

• 生物技术与方法 •

多片段扩增结合 Gibson 组装法克隆基因定点突变

程盈盈, 李国庆, 刘君怡, 陈婉煜, 陈华波

湖北文理学院 基础医学院, 湖北 襄阳 441053

程盈盈, 李国庆, 刘君怡, 陈婉煜, 陈华波. 多片段扩增结合 Gibson 组装法克隆基因定点突变. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1218-1226.

CHENG YY, LI GQ, LIU JY, CHEN WY, CHEN HB. Using multiple-fragment amplification combined with Gibson assembly to clone genes with site-directed mutations. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1218-1226.

摘要: 为寻找一种简洁高效的基因定点突变方案, 利用 Gibson 组装技术对重叠延伸 PCR 法进行简化, 并以克隆细胞周期蛋白依赖性激酶 4 基因单位点与双位点突变为例进行验证。采用与重叠延伸 PCR 相似的策略扩增含点突变的基因片段, 同时采用双酶切制备线性质粒载体, 保证质粒载体与基因片段含有一小段重叠序列作为接头。直接将基因片段与线性载体通过 Gibson 组装法拼接成完整质粒。经转化、筛选与检测, 成功得到数个单位点与双位点目标突变体克隆, 且阳性率均为 100%。由于没有繁琐的多轮 PCR 扩增和频繁的 DNA 回收操作, 也无需消化原始质粒, 该方案避免了很多干扰定点突变的因素, 能简便、高效地克隆基因单位点与多位点突变。对比而言, 该方案规避了重叠延伸 PCR 与滚环扩增法的主要缺陷, 是一种基因定点突变的良好解决方案。

关键词: 定点突变; 重叠延伸 PCR; 滚环扩增; Gibson 组装; 细胞周期蛋白依赖性激酶 4

Using multiple-fragment amplification combined with Gibson assembly to clone genes with site-directed mutations

CHENG Yingying, LI Guoqing, LIU Junyi, CHEN Wanyu, CHEN Huabo

College of Basic Medicine, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, Hubei, China

Abstract: In order to develop a simple and efficient site-directed mutagenesis solution, the Gibson assembly technique was used to clone the cyclin dependent kinase 4 gene with single or double site mutations, with the aim to simplify the overlap extension PCR. The gene fragments containing site

Received: December 9, 2021; **Accepted:** January 10, 2022; **Published online:** January 13, 2022

Supported by: The Project of Xiangyang Science and Technology Program in Medical and Health (2020YL37)

Corresponding author: CHEN Huabo. E-mail: chenhb@hbuas.edu.cn

基金项目: 襄阳市医疗卫生领域科技计划项目 (2020YL37)

mutations were amplified using a strategy similar to overlap extension PCR. Meanwhile, an empty plasmid was digested by double restriction endonucleases to generate a linearized vector with a short adaptor overlapping with the targeted gene fragments. The gene fragments were directly spliced with the linearized vector by Gibson assembly in an isothermal, single-reaction, creating a recombinant plasmid. After the recombinant plasmids were transformed into competent *Escherichia coli* DH5 α , several clones were screened from each group. Through restriction analysis and DNA sequencing, it was found that the randomly selected clones were 100% target mutants. Since there was neither tedious multiple-round PCR amplification nor frequent DNA extraction operation, and there was no need to digest the original plasmid, this protocol circumvents many factors that may interfere with the conventional site-directed mutagenesis. Hence, genes with single or multiple mutations could be cloned easily and efficiently. In summary, the major defects associated with overlap extension PCR and rolling circle amplification were circumvented in this protocol, making it a good solution for site-directed mutagenesis.

