

DNA 重组酶 FLP 原核表达与多步法纯化及其活性检测

Prokaryotic Expression of DNA Recombinase FLP and Its Purification with Enzymatic Activity

盖 颖, 王文棋, 陆 海, 蒋湘宁*

GAI Ying, WANG Wen-Qi, LU Hai and JIANG Xiang-Ning*

北京林业大学生物科学与技术学院, 国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室, 北京 100083

College of Life Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, The Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of State Forestry Administration, Beijing 100083, China

摘 要 DNA 重组酶 FLP 存在于酵母 2 μ 质粒上, 能识别 34bp 的 FRT 位点, 并根据 2 个 FRT 位点的相对方向完成位点间 DNA 序列的交换、重组、删除与逆转, 在现代分子生物学理论研究与基因工程技术开发中具有广泛应用。构建了在原核大肠杆菌中高效表达 FLP 重组酶的表达载体 pQE32-flpe 并建立起相应的原核高效表达体系, 在原核细菌大肠杆菌 M15 菌株中实现 FLP 酶蛋白的高效表达, 同时建立了相应的纯化方法。纯化时先用硫酸铵沉淀法富集 FLP 酶蛋白, 经透析脱盐后再用镍离子螯合微柱 (0.5 ~ 1.0mL) 亲和层析梯度洗脱的方法获得纯化的 FLP 酶蛋白。通过构建含有 2 个方向相同的 FRT 序列位点的质粒 pUC18-FRT-gfp-FRT 和含有 1 个 FRT 位点的表达载体 pET30a-FRT, 并分别以其为底物来检测 FLP 重组酶的删除、交换与重组功能的活性。结果表明, 该方法不仅能有效表达 FLP 酶蛋白, 并能行之有效地纯化 FLP 酶蛋白, 以及检测纯化的 FLP 酶蛋白对 DNA 序列的删除、重组与交换功能。该方法简单易行并能获得有活性的 FLP 酶蛋白, 为深入研究其机理以及研发相应的 DNA 重组技术提供重要参考。

关键词 重组酶 FLP, 高效表达, 硫酸铵沉淀, 亲和层析, 交换活性

中图分类号 Q814.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0724-06

Abstract DNA recombinase FLP gene exists on the 2 μ plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. Recombinase FLP could recognize an FRT site composed of 34bp and function the sequences for exchange, recombination, deletion and reversion between the two orientated FRT sites. These functions are highly recognized by molecular biologists and biotechnology engineers for theoretic and applicable technology studies. This work constructed a prokaryotic over-expressed vector harboring FLP gene nominated as pQE30-flpe and established its over-expression culture system in which recombinase FLP could be efficiently expressed in *E. coli* strain M15. Purification procedures for high purity and active FLP are established through combination of ammonium sulfate precipitation with a 0.5 ~ 1.0mL micro-column technique of Ni affinity chromatography with gradient elution. To verify the recombinase activity of purified FLP, substrate vectors, sequence donor vector (pUC18-FRT-gfp-FRT) and sequence accepting vector (pET30a-FRT) are constructed with various number, orientation of FRTs harboring the GFP gene for the expression of visible assay of the functions of recombination, exchange and deletion. Results showed that the system not only over expressed recombinase FLP in prokaryotic *E. coli*, but also efficiently purified the enzyme with a higher activity of the function of

Received: December 6, 2006; Accepted: January 9, 2007.

This work was jointly supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30571512, No. 30630053) and Postgraduate Training Foundation of Beijing Forestry University.

* Corresponding author. Tel: +86-10-62338063; Fax: +86-10-62338063; E-mail: jiangxn@bjfu.edu.cn

国家自然科学基金资助 (No. 30571512, No. 30630053) 和北京林业大学研究生培养基金联合资助。© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

recombination, exchange and deletion. The system and the method are easily implemented and feasibly manipulated for theoretic study and biotechnology application.

