微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn

Feb. 20, 2017, 44(2): 473−482
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.160196

专论与综述

细菌重组系统及其应用研究进展

田雨顺[1,2]　罗鹏[1*]　刘秋婷[1]　胡超群[1]

(1. 中国科学院南海海洋研究所 中科院热带海洋生物资源与生态重点实验室
广东省应用海洋生物学重点实验室　广东 广州　510301)
(2. 中国科学院大学生命科学学院　北京　101408)

摘　要：利用重组酶和辅助蛋白共同作用于 DNA 片段上，使不同基因重新组合以完成基因重组的现象在细菌中广泛存在，基因重组对于细菌的遗传多样性、进化等具有重要意义。目前，细菌基因重组主要分为同源重组、位点特异性重组和转座重组 3 种类型。本文主要对细菌重组系统重组酶的种类、作用机制及其在细菌遗传操作中的应用策略进行阐述。

关键词：细菌，重组，重组酶，遗传操作

Progress on bacterial recombination systems and their application

TIAN Yu-Shun[1,2]　LUO Peng[1*]　LIU Qiu-Ting[1]　HU Chao-Qun[1]

(1. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)
(2. College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China)

Abstract: Gene recombination through recombinases and auxiliary protein enzymes exists widely in bacteria and it has great significance to bacterial genetic diversity and evolution. At present, genetic recombinations in bacteria are classed into three types: homologous recombination, site-specific recombination and transposition recombination. In this article, recombinases, and related protein enzymes of bacterial recombination systems, the mechanisms of various recombinations, and applications of recombination systems to genetic manipulation were reviewed.

Keywords: Bacteria, Recombination, Recombinase, Genetic manipulation

基因重组是生物利用重组酶将不同的基因重新组合在一起产生新遗传型个体的方式，它广泛存在于原核生物中，具有维护生物遗传多样性、促进生物进化等重要意义。随着分子生物学、基因组学和结构生物学的发展，多种重组酶不断被发掘，其结构和重组机制也逐渐得到清晰的阐

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31370149); Strategic Prority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. XDA13000000); Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-EW-G-12B)
***Corresponding author:** Tel: 86-20-89023216; E-mail: luopeng@scsio.ac.cn
Received: March 07, 2016; **Accepted:** May 18, 2016; **Published online** (www.cnki.net)**:** June 08, 2016
基金项目：国家自然科学基金项目(No. 31370149)；中国科学院战略先导项目(No. XDA13000000)；中国科学院知识创新工程项目(No. KSCX2-EW-G-12B)
*通讯作者：Tel：86-20-89023216；E-mail：luopeng@scsio.ac.cn
收稿日期：2016-03-07；接受日期：2016-05-18；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2016-06-08

述，为发现和改造重组酶、探索新的基因重组模式提供了广泛的思路，并为利用这些重组机制，开展新颖的细胞遗传学操作工具打下基础。目前，细菌基因重组主要分为同源重组(Homologous recombination)、位点特异性重组(Site-specific recombination)和转座重组(Transposition recombination) 3 种类型，它在细菌遗传、变异过程中发挥巨大作用。本文主要介绍了细菌重组系统重组酶的种类、作用机制，并对其应用策略进行了简要阐述。

1 重组酶及相关重组机制

1.1 RecA 同源重组系统及相关酶

RecA 重组系统是细菌内源性同源重组系统，它由 RecA 和相关的辅助蛋白组成。在行使重组功能过程中，RecA 的蛋白以右手螺旋的形式结合单链 DNA (ssDNA)片段[1-2]，形成 DNA-蛋白纤维结构，这种结构协助 RecA 蛋白在双链 DNA (dsDNA)中寻找单链 DNA 同源片段，一旦发现同源序列，两同源片段便形成 Holliday Junction 结构，伴随着 ATP 的水解作用而发生同源重组[3]。

在 RecA 重组系统中，不同的辅助蛋白以不同的方式促进 RecA 蛋白介导 DNA 发生重组反应。目前被报道的 RecA 重组系统中重要的辅助蛋白有 RecBCD、RecFOR、AddAB 和 DprA。RecBCD 蛋白分子量较大，是一个由 RecB、RecC 和 RecD 组成的复合体，具有解旋酶活性和 ATP 依赖的核酸外切酶活性[4-5]。RecBCD 与受损双链 DNA 上的切口结合，沿 DNA 链移动，并切割核苷酸形成 3′突出末端结构，随后识别 Chi 位点(5′-GCTGGTGG-3′)[4]，并在 Chi 位点停顿约 5 s 以减慢移动速率[4-6]。继而由 RecA 蛋白介导单链 DAN-RecA 复合物结合到双链 DNA 上，形成 Holliday Junction 结构，从而发生同源重组。作为 RecBCD 的功能等价物 RecFOR 和 AddAB 也在 RecA 同源重组过程中发挥重要作用。RecFOR 蛋白是一个由 RecF、RecO 和 RecR 组成的复合体，主要参与 ssDNA 的修复过程，它移除结合在 ssDNA 上的 SSB (ssDNA-Binding proteins)从而协助 RecA 结合在 ssDNA 上[1,7] (图 1)。AddAB 又称 RexAB[8-9]，存在于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中[4,6,10-11]，是由 AddA 和 AddB 组成的复合物，功能与 RecBCD 类似。Saikrishnan 等在 2012 年获得 AddAB 蛋白晶体结构以后[12]，AddAB 蛋白的功能与结构的关系得到了清晰的阐述[4]。在辅助 RecA 介导 DNA 发生同源重组的过程中，AddAB 蛋白发挥的作用与 RecBCD 蛋白相同。AddAB 蛋白在遇到 Chi 位点前，以较高的速率解旋双链 DNA，并沿着 DNA 链移动；遇到 Chi 位点后发生停顿。与 RecBCD 蛋白识别的 Chi 位点序列相比，AddAB 蛋白识别的 Chi 位点序列较短，仅有 5 个碱基(5′-AGCGG-3′)，且 AddAB 蛋白识别 Chi 位点的频率仅有 RecBCD 的 30%，甚至更低。目前关于 DprA 蛋白的相关报道较少，它被发现在肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)中，可装载 RecA 蛋白到裸露的 ssDNA 或 SSB 包裹的 ssDNA 上[9]。

