

综述与专论

蛋白质二级结构的实测与预测

华 庆 新

(中国科学院生物物理所, 北京)

提 要

蛋白质二级结构的实测和预测在理论和实践上都有重要意义。常用实测方法为圆二色性, 红外及二维核磁共振。讨论了各种圆二色性计算方法的优点和缺陷, 介绍了二维核磁共振测二级结构的主要方法, 讨论了 Chou 和 Fasman 预测法的优劣。建议用多种方法测定并结合预测结果分析, 得出恰当结论。

关键词 蛋白质, 圆二色性, 核磁共振

分子生物学的研究围绕着三个问题展开。一是生命信息如何从 DNA 双螺旋结构流向蛋白质; 二是蛋白质一级结构如何决定其空间结构; 三是蛋白质的空间结构如何决定其生物功能。在这三个问题中, 相对而言, 第二个问题远还没有解决, 即在生物合成过程中新生肽链是怎样折叠成为具有特定空间结构的蛋白质。而新生肽链的折叠, 涉及溶液中蛋白质二级结构的测定。在实践中, 蛋白质工程面临的一个难题是, 虽然能以蛋白质工程技术得到序列完全正确的肽链, 但往往不能表达, 不能正确折叠成天然状态的空间结构, 也就没有相应的生物功能。这里同样涉及二级结构是如何卷曲形成的。因此从理论和实践上, 蛋白质二级结构的测定都是我们面临的重要课题, 需要从溶液中实验测定和从残基序列预测两个侧面加强研究。

溶液中蛋白质二级结构的实测方法有早期的氢同位素交换法(包括氘交换与氙交换); 有目前最常用的圆二色性方法(CD)及红外光谱、激光拉曼光谱; 还有近几年才崭露头角的二维核磁共振方法(2D-NMR)。

圆二色性方法是当今最流行的测定溶液中

蛋白质二级结构的方法, 其实实验测定的注意事项可见文献[1, 2]。目前圆二色性方法的主要问题在于, 虽已有多种从 CD 曲线计算二级结构含量的方法, 却没有一种方法对所有蛋白质都可靠。这里介绍三类方法:

(1) 以合成多肽作模型化合物, 如 1969 年 Greenfield-Fasman^[3] 提出的以多聚赖氨酸为模型, 得出螺旋(H)、 β -折叠(β)和无规卷曲(R)三种构象的标准曲线 $[\theta]_H^R$ 、 $[\theta]_\beta^R$ 、 $[\theta]_R^R$, 从实测曲线 $[\theta]_A$ 按下式计算二级结构含量 f_H 、 f_β 、 f_R 。

$$[\theta]_A = f_H[\theta]_H^R + f_\beta[\theta]_\beta^R + f_R[\theta]_R^R$$

1980 年 Brahms^[4] 用真空紫外 CD 仪以合成多肽为模型测至 165nm, 并引入 β -turn(f_t)项。这类以合成多肽作模型的计算方法目前使用不多。

(2) 用已知二级结构的几个蛋白质作参考蛋白, 用计算机分析出特定二级结构的参考谱, 再用计算机对欲测蛋白的 CD 谱作曲线拟合, 估算出二级结构含量。1971 年 Saxena^[5] 和 Chen^[6] 分别以三个和五个蛋白作参考蛋白开始此类计算。1974 年 Chen^[7] 用八个参考蛋白, 并引入螺旋链长因子计算。1978 年 Chang^[8]

以 15 种蛋白作参考,加进 β -转折项,并用了两个制约条件: $\sum f_i = 1$ 和 $0 \leq f_i \leq 1$ 。以上方法都是用最小二乘法作曲线拟合。

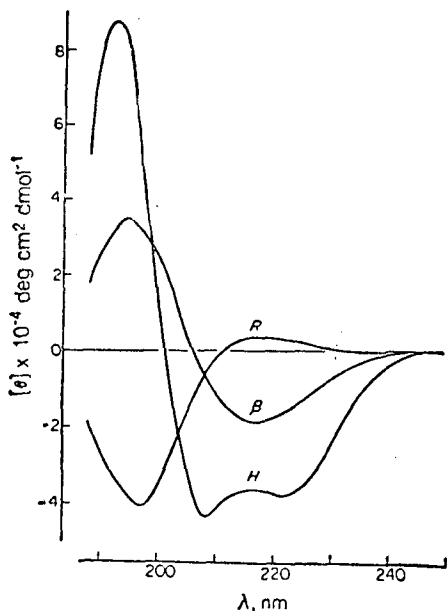


图 1 基于多肽链 (Poly Lys, Mr = 193000) 算出的螺旋 (H)、 β -结构 (β) 和无序结构 (R) 的 CD 参考谱

R: 在中性 pH 测定; H: 在 pH10.8 测定; β : 在 52°C 加热 15 分钟后冷至 25°C, 在 pH11 所测^[3]。
L-(Lys)_n 浓度为 0.07%

