

Red/ET 同源重组介导细菌人工染色体的快速修饰*

王军平^{1)**} 张友明²⁾ 栗永萍¹⁾

(¹⁾第三军医大学预防医学系全军复合伤研究所, 创伤烧伤复合伤国家重点实验室, 重庆 400038;

²⁾ Gene Bridge GmbH, Dresden 01307, Germany)

摘要 随着基因组测序工程的实施与完成, 如何对包含完整基因信息的特定细菌人工染色体(BAC)进行有目的修饰, 已成为功能基因组学研究的一个重要环节. 应用新近优化的 Red/ET 同源重组技术对目标 BAC 进行修饰, 以 pSC101-BAD-gbaA 为依托质粒, 采用 *rpsL-neo* 为正/反向筛选系统, 可以快速、高效地对 BAC 进行剪切、插入、替换等操作, 其中能够进行抗性筛选的一步 BAC 修饰只需一周时间, 以插入非抗性标记基因 *Cre* 为代表的两步 BAC 修饰在两周内即可完成. 通过阿拉伯多糖诱导调控和简单地变化培养温度, 能使 pSC101-BAD-gbaA 依托质粒在发挥完 Red/ET 同源重组作用后自然消失, 最终获得完整而纯净的修饰后 BAC, 为加快功能基因组学研究提供了一个可靠的实验平台.

关键词 Red/ET 同源重组, BAC 修饰, 功能基因组

学科分类号 Q78

包括人类基因组计划在内的多种生物体基因组测序工程的实施与完成, 将大量基因组序列信息展现在人们面前. 基于序列信息所开展的功能基因组学研究已成为当今生命科学领域的一个重要课题. 由于容量大、操作简单以及结构与复制稳定等特点, 细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 被人们认为是最理想的基因组 DNA 载体^[1]. 已知, 一个 BAC 的最大容量可以达到 300 kb, 能够装载包括调控元件、内含子、外显子等在内几乎任何真核基因的完整序列、基因簇以及某些病毒的全部基因组^[2,3]. 目前, 人、鼠以及其他一些模式生物的基因组 DNA 都已经或正在建立相应的 BAC 文库, 从而使得 BAC 成为功能基因组学研究的一个有效资源. 因此, 对 BAC 进行有目的的修饰, 包括基因的剪切、插入、突变、克隆与亚克隆等, 成为运用 BAC 开展功能基因组学研究的必经之路.

然而, 由于 DNA 碱基构成方式和限制性内切酶识别位点的序列要求, 对于像 BAC (100 ~ 300 kb) 这样大的 DNA, 通过依赖于限制性内切酶的传统分子克隆技术很难对其进行操作, 因为从中找到只有单一识别位点内切酶的几率太小, 要对 BAC 进行定点修饰就更难了. 根据体内同源重组现象, 人们最初通过合理应用大肠杆菌的 *RecA* 重组系统实现了 BAC 定点修饰, 但是这种由 *RecA* 介导的同源重组需要较长的同源臂 (1 kb 左右), 操作

起来费时、费力^[4]. 正因如此, BAC 的应用一直受到限制.

近年来, 基于 λ 噬菌体 Red 操纵子 (Red α /Red β /Red γ) 和 ϕ 噬菌体 RecE/RecT 同源重组酶的 “Red/ET 重组” 首次展示了仅需 35 ~ 50 bp 同源臂的同源重组技术^[5-7]. 50 bp 的同源臂可以通过 PCR 方法加载在打靶序列的两侧, 也可以直接合成仅含两个同源臂的寡核苷酸序列, 在同源臂与 PCR 引物之间或两个同源臂之间还可以加入一些特殊序列, 如 loxP 位点、限制性内切酶识别位点、蛋白质标签以及点突变等, 从而实现应用 PCR 产物或体外合成的寡核苷酸直接对靶 DNA 分子进行各种有目的的修饰. 由于同源臂序列既无特殊要求又不受识别位点限制, 可以人为随意选择, 因此该技术不仅操作简单、省时、省力, 而且可对各种大小 DNA 分子进行操作, 尤其在 BAC、PAC (P1 artificial chromosome) 等大分子 DNA 修饰方面具有独到的优势^[8,9]. 最近, 我们又对 Red/ET 重组进行了优化, 把 *RecA* 引入了该操作系统, 同时将其依托质粒改为低拷贝、温度敏感型. 本实验通过