Keywords: site-directed mutagenesis; overlap extension PCR; rolling circle amplification; Gibson assembly; cyclin dependent kinase 4

基因定点突变是当前生物学和基础医学研究中的重要实验技术,是改造和优化基因的便捷方案,也是研究蛋白质结构和功能之间复杂关系的有力工具。常见的基因定点突变方法有重叠延伸 PCR (overlap extension PCR, OE-PCR)、滚环扩增法及盒式突变等^[1-2],每种方法各有利弊。传统的 OE-PCR 法最大缺陷是操作繁琐,两轮 PCR 扩增和频繁的 DNA 回收操作还会增加原始质粒污染的风险;其次是第二轮 PCR 受众多因素影响,有时反复调整反应条件亦不能达到满意的上、下游片段融合效果^[3-4]。很多人尝试对 OE-PCR 法加以改进,在其基础上提出了平行模板法、大引物法等改进方案^[5-7],但没有从根本上解决 OE-PCR 法的缺陷^[8]。滚环扩增法是当前普遍采用的定点突变方法,多种突变试剂盒都以滚环扩增法为基本原理,如 TaKaRa MutanBEST Kit^[9]、Stratagene Quik Change^[10]及全式金 Fast Mutagenesis System 等^[11]。滚环扩增法操作相对简单,但其缺陷在于对 7-10 kb 全长质粒进行 PCR 扩增往往并不顺利;此外,若不能对原始质粒模板进行彻

底消化则极易产生假阳性克隆,严重干扰目标克隆的筛选。因此,滚环扩增法强烈依赖 DNA 聚合酶与 *Dpn* I 内切酶的活性。随着试剂盒存储时间延长或使用次数增加,不易察觉的酶活降低势必严重影响突变效率。寻找简便、高效的定点突变方法一直是科研工作者的心愿。

Gibson 组装是由 Gibson 等于 2009 年提出的一种多 DNA 片段拼接技术。利用 T5 核酸外切酶、Phusion DNA 聚合酶和 *Taq* DNA 连接酶的协同作用,在同一试管中对含有重叠末端序列的 DNA 片段进行快速拼接^[12-13]。Gibson 组装摆脱了以往基因拼接方案中对限制性酶切位点的依赖,可实现 DNA 片段的无缝拼接。该技术目前主要应用于大片段或多片段组装,如病毒载体的改造和重构^[14-15],因为一般难以找到合适的限制性酶切位点,无法按传统酶切-连接法拼接。分析 Gibson 组装过程,会发现 3 个酶的协同作用近似于将 OE-PCR 融合和酶切-连接一次性完成。以 OE-PCR 为框架,先进行第一轮 PCR 扩增含突变位点的基因片段,后续第二轮 PCR 融合及酶切、连接步骤都由

Gibson 组装一次性完成, 从而实现基因定点突变。

细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4) 是调控细胞周期进程的重要蛋白, 其活性受 cyclin D1 调节^[16-17]。Cyclin D1/CDK4 复合物在调控细胞周期 G1/S 转换中发挥关键作用^[18]。为验证上述实验构思的可行性, 以 pcDNA3.1-*CDK4* 为基础克隆其单位点与双位点突变为例进行分析。本研究尝试利用 Gibson 组装技术对 OE-PCR 定点突变法进行简化, 以期提供一种简便、高效的基因定点突变方法。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

质粒载体 pcDNATM3.1/myc-His A (V800-20, 简称为 pcDNA3.1) 购自 Invitrogen 公司; 感受态大肠杆菌 DH5 α (CD201-01) 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 试剂

PyrobestTM DNA Polymerase (R005A) 购自 TaKaRa; *EcoR* I (R3101V)、*Hind* III (R3104V)、*Xho* I (R0146V)、NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix (E2621S) 购自 NEB; 2 \times EasyTaq Mix (AS111), 购自北京全式金生物技术有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒 (BSC02M1)、质粒

小量抽提试剂盒 (BSC01M1) 购自杭州博日科技有限公司。

1.3 引物设计及合成

引物采用 Primer Premier5.0 软件设计, 由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成, 经 PAGE 纯化, 引物序列见表 1。

