

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



第一型 DNA 聚合酶校正機制之研究分析

Mechanistic analysis of DNA Polymerase I
proofreading activity

徐仙珏

Chen-Jyue Hsu

指導教授：方偉宏 博士

Advisor: Woei-horng Fang
Ph.D.

中華民國 112 年 08 月

August, 2023

誌謝



時光匆匆，宛若白駒過隙，兩年的碩士班生活，已經走到了終點。回想當初剛進入碩班時，大學延畢、國考失利，沒有實驗經驗、沒有相關背景知識，只帶著一句空洞的保證，聲稱自己一定會努力學習、趕上進度，十分感謝方偉宏老師願意信任這樣的我，收我為學生，鞭策我、指導我，當我犯錯時，給予斥責；在我取得成果時，給予鼓勵；於我失意時，給予支持與安慰。對於每一個我無法理解的理論，一次次耐心的講解；對每一個錯誤的觀念，一次次溫和的指正；對每一個忽略的細節，一次次細心的叮嚀。也感謝許濤老師、蔡芷季老師、蘇剛毅老師、郭靜穎老師對我的論文提出了許多的建議，也感謝各位老師在口試時所給予的肯定。

感謝賴婉君學姊幫助我們完成質譜儀上機，這兩年的時間多有麻煩，十分感謝。感謝我的家人，整整 25 年的陪伴、支持，不論在什麼時候，始終讓我有一個可以回去的地方，沒有了你們，不會有今日的我。感謝張惠嵐學姊，還記得剛進入實驗室時，什麼都不懂、什麼都做不好，給學姊添了不少的麻煩。雖然不能說是不厭其煩，但學姊仍一步步的從實驗的基本概念、技巧，到報告時的表達、呈現方法傾囊相授。感謝我的同學方羿凱還有學妹莊詠筑，因為你們的陪伴，這兩年的風風雨雨中增添了不少的笑聲。感謝我的朋友們，晁維、晁銘、沛倫、聖佑、岳庭、凱鈞，你們真的是一群瘋子，一群最棒的瘋子。

最後，特別感謝我的父親，徐智鵬先生。爸，我終於要畢業了，我跟你一樣，是台大碩士了。不肖子岫玆，這麼多年來，一直都沒能讓你放心。在這段時間，能夠振作起來，都是多虧了你沒有放棄我。你的教導、精神、榮耀，將永遠伴隨我。我曾承諾，我會活得比你更精彩、更快樂、更幸福、更有成就，今天，便是我的第一步。您的故事結束了，剩下的空白，岫玆會在未來的日子裡，替您繼續譜寫。謝謝您，我愛您。

中文摘要



當 DNA 上兩個不相互補的核苷酸互相配對時，便被稱為 DNA 誤配(DNA mismatch)。生物體中，DNA 誤配主要 DNA 聚合酶的校正(proofread)以及誤配修補系統(mismatch repair, MMR)進行修復，其中，DNA 聚合酶的校正主要針對正在進行複製的 DNA 進行。

本實驗室過去曾研究 Klenow fragment(KF)對於誤配核苷酸與插入/缺失錯誤(insertion/ deletion error, indel error)的校正活性，發現 KF 對於自引子股 3'端數來 1 至 4 個位置的異常核苷酸有著較高的校正活性。實驗室據此提出了假說，認為 KF 能夠與距離 DNA 引子股 3'端 4 個核苷酸直接接觸，因此在這個範圍內的異常核苷酸能夠受到較強的校正作用。

在本篇研究中，我們首先使用 KF 與在引子 3'端數來 1 至 7 個位置帶有單一誤配核苷酸的 DNA 進行反應並以 MALDI-TOF MS 分析，發現 KF 對於自引子股 3'端的 1 至 3 個位置的誤配核苷酸有著較高的校正活性，4 號位置的校正活性較低，5 至 7 號位置則無校正活性而進行引子延伸。接著，我們測試帶有兩個誤配核苷酸的 DNA 的校正活性，發現當兩個誤配核苷酸包含彼此在內相距 4 個核苷酸以內時若有一個誤配核苷酸位於可被校正的範圍內，另一個誤配核苷酸會一併進行校正。另外也發現誤配序列的種類會影響誤配核苷酸共同受到校正的活性。

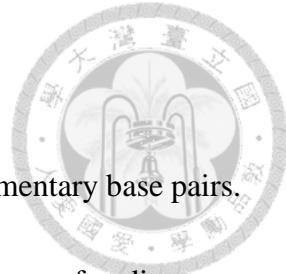
為了能夠進一步了解 KF 進行校正反應的過程，我們利用含有兩個誤配核苷酸的 DNA 與 KF 反應並進行 time course 實驗，在實驗中，我們觀察到了 KF 中 3'→5' 外切酶(3'→5' exonuclease)的非連續性(non-processive)作用。最後，結合本篇研究的實驗結果，我們對 KF 的校正反應機制提出了以下模型：當 KF 對 DNA 進行校正時，將引子股 3'端送往 3'→5' 外切酶活性位 (3'→5' exonuclease site) 並且水解一個核苷酸後送回聚合酶活性位 (polymerase site)，若 DNA 上仍有異常序列，便會重複以上步驟，直到異常序列受到水解為止。



關鍵詞: DNA 誤配、Klenow fragment、Klenow fragment 校正活性、MALDI-TOF
MS、核酸修復、校正反應

Abstract

DNA mismatch occurs during DNA synthesis as the noncomplementary base pairs.



In living organism, DNA mismatch could be corrected by either DNA proofreading or mismatch repair (MMR).

In previous research devoted by our laboratory, the proofreading activity of Klenow fragment(KF) for mismatch error and insertion/deletion error(indel error) was studied. The results showed relatively strong proofreading activity for errors within 4 nucleotides from primer 3' end in both experiments. Thus, our laboratory proposed a hypothesis that KF may physically contact with 4 nucleotides from primer 3' end, therefore preform strong proofreading ability within such range.

In this study, proofreading activity of KF for single mismatched nucleotide was examined. The data revealed that polymerase showed strong proofreading activity for mismatched nucleotide within 3 nucleotides distant from primer 3' end. Less proofreading activity to the fourth nucleotide from primer 3' end. As for those whose distance from primer 3' end is over 5 nucleotides, KF was unable to correct the mismatched nucleotide. After that, proofreading efficiency of KF for DNA which contains two mismatches was tested. The data suggests that if the distance between two mismatches is beyond 3 nucleotides, KF would tend to correct both mismatched nucleotides as long as one of them could be recognized by the polymerase. Also, the

proofreading activity for the two mismatched base pairs would also be influenced by the type of mismatches.



To investigate the process of proofreading activity carried out by KF, time course experiment of a double-mismatched DNA proofread by KF were practiced. According to the result, we found the non-processive activity of KF 3'→5 exonuclease. Finally, based on the experimental result obtained in this study, we proposed a model of KF proofreading process. Upon recognizing errors on the DNA, the single stranded primer would be transferred to the 3'→5 exonuclease site, after that, a nucleotide would be hydrolyzed. The primer would then be transferred back into polymerization site, there, KF would determine whether the error has been removed. If not, the primer would be transferred to the 3'→5 exonuclease site once again, and the process would be repeated once and again until the error sequence was corrected.

Key words: DNA mismatch, Klenow fragment, proofreading activity, MALDI-TOF, DNA repair

總目次



誌謝.....	I
中文摘要.....	II
Abstract.....	IV
圖目次.....	VIII
表目次.....	IX
附錄目次.....	X
縮寫表.....	XI
第一章 研究背景.....	1
1.1 第一型 DNA 聚合酶(DNA polymerase I, Pol I)	1
1.2 DNA 誤配(DNA mismatch)	3
1.3 基質協助雷射去吸附離子化-飛行時間質譜儀(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)	5
1.4 研究動機	7
第二章 材料與方法.....	10
2.1 DNA 序列	10
2.2 試劑與酵素	11
2.2.1 酵素	11
2.2.2 試劑	11
2.2.3 純化套組	11
2.4 Klenow fragment 校正能力試驗	11
2.5 Klenow fragment 校正 time course 試驗	12
2.6 樣品去鹽純化	12
2.7 基質協助雷射去吸附離子化-飛行時間質譜儀分析 MALDI-TOF MS	13
2.8 產物百分比計算	13
2.9 純化套組測試	14

第三章 結果.....	15
3.1 Klenow fragment 對單一核苷酸誤配之校正能力分析	15
3.2 引子股 3'近端誤配對遠端誤配核苷酸校正活性之影響	15
3.3 雙誤配核苷酸間距對其共同受到校正活性之影響.....	17
3.4 誤配鹼基對於雙誤配核苷酸共同校正活性之影響	18
3.5 DM47 校正反應中間產物分析	19
3.6 離子濃度對於 Klenow fragment 校正活性之影響	20
3.7 EasyPure PCR/Gel Extraction Kit 純化能力分析.....	20
第四章 討論.....	22
附錄.....	48
參考文獻.....	53

圖目次

圖 一 單一核苷酸誤配校正能力實驗設計示意圖	28
圖 二 Klenow fragment 針對不同位置上單一核苷酸誤配校正能力	30
圖 三 雙核苷酸誤配校正能力實驗設計示意圖	31
圖 四 DNA 引子股 3'近端誤配對遠端誤配核苷酸校正能力之影響	33
圖 五 雙誤配核苷酸間距離對共同校正活性之影響	35
圖 六 DM47n 與 DM36n 實驗設計示意圖	36
圖 七 誤配序列對雙誤配核苷酸共同校正活性之影響	37
圖 八 DM47 校正反應中間產物分析	38
圖 九 離子濃度對於 Klenow fragment 校正活性之影響	40
圖 十 Klenow fragment 對 DM47 進行校正推測模型示意圖	41



表目次

表 一 Klenow fragment 針對不同位置上單一核苷酸誤配校正能力.....	42
表 二 雙誤配核苷酸 DM17 至 DM67 實驗產物序列與分子量.....	43
表 三 雙誤配核苷酸間距離對共同校正活性之影響.....	44
表 四 誤配序列對雙誤配核苷酸共同校正活性之影響.....	45
表 五 離子濃度對於 Klenow fragment 校正活性之影響.....	46
表 六 純化套組去鹽純化能力.....	47

附錄目次

附錄 一 Klenow fragment 結構示意圖.....	48
附錄 二 第一型 DNA 聚合酶校正作用示意圖.....	49
附錄 三 誤配修復系統(mismatch repair, MMR)示意圖	50
附錄 四 MALDI-TOF MS 作用流程與機制示意圖	51
附錄 五 質譜分析 normalize 示意圖.....	52

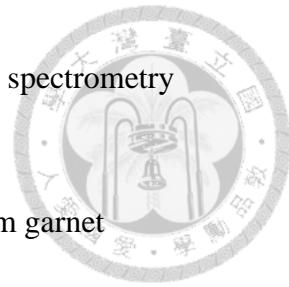


縮寫表

A	adenine
BER	Base excision repair
C	cytosine
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCMP	Deoxycytidine monophosphate
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
ddCTP	Dideoxycytidine 5'-triphosphate
ddNTP	Dideoxynucleotides triphosphates
dGMP	Deoxyguanosine monophosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ExoI	Exonuclease I
ExoVII	Exonuclease VII
ExoX	Exonuclease X
G	Guanine
HCl	Hydrochloric acid
Indel error	Insertion/deletion error
IR-MALDI-TOF MS	Infrared matrix-assisted laser desorption mass spectrometry
KF	Klenow fragment



MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry
MMR	mismatch repair
Nd:YAG	Neodymium-doped yttrium aluminium garnet
NER	Nucleotide excision repair
PCR	Polymerase chain reaction
Pol I	DNA Polymerase I
Pol III	DNA Polymerase III
S	Second
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SSB	Single-strand binding protein
T	Thymine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV-MALDI-TOF MS	Ultraviolet matrix-assisted laser desorption mass spectrometry



第一章 研究背景



1.1 第一型 DNA 聚合酶(DNA polymerase I, Pol I)

DNA 聚合酶對於生物體的存活扮演著至關重要的角色。依據其不同的類型，具有合成新股 DNA (DNA synthesis)、DNA 校正(DNA proofread)的功能，也會參與如 DNA 鹼基切除式修復(base excision repair, BER)、DNA 誤配修補(mismatch repair, MMR)、核苷酸切除式修復(Nucleotide excision repair, NER)等 DNA 修復系統 (Garcia-Diaz & Bebenek, 2007)。

目前已知的大腸桿菌 DNA 聚合酶共有五種，分別被命名為第一型~第五型DNA 聚合酶 (DNA polymerase I~V)，其中第一型 DNA 聚合酶(DNA polymerase I,Pol I)為最早被分離出的 DNA 聚合酶(Lehman et al., 1958)，其結構也是最早被研究的 (Ollis et al., 1985)。另外，第一型 DNA 聚合酶亦是大腸桿菌在正常生理情況下含量最高的 DNA 聚合酶，由於容易取得的特性，已廣泛運用於分子生物學研究中 (Allison, 2007)。第二型 DNA 聚合酶(DNA polymerase II, Pol II)的大小約為 90kDa(Fijalkowska et al., 2012)，其主要功能為參與生物體中的 DNA 修復系統，如針對紫外線引發 DNA 損傷之修復(Rangarajan et al., 1999)、氧化作用引發之損傷修復(Escarceller et al., 1994)等。第三型 DNA 聚合酶(DNA polymerase III)為大腸桿菌中主要執行 DNA 聚合反應的聚合酶，同時亦參與大腸桿菌中的 NER 系統 (Allison, 2007)。第四型 DNA 聚合酶與第五型 DNA 聚合酶主要參與跨損傷區域 DNA 合成(translesion DNA synthesis)，由於其易出錯(error prone)的特性，可以在 DNA 受到難以修復的損傷時忽略該損傷並繼續進行 DNA 複製(Vaisman et al., 2012)。

第一型 DNA 聚合酶又可區分為大、小兩個片段，如附錄一所示(Federley & Romano, 2010)，小片段具有 5'→3'外切酶活性(Joyce & Steitz, 1987)，大片段具有 DNA 聚合酶活性位及 3'→5'外切酶活性位(3'→5' exonuclease)，又稱為 Klenow



fragment(KF)(Klenow & Overgaard-Hansen, 1970)，兩酶之間相距約 35Å(Beese et al., 1993)。其中，KF 上的 3'→5'外切酶能夠移除 DNA 複製時產生的誤配鹼基並進行 DNA 校正(Bebenek et al., 1990)。KF 的結構又可再區分為大、小兩個結構域(domain)，小結構域合約 200 個胺基酸，其中央主要由 β -sheet、外圍由 α -helix 組成，並包含了 3'→5'外切酶活性位(Beese et al., 1993; Ollis et al., 1985)。大結構域合約 400 個胺基酸，結構如同一個握住棒狀物體的右手，如附錄一所示(Federley & Romano, 2010)，上有一個寬度約 20-24Å、深度為 25-35Å 的裂口(cleft)，裂口底部由 6 個 anti-parallel β -sheet 組成，如同手部的手掌(Aoude et al.)，兩側則由 α -helix 組成，其中一側長度較長約為 50Å，如同手部的手指(finger)，另一側主要由 I 和 H 兩個 α -helix 組成，其結構如同手部的拇指(thumb)懸掛於裂口上方(Ollis et al., 1985)。在與 DNA 結合後，Klenow fragment 的拇指部位會發生結構改變並向 3'→5'外切酶活性位移動，此結構改變也會在拇指以及 3'→5'外切酶活性位之間產生第二個裂口以供 DNA 結合，這個新產生的裂口與原本的裂口呈垂直走向，並且包含了 Klenow fragment 的 DNA 聚合酶活性位(Beese et al., 1993)。新進dNTP 與 Klenow fragment 的結合主要由手指部位 O-helix 上的 Arg754、Lys758 與 Phe762 胺基酸參與(Astatke et al., 1998)，在結合後，手指結構域會產生形變將 DNA 包覆住，使 Klenow fragment 從 open conformation 轉變為 close conformation，在此次結構改變中，O-helix 會旋轉 40° 並且朝向 DNA 聚合酶活性位(Patel et al., 2001)。接著會由兩個二價金屬離子參與將新進 dNTP 合成至新股 DNA 上，其中一個金屬離子與 DNA 引子 3'端產生交互作用，降低其 pK_a 並促使其攻擊新進 dNTP 的 α -phosphate；另一個金屬離子則促使 β -與 γ -phosphate 脫離新進 dNTP。另外，兩個二價金屬離子對新進 dNTP 合成至 DNA 上的過程中產生的中間產物有穩定其結構、電荷的效果(Steitz, 1999)。

