

一种新型的基因定点突变方法及其在 DdsA 突变研究中的应用

刘欣毅, 张惠展, 袁勤生*

(华东理工大学生物工程学院, 上海 200237)

摘要 为了发展基因突变技术, 介绍一种新型的基因定点突变方法. 该方法巧妙利用了基因序列中广泛存在的不完整的平端酶切位点. 与传统方法相比, 可以迅速地在全基因的任何部位替换核苷酸, 并可以在突变实验过程中直接将目的基因克隆到 T 载体上, 便于测序及进一步克隆. 利用该方法成功地获得了 DdsA (decaprenyl diphosphate synthase, 十聚异戊二烯焦磷酸合成酶) 在 4 个氨基酸位点上的 19 个变体酶. 这些位点分布在基因的不同区域内. 证明这种新方法的高效性.

关键词 基因突变; 平端酶切位点; 定点突变; DdsA 变体

中图分类号 Q78

A Novel Method for Site-directed Mutagenesis and Its Application in DdsA Mutant Research

LIU Xin-Yi, ZHANG Hui-Zhan, YUAN Qin-Sheng*

(Department of Biochemistry Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract To develop the gene mutagenesis technique, a novel method of site-directed mutagenesis was introduced. The half-blunt end restriction enzyme sites were used in this new method. Comparing with the traditional overlapping extension mutagenesis, this method could replace any nucleotides covered the gene sequence. Meanwhile, the mutant gene was cloned in the T-vector directly that make sequencing convenient. Nineteen mutants of DdsA (decaprenyl diphosphate synthase), focused on four residues, were generated via this method. The results showed that the new gene mutagenesis method was efficient.

Key words gene mutagenesis; blunt end site; site-directed mutagenesis; DdsA mutant

随着 DNA 重组技术的不断发展, 人们可以很容易地在特定的宿主中表达所需要的任何蛋白质, 并纯化出可商品化的产品. 但大部分天然蛋白质的理化性质并不合适工业化的生产, 这就需要通过蛋白质工程的手段对其进行改造, 设计并创造出性质优良的非天然全新蛋白质^[1].

在蛋白质工程中最常用的技术就是定点突变技术, 即专一改变基因中某个或某些特定的氨基酸来提高酶对底物的亲和力, 增强酶的专一性. 在各种定点突变方法中重叠延伸突变法是使用最广泛的一种^[2,3]. 它需要 4 条 PCR 引物: 分别是含有突变的碱基并且反向部分重叠的引物 2, 3 以及与目的基因两端互补的引物 1, 4. 首先, 引物 1, 3 和 2, 4 两两配对, 分两管进行第一次 PCR, 产生两个部分重叠的 DNA 片段. 然后将上述两管 PCR 产物混合, 变性再复性. 在 DNA 聚合酶的作用下延伸产生完整的双链 DNA. 最

后用引物 1, 4, 以新合成的完整双链 DNA 为模板进行第二次 PCR, 即可得到含有预期突变位点的 DNA 片段. 但在实际使用中, 该方法却存在限制: 1) 所突变的位点要尽量位于目的基因中间区域, 否则在变复性过程中, DNA 聚合酶无法延伸出完整的双链 DNA, 最终得不到目的产物; 2) 两轮 PCR 要相继进行, DNA 延伸产物无法鉴定, 增加了实验失败的可能性; 3) 得到的最终产物还需进行一步克隆实验, 延长了实验周期.

我们利用基因序列中广泛存在的不完整平端酶切位点, 开发一种新型的定点突变技术. 这种方法缩

收稿日期: 2006-10-12, 接受日期: 2007-01-09

*联系人 Tel: 021-64252255, E-mail: qsyuan@ecust.edu.cn

Received: October 12, 2006; Accepted: January 9, 2007

*Corresponding author Tel: 021-64252255,

E-mail: qsyuan@ecust.edu.cn

短了实验周期,提高了突变实验的效率,降低了实验成本.我们使用该方法成功地获得了 DdsA(十聚异戊二烯焦磷酸合成酶)在 4 个氨基酸位点上的 19 个变体酶.这些位点分布在基因的不同区域内.测序结果证明,这种新方法的正确性和高效性.

