

[4] Nakajima, M. et al., 1989, *Cancer Res.*, **49**:1689

-1706.

## RETINOIC ACID INHIBITS THE SECRETION OF TYPE IV COLLAGENASE BY HUMAN COLORECTAL CARCINOMA CELLS

ZHANG Ya Hui SONG Jin Dan WAN Yun Qing

(Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health, China Medical University, Shenyang, China, 110001)

### ABSTRACT

Type IV collagenase, consisting of 72kDa and 92kDa type IV collagenase, have close relationship with tumor invasion and metastasis. Human colorectal carcinoma cells clone A was treated with all-trans-Retinoic Acid. Gelatin zymography showed that the activity of both active and latent forms of type IV collagenases decreased. RT-PCR showed that 92kDa type IV collagenase gene expression was down regulated. So, we conclude that the secretion of type IV collagenases in human colorectal carcinoma cells can be inhibited by RA and the effect probably happens in the level of transcription.

**Key words:** Invasion and metastasis Type IV collagenase All-trans-RA Human colorectal carcinoma cell

### 实验技术

## 一种简单、快速、高效的基因定点突变方法\*

任彩萍 刘卫东 何志巍 姚开泰

(湖南医科大学肿瘤研究所 长沙 410078)

为了探索鼻咽癌(NPC)的病因发病机制,最重要的是要建立与 Epstein-Barr 病毒(EBV)有密切关系的 NPC 动物模型,但至今尚未成功。在人类,EBV 受体为补体 I 型受体基因(CR2)编码<sup>[1]</sup>。在小鼠亦有 CR2 基因,且与人的 CR2 有高度同源性<sup>[2]</sup>,不同的是,它可以有 4.5kb 和 3.3kb 两种不同的 mRNA 剪接形式<sup>[3,4]</sup>,但是 EBV 不能感染小鼠细胞,原因在于两种受体构像不同。有研究表明,当 mCR2 基因中第 15 位和 68 位密码子发生 CCC→TCC 和 ACC→TAC 突变,则分别导致脯氨酸变成丝氨酸(P15S)和苏氨酸变成酪氨酸(T68Y)后,EBV 就可能感染小鼠细胞<sup>[5]</sup>,也就有可能建立小鼠 NPC 动物模型。因此,我们首要工作

就是要对 mCR2 进行这两个位点的突变。目前,定点突变方法有很多,主要可分为三类:1) PCR 反应介导的;2) 非 PCR 反应介导的;3) 体内定点突变技术<sup>[6]</sup>。PCR 技术自从问世就成为定点突变技术的一个强有力的工具。根据实验目的不同,PCR 反应设计方案可以多样化。在此,本文介绍一种可以简单、快速、高效地引入点突变的 PCR 介导的基因定点突变方法。

### 材料与方 法

#### 1. 材料与仪器

本文 1999 年 4 月 9 日收到,7 月 1 日接受。

\* 国家自然科学基金资助重点项目(39730200)和面上项目(39870370)。

*Pfu* DNA 多聚酶, *DpnI* 限制性内切酶, dNTPs 为 Stratagene 公司产品。X-gal、IPTG 为 Gibco BRL 生命技术公司产品。胰蛋白酶、酵母抽提物为 Oxoid 公司产品。酪蛋白水解产物为华美生物工程公司产品。pWhitescript (pWS) 质粒购于 Stratagene 公司, XL1-Blue 细菌由本室提供, pBluescript. CR1 (pBS. CR1) 及 pBluescript. CR2 (pBS. CR2), 即分别含有 4.5kb 和 3.3kb 两种形式的 mCR2 cDNA 的质粒由匹兹堡大学的 Ahearn J M 博士赠送。PCR 反应在 PE 公司 DNA 热循环仪上进行, 测序由 Appliance Biosystem 公司全自动 DNA 测序仪 ABI 377 完成。