在大肠杆菌 RecA 重组系统中，除了上述辅助蛋白外，RuvAB 和 RuvC 蛋白在催化分支迁移和降解 Holliday Junction 结构过程中也起到非常重要的作用[2,7-8]。此外，在枯草芽孢杆菌中，RecU 蛋白替换大肠杆菌中的 RuvC 蛋白发挥降解 Holliday Junction 结构的功能[8]。

1.2 噬菌体及其他细菌同源重组酶组合元件

Red 同源重组系统是最先由 Murphy 报道，该系统由 λ 噬菌体的 3 个基因 *exo*、*bet* 和 *gam* 组成，分别编码 Exo、Beta 和 Gam 蛋白，主要用于双链 DNA 同源重组[13]。Exo 蛋白单亚基分子量为 24 kD，具有双链核酸外切酶活性，可结合在双链 DNA (dsDNA)末端，沿双链 DNA 的 5′端向 3′端降解 DNA，产生 3′突出端[14]。晶体学研究发现，Exo 蛋白核酸外切酶是由 3 个亚基组成的环形聚合体，具有一个漏斗形的中心通道，在通道一端可容纳双链 DNA，而在另一端可容纳单链 DNA[2]。相比而言，Exo 蛋白对于单链 DNA 的降解能力较弱。Beta 蛋白单亚基分子量为 29 kD[15]，是一种单链退

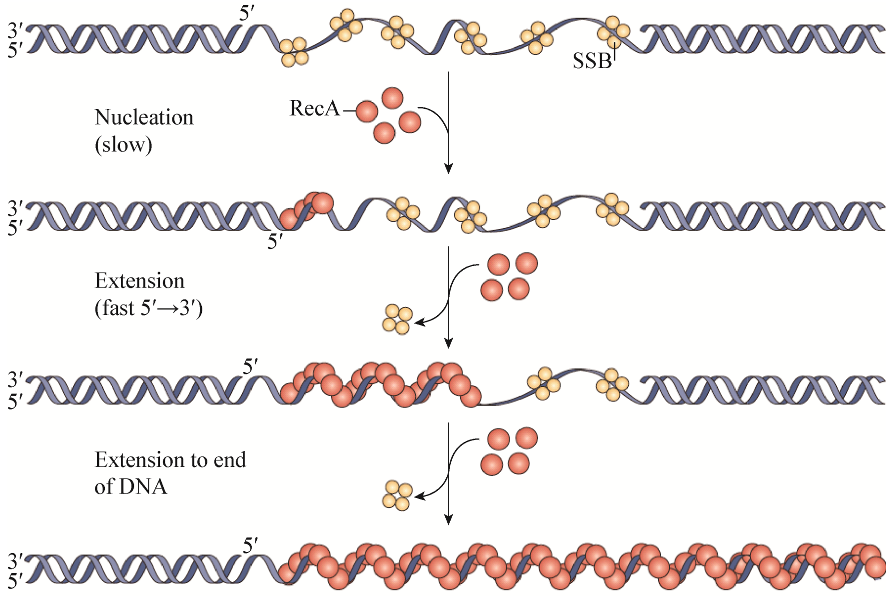

图 1　RecA 蛋白结合 DNA 的过程[1]

Figure 1　RecA binds to DNA and forms a nucleoprotein[1]

火蛋白，在 Red 同源重组过程中起着决定性作用。在溶液中，Beta 蛋白自发地形成环状结构，紧密地结合在单链 DNA 3′突出端，介导互补 DNA 的配对和退火，同时也防止 DNA 被 DNase I 等核酸酶降解[2,15]。此时，Beta 蛋白只需结合 35 bp 的同源单核苷酸链即可。Gam 蛋白是 Exo 和 Beta 蛋白的功能辅助蛋白，可与 RecBCD 核酸外切酶和 SbcCD 核酸内切酶结合，分别形成 RecBCD-Gam 和 SbcCD-Gam 复合物，进而抑制 RecBCD 和 SbcCD 的活性，从而防止线性 DNA 被降解[2,16-17]。

在发生 λRed 重组过程中，根据宿主个体内有无 RecA，将重组分为 2 种方式，即链入侵(SI)和单链退火(SSA)[2,15] (图 2)。当宿主细胞内缺失 RecA 时，重组以 SSA 方式发生；而当宿主细胞内存在 RecA 时，重组主要以 SI 方式发生。

Zhang 等在 1998 年报道了一种大肠杆菌隐蔽型噬菌体 Rac 噬菌体通过 RecE (140 kD)和 RecT (33 kD)蛋白介导的同源重组系统[18]。由于 λRed 同源重组系统与 RecE/T 重组系统相似，因此二者合称为 Red/ET 重组系统，其中 λRed 同源重组系统中的 Exo 蛋白与 RecE 蛋白的功能相同，Beta 蛋白与

