10 min以打破細胞壁，再加入 40ml現配之 0.2N NaOH、1% SDS 溶液於冰上反應 10 min，進一步打破細胞並將蛋白質與核酸變性(denature)，接著加入 30ml 3M醋酸鉀(pH 5.5)冰上作用 10 min以中和酸鹼性(renature)。離心 20 min (8000rpm in Beckman type JA10、4°C)後收集上清液。加入 0.6 倍體積之異丙醇(isopropanol)，混勻置於室溫 10 min沉澱核酸。離心 30 min (8000rpm in Beckman type JA10、25°C)後將沉澱物 (pellet) 以 70%酒精清洗並以真空抽乾殘餘酒精。以 7ml TE (10mM Tris-Cl、1mM EDTA)回溶後，以最終濃度 4mM LiCl均勻混和置於冰上作用 30 min，離心 30 min (10000rpm in Beckman type JA25.5、4°C)以去除RNA。收集上清液並加入 2 倍體積之 100%酒精、0.1 倍體積之 3M醋酸鈉(Sodium acetate)溶液，以沉澱其DNA，離心 30 min (10000rpm in Beckman type JA25.5、4°C)後以 70%酒精清洗沉澱物並以真空抽乾，產物以 9ml TE回溶。將此溶液加入 1.05 倍重量之CsCl賦予密度梯度，300ul 10mg/ml EtBr結合並標定核酸，將溶液移置於超高速離心管 (Beckman ultra-centrifugation tube) 超高速離心 24hr (50000rpm in Beckman L8-60M ultracentrifuge tube 70.1 Ti rotor、25°C)可依不同密度分層。以 18G針筒將超螺旋結構 (supercoiled form) 之雙股複製型核酸取出，以飽和含水丁醇去除 EtBr，無水丁醇縮小體積，於TE緩衝液內透析 3 次，每次 6 hr以上。得到純化之複製型雙股核酸。

六、f1PM mutant 單股核酸之製備

本實驗使用液態培養方法製備單股核酸 (Fang, Wu et al. 1997)。以 maleness test 方法篩選 NM522 雄性菌株作為宿主細胞 (host cell)，將飽和菌液以 1:50 的比例接種至 800ml 2xTY，37°C、180rpm 培養至 A590=0.3~0.4，以 M.O.I.=10 的比例加入噬菌體感染 5.5 hr，以利噬菌體在宿主細胞內複製。離心 25 min (8000rpm in Beckman type JA10、4°C) 後取富含噬菌體之上清液。每 300ml 上清液加入 17.5g PEG-8000 及 10.3g NaCl，於室溫緩慢攪拌 1 hr 以上至溶解。離心 1 hr (8000rpm in Beckman type JA10、4°C) 後得含噬菌體的沉澱物。以 4ml TE 回溶，經過酚萃取及酒精沉澱後，離心 30 min (10000rpm in Beckman type JA20、4°C) 將沉澱物以 70% 酒精清洗並以真空抽乾殘餘酒精，最後以 4ml TE 回溶。

七、不同位置錯誤配對異雙股核酸之製備

萃取出 f1PM mutant 單股核酸為 viral strand 因此可與 f1PM mutant 複製型雙股核酸的 complementary strand 互補而配對雜交 (hybridization)。首先將複製型雙股 DNA 以不同限制酶水解為線形雙股 DNA，不同限制酶切位與欲製造錯誤配對之相對位置不同，進而達成將錯誤配對置於斷股上游不同位置之目的。以 1% TPE 瓊脂凝膠電泳確認其完全水解後，以酚萃取及酒精沉澱回收核酸，並以適當體積 TE 回溶。將線形雙股 DNA 與單股 DNA 以莫爾數 1:4 之比例，於最終濃度 50mM Tris-Cl pH7.6 與 10mM NaCl 環境下，以 0.03 倍體積新鮮配置之 10N NaOH 將核酸變性 (alkaline denature)，室溫作用 10 min 後加入 0.1 倍體積之 2.9N HOAc 中和酸鹼性。再加入 0.045 倍體積之 3M KCl 及 0.124 倍體積之 1M KPi pH7.4 溶液，用以降低核酸之磷酸根間的排斥力。接著在 65°C 作用 30 min 將不穩定的鍵結重新變性後移至 37°C 作用 30 min 重新黏合 (reanneal)，最終置於冰上終止反應。此時產物包含剩餘未黏合之單股核酸及自行黏合之雙股線形核酸，主要產物則為我們欲製備的含斷股之雙股核酸。

為提高純度，我們使用下列方式去除未黏合之單股核酸及自行黏合之雙股線形核酸。首先利用 HAP 管柱層析法分離雙股及單股核酸。核酸之磷酸鍵能與 HAP 中帶正電磷酸鈣化合物結合，此時加入不同濃度的 KPi 緩衝液能競爭性的將 DNA 解離出。使用 0.18M KPi 將單股 DNA 沖出，以 0.6M KPi 收集雙股 DNA。透過 Vivaspin column 離心透析之方式降低鹽類濃度及縮小體積。此時產物中的雙股線形 DNA 可利用 RecBCD nuclease 選擇性水解而不影響含斷股之異雙股 DNA，以 1% TPE 瓊脂凝膠電泳確認後進行酚萃取及使用無水丁醇縮小體積至約 1ml。此時產物中含有 RecBCD nuclease 水解後的小片段核苷酸，可經由 Sephacryl S300 分子篩層析法去除。若產物仍殘留單股 DNA，可經由 BND-cellulose 去除（圖二）。最終產物使用傳統透析法置於 TE 緩衝液中透析 3 次，每次 6 hr 以上。

八、配對錯誤受質對鑑定用限制酶之敏感性分析

製備出的異雙股核酸當中含有不同位置之錯誤配對，使前述之限制酶無法辨認及水解。因此利用限制酶作用，確認此產物無攙雜其他正確配對雙股核酸。另外，確認限制酶是否會對產物序列失去專一性（star activity）而影響後續實驗。我們利用雙酶切法比較異雙股核酸以及正確配對的水解程度，其中一個限制酶為辨認 f1PM 載體上之 AlwNI 切位，使用另一個限制酶可辨認我們設計之寡鏈核苷酸鏈上之特定序列，於 37°C 水解 1 hr 後以 1% TBE 瓊脂凝膠電泳分析。（圖五）

九、DNA 聚合酶 I 於配對錯誤受質之校正活性測定

參考本實驗室先前研究的反應條件（林千如，國立台灣大學 100 學年碩士論文）。將 100ng（約 22.7fmol）配對錯誤異雙股核酸以 10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 10^{-4} 、 5×10^{-5} 序列稀釋濃度的 DNA 聚合酶 I 在一倍的 NEB buffer 2（50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl pH 7.9、10 mM MgCl₂、1 mM Dithiothreitol）、0.5 倍的 10 mg/ml BSA 及 0.1mM ATP 條件下，37°C 作用 3 min 後置於 75°C 加熱 20 min 終止反應。我們將上述反應完後的 sample 增加體積，補足雙酶切鑑

定所需分子濃度，以雙酶切法於 37°C 作用 1 hr。若 DNA 聚合酶 I 能夠校正錯誤配對，則可得長度約 3.0kb 及 3.7kb 的產物。1% TBE 瓊脂凝膠電泳分析後利用 ImageJ 影像分析軟體，將修復產物量除以核酸總量即可得修復百分比（圖三）。並以 3 min 時修復百分比小於 50% 的濃度作為 DNA 聚合酶 I 反應速率分析的濃度反應條件。每 2 min 為間隔，共反應 6 min，觀察修復比例。（圖七）在實驗結果皆以 fmol 表示並且每項結果均經過三次以上之獨立實驗。

十、DNA 聚合酶 I 於線性配對錯誤受質之校正活性測定

為確認我們觀察之修復反應為 DNA 聚合酶 I 行校正反應而非行缺口轉譯之結果，我們將 100ng（約 22.7fmol）之配對錯誤異雙股核酸先以 AlwNI 水解為線性（linear form）配對錯誤異雙股核酸，再以方法九反應。

十一、Klenow fragment 於配對錯誤受質之校正活性測定

將 100ng（約 22.7fmol）配對錯誤異雙股核酸與 10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 10^{-4} 、 5×10^{-5} 序列稀釋濃度的 Klenow fragment，以方法九反應。

實驗結果



一、f1PM 嵌入變種噬菌體之選殖

利用人工合成之寡鏈核苷酸序列嵌入 f1PM，我們成功的選殖到二種噬菌體變種 f1PM-12 及 f1PM-23，分別以限制酶 AlwNI/NcoI 及 AlwNI/StyI 雙酶切法做初步的篩選(圖一(2))，之後再以核酸序列定序確認無誤(圖一(3))

二、配對錯誤受質對鑑定用限制酶之敏感性分析

本次利用兩組不同的合成序列，可以製造出錯誤配對鹼基為 A-A 或 T-T 之不同位置配對錯誤受質，以錯誤配對位置-錯誤配對鹼基種類來命名，例如 A-A-1 即代表位於斷股上游第一個鹼基對，錯誤配對種類為 AA 的錯誤配對鹼基。首先我們確認未校正前之受質不會被鑑定用限制酶水解，即是否有 star activity，並且與正確配對之雙股核酸 (homoduplex) 比較，確認當配對錯誤受質被修復成正確配對鹼基後能被限制酶辨認。

結果顯示配對錯誤受質對鑑定用限制酶之敏感性分析，錯誤配對若被修復，將呈現 StyI 或 NcoI 限制酶切位，其中 StyI 的辨識序列為 CCWWGG (W 表示鹼基為 A 或 T)，而 NcoI 的辨識序列為 CCATGG，意即 NcoI 可辨識的序列，也可被 StyI 所辨識，反之則不一定。搭配 AlwNI 做雙酶切後會有 3.7kb 及 3.0kb 兩個片段產物 (圖三)。

結果可確認 homoduplex control 皆可被其鑑定用限制酶辨認，並且水解程度近 100%，證明鑑定用限制酶的水解能力以及反應條件均合乎要求。StyI 限制酶可以順利辨認 CCTAGG 及 CCATGG。而 NcoI 限制酶則只能辨認 CCATGG 序列，兩者皆具有序列的特異性。

本次實驗所製備的含有一斷股的配對錯誤受質 (nick-form)，我們發現 A-A 種類配對錯誤受質中，A-A-1、A-A-2、A-A-3、A-A-4、A-A-5、A-A-8 皆不具有 star activity。(圖五 (1))

T-T 種類配對錯誤受質中，NcoI 對 T-T-1 不具有 star activity。但對 T-T-2

具有 39.3% 的 star activity (結果未顯示), 改使用購自 New England Biolabs 的 NcoI-HF, 對 T-T-2 不具有 star activity。在實際測定時, 其校正活性的信號在扣除背景數值後仍可獲得有效的數據。而 StyI 作用的結果顯示並不會對 T-T-2 產生 Star activity, 欲避免 NcoI 對 T-T-2 錯誤配對受質產生 Star activity 影響到實驗結果, 也可以換用 StyI 作為鑑定用限制酶。(圖五(2))

結果確認本次實驗製備出的配對錯誤受質具有符合研究 DNA 聚合酶 I 校正活性之特性。

三、DNA 聚合酶 I 對配對錯誤受質之校正活性測定

依照本實驗室先前研究的結果(林千如, 國立台灣大學 100 學年碩士論文), 我們選用 A-A 之異類置換為 purine-purine 組合之受質。因其校正活性較高。另外選用 T-T 之 pyrimidine-pyrimidien 組合之受質。實驗室先前的研究結果指出, A-A 異類置換錯誤配對受質, 其 DNA 聚合酶 I 校正反應初速率為 $0.096(\text{nm} \cdot \text{S}^{-1})$ 而 T-T 則為 0.056。

參考本實驗室先前研究的反應條件(林千如, 國立台灣大學 101 學年碩士論文)。為了找出最適宜進行校正活性酵素動力學分析之條件, 我們將 DNA 聚合酶 I 做序列稀釋, 分別為 10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 10^{-4} 、 5×10^{-5} unit 與 100ng(約 22.7 fmol) 之配對錯誤受質於 37°C 反應 3 min, 置於 75°C 20 min 終止反應後進行雙酶切後跑膠(圖三)。

各種不同濃度 DNA 聚合酶 I 作用於 A-A 種類配對錯誤受質之校正活性分析結果, 發現 DNA 聚合酶 I 校正活性由 A-A-1 開始遞減。以 10^{-2} unit DNA 聚合酶 I 與 A-A 種類配對錯誤受質反應結果為例: 由 A-A-1 至 A-A-4 的修復比例換算成 fmol 呈現分別為: 20.6、18.8、10.8、1.7 fmol。至 A-A-5、A-A-8 沒有觀察到修復反應。(圖六)

而以 10^{-2} unit DNA 聚合酶 I 與 T-T 種類配對錯誤受質反應結果為: 由 T-T-1 至 T-T-2 的修復比例換算成 fmol 呈現分別為: 21.9 及 15.0 fmol。(圖六)

和本實驗室先前對於引子末端倒數第二個配對錯誤鹼基校正活性的研

究結果比較：A-A 有 90.7% 修復活性，T-T 則有 65.4% 的修復活性。本實驗的-2 配對錯誤配受質顯示了相近的結果。印證了本實驗的可信度。

我們發現不論是A-A或是T-T種類配對錯誤受質，在DNA聚合酶I濃度小於 10^{-3} 時校正活性很低，但是當DNA聚合酶I濃度到達增加到 5×10^{-3} 及 10^{-2} unit時，校正活性則突然的上升。

四、DNA 聚合酶 I 對配對錯誤受質校正活性之反應速率分析

藉由校正活性測定實驗結果，我們挑選在反應 3 分鐘後未達到 50% 修復比例的DNA聚合酶I濃度，估計此濃度可對受質進行校正並且校正程度未趨於飽和。因為校正活性呈現遞減，所以我們在A-A-1、A-A-2、A-A-3 這三個配對錯誤受質，選用 5×10^{-4} unit DNA聚合酶I。在這個濃度下酵素與受質的比率約為 1: 10。校正反應於 37°C 進行 0、2、4、6 min後，以在 75°C 加熱 20 min的方式終止反應。進行雙酶切後跑膠。將修復比例換算成fmol修復產物，再計算出反應的初速率。

根據將膠圖定量的結果，可知道DNA聚合酶I在不同配對錯誤受質作用的情況，我們以反應起始到反應 2 分鐘的時間，約略估算DNA聚合酶對於該受質的作用初速率 (V_0)；而校正量化圖顯示DNA聚合酶對配對錯誤受質之校正反應速率最快的時間也在兩分鐘以內，故反應初速率 (V_0) 約等於最大反應速率 (V_{\max})。

由表二中的反應初速率分析，結果顯示，DNA 聚合酶 I 對不同的配對錯誤反應初速率強度的排序如下：A-A-1> A-A-2> A-A-3。

五、DNA 聚合酶 I 於線形配對錯誤受質之校正活性測定

由於 DNA 聚合酶 I 具有可進行缺口轉譯的特性，若是 DNA 聚合酶 I 以此特性繞著環狀異雙股核酸受質反應，則在繞行約一圈後，也可將錯誤配對移除而補上正確的鹼基，並在鑑定用限制酶的雙重水解反應下，在膠圖上呈現 3.0kb 和 3.7kb 兩個不同大小的片段。