1.4 突变克隆

取 pcDNA3.1 质粒 0.5 μ g 稀释到 17 μ L ddH₂O 中, 加 2 μ L 10 \times buffer, 0.5 μ L *Hind* III, 0.5 μ L *Xho* I, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。PCR (TaKaRa TP600) 扩增含突变位点的基因片段: 2 μ L 10 \times buffer, 1.6 μ L dNTPs, 0.2 μ L 正向引物, 0.2 μ L 反向引物, 0.2 μ L PyrobestTM DNA Polymerase, 0.1 μ L (10 ng) pcDNA3.1-*CDK4* 质粒模板, 补充 ddH₂O 至 20 μ L; PCR 运行程序: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环。酶切及 PCR 产物经电泳检测后回收至 30 μ L ddH₂O 中。双片段组装: 载体 1 μ L, 两个片段各 3 μ L, 2 \times Assembly Mix 7 μ L (图 1); 三片段组装: 载体 0.7 μ L, 3 个片段各 2 μ L, 2 \times Assembly Mix 6.7 μ L; 50 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。组装产物直接转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂布到氨苄青霉素-LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。

1.5 克隆筛选和序列分析

在过夜平板上随机挑取 10 个菌落, 置于 3 mL 氨苄青霉素-LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 5 h。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Abbreviation	Sequences (5'→3')	Size (bp)
T7 promoter	T7	TAATACGACTCACTATAGG	21
CDK4_463 <i>Hind</i> III_S	463H_S	AGTCAAGCTTGCTGACTTTG	20
CDK4_463 <i>Hind</i> III_A	463H_A	CAGCAAGCTTGACTGTTCCA	20
CDK4_629 <i>EcoR</i> I_S	629E_S	CGTCGAATTCCTCTCTCTG	20
CDK4_629 <i>EcoR</i> I_A	629E_A	AGAGAGGAATTCGACGAAAC	20
pcDNA3.1_1000A	1000A	TGTTCTGAAGGGCCCTCTAGAC	21

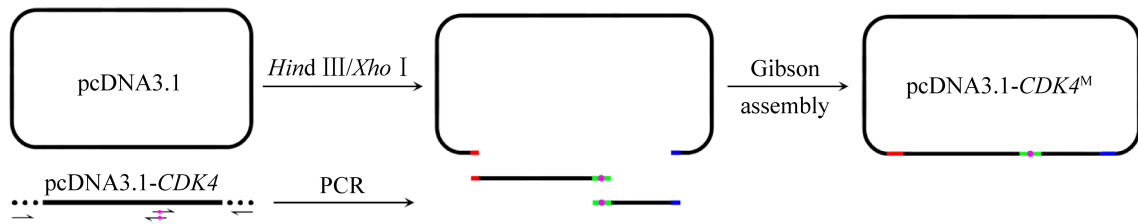


图 1 突变克隆过程示意图

Figure 1 Schematic diagram of mutation cloning. Vector was digested from empty pcDNA3.1 plasmid with *Hind* III/*Xho* I. DNA fragments containing the site mutation were amplified from wild type pcDNA3.1-*CDK4* plasmid with mutant primers. Color lines represent overlap sequences and color dots represent target site mutation. The half arrows indicated the primer matching positions.

直接以菌液为模板进行 PCR 检测：5 μ L 2 \times EasyTaq Mix, 0.1 μ L 正向引物, 0.1 μ L 反向引物, 0.8 μ L 菌液, 补充 ddH₂O 至 10 μ L, 运行程序：94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 28 个循环。培养至 8 h 后从菌液中少量提取质粒进行酶切检测：7.5 μ L 质粒 DNA, 2 μ L 10 \times 缓冲液, 0.5 μ L 内切酶, 补充 ddH₂O 至 20 μ L; 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。PCR 及酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。选取部分阳性质粒进行序列测定, DNA 测序由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成, 采用 DNAMAN4.0 软件进行序列比对与限制性酶切分析。

2 结果与分析

2.1 部分扩增与双片段连接法制作思路

为便于评估突变效率, 结合 pcDNA3.1-*CDK4* 质粒序列特征, 将 *CDK4* 基因 463 bp 附近 AAGCTG 突变为 AAGCTT, 引入一个 *Hind* III 位点 (记为 *CDK4*_{463H}); 将 629 bp 附近 GAAAGC 突变为 GAATTC, 引入一个 *Eco*R I 位点 (记为 *CDK4*_{629E})。分别选定单位点突变 *CDK4*_{629E} 和双位点突变 *CDK4*_{463H,629E} (记为 *CDK4*_{HE}) 为克隆目标。目标突变体中