1 材料和方法

1.1 试剂

限制性内切酶、DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶及其缓冲液为 TaKaRa 产品,pMD18-T 购于 TaKaRa 公司,*Pfu* DNA 聚合酶购于上海博光生物科技有限

公司.DNAMarker 由本实验室制备,片段大小依次为:0.5、1.1、1.6、2.6、3.1、4.1、5.4、9.34、17.0 kb.

1.2 质粒

本实验所用质粒见 Table 1.

1.3 引物

本实验所用引物见 Table 2.

1.4 新型定点突变方法

DNA 操作参见文献[4].利用 PCR 的方法来定点突变目的基因.PCR 的体系为 50 μ l,其中包括 1 \times PCR 缓冲液,200 μ mol/L dNTP,50 pmol 引物,100 pg 模板 DNA 和 2.5 U DNA 聚合酶.PCR 总共进行 30

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Relevant characteristics	Source
pMD18-T	<i>Ap^r</i>	Takara, Japan
pLD ₂ -trc	<i>Ap^r</i> ; 1.2-kb <i>Bam</i> H - <i>Hind</i> I fragment contain <i>ddsA</i> in pTRC99a	Ye (2004)
pFIB25	<i>Ap^r</i> , 1.1-kb PCR fragment contain partial unchanged <i>ddsA</i> in pMD18-T	This study
pFIB70	<i>Ap^r</i> , 0.4-kb PCR fragment contain partial unchanged <i>ddsA</i> in pMD18-T	This study
pFIB186	<i>Ap^r</i> , 0.8-kb PCR fragment contain partial unchanged <i>ddsA</i> in pMD18-T	This study
pFIB226	<i>Ap^r</i> , 0.6-kb PCR fragment contain partial unchanged <i>ddsA</i> in pMD18-T	This study
pTB25X	<i>Ap^r</i> , mutated <i>ddsA</i> gene with H25X in pMD18-T	This study
pTB70X	<i>Ap^r</i> , mutated <i>ddsA</i> gene with A70X in pMD18-T	This study
pTB186X	<i>Ap^r</i> , mutated <i>ddsA</i> gene with A186X in pMD18-T	This study
pTB226X	<i>Ap^r</i> , mutated <i>ddsA</i> gene with K226X in pMD18-T	This study

The letter X indicates different amino acids in different plasmid

Table 2 Primers used in the experiments

Primer	Sequence
P1	5-TGAAATGAGCTGTTGATAATTAATG-3
P2	5-GACCGCTTCTGCGTICTGAF3
UC25	5-TCGCCCGGGA GCGAA-3
UC70	5-CGGTATGAGTTAACTCAACGCA-3
UC186	5-AGAGA GCGCTTCTTCTGCTTCC-3
UC226	5-AAGGCGATATCACCCCTGCC-3
25TB	5-GCCGCGACAAGNNNGCCG3
70TB	5-TCATTCATACNNNACACTGCTGCF3
186TB	5-AA GNNNTGGA GCGGTTTGG3
226TB	5-NNNGCCTTACCGCATGTCA-3

The letter N indicates A, C, G, or T

The underlined sequences were restriction enzyme sites for *Sma*, *Hinc*, *Stu* and *EcoRV*

个循环,每个循环包括 95 30 s, 58 1 min, 72 2 min. 在最后 1 个循环之后,再进行 72 延伸 10 min. 反应产物用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离纯化,并进行后续克隆实验. Fig. 1 表示新型定点突变方法的工作原理. 首先,使用引物 1 (P1) 和 UC 引物扩增出含有目的基因不变区的产物片段并与 pMD18-T 连接,利用 UC 引物将基因内部不完整的平端酶切位点补充完整. 第二步,使用 TB 引物和引

物 2 扩增出突变的区域,以 TB 引物引入碱基替换. 最后用引入的平端酶切含基因不变区的质粒并与 PCR 得到的突变区连接,筛选得到含有完整突变基因的目的质粒. 由于 TB 引物的 5 端正好位于不完整平端酶切位点的 3 端 (Fig. 1 虚线所示),连接不会造成目的基因序列的移码.