因此我們先將環狀異雙股核酸受質 (T-T-1) 以限制酶AlwNI水解成線形

異雙股核酸受質，即排除DNA聚合酶I行缺口轉譯將錯誤鹼基修復之可能(圖四)，再與序列稀釋之DNA聚合酶I(10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 10^{-4} 、 5×10^{-5} unit)於 37°C 反應 3 min，終止反應後利用鑑定限制酶水解(圖八)，將修復比例換算成fmol呈現。以DNA聚合酶I濃度由低至高得到之校正活性分別為 0.0、0.7、2.0、8.4、14.9、19.6、22.4 fmol，與環狀異雙股核酸受質(T-T-1)測試結果比較，如圖。DNA聚合酶I仍然有幾乎同樣比例的修復效果，並且以t test計算發現在不同的酵素稀釋濃度下，線形異雙股核酸受質之測試結果，皆與相同濃度下環狀異雙股核酸受質之測試結果無顯著差異(p value > 0.05)。因此可知我們觀察到的結果確實由DNA聚合酶I進行校正之反應。因此之後仍以環狀異雙股核酸受質作測試。

六、以 Klenow fragment 取代 DNA 聚合酶 I 測試其修復反應。

Klenow fragment 為 DNA 聚合酶 I 的衍生蛋白，具有 5'端往 3'端聚合酶活性及 3'端往 5'端外切酶活性，但缺少了 5'端往 3'端外切活性。

我們以Klenow fragment 取代DNA聚合酶I，將Klenow fragment做序列稀釋，分別為 10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 10^{-4} 、 5×10^{-5} unit與 100ng (約 22.7 fmol) 之配對錯誤受質於 37°C 反應 3 min，置於 75°C 20 min終止反應後進行雙酶切後跑膠。

各種不同濃度Klenow fragment作用於A-A種類配對錯誤受質之校正活性分析結果，發現校正活性由A-A-1 開始遞減。以 10^{-2} unit Klenow fragment 與A-A種類配對錯誤受質反應結果為例：由A-A-1 至A-A-4 的修復比例換算成fmol呈現分別為：21.4、15.1、16.3、0.0 fmol (圖九)。

而以 10^{-2} unit DNA聚合酶I與T-T種類配對錯誤受質反應結果為：由T-T-1 至T-T-2 的修復分別為：21.5 及 13.0 fmol (圖十)。

討論

文獻指出，DNA 聚合酶 I 之校正活性，可以移除引子末端之錯誤鹼基 (Brutlag and Kornberg 1972)。另外，以 T4 聚合酶作為研究對象的結果也顯示，校正能力可以將引子末端連續兩個錯誤鹼基移除 (Reddy et al. 1992)。本實驗室先前發表的論文中指出 DNA 聚合酶 I 與 DNA 內切酶 V 共同存在下能夠修復上游第二個鹼基 di (Lee, Yang et al. 2010)。由本實驗室陳怡安、林千如論文中結果顯示，DNA 聚合酶 I 對於位在斷股上游第二個位置之錯誤鹼基具有校正活性 (陳怡安, 國立臺灣大學 100 學年碩士論文) (林千如, 國立臺灣大學 101 學年碩士論文)。

為探討 DNA 聚合酶 I 能否校正引子末端前方不同位置之錯誤鹼基，我們設計並製造斷股上游不同位置帶有錯誤配對鹼基的核酸受質，並利用限制酶對序列的專一性，偵測 DNA 聚合酶 I 的校正活性。

在製備核酸受質的過程中，發現一開始製備出來的核酸受質，依其吸光度所換算出的核酸濃度，與膠圖所呈現的核酸量並不相符。無法在膠圖上得到可觀察的核酸色帶 (Band)，也無法用以量化 DNA 聚合酶 I 的校正比例。在以 Sephacryl S300 分子篩層析法純化後，發現核酸受質在膠圖上呈現的核酸量變得穩定，也可以由膠圖上觀察到校正反應的產物。造成此現在的原因為：使用 RecBCD nuclease 選擇性切除雙股線形 DNA 及單股 DNA 時，會產生小片段的單股 DNA 及 dNMP，兩者存在於核酸受質溶液中，會造成吸光度的高估，而使得測得的核酸受質濃度與實際濃度不相符。另外，dNMP 作為 3' 端往 5' 端外切酶的產物及抑制物 (Que et al. 1978; Ollis, Brick et al. 1985)，會抑制 DNA 聚合酶 I 的校正反應，使我們無法得到正確的反應結果。

進行配對錯誤受質對鑑定用限制酶之敏感性分析，發現限制酶 NcoI 對 T-T-2 配對錯誤受質有 star activity。因為另外一個限制酶 StyI 沒有 star activity 的現象，所以排除配對錯誤受質中混入了 homoduplex DNA 的可能性。使用

StyI 進行鑑定，或使用購自 New England Biolabs 的 NcoI-HF，可以解決 T-T-2 配對錯誤受質的 star activity 現象。

校正活性測定實驗結果顯示，DNA 聚合酶 I 可以對引子末端倒數第四個錯誤配對鹼基產生校正反應。此結果符合先前研究的發現。根據 T4 DNA 聚合酶立體構造的研究，核酸聚合酶與引子、模板的交互作用中，前端的 5 個鹼基對會與活化區胺基酸或金屬離子相互作用(Doublie et al. 1998)。因此有可能在引子末端五個鹼基對中有錯誤配對存在下，DNA 聚合酶會啟動校正活性。另外，在對 Klenow fragment 的構造研究中發現，聚合酶活化位和 3'端往 5'端外切酶活化位相距約 30Å，所以推測 DNA 聚合酶在進行校正活性時，經溶解而轉移到 3'端往 5'端外切酶活化位的單股核酸大約為八至九個鹼基(Xie 2009)，本實驗並沒有觀察到斷股上游距離 5 個鹼基以上的錯誤配對有被修復的現象。推測轉移到 3'端往 5'端外切酶活化位的單股核酸並不會全部被水解。在校正反應中，轉移到 3'端往 5'端外切酶活化位的單股核酸有多少個會被水解也是一個待研究的課題。

我們證實了在距離斷股上游四個鹼基對以內產生錯誤配對時，DNA 聚合酶 I 仍然可以啟動校正的活性，而這方面的機制有待更清楚的研究。研究顯示在 DNA 聚合酶 I 進行校正之前，會經過一個讓核酸由聚合酶活化位轉移到 3'端往 5'端外切酶活化位的過程，這個步驟頗為重要。在鹼基正確配對的情形下，核酸轉移的速率，相較於在引子末端帶有錯誤配對的核酸，速率較低。而在引子末端具有一個錯誤配對又相較於含有兩個錯誤配對時，轉移的速率較低，顯示有錯誤配對的存在會使核酸較快進行轉移。而即使 3'端往 5'端外切酶活化位對於單股核酸有比較強的親合力，從 3'端往 5'端外切酶活化位轉移至聚合酶活化位的速率仍然大得多(Xie 2009)。雖然本實驗是直接加入核酸受質與 DNA 聚合酶 I 反應，但過去研究認為辨認到錯誤配對的異常結構仍然需要由 DNA 聚合酶 I 的聚合酶活化位來達成(Fidalgo da Silva et al. 2007)。因此推測我們本實驗中的反應也是必須經由 DNA 聚合酶

I 的聚合酶活化位辨識之後，將核酸轉移至 3'端往 5'端外切酶活化位進行校正反應，校正完成之後再移至聚合酶活化位往下游進行聚合反應。

由文獻中得知，若將 2,4-difluorotoluene 及 4-methylbenzimidazole 置於引子末端時，將因無法與執行 DNA 聚合酶 I 之 3'端往 5'端外切酶之胺基酸側鏈形成氫鍵，其校正活性相較於正常鹼基之錯誤配對分別下降 14-40 倍及 1.7-4 倍(Morales et al. 2000)。與校正活性有關之 DNA 聚合酶 I 的側鏈胺基酸 Glu357、Leu361、Phe473、Tyr497 等環繞在引子末端與核糖(ribose)間，幫助受質正確地置於活化位，並且藉由與引子末端結合作用加速雙股 DNA 的溶解現象(Derbyshire, Grindley et al. 1991; Brautigam, Sun et al. 1999)。因此，若引子末端鹼基失去與這些胺基酸結合的能力時，將大幅降低 DNA 聚合酶 I 之校正活性。文獻指出 purine 的鹼基堆疊力 (base stacking force) 較高 (Yu-Jane Sheng 2004)，可能造成 purine 與 3'端往 5'端外切酶之胺基酸側鏈親和力好，或藉由 purine N7 形成氫鍵鍵結，以 A 位於引子末端之校正活性最好，其次為 G、T、C 位於引子末端時則校正活性最低(Morales and Kool 2000)。但在本實驗以 A-A-1 配對錯誤與 T-T-1 配對錯誤進行比較，並沒有發現顯著的差異。

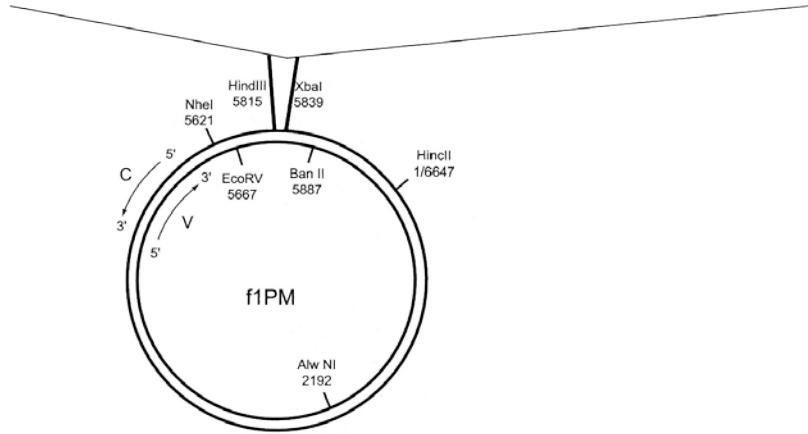
我們使用缺少 5'端往 3'端外切酶活性的 Klenow fragment 測試，發現酵素對於核酸受質仍有校正活性。然而我們發現，在高濃度的情況之下，才看得出有比較明顯的修復效率，相較於以 DNA 聚合酶 I 與受質的反應，在低濃度時修復效率低的多，推測因為我們所設計的核酸受質在斷股的下流是雙股核酸，類似 lagging strand 在複製時產生的岡崎片段 (okazaki fragment)，而 Klenow fragment 缺少了 5'端往 3'端外切酶的活性，無法將下游的鹼基切除，亦即無法作 nick translation，並且有研究指出 Klenow fragment 對於雙股核酸的結合強度是很微弱的 (Xie 2009)，是否因為上述的原因，造成 Klenow fragment 在高濃度才比較能夠觀察到校正反應，需要進一步研究。

本篇論文增進我們對 DNA 聚合酶校正活性的了解，核酸複製時置入錯

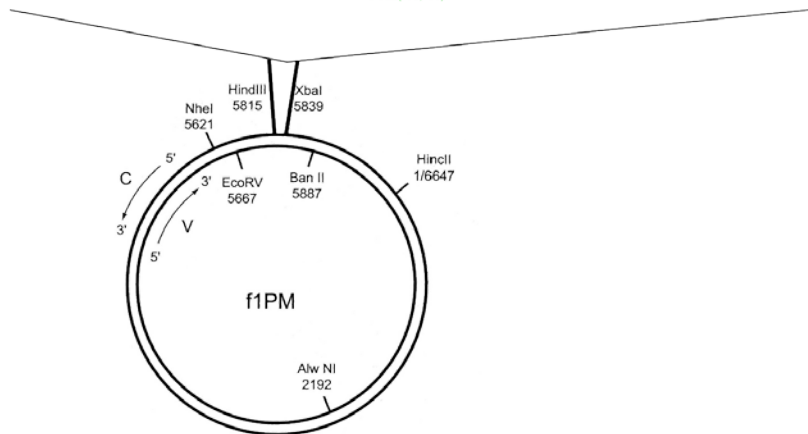
誤的鹼基後，即使聚合酶又加入正確的鹼基，之前複製錯誤仍有可能被檢測出來加以校正，目前的觀察可以校正至斷股上游第四個錯誤配對鹼基。另外，本研究也證實，配對錯誤在離斷股 3'端上游超過 5 個核苷長度時，就不容易被 DNA 聚合酶 I 所移除，這個結果可以作為 site-directed mutagenesis 實驗設計寡核苷酸引子(oligonucleotide primer)時作為參考。



A

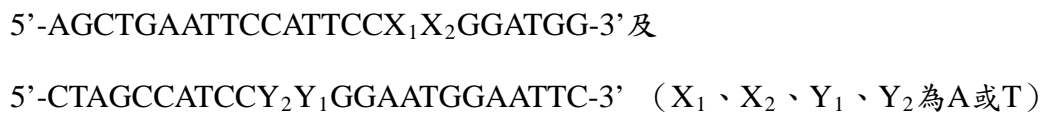


B

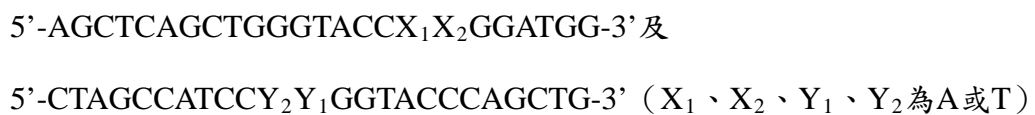


圖一(1): 突變噬菌體 f1PM 之建構。在 f1PM 之 HindIII(5815) 與 XbaI(5839) 切位間，插入設計好之 2 組 24 對人工合成寡核苷酸，分別為：

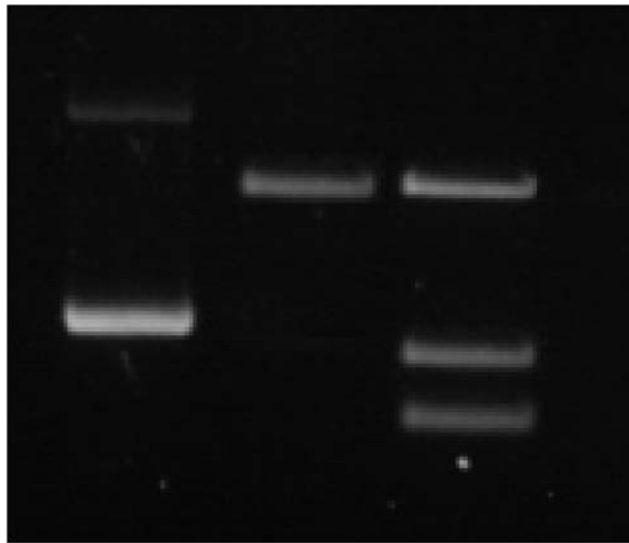
A : f1PM-12 :



B : f1PM-23 :



StyI	-	-	+
AlwNI	-	+	+



- 6.7 kb (linear form)

