

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's Thesis

第一型 DNA 聚合酶校正特異性之研究分析

Specificity analysis of DNA Polymerase I proofreading
activity

游曉沛

Hsiao-Pei Yu

指導教授:方偉宏 博士

Advisor: Woei-horng Fang Ph.D

中華民國 114 年 7 月

July 2025



誌謝



這篇論文是由回首來時路上，提供幫助、指導我、鼓勵我的人們孕育下誕生的，我由衷感謝每一位教導與支持我的人。

我想感謝我的指導教授方偉宏老師，讓我能夠進入實驗室學習，在我迷茫沒有方向時給予指引以及指導，老師在邏輯上以及表達上耐心並盡力地指導對於修復領域是完全門外漢的我，謝謝老師這兩年來的包容與教導，再怎麼健忘也不會忘了這兩年的教導。感謝我的口試委員，許濤老師、蔡芷季老師以及蘇剛毅老師，百忙中抽空擔任我的口試委員，提出諸多具體的意見讓這篇論文能在短時間內更加完善，還有許多觀點以及想法的腦力激盪可謂是不可多得的寶貴經驗。

再來，我要謝謝張惠嵐學姊一路上的諄諄教誨，每次實驗出錯或失敗都像是夜空中最亮的那顆星，點亮毫無頭緒的我，幫忙 trouble shooting 找到問題源頭，一直抽不出來的 ssDNA 都還得靠學姊扛起，實驗室才得以繼續實驗下去，也謝謝學姊畢業後人在中研院同時還得被我抱住大腿到我畢業，給予各方面的疑難雜症處理，謝謝學姊。還有謝謝莊詠筑學姊，充滿包容地指導令人頭疼的碩一時期的我，給了我很多建議以及優良的榜樣，沒有學姊的話這個實驗室就不一樣了。也謝謝岫珏學長、羿凱學長教導我實驗，雖然我們相處時間不多但給我的幫助也很大，還有謝謝 Hawk 在實驗室內一起跟我做實驗，讓剩下一個人的我不孤單。

最後我要謝謝我的親朋好友與家人，給予我最大的支持與鼓勵，讓我無後顧之憂努力寫論文，即便因此不能常回家也毫無怨言。謝謝王盈、南馨、宣萱，在研究所認識妳們是我最開心的事情之一了，彼此的加油打氣絕對是最棒的回憶。謝謝光勛，在自己忙於國考的同時甚至來幫忙我，給予我滿滿的溫暖和照顧，你永遠是最溫暖的人。

兩年之間我學到許多，一路以來我一直覺得我是幸運且開心的人，謝謝大家的陪伴跟幫助，未來我也會繼續努力，往前邁進。



摘要

DNA 複製的高保真度對於維持細胞的遺傳穩定性與防止有害突變的累積至關重要。DNA 聚合酶在 DNA 合成過程中，透過其 3'→5' 外切酶活性進行校對，能有效移除錯誤嵌入的核苷酸，降低 DNA 合成過程中的錯誤率。然而，雖然先前研究已確認大腸桿菌 DNA 聚合酶 I (Pol I) 可校正位於引子股 3' 端倒數 1 至 4 個核苷酸範圍內的錯配，但針對不同類型錯誤配對在各位置的校對特異性仍未釐清。因此，本研究旨在針對引子股 3' 端倒數 1 至 4 個核苷酸位置，系統性探討 Pol I 對各類型錯誤配對的校對特異性，並嘗試建立體外與體內的校對分析模型。

本研究利用設計錯配於特定位置的引子與模板 DNA，建構體外延伸反應平台，搭配 MALDI-TOF 質譜技術分析產物組成與校對比例，並控制反應條件以模擬生理環境，避免非特異性延伸與序列偏差干擾。結果顯示，Pol I 的校對效率高度依賴錯配位置，特別是在引子股倒數第一個位置，即使為結構不穩定的 purine-purine 錯配亦能完全校正；相對地，當錯配位於倒數第三或第四個核苷酸時，即便為常見的 G:T 錯配亦無法觸發有效校對反應。此結果突顯 Pol I 校對活性的空間限制，顯示其 proofreading 僅侷限於 3' 末端數個鹼基內。

為進一步評估細胞內的修正機制，本研究亦嘗試建立體內校對分析模型，將含有特定位置錯配的 DNA 序列轉型至錯配修復功能缺失的菌株，初步驗證錯配可否逃脫 Pol I 校對並交由其他修復系統處理。實驗結果顯示，Pol I 無法修正的 G:T 錯配若未即時修復，將可能累積為突變，顯示校對與錯配修復系統在細胞內具互補分工。

此外，結合結構功能的初步觀察，本研究亦關注一可能參與錯配辨識的高度

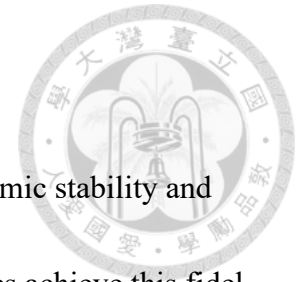
保守結構: J-helix。此結構被推測與引子末端錯配識別與修正行為相關，並可能參與催化活性位點與錯配間的構型變化。



結合以上觀點來看，本研究揭示 Pol I 對錯配的校對特性受錯配位置顯著影響，並與細胞內錯配修復系統形成互補協作。所建立之 MALDI-TOF 平台提供一套可量化、具可擴充性的 proofreading 分析工具，未來可應用於探討其他 DNA 聚合酶之錯配辨識特性，亦為後續聚合酶結構功能與基因體穩定性研究奠定基礎。

關鍵字: DNA 修復系統、MALDI-TOF Mass、第一型 DNA 聚合酶、校對特異性、菌體內試驗

Abstract



High-fidelity DNA replication is essential for maintaining genomic stability and preventing the accumulation of harmful mutations. DNA polymerases achieve this fidelity in part through their 3'→5' exonuclease activity, which proofreads and removes incorrectly incorporated nucleotides during DNA synthesis. Although previous studies have demonstrated that *Escherichia coli* DNA polymerase I (Pol I) is capable of proofreading mismatches located within the last one to four nucleotides at the 3' end of the primer strand, the mismatch-type and position-specific proofreading specificity of Pol I remains poorly understood. Therefore, this study aims to systematically investigate the proofreading specificity of Pol I against various mismatch types located at positions 1 to 4 from the 3' terminus of the primer and to establish both in vitro and in vivo platforms for proofreading analysis.

In vitro assays were conducted using synthetic primer-template duplexes containing site-specific mismatches, analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry under controlled reaction conditions to mimic physiological environments. Results revealed a strong positional dependency of Pol I proofreading activity. Near-complete correction was observed for purine-purine mismatches at the terminal position, while mismatches located at the third or fourth nucleotide from the 3' end—such as G:T—were not

efficiently repaired. This spatial limitation suggests that Pol I proofreading is confined to a narrow range near the primer terminus.

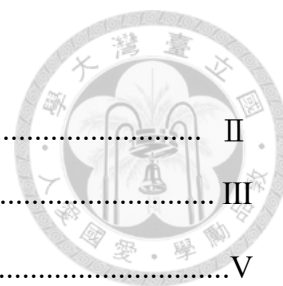


Preliminary in vivo experiments using mismatch-containing plasmids transformed into mismatch repair-deficient strains further indicate a cooperative relationship between Pol I proofreading and the mismatch repair (MMR) system. Additionally, structural analysis highlights the potential role of the conserved J-helix motif in mismatch recognition and catalysis.

Overall, this study elucidates the position-dependent proofreading mechanism of Pol I and provides a quantitative platform applicable to the study of proofreading specificity in other DNA polymerases.

Keywords: DNA repair system, MALDI-TOF mass spectrometry, DNA Polymerase I, proofreading specificity, In vivo assay

目次



誌謝.....	II
摘要.....	III
Abstract	V
圖次.....	IX
表次.....	X
附錄目次.....	X
縮寫對照.....	XI
第一章 緒論	1
1-1. DNA 錯配 (DNA mismatch) 與高保真性的生物學意義	1
1-2. 大腸桿菌 DNA 聚合酶 I 的校對功能與結構特色.....	3
1-3. 大腸桿菌各類 DNA 聚合酶之比較與 Pol I 的獨特性	6
1-4. 基質輔助雷射脫附/游離飛行時間式質譜儀 (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS).....	8
1-5. 研究動機.....	10
第二章 材料與方法.....	14
2-1. DNA 序列.....	14
2-2. 酵素和試劑.....	15
2-3. 活體內試驗菌株.....	17
2-4. 活體內試驗載體.....	17
2-5. MALDI-TOF MASS.....	17
2-6. Klenow fragment 校正能力試驗.....	18
2-7. 校正產物百分比計算.....	19
2-8. 樣本去鹽化.....	19

2-9. 含錯誤配對之異股核酸質體構築.....	20
2-10. 勝任細胞準備和轉型作用.....	20
2-11. 雙股引子股核酸之大量製備.....	21
2-12. 單股模板股核酸之大量製備.....	22
2-13. 含有錯配受質之合成.....	23

第三章 結果.....25

3-1. 不同濃度 dNTPs 對錯配校正能力之影響	25
3-2. 引子股 3'端倒數第一位置第三版序列校正分析.....	27
3-3. 引子股 3'端倒數第二位置第三版序列校正分析.....	30
3-4. 引子股 3'端倒數第三位置第三版序列校正分析.....	30
3-5. 引子股 3'端倒數第三位置第二版序列校正分析.....	31
3-6. 引子股 3'端倒數第四位置第一版序列校正分析.....	32
3-7. 活體內試驗受質合成.....	33

第四章 討論36

附錄	61
引用文獻.....	65

圖次



圖 1 校正能力試驗設計.....	42
圖 2 不同濃度 dNTPs 對錯配校正能力之結果分析.....	43
圖 3 第三版序列引子股 3'端倒數第一位置校正分析.....	44
圖 4 第三版序列引子股 3'端倒數第二位置校正分析.....	45
圖 5 第三版序列引子股 3'端倒數第三位置校正分析.....	46
圖 6 第二版本序列引子股 3'端倒數第三位置修復結果分析.....	47
圖 7 第一版本序列引子股 3'端倒數第四位置修復結果分析.....	48
圖 8 活體內試驗 NGT1 受質設計.....	49
圖 9 活體內試驗 NGT1 受質製備過程.....	50

表次



表 1 引子股 3'端倒數第四位置第一版序列及其產物.....	51
表 2 引子股 3'端倒數第三位置第二版序列及其產物.....	53
表 3 引子股 3'端倒數第三位置第三版序列及其產物.....	55
表 4 引子股 3'端倒數第二位置第三版序列及其產物.....	57
表 5 引子股 3'端倒數第一位置第三版序列及其產物.....	59

附錄目錄

附錄 1 MM1-MM7 校正修復比例圖.....	61
附錄 2 活體內試驗分析結果圖.....	62
附錄 3 Stepwise fitting and trimming mechanism 機制示意圖.....	63
附錄 4 質譜分析 normalize 示意圖.....	64

縮寫對照表



2XTY : 2× tryptone yeast extract

A : adenine

A590 : absorbance at 590 nm

Arg : arginine

Asn : asparagine

Asp : aspartic acid

ATP : adenosine triphosphate

BER : base excision repair

bp : base pair

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

dsDNA : double strand DNA

E. coli : Escherichia coli

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid



EtBr : ethidium bromide

exo : exonuclease

G : guanine

HAP : hydroxyapatite

HCl : hydrochloric acid

HOAc : acetic acid

Indel error : insertion/deletion error

KF : Klenow fragment

KPi buffer : potassium phosphate buffer

MALDI-TOF MS : matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

MMR : mismatch repair

Nd:YAG : neodymium-doped yttrium aluminium garnet

NER : nucleotide excision repair

nt : nucleotide

PCR : polymerase chain reaction

PEG : polyethylene glycol

Phe : phenylalanine

Pol I : DNA polymerase I

Pol III : DNA polymerase III

rpm : revolution per minute

S : second

SDS : sodium dodecyl sulfate

SSB : single-strand binding protein

SNP : single-nucleotide polymorphism

ssDNA : single strand DNA

T : thymine

TPE : tris-phosphate-EDTA

Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

WT : wild type





第一章 緒論

1-1. DNA 錯配 (DNA mismatch) 與高保真性的生物學意義

在遺傳訊息傳遞的過程中，DNA 的高保真性 (fidelity) 對於維持基因組的穩定性與生物體正常功能具有關鍵性角色。若 DNA 複製錯誤未經修正，可能導致突變累積，進而影響蛋白質的功能或基因調控，甚至引發疾病。由於真核與原核生物每一世代皆需進行數十億個鹼基的複製，因此，即便是極低頻率的錯誤，也可能對整體細胞功能造成重大影響 (Kunkel, 2004; Loeb & Kunkel, 1982)。

DNA 複製過程主要仰賴 DNA 聚合酶進行模板導向的核苷酸聚合反應。在理想情況下，聚合酶會正確地選擇互補的鹼基配對，形成 A 對 T、C 對 G 的 Watson-Crick 鍵結。然而，實際反應過程中可能因多種因素導致非典型的鹼基配對組合，此現象即為 DNA 錯配 (DNA mismatch) (Modrich, 1987; Kool, 2002)。DNA 錯配是一種核苷酸錯誤配對的事件，可能發生於 DNA 複製、重組或修復期間，若未及時修正，便可能固定為突變 (Schaaper, 1993)。

造成 DNA 錯配的原因主要包括：一、DNA 複製期間聚合酶錯誤選擇核苷酸 (Goodman, Creighton, Bloom, & Petruska, 1993)，這是最常見的錯配來源之一。二、異源雙股 DNA (heteroduplex DNA) 的形成，例如在基因重組或同源修復過程中，不同來源的 DNA 片段形成非完美互補的雙股結構 (Wildenberg & Meselson, 1975)。三、由外因如化學致突變劑、紫外線與游離輻射所造成的 DNA 傷害 (Li, 2008)，此類損傷常誘發鹼基異常修復，導致錯配發生。四、內源性自發性去胺化 (spontaneous deamination)，例如胞嘧啶去胺後轉變為尿嘧啶，易導致 C:G → T:A 的突變類型 (Petruska et al., 1988)。



倘若錯配事件未被修復，將可能固定為點突變，進一步累積於基因組中，長期下來會造成基因功能異常、表觀調控錯亂，甚至引發癌症。研究指出，約有 10% 至 30% 的自發性癌症與 DNA 錯配事件有關 (Rossetti et al., 2015)。此外，DNA 錯配修復機制 (mismatch repair, MMR) 若發生缺損，亦與特定遺傳性癌症有密切關聯，如遺傳性非息肉性大腸癌 (HNPCC，又稱林奇症候群) (Kolodner, 1995；Renkonen et al., 2003) 其最初發現與 MMR 有關，後來也發現與聚合酶的校對活性缺乏有關。

DNA 錯配不僅是突變的起源，也與癌症生成息息相關。例如，在腫瘤細胞中常觀察到微衛星不穩定性 (microsatellite instability, MSI)，這正是 DNA 錯配修復功能受損所導致的表徵之一 (Kunz, Saito, & Schär, 2009)。當修復錯配的蛋白質功能受損，尤其是 MutS、MutL 等核心因子的突變，會使細胞內累積大量未修復的錯配事件，最終引發腫瘤發展。

在細胞中，為了維持 DNA 複製的高準確性，演化出三重層次的錯誤防範與修正系統。第一道防線為鹼基選擇性 (base selection)，即 DNA 聚合酶在結合正確配對的 dNTP 時具有較高的親和力與催化速率。研究顯示，聚合酶合成正確鹼基的速率通常比誤配鹼基快上 10^4 到 10^6 倍 (Johnson, 1993；Bebenek et al., 1990)。第二道防線為 3'→5' 外切酶校對功能 (proofreading)，即聚合酶在辨識到錯配時，能將新合成的 DNA 鏈反向移至外切酶活性位點，移除錯誤核苷酸後重新合成 (Derbyshire et al., 1988)。第三道機制則為 DNA 錯配修復系統 (MMR)，主要於 DNA 合成後期負責識別並修正錯配區域，若前兩層機制未能處理錯誤，便由此機制進行事後修復 (Schaaper, 1993；Kunkel & Erie, 2005)。



在分子機制層次上，DNA 聚合酶之所以能進行鹼基選擇與錯誤辨識，與其活性中心的空間結構密切相關 (Beese, Derbyshire, & Steitz, 1993)。正確配對的鹼基對 (如 A:T、C:G) 在空間構型上可完整嵌入聚合酶活性位，而錯配鹼基由於構型扭曲或氫鍵異常，較難被穩定嵌入，甚至導致聚合速率下降。舉例來說，聚合酶形成磷酸二酯鍵的速率，在正確配對時約為 300 s^{-1} ，但當配對錯誤時速率降至 0.01 s^{-1} ，且聚合酶傾向啟動校對機制，將錯誤鹼基移除 (Johnson, 1993; Dahlberg & Benkovic, 1991)。

因此，DNA 的高保真性不僅體現在聚合酶的精確催化上，更仰賴複雜且多層次的監控機制協同運作。這些機制的存在，顯示生物在演化上對於遺傳穩定性的極致追求。為進一步解析這些校對與錯配辨識的機制，後續將聚焦探討大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 中 DNA 聚合酶的結構與功能特性，特別是第一型 DNA 聚合酶 (Pol I) 在處理錯配鹼基方面所扮演的角色，並探討如何利用先進質譜技術進行其校正能力的定量分析。

1-2. 大腸桿菌 DNA 聚合酶 I 的校對功能與結構特色

DNA 聚合酶 I (DNA polymerase I, Pol I) 為 *Escherichia coli* 中含量最豐富的 DNA 聚合酶，在常規生理條件下，每個細胞中約含有 400 個 Pol I 分子 (Kornberg & Baker, 1992)。Pol I 是歷史上第一個被發現並純化的 DNA 聚合酶，其功能涵蓋 DNA 合成、引子去除與錯配校對等多種過程。Pol I 由 *polA* 基因所編碼，具有三種不同的酶學活性，分別為 $5'\rightarrow 3'$ DNA 聚合活性、 $3'\rightarrow 5'$ 校對型外切酶活性與 $5'\rightarrow 3'$ RNA 引子移除外切酶活性，是五種大腸桿菌聚合酶中唯一具備三重活性的酶種。



Pol I 可經由枯草桿菌蛋白酶 (subtilisin) 處理後分為兩個功能性結構區段：分子量約為 68 kDa 的 C 端 Klenow fragment (KF)，以及分子量約 35 kDa 的 N 端小片段。KF 區段包含 DNA 聚合與校對所需之結構域，其立體構造可比擬為一隻右手，由 fingers (手指)、palm (手掌) 與 thumb (拇指) 三部分構成 (Green & Sambrook, 2020)。Palm 區域為聚合反應的催化中心，包含一個由六條 anti-parallel β -sheet 構成的裂口，底部由 J 與 K 兩條 α -helix 所支撐，形成指部結構，而另一側則由 I 及 H 兩條 α -helix 組成拇指部 (Ollis et al., 1985)。這樣的結構安排確保了 DNA 與酵素間的穩定結合與適當定位，有利於聚合反應的精準進行。

DNA 聚合過程中，Pol I 的活性區需與正確配對的引子-模板接合區 (primer-template junction) 形成穩定的複合體。此時，手指區域的 O-helix 會轉動以引導 dNTP 進入聚合活性位點，進一步形成 Watson-Crick 鍵結。研究指出，Arg754、Lys758、Phe762 等關鍵胺基酸可與 dNTP 結合，當核苷酸成功配對時，O-helix 會進一步向 palm 旋轉約 40 度，聚合酶由 open form 轉變為 closed form，包覆 nascent base pair，進入催化階段 (Astatke et al., 1998; Joyce et al., 2008)。催化反應需依賴兩個二價金屬離子 (主要為鎂離子) 協同進行：第一金屬離子位於 A site，協助引子末端 3' -OH 去質子化；第二金屬離子位於 B site，與進入之 dNTP 的磷酸根配位，穩定反應中間體並促進焦磷酸脫離，最終完成磷酸二酯鍵的生成 (Vashishtha et al., 2016)。