新增的酶切位点可通过质粒酶切进行验证, 以此初步估计突变效率。突变引物的设计原则与 OE-PCR 法相同; 正向引物 T7 匹配载体 *Hind* III 位点上游, 使 F1 片段与线性载体有 41 bp 重叠序列; 反向引物 1 000A 匹配载体 *Xho* I 位点下游, 使 F3 片段与线性载体有 20 bp 重叠序列 (图 2)。

2.2 突变基因片段的扩增与线性载体的制备

为克隆 *CDK4*_{629E} 单位点突变, 需 PCR 扩增 F12 与 F3 两个片段; 为克隆 *CDK4*_{HE} 双位点突变, 需 PCR 扩增 F1、F2 与 F3 三个片段, 其中 F3 片段相同。以 pcDNA3.1-*CDK4* 质粒为模板, 以 T7/463H_A 为引物扩增 F1 片段 (558 bp), 以 463H_S/629E_A 为引物扩增 F2 片段 (182 bp), 以 T7/629E_A 为引物扩增 F12 片段 (726 bp), 以 629E_S/1000A 为引物扩增 F3 片段 (311 bp)。PCR 产物经电泳检测, 得到 4 个预期大小的 DNA 片段。pcDNA3.1 载体经 *Hind* III/*Xho* I 双酶切得到预期大小的线性分子 (图 3)。从凝胶中回收对应的 DNA 片段即可除去原始模板质粒。上述基因片段无需 OE-PCR 融合或酶切处理, 即可与线性载体组装成完整质粒。

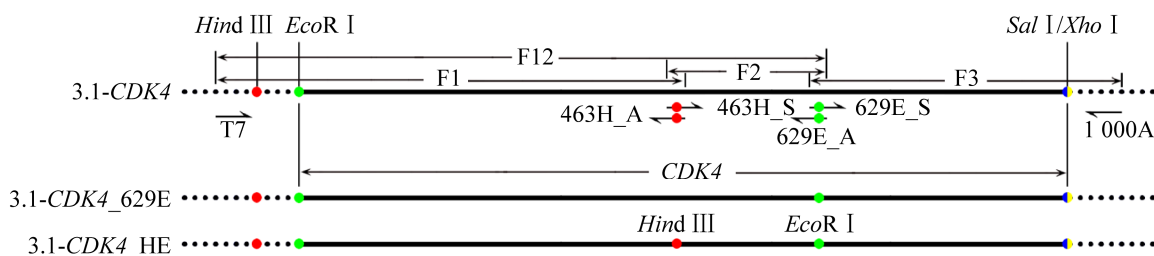


图2 质粒图谱及引物匹配位点

Figure 2 Plasmid maps and primer matching points. Wild type plasmid pcDNA3.1-*CDK4* contains a *Hind* III site and an *EcoR* I site in front of the *CDK4* gene. Mutant plasmid pcDNA3.1-*CDK4*_{629E} contains two *EcoR* I sites and pcDNA3.1-*CDK4*_{HE} contains two extra *Hind* III sites. The color dots indicate the restriction sites and the half arrows indicate the primer matching positions. 3.1-*CDK4* refers to pcDNA3.1-*CDK4* plasmid.

2.3 目标克隆的筛选与鉴定

组装产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α 后经氨苄青霉素选择平板筛选，双片段组装（即 *CDK4*_{629E}）得到近百个菌落（图 4A），与本实验室常规酶切-连接法得到的菌落数相近^[19]。从 A 平板上挑取 10 个菌落，先以 629E_S/1 000A 为引物进行 PCR 检测，结果显示 10 个克隆都是阳性（图 4B）。目标突变新增一个 *EcoR* I 位点，

