

运用新型的反向 PCR 策略高效构建基因的点突变体 *

程 龙^{1)**} 韩白玉^{1, 2)**} 侯 莎¹⁾ 韩永健¹⁾ 徐小洁¹⁾ 蒋 凯¹⁾ 李法曾¹⁾
 杨智洪¹⁾ 窦京涛²⁾ 吕朝晖²⁾ 张 浩^{1)***} 叶棋浓^{1)***}

(¹⁾ 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850; (²⁾ 解放军总医院内分泌科, 北京 100853)

摘 要 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, 如何高效、经济地构建基因点突变体是许多分子生物学研究遇到的棘手问题. 以 *PIAS3* 点突变体的构建为对象, 设计了新型的以反向 PCR 为基础的点突变构建流程, 获得的点突变体质粒经测序后均与预期相符, 并在 293T 细胞内得到了正确表达. 以上结果表明, 该实验设计方案能够高效、方便地用于基因点突变体的构建, 为进一步研究它们的分子功能打下了基础.

关键词 反向 PCR, *PIAS3*, 点突变

学科分类号 Q52

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00487

蛋白质的缺失突变以及点突变体在其结构和功能研究中发挥非常关键的作用, 比如蛋白质相互作用区域的界定^[1], 磷酸化^[2]、甲基化^[3]、乙酰化^[4]、泛素化^[5]等修饰位点的确定, 蛋白质细胞内定位序列的确定等. 目前, 基因点突变体构建的常规方法有: a. 重组 PCR 的方法^[6]. 该方法基本原理是先进进行两轮 PCR 将目的基因片段进行点突变, 经酶切后再插入至表达载体中. 但是在实验中我们发现该方法比较繁琐、耗时较长、要设计两对引物(其中需要一对序列部分互补的较长的引物序列), 进行两轮 PCR, 第一轮 PCR 结束后必须进行胶回收以去除模板对后续实验的干扰, 另外第二轮 PCR 结束后需要再回收、酶切、与酶切后的载体连接后转化大肠杆菌感受态细胞, 挑克隆进行 PCR 和酶切鉴定. b. 运用 Stratagene(La Jolla, CA, USA) 公司提供的点突变试剂盒^[7-8], 虽然实验有一定的程式, 但该方法要通过该公司提供的引物设计网页设计一对很长的彼此部分互补的引物序列, 由于引物较长, 需要花很多时间去优化 PCR 条件, 同时在转化子中会出现许多错误的克隆, 而且该试剂盒

价格不菲.

为此, 我们设计了一个用于高效、方便地用于基因点突变的试验流程(图 1). 首先设计两对含有 *PIAS3* 突变序列的引物, 将其 5'端磷酸化, 再以含目的基因的质粒为模板, 扩增含点突变的质粒片段, PCR 产物经 *Dpn I* 处理、切胶回收、自身连接、转化至大肠杆菌 DH5 α 后, 分别挑取 3 个克隆进行 DNA 序列测定, 阳性质粒转染 293T 细胞进行蛋白质表达鉴定. 本研究旨在建立高效、快速的基因点突变体构建方法.

* 国家自然科学基金(30800205), 军队医药卫生杰出人才基金(06J021), “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-002)和北京市自然科学基金(7112101)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 010-66931830

张 浩. E-mail: zhanghal197@hotmail.com

叶棋浓. E-mail: Yeqn66@yahoo.com

收稿日期: 2010-09-19, 接受日期: 2010-11-11

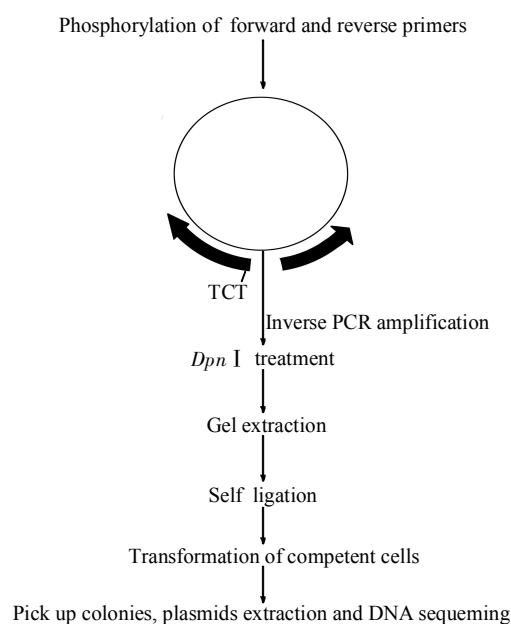


Fig. 1 Novel strategy for generating a site-directed mutagenesis by inverse PCR

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 pXJ40-myc 由军事医学科学院生物工程研究所保存; 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; 胶回收试剂盒为 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 Myc 抗体购自 Sigma 公司。