1976 年 Baker^[9] 用积分法分析计算实测谱, 仍用参考蛋白所得参考谱。实际上, 正如 Chang^[8] 指出的积分法最后用矩阵运算时, 与最小二乘法等价。1981 年 Bolatina^[10] 基于 Finkel'stein 提出的“刚性”准则的 X-衍射数据的二级结构划分标准, 重新研究了 Chen 的方法, 所得结果与相应 X-衍射数据吻合甚好。在这类方法中, 以 Chang^[8] 法最流行。

(3) 直接用已知二级结构的蛋白质 CD 谱作线性组合, 以拟合逼近实测谱, 避免定义特定构象的参考谱。1981 年 Provencher^[11] 用 16 个蛋白的 CD 谱作参考, 引入了一调制约项, 直接线性组合拟合实测谱, 也用了 Chang^[8] 的两项制约。

即设 $X(\lambda) = \sum_{i=1}^{N_r} r_i R_i(\lambda)$, 其中 $X(\lambda)$ 为实测 CD 谱, $R_i(\lambda)$ 为所选第 i 个蛋白在波长 λ

时的 $[\theta]$ 值, N_r 为 16, r_i 即第 i 个蛋白的贡献。若能算出 r_i , 则由 $f_i = \sum_{j=1}^{N_r} r_j F_{ji}$, 可得到欲测蛋白的第 i 种构象的比值 f_i 。其中, F_{ji} 为第 j 个蛋白在第 i 种构象的比值。而 r_i 值可由加调制约项的最小二乘法拟合得到:

$$\varepsilon = \sum_{\lambda=1}^{N_r} [Y(\lambda) - X(\lambda)]^2 + \alpha \sum_{i=1}^{N_r} (r_i - 1/N_r)^2$$

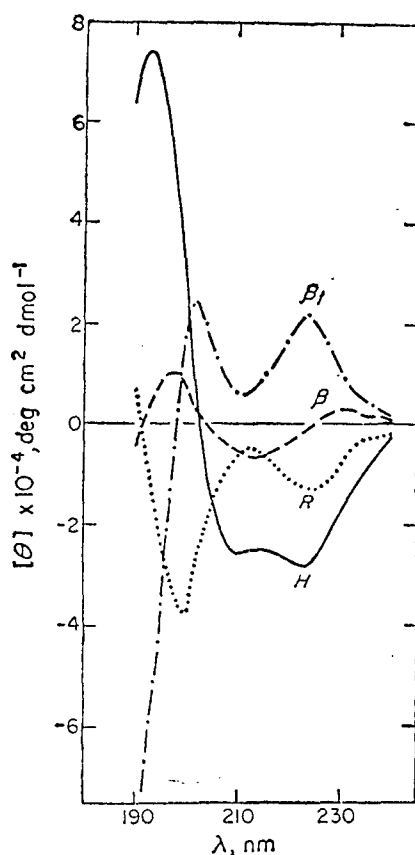


图 2 Chang^[8] 由 15 个蛋白算出的螺旋 (H)、 β 结构 (β)、 β -转折 (β_1) 和无规卷曲 (R) 的 CD 参考谱。(假定螺旋链长 $\bar{n} = 10$)

其中, $Y(\lambda)$ 为计算值, N_r 为数据总点数。式中加号右侧为调制约项。当 $\alpha = 0$ 时, 此式为一般最小二乘算法。当 $\alpha > 0$ 时, 可用以稳定求解, 使每一 r_i 较小, 接近于 $1/N_r$ 。此法的拟合曲线与实测曲线总吻合很好。