當發生錯誤配對時，聚合酶的延伸效率顯著下降，錯配鹼基與模板間氫鍵不穩定，造成新合成股的末端熔解 (melting)，進而導致單股 primer strand 偏離活性中心 (Lam et al., 2002)。此時 DNA 會由聚合中心轉移至位於小片段中的 3' → 5' 校對型外切酶活性位，該區域主要由 Asp355、Glu357、Asp501 等催化殘

基組成，能與錯誤的 dNMP 及金屬離子協同移除 mismatch 核苷酸 (Derbyshire et al., 1988)。錯配移除後，DNA 再度轉回聚合活性區域進行正確的鹼基延伸，完成所謂的「校對循環」(proofreading cycle) (Brutlag & Kornberg, 1972)。

在本實驗室近期的結構功能探討中，我們關注到一個具有研究潛力的結構元件：J-helix。此結構位於 palm 區域，於多種 DNA 聚合酶（如 Pol I、T4 DNA polymerase、T7 DNA polymerase 等）中均被發現並保留。J-helix 極可能於 DNA 聚合酶辨識 primer-template junction 是否正確配對的過程中發揮關鍵作用，特別是接近引子與模板股末端的錯配校對。我們近期的研究亦指出，Pol I 可有效校正引子-模板接合處 3-4 個核苷酸範圍內的錯配，並支持其 proofreading 活性與特定結構變化相關 (Chang et al., 2025)。文獻指出，當 DNA 與聚合酶結合時，J-helix 會發生構象變化 (conformational change)，藉此穩定 DNA 於活性中心。若 dNTP 為錯配，J-helix 將促使 DNA 向 exonuclease site 移動以進行錯誤移除，進一步提升聚合反應之準確性 (Clement et al., 2020)。

J-helix 的保守性及其參與錯配識別的潛在機制，使其成為理解 Pol I 校對機制的重要切入點。相較於傳統針對末端 mismatch 進行酶活性分析的研究方法，我們提出聚焦於 J-helix 構象變化與 DNA 錯配反應之間的結構關聯，將可釐清 Pol I 是如何感知錯配並啟動校對的分子細節。特別是，在不同 mismatch 類型下，J-helix 是否呈現不同構象、其變化是否為引發 proofreading 的「開關」信號，這些問題目前仍缺乏實證性說明。本研究以 Klenow fragment 為模型，針對 A:G、T:C、G:T 等錯配情境下的校對效率進行比較，酵素對不同錯配展現的特異性有可能為 J-helix 構型變化所導致。

結合所有觀點來看，Pol I 為一具高度功能多樣性的 DNA 聚合酶，其三重酶學活性與結構域分工，使其得以同時參與 DNA 合成與修復工作。Palm 區域中之 J-helix 結構，在結合 DNA、穩定引子-模板交界處及辨識錯配方面具有關鍵地位。透過對其構象變化的深入分析，有望揭示高保真性 DNA 聚合酶辨識錯配與誘導校對的全新結構依據，進一步推進我們對 DNA 複製保真性的理解，亦有助於未來設計具專一性核酸酶或酵素診斷工具之發展。

1-3. 大腸桿菌各類 DNA 聚合酶之比較與 Pol I 的獨特性

DNA 聚合酶為細胞維持遺傳穩定性的關鍵酵素，其結構與功能在生物演化過程中高度保守。Escherichia coli 細胞內已知存在五種 DNA 聚合酶，分別為第一型至第五型，它們在 DNA 複製、修復及跨損傷合成中扮演不同角色，各司其職以確保基因組完整性。這五種聚合酶功能分工明確，但其中以第一型 DNA 聚合酶 (Pol I) 因其發現歷史、結構完整性與工具酶應用價值，特別值得深入探討。

第一型 DNA 聚合酶 (Pol I) 是歷史上首個被發現並純化的 DNA 聚合酶，1956 年由 Arthur Kornberg 團隊首次分離並鑑定 (Kornberg, 1957)。此項發現不僅揭開 DNA 合成酵素學研究的序幕，也為分子生物學及基因工程技術奠定基礎。Pol I 由 polA 基因編碼，屬於 A 家族 DNA 聚合酶 (A-family polymerase)，分子量約 103 kDa，在大腸桿菌細胞中含量豐富，每個細胞約含有 400 個分子 (Kornberg & Baker, 1992)。其主要功能並非大規模 DNA 複製，而是參與 DNA 損傷修復、空隙填補及延遲股 (lagging strand) 岡崎片段的 RNA 引子移除與成熟處理 (Okazaki et al., 1971)。Pol I 同時具備三種酶學活性：5'→3' 聚合酶活性用以催化核苷酸聚合，3'→5' 校對型外切酶活性可移除錯配核苷酸以提升保真性，5'→3' 外切酶活性則負責移除 RNA 引子並進行缺口轉譯 (nick

translation)，協助 DNA 修復與片段連接 (Joyce et al., 1982)。此多重功能結構域的特性，使 Pol I 在實驗室中被廣泛應用於 DNA 序列分析、定點突變、末端修飾等分子生物學技術，被譽為「工具酶」的重要代表。



相較之下，第二型 DNA 聚合酶 (Pol II) 由 *polB* (又稱 *dinA*) 基因編碼，屬於 B 家族聚合酶 (B-family polymerase)，含量相對稀少，每個細胞約含 30 至 50 個分子。Pol II 為高保真性聚合酶，主要在 DNA 損傷修復中發揮作用，參與處理股內交叉鏈結、紫外線誘發的 DNA 損傷，以及壓力誘導突變等過程 (Masker et al., 1973; Berardini et al., 1999; Hastings et al., 2010)。當細胞遭受壓力啟動 SOS 反應時，Pol II 的表達量會大幅提升至平時的數倍 (Banach-Orlowska et al., 2005)。此外，Pol II 亦被認為是 Pol III 的備援聚合酶，在複製遭遇困難時發揮補充作用。

第三型 DNA 聚合酶 (Pol III holoenzyme) 為大腸桿菌的主要 DNA 複製酶，組成複雜，由多個亞基組成， α 亞基具 5'→3' 聚合活性， ϵ 亞基具 3'→5' 校對外切酶活性 (Takano et al., 1986)。Pol III 在正常生理情況下每個細胞約有 10 至 20 個分子，具備極高的 processivity 與 fidelity，每秒可合成約 1000 個核苷酸 (Fijalkowska et al., 2012)。其高效能與高精準性使其成為 DNA 大規模複製的主力酶種。

第四型與第五型 DNA 聚合酶 (Pol IV 與 Pol V) 均屬於 Y 家族 (Y-family polymerase)，為跨損傷合成專屬聚合酶。Pol IV 在正常細胞中約含 250 個分子，SOS 反應時數量可增至 10 倍以上 (Kim et al., 2001)，主要功能為重啟停滯的複製叉並跨越特定 DNA 損傷，如 guanine N2-adducts (Ikeda et al., 2014)。Pol V 則為 UmuC 與 UmuD 組成的異三聚體，其表達在 SOS 反應啟動後急劇上升

至 200 個 UmuC 及 2400 個 UmuD 分子，負責嚴重 DNA 損傷條件下的應急複製 (Cafarelli et al., 2014)。兩者皆缺乏校對活性，保真度低，但對損傷應答至關重要。



綜觀這五種 DNA 聚合酶的功能與特性，Pol I 的獨特性體現於其多功能結構域設計與三重酶學活性配置，在修復、空隙填補及引子移除中扮演多重角色，同時具備校對功能以維持合成準確性。此外，由於 Pol I 結構域分工清楚，可分離為 Klenow fragment 與小片段，使其在分子生物學研究及應用中尤為便利，成為許多 DNA 操作實驗中的首選工具酶。相較於 Pol III 結構龐大、難以純化，Pol I 憑藉其適中大小、穩定性與功能多樣性，在研究 DNA 合成保真性、錯配校正以及酶學機制上皆具有不可取代的重要地位。

1-4. MALDI-TOF MS 在聚合酶校對分析上的應用

基質輔助雷射脫附/游離飛行時間式質譜儀 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) 自 1980 年代問世以來，憑藉其高靈敏度、分析快速、低樣品消耗與適用於大分子分析等特性，已廣泛應用於生物化學、微生物學、藥理學及奈米科技等研究領域

(Fukuyama et al., 2008 ; Seng et al., 2009 ; Kafka et al., 2011)。MALDI-TOF MS 採用軟性離子化 (soft ionization) 技術，相較於傳統質譜方法，可在保留大分子完整結構的前提下進行質量分析，因此特別適合用於核酸、蛋白質等大分子研究 (Hosseini & Martinez-Chapa, 2016)。

MALDI-TOF MS 的核心原理在於將待測物與基質以高比例混合後乾燥成固態混合物。基質在此扮演兩大角色：一方面吸收雷射能量以保護樣品避免直接破壞，另一方面協助分析物分子解離並電離，形成帶電離子 (Wu & Odom, 1998)。



該技術主要由六個關鍵組件構成：基質負責吸收雷射能量並協助樣品分子游離；雷射光源（常用氮氣雷射 337 nm 或鈷雅鉻雷射 355 nm）產生脈衝雷射照射基質與樣品混合物；樣品板固定樣品，確保照射均勻與分析穩定；離子源使樣品與基質共同氣化形成帶電離子；飛行管（Time-of-Flight tube）利用電場加速離子，依據質量電荷比（ m/z ）不同產生不同飛行時間；偵測器根據飛行時間計算質量並產生質譜圖（Hosseini & Martinez-Chapa, 2016）。

在核酸分析上，MALDI-TOF MS 已被成功應用於探討 DNA 定序、突變檢測及單核苷酸多型性（SNP）分析等。例如 Haff 等人於 1997 年開發的 Pin-Point assay 即結合 MALDI-TOF MS 與 DNA 延伸反應，藉由精準測定延伸後的寡核苷酸質量，判定 SNP 類型（Gut, 2004）。相較傳統電泳定序法，MALDI-TOF MS 具備快速、高通量、樣品需求低的優勢，可在數小時內完成定序分析（Griffin et al., 1999）。

應用於 DNA 聚合酶校對機制的研究中，MALDI-TOF 質譜儀（matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS）提供了一種可直接偵測聚合與外切酶反應產物質量變化的替代途徑。相較於傳統依賴放射性或螢光標記結合凝膠電泳以觀察 DNA 長度改變的方式（Bebenek et al., 1990），MALDI-TOF MS 無需額外標記，即可根據質量差異識別錯配鹼基去除或正確延伸產物，並提供單核苷酸層級的解析度（Chang et al., 2020；Su et al., 2018）。雖然在靈敏度上，放射性標記仍為目前最敏銳的偵測方式之一（Bebenek et al., 1990），但操作時有暴露輻射危險的可能。以具校對功能的聚合酶為例，當延伸引子末端含有 mismatch 時，聚合效率顯著下降，使錯配末端更容易誘發局部解鏈，進而促使單股引子轉移至 3'→5' 外切酶活性位點，完成錯誤核苷酸的切除後再返回聚合活性位進行修正延伸（Clement et al.,

2024)。MALDI-TOF MS 能即時偵測此校對循環中各階段產物質量的變化，有助於直接呈現 DNA 聚合酶辨識與校對錯配的動態效率與偏好性。

具體而言，本研究中 MALDI-TOF MS 將用於分析 Pol I Klenow fragment 在不同錯配類型下（如 G:T、A:C 錯配）引子延伸與校對產物，藉由高解析質譜數據區分正確延伸產物、錯配殘留物與切除產物，從而評估不同 mismatch 對 Pol I 校正特性的影響。此外，MALDI-TOF MS 可同時分析多組樣品反應，不僅提升實驗通量，亦能減少實驗操作時間與誤差。

除了 UV-MALDI-TOF MS 外，紅外線 MALDI-TOF MS (IR-MALDI-TOF MS) 技術近年亦被發展應用於核酸分析，該技術採用紅外雷射激發，離子化過程更為溫和，適合分子量高達數百 kDa 的 DNA 分析 (Kirpekar et al., 1999)，提供研究聚合酶處理長鏈 DNA 的可能工具。這些技術進展為 DNA 聚合酶結構功能研究、突變機制解析及新型聚合酶篩選開啟新契機。

MALDI-TOF MS 憑藉其高靈敏度、快速分析及直接質量測定的優勢，已成為 DNA 聚合酶校對研究中不可或缺的技術。未來若能結合時間解析質譜技術與單分子分析方法，MALDI-TOF MS 在探討聚合酶錯配辨識、催化動態與結構構象變化等領域，將具備更廣闊的應用前景。

1-5. 研究動機

DNA 聚合酶在遺傳訊息複製與修復中扮演核心角色，其校對能力 (proofreading activity) 為維持基因組穩定性的重要防線。第一型 DNA 聚合酶 (Pol I) 除具備 5'→3' 聚合活性外，還具備 3'→5' 外切酶活性，能夠有效移除新生 DNA 鏈末端的錯配核苷酸。然而，Pol I 在不同錯配型態與結構環境下的校對特異性，迄今仍有待更為全面與精確的解析。本研究旨在延續本實驗室過去

成果，深入探討 Pol I 對不同類型錯配核苷酸的校對能力，期望進一步釐清 Pol I 校正機制的分子基礎，並為未來開發以聚合酶為基礎的基因編輯工具提供實驗依據。

本實驗室長期以來致力於建立高解析度的 DNA 修復與聚合酶功能分析平台，尤以基質輔助雷射去吸附離子化-飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS) 應用於核酸修飾與錯配修正反應的分析為技術核心。前期研究聚焦於 MALDI-TOF MS 於 DNA 化學修飾反應之可行性，成功應用於甲基化、磷酸化與去磷酸化反應的定量偵測，並建立修飾效率與質譜質量位移訊號間的對應關係。(曹禮醫，2020) 此技術平台亦進一步應用於分析人類 DNA glycosylase hSMUG1 於去除 dU 錯配之活性表現，並評估其對不同配對 (如 U:G 與 U:A) 及不同序列位置之反應效率。同時，藉由質譜平台偵測重金屬鎘對 hSMUG1 修復效率的抑制效應，成功建立一套可用於 DNA 修復活性與抑制劑篩選之分析架構。(張偉林，2020)

另一方面，本實驗室亦投入於探討大腸桿菌第五型核酸內切酶 (Endonuclease V) 與 Pol I 在亞黃嘌呤 (hypoxanthine) 修復中的交互作用。系列試管修復實驗顯示，單獨使用 Endo V 難以完成完整修復，但在 Pol I 存在下可顯著提升其反應 turnover。此結果提示兩酵素間可能具協同機制，並推動後續針對 Pol I proofreading 活性與結構辨識能力之研究動機。(林哲噢，2021)(林靜宜，2021)

本實驗室先前研究已建立聚合酶校對機制的 *in vitro* 與 *in vivo* 分析平台。在體外部分，我們利用基質輔助雷射脫附/游離飛行時間式質譜儀 (MALDI-TOF MS) 進行 Pol I Klenow fragment (KF) 的校對活性研究。實驗中將等量 50 pmol 的引子與模板於 65°C 水浴黏合 30 分鐘後，再置於 37°C 水浴 30 分鐘以促進

黏合穩定性，最後置於冰上以強化引子-模板雙股的結合。接著加入三種不同 dNTP 及 1 U KF 進行 20 分鐘反應，並以純化套組去鹽後進行 MALDI-TOF MS 分析。實驗結果顯示，當錯配位於引子 3' 端數來第 4 個核苷酸範圍內時，KF 能有效識別並移除錯配鹼基，顯示 KF 對該範圍內錯配具高度校對能力。

為驗證體外實驗結果的生物學意義，本實驗室進一步建立細菌體內 Pol I 校對活性的分析模型。透過製備含有距缺口 (nick) 不同位置之 C:C 錯配的 DNA 受質，並轉型至大腸桿菌勝任細胞內，經培養後抽取 DNA 進行雙酶水解與分析。我們觀察到體內實驗結果與體外 MALDI-TOF MS 分析結果一致，皆顯示當錯配位於引子 3' 端數來第 3 個核苷酸以內時，Pol I 具高效率校對活性，反之當錯配位於第 4 個核苷酸位置時，校對反應顯著下降或未發生。

在先前徐岫珏學長於 2023 年的研究中，進一步驗證了 Pol I 校對範圍與位置特异性。實驗設計中將 A:C 或 G:T 錯配分別置於引子 3' 端數來第 1 至第 7 個核苷酸位置，形成命名為 mm1 至 mm7 的系列受質。MALDI-TOF MS 分析結果顯示，當錯配位於第 1 至第 4 個位置時，錯配去除 (PR 產物) 比例由約 82% 逐漸下降至 66%，而當錯配位於第 5 至第 7 個位置時，PR 產物訊號幾乎消失，延伸產物 (PE 產物) 占比超過 70%。此結果進一步確認 Pol I 對 3' 端數來第 4 個核苷酸以內錯配具顯著校正能力。(徐岫珏, 2023)。可參考附錄 1。

此外，2024 年莊詠筑學姊之研究針對 C:C 錯配進行系統性探討。實驗中設計將 C:C 錯配分別置於引子 3' 端倒數第 2 至第 7 個位置，並以 MALDI-TOF MS 與細菌體內模型同步分析。結果顯示，當 C:C 錯配位於引子 3' 端前 3 個位置時，校對效率皆達約 70%；但當錯配位於第 4 個位置時，校對反應完全喪失，Pol I 直接進行聚合反應，延伸錯配核苷酸。可參考附錄 2。體內試驗與

MALDI-TOF MS 分析結果高度一致，進一步驗證 Pol I 主要針對 3'端數來 4 個核苷酸內的錯配進行修正的假說。(莊詠筑，2024)



綜合上述實驗室先前成果，我們提出「逐步貼合與修剪機制」(stepwise fitting and trimming mechanism) (Chang et al., 2025)，可參考附錄 3。推測 Pol I 於延伸過程中會先對引子末端逐步貼合至活性位點，檢視是否存在錯配，若偵測到錯配則啟動修剪反應，移除錯誤鹼基以維持複製準確性。然而，現有研究主要聚焦於 G:T、A:C 或 C:C 錯配的單一類型，且多以單一位置為探討對象，對於不同類型錯配於 3'端數來不同位置的全面性校正特异性仍缺乏系統性資料。

因此，本研究計畫延續本實驗室既有成果，旨在系統性探討第一型 DNA 聚合酶對引子 3' 端數來第 1 至第 4 個核苷酸範圍內不同錯配類型的校對能力。我們將結合 MALDI-TOF MS 精準質量分析與細菌體內轉型模型，以揭示 Pol I 對不同錯配類型的識別與修正特性。

第二章 材料與方法



2-1. DNA 序列

In vitro

Primer:

P21D74-G	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTGATC
P22C4	5' -CGTAAGTCACGAGCGCTCTAG
mm4-T	5' -CGTAAGTCAGGATCTATTATC
mm4-G-02	5' -CGTAAGTCAGGATCTATTATT
P21D74	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTAATC
P20-3G	5' -ACTGCACTTAAGCACGAGGA
P20-3C	5' -ACTGCACTTAAGCACGACGA
P20-3T	5' -ACTGCACTTAAGCACGATGA
P20-3A	5' -ACTGCACTTAAGCACGAAGA
P20-3G-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAGCA
P20-3C-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGACCA
P20-3T-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGATCA
P20-3A-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAACA
P19-2G-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAGC
P19-2C-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGACC
P19-2T-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGATC
P19-2A-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAAC
P18-1G-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAG
P18-1C-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAC
P18-1T-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAT
P18-1A-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA

Template:

