

一种快速构建基因多个点突变体方法的建立*

陈立涵** 李玮妮** 张浩** 程龙 叶棋浓***

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘要 蛋白质内部多个位点的翻译后修饰在基因的功能调节过程中发挥重要作用, 基因的点突变体在其结构和功能研究中发挥非常关键的作用, 因此, 高效、快速构建基因的多个点突变体在基因的功能研究中意义重大. 本研究在建立了对目的基因进行高效准确的单点突变方法的基础上, 以 SRrp53 点突变体的构建为例, 设计了新型的以反向 PCR 为基础的多个点突变的实验流程, 获得的多位点突变体质粒经测序后均与预期相符, 将测序正确的多位点突变体质粒转染 293T 细胞后, 均表达了分子质量正确的蛋白质. 以上结果表明, 该实验设计方案能够高效、方便地用于基因多个点突变体的构建, 为进一步研究它们的分子功能打下了基础.

关键词 反向 PCR, SRrp53, 多位点突变

学科分类号 Q52

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00601

蛋白质的翻译后修饰在基因功能的调节过程中发挥非常关键的作用, 研究表明, 蛋白质分子能够发生多种形式的修饰, 如磷酸化^[1]、甲基化^[2]、乙酰化^[3]、泛素化^[4]、类泛素化^[5]等共价修饰, 而每一种修饰可能发生在不同位点的相同氨基酸残基上, 不同位点的同种类型修饰又会产生不同的生物学效应^[6-7], 因此, 通过对目的基因进行多位点的点突变, 以确定其修饰的位置及其相应生物学意义, 是基因功能研究的必要手段. 我们曾建立了高效构建基因单点突变体的方法, 很大程度地提高了单点突变的速度和准确度^[8], 但是, 如何建立快速对基因进行多点突变的方法, 成为一个绕不开的难题.

为此, 我们设计了一个用于在目的基因内部快速构建多位点突变的方法(图 1): 首先将待突变的所有正、反向引物进行磷酸化, 再以含野生型目的基因 cDNA 的质粒为模板, 用其中的一对正反向引物进行反向 PCR 反应. PCR 产物经 *Dpn* I 处理 1 h 后, 进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 切下目的条带用胶回收试剂盒进行回收, 将回收产物用 *dam* 甲

基化酶处理后进行自身连接. 随后以连接后的 PCR 产物为模板, 用另一对磷酸化的引物进行第二轮的反向 PCR 反应, 反应结束后将 PCR 产物分别经 *Dpn* I 处理、胶回收、连接和回收, 再以之为模板进行下一轮反向 PCR 反应. 反应产物经上述同样方法处理后再进行后续 PCR 反应, 直至所需突变位点全部突变完毕. 将最后的反向 PCR 产物进行 *Dpn* I 处理、胶回收、连接并转化大肠杆菌 DH5 α . 提取质粒进行序列分析后, 将发生全部正确突变的质粒转染 293T 细胞进行蛋白质表达鉴定. 本研究旨在建立高效、快速的构建基因多位点点突变体方法.

* 北京市自然科学基金(7112101)和国家重点基础研究发展计划(973)(2011CB504200)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 010-66931830

