

体 外 诱 变

王 武

(无锡轻工业学院)

专论与综述

利用物理和化学诱变因子直接处理微生物使之变异的方法统称体内诱变法。体内诱变法曾为改良微生物菌种作出巨大贡献,而且至今仍是强有力的育种方法。遗憾的是,要靠体内诱变法对微生物的某个或某些基因的特定位点进行定向诱变几乎是不可能的。许多诱变因子的作用机理已经探明,如紫外线可造成DNA中相连的二个胸腺嘧啶(T)形成二聚体,结果DNA链局部变形导致复制失误而造成了变异。然而DNA序列中TT相连的部位很多,经紫外线处理后,哪些TT将形成二聚体是随机的。其他一些专门作用于某种碱基的诱变因子也同样不可能造成定向诱变。N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)勉强算得上定向诱变剂^[1],因为它会造成被处理细胞中DNA复制叉口处成簇的碱基发生变异,如果被诱变的细菌基因组的图谱是已知的,就有可能对DNA复制叉口延伸到一定位置的同步培养细胞进行定位诱变。可惜这种方法难以应用于真核生物细胞的定向诱变。真核生物DNA的复制原点很多,NTG将随机地作用于许多复制叉口处,这样即使处理对象是同步培养细胞也无法实现定位诱变。

70年代重组DNA技术问世后,定向诱变体系也

就随之发展起来。所采用的基本方法是,克隆一段含有待诱变的目的DNA片段,将它与载体连接起来,在体外对这个环状的重组DNA分子进行定位诱变,然后再把处理过的DNA片段环化后导入细胞内,使其表达。最后仍然需要靠特定的甄别手段把合适克隆子挑选出来,不过在这种情况下,目的变异株出现的机率非常高,而且它们基因组不再是遍体鳞伤的(体内诱变法往往造成被处理的细胞基因组多处损伤)。

由于上述体系的关键是对离体的DNA分子进行定位诱变,故称为体外诱变法。现在可能进行的体外诱变手法可分为以下几类:删却法,插入法,特定碱基取代法和不完全适配的低聚核苷酸处理法。

删 却 法

如果诱变目的是想造成细胞中的某个或某些基因缺失的话,最简单的作法是克隆目的DNA片段,然后切除适当的两个限制性切割位点之间的一个片段,把保留部分重新连接起来,再导入细胞,这种手段可以很方便地用来消除或破坏抗药性基因、阻遏蛋白基因等。

