

经验交流

用改进的重叠 PCR 引入血管内皮生长因子基因突变

白向阳 吕安国* 吴文芳 孙 静

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016)

牛瑞芳

(天津医科大学肿瘤医院中心实验室, 天津 300060)

摘要 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的 PCR 产物克隆于 T 载体上, 经转化 JM109 感受态菌株后, 随机挑取 8 个白斑菌落, 混合后制成混合模板。采用 3 条引物, 做两轮重叠 PCR 反应, 获得了 VEGF 的突变基因, 经 PCR 鉴定, 酶切鉴定和测序分析表明所得基因为目的产物。实践证明这种突变方法简单快速, 为下一步实验大量引入突变奠定了实验基础。

关键词 点突变, 血管内皮生长因子, 重叠 PCR

学科分类号 Q78

基因突变有很多种方法。重叠 PCR 是常用的一种。Ho 等^[1]早在 1989 年就使用了这一方法实现了对基因的剪切、连接以及突变等工作。1997 年 Warrens 等^[2]对这种突变方法又做了改进, 直到近来这仍是基因突变常用方法之一^[3], 但还有操作复杂的缺点。在实际工作中发现, 由于 PCR 的高度灵敏性, 痕量的原模板污染就会造成突变的失败。由于带突变位点的引物之间的结合能不一定足够低, 使得大量的两侧引物与未突变模板结合。在最终 PCR 产物中未突变的产物占绝大多数, 从而使后继筛选工作不胜其烦。Urban^[4], Xu^[5], Wang^[6], Li^[7]等对这一方法进行了改进, 但是其前期工作也比较繁杂, 有些要用到 *Dpn* I 酶。我们对这些突变方法进行改进, 使其操作更简便, 而且在突变产物中基本排除了原模板扩增物的污染。

血管内皮生长因子对于血管的发生和维持具有重要意义。VEGF 的生物活性与其空间结构的关系研究是当前 VEGF 研究中一个重要领域^[8]。通过在 VEGF 的基因上引入点突变, 改变其蛋白质的一级结构, 即引入氨基酸突变, 可以考察 VEGF 的空间结构与其生物活性的关系。Keyt 等^[9]运用丙氨酸点突变考察了 VEGF 上的重要活性位点, 为其进一步深入理解 VEGF 的作用机理和研制新型人工蛋白打下了基础。我们在这里运用改良的重叠 PCR 法, 对 VEGF 做了突变。实验证明这一方法可行、高效, 为今后进一步在 VEGF 中引入更多的突变位点, 详细考察其生物活性与一级结构乃至高级结构的关系奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Primix Taq 试剂盒, T4 DNA 连接酶, JM109 感受态菌株均购自大连宝生物公司, 引物合成与产物测序由宝生物工程 (大连) 有限公司进行。T 载体由天津医科大学肿瘤医院中心实验室牛瑞芳主任惠赠。引物 1 (P1): GTT GTA AAA CGA CGA CCA GTG A; 引物 2 (P2): AGC CAG GCC AGC AGC ATT GCA GCA GC; 引物 3 (P3): GCT GCT GGC CTG GCT TGT GTG C。阴影部分是互补区, 下划线部分是引入的突变点。

1.2 方法

1.2.1 突变模板的制备: 取 VEGF 的 PCR 产物做加尾反应, PCR 加尾产物与 T 载体连接。连接产物转化 JM109 感受态菌株, 铺于 IPTG-Xgal-Amp⁺ LB 琼脂平板上, 37℃ 培养过夜。随机挑取 8 个白色菌落, 悬浮于 100 μ l 无菌 milli Q 水中。振荡混匀, 100℃ 加热 10 min。取 10 μ l 混合物加水 90 μ l, 做 10 倍稀释。此稀释物命名为混合模板。

1.2.2 突变反应: 依以下条件做 PCR 反应。VEGF N 端编码基因突变物的合成: 混合模板 1 μ l, P1 1 μ l, P2 1 μ l, Primix 25 μ l, 双蒸水 22 μ l。分装 12.5 μ l/管。做梯度 PCR 反应, 退火温度依次

* 通讯联系人。

Tel: 024-83970384, E-mail: bxy31@yahoo.com

收稿日期: 2003-06-30, 接受日期: 2003-08-28

设定为 43℃, 48℃, 53℃. VEGF C 端编码基因突变物的合成: 混合模板 1 μl, P1 1 μl, P3 1 μl, Primix 25 μl, 双蒸水 22 μl. 分装 12.5 μl/管. 做梯度 PCR 反应, 退火温度依次设定为 43℃, 48℃, 53℃. VEGF 突变物的合成: VEGF N 端编码基因突变物 0.5 μl, VEGF C 端编码基因突变物 0.5 μl, P1 1 μl, Primix 25 μl, 双蒸水 23 μl, 做梯度 PCR 反应, 退火温度依次设定为 41.3℃, 45.4℃, 48.0℃, 50.7℃, 56℃.

