

## 用 Red/ET 重组酶构建基因打靶载体

# New Option for Gene-targeting Vector Construction——Red/ET Recombination

杨建岭<sup>1</sup>, 顾淑萍<sup>2\*</sup>, 陈 臣<sup>2</sup>, 王铸钢<sup>2</sup>, 许 燕<sup>1</sup>, 费 俭<sup>2</sup>

YANG Jian-Ling<sup>1</sup>, GU Shu-Ping<sup>2\*</sup>, CHEN Chen<sup>2</sup>, WANG Zhu-Gang<sup>2</sup>, XU Yan<sup>1</sup> and FEI Jian<sup>2</sup>

1 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234

2 上海南方模式生物研究中心, 上海 201203

1 Department of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China

2 Shanghai Research Center for Biomodel Organism, Shanghai, China

**摘 要** 基因敲除的小鼠模型是研究基因功能的一种重要资源。采用常规分子克隆的方法建立基因敲除的打靶载体存在构建效率低和难以获得长片段同源臂的缺点。因此快速高效地构建打靶载体, 已成为获得特定基因敲除动物模型的关键环节。为研究 *Resp18* 未知功能分泌肽基因, 应用一种新的 DNA 工程平台——Red/ET 同源重组技术来构建其打靶载体, 并比较了这一方法在构建不同长度同源臂中的效率。研究表明, Red/ET 重组方法构建打靶载体具有很高的效率, 可以获得较长的同源臂, 并且不会引入突变, 有助于获得更高的打靶效率。因此 Red/ET 重组为构建打靶载体提供了一种新的可靠的方法。

**关键词** Red/ET 重组, 基因打靶, 载体

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)06-0919-06

**Abstract** The study of human new gene's function has become an increasingly active academic field basically relying on the gene knockout (KO) mouse. The construction of targeting vector economically and efficiently has turned into the key step to acquire a KO mouse because of the low efficiency of recombination with traditional constructed targeting vector. For study of the function of new gene-*Resp18*, we brought in a new DNA engineering platform-Red/ET recombination to construct *Resp18* targeting vector. Red/ET recombineering differs from the conventional ways of vector construction (e.g. PCR, restriction enzyme digestion and ligation) and achieves genetic modification by acquisition, insertion, fusion or replacement of the target gene through small fragments mediated homologous recombination. Now *Resp18* targeting vectors of three strategies were yielded successfully through two homologous recombination processes of retrieve and *neo*-targeting. Red/ET recombination has the advantage of getting longer homology regions without mutation, which makes it a new and reliable alternative to the construction of a targeting vector today.

**Key words** Red/ET recombination, knockout, vector

Red/ET 重组系统 (Red/ET recombination) 是通过应用 *Rac* 噬菌体的 *RecE/RecT* 或  $\lambda$  噬菌体的 *Red $\alpha$ /Red $\beta$*  系统而建立的 DNA 重组技术<sup>[1,2]</sup>。其中 ET 是指 *Rac* 噬菌体的 *RecE/RecT*, Red 是指  $\lambda$  噬菌体的

*Red $\alpha$ /Red $\beta$ /Red $\gamma$* <sup>[3]</sup>。以 *Red $\alpha$ /Red $\beta$ /Red $\gamma$*  系统为例, *Red $\alpha$*  编码一个 5'-3' 的核酸外切酶 (*Exo*), 能够从 5' 末端向 3' 降解 DNA 单链, 产生 3' 末端单链悬突 (3' single-strand DNA overhangs); *Red $\beta$*  编码一种单链结

合蛋白(Beta),它结合到由核酸外切酶(Exo)外切产生的3'末端单链悬突上。而Red $\gamma$ 编码的蛋白Gam,可以抑制大肠杆菌体内表达的RecBCD核酸外切酶活性,使体内的外源DNA不被降解。尽管Gam不是重组过程所必需,但却提高了Beta、Exo完成的体内同源重组的效率<sup>[1]</sup>。许多研究都证实,RecE/RecT与Red $\alpha$ /Red $\beta$ 所行使的功能相似<sup>[4]</sup>。人们推测认为,Red/ET可能的作用机理是:带有同源臂的供体DNA分子首先经核酸外切酶(Exo)的作用而使其3'端形成单链悬突,在单链结合蛋白(Beta)的引导下,供体分子的同源臂单链悬突与受体分子的同源臂发生结合,由于DNA链间的呼吸作用,促成供体与受体DNA分子之间重组的发生。