*国家自然科学基金重点资助项目(30230360)和第三军医大学留学回国人员启动基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 023-68752283, Fax: 023-68752009

E-mail: wangjunp@yahoo.com

收稿日期: 2004-11-19, 接受日期: 2005-01-31

对两个不同 BAC 不同目的的修饰来分析和验证 Red/ET 重组优化后的可行性, 并详细阐述了该技术在 BAC 修饰中的应用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 BACs. 含有小鼠混合细胞白血病 (mixed-lineage leukemia, MLL) 完整基因组序列的 BAC 和促黑激素皮质素受体 -4 (melanocortin-4 receptor, MC4R) 完整基因组的 BAC 由德国德累斯顿工业大学生物技术中心 Stewart 教授惠赠.

1.1.2 质粒与菌株. 表达 *red γ /red β /red α /recA* 的 Red/ET 依托质粒 pSC101-BAD-gbaA、反向筛选模板质粒 pRPSL-Neo 以及 *Cre* 基因 PCR 模板质粒 Cre-706 由德国 Gene Bridges 公司提供, *neo* 基因 PCR 模板质粒 pACYC177 为 Invitrogen 公司产品. BAC 宿主菌为大肠杆菌 HS996 (一种具有噬菌体抗性的 DH10B, *recA*⁻), Gene Bridges 保存.

1.1.3 试剂. BAC 质粒 DNA 提取试剂盒 (Qiagene 公司), L-阿拉伯多糖 (Sigma 公司), 卡那霉素、氯霉素、链霉素、四环素 (Hyclone 公司), *Xho* I、*Nco* I 限制性内切酶 (NEB 公司), Triplemaster Taq 聚合酶 (Eppendorf 公司).

1.2 方法

1.2.1 一步法 BAC 修饰——通过插入抗性筛选基因删除 MLL BAC 上多余的 loxP 位点 (图 1a).

a. PCR 扩增 *neo* 基因: 首先选择目标 BAC (含有小鼠 MLL 基因, BAC 全长约 150 kb) 上 loxP 位点两侧各 50 bp 的碱基序列作为同源臂 A(HA)和同源臂 B(HB). 以含有 *neo* 基因的 pACYC177 质粒 DNA 为模板, 设计合成两端分别带有同源臂 HA 和 HB 的上、下游引物. 为了利于酶切检测, 在 HB 与 *neo* 基因下游特异性引物之间引入一个 *Xho* I 识别序列. PCR 扩增 *neo* 基因, 回收并纯化所得 PCR 产物.

b. 电转化 Red/ET 依托质粒 pSC101-BAD-gbaA: 将含有 MLL BAC 的宿主菌单克隆过夜培养, 次日制备感受态, 取 0.1 μ g pSC101-BAD-gbaA 质粒 DNA 电击转化感受态细胞, 之后涂于氯霉素 (15 mg/L) + 四环素 (5 mg/L) 的 LB 平板上, 30℃ 过夜.

c. Red/ET 重组: 挑取 30℃ 过夜 LB 平板上的单克隆 (此单克隆已同时含有目标 BAC 和依托质粒 pSC101-BAD-gbaA), 过夜培养, 次日 1:50 接种

细菌至 1.5 ml LB 培养基中, 30℃ 振荡培养至 A_{600} 值为 0.25, 加 L-阿拉伯多糖至终浓度为 0.1%, 并改为 37℃ 振荡培养至 A_{600} 值为 0.4, 此期间 *red γ /red β /red α /recA* 发生了短暂表达. 将诱导表达后的细胞制备感受态, 取 0.2 μ g 带有同源臂的 *neo* 基因 PCR 产物电击转化感受态细胞, 电转后加入 1 ml LB 培养基, 37℃ 振荡培养 70 min, 最后取其中的 100 μ l 涂于氯霉素 (15 mg/L) + 卡那霉素 (15 mg/L) LB 平板上, 37℃ 过夜.