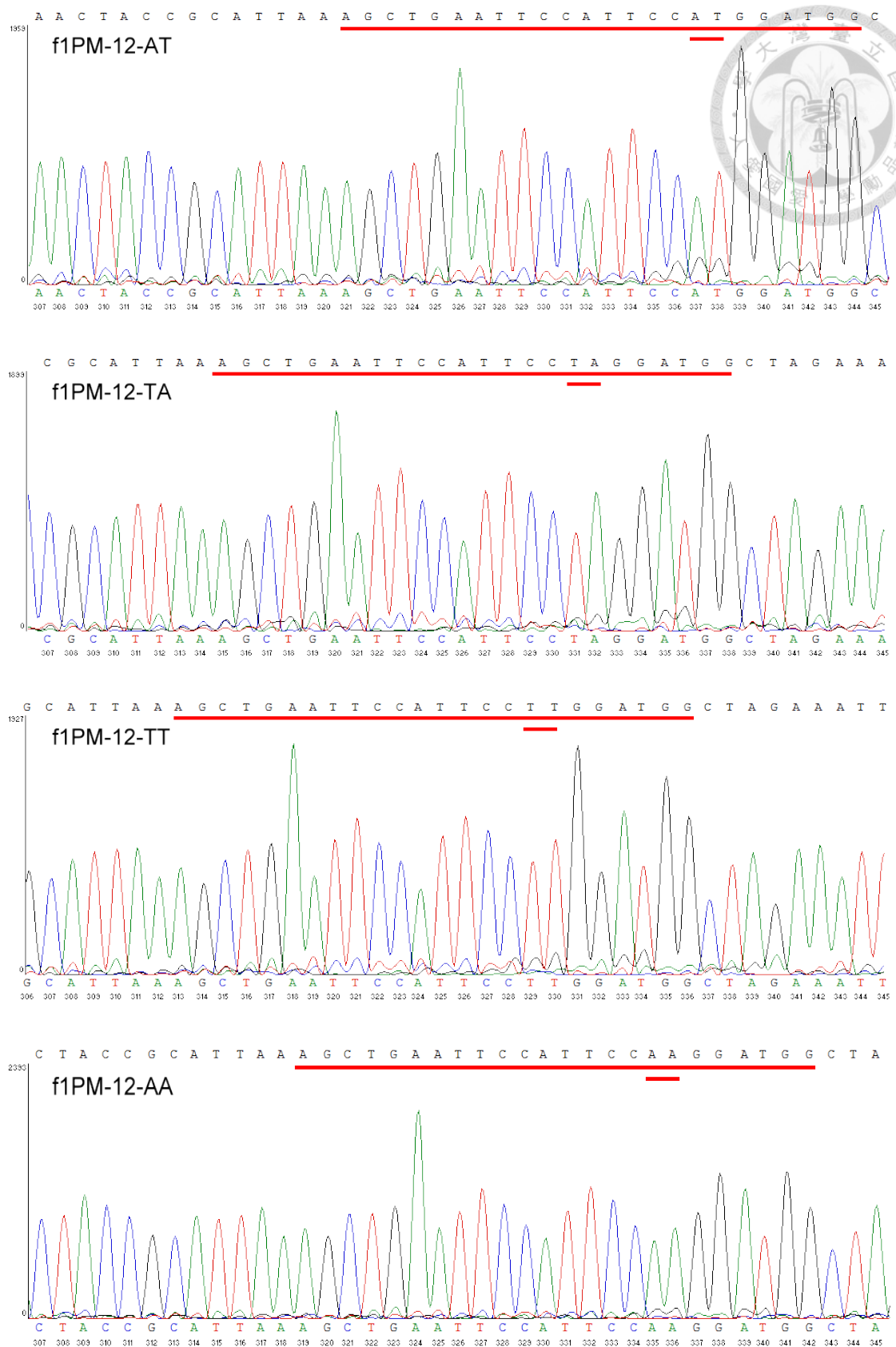
- 6.7 kb (supercoil form)

- 3.7 kb

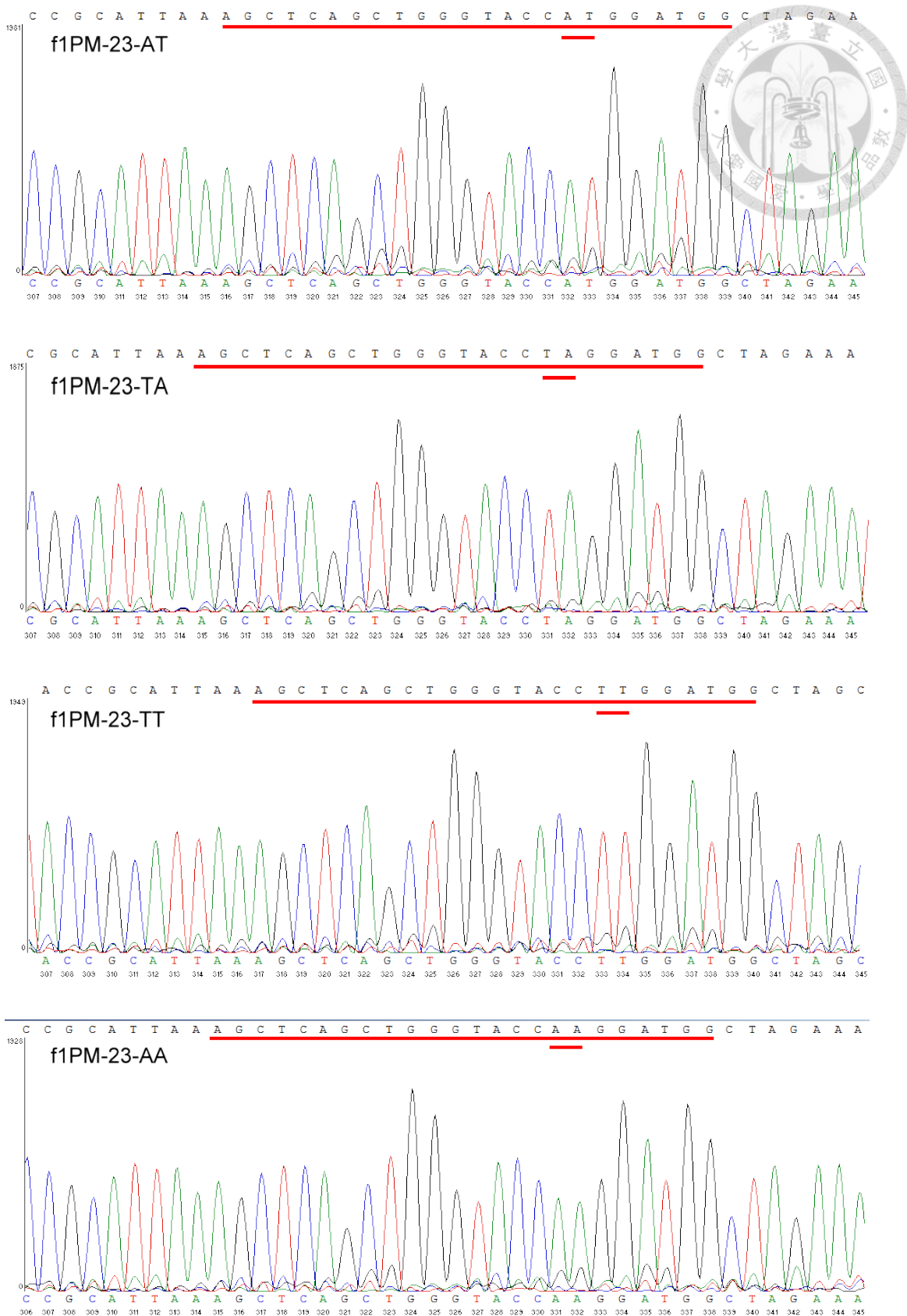
- 3.0 kb

f1PM-12-WW

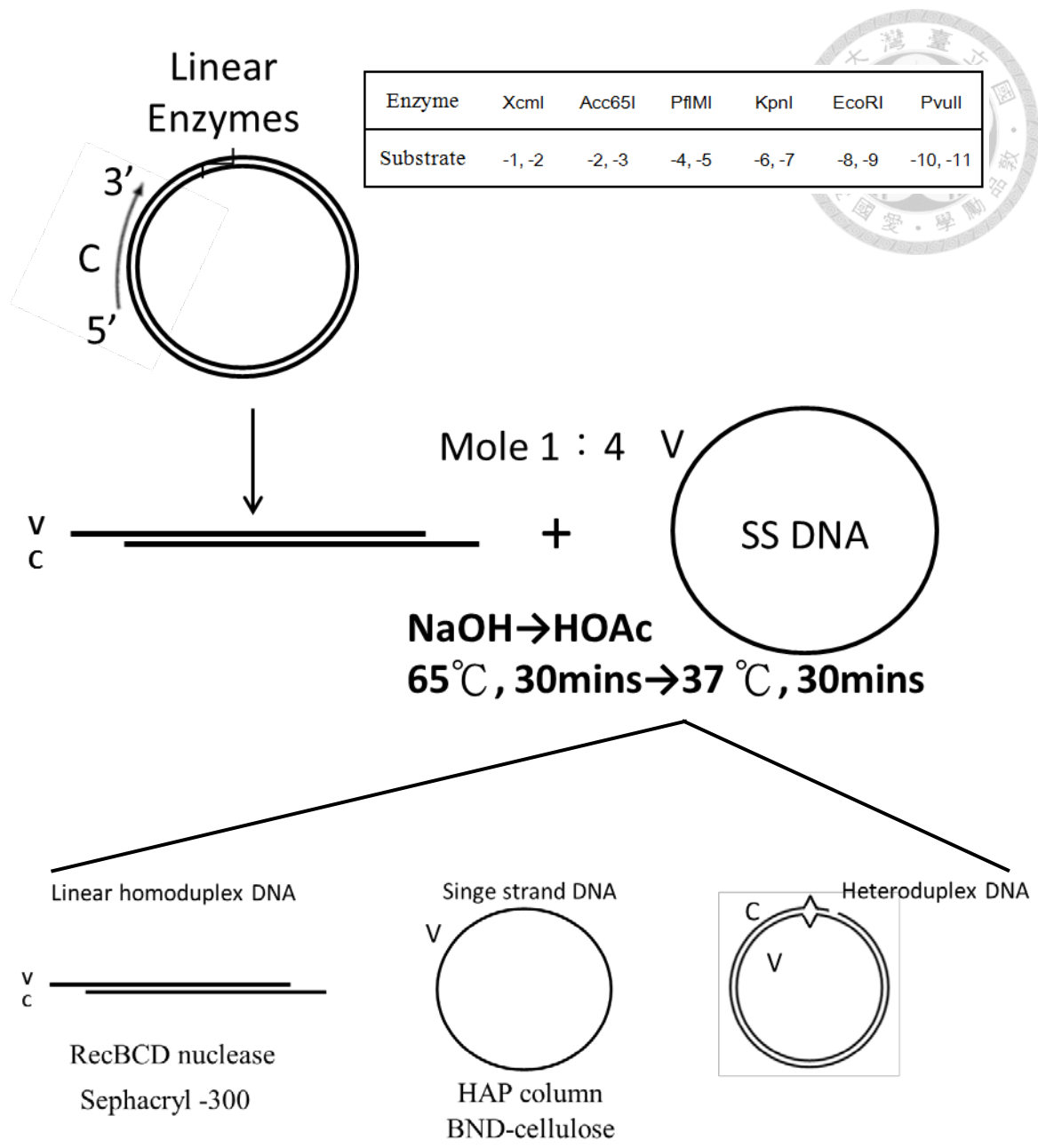
圖一(2): 突變噬菌體 f1PM 之建構。利用人工合成之寡鏈核苷酸序列嵌入 f1PM, 我們可以成功選殖到二種噬菌體變種 f1PM-12 及 f1PM-23, 以限制酶 AlwNI/StyI 雙酶切法做初步的篩選, 若成功插入寡核苷酸則會產生 StyI 限制酶切位。可以成功被水解成 3.7kb 及 3.0kb 兩個不同大小的片段。結果顯示此 f1PM-12 突變噬菌體中已嵌入 AGCTGAATTCCATTCCWWGGATGG (W 為 A 或 T), 必須進一步由桑格定序法確認其序列。



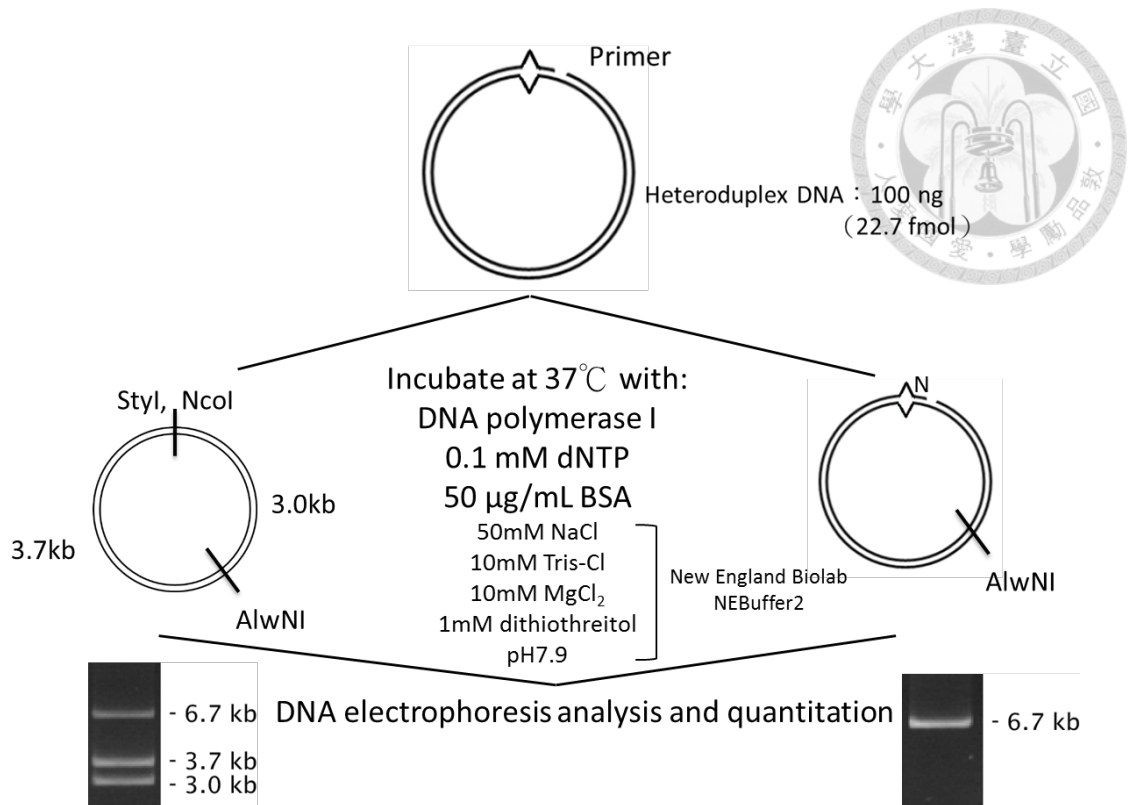
圖一 (3): 突變噬菌體 f1PM 之建構。利用桑格定序法 (Sanger sequencing) 的毛細管電泳結果。底線為插入之人工合成寡核苷酸鏈片段，雙底線為特定鹼基。



