

一种可转移的重组工程系统 pYM-Red 的建立*

于梅¹⁾ 周建光^{1)**} 陈伟²⁾ 李山虎¹⁾ 黄翠芬¹⁾

(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)

摘要 重组工程是近几年发展的新型遗传工程技术. 以 PCR 扩增的线性低拷贝质粒 pACYC184 为载体, 用 Gap-repair 方法从大肠杆菌 DY330 染色体上直接体内亚克隆了包括 Red 重组酶基因在内的长约 6.7 kb 的基因序列, 构建了 pYM-Red 重组质粒. 在宿主菌 W3110 体内进行了染色体上 *galK* 基因的敲除, 验证了 Red 重组酶的生物功能, 并确定了影响 pYM-Red 重组效率的诱导时间和线性 DNA 片段用量. 在 42℃ 诱导 10 min 和线性 DNA 打靶分子浓度为 300 ng 时, pYM-Red 的重组效率可达到大约每 4 000 个电转存活细胞中有 1 个重组阳性克隆, 分别比 pKD46 和 pBR322-Red 系统高 5~6 倍.

关键词 重组工程, Red 重组系统, Gap-repair, 体内克隆, pYM-Red 质粒

学科分类号 Q78

重组工程是一种基于噬菌体重组酶 Red/RecET 和同源重组反应的新型遗传工程技术. 该技术应用 PCR 合成的线性 DNA 片段做为打靶分子, 在大肠杆菌体内通过高效率的同源重组, 完成基因敲除、敲入、替换、基因克隆或引入单碱基突变等基因修饰. 目前, 重组工程所能完成的工作主要包括在大肠杆菌体内进行染色体 DNA、BAC 或其他类型质粒 DNA 分子的基因修饰^[1,2].

λ 噬菌体左向操纵子包含 Red 重组酶基因等 10 多个基因及调控元件. Red 重组酶由功能各异的 3 个基因 *exo*、*bet* 和 *gam* 组成, 其表达产物分别为 Exo、Beta 和 Gam. Exo 具有核酸外切酶活性, 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; Beta 结合在由 Exo 消化产生的 3' 单链末端, 防止其被单链核酸酶消化, 促进单链互补区域间的退火; Gam 抑制宿主菌的 RecBCD 线性双链 DNA 外切酶活性, 阻止其对外源线性打靶分子的降解, 协助 Exo, Beta 完成同源重组过程^[2]. 重组过程不依赖 RecA 蛋白^[3,4]. 另外, Red 重组酶基因表达受 P_L 启动子、CI857 阻遏蛋白、抗转录终止因子 N、转录终止子以及致死因子 Kil 等多重调控^[5,6]. 在 42℃ 诱导一定时间后, CI857 阻遏蛋白失活, Red 基因暂时性表达, 高效率催化体内重组反应. 2000 年, Yu 等^[7]将缺陷型 λ 噬菌体左向操纵子部分 DNA 序列整合在大肠杆菌 W3110 染色体上, 建立了 DY330 等一系列重组工程系统. 在这些菌株中, 重组酶基因以自然状态存在于 λ 噬菌体左向操纵子中, 保证了 3 种重组酶基因以正确

的比例表达. 同时保证了在 30℃ 培养时, λ 噬菌体左向操纵子中的所有基因表达关闭, 防止由于重组酶基因过表达带来的负面效应^[2]. 这种以缺陷型 λ 原噬菌体, 整合在大肠杆菌 W3110 染色体上的重组工程系统提供的重组效率是其他 Red/RecET 系统的 50~100 倍^[8].

由于 Red 重组酶基因整合在大肠杆菌 W3110 染色体上, 限定了只能在这样的菌株中进行 DNA 修饰, 无法修饰其他种类细菌染色体, 有时 BAC 大质粒难以转化这些菌株. 为建立一种可转移到不同宿主细菌中、重组效率高、调控严谨的重组工程系统, 本研究采用 Gap-repair 新技术^[8,9], 以线性低拷贝 pACYC184 质粒为载体, 体内亚克隆了整合在染色体 DNA 上的缺陷型 λ 噬菌体左向操纵子自 *exo* 到 *cI857* 长约 6.7 kb 的基因序列, 建立了 pYM-Red 新型重组工程系统. 为能更好地将重组工程技术应用到修饰 BAC、PAC 以及直接修饰其他种类细菌染色体的研究奠定了重要基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株质粒. 大肠杆菌 W3110 菌株、大肠杆菌 DY330(基因型为 *W3110ΔlacU169 gal490 λ cI857Δ(cro-bioA)*)(图 1))由美国国立卫生院肿瘤研究

