

重叠 PCR 法构建 XLRS1 三种不同类型突变体 *

王 峰 程海霞 袁冬青 夏 鑫 刘庆淮[△]

(南京医科大学第一附属医院 江苏 南京 210029)

摘要 目的 构建 X 连锁视网膜劈裂 (XLRs) 三种不同类型突变体 (点突变、缺失突变、插入突变), 以便进一步构建不同类型的突变细胞模型。方法 根据 NCBI gene 数据库中 XLRS1 基因的 CDS 设计三对不同引物, 使用重叠 PCR 法获得突变片段, 然后克隆入载体 pLJM1-EGFP。结果 经测序验证, 成功构建了三种不同类型突变体。结论 使用重叠 PCR 法构建三种不同类型突变体, 为进一步研究 XLRS1 不同类型突变的致病机制奠定了基础。

关键词 X 染色体连锁视网膜劈裂蛋白 1 重叠 PCR 定点突变 视网膜劈裂

中图分类号 Q78, R77 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 16-3068-03

Construction of Three Different Types of Mutants of XLRS1 by Overlapping PCR*

WANG Feng, CHENG Hai-xia, YUAN Dong-qing, XIA Xin, LIU Qing-huai[△]

(The First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To construct three different types of mutations of XLRS1 for further modeling different types of mutant cell lines. **Methods:** Three different pairs of mutation primers were designed according to the CDS sequence of XLRS1 from the gene database of NCBI. Then three mutant fragments were obtained by overlapping PCR, which were further cloned into the vector pLJM1-EGFP. **Results:** Three types of mutant plasmids were verified by sequencing. **Conclusions:** Construction of three different types of mutants by overlapping PCR provided the foundation for investigating the pathogenesis of different types of XLRS1 mutants.

Key words: XLRS1; Overlapping PCR; Sited directed mutagenesis; Retinoschisis

Chinese Library Classification: Q78, R77 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 16-3068-03

前言

X 染色体连锁视网膜劈裂 (X-Linked Retinoschisis, XLRs), 又称先天性视网膜劈裂, 主要发生于青少年, 以视网膜神经纤维层撕裂为特征, 严重影响视力^[1]。该病主要是 X 染色体连锁遗传, 基因 XLRS1 (X-Linked Retinoschisin 1, X 染色体连锁视网膜劈裂蛋白 1, NCBI Gene ID: 6247) 的突变经由从携带者母亲经由传给男性后代而致病, 也有部分病例是常染色体显性遗传^[2]。目前专门记录 XLRS1 突变的数据库 (<http://www.dmd.nl>) 报道的突变有 191 种, 以点突变导致的错义突变为主, 还包括缺失和插入突变, 后两种突变会引起严重的框移突变, 严重影响蛋白的功能^[3]。目前对于这些突变的致病机制的研究主要还是基于构建 XLRS1 的突变质粒转染细胞以建立各种突变模型^[4]。信号肽区域的突变会使视网膜劈裂蛋白 retinoschisin 滞留于内质网内, 无法分泌到细胞外^[5,6]。还有一些突变会影响蛋白质八聚体形成^[7], 影响蛋白正常功能^[8]。本文使用重叠 PCR 法构建了 XLRS1 三种类型的突变质粒: 点突变, 缺失突变和插入突变。首先使用重叠 PCR 法用于构建定点突变^[9], 该方法使用突变引物引入各种突变, 然后使用常规的分子生物学方法克隆入载体^[10], 进行后续实验。

1 材料和方法

1.1 材料

高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (大连 TaKaRa 公司, DR010A), 琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒 (Takara, D823A), DNA 片断纯化试剂盒 (Takara, D822A), 质粒抽提试剂盒 (天根生化科技有限公司, DP103-02), T4 DNA 连接酶 (Promega, M1801S)。

1.2 方法

1.2.1 模板质粒的制备 在南京金斯瑞生物科技有限公司合成 XLRS1 基因的 CDS 区 (去除终止密码子), 下游是去除起始密码子的 3x FLAG 标签蛋白编码序列 (gactacaaagaccatgacgggtgattataagatcatgacatcgactacaaggatgacgatgacaag) 和 3x STOP 终止密码子序列 (tagtaatga)。合成的序列以 Nhe I/EcoR I 克隆入质粒 pLJM1-EGFP^[11] (购自美国 addgene, 质粒代号 19319), 获得 pLJM1-XLRs1-3xFLAG 模板质粒。

