

# pBR322-Red 在大肠杆菌 *lac* 操纵子基因敲除和敲入中的应用 Gene Knockout and Knockin on the *Escherichia coli lac* Operon Loci Using pBR322-Red System

陈伟<sup>1,2</sup>, 于梅<sup>1</sup>, 李山虎<sup>1</sup>, 王鸣刚<sup>2</sup>, 周建光<sup>1\*</sup>

CHEN Wei<sup>1,2</sup>, YU Mei<sup>2</sup>, LI Shan-Hu<sup>2</sup>, WANG Ming-Gang<sup>2</sup> and ZHOU Jian-Guang<sup>1\*</sup>

1. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850

2. 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005

1. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

2. The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**摘要** pBR322-Red 是一种新型重组工程系统, 它携带了  $\lambda$ -噬菌体 Red 重组酶基因和一系列调控元件。对 pBR322-Red 最优重组条件进行探索后应用该质粒提供的体内同源重组功能, 在菌株 W3110 体内, 对染色体上的 *lac* 操纵子进行了基因修饰, 包括: ①运用 *kan/sacB* 选择反选择方法和重叠引物方法敲除了阻遏基因 *lacI*, ②运用 *kan/sacB* 选择反选择方法和线性双链 DNA 介导的 DNA 重组方法将报告基因 *lacZ* 敲入 *lacA* 和 *lacY* 的位置, 并且首次测定了报告基因 *lacZ* 在这三个结构基因位置的组成性表达情况。结果表明运用不同的重组策略, pBR322-Red 系统都能方便有效地对大肠杆菌 W3110 染色体进行基因敲除和敲入修饰。

**关键词** pBR322-Red, 同源重组, *lac* 操纵子, 敲除, 敲入

中图分类号 Q87 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0192-06

**Abstract** pBR322-Red is a newly constructed recombinering plasmid, which contains a part of the pBR322 vector, a series of regulatory elements of  $\lambda$ -prophage and Red recombination genes. In the beginning, we studied the best working conditions of pBR322-Red, and then modified *lac* operon in *E. coli* W3110 chromosome using the plasmid as follow: Firstly, we knockout the *lacI* gene using Red-mediated recombinering with overlapping single stranded DNA oligonucleotides. Secondly, we substituted the *lacA* and *lacY* genes with *lacZ*, a report gene, by Red-mediated linearized double strands DNA homologous recombination. Finally, we detected the expression of *lacZ* on these loci for the first time. The results suggested that pBR322-Red system is suitable for modifying W3110 chromosome with various recombination strategies.

**Key words** pBR322-Red, homologous recombination, *lac* operon, knockout, knockin

近年来, Red 重组工程(recombineering)系统被成功地应用于大肠杆菌染色体 DNA 和 BAC 基因组 DNA 的修饰<sup>[1,2]</sup>, 为建立具有新遗传特性的工程菌株和基因功能研究提供了有力的工具。

Red 是一种  $\lambda$ -噬菌体主管同源重组的重组酶, 存在于  $\lambda$ -噬菌体左向操纵子上, 由 *exo*、*beta* 和 *gam* 基因组成, 表达由  $P_L$  启动子和 C1857 阻遏蛋白所控制, 编码 Exo、Beta 和 Gam 三种蛋白质。美国国立卫

Received: November 5, 2004; Accepted: December 24, 2004.

This work was supported by Grant from the Medical Science Foundation of PLA during the 10th Five-year Plan Period(No. 01MA089).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-66931807; E-mail: zhoujgx@public.bta.net.cn

