

• 生物技术与方法 •

## 部分扩增与双片段连接相结合制作长基因定点突变

肖娟, 马梦琪, 梁明星, 贺如阳, 陈华波

湖北文理学院 医学院, 湖北 襄阳 441053

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. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1232-1240.

Xiao J, Ma MQ, Liang MX, et al. Site-directed mutagenesis of long gene by partial amplification combining with double fragments ligation. Chin J Biotech, 2020, 36(6): 1232-1240.

**摘要:** 重叠延伸 PCR 是基因定点突变的主要方法, 但是以该方法制作长基因定点突变时, 往往遇到难以获得第二轮 PCR 产物或容易引入新的非预期突变等问题。此时, 可先以重叠延伸 PCR 扩增含突变位点的部分基因片段, 再将其连入适当载体获得重组质粒。若该扩增片段两侧的酶切位点在质粒载体上不单一, 则可采用双片段连接法构建完整质粒。以制作视网膜母细胞瘤基因 S780E 定点突变为例, 直接以重叠延伸 PCR 扩增全长基因时未能得到理想的目标产物。故先扩增含点突变的 F3 片段, 再将其与源自原始质粒的 F2 片段一起连入含 F1 片段的质粒载体而构建完整质粒。两个筛选出的重组质粒经序列检测完全符合目标突变序列特征, 验证了该方案的可行性。该方法作为重叠延伸 PCR 的补充, 可为许多长基因定点突变提供解决方案。

**关键词:** 基因克隆, 定点突变, 重叠延伸 PCR, 视网膜母细胞瘤基因

## Site-directed mutagenesis of long gene by partial amplification combining with double fragments ligation

Juan Xiao, Mengqi Ma, Mingxing Liang, Ruyang He, and Huabo Chen

Medical College, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, Hubei, China

**Abstract:** Overlap extension PCR is a common method for site-directed mutagenesis. As objective gene sequence growing longer, it is often difficult to obtain the target product in the second round of PCR, and it is highly possible to introduce unexpected mutations into a long gene fragment by PCR. To circumvent these problems, we can only amplify a small gene fragment which contain the target mutation by overlap extension PCR, and then ligate it with vector to get target plasmid. If the restriction site at the end of the amplified fragment was not a single one on plasmid vector, double fragments ligation method could be used to construct target plasmid. Partial amplification, combined with double fragments ligation, could solve lots of problems in long gene mutagenesis. Taking retinoblastoma gene 1 S780E mutagenesis as an example, it is difficult to

**Received:** October 22, 2019; **Accepted:** December 5, 2019

**Supported by:** Hubei Provincial Excellent Young and Middle-aged Science and Technology Innovation Team Plan of Higher Education Institutions (No. T201715), Hubei University of Arts and Science Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (No. X201910519062).

**Corresponding author:** Huabo Chen. Tel: +86-710-3591126; E-mail: chenhb610@163.com

湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划 (No. T201715), 湖北文理学院大学生创新创业训练计划项目 (No. X201910519062) 资助。

amplify whole retinoblastoma gene 1 by overlap extension PCR because of long fragment interfering the overlapping extension of second round PCR. However, it is relatively easy to amplify the F3 (1 968–2 787) fragment which contains target mutation S780E. There is a *Nhe* I site which can be used for ligation on 5' end of F3 fragment, but another *Nhe* I site on the plasmid restrained from doing so directly. In order to circumvent this obstacle, we ligated F3 fragment, combining with F2 (900–1 968) fragment which was digested from wild type plasmid, with the vector which contain F1 (1–900) fragment of the gene. That double fragments ligated with one vector at the same time, though less efficient, can recombine into a complete plasmid. The sequences of the two selected recombinant plasmids were consistent with the target mutation, which verified the feasibility of this scheme. As an improvement of overlap extension PCR, partial amplification and double fragments ligation methods could provide solutions for site directed mutagenesis of many long genes.

**Keywords:** gene cloning, site-directed mutagenesis, overlap extension PCR, retinoblastoma gene

基因定点突变是常用的分子生物学技术,是蛋白质结构与功能研究的基础手段。目前基因定点突变主要采用基于聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 的突变引入办法。最早开发出来的重叠延伸 PCR (Overlap extension PCR, OE-PCR) 是基因突变的主要方法<sup>[1]</sup>,近年来还发展出大引物法与滚环扩增法等定点突变方法<sup>[2-3]</sup>。这些方法各有优劣,不同实验室在选择基因定点突变方法时有所偏好。

