[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1132790A

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 95119768.1

[51]Int.Cl[6]

[43]公开日 1996 年 10 月 9 日

C12N 15/70

[22]申请日 95.11.22

[30]优先权

[32]94.11.22[33]JP[31]311306/94

[71]申请人 宝酒造株式会社

地址 日本京都

[72]发明人 山下裕兄 友野润 喜多昭彦
野田晃弘 中岛和男
加藤郁之进

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 定点诱变的方法

[57]摘要

本发明提供了定点诱变的简化方法以及此方法所使用的试剂盒。定点诱变的方法包括步骤：(1) 在体外用能催化链交换反应的蛋白质处理含有定点诱变靶 DNA 的载体以及诱变 DNA 以制备其中通过链交换反应引入了突变的载体；和 (2) 将其中引入了突变的所得载体引入宿主细胞。定点诱变的试剂盒包含能催化链交换反应的蛋白质。

权 利 要 求 书

1、一种定点诱变的方法，包括以下步骤:

(1)在体外用能催化链交换反应的蛋白质处理含有定点诱变靶DNA的载体以及含有引入靶DNA所需突变的DNA，以使链交换反应得以进行；和

(2)将所得载体引入宿主细胞。

2、根据权利要求1的定点诱变的方法，其中所说能催化链交换反应的蛋白质是RecA蛋白质。

3、根据权利要求1的定点诱变的方法，其中所说宿主细胞选自细菌、酵母菌、真菌、植物细胞和动物细胞。

4、根据权利要求1的定点诱变的方法，其中所说载体选自pUC-系列、pBR－系列和M13，宿主是大肠杆菌。

5、根据权利要求4的定点诱变的方法，其中所说载体在链交换反应之前用限制性酶在相应于与靶DNA互补的DNA区域内的位点处切开。

6、根据权利要求1的定点诱变的方法，进一步包含从宿主细胞中回收载体（其中已引入所需突变）的步骤(3)。

7、一种定点诱变的试剂盒，包含能催化链交换反应的蛋白质。

8、根据权利要求7的定点诱变的试剂盒，进一步包含链交换反应的缓冲液。

9、根据权利要求7的定点诱变的试剂盒，进一步包含都用作对照的载体和合成的寡核苷酸。

10、根据权利要求7的定点诱变的试剂盒，其中所说能催化链交换反应的蛋白质是RecA蛋白质。

说 明 书

定点诱变的方法

本发明涉及基因工程领域使用的定点诱变的简化方法以及用于此方法的试剂盒。

近年来，定点诱变已成为阐明基因工程领域克隆基因的结构和功能之间关系所必不可少的技术。在蛋白质工程领域，定点诱变也是修饰蛋白质以改变其特性所必不可少的技术。

例如，常规下定点诱变可按下列步骤进行。

(1)将需要引入定向突变的DNA插入载体。 对于双链质粒DNA而言，还需通过热变性分离互补链， 或者也可以使用M13噬菌体载体以得到单链DNA。

(2)将依据定向突变化学合成的寡核苷酸与上述单链DNA一起退火，再经受聚合酶反应和连接酶反应以得到除定向突变处以外皆为互补的双链DNA。

(3)用上述DNA转化大肠杆菌(Escherichia coli)并筛选出其中引入突变的菌落。

这种定点诱变法需要复杂而麻烦的步骤。

另外，已知的几个蛋白质可催化链交换反应。在这些蛋白质中，对来源于大肠杆菌、被称作RecA的蛋白质的特性进行了详细研究，并尝试将此RecA蛋白质用于诱变[Tanpakushitsu. Kakusan. Koso (Protein, Nucleic Acid and Enzyme).32 (1), 73-74 (1987)]。

