

Red/ET 重组及其在生物医学中的应用

Red/ET Recombination and its Biomedical Applications

王军平^{1*}, 张友明²

WANG Jun-Ping^{1*} and ZHANG You-Ming²

1. 第三军医大学预防医学系全军复合伤研究所, 创伤烧伤复合伤国家重点实验室, 重庆 400038

2. 基因桥研究室, 德累斯顿 01307, 德国

1. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

2. Gene Bridge GmbH, Dresden 01307, Germany

摘要 通过应用 *Rac* 噬菌体的 RecE/RecT 和 λ 噬菌体的 Red α /Red β 系统而建立的 DNA 工程平台——Red/ET 重组, 是一种不依赖于限制性内切酶的分子克隆新技术。运用该技术能够介导 PCR 产物或寡核苷酸对目标基因进行剪切、插入、融合及突变等多种操作, 在生物医学领域里具有广阔的应用前景, 尤其在基因组功能研究中对 BACs、PACs 和细菌染色体的打靶修饰以及基因敲除动物 DNA 靶分子的快速构建等方面最有效。随着 Red/ET 重组的推广与应用, 该技术本身也在不断被改进, 在工作效率得到显著提高的同时, 其操作也变得更加简单、省时、省力。结合自身的一些研究结果, 对 Red/ET 重组的技术特点、发展现状和在生物医学中的应用进行了详细阐述。

关键词 Red/ET 重组, DNA 修饰, BACs, 噬菌体

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)03-0502-05

Abstract Red/ET recombination, a powerful homologous recombination system based on the Red operon of λ phage or RecE/RecT from *Rac* phage, provides an innovative approach for DNA engineering. Deletion, insertion and mutation can be quickly and precisely performed on the target gene mediated by Red/ET recombination with PCR derived DNA fragments or oligonucleotides. This technical platform has extensive applications in biomedical field including bacterial artificial chromosome modification, gene knock-out construction and genetic modification of *E. coli* strains as well as some other kinds of microorganisms. Recently, Red/ET recombination was improved in several aspects so that it becomes more powerful and maneuverable. The characteristic and development of Red/ET recombination and its biomedical applications were described in this review.

Key words Red/ET recombination, DNA modification, bacterial artificial chromosomes, phage

随着包括人类基因组计划在内的各种基因组测序工程的实施与完成, 以序列信息为基础的基因组功能研究随即成为生命科学领域的又一重大课题^[1]。相对于测序工程, 基因组的功能研究就更加复杂和困难。对于某一特定基因, 要想彻底了解其生物学作用, 往往需要对包含基因完整信息的基

因组 DNA 进行克隆、删除、突变等多种修饰, 从而为后续的表达和功能研究奠定基础。一般情况下, 一个完整的哺乳动物基因包括内含子、外显子以及启动子等调控元件在内的全长 DNA 序列都在几十甚至上百个 kb, 另外, 还有很多基因是以基因簇形式存在。这种包含完整基因信息的基因组 DNA

Received: December 29, 2004; Accepted: March 4, 2005.

This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (No. 30230360) and The TMMU Foundation for returnee.

* Corresponding author. Tel: 86-23-68752283; E-mail: wangjunp@yahoo.com

国家自然科学基金资助项目 (No. 30230360), 第三军医大学留学回国人员启动资金资助。

通常是经过建库方式被装载于 BACs (bacterial artificial chromosomes) 或 PACs (P1 artificial chromosomes) 等大容量载体中^[2,3]。对如此大的 DNA 分子,此时很难应用 PCR 和限制酶等传统分子克隆技术对其进行修饰。另外,由于限制性内切酶和 PCR 都是在体外 (*in vitro*) 对 DNA 分子进行操作,所以碱基的无谓突变也常常困扰着实验的正常进行。

正是在这种情况下,一种基于噬菌体同源重组系统的 Red/ET 重组技术应运而生,通过该技术可以简单、快速地对任意大的 DNA 分子进行各种修饰,由于重组反应的整个过程都是在大肠杆菌细胞内部完成,因此就不存在碱基突变的危险,从而为基因功能研究提供了一个有效的前期操作平台。本文结合我们自己的工作,对 Red/ET 重组的特点、原理、发展现状以及它在生物医学领域的应用做一阐述。