图 2　RecA 介导的单链入侵和 Beta 介导的单链退火[2]

Figure 2　RecA-mediated single-strand invasion and Beta-mediated single-strand annealing[2]

RecT 蛋白功能相同。RecE 和 Exo 可分别促进 RecT 和 Beta 与 DNA 的结合[19]。与 λRed 同源重组系统相比，RecE/T 重组系统缺少 Gam 蛋白[20]，从分子结构角度来说，RecE 蛋白是环形四聚体，而 Exo 是环形三聚体[21]。与 RecA 系统相比，在单链退火过程中，RecA 需要 ATP 降解产生的能量，而 Beta 蛋白和 RecT 则不需要 ATP 的能量供给[15]。

另外，来自不同噬菌体和细菌的 RecE 和 RecT 的类似物在不同细菌同源重组中起着非常重要的作用。2007 年 van Kessel 等在名为 Che9c 的分枝杆菌噬菌体内发现了重组蛋白 RecE 和 RecT 的同系物，分别是 gp60 和 gp61[22-23]。gp60 和 gp61 的功能与 RecE 和 RecT 功能类似，即 gp60 具有核酸外切酶活性，gp61 为单链 DNA 退火蛋白，介导 DNA 发生同源重组[23]。

从上述可以看出，同源重组酶由核酸外切酶

和退火蛋白两个基本元件和其他辅助功能蛋白构成。目前，已在多种细菌中发现不同同源重组元件，并且其中某些元件已被应用于细菌遗传操作的重组系统中(表 1)[24-35]。

1.3 位点特异性重组酶

位点特异性重组是重组酶识别特定 DNA 位点形成联会复合体，进而发生 DNA 链的切割和交换，实现靶位点之间的整合、切离或倒位的 DNA 序列重组反应[36-38]。在这一反应过程中，由位于重组酶催化活性中心的酪氨酸或丝氨酸向 DNA 磷酸骨架发起进攻，引起 DNA 链断裂。根据重组酶催化活性中心的 2 种氨基酸，位点特异性重组酶被划分为两大家族，即酪氨酸重组酶家族(Tyrosine recombinases) 和丝氨酸重组酶家族 (Serine recombinases)。两大家族重组酶种类繁多，分别来源于不同细菌、真菌，具有整合、解离、转座、切离和倒位等生物学作用(表 2)。

酪氨酸重组酶家族也称 λ 整合酶家族(λ Integrase family)，广泛存在于原核生物中。从氨基酸水平上看，该家族序列保守性低。但从催化结构域角度来说，该家族的结构域非常保守[37-38]。酪氨酸重组酶一般由 2 个结构域组成，一个是 N-端 DNA 结合域，它可联系酶内部核心区；另一个是 C-端区域，它结合 DNA 并提供全部的催化基团，这 2 个区域形成一个 C-夹结构包裹 DNA，进而催化 DNA 发生重组[38]。

表 1 噬菌体重组系统及其他细菌类似的重组系统元件
Table 1 The elements of phages and other bacteria for recombineering

细菌 Bacteria	分类 Classification	元件 Element 5′→3′ Exonuclease	元件 Element ssDNA annealing protein
Escherichia coli	G^-	Exo (phage λ) RecE (phage Rac)	Beta (phage λ) RecT (phage Rac)
Salmonella enterica	G^-	Exo (phage λ)	Beta phage λ)
Yersinia pseudotuberculosis	G^-	Exo (phage λ)	Beta (phage λ)
Shigella	G^-	Exo (phage λ)	Beta (phage λ)
Agrobacterium tumefaciens	G^-	Exo (phage λ)	Beta (phage λ)
Vibrio cholerae	G^-	Exo (SXT/R39)	Beta (SXT /R39))
Mycobacterium tuberculosis	G^+	Gp60 (phage Che9c)	Gp61 (phage Che9c)
Mycobacterium smegmatis	G^+	Gp60 (phage Che9c)	Gp61 (phage Che9c)
Mycobacterium avium	G^+	MAV_0830 (*M. avium*)	MAV_0829 (*M. avium*)
Pseudomonas syringae	G^-	RecEPsy (*P. syringae*)	RecTPsy (*P. syringae*)
Bacillus subtilis	G^+	Gp34.1 (phage SPP1)	Gp35 (phage SPP1)
Listeria monocytogenes	G^+	Orf47 (phage A118)	Orf48 (phage A118)
Photorhabdus luminescens	G^-	Plu2936 (*P. luminescens*)	Plu2935 (*P. luminescens*)
Xenorhabdus stockiae	G^-	Plu2936 (*P. luminescens*)	Plu2935 (*P. luminescens*)
Legionella pneumophila	G^-	OrfB (*L. pneumophila*)	OrfC (*L. pneumophila*)
Enterococcus faecalis	G^+	EF2131 (*E. faecalis*)	EF2132 (*E. faecalis*)
Staphylococcus aureus	G^+	–	Gp20 (phage phiNM3)
Lactococcus lactis	G^+	–	Orf245 (phage ul36.2)
Lactococcus lactis	G^+	–	RecT1 (*L. reuteri*)
Lactococcus reuteri	G^+	–	RecT1 (*L. reuteri*)
Clostridium acetobutylicum	G^+	–	Cpf0939 (*C. perfringens*)

注：G^+：革兰氏阳性菌；G^-：革兰氏阴性菌.
Note: G^+: Gram-positive bacteria; G^-: Gram-negative bacteria.