*军队“十五”医药卫生科学基金(01MA 089).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931807, E-mail: zhoujgx@public.bta.net.cn

收稿日期: 2004-11-01, 接受日期: 2004-12-01

所 Court 博士惠赠; DY330-*kan* 是将 DY330 染色体上的 *galk* 基因替换为 *kan* 基因, 由本室构建; DH5 α 为本室保存. pACYC184 为本室保存;

pBR322-Red 携带有 λ 噬菌体中 *exo-cl857* 长约 6.7 kb 的基因, 为本室构建, pKD46 由 Wanner 博士馈赠.

nadA gal attL int xis ea8.5 ea22 hin exo bet gam kil c III ssb ral sieB N rexB rexA cl857 (cro-attR-bioA)

PL PR ^

Fig.1 Description of the defective λ prophage on the *E.coli* chromosome

1.1.2 工具酶与化学试剂. TaqDNA 聚合酶、SuperTaq 酶购自上海申能博彩生物科技有限公司; Cm (氯霉素)、Km (硫酸卡那霉素) 是 Sigma 公司产品; 氯霉素抗性培养基 (Cm^R) 和卡那霉素抗性培养基 (Km^R) 的工作浓度分别为 25 mg/L, 20 mg/L; 限制性内切酶购自 TakaRa 公司和 BioLabs 公司. L-阿拉伯糖、质粒小量提取试剂盒、DNA 胶回收试

剂盒、PCR 产物回收试剂盒为 Promega 公司产品; MacConKey Agar 购自 Becton, Dickinson and Company (BD 公司).

1.1.3 引物合成与测序. 引物由上海博亚生物技术有限公司合成 (表 1); 测序结果由上海博亚生物技术有限公司提供.

Table 1 Primers used in this research

Sequence name	DNA sequence of PCR primer*
PR1	5' <u>TCACGATAATATCCGGGTAGGCGCAATCACTTTCGTCTACATTCAGGCGTAGCACCAGG</u> 3'
PR2	5' <u>CTCTGGCGGTGATAATGGTTGCATGTACTAAGGAGGTTGTTTATCGATGATAAGCTGTC</u> 3'
PR3	5' CGGAATTCCGATCAGCCAAACGTCTCTTCAG 3'
PG-K1	5' <u>TCGGTGTGTTGCTGGTGATTTGAACAATATGAGATAAAGCCTATGGACAGCAAGCGAACCG</u> 3'
PG-K2	5' <u>TCGCGCATAAAAAACGGCTAAATTCTTGTGTAAACGATTTCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG</u> 3'
PK1	5' TATGGACAGCAAGCGAACCG 3'
PK2	5' TCAGAAGAACTCGTCAAGAAG 3'

* Homology Arms are underlined in primers.

1.2 方法

1.2.1 电转感受态的制备. a. 携带 pYM-Red、pBR322-Red 细菌电转感受态的制备. 挑取已转化有 pYM-Red 或 pBR322-Red 的大肠杆菌 W3110 单菌落接种于 5 ml 液体 LB 培养基, 30℃ 摇床过夜培养, 取过夜培养物稀释 50 倍后接种于 100 ml 液体 LB, 30℃ 震荡培养至 $0.4 < A_{600} < 0.6$, 取 15 ml 培养物置于 150 ml 锥形瓶中, 42℃ 水浴震荡培养 (≥ 200 r/min) 10 min/7.5 min, 立刻冰浴 30 min. 将上述培养物转移至高压灭菌处理的聚丙烯离心管中, 4℃ 条件下, 7 500 r/min 离心 8 min, 弃去上清, 加入 30 ml 冰冷的无菌水重悬菌体以清洗除盐, 7 500 r/min 离心 8 min, 小心弃去上清, 重复水洗一次后再用 1 ml 冰冷的无菌去离子水重悬于 1.5 ml Eppendorf 管中. 最后在 4℃ 高速离心 30 s, 小心弃去上清, 重悬于 200 μ l 冰冷的无菌水中. 这

