View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Xiamen University Institutional Repository

学校编码：10384　　分类号_____密级_____
学号：21720061152202　　UDC _

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

# 基于中心重合引物的 PCR 诱变技术新进展

# Advances in the methods of PCR-based mutagenesis with central overlap primers (COP)

周 楠

指导教师姓名：陈瑞川　　教授
专 业 名 称：细胞生物学

论文提交日期：2009 年 06 月
论文答辩时间：2009 年　　月
学位授予日期：2009 年　　月

答辩委员会主席：_____
评　　阅　　人：_____

2009 年 06 月

厦门大学博硕士论文摘要库

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（　　）课题（组）的研究成果，获得（　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　　年　　月　　日解密，解密后适用上述授权。

（　　）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

# 目 录

英文缩略语对照表……V
中文摘要……Ⅶ
英文摘要……Ⅷ
1 前言……1
1.1 重组PCR诱变法……2
1.1.1 重组PCR定点诱变法……2
1.1.2 重叠延伸PCR技术……3
1.2 大引物 PCR(megaprimerPCR)进行基因突变……5
1.2.1 Megaprimer PCR 法进行单碱基突变……5
1.2.2 Megaprimer PCR 法进行插入和删除突变……7
1.3 Quikchange 快速突变法及反向 PCR 法……8
1.3.1 Quikchange 法快速制备点突变……8
1.3.2 反向 PCR 突变方案……10
1.4 本课题研究的目标、内容和意义……11
2 材料与方法……13
2.1 实验药品、试剂与仪器……13
2.2 实验方法……15
3 结果与分析……25
3.1 基于 Quikchange 原理的改进型突变方法 ——COP 法……25
3.1.1 COP 法引物设计的优化……25
3.1.2 COP 突变法的条件优化……32
3.2 COP 法做删除突变的阳性率及该方法的实际应用……35
3.2.1 COP 法做删除突变的阳性率……35
3.2.2 COP 法删除 HIV-1 LTR 启动子的顺式元件及转录因子结合位点……36
3.2.3 一些用于 COP 删除法的引物列表……38

厦门大学博硕士论文摘要库

**3.3 COP 法用于插入和替代突变(多点突变)的研究**.....39

3.3.1 COP 法用于插入或替代突变的引物设计方案.....39

3.3.2 COP 法用于插入或替代突变(多点突变)的产物阳性率.....40

**4 讨论与结论**.....42

**5 参考文献**.....46

**致谢**.....49

厦门大学博硕士论文摘要库

# Table of Contents

**Abbreviation**……Ⅴ

**Abstract in Chinese**……..Ⅶ

**Abstract in English**……..Ⅷ

**1 Introduction**……..……1

**1.1 Mutagenesis by recombination PCR**……..…..2

1.1.1 Point mutagenesis by recombination PCR in vivo……..2

1.1.2 Splicing overlap extension by PCR……..3

**1.2 Mutagenesis by megaprimer PCR**……..…5

1.2.1 Site-directed mutagenesis by megaprimer PCR……..……..5

1.2.2 Deletion and insertion mutagenesis by megaprimer PCR……..7

**1.3 Quikchange mutagenesis method and Inverse PCR**……..……..…..8

1.3.1 Method of Quikchange for site-directed mutagenesis.…….……..8

1.3.2 Method of Inverse PCR for mutagenesis……10

**1.4 Aims, contents and significance of this research**……..11

**2 Materials and methods**……13

**2.1 Chemicals, reagents and equipments**.....13

**2.2 Methods for research study**……..…15

**3 Results**……..25

**3.1 A modified method of Quikchange mutagenesis with COP primers**…...25

3.1.1 Optimization of COP mutagenesis primers design…….…..…….25

3.1.2 Optimization of the protocol for COP mutagenesis……32

**3.2 Generate deletion mutations by COP PCR and its applications**…….35

3.2.1 The efficiency of deletion mutagenesis by COP PCR……..…….35

3.2.2 Delete the binding site of trans-acting factor and cis-acting element on

厦门大学博硕士论文摘要库

HIV-1 LTR promoters……..……..…..…….36

3.2.3 Primers stock used in COP Deletion mutagenesis…….……..…38

**3.3 Generate Insertion and substitution(point mutations) mutations with COP primers**.....39

3.3.1 Design primers for Insertion and substitution(point mutations)…….39

3.3.2 The efficiency of Insertion and substitution mutagenesis by COP PCR……..40

**4 Conclusion and Discussion**……..42

**5 References**……46

**Acknowledgement**……49

厦门大学博硕士论文摘要库

# 英文缩略语对照表

| Abbreviation | Full Name |
|---|---|
| CDK | Cyclin dependent kinase |
| COP | Central overlap primer |
| HIV-1 | Human immunodeficiency virus type 1 |
| I-PCR | Inverse PCR |
| LTR | Long terminal repeats |
| NTD | N-terminal domain |
| POP | Partial overlap primer |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| QCM | Quikchange mutagenesis |
| SOE-PCR | Splicing by overlap extension PCR |