T28P21T-G	3' -GCATTCAGTCCTAGACA GTAGATCGATC
T28C1	3' -GCATTCAGTGCTAGCGA CATCATAGGTA
T28C1-A	3' -GCATTCAGTGCTAGCGA AATCATAGGTA
T28C1-T	3' -GCATTCAGTGCTAGCGA TATCATAGGTA
mm4-T	3' -GCATTCAGTCCTAGATA TTAGATCGATC
mm4-C	3' -GCATTCAGTCCTAGATA CTA GATCGATC

mm4-C-02	3' -GCATTCAGTCCTAGATAC TA AATCGATC
T28-G	3' -TGACGTGAATTCGTGCT G CTCCGATCGA
T28-C	3' -TGACGTGAATTCGTGCT C CTCCGATCGA
T28-T	3' -TGACGTGAATTCGTGCT T CTCCGATCGA
T28-A	3' -TGACGTGAATTCGTGCT A CTCCGATCGA
T28-G-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCT GGTGGC ATCGA
T28-C-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCT C GTGGC ATCGA
T28-T-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCT T GTGGC ATCGA
T28-A-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCT A GTGGC ATCGA

In vivo

Primer:

P41G	5' ----ACTGCACTTAAGTATCCACGT G GACCATGGGTCTTCAGCT-3'
P41C	5' ----ACTGCACTTAAGTATCCACGT C GACCATGGGTCTTCAGCT-3'
P41A	5' ----ACTGCACTTAAGTATCCACGT A GACCATGGGTCTTCAGCT-3'
P41T	5' ----ACTGCACTTAAGTATCCACGT T GACCATGGGTCTTCAGCT-3'

Template:

T41G	3' CATGTGACGTCAATTCATAGGGTGCA G CTGGTACCCAGAAG-----5'
T41C	3' CATGTGACGTCAATTCATAGGGTGCA C CTGGTACCCAGAAG-----5'
T41A	3' CATGTGACGTCAATTCATAGGGTGCA A CTGGTACCCAGAAG-----5'
T41T	3' CATGTGACGTCAATTCATAGGGTGCA T CTGGTACCCAGAAG-----5'

以上 oligo 皆購買自基龍米克斯。

2-2. 酵素和試劑

2-2-1. 酵素

此篇研究所用之酵素都購買自 New England Biolabs。

- (1) DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment，購買自 New England Biolab (Ipswich, MA, US)。
- (2) 製備 DNA 受質使用之酵素: KpnI(R3142S ; 20,000U/ml)、SacI (R3156 ; 20,000U/ml)、HincII (R0103S ; 10,000 units/ml)、T4 DNA Ligase(M0202L ; 400,000U/ml)、RecBCD (M0345S ; 10,000U/ml)
- (3) 修復試驗所使用之酵素: BsaHI (R0556S ; 10,000U/ml)、AflII

(R0520L ; 20,000U/ml) 、PstI -HF (R3140L ; 20,000U/ml)



2-2-2. 試劑

(1) NEB Buffer 2 (10X) 購買自 New England Biolab (Ipswich, MA, US) ,

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

(2) dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 購買自 Genestar Biotechnology (Taiwan)

(3) 鹽酸 (HCl) 購買自 景明化工股份有限公司 (Taiwan)

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

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

以下為包含養菌、質體 DNA 萃取以及合成 DNA 受質所使用到之試劑。

(6) 2XTY 培養基: 1L 內含 16 g Trypton , 10 g Yeast extract , 5 g

(7) NaCl , 1 N NaOH

(8) Solution I:內含 10 mM EDTA , 25mM Tris-HCl pH 8.0 , 50 mM

(9) glucose

(10) Solution II:內含 10% SDS , 0.2N NaOH

(11) Solution III:內含 11% acetic acid , 3M Potassium acetate

(12) TE buffer:內含 10 mM Tris-HCl pH7.6 , 1 mM EDTA

(13) NEBuffer4: 內含 50 mM Potassium acetate , 20 mM Tris-acetate , 10 mM magnesium acetate , 1 mM dithiothreitol,pH7.9

(14) 1M Potassium Phosphate buffer(KPi buffer): 內含 1M Potassium phosphate dibasic , 1M Potassium phosphate monobasic

(15) PEG6000 solution: 20% PEG6000 , 2.5 M NaCl

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)



2-3. 活體內試驗菌株

此研究中使用的大腸桿菌(*Escherichia coli*)的菌株為以下兩種:

(1) NM522 (F', lacIqZΔM15/Δ(lac-proAB) glnV thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5)

此菌株為校對功能正常之野生菌株。在噬菌體質體的增殖與單股 DNA 的製備也使用本株大腸桿菌。

(2) RK1517 (mutS201::Tn5 thr-1 leu-6 thi-1 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1

kdgK51 proA2 his-4 str-31 tsx-33 supE44) 來自 Paul Modrich (Duke University,

Durham, NC), 此菌株帶有 mutS 突變, 屬於 DNA mismatch repair 缺陷

型, 此菌株作為後續修復試驗的載體。

2-4. 活體內試驗載體

本研究所採用之噬菌體質體 (phagemid) 載體為 pBluescript II SK(+), 總長 2961 個鹼基對, 含有 LacZα 序列, 可表現 β-半乳糖苷酶基因之 α 補片, 用於藍白篩選。此外, 此載體帶有多重限制酶切位 (multiple cloning site, MCS), 以便於外源片段插入, 同時具備 AmpR 抗性基因, 能表現 β-內醯胺酶 (β-lactamase) 以水解 ampicillin, 賦予抗生素抗性。pBluescript II SK(+) 同時含有 fl ori 起始區, 可供 M13KO7 助噬菌體啟動滾環式複製 (rolling circle replication), 以製備單股 DNA。

2-5. MALDI-TOF MASS

本研究所使用的 MALDI-TOF 質譜分析儀由國立臺灣大學基因體醫學研究中心提供。在進行分析之前, 先使用 Clean Resin Tool Kit (Agena Bioscience, CA) 移除檢體中之陽離子, 以降低鹽類雜訊干擾。操作流程為: 首先以 resin 裝填 384 凹槽板, 並回收未使用的樹脂; 接著, 將待測樣品加入 384 孔盤中, 每

孔以 16 μ L 無菌水稀釋後離心以排除氣泡。隨後將該孔盤倒置於事先裝填 resin 的凹槽板上，進行上下翻轉，使 resin 均勻落入各孔。去除凹槽板後，再以 3200 g 離心去除殘留氣泡，並將孔盤置於室溫下的旋轉平台上緩慢翻轉約 15 分鐘，以促進 resin 與樣品反應並去除鹽分。最後再次以 3200 g 離心 5 分鐘以沉降 resin，完成去鹽步驟。

去鹽後的樣品經由 Agena Bioscience MassARRAY® 系統進行分析，該系統由三個組件構成：自動化微量晶片點樣平台 SpectroCHIP array、MassARRAY 飛行時間質譜儀（皆為 Agena Bioscience, CA 出品）以及對應分析軟體 Typer 4.0（Agena Bioscience, CA）。分析流程中，先將 384 孔盤與晶片置入點樣平台，機械手臂會自動吸取約 5 - 10 nL 的樣品並點置於晶片對應位置。完成點樣後，於電腦介面設定晶片序號、樣品編號、位置與分析模式等資訊，接著將已點樣之晶片置入質譜儀中進行樣品離子化與飛行時間分析。最終，透過 Typer 4.0 軟體調整圖像比例與分析區段，輸出頻譜圖以進行訊號強度判讀與比對。

2-6. Klenow fragment 校正能力試驗

將粉末狀 oligo 以滅菌過的 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 NEBuffer2 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。



2-7. 校正產物百分比計算

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 4 所示(K. Y. Su et al., 2018)。

而新設計之序列，包括第二版本以及第三版本則因目標將差異降到最低，固定所有錯配 Template 和 Primer 的長度，並且除了錯誤配對以外的序列相同固不必 normalize。

接著，以訊號強度計算各訊號所占比例，如下列公式：

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

2-8. 樣本去鹽化

實驗樣品冷卻後，接著用 EasyPure PCR/Gel Extraction Kit 做去鹽純化。首先加進樣品體積 5 倍（145 μL ）的 PG Buffer，攪拌均勻，再加入樣品體積 9 倍（261 μL ）的 isopropanol（異丙醇），繼續混合好。混合液轉入純化管柱，以 11,000 g 離心 30 秒，把流出的液體倒掉。然後加入 600 μL Wash Buffer，同樣 11,000 g 離心 30 秒，再把濾出液棄去。為了讓 membrane 完全甩乾，用 18,000 g 離心 3 分鐘。

之後加上 30 μL Elution Buffer，放著靜置 1 分鐘，讓 buffer 充分浸潤 membrane，最後 18,000 g 再離心 1 分鐘，把濾液收集起來，放到 -20°C 保存，待後續進行 MALDI-TOF 質譜分析。



2-9. 含錯誤配對之異股核酸質體構築

將 20 µg pBluescript II SK+ 以 50U KpnI 和 50U SacI 分別於核苷酸位點 657 和 759 處將大部分多基因選殖限制酶切位(multiple cloning site, MCS)切除，接著插入人工合成寡核苷酸，上面帶有特定限制酶酵素序列。成功插入後會出現終止密碼子而不能製造出有功能性的 β-半乳糖苷酶。後面將細菌在含有 40 mM X-gal 及 40 mM IPTG 的 2XTY plate 於 37 度培養 16 個小時，挑選藍色菌落，以鹼性溶解法抽取出質體。確認用於製備受質引子股的 P41T 帶有 BsaHI、Hinc II 及 AflIII 的酵素切位;製備受質模板股 T41G 則帶有 BsaHI 及 PstI 酵素切位後，再透過定序(委託廠商:基隆米克斯) 確認序列正確，即完成質體之製備。

2-10. 勝任細胞準備和轉型作用

培養濁度飽和的大腸桿菌菌液 100 µl 加至 50 ml 的 2XTY 培養液，置於 37°C、160 rpm 培養箱培養至吸光值 A590=0.3~0.4 之間，將菌液於 4 °C 以 3000 rpm 離心 10 分鐘(KUBOTA2800)後去除上清液，再以二分之一體積之 0.1M CaCl₂ 輕柔以 dropper 沖起沉澱細菌讓其懸浮，之後靜置於冰上 20 分鐘，接著以 3000rpm 於 4 °C 離心 10 分鐘(KUBOTA2800) 移除上清液並加入 800 µl 0.1 M CaCl₂/ 20% glycerol 回溶，分裝 40 µl 至微量離心管，結束勝任細胞的製備。

將要進行轉型作用之 DNA 加入 40 µl 的勝任細胞中，並靜置於冰上 30 分鐘讓 DNA 進入。再來於 42 °C 水浴槽中，進行熱休克(heat shock) 40 秒後立即置於冰上 5 分鐘。加入 400 µl 2XTY 培養基後於 37 °C，160 rpm 培養箱培養 30 分鐘，讓細胞復原。取出後以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉大部分的培養基留下約 100 µl 的培養與細菌合，均勻混合後取 20 µl 以玻璃珠塗盤於含可篩選殖體抗生素的 2XTY 培養基，於 37 °C 培養到隔天。因含有抗生素故轉型成功的

菌落可生長於培養基上，挑選單一菌落培養進行後續實驗。



2-11. 雙股引子股核酸之大量製備

將成功轉型並攜帶特定序列質體 (P41T) 的菌落，首先接種於 3 mL 含 ampicillin (150 $\mu\text{g/mL}$) 的 2XTY 液體培養基中，於 37°C、160 rpm 培養至隔日，形成飽和培養液。隔日取此培養液以 1:50 比例接種至 50 mL 含同濃度 ampicillin 的 2XTY 培養基中，持續在 37°C、160 rpm 搖 flask 培養，待 A590 吸光值超過 1 後，再以 1:40 比例接種至 500 mL 同條件培養基中，繼續培養至隔日。

菌液經 HA6000 離心瓶以 6242 g、4°C 離心 18 分鐘 (Sorvall RC 3C rotor) 後棄去上清。殘留菌體以 9.4 mL Solution I 重懸，轉入 JA-10 離心瓶，加入 2.5 mL lysozyme (25 mg/mL)，室溫作用 10 分鐘以破壞細胞壁。隨後加入 25 mL Solution II，置冰上輕攪至溶液呈現透明黏稠狀，再加入 18.75 mL Solution III 中和溶液並沉澱蛋白質，輕搖均勻後冰浴靜置 10 分鐘，接著於 4°C、11300 g (Beckman JA-10 rotor) 離心 30 分鐘以收集上清液。

計算上清體積後，加入其 0.6 倍體積的異丙醇 (isopropanol)，輕輕混合均勻後室溫靜置 10 分鐘以沉澱 DNA，25°C、11300 g 離心 30 分鐘收集沉澱。所得沉澱以 2 mL 70% ethanol 洗滌，待酒精完全揮發後，以 3 mL TE buffer 溶解，轉移至 JA-20 離心瓶，再以 750 μL TE buffer 沖洗原離心瓶並合併。加入 1 mL 12.5 M lithium chloride 混勻，-20°C 放置 30 分鐘以沉澱高分子量 RNA，接著 4°C、12096 g (Beckman JA25.50 rotor) 離心 30 分鐘。將上清移至新管，加入 0.1 倍體積 3 M sodium acetate 和 2 倍體積 100% ethanol 混勻，-20°C 靜置至少 30 分鐘以再次沉澱 DNA，接著同條件離心 30 分鐘。沉澱以 1 mL 70% ethanol 洗滌，揮發殘留酒精後以 2 mL TE buffer 溶解，轉移至 15 mL 離心管，再用 500 μL TE buffer 沖洗原瓶並合併。

加入 10 μL RNase (10 mg/mL) 於 37°C 作用至少 2 小時以去除小片段

RNA，反應後以等體積 phenol 萃取除去 RNase 和蛋白質，上層液轉入新離心瓶，加入 0.1 倍體積 3 M sodium acetate 和 2 倍體積 100% ethanol 混勻後，-20°C 靜置至少 30 分鐘沉澱核酸，再以 4°C、12096 g 離心 30 分鐘。沉澱以 1 mL 70% ethanol 洗滌，揮發酒精後以 1 mL TE buffer 溶解，再用 500 μ L TE buffer 沖洗原瓶合併入 15 mL 離心管。最後將樣品裝入透析袋中於 TE buffer 透析兩小時以去除鹽分。

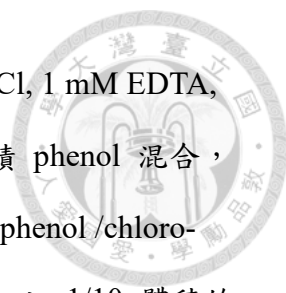
最終萃取之 DNA 經 NanoDrop 1000 (Thermo) 偵測 A230、A260 與 A280 吸光值以測定雙股 DNA 濃度，並經膠體電泳確認其純度與完整性。

2-12. 單股模板股核酸之大量製備

為製備單股 DNA (ssDNA)，本研究採用以 M13KO7 幫助性噬菌體感染含有 fl ori 的質體，經測試後原有 semi-solid agar 方法感染成效不佳，因此改選擇以多管小量培養從上清液純化 ssDNA 的方法。

首先，挑含有目標 phagemid 的單一菌落，接種於 3 mL 含 100 μ g/mL ampicillin 的 2XTY 液體培養基中，於 37°C、250 rpm 培養箱中培養過夜。次日取 100 μ L 過夜菌液接種至新鮮 3 mL 2XTY + ampicillin 培養基中，37°C 培養至 OD600 約 0.3 - 0.5，菌液呈對數生長期狀態。隨後加入 M13KO7 幫助性噬菌體，感染倍率 (MOI) 約為 10。完成感染後，培養條件維持 37°C、150 rpm 搖菌，持續培養過夜以增加 ssDNA 產量。

第三天收集上清液：先以 14,000 rpm、10 分鐘、4°C 離心去除細胞，取上清液轉移至新管。之後向上清液中加入 1/5 體積的 20% PEG 6000 / 2.5 M NaCl 溶液，使終濃度約為 4% PEG、0.5 M NaCl，目的是回收 M13 phage 顆粒。混勻後置於 4°C 冰箱靜置過夜以促進 phage 聚集沉澱。完成沉澱後，以 14,000rpm、30 分鐘、4°C 離心，小心倒掉上清液，避免擾動沉澱在管底的白色



phage pellet。phage pellet 使用 30 μ L TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 回溶。為提取純化的 ssDNA，將溶解後的懸液與等體積 phenol 混合，以 14,000 rpm、離心 3 分鐘分層。小心取出上層水相，並重複 phenol/chloroform、chloroform 以去除殘留有機溶劑。純化後的上層水相中加入 1/10 體積的 3 M sodium acetate 與 2 倍體積的冰 100% ethanol，-20°C 放置至少 30 分鐘以進行沉澱。完成後以 14,000 rpm、30 分鐘、4°C 離心回收 DNA。最後室溫下風乾 10 分鐘後以 TE buffer 回溶 ssDNA，並使用 NanoDrop 1000 (Thermo) 測量 A230、A260、A280 吸光值和濃度，並以膠體電泳確認。

2-13. 含有錯配受質之合成

此次採用 modified 後的作法，以求盡快產出受質，將 100 μ g 的引子股雙股 DNA 加入 100 U Hinc II，在 37°C 下反應 2 小時，確保完全切解成線性雙股 DNA (linear dsDNA)。經 1% 膠電泳確認切完成後，用 phenol 去除酵素，再加入等體積 butanol 混合，去除殘留 phenol，丟棄上層液體，取下層含 DNA 的水相，放入透析袋，在 TE buffer 中透析以去除鹽分、降低離子濃度。

透析後，將線狀引子股雙股 DNA 和 2 倍莫耳數的模板股單股 DNA 混合，在含 10 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH 7.6) 的條件下進行 Hybridization。加入原體積 0.03 倍的 10 N NaOH 室溫作用 5 分鐘，將現有雙股 DNA 完全變性為單股 (alkaline denature)。隨後以 0.1 倍體積的 2.9 N HOAc 中和至中性，再連續加入 0.145 倍 3 M KCl 與 0.124 倍 1 M KPi buffer (pH 7.6)，充分混勻後，分別在 65°C 及 37°C 各反應 30 分鐘，最後冰浴 10 分鐘，促使引子股單股 DNA 黏合到環狀模板股上。以 1.5% 瓊脂膠電泳檢查，確認產生含 G:T 錯配的缺口 DNA (nick DNA)。

為了去除未結合的模板股單股 DNA，我們用 hydroxyapatite chromatography (HAP，羥基磷灰石層析)，根據單股和雙股 DNA 對羥基磷灰石的親和力差

異，分別以 0.13 M 到 0.16 M KPi 梯度沖洗，逐步洗出單股 DNA，經 1% 瓊脂膠電泳確認已完全沖出。最後用 0.4 M KPi 沖出雙股 DNA（包括缺口 DNA 與線性雙股 DNA），並用 1.5% 瓊脂膠電泳檢視純度，再進行 TE buffer 透析，去除多餘磷酸鹽，並用 NanoDrop 1000（Thermo）測定 A230、A260、A280 吸光值以求得總濃度。

為進一步純化除掉不需要的線性雙股 DNA，我們加入 RecBCD 酵素，以 1 μ g 線性雙股 DNA 配 1 U RecBCD 比例，在 $1\times$ NEBuffer4、2 mM ATP、37°C 下反應 2 小時，完全切解線狀同質雙股 DNA（由 1.5% 膠體電泳確認）。隨後以 phenol 移除酵素，再用等體積 1-butanol 去除 phenol 並濃縮至約 2 mL，將 DNA 放入透析袋以 TE buffer 透析去鹽及去除 1-butanol。因不影響轉型後效果，以往 free nucleotides 通 Viva spin column 的步驟去除，至此完成缺口異股 DNA 的純化製備。