Klenow fragment 對於 DNA 的校正可分為三個步驟：一、DNA 與 DNA 聚合酶結構域結合；二、DNA 引子的 3'端移動至 3'→5'外切酶活性位；三、外切酶催化



化學反應將錯誤的核苷酸移除(Green & Sambrook, 2020)。當 DNA 引子末端出現錯誤時，DNA 會在 Klenow fragment 上滑動相當於 8 bp 的距離，並且引子末端 3'-4 bp 會發生 DNA 解鏈(melting)形成單股 DNA 並與 3'→5'外切酶活性位結合，如附錄二所示(Cowart et al., 1989; Freemont et al., 1988; Joyce & Steitz, 1987)。3'→5'外切酶同樣需要兩個二價金屬離子參與作用，其中一個金屬離子與從水分子產生的氫氧根結合，並在 Tyr497、Glu357 的幫助下對目標核苷酸的磷酸進行攻擊，另一個離子作為路易斯酸(Lewis acid)能夠促進 DNA 3' 氧的離開(Brautigam et al., 1999; Steitz & Steitz, 1993)。

1.2 DNA 誤配(DNA mismatch)

在正常的雙股 DNA 中 A 會與另一股上的 T 配對，C 則與 G 配對，而若產生了其他的配對則被稱為 DNA 誤配(Modrich, 1987)。DNA 誤配的主要成因有以下幾種: DNA 合成過程產生的錯誤(Goodman et al., 1993)、異源雙股 DNA(heteroduplex DNA)的形成(Wildenberg & Meselson, 1975)，以及由化學物質、輻射誘發(Li, 2008)和自發性脫氨(spontaneous deamination)產生，如未被即時偵測、修復便會導致基因突變(Kunz et al., 2009)，嚴重可能引發癌症(Rossetti et al., 2015)。根據過去的研究發現，有 10~30% 的自發性癌症(spontaneous cancers)與 DNA 誤配有關(Rossetti et al., 2015)，同時，DNA 誤配修復機制的缺失也會與部分遺傳性癌症相關(Kolodner, 1995; Renkonen et al., 2003)。

生物體中有三種防止 DNA 誤配與修復誤配的機制: 鹼基選擇性(base selection)、DNA 校正與 DNA 誤配修復(Schaaper, 1993)。DNA 在進行複製時，根據 DNA 聚合酶的不同，合成正確配對的核苷酸比例會比合成誤配核苷酸高出 10^4 至 10^6 倍(Kunkel, 2004)，如第一型 DNA 聚合酶在缺乏 3'→5'外切酶活性的情況下，其合成錯誤率(error rate) 10^{-5} 至 10^{-6} (Bebenek et al., 1990)，而第三型 DNA 聚合酶的鹼基選擇性為 10^4 至 10^5 。目前的研究認為，鹼基選擇性來自於配對鹼基間自



由能的不同(Loeb & Kunkel, 1982)，同時，DNA 聚合酶會放大正確與誤配鹼基間自由能的差異(Petruska et al., 1988)；另外，在 DNA 中 A:T 與 C:G 正確配對後的結構十分相似，但誤配核苷酸的立體結構和前二者相差較多(Kunkel, 2004)，並且 DNA 聚合酶與 DNA 的結合位點十分狹窄(Kunkel & Bebenek, 2000)，因此誤配的 dNTPs 會受到 DNA 聚合酶的擠壓而難以與 DNA 結合(Kool, 2002)。最後，當 DNA 聚合酶將誤配核苷酸合成至 DNA 上時，其形成磷酸二酯鍵(phosphodiester bond)的速率會低於正確配對之核苷酸(Dahlberg & Benkovic, 1991)，因此也會降低將誤配核苷酸合成至模板股的速率。

若 DNA 在複製期間發生誤配，DNA 聚合酶會將複製中的 DNA 從具有聚合酶活性位轉送到外切酶活性位，DNA 聚合酶的 3'→5'外切酶活性位將其切除後重新合成新的核苷酸，稱為校正。在大腸桿菌的五種 DNA 聚合酶中，第一型、第二型與第三型 DNA 聚合酶皆具有 3'→5'外切酶活性，具有校正 DNA 的能力(Lovett, 2011)。過去利用 T7 DNA 聚合酶進行的研究顯示，DNA 聚合酶在進行正確配對的 DNA 合成反應速率常數為 300 s^{-1} ，DNA 移動至 3'→5'外切酶活性位的速率常數為 0.2 s^{-1} 。而 DNA 聚合酶將 dNTP 合成至誤配 DNA 的反應速率常數為 0.01 s^{-1} ，此時 DNA 移動至 3'→5'外切酶活性位的速率常數增加至 2.3 s^{-1} (Johnson, 1993)。由此可見，當 DNA 聚合酶遭遇到誤配的 DNA 時，由於合成效率的降低以及將 DNA 由聚合酶活性位轉移至 3'→5'外切酶活性位的效率增加，故會傾向進行校正。

若 DNA 誤配發生於已複製完成的 DNA 上，則會以誤配修復系統進行修復(mismatch repair, MMR)。大腸桿菌的 DNA 誤配修復系統由以下蛋白質進行：MutS、MutL、MutH、第二型 DNA 解旋酶(DNA helicase II，也被稱為 MutU 或者 UvrD)、四種核酸外切酶(exonuclease)；分別為 ExoI、ExoVII、ExoX 和 RecJ，單股 DNA 結合蛋白(single-strand binding protein, SSB)、第三型 DNA 聚合酶(DNA polymerase III)以及 DNA 連接酶(DNA ligase)(Li, 2008)。首先由 MutS 辨識並與誤



配的核苷酸結合，MutS 具有 ATPase 活性，會藉由消耗 ATP 吸引 MutL，MutL 與 MutS-異源雙股 DNA 形成複合物並加強系統對於誤配的辨識後吸引並活化MutH，MutH 具有核酸內切酶活性，會對 DNA 上帶有未甲基化 d(GATC)片段 (unmethylated d(GATC))的一股進行剪切形成鏈裂(nick)，由於 d(GATC)片段的甲基化是在 DNA 複製完畢後進行的，因此 MutH 只會針對 DNA 的新合成股進行剪切(Li, 2008; Modrich, 2016)。MutS-MutL-異源雙股 DNA 複合物同時會活化第二型 DNA 解旋酶以及上述四種核酸外切酶，首先由第二型 DNA 解旋酶自 MutH 剪切出的鏈裂朝向 MutS-MutL-異源雙股 DNA 複合物的位置，同時也是 DNA 誤配的位置，進行解旋。接著由上述的四種核酸外切酶將第二型 DNA 解旋酶置換出 DNA 片段進行移除，如果鏈裂位於誤配位置的 5'方向，會由 ExoVII 或者 RecJ 執行，若鏈裂位於誤配位置的 3'方向，則以 ExoI 或 ExoX 進行(Modrich, 2016)。在此過程中，單股 DNA 結合蛋白會迅速與產生的單股 DNA 結合並保護其不被核酸酶(nuclease)攻擊(Li, 2008)。最後，第三型 DNA 聚合酶會將被移除的 DNA 片段重新合成，最後 DNA 連接酶會將新合成的 DNA 與原有的 DNA 進行連接 (Modrich, 2016)。DNA 誤配修復系統之示意圖如附錄 3 所示。

以上三種機制中，鹼基選擇能夠降低 20 萬至 200 萬倍不同種類的的 DNA 錯誤合成，DNA 校正為 40 至 200 倍，而誤配修復為 20 至 400 倍(Schaaper, 1993)。

1.3 基質協助雷射去吸附離子化-飛行時間質譜儀(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS 採用與傳統質譜儀不同的軟性離子化(soft ionization)方法。一般的做法為將待測物(analyte)與特定基質(matrix)以濃度比 1:10⁴ 的比例混合並溶解於適當溶劑中，如水、丙酮(acetone)或者四氫呋喃(tetrahydrofuran)。接著，將數微升的混合物滴至晶片表面待其乾燥並且形成固態混合物。在此固態混合物中，



基質作為溶劑能夠降低待測物的分子間作用力並將其分離，此一現象稱為基質隔離(matrix isolation)(Wu & Odom, 1998)。接著，以脈衝雷射對待測物-基質混合物進行照射(irradiation)，一般 MALDI-TOF 所使用的雷射為氮氣雷射(nitrogen laser)或者鈰雅鉻雷射(Nd:YAG laser)，波長分別為 337 nm 與 355 nm(Li et al., 2022)。由於混合物中基質的濃度遠高於待測物，因此大部分的光子(photon)能量會被基質吸收並減少待測物受到雷射的直接照射。基質所吸收的能量導致其進入電子激發態並快速氣化形成高密度的氣體雲並以約 3 馬赫的速度於真空中擴散，在此氣體雲中，待測物在與離子化的基質碰撞下發生離子化並進入質譜儀中進行分析(Wu & Odom, 1998)。離子化的待測物在受到加速後會進入 drift zone，此區域遠大於樣品離子化以及加速的空間，在終點此區域終點的離子探測器可記錄離子到達探測器的飛行時間，並依據單位時間內偵測到待測誤離子的次數得出各訊號之強度(intensity)。待測物離子會因其分子量不同而有不同的飛行速度，分子量越大到達離子探測器所需的時間越長，其關係遵守下列方程式：

$$m/z = 2eE(t/d)^2$$

其中， m 為待測物分子量， z 為待測物分子在離子化時失去的電子(electron)數量， E 為離子進行加速時的使用的電壓， e 為基本電荷， t 為飛行時間而 d 為 drift zone 的長度(Hosseini & Martinez-Chapa, 2016, p. 6)。MALDI-TOF MS 作用機制如附錄四所示。

與傳統質譜儀相比，MALDI-TOF MS 的優點為離子化樣品的過程中，待測樣品較不容易受到直接雷射照射而被打斷，因此 MALDI-TOF MS 相較於傳統質譜儀更適合用作大分子的分析(Hosseini & Martinez-Chapa, 2016, p. 1)。目前，MALDI-TOF MS 已被應用於許多領域的研究以及臨床應用上，包括生物化學(Fukuyama et al., 2008; Huberty et al., 1993; Sekiya et al., 2005)、有機化學(Chikh et al., 2007, 2008)、微生物學(Seng et al., 2009)、藥理學(Hrabák, 2015; Sim et al., 2015)、奈米技術(Kafka et al., 2011)等領域。

1997 年由 Lawrence A. Haff 等人所提出的 PinPoint assay 中將 MALDI-TOF MS 應用於 DNA 分析上，其作用原理為將寡核苷酸鏈結合於 DNA 上的 SNP 位點前，並以雙去氧核糖核苷三磷酸(ddNTPs)延伸一個鹼基，依照分子量的不同，MALDI-TOF MS 可區分延伸產物以及引子且可以依照延伸一個 ddNTP 的種類分析核苷酸多型性(single-nucleotide polymorphism ,SNP) (Lehman et al., 1958)。

相較於傳統以電泳進行 DNA 定序的方法，MALDI-TOF MS 具有較快速的 DNA 分析能力。目前的 MALDI-TOF MS 可在 1 秒內完成對一個頻譜圖的測定與紀錄，同時，一台質譜儀可同時提供多個測量管道，因此可同時對多組實驗進行分析(Gut, 2004)。另外，MALDI-TOF MS 由於其測定所需的樣品量較少，不需要以聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)放大待測樣本，以高通量 SNP 定序為例，自樣品準備至分析完成可於大約 5 小時內完成(Griffin et al., 1999)，相較之下，傳統的 DNA 定序法樣品需經過 PCR 放大、樣品純化、樣品分離並以電泳方式進行分析，所需時間約為一天以上(Griffin et al., 1999)。

另外，近年來亦發展以紅外線雷射對待測物進行激發的 IR-MALDI-TOF MS 技術，相較於傳統的 UV-MALDI-TOF MS 技術更為溫和，可對分子量為 9kDa 至 500kDa 的大分子 DNA 進行分析(Kirpekar et al., 1999)。

1.4 研究動機

本實驗室在 2018 年發表以 MALDI-TOF MS 分析 KF 對 DNA 在引子末端第 1 至 9 個位置上之誤配核苷酸的校正活性。在這篇研究中，設計了 9 種不同的引子股(primer)，在與模板股(template)結合後分別會在引子股由 3' 端數來第 1 至 9 個位置上帶有 G:T 或者 A:C 誤配並依其誤配核苷酸位置分別命名為 MM1 至 MM9，並且在含有四種雙去氧核糖核苷三磷酸(ddNTPs)，分別為 ddATP、ddTTP、ddCTP、ddGTP，的環境中與 KF 進行反應。KF 以 ddNTP 作為合成原料時，只能將一個 ddNTP 合成至 DNA 上即無法接續合成 DNA(Gade et al., 2016)，故可以利

用 MALDI-TOF MS 分析反應前後的分子量變化並得知 DNA 上的誤配是否有被校正。在該篇研究中發現 MM1 至 MM4 傾向被 KF 校正，MM5 會有部分的 DNA 逃脫校正並進行聚合作用(polymerization)，MM6 至 MM9 無法被校正並且傾向進行聚合作用(K. Y. Su et al., 2018)。

接著，在 2020 年發表的研究中，實驗室以 MALDI-TOF MS 分析 KF 對 DNA 末端第 1 至 9 個位置上帶有的插入/缺失錯誤(insertion/deletion error, indel error)校正活性進行分析。在本篇研究中使用了 18 種不同的 DNA 引子，在與模板股結合後會分別於末端第 1 至 9 個位置產生一個 insertion error 或者 deletion error，將帶有 indel error 的 DNA 在含有四種 ddNTPs 的環境中與 Klenow fragment 進行反應。同時測試將帶有 indel error 的 DNA 在含有三種去氧核醣核苷三磷酸(dNTPs)與一種 ddNTP，分別為 dATP、dGTP、dTTP 以及 ddCTP 的環境中進行反應，以更貼近於真實的生理環境，以 MALDI-TOF MS 分析 DNA 引子股在進行反應前後的變化。實驗結果發現，在四種 ddNTPs 的環境下，1 至 5 號位置的 deletion error 傾向被 KF 校正，6 號位置上的 deletion error 會有部分逃脫 Klenow fragment 的校正並進行聚合作用，7 至 9 號位置上的 deletion error 則無法被校正。而在使用三種 dNTPs 與 ddCTP 的環境下，第 1 至 4 號位置上的 deletion error 會完全受到校正，5 號、6 號位置上的 deletion error 分別有 4% 與 61% 逃脫校正並且延長，7 至 9 號位置的 deletion error 皆有超過九成可以逃脫校正並進行聚合作用(Chang et al., 2020)。

綜合以上的兩個實驗結果，實驗室推測 Klenow fragment 可以與 DNA 引子末端的 4 個鹼基直接接觸，因此對於末端第 1~4 個鹼基的誤配以及插入/缺失錯誤皆有較好的校正能力。

在實驗室過去對於 DNA 誤配的研究中僅採用了使用四種 ddNTPs 的實驗方法進行研究(K. Y. Su et al., 2018)。而在之後的發表中，我們發現了相較於四種 ddNTPs，在具有三種 dNTPs 的環境中能夠逃離 KF 校正活性的位置向引子股末端



靠近了一個核苷酸的位置，這是因為 ddNMPs 會抑制 DNA 聚合酶的活性使 DNA 聚合酶無法進行聚合作用(Tabor & Richardson, 1995)，因此反應中的 ddNTPs 會延長 DNA 聚合酶停留在 DNA 上的時間，也造成其有更多的機會辨識出 DNA 上的錯誤(Chang et al., 2020)。因此，為了使實驗的環境更接近生理條件，本篇研究使用三種 dNTPs 與 KF 進行誤配 DNA 校正能力之分析，同時測試以同時帶有兩個誤配的 DNA 與 Klenow fragment 反應並以此分析 DNA 聚合酶的校正機制。

第二章 材料與方法

2.1 DNA 序列

本實驗中所使用寡核苷酸序列購買自 Integrated DNA Technologies (Singapore) 及基龍米克斯(Taiwan)。

Primer:

P21D71: 5'-CGTAAGTCAGGATCTGTGATT-3'

P21D72: 5'-CGTAAGTCAGGATCTGTGACC-3'

P21D73: 5'-CGTAAGTCAGGATCTGTGGTC-3'

P21D74: 5'-CGTAAGTCAGGATCTGTAATC-3'

P21D75: 5'-CGTAAGTCAGGATCTGCGATC-3'

P21D76: 5'-CGTAAGTCAGGATCTATGATC-3'

P21S7: 5'-CGTAAGTCAGGATCTGTGATC-3'

P21D15: 5'-CGTAAGTCAGGATCCCGCGATT-3'