叶棋浓. E-mail: Yeqn66@yahoo.com

张浩. E-mail: zhanghal197@hotmail.com

收稿日期: 2012-12-18, 接受日期: 2013-05-15

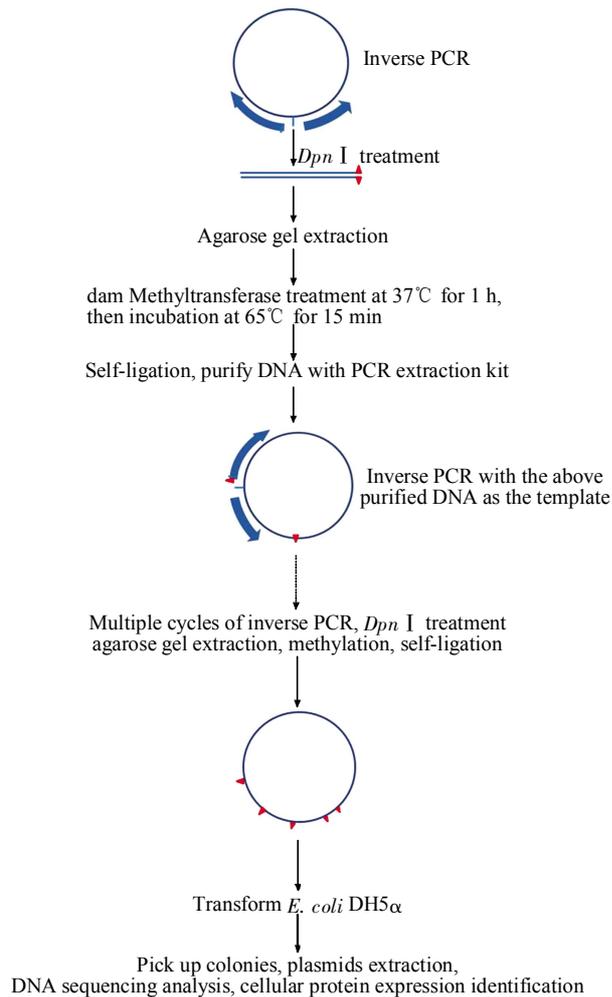


Fig. 1 Novel strategy for rapidly generating multiple-site mutations

1 材料与方法

1.1 材料

人肾细胞 293T、大肠杆菌 DH5 α 、真核表达质粒 pcDNA3-FLAG 由本室保存; T4 多聚核苷酸激酶、DNA 聚合酶 LA Taq、T4 DNA 连接酶、*Dpn* I 购自 TaKaRa 公司; 用于点突变的高保真 DNA 聚合酶 PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase 购自 STRATAGENE 公司; dam 甲基转移酶、S-腺苷甲硫氨酸为 BioLabs 公司产品; 胶回收试剂盒、PCR 回收试剂盒为 Promega 公司产品; 脂质体转染试剂、Western blot 发光检测试剂盒购自威格拉斯生物技术有限公司; HRP 标记的 FLAG 抗体购自 Sigma 公司。

1.2 SRrp53 编码区 cDNA 引物序列的设计及 pcDNA3FLAG-SRrp53 表达载体的构建

根据 NCBI 公布的人源 SRrp53 的 cDNA 编码区序列, 设计一对如下引物: 正向引物, 5' CGC-GGATCCATGGGACGTCGGTCATC 3'; 反向引物, 5' CCGGATCCTTAGGCCACAGGACTGCC 3'.

在正向引物与反向引物的 5' 端分别加入 *Bam*H I 及 *Eco*R I 位点. 将用 *Bam*H I 与 *Eco*R I 双酶切后的 pcDNA3-FLAG 载体片段与用相同双酶切后的 SRrp53 cDNA 片段用 T4 连接酶连接过夜, 连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 随即挑取 3 个克隆于 5 ml LB 培养基培养 6 h 后, 菌液 PCR(所用引物为前述正向及反向引物)筛选阳性克隆, 转接 1 管阳性菌液 5 μ l 于 5 ml LB 中过夜培养, 提取质粒并分别用 T7 和 SP6 引物进行测序.

1.3 SRrp53 类泛素化修饰位点的预测

在 NCBI 公布的 GeneBank 数据库中找到其编码的蛋白质氨基酸序列 (GeneBank 号为 NM_016625.2), 运用软件 SUMOplot (<http://www.abgent.com/tools/sumoplot>) 进行类泛素化修饰位点的预测.