Key words recombinase FLP, overexpression, ammonium sulfate precipitation, micro-column Ni^{2+} -affinity purification, activity assay

FLP (flippase) 重组酶基因来自真核细胞酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 2 μ 质粒, 属于重组酶家族。FLP 重组酶基因约 1.3kb, 编码 422 个氨基酸^[1]。FLP 重组酶的识别与结合作用位点(靶位点)是由 34bpDNA 碱基组成的序列, 简称 FRT (flippase recognition targets)。34bp 的 FRT 序列是一个反向重复序列, 两端分别由两个高度对称反向重复的 13bp (5'-GAAGTTCCTATAC, GAATAGGAAGTTC-3') 元件组成, 中间是一个决定 FRT 方向的 8bp 的 DNA 序列, 其序列为 5'-GAAGTACCTATTCTTTCTAGA GAATAGGAAGTTC-3'。FLP 重组酶以特定方式结合于其上, 其断裂位点位于 TCTT 四个碱基的中间^[2,3]。FLP 重组酶在离体条件下的重组效率和各种重组反应已被广泛研究^[4]。2 条双链 DNA 间发生

的重组反应中共有 4 条单链的断裂和连接过程, FLP 通过四个重组酶单体结合到临近的四个易被切割的磷酸二酯键上来完成重组反应。当 FLP 重组酶结合到 13bp 的对称序列上后, 它诱导 FRT 位点的剧烈弯曲, 使 FRT 位点链的顶端或底端断裂, 并引发双链间 2 条单链的对等交换形成 Holliday 结构的中间产物。随后这一中间产物的另两条单链进行交换解体并连接形成重组分子, 完成重组反应(图 1)^[5-10]。在重组过程中链的断裂与连接的能量是守恒的, 因此该重组反应不需要消耗外界能量。根据 FRT 识别位点的位置与方向, FLP 重组酶可以引发完成 FRT 位点间 DNA 序列的删除、倒位、插入和重排反应, 这些反应被广泛用于微生物、动物、植物基因工程研究与技术的各个方面^[11-19]。

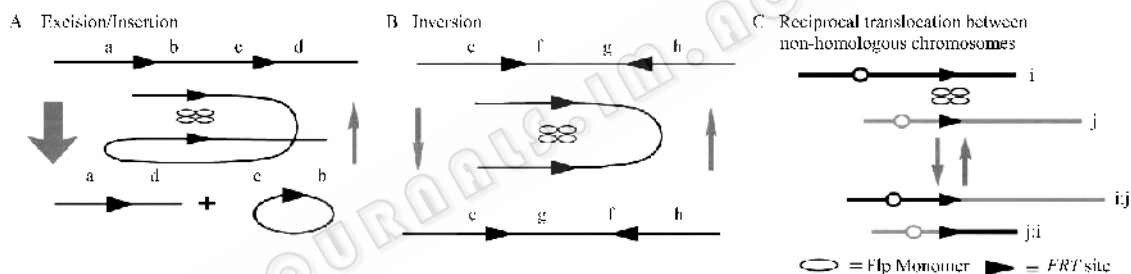


图 1 FLP 介导的重组反应示意图

Fig. 1 Recombination reactions mediated by FLP

Black and green lines represent chromosomal DNA, with orientation indicated by the letters a-d, e-h; gray arrows indicate the reversible nature of each reaction.

由于 FLP 重组酶基因来源于真核生物酿酒酵母, 在对其进行原核诱导表达时发现, 其在大肠杆菌中的表达效率并不高。因此, 本研究以建立起一套包括有效或高效的 FLP 原核表达方法、相应的简便并行之有效的纯化方法获得具有重组酶活性的 FLP 重组酶蛋白, 以及检测 FLP 重组酶活性的方法为主要目标, 分别构建了 FLP 高效表达载体 pQE32-flpe、用可视检测 FLP 重组酶重组功能实现为目标的重组序列供体底物载体 (pUC18-FRT-gfp-FRT) 和重组序列受体表达载体 (pET30a-FRT), 并用于本研究来实现 FLP 的高效表达、有效纯化和活性检测以及 DNA 序列在载体间的重组传递与表达。

1 材料与方法

1.1 材料

pUC18 中间载体及其大肠杆菌菌株 JM109 和

DH5 α 为本实验室保存; 原核高效表达载体 pQE-32 及其菌株 M15、pET-30a 及其菌株 BL21(DE3) 为 Qiagen 和 Novagen 产品, 本实验室保存; flp 基因为 Yuri 惠赠 pBAD33-flpe。

