

## QuickMutation™基因定点突变试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D0206S	QuickMutation™基因定点突变试剂盒	10次
D0206M	QuickMutation™基因定点突变试剂盒	50次

### 产品简介:

- 碧云天生产的QuickMutation™基因定点突变试剂盒(QuickMutation™ Site-Directed Mutagenesis Kit)可以快速完成质粒DNA的点突变(point mutation), 多个邻近密码子的突变, 单个或多个邻近密码子的缺失(deletion)或插入(insertion)突变。
- 基因定点突变常用于研究基因的转录调控、RNA或蛋白质的结构和功能, 以及用于质粒中部分序列的微调等。
- 本试剂盒利用了目前最常用的基因点突变技术, 只需通过基于PCR的突变质粒的生成, 和基于DpnI的模板质粒的消化, 转化培养以及后续的酶切或测序鉴定, 即可得到预期的突变质粒(参考图1)。DpnI消化仅需5分钟, 累计操作时间不足2小时即可完成基因的定点突变。
- 本试剂盒使用了最新的保真性更强, 灵敏度更高, 扩增速度可达2kb/min, 扩增长度可达12kb的BeyoFusion™ DNA Polymerase, 从而大大缩短了突变反应所需的时间, 进一步提高了基因定点突变的成功率。同时进一步严格验证了试剂盒中的DpnI, 确保能在5分钟内充分消化掉甲基化的模板质粒, 同时不会消化未甲基化的PCR产物。
- 参考图1, 使用本试剂盒时需要先设计长度通常为25-45个碱基互补的两个引物, 在引物中含有预期的突变位点。然后以待突变的质粒为模板, 用这两个引物进行PCR扩增反应。这样可以产生含有预期的突变位点的双链质粒, 但这个双链质粒中有两个nick位点。待突变的质粒通常来源于DH5α等dam<sup>+</sup>大肠杆菌, 在这些dam<sup>+</sup>细菌中质粒会被甲基化修饰, 而在体外通过PCR扩增得到的质粒不会被甲基化。这样用特异性识别甲基化位点的酶DpnI处理, 可以消化掉待突变的质粒模板, 而使通过PCR扩增出来的含有突变位点的质粒被选择性地保留下来。随后把DpnI处理过的产物转化感受态细菌后, 突变质粒中的两个nick位点可以被大肠杆菌修复, 得到的克隆就会含有预期的突变质粒了。
- 本试剂盒提供了DH5α甘油菌, 可用于感受态细菌的制备。
- 本试剂盒分别使用6kb和12kb的质粒进行了点突变测试, 实测突变率接近100%(参考图2)。实际进行点突变时, 可能会因为突变引物的设计、模板使用量、感受态效率等因素出现不同的突变率。

