

利用优化的反向 PCR 策略高效构建多位点突变体

徐碧林¹, 朱庆², 陈岩岩¹, 郑永良¹

1 黄冈师范学院 生物与农业资源学院 经济林种质资源改良与综合利用湖北省重点实验室 湖北省大别山特色资源开发协同创新中心, 湖北 黄冈 438000

2 武汉市疾病预防控制中心, 湖北 武汉 430015

徐碧林, 朱庆, 陈岩岩, 等. 利用优化的反向 PCR 策略高效构建多位点突变体. 生物工程学报, 2020, 36(4): 801–809.

Xu BL, Zhu Q, Chen YY, et al. Optimized inverse PCR strategy for constructing multilocus mutants efficiently. Chin J Biotech, 2020, 36(4): 801–809.

摘要: 蛋白质的突变体是研究其结构和功能的基础, 文中旨在建立一种高效、快捷的多位点突变体构建方法。当要突变 4 个及以上相邻的氨基酸残基时, 设计两长两短 (长引物 I/III、短引物 II/IV) 4 条引物: 长引物包含突变位点, 且突变碱基数 ≤ 20 bp, 短引物不包含突变位点; 两条引物的 GC 含量 ≤ 80%、退火温度之差 ≤ 40 °C, 分别以 I/II 和 III/IV 两对引物和模板进行两组反向 PCR 扩增。扩增后各体系均可得到含有突变位点的非甲基化线性质粒, 且以 I/II 和 III/IV 为引物扩增得到的两组线性质粒的断开位点分布在突变位点两侧。用 *Dpn* I 酶切回收后等摩尔比混合的 PCR 产物除去甲基化模板, 再进行一轮变性和退火处理, 两组线性质粒在 95 °C 变性后互相以来自对方的单链 DNA 为模板退火形成开环质粒, 转化大肠杆菌感受态细胞即可得到包含突变位点的转化子。结果表明, 该方法可同时突变 4–11 个连续氨基酸残基 (8–20 bp), 将大幅简化多位点突变体的构建, 从而进一步提高蛋白质结构和功能研究的效率。

关键词: 引物, 反向 PCR, 定点突变, 多位点突变体

Optimized inverse PCR strategy for constructing multilocus mutants efficiently

Bilin Xu¹, Qing Zhu², Yanyan Chen¹, and Yongliang Zheng¹

1 Hubei Key Laboratory of Economic Forest Germplasm Improvement and Resources Comprehensive Utilization, Hubei Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation of Dabie Mountains, College of Biological and Agricultural Resources, Huanggang Normal University, Huanggang 438000, Hubei, China

2 Wuhan Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430015, Hubei, China

Abstract: Mutants of proteins are the basis for studying their structure and function, this work aimed to establish an efficient and rapid method for constructing multi-site mutants. When four or more adjacent amino acid residues need to be mutated,

Received: July 13, 2019; **Accepted:** September 16, 2019

Supported by: The Doctoral Foundation of Huanggang Normal University (No. 201802103), the High-level Scientific Research Project Cultivation Fund of Huanggang Normal University (No. 201816503).

Corresponding authors: Yongliang Zheng. Tel: +86-713-8833727; E-mail: 11169214@qq.com

黄冈师范学院博士科研启动基金 (No. 201802103), 黄冈师范学院高级别科研项目培育基金 (No. 201816503) 资助。

网络出版时间: 2019-10-10

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20191010.0945.004.html>

firstly, two long and two short primers (long primers I/III, short primers II/IV) were designed: the long primers contain mutated sites, and the number of mutant bases is ≤ 20 bp, the short primers do not contain mutated sites; GC contents of the long and short primers are $\leq 80\%$, and the difference of annealing temperature is ≤ 40 °C. Then two sets of reverse PCR amplifications were performed using primer pairs (I/II and III/IV) and templates, respectively. After amplification, each system can obtain non-methylated linear plasmids which contain mutated sites, and the breakpoints of the two sets of linear plasmids amplified by primers I/II and III/IV were distributed on both sides of the mutated sites. Followed by digested by *Dpn* I to remove the methylated templates, the recovered PCR products, which were mixed in an equimolar ratio, were performed another round of denaturation and annealing: the two sets of linear plasmids were denatured at 95 °C and then annealed with each other's single-stranded DNA as templates to form open-loop plasmids, and then the transformants containing the mutations will be obtained after transformed the open-loop plasmids into *Escherichia coli* competent cells. Results showed that, this method can mutate 4 to 11 consecutive amino acid residues (8–20 bp) simultaneously, which will greatly simplify the construction of multi-site mutants, Thereby improve the efficiency of protein structure and function research further.