样一次制备的感受态细胞的量够 4 次标准的电穿孔转化. b. 携带 pKD46 细菌电转感受态的制备. 挑取转化有 pKD46 的 W3110 单克隆接种于 5 ml 液体 LB 培养基, 30℃ 摇床过夜培养, 取过夜培养物稀释 50 倍后接种于 30 ml 液体 LB, 30℃ 震荡培养至合适浓度后, 加入 0.2% 的 L-阿拉伯糖诱导 35~40 min 至 $0.4 < A_{600} < 0.6$, 取 15 ml 菌液置于高压灭菌处理的聚丙烯离心管中, 冰浴 30 min. 水洗和重悬过程同上.

1.2.2 同源臂设计及线性打靶载体制备. a. 同源臂决定了体内亚克隆目的基因的大小和区域, 它的设计遵循 GC 分布均匀、含量约 50% 的原则, 长度大约 40 个碱基. b. 扩增线性 pACYC184 打靶载体的 PCR 引物包括两部分, 5' 端 40 个碱基为同源臂序列, 3' 端 19 个碱基是与 pACYC184 模板互补的 PCR 扩增引物. 通过 PCR 反应将上述同源臂加载到

线性 pACYC184 打靶载体的两侧. 引物 PR1 的序列为: λ 噬菌体 *exo* 基因下游 31 340~31 301 bp 连接 pACYC184 载体 3 753~3 771 bp 共 59 个碱基; 引物 PR2 的序列为: λ 噬菌体阻遏基因 *cI857* 的启动子上游 38 001~38 040 bp 连接 pACYC184 载体 1 525~1 507 bp 共 59 个碱基. 用 SuperTaq 酶进行 PCR 反应. 线性 pACYC184 打靶载体保留了 1 个氯霉素抗性筛选标记和复制起始点 (ori), 总长度为 2 018 bp, 能克隆 DY330 染色体上约 6.7 kb 的 λ 噬菌体左向操纵子基因和调控元件. c. 携带 *kan* 筛选标记的 *galk* 基因打靶分子的合成 PG-K1、PG-K2 引物 5' 端 40~41 bp 与大肠杆菌 K12 的 *galk* 基因两端序列同源, 3' 端 20~21 bp 是 *kan* 基因的 PCR 扩增引物. PCR 扩增条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min; 72°C 7 min, 模板为 DY330-*kan* 菌株.

1.2.3 电击转化. 100~500 ng 的纯化线性 DNA 片段与细菌电感受态混合至终体积 50 μ l, 加入预冷的 0.1 cm 电击杯中; Bio-Rad 电转仪设置 1.8 kV, 25 μ F, 电阻 200 Ω , 电击后迅速加入 1 ml LB 将细菌洗出, 30°C 孵育 2 h; 取适量细菌涂抗性平板和空白平板, 筛选阳性克隆并计算重组率.

1.2.4 重组克隆的鉴定. a. pYM-Red 重组质粒的鉴定. 用 PR1、PR3 引物进行 PCR 鉴定, 扩增条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 3 min; 72°C 7 min. b. 染色体上 *galk* $\triangle$ *kan* (*kan* 基因替换 *galk* 基因) 阳性克隆的鉴定. PK1、PK2 是 *kan* 基因的 PCR 鉴定引物, 扩增条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min; 72°C 7 min.

1.2.5 重组效率的计算. 进行 *galk* $\triangle$ *kan* 基因替换的细菌被电击后在 30°C 继续摇菌培养 2 h, 取约 100 μ l 菌液分别涂布 3 个 Km^R 抗性平板 (重组阳性克隆), 另取同样量的上述细菌稀释至 10^{-3} ~ 10^{-6} , 分别涂布 3 块空白平板 (电转存活细胞); 30°C 培养过夜后计数, 将同样的 3 个平板的克隆数取平均值; 重组阳性克隆数与电转存活细胞数的比值即为重组效率. 每项实验均重复 3 次.