军队“十五”医药卫生科学基金资助(No. 01MA089)。

生研究院 Yu 等将缺陷型  $\lambda$  噬菌体整合到大肠杆菌染色体上,构成了 DY330 和 DY331 等重组工程系统<sup>[3]</sup>。在该系统中,PCR 方法产生的线性双链 DNA 分子或者合成的寡核苷酸单链 DNA 分子均可用做打靶分子,只需约 40bp 长的同源臂序列就能实现高达  $10^{-3}$  的重组效率。在体内实现对 DNA 序列的敲除、敲入、定点突变。省去传统的体外构建环型打靶载体的繁琐步骤。由于 DY330 和 DY331 系统具有高的重组效率和低非特异性重组背景,因而成为最有用的重组工程菌株。然而,Red 介导的基因修饰只能在上述菌株中进行,有时 BAC 大质粒难以转化这些菌株,也无法对其他种类细菌染色体进行修饰。

为了解决上述问题,本研究室通过 gap-repair<sup>[4]</sup> 的方法将包括 Red 基因和一系列完整调控元件的长 6.7kb 的缺陷型  $\lambda$  噬菌体 DNA 亚克隆到质粒 pBR322 上,建立了一种可转移的新型重组工程系统 pBR322-Red<sup>[5]</sup>。本研究中我们应用 pBR322-Red 系统,分别成功地对大肠杆菌 lac 操纵子携带的基因进行了敲除和敲入。证实了 pBR322-Red 的方便实用性,为进一步运用 pBR322-Red 奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒:菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、W3110、质粒 pBR322 和 pUC19 均为本室保存,pK03 为美国国立卫生研究院 Court DL 博士馈赠,pBR322-Red、puc19-kan-sacB 为本室构建,pGL3-basic 购自 Promega 公司,

ONPG 为 Sigma 公司产品。

1.1.2 工具酶和试剂: *Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶为申能博彩生物公司产品;质粒提取试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒购自 Promega 公司;PCR 引物为上海博亚公司合成。

1.1.3 PCR 扩增及鉴定引物:引物由上海博亚生物技术有限公司合成,带同源臂引物序列见表 1;小写字母代表同源臂序列,正常大写字母代表 PCR 扩增引物序列,斜体大写字母代表重叠引物序列。其中 cwt1 和 cwt2 用于扩增 *kan-sacB* 以替换 *lacZ* 编码区;重叠引物 cwt3 和 cwt4 用于替换上述 *kan-sacB*;cwt5 和 cwt6 用于扩增 *kan-sacB* 以替换 *lacI* 编码区;重叠引物 cwt7 和 cwt8 用于替换上述 *kan-sacB*;cwt9 和 cwt10 用于扩增 *kan-sacB* 以替换 *lacA* 编码区,cwt11 和 cwt12 用于扩增 *lacZ* 编码区以替换 *lacA* 编码区;cwt13 和 cwt14 用于扩增 *kan-sacB* 以替换 *lacY* 编码区;cwt15 和 cwt16 用于扩增 *lacZ* 编码区以替换 *lacA* 编码区。

对重组菌进行鉴定时,引物设计的一般原则是:一条引物设计在打靶区外围,另外一条则位于线性打靶序列内部;或者两条位于打靶区左右两侧(见表 2)。其中引物 cw5 为 *kan* 基因编码链上的一段序列,引物 cw7 为 *lacZ* 编码链 5' 端的一段序列,引物 cw9 和 cw10 位于 *lacI* 基因编码区左右两侧,引物 cw11 为 *lacA* 编码链 5' 端的一段序列,引物 cw12 为 *lacZ* 编码区无义链上的一段序列,引物 cw14 为 *lacY* 非编码链 5' 端的一段序列。