P21D14: 5'-CGTAAGTCAGGATCCGTAATT-3'

P21D16: 5'-CGTAAGTCAGGATCCATGATT-3'

P21D25: 5'-CGTAAGTCAGGATCCCGCGACC-3'

P21D26: 5'-CGTAAGTCAGGATCCATGACC-3'

P21D36: 5'-CGTAAGTCAGGATCCATGGTC-3'

P21D48: 5'-CGTAAGTCAGGATTCGTAATC-3'

P21D38: 5'-CGTAAGTCAGGATTCGTGGTC-3'

P21D58: 5'-CGTAAGTCAGGATTCGCGATC-3'

P21D36n: 5'-CGTAAGTCAGGATCGTTAAC-3'

P21D47n: 5'-CGTAAGTCAGGATCACTGGTC-3'

Templet:



T28P21T7: 3'-GCATTCAGTCCTAGGCACTAGATCGATC-5'

T28P21T: 3'-GCATTCAGTCCTAGACACACTAGATCGATC-5'

T28P21T7n: 3'-GCATTCAGTCCTAGCGATCAGATCGATC-5'



2.2 試劑與酵素

2.2.1 酵素

DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment 購買自 New England Biolab (Ipswich, MA, US)。

2.2.2 試劑

1. 三羥甲基氨基甲烷 (Tris-Base) 購買自慧眾生物科技有限公司 (Taiwan)

2. 鹽酸 (HCl) 購買自景明化工股份有限公司 (Taiwan)

3. Tris-EDTA (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) buffer (pH=8.0)

4. NEBuffer 2 (10X) 購買自 New England Biolab (Ipswich, MA, US)

(500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 100 mM Tris-HCl, pH 7.9)

5. dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 購自 Genestar Biotechnology (Taiwan)

2.2.3 純化套組

EasyPure PCR/Gel Extraction Kit 購自慧眾生物科技有限公司 (Taiwan)

2.4 Klenow fragment 校正能力試驗

將購買的粉末狀寡核苷酸以滅菌之 Tris-EDTA buffer (pH=8.0) 配置為 100 μ M 寡核苷酸保存於-20°C。實驗中，配置含有 50 pmol 引子股與模板股以及 NEBuffer 2 的溶液於 1.5 mL 微量離心管中，依序放置 65°C水浴 30 分鐘、37°C水浴 30 分

鐘最後置於冰上使二股序列黏合。接著加入適配的 dNTP，混合均勻後加入 1U 之 Klenow fragment 於反應體積 20 μ L 放置 37°C 水浴槽中反應 20 分鐘，接著加入 2 μ L 0.25M HCl 並置於冰上 6 分鐘，藉由降低反應環境 pH 以終止反應。加入 2 μ L 0.23M Tris-Base 中和 pH 值，避免鹼基因長時間處於酸性環境而脫落。最後加入 5 μ L Tris-EDTA buffer 以 75°C 乾浴 10 分鐘以完全破壞酵素並置於冰上冷卻。

2.5 Klenow fragment 校正 time course 試驗

以前述流程配置相同濃度，體積為 10 倍之寡核苷酸、NEB buffer 2 和適配之 dNTPs 之混和物，取出 19 μ L 混和物並加入 1 μ L 試劑純水、2 μ L 0.25M HCl 與 2 μ L 0.23M Tris-Base 作為 Blank。接著，加入 9U Klenow fragment 以總體積 180 μ L 在 37°C 水浴槽中，於反應到達 2.5 分鐘、5 分鐘、7.5 分鐘、10 分鐘、12.5 分鐘、15 分鐘、17.5 分鐘與 20 分鐘時取出 20 μ L 至預先加入 2 μ L 0.25M HCl 之 1.5mL 微量離心管並置於冰上以進行酸終止。接著如 2.4 部分所述流程進行酸鹼中和、熱終止以及樣品冷卻。

2.6 樣品去鹽純化

實驗樣品於冷卻完畢後利用 EasyPure PCR/Gel Extraction Kit 進行去鹽純化，首先加入相當於樣品 5 倍體積(145 μ L)之 PG Buffer 並混和均勻，再加入相當於樣品 9 倍體積(261 μ L)之異丙醇(isopropanol)並混和均勻。將混合物加入純化管柱中，以 11000g 離心 30 秒後丟棄濾出液，接著加入 600 μ L Wash Buffer 並以 11000g 離心 30 秒後丟棄濾出液，再以 18000g 離心 3 分鐘將純化管柱的 membrane 甩乾。加入 29 μ L Elution Buffer 並靜置 1 分鐘確保 buffer 完全將 membrane 浸潤，最後以 18000g 離心 1 分鐘，收集濾出液並且保存於 -20°C 等待 MALDI-TOF Mass 分析。



2.7 基質協助雷射去吸附離子化-飛行時間質譜儀分析 MALDI-TOF MS

本實驗所使用之 MALDI-TOF MS 儀器由國立台灣大學基因體醫學研究中心提供。在進行質譜分析前，會先以 Clean Resin Tool Kit (Agena Bioscience, CA)去除陽離子以降低鹽類訊號干擾判讀。首先以 resin 填滿 384 凹洞盤並回收剩餘 resin，再將樣品加入 384 孔盤中，每個孔洞加入 16 μ L 滅菌水稀釋後離心以去除氣泡。接著，將 384 孔盤朝下翻轉並蓋住內涵 resin 的 384 凹洞盤，上下翻轉孔盤-凹洞盤並確保凹洞盤中的 resin 落入孔盤的孔洞中。拿掉凹洞盤後將 384 孔盤以 3200g 離心去除氣泡，並於室溫環境下置於轉盤上翻轉 15 分鐘使 resin 與待測樣品充分反應並去除鹽類，最後以 3200g 離心 5 分鐘沉澱 resin。

去鹽完成後，以 Agena Bioscience MassARRAY® System 分析檢體。此系統可分為三個部分：自動化超微量晶片點樣系統 SpectroCHIP array (Agena Bioscience, CA)、飛行質譜儀 MassARRAY system (Agena Bioscience, CA) 以及電腦分析軟體 Typer 4.0 software (Agena Bioscience, CA)。首先，將 384 孔盤與晶片放入自動化超微量晶片點樣系統，由機械手臂吸取 5~10nL 並將待測樣品點在晶片的對應位置上。接著，於電腦中設定晶片序號、待測物編號、位置和分析模式等，設定完成後取出沾有待測樣品的晶片並將之放入飛行質譜儀以進行樣品離子化與飛行管分析。最後，利用 Typer 4.0 software 調整欲分析之範圍及圖檔比例後輸出頻譜圖並對各訊號之強度進行分析。

2.8 產物百分比計算

除待測物濃度外，先前研究發現在相同濃度之下，待測物的訊號強度與 DNA 序列長度成負相關 (K. Y. Su et al., 2018)，因此實驗所得之訊號強度需先依照產物

長度進行 normalize 後才能分析結果。產物長度與 normalize 係數之關係如附錄五所示(K. Y. Su et al., 2018)。

接著，以 normalize 過後的訊號強度計算各訊號所占比例，以如下公式為例：

$$\text{校正產物比例} = \frac{\text{校正產物訊號強度}}{\text{校正產物訊號強度} + \text{中間產物訊號強度} + \text{未反應DNA訊號強度} + \text{延長產物訊號強度}} \times 100\%$$

2.9 純化套組測試

配置含有 100pmol 引子股與模板股寡核苷酸以及 NEBuffer 2，總體積為 40 μL 的溶液於 1.5 mL 微量離心管中，加入 4 μL 0.25M HCl、4 μL 0.23M Tris-base 以及 10 μL Tris-EDTA buffer(pH=8.0)，混和均勻後分裝置 2 管 1.5 mL 微量離心管中為，每管 29 μL 。其中一管留作 before，另一管以如 2.6 部分所述之方法進行去鹽純化為 after。

接著，before 與 after 中各取出 2 μL 並以 Thermo Fisher NanoDrop 1000 Spectrophotometer 測定濃度。最後，自 before 與 after 各取出 10 μL 溶液，加入 4mL 試劑純水中進行稀釋並以 Radiometer Medical CDM83 CONDUCTIVITY METER 測量導電度。

第三章 結果

3.1 Klenow fragment 對單一核苷酸誤配之校正能力分析

首先以 dNTPs 作為合成原料探討 KF 對於 DNA 上不同位置的誤配之校正能力。首先設計於引子股 3' 端數來第 1 至 7 個位置上帶有 A:C 或者 G:T 誤配之 DNA，根據誤配核苷酸的位置，DNA 受時命名為 mm1 至 mm7。在反應中給予 100 μ M dATP、100 μ M dTTP、100 μ M dCTP 與 1U Klenow fragment 於 37°C 反應 20 分鐘。由於反應中未給予 dGTP，Klenow fragment 在進行聚合作用時會若模板股為 dCMP 則聚合作用終止，透過對於模板股的序列設計，可以以產物長度區分出 DNA 上的誤配是否有受到 Klenow fragment 的校正，如圖一所示。

mm1 至 mm7 反應頻譜圖結果如圖二所示，各產物序列與分子量詳列於表一。在校正實驗中，受到校正的產物以 PR (Proof Reading) 表示，而 KF 無法辨識誤配並且直接進行聚合作用的產物以 PE (Primer Extension) 表示，另外，我們在 mm4 的實驗中觀察到了分子量為 5538.7 的產物，其分子量介於原引子股與 PR 之間，我們推測其為校正反應的中間產物並將其命名為 Ex，由於其已經開始進行校正反應，因此在計算產物比例時將其併入 PR 計算。實驗數據顯示，mm1 至 mm3 的 PR 產物比例分別為 79.1%、100.0%、100.0%，mm4 在經過反應後產生了 24.5% 的 PR 產物以及 75.5% 的 PE 產物，mm5 至 mm7 在反應後均未出現 PR 產物訊號，PE 產物的占比皆高於 80%。依據上述結果可推測，在 3 種 dNTPs 的反應條件下，KF 對於自引子股 3' 端數來的 4 個核苷酸範圍內之誤配具有校正活性，其中，第 1 至 3 個位置上誤配核苷酸的校正活性較高，4 號位置較低並且部分可在逃脫 KF 的校正後進行延長。距離引子股 3' 端 5 至 7 個核苷酸的誤配核苷酸則因無法被 KF 辨識與校正，在 KF 的聚合作用下延長並形成 PE。

3.2 引子股 3' 近端誤配對遠端誤配核苷酸校正活性之影響



為了更進一步探討 KF 對於 DNA 上誤配核苷酸的校正機制，我們調整了前述實驗中使用的模板股 DNA 並設計了一系列帶有兩個誤配核苷酸的 DNA 受質進行實驗。

本實驗所使用之 DNA 受質在自引子股 3'端數來的第 7 個位置固定帶有 G:T 誤配的情況下，第 1 至 6 個位置各別帶有 A:C 或者 G:T 誤配，其 DNA 受質命名為 DM17 至 DM67，以此 DNA 受質了解當有兩個誤配核苷酸同時出現在 DNA 上時，KF 之校正活性會受到什麼影響。在實驗中，採用給予 dATP、dTTP、dCTP 並不給予 dGTP 的方式使 DNA 聚合反應停止以區別不同產物，如圖三所示。實驗結果如圖四所示，各產物序列與分子量詳列於表二。

以下將產物中僅有靠近引子股 3'端之誤配核苷酸受到校正的產物以 PR1 表示；DNA 上的兩個誤配核苷酸皆受到校正的產物以 PR2 表示。逃離校正反應進行延長的產物以 PE 表示。另外，校正反應之中間產物依據其長度與反應前引子股的差異命名，若校正產物長度比引子股少一個核苷酸，命名為 Ex1 少兩個核苷酸，命名為 Ex2，以此類推。在計算產物比例時，DM27 之 Ex1 以及 DM37 之 Ex1、Ex2 皆是已經開始進行校正反應，並且尚未對 3'近端之誤配核苷酸進行校正，因此我們將其與 PR1 產物合併計算。

實驗結果發現 KF 對於距離引子股 3'端 1 至 3 個位置上的誤配核苷酸校正產物 PR1 均高於 70%，同時校正 7 號位置誤配核苷酸的校正產物 PR2 為 5 至 8%，且沒有逃脫校正之 PE 產物出現。DM47 在經過反應後，主要出現 PR2 產物為 83.8%，而 PR1 比例為 10.3%，PE 為 5.9%。在 DM57 與 DM67 的實驗中，兩者皆未出現 PR1 的訊號，PR2 的比例分別為 3.3% 與 10.0%，PE 的比例分別為 93.3% 與 88.9%。根據上述結果發現，當引子股 3'近端之誤配核苷酸位於 1 至 3 號位置時，KF 傾向於只對近端之誤配核苷酸進行校正；若近端誤配核苷酸位於 4 號位置，則 7 號位置上的誤配核苷酸傾向一併受到 KF 的校正。而近端誤配核苷酸位於 5 號以及 6 號時，DNA 受質上的兩個誤配核苷酸都傾向逃脫 KF 的校正並

進行延長。另外，我們在比較 DM47 與前述 mm4 實驗的結果時，我們發現 7 號位置上的誤配核苷酸亦會影響 KF 對於 4 號位置上誤配核苷酸的校正活性，在 mm4 實驗中產生了 75.5% 的 PE 產物，而在 DM47 實驗中 PE 產物為 5.9%，此一現象將於第四部份進行討論。

由於 PR2 產物為 DNA 上兩個誤配核苷酸皆受到校正之產物，因此引子股 3' 近端之誤配核苷酸受到校正的比例實際上為 PR1+PR2，以 DM47 為例，4 號位置上誤配核苷酸受到校正的比例為 $PR1+PR2=10.3\%+83.8\%=94.1\%$ 。此一計算方法於後續的實驗中亦同，因此不再做贅述。

在單一誤配核苷酸校正活性實驗中，我們發現了 KF 能夠對距離引子股 3' 端 4 個核苷酸以內的誤配核苷酸進行校正，而在 DM47 的實驗中，至 4 號位置上的誤配到 7 號位置上的誤配長度剛好也是 4 個核苷酸，因此，我們推測 DM47 的雙誤配校正活性與兩個誤配核苷酸間的距離相關。

3.3 雙誤配核苷酸間距對其共同受到校正活性之影響

為了瞭解雙誤配核苷酸間距對其受到共同校正活性的影響，我們設計了一系列的 DNA 引子，當他們與 T28P21T7 模板股配對時會在長度為 4 至 6 個核苷酸的範圍內同時帶有兩個誤配核苷酸。依照 DM17 等 DNA 的命名原則，我們將此實驗之 DNA 受質命名為 DM14、DM15、DM16、DM25、DM26、DM36、DM38、DM48、DM58 並以前述實驗方法測試 KF 之校正活性。實驗結果如圖五所示，並將產物序列詳列於表三。

在本實驗中，反應後只有靠近引子股 3' 端之誤配核苷酸受到校正後的產物稱為 PR1，兩個誤配核苷酸皆受到校正的產物稱為 PR2，而若兩個誤配核苷酸皆逃脫校正並且受到 KF 聚合作用而延長，則稱為 PE。在實驗中，有部分 DNA 受質在反應後出現了校正反應的中間產物，這些中間產物的命名依據其長度與反應前引子股的差異命名：若比引子股短 1 個核苷酸，命名為 Ex1，若短 2 個核苷酸，

則命名為 Ex2，以此類推。在 DM14 以及 DM25 中出現的 Ex3 中間產物其分子量符合未經反應的引子股自 3'端數來前三個核苷酸受到水解後之分子量，這代表著在引子股上靠近 3'端的誤配核苷酸已被移除，並且 KF 仍在繼續對此引子進行校正，因此在計算產物時，我們將其合併至 PR2 進行計算。而 DM36 中的 Ex1、DM38 的 Ex2 以及 DM48 的 Ex3 中，靠近引子股 3'端之誤配核苷酸皆還未受到校正，因此將其合併於 PR1 計算。

實驗結果顯示 DM15 與 DM38 在反應過後的產物 100%為 PR1，DM16 產生了 90.9%的 PR1 以及 9.1%的 PR2，DM26 反應過後產生了 85.1%的 PR1 以及 8.4%的 PR2，DM48 在反應後的產物占比為 PR1 60.2%、PR2 11.0%以及 PE 16.5%，這代表著當兩個誤配核苷酸距離長度為相隔 5 個核苷酸時，KF 傾向只對一個誤配核苷酸進行校正。另外，DM14 中 PR1 佔全部產物的 19.4%，PR2 則為 80.6%；DM25 在進行反應後產生了 81.1%的 PR1 以及 18.9%的 PR2；DM36 的產物中有 74.3%的 PR1 以及 25.7%的 PR2。上述三個 DNA 受質與之前實驗中的 DM47 相同，兩個誤配核苷酸距離皆為 4 個核苷酸，但 DM14 傾向於將兩個誤配核苷酸一併校正，而 DM25、DM36 却傾向僅對引子股 3'近端之誤配核苷酸進行校正。最後，DM58 反應後的產物為 100% PE，代表此 DNA 受質上的兩個誤配核苷酸皆無法受到 KF 的校正。