实验用限制性内切酶、T4 连接酶、pMD18-T Vector、DNA 回收试剂盒为 TaKaRa 公司产品; 蛋白纯化系统 Ni^{2+} 亲和层析柱为 Qiagen 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物合成: 为验证 FLP 重组酶的删除及插入活性, 设计下列引物序列用以构建两个底物载体。引物 P1, P2 是为构建底物载体 pUC18-FRT-gfp-FRT 用, 在 *gfp* 基因两端分别加入限制性内切酶 *EcoRV* 位点及同方向的 FRT 序列。引物 P3, P4 是为构建底物载体 pET30a-FRT 用, 在 *gfp* 基因的 5' 端引入 *BamHI* 位点, *EcoRI* 位点, 其 3' 端引入 *EcoRV* 位点, 其 3' 端引入 *EcoRI* 位点, 其 3' 端引入 *EcoRV* 位点。

*Hind*III 位点。引物合成及后续测序等工作均用 DNA 合成仪和 ABI-3730 测序仪完成(北京奥科公司)。

P1: 5'-GGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGAACTTCGATATCGATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'

P2: 5'-GGGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGAACTTCCGATATCCTTACTTGTACAGCTCGTCC-3'

P3: 5'-GGGATTCGGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'

P4: 5'-GAAGCTTGAAGTTCCTTACTTTCTAGAGAA TAGGAAGTTCGAAATTCCTTACTTGTACAGCTCGTCC -3'

1.2.2 常规分子生物学操作:PCR 扩增、感受态细胞制备、细菌转化、质粒 DNA 提取、DNA 连接、DNA 电泳、蛋白质电泳等参照《分子克隆实验指南》和《Short Protocol of Molecular Biology》进行;DNA 片段回收、酶切等按照相关说明完成。

2 结 果

2.1 FLP 原核表达载体的构建与检验

FLP 原核诱导高效表达载体 pQE32-flpe 的构建是利用 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切 pBAD33-flpe 和 pQE-32 载体(图 2,3)。将从 pBAD33-flpe 酶切体系中回收纯化得到的 flp 基因通过 T4DNA 连接酶连接到 pQE-32 载体上并转化至 JM109 菌株中。质粒经扩增、PCR 与酶切验证后再转化到大肠杆菌 M15 菌株中进行高效表达(图 4,5)。

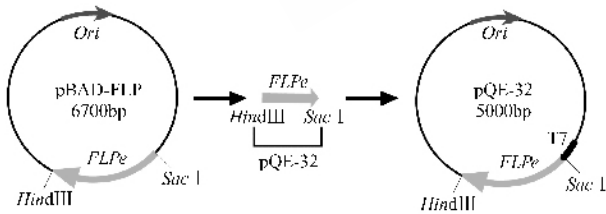


图 2 FLP 原核表达载体的构建图

Fig. 2 Construction scheme of prokaryotic expression vector

2.2 原核诱导表达、纯化 FLP 蛋白

2.2.1 诱导表达:挑取鉴定正确的克隆于相应抗生素的 LB 液体培养基中 37℃ 摇床培养,活化培养至 OD 值 0.7 左右,加入诱导剂 IPTG,终浓度为 1mmol/L 转移至 28℃ 摇床,进行诱导表达。诱导 3h 后,收集菌体,液氮速冻,-70℃ 保存,贮存备用。

2.2.2 纯化:FLP 纯化过程全在冰浴条件下完成。

(1)菌体破碎:将收集的菌体用悬浮缓冲液(20mmol/L Tris-HCl pH7.5, 0.5mol/L NaCl, 2mmol/L β-巯基乙醇)按 1:2(菌体:溶液)的比例重新悬浮。悬

