

## 用 DREAM 技术进行全长质粒快速定点突变

张宝中<sup>1,2</sup>, 冉多良<sup>2</sup>, 张昕<sup>1</sup>, 安小平<sup>1</sup>, 单云竹<sup>1</sup>, 周育森<sup>1</sup>, 童贻刚<sup>1</sup>

1 军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

2 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052

**摘要:** 利用“设计限制酶辅助突变”(Designed Restriction Enzyme Assisted Mutagenesis, DREAM)进行全长质粒快速定点突变。根据突变位点附近氨基酸靶序列,以简并密码子进行逆向推导,这样在不改变氨基酸序列的前提下可以得到数目巨大的隐性突变体(Silent mutants),这些突变体中包含大量的限制性酶切位点,选择合适的酶切位点设计引物,用 Phusion 超保真 DNA 聚合酶扩增全长质粒的 DNA 序列,得到的 PCR 产物用 T4 多聚核苷酸激酶添加 5'磷酸基团后进行平末端连接,转化大肠杆菌受体菌后用设计的酶切位点进行快速筛选。本研究用该方法成功地纠正了长约 8 kb 的质粒 pcDNA3.1-pIgR 中的突变碱基,从而获得了多聚免疫球蛋白受体(pIgR)的野生型氨基酸序列。以上结果表明:利用 DREAM 技术将限制性酶切位点引入目的基因而不改变目的蛋白质的氨基酸序列,使突变体的筛选简单化;配合使用高保真和高效率的 Phusion DNA 聚合酶可以进行长达 8 kb 的全长质粒的快速突变;该方法无需使用定点突变试剂盒和特殊的受体菌,同时避免了核酸杂交以及同位素的使用。

**关键词:** 定点突变, 聚合酶链反应, 设计限制酶辅助突变

## Rapid site-directed mutagenesis on full-length plasmid DNA by using designed restriction enzyme assisted mutagenesis

Baozhong Zhang<sup>1,2</sup>, Duoliang Ran<sup>1</sup>, Xin Zhang<sup>2</sup>, Xiaoping An<sup>2</sup>, Yunzhu Shan<sup>2</sup>, Yusen Zhou<sup>2</sup>, and Yigang Tong<sup>2</sup>

1 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China

2 College of Veterinary Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

**Abstract:** To use the designed restriction enzyme assisted mutagenesis technique to perform rapid site-directed mutagenesis on double-stranded plasmid DNA. The target amino acid sequence was reversely translated into DNA sequences with degenerate codons, resulting in large amount of silently mutated sequences containing various restriction endonucleases (REs). Certain mutated sequence with an appropriate RE was selected as the target DNA sequence for designing mutation primers. The full-length plasmid DNA was amplified with high-fidelity Phusion DNA polymerase and the amplified product was 5' phosphorylated by T4 polynucleotide kinase and then self-ligated. After transformation into an E.coli host the transformants were rapidly screened by cutting with the designed RE. With this strategy we successfully performed the site-directed mutagenesis on an 8 kb plasmid pcDNA3.1-pIgR and recovered the wild-type amino acid sequence of human polymeric immunoglobulin receptor (pIgR). A novel site-directed mutagenesis strategy based on DREAM was developed which exploited RE as a rapid screening measure. The highly efficient, high-fidelity Phusion DNA

**Received:** October 6, 2008; **Accepted:** November 17, 2008

**Supported by:** the National Key Technology R&D Program (No. 2006BAD06A15).

**Corresponding author:** Yigang Tong. Tel: +86-10-66948407; E-mail: tongyg@hotmail.com

国家科技支撑计划项目(No. 2006BAD06A15)资助。

polymerase was applied to ensure the efficient and faithful amplification of the full-length sequence of a plasmid of up to 8 kb. This rapid mutagenesis strategy avoids using any commercial site-directed mutagenesis kits, special host strains or isotopes.