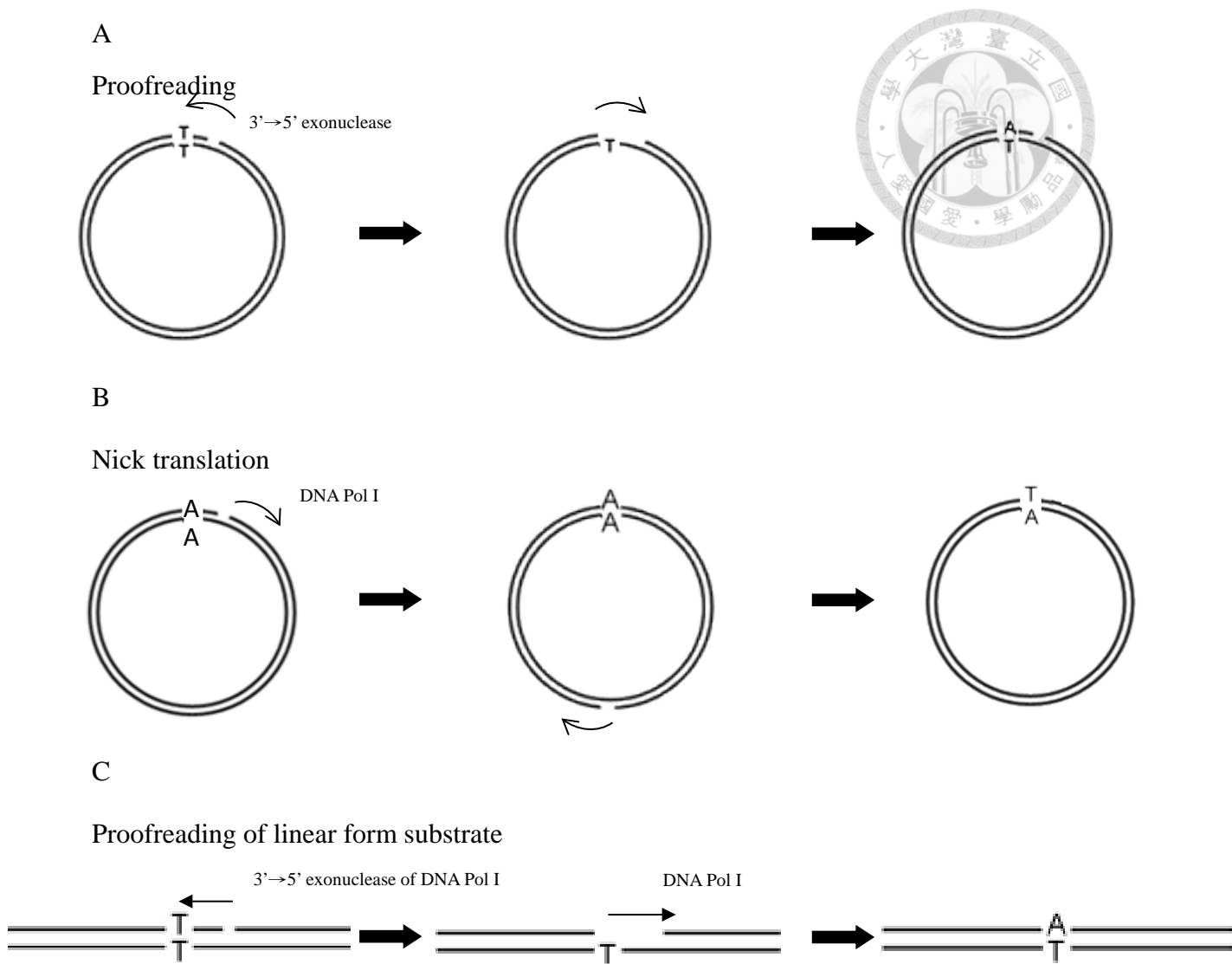
圖一 (4)：突變噬菌體 f1PM 之建構。利用桑格定序法 (Sanger sequencing) 的毛細管電泳結果。底線為插入之人工合成寡核苷酸鏈片段，雙底線為特定鹼基。



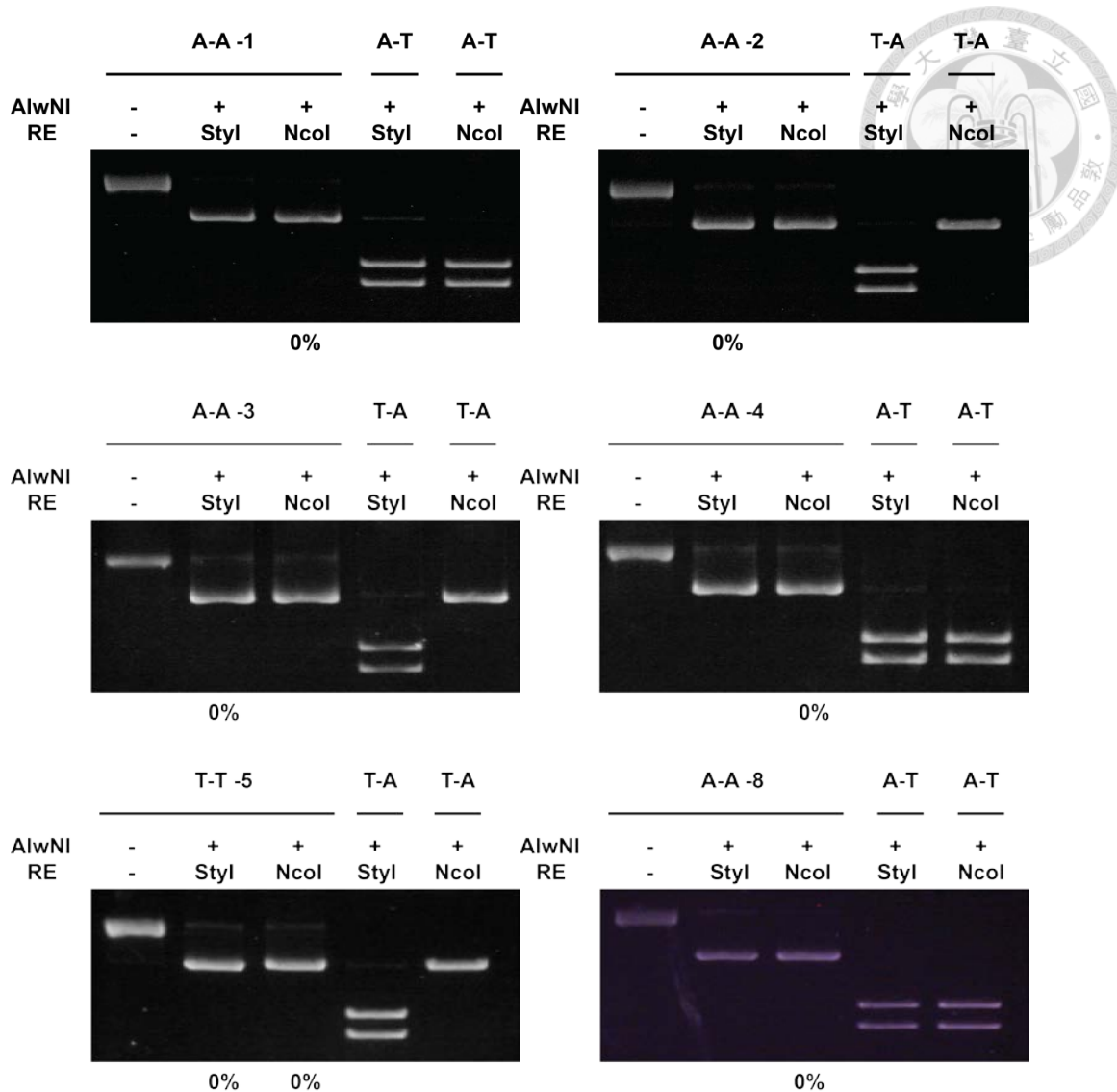
圖二：錯誤配對受質之製備與純化示意圖。利用不同限制酶在 f1PM 複製型雙股核酸的不同序列位置水解，產生 c strand 上不同位置的斷股，最終形成 c strand 斷股上游不同位置錯誤配對受質。



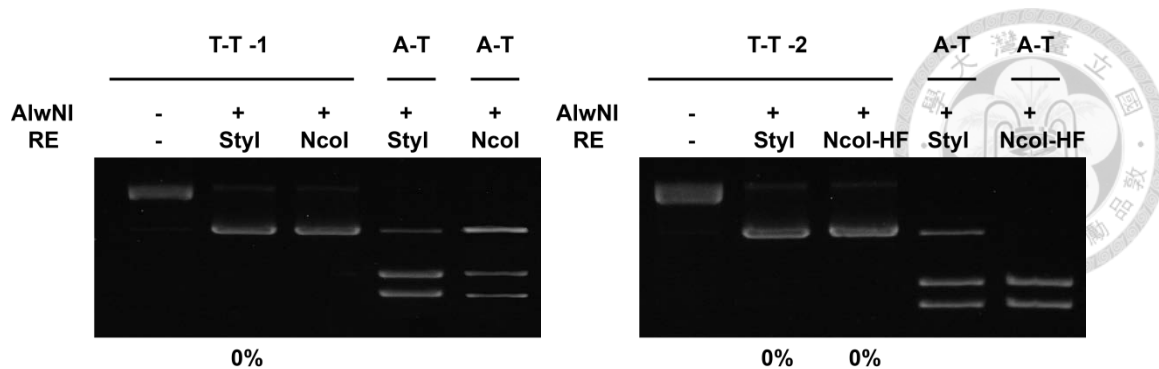
圖三：DNA 聚合酶 I 之校正活性分析。錯誤配對若可被修復，將呈現 NcoI 或 StyI 限制酶切位，搭配 AlwNI 做雙酶切後會有 3.7kb 及 3.0kb 兩個片段產物。若不被修復則只能被 AlwNI 切成線形 DNA。



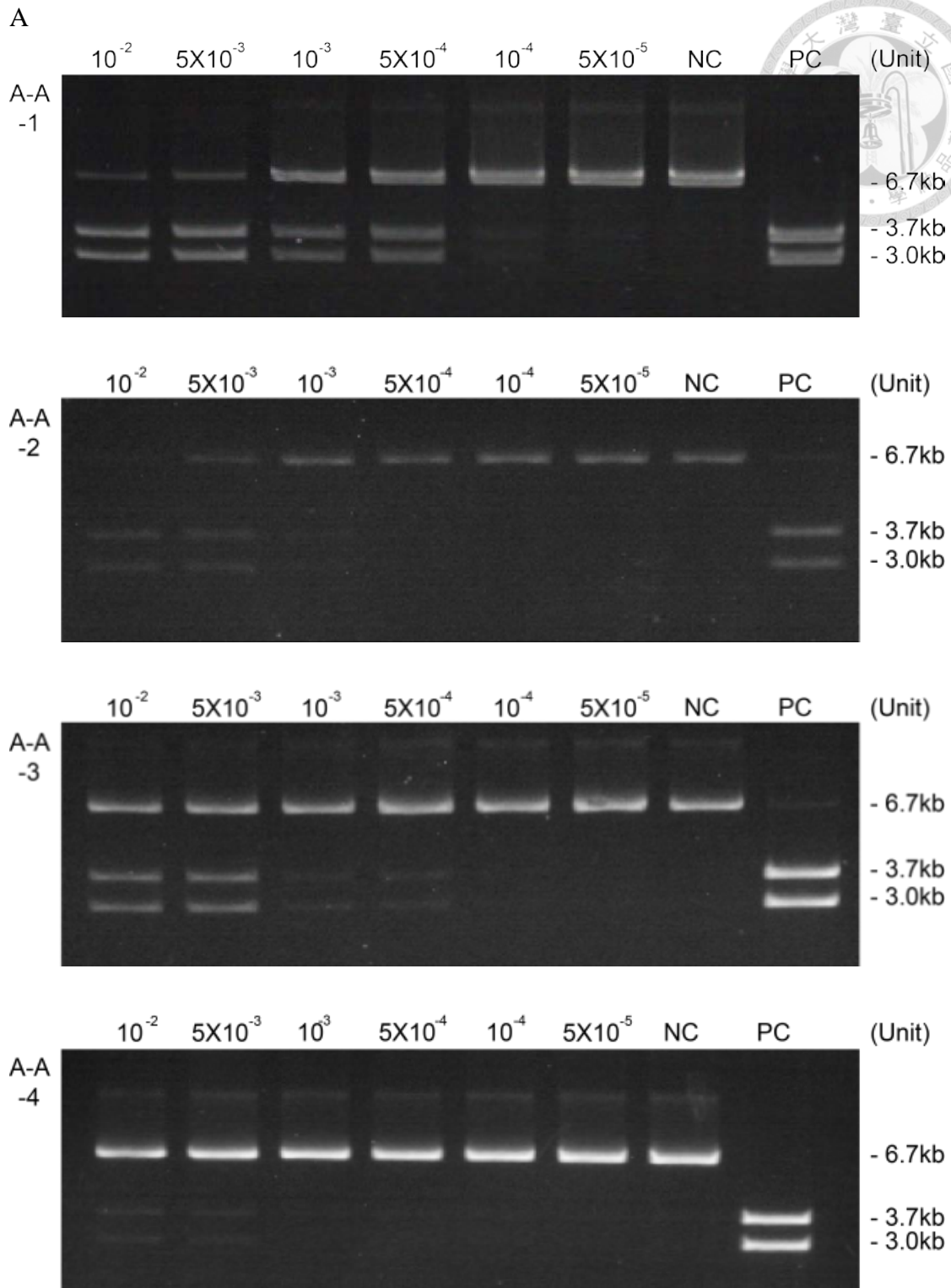
圖四：比較DNA聚合酶I之校正反應與缺口轉譯。A：環狀受質可經由DNA聚合酶I行校正反應，先移除上游錯誤鹼基後，再往下游聚合。B：若DNA聚合酶I行缺口轉譯將含nick的這一股鹼基嵌入對應的正確鹼基後，錯誤配對將消失。C：線形受質可經由DNA聚合酶I行校正反應修復錯誤鹼基，但無法經由缺口轉譯活性修復（箭號代表DNA聚合酶I作用處及作用方向）。



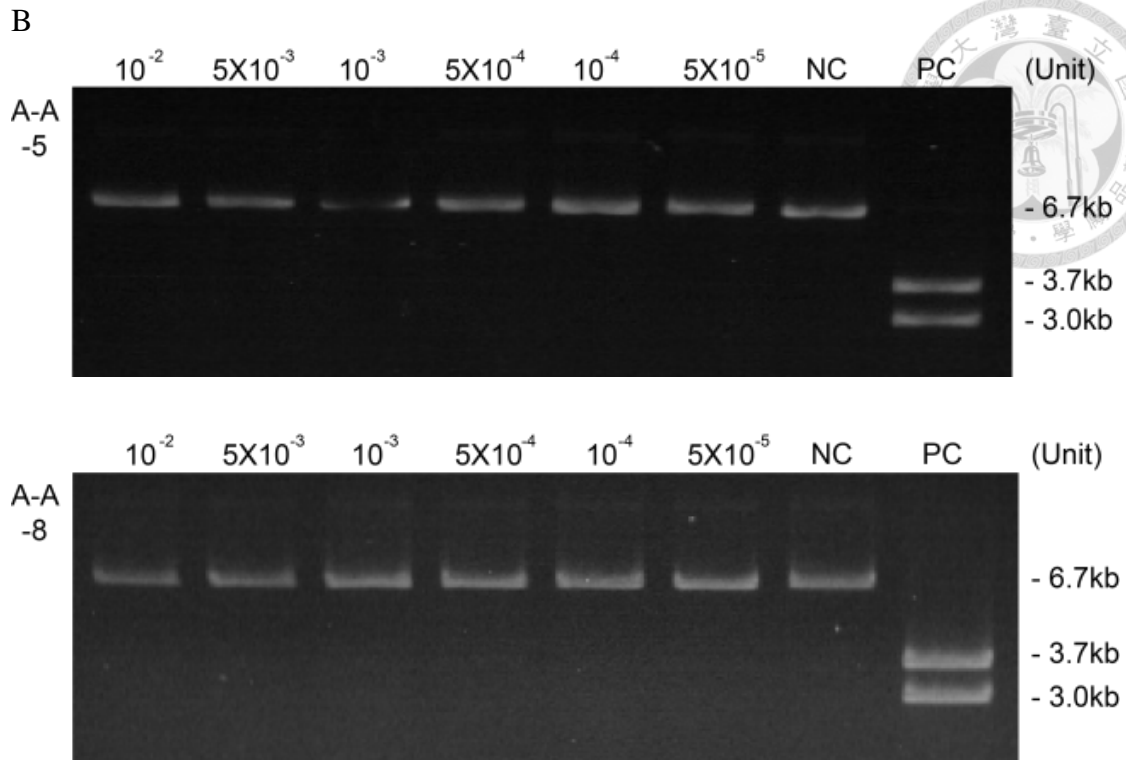
圖五 (1)：AA 種類配對錯誤受質對鑑定用限制酶之敏感性分析。詳細實驗方法如材料與方法八。取配對錯誤受質 100ng (約 22.7fmol) 以及 homoduplex 對照組分別進行雙酶切。膠圖下方百分比顯示鑑定用限制酶之 star activity。將 star activity 作為背景值扣除後，仍可得到足夠的信號進行校正活性的分析。結果顯示，A-A 種類配對錯誤受質皆無 star activity。