故突变质粒可以 *EcoR* I 酶切出 634 bp 小片段，而原始野生型质粒无小片段产生。小提质粒酶切结果显示 10 个克隆都是阳性（图 4C），酶切检测与 PCR 检测结果一致。三片段组装（即 *CDK4*_{HE}）得到数十个菌落，略少于双片段组装（图 4D）。从 D 平板上挑取 10 个菌落适当培养后进行检测、鉴定。目标突变体中新增一个 *Hind* III 位点和一个 *EcoR* I 位点，故目标质粒可以 *Hind* III 或 *EcoR* I 酶切出小片段，而原始野生型质粒只能被这两种酶切割成线性分子，无小片段产生。小提质粒酶切结果显示 10 个克隆都是阳性（图 4E、F），且两种检测结果一致。上述结果提示这些克隆至少在目标位点处的突变都是成功的，阳性率均为 100%。

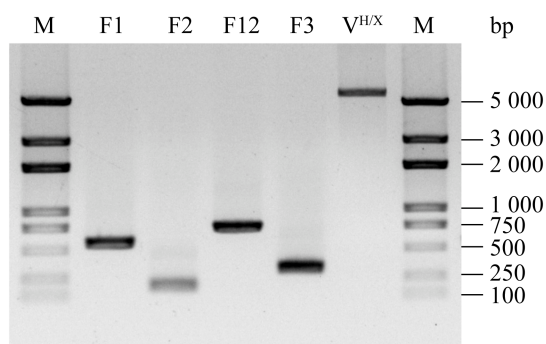


图3 制备含突变位点的基因片段与线性质粒

Figure 3 Preparation of gene fragments containing site mutation (s) and the linearized vector. Band F1 to F3 were PCR products with T7/463H_A, 463H_S/629E_A, T7/629E_A and 629E_S/1000A primers, respectively. The template was pcDNA3.1-*CDK4*. V^{HX} stands for linearized vector digested from pcDNA3.1 plasmid by *Hind* III/ *Xho* I, and M stands for DNA marker.

为检测目标质粒中是否存在非预期的随机突变，对其中 *CDK4*_{629E} 组#1-3 质粒和 *CDK4*_{HE} 组#11-13 质粒进行序列测定。从上游插入位点 *Hind* III 前 50 bp 准确测序至下游插入位点 *Xho* I 后 50 bp。序列比对发现#1-3 质粒仅存在预期单点突变，#11-13 质粒仅存在预期双点突变，6 个质粒均未发现非预期突变点（图 4G、H）。说明#1-3 与#11-13 克隆均为序列准确的目标突变体。

