DOI [illegible] cnki [illegible]
河南 农业 科学

以 PCR 为基础的定点诱变方法研究进展

黄春晓, 段学军
(中原工学院能源与环境学院, 河南 郑州 450007)

摘要: 以 PCR 为基础的定点诱变技术是近年来得到极大发展的分子生物学方法, 不仅用于基因和蛋白质的结构与功能的基础研究, 还用于定点改造目的基因。综述了以 PCR 为基础的定点诱变的各种方法, 并介绍了国内外最新的研究进展, 重点介绍并分析了单管大引物法、一步重叠延伸 PCR、多位点环状诱变 PCR 及 TAMS 定点诱变等新方法, 比较了不同方法的优缺点, 分析了存在的问题并提出解决对策。

关键词: PCR; 定点诱变; 重叠延伸法; 大引物法; 多位点环状诱变; TAMS 技术
中图分类号: Q78　　文献标识码: A　　文章编号: 1004-3268(2006)12-0005-04

以诱变改造生物体的技术已经过了从整体(细胞)诱变到局部(基因)诱变, 从体内、体外的随机诱变到体外的定点诱变[1]。定点诱变已成为分子生物学研究的常用方法, 可用于研究 DNA 的结构与功能、探索蛋白质的结构与功能、定点改造目的基因等。

定点诱变有寡核苷酸介导的定点诱变、盒式诱变和以 PCR 为基础的定点诱变[2]。近几年来, 以 PCR 为基础的定点诱变得到不断的创新和改进, 产生突变体的回收率高, 并且快速、简便、准确, 使得定点诱变越来越省时省力, 简单易行, 所以倍受研究者青睐。

1　以 PCR 为基础的定点诱变的方法及其研究进展

1.1　重叠延伸 PCR(Overlap extension PCR 简称 OE-PCR)法

重叠延伸 PCR 最早由 Higuchi R[3] 于 1988 年提出。该方法需要 4 个引物, 其中, 包括 2 个含有突变碱基的反向互补的引物, 2 个上、下游通用引物。整个诱变过程需要 3 个 PCR 反应分 2 轮进行。第 1 轮 PCR 的 2 个反应分别产生 2 个含突变位点的上下游 DNA 片断, 这 2 个 DNA 片断的末端互补。第 1 轮 PCR 的产物需要经凝胶电泳纯化。第 2 轮 PCR 将上述 2 个 PCR 产物混合, 通过末端互补配对互为引物延伸得到完整的含突变位点的全长 DNA, 再用通用引物扩增诱变的全长的 DNA。

Andreas Urban 等人[4] 于 1997 年报道了一种一步重叠延伸 PCR(One-step overlap extension PCR, 简称 OOE-PCR)(图 1)。该方法使得 3 个 PCR 反应在同一管中进行, 但首先要把目的 DNA 克隆到只有多克隆位点的方向不同的 1 对载体中, 如 pUC18 和 pUC19。这 2 个不同方向的 DNA 作为 PCR 早期反应的模板(T1 和 T2)。该方法需要 2 个互补的突变引物(B 和 C)和 1 个通用引物(A), 该通用引物的序列与载体的序列互补。在反应体系中, 加入的诱变引物的量是通用引物的 1%。这样, 在反应的早期进行指数扩增, 分别产生含突变位点的上游 DNA 片断(AB)和下游 DNA 片断(CA)。随着诱变引物(B和C)消耗殆尽, 中期的PCR过程

