

TAT PTD - Tachypleisin 融合基因的重叠延伸 PCR 法合成

邱道寿¹, 刘晓津¹, 王军², 苏永全^{2*}

(1. 广东省农业科学院作物研究所, 广东省农作物遗传改良重点实验室, 广东广州 510640; 2. 厦门大学海洋与地球学院, 福建厦门 361005)

摘要 为探讨 HIV-Tat 蛋白转导域 (protein transduction domain, PTD) 对中国鲎抗菌肽 tachypleisin 的协同作用, 试验以经毕赤酵母密码子优化后的 tachypleisin 成熟肽 (54 aa) 加 TAT PTD (11 aa) 的 cDNA 序列为参考模板, 设计了 6 条单链寡核苷酸片段, 首尾引物的 5' 端分别引入 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点, 通过重叠延伸 PCR 方法成功合成了 TAT PTD + Tachypleisin 序列, 序列全长 219 bp, 为其后续功能与协同作用研究奠定了基础。

关键词 PTD TAT; 鲎素; 重叠延伸 PCR

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)04-01438-04

The Artificial Synthesis of TAT PTD and Tachypleisin Fusion Gene by Overlap Extension PCR

QIU Dao-shou et al (Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crops Genetics and Improvement of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510640)

Abstract In order to study the coefficient of the TAT PTD (the protein transduction domain in HIV-1 transactivator of transcription protein) to the antibacterial peptide tachypleisin from *Tachypleus tridentatus*, 6 sequence of oligonucleotides with *EcoR* I and *Xba* I in the ends of 5'-end of the first and last primers respectively were designed, based on the TAT PTD and tachypleisin mature peptide cDNA template, which was optimized according to the *Pichia pastoris* preferred codon. A optimized TAT PTD and tachypleisin fusion gene with 219 base pairs was artificially synthesized by overlap extension PCR, which laid a preliminary foundation for the following functional and coefficient studies.

Key words TAT protein transduction domain; Tachypleisin; Overlap extension PCR

鲎 (*Horseshoe crab*) 是一种进化地位特殊的海洋生物“活化石”, 自泥盆纪出现以来其形态结构未发生重大变化, 经过 4 亿多年的物竞天择, 鲎的蓝色血液中蕴藏着丰富的功能特殊的生物活性物质^[1]。鲎血液天然活性物质研究一直受到美日等国学者的高度重视^[2], 目前已从美洲鲎 (*Limulus polyphemus*) 和东方鲎 (*Tachypleus tridentatus*) 的血液中分离得到鲎素 (tachypleisins), 研究表明它是一种 2.3 kD 带阳离子的肽类^[3], 在鲎血细胞中定位于小颗粒中^[4], 具有强烈抗菌、抗病毒 (尤其抗艾滋病毒) 和抗癌活性^[1,3,5-11], 因此, 其在生物医药研究中倍受关注。近几年来, 我国学者张春义等开始探讨鲎素在农作物抗病上应用, 他们发现利用大肠杆菌和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达的鲎素基因产物对黄曲霉菌和稻瘟病菌具有很强的抗菌活性^[12-14], 并正在进行转鲎素基因的抗病水稻研究。这表明鲎素在农作物抗病领域也有广泛的应用前景。

TAT (transactivator of transcription) 为人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 的重要调节基因, 其编码的 TAT 蛋白是 HIV-1 重要的反式激活因子。在 TAT 功能区有一段被称为蛋白转导结构域 (protein transduction domain, PTD) 的区段, 其核心序列由 11 个氨基酸组成, 目前的诸多研究发现它具有细胞传导和亚细胞定位功能^[15-17], 能有效引导肽段或蛋白质通过细胞膜, 从细胞外向细胞内直接跨膜转运^[17-20], 并通过血脑屏障^[21], 而且具有转导速度快、效率高和广谱性等特点, 是