但在此方法中，不是直接通过链交换反应而是随机地通过诱变剂处理来引入突变。因此很难将突变引入确定的位点，此方法因此也不能被当作定点诱变。

本发明的目的是提供定点诱变的简化方法以及实施此方法的试剂盒。

本发明第一方面涉及包括以下步骤的定点诱变的方法：

(1)在体外用能催化链交换反应的蛋白质处理含有定点诱变靶DNA的载体以及诱变DNA，由此可制得其中已通过链交换反应引入突变的载体；和

(2)将其中已引入突变的载体引入宿主细胞。

本发明第二方面涉及定点诱变的试剂盒，它包含能催化链交换反应的蛋白质。

本发明将在下文详细描述。

例如，根据本发明方法的定点诱变可按下列方法进行。

(1)在体外用能催化链交换反应的蛋白质处理已插入定点诱变靶DNA的载体以及诱变DNA以诱导同源重组。

(2)将上述(1)中制得的载体引入宿主细胞。在此步骤中，优选使用选择压力以避免筛选出未引入突变的载体。

(3)通过提取载体可得到已引入突变的DNA。如有必要，可将提取出的载体再引入适当宿主以得到必定已引入了突变的DNA。

用作诱变靶子的DNA无需作特别限制，只要它在宿主细胞中不产生致死活性。当载体是双链时，诱变DNA（单链）和载体使用的摩尔比约为1:2。

能催化链交换反应的蛋白质的典型例子当推来源于大肠杆菌的

RecA蛋白质。然而本发明并不局限于此，也即本文中还可使用类似于RecA但为其它来源及其变异体的蛋白质。其它来源蛋白质的例子是来源于裂殖酵母的Rad 51基因产物。已克隆了鼠和人类的类似基因，这些基因的产物也可使用。当使用RecA蛋白质引入突变时，反应可在含有镁盐，如醋酸镁或氯化镁，和腺苷三磷酸(ATP)的，如Tris-HCl或者HEPES的缓冲液中进行。例如，优选的反应介质所具有的组分包括25 mM Tris-HCl (或Tris醋酸) (pH 7.5)、10 mM $MgCl_2$、1 mM DTT和1mM ATP，或者含有30 mM HEPES (pH 7.2)、15 mM醋酸镁、2 mM DTT、1.2 mM ATP和100μg/ml BSA。此时，所使用的RecA蛋白质的浓度应能有效地允许链交换反应得以进行。例如，当载体是双链时，载体和蛋白质可使用的浓度分别约为2.5至20μM和5至40μM。

反应介质可进一步含有ATP再生系统，例如可含有8 mM 磷酸肌酸和10U/ml 肌酸磷酸激酶。此时，该蛋白质的量可减少为约2μM。

将除该蛋白质以外的成分混合，预热此混合物，在其中加入该蛋白质并在37℃下温育此反应混合物1至2小时以进行链交换反应。

在步骤(2)中所使用的宿主细胞的例子包括已建立了宿主－载体系统的细胞，即如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)的细菌、酵母菌、真菌、植物细胞和动物细胞。从方便操作的观点出发可优选使用大肠杆菌。尽管大肠杆菌的任何菌株都可不受限制地被使用，但更优选使用具有mut S突变的菌株，如BMH 71-18 mut S菌株。也可使用其它错配修复系统缺陷的菌株，如mut T或mut D。

步骤(1)中所使用的载体既可以是单链载体也可以是双链载体。可根据所使用的宿主细胞选择适当的载体。当大肠杆菌被用作宿主

细胞时，所使用的载体的例子包括pUC系列，pBR系列或M13。

诱变DNA是含有定向突变的天然的或合成DNA。例如可使用单链合成的寡核苷酸，此寡核苷酸所具有的长度必须能使之与靶序列稳定杂交，通常为20个单体或更长。

在分子间同源重组的情况下，较长的同源序列可确保重组的发生。通过使用如PCR产物等的长链DNA作为诱变DNA可使定点诱变更有效地进行。例如，使用含有定向突变的寡核苷酸和与载体上除了计划引入突变的区域外的位点互补的另一个寡核苷酸作为一对引物以进行PCR。然后将所得PCR产物用作诱变DNA。因此难以通过化学合成的长链DNA可轻易地制备到。长链DNA的使用使得提供更稳定的效率成为可能。诱变DNA的长度通常在几十个碱基对至几千个碱基对之间变化，它小于引入该DNA的载体的大小。

在通过使用寡核苷酸难以建立稳定杂交（由于与除了诱变位点外的寡核苷酸高度互补的位点的存在使得定向突变不能被引入）或者所使用的宿主转化率低的情况下这种方法特别有效。

载体和诱变DNA的结合可以形成所谓的D－环或双D－环[Nature Genetics，3，365-371 (1993)]。

为了将DNA引入宿主，可选择使用依赖于宿主能得到高转化率的方法，例如可使用电穿孔法。

通过在步骤(2)中使用选择压力，可更有效地筛选出目标DNA。例如选择压力可以下列方式使用。当大肠杆菌被用作宿主时，先通过在相应于诱变DNA区域内的适当限制性酶切位点处切开，使载体直线化，再进行链交换反应。当由于链交换反应而发生同源重组时，载体重新环化。而当链未反应因此没发生同源重组时，载体保持线

