

在基于 BAC 的 EB 病毒基因组中引入突变

卢建红^{**}, 唐运莲^{**}, 周鸣, 武明花, 欧阳珏, 高建明, 张荔茗, 李丹, 陈琼,
熊炜, 李小玲, 唐珂, 李桂源^{*}

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要: 为了在 Epstein-Barr 病毒(EBV)172kb 的基因组中引入突变以研究基因功能, 建立了一种简单有效的基因操作方法。在载体 pcDNA3.1(+)上操作, 将两端含有重组蛋白 FLP 识别位点(FRT)的卡那霉素筛选标记基因(*kan*)与鼻咽癌(NPC)来源的、包含 LMP1 基因全长 ORF 的 gDNA “无缝”连接(无外源序列插入)。连接后的 *kan*-LMP1 线性 DNA 片段经转化、由噬菌体中 *red α β* 系统介导在 *E.coli* 中发生同源重组(ET 克隆), 用 *kan*-LMP1 替代了 BAC-EBV(p2089)中相应的 LMP1 基因区域, 然后经过重组蛋白 FLP 对 FRT-*kan*-FRT 特异性的识别, 切除了引入的 *kan* 基因, 留下一个 69bp 的 FRT “疤痕”。通过抗性筛选和对菌液进行 PCR 扩增可以鉴定突变子。这种经改进并程序化的方法, 也适应于引入其它突变或在其它 BAC-疱疹病毒基因组中引入突变。

关键词: EB 病毒; 突变; 同源重组; 线性转化

中图分类号: R739.63 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0385-06

疱疹病毒科的成员是感染人和动物的重要病原, 对它们的研究具有重要意义。EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)属于 γ 疱疹病毒亚科, 基因组大小约 172kb, 包含近 100 个基因, 编码 200 多种蛋白, 但大多数基因的功能还不清楚。EBV 与多种人类恶性肿瘤如 Burkitt 氏淋巴瘤和在中国南方高发的鼻咽癌(Nasopharyngeal Carcinoma, NPC)相关^[1]。为研究病毒基因功能, 对特定基因进行修饰构建病毒突变子具有重要价值, 但是由于疱疹病毒基因组大, 产生重组病毒一直是个难题。近年来把细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)技术应用于疱疹病毒的感染性克隆为疱疹病毒基因组学提供了重要的技术平台^[2,3]。BAC 中的 F 因子使之能在大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)中的复制受到严格控制并保持低拷贝, 克隆至 BAC 的疱疹病毒基因组随着 BAC 而复制, 在每个细菌细胞中保持 1~2 个拷贝^[4]。

BAC-疱疹病毒转染真核细胞产生病毒, 然后可以对它进行表型研究。

为了研究与鼻咽癌相关的 EBV 基因功能, 我们从 Hammerschidit 研究组引入了最早报道的 EBV-BAC 基因组(p2089)^[5], 在国内首次建立了 EBV 感染性克隆技术^[6], 同时, 还从鼻咽癌活检组织中克隆了 21 个 EBV 癌蛋白 LMP1 的全长基因序列(GenBank 登录号 EF419184~EF419204)。要应用该技术进一步研究基因功能, 关键的步骤之一是在 EBV 基因组中引入突变。克隆至 BAC 的 EBV 基因组大, 不能直接使用常规的酶切和连接等克隆技术引入突变, 必须借鉴在大肠杆菌中操作 BAC 载体的一些修饰方法如同源重组。在 BAC 操作技术中有 2 种同源重组的方法比较常用。一种被称为“两步法”, 由重组蛋白 *recA* 介导重组^[7]。这种方法需要 1~3kb 的同源臂, 构建穿梭质粒的工作烦琐, 而且效率低, 筛选重组体的过程也费时费力。

基金项目: 中国博士后基金(20060390264); 湖南省自然科学基金资助项目(05JJ300064); 国家重大科学研究计划(2006CB910504)

^{*}通讯作者。Tel/Fax: +86-731-4805383; E-mail: ligy@xysm.net

^{**}作者简介: 两位作者具有同等贡献。卢建红(1968-), 女, 湖南醴陵人, 博士后, 研究员, 主要从事病毒分子生物学和肿瘤学研究, E-mail: ji-anhl@sohu.com; 唐运莲(1968-), 女, 湖南衡山人, 博士, 讲师, 主要从事病理学和肿瘤学研究和教学, E-mail: tangyunlian@163.com