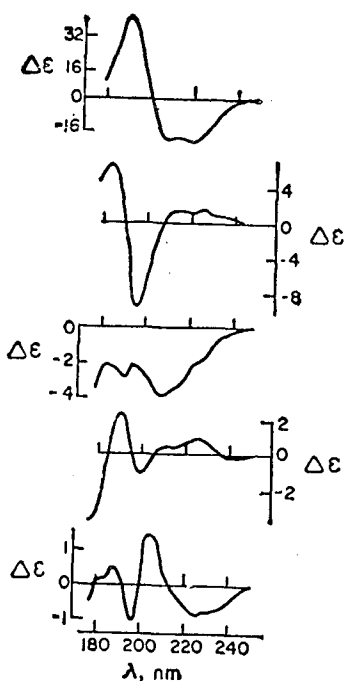


图3 Hennesey^[12] 法的五条最显著的 CD 基本谱线

1981年 Hennesey^[12] 用真空紫外 CD 仪测得 15 个蛋白及一个螺旋多肽的 CD 谱 (178nm—250nm), 用正交矢量法得出五条最重要的基本谱线, 再用这五条谱线以线性组合拟合逼近实测谱, 结果也不错。只是目前商用仪器都测不到 178nm。

用不同计算方法计算同一条 CD 曲线, 会得出不尽相同的结果, 有些差异还很大, 人们自然要问哪种方法最可靠, 可惜, 目前尚无定论, 各种方法都有缺陷。选用蛋白拟合出参考曲线, 显然比选用多肽恰当。但也有其缺点, 首先是难以得到一组理想的参考蛋白, 因为不同组的参考蛋白会得到不同强度以致形状不同的参考谱; 其次, 参考蛋白的二级结构数据来自 X-衍射结果, 而所用二级结构的判定标准又不尽相同, 所用晶体结果的精度又不同, 如溶菌酶的 f_H 、 f_β 、 f_C , 有的取 0.45、0.19 和 0.32, 而别的实验室则取 0.30、0.09 和 0.19, 这些当然也影响各自的参考谱, 特别对 β 及 R 参考曲线影响较大; 此外, 一个蛋白质分子的二级结构通常都远不是理想的, 这都使蛋白质的 CD 分析复杂化。

Provencher 和 Hennesey 法不用 CD 参考谱, 这是它们的共同优点。但是实验与计算曲线拟合甚好, 不一定保证其二级结构的结果正确。Yang^[2] 曾比较五家 CD 实验室所得的 CD 分析结果与晶体结构数据之间的相关系数。对 Chang^[8]、Bolotina^[10]、Provencher^[11]、Hennesey^[12] 和 Brahms^[4] 这五种方法, α 螺旋含量的相关系数都在 85—98% 之间, 结果甚好; β -结构含量的相关也显著, 特别是 Provencher 法和 Brahms 法, 相关系数约 93%, 其它方法则只为 50—60%; 而 β -转折和 Coil 则都不好, 相关系数在 30% 上下。

总之, 目前的 CD 分析都是从经验结果中推算出来, 对 α 螺旋含量较高的蛋白, 计算结果比较可信; 而 α 含量少的蛋白, 计算不很可靠。目前没有一种方法对所有蛋白都十全十美, 更不用说未知晶体结构的蛋白 CD 谱分析结果是否可靠。若在不同溶液条件下测某一蛋白, 应使用同一分析方法比较其二级结构变化, 其变化趋势可以肯定, 而对计算的确切值, 似应有所保留。尽管 CD 分析方法还有待改进, 其快速简便、用量小等优点, 仍使 CD 法为最流行的蛋白质二级结构测定方法。

2D-NMR 是在溶液中测定蛋白质等生物大分子三维结构的唯一方法。它可以确切测定二级结构的种类、段数和位置, 而 CD 结果既不知有序结构在分子中是一段或几段, 也不知某段有序结构从何残基开始, 到何残基终止。用 2D-NMR 测蛋白质二级结构有三种方法, 详见文献[14, 15]。

(1) 在完成整个分子的质子峰顺序识别, 即知道每一谱峰是何残基哪一质子所贡献之后, 由 NOESY 谱分析顺序和中、近程 1H — 1H 间距, 可知二级结构的类型和确切位置。NOESY 谱可显示两个空间间距在 $5\text{\AA}$ 之内的质子的交叉峰, 由交叉峰强度可知两质子大体距离。而有序二级结构各残基间不同质子的间距, 可由晶体结构统计得到。如 β 结构是伸展的肽链, 主链质子间距一般在 $4\text{\AA}$ 以上, 只有 $C^iH-N_{i+1}H$ 即 d_1 间距为 $2.2\text{\AA}$; α 螺旋是扭折的肽链, 相邻