OE-PCR 包括两轮扩增,第一轮 PCR 分别扩增基因上、下游片段,第二轮 PCR 通过上、下游片段的末端重叠延伸产物作为模板扩增全长基因<sup>[4]</sup>。很多科研工作者都有类似的经验,即上、下游片段较小时,第二轮 PCR 容易成功;随着上、下游基因片段长度增加,第二轮 PCR 成功率逐渐降低;当某一片段超过 2 kb 时,第二轮 PCR 不易获得目标产物。一般认为是较长的基因片段干扰了上、下游片段的末端互补所致。另一方面,PCR 体外扩增 DNA 时总是存在随机突变的可能,而且随着目标产物长度增加,随机突变的概率也逐渐增加。由于以上两点,OE-PCR 在制作长基因定点突变时往往并不顺利。因此,在遇到相应问题时,有科研工作者会转向滚环扩增法。滚环扩增法也是目前市场上大多数突变试剂盒所采用的基本原理,如 NEB Q5、Stratagene QuikChange 及碧云天 QuickMutation 基因定点突变试剂盒等<sup>[5-7]</sup>。然而,滚环扩增法也存在固有缺陷:其一,PCR 扩增 7–12 kb 质粒依赖于高保真、快速且稳

定的 DNA 聚合酶,否则无法得到目标产物或容易引入随机突变;其二,若 *Dpn* I 酶未能对模板质粒做彻底消化,则会严重干扰目标突变质粒的筛选。尽管所有试剂盒厂商都声称其所含上述两酶都满足要求,但随着试剂盒使用和存储时间增加,不可避免的酶活性降低就会极大地影响基因突变的效率。其三,滚环扩增法还会使目标质粒载体序列部分出现突变的风险,因为这部分序列经过了 PCR 扩增,但一般不会测序确认。

我们发现一般较长的基因内往往含有较多常见的限制性酶切位点。对于突变位点两侧有合适酶切位点的基因突变,仍可采取 OE-PCR 法扩增其两侧酶切位点之间的部分序列,再将其连入适当载体即可获得重组质粒。若这两个酶切位点在质粒序列上并不单一,则可以采用双片段连接法,利用恰当的片段组合,亦可得到完整的目标质粒。

视网膜母细胞瘤基因 (Retinoblastoma gene 1, *rb1*) 是典型的抑癌基因<sup>[8]</sup>,*rb1* 基因缺失与突变是众多肿瘤发生的重要诱因<sup>[9]</sup>。*rb1* 基因转录终产物约 4.7 kb,其开放阅读框全长 2 787 bp,编码 928 个氨基酸。在细胞周期的 G1 期,Rb1 蛋白相继被 cyclin D1/CDK4 与 cyclin E/CDK2 磷酸化,释放与之结合的 E2F,从而启动 G1/S 转换<sup>[10-12]</sup>。Rb1 蛋白 C 端有数个 CDK 潜在磷酸化位点,其中大多受 cyclin E/CDK2 修饰,唯有 780Ser 是较为可信的 CDK4 磷酸化位点<sup>[13-14]</sup>,将 Rb1 蛋白 780Ser(S) 突变为 780Glu(E) 可模拟其磷酸化修饰效果,进而研究其调节机制<sup>[15]</sup>。由于 *rb1* 基因

编码区较长, 常规 OE-PCR 制作 *rb1*<sup>S780E</sup> 突变体时遇到困难。采用部分扩增与双片段连接法相结合, 成功克隆了 *rb1*<sup>S780E</sup> 突变体并将其连入质粒载体, 为进一步研究该基因的调节机制做好了基础准备, 同时也提供了一种有效的长基因定点突变解决方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态购自天根生化科技(北京)有限公司; pEGFP\_C3-*rb1* 质粒由北京大学生命科学学院张传茂教授馈赠。

### 1.2 试剂

2 $\times$ EasyTaq PCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司; Pyrobest DNA Polymerase、DNA Ligation Kit Ver.2.1 购自 TaKaRa; *EcoR* I、*Mlu* I、*Nhe* I、*Sal* I 购自 NEB; DNA 回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒购自杭州博日科技有限公司。

### 1.3 引物设计与合成

引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计, 由北京天润奥科生物科技有限公司合成, 经 PAGE 纯化。引物序列见表 1。

### 1.4 基因克隆

扩增含突变位点的目标基因采用高保真 Pyrobest DNA Polymerase。方案如下: 总体积 20  $\mu$ L, 含 14.3  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ L 10 $\times$ 缓冲液, 3  $\mu$ L