厦门大学博硕士论文摘要库

# 摘　要

基于 PCR 的体外诱变法发展至今，使用的引物从重组 PCR 法(Recombination PCR)的至少 4 条引物到大引物 PCR 法(Megaprimer PCR)的 3 条引物，再到 Quikchange 快速突变法(QuikChange Mutagenesis PCR)的 2 条引物。从至少 3 轮 PCR 反应发展到只需 2 轮，到 Quikchange 法及反向 PCR 法（Inverse PCR）的仅使用一轮 PCR 反应，步骤越来越简单，操作越来越简便，为使用 PCR 技术进行各种基因克隆操作的科学工作者节省了大量的时间和精力。

近几年, 有文献报道使用基于 Quikchange 原理的方法来制作 DNA 片段的插入、替代以及删除突变，但由于 QCM-PCR 的低产量，难以产生阳性克隆。而采用末端相对的（tail-to-tail）引物设计方法的反向 PCR 则需要用连接酶连接 PCR 扩增产物，操作麻烦且阳性率也偏低。

我们实验室一直在寻找一种简单高效的可以用于基因的删除、插入及替代突变的方法，通过大量研究和实验发现，可以使用一种基于反向 PCR 原理，使用全新的引物设计的突变方法——“COP”突变法，该方法采用与 QuikChange 点突变法相同的操作步骤，其策略是设计一对中心重合（Central overlap）的引物，长引物的 5’端序列和 3’端序列的 Tm 值均不低于 66$^{o}$C，短引物 Tm 值约为长引物一半，且与长引物中心重合互补。这种方法能用于超过 20bp 的碱基的插入或替代突变，及用于超过 2000bp DNA 片段的删除突变的研究。

这种方法引物设计极为简单，能快速构建突变质粒，可以用于多点突变，删除，替代，插入等多种基因克隆操作，有 85%以上的阳性产率。

**关键词**: Quikchange; PCR; 中心重合引物;

厦门大学博硕士论文摘要库

# Abstract

With the development of PCR-based mutagenesis in vitro, the number of primer varied from at least 4 primers of Recombination PCR to 3 primers of Megaprimer PCR. When it comes to QuikChange Mutagenesis PCR, there are only 2 primers in use. It is improved from 3 rounds of PCR to only one round in Quikchange PCR and Inverse PCR. The great advances in PCR technology have saved a lot of time and energy for scientists.

Recently, it is reported that DNA fragments of insertion, substitution and deletion mutation are generated according to methods based on QCM-PCR. However, it is difficult to yield positive clones because of low output efficiency. On the other hand, the Inverse PCR combined with a tail-to-tail primer design requires T4 DNA ligase enzyme to ligate PCR products, which makes the positive rate relatively low.

We aim to find out an easy and effective method to perform gene deletion, insertion and substitution mutation. On the base of numerous research and experiments, a new mutagenesis method is initiated, which uses a pair of central overlap primers (COP) ground on the principle of Inverse PCR. The method is just like the QuikChange site-directed mutagenesis method except for its special primer. This pair of primers is composed of a long primer and a short primer which is central overlapped. Both of the Tm of 5'sequence in long primer and Tm of 3'sequence in short primer are above 66$^{o}$C. The Tm of short primer is almost half of that of long primer. It is convenient to perform insertion or substitution mutation of DNA fragments larger than 20bp, In addition, it is highly applicable in research about the deletion mutation of DNA fragments larger than 2000bp.

This method of primer design can be used to construct mutant plasmids with great ease and speed. It applies to various gene cloning techniques, such as multiple-point mutation, deletion, replacement, insertion, generating positive rates of higher than 85%.

