

基于平行模板的重叠延伸PCR优化策略

李国庆, 刘君怡, 罗雪儿, 陈明, 王程君, 陈华波*

湖北文理学院基础医学院, 湖北 襄阳

收稿日期: 2022年12月8日; 录用日期: 2023年1月19日; 发布日期: 2023年1月30日

摘要

基于平行模板的一步法重叠延伸PCR是传统基因定点突变的简化方案, 其瑕疵是不完全延伸片段交叉互补会产生野生型干扰。为寻找原方案下形成交叉互补的关键因素, 提高其定点突变效率, 对诸多相关因素进行了分析。发现调整中介引物浓度稀释比可以增加目标突变体含量, 但难以彻底消除野生型干扰; 而基因长度则明显影响终产物构成。据此提出两步法重叠延伸PCR优化策略, 先分别在两个小管中扩增突变位点上、下游片段, 再直接混合继续PCR扩增目标基因突变体。以克隆细胞周期蛋白E的定点突变为例进行验证, 得到90%阳性率。优化的两步法重叠延伸PCR方案既保持了相对简化的操作步骤, 又明显提高了突变效率, 是对传统重叠延伸PCR定点突变技术的重要改进。

关键词

定点突变, 平行模板, 一步法重叠延伸PCR, 两步法重叠延伸PCR

Optimization Strategy of Overlap Extension PCR Based on Parallel Template

Guoqing Li, Junyi Liu, Xue'er Luo, Ming Chen, Chengjun Wang, Huabo Chen*

Basic Medical College, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang Hubei

Received: Dec. 8th, 2022; accepted: Jan. 19th, 2023; published: Jan. 30th, 2023

Abstract

That one-step overlap extension PCR which based on parallel template is a simplified scheme of

*通讯作者。

traditional site-directed mutagenesis, however, its drawback is that some incomplete extension DNA fragments cross complement with each other lead to wild-type gene interference. In order to find out the key factors of cross complementation under the original scheme so as to improve the efficiency of site-directed mutagenesis, many related factors were checked. It was found that adjusting the concentration or dilution ratio of the intermediate primer can increase the content and percentage of the target mutant, but this treatment could not eliminate the wild type interference thoroughly; However, the gene length in the parallel template significantly affected the composition of the final product. According to the above conclusions, a two-step overlap extension PCR optimization strategy was described. First, the upstream and downstream fragments of the mutation site were amplified in two separate tubes with 1/10 diluted intermediate primers, and then they were mixed directly for another PCR reaction to amplify the mutated DNA. Taking the cloning of a mutation of cyclin E as example, 90% positive clones were obtained. The optimized two-step overlap extension PCR not only keeps the relatively simple operation steps, but also improves the mutation efficiency significantly, making it an important improvement of the traditional overlap extension PCR site-directed mutagenesis technology.

Keywords

Site-Directed Mutagenesis, Parallel Template, One-Step Overlap Extension PCR, Two-Step Overlap Extension PCR

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

重叠延伸 PCR (overlap extension PCR, OE-PCR)是基因定点突变的传统方法[1], 已被广泛使用了三十多年。OE-PCR 定点突变的最大缺陷是操作繁琐, 前后两轮 PCR 与电泳检测和胶回收操作还会增加野生型污染风险。虽然目前已开发出几种新的基因定点突变方法, 如滚环扩增法和 Gibson 组装法等[2] [3], 但这些方法也各有弊端[4]。滚环扩增法中若不能对原始质粒模板进行彻底消化则极易产生假阳性干扰; Gibson 组装试剂盒价格昂贵, 且克隆形成数偏少; 故 OE-PCR 法并未被完全取代。

很多研究者尝试对传统 OE-PCR 法进行简化改进, 提出了不少行之有效的优化方案[5] [6] [7]。Andreas Urban 等人曾提出一种基于平行模板的简化方案[8]。利用含同一基因的两个不同质粒混合物作为平行模板, 采用分别匹配两个质粒的正、反向引物和一对含目标突变的中介引物进行一步法 OE-PCR (One-step overlap extension PCR, OOE-PCR)即可扩增出定点突变 DNA (图 1(a))。其理论基础是“无中介引物时, 由于平行模板末端不互补, 野生型 DNA 不会被扩增”; 那么添加中介引物后扩增得到的 DNA 片段一定含有目标点突变。该简化方案也得到了很多科研工作者的支持[9]。然而, 我们在实验中发现无中介引物的 OOE-PCR 负对照往往能扩增出单一、明亮且大小正确的目标 DNA 条带[10]。对于这一现象, 我们曾分析了其可能原因, 即不完全延伸 DNA 片段交叉互补, 互相作为模板和引物合成完整基因进而继续扩增(图 1(b))。该结论与 OOE-PCR 理论基础有所冲突, 尽管如此, 并不能彻底否定 OOE-PCR 法的价值。

常规 OOE-PCR 产物中目标基因突变型比例如何, 它受哪些因素影响及如何控制等都有待进一步研究。为此, 我们对中介引物浓度、基因长度、DNA 聚合酶, PCR 延伸时间等诸多 OOE-PCR 影响因素进行了对比分析, 在此基础上提出一种两步法 OE-PCR (two-step overlap extension, TOE-PCR)优化策略, 并

以克隆细胞周期蛋白 E (cyclin E) 的一个定点突变为例进行了验证。本研究旨在找出 OOE-PCR 定点突变的效率制约因素并制定相应优化策略, 以期提供一种更加高效的基因定点突变优化方案。