1 Red/ET 重组的产生及其特性

同源重组是多种生物体内普遍存在的一种生理现象,它是生物体用于纠正自身(DNA 复制过程中产生)或由外界因素诱导所致 DNA 突变的一种内在机制,由体内的同源重组酶介导完成。同源重组酶的作用机理不同于限制性内切酶,它不受酶切位点限制,只要供体和受体 DNA 分子间具有一段相同的碱基序列(即所谓的同源臂)两者就能发生重组或替换(图 1)。

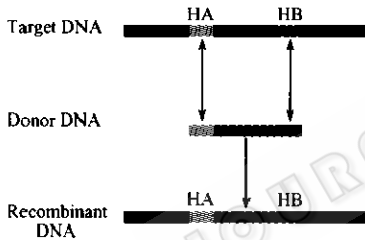


图 1 同源重组示意图

Fig. 1 The sketch map of homologous recombination

HA: homology arm A; HB: homology arm B.

同源重组酶有多种,不同的酶在进行同源重组时所需同源臂大小也不同,其中最为人们熟知的是大肠杆菌 RecA 系统。应用 RecA 介导的同源重组,人们已经实现了多种形式的 DNA 修饰^[4,5]。近些年,有研究者又利用该系统对载有基因组 DNA 的 BACs 和 PACs 进行了成功修饰,为基因敲除、转基因等研究中上游靶分子的构建提供了一条有效途径^[6,7]。然而,由 RecA 介导的同源重组所需同源臂长度通常在 1 kb 左右,这样长的同源臂要加载到供体打靶分子的两侧并不容易,而且同源重组过程一般要经过重组 (Recombination) 和拆分 (Resolution) 两轮筛选,操作相对费时、费力,从而使其应用受到很大程度的限制。

1998 年 Stewart 研究小组报道了另一种可在大肠杆菌中应用的同源重组技术,它是通过诱导表达 λ 噬菌体的 RecE 和 RecT 蛋白组合来介导实施重组反应,当时将这种技术命名为 ET 克隆 (ET cloning)^[8]。与 RecA 介导同源重组不同的是 ET 克隆所需同源臂仅为 35 ~ 50 bp,且同源重组效率更高。35 ~ 50 bp 的同源臂意义非同寻常,人们就可以通过

PCR 将同源臂直接加在供体打靶片段的两侧。经 RecE/RecT 介导,两端带有同源臂的供体分子就能直接插入到受体 DNA 靶分子的同源区部位。通过改变同源臂的区域和它们中间的打靶序列,人们就可以达到对 DNA 靶分子进行插入、剪切等多种目的。同理,如果将 50 bp 的同源臂放在线性质粒载体的两端,通过该系统还可直接克隆或亚克隆 DNA 靶分子。由于同源臂可以人为选择,而且同源重组本身不受酶切位点和 DNA 分子大小的限制,所以运用 ET 克隆可以对任意大的 DNA 分子进行操作,做到人们以前想做而又无法实现的各种 DNA 修饰。另外,因为 ET 克隆的整个过程都是在细菌体内 (*in vivo*) 完成,所以就排除了产生突变的危险。正因如此,ET 克隆一经出现就引起了人们的广泛关注,被国际同行专家誉为分子生物技术领域的一场革命。