1.5 突变基因序列检测

基因测序由英骏生物技术公司完成.

2 结果

2.1 构建和鉴定含基因不变区的质粒 pFIB25, pFIB70, pFIB186 和 pFIB226

以质粒 pLD₂-trc 为模板,按 1.4 的描述,用 P1 和对应的 UC 引物的扩增产物,构建了 pFIB25, pFIB70, pFIB186 和 pFIB226. 分别用 *Sma* (Fig. 2A), *Hinc* (Fig. 2B), *Nco* / *Hind* (Fig. 2C) 和 *EcoR* (Fig. 2D) 酶切鉴定.

2.2 构建和鉴定含突变基因的质粒 pTB25, pTB70, pTB186 和 pTB226

同样以质粒 pLD₂-trc 为模板,按 1.4 的描述,P2 和对应的 TB 引物的扩增出突变片段(使用 *Pfu* DNA 聚合酶). 分别用 *Sma*, *Hinc*, *Stu* 和 *EcoR* 酶

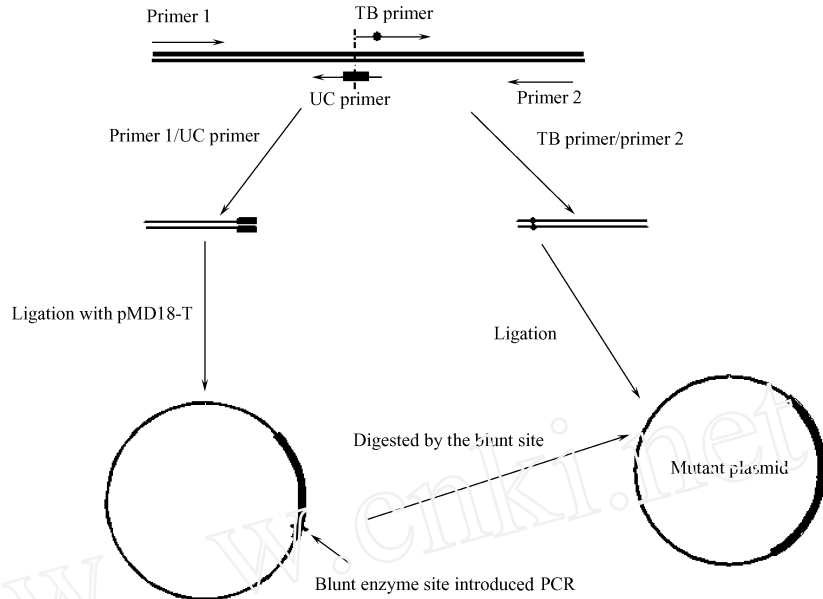


Fig. 1 Novel method of site-directed mutagenesis

Black dot indicates the mutant site and black rectangle indicates a blunt end restriction enzyme site. Unchanged gene fragment is amplified with primer1/UCprimer and digested by the blunt end restriction enzyme. TB primer/primer2 is used to amplify the mutated fragment with Pyrobest™ DNA Polymerase. The mutant gene will be produced by ligating these two fragments

