

寡核苷酸引导的定向诱变

苏国富

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100850)

由寡核苷酸引导的体外诱变技术又称定向诱变技术,它包括下列步骤:克隆待诱变的 DNA 至 phagemid;制备单链 DNA 模板;设计并合成特殊的诱变寡核苷酸(在寡核苷酸中,除其中少数几个待诱变的碱基外,其余均与单链 DNA 模板上的待定区域互补);合成双链 DNA。通过上述步骤,我们使 Stx-B 基因的 N 末端产生了新的 BamH I 位点,在 C 末端产生了新的 Bgl I 识别序列,从而为 Stx-B 基因融合至 LamB 基因创造了条件。该法是遗传工程中不可缺少的重要手段之一。

关键词 定向诱变;寡核苷酸;Phagemid

目前由寡核苷酸引导的定向诱变不仅广泛用于研究 DNA 和由它编码的蛋白质的结构及功能,而且亦是 DNA 重组技术中不可缺少的重要手段。迄今为止已建立了许多关于定向诱变的方法^[1,2]。早期用寡核苷酸进行定向诱变时采用丝状噬菌体(如 M13, f1 和 fd)的单链环状 DNA 为模板^[3],但存在着插入的 DNA 不稳定、易部分缺失(插入 DNA 片段越大,部分缺失频率越高),以及外源 DNA 只能单方向插入^[4]等缺点。最近已采用包含丝状噬菌体复制原点的质粒(phagemid)进行寡核苷酸引导的定点诱变,phagemid 既有质粒的优点,也保持了丝状噬菌体的性质。由于该质粒很小,因此可插入其中的外源 DNA 片段可达 10kb^[5]。本文用 phagemid 诱变系统,采用一种简便而有效的方法^[6],通过定点诱变,使在志贺氏毒素 B 亚单位(Stx-B)基因的 N 末端和 C 末端分别产生一个新的 BamH I 和 Bgl I 位点,为将 Stx-B 基因融合至 LamB 创造了条件。

材料和方法

(一) 质粒、细菌菌株和噬菌体(见表 1)

(二) 培养基和细菌培养

本试验按常规用 LB 液体和固体培养基^[7]在 37℃ 培养细菌,但在制备单链 DNA 模板时,需用 2×YT 培养基(1L 中含 16g 蛋白胨、10g 酵母抽提物和 5g NaCl),S1001 需在 30℃ 培养。在需用氨苄青霉素和氯霉素时,其浓度分别为 100μg/ml 和 30μg/ml。

(三) 各种酶和化学试剂

限制性内切酶均为华美公司产品。T4 DNA 连接酶, T4 DNA 多聚酶、T4 多核苷酸激酶和 DNA Sequenase 购自 Boehringer。[α-³⁵S]dATP 由 Amersham 供应。ATP、DTT、

PEG600、SDS、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺,均由 Sigma 公司出品。四种脱氧核糖核苷酸 (dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP) 由 Boehringer 公司供应。其余化学试剂均为分析纯级。

表 1 质粒、菌株和噬菌体

Table 1 List of plasmids, bacteria and phage

菌株 Strains	有关性状 Relevant character	来源 Source
大肠杆菌 <i>E. coli</i> K-12		
HB101	F ⁻ , hsdS20 (r _B , m _B), recA13, ara ⁻¹⁴ , proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Sm ^r), xyl-5, mt1-1, supE44, λ ⁻	Store in our Lab.
S1001	DH5/pSU108	Su et al.
S1002	HB101/pSU109	this study
CJ236	dut, ung, thi, relA; pCJ105 (Cm ^r)	Victor
S1003	CJ236/pSU109	this study
MV1190	Δ (lac-proAB), thi, supE, Δ (sr1-recA) 306 ::Tn10 (tet ^r) [F': traD36, proAB, lacIqZAM15]	Victor
S1004	pSU110/MV1190	this study
辅助噬菌体 helper phage		
M13 K07	derivative of M13	Victor
质粒 plasmids		
pGCl	Ap	Victor
pSU108	Ap, Stx-B	Su et al.
pSU109	Ap, Stx-B	this study
pSU110	Ap, Stx-B	this study

