

利用套叠 PCR 和高保真 DNA 聚合酶 进行基因多位点突变的研究

周 鹏, 沈文涛, 黎小琪

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所/热带作物生物技术国家重点实验室, 中国海南 海口 571101)

摘 要: 利用套叠 PCR 和高保真 DNA 聚合酶对人工合成的牛口蹄疫病毒 VP1 基因 (FMDV-VP1, Foot-Mouth Disease Virus-VP1) 的 5 个突变位点进行修复, 修复的成功率为 100%。

关键词: 套叠 PCR; 高保真 DNA 聚合酶; 基因突变

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)01-0028-04

Multi-mutation of FMDV-VP1 Gene by Overlap Extension of PCR with High-fidelity Thermostable DNA Polymerase

ZHOU Peng, SHEN Wen-tao, LI Xiao-ying

(State Key Laboratory for Tropical Crops Biotechnology, Institute of Tropical Biology Science, China Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, Hainan, China)

Abstract: Five mutant sites of VP1 gene synthesized artificially from cattle Foot-Mouth Disease Virus (FMDV) were rectified by overlap extension with high-fidelity thermostable DNA polymerase, the rate of success was 100 percent.

Key words: overlap extension of PCR; high-fidelity thermostable DNA polymerase; gene mutation

(Life Science Research, 2004, 8(1): 028 ~ 031)

重叠区扩增基因拼接法 (gene splicing by overlap extension, gene SOEing) 是利用 PCR 技术在体外进行有效的基因重组和定点突变, 任何与原模板不匹配的碱基都可掺入到 PCR 产物中, 这被 Mullis 称为“不配或错误 (mispriming)”^[1, 2], 为创造定点突变提供了简便易行的方法。在 PCR 过程中使用具有 3'-外切酶活性的耐热高保真

DNA 聚合酶, 如 Pfu 聚合酶, 避免在产物 3'-端引入非模板碱尾 A^[3], 这对复杂的基因多位点突变具有重要意义。本研究利用套叠 PCR 和高保真 DNA 聚合酶对人工合成的牛口蹄疫病毒表面抗原 VP1 基因的 5 个位点进行突变修饰, 以确保 VP1 基因突变的正确性。

收稿日期: 2003-11-18; 修回日期: 2004-01-13

基金项目: 2002 年中国热带农业科学院重点方向资助项目

作者简介: 周鹏 (1963-), 男, 安徽绩溪人, 中国热带农业科学院研究员, 主要从事植物和微生物反应器研究, Tel: +86-0898-66988559, E-mail: zhpeng@hainan.net; 沈文涛 (1976-), 安徽安庆人, 中国热带农业科学院助理研究员, 主要从事植物生物技术研究, Tel: +86-0898-66890687, E-mail: dnaswt@hotmail.com.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 待修复基因

人工全序列合成的牛口蹄疫病毒表面抗原基因 MVP1 (mutant VP1 gene), 含 AG₋(126)→AG_T、CTC₋(T182)→CGC、AGT(T330)→AGC、CC₋(372)→CCC 和 GT(436)→GGT(划线碱基为缺失碱基或突变碱基, 数字为碱基所处的位置)5个变异位点.

1.1.2 生化试剂

实验中所用高可信度扩增 *Pyrobest* DNA 聚合酶为大连宝生物工程公司产品, pGEM T- Easy Vector 及限制性内切酶 *EcoR* I 等为 Promega 公司产品, PCR Marker (1543, 994, 695, 515, 377, 237 bp 6 条带) 为华美生物工程公司产品, High Pure PCR Product Purification Kit 为 Roche 公司产品.

