

## 用优化的 OE-PCR 法构建 C II TA 中间缺失突变体

管 政, 沈 茜\* (第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**以构建缺失第 109~226 位氨基酸密码子的 MHC II 类分子反式激活因子(MHC class II molecule transactivator, C II TA)突变体为例探索一种简便、稳定的构建中间缺失突变体的方法。**方法:**首先按照传统重叠延伸 PCR 方法的原理扩增缺失片段两端的基因片段,再将两片段混合,在不加入外围引物的情况下进行 8 次 PCR 循环以有效完成重叠延伸,然后再加入引物进行目的片段指数扩增,将扩增产物直接克隆至真核表达载体 pIRES。**结果:**成功地构建出缺失第 109~226 位氨基酸密码子的 C II TA 突变体。**结论:**优化后的重叠延伸 PCR 法(OE-PCR)克服了传统方法的诸多弊端,非常适合于构建中间缺失突变体,值得推广。

**[关键词]** 重叠延伸 PCR 法;中间缺失突变体;MHC II 类分子反式激活因子

**[中图分类号]** Q 784 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-1014-04

## Construction of a middle fragment-deleted class II molecule transactivator mutant by modified OE-PCR technique

GUAN Zheng, SHEN Qian\* (Department of Clinical Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To develop a simple and efficient method for constructing a middle fragment-deleted mutant of MHC class II molecule transactivator (C II TA) mutant with the 109<sup>th</sup> to 226<sup>th</sup> amino acid codons deleted. **Methods:** Two gene fragments at each end of the deleted C II TA gene were obtained by OE-PCR method and were mixed together for 8 PCR cycles without primers to achieve effective overlapping, then 2 primers was added for amplification of the desired fragments. The amplification products were subsequently cloned into eukaryotic vector pIRES for identification. **Results:** A mutant of C II TA with the 109<sup>th</sup> to 226<sup>th</sup> amino acids deleted was successfully constructed. **Conclusion:** This modified OE-PCR technique overcomes some shortcomings of traditional method and is very suitable for constructing mutants with middle fragment deletion, making it worth to be popularized.

**[KEY WORDS]** overlap extension by polymerase chain reaction; middle fragment deletion mutant; MHC class II molecule transactivator

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9):1014-1017]

体外基因定点突变(site-directed mutagenesis)技术是研究蛋白质结构和功能之间复杂关系的有力工具,也是在实验室中改造和优化基因常用的手段。进行定点突变的方法很多,其中以重叠延伸 PCR 法(overlap extension by polymerase chain reaction, OE-PCR)最为有效<sup>[1]</sup>。由于该方法本身独特的技术特点,在构建中间片段缺失突变体时常被采用,但是传统方法不太稳定、重复性较差,特别对于构建较大片段的中间缺失突变体(>1.5 kb)时这些缺点尤为突出。在本研究中,我们以构建第 109~226 位氨基酸密码子缺失的小鼠 MHC 类分子反式激活因子(MHC class II molecule transactivator, C II TA)突变体基因为例,对传统方法进行了适当的优化,最终成功构建了突变体基因并克隆入表达载体 pIRES,实践证明优化后的 OE-PCR 方法能够简便高效的构建中间缺失突变体。

## 1 材料和方法

## 1.1 材料 携带小鼠 IV 型 C II TA 基因全长的重组质粒

pIRES-C II TA 由本实验室克隆;PCR 引物均由上海捷倍思基因技术有限公司设计合成;PCR 反应所用的 Pyrobest<sup>TM</sup> DNA 聚合酶、LA-Taq 酶以及限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 均为 TaKaRa 公司产品(大连宝生物公司提供);T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 Promega 公司;真核表达载体 pIRES 购自 Clontech 公司;质粒少量抽提和 DNA 凝胶回收纯化试剂盒购自浙江维特洁公司;JM109 感受态细菌由本实验室保存。

1.2 引物设计 缺失碱基部分将 C II TA 基因分成两部分,分别是上游小片段和下游大片段(以下分别简称为 F1 和 F2)。扩增 F1 的正向引物 F1F: 5'-TAA CGA ATT CAG ATC TAT GGG TCT GGG ATC TCC-3', 反向引物 F1R: 5'-GGA GGT CAG CGC AGG TTC GTT CTC ACC AAA GCC TTC-3'; 扩增 F2 的正向引物 F2F: 5'-GGA AGG CTT TGG