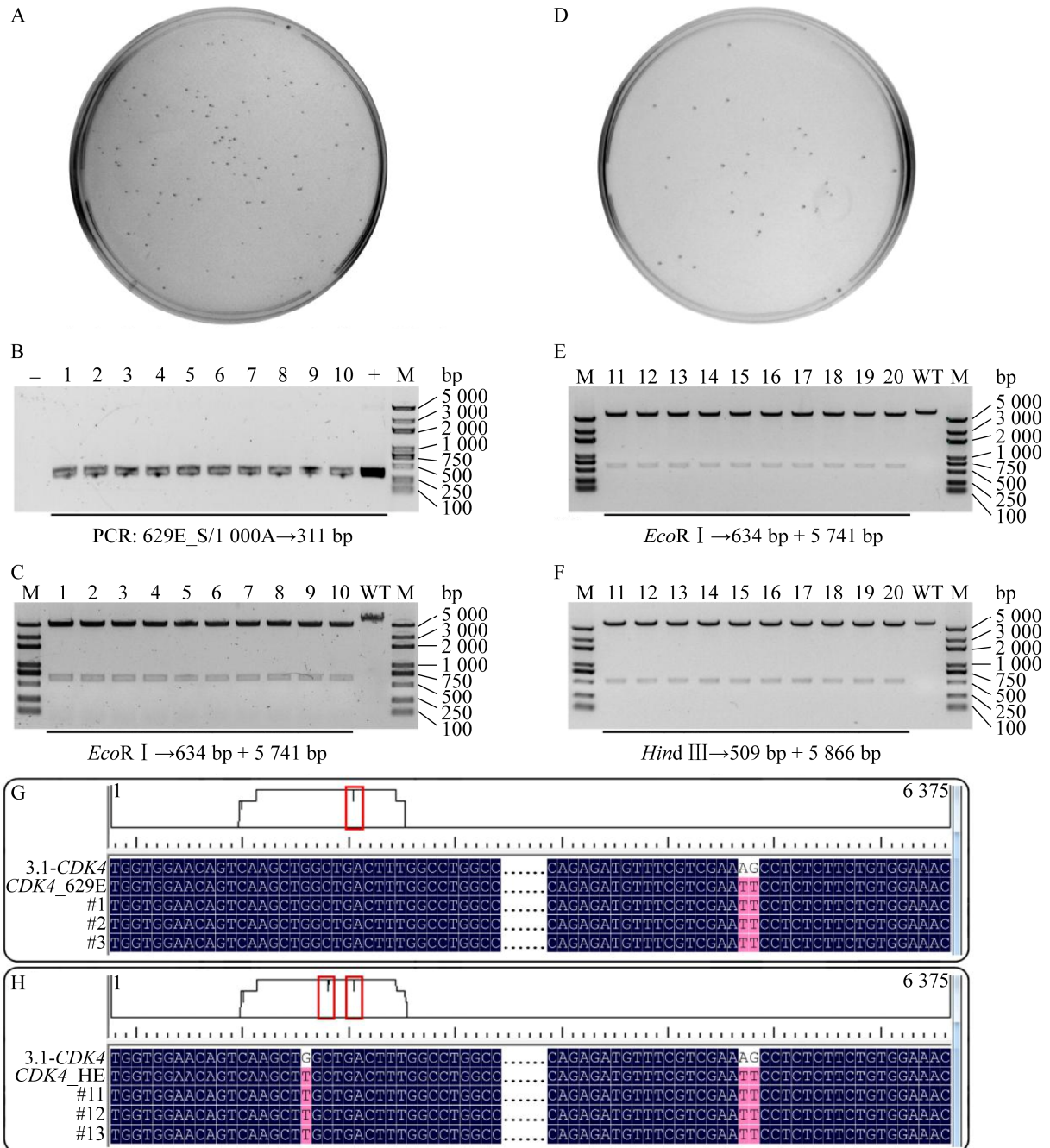


图 4 目标克隆的筛选结果

Figure 4 Detection of positive clones. (A) pcDNA3.1-*CDK4*_629E colonies on plate. Agarose gel electrophoresis showed detection result of PCR with 629E_S/1 000A primers (B) and restriction enzymatic digestion with *EcoR* I (C). (D) pcDNA3.1-*CDK4*_HE colonies on plate. Agarose gel electrophoresis showed detection result of the restriction enzymatic digestion with *EcoR* I (E) or *Hind* III (F). -/+ stand for negative/positive control, #1-20 stand for random selected colonies and M stands for DNA marker. Expected DNA sizes are shown at the bottom of each figure. (G/H) Multiple alignments between *CDK4*_629E #1-3/*CDK4*_HE #11-13 with wild type *CDK4* gene and their expected sequence. The red boxes show the position of the mismatched sequence on the plasmid. 3.1-*CDK4* refers to pcDNA3.1-*CDK4* plasmid.

3 讨论

操作是否简便选择实验方法的重要考虑因素,传统 OE-PCR 定点突变法由于操作繁琐饱受诟病。本研究方案较 OE-PCR 法减少了第二轮 PCR 扩增和随后的基因片段酶切处理,相对简便得多。载体虽需酶切处理,但一次实验的回收物可供多次使用。且本方案对载体的酶切不必局限于特定位点,只要保证线性载体两端与插入片段具有重叠序列即可。以本研究为例,作用于载体上游插入位点的内切酶可选择 *Hind* III、*Eco*R I 或识别这段序列的其他酶(图 2);下游插入位点同理。因此本方案中线性质粒载体具有广泛适用性,可结合实验室条件灵活选择内切酶组合。