1.2 方 法

1.2.1 引物设计合成

依据 MVP1 基因各突变位点 (缺失或突变) 设计合成下列引物:

M01 5' TCGAGCTCTCTTTACAAG3'

M02 5' ACTCGGGTACTGAAGTCTTTACC
GCACG3'

M03 5' CGTGC GGTA AAGCAGTTCAGTCAC
CCGAGT3'(T126)

M04 5' GTTGGCCCAGAAGGCGGCAAGAAC3'

M05 5' GTTCTTGCCGCCTTCTG3'(G182)

M06 5' ATCCAACGGCTTACCAC3'

M07 5' GTGGTAAGCCGTTGGAT3'(C330)

M08 5' GTCCCGAATGGGGCGC3'

M09 5' GCGCCCCATTTCGGGAC3'(C372)

M10 5' GTACTGCCACCTACTACT3'

M11 5' AGTAGTAGGTGGCAGTACG3'(G436)

M12 5' GTACTAGTATGGCTACCTCC3'

注: 黑体加下划线碱基为缺失或突变碱基, 括号中的黑体字母及数字为缺失或突变碱基位置.

1.2.2 PCR 热反应循环

94 °C, 3 min→94 °C, 30 s; X, 30 s; 72 °C, 40 s→72 °C, 7 min→4 °C, + ∞, 30 个循环.

注: 各引物对退火温度 X = 41 °C (M01-M02/M03-M04), 43 °C (M05-M06/M07-M08/M01-M12), 45 °C (M01-M04/M05-M08/M09-M10/M11-M12/M09-M12/M01-M08).

以 MVP1 为模板, 进行如下 PCR 反应:

M01-M02 + M03-M04 → M01-M04 → PCR1

M05-M06 + M07-M08 → M05-M08 → PCR2

M09-M10 + M11-M12 → M09-M12 → PCR3

PCR1 + PCR2 → M01-M08 → PCR4

PCR3 + PCR4 → M01-M12 → PCR5

1.2.3 PCR 产物的回收与克隆

回收 PCR5 产物, 利用常规 *Taq* 酶在仅含 dATP 的反应体系中将产物的 3' 端加上碱基 A, 采用 T- 载体克隆技术对修饰产物进行克隆.

1.2.4 克隆载体的鉴定与序列分析

对在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板长出的单菌落进行液体扩大培养、质粒提取及 *EcoR* I 酶切鉴定, 将阳性菌株送上海生物工程公司进行基因序列测定.

2 结果与分析

2.1 初次 PCR 扩增结果

以 MVP1 为模板、M01-M02、M03-M04、M05-M06、M07-M08、M09-M10、M11-M12 为扩增引物对, 获得如图 1 中所示的研究结果, 各引物对通过扩增获得了相应大小的产物, 其中 M01-M02、M09-M10 扩增获得了 2 条 DNA 带 (约 420/140 bp、200/60 bp), 利用回收试剂盒回收相应大小的目标带 (140、60 bp), 用于后续的 PCR; 实验中通过重新合成加长的 M01-M02、M09-M10 引物, 以增加扩增的特异性, 结果表明均获得一条相应的目标 DNA 带 (结果未显示), 大大加强了实验结果的可靠性.

2.2 第 2 次 PCR 扩增结果

分别以 M01-M02/M03-M04、M05-M06/M07-M08、M09-M10/M11-M12 扩增产物等量混和物为模板, M01-M04、M05-M08、M09-M12 为引物对, 扩增获得大小分别约为 PCR1-190 bp、PCR2-200 bp 及 PCR3-330 bp 的产物 (结果未显示).

2.3 第 3 次 PCR 扩增结果

以 PCR1、PCR2 等量混和物为模板、M01/M08 为引物对, 扩增获得大小约为 380 bp 的 PCR4 (结果未显示).

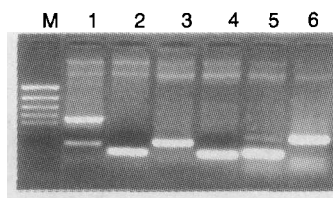


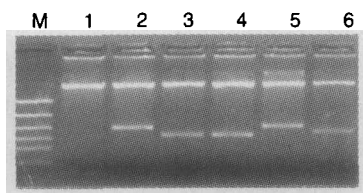
图 1 初次 PCR 扩增结果

Fig. 1 The Results of First PCR Amplification

M-PCR marker

1-M01-M02 2-M03-M04 3-M05-M06,

4-M07-M08 5-M09-M10 6-M11-M12.