一个极好的蛋白质、多肽和基因的转运载体, 为蛋白传送及基因治疗提供了一个很好的工具^[22-23]。利用 PTD-蛋白质系统来提高目的蛋白穿透生物膜的方法既简单可行, 又不影响生物大分子的活性, 因此对蛋白功能研究、协同作用研究是一个极好的手段。

为探讨 TAT PTD 对 tachypleisin 是否具有协同作用, 能否提高 tachypleisin 在抗菌或抗肿瘤方面的功能, 笔者利用 tachypleisin 成熟肽 (NCBI 登录号为 AAA63538.1) 氨基酸序列, 在其 N 端加上 11 个氨基酸组成 TAT PTD 核心序列, 然后将经毕赤酵母偏好密码子优化后得到的 cDNA 序列为模板, 设计 6 条单链寡核苷酸片段, 通过重叠延伸 PCR 方法合成全长 219 bp 的 TAT PTD + Tachypleisin 序列。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和载体。 pMD18-T Vector, 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。菌株 *Escherichia coli* DH5 α 由实验室保存。

1.1.2 工具酶和试剂盒。 *Pfu* 酶、*Taq* 酶、dNTPs、10 \times PCR buffer、限制性内切酶、质粒提取、小量胶回收试剂盒和 DNA Marker 等分别购自大连 TaKaRa、北京鼎国 (Dingguo)、上海申能博彩 (SNBC)、Gen-view 等公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计。 根据 tachypleisin 基因成熟肽的氨基酸序列 (NCBI 登录号为 AAA63538.1), 在其 N 端加上 11 个氨基酸组成 TAT PTD 核心序列 (YGRKKRRQRRR), 然后经毕赤酵母偏好密码子优化后得到 cDNA 序列。依据该序列设计 6 条单链寡核苷酸片段 (超长引物), 由上海英骏 (Invitrogen) 公司合成。其中, 引物 P1 和 P6 的 5' 端分别设置含 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点的序列 (表 1)。

基金项目 广东省自然科学基金 (06025389); 福建省博士后项目。
作者简介 邱道寿 (1965-), 男, 江西遂川人, 副研究员, 博士, 从事作物病虫害防治与生物技术研究, E-mail: dsqiu@163.com。
* 通讯作者, 教授, 博士, 从事海水养殖病害防治、海水鱼类种质资源和遗传改良研究, E-mail: yqsu@jgmxian.xmn.edu.cn。
收稿日期 2012-12-18

表 1 设计的寡核苷酸引物序列

名称	序列(5' - 3')
P1	GGAAATCATGTACGGTAGAAAGAAGAGAAGACAAAGAAGAAA-GTGGTC
P2	CTTCTGTAACAAATACCTCTCTGTAACAAACTCTGAAACACCACTTCTTCTTCTTTG
P3	CAGAGGTATTTGTTACAGAAGATGTAGAGGTAAGAGAAACGAGGTTAGACAATACAG
P4	CTCTGGAATAGCTCTAAGCGTCTAACCTCTCTCTCTGATTGTCTAACCTCGTTT
P5	ACGTTTAGAGCTATTCCAGAGGAGACTTTTCTCACTAGACAAGACGAGGACCA
P6	GCTCTAGATTATTACTCTCTCGTCTGCTCTCTCTCTCTGTTGTCTAGT

注:P1 和 P6 的下划线部分分别为 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点。

每两条相邻的超长引物之间均有约 20 个碱基的序列反向互补,互为模板,通过 PCR 聚合酶延伸得到下一步的模板(图 1)。

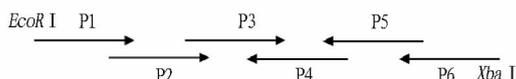


图 1 6 条寡核苷酸片段

1.2.2 融合基因的合成策略。先取中间两条单链的寡核苷酸引物 P3 和 P4 进行第 1 步 PCR 反应,得到目的片段后,进行琼脂糖凝胶电泳、回收。接下来的每步 PCR 循环都以上一步的 PCR 反应产物为模板,依次在两侧引入 2 条下一步的寡核苷酸引物,互为动态模板,最终实现目的基因的合成(图 2)。

