

# Red/ET 同源重组系统介导的质粒载体快速构建

苏 春<sup>\*1</sup>, 余 佳<sup>2</sup>, 邱荣国<sup>2</sup>, 唐 莉<sup>1</sup>

(1. 大连理工大学 化工学院, 辽宁 大连 116024;

2. 大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024)

**摘要:** Red/ET 重组技术是近年来建立的一种基于高效率体内同源重组的新型遗传工程技术, 该技术简便、快速。首先, 通过一步融合的方法将链霉素抗性基因和氯霉素抗性基因同时克隆至 pUC19 上, 从而构建出含有正反选择标记的载体 pRC; 其次, 用安普霉素抗性基因或者氯霉素抗性基因替换了常用表达载体 pET-28b 上的卡那霉素抗性基因, 改变了其抗性选择标记, 得到的表达载体 pMT 和 pCT 可以更广泛地应用于不同宿主中; 最后, 还将启动和终止表达的区域定点插入 pACYC184 载体中, 使其成为可以独立表达蛋白的表达载体 p184。本研究所得到的载体为大肠杆菌宿主菌中的基因克隆和蛋白表达提供了基础。

**关键词:** Red/ET 技术; 同源重组; 抗性基因; 一步融合; 正反选择标记; 克隆  
**中图分类号:** Q78 **文献标志码:** A

## 0 引言

对 DNA 载体的改造已成为分子生物学研究中极为重要的手段。用质粒载体进行克隆的传统策略是: 用一种或几种限制性内切核酸酶将闭环质粒切割后, 使其与具有相匹配末端的外源 DNA 在体外连接, 连接反应的产物即可用于转化合适的大肠杆菌菌株。传统的克隆策略只适用于简单的基因克隆操作方面, 当面临多片段克隆时, 其缺点也是比较明显的, 如系统需要的特定的限制性内切酶位点以及长距离 PCR 操作等条件就比较难达到。此外, 凝胶回收、紫外线照射、长距离 PCR 等均可能引入碱基突变而破坏基因的功能, 所构建的载体往往需要进行测序验证。因此这种方法相对费时、费力。

ET 重组 (ET recombination) 系统最先是由 Stewart 等于 1998 年报道的<sup>[1]</sup>, 此后其与 Red 系统被统一命名为 Red/ET 系统<sup>[2]</sup>。Red/ET 重组是一种在大肠杆菌中应用的同源重组技术, 它通过诱导表达  $\lambda$  噬菌体的 RecE 和 RecT 蛋白组合或  $\lambda$  噬菌体的 Red 蛋白组合 (Red $\alpha$ /Red $\beta$ /Red $\gamma$ ) 来达到同源重组的目的<sup>[3-4]</sup>。这些蛋白在介

导重组发生时, 所需要的同源臂仅为 50 bp 左右就能够达到很高的效率和正确率, 从而可以对任意大小的 DNA 分子的任意部位进行插入、敲除、突变等多种修饰<sup>[5]</sup>, 而且还可对长达 80 kb 的 DNA 片段进行亚克隆<sup>[6-7]</sup>。此外, 由于重组反应的整个过程都是在大肠杆菌细胞内部完成的, 不存在碱基突变危险<sup>[8]</sup>。目前, 该技术已被广泛地应用于基因组 DNA 如细菌人工染色体 (BAC)、大肠杆菌染色体等的遗传修饰研究中<sup>[9-10]</sup>。

本研究利用 Red/ET 重组技术构建不同用途的载体, 以为后续载体构建过程中阳性克隆的筛选打下基础, 同时真正实现打靶载体的快速、高效构建。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 质粒 pSET152、pUC19 和 pET-28b 为本实验室所有; pBAD322C 由尚广东博士惠赠; pACYC184 由包永明教授惠赠; 含重组酶质粒的菌株 HS996 (pSC101- $\gamma\beta\alpha$ -tet) 由张友明教授惠赠; 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  为 TaKaRa 公司产品。