d. 修饰后的 BAC 鉴定: 从 37℃ 过夜后的 LB 平板上挑取数个单克隆至 2 ml LB 培养基中 (含 15 mg/L 氯霉素和 15 mg/L 卡那霉素), 37℃ 振荡培养过夜, 次日提取 BAC DNA, *Xho* I 37℃ 酶切 3 h, 1% 琼脂糖脉冲场电泳检测酶切产物.

1.2.2 两步法 BAC 修饰——借助 *rpsL-neo* 反向筛选系统将非抗性基因 *Cre* 定点插入到 MC4R BAC 上 (图 1b).

a. PCR 扩增 *rpsL-neo*. 选择目标 BAC (含有小鼠 MC4R 基因, BAC 全长约 210 kb) 上 MC4R 基因第一个外显子 ATG 前面的 50 bp 碱基序列和第一个外显子最后的 50 bp 碱基序列作为同源臂 HA 和 HB, 将 HA 与 HB 分别置于 *rpsL-neo* 上、下游特异引物序列的 5' 端, 合成新引物, 并以质粒 pRPSL-Neo 为模板 PCR 扩增 *rpsL-neo*, 选择相同的同源臂序列, 同样方法扩增 *Cre* 基因, 回收并纯化所得 PCR 产物.

b. 第一轮 Red/ET 重组. 同一步法操作一样, 在卡那霉素筛选压力下经 Red/ET 重组将 *rpsL-neo* 插入到 MC4R BAC 的指定位置. 不同的是电转 *rpsL-neo* PCR 产物后, 涂于氯霉素 (15 mg/L) + 卡那霉素 (15 mg/L) + 四环素 (5 mg/L) LB 平板上, 30℃ 过夜, 次日挑取单克隆接种, 30℃ 振荡培养 4~5 h 后, 取部分于 4℃ 保存备用 (用于继续维持 pSC101-BAD-gbaA 的存在), 其余 37℃ 培养过夜, 次日提取 BAC DNA, 应用 GCK (Gene construction kit) 软件做电子酶切分析后选择 *Nco* I 进行单酶切, 0.7% 琼脂糖普通电泳检测酶切产物.

c. 第二轮 Red/ET 重组. 对于酶切鉴定正确的克隆, 取 4℃ 对应保存部分加入新鲜 LB 培养基后 30℃ 振荡培养过夜, 同时进行两次划线实验, 即同一克隆先后分别在链霉素 (15 mg/L) LB 平板和卡那霉素 (15 mg/L) LB 平板上进行划线, 30℃ 过夜. 对于只在卡那霉素 LB 平板上生长而不在链霉素 LB 平板上生长的克隆, 再通过 Red/ET 重组介导 *Cre*

替换 *rpsL-neo*, 经氯霉素 (15 mg/L) + 链霉素 (15 mg/L) 筛选后生长的克隆, 继续 37°C 培养过夜, 最后提取 BAC DNA, *Nco* I 酶切, 0.7% 琼脂糖普

通电泳检测酶切产物, 对于正确的克隆进一步测序验证.