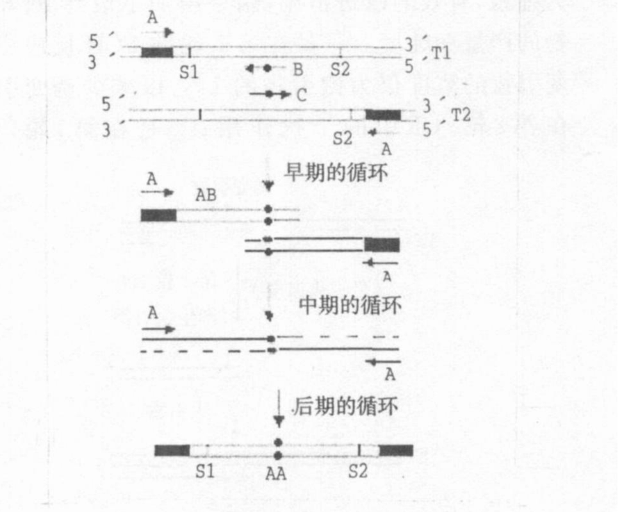

图 1　一步重叠延伸 PCR 原理

收稿日期: 2006-07-25

作者简介: 黄春晓(1968-), 女, 河南叶县人, 讲师, 硕士, 主要从事微生物分子遗传学研究。

产生非对称扩增，产生2种单链DNA，它们以互补末端配对并延伸成新的含突变位点的全长的双链DNA(AA)。这样的不对称扩增加强了2个中间产物片段的重叠末端之间的退火与双链自身复性的竞争。反应的后期，用通用引物扩增出大量的全长的突变DNA(AA)。通过限制性内切酶双酶切得到诱变基因(图1中S1和S2代表2个限制性酶切位点)。

1.2 大引物PCR(Megaprimer PCR)法

大引物PCR法由Kammann M等人[5]于1989年提出，随后经Sarkar G和Sommer S S等人[6]加以改进。该方法需2个侧引物和1个内部诱变引物，经过2轮PCR获得突变的全长DNA。第1轮PCR用诱变引物和1个侧引物，扩增产物经凝胶纯化后作为大引物再与另一侧引物进行第2轮PCR，产生全长的突变的DNA。

Picard V[7]和Song Hua Ke等[8]分别建立了单管大引物PCR(Single-tube megaprimer PCR)。单管大引物法省去第1轮PCR产物的纯化过程，实现在同一管中先后进行两轮PCR反应。Song Hua Ke提出的方案更加巧妙简单(图2)。需设计Tm值不同的2个侧引物，第1轮PCR反应用低Tm值的侧引物(F1)和诱变引物，用较低的退火温度，扩增反应产生大引物。然后再加入高Tm值的侧引物(F2)在较高的退火温度下进行第2轮的反应，扩增出全长的含突变位点的DNA产物。Song Hua Ke和Edwin L. Madison在此方法中还提出了2条更为细致、有效的改进措施，结果增加了最终PCR产物的产量和纯度。一是在第1轮的PCR反应中诱变引物的浓度仅为侧引物的1%，以减少诱变引物在第2轮PCR中的干扰作用；二是在第1轮PCR反应后亦即第2轮PCR反应前增加5个循环的不对称扩增。这5个循环的不对称扩增有利于提高其后的扩增效率。

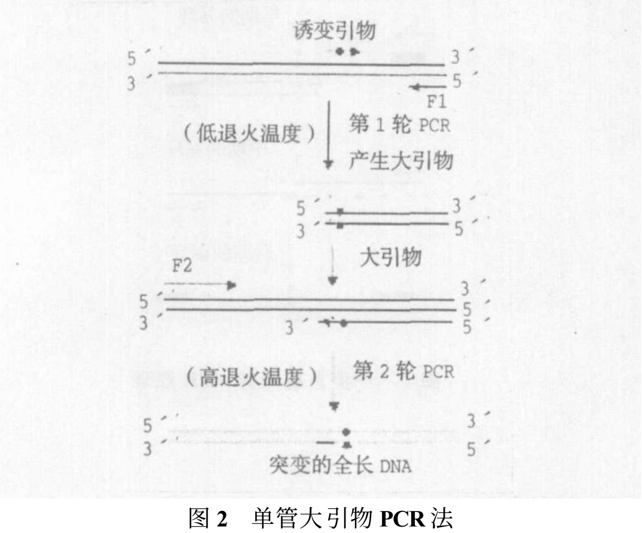

图2 单管大引物PCR法

1.3 环状诱变PCR法

环状诱变PCR是以整个带有目的基因的质粒为模板，用诱变引物进行扩增，最后产生环状的带有目的突变的质粒。包括以反向PCR为基础的快速定点诱变和同时引入多个突变位点的多位点环状诱变。

