

SPR生物传感器研究缺乏 3'→5'核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶对 DNA 的分子识别功能*

吴 蕾^{1,2)} 黄明辉²⁾ 赵建龙^{1)**} 杨梦苏^{1,2)**}

(¹⁾中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050;

²⁾香港城市大学深圳研究院, 深圳 518057)

摘要 Taq 聚合酶 (Taq pol)、失去核酸酶结构域的鼠白血病逆转录酶 (MMLV RT-) 和人源的聚合酶 β (pol β) 缺少 3'→5'外切核酸酶活性. 利用表面等离子激元共振 (SPR) 生物传感器, 研究了 Taq pol 与引物末端完全匹配和含有 1、2、3 个错配碱基的 DNA 模板 - 引物 (T-P) 的结合动力学, 并分析比较了在“正确”或“错误”dNMP 环境中 Taq pol 和引物末端完全匹配的 DNA T-P 的结合. 实验结果表明, 随着引物末端错配碱基逐个增加, Taq pol 和 DNA 的结合亲和力呈下降趋势, 说明增强和引物末端完全匹配的 DNA T-P 的亲和力是 Taq pol 选择正确配对碱基的途径之一. 在“错误”的 dNMP 环境中, Taq pol 与 DNA T-P 的结合动力学能够用简单的 1:1 Langmuir 模型进行拟合, 但是 MMLV RT-与 DNA T-P 的结合动力学可能存在构象变化. 而在“正确”的 dNMP 环境中, Taq pol 或 MMLV RT-与 DNA T-P 的结合符合构象变化模型, 而且亲和力常数分别是无 dNMP 时的 20 倍和 64 倍, 说明“正确”的 dNMP 诱导酶 (Taq pol 或 MMLV RT-) - DNA 复合物发生构象变化, 大大增强了酶 - DNA 复合物结合的紧密程度. 在存在大量 dNMP 的环境中, pol β 与 DNA T-P 的结合动力学明显与缺乏 dNMP 时相异, pol β 和 DNA 的亲和力显著增强.

关键词 SPR 生物传感器, DNA 聚合酶, 动力学, 1:1 Langmuir 模型, 构象变化模型

学科分类号 Q6-3

半个世纪以来, 科学家们一直在研究 DNA 复制的保真性 (fidelity) 问题. DNA 的准确复制与复制时 DNA 聚合酶正确识别、选择脱氧核苷酸底物以及复制完成后发现、清除错误的脱氧核苷酸紧密相关. 近来的结构研究强调了分子间相互作用在保证准确复制中的重要作用, 这些相互作用包括碱基之间的氢键、聚合酶活性位点对水分子的排斥作用、碱基配对的几何适应性, 因结合 DNA 和 dNTP 而诱导的聚合酶构象变化^[1-4]. 另外, 许多高保真的聚合酶具有 3'→5'外切核酸酶的活性位点, 能够识别和切除错误的新生核苷酸, 即校读 (proofreading), 通过校读将 DNA 复制的保真性提高 10~100 倍.

表面等离子激元共振 (SPR) 生物传感器技术具有不需标记、实时检测和不影响生物分子活性等优点, 已经广泛用于研究生物分子之间的相互作用. Tsoi 等^[5,6]用 SPR 生物传感器研究了 Klenow 片段 (KF)、T7 聚合酶和含有错配的 DNA 模板 - 引物 (T-P) 的结合, 发现碱基错配促使 DNA T-P 引物末端由聚合酶活性位点向 3'→5'外切核酸酶活性位点移位. 本文利用 SPR 生物传感器研究 Taq 聚合酶 (Taq pol) 对 DNA T-P 末端碱基错配的识别能力. 因

为 Taq pol 缺少 3'→5'外切核酸酶的活性, 便于研究聚合酶活性位点对 DNA T-P 末端的相互作用. 另外, 结构学的研究认为正确的 dNTP 能够诱导聚合酶 - DNA 复合物从“开放”构象向“闭合”构象转变, 此构象变化是聚合酶保证复制准确性的重要途径^[1,4,7]. 为了利用 SPR 生物传感器研究 DNA 聚合酶在聚合过程中对 dNTP 的选择, 实验选择缺乏 3'→5'外切核酸酶活性的 Taq pol、失去了核酸酶结构域的鼠白血病逆转录酶 (MMLVRT-) 和人源的聚合酶 β (pol β) 作为研究对象, 将过量的“正确”或者“错误”的 dNMP 加入聚合酶和 DNA 反应的溶液中, 检测聚合酶 - DNA-dNMP 三元复合物形成的动力学.

*上海重点基础研究资助项目 (04JC14081).

** 通讯联系人.

赵建龙. Tel: 021-62511070-5709, Fax: 021-62511070-8714

E-mail: jianlong_zhao@yahoo.com

杨梦苏. Tel: 00852-27887797, Fax: 00852-27887406

E-mail: bhmyang@cityu.edu.hk

收稿日期: 2005-05-31, 接受日期: 2005-07-31

1 材料和方法

1.1 材料

SPR 生物传感器 BIAcoreX 购自 Pharmacia Biosensor AB (Uppsala, Sweden).

生物传感器芯片 CM5、HSB-EP 缓冲液和氨基偶合试剂包括 N-羟基丁二酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS), N-乙基-N'-(3-二甲胺基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (N-ethyl-NP-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide, EDC) 和盐酸乙醇胺购自 Pharmacia Biosensor AB (Uppsala, USA). 链酶亲和素购自 Promega (深圳晶美代办处). dAMP (2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate) 和 dCMP (2'-deoxycytidine 5'-monophosphate) 购自 Sigma 公司 (St Louis, MO, USA). 固定前链酶亲和素溶于 10 mmol/L 乙酸钠 (pH 4.8).

Taq pol (rTaq) 购自大连宝生物公司, MMLV RT⁻ (SuperScript II RT) 购自 Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), Human DNA pol β 购自 Chimex (Milwaukee, WI, USA). 考马斯亮蓝印迹的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析表明蛋白质纯度大于 95%.

5'端标记生物素的寡聚脱氧核糖核酸和非生物素标记的互补链在上海生工生物工程技术有限公司合成并且经过 HPLC 纯化, 具体序列表示如下: 3' CGTCGGCGAACCTTTGTCAGAACCA-GTGTACGCGATTGCACGCAACTACG 5' Biotin (ATTEM), 5' GCAGCCGCTTGGAAA 3' (ATPM1), 5' GCAGCCGCTTGGAAC 3' (ATPM2), 5' GCA-GCCGCTTGGACC 3' (ATPM3), 5' GCAGCCGCTTGGCCC 3' (ATPM4).

为了让互补双链严格退火, 5'端标记了生物素的模板链和没有标记的引物链 (ATPM1、ATPM2、ARPM3 或 ATPM4) 在 99℃ 的 HSM (0.01 mol/L HEPES, 0.15 mol/L NaCl, 0.01 mol/L MgCl₂, pH 7.4) 缓冲液中孵育 5 min, 然后溶液缓慢降至室温. 最终, 15-mer 的引物与 50-mer 的模板形成完全匹配的 dsATPM1 以及引物链末端分别含有 1、2、3 个碱基错配的 dsATPM2、dsATPM3、dsATPM4.