1.2.2 突变片段构建流程 构建流程 (图 1), 图片改编自 Heckman 他们的文献^[10]。①显示引物与野生型模板 DNA 的位置对应关系, 引物 a 和 d 用于构建 CDS 全长, 引物 b 和 c 含有突变序列 (图中以 "X" 表示), 突变序列的两侧侧翼序列和模板匹配。

* 基金项目 国家自然科学基金 (30973257; 81170855; 81070743)

作者简介 王峰 (1982), 男, 硕士研究生, 主要研究方向 玻璃体视网膜疾病, 电话 025-57216537, E-mail: white_fox_inside@yahoo.com.cn

[△]通讯作者 刘庆淮, 电话 025-83718836-6862, E-mail: liuqh@njmu.edu.cn

(收稿日期 2012-03-07 接受日期 2012-04-02)

达到 15bp 以上,并且 b 和 c 是完全互补的 ;②引物 a 和 b PCR 扩增出产物 AB,c 和 d PCR 扩增出产物 CD,AB 和 CD 都带有突变 ;③AB 和 CD 在各自的 3' 端互补,在 DNA 聚合酶作用下,彼此互为模板延伸出完整的突变型 DNA,但是产量很低 ;④利用引物 a 和 d 指数化 PCR 扩增突变型 DNA ;⑤PCR 得到大量的突变型 DNA,进一步克隆入载体。

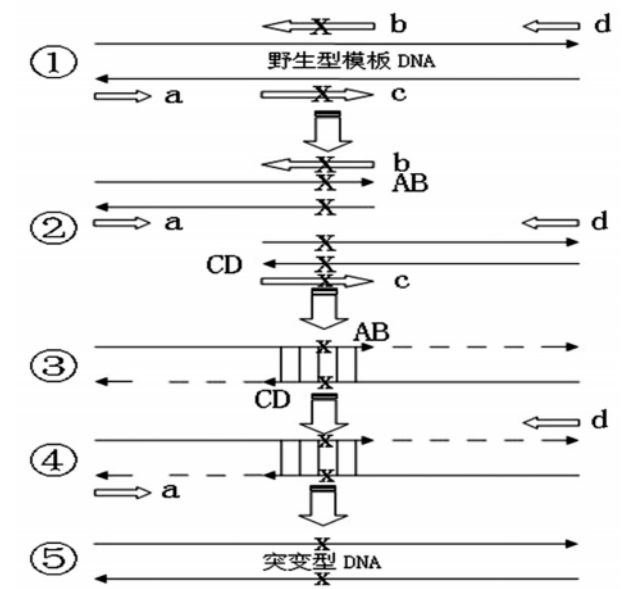


图 1 突变片段的构建流程

Fig.1 Workflow of constructing the mutant fragment

1.2.3 扩增 CDS 全长的引物 上游引物 5' 端加入保护碱基和 Nhe I 酶切位点,a 'aataatgctagcatgtcacgaagataga ;下游引物依据 3x STOP 终止密码子序列设计,其 5' 端加入 EcoR I 酶切位点和保护碱基,b 'aataatgaattctcattactactgtcatcgtc。