1.1.2 试剂和仪器 各种限制性内切核酸酶、T4

收稿日期: 2011-05-11; 修回日期: 2012-12-24。

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (30688003)。

作者简介: 苏 春<sup>\*</sup> (1981-), 女, 博士生, E-mail: suchun810918@126.com。

DNA 连接酶、PCR 相关试剂以及 DNA 纯化回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司；L-阿拉伯糖、各种抗生素等常规化学试剂主要购自 Sigma 和上海化学试剂公司；PCR 仪为 Bio-Rad 公司 MJ researcher PTC - 200 仪；电转化仪为 Bio-Rad 公司 Gene Pulser IIR 电转化仪。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 引物的设计与合成以及外源 DNA 片段的获取 引物及测序均由 TaKaRa 公司完成，引物序列见表 1。大肠杆菌的培养、CaCl<sub>2</sub> 感受

态细胞的制备及转化、质粒 DNA 以及菌株总基因组 DNA 的提取参照文献[11]。

PCR 反应体系：5 μL 10 × LA PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Free)，8 μL 2.5 mmol/L dNTP，1.5 μL 20 μmol/L 引物，5 μL 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>，2.5 ng 模板 DNA，0.5 μL 5 U/μL TaKaRa LA Taq，加去离子水 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μL 体系。PCR 反应条件：100 ℃，2 min；97 ℃，30 s，T<sub>m</sub>，30 s，72 ℃，1 min，30 个循环；72 ℃，5 min，16 ℃，5 min。PCR 产物经回收试剂盒纯化并进行透析膜透析后待用。

表 1 Red/ET 重组所用引物  
Tab. 1 Oligonucleotide primers used for Red/ET recombination

| 引物         | 模板              | 序列                                                           |
|------------|-----------------|--------------------------------------------------------------|
| rpsL-F     | DH5α chromosome | CACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGC                    |
| rpsL-R     |                 | TGGTATATCCAGTGATTTTTTCTCCATGATTGTCTCTTAAGCCTTAGGACGCTTCAC    |
| rpsL-Cat-F | pBAD322c        | ATGGAGAAAAAATCACTGGAT                                        |
| rpsL-Cat-R |                 | GCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGATTACGCCCCGCCCTGCCA  |
| Am-F       | pSET152         | TAAAACTGCTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTCTCACGTAAAGGGATTTTG |
| Am-R       |                 | TTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTCATGAGCTCAGCCAATCGA |
| Cat-F      | pBAD322c        | AAACTGCTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTAGATTACGCGCAGAAAAAAG  |
| Cat-R      |                 | TTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATCTTACGCCCCGCCCTGCCA  |
| 184-P      | pET-28b         | AGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTGATCCCGCGAAATTAAT  |
| 184-T      |                 | TTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCTTCCATCAAAAAACCCCTCAAGAC |

注：黑体表示同源臂

1.2.2 HS996/pSC101\_γβα\_tet 电击感受态的制备 将在 -70 ℃冻存的 HS996/pSC101\_γβα\_tet 画线于含四环素 (Tet, 5 μg/mL) 抗性的固体 LB 平板上，30 ℃培养 20 h 以上。挑取单菌落接种于含有四环素 (3 μg/mL) 抗性的液体 LB 培养基中，30 ℃摇床过夜培养。次日，取 30 μL 菌液接种于 1.4 mL 含相同浓度抗性的液体 LB 中，30 ℃摇床培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.3，加入 50 μL 10% 的 L-阿拉伯糖于 37 ℃摇床培养 1 h。将菌液转移至 1.5 mL EP 管中，冰上放置 20 min 后，2 ℃，4 000 r/min 离心 3 min，弃上清，沉淀迅速置冰上，用 1 mL 的冰超纯水悬浮后，2 ℃，4 000 r/min 离心 3 min，弃上清，重复洗涤两次，最后悬浮于 20 μL 的冰超纯水中。