收稿日期: 2007-08-28; 修回日期: 2007-10-22

后来这个方法得到了一些改进^[8,9], 现在也仍被应用到 BAC-疱疹病毒的突变操作中。White 等^[10]使用单独表达的 *recA* 质粒, 精确地用绿色荧光蛋白(GFP)基因替换了 BAC 基因组中的标记基因 *dsRed*, 这种方法需要经过共整合和两次筛选工作, 优点是没有引入外源序列, 但两端的同源区还是比较长, 分别为 750bp 和 480bp。另一种方法为“一步法”, 也称 ET 克隆技术(由重组蛋白 ET 介导的重组), 因介导重组的酶不同而具有不同的操作系统^[11], 其中 *redαβγ* 系统是效率比较高的一个系统^[12]。ET 重组的优点是重组的同源臂短(30~70bp)。本研究通过使用合适的内切酶和方法改进等, 使用一种 BAC 技术即 ET 重组, 简化了在 EBV-BAC 中构建突变体的工作, 减少了外源序列的引入, 并使该方法程序化。这个方法也适应于在 EBV 其它基因和基于 BAC 的其它疱疹病毒基因组中引入任意突变。本文将以在 p2089 中用 NPC 来源、包含 LMP1 全长编码区的基因替代相应区域为例详细报道这种方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、DH10B 和质粒 pcDNA3.1(+)购于 Invitrogen 公司; 含 EBV B95-8 株全基因组的 BAC 质粒

(BAC-EBV) p2089^[5]由德国 GSF 国家环境与卫生研究中心的 Hammerschmidt 教授惠赠, 其中插入的氯霉素抗性基因 *cat* 可用于原核筛选。两端含有可被重组蛋白 FLP 识别的 FRT 位点(FLP recognition target)的 *kan* 基因来源的质粒 pKD13^[13]、表达 λ 噬菌体中 *redαβγ* 系统的质粒 pKD46(Amp^r)^[13]、表达 FLP 的质粒 pCP20(Amp^r)^[14]均由美国 Yale 大学的分子细胞开发生物学学院惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器: Pyrobest DNA polymerase, dNTPs, λDNA/*Hind* Marker, DL2000 DNA marker, 限制性内切酶 *EcoR*、*Hind* 及 T4DNA 连接酶等购自大连宝生物公司(TakaRa 产品), 限制性内切酶 *BsmB* 为 New England Biolabs 公司产品, T 载体(T-easy vector)为 Promega 公司产品; L-阿拉伯糖为 Sigma 公司产品, 少量质粒抽提试剂盒和凝胶 DNA 回收纯化试剂盒购自上海华舜生物工程公司。电穿孔仪由美国 BTX 公司生产, 型号为 ECM399。

1.2 将带有 FRT 位点的卡那霉素基因(*kan*)与 NPC 来源的 LMP1(N-LMP1)全长 gDNA 连接成片

1.2.1 连接方式: 如图 1。先将 FRT-*kan*-FRT 基因连接至载体 pcDNA3.1(+), 然后将包含 N-LMP1 全编码区的 gDNA 通过在 2 个基因中引入的内切酶 *BsmB* 位点同向连接, 使得在 2 个基因之间不插入任何外源序列。同时, 为了下一步的重组, 在连接基因的两端分别先引入长度为 20nt 的同源臂(*arm1* 和 *arm2*)。

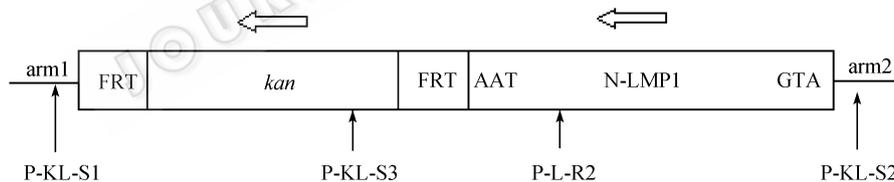


图 1 FRT-*kan*-FRT 与 NPC 来源的 LMP1 全长基因连接示意图

Fig. 1 Ligation of FRT-flanked *kan* gene and NPC-derived full-length LMP1. RT-flanked *kan* gene was introduced for kanamycin resistance. Homologous regions, *arm1* and *arm2*, were for the next step of homologous recombination. The four primers showed as black arrows were designed for the identification of recombination mutant.

