基因的多点定位突变方法的研究

——双点定位突变法改造人α心钠素基因

杨 迪 谢 毅 施 文 闵永浩 王启松

（复旦大学遗传学研究所，上海）

关键词 定位突变、双点定位突变、人心钠素

定位突变作为基因工程和蛋白质工程研究中的一种基本方法，已广为应用。定位突变法可利用噬菌体 M_{13} 单链 DNA 作为基因载体，在化学合成的寡聚核苷酸引物的诱导下，把碱基突变导入基因的任何预定位置。但经典的方法[1]常常需要通过碱性蔗糖梯度离心、凝胶电泳等耗时而复杂的手段富集经体外诱变的闭环双链 DNA，突变基因的产率一般较低，且只进行碱基的单点突变。因此，当某些基因需要进行间隔一段距离的多点突变时，用此法逐一改变碱基效率甚低。

本文的研究目的是建立一种多点定位突变的新方法。我们以克隆在 M_{13}mp 8 中的人α心钠素基因为材料，先制备缺口双链 DNA，然后用两种诱变引物同时与单链 DNA 模板退火在体外制备异源双链 DNA，转化大肠杆菌。运用通用性强的温度洗膜法筛选出突变株，一次性获得了人α心钠素基因双点突变的突变株，且双点突变率可达 10% 左右。该方法可广泛而有效地运用到其它的基因及 DNA 突变中。

一、材料和方法

1. 噬菌体和细菌菌株 大肠杆菌 JM103 和噬菌体 M_{13}mp8/hANP[2] 由本实验室保存。噬菌体 M_{13}mp8 双链 DNA 由华美生物工程公司提供。

2. 试剂和酶 合成 DNA 寡聚核苷酸片段所用的试剂为美国 Applied Biosystems 公司产品；r-^{32}P-ATP 和 α-^{32}P-dATP 为英国 Amersham 公司产品；限制性内切酶 EcoRI、BamHI 和 BanII 为美国 Biolabs 公司产品。

3. 异源双链 DNA 的构建 取经 EcoRI 和 BamHI 酶双切的 M_{13}mp8 双链 DNA 与 M_{13}mp8/hANP 单链 DNA 混合，自 100℃ 退火至室温，即为缺口双链 DNA 的混合液。再取化学合成的诱变引物 SM-1 和 SM-2（序列见图 1），用 T_4 多核苷酸激酶在其 5′-端加磷，再与缺口双链 DNA 混合，于 65℃ 退火至室温，加 T_4-DNA 聚合酶 1 补齐缺口，加 T_4-DNA 连接酶将 DNA 断口连接，此即为异源双链 DNA 混合物，可直接用于转化。具体操作见文献[2]。

4. 噬菌体单链 DNA 的制备 按 Zoller 和 Smith[3] 的方法进行。

5. 寡聚核苷酸片段的化学合成、纯化和 ^{32}P 末端标记、大肠杆菌转化、Dot blot 杂交及

本文 1988 年 1 月 22 日收到，1988 年 5 月 25 日收到修改稿。

DNA 序列测定　均参照文献[2]。

二、 结果和讨论

1. 异混双链 DNA 的构建　我们以人 α-hANP 基因作为双点定位突变的材料，设计了诱变引物 SM-1 和 SM-2，通过一次性体外诱变，将原基因编码第 16 位 Gly 的密码子 GGT 改成 GGG，编码第 25 位 Ser 的密码子 TCT 改成编码 Thr 的密码子ACT. α-hANP 基因的部分序列及诱变引物 SM-1，SM-2 的序列见图 1. 构建异源双链 DNA 及人 α 心钠素基因的双点定位突变的实验流程见图 2.

2. 突变株的筛选　取异源双链 DNA 混合液转化大肠杆菌 JM103，然后任选 20 个白色噬菌斑，制备其单链 DNA，每个样品点 1μl(0.01μg) 和 5μl(0.05μg) DNA 在硝酸纤维薄膜上，并以 M_{13}mp8 和 M_{13}mp8/hANP 的单链 DNA 作对照. Dot blot 杂交首先选用 SM-1 作探针，在 42℃ 杂交 10h. 将膜取出，分别在 42, 49, 52, 65℃ 温度下用 6 × SSC 溶液洗膜，每次洗膜后经放射自显影检测，结果见图 3. 从图 3 可知，洗膜温度为 42℃ 时，除 M_{13}mp8 对

