



國立臺灣大學醫學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

大腸桿菌第一型 DNA 聚合酶校對活性活體試驗分析

Analysis of Escherichia coli DNA polymerase I

Proofreading activity by in vivo assay

方羿凱

Yi-Kai Fang

指導教授：方偉宏 博士

Advisor: Woei-horng Fang, Ph.D.

中華民國 112 年 7 月

July, 2023



誌謝

時光飛逝，不知不覺在碩士班兩年多的日子轉瞬即逝，回顧這兩年有開心的日子，也有辛苦的時光，那感覺還歷歷在目彷彿昨日，這些日子我從課堂學到很多，醫學新知、科學研究方法、甚至生物資訊相關的資料統整，這些知識都將有助於我未來職涯的發展。首先要特別感謝我的家人，作為我的後盾提供我金錢於各項支出，讓我在台北求學時不必擔憂，也特別感謝我的指導老師方偉宏老師，不論是在科學研究上，亦或是生活方面都讓我學到很多，在實驗遇到問題時總是適當的給予建議，也幫助我找到人生的新方向。感謝郭靜穎老師、蘇剛毅老師、許濤老師、蔡芷季老師撥空參加我的口試，以及給予我寶貴的建議。

我也要感謝實驗室夥伴們的照顧及幫忙，謝謝張惠嵐學姊在實驗上一步一步的指導，也勞心勞力的處理在我犯下許多過錯，也謝謝我的同學徐岫珩，就像我的哥哥一樣，除了實驗上許多幫助，在待人處事上也給了我許多意見，在低谷期也是共同安慰、勉勵的好夥伴，也謝謝學妹莊詠筑平時的配合與幫助，也感謝我從國中就一直陪伴的朋友們，在不順心時的陪伴、聊天與娛樂，讓我重新充滿活力繼續努力。最後再次感謝一路上幫助過我的每個人，因為大家的協助才能讓我順利畢業，也祝福你們一切順心如意。

中文摘要




在大腸桿菌中第一型 DNA 聚合酶為高忠誠性聚合酶，具有校對活性為 3'端往 5'端核酸外切酶，除了進行 DNA 複製外，也與許多 DNA 修復路徑相關，因此其校對活性相當重要。

先前時實驗室建立了 MALDI-TOF MS 的第一型 DNA 聚合酶校對活性試驗，結果發現當錯誤配對發生距離 3'端 1 至 4 個核苷酸位置時可被第一型 DNA 聚合酶校對，發生距離 3'端超過 6 個核苷酸位置時則無法被校對。至今仍未有報告 DNA 聚合酶校對活性之活體內試驗，以印證試管中實驗的生物學意義，因此本篇研究致力於建立細菌體內試驗的方法，以與 DNA 聚合酶體外校對試驗比對。

本篇研究以 pBluescript II SK(+) phagemid 載體製備在 5'端帶有 C:C 標誌，以及 3'有錯誤配對之 G:T 或 C:C 錯配合三個核苷酸之 gap 受質及 C:C 錯配之 nick 受質，將受質轉型至菌株 NM522(*polA* WT)進行校對活性的評估，同時也以大腸桿菌 KA796(*polA*⁺)及無 3'→5'核酸外切酶活性菌株 KA796^{D424A} (*polA*exo D424A mutation)比對校對活性。

首先，以 3'端第一個核苷酸為 G:T 錯配之三個核苷酸 gap 受質測定第一型 DNA 聚合酶錯誤配對校對能力，再由限制酶水解判讀校對結果，發現 KA796(55.33%)與 KA796^{D424A}(49.33%)校對活性無顯著差異，懷疑為 mismatch repair system(MMR)所干擾，因此將 G:T 錯配換成 C:C 錯配，以降低 MMR 影響。接著，以 NM522、KA796 及 KA796^{D424A}測定 3'端第一個核苷酸為 C:C 錯誤配對之 gap 受質皆有高的背景值，C:C 錯配結構會影響其周圍配對之穩定性造成 strand loss 增加，而校對活性結果 NM522(51.33%)、KA796(52.67%)、KA796^{D424A} (44%)無顯著差異，可能為第二型與第三型 DNA 聚合酶之干擾，因此設計 nick 受質以降低除了第一型 DNA 聚合酶以外的聚合酶干擾。以 NM522 測定 3'端第一個核苷酸位置 C:C 錯配之 nick 受質，C:C 錯配之 nick 受質(74%)較 C:C 錯配之 gap 受質(51.33%)顯示出較高的校對活性且有統計上的差異(p=0.008)以及較低的背景值，但仍因 C:C 結構於 3'末端位置不利於 DNA 連接酶作用，造成引子股損失增加，卻只觀察到少數的無校對修復結果。而 3'端第四個核苷酸位置 C:C 錯誤配對之 nick 受質於 NM522 結果發現無



校對成功結果，其可能受到 DNA 連接酶之干擾，因此後續需將受質之 5'端磷酸根去除，以避免受質在未受到 DNA 聚合酶反應前就被黏合。實驗也觀察到 aberrant 結果，可能為受質進行轉型作用引起 SOS 反應使 DNA polymerase I*增加，因其在複製過程中較容易插入錯誤核苷酸造成。

本研究顯示於 NM522 結果中當錯誤配對位於 3'端 1、2、3 個核苷酸位置時可被第一型 DNA 聚合酶校對，但校對比率呈下降趨勢(1:74%、2:64%、3:56.6%)。KA796 與 KA796^{D424A}之結果比對發現，無 3'→5'核酸外切酶活性菌株 KA796^{D424A} 其校對比率下降，但仍有校對成功結果懷疑為 proofreading in trans 影響，為 KA796^{D424A} 內其他具有核酸外切酶活性蛋白與第一型 DNA 聚合酶進行校對反應。因此，C:C 錯配且去除 5'端磷酸根之受質可使用於野生型菌株 NM522 進行後續研究生物體內第一型 DNA 聚合酶校對錯誤配對與否於 3'端距離之臨界點與試管試驗結果是否相符，而於 KA796 與 KA796^{D424A} 之校對活性比對則因仍無法排除 proofreading in trans 之干擾，需後續實驗進行改善。

關鍵字詞:DNA 聚合酶校對活性、第一型 DNA 聚合酶、DNA 複製忠誠性、錯誤配對、聚合酶校對活性試驗、3'→5'核酸外切酶、細菌體內試驗。

Abstract



DNA polymerase I is a high-fidelity polymerase in *Escherichia coli* with 3'→5' proofreading activity. DNA Pol I plays important roles in DNA replication and various DNA repair pathways, and it is crucial in maintain gene stability.

We had established a MALDI-TOF MS based proofreading activity analysis for DNA polymerase I *in vitro*. The results revealed that mismatch within the primer-template junction about 1 to 4-nt from the primer 3'end provoked proofreading, mismatch at 6-nt away from the primer 3'terminus escaped from proofreading. To date, there have been no reports of *in vivo* proofreading assay for DNA polymerase to validate the biological significance for *in vitro* data. Thus, this study aims to establish a phagemid-base substrates for *in vivo* Pol I proofreading assay, moreover, to compared the *in vitro* proofreading assay results.

In this study, synthetic oligonucleotide-cloned pBluescript II SK(+) phagemid containing C:C marker at 5'end substrates, with a 3-nucleotide gap containing G:T or C:C mismatch, or a nick containing C:C mismatch. For evaluating proofreading activity of Pol I, mismatched substrates were transformed into *E.coli* wild-type strain NM522(*polA* WT). The assay also performed in PolI proofreading proficient strain KA796(*polA*⁺) and PolI proofreading deficient strain KA796^{D424A}(*polA*_{exo} D424A mutation).

First, the proofreading activity of DNA Pol I was measured by using 3-nucleotide gap containing G:T substrate. The proofreading activity showed no significant difference in strain



KA796(55.33%) and KA796^{D424A}(49.33%), suggesting that mismatch repair system (MMR) may interfere the proofreading assay. To minimize MMR interference, the G:T mismatch was replaced by a C:C mismatch. However, the C:C mismatch gapped substrates caused high strand loss background in strain NM522, KA796, and KA796^{D424A}, possibly due to the structure destabilization by the C:C mismatch surrounding base pairing. Moreover, no significant difference in proofreading activity among NM522 (51.33%), KA796 (52.67%), and KA796D424A (44%), possibly due to interference by DNA polymerase II and III. We then designed a nicked substrates that would reduce interference by Pol II and Pol III. The proofreading activity in NM522 with the gapped C:C substrate (51.33%) and the nicked C:C substrate (74%) showed significant difference ($p=0.008$). Moreover, the quick ligation by DNA ligase to the nicked substrates with C:C mismatch at the fourth nucleotide from 3' end showed no proofreading results. Therefore, removing the 5' phosphate group from the substrate is solution to prevent premature ligation before proofreading reaction

This study demonstrates that proofreading activities of C:C errors from different positions at primer-template junction showed different efficiencies in the NM522, being highest 74% at 3'-end, 64% at penultimate site, and 56.7% at 3rd position from the primer 3' end and the proofreading rate decreases in KA796^{D424A}. Therefore, the C:C mismatch nicked substrates lacking the 5' phosphate group is suitable for *in vivo* studies in strain NM522 to investigate the proofreading patch of the 3' end, which shown a comparable results to the *in vitro* experiments.

Key word: DNA polymerase proofreading activity 、 DNA polymerase I 、 DNA replication

fidelity 、 mismatch 、 DNA polymerase proofreading assay 、 3'→5' exonuclease activity 、 *in vivo*

assay °



總目次



誌謝.....	i
中文摘要.....	ii
Abstract.....	iv
圖目次.....	xi
表目次.....	xii
附錄目次.....	xiii
縮寫表.....	xiv
第一章 前言.....	1
1.1 核酸複製校對活性的生物學意義.....	1
1.2 核酸修復.....	1
1.3 大腸桿菌 DNA 聚合酶.....	2
1.4 研究動機.....	4
第二章 材料與方法.....	6
2.1 菌株.....	6
2.2 載體.....	6
2.3 酵素.....	7
2.4 人工合成寡核苷酸.....	7
2.5 建構 primer strand DNA.....	9
2.6 建構 template strand DNA.....	9
2.7 大量製備雙股 primer strand DNA.....	10
2.8 製備單股環狀 template strand DNA.....	11
2.9 含有錯誤配對之受質的製備.....	12
2.10 細菌體內聚合酶校對活性試驗.....	13
第三章 結果.....	14



3.1 pBSK 質體製備.....	14
3.2 Primer strand DNA 建構與製備	14
3.3 Template strand DNA 建構與製備	14
3.4 具錯誤配對之受質製備.....	15
3.5 細菌體內聚合酶校對試驗.....	15
3.6 含有 gap 受質於細菌體內轉型作用效率	16
3.7 含有 G:T 錯誤配對之 gap 受質於細菌體內聚合酶校對試驗	16
3.8 含有 C:C 錯誤配對之 gap 受質於細菌體內聚合酶校對試驗	17
3.9 含有 nick 受質於細菌體內轉型作用效率	18
3.10 含有 C:C 錯誤配對之 nick 受質於細菌體內聚合酶校對試驗	19
第四章 討論.....	23
4.1 含有 G:T 錯誤配對之 gap 受質	23
4.2 含有 C:C 錯誤配對之 gap 受質	24
4.3 含有 C:C 錯誤配對之 nick 受質	24
4.4 錯誤配對受質於大腸桿菌體內試驗方法之建立.....	26
圖表.....	28
圖一:質體 pBSK 之製備.....	28
圖二:primer strand DNA 及 template strand DNA 之建構.....	29
圖三:大量製備雙股 primer strand DNA 與製備環狀單股 template strand DNA.....	30
圖四:具錯誤配對之受質製備.....	31
圖五:含有 gap 受質於細菌體內轉型作用效率	33
圖六:含有 G:T 錯誤配對之 gap 受質於細菌體內聚合酶校對試驗	34
圖七:含有 C:C 錯誤配對之 gap 受質於細菌體內聚合酶校對試驗	35
圖八:含有 nick 受質於細菌體內轉型作用效率.....	36
圖九:含有 C:C 錯誤配對之 nick 受質於細菌體內聚合酶校對試驗	37



表一:建構合成受質使用之 DNA.....	40
表二:細菌體內校對活性試驗之受質.....	41
表三:大腸桿菌 KA796 內之 gap 受質轉型作用效率.....	42
表四:大腸桿菌 KA796 ^{D424A} 內之 gap 受質轉型作用效率.....	43
表五:大腸桿菌 KA796 內於倒數第一個核苷酸位置為 G:T 錯誤配對之 gap 受質校對活性.....	44
表六:大腸桿菌 KA796 ^{D424A} 內於倒數第一個核苷酸位置為 G:T 錯誤配對之 gap 受質校對活性.....	45
表七:大腸桿菌 NM522 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 gap 受質校對活性.....	46
表八:大腸桿菌 KA796 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 gap 受質校對活性.....	47
表九:大腸桿菌 KA796 ^{D424A} 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 gap 受質校對活性.....	48
表十:大腸桿菌 NM522 之 nick 受質轉型作用效率.....	49
表十一:大腸桿菌 NM522 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性.....	50
表十二:大腸桿菌 KA796 ^{D424A} 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性.....	51
表十三:大腸桿菌 NM522 內於倒數第三個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性.....	52
表十四:大腸桿菌 KA796 ^{D424A} 內於倒數第三個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性.....	53
表十五:大腸桿菌 NM522 內於倒數第四個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性.....	54



表十六:大腸桿菌 NM522 內於倒數第二個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對 活性.....	55
附錄.....	56
附錄一: Klenow fragment 之結構	56
附錄二:第一型 DNA 聚合酶複製過程辨識錯誤配對及後續作用之示意圖.....	57
附錄三:第一型 DNA 聚合酶校對活性.....	58
附錄四:含有錯誤配對之受質.....	59
參考文獻.....	60

圖目次



圖一:質體 pBSK 之製備.....	28
圖二:primer strand DNA 及 template strand DNA 之建構.....	29
圖三:大量製備雙股 primer strand DNA 與製備環狀單股 template strand DNA.....	30
圖四:具錯誤配對之受質製備.....	31
圖五:含有 gap 受質於細菌體內轉型作用效率.....	33
圖六:含有 G:T 錯誤配對之 gap 受質於細菌體內聚合酶校對試驗.....	34
圖七:含有 C:C 錯誤配對之 gap 受質於細菌體內聚合酶校對試驗.....	35
圖八:含有 nick 受質於細菌體內轉型作用效率.....	36
圖九:含有 C:C 錯誤配對之 nick 受質於細菌體內聚合酶校對試驗.....	37

表目次



表一:建構合成受質使用之 DNA.....	40
表二:細菌體內校對活性試驗之受質.....	41
表三:大腸桿菌 KA796 內之 gap 受質轉型作用效率.....	42
表四:大腸桿菌 KA796 ^{D424A} 內之 gap 受質轉型作用效率.....	43
表五:大腸桿菌 KA796 內於倒數第一個核苷酸位置為 G:T 錯誤配對之 gap 受質校對活性.....	44
表六:大腸桿菌大腸桿菌 KA796 ^{D424A} 內於倒數第一個核苷酸位置為 G:T 錯誤配對之 gap 受質校對活性.....	45
表七:大腸桿菌 NM522 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 gap 受質校對活性....	46
表八:大腸桿菌 KA796 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 gap 受質校對活性.....	47
表九:大腸桿菌 KA796 ^{D424A} 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 gap 受質校對活性.....	48
表十:大腸桿菌 NM522 之 nick 受質轉型作用效率.....	49
表十一:大腸桿菌 NM522 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性.....	50
表十二:大腸桿菌 KA796 ^{D424A} 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性.....	51
表十三:大腸桿菌 NM522 內於倒數第三個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性.....	52
表十四:大腸桿菌 KA796 ^{D424A} 內於倒數第三個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性.....	53
表十五:大腸桿菌 NM522 內於倒數第四個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性.....	54
表十六:大腸桿菌 NM522 內於倒數第二個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性.....	55

附錄目次

附錄一: Klenow fragment 之結構	56
附錄二: 第一型 DNA 聚合酶複製過程辨識錯誤配對及後續作用之示意圖	57
附錄三: 第一型 DNA 聚合酶校對活性	58
附錄四: 含有錯誤配對之受質	59



縮寫表



2XTY	2x tryptone yeast extract
A	adenine
BER	base excision repair
bp	base pair
C	cytosine
DNA	deoxyribonucleic acid
ddNTP	2',3-dideoxynucleotide
dNTP	deoxynucleotide 5'-phosphate
ds	double strand
G	guanine
HAP	hydroxyapatite
KF	klenow fragment
Kb	kilo base
KOAc	potassium acetate
Kpi	potassium phosphate buffer
MALDI-TOF MS spectrometry	matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass
MMR	mismatch repair



NaOAc	sodium acetate
NER	nucleotide excision repair
nt	nucleotide
pBSK	pBluescript II SK(+)
pol I	DNA polymerase I
pol II	DNA polymerase II
pol III	DNA polymerase III
pol IV	DNA polymerase IV
pol V	DNA polymerase V
rpm	revolution per minute
ss	single strand
T	thymine
TE	tris(hydroxymethyl)aminomethane ethylenediaminetetraacetic acid
U	unit
WT	wild type