2 结 果

2.1 Gap-repair 方式体内亚克隆

将 300 ng 线性 pACYC184 打靶载体电击转化进 DY330 菌株中. 在 42°C 诱导 15 min 条件下, 线性 pACYC184 载体通过同源重组捕获 DY330 染色

体上 6.7 kb 的目的基因, 在体内形成环型 pACYC184-Red 重组 DNA 分子 (图 2). 挑选 6 个氯霉素抗性克隆进行 PCR 鉴定, 其中 5 个为阳性结果, 产生的 PCR 片段长约 2 800 bp, 与预期结果一致. 重组阳性率约为 83%. 用限制酶切方法鉴定其中一个阳性克隆, 并与原始质粒相应的酶切图谱对比, 结果显示, 除 7 815 位的 *exo* 基因内 *EcoR* I 酶切位点发生突变外, 其他酶切图谱正确 (图 3). *Red* 基因序列分析结果显示, 该 *EcoR* I 酶切位点发生由 GAATTC 到 GAATTT 的单碱基同义突变, 不改变氨基酸组成, 因此对重组效率没有影响. 对 DY330 菌株的该酶切位点进行分析, 发现突变是 DY330 本身就存在的, 不是由 Gap-repair 过程造成的. 命名新构建的质粒为 pYM-Red. 该质粒是氯霉素抗性, 复制子为 P15, 每个细胞中含 2~8 个拷贝.

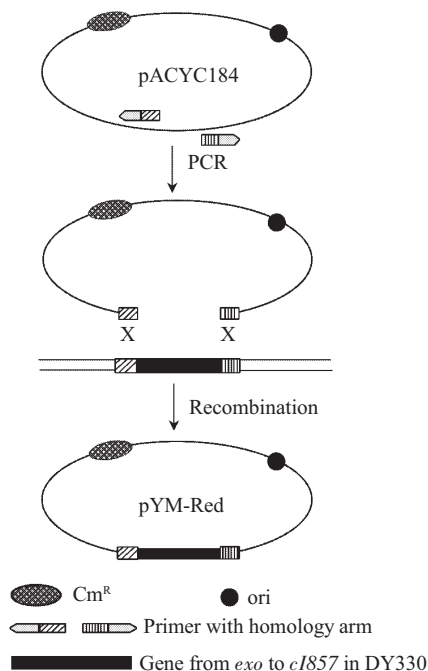


Fig.2 The construction of pYM-Red plasmid

2.2 pYM-Red 介导的大肠杆菌 W3110 和 DH5 α 染色体中 *galk* 基因敲除

为确定 pYM-Red 质粒中 Red 重组酶的生物功能, 同时验证 Red 能否在不同宿主菌中发挥作用, 以大肠杆菌 W3110 和 DH5 α 染色体上功能已知的 *galk* 基因为靶标, 进行了 *galk* 基因敲除. 将 pYM-Red 质粒分别转入 W3110 和 DH5 α 中, PCR 方法合成携带 *kan* 筛选标记的 *galk* 基因打靶分子, 将打靶分子电击转化进以上细菌中, 通过检测 *kan*

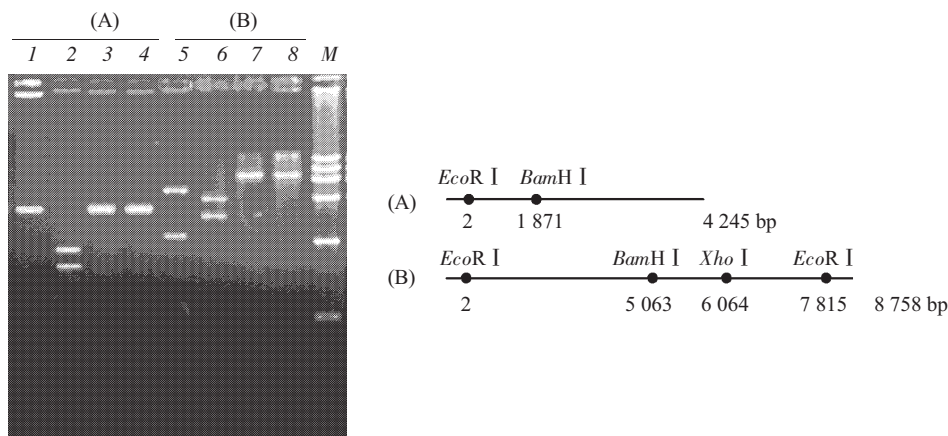


Fig.3 Restriction enzyme analysis of pACYC184 and pYM-Red

M: marker (from the top to the bottom: 15 kb, 10 kb, 7.5 kb, 5 kb, 2.5 kb, 1 kb, respectively). (A) pACYC184. 1: *Xho* I and *EcoR* I digestion of pACYC184; 2: *Bam*H I and *EcoR* I digestion of pACYC184; 3: *EcoR* I digestion of pACYC184; 4: *Bam*H I digestion of pACYC184. (B) pYM-Red. 5: *Xho* I and *EcoR* I digestion of pYM-Red; 6: *Bam*H I and *EcoR* I digestion of pYM-Red; 7: *EcoR* I digestion of pYM-Red; 8: *Bam*H I digestion of pYM-Red.