(四) DNA 的分离与纯化

质粒的快速、小量抽提,采用 Maniatis 方法^[8]。质粒 DNA 大量分离纯化用氯化铯密度梯度离心法^[9]。质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳采用水平电泳仪,琼脂糖的浓度分别为 1%或 2%。从凝胶中回收 DNA 片段采用电泳洗脱装置 Biotrap[®] BT1000 (Schleicher & Schuell)。

(五) DNA 的重组与转化

限制性内切酶酶解 DNA 和其它酶的使用均按厂家推荐的条件。质粒 DNA 在重组前先用限制性内切酶酶解,然后与以相同酶消化过的待克隆 DNA 用 T4 DNA 连接酶在 4℃连接过夜,转化经氯化钙方法制备的感受态细胞^[10]。在涂布于含 Ap 的 LB 平皿后,随机挑选一些转化子,进行质粒图谱分析和限制性内切酶消化,挑选出所需的克隆。

(六) 核苷酸序列分析

核苷酸序列分析按 Sanger 方法进行^[11]。

结果和讨论

(一) 寡核苷酸引导的定向诱变方案

采用的定向诱变技术包括如下步骤：克隆待诱变的基因至噬菌体质粒 (phagemid)；转移杂种质粒至大肠杆菌 CJ236 (dut, ung)；制备单链模板 DNA；合成诱变寡核苷酸并与单链 DNA 模板退火；合成双链 DNA，详见图 1 所示。

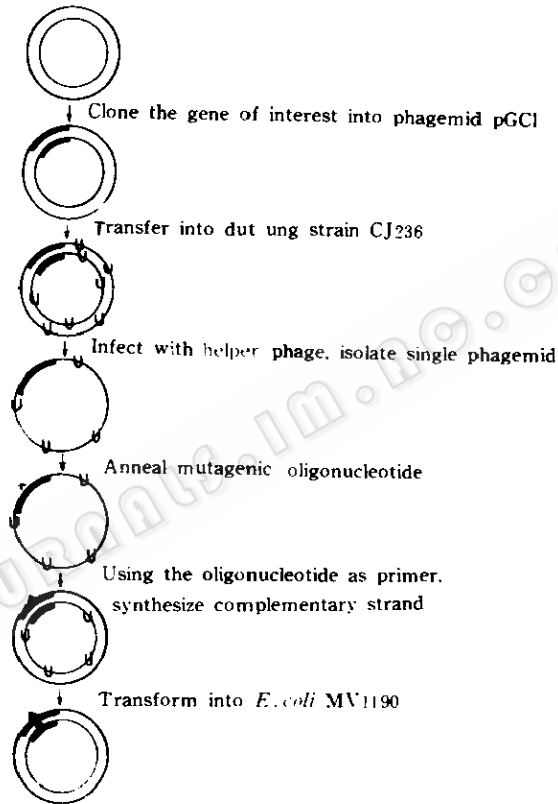


图 1 寡核苷酸引导的定向诱变步骤

Fig. 1 Steps involved in oligonucleotide directed mutagenesis

(二) 克隆待诱变基因至 phagemid pGC1

按图 2 所示将包含志贺氏毒素 B 亚单位 (Stx-B) 的基因克隆至载体 pGC1。先用限制性内切酶 Sal I 和 BamH1 酶解质粒 pSU108，经琼脂糖凝胶电泳后，用电洗脱法从凝胶中回收含 Stx-B 基因的 0.7kb DNA 片段。再与用相同限制性内切酶消化过的载体 pGC1 连接，转化大肠杆菌 HB101。通过质粒的抽提和酶切分析，确定含 Stx-B 基因的克隆株，并命名为 S1002 (HB101/pSU109)。