1.4 SRrp53 K196R、K171R、K163R、K146R、K309R 点突变体引物的设计

根据 NCBI 公布的人源 SRrp53 cDNA 编码区的碱基序列和对应的氨基酸序列设计如下引物.

a. 用于 K196R 点突变的反向及正向引物:

```
189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204
CTG GTT CTT GAA GCT GCT GCA AAA GCT GAT GAA GCA TTG AAA GCC AAA
      ← 反向引物                                正向引物 →
```

K196F 正向引物: 5' GCTGATGAAGCATTG-AAAGC 3'; K196R 反向引物: 5' TCTTGCAGCA-GCTTCAAGAAC 3'.

其中, 在反向引物的 5' 端加入 TCT 3 个碱基, 这 3 个碱基编码精氨酸, 以替代第 196 位的赖氨酸密码子.

b. 用于 K171R 点突变的反向及正向引物:

```
163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179
AAA CGT GGG GAA TCT GGA AAC ATC AAA GCT GGA TTA GAA CAT CTG CCA CCA
      ← 反向引物                                正向引物 →
```

K171F 正向引物: 5' GCTGGATTAGAACATCTGCC 3'; K171R 反向引物: 5' TCTGATGTTTCCAGATTCCCCAC 3'

其中, 在反向引物的 5'端加入 TCT 3 个碱基, 这 3 个碱基编码精氨酸, 以替代第 171 位的赖氨酸密码子.

c. 用于 K163R 点突变的反向及正向引物:

```
155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171
AAG GAC AAG GAA TTA CAT AAC ATC AAA CGT GGG GAA TCT GGA AAC ATC AAA
      ←反向引物                    正向引物→
```

K163F 正向引物: 5' CGTGGGGAATCTGGAAAC-AT 3'; K163R 反向引物: 5' TCTGATGTTATGT-AATTCCTTGTC 3'

其中, 在反向引物的 5'端加入 TCT 3 个碱基, 这 3 个碱基编码精氨酸, 以替代第 163 位的赖氨酸密码子.

d. 用于 K146R 点突变的反向及正向引物:

```
138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154
CGA CGT AAG GGC AGA GAT AAA GAG AAA AGA GAA AAG GAG AAG GAT AAA GGG
      ←反向引物                    正向引物→
```

K146F 正向引物: 5' AGAGAAAAGGAGAAGGA-TAAAG 3'; K146R 反向引物: 5' TCTCTCTTTA-TCTCTGCCCTTAC 3'

其中, 在反向引物的 5'端加入 TCT 3 个碱基, 这 3 个碱基编码精氨酸, 以替代第 146 位的赖氨酸密码子.

e. 用于 K309R 点突变的反向及正向引物:

```
301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317
GCC CAT CCA AAT TTA TTT ATC GAG AAA GCT GAT GCT GAG GAA AAA TGG TTC
      ←反向引物                    正向引物→
```

K309F 正向引物: 5' GCTGATGCTGAGGAAAA-ATG 3'; K309R 反向引物: 5' TCTCTCGATAAA-TAAATTTGGATGG 3'

其中, 在反向引物的 5'端加入 TCT 3 个碱基, 这 3 个碱基编码精氨酸, 以替代第 309 位的赖氨酸密码子.

1.5 SRrp53 K196R、K171R、K163R、K146R、K309R 5 个点突变的构建

以 pcDNA3FLAG-SRrp53 质粒为模板 (20 ng), 用 STRATAGENE 公司的高保真 DNA 聚合酶

PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase 以及上述引物进行反向 PCR 反应, 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min, 然后以 94℃ 变性 15 s、56℃ 退火 15 s、72℃ 延伸 2.5 min, 进行 30 个循环, 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保温.