表 1 本研究所用带同源臂引物及其序列

Table 1 Primers with homologous arm used in this research

Sequence name	Primer sequence
10	5'-tcggtgttgcctggtgattgaacaatatgagataaagccTATGGACAGCAAGCGAACCG-3'
11	5'-tcgceataaaaaagcgttaattcttgtaaacgattccTACAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3'
cwt1	5'-gtggaattgtagcggataacaatttcacacaggaacagctTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3'
cwt2	5'-ccttaacggaatacggcagacatggcctgcccgttattaCATCACATATACCTGCCGTTTC-3'
cwt3	5'-ggaattgtagcggataacaatttcacacaggaacagctTAATAACCGGGC-3'
cwt4	5'-ggatttccttacggaatacggcagacatggcctGCCCGTTATTA-3'
cwt5	5'-gatagcggcggaaagagtgcaattcagggtggaafTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3'
cwt6	5'-cctaatgagtgagctaacacattaattgcgtgcccCATCACATATACCTGCCGTTTC-3'
cwt7	5'-tggcatgatagcggcggaaagagtgcaattcagggTGCTGAATGCCCAACG-3'
cwt8	5'-ggggtgcccattgagtgagctaacacattaattgCGTTGCCCAITCACCA-3'
cwt9	5'-gcctatccgacaaacatatacagaagggatgagcTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3'
cwt10	5'-ggcctgataagcgcagctatcaggcaattttataatCATCACATATACCTGCCGTTTC-3'
cwt11	5'-ttacggcaatacggcagacatggcctgcccgttattaTTACACGGCGATCTTTCCGGC-3'
cwt12	5'-gatagcggcggaaagagtgcaattcagggtggaafTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3'
cwt13	5'-ggcattgctgcccgtatttcgctgaaggaaatccatCATCACATATACCTGCCGTTTC-3'
cwt14	5'-tcgataagcggcctcggccatccagcattgctTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3'
cwt15	5'-cctaatgagtgagctaacacattaattgcgtgcccCATCACATATACCTGCCGTTTC-3'
cwt16	5'-tggcatgatagcggcggaaagagtgcaattcagggTCCTGAATGCCCAACG-3'

表 2 本研究所用鉴定引物

Table 2 Primers for identification used in this research

Sequence name	Primer sequence
cw5	5'-GGAATTCATATGTATGGACAGCAAGCGAACCG-3'
cw7	5'-GAGTTAGCTCACTCATTAGG-3'
cw9	5'-GCATCTCCGGCGCTACAAC-3'
cw10	5'-CGCTCACAATTCCACACAAC-3'
cw11	5'-CGTCGTCAGCTGAATGAAGTC-3'
cw12	5'-AGCATATCCTGCACCATCGTCTGC-3'
cw14	5'-CAATGCGATCACTCCGTTATG-3'

## 1.2 方法

**1.2.1 感受态的制备与电击转化:**将过夜培养的大肠杆菌 W3110(pBR322-Red)按 50:1 的量接种,振荡培养至  $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 。取 15 mL 培养液于 42℃ 诱导 7.5 min 后冰浴 30 min。离心收集菌体,用去离子水洗 3~4 次,最后将菌体重悬于 100  $\mu$ L 冷的去离子水中,取 48  $\mu$ L 菌液与约 300 ng 的打靶分子 DNA 片段进行电转。电转条件参照 Yu<sup>[3]</sup> 等人的方案进行。

**1.2.2 线性双链 DNA 介导的 DNA 重组:**先合成 2 条引物,由约 40 个碱基的同源臂和约 20 个碱基的 PCR 引物 2 部分组成。使用高保真 DNA 聚合酶,经 PCR 合成线性双链 DNA 打靶分子(5'同源臂 + 筛选标记或目的基因 + 3'同源臂)。取大约 300 ng 经纯化的打靶分子和约 50  $\mu$ L W3110(pBR322-Red)感受态细菌混合,进行电击转化。用含筛选标记的 LB 平板筛选发生基因替换的阳性的克隆。

**1.2.3 重叠引物介导的 DNA 重组:**合成两条 50~60 个碱基长的寡核苷酸作为同源臂,使它们的 3' 端 10~30 个碱基序列互补。将各约 100 ng 的上述重叠引物寡核苷酸打靶分子电击转化 W3110(pBR322-Red)感受态,通过合适的遗传表型筛选阳性克隆。