1.2 DNA 底物的固定

CM5 芯片首先用链酶亲和素按照 BIAcore AB 提供的标准程序 (参见 <http://www.biocore.com>) 修饰. 反应温度为 25℃, 溶液流速为 5 μ l/min. HSB-EP 缓冲液充分平衡 CM5 生物传感芯片后,

35 μ l 的 EDC (0.2 mol/L) 和 NHS (0.05 mol/L) 的混合溶液流过芯片表面 7 min 以激活表面的羧基基团, 接着 35 μ l 200 mg/L 的链酶亲和素乙酸钠溶液 (10 mmol/L, pH 4.8) 与芯片表面反应 7 min, 然后用 35 μ l 乙醇胺封闭没有参加反应的羧基基团.

链酶亲和素修饰 SPR 生物传感器 Fc1, Fc2 两个通道对应的芯片表面, 其中 Fc1 的表面进一步用带有生物素标记的某种 DNA T-P 修饰. 具体做法为: HSM 缓冲液平衡芯片表面, 注入 35 μ l DNA 溶液 (2 μ mol/L) 反应 7 min. HSM 缓冲液冲洗表面.

1.3 SPR 检测 Taq pol 和不同 DNAT-P 的结合

SPR 生物传感器的基本原理是: 传感芯片金膜中的离域电子能量能够与某个角度入射光的能量耦合, 能量在金膜附近传播而光的反射能量被大大削弱, 这个角度称为表面等离子共振角. 流过传感芯片的溶液里如果含有某种大分子物质能够与固定在芯片表面或芯片修饰介质层中的生物分子结合, 就会改变金膜表面的折射率, 从而使表面等离子共振角迁移. 通过实时测量角迁移的数值我们可以得到固定的生物分子和溶液相中相应配体结合的量化信息, 细节参见文献[8].

所有的结合实验中, Fc2 对应的表面没有固定 DNA, 被用做参考表面以减少或避免分析物异性、分析物与芯片表面的非特异性结合和流过不同溶液时溶液变化造成的误差. Taq pol 和不同 DNA T-P 的结合在 25℃ 下完成, 溶液流速是 20 μ l/min. Taq pol 在实验前用 TSM 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂) 稀释至最终浓度, 结合实验时的流动缓冲液也是 TSM. 含有不同浓度 Taq pol 的 40 μ l HSM 溶液依次流过 Fc1 和 Fc2 对应的芯片表面, 作用 120 s 以得到结合过程的响应曲线, 接着 HSM 溶液流过芯片表面持续 200 s 以得到解离过程的响应曲线, 然后注入 40 μ l 3 mol/L KCl 作用 1 min 以完全解离结合在 DNA 上的 RT, 基线平衡时进行下一次注入.

1.4 SPR 检测 dAMP 和 dCMP 存在时 DNA 聚合酶与完全匹配的 DNA T-P 的结合

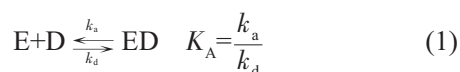
100 μ mol/L dAMP 或者 100 μ mol/L dCMP 和不同浓度的 DNA 聚合酶 (Taq pol、人源的 pol β 或 MMLV RT⁻) 充分混合后依次流过 Fc1 和 Fc2 对应的芯片表面作用 120 s, 接着缓冲液流过芯片表面持续 200 s. Fc2 对应的芯片表面仍然作为参考表面. 反应温度均为 25℃, 用 Taq pol、human pol β 和

MMLV RT实验时的缓冲液分别为 TSM(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$), TBS (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl) 和 HSM (0.01 mol/L HEPES, 0.15 mol/L NaCl, 0.01 mol/L $MgCl_2$, pH 7.4), 流速分别为 20 μ l/min, 5 μ l/min, 5 μ l/min, 分别用 3 mol/L KCl, 1 mol/L NaCl 和 1% SDS-HSM 流过芯片表面 1 min 以再生传感芯片。

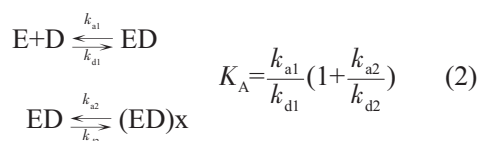
1.5 数据分析

所有的实验数据用 BIAevaluation 软件 (version 4.1, Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden) 分析. BIAevaluation 软件所采用的数值积分算法对初始参数的设置很敏感, 容易造成拟合数据与真实值之间的偏差. 偏差的产生一般是由于溶液中物质到芯片表面的传质效应以及结合位点的异质性^[9], 为了尽量减小或避免偏差, 我们用直接的全局曲线拟合方法 (globally fitting) 分析数据, 因为 Taq pol 和 DNA T-P 的结合可能存在构象变化, 我们分别用 1:1 Langmuir 模型 (式 1) 和构象变化模型 (式 2) 对 SPR 响应曲线进行拟合, 根据残差分布随机而且 χ^2 值小的原则评判合适的动力学模型。

1:1 Langmuir 模型



构象变化模型



2 实验结果

2.1 芯片的表面修饰

由于 1 000 响应单位 (response unit, RU) 对应于每平方毫米的表面固定了 1 ng 的蛋白质或者 0.8 ng 的 DNA (参见文献 [10] 及 BIAtechnology Handbook). 固定链酶亲和素前后响应变化了 2 075 RU, 计算得到芯片表面所修饰的链酶亲和素的密度约为 3.5×10^{-14} mol/mm². 而每次固定 DNA T-P 前后响应变化约 900 RU, DNA T-P 的固定量大约是 3.6×10^{-14} mol/mm², 即每平方毫米的 SPR 传感芯片表面分布有 2.2×10^{10} mol dsDNA 分子. 每个链酶亲和素上提供了 4 个与生物素结合的位点, 但是根据以上数据计算, 每个蛋白质大约只结合了一

个生物素标记的 dsDNA. 影响此结合过程的因素可能是: 链酶亲和素通过氨基耦合固定到芯片表面时, 随机的取向造成较大的空间位阻; 结合生物素的活性位点参与了氨基耦合的化学反应从而屏蔽了部分结合位点。

2.2 DNA 修饰表面的响应特异性

以 Taq pol 与 DNA T-P 的结合为例. 从图 1a 可以看到, Taq pol 在固定了 DNA 的传感芯片表面 (Fc1) 产生很明显的非线性响应信号, 而它在没有固定 DNA 的表面 (Fc2) 所产生的 SPR 信号几乎是一条水平线, 说明在这个体系中酶对传感芯片的背景吸附是很小的. 每次酶-DNA 作用后, 向传感芯片表面注入 20 μ l 3 mol/L KCl (流速 20 μ l/min) 再生传感芯片表面, 使仍没有解离的酶与 DNA 分离, 此时 SPR 信号的值与酶和 DNA 没有反应前的响应强度相同, 说明 3 mol/L KCl 的再生是充分有效的. 从 Fc1 获得的 SPR 信号减去 Fc2 获得的 SPR 信号, 得到 Taq pol 与 DNA T-P 的结合曲线和解离曲线 (图 1b).