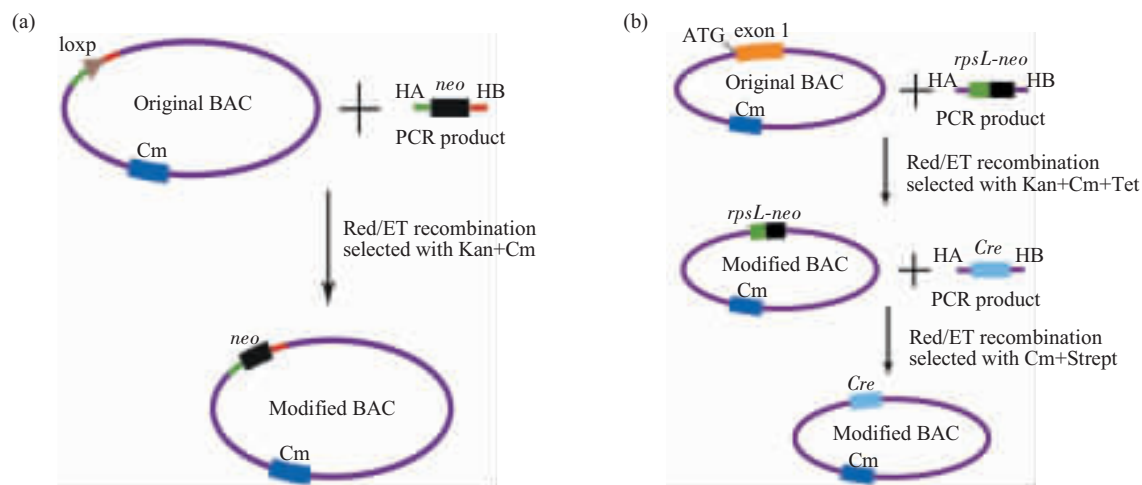


Fig.1 Sketch map of BAC modification mediated by optimized Red/ET recombination

(a) one step BAC modification for loxP deletion. (b) two step BAC modification for Cre insertion. HA: homology arm A; HB: homology arm B; Cm: chloramphenicol; Kan: kanamycin; Tet: tetracycline; Strept: streptomycin.

2 结 果

2.1 带同源臂的 *neo*、*rpsL-neo* 及 *Cre* PCR 扩增结果

由于带有 50 bp 的同源臂序列, 使得 PCR 引物的长度达到 70 bp 左右, 为保证 PCR 的扩增效果, 选用了 Eppendorf 公司高保真、高产量的 Triplemaster Taq 聚合酶, 从实验结果来看 50 μ l 反应体系可以获得 50~100 μ g 的 PCR 产物. 所扩增的 *neo*、*rpsL-neo* 及 *Cre* PCR 产物大小分别为 1 075 bp、1 419 bp、1 238 bp (图 2), 其中 *neo* 基

因 PCR 产物比模板本身 (969 bp) 大 106 bp (包括了 6 bp 的 *Xho* I 位点序列), 而 *rpsL-neo* 和 *Cre* PCR 产物也都比各自模板 (1 319 bp 和 1 138 bp) 大了 100 bp, 与预期结果一致.

2.2 MLL BAC 的修饰结果

在 Red/ET 重组后的 LB 平板上共有上千个克隆, 随机挑取数个克隆进行鉴定, 脉冲场电泳结果显示, 经 *Xho* I 酶切后, 与对照组相比, 修饰后的 BAC 少了一条 13.6 kb 的 DNA 条带, 同时增加了两条分别为 5.8 kb 和 8.9 kb 的 DNA 条带, 与电子酶切图谱完全一致 (图 3), 再加上 BAC 克隆新出现的卡那霉素抗性, 表明 *neo* 基因已经成功地插入到目标 BAC 的指定位置.

从 BAC 修饰的效率来看, 酶切结果显示所挑取克隆几乎都为正确的阳性克隆. 由于我们只取了转化后 1/10 菌液进行涂板, 所以总的阳性克隆数可以超过上万个, 而且整个操作过程仅需要一周时间. 另外, 从酶切后的电泳结果看, 与对照组相比, 修饰后的 BAC 没有发生其他无谓片段缺失, 最终所得到的修饰后的 BAC DNA 中也没有依托质粒 pSC101-BAD-gbaA 的污染.