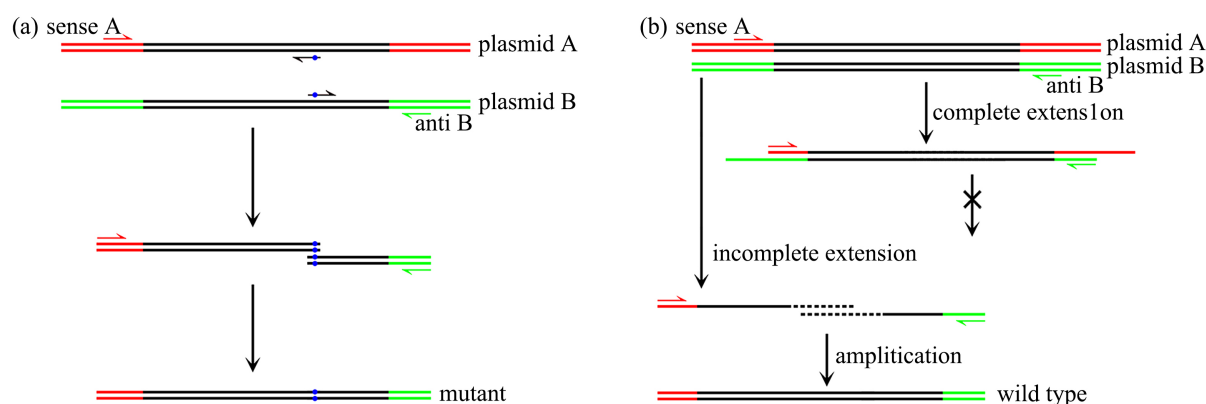


Figure 1. Schematic diagram of OOE-PCR based on parallel template. (a) Amplification of mutant gene by OOE-PCR in a single tube with the aid of parallel template and intermediate primers. (b) Wild type gene could be amplified with the aid of cross-complemented incomplete extension fragments in the absence of intermediate primers

图 1. 基于平行模板的 OOE-PCR 原理示意图。(a) 中介引物辅助下利用平行模板在一个小管内一步法重叠延伸 PCR 扩增突变型基因。(b) 无中介引物下不完全延伸片段交叉互补可使野生型基因扩增

2. 材料与方法

2.1. 材料

感受态大肠杆菌 DH5 α 为本实验室自制与保存[11]; pcDNA3.1 质粒(V800-20)购自 Invitrogen; pEGFP_C2 质粒(#6083-1)购自 Clontech; pcDNA3.1~与 pEGFP_C2~系列质粒由本实验室构建。

Taq DNA Polymerase (AP111)购自北京全式金生物技术有限公司; 2 \times PCR Taq MasterMix (G013)购自 abm; LA-Taq (RR02MQ)、Pyrobest DNA Polymerase (R005A)、rTaq DNA Polymerase (R001)、DNA Ligation Kit Ver.2.1 (6002)购自 Takara; 限制性内切酶 *Age*I (R3552S)、*Bam*HI (R3136V)、*Eco*RI (R3101V)及 *Xho*I (R0146V)购自 NEB; DNA 回收试剂盒(BSC02M1/BSC03M1), 质粒小量抽提试剂盒(BSC01M1)购自杭州博日科技有限公司。

2.2. 引物设计与合成

引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计, 由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成, 经 PAGE 纯化。引物序列见表 1。

Table 1. Primers sequences for PCR

表 1. PCR 引物序列

Primer	Sequence	Length (nt)
p16_170X sense	5'-GCAGCGCTCGAGTGGCGGAGCT-3'	22
p16_170X anti	5'-GCCACTCGAGCGCTGCCCATCAT-3'	23
p21_175X sense	5'-ACACCACTCGAGGGTGACTTCGCCT-3'	25
p21_175X anti	5'-ACCCTCGAGTGGTGTCTCGGTGA-3'	23

Continued

p27_210X sense	5'-ACCCCTCGAGGGCAAGTACGAGT-3'	23
p27_210X anti	5'-TGCCCTCGAGGGGTTTGTGATTCT-3'	24
CDK4_629E sense	5'-CGTCGAATTCCTCTCTTCTG-3'	19
CDK4_629E anti	5'-AGAGAGGAATTCGACGAAAC-3'	20
cyclin E_M2 sense	5'-TTTCGCTGCCGCGGCTGCGGCGACACAAGA AAATG-3'	35
cyclin E_M2 anti	5'-CGCCGCAGCCGCGGCAGCGAAATCTTGTGCCAA-3'	33
RB 1786X sense	5'-TCTTCCTCTCGAGAATAATCACACTG-3'	26
RB 1786X anti	5'-TGATTATTCTCGAGAGGAAGATTAAG-3'	26
T7 Promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'	19
BGH	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	18
pEGFP_C3	5'-TATGGCTGATTATGATCAGT-3'	20

下划线指示酶切位点。

2.3. 基因扩增与检测

常规 PCR: 4 μ L 10 \times buffer, 4 μ L dNTP, 0.4 μ L 正向引物/0.4 μ L 反向引物, 0.4 μ L DNA 聚合酶, 2 ng 质粒模板, 补水至 40 μ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1~3 min, 30 循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。

OOE-PCR: 4 μ L 10 \times buffer, 4 μ L dNTP, 0.4 μ L T7 Promoter/0.4 μ L pEGFP_C3', 0.4 μ L 正/反向中介引物, 0.4 μ L DNA 聚合酶, 2 ng pcDNA3.1~pEGFP_C2~质粒模板混合物, 补水至 40 μ L。94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1~3 min, 30 循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。