之后,包括 Stewart 研究小组在内的多个实验室又相继发现 λ 噬菌体的 Red α 和 Red β 蛋白组合也具有与 RecE/RecT 类似的同源重组功能^[9-12]。值得一提的是,无论是 RecE/RecT 还是 Red α /Red β 所介导的同源重组,只有在 recBCD 的大肠杆菌中才能充分发挥作用。其原因是 recBCD 作为大肠杆菌内非常强效的核酸外切酶,能够快速降解外源线性 DNA 分子,包括 PCR 产物和寡核苷酸^[13]。在应用 RecE/RecT 和 Red α /Red β 实施同源重组时将 recBCD 的主要抑制分子—— λ 噬菌体的 Gam 蛋白 (Red γ) 进行共表达,可使同源重组在 recBCD⁺ 的大肠杆菌中同样发挥作用。不同的实验室对 RecE/RecT 和 Red α /Red β 所介导同源重组的命名也各不相同。除了上述的 ET 克隆外,还有 ET 和 GET 重组 (GET recombination)^[14]、 λ 重组 (λ recombination)^[11]、重组遗传工程 (Recombinogenic engineering)^[15] 以及重组工程 (Recombineering)^[16] 等。因为 RecE/RecT 和 Red α /Red β 所介导的同源重组可以相互通用,为了统一概念,最近 Stewart 将它们统称为 Red/ET 重组 (Red/ET recombination)。在这里 Red 是指 λ 噬菌体的 Red 蛋白组合 (Red α /Red β /Red γ),ET 则代表了 λ 噬菌体的 RecE/RecT^[17]。

2 Red/ET 重组的作用机理及其应用方式

事实上,在 Red/ET 重组出现之前人们对 RecE、RecT、Red α 和 Red β 这四种蛋白质就有研究,只不过所关注的是它们与 DNA 双链断裂修复 (Double strand break repair, DSBR) 的关系。研究揭示 RecE 和 Red α 实际上都具有典型的 5'→3' 核酸外切酶活性,它们能够由 5' 末端向 3' 末端酶切双链 DNA (包括 PCR 产物),使 DNA 分子的 3' 末端变成单链悬突 (3' ssDNA overhang)^[18,19]。对于 RecT 和 Red β ,体外结合实验和电子显微镜观察发现它们其实是一种具有退火 (Annealing) 和链侵入 (Strand invasion) 功能的单链结合蛋白质^[20,21]。为此,人们推测 Red/ET 重组的作用机理可能是:带有同源臂的供体 DNA 分子首先经 RecE 或 Red α 作用而使其两端形成单链悬突,然后在 RecT 或 Red β 的引导下,供体分子的同源臂单链悬突即可与受体分子的同源臂部分发生结合,最终导致供体与受体 DNA 分子发生重组和替换^[22] (图 2)。

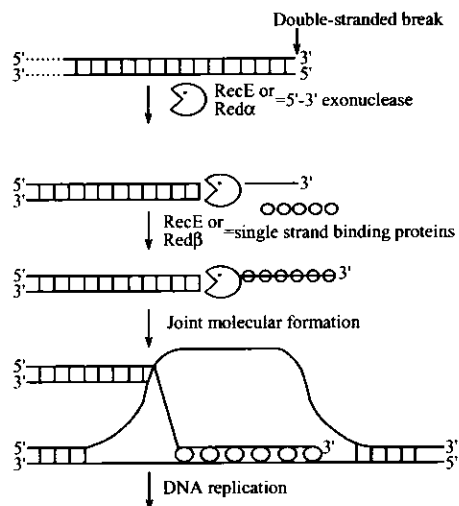


图2 Red/ET重组的作用机理

Fig. 2 The possible mechanism of Red/ET recombination

Red/ET重组的具体实施方式主要有两种:一是构建含有 RecE/RecT/RedY 和 Redα/Redβ/RedY 的诱导表达型依托质粒,通过共转染使依托质粒与受体和供体 DNA 分子进入同一细胞内,经诱导表达后即可发生重组反应^[8, 9, 23]。另外一种方式是筛选和构建具有 Red/ET 重组功能的大肠杆菌菌株,如 Zhang 等通过对 *sbcA*(RecE/RecT⁺) 大肠杆菌 JC8679 染色体上某些限制/调节元件及内源性 Lac 操纵子进行突变缺失,获得了一株重组功能型工程菌—YZ2000^[9]; Yu 等则是将突变失活的 λ 噬菌体整合到大肠杆菌的染色体中而构建了具有同源重组功能的 DY330、DY380 等菌株^[10, 24]。这两种使用方式各有利弊:由于依托质粒的拷贝数要显著高于染色体的单一拷贝,所以前者提供重组酶蛋白的表达量和重组效率显著高于后者^[25];除了重组效率,应用依托质粒在 BACs、PACs 或细菌染色体的修饰方面具有优势,因为依托质粒可以随意转化宿主菌;但是,当受体 DNA 结构比较稳定,能够进行反复转化时,应用第二种方式相对简单、省时^[24];另外,应用依托质粒时要涉及到重组结束后依托质粒的清除问题。