型。当大肠杆菌被用作宿主时，线型DNA的引入率通常比环型DNA要低10^{-2}至10^{-3}。因此其中引入了定向突变的环状DNA被优先引入宿主，结果就可更加有效地筛选出目标DNA。由于它与通过琥珀突变使用选择压力的情况相类似，可不受限制地适用于任何载体，因而特别优选此方法。当不使用上述选择压力时，也可使用β－半乳糖苷酶或绿色荧光素蛋白(GFP)通过颜色选择筛选出所需菌落。

在本发明方法中，无需如常规方法中那样，通过噬菌体感染或变性来制备单链DNA，因为可使用双链载体。而且，无需使用两个或更多个酶催化的反应步骤(聚合酶反应、连接酶反应等)。由于使用了可催化链交换反应的蛋白质，进而本发明方法与包括退火步骤的常规方法相比，使得稳定地引入突变成为可能而不管诱变DNA的碱基序列。

通过将所使用的试剂组装成试剂盒可使本发明的定点诱变方法进一步地简单进行。此试剂盒至少含有能催化链交换反应的蛋白质。它可包括反应缓冲液。它也可包括都用作对照的载体和合成的寡核苷酸。每种成分都可以溶液的形式提供。

下文给出的实施例是为了进一步更详细阐明本发明，而不是对本发明的限制。

实施例1

(1) pUC19-Mut的构建

将质粒pUC19-Mut构建为以下实施例中使用的载体，其中质粒pUC19的lac Z′基因多克隆位点的下游30－位置处的G被A所置换。当编码lac Z α－肽的lac Z′基因被引入具有lac Z′△M15 基因型的宿主时可产生β－半乳糖苷酶活性。有IPTG (异丙基-β-D-硫代

半乳糖苷）存在时，未经受碱基置换的lac Z′基因由于X-gal作为底物的反应而显示出蓝色菌落。相反，由于碱基置换而导致突变的lac Z′基因不能产生其固有的活性因而只能显示白色菌落。

利用这些现象，通过计数蓝色和白色菌落可计算出由定点诱变而突变的pUC19-Mut lac Z′基因中碱基置换的回复突变率。

(2)合成用作诱变DNA的寡核苷酸

合成序列表中SEQ ID NO.1所示的5′-末端磷酸化寡核苷酸(dR2)以作为目的在于lac Z′基因中碱基置换回复突变的诱变DNA。也即，dR2被设计成可激活 lac Z′基因，其中通过12－位置处的C碱基置换得以回复。

(3)由RecA蛋白质催化的链交换反应

在1μl 10×反应缓冲液[250 mM Tirs 醋酸(pH 7.5)、100 mM醋酸镁、10 mM二硫苏糖醇、25 mM ATP]中加入200 pmol RecA蛋白质(Pharmacia Biotech制品)、50 ng PUC19-Mut和100 pmol dR2。用无菌水将总体积调至10μl后，将混合物于37℃下反应1至2小时。

反应完成后，以浓度为10 mg/ml的方式将蛋白酶K（由Takara Shuzo，Co.，Ltd. 制备）加入其中以除去RecA蛋白质。接着使用Microcon 100 (Takara Shuzo Co.，Ltd. 制品）除去过量的dR2。

(4)通过电穿孔引入宿主大肠杆菌

使用基因脉冲发生器（由Bio－Rad制造）以下述方法引入宿主大肠杆菌(BMH 71-18 mut S菌株）。

首先，将100 μl BMH－71－18 mut S感受态细胞（由Takara Shuzo Co.，Ltd. 制备）加入含有1 mM硫胺素的M9培养基中，37℃下振荡温育过夜。将5 ml这种培养物再接种于500 ml LB培养基中。

当600 nm下的光吸收值约达到0.8时，在4,000 rpm 下离心8分钟以收获细胞并悬浮于1 ml 10%的甘油溶液中。

然后，将上述(3)中制备的几μl反应混合物加入50 μl上述悬浮液中。将所得混合物倒入预先在冰中冷却的宽度为0.1 cm的小槽中，再对它施用1.5 KV的脉冲。之后立即加入1 ml SOC培养基，在37℃下振荡温育1小时。温育完成后，收获细胞，涂布于含有100μg/ml氨苄青霉素和X-gal的LB琼脂培养基中，并在37℃下温育过夜。计数培养基上长出的菌落。回复突变的lac Z′基因的菌落为蓝色，而那些未回复突变的为白色。