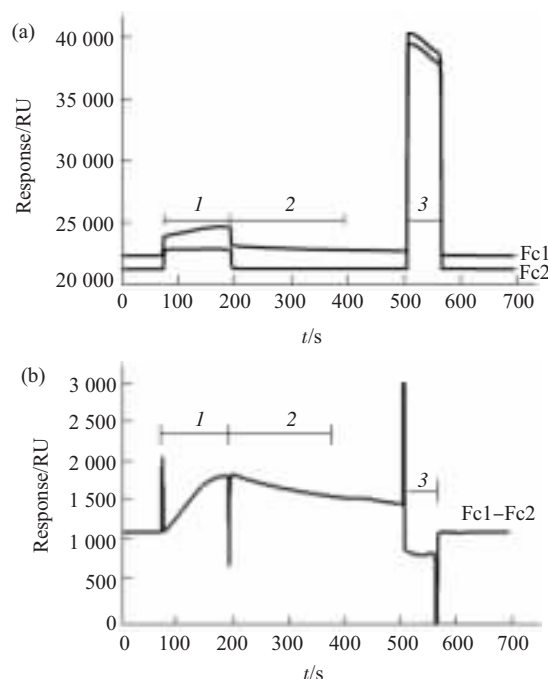


Fig. 1 The SPR response of 131.1 nmol/L Taq pol flowed over the surface with DNA T-P (Fc1) and without DNA T-P (Fc2) (a) and the response difference by subtracting Fc2 from Fc1 (b)

1: Association of Taq pol with DNA T-P; 2: Dissociation of Taq pol from DNA T-P; 3: Regeneration of chip surface by 20 μ l of 3 mol/L KCl solution. The spikes were caused by the small time difference of enzyme solution reaching the two different surfaces.

2.3 Taq pol 与完全匹配和末端含有不同错配的 DNA T-P 的结合动力学分析

分别用固定有 4 种 DNA T-P (包括引物和模板完全匹配的 dsATPM1, 引物末端含有 1、2、3 个错配碱基的 dsATPM2、dsATPM3 和 dsATPM4) 的芯

片进行这部分实验. DNA 的固定量在每个芯片上基本一致. 不同浓度 (17.5 ~ 219.1 nmol/L) 的 Taq pol 流过芯片表面. 从 Fc1 获得的 SPR 信号减去 Fc2 获得的 SPR 信号, 得到 Taq pol 与这 4 种不同 DNA T-P 作用的结合曲线和解离曲线 (图 2).

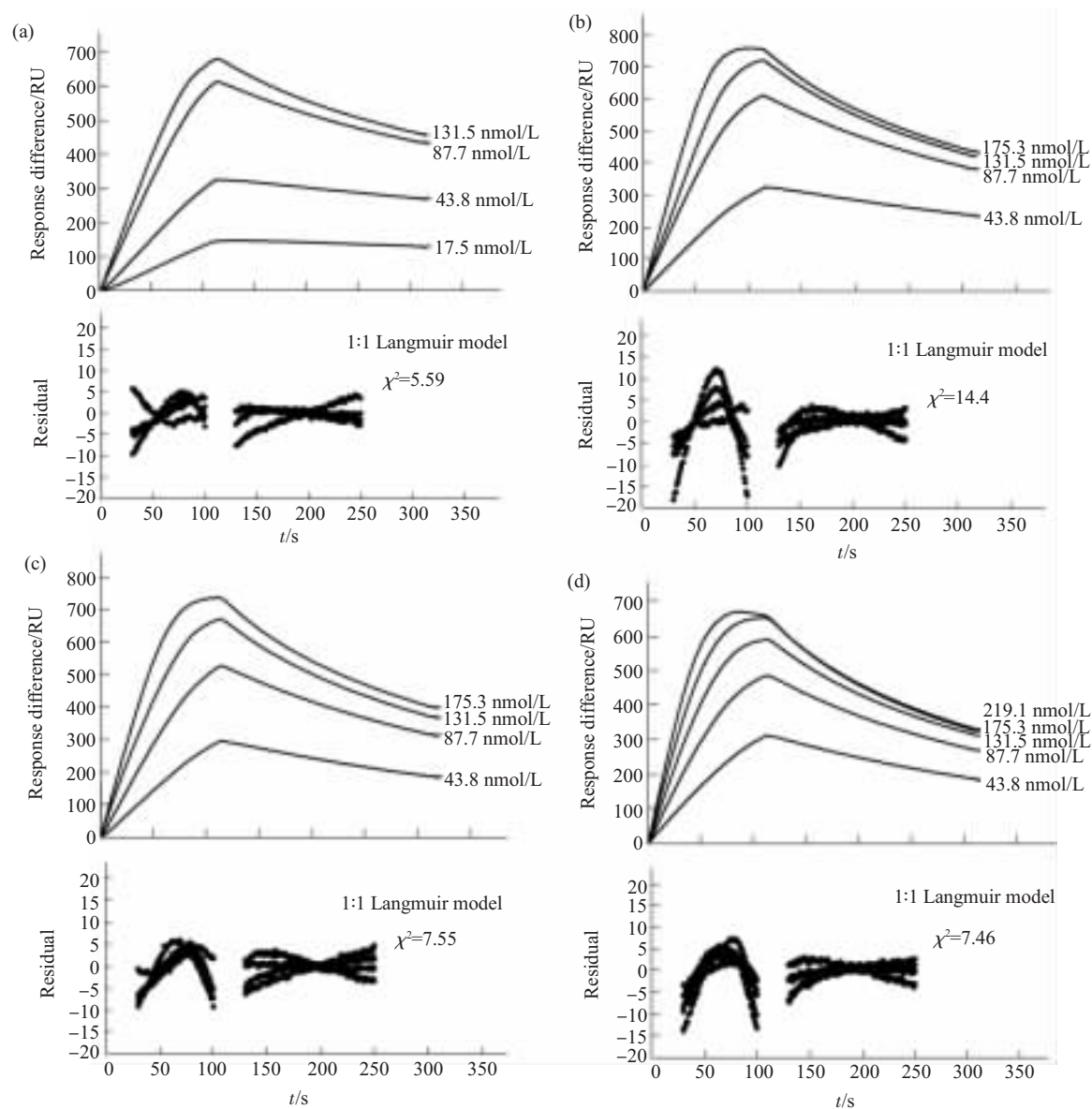


Fig. 2 The responses of Taq pol binding with different DNA T-P duplexes and the corresponding residual plots based on 1:1 Langmuir model
(a) dsATPM1; (b) dsATPM2; (c) dsATPM3; (d) dsATPM4.