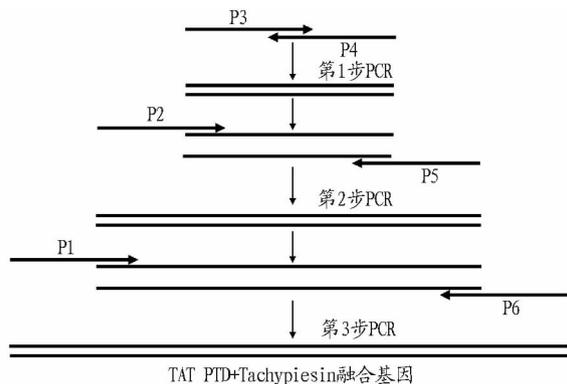


图 2 PCR 扩增策略

1.2.3 重叠延伸 PCR 反应。第 1 步 PCR 反应:反应体系为 *pfu* (SNBC) 或 *Taq* (Dingguo) 1 μ l, 10 \times PCR buffer (SNBC) 1 μ l, P3 和 P4 各 2 μ l, dNTPs (Gen-view) 2 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L, SNBC) 2 μ l, 加去离子水 10 μ l 至总体积为 20 μ l。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 24 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保持。产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,并按凝胶回收方法回收目的片段。

第 2 步 PCR 反应:反应体系为 *pfu* (SNBC) 或 *Taq* (Dingguo) 1 μ l, 10 \times PCR buffer (SNBC) 1 μ l, P2 和 P5 各 2 μ l, dNTPs (Gen-view) 2 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L, SNBC) 2 μ l, P3 和 P4 扩增回收产物 0.5 μ l, 加去离子水 9.5 μ l 至总体积为 20 μ l。PCR 反应条件、扩增产物检测、回收方法同第 1 步。

第 3 步 PCR 反应:反应体系为 *pfu* (SNBC) 或 *Taq* (Dingguo) 1 μ l, 10 \times PCR buffer (SNBC) 1 μ l, P1 和 P6 各 2 μ l, dNTPs (Gen-view) 2 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L, SNBC) 2 μ l, P2 和 P5 扩增回收产物 0.5 μ l, 加去离子水 9.5 μ l 至总体积为 20 μ l。PCR 反应条件、扩增产物检测、回收方法同第 1 步。

1.2.4 T 克隆载体的构建。将上述第 3 步 PCR 反应的回收产物与 pMD18 - T 载体连接,构建重组质粒 pMD18 - T - PTD - Tachypleisin, 连接的反应体系和反应条件根据公司说明书进行。然后将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,取 100 μ l 转化菌涂布于含 100 mg/L 氨苄西林、IPTG (20 mg/ml) 和 X - Gal (20 mg/ml) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 孵育 16 h, 分别挑 10 个白色单菌落扩大培养。采用质粒小提试剂盒提取质粒,经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,筛选阳性克隆。