1.2.4 突变引物的设计 三种类型的突变引物均使用美国 stratagene 公司的在线突变引物设计工具设计 (<http://www.stratagene.com>)。点突变 305G>A, 选取自在线数据库 <http://www.dmd.nl/>, 是 CDS 区第 305 位碱基 G 突变成 A。上游引物 305G>A-F: ctgcaacaaggccagctcaacagtcagg, 下游引物 : 305G>A-R: ccttgactgttgagctggcctgtgttcag。缺失突变 371-374delAGAT, 是 Hiriyan KT 他们首先报道的突变,是 CDS 区第 371 位到第 374 位碱基的连续四个碱基缺失突变。上游引物 371-374del-F: cagtagccagtggtacagatctgaaggagatca,下游引物 371-374del-R: tgatctccttcagatctgtaaccactggctactg。插入突变 220_221insTCCCCTGACCGGGTTA, 源于在线数据库 <http://www.dmd.nl/>, 是 CDS 区第 220 位和第 221 位碱基之间插入 16 个碱基。上游引物 220_221ins-F: gggtttcagtcagtcacctgaccgggttagggaggtcacaccg, 下游引物 220_221ins-R: cgggtgtgac-tcccctaaccgggtcaggggactgactcgaacc。三对突变引物与野生型 XLR1S1 CDS 区的对应关系 (图 2), 图片截取自 stratagene 公司的突变引物在线设计工具 <http://www.stratagene.com>。

1.2.5 突变质粒的构建 三种突变质粒的构建,按照图 1 的程序获得三种突变片段,以 Nhe I/EcoR I 酶切克隆入质粒 pLJM1-EGFP, 转化感受态大肠杆菌。挑取单克隆菌落进行

PCR 检测,选取阳性克隆扩大培养抽提质粒,送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

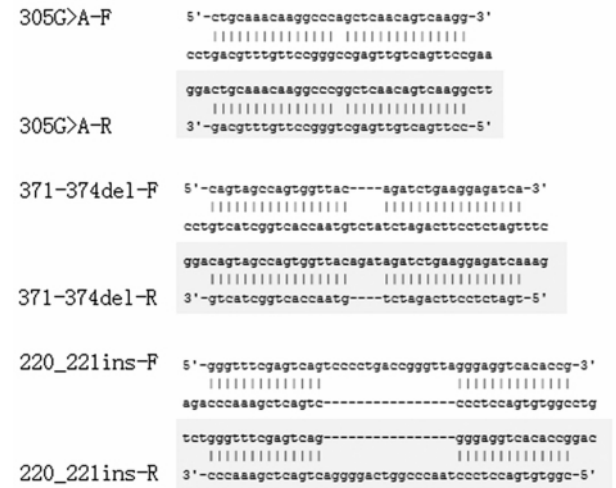


图 2 三对突变引物与模板 XLR1S1 CDS 区的对应关系

Fig.2 The corresponding relationship between those three pairs of mutation primers and the template of the CDS sequence of XLR1S1

1.2.6 测序结果分析 使用 NCBI 的在线比对工具 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), 将测序结果与野生 XLR1S1 的序列进行比对。

2 结果

2.1 PCR 获得产物 AB 和 CD

以引物 a 和每对突变引物的下游引物配对 PCR,以引物 d 和每对突变引物的上游引物配对,pljm1-XLR1S1-3xFLAG 质粒为模板,以 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 进行 PCR,获得的 PCR 产物进行 1 %琼脂糖凝胶电泳,泳道 1、5、9 分别为三种突变 :点突变、缺失突变、插入突变的 AB 段 PCR 产物,3、7、11 分别为三种突变的 CD 段 PCR 产物,其余泳道均为各对引物以水为模板进行 PCR 的空白对照,Marker :Takara DL2000 DNA Marker (图 3)。

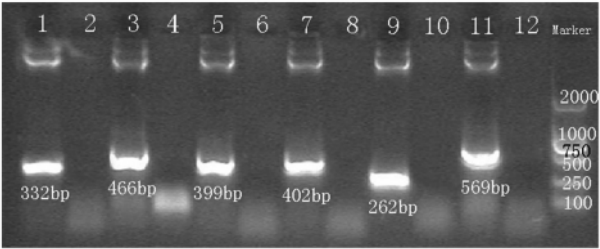


图 3 PCR 产物 AB 和 CD 的 1 %琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 1 % agarose gel electrophoresis of PCR products of AB and CD

2.2 三种突变类型的全长 DNA 片段

AB 和 CD 段 PCR 产物经过切胶,使用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒纯化,各取 1μl 作为模板 DNA,均以 a 和 d 为引物,以 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 进行 PCR,获得的 PCR 产物进行 1 %琼脂糖凝胶电泳,泳道 1、2、3 分别为点突变、缺失突变、插入突变的全长 PCR 产物,泳道 4 是以水为模

