

非连续多核苷酸定点突变的方法

王易伦 张平武* 戴建新 郭瀛军 陆德如

(第二军医大学分子遗传教研室 上海 200433)

摘要 以人粒-巨噬细胞集落刺激因子(hGM-CSF)、人 α 8-干扰素(hIFN- α 8)和分裂细胞核抗原(PCNA)的cDNA定点突变为例,建立了一种新的大区域非连续多核苷酸同步定点突变的方法。经碱变性后的质粒DNA,先用突变引物延伸单链,然后通过PCR扩增得到突变双链DNA。用该方法成功地改造了hGM-CSF基因5'端36个核苷酸中的9个位点、IFN- α 8基因5'端39个核苷酸中的9个位点和PCNA基因SD顺序两侧6个和7个核苷酸。与经典的含U单链寡核苷酸定点突变方法相比,本方法突变效率高,并省去了对突变克隆杂交筛选的操作。

关键词 基因,定点突变,PCR

在核苷酸顺序水平进行定点突变,进而改造蛋白质的结构,是目前研究生物大分子结构与功能关系常用的策略和方法^[1]。本文建立了一种突变引物延伸单链与PCR技术相结合的方法,它能有效地对目的基因进行大区域非连续多核苷酸的定点突变改造。

1 材料和方法

1.1 工具酶和试剂

Klenow(Boehringer公司),PCR试剂盒(PE公司),DNA测序试剂盒(USB公司),化学试剂均为市售分析纯。

1.2 DNA模板

含人粒-巨噬细胞集落刺激因子(hGM-CSF)cDNA的质粒(pZP6)、含人 α 8干扰素(hIFN- α 8)cDNA质粒(pZP3)和含人分裂细胞核抗原(PCNA)cDNA的质粒(pGEM-2)均为本室保存,质粒DNA按常规碱裂解法制备。

1.3 寡核苷酸引物合成

采用固相亚磷酸三酯法合成。由本室或中国科学院细胞生物学研究所完成。

1.4 非连续性多核苷酸定点突变

1.4.1 碱变性:取约1 μ g纯化的质粒DNA(含待突变基因),溶于12 μ l TE(pH8.0)中,加4 μ l 1mol/L NaOH,37 $^{\circ}$ C,5min,加4 μ l 10mol/L NH₄Ac(pH7.6),加50 μ l乙醇,-20 $^{\circ}$ C,沉淀过夜。

1.4.2 突变单引物延伸:离心沉淀碱变性DNA,抽干后,溶于7 μ l H₂O中,加1 μ l 延伸反应缓冲液(0.2mol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.1mol/L MgCl₂, 0.1mol/L DTT),0.5 μ l 4种dNTP混合物(每种dNTP为2.5mmol/L),1~5pmol突变引物,klenow酶1u,37 $^{\circ}$ C,15~30min(视延伸单链长度而定),100 $^{\circ}$ C,5min,缓慢冷至40 $^{\circ}$ C。

* 联系人。

本文于1995年2月14日收到。

1.4.3 PCR 反应:取 2 μ l 突变单引物延伸反应物,加入 20~50pmol 未突变引物,反应体积 20~50 μ l,按厂家推荐条件加入其它成分,先 70 $^{\circ}$ C, 30s, 94 $^{\circ}$ C, 40s, 再补充突变引物至 20~50pmol,按以下条件循环 30 次,55 $^{\circ}$ C, 60s, 72 $^{\circ}$ C, 30s, 94 $^{\circ}$ C, 40s。最后 70 $^{\circ}$ C, 10min, 然后 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 DNA 顺序测定

采用双脱氧链终止法(按厂家推荐条件进行)。

2 结 果

2.1 引物设计

3 个基因中突变改造的区域均位于 cDNA 的 5' 端,突变引物均为 PCR 扩增时的 5' 端引物,其中 GM-CSF 5' 端引物长 53 聚核苷酸,突变区域为 36 个核苷酸,含 11 个非连续定点突变位点;IFN- α 8 5' 端引物长 56 聚核苷酸,突变区域为 39 核苷酸,含 9 个非连续定点突变位点;PCNA 5' 端引物则在 SD 顺序(GAGGT)两侧各随机突变 6 个和 7 个核苷酸。GM-CSF 和 IFN- α 8 引物 3' 端一侧保持 9 个与模板完全配对的核苷酸,PCNA 引物的 3' 端一侧有 15 个与模板完全配对的核苷酸。3 个基因的 PCR 3' 端引物均为未突变引物,长 26 或 27 聚核苷酸,其中 3' 端一侧 15~17 个核苷酸与模板配对,见表 1。