第一轮 PCR 反应结束后, 将 PCR 产物用 *Dpn* I 于 37℃ 处理 1 h, 随后进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 切下特异性 PCR 片段 (6.5K), 用胶回收试剂盒进行回收, 将回收产物用 *dam* 甲基转移酶于 37℃ 处理 1 h, 65℃ 灭活 15 min, 再将甲基化的产物用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 连接 4 h, 用 PCR 回收试剂盒将连接产物进行直接回收, 取 4 μl 作为模板进行下一轮 PCR 反应 (PCR 反应的顺序是根据网上预测各位点发生修饰的分值高低从高到低进行的, 预测分值的高低参见 2.3), 随后对 PCR 产物分别进行 *Dpn* I 处理、切胶回收、*dam* 甲基化酶处理、连接、PCR 产物试剂盒回收等步骤, 进而再进行下一轮 PCR 反应, 至最后一轮后, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5α, 挑取 10 个克隆提取质粒, 分别用 T7 和 SP6 引物进行 DNA 测序反应.

1.6 转染哺乳动物细胞

293T 细胞用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基培养, 转染前一天, 细胞接种于 12 孔板中, 分别转染表达野生型以及突变体的质粒 2 μg, 转染 6 h 后用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液换液.

1.7 细胞裂解及蛋白质印迹分析

细胞转染 36 h 后用 1 ml PBS 吹下, 3 000 r/min 离心 3 min, 在细胞沉淀中加入 100 μl RIPA 缓冲液裂解, 取 15 μl 裂解上清加入 15 μl 2×SDS 加样缓冲液, 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 3 min, 取 15 μl 上清液进行 SDS-PAGE, 电泳结束后转移至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入 HRP 标记的 FLAG 抗体室温孵育 1 h, 1×TBST 洗膜 3 次, 每次 7 min, 用化学发光法显色 5 min, 压片显影.

2 结 果

2.1 SRrp53 编码区 cDNA 的扩增

以人乳腺 cDNA 为模板, 运用一对针对 SRrp53 编码区 cDNA 的引物扩增出了特异性的长度为 1 000 bp 的条带, 结果与预期相符 (图 2).

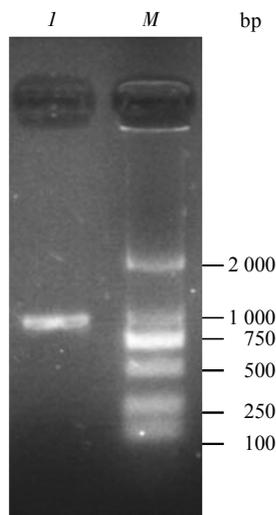


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of SRrp53 cDNA PCR product

M: 2 000 bp DNA marker; I: PCR product of SRrp53 cDNA.

测序, 经序列分析发现 SRrp53 cDNA 正确, 克隆至表达载体 pcDNA3-FLAG 中(结果略).

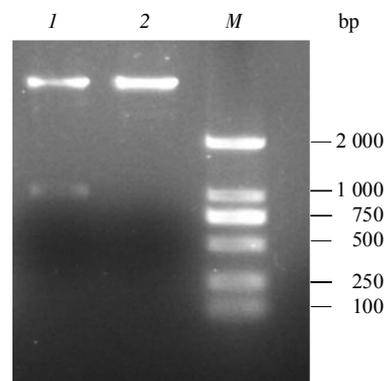


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of pcDNAFLAG-SRrp53 digested with double restriction endonuclease

M: 2 000 bp DNA marker; I: pcDNAFLAG-SRrp53 plasmid digested with *EcoR* I + *BamH* I; 2: pcDNA-FLAG plasmid digested with *EcoR* I + *BamH* I.