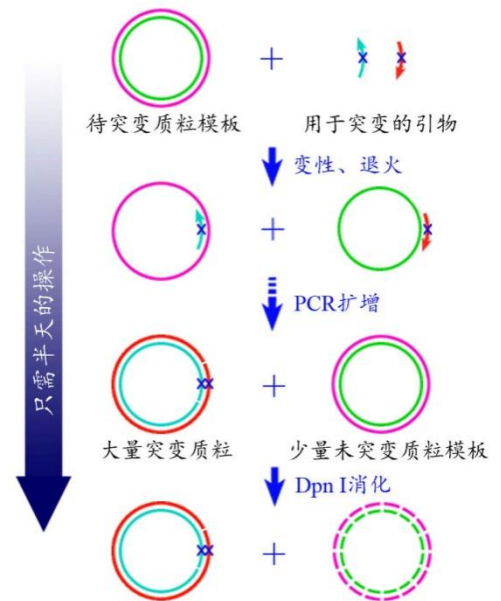


图1. 基因定点突变试剂盒原理图

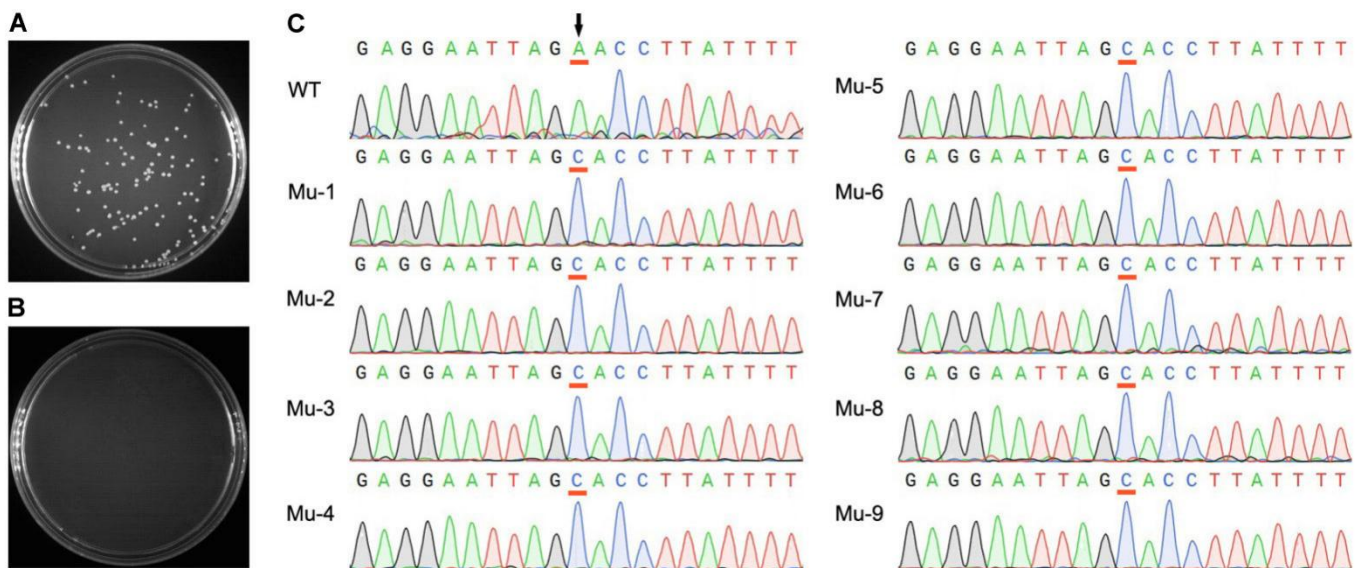


图2. 本试剂盒实际使用效果图。A. 使用本试剂盒进行点突变获得的LB平板照片。以一个6kb质粒为模板, 使用本试剂盒进

行PCR扩增以实现点突变，DpnI 37°C消化5min，取10μl产物转化100μl DH5α感受态，涂板后37°C培养过夜所获得的LB平板照片。B. 阴性对照LB平板照片。与A相比没有添加BeyoFusion™ DNA Polymerase，这样模板质粒完全被DpnI酶所消化，没有任何的假阳性克隆产生。C. 突变前后的测序图。突变前的测序结果(WT, wild type)和从图A中挑取9个克隆的测序结果(Mu, mutant)。箭头所示为拟突变的位点，红色下划线的为突变前和突变后的碱基。本次实验的突变率达到了100%。

➤ 本试剂盒小包装D0206S和中包装D0206M分别可以进行十次和五十次基因定点突变反应。

### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D0206S-1	BeyoFusion™ DNA Polymerase	10μl
D0206S-2	10X BeyoFusion™ Buffer (with Mg <sup>2+</sup> )	100μl
D0206S-3	dNTP Mix (2.5mM each)	100μl
D0206S-4	DpnI	10μl
D0206S-5	DH5α甘油菌	200μl
D0206S-6	Nuclease-Free Water	1ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0206M-1	BeyoFusion™ DNA Polymerase	50μl
D0206M-2	10X BeyoFusion™ Buffer (with Mg <sup>2+</sup> )	500μl
D0206M-3	dNTP Mix (2.5mM each)	500μl
D0206M-4	DpnI	50μl
D0206M-5	DH5α甘油菌	200μl
D0206M-6	Nuclease-Free Water	5ml
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20°C保存，一年有效。

### 注意事项：

- 需自行配制LB液体培养基和LB平板以用于细菌的培养。
- 需自行设计和合成用于基因定点突变的引物。需自备用于细菌转化的试剂。
- 使用本试剂盒前请先阅读后面的常见问题。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明：

#### 1. 引物设计：

用于特定基因突变的引物需要单独设计，请参考如下一些基本原则进行设计：

- 共需设计两条互补的引物。可以先集中设计一条，然后就可以得到互补的另一条引物。
- 引物的长度通常为25-45个碱基。
- 利用如下公式进行引物Tm值的估算，通常Tm值应该不低于78°C。

$$Tm = 81.5 + 0.41(\%GC) - (675/N) - \%mismatch$$

N表示引物所含碱基总数

%GC表示引物中GC碱基数占引物总碱基数的百分值，例如GC含量为50%，那么%GC就是50。

%mismatch表示引物中突变碱基数占引物总碱基数的百分值，例如错配率是2.5%，那么%mismatch就是2.5。

例一：对于模板序列5'-CCAATTCGAGGAATTAGAACCTATTTTGAACCTACTGAAGG-3'，其中带有灰色阴影的A为待突变位点，需要突变为C，设计正向突变引物如下：

5'-CCAATTCGAGGAATTAGCACCTATTTTGAACCTACTGAAGG-3'

$$Tm = 81.5 + 0.41 * (15/43) * 100 - (675/43) - (1/43) * 100 = 77.8$$

例二：对于模板序列5'-GGGAGCTCACCAAGCTGAAGAGCACCTACATTGA-3'，其中两个有灰色阴影的A为待突变位点，均需要突变为G，设计正向突变引物如下：