基因替换染色体中的 *galk* 基因 (*galk* $\rightarrow$ *kan*) 的频率来确定 pYM-Red 的重组功能. 随机在 Km^R 抗性平板上挑出数个克隆, 划线 MacConKey 平板, *galk*⁺ 表型的野生型大肠杆菌菌落应该在 MacConKey gal 指示平板上呈红色. 而将 *galk* 基因敲除后产生 *galk*⁻ 表型的细菌菌落为白色. 结果除 3 个阴性对照 (野生型 W3110 或 DH5 α) 为红色外, 其余克隆全部呈白色, 提示其中 *galk* 基因已被敲除 (图 4). 为了进一步确定上述结果, 随机挑出 6 个白色的菌落进行 PCR 鉴定, 从 6 个菌落中全部扩出 1 000 bp 左右的 DNA 条带, 与预期结果一致.

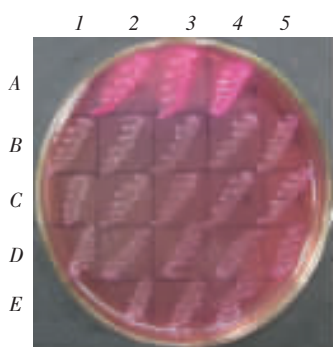


Fig.4 Identification of *galk* gene on MacKonKey agar plate

A2~A4: wild-type strains of W3110 or DH5 α ; B1~E4: W3110 or DH5 α strains with the deletion of *galk* gene.

2.3 pYM-Red 重组系统的最优重组条件选择

为精确确定影响 pYM-Red 系统重组效率的诱导时间和线性 DNA 片段用量, 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°C 诱导 5 min、10 min、12.5 min、15 min 和 20 min. 均使用 300 ng 线性打靶分子. 通过检测 *kan* 基因替换 W3110 染色体中的 *galk* 基因 (*galk* $\rightarrow$ *kan*) 的频率, 计算各个时间点的重组效率. 实验结果显示, pYM-Red (在 W3110 中) 诱导 10~12.5 min 时的重组效率最高, 诱导 15 min 后重组效率显著下降 (图 5a). 在同一次实验中, 诱导时间均采用 10 min, 分别取 100 ng、300 ng、500 ng 的线性 DNA 打靶分子进行重组. 结果表明, 当线性 DNA 分子为 100 ng 和 300 ng 时重组效率最高, 当外源片段超过 500 ng 后重组效率下降 (图 5b).

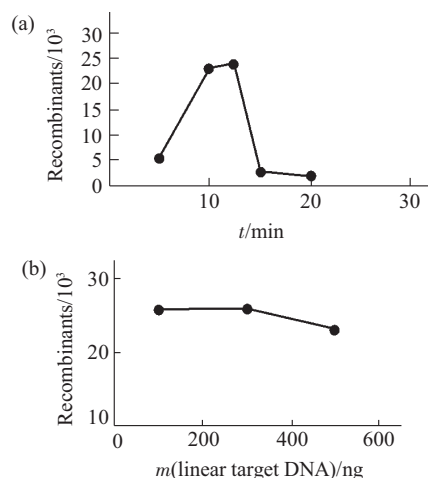


Fig.5 Effect of induction time (a) and concentration (b) of the linear DNA targeted fragment on recombination

Recombinants indicate the number of recombination positive clones per 10⁸ electroporation survived cells.