1.2.3 VEGF 突变物的鉴定: PCR 产物走 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切取目的条带 (700 bp), 用引物 P1-P2, P1-P3 做 PCR 鉴定. P1-P2, P1-P3 PCR 产物做酶切分析. VEGF 突变物做序列测定.

2 结 果

2.1 VEGF N 端和 C 端编码基因突变物 PCR 结果

如图 1 所示, 可以看到扩增出的带突变位点的 VEGF N 端编码基因端大小约为 317 bp, 扩增出的带突变位点的 VEGF C 端编码基因端大小约为 421 bp, 与预期基因片段大小一致.

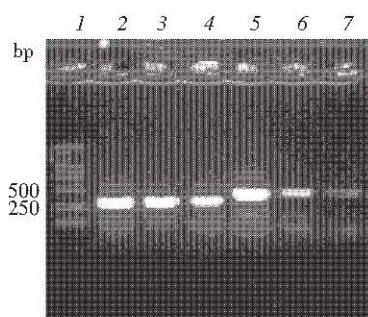


Fig. 1 The PCR production of VEGF N-terminal and C-terminal encoding gene amplified in different annealing temperatures

1: DL2000 marker; 2 ~ 4: production of VEGF N-terminal encoding gene annealing in 43℃, 48℃, 53℃; 5 ~ 7: production of VEGF C-terminal encoding gene annealing in 43℃, 48℃, 53℃.

2.2 VEGF 突变物最终 PCR 扩增结果

如图 2 所示, 图 2 可以看到在 700 bp 左右有一条目的产物带.

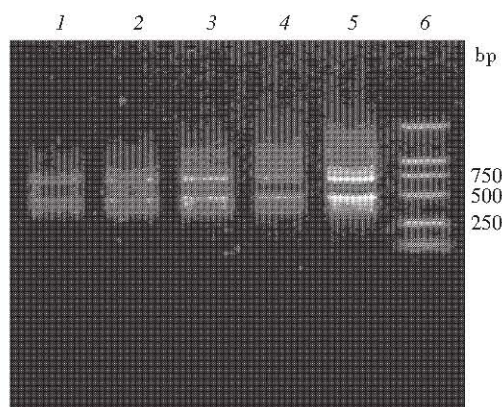


Fig. 2 The PCR production of VEGF mutation annealing in different temperature

1 ~ 5: the production of VEGF annealing in 56℃, 50.7℃, 48.0℃, 45.4℃, 41.3℃; 6: DL2000 marker.

2.3 VEGF 突变物的鉴定

VEGF 突变物做 PCR 鉴定, 可以检出大小为 317 bp 的 P1-P2 产物, 421 bp 的 P1-P3 产物. VEGF 突变物做 *EcoR* I 酶切鉴定, 可把 VEGF N 端编码基因切成 21 bp, 91 bp, 205 bp 3 个片段. C 端编码基因切成 21 bp, 91 bp, 209 bp 3 个片段. 终末突变物切成 21 bp, 91 bp, 495 bp 3 个片段. VEGF 突变物测序结果表明突变位点已成功引入 (图 3). 引入的两端反向序列和引入的突变位点以黑体加下划线表示. P1 引物对应处以阴影加框标于突变物序列上. P2, P3 引物对应处加框标于原模板上, 阴影部为 P2, P3 引物重叠部分.

3 讨 论

我们用 T 载体做突变载体. 因为 T 载体可以直接与 PCR 产物连接, 省去了繁琐的酶切连接步骤, 其总体操作与常见的突变载体相比要便捷许多. 另外带 VEGF 片段的连接物可以方便地通过蓝白斑筛选鉴定. 随机挑取几个白斑菌落使用简单的煮沸法即可有效地获取突变用的模板. 由于 T 载体只有一个突出的 T 端与 PCR 产物的 A 端互补, 所以其插入产物不具有方向性. 正向反向的插入片段都有. 随机挑取一个白色转化菌落, 其中含有正向插入片段的概率是 1/2, 其中含有反向插入片段的概率也是 1/2. 所以随机挑取 n 个菌落, 所得的

GTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCGTAATACGACTCACTATAGG
 Sequence corresponding to primer 1
GCGACATATGATCGATGATATCCCATGGGCGGCCGCTGCAGACCAGGTCTTAGAATTCA
CATGAATTCACATATGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAATCATCACGAAGTGGTGAAGTTCATG
 GATGTCTATCAGCGCAGCTACTGCCATCCAATCGAGACCCTGGTGGACATCTTCCAGGAGT
 ACCCTGATGAGATCGAGTACATCTTCAAGCCATCCTGTGTGCCCTGATGCGATGCGGGGG
 CTGCTGCAATG**CTGCTGGCCTGGCT**TGTGTGC CCACCTGAGGAGTCCAACATCACCATGCAG
 Sequence that primer 2 will annealing with Primer 3
 ATTATGCGGATCAAACCTCACCAAGGCCAGCACATAGGAGAGATGAGCTTCTCTACAGCACAA
 CAAATGTGAATGCAGACCAAAGAAAGATAGAGCAAGACAAGAAAATCCCTGTGGGCCTTGCT
 CAGAGCGGAGAAAGCATTGTGTTGTACAAGATCCGCAGACGTGTAAATGTTCTGCAAAAAC
 ACAGACTCGCGTTGCAAGGCGAGGCAGCTTGAGTTAAACGAACGTACTTGCAGATGTGACA
 AGCCGAGGCGTGAATTC**TGAATTCTAAGACCTGGTCTGCAGGCGGCCGCCCATGGGATA**
TCATCGATCATATGTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGGTACCGAGCTCGAATTCACTG
GCCGTCGTTTACAAC
 Nucleotides that primer 1
 will annealing with

Fig. 3 The proved sequence of mutant in VEGF

The two reverse oriented sequences, which were added to the both terminals of VEGF gene, are underlined and printed in bold. The sequences identical to or complementary with those primers are boxed and shaded. The shaded region in line six represents the overlap between primer 2 and primer 3.

菌株中只含有正向, 或只含有反向插入片段的概率为 $(1/2)^n$. 而包含两个方向插入片段的概率为 $1 \times (1/2)^n \sim 2 \times (1/2)^n$. 此处用 8 个菌落混匀制成混合模板, 一次实验成功获得两个方向插入片段的概率为 $1 \times (1/2)^n \sim 2 \times (1/2)^8$, 约为 99%. 投入 P1 和 P2 引物后, 只有正向插入的 VEGF N 端编码基因夹在两个引物中间被扩增出来, 而反向插入的 VEGF 不能被扩增. 当投入 P1 和 P3 引物后, 只有反向插入的 VEGF C 端编码基因端夹在两个引物中间被扩增出来, 而正向插入的 VEGF 不能被扩增. 将 P1-P2 PCR 产物和 P1-P3 PCR 产物混合到一起, 变性并退火, 这两个片段的互补部分相互退火, PCR 条件下延伸形成一条两端带反向 T 载体片段的 VEGF 突变物. 由于 P1 引物的互补片段在 T 载体的片段上, 因此投入 P1 引物进行扩增时只有突变片段的退火产物可以被扩增出来. 而留在反应体系中的原模板由于两端不带突变时引入的反向 T 载体片段, 这就有效地排除了原模板污染对后期工作的不利影响, 提高了工作效率 (图 4).

本实验采用两步法 PCR 引入突变位点, 与一步法相比似乎更麻烦, 但实际上由于第一次 PCR 反应中的产物无需纯化, 只需取 1 μ l 做为底物加入第二步 PCR 反应体系即可, 所以操作并不复杂. 而且第一步 PCR 产物的剩余部分可以用做电泳分析, 在扩增失败时可以一步步查找原因, 反倒比一步法更可靠.