有时也可以通过对基因中特定小范围序列的删除以达到改变基因产物性状的目的。笔者曾经参加过

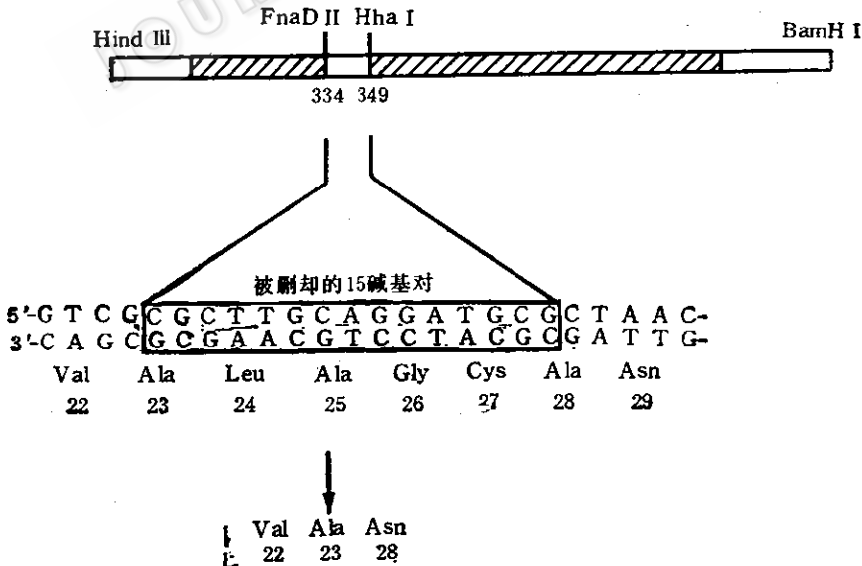


图1 基因内限制性切割位点 FnaDII-HhaI 之间的删却处理得到缺失5个氨基酸的β-内酰胺酶

对地衣芽孢杆菌的 β -内酰胺酶基因进行这样的定向诱变^[2]。这种 β -内酰胺酶具有脂蛋白形式,它以肽链中的半胱氨酸 27 与膜类脂的甘油酯以硫醚键相连成为酶分泌过程中的中间产物。为了探讨脂蛋白形式是否是必要的中间产物,我们设法把脂蛋白定向诱变成非脂蛋白。这个 β -内酰胺酶基因被克隆后,经过几步设计好的步骤使得其中的一个 *FnaDII* (位点 334) 和一个 *HhaI* (位点 349) 之间片段被切除,在不影响读码格局的前提下,定位删却造成了基因产物缺失了五个氨基酸,其中正好包括了半胱氨酸 27 (图 1)。结果脂蛋白中间产物不再出现,但酶的催化活性和分泌性能皆不受影响。从而我们得到了一个重要的结论。

若想对 DNA 序列上某个限制性切割位点附近进行删除,则可以先进行单处切割,把环状分子切成线状分子,再用外切 DNA 双链(或单链)的核酸酶 *Bal31* 对线状分子两端进行消化。通过调整 DNA 底物浓度、*Bal31* 酶浓度,以及酶促反应时间,可以适当地控制 10—2000 碱基对范围的删却处理。*Bal31* 消化过的线状分子可通过 *linker* 连接成环状,也可直接连接环化。

插入法

插入法也可以用来定位地改变 DNA 序列。比较方便的作法是,对一个含有待处理 DNA 序列的环状分子的适当位点进行单处切割,这个限制性切割位点必须是粘性位点,这样切开后的线状分子的两端各有单链尾巴。此时如果用 *E. coli* DNA 多聚酶 I 的 *Klenow* 片段去处理上述样品,在各种三磷酸脱氧核苷酸 (dNTP) 和 Mg^{++} 的存在下,单链尾巴将被补链而成

为双链的,这样原来的粘性末端就成了钝性末端。然后使其环化并导入细胞(图 2)。处理后净插入的碱基对数等于补链前一条单链尾巴上的核苷酸数。若要使转译时产生移码效应,可使插入的碱基对数为 2 或 4;有时可以造成 3 个碱基对插入,这样转译时就多出一个氨基酸。

如果目的插入位置上不存在任何限制性切割位点,可以用胰脱氧核酸酶 (pancreatic DNase) 对 DNA 分子进行随机切割。正常情况下,这种酶内切 DNA 分子,可把它们降解成很小的片段,不过如果只用极少量的酶对一种 DNA 分子进行短暂的切割,可以控制使得每个 DNA 分子平均只被切割一处,通过凝胶电泳除去那些分子量偏小的 DNA 片段。然后把这些分子量相同但是末端相异的线状分子混合物与 *linker* 相连接环化。^[3]这样就产生了一组 *linker* 随机插入的 DNA 分子群体。这种插入法随机性较强,但是由于可以在特定范围的 DNA 序列上进行处理,只要有特定的甄别手段相配合,仍然可以较容易地得到理想的变异株。

取代法

1. 使特定的 G:C 变 A:T

很重要的一类体外诱变处理方法是,对一种 DNA 分子中的某个碱基进行置换(点突变作用)。其中的一种手段是通过胞嘧啶脱氨基化而造成 $G:C \rightarrow A:T$ 。单链 DNA 上的胞嘧啶被酸式亚硫酸离子作用后会脱去氨基而变为尿嘧啶 ($C \rightarrow U$)。根据这个原理,假如设法在待处理的 DNA 序列上开创出一个小范围的单链区域,这个区域中的 C 经过酸式亚硫酸离子作用就变为 U,而双链部分的 C 则不发生变化。而后把单链区域修补成双链时, A 将与 U 配对,此时 U 相应于 T。(DNA 复制时 A:U 就成了 A:T),结果原来的 G:C 碱基对变成了 A:T 碱基对。^[4]