表 1 引物顺序

Table 1 Primer sequences

Gene	Primer	5' → 3'
GM-CSF	5' end	<u>CGCATATGGCtCCaGCaaGATcCCaA6CCC</u> Nde I <u>aAGCACtCaACCaTGGGAGCAT</u>
	3' end	<u>CGGATCCTCACTCCTGGACTGGCTCCC</u> BamH I
IFN- α 8	5' end	<u>CGCATATGTGcGAcCTtCCTCaACTCACAGCCTtGGcAAcAGaCGtGCCTTGATA</u> Nde I
	3' end	<u>GCGGATCCTCAITCCTTACTCTTCAA</u> BamH I
PCNA	5' end	<u>ACAAGCTTXXXXXXGAGGTXXXXXXATGTTTCGAGGCGCGC</u> Hind III
	3' end	<u>CTGAATTCGACTGCAGGTTTACACC</u> EcoR I

Small letters indicating mutated sites, X indicating the sites of random mutated nucleotides, the underlined nucleotides presenting the ranges of complement to templates of each primer, dotted line indicating the attached RE sites.

2.2 PCR 扩增产物的电泳鉴定

用 hGM-CSF5' 和 3' 端引物可扩增出编码成熟蛋白 127 个氨基酸的 cDNA 片段, 加上两端的酶切位点等, 全长 399bp; 用 hIFN- α 8 5' 和 3' 端引物可扩增出编码成熟蛋白 166 个氨基酸的 cDNA 片段, 加上两端的酶切位点等全长 516bp; 用 PCNA 两个引物可扩增出编码 5' 端前 38 个氨基酸顺序及上游非翻译区 24 个核苷酸 cDNA 片段, 加上两端的酶切位点等全长 150bp。PCR 扩增产物经电泳鉴定, 长度与预期结果一致, 见图 1~3。

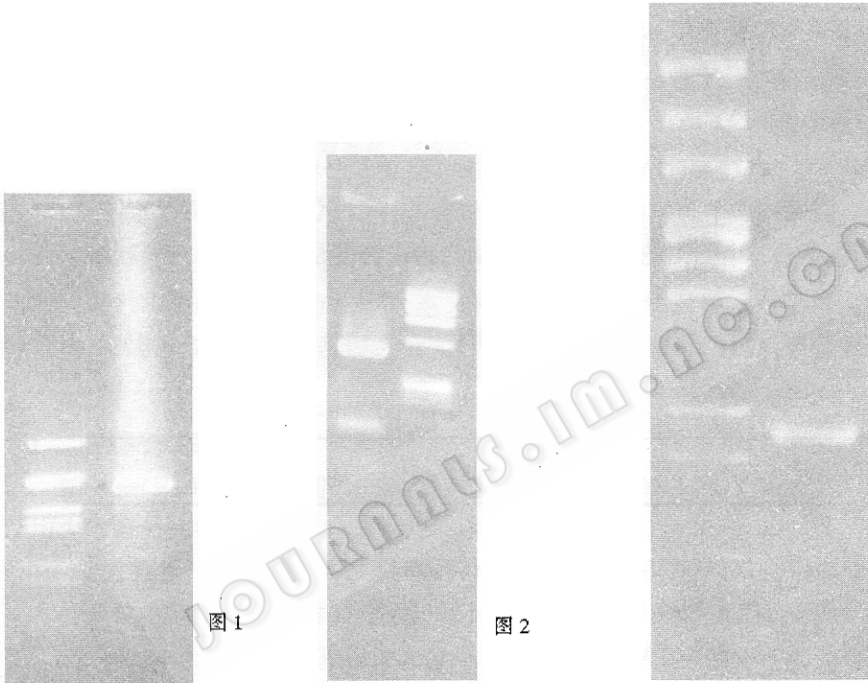


图 1

图 2

图 3

图 1 PCR 扩增 hGM-CSF cDNA 的 agarose gel 鉴定

Fig. 1 Identification of hGM-CSF cDNA amplified by PCR on agarose gel

Left: pGEM-3Zi(+)DNA-HaeIII marker

Right: amplified GM-hCSF cDNA

图 2 PCR 扩增 hIFN- α 8 cDNA 的 agarose gel 鉴定

Fig. 2 Identification of hIFN- α 8 cDNA amplified by PCR on agarose gel

Right: ϕ X174DNA-Hae III marker

Left: amplified hIFN- α 8 cDNA

图 3 PCR 扩增 PCNA cDNA 5' 侧顺序的 PAGE 鉴定

Fig. 3 Identification of 5' flanking sequence of PCNA cDNA amplified by PCR on PAGE