第一章 前言

1.1 核酸複製校對活性的生物學意義

癌症具有不同突變表現型(Loeb, 2001)，突變率升高是惡性腫瘤發生原因之一，錯誤配對修復系統(Mismatch repair system, MMR)的突變經常被發現於子宮內膜癌，在人類腫瘤細胞株中發現若 DNA 複製後缺少 MMR 之檢查其修復突變率會上升 100 倍(Parsons et al., 1993)。而最近研究發現除了 MMR 之突變，人類核酸聚合酶 DNA polymerase epsilon 喪失校對活性之突變也存在於子宮內膜癌。人類核酸聚合酶 DNA polymerase delta/epsilon 如果突變喪失校對活性，會造成 Lynch syndrome，容易發生遺傳性大腸癌等癌症(Valle et al., 2014)。

在大腸桿菌中，DNA 複製過程中鹼基配對錯誤機率約為 10^{-9} 至 10^{-10} ，其中校對能力提供約百倍之精準度，藉由體外試驗測試大腸桿菌中 3'端往 5'端核酸外切酶活性缺失之第一型 DNA 聚合酶與第三型 DNA 聚合酶，發現第一型 DNA 聚合酶合成錯誤機率提高 4 至 7 倍，第三型 DNA 聚合酶合成錯誤機率提高大於 10 倍(Pham et al., 1998)。透過無 3'端往 5'端外切酶活性 pol I I709F 突變體與野生型 pol I 之菌株比較，發現其突變率提高 40 倍(Shinkai & Loeb, 2001)。先前研究顯示，大腸桿菌菌株 dnaQ49^{ts} 其 pol III 缺失 3'端往 5'端外切酶活性，會增加三重複序列之增加或減少，導致基因組的不穩定性(Bzymek et al., 1999; Saveson & Lovett, 1997)。

1.2 核酸修復

生物體的存活需要精確的基因組複製，每次鹼基複製錯誤機率約為 10^{-9} 至 10^{-10} ，在原核生物複製系統中，主要是透過三種機制來保持來維持基因組複製的高保真性；(1)鹼基選擇性(Base selection)，DNA 聚合酶在使用正確鹼基進行合成的效率為錯誤鹼基的 10^4 至 10^5 倍，其原因可能為鹼基配對構型與 DNA 聚合酶催化中心形成磷酸雙脂鍵有關；(2)聚合酶的校對活性(Proofreading activity)，DNA


聚合酶的校對能力是透過其核酸外切酶活性，由於錯誤配對之鹼基較不穩定，容易形成分開的單股 DNA，又再插入錯誤鹼基後下一個合成反應速率會降低導致核酸外切酶更有機會移除配對錯誤之核苷酸；(3)錯誤配對修復系統(MMR)，在一些 MMR 失能的菌株中也發現其有較高的突變率(Echols & Goodman, 1991)。

將帶有配對錯誤的受質送進細菌體進行修復測定，引發的反應除了核酸聚合酶外，也有可能引起核酸配對修復系統的作用，因此對這個系統做一個介紹。

當細胞核酸進行複製時，若 DNA 聚合酶進使用了受損的鹼基，又或是因滑動而造成的錯誤配對，此錯誤經常由核酸配對錯誤修復系統(MMR)進行修復 (Modrich, 1991)。大腸桿菌的錯誤配對修復由 MutS 搜尋辨識錯誤配對之鹼基，接著 MutL 會與之結合，將 MutH 召集並切割錯誤配對附近未被甲基化的 GATC 位點使其產生 nick，之後解旋酶可將 DNA 的兩股分開，並由核酸外切酶開始水解含錯誤鹼基之股直到經過錯配的鹼基，最後由 DNA 聚合酶重新合成被移除的 DNA 序列與 DNA 連接酶將 nick 黏合，而在大腸桿菌對 12 種可能的配對錯誤，僅 C:C 不會修復(Modrich, 1989)。

1.3 大腸桿菌 DNA 聚合酶


大腸桿菌擁有五種不同的 DNA 聚合酶，按照發現的順序被命名為第一型至第五型 DNA 聚合酶。第一型 DNA 聚合酶由 *polA* 基因編碼，分子量為 103KDa，是大腸桿菌中最豐富的聚合酶，每個細胞大約 400 個分子(Brutlag & Kornberg, 1972)。第一型 DNA 聚合酶經由枯草桿菌蛋白酶作用水解後會產生一大一小之片段，一是靠近於多胜肽鍊之 C 端的 68 KDa 大片段，被稱為 Klenow fragment，另為 N 端之 35 KDa 小片段，而其中 Klenow fragment 同時具有 3'端往 5'端之外切酶活性以及 5'端往 3'端之聚合酶活性，而 N 段之小片段則具有 5'端往 3'端之外切酶活性(Joyce & Grindley, 1983)。第一型 DNA 聚合酶共同參與了 DNA 的複製與修復，其 5'端往 3'端之聚合酶活性負責在 DNA 複製過程中延遲股的合成，其也參與了核苷酸移除修復時所產生的空隙填補(gap filling)。而其 3'端往 5'



端之外切酶為在 DNA 複製過程中的校對活性，將錯誤配對的核苷酸移除以保持 DNA 複製的保真性，其 5'端往 3'端之聚合酶則能夠清除在延遲股上的引子以及在 DNA 受損時的 nick translation(Friedberg, 2003)。第二型 DNA 聚合酶為 *polB* 基因編碼，具有 3'端往 5'端之外切酶，為高保真性 DNA 聚合酶(Cai et al., 1995)，參與 DNA 損傷的修復，如因紫外線引起之損傷，且在 DNA 複製又可補救當第三型 DNA 聚合酶在複製過程中停滯現象，也能與第四型 DNA 聚合酶競爭 DNA 3'末端，以防止其進行 error-prone repair(Banach-Orlowska et al., 2005)。第三型 DNA 聚合酶為多聚合體， α -subunit 具有 5'端往 3'端之聚合酶活性， ϵ - subunit 具有 3'端往 5'端之外切酶活性，主要負責 DNA 的複製(Nusslein et al., 1971)。第四型及第五型 DNA 聚合酶由於缺乏校對活性，被認為是低保真度 DNA 聚合酶(Goodman, 2002)，主要參與 translesion synthesis(Napolitano et al., 2000; Wagner et al., 2002)。

第一型 DNA 聚合酶在進行 DNA 複製主要由 Klenow fragment 進行，其有一大一小兩個結構，較大的有 400 個胺基酸，主要由 alpha-helix 構成像是手的結構，其包含拇指(thumb)、手指(fingers)及手掌(palm)三個部分(Garcia-Diaz & Kunkel, 2006)(附錄一)，以及較小的 200 胺基酸，外圍由 alpha-helix 構成，中心由 beta-sheet 構成(Ollis et al., 1985)。

DNA 聚合酶是維持基因遺傳的重要核心元素，因此其中酵素活性中心位點一直是具有高度保守性的，透過聚合酶活性位點之序列將其兩大家族其中之一為大腸桿菌第一型 DNA 聚合酶之(*pol I* 家族，A 家族)(Delarue et al., 1990)，及人類 DNA 聚合酶 α (*pol α* 家族，B 家族)。許多 DNA 聚合酶之分子結構已被解析(Brautigam & Steitz, 1998)，都具有部分相似之共同結構，就是聚合酶之拇指、手指及手掌，正如同 Klenow fragment，雖然在拇指、手指及手掌序列及結構可能稍有不同，但其普遍都包含了兩個天門冬胺酸殘基，負責與核苷酸及兩價金屬離子結合來進行核酸合成反應(Brautigam & Steitz, 1998; Steitz & Steitz, 1993)。




經由 DNA 聚合酶與 DNA 之二元結構，DNA 聚合酶、核苷酸及 DNA 之三元結構比對(Doublie et al., 1999; Li et al., 1998; Pelletier et al., 1994)，第一型 DNA 聚合酶剛開始合成時會先與 DNA 雙股結合，導致其拇指在 DNA 周圍閉合像是抓住 DNA，接著核苷酸在與此二元結構結合，誘導手指結構改變，使其往酵素活性中心移動進行聚合反應(Doublie et al., 1998; Huang et al., 1998; Pelletier et al., 1994)。而在複製過程中，若 DNA 聚合酶使用錯誤之核苷酸將其合成至 DNA 上時，因末端錯誤配對之結構不穩定，使其末端四對核苷酸分開(Cowart et al., 1989)，引子股接著會落入 3'端往 5'端之外切酶活性區域，移除錯誤配對之核苷酸(Brutlag & Kornberg, 1972)，接著引子股會重回 5'端往 3'端之聚合酶活性中心繼續進行 DNA 合成(附錄三)。DNA 聚合酶合成上正確配對之核苷酸比錯誤配對的效率高出 10^2 至 10^3 倍(Patel et al., 1991)，在合成上錯誤的核苷酸後，合成速率會大幅降低，而使 DNA 聚合酶之 3'端往 5'端之外切酶更有機會去除錯誤的核苷酸而此種透過核酸外切酶校對提高了 DNA 聚合酶在進行複製的保真度(Donlin et al., 1991)。

1.4 研究動機

由於 DNA 聚合酶是維持基因遺傳的重要核心元素，在不同生物體中的 DNA 聚合酶機制仍是許多研究探討的主題(Dorawa et al., 2022; Zhou et al., 2021)，在許多突變表型研究顯示，DNA 聚合酶的校對活性於基因體穩定性有關鍵作用，但對於 DNA 聚合酶之保真性之機制仍較少，透過 *polA* 突變的大腸桿菌發現其突變率為野生型大腸桿菌之 10 倍(Agemizu et al., 1999; Coukell & Yanofsky, 1970; Fix et al., 1987)，目前仍未有任何研究透過生物體內進行 DNA 聚合酶之校對能力試驗，由於第一型 DNA 聚合酶為大腸桿菌體內最多的聚合酶，應能較好測試其在大腸桿菌內校對活性。

先前實驗室透過 MALDI-TOF MS 的聚合酶校對活性試驗來研究第一型 DNA 聚合酶對於核苷酸錯配之校正能力，設計由引子股與模板股配對後會在距離 3'之末段 1 至 9 個核苷酸位置之錯誤配對與 Klenow fragment 及核苷酸進行反應，結



果顯示當錯誤配對發生距離 3'端 1 至 4 個核苷酸位置時可被 Klenow fragment 校對，再插入正確之 ddNTP，而發生距離 3'端超過 6 個核苷酸位置時則無法被校對直接合上後續正確之 ddNTP(Chang et al., 2020)(附錄三)，這些可解釋當錯誤配對超過 Klenow fragment 所能辨識之區域，因無直接接觸而逃脫校對，但目前僅此於體外試驗之結果。

因此本研究想延續之前結果，設計一含有錯誤配對之質體，將其送入大腸桿菌體內以觀察其 DNA 校對活性，先前本實驗室所設計之質體使用，首先 C:C 之錯誤配對不會被大腸桿菌內已知任何 DNA 修復系統處理(Modrich, 1987)，因此實驗室先前就以 C:C 標誌作為 DNA 是否有其中一股的遺失(Su et al., 2018)。透過設計距離 3'-末段 1 至 9 個核苷酸位置之 C:C 錯誤配對，防止 MMR 之干擾，且有一個 nick 之質體，防止除第一型聚合酶之其他 DNA 聚合酶干擾，建立活體內試驗的方法，利用菌株 NM522(*polA* WT)進行校對活性的評估，同時也以大腸桿菌 KA796(*polA*⁺)及無 3'→5'核酸外切酶活性菌株 KA796^{D424A} (*polA*exo D424A mutation)比對校對活性，並與先前 MALDI-TOF MS 的聚合酶校對活性試驗比較，實現 DNA 聚合酶校對能力體外與體內試驗結果之比對。

第二章 材料與方法



2.1 菌株

本研究中所使用之菌種為大腸桿菌 *Escherichia coli*，其菌株如下：

菌株	特徵	來源
NM522	($\Delta(\text{lac-proAB})$, proAB^+ , $\text{lacI}^q\text{lacZ}\Delta\text{M15}$, supE $\text{thi}\Delta(\text{hsdMS-mcrB})5$)，DNA 聚合酶功能正常之大 腸桿菌，為建構受質及體外校對活性試驗所用。	
KA796	($\Delta(\text{lac proB})\text{thi}$, $\text{polA}^{+}::\text{Tn9}(\text{cam}^R)$)為 KA796 ^{D424A} 之 isogenic polA^+ 野生株大腸桿菌，具有 chloramphenicol 抗藥性基因，用於體外校對活性 試驗。	Dr. Laurent Jannièrè 提供
KA796 ^{D424A}	($\Delta(\text{lac proB})\text{thi}$, $\text{polA}^{\text{Exo}}(\text{D424A})::\text{Tn9}(\text{cam}^R)$)為 polA^{exo} 基因突變之大腸桿菌，其 DNA 第一型聚 合酶中的 3'-5' 核酸外切酶失去活性，具有 chloramphenicol 抗藥性基因，用於體外校對活性 試驗。	Dr. Laurent Jannièrè 提供

2009 年 Makiela-Dzbenka 的文章所描述，KA796 菌株是將染色體上的 polA^+ 置換成 cat -containing polA^+ 或 polA^{exo} D424A mutation，因此兩種菌株為 isogenic strain(Makiela-Dzbenka et al., 2009)。

2.2 載體

pBluescript II SK(+)(pBSK)為 phagemid 載體，全部含 2961 個鹼基配對，具 $\text{lacZ}\alpha$ 基因，能夠表現出 β -半乳糖苷酶 α 片段(α fragment of β -galactosidase)，且可藉由 α -complementation 挑出建構之質體，具有多基因選殖限制酶切位(multiple cloning site, MCS)，且帶有 *AmpR* 為 ampicillin 抗藥基因。另外，pBSK 上還具有



f1 ori，可藉由 helper phage M13KO7 噬菌體以 rolling circle replication 方式產生單股 DNA。

2.3 酵素

本實驗所使用之酵素皆採購自 New England Biolabs

本研究所使用之酵素

1. 限制酶酵素:

AflII, 20U/ μ L

ApaI, 50U/ μ L

BsaHI, 10U/ μ L

BstXI, 10U/ μ L

NcoI, 20U/ μ L

PstI, 20U/ μ L

SacII, 20U/ μ L

XhoI, 20U/ μ L

2. 其他酵素

Quick CIP, 5U/ μ L

RecBCD, 10U/ μ L

T4 ligase, 400U/ μ L

2.4 人工合成寡核苷酸

1. AflII oligo

AflII-f 5'TCGACCTCAGCTTAAGTCGAGAATTCCAGCT 3'

AflII-r 3'----GGAGCTGAATTCAGCTCTTAAGG---- 5'

2. XhoI oligo

XhoI-f 5'TCGACCTCGAGTTAAGTCGAGAATTCCAGCT 3'

XhoI-r 3'----GGAGCTCAATTCAGCTCTTAAGG---- 5'



3. MM0 oligo

MM0-f 5'AATTTCTAGACCACTGCAGTGGC---- 3'

MM0-r 3'----AGATCTGGTGACGTCACCGTTAA 5

4. MM1 oligo

MM1-f 5'AATTTCTAGACCACTGCGGTGGC---- 3'

MM1-r 3'----AGATCTGGTGACGCCACCGTTAA 5'

5. Sm1-9-t oligo

Sm1-9-t-f 5'AATTTCTAGACCACTGCAGTGGTGGC---- 3'

Sm1-9-t-r 3'----AGATCTGGTGACGTCACCACCGTTAA 5'

6. P0 oligo

P0-f 5'----ACTGCACTTAAGGCCGCGGGGGGTACCAGCT 3'

P0-r 3'CATGTGACGTGAATTCCGGCGCCCCCATGG---- 3'

7. P1 oligo

P1-f 5'----ACTGCACTTAAGGCCGCGGGGCCATGGAGCT 3'

P1-r 3'CATGTGACGTGAATTCCGGCGCCCCGGTACC---- 5'

8. T0 oligo

T0-f 5'----ACTGCAGTTAAGGCCGCGGGGGCCCGTACCAGCT 3'

T0-r 3'CATGTGACGTCAATTCCGGCGCCCCGGGCATGG---- 5

9. T1 oligo

T1-f 5'----ACTGCAGTTAAGGCCGCGGGGGCCCGTACCAGCT 3'

T1-r 3'CATGTGACGTCAATTCCGGCGCCCCGGGGTACC---- 5

10. S1 oligo

S1-f 5'----ACTGCAGTTAAGGCCGCGGGGGCATGGAGCT 3'

S1-r 3'CATGTGACGTCAATTCCGGCGCCCCGTACC---- 5'

11. P3 oligo



P3-f 5'----ACTGCACTTAAGGCCGCGGCCATGGAGCT 3'

P3-r 3'CATGTGACGTGAATTCCGGCGCCGCGGTACC---- 5'

12. P4 oligo

P4-f 5'----ACTGCACTTAAGGCCGCGCGGGGTACCAGCT 3'

P4-r 3'CATGTGACGTGAATTCCGGCGCGCCCCATGG---- 5'

13. S0 oligo

S0-f 5'----ACTGCAGTTAAGGCCGCGGGGGGTACCAGCT 3'