1.2.2 引物设计: 按照图 1 所示的连接方式设计引物: 从质粒 pKD13 上扩增 FRT-*kan*-FRT 基因的引物。Hin-*kan*-F: 5'-CCCAAGCTTTGCCTAGAAGTAAAGAAAGGAGGCTGGAGCTGCTTCGAA-3; Eco-*kan*-R: 5'-A CTCGAATTCTGTTGATATCCGTCCTCATCCGTCGA CCTGCAGTTCG-3。在上游引物 Hin-*kan*-F 中加入了长度为 20nt、与 p2089 中 LMP1 终止密码子“TAA”之后同源的序列(同源臂 *arm1*, 下划线所示); 在下游引物 Eco-*kan*-R 中引入了一个 *BsmB* (Bm)位点

(CGTCTCN NNNN), Bm 位点前的 11nt 是随机引入的序列, 以保证 2 条引物的长度和退火温度的一致性。在 2 条引物 5 端引入的 *Hind* 和 *EcoR* 位点是为了将 FRT-*kan*-FRT 连接至载体 pcDNA3.1(+).

从已经克隆至 T 载体的 NPC 来源的 LMP1 基因中选择一个用于扩增 N-LMP1 基因, 引物如下。Bm-NL-F: 5'-GCCTCGTCTCA^{GGAT}TTAGTCATAGT AGCTTAGCT-3; Eco-NL-R: 5'-ATGTAGAATTCAC TGCCTTGCTCCTGACACACT-3。在上游引物 Bm-NL-F

中引入 Bm 酶切位点, 注意酶切后的末端序列“GGAT”(方框所示)应与上述扩增 *kan* 基因的下游引物 Eco-*kan*-R 上 Bm 酶切的末端、*kan* 基因上的特异序列“ATCC”(方框所示)反向互补。在下游引物 Eco-NL-R 中的特异序列(下划线所示)是 LMP1 起始密码子之外、在 p2089 上用于重组的同源臂序列(arm2); 在 5 端引入的 *Eco*R 位点是为了将 N-LMP1 基因的 3 端连接至 pcDNA3.1(+).

增加同源臂长度的引物。由于上述扩增 *kan* 和 N-LMP1 的引物太长, 只设计了 20nt 的两端同源臂序列, 2 个基因连接后(pcDNA3.1(+)/KL), 再用另外一对延长同源臂至 43bp 的引物在 pcDNA3.1(+)/KL 上扩增连接后的片段(43KL)。引物分别为, P-KL-F: 5'-CA GGCAAGCCTATGACATGGTAATGCCTAGAAAGTA AAGAAAGG-3; P-KL-R: 5'-CTCTGCCCCCTTCTT TCCTCAACTGCCTTGCTCTGACACA-3。为提高同源重组的效率, 将 43KL 片段连接至 T 载体(T/43KL), 用第二对引物进一步延长同源臂至 59bp (得到 59KL 片段), 引物分别为, P-KL-F2: 5'-TGGAG GGAGAGTCAGTCAGGCAAGCCTATGACATGG-3; P-KL-R2: 5'-TAAGCCTCTCACACTGCTCTGCCCC CTCTTTCCTC-3。在 2 对引物上的下划线部分为被扩增片段上的特异序列, 是通过引物与被扩增片段的部分重叠增长同源臂的。

按上述设计, 59KL 片段的全长为 2689bp。经纯化的 PCR 产物 59KL 用于下一步的转化和重组。

另外, 为了鉴定重组后的片段插入到 BAC-EBV 基因组的情况, 在图 1 黑色箭头所示位置设计了 4 条长度分别为 20nt 的特异引物, 其中 P-KL-S1 和 P-KL-S3 为上游引物, P-L-R2 和 P-KL-S2 为下游引物。