第三章 結果



3-1. 不同濃度 dNTPs 對錯配校正能力之影響

本研究接續實驗室先前對 Klenow fragment (KF) 校對特異性之探討，進一步針對 DNA 聚合酶 I 於校正能力邊界上的錯配特異性進行分析。我們設計不同位置帶有錯配的 DNA，並藉由質譜訊號的標準化與定量，評估 KF 對不同序列的校正能力與聚合效率。

由於質譜分析中，Mass 值譜圖的峰強度與分析物質量呈反比關係，因此實驗室先前已由張惠嵐學姊完成每個相關序列及各寡核苷酸的等體積莫爾濃度 (molar concentration) 測定。此測定結果作為標準化依據，以確保不同產物間 MS 訊號的比較具一致性。根據該測定結果，每當產物長度相差一個核苷酸時，訊號強度約減弱 15%。因此，在本實驗中，我們在序列版本尚未最終固定前，先採用該版本作為訊號差異的標準化基準，以減少定量分析中的誤差。(張惠嵐，2024)

在實驗設計上，我們首先以原有材料進行測試。所使用之 primer 與 template 於反應前先行黏合處理：將等量 50 pmol primer 與 template 混合後，置於 65°C 水浴 30 分鐘，隨後於 37°C 再處理 30 分鐘以促進黏合，最後置於冰上以進一步穩定黏合結構。反應條件為 1U Klenow fragment 於 37°C 下與三種不同的 dNTPs 共同作用 20 分鐘，反應後通過商用純化套組去鹽處理並進行質譜分析。此處我們僅提供三種 dNTPs，而未加入 dGTP 或 dCTP，目的在於讓 KF 聚合作用於模板股為 dCMP 或 GMP 時無法繼續延伸，藉此區分出不同錯配是否受到 KF 校正的影響，流程如圖 1。

此外，限制 dNTP 種類也能有效控制聚合長度，使 PR (proofread 產物) 與 PE (primer extension 產物) 僅比原 primer 多延伸 2 至 3 個核苷酸。此策略有助於減少過多延伸導致的質譜強度誤差，因為產物越長，質譜偵測的誤差也隨之

增大，進而影響 PR、PE 與 primer 之間的訊號比值與定量精準度。

針對 KF 校對能力之分析，我們分別於引子股 3'端數來第 1、2、3、4 個位置設計不同的錯配序列。反應中分別給予 100 μ M 或 20 μ M dNTPs，以模擬不同核苷酸濃度對校對活性的可能影響。實驗結果如圖 2 所示，在未提供正確配對 dNTP 的條件下，KF 聚合作用多數停留於預期長度，僅在部分樣品中觀察到延伸至錯配位置後出現 proofread 或延伸產物。此現象顯示 KF 對特定位點錯配的校正能力具有明顯差異，並可能受序列背景或錯配位置的影響。

首先，我們因應投稿審查意見，相較於先前實驗室得實驗設計，我們對 dNTP 濃度的設計進行了調整與優化。審稿人提問為何本研究選用 100 μ M 作為 dNTPs 的濃度，而未採用更接近生理條件的濃度進行測試。針對這點，我們重新檢視了實驗設計。原始選用 100 μ M dNTPs 濃度，主要是基於 DNA 聚合酶的標準體外反應條件，該濃度範圍（100–250 μ M）廣泛用於 PCR 與 DNA 延伸試驗中，公認為適合作為聚合酶催化反應的最佳濃度條件（Saiki et al., 1988；Li et al., 1999），且亦符合本實驗室既有體外聚合研究的傳統標準，以利與過去數據直接比較。然而，我們也認同此意見具有參考價值，特別是若欲模擬接近 *E. coli* 細胞內的實際環境條件。根據文獻報導，*E. coli* 細胞內游離 dNTP 的濃度大約介於 10 – 50 μ M 之間（Buckstein et al., 2008），因此我們重新設計了實驗流程，新增以 20 μ M 作為代表生理濃度的 dNTP 梯度條件，並進行不同濃度的修復試驗，結果如圖 2 表示，實驗結果顯示，在不同 dNTP 濃度下，Pol I 的校對表現趨勢一致：100 μ M、50 μ M 及 20 μ M 條件下 PR（proofread）產物的比例分別為 10%、10% 及 14%，差異極小。此結果說明，我們先前選用 100 μ M 所觀察到的反應現象，與更接近生理濃度的條件下的結果相當一致，具備生理意義與代表性。因此後續也改用接近生理濃度的 20 μ M dNTPs。

透過本次調整，我們對序列與反應條件進行了更精細的設計，也藉由酮濃度

比較實驗，使數據更貼近生理情境。後續分析將針對第三版本序列與生理濃度條件下的校正效率與延伸行為進行呈現。



3-2. 引子股 3'端倒數第一位置第三版序列校正分析

在本研究中，我們一共使用三個不同版本的序列進行實驗：分別是使用現有材料的第一版本，改進長度使其一致化的第二版本，以及最後壁面產物傾向延長的第三版本。以往研究末端錯配是修復領域的主流趨勢，因此本論文也以末端倒數位置第一號到第四號的順序開始介紹。在本研究所進行的校對活性試驗中，成功經由 Klenow fragment (KF) 移除錯配核苷酸的產物，統一以 PR (proofread) 表示；相對地，若 KF 未能辨識該錯配而直接催化 DNA 延伸反應，則產物以 PE (primer extension) 標示。

第一版本序列詳見表 1，在第一版本序列之後，後續實驗中我們調整並設計了新的 DNA 序列組合。之所以更換序列，是因為在第一版本序列中觀察到不同錯配間存在較大差異，可能干擾校正活性之比較分析。因此，我們重新設計一套以統一性為原則的序列，確保所有錯配的 template 與 primer 長度一致，並將除錯配位置外的序列內容完全相同，以此盡可能減少因序列背景或結構差異所造成的干擾，提升實驗數據的可比較性與精確度。第二版本以及其產物的序列組成與其對應的分子量詳見表 2。

而在研究後期我們又針對序列設計進行最終調整，制定了第三版本的實驗序列，詳細序列請參照表 3。相較於第二版本，此版本主要的改進在於我們考量了 guanine (G) 在 DNA 雙股結構中的堆疊穩定性對聚合反應的可能影響。根據先前研究指出，guanine 具有較高的堆疊能量 (SantaLucia, 1998)，當 DNA 聚合酶 I (Pol I) 在 primer 3' 端加入 dGTP 並形成 G-C 配對時，新合成的雙股 DNA 區段將更為穩定，進而可能促使聚合酶傾向後續的延伸反應 (Freemont et al.,

1988; Joyce & Benkovic, 2004)。事實上，本實驗室亦曾觀察到當 primer 的第一個延伸核苷酸為 dGTP 時，Pol I 的聚合行為更偏向延伸而非校對。為避免此類穩定性差異對反應造成偏倚，我們在第三版本序列中調整了關鍵位置的序列設計，以降低 primer 3' 端接入 dGTP 的機會，進而減少因雙股區段過度穩定所導致的延伸趨勢，提升校對反應的觀察精準度。

我們針對第三版本序列中引子股 3' 端倒數第一個核苷酸位置的錯配進行校對效率分析。實驗結果顯示，各類錯配在此位置的 PR (proofread) 產物比例均有顯著提升，甚至接近完全修正的水平。各錯配的校對比例由高至低分別為：GA 100%、GG 100%、CC 100%、CA 100%、TT 100%、CT 88.6%、TC 82.7%、GT 78.8%以及 TG 65.8%。與倒數第二與倒數第三位置的數據進行比較可見，當錯配位置越靠近 primer 3' 端時，Pol I 的校對效率越高，且對各類錯配的選擇性差異也逐漸縮小，比例如圖 3 所示。

回顧倒數第二位置的數據，各錯配的校對比例為：CC 96.3%、GA 80.3%、TT 67.2%、TC 38.1%、CT 33.1%、CA 22.2%、GT 16.5%、GG 5.5%以及 TG %。而倒數第三位置的校對比例則明顯較低，依序為：CC 73.76%、TT 41.4%、TC 25%、CT 21.8%，其餘 GA、GG、GT、TG 及 CA 則未偵測到 PR 產物。從數據可明顯觀察到，隨著錯配位置由倒數第三向倒數第一推進，KF 的校對效率在各類錯配上皆有顯著提升。以 GA 為例，其在倒數第三位置完全無法觸發校對，但在倒數第二位置已提升至 80.3%，至倒數第一位置更達到 100%，顯示 Pol I 在 3' 端最末端位置對 GA 錯配具有極高的敏感性與修正能力。GG 錯配亦呈現類似趨勢，從倒數第三位置的 0%、倒數第二位置的 5.5%，到倒數第一位置的 100%，同樣顯示 KF 校對位點對 3' 端錯配的辨識能力強烈依賴位置因素。

其他錯配也有類似的提升。CC 錯配在三個位置的校對比例分別為 73.76%、



96.3% 與 100%，可見其即便在較遠位置已有相對較高的修正比例，在更接近 3' 端時仍可達到完全修正。TT、TC 與 CT 等錯配在倒數第三位置僅有中等或偏低的修正比例（TT 41.4%、TC 25%、CT 21.8%），在倒數第二位置則分別提升至 67.2%、38.1% 與 33.1%，至倒數第一位置進一步升高至 100%、82.7% 與 88.6%。GT 與 CA 則從倒數第三位置的 0%、倒數第二位置的 16.5% 與 22.2%，提升至倒數第一位置的 78.8% 與 100%。這些結果一致顯示 Pol I 校對活性強烈受引子股 3' 端錯配位置影響，當錯配越接近 3' 末端時，其修正能力大幅提升，且錯配類型間的校對效率差異隨之縮小。

從三個位置的比較結果我們可以清楚看到 KF 校對活性的幾個重要特性。首先，KF 對 3' 末端錯配的校對能力最強，顯示其外切酶活性具有明顯的空間位置偏好。當錯配位置離 3' 端越近，DNA 聚合酶更易誘導外切酶活性位點啟動，進而移除錯配核苷酸。這與先前文獻報導一致，即 Pol I 外切酶活性主要針對引子 3' 端附近的錯配發揮作用。其次，不同錯配類型在倒數第三與倒數第二位置時，校對效率差異明顯，但在倒數第一位置時，幾乎所有類型皆可高效修正，顯示當錯配位於 3' 端極近處時，Pol I 的選擇性顯著降低，校對行為較為全面。此外，從 GG、GA、GT 等在倒數第三與倒數第二位置的低修正比例，到倒數第一位置幾乎完全修正。

本研究突顯序列與空間位置在 Pol I 校對機制中的關鍵作用。從設計上看，第三版本序列經調整後，成功降低 primer 延伸初始階段因 G-C 配對高堆疊能量引起的延伸偏向，並清晰呈現出 KF 校對活性在不同位置、不同錯配條件下的特徵與變化。

3-3. 引子股 3'端倒數第二位置第三版序列校正分析



針對倒數第二個核苷酸位置的錯配(此為第三版本序列)，我們進一步進行校對效率分析，結果如圖 4。各類錯配的 PR (proofread) 產物比例由高至低分別為：CC 96.3%、GA 80.3%、TT 67.2%、TC 38.1%、CT 33.1%、CA 22.2%、GT 16.5%，而 GG、TG 的校對比例則僅為 5.5%及 0%。與倒數第三位置的數據 (CC 73.76%、TT 41.4%、TC 25%、CT 21.8%、GA 0%、GG 0%、GT 0%、CA 0%、TG 0%) 進行比較可見，當錯配位置更接近引子股 3' 端時 (倒數第二位置)，幾乎所有錯配類型的修復比例均有明顯提升。其中，CC 與 GA 錯配的修正效率提升尤為顯著，CC 從 73.76% 上升至 96.3%，GA 則從無 PR 產物上升至 80.3%，顯示 Pol I 在 3' 端更接近的錯配位置時，其校對能力顯著增強。TT、TC 與 CT 等錯配亦有類似趨勢，分別從 41.4%、25% 與 21.8% 提升至 67.2%、38.1% 與 33.1%。即便是先前完全未偵測到校對產物的 GT 與 CA，在倒數第二位置亦觀察到 16.5% 與 22.2% 的 PR 產物。相對而言，GG 錯配在兩個位置的校對效率均偏低，但倒數第二位置仍有小幅提升 (由 0% 增至 5.5%)。

結果顯示，Pol I 對引子股 3' 端較接近的錯配位置具有更高的校對能力，支持其外切酶活性在空間位置上的偏好特性。此現象對應文獻中指出 Pol I 校對位點對於 3' 端附近錯配的敏感性更高，較易啟動修正反應 (Freemont et al., 1988; Joyce & Benkovic, 2004)。而數據進一步證實，錯配位置為影響 Pol I 校對特異性的關鍵因素之一。

3-4. 引子股 3'端倒數第三位置第三版序列校正分析

我們針對第三位置不同錯配類型進行校對效率的評估，第三版本序列的實驗數據如圖 5 顯示，各類錯配的 PR (proofread) 產物比例由高至低分別為：CC 73.8%、TT 41.4%、TC 25%、CT 21.8%。相對地，GA、GG、GT、TG 與 CA 等錯配在實驗中未偵測到 PR 產物，顯示 Pol I 對這些錯配的校對能力顯著不

足。在與第二版本結果比較後可發現，第二版本序列最高 PR 比例為 CC 的 46%，而其他錯配多數低於 30%。此對比顯示，第三版本在部分錯配（特別是 CC 與 TT）上的校對效率顯著提升。此結果驗證了序列優化策略確實在一些錯配上降低了因 primer 起始延伸時 G-C 配對穩定性過高所造成的延伸偏向，強化了 KF 的校對行為。

其中 AG、AC 與 AA 四種錯配，進行三重複時所有重複實驗中，這四組錯配均僅出現背景雜訊，未能獲得清晰可判讀的質譜訊號，由於缺乏有效訊號，本組資料尚無法納入後續統計分析，後續實驗將針對上述四種錯配進行條件優化與補充。

進一步探討不同錯配的校對比例可見，KF 對於 CC 錯配表現出最顯著的校對活性。這可能與 CC 錯配在空間構型上較易誘導聚合酶 3'-5' 外切酶活性位點的啟動有關。此外，TT、TC 與 CT 等錯配的中等校對比例，或與其錯配穩定性較低、較易被辨識有關。反之，GA、GG、GT 與 CA 等錯配未見 PR 產物，可能因這些錯配在 KF 催化反應中未達觸發校對閾值，或聚合酶在此情況下仍偏向直接延伸。尤其 GG、GA 等涉及 purine-purine 錯配的組合，結構上可能較難進入外切酶活性位點，進一步降低校對機率。

3-5. 引子股 3'端倒數第三位置第二版序列校正分析

針對第二版本序列的分析結果，我們聚焦於引子股 3' 端倒數第三個核苷酸位置的錯配校正表現。此版本序列的設計已統一除錯配以外的序列內容與長度，以降低背景序列對 KF 校正活性的干擾。實驗結果如表所示，各類錯配的 PR (proofread) 產物比例由高至低分別為：CC 46.0%、GA 26.2%、AG 20.5%、GG 11.8%、CT 10.0%，其餘錯配則未觀察到 PR 產物訊號，包括 GT、CA、AA、

AC、TG、TC 及 TT，PR 百分比均為 0.00%。此數據顯示，在倒數第三個位置，KF 對不同錯配的辨識與修正能力有差異。產物比例結果請參見圖 6。



從數據可見，CC 錯配最易被 KF 校正，PR 產物比例接近一半，而 GA 與 AG 雖然仍有一定的校正比例，但明顯低於 CC。GG、CT 等錯配的修正效率更低，僅有一成左右。值得注意的是，GT、CA、AA、AC、TG、TC 與 TT 等錯配在反應後完全未見 PR 產物，推測 KF 在這些錯配情境下傾向直接進行聚合作用，未執行錯配去除的功能。本結果再次突顯 KF 校正活性受錯配種類影響。

3-6. 引子股 3'端倒數第四位置第一版序列校正分析

在實驗最早之際，我們使用實驗室當時現有材料進行引子股 3' 端數來第四個位置的校正修復實驗，第一版序列結果如圖 7 所示，各類產物的序列組成與其對應的分子量已彙整於表 1 中。

根據實驗結果顯示，針對第一版序列中引子股 3' 端倒數第四個位置的不同錯配組合，KF 校正活性的表現存在著差異。當該位置的錯配組合為 GA、GG、TC、CC、CA 及 CT 時，PR 產物的比例依序為 91%、81%、55%、24%、15% 及 11%。此結果顯示 GA 與 GG 錯配最易被 KF 偵測並去除，而 TC、CC 及 CA 錯配的校正效率則依序降低，至於 CT 的修正能力更顯微弱。另一方面，若該位置的錯配為 GT、TT、TG、AA 或 AG，質譜圖中均未看到 PR 產物的訊號，表示在這些錯配情況下，KF 並未發揮校正功能，而是直接進行了聚合作用，產生僅有延伸但未修正的產物。此現象可推測酵素在面對這類錯配時，較無能力或傾向執行錯誤修復，而使錯配直接被延長進入後續序列。

此實驗結果不僅反映 KF 校正活性對不同錯配組合的敏感程度，也進一步突

顯該酵素在聚合與校正之間的選擇性與偏好，為後續探討序列背景對 KF 校正機制影響提供了有價值的依據。



3-7. 活體內試驗受質合成

在本研究中，繼完成體外聚合酶校對活性分析後，我們進一步規劃進行體內試驗，以驗證在細胞環境中聚合酶對不同錯配類型的校對表現。該實驗的設計目的，是希望製備 12 種於引子股 3' 端倒數第 4 號位置帶有不同錯配的缺口異股 DNA 受質，並以 *E. coli* MutS 缺失突變株 RK1517 作為受體，避免細胞內錯配修復系統干擾，以純粹觀察聚合酶對不同錯配受質的校對能力，我們選定了缺口旁邊 1 號位置 G:T 錯配進行受質合成，詳細請見圖 8。然而，雖然我們在體外順利完成受質 DNA 的製備與純化，實際進行轉型實驗時，不論使用常用實驗室宿主 NM522 或預期具優勢的 RK1517 突變株，皆未能成功獲得轉型子菌落。

在受質製備部分，首先以高純度方法製備大量雙股引子股 DNA。藉由大容量液體培養與多次離心萃取、純化，最終經 RNase 處理、phenol 萃取及多次乙醇沉澱，成功取得高純度、完整性良好的雙股 DNA，並以 NanoDrop 檢測純度比值與濃度，確認 DNA 質量符合後續反應需求。接著，我們以 M13KO7 幫助性噬菌體感染含 *fl ori* 的目標質體菌株，利用液體培養法純化獲得所需單股模板 DNA (ssDNA)，並經多次 phenol/chloroform 純化及乙醇沉澱，ssDNA。

隨後，我們採用 modified 後的方法以加速受質製備進程，如圖 9 所示。將引子股雙股 DNA 線性化後，與過量模板股 ssDNA 在適當緩衝液與鹽濃度條件下進行黏合，並藉由鹼變性與酸中和步驟消除原雙股 DNA 結構，確保引子股與模板股正確重組。經過高溫與中溫階段反應，並經冰浴穩定後，以電泳確認成功獲得含缺口與目標錯配的異股 DNA。為去除多餘未結合模板股 ssDNA，進行羥基

磷灰石層析分離，再以 RecBCD 酵素專一性切解殘留線性雙股 DNA。最後透過透析去鹽，並以 NanoDrop 與膠體電泳確認純度、完整性與濃度。上述流程皆順利完成，最終純化產物為理論上結構正確、錯配位置與類型明確的受質 DNA。

然而，在進行體內轉型試驗時，結果卻不如預期。無論選用 NM522 標準實驗株，或特別選擇的 RK1517 MutS 缺失突變株進行轉型，均未觀察到轉型子形成。此結果令人意外，因體外確認受質的完整性、純度及濃度皆達實驗標準，且轉型條件皆遵循既往成功經驗執行。實驗過程亦多次重複，結果一致為轉型失敗。