S0-r 3'CATGTGACGTCAATTCCGGCGCCCCCATGG---- 5'

14. S2 oligo

S2-f 5'----ACTGCAGTTAAGGCCGCGGGGCCATGGAGCT 3'

S2-r 3'CATGTGACGTCAATTCCGGCGCCCCGGTACC---- 5'

2.5 建構 primer strand DNA

使用 100U KpnI 及 100U SacI 將 20 μ g pBSK 上大部分多基因選殖限制酶切位 (multiple cloning site, MCS) 移除，並插入帶有 AflII 及個別有特定酵素切位之人工寡核苷酸，成功插入質體為 in-frame 但會出現 stop codon，菌落經由 α -complementation 挑選白色菌落。挑出單一菌落，以 alkaline lysis 方法抽出質體，確認有 AflII、BsaHI 及個別人工寡核苷酸上的酵素切位後，質體由定序確認序列無誤，完成錯誤配對受質的 primer 雙股 DNA 之建構。

2.6 建構 template strand DNA

使用 100U KpnI 及 100U SacI 將 20 μ g pBSK 上大部分多基因選殖限制酶切位 (multiple cloning site, MCS) 移除，並插入帶有 PstI 及個別有特定酵素切位之人工寡核苷酸，成功插入質體為 in-frame 但會出現 stop codon，菌落經由 α -complementation 挑選白色菌落。挑出單一菌落，以 alkaline lysis 方法抽出質體，確認有 PstI、BsaHI 及個別人工寡核苷酸上的酵素切位後，質體由定序確認序列無誤，完成錯誤配對受質的 template 雙股 DNA 之建構。




2.7 大量製備雙股 primer strand DNA

將帶有 AflII(+)之 primer strand DNA 質體之菌落培養於 3mL 含有 150 μ g/mL ampicillin 的 2XTY medium，於培養箱 160rpm 37°C overnight。第二天，將菌液以 1:50 之比例放大於 50mL 含有 150 μ g/mL ampicillin 的 2XTY medium 於培養箱 160rpm 37°C overnight。第三天，將菌液以 1:40 比例放大於 500mL 含有 150 μ g/mL ampicillin 的 2XTY medium 於培養箱 160rpm 37°C 培養至吸光值 OD₅₉₀ 大於 1，將菌液轉移至 JA10 的離心瓶，於 4°C 離心 18 分鐘(7025xg, JA10, Beckman)後除去上清液，加入 9.4mL solution I (10mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH8.0, 50mM glucose)使沉澱細菌懸浮，加入 2.5mL 25mg/mL lysozyme 在室溫作用 10 分鐘使細菌細胞壁破損，再加入 25mL solution II (10 %SDS, 0.2N NaOH)置於冰上以玻璃棒輕微攪拌置菌液變化為透明且黏稠狀，再加入 18.75mL solution III (11% acetic acid, 3M KOAc)混合均勻以中和酸鹼值與使蛋白變性，於 4°C 離心 30 分鐘(7025xg, JA10, Beckman)。接著以紗布過濾上清液，由量筒計算體積加入體積 0.6 倍的異丙醇(Isopropanol)與上清液混合均勻，在室溫沉澱 10 分鐘後，於 25°C 離心 30 分鐘(7025xg, JA10, Beckman)。去除上清液後，沉澱物以 3 至 5mL 70%酒精清洗，待酒精揮發，以 3mL TE 回溶沉澱物，750 μ L 沖洗離心瓶吸取可能殘餘之核酸。將回溶液體轉移至 JA20 離心管與 1mL 12.5M LiCl 混合均勻，於 -20°C 靜置沉澱 30 分鐘，於 4°C 離心 30 分鐘(8198xg, JA25.5, Beckman)去除大片 RNA。將上清液轉移至新的 JA20 離心管，加入體積 0.1 倍的 3M NaOAc 與體積 2 倍的 100%酒精混合均勻，於 -20°C 靜置沉澱 30 分鐘，於 4°C 離心 30 分鐘(8198xg, JA25.5, Beckman)沉澱核酸。去除上清液後，將沉澱物以 1mL 70%酒精清洗，等待酒精揮發以 2mL TE 回溶沉澱物，1mL 沖洗離心管吸取可能殘餘之核酸。回溶液體轉移至 15mL 離心管，加入 10 μ L 10mg/mL RNase 在 37°C 作用兩小時水解小片段 RNA，接著以等體積 phenol 將 RNase 與蛋白質移除，收集水層液體轉移至 JA20 離心管，加入體積 0.1 倍的 3M NaOAc 與體積 2 倍的 100%酒精混

合均勻，於-20°C 靜置沉澱 30 分鐘，於 4°C 離心 30 分鐘(8198xg, JA25.5, Beckman)沉澱核酸。去除上清液後，沉澱物以 1mL 70% 酒精清洗，等待酒精揮發以 1mL TE 回溶沉澱物，0.5mL 沖洗離心管吸取可能殘餘之核酸。將回溶核酸液體放入透析袋，在 4°C 的 TE 溶液中進行透析以降低鹽類離子濃度，過程中於 3 小時、overnight、6 小時更換 TE 溶液。將經過純化的雙股 DNA 進行適當的稀釋，使用石英比色管於分光光度計偵測 OD₂₃₀、OD₂₆₀、OD₂₈₀ 之吸光值分析 DNA 品質，最後由 agarose 電泳確認 DNA 濃度。

2.8 製備單股環狀 template strand DNA

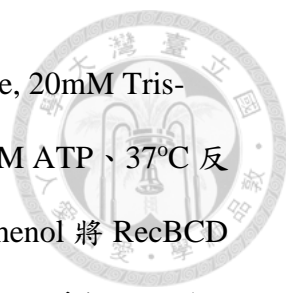
將帶有 PstI(+)之 template strand DNA 質體之菌落培養於 3mL 含有 150μg/mL ampicillin 的 2XTY medium，於培養箱 160rpm 37°C overnight。第二天，將菌液以 1:50 之比例放大於 50mL 含有 150μg/mL ampicillin 的 2XTY medium 於培養箱 160rpm 37°C 培養至吸光值 OD₅₉₀ 於 0.3 至 0.4，取出 30mL 菌液加入 MOI 為 10 之 M13KO7 噬菌體於 37°C 水浴進行感染 30 分鐘，與 600mL 含有 5mM MgCl₂ 之 1% 2XTY soft agar 混合均勻，倒入培養皿中等待凝固，約為 20 盤的製作，將所有培養皿倒置於培養箱 37°C overnight。隔日將所有 soft agar 刮除與 1200mL 含有 5mM MgCl₂ 的 2XTY medium 混合均勻，收集至塑膠錐形瓶，於培養箱 160rpm 37°C 搖動三小時，加入 400μL chloroform 再搖動 5 分鐘殺死細菌讓噬菌體釋出，將所有培養液以紗布過濾去除大部分 agar 雜質並轉移至 JA10 離心瓶於 4°C 離心 30 分鐘(7025xg, JA10, Beckman)，將上清液轉移至新的 JA10 離心瓶於 4°C 離心 30 分鐘(7025xg, JA10, Beckman)，接著以紗布過濾雜質至塑膠燒杯計算體積。以每 300mL 加入 17.5g PEG6000 與 10.3gNaCl 的比例於室溫攪拌至全部溶解，再於室溫攪拌 30 分鐘。將溶液收集至 JA10 離心瓶於室溫沉澱 10 分鐘後，於 4°C 離心 30 分鐘(7025xg, JA10, Beckman)去除上清。沉澱物以 TE 回溶完全後轉移至 JA20 離心管，於 4°C 離心 10 分鐘(8198xg, JA25.5, Beckman)。將上清液轉移至 50mL 離心管，沉澱物再以 1mL TE 回溶，再於 4°C 離心 5 分鐘(8198xg, JA25.5,



Beckman)，將上清液轉移至 50mL 離心管，加入 10 μ L 10mg/mL RNase 在 37°C 作用兩小時水解 RNA，加入 phenol 打破噬菌體及將蛋白移除，再加入 phenol/chloroform 萃取單股 DNA，再加入 butanol 移除 phenol、chloroform 及縮小體積至 2mL，將水層收集至透析袋，在 4°C 的 TE 溶液中進行透析以降低鹽類離子濃度與移除 butanol，過程中於 3 小時、overnight、6 小時更換 TE 溶液。純化出的單股 DNA 經過適當稀釋，以石英比色管於分光光度計偵測 OD₂₃₀、OD₂₆₀、OD₂₈₀ 之吸光值分析 DNA 品質，最後由 agarose 電泳確認 DNA 濃度。

2.9 含有錯誤配對之受質的製備

首先使用 500U 酵素將 500 μ g primer strand DNA 於 37°C 作用 2 小時透過電泳確認完全水解成線狀 DNA，再以 4U Quick CIP alkaline phosphatase 作用 15 分鐘將 DNA 5'端 phosphate 移除，透過 phenol 萃取移除蛋白，再以酒精沉澱 DNA，離心取得 DNA 沉澱物並以 TE 回溶，接著在 4°C 的 TE 溶液中進行透析以降低鹽類離子濃度。將線狀 primer strand DNA 移至 15mL 離心管，使用分子數 1:1 之比例將線狀雙股 primer strand DNA 和單股 template strand DNA 於 50mM Tris-HCl pH7.6, 10mM NaCl 的環境進行雜交，加入 0.03 倍體積之 10N NaOH 於室溫作用 5 分鐘，使所有線狀雙股 DNA 變性為單股狀態，接著陸續加入 0.1 倍體積之 2.9N HOAc、0.145 倍體積之 3M KCl 和 0.124 倍體積之 1M 磷酸鹽溶液 (Kpi) pH7.6，使 pH 回到中性讓單股 primer strand DNA 與單股 template strand 雜交，於 65°C 水浴作用 30 分鐘，37°C 水浴作用 30 分鐘，使錯誤配對之核酸可重新黏合，以電泳確認 nick DNA、linear 雙股 DNA 及單股 DNA 比例。透過 hydroxyapatite 層析法將剩餘單股 DNA 移除，以 0.13M, 0.14M, 0.15M, 0.16M 濃度梯度之磷酸鹽溶液(Kpi)將單股 DNA 沖出，最後再以 0.4M Kpi 將所有 nick DNA 與 linear 雙股 DNA 沖出，透過電泳確認將含有雙股 DNA 之溶液收集，在 4°C 的 TE 溶液中進行透析以降低磷酸鹽類濃度，使用石英比色管於分光光度計偵測 OD₂₃₀、OD₂₆₀、OD₂₈₀ 之吸光值分析 DNA 品質。接著以每 1 μ g 雙股線狀



DNA 加入 1U RecBCD 於 1x NEB buffer4(50mM potassium acetate, 20mM Tris-acetate, 10mM magnesium acetate, 1mM DTT, pH7.9 at 25°C)、2mM ATP、37°C 反應 2 小時，透過電泳確認雙股線狀 DNA 已被完全水解，經由 phenol 將 RecBCD 移除，使用 butanol 縮體積至 2.5 至 3mL，在 4°C 的 TE 溶液中進行透析以移除 butanol，過程中於 3 小時、overnight、6 小時更換 TE 溶液(表二)(附錄四)。

2.10 細菌體內聚合酶校對活性試驗

將 50 至 100ng 受質透過轉型作用分別送入大腸桿菌 NM522(*polA* WT)、KA796(*polA*⁺)及 KA796^{D424A}(*polA*exo D424A mutation)，接種在含濃度 150μg/mL ampicillin 之 2XTY 固態培養基，在 37°C 下培養 overnight，有轉型成功之細菌才能於含有 ampicillin 環境下生長，挑選超過 50 個菌落以 alkaline lysis 方法將質體抽出，再使用 AflIII、PstI、BsaHI 與錯誤配對位點限制酶酵素進行 50 個反應分析、限制沒反應需加入兩種酵素。第一種酵素 BsaHI 將質體作用成線狀 DNA，第二種加入 AflIII、PstI 或特定限制酶酵素進行反應，反應結束後加入 DNA loading dye 終止酵素反應，接著以 agarose 電泳確認 DNA 片段。當反應結果 AflIII 及 PstI 皆為部分水解，表示其位於 5'上游 C:C 標誌未經由其他修復系統作用。當以錯誤配對位點之限制酶進行反應時，其 DNA 切割片段有兩種可能的情形，若錯誤配對位點之限制酶切位為完全水解的形式，表示為配對錯誤之 DNA 序列被校對修復還原限制酶切位序列；無法水解表示其錯誤配對未被修復而失去限制酶切位序列，若其為部分水解，表示發生 strand loss 的情形，若結果 AflIII 被完全水解則表示 template strand 喪失，PstI 被完全水解則表示 primer strand 喪失。

第三章 結果



3.1 pBSK 質體製備

以 NM522 作為載體透過轉型作用將 pBSK 送入並且養殖至少 500mL 之菌液，之後以 alkaline lysis 方法將質體 DNA 抽出，透過分光光度計測量 DNA 濃度與品質，260/230 需大於 2、260/280 須為 1.8~1.9。完成濃度與品質測量後，將 DNA 稀釋至 100ng，單獨使用 BsaHI 進行水解後的 DNA 片段大小約為 2.9Kb，與 pBSK control 相同大小，再以 XhoI 與 BsaHI 進行水解後確認產物分別約為 1.8Kb 以及 1.1Kb 之片段 (圖一)。

3.2 Primer strand DNA 建構與製備

使用 100U KpnI 及 SacI 將 20 μ g pBSK DNA 水解，以電泳確認完全水解後(圖二 A)，個別插入人工合成寡核苷酸(圖二 B)，以轉型作用將質體送入 NM522 中，以 α -complementation 挑選白色菌落，再經由 alkaline lysis 方法將 DNA 抽出，使用 AflII 及 BsaHI 初步確認是否有接上人工合成寡核苷酸(圖二 C)，並將 DNA 送至定序確認序列無誤，再製備大量質體，以分光光度計測量 DNA 濃度與品質，取出 100ng DNA 並以電泳確認濃度與 AflII 及 BsaHI 酵素切位(圖三 A)，以相同方法完成數種 primer strand DNA 列舉如表一所示。

3.3 Template strand DNA 建構與製備

使用 100U KpnI 及 SacI 將 20 μ g pBSK DNA 水解，以電泳確認完全水解後(圖二 A)，個別插入 S2 之人工合成寡核苷酸(圖二 B)，以轉型作用將質體送入 NM522 中，以 α -complementation 挑選白色菌落，再經由 alkaline lysis 方法將 DNA 抽出，使用 PstI 及 BsaHI 初步確認是否有接上人工合成寡核苷酸(圖二 C)，並將 DNA 送至定序確認序列無誤。之後以 helper phage M13KO7 製備成單股環狀 DNA，透過分光光度計測量 DNA 濃度與品質，並以 agarose 電泳確認濃度(圖三 B)，以相同方法完成數種 template strand DNA 詳列如表一所示。



3.4 具錯誤配對之受質製備

位於 3'端倒數第三個位置為 C:C 的錯誤配對的 nick DNA 受質(nCC3)是以 2U NcoI 與 1 μ g DNA 的比例，將 400 μ g P3 DNA 於 37°C 作用 2 小時(圖四 A)，使用電泳確認完全水解成雙股線狀 DNA(圖四 B)，之後以分子數比例 1:1 將雙股線狀 P2 DNA 與單股環狀 S2 DNA 進行雜交產生 nick DNA(圖四 C)，經電泳確認反應後產生 nick DNA、雙股線狀 DNA、單股 DNA(圖四 D)。使用氫氧磷石灰層析法，將所有 DNA 捕捉至氫氧磷石灰上，接著透過由低濃度 0.13M Kpi 至高濃度 0.16M Kpi 依序將單股 DNA 沖出與雙股 DNA 分離，然後以 0.4M Kpi 將雙股 DNA 全數沖出(圖四 E)，以電泳確認含有雙股 DNA 之溶液(圖四 F)，然後收集並進行透析，後續由 nanodrop 與電泳測量品質及定量濃度，以適量 RecBCD 將雙股線狀 DNA 水解(圖四 G)，最後再以電泳確認受質濃度(圖四 H)。後續使用相同方法完成其餘錯誤配對之受質。

3.5 細菌體內聚合酶校對試驗

當錯誤配對之受質進入個別大腸桿菌之勝任細胞體內可能出現以下結果。

1. 當未於 3'端特定位置之錯誤配對經由細菌體內校對修復後，限制酶切位序列被還原或破壞而出現完全水解或完全不水解。而 5'端上游之 C:C 標誌為 strand loss 之 marker 應落於修復區域外而被保留，因而在複製之後產生一半配對為 C:G 以及一半配對為 G:C，故經由 C:C 標誌之限制酶作用後產生 2.9Kb、1.8Kb、1.1Kb。
2. 當未於 3'端特定位置之錯誤配對沒有經過細菌體內修復，錯誤配對個別保留，之後形成一半以錯誤鹼基之股進行複製，一半以正確鹼基之股進行複製，限制酶切位序列錯誤及正確各佔一半，因此出現 2.9Kb、1.8Kb、1.1Kb 之三個片段。而上游之 C:C 標誌應落於修復區域外而被保留，故經由 C:C 標誌之限制酶作用後產生 2.8Kb、1.8Kb、1.1Kb 之三個片段。