1.3 电转化感受态细菌细胞的准备

首先将表达重组蛋白 red $\alpha\beta\gamma$ 的温敏质粒 pKD46 按常规化学方法转化至含有 p2089(BAC-EBV)质粒的 *E.coli* DH10B 细胞中, 得到“BAC-46”细菌。该菌用 30 培养, 具有氯霉素抗性(Cam^r)和氨苄青霉素抗性(Amp^r)。用 BAC-46 细菌制备电转化感受态细胞, 基本步骤如下: 将 BAC-46 的新鲜菌液 1mL 加入 100mL 的 LB 培养基中, 30、220r/min 培养约 1.5h(*OD*₆₀₀ 为 0.15)时加入 1mL 新配置的 10% L-阿拉伯糖(终浓度为 0.1%, w/v), 以诱导 pKD46 中 red $\alpha\beta\gamma$ 的表达, 继续在 30 条件下培养 1h(*OD*₆₀₀ 为 0.3), 按已报道的方法制备 BAC-46 电转化感受态细胞^[6]。

1.4 线性转化(ET 重组)

将纯化的 PCR 片段 59KL 0.3 μ g 加到 100 μ L 的 BAC-46 电转化感受态细胞中, 混匀, 置冰上 30min, 转至预冷的 0.1mm 电击杯中, 在电脉冲为 36 F、电阻 151 Ω 、电压 1.6kV 的条件下启动电穿孔仪, 脉冲时间为 5ms。然后加入 700 μ L SOC 培养基, 将细胞转至 1.5mL tube 管中, 于 30、180r/min 培养 2h。离心后将菌液涂板于含卡那霉素(Kan^r, 30 μ g/L)的 LB 培养基上, 30 过夜培养后转移至 37 继续培养 24h。将具有 Kan 抗性(Kan^r)的菌落挑至 Kan^r(30 μ g/L)和 Cam^r(25 μ g/L)的 LB 液体培养基中, 42 培养, 以消除其中的 pKD46 质粒, 菌液进一步用含不同抗生素的液体 LB 培养基鉴定抗性, 将具有 Kan^r和 Cam^r、无 Amp^r的菌液涂 Kan^r+Cam^r平板, 再纯化一次。用引物对 P-KL-S3/P-L-R2、P-KL-S1/P-L-R2、P-KL-S1/P-KL-S2 对菌液(1:100 稀释)进行 PCR 扩增鉴定, 重组成功的能分别扩增出大小为 0.58kb、1.75kb、2.6kb 的片段。

1.5 切除在重组体中引入的 *kan* 基因

将线性转化重组阳性的细菌克隆(BAC-KL)菌液按常规方法制备化学转化的感受态细胞, 将表达重组蛋白 FLP 的温敏质粒 pCP20 转化至感受态 BAC-KL 中, 在 30 条件下、Amp^r LB 平板上培养 30~48h, 挑取菌落至 Cam^r LB 液体培养基中, 42 培养以消除 pCP20, 鉴定 Kan 和 Amp 抗性, 将只有 Cam^r、无 Kan^r和 Amp^r的菌液划 Cam^r平板, 纯化。对抗性筛选阳性的克隆菌液, 用引物对 P-KL-S1/P-L-R2、P-KL-S1/P-KL-S2 进行 PCR 扩增鉴定, 被切除 *kan* 基因后分别能扩增出大小为 0.5kb、1.4kb 的片段。含有经鉴定阳性的突变体的细菌, 即可用于大量抽提质粒及进一步的研究。

2 结果

2.1 卡那霉素抗性基因 *kan* 与 N-LMP1 基因的连接

PCR 扩增和酶切鉴定的结果见图 2。基因 *kan* 与 N-LMP1 在 pcDNA3.1(+)上连接后, 增长同源臂长度至 59bp 的 PCR 片段 59KL 经测序, 2 个基因片段在连接方向和全长序列上与预先设计的完全一致, 在接口处无任何外源序列的插入, 即实现了“无缝”连接(图 3)。这一步的关键在于用 *Bsm*B I 酶切 pcDNA3.1(+)/FRT-flanked *kan* 和 N-LMP1 后将 2 个基因连接, 应使用酶切效率高的 *Bsm*B。