TOE-PCR: A 管: 2 μ L 10 \times buffer, 2 μ L dNTP, 0.2 μ L T7 Promoter/0.2 μ L 反向中介引物, 0.2 μ L Pyrobest DNA Polymerase, 1 ng pcDNA3.1~质粒模板, 补水至 20 μ L。B 管: 2 μ L 10 \times buffer, 2 μ L dNTP, 0.2 μ L 正向中介引物/0.2 μ L pEGFP_C3', 0.2 μ L Pyrobest DNA Polymerase, 1 ng pEGFP_C2~质粒模板, 补水至 20 μ L。94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1~3 min, 0~30 循环; A、B 管混合后 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1~3 min, 30 循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。

从琼脂糖凝胶中回收目标 DNA, 根据条带亮度将其洗脱至 20~50 μ L 纯水中。酶切: 7.5 μ L DNA 回收物, 2 μ L 10 \times buffer, 0.5 μ L 内切酶, 补水至 20 μ L; 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。

2.4. cyclin E^{M2} 突变体的克隆

取目标 DNA 凝胶回收物 17 μ L (同时取 pEGFP_C2 质粒 1 μ g 稀释到 17 μ L 纯水中), 加 2 μ L 10 \times buffer, 0.5 μ L *EcoRI*/0.5 μ L *SalI*, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。酶切产物直接回收至 40 μ L 纯水中。采用 DNA Ligation Kit Ver.2.1 进行连接: DNA 片段 4.5 μ L, 载体 0.5 μ L, solution I 5 μ L; 16 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。连接产物直接转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂布于卡那霉素-LB 平板。从过夜平板上随机挑取 20 个菌落, 置于 3 mL 卡那霉素-LB 培养基中继续培养 7 h 后提取质粒进行酶切检测: 质粒 DNA 7.5 μ L, 加 2 μ L 10 \times buffer, 0.25 μ L *AgeI*/0.25 μ L *BamHI*, 补水至 20 μ L; 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后 1%琼脂糖凝胶电泳检测。任取 1 个阳性克隆进行序列测定,

DNA 测序由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成, 采用 DNAMAN 4.0 软件进行序列比对。

3. 结果与分析

3.1. 中介引物浓度对 OOE-PCR 产物的影响

关于以平行模板为基础的 OOE-PCR 定点突变简化策略, 既然无中介引物下依然可以扩增出目标基因, 那么在添加中介引物时, 终产物是其野生型还是突变型? 为此我们以克隆 $CDK4^{629E}$ 突变体为例进行研究。正向引物 T7 Promoter 仅匹配 pcDNA3.1- $CDK4$ 质粒, 反向引物 pEGFP_C3' 仅匹配 pEGFP_C2- $CDK4$ 质粒。中介引物在 $CDK4$ 基因 629 位引入一个 $EcoRI$ 位点, 以便于后续对 PCR 产物进行快速酶切分析(图 2(a))。

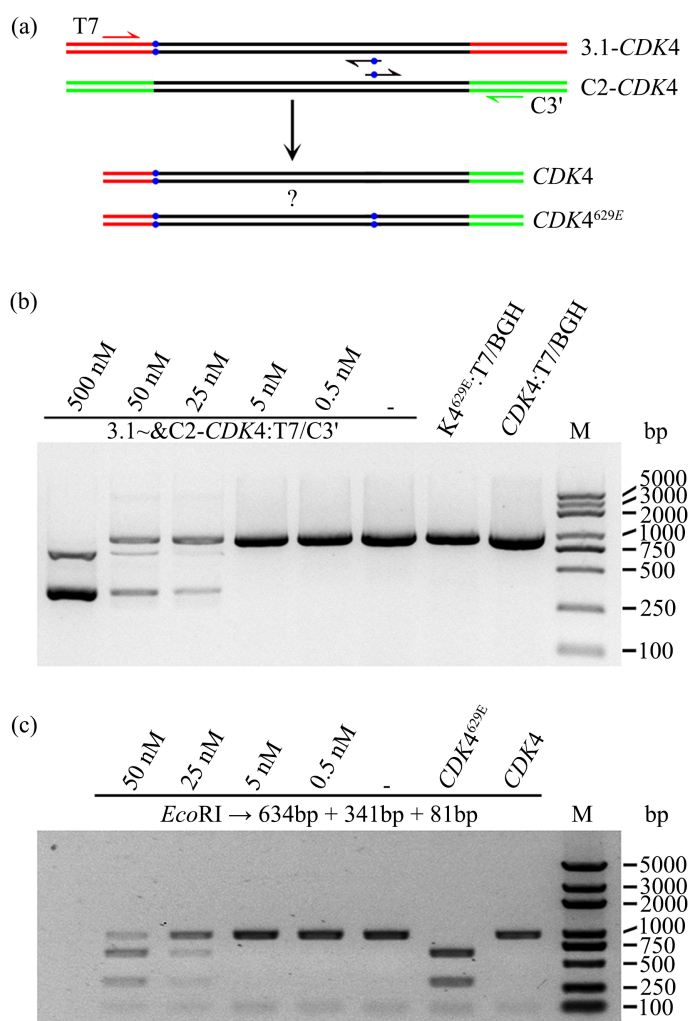


Figure 2. Effect of intermediate primers concentration on OOE-PCR products. (a) Gene map and primer matching sites. The blue dot indicates the $EcoRI$ restriction site. (b) Amplification of $CDK4^{629E}$ by OOE-PCR with different concentrations of intermediate primers. The last two lanes were positive control with conventional PCR amplification of wild type $CDK4$ and its mutant. (c) $EcoRI$ digesting result of the extraction from figure b. The expected result of $CDK4^{629E}$ mutant was shown in the up of the figure. M represents DNA marker