3. 當 5'端上游 C:C 標誌因其他原因導致遺失，會出現完全為 C:G 之配對或 G:C 完全之配對，因此以限制酶進行反應會出現其中之一為完全不水解，另一完全水解之結果。

3.6 含有 gap 受質於細菌體內轉型作用效率

MM0 為 5'端上游存在 C:C 標誌且 3'端有 3 個核苷酸的 gap 且無錯誤配對之 gap DNA，以 100ng 進行轉型作用至大腸桿菌 KA796(*polA*⁺)及 KA796^{D424A} (*polA*_{exo D424A} mutation)之勝任細胞。經由 BsaHI 搭配 AflIII、XhoI 或 PstI 兩種酵素進行反應以分析結果。MM0(2927bps)，以 BsaHI(2549)與 AflIII(679)、XhoI(674)、PstI(707)進行反應。如圖五所示，經過 agarose 電泳結果，若受質在細菌體內發生 3 個核苷酸的 gap 填補，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 XhoI 為部分水解，PstI 為完全水解。若發生 primer strand loss，則會出現 AflIII 切位序列遺失但 XhoI 仍保留，結果為 AflIII/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 XhoI/BsaHI 與 PstI/BsaHI 雙水解都為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。若發生 template strand loss 則會出現 XhoI 切位序列遺失但 AflIII 仍保留，結果為 XhoI/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 AflIII/BsaHI 與 PstI/BsaHI 雙水解都為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。

每個 DNA 受質皆會進行獨立三次 DNA 受質轉型作用，並且挑取超過 50 菌落抽取 DNA 並且以限制酶酵素分析 50 個 DNA，判讀校正效能以及 strand loss 的情形，並且計算平均值與標準差。首先以大腸桿菌 KA796 測試含有三個核苷酸 gap 的 MM0 受質，如表三所示，結果為 65.3% 為成功進行 gap filling，其背景值包含 13.3% 為 primer strand loss、8.6% 為 template strand loss 及 12.6% 為 aberration。如表四所示，以 KA796^{D424A} 測試 MM0 受質中，50.6% 為成功進行 gap filling，背景值包含 24.6% 為 primer strand loss、18% 為 template strand loss 及 6.6% 為 aberration。

3.7 含有 G:T 錯誤配對之 gap 受質於細菌體內聚合酶校對試驗

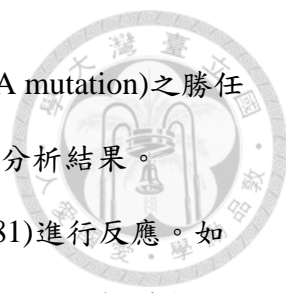


MM1 為 5'端上游存在 C:C 標誌且 3'端有 3 個核苷酸的 gap 且倒數第一個核苷酸位置為 G:T 錯誤配對之 gap DNA，以 100ng 進行轉型作用至大腸桿菌 KA796(*polA*⁺)及 KA796^{D424A} (*polA*exo D424A mutation)之勝任細胞。經由 BsaHI 搭配 AflIII、XhoI 或 PstI 兩種酵素進行反應以分析結果。MM1(2927bps)，以 BsaHI(2549)與 AflIII(679)、XhoI(674)、PstI(707)進行反應。如圖六所示，經過 agarose 電泳結果，若受質在細菌體內成功將 G:T 錯配校對也將 3 個核苷酸的 gap 填補，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 XhoI 為部分水解，PstI 為完全水解，若受質在細菌體內未將 G:T 錯配校對就將 3 個核苷酸的 gap 填補，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 XhoI 為部分水解，PstI 之結果也為部分水解。若發生 primer strand loss，則會出現 AflIII 切位序列遺失但 XhoI 仍保留，結果為 AflIII/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 XhoI/BsaHI 與 PstI/BsaHI 雙水解都為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。若發生 template strand loss 則會出現 XhoI 切位序列遺失但 AflIII 仍保留，結果為 XhoI/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 AflIII/BsaHI 與 PstI/BsaHI 雙水解都為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。

每個 DNA 受質皆會進行獨立三次 DNA 受質轉型作用，並且挑取超過 50 個菌落抽取 DNA 並且以限制酶酵素分析 50 個 DNA，判讀校正效能以及 strand loss 的情形，並且計算平均值與標準差。首先以大腸桿菌 KA796 測試含有 G:T 錯誤配對之三核苷酸 gap 的 MM1 受質，如表五所示，結果為 55.3%的錯誤配對被成功校對修復，13.3%無進行修復，其背景值包含 14%為 primer strand loss、17.3%為 template strand loss。如表六所示，以 KA796^{D424A} 測試 MM1 受質，有 49.3%的錯誤配對被校對修復，30%無進行修復，背景值包含 10%為 primer strand loss、10.6%為 template strand loss。

3.8 含有 C:C 錯誤配對之 gap 受質於細菌體內聚合酶校對試驗

CC1 為 5'端上游存在 C:C 標誌且 3'端有 3 個核苷酸的 gap 且倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 gap DNA，以 100ng 進行轉型作用至大腸桿菌




NM522(*polA*⁺ WT)、KA796(*polA*⁺)及 KA796^{D424A} (*polA*exo D424A mutation)之勝任細胞。經由 BsaHI 搭配 AflIII、PstI 或 ApaI 兩種酵素進行反應以分析結果。CC1(2890bps)，以 BsaHI(2512)與 AflIII(664)、PstI(663)、ApaI(681)進行反應。如圖七所示，經過 agarose 電泳結果，若受質在細菌體內成功將 C:C 錯配校對也將 3 個核苷酸的 gap 填補，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 PstI 為部分水解，ApaI 為完全水解，若受質在細菌體內未將 C:C 錯配校對就將 3 個核苷酸的 gap 填補，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 PstI 為部分水解，ApaI 之結果也為部分水解。若發生 primer strand loss，則會出現 AflIII 切位序列遺失但 PstI 仍保留，結果為 AflIII/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 PstI/BsaHI 與 ApaI/BsaHI 雙水解都為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。若發生 template strand loss 則會出現 PstI 切位序列遺失但 AflIII 仍保留，結果為 PstI/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 AflIII/BsaHI 與 ApaI/BsaHI 雙水解都為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。

每個 DNA 受質皆會進行獨立三次 DNA 受質轉型作用，並且挑取超過 50 個菌落抽取 DNA 並且以限制酶酵素分析 50 個 DNA，判讀校正效能以及 strand loss 的情形，並且計算平均值與標準差。首先以大腸桿菌 NM522 測試含有 C:C 錯誤配對之三個核苷酸 gap 的 CC1 受質，如表七所示，結果為 51.3%的錯誤配對被成功校對修復，1.3%無進行修復，其背景值包含 32.6%為 primer strand loss、14.6%為 template strand loss。如表八所示，以 KA796 測試 CC1 受質，52.6%的錯誤配對被成功校對修復，未觀察到無修復結果，其背景值包含 24.6%為 primer strand loss、22.6%為 template strand loss。如表九所示，以 KA796^{D424A} 測試 CC1 受質，有 44%的錯誤配對被校對修復，未觀察到無修復結果，背景值包含 26%為 primer strand loss、30%為 template strand loss。

3.9 含有 nick 受質於細菌體內轉型作用效率

nCC0 為 5'端上游存在 C:C 標誌且 3'端有 nick 且無錯誤配對之 nick DNA，以 100ng 進行轉型作用至大腸桿菌 NM522(*polA*⁺ WT)。經由 BsaHI 搭配 AflIII、



PstI 兩種酵素進行反應以分析結果。nCC0(2890bps)，以 BsaHI(2512)與 AflIII(664)及 PstI(663)進行反應。如圖八所示，經過 agarose 電泳結果，若受質在細菌體內成功將 nick 黏合，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 PstI 為部分水解。若發生 primer strand loss，則會出現 AflIII 切位序列遺失但 PstI 仍保留，結果為 AflIII/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 PstI/BsaHI 雙水解為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。若發生 template strand loss 則會出現 PstI 切位序列遺失但 AflIII 仍保留，結果為 PstI/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 AflIII/BsaHI 雙水解為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。

每個 DNA 受質皆會進行獨立三次 DNA 受質轉型作用，並且挑取超過 50 個菌落抽取 DNA 並且以限制酶酵素分析 50 個 DNA，判讀校正效能以及 strand loss 的情形，並且計算平均值與標準差。如表十所示，以大腸桿菌 NM522 測試含有 nick 的 nCC0 受質，結果為 65.3% 成功黏合 nick，其背景值包含 22% 為 primer strand loss、12.6% 為 template strand loss。

3.10 含有 C:C 錯誤配對之 nick 受質於細菌體內聚合酶校對試驗

nCC1 為 5'端上游存在 C:C 標誌且 3'端有 nick 且於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick DNA，以 100ng 進行轉型作用至大腸桿菌 NM522(*polA*⁺ WT) 及 KA796^{D424A} (*polA*exo D424A mutation)之勝任細胞。經由 BsaHI 搭配 AflIII、PstI 或 NcoI 兩種酵素進行反應以分析結果。nCC1(2890bps)，以 BsaHI(2512)與 AflIII(664)、PstI(663)及 NcoI(679)進行反應。如圖九 A 所示，經過 agarose 電泳結果，若受質在細菌體內成功將 C:C 錯配校對也將 nick 黏合，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 PstI 為部分水解，NcoI 為不水解，若受質在細菌體內未將 C:C 錯配校對就將 nick 黏合，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 PstI 為部分水解，NcoI 之結果也為部分水解。若發生 primer strand loss，則會出現 AflIII 但 PstI 仍保留，結果為 AflIII/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 PstI/BsaHI 雙水解為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。若發生 template strand loss 則會出現 PstI 切位序列遺失但 AflIII 仍保留，



結果為 PstI/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 AflIII/BsaHI 雙水解為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。

每個 DNA 受質皆會進行獨立三次 DNA 受質轉型作用，並且挑取超過 50 個菌落抽取 DNA 並且以限制酶酵素分析 50 個 DNA，判讀校正效能以及 strand loss 的情形，並且計算平均值與標準差。以大腸桿菌 NM522 測試含有 nick 的 nCC1 受質，如表十一所示，結果為 74% 的錯誤配對被成功校對修復，2% 無進行修復，其背景值包含 16% 為 primer strand loss、8% 為 template strand loss。如表十二所示，以 KA796^{D424A} 測試 nCC1 受質，有 64% 的錯誤配對被校對修復，未觀察到無修復結果，背景值包含 16% 為 primer strand loss、20% 為 template strand loss。

nCC3 為 5' 端上游存在 C:C 標誌且 3' 端有 nick 且於倒數第三個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick DNA，以 100ng 進行轉型作用至大腸桿菌 NM522(*polA*⁺ WT) 及 KA796^{D424A} (*polA*_{exo} D424A mutation) 之勝任細胞。經由 BsaHI 搭配 AflIII、PstI 兩種酵素進行反應以分析結果。nCC3(2890bps)，以 BsaHI(2512) 與 AflIII(664)、PstI(663) 進行反應。如圖九 B 所示，經過 agarose 電泳結果，若受質在細菌體內成功將 C:C 錯配校對也將 nick 黏合，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 PstI 為部分水解，BsaHI 為只有 2.9Kb 之片段，若受質在細菌體內未將 C:C 錯配校對就將 nick 黏合，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 PstI 為部分水解，BsaHI 之結果為產生 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 片段。若發生 primer strand loss，則會出現 AflIII 但 PstI 仍保留，結果為 AflIII/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 PstI/BsaHI 雙水解為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。若發生 template strand loss 則會出現 PstI 切位序列遺失但 AflIII 仍保留，結果為 PstI/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 AflIII/BsaHI 雙水解為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。


每個 DNA 受質皆會進行獨立三次 DNA 受質轉型作用，並且挑取超過 50 個菌落抽取 DNA 並且以限制酶酵素分析 50 個 DNA，判讀校正效能以及 strand loss 的情形，並且計算平均值與標準差。以大腸桿菌 NM522 測試含有 nick 的 nCC3

受質，如表十三所示，結果為 56.6% 的錯誤配對被成功校對修復，8% 無進行修復，其背景值包含 18% 為 primer strand loss、17.3% 為 template strand loss。如表十四所示，以 KA796^{D424A} 測試 nCC3 受質，有 27.3% 的錯誤配對被校對修復，19.3% 無進行修復，背景值包含 27.3% 為 primer strand loss、22.6% 為 template strand loss 及 3.3% 為 aberration。

nCC4 為 5' 端上游存在 C:C 標誌且 3' 端有 nick 且於倒數第四個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick DNA，以 100ng 進行轉型作用至大腸桿菌 NM522(*polA*⁺ WT) 勝任細胞。經由 BsaHI 搭配 AflIII、PstI 及 SacII 兩種酵素進行反應以分析結果。nCC4(2890bps)，以 BsaHI(2512) 與 AflIII(664)、PstI(663) 及 SacII(674) 進行反應。如圖九 C 所示，經過 agarose 電泳結果，若受質在細菌體內成功將 C:C 錯配校對也將 nick 黏合，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 PstI 為部分水解，SacII 為完全水解，若受質在細菌體內未將 C:C 錯配校對就將 nick 黏合，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 PstI 為部分水解，SacII 為部分水解。若發生 primer strand loss，則會出現 AflIII 但 PstI 仍保留，結果為 AflIII/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 PstI/BsaHI 雙水解為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。若發生 template strand loss 則會出現 PstI 切位序列遺失但 AflIII 仍保留，結果為 PstI/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 AflIII/BsaHI 雙水解為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。

表十五所示，nCC4 於大腸桿菌 NM522 中，未觀察到校對修復結果，70% 無進行修復，其背景值包含 18% 為 primer strand loss、12% 為 template strand loss。

nCC2 為 5' 端上游存在 C:C 標誌且 3' 端有 nick 且於倒數第二個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick DNA，以 100ng 進行轉型作用至大腸桿菌 NM522(*polA*⁺ WT) 之勝任細胞。經由 BsaHI 搭配 AflIII、PstI 及 SacII 兩種酵素進行反應以分析結果。nCC2(2890bps)，以 BsaHI(2512) 與 AflIII(664)、PstI(663) 及 PspOMI(675) 進行反應產生。如圖九 D 所示，經過 agarose 電泳結果，若受質在細菌體內成功將 C:C 錯配校對也將 nick 黏合，則當作為 C:C 標誌的 AflIII 與 PstI 為部分水解，



PspOMI 無法水解，若受質在細菌體內未將 C:C 錯配校對就將 nick 黏合，則當作為 C:C 標誌的 AflII 與 PstI 為部分水解，PspOMI 為部分水解。若發生 primer strand loss，則會出現 AflII 但 PstI 仍保留，結果為 AflII/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 PstI/BsaHI 雙水解為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。若發生 template strand loss 則會出現 PstI 切位序列遺失但 AflII 仍保留，結果為 PstI/BsaHI 雙水解只有 2.9Kb 之片段，而 AflIII/BsaHI 雙水解為 1.8Kb 與 1.1Kb 之兩片段。

如表十六所示，nCC2 於大腸桿菌 NM522 中，有 64% 的錯誤配對被成功校對修復，未觀察到無修復結果，其背景值包含 18% 為 primer strand loss、18% 為 template strand loss。

第四章 討論



4.1 含有 G:T 錯誤配對之 gap 受質

先前本實驗室研究成果中，使用 MALDI-TOF MS 方法進行 DNA 聚合酶校對活性試驗，以第一型 DNA 聚合酶的 Klenow fragment 與錯誤配對之寡核苷酸反應，結果顯示當錯誤配對發生距離 3'端 1 至 4 個核苷酸位置時可被校對，而發生距離 3'端超過 6 個核苷酸位置時則無法被校對(Chang et al., 2020)。實驗室先前以 phagemid 進行的生物體內核酸修復試驗反應中，得知可以利用轉型作用將含有特定 DNA 損傷或錯誤的質體送入細菌體內進行反應，且可使用 C:C 標誌作為 DNA 是否有其中一股的遺失。(Su et al., 2018)。本實驗設計的錯誤配對受質也是以 phagemid 作為載體，在 5'端上游有 C:C 標誌，3'端有錯誤配對，及三個核苷酸 gap 以模擬試管內 Klenow fragment 與錯誤配對之寡核苷酸反應，以測試第一型 DNA 聚合酶在細胞體內對於錯誤配對之偵測、移除及填補空隙反應。

以 MM0(無錯誤配對有 3 個核苷酸 gap)作為轉型作用之控制組，於大腸桿菌 KA796(*polA*⁺)及 KA796^{D424A}(*polA*exo D424A mutation)中其 gap filling 之比率為 KA796(65.33%)及 KA796^{D424A}(50.67%)，皆超過 50%有相當的校對活性，也在 KA796 中觀察到 13.33%的 primer strand loss 比 8.67%的 template strand loss 高，而在 KA796^{D424A} 中，24.67%的 primer strand loss 也比 18%的 template strand loss 高。然而，也觀察到在 KA796(*polA*⁺)中出現 12.67%以及 KA796^{D424A}(6.67%)的 aberration 結果，其為於 PstI/BsaHI 結果部分水解，懷疑可能為填補錯誤亦或是未進行填補由 DNA 連接酶直接黏合(Kamble et al., 2021)導致 PstI 切位序列之缺失造成。