制约定点突变效率的因素众多,其中原始质粒污染是较为普遍的干扰因素。就 OE-PCR 法而言,痕量原始质粒污染在第一轮 PCR 产物中,极容易在第二轮 PCR 时被扩增,这是

OE-PCR 法突变失败的重要原因。滚环扩增法则需彻底消化原始质粒,在模板质粒使用偏多或 *Dpn* I 酶活性降低时易导致原始质粒消化不彻底,严重干扰目标克隆的筛选。本方案不存在第二轮 PCR 扩增和对原始质粒的消化,因此极大降低了原始质粒污染的风险。

实验中,我们发现 Gibson 组装产物的转化菌落数略少于酶切-连接法,三片段组装尤甚,但菌落的阳性率较高。结合两者的拼接原理,不难分析其中的原因。II 型限制性内切酶作用产生的粘性末端为短回文序列,这种粘性末端在连接混合物中存在多种匹配可能。除了预期的载体-DNA 片段连接之外,还可能形成载体自连以及插入片段的多次串联(图 5A),后两者都可以形成转化菌落。Gibson 组装则依赖于一段相对长的重叠序列,同一种接头不能自身拼接,因此预期的载体-插入片段拼装是能形成转化克隆的唯一模式(图 5B)。基于以上分析,我们认为该方案在克隆基因多位点突变时优势更为明显。

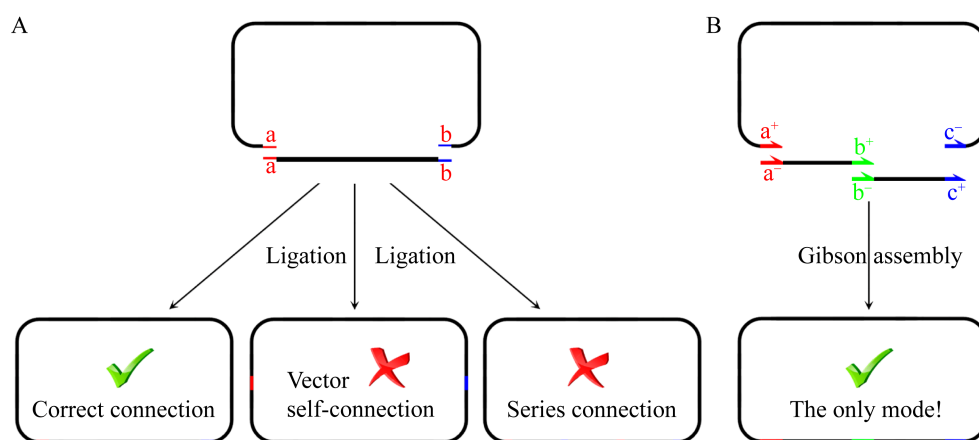


图 5 两种基因片段拼接方案的比较

Figure 5 Comparison of two protocols. (A) In the digestion-ligation scheme, the vector and the DNA fragment had the same sticky end with palindrome sequence. In addition to the expected connection, it may also form vector self-ligation or series connection of inserted fragment, thus interfering the screening of target clone. (B) In Gibson assembly, the directional overlapping sequences can be fused into a complete plasmid according to the only expected mode.

Gibson 组装依赖于 DNA 片段末端的重叠序列接头,重叠序列长度可能会影响拼接效率,具体关系尚缺乏深入研究。本研究中,克隆双位点突变时共有 4 个接头进行拼接,其重叠序列依次长 41、14、16、20 bp,均可成功拼接。在实际操作中,应通过引物设计尽量控制 DNA 接头重叠序列在 15–40 bp 之间以保证拼接效率。此外,组装过程中接头处存在 DNA 降解与重新合成,理论上存在随机突变的可能。因此除插入序列外,插入位点两侧附近序列亦需测序确认。实际上 Gibson 组装中采用的 Phusion DNA 聚合酶保真性较高,该酶由 *Pfu* DNA 聚合酶和双链 DNA 结合蛋白 Sso7d 融合而成,独特的功能性搭配使其具备极高的合成精度^[20-21]。本次实验中多个克隆的测序结果中均未在接头处发现插入、缺失或其他点突变。