板进行 PCR 的空白对照,泳道 5 是以 pLJM1-XLRS1-3xFLAG 为模板的阳性对照,Marker :Takara DL2000 DNA Marker (图 4)。

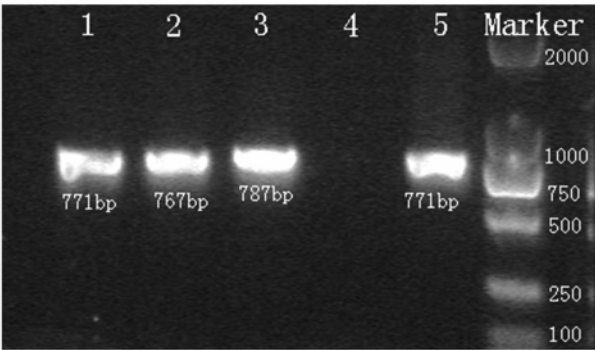


图 4 三种突变类型的全长 DNA 片段的 1%琼脂糖凝胶电泳图
Fig.4 1% agarose gel electrophoresis of three different types of mutants of full length DNA fragments

2.3 测序结果比对

突变质粒测序使用 NCBI 的 BLAST 程序与野生型 XLRS1 的 CDS 序列比对,每条双链的上链为突变序列,下链为野生型 XLRS1 的 CDS 序列(图 5)。

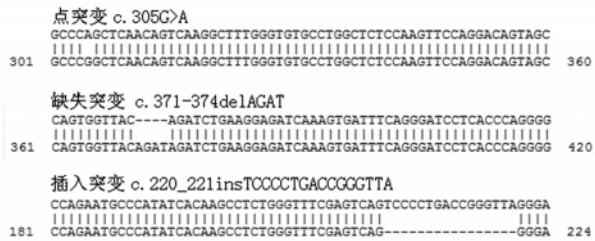


图 5 三种突变质粒测序后的 BLAST 比对结果
Fig.5 Results of alignment of three mutant plasmids by BLAST

3 讨论

定点碱基突变技术构建遗传病模型目前广泛运用于经典的孟德尔遗传病的研究,该技术在改造蛋白质功能获得改良的重组蛋白中也发挥了极大作用。早期构建定点突变的方法是使用单链质粒,实验难度较大^[12-15]。目前商品化的突变试剂盒主要运用了全长质粒扩增技术^[16,17],比如 stratagene 公司的突变试剂盒,不需要单链质粒^[18],但是这种方法的 PCR 模板必须是事先构建好的质粒,且用 PCR 法扩增全长质粒,骨架质粒的序列有发生意外突变的可能。而重叠 PCR 法的模板 DNA 不仅仅限于质粒,基因组 DNA、互补 DNA(complementary DNA,cDNA)都可以作为模板。且 PCR 扩增区域仅限于克隆片段,不包括骨架质粒,可以排除 PCR 在骨架质粒区域引入的意外突变。

重叠 PCR 构建定点突变有以下几个关键点:1) 设计带有突变序列的引物 b 和 c (图 1)是整个流程的核心,需满足 a.突变序列的上下游侧翼序列和野生型模板序列要完全互补,单侧互补序列要达到 15bp 以上,以保证突变引物可以和野生型模板互补结合;b.引物 b 和 c 完全互补,以保证在图 1 的第三步反应中产物 AB 和 CD 的部分碱基互补结合^[10]。2) 产物 AB 和 CD 之间的结合(图 1 中的③)有两种可能:a. AB 的正义链和