1.2.3 同源重组系统中目标载体的构建

(1) 以 pUC19 为骨架的 rpsL、Cat 基因的融合 首先，将 pUC19 转化至 HS996/pSC101\_γβα\_tet 的感受态细胞中，以氨苄青霉素 (Amp, 100 μg/mL) 和四环素 (Tet, 5 μg/mL) 在 30 ℃进行筛选，所得菌株为 HS996/pSC101\_γβα\_tet/pUC19。然后，将 0.3 μg oriT-rpsL 基因盒 DNA 片段 (由 rpsL-F 与 rpsL-R 扩增获得)、0.3 μg

rbs-Cat DNA 片段 (由 rpsL-Cat-F 与 rpsL-Cat-R 扩增获得) 以及 L-阿拉伯糖诱导重组酶表达的 HS996/pSC101\_γβα\_tet/pUC19 电击感受态细胞，混匀，置于冰的 1 mm 电极杯中，1.35 kV、10 μF、600 Ω 电击转化，加 1 mL 无抗性的液体 LB，37 ℃孵育 1 h。最后，取 100 μL 菌液涂至含氯霉素 (Cat, 12.5 μg/mL) 和氨苄青霉素 (Amp, 100 μg/mL) 的固体 LB 平板上，37 ℃进行筛选。

(2) 以 pET-28b 为骨架的表达载体的构建 首先，将 pET-28b 转化至 HS996/pSC101\_γβα\_tet 的感受态细胞中，以卡那霉素 (Kan, 30 μg/mL) 和四环素 (Tet, 5 μg/mL) 在 30 ℃进行筛选，所得菌株为 HS996/pSC101\_γβα\_tet/pET-28b。然后，将 0.3 μg Am DNA 片段 (由 Am-F 与 Am-R 扩增获得) 或 0.3 μg 的 Cat DNA 片段 (由 Cat-F 与 Cat-R 扩增获得) 电击转化入 L-阿拉伯糖诱导重组酶表达的 HS996/pSC101\_γβα\_tet/pET-28b 感受态细胞中。最后，在含安普霉素 (Am, 100 μg/mL) 或氯霉素 (Cat, 12.5 μg/mL) 的固体 LB 平板上 37 ℃进行筛选。

(3) 以 pACYC184 为骨架的表达载体的构建 首先，将 pACYC184 用 Sal I 和 BamH I 进

行双酶切,回收后获得 pACYC184 线性片段.然后,将 0.3  $\mu\text{g}$  pACYC184 线性片段和 0.3  $\mu\text{g}$  P&T DNA 片段(由 184-P 与 184-T 扩增获得)共同电击转化入 L-阿拉伯糖诱导重组酶表达的 HS996/pSC101- $\gamma\beta\alpha$ -tet 感受态细胞中.最后,在含氯霉素(Cat, 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的固体 LB 平板上 37  $^{\circ}\text{C}$  进行筛选.

## 2 结 果

### 2.1 Red 介导外源基因体内融合和基因克隆的策略

2.1.1 正反标记的一步融合 根据同源重组的原理,将目的基因在 PCR 过程中加载同源臂序列.用引物 rpsL-F 和 rpsL-R,以 DH5 $\alpha$  的基因组 DNA 为模板,扩增 oriT+rpsL 基因;其中引物 rpsL-F 中含有 41 个碱基的同源臂序列,引物 rpsL-R 中含有 39 个碱基的同源臂序列,这样获得的 oriT+rpsL 基因的 5'端是和 pUC19 载体待交换部位的上游同源的,3'端是和 Cat 基因的 5'端同源的.同样,用引物 rpsL-Cat-F 和 rpsL-Cat-R,以质粒 pBAD 322c 为模板,扩增 Cat 基因;其中,引物 rpsL-Cat-R 中含有 42 个碱基的同源臂序列,这样获得的 Cat 基因的 5'端是和 oriT+rpsL 基因的 3'端同源的,以使 oriT+rpsL 和 Cat 基因在体内发生同源重组;3'端是和 pUC19 载体待交换部位的下游同源的.