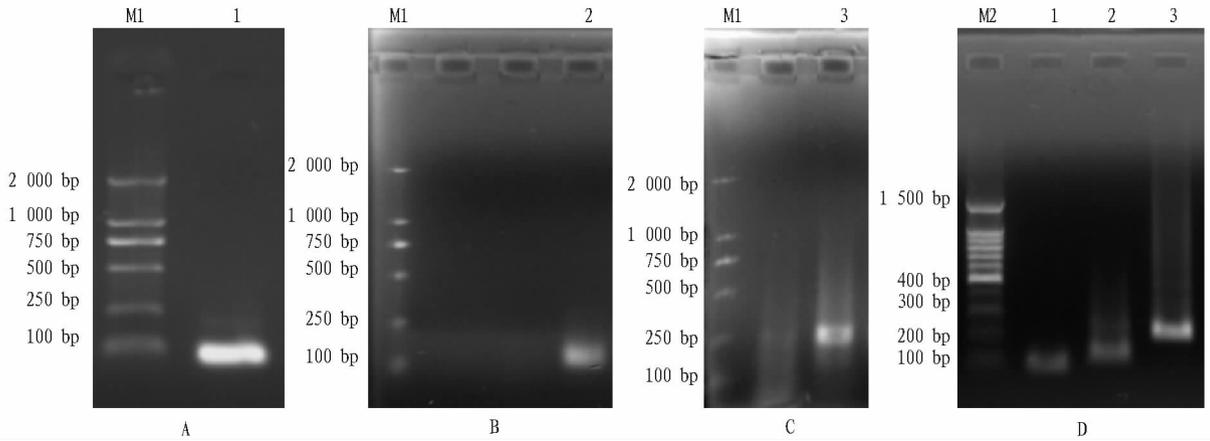
1.2.5 测序及序列分析。将鉴定正确的含目的片段的质粒交由上海英骏 (Invitrogen) 公司进行测序,并用 DNAMAN6.0 软件对测序结果进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 重叠延伸 PCR 产物 经第 1 步 PCR 扩增后,根据 P3 (57 bp) 和 P4 (55 bp) 引物序列,它们的 3' 端有 21 个碱基互补并互为模板,其扩增产物预期为 91 bp。琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,实际扩增条带与预期大小一致(图 3A)。接着以第 1 步获得的 91 bp 扩增产物为模板,以 P2 (56 bp) 和 P5 (52 bp) 为引物进行第 2 步 PCR 反应,由于 P2 和 P5 与模板分别有 21 和 20 bp 的互补,因此,其扩增产物预期应为 158 bp (56 - 21 + 91 + 52 - 20 = 158)。琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,实际扩增条带与预期大小一致(图 3B)。再以第 2 步获得的 158 bp 扩增产物为模板,以 P1 (51 bp) 和 P6 (50 bp) 为引物进行第 3 步 PCR 反应,鉴于 P1 和 P6 与模板均有 20 bp 的互补,因此,其扩增产物预期应为 219 bp (51 - 20 + 158 + 50 - 20 = 219)。琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,实际扩增条带与预期大小一致(图 3C)。如此,通过 3 步 PCR 反应,扩增片段得到逐级延伸,最终获得了全长的 TAT PTD + Tachypleisin 融合基因(图 3D)。

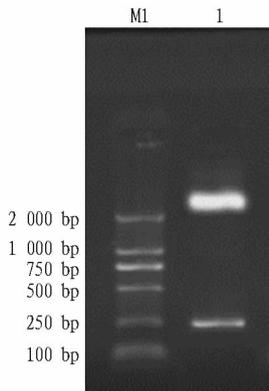
2.2 重组质粒 pMD18 - T - PTD - Tachypleisin 的酶切鉴定 随机挑取阳性克隆用 *EcoR* I 和 *Xba* I 进行双酶切后,用琼脂糖凝胶电泳检测,得到 2 条 2 600 和 220 bp 左右的条带(图 4),与预计大小完全吻合,证明融合基因 TAT PTD - Tachypleisin 成功插入了 pMD18 - T 载体。

2.3 重组质粒 pMD18 - T - PTD - Tachypleisin 的测序鉴定 随机挑取 4 个阳性克隆送上海 Invitrogen 公司进行测序,并用 DNAMAN6.0 软件对 4 个测序结果进行了比对分析,从结果可看出,测序编号为 E02 的克隆出现了 3 个碱基错误,分别是第 85 位的 A 错配为 G,第 88 位的 A 错配为 G,及第 139 位的 C 错配为 T,准确率为 98.63%;测序编号为 E05 的克隆只出现了 1 个碱基错配,即第 137 位的 G 错配为 A,准确率达 99.54%;测序编号为 H08 的克隆也出现了 3 个碱基错误,分别是第 62 位的 T 发生缺失,第 78 位增配了一