dNTPs, 0.2  $\mu$ L 上游引物/0.2  $\mu$ L 下游引物, 0.2  $\mu$ L 酶, 0.1  $\mu$ L (10 ng) 质粒; 运行程序: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 54  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。第二轮 PCR 方案: 总体积 20  $\mu$ L, 含 13.4  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ L 10 $\times$ 缓冲液, 3  $\mu$ L dNTPs, 0.2  $\mu$ L 上游引物/0.2  $\mu$ L 下游引物, 0.2  $\mu$ L 酶, 0.5  $\mu$ L 上游片段/0.5  $\mu$ L 下游片段; 运行程序: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 54  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经电泳检测后回收至 20  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中。酶切方案: 取 PCR 回收物 17  $\mu$ L, 加 2  $\mu$ L 10 $\times$ 缓冲液, 0.5  $\mu$ L *Nhe* I /0.5  $\mu$ L *Sal* I; 另取 pEGFP\_C3-*rb1* 质粒 3  $\mu$ g 稀释到 17  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中, 加 2  $\mu$ L 10 $\times$ 缓冲液、0.5  $\mu$ L *Nhe* I /0.5  $\mu$ L *EcoR* I; 取 pEGFP\_C3-*rb1* 质粒 1  $\mu$ g 稀释到 17  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中, 加 2  $\mu$ L 10 $\times$ 缓冲液, 0.5 *EcoR* I /0.5  $\mu$ L *Sal* I; 37  $^{\circ}$ C 2 h。电泳检测后将目标片段回收至 20  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中, 用 DNA Ligation Kit Ver.2.1 连接: 载体 0.5  $\mu$ L, 两个片段各 3.5  $\mu$ L, solution I 7.5  $\mu$ L 混合, 16  $^{\circ}$ C 30 min。连接产物直接转化感受态大肠杆菌, 然后涂布在含卡那霉素的 LB 固体培养基平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。

### 1.5 菌落检测与序列分析

在过夜培养的平板上随机挑取数个成型菌落, 置于 4 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中继续培养 6 h, 以菌液为模板进行 PCR 检测。方案: 5  $\mu$ L 2 $\times$ SuperMix, 0.1  $\mu$ L 上游引物/0.1  $\mu$ L 下游引物, 0.8  $\mu$ L 菌液, 补水至 10  $\mu$ L; 扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
S0	AAAG <u>GATCC</u> ATGCCGCCAAAACCCCCGAAA	32
S1	TATGAATTCTCTTGGACTTGTAAC	24
S2	GCCATTGAAATCTACCTCTCT	21
780E_S	ACCTTGGAACCAATACCTCA	20
780E_A	ATTGGTTCCAAGGTAGGGGG	20
pEGFP_C3'	TATGGCTGATTATGATCAGT	20

Underline indicates that the corresponding nucleotide sequence is a restriction site.

5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环。另对部分克隆取 3 mL 菌液少量提取质粒进行酶切检测, 方案为: 12.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ L 10 $\times$ 缓冲液, 0.5  $\mu$ L 内切酶, 5  $\mu$ L 小提质粒; 37 °C 2 h。PCR 产物及酶切产物皆经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。取 2 个经验证的阳性质粒进行序列测定, 质粒测序由北京天润奥科生物科技有限公司完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同方案下目标突变体的扩增

欲制作 *rb1*<sup>S780E</sup> 定点突变, 需将 *rb1* 基因编码区 2 338–2 339 位“TC”突变为“GA”。考虑到该基因较长, 采用常规 OE-PCR 法可能不易得到理想的第二轮 PCR 产物。对 *rb1* 作限制性酶切分析, 发现目标突变位点 S780E 上游 470 bp 处有一个 *Nhe* I 位点, 另上游 1 438 bp 处有一个 *Eco*R I 位点 (图 1A)。因此, 可以仅对 *rb1*\_F2 (900–2 787) 或 *rb1*\_F3 (1 968–2 787) 部分做 OE-PCR 扩增, 再利用 *Nhe* I 或 *Eco*R I 酶切位点将该片段连入载体构建完整的突变体质粒。为寻找最佳解决方案,

依上述思路按 OE-PCR 定点突变法进行对比操作。

以原始质粒 pEGFP\_C3-*rb1* 为模板, 分别以 S0、S1、S2 搭配 780E\_A 为引物扩增上游片段, 以 780E\_S/pEGFP\_C3' 为引物扩增下游片段。PCR 产物经电泳检测, 得到 4 个预期大小的 DNA 片段 (图 1B)。在第二轮 PCR 时, 发现上游片段 a 与下游片段 d 组合未能扩增出全长 *rb1*, 上游片段 b 与下游片段 d 组合扩增出的产物主带不明, 且杂带较多; 而上游片段 c 与下游片段 d 组合扩增出预期的目标产物片段。经多次调整 PCR 反应条件, 仍未能得到理想的全长 *rb1* 产物及 F23 片段。以上结果说明 OE-PCR 时较长片段不易重叠延伸而扩增出目标产物, 与经验相符。

### 2.2 目标质粒的双片段连接

理论上, 将上述#3 产物以 *Nhe* I /*Sal* I 双酶切即可得到 *rb1*\_F3 片段, 再连接到切除对应片段的载体即可得到完整的突变体质粒。然而, 限制性酶切分析发现原始质粒多克隆位点上游还有另一个 *Nhe* I 位点, 因此 F3 片段无法直接与载体连接得到目标质粒。尽管如此, 可采用双片段连接

