

PCR 技术对 Wilson 病基因进行定点突变的研究

闫振文, 梁秀龄, 杨春水, 侯国庆, 王莹, Toshihiro Sugiyama

(中山医科大学附属第一医院神经内科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】利用聚合酶链反应(PCR)技术对 Wilson 病(WD)基因进行体外定点突变的研究。【方法】采用 PCR 定点突变技术, 首先设计两对引物, 将突变位点设计在引物上, 通过重叠延伸法两次 PCR 扩增, 扩增片段上含有所需要的突变位点, 最后将扩增片段克隆入 pRc/CMV 载体中。【结果】DNA 测序表明在预期位点已经发生突变, WD 基因第 778 位密码子由精氨酸(Arg)残基突变为亮氨酸残基(Leu), 用 PCR 定点突变技术成功构建 Wilson 病基因突变体。【结论】PCR 技术诱导定点突变准确、高效。Wilson 病基因突变体的构建成功, 为进一步研究该突变位点导致 Wilson 病的发病机制和 Wilson 病蛋白的结构和功能的关系奠定了基础。

关键词: 肝豆状核变性/遗传学; 聚合酶链反应; 定点诱变

中图分类号: R742.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)02-0094-03

PCR Site-Directed Mutagenesis of Wilson Disease Gene *in Vitro* YAN Zhen-wen, LIANG Xiu-ling, YANG Chun-shui, HOU Guo-qing, WANG Ying, Toshihiro Sugiyama. (Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract 【Objective】To study PCR site directed mutagenesis of Wilson disease (WD) gene *in vitro*. 【Methods】The site-directed mutagenesis of WD gene was made by using PCR. Two sets of primers were designed according to the gene sequence of WD, and mismatches were introduced into primers. Mutagenesis was performed in a two-step PCR. The amplified fragments from the second PCR which contained the mutation site were subcloned into the pRc/CMV vector. 【Results】The sequencing analysis showed that the mutation site was correct. Mutation from Arg to Leu in 778 codon of WD gene was found. The mutation of WD gene was constructed successfully. 【Conclusion】PCR site-directed mutagenesis method is accurate and highly efficient, and the mutant WD gene is a promising candidate for further studies.

Key words: hepatolenticular degeneration/genetics; polymerase chain reaction; mutagenesis, site-directed

Wilson 病(Wilson disease, WD)基因突变类型以点突变为主, 并且存在突变热点(hot-spot)。在奥地利、波兰、德国等欧美白种人群中, WD 基因 14 号外显子第 1069 位密码子突变(H1069Q)是一个典型的突变热点, 占欧美等国家 WD 患者所有基因突变的 28.8%~68.3%^[1,2], 而 WD 基因 8 号外显子第 778 位密码子的突变(R778L)是中国人 WD 患者高频突变热点(28.8%~64.9%)^[3,4]。到目前为止, 对中国人 WD 基因突变检测始终未发现 H1069Q 突变类型的报道。由此可见, WD 基因突变热区存在明显的种族差异性或可能存在着不同的发病机制。另一方面, 目前对于 R778L 突变蛋白在哪些环节上引起铜转运障碍报道较少。本研究利用 PCR 技术对 WD 基因 8 号外显子第 778 位密码子进行定点突变, 这为下一步更深入的研究中

国人 WD 基因高频突变位点导致 WD 的发病机制, 以及为探讨 R778L 突变蛋白引起铜转运障碍机制奠定物质基础。

1 材料与方 法

1.1 质粒和菌株

含有正常人全长 WD cDNA 片段的真核细胞表达质粒(pRc/CMV-WD)为本室保存, WD cDNA 序列插在 Xba I 位点, 内含氨苄西林筛选位点。PUCm-T 质粒载体, DH5 α 大肠杆菌菌株为本室保存。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-乳糖苷(X-gal), 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG), 各种限制性内切酶均为美国 Promega

收稿日期: 2001-06-08

基金项目: 卫生部临床学科重大基金资助项目(37091); “211 工程”重点建设基金资助项目、广东省自然科学基金资助项目(20010705); 广东省科委重点攻关基金资助项目(9827830)

作者简介: 闫振文(1971-), 男, 山东泰安市人, 博士, 现在中山医科大学孙逸仙纪念医院神经内科工作; 梁秀龄, 博士生导师; 侯国庆, 现在广州市第一人民医院; Toshihiro Sugiyama 日本 Akita 大学医学院。

公司产品。琼脂糖、PCR产物纯化试剂盒,质粒抽提纯化试剂盒为上海博采生物科技有限公司产品;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计

按照引物设计原则,采用引物设计软件(Primer Premier 5.0),根据正常WD基因序列设计两对引物,P1和P3,P2和P4。其中P1引入*Stu*I限制性内切酶位点;P2和P3互补,且都带有一个突变位点,即在8号外显子第778位密码子的点突变(cgg突变为ctg);P4引入*Cla*I限制性内切酶位点。两对引物分别是:

P1: gttcaggcctacaaatctctg (内含*Stu*I限制性内切酶位点); P2: cattgccctggg cctgtg gctggaacactg (引入突变点); P3: gtaacggg acccggacaccgacctgtgaac (引入突变点); P4: aaatcgatagaaccgattaca (内含*Cla*I限制性内切酶位点)

引物由上海博采生物科技有限公司合成,用去离子水配制成50 μmol/L。

1.4 目的基因的扩增

分别执行下列2个反应,反应体系为50 μL,按次序加入38 μL H₂O,5 μL *Taq* DNA Polymerase Buffer(10×),1 μL 10 mmol/L 4×dNTP,2 μL 引物P1,2 μL 引物P3,0.5 μL *Taq* DNA Polymerase (2.5 U),0.5 μL(约100 ng)pRe/CMV-WD。反应条件为:94 °C预变性2 min,然后94 °C变性45 s,56 °C退火30 s,72 °C延伸60 s,30个循环,最后72 °C保温7 min。引物P2,P4采用相同的反应体系,反应条件为:94 °C预变性2 min,然后94 °C变性45 s,56 °C退火45 s,72 °C延伸60 s,30个循环,最后72 °C保温7 min。扩增产物用16 g/L Agarose 电泳鉴定。引物P1/P3扩增的产物命名为T13;引物P2/P4扩增的产物命名为T24。扩增产物T13和T24直接用PCR产物纯化试剂盒回收后继续进行下列2个反应,目的是将片段T13和T24拼接成T1234,反应体系为50 μL,扩增条件为:94 °C预变性2 min,然后94 °C变性45 s,60 °C退火45 s,72 °C延伸60 s,30个循环,最后72 °C保温7 min。扩增产物取名为T1234。

1.5 中间载体的构建

在实验过程中,发现对PCR产物进行直接酶切比较困难,因此采用T/A克隆法,将PCR产物先亚克隆入PUCm-T载体中。将6.5 μL T1234,1.5 μL PUCm-T载体,1 μL 10× T4 DNA Ligase

Buffer,1 μL T4 DNA Ligase,总体积为10 μL,混匀后16 °C水浴连接过夜。次日电泳回收连接片段,命名为T14m-T。用常规分子生物学方法^[5]将质粒载体T14m-T转入感受态DH5α大肠杆菌中,采用蓝白斑筛选(在平板中事先加入X-gal/IPTG)。挑取白斑,接种到含氨苄西林的5 mL LB培养基中,37 °C培养过夜。次日按照试剂盒说明书抽提纯化质粒T14m-T。

1.6 含突变位点的真核细胞表达载体的构建

将提取的T14m-T质粒载体用限制性内切酶*Stu*I和*Cla*I双酶切37 °C过夜。反应体系为20 μL,2 μL *Stu*I (20 U),2 μL *Cla*I (20 U),5 μL T14m-T载体,2 μL *Stu*I Buffer(10×),9 μL H₂O。次日12 g/L琼脂糖凝胶电泳,从Agarose胶中回收酶切片段Tm1234(720 bp)。pRe/CMV-WD1(200 ng)同样用*Stu*I和*Cla*I双酶切,条件同上。从8 g/L Agarose胶中回收2 900 bp的片段W1,6 700 bp的片段W2。回收方法同前。产物用20 μL TE洗脱。

将以上片段连接,在10 μL连接反应体系中加入:1 μL T4 DNA Ligase(10 U),2 μL W1,2 μL Tm1234,2 μL W2,1 μL T4 DNA Ligase Buffer(10×)。16 °C连接过夜。取2 μL连接产物转化感受态大肠杆菌DH5-α,氨苄西林筛选,挑6个阳性菌落,提取纯化质粒(方法同上),用*Stu*I和*Cla*I双酶切(反应条件同上)。将含约6700 bp,2900 bp,700 bp 3条带的克隆送测序证实是否引入突变。

1.7 DNA测序鉴定

采用引物设计软件(Primer Premier 5.0)设计测序引物,测序目的是确认是否已经引入定点突变以及排除在反应过程中有无随机产生新的突变。

2 结果

2.1 PCR扩增产物

第1次PCR反应以野生型质粒pRe/CMV-WD为模板,用引物P1和P3,P2和P4分别扩增,获得了部分序列互补的片段T13(200 bp)和T24(520 bp),两者都带有点突变,回收纯化片段T13和T24。第2次PCR以纯化的片段T13和T24为模板,按300~400 ng的用量等比例加入,用引物P1和P4扩增,产生带有目的突变片段T1234(720 bp),PCR扩增片段的琼脂糖凝胶电泳见图1。