在 MM1(3'端倒數第一個核苷酸 G:T 錯誤配對有 3 個核苷酸 gap)的結果未修復比率於大腸桿菌 KA796^{D424A}(30%)比 MM1 KA796(13.33%)高出 16.67%，和 MM1 於 KA796 校對修復比率為 55.33%，於 KA796^{D424A} 校對修復比率為 49.33%




只有降低 6%，此結果無顯著差異，懷疑為 MMR system 所干擾，因此後續將 G:T 錯配換成 C:C 錯配，以降低 MMR system 影響。

4.2 含有 C:C 錯誤配對之 gap 受質

CC1(3'端倒數第一個核苷酸 C:C 錯誤配對有 3 個核苷酸 gap)於 NM522(*polA*⁺ WT)中其校對修復比率為 51.33%與 KA796^{D424A}(44%)無顯著差異($p=0.234$)，KA796(52.67%)與 KA796^{D424A}(44%)也無顯著差異($p=0.239$)，其原因可能為其他具有校對活性的 DNA 聚合酶如 pol II 或 pol III 之干擾，尤其在進行轉型作用後若引起 SOS 反應，Pol II 之分子數量會上升七倍造成顯著干擾。而在 NM522 strand loss 之背景值(47.34%)，KA796(47.34%)，KA796^{D424A}(56%)，皆比 MM1 於 KA796(31.33%)，KA796^{D424A}(20.67%)還要高。由於較高的背景值與其他 DNA 聚合酶之干擾，因此無法觀察出其校對活性之顯著差異。在 NM522 中未修復結果比率只有(1.33%)，而於 KA796 與 KA796^{D424A} 中未能觀察到未修復結果可能為 C:C 之錯誤配對之結構相當不穩定(Tikhomirova et al., 2006)不利於 DNA 聚合酶作用，導致其停滯在受質上，又因此受質包含 3 個核苷酸 gap，暴露之單股 DNA 容易成為其他核酸酶或蛋白之作用對象，從而無法完成 gap filling，造成了更多 strand loss 之背景值。而目前已知大腸桿菌內只有第一型 DNA 聚合酶能進行 nick translation(Mathew, 1985)，因此後續將 gap 之受質重新設計成 nick 之受質，以降低除了第一型 DNA 聚合酶之干擾，以及降低若因 DNA 聚合酶停滯而長時間暴露之單股可能造成之 strand loss。

4.3 含有 C:C 錯誤配對之 nick 受質

nCC0(無錯誤配對有 nick)作為轉型作用之控制組於 NM522 中，有 65.33%成功黏合 nick，其背景值為 34.67%與 MM0 於 KA796(34.67%)中相同，證明以無錯誤配對之受質進行轉型作用有一定穩定之背景值，而第一型 DNA 聚合酶會進行 nick translation，因此也如預期所想 primer strand loss(22%)比 template strand loss(12.67%)高。



nCC1 於 NM522 中，有 24% 的 strand loss 與 nCC0(34.67%) 相比有較低之背景值，而在 KA796^{D424A} 為 36%，但目前尚無 KA796^{D424A} 之 nCC0 數據做為背景值之比較。nCC1 於 NM522 有 74% 的錯誤配對被成功校對修復，於 KA796^{D424A} 中，有 64% 的錯誤配對被校對修復，修復比率下降 10%($p=0.018$)。於 NM522 中，2% 無進行修復，於 KA796^{D424A} 中，未觀察到無修復結果可能仍是 C:C 之錯誤配對於末端不利於 DNA 連接酶作用(Caglayan, 2020)，因此本應降低之修復比率 10% 未如期以無修復比率上升呈現，而可能是 primer strand loss 與背景值混雜一起。從 nCC1(74%) 結果與 CC1(51.33%) 相比發現修復比率顯著上升($p=0.0006$)，去除了其他 DNA 聚合酶之干擾，也降低 mismatch repair system 影響，而背景值 nCC1(24%) 與 CC1(47.33%) 相比也顯著下降($p=0.009$)，但仍因 C:C 結構不利於 DNA 連接酶作用，只有少數的無修復結果。而在 template strand loss 結果中，由於 NcoI 序列設計位於 primer strand 應繼續存在，但其結果都隨著 template strand loss 而遺失，推測其因為已被第一型 DNA 聚合酶校對修復，但後續因其他原因而遺失 template strand 所導致，而會發生此現象可能為 template strand 是由 helper phage 所製造，因此其 GATC 之序列上無進行甲基化，因此若再複製過後若產生錯誤就會受到 MMR 影響，GATC 無甲基化之股受到 MutH 切出缺口而導致其遺失。

nCC4 於 NM522 中，其背景值為 30%，與 nCC0(34.67%) 無太大差異，但是未觀測到修復結果，且都為未修復結果，因仍未進行三重複實驗，懷疑是其 nick 直接被 DNA 連接酶所黏合，DNA 聚合酶無法進行校對修復，因此後續 nick 受質都會經由 Quick CIP 移除位於 5' 端之磷酸，使 DNA 連接酶無法先行作用。

nCC3 於 NM522 中，有 35.33% 之 strand loss 背景值與 nCC0(34.67%) 無顯著差異($p=0.43$)，nCC3 在 NM522 中有 56.67% 的錯誤配對被成功校對修復，於 KA796^{D424A} 中，有 27.33% 的錯誤配對被校對修復，修復比率在 KA796^{D424A} 下降 29.34% 有顯著差異($p=0.0006$)，也於未修復比率中觀察到 KA796^{D424A} 19.33% 比



NM522 8% 高出 11.33%，於 nCC3 能夠觀察到較明顯的未修復比率上升可能為 C:C 不在於末端，可能對於 DNA 連接酶較無影響。


nCC2 於大腸桿菌 NM522 中，其背景值為 36% 與 nCC0(34.67%) 相比無太大差異，有 64% 的錯誤配對被成功修復，未觀察到無修復結果。根據先前研究 C:C 之錯誤配對由於配對之熱動力極不穩定，會影響其附近 7 至 9 個核苷酸之配對穩定(Tikhomirova et al., 2006)，本研究結果發現，其配對不穩定對 DNA 連接酶之影響，於 NM522 結果 nCC1(2%)、nCC2(0%) 都會造成 DNA 連接酶無法有效將 nick 黏合因此無未修復結果，於 nCC3 才有較多未修復結果(8%)。

在與大腸桿菌 NM522 的 nCC1、nCC3 數據相比發現其修復比率從 nCC1(74%)、nCC2(64%)、nCC3(56.67%) 呈現逐漸下降趨勢，而在 nCC3 數據才有較明顯之未修復結果，發現 C:C 之結構可能須與 3' 末端距離超過兩個核苷酸才能避免影響 DNA 連接酶之黏合，但 nCC2 之數據並未進行三重複試驗，因此此結果仍需進行後續實驗證明。

此外先前實驗室之體外試驗結果，位於 3' 端 1 至 4 個核苷酸之錯誤配對皆可被 Klenow fragment 完全校對，但於本研究結果則顯示出第一型 DNA 聚合酶於 1 至 3 個核苷酸之錯誤配對校對活性會逐漸下降。而體內與體外試驗結果不同其原因為：1. 在細菌體內為完整之第一型 DNA 聚合酶，其 5' 端往 3' 端之核酸外切酶活性會進行 nick translation 而導致 primer strand loss，2. 錯誤配對結構於 DNA 連接酶之活性也會影響結果，3. C:C 錯誤配對會影響其周圍配對之穩定性可能也會造成 primer loss，4. 雖然以 C:C 錯誤配對降低了 MMR 之影響，但因 template strand 之 GATC 序列無甲基化仍較容易成為 MMR 之標的。

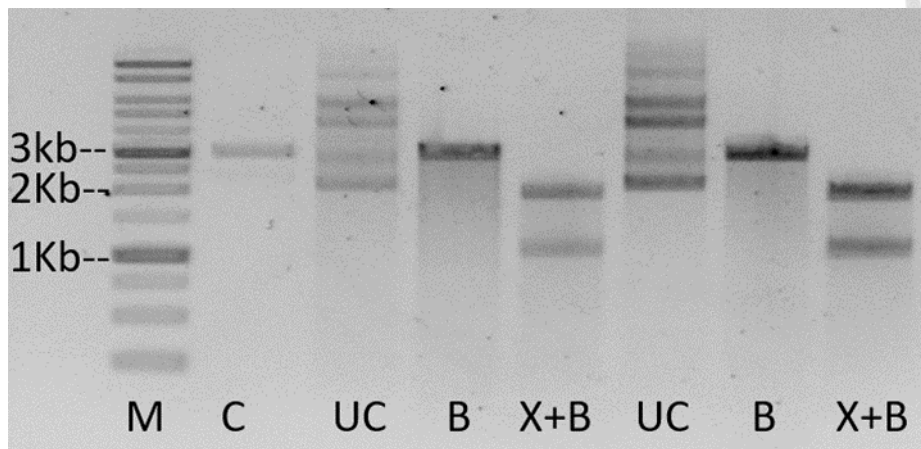
4.4 錯誤配對受質於大腸桿菌體內試驗方法之建立

本研究方法是將每個 DNA 受質進行獨立三次 DNA 受質轉型作用，並且挑取超過 50 個菌落抽取 DNA 並且以限制酶酵素分析 50 個 DNA，判讀校正效能以及 strand loss 的情形，並且計算平均值與標準差。而挑取超過 50 個菌落是因為質體



於細菌體內之不確定性，多取以備用。G:T 錯誤配對(55.3%)改為 C:C 錯誤配對(52.6%)之受質於 KA796 結果發現其校對活性無顯著差異，與先前實驗室 G:T 與 C:C 錯誤配對於 3'端倒數第二位置校對初速率無顯著差異結果相符，無錯誤配對與含 C:C 錯誤配對於不同位置之 nick 結果顯示，此受質轉型至大腸桿菌中可有穩定之背景值(30%至 36%)，實驗也觀察到 aberrant 結果，可能為受質進行轉型作用引起 SOS 反應使 DNA polymerase I 增加(Lackey et al., 1985)，因其在複製過程中較容易插入錯誤核苷酸造成，後續會透過改善轉型作用之條件以降低 SOS 反應。透過 KA796 與 KA796^{D424A} 之結果比對發現，無 3'→5'核酸外切酶活性菌株 KA796^{D424A} 其校對比率下降，但仍有校對成功結果懷疑為 proofreading in trans 影響(Albertson & Preston, 2006)，為 KA796^{D424A} 內其他具有核酸外切酶活性蛋白與第一型 DNA 聚合酶進行校對反應，所以 KA796 與 KA796^{D424A} 之校對活性比對因無法排除 proofreading in trans 之干擾，需後續實驗進行改善。最後，研究結果發現校對活性於 NM522 之常用野生菌株有下降趨勢之結果(nCC1(74%)、nCC2(64%)、nCC3(56.67%))，因此後續可透過此方法完成錯誤配距離 3'端 5 至 9 個核苷酸位置並使用於野生型菌株 NM522 進行後續研究生物體內第一型 DNA 聚合酶校對錯誤配對與否於 3'端距離之臨界點與試管試驗結果是否相符。

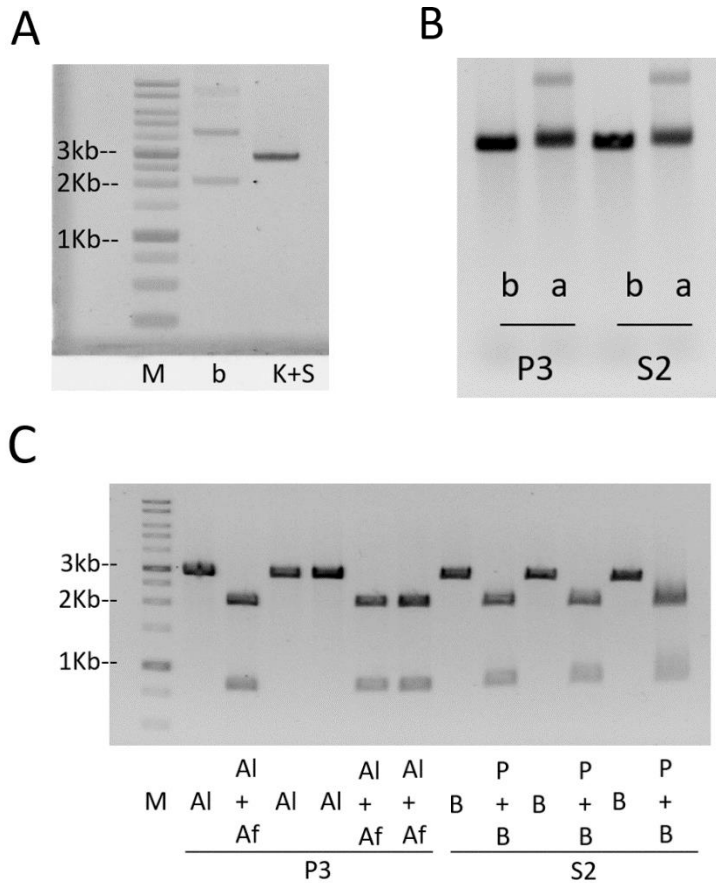
圖表



圖一:質體 pBSK 之製備

將由 alkaline lysis 大量抽出之 pBSK 質體以限制酶進行確認。使用 XhoI 以及 BsaHI 水解質體，由單獨使用 BsaHI 進行水解後的 DNA 片段大小約為 2.9Kb，與 pBSK control 相同大小，再以 XhoI 與 BsaHI 進行水解後確認產物分別約為 1.8Kb 以及 1.1Kb 之片段。

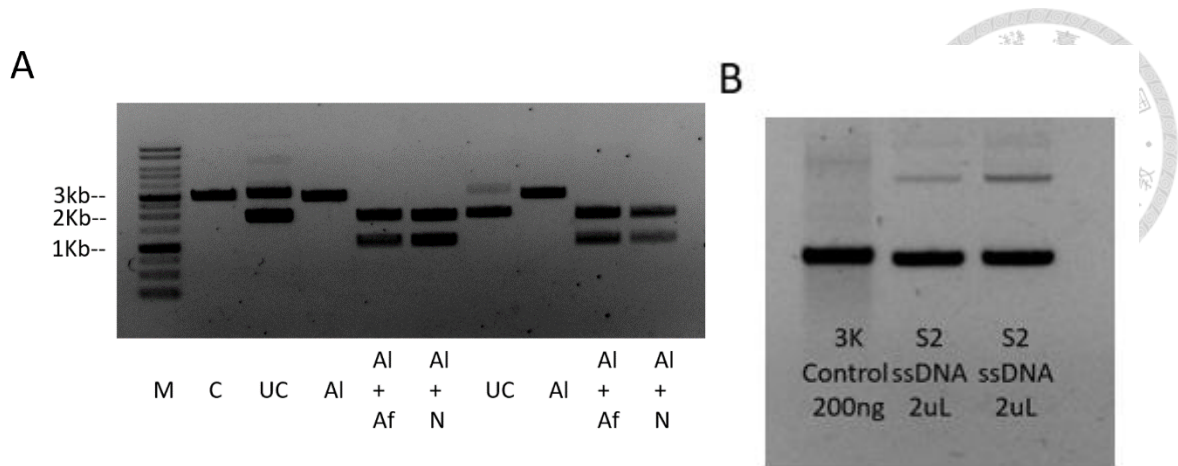
(M:marker, C:pBSK control, UC:uncut, B:BsaHI, X:XhoI)



圖二:primer strand DNA 及 template strand DNA 之建構

A.使用 KpnI 及 SacI 將 pBSK 質體水解成線狀。B.插入 P3 及 S2 人工合成寡核苷酸並使用 T4 DNA ligase 黏合，通過電泳確認產物。C.將建構之質體送入細菌體內，抽出後 primer strand DNA 之 P3 質體使用 AlwNI 及 AflII 確認，template strand DNA 之 S2 質體使用 BsaHI 及 PstI 確認。