目前,Red/ET(Red $\alpha$ /Red $\beta$ /Red $\gamma$ )重组系统在实验室使用过程中主要有两种方式<sup>[5]</sup>:一是构建含有Red $\alpha$ /Red $\beta$ /Red $\gamma$ 和RecE/RecT的诱导表达型质粒,在使用过程中将这种质粒导入到需要进行同源重组的细胞中,表达相应的重组系统,这方面的代表有pSC101-BAD- $\gamma$  $\beta$  $\alpha$ -A-tet。它是一种低拷贝、温度敏感型质粒,于30℃时复制,37℃时停止复制,通过L-阿拉伯糖诱导重组蛋白的表达。二是将突变失活的 $\lambda$ 噬菌体Red $\alpha$ /Red $\beta$ 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菌株,在使用时将需要进行同源重组的DNA导入到这些菌株中。这方面的代表有DY330、DY380、EL-250等菌株<sup>[1,5]</sup>。在这些菌株内,启动子 $\lambda$ -P<sub>L</sub>启动 $exo$ 、 $bet$ 、 $gam$ 这三个基因编码负责重组的蛋白。而启动子 $\lambda$ -P<sub>L</sub>本身又受一个温度敏感型的 $\lambda$ cI857阻抑物控制。在32℃时检测不到 $exo$ 、 $bet$ 、 $gam$ 的表达,当培养温度提高到42℃诱导10~15min时, $exo$ 、 $bet$ 、 $gam$ 会大量表达。Red/ET重组可用于质粒的构建或对BAC或者PAC修饰,包括点突变、删除、插入以及对于BAC的亚克隆<sup>[6,7]</sup>。本文综合应用上述的两种重组系统,以Resp18为实验对象,进行不同长度打靶载体的构建,比较了各自构建的效率,并讨论了这一方法的操作过程。Resp18位于小鼠1号染色体(75718870-75725420),与人类该基因具有较高同源性,是编码175个氨基酸的小肽且N-端具有信号肽结构。Resp18打靶载体的成功构建,证实Red/ET重组系统的有效性,也为进一步研究该基因功能打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 BACs:含Resp18的BAC购买于BAC PAC

RESOURCES CHILDREN'S HOSPITAL OAKLAND.

**1.1.2 质粒与菌株:**质粒PL-451、PL-253、菌株EL-250由Liu Pentao惠赠。pSC101-BAD- $\gamma$  $\beta$  $\alpha$ -A-tet由张友明惠赠。DH5 $\alpha$ 为博大泰克产品。pBR322-MK为本实验室改建。

**1.1.3 试剂:**各种限制酶、T4 DNA连接酶及PCR相关试剂购自TaKaRa。L-阿拉伯糖、盐酸四环素等常规化学试剂主要购自Sigma和上海化学试剂公司。

**1.1.4 PCR引物与测序:**引物与测序均由上海英骏生物技术有限公司完成。

### 1.2 设计

**1.2.1 同源臂套取:**在含Resp18的BAC DNA上,PCR扩增4个同源臂a、b、c、d,分别实施三种套取方案。a和b以正确方向克隆至PL-253和pBR322-MK,a与b连接处线性化后,两者从BAC上套取21.4kb DNA片段。将a/c、a/d分别克隆至PL-253,克隆了a和c两同源臂的载体线性化后套取15.7kb DNA片段,克隆了a和d两同源臂的载体线性化后套取10.5kb DNA片段。

**1.2.2 neo基因靶向插入:**在含Resp18的BAC DNA上,PCR扩增同源臂e、f、g,分别实施两种靶向插入方案。e、f克隆至PL-451的neo基因两侧后,限制酶消化获得含有同源臂e和f的neo基因片段,靶向插入到上述套取的含21.4kb DNA片段的质粒中,得到的打靶载体敲除了基因组6.5kb,两同源臂分别为10.5kb、4.9kb;同理,e、g克隆至PL-451后,获得含有同源臂e和g的neo基因片段,靶向插入到含15.7kb和10.5kb的质粒中,两者获得的打靶载体均敲除了3.5kb的基因组DNA,同源臂分别为7.8kb、4.9kb和2.6kb、4.9kb。

