

基因改造中快速 PCR 定点突变方法应用^{*}

周赞虎¹, 张永祥¹, 陈枝华¹, 刘仁海², 田蕴², 郑天凌²

铜锌超氧化物歧化酶(Cu,Zn-SOD)因为可以消除O₂^{·-}而被广泛应用于延缓衰老和控制炎症,但是由于多种因素影响,尤其是Cu,Zn-SOD具有种质特异性以及在体内停留时间短(通常只有6~10min),使得Cu,Zn-SOD的应用受到很大限制。定点突变技术是改造、优化基因常用的手段,也是研究蛋白质结构和功能之间复杂关系的有效方法,在医学上还可用于基因治疗等。目前常用的定点突变方法有寡核苷酸引物介导的定点突变、重叠延伸PCR定点突变及盒式突变等^[1]。但由于这些方法操作繁琐,意外突变多等缺陷,使定点突变的实验受到一定限制。本研究采用一种近年来新的定点突变技术—快速PCR定点突变方法成功地对hCu,Zn-SOD进行了基因改良(将hCu,Zn-SOD基因中非活性中心的Cys111密码子突变为Ala密码子,以提高其稳定性),同时对定点突变技术要点进行探讨。

1 材料

1.1 菌株与质粒 *E. coli* DH5,由本实验室保存。质粒pESOD(含hCu,Zn-SOD基因、Amp^r基因以及EcoRI酶切位点,整个质粒约3.3kb)由本实验室构建,并转化于*E. coli* DH5保存。

1.2 主要试剂 Pfu高保真DNA聚合酶(深圳晶美生物工程有限公司);DpnI酶(河南华美生物工程有限公司);小量质粒快速抽提纯化试剂盒(上海博亚生物技术有限公司);DNA Marker,T₄DNA连接酶,EcoRI等常规酶(上海Sangon公司)。

1.3 pESOD质粒提取及鉴定 用质粒快速抽提纯化试剂盒从含pESOD质粒的*E. coli* DH5转化菌里提取pESOD质粒,取部分质粒用EcoRI酶切后琼脂糖电泳鉴定,另取部分质粒送上海博亚生物技术有限公司测序。

1.4 定点突变

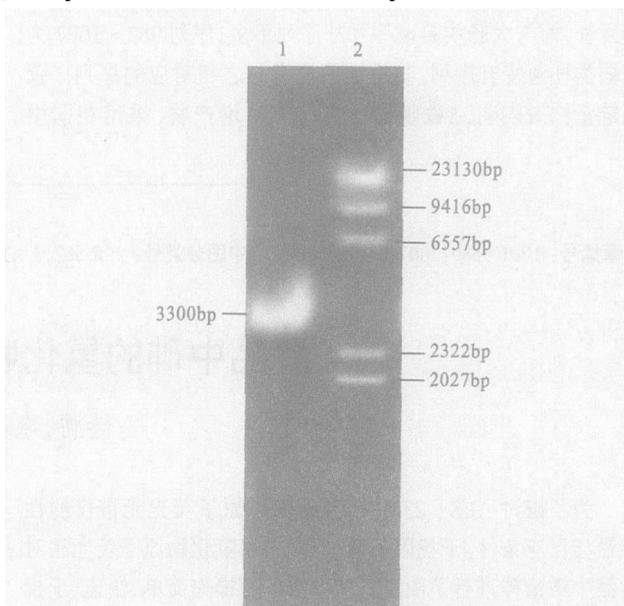
1.4.1 引物设计 根据hCu,Zn-SOD基因序列和定点突变的要求(将hCu,Zn-SOD中第111位Cys的密码子TGC突变为Ala密码子GCC)设计出一对包含突变位点的引物(正、反向)P1和P2,具体序列如下:P1:5'CTCTCAGGACCATGCCATCAATTGGCCGCAC3';P2:5'GTGCGCCAATGATGGCATGGTCTCTCTGAGAG3'。下划线的碱基为突变位置。所有引物均由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.4.2 PCR定点突变 整个反应体系为50μl,其中含无菌去离子水41μl,10×Pfu Polymerase Buffer(含Mg²⁺)5μl,20μmol/L P1、P2引物各1μl,pESOD质粒1μl(约100ng),Pfu DNA聚合酶1μl(5U);反应条件为:94℃预变性3min;然后94℃变性1min,65℃退火30s,72℃延伸7min,25个循环;最后72℃延伸7min,4℃保存。