3.4 誤配鹼基對於雙誤配核苷酸共同校正活性之影響

前述實驗結果顯示誤配核苷酸在同樣距離下，DM14、DM47 的兩個誤配核苷酸容易一併受到 KF 的校正，而 DM25、DM36 中 KF 傾向於只對接近引子股 3'端之誤配核苷酸進行校正。在同時帶有兩個誤配的 DNA 受質中，發現到了誤配組合的不同：DM47 的 DNA 受質靠近引子股 3'端的第 4 個誤配為 C:A 誤配，而遠端第 7 個誤配為 G:T 誤配；在 DM36 中，引子股 3'近端的第 3 個誤配為 T:G 誤配，遠端第 6 個誤配則為 C:A 誤配。

為了確認兩種 DNA 間校正活性的差異是否是由序列不同所致，於是以下 DM47n 與 DM36n DNA 受質進行試驗，DM47n 為在引子股 3' 端數來第 4 個位置產生 T:G 誤配，第 7 個位置產生 C:A 誤配；而 DM36n 為在引子股 3' 端數來的 3 個位置產生 C:A 誤配，而第 6 個位置則產生 G:T 誤配。為配合新的 DNA 受質序列，在本實驗中使用的三種 dNTPs 為 $100 \mu\text{M}$ dATP、 $100 \mu\text{M}$ dCTP、 $100 \mu\text{M}$ dGTP，如圖六所示。

實驗結果如圖七所示，並將序列詳列於表四。在改變誤配核苷酸序列後，DM35n 反應產物 PR1 占比為 9.5%，PR2 為 90.5%。DM47n PR1 占比為 63.0%、PR2 12.2%。相較於 DM35，DM35n 傾向於將 3 號與 5 號位置上的誤配核苷酸一併校正；而 DM47n 與 DM47 相比，傾向於僅將 4 號位置上的誤配核苷酸校正。根據實驗結果，誤配核苷酸的不同，會影響 Klenow fragment 是否會將 DNA 上的兩個誤配核苷酸一同修復，推測誤配序列的不同對雙誤配核苷酸共同校正活性有所影響，更多的細節將在第四章進行討論。

3.5 DM47 校正反應中間產物分析

接下來，為了對於雙誤配核苷酸共同校正的過程能有進一步的理解，我們利用 DM47 DNA 受質進行了 time course 實驗，實驗結果如圖八所示。結果發現在反應開始的前 5 分鐘，KF 會將引子股上的 dNMP 自 3' 端逐個移除至將 4 號位置上的誤配鹼基校正，過程中產生中間產物 Ex1、Ex2、Ex3，分別代表 DM47 引子股 3' 端的 1 至 3 個核苷酸受到水解後的產物，此時也有部分 DNA 逃脫了校正並進行聚合作用形成 PE。反應至 5 分鐘至 7.5 分鐘時，所有的 DNA 都進行校正反應，或者由 KF 進行聚合作用並延長形成 PE 產物，另外，部分的 PR1 產物接著進一步進行校正反應，形成 PR2 以及中間產物 Ex5。反應開始後 10 分鐘至 12.5 分鐘時，4 號位置誤配核苷酸完成校正，並且在 12.5 分鐘至 20 分鐘時，KF 繼續對 PR1 進行校正反應，PR1 產物上的核苷酸自 3' 端被逐漸水解，形成 Ex5 與

PR2。



3.6 離子濃度對於 Klenow fragment 校正活性之影響

當利用 MALDI-TOF MS 測定反應結果時，會遇到某些樣品無法產生出訊號與頻譜圖的情形尤其以雙誤配核苷酸的實驗最常發生。針對此一狀況，首先試圖增加誤配核苷酸雙股 DNA 的穩定性，當引子股與模板股無法形成穩定的雙股 DNA 時，DNA 受質會容易受到 KF 的 3'→5'外切酶攻擊並水解。

過去的研究中，曾提到可藉由提高反應物中的鹽類離子濃度來穩定雙股 DNA(Owczarzy et al., 2004)。因此我們首先以 DM47 DNA 受質於 100mM NaCl 的環境中進行校正反應，同時比較 50mM NaCl 分別於兩種鹽類濃度的環境下同步進行了三重複實驗並進行單尾 t-test。實驗結果如圖九所示，單尾 t-test 結果如表五所示。根據實驗結果，PR1 與 PE 之 p value 皆<0.05，PR2 則為 0.102。依據實驗結果可得知，在提高鹽類離子濃度後，PE 產物比例有顯著的減少，PR1 則有顯著的增加。

3.7 EasyPure PCR/Gel Extraction Kit 純化能力分析

為了在 MALDI-TOF MS 的分析中取得較佳的訊號，在實驗中使用 EasyPure PCR/Gel Extraction Kit 純化套組以去除鹽類。為了瞭解其純化能力，我們進行了三重複實驗以測試樣品於純化前後的 DNA 濃度以及導電度變化並進行單尾 t-test。實驗結果如表六所示。實驗結果顯示，在使用純化套組過後，樣品的導電度有顯著的下降，這代表著在使用純化套組過後，樣品中鹽類離子被移除且濃度有著顯著的下降。另外，我們也發現，在樣品通過純化套組後，其中的 DNA 濃度亦有顯著的下降，但由於 DNA 加成物(adduct)的減少，實際在 MALDI-TOF MS 分析後所得的產物訊號反而會比未經純化之樣品還要強，因此我們決定採用此純

化套組進行樣品去鹽。





第四章 討論

本實驗室過去的發表中利用 KF 在含有四種 ddNTPs 的環境下與 MM1 至 MM9 DNA 受質進行反應，並發現距離引子股 3'端 1 至 4 個位置上的誤配核苷酸皆會進行校正反應產生 PR 產物，而 MM5 中出現部分校正產物 PR，以及部份的聚合產物 PE，而當誤配核苷酸與 DNA 引子股 3'端的距離超過 5 個核苷酸，反應後產物中不再出現 PR(K. Y. Su et al., 2018)。在本篇研究中，距離引子股 3'端 3 個核苷酸以內之誤配核苷酸，亦即 mm1、mm2、mm3 DNA 受質，皆進行校正反應，mm4 反應後的產物中同時有 PR 以及 PE 的存在，在 mm5 至 mm7 的實驗中，KF 無法對 DNA 上的誤配核苷酸進行校正而會直接將 DNA 受質進行聚合反應。與 2018 年發表的結果比較，本篇研究中開始出現 PE 的組別由 MM5 變為 mm4，並且 KF 對 mm5 上的誤配核苷酸無法偵測到校正活性，代表著 KF 能夠及時辨識並進行校正的範圍比起過去實驗中少了 1 個核苷酸。這個現象與本實驗室在 2020 年所發表的研究中，使用三種 dNTPs 以及四種 ddNTPs 進行實驗所得出的差異相似(Chang et al., 2020)。我們推測這是由於 ddNTP 對 DNA 聚合酶的抑制作用(Tabor & Richardson, 1995)使 DNA 聚合酶花費更多時間停留於 DNA 上，讓 DNA 聚合酶有更多的機會對誤配鹼基進行校正所致。另外，KF 對於 1 至 4 號位置上誤配核苷酸的校正能力也符合本實驗室過去所提出，KF 能與引子末端 4 個鹼基直接接觸的敘述(Chang et al., 2020)。

在雙誤配核苷酸 DNA 受質的實驗中，結果顯示 KF 作用於 DM17、DM27 以及 DM37 時，傾向僅修復靠近引子股末端之誤配核苷酸，以下稱此種產物為 PR1。DM47 中的兩個誤配核苷酸容易一併受到 KF 的校正，以下稱此種產物為 PR2，由於在先前的實驗中發現，mm7 無法受到 KF 的辨識以及校正，因此我們可以推測 DM47 中，KF 對 7 號位置誤配核苷酸的校正反應是受到了 4 號位置上的誤配核苷酸進行校正反應所影響。另外，與 mm4 相比，DM47 反應後產生的 PE 有所下降。在過去的研究中曾提到，DNA 上的誤配核苷酸會影響其 3'與 5'方



向各 4 個核苷酸以內的範圍之結構(Rossetti et al., 2015)，而 4 號位置變在此範圍內，因此可能會受到 7 號位置誤配的影響產生更大的結構改變，因此更容易被 KF 辨識與校正。

接著，我們針對 DNA 上兩個誤配核苷酸的距離對其共同受到校正的活性影響進行分析。DM14 在經過反應後，PR2 佔了總產物的 80.6%，考慮到在先前實驗中 mm1 與 mm4 皆能夠獨自接受 Klenow fragment 的校正作用，這是個十分合理的結果。而兩個誤配核苷酸間距離較遠的 DM15、DM16、DM26 以及 DM48 皆產生了較高比例的 PR1，因此我們推測，自接近引子股 3' 端的誤配核苷酸算起 3 個核苷酸範圍以內的誤配核苷酸，容易受到 3' 近端之誤配核苷酸影響進而被 DNA 聚合酶校正。但令人意外的，同樣距離 3 個核苷酸的 DM36 以及 DM25 的反應產物中，PR1 分別佔了 74.3% 與 81.1%，與 DM14 相比，這兩組 DNA 距離引子股 3' 端較遠的誤配核苷酸皆位於無法被 KF 直接接觸的位置，但在前項實驗中的 DM47 上 7 號位置的誤配同樣無法直接與 KF 接觸，其反應後產物中卻有 83.8% 的 PR2。比較這幾組 DNA 的序列後，我們推測除去誤配核苷酸之間的距離外，誤配的種類，如 A:C 誤配與 G:T 誤配，也可能會影響 Klenow fragment 的校正能力。

為了證明這個假說，在我們對 DM47 以及 DM36 的序列進行調整後，DM47n 中引子股 3' 近端的誤配由 C:A 誤配改為 T:G 誤配，遠端由 G:T 誤配改為 C:A 誤配；DM36n 引子股 3' 近端的誤配由 T:G 誤配改為 C:A 誤配，遠端則由 C:A 誤配改為 T:G 誤配。以 DM47n 與 DM36n 進行實驗後發現，DM47n 反應後的產物中，PR1 占了 63.0%，而 PR2 僅有 12.2%，與之相反的，DM36n 反應後的產物中，PR2 占了 90.5%，而 PR1 僅有 9.5%。DM47 與 DM47n、DM36 與 DM36n 實驗的差異顯示，誤配種類的不同亦會影響兩個誤配核苷酸共同受到校正的活性。在過去的研究中曾提到，不同的誤配會對 DNA 局部造成不同的結構改變，同時其穩定度也有所差異(Rossetti et al., 2015)，因此，我們認為誤配種類對於雙誤配

核苷酸共同校正活性的影響是源自於誤配核苷酸本身結構上的差異，造成 KF 對其辨識能力的不同，然而其具體的影響以及機轉仍有待更進一步的實驗分析。而在 DM58 的實驗中，5 號以及 8 號位置上的誤配核苷酸皆無法受到 KF 的校正，結合 mm5 無法被校正的結果，我們推測這個現象是由於 5 號位置的誤配核苷酸本身便位於 KF 能夠進行辨識的範圍之外，因此兩個誤配核苷酸皆能夠逃脫 KF 的校正並進行延長。

接著，為了對 KF 校正作用的過程有進一步的了解，我們以 DM47 進行了總時長為 20 分鐘的 time course 實驗。結果發現於反應的前 10 分鐘內觀察到 KF 在對 4 號位置的誤配核苷酸進行校正時，會自引子股 3' 端開始逐個將核苷酸移除，因此產生 Ex1、Ex2 以及 Ex3 的訊號。與此同時，在 5 分鐘到 7.5 分鐘之間，Klenow fragment 也開始將 PR1 引子股 3' 端的核苷酸逐個移除，並且產生 Ex5 以及 PR2，並且在 10 分鐘過後，原本的 DM47 DNA 以及 Ex1、Ex2 與 Ex3 已反應完畢，不再產生新的 PR1 產物，與此同時，KF 仍然繼續對 PR1 進行校正反應，造成 PR1 逐漸減少，並且 PR2 逐漸增加。另外，從 2.5 分鐘與 5 分鐘的結果可以觀察到，在沒有產生 PR1 之前，Klenow fragment 無法跳過 4 號位置上的誤配核苷酸直接對遠端的誤配核苷酸進行校正。有鑑於 3'→5' 外切酶對於核苷酸的水解的速度高於 5000 s^{-1} (Dangerfield & Johnson, 2023)，且在我們的實驗中仍能觀察到校正反應中間產物的存在，我們推測 KF 在對引子股 3' 端核苷酸進行水解時，並非連續進行水解作用，而是將一個核苷酸進行水解後，將單股 DNA 自 3'→5' 外切酶活性位送回聚合酶活性位，並且由聚合酶活性位判斷是否仍有誤配核苷酸後，再次送往 3'→5' 外切酶活性位對下一個核苷酸進行水解。整理以上幾點，我們提出了 KF 對 DM47 DNA 進行校正作用的流程模型圖示於圖十。以下將位於 4 號位置的誤配核苷酸稱為 A、7 號位置上的誤配核苷酸稱為 B。一、由於誤配核苷酸 A 與 KF 的直接接觸以及誤配核苷酸 B 造成的 DNA 結構改變影響，KF 將 DM47 之引子股由聚合酶活性位轉移至 3'→5' 外切酶活性位。二、3'→5' 外切酶

水解引子股 3'端第一個核苷酸後將引子股送回聚合酶活性位。三、由於原本位於引子股 3'端之核苷酸受到水解，KF 重新與原本位於 2 號至 5 號位置上總共 4 個核苷酸直接接觸。四、KF 因為與誤配核苷酸 A 的直接接觸以及誤配核苷酸 B 所造成的 DNA 結構改變再次將引子股 3'端送至 3'→5'外切酶活性位，並在水解了一個核苷酸以後將引子股送回聚合酶活性位。五、重複步驟三與步驟四，直到將誤配核苷酸 A 移除。六、此時誤配核苷酸 B 已由原本的 7 號位置前進至 3 號位置因而與 Klenow fragment 直接接觸，Klenow fragment 在辨識出誤配核苷酸 B 後繼續進行校正反應，直到誤配核苷酸 B 被切除。

在實驗過程中，我們時常遭遇 DNA 在經過酵素反應後無法被 MALDI-TOF MS 偵測的情況。基於我們的實驗設計，我們懷疑是由於 DNA 序列上的兩個誤配核苷酸導致 DNA 不穩定，在進行酵素反應前引子股便與模板股分離，並於加入 Klenow fragment(KF)後引子股、模板股皆受到 3'→5'外切酶的攻擊並且水解。以 DM47 為例，在引子股與模板股黏合後，其自由能(Free energy)為-19.2，若引子股與模板股間沒有誤配的發生，黏合後自由能為-27.5。過去的文獻指出，環境中的鹽類離子能對 DNA 的穩定性起到至關重要的作用(Tan & Chen, 2006)，因此我們嘗試增加反應中所使用的鹽類離子濃度以穩定 DNA。然而，反應中使用的鎂離子為 DNA 聚合酶以及 KF 之 3'→5'外切酶作用所需的物質(Brautigam et al., 1999; Steitz, 1999)，因此，我們以 DM47 進行了三重複實驗並發現在提高鹽類離子濃度後，PE 產物有顯著的下降並且 PR1 產物有顯著的上升。在過去發表的研究中曾提到，過量的鎂離子會抑制 DNA 聚合酶的活性並使 DNA 聚合酶在 DNA 上停留更長的時間(Wang & Konigsberg, 2022)。因此，我們推測這樣的改變是源自於 DNA 聚合酶在 DNA 上停留時間的延長造成更大的機會可以辨認出誤配的核苷酸。

在本篇研究中主要討論的是 KF 針對 DNA 上不同位置誤配核苷酸的校正活性。雖然改變鹽類濃度後 DM47 實驗中 PR1 以及 PE 的比例有所改變，但

PR2>PR1>PE 的整體趨勢並沒有不同。另外，在採用高鹽濃度環境進行實驗後，我們也發現了單次實驗可取得地有效數據有明顯的增加，因此，我們決定使用高鹽濃度進行反應。