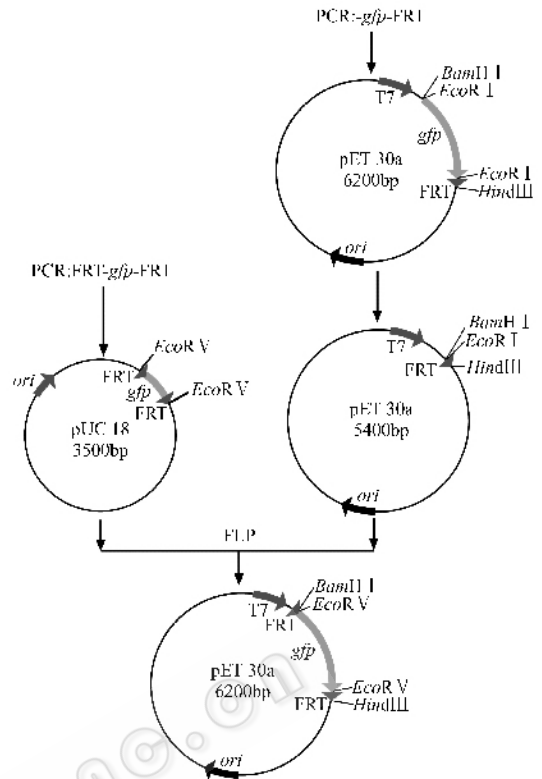


图 3 活性检测所用的载体构建示意图

Fig. 3 Construction protocol of vectors and identification of FLP activity

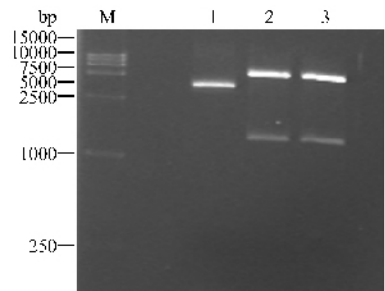


图 4 限制性内切酶 *Sac* I 和 *Hind* III 双切 pQE32 和 pBAD-FLPe

Fig. 4 The result of digestion by restriction enzymes *Sac* I and *Hind* III

M: DNA Marker; 1: pQE32 were digested by *Sac* I and *Hind* III; 2: pBAD-FLPe were digested by *Sac* I and *Hind* III.

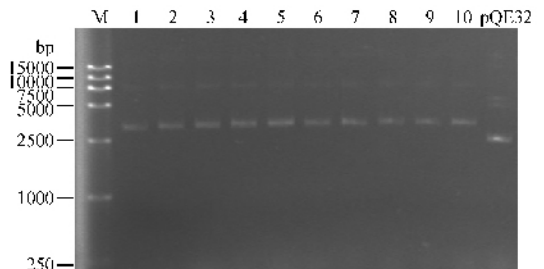


图 5 质粒 pQE32-FLPe 的验证

Fig. 5 The verification of plasmids pQE32-FLPe
M: DNA Marker; 1-10: plasmid pQE32-FLPe.

浮后的菌体用超声波破碎仪短时多次超声破碎(超声波破碎仪的工作功率为 200~300W,工作 6 秒,间歇 6 秒,至少破碎 20 次以上)。

(2) FLP 粗提液: 超声破碎后的溶液在低温高速离心机上离心(18 000g × 30min, 4℃), 取上清为 FLP 酶蛋白粗提液。

(3) 硫酸铵沉淀: 向超声破碎后离心获得的 FLP 粗提液中缓慢加入 (NH₄)₂SO₄ 沉淀蛋白质, 至硫酸铵饱和度为 43%。4℃ 条件下 16 000g × 10min 离心, 弃上清。沉淀用悬浮缓冲液重新悬起。

(4) 透析脱盐: 待上柱用。

(5) 镍离子螯合亲和柱层析: 透析脱盐后的 FLP 酶蛋白用微型镍离子螯合柱亲和层析纯化。层析柱先用 10 倍柱床体积平衡液(20mmol/L Tris-HCl pH7.5, 0.5mol/L NaCl, 2mmol/L β-巯基乙醇)平衡, 然后将样品缓慢(1mL/min 流速)上柱。整个上柱过程均在冰浴或低温条件下完成。上柱结合完成后, 用含不同浓度咪唑(10、20、50、100、250mmol/L)的漂洗液进行梯度漂洗, 同时连于蛋白质紫外检测器监测, 最后收集 250mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱的蛋白质组分。收集组分的 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 6。



图 6 FLP 蛋白 SDS-PAGE 分析图

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purification of recombinase FLP 1: flow through solution; 2: wash solution by buffer with 10mmol/L imidazole; 3: wash by 20mmol/L imidazole; 4: wash by 50mmol/L imidazole; 5: wash by 100mmol/L imidazole; 6~9: elute by 250mmol/L imidazole.