針對此現象，我們初步推測可能原因如下：首先，受質本身為缺口異股 DNA，雖結構經電泳與純化確認無明顯降解或副產物，但該結構在進入細胞後可能無法穩定存續，或因缺口結構易受細胞核酸酶降解，導致無法形成可穩定複製或表現的重組質體。其次，受質量雖高，但 modified 法在製備過程中，仍可能遺留微量污染物（如殘餘酶、鹽類或溶劑），這些成分可能抑制轉型效率或影響細胞存活率。此外，也不排除 DNA 受質進入細胞後，因缺口結構啟動細胞內不明降解機制，即便在 MutS 缺失背景下，其他 DNA 修復或降解路徑亦可能介入而使受質快速降解。

最後，本研究原預期 RK1517 突變株可有效避免錯配修復干擾，使聚合酶的校對活性能在體內純粹呈現，但實驗結果反映出實際細胞環境遠比體外系統複雜許多，特別是對於非完整閉環質體結構的接受與維持能力。未來方向上，我們計畫優化受質製備純化流程，例如改以 slow annealing 法提升異股 DNA 的穩定性與同質性，或採用更嚴謹的酶去除與溶劑殘留清除步驟，以降低轉型抑制因子。同時，也將評估是否需在受質結構中補足缺口以形成閉環質體後再進行轉型，以提升進入細胞後的穩定性與表現機會。此部分研究將作為後續體內聚合酶校對活

性解析的重要基礎工作。



第四章 討論



在 DNA 複製與維持基因體完整性的過程中，錯配 (mismatch) 是一種常見的分子事件。各類型錯配在自然界中的生成頻率及其生物學意義，不僅反映了突變壓力與選汰動態，也為校對修復系統的演化提供了背景。根據文獻報導，最常見的錯配類型為 G:T (或 T:G) 錯配，主要源自胞嘧啶 (C) 自發脫胺形成尿嘧啶 (U)，最終導致 C:G 配對轉為 T:G 錯配 (Modrich, 1991 ; Kunkel & Erie, 2005)。此外，在 DNA 合成過程中，DNA 聚合酶的插入錯誤亦會引入 A:C、G:G、A:G 等 purine-purine 或 purine-pyrimidine 錯配，但由於其空間構型與雙股穩定性較差，此類錯配生成頻率相對低 (Schofield & Hsieh, 2003 ; Schaaper & Dunn, 1991 ; Fijalkowska, Schaaper, & Jonczyk, 2012)。

本研究中，我們對不同錯配在 Pol I 校對活性中的表現進行了系統性分析。實驗結果顯示，G:T 錯配在倒數第三位置幾乎未被 Pol I 修正 (0% PR)，但在倒數第二與第一位置時校正效率分別提升至 16.5% 與 78.8%。此趨勢反映出 G:T 錯配雖然在自然界中最常發生，但其能否被 Pol I 修正取決於錯配位置與 Pol I 校對結構的接觸範圍。此外，purine-purine 錯配如 G:G、A:G 在倒數第三位置未見校對產物，但在倒數第一位置時卻均能達到近乎完全修正 (100% PR)，顯示 Pol I 主要透過外切酶活性位點針對引子股末端錯配進行校正，而較遠位置錯配即便屬於不穩定型也難以引發修正。

這樣的觀察與自然突變頻率可能有關，根據 Schaaper (1993) 對 *E. coli* 突變譜的研究，T:G 錯配是自發突變的重要來源，本研究結果說明，即便生成頻率低的 purine-purine 錯配在自然中較罕見，當其發生於引子股末端時，Pol I 仍具

備強大的校正能力以阻止其突變固定。反之，對於高頻生成但位置偏遠的 G:T 錯配，Pol I 校正能力有限，因此在自然界中可能更依賴後續 MMR 系統介入修正 (Modrich, 1991; Fang & Modrich, 1993)。



此外，這些錯配類型在雙股 DNA 結構的穩定性也影響其校對機制的啟動。文獻指出，G:T 錯配可形成 wobble 配對，並維持一定程度的雙股穩定性，使得 DNA 聚合酶在合成過程中不易察覺到錯配存在 (Rossetti et al., 2015)。相較之下，A:G 或 G:G 錯配因空間排斥與氫鍵形成困難，使雙股局部結構扭曲更顯著，當其位於引子股末端時更易被 Pol I 外切酶活性位直接辨識並移除 (Patterson, Sapam, & Nair, 2024; Freemont et al., 1988)。

DNA 聚合酶 I (Pol I) 與 mismatch repair (MMR) 系統作為細胞內防止突變累積的兩道重要防線，在修復不同類型錯配時表現出顯著的機制差異與互補性。Pol I 主要透過 3'→5' 外切酶活性去除引子股末端的錯配核苷酸，具備即時校對的功能；而 MMR 系統則以較高階層的監控機制在 DNA 合成完成後掃描並修正錯配，確保基因體穩定性 (Modrich, 1991; Kunkel & Erie, 2005)。本研究所觀察到 Pol I 對不同位置與類型錯配的修正表現，與 MMR 系統對錯配修正的特性對照，可進一步揭示兩者在 DNA 修復網絡中的分工與互補角色。

Pol I 對倒數第三位置上的 G:T、GA、GG、GT 等錯配幾乎無法啟動校對 (PR 比例接近 0%)，但在倒數第一位置時即便是 purine-purine 錯配亦能達到接近 100% 的修正比例。這強烈支持 Pol I 的校對能力高度受限於引子股 3' 端的位置依賴性，當錯配超出外切酶活性位能直接接觸的範圍時，即便為結構最不穩定的 purine-purine 錯配，也難以引發 Pol I 的校對反應。此特性與 MMR 系統的錯配修復策略形成鮮明對比。根據 Modrich (1991) 與 Modrich 團隊後續實

驗，MMR 系統的 MutS 蛋白能廣泛辨識各類型錯配，包括 G:T、A:C、G:G 等，且修正效率不受錯配於引子股末端或內部位置影響 (Modrich, 1991)。尤其 G:T 錯配被確認是 MMR 系統最優先的修正目標之一，修正效率極高 (Kunkel & Erie, 2005；Schofield & Hsieh, 2003)。

從研究數據與 MMR 文獻對照可見，當 Pol I 對 3' 端以外位置的錯配無法發揮校對功能時，細胞會依賴 MMR 系統的補救作用。例如在我們體外數據中，倒數第三位置的 G:T 錯配未被 Pol I 修正，但此類錯配在細胞中若未被即時校正，即會被 MMR 系統透過 MutS 與 MutL 蛋白複合體辨識並引導下游修復步驟完成去除 (Modrich, 1991)。此外，根據 Lee 等 (2012) 以 MutS 缺失突變株的研究，當 MMR 缺失時，G:T 錯配在基因體中易於逃脫修正而固定為突變，進一步凸顯 MMR 在修正高頻生成但 Pol I 難以校對錯配中的重要性。

另外值得注意的對比是，MMR 對 purine-purine 錯配的修正效率雖低於對 G:T 錯配，但仍具一定能力 (Kunkel & Erie, 2005)，而 Pol I 僅在錯配位於 3' 末端時能有效校正 purine-purine 錯配。這反映 Pol I 與 MMR 系統在修復不同錯配上的分工特性：Pol I 擅長及時移除 3' 末端錯配，以防止錯配延伸成突變；MMR 則作為第二道防線，掃描並修正 Pol I 校對疏漏的錯配，特別是位置較遠或在 Pol I 活性位無法及時接觸的區域。這種分工機制的演化意義在於節省細胞資源，確保高頻突變類型如 G:T 錯配得到多層次防護，而極少生成的 purine-purine 錯配則可由聚合酶即時校正以降低突變風險。

此外，本研究的受質設計初衷也印證了這一修復層級邏輯。我們選用 RK1517 突變株作為轉型受體，正是為避免 MMR 干擾純粹觀察 Pol I 對不同錯配的校對表現。然而體內試驗轉型失敗的原因尚待釐清。



DNA 聚合酶 I (Pol I) 的校對活性不僅體現於其酵素活性位的功能，也深受結構區域間的協作調控影響。在 A-family DNA 聚合酶中，palm 區域的 J-helix 結構已被證明在錯配辨識及校對啟動中扮演關鍵角色 (Patterson, Sapam, & Nair, 2024)。在本研究中，我們觀察到不同位置錯配在 Pol I 校對表現上呈現強烈位置依賴性，這與 J-helix 結構於錯配定位與外切酶活性位引導中的功能密切相關，並呼應了近期結構生物學的發現。

J-helix 為 A-family DNA 聚合酶高度保守的構造元件，位於聚合酶 palm 區域，主要參與將引子股 3' 端核苷酸精準定位於聚合酶與外切酶活性位點之間的切換過程 (Joyce & Steitz, 1994; Patterson et al., 2024)。Patterson 等 (2024) 在對 Klenow fragment 解析的最新結構研究中發現，J-helix 上的保守極性殘基 (如 Glu、Arg) 可直接參與辨識 3' 端錯配核苷酸所引起的局部雙股變形，並協助引子股末端準確對準外切酶活性位，以啟動水解修正反應。在本研究實驗中，我們發現當錯配位置位於倒數第一位置時，不論錯配類型 (G:T、G:G、A:G、C:A 等)，Pol I 幾乎均能達到接近完全 (>95%) 的校對效率；反之，當錯配位置退至倒數第三位置時，即便是局部結構變形較大、理應易被校正的 purine-purine 錯配，其修正比例亦顯著下降至接近 0%。這與 J-helix 在外切酶啟動中精準定位範圍僅限於 3' 端數個核苷酸的觀察結果一致 (Patterson et al., 2024)。

進一步對比 Freemont 等 (1988) 與 Joyce 和 Steitz (1994) 的早期結構研究，同樣指出 J-helix 作為外切酶活性位與聚合酶活性位之間的橋接元件，提供了 DNA 末端定位的靈活性與精準性。Freemont 等 (1988) 解析的 Klenow fragment-DNA 複合體結構中，J-helix 協助 3' 端錯配 DNA 在兩活性位間轉換時避免解離，並提供穩定支撐，使外切酶活性位能對目標核苷酸進行高效率水解。本

研究數據進一步實驗驗證，當錯配位於倒數第一或第二位置時，Pol I 校對活性充分發揮，而當錯配超出 J-helix 結構輔助引導的範圍（如倒數第三位置），即便理論上雙股結構扭曲較明顯，仍難以引發外切酶活性位的有效定位與啟動。

除了在定位功能上，J-helix 也與錯配辨識選擇性密切相關。Patterson 等（2024）特別強調，J-helix 上的保守極性殘基在辨識錯配誘導的 DNA 主鏈偏移與鹼基堆疊能變化時發揮重要作用。例如，在 G:T 錯配形成的 wobble 配對中，J-helix 可藉由偵測雙股主鏈的輕微扭曲，協助將錯配引導至外切酶活性位；而對於 G:G、A:G 這類引起主鏈顯著偏移的 purine-purine 錯配，J-helix 的辨識與定位作用更為顯著。因此，本研究中觀察到當錯配位置足夠靠近 3' 端時，不論錯配類型，Pol I 均能高效完成修正，顯示 J-helix 在錯配辨識與定位啟動間的功能一致性。

有趣的是，對於位置較遠的錯配（倒數第三位置），即便理論上 purine-purine 錯配引發雙股局部變形較大，Pol I 仍無法有效啟動修正，這進一步凸顯了 J-helix 功能受限於空間範圍的特性。因此推導：當錯配位置超出 J-helix 能穩定引導範圍時，引子股 3' 端與外切酶活性位間的精準對準難以實現（Patterson et al., 2024；Rossetti et al., 2015）。

J-helix 作為 Pol I 校對選擇性與效率的結構基礎，不僅影響錯配核苷酸是否能被外切酶活性位有效定位，也決定了 Pol I 對不同位置錯配的敏感範圍。由本研究的結果，我們推論 DNA 聚合酶 I（Pol I）在校對含錯配 DNA 引子股時，主要仰賴其對引子股 3' 端位置的精準定位與外切酶活性進行逐步修正。以倒數第一至第三位置單錯配受質為例，本研究顯示，當錯配位於引子股 3' 端極近處（倒數第一與第二位置）時，Pol I 可高效率啟動校對反應，對各類型錯配均具高修正比例（多達 100%），而當錯配位置退至倒數第三位置時，即便為結構上

較易引發局部雙股變形的 purine-purine 錯配，其校正能力亦大幅下降至幾乎無法偵測。這顯示 Pol I 在校對過程中，需引子股末端錯配與外切酶活性位維持直接接觸，方能啟動水解修正。



根據本研究推測，當 Pol I 偵測到引子股 3' 端錯配時，會啟動位置依賴的倒退機制：引子股被轉移至 3'→5' 外切酶活性位，水解去除末端核苷酸，隨後回到聚合酶活性位進行評估。若錯配尚未完全移除，此過程將重複進行，每次外切後引子股位置重設，錯配逐步向 3' 端接近，直到所有錯配核苷酸皆被切除，再重新延伸正確配對的核苷酸完成校對。以倒數第三位置錯配為例，本研究數據說明當錯配距離外切酶活性位超出定位範圍時，即便結構變形顯著，Pol I 亦難以觸發此機制。

最後，本研究系統性分析了 *E. coli* 第一型 DNA 聚合酶對不同位置單一錯配受質的校對特性。結果顯示，即便在體外 DNA 合成過程中產生錯配，只要錯配位於其 3'→5' 外切酶活性可及的範圍內，Pol I 仍可透過位置依賴的倒退與逐步切除機制進行有效修正。此一機制不僅進一步強化了 DNA 合成的精確性，也為理解 DNA 聚合酶與細胞內其他修復系統（如錯配修復，MMR）之間的協作關係奠定了基礎。此外，本研究所建立的方法亦可延伸應用於其他 Pol I 類聚合酶的研究，例如 T4 polymerase、T7 polymerase，乃至於人類的 pol δ 、pol ϵ 等，具拓展性與參考價值。



GA

5' -CGTAAGTCAGGATCTGT**G**ATC
3' -GCATTCAGTCCTAGACA**A**TAGATCGATC



KF, dATP, dCTP, dTTP

37°C, 20 mins



PR

5' -CGTAAGTCAGGATCTGT**TATCTA**
3' -GCATTCAGTCCTAGACA**A**TAGATCGATC

or

PE

5' -CGTAAGTCAGGATCTGT**GATCTA**
3' -GCATTCAGTCCTAGACA**A**TAGATCGATC

圖 1 校正能力試驗設計

50 pmol primer 與 template 於 65°C 分開 30 分鐘，再於 37°C 促進黏合，冰上冷卻黏合更好後加入三種 dNTP 與 1U Klenow fragment 反應 20 分鐘，純化去鹽後進行 MALDI-TOF 分析。為避免延伸過長影響質譜定量，僅設計延伸 2-3 個核苷酸以降低信號誤差。

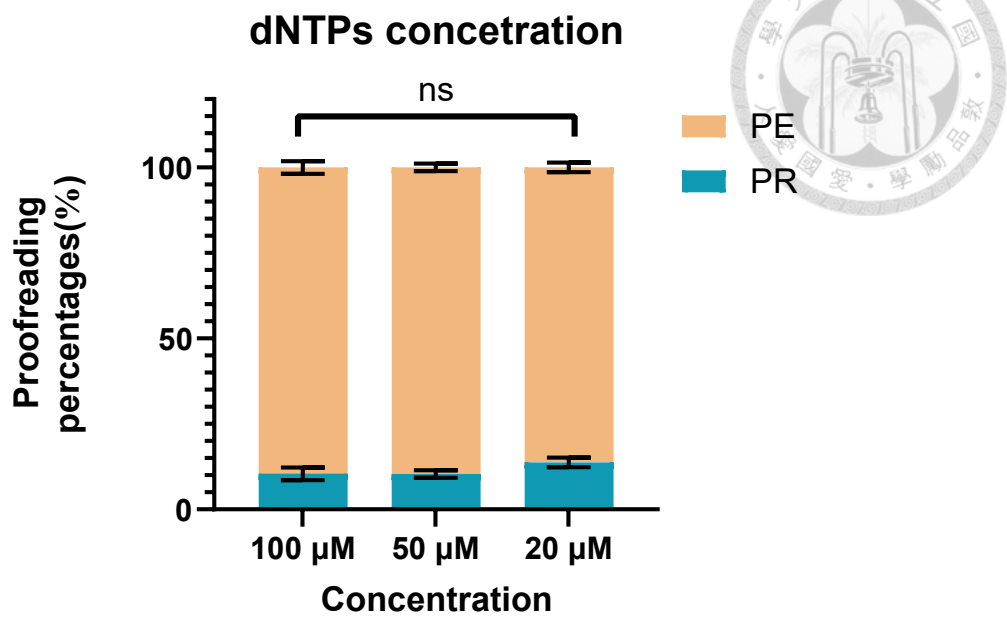


圖 2 不同濃度 dNTPs 對錯配校正能力之結果分析

不同 dNTP 濃度下校正結果相近：100 μ M (10.4%)、50 μ M (10.4%)、20 μ M (13.7%)，證實原條件具生理代表性，後續採用 20 μ M dNTPs 進行實驗。



The 1st nucleotide from the 3' end

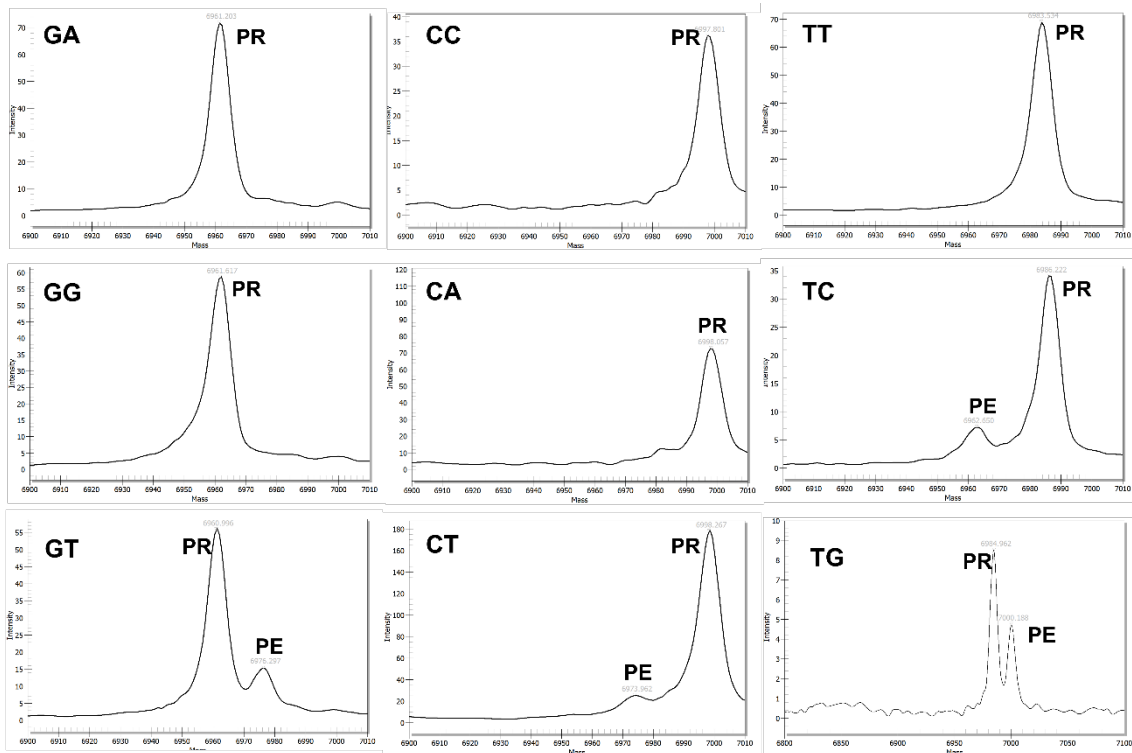
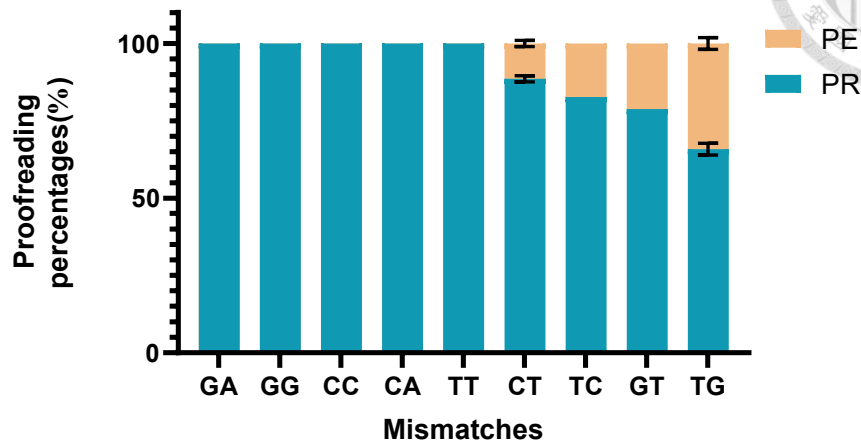