注:M1. DNA Marker DL2000;1、2 和 3. 第 1、2、3 步的 PCR 产物;M2. 100 bp DNA Ladder Marker。

图 3 3 步 PCR 反应的扩增产物



注:M1. DNA Marker DL2000;1. 重组质粒的 *EcoR* I 和 *Xba* I 的双酶切产物。

图 4 重组质粒的鉴定

original.txt	GGAAATTCATGTACGGGTAGAAAGAAGAGAAGACAAAGAAGAAGAAAAGTGGTGTITC	55
E02.txt	GGAAATTCATGTACGGGTAGAAAGAAGAGAAGACAAAGAAGAAGAAAAGTGGTGTITC	55
E03.txt	GGAAATTCATGTACGGGTAGAAAGAAGAGAAGACAAAGAAGAAGAAAAGTGGTGTITC	55
E05.txt	GGAAATTCATGTACGGGTAGAAAGAAGAGAAGACAAAGAAGAAGAAAAGTGGTGTITC	55
H08.txt	GGAAATTCATGTACGGGTAGAAAGAAGAGAAGACAAAGAAGAAGAAAAGTGGTGTITC	55
Consensus	ggaatttc atgtacgggtagaaagaagagacaagaagaagaagaagaagaagtgggtgtttc	
original.txt	AGAGTTTGTTACAGAGGTATTT.GTTACAGAGCTGTAGAGGTAAGAGAAACGAG	109
E02.txt	AGAGTTTGTTACAGAGGTATTT.GTTACAGAGGTTAGAGGTAAGAGAAACGAG	109
E03.txt	AGAGTTTGTTACAGAGGTATTT.GTTACAGAGCTGTAGAGGTAAGAGAAACGAG	109
E05.txt	AGAGTTTGTTACAGAGGTATTT.GTTACAGAGCTGTAGAGGTAAGAGAAACGAG	109
H08.txt	AGAGTTTGTTACAGAGGTATTT.GTTACAGAGCTGTAGAGGTAAGAGAAACGAG	109
Consensus	agagtt gttacagaggtat ttt gttacag ag tgtagaggt aagagaaacgag	
original.txt	GTTAGACAATACAGAGACAGAGGTTACGACGTTAGAGCTATTCAGAGGAGACTT	164
E02.txt	GTTAGACAATACAGAGACAGAGGTTACGATGTTAGAGCTATTCAGAGGAGACTT	164
E03.txt	GTTAGACAATACAGAGACAGAGGTTACGACGTTAGAGCTATTCAGAGGAGACTT	164
E05.txt	GTTAGACAATACAGAGACAGAGGTTACACGTTAGAGCTATTCAGAGGAGACTT	164
H08.txt	GTTAGACAATACAGAGACAGAGGTTACCA GTTAGAGCTATTCAGAGGAGACTT	164
Consensus	gttagacaatacagagacagaggttac a gttagagctat tccagaggagactt	
original.txt	TCTTCACTAGACAAGACGAGGACGAGGACGACGACGAGGAGTAATAATCTAGAGC	219
E02.txt	TCTTCACTAGACAAGACGAGGACGAGGACGACGACGAGGAGTAATAATCTAGAGC	219
E03.txt	TCTTCACTAGACAAGACGAGGACGAGGACGACGACGAGGAGTAATAATCTAGAGC	219
E05.txt	TCTTCACTAGACAAGACGAGGACGAGGACGACGACGAGGAGTAATAATCTAGAGC	219
H08.txt	TCTTCACTAGACAAGACGAGGACGAGGACGACGACGAGGAGTAATAATCTAGAGC	219
Consensus	tcttcactagacaagacgaggacgaggacgacgacgaggagtaataatctagagc	

图 5 合成基因与原始设计基因的多序列比对结果

种经济可行的方法^[24-29],同时也是通过密码子优化和基因修饰来提高蛋白产量的一种新思路和新途径^[30]。该研究中利用重叠延伸 PCR 合成经过毕赤酵母偏爱密码子优化后的

个 T,及第 137 位的 G 错配为 C,准确率为 98.63%;其中,有一个样品(E03)的准确率达 100%,其测序结果与经毕赤酵母密码子优化的原始序列完全一致,表明该试验通过重叠延伸 PCR 技术已成功获得了 TAT PTD + Tachypleisin 融合基因(表 2,图 5)。