2.2 pcDNA3FLAG-SRrp53 表达载体的构建

将 SRrp53 cDNA PCR 产物用 *EcoR* I 与 *BamH* I 双酶切, 与经同样双酶切处理后的 pcDNA3-FLAG 载体片段连接后并转化大肠杆菌 DH5 α , 经菌落 PCR 获得阳性克隆后提取质粒进行双酶切鉴定(图 3), 阳性克隆质粒分别用 T7 和 SP6 引物进行

2.3 SRrp53 类泛素化修饰位点的预测

通过软件 SUMOplot(<http://www.abgent.com/tools/sumoplot>)对 SRrp53 进行类泛素化修饰位点的预测, 发现在第 196、171、163、146 和第 309 位赖氨酸残基发生类泛素化修饰的可能性比较高(图 4).

```

1 MGRSSDTEE ESRKRKKKH RRRSSSSSS DSRTYSRKKG GRKSRKSR
51 WSRDLQPRSH SYDRRRRHRS SSSSYGSRR KRSRSRGR GKSYRVQRSR
101 SKSRTRRSRS RPRLRSHSRS SERSSHRTR SRSRDRERR GRDKEKREKE
151 KDKGDKELH NIKRGESGNI KAGLEHLPPA EQAKARLQLV LEAAKADEA
201 LKAKERNEEE AKRRKEEDQA TLVEQVKRVK EIEAIESDSF VQQTFRSSKE
251 VKKSVPESEV KQATSTSGPA SAVADPPSTE KEIDPTSIPT AIKYQDNSL
301 AHPNLFIEKA DAEKWFKRL IALRQERLMG SPVA
  
```

X Motifs with high probability

~~X~~ Motifs with low probability

~~X~~ Overlapping Motifs

No.	Pos.	Group	Score
1	K196	VLEAA <u>AKAD</u> EALKA	0.79
2	K171	GESGN <u>IKAG</u> LEHLP	0.77
3	K163	KELHN <u>IKRG</u> ESGNI	0.77
4	K146	KGRDK <u>EKRE</u> KEKDK	0.50
5	K309	PNLFI <u>EKAD</u> AEEKW	0.50
6	K215	EAKR <u>RKEE</u> DQATL	0.44
7	K39	RTYSR <u>KKGG</u> RKSRS	0.31
8	K38	SRTYS <u>RKKG</u> GRKSR	0.27
9	K315	KADAE <u>EKWF</u> RKLIA	0.15

Fig. 4 Prediction of SRrp53 sumoylation sites with online SUMOplot software

2.4 反向 PCR 扩增 SRrp53 K196R、K171R、K163R、K146R、K309R 5 个点突变的表达载体

根据预测的 SRrp53 分子中发生类泛素化位点分值的高低, 分别设计产生 K196R、K171R、K163R、K146R、K309R 5 个点突变的正向和反向

引物, 依序进行 5 轮反向 PCR 反应, 每次 PCR 反应都以上次 PCR 反应的连接产物为模板, 分别将这些 PCR 产物进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 结果表明, 反向 PCR 扩增产物在 6 500 bp 处有特异的电泳条带(图 5), 与预期结果相符.

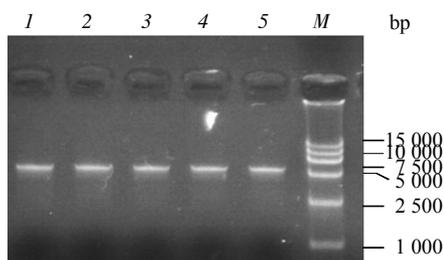


Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of inverse PCR product of pcDNAFLAG-SRrp53 at different runs

M: 15 000 bp DNA marker; 1~5: Inverse PCR product of pcDNAFLAG-SRrp53 plasmid from 1st to 5th run.

2.5 SRrp53 K196R、K171R、K163R、K146R、K309R 点突变体质粒的测序结果

将第五轮 PCR 反应产物连接后转化大肠杆菌 DH5 α ，挑取 10 个克隆提取质粒，分别用 T7 和 Sp6 引物进行 DNA 测序反应(第 196、171、163、146 位突变用 T7 引物检测，第 309 位突变用 Sp6 引物检测)，其中有 9 个质粒均将第 196、171、163、146、309 5 个位点的赖氨酸成功突变为精氨酸(图 6)。