**Keywords:** site-directed mutagenesis, polymerase chain reaction, designed restriction enzyme assisted mutagenesis

定点突变(Site-directed mutagenesis) 是分子生物学实验室中常用的实验技术, 目前成熟的定点突变技术有很多<sup>[1,2]</sup>, 这些技术大体上可以归纳为 3 类: 第 1 类为寡核苷酸引物介导的定点突变, 其原理是用含有突变碱基的寡核苷酸片段作引物, 在 DNA 聚合酶的作用下启动 DNA 分子进行复制, 后来在此基础上又发展起来多种改进的技术, 如利用尿嘧啶 DNA 糖基化酶进行筛选<sup>[3]</sup>、利用限制性内切酶 *DpnI* 进行筛选<sup>[4-7]</sup>以及通过消除单一限制性酶切位点 (USE) 进行筛选的定点突变技术<sup>[8,9]</sup>。这些方法的优点是保真度高, 由于使用的是具有校正功能的 DNA 聚合酶, 一般不会引起靶位点以外的点突变; 改进的筛选手段使该方法的效率大大提高。该方法的缺点是操作过程环节复杂、周期长, 而且在克隆待突变基因时会受到限制性酶切位点的限制。第 2 类为 PCR 介导的定点突变法, PCR 技术使得定点突变变的简单而且有效。如果待突变的位点紧邻合适的限制性酶切位点, 则只需合成一条突变引物, 进行一次 PCR 即可完成突变, 但是一般情况下很难找到这样的限制性酶切位点。典型的基于 PCR 的定点突变是重叠延伸 PCR 定点突变技术<sup>[10]</sup>, 后来人们在此基础上建立了大引物 PCR 定点突变技术<sup>[11,12]</sup>, 后者较之前者少合成一条突变引物, 并且少进行一次 PCR 反应。大引物 PCR 定点突变技术经过进一步发展, 可以不经 PCR 产物分离纯化而在同一个反应管中完成两轮 PCR 扩增<sup>[13]</sup>。第 3 类为盒式突变技术<sup>[14]</sup>, 就是人工合成一段含突变序列的互补寡核苷酸片段, 变性退火后产生粘性末端, 取代原始质粒中的相应序列。如果在合成的寡核苷酸中引入简并碱基, 则可以在一次实验中获得数量众多的突变体。盒式突变法具有比前两者简单易行、突变效率高等优点, 还可以在一对限制酶切位点内一次突变多个位点。缺点是在靶 DNA 序列的两侧需要有合适的酶切位点。

Rabhi 等<sup>[15]</sup> 曾经介绍过一种基于 PCR 的质粒双链 DNA 突变方法, 该方法通过设计突变引物直接扩增全长质粒, 进行自连后转化受体菌, 由于突变

后质粒与原始质粒在大小和酶切位点上没有任何区别, 无法应用 PCR 和酶切方法进行筛选, 只能采用同位素探针杂交(以突变位点序列为靶序列)或者直接进行 DNA 序列分析来筛选阳性克隆, 这些方法操作复杂、成本高昂。本研究介绍一种新的基于 DREAM<sup>[16]</sup>设计的、针对全长质粒进行快速定点突变的方法, 该方法是对 Rabhi 等<sup>[15]</sup>方法的改进, 通过 DREAM 设计引进常用的限制性内切酶, 对转化子进行简便快速的酶切筛选, 避免了复杂的杂交程序和同位素的使用; 同时采用高保真、高反应速度的 Phusion DNA 聚合酶, 扩增产物可以轻易达到 10 kb 以上, 因此一般质粒均可以顺利地进行全长的扩增。该方法的原理是: 根据质粒突变位点附近的氨基酸靶序列, 进行逆向推导, 这样在不改变氨基酸序列的前提下可以得到数目巨大的隐性突变体, 这些突变体中包含大量的限制性内切酶位点, 选择合适的酶切位点设计引物, 用高保真耐热 DNA 聚合酶扩增质粒全长 DNA 序列, 进行 5' 末端磷酸化后自连, 转化宿主菌后用设计的酶切位点筛选阳性克隆, 即可完成全长质粒快速定点突变。以下以长约 8 kb 的质粒 pcDNA3.1-pIgR 为例, 介绍这一新的定点突变技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