Left: pGEM-3Zi(+) DNA-Hae III marker

Right: amplified 5' flanking sequence of PCNA cDNA

2.3 DNA 顺序测定

图 4、5、6 分别是上述 3 个 PCR 扩增产物突变区域的 DNA 顺序分析, 结果与实验设计完全一致。图 6 列举了 3 个在 SD 顺序两侧随机突变的克隆, 它们在 SD 上游和下游的 6 个和 7 个核苷酸顺序彼此不同。

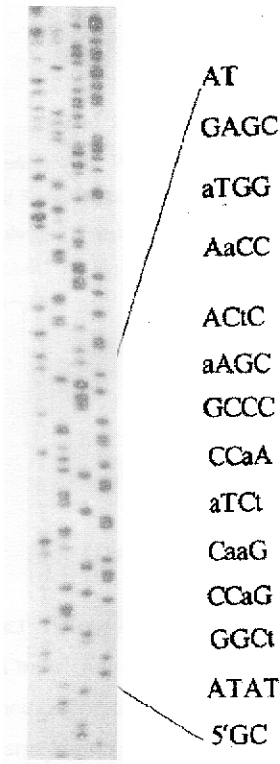


图 4 hGM-CSF cDNA 突变区域的顺序分析

Fig. 4 Sequencing of mutated range of hGM-CSF cDNA

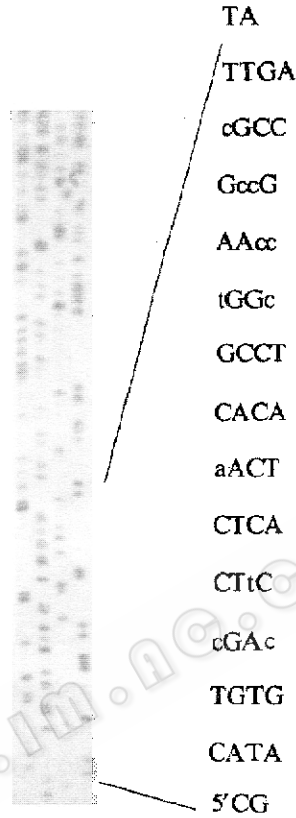


图 5 hIFN-α8 cDNA 突变区域的顺序分析

Fig. 5 Sequencing of mutated range of hIFN-α8 cDNA

3 讨 论

本文建立的方法综合了质粒双链 DNA 测序中的碱变性^[2]和寡核苷酸定点突变中的突变引物延伸^[3],即突变引物与碱变性的单链模板先结合并延伸,产生含突变位点的单链,再通过 PCR 扩增出双链。在突变引物中,由于突变位点是分散的,被突变位点间隔的核苷酸能否与模板结合起到稳定突变引物-模板杂合体的作用尚不清楚。但从我们的结果来看,当突变引物 3'端一侧有 9 个碱基与模板完全配对,即能保证杂合体的足够稳定和延伸反应的正确性。延伸反应后,先高温(100℃, 5min)变性,再缓慢降温,我们推测这有利于被碱变性解链的两条完全互补的单链重新退火结合,使反应体系中有较多的突变引物延伸的单链。在 PCR 第一个循环中,省去加热变性步骤,通过 3'端引物与反应体系中游离的单链结合和延伸,为后续循环反应的 5'端(突变)引物提供单链模板;然后在严谨退火(55℃ 或更高温度)条件下,使 5'端和 3'端引物分别与各自完全配对的模板结合,从而得到与突变设计一致的双链片段。除了用环状质粒 DNA 作为模板,本方法也适用于线性双链 DNA 模板。