	β, β_p	α -Helix	3_{10} -Helix	Turn I	Turn II	Turn I'	Turn II'	Half-Turn
$d_{\alpha N}(i, i+4)$								
$d_{\alpha\beta}(i, i+3)$								
$d_{\alpha N}(i, i+3)$								
$d_{NN}(i, i+2)$								
$d_{\alpha N}(i, i+2)$								
d_{NN}								
$d_{\alpha N}$ $^3J_{\alpha N}(\text{Hz})$								
	9 9 9 9 9 9 1 2 3 4 5 6	4 4 4 4 4 4 4 1 2 3 4 5 6 7	4 4 4 4 4 4 1 2 3 4 5 6	4 9 1 2 3 4	4 5 1 2 3 4	7 5 1 2 3 4	7 9 1 2 3 4	4 9 1 2 3 4

图4 在二级结构中的顺序和中程 $^1\text{H}-^1\text{H}$ NOE's 及偶合常数 $^3J_{\alpha N}$

线的粗细与质子间距 r^6 成反比,即代表 NOESY 交叉峰强弱。最低行的数字为该二级结构单元中的残基序号

酰胺质子间距 (d_2) 为 $2.8\text{\AA}$, 而 $\text{C}_i^{\alpha}\text{H}-\text{N}_{i+3}\text{H}$ 即 $d_1(i, i+3)$ 也只 $3.4\text{\AA}$ 。因此,若在 NOESY 谱上观察到连续的强 d_1 NOESY 联系,则这肽段极有可能是 β 折叠;若观察到一段强的 d_2 和 $d_1(i, i+3)$ 联系区,则很可能是 α 螺旋。其它有序结构的残基内,残基间质子间距亦都有规律可循,在 NOESY 谱上都有反映。

(2) 由相敏双量子滤波同核相关谱(DQF-COSY)的交叉截面,可精确测定 αH 与 NH 之间的偶合常数 $^3J_{\alpha N}$ 。由修正的 Karplus 公式:

$$^3J_{\alpha N} = 6.4\cos^2\theta - 1.4\cos\theta + 1.9 \dots$$

$$(\theta = |\phi - 60^\circ|)$$

可计算出 αH 与 NH 质子之间的二面角 ϕ 。而有序二级结构的 ϕ 角都已测知,由各残基酰胺键两质子偶合常数确定这一段肽段是否或处于何种二级结构之中。对螺旋($\phi = -57^\circ$), $^3J_{\alpha N}$ 为 3.9Hz ;反平行 β 折叠($\phi = -139^\circ$), $^3J_{\alpha N}$ 为 8.9Hz 。

(3) 测定酰胺质子与溶剂质子的交换速率了解二级结构。可将普通水中冻干的蛋白样品溶于重水中,立即测其二维同核相关谱(COSY);再间隔一段时间,反复测定,得一组 COSY 谱。处于有序二级结构中的酰胺质子与重水交换慢,其酰胺质子交叉峰消失慢,而非有序结构的肽段中酰胺质子与溶剂中氘交换快,由每一残基间酰胺质子交换速率的快慢可判断哪些残基处于有序结构中。这三种方法以质子

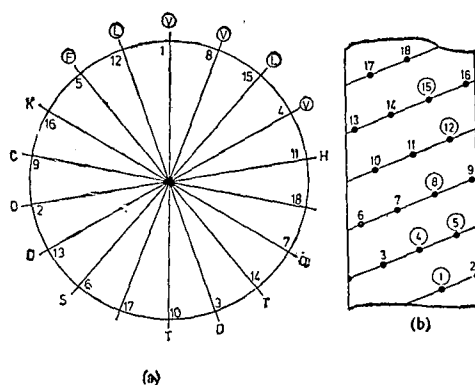


图5 腺苷激酶C端 α 螺旋的螺旋轴轮图

(a) 沿螺旋轴的纵投影,疏水弧排列于上部 (b) 沿螺旋圆筒的横投影,非极性残基均有圈标号1的残基是 Val-179, 16 位残基是 Lys-194

间距分析为主,辅以其它方法。可相互对照、补充。

以 2D-NMR 测定蛋白质二级结构虽很准确,但测定时间长、分析较复杂。蛋白用量较大,目前还不普遍。其它二级结构测定法不复赘述。

从氨基酸序列预测蛋白质二级结构的方法也有一、二十种,可分为两类。一类是统计方法,主要考虑短程相互作用,基于已知晶体结构的蛋白质分子,统计出各残基或二肽、三肽片段在有序结构中出现的频率,用以计算预测肽段形成二级结构的可能,由某些统计规则预测其成何结构。另一类方法是基于残基的物理化学性质,基于立体化学的考虑作出预测,在一定程