### 1.3 方法

**1.3.1 同源臂的扩增:**按Qiagen Large-Construct Kit方法,抽提Resp18-BAC DNA。在PCR引物末端设计好酶切位点,以BAC DNA为模板扩增套取所需的同源臂a、b、c、d及neo靶向重组所需要同源臂e、f、g。

**1.3.2 套取质粒及neo基因靶向插入质粒的构建:**同源臂a、b分别克隆至PL253中(图1),构建PL253-Resp18R-20k-RL。同上方法克隆同源臂至载体,构建PL-253-Resp18R-15k-RL、PL-253-Resp18R-10k-RL及pBR322-MK-Resp18R-20k-RL,在两小同源臂的连接处设计Spe I位点。Spe I线性化后胶回收用于DNA套取。同源臂e、f分别克隆至PL-451(图2)构建PL-451-Resp18neo-RL。同样方法克隆

e、g 构建 PL-451-Resp18neo-RL2。限制性内切酶酶切消化后胶回收含两小同源臂的 *neo* 基因靶向插入片段。

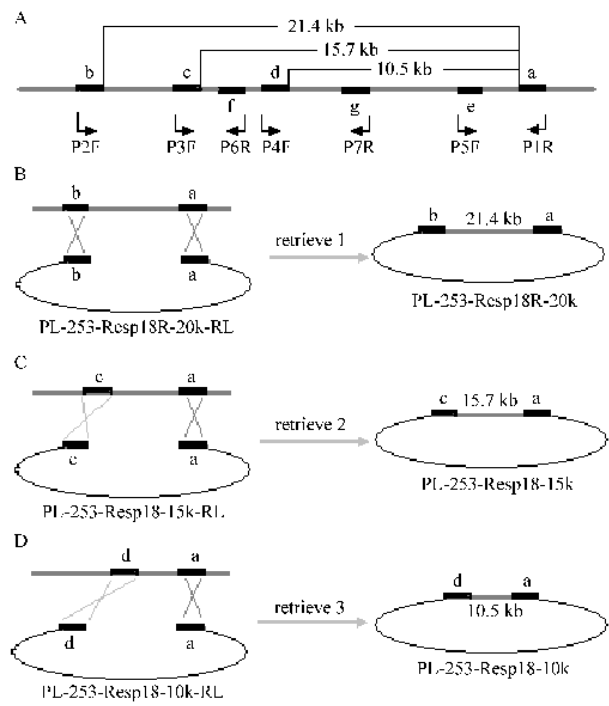


图 1 三种套取 *Resp18* DNA 的策略

Fig.1 The sketch map for retrieving of *Resp18* in three ways A : a (225bp ) b ( 376bp ) c ( 382bp ) d ( 385bp ) homologous arms were showed on the BAC which contained the *Resp18* used for retrieving , and e ( 372bp ) f ( 338bp ) g ( 255bp ) were the homologous arms used for *neo*-targeting. P1R, P2F, P3F, P4F, P5F, P6R, P7R were primers used for PCR identification of recombinering clones. B-D : The process of retrieving PL-253-Resp18R-20k、 PL-253-Resp18R-15k、 PL-253-Resp18R-10k.