表 2 4 个克隆测序结果统计

测序号	错误碱基数(增加、缺失或错配)	准确率//%
E02	3	98.63
E03	0	100
E05	1	99.54
H08	3	98.63

3 讨论

重叠延伸 PCR 是在无基因模板的情况下获得基因的一

TAT PTD + Tachypleisin 融合基因,通过对随机挑取的 4 个阳性克隆进行测序、分析,结果发现,其中有 2 个克隆出现了 3 个碱基错配、增配或缺失而发生的突变,1 个克隆错配突变,1

个克隆则完全正确,说明重叠延伸 PCR 技术在人工合成基因方面是一项有效、稳定的技术,通过该技术可获得高度精确的、甚至完全正确的目的基因。已有的研究表明,在无 DNA 模板的情况下,利用该技术完全可合成大于 500 bp 的目的基因^[28,31-33],甚至超过 1 kb 的目的基因^[27]。

当然,通过重叠延伸 PCR 方法在合成目的基因时,可能由于寡聚核苷酸序列偏长、*Taq* 酶或 *Pfu* 酶的精度等因素而不可避免地造成少量碱基的突变、增配或缺失。一般认为寡聚核苷酸序列越长(如超过 80 bp)、分步进行 PCR 的步骤越多(亦即待合成片段越长)发生错误的几率就越高。在制定基因合成策略时,可适当考虑降低寡聚核苷酸序列的长度,增加互补(或重叠)部分的长度,以降低这种错误发生;但这样做同时又相对会增加 PCR 的步骤,从而提高扩增序列错误发生几率。因此,在制定合成策略时,要综合考虑各方面的因素,才能取得满意的结果。当然,在合成较长的目的基因(如 > 500 bp)时,使用高保真 DNA 聚合酶,肯定可大幅减少突变率或缺失率。在文中,由于合成片段较短(219 bp),使用普通的 *Taq* 酶也能得到不错的结果。