圖 3 第三版序列引子股 3'端倒數第一位置校正分析

倒數第 1 位錯配校正結果：GA、GG、CC、CA、TT (均 100%)、CT (88.6%)、TC (82.7%)、GT (78.8%)、TG (65.8%)。錯配越靠近 3' 端，校對效率越高，各類型間選擇性差異縮小。

† GT、TC 目前是單次實驗結果，GA、GG、CC、CA、TT 則是三重複皆為 100%PR 因此 SD 為 0。

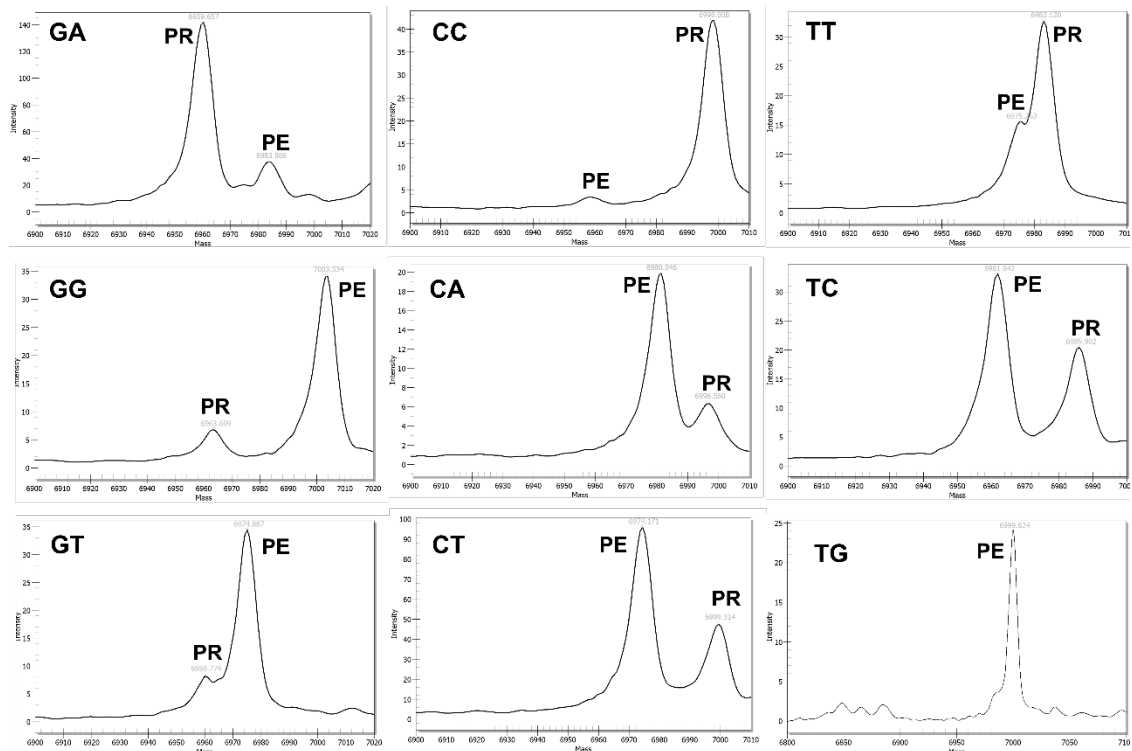
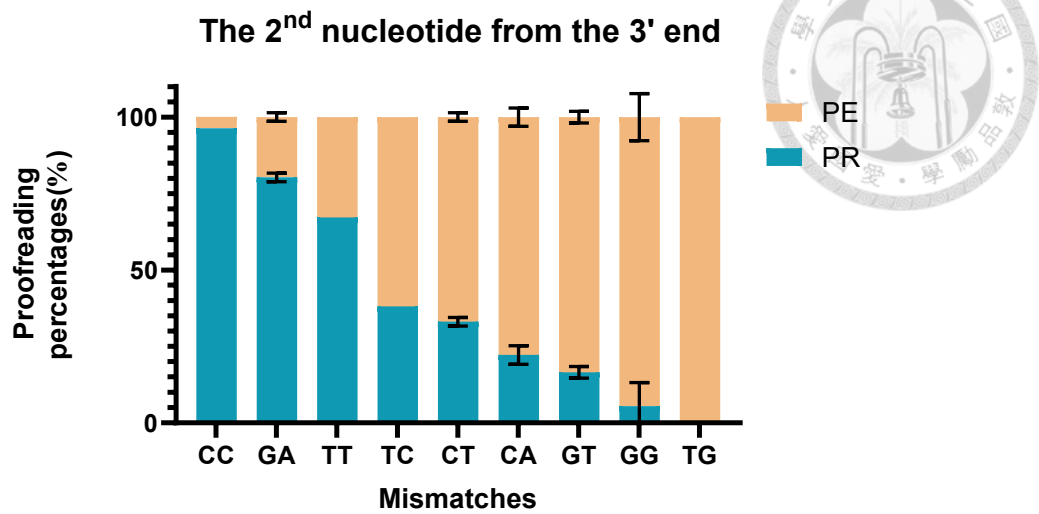


圖 4 第三版序列引子股 3'端倒數第二位置校正分析

倒數第 2 位錯配校正結果：CC (96.3%)、GA (80.3%)、TT (67.2%)、TC (38.1%)、CT (33.1%)、CA (22.2%)、GT (16.5%)、GG (5.5%)。與倒數第 3 位相比，各錯配修復比例顯著提升。

† 目前 CC、TT、TG 為兩重複，TC 則是單次實驗結果。

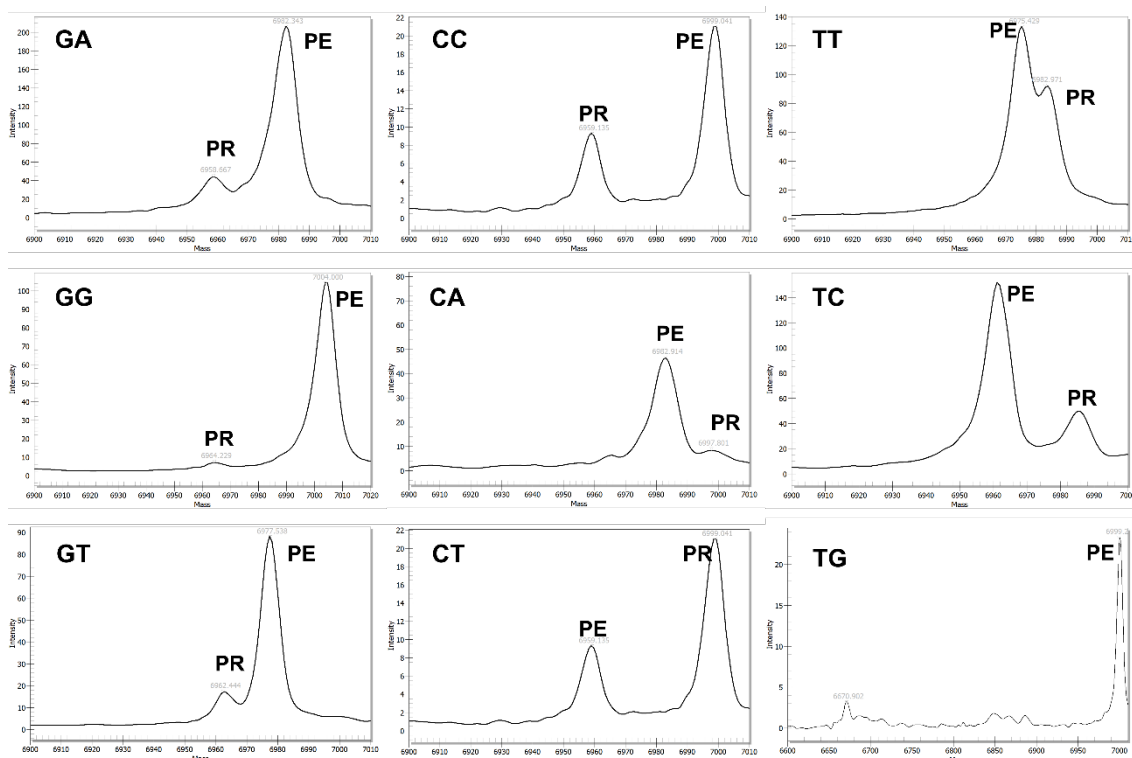
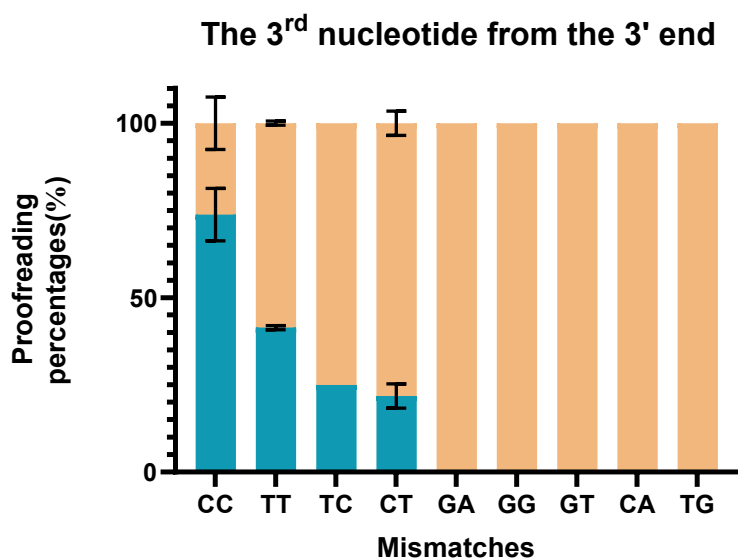


圖 5 第三版序列引子股 3'端倒數第三位置校正分析

第三版倒數第 3 位錯配校正結果：CC (73.76%)、TT (41.4%)、TC (25%)、CT (21.8%)；GA、GG、GT、CA、TG 無 PR 產物。

† 目前 GA 為兩重複，GG、TC、TG 則是單次實驗結果，GT、CA 則是三重複皆為 100%PE 因此 SD 為 0。

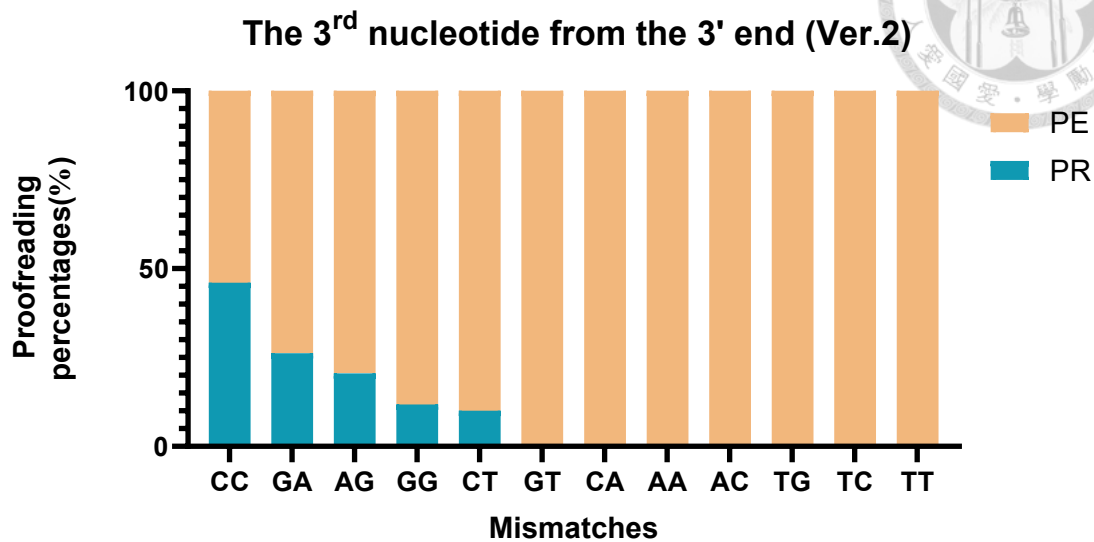


圖 6 第二版本序列引子股 3'端倒數第三位置修復結果分析

倒數第 3 位錯配校正結果：CC (46%)、GA (26.19%)、AG (20.5%)、GG (11.76%)、CT (10%)，其餘錯配 PR 產物未檢出，顯示 KF 校正能力因錯配類型而異。

† 此版本為中間測試版本，因此 GT、CA、TC、AG、AC 目前為兩重複，其餘則是單次實驗結果。

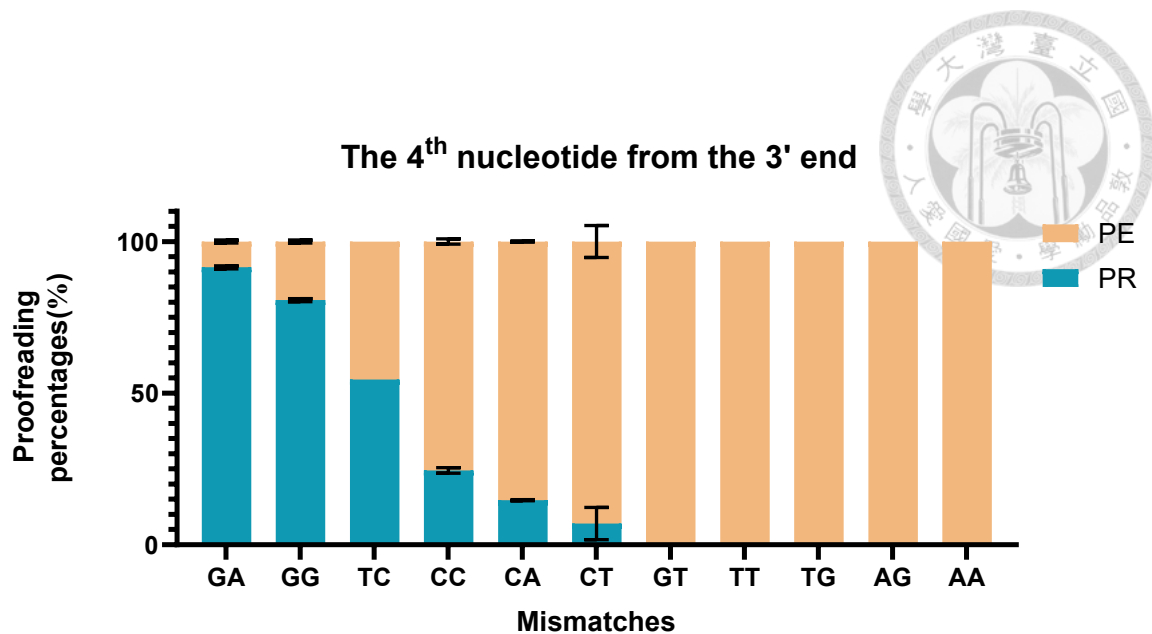


圖 7 第一版本序列引子股 3'端倒數第四位置修復結果分析

第一版序列倒數第 4 位錯配校正結果：GA ($91.5 \pm 0.5\%$)、GG ($80.7 \pm 0.5\%$) 校正效率最高，TC (54.5%)、CC ($24.5 \pm 0.9\%$)、CA ($14.7 \pm 0.2\%$)、CT ($7 \pm 5.3\%$) 效率依序降低，顯示 GA、GG 最易被 KF 偵測去除。

† TC、TT、AG、AA 目前為兩重複，GT、TG 則是三重複皆為 100%PE 因此 SD 為 0。

Substrate NGT1

P41T	P41T f 5'-----ACTGCACCTTAAGTATCCACGTTGACCATGGGTCTTCAGCT 3' P41T r 3'CATGTGACGTGAATTCATAGGGTGCAACTGGTACCCAGAAG----- 5'	Afl II /Hinc II Nco I
T41G	T41G f 5'-----ACTGCAGTTAAGTATCCACGTCGACCATGGGTCTTCAGCT T41G r 3'CATGTGACGTCAATTCATAGGGTGCACTGGTACCCAGAAG----- 5'	Pst I

1x

P41T f 5'-----ACTGCACCTTAAGTATCCACGTTGACCATGGGTCTTCAGCT 3' Afl II / Hinc II
T41G r 3'CATGTGACGTCAATTCATAGGGTGCACTGGTACCCAGAAG----- 5' Pst I

Proofread	5'-----ACTGCACCTTAAGTATCCACGTTGACCATGGGTCTTCAGCT3' 3'CATGTGACGTCAATTCATAGGGTGCACTGGTACCCAGAAG-----5' 經一次半保留複製後 -C-C- -G-C- -G-G- -C-G- Afl II +/- Sal I + Pst I +/-
Non-proofread	5'-----ACTGCACCTTAAGTATCCACGTTGACCATGGGTCTTCAGCT3' 3'CATGTGACGTCAATTCATAGGGTGCACTGGTACCCAGAAG-----5' 經一次半保留複製後 -C-T- -G-C- -G-A- -C-G- Afl II +/- Sal I - Pst I +/-
Primer loss	5'-----ACTGCACCTTAAGTATCCACGTTGACCATGGGTCTTCAGCT3' Afl II - Sal I + 3'CATGTGACGTCAATTCATAGGGTGCACTGGTACCCAGAAG-----5' Pst I +
Template loss	5'-----ACTGCACCTTAAGTATCCACGTTGACCATGGGTCTTCAGCT3' Afl II + Sal I - 3'CATGTGACGTCAATTCATAGGGTGCACTGGTACCCAGAAG-----5' Pst I +

Hinc II: Buffer 4 (Linearization) Cut Site: GTY/RAC

5'---GTY•RAC---3'

3'---CAR•YTG---5'

➤ Afl II

5'---C•TTAA G---3'

3'---G AATT•C---5'

➤ Pst I -HF

5'---C TGCA•G---3'

3'---G•ACGT C---5'

➤ Sal I

5'---G•TCGAC---3'

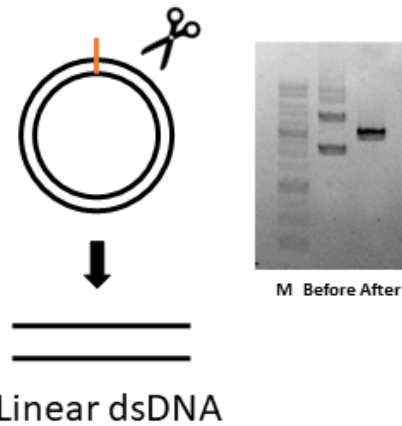
3'---CAGCT•G---5'