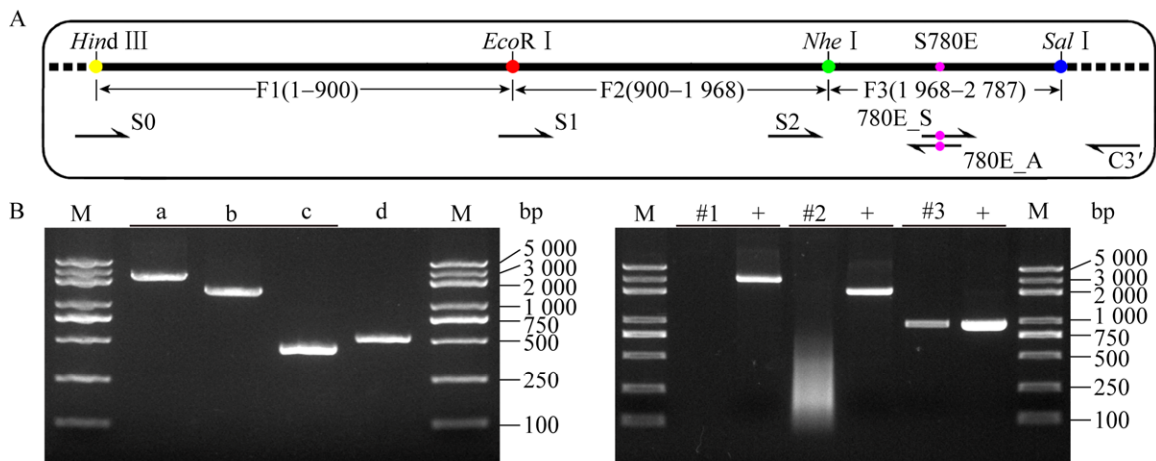


图 1 OE-PCR 扩增含突变位点的基因片段

Fig. 1 Amplification of the gene fragments containing target mutation by OE-PCR. (A) *rb1* gene map and primers position. (B) Agarose gel electrophoresis of the first round of PCR. The upstream primers for lane 'a' to 'c' were S0, S1, S2 respectively and all of their downstream primer was 780E\_A. The primers for lane 'd' were 780E\_S/pEGFP\_C3'. (C) Agarose gel electrophoresis of the second round of PCR. The template for #1 to #3 were mixture of product a&d, b&d, c&d, respectively. The template for '+' was pEGFP\_C3-*rb1* plasmid. The upstream primers for group 1 to 3 were S0, S1, S2 respectively and all of their downstream primer was pEGFP\_C3'. M stands for DNA marker.

法解决上述问题。即以 *Nhe* I/*Eco*R I 双酶切原始质粒获得 *rb1*\_F2 (900–1968) 片段, 以 *Nhe* I/*Sal* I 双酶切#3 PCR 产物获得 F3 片段, 将上述两个片段一起与经 *Eco*R I/*Sal* I 酶切的质粒载体部分连接, 从而得到完整目标质粒 (图 2)。

上述#3 PCR 产物双酶切简单易行 (图 3 a 泳

道)。将原始质粒以 *Nhe* I/*Eco*R I 双酶切, 得到 1 068 bp、1 662 bp、4 773 bp 三个片段, 其中最小的片段即所需的 F2 片段, 它与 1 622 bp 片段相距较远, 容易分离回收 (图 3 b 泳道)。将原始质粒以 *Eco*R I/*Sal* I 双酶切可得到 1 888 bp、5 615 bp 两个片段, 其中大片段即所需的载体部分 (图 3 c 泳道),