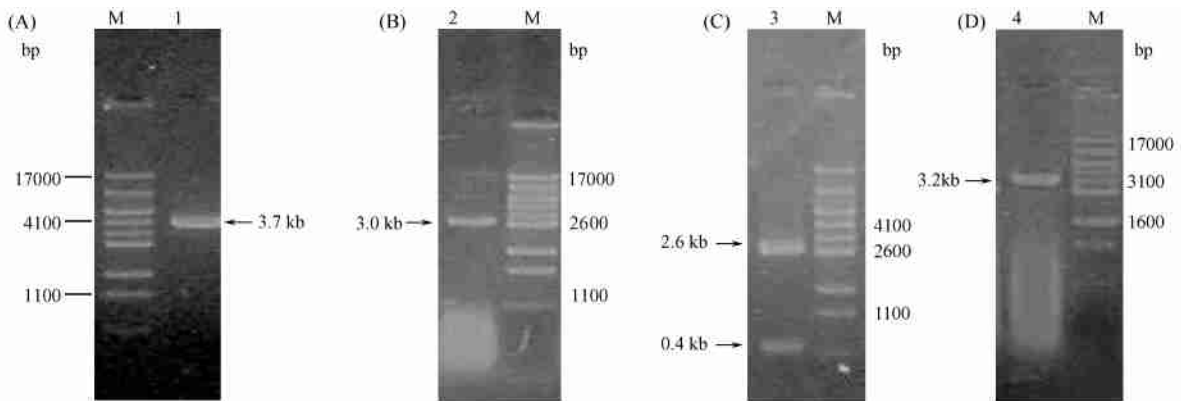


Fig. 2 Electrophoresis identification of pFTB25, pFTB70, pFTB186 and pFTB226 digested with different enzymes

M:Marker(1 100, 1 600, 2 600, 3 100, 4 100, 5 300, 9 000, 17 000 bp)
 1: pFTB25 digested with *Sma*I 3.7 kb; 2: pFTB70 digested with *Hinc*II 3.0 kb;
 3: pFTB186 digested with *Nco*I / *Hind*III 0.4 + 2.6 kb;
 4: pFTB226 digested with *Eco*R 3.2 kb

切质粒 pFTB25, pFTB70, pFTB186 和 pFTB226. 将突变片段与线性化质粒连接,用引物 P1/P2 以 PCR 的方法筛选重组质粒. 结果如 Fig. 3 所示,其中 1、3、5、8 分别是 pFTB226、pFTB186、pFTB70 和 pFTB25 的阳性结果,2、4、6 和 7 是相应的阴性质粒结果.

2.3 突变基因的鉴定

DNA 双脱氧末端终止法测序结果显示,质粒 pFTB25、pFTB70、pFTB186 和 pFTB226 上的 DdsA(十聚异戊二烯焦磷酸合成酶) 编码基因在设计位点上均发生了碱基替换,共获得 19 个变体酶,说明定点突变

实验成功.

3 讨论

定点突变技术用于蛋白质工程已经取得了很多成功的案例,产生了许多性状优良的变体酶.如绿色荧光蛋白 K79R 的变体酶发光强度提高了 1.25 ~ 2.44 倍^[5]. 编码基因突变的效率是成功改造蛋白质的保证.但在实践中发现,传统的重叠延伸突变法涉及到一步无引物的延伸过程,如果左右延伸距离相差太大,会直接导致最终实验的失败.这就使得利用

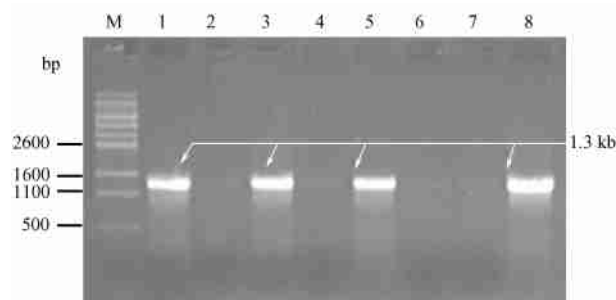


Fig. 3 Electrophoresis identification of pTB25, pTB70, pTB186 and pTB226 by PCR

M:Marker (500, 1 100, 1 600, 2 600, 3 100, 4 100, 5 300, 9 000, 17 000 bp)

1: Positive result of pTB226, 1.3 kb; 2: Negative result of pTB226;
3: Positive result of pTB186, 1.3 kb; 4: Negative result of pTB186;
5: Positive result of pTB70, 1.3 kb; 6: Negative result of pTB70
7: Negative result of pTB25; 8: Positive result of pTB25, 1.3 kb

该方法进行突变实验,突变位点必须位于模板的中间区域.降低了我们获得形状优良变体基因的概率.日本 TaKaRa 公司的 site-directed mutagenesis 是以一步 PCR 法^[6]为基础设计的基因突变试剂盒,但是该试剂盒价格贵,且要求载体与插入的目标 DNA 片段总长度小于 5 kb.限制了 ORF 较长的基因的定点突变.所以利用实验现有的资源,开发一种高效的定点突变技术有利于推进蛋白质工程的发展.