2.3 MC4R BAC 的修饰结果

Nco I 酶切电泳结果显示, 第一轮 Red/ET 重组后, 与对照组相比, 修饰后的 MC4R BAC 少了

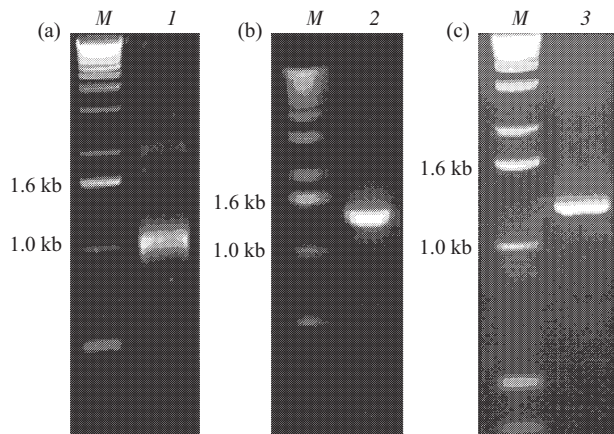


Fig.2 PCR results of *neo*, *rpsL-neo* and *Cre* with homology arms

M: 1 kb DNA molecular mass marker; 1: *neo*; 2: *rpsL-neo*; 3: *Cre*.

一条 2 782 bp 的 DNA 带 (从亮度上看此处的 DNA 双带变成了单带), 同时多了一条 2 088 bp 的 DNA 带, 与电子酶切图谱一致(图 4), 结合卡那霉素抗性的出现, 表明 *rpsL-neo* 成功地插入到预定的位置. 第二轮 Red/ET 重组后, 与第一步修饰后的 BAC 相比, 2 088 bp 处 DNA 条带发生丢失, 并且新增一条 1 967 bp DNA 带 (从亮度上看此处的 DNA 单带变成了双带), 与电子图谱相吻合. 对最终所得的 BAC 进行测序, 结果进一步证实了原始 BAC 上的 MC4R 基因已经被 *Cre* 基因替换, 而且

所插入的 *Cre* 基因没有任何碱基突变和缺失 (资料未显示).

因为有 *neo* 基因存在, *rpsL-neo* 替换 MC4R 的修饰可进行卡那霉素筛选, 所以这一步的效率很高, 挑取检测的克隆经酶切鉴定几乎都正确. 对于第二步用 *Cre* 替换 *rpsL-neo*, 链霉素反向筛选所得克隆经酶切鉴定, 其中约 20% 为完全正确的阳性克隆. 另外, 修饰后的 BAC DNA 中也无依托质粒 pSC101-BAD-gbaA 的污染.

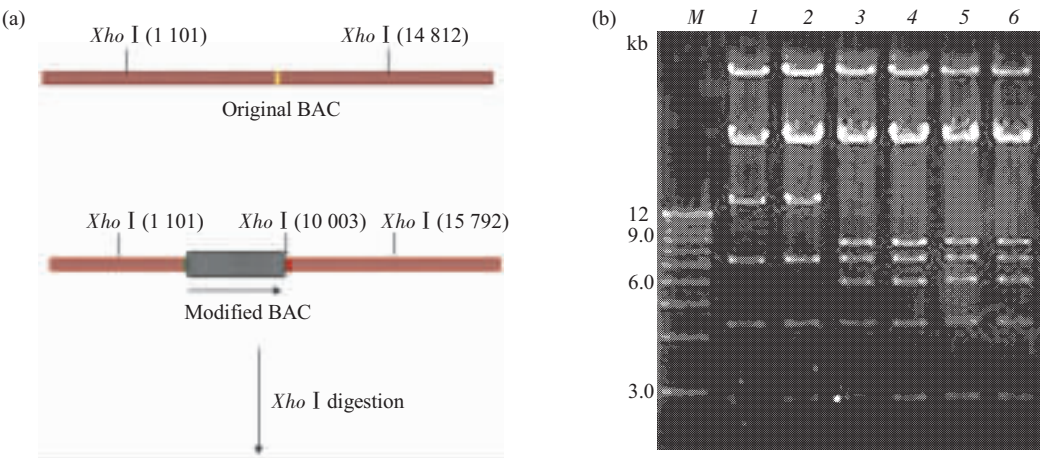


Fig.3 *Xho* I digestion result of MLL BAC

(a) predicted digestion pattern: the special fragment size of original MLL BAC is 13 711 bp, while the modified BAC is 5 789 bp and 8 902 bp; (b) the PFGE result of *Xho* I digested MLL BAC.