1.4.3 转化 用DpnI限制性内切酶处理PCR反应产物,直接转化感受态的*E. coli* DH5,涂布培养后随机挑3个菌落并提取相应质粒,由上海博亚生物技术有限公司测序,测序引物P3:5'ACTCAGGACTACTGGGAGTG3'。

2 结果

2.1 提取的质粒经EcoRI酶切后琼脂糖电泳 质粒大小为3300bp左右,证明所提取的质粒就是pESOD质粒,见图1。

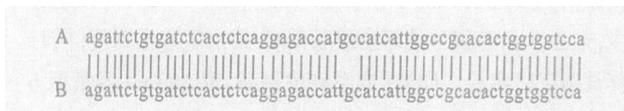


1: EcoRI酶切后的pESOD质粒; 2: Marker

图1 pESOD质粒经EcoRI酶切后琼脂糖电泳

2.2 pESOD质粒测序的部分结果 所测序列与文献^[2]报道的hCu,Zn-SOD序列对比完全一致,证明pESOD质粒内含的hCu,Zn-SOD基因完全正确。

2.3 定点突变后3个质粒测序结果及突变前后序列对比(图2) 3个质粒的测序结果有2种,分别和文献^[2]的hCu,Zn-SOD序列对比:其中1个质粒测序结果和hCu,Zn-SOD基因序列完全一致,说明突变未成功;另外2个质粒分别有2个碱基和hCu,Zn-SOD基因序列不同,也就是Cys的密码子TGC变成了Ala的密码子GCC,其他序列与hCu,Zn-SOD基因一致,符合预期要求;图2中没有短线条相连的部分为突变前后2序列的不同之处。



A: 突变后的hCu,Zn-SOD基因序列; B: hCu,Zn-SOD基因序列

图2 hCu,Zn-SOD基因突变前后部分序列对比

3 讨论

通过快速PCR定点突变,本研究实现了把hCu,Zn-SOD基因中的Cys¹¹¹突变为Ala¹¹¹。整个突变过程只需要1次PCR反应、1次DpnI酶解和1次转化,即完成了定点突变,无需对PCR产物进行末端处理,也无需进行亚克隆等,大大

*基金项目:福建省自然科学基金(C0510004)

作者单位:1.福建漳州出入境检验检疫局农食实验室,福建漳州363000;2.厦门大学生命科学学院

作者简介:周赞虎(1973-),男,福建大田县人,工程师,博士,研究方向:微生物分子生物学。

减少了传统定点突变的工作量,而突变成功率较高(本次实验随机挑取的 3 个菌落中有 2 个是阳性突变菌落),尤其适用于大肠埃希菌来源的 DNA。

快速 PCR 定点突变的技术要点:(1)准备突变的质粒必须是甲基化。(2)引物是一对包含突变位点的互补的(正、反向)核苷酸链,而且要比一般的 PCR 引物(18 bp ~ 21 bp)长,一般要在 25 bp 以上,因为引物中含有突变位点,和模板不能完全匹配。(3)须要高保真的 DNA 聚合酶如 Pfu Turbo 聚合酶。(4)PCR 产物要用 DpnI 酶充分酶切消化,以提高突变检出率。(5)PCR 延伸步骤时间要充足;因为 Pfu DNA 聚合酶扩增速率为 0.5 kb/min,比 Taq 酶慢 1 倍左右。(6)高保真 Pfu DNA 聚合酶用量要比普通 PCR 所需的 Taq 酶多一些;因 Pfu DNA 聚合酶不但扩增速率较慢,而且一步法 PCR 定点突

变扩增的是整个质粒,故所需的总时间比一般的 PCR 时间要长很多,适当增加酶量以补充长时间高温下的酶活力损失。(7)克隆子最后需经测序验证;高保真不等于 100%保真。本研究挑选测序的 3 个菌落中有 1 个是未突变的阴性菌落,故后续的测序步骤不能省略。

参考文献

[1] 罗师平,冷希岗.基于 PCR 的体外诱变技术[J].国外医学生物医学工程分册,2005,28(3):188-192.
 [2] Sherman L,Dafni N,Lieman-Hurwitz,et al.Nucleotide sequence and expression of human chromosome 21-encoded superoxide dismutase mRNA[J].PNAS,1983,80(18):5465-5469.