根据 Fick 定律, Taq pol 从溶液到生物传感器表面与 DNA 作用要先经过一个扩散过程^[1]. 如果这个质量传递过程的速度不够快, 使 Taq pol 的

浓度在溶液相和表面相之间存在梯度差, 那么进行 Taq pol 和 DNA 结合动力学分析的时候就必须考虑此传质过程的影响. 为了可靠地分析图 2 中 Taq pol

与不同 DNA T-P 的结合曲线和解离曲线, 我们先考察传质过程是否对数据分析和曲线拟合产生影响. 根据 $\ln(\text{abs}(\text{d}RU/\text{d}t))$ 对时间 t 作图 (图 3) 发现得到的曲线并不是线性的, 说明 SPR 响应随时间的变化不是简单的指数形式. 另外, 构象变化模型分析也不能描述此动力学过程 ($\chi^2 > 30$). 考虑到 Taq pol 分子较大, 传感芯片表面固定 DNA 密度较大

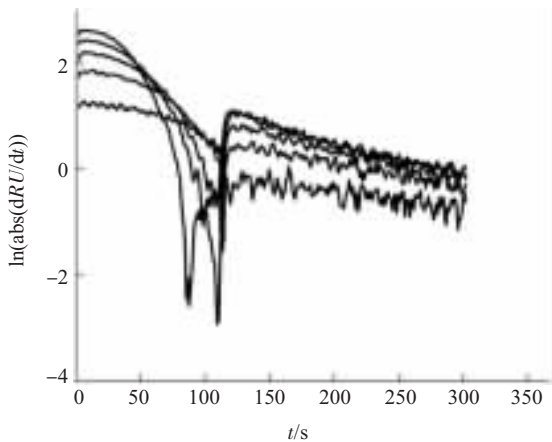


Fig. 3 The plot of $\ln(\text{abs}(\text{d}RU/\text{d}t))$ vs. t
The RU data are from Figure 2d.

(2.2×10^{10} mol 个 dsDNA/mm²), 而且 Taq pol 与 DNA 的结合是一个快速的过程, 所以传质效应可能影响了 Taq pol 和固定的 DNA 的结合动力学. 考虑了传质常数 k_m 的 1:1 Langmuir 模型和构象变化模型的动力学方程分别如式 3、式 4 所示.

$$\begin{cases} \frac{d[E]}{dt} = k_m([E]_{\text{溶液}} - [E]) - (k_a[E][D] - k_d[ED]) \\ \frac{d[D]}{dt} = -(k_a[E][D] - k_d[ED]) \end{cases} \quad (3)$$

$$\begin{cases} \frac{d[E]}{dt} = k_m([E]_{\text{溶液}} - [E]) - (k_{a1}[E][D] - k_{d1}[ED]) \\ \frac{d[D]}{dt} = -(k_{a1}[E][D] - k_{d1}[ED]) \\ \frac{d[ED]}{dt} = (k_{a1}[E][D] - k_{d1}[ED]) - (k_{a2}[ED] - k_{d2}[(ED)x]) \\ \frac{d[(ED)x]}{dt} = (k_{a2}[ED] - k_{d2}[(ED)x]) \end{cases} \quad (4)$$

因为用考虑了传质效应的 1:1 Langmuir 模型进行拟合时残基分布随机, χ^2 值较小, 所以用此模型分析 Taq pol 与不同 DNA T-P 结合的动力学曲线 (图 2), 拟合得到的动力学参数参见表 1. 由于传质常数 k_m 在 $6 \times 10^7 \sim 3 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内变化, 这个常数的引进不会影响数据分析的可靠性.

Table 1 The comparison of the kinetics constants of Taq pol binding with different DNA T-P duplexes based on 1:1 Langmuir model

	$k_a / \text{L}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$	k_d / s^{-1}	$K_A / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$
dsATPM1	$(1.23 \pm 0.02) \times 10^6$	$(5.87 \pm 0.36) \times 10^{-3}$	2.10×10^8
dsATPM2	$(1.12 \pm 0.03) \times 10^6$	$(1.22 \pm 0.06) \times 10^{-2}$	9.17×10^7
dsATPM3	$(5.24 \pm 0.08) \times 10^5$	$(7.69 \pm 0.24) \times 10^{-3}$	6.81×10^7
dsATPM4	$(3.96 \pm 0.06) \times 10^5$	$(7.89 \pm 0.22) \times 10^{-3}$	5.02×10^7

根据 Taq pol 与 DNA 的结构学研究结果^[12, 13]和实验中用到的 DNA T-P 的组成形式, Taq pol 是结合到 DNA T-P 引物末端的双链部位, 1:1 Langmuir 模型与之一致. 当 DNA T-P 末端错配的碱基数逐个增加时, Taq pol 与 DNA 的结合亲和力变弱, 当错配碱基数增加到 3 个的时候, 亲和力常数 ($K_A = 5.02 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 约是完全匹配时 ($K_A = 2.10 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 的 1/4, 这与以前对 KF 的研究结果是一致的^[6], KF 聚合活性结构域与含有不同错配的 DNA T-P 的亲和力也是随着错配碱基数目的增加

而慢慢下降. Taq pol 与 DNA 结合亲和力的下降主要是由于: 随着错配数的增加, 酶和 DNA 的结合速率变缓 (表 1). 引物末端含有 3 个错配碱基时的结合速率常数 ($k_a = (3.96 \pm 0.06) \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 约是完全匹配时 ($k_a = (1.23 \pm 0.02) \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 的 1/3. DNA T-P 末端含有错配碱基时, Taq pol 与 DNA 的解离速率 (含有 1, 2, 3 个错配时的 k_d 分别为 $(1.22 \pm 0.06) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $(7.69 \pm 0.24) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $(7.89 \pm 0.22) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) 比完全匹配时 ($k_d = (5.87 \pm 0.36) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) 略有增大.

2.4 dNMP 环境中，Taq pol、MMLV RT和人源的 pol β 与 DNA T-P 的结合动力学分析

dNTP 与聚合酶 -DNA 复合物结合形成三元复合物是 DNA 复制过程中非常重要的一步，聚合酶一般主要通过这步反应保证复制的准确度. 为了利用 SPR 生物传感器研究这个步骤的动力学，实验中用 dNMP 代替 dNTP 以防止发生化学聚合反应. 分别把不同浓度的 Taq pol (43.4 ~ 219.1 nmol/L) 和过量的 dNMP (100 μmol/L) 混合后，流过固定有完全匹配的 DNA T-P (dsATPM1) 的传感芯片表面. 实验中使用了两种 dNMP：dCMP 能够与 T-P 末端模板的碱基形成正确配对而 dAMP 不能. 我们称 dCMP 为“正确”的，称 dAMP 为“错误”的. 分别得到 Taq pol 酶在“错误”的 dAMP 或“正确”的 dCMP 环境中，与完全匹配的 DNA T-P 的结合曲线(图 4). 同样地，检测了不同浓度的 MMLV RT-

(80 ~ 200 nmol/L) 和人源 pol β (20 ~ 80 nmol/L) 在无 dNMP，含有“错误”的 dAMP 或“正确”的 dCMP 环境中，与完全匹配的 DNA T-P 结合，得到的响应曲线如图 5. 其中，为了能和 dNMP 环境中酶 -DNA 的结合进行比较，SPR 生物传感器首先检测了没有 dNMP 环境下 Taq pol，MMLV RT-和 human pol β 与 DNA 的结合 (图 2a，图 6，图 7a).