Keywords: primer, reverse PCR, site-directed mutagenesis, multilocus mutant

构建突变体是设计生物医学/生物技术具有预期性能的新物质^[1]和研究蛋白质结构与功能的主要策略之一,例如,研究酶的稳定性和活性^[2-3]蛋白质相互作用^[4]、蛋白质修饰位点的确定^[5-8]、蛋白质和 DNA 相互作用^[9]以及酶的加工成熟方式^[10]等。目前常用的引入突变的方法大体可分为两类:以常规 PCR^[11]、重叠 PCR^[12-15]、大引物 PCR^[16-18]和反向 PCR^[19]为主的重组 PCR 技术^[20]以及 Stratagene 公司基于反向 PCR 原理开发的点突变试剂(QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis System (QCM))^[21]。其中重组 PCR 方法能构建点突变、插入和缺失等多种突变体,但是具体操作起来比较繁琐、耗时较长,而且多步操作还会降低克隆的阳性率;尤其是重叠 PCR 和大引物 PCR,第一轮 PCR 结束后必须进行胶回收得目的片段用于第二轮 PCR,另外第二轮 PCR 结束后需要再回收、酶切、与酶切后的载体连接后转化大肠杆菌感受态细胞,挑克隆进行 PCR 和酶切鉴定。QCM 利用突变引物进行一轮反向 PCR 扩增全长质粒,用限制性内切酶 *Dpn* I 酶切除去甲基化和半甲基化的模板后,再进行转化就可以在 24 h 内得到阳性率高达 70%–90%的转化子。然而,经过验证发现,该方法可以高效构建 3 个及以下相邻氨基酸残基突变的突变体,较难构建 4 个及以上相邻氨基酸残基突变的突变体。为此,基于反向 PCR 原

理,本研究设计了一个可高效、快捷地构建多位点突变体的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

菌种 *Escherichia coli* DH5 α 和质粒 pET26b、pUC18-Lip-SBRN2 均保存于黄冈师范学院经济林种质资源改良与综合利用湖北省重点实验室。

1.1.2 主要试剂

酵母提取物 (Yeast extract) 和蛋白胨(Tryptone) 购自英国 OXOID 公司,琼脂粉购于 BioSharp 公司。氯化钠 (NaCl) 和卡那霉素购自上海申试化工。FastPfu DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司 (TransGen Biotech.)。限制性内切酶 *Dpn* I 购于赛默飞世尔 (Thermo scientific)。 λ -*Hind* III digest DNA Marker 购于 TaKaRa 公司。Cycle-pure PCR 产物回收试剂盒及质粒抽提试剂盒购自美国 Omega Bio-tek 公司。琼脂糖:分析纯,购自西班牙 Biowest 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pET26b-Lip-SBRN2 的构建

以包含编码嗜热脂肪酶 Lip-SBRN2 基因的质粒 pUC18-Lip-SBRN2 为模板,上游引物

pET26b-Lip-SBRN2-F: 5'-ATTAATTCGGATCCGA TGCTGTCTGTTGTG-3', 下游引物 pET26b-Lip-SBRN2-R: 5'-GTGGTGGTGCTCGAGTTATTCC CGCT-3' (下划线标明的序列为酶切位点, 正向引物的酶切位点为 *Bam*H I, 反向引物的酶切位点为 *Xho* I)。总体积 50 μ L 反应体系含有 20 ng 模板质粒、各 10 pmol 上下游引物、10 nmol/L dNTPs、2.5 U *FastPfu* DNA 聚合酶、10 μ L 5 \times *FastPfu* 缓冲液和 10 μ L 5 \times PCR 刺激剂。按照反应程序 (95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s; 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 从变性到延伸共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 保温 5 min 后 12 $^{\circ}$ C 保温) 进行 PCR 反应扩增得到 Lip-SBRN2 基因片段。用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切大肠杆菌表达载体 pET26b 及回收的 PCR 产物, 酶切产物回收后连接转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 随机挑取 3 个转化子于 5 mL LB 液体培养基

37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后, 提质粒酶切检测, 挑取酶切正确的质粒利用 T7 通用引物进行测序鉴定。

1.2.2 多位点突变体 ZQ1~ZQ7 引物设计

为探究嗜热脂肪酶 Lip-SBRN2 (GenBank: EF584562.1) 的温度适应机制, 将其成熟酶区与高度同源的嗜温脂肪酶 Lip A (UniProtKB: P37957) 非保守氨基酸残基替换为 Lip A 对应位点的氨基酸残基, 突变策略如图 1 所示, 其中 ZQ1~ZQ7 为本研究重点阐述的突变体, 它们包含的突变位点如表 1 所示。结合优化的反向 PCR 策略, 遵循以下原则设计引物: 1) 如图 2A 所示, 每构建一个多位点突变体需要设计 4 条引物: 两条长引物 (II/III) 和两条短引物 (I/IV), 其中长引物包含突变位点, 短引物不包含突变位点, 长短引物分别与质粒模板的两条链互补, 二者 5'端可以交错重叠也可不重叠 (图 2B 和 2C); 2) 根据