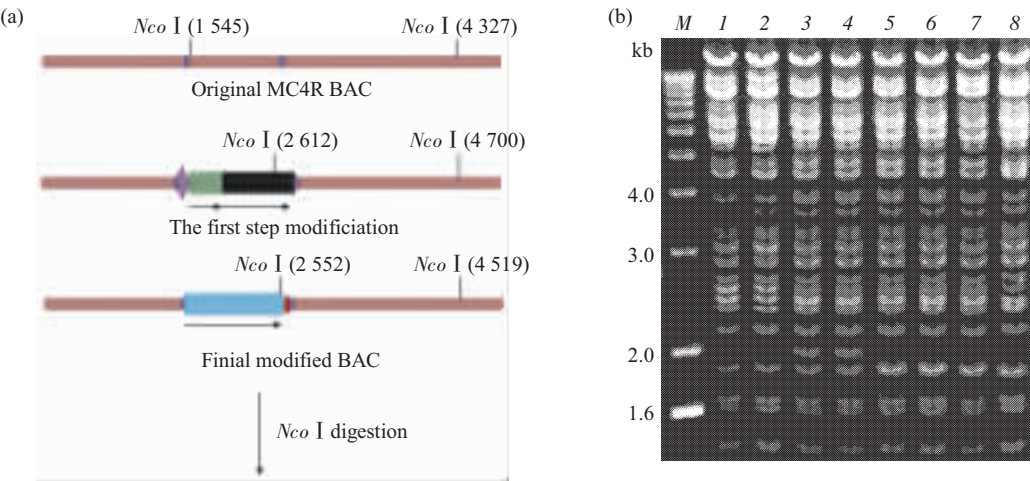


Fig.4 *Nco* I digestion result of MC4R BAC

(a) predicted digestion pattern: the special fragment size of original MC4R BAC is 2 782 bp, the medium BAC is 2 088 bp and the final modified BAC is 1 967 bp; (b) the PFGE result of *Nco* I digested MC4R BAC.

3 讨 论

由于 Red/ET 重组仅需 35~50 bp 的碱基序列作为同源臂, 从而使得 PCR 产物或寡核苷酸可以直接作为供体分子对目标 DNA 进行打靶修饰, 不仅简化了同源重组的操作过程, 也提高了重组的效率. 同时, 因为同源臂不受碱基序列的组成限制, 所以运用该技术可以轻松地对各种 DNA 分子尤其是基因组或染色体大分子进行修饰^[5]. 因而, Red/ET 重组一经出现就受到了世界范围的广泛关注. 之后, 其他一些实验室也相继建立了类似的 Red 同源重组操作系统^[10,11], 其中比较有代表性的是 Yu 等^[10]将缺失突变的 λ 噬菌体整合到大肠杆菌染色体中, 构建了带有 Red 同源重组功能的特殊菌株. 目前人们把利用这种同源重组技术对 DNA 进行打靶修饰称为重组工程(recombineering)^[12-14].

Red/ET 重组是通过其依托质粒表达和分泌相应的同源重组酶来发挥作用. 最初所使用的依托质粒为 ColE1 来源的 pBAD-ETg 和 pBAD-gba, 在这两个质粒中 RecE/RecT 和 Red α /Red β /Red γ 被置于 P_{BAD} 启动子之后, 从而使同源重组酶的表达受 L-阿拉伯多糖诱导调控^[5,9]. 在随后的应用中我们发现, 虽然该依托质粒具有很高的同源重组效率, 但当发挥完同源重组功能后不易于从含有目标 BAC 的宿主菌细胞中清除, 给后续研究带来麻烦. 为此, 最近我们对 Red/ET 的依托质粒又进行了改良, 构建了低拷贝、温度敏感型 pSC101-BAD-gbaA 质粒. 这种 pSC101 来源质粒在每个细胞中的拷贝数为 3~5 个, 于 30℃ 复制, 37℃ 以上复制终止. 从本实验的结果来看, 通过合理、简单地改变细菌培养温度, 最终获得的修饰后 BAC 中没有 pSC101-BAD-gbaA 质粒 DNA 的污染, 表明在行使完 Red/ET 重组功能后, 该质粒已经从宿主细胞中消失. 这样所获得的 BAC 就可以直接用于表达和功能等研究.