由于 SPR 生物传感器无法检测到小分子如 dNMP 和传感芯片表面固定的生物分子的结合，在这个实验里检测的是 DNA 聚合酶和 DNA 的结合以及酶 -DNA-dNMP 复合物的构象变化 (如果存在的话)，其中可能发生了分别如式 (5) 或式 (6) 所示的反应过程，它们分别对应于 1:1 Langmuir 模型和构象变化模型. 用这两个模型分别拟合数据，动力学常数计算结果如表 2.

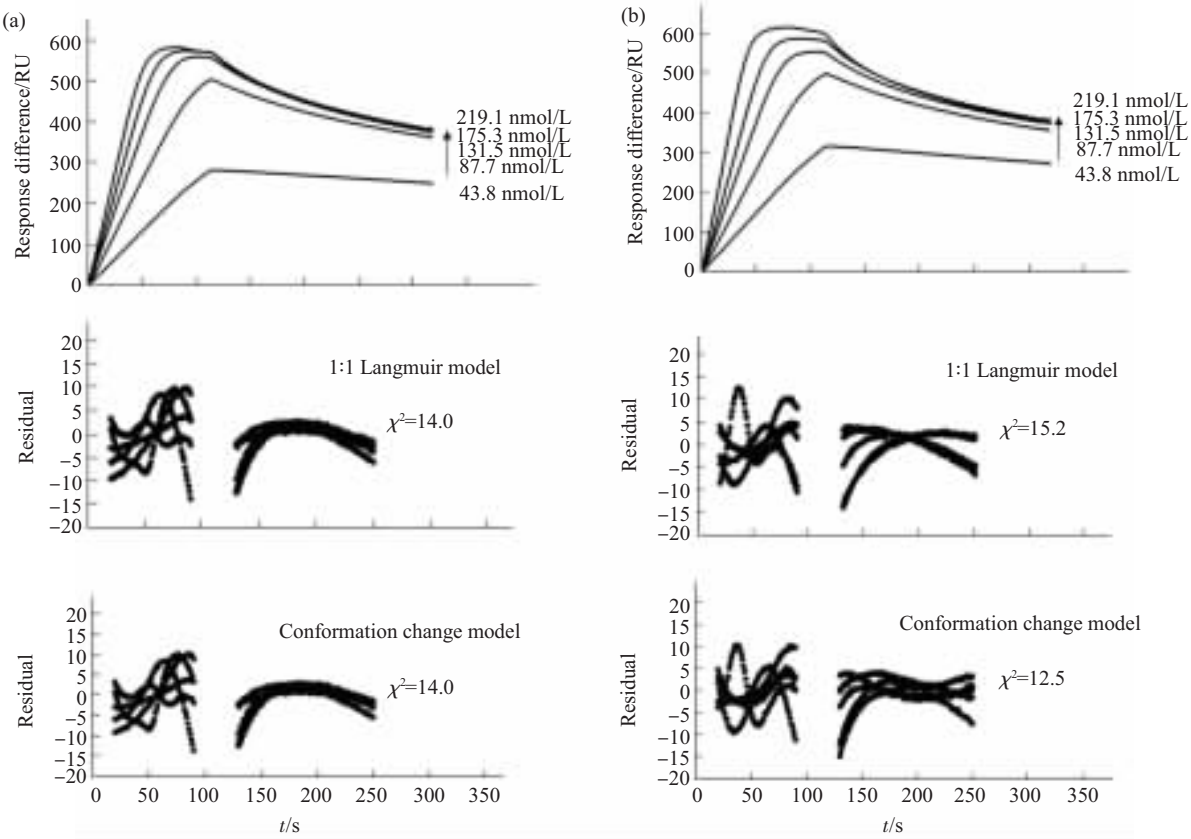


Fig. 4 The responses of Taq pol binding with dsATPM1 in the presence of “incorrect” dAMP (a) or “correct” dCMP (b) and the corresponding residual plots based on 1:1 Langmuir model and conformation change model

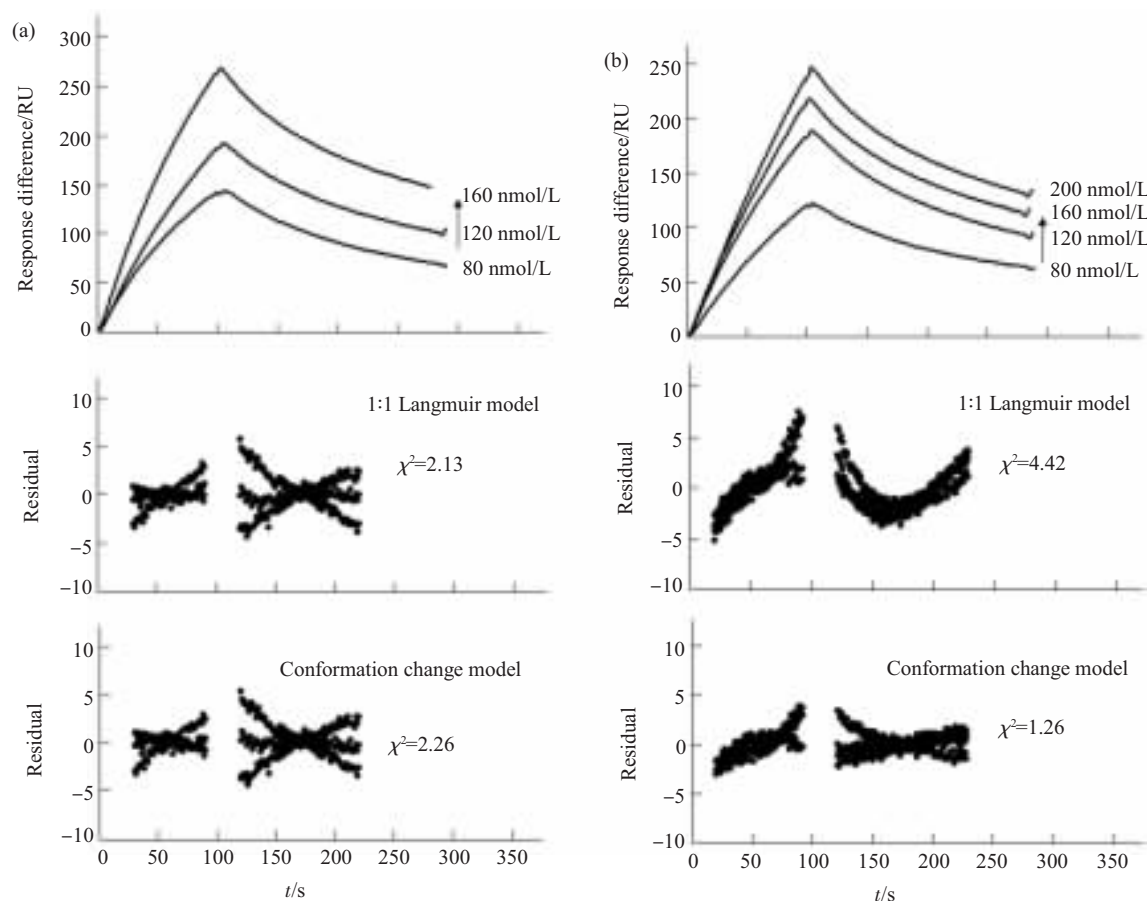


Fig. 5 The responses of MMLV RT- binding with dsATPM1 in the presence of “incorrect” dAMP (a) or “correct” dCMP (b) and the corresponding residual plots based on 1:1 Langmuir model and conformation change model