由於 DNA 骨架(backbone)所帶有的負電荷，DNA 容易吸引陽離子(cation)與 DNA 形成加成物(adduct)。由於 MALDI-TOF MS 的高解析度，加成物會以雜訊的形式出現在 DNA 產物訊號周圍。另外，在本篇研究中，使用了高濃度的鹽類離子來穩定 DNA 雙股結構，因此，為了避免加成物訊號的干擾，我們於 KF 酵素反應結束後以 EasyPure PCR/Gel Extraction Kit 套組進行去鹽純化。為了瞭解套組的純化能力，我們首先嘗試將引子股、模板股以及含有鹽類的 buffer 混和後以此套組進行純化並比較樣品在純化前後之 DNA 濃度以及離子濃度的不同。在 DNA 濃度的測定上，我們測定了樣品吸收光譜於 260nm 吸光度並換算為 DNA 濃度，而鹽類濃度的變化則以樣品導電度的變化進行分析。根據結果我們發現，樣品於使用該套組進行純化後，其導電度有顯著的下降，然而與此同時，DNA 的濃度也從 39.4ng/μL 下降至 18.7ng/μL，雖然如此，我們發現在經過純化後，MALDI-TOF MS 頻譜圖上得到的訊號反而較純化前強。這可能是因為鹽類離子的減少導致待測物 DNA 訊號不會被分散至加成物的訊號中所致，因此，我們認為使用此純化套組的利大於弊。

在本篇研究中，我們探討了 Klenow fragment (KF) 對於 DNA 不同位置上的核苷酸物配的校正活性，以及對於雙誤配核苷酸共同校正的活性。最後，根據 time course 的實驗，我們認為 KF 在對誤配核苷酸進行校正時，會逐個將引子股 3' 端核苷酸水解並檢查 DNA 上的錯誤是否被修正。另外，我們也提出了誤配的種類會影像校正活性的可能性。

然而，誤配種類對 KF 校正活性具體的影響以及機制仍然需要進行更進一步的實驗才能夠探討。另外，根據本篇研究所提出的 KF 校正流程模型，在本篇研究中所使用對各產物百分比的計算中對於反應中間產物的計算，可能需要考慮到



中間產物並未被 KF 辨認為異常 DNA 而重新進行聚合作用並形成 PE 的可能性並加以修正。同時，根據我們所推測的模型，當兩個誤配核苷酸距離長度為 5 個核苷酸時，於 3'近端核苷酸受到水解後，遠端之誤配合乾算會位於 4 號位置並且能夠被 KF 辨識以及校正。而在 DM15、DM26 以及 DM38 的實驗結果中，PR2 的占比卻都不及 10%。這是否是源自於誤配序列的不同，亦或是有其他的影響因素仍有待更進一步的實驗探討。為了穩定 DNA 受質，我們使用了較高濃度的鹽類進行實驗，然而 buffer 中鎂離子的濃度會降低 DNA 聚合酶的反應活性進而使 PE 產物減少、PR1 增加。因此，為了最佳化實驗的環境，配置含有較高濃度鈉離子與正常濃度的鎂離子之 buffer 也是必要的。最後，本篇研究中參考了實驗室過去實驗中所做出的 normalization 標準(K.-Y. Su et al., 2018)，然而在該實驗中所使用的寡核苷酸長度範圍為 17 個核苷酸至 24 個核苷酸，而在本篇研究中的實驗產物長度範圍為 14 至 23 個核苷酸，為了取得更精確的產物比例，有必要重新建立 normalization 標準。

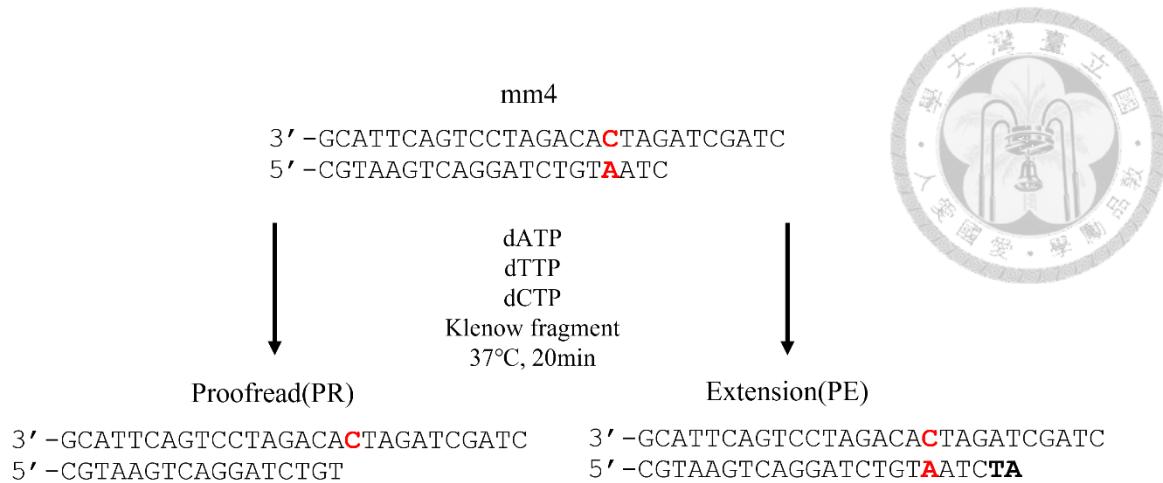
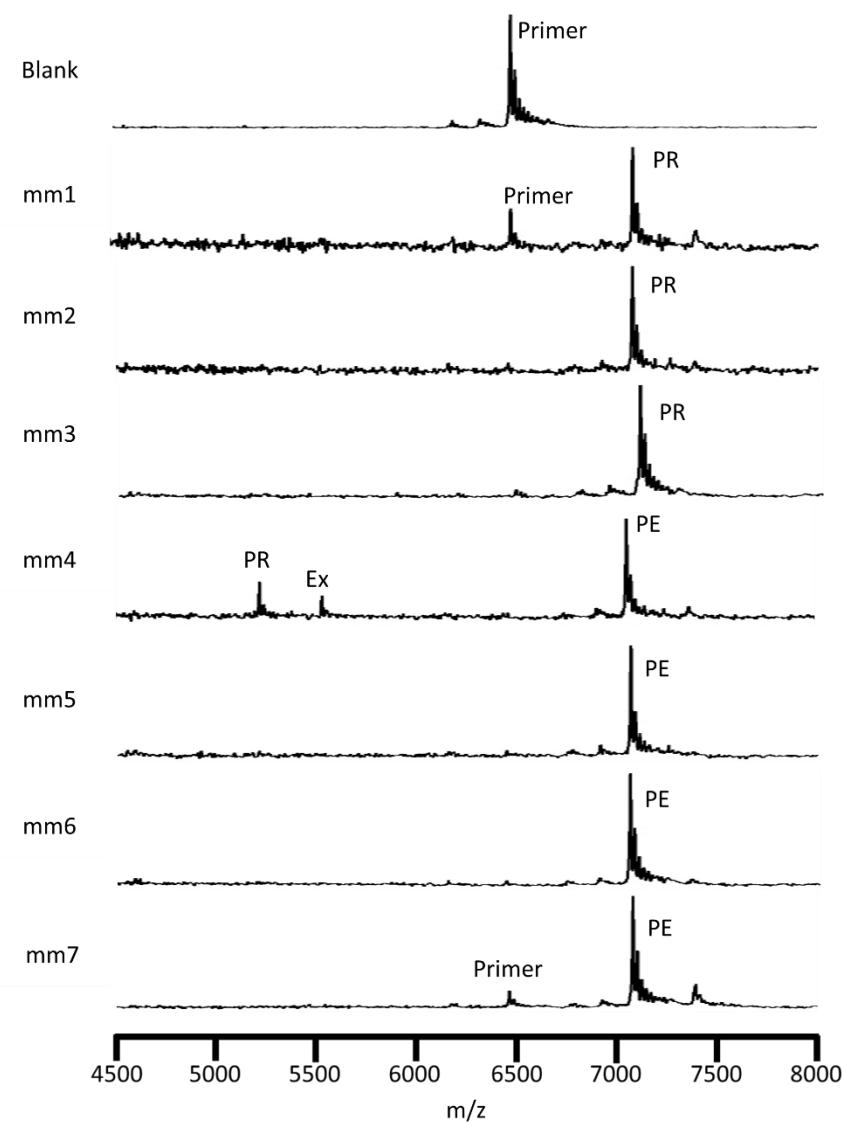


圖 一 單一核苷酸誤配校正能力實驗設計示意圖

以 mm4 為例，引子股的原始長度為 21nt，由於在反應中不提供 dGTP，因此在反應中若是位於引子股由 3' 端數來第 4 個位置，那麼校正的產物長度便為 17nt，以 PR 表示；而如果此誤配逃離 Klenow fragment 的校正的話便會延長至 23nt，以 PE 表示。



	Primer	PR	PE
mm1	20.9 \pm 8.1%	79.1 \pm 8.1%	0.0 \pm 0.0%
mm2	0.0 \pm 0.0%	100.0 \pm 0.0%	0.0 \pm 0.0%
mm3	0.0 \pm 0.0%	100.0 \pm 0.0%	0.0 \pm 0.0%
mm4	0.0 \pm 0.0%	24.5 \pm 2.7%	75.5 \pm 2.7%
mm5	3.9 \pm 5.5%	0.0 \pm 0.0%	96.1 \pm 5.5%
mm6	0.0 \pm 0.0%	0.0 \pm 0.0%	100.0 \pm 0.0%
mm7	18.5 \pm 3.5%	0.0 \pm 0.0%	81.5 \pm 3.5%

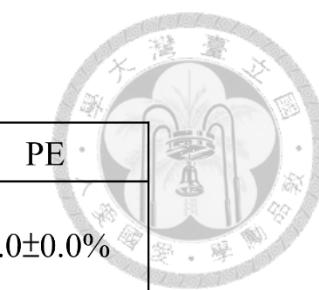


圖 二 Klenow fragment 針對不同位置上單一核苷酸誤配校正能力

實驗設計了 7 種長度為 21 個核苷酸的引子股，在與模板股黏合後分別在由引子股 3' 端數來的 1 至 7 個位置帶有誤配核苷酸，並依據誤配位置將其命名為 mm1 至 mm7 並與 1U KF 進行反應。Blank 為未加入 KF 的組別，PR 為誤配核苷酸受到校正後的產物，PE 為 KF 並未辨識出誤配核苷酸並且將引子股延伸的產物，mm4 中的 Ex 為校正反應的中間產物。各產物所占百分比詳列於右表，其序列列於表一。

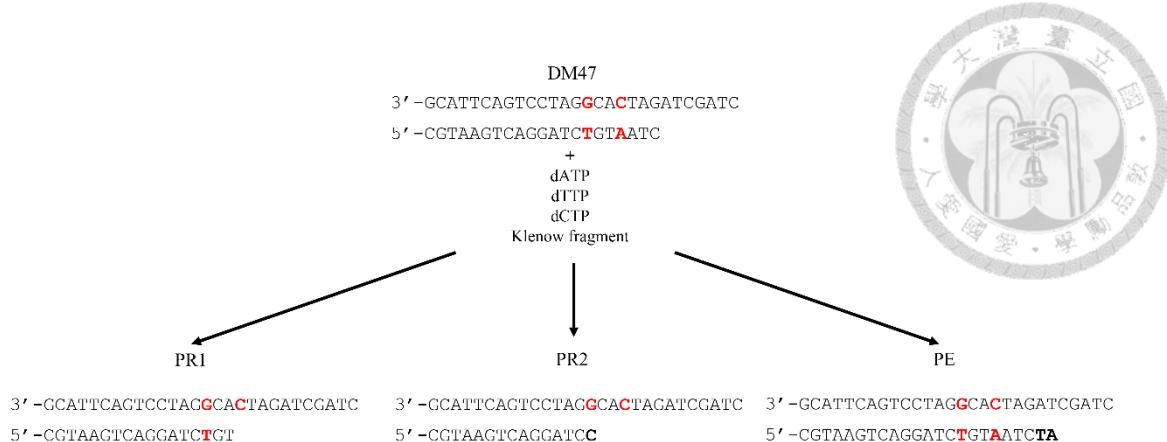
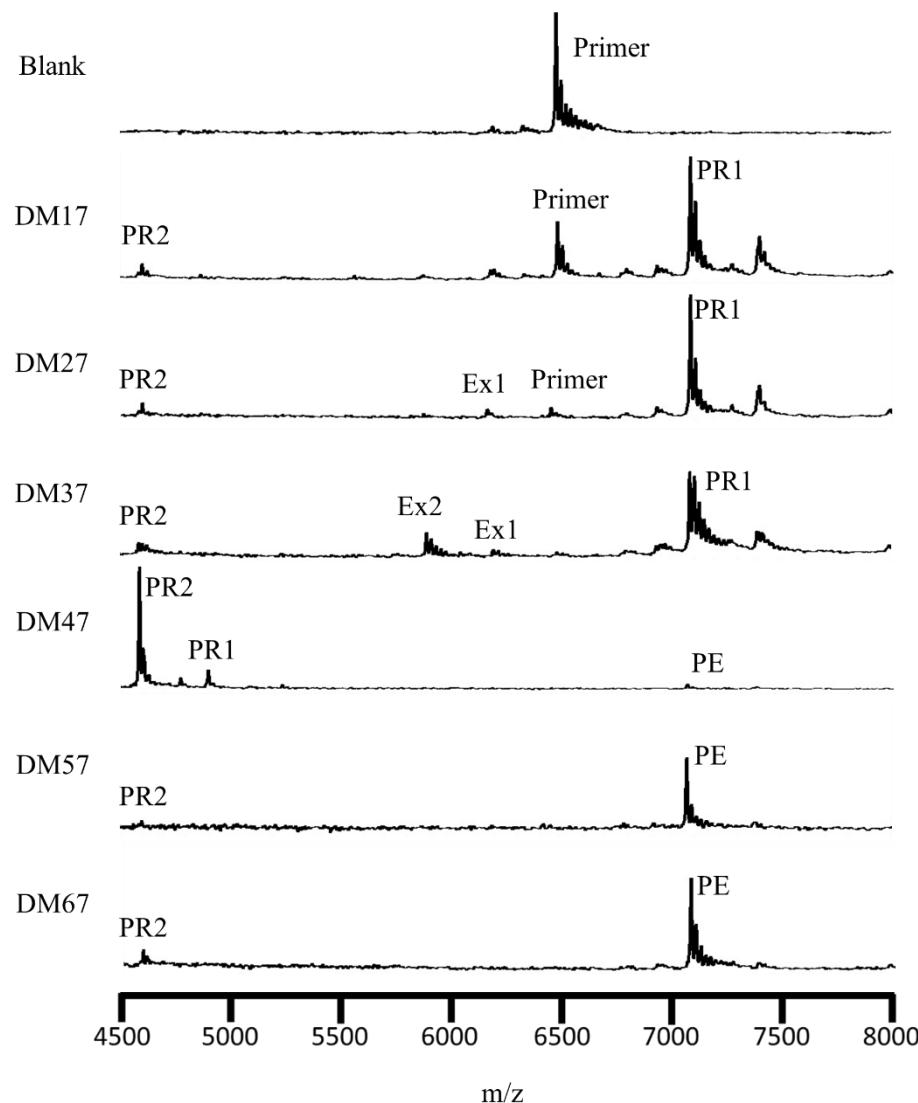