表1 形成 α 螺旋的趋势^{a)}

	Blout <i>et al.</i> 1960	Kotelchuck and Scheraga, 1968	Lewis <i>et al.</i> , 1970	Robson and Pain, 1971	Chou and Fasman, 1974	Finkelstein and Ptitsyn, 1976
A Ala	(H)	H	I	+0.09	1.45	1.08
C Cys	C	H	I	+0.03	0.77	0.95
D Asp	H	C	B	-0.02	0.98	0.85
E Glu	H	H	H	+0.12	1.53	1.15
F Phe	(H)	H	H	+0.03	1.12	1.10
G Gly	—	Indifferent	B	-0.05	0.53	0.55
H His	(H)	H	I	+0.08	1.24	1.00
I Ile	(C)	H	H	+0.07	1.00	1.05
K Lys	(H)	C	I	-0.03	1.07	1.15
L Leu	H	H	H	+0.11	1.34	1.25
M Met	H	H	H	+0.10	1.20	1.15
N Asn	(C)	C	I	-0.04	0.73	0.85
P Pro	—	Special	B	—	0.59	—
Q Gln	(H)	H	I	+0.07	1.17	0.95
R Arg	(H)	H	I	+0.02	0.79	1.05
S Ser	C	C	B	-0.07	0.79	0.75
T Thr	(C)	H	I	-0.01	0.82	0.75
V Val	C	H	I	+0.04	1.14	0.95
W Trp	(H)	C	H	+0.10	1.14	1.10
Y Tyr	(H)	C	H	-0.02	0.61	1.10

a) 数据取自六种方法。H、I、B、C 分别表示螺旋形成者、无差别、螺旋中断者及在无规卷曲之中。

表2 形成 β 及 rt (转折)的趋势¹⁾

	β -sheet propensities			rt -propensities		
	Chou and Fasman, 1974	Burgess <i>et al.</i> 1974	Beghin and Dirks, 1975	Lewis <i>et al.</i> 1971	Kuntz 1972	Chou and Fasman, 1974
A Ala	0.97	0.29	0.37	0.22	(T)	0.15
C Cys	1.30	0.53	0.84	0.20	—	0.31
D Asp	0.80	0.27	0.97	0.73	T	0.33
E Glu	0.26	0.26	0.53	0.08	T	0.12
F Phe	1.28	0.32	0.53	0.08	—	0.19
G Gly	0.81	0.31	0.97	0.58	T	0.45
H His	0.71	0.20	0.75	0.14	T	0.18
I Ile	1.60	0.41	0.37	0.22	—	0.15
K Lys	0.74	0.27	0.75	0.27	T	0.27
L Leu	1.22	0.40	0.53	0.19	—	0.14
M Met	1.67	0.38	0.64	0.38	—	0.18
N Asn	0.65	0.23	0.97	0.42	T	0.45
P Pro	0.62	0.34	0.97	0.46	T	0.41
Q Gln	1.23	0.33	0.64	0.26	T	0.15
R Arg	0.90	0.36	0.84	0.28	T	0.27
S Ser	0.72	0.35	0.84	0.55	T	0.41
T Thr	1.20	0.39	0.75	0.49	T	0.27
V Val	1.65	0.50	0.37	0.08	—	0.08
W Trp	1.19	0.23	0.97	0.43	—	0.30
Y Tyr	1.29	0.43	0.84	0.46	T	0.33