已知, 几乎所有 BAC 在构建之初都以 RecA⁺ 大肠杆菌 DH10B 为宿主菌, 目的是防止 BAC 发生自身重组. 但 RecA 的缺失也会带来其他影响, 尤其是可以降低外源 DNA 的转化效率^[5]. 为此, 在新的依托质粒中 RecA 与 Red α /Red β /Red γ 一起被置于 P_{BAD} 启动子之后, 使其与 Red 同源重组酶共同表达. 我们前期的实验结果表明, RecA 的瞬时表达可以通过促进外源 DNA 的转化而显著提高 Red/ET 同源重组效率. 本实验中两种 BAC 不同类

型的修饰结果也反映出, 以 pSC101-BAD-gbaA 为依托质粒的 Red/ET 重组效率非常高.

从本实验 BAC 修饰的具体过程看, 应用优化后的 Red/ET 重组技术所介导的 BAC 修饰操作简单, 整个过程中不需要对目标 BAC 进行再转化. 由于常规 BAC 最初都保存在宿主菌 DH10B 中, 所以当应用含有 λ 噬菌体的特殊大肠杆菌对 BAC 进行修饰时, 首先需要提取目标 BAC DNA 并将其转化至这些特殊大肠杆菌中, 然后才能进行重组修饰^[10]. 相对而言, 依托质粒的转化要比 BAC 自身转化既简单又安全, 因为有相当部分 BAC 并不稳定, 不易于反复转化. 所以应用 Red/ET 重组技术对 BAC 进行修饰更加切实可行.

另外, 在将非抗性基因 *Cre* 插入到目标 BAC 的特定位置时, 本实验采用了 *rpsL-neo* 作为正 / 反向筛选标记. 之所以应用 *rpsL-neo*, 一方面是因为 BAC 的宿主菌 DH10B 为 *rpsL* 缺失突变大肠杆菌, 其自身具有链霉素抗性, 当插入并重新表达 *rpsL* 后细菌又会变为链霉素敏感, 同理, 当 *rpsL* 再次缺失突变或被其他基因替换时宿主菌则又会恢复链霉素抗性. 因此, 通过链霉素筛选就可以实现非抗性基因如 LacZ、eGFP、*Cre* 或寡核苷酸等对 BAC 的修饰, 联合 *neo* 基因的目的在于能够通过卡那霉素做正向筛选, 使 *rpsL* 顺利插入 BAC^[10]. 应用 *rpsL-neo* 的另一方面原因是此联合基因比较小, 总共只有 1.3 kb, 易于进行 PCR 扩增以加载同源臂. 由于能够进行卡那霉素进行正向筛选, 所以第一步 *rpsL-neo* 的插入修饰比较简单, 效率也很高. 但对于第二步, 因为链霉素所筛选的是目标 BAC 的缺失突变体, 具体到本实验就是通过链霉素去筛选缺失了 *rpsL* 基因的 MC4R BAC, 而事实上 BAC 在正常情况下就存在一定比例的突变, 所以在链霉素平板上生长的克隆中只有部分是真正因为 *Cre* 基因替换而引起的 *rpsL* 缺失, 因而这一步 BAC 的修饰效率相对要低, 本实验在链霉素平板上挑取的克隆中有 20% 为完全正确的阳性克隆. 不过, 由于 Red/ET 重组本身的效率很高, 因此第二步修饰后我们还是比较容易地获得了多个正确的阳性 BAC 克隆.