**Keyword:** Quikchange; PCR; COP;

厦门大学博硕士论文摘要库

# 1 前言

对于任何一种遗传学研究，尤其是有关基因结构与功能的分析，突变都是最基本的手段。经典的方法是，应用能够修饰DNA分子的化学诱变剂或者物理诱变剂处理生物体，此类诱变方法虽然已经得到了广泛的应用，能获得大量的突变体，但亦存在诸多不便之处。

第一，经受诱变剂处理的生物体，他的任何基因都有可能发生突变，而目的基因的突变频率又可能相当低，因此给突变体的筛选工作造成了很大的麻烦。

第二，即便分离到了具有期望表型的突变体，人们也无法保证所出现的突变确实就是发生在目的的基因上。

第三，在基因克隆和核苷酸技术发展之前，我们既无法知道究竟在基因的什么部位发生了突变，也无法弄清这种突变到底是因单碱基取代抑或是由于DNA片段的插入或者缺失所致。

随着分子生物学方法的进步，特别是基因克隆技术的应用，分离并研究单基因的结构和功能已经成为一种常规的工作。与此相适应，基因的体外突变技术也有了很大的发展。现在，人们不仅能够对多细胞或者有机体做诱变处理，并从成千上万突变群体中筛选出期望的突变体，而且还能够取代、插入或者缺失克隆基因或DNA序列中的任何一个特定的碱基，这种体外特异性改变某个碱基的技术，叫定点诱变（site-directed mutagenesis）。由于它具有简单易行、重复性高等优点，现已发展成为基因操作的一种基本技术。通过定点诱变除了可以研究基因表达以及蛋白质的结构与功能之间的关系，还能够通过使特异的氨基酸改变来获得突变蛋白质，即所谓的蛋白质工程。此类蛋白突变体的产生则有助于研究蛋白的功能及蛋白间的相互作用。目前已发展的定点诱变方法主要有盒式诱变、寡聚核苷酸引物诱变及PCR诱变。

其中PCR诱变是我们要讨论的重点，通过PCR技术的快速发展和实验条件的优化， PCR诱变法已经不仅仅能制备单点诱变，更能用于目的基因的多点突变及基因片段的删除、插入及替代研究。PCR诱变常用的方法通常有以下几种：重组诱变法，大引物诱变法，Quikchange快速突变法及反向PCR法。

厦门大学博硕士论文摘要库

## 1.1 重组PCR诱变法

早在 Mullis K 等 1986 年创建 PCR 技术以来，科学工作者就已经意识到它同样具备着应用于基因诱变的潜力。因为从原则上讲，PCR 扩增引物与模板 DNA 之间错配的单碱基，经过扩增之后会掺入模板序列中去，最终产生出带有突变的双链 DNA 分子。[1]这为 DNA 重组和定点突变（site-directed mutagenesis）提供了一种简便快速的手段，这是因为引物通过 PCR 要整合到 PCR 产物中去，因此可通过人为的改变引物来对扩增产物进行修饰。这种基于用 PCR 来完成的定点突变或 DNA 重组的方法叫重组 PCR（recombination PCR）。

重组 PCR 的产物在大肠杆菌体内完成重组，生成突变株或重组子[2]。在这种技术中，通过 PCR 往两个不同的 DNA 分子末端加上一段同源序列，这段同源序列可介导两个不同的线性 PCR 产物在大肠杆菌中重组，形成一个环形的 DNA 融合分子。如果环形分子是构建在可选择质粒上的，就可用它来转化大肠杆菌，再从转化菌中挑选出突变株或者重组子。自从 1991 年这种方法被采用以来，已被许多研究者所使用[3,4,5]。

### 1.1.1 用重组 PCR 做定点突变。

图 1-1 说明了该方法的基本原理及其过程。方法只涉及 PCR 技术及转化技术。在引物 1，3 中引入突变位点，在第一套 PCR 反应中，用引物 1、2 从模板质粒上扩增出带有突变点的片段。在第二套 PCR 反应中，用引物 3、4 来扩增模板质粒，并同样引入突变点。两套 PCR 产物两端均需包含 24 个碱基或以上的同源序列，将两套 PCR 产物混合在一起，直接转化感受态细胞，通过菌体内的同源重组，可生成环形的突变质粒。

在 PCR 反应之前，应选用某种限制性内切酶来消化质粒 DNA，使其线性化。这样转化时就不必要对 PCR 产物进行纯化，因为线性化质粒不能有效的转化大肠杆菌。如果质粒在扩增前没有用内切酶消化，没有线性化的质粒就会产生很高的背景菌落。若需要对扩增产物进行纯化，可采用琼脂糖凝胶分离 PCR 产物，再用胶回收试剂盒来完成纯化。也可通过向 PCR 扩增产物中加入限制性内切酶 DpnI,这个酶的识别序列是甲基化的 GATC。该位点在质粒中已被大肠杆菌甲基化，而在 PCR 产物中却未被甲基化。故用 DpnI 消化就可切开质粒而不切断 PCR 产物[7]。

