

利用体外定点诱变技术构建人突变型 α -L-艾杜糖醛酸酶基因

于洪枫, 曾瑞萍, 葛春喜, 林群娣

(中山医科大学医学遗传教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 【目的】构建突变型 α -L-艾杜糖醛酸酶基因(*IDUA*) cDNA, 为体外表达、鉴定突变的性质提供物质基础。【方法】以野生型 pcDNA3-*IDUA* 为基础质粒, 采用双引物法体外定点诱变技术, 引入突变 E404X。【结果】突变区域经 PCR-SSCP 和测序证实诱导突变成功。【结论】本研究成功构建了突变型 *IDUA* cDNA, 可用于下游的体外表达; 此定点突变技术具有简便、诱变效率高等优点, 是体外构建突变型基因的一种有效方法。

关键词: 诱变, 定点; α -L-艾杜糖醛酸酶; 基因; *IDUA*; 突变

中图分类号: R394.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)02-0105-03

Constructing Human Mutant *IDUA* Gene by *in Vitro* Site-Directed Mutagenesis Technique YU Hong-feng, ZENG Rui-ping, GE Chun-xi, LIN Qun-di. (Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】The mutant *IDUA* gene (*IDUA*) cDNA was constructed in order to establish the foundation for *in vitro* expression and further identification. 【Methods】Using double primer *in vitro* site-directed mutagenesis, the mutation was induced into the wild *IDUA* cDNA. 【Results】The mutant *IDUA* cDNA gene was successfully constructed, which was proved by PCR-SSCP and sequencing. 【Conclusion】The mutant *IDUA* cDNA is going to be used for further analysis of the mutation; this site-directed mutagenesis technique has the advantages of simplicity and high-efficiency.

Key words: mutagenesis site-directed; α -L-iduronidase; gene *IDUA*; mutation

现已知许多疾病的发生均与基因突变有关, 突变始终是遗传学研究领域的一个中心课题。利用体外定点突变技术, 可以按照研究者的计划, 在 DNA 分子上“制造出”基因的变异, 再研究这一变异如何影响功能^[1~3], 因而是用于研究基因功能的有效方法。*IDUA* 基因(*IDUA*)是黏多糖贮积症 I 型的疾病相关基因, 该基因突变的是本病发生的分子基础^[4]。且此基因突变具有显著的种族差异, 我们已经在中国人黏多糖贮积症 I 型患者中检测到几种 *IDUA* 的新突变型^[5], 其中包括 E404X。为了进一步鉴定其突变的性质及程度, 我们利用体外定点突变技术构建了突变型 *IDUA* cDNA。另外, 在我们研究中发现, 一个患者的 *IDUA* 往往具有一种以上突变, 若想确定某一突变究竟为致病性突变亦或多态性, 就必须采用体外定点突变技术分别构建单一突变型的全长基因或 cDNA, 来研究各种突变的单一效应。

1 材料与方 法

1.1 材 料

基础质粒 pcDNA3-*IDUA* 长为 7.5 kb, 是将野生型 *IDUA* 编码区 cDNA (2.1 kb) 以 *Eco*R 1 位点平端克隆入质粒 pcDNA3 (长 5.4 kb)。定点突变试剂盒、T4 多核苷酸激酶购自于 Promega 公司。ATP 购自于上海生工公司。质粒抽提试剂盒购自于 Qiagen 公司。

1.2 引物的选择和磷酸化

抗药性诱变引物为 Top 引物(由试剂盒提供), 与 *Ampr* 基因的反义链结合; 定点诱变引物长 19 个碱基, 除正中间的碱基为错配碱基外, 其余均与 *IDUA* 同源; 该引物与抗性诱变引物互补于同一模板链。5'磷酸化采用 T4 多核苷酸激酶。

1.3 突变链的合成与连接

双链质粒模板的碱变性, 变性剂为 (2 mol/L NaOH, 2 mmol/L EDTA); 引物与模板按试剂盒推荐的条件退火, 并在 T4 DNA 聚合酶的作用下延伸; 延伸后末端缺口在 T4 DNA 连接酶的作用下连接。

1.4 转化 BMH 感受态细胞

收稿日期: 2001-10-11

基金项目: 国家教委博士点基金资助项目(NO2000044)

作者简介: 于洪枫(1974-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士生, E-mail: hongfengyu@163.net.