1.3.1 快速定点诱变法 快速定点诱变法以反向PCR为基础，直接以含有目的基因的环状质粒为模板，用2个反向的、5′端相邻且磷酸化的引物向2个反方向延伸，扩增出线性的双链DNA，然后用*Dpn* I酶降解甲基化或半甲基化(只含有1条模板链)的模板链，而在体外合成的突变链不受*Dpn* I酶的降解，这样可以净化突变的双链DNA。最后用连接酶连接形成带突变基因的环状质粒[9,10]。张巍等[11]利用类似的方法实现了hTNF-α基因的定点诱变。

1.3.2 多位点环状诱变法 2000年，Asako Sawano和Atsushi Miyawaki[12]对快速定点诱变进行了重大修改，报道了一种可同时引入多个突变位点的多功能的环状诱变PCR方法。

这个方法可用多个5′端磷酸化的、方向相同的诱变引物同时引入多个突变位点。主要包括几个步骤：①边扩增边连接的反应(LDA, ligation-during-amplification)。以环状质粒的一条链为模板，DNA聚合酶使多个诱变引物延伸，耐热的Taq DNA连接酶把多个引物的延伸片段连接起来，形成完整的环状双链。②亲本链的降解。用*Dpn* I降解甲基化或半甲基化的非突变的模板链。③双链质粒DNA的合成。以模板链的降解片段作大引物，以突变链为模板，合成双链的突变的质粒DNA。这种方法一次可引入多个突变位点并且1个突变位点只需1条引物。

1.4 TAMS定点诱变技术

2003年，Lei Young等人[13]报道一种TAMS(Targeted amplification of mutant strand，有目的地扩增突变链)定点诱变技术，能够一次引入多个位点的突变，并且能够有目的扩增突变链，从而使突变效率几乎达到100%。

该方法主要分3步(图3)：①线性单链DNA模板的制备。通过线性PCR制备单链DNA模板。②突变链的合成。该步骤用2个锚锭引物(Anchor5′和 Anchor3′)和多个诱变引物(Mut1 和 Mut2)。首先在多核苷酸激酶的作用下使每个引物磷酸化,接着在DNA 聚合酶的作用下使引物与线性模板退火、延伸,最后在DNA 连接酶的作用下,合成突变链。其中2 个锚锭引物在目的基因序列外,与载体的序列互补,分别引入1 个突变位点(该突变位点是有目的扩增突变链的基础)。该步骤采用的退火温度是变化的、广范围的退火温度(把反应体系置于含1L 75℃水的广口杯中,室温渐冷至37℃),以保证满足所有引物,提高突变效率。③有目的地扩增突变链:设计扩增引物(PCR5′和 PCR3′),使其3′端碱基分别与锚锭引物引入的突变碱基配对,扩增引物只能退火到突变链而不是亲本链,这个方案基于这样的一个事实,即只有引物3′端碱基完全与DNA 配对,DNA 才能得到有效的扩增。所以在这个方案中只有突变链才能扩增。