将上述 oriT+rpsL 基因和 Cat 基因片段经纯化后同时电击转化入含 pUC19 载体的 Red/ET 双交换系统中.这样,oriT+rpsL 基因的 5'端和 pUC19 载体待交换部位的上游,oriT+rpsL 基因的 3'端和 Cat 基因的 5'端,以及 Cat 基因的 5'端和 pUC19 载体待交换部位的下游,经过重组酶介导的同源交换后,oriT+rpsL 基因盒和 rbs+Cat 基因盒融合在一起,并克隆至 pUC19 上,命名为 pRC.一步融合策略设计如图 1(a)所示.

2.1.2 抗性基因的精确替换 通过 Red/ET 同源重组系统,用 Am 或 Cm 抗性基因精确替换 pET-28b 质粒中的 Kan 抗性基因.用引物 Am-F 和 Am-R,以 pSET 152 为模板,扩增 Am 抗性基因;用引物 Cat-F 和 Cat-R,以 pBAD 322c 为模板,扩增 Cm 抗性基因;其中引物 Am-F 和 Cat-F 中均含有被替换的 pET-28b 质粒中 Kan 抗性基因上游的同源臂序列,而引物 Am-R 和 Cat-R 中均含有被替换的 pET-28b 质粒中 Kan 抗性基因下游的同源臂序列,这样获得的 Am 或 Cm 抗性基

因的 5'端是和 Kan 抗性基因待交换部位的上游同源的,3'端是和 Kan 抗性基因待交换部位的下游同源的.将上述 Am 或 Cm 抗性基因片段经纯化后分别电击转化入含 pET-28b 载体的 Red/ET 双交换系统中,在重组酶介导的同源重组作用下,载体上的 Kan 抗性基因被分别精确替换为 Am 或 Cm 抗性基因.替换后的质粒分别命名为 pMT 和 pCT.抗性基因的精确替换策略设计如图 1(b)所示.

2.1.3 表达区域的定点插入 用引物 184-P 和 184-T,以 pET-28b 为模板,扩增启动和终止外源蛋白表达的基因;其中引物 184-P 中含有 pACYC184 质粒中上游的同源臂序列,而引物 184-T 中含有 pACYC184 质粒中下游的同源臂序列;这样获得的 P&T 基因的 5'端和 3'端分别是和 pACYC184 质粒待插入位点的上下游同源的.另外,在特定位点通过限制性内切酶 BamH I 和 Sal I 双酶切将质粒 pACYC184 线性化.将上述 P&T 基因片段以及线性化的 pACYC184 经纯化后共同电击转化入 Red/ET 双交换系统中,在重组酶介导的同源重组作用下,负责启动和终止外源蛋白表达的 P&T 基因就定点插入 pACYC184 质粒中,同时按照预期的设计破坏了 pACYC184 质粒中的 Tet 抗性基因,从而得到质粒 p184.表达区域的定点插入策略设计如图 1(c)所示.

### 2.2 重组质粒的筛选

2.2.1 重组质粒的筛选及酶切鉴定 在正反选择标记融合实验中,由于敲入的外源 DNA 片段中含有一氯霉素抗性基因筛选标记,可以一次性方便地通过氯霉素抗性筛选得到 rpsL+Cat 基因融合片段的重组质粒.电转后的孵育产物用氯霉素和氨苄青霉素双抗平板进行筛选,得到 30 多个克隆,将挑取的转化子通过限制性内切酶酶切方法鉴定,其结果表明,重组酶介导的双片段一次性融合的正确交换率在 90%,所得重组质粒命名为 pRC.在抗性基因精确替换实验中,利用一个线性片段和一个环状质粒进行同源重组,用安普霉素或氯霉素抗性平板筛选阳性克隆,得到 200 多个克隆,其中正确转化子占 95%,所得到的质粒分别命名为 pMT 和 pCT.在基因表达区域的定点插入实验中,则是利用两个线性片段进行同源重组,用氯霉素抗性平板筛选阳性克隆,最终得到 50 多个克隆,其正确交换率在 98%,质粒命名为 p184.质粒图谱如图 2 所示.