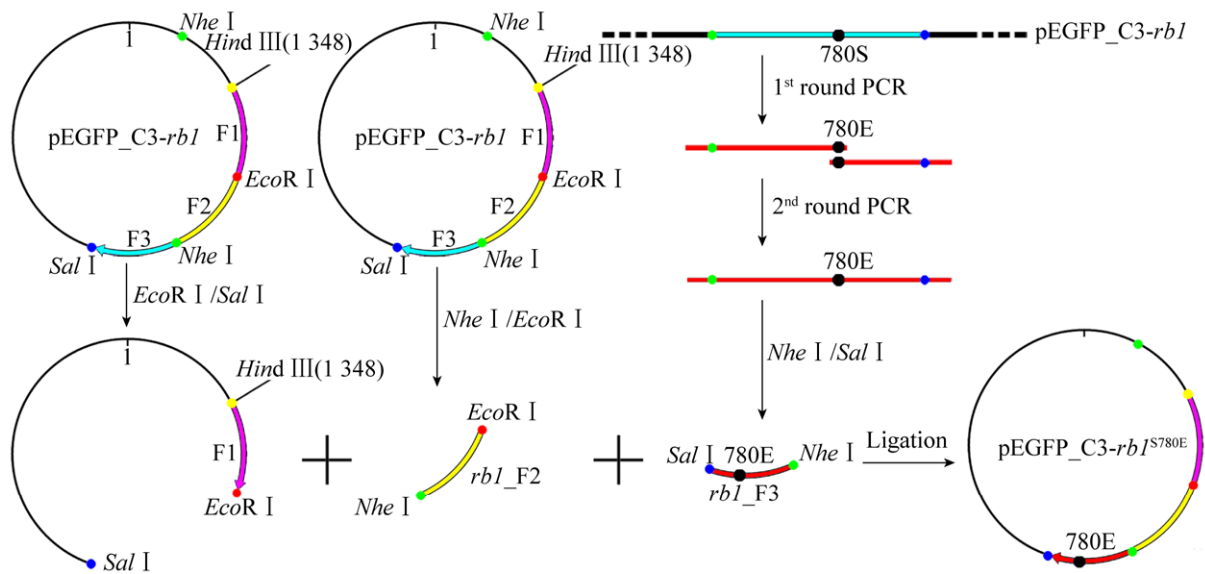


图 2 双片段连接示意图

Fig. 2 The diagram of double fragments ligation. F2 (yellow line) and F3 (red line) are ligated with vector, which contain F1 (purple line), to obtain the complete plasmid. Color dots represent different restriction sites and black dot represents the target mutation site.

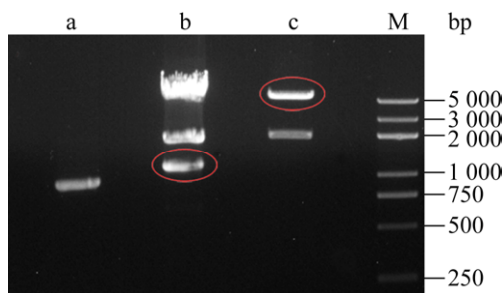


图 3 基因片段及载体的限制性酶切

Fig. 3 Restriction enzymatic digestion of gene fragments and vector. Agarose gel electrophoresis of the OE-PCR product #3 digested by *Nhe* I/*Sal* I (lane a), and pEGFP\_C3-*rb1* plasmid digested by *Nhe* I/*Eco*R I (lane b) or *Eco*R I/*Sal* I (lane c). M stands for DNA marker. DNA fragments that need to be retrieve from gel were encircled by an ellipse.

它含有 *rb1*\_F1 (1–900) 部分。

### 2.3 目标质粒的检测与鉴定

连接产物转化感受态大肠杆菌后经卡那霉素选择性平板培养基筛选, 得到数十个菌落 (图 4A), 明显少于本实验室单片段连接时的菌落形成数<sup>[16]</sup>。从中任意挑取 8 个菌落, 经适当培养后进行检测、鉴定。以两种不同的引物组合进行 PCR 检测, 方案一选用 S2/780E\_A 引物组合; 阳性结果表示质粒含有 *rb1* 基因后半部分 (图 4B)。检测得到#1、#4、#5 三个阳性克隆, 其产物大小约 500 bp, 与预期 (514 bp) 相符 (图 4C)。方案二选用 780E\_S/pEGFP\_C3'引物组合; 阳性结果表示质粒

为 pEGFP\_C3 载体, 且含有 *rb1* 后半部分。该方案检测结果与方案一一致, 其产物大小约 400 bp, 与预期 (421 bp) 相符 (图 4D)。为进一步确认检测结果的可靠性, 对#1-5 号克隆提取质粒作酶切检测。分别以 *Mlu* I 与 *Nhe* I 作单酶切检测, 结果显示#1、#4、#5 这 3 个质粒能切出预期片段, 而#2、#3 号质粒无预期片段 (图 4E, F)。酶切检测结果与 PCR 检测结果一致。

为鉴定目标质粒序列准确性, 对其中#1、#4 阳性质粒进行序列测定。由于经 PCR 扩增的 F3 片段位于基因下游, 且目标突变位点 S780E 距下游 *Sal* I 位点仅 490 bp, 故选择 pEGFP\_C3' 引物对该质粒反义链进行序列测定。结果显示两者目标位点为 TC 碱基, 且 F3 部分序列内未引入其他非预期突变点 (图 5)。表明其正义链对应位置为 GA 碱基, 符合预期的 *rb1*<sup>S780E</sup> 突变体序列特征。由于