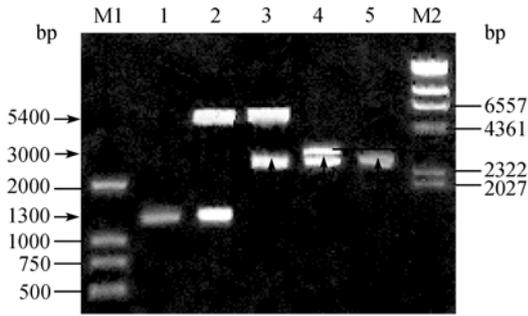


图 2 FRT-kan-FRT 与 N-LMP1 连接前后的 PCR 和酶切鉴定
 Fig. 2 PCR amplification and restrictive analysis of the ligation of FRT-flanked *kan* and NPC-derived LMP1 gene. M1: DL2000 DNA marker; 1: N-LMP1 of 1.3kb; 2: *Hind* III/*Eco*R I double enzyme cutting of pcDNA3.1(+)/FRT-flanked *kan* (*kan*, 1.3kb); 3: *Hind* III/*Eco*R I double enzyme cutting of pcDNA3.1(+)/KL (KL, 2.62kb); 4: *Eco*R I enzyme cutting of T/43KL(43KL, 2.66kb); 5: 59KL segment of 2.69kb; M2: λ DNA/*Hind*III Marker.

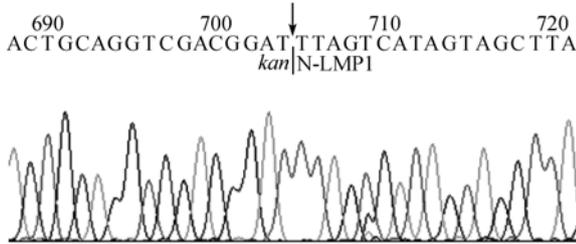


图 3 FRT-kan-FRT 与 N-LMP1 无外源序列连接处的序列测定
 Fig. 3 “No-gap” ligation between FRT-flanked *kan* and N-LMP1 gene. The PCR segment of ligated FRT-*kan*-FRT+N-LMP1 with 59bp of homologous arms was sequenced. The ligation site is showed as the arrow.

2.2 线性转化和重组

59KL 片段电转化至 BAC-46, 转化和重组的效率不高, 一次成功的重组可获得数个阳性克隆。阳性克隆具有双重抗性(Cam^r 和 Kan^r), 经 42 培养后失

去 pKD46 质粒(Amp^r)。用不同引物对从菌液中经 PCR 扩增得到不同目的大小的片段(图 4)。因菌液中 DNA 成分复杂, 往往同时扩增到非特异性条带。

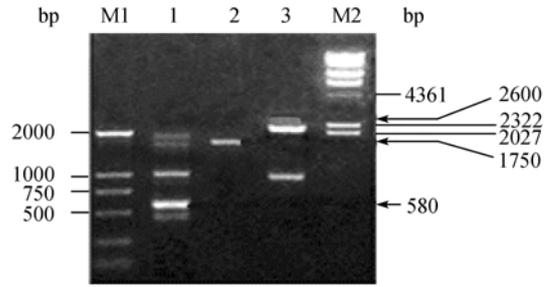


图 4 线性转化重组后突变子的 PCR 鉴定
 Fig. 4 PCR identification of mutant after the ET recombination. M1: DL2000 DNA marker; 1: 0.58kb product for primer pair P-KL-S3/P-L-R2; 2: 1.75kb for P-KL-S1/P-L-R2; 3: 2.6kb for P-KL-S1/P-KL-S2; M2: λ DNA/*Hind*III Marker.