T4 多聚核苷酸激酶(T4 PNK)、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶均购自宝生物公司 (TaKaRa), Phusion 超保真 DNA 聚合酶购自 New England Biolabs, DNA 分子量标准 DL2000 及 1 kb DNA Markers 购自北京博迈得公司, 质粒小提纯化试剂盒购自北京博大公司, Top10 感受态细胞购自北京天根公司。含有突变的原始质粒 pcDNA3.1-pIgR 为本实验室构建, 该质粒由多聚免疫球蛋白受体(pIgR) 基因插入真核表达载体 pcDNA3.1 (Invitrogen 公司) 而形成, 其中 pIgR 基因中有一个碱基突变并导致一个氨基酸改变。

## 1.2 方法

### 1.2.1 利用 DREAM 技术进行全长质粒定点突变的原理

如图 1 所示,在不改变氨基酸序列的前提下,利用氨基酸密码子的简并性,逆向推导出其简并编码序列,选择含有限制性酶切位点的序列作为靶序列,自酶切位点向两侧设计引物,扩增质粒全长 DNA,用 T4 多聚核苷酸激酶在 PCR 产物 5' 添加磷酸基团后进行平末端自连,转化后用设计的酶切位点快速筛选阳性克隆。

### 1.2.2 引物设计

根据上述突变思路,我们设计合成了 2 条引物来纠正质粒 pcDNA3.1-pIgR 中 1465 位的突变碱基 A(图 2),引物序列分别为: pcDNA3.1-pIgR-zmF, 5'-

TCG AGG TCA GCC AGG GTC-3'; pcDNA3.1-pIgR-zmR, 5'-GGC TGA CAT CAA AGG ACA GG-3'。

### 1.2.3 DNA 的扩增

用 Phusion 超保真 DNA 聚合酶做标准的 PCR 反应,50  $\mu$ L 体系含有 10  $\mu$ L 5 $\times$ GC Buffer(含 MgCl<sub>2</sub>),4  $\mu$ L dNTP(各 2.5 mmol/L),引物 pcDNA3.1-pIgR-zmF 和 pcDNA3.1-pIgR-zmR(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L,0.2  $\mu$ L pcDNA3.1-pIgR(10 ng)作为 PCR 反应的模板,0.5  $\mu$ L (2 U/ $\mu$ L) Phusion 超保真 DNA 聚合酶,用去离子水补至 50  $\mu$ L。将配好的 PCR 反应体系放入 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Foster City, CA)中进行扩增,反应条件为:98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;变性 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,65 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 150 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