2.3 序列供体底物载体 pUC-FRT-gfp-FRT 的构建

以含有 *gfp* 基因的质粒为模板, P1、P2 为引物, 进行 PCR 扩增。循环条件为: 94℃ 变性 30s, 65℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 50s, 共 30 个循环。将扩增获得的 823bp 克隆产物与 pMD18-T 载体相连, 构建成底物载体 pUC-FRT-gfp-FRT(图 7)。测序结果表明, *gfp* 基因及两端的 FRT 位点正确。

2.4 序列受体(表达)载体 pET30a-FRT 的构建

仍以含有 *gfp* 基因的质粒为模板, 以 P3、P4 为引物, 进行 PCR 扩增。循环条件为: 94℃ 变性 30s,

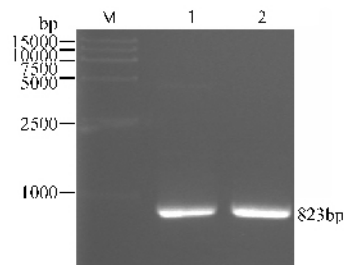


图 7 基因 FRT-gfp-FRT 的 PCR 结果

Fig. 7 PCR product of FRT-gfp-FRT
M: DNA Marker; 1, 2: FRT-gfp-FRT.

60℃ 退火 40s, 72℃ 延伸 50s, 共 30 个循环。PCR 获得的克隆产物连到 T 载体上, 经质粒提取、酶切电泳、及核酸测序鉴定出正确的克隆体后, 与 pET30a 质粒通过 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切连接起来, 得到载体 pET30a-gfp-FRT(图 8)。利用 *Eco*R I 限制性内切酶消化该载体, 切掉两端带有 *Eco*R I 酶切位点的 *gfp* 基因(图 9), 用 T4 连接酶将酶切后的大片段自连, 转化到大肠杆菌 BL21 菌株中, 提取质粒, 测序鉴定, 则构建出底物载体 pET30a-FRT。

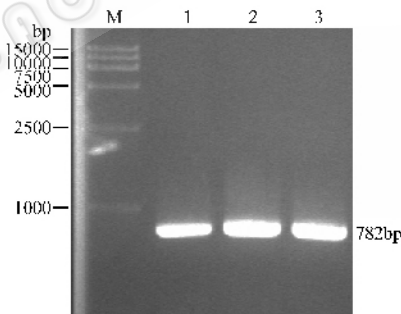


图 8 gfp-FRT 的 PCR 结果

Fig. 8 PCR product of gfp-FRT
M: DNA marker; 1, 2, 3: gfp-FRT.

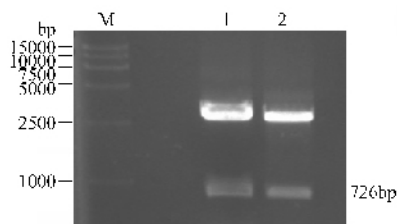


图 9 *Eco*R I 酶解质粒 T-gfp-FRT 结果

Fig. 9 Restriction digestion of plasmid T-gfp-FRT by *Eco*R I
M: DNA marker; 1, 2: results of digestion.

2.5 FLP 重组酶的活性鉴定

2.5.1 FLP 重组酶作用于单个底物 pUC-FRT-gfp-FRT 当重组酶 FLP 作用于含有两个同方向 FRT 识别位点的底物时, 发生删除反应, 即两个 FRT 位点之间的序列将被删除。将纯化的 FLP 蛋白与底物 pUC-FRT-gfp-FRT 在反应缓冲液(2mmol/L MgCl₂,
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

70mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris-HCl, pH7.5) 中反应一段时间, 通过凝胶电泳, 可以看到反应后的产物。从温度梯度反应的结果可知, FLP 酶活反应的最佳反