**[基金项目]** 上海市科委联合利华研究与发展基金(200305), Shanghai-Unilever Research and Development Fund(200305)。

**[作者简介]** 管 政, 硕士。

\* Corresponding author. E-mail: msminli@hotmail.com

TGA GAA CGA ACC TGC GCT GAC CTC-3', 反向引物 F2R:5'-CCG CCT TCT AGA GTC ATC TCA GAC TGA TCC TG-3'。引物 F1F 从 CⅡTA 基因的起始密码子开始, 在 5' 端加上了 *EcoR* I 的酶切位点并加了 4 个保护碱基; 引物 F2R 的 5' 端加了 *Xba* I 的酶切位点, 加了 6 个保护碱基。引物 F1R 和 F2F 反向互补, 不同下划线表示引物跨越缺失突变区域, 相同下划线部分为互补重叠序列, 总长度为 36 个碱基。

1.3 采用优化后的 OE-PCR 法扩增中间缺失 DNA 片段共分 3 步进行(图 1)。

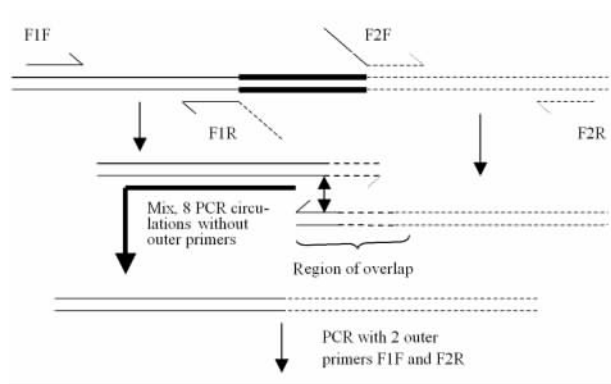


图 1 优化的 OE-PCR 法构建中间缺失突变体示意图

Fig 1 Schematic depiction for constructing middle fragment-deleted mutant with modified overlap extension by PCR

1.3.1 步骤一 分别扩增并纯化片段 F1 和 F2 抽取重组质粒 pIRES-CⅡTA, 纯度和浓度采用分光光度计法测量并适当稀释作为 PCR 反应模板。扩增片段 F1 的 PCR 反应体系为: 纯水 37.75  $\mu$ l, 10 $\times$  Pyrobest Buffer 5  $\mu$ l, dNTP(各 2.5 mmol/L) 4  $\mu$ l, 引物 F1F 和 F1R(20  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ l, Pyrobest-Taq 酶 0.25  $\mu$ l, 稀释质粒模板 1  $\mu$ l, 体系共 50  $\mu$ l。循环条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min(循环 25 次); 72 $^{\circ}$ C 5 min。反应完成后, 胶回收片段 F1。将引物更换为 F2F 和 F2R, 按照如上操作扩增并纯化片段 F2。

1.3.2 步骤二 在不加入引物的情况下进行重叠延伸并扩增分别取纯化后的 F1 和 F2 的 PCR 产物, 用紫外分光光度法进行定量, 稀释成浓度为 10 ng/ $\mu$ l 的 PCR 模板, 然后配制如下反应体系: 纯水 38.75  $\mu$ l, 10 $\times$ LA Buffer 5  $\mu$ l, dNTP(各 2.5 mmol/L) 4  $\mu$ l, LA-Taq 酶 0.25  $\mu$ l, F1 模板 1  $\mu$ l, F2 模板 1  $\mu$ l, 体系共 50  $\mu$ l。将该反应体系进行 PCR 循环, 循环条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min(循环 8 次); 72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.3.3 步骤三 在加入引物的情况下 PCR 扩增缺失第 109~226 位氨基酸密码子的 CⅡTA 突变体基因(CⅡTA $\Delta$ 109-226AA)上述步骤完成后, 再向反应体系中加入引物 F1F(20  $\mu$ mol/L) 和 F2R(20  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ l。循环条件

为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min(循环 20 次); 72 $^{\circ}$ C 5 min。反应完成后采用与前述相同的方法回收并纯化目的片段。