5'-GGGAGCTCACCAAGCTGAGGAGCACCTACATTGA-3'

$$Tm = 81.5 + 0.41 * (20/34) * 100 - (675/34) - (2/34) * 100 = 79.9$$

对于插入、缺失型的突变引物，推荐利用如下公式进行引物Tm值的估算：

$$Tm = 81.5 + 0.41(\%GC) - (675/N)$$

此公式中，N不包含插入或缺失的碱基。因为如果N包含插入或缺失的碱基，数字可能会比较大，从而影响计算结果。

d. 也可以利用如下公式进行引物设计。

引物中突变位点任何一侧都必需满足 $4*(GC碱基数) + 2*(AT碱基数) \geq 45$ 。但引物也不宜过长，否则通常会形成非常稳定的二级结构。通常把突变位点两侧的碱基数控制在15个左右，且使两侧按照上述计算得到的数值相近。

例如引物为AGTCAGCCAATTTCGAAGCAGTCGAATTGCCAAG，其中有灰色阴影的AAG为突变位点，则

左侧： $4*(GC碱基数) + 2*(AT碱基数) = 4*8 + 2*7 = 46 \geq 45$

右侧： $4*(GC碱基数) + 2*(AT碱基数) = 4*8 + 2*8 = 48 \geq 45$

e. 上述c和d这两种方法的计算标准有较明显的差异，但经过多次测试，两种方法都可以顺利获得预期的突变。

f. 在可能的情况下，尽量把引物的GC含量控制在40-60%。

g. 在可能的情况下，尽量使引物不要产生非常稳定的二级结构和引物二聚体。二级结构和二聚体可通过一些软件进行分析。

h. 最好使用经过PAGE纯化的引物或更高纯度的引物。

## 2. 引物的配制：

如果合成得到的一个引物A的量是20nmol，另外一个互补引物B的量是19nmol。在引物A中加入200 $\mu$ l水，配制成浓度为100 $\mu$ M，在引物B中加入190 $\mu$ l水也配制成浓度为100 $\mu$ M。吸取20 $\mu$ l 100 $\mu$ M引物A和20 $\mu$ l 100 $\mu$ M引物B到一新的离心管中，再加入160 $\mu$ l水，混匀后即可得到可以直接用于基因定点突变反应的引物(10 $\mu$ M each)。

## 3. 待突变模板质粒的选择：

选择GC含量在40-55%的待突变模板质粒，并且每一个50bp左右的局部GC含量最好也不超过70%。如果GC含量过高，请先把目的基因克隆到其它合适的载体上，再进行基因定点突变反应。另外目的基因GC含量最好也在40-55%的范围，并且每一个50bp左右的局部GC含量最好也不超过70%。如果目的基因GC含量过高，而突变位点不在高GC含量区域，可以先把该基因的不含高GC含量的一个区域克隆出来，进行定点突变，然后再把突变后的片段克隆回原基因中。如果必需使用高GC含量的质粒模板，或者有局部高GC含量的质粒模板，请另外使用专门用于高GC含量模板的PCR反应试剂。

必须使用从dam<sup>+</sup>的大肠杆菌(这类菌中质粒可以被甲基化)中抽提得到的质粒用于基因定点突变。常用的大部分大肠杆菌都是dam<sup>+</sup>的，包括DH5 $\alpha$ 、JM109等。

## 4. 基因定点突变反应：

a. 如下设置基因定点突变反应体系：

试剂	扩增片段小于6kb		扩增片段大于6kb	
	最终浓度	体积	最终浓度	体积
Nuclease-Free Water	-	? $\mu$ l	-	? $\mu$ l
10X BeyoFusion™ Buffer (with Mg <sup>2+</sup> )	1X	5 $\mu$ l	1X	5 $\mu$ l
引物混合物(10 $\mu$ M each)	0.4 $\mu$ M each	2 $\mu$ l	0.8 $\mu$ M each	4 $\mu$ l
dNTP mix (2.5mM each)	0.25mM each	5 $\mu$ l	0.5mM each	10 $\mu$ l
待突变模板质粒	200ng	? $\mu$ l	200ng	? $\mu$ l
BeyoFusion™ DNA Polymerase	1/50	1 $\mu$ l	1/50	1 $\mu$ l
总体积	-	50 $\mu$ l	-	50 $\mu$ l

按照上面的顺序依次加入各种试剂。在上述反应体系中，根据待突变模板质粒的量，计算出需加入的Nuclease-Free Water的量，使总体积为49 $\mu$ l。适当混匀后，加入1 $\mu$ l BeyoFusion™ DNA Polymerase，混匀。如果用的PCR仪没有热盖，在反应体系上加入一滴矿物油(mineral oil)以防止蒸发。

b. 按照如下参数设置PCR仪：

步骤	循环数	温度	<6kb时的时间	>6kb时的时间	说明
1	1	95°C	3min	3min	最初变性
2	20	95°C	30sec	30sec	变性
		55°C	30sec	30sec	退火
		68°C	30sec/kb	60sec/kb	延伸
3	1	68°C	10min	15min	延伸、补全
4	1	4°C	长时间保持	长时间保持	暂时存放