表 2 位点特异性重组酶及其功能
Table 2 Site-specific recombinases and their functions

重组酶 Recombinases	生物学功能 Biological functions
酪氨酸家族 Tyrosine recombinases	
λ Int	噬菌体 λ 与宿主基因组的切离与整合
Int I	整合子中基因盒的切离与整合
L5 Int	噬菌体 L5 与宿主基因的切离与整合
P22 Int	噬菌体 P22 与宿主基因的切离与整合
Cre	P1 噬菌体二聚体质粒的解离
XerC/D、XerS、XerH	原核生物基因组二聚体的解离
Int of Tn916/Tn1545	环状转座子的切离与整合
TnpI (Tn4430, Tn5401)	转座子共合体的解离
TnpA (Tn554)	与 TnpB、TnpC 协同控制转座子的切离与整合
FimB, FimE	大肠杆菌纤毛相转变
Flp	酵母 2μ 质粒的倒位
丝氨酸家族 Serine recombinases	
TnpR (γδ/Tn3)	复合型转座子中共合体的解离
Sin	葡萄球菌二聚体质粒的消除
ParA of RP4	RP4 质粒二聚体的切离
Hin	沙门氏菌鞭毛的相转变
Gin/Cin	噬菌体 Mu 和 P2 尾蛋白基因的倒位
Int of φC31/φBT1/TG1/R4	链霉菌噬菌体的切离与整合
Int of Bxb1/φRv1	分枝杆菌噬菌体的切离与整合
TnpX of Tn4451	转座子 Tn4451 的切离与整合

对于酪氨酸重组酶催化过程，目前已经从分子结构和生物化学研究中得到了清楚的阐释[36-37,39-40](图 3)。首先，DNA 与重组酶形成 DNA-蛋白复合物；随后，重组酶催化活性中心的酪氨酸残基攻击核酸骨架，形成单链断裂切口，产生 5′-OH 和一个与 DNA 共价连接的 3′磷酸酪氨酸。此时，DNA 骨架中的磷酸二酯键断裂产生的能量被转移到磷酸酪氨酸中的共价连接中间体中，由此可以看出，该重组过程不需要额外的能量参与[36-37]。然后，游离的 5′-OH 攻击配对底物 DNA 的 3′-磷酸酪氨酸，进而形成 Holliday Junction 结构，经异构化(Isomerization)，再次进行 DNA 链断裂、连接，最终解离 Holliday 连接而形成重组产物。

丝氨酸重组酶家族也称解离/倒位家族(Resolvase/invertase family)[36,38]。该家族更为庞大，其蛋白质大小从 180 个氨基酸到近 800 个氨基酸不等，但相对于酪氨酸重组酶，丝氨酸重组酶有较为保守的催化结构域[36-37]。根据重组酶蛋白分子量的大小和功能差异，丝氨酸重组酶家族又被分为 2 个亚族：包括 Hin、Gin、TnR 等小型丝氨酸重组酶和包括 phiC31、Bxb1 等大型丝氨酸重组酶[36-37,41]。在丝氨酸重组酶催化反应过程中，先由 DNA 与重组酶形成复合物，然后重组酶结构域中的丝氨酸攻击 DNA 磷酸骨架致使 DNA 形成切口，切口处形成 3′-OH 的双链断裂末端和一个与 DNA 共价连接的 5′-磷酸丝氨酸，经联会复合物翻转，双链 DNA 重新连接，形成重组产物[36-38]。

目前，关于丝氨酸重组酶的催化反应机制已有大量研究。最具有突破性的进展是 2013 年 Rutherford 等报道了丝氨酸整合酶-DNA 复合物的结构[42]，从而更清晰地阐述了整合酶的作用机制及重组反应过程(图 4)[43]。

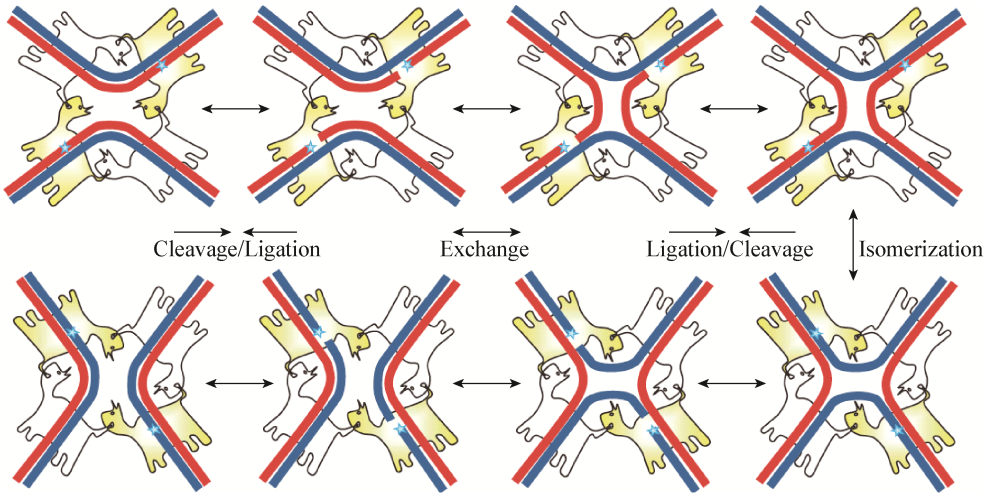

图 3　酪氨酸重组酶催化重组过程[37]
Figure 3　The process of tyrosine Recombinase-catalyzed strand exchange[37]