1.3.3 转化 pSC101-BAD- $\gamma\beta\alpha$ -A-tet :挑 BAC 单克隆在含有氯霉素抗性的 LB 中 37℃ 摇培过夜 ,次日 1 : 40 转接摇瓶培养 2h ,冰上放置 10min。0℃、4000 r/min 离心 5min ,去上清洗涤于 1mL 含 10% 甘油的双蒸水 ,0℃、13000r/min 离心 20s ,弃上清 ,同上重复洗涤两次 ,最后溶解于 100 $\mu$ L 含 10% 甘油的双蒸水。加 200ng pSC101-BAD- $\gamma\beta\alpha$ -A-tet 于细胞 ,1.35kV、10 $\mu$ F、600 $\Omega$  电击转化 ,加 1mL SOC ,30℃ 恢复 1h。100 $\mu$ L 菌液涂至含氯霉素( 20 $\mu$ g/mL ) 四环素( 3  $\mu$ g/mL )的 LB 板 ,30℃ 培养 15h。

1.3.4 DNA 套取 :挑取 *Resp18* -BAC ( 含 pSC101-BAD- $\gamma\beta\alpha$ -A-tet )单克隆 ,30℃ 培养过夜 ,次日 1 :40 转接至 2mL LB 中 ,30℃ 摇培 2h ( *OD*<sub>600</sub> < 0.2 ) ,加 L-阿拉伯糖至终浓度为 0.1% ,改至 37℃ 摇培 1h ( *OD*<sub>600</sub> < 0.4 ) ,此期间 *red $\gamma$ /red $\beta$ /red $\alpha$*  被诱导表达。经诱导然后制备感受态细胞 ,方法同上。取 300ng 线性化的套取质粒电击转化细胞。1mL SOC 37℃ 恢复 1h ,100 $\mu$ L 菌液涂于氨苄青霉素( 50 $\mu$ g/mL )的 LB 板 ,37℃ 培养过夜。

1.3.5 套取后质粒的鉴定及转化 :抽提质粒 ,初步酶切鉴定后 ,进一步用 PCR 方法鉴定重组质粒。两步鉴定正确的质粒分别转化到 EL-250、DH5 $\alpha$  ( pSC101-BAD- $\gamma\beta\alpha$ -A-tet )感受态细胞中( EL-250、DH5 $\alpha$  pSC101-BAD- $\gamma\beta\alpha$ -A-tet )感受态细胞与普通电转感受态制备方法相同 ) ,分别在氨苄青霉素、氨苄青霉素和四环素双抗性的 LB 板上筛选。

1.3.6 *neo* 基因靶向插入<sup>[1]</sup> :挑取已转化了套取后

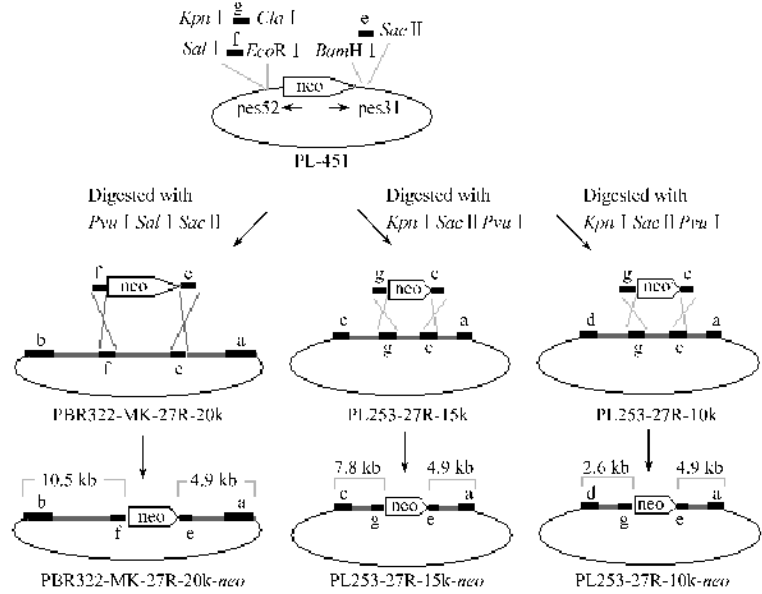


图 2 *neo* 基因靶向插入质粒的构建及 *neo* 基因靶向插入示意图

Fig.2 The sketch map of *neo*-targeting

质粒的 EL-250 克隆接种于含有氨苄青霉素的 LB 中 32℃ 摇培过夜,次日 1:20 比例转接,继续 32℃ 摇培 2h。转至 42℃ 摇培 15min,诱导 Beta/Exo/Gam 的表达。同上述方法制备感受态。取 200ng 胶回收 *neo* 基因靶向片段电击转化感受态,1mL SOC 中 32℃ 恢复 1h,涂于含氨苄青霉素(50μg/mL)卡那霉素(15μg/mL)的 LB 板子上,培养过夜。同理在转化了套取后质粒的 DH5α(pSC101-BAD-γ β α-A-tet)细菌中进行 *neo* 基因靶向插入。