图 2. 中介引物浓度对 OOE-PCR 产物的影响。(a) 基因图谱及引物匹配位点。蓝色圆点表示 $EcoRI$ 酶切位点。(b) 添加不同浓度中介引物 OOE-PCR 扩增 $CDK4^{629E}$ 结果。最后 2 道为常规 PCR 扩增野生型 $CDK4$ 及其突变体作对照。(c) b 图目标条带回收物 $EcoRI$ 酶切检测结果。 $CDK4^{629E}$ 突变体酶切预期变化如图所示。M 为 DNA 标志物

电泳检测发现高浓度中介引物下只得到两个稍小片段, 根据其大小推测为突变位点上、下游基因片段; 随着中介引物浓度降低, 上、下游片段产量随之减少, 并出现全长 CDK4 基因产物; 无中介引物时亦能扩增出全长目标基因(图 2(b))。CDK4 基因通过 *EcoRI/SaII* 双酶切插入载体, *EcoRI* 位点会保留在 PCR 产物 DNA 前段。目标突变在 629 位新增一个 *EcoRI* 位点, 故突变型基因被 *EcoRI* 酶切为三个片段, 而野生型只会产生两个片段。对上述全长基因片段回收物作酶切分析, 发现高浓度中介引物下的 OOE-PCR 产物大部能被切开, 但仍保留一定量全长基因片段, 提示该 PCR 产物中仍含有少量野生型基因。降低中介引物浓度, 则突变型比例减少, 野生型比例增加; 至 5 nmol/L (即常规 PCR 引物浓度 1/100) 时, 已不见突变型基因存在(图 2(c))。经反复调整 PCR 反应条件, 仍未能得到任何一道彻底去除野生型干扰的终产物(结果未显示)。

3.2. 延伸时间对 OOE-PCR 的影响

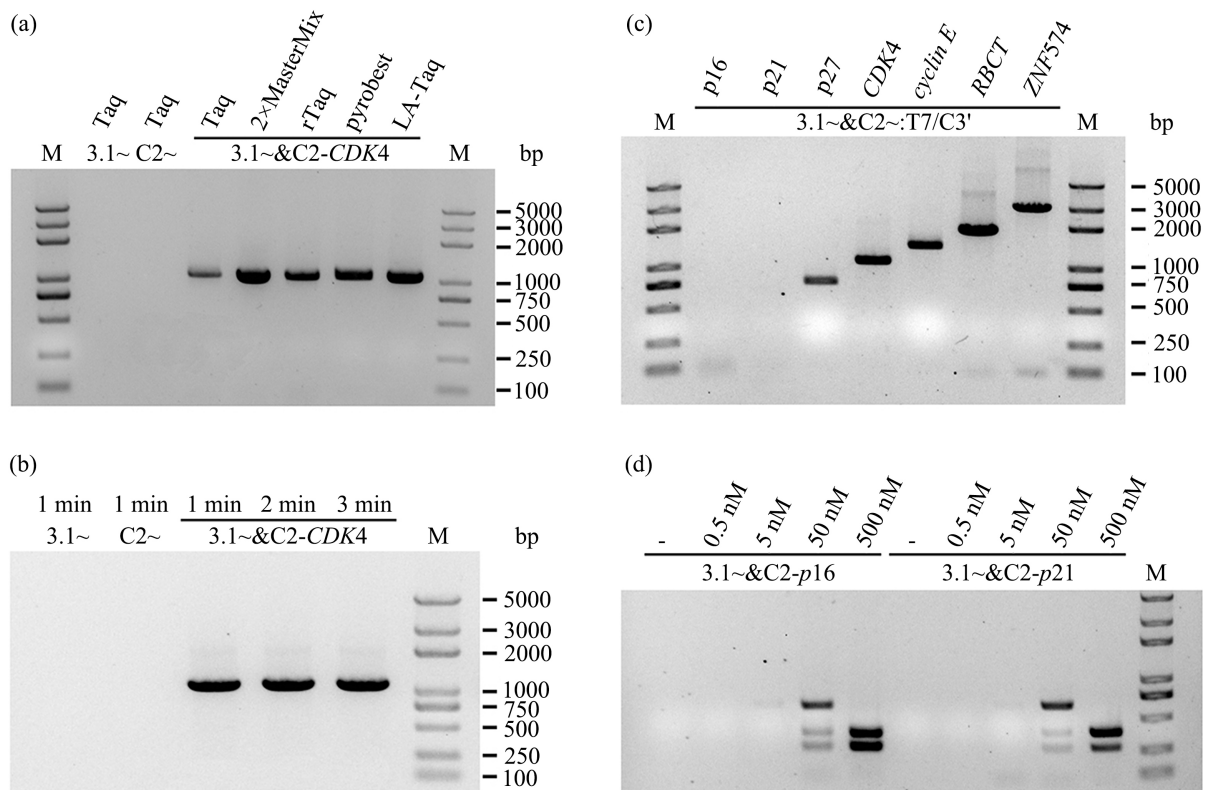


Figure 3. Effect of gene length on OOE-PCR products. (a) OOE-PCR results with different DNA polymerase in the absence of intermediate primers. (b) OOE-PCR results in different elongation time in the absence of intermediate primers. (c) Amplification of genes in different length with OOE-PCR in the absence of intermediate primers. (d) Amplification of *p16* and *p21* genes with OOE-PCR in the presence of intermediate primers. All their primers were T7 and C3', M stands for DNA marker.