3 Red/ET 重组的发展与改进

Red/ET 重组技术的建立,让人们实现了以 PCR 产物作为供体分子对目的基因的打靶修饰。虽然这已经使同源重组的操作和应用向前迈出了历史性的一步,但是在某些情况下并不需要以 PCR 产物作为供体分子,所需的是仅仅包含两个同源臂的寡核苷酸短链,如点突变或蛋白标签的插入等。为此,Red/ET 重组建立后不久,人们即开始尝试应用体外直接合成的寡核苷酸来实施对目标 DNA 分子的修饰。令人惊喜的是,研究发现 70~100 bp 长(两侧各带 35~50 bp 同源臂)的双链和单链寡核苷酸,同样可以作为打靶分子来对 BAC 进行点突变和插入等修饰^[25, 26]。考虑到 RecE 和 Redα 对单链寡核苷酸可能不起作用,所以在上述发现的基础上 Zhang 等^[17]又构建了只表达 RecT 和 Redβ 的依托质粒,发现应用这种质粒进行单链寡核苷酸修复时 also 具有很高的效率,

并且这种修复效率的高低与所选用核苷酸链的性质有关,应用与受体 DNA 分子滞后链(Lagging strand)互补的寡核苷酸效果更好。由于寡核苷酸可以体外快速合成,所以寡核苷酸修复的成功应用使 Red/ET 重组更加引起人们的重视。

Red/ET 重组最初所使用的依托质粒是 ColE1 来源的 pBAD-ETg 和 pBAD-gba,在这两个质粒中 RecE/RecT/RedY 和 Redα/Redβ/RedY 被置于 P_{BAD} 启动子之后,同源重组酶的表达受 L-阿拉伯多糖诱导调控^[8, 9, 23, 25]。在以后的应用中人们逐渐发现,这种高拷贝的依托质粒虽然具有很高的同源重组效率,但当发挥完重组功能后它们却不易从宿主菌细胞中清除,给后续研究带来影响。为此,最近我们对 Red/ET 的依托质粒又进行了改良,构建了低拷贝、温度敏感型 pSC101-BAD-gbaA 质粒。这种 pSC101 来源的质粒在每个细胞中拷贝数为 3~5 个,于 30℃ 复制,37℃ 以上复制终止。在实验过程中通过简单、合理的改变宿主菌培养温度,就可使此依托质粒在行使完 Red/ET 重组功能后自动地从宿主细胞中消失。这样就容易获得比较纯的修饰后重组体。除了对依托质粒的类型进行优化外,我们还将 RecA 引进了 Red/ET 重组系统。之所以引入 RecA 是因为常用工程菌都是 RecA 缺失突变的大肠杆菌,RecA 缺失突变的目的是使外源质粒 DNA 尤其是 BAC 复制稳定。但 RecA 的缺失也会带来其它影响,研究表明当 RecA 缺失时大肠杆菌接受外源 DNA 转化的效率将会显著降低^[27]。为此,在新的依托质粒中我们将 RecA 与 Redα/Redβ/RedY 一起置于 P_{BAD} 启动子之后,使其与 Red 同源重组酶共同表达。实验结果证实,RecA 的瞬时表达可以通过促进外源 DNA 的转化而显著提高 Red/ET 的同源重组效率,使得低拷贝型的依托质粒具有高效的同源重组功能。