说明：上面表格中30sec/kb表示，如果待突变的质粒为6kb，那么68°C的延伸时间为3分钟。60sec/kb的含义相同。

## 5. DpnI消化：

PCR反应后，直接在PCR反应体系中加入1 $\mu$ l DpnI，混匀后37°C孵育5min。37°C孵育可以在PCR仪上进行，也可以在水浴锅中进行。DpnI消化完毕后可以用于转化，或者-20°C保存备用。

## 6. 转化、挑克隆鉴定：

感受态细菌的转化效率必需至少在10<sup>7</sup>以上，否则很难得到克隆。根据所使用的感受态细菌，加入尽量多的经过DpnI消化后的突变产物用于转化。通常每100 $\mu$ l感受态细菌中可以加入5-10 $\mu$ l经过DpnI消化后的突变产物。按照所使用的感受态细菌的操作方法进行操作，在涂板前通过离心浓缩的办法，把所有被转化后的细菌，全部涂布到含有适当抗生素的平板上，培养过夜。通常会得到100个以下的克隆。如果发现上千个克隆，那么通常是有什么地方出了问题。

对于得到的克隆，可以挑取3-5个克隆送样测序去测序，以确认得到的克隆是否是预期的突变克隆。通常大部分的是预期的突变克隆。但有时也可能会因为随机因素，会测序了3-5个克隆才得到一个预期的突变克隆。

## 常见问题:

- 转化后没有克隆或克隆数极少:
  - 感受态细菌效率不够高, 请检测一下感受态细胞的效率, 确保转化效率在10<sup>7</sup>以上, 当然高一些更好。
  - 把DpnI消化后的产物用常规的乙醇沉淀方法进行沉淀, 然后溶解在较小的体积中。这样就可以把所有的产物全部用于转化。
  - 优化基因定点突变中的PCR参数。可以把最初的95°C变性时间延长为5min, 循环中95°C变性的时间延长至1min, 把循环中的68°C的延伸时间改为1min/kb 至2min/kb, 退火可以改为60-55°C或65-55°C等的touch down, 退火时间也可以适当延长。
  - 引物设计有问题。通过突变反应中的PCR没有很好地扩增出预期的突变质粒。
  - 如果使用矿物油(mineral oil), 在转化时如果把矿物油带入感受态菌, 会严重影响转化效率。
- 有克隆, 但没有或很难检测到预期的突变克隆:
  - DpnI消化效果不佳。一种可能是加入DpnI后, 由于该酶在甘油中, 会迅速下沉, 如果没有混匀就会严重影响DpnI的消化作用。另一种可能是DpnI由于保存不当或保存时间过长等原因导致活性下降, 这时可以适当延长消化的时间至1-2小时。
  - 使用的待突变的模板质粒质量过多, 导致DpnI消化时不完全。我们这里推荐的模板质粒用量0.5μg, 已经是模板质粒用量的上限, 不能再使用更多的模板质粒了。
  - 尽量避免多次反复冻融dNTP。可以把dNTP适当分装后再使用。
- 有突变克隆, 但突变位点不是预期的位点:
  - 引物设计不佳, 并且PCR反应中退火温度过低, 导致引物退火到错误的地方。
  - 引物质量较差, 没有经过PAGE纯化。这样引物中通常会含有比设计的引物要短的特异性较差的引物, 容易导致非预期的突变。