**1.2.4 *kan/sacB* 选择反选择方法:**需要两步,① PCR 合成第一个打靶分子(5'同源臂 + *kan/sacB* + 3'同源臂),取上述 300 ng 纯化的打靶分子 DNA,与大约 50  $\mu$ L 感受态细菌混合后进行电击转化。阳性克隆能在含 25  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上生长(*kan<sup>R</sup>*),在含 7% 蔗糖的 M63 培养基上死亡(*sacB<sup>S</sup>*)。②按照 1.2.2 中线性双链 DNA 介导的重组方法,PCR 合成第二个打靶分子(5'同源臂 + 目的基因 + 3'同源臂);或者按照 1.2.3 重叠引物介导的 DNA 重组方法,合成第二个打靶分子(两条寡核苷酸)。第二个打靶分子替换 *kan/sacB* 基因时,完成基因敲入或敲除,阳性菌落呈现 *kan<sup>S</sup>* 和 *sacB<sup>R</sup>* 表型,

能在含 7% 蔗糖的 M63 培养基上生长。

**1.2.5  $\beta$ -gal 的定量分析:**过夜培养的细菌按 50:1 的量接种,振荡培养至  $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 。取 1 mL 培养液与 1 mL Z Buffer(参见分子克隆第二版)混合,测  $OD_{600}$  的值。从中取一定体积的液体与 Z Buffer 混合至体积为 1 mL,并加 2 滴氯仿和 1 滴 0.1% 的 SDS 进行剧烈振荡 10 s。于 28℃ 水浴 5 min 后加 200  $\mu$ L ONPG(4 mg/mL)混匀至出现黄色,记下变黄时间,同时加入 0.5 mL 1 mol/L 的  $Na_2CO_3$  以终止反应,测定此时  $OD_{420}$  和  $OD_{550}$  的值。最后根据公式:  $u = 1000 \times (A_{420} - 1.75 \times A_{550}) / (tv \times A_{600})$  计算  $\beta$ -gal 的表达量。其中  $t$  表示变黄时间(min), $v$  为所取细菌的量(mL)。

## 2 结果

### 2.1 重组条件的选择

根据 Yu 等人提供实验方案<sup>[3]</sup>,设计了通过检测 *kan* 基因替换 W3110 染色体中的 *galk* 基因(*galk* < *kan*)的频率,确定 Red 表达量对重组效率的影响。将打靶分子 DNA 片段的用量定为 300 ng。在同一次实验中设计一系列诱导 Red 重组酶表达的不同时间点:42℃ 诱导 2.5 min、7.5 min、10 min 和 12.5 min。计算各个时间点的重组效率。结果证明 42℃ 诱导 7.5 min 时,W3110(pBR322-Red)介导的重组效率最高,诱导 10 min 后重组效率显著下降(图 1)。

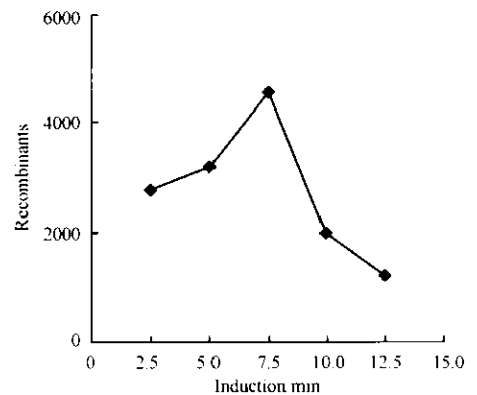


图 1 诱导时间对 pBR322-Red 重组效率的影响

Fig. 1 Effect of induction time on recombination

### 2.2 重叠引物介导的 *lacI* 基因敲除与表达分析

为了验证重组质粒 pBR322-Red 在重叠引物介导的 DNA 重组中的有效性,同时探索 *lac* 操纵子中 *lacZ*、*lacY* 和 *lacA* 基因在不同调控模式下的表达情况,以 W3110 染色体上 *lacI* 基因为靶点,按照材料与方法中 *sacB-kan* 选择反选择方法和重叠引物(用引物 cw5 和 cw6 扩增 *kan-sacB* 替换 *lacI* 后的菌株