有几种方法可以用来开创出某个限制性切割位点附近的一小段单链区域。^[5]当限制性内切酶对于结合有溴化乙锭的 DNA 进行切割时,往往只切开一个切口,这样双链 DNA 中的一条链仍保持完整。而后可以用核酸酶 *exoIII* 去开创出一个单链区域,控制 *exoIII* 酶浓度和酶促反应时间可以使单链区域的范围大小得以控制。另一种可控性更强的单链区域开创法是,利用 DNA 多聚酶沿着 $3' \rightarrow 5'$ 的方向降解带有切口的那一条链。假若 4 种 dNTP 都不存在, DNA 多聚酶无法补链。要是反应体系中存在某种 dNTP,那末 DNA 多聚酶的降解作用将停留在所加的那种碱基的位点之前,这是因为酶的降解作用与补链作用形成动态平衡。噬菌体 T4 DNA 多聚酶和 *E. coli* DNA 多聚酶 I 的大片段——*Klenow* 酶都具有这种作用。例如,用 *Klenow* 酶去处理一个带有切口的 DNA 序列,假设反应

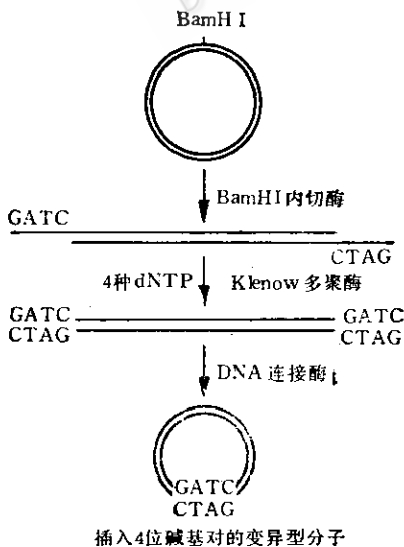


图 2 对切开的粘性末端补链而造成的插入型变异

体系中加入 dATP, Klenow 酶对带有刻口的那条链沿 3'→5' 水解直至抵达 A 为止。这个位点往往仅与酶作用的起始点相距三、五个碱基,于是只暴露出很小范围的单链区域。此时即用酸式亚硫酸离子处理之,使单链区域中的 C 变成 U。接着再加入四种 dNTP,由 Klenow 酶把变异过的单链区域修复成双链。DNA 复制后那个特定的 G:C 就变成了 A:T (图 3)。Ciampi 等曾利用类似的手段使一种脯氨酸 tRNA 分子的基因发生单碱基和双碱基取代,结果发现点突变株的转录作用非常弱,从而发现了这个基因的启动子原来是位于基因内部,而不是位于编码序列的前方。“内在启动子”的存在就这样被碱基取代法所证实^[4]。

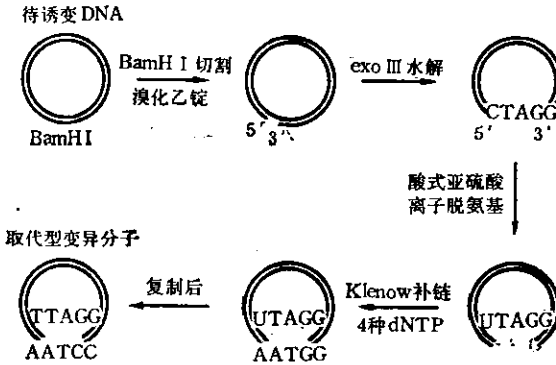


图 3 酸式亚硫酸离子对胞嘧啶脱氨基而造成点突变

2. 使特定的 A:T 变 G:C

另一种行之有效的碱基取代法可以使 A:T 变为 G:C。取代作用是基于 N-4-羟胞嘧啶被 DNA 多聚酶误认成胸腺嘧啶而结合在 T 的位置上而实现的。诱变处理前,同样必须在 DNA 序列的目标位点附近先开创出一个小小的单链区域。此时可以让 DNA 分子先与溴化乙锭结合,由限制性内切酶对 DNA 上的目标位置“刻道口子”,再用细菌 *M. luteus* 的 DNA 多聚酶从刻口处沿 5'→3' 的方向开创出一个小小的单链区域。当 *M. luteus* DNA 多聚酶用量极小,反应体系中不存在三磷酸核苷酸时,这种 DNA 多聚酶从刻口处开始的水解将只除去少数几个碱基。而后在 dATP、dCTP、dGTP 和三磷酸羟胞苷酸 (dHTP) 存在下,由 Klenow 多聚酶来修补这个单链区域。dHTP 不存在的情况下,N-4-羟胞嘧啶结合到了碱基 T 的位置。这种碱基的 6-酮式与烯醇式互变比率几乎等于 1,这样它既可与碱基 A 配对也可与 G 配对。如果 N-4-羟胞嘧啶与 A 配对,将不产生诱变效应,不过它与 G 配对的可能性将是二分之一,当 G 结合在原来应该是 A 所在的位置上,就造成了 A:T 变为 G:C 的变异作用。