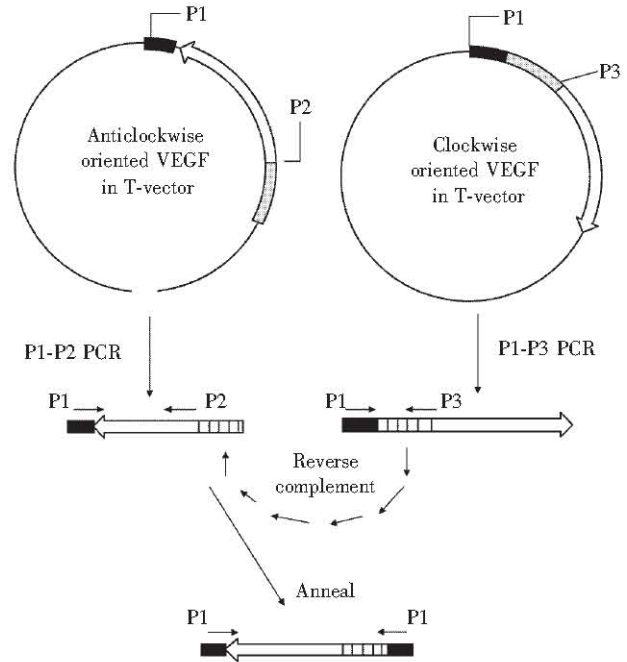


Fig. 4 The mutagenesis of VEGF

实验中还发现, P2, P3 引物的设计十分重要. P2, P3 之间的结合自由能越低, 则其退火温度越高, 退火越容易, 退火产物的特异性越强, 相反, P2, P3 之间的结合自由能越高, 则其退火温度越低, 越不利于长引物退火时形成有效的互补产物. 在图 1 中可以看出 VEGF N 端编码基因基本不受实验所设不同退火温度的影响, 而 C 端编码基因突

变物 PCR 扩增结果受退火温度变动的的影响很大, VEGF 最终突变物受 PCR 退火条件的的影响也很大, 在低温退火时, 产物量大一点但是杂带明显增多. 高温退火时杂带减少, 但产量也下降. 这可能是由于 P3 的结合自由能较高所致. 如果改进 P2, P3 设计, 提高 P2, P3 之间的结合能, 则 PCR 情况会更好些. 同时, 在实验中还发现, 用完全互补的引物, 即 P2, P3 的阴影部分也可以完成突变, 这意味着可以直接在要引入突变的部位选取一段 DNA 序列, 以其正负链做为引物, 虽然这样做会使扩增效率有所下降, 但可使引物的设计更简便.

总之, 本实验在 VEGF 基因中一次引入了 6 个突变点, 说明这种方法引入突变的能力还是很强的. 这种方法操作简便, 不受原始模板污染的影响, 为今后进一步实验打下了基础.

参 考 文 献

1 Ho S N, Hunt H D, Horton R M, *et al.* Site directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*,

1989, **77** (1): 51 ~ 59

- 2 Warrens A N, Jones M D, Lechler R I. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene*, 1997, **20**; **186** (1): 29 ~ 35
- 3 Jeltsch A, Lanio T. Site-directed mutagenesis by polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*, 2002, **182** (1): 85 ~ 94
- 4 Urban A, Neukirchen S, Jaeger K E. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acid Res*, 1997, **25** (11): 2227 ~ 2228
- 5 Xu W, Zhang Y, Yeh L Y, *et al.* One-step, highly efficient site-directed mutagenesis by toxic protein selection. *Biotechniques*, 2002, **32** (6): 1266 ~ 1270
- 6 Wang W, Malcolm B A. Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis. *Methods Mol Biol*, 2002, **182** (1): 37 ~ 43
- 7 Li F, Mullins J I. Site-directed mutagenesis facilitated by Dpn I selection on hemimethylated DNA. *Methods Mol Biol*, 2002, **182** (1): 19 ~ 27
- 8 Goodsell D S. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Oncologist*, 2002, **7** (6): 569 ~ 570
- 9 Keyt B A, Nguyen H V, Berieau L T, *et al.* Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. *J Biol Chem*, 1996, **271** (10): 5638 ~ 5646

Site-Directed Mutagenesis of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by An Improved Overlap PCR

BAI Xiang-Yang, LÜ An-Guo*, WU Wen-Fang, SUN Jing

(Shenyang Institute of Applied Ecology, The Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

NIU Rui-Fang

(Oncology Central Laboratory Cancer Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

Abstract The PCR production of vascular endothelial growth factor (VEGF) was subcloned into a T-vector, and the recombined plasmids were then transformed into competent cell JM109. Eight white clones were selected randomly, and the recombined plasmids were extracted and mixed as template. Three selected primers were adapted and two rounds of PCR were performed to introduce mutations. The production of those were confirmed by enzyme digestion, PCR amplification and sequencing. The method is proved to be a simple, quick and easy way to introduce site-directed mutagenesis, and make latter work easy to do.

Key words site-directed mutagenesis, vascular endothelial grow factor, overlap-PCR

* Corresponding author. Tel: 86-24-83970384, E-mail: bxy31@yahoo.com

Received: June 30, 2003 Accepted: August 28, 2003