命名为 CW3,然后用重叠引物 *cwt7* 和 *cwt8* 替换 CW3 中的 *kan-sacB*,得到的阳性克隆菌株命名为 CW4) 介导的 DNA 重组方法(图 2),不留痕迹地敲除了 *lacI* 基因,敲除 *lacI* 基因的菌落能在含 7% 蔗糖的固体 M63 培养基上生长,菌株 CW3 和 CW4 的 PCR 鉴定见图 3(用引物 *cw9* 和 *cw10* 进行扩增时,成功敲除 *lacI* 基因的菌株应出现 274bp 的条带;由于我们所使用的普通 *Taq* 酶的效率不高,不能扩增大于 3kb

的片段,因而对 CW3 进行鉴定时没有出现带。当用引物 *cw5* 和 *cw9* 进行扩增时,含 *kan-sacB* 的菌株 CW3 应出现 1.1kb 的带,而不含 *kan-sacB* 的菌株 CW4 则不能扩增出任何条带)。结果表明我们所构建的菌株正确。然后我们对 CW4 和野生型 W3110 进行了  $\beta$ -半乳糖苷酶活性分析,结果表明 CW4 中组成型表达的  $\beta$ -半乳糖苷酶产量大约是经 IPTG 诱导后 W3110 中表达产量的 2 倍以上。