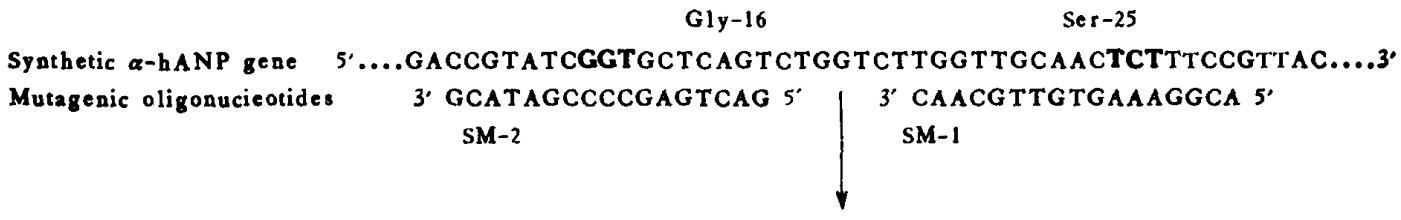


图 1　用诱变引物 SM-1 和 SM-2 将双点突变引入 α-hANP 基因

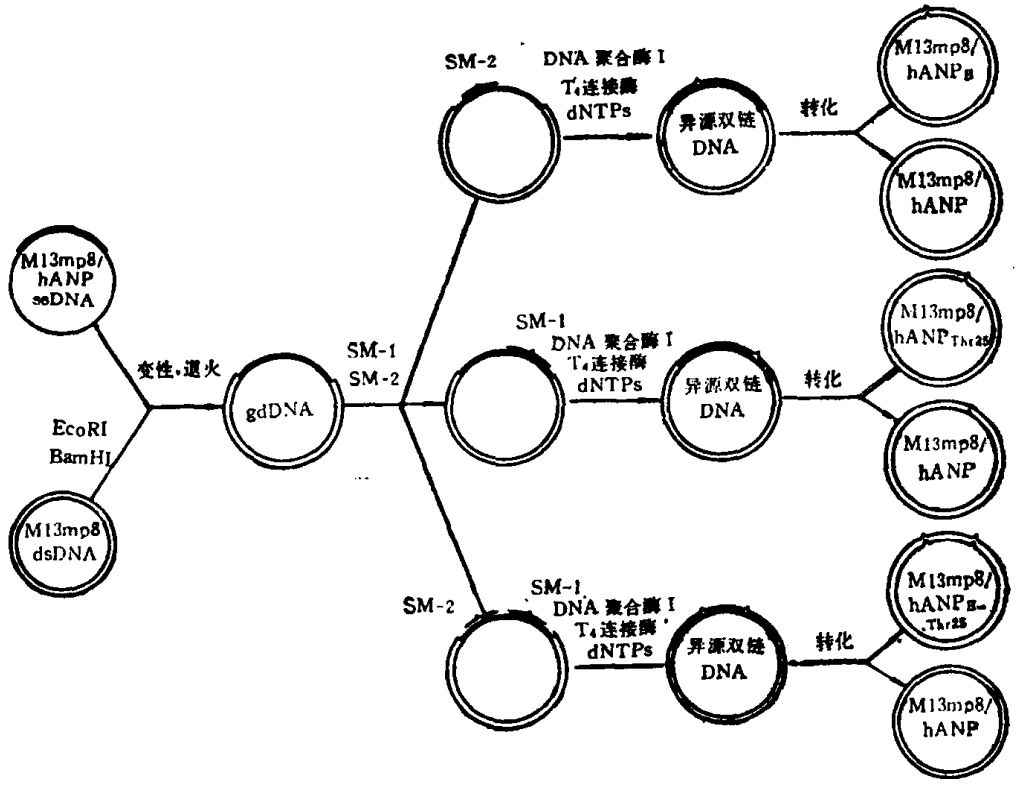


图 2　用双点定位突变法改造α-hANP 基因的实验示意图

ssDNA: 单链 DNA, dsDNA: 双链 DNA, gdDNA: 缺口双链 DNA, SM-1, SM-2 两种诱变引物

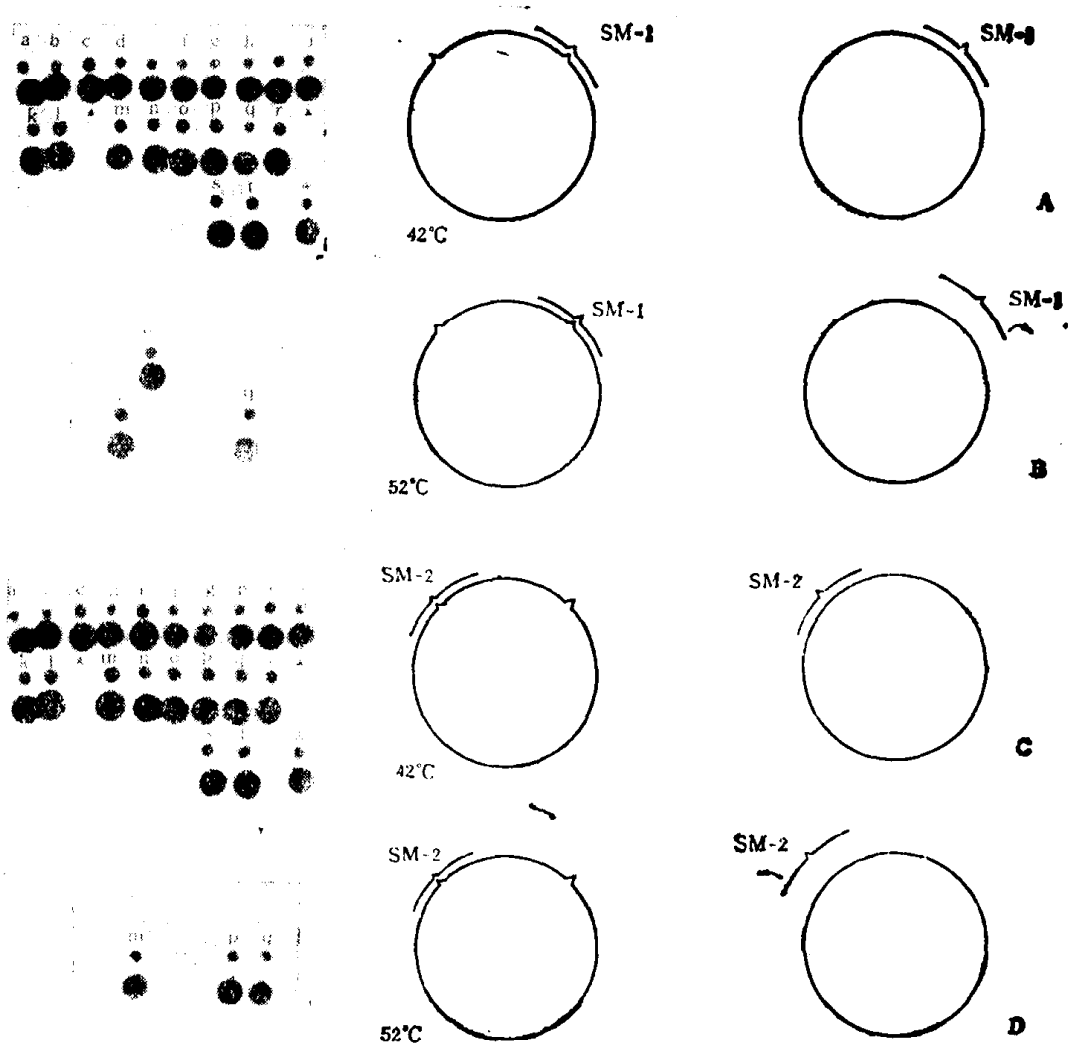


图 3　温度梯度洗膜法筛选双点突变株

样品 a—t 均为经双点诱变的待选白色噬斑. ▲ 为 $M_{13}mp8$ 对照; ⊙ 为 $M_{13}mp8/hANP$ 对照.