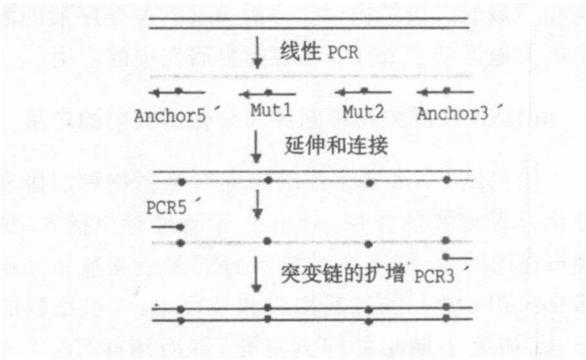

图3 TAMS定点诱变原理

2 几种 PCR 诱变方法的比较

由R Higuchi 提出的重叠延伸PCR 法因需要引物多、需两轮PCR,中间产物需要纯化,所以较为费时、费力,成本较高。一步重叠延伸PCR 法中,所有的反应可以在一个管中进行,省去了中间的纯化过程,所以操作较为简单。但PCR 反应之前需把DNA 模板克隆到2 种载体上,因此,该方法也不是最简单的方法。

较早的大引物PCR 法因为需要对第1 轮PCR 产物纯化,所以较为费时费力。而单管大引物法实现在同一管中先后进行两轮PCR 反应。该方法省时省力,尤其是对多个样品进行操作时其优点更为显著,在以PCR 为基础的诱变方法中,它是引入单位点突变的最简单、最经济的方法。

在环状诱变PCR 的方法中,由于以整个质粒为模板,所以对引物的设计及DNA 聚合酶的要求较高。如果能满足这两点要求,环状PCR 诱变也是较为快速有效的好方法。已经成功用于环状PCR 诱变的DNA 聚合酶有 *Taq*Plus,*Pwo* DNA 聚合酶、*rTth* DNA 聚合酶 XL,*Vent*R DNA 聚合酶和 *Pfu*DNA 聚合酶等[14]。

TAMS 诱变技术不仅可以同时引入多个突变位点,而且由于采用了渐变的广范围的退火温度,并且能够有目的地扩增突变链,因此,突变效率很高,几乎达到100%。另外,也可用于单链cDNA 的诱变。所以在多位点的突变试验中,TAMS 诱变技术应该是首选的。

3 以 PCR 为基础的定点诱变技术存在的问题及解决对策

3.1 诱变产物的忠实性

PCR产物有相对高的错误率,除目的突变外,常包含一些非预定突变。可以通过以下2 个方法将错误率降到最低。①限制扩增的循环数;②应用更好的热稳定DNA 聚合酶,如 *Pfu*,*Vent* 等,它们具有$3'\to5'$外切酶活性,并具有校正功能。

3.2 诱变的效率

提高诱变效率是以PCR 为基础的定点诱变面临的问题。通过PCR条件的优化、不同Tm 值的引物的巧妙的设计、不对称扩增、把引物标记上生物素分离突变DNA 等手段可以提高诱变效率。

PCR 定点诱变方法的不断创新和发展使得分子生物学关于基因和蛋白质的结构与功能的基础研究和基因工程中定点改造目的基因更加简便、高效、低耗。

参考文献:

[1] 马向东,黄春华,周俊初. 基因体外诱变[J]. 微生物学通报,2002,29(1):70-73.

[2] 罗师平,冷希冈. 基于PCR的体外诱变技术[J]. 国外医学生物医学工程分册,2005,3(28):188-192.

[3] Higuchi R,Krummel B,Saiki R K. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragment:study of protein and DNA interactions[J]. Nucleic Acids Research,1988,16(15):7351-7357.

[4] Andreas Urban,Susanne Neukirchen,Karl-Erich Jaeger. A rapid and efficient method for site directed mutagenesis using one step overlap extension PCR[J]. Nucleic Acids Research,1997,25(11):2227-2229.

[5] Kammann M,Laufs J,Schell J,*et al*. Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR)[J]. Nucleic Acids Res,1989,17(13):5404.

[6] Sarkar G,Sommer S S. The "megaprimer" method of site directed mutagenesis[J]. Bio Techniques,1990,8(4):404-407.