圖五 (2)：TT 種類配對錯誤受質對鑑定用限制酶之敏感性分析。詳細實驗方法如材料與方法八。取配對錯誤受質 100ng (約 22.7fmol) 以及 homoduplex 對照組分別進行雙酶切。膠圖下方百分比顯示鑑定用限制酶之 star activity。T-T -2 配對錯誤受質以 NcoI 作為鑑定用限制酶具有 39.3% star activity (未顯示)，而以 NcoI-HF 或 StyI 作為鑑定用限制酶則不具有 star activity。將 star activity 作為背景值扣除後，仍可得到足夠的信號進行校正活性的分析。

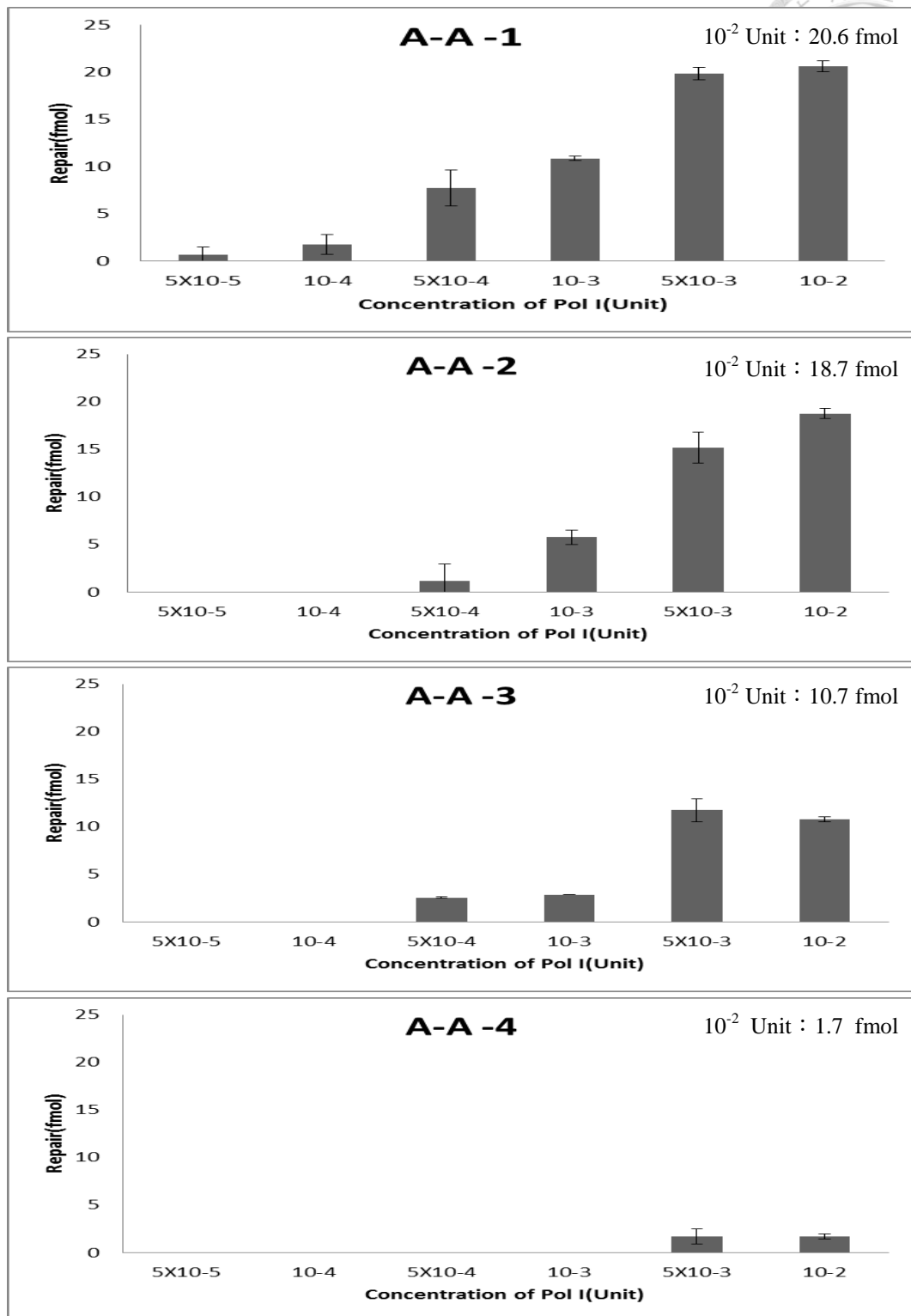


圖六 (1): 不同濃度之 DNA 聚合酶 I 對 A-A 配對錯誤受質之校正活性測定。詳細實驗方法如材料與方法九。A: 分別顯示 A-A-1、A-A-2、A-A-3、A-A-4 四種受質其校正膠圖。結果顯示 DNA 聚合酶 I 對 A-A 種類配對錯誤受質的校正活性由 A-A-1 至 A-A-4 遞減。(NC: 無 DNA 聚合酶 I 反應為 negative control; PC: 正確配對之雙股核酸為 positive control)

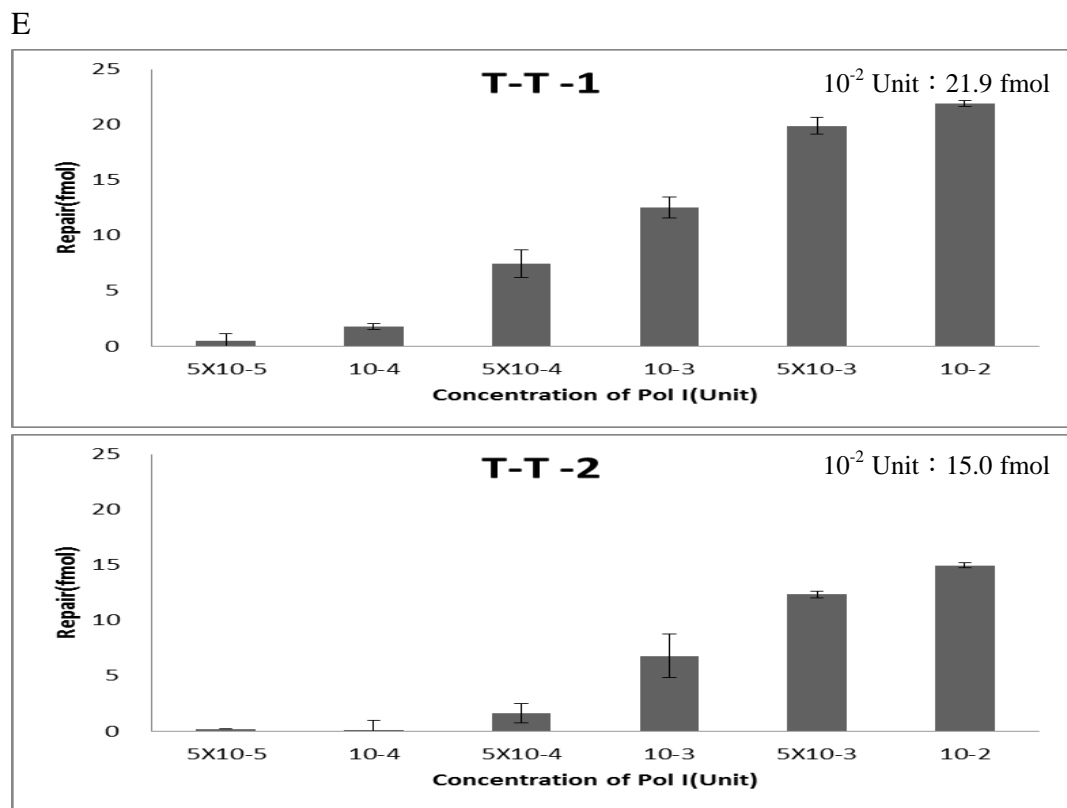
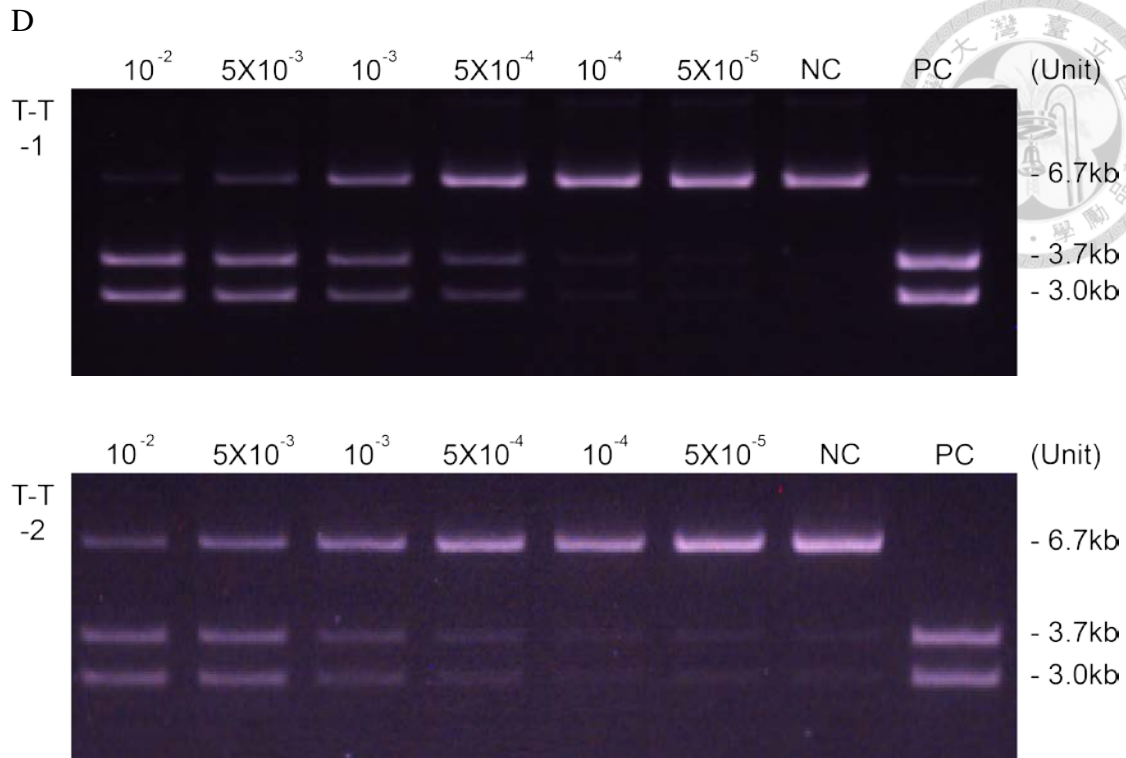


圖六(2): 不同濃度之 DNA 聚合酶 I 對 A-A 配對錯誤受質之校正活性測定。詳細實驗方法如材料與方法九。B: 分別顯示 A-A -5、A-A -8 二種受質其校正膠圖。結果顯示 DNA 聚合酶 I 對 A-A -5 及 A-A -8 配對錯誤受質不具有校正活性。(NC: 無 DNA 聚合酶 I 反應為 negative control; PC: 正確配對之雙股核酸為 positive control)

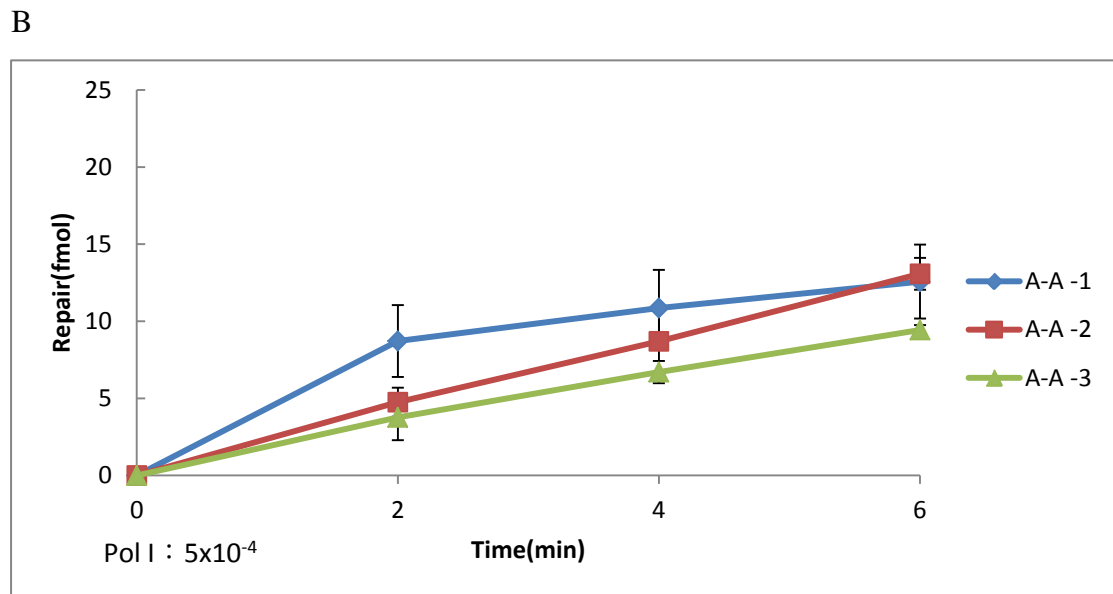
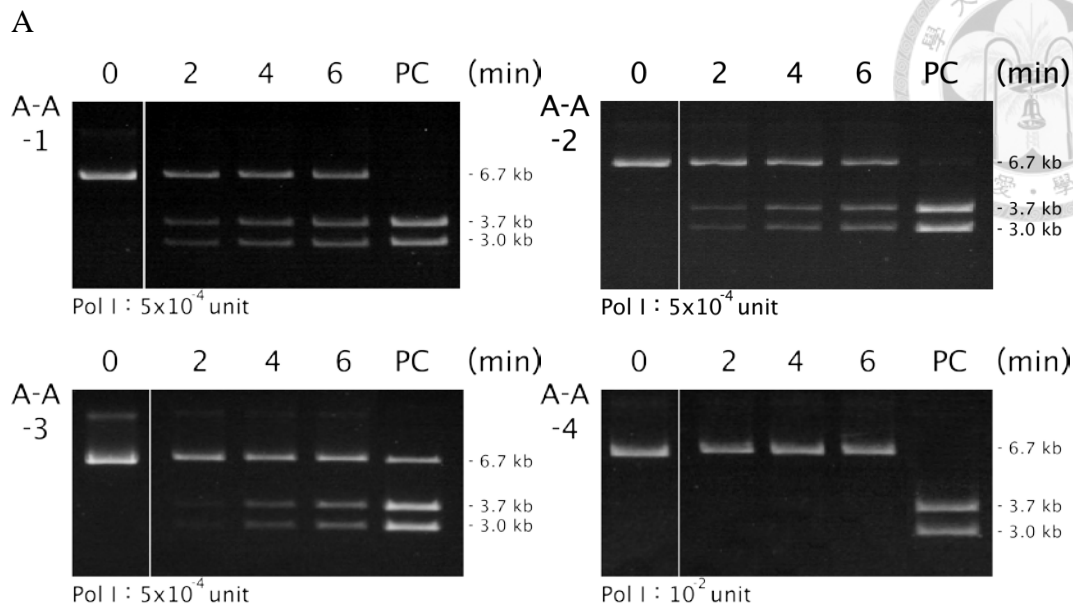
C