按常规方法转化^[1], 培养、扩增、抽提质粒。培养基为 Antibiotic Selection Mix (终质量浓度 50 mg/L) 的选择性 LB 培养基。

1.5 转化 JM109 细胞

准备 LB 平板, 含有两种抗生素: 氨苄西林 (终质量浓度 125 mg/L) 和 Antibiotic Selection Mix (终质量浓度 50 mg/L), 按常规方法转化, 37 °C 培养 14 h。随机挑选 10 个单克隆接种, 扩增、抽提质粒^[7]。

1.6 质粒的筛选及鉴定

在含有靶诱变区域的两侧设计一对引物, 目的片段长 470 bp。采用 PCR-SSCP 方法筛选阳性质粒, 再对阳性质粒行测序验证。

2 结果

2.1 基础质粒变性前后的电泳检测

于 8 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后于紫外灯下观察, pcDNA3-IDUA 长约 8 kb, 变性后可见 2 条主带, 泳速稍快于变性前的质粒(图 1)。

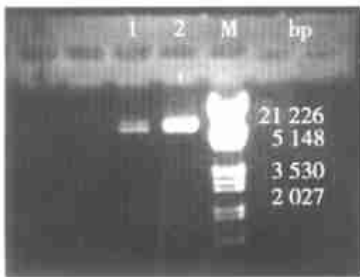


图 1 基础质粒的电泳

Fig 1 The electrophoresis of basic plasmid

1: denatured plasmid pcDNA3-IDUA; 2: undenatured plasmid pcDNA3-IDUA; 3: λDNA marker

2.2 7 个随机选取的诱变后的质粒靶区域的 PCR 扩增

图 2 显示, 每一质粒均清晰可见一条 400 ~ 500 bp 的扩增带。

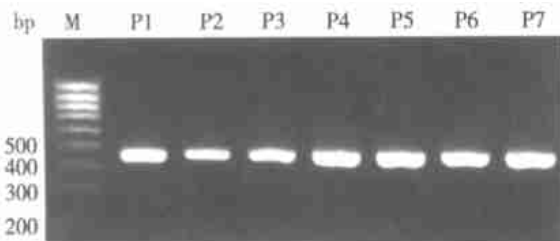


图 2 诱变质粒的靶区域的 PCR 扩增

Fig 2 PCR amplification of interest region of mutagenesis plasmids

M: PCR markers; Lane p1~p7: PCR products of plasmid 1~7

2.3 PCR 产物经 SSCP 检测

7 个随机选取的诱变质粒的 PCR-SSCP 带型均与野生型不同。

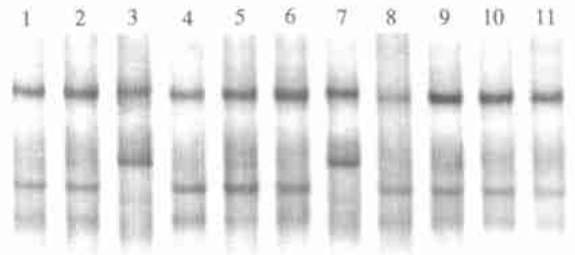


图 3 诱变质粒的 PCR-SSCP 筛选

Fig 3 PCR-SSCP screening of the mutated plasmids

3, 7: wild recombinant plasmids; 1, 2, 4, 5, 6, 8~11: mutated plasmids

2.4 阳性质粒诱变区域的测序

图 4 显示, 经测序证实 IDUA 基因的第 404 位密码子由原编码谷氨酸的 GAA 变成了终止密码子 TAA, 证实定点诱变成功。

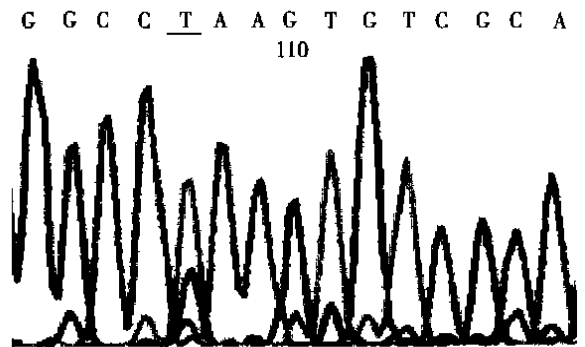


图 4 阳性质粒诱变部位的测序

Fig 4 The DNA sequence of surrounding mutagenesis position in positive plasmid

3 讨论

IDUA 突变导致溶酶体 α-L-艾杜糖醛酸酶活性降低或缺如, 使糖氨聚糖硫酸皮肤素(DS)和硫酸乙酰肝素(HS)降解代谢障碍, 从而引起各组织器官损害。IDUA 全长 19 kb, 由 14 个外显子和 13 个内含子组成。其 cDNA 全长为 2 1 kb, 含有 1 959 bp 的可读框, 编码 653 个氨基酸^[6]。目前, 全世界已报道 50 余种突变和 30 多种多态性, 多为单碱基置换引起氨基酸的改变, 从而使蛋白酶活性发生改变。因此, cDNA 的克隆、表达和蛋白酶活性的测定是鉴定突变性质的一种有效途径^[7], 而体外定点诱变是获得突变型基因的前提和基础。

寡核苷酸介导的诱变用于在序列已知的DNA区段中增删或置换寡核苷酸,如今已能在已知DNA序列中随心所欲地导入任意的改变,且在许多情况下,寡核苷酸介导的诱变是导入这种变化的唯一方法。其他大多数诱变方法所产生的变异体一般为混合群体,而寡核苷酸介导的诱变与此不同,它将特异地产生实验者所设计的突变,正因为这种精确性,它通常被用于改变蛋白质编码序列的个别密码子的研究。