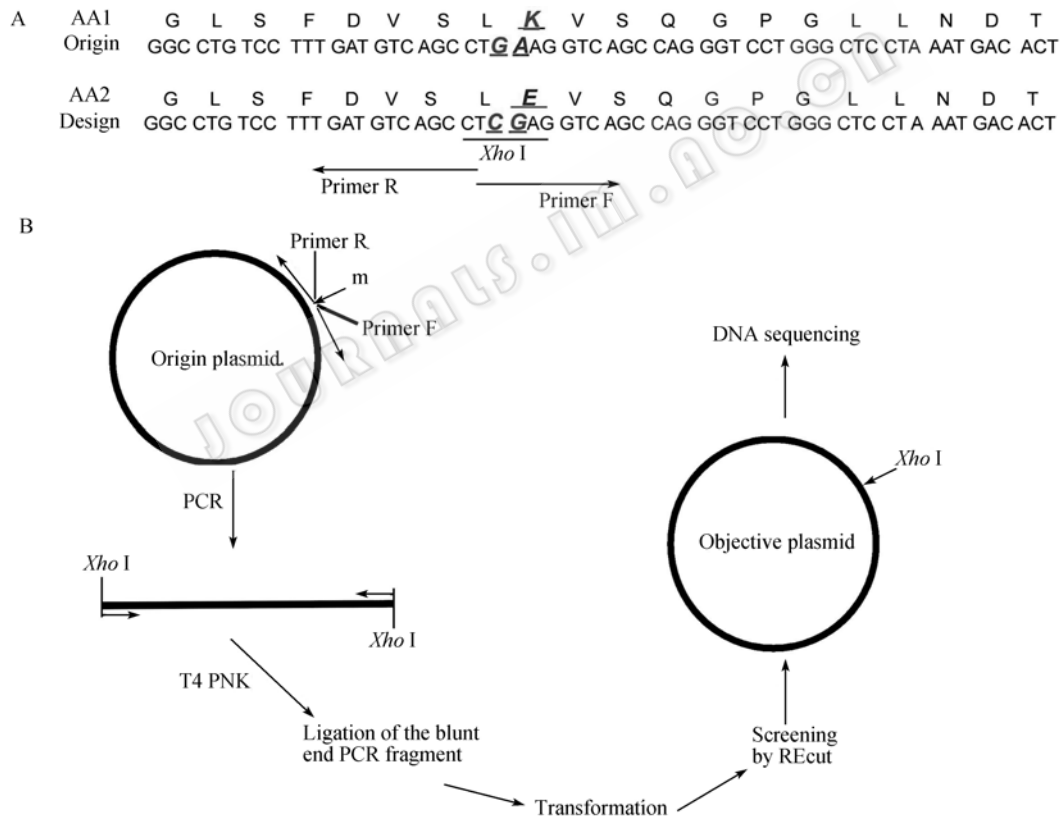


图 1 利用 DREAM 技术进行全长质粒定点突变原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of rapid site-directed mutagenesis on full-length plasmid DNA using DREAM technique. (A) Design of target DNA sequence with an appropriate restriction endonuclease cleavage site, by reverse translating the target amino acid sequence. Mutation PCR primers for full-length plasmid amplification are designed according to the target DNA sequence. (B) Flow chart of the mutation procedures. Origin, The original DNA sequence to be mutated. AA1, Amino acid sequence deduced from the original DNA sequence. AA2, The target amino acid sequence. Design, The designed target DNA sequence with a restriction endonuclease cleavage site for rapid screening of recombinants.

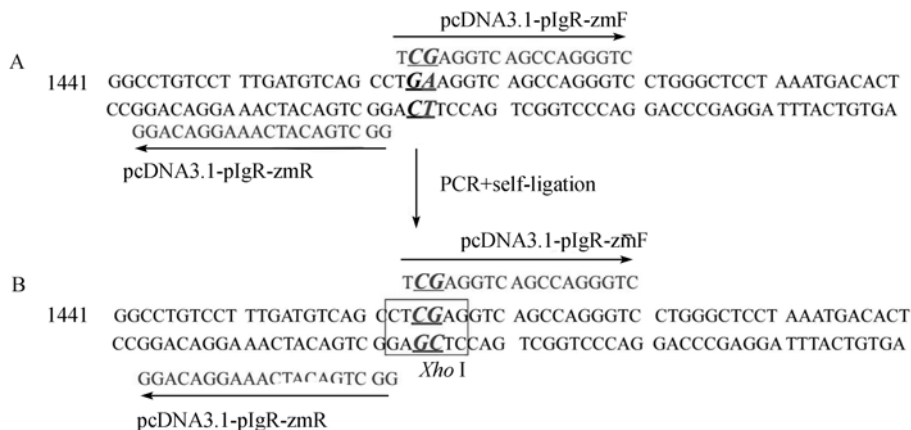


图 2 突变引物设计

Fig. 2 Design of mutation primers. (A) The original DNA sequence to be mutated. (B) The target DNA sequence with a restriction endonuclease cleavage site (*Xho* I). The designed restriction enzyme is indicated by an open box.