参考文献

- [1] 洪水根,陈菲,李祺福,等. 中国鲎毒素抗菌活性[J]. 厦门大学学报:自然科学版,1998,37(6):915-920.
- [2] SEKIGUCHI K. Biology of Horseshoe Crab [M]. Tokyo: Science House Co., Ltd, 1988.
- [3] NAKAMURA T, FURUNAK H, MIYATA T, et al. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*) [J]. J Biol Chem, 1988, 263(32): 16709-16713.
- [4] SHIGENAGA T, TAKAYENOKI Y, KAWASAKI S, et al. Separation of large and small granules from horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*) hemocytes and characterization of their components [J]. J Biochem, 1993, 114(3): 307-316.
- [5] 李祺福,李长友,欧阳高亮,等. 中国鲎毒素对人胃癌 BGC-823 细胞形态和超微结构的影响[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2000,39(6): 837-843.
- [6] 李祺福,李长友,欧阳高亮,等. 中国鲎毒素对人胃癌 BGC-823 细胞增殖的抑制作用[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2001,40(1): 110-115.
- [7] 李祺福,欧阳高亮,刘庆榕,等. 中国鲎毒素诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞分化的观察[J]. 癌症,2002,21(5): 480-483.
- [8] 李祺福,欧阳高亮,鲍仕登,等. 中国鲎毒素对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用[J]. 中国海洋药物,2002,86(2): 22-25.
- [9] 洪水根,陈菲,李祺福,等. 中国鲎毒素 T-1 抗人幼粒白血病 HL-60 细胞活性研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版,1999,38(3): 448-451.
- [10] MASUDA M, NAKASHIMA H, UEDA T. A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Try5, 12, Lys7]-polyphemusin) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 189(2): 845-850.
- [11] TAMAMURA H, IKOMA R, NIWA M, et al. A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Try5, 12, Lys7]-polyphemusin), determined by nuclear magnetic resonance [J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1163: 209-216.
- [12] 张春义,范云六. 抗真菌毒素基因在大肠杆菌中的表达[J]. 农业生物技术学报,1998,6(3): 211-216.
- [13] 张春义,范云六. 在大肠杆菌中表达具有抗黄曲霉活性的毒素[J]. 高技术通讯,1999(1): 43-46.
- [14] 张春义,赵军,武长剑. 利用毕赤酵母表达抗真菌毒素基因[J]. 科学通报,1998,43(19): 2085-2089.
- [15] STEPHEN F, JOE S, YASOMIN D, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 664-668.
- [16] NAGAHARA H, VOCERO-AKBANI A M, SNYDER E L, et al. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells; TAT-p27kpi1 induces cell migration [J]. Nature Med, 1998, 4(12): 1449-1452.
- [17] VIVES E, BRODIN P, LEBLEU B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus [J]. J Biol Chem, 1997, 272: 16010-16017.
- [18] MAURICE G, PAUL M. Autonomous functional domain of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat Trans-activator protein [J]. Cell, 1988, 55: 1179-1188.
- [19] FRANKEL A D, PABO C O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus [J]. Cell, 1988, 55: 1189-1193.
- [20] GREEN M, LOEWENSTEIN P M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein [J]. Cell, 1988, 55: 1179-1188.
- [21] SCHWARZE S R, HO A, VOCERO-AKBANI A, et al. In vivo protein transduction; delivery of a biologically active protein into the mouse [J]. Science, 1999, 285(5433): 1569-1572.
- [22] SCHWARZE S R, DOWDY S F. In vivo protein transduction; intracellular delivery of biologically active protein, compounds and DNA [J]. Trends, Pharm, Science, 2000, 21: 45-48.
- [23] YOON J S, JUNG Y T, HONG S K, et al. Characteristics of HIV-Tat Protein Transduction Domain [J]. The Journal of Microbiology, 2004, 42(4): 328-335.
- [24] 陈波. 用重叠 PCR 合成植物甜蛋白 brazzein 基因 [J]. 生物技术, 2007, 17(4): 43-45.
- [25] CHERRY JESSICA, NIEUWENHUIJSEN BART W, KAFTAN EDWARD J, et al. A modified method for PCR-directed gene synthesis from large number of overlapping oligodeoxynucleotides [J]. J Bio Chem Biophys Methods, 2008, 70(6): 820-822.
- [26] FARAMARZ MEHRNEJAD, HOSSEIN NADERI-MANESH, BIJAN RANJBAR, et al. PCR-based gene synthesis, molecular cloning, high level expression, purification, and characterization of novel antimicrobial peptide, Brevin in-2R, in *Escherichia coli* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2008, 149(2): 109-118.
- [27] 冉丹霞,王荣荣,郝亚宁,等. 重叠 PCR 法合成轮状病毒抗原基因 VP4 [J]. 生物技术通报, 2009(8): 118-124.
- [28] 张继红,张靖,王俐,等. 重叠延伸 PCR 合成血管内皮生长因子基因 [J]. 生物技术, 2010, 20(5): 40-42.
- [29] LUO L N, WANG S, WANG Y J. Site-directed Mutagenesis Based on Overlap Extension PCR [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(4): 719-722.
- [30] GORDEEVA TATIANA L, BORSCHESKAYA LARISA N, SINEOKY SERGEI P. Improved PCR-based gene synthesis method and its application to the *Citrobacter freundii* phytase gene codon modification [J]. J Microbiol Methods, 2010, 81(2): 147-152.
- [31] 刘顺爱,浅野龙太郎,郭晶晶,等. 重叠延伸 PCR 法克隆重组复合干扰素 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(5): 479-483.
- [32] 谷铁军,张凤羽,段冶,等. SOE-PCR 法合成狂犬病毒单链抗体基因 Fv57 [J]. 生物技术, 2011, 21(3): 36-39.
- [33] 牛苏燕,蒋素华,武思,等. 甜蛋白 thaumatin 基因高效植物表达载体的构建 [J]. 江西农业学报, 2012, 24(1): 109-111.