综合分析,本方案规避了 OE-PCR 法与滚环扩增法的主要缺陷,操作简便且突变效率高,是一种基因定点突变的良好解决方案。

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] 赵松子, 沈向群. 用滚环扩增与大引物 PCR 法高效构建定点突变序列. *江西农业学报*, 2009, 21(8): 7-8, 11.
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).
- [3] 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 (in Chinese).
- [4] 梁明星, 马梦琪, 程盈盈, 等. 部分扩增结合双片段连接法克隆系列截短基因突变体. *生物技术进展*, 2021, 11(1): 111-117.
Liang MX, Ma MQ, Cheng YY, et al. Cloning of series truncated gene mutants by partial amplification combining with double fragment ligation. *Curr Biotechnol*, 2021, 11(1): 111-117 (in Chinese).
- [5] Urban A, Neukirchen S, Jaeger KE. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(11): 2227-2228.
- [6] Forloni M, Liu AY, Wajapeyee N. Megaprimer polymerase chain reaction (PCR)-based mutagenesis. *Cold Spring Harb Protoc*, 2019, 2019(6): pdb.prot097824.
- [7] 莫秋华, 徐湘民, 钟雄霖, 等. 一种改进的大引物 PCR 定点诱变方法. *中华医学遗传学杂志*, 2002(1): 68-71.
Mo QH, Xu XM, Zhong XL, et al. An improved PCR-based megaprimer method for site-directed mutagenesis. *Chin J Med Genet*, 2002(1): 68-71 (in Chinese).
- [8] 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.
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).
- [9] Kimura H, Nishikawa S, Koba H, et al. A rapid and sensitive method for detection of the T790M mutation of EGFR in plasma DNA. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 924: 171-174.
- [10] Qi RH, Otting G. Mutant T4 DNA polymerase for easy cloning and mutagenesis. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0211065.
- [11] Wang J, Zhou L, Shi H, et al. A single transcription factor promotes both yield and immunity in rice. *Science*, 2018, 361(6406): 1026-1028.
- [12] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 343-345.
- [13] Gibson DG. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods Enzymol*, 2011, 498: 349-361.
- [14] 邹小辉, 夏百成, 郭小娟, 等. 利用 Gibson DNA 组装技术构建人 5 型腺病毒感染性克隆. *病毒学报*, 2018, 34(3): 349-355.
Zou XH, Xia BC, Guo XJ, et al. Construction of an infectious clone of human adenovirus type 5 using the Gibson DNA assembly method. *Chin J Virol*, 2018, 34(3): 349-355 (in Chinese).
- [15] Li ZN, Jelkmann W, Sun PP, et al. Construction of

- full-length infectious cDNA clones of apple stem grooving virus using Gibson assembly method. *Virus Res*, 2020, 276: 197790.
- [16] McCann JL, Klein MM, Leland EM, et al. The DNA deaminase APOBEC3B interacts with the cell-cycle protein CDK4 and disrupts CDK4-mediated nuclear import of Cyclin D1. *J Biol Chem*, 2019, 294(32): 12099-12111.
- [17] Chen HB, Xu XW, Wang GP, et al. CDK4 protein is degraded by anaphase-promoting complex/cyclosome in mitosis and reaccumulates in early G1 phase to initiate a new cell cycle in HeLa cells. *J Biol Chem*, 2017, 292(24): 10131-10141.
- [18] Li Y, Xiao X, Chen HX, et al. Transcription factor NFYA promotes G1/S cell cycle transition and cell proliferation by transactivating cyclin D1 and CDK4 in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(8): 2446-2463.
- [19] 杨林, 王柳月, 李慧美, 等. 改进的多片段重叠延伸 PCR 制作基因多位点突变. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(8): 52-58.
- 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).
- [20] Vandenbroucke I, Van Marck H, Verhasselt P, et al. Minor variant detection in amplicons using 454 massive parallel pyrosequencing: experiences and considerations for successful applications. *BioTechniques*, 2011, 51(3): 167-177.
- [21] Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *PNAS*, 2011, 108(23): 9530-9535.

(本文责编 郝丽芳)