**1.3.7 打靶载体的鉴定:**在氨苄青霉素-卡那霉素双抗的 LB 板子上长出的克隆,抽提质粒后,酶切分析,并进一步用 *neo* 基因上的引物 pes52、pes31 分别与 *neo* 基因插入处外侧臂上引物 PCR 扩增鉴定,两步鉴定后正确的克隆送测序,采用 P1R、P2F(图 1.A)和位于 *neo* 基因上的引物 pes52、pes31(图 2)四个引物测序,鉴定两轮重组发生的位置。

2 结果

2.1 套取质粒及 *neo* 基因插入质粒的构建

重组所需同源臂长度都在 250 ~ 350bp 之间,构建的载体经过酶切鉴定分析,均可以消化出相应的小同源臂(图 3.A)。PL-451-Resp18-*neo*-RL 经 *Sac* II、*Sal* I、*Pvu* I 酶切分析(图 3.B),其中 *Pvu* I 用于消化质粒骨架,消化后获得 *neo* 插入片段及同源臂 e、f(2602bp),PL-451-Resp18-*neo*-RL2 经 *Kpn*

I、*Sac* II、*Pvu* I 酶切分析,得含 e、g 的 *neo* 插入片段(2536bp)。酶切鉴定正确的载体,经测序,各同源臂均正确插入。

2.2 DNA 套取的结果和效率

在氨苄青霉素抗性的 LB 平板上长出的克隆,抽质粒进行鉴定。PL-253-Resp18R-10k 酶切消化后得到 11.2kb、5.1kb 两种条带(图 3.C);PL-253-Resp18R-15k 酶切消化后得 15.3kb、3.8kb、2.4kb 三条带(图 3.D);PL-253-Resp18R-20k 酶切后得 21.0kb、3.8kb、2.4kb 三条带(图 3.E);酶切分析 pBR322-MK-Resp18R-20k 得 15.1kb、9.5kb、3.5kb 三条带(图 3.F)。由上述可知 pBR322-MK-Resp18R-20k、PL-253-Resp18R-20k、PL-253-Resp18R-15k、PL-253-Resp18R-10k 大小分别为 28.2kb、27.3kb、21.7kb、16.5kb 均明显超过了 6kb 左右的套取质粒,说明重组已经发生。为进一步验证重组发生的位置,以 PL-253-Resp18R-10k、PL-253-Resp18R-15k、PL-253-Resp18R-20k、pBR322-MK-Resp18R-20k 为模板进行 PCR 鉴定(图 3.G)。4 种载体以 P1R/P5F 为引物扩增其右臂,产物大小均为 4929bp,重组所得 4 个载体分别以 P4F/P7R、P3F/P7R、P2F/P6R、P2F/P6R 为引物扩增其左臂,产物分别为 2648bp、7853bp、10.565kb、10.565kb。PCR 扩增结果正确的质粒测序正确,证明套取的序列与预期结果相符。经过 PCR 筛选后,比较分析了套取不同大小 3 种片段的效率