➤ Enzyme check: Buffer 4

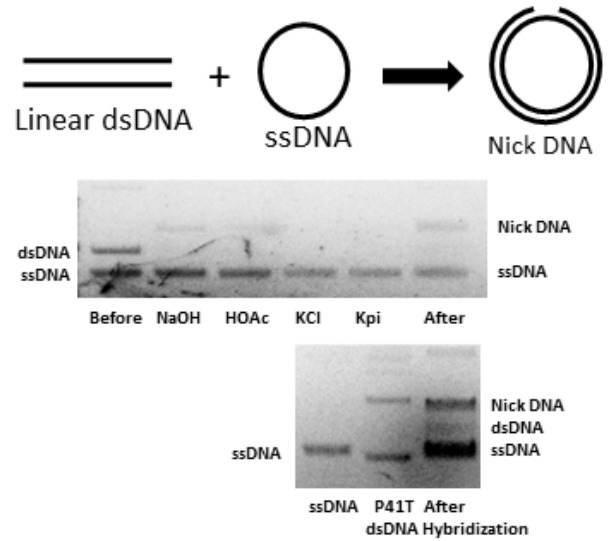
圖 8 活體內試驗 NGT1 受質設計

圖上可見引子股 P41T 以及模板股 T41G 之酵素位點設計，並在中間設計一個 Nick 旁的錯配。圖下半部分可看到四種結果的各酵素判讀: Proofread (AflII +/-; SalI +; PstI +/-)、Non-proofread (Afl II +/-; Sal I -; Pst I +/-)、Primer loss (Afl -; Sal I -; Pst I +)、Template loss (Afl II +; Sal I -; Pst I +)

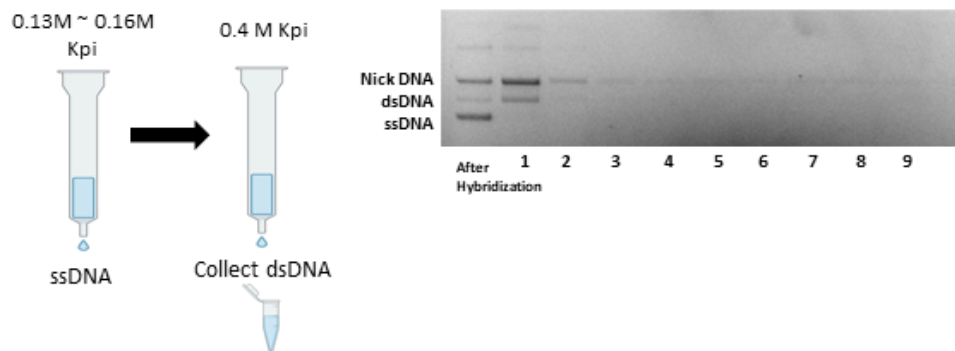
(A) dsDNA Linearization



(B) Hybridization



(C) HAP column chromatography



(D) RecBCD Digestion

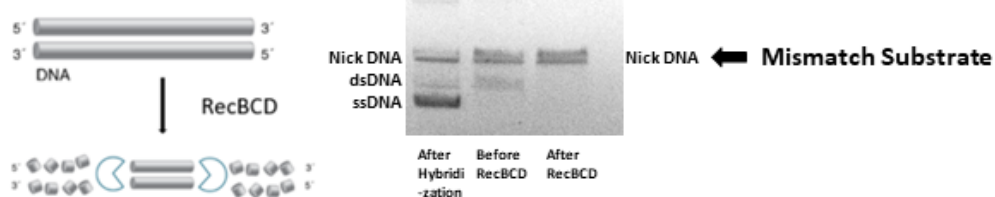


圖 9 活體內試驗 NGT1 受質製備過程

- (A)使用 Hinc II 將 primer strand DNA 水解成線狀
- (B) 將線狀 primer strand DNA 與環狀單股 template strand DNA 進行 Hybridization，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，下圖為再次跑交確認有 Nick DNA。
- (C) 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。經由電泳結果將有雙股 DNA 之溶液收集並透析兩小時以上。
- (D)使用 RecBCD 將雙股線狀 DNA 水解。經由電泳結果確認雙股線狀 DNA 與單股 DNA 皆去除，只留我們要的 nick DNA 受質。

G

表 1 引子股 3' 端倒數第四位置第一版序列及其產物

G/A -dGTP

T28P21T-A	3' -GCATTCAGTCCTAGACA ^A TAGATCGATC	8556.6
P21D74-G	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^G ATC	6461.2
Proofread	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^T ATCTA	7053.6
Primer extension	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTGATCTA	7078.6

G/G -dGTP

T28P21T-G	3' -GCATTCAGTCCTAGACA ^G TAGATCGATC	8572.6
P21D74-G	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^G ATC	6461.2
Proofread	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^C ATCTA	7038.6
Primer extension	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTGATCTA	7078.6

G/T -dGTP

T28P21T-T	3' -GCATTCAGTCCTAGACA ^T TAGATCGATC	8547.6
P21D74-G	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^G ATC	6461.2
Proofread	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^A ATCTA	7062.6
Primer extension	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTGATCTA	7078.6

C

C/A -dCTP

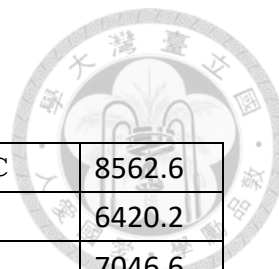
T28C1-A	3' -GCATTCAGTGCTAGCGA ^A ATCATAGGTA	8636.7
P22C4	5' -CGTAAGTCACGAGCGCT ^C TAG	6431.2
Proofread	5' -CGTAAGTCACGAGCGCT ^T TAGTAT	7367
Primer extension	5' -CGTAAGTCACGAGCGCTCTAG ^{TAT}	7352.8

C/C -dCTP

T28C1	3' -GCATTCAGTGCTAGCGA ^C ATCATAGGTA	8612.6
P22C4	5' -CGTAAGTCACGAGCGCT ^C TAG	6431.2
Proofread	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^G TAGTAT	7392
Primer extension	5' -CGTAAGTCAGGATCTGTCTAGTAT	7352.8

C/T -dCTP

T28C1-T	3' -GCATTCAGTGCTAGCGA ^T ATCATAGGTA	8627.7
P22C4	5' -CGTAAGTCACGAGCGCT ^C TAG	6431.2
Proofread	5' -CGTAAGTCACGAGCGCT ^A TAGTAT	7376.8
Primer extension	5' -CGTAAGTCACGAGCGCTCTAG ^{TAT}	7352.8



T

T/T -dGTP

mm4-T	3' -GCATTCAGTCCTAGATA ^T TAGATCGATC	8562.6
mm4-T	5' -CGTAAGTCAGGATCTAT ^T ATC	6420.2
Proofread	5' -CGTAAGTCAGGATCTAT ^A ATCTA	7046.6
Primer extension	5' -CGTAAGTCAGGATCTAT ^T ATCTA	7037.6

T/G -dGTP

mm4-T	3' -GCATTCAGTCCTAGATA ^G TAGATCGATC	8587.6
mm4-T	5' -CGTAAGTCAGGATCTAT ^T ATC	6420.2
Proofread	5' -CGTAAGTCAGGATCTAT ^C ATCTA	7022.6
Primer extension	5' -CGTAAGTCAGGATCTAT ^T ATCTA	7037.6

T/C -dCTP

mm4-C	3' -GCATTCAGTCCTAGATA ^C TAGATCGATC	8547.6
mm4-T	5' -CGTAAGTCAGGATCTAT ^T ATC	6420.2
Proofread	5' -CGTAAGTCAGGATCTAT ^G AT	6156.1
Primer extension	5' -CGTAAGTCAGGATCTAT ^T ATCTAG	7366.8

A

A/A -dGTP

P21D74	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^A ATC	6445.2
T28P21T-A	3' -GCATTCAGTCCTAGACA ^A TAGATCGATC	8556.6
Proofread	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^T ATCTA	7053.6
Primer extension	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^A ATCTA	7062.6

A/G -dGTP

P21D74	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^A ATC	6445.2
T28P21T-G	3' -GCATTCAGTCCTAGACA ^G TAGATCGATC	8572.6
Proofread	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^C ATCTA	7038.6
Primer extension	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^A ATCTA	7362.6

A/C -dGTP

P21D74	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^A ATC	6445.2
T28P21T	3' -GCATTCAGTCCTAGACA ^C TAGATCGATC	8532.6
Proofread	5' -CGTAAGTCACGAGCGCT ^G TAGTAT	7392.8
Primer extension	5' -CGTAAGTCAGGATCTGT ^A ATCTA	7362.6

G 表 2 引子股 3' 端倒數第三位置第二版序列及其產物

G/A -dTTP

T28-G	3' -TGACGTGAATTCGTGCTGCTCCGATCGA	8595.6
P20-3A	5' -ACTGCACTTAAGCACGAAGA	6119
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACGAGGC	7042.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGAAGAGGC	7066.6

G/G -dTTP

T28-G	3' -TGACGTGAATTCGTGCTGCTCCGATCGA	8595.6
P20-3G	5' -ACTGCACTTAAGCACGAAGA	6135
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACGAGGC	7042.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGAAGAGGC	7082.6

G/T -dTTP

T28-G	3' -TGACGTGAATTCGTGCTGCTCCGATCGA	8595.6
P20-3T	5' -ACTGCACTTAAGCACGATGA	6110
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACGAGGC	7042.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGATGAGGC	7057.6

C

C/A -dTTP

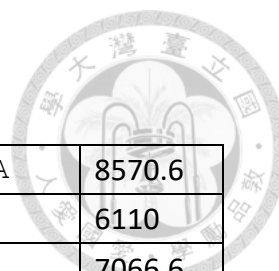
T28-C	3' -TGACGTGAATTCGTGCTCCTCCGATCGA	8555.6
P20-3A	5' -ACTGCACTTAAGCACGAAGA	6119
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACGAGGC	7082.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGAAGAGGC	7066.6

C/C -dTTP

T28-C	3' -TGACGTGAATTCGTGCTCCTCCGATCGA	8555.6
P20-3C	5' -ACTGCACTTAAGCACGAAGA	6095
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACGAGGC	7082.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGAAGAGGC	7042.6

C/T -dTTP

T28-C	3' -TGACGTGAATTCGTGCTCCTCCGATCGA	8555.6
P20-3T	5' -ACTGCACTTAAGCACGATGA	6110
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACGAGGC	7082.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGATGAGGC	7057.6



T

T/T -dTTP

T28-T	3' -TGACGTGAATTCGTGCTTCTCCGATCGA	8570.6
P20-3T	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^T GA	6110
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^A GAGGC	7066.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^T GAGGC	7057.6

T/C -dTTP

T28-T	3' -TGACGTGAATTCGTGCTTCTCCGATCGA	8570.6
P20-3C	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^C GA	6095
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^A GAGGC	7066.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^C GAGGC	7042.6

T/G -dTTP

T28-T	3' -TGACGTGAATTCGTGCTTCTCCGATCGA	8570.6
P20-3G	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^G GA	6135
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^A GAGGC	7066.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^G GAGGC	7082.6

A

A/A -dCTP

T28-A	3' -TGACGTGAATTCGTGCTACTCCGATCGA	8579.6
P20-3A	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^A GA	6119
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^T GAGG	6768.5
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^A GAGG	6777.5

A/C -dCTP

T28-A	3' -TGACGTGAATTCGTGCTACTCCGATCGA	8579.6
P20-3C	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^C GA	6095
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^T GAGG	6768.5
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^C GAGG	6753.4

A/G -dCTP

T28-A	3' -TGACGTGAATTCGTGCTACTCCGATCGA	8579.6
P20-3G	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^G GA	6135
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^T GAGG	6768.5
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^G GAGG	6793.5

G 表 3 引子股 3' 端倒數第三位置第三版序列及其產物

G/A -dTTP

T28-G-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTGGTGGCATCGA	8675.6
P20-3A-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAACA	6079
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACACCG	6962.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGAACACCG	6986.6

G/G -dTTP

T28-G-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTGGTGGCATCGA	8675.6
P20-3G-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAGCA	6095
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACACCG	6962.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGAGCACCG	7002.6

G/T -dTTP

T28-G-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTGGTGGCATCGA	8675.6
P20-3T-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGATCA	6070
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACACCG	6962.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGATCACCG	6977.6

C

C/A -dTTP

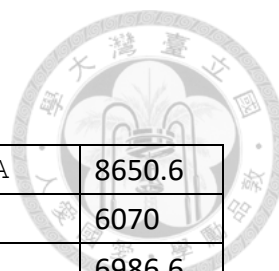
T28-C-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTCGTGGCATCGA	8635.6
P20-3A-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAACA	6079
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACACCG	7002.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGAACACCG	6986.6

C/C -dTTP

T28-C-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTCGTGGCATCGA	8635.6
P20-3C-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGACCA	6055
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACACCG	7002.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGACACCG	6962.6

C/T -dTTP

T28-C-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTCGTGGCATCGA	8635.6
P20-3T-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGATCA	6070
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACACCG	7002.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGATCACCG	6977.6



T

T/T -dTTP

T28-T-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTT GTGGC ATCGA	8650.6
P20-3T-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA TCA	6070
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ACACCG	6986.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA TACACCG	6977.6

T/C -dTTP

T28-T-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTT GTGGC ATCGA	8650.6
P20-3C-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA CCA	6055
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ACACCG	6986.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA CCACCG	6962.6

T/G -dTTP

T28-T-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTT GTGGC ATCGA	8650.6
P20-3G-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA GCA	6095
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ACACCG	6986.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA GCACCG	7002.6

A

A/A -dCTP

T28-A-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTA GTGGC ATCGA	8659.6
P20-3A-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ACA	6079
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA TCA	6070
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ACA	6079

A/C -dCTP

T28-A-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTA GTGGC ATCGA	8659.6
P20-3C-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA CCA	6055
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA TCA	6070
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA CCA	6055

A/G -dCTP

T28-A-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTA GTGGC ATCGA	8659.6
P20-3G-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA GCA	6095
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA TCA	6070
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA GCA	6095

G 表 4 引子股 3' 端倒數第二位置第三版序列及其產物

G/A -dTTP

T28-G-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTGGTGGCATCGA	8675.6
P19-2A-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAAC	5765.8
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACACCG	6962.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGAACACCG	6986.6

G/G -dTTP

T28-G-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTGGTGGCATCGA	8675.6
P19-2G-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAGC	5781.8
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACACCG	6962.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGAGCACCG	7002.6

G/T -dTTP

T28-G-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTGGTGGCATCGA	8675.6
P19-2T-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGATC	5756.8
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGACACCG	6962.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGATCACCG	6977.6

C

C/A -dTTP

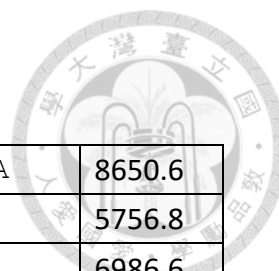
T28-C-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTCGTGGCATCGA	8635.6
P19-2A-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGAAC	5765.8
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGAGCACCG	7002.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGAACACCG	6986.6

C/C -dTTP

T28-C-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTCGTGGCATCGA	8635.6
P19-2C-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGACC	5741.8
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGAGCACCG	7002.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGACCACCG	6962.6

C/T -dTTP

T28-C-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTCGTGGCATCGA	8635.6
P19-2T-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGATC	5756.8
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGAGCACCG	7002.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGATCACCG	6977.6



T

T/T -dTTP

T28-T-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTT GTGGC ATCGA	8650.6
P19-2T-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA TC	5756.8
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ACACCG	6986.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA TCACCG	6977.6

T/C -dTTP

T28-T-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTT GTGGC ATCGA	8650.6
P19-2C-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA CC	5741.8
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ACACCG	6986.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA CCACCG	6962.6

T/G -dTTP

T28-T-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTT GTGGC ATCGA	8650.6
P19-2G-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA GC	5781.8
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ACACCG	6986.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA GCACCG	7002.6

A

A/A -dCTP

T28-A-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTA GTGGC ATCGA	8659.6
P19-2A-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA AC	5765.8
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA TCA	6070
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ACA	6079

A/C -dCTP

T28-A-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTA GTGGC ATCGA	8659.6
P19-2C-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA CC	5741.8
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA TCA	6070
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA CCA	6055

A/G -dCTP

T28-A-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTA GTGGC ATCGA	8659.6
P19-2G-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA GC	5781.8
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA TCA	6070
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA GCA	6095

G 表 5 引子股 3' 端倒數第一位置第三版序列及其產物

G/A -dTTP

T28-G-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTGGTGGCATCGA	8675.6
P18-1A-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^A	5476.6
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^C CACCG	6962.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^A CACCG	6986.6

G/G -dTTP

T28-G-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTGGTGGCATCGA	8675.6
P18-1G-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^G	5492.6
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^C CACCG	6962.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^G CACCG	7002.6

G/T -dTTP

T28-G-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTGGTGGCATCGA	8675.6
P18-1T-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^T	5467.6
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^C CACCG	6962.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^T CACCG	6977.6

C

C/A -dTTP

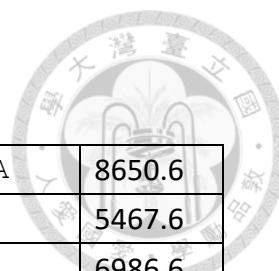
T28-C-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTCGTGGCATCGA	8635.6
P18-1A-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^A	5476.6
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^G CACCG	7002.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^A CACCG	6986.6

C/C -dTTP

T28-C-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTCGTGGCATCGA	8635.6
P18-1C-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^C	5452.6
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^G CACCG	7002.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^C CACCG	6962.6

C/T -dTTP

T28-C-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTCGTGGCATCGA	8635.6
P18-1T-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^T	5467.6
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^G CACCG	7002.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA ^T CACCG	6977.6



T

T/T -dTTP

T28-T-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTT GTGGC ATCGA	8650.6
P18-1T-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA T	5467.6
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA A CACCG	6986.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA T CACCG	6977.6

T/C -dTTP

T28-T-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTT GTGGC ATCGA	8650.6
P18-1C-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA C	5452.6
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA A CACCG	6986.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA C CACCG	6962.6

T/G -dTTP

T28-T-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTT GTGGC ATCGA	8650.6
P18-1G-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA G	5492.6
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA A CACCG	6986.6
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA G CACCG	7002.6

A

A/A -dCTP

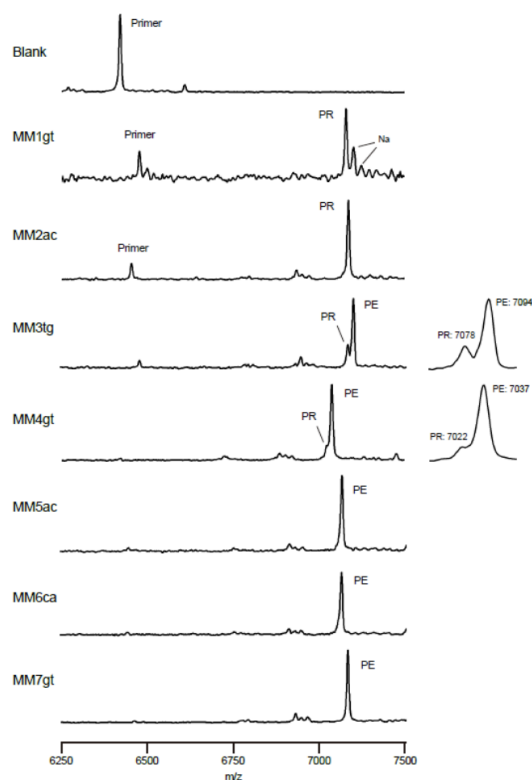
T28-A-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTA GTGGC ATCGA	8659.6
P18-1A-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA A	5476.6
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA T CA	6070
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA A CA	6079

A/C -dCTP

T28-A-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTA GTGGC ATCGA	8659.6
P18-1C-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA C	5452.6
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA T CA	6070
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA C CA	6055

A/G -dCTP

T28-A-new	3' -TGACGTGAATTCGTGCTA GTGGC ATCGA	8659.6
P18-1G-new	5' -ACTGCACTTAAGCACGA G	5492.6
Proofread	5' -ACTGCACTTAAGCACGA T CA	6070
Primer extension	5' -ACTGCACTTAAGCACGA G CA	6095