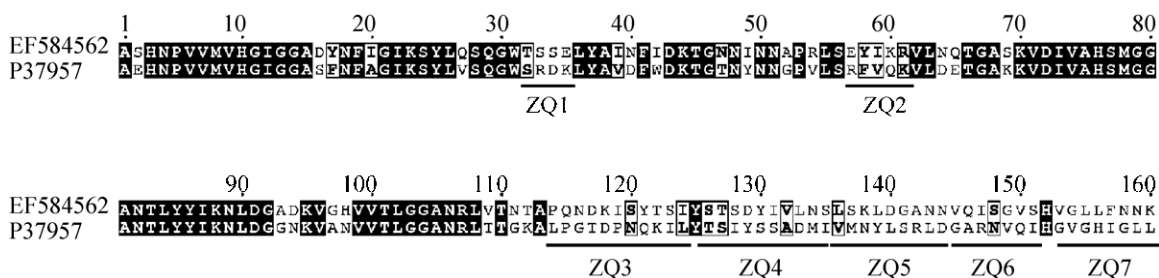


图 1 Lip-SBRN2 (GenBank: EF584562)和 Lip A (UniProtKB: P37957) 成熟酶氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of the mature of Lip-SBRN2 (GenBank: EF584562) and Lip A (UniProtKB: P37957). Sequence alignment was performed by ESPript 3.0 software. The black shadows represent conserved amino acid residues, unshaded represents non-conserved amino acid residues. The underlined sequences represent the non-conserved amino acid residues substituted from Lip A into Lip-SBRN2, ZQ1~ZQ7 represent the multi-locus mutants to be constructed in this study.

表 1 多位点突变体 ZQ1~ZQ7 包含的突变位点

Table 1 Mutated sites contained in the multi-site mutant ZQ1~ZQ7

Mutants	Mutated sites	Number of mutated amino acids
ZQ1	T32S/S33R/S34D/E35K	4
ZQ2	E57R/Y58F/I59V/K60Q/R61K	5
ZQ3	P114L/Q115P/N116G/D117T/K118D/I119P/S120N/Y121Q/T122K/S123I/I124L	11
ZQ4	S126T/T127S/S128I/D129Y/Y130S/I131S/V132A/L133D/N134M/S135I	10
ZQ5	L136V/S137M/K138N/L139Y/D140L/G141S/A142R/N143L/N144D	9
ZQ6	V145G/Q146A/I147R/S148N/G149V/V150Q/S151I	7
ZQ7	V153G/G154V/L155G/L156H/F157I/N158G/N159L/K160L	8

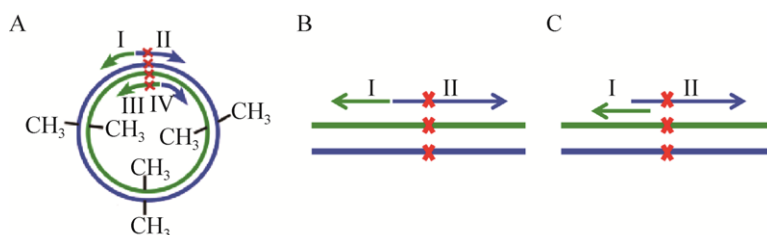


图 2 多位点突变体引物设计策略示意图

Fig. 2 Schematic diagram of primer design strategy for mutants with multiple sites.

突变氨基酸残基数目的差异, 包含突变位点的长引物 3'端延伸区最少需要包含与突变的氨基酸残基数目相匹配的且与模板完全互补的碱基; 3) 引物的 3'端应包含至少一个 G 或 C 碱基, 尽量避免 3 个以上的重复碱基, 以免错配; 4) 两条引物 GC 含量最好都控制在 80% 以内; 5) 同一组反向 PCR 内, 两条引物 (如 I / II 和 III / IV) 退火温度差 ≤ 40 $^{\circ}\text{C}$; 6) 短引物一般长约 15–18 bp, 如果需要突变的氨基酸残基较多, 可根据长短引物退火温度差 ≤ 40 $^{\circ}\text{C}$ 来调节短引物的长度; 7) 使用经过 PAGE 或 HPLC 纯化的引物, 否则会降低突变阳性率。

1.2.3 多位点突变体 ZQ1–ZQ7 的构建

以包含编码嗜热脂肪酶 Lip-SBRN2 基因的质粒 pET26b-Lip-SBRN2 为模板, 高保真聚合酶 FastPfu DNA 聚合酶以及表 1 中的引物进行反向 PCR。构建每一个多位点突变体分别包含两组反向 PCR 反应 (分别以引物对 ZQ(1–7)-a-F/R 和 ZQ(1–7)-b-F/R 进行两组 PCR), 总体积 50 μL 反应体系含有 20 ng 模板质粒、各 10 pmol 上下游引物、10 nmol/L dNTPs、2.5 U FastPfu DNA 聚合酶、10 μL 5 \times FastPfu 缓冲液和 10 μL 5 \times PCR 刺激剂。按照反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s; ZQ1-a: 44 $^{\circ}\text{C}$ 、ZQ1-b: 32 $^{\circ}\text{C}$, ZQ2-a: 48 $^{\circ}\text{C}$ 、ZQ2-b: 48 $^{\circ}\text{C}$, ZQ3-a: 54 $^{\circ}\text{C}$ 、ZQ3-b: 55 $^{\circ}\text{C}$, ZQ4-a: 50 $^{\circ}\text{C}$ 、ZQ4-b: 38 $^{\circ}\text{C}$, ZQ5-a: 40 $^{\circ}\text{C}$ 、ZQ5-b: 42 $^{\circ}\text{C}$, ZQ6-a: 40 $^{\circ}\text{C}$ 、ZQ6-b: 47 $^{\circ}\text{C}$,