CD 的反义链在各自的 3' 端互补结合;b. AB 的反义链和 CD 的正义链在各自的 5' 端结合。但是只有第一种结合方式,互补的区域可以在 DNA 聚合酶的作用下沿着 5'→3' 以彼此的序列为模板继续延伸产生完整的突变型 DNA 片段,但是产量极低。该过程仅仅发生在 PCR 循环的第一个退火和延伸阶段。3) 从第二个退火和延伸的循环开始直至 PCR 结束(图 1 中的④),引物 a 和 d 以前期产生的少量的完整的突变型 DNA 为模板,指数化扩增这个突变型 DNA,极大的增加了产量。4) 重叠 PCR 法构建突变质粒可用质粒、基因组 DNA 和 cDNA 为模板,在以质粒为模板时,为了防止后期转化感受态大肠杆菌野生型模板质粒的污染,在图 1 的②中,产物 AB 和 CD 的获取必须采用根据目的条带大小切取琼脂糖凝胶的方法,以纯化产物,这样可以通过 DNA 的碱基长度差异去除模板质粒的污染。虽然基因组 DNA 和 cDNA 作为模板不存在这个问题,但是采用切胶纯化的方法获取产物 AB 和 CD,有利于去除非特异反应的条带。

本实验中选择了 pLJM1-EGFP 为骨架质粒,该质粒是一种基于慢病毒技术的高表达质粒,配合嘌呤霉素筛选可以得到稳定表达各种突变类型视网膜劈裂蛋白的细胞系,避免了多次瞬时转染。最为关键的是,相对于瞬时转染的效率不一,稳定转染细胞系的实验重复性好^[19]。此外,文中构建的所有质粒均带有 FLAG 标签序列,以便于中一步实验中使用针对 FLAG 蛋白的抗体检测各种类型的突变蛋白^[20]。本文使用了重叠 PCR 法成功构建了 XLRS1 基因的三种不同类型的突变,为本课题组进一步研究 X 染色体连锁视网膜劈裂这种经典的孟德尔遗传病奠定了分子生物学基础。

参考文献 (References)

[1] Molday LL, WWH Wu, RS Molday. Retinoschisin (RS1), the protein encoded by the X-linked retinoschisis gene, is anchored to the surface of retinal photoreceptor and bipolar cells through its interactions with a Na/K ATPase-SARM1 complex [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(45): 32792-32801

[2] Yassur Y, I Nissenkorn, I Ben-Sira, et al. Autosomal dominant inheritance of retinoschisis [J]. Am J Ophthalmol, 1982, 94(3): 338-343

[3] Sikkink SK, S Biswas, NRA Parry, et al. X-linked retinoschisis: an update [J]. Journal of medical genetics, 2007, 44(4): 225-232

[4] Vijayarathay C, R Sui, Y Zeng, et al. Molecular Mechanisms Leading to Null Protein Product from Retinoschisin (RS1) Signal Sequence Mutants in X Linked Retinoschisis (XLRS) Disease [J]. Human mutation, 2010, 31(11): 1251-1260

[5] Wu WW, RS Molday. Defective discoidin domain structure, subunit assembly, and endoplasmic reticulum processing of retinoschisin are primary mechanisms responsible for X-linked retinoschisis [J]. J Biol Chem, 2003, 278(30): 28139-28146

[6] Grayson C, SNM Reid, JA Ellis, et al. Retinoschisin, the X-linked retinoschisis protein, is a secreted photoreceptor protein, and is expressed and released by Weri-Rb1 cells [J]. Human molecular genetics, 2000, 9(12): 1873-1879

[7] Wu WWH, JP Wong, J Kast, et al. RS1, a discoidin domain-containing retinal cell adhesion protein associated with X-linked retinoschisis, exists as a novel disulfide-linked octamer [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(11): 10721

(下转第 3083 页)

间接判断斑块稳定性。

本研究尚存在一定的局限性,如样本量偏小,超声造影剂衰减导致的新生血管显示受限,腹主动脉球囊损伤内膜情况存在偏差等问题有待进一步解决。

综上所述,本实验通过高脂喂养联合球囊损伤成功构建腹主动脉不稳定斑块模型,采用超声造影方法直观显示斑块内新生血管的存在及分布情况,从而判断斑块稳定性,为临床采用无创超声造影技术判断斑块稳定性奠定了理论基础。

参考文献 (References)