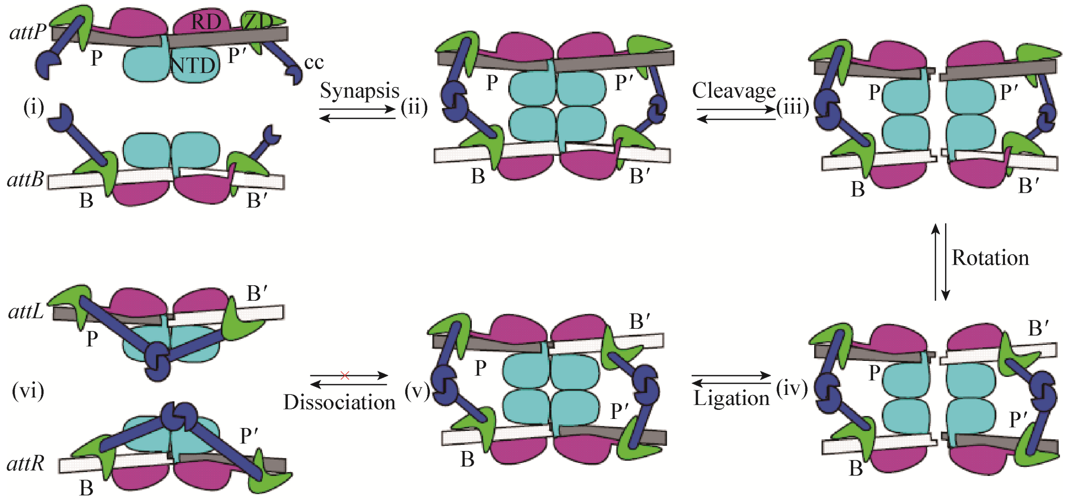

图 4　丝氨酸重组酶催化的整合反应过程[42]
Figure 4　The process of the integration reaction catalyzed by serine integrases[42]

酪氨酸重组酶和丝氨酸重组酶催化发生的重组过程存在很多不同点：(1) 酪氨酸重组酶催化 2 个连续的 DNA 链交换过程，4 条 DNA 单链并不同时断裂，而丝氨酸重组酶催化过程要求 2 条 DNA 双链同时断裂。(2) 亲核氨基酸残基攻击磷酸骨架后，酪氨酸重组酶产生 3′磷酸酪氨酸和 5′-OH，而丝氨酸重组酶则产生 5′磷酸丝氨酸和 3′-OH。(3) 在联会复合体中，酪氨酸重组酶催化的 DNA 链交换位点位于催化域内部，而丝氨酸重组酶催化反应中，交换位点被催化域分开位于外部，这是 2 个家族最显著的差别[36,38]。

2　重组酶应用策略

目前，在细菌基因工程操作中，重组酶一般被用于染色体或质粒 DNA 片段的敲除或外源 DNA 片段的插入过程。基于细菌 RecA 重组系统的同源重组技术是最先被广泛应用的策略[2,13-14]。在这种

策略中，靶 DNA 片段的同源片段被克隆在自杀载体上，形成自杀质粒，该质粒通过接合作用从供体菌转移到受体菌中，由于自杀质粒不能在受体菌复制，只能通过 RecA 重组系统介导的第一次重组整合在受体菌的染色体或质粒上才能维持存在，在这个过程中导致外源 DNA 片段的插入。自杀质粒往往带有反向选择标记，在反向选择压力下，发生第二次重组，质粒脱离染色体，形成靶 DNA 片段的缺失[44]。基于 RecA 重组系统的重组策略在实际应用中也有不少局限性，如：RecBCD 具有核酸外切酶活性，可降解线性 DNA，因此打靶基因片段需整合于质粒载体上才可进行同源重组[44]；打靶片段需较长的同源臂，重组率低[13,45-46]；当前常用的反向选择标记如 *sacB* 和 *ccdB* 基因不能广泛使用[47]；接合转移的效率低，且要求受体菌具有可供筛选的抗性标记[47-48]。2005 年，Demarre 等[48]开发了生长缺陷型供体菌及自杀质粒，提高了 RecA 重组系统中第一次重组整合的效率，并解决了重组技术对受体菌抗性依赖的问题。在此基础上，Luo 等[49]开发了新的反向选择标记 *vm480* 基因，其表达产物对于革兰氏阴性细菌具有广泛的毒性，并构建了受 IPTG 或阿拉伯糖诱导的自杀载体，大大提高了重组效率及重组技术的通用性。