3. 利用核苷酸底物的错误结合造成任意取代

上述两种取代法只能把特定的碱基变为某种其他碱基。如果想把四种碱基中的任一种变为另一种,

则可以采用迫使核苷酸底物发生错误结合的取代方法。^[5]这种方法的原理是,当 *E. coli* DNA 多聚酶或噬菌体 T₄ DNA 多聚酶对 DNA 分子的单链部分补链时,如果四种 dNTP 中只有三种存在于反应体系中,正常情况下,新链的合成将停止在所缺加的那种 dNTP 应该结合的位置之前。但是偶而的情况下, DNA 多聚酶会把所存在于反应体系中的某一种 dNTP 错误地安放在所缺加的那种 NTP 应该结合的位置上,这样就可能造成取代作用。不过这种处理方法具有潜在的缺陷,因为大多数的 DNA 多聚酶都具有 3'→5' 水解活力,也称为“证读”功能。当补链时一旦不配的核苷酸底物结合在不该结合的位点上, DNA 多聚酶的“证读”功能将把它除去,以保证补链正常进行。为了防止“证读”功能影响取代反应,可以用 α-硫代三磷酸核苷酸作为底物^[6],这种类似物可被 DNA 多聚酶的活力所认识,却不会被“证读”活力所切除。

具体处理时,可用类似上述的方法在目标 DNA 序列上开创一个小小的单链区域。此时假设欲使 G 取代 C,补链反应的底物中不加 dGTP,而加 dATP、dTTP 和 α-硫代-dCTP。DNA 多聚酶对单链区域补链完毕后,就得到了特定 G 取代 C 的变异型 DNA 分子,不过这种 DNA 分子中的一条链仍带有野生型序列。当补链好的 DNA 分子导入细胞后, DNA 分子的第二轮复制将使原来结合在一起的野生型链和变异型链分开,最后可以靠特定的甄别手段把含有变异型 DNA 分子的克隆子挑出来。(图 4)

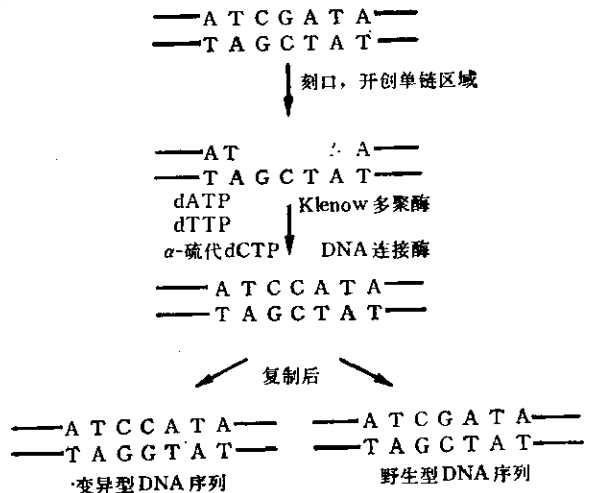


图 4 利用补链时核苷酸底物的错误结合造成取代型变异

不完全配对的低聚核苷酸诱变法

前面谈及的碱基取代法都是在双链 DNA 分子的某个单链区域进行的,要开创单链区域必须先要对双链分子的特定位置“刻”个口子,这一步骤是靠限制性内切酶来完成的,这就意味着上述技术的不足之处在

子, 只有限制性切割位点邻近的碱基可以得到取代。若用不完全配对的低聚核苷酸处理法则可以克服上述方法的局限性。^[9]

诱变处理前, 必须先测定待诱变的 DNA 序列, 根据诱变位点附近的碱基排列, 合成一段 13 个碱基左右的低聚核苷酸片段, 使其与待诱变位点不配对, 而与这个位点的两侧皆完全配对。待诱变的 DNA 分子克隆在噬菌体 M13 载体上变为单链分子后,^[10] 与那段特意设计合成好的低聚核苷酸片段相混合。低聚核苷酸片段上不配的碱基总是被安排在片段的中部, 这样只要 DNA 杂交条件不太苛刻(温度低些), 这段低聚核苷酸片段将与单链的待诱变分子的相应部位发生“退火粘合”。用 DNA 多聚酶对这种分子进行补链时, 低聚核苷酸片段起着引物的作用。补链后的双链 DNA 分子导入细胞后, 经过第二轮复制, 误配分子产生出野生型子代和变异型子代(图 5)。