ZQ7-a: 45 $^{\circ}\text{C}$ 、ZQ7-b: 55 $^{\circ}\text{C}$, 退火 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min 30 s, 从变性到延伸共 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min 后 12 $^{\circ}\text{C}$ 保温, 进行 PCR 反应扩增得到含有突变位点的线性质粒。

反应结束后, 用 1% 琼脂糖凝胶检测目的条带, 限制性内切酶 Dpn I 酶切回收产物, 除去甲基化和半甲基化模板; 将每一个多位点突变体的两组酶切产物 (ZQ(1–7)-a 和 ZQ(1–7)-b) 等摩尔比混合, 按照 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 min、然后 12 $^{\circ}\text{C}$ 保温的程序进行处理后, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布含有终浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。在每一个平板上随机挑取 3 个转化子于 5 mL LB 液体培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后, 提质粒酶切检测, 挑取酶切正确的质粒利用 T7 通用引物进行测序鉴定。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET26b-Lip-SBRN2 的构建

以 pUC18-Lip-SBRN2 为模板, 及针对脂肪酶 Lip-SBRN2 编码区的引物 pET26b-Lip-SBRN2--F 和 pET26b-Lip-SBRN2-R, 扩增得到了特异性的长度为 588 bp 的目的条带 (图 3A), 与载体 pET26b 同时经 BamH I 和 Xho I 酶切、回收、连接后, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、挑取转化子测序鉴定之后, 成功构建了重组质粒 pET26b-Lip-SBRN2 (图 3B)。

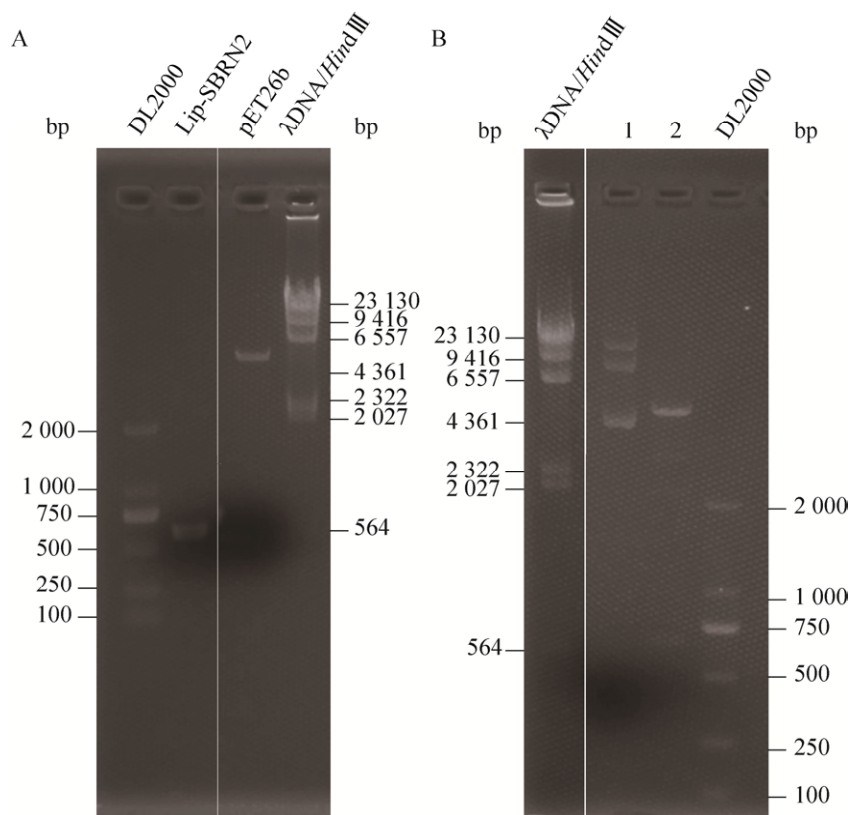


图 3 pET26b-Lip-SBRN2 构建过程中酶切片段琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of enzyme digestion fragment during the construction of pET26b-Lip-SBRN2. (A) Agarose gel electrophoresis of recovered Lip-SBRN2 gene and pET26b which were digested by *Bam*H I and *Xho* I. (B) Agarose gel electrophoresis of plasmid pET26b-Lip-SBRN2 and its' double enzyme digested fragments : 1: plasmid pET26b-Lip-SBRN2; 2: enzyme digested fragments of plasmid pET26b-Lip-SBRN2 which digested by *Bam*H I and *Xho* I.