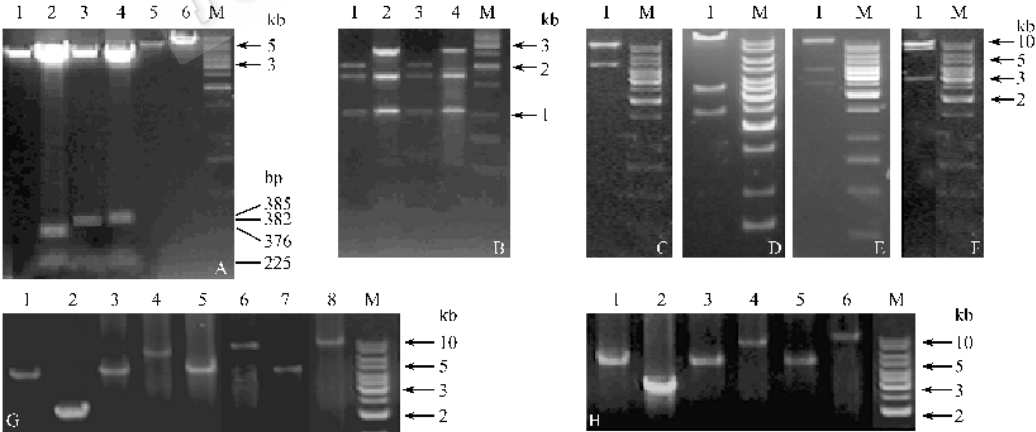


图 3 Resp18 套取、*neo* 基因靶向插入的鉴定

Fig.3 Resp18 retrieving, *neo* targeting vectors and the identification of the plasmids after retrieve, *neo* targeting

A :Lane1-4 were PL-253、PL-253-Resp18R-20k-RL、PL-253-Resp18R-15k-RL、PL-253-Resp18R-10k-RL digested with *Not* I、*Xba* I、*Spe* I . Lane5-6 were linearization of pBR322-MK and pBR322-MK-Resp18R-20k-RL. B :Lane1、2 were *Sac* II、*Sal* I、*Pvu* I analysis of PL-451 and PL-451-Resp18-*neo*-RL , Lane3、4 were *Kpn* I、*Sac* II、*Pvu* I analysis of PL-451 and PL-451-Resp18-*neo*-RL2. C :PL-253-Resp18R-10k was digested with *Not* I、*EcoR* I . D、E : Digestion of PL-253-Resp18R-15k、PL-253-Resp18R-20k with *Kpn* I F : pBR322-MK-Resp18R-20k . was digested with *Sal* I and *Xho* I G :Lane1、3、5、7 were PCR with P1R /P5F of PL-253-Resp18R-10k、PL-253-Resp18R-15k、PL-253-Resp18R-20k and pBR322-MK-Resp18R-20k. Lane2、4、6、8 PCR products of PL-253-Resp18R-10k、PL-253-Resp18R-15k、PL-253-Resp18R-20k and pBR322-MK-Resp18R-20k with P4F/P7R、P3F/P7R、P2F/P6R、P2F/P6R. H :Lane1-2 were PCR amplification of PL-253-Resp18R-10k-*neo* with pes31/P1R and P4F/pes52 ; Lane3、4 were PCR amplification of PL-253-Resp18R-15k-*neo* with pes31/P1R and P3F/pes52 ; Lane5、6 were PCR amplification of pBR322-MK-Resp18R-20k-*neo* with pes31/P1R and P2F/pes52.

差异(表 1)。

表 1 DNA 套取和 *neo* 基因靶向插入结果统计  
Table 1 The statistics of retrieving and *neo*-targeting

Vectors	Total clones	Identified	Positive clones	Ratios of positive/%
pBR322-MK-Resp18R-20k	28	28	17	60.7
PL-253-Resp18R-20k	110	29	14	48.2
PL-253-Resp18R-15k	70	30	16	53.3
PL-253-Resp18R-10k	36	28	15	53.6
pBR322-MK-Resp18R-20k- <i>neo</i>	2000	30	29	96.7
PL-253-Resp18R-15k- <i>neo</i>	380	30	28	93.3
PL-253-Resp18R-10k- <i>neo</i>	1700	30	28	93.3