图 3. 基因长度对 OOE-PCR 产物的影响。(a) 不同 DNA 聚合酶进行无中介引物 OOE-PCR 结果。(b) 不同延伸时间下无中介引物 OOE-PCR 结果。(c) 不同长度基因进行无中介引物 OOE-PCR 结果。(d) *p16* 与 *p21* 两基因进行有中介引物 OOE-PCR 结果。以上引物皆为 T7/C3', M 表示 DNA 标志物

OOE-PCR 中野生型基因产物的干扰在于不完全延伸形成的 DNA 片段交叉互补, 找到影响不完全延伸的原因并加以解决即可改善 OOE-PCR 定点突变效率。这里涉及到 DNA 聚合酶体外持续合成能力、PCR 反应延伸时间、DNA 长度等影响因素。选用 5 中常见 PCR 专用 DNA 聚合酶进行对比分析, 发现无中介引物下它们都能顺利扩增出目标基因(图 3(a))。DNA 聚合酶体外合成速度可达 2 kb/min 以上[12], 常按 1

kb/min 保守估计 PCR 反应延伸时间。选用高保真 DNA 聚合酶 pyrobest 扩增 CDK4 基因, 在不添加中介引物的情况下, 延伸时间增加到 3 min 仍能扩增出目标基因(图 3(b))。采用其他 DNA 聚合酶亦得到同样结果(结果未展示), 说明延长 PCR 反应延伸时间不能削弱平行模板的交叉互补。

如果不完全延伸片段是 DNA 聚合酶随机中止的结果, 那么很容易推测长基因 OOE-PCR 更容易出现平行模板交叉互补。选用 7 个长度各异的细胞周期相关基因(表 2)进行无中介引物 OOE-PCR 检测, 发现 *p16* 与 *p21* 两个小基因组未见目标产物, *p27* 以上长基因组皆能扩增出目标片段(图 3(c))。在 *p16* 与 *p21* 组添加中介引物, 当其浓度增加至 50 nmol/L (正、反向引物浓度 1/10)时出现目标产物, 并伴有少量上、下游基因片段(图 3(d))。该结果与 OOE-PCR 原构思相符, 只是中介引物浓度略高。似乎短基因不易交叉互补, 而更适合直接 OOE-PCR 克隆定点突变。

Table 2. Gene information

表 2. 基因信息表

Gene name 基因名称	Genebank Accession NO. 基因库登录号	Mutant point 突变位点	Size (bp) 长度
<i>p16</i>	NM_000077	170_ <i>Xho</i> I	471
<i>p21</i>	NM_000389	175_ <i>Xho</i> I	495
<i>p27</i>	NM_004064	210_ <i>Xho</i> I	597
<i>CDK4</i>	NM_000075	629_ <i>Eco</i> RI	912
<i>cyclin E</i>	NM_001238	FDRYM [156~160] AAAAA	1233
<i>RBCT</i>	NM_000321	1786_ <i>Xho</i> I	1653

3.3. 两步法对 OOE-PCR 的优化效果

为减少 OE-PCR 过程中不完全延伸片段产量, 尝试进行 TOE-PCR, 即先在两个小管中扩增突变位点上、下游片段, 再将两管直接混合继续运行 PCR 程序扩增基因突变体。首先进行无中介引物验证, 发现第一轮 PCR 循环 15 次时, 目标基因产量明显降低; 至 20 循环以上时, 已看不到明显的目标产物主带(图 4(a))。以此为基础, 添加适量中介引物对比 TOE-PCR 与 OOE-PCR 差异, 其中 TOE-PCR 第一轮运行 15 次循环。电泳检测发现低中介引物浓度下, TOE-PCR 产物量较少; 至 50 nmol/L 时两者产物量相当(图 4(b))。回收两种方案下目标产物进行酶切检测, 发现低中介引物浓度下, 两种方案的产物均为基因野生型; 至 50 nmol/L 时, 出现被 *Eco*RI 切开的突变体, 且 TOE-PCR 方案下几乎不见野生型残留(图 4(c))。对比上述结果, 发现 TOE-PCR 方案添加 50 nmol/L (即常规 PCR 引物浓度 1/10)中介引物, 第一轮 PCR 运行 15 次循环可得到理想目标产物, 称之为“优化的 TOE-PCR 方案”。

采用 OOE-PCR 与优化的 TOE-PCR 方案在 1/10 中介引物下扩增其它基因定点突变, 发现对于 *p16* 和 *p21* 两个较短的基因, 两种方案的产物相差无几; 对于稍长一些的其它基因, TOE-PCR 方案上、下游片段量少, 而目标产物量略多(图 4(d))。说明优化的 TOE-PCR 方案可以减少副产物的干扰, 增加目标 DNA 产量。对各组目标产物进行酶切检测鉴定其构成, 发现短基因 *p16* 和 *p21* 在两种方案下均为突变型; 其它基因在 OOE-PCR 方案下仍有一定量野生型, 而 TOE-PCR 方案下野生型比例有明显减少(图 4(e))。说明对于长基因定点突变, 优化的 TOE-PCR 方案优势更加明显。