同源重组与位点特异性重组结合是当今细菌遗传操作技术中最流行的应用方法。2000 年，Datsenko 等[45]利用 λ 噬菌体 Red 重组系统发展了操作更便捷的细菌染色体基因一步失活技术，成为大肠杆菌及邻近种细菌基因替换或敲除的标准技术。其操作流程为：将一段两侧含有 FRT 特异位点的抗性基因通过 λRed 重组酶重组替换靶基因，然后将靶细菌引入辅助质粒，表达 Flp 重组酶切除抗性基因以达到敲除靶基因的目的。2008 年，Herring 等[50]和 Kolisnychenko 等[51]在 Datsenko 等重组方法基础上开发了另一种基于 λRed 重组系统的方法——Gene gorging。Gene gorging 与前者最明显的区别在于利用 I-*Sce* I 归巢内切酶代替辅助质粒上的 Flp 重组酶，避免了切除抗性基因后仍然留下一个 FRT 位点(疤痕)的问题。2008 年 Yu 等[52]则进一步改进了 Gene gorging 法，采用单个质粒代替双质粒系统，单个质粒上带有 2 个独立的启动子，一个为阿拉伯糖启动子，诱导 λRed 重组酶表达；另一个为鼠李糖启动子，诱导 I-*Sce*I 归巢内切酶表达，切割染色体 DNA，实现重组。尽管如此，λRed 同源重组技术目前仅能在大肠杆菌以及少量邻近细菌中实现[52]，严重制约了该技术的广泛适用性。2009 年，Yamamoto 等[53]首次将 λRed 重组质粒 pKD46 引入霍乱弧菌，完成了霍乱弧菌多个基因的替换，实现了 λRed 重组技术在与大肠杆菌亲缘关系远的细菌中的应用。他们发现 λRed 重组系统在霍乱弧菌中的重组效率低，所需的同源臂片段长。此外，他们的成功并不能在更多的细菌物种中复制，笔者试图将 pKD46 以及衍生质粒 pSIM5 采用同样方法引入多种弧菌中均不能实现基因重组(未发表)。

除上述将同源重组酶与位点特异性重组酶结合外，将不同位点特异性重组酶结合应用也可实现基因组 DNA 的插入或敲除[54](图 5)。由此可以看出，不同重组酶间的组合可改变其应用策略，优化应用方法，从而扩展细菌重组系统在细菌遗传操作中的应用能力。

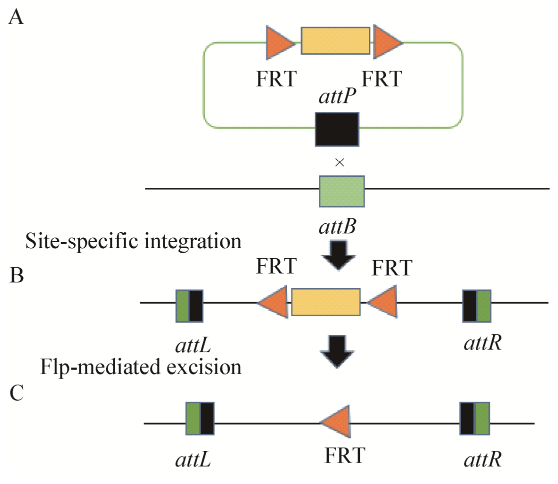

图 5 位点特异性重组酶介导的基因插入和敲除[54]
Figure 5 Site-specific Recombinase-mediated gene invasion and excision[54]

3 问题与展望

尽管细菌重组系统在基因工程操作中得到广泛应用，但仍存在很多不足。如重组过程中，由于假位点的存在，脱靶导致基因重组异常仍是一个有待解决的问题。应用位点特异性重组往往会留下一段“疤痕”，如 loxp 或 FRT 等，这样的疤痕可能会影响其他基因的表达或产生极性效应[55-56]。而引用 I-*Sce* I 归巢内切酶的无痕 λRed 方法操作程序复杂，实验周期长，并且重组效率有待进一步提高[46,50,52]。在 λRed 同源重组与转座重组后，染色体会发生 DNA 分子内的重排现象，导致基因组不稳定[8,16,57]。解决上述问题需要经过长期的实验探索来完善基因工程操作方法。

随着细菌重组系统研究的深入，微生物中新的重组系统被不断发现，它们为细菌遗传操作技术的创新提供了基础。如，继 XerC/D 双组分重组酶发现后，XerS 和 XerH 等单组分重组酶先后被发现[58-59]，它们分别识别 difH 和 difSL 位点，解离基因组二聚体。而细菌整合性接合元件家族 SXT/R391 中存在类似 λRed 重组系统的基因 *bet* 和 *exo*[35,60]，SXT/R391 在弧菌中广泛存在，且实验证实 SXT/R391 宿主范围广泛[35,60-61]，提示 SXT/R391 元件中的 Beta/Exo 重组系统很可能具有高的重组活性，并且其功能发挥很可能不受宿主菌胞内环境差异的影响。λRed 重组系统技术应用的局限性表明迫切需要对此技术进行革新，以扩大其适用对象范围。目前我们对 λRed 重组质粒进行系列改造的工作正在进行当中，其中包括以 SXT/R391 元件的 Beta/Exo 替换 λRed 重组质粒中的同源基因。

另外，由于不同重组酶对相同细菌的生长产生不同影响，如 λRed 同源重组系统在鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)体内的表达将减缓细菌的生长速率，而 RecE/T 同源重组酶却对其生长无影响[20]；并且具有类似重组功能的酶在相同细菌中表达效率存在差异，如 λRed 和 RecE/T 重组酶在分枝杆菌(*Mycobaterium*)中表达效率不如 gp60/61 重组酶[62]。为此，人工改造重组酶或重组酶基因使其在不同细菌中高效表达也显得十分必要，目前已经有成功的案例，如在链霉菌和分枝杆菌的遗传操作中，人工改造 *flp* 基因可提高细菌基因重组效率[53,56,63-64]；此外，2012 年，Fu 等[65]发现全长 RecE/T 重组酶比 λRed 和被截短的 RecE/T 重组酶催化基因重组效率高。

作为细菌遗传操作技术的核心，细菌重组系统在探索基因功能、合成新的次级代谢产物等实验中发挥着巨大作用。随着研究的不断深入，细菌重组系统将会被更广泛地应用在不同生物体中，推动功能基因组学的发展。