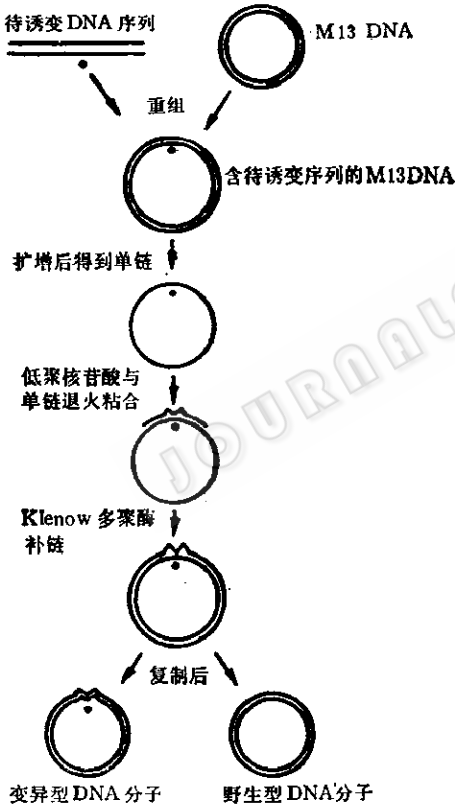


图 5 不完全配对的低聚核苷酸造成任意的取代型变异

理论上, 野生型子代 DNA 分子和变异型子代 DNA 分子的形成率应当各占 50%, 实际上, 变异型分子出现的机率小得多。这可能是由于 DNA 多聚酶补链时沿着环状 DNA 分子走了一圈后继续走下去, 于是把低聚核苷酸片段置换成野生型序列。为了把少数的变异型子代与多数的野生型子代区分开来, 需要借

助一些特殊的甄别技术。如用 DNA 序列分析法测定子代 DNA 的特定序列, 这种方法比较费事。假若碱基取代将造成某个限制性内切酶切割位点的产生或消除, 可以通过检查这个位点来甄别变异型子代 DNA 分子。还有一种巧妙的方法是, 利用那段低聚核苷酸片段本身来甄别。用磷同位素 ³²P 标记这段低聚核苷酸, 然后以它作为探针去与固定在硝酸纤维素膜上的克隆子的 DNA 相杂交。通过逐步提高杂交温度, 总可以找到一个合适的温度点, 在这种温度条件下, 探针能与完全配对的变异型 DNA 分子杂交, 而不与不完全配对的野生型 DNA 分子发生杂交。于是很容易把变异型克隆子甄别出来(图 6)。

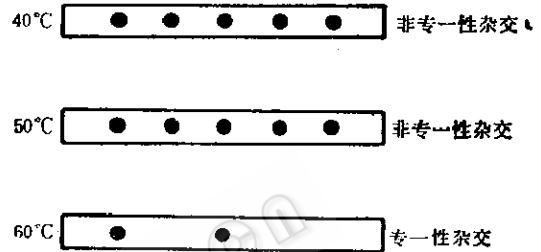


图 6 一定温度条件下低聚核苷酸与变异型分子专一性杂交, 而不与野生型分子杂交

随着 DNA 序列分析技术和化学合成低聚核苷酸片段技术的进展, 不完全配对的低聚核苷酸诱变法成为最灵活的体外诱变方法, 它可以在 DNA 序列的任意位点上造成任意要求的点变异。从 1980 年起, 这种方法已经被应用于实际过程, 人们应用它构建出具有目的表现型的噬菌体 $\phi X174$ 变异株;^[11] 有人应用这种手段有目的地把蛋白质中一个关键氨基酸的密码子变为另一种氨基酸的密码子, 以研究单个氨基酸变化对该蛋白质的结构与功能所产生的影响。^[12] 根据同样的道理, 有人应用这种体外诱变法对酶的一级结构进行重新设计改造^[13]。为获得比天然酶蛋白具有更佳性能的新酶而奠定了基础。不完全配对的低聚核苷酸体外诱变法已被越来越多的人所采用。