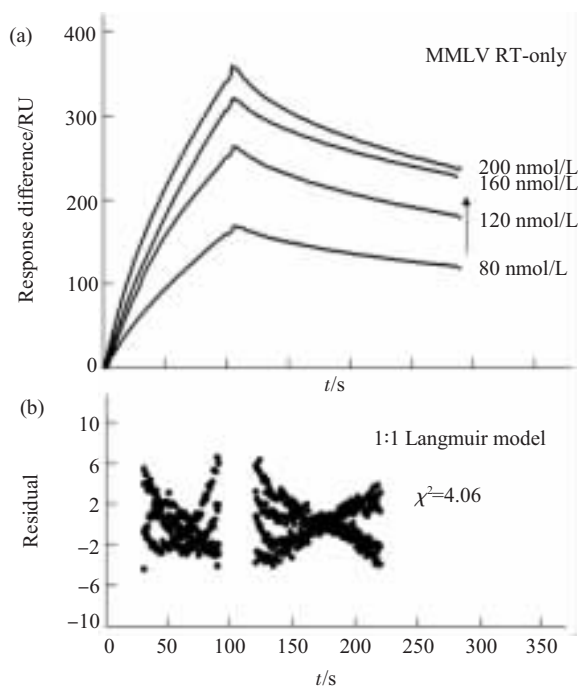


Fig. 6 The response of MMLV RT-binding with dsATPM1 DNA T-P (a) and the corresponding residual plot based on 1:1 Langmuir model (b)

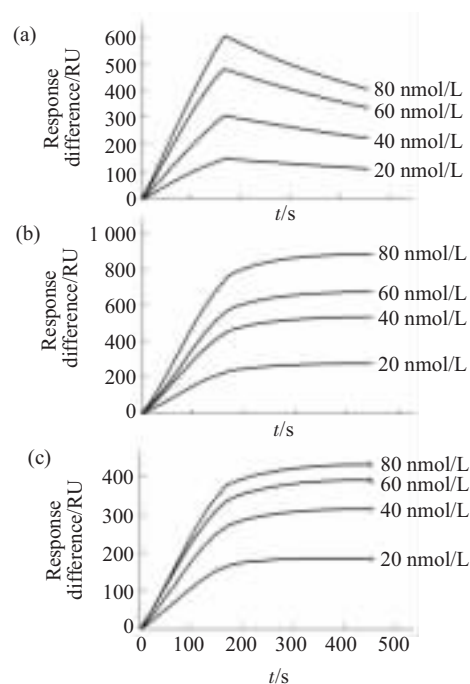


Fig. 7 The responses of pol β binding with dsATPM1 in the absence of NMP (a), “incorrect” dAMP (b) and “correct” dCMP (c)

$$\text{Enzyme+DNA+dNMP} \xrightleftharpoons[k_d]{k_a} \text{Enzyme} \cdot \text{DNA} \cdot \text{dNMP} \quad K_A = \frac{k_a}{k_d} \quad (5)$$

$$\text{Enzyme+DNA+dNMP} \xrightleftharpoons[k_{d2}]{k_{a1}} \text{Enzyme} \cdot \text{DNA} \cdot \text{dNMP}$$
$$\text{Enzyme} \cdot \text{DNA} \cdot \text{dNMP} \xrightleftharpoons[k_{d2}]{k_{a1}} (\text{Enzyme} \cdot \text{DNA} \cdot \text{dNMP})^* \quad K_A = \frac{k_{a2}}{k_{d2}} (1 + \frac{k_{a2}}{k_{d2}}) \quad (6)$$

Table 2 The comparison of kinetics constants based on 1:1 Langmuir model and conformation change model

	$k_{a1} / \text{L}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{d1} / s^{-1}	k_{a2} / s^{-1}	k_{d2} / s^{-1}	$K_A / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	χ^2
Taq pol dsATPM1 ^L	(1.23±0.02)×10 ⁶	(5.87±0.36)×10 ⁻³			2.10×10 ⁸	5.59
Taq pol dsATPM1+dAMP ^L	(1.02±0.12)×10 ⁶	(1.36±0.18)×10 ⁻¹			7.49×10 ⁷	14.0
Taq pol dsATPM1+dAMP ^C	(9.28±0.24)×10 ⁶	(1.23±0.03)×10 ⁻¹	(4.82±0.38)×10 ⁻⁶	(2.50±0.13)×10 ⁻⁴	7.69×10 ⁷	14.0
Taq pol dsATPM1+dCMP ^L	(5.42±0.59)×10 ⁵	(6.60±0.86)×10 ⁻²			8.22×10 ⁷	15.2
Taq pol dsATPM1+dCMP ^C	(1.17±0.05)×10 ⁷	(3.09±0.13)×10 ⁻¹	(1.53±0.04)×10 ⁻²	(1.40±0.86)×10 ⁻⁴	4.18×10 ⁹	12.5
MMLV RT ⁻ dsATPM1 ^L	(5.22±0.24)×10 ⁴	(5.42±0.17)×10 ⁻³			9.64×10 ⁶	4.06
MMLV RT ⁻ dsATPM1+dAMP ^L	(1.23±0.22)×10 ⁵	(1.87±0.19)×10 ⁻²			6.59×10 ⁶	2.13
MMLV RT ⁻ dsATPM1+dAMP ^C	(3.05±0.12)×10 ⁴	(8.01±0.20)×10 ⁻³	(3.72±0.09)×10 ⁻³	(5.46±0.51)×10 ⁻⁵	2.64×10 ⁸	2.26
MMLV RT ⁻ dsATPM1+dCMP ^L	(6.42±0.37)×10 ⁴	(9.27±0.32)×10 ⁻³			6.92×10 ⁶	4.42
MMLV RT ⁻ dsATPM1+dCMP ^C	(2.02±0.05)×10 ⁴	(1.93±0.03)×10 ⁻²	(8.15±0.11)×10 ⁻³	(1.38±2.86)×10 ⁻⁵	6.20×10 ⁸	1.26

^L: 1:1 Langmuir model, ^C: Conformation change model.