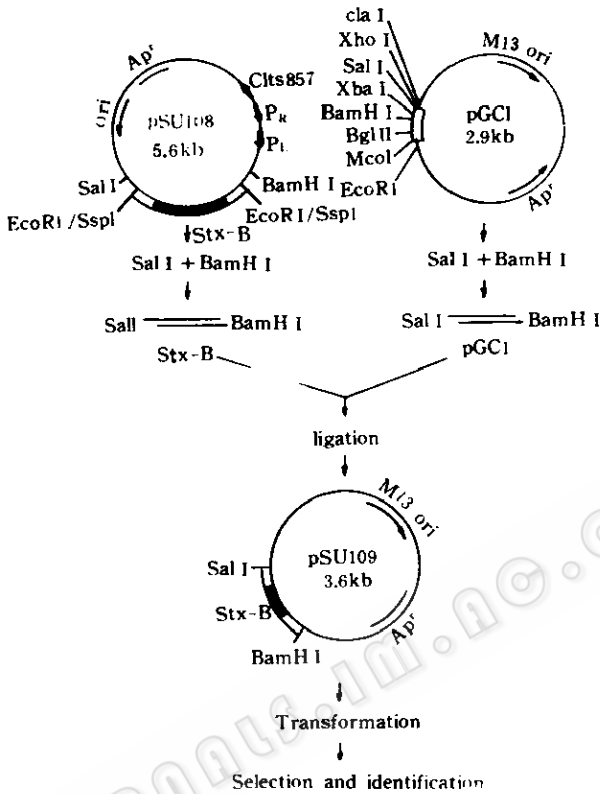


图 2 包含 *Stx-B* 基因的杂种质粒 pSU109 之构建

Fig. 2 Construction of hybrid plasmid pSU109 containing *Stx-B* gene

(三) DNA 单链模板的制备

为制备单链 DNA 模板, 将重组质粒 pSU109 转化至大肠杆菌 CJ236, 得转化子 S1003 (CJ236/pSU109)。CJ236 有下列表型: *dut-1*、*ung-1* 和 pCJ105 (*cm^r*) 等。*dut* 突变使 dUTPase 失活, 导致细胞内 dUTP 水平增高; 而 *ung* 突变使尿嘧啶 N-糖基酶失活, 使结合至 DNA 的尿嘧啶得以保存在 DNA 中。因此 *dut-1* 和 *ung-1* 导致所有在该细菌内合成的 DNA 中某些胸腺嘧啶被尿嘧啶所取代^[12] (参见图 1)。

质粒 pCJ105^[13] 带有表达纤毛的基因, 而性纤毛是 phagemid 和辅助噬菌体附着并进入细菌细胞所必需的。通过辅助噬菌体 M13K07 (M13 的衍生物) 超感染 S1003 (CJ236/pSU109), 它本身很难复制, 加上 phagemid 有很高的拷贝数, 导致有利于包装 phagemid, 而不是辅助噬菌体本身。根据上述原理, 我们按如下方法制备包含尿嘧啶的单链 DNA 模板: 接种 S1003 至含 *Ap* 和 *Cm* 的 LB 培养液, 37°C 培养过夜, 取 20 μl 辅助噬菌体 M13K07 ($\geq 1 \times 10^{11}$ pfu/ml) 与上述 50 μl 过夜培养液混合, 室温吸附 10 分钟, 加入含 15 ml 2×YT 培养液的容量为 150 ml 的三角瓶中, 加 *Ap* 和 *Cm* 至所需浓度, 37°C 剧烈振荡过夜。次日晨离心后收集上清液, 加 3.5 ml 20% PEG6000-2.5 mol/L NaCl 至上清部分, 充分混匀,

置冰浴 30 分钟,于 4℃ 离心 (3000r/min) 30 分钟,除去上清,沉淀悬浮于 0.5ml TE (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0),离心 (4℃, 2000r/min) 30 分钟,收集上清,加入 $\frac{1}{4}$ 体积 20% PEG6000-2.5mol/L NaCl,充分混匀后,置冰浴 5 分钟,离心后除去上清,悬浮沉淀于 5000 μ l TE 缓冲液,用等体积的水饱和酚 (pH8.0) 抽提 2 次,再用乙醚抽提三次除去酚,然后用酒精沉淀,最后溶解单链 DNA 模板于 50 μ l TE 缓冲液,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查,结果如图 3 所示。