在对大量基因 DNA 序列研究后发现,在全基因范围内存在大量的不完整平末端酶切位点.如 GAT,ATC(不完整 *EcoR* 位点);GTT,AAC(不完整 *Hinc* 位点);CCC,GGG(不完整 *Sma* 位点);AGG,CCT(不完整 *Stu* 位点)等.如果利用分子生物学的方法将这些不完整序列完整化,那么就等于使目的基因分割成两部分,方便了突变工作.我们基于这一想法,利用 PCR 开发了一种新型的基因定点突变方法(Fig. 1).通过实验发现,这种方法可以方便地在 *DdsA* 编码基因的全区域内高效地引入突变.同时,由于在操作过程中直接将突变基因克隆到 T 载体上,可以方便后续工作.

与传统的重叠延伸突变法和突变试剂盒相比,本工作中开发的新型定点突变技术具有以下几个优点:

1) 不受待突变基因上突变点相对位置的影响.由于在 DNA 序列的任意位置上几乎都有各种不完整平末端酶切位点,因此,利用这些序列设计方案可以替换几乎任何位置上感兴趣的核苷酸.

2) 实验过程便于跟踪.传统的重叠延伸突变操作,关键的无引物延伸结果无法在琼脂糖凝胶电泳

上进行观测,这就增大了实验失败的不确定因素. MutanBest 试剂盒也存在相似的问题,只有自身连接成功的变异体才能进行测序检测.而新方法将非突变区和突变区的扩增分离操作,两者可以单独测序鉴定,有利于实验结果的分析.

3) 操作简化,成本降低.与重叠延伸突变相比操作程序得到简化,突变基因可以直接克隆到 pMD18-T 载体上,便于后续鉴定与克隆实验.与 MutanBest 试剂盒相比,无需特殊磷酸化和自身连接试剂,降低了实验成本.

该方法主要局限在于所创造的平头酶切位点不能是待突变基因内部或载体上所存在的序列.值得庆幸的是:一般基因内部可供选择的不完整平头酶切位点种类很多,这就降低了这一方法的受限度.

综上所述,该定点突变技术有利于基因突变在蛋白质工程中的应用.配合计算机预测蛋白质功能,可以生产工业上和医药上所需性状的蛋白质.笔者认为这一方法将丰富基因定点突变的手段,是值得推广的.

参考文献 (References)

- [1] 瞿礼佳,顾红雅,等.现代生物技术导论[M].北京:高等教育出版社 (Qu Li-Jia, Gu Hong-Ya, et al. Introduction to Modern Biotechnology [M]. Beijing: Higher Education Press), 1998: 72-78
- [2] 曹阳,李冬田,尹冰楠,等.重叠延伸 PCR 方法的建立与应用[J].河北医药 (Cao Yang, Li Dong-Tian, Yin Bing-Nan, et al. Establishment and application of overlap-extension PCR [J]. Hebei Med J), 2005, 27(11): 803-804
- [3] Warrens A N, Jones M D, Lechler R I, et al. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest[J]. Gene, 1997, 186(1): 29-35.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M],第 2 版.金冬雁等译.北京:科学出版社,1998 (Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998)
- [5] 周俊初,史巧娟,马立新,等.一个绿色荧光蛋白 K79R 突变 *gfp* 基因的鉴定与表达[J].自然科学进展 (Zhou Jun-Chu, Shi Qiao-Juan, Ma Li-Xin, et al. Identification and expression of a *gfp* K79R mutant of green fluorescent protein [J]. Prog Nat Sci), 2002, 12(7): 648-651
- [6] 曾劲杨,黄家强,李卓娅,等.一种快速简便的缺失突变方法[J].细胞与分子免疫学杂志 (Zeng Jin-Yang, Huang Jia-Qiang, Li Zhuo-Ya, et al. A rapid and simple method of mutagenic deletion [J]. J Cell Mol Immunol), 1998, 14(4): 289-291