## 使用本产品的文献:

- Song ZB, Bao YL, Zhang Y, Mi XG, Wu P, Wu Y, Yu CL, Sun Y, Zheng LH, Huang YX, Liu B, Li YX. Testes-specific protease 50 (TSP50) promotes cell proliferation through the activation of the nuclear factor κB (NF-κB) signalling pathway. *Biochem J*. 2011 Jun 1;436(2):457-67.
- Li YY, Bao YL, Song ZB, Sun LG, Wu P, Zhang Y, Fan C, Huang YX, Wu Y, Yu CL, Sun Y, Zheng LH, Wang GN, Li YX. The threonine protease activity of testes-specific protease 50 (TSP50) is essential for its function in cell proliferation. *PLoS One*. 2012;7(5):e35030.
- Guo CJ, Yang LS, Zhang YF, Wu YY, Weng SP, Yu XQ, He JG. A novel viral SOCS from infectious spleen and kidney necrosis virus: interacts with Jak1 and inhibits IFN-α-induced Stat1/3 activation. *PLoS One*. 2012;7(7):e41092.
- Fei X, Qi M, Wu B, Song Y, Wang Y, Li T. MicroRNA-195-5p suppresses glucose uptake and proliferation of human bladder cancer T24 cells by regulating GLUT3 expression. *FEBS Lett*. 2012 Feb 17;586(4):392-7.
- Qin Y, Fang Z, Pan F, Zhao Y, Li H, Wu H, Meng X. Significance of Tyr302, His235 and Asp194 in the α-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett*. 2012 May;34(5):895-9.
- Li F, Jiang Z, Wang K, Guo J, Hu G, Sun L, Wang T, Tang X, He L, Yao J, Wen D, Qin X, Zhang L. Transactivation of the human NME5 gene by Sp1 in pancreatic cancer cells. *Gene*. 2012 Jul 25;503(2):200-7.
- Liu Y, Zhang C, Chen J, Guo L, Li X, Li W, Yu Z, Deng J, Zhang P, Zhang K, Zhang L. Arabidopsis heat shock factor HsfA1a directly senses heat stress, pH changes, and hydrogen peroxide via the engagement of redox state. *Plant Physiol Biochem*. 2013 Mar;64:92-8.
- Li X, Lu Y, Chen Y, Lu W, Xie X. MicroRNA profile of paclitaxel-resistant serous ovarian carcinoma based on formalin-fixed paraffin-embedded samples. *BMC Cancer*. 2013 Apr 30;13:216.
- Yang L, Shi LP, Chen HJ, Tong XK, Wang GF, Zhang YM, Wang WL, Feng CL, He PL, Zhu FH, Hao YH, Wang BJ, Yang DL, Tang W, Nan FJ, Zuo JP. Isothiafludine, a novel non-nucleoside compound, inhibits hepatitis B virus replication through blocking pregenomic RNA encapsidation. *Acta Pharmacol Sin*. 2014 Mar;35(3):410-8.
- Wang G, Sai K, Gong F, Yang Q, Chen F, Lin J. Mutation of isocitrate dehydrogenase 1 induces glioma cell proliferation via nuclear factor-κB activation in a hypoxia-inducible factor 1-α dependent manner. *Mol Med Rep*. 2014 May;9(5):1799-805.
- Zhou ZJ, Dai Z, Zhou SL, Hu ZQ, Chen Q, Zhao YM, Shi YH, Gao Q, Wu WZ, Qiu SJ, Zhou J, Fan J. HNRNPAB induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma by transcriptionally activating SNAIL. *Cancer Res*. 2014 May 15;74(10):2750-62.
- Huang L, Hu X, Zhou M, Yang Y, Qiao J, Wang D, Yu J, Cui Z, Zhang Z, Zhang XE, Wei H. Rapid detection of New Delhi metallo-β-lactamase gene and variants coding for carbapenemases with different activities by use of a PCR-based in vitro protein expression method. *J Clin Microbiol*. 2014 Jun;52(6):1947-53.
- Peng Y, Guo JJ, Liu YM, Wu XL. MicroRNA-34A inhibits the growth, invasion and metastasis of gastric cancer by targeting PDGFR and MET expression. *Biosci Rep*. 2014 Jun 25;34(3).
- Guan Y, Guo L, Yang E, Liao Y, Liu L, Che Y, Zhang Y, Wang L, Wang J, Li Q. HSV-1 nucleocapsid egress mediated by UL31 in association with UL34 is impeded by cellular transmembrane protein 140. *Virology*. 2014 Sep;464-465:1-10.
- Zhao H, Li H, Du W, Zhang D, Ge J, Xue F, Zhou Z, Yang R. Reduced MIR130A is involved in primary immune thrombocytopenia via targeting TGFβ1 and IL18. *Br J Haematol*. 2014 Sep;166(5):767-73.
- Zhang XW, Zhang BY, Wang SW, Gong DJ, Han L, Xu ZY, Liu XH. Twist-related protein 1 negatively regulated osteoblastic transdifferentiation of human aortic valve interstitial cells by directly inhibiting runt-related transcription factor 2. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Oct;148(4):1700-1708.e1.
- Liu Y, Zhou J, Pan JA, Mabilia P, Guo D. A novel approach to block HIV-1 coreceptor CXCR4 in non-toxic manner. *Mol Biotechnol*. 2014 Oct;56(10):890-902.
- Jiang W, Min J, Sui X, Qian Y, Liu Y, Liu Z, Zhou H, Li X, Gong Y. MicroRNA-26a-5p and microRNA-23b-3p up-regulate peroxiredoxin III in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2014 Jun; 25:1-12.
- Guo X, Qi Y, Huang Y, Liu Z, Ma Y, Shao Y, Jiang S, Sun Z, Ruan Q. Human cytomegalovirus miR-US33-5p inhibits viral DNA synthesis and viral replication by down-regulating expression of the host Syntaxin3. *FEBS Lett*. 2015 Feb 13;589(4):440-6.
- Zhao F, Wang M, Li S, Bai X, Bi H, Liu Y, Ao X, Jia Z, Wu H. DACH1 inhibits SNAIL-mediated epithelial-mesenchymal transition and represses breast carcinoma metastasis. *Oncogenesis*. 2015 Mar 16; 4:e143.
- Yang S, Fan R, Shi Z, Ji K, Zhang J, Wang H, Herrid M, Zhang Q, Yao J, Smith GW, Dong C. Identification of a novel microRNA important for melanogenesis in alpaca (*Vicugna pacos*). *J Anim Sci*. 2015 Apr; 93(4):1622-31.
- Wei JY, Lu QN, Li WM, He W. Intracellular translocation of histone deacetylase 5 regulates neuronal cell apoptosis. *Brain Res*. 2015 Apr 16; 1604:15-24.
- Zhao Y, Wang P, Meng J, Ji Y, Xu D, Chen T, Fan R, Yu X, Yao J, Dong C. MicroRNA-27a-3p Inhibits Melanogenesis in Mouse Skin Melanocytes by Targeting Wnt3a. *Int J Mol Sci*. 2015 May 14;16(5):10921-33.
- Wei JY, Li WM, Zhou LL, Lu QN, He W. Melatonin induces apoptosis of colorectal cancer cells through HDAC4 nuclear import mediated by