### 1.2.4 PCR 产物的磷酸化、连接及转化

50  $\mu$ L 反应体系加 5  $\mu$ L 10  $\times$  T4 多聚核苷酸激酶缓冲液 (500 mmol/L Tris  $\cdot$  HCl、100 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、50 mmol/L DTT), 0.5  $\mu$ L (10/ $\mu$ L) T4 多聚核苷酸激酶 (PNK), 1  $\mu$ L (10 mmol/L) ATP, 纯化 PCR 产物 43.5  $\mu$ L。然后放入 37°C 的水浴锅中 30 min。最后 70°C 加热 5 min 将 T4 多聚核苷酸激酶灭活。连接反应总体积 10  $\mu$ L, 含磷酸化 PCR 产物 7  $\mu$ L, 2  $\mu$ L T4 DNA 连接酶, 1  $\mu$ L T4 DNA 连接缓冲液。16°C 连接 16 h。取 Top10 感受态细菌加入 5  $\mu$ L 连接产物, 冰浴 30 min, 加入 300  $\mu$ L LB 培养基, 37°C、150 r/min 振荡培养 1 h, 涂布羧苄 LB 平板, 37°C 倒置培养 16 h。

## 2 结果

### 2.1 利用 DREAM 技术进行进行突变引物设计

由于氨基酸密码子的简并性, 每一个氨基酸可以由多种密码子进行编码, 因此将突变位点附近的氨基酸序列进行逆向推导, 可以得到大量的隐性突变, 其中包含着各种各样的限制性酶切位点, 很容易在突变位点的附近找到理想的酶切位点。酶切位点可以通过人工的方法分析寻找, 也可以借助计算机软件。使用计算机软件将得到更多的选择, 互联网上有一个免费在线工具 Watcut 可以非常好地用于本方案的设计。该工具网站的网址为 [http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php?act=silent\\_new](http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php?act=silent_new)。打开该网页后输入突变后的目的 DNA 序列, 点击搜索按钮, 在搜索结果界面选择

“列出>3 个碱基的隐性突变”即可得到大量的限制性酶切序列。

本实验中, 利用在线工具 Watcut 设计突变引物, 获得了一系列可供选择的突变序列, 我们从中挑选了靠近突变位点的 *Xho* I 位点 (图 1、图 2), 一方面是因为 *Xho* I 是很常见的限制性内切酶, 另一方面该酶引入质粒后很容易通过酶切鉴定。此外由于 *Xho* I 位点十分靠近待突变位点, 设计的引物无需太长即可保证有足够的碱基与模板配对。

### 2.2 利用 DREAM 技术进行进行定点突变和快速筛选

本实验 DNA 的扩增是以质粒 pcDNA3.1-pIgR 为模板, 由于质粒相对于其他模板来说浓度较大, 要尽量降低其模板的用量, 便于阳性克隆的筛选。因为目的条带与质粒模板一样大, 所以在纯化 PCR 产物时, 质粒模板会被一并回收, 这样会增加筛选阳性克隆的难度。由于全长质粒一般比较大, 使用普通 *Taq* 酶进行扩增一方面会引起较多的突变, 另一方面, 普通 *Taq* 酶难以扩增较大的 DNA 片段。本实验采用 Phusion 超保真 DNA 聚合酶, 该酶保真率是普通 *Taq* 的 50 倍, 活性是 *Pfu* 酶的 5 倍, 能有效地从基因组 DNA 中扩增长 7.5 kb 的目的片段和从噬菌体 DNA 中扩增 20 kb 目的片段。因此使用 Phusion 超保真 DNA 聚合酶既可以避免 PCR 导致的意外突变, 也可以顺利地对大多数质粒 (小于 20 kb) 进行快速突变, 而无需进行突变产物的亚克隆。由于该酶具有极高的反应速率, 延伸时间为 15~30 s/kb, 这样就可以有效地缩短 PCR 反应时间。在本实验中,

延伸时间仅用 150 s 便成功地扩增出 pcDNA3.1-pIgR 的全长 8 kb 条带(见图 3)。

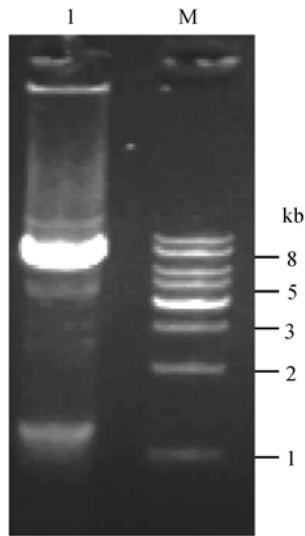


图 3 全长质粒 pcDNA3.1-pIgR 的 PCR 扩增

Fig. 3 Amplification of plasmid pcDNA3.1-pIgR. 1: PCR products of full-length plasmid pcDNA3.1-pIgR; M: DNA molecular marker.