本研究通过采用双引物法体外定点诱变技术成功获得了IDUA-E404X突变型全长cDNA,为鉴定该突变的性质奠定了物质基础,同时也从技术上为体外定点诱变技术进行了可贵的探索。该定点诱变技术与传统的寡核苷酸介导的诱变相比较,其原理相同,而本方法在每一技术环节均做了重要的改进。首先,它以双链DNA为起始原料,并利用抗药性的改变来进行筛选,大大地简化了整个操作过程;另外,本方法更好地掌握了错配寡核苷酸的杂交条件,显著提高体外生成错配异双链体的效率。

综上所述,本法具有简便,诱变率高等优点,值得推广。

(李桂楨教授惠赠质粒pcDNA3-IDUA,特此致谢)

参考文献:

- [1] 金冬雁,黎孟枫. 分子克隆指南[M]. 第2版. 北京. 科学出版社. 1992. 724~731.
- [2] Bragg P D. Site-directed mutagenesis of the proton-pumping pyridine nucleotide transhydrogenase of *Escherichia coli* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1365(1-2): 98.
- [3] Ryu D D, Nam D H. Recent progress in biomolecular engineering [J]. *Biotechnol Prog*, 2000 16 (1): 2.
- [4] 于洪枫. 粘多糖贮积症的分子遗传学进展[J]. 国外医学遗传学分册, 2000, 23 (2): 86.
- [5] 于洪枫,曾瑞萍,林群娣. 中国人粘多糖贮积症I型IDUA基因突变的检测[J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(6): 439.
- [6] Scott H S, Bunge S, Gal A, et al. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnosis, clinical, and biological implications [J]. *Hum Mutat*, 1995, 6(2): 288.
- [7] Lee-Chen G J, Lin S P, Tang Y F, et al. Mucopolysaccharidosis type I: characterization of novel mutations affecting α -L-iduronidase activity [J]. *Clin Genet*, 1999, 56 (1): 66.

(编辑 张敏瑞)

·简讯·

让心脏暂停跳动26 min 切除肝癌

近日,我校附属第一医院肝胆外科大胆采用体外循环技术,让病人心脏停止跳动26 min,成功地为一名晚期肝癌病人切除右肝的肝癌以及侵犯到整条肝后下腔静脉的癌栓,使一个不治之症的病人恢复了健康,也填补了国内(大陆)同类技术的空白。

患者,男,64岁,江西某市区水利局干部,因患右肝脏肝癌合并肝硬化,到多间医院求医均被告为不能手术治疗。患者在走投无路的情况下,不远千里从江西慕名来到广州中山大学附属第一医院肝胆外科求医。接诊的是该院肝胆外科专家、主任、博士生导师梁力健教授。在住院检查中进一步发现,病人的心脏情况不太好,每上一层楼就感到气喘,经B超、CT及各种化验检查,病人的肿瘤已有6 cm大小,位于最难切除的肝的第7、第8段,最可怕的是,肝癌已经从肝右静脉蔓延到了回流入心脏的主要血管——下腔静脉。

针对这种情况,梁力健教授组织全科医生进行了详细的讨论,有些医生认为没有适合治疗这类肝癌的手术,只好让病人放弃治疗回家休息。但是,如果不给病人积极的治疗,病人随时受到死亡的威胁。经过再三研究,在病人及家属的积极要求下,最后大家一致同意只有在让心脏停止跳动的情况下,才能安全地取出下腔静脉的癌栓,否则下腔静脉的血流在手术中可以将癌栓冲到心房,造成病人猝死。为了寻求这种手术的可能性,肝胆外科与该院的心脏外科、麻醉科共同研究了多种手术方案,为手术做了充分的准备。

1月10日,由梁力健教授亲自主刀进行手术,术中探查证实完全符合手术前的诊断。手术按计划进行,术中使用体外循环机辅助循环,用碎冰块低温停跳心脏,切开右心房,分别在上面从心房、下面从下腔静脉取出癌栓,直至完全取出。然后缝合下腔静脉切口、缝合心房,使心脏复跳而完成手术。整个手术时间为7 h,其中心脏停止跳动26 min。手术后病人恢复顺利,无任何手术并发症出现。目前病人已能自由进食,肝功能各项指标已恢复正常,并已经起床行走。

据了解,此类手术在国内(大陆)尚未报告过,2000年我国台湾省曾有1例在国外报告。国际上,日本有极少的病例报告(每篇文章都是1例、2例)。在可检索的英文文献中,全世界使用心脏停跳切除肝癌和下腔静脉或右心房癌栓的只有7例,但是,从肾静脉开口部位到心房水平长达16 cm的下腔静脉内完全充满癌栓的病例世界上没有文献报告过。中山一院肝胆外科在麻醉科、心脏外科的密切配合下大胆向这一高难度的新技术挑战,终于成功了。这例病例手术的成功标志着中山一院手术治疗肝癌的技术已达到国内一流、国际先进水平。

(学校新闻中心)