图 4a 和表 2 表明，用 1:1 Langmuir 模型和构象变化模型分析溶液中含过量 dAMP 时 Taq pol 和 DNA T-P 的结合，两个模型的残基分布和 χ^2 几乎是一样的，最终得到的亲和力常数也非常相近，但是基于构象变化模型得到的第二步构象反应的动力学常数 $k_{a2} < k_{d2}$ ，而且这两个值都很小，说明构象变化模型不能准确描述结合的动力学过程，所以动力学常数的计算应该基于 1:1 Langmuir 模型. 在“正确”的 dCMP 环境中，Taq pol 和 DNA T-P 的结合反应依循构象变化模型，因为用这个模型分析得到的残差分布较为随机，且残差值较小(图 4b). 用 1:1 Langmuir 模型和构象变化模型分别分析存在

dAMP 和 dCMP 情况下酶和 DNA 的结合，结果说明“正确”的 dCMP 存在下，酶和 DNA 的亲和力 ($K_A=4.18 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 是缺少 dNMP 时 ($K_A=2.10 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 的 20 倍. 此外，“错误”的 dAMP 的存在使酶和 DNA 的亲和力 ($K_A=7.49 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 低于缺少 dNMP 环境下的 ($K_A=2.10 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$). 酶和 DNA 结合下降主要是通过加快酶的解离实现的，其解离常数 ($k_d=(1.36 \pm 0.18) \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$) 比缺乏 dNMP 时的解离 ($k_d=(5.87 \pm 0.36) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) 增加了大约 23 倍.

图 6 说明没有 dNMP 时 MMLV RT⁻ 和 dsATPM1 的结合曲线，1:1 Langmuir 模型能够描述

这个过程, 相应的动力学常数见表 2. dNMP 作用下 MMLV RT 和 DNA T-P 的结合动力学分析结果如图 5 和表 2. 根据 χ^2 值和残基分布的随机性 (图 5b) 容易判断构象变化模型适用于“正确”的 dCMP 作用下酶和 DNA 的结合, 而不能决定哪个模型能够更好地描述“错误”的 dAMP 作用下的结合曲线 (图 5a). 在 dAMP 环境中, MMLV RT 和 DNA T-P 的结合用 1:1 Langmuir 模型和构象变化模型拟合得到的残基分布比较相似, χ^2 也几乎一样 (1:1 Langmuir 模型为 2.13; 构象变化模型为 2.26). 两个模型拟合得到的亲和力常数差异明显, 但是都低于用 dCMP 进行实验的结果. 比较构象变化模型分析的结果 (表 2), dAMP 影响下酶-底物结合的第一步反应动力学常数和 dCMP 作用下的接近, 而构象变化过程中的动力学常数在两种 dNMP 作用下有明显不同. dCMP 作用下, 酶-DNA 复合物发生构象变化的速率比 dAMP 存在时快 (dCMP: $k_{a2} = (8.15 \pm 0.11) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $k_{d2} = (1.38 \pm 2.86) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; dAMP: $k_{a2} = (3.72 \pm 0.09) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $k_{d2} = (5.46 \pm 0.51) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). 没有 dNMP 时 MMLV RT 和 dsATPM1 的亲和力常数 ($K_A = 9.64 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 是 dCMP 作用下 ($K_A = 6.20 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 的 1/64.

同样的, SPR 生物传感器被用来研究人源 pol β 在没有 dNMP 的环境中、“错误”的 dAMP 环境中、“正确”的 dCMP 环境中与 dsATPM1 结合的 SPR 响应曲线. 从图 7 中可以观察到, 如果 dNMP 参与到酶和 DNA 的结合过程中, 将会使结合的动力学行为发生很大的改变. 图 7b, 7c 中的解离曲线并不随时间增加向响应值减小的方向变化, 说明传质效应严重地影响了整个反应过程. 我们推测酶和固定的 DNA 解离过程中, 由于扩散速率远远小于反应的结合速率或者解离速率过小, 离开 DNA 的酶不断地重新结合到 DNA 上. 这样的曲线无法进行动力学拟合分析, 但是可以得到一个结论: pol β 与 DNA T-P 结合时, 如果环境中存在大量的 dNMP, 不管 dNMP 是否能和引物末端模板上的碱基配对, 都会明显增加 pol β 与 DNA 的结合.

3 讨 论

SPR 生物传感器技术与传统的动力学分析方法相比, 它不需要荧光和放射性同位素的标记, 这些标记可能影响生物分子之间的相互作用. 而且它是一种比较灵敏的检测手段, 0.1~1 mg/L 的蛋白质和 DNA 的结合动力学能够被可靠地分析. 另外, 通过

灵巧的实验设计, 精细的反应步骤能够被检测. 本文介绍了用 SPR 生物传感器研究聚合酶保真性的方法, 首先用 SPR 生物传感器研究 DNA 聚合酶和引物末端完全匹配和含有 1, 2, 3 个错配的 DNA T-P 的结合, 然后再用这个技术研究 DNA 聚合酶对脱氧核苷酸底物的选择. 我们选用 Taq pol、MMLV RT、pol β 3 种聚合酶进行实验是因为它们分别来自聚合酶的 A, 逆转录酶, X 家族, 由于缺少 3'→5'外切核酸酶的活性, 我们可以集中研究酶的聚合酶活性区域怎样保证选择正确的脱氧核苷酸而不必考虑校读.

首先, 我们在引物链的末端引入不同数目的错配碱基, 检测 Taq pol-DNA 的结合动力学. Taq 聚合酶是从嗜热细菌 *Thermus aquaticus* 中得到的 DNA 聚合酶, 由于它有很好的热稳定性, 被广泛应用于 PCR 反应中. 在体内, Taq pol 的功能是参与核苷酸的取代反应和切除冈崎 (Okazaki) 片段合成时用作引物的 RNA. 根据以前的结构学研究, Taq pol 是一条包含三个结构域 (domain) 的多肽链, C 端是聚合酶结构域, N 端是 5'核酸酶结构域, Taq pol 的 3'→5'核酸外切酶结构域位于聚合酶结构域和 5'核酸酶结构域之间, 已经失去了功能^[14-17]. Taq pol 的聚合酶结构域和 5'核酸酶结构域在结构和功能上相对独立, 这两个结构域在晶体状态和溶液状态都是分开的^[17, 18], 且不能同时与 DNA 结合^[12, 13]. 我们的实验结果表明, Taq pol 与 DNA T-P 的结合符合 1:1 Langmuir 模型, 应该是 Taq pol 的聚合酶结构域结合在 DNA T-P 的引物延伸端. 随着引物末端错配碱基逐个增加, Taq pol 和 DNA 的结合亲和力呈下降趋势, 说明倾向选择完全匹配的 DNA T-P 是 Taq pol 实现保真复制的途径之一. 错配碱基数的增多减慢了酶和 DNA 的结合速率.