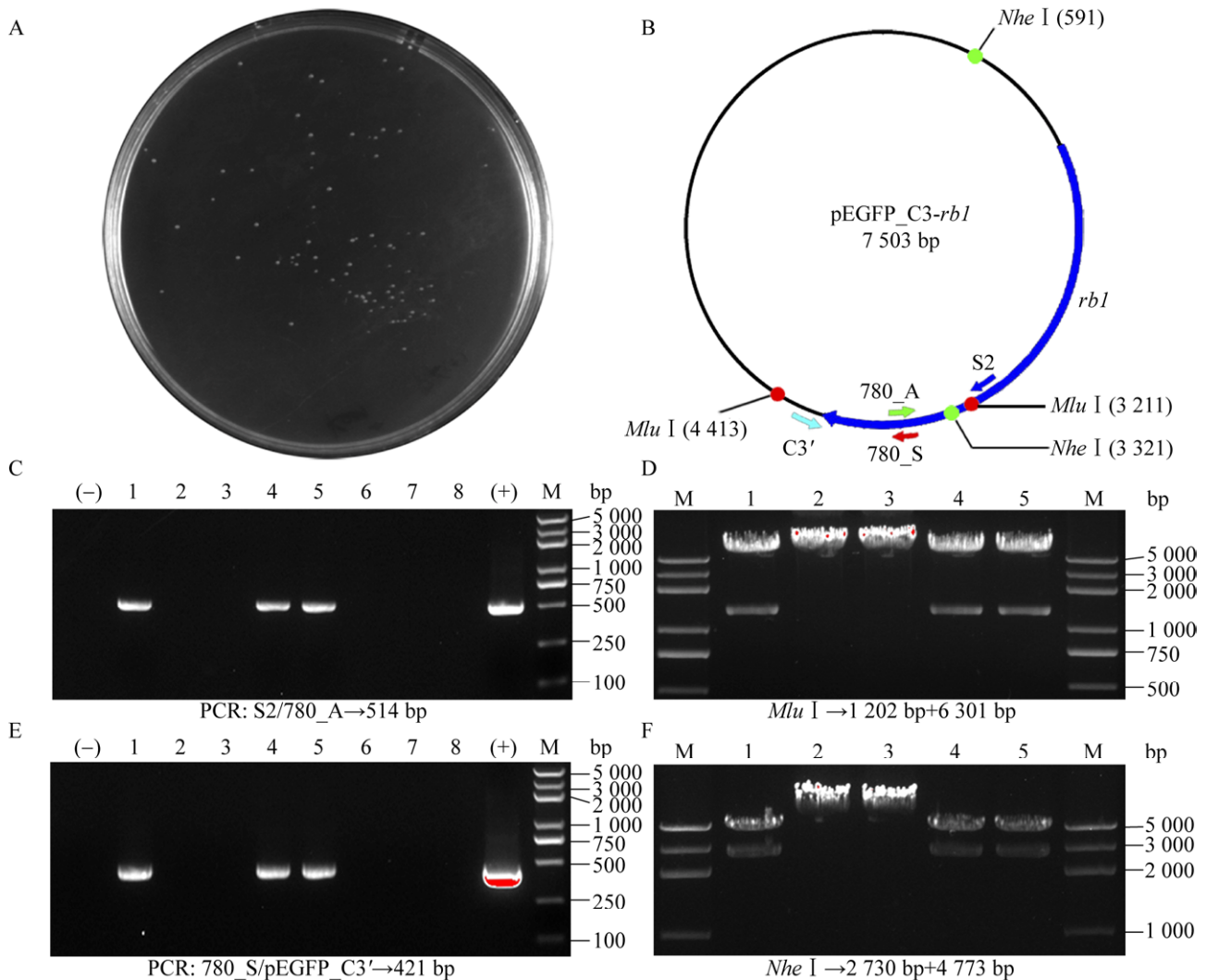


图 4 阳性克隆的筛选

Fig. 4 Screening positive colonies. (A) Bacterial colonies on plate. (B) The position of the primers and restriction enzymes which were used for detection of positive colonies. Agarose gel electrophoresis showed the results of PCR with S2/780E\_A primers (C) or 780E\_S/pEGFP\_C3' primers (D) and the restriction enzymatic digestion results with *Mlu* I (E) or *Nhe* I (F). -/+ stand for negative/positive control, #1-8 stand for the selected colony and M stands for DNA marker. Expected fragment sizes were showed at the bottom of each figure.