收稿日期:2006-04-23

(文涛编校)

文章编号:1001-0580(2007)01-0103-01

中图分类号:R 174

文献标志码: B

【基层公共卫生】

辽宁省 2000 ~ 2004 年 5 岁以下儿童死亡率分析

李嘉

5 岁以下儿童死亡率是国际社会公认衡量一个国家或地区人群健康水平的主要指标。为掌握辽宁省 5 岁以下儿童死亡率及主要死亡原因,为政府部门进行妇幼卫生工作管理和决策提供科学依据,对我省 2000 ~ 2004 年 5 岁以下儿童生命监测结果进行回顾分析。

资料与方法 (1)资料来源:2000 ~ 2004 年全省 33 个监测区县的妇幼保健院(所)上报的儿童死亡报告卡和报表。(2)方法:依据《辽宁省 5 岁以下儿童死亡监测方案》,监测地区所有 5 岁以下儿童,发生死亡后,运用三级网络,统一应用辽宁省 5 岁以下儿童死亡监测的表卡册,逐级审核,上报至省妇幼保健院。各年龄组死亡率采和漏报校正和加权处理得出。

结果 (1)死亡率及其变化趋势(表 1):新生儿死亡率、婴儿死亡率、5 岁以下儿童死亡率 5 年间分别下降 31.6%,18.9%,17.6%。

(2)主要死因及其顺位(表 2):5 年来,我省 5 岁以下儿童前 6 位死因均为先天异常(先心病 + 其他先天异常)、早产低体重、出生窒息、肺炎、颅内出血、意外伤害。(3)儿童死亡年龄构成:连续 5 年,我省 5 岁以下儿童死亡的年龄构成均以婴儿死亡为主,约占总死亡的 85%。婴儿死亡构成中绝大多数是新生儿,新生儿死亡中又以 7d 内死亡为主,约占总死亡的 50%。

表 1 2000 ~ 2004 年辽宁省 5 岁以下儿童死亡率变化

年份	活产数	新生儿		婴儿		5 岁以下儿童	
		死亡数	‰	死亡数	‰	死亡数	‰
2000	31 346	323	13.3	399	15.9	460	18.2
2001	30 355	278	12.4	366	15.3	416	17.3
2002	32 567	291	11.5	371	14.7	436	16.6
2003	42 644	327	10.0	457	13.7	538	16.1
2004	73 984	518	9.1	682	12.9	766	15.0

表 2 5 岁以下儿童主要死因顺位及构成比(%)

年份	先天异常		早产低体重		出生窒息		肺炎		颅内出血		意外伤害	
	构成	顺位	构成	顺位	构成	顺位	构成	顺位	构成	顺位	构成	顺位
2000	24.4	1	16.1	2	15.7	3	10.1	4	6.5	5	4.5	6
2001	25.5	1	21.9	2	13.0	3	9.9	4	4.8	5	4.0	6
2002	24.1	1	22.9	2	15.4	3	8.7	4	5.0	6	6.4	5
2003	29.0	1	17.1	2	12.3	3	6.9	5	4.8	6	8.6	4
2004	27.8	1	20.8	2	13.5	3	7.2	6	7.3	4	7.3	4

讨论 (1)2000 ~ 2004 年,我省新生儿、婴儿和 5 岁以下儿童死亡率呈逐年下降趋势,其中又以新生儿死亡率下降最为明显,5 年间下降了 1/3。从死亡年龄分析可见,今后工作的重点仍是降低新生儿死亡率,尤其是 7d 内的新生儿死亡率。(2)连续 5 年来,先天异常成为我省 5 岁以下儿童主要死因,占总死亡的 1/4,其中绝大多数是先天性心脏病和其他先天异常。所以,应该加强孕早期的保健管理,推广产前诊断并提高筛查率和治疗水平,减少残疾儿童的出生。(3)早产低出生体重和出生窒息是 5 岁以下儿童死亡的第 2、3 位死因,相应的干预措施有识别高危、早产孕妇,提高基层单位的早产儿存活技术;推广新生儿窒息复苏技术,以及建立快速通畅的新生儿急救绿色通道。

死亡原因中儿童意外死亡有逐年上升的趋势,2004 年升至第 4 位。死亡年龄以 1 ~ 4 岁为主,占 64.3%;主要为意外窒息和交通意外,占 58%。应宣传母子分床等有关婴儿窒息的防范知识,对农村要提高 1 ~ 4 岁儿童的入园率,使儿童得到良好的安全照顾,健全急救网络,最大限度减少儿童意外伤害死亡的发生。

收稿日期:2006-04-26

(刘铁编辑 文涛校对)

作者单位:辽宁省妇幼保健院,沈阳 110005

作者简介:李嘉(1972-),女,沈阳人,副主任医师,本科,主要从事儿童保健基层指导工作。