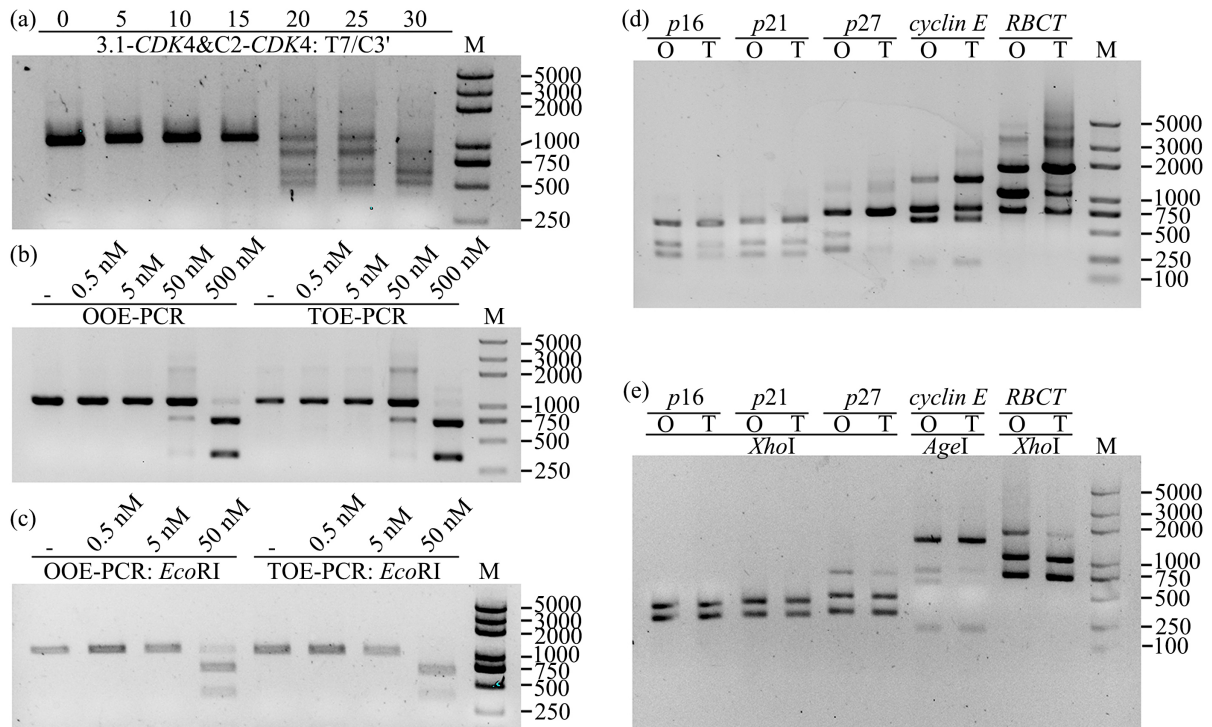


Figure 4. TOE-PCR is better than OOE-PCR. (a) Amplification of *CDK4* gene by TOE-PCR. The number of PCR cycles in first round PCR was shown on top of figure. (b) A comparison of OOE-PCR and TOE-PCR in the amplification of *CDK4* gene. (c) *EcoRI* digesting result of the extraction from figure b. (d) Amplification of other gene mutants with different lengths by OOE-PCR and TOE-PCR. (e) The restriction results of the extraction from figure d. Wild type *cyclin E* could be cut off by *AgeI*, while the mutant of other groups cut off by *XhoI*

图 4. TOE-PCR 优于 OOE-PCR。(a) TOE-PCR 扩增 *CDK4* 基因，第一轮 PCR 循环次数如图所示。(b) OOE-PCR 与 TOE-PCR 扩增 *CDK4* 基因对比。(c) b 图对应目标产物 *EcoRI* 酶切检测结果。(d) OOE-PCR 与 TOE-PCR 扩增相关基因突变体的对比效果。(e) d 图相应目标产物的酶切检测结果。*cyclin E* 组野生型可被 *AgeI* 切开，其它组均为突变型可被 *XhoI* 切开

3.4. 两步法 OE-PCR 克隆 *cyclin E*^{M2} 的实践

为进一步检测优化的 TOE-PCR 方案在基因定点突变中的可行性，以克隆 *cyclin E*^{M2} 突变体为例进行验证。*cyclin E*^{M2} 在其 CDK 结合结构域内发生 FDRYM [156~160] AAAAA 突变，从而失去 *CDK2* 结合能力，常用于研究 *cyclin E/CDK2* 复合物功能[13]。

首先采用优化的 TOE-PCR 方案扩增 *cyclin E*^{M2} 基因片段，同时以不同浓度中介引物进行 OOE-PCR 对比分析。电泳检测发现中介引物浓度增至 50 nmol/L 后目标 DNA 产量降低，而 TOE-PCR 明显增加了同等条件下的目标 DNA 产量(图 5(a))。由于 *cyclin E*^{M2} 将原序列 TTTGACCGGTATAT 突变为 GCTGCCGCGGCTGC，破坏了其中的 *AgeI* 位点，因此可通过酶切鉴定 PCR 产物构成。对上述 PCR 产物作 *AgeI* 酶切分析，发现 TOE-PCR 产物中能被切开的野生型片段明显减少，提示其中绝大部分都是突变型(图 5(b))。将 TOE-PCR 产物插入 pEGFP_C2 载体，筛选出上百个菌落(图 5(c))，与常规分子克隆经验值相符[14]。从平板上任意挑取 20 个菌落，小提质粒作 *AgeI/BamHI* 酶切检测。目标突变质粒切出 888 bp 与 1132 bp 两个小片段，而野生型质粒切出 401 bp、731 bp 与 888 bp 三个小片段。结果显示得到 18 个突变克隆，1 个野生型克隆，另有 1 个推测为空载体(图 5(d))。阳性率 90%，结合经验值及对比其它基因定点突变方案，仍属于优秀水平[4] [15] [16]。取#1 号克隆作序列测定，序列比对结果显示其突变位点与目标序列完全相符，且其它位置无非预期突变(图 5(e))。说明成功克隆了 *cyclin E*^{M2} 突变体，并已将其插入 pEGFP_C2 载体。