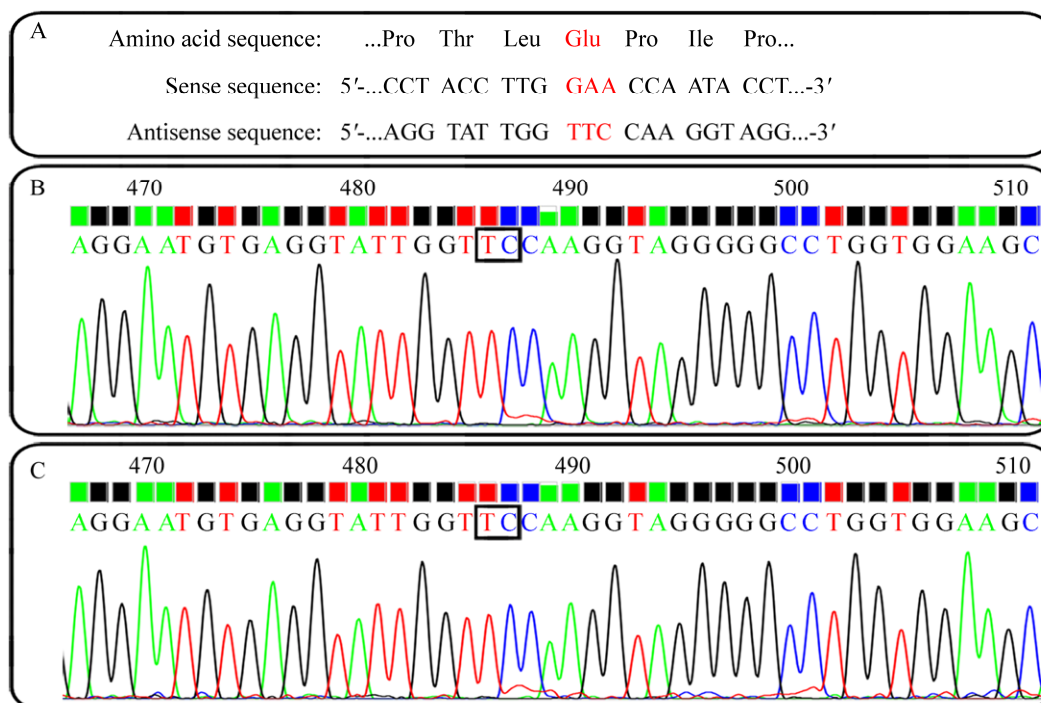


图 5 阳性质粒的关键序列

Fig. 5 Sequence of the positive plasmids. (A) Amino acid and nucleotide sequence of target mutant. Peak trace of antisense of plasmid #1 (B) and #4 (C). Critical sequences of mutant position were encircled by square frame.

目标质粒其他部分未经 PCR 扩增, 故未作序列测定。综合分析, #1、#4 克隆皆是符合要求的 pEGFP\_C3-*rb1*<sup>S780E</sup> 目标突变体。

### 3 讨论

长片段干扰重叠延伸效率是制约 OE-PCR 应用于长基因定点突变的重要因素; 另一方面, 制作长基因突变体时, 往往得到了预期定点突变, 却引入了新的非预期突变 (图 6A)。滚环扩增法在一定程度上可以解决长基因定点突变的问题, 但其也存在其他固有缺陷。若仍以 OE-PCR 制作长基因定点突变, 则仅扩增含突变位点的部分基因序列成为克服上述困难的良好解决方案。一则 OE-PCR 扩增较短的基因片段成功率较高, 二则扩增短基因片段时引入非预期突变的几率相对较小 (图 6B)。

采取部分扩增结合酶切-连接法制作长基因定点突变要求突变位点两侧附近皆有合适的酶切

位点, 以便于将扩增的基因片段重新连入载体获得完整目标质粒。最理想的情况是其两侧附近各有一个单一酶切位点, 此时按常规基因克隆方法即可重新连接得到完整目标质粒。然而往往遇到另外一种情况, 即突变位点两侧虽有酶切位点, 但它们在目标质粒上并不单一。如本例中目标位点 S780E 上游虽有一个 *Nhe* I 位点, 但载体序列本身还有另一个 *Nhe* I 位点。若以 *Nhe* I/*Sal* I 酶切原始质粒再连接扩增基因片段, 则目标质粒将丢失 *rb1* 基因上游大部分序列。对于这种情况, 双片段连接法是一个很好的解决方案: 本例中两个片段同时与一个载体连接的办法成功避开了双 *Nhe* I 位点对片段连接的限制 (图 2)。该方案所获得的完整质粒中基因上游 F1 部分与中部 F2 皆源自原始质粒, 一般认为序列忠实, 不会出现新的突变 (图 6B)。唯一存在随机突变可能的只有经 PCR 扩增的 F3 部分, 只对这部分 DNA 进行序列

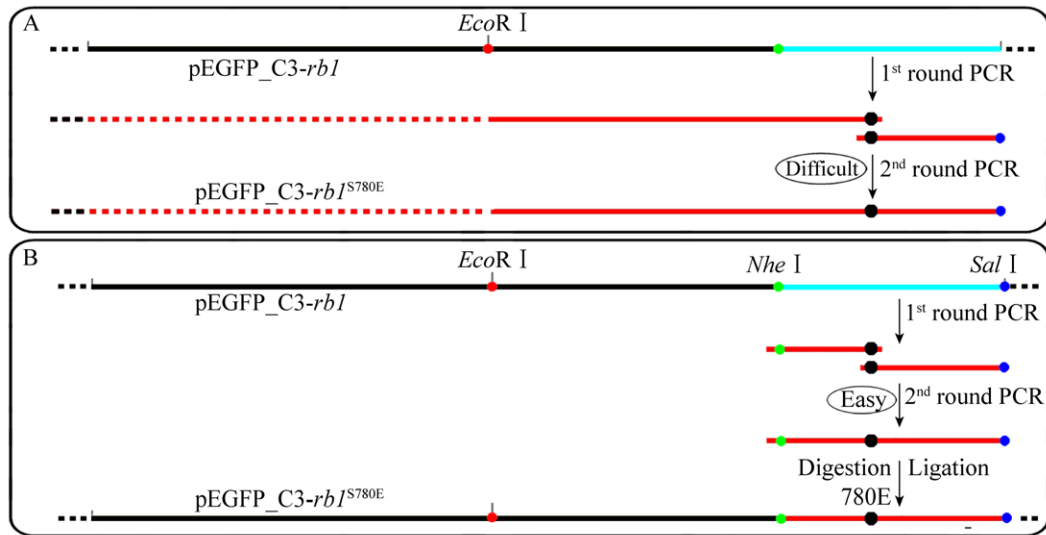


图 6 常规 OE-PCR 与部分扩增法的比较

Fig. 6 Comparison of two protocols. (A) In conventional protocol, it is difficult to get target product by OE-PCR with long upstream and/or downstream fragments. (B) It is relatively easy to amplify a short DNA fragment containing mutation site. Red lines indicate that there may be unexpected mutations in DNA fragments which were amplified by PCR.