把变异基因送回染色体

1. 通过自发的整合作用

体外诱变的对象是离体的 DNA 分子, 诱变后这个 DNA 分子导入细胞, 往往以染色体外的形式存在。当被诱变的这个基因的功能与它在基因组中所处的位置有关, 或者被诱变的基因存在于质粒中比较容易因选择压力撤消而丢失时, 人们往往希望能把基因放回到它原来所在的染色体位置上。这种目的可以通过自发的整合作用来实现, 也就是通过诱变处理过的 DNA 片段与染色体上的同源序列发生自发整合来实现, 不过这种自发整合的频率非常低 (1/10⁶ 个细胞), 由于

拓扑学上的原因, 线状 DNA 分子与同源序列发生自发重组的频率比环状分子的情况高 100 倍左右。因此可以先用一种限制性内切酶把变异过的环状分子切成线状分子, 再导入细胞, 使其发生自发的整合作用。

2. 定位整合作用

在研究酵母的整合型质粒时发现, 如果用限制性内切酶切在这种质粒所含的某个基因内部, 线形化的 DNA 分子导入细胞后很容易发生专一性整合作用, 即: 它往往插入同源于它两端序列的染色体片段中。例如, 一个质粒中的肌动蛋白基因被切开后, 这个线状分子往往整合在酵母染色体上的肌动蛋白基因内部^[14]。关于这种专一性整合作用的机理尚未探明, 不过这种效应可以被用来把一种变异型基因送回到染色

体上原有的野生型等位基因位置中。

具体的处理方法可以是, 把克隆得到的野生型基因的內部切去一小段, 并插入一种 linker, 这种 linker 所含的切割位点必须是携载着变异基因的质粒分子所不包含的, 修饰过的野生型基因片段与上述质粒分子相连接, 而后在 linker 处把重组质粒切成线状分子。导入细胞后发生的整合作用将使得整个质粒分子座入染色体的那个野生型等位基因内部。由于野生型等位基因被分割, 不再能表达, 这就相当于变异型基因取代了原有的野生型等位基因(图 7)。最后根据相应的表现型可把整合子甄别出来。

参 考 文 献

- [1] Stanbury, P. F., and Whitaker, A.: Principles of Fermentation Technology, P 22, 1984.
- [2] Wang Wu: China-Japan Joint Symposium of Applied Microbiology, P 22—23, 1986.
- [3] Heffron, F.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 6012—6016, 1978.
- [4] Hayatsu, H.: Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol., 16: 75—124, 1976.
- [5] Shortle, D.: Molecular and Cellular Mechanisms of Mutagenesis, ed by J. F. Lemont and W. M. Generosa, P. 147—156, 1982.
- [6] Ciampi, M. S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 1388—1392, 1982.
- [7] Zakour, R. A.: Nature, 295: 708—710 1982.
- [8] Vosberg, H. P., Biochemistry, 16: 3633—3640, 1977.
- [9] Smith, M.: Genetic Engineering, Principles and Methods, 3: 1—32, 1981.
- [10] Messing, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 3642—3646, 1977.
- [11] Gillam, S.: Gene, 12: 129—137, 1980.
- [12] Dalhadié-McFarland, G.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6409—6413, 1982.
- [13] Winter, G.: Nature, 299: 756—758, 1982.
- [14] © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

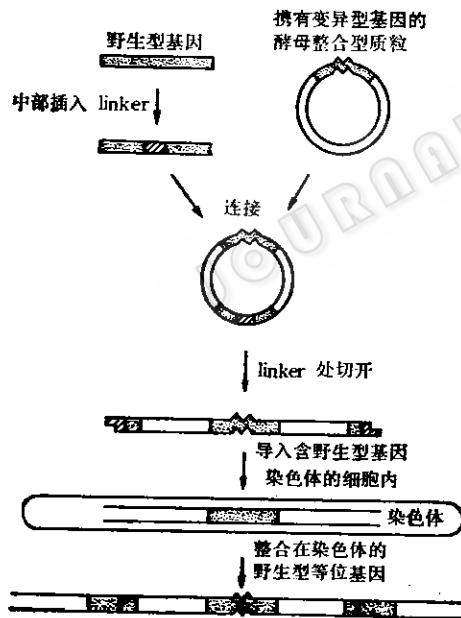


图 7 借助载体使变异基因整合入染色体
的野生型等位基因中