厦门大学博硕士论文摘要库

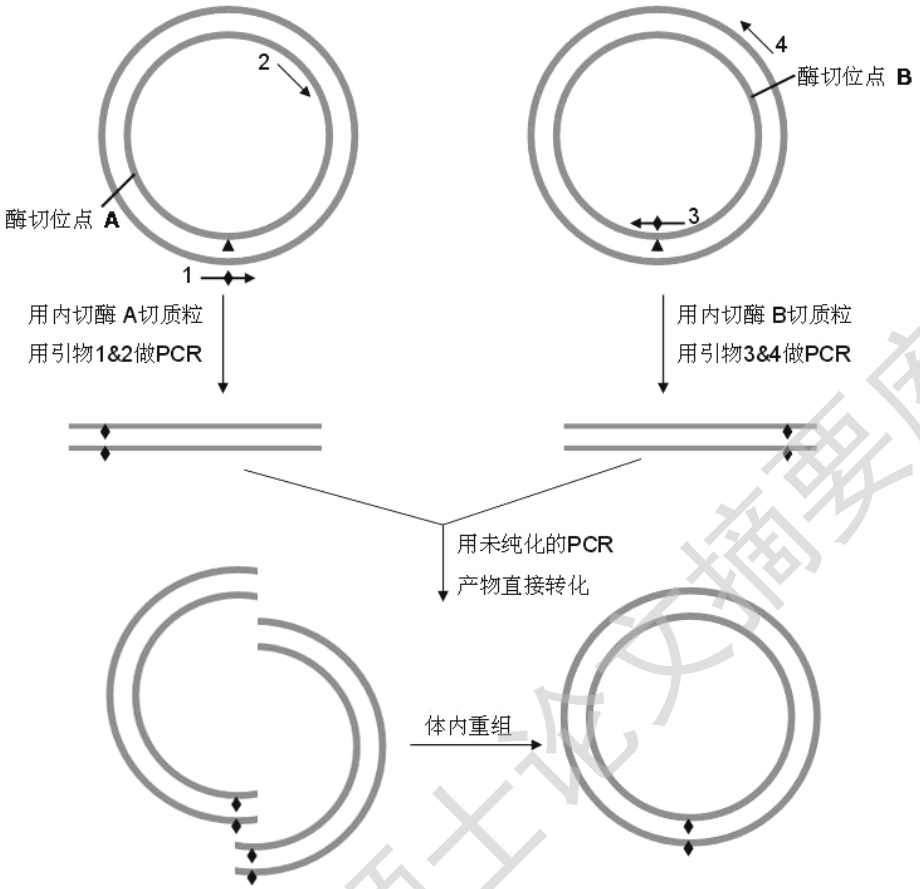


**图 1-1：用重组 PCR 做定点突变的模式图**[6]

**Figure 1-1: Generate point mutation by recombination PCR**

将两个PCR管的扩增产物加到一起，再用以转化感受态大肠杆菌，就可挑选到突变株。这种线性分子的转化效率是很低的，故必须使用超敏的感受态细胞做受体菌（转化效率>$10^8$/ug质粒DNA）。在条件掌握很好的情况下，1ng的DNA转化出来的突变菌落大约有10个左右。

该种点突变方法需要用限制性内切酶使质粒DNA线性化，经两次PCR扩增模板质粒，再通过转化大肠杆菌得到突变的重组质粒，由于突变率较低，且转化效率也不高，现在已经很少有人用PCR重组法来制备点突变。

### 1.1.2 重叠延伸 PCR 技术

重叠延伸 PCR (splicing by overlap extension PCR,简称 SOE PCR)技术是一种在体外完成的 DNA 重组和突变技术，该技术是通过重叠延伸来完成的 DNA 剪切。[8]由于采用具有互补末端的引物,使 PCR 产物形成了重叠链,从而在随后的扩增反应中通过重叠链的延伸,将不同来源的扩增片段重叠拼接起来.此技术利用



厦门大学博硕士论文摘要库

PCR 技术能够在体外进行有效的基因重组,而且不需要内切酶消化和连接酶处理,我们可利用这一技术很快获得其它依靠限制性内切酶消化的方法难以获得的产物.重叠延伸 PCR 技术成功的关键是重叠互补引物的设计.重叠延伸 PCR 在基因的定点突变、融合基因的构建、长片段基因的合成、基因敲除以及目的基因的扩增等方面有其广泛而独特的应用。