1.2 PIAS3 编码区 cDNA 序列的设计及 pXJ40myc-PIAS3 表达载体的构建

根据 NCBI 公布的人源 PIAS3 的 cDNA 编码区序列, 设计一对引物: 正向引物, 5' GAAGA-TCTATGGCGGAGCTGGGCG 3'; 反向引物, 5' AAGGAAAAAAGCGGCCGCTCAGTCCAGGG-AAATGATG 3'。

在正向引物与反向引物的 5'端分别加入 *Bgl* II 及 *Not* I 位点。将用 *Bam*H I 与 *Not* I 双酶切后的 pXJ40myc 载体片段与用 *Bgl* II 及 *Not* I 双酶切后的 PIAS3 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 , 随机挑取 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 PIAS3 K110R、K411, 412R 点突变体引物的设计

根据 NCBI 公布的人源 PIAS3 cDNA 编码区序列和对应的氨基酸序列设计如下引物:

a. 用于 K110R 点突变的反向及正向引物。

101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118
 TTG GCC CCT GGC ACC CTG CTG GGC CCC AAG CGT GAG GTG GAC ATG CAC CCC CCT
 反向引物 正向引物

K110R 正向引物: 5' CGTGAGGTGGACATGCAC 3'

K110R 反向引物: 5' TCTGGGCCCCAGCAGGT 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, 替代第 110 位的赖氨酸。

b. 用于 K411, 412R 点突变的反向及正向引物。

402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419
 GAT GGA TCC TGG TGC CCA ATG AAA CCC AAG AAG GAG GCA TCT GAG GTT TGC CCC
 反向引物 正向引物

K411, 412R 正向引物: 5' GAGGCATCTGAGGT-TTGC 3'

K411, 412R 反向引物: 5' TCTTCTGGGTTTCA-TTGGGCACCA 3'

其中, 在反向引物的 5'端加入 TCTTCT 6 个碱基, 这 3 个碱基编码 2 个精氨酸以替代第 411、412 位的赖氨酸。

1.4 PIAS3 K110R、K411, 412R 点突变体的构建

以 pXJ40myc-PIAS3 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 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后以 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s、56 $^{\circ}$ C 退火 15 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 进行 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。

反应结束后, PCR 产物进行 0.7%琼脂糖凝胶电泳, 切下特异性 PCR 片段(6.8K), 用胶回收试剂盒进行回收, 回收产物加入 *Dpn* I 处理 1 h 后, 用 PCR 回收试剂盒进行再回收, 取 10 μ l 加入 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜进行连接反应。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 各挑取 3 个克隆提取质粒, PIAS3 K110R 突变体质粒用 T7 引物进行 DNA 测序反应, K411, 412R 突变体质粒用自己设计 PIAS3 内部的引物进行测序, 引物序列为: 5' TA-TGAATCTCTTATCATTGATG 3'。

1.5 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 μ g, 转染 6 h 后用 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液换液.

1.6 细胞裂解及 Western blot 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 μ l RIPA 缓冲液裂解, 取 15 μ l 裂解上清加入 15 μ l 2 $\times$ SDS 加样缓冲液, 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 3 min, 取 15 μ l 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 Myc 抗体室温孵育 1 h, 1 $\times$ 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 PIAS3 编码区 cDNA 的扩增

以 MCF-7 细胞 cDNA 为模板, 运用一对针对 PIAS3 编码区 cDNA 的引物扩增出了特异性的长度为 1 900 bp 的条带, 结果与预期相符.