1.4 CⅡTA $\Delta$ 109-226AA 基因克隆入载体 pIRES 分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切空载体质粒 pIRES 以及 CⅡTA $\Delta$ 109-226 基因的 PCR 产物(两端分别带有 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点), 然后以低熔点琼脂糖凝胶电泳回收目的片段, 再用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接, 转化 JM109 感受态细胞, 用 1 mg/L 氨苄青霉素平板筛选。挑克隆抽质粒, 酶切鉴定后获得阳性克隆, 命名为 pIRES-CⅡTAm, 并将阳性克隆送公司进行测序。

1.5 对照实验

1.5.1 对照实验一 步骤一和步骤三同上, 步骤二的反应体系同上, 反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 70 $^{\circ}$ C 5 min。

1.5.2 对照实验二 步骤一同上, 然后配制如下反应体系: 纯水 36.75  $\mu$ l, 10 $\times$ LA Buffer 5  $\mu$ l, dNTP(各 2.5 mmol/L) 4  $\mu$ l, LA-Taq 酶 0.25  $\mu$ l, F1 模板 1  $\mu$ l, F2 模板 1  $\mu$ l(浓度皆为 10 ng/ $\mu$ l), 引物 F1F(20  $\mu$ mol/L) 和 F2R(20  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ l, 体系共 50  $\mu$ l。将该反应体系进行 PCR 循环, 循环条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 5 min(循环 25 次); 72 $^{\circ}$ C 5 min。

## 2 结果

2.1 优化的 OE-PCR 法扩增 CⅡTA $\Delta$ 109-226AA 基因 以重组质粒 pIRES-CⅡTA 为模板, PCR 分别扩增出长度约为 340 bp 的片段 F1 和长度约为 2.5 kb 的片段 F2(图 2), 然后按照优化后的方法, 扩增出长度约为 2.8 kb 的 CⅡTA $\Delta$ 109-226AA 基因(图 3)。

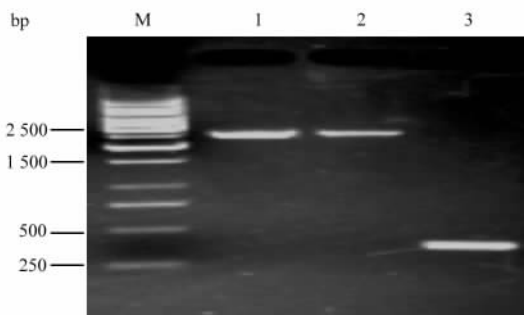


图 2 片段 F1 和片段 F2 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig 2 Identification of PCR product of fragment F1 and F2 by agarose gel electrophoresis

M; 1 kb DNA ladder; 1, 2: PCR product of fragment F2; 3: PCR product of fragment F1

2.2 重组质粒 pIRES-CⅡTAm 的双酶切鉴定 重组质粒 pIRES-CⅡTAm 使用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切后可见 2 条电泳区带(图 4), 位于 6 kb 附近的泳带为载体 pIRES, 位于 3 kb 附近的泳带很可能是 CⅡTA $\Delta$ 109-226AA 基因。

2.3 重组质粒 pIRES-C II TAm 的测序结果 测序结果表明待测质粒上已成功插入的 C II TA $\Delta$ 109-226AA 基因且方向正确,缺失的碱基位置为 C II TA 基因 5'端第 109~226 位氨基酸密码子,与实验构想完全吻合,并且未发生移码或错义突变(图 5)。

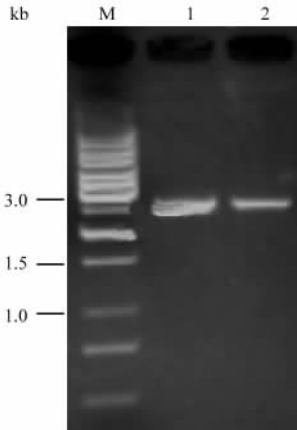


图 3 C II TA $\Delta$ 109-226AA 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig 3 Identification of PCR product of