1) 所观察的频率作为在二级结构中出现的趋势。倒二行 Kuntz 法中的 T 为趋向于在 β 转折中出现。

度上考虑了长程相互作用。其中, Schiffer^[46] 在 1967 年提出的螺旋轴轮法是最简便易用的方法。由于非极性残基总排在螺旋结构的一侧,一般在 (1-4-5) 或 (1-2-5) 位上,形成一段非极性弧圈成为螺旋核心,螺旋可向两端发展,直到被极性残基或 Pro 所阻断。螺旋轴轮法把 360° 的圆弧分为 18 等分,将残基按顺序沿逆(或顺)时针方向每隔 100° 在轮幅处填写一个;若有一串几个疏水残基排在一侧,则很可能为螺旋核心。1974 年 Lim^[47] 又进一步总结出预测 α 螺旋和 β 折叠的许多规则,考虑了侧链的疏水性和大小。

在众多的统计预测方法中,最为流行的是 Chou 和 Fasman 在 1974 年提出,于 1978 年完善的 C-F 法^[48]。他们统计分析了 29 个已知晶体结构的蛋白,得出各残基形成螺旋、 β 结构和转折的构象参数,以及在螺旋和 β 结构边缘出现的频率,将残基按形成还是破坏 α 或 β 结构的趋势分为六类,并总结出几条形成有序二级结构的判定规则和条件。详见本刊 1985 年的综述^[49]。C-F 法的预测成功率为 70%。表 1、2 列出了几家实验室所得各残基形成 α 、 β 、turn 的趋势。

但是蛋白质的二级结构终究应着重考虑相邻或近邻残基间相对位置,而非单个残基本身,因此预测的依据应是各种二肽以至三肽的构象参数。Perite^[20] 于 1974 年发表二肽统计结果, Kabat^[21] 还统计了三肽在各二级结构中的频率,并发展了“反向预测”,归结出使 α 螺旋和 β 折叠中断的二肽。20 种氨基酸的二肽、三肽构象参数可作为以单残基构象参数作二级结构预测时的补充^[18]。相对而言,构象参数的统计比较可信,而形成二级结构的判定规则则有不少人为因素。C-F 法的判定规则就有不少模糊之处,如怎样寻找有序结构的核,如何在有序结构重叠区进行判定以及边界条件的处理等。生化所江寿平对 C-F 法编写了快速计算机算法,并根据主体化学规则及序列中残基的疏水性强弱变化的周期性,提出了解决既可形成 α , 又可形成 β 结构的重叠片段归属的算法^[22]。二级结构

预测在遇到 Cys 时必须谨慎, C-F 法给出了 Cys 的构象参数,但没有考虑它是否与分子内其它 Cys 形成二硫键。而二硫键形成与否,对疏水性、对二级结构的形成有很大影响。尽管如此, C-F 法目前仍是最流行的预测方法。近年所提出的以神经网络理论预测二级结构的方法也越益受人重视。

总之,二级结构的测定,最好将实测和预测相结合,将多种实测和预测方法的结果相互印证、补充、得出尽可能恰当的结论。我们曾尝试在用圆二色性实测胰岛素 A 及 B 链二级结构的同时,用 C-F 法作出预测^[23]。对 B 链 N 端六肽的 C-F 法预测表明,它既可形成 α 螺旋,也可形成 β 折叠。事实上, 2-Zn 胰岛素晶体中此段为 β 折叠,而在 6% NaCl 中结晶出的 4-Zn 胰岛素中却是 α 螺旋。这表明,序列预测确可提出各肽段形成二级结构的各种可能,而实际上究竟形成什么结构,还视晶体或溶液的具体状况而定,包括溶剂状况,二硫键、盐键、氢键是否形成,电荷残基是否解离等,应结合在不同条件下实测的二级结构结果作综合分析。

参 考 文 献

- 1 Adler A J *et al. Methods in Enzymology*, 1972; 27: 675
- 2 Yang J T *et al. Methods in Enzymology*, 1986; 130: 208
- 3 Greenfield N *et al. Biochemistry*, 1969; 8: 4108
- 4 Brahms S *et al. J Mol Biol*, 1980; 138: 149
- 5 Saxena V P *et al. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1961; 68: 969
- 6 Chen Y H *et al. Biochem Biophys Res Commun.*, 1971; 44: 1285
- 7 Chen Y H *et al. Biochemistry*, 1974; 13: 3350
- 8 Chang C T *et al. Anal Biochem*, 1978; 91: 12
- 9 Baker C C *et al. Biochemistry*, 1976; 15: 629
- 10 Bolotina I A *et al. Mol Biol(USSR)*, 1981; 14: 709 (Eng)
- 11 Provencher S W. *et al. Biochemistry*, 1981; 20: 33
- 12 Hennessey J P *et al. Biochemistry*, 1981; 20: 1085
- 13 Wüthrich K *NMR in Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley and Sons Inc, 1986
- 14 华庆新.生物化学与生物物理进展,1984;(3): 2
- 15 华庆新.生物物理学报,1988;4: 67
- 16 Schiffer M *et al. Biophys J*, 1967; 7: 121
- 17 Lim V I *J Mol Biol*, 1974; 88: 857
- 18 Chou P Y *et al. Adv Enzymology*, 1978; 47: 45
- 19 华庆新.生物化学与生物物理进展 1985;(3): 2