2.3 用 FRT/FLP 重组系统切除在 BAC-EBV 中引入的卡那霉素抗性筛选基因 kan

经过线性转化和重组, 用 NPC-LMP1 替换了 EBV-BAC 基因组中相应的基因区, 同时引入的 *kan* 基因两端带有 FRT 位点, 能被 pCP20 质粒表达的重组蛋白 FLP 特异性地识别并切除 *kan* 基因, 留下一个“疤痕”, 这个“疤痕”包括 1 个 FRT 位点和 FRT 两端引物中的序列, 共 69bp(图 5)。被切除 *kan* 基因后的 BAC 质粒只有 Cam^r 抗性。随着 42 筛选, 温敏质粒 pCP20 从细菌中消除。阳性克隆的菌液用不同引物对 PCR 扩增得到的目的大小的片段(图 6)长度与被切除 *kan* 基因前(图 4)不同。这一步与一般的质粒转化一样效率很高, pCP20 表达重组蛋白 FLP 及 FLP 的获得目的突变子的效率也比较高, 转化 pCP20 后, 约 60%的克隆失去 Kan^r 抗性。

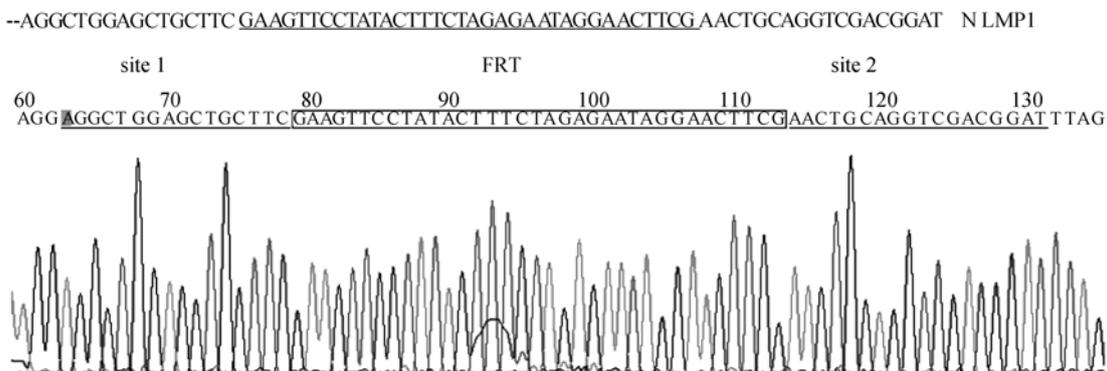


图 5 卡那霉素基因 kan 被 FRT/FLP 系统切除后留下的 69bp “疤痕” 序列
 Fig. 5 FRT scar sequence of 69bp after the Kan resistance elimination by FRT/FLP system.

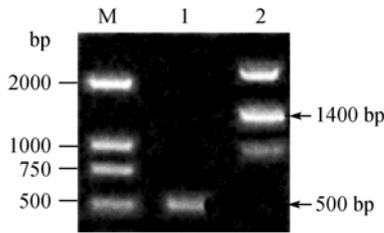


图 6 卡那霉素基因 *kan* 被切除后的 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR identification of mutant after the Kan resistance elimination. M: DL2000 DNA marker; 1: 0.5kb product for primer pair P-KL-S1/P-L-R2; 2: 1.4kb for P-KL-S1/P-KL-S2.

3 讨论

疱疹病毒基因组被克隆为 BAC 之后,更重要的是对病毒基因进行功能研究,而建立一种有效的方法对基因进行突变很重要。目前,还没有一种详细描述操作 BAC-疱疹病毒的简单的程序化的方法报道。本研究借鉴一种 BAC 技术(ET 重组),并结合使用合适的内切酶和方法的改进,实现了在大 DNA 病毒基因组中突变单个基因的简单化和程序化。该突变体 EBV-BAC 与突变前的基因组一样^[6],已经成功地产生了感染性克隆,功能研究正在进行中。

本方法的特点是通过引入合适的内切酶和引物设计,使得在突变体中插入的外源序列减短,同时可以单独操作目的基因,把修饰后的基因引入 EBV-BAC 基因组中。利用内切酶 *BsmBI* 的酶切特点(CGTCTCN NNNN)将 N-LMP1 与 *kan* 连接,没有引入外源序列如酶切位点。在设计扩增 FRT-*kan*-FRT 的引物时,对引物位置也进行了移动修改,使最后被 FLP 特异性切割后的“疤痕”为 69bp,比报道的 84bp^[13]短,这样也尽量减少了外源序列的插入。因 *kan* 两端都必须带上 FRT 位点,扩增 *kan* 的引物不能全在 FRT 位点上,否则上下游引物反向互补,难以扩增到 *kan* 基因。因此,本研究中的“疤痕”长度达到了最小。一些研究者为了引入突变,往往在很长的基因片段中寻找可用的酶切位点,在基因中插入抗性标记基因,通过酶切获得线性转化的 DNA 片段^[15]。这样的位点通常是稀有酶的切割位点,因片段长也不利于操作,如果进行“精细”的突变如点突变,还要结合使用其它 BAC 技术^[16]。