- CaMKII inactivation. *J Pineal Res.* 2015 May;58(4):429-38.
25. Li X, Pan Q, Wan X, Mao Y, Lu W, Xie X, Cheng X. Methylation-associated Has-miR-9 deregulation in paclitaxel-resistant epithelial ovarian carcinoma. *BMC Cancer.* 2015 Jul 8;15:509.
  26. Wang XL, Zhang T, Wang J, Zhang DB, Zhao F, Lin XW, Wang Z, Shi P, Pang XN. MiR-378b Promotes Differentiation of Keratinocytes through NKX3.1. *PLoS One.* 2015 Aug 27;10(8):e0136049.
  27. Jiang S, Qi Y, He R, Huang Y, Liu Z, Ma Y, Guo X, Shao Y, Sun Z, Ruan Q. Human cytomegalovirus microRNA miR-US25-1-5p inhibits viral replication by targeting multiple cellular genes during infection. *Gene.* 2015 Oct 1;570(1):108-14.
  28. Guo X, Huang Y, Qi Y, Liu Z, Ma Y, Shao Y, Jiang S, Sun Z, Ruan Q. Human cytomegalovirus miR-UL6-5p inhibits apoptosis via downregulation of adenine nucleotide translocator 3 in cultured cells. *Arch Virol.* 2015 Oct;160(10):2483-90.
  29. Xiao Y, Yao Y, Jiang H, Lu C, Zeng S, Yu L. Regulation of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A3 activity by protein phosphorylation. *Biopharm Drug Dispos.* 2015 Nov;36(8):520-8.
  30. Li C, Wang Y, Lu S, Zhang Z, Meng H, Liang L, Zhang Y, Song B. MiR 34a inhibits colon cancer proliferation and metastasis by inhibiting platelet derived growth factor receptor  $\alpha$ . *Mol Med Rep.* 2015 Nov; 12(5):7072-8.
  31. Zhou Y, Wang M, Wu J, Jie Z, Chang S, Shuang T. The clinicopathological significance of miR-1307 in chemotherapy resistant epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2015 Apr 9;8:23.
  32. Cheng S, Liang X, Wang Y, Jiang Z, Liu Y, Hou W, Li S, Zhang J, Wang Z. The circadian Clock gene regulates acrosin activity of sperm through serine protease inhibitor A3K. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016 Jan;241(2):205-15.
  33. Yang D, Yan R, Zhang X, Zhu Z, Wang C, Liang C, Zhang X. Deregulation of MicroRNA-375 inhibits cancer proliferation migration and chemosensitivity in pancreatic cancer through the association of HOXB3. *Am J Transl Res.* 2016 Mar 15;8(3):1551-9.
  34. Mi S, Qin XW, Lin YF, He J, Chen NN, Liu C, Weng SP, He JG, Guo CJ. Budding of Tiger Frog Virus (an Iridovirus) from HepG2 Cells via Three Ways Recruits the ESCRT Pathway. *Sci Rep.* 2016 May 26;6:26581.
  35. Li Z, Yin H, Hao S, Wang L, Gao J, Tan X, Yang Z. miR-200 family promotes podocyte differentiation through repression of RSAD2. *Sci Rep.* 2016 Jun 2;6:27105.
  36. Shao Y, Qi Y, Huang Y, Liu Z, Ma Y, Guo X, Jiang S, Sun Z, Ruan Q. Human cytomegalovirus-encoded miR-US4-1 promotes cell apoptosis and benefits discharge of infectious virus particles by targeting QARS. *J Biosci.* 2016 Jun;41(2):183-92.
  37. Xu Y, Liu F, Liu J, Wang D, Yan Y, Ji S, Zan J, Zhou J. The co-chaperone Cdc37 regulates the rabies virus phosphoprotein stability by targeting to Hsp90AA1 machinery. *Sci Rep.* 2016 Jun 2;6:27123.
  38. Gao Z, Zhang H, Hu F, Yang L, Yang X, Zhu Y, Sy MS, Li C. Glycan-deficient PrP stimulates VEGFR2 signaling via glycosaminoglycan. *Cell Signal.* 2016 Jun;28(6):652-62.
  39. Chen Q, Zhang J, Zhang F, Guo H, Fang Q. Identification and characterization of two cleavage fragments from the Aquareovirus nonstructural protein NS80. *Virol Sin.* 2016 Aug;31(4):314-23.