A. 42℃ 洗膜, SM-1 与突变株 ssDNA 和 $M_{13}mp8/hANP$ ssDNA 均能杂交,故除 $M_{13}mp8$ 为阴性外, 所有样品都呈阳性;

B. 52℃ 洗膜,由于 SM-1 与 $M_{13}mp8/hANP$ ssDNA 之间存在一对错配碱基,在此温度下不能杂交. 而 SM-1 与突变株 ssDNA 完全互补,故仅留样品 e, m, q 为阳性,即为突变株;

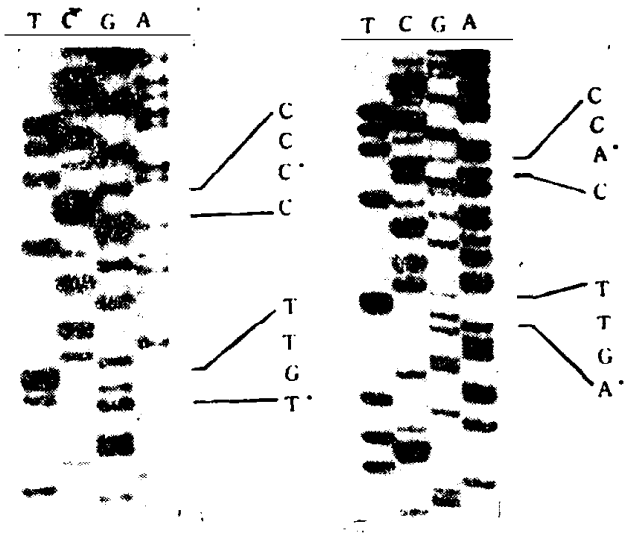
C. 经 65℃ 洗膜后,再用 SM-2 杂交, 42℃ 洗膜,除 $M_{13}mp8$ 是阴性外,所有样品都呈阳性;