将扩增的 PCR 产物纯化后, 用 T4 PNK 使 5' 末端磷酸化, 将磷酸化的 PCR 产物平末端自连, 进而转化普通的大肠杆菌受体菌(无需任何特殊的受体菌)。随即挑选 12 个转化子, 摇菌提取质粒, 直接用设计的 *Xho* I 位点进行克隆筛选(无需使用杂交筛选

和同位素)。为了使酶切产物更容易区分, 使用引入的酶切位点 *Xho* I 与质粒载体上的 *Bgl* II 组合消化。目的质粒应切出 4459 bp、2077 bp 和 1450 bp 三条 DNA 带, 而原始的质粒 pcDNA3.1-pIgR 应切出 4459 bp 和 3527 bp 的 2 条带。我们用上述的 *Xho* I 和 *Bgl* II 组合酶切结果显示: 2、5 和 7 号克隆为阳性克隆(如图 4A), 而其他克隆为原始质粒 pcDNA3.1-pIgR。目的质粒比原始质粒只多一个 *Xho* I 酶切位点, 其他的限制性酶切位点应完全相同, 所以我们选择 *Sal*I 和 *Kpn*I 双酶切, 进一步鉴定是否与理论相符。电泳图结果显示: 这 4 个克隆切出的 DNA 条带完全一样, 大小为: 2702 bp、2188 bp、1567 bp、889 bp、606 bp 和 34 bp (34 bp 带在电泳图上不可见, 图 4B)。

### 2.3 DNA 序列分析

我们挑选 2 号阳性克隆进行 DNA 序列分析, 围绕目的基因及其表达调控序列(包括上游的 CMV 启动子和下游的 BGH Poly(A) 信号位点) 总共进行了 6 个测序反应, 得到了约 4500 bp 的序列结果, 该结果显示, 所有 4500 bp 的 DNA 序列与预期完全相同, 表明成功地校正了 pcDNA3.1-pIgR 上 1465 位的突变碱基, 并且没有因为 PCR 导致任何意外突变(图 5)。

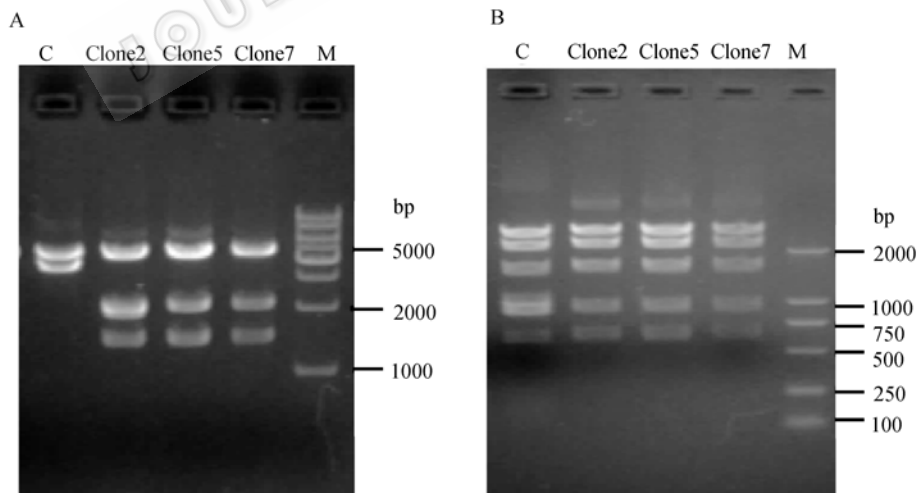


图 4 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant plasmids by restriction endonucleases. (A) Recombinant plasmids and the original plasmid as a control are digested by designed endonuclease *Xho* I combined with *Bgl* II, showing that recombinant plasmids are readily identified by designed endonuclease (*Xho* I) digestion. (B) Recombinant plasmids and the original plasmid are digested by non-designed enzyme *Sal* I and *Kpn* I, showing that there is no difference between Recombinant plasmids and the original plasmid. (C) the original plasmid pcDNA3.1-pIgR. M: DNA molecular weight marker.