  40. Fang T, Wu Q, Zhou L, Mu S, Fu Q. miR-106b-5p and miR-17-5p suppress osteogenic differentiation by targeting Smad5 and inhibit bone formation. *Exp Cell Res.* 2016 Sep 10;347(1):74-82.
  41. Huang Y, Li Y, Wang FF, Lv W, Xie X, Cheng X. Over-Expressed miR-224 Promotes the Progression of Cervical Cancer via Targeting RASSF8. *PLoS One.* 2016 Sep 14;11(9):e0162378.
  42. Yang Y, Wu N, Tian S, Li F, Hu H, Chen P, Cai X, Xu L, Zhang J, Chen Z, Ge J, Yu K, Zhuang J. Lithium promotes DNA stability and survival of ischemic retinal neurocytes by upregulating DNA ligase IV. *Cell Death Dis.* 2016 Nov 17;7(11):e2473.
  43. Zhang YX, Yan YF, Liu YM, Li YJ, Zhang HH, Pang M, Hu JX, Zhao W, Xie N, Zhou L, Wang PY, Xie SY. Smad3-related miRNAs regulated oncogenic TRIB2 promoter activity to effectively suppress lung adenocarcinoma growth. *Cell Death Dis.* 2016 Dec 22;7(12):e2528.
  44. Zhang J, Liu Y, Zhu Z, Yang S, Ji K, Hu S, Liu X, Yao J, Fan R, Dong C. Role of microRNA508-3p in melanogenesis by targeting microphthalmia transcription factor in melanocytes of alpaca. *Animal.* 2017 Feb; 11(2):236-243.
  45. Zhang Y, Yao L, Xu X, Han H, Li P, Zou D, Li X, Zheng L, Cheng L, Shen Y, Wang X, Wu X, Xu J, Song B, Xu S, Zhang H, Cao H. Enterovirus 71 inhibits cytoplasmic stress granule formation during the late stage of infection. *Virus Res.* 2018 Aug 15;255:55-67.
  46. Jiang YL, Zhao ZY, Li BR, Yang F, Li J, Jin XW, Wang H, Yu ED, Sun SH, Ning SB. The altered activity of P53 signaling pathway by STK11 gene mutations and its cancer phenotype in Peutz-Jeghers syndrome. *BMC Med Genet.* 2018 Aug 9;19(1):141.
  47. Li P, Huang Z, Wang J, Chen W, Huang J. Ubiquitin-specific peptidase 28 enhances STAT3 signaling and promotes cell growth in non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther.* 2019 Feb 26;12:1603-1611.
  48. Li W, Fang J, Shen J, Liu X, Hou J, Zhu Y, Ma X. MicroRNA-135a-5p promotes neuronal differentiation of pluripotent embryonic carcinoma cells by repressing Sox6/CD44 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Feb 5;509(2):603-610.
  49. Huang Z, Li Q, Luo K, Zhang Q, Geng J, Zhou X, Xu Y, Qian M, Zhang JA, Ji L, Wu J. miR-340-FHL2 axis inhibits cell growth and metastasis in ovarian cancer. *Cell Death Dis.* 2019 May 8;10(5):372.
  50. Li X, Xiao J, Fan Y, Yang K, Li K, Wang X, Lu Y, Zhou Y. miR-29 family regulates the puberty onset mediated by a novel Gnrh1 transcription factor TBX21. *J Endocrinol.* 2019 Sep 1;242(3):185-197.
  51. Zhu XX, Li JH, Cai JP, Hou X, Huang CS, Huang XT, Wang JQ, Li SJ, Xu QC, Yin XY. EYA4 inhibits hepatocellular carcinoma by repressing MYCBP by dephosphorylating  $\beta$ -catenin at Ser552. *Cancer Sci.* 2019 Oct;110(10):3110-3121.
  52. Tian N, Shangguan W, Zhou Z, Yao Y, Fan C, Cai L. Lin28b is involved in curcumin-reversed paclitaxel chemoresistance and associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Cancer.* 2019 Oct 15;10(24):6074-6087.
  53. Zong H, Zhou H, Xiang Y, Wu G. miR-125b suppresses cellular proliferation by targeting c-FLIP in gallbladder carcinoma. *Oncol Lett.* 2019 Dec;18(6):6822-6828.