在通常情况下,由于细菌内源性的外切酶作用,转化至细菌中的 DNA 片段会被很快降解,而使用噬菌体的 *red $\alpha\beta$* 系统,其中的 *red γ* 能抑制外切酶,*red $\alpha\beta$* 则介导重组。线性转化和重组常被用于缺失单个基因的突变,没有见到用于基因置换的报道。在基因的置换中,由于片段内部也有与被置换基因的同源序列,

甚至长度比两端的同源臂还大,有发生部分重组置换的可能性,但本研究证明重组主要是通过两端的同源等位序列,只是置换的效率比较低,要设计更长的同源臂。根据报道,同源臂长度在 43bp 以上效率高^[16],本研究中在第一次延长同源臂至 43bp 时未获得成功,因此设计了更长的同源序列(59bp)。经过 ET 重组,引入了一个抗性筛选标记基因,有些研究者并没有将它切除,可能在缺失突变中它的影响不会太大,而在其它突变中,它对 BAC-病毒基因组中特定基因的表达的影响尚未见报道,本方法设计了在 ET 重组后再切除 *kan* 基因。实际上,这个步骤的效率很高,筛选工作量也不大。

本方法中的关键步骤是线性转化和重组。与质粒的转化相比,线性转化的难度大,必须通过电转化,使用的脉冲电压比质粒转化的大,而且使用不同的电穿孔仪其脉冲条件也不同。

此外,由于宿主菌容易产生耐药性,插入抗性筛选基因如 *kan* 后可能出现假阳性,另一方面,BAC 质粒是单拷贝质粒,表达卡那霉素的量也低,所以筛选培养基中加入卡那霉素的量不宜过低或过高,30~35 μ g/L 比较合适,还应注意电转化后让其充分表达(如在无抗生素的 LB 中培养 2h)后再涂版,涂版后培养时间也不宜长,达到 40h 后生长的多为假阳性,这种菌落生长得比较小。为达到鉴定的目的,不能只依赖于抗性筛选,本方法中对菌液直接进行 PCR 扩增(反应条件与常规一样),利用 *kan* 基因被切除前后片段长度的变化进行鉴定,虽然容易扩增到非特异条带,但是证明这种方法是可行的。

本方法也适应于对兴趣基因中引入其它突变,如点突变、缺失突变和插入突变等。可以先将连接到 T 载体的目的基因通过设计引物、进行反向的“一步法”PCR 扩增等方法引入突变,然后将它与 *kan* 连接,按照本方法的程序操作即可。这种方法经程序化后,操作很方便,同样适应于在其它基于 BAC 的疱疹病毒基因组中引入突变。

致谢 感谢德国 GSF 国家环境与健康研究中心 Hammerschmidt W 教授惠赠 BAC-EBV 质粒 p2089;感谢美国 Yale 大学分子细胞发育生物学学院惠赠质粒 pKD13、*red $\alpha\beta\gamma$* 重组系统的 pKD46、表达 FLP 的 pCP20 以及 John Wertz 博士的热心帮助。

参 考 文 献

- [1] Serraino D, Piselli P, Angeletti C, et al. Infection with Epstein-Barr virus and cancer: an epidemiological review. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2005, 19(1-2): 63-70.
- [2] Wagner M, Ruzsics Z, Koszinowski UH. Herpesvirus genetics