2.2 pXJ40myc-PIAS3 表达载体的构建

将 PIAS3 cDNA PCR 产物用 *Bgl* II 与 *Not* I 双酶切, 与经 *Bam*H I + *Not* I 处理后的 pXJ40myc 载体片段连接后获得阳性重组质粒, 分别用 T7 和 SP6 引物进行测序, 经序列分析发现 PIAS3 cDNA 正确克隆至表达载体 pXJ40-myc 中(结果略)

2.3 反向 PCR 扩增表达 PIAS3 K110R、K411, 412R 点突变体的表达载体

分别用两对含有 PIAS3 点突变的引物进行反

向 PCR, 将 PCR 产物进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 结果表明, 反向 PCR 扩增产物特异地在 6 900 bp 处有明亮的电泳条带(图 2), 与预期结果相符.

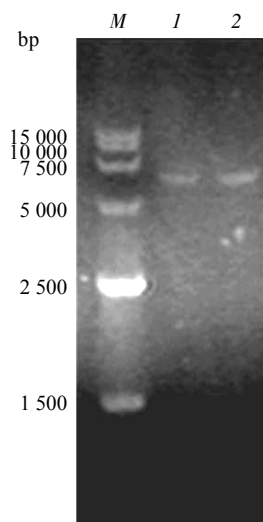


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PIAS3 mutants PCR product

M: DNA marker; 1: PCR product of PIAS3 K110R mutant; 2: PCR product of PIAS3 K411, 412R mutant.

2.4 PIAS3 K110R、K411, 412R 点突变体质粒的测序结果

在两个点突变体转化的平板上分别随机挑选 3 个克隆, 提取质粒, 再分别用 T7 引物以及自行设计的引物进行测序, 结果表明, 3 个克隆的测序结果均与预期相符(图 3, 图中划横线的表示发生突变的碱基序列), 缺失突变成功率达到 100%.

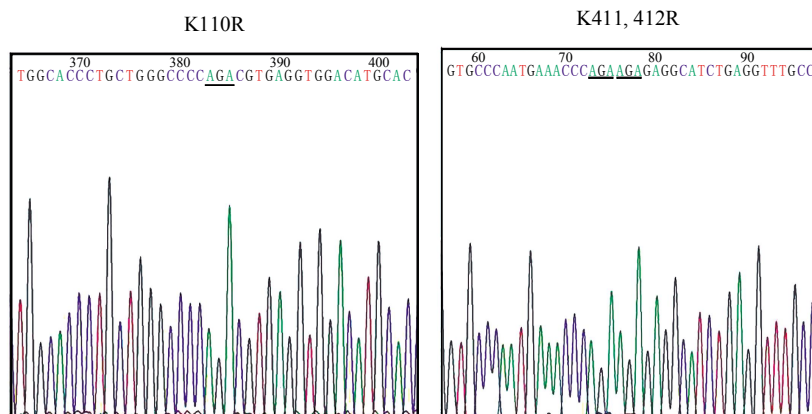


Fig. 3 DNA sequencing results of two PIAS3 mutants

2.5 PIAS3 点突变体在细胞内的表达

将表达 PIAS3 野生型及其 K110R、K411, 412R 点突变体(各 3 个克隆)的表达质粒转染 293T 细胞, 36 h 后裂解细胞, 进行 SDS-PAGE, 用 HRP 标记的 Myc 抗体进行蛋白质印迹反应, 结果见图 4, PIAS3 野生型及其点突变体在细胞内均得到了表达, 其分子质量为 70 ku 左右。

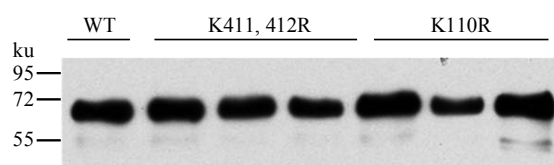


Fig. 4 Transient expression of PIAS3 WT and two point mutants in 293T cells

For each point mutant, plasmids from three colonies were extracted and transfected.