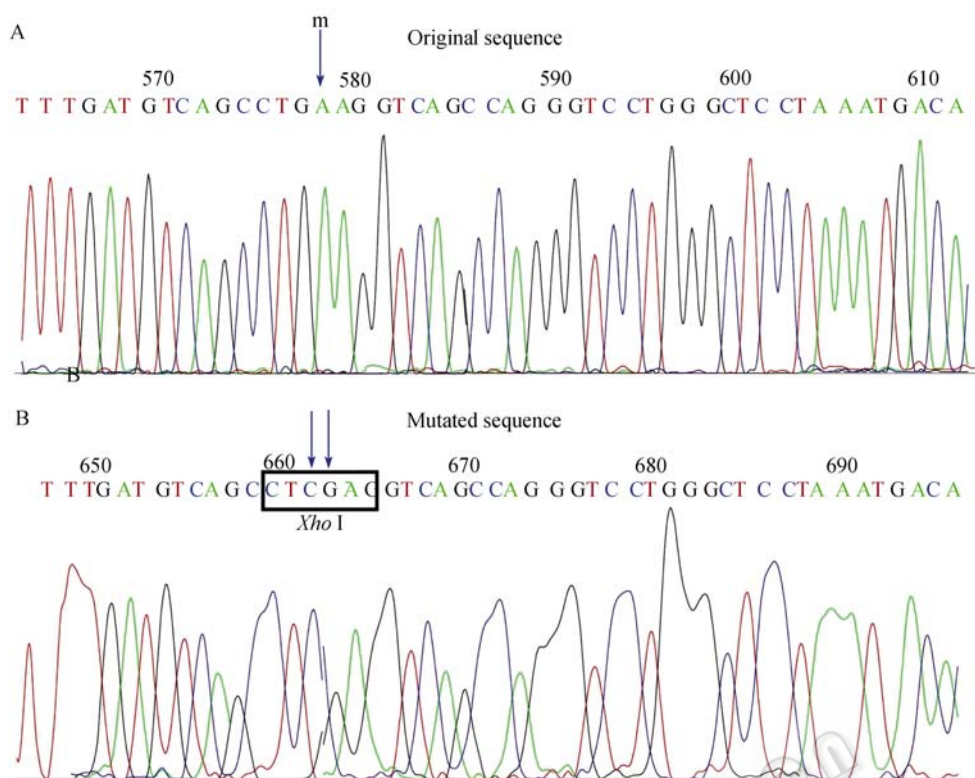


图 5 利用 DREAM 技术快速定点突变的 DNA 序列测定结果

Fig. 5 DNA sequence analysis of the rapid site-directed mutagenesis based on DREAM strategy. (A) The original plasmid with an arrow to show the nucleotide to be mutated. (B) The target plasmid with the arrows to show the target nucleotides and an open box to show the designed restriction endonuclease *Xho* I.

### 3 讨论

定点突变技术在基因和蛋白质功能研究、生物工程药物研发以及基因克隆、载体构建等诸多领域具有广泛的应用,是分子生物学的一种常规实验技术。早期采用寡核苷酸介导的单链噬菌体进行人工定点突变<sup>[17]</sup>, Micheal Smith 曾因为发明此项技术而于 1993 年获得诺贝尔奖。自从 PCR 技术诞生以来,定点突变技术有了迅速的发展,出现了各种各样的变化形式。目前市场上已经有一些商业化的定点突变试剂盒可供选购。尽管进行定点突变的选择方案很多,然而每种方法都有自身的优势和缺点。比如商业化试剂盒多为进口,往往价格较贵;有些定点突变方案需要使用特殊的酶类如 *Dpn* I, 或者一些特殊的受体菌;各种定点突变方案操作复杂程度和突变效率各不相同,因此不同的实验室往往根据自己的习惯和偏好而使用不同的方法。