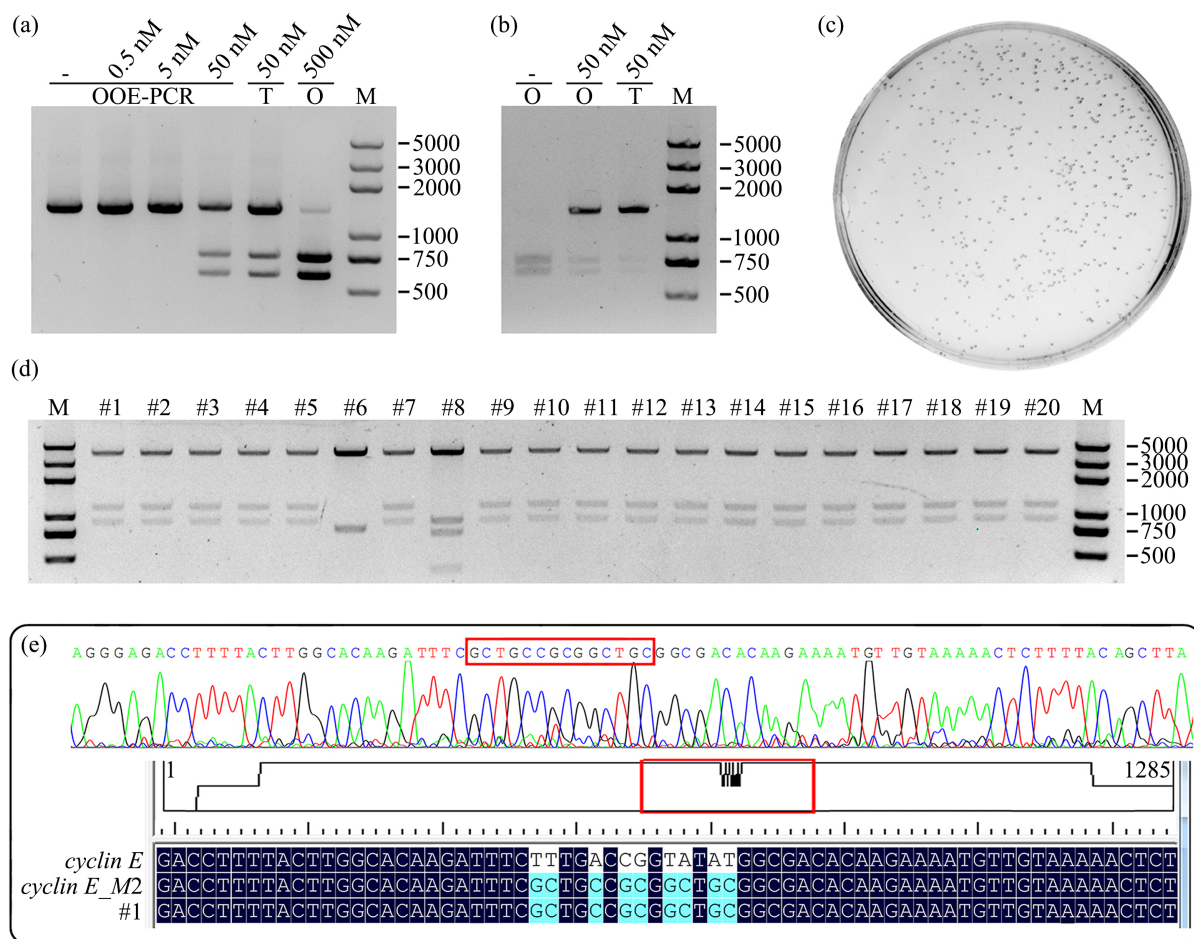


Figure 5. Clone *cyclin E*^{M2} mutant with TOE-PCR. (a) Amplification of *cyclin E*^{M2} mutant by OOE-PCR or TOE-PCR. (b) *AgeI* digesting result of three designated PCR products from figure a. (c) Bacterial colonies on plate after transformation of recombinant plasmid. (d) Restriction results of selected clone from plate C. (e) Multiple alignments between #1 positive clone and its expected sequence. The red boxes show the target sequence

图 5. TOE-PCR 方案克隆 *cyclin E*^{M2} 突变体。(a) OOE-PCR 与 TOE-PCR 扩增 *cyclin E*^{M2} 突变基因。(b) a 图 3 个关键 PCR 产物的 *AgeI* 酶切检测结果。(c) 重组质粒转化大肠杆菌后形成的菌落。(d) c 图平板菌落酶切检测结果。(e) #1 号阳性克隆与目标序列比对结果。红色方框显示目标序列

4. 讨论

利用含有同一基因的两个不同质粒混合物作为平行模板，采用 OOE-PCR 方案是对常规 OE-PCR 定点突变法的简化。而实际上由于 PCR 过程中产生的不完全合成片段交叉互补，导致无中介引物时也能扩增出全长基因，即 OOE-PCR 方案负对照不能完全成立[10]。添加含突变位点的中介引物有助于合成目标基因突变体；但中介引物必须稀释，否则只会(或主要)合成突变位点上、下游 DNA 片段副产物。调整中介引物稀释比至 1/10 时，得到较理想的目标产物主带，但其中仍含有一定比例野生型。故单纯调整中介引物浓度虽可改善产物构成，但无法根本克服该方案的缺陷。

消除或减少反应过程中不完全延伸 DNA 片段可以提高 OOE-PCR 终产物中基因突变型比例，这里涉及多种影响因素。常见热稳定性 DNA 聚合酶有快速型与高保真型两类，从选用的几个代表性酶来看，两者效果差异不大。高保真型 PCR 酶在无中介引物 OOE-PCR 中似乎更容易导致交叉互补，这对于基因定点突变是不利的。单纯延长 PCR 反应延伸时间也毫无作用，但是基因长度对结果却有显著影响，其中短

基因更不易交叉互补。这种现象可能与 DNA 聚合酶的持续合成能力有关。虽然 PCR 酶体外持续合成能力可达数十 kb [17], 但仍有可能在更短范围内中止, 由此形成不完全延伸片段。基于上述实验结果, 很容易推测 PCR 过程中 DNA 聚合酶存在随机中止, 则对于长基因更容易形成不完全延伸片段, 故而发生无中介引物下的平行模板交叉互补。