特异性 DNA 倍增技术 (PCR) 及其应用

付四清 宋后燕* 程 立

(上海医科大学病理生理学教研室, 上海)

提 要

特异性 DNA 倍增技术 (PCR) 是近年来发展的一种新技术, 具有快速、简便、灵敏、特异性高和重复性好等优点, 尤其适合于临床分子生物学检测。PCR 技术包括三个循环过程: (1) 模板 DNA 的变性, (2) 模板 DNA-引物的复性, (3) DNA 聚合酶作用下的引物链的延伸。本文对耐高温 Taq DNA 聚合酶、PCR 的反应体系、PCR 产物特异性的影响因素和 PCR 技术的应用等几个方面进行了综述。

关键词 特异性 DNA 倍增技术, 寡聚核苷酸引物, Taq DNA 聚合酶, 分子病检测

特异性 DNA 倍增技术 (polymerase chain reaction, PCR) 是美国 Cetus 公司分子生物学家 K. B. Mullis 等近年来发展的一种新方法, 在 1985 年首次报道^[1]。PCR 技术是利用两种寡聚核苷酸引物分别与特异性 DNA 区段的正链和负链末端互补, 经过模板 DNA 变性, 模板 DNA-引物复性和在 DNA 聚合酶作用下发生的引物链延伸反应。引物链的延伸产物与原来的模板 DNA 经加热变性后, 作为模板 DNA 和另一种引物互补, 在 DNA 聚合酶作用下又发生引物链的延伸反应。这样反复循环数十次, 可使特异性 DNA 区段成几何级数量倍增。PCR 技术可用来研究限制性内切酶片段长度多态性、基因突变, 检测细胞单拷贝基因和病毒感染等。PCR 技术具有快速、简便、灵敏和特异性高等优点, 尤其适合于临床实验室的应用和推广。它对推进我国临床分子生物学检测的水平具有重大的意义。

Taq DNA 聚合酶

Taq DNA 聚合酶, 又称耐高温 DNA 聚

合酶, 是 A. Chien 等在 1976 年从嗜高温性细菌 *Thermus aquaticus* 中提取的具有 DNA 聚合酶活性的蛋白质^[2]。

Taq DNA 聚合酶是单链蛋白质, 分子量为 63—68 kD, 没有单链核苷酸外切酶、磷酸单酯酶和磷酸二酯酶活性。其 DNA 聚合酶的活性需要四种三磷酸脱氧核糖核苷酸、模板 DNA、引物 DNA 和二价离子的存在。最适反应温度是 70—75℃, 最适反应体系的 pH 值为 8.0, 反应缓冲液以 Tris-HCl 为好, 单价离子浓度高至 0.1 mol/L 时不会抑制反应速度, 二价离子 Mg^{2+} 对反应的促进作用比 Mn^{2+} 的作用强。一个 Taq DNA 聚合酶的活性单位是在 70℃ 下反应 30 分钟后将 10 nmol 的核苷酸结合到引物 DNA 分子上。Taq DNA 聚合酶的显著特点是能耐高温, 在 70℃ 下反应 2 小时后其残留活性大于原来的 90%, 在 93℃ 下反应 2 小时后其残留活性是原来的 60%, 在 95℃ 下反应 2 小时后其残留活性仍有原来的 40%

* 上海医科大学分子遗传学研究室

20 Periti P F. *Boll Chim Farm*, 1974; 113: 187

21 Wu T T et al. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 1971; 68: 1501

22 刘志平等. 生物化学与生物物理学报, 1985; 17: 657

23 华庆新等. 中国科学 B 辑, 1985; 6: 537

[本文于 1988 年 12 月 9 日收到]