C II TA $\Delta$ 109-226AA by agarose gel electrophoresis

M: 1 kb DNA ladder; 1,2: PCR product of C II TA $\Delta$ 109-226AA

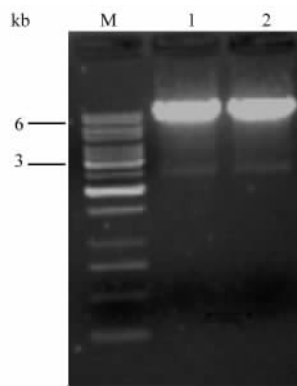


图 4 pIRES-C II TAm 的双酶切鉴定

Fig 4 Double enzyme digestion analysis of pIRES-C II TAm

M: 1 kb DNA marker; 1,2: pIRES-C II TAm / EcoR I and Xba I

2.4 对照实验结果 两组对照实验均未扩增出目的片段。

### 3 讨论

体外定点突变(site-directed mutagenesis)技术改变了过去只能诱变随机突变体的落后状况,使精确定位突变部位成为可能,极大地促进了生物学及其相关领域的发展。目前定点突变方法主要分为 PCR 突变法及非 PCR 突变法两大类,每大类又具体分成多种不同的方法,每种方法都有其优缺点,在使用时应根据实际情况合理选择。

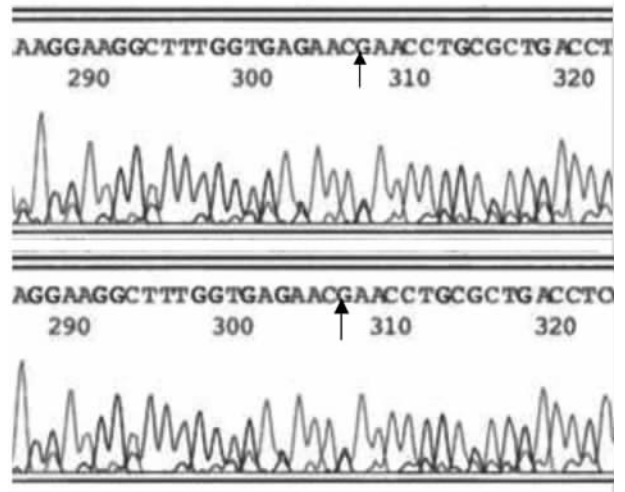


图 5 C II TA $\Delta$ 109-226AA 的正反测序结果 (缺失部位以箭头表示)

Fig 5 Sequencing results of C II TA $\Delta$ 109-226AA

The deleted area was marked with arrows

片段缺失可分为 N 端缺失、C 端缺失和中间片段缺失。相对于构建其他类型缺失突变体来说,构建中间片段缺失突变体难度较大,并且可供选择的方法不多,因此较为棘手。文献报道中较常出现的是酶切法,比如 Chin 等<sup>[2]</sup>在构建 C II TA 中间缺失突变体时就是采用此方法的。其原理是首先在目的缺失片段两端进行定点突变,产生相同的新生酶切位点,然后酶切去除缺失片段,再重新连接成突变基因。该方法虽较为成熟,但步骤较为烦琐、实验周期较长,并且还受酶切位点的严格限制。OE-PCR 法最早由 Higuchi 等提出的,它是一种通过复制时 DNA 链的交错延伸而实现 DNA 片段拼接的 PCR 方法,目前仍有广泛的应用<sup>[3]</sup>。该法独特的技术优势以及 PCR 法本身所具有的周期短、操作简便等特点使其逐步成为在构建中间缺失突变体时替代酶切法的常用手段。但是该法也存在一些不足,主要表现为实际操作有难度、稳定性较差,尤其是在构建较大的中间缺失突变体时更是如此,因而在某种程度上限制了它的应用范围。

本研究以构建 C II TA 中间缺失突变体为例,对传统 OE-PCR 法进行优化,以期使其更易控制,提高结果的稳定性。在步骤一中我们仍然按照传统方法的原理和方法设计引物并扩增出片段 F1 和 F2,但优化方法的步骤二是将片段 F1 和 F2 混合后在不加入外围引物 F1F 和 F2R 的情况下进行了 8 次 PCR 循环,这一步骤与传统方法不太相同。若按照传统方法,这一步骤应该是在固定的温度下退火延伸或者跳过直接进入 PCR 指数扩增全长模板的步骤,在本研究中我们也分别按此进行了对照实验。最后在加入外围引物 F1F 和 F2R 情况下进行扩增突变体基因全长的 PCR 循环,这一步骤与 Higuchi 等人所述的传统方法相同。实验结果显示使用优化后的 OE-PCR 法成功扩增出 C II TA $\Delta$ 109-226AA 基因并克隆入载体,而使用传统方法的两对照实验均