圖六 (3): 不同濃度之 DNA 聚合酶 I 對 A-A 配對錯誤受質之校正活性測定。詳細實驗方法如材料與方法九。C: 顯示 A-A-1、A-A-2、A-A-3、A-A-4 四種受質其校正結果量化圖。A-A-5、A-A-8 因無校正活性，故不列出。Error bar 表示經過三次以上反應量化分析並求出 1SD。

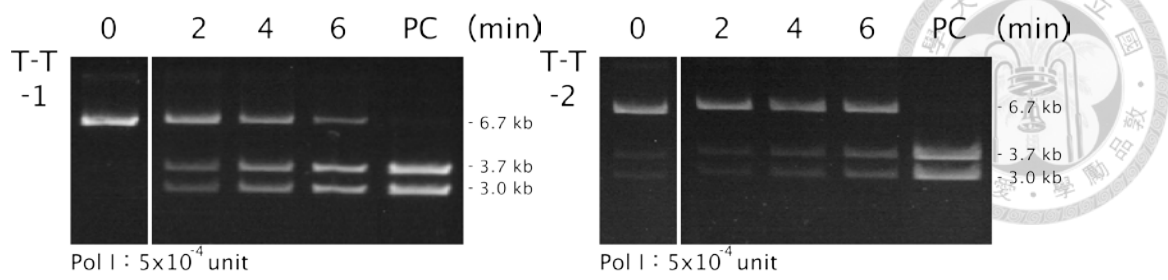


圖六 (4)：不同濃度之 DNA 聚合酶 I 對 T-T 配對錯誤受質之校正活性測定。詳細實驗方法如材料與方法八。D：分別顯示 T-T -1、T-T -2、二種受質校正膠圖及 E：結果量化圖(NC：無 DNA 聚合酶 I 反應為 negative control；PC：正確配對之雙股核酸為 positive control)。Error bar 表示經過三次以上反應量化分析並求出 1SD。

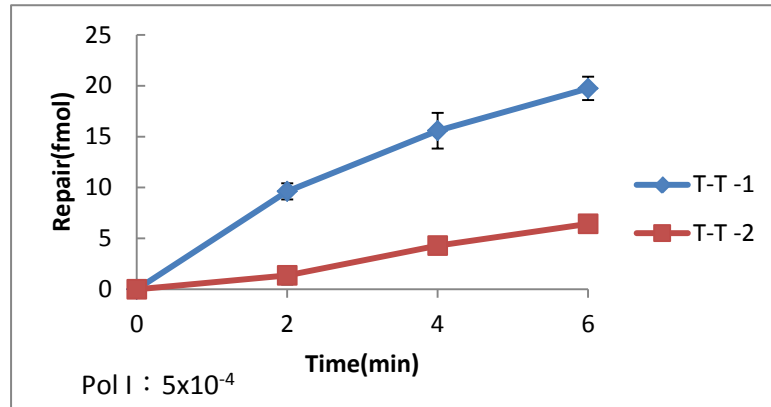


圖七 (1)：DNA 聚合酶 I 於不同位置錯誤配對受質之反應速率分析。詳細實驗方法如材料與方法九。A：分別顯示 A-A-1、A-A-2、A-A-3 及 A-A-4 校正膠圖。組別 0 表示不經過 DNA 聚合酶 I 反應的受質，PC 表示正確配對之雙股核酸作為 positive control。B：校正量化結果，隨著時間延長，受質的修復比例也跟著上升。Error bar 表示經過三次以上反應量化分析並求出 1SD。

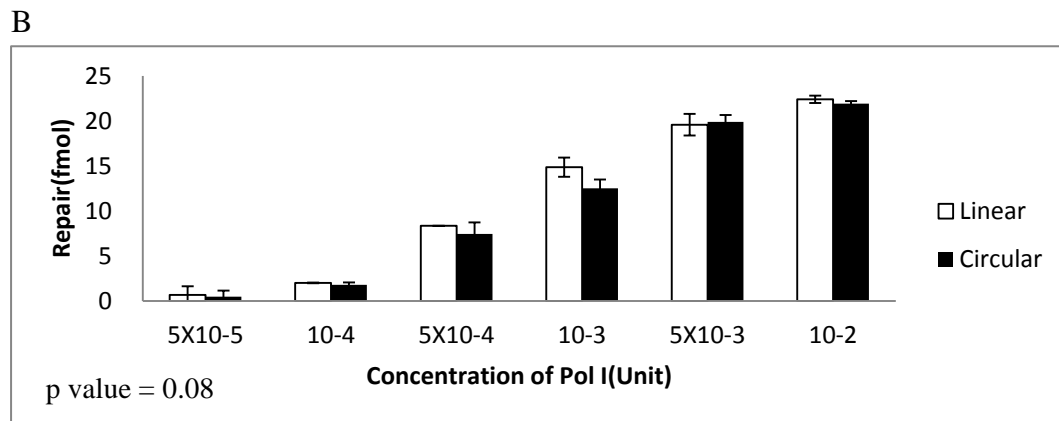
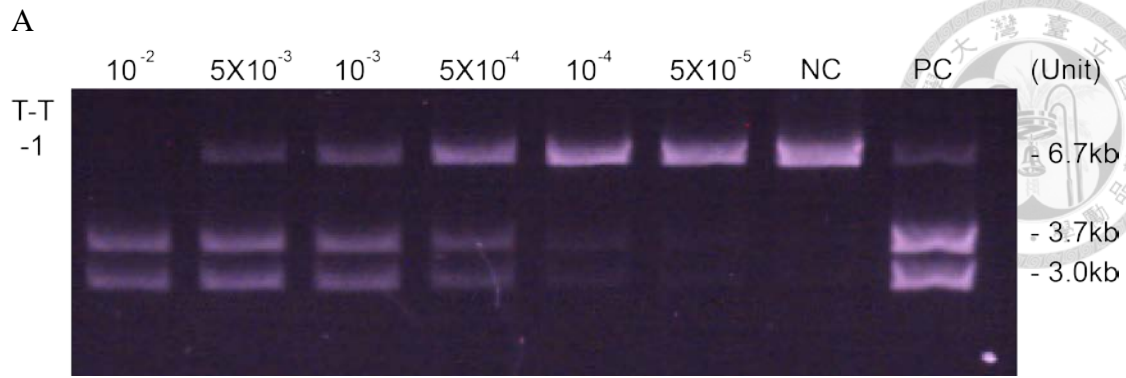
C



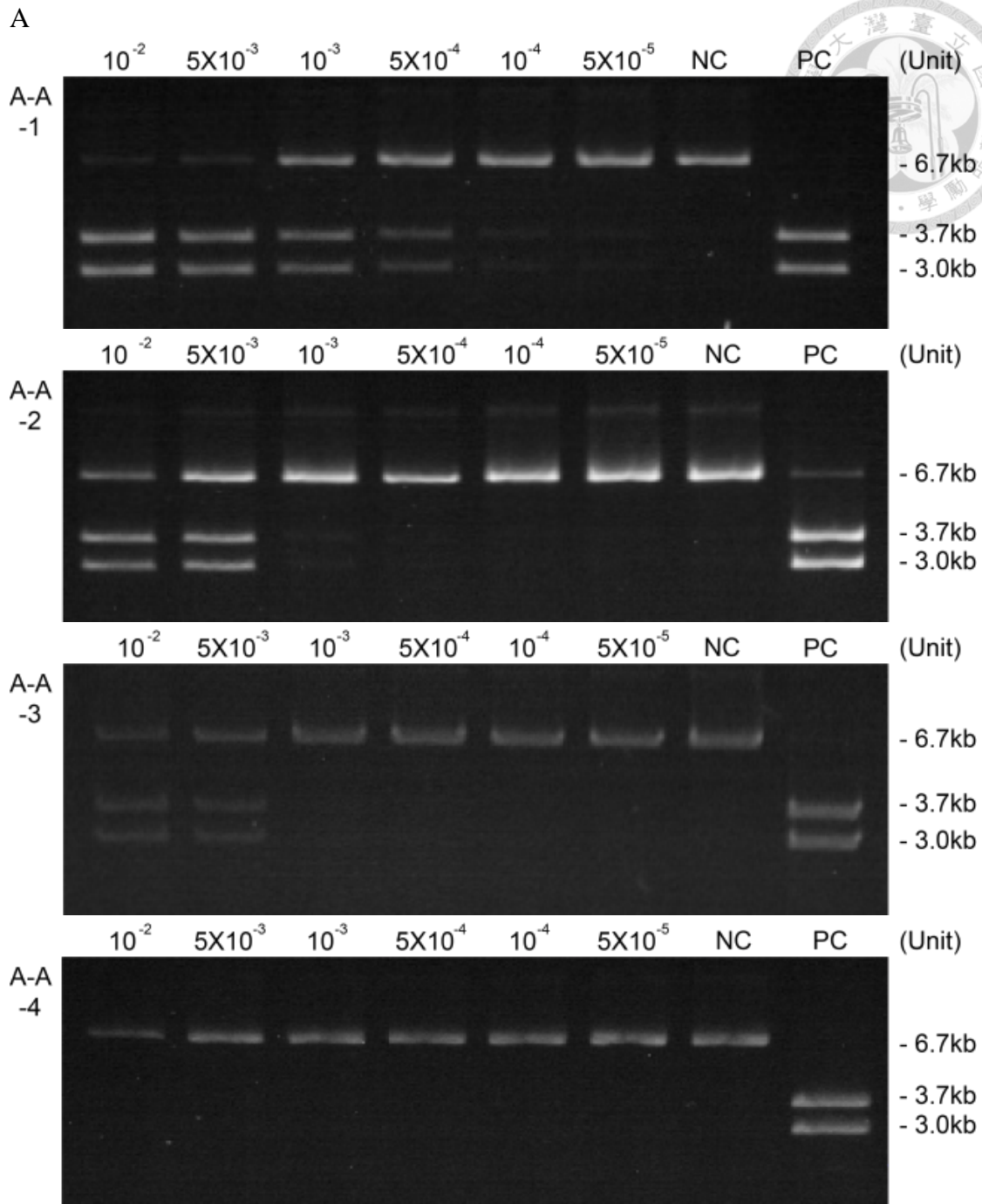
D



圖七 (2): DNA 聚合酶 I 於不同位置錯誤配對受質之反應速率分析。詳細實驗方法如材料與方法九。C: 分別顯示 T-T-1 及 T-T-2 校正膠圖。組別 0 表示不經過 DNA 聚合酶 I 反應的受質, PC 表示正確配對之雙股核酸作為 positive control。B: 校正量化結果, 隨著時間延長, 受質的修復比例也跟著上升。Error bar 表示經過三次以上反應量化分析並求出 1SD。

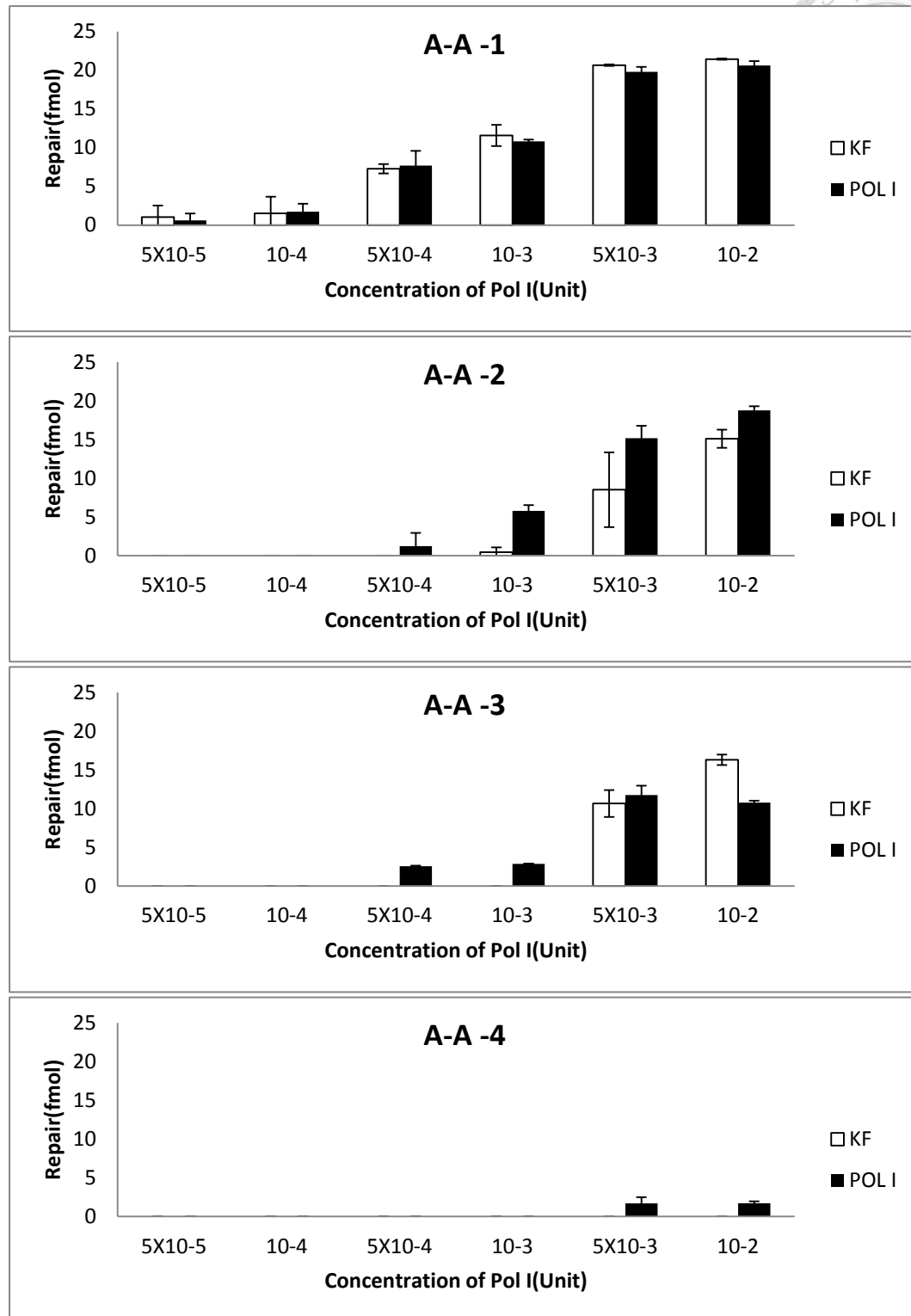


圖八：線形錯誤配對核酸受質 T-T-1 經 DNA 聚合酶 I 作用後之修復情況。A：將環狀異雙股核酸受質 (T-T-1) 以限制酶 AlwNI 水解成線形異雙股核酸受質，和不同濃度的 DNA 聚合酶 I 作用測試其校正活性。發現仍有相似的校正反應。(NC: 無 DNA 聚合酶 I 反應為 negative control; PC: 正確配對之雙股核酸為 positive control)。B：比較 DNA 聚合酶 I 對於環狀異雙股核酸受質及線形異雙股核酸受質校正反應，結果並無太大差異，且以 t test 計算得 p value 大於 0.05，顯示線形線形異雙股核酸受質之測試結果，與同酵素稀釋濃度反應條件下的環狀異雙股核酸受質測試結果比較，皆無顯著差異。