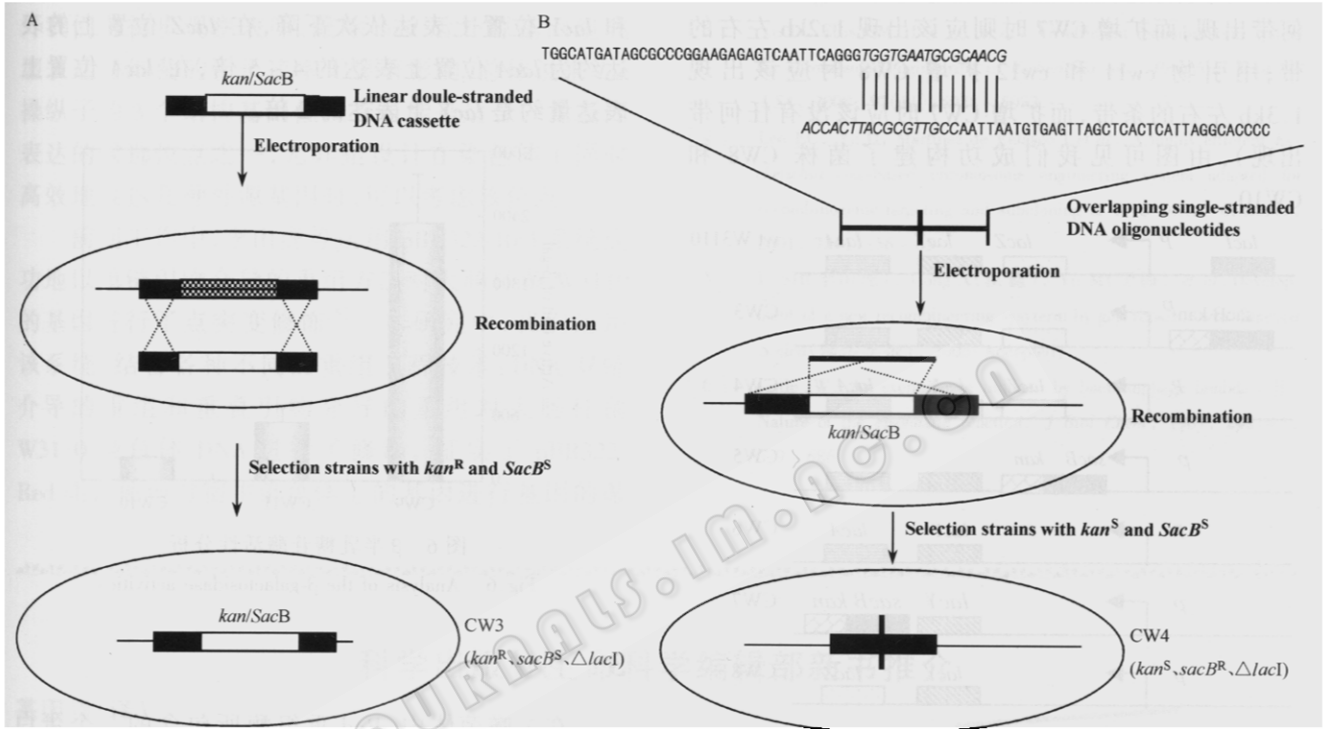


图 2 敲除 *lacI* 基因的策略

Fig.2 Strategy of knockout gene *lacI*

A: substitute *kan/sacB* for *lacI*; B: knockout *kan/sacB* by overlapping primers.

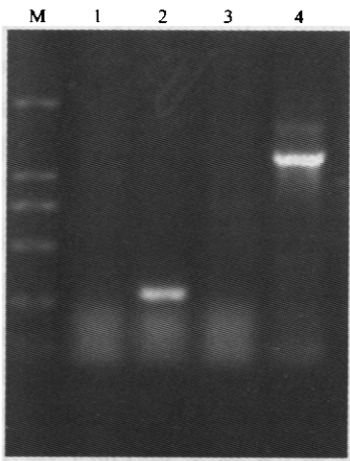


图 3 菌株 CW3 和 CW4 的 PCR 鉴定图

Fig. 3 Identification of strains CW3 and CW4 by PCR

M: marker DL 2000; 1: CW3 (amplified by *cw9/cw10*); 2: CW4 (amplified by *cw9/cw10*); 3: CW4 (amplified by *cw9/cw5*); 4: CW3 (amplified by *cw9/cw5*).

### 2.3 线性双链 DNA 介导的 *lacZ* 报告基因敲入 *lacA* 和 *lacY* 位点

同样通过重叠引物介导的重组将 CW4 染色体上的 *lacZ* 基因敲除,构建的阳性克隆菌为 CW6。为验证用 pBR322-Red 重组系统进行线性双链 DNA 介导基因敲入的可行性,选择以大肠杆菌 CW6 染色体上 *lacA* 和 *lacY* 基因为外源报告基因 *lacZ* 的敲入位点。按照材料与方法中给出步骤诱导 Red 重组酶表达,再通过 *sacB-kan* 选择反选择方法和线性双链 DNA 介导的 DNA 重组方法(用引物 *cwt9* 和 *cwt10* 扩增 *kan-sacB* 替换 *lacA* 的菌株命名为 CW7,用 *cwt11* 和 *cwt12* 扩增 *lacZ* 以替换上述 *kan-sacB* 的菌株命名为 CW8;用 *cwt13* 和 *cwt14* 扩增 *kan-sacB* 替换 *lacY* 的菌株命名为 CW9,用 *cwt15* 和 *cwt16* 扩增上述 *kan-sacB* 的菌株命名为 CW10),构建了外源报告基因

*lacZ* 敲入 *lacA* 和 *lacY* 位点菌株 CW8 和 CW10(图 4)。CW8 和 CW10 均呈现 *kan<sup>r</sup>* 和 *sacB<sup>r</sup>* 表型,在含 7%蔗糖的 M63 培养基上生长。PCR 鉴定结果见图 5(用引物 cw14 和 cw5 扩增菌株 CW10 应该没有任何带出现,而扩增 CW9 时则应该出现 1.1kb 左右的条带;用引物 cw7 和 cw12 扩增 CW10 时应该出现 1.2kb 左右的条带,而扩增 CW9 时应该没有任何带出现。用引物 cw11 和 cw5 扩增 CW8 时应该没有任何带出现,而扩增 CW7 时则应该出现 1.2kb 左右的条带;用引物 cw11 和 cw12 扩增 CW8 时应该出现 1.3kb 左右的条带,而扩增 CW7 时应该没有任何带出现),由图可见我们成功构建了菌株 CW8 和 CW10。