未获成功。虽然从理论上两对照实验与采用优化法实验的原理并无本质区别,但实验结果的确完全不同。究其原因,我们认为对于对照实验二来说由于其忽略步骤二,将外围引物直接加入步骤三中,因此反应液中高浓度的引物可能封闭了模板片段 F1 和 F2 的空间结构,从而影响两者重叠延伸以获得 CⅡTA 突变体基因全长;而对照实验一的步骤二仅仅进行一次退火和延伸,可能不足以有效地形成突变体基因全长,特别是在两拼接片段较大的情况下,DNA 片段折叠成较复杂的空间结构可能阻碍了片段之间的有效重叠。优化后的 OE-PCR 法恰恰解决了上述的两个问题,首先步骤二的反应体系中没有加入引物,因此不会由于引物封闭作用而影响片段的拼接;其次由于进行了 8 次 PCR 循环,通过反复的变性和退火增加了模板片段 F1 和 F2 之间重叠的概率,同时两片段也可以起到类似引物的作用,从而增加突变体基因全长的原始产出,此原理有些类似于大引物法<sup>[4]</sup>。

另外,在优化法实验的步骤二中我们将退火时间延长到 2 min,并且尽量降低退火温度,这样做是为了有利于片段 F1 和 F2 在退火时能够有效重叠从而延伸出突变体基因全长。同时片段 F1 和 F2 在反应液中的浓度也很重要,浓度应控制在 10 ng/ml 左右,过高和过低都不利于重叠延伸。值得一提的是我们曾经采用高保真酶来扩增片段 F2,可能是由于该片段较大的缘故,一直未能成功,后来不得已采用 LA-*Taq* 酶,不过最终的测序结果显示未有错义突变发生;由于扩增片段 F2 时采用的是 LA-*Taq* 酶,因此该片段 3' 末端会带有碱基 A,它的存在是否造成在随后的片段拼接时发生点突变

或移码突变,我们不得而知,不过这种情况并未发生。尽管如此,我们仍然强烈建议实验中尽量使用高保真 DNA 聚合酶。

总之,通过这种优化的 OE-PCR 法,我们成功地扩增了缺失第 109~226 位氨基酸密码子的小鼠 CⅡTA 突变体基因,并成功克隆入表达载体。研究结果证实了这种优化的 OE-PCR 法能够快捷、高效地构建中间缺失突变体,应加以推广。

#### [参考文献]

- [1] Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988,16:7351-7367.
- [2] Chin KC, Li GG, Ting JP. Importance of acidic, proline/serine/threonine-rich, and GTP-binding regions in the major histocompatibility complex class II transactivator: generation of transdominant-negative mutants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997,94:2501-2506.
- [3] An Y, Ji J, Wu W, et al. A rapid and efficient method for multiple-site mutagenesis with a modified overlap extension PCR[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005,68:774-778.
- [4] Brons-Poulsen J, Petersen NE, Horder M, et al. An improved PCR-based method for site directed mutagenesis using mega-primers[J]. *Mol Cell Probes*, 1998,12:345-348.

[收稿日期] 2005-12-06

[修回日期] 2006-05-22

[本文编辑] 曹静

## 《中国医药导刊》征订启事

欢迎订阅《中国医药导刊》(双月刊),本刊刊号:CN11-4395/R,ISSN 1009-0959,广告经营许可证:京西工商广字第 0111 号  
《中国医药导刊》杂志由国家食品药品监督管理局主管,国家食品药品监督管理局信息中心主办,国内外公开发行的医药科技期刊。编委会由总编辑国内著名心血管专家胡大一教授领衔广揽各学科 130 多位著名临床医药学权威专家组成。报道内容主要包括医疗与药品领域的法规、临床、研究、评价等方面的研究论文。本刊紧密结合临床医疗实际,突出先导性、实用性和时效性。也是药品和医疗设备生产、营销企业了解我国临床需求信息的重要窗口。2007 年为双月刊,大 16 开本,80 页,每册定价 15 元,共 90 元。由邮局向全国征订发行,邮发代号 2-492。读者可在附近邮局订阅或拨打“11185”邮政热线电话订阅。欢迎广大读者、作者订阅本刊,踊跃来稿,刊登广告。

联系办法:汇入行开户名称:国家食品药品监督管理局信息中心

开户行:建设银行北京展览路支行;帐号:6510003042610002517

通讯地址:北京西城区北礼士路甲 38 号局信息中心《中国医药导刊》,邮编:100810

电话:62219478,62214715;传真:62214866;

E-mail:cjmg-s@163.com;联系人:苍宁