测定即可判断目标质粒的准确性。

结合实际工作经验,我们发现相对常规单片段连接方案,双片段连接时得到的转化克隆数较少,且阳性率偏低;调整连接体系中两片段和载体的比例可适当提高转化克隆数。本例中平板上只形成数十个菌落,检测阳性率只有 37.5%,都低于本实验室常规方案下的经验值。尽管如此,若常规 OE-PCR 难以解决某些长基因定点突变问题时,本方法不失为一种有效的解决方案。

## REFERENCES

- [1] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, 77(1): 51–59.
  - [2] Kooi CWV. Megaprimer method for mutagenesis of DNA. *Methods Enzymol*, 2013, 529: 259–269.
  - [3] Zhao SZ, Shen XQ. A High efficient site-directed mutagenesis method by RCA and megaprimer PCR. *Acta Agric Jiangxi*, 2009, 21(8): 7–8, 11 (in Chinese).
  - [4] Yang L, Wang LY, Li HM, et al. Multi-site specific mutagenesis by multi-fragment overlap extension PCR. *China Biotechnol*, 2019, 39(8): 52–58 (in Chinese).
  - [5] Qi RH, Otting G. Mutant T4 DNA polymerase for easy cloning and mutagenesis. *PLoS ONE*, 2019, 14(1): e211065.
  - [6] Zhang J, Liu Y, Zhu Z, et al. Role of microRNA508–3p in melanogenesis by targeting microphthalmia transcription factor in melanocytes of alpaca. *Animal*, 2017, 11(2): 236–243.
  - [7] Tang SW, Li H, Cui SY, et al. Construction of a novel plasmid system for epitope tagging and gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiol Sin*, 2019, 59(5): 939–949 (in Chinese).
- 唐仕伟, 李辉, 崔时媛, 等. 新型酵母蛋白表位标记和基因敲除质粒系统的构建及可行性验证. *微生物学报*, 2019, 59(5): 939–949.



- [8] Liu SH, Wang SZ, Zhang H, et al. Research advances on RB1 gene. *Hereditas* (Beijing), 2010, 32(11): 1097–1104 (in Chinese).  
刘双虎, 王守志, 张慧, 等. 视网膜母细胞瘤基因1(RB1)研究进展. *遗传*, 2010, 32(11): 1097–1104.
- [9] Du Q, Jiang YH, Galli BL. Low-penetrance retinoblastoma due to exons 24 and 25 deletions in the Rb1 gene. *Chin J Med Genet*, 2002, 19(5): 370–374 (in Chinese).  
杜琴, 江悦华, Galli BL. Rb1 基因第 24 和 25 外显子缺失导致低外显性视网膜母细胞瘤. *中华医学遗传学杂志*, 2002, 19(5): 370–374.
- [10] Yang Y, Ma B, Li L, et al. CDK2 and CDK4 play important roles in promoting the proliferation of SKOV3 ovarian carcinoma cells induced by tumor-associated macrophages. *Oncol Rep*, 2014, 31(6): 2759–2768.
- [11] Taylor-Harding B, Aspuria PJ, Agadjanian H, et al. Cyclin E1 and RTK/RAS signaling drive CDK inhibitor resistance via activation of E2F and ETS. *Oncotarget*, 2015, 6(2): 696–714.
- [12] Delfau-Larue MH, Klapper W, Berger F, et al. High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma. *Blood*, 2015, 126(5): 604–611.
- [13] Liu JC, Granieri L, Shrestha M, et al. Identification of CDC25 as a common therapeutic target for triple-negative breast cancer. *Cell Rep*, 2018, 23(1): 112–126.
- [14] Shi Y, Qian Z, Zhang S, et al. Cell Cycle protein expression in neuroendocrine tumors: association of CDK4/CDK6, CCND1, and phosphorylated retinoblastoma protein with proliferative index. *Pancreas*, 2017, 46(10): 1347–1353.
- [15] Zhang XY, Chen Q, Feng J, et al. Sequential phosphorylation of Nedd1 by Cdk1 and Plk1 is required for targeting of the gammaTuRC to the centrosome. *J Cell Sci*, 2009, 122(13): 2240–2251.
- [16] Wang LY, Li HM, Ma MQ, et al. Improve the site-directed mutagenesis efficiency of overlap extension PCR by outboard-primers. *Biotechnol Bull*, 2019, 35(12): 196–202 (in Chinese).  
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. *生物技术通报*, 2019, 35(12): 196–202.

(本文责编 郝丽芳)