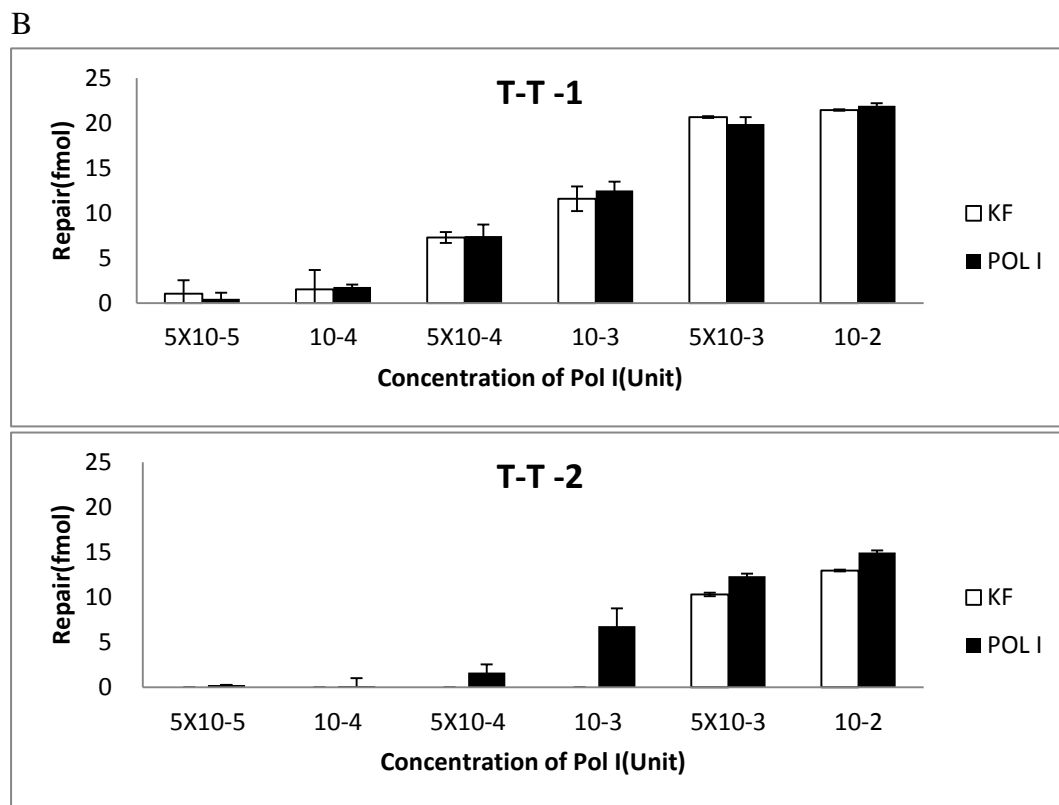
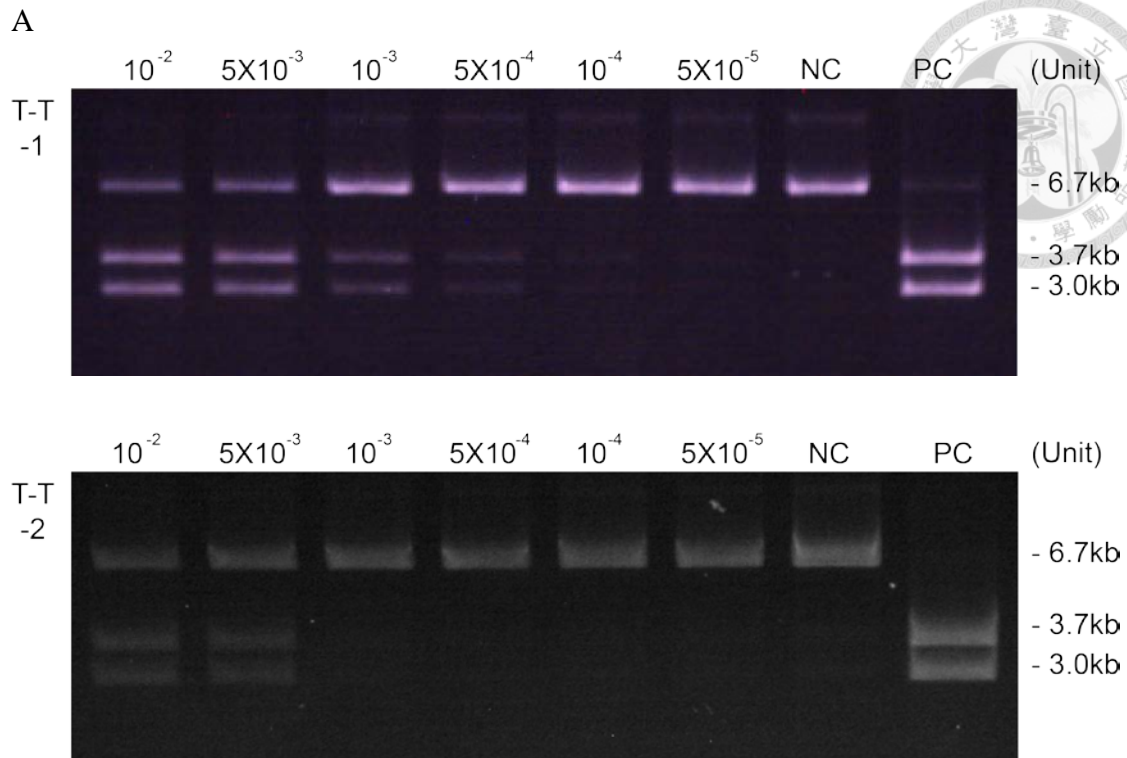


圖九(1): 不同濃度之 Kleonw fragment 對 A-A 配對錯誤受質之校正活性測定。詳細實驗方法如材料與方法九。A: 分別顯示 A-A-1、A-A-2、A-A-3、A-A-4 四種受質其校正膠圖。結果顯示 DNA 聚合酶 I 對 A-A 種類配對錯誤受質的校正活性由 A-A-1 至 A-A-4 遞減。(NC: 無 DNA 聚合酶 I 反應為 negative control; PC: 正確配對之雙股核酸為 positive control)

B

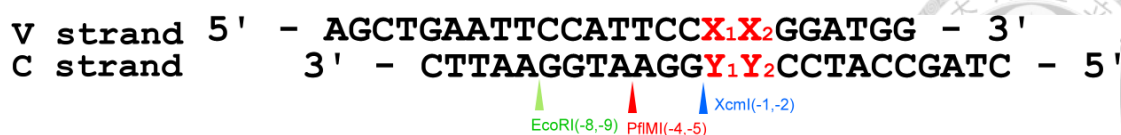


圖九(2): 不同濃度之 Kleonw fragment 對 A-A 配對錯誤受質之校正活性測定。詳細實驗方法如材料與方法九。B: 分別顯示 A-A-1、A-A-2、A-A-3、A-A-4 四種受質其校正活性量化圖。結果顯示 DNA 聚合酶 I 對 A-A 種類配對錯誤受質的校正活性由 A-A-1 至 A-A-4 遞減, A-A-4 無法觀察到校正活性。



圖十：不同濃度之 Klenow fragment 對 T-T 配對錯誤受質之校正活性測定。A：分別顯示及 T-T-1、T-T-2 二種 T-T 配對錯誤受質之校正膠圖。(NC：無 Klenow fragment 反應為 negative control；PC：正確配對之雙股核酸為 positive control) B：量化結果與 DNA 聚合酶之比較圖。

f1PM-12 :



f1PM-23 :



Restriction enzyme	Cut site	Nicking enzyme	V strand X ₁ X ₂	C strand Y ₁ Y ₂	Named
NcoI	5'...C [▽] CATGG...3' 3'...GGTACC [▲] ...5'	XcmI	AT	AA	A-A-1
StyI	5'...C [▽] CWWGG...3' 3'...GGWWC [▲] C...5'	XcmI	TA	AA	A-A-2
StyI	5'...C [▽] CWWGG...3' 3'...GGWWC [▲] C...5'	Acc65I	TA	AA	A-A-3
NcoI	5'...C [▽] CATGG...3' 3'...GGTACC [▲] ...5'	PflMI	AT	AA	A-A-4
StyI	5'...C [▽] CWWGG...3' 3'...GGWWC [▲] C...5'	PflMI	TA	AA	A-A-5
NcoI	5'...C [▽] CATGG...3' 3'...GGTACC [▲] ...5'	EcoRI	AT	AA	A-A-8
NcoI	5'...C [▽] CATGG...3' 3'...GGTACC [▲] ...5'	PvuII	AT	AA	A-A-10
StyI	5'...C [▽] CWWGG...3' 3'...GGWWC [▲] C...5'	XcmI	TA	TT	T-T-1
NcoI	5'...C [▽] CATGG...3' 3'...GGTACC [▲] ...5'	XcmI	AT	TT	T-T-2

表一：24 個鹼基對之人工合成寡鏈核苷酸建構。

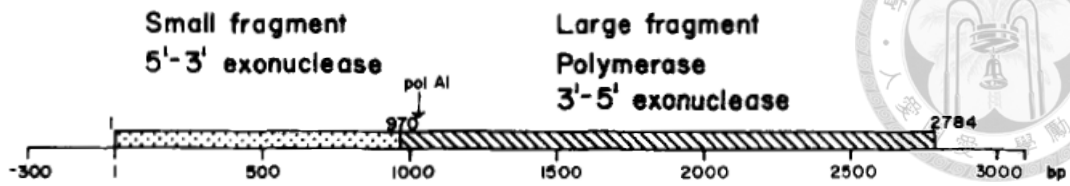
利用兩組不同的人工合成寡鏈核苷酸插入 f1PM 中，其中帶有多個不同位置的限制酶切位，可供我們在錯誤配對鹼基下游不同位置形成斷股。使用統一的鑑定序列 StyI 或 NcoI，表列出詳細之辨認序列、切位及命名方式。



Mismatches	v_0 (nm · s ⁻¹)
A-A mismatches	
A-A-1	0.109
A-A-2	0.060
A-A-3	0.047
A-A-4	--
T-T mismatches	
T-T-1	0.121
T-T-2	0.017

表二：DNA 聚合酶 I 對不同位置配對錯誤受質之反應速率分析

A



B

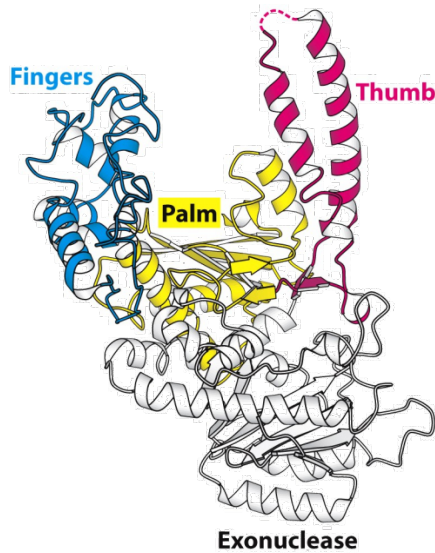
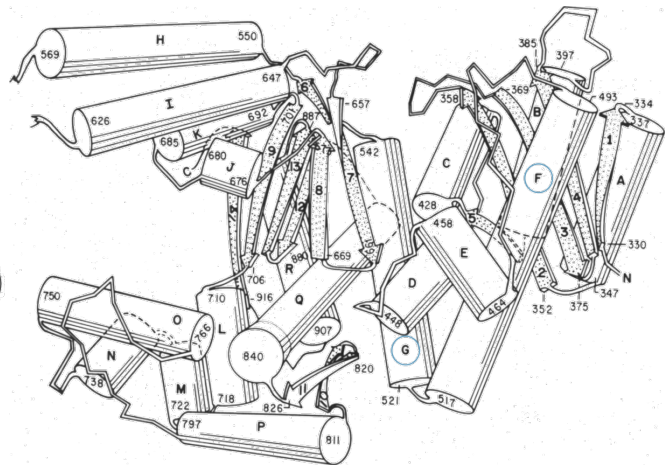


Figure 28.3
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

C



附錄一：DNA 聚合酶 I 之結構及示意圖

A：DNA 聚合酶 I 序列（共 2784 對鹼基），由圖所示，分為靠近 N 端之小片段，負責 5' 端往 3' 端外切酶活性；以及靠近 C 端之大片段，執行 5' 端往 3' 端聚合酶活性及 3' 端往 5' 端外切酶活性(Joyce, Kelley et al. 1982)。

B：Klenow fragment 中較大 domain 含有聚合酶活化位，形狀為半開放右手形。較小 Domain 具有 3' 端往 5' 端外切酶活化位，可以執行校正反應，提高複製忠誠度(Jeremy M. Berg 2012)。

C：立體結構示意圖，手掌位置由 β -sheet 及 α -helix 形成大的裂縫供雙股 DNA 結合，兩個活化位由 F 和 G helix 區隔(Ollis, Brick et al. 1985; Steitz et al. 1987)

圖片參考資料來源：

圖 A：

Joyce, C. M., et al. (1982). *J Biol Chem* **257**(4): 1958-1964.