## 2. 方法

1) 质粒的抽提 采用 QIAGEN Plasmid Mini Kit 抽提、纯化, 操作按说明书进行。

2) 突变反应 体外合成特定突变引物对 1, 2 及阳性对照突变引物对 3。

引物对 1: Pf: 5'GTCAAAAATGCTCGGAAAT (C)CCTATTATTCTCTTCCC3';

Pb: 5'GGGAAGAGAATAATAGGA (G)TTTC-CGAGCATTTTTGAC3';

引物对 2: Pf: 5'GTGAATCTGTGAATAAAT (A)A(C)CATTCTTCTGCTCAGATCCC3';

Pb: 5'GGGATCTGAGCAAGAAATGT (G)A (T)TTTATTACAGATTACAC3';

引物对 3: Pf: 5'CCATGATTACGCCAAGCG-CGC (T)AATTAACCCTCAC3';

Pb: 5'GTGAGGGTTAATT (A)GCGCGCTTG-GCGTAATCATGG3'

说明: 括号内为原序列, 括号前为突变碱基。

分别以 pBS. CR1、pBS. CR2、pWS 载体为模板进行 PCR 反应, 反应参数: 95°C 变性 30sec; 95°C 30sec, 55°C 1min, 68°C 2min/质粒长度 (kb), 16 个循环。PCR 产物用 *DpnI* (10u) 37°C 消化 1 小时。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测突变产物。

3) XL1-Blue 感受态细菌的制备 采用 CaCl<sub>2</sub> 法, 见《分子克隆》一书。取适量消化后的突变产物转化 XL1-Blue 感受态细菌, 分别铺在 LB-Amp 平板及涂有 X-gal 和 IPTG 的 LB-Amp 平板上, 37°C 培养过夜。

4) 测序反应 随机挑选氨苄抗性克隆 2-4 个不等/每种反应, 经自动测序筛选, 证实阳性克隆。

5) 选取阳性克隆用另一个突变引物再进行另一个位点的突变, 具体步骤同前。

## 结果与讨论

### 1. 质粒模板的准备

将 QIAGEN Plasmid Mini Kit 抽提的质粒经光密度值测定及琼脂糖电泳检测说明质粒很纯, 没有降解, 可直接用于突变反应。

### 2. 突变反应产物的检测

突变反应产物用 1% 琼脂糖电泳检测可见一清晰条带, 条带位置正确, 未见明显非特异带, 阴性对照没有条带, 表明发生了突变反应 (见图 1)。

3. 突变产物测序结果 (见图 2)

4. 突变率的测定 pWS 阳性对照质粒含有  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 ( $\beta$ -gal), 但是该基因中已人为地引入了一个无义突变, 即 CAA  $\rightarrow$

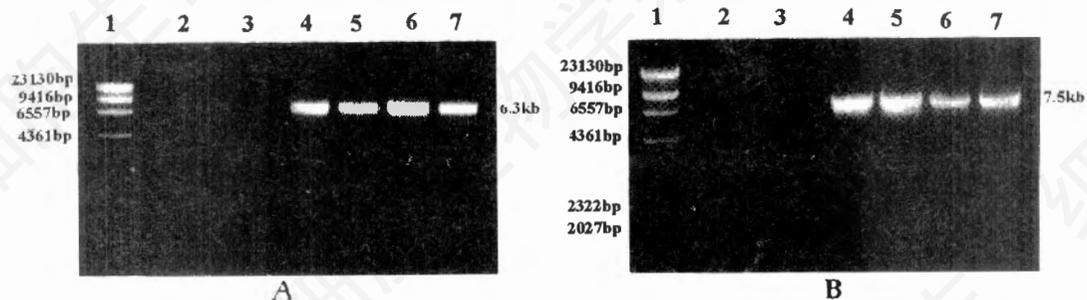


图 1 突变反应产物的鉴定

图 A 中模板为 pBS. CR2 (6.3kb); 图 B 模板为 pBS. CR1 (7.5kb)

1.  $\lambda$ DNA/HindIII marker; 2, 3. 阴性对照; 4. P15S 突变产物;