虽然这里只列举了两种类型的 BAC 修饰, 但实际上我们利用此系统已成功地对数个 BAC 进行了多种修饰, 包括突变、融合、克隆和亚克隆等. 除此之外, 利用此系统还可对细菌染色体进行快速修饰以改良菌种等. 总之, 本实验向人们展示了一种高效的 BAC 修饰操作平台, 在充分应用 BAC

资源开展功能基因组学研究方面将具有深远意义。

参 考 文 献

- Zhao S. A comprehensive BAC resource. *Nucleic Acid Res*, 2001, **29**(1): 141~143
- Shizuya H, Birren B, Kim U J, *et al.* Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (18): 8794~8797
- Brune W, Messerle M, Koszinowski U H. Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet*, 2000, **16** (6): 254~259
- Yang X W, Model P, Heintz N. Homologous recombination based on modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat Biotech*, 1997, **15** (9): 859~865
- Zhang Y, Buchholz F, Muylers J P P, *et al.* A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*, 1998, **20** (2): 123~128
- Zhang Y, Muylers J P P, Testa G, *et al.* DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biotech*, 2000, **18**(12): 1314~1317
- Zhang Y, Muylers J P P, Rientjes J, *et al.* Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in *Escherichia coli* and mouse ES cells. *BMC Mol Biol*, 2003, **16** (1): 1~14
- Muylers J P P, Zhang Y, Testa G, *et al.* Rapid modification of bacterial artificial chromosome by ET-recombination. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27** (6): 1555~1557
- Muylers J P P, Zhang Y, Benes V, *et al.* Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. *EMBO Rep*, 2000, **1** (3): 239~243
- 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
- Zhang P, Li M Z, Elledge S J. Towards genetic genome projects: genomic library screening and gene-targeting vector construction in a single step. *Nat Genet*, 2002, **30** (1): 31~39
- 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
- 周建光, 洪 鑫, 黄翠芬. 重组工程及其应用. *遗传学报*, 2003, **30** (10): 983~988
- Zhou J G, Hong X, Huang C F. *Acta Genetica Sinica*, 2003, **30** (10): 983~988
- Oppenheim A B, Rattray A J, Bubunenko M, *et al.* *In vivo* recombineering of bacteriophage lambda by PCR fragments and single-strand oligonucleotides. *Virology*, 2004, **319** (2): 185~189
- Berge M, Mortier-Barriere I, Martin B, *et al.* Transformation of *Streptococcus pneumoniae* relies on DprA- and RecA-dependent protection of incoming DNA single strands. *Mol Microbiol*, 2003, **50** (2): 527~536
- Sung C K, Li H, Claverys J P, *et al.* An *rpsL* cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** (11): 5190~5196

Rapid Modification of BACs With The Optimized Red/ET Recombination System*

WANG Jun-Ping^{1)**}, ZHANG You-Ming²⁾, SU Yong-Ping¹⁾

⁽¹⁾State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

⁽²⁾Gene Bridge GmbH, Dresden 01307, Germany)

Abstract With the completion of genome-sequencing projects, intentional modification of definite bacterial artificial chromosomes (BACs), which carry entire components of most eukaryotic genes, is becoming more important for the subsequent functional genomics studies. The newly optimized Red/ET recombination system was applied to the BAC modification. Mediated by the plasmid, pSC101-BAD-gbaA, and assisted by the counter-selectable/selectable system conferred by rpsL-Neo, two BACs were successfully modified. One step selectable BAC modification such as simple deletion or insertion was achieved in one week. For insertion or fusion of unselectable gene such as Cre, EFGP and LacZ as well as point mutation into targeted BACs, two rounds of Red/ET recombination was proceeded and two weeks was needed. After L-arabinose induction for transient expression of *redγ/redβ/redα/recA*, the pSC101-BAD-gbaA plasmid died out spontaneously from the BAC host bacteria by shifting the temperature from 30°C to 37°C. Thus, there was no DNA contamination in the modified BACs being used for subsequent transgenesis research. The high efficient BAC modification mediated by optimized Red/ET recombination offers a significant facility to the functional genomics investigations.

Key words Red/ET recombination, BAC modification, functional genomics

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30230360) and The TMMU Foundation for Returnee.

**Corresponding author. Tel: 86-23-68752283, Fax: 86-23-68752009, E-mail: wangjunp@yahoo.com

Received: November 19, 2004 Accepted: January 31, 2005