**图 2 PCR5 产物克隆鉴定结果****Fig. 2 Identification and Cloning of PCR5 Product**1-pGEM T-Vector/ *EcoR* I,2-6-PCR5/ pGEM T-Vector/ *EcoR* I.

2.4 第 4 次 PCR 扩增结果

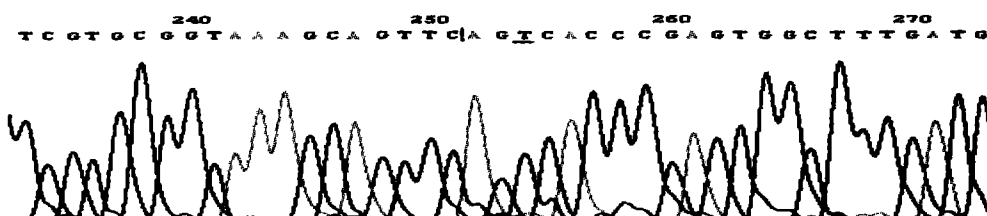
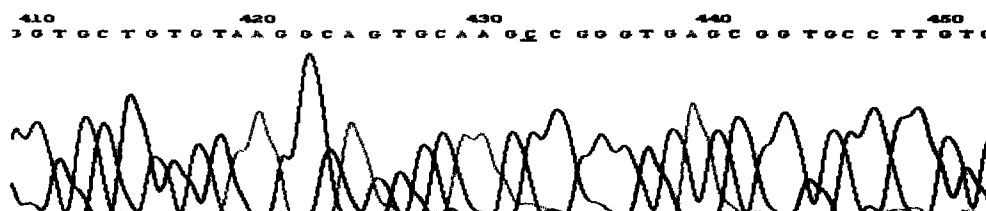
以 PCR3、PCR4 等量混和物为模板、M01/M12 为引物对，扩增获得大小约为 690 bp 的 PCR5(结果未显示)。

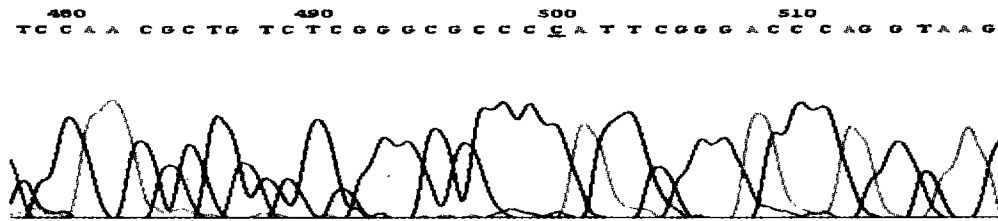
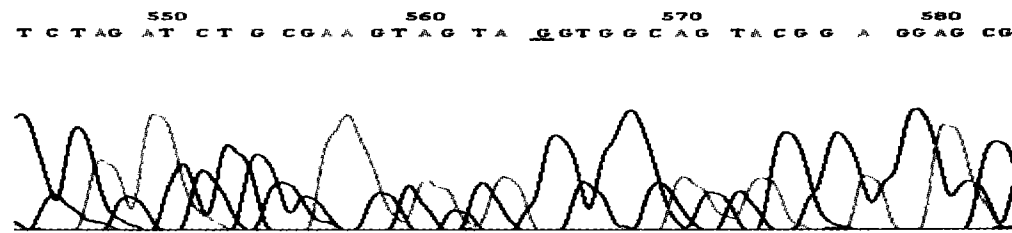
2.5 PCR5 产物的回收与克隆鉴定

PCR5 产物经 T-载体连接、转化及质粒鉴定(用 *EcoR* I 单酶切)，获得如图 2 所示的结果，从图中可看出 2、5 两个质粒能切出约 690 bp 的 DNA 片段，与 VP1 基因实际大小一致，该质粒用于 DNA 序列测定分析；3、4、6 三个质粒切出的 DNA 片段小于 690 bp，造成这两种结果的可能原因是套叠 PCR 的复杂性和影响因素的多样性造成 PCR 产物的非特异性，使回收产物中夹带非目标产物，上述两种质粒的测序结果说明了这一点，3、4、6 号质粒中的 DNA 片段比正常序列缺失约 45 bp 的小段(结果未显示)。