结果，蓝色菌落出现的频率为每约1,000个菌落中1个。在既未加入RecA蛋白质又未加入dR2的对照中未观察到蓝色菌落，换句话说，所有菌落都是白色的。此外通过测序分析突变位点。因而蓝色菌落显出对应于A的带，另一个对应于G的带是反向的，而白色菌落只显出A带。

然后，将由此得到的蓝色菌落接种于2 ml含有100μg/ml 氨苄青毒素的L－培养基中并在37℃下温育过夜。从由此得到的细胞中提取质粒，用此质粒转化大肠杆菌JM109并涂布于含有氨苄青霉素和X-gal的L－琼脂培养基上。结果，蓝色菌落和白色菌落出现的频率约为1:1。使用从蓝色菌落中提取的质粒进行测序，未观察到A只观察到反向的G。

这些结果表明，当在体外用RecA蛋白质进行处理时，即使在含有错配的寡核苷酸中也会发生由于链交换的同源重组。

实施例2

(1)由PCR制备诱变DNA

使用含有定向突变并由序列表中SEQ ID NO.2所示的寡核苷酸(dR1)，以及与模板中除引入突变的位点外的位点互补并由SEQ ID NO.3所示的另一个寡核苷酸(dR3)作为一对引物，以实施例1－(1)中的pUC19-Mut作为模板按下列方法进行PCR。反应系统包含10 ng pUC19-Mut、 20 pmol一份的引物dR1和dR3、 200μM一份的dATP、dGTP、dCTP和dTTP， 2.5 U的Ampli Taq DNA聚合酶(由Takara Shuzo Co., Ltd.制备)， 10 mM Tris-HCl (pH 8.4)， 50 mM KCl， 2.5 mM $MgCl_2$和0.02%明胶 (总体积: 100μl) 。铺上矿物油后，反应进行30个循环，每个循环包含94℃下30秒、60℃下30秒和72℃下1分钟。

反应完成后，除去上铺的矿物油。 然后取出10μl一份的反应混合物，电泳以确证目的大小的DNA片段已经扩增。 然后，将反应混合物浓缩至约为10μl并用Microcon 100纯化。

(2)载体的制备

用限制性酶BamHI消化以使上述实施例1－(1)中制备的pUC19-Mut线型化。 消化完成后，用苯酚抽提载体，用乙醇沉淀再溶于适量TE缓冲液中。

(3)用RecA蛋白质催化链交换反应并引入宿主大肠杆菌

重复上述实施例1－(3)和(4)中的步骤， 只是用实施例2－(2)中制备的线形DNA和实施例2－(1)中所得的PCR产物分别替代pUC19-Mut和dR2，以此转化BMH71-18 mut S菌株。结果，蓝色菌落形成的频率约为50%。 然后从这些蓝色菌落中提取质粒，并以与实施例1－(4)中描述的相同方法转化大肠杆菌JM109。从由此形成的蓝色菌落中得到其中引入了定向突变的DNA。

实施例3

用RecA蛋白质、反应缓冲液、 对照用的载体和寡核苷酸(表1)装配定点诱变的试剂盒 (50次操作) 。

表 1

成 分	含量
RecA蛋白质溶液(7.4 mg/ml)	50μl
10×反应缓冲液	50μl
pUC19-Mut溶液(10 ng/μl)	10μl
dR1溶液(100 pmol/μl)	10μl

本发明已被详细描述，根据其特定的实施例，本技术领域的熟练人员显然可在不脱离本发明的精神和范围的情况下作出不同的变化和修饰。

序列表

SEQ ID NO (序列编号) :1

序列长度: 22

序列类型: 核酸

链型: 单链

拓扑结构: 线形

分子类型: 其它核酸 (合成的DNA)

序列描述:

CAGGGTTTTC CCAGTCACGA CG

SEQ ID NO:2

序列长度: 31

序列类型: 核酸

链型: 单链

拓扑结构: 线形

分子类型: 其它核酸 (合成的DNA)

序列描述:

GGGTAACGCC AGGGTTTTCC CAGTCACGAC G

SEQ ID NO:3

序列长度: 24

序列类型: 核酸

链型: 单链

拓扑结构: 线形

分子类型: 其它核酸 (合成的DNA)

序列描述:

GAGCGGATAA CAATTTCACA CAGG