圖 三 雙核苷酸誤配校正能力實驗設計示意圖

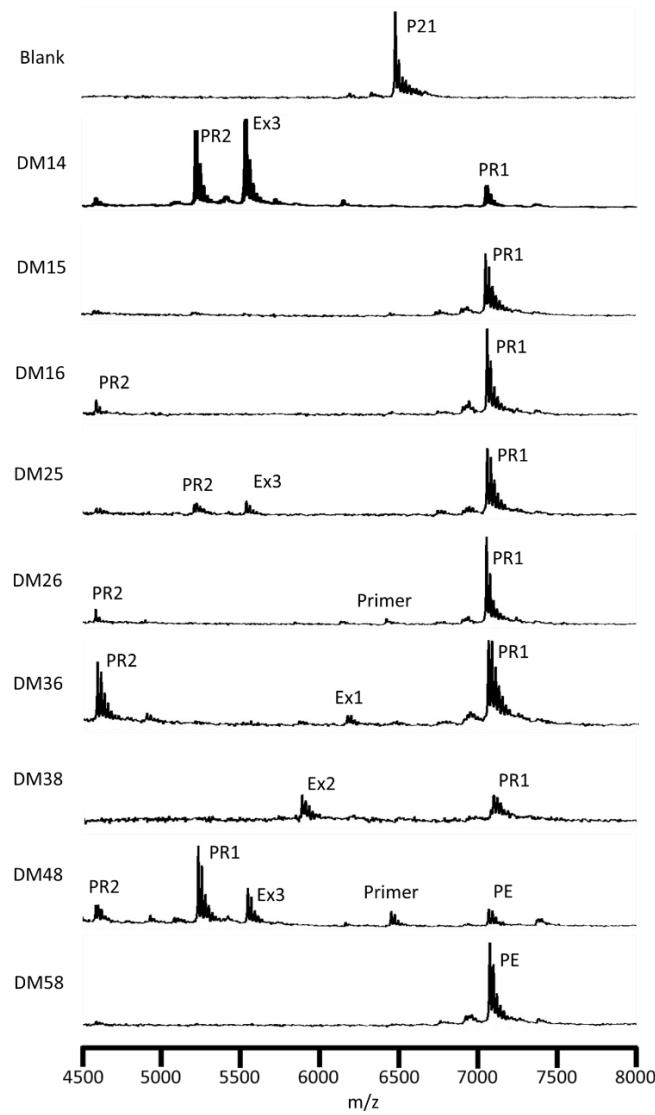
PR1 為僅接近 DNA 引子股 3' 端之誤配核苷酸接受校正後之產物，PR2 為兩個誤配核苷酸皆受到校正之產物，PE 為誤配核苷酸未受到校正並且 DNA 受到 KF 聚合作用之產物。以 DM47 為例，反應前的引子股長度為 21nt，在缺少 dGTP 的反應環境下與 KF 反應後，PR1、PR2 以及 PE 長度分別為 17nt、15nt 以及 23nt，可以 MALDI-TOF 區分出其分子量的不同。



Substrate \ Signal	Primer	PR1	PR2	PE
DM17	20.3 \pm 5.7%	74.5 \pm 4.5%	5.2 \pm 0.3%	0.0 \pm 0.0%
DM27	13.5 \pm 5.7%	81.5 \pm 5.3%	5.0 \pm 0.5%	0.0 \pm 0.0%
DM37	0.0 \pm 0.0%	92.2 \pm 0.7%	7.8 \pm 0.7%	0.0 \pm 0.0%
DM47	0.0 \pm 0.0%	10.3 \pm 8.2%	83.8 \pm 7.1%	5.9 \pm 4.7%
DM57	3.4 \pm 4.8%	0.0 \pm 0.0%	3.3 \pm 4.6%	93.3 \pm 9.5%
DM67	1.2 \pm 1.7%	0.0 \pm 0.0%	10.0 \pm 2.8%	88.9 \pm 1.5%

圖 四 DNA 引子股 3'近端誤配對遠端誤配核苷酸校正能力之影響

藉由調整模板股序列，我們讓 mm1 至 mm6 DNA 除原本帶有的誤配核苷酸外同時在由末端數來第 7 個位置發生 G:T 誤配，並將他們重新命名為 DM17 至 DM67。DNA 與 KF 反應 20 分鐘後結果如圖所示。Blank 為未加入酵素的組別，PR1 為僅有較靠近末端的誤配核苷酸受到校正所產生的產物，PR2 為兩個誤配核苷酸皆受到修復的產物，PE 為 KF 未辨識出誤配並且使模板股延長所產生的產物，Ex1、Ex2 皆為進行校正反應時產生的中間產物。DNA 之序列以及計算後所得各產物占比詳列於表二。



	Primer	PR1	PR2	PE
DM14	0.0%	19.4%	80.6%	0.0%
DM15	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%
DM16	0.0%	90.9%	9.1%	0.0%
DM25	0.0%	81.1%	18.9%	0.0%
DM26	6.4%	85.1%	8.4%	0.0%
DM36	0.0%	74.3%	25.7%	0.0%
DM38	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%
DM48	12.3%	60.2%	11.0%	16.5%
DM58	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%

圖 五 雙誤配核苷酸間距離對共同校正活性之影響

引子股經重新設計後，與 T28P21T7 模板股黏合後產生兩個間距為 3 至 5 個核苷酸之誤配核苷酸。並依照其誤配核苷酸距離引子股 3' 端的位命名。DNA 受質與 1U KF 於 37°C 進行。Blank 為未加入酵素的組別，PR1 為僅有較靠近末端的誤配核苷酸受到校正所產生的產物，PR2 為兩個誤配核苷酸皆被校正的產物，PE 為 KF 未辨識出誤配並使模板股延長所產生的產物。校正反應的中間產物依據其相對於原引子股所減少的長度命名，若長度比引子股少 1 個核苷酸，命名為 Ex1，若比引子股短 2 個核苷酸，則命名為 Ex2，以此類推。在計算各產物占比時 DM14 及 DM25 之 Ex3 皆已將引子股 3' 近端的誤配核苷酸移除，同時仍在繼續校正反應，因此併入 PR2 計算，其他反應中間產物，即 DM36 之 Ex1、DM48 之 Ex3 併入 PR1 計算。

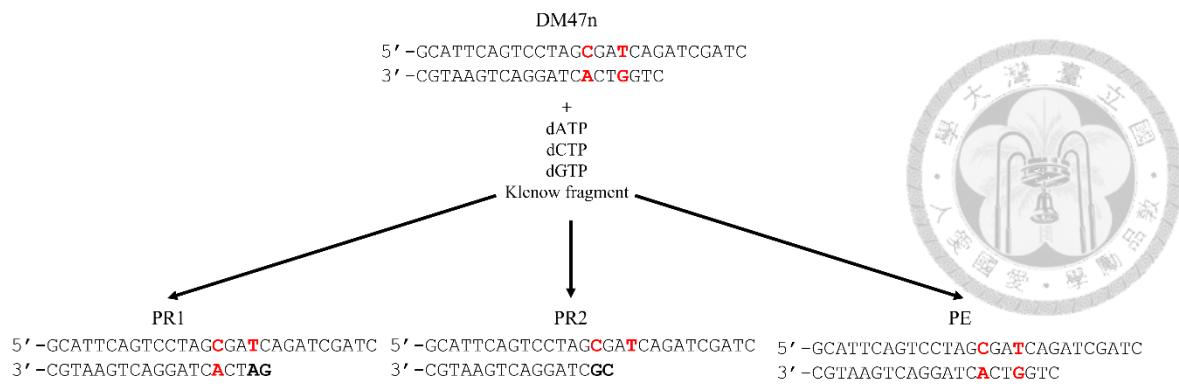


圖 六 DM47n 與 DM36n 實驗設計示意圖

相較於前述實驗，由於序列的改變，我們將實驗中所使用的 dNTPs 改為 dATP、dCTP、dGTP，並透過模板股上的 dTMP 來區分 PR1 以及 PR2。圖中以 DM47n 為例，原本長度為 21nt 的模板股經由 Klenow fragment 作用後產生的 PR1 長度為 20nt，PR2 為 17nt。

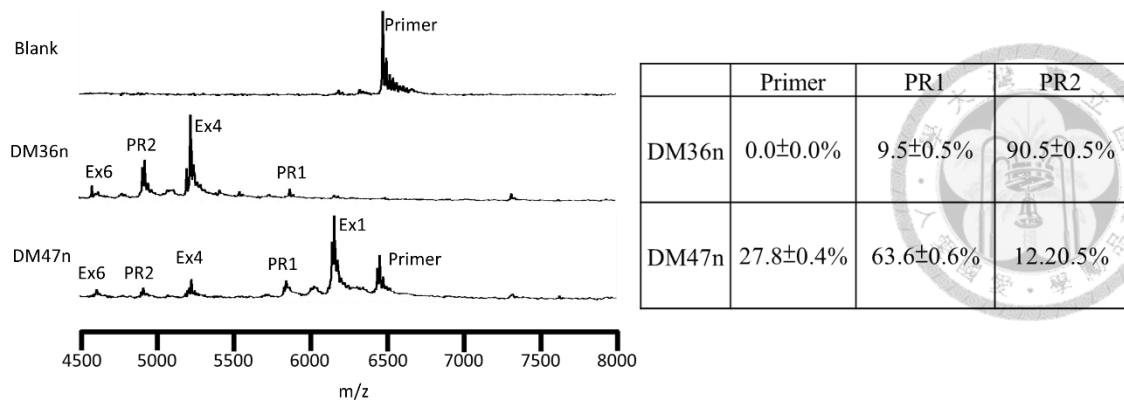


圖 七 誤配序列對雙誤配核苷酸共同校正活性之影響

將重新設計後的 DNA 在含有 $100\mu\text{M}$ dATP、 $100\mu\text{M}$ dCTP、 $100\mu\text{M}$ dGTP 的環境下與 Klenow fragment 以 37°C 反應 20 分鐘。Blank 為未加入酵素的組別，PR1 為僅有較靠近末端的誤配核苷酸受到校正所產生的產物，PR2 為兩個誤配核苷酸皆被校正的產物。校正反應的中間產物依據其相對於原引子股所減少的長度命名，於計算比例時，DM35n 之 Ex4、Ex6 以及 DM47n 之 Ex6 由於圍在已經移除模板股 3'近端之誤配後繼續進行校正反應，故合併於 PR2 計算，DM47n 之 Ex1、Ex4 則合併於 PR1 計算。各產物比例列於表四。

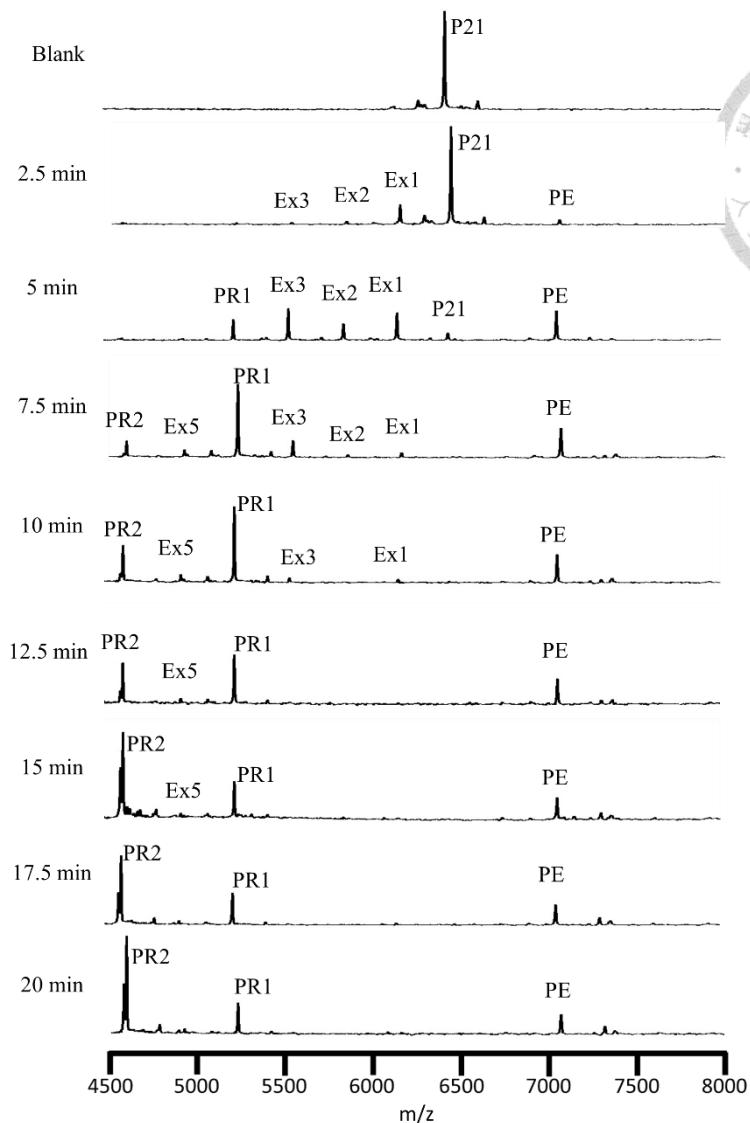


圖 八 DM47 校正反應中間產物分析

在這個實驗中，我們將 DM47 實驗的各反應物(DNA、dNTPs)以及 Klenow fragment 在濃度不變的條件下放大體積為 9 被並置於 37°C水浴槽中反應，每經過 2.5 分鐘取出 20 μ L 加入微型管中，微型管為事前準備並且內含 2 μ L 0.25M HCl 可對酵素反應進行酸終止，並在實驗結束後加入 2 μ L 0.25M tris-base 以中和 pH 避免 DNA 因長期處於酸性環境導致鹼基脫落。接著，以 75°C加熱 10分鐘確保酵素完全破壞並於冰上冷卻後再進行純化、保存與 MALDI-TOF 分析等步驟。PR1 為僅有較靠近末端的誤配核苷酸受到校正所產生的產物，PR2 為兩個誤配核苷酸皆被校正的產物。校正反應的中間產物依據其相對於未經反應之引子

股所減少的長度命名，如 Ex1 長度為 20nt、Ex2 為 19nt，以此類推。



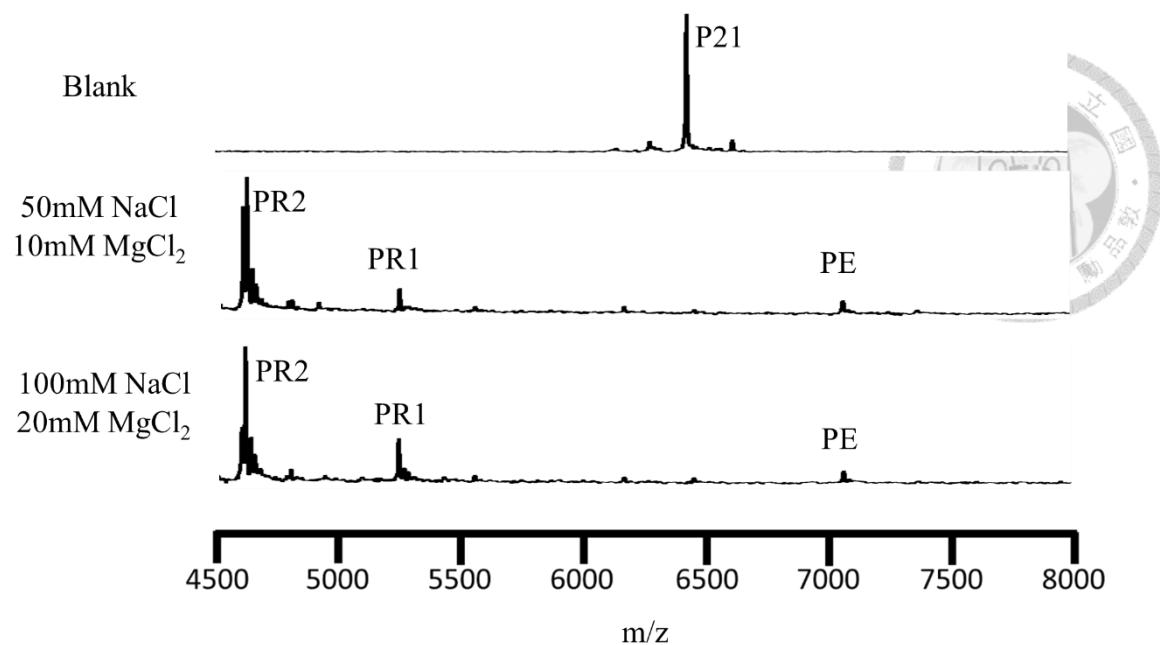
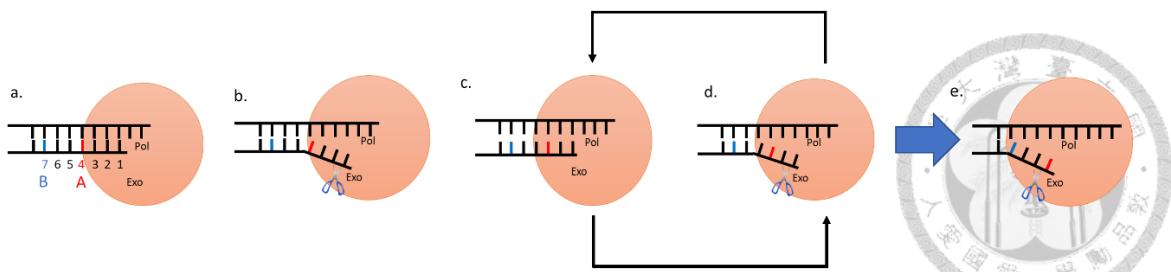


圖 九 離子濃度對於 Klenow fragment 校正活性之影響

廠商所提供之 NEB buffer 於 1X 濃度下含有 50 mM NaCl、10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol 以及 10 mM Tris-HCl。在本實驗中，我們嘗試使用 2X 濃度之 NEB buffer 2 進行 Klenow fragment 的校正實驗並對其產物進行雙尾 t-test, t-test 結果如表五所示。