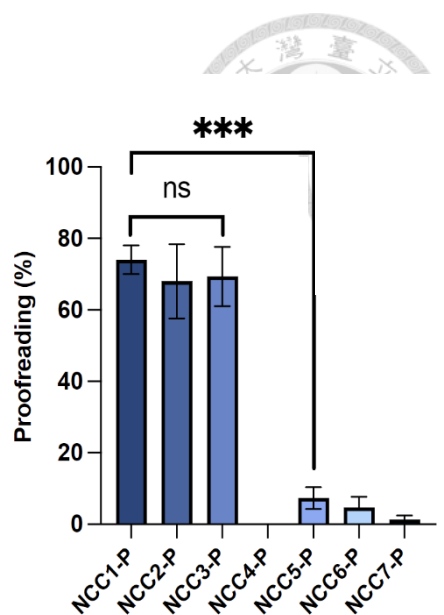


Substrate	Sequence	Reaction % ^a		
		PR	PE	NR
MM1gt	3' - GCATTCAGTCCTAGACACTAGATCGATC 5' - CGTAAGTCAGGATCTGTGAT T	82	-- ^b	18
MM1cc	3' - TGACGTGAATTCGGCGCCCCAGTTAT 5' - ACTGCACTTAAGGCCGCGGGC C	77	--	23
MM2cc	3' - TGACGTGAATTCGGCGCCCCAGTTAT 5' - ACTGCACTTAAGGCCGCGGGC C	66	--	34
MM2ac	3' - GCATTCAGTCCTAGACACTAGATCGATC 5' - CGTAAGTCAGGATCTGTG A CC	76	--	24
MM3cc	3' - TGACGTGAATTCGGCGCCCCAGTTAT 5' - ACTGCACTTAAGGCCGCGGGC C	82	--	18
MM3tg	3' - GCATTCAGTCCTAGACACTAGATCGATC 5' - CGTAAGTCAGGATCTGTG G TC	23	77	--
MM4ca	3' - GCATTCAGTCCTAGACACTAGATCGATC 5' - CGTAAGTCAGGATCTGT A ATC	12	88	--
MM4gt	3' - GCATTCAGTCCTAGATAGTAGATCGATC 5' - CGTAAGTCAGGATCTAT T ATC	14	86	--
MM4cc	3' - TGACGTGAATTCGGCGCCCCAGTTAT 5' - ACTGCACTTAAGGCCGCGGGC C	--	78	12
MM5ac	3' - GCATTCAGTCCTAGACACTAGATCGATC 5' - CGTAAGTCAGGATCTG C GATC	--	97	3
MM5cc	3' - TGACGTGAATTCGGCGCCCCAGTTAT 5' - ACTGCACTTAAGGCCGCGGGC C	--	100	--
MM6ca	3' - GCATTCAGTCCTAGACACTAGATCGATC 5' - CGTAAGTCAGGATCT A TATC	--	100	--
MM6cc	3' - TGACGTGAATTCGGCGCCCCAGTTAT 5' - ACTGCACTTAAGGCCGCGGGC C	--	100	--
MM7gt	3' - GCATTCAGTCCTAGGCACTAGATCGATC 5' - CGTAAGTCAGGATCT T GTATC	--	86	14
MM7cc	3' - TGACGTGAATTCGGCGCCCCAGTTAT 5' - ACTGCACTTAAGGCC C CGGGGC	--	100	--
MM8cc	3' - TGACGTGAATTCGGCGCCCCAGTTAT 5' - ACTGCACTTAAGGCC C CGGGGC	--	100	--

附錄 1 MM1-MM7 校正修復比例圖

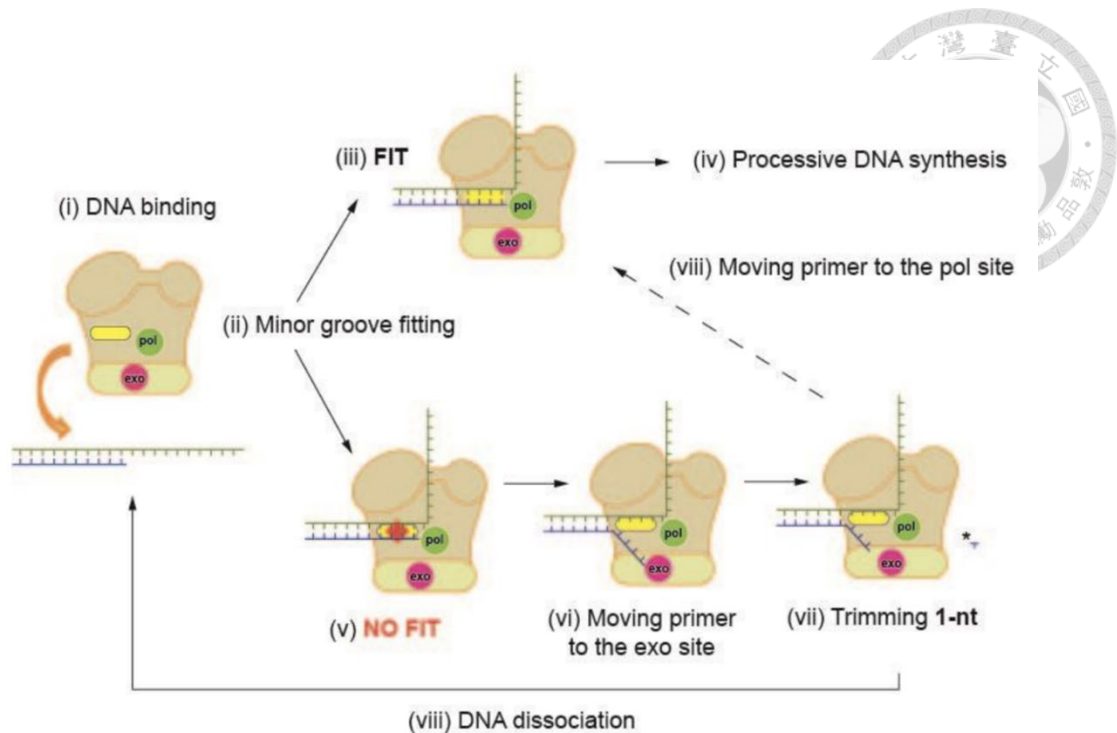
徐岫珏學長設計一系列於引子 3' 端數來第 1 至第 7 個位置帶有 A:C 或 G:T 錯配的 DNA 受質 (mm1-mm7)，並於僅含三種 dNTP 的反應條件下進行延伸反應。結果顯示，PR (proofreading) 產物比例自 mm1 至 mm4 顯著下降 (約 82%、77%、66%、76%)，而 mm5 起至 mm7 均未觀察到 PR 產物，PE (primer extension) 產物比例則皆高於 70%。此結果指出，KF 具位置依賴性的 proofreading 活性，僅能有效修正位於引子股 3' 端數來第 1-4 個核苷酸內的錯配。

Proofreading (%)					
Substrates	Proofread	No reaction	Primer loss	Template loss	Template loss after proofreading
NCC0-P	-	68±9.6	22±1.8	10±1.6	-
NCC1-P	74±4	2±2	16±7.2	0±0	8±2
NCC2-P	68±10	0±0	21.3±8.1	1.3±1.2	9.3±3.1
NCC3-P	69.3±8.3	0±0	18.1±5	3.3±2.2	9.3±6.1
NCC4-P	0±0	74±4	21.3±4.2	4.7±6.4	0±0
NCC5-P	7.3±3.1	44.7±9.5	28.7±5	17.3±3.1	2±2
NCC6-P	4.7±3.1	65.3±3.1	16.7±4.2	12.7±1.2	0.7±1.2
NCC7-P	1.3±1.2	78±3.5	14±0	6.7±3.1	0±0



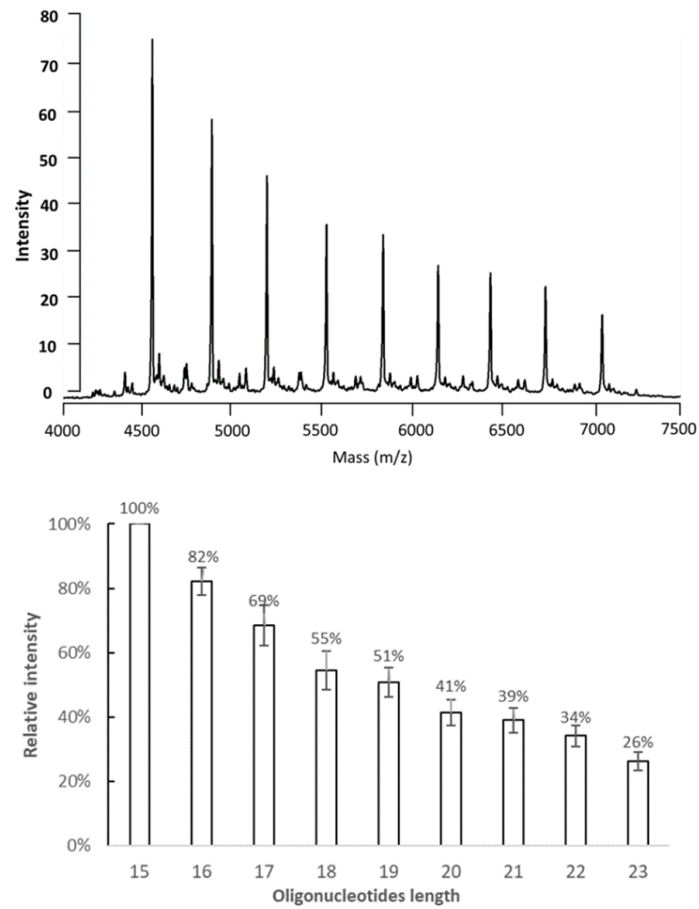
附錄 2 活體內試驗分析結果圖

莊詠筑學姊（2024）針對引子股 3' 端倒數第 2 至第 7 個位置設計含 C:C 錯配之受質，結果顯示：錯配位於前 3 個位置時，校對率皆達約 70%；但當錯配位於第 4 個位置時，校對活性降為 0%，而第 5 至 7 個位置則幾乎無明顯修正反應。此結果進一步驗證 DNA polymerase 對於 3' 端數來第 1 至 4 個核苷酸範圍內錯配具有 proofreading 活性之推論。



附錄 3 Stepwise fitting and trimming mechanism 機制示意圖

聚合酶首先結合於引子-模板接合處，檢測 minor groove 與 DNA 結合位的 r 結合良好與否。當末端 3-4 bp 結合良好時開始延伸；若偵測到錯配，聚合酶停滯並部分解開引子末端，將引子轉移至外切酶活性位進行 1 個核苷酸的切除。若為末端錯配，修正後引子迅速回至聚合酶活性位。若上游有內部錯配，聚合酶可能會解離，然後再啟動下一循環。(Chang et al., 2018)。



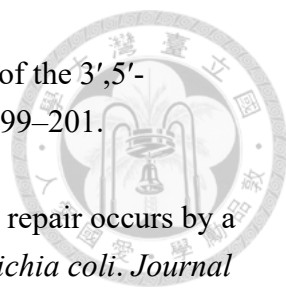
附錄 4 質譜分析 Normalize 示意圖

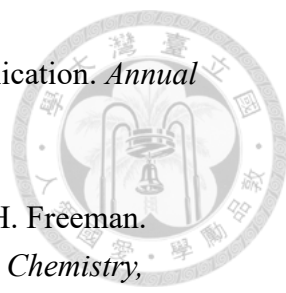
在質譜分析中，待測分子的分子量與其訊號強度呈現負相關，因此需依據本圖對所得訊號強度進行標準化後再行分析 (K.-Y. Su et al., 2018)。

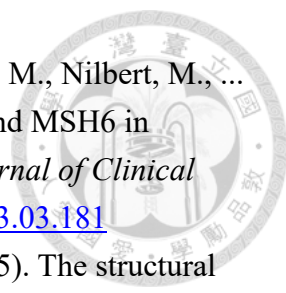
參考文獻



- Astatke, M., Ng, K., Grindley, N. D., & Joyce, C. M. (1998). A single side chain prevents the formation of a catalytically competent ternary complex in inactive DNA polymerase I (Klenow fragment). *Journal of Molecular Biology*, 278(1), 147–165. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.340>
- Bebenek, K., Kunkel, T. A., & Copeland, W. C. (1990). The fidelity of DNA synthesis catalyzed by yeast DNA polymerase delta. *Journal of Biological Chemistry*, 265(24), 14446–14452.
- 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. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.8469987>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 247(1), 241–248.
- Buckstein, M. H., He, J., & Rubin, H. (2008). Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 718–726. <https://doi.org/10.1128/JB.01020-07>
- 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*, 88, 102810. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102810>
- Chang, H.-L., Su, K.-Y., Goodman, S. D., Chuang, Y.-C., Hsu, S.-J., Fang, Y.-K., Yu, H.-P., Fang, C.-H., Yang, Y.-C., Chang, S.-Y., & Fang, W.-H. (2025). Proofreading of mismatches within primer-template junctions by *Escherichia coli* DNA polymerase I in vitro and in vivo. *DNA Repair*, 152, 103864. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2025.103864>
- Clement, P. C., Sapam, T., & Nair, D. T. (2024). A conserved polar residue plays a critical role in mismatch detection in A-family DNA polymerases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 269(Pt 2), 131965. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131965>
- Dahlberg ME, Benkovic SJ. Kinetic mechanism of DNA polymerase I (Klenow fragment): identification of a second conformational change and evaluation of the internal equilibrium constant. *Biochemistry*. 1991 May 21;30(20):4835-43. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00234a002>
- Derbyshire, V., Freemont, P. S., Sanderson, M. R., Beese, L., Friedman, J. M., Joyce, C.

- 
- M., & Steitz, T. A. (1988). Genetic and crystallographic studies of the 3',5'-exonucleolytic site of DNA polymerase I. *Science*, 240(4849), 199–201.
<https://doi.org/10.1126/science.2832946>
- Fang, W. H., & Modrich, P. (1993). Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterium *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(16), 11838–11844.
- Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M., & Jonczyk, P. (2012). DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: A multi-DNA polymerase affair. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(6), 1105–1121. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00338.x>
- Freemont, P. S., Friedman, J. M., Beese, L., Sanderson, M. R., & Steitz, T. A. (1988). Cocystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(22), 8924–8928. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.23.892>
- Goodman MF, Creighton S, Bloom LB, Petruska J. Biochemical basis of DNA replication fidelity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1993;28(2):83-126.
doi: 10.3109/10409239309086792.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). *E. coli* DNA polymerase I and the Klenow fragment. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(5), pdb.top100743.
<https://doi.org/10.1101/pdb.top100743>
- Johnson, K. A. (1993). Conformational coupling in DNA polymerase fidelity. *Annual Review of Biochemistry*, 62, 685–713.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.003345>
- Joyce, C. M., & Benkovic, S. J. (2004). DNA polymerase fidelity: Kinetics, structure, and checkpoints. *Biochemistry*, 43(45), 14317–14324.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi048422z>
- Joyce, C. M., & Steitz, T. A. (1994). Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 777–822.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.004021>
- Joyce, C. M., Potapova, O., Delucia, A. M., Huang, X., Basu, V. P., & Grindley, N. D. F. (2008). Fingers-closing and other rapid conformational changes in DNA polymerase I (Klenow fragment) and their role in nucleotide selectivity. *Biochemistry*, 47(23), 6103–6116. <https://doi.org/10.1021/bi7021848>
- Klenow, H., & Overgaard-Hansen, K. (1970). Proteolytic cleavage of DNA polymerase from *Escherichia coli* B into an exonuclease unit and a polymerase unit. *FEBS Letters*, 6(1), 25–27. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(70\)80032-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(70)80032-1)
- Kolodner, R. D. (1995). Mismatch repair: Mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(10), 397–401.
[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89087-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89087-8)

- 
- Kool, E. T. (2002). Active site tightness and substrate fit in DNA replication. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 191–219.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135453>
- Kornberg, A., & Baker, T. A. (1992). *DNA replication* (2nd ed.). W. H. Freeman.
- Kunkel, T. A. (2004). DNA replication fidelity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 16895–16898. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400006200>
- Kunkel, T. A., & Bebenek, K. (2000). DNA replication fidelity. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 497–529. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.497>
- Kunkel, T. A., & Erie, D. A. (2005). DNA mismatch repair. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 681–710.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243>
- Kunz, C., Saito, Y., & Schär, P. (2009). DNA repair in mammalian cells: Mismatched repair—variations on a theme. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), 1021–1038. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-009-8739-9>
- Lam, W. C., Thompson, E. H., Potapova, O., Sun, X. C., Joyce, C. M., & Millar, D. P. (2002). 3'–5' exonuclease of Klenow fragment: Role of amino acid residues within the single-stranded DNA binding region in exonucleolysis and duplex DNA melting. *Biochemistry*, 41(12), 3943–3951. <https://doi.org/10.1021/bi0120603>
- Lee, H., Popodi, E., Tang, H., & Foster, P. L. (2012). Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41), E2774–E2783. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210309109>
- Loeb, L. A., & Kunkel, T. A. (1982). Fidelity of DNA synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 51, 429–457. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.002241>
- Modrich, P. (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annual Review of Genetics*, 25, 229–253.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ge.25.120191.001305>
- 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>
- Patterson, C. C., Sapam, T., & Nair, D. T. (2024). A conserved polar residue plays a critical role in mismatch detection in A-family DNA polymerases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 269, 131965.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131965>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(17), 6252–6256. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6252>

- 
- Renkonen, E., Zhang, Y., Lohi, H., Salovaara, R., Abdel-Rahman, W. M., Nilbert, M., ... & Peltomäki, P. (2003). Altered expression of MLH1, MSH2, and MSH6 in predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(19), 3629–3637. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.03.181>
- Rossetti, G., Bagherpoor Helabad, M., Danne, R., & Carloni, P. (2015). The structural impact of DNA mismatches. *Nucleic Acids Research*, 43(18), 9117–9129. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv254>
- SantaLucia, J. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4), 1460–1465. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1460>
- Schaaper, R. M. (1993). Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 23762–23765.
- Steitz, T. A., & Steitz, J. A. (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(14), 6498–6502. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6498>
- Su, K. Y., Chang, H. L., Goodman, S. D., Chuang, Y. C., Hsu, S. J., Fang, Y. K., Yu, H. P., Fang, C. H., Yang, Y. C., Chang, S. Y., & Fang, W. H. (2018). Proofreading of mismatches within primer-template junctions by *Escherichia coli* DNA polymerase I in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 293(25), 9865–9877. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2025.103864>
- Su, K. Y., Lin, L. I., Chang, S. Y., Cheng, W. C., Fang, W. H., & Chang, H. L. (2018). Mass spectrometry-based quantitative assay to characterize DNA polymerase proofreading activity. *Analytical Chemistry*, 90(24), 14419–14425. doi: 10.3791/57862 <https://app.jove.com/t/57862/proofreading-dna-repair-assay-using-single-nucleotide-extension-maldi>
- Wang, J., & Konigsberg, W. H. (2022). Two-metal-ion catalysis: Inhibition of DNA polymerase activity by a third divalent metal ion. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 824794. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.824794>
- Wildenberg, J., & Meselson, M. (1975). Mismatch repair in heteroduplex DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(6), 2202–2206. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.6.2202>
- 徐岫珏. (2023). 第一型 DNA 聚合酶校正機制之研究分析 [Mechanistic analysis of DNA polymerase I proofreading activity] (碩士論文，國立臺灣大學) . <https://doi.org/10.6342/NTU202303596>
- 莊詠筑. (2024). 大腸桿菌第一型 DNA 聚合酶對 C:C 配對錯誤之活體內校對 [Proofreading of terminal and internal C:C mismatches by *Escherichia coli* DNA

polymerase I in vivo] (碩士論文, 國立臺灣大學).
<https://doi.org/10.6342/NTU202403150>