结果表明,3 组实验由于其进行交换的形式不同其双交换效率也不同:一段线性片段和环状载体的双交换效率最高,所得到的转化子最多;而

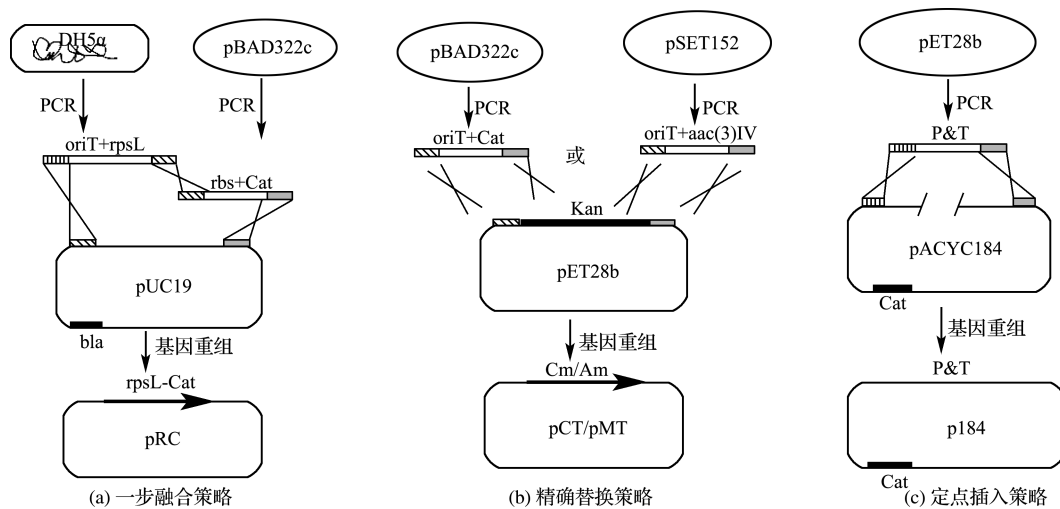


图 1 基因融合载体构建策略示意图

Fig. 1 The sketch map for construction of gene-targeting vectors

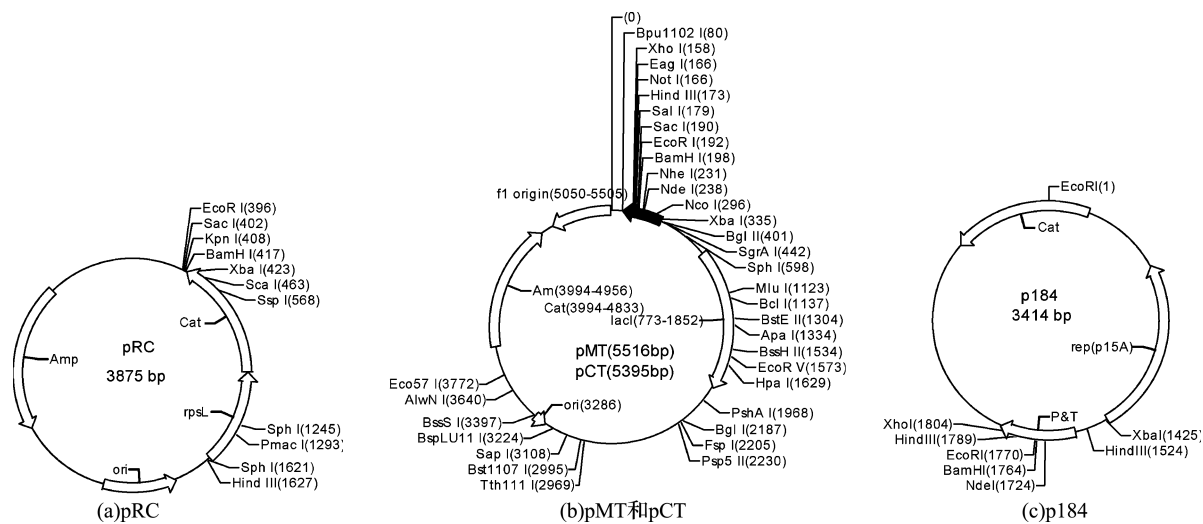


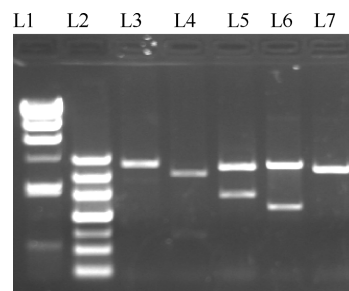
图 2 质粒图谱

Fig. 2 Plasmid map

双片段交换的效率高于两个片段和环状载体交换的效率. 这是同源交换片段的复杂性不同造成的. 另外, 发现这 3 组得到的双交换克隆的正确率也各不相同, 在 90%~98%, 这与所设计交换的同源臂的特异性以及载体序列的不同有关, 同源臂特异性越强重组的正确性就越高.

将挑取的转化子通过限制性内切酶酶切方法进行鉴定: pRC 用 BamH I 和 Ssp I 分别酶切; pMT 和 pCT 分别用 Mlu I 和 Sac I 酶切; p184 用 EcoR I 酶切. 其酶切结果均与预期的相同, 限制性内切酶酶切鉴定电泳图如图 3 所示.

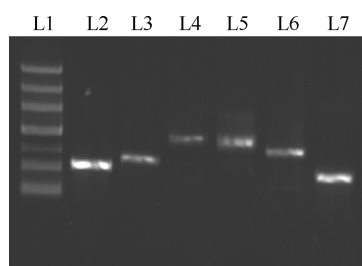
2.2.2 重组质粒的 PCR 鉴定 将经过限制性内切酶酶切后挑取的重组质粒进一步进行 PCR 鉴定: 以 pRC 为模板, 用引物 rpsL-F 和 rpsL-R 扩



L1 λHind III digest Marker; L2 DNA Marker III; L3 pRC/BamH I; L4 pRC/Ssp I; L5 pMT/Mlu I; L6 pCT/Sac I; L7 p184/EcoR I