5. T68Y 突变产物; 6, 7. P15S 和 T68Y 均发生突变, 但两者突变的先后次序不同。

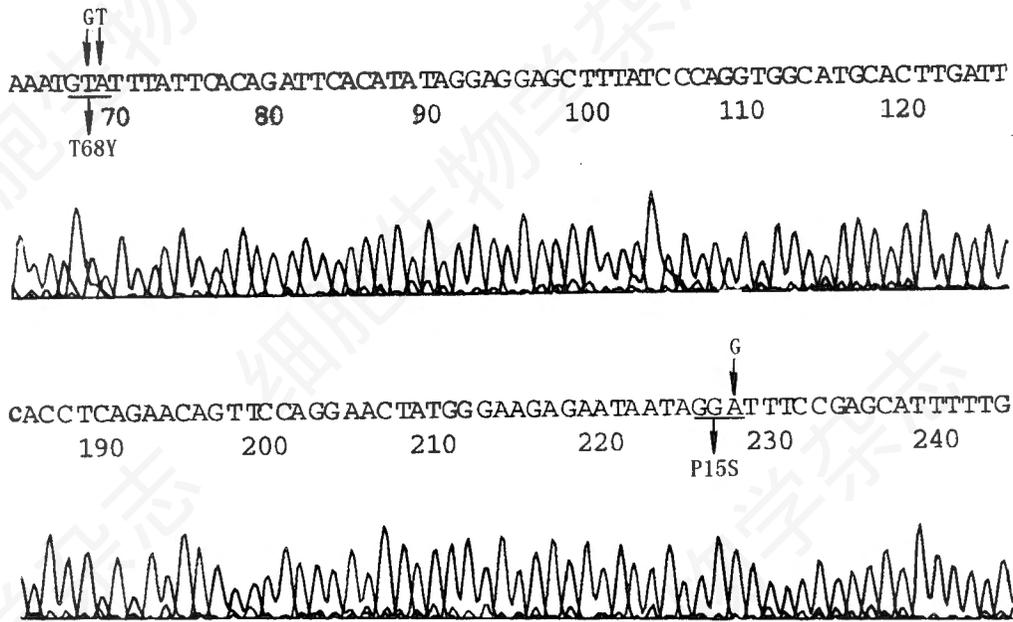


图 2 突变阳性克隆的测序图(图示为反义链序列,箭头所指为定点突变核苷酸)

TAA,使得本来编码谷氨酰胺的密码子变成了终止密码子,从而不能合成有功能的 $\beta$ -半乳糖苷酶,在LB-Amp平板上表现出白色菌落。当阳性对照引物介导的突变反应成功时,可将TAA $\rightarrow$ CAA,从而使得翻译进行下去,产生有功能的 $\beta$ -半乳糖苷酶,催化底物X-gal产生蓝色物质,在LB-Amp平板上表现出蓝色菌落。因此,根据蓝色菌落占总菌落的比率就可计算出突变率大小。三次实验结果表明,该法的突变率为91%—95%。而所有随机挑选的24个克隆经测序证实均突变成功,即成功率为100%。*DpnI*是一种识别甲基化位点的限制性内切酶,其识别序列为G<sup>m</sup>ATC。几乎所有大肠杆菌均为*dam*<sup>+</sup>,可以将DNA甲基化,而体外合成的DNA则是未甲基化的,所以*DpnI*可以选择性消化模板DNA,而不影响新合成的带有突变的DNA。为了研究*DpnI*酶在反应中发挥作用的大小,我们设计了平行对照。结果发现,未用*DpnI*处理样品的突变率约50%,仅为处理样品的一半左右。这充分说明*DpnI*处理的重要性,即它能有效地去除未突变的模板DNA,从

而大大提高突变率。

**5. 准确率的讨论** 本实验中采取的*Pfu* DNA多聚酶具有3'—5'外切酶活性,其指导DNA合成的准确率比Taq DNA多聚酶高12倍左右<sup>[7,8]</sup>,因而比Taq DNA聚合酶更好,也更适合应用于定点突变反应。此外,我们通过提高模板浓度(0.01—0.5pmol)、降低PCR反应的循环数(仅16个或更少)等提高定点突变率、降低非必需位点突变。同时,我们采用*DpnI*酶消化的办法去除高模板量所造成的非突变背景。本实验测序结果显示所测的600bp范围内除引入两个定点突变外无其他非必需突变,这充分说明该法的可靠性。