目前大部分的实验室都采用基于 PCR 的定点突变技术,如突变引物重叠延伸法、大引物 PCR 法,这

些突变方法操作简便,无需购买任何其他试剂,然而这些突变技术都需要使用较长的引物和多轮 PCR,这样很容易导致一些意外的突变。

本实验用 DREAM 技术进行全长质粒快速定点突变也是基于 PCR 技术的一种突变方法,克服了上述的缺点,操作简便,只需要一轮 PCR 即可完成,同时用设计的酶切位点可以实现快速筛选,突变成功率高。为了保证除靶序列外不含其他突变,采用了高保真耐热 DNA 聚合酶进行 PCR 反应。同时,由于本实验使用的高保真耐热 DNA 聚合酶(Phusion)可以轻易地扩增 10 kb 以上的 DNA 片段,以此一般的质粒均可以使用这种方法进行快速突变。

本实验室先前报道了一种基于 DREAM 设计的定点突变方法,使用该方法的目的是避免使用重叠 PCR 进行定点突变,因为重叠 PCR 会增加突变的机会,而且重叠 PCR 由于使用较长的突变引物有时难以有效地扩增出目的产物<sup>[16]</sup>。本实验使用的定点突变技术与先前报道的定点突变技术虽然都使用了 DREAM 设计思路,但是二者在突变技术路线上完

全不同,前者使用 DREAM 设计引进酶切位点以利于突变位点前后 DNA 片段的重组,以取代用重叠 PCR 的方法进行重组;后者利用 DREAM 设计引进酶切位点以利于重组子的快速筛选。本研究介绍的突变技术在操作的简易程度和成功率上都优于本实验室先前报道的方法,而且比 Rabhi 等人<sup>[15]</sup>报道的全长质粒定点突变方法更加简便实用。

## REFERENCES

- [1] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [2] Aiyar A, Xiang Y, Leis J. Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. *Methods Mol Biol*, 1996, **57**(2): 177-191.
- [3] Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**(2): 488-492.
- [4] Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, et al. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, 1994, **151**(1/2): 119-123.
- [5] Li S, Wilkinson MF. Site-directed mutagenesis: a two-step method using PCR and DpnI. *Biotechniques*, 1997, **23**(4): 588-590.
- [6] Wei D, Li M, Zhang X, Xing L. An improvement of the site-directed mutagenesis method by combination of megaprimer, one-side PCR and DpnI treatment. *Anal Biochem*, 2004, **331**(2): 401-403.
- [7] Shenoy AR, Visweswariah SS. Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA. *Anal Biochem*, 2003, **319**(2): 335-336.
- [8] Zhu L. *In vitro* site-directed mutagenesis using the unique restriction site elimination (USE) method. *Methods Mol Biol*, 1996, **57**(1): 13-29.
- [9] Deng WP, Nickoloff JA. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal Biochem*, 1992, **200**(1): 81-88.
- [10] 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.
- [11] Kammann M, Laufs J, Schell J, et al. Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**(13): 5404.
- [12] Barik S. Site-directed mutagenesis *in vitro* by megaprimer PCR. *Methods Mol Biol*, 1996, **57**(2): 203-215.
- [13] Ke SH, Madison EL. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(16): 3371-3372.
- [14] Wells JA, Vasser M, Powers DB. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene*, 1985, **34**(2-3): 315-323.
- [15] Rabhi I, Guedel N, Chouk I, et al. A novel simple and rapid PCR-based site-directed mutagenesis method. *Mol Biotechnol*, 2004, **26**(1): 27-34.
- [16] Zhu XF, Chen JH, Zhang X, et al. Correction of a mutation in a synthetic gene by DREAM technique, a site-directed mutagenesis. *China Biotechnol*, 2006, **27**(1): 86-89.  
朱晓峰, 陈锦辉, 张昕, 等. 用 DREAM 技术纠正人工合成基因中的突变. *中国生物工程杂志*, 2006, **27**(1): 86-89.
- [17] Hutchison CA, Phillips S, Edgell MH, et al. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J Biol Chem*, 1978, **253**(18): 6551-6560.