D. 52℃ 洗膜,仅留样品 m, p, q 为阳性

照是阴性外,其余样品均为阳性. 洗膜温度升至 52℃ 时. 除样品 e, m, q 呈阳性外, 其它样品转为阴性. 洗膜温度升至 65℃ 时,全部样品均呈阴性. 然后再用 SM-2 作探针, 在同一张膜上重复上述杂交及洗膜操作. 当洗膜温度为 42℃ 时,除 $M_{13}mp8$ 是阴性外, 其余样品均是阳性. 当温度升至 52℃ 时, 样品 m, p, q 呈阴性. 实验确定 m, q 为双点突变株, e, p 为单点突变. 探针与 DNA 单链模板的杂交解离温度可用 Wallace 公式[4]来大略估计.

3. 突变株的鉴定　经 SM-1 和 SM-2 诱变的突变株,称之为 $M_{13}mp8/hANP_{B-Thr25}$; 经 SM-1 诱变的单点突变株称之为 $M_{13}mp8/hANP_{Thr25}$; 经 SM-2 诱变的单点突变株称之为 $M_{13}mp8/hANP_B$. 突变株的鉴定选用酶切电泳图谱分析和 DNA 序列分析法.

由于 $M_{13}mp8/hANP_B$ 及 $M_{13}mp8/hANP_{B-Thr25}$ 的基因序列均由原来的 5′CGGT*GCTC



双点突变株 $hANP_{B-Thr25}$ 基因　　未发生突变 α-hANP 基因

图 4　人α心钠素基因（$M_{13}mp8/hANP$）和经双点突变的突变株基因（$M_{13}mp8/hANP_{B-Thr25}$）的 DNA 序列

AG3′ 改为 5′CGGG*GCTCAG3′，这样就产生了一个限制性内切酶 BanII 的识别位点（GPuGC PyC）。载体 $M_{13}mp8$ 原有一个 BanII 切点。用 BanII 切 $M_{13}mp8/hANP$ DNA 和 $M_{13}mp8/hANP_{B-Thr25}$（或 $M_{13}mp8/hANP_B$）DNA，前者为 7.3kb 单片段，而后者将切成 6.7kb 和 640bp 两个片段。

取样品 e，p，q 进行序列测定，序列分析证实了第 e 另样品是经 SM-1 诱变的单点突变株；第 p 号样品是经 SM-2 诱变的单点突变株；而第 q 号样品是经 SM-1 和 SM-2 同时诱导的双点突变株。图 4 列出了 q 号样品突变前、后的序列分析结果。

本文的实验吸收了异源 M_{13} 双链法有较高突变率的优点。该法可以大大提高定位突变的准确性，同时因缩小了缺口长度，使缺口补齐的效率大大提高。这两个因素均使突变率增高。另外，我们选用的温度差异洗脱法筛选突变株，使本实验可对基因的任何位置均可进行突变。最后，本实验的操作简便，无需特殊试剂，且通过一次实验，可同时筛选到双点突变株和两种不同的单点突变株。

本实验将 α-hANP 结构基因编码第 16 位 Gly 的密码子 GGT 改变为 GGG，目的是产生一个 BanII 的酶切位点，便于以后的基因操作；同时，将编码第 25 位 Ser 的密码子 TCT 改变成编码 Thr 的密码子 ACT，以期获得一种在生物体内延长半衰期的心钠素类似物。点突变后的人α心钠素基因的表达工作将另文报道。

参　考　文　献

[1] Zoller, M. J. and Smith, M., *Nucl. Acids Res.*, **10**(1982), 4687.
[2] 杨迪等，*生物化学杂志*(待发表).
[3] Zoller, M. J. and Smith, M., *DNA*, **3**(1984), 479.
[4] Wallace, R. B. et al., *Nucl. Acids Res.*, 6(1979), 3543.
[5] Norris, R. F. et al., *Nucl. Acids Res.*, **11**(1983), 5103.
[6] Kramer, W. et al., *Nucl. Acids Res.*, **12**(1984), 9441.
[7] Taylor, J. W. et al., *Nucl. Acids Res.*, **13**(1985), 8764.
[8] Bueel, G. et al., *Nucl. Acids Res.*, **13**(1985), 1923.
[9] Wells, J. A. et al., *Gene*, **13**(1985), 315.
[10] Grundstrom, T. et al., *Nucl. Acids Res.*, **13**(1985), 3305.