应温度在 28 ~ 32°C 之间。在 30°C 条件下, 做了时间梯度反应(图 10), 从图中看出, FLP 酶活反应完全至少要 60min。

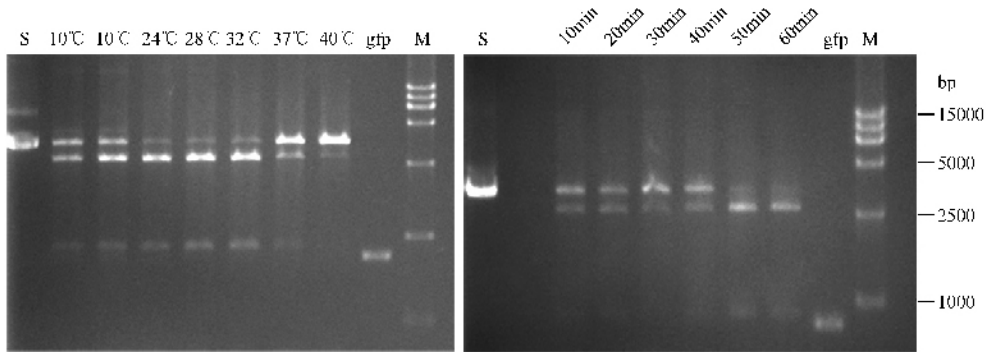


图 10 不同反应温度(A)和不同反应时间(B)下 FLP 介导的重组反应活性

Fig. 10 The result of reaction under different temperature(A) and for different time(B)

S: substrate pUC-FRT-gfp-FRT.

2.5.2 FLP 重组酶作用于两个底物 pUC-FRT-gfp-FRT 和 pET30a-FRT:将两个底物、缓冲液、纯化的 FLP 蛋白的混合液于 30°C 反应 90min 后的体系, 转化入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 辅以含有抗生素卡那霉素和 T7 启动子诱导剂 IPTG 的平板培养基上 37°C 培养 24h 待菌落出现后, 移至室温或 4°C 冰箱中 72 ~ 96h 积累表达 GFP 蛋白质至可视检测含量水平。在紫外检测仪或荧光显微显微镜下即可看到平板的绿色荧光菌落。为了进一步证明绿色荧光蛋白

GFP 确实是通过 FLP 重组酶由序列供体载体 pUC-FRT-gfp-FRT 重组交换到序列受体表达载体 pET30a-FRT 形成了新的表达载体 pET30a-FRT-gfp-FRT, 挑出具有绿色荧光的菌落提取质粒并测序。测序结果表明, 该方法表达和纯化的 FLP 蛋白成功地介导了两个底物间的基因序列重组交换反应, 并能完成表达。测序结果与预期一致。

重组产生的新的高效表达载体(局部含 FRT) 序列:

```
TTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTFAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCATCATCATCAATTCCTTCTGGTCTGGTCCACGCGG
TTCTGGTATGAAAGAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATGGC
TGATATCGGATCCGGAATTCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTTCGATATCGATGGTGTAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGG
GGTGGTGGCCATCCTGGTGGGCTGGACGGCAGCTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
AGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCA
GCCCCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAGC
ACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCCGATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC
GGCAACATCTGGGGACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTACATCATGGCCACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA
CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAGCACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCT
GCCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGCTCCTGCTGAGTTCGTGACCGC
CGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGATATCGGAAAGTTCCTATTCTCTAGAAAAGTATAGGAA CTTCAAGCTTGGCGC
CGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGGCCGAAAGGAAGCT
```

3 讨论

DNA 重组酶 FLP 基因源自于真核生物酿酒酵母, 在原核生物细菌大肠杆菌中表达并纯化出具有活性的该酶蛋白并不简单。纯化该蛋白介绍较多的是用离子交换法, 而亲和层析法纯化该蛋白的报道尚未见过。试验中发现, 若单独用亲和层析方法来纯化, 由于该基因在大肠杆菌中的表达效率不高, 纯化效果不是很好。而在上 Ni 离子螯合柱之前, 用硫