2.2 多位点突变体 ZQ1-ZQ7 引物设计

根据脂肪酶 Lip-SBRN2 (GenBank: EF584562.1) 和 Lip A(UniProtKB: P37957)的 DNA 和氨基酸序列, 结合优化的反向 PCR 策略, 以及上述引物设计的原则, 成功设计多位点突变体 ZQ1-ZQ7 的引物如表 2 所示。其中各突变体包含的突变碱基数和长引物 3'端与模板完全互补的碱基数以及短引物的碱基数总结如表 3 所示。

2.3 多位点突变体 ZQ1-ZQ7 的构建

以重组质粒 pET26b-Lip-SBRN2 为模板, 以及针对全长质粒且含有突变位点的引物 ZQ(1-7)-a-F/R 和 ZQ(1-7)-b-F/R, 分别进行两轮反向 PCR, 扩增得到了特异性的长度约为 5 900 bp 的目的条带 (图 4A)。经过回收、*Dpn* I 酶切及二轮变性退

火处理后, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、挑取转化子测序鉴定之后, 成功构建了重组质粒 ZQ1-ZQ7 (图 4B)。

2.4 优化的反向 PCR 策略

根据 2.2 所述原则设计的引物, 利用上述 PCR 体系和程序, 我们成功构建了多位点突变体 ZQ1-ZQ7, 该结果表明优化的反向 PCR 策略可以高效构建多位点突变体。现将该 PCR 策略的原理展示如图 5 所示。设计合成 I、II、III 和 IV 四条引物, 分别以 I/II 和 III/IV 两对引物和模板进行两组反向 PCR 扩增全长质粒。一轮 PCR 反应结束后, 可得到一条链含有突变位点的半甲基化非正常质粒; 第二轮 PCR 反应结束后, 以含有突变位点的那一条链为模板扩增时, 可得到双链都含有

表 2 多位点突变体 ZQ1-ZQ7 的引物序列*

Table 2 Primer sequences of multilocus mutants ZQ1-ZQ7*

Primer name	Primer sequence (5'-3')
ZQ1-a-F	T CT AGGGATAAGCTGTATGCAATTAAT
ZQ1-a-R	CCAGCCTTGACTTTG
ZQ1-b-F	CT TATCCCT AG A CCAGCCTTGACTTTGGAG
ZQ1-b-R	CTGTATGCAATTAAT
ZQ2-a-F	CG AT TT GT TC CAA AAA GTTT TAAACCAAACGGGT
ZQ2-a-R	TGATAATCGCGGTGC
ZQ2-b-F	TTT TT G GA CAA AT CG TGATAATCGCGGTGCATT
ZQ2-b-R	GTTTAAACCAAACGGGT
ZQ3-a-F	C T AC CG GGT AC CG A TCC AAAT CA AA AAAT CT CTACAGTACCTCTGACTATATCGTGCTTAACT CACTA
ZQ3-a-R	AGCTGTGTTTGTCCAAATCGGTTTCGCGCC
ZQ3-b-F	GA GA ATTT TT GATT GGA T CG GT ACC GGT A GAGCTGTGTTTGTCCAAATCGGTT
ZQ3-b-R	TACAGTACCTCTGACTATATCGTGCTTAACT
ZQ4-a-F	A CT AG CA T TT ACT CT AG CG CG GA TA TGAT ACTAAGTAACTTGATGGTGCAAAC
ZQ4-a-R	GTAGATAGAGGTGTATGATATTTTGTG
ZQ4-b-F	T ATCA TA TC CG CT AG AGT AA AT G CT AG T GTAGATAGAGGTGTATGATATTTTGTGCTT
ZQ4-b-R	CTAAGTAACTTGATGGTGCAAACAAT
ZQ5-a-F	G TAA TG AA TTA T CT AG TC GA CT CG AT GTACAAATTAGCGGTGTAAGCCACGTCGGT
ZQ5-a-R	TGAGTTAAGCACGATATA
ZQ5-b-F	AT CG AG TC GA CT AA AGA TAA TT CA TTA CTGAGTTAAGCACGATATAGTCAGAGGTACT
ZQ5-b-R	GTACAAATTAGCGGTGTA
ZQ6-a-F	G GA GC AC GT AA CG CT CA AA TCCACGTCGGTCTGCTCTTCAAC
ZQ6-a-R	ATTGTTTGCACCATC
ZQ6-b-F	G A TT TG AG CG TT AC GT GCT CT C ATTGTTTGCACCATCAAGTTT
ZQ6-b-R	CACGTCGGTCTGCTC
ZQ7-a-F	G G CG TT GG GC CA AT CG CT CT TT AGTAAATGCTCTTATAAAGGACGGG
ZQ7-a-R	GTGGCTTACACCGCT
ZQ7-b-F	T AA GA G CC GA T G TGC CAA CG C CGTGCTTACACCGCTAATTTGTAC
ZQ7-b-R	GTAAATGCTCTTATAAAGGACGGC

* The boxed bold bases are mutant bases.