圖十 Klenow fragment 對 DM47 進行校正推測模型示意圖

圖中 Pol 為 Klenow fragment 聚合酶活性位，Exo 為 Klenow fragment 3'→5'外切酶活性位，紅色與藍色部分為引子股上的誤配核苷酸，分別已誤配核苷酸 A、B 代稱。a. DNA 與 Klenow fragment 結合，誤配核苷酸 A 與 Klenow fragment 直接接觸。b. 3'→5'外切酶將引子股 3'端核苷酸水解。c. 引子股回到聚合酶活性位。d. 由於誤配核苷酸 A 的存在再次被送往 3'→5'外切酶活性位。e. 重複以上流程，至誤配核苷酸 A 被 3'→5'外切酶水解，此時誤配核苷酸 B 進入 Klenow fragment 聚合酶活性位與酵素直接接觸，因此可以被辨認出並且進行校正作用。

表 一 Klenow fragment 針對不同位置上單一核苷酸誤配校正能力

將引子股與模板股黏合後加入 dATP、dCTP、dTTP 與 1U Klenow fragment 於 37°C反應 20 分鐘。使用之寡核苷酸與反應產物序列詳列於下表，引子股誤配核苷酸以粗體標示。PR 為引子股受到校正反應後的產物，PE 為引子股逃脫校正並進行聚合反應的產物。模板股皆不列入產物計算，由於後續實驗需要，mm7 使用與 mm1 至 mm6 不同之模板股。

	Signal	Sequence	Molecular weight(Da)
Templet	T28P21T	3' -GCATTCAGTCCTAGACACTAGATCGATC	8532.6
mm1	P21D71	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTGATT	6476.3
	PR	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTGATCTA	7078.7
mm2	P21D72	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTGACC	6446.2
	PR	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTGATCTA	7078.7
mm3	P21D73	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTGGTC	6477.3
	PR	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTGATCTA	7078.7
mm4	P21D74	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTAAATC	6445.3
	PR	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT	5225.5
	PE	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTAAATCTA	7062.7
mm5	P21D75	5' -CGTAAGTCAGGATCTGCGATC	6446.2
	PE	5' -CGTAAGTCAGGATCTGCGATCTA	7063.7
mm6	P21D76	5' -CGTAAGTCAGGATCTATGATC	6445.3
	PE	5' -CGTAAGTCAGGATCTATGATCTA	7062.7
mm7	T28P21T7	3' -GCATTCAGTCCTAGGCAGTACGATC	8548.6
	P21s7	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTGATC	6461.3
	PE	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTGATCTA	7078.7

表 二 雙誤配核苷酸 DM17 至 DM67 實驗產物序列與分子量

將引子股與模板股黏合後加入 dATP、dCTP、dTTP 與 1U Klenow fragment 於 37°C反應 20 分鐘。使用之寡核苷酸與產物序列與分子量如表所示。引子股誤配核苷酸以粗體標示。PR1 為僅對引子股 3'近端誤配核苷酸校正的產物，PR2 為兩個誤配核苷酸皆受到校正的產物，PE 為兩個誤配核苷酸皆逃脫校正作用並進行引子股延長之產物。

Substrate	Signal	Sequence	Molecular weight(Da)
Templet	T28P21T7	3'-GCATTCAGTCCTAGGCAGTAGATCGATC	8548.6
DM17	P21D71	5'-CGTAAGTCAGGATC TGTGATT	6476.3
	PR1	5'-CGTAAGTCAGGATC TGTGATCTA	7078.6
	PR2	5'-CGTAAGTCAGGATCC	4577.0
DM27	P21D72	5'-CGTAAGTCAGGATC TGTGACC	6446.2
	PR1	5'-CGTAAGTCAGGATC TGTGATCTA	7078.6
	PR2	5'-CGTAAGTCAGGATCC	4577.0
DM37	P21D73	5'-CGTAAGTCAGGATC TGTGGTC	6477.2
	PR1	5'-CGTAAGTCAGGATC TGTGATCTA	7078.6
	PR2	5'-CGTAAGTCAGGATCC	4577.0
DM47	P21D74	5'-CGTAAGTCAGGATC TGTAAATC	6445.2
	PR1	5'-CGTAAGTCAGGATC TGT	5225.4
	PR2	5'-CGTAAGTCAGGATCC	4577.0
	PE	5'-CGTAAGTCAGGATC TGTAAATCTA	7062.7
DM57	P21D75	5'-CGTAAGTCAGGATC TGCGATC	6446.2
	PR2	5'-CGTAAGTCAGGATCC	4577.0
	PE	5'-CGTAAGTCAGGATC TGCGATCTA	7063.6
DM67	P21D76	5'-CGTAAGTCAGGATC TATGATC	6445.2
	PR2	5'-CGTAAGTCAGGATCC	4577.0
	PE	5'-CGTAAGTCAGGATC TATGATCTA	7062.6

表 三 雙誤配核苷酸間距離對共同校正活性之影響

將引子股與模板股黏合後加入 dATP、dCTP、dTTP 與 1U Klenow fragment 於 37°C反應 20 分鐘。使用的寡核苷酸以及產物序列及分子量如下表所示。各 DNA 序列中誤配核苷酸以粗體標示。PR1 為僅校正接近末端之 DNA 誤配之產物，PR2 為兩對誤配核苷酸皆被校正之產物，PE 為逃離校正後引子股延長之產物。

Substrate	Signal	Sequence	Molecular weight(Da)
Templet	T28P21T7	3'-GCATTCAGTCCTAGGCAGTAGATCGATC	8548.6
DM14	P21D14	5'-CGTAAGTCAGGATCCGT AATT	6445.3
	PR1	5'-CGTAAGTCAGGATCCGT AATCTA	7047.7
	PR2	5'-CGTAAGTCAGGATCCGT	5210.5
DM15	P21D15	5'-CGTAAGTCAGGATCCG CGATT	6446.2
	PR1	5'-CGTAAGTCAGGATCCG CGATCTA	6445.3
DM16	P21D16	5'-CGTAAGTCAGGATCC ATGATT	6445.3
	PR1	5'-CGTAAGTCAGGATCC ATGATCTA	7047.7
	PR2	5'-CGTAAGTCAGGATCC	4577.0
DM25	P21D25	5'-CGTAAGTCAGGATCCG CGACC	6416.2
	PR1	5'-CGTAAGTCAGGATCCG CGATCTA	7048.6
	PR2	5'-CGTAAGTCAGGATCCGT	5210.5
DM26	P21D26	5'-CGTAAGTCAGGATCC ATGACC	6415.2
	PR1	5'-CGTAAGTCAGGATCC ATGATCTA	7047.7
	PR2	5'-CGTAAGTCAGGATCC	4577.0
DM36	P21D36	5'-CGTAAGTCAGGATCC ATGGTC	6446.2
	PR1	5'-CGTAAGTCAGGATCC ATGATCTA	7047.7
	PR2	5'-CGTAAGTCAGGATCC	4577.0
DM38	P21D38	5'-CGTAAGTCAGGAT TCGTGGTC	6477.3
	PR1	5'-CGTAAGTCAGGAT TCGTGATCTA	7078.7
DM48	P21D48	5'-CGTAAGTCAGGAT TCGTAAATC	6445.3
	PR1	5'-CGTAAGTCAGGAT TCGT	5225.5
	PR2	5'-CGTAAGTCAGGATCC	4577.0
	PE	5'-CGTAAGTCAGGAT TCGTAAATCTA	7062.7
DM58	P21D58	5'-CGTAAGTCAGGAT TCGC GATC	6446.2
	PE	5'-CGTAAGTCAGGAT TCGC GATCTA	7063.7

表 四 誤配序列對雙誤配核苷酸共同校正活性之影響

將引子股與模板股黏合後加入 dATP、dCTP、dGTP 與 1U Klenow fragment 於 37°C反應 20 分鐘。所使用之寡核苷酸與產物序列如下表所示。引子股序列中誤配核苷酸以粗體標示。PR1 為僅校正接近末端之 DNA 誤配之產物，PR2 為兩對誤配核苷酸皆被校正之產物，PE 為逃離校正後引子股延長之產物。

Substrate	Signal	Sequence	Molecular weight(Da)
Templet	T28P21T7n	3' -GCATTCA GTC CTAGCGATCAGATCGATC	8548.6
DM36n	P21D36n	5' -CGTAAGTCAGGATCG TTAATC	6445.3
	PR1	5' -CGTAAGTCAGGATCG TT AG	5867.9
	PR2	5' -CGTAAGTCAGGATCGC	4906.2
DM47n	P21D47n	5' -CGTAAGTCAGGAT CA CTGGTC	6446.2
	PR1	5' -CGTAAGTCAGGAT CA CTAG	5836.9
	PR2	5' -CGTAAGTCAGGATCGC	4906.2

表 五 離子濃度對於 Klenow fragment 校正活性之影響

在低鹽類濃度以及高鹽類濃度的環境下以 KF 對 DM47 進行反應後計算各產物所占比例，計算所得之 p value 如下表所示。

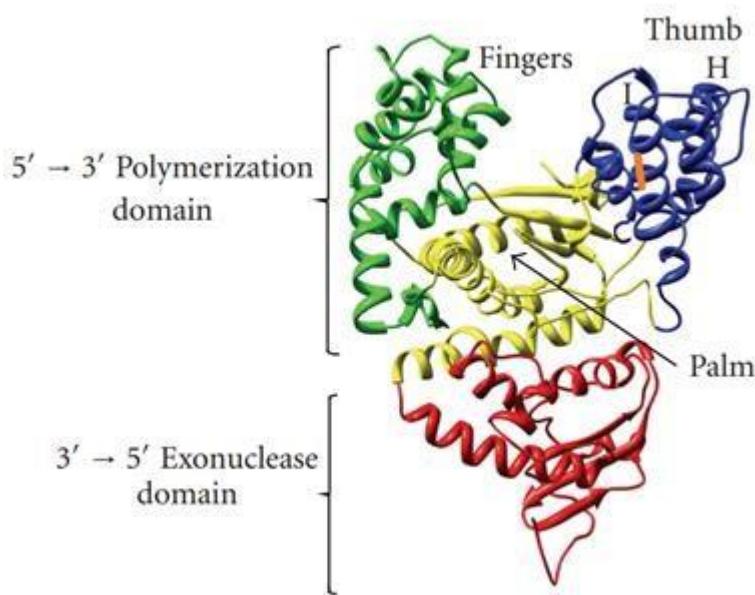
	PR1	p value (PR1)	PR2	p value (PR2)	PE	p value (PE)
Low salt	9.2±6.5%	0.018	83.1±9.2%	0.106	11.4±2.8%	0.043
High salt	23.6±0.8%		69.3±0.7%		6.8±0.9%	

表 六 純化套組去鹽純化能力

實驗比對含有引子股、模板股以及含有鹽類離子之 buffer 在使用純化套組前後的 DNA 濃度以及導電度變化，並以單尾 t-test 計算。溶液的導電度來自於其中含有的離子濃度，因此我們以導電度的變化評估套組去除鹽類離子的能力。

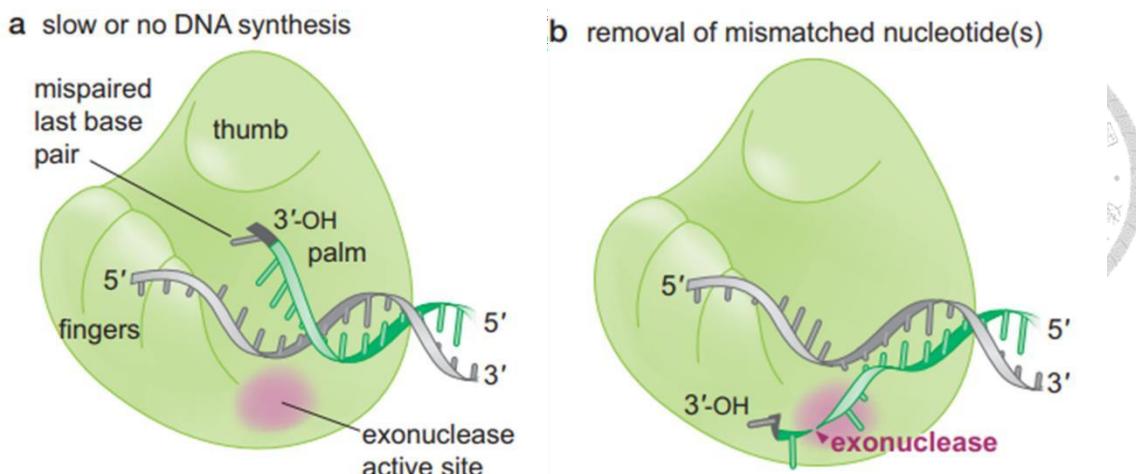
	導電度(μ S/cm)	p value	DNA濃度($\text{ng}/\mu\text{L}$)	p value
Before	50.2 ± 1.5	<0.00001	39.2 ± 4.4	0.018
After	3.4 ± 1.5		18.7 ± 0.9	

附錄



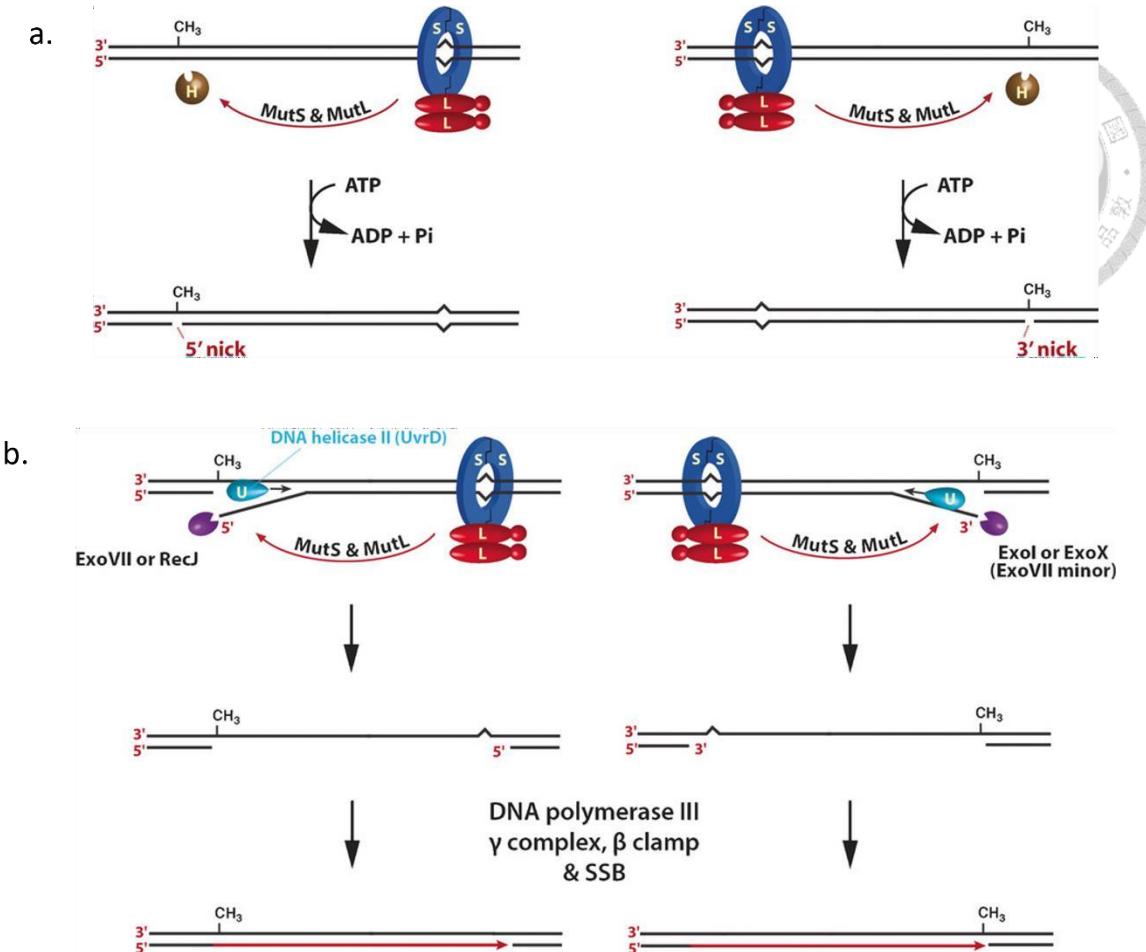
附錄一 Klenow fragment 結構示意圖

Klenow fragment 結構形狀如同一隻右手手掌，包含拇指域(thumb)、手指域(finger)與手掌域(Aoude et al.)。另外，Klenow fragment 還可分為兩個次單元: 200 個胺基酸組成的 3'→5'外切酶活性位，以及 400 個胺基酸組成的聚合酶活性位。(Federley & Romano, 2010)