2.4 pYM-Red 与 pBR322-Red 和 pKD46 重组效率的比较

为确定 pYM-Red 的重组效率，将其与 pBR322-Red 和 pKD46 进行重组效率的比较。pBR322-Red 是本室以拷贝数为 20~50 个、复制子是 ColE1 的 pBR322 质粒为载体，用 Gap-repair 方法构建的重组质粒。经实验测定 pBR322-Red 的最佳诱导时间为 7.5 min (过程省略)。pKD46 是由 Datsenko 等^[10]将 3 个重组酶基因 *exo*、*bet* 和 *gam* 放置在 pBAD 启动子控制下，构建了由质粒携带重组酶的重组系统。本研究将 pYM-Red、pKD46 和 pBR322-Red 质粒分别转入 W3110 宿主中。在同一次操作中用各自最佳重组条件进行染色体上 *galk* 基因敲除 (*galk* > *kan*)，并比较重组效率。其中，pYM-Red 诱导 10 min，pBR322-Red 诱导 7.5 min，pKD46 用终浓度 0.2% 的 L-阿拉伯糖诱导 35~40 min，线性 DNA 打靶分子都采用 300 ng。3 次重复实验的结果均显示 pYM-Red 的重组效率比 pKD46 高约 6 倍，比 pBR322-Red 高 5 倍左右 (表 2)。

Table 2 Comparison of the recombination efficiency of three plasmids

Recombinant plasmid	Recombination efficiency
pYM-Red	1/4 000
pBR322-Red	1/20 000
pKD46	1/25 000

3 讨 论

重组工程系统主要分为两类：a. 大肠杆菌染色体上携带缺陷型 λ 噬菌体 Red 重组酶的 DY330 等重组系统^[7]；b. 人工克隆在质粒上的 Red/RecET 重组系统，其中重组酶基因组成性表达或受 pBAD 启动子调控^[10-13]。在缺陷型 λ 噬菌体左向操纵子部分基因整合在大肠杆菌染色体上的重组系统中，其 Red 重组酶基因能够在 λ 噬菌体的自然状态下协调表达，不会由于 *exo*、*bet* 表达产物的比例失调引起重组效率下降，在 30℃ 培养条件下，CI857 阻遏基因对 PL 启动子严谨调控，不会因 *gam* 基因的过量表达产生质粒的不稳定性和细胞毒性问题^[2]，42℃ 温度下诱导仅 15 min，即可产生高达 6%~0.1% 的重组效率，因此，该系统是目前几个重组工程系统中效率最高的一个^[7,8,14]。但是，由于 Red

基因整合在染色体中，限定了重组只能在这样的受体菌中进行，应用范围因而受到局限。Datsenko 等亚克隆了 λ 噬菌体 31 088~33 241 之间，长度为 2 154 bp 的，包含 3 个重组酶基因 *exo*、*bet* 和 *gam* 的 DNA 片段。将其人工放置在 pBAD 启动子控制之下，用 L-阿拉伯糖诱导重组酶基因的表达。它的优点是在不同的宿主菌间转移，因此应用比较广泛。文献报道 pKD46 存在于基于大肠杆菌 K12 株的阿拉伯糖基因突变的 BW25133 菌株中时，用 1 mmol/L 的 L-阿拉伯糖诱导 pKD46 重组酶基因表达，有效地从染色体上敲除了多个基因，重组效率未见报道^[8]。本研究室用该条件在含野生型阿拉伯糖基因的 W3110 菌株中进行基因敲除时没有得到阳性克隆。大肠杆菌自身的阿拉伯糖启动子在外源阿拉伯糖的诱导下也会分解阿拉伯糖，而且若表达重组酶基因时间过长，特别是 *gam* 基因的过量表达会导致质粒的不稳定性和对细胞的毒性^[2]，不同细菌中阿拉伯糖诱导的用量和诱导时间很难把握，考虑到上述因素，我们比较了一系列阿拉伯糖的浓度和诱导时间，发现在 W3110 菌株中，使用 0.2% 的阿拉伯糖诱导 35~40 min 时，发生体内同源重组的效率最高 (过程省略)。