表 3 各突变体包含的突变碱基数及引物与模板互补的碱基数

Table 3 The number of mutant bases and the base number of primers complementary to the template

Mutants	Number of mutated bases (bp)	Number of 3'-end complementary bases of long primers (bp)	Number of short primer bases (bp)
ZQ1	8	15	15
ZQ2	8	18	15
ZQ3	20	36	30
ZQ4	14	24	27
ZQ5	14	30	18
ZQ6	10	21	15
ZQ7	12	24	15

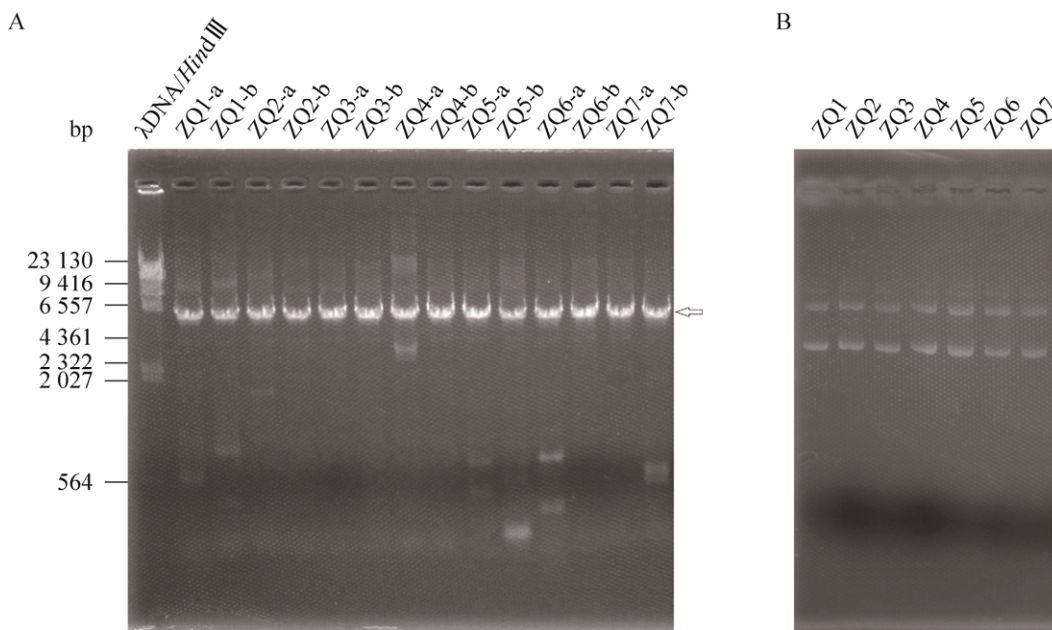


图 4 多位点突变体 ZQ1–ZQ7 PCR 结果及重组质粒凝胶电泳检测图

Fig. 4 Gel electrophoresis diagram of pcr products and recombinant plasmid of multilocus mutants ZQ1–ZQ7. (A) PCR products of ZQ1–ZQ7. ZQ-a and ZQ-b were the products of two rounds of reverse PCR, the target strip were pointed by the arrow. (B) Recombinant plasmids ZQ1–ZQ7.

突变位点的无甲基化非正常质粒；第三轮 PCR 反应结束后，以双链都含有突变位点的非正常质粒为模板扩增时，可得到含有突变位点的非甲基化的线性质粒，且以 I/II 和 III/IV 为引物扩增得到的两组线性质粒的断开位点分布在突变位点两侧。经过多轮反向 PCR 扩增后，体系中可积累大量的含有突变位点的非甲基化线性质粒。将这两组 PCR 扩增产物分别回收后用限制性内切酶 *Dpn* I 酶切去掉甲基化和半甲基化的模板，等摩尔比混合后按照 95 °C 变性 10 min、60 °C 退火 30 min、然后 12 °C 保温的程序进行处理，两条线性质粒在 95 °C 变性后互相以来自对方的单链 DNA 为模板退火形成开环质粒，将处理后的开环质粒直接转化大肠杆菌感受态细胞后可环化为可存活的质粒，挑转化子进行鉴定即可得到阳性克隆。

3 讨论

本研究基于反向 PCR 原理，通过设计两对一长一短的引物（长引物包含突变位点，短引物不

包含突变位点，长短引物分别与质粒模板的两条链互补），取一长一短两条引物同时进行两轮反向 PCR 扩增得到包含突变位点的线性质粒，用 *Dpn* I 酶切扩增产物降解甲基化模板后等摩尔比混合，再进行一轮变性和退火处理并转化大肠杆菌感受态细胞，即可在 24 h 内得到包含多位点突变的转化子。

由 Stratagene 公司基于反向 PCR 原理开发的点突变试剂盒 QCM，通过设计一对包含突变位点的互补引物，进行一轮反向 PCR 反应扩增全长质粒就可以在 DNA 序列中引入突变，用 *Dpn* I 酶切扩增产物降解甲基化模板后转化大肠杆菌感受态细胞，在 24 h 内即可得到突变体阳性率约为 70%–90% 的转化子^[21]。反向 PCR 方法和 QCM 技术可以快速构建突变 3 个及以下氨基酸残基的突变体，对于突变多于 4 个及以上氨基酸残基的突变体阳性率则急剧降低^[21–22]。而本研究提供的优化反向 PCR 策略可以成功构建 4–11 个相邻氨基酸残基突变的多位点突变体。