2.3 *neo* 基因靶向插入的结果

DNA 套取后的 4 个质粒转化进入 EL-250 之后,通过 42℃ 诱导, *exo*、*bet*、*gam* 获得表达,这时转入携带有同源臂 *neo* 片段,与细胞中已有的质粒发生重组,得到基因组特定 DNA 被敲除的打靶载体。通过此方法我们分别得到了 PBR322-MK-Resp18R-20k-*neo*、PL-253- Resp18R-15k-*neo*、PL-253-Resp18R-10k-*neo* 三个对同一基因的三种打靶载体。三个载体的 3'臂加部分 *neo* 序列大小一样均为 5.3kb,5'臂加部分 *neo* 序列分别为 11.3kb、8.2kb、3.4kb。我们用 PCR 鉴定了其正确性(图 3.H)。经测序进一步证实了 *neo* 基因插入位点与预期位点相同。构建成功的打靶载体只需 3'端线性化便可用于 ES 细胞打靶。我们比较了 EL-250、pSC101-BAD- $\gamma$   $\beta$   $\alpha$ -A-tet 两种重组系统进行 *neo* 基因插入的效率差异。结果显示,EL-250 作为一个 Red/ET 重组的菌株,在相同的实验条件下(先转化受体 DNA 再转化 *neo* 基因打靶片段)效率较 DH5 $\alpha$ (pSC101-BAD- $\gamma$   $\beta$   $\alpha$ -A-tet)高(图 4),且操作相对简单。

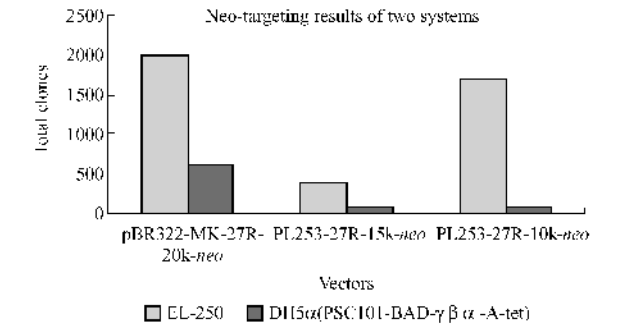


图 4 两种体系中 *neo*-targeting 结果分析  
Fig.4 Analysis of *neo*-targeting result in two systems

3 讨论

我们采用了两种 Red/ET 重组体系,其一是依托质粒 pSC101-BAD- $\gamma$  $\beta$  $\alpha$ -A-tet 的重组系统,另一个是整

合了重组蛋白基因的菌株 EL-250。两者都可实现不再依赖限制性内切酶、连接酶的 DNA 重组,为构建打靶载体提供了新的选择,但两者在使用上又各有所长。依赖于重组质粒 pSC101-BAD- $\gamma$   $\beta$   $\alpha$ -A-tet 的系统,在对 BAC、PACs 上的修饰方面具有明显的优势,通过转化重组质粒到含有 BAC 的细胞来实现对 BAC 上片段的亚克隆或者进行其他突变,避免了对 BAC 等 DNA 大分子的转移操作。本实验中,从 BAC 上进行 DNA 套取,采用 pSC101-BAD- $\gamma$   $\beta$   $\alpha$ -A-tet 重组系统具有明显的优势。然而,pSC101-BAD- $\gamma$   $\beta$   $\alpha$ -A-tet 发挥作用后的去除可能存在隐患。若未全部去除则会在最终所得修饰后的 DNA 中混有 pSC101-BAD- $\gamma$   $\beta$   $\alpha$ -A-tet。本实验通过 DH5 $\alpha$  pSC101-BAD- $\gamma$   $\beta$   $\alpha$ -A-tet 系统与 EL-250 系统在 *neo* 基因靶向插入时效率的比较发现:EL-250 使用相对简单,能够进行反复转化,且可以获得很高的重组效率,而在 DH5 $\alpha$  菌株内的 pSC101-BAD- $\gamma$   $\beta$   $\alpha$ -A-tet 重组系统明显效率低于 EL-250。考虑可能是由于 Red/ET 重组在 DH5 $\alpha$  菌株内的效率较差导致了这两种系统中 *neo* 基因靶向插入时效率的差异。采用 EL-250 重组系统,省去了对 pSC101-BAD- $\gamma$   $\beta$   $\alpha$ -A-tet 的转化操作,也避开了 pSC101-BAD- $\gamma$   $\beta$   $\alpha$ -A-tet 对受体质粒的影响。在构建 *Resp18* 打靶载体的过程中,合理地将这两个系统结合使用,各取所长,大大地提高了构建打靶载体的效率。