在图 3 中,行 1 为 1 μ l 辅助噬菌体 M13K07; 行 2 为 1 μ l 上述制备的单链 phagemid。由图可见,在经上述制备的单链 phagemid 中,只含极少量的 M13K07; 绝大部分为 phagemid 本身。

(四) 诱变寡核苷酸的设计和合成

为通过寡核苷酸引导的定向诱变在志贺氏毒素 B 亚单位 (Stx-B) 的 N 端创造一个新的 BamH1 位点,并在 C 末端产生一个新的 Bgl I 的识别序列,首先必须用核苷酸序列分析得到 Stx-B 的 N 和 C 末端的核苷酸序列 (图 4-A)。

对于 N 端,CTGG 须变为 GATC,而 C 末端的 TTGA 应变成 AGAT。定向诱变使用的诱变寡核苷酸必须能与单链 DNA 模板的特殊靶序列互补,而且要有一定的长度以便与靶序列牢固结合;将诱变核苷酸置于诱变寡核苷酸的中间,每边应有 10 个以上核苷酸能完全与靶序列互补。为此我们分别设计并合成了寡核苷酸 Stx-B-N 和 Stx-B-C,前者为产生 BamH1 位点,而后者为创建 Bgl I,结果见图 4-B。在 Stx-B-N 和 Stx-B-C 中,黑体字母表示诱变核苷酸。

为合成共价、闭合及环状的 DNA (cccDNA),先对诱变寡核苷酸进行磷酸化。在 20 μ l 反应体积中包含 2 μ l 10 倍浓缩的缓冲液 (500mmol/L Tris-HCl pH7.5-10mmol/L MgCl₂-50mmol/L DTT), 1 μ l Stx-B-N (100ng/ μ l), 1 μ l Stx-B-C (100ng/ μ l) 0.5 μ l 0.1mmol/L ATP, 1 μ l T4 多核苷酸激酶 (10u/ μ l), 加蒸馏水补充体积至 20 μ l。37℃ 保温 1 小时后,在 70℃ 下加热 10 分钟以失活 T4 多核苷酸激酶。

(五) 双链 DNA 的合成

将上述已磷酸化的诱变寡核苷酸 Stx-B-N 和 Stx-B-C 与单链 DNA 模板进行退火。在 30 μ l 总反应体积内包含 20 μ l 上述经磷酸化的寡核苷酸, 1.5 μ l 20 \times SSC (3mol/L NaCl, 0.3mol/L 柠檬酸钠), 8.5 μ l 单链模板 (约 1 μ g)。在 70℃ 中保温 5 分钟,在室温下慢

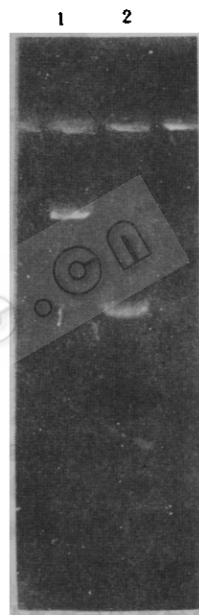


图 3 单链 phagemid 的琼脂糖凝胶电泳

1. 辅助噬菌体 M13K07;
2. 单链 phagemid

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of single strand phagemid
1. Helper phagemid M13K07;
2. Single strand phagemid

慢冷却至 30℃，置冰浴待用。

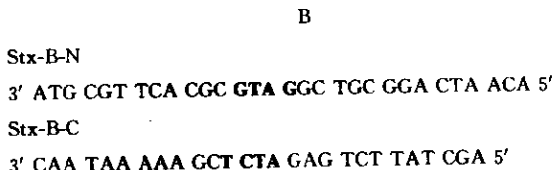
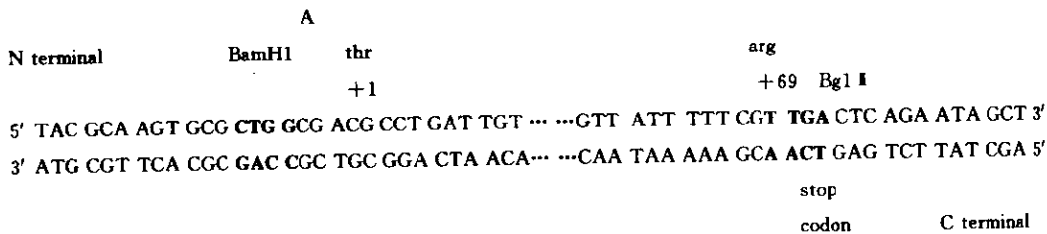