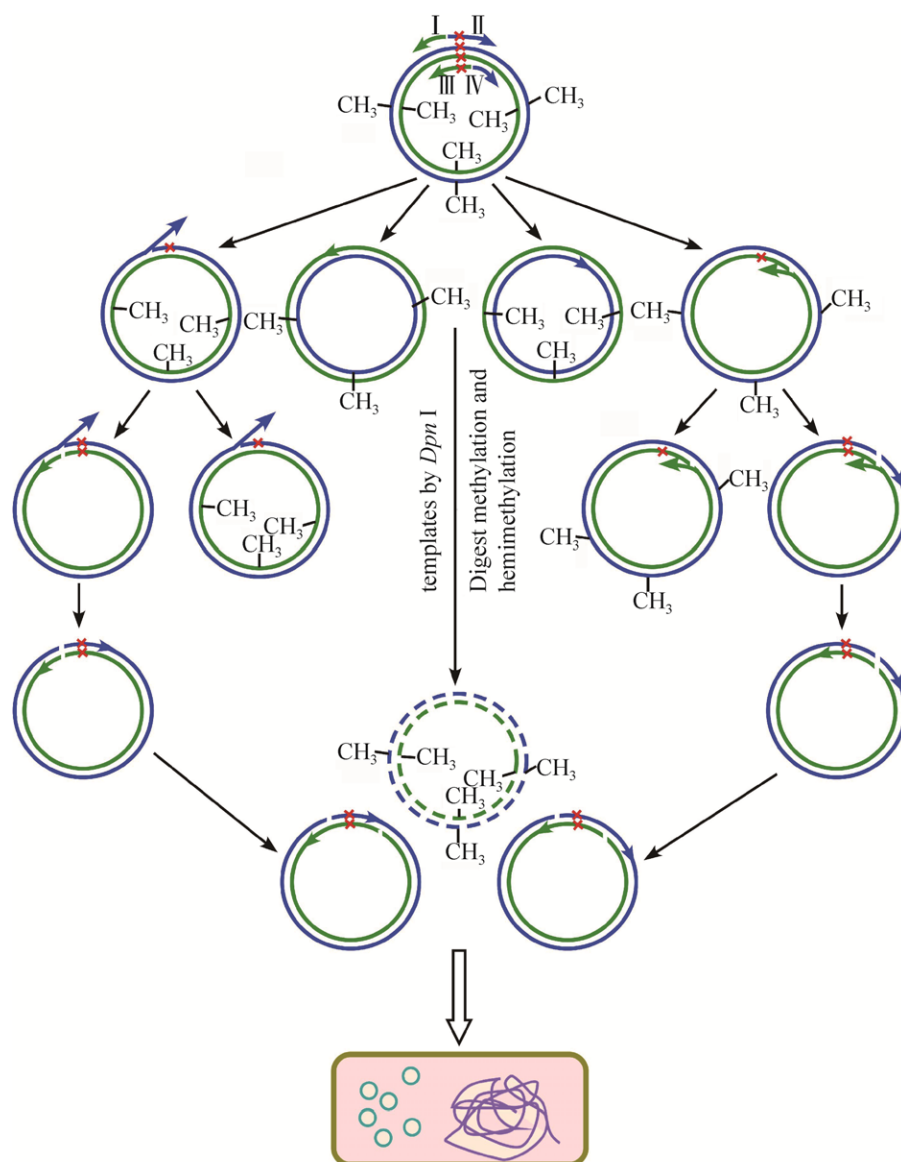


图 5 优化的反向 PCR 策略原理图

Fig. 5 Schematic diagram of optimized reverse PCR strategy.

对于多位点突变体的构建, Wang 等曾基于 QCM 技术,通过两步共三轮 PCR 反应实现了多位点突变、插入和缺失,该方法的阳性突变率也高达 70%–90%,但是多轮 PCR 反应耗时更长且相对较繁琐^[23]。Cabré 也曾基于 QCM 技术,利用完全反向互补且包含突变位点的一对长引物实现了 8 个相邻碱基突变体的构建^[24],对于相邻碱基突变,该方法具有较强的可操作性,但是对于不相邻的多碱基突变,该方法的效果可能有待进一步检测。相对于 Wang 等的多轮 PCR 扩增,本研究只需要同

步的两组反向 PCR 扩增即可构建多位点突变,大大提高了构建克隆的效率。此外,本研究提供的方法可以实现 8–20 bp 碱基突变,其中包含 7 个相邻碱基突变,相对于 Cabré 等 8 个相邻碱基的突变具有更广泛适用性。综上所述,本研究提供的优化反向 PCR 策略高效、快捷地实现了多位点突变体的构建。但是利用该方法进行多位点缺失和插入突变的效果还有待进一步研究,且该方法构建突变体过程中出现的包含一条多余的扩增引物的假阳性转化子的形成原因也有待进一步深入探究。