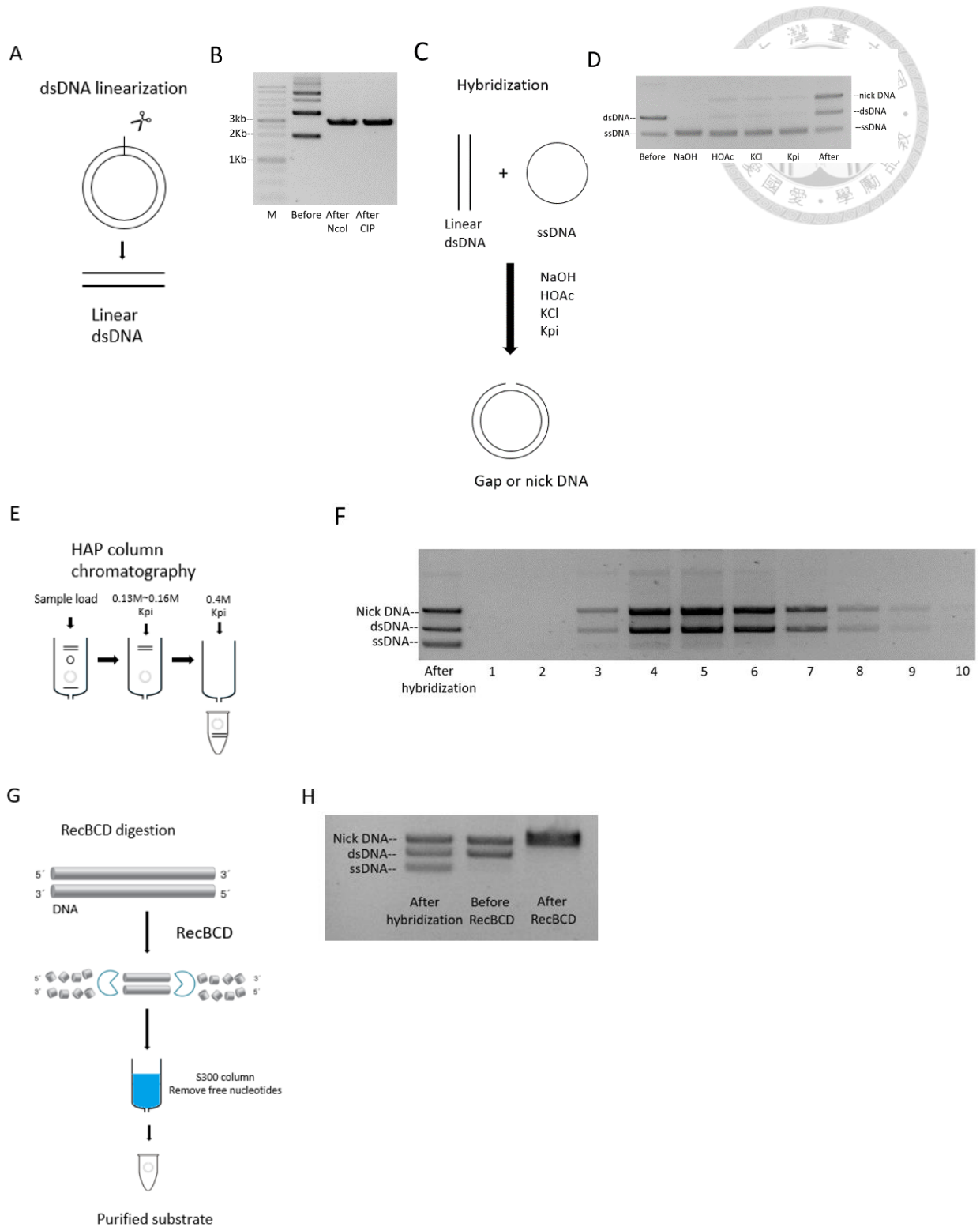
(M:marker, b:before digestion or ligation reaction, a:after ligation reaction, K:KpnI, S:SacI, Al:AlwNI, Af:AflII, B:BsaHI, P:PstI)



圖三:大量製備雙股 primer strand DNA 與製備環狀單股 template strand DNA

A.將 primer strand DNA 之 P3 質體送入細菌內大量培養後，大量抽出質體以單獨用 AlwNI 水解與 200ng control 相比確認濃度，並與用 AlwNI 與 AflIII 及 NcoI 搭配確認酵素切位。B.將 S2 質體以 M13KO7 的 helper phage 製備成單股環狀 DNA，經由電泳以 200ng 3K control 確認濃度。

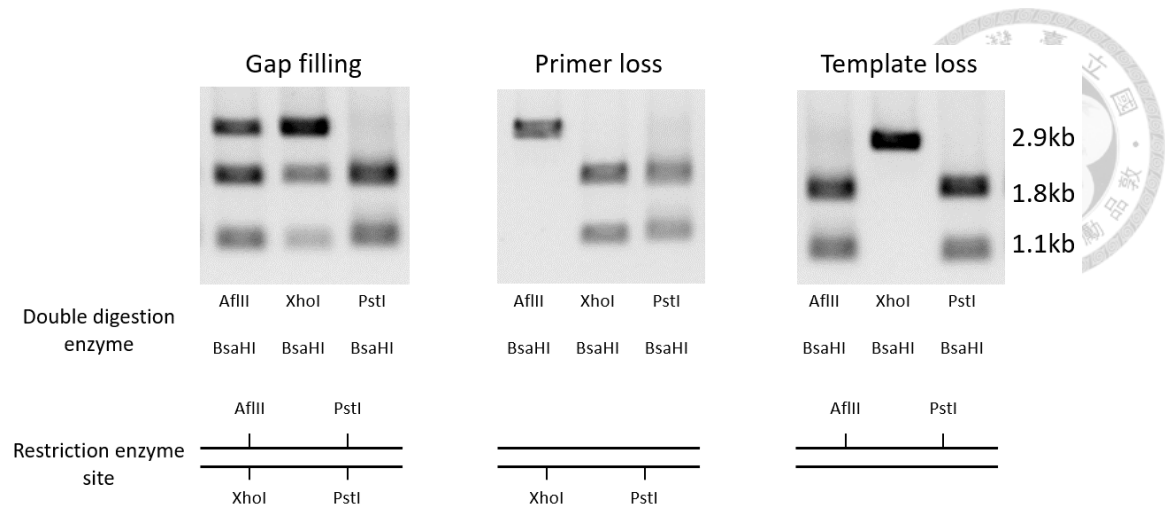
(M:marker, C:200 ng control, UC:uncut, AI:AlwNI, Af:AflIII, N:NcoI)



圖四:具錯誤配對之受質製備

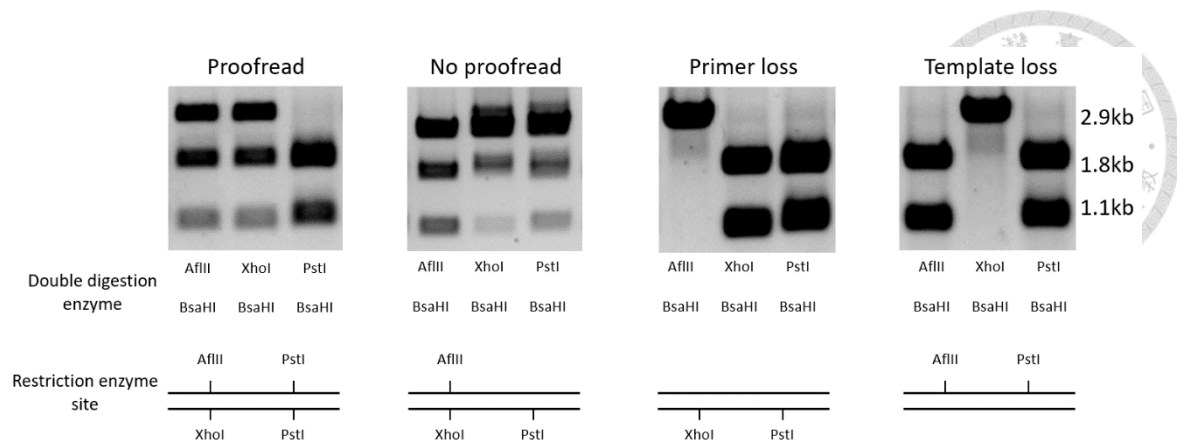
A.使用 NcoI 將 primer strand DNA 水解成線狀，並使用 Quick CIP 去除 5'端磷酸根 B.Primer strand DNA 水解成線狀電泳結果 C.將線狀 primer strand DNA 與環狀單股 template strand DNA 進行雜交反應 D.雜交反應電泳結果由左至右為反應前、

加入 10N NaOH、2.9N HOAc、3M KCl、1M Kpi 與反應後。E.將雜交反應產物以
氫氧磷石灰層析法將單股 DNA 與雙股 DNA 分離。F.經由電泳結果將有雙股
DNA 之溶液收集並進行透析。G.使用 RecBCD 將雙股線狀 DNA 水解。H.經由電
泳結果確認雙股線狀 DNA 與單股 DNA 皆以去除，只剩餘 gap 或 nick DNA 之受
質。



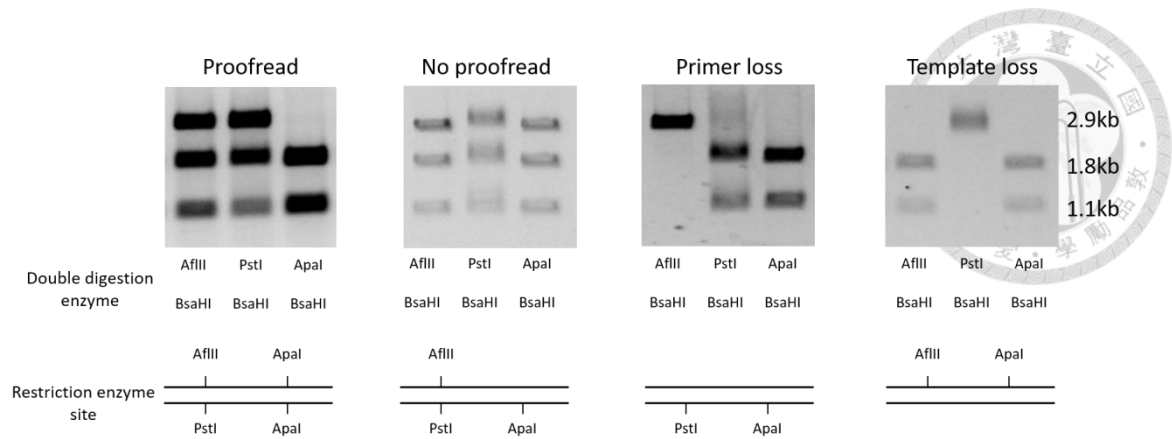
圖五:含有 gap 受質於細菌體內轉型作用效率

受質 MM0 結果，gap filling 之受質由 AflII 與 BsaHI、XhoI 與 BsaHI 作用後為部分水解有 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 三個片段，於 PstI 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段；primer loss 於 AflII 與 BsaHI 只有因 BsaHI 水解產生 2.9Kb 片段，於 XhoI 與 BsaHI、PstI 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段；template loss 於 XhoI 與 BsaHI 只有因 BsaHI 水解產生 2.9Kb 片段，於 AflII 與 BsaHI、PstI 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。



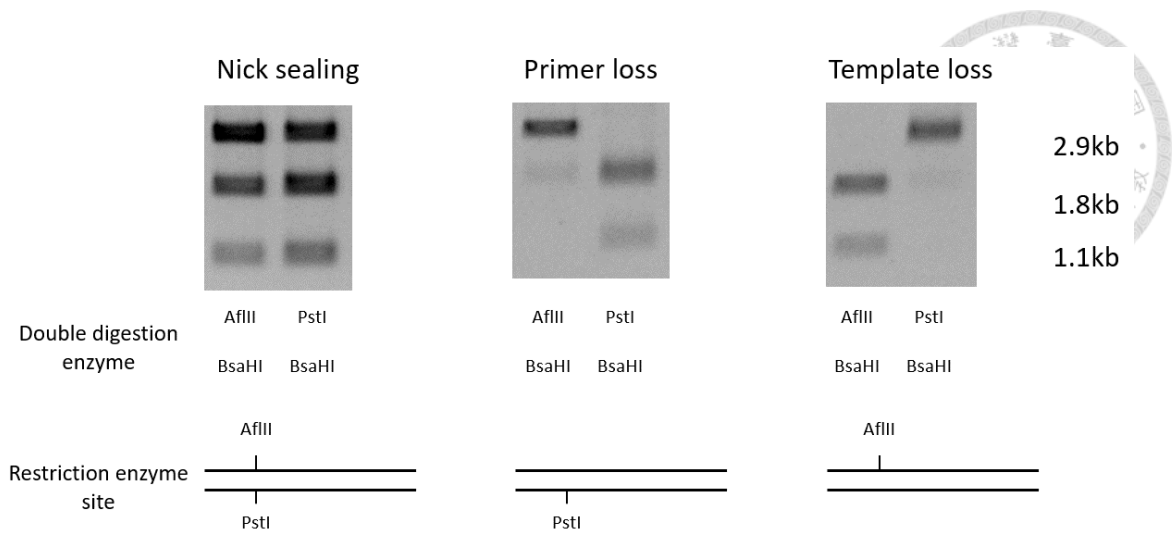
圖六:含有 G:T 錯誤配對之 gap 受質於細菌體內聚合酶校對試驗

受質 MM1 結果，Proofreading 之受質由 AflIII 與 BsaHI、XhoI 與 BsaHI 作用後為部分水解有 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 三個片段，於 PstI 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。No proofreading 於 AflIII 與 BsaHI、XhoI 與 BsaHI 及 PstI 與 BsaHI 皆為部分水解有 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 三個片段。Primer loss 於 AflIII 與 BsaHI 只有因 BsaHI 水解產生 2.9Kb 片段，於 XhoI 與 BsaHI、PstI 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。Template loss 於 XhoI 與 BsaHI 只有因 BsaHI 水解產生 2.9Kb 片段，於 AflIII 與 BsaHI、PstI 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。



圖七:含有 C:C 錯誤配對之 gap 受質於細菌體內聚合酶校對試驗

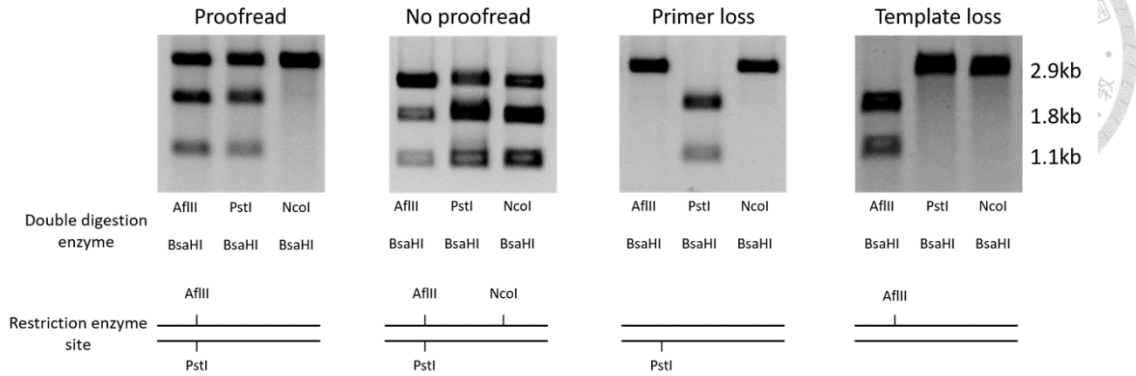
受質 CC1 結果，Proofreading 之受質由 AflIII 與 BsaHI、PstI 與 BsaHI 作用後為部分水解有 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 三個片段，於 ApaI 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。No proofreading 於 AflIII 與 BsaHI、PstI 與 BsaHI 及 ApaI 與 BsaHI 皆為部分水解有 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 三個片段。Primer loss 於 AflIII 與 BsaHI 只有因 BsaHI 水解產生 2.9Kb 片段，於 PstI 與 BsaHI、ApaI 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。Template loss 於 PstI 與 BsaHI 只有因 BsaHI 水解產生 2.9Kb 片段，於 AflIII 與 BsaHI、ApaI 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。



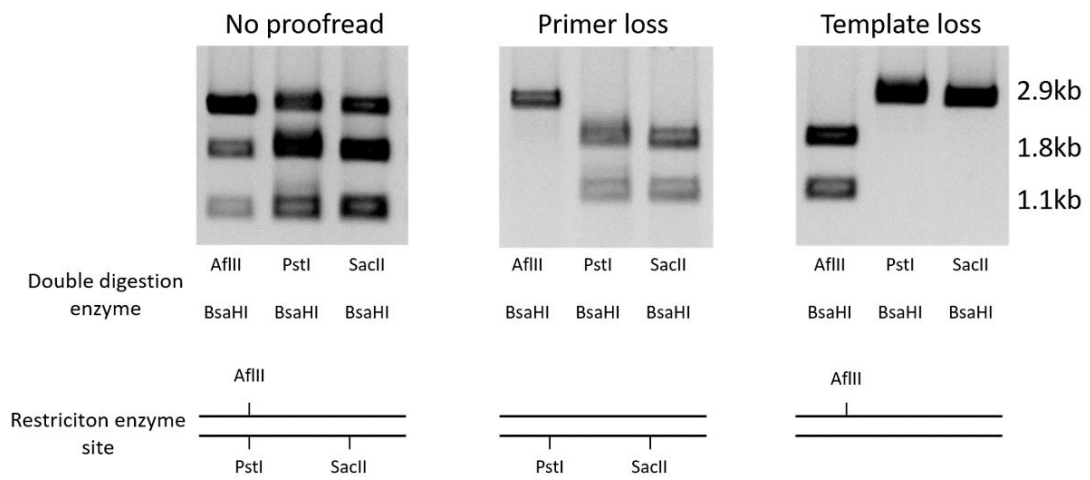
圖八:含有 nick 受質於細菌體內轉型作用效率

受質 nCC0 結果，成功將 nick 黏合之受質由 AflIII 與 BsaHI、PstI 與 BsaHI 作用後為部分水解有 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 三個片段。Primer loss 於 AflIII 與 BsaHI 只有因 BsaHI 水解產生 2.9Kb 片段，於 PstI 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。Template loss 於 PstI 與 BsaHI 只有因 BsaHI 水解產生 2.9Kb 片段，於 AflIII 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。