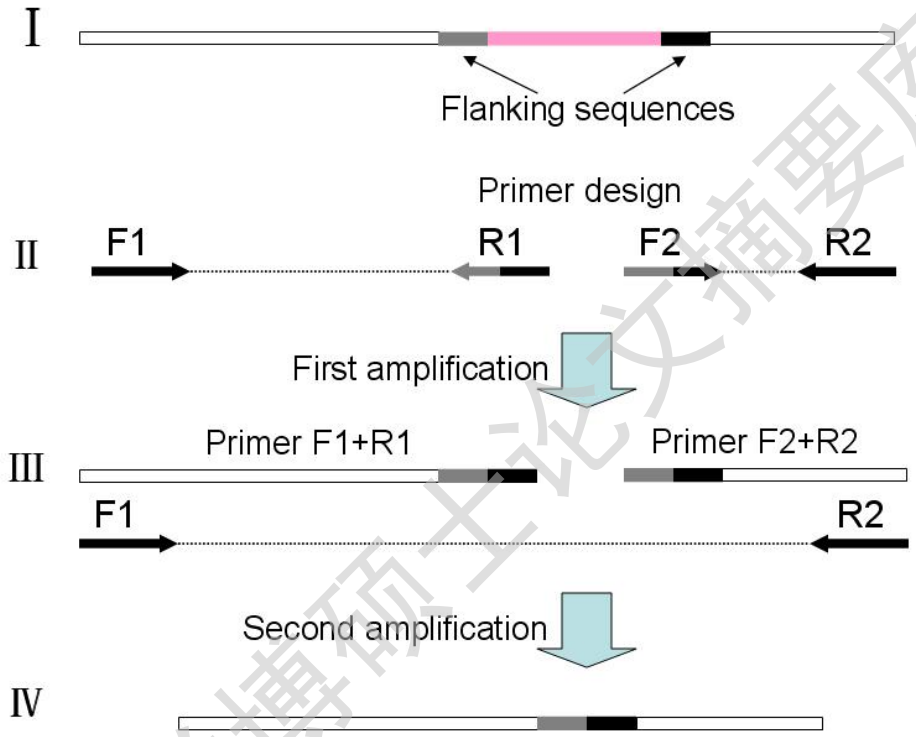


**图 1-2：重叠延伸 PCR 做基因删除的示意图**[8]

**Figure 1-2: Deletion mutagenesis by SOE PCR**

图 1-2 为使用重叠延伸 PCR 对基因进行删除突变的研究，以此来说明重叠延伸 PCR 的原理及引物的设计：

起始端基因：

上游（F1）与基因开放阅读框起始密码子附近的序列相对应；下游（R1）与欲删除的片段之前的序列及之后的序列互补。

终止端基因：

上游（F2）与欲删除序列之前及之后的序列互补，下游（R2）与基因的开放阅读框终止密码子序列互补。

厦门大学博硕士论文摘要库

引物 R1 的 5’端有一段附加序列并非以起始端基因为模板，而来自于终止端基因，与引物 F2 的 5’一端同源，通过 PCR 扩增，这段附加序列被加在了起始端基因的扩增产物上（Primer F1+R1），同样通过 PCR 得到终止端基因的扩增产物（Primer F2+R2），这样起始端产物和终止端产物就有了一段重叠序列。将两次 PCR 的产物加在一起，然后再用 F1 和 R2 将两基因连接起来，得到融合基因。重叠部分的长度从 12 个碱基[9]到 164 个碱基[10]都有人报道。但是使其重叠部分 Tm 值为 50°C 左右来确定重叠部分的长度，可能是比较明智的选择。

重叠延伸 PCR 作为一个有效的方法被越来越广泛得使用，该方法有以下优点：①重组和突变可同时完成[11]。②突变率较高[12]。③产物分子是在体外产生的，不需要做培养细菌、提取质粒等操作便可直接用于后续实验。但是运用该方法构建一个突变株至少需要 3 次 PCR 反应和 4 条寡聚核苷酸引物，且 PCR 的中间产物及终产物均需纯化，比较耗时耗工，且通过 PCR 可能带来随机突变。近年来发展的大引物法仅需三条引物，在某些实验的应用中，相比重叠延伸 PCR 来说，更为简便[13]。