参 考 文 献

[1] Cox MM. Motoring along with the bacterial RecA protein[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(2): 127-138
[2] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination[J]. Annual Review of Genetics, 2002, 36: 361-388
[3] Ha T, Kozlov AG, Lohman TM. Single-molecule views of protein movement on single-stranded DNA[J]. Annual Review of Biophysics, 2012, 41: 295-319
[4] Wilkinson M, Wigley DB. Structural features of Chi recognition in AddAB with implications for RecBCD[J]. Cell Cycle, 2014, 13(18): 2812-2820
[5] Krajewski WW, Fu X, Wilkinson M, et al. Structural basis for translocation by AddAB helicase-nuclease and its arrest at χ sites[J]. Nature, 2014, 508(7496): 416-419
[6] Gilhooly NS, Dillingham MS. Recombination hotspots attenuate the coupled ATPase and translocase activities of an AddAB-type helicase-nuclease[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(9): 5633-5643
[7] Wyman C, Ristic D, Kanaar R. Homologous recombination-mediated double-strand break repair[J]. DNA Repair, 2004, 3(8/9): 827-833
[8] Rocha EPC, Cornet E, Michel B. Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems[J]. PLoS Genetics, 2005, 1(2): e15
[9] Quevillon-Cheruel S, Campo N, Mirouze N, et al. Structure-function analysis of pneumococcal DprA protein reveals that dimerization is crucial for loading RecA recombinase onto DNA during transformation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(37): E2466-E2475
[10] Million-Weaver S, Samadpour AN, Merrikh H. Replication restart after replication-transcription conflicts requires RecA in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(14): 2374-2382
[11] Carrasco B, Yadav T, Serrano E, et al. *Bacillus subtilis* RecO and SsbA are crucial for RecA-mediated recombinational DNA repair[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(12): 5984-5997
[12] Saikrishnan K, Yeeles JT, Gilhooly NS, et al. Insights into Chi recognition from the structure of an AddAB-type helicase-nuclease complex[J]. The EMBO Journal, 2012, 31(6): 1568-1578
[13] Murphy KC. Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(8): 2036-2071
[14] Stahl MM, Thomason L, Poteete AR, et al. Annealing vs.

invasion in phage λ recombination[J]. Genetics, 1997, 147(3): 961-977
[15] Weller SK, Sawitzke JA. Recombination promoted by DNA viruses: phage lambda to herpes simplex virus[J]. Annual Review of Microbiology, 2014, 68: 237-258
[16] Hu SB, Fu J, Huang F, et al. Genome engineering of *Agrobacterium tumefaciens* using the lambda Red recombination system[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(5): 2165-2172
[17] Lim SI, Min BE, Jung GY. Lagging strand-biased initiation of red recombination by linear double-stranded DNAs[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 384(5): 1098-1105
[18] Zhang YM, Buchholz F, Muyrers JPP, et al. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*[J]. Nature Genetics, 1998, 20(2): 123-128
[19] Muyrers JPP, Zhang YM, Buchholz F, et al. RecE/RecT and Redα/Redβ initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners[J]. Genes and Development, 2000, 14(15): 1971-1982
[20] Tucker AT, Nowicki EM, Boll JM, et al. Defining gene-phenotype relationships in *Acinetobacter baumannii* through one-step chromosomal gene inactivation[J]. mBio, 2014, 5(4): e01313-e01314
[21] Zhang JJ, Xing X, Herr AB, et al. Crystal structure of *E. coli* RecE protein reveals a toroidal tetramer for processing double-stranded DNA breaks[J]. Structure, 2009, 17(5): 690-702
[22] van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Nature Methods, 2006, 4(2): 147-152
[23] van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. Recombineering mycobacteria and their phages[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(11): 851-857
[24] Sun ZP, Deng AH, Hu T, et al. A high-efficiency recombineering system with PCR-based ssDNA in *Bacillus subtilis* mediated by the native phage recombinase GP35[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(12): 5151-5162
[25] Derbise A, Lesic B, Dacheux D, et al. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in Yersinia[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2003, 38(2): 113-116
[26] Yin J, Zhu HB, Xia LQ, et al. A new recombineering system for *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(6): e36
[27] Swingle B, Bao ZM, Markel E, et al. Recombineering using RecTE from *Pseudomonas syringae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(15): 4960-4968
[28] Datta S, Costantino N, Zhou XM, et al. Identification and analysis of recombineering functions from Gram-negative and Gram-positive bacteria and their phages[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(5): 1626-1631
[29] Loessner MJ, Inman RB, Lauer P, et al. Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes*: implications for phage evolution[J]. Molecular Microbiology, 2000, 35(2): 324-340
[30] Lü neberg E, Mayer B, Daryab N, et al. Chromosomal insertion and excision of a 30 kb unstable genetic element is responsible for phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*[J]. Molecular Microbiology, 2001, 39(5): 1259-1271
[31] Bae T, Baba T, Hiramatsu K, et al. Prophages of *Staphylococcus aureus* Newman and their contribution to virulence[J]. Molecular Microbiology, 2006, 62(4): 1035-1047
[32] Bouchard JD, Moineau S. Homologous recombination between a lactococcal bacteriophage and the chromosome of its host strain[J]. Virology, 2000, 270(1): 65-75
[33] van Pijkeren JP, Britton RA. High efficiency recombineering in lactic acid bacteria[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(10): e76
[34] Dong HJ, Tao WW, Gong FY, et al. A functional *recT* gene for recombineering of Clostridium[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 173: 65-67
[35] Luo P, He XY, Hu CQ. Bacterial SXT/R391 family from integrating conjugative elements—a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(5): 471-479 (in Chinese)
罗鹏, 何香燕, 胡超群. 细菌整合性接合元件 SXT/R391 研究进展[J]. 微生物学报, 2014, 54(5): 471-479
[36] Zhang L, Zhao GP, Ding XM. Site-specific recombination systems: mechanisms and applications[J]. Scientia Sinica Vitae, 2010, 40(12): 1090-1111 (in Chinese)
张霖, 赵国屏, 丁晓明. 位点特异性重组系统的机理和应用[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(12): 1090-1111
[37] Grindley NDF, Whiteson KL, Rice PA. Mechanisms of site-specific recombination[J]. Annual Review of Biochemistry, 2006, 75: 567-605
[38] Grainge I, Sherratt DJ. Site-specific Recombination[M]. Molecular Genetics of Recombination, 2006, 17: 443-467
[39] van Duyne GD. A structure view of Cre-*loxP* site-specific recombination[J]. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2001, 30: 87-104
[40] Chen Y, Rice PA. New insight into site-specific recombination from Flp recombinase-DNA structures[J]. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2003, 32: 135-159
[41] Sekan AS, Isayenkov SV, Blume YB. Development of marker-free transformants by site-specific recombinases[J]. Cytology and Genetics, 2015, 49(6): 397-407
[42] Rutherford K, van Duyne GD. The ins and outs of serine integrase site-specific recombination[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2014, 24: 125-131
[43] Rutherford K, Yuan P, Perry K, et al. Attachment site recognition and regulation of directionality by the serine integrases[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(17): 8341-8356
[44] Nakashima N, Miyazaki K. Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(2): 2773-2793
[45] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645
[46] Lee DJ, Bingle LEH, Heurlier K, et al. Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains[J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 252
[47] Luo P, He XY, Liu QT, et al. Developing universal genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in *Vibrio* species based on suicide T-Vectors carrying a novel counterselectable marker, *vmi480*[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144465
[48] Demarre G, Guérout AM, Matsumoto-Mashimo C, et al. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPα) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(2): 245-255
[49] Luo P, He XY, Liu QT, et al. A universal suicide vector for gene knockout in *Vibrio* and its application: China, CN105063073A[P]. 2015-11-18 (in Chinese)
罗鹏, 何香燕, 刘秋婷, 等. 一种弧菌通用的基因敲除自杀载体及其应用: 中国, CN105063073A[P]. 2015-11-18
[50] Herring CD, Glasner JD, Blattner FR. Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*[J]. Gene, 2003, 311: 153-163
[51] Kolisnychenko V, Plunkett G III, Herring CD, et al. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome[J]. Genome Research, 2002, 12(4): 640-647
[52] Yu BJ, Kang KH, Lee JH, et al. Rapid and efficient construction of markerless deletions in the *Escherichia coli* genome[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(14): e84
[53] Yamamoto S, Izumiya H, Morita M, et al. Application of λ Red recombination system to *Vibrio cholerae* genetics: simple methods for inactivation and modification of chromosomal