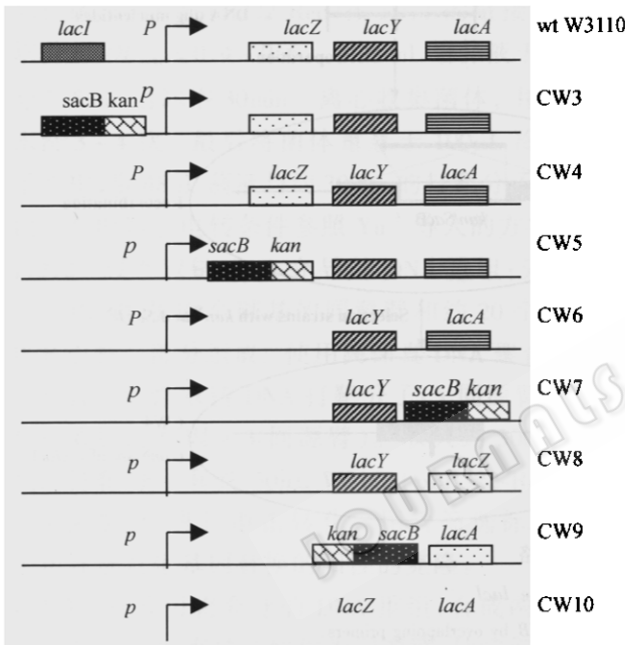


图 4 本研究所构建菌株基因型简图

Fig.4 Sketch maps of recombinated strains constructed in this study

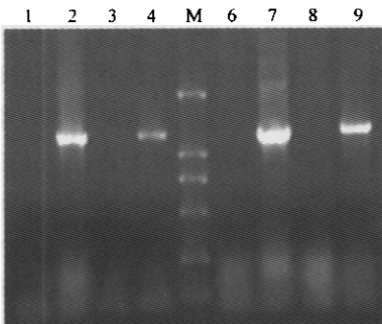


图 5 菌株 CW7、CW8、CW9 和 CW10 的 PCR 鉴定

Fig.5 Identification of CW7, CW8, CW9 and CW10 by PCR 1: CW10 (cw14/cw5); 2: CW9 (cw14/cw5); 3: CW9 (cw7/cw12); 4: CW10 (cw7/cw12); M: marker DL 2000; 6: CW8 (cw11/cw5); 7: CW7 (cw11/cw5); 8: CW7 (cw11/cw12); 9: CW8 (cw11/cw12).

### 2.4 报告基因在 *lacZ*、*lacA* 和 *lacY* 位点处的组成型表达分析

为了探索外源基因在 *lacZ*、*lacA* 和 *lacY* 位点处的组成型表达,分别对报告基因 *lacZ* 进行  $\beta$ -gal 定量分析,每次每个菌株至少取 5 个不同量的细菌数进行分析,每个菌株至少进行了 3 次重复实验。最后进行统计学分析,结果如图所示。实验表明无阻遏基因 *lacI* 存在时,报告基因 *lacZ* 分别在 *lacZ*、*lacA* 和 *lacY* 位置上表达依次下降,在 *lacZ* 位置上的表达约为 *lacA* 位置上表达的 4~5 倍,在 *lacA* 位置上表达量约是 *lacY* 上表达的 2 倍。