附錄 二 第一型DNA 聚合酶校正作用示意圖

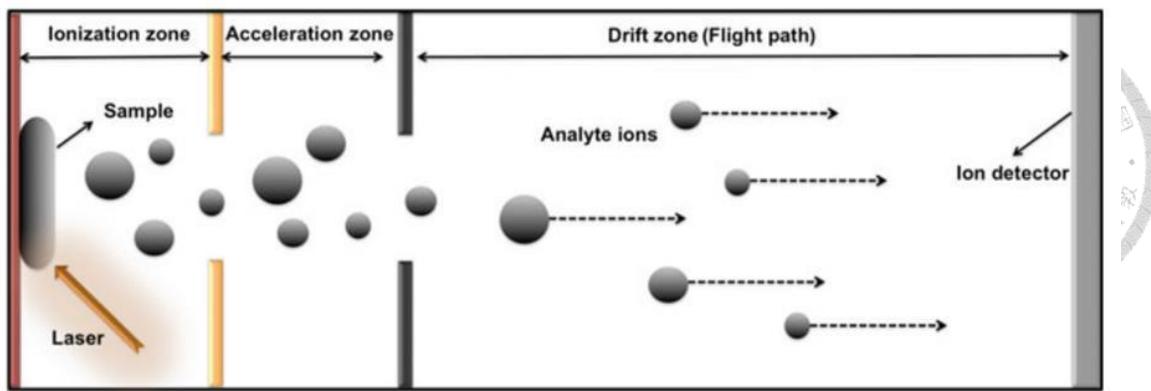
圖 a 中 第一型聚合酶於聚合酶活性位辨識出誤配核苷酸，並於圖 b 中將帶有誤配核苷酸引子股 3' 端送至 3'→5' 外切酶活性位進行校正(Allison, 2007)。



附錄 三 誤配修復系統(mismatch repair, MMR)示意圖

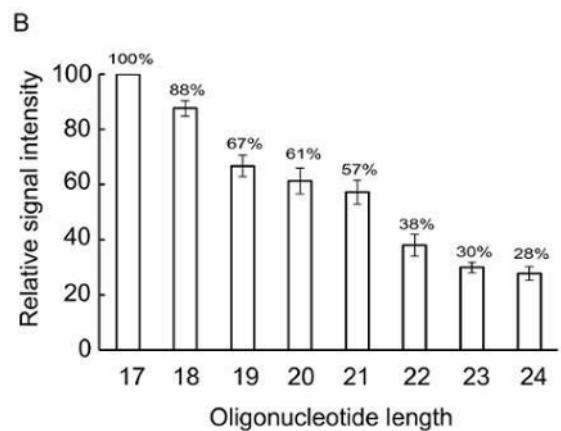
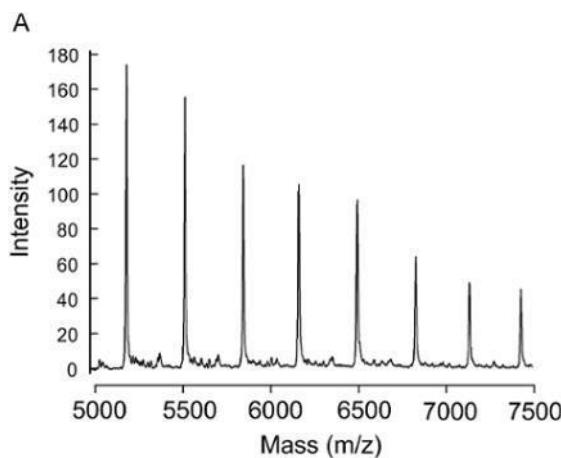
圖 a. MutS 在辨識出誤配核苷酸後與之結合，並吸引 MutL。接著，MutS 與 MutL 以及 DNA 的複合誤再吸引 MutH，MutH 於 DNA 新合成股尚未甲基化之 d(GATV) 序列進行剪切並形成鏈裂(nick)。

圖 b. 第二型 DNA 解旋酶自鏈裂位朝誤配位置進行解旋，並根據鏈裂位置由 ExoVII、RecJ 或者 ExoI、ExoX 將單股 DNA 進行水解，最後由第三型 DNA 聚合酶以及 SSB 將被水解的單股 DNA 重新合成。
(Modrich, 2016)



附錄 四 MALDI-TOF MS 作用流程與機制示意圖

首先，將樣品與基質混和於晶片上，再以雷射脈衝照射晶片後，待測物離子化並且通過電壓加速進入 drift zone。在 drift zone 終點具有離子探測器，透過記錄樣品飛行時間並進行換算可得到樣品 m/z 值對樣品進行分析(Hosseini & Martinez-Chapa, 2016, p. 6)。



附錄 五 質譜分析normalize 示意圖

在質譜儀分析中，待測物分子量與其訊號強度呈負相關，因此須將所得訊號強度依照本圖進行 normalized 後再進行分析(K.-Y. Su et al., 2018)。

參考文獻



Allison, Elizabeth A. (2007). *Fundamental Molecular Biology*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Aoude, L. G., Heitzer, E., Johansson, P., Gartside, M., Wadt, K., Pritchard, A. L., Palmer, J. M., Symmons, J., Gerdes, A. M., Montgomery, G. W., Martin, N. G., Tomlinson, I., Kearsey, S., & Hayward, N. K. (2015). POLE mutations in families predisposed to cutaneous melanoma. *Familial Cancer*, 14(4), 621-628.

Astatke, M., Grindley, N. D., & Joyce, C. M. (1998). How *E. coli* DNA polymerase I (Klenow fragment) distinguishes between deoxy- and dideoxynucleotides. *J Mol Biol*, 278(1), 147-165.

Bebenek, K., Joyce, C. M., Fitzgerald, M. P., & Kunkel, T. A. (1990). The fidelity of DNA synthesis catalyzed by derivatives of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *J Biol Chem*, 265(23), 13878-13887.

Beese, L. S., Derbyshire, V., & Steitz, T. A. (1993). Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA. *Science*, 260(5106), 352-355.

Brautigam, C. A., Sun, S., Piccirilli, J. A., & Steitz, T. A. (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.

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.

Chikh, L., Tessier, M., & Fradet, A. (2007). NMR and MALDI-TOF MS study of side

reactions in hyperbranched polyesters based on 2,2-bis(hydroxymethyl)propanoic acid. *Polymer*, 48(7), 1884-1892.

Chikh, L., Tessier, M., & Fradet, A. (2008). Polydispersity of Hyperbranched Polyesters Based on 2,2-Bis(hydroxymethyl)propanoic Acid: SEC/MALDI-TOF MS and ¹³C NMR/Kinetic-Recursive Probability Analysis. *Macromolecules*, 41.

Cowart, M., Gibson, K. J., Allen, D. J., & Benkovic, S. J. (1989). DNA substrate structural requirements for the exonuclease and polymerase activities of prokaryotic and phage DNA polymerases. *Biochemistry*, 28(5), 1975-1983.

Dahlberg, M. E., & Benkovic, S. J. (1991). Kinetic mechanism of DNA polymerase I (Klenow fragment): identification of a second conformational change and evaluation of the internal equilibrium constant. *Biochemistry*, 30(20), 4835-4843.

Dangerfield, T. L., & Johnson, K. A. (2023). Kinetics of DNA strand transfer between polymerase and proofreading exonuclease active sites regulates error correction during high-fidelity replication. *J Biol Chem*, 299(1), 102744.

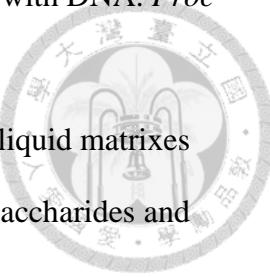
Escarceller, M., Hicks, J., Gudmundsson, G., Trump, G., Touati, D., Lovett, S., Foster, P. L., McEntee, K., & Goodman, M. F. (1994). Involvement of Escherichia coli DNA polymerase II in response to oxidative damage and adaptive mutation. *J Bacteriol*, 176(20), 6221-6228.

Federley, R. G., & Romano, L. J. (2010). DNA polymerase: structural homology, conformational dynamics, and the effects of carcinogenic DNA adducts. *J Nucleic Acids*, 2010.

Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M., & Jonczyk, P. (2012). DNA replication fidelity in Escherichia coli: a multi-DNA polymerase affair. *FEMS Microbiol Rev*, 36(6), 1105-1121.

Freemont, P. S., Friedman, J. M., Beese, L. S., Sanderson, M. R., & Steitz, T. A. (1988).

Cocrystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(23), 8924-8928.



Fukuyama, Y., Nakaya, S., Yamazaki, Y., & Tanaka, K. (2008). Ionic liquid matrixes optimized for MALDI-MS of sulfated/sialylated/neutral oligosaccharides and glycopeptides. *Anal Chem*, 80(6), 2171-2179.

Gade, C. R., Dixit, M., & Sharma, N. K. (2016). Dideoxy nucleoside triphosphate (ddNTP) analogues: Synthesis and polymerase substrate activities of pyrrolidinyl nucleoside triphosphates (prNTPs). *Bioorg Med Chem*, 24(18), 4016-4022.

Garcia-Diaz, M., & Bebenek, K. (2007). Multiple functions of DNA polymerases. *CRC Crit Rev Plant Sci*, 26(2), 105-122.

Goodman, M. F., Creighton, S., Bloom, L. B., & Petruska, J. (1993). Biochemical basis of DNA replication fidelity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 28(2), 83-126.

Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). E. coli DNA Polymerase I and the Klenow Fragment. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020(5), 100743.

Griffin, T. J., Hall, J. G., Prudent, J. R., & Smith, L. M. (1999). Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11), 6301-6306.

Gut, I. G. (2004). DNA analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum Mutat*, 23(5), 437-441.

Hrabák, J. (2015). Detection of carbapenemases using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) meropenem hydrolysis assay. *Methods Mol Biol*, 1237, 91-96.

Huberty, M. C., Vath, J. E., Yu, W., & Martin, S. A. (1993). Site-specific carbohydrate identification in recombinant proteins using MALD-TOF MS. *Anal Chem*, 65(20), 2791-2800.

Johnson, K. A. (1993). Conformational coupling in DNA polymerase fidelity. *Annu Rev Biochem*, 62, 685-713.

Joyce, C. M., & Steitz, T. A. (1987). DNA polymerase I: from crystal structure to function via genetics. *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 288-292.

Kafka, A. P., Kleffmann, T., Rades, T., & McDowell, A. (2011). The application of MALDI TOF MS in biopharmaceutical research. *Int J Pharm*, 417(1-2), 70-82.

Kirpekar, F., Berkenkamp, S., & Hillenkamp, F. (1999). Detection of double-stranded DNA by IR- and UV-MALDI mass spectrometry. *Anal Chem*, 71(13), 2334-2339.

Klenow, H., & Overgaard-Hansen, K. (1970). Proteolytic cleavage of DNA polymerase from Escherichia Coli B into an exonuclease unit and a polymerase unit. *FEBS Lett*, 6(1), 25-27.

Kolodner, R. D. (1995). Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem Sci*, 20(10), 397-401.

Kool, E. T. (2002). Active site tightness and substrate fit in DNA replication. *Annu Rev Biochem*, 71, 191-219.

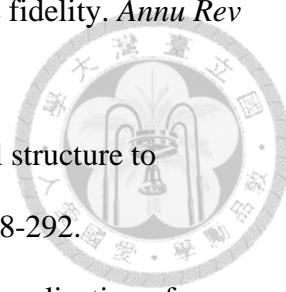
Kunkel, T. A. (2004). DNA replication fidelity. *J Biol Chem*, 279(17), 16895-16898.

Kunkel, T. A., & Bebenek, K. (2000). DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem*, 69, 497-529.

Kunz, C., Saito, Y., & Schär, P. (2009). DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cell Mol Life Sci*, 66(6), 1021-1038.

Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S., & Kornberg, A. (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.

Li, D., Yi, J., Han, G., & Qiao, L. (2022). MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. *ACS Meas Sci Au*, 2(5), 385-404.



Li, G. M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*, 18(1), 85-98.



Loeb, L. A., & Kunkel, T. A. (1982). Fidelity of DNA synthesis. *Annu Rev Biochem*, 51, 429-457.

Lovett, S. T. (2011). The DNA Exonucleases of Escherichia coli. *EcoSal Plus*, 4(2).

Modrich, P. (1987). DNA mismatch correction. *Annu Rev Biochem*, 56, 435-466.

Modrich, P. (2016). Mechanisms in E. coli and Human Mismatch Repair (Nobel Lecture).

Angew Chem Int Ed Engl, 55(30), 8490-8501.

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.

Owczarzy, R., You, Y., Moreira, B. G., Manthey, J. A., Huang, L., Behlke, M. A., & Walder, J. A. (2004). Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures. *Biochemistry*, 43(12), 3537-3554.

Patel, P. H., Suzuki, M., Adman, E., Shinkai, A., & Loeb, L. A. (2001). Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and "base flipping" mechanism for nucleotide selection. *J Mol Biol*, 308(5), 823-837.

Petruska, J., Goodman, M. F., Boosalis, M. S., Sowers, L. C., Cheong, C., & Tinoco, I., Jr. (1988). Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(17), 6252-6256.

Rangarajan, S., Woodgate, R., & Goodman, M. F. (1999). A phenotype for enigmatic DNA polymerase II: a pivotal role for pol II in replication restart in UV-irradiated Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16), 9224-9229.

Renkonen, E., Zhang, Y., Lohi, H., Salovaara, R., Abdel-Rahman, W. M., Nilbert, M., Aittomaki, K., Jarvinen, H. J., Mecklin, J. P., Lindblom, A., & Peltomaki, P. (2003). Altered expression of MLH1, MSH2, and MSH6 in predisposition to

hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 21(19), 3629-3637.

Rossetti, G., Dans, P. D., Gomez-Pinto, I., Ivani, I., Gonzalez, C., & Orozco, M. (2015). The structural impact of DNA mismatches. *Nucleic Acids Res*, 43(8), 4309-4321.

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

Sekiya, S., Wada, Y., & Tanaka, K. (2005). Derivatization for stabilizing sialic acids in MALDI-MS. *Anal Chem*, 77(15), 4962-4968.

Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 49(4), 543-551.

Sim, K., Shaw, A. G., Randell, P., Cox, M. J., McClure, Z. E., Li, M. S., Haddad, M., Langford, P. R., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., & Kroll, J. S. (2015). Dysbiosis anticipating necrotizing enterocolitis in very premature infants. *Clin Infect Dis*, 60(3), 389-397.

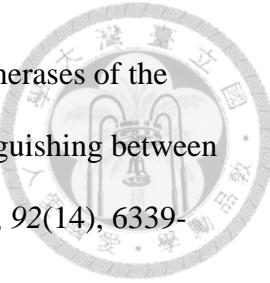
Steitz, T. A. (1999). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem*, 274(25), 17395-17398.

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.

Su, K.-Y., Lai, H.-M., Goodman, S. D., Hu, W.-Y., Cheng, W.-C., Lin, L.-I., Yang, Y.-C., & Fang, W.-h. (2018). Application of single nucleotide extension and MALDI-TOF mass spectrometry in proofreading and DNA repair assay. *DNA Repair*, 61, 63-75.

Su, K. Y., Goodman, S. D., Lai, H. M., Yen, R. S., Hu, W. Y., Cheng, W. C., Lin, L. I., Yang, Y. C., & Fang, W. H. (2018). Proofreading and DNA Repair Assay Using Single Nucleotide Extension and MALDI-TOF Mass Spectrometry Analysis. *J*

Tabor, S., & Richardson, C. C. (1995). A single residue in DNA polymerases of the Escherichia coli DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(14), 6339-6343.



Tan, Z. J., & Chen, S. J. (2006). Nucleic acid helix stability: effects of salt concentration, cation valence and size, and chain length. *Biophys J*, 90(4), 1175-1190.

Vaisman, A., McDonald, J. P., & Woodgate, R. (2012). Translesion DNA Synthesis. *EcoSal Plus*, 5(1).

Wang, J., & Konigsberg, W. H. (2022). Two-Metal-Ion Catalysis: Inhibition of DNA Polymerase Activity by a Third Divalent Metal Ion. *Front Mol Biosci*, 9, 824794.

Wildenberg, J., & Meselson, M. (1975). Mismatch repair in heteroduplex DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(6), 2202-2206.

Wu, K. J., & Odom, R. W. (1998). Characterizing synthetic polymers by MALDI MS. *Anal Chem*, 70(13), 456a-461a.