- has come of age. *Trends Microbiol*, 2002, 10(7): 318–324.
- [3] 卢建红, 唐运莲, 李桂源. 以 BAC 为基础的疱疹病毒感染性克隆技术. 中国生物工程杂志 (*China Biotechnology*), 2006, 26(6): 78–82.
- [4] Shizuya H, Birren B, Kim UJ, *et al.* Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(18): 8794–8797.
- [5] Delecluse HJ, Hilsendegen T, Pich D, *et al.* Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(14): 8245–8250.
- [6] 唐运莲, 卢建红, 武明花, 等. 裂解性复制诱导产生可视化重组 Epstein Barr 病毒. 生物化学与生物物理进展 (*Progress in Biochemistry and Biophysics*), 2007, 34(4): 418–424.
- [7] Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol Microbiol*, 1991, 5(6): 1447–1457.
- [8] Imam AM, Patrinos GP, de Krom M, *et al.* Modification of human beta-globin locus PAC clones by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: e65.
- [9] Lalioti MD, Heath JK. A new method for generating point mutations in bacterial artificial chromosomes by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(3): e14.
- [10] White RE, Calderwood MA, Whitehouse A. Generation and precise modification of a herpesvirus saimiri bacterial artificial chromosome demonstrates that the terminal repeats are required for both virus production and episomal persistence. *J Gen Virol*, 2003, 84: 3393–3403.
- [11] Zhang Y, Buchholz F, Muyrers J, *et al.* A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics*, 1998, 20: 123–128.
- [12] Muyrers J, Zhang Y, Testa G, *et al.* Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(6): 1555–1557.
- [13] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(12): 6640–6645.
- [14] Cherepanov PP, Wackernagel W. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of *Flo*-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 1995, 158: 9–14.
- [15] Dirmeier U, Neuhierl B, Kilger E, *et al.* Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res*, 2003, 63(11): 2982–2989.
- [16] Yang Y, Sharan S. A simple two-step, “hit and fix” method to generate subtle mutations in BACs using short denatured PCR fragments. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(15): e80.
- [17] Yu D, Ellis HM, Lee E, *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 5978–5983.

Gene modification in the genome of Epstein-Barr virus cloned as a bacterial artificial chromosome

Jianhong Lu^{**}, Yunlian Tang^{**}, Ming Zhou, Minghua Wu, Jue Ouyang, Jianming Gao, Liming Zhang, Dan Li, Qiong Chen, Wei Xiong, Xiaoling Li, Ke Tang, Guiyuan Li^{*}

(Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Epstein-Barr virus (EBV) is an oncogenic herpesvirus associated with a variety of malignancies, including Burkitt’s lymphoma and nasopharyngeal carcinoma (NPC). Functions of most EBV genes have not been determined. The use of bacterial artificial chromosome (BAC) to clone and modify the genome of EBV has enhanced the gene function study in the context of genome. Infectious clones of EBV were previously established by using EBV-BAC plasmid p2089. In order to further investigate EBV mutant biology, an easy and efficient method for gene modification in EBV-BAC was developed and detailed. The kanamycin gene (*kan*) flanked by recombinase FLP recognition targets (FRTs) was amplified from plasmid pKD13 and inserted into the vector of pcDNA3.1(+). Through the introduction of restriction endonuclease *BsmB I* in PCR primers, NPC-derived LMP1 gDNA containing the full-length ORF was then precisely ligated with *kan* on pcDNA3.1(+). The linear DNA segment of *kan*-LMP1 was transformed into *E. coli* DH10B cells containing p2089 and plasmid pKD46, homologous recombination was subsequently mediated by $red\alpha\beta\gamma$ system from bacteriophage λ . By this linear transformation and ET cloning, the full-length LMP1 in EBV-BAC (p2089) was replaced by the *kan*-LMP1. The introduced *kan* gene in EBV-BAC genome was eliminated specifically by the recombinase FLP when transformed by plasmid pCP20, leaving an FRT scar of 69 bp. The mutant could be identified by antibiotic screening and PCR amplification on bacteria medium. This method allows the gene of interest to be easily modified alone and then to be introduced into EBV-BAC genome. Following this example of gene substitution, other mutations such as deletion, insertion and point mutation become convenient work, and this improved method can be a potential use of gene modification in other BAC-based herpesvirus genome.

Keywords: Epstein-Barr virus, mutation, homologous recombination, linear transformation

Supported by the China Postdoctor Foundation (20060390264), the Natural Sciences Foundation of Hunan Province (05JJ300064) and the Key National Research Plan of China (2006CB910504)

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: +86-731-4805383; Email: ligy@xysm.net

^{**}These authors contributed equally in this work.

Received: 28 August 2007/ Revised: 22 October 2007