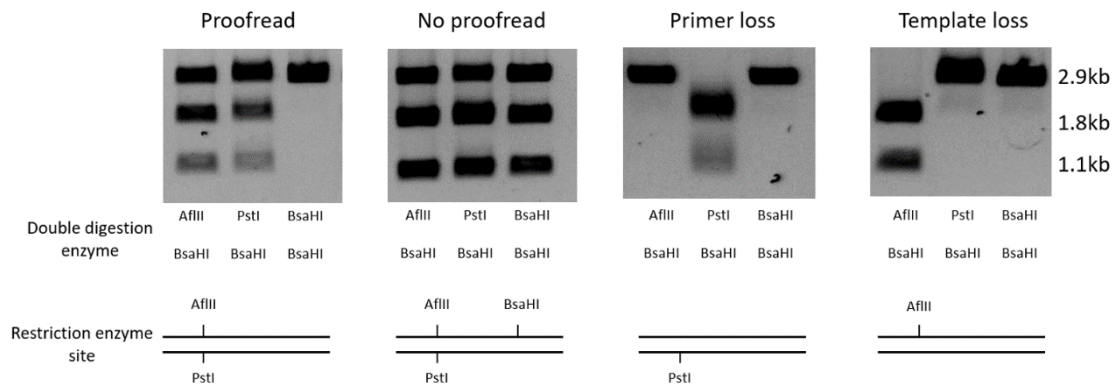
A.nCC1



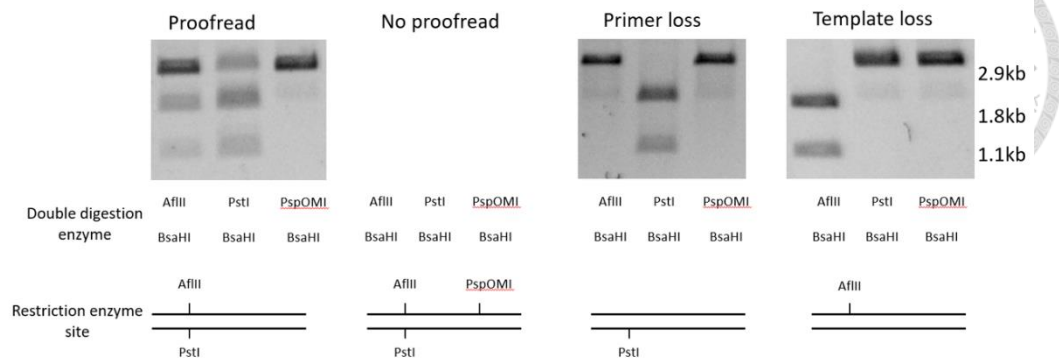
B.nCC4



C. nCC3



D.nCC2




圖九:含有 C:C 錯誤配對之 nick 受質於細菌體內聚合酶校對試驗

A. 受質 nCC1 結果，Proofreading 之受質由 AflIII 與 BsaHI、PstI 與 BsaHI 作用後為部分水解有 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 三個片段，於 NcoI 與 BsaHI 只有因 BsaHI 水解產生 2.9Kb 片段。No proofreading 於 AflIII 與 BsaHI、PstI 與 BsaHI 及 NcoI 與 BsaHI 皆為部分水解有 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 三個片段。Primer loss 於 AflIII 與 BsaHI、NcoI 與 BsaHI 只有因 BsaHI 水解產生 2.9Kb 片段，於 PstI 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。Template loss 於 PstI 與 BsaHI、NcoI 與 BsaHI 只有因 BsaHI 水解產生 2.9Kb 片段，於 AflIII 與 BsaHI 為完全水解只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。

B. 受質 nCC4 結果，No proofreading 限制酶水解皆有 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 三個片段。Primer loss 於 AflIII 與 BsaHI 只有 2.9Kb 片段，於 PstI 與 BsaHI、SacII 與 BsaHI 只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。Template loss 於 PstI 與 BsaHI、SacII 與 BsaHI 只有 2.9Kb 片段，於 AflIII 與 BsaHI 只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。

C. 受質 nCC3 結果，Proofreading 之受質於 AflIII 與 BsaHI、PstI 與 BsaHI 有 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 三個片段，於單獨使用 BsaHI 只產生 2.9Kb 片段。No proofreading 於限制酶水解皆有 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 三個片段。Primer loss 於 AflIII 與 BsaHI 及單獨使用 BsaHI 只有 2.9Kb 片段，於 PstI 與 BsaHI 只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。Template loss 於 PstI 與 BsaHI 及單獨使用 BsaHI 只有 2.9Kb 片段，於 AflIII 與 BsaHI 只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。



D.受質 nCC2 結果，Proofreading 之受質於 AflIII 與 BsaHI、PstI 與 BsaHI 有 2.9Kb、1.8Kb 及 1.1Kb 三個片段，於 PspOMI 與 BsaHI 只有 2.9Kb 片段。Primer loss 於 AflIII 與 BsaHI、及 PspOMI 與 BsaHI 只有 2.9Kb 片段，於 PstI 與 BsaHI 只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。Template loss 於 PstI 與 BsaHI、PspOMI 與 BsaHI 只有 2.9Kb 片段，於 AflIII 與 BsaHI 只有 1.8Kb 及 1.1Kb 片段。



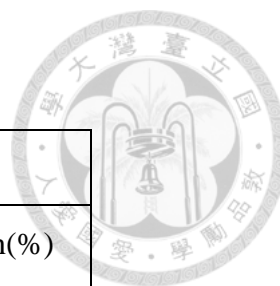
表一:建構合成受質使用之 DNA

DNA	序列	
MM0	5' TCGACCTCGACTTAAGTCGAGAATTTCTAGACCACTGCAGTGGC---- 3' 3' ----GGAGCTGAATTCAGCTCTTAAAGATCTGGTGACGTCACCGTTAA 5'	AflII/BstXI /PstI
MM1	5' TCGACCTCGACTTAAGTCGAGAATTTCTAGACCACTGCGGTGGC---- 3' 3' ----GGAGCTGAATTCAGCTCTTAAAGATCTGGTGACGCCACCGTTAA 5'	AflII/BstXI
Sm1-9-	5' TCGACCTCGAGTTAAGTCGAGAATTTCTAGACCACTGCAGTGGTGGC---- 3' 3' ----GGAGCTCAATTCAGCTCTTAAAGATCTGGTGACGTCACCACCGTTAA 5'	XhoI/PstI
P1	5' ----ACTGCACTTAAGGCCGCGGGGCCATGGAGCT 3' 3' CATGTGACGTGAATTCGGCGCCCCGGTACC---- 5'	AflII/NcoI
T1	5' ----ACTGCAGTTAAGGCCGCGGGGCCCATGGAGCT 3' 3' CATGTGACGTCAATTCGGCGCCCCGGGTACC---- 5	PstI/ApaI
P0	5' ----ACTGCACTTAAGGCCGCGGGGGTACCAGCT 3' 3' CATGTGACGTGAATTCGGCGCCCCCATGG---- 3'	AflII/Acc65 I
S0	5' ----ACTGCAGTTAAGGCCGCGGGGGTACCAGCT 3' 3' CATGTGACGTCAATTCGGCGCCCCCATGG---- 5'	PstI/SacII
S1	5' ----ACTGCAGTTAAGGCCGCGGGGGCATGGAGCT 3' 3' CATGTGACGTCAATTCGGCGCCCCGTACC---- 5'	PstI
P3	5' ----ACTGCACTTAAGGCCGCGGGGCCATGGAGCT 3' 3' CATGTGACGTGAATTCGGCGCCCGGTACC---- 5	AflII/NcoI/ BsaHI
S2	5' ----ACTGCAGTTAAGGCCGCGGGGGCATGGAGCT 3' 3' CATGTGACGTCAATTCGGCGCCCCGTACC---- 5'	PstI
P4	5' ----ACTGCACTTAAGGCCGCGGGGGTACCAGCT 3' 3' CATGTGACGTGAATTCGGCGCCCCCATGG---- 5	AflII/Acc65 I

表二:細菌體內校對活性試驗之受質



受質	序列	判讀結果之限制酶
MM0	5' TCGACCTCGACTTAAGTCGAGAATTTCTAGACCA CTGCA ---GTGGC---- 3' 3' ----GGAGCTCAATTCAGCTCTTAAAGATCTGGT GACGTC ACCACCGTTAA 5'	AflIII/XhoI/ PstI
MM1	5' TCGACCTCGACTTAAGTCGAGAATTTCTAGACCA CTGCG ----GTGGC---- 3' 3' ----GGAGCTCAATTCAGCTCTTAAAGATCTGGT GACGTC ACCACCGTTAA 5'	AflIII/XhoI/ PstI
CC1	5' ----ACTGCACTTAAGCCGCGGG GGC ---CATGGAGCT 3' 3' CATGT GACGTC CAATTCGGGCGCC CCCCGGG TACC---- 5'	AflIII/PstI/ ApaI
nCC0	5' ----ACTGCACTTAAGCCGCGGGGG' GTACCAGCT 3' 3' CATGT GACGTC CAATTCGGGCGCCCC CATGG---- 5'	AflIII/PstI
nCC1	5' ----ACTGCACTTAAGCCGCGGGGG' CATGG AGCT 3' 3' CATGT GACGTC CAATTCGGGCGCCCC GTACC ---- 5'	AflIII/PstI/ NcoI
nCC3	5' ----ACTGCACTTAAGCCGCGGG GGC ' CATGGAGCT 3' 3' CATGT GACGTC CAATTCGGGCG CCCCG ' GTACC ---- 5'	AflIII/PstI/ BsaHI
nCC4	5' ----ACTGCACTTAAG CGCGCG GGG' GTACCAGCT 3' 3' CATGT GACGTC CAATTC GGCGCCCC CATGG---- 5'	AflIII/PstI/ SacII



表三:大腸桿菌 KA796 內之 gap 受質轉型作用效率

KA796				
MM0	Gap filling(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)	Aberration(%)
	76	8	6	10
	60	14	10	16
	60	18	10	12
average	65.3	13.3	8.6	12.6
sd	7.5	4.1	1.8	2.4

MM0 於大腸桿菌 KA796 中，gap filling 平均為 65.3%，primer strand loss 平均為 13.3%，template strand loss 平均為 8.6%，aberration 平均為 12.6%。

表四:大腸桿菌 KA796^{D424A} 內之 gap 受質轉型作用效率

KA796 ^{D424A}	Gap filling(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)	Aberration(%)
	70	14	6	10
	42	28	28	2
	40	32	20	8
Average	50.6	24.6	18.0	6.6
Sd	13.6	7.7	9.0	3.3

MM0 於 KA796^{D424} 中，gap filling 平均為 50.6%， primer strand loss 平均為 24.6%， template strand loss 平均為 18.0%， aberration 平均為 6.6%。

表五:大腸桿菌 KA796 內於倒數第一個核苷酸位置為 G:T 錯誤配對之 gap 受質校對活性

KA796				
MM1	Proofreading(%)	No proofreading(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)
	56	20	10	14
	52	8	14	26
	58	12	18	12
average	55.3	13.3	14.0	17.3
sd	2.4	4.9	3.2	6.1

MM1 於大腸桿菌 KA796 中，proofreading 平均為 55.3%，no proofreading 為 13.3%，primer strand loss 平均為 14.0%，template strand loss 平均為 17.3%。

表六:大腸桿菌大腸桿菌 KA796^{D424A} 內於倒數第一個核苷酸位置為
G:T 錯誤配對之 gap 受質校對活性

KA796 ^{D424A}				
MM1	Proofreading(%)	No proofreading(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)
	50	26	6	18
	52	18	20	10
	46	46	4	4
Average	49.3	30.0	10.0	10.6
Sd	2.4	11.7	7.1	5.7

MM1 於 KA796^{D424A} 中，proofreading 平均為 49.3%，no proofreading 平均為 30.0%，primer strand loss 平均為 10.0%，template strand loss 平均為 10.6%。

表七:大腸桿菌 NM522 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 gap 受質校對活性

NM522				
CC1	Proofreading(%)	No proofreading(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)
	42	0	36	22
	52	4	30	14
	60	0	32	8
average	51.3	1.3	32.6	14.6
Sd	7.3	1.8	2.4	5.7

CC1 於大腸桿菌 NM522 中，proofreading 平均 51.3%，no proofreading 平均 1.3%，primer strand loss 平均 32.6%，template strand loss 平均 14.6%。

表八:大腸桿菌 KA796 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 gap 受質校對活性



KA796				
CC1	Proofreading(%)	No proofreading(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)
	38	0	46	16
	54	0	18	28
	66	0	10	24
average	52.6	0	24.6	22.6
Sd	11.4	0	15.4	4.9

CC1 於大腸桿菌 KA796 中，proofreading 平均 52.6%，無 no proofreading 數據，primer strand loss 平均 24.6%，template strand loss 平均 22.6%。

表九:大腸桿菌 KA796^{D424A} 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 gap 受質校對活性

KA796 ^{D424A}	Proofreading(%)	No proofreading(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)
	42	0	30	28
	32	0	30	38
	58	0	18	24
Average	44.0	0	26	30.0
Sd	10.7	0	5.6	5.8

CC1 於大腸桿菌 KA796^{D424A} 中，proofreading 平均 44.0%，無 no proofreading 數據，primer strand loss 平均 26.0%，template strand loss 平均 30.0%。



表十:大腸桿菌 NM522 之 nick 受質轉型作用效率

NM522			
nCC0	Sealing(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)
	62	24	14
	70	20	10
	64	22	14
average	65.3	22.0	12.6
sd	3.3	1.6	1.8

nCC0 於大腸桿菌 NM522 中，sealing 平均為 65.3%，primer strand loss 平均為 22.0%，template strand loss 平均為 12.6%。

表十一:大腸桿菌 NM522 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性



NM522				
nCC1	Proofreading(%)	No proofreading(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)
	70	2	22	6
	74	0	18	8
	78	4	8	10
average	74.0	2.0	16.0	8.0
sd	3.2	1.6	5.8	1.6

nCC1 於大腸桿菌 NM522 中，proofreading 平均 74.0%，no proofreading 平均 2.0%，primer strand loss 平均 16.0%，template strand loss 平均 8.0%。

表十二:大腸桿菌 KA796^{D424A} 內於倒數第一個核苷酸位置為 C:C 錯誤
配對之 nick 受質校對活性

KA796 ^{D424A}				
nCC1	Proofreading(%)	No proofreading(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)
	68	0	10	22
	64	0	22	14
	60	0	16	24
average	64.0	0	16	20.0
sd	3.2	0	4.8	4.3

nCC1 於大腸桿菌 KA796^{D424A} 中，proofreading 平均 64.0%，無 no proofreading 數據，primer strand loss 平均 16.0%，template strand loss 平均 20.0%。



表十三:大腸桿菌 NM522 內於倒數第三個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性

NM522				
nCC3	Proofreading(%)	No proofreading(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)
	58	0	18	24
	58	16	14	12
	54	8	22	16
average	56.6	8.0	18.0	17.3
sd	1.8	6.5	3.2	4.9

nCC3 於大腸桿菌 NM522 中，proofreading 平均 56.6%，no proofreading 平均 8.0%，primer strand loss 平均 18.0%，template strand loss 平均 17.3%。

表十四:大腸桿菌 KA796^{D424A} 內於倒數第三個核苷酸位置為 C:C 錯誤
配對之 nick 受質校對活性

KA796 ^{D424A}	Proofreading(%)	No proofreading(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)	Aberration (%)
	24	14	38	18	6
	24	16	24	36	0
	34	28	20	14	4
average	27.3	19.3	27.3	22.6	3
sd	4.7	6.1	7.7	9.5	2.4

nCC3 於大腸桿菌 KA796^{D424} 中，proofreading 平均 27.3%，no proofreading 平均為 19.3%，primer strand loss 平均 27.3%，template strand loss 平均 22.6%，aberration 平均為 3.3%。

表十五:大腸桿菌 NM522 內於倒數第四個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性

NM522				
nCC4	Proofreading(%)	No proofreading(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)
	0	70	18	12

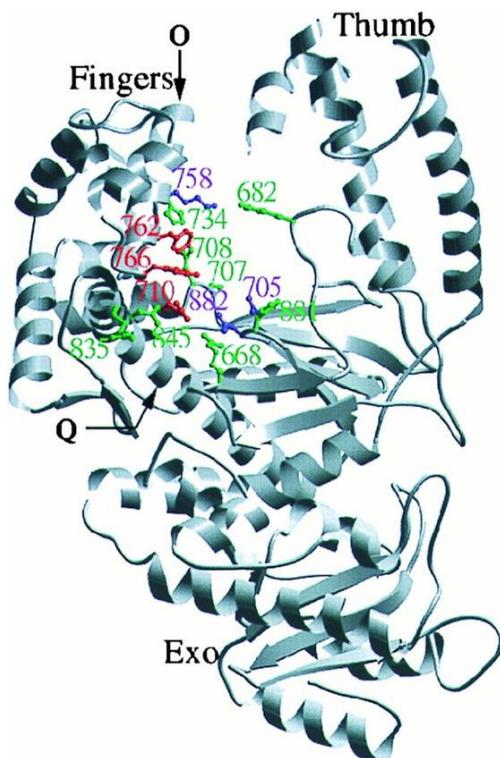
nCC4 於大腸桿菌 NM522 中，無 proofreading，no proofreading 70%，primer strand loss 18%，template strand loss 12%。