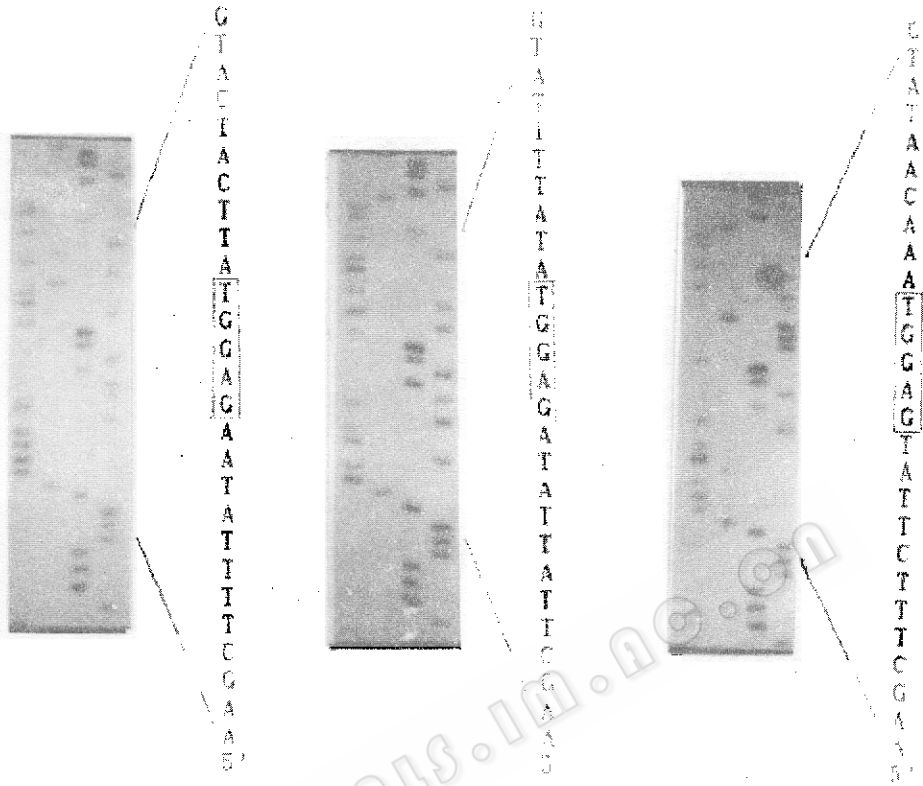


图 6 PCNA cDNA 突变区域的顺序分析

Fig. 6 Sequencing of mutated ranges of PCNA cDNAs

3 examples of randomly mutated at the 6 and 7 nucleotides in close proximity to SD sequence of PCNA cDNA shown in (1) (2) (3) respectively

由 Kunkel 建立的含 U 单链寡核苷酸定点突变是目前实验室最常用的定点突变方法^[4]。该方法在突变改造少数几个相邻的核苷酸时,在理论上突变效率可达 50%。但是,由于体内宿主菌修复系统的修正作用和体外延伸形成环化单链时 5'→3' 外切酶活性对突变引物的破坏等因素的影响,实际工作所得到的突变效率常常低于此值。大区域多核苷酸的突变较难用寡核苷酸定点突变法完成。我们在 PCNA cDNA 突变时曾先用 48 聚核苷酸的突变引物进行含 U 单链寡核苷酸定点突变,未能成功,改用本文方法,一次获得数百个在 SD 顺序两侧发生定点的随机突变的克隆。因此在对基因两端(5'端或 3'端)大区域非连续的多核苷酸定点突变时,本方法有着明显的优越性。本文建立的方法所有突变操作均在体外进行,延伸反应不需合成环化的单链(可采用线性双链 DNA 作为模板),大大提高了突变效率。此外,省去了含 U 单链寡核苷酸定点突变中对突变克隆的杂交筛选这一耗时费事的操作(尤其是大区域突变时),因而简化了操作过程。

参 考 文 献

- [1] Freedman R B, Wetzel R. Protein Engineering Curr Opin Biotech, 1992, 3:323~324.
- [2] Unit States Biochemical Co., SEQUENASE, 4th ed. 1988, p. 12.
- [3] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular Cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, 1989, p. 15. 51.
- [4] Kunkel T A. Rapid and Efficient Site-specific Mutagenesis without Phenotypic Selection. Proc Natl Acad Sci USA. 1985, 82: 488~492.

A Method for Site-directed Mutagenesis of Non-consecutive and Multiple nucleotides

Wang Yilun Zhang Pingwu Dai jianxin Guo Yingjun Lu Deru

(Department of Molecular Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract Using the cDNAs of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF), human interferon- α 8(hIFN- α 8) and human proliferating cellular nuclear antigen(PCNA) as samples, a new method for simultaneously site-directed mutagenesis of non-consecutive and multiple nucleotides flanking a large region is established. The process involves the primer extension with mutagenic oligonucleotides on single strand derived from alkaline-denatured plasmid DNA and then the use of polymerase chain reaction to generate mutated double strand DNA. With this method we have successfully mutated 11 or 9 sites distributing over 36 nucleotides at 5' regions of hGM-CSF gene and hIFN- α 8 gene, and 6 and 7 consecutive nucleotides on both sides of SD sequence of PCNA gene. As compared with the typical oligonucleotide-mediated mutagenesis (Kunkel method), this method is more efficient to obtain the mutants and much simpler due to omitting the operation of plaque hybridization screening.

Key words Gene, site-directed mutagenesis, PCR