图4-A Stx-B N 末端和 C 末端的核苷酸序列

图4-B 寡核苷酸 Stx-B-N 和 Stx-B-C

Fig. 4-A The nucleotide sequences of Stx-B N and C terminals

Fig. 4-B Oligonucleotides Stx-B-N and Stx-B-C

以上述的单链 phagemid 为模板，诱变寡核苷酸为引物合成 cccDNA 如下：在上述 30μl 退火反应液中分别加入 0.5μl 0.1mmol/L dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP，10μl 10 倍的引物延伸缓冲液 (200mmol/L Hepes pH7.8, 20mmol/L DTT, 100mmol/L MgCl₂)，1μl T4 DNA 多聚酶 (1u/μl)，2μl T4 DNA 连接酶 (1u/μl)，用蒸馏水调节总反应体积至 100μl。充分混匀后先置 4℃ 5 分钟，然后在室温放置 5 分钟，再在 37℃ 反应 2 小时。待反应结束后，加入 6μl 0.25mol/L EDTA 以终止反应，取 10μl 进行琼脂糖凝胶电泳，观察双链 DNA 是否已合成，结果见图 5。

图 5 中，行 1 为阴对照 (单链模板 DNA)，行 2 为以单链 phagemid DNA 为模板，诱变寡核苷酸为引物经延伸反应后的样品。从图 5 可见，经延伸反应后，反应液中大部分成分为 cccDNA，这表明以诱变核苷酸为引物的延伸反应是成功的。于是用 10μl 上述反应液转化大肠杆菌 MV1190，从转化子抽提质粒 DNA，再用限制性核酸内切酶 BamH1 和 Bg1 I 酶解，确定是否在 Stx-B 的 N 端和 C 端分别产生了 BamH1 和 Bg1 I 位点，结果如图 6 所示。

从图 6 行 1 可见，重组质粒 pSU110 经 BamH1 和 Bg1 I 酶解后，在 190bp 和 242bp 两条带之间有一条分子量约为 210bp 的带，这恰好与整个 Stx-B 基因的分子量相一致，因整个 Stx-B 为 69 个氨基酸 (207bp)^[14]。所以图 6 的结果表明在质粒 pSU110 的 Stx-B 基因的 N 末端和 C 末端已用上述方法分别产生了 BamH1 和 Bg1 I 位点。进一步对 Stx-B 基因的核苷酸序列进行了测定，结果表明 Stx-B 基因的 N 和 C 末端的序列完全与设计的要求一致，分别在 N 和 C 末端产生了 BamH1 和 Bg1 I 的识别位点，这为以后将 Stx-B 与 LamB 融合创造了条件。LamB 位于大肠杆菌的外膜，其功能之一是使麦芽糖糊精进入细胞^[15]，LamB 的另一个功能是包括 λ 噬菌体在内的几个细菌噬菌体的表面受体^[16]。

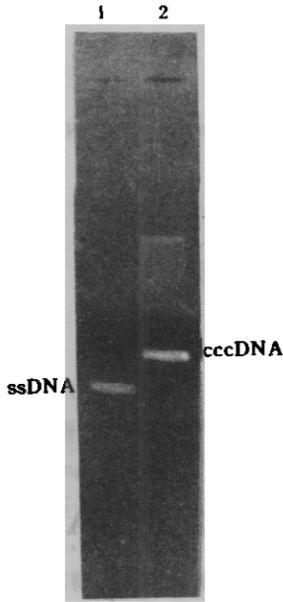


图5 合成的 cccDNA 之琼脂糖凝胶电泳

1. 单链模板 DNA (阴性对照);
2. 合成的 cccDNA

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of synthesized cccDNA

1. Single strand DNA as a negative control;
2. Synthesized cccDNA

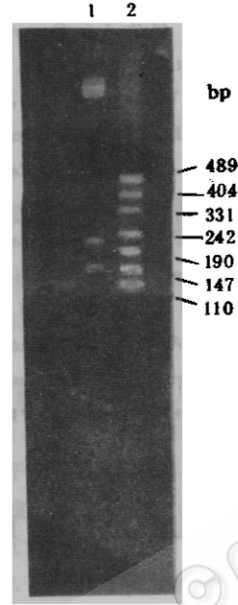


图6 重组质粒的限制性内切酶分析

1. 重组质粒 pSU110+BamH1+Bgl I ;
2. 分子量标准 (pUC19+Hpa I)