2.6 PCR5 克隆产物的序列分析

测序分析结果见图 3、图 4、图 5、图 6、图 7，突变、缺失位点 $G_C \rightarrow GTC$ 、 $CTC \rightarrow CGC$ 、 $AGT \rightarrow AGC$ 、 $C_A \rightarrow CCA$ 和 $A_G \rightarrow AGG$ (划线碱基为缺失碱基或突变碱基) 完全按照实验设计进行了修复，正确率为 100%，这说明本研究所采用的技术方法对基因多位点突变进行修复是完全可行的。

**图 3 G_C → GTC 缺失修复****Fig. 3 G_C → GTC absence rectified****图 4 CTC → CGC 突变修复****Fig. 4 CTC → CGC mutation rectified****图 5 AGT → AGC 突变修复****Fig. 5 AGT → AGC mutation rectified**

图 6 C_A→CCA 缺失修复Fig. 6 C_A→CCA absence rectified图 7 A_G→AGG 缺失修复Fig. 7 A_G→AGG absence rectified

3 讨论

3.1 高保真 DNA 聚合酶对提高基因突变正确率的重要性

本研究中采用高可信度扩增 *Pyrobest* DNA Polymerase 进行实验,该酶来自 *Pyrococcus* Sp., 具有 3'→5' Exonuclease (Proof reading 活性) 的耐热性 α 型 DNA 聚合酶, 其特点为可信度极高, 与 *Pyrococcus furiosus* 来源的 Pfu DNA Polymerase 及 Vent DNA Polymerase 具有相同的扩增可信度, 而与 Taq DNA Polymerase 具有相同的扩增效率, 并且与 Taq DNA Polymerase 相比, 即使不用 Hot start 法, 非特异性带也可得到有效的控制, 尤为重要是, 由于其具备 3'→5' Exonuclease 活性, 在 PCR 扩增产物的 3' 端不加碱基 A, 这使得复杂的多套叠 PCR 大大提高了准确性; 本研究中曾采用 Taq DNA Polymerase, 测序结果表明虽待突变位点得到校正, 但又重新出现新的突变及碱基缺失且往往出现在 PCR 产物片段的 3' 端, 这给基因修复工作带来了新的问题。

3.2 高保真 DNA 聚合酶的使用与套叠 PCR 技术相结合是完成基因多位点突变修复的有效方法之一

在进行定点突变的各种方案中, 重叠区扩增

法十分简单, 与其他方法相比有重组与突变同时进行、几乎所有产物均含有设计突变和突变率接近 100% 等优点, 因此在找不到合适的内切酶位点等“复杂”情况下, 使用基因 SOEing 是明智的选择之一^[4]。有研究表明在 PCR 条件下, Taq 聚合酶有很高的忠实性。通过一轮的重叠区延伸反应后随机错误的发生率为 1/4 000, 而连续 SOEing 反应产生的较复杂的产物中错误率稍高, 约为 1/1 800, 因此使用比 Taq 酶的忠实性高得多的 DNA 聚合酶, 是提高重叠扩增反应的重要措施。

参考文献 (References):

- [1] MULLIS K B. The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion[J]. PCR Methods Appl. 1991, 1: 1-4.
- [2] JONES D H, WINISTORFER S C. Recombination and site-directed mutagenesis using recombination PCR[J]. Methods-Mol-Biol, 1997, 67: 131-140.
- [3] BARIK S. Site-directed mutagenesis by PCR: substitution, insertion, deletion, and gene fusion[J]. Meth Neurosci, 1995, 26: 309-323.
- [4] HORTON R M, HUNT H D, HO S N, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension[J]. Gene, 1989, 77: 61-68.