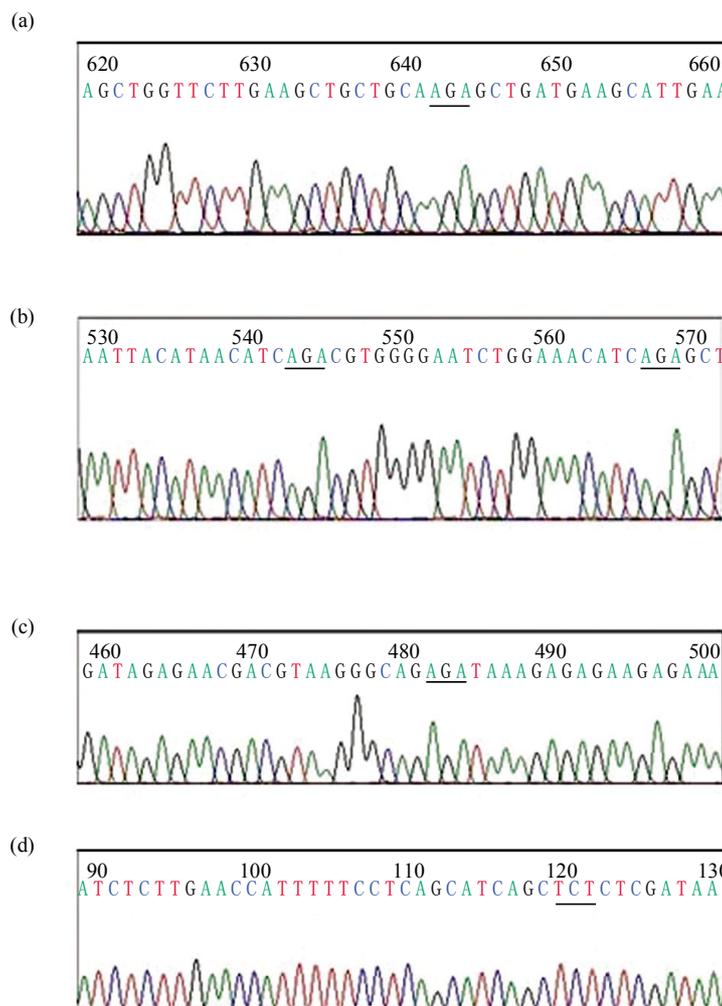


Fig. 6 DNA sequencing results of SRrp53 K196R, K171R, K163R, K146R, K309R mutant (a)~(d) Containing K196R、K171R+K163R、K146R and K309R mutant codon (underlined) respectively.

2.6 SRrp53 K196R、K171R、K163R、K146R、K309R 点突变体质粒在细胞内的表达

将表达 SRrp53 野生型及其 9 个点突变体的表

达质粒(9 个克隆)转染 293T 细胞，36 h 后裂解细胞，进行 SDS-PAGE，用 HRP 标记的 FLAG 抗体进行 Western blot 反应，结果见图 7，这些突变体

质粒在细胞内均表达了分子质量为 50 ku 的蛋白, 与野生型质粒表达蛋白的分子质量一致。

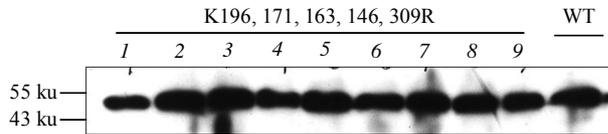


Fig. 7 Transient expression of SRrp53 wt and K196R, K171R, K163R, K146R, K309R mutants in 293T cells