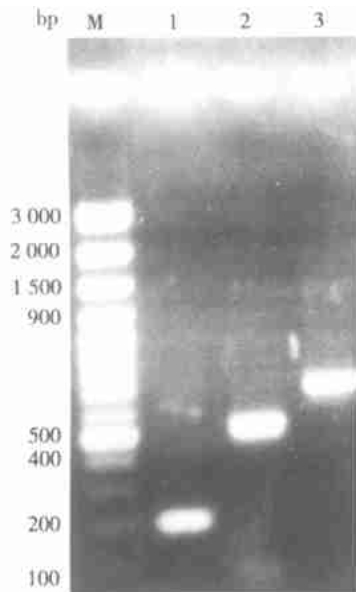


图1 PCR定点突变所需扩增的片段

Fig 1 Amplified fragments of PCR site directed mutagenesis

Lane 1; fragment T13(200 bp); Lane 2; fragment T24 (500 bp); Lane 3; fragment T1234(720 bp)

2.2 WD 基因突变的序列测定

对构建在 pRc/CMV 载体内的突变型 WD 基因进行测序,并与正常 WD 基因序列进行对比。序列测定结果表明,WD 基因 8 号外显子第 778 位密码子由 CGG (Arg) 突变为 CTG (Leu) (图 2),其余的序列与正常完全相同,说明成功引入了预期突变。同时对 WD 基因其它片段进行测序表明,未发现随机突变的产生,测序结果不一一显示。

3 讨论

已往研究蛋白质结构与功能之间的关系一般采用以下两种方法:①对赖以形成蛋白质一级结构的氨基酸侧链进行化学修饰;②蛋白质晶体的 X 射线衍射。用这两种方法可以显示出蛋白质分子骨架,原子排列以及是否有 α 螺旋和 β 折叠等特殊结构,但单靠物理学技术只能分析出分子的结构,并不能说明这种结构与功能有什么关系,且这些方法的应用必须有大量的高纯度蛋白,因此局限性很大。采用定点突变技术在克隆 cDNA 的预定点导入突变,然后在适当的宿主细胞—载体系统中表达改变的基因,可以部分打破上述的局限性。通过比较突变型蛋白和野生型蛋白的性质,有助于鉴别对蛋白质结构完整性和(或)生物学功能至关重要的结构域或个别氨基酸残基。对克隆基因进行定点突变已经成为研究蛋白质结构与功能关系的首

选方案之一。

传统的体外定点突变技术多采用寡核苷酸引物介导的突变法,突变仅仅限于 5' 端。PCR 技术的发展提供了体外定点突变的新手段,可在 DNA 片段的任何位置定点突变。本实验在操作中,为减少其它位点随机突变的可能性,在第 2 次 PCR 扩增时采用纯化后的片段 T13、T24 作为模板,优化复性与延伸温度。测序结果表明,在预定位置引入了定点突变,因此设计是合理的。

截止到 2001 年 3 月,已经报道发现 WD 基因有 187 种突变类型,其中 120 种以上为点突变。WD 基因存在突变热点,其 8 号外显子中 R778L 突变为中国人 WD 基因突变热点(28.8%)。序列分析表明,WD 基因 8 号外显子编码 ATP7B 的部分第 2 跨膜区、第 3 和第 4 跨膜区。目前推测当 8 号外显子发生 R778L 突变后,导致突变的 ATP7B 与细胞膜结合发生某种改变,最终使铜无法从胞内转运出去,引起铜在细胞内聚积^[6]。然而细胞内 R778L 突变蛋白的活性以及突变蛋白在细胞内的定位是否也发生了改变,均未有实验数据进行验证。

目前我们已经研究了野生型 WD 基因在皮肤成纤维细胞株内的表达情况^[7]。本实验又利用 PCR 技术将 WD 基因 8 号外显子第 778 位密码子成功进行了定点突变,下一步的工作将研究突变蛋白在细胞内的定位和活性改变,从而在蛋白质水平上进一步阐明该突变热点导致 WD 的发病机制以及探讨 ATP7B 结构和功能之间关系。

(本文图 2 见封 2. Fig. 2 show inside front cover)

参考文献:

- [1] Riordan S M, Williams R. The Wilson's disease gene and phenotypic diversity [J]. J Hepatol 2001, 34(1): 165.
- [2] Genschel J, Czbnkowska A, Sommer G, et al. Three novel mutations (P760L, L1305P, Q1351Stop) causing Wilson disease [J]. Hum Mutat, 2001, 17(2): 156.
- [3] 马少春,梁秀龄,徐评议,等. 肝豆状核变性 8、14 号外显子基因突变的检测[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(1): 14.
- [4] 梁秀龄. 肝豆状核变性研究的过去、现在和将来[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2001, 27(2): 81.
- [5] Sambrook E F, Fritsch T, Maniatis A. Molecular cloning, a laboratory[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 39~47.
- [6] 徐评议,梁秀龄,马少春. Wilson's 病 8 号外显子突变研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16(2): 88.
- [7] 闫振文,梁秀龄,杨春水,等. 肝豆状核变性基因在皮肤成纤维细胞株转染后的表达[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2001, 27(2): 83.

(编辑 刘清海)