## 1.2 大引物 PCR（Megaprimer PCR）进行基因突变

PCR技术进行基因突变有许多不同的方案，其中Megaprimer PCR法[14,15]是比较简单和灵活的方法。其通过突变引物和相应的外侧引物引发第一轮的PCR扩增，其产物又作为引物与另一外侧引物用于第二轮PCR反应，通过第一轮PCR扩增得到的双链DNA分子少则几十碱基多则上千碱基，远大于普通意义上的引物，故把它称为大引物。

### 1.2.1 Megaprimer PCR 法进行单碱基突变

大引物PCR点诱变技术利用三条寡聚核苷酸引物和两轮PCR循环在含有需要突变的克隆基因模板DNA上进行，图1-3是Megaprimer法的原理。其三条引物包括两条正向和反向的外侧引物以及突变引物，引物设计在遵循一般性引物设计原则的基础上，再按照突变位点的不同加以变化。

图中字母A、B代表了两侧引物。侧引物（flanking primer）可设计在克隆基因序列内，也可设计在克隆基因的两侧（即载体质粒的序列上）；字母M代表的



厦门大学博硕士论文摘要库

是内部有突变碱基的引物，首先利用突变引物和侧引物进行第一轮的PCR扩增，其扩增产物经纯化后作为第二轮PCR循环的引物（成为Megaprimer）与另一侧引物进行PCR扩增，在两轮PCR循环中野生型的克隆基因都作为扩增模板，PCR诱变后得到的目的DNA序列一般需克隆到表达载体上做进一步的测序或者功能研究。

为利于克隆，两条外侧引物选择含有唯一的限制性内切酶位点的序列是必要的。至于突变引物，为了有效的与模板结合，错配的突变碱基（引入突变的位点）不能太接近于引物的3’端，应距3’末端有4-10个碱基以上。许多作者在引物和设计上进行变化以提高诱变效率：Datta的方法[16]是在第二轮PCR的五个循环中只用大引物引发不对称PCR，产生大量单链突变的DNA片段，然后再加入外侧引物，这样能提高最后的终产物量。Ke等在设计引物时使两个正向和反向外侧引物的长度相差较大[17]，相应他们的Tm值也产生显著差异，这样第一轮PCR采用低的退火温度，之后在无需纯化的情况下直接加入高Tm值的外侧引物，同时相应提高退火温度，与大引物一起引发第二轮PCR扩增。给予这一设计，不仅排除低Tm值的外侧引物的干扰，使野生型模板不致被扩增，而且省略了大引物的纯化步骤，使整个反应可以在一个管中进行。

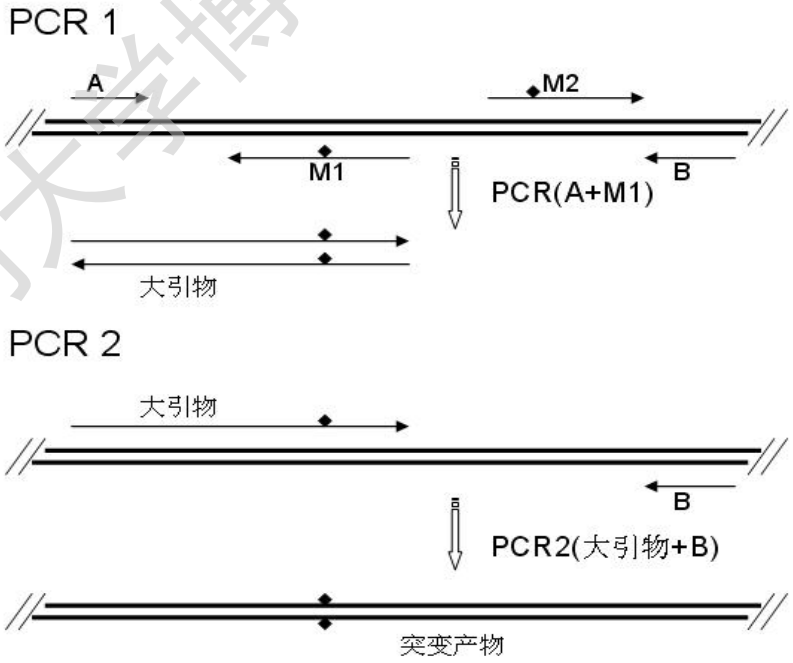


**图 1-3：用 Megaprimer PCR 法进行单碱基突变的模式图**[6]

**Figure 1-3: Generate point mutation by Megaprimer PCR**

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the “Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database”. Full texts are available in the following ways:
1. If your library is a CALIS member libraries, please log on http://etd.calis.edu.cn/ and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库