为了较好地模拟 λ 噬菌体基因表达调控的自然状态，综合 DY330 和可转移重组工程系统二者的优势。本研究以低拷贝质粒为载体，用 Gap-repair 方法在大肠杆菌 DY330 体内直接亚克隆了 λ 噬菌体左向操纵子自 *exo* 到 *cI857* 的全部基因和调控元件，构建了 pYM-Red 重组系统，由于 Gap-repair 亚克隆技术是在大肠杆菌体内进行的，因此外源 DNA 片段产生突变的几率非常小，可以从大肠杆菌染色体 DNA 上精确地克隆任意的区域、不受限制性酶切位点的限制。另外，我们还对影响重组效率的两个重要参数进行分析，发现诱导时间为 10~12.5 min 时重组效率最高，超过 12.5 min 后重组效率显著下降；线性 DNA 片段用量为 100 ng 和 300 ng 的重组克隆数相当，用量过高重组效率反而降低。在最优重组条件下，pYM-Red 的重组效率可达到每 4 000 个电转存活细胞中有一个重组阳性克隆。为了尽量消除外界环境和实验操作所致的误差，在同一次实验中比较了 pBR322-Red、pKD46 与 pYM-Red 的重组效率，结果表明，pYM-Red 的重组效率比本研究室自己建立的中低拷贝的 pBR322-Red 系统高 5 倍左右，比国际上广泛应用的 pKD46 系统高 6 倍左右。另外，我们已经验证了

pYM-Red系统可在不同大肠杆菌中进行染色体DNA基因敲除。

总之,本研究建立了pYM-Red重组工程系统,它具备了能在广泛细菌宿主中随意转移、高重组效率以及重组酶基因表达的严谨调控等特性。有希望在精确修饰BAC载体,制备重组BAC质粒、改构其他类型质粒DNA分子,以及不同细菌染色体基因的修饰等工作中发挥重要作用。

参 考 文 献

- 1 Copeland N G, Jenkins N A, Court D L. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*, 2001, **2** (10): 769~779
- 2 Court D L, Sawitzke J A, Thomason L C. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet*, 2002, **36**: 361~388
- 3 Muylers J P, Zhang Y, Buchholz F, *et al.* RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev*, 2000, **14** (15): 1971~1982
- 4 Stahl F W, Stahl M M, Malone R E. Red-mediated recombination of phage lambda in a recA⁻ recB⁻ host. *Mol Gen Genet*, 1978, **159**: 207~211
- 5 Friedman D I, Court D L. Bacteriophage lambda: alive and well and still doing its thing. *Curr Opin Microbiol*, 2001, **4** (2): 201~207
- 6 Greer H. The kil gene of bacteriophage lambda. *Virology*, 1975, **66** (2): 589~604
- 7 Yu D, Ellis H M, Lee E C, *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (11): 5978~5983
- 8 Lee E C, 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
- 9 Zhang Y, Muylers J P, Testa G, *et al.* DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 2000, **18** (12): 1314~1317
- 10 Datsenko K A, Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (12): 6640~6645
- 11 Zhang Y, Buchholz F, Muylers J P, *et al.* A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*, 1998, **20** (2): 123~128
- 12 Narayanan K, Williamson R, Zhang Y, *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 Ther*, 1999, **6** (3): 442~447
- 13 Muylers J P, Zhang Y, Testa G, *et al.* Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27** (6): 1555~1557
- 14 Ellis H M, 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

The Construction of a New Mobile Recombineering System of pYM-Red*

YU Mei¹⁾, ZHOU Jian-Guang^{1)**}, CHEN Wei²⁾, LI Shan-Hu¹⁾, HUANG Cui-Fen¹⁾

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)

Abstract Recombineering is a new developed genetic engineering technology in the past few years. A new recombineering system named pYM-Red was constructed by gap-repair, that is a technology called *in vivo* cloning. Linear PCR fragments that amplified from low copy plasmid pACYC184 were used as gene targeting vector. The length of subcloned DNA sequence including *Red* gene and a series regulatory sequences are about 6.7 kb. The biology function of Red gene in pYM-Red was tested by gene replacement (*galk* > *kan*) of W3110 chromosome. Factors that effect recombination efficiency were precisely confirmed. When induced 10 min at 42°C and using 300 ng linear DNA fragment as targeting molecules, the efficiency of pYM-Red mediated recombination can reach one positive recombination clone per four thousands electroporation survived cells, it is 5~6 folds higher than pBR322-Red and pKD46 recombination system.

Key words recombineering, red recombination system, gap-repair, *in vivo* cloning, pYM-Red

*This work was supported by a grant from Medical Science Foundation of PLA (01MA 089).

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

Received: November 1, 2004 Accepted: December 1, 2004