总之,这的确是一种简单、快速、高效的定点突变方法,与Weiner等人<sup>[9]</sup>的方法相比,该方法省略了定点突变引物5'端磷酸化、*Pfu* DNA多聚酶修饰PCR产物及线性化PCR产物环化等步骤,因而更加简单易行、省时省力。与一般的PCR介导的定点突变方法相比,其优点在于:1. 操作简单;1) 任何双链DNA均可作为模板,而不需要将目的基因克隆到M13等

产生单链 DNA 的载体中,即节省了制备单链 DNA 模板这一费时又费力的工作;2) 不需要特殊载体和特殊限制性酶切位点;3) 不需要连接反应,可直接将带有缺口的突变产物转化细菌即可得到抗性克隆,且不需多次转化及进一步的亚克隆;2. 快速:突变反应只需数小时,整个过程只需 1-2 天就可完成;3. 高效:突变率很高,一般大于 90%,因此不需要用 PCR-SS-CP 等方法进行初筛,可以直接用测序来筛选阳性克隆等,是一种值得推广应用的方法。

### 摘要

小规模抽提含有编码小鼠补体 II 型受体 (mCR2)cDNA 的质粒,体外合成两对寡核苷酸突变引物,利用 PCR 反应将突变引入 mCR2 cDNA 中,即产生 P15S 和 T68Y 两种定点突变。然后用 *DpnI* 消化 PCR 产物以去除模板 DNA,取适量消化产物转化大肠杆菌 XL1-Blue,随机挑选克隆进行测序筛选、鉴定所需突

变株。结果表明这一新方法不仅操作简单、快速,而且突变率极高,几乎 100%。

关键词: 定点突变 小鼠补体 II 型受体基因  
PCR

### 参考文献

- [1] Kearns-Jonker M., et al., 1997, *Virus Res.*, **50**:85-94.
- [2] Fingerth J. D. 1990, *J. Immunol.*, **144**:3458-3467.
- [3] Molina H., et al., 1990, *J. Immunol.*, **145** (9):2974-2983.
- [4] Kurtz C. B., et al., 1990, *J. Immunol.*, **144** (9):3581-3591.
- [5] Martin D. R., et al., 1994, *J. Virol.*, **68**:4716-4726.
- [6] Ling M. M., et al., 1997, *Anal. Biochem.*, **254**:157-178.
- [7] Lundberg K., et al., 1991, *Gene*, **108**:1-6.
- [8] Scott B., et al., 1994, *Strategies*, **7**:62-63.
- [9] Weiner M. P., et al., 1994, *Gene*, **151**:119-123.

## A SIMPLE, FAST AND EFFICIENT SITE-DIRECTED MUTAGENESIS METHOD

REN Cai Ping LIU Wei Dong HE Zhi Wei YAO Kai Tai

(Cancer Research Institute of Hunan Medical University, Changsha 410078)

### ABSTRACT

Pure plasmid containing cDNA of murine complement receptor type II gene (mCR2) was mini-prepared. Two pairs of mutagenic primers were synthesized in vitro and the desired two mutations, P15S and T68Y, were introduced into mCR2 cDNA by PCR. After that, *DpnI* was used to digest the PCR products to remove the methylated, nonmutated parental DNA template. Optimal amount of the digested products were used to transform competent XL1-Blue cells and colonies resistant to ampicillin were picked up randomly followed by being sequenced in order to screen and identify the needed mutant strains. The results show that this novel site-directed mutagenesis method is not only fast and easy to perform, but also very efficient, for the mutagenesis rate is almost 100%.

Key words: Site-directed mutagenesis Murine complement receptor type II gene(mCR2) PCR

欢迎订阅《Cell Research》, 邮发代号 4-645。