此外,人们对 Red/ET 重组介导非抗性基因打靶修饰时所使用的反向筛选系统也进行了多次改进。在尝试了 SacB-Neo^[8, 23] 和 TetR^[28] 后, Jamsai 等^[29] 通过合理应用限制性内切酶 I-Sce I 显著提高了反向筛选系统的严密性;我们则是选用了只有 1.4 kb 的 *rpsL*-Neo 作为反向/正向筛选标记基因,一方面便于 PCR 扩增以加载同源臂,另一方面又可采用卡那霉素和链霉素进行正、反向筛选,从而使 Red/ET 重组的操作过程更加简单、易行^[17]。

4 Red/ET 重组在生物医学中的应用

由于 Red/ET 重组在 DNA 修饰方面具有常规分子克隆技术无法比拟的优越性,通过选择同源臂的位置以及改变两个同源臂之间的打靶序列,人们可以达到对 DNA 靶分子进行插入、融合、剪切、敲除和突变等多种目的(图 3),所以该技术在生物医学领域里具有广阔的应用前景和很高的实用价值。

目前,Red/ET 重组在生物医学领域里应用最广泛的还是对载有基因组 DNA 的 BACs、PACs 进行修饰,为基因功能和表达研究提供有效的前期操作平台。在具体应用过程中,当目的 BACs 或 PACs 仅需要删除某部分基因序列时,就可以通过 Red/ET 重组介导带有同源臂的抗性标记基因插入并替

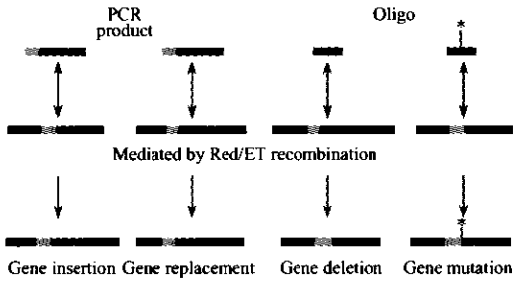


图3 Red/ET 重组在 DNA 工程中的应用范例

Fig. 3 The applications of Red/ET recombination in DNA engineering

换目的基因序列,这种 BACs 或 PACs 的一步法修饰在一周内即可完成^[23, 24]。当需要在目的 BACs 或 PACs 上定点插入某一非筛选性基因(如 LacZ、EGFP 等示踪基因)或特异寡核苷酸序列(如点突变、内切酶或特异性重组酶的识别位点等)时,由于所插入的供体基因或寡核苷酸不具有抗性筛选能力,所以此时应借助反向筛选系统并经过两轮的 Red/ET 重组才能达到修饰目的^[17, 25, 28, 29](图 4)。

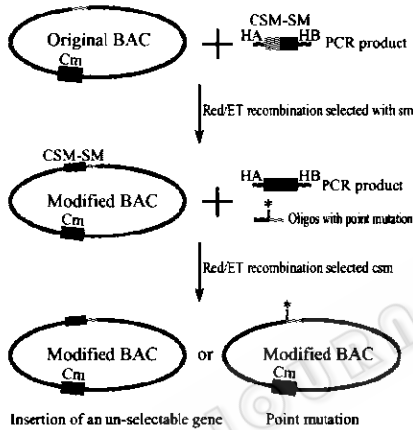


图4 应用 Red/ET 重组介导 BAC 修饰的操作示意图

Fig. 4 The sketch map of BAC modification mediated by Red/ET recombination

csm: counter-selectable marker; sm: selectable marker; HA: homology arm A; HB: homology arm B; Cm: chloramphenicol.

在对 BACs 或 PACs 修饰的基础上,运用 Red/ET 重组还可以进行基因敲除动物上游靶分子的快速构建。基本实施方案有两种,其一是首先应用 Red/ET 重组从目标 BAC 或 PAC 上亚克隆目的基因序列(含左右长短臂)至打靶质粒载体中,然后再应用 Red/ET 重组将带有原核与真核双启动子的 pGKneo 定点插入并删除目的基因序列;另外一种实施方式是,首先对目标 BAC 或 PAC 进行修饰,即将带有原核与真核双启动子的 pGKneo 定点插入并删除目的基因序列,然后再通过 Red/ET 重组进行亚克隆。两种方案都是仅需两次简单的 Red/ET 重组即能完成基因敲除靶分子的构建。同理,对于条件性敲除 DNA 靶分子的构建则需再多进行一步 Red/ET 重组和 Cre 重组过程。与传统 PCR 扩增和酶切连接法相比,运用 Red/ET 重组进行基因敲除靶分子的构建不仅操作简单、快速,而且还不存在碱基突变的危险^[22]。