3 讨 论

本方法是在运用反向 PCR 原理高效构建基因单点突变体的基础上设计的用于快速构建基因多位点突变的新方法。本方法基本思路是将反向 PCR 产物进行连接后, 再以为之模板依次用下一对突变引物进行反向 PCR 反应, 待所有 PCR 结束后, 将 PCR 产物进行连接、转化、序列分析、表达鉴定。但是由于第一轮 PCR 产物模板进行第二轮反向 PCR 后, 会污染第三轮反向 PCR (该轮反应只需要第二轮 PCR 产物作为模板), 而且在最后转化大肠杆菌 DH5 α 的过程中, 最后一轮反向 PCR 之前的所有 PCR 产物都会造成假阳性, 为此, 我们又对实验进行了优化: 第一轮 PCR 产物在连接之前先用 dam 甲基化酶处理使其发生甲基化, 再进行连接, 第二轮 PCR 反应结束后, 将 PCR 产物用 *Dpn* I 处理, 这样就可以将第一轮的 PCR 产物降解掉 (*Dpn* I 只消化发生 dam 甲基化的模板序列, 而在体外进行的 PCR 产物由于没有发生甲基化, 所以不受 *Dpn* I 的影响), 经 DNA 琼脂糖凝胶电泳后切下特异的目的 PCR 产物片段, 用胶回收试剂盒回收后就得到了纯净的片段, 同样, 第二轮 PCR 产物在连接之前也用 dam 甲基化酶处理, 余下类推, 这样就消除了第一轮或者后续 PCR 产物对下一轮 PCR 反应的污染, 以及最后一轮 PCR 反应之前的所有连接的 PCR 产物模板在转化大肠杆菌时的污染, 显著降低了实验的假阳性。本实验中, 随机挑取 10 个克隆提取质粒, 进行序列分析后发现 9 个克隆发生了正确的突变, 而且在 293T 细胞中均表达了分子质量正确的目的蛋白。

构建基因多位点突变的常规方法是首先对基因进行单点突变, 在确定单位点突变体序列正确和其编码的蛋白能够表达的基础上, 再进行下一轮突

变。这需要先对前一轮的点突变体进行序列测定, 再通过将该点突变体质粒瞬时转染真核细胞以鉴定其编码的蛋白能否表达 (目的基因的 cDNA 序列虽然正确, 但在真核细胞内不能表达的情况在分子克隆中常常发生, 这是由于虽然目的基因的 cDNA 序列正确, 但是影响 cDNA 转录或者翻译的序列在基因克隆过程中发生了突变, 最终影响目的基因的转录或者翻译) 才能进行下一个位点的突变, 如果顺利, 这需要一周时间, 这样, 构建 5 个点突变体则需要一个多月时间。而运用我们设计的实验流程在一周内可同时获得 5 个点突变, 这对于蛋白质修饰位点的快速确定和其功能的研究将发挥很大的推动作用。该方法另一个优势是先根据生物信息学分析基因的潜在修饰位点后, 首先快速将这些位点全部突变, 检测该多个位点突变的蛋白质修饰水平是否发生改变, 从而确定能够发生修饰的氨基酸位点的范围, 而后再依次减少突变位点 (只需要将相应的反向 PCR 连接产物转化, 经测序和蛋白质表达鉴定即可), 最终确定发生修饰的氨基酸位点 (可能是单位点或者多位点), 从而减少工作量并节约成本和时间。

本研究对基因的多位点突变主要是针对距离较远的碱基而言, 如果待突变的碱基距离较近, 可以在同一条正向或反向引物中设计含多个突变的序列, 再进行反向 PCR 等后续步骤, 这样经过一次反向 PCR 流程可以产生多个点突变。

SRrp53 是我们通过酵母双杂交筛选出的参与雌激素信号通路调节的基因, 有关该基因的功能研究较少, 目前只有一篇文章报道该分子可能参与了 RNA 的剪切和加工过程^[9]。因此, 我们又以该分子为诱饵进行酵母双杂交实验, 发现了 UBC9、PIAS1/3 等与之相互作用的分子, 提示该分子可能发生类泛素化修饰, 随后的实验也确证了这种共价修饰 (另文发表)。通过在线 sumoplot 软件进行预测, 发现该分子中第 196、171、163、146、309 位发生类泛素化修饰的可能性很大, 我们曾对这些位点分别进行了点突变, 但是它们均不影响 SRrp53 的类泛素化修饰水平, 考虑到 AKT、PRLR 等分子内部发生很多位点的磷酸化、乙酰化等蛋白质修饰^[6,7], 提示该分子的类泛素化修饰有可能是多位点的。为此, 我们设计并成功地在一周内完成了对 5 个位点的全部突变, 为后续研究打下了很好的基础。