  54. Rong ZH, Chang NB, Yao QP, Li T, Zhu XL, Cao Y, Jiang MJ, Cheng YS, Jiang R, Jiang J. Suppression of circDbp1 Alleviates Intimal Hyperplasia in Rat Carotid Artery by Targeting miR-145-3p/Neuropilin-1. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019 Dec 6;18:999-1008.
  55. Zhu B, Sun X, Nie X, Liang P, Gao X. MicroRNA-998-3p contributes to Cry1Ac-resistance by targeting ABCC2 in lepidopteran insects. *Insect Biochem Mol Biol.* 2020 Feb;117:103283.
  56. Niu K, Fang H, Chen Z, Zhu Y, Tan Q, Wei D, Li Y, Balajee AS, Zhao Y. USP33 deubiquitinates PRKN/parkin and antagonizes its role in mitophagy. *Autophagy.* 2020 Apr;16(4):724-734.
  57. Yu Liang, Chun-Dong Zhang, Cheng Zhang, Dong-Qiu Dai. DLX6-AS1/miR-204-5p/OCT1 positive feedback loop promotes tumor progression and epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2020 Mar;23(2):212-227.
  58. Niu K, Fang H, Chen Z, Zhu Y, Tan Q, Wei D, Li Y, Balajee AS, Zhao Y. USP33 deubiquitinates PRKN/parkin and antagonizes its role in mitophagy. *Autophagy.* 2020 Apr;16(4):724-734.
  59. Yuhang Sun, Guiying Zhai, Rui Li, Weinan Zhou, Yumao Li, Zhiping Cao, Ning Wang, Hui Li, Yuxiang Wang. RXR $\alpha$  Positively Regulates Expression of the Chicken PLIN1 Gene in a PPAR $\gamma$ -Independent Manner and Promotes Adipogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2020 May 14;8:349.
  60. Min Li, Ling-Yan Jiang, Qin Liu, Yuan-Hang Wu, Guo-Dao Liu, Yin-Hua Chen, Li-Juan Luo. A method combining TA cloning and fluorescence screening for rapid acquisition of transgenic seeds. *Biotechniques.* 2020 May;68(5):251-256.
  61. Zhi-Fei Liu, Jian-Fei Ji, Xiao-Feng Jiang, Tong Shao, Dong-Dong Fan, Xin-Hang Jiang, Ai-Fu Lin, Li-Xin Xiang, Jian-Zhong Shao. Characterization of cGAS homologs in innate and adaptive mucosal immunities in zebrafish gives evolutionary insights into cGAS-STING pathway. *FASEB J.* 2020 Jun;34(6):7786-7809.
  62. Xiuli Gao, Hongguang Bao, Likun Liu, Wenbin Zhu, Liping Zhang, Liling Yue. Systematic analysis of lysine acetylome and succinylome reveals the correlation between modification of H2A.X complexes and DNA damage response in breast cancer. *Oncol Rep.* 2020 Jun;43(6):1819-1830.
  63. Shuping Zhang, Yan Wang, Ping Wang, Jin Xuan. miR-708 affords protective efficacy in anoxia/reoxygenation-stimulated cardiomyocytes by blocking the TLR4 signaling via targeting HMGB1. *MOL CELL PROBE.* 2020 Dec;54:101653.
  64. Yong Lan, Min Dong, Yongjun Li, Yongpeng Diao, Zuoguang Chen, Yangfang Li. SIRT1-induced deacetylation of Akt expedites platelet phagocytosis and delays HEMEC aging. *MOL THER-NUCL ACIDS.* 2021 Jan 26;23:1323-1333.

65. Yanan Wang,Houshuang Zhang,Li Luo,Yongzhi Zhou,Jie Cao,Xuenan Xuan,Hiroshi Suzuki,Jinlin Zhou.ATG5 is instrumental in the transition from autophagy to apoptosis during the degeneration of tick salivary glands.PLOS NEGLECT TROP D . 2021 Jan 29;15(1):e0009074.

66. Yufeng Hu,Yangping Li,Jianfeng Weng,Hanmei Liu,Guowu

Yu,Yinghong Liu,Qianlin Xiao,Huanhuan Huang,Yongbin Wang,Bin Wei,Yao Cao,Ying Xie,Tiandan Long,Hui Li,Junjie Zhang,Xinhai Li,Yubi Huang.Coordinated regulation of starch synthesis in maize endosperm by microRNAs and DNA methylation.Plant J. 2021 Jan;105(1):108-123.

Version 2022.04.15