Red/ET 重组在生物医学领域的另外一个重要应用是介

导实施大肠杆菌染色体的各种遗传修饰。与常规转座子法相比,Red/ET 重组介导的染色体修饰不仅高效、快速,而且还能准确定位。应用这种重组技术人们对大肠杆菌染色体上的多个基因如 *arcB*、*cyaA*、*recA*、*ptsG* 等进行了敲除、替换等修饰,有目的地改良了一些生物工程菌株^[11, 30]。除了工程菌外,一些致病大肠杆菌的遗传修饰也在引起人们的重视,如 Murphy 等^[31]就通过该技术对致病大肠杆菌 EHEC 和 EPEC 中的一些毒性基因进行了删除,为制备肠道感染病疫苗和粘膜免疫佐剂等提供了一些捷径。不仅如此,借助合适的依托质粒人们应用该系统还实现了对一些条件性致病真菌的遗传修饰,为研究临床上相关疾病的发病机制奠定了基础^[32]。此外,随着多种生物基因组 DNA BAC 文库的构建和测序工作的实施与完成,人们应用 Red/ET 重组还可对病毒、噬菌体以及其它模式生物的基因组 DNA 进行有目的修饰^[33],从而加速生物体的基因功能研究。

正是由于 Red/ET 重组在 DNA 修饰方面的独特优势,基于该技术的 DNA 工程操作已经开始向生物制药领域拓展,尤其对于那些通过常规分子克隆很难实现的生物工程药物的研制。如运用这种重组技术对载有聚酮合成酶基因簇的柯氏质粒进行重排、突变、替换等修饰,从而去创造生成新的抗生素^[34]。最近, Eustaquio 等^[35]就利用此方法在对新生霉素基因簇进行替换修饰后获得了一种新的“杂合抗生素”。

5 结语

总之,作为生物工程领域里的一项革新性技术,Red/ET 重组能够准确、快速地对目标 DNA 分子,尤其是基因组 DNA 大分子进行各种人为修饰,它的出现使以往通过传统分子克隆技术无法完成的多种 DNA 操作得以实现。随着后基因组时代的到来,Red/ET 重组的发展和运用将会显著推动基因组功能的研究进展。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Bogue CW. Genetic models in applied physiology. Functional genomics in the mouse: powerful techniques for unraveling the basis of human development and disease. *J Appl Physiol*, 2003, **94**(6): 2502 - 2509
- [2] 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
- [3] Zhao S. A comprehensive BAC resource. *Nucleic Acid Res*, 2001, **29**(1): 141 - 143
- [4] O'Connor M, Peifer M, Bender W. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science*, 1989, **244**(4910): 1307 - 1312
- [5] Hamilton CM, Aldea M, Washburn BK *et al*. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1989, **171**(9): 4617 - 4622