3 讨 论

本实验建立了运用反向 PCR 技术快速构建基因点突变体的方法, 该方法只需设计一对常规引物, 进行一轮 PCR(PCR 反应条件简单, 容易扩增), 随后用 *Dpn* I 处理(*Dpn* I 只切割发生甲基化的 DNA, 模板 DNA 是从大肠杆菌中扩增并提取的 DNA, 在大肠杆菌中发生了甲基化, 而 PCR 产物是在体外进行的扩增反应, 不会被甲基化, 因此 *Dpn* I 只降解模板 DNA 片段)、胶回收后即可进行片段自身的连接反应, 由于在回收后的 PCR 产物中没有模板 DNA 的出现(在 PCR 反应体系中仅加入 20 ng 模板, 经 *Dpn* I 处理后将其完全降解), 因此连接产物转化大肠杆菌后生长出的转化子阳性率为 100%, 我们的实验也证实了这一点。

利用反向 PCR 构建基因突变体通常用的引物

是一对序列较长且部分互补的引物, 本研究巧妙设计一对常规引物, 在反向引物的 5'端加入编码精氨酸的碱基以替代被突变的赖氨酸, 将该对引物 5'端磷酸化后再进行 PCR, 所获得产物的 5'端具有磷酸基团, 这样经 T4 DNA 连接酶连接后即可与自身分子内部的 3'端连接成环状分子, 运用该对引物进行 PCR 扩增的反应条件简单, 不需另行摸索, 极大程度简化了实验程序, 同时运用该方法还可以快速构建基因的缺失突变体。

参 考 文 献

- [1] Sun Y, Ding L, Zhang H, *et al.* Potentiation of Smad-mediated transcriptional activation by the RNA-binding protein RBPMs. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(21): 6314-6326
- [2] 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
- [3] 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
- [4] Yuan Z L, Guan Y J, Chatterjee D, *et al.* Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*, 2005, **307**(269): 269-273
- [5] 张 浩, 周建光, 李杰之, 等. PC-1 分子细胞定位的深入探讨. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31**(3): 260-266
Zhang H, Zhou J G, Li J Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31**(3): 260-266
- [6] Wang W, Malcolm B A. Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using quik change site-directed mutagenesis. *Biotechniques*, 1999, **26**(4): 680-682
- [7] Arghya R, Sandra W, Paul W M, *et al.* Identification of BCR-ABL point mutations conferring resistance to the Abl kinase inhibitor AMN107 (nilotinib) by a random mutagenesis study. *Blood*, 2007, **109**(1): 5011-5015
- [8] Vries A, Flores E R, Barbara Miranda, *et al.* Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(5): 2948-2953

Site-directed Mutagenesis by Novel Inverse PCR Strategy*

CHENG Long^{1)**}, HAN Bai-Yu^{1,2)**}, HOU Sha¹⁾, HAN Yong-Jian¹⁾, XU Xiao-Jie¹⁾, JIANG Kai¹⁾, LI Fa-Ceng¹⁾,
YANG Zhi-Hong¹⁾, DOU Jing-Tao²⁾, LÜ Zhao-Hui²⁾, ZHANG Hao^{1)***}, YE Qi-Nong^{1)***}

¹⁾ Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

²⁾ Department of Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100850, China)

Abstract Site-directed mutagenesis plays important roles to study protein structure-function relationship and the researchers are always confronted with the problem on how to generate a point mutation of a target gene efficiently. A novel strategy to produce a point mutation was depicted based on inverse PCR with PIAS3 as an example. Firstly, the entire PIAS3 coding sequence was amplified from MCF-7 cDNA and then cloned into the expression vector pXJ40-myc. Two sets of PIAS3 primers with specific mutation sequences were synthesized and then phosphorylated at their 5' terminus. Inverse PCR was performed with the phosphorylated primers as well as with the plasmid pXJ40myc-PIAS3 as the template. Further, the PCR products were subjected to *Dpn* I treatment, agarose gel purification, self-ligation and transformation into DH5 α . Three colonies were randomly selected for DNA sequencing. The expression of both the PIAS3 wide type and the point mutants(PIAS3 K110R and K411, 412R) was analyzed by transfection of these plasmids into 293T cells. The result showed that the PIAS3 K110R and K411,412R point mutants were successfully constructed and expressed in mammalian cells, which suggested that the novel inverse PCR strategy can be applied to construct the point mutants of a target gene efficiently and conveniently.

Key words inverse PCR, PIAS3, point mutation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00487

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30800205), Outstanding Youth Foundation of Medicine and Health of PLA(06J021), The National Key Technologies R&D Program for New Drugs (2009ZX09301-002) and The National Science Foundation of Beijing(7112101).

**These authors contributed equally to this work.

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

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

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

Received: September 19, 2010 Accepted: November 11, 2010