为了进一步研究聚合酶怎样保证复制的准确性, 我们在分析溶液中加入 dNMP, 模拟聚合酶-DNA-dNTP 三元复合物的形成. 对于大多数 DNA 聚合酶, 它们与 DNA 反应时, 酶-DNA 复合物有开放和闭合两种状态. dNTP 能够结合到具有开放构象的酶-DNA 复合物上, 此时聚合酶根据空间立体结构相适性判断新来的 dNTP 是否“正确”, 如果 dNTP 通过了检查, 那么酶-DNA-dNTP 三元复合物就会发生一个构象变化, 转变为闭合状态. 这个构象变化是整个聚合反应过程中的限速步骤. 化学反应发生在闭合状态, 一个脱氧核苷酸结合到延伸的 DNA 链的末端^[1-4, 7, 19-22]. 我们的实验结果说明

Taq pol 对 dNMP 的选择符合上述诱导适应机制。“错误”的 dNMP 不会引起 Taq pol-DNA 复合物动力学行为的明显改变,而“正确”的 dNMP 诱导 Taq pol-DNA 复合物发生构象变化,明显增强酶-DNA 复合物的结合紧密程度,其亲和力常数是没 dNMP 时的 20 倍.对于 MMLV RT⁻,我们的数据分析说明“错误”的 dNMP 环境中 MMLV RT-DNA 复合物也可能发生构象变化,但是,酶-DNA 复合物的亲和力常数在“正确”的 dNMP 环境是最大的,而且“正确”的 dNMP 肯定诱导酶-DNA 复合物发生构象变化.不同的是,存在远远过量的 dNMP 的环境中, pol β 与 DNA T-P 的结合动力学比没有 dNMP 存在时改变了许多, dNMP 帮助 pol β 紧紧抓住 DNA,具体机理还需进一步研究.

参 考 文 献

- Kunkel T A. DNA replication fidelity. J Biol Chem, 2004, **279** (17): 16895~16898
- Prakash S, Johnson R E, Prakash L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. Annu Rev Biochem, 2005, **74**: 317~353
- Beard W A, Shock D D, Vande Berg B J, *et al.* Efficiency of correct nucleotide insertion governs DNA polymerase fidelity. J Biol Chem, 2002, **277** (49): 47393~47398
- Kunkel T A, Bebenek K. DNA replication fidelity. Annu Rev Biochem, 2000, **69**: 497~529
- Tsoi P Y, Yang M. Surface plasmon resonance study of the molecular recognition between polymerase and DNA containing various mismatches and conformational changes of DNA-protein complexes. Biosens Bioelectron, 2004, **19** (10): 1209~1218
- Tsoi P Y, Zhang X, Sui S F, *et al.* Effects of DNA mismatches on binding affinity and kinetics of polymerase-DNA complexes as revealed by surface plasmon resonance biosensor. Analyst, 2003, **128** (9): 1169~1174
- Kool E T. Active site tightness and substrate fit in DNA replication. Annu Rev Biochem, 2002, **71**: 191~219
- Sjolander S, Urbaniczky C. Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis. Anal Chem, 1991, **63**: 2338~2345
- Luo J, Zhou J, Zou W, *et al.* Antibody-antigen interactions measured by surface plasmon resonance: global fitting of numerical integration algorithms. J Biochem, 2001, **130**: 553~559
- Gorshkova I I, Rausch J W, Le Grice S F, *et al.* HIV-1 reverse transcriptase interaction with model RNA-DNA duplexes. Anal Biochem, 2001, **291** (2): 198~206
- Bergethon P R. The Foundations of Molecular Biophysics. New York: Springer-Verlag, 1998. 445~448
- Ho D L, Byrnes W M, Ma W P, *et al.* Structure-specific DNA-induced conformational changes in Taq polymerase revealed by small angle neutron scattering. J Biol Chem, 2004, **279** (37): 39146~39154
- Xu Y, Grindley N D, Joyce C M. Coordination between the polymerase and 5'-nuclease components of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. J Biol Chem, 2000, **275** (27): 20949~20955
- Eom S H, Wang J, Steitz T A. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. Nature, 1996, **382** (6588): 278~281
- Lawyer F C, Stoffel S, Saiki R K, *et al.* Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. J Biol Chem, 1989, **264** (11): 6427~6437
- Lawyer F C, Stoffel S, Saiki R K, *et al.* High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. PCR Methods Appl, 1993, **2** (4): 275~287
- Kim Y, Eom S H, Wang J, *et al.* Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Nature, 1995, **376** (6541): 612~616
- Joubert A M, Byrd A S, LiCata V J. Global conformations, hydrodynamics, and X-ray scattering properties of Taq and *Escherichia coli* DNA polymerases in solution. J Biol Chem, 2003, **278** (28): 25341~25347
- Li Y, Korolev S, Waksman G. Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation. Embo J, 1998, **17** (24): 7514~7525
- Korolev S, Nayal M, Barnes W M, *et al.* Crystal structure of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I at 2.5-Å resolution: structural basis for thermostability. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92** (20): 9264~9268
- Cramer J, Strerath M, Marx A, *et al.* Exploring the effects of active site constraints on HIV-1 reverse transcriptase DNA polymerase fidelity. J Biol Chem, 2002, **277** (46): 43593~43598
- Eckert K A, Kunkel T A. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. PCR Methods Appl, 1991, **1** (1): 17~24

SPR Biosensor Study of The Molecular Recognition Between The DNA Polymerase Without 3'→5' Exonuclease Activity With DNA^{*}

WU Lei^{1,2)}, HUANG Ming-Hui²⁾, ZHAO Jian-Long^{1)**}, YANG Meng-Su^{1,2)**}

¹⁾Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China;

²⁾Shenzhen Institute of City University of Hong Kong, Shenzhen 518057, China;

Abstract Taq pol, MMLV- RT and human pol β are polymerases lack of 3'-5' exonuclease activity. The Taq polymerase binding with DNA template-primer (T-P) with 1, 2, or 3 mismatched base/bases at the terminus of primer was studied by surface plasmon resonance (SPR) biosensor, comparing with the binding with full matched DNA T-P. The experiment showed that the affinity of Taq pol binding with DNA T-P decreases when the number of mismatched bases increased, indicating that Taq pol preferred to binding with matched DNA T-P. With "incorrect" dNMP, the kinetics of Taq pol binding with matched DNA T-P could be analyzed by 1:1 Langmuir model while the kinetics of MMLV RT⁻ binding with matched DNA T-P might involve conformation change. Conformation change model fitted well with Taq pol and MMLV⁻ RT-DNA binding curves in the presence of "correct" dNMP. The binding affinity was 20 times and 64 times higher than that without dNMP, respectively, indicating "correct" dNMP induced the conformation change of polymerase-DNA complex and enhanced the binding tightness. In the presence of dNMP, the kinetics of pol β binding with DNA T-P changed significantly and pol β grasped DNA closely.

Key words SPR biosensor, DNA polymerase, kinetics, 1:1 Langmuir model, conformation change model

*This work was supported by a grant from The Major Basic Research Program of The Science and Technology Commission Foundation of Shanghai (04JC14081).

**Corresponding author .

ZHAO Jian-Long. Tel: 86-21-62511070-5709, Fax: 86-21-62511070-8714, E-mail: jianlong_zhao@yahoo.com

YANG Meng-Su. Tel: 852-27887797, Fax: 852-27887406, E-mail: bhm yang@cityu.edu.hk

Received: May 31, 2005 Accepted: July 31, 2005