4 结论

通过优化引物设计, 利用两长两短 (长引物包含突变位点, 短引物不包含突变位点, 长短引物分别与模板质粒的两条链互补) 4 条引物同时进行两组反向 PCR 扩增, 以及一轮变性、退火处理, 成功高效快捷 (24 h 内即可得到转化子) 地实现了 4–11 个氨基酸残基突变 (8–20 bp) 的突变体构建。该方法为生物医药和生物技术设计新的化合物及蛋白质结构和功能的研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Nabeshima A, Pajarinen J, Lin TH, et al. Mutant CCL2 protein coating mitigates wear particle-induced bone loss in a murine continuous polyethylene infusion model. *Biomaterials*, 2017, 117: 1–9.
- [2] Goldenzweig A, Fleishman SJ. Principles of protein stability and their application in computational design. *Annu Rev Biochem*, 2018, 87: 105–129.
- [3] Xu BL, Dai MH, Chen YH, et al. Improving the thermostability and activity of a thermophilic subtilase by incorporating structural elements of its psychrophilic counterpart. *Appl Environ Microb*, 2015, 81(18): 6302–6313.
- [4] Nilles ML, Condry DLJ. *Type 3 Secretion Systems*. New York, NY: Humana Press, 2017: 11–31.
- [5] Hu JL, Yang HJ, Mu JY, et al. Nitric oxide regulates protein methylation during stress responses in plants. *Mol Cell*, 2017, 67(4): 702–710.e4.
- [6] Nakanishi A, Hatano N, Fujiwara Y, et al. AMP-activated protein kinase-mediated feedback phosphorylation controls the Ca^{2+} /calmodulin (CaM) dependence of Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase kinase β . *J Biol Chem*, 2017, 292(48): 19804–19813.
- [7] Pérez-Villegas EM, Negrete-Díaz JV, Porrás-García ME, et al. Mutation of the HERC 1 ubiquitin ligase impairs associative learning in the lateral amygdala. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(2): 1157–1168.
- [8] Sein H, Reinmets K, Peil K, et al. Rpb9-deficient cells are defective in DNA damage response and require histone H3 acetylation for survival. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2949–2959.
- [9] D’Annessa I, Gandaglia A, Brivio E, et al. Tyr120Asp mutation alters domain flexibility and dynamics of MeCP2 DNA binding domain leading to impaired DNA interaction: atomistic characterization of a Rett syndrome causing mutation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*, 2018, 1862(5): 1180–1189.
- [10] Zhu H, Xu BL, Liang XL, et al. Molecular basis for auto- and hetero-catalytic maturation of a thermostable subtilase from thermophilic *Bacillus* sp. WF146. *J Biol Chem*, 2013, 288(48): 34826–34838.
- [11] Seliger H. *PCR protocols—a guide to methods and applications*. Trends Biotechnol, 1990, 8: 335.
- [12] Trower MK. *In vitro Mutagenesis Protocols*. New York, NY: Humana Press, 1996: 177–191.
- [13] McLaughlin RN Jr, Poelwijk FJ, Raman A, et al. The spatial architecture of protein function and adaptation. *Nature*, 2012, 491(7422): 138–142.
- [14] Schlinkmann KM, Honegger A, Türeci E, et al. Critical features for biosynthesis, stability, and functionality of a G protein-coupled receptor uncovered by all-versus-all mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(25): 9810–9815.
- [15] Meleady P. *Heterologous Protein Production in CHO Cells*. New York, NY: Humana Press, 2017: 57–69.
- [16] Colosimo A, Xu Z, Novelli G, et al. Simple version of “megaprimer” PCR for site-directed mutagenesis. *BioTechniques*, 1999, 26(5): 870–873.
- [17] Ke SH, Madison EL. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube ‘megaprimer’ PCR method. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(16): 3371–3372.
- [18] Adkar BV, Tripathi A, Sahoo A, et al. Protein model discrimination using mutational sensitivity derived from deep sequencing. *Structure*, 2012, 20(2): 371–381.
- [19] Huang SH. Inverse polymerase chain reaction: an efficient approach to cloning cDNA ends. *Mol Biotechnol*, 1994, 2(1): 15–22.
- [20] Jones DH. PCR mutagenesis and recombination *in vivo*. *PCR Methods Appl*, 1994, 3(6): S141–S148.
- [21] Hogrefe HH, Cline J, Youngblood GL, et al. Creating randomized amino acid libraries with the QuikChange® multi site-directed mutagenesis kit. *Biotechniques*, 2002, 33(5): 1158–1160, 1162, 1164–1165.
- [22] Jain PC, Varadarajan R. A rapid, efficient, and economical inverse polymerase chain reaction-based method for generating a site saturation mutant library. *Anal Biochem*, 2014, 449: 90–98.
- [23] Wang WY, Malcolm BA. Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange™ site-directed mutagenesis. *BioTechniques*, 1999, 26(4): 680–682.
- [24] Cabré A, Girona J, Zalba G, et al. Generation of eight adjacent mutations in a single step using a site-directed mutagenesis kit. *Clin Chem Lab Med*, 2004, 42(4): 384–386.

(本文责编 陈宏宇)