- [6] Yang XW, Model P, Heintz N. Homologous recombination based on modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat Biotech*, 1997, 15(9): 859 - 865
- [7] Gong S, Yang XW, Li C *et al*. Highly efficient modification of bacterial artificial chromosomes(BACs) using novel shuttle vectors containing the R6K γ origin of replication. *Genome Res*, 2002, 12(12): 1992 - 1998
- [8] Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JPP *et al*. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*, 1998, 20(1): 123 - 128
- [9] Zhang Y, Muyrers JPP, Testa G *et al*. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biotech*, 2000, 18(12): 1314 - 1317
- [10] Yu D, Ellis HM, Lee EC *et al*. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(11): 5978 - 5983
- [11] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640 - 6645
- [12] Zhang P, Li MZ, Elledge SJ. Towards genetic genome projects: genomic library screening and gene-targeting vector construction in a single step. *Nat Genet*, 2002, 30(1): 31 - 39
- [13] Murphy KC. Lambda Gam protein inhibits the helicase and chi-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme. *J Bacteriol*, 1991, 173(18): 5808 - 5821
- [14] Narayanan K, Zhang Y, Stewart AF *et al*. Efficient and precise engineering of a 200 kb beta-globin human/bacterial artificial chromosome in *E. coli* DH10B using an inducible homologous recombination system. *Gene Therapy*, 1999, 6(3): 432 - 441
- [15] Muyrers JPP, Zhang Y, Stewart AF. Techniques: Recombinogenic engineering - new options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(5): 325 - 331
- [16] Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(10): 769 - 779
- [17] Zhang Y, Muyrers JPP, Rientjes J *et al*. Phage annealing proteins promote oligonucleotide directed mutagenesis in *Escherichia coli* and mouse ES cells. *BMC Mol Biol*, 2003, 16(1): 1 - 14
- [18] Joseph JW, Kolodner R. Exonuclease VIII of *Escherichia coli*. 1. Purification and physical properties. *J Biol Chem*, 1983, 258(17): 10411 - 10417
- [19] Kovall R, Matthews BW. Toroidal structure of lambda-exonuclease. *Science*, 1997, 277(5333): 1824 - 1827
- [20] Thresher RJ, Makhov AM, Hall SD *et al*. Electron microscopic visualization of RecT protein and its complexes with DNA. *J Mol Biol*, 1995, 254(3): 364 - 371
- [21] Passy SI, Yu X, Li Z *et al*. Rings and filaments of beta protein from bacteriophage lambda suggest a superfamily of recombination proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(8): 4279 - 4284
- [22] Muyrers JPP, Zhang Y, Buchholz F *et al*. RecE/RecT and Red α /Red β initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev*, 2000, 14(15): 1971 - 1982
- [23] Muyrers JPP, Zhang Y, Testa G *et al*. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(6): 1555 - 1557
- [24] Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J *et al*. A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, 2001, 73(1): 56 - 65
- [25] Muyrers JPP, Zhang Y, Benes V *et al*. Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. *EMBO Rep*, 2000, 1(3): 239 - 243
- [26] Ellis HM, Yu D, DiTizio T *et al*. High efficiency mutagenesis, repair and engineering of chromosomal DNA using single stranded oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12): 6742 - 6746
- [27] Mortier-Barrière I, de Saizieu A, Claverys JP *et al*. Competence-specific induction of recA is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 1998, 27(1): 159 - 170
- [28] Nefedov M, Williamson R, Ioannou PA. Insertion of disease-causing mutations in BACs by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): e79
- [29] Jamsai D, Orford M, Nefedov M *et al*. Targeted modification of a human β -globin locus BAC clone using GET Recombination and an I-SceI counterselection cassette. *Genomics*, 2003, 82(1): 68 - 77
- [30] Han C(韩聪), Zhang WC(张惟材), You S(游松) *et al*. Knock out the pstG gene in *Escherichia coli* and cultural characterization of the mutants. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2004, 20(1): 16 - 20
- [31] Murphy KC, Campellone KC. Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *BMC Mol Biol*, 2003, 4(1): 11
- [32] Langfelder K, Gattung S, Brakhage AA. A novel method used to delete a new *Aspergillus fumigatus* ABC transporter-encoding gene. *Curr Genet*, 2002, 41(4): 268 - 274
- [33] Oppenheim AB, Rattray AJ, Bubunenko M *et al*. *In vivo* recombineering of bacteriophage λ by PCR fragments and single-strand oligonucleotides. *Virology*, 2004, 319(2): 185 - 189
- [34] Kim BS, Sherman DH, Reynolds KA. An efficient method for creation and functional analysis of libraries of hybrid type I polyketide synthases. *Protein Eng Des Sel*, 2004, 17(3): 277 - 284
- [35] Eustaquio AS, Gust B, Li SM *et al*. Production of 8'-halogenated and 8'-unsubstituted novobiocin derivatives in genetically engineered streptomyces coelicolor strains. *Chem Biol*, 2004, 11(11): 1561 - 1572