本实验采用了 200 ~ 400bp 的同源臂用于 DNA 套取和 *neo* 基因的靶向插入,我们发现在这一条件下 50 ~ 100 ng 的套取质粒便可以获得较多的克隆,且重组正确率高。200bp 左右长度的同源臂对于存在较多重复序列的基因组的重组效率及特异性较 45 ~ 60bp 高,这种通过延长同源臂,来提高正确重组效率的方法早在酵母中已有证实<sup>[8]</sup>。本实验中:套取效率在 50% 左右,*neo* 基因靶向插入效率在 90% 以上,可见挑取 2 个克隆即可得到 1 个正确的,这个结果完全能够满足载体构建的需要。

研究认为,ES 细胞同源重组中当同源臂总长度在 18kb 以内时,同源臂越长打靶效率越高<sup>[9,10]</sup>。而通过 Red/ET 重组便可以比较方便地从 BAC 上获得 18kb 以上的 DNA 片段,而且所得序列较 PCR 方法突变少,且无需考虑常规酶切连接构建方法中酶切位点的设计问题<sup>[11]</sup>。我们采用这种技术分别从 BAC 上定点套取了 11kb、16kb、22kb 三种 DNA 片段,以观察套取不同长度时的效率差异。同时也为研究同源臂长度与打靶效率的关系提供了载体。所得载

体 PL-253-Resp18R-10k-neo 和 PL-253-Resp18R-15k-neo 均敲除了五个外显子 (3.5kb), 其两侧同源臂长分别为 2.6kb、4.9kb 和 7.8kb、4.9kb, 而 pBR322-MK-Resp18R-20k-neo 敲除了 6 个外显子 (6.5kb), 同源臂分别为 10.5kb 和 4.9kb。其中 PL-253-Resp18R-10k-neo 与常规方法构建载体的同源臂大小相近, 为此技术的一个最保守的设计。套取 20kb 后的质粒大小在 27kb 左右, 考虑到高拷贝数的大质粒可能会对细胞造成毒性, 影响其生存, 造成质粒的不稳定, 故在套取 20kb 时, 我们分别用了 PL-253 和 pBR322 两种质粒。通过采用低拷贝质粒 pBR322 作为 20kb 套取载体骨架, 来减小由质粒在套取后增大对细胞生存造成的影响。本实验中 pBR322-MK-Resp18R-20k 阳性克隆的比例为 60.7%, 明显高于 PL-253-Resp18R-20k, 因此从 BAC 上亚克隆大片段的 DNA 时, 应使用低拷贝质粒作为套取的质粒骨架。

从本实验来看, 采用 Red/ET 重组酶构建打靶载体与常规方法相比, 它可以从 BAC DNA 上获得 20kb 长度的亚克隆<sup>[12,13]</sup>, 且序列保真性高, 大大的提高了构建打靶载体的效率。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Liu P, Jenkins NA, Copeland NG. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genomic Res*, 2003 **13**: 2190 – 2194
- [2] Zhang Y, Buchholz F, Muirers JP, Stewart AF. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genet*, 1998 **20**: 123 – 128
- [3] Wang JH (王军平), Zhang YM (张友明). Red/ET recombination and its biomedical applications. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2005, **21**(3): 502 – 506
- [4] Muirers JP, Zhang Y, Buchholz F, Stewart AF. RecE/RecT and Red $\alpha$ /Red $\beta$  initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their Respective partners. *Genes Dev*, 2000 **14**: 1971 – 1982
- [5] Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nature Rev Genet*, 2001 **2**: 769 – 779
- [6] Muirers JP, Zhang Y, Testa G, Stewart AF. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res*, 1999, *Resp18*, pp. 1555 – 1557
- [7] Lee EC *et al.* A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, 2001, **73**: 56 – 65
- [8] Wach A. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast*, 1996, **12**: 259 – 265
- [9] Ulrike Müller. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis mechanisms of development. 1999, pp. 3 – 21
- [10] Paul Hasty, Jaime Rivera-Perez, Allan Bradley. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, pp. 5586 – 5591
- [11] Muirers JP, Zhang Y, Stewart AF. Techniques: recombinogenic engineering-new options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem Sci*, 2001, **26**: 325 – 331
- [12] Yu D *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2000, **97**: 5978 – 5983
- [13] Lee EC, Yu D, Copeland NG. A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, 2001, **73**: 56 – 65