表十六:大腸桿菌 NM522 內於倒數第二個核苷酸位置為 C:C 錯誤配對之 nick 受質校對活性

NM522				
nCC2	Proofreading(%)	No proofreading(%)	Primer loss(%)	Template loss(%)
	64	0	18	18

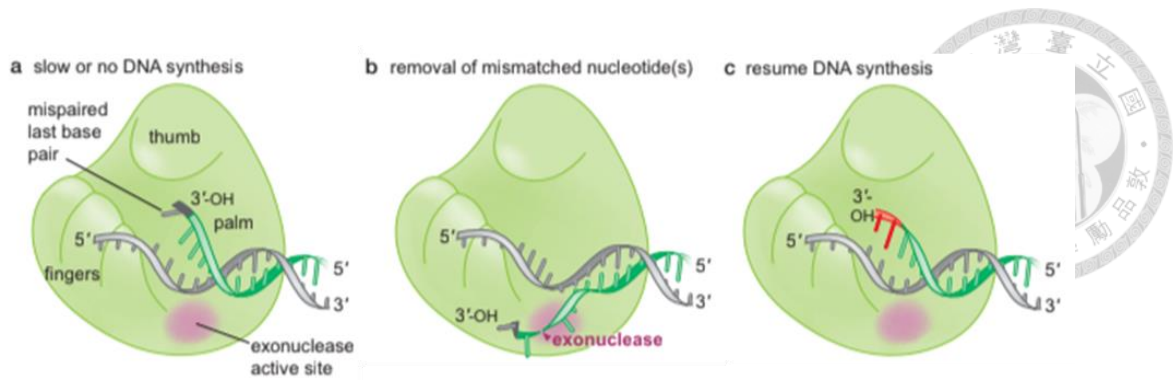
nCC2 於大腸桿菌 NM522 中，proofreading 64%，無 no proofreading 數據，primer strand loss 18%，template strand loss 18%。

附錄



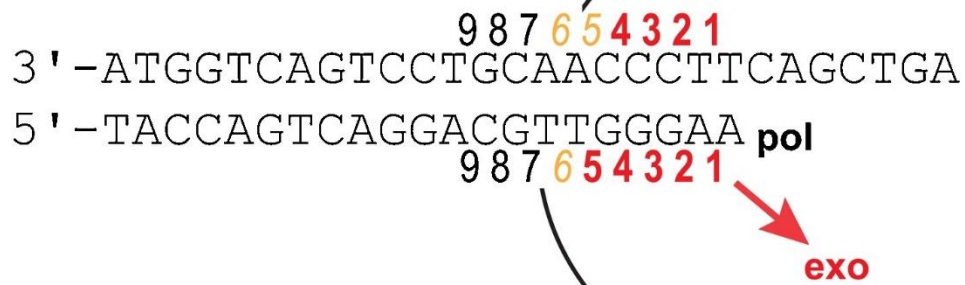
附錄一：Klenow fragment 之結構

Klenow fragment 其構成像是手之結構，其包含拇指(thumb)、手指(fingers)及手掌(palm)三個部分(Astatke et al., 1998)。



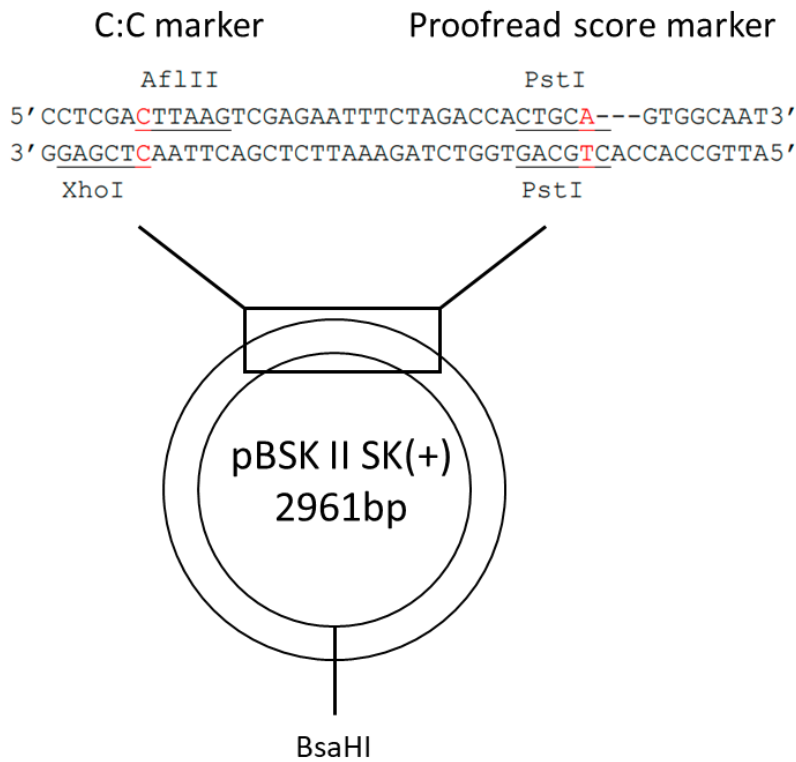
附錄二:第一型 DNA 聚合酶複製過程辨識錯誤配對及後續作用之示意圖

複製過程中，若 DNA 聚合酶使用錯誤之核苷酸將其合成至 DNA 上時，因末端錯誤配對之結構不穩定，使其末端四對核苷酸分開，引子股接著會落入 3'端往 5'端之外切酶活性區域，移除錯誤配對之核苷酸，接著引子股會重回 5'端往 3'端之聚合酶活性中心繼續進行 DNA 合成(James Watson, *Molecular Biology of the Gene* Edition 7th)。



附錄三:第一型 DNA 聚合酶校對活性

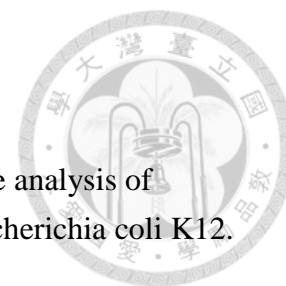
當錯誤配對發生距離 3'端 1 至 4 個核苷酸位置時可被第一型 DNA 聚合酶校對，發生距離 3'端超過 6 個核苷酸位置時則無法被校對(Chang et al., 2020)。



附錄四:含有錯誤配對之受質

使用 pBluescript II SK(+) phagemid 載體，插入在 5'端帶有 C:C 標誌，3'有錯誤配對之人工寡核苷酸製備出 G:T 錯配、C:C 錯配含三個核苷酸之 gap 受質及 C:C 錯配之 nick 受質。

參考文獻

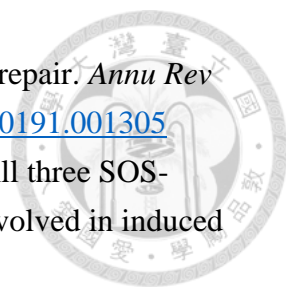


- Agemizu, Y., Uematsu, N., & Yamamoto, K. (1999). DNA sequence analysis of spontaneous tonB deletion mutations in a polA1 strain of Escherichia coli K12. *Biochem Biophys Res Commun*, 261(3), 584-589. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1074>
- Albertson, T. M., & Preston, B. D. (2006). DNA replication fidelity: proofreading in trans. *Curr Biol*, 16(6), R209-211. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.02.031>
- Astatke, M., Ng, K., Grindley, N. D., & Joyce, C. M. (1998). A single side chain prevents Escherichia coli DNA polymerase I (Klenow fragment) from incorporating ribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7), 3402-3407. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3402>
- Banach-Orlowska, M., Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M., & Jonczyk, P. (2005). DNA polymerase II as a fidelity factor in chromosomal DNA synthesis in Escherichia coli. *Mol Microbiol*, 58(1), 61-70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04805.x>
- Brautigam, C. A., & Steitz, T. A. (1998). Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol*, 8(1), 54-63. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(98\)80010-9](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(98)80010-9)
- Brutlag, D., & Kornberg, A. (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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4336040>
- Bzymek, M., Saveson, C. J., Feschenko, V. V., & Lovett, S. T. (1999). Slipped misalignment mechanisms of deletion formation: in vivo susceptibility to nucleases. *J Bacteriol*, 181(2), 477-482. <https://doi.org/10.1128/JB.181.2.477-482.1999>
- Caglayan, M. (2020). Pol beta gap filling, DNA ligation and substrate-product channeling during base excision repair opposite oxidized 5-methylcytosine modifications. *DNA Repair (Amst)*, 95, 102945. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102945>
- Cai, H., Yu, H., McEntee, K., & Goodman, M. F. (1995). Purification and properties of DNA polymerase II from Escherichia coli. *Methods Enzymol*, 262, 13-21. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)62004-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)62004-4)
- Chang, H. L., Su, K. Y., Goodman, S. D., Chou, N. A., Lin, K. C., Cheng, W. C., Lin, L. I., Chang, S. Y., & Fang, W. H. (2020). Proofreading of single nucleotide insertion/deletion replication errors analyzed by MALDI-TOF mass



- spectrometry assay. *DNA Repair (Amst)*, 88, 102810.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102810>
- Coukell, M. B., & Yanofsky, C. (1970). Increased frequency of deletions in DNA polymerase mutants of *Escherichia coli*. *Nature*, 228(5272), 633-635.
<https://doi.org/10.1038/228633a0>
- Cowart, M., Gibson, K. J., Allen, D. J., & Benkovic, S. J. (1989). DNA substrate structural requirements for the exonuclease and polymerase activities of procaryotic and phage DNA polymerases. *Biochemistry*, 28(5), 1975-1983.
<https://doi.org/10.1021/bi00431a004>
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., & Argos, P. (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng*, 3(6), 461-467.
<https://doi.org/10.1093/protein/3.6.461>
- Donlin, M. J., Patel, S. S., & Johnson, K. A. (1991). Kinetic partitioning between the exonuclease and polymerase sites in DNA error correction. *Biochemistry*, 30(2), 538-546. <https://doi.org/10.1021/bi00216a031>
- Dorawa, S., Werbowy, O., Plotka, M., Kaczorowska, A. K., Makowska, J., Kozłowski, L. P., Fridjonsson, O. H., Hreggvidsson, G. O., Aevansson, A., & Kaczorowski, T. (2022). Molecular Characterization of a DNA Polymerase from *Thermus thermophilus* MAT72 Phage vB_Tt72: A Novel Type-A Family Enzyme with Strong Proofreading Activity. *Int J Mol Sci*, 23(14).
<https://doi.org/10.3390/ijms23147945>
- Doublet, S., Sawaya, M. R., & Ellenberger, T. (1999). An open and closed case for all polymerases. *Structure*, 7(2), R31-35. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80017-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80017-3)
- Doublet, S., Tabor, S., Long, A. M., Richardson, C. C., & Ellenberger, T. (1998). Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature*, 391(6664), 251-258. <https://doi.org/10.1038/34593>
- Echols, H., & Goodman, M. F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem*, 60, 477-511.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.002401>
- Fix, D. F., Burns, P. A., & Glickman, B. W. (1987). DNA sequence analysis of spontaneous mutation in a PolA1 strain of *Escherichia coli* indicates sequence-specific effects. *Mol Gen Genet*, 207(2-3), 267-272.
<https://doi.org/10.1007/BF00331588>
- Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, 421(6921), 436-440.
<https://doi.org/10.1038/nature01408>

- 
- Garcia-Diaz, M., & Kunkel, T. A. (2006). Mechanism of a genetic glissando: structural biology of indel mutations. *Trends Biochem Sci*, 31(4), 206-214.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.02.004>
- Goodman, M. F. (2002). Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem*, 71, 17-50.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.083101.124707>
- Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L., & Harrison, S. C. (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science*, 282(5394), 1669-1675.
<https://doi.org/10.1126/science.282.5394.1669>
- Joyce, C. M., & Grindley, N. D. (1983). Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(7), 1830-1834.
<https://doi.org/10.1073/pnas.80.7.1830>
- Kamble, P., Hall, K., Chandak, M., Tang, Q., & Caglayan, M. (2021). DNA ligase I fidelity mediates the mutagenic ligation of pol beta oxidized and mismatch nucleotide insertion products in base excision repair. *J Biol Chem*, 296, 100427.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100427>
- Lackey, D., Krauss, S. W., & Linn, S. (1985). Characterization of DNA polymerase I*, a form of DNA polymerase I found in *Escherichia coli* expressing SOS functions. *J Biol Chem*, 260(5), 3178-3184.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3882707>
- Li, Y., Korolev, S., & Waksman, G. (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. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7514>
- Loeb, L. A. (2001). A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*, 61(8), 3230-3239.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309271>
- Makiela-Dzbenska, K., Jaszczur, M., Banach-Orlowska, M., Jonczyk, P., Schaaper, R. M., & Fijalkowska, I. J. (2009). Role of *Escherichia coli* DNA polymerase I in chromosomal DNA replication fidelity. *Mol Microbiol*, 74(5), 1114-1127.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06921.x>
- Mathew, C. G. (1985). Radiolabeling of DNA by nick translation. *Methods Mol Biol*, 2, 257-261. <https://doi.org/10.1385/0-89603-064-4:257>
- Modrich, P. (1987). DNA mismatch correction. *Annu Rev Biochem*, 56, 435-466.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.002251>
- Modrich, P. (1989). Methyl-directed DNA mismatch correction. *J Biol Chem*, 264(12), 6597-6600. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2651430>

- 
- Modrich, P. (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet*, 25, 229-253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.25.120191.001305>
- Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J., & Fuchs, R. P. (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. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.22.6259>
- Nusslein, V., Otto, B., Bonhoeffer, F., & Schaller, H. (1971). Function of DNA polymerase 3 in DNA replication. *Nat New Biol*, 234(52), 285-286. <https://doi.org/10.1038/newbio234285a0>
- Ollis, D. L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N. G., & Steitz, T. A. (1985). Structure of large fragment of Escherichia coli DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature*, 313(6005), 762-766. <https://doi.org/10.1038/313762a0>
- Parsons, R., Li, G. M., Longley, M. J., Fang, W. H., Papadopoulos, N., Jen, J., de la Chapelle, A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Modrich, P. (1993). Hypermutable and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell*, 75(6), 1227-1236. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90331-j](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90331-j)
- Patel, S. S., Wong, I., & Johnson, K. A. (1991). Pre-steady-state kinetic analysis of processive DNA replication including complete characterization of an exonuclease-deficient mutant. *Biochemistry*, 30(2), 511-525. <https://doi.org/10.1021/bi00216a029>
- Pelletier, H., Sawaya, M. R., Kumar, A., Wilson, S. H., & Kraut, J. (1994). Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP. *Science*, 264(5167), 1891-1903. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7516580>
- Pham, P. T., Olson, M. W., McHenry, C. S., & Schaaper, R. M. (1998). The base substitution and frameshift fidelity of Escherichia coli DNA polymerase III holoenzyme in vitro. *J Biol Chem*, 273(36), 23575-23584. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.36.23575>
- Saveson, C. J., & Lovett, S. T. (1997). Enhanced deletion formation by aberrant DNA replication in Escherichia coli. *Genetics*, 146(2), 457-470. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.2.457>
- Shinkai, A., & Loeb, L. A. (2001). In vivo mutagenesis by Escherichia coli DNA polymerase I. Ile(709) in motif A functions in base selection. *J Biol Chem*, 276(50), 46759-46764. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104780200>
- Steitz, T. A., & Steitz, J. A. (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(14), 6498-6502. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6498>

- 
- Su, K. Y., Lin, L. I., Goodman, S. D., Yen, R. S., Wu, C. Y., Chang, W. C., Yang, Y. C., Cheng, W. C., & Fang, W. H. (2018). DNA polymerase I proofreading exonuclease activity is required for endonuclease V repair pathway both in vitro and in vivo. *DNA Repair (Amst)*, *64*, 59-67.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.02.005>
- Tikhomirova, A., Beletskaya, I. V., & Chalikian, T. V. (2006). Stability of DNA duplexes containing GG, CC, AA, and TT mismatches. *Biochemistry*, *45*(35), 10563-10571. <https://doi.org/10.1021/bi060304j>
- Valle, L., Hernandez-Illan, E., Bellido, F., Aiza, G., Castillejo, A., Castillejo, M. I., Navarro, M., Segui, N., Vargas, G., Guarinos, C., Juarez, M., Sanjuan, X., Iglesias, S., Alenda, C., Egoavil, C., Segura, A., Juan, M. J., Rodriguez-Soler, M., Brunet, J., . . . Blanco, I. (2014). New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis. *Hum Mol Genet*, *23*(13), 3506-3512. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu058>
- Wagner, J., Etienne, H., Janel-Bintz, R., & Fuchs, R. P. (2002). Genetics of mutagenesis in *E. coli*: various combinations of translesion polymerases (Pol II, IV and V) deal with lesion/sequence context diversity. *DNA Repair (Amst)*, *1*(2), 159-167.
[https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(01\)00012-x](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(01)00012-x)
- Zhou, X., Chen, X., An, Y., Lu, H., Wang, L., Xu, H., Tian, B., Zhao, Y., & Hua, Y. (2021). Biochemical characterization of a unique DNA polymerase A from the extreme radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Biochimie*, *185*, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.02.014>