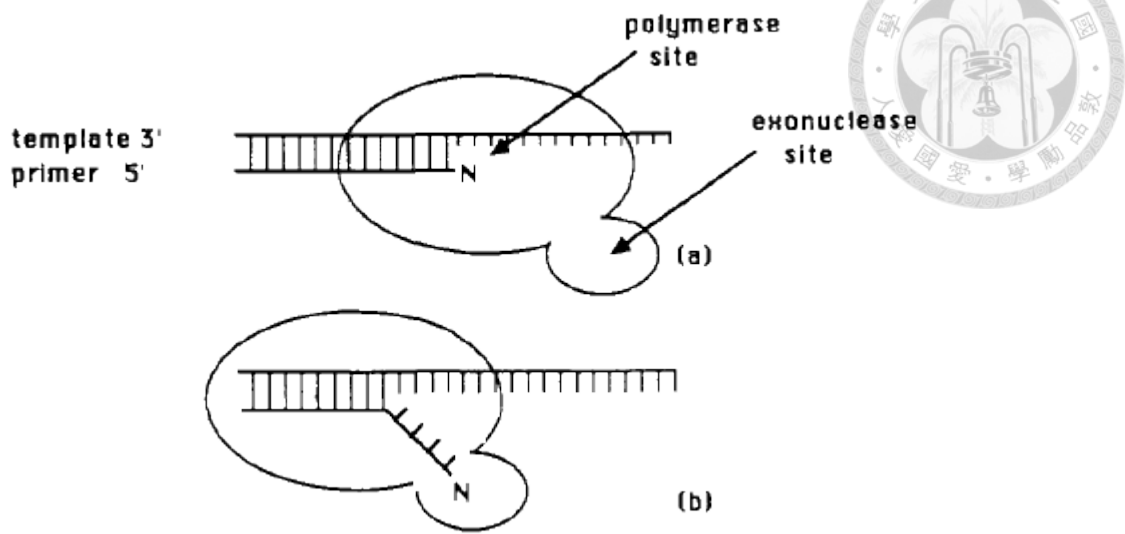
圖 B：

Jeremy M. Berg, J. L. T., and Lubert Stryer (2012). *Biochemistry, Seventh Edition.*

圖 C：

Kenneth A. Johnson (1993). *Annu Rev Biochem* **62**: 185-173.

A



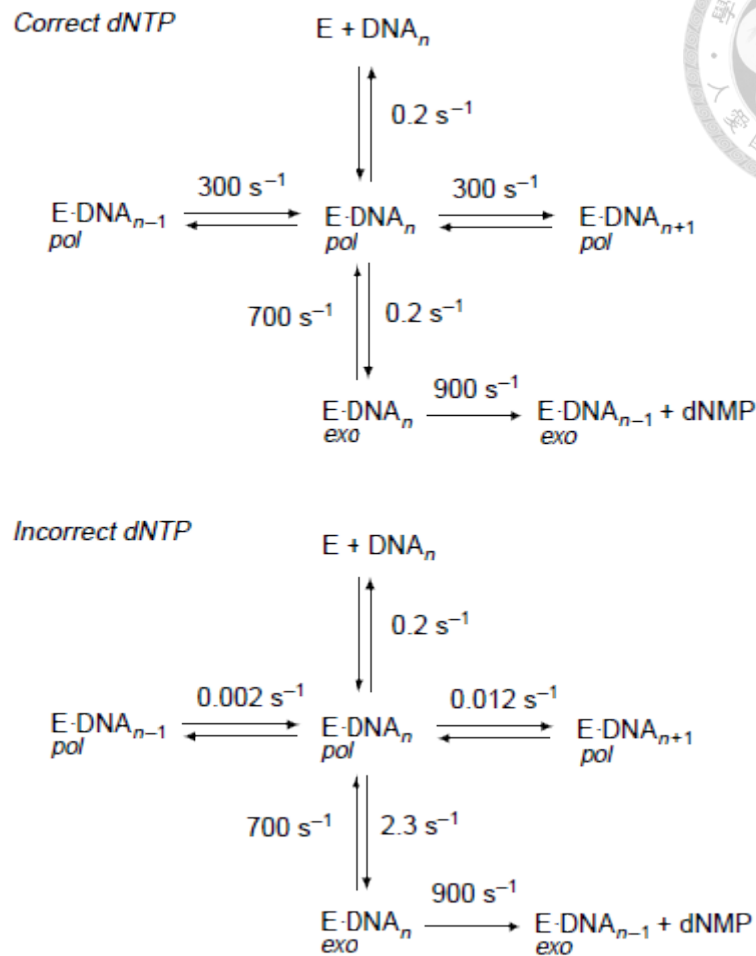
附錄二：引子末端錯誤鹼基引發的四個核苷酸溶解

A：研究指出，當引子末端有錯誤鹼基時，DNA 聚合酶 I 會以 3'端往 5'端外切酶活性，將末端鹼基切除(Brutlag and Kornberg 1972)。由於錯誤的鹼基會形成不正常的鍵結，造成引子末端四至五個核苷酸溶解(Cowart, Gibson et al. 1989)。溶解的單股 DNA 可進入 3'端往 5'端外切酶活化位，進行切除反應。

圖片參考資料來源：

Cowart, M., et al. (1989). *Biochemistry* **28**(5): 1975-1983.

A



附錄三：T7 聚合酶之酶素動力學分析

T7 聚合酶對於正確配對的DNA進行聚合反應的速率常數為 300s^{-1} (Patel, Wong et al. 1991)，由聚合酶活化位轉移至外切酶活化位以及聚合酶與DNA解離的速率只有 0.2 s^{-1} (Donlin, Patel et al. 1991) 此時聚合酶傾向於繼續合成DNA。

當錯誤配對DNA與DNA聚合酶結合後，進行聚合反應的速率常數只有 0.012 s^{-1} (Wong, Patel et al. 1991)。解離的速率 0.2 s^{-1} ，由聚合酶活化位轉移至外切酶活化位的速率上升至 2.3 s^{-1} 。綜合上述數據，可以總結為錯誤配對的DNA不會直接從聚合酶解離，而是轉移至外切酶活化位。外切酶移除錯誤鹼基，校正完畢後轉移回聚合酶活化位的速率非常快，分別為 700 s^{-1} 與 900 s^{-1} (Donlin, Patel et al. 1991; Kunkel et al. 2000)。

圖片參考資料來源：

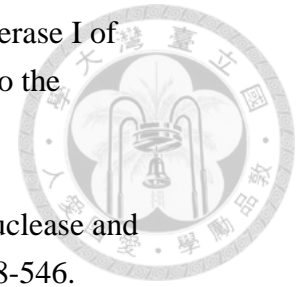
Kenneth, A., et al. (2004). Encyclopedia of Biological Chemistry, Volume 1.

參考文獻



- Astatke, M., et al. (1998). "How E. coli DNA polymerase I (Klenow fragment) distinguishes between deoxy- and dideoxynucleotides." J Mol Biol **278**(1): 147-165.
- Bailey, M. F., et al. (2004). "Thermodynamic dissection of the polymerizing and editing modes of a DNA polymerase." J Mol Biol **336**(3): 673-693.
- Bailey, M. F., et al. (2007). "Dimerization of the Klenow fragment of Escherichia coli DNA polymerase I is linked to its mode of DNA binding." Biochemistry **46**(27): 8085-8099.
- Beese, L. S., et al. (1993). "Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA." Science **260**(5106): 352-355.
- Bell, J. B., et al. (1997). "Base miscoding and strand misalignment errors by mutator Klenow polymerases with amino acid substitutions at tyrosine 766 in the O helix of the fingers subdomain." J Biol Chem **272**(11): 7345-7351.
- Bell, S. P., et al. (2002). "DNA replication in eukaryotic cells." Annu Rev Biochem **71**: 333-374.
- Brautigam, C. A., et al. (1999). "Structures of normal single-stranded DNA and deoxyribo-3'-S-phosphorothiolates bound to the 3'-5' exonucleolytic active site of DNA polymerase I from Escherichia coli." Biochemistry **38**(2): 696-704.
- Brutlag, D., et al. (1972). "Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. 36. A proofreading function for the 3' leads to 5' exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases." J Biol Chem **247**(1): 241-248.
- Catherine, M. J., et al. (1987). "DNA polymerase I: from crystal structure to function via genetics." Trends in Biochemical Sciences **12**: 288-292.
- Cowart, M., et al. (1989). "DNA substrate structural requirements for the exonuclease and polymerase activities of procaryotic and phage DNA polymerases." Biochemistry **28**(5): 1975-1983.

Derbyshire, V., et al. (1991). "The 3'-5' exonuclease of DNA polymerase I of *Escherichia coli*: contribution of each amino acid at the active site to the reaction." EMBO J **10**(1): 17-24.



Donlin, M. J., et al. (1991). "Kinetic partitioning between the exonuclease and polymerase sites in DNA error correction." Biochemistry **30**(2): 538-546.

Doublet, S., et al. (1998). "Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution." Nature **391**(6664): 251-258.

Fang, W., et al. (1997). "Methyl-directed repair of mismatched small heterologous sequences in cell extracts from *Escherichia coli*." J Biol Chem **272**(36): 22714-22720.

Fidalgo da Silva, E., et al. (2007). "DNA polymerase proofreading: active site switching catalyzed by the bacteriophage T4 DNA polymerase." Nucleic Acids Res **35**(16): 5452-5463.

Freemont, P. S., et al. (1988). "Cocrystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 8924-8928.

Freemont, P. S., et al. (1986). "A domain of the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I has polymerase but no exonuclease activity." Proteins **1**(1): 66-73.

Friedberg, E. C., G.C. Walker, and W. Siede (1995). DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C, ASM Press

Garg, A., et al. (2004). "Juvenile pilocytic astrocytoma presenting with subarachnoid hemorrhage. Case report and review of the literature." J Neurosurg **100**(5 Suppl Pediatrics): 525-529.

Goldsby, R. E., et al. (2002). "High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase delta proofreading." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15560-15565.

Jeremy M. Berg, J. L. T., and Lubert Stryer (2012). Biochemistry.

Joyce, C. M., et al. (1982). "Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* polA gene and primary structure of DNA polymerase I." J Biol Chem **257**(4): 1958-1964.



Joyce, C. M., et al. (1994). "Function and structure relationships in DNA polymerases." Annu Rev Biochem **63**: 777-822.

Kaguni, L. S. (2004). "DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase." Annu Rev Biochem **73**: 293-320.

Klenow, H., et al. (1970). "Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from Escherichia coli B by limited proteolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **65**(1): 168-175.

Kramer, W., et al. (1984). "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction." Nucleic Acids Res **12**(24): 9441-9456.

Kukreti, P., et al. (2008). "Identification of a new motif required for the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase I (Klenow fragment): the RRRY motif is necessary for the binding of single-stranded DNA substrate and the template strand of the mismatched duplex." J Biol Chem **283**(26): 17979-17990.

Kunkel, T. A., et al. (2000). "DNA replication fidelity." Annu Rev Biochem **69**: 497-529.

Lee, C. C., et al. (2010). "Endonuclease V-mediated deoxyinosine excision repair in vitro." DNA Repair (Amst) **9**(10): 1073-1079.

Lehman, I. R., et al. (1958). "Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from Escherichia coli." J Biol Chem **233**(1): 163-170.

Lehman, I. R., et al. (1973). "Persistence of deoxyribonucleic acid polymerase I and its 5'--3' exonuclease activity in PolA mutants of Escherichia coli K12." J Biol Chem **248**(22): 7717-7723.

Li, Y., et al. (1998). "Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of Thermus aquaticus DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation." EMBO J **17**(24): 7514-7525.

Matsumoto, Y., et al. (1995). "Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair." Science **269**(5224): 699-702.

Morales, J. C., et al. (2000). "Importance of terminal base pair hydrogen-bonding in 3'-end proofreading by the Klenow fragment of DNA polymerase I." Biochemistry **39**(10): 2626-2632.

Mullen, G. P., et al. (1989). "Substrate and DNA binding to a 50-residue peptide fragment of DNA polymerase I. Comparison with the enzyme." J Biol Chem **264**(33): 19637-19647.

Napolitano, R., et al. (2000). "All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis." EMBO J **19**(22): 6259-6265.

Nusslein, V., et al. (1971). "Function of DNA polymerase 3 in DNA replication." Nat New Biol **234**(52): 285-286.

Ollis, D. L., et al. (1985). "Structure of large fragment of Escherichia coli DNA polymerase I complexed with dTMP." Nature **313**(6005): 762-766.

Patel, P. H., et al. (2001). "Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and "base flipping" mechanism for nucleotide selection." J Mol Biol **308**(5): 823-837.

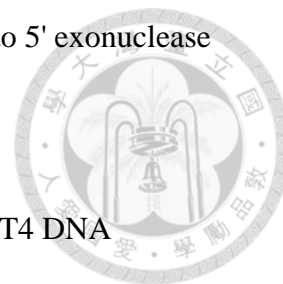
Patel, S. S., et al. (1991). "Pre-steady-state kinetic analysis of processive DNA replication including complete characterization of an exonuclease-deficient mutant." Biochemistry **30**(2): 511-525.

Polesky, A. H., et al. (1992). "Side chains involved in catalysis of the polymerase reaction of DNA polymerase I from Escherichia coli." J Biol Chem **267**(12): 8417-8428.

Polesky, A. H., et al. (1990). "Identification of residues critical for the polymerase activity of the Klenow fragment of DNA polymerase I from Escherichia coli." J Biol Chem **265**(24): 14579-14591.

Pursell, Z. F., et al. (2007). "Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication." Science **317**(5834): 127-130.

Que, B. G., et al. (1978). "Mechanisms of selective inhibition of 3' to 5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase I by nucleoside 5'-monophosphates." Biochemistry **17**(9): 1603-1606.



Reddy, M. K., et al. (1992). "Processive proofreading is intrinsic to T4 DNA polymerase." J Biol Chem **267**(20): 14157-14166.

Reddy, M. K., et al. (1992). "Processive proofreading is intrinsic to T4 DNA polymerase." Journal of Biological Chemistry **267**(20): 14157-14166.

Schaaper, R. M. (1993). "Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in Escherichia coli." J Biol Chem **268**(32): 23762-23765.

Seeman, N. C., et al. (1976). "Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(3): 804-808.

Simon, M., et al. (1991). "The 3' to 5' exonuclease activity located in the DNA polymerase delta subunit of Saccharomyces cerevisiae is required for accurate replication." EMBO J **10**(8): 2165-2170.

Steitz, T. A. (1998). "A mechanism for all polymerases." Nature **391**(6664): 231-232.

Steitz, T. A., et al. (1987). "Structural studies of Klenow fragment: an enzyme with two active sites." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **52**: 465-471.

Thompson, E. H., et al. (2002). "Determinants of DNA mismatch recognition within the polymerase domain of the Klenow fragment." Biochemistry **41**(3): 713-722.

Tom Brown, O. K. (1992). "Structural basis of DNA mutagenesis " Current Opinion in Structural Biology **2**(3): 354-360.

Tuske, S., et al. (2000). "The J-helix of Escherichia coli DNA polymerase I (Klenow fragment) regulates polymerase and 3'- 5'-exonuclease functions." J Biol Chem **275**(31): 23759-23768.

Wong, I., et al. (1991). "An induced-fit kinetic mechanism for DNA replication fidelity: direct measurement by single-turnover kinetics." Biochemistry **30**(2): 526-537.

Woodgate, R. (1999). "A plethora of lesion-replicating DNA polymerases." Genes Dev **13**(17): 2191-2195.

Xie, P. (2009). "A possible mechanism for the dynamics of transition between polymerase and exonuclease sites in a high-fidelity DNA polymerase." J Theor Biol **259**(3): 434-439.

Yu-Jane Sheng, H.-J. L., Jeff Z. Y. Chen, Heng-Kwong Tsao (2004). "Static Properties of a Stacking Chain." Macromolecules **37**: 9631-9638.

林千如 (2012). "DNA聚合酶I於引子末端倒數第二個配對錯誤鹼基校正活性之全面分析." 國立臺灣大學 101 學年碩士論文.

陳怡安 (2011). "核酸聚合酶I對於模板與引子交會處帶有異雙股的核酸受質之校正活性分析." 國立臺灣大學 100 學年碩士論文.