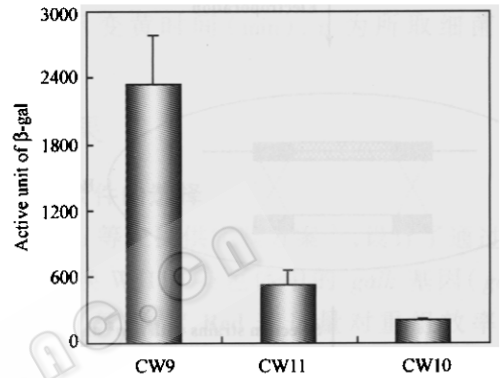


图 6  $\beta$  半乳糖苷酶活性分析

Fig.6 Analysis of the  $\beta$ -galactosidase activities

### 3 讨论

在  $\lambda$ -噬菌体中,Red 重组酶所包含的 3 个蛋白质分子通过严格的调控按照合适的比例进行表达,并分别行使各自的生物功能。其中 Gam 抑制 RecB-CD 核酸酶活性,防止 RecBCD 降解线性双链 DNA<sup>[2]</sup>; Exo 从双链 DNA 末端按 5'→3' 方向消化,产生有 3' 单链突出端的 DNA 分子<sup>[6]</sup>; Beta 结合在由 Exo 消化产生的 3' 端突出上,介导两条互补 DNA 链之间的退火和重组<sup>[2]</sup>。在 30℃ 时, cI857 阻遏物完全抑制 P<sub>L</sub> 启动子的活性; 温度上升到 42℃ 时, cI857 阻遏蛋白失活, P<sub>L</sub> 启动子高效率的启动下游 Red 基因的表达从而提供重组功能<sup>[2]</sup>。Yu 等人的研究表明, Red 基因以单拷贝形式存在存在 *E. coli* DY330 染色体上时, 42℃ 诱导 15min, 即可达到最佳重组效率<sup>[3]</sup>。与 DY330 不同, pBR322 质粒为中等拷贝 (20~50 个) 质粒载体, 复制子是 ColE1 类型。为此对 pBR322-Red 系统的反应条件进行了探索, 证明 pBR322-Red 系统的最佳诱导时间为 7.5 min, 应用该条件对 *lacI* 基因进行了完全敲除, 将 *lacZ* 报告基因分别替换了 *lacA* 和 *lacY* 基因。

我们的研究表明,在 *lacI* 基因缺失的条件下,染色体上的 *lacZ* 基因能够相对高效地进行组成型表达,表达产量与以质粒 pBR322 为载体的以强启动子  $P_L$  控制的 *lacZ* 基因表达量相差无几(数据未显示)。比较了 *lacZ* 报告基因分别在 *lacZ*、*lacY* 和 *lacA* 位置上的组成型表达,结果表明其表达的比例约为 1:0.2:0.1,与在自然状态下, *lacZ*、*lacY* 和 *lacA* 3 个基因在细胞中表达比例为 1:0.5:0.2 类似。此外我们的初步观察表明,敲除 *lacI* 后外源基因组成型表达对细菌的生长速率无显著影响,总体说来 *lac* 操纵子的 3 个结构基因位置有可能是适合外源基因表达的候选位点之一,尤其是设计在染色体上同时高效地表达几种外源基因时,可以考虑该位点。

前期工作中,李山虎等运用 pBR322-Red 系统成功地以单链引物介导的重组方法对大肠杆菌 W3110 的基因进行了点突变修饰<sup>[5]</sup>。本研究中,我们运用该系统,结合各种不同的重组工程技术:DNA 双链介导的重组和重叠引物介导的重组对大肠杆菌 W3110 染色体 DNA 进行了修饰,证实了 pBR322-Red 能方便地对宿主染色体上的基因进行基因的敲

除和敲入。为 pBR322-Red 新型重组工程在各种不同宿主菌中的进一步运用奠定了基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(10): 769 - 779
- [2] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet*, 2002, 36: 361 - 388
- [3] Yu D, Ellis HM, Lee EC *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 5978 - 5983
- [4] 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
- [5] Li SH(李山虎), Hong X(洪鑫), Yu M(于梅) *et al.* Development of a new recombineering system by gap-repair. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报). 2005(Accepted).
- [6] Little JW. An exonuclease induced by bacteriophage lambda. II. Nature of the enzymatic reaction. *J Biol Chem*, 1967, 242(4): 679 - 686