蝗虫线粒体 DNA(mtDNA)研究概况

乔卿梅[1], 程茂高[1], 原国辉[2]*
(1.郑州牧业工程高等专科学校生物工程系, 河南 郑州 450011; 2.河南农业大学植物保护学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 线粒体 DNA(mtDNA)具有快速进化、不易发生突变等独特的优点, 正成为昆虫系统发育、种群遗传变异与分化研究和近缘种、种下分类单元鉴定的理想工具之一。文中介绍了应用线粒体 DNA 研究蝗虫物种起源与分化、系统发育、遗传多样性及体色分化等方面的进展概况。

关键词: 蝗虫; mtDNA; 分子系统学
中图分类号: Q731　　文献标识码: A　　文章编号: 1004－3268(2006)12－0008－03

线粒体 DNA(mtDNA)以双链共价闭合环状分子形式广泛分布于动物的各种组织中, 具有快速进化、在遗传过程中不发生基因重组、倒位和易位等突变, 以及严格遵守母系遗传等特点, 加之其结构紧密而易于分离, 已成为研究动物系统发育、种群遗传变异与分化和进行近缘种、种下分类单元鉴定的理想工具之一。

飞蝗(*Locusta migratoria*)线粒体 DNA 全序列的测定结果表明: 其全长为 15722bp, 包括 2 个 rRNA, 20 个 tRNA(其中 tRNAlys 和 tRNAasp 基因发生重排), 13 个蛋白编码基因和 1 个重复区, A＋T 含量为75.3%; 虽然编码基因 A＋T 含量(74.1%)与线粒体基因组 A＋T 含量相似, 但是在其第 3 个密码子位置上, 胞核嘧啶含量很高; A＋T 富集区域中的 A, T 核苷含量要比其他昆虫低; 其最大和最小的 rRNA 基因分别长 1314bp 和 827bp, 并且这 2 种序列都能够折叠形成与果蝇相应的推测结构相类似的二级结构[1]。飞蝗 mtDNA 全序列的测定极大地推动了 mtDNA 在蝗虫研究中的应用。

1　mtDNA 在蝗虫物种起源与分化研究中的应用

线粒体 DNA 多态性的研究对推测物种起源和分化有着重要的作用。Flook 等通过对包括 32 种蝗虫在内的 38 种昆虫线粒体 rRNA 小亚基和大亚基长 630bp 片段的碱基构成和替代率、二级结构的分析, 研究了昆虫的序列进化, 并对用 rRNA 片段

收稿日期: 2006－05－13
基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(39630210)
作者简介: 乔卿梅(1974－), 女, 河南南阳人, 讲师, 硕士, 主要从事植物病虫害防治研究。
通讯作者: 原国辉(1959－), 男, 河南温县人, 教授, 博士生导师, 主要从事寄生虫综合防治与作物安全生产研究。

[7] Picard V, Ersdal Badju E, Lu A, *et al*. A rapid and efficient one tube PCR based mutagenesis technique using Pfu DNA polymerase[J]. 1994, 13(22): 2587－2591.

[8] Song Hua Ke, Edwin L Madison. Rapid and efficient site directed mutagenesis by single tube megaprimer PCR methed[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 16(25): 3371－3372.

[9] C W 迪芬巴赫, G S 德维克斯勒. PCR 技术实验指南(第 1 版)[M]. 黄培堂, 俞炜源, 陈添弥, 等译. 北京: 科学出版社, 2002. 437－439.

[10] Weiner M P, Costa G L. Rapid PCR site directed mutagenesis[J]. PCR Methods Appl, 1994, 4(3): 131－136.

[11] 张巍, 沈倍奋. 一种快速简便的定点突变方法[J]. 免疫学杂志, 2003, 19(3): 8－11.

[12] Asako Sawano, Atsushi Miyawaki. Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site directed and semi random mutagenesis[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(16): 78.

[13] Lei Yong, Qihan Dong. TAMS technology for simple and efficient in vitro site directed mutagenesis and mutant screening[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(3): 11.

[14] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 黄培堂, 汪嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002. 1095－1096.