- [1] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II[J]. Circulation, 2003, 108(15): 1772-1778
- [2] 宾建国. 血管内超声检测易损斑块的研究进展[J]. 临床超声医学杂志, 2009, 11(10):684-686
Bin Jian-guo. Research Progress on Intravascular ultrasound detection of the vulnerable plaques [J]. Journal of Ultrasound in Clinical Medicine, 2009, 11(10):684-686
- [3] Davies M J, Richardson PD, Woolf N, et al. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content[J]. Br Heart J, 1993, 69: 377-381
- [4] 石怀银, 韦立新, 余明鹏, 等. 冠脉斑块中炎细胞及平滑肌细胞含量对斑块稳定性的影响[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28: 256-259
Shi Huai-yin, Wei Li-xin, She Ming-peng, et al. Quantity of inflammatory cells and smooth muscle cells in coronary artery plaque and its relationship with the stability of plaques [J]. Chinese Journal of Pathology, 1999, 28(4): 256-259
- [5] Barger AC, Beeuwkes R 3rd, Lainey LL, et al. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries[J]. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. N Engl J Med, 1984, 310(3): 175-177
- [6] Moulton, K.S. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Circulation, 1999, 99(13): 1726-1732
- [7] Celletti. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor165 on progression of atherosclerotic plaque [J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 37(8):2126-2130
- [8] Baldassarre D, Castelnuovo S, Frigerio B, et al. Effects of timing and extent of smoking, type of cigarettes, and concomitant risk factors on the association between smoking and subclinical atherosclerosis[J]. Stroke, 2009, 40(6):1991-1998
- [9] Funabashi N, Asano M, Komuro I. Predictors of non-calcified plaques in the coronary arteries of 242 subjects using multislice computed tomography and logistic regression models [J]. Int J Cardiol, 2007, 117(2):191-197
- [10] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005 Oct, (100):2054-2061
- [11] Piao M, Tokunaga O. Significant expression of endoglin (CD105), TGFbeta-1 and TGFbeta R-2 in the atherosclerotic aorta: an immunohistological study[J]. J Atheroscler Thromb, 2006 Apr, 13(2):82-89
- [12] Sergeev Y, R Caruso, M Meltzer, et al. Molecular modeling of retinoschisin with functional analysis of pathogenic mutations from human X-linked retinoschisis [J]. Human molecular genetics, 2010, 19(7): 1302-1313
- [13] Ho SN, HD Hunt, RM Horton, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction [J]. Gene, 1989, 77(1): 51-59
- [14] Heckman KL, LR Pease. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension [J]. Nature protocols, 2007, 2(4): 924-932
- [15] Sancak Y, TR Peterson, YD Shaul, et al. The Rag GTPases bind rapTOR and mediate amino acid signaling to mTORC1 [J]. Science's STKE, 2008, 320(5882): 1496
- [16] Kunkel LM, AP Monaco, W Middlesworth, et al. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985, 82(14): 4778
- [17] Sugimoto M, N Esaki, H Tanaka, et al. A simple and efficient method for the oligonucleotide-directed mutagenesis using plasmid DNA template and phosphorothioate-modified nucleotide [J]. Analytical biochemistry, 1989, 179(2): 309-311
- [18] Taylor WJ, J Ott, F Eckstein. The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA [J]. Nucleic acids research, 1985, 13(24): 8765-8785
- [19] Vandeyar MA, MP Weiner, CJ Hutton, et al. A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide-directed mutants [J]. Gene, 1988, 65(1): 129-133
- [20] Morinaga Y, T Franceschini, S Inouye, et al. Improvement of oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis using double-stranded plasmid DNA [J]. Nature Biotechnology, 1984, 2(7): 636-639
- [21] Lai D, X Zhu, S Pestka. A simple and efficient method for site-directed mutagenesis with double-stranded plasmid DNA [J]. Nucleic acids research, 1993, 21(17): 3977-3980
- [22] Braman J, C Papworth, A Greener. Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates [J]. The Nucleic Acid Protocols Handbook, 2000, 835-844
- [23] Robl J, Z Wang, P Kasinathan, et al. Transgenic animal production and animal biotechnology [J]. Theriogenology, 2007, 67(1): 127-133
- [24] Maue RA. Understanding ion channel biology using epitope tags: Progress, pitfalls, and promise [J]. Journal of cellular physiology, 2007, 213(3): 618-625

(上接第 3070 页)