Fig. 6 Analysis of restriction enzyme of recombinant plasmid

1. Recombinant plasmid pSU110+BamH1+Bgl I ;
2. Molecular weight markers (pUC19+Hpa I)

由以上可知,用 phagemid 作为单链模板进行定向诱变是一种简单实用的方法,只需要一个酶反应步骤和两个容易培养的大肠杆菌。其诱变效率很高,只需检查少数转化子,就可获得在特定位点已发生了诱变的重组子。我们的试验同时表明:引物与模板的比例从 25:1 到 200:1,其诱变效率没有明显的差别;试验成功与否,与合成的诱变寡核苷酸有很大关系。在设计寡核苷酸时,不仅要考虑到需要一定的长度,而且要避免回文结构,否则不能与模板互补。若单链模板本身能形成二级结构,也往往会导致试验失败,这是因为 T4 DNA 多聚酶不能通过二级结构区,但 T4 基因蛋白 32 (T4 gene 32 protein) 可增强体外 DNA 合成。总之,只要诱变寡核苷酸和单链模板本身没有什么问题,试验是不难取得成功的。该方法可在已知核苷酸序列的 DNA 的任何位点进行诱变,是基因工程中一种非常有用的手段。

参考文献

- [1] Shortle, D. et al. : *Annu. Rev. Genet.*, 15: 265, 1981.
- [2] Itakura, K. et al. : *Annu. Rev. Biochem.*, 53: 323, 1984.
- [3] Norrander, J. et al. : *Gene*, 26: 101, 1983.
- [4] Sambrook, J. *Molecular cloning, a Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory,

CSH, N. Y., 4. 16, 1989.

- [5] Vieira, J. et al. : *Methods in Enzymol.* , **153**: 3, 1987.
- [6] Kunkel, T. A. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA.* , **82**: 488, 1985.
- [7] Lennox, E. S. : *Virology* , **1**: 190, 1955.
- [8] Maniatis, T. et al. : *Molecular cloning, a Laboratory Manual*, CSH Laboratory, CSH, N. Y. , 1982.
- [9] Zasloff, M. et al. : *Nucleic Acid Res.* , **5**: 1139, 1978.
- [10] Cohen, S. N. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci.* , **69**: 2110, 1973.
- [11] Sanger, F. et al. : *Proc. Nat. Acad. Sci. , USA.* , **74**: 5463, 1977.
- [12] Kunkel, T. A. et al. : *Methods in Enzymol.* , **154**: 367, 1987.
- [13] Joyce, C. M. et al. : *J. Bacteriol.* , **158**: 636, 1984.
- [14] Strockbine, N. A. et al. : *J. Bacteriol.* , **170**: 1116, 1988.
- [15] Szmelcman, S. et al. : *J. Bacteriol.* , **124**: 112, 1975.
- [16] Thirion, J. P. et al. : *Genetics* , **71**: 207, 1972.

OLIGONUCLEOTIDE DIRECTED *IN VITRO* MUTAGENESIS

Su Guofu

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

In this study, a method for oligonucleotide directed *in vitro* mutagenesis was described. It includes the following steps: clone of the gene to be mutated into the phagemid pGCI; preparation of single strand template; design and synthesis of mutated oligonucleotides; synthesis of double strand DNA. Using this method, a new BamHI site was originated at the N terminal of Stx-B and BglII site at the C terminal of Stx-B. It is ready to fuse the Stx-B gene to Lamb. This method is a very useful tool for genetic engineering.

Key words Site-directed mutagenesis; Oligonucleotide; Phagemid