genes[J]. Gene, 2009, 438(1/2): 57-64
[54] Fedoryshyn M, Petzke L, Welle E, et al. Marker removal from actinomycetes genome using Flp recombinase[J]. Gene, 2008, 419(1/2): 43-47
[55] Chen FW, Jiang J, Ouyang HS, et al. Markerless deletion system for *Escherichia coli* using short homologous sequences and positive-negative selectable cassette[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(5): 1472-1481
[56] Zelyas N, Tahlan K, Jensen SE. Use of the native flp gene to generate in-frame unmarked mutations in *Streptomyces* spp.[J]. Gene, 2009, 443(1/2): 48-54
[57] Komatsu M, Uchiyama T, Ōmura S, et al. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(6): 2646-2651
[58] Le Bourgeois P, Bugarel M, Campo N, et al. The unconventional Xer recombination machinery of Streptococci/Lactococci[J]. PLoS Genetics, 2007, 3(7): e117
[59] Leroux M, Rezoug Z, Szatmari G. The Xer/*dif* site-specific recombination system of *Campylobacter jejuni*[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2013, 288(10): 495-502
[60] Garriss G, Poulin-Laprade D, Burrus V. DNA-damaging agents induce the RecA-independent homologous recombination functions of integrating conjugative elements of the SXT/R391 family[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(9): 1991-2003
[61] Luo P, Jiang HY, Wang YH, et al. Prevalence of mobile genetic elements and transposase genes in *Vibrio alginolyticus* from the southern coastal region of China and their role in horizontal gene transfer[J]. International Microbiology, 2012, 15 (4): 201-210
[62] van Kessel JC, Hatfull GF. Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets[J]. Molecular Microbiology, 2008, 67(5): 1094-1107
[63] Gust B, Challis GL, Fowler K, et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(4): 1541-1546
[64] Song HH, Niederweis M. Functional expression of the Flp recombinase in *Mycobacterium bovis* BCG[J]. Gene, 2007, 399(2): 112-119
[65] Fu J, Bian XY, Hu SB, et al. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(5): 440-446

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一，主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展，其内容要求新颖丰富，观点明确，论述恰当，应包含作者自己的工作内容和见解。因此，作者在动笔之前必须明确选题，一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面，在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势，即掌握其内在的精髓，深入到专题研究的本质，论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望，提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外，作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法，辅以注释，客观而有少量评述，使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是：(1) 我刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介，并指出自己的工作(已发表的文章或专利)在综述中的体现，同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文，引用文献数量不限。