TOE-PCR 是一种不错的改进策略, 既可以增加重叠延伸之前含点突变的上、下游片段含量, 也可以“补齐”不完全延伸片段副产物。关于中介引物浓度和第一轮 PCR 循环次数两点, 我们发现中介引物作 1/10 稀释效果较好, 而后者可视基因长度而调整。对于 1 kb 左右的基因, 虽然无中介引物时第一轮 PCR 循环 20 次以上产物主带才会消失, 但添加中介引物后循环 15 次时 TOE-PCR 产物中已几乎不见野生型基因。短基因可减少第一轮 PCR 循环次数, 甚至直接 OOE-PCR 即可; 长基因则应当增加第一轮 PCR 循环次数。

我们以优化的 TOE-PCR 方案克隆 *cyclin E^{M2}* 定点突变, 筛选得到 90% 克隆阳性率; 在克隆其它基因定点突变时, 往往也有相当高阳性率(结果未显示)。实际上, 各种基因定点突变方法都存在多种原因的野生型干扰风险。如滚环扩增法中原始质粒未能彻底消化, 或 OE-PCR 法回收物中污染的痕量原始质粒在第二轮 PCR 时扩增等, 都会造成一定比例的野生型干扰。相较而言, 我们认为 TOE-PCR 方案阳性率并不亚于其它定点突变方法。相比常规 OE-PCR 定点突变, TOE-PCR 方案操作步骤有所简化。虽然需要两轮 PCR 反应, 但第二轮 PCR 反应物只是第一轮产物的简单混合, 中途无需电泳检测和胶回收。前提是实验室准备有插入同一目标基因的不同载体以及匹配不同载体的通用引物。我们认为 TOE-PCR 方案在克隆某基因的多个定点突变时优势较明显。

基金项目

湖北文理学院大学生创新创业训练计划项目(X202210519015, X202210519065)资助。

参考文献

- [1] Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., *et al.* (1989) Site-Directed Mutagenesis by Overlap Extension Using the Polymerase Chain Reaction. *Gene*, **77**, 51-59. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90358-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2)
- [2] Isaac, T.Y. and Philip, D.W. (2017) Facile Site-Directed Mutagenesis of Large Constructs Using Gibson Isothermal DNA Assembly. *Methods in Molecular Biology*, **1498**, 359-366. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6472-7_24
- [3] Zeng, F., Zhang, S., Hao, Z., *et al.* (2018) Efficient Strategy for Introducing Large and Multiple Changes in Plasmid DNA. *Scientific Reports*, **8**, Article No. 1714. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20169-8>
- [4] 程盈盈, 李国庆, 刘君怡, 等. 多片段扩增结合 Gibson 组装法克隆基因定点突变[J]. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1218-1226.
- [5] 谢振华, 史小军, 蔡国平. 在单个 PCR 管内快捷完成定点突变[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006(8): 681-684.
- [6] Hilgarth, R.S. and Lanigan, T.M. (2020) Optimization of Overlap Extension PCR for Efficient Transgene Construction. *MethodsX*, **7**, Article ID: 100759. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.12.001>
- [7] Forloni, M., Liu, A.Y. and Wajapeyee, N. (2019) Megaprimer Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Mutagenesis. *Cold Spring Harbor Protocol*, **2019**, t97824. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot097824>
- [8] Urban, A., Neukirchen, S. and Jaeger, K.E. (1997) A Rapid and Efficient Method for Site-Directed Mutagenesis Using One-Step Overlap Extension PCR. *Nucleic Acids Research*, **25**, 2227-2228. <https://doi.org/10.1093/nar/25.11.2227>
- [9] 莫秋华, 徐湘民, 钟雄霖, 等. 一种改进的大引物 PCR 定点诱变方法[J]. 中华医学遗传学杂志, 2002(1): 72-75.
- [10] 王柳月, 李慧美, 马梦琪, 等. 利用旁侧引物提高重叠延伸 PCR 定点突变效率[J]. 生物技术通报, 2019, 35(12): 196-202.
- [11] Nakata, Y., Tang, X. and Yokoyama, K.K. (1997) Preparation of Competent Cells for High-Efficiency Plasmid Transformation of *Escherichia coli*. *Methods in Molecular Biology*, **69**, 129-137. <https://doi.org/10.1385/0-89603-383-X:129>
- [12] Bu, Z., Biehl, R., Monkenbusch, M., *et al.* (2005) Coupled Protein Domain Motion in Taq Polymerase Revealed by

- Neutron Spin-Echo Spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 17646-17651. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503388102>
- [13] Welcker, M., Singer, J., Loeb, K.R., *et al.* (2003) Multisite Phosphorylation by Cdk2 and GSK3 Controls Cyclin E Degradation. *Molecular Cell*, **12**, 381-392. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00287-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00287-9)
- [14] 王媛, 程盈盈, 马梦琪, 等. 双片段连接法克隆融合基因及其突变体[J]. 生物学杂志, 2021, 38(5): 39-42.
- [15] 梁明星, 马梦琪, 程盈盈, 等. 部分扩增结合双片段连接法克隆系列截短基因突变体[J]. 生物技术进展, 2021, 11(1): 111-117.
- [16] 肖娟, 马梦琪, 梁明星, 等. 部分扩增与双片段连接相结合制作长基因定点突变[J]. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1232-1240.
- [17] Yamagami, T., Ishino, S., Kawarabayasi, Y., *et al.* (2014) Mutant Taq DNA Polymerases with Improved Elongation Ability as a Useful Reagent for Genetic Engineering. *Frontiers in Microbiology*, **25**, Article No. 461. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00461>