参 考 文 献

- [1] Gwinn D M, Shackelford D B, Egan D F, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 2008, **30**(2): 214-226
- [2] Mowen K A, Tang J, Zhu W, *et al.* Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α / β -induced transcription cell. *Cell*, 2001, **104**(5): 731- 741
- [3] Yuan Z L, Guan Y J, Chatterjee D, *et al.* Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*, 2005, **307**(5707): 269-273
- [4] Conaway R C, Brower C S, Conaway J W. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science*, 2002, **296** (5571): 1254-1258
- [5] Gareau J R, Lima C D. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, **11**(12): 861-871
- [6] Ma L, Gao J, Guan Y, *et al.* Acetylation modulates prolactin receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107** (45): 19314- 19319
- [7] Conus N M, Hannan K M, Cristiano B E, *et al.* Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase. *J Biol Chem*, 2002, **277**(41): 38021-38028
- [8] Cheng L, Han B, Hou S, *et al.* Site-directed mutagenesis by novel inverse PCR strategy. *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38** (4): 378-382
- [9] Cazalla D, Newton K, Caceres J F. A novel SR-related protein is required for the second step of Pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(8): 2969-2980

A Novel Method for Rapid Generation of Multiple-site Mutations Within a Target Gene*

CHEN Li-Han**, LI Wei-Ni**, ZHANG Hao**, CHENG Long, YE Qi-Nong***

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Protein post-translational modifications play very important roles in the regulation of gene functions and successful site-directed mutagenesis is vital to determine a protein's modification sites and hence, to define its structure and function. Yet, researches are always confronted with the problem on how to generate multiple-site mutations of a target gene rapidly. In this study, a novel strategy to generate multiple-site mutations was developed based on accurate single site mutagenesis with SRrp53 as an example. Firstly, the entire SRrp53 coding sequence was amplified from the human breast cDNA library and then cloned into the expression vector pcDNA3-FLAG. Five sets of primers for K196R, K171R, K163R, K146R and K309R mutations were synthesized and were then phosphorylated at their 5' terminus. In the next step, the first run of inverse PCR was performed with one specific set of phosphorylated primers. Further, the PCR products were subjected to *Dpn I* treatment, agarose gel purification, dam methyltransferase treatment, self-ligation and purification with PCR extraction kit. Afterwards, the second run of inverse PCR was performed and the PCR products were treated as above protocol. The second processed PCR products were then used as the template for the third run of inverse PCR. The exact run times of inverse PCR are according to the number of mutation sites that you wanted. The PCR products of the last run were treated with *Dpn I*, purified with agarose gel extract kit, self-ligated and were transformed into DH5 α . Ten colonies were randomly picked up for plasmids extraction and DNA sequencing. The expression of both the SRrp53 wild type and five-site mutants was analyzed by transfection of these plasmids into 293T cells. The DNA sequencing results showed that 9 of 10 extracted plasmids gained the correct mutations. And after these 9 correct plasmids were transfected into 293T cells, all of the mutants were expressed with the right molecular mass. In a word, our novel strategy can be applied to generate multiple-site mutants of a target gene efficiently and conveniently. The method has laid a good foundation for further exploration of this protein's function.

Key words inverse PCR, SRrp53, multiple-site mutations

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00601

*This work was supported by grants from Beijing Natural Science Foundation (7112101) and National Basic Research Program of China (973) (2011CB504200).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-10-66931830

YE Qi-Nong. E-mail: Yeqn66@yahoo.com

ZHANG Hao. E-mail: zhanghal197@hotmail.com

Received: December 18, 2012 Accepted: May 15, 2013