酸铵沉淀法先富集蛋白, 再用含不同浓度咪唑的洗脱液进行梯度洗脱, 可得到纯度较高的 FLP 酶蛋白。

该方法较离子交换法操作简便且成本较低, 整个纯化过程可在较短的时间内完成, 容易获得具有较高活性的 FLP 蛋白。

用纯化获得的 FLP 重组酶直接作用于 1 个底物或同时作用于 2 个底物, 均能分别检测到其重组删除和重组插入活性。对于底物 pUC-FRT-gfp-FRT,

FLP 催化 2 个同向 FRT 之间的序列片段的删除,从电泳图中可以看到掉下的带有不完全 FRT 序列的 gfp 片段的条带约 800bp。将纯化的 FLP 加入到含有 2 个底物载体的体系中时,FLP 重组酶识别并切割 FRT 位点,将 pUC-FRT-gfp-FRT 中的 gfp 删除,并介导其重组插入到另一个载体 pET30a-FRT,得到产物 pET30a-FRT-gfp-FRT,这种插入反应的趋向远大于删除反应的逆向反应。将 FLP 酶促反应混合物直接转化到大肠杆菌表达菌株 BL21 中,经诱导表达后在紫外光或荧光显微镜下可检测到含有新质粒产生的绿色荧光菌落,这也充分证明了重组酶 FLP 在其识别序列存在下,可作为限制性内切酶和连接酶来使用。

致谢 特别感谢 Louisiana Tech University 的 Yuri Voziyarov 教授惠赠 pBAD33-flpe 质粒。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Cox MM. The FLP protein of the yeast 2-microns plasmid: expression of a eukaryotic genetic recombination system in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1983, **80**(14): 4223 - 4227.
- [2] Sadowski PD. The Flp recombinase of the 2-microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology*, 1995, **51**: 53 - 91.
- [3] Schwartz CJ, Sadowski PD. FLP protein of 2 μ circle plasmid of yeast induces multiple bends in the FLP recognition target site. *Journal of Molecular Biology*, 1990, **216**: 289 - 298.
- [4] Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF. Improved properties of Flp recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nature Biotechnology*, 1998, **16**: 657 - 662.
- [5] Lee J, Jayaram M. Functional roles of individual recombinase monomers in strand breakage and strand union during site-specific DNA recombination. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**: 23203 - 23211.
- [6] Lee J, Whang I, Jayaram M. Assembly and orientation of Flp recombinase active sites on two, three and four-armed DNA substrates: implications for a recombination mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 1996, **257**: 532 - 549.
- [7] Jayaram M. Phosphoryl transfer in Flp recombination: a template for strand transfer mechanisms. *Trends in Biochemical Sciences*, 1994, **19**: 78 - 82.
- [8] Chen Y, Narendra U, Iype LE, et al. Crystal structure of a Flp recombinase-Holliday junction complex: assembly of an active oligomer by helix swapping. *Molecular Cell*, 2000, **6**: 885 - 897.
- [9] Lee J, Jayaram M, Grainge I. Wild-type Flp recombinase cleaves DNA in trans. *The EMBO Journal*, 1999, **18**: 784 - 791.
- [10] Voziyarov Y, Stewart AF, Jayaram M. A dual reporter screening system identifies the amino acid at position 82 in Flp site-specific recombinase as a determinant for target specificity. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**: 1656 - 1663.
- [11] Huang LC, Wood EA, Cox MM. A bacterial model system for chromosomal targeting. *Nucleic Acids Research*, 1991, **19**: 443 - 448.
- [12] Huang LC, Wood EA, Cox MM. Convenient and reversible site-specific targeting of exogenous DNA into a bacterial chromosome by use of the FLP recombinase: the FLIRT system. *The Journal of Bacteriology*, 1997, **179**: 6076 - 6083.
- [13] Manoil C. Tagging exported proteins using *Escherichia coli* alkaline phosphatase gene fusions. *Methods Enzymol*, 2000, **326**: 35 - 47.
- [14] Dymecki SM. Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, **93**: 6191 - 6196.
- [15] Waite LL, Cox MM. A protein dissociation step limits turnover in FLP recombinase-mediated site-specific recombination. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**: 23409 - 23414.
- [16] Konieczka J, Paek A, Jayaram M. Recombination of hybrid target sites by binary combinations of Flp variants: mutations that foster interprotomer collaboration and enlarge substrate tolerance. *Journal of Molecular Biology*, 2004, **339**: 365 - 378.
- [17] Nakano M, Odaka K, Takahashi Y. Production of viral vectors using recombinase-mediated cassette exchange. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**: No. 8: e76.
- [18] Kocha KS, Aoki T, Wang Y, et al. Site-specific integration of targeted DNA into animal cell genomes. *Gene*, 2000, **249**: 135 - 144.
- [19] Radhakrishna R, Srivastava V. Utility of the FLP-FRT recombination system for genetic manipulation of rice. *Plant Cell Reports*, 2005, **23**: 721 - 726.