图 3 重组质粒的限制性内切酶酶切鉴定  
Fig. 3 Restriction enzyme digestion identification of restriction endonuclease in recombinant plasmid

增产生 500 bp 片段,得到 oriT+rpsL 基因;用引物 rpsL-Cat-F 和 rpsL-Cat-R 扩增产生 700 bp 片段,得到 rbs+Cat 基因;用引物 rpsL-F 和 rpsL-Cat-R 扩增产生 1 200 bp 片段,得到 rpsL+Cat 基因.以 pMT 为模板,用引物 Am-F 和 Am-R 扩增产生 1 000 bp 片段,得到 Am 抗性基因.以 pCT 为模板,用引物 Cat-F 和 Cat-R 扩增产生 800 bp 片段,得到 Cm 抗性基因.以 p184 为模板,用引物 184-P 和 184-T 扩增产生 400 bp 片段,得到 P&T 基因.其 PCR 扩增片段的大小均正确,PCR 鉴定电泳图如图 4 所示.对重组质粒中外源基因进行测序分析,结果表明外源基因序列正确,说明重组质粒构建成功.



L1 Marker III; L2 pRC/(rpsL-F, rpsL-R), rpsL ~ 0.5 kb; L3 pRC/(rpsL-Cat-F, rpsL-Cat-R), Cat ~ 0.7 kb; L4 pRC/(rpsL-F, rpsL-Cat-R), rpsL+Cat ~1.2 kb; L5 pMT/( Am-F, Am-R), Am ~1 kb; L6 pCT/( Cat-F, Cat-R), Cat ~0.8 kb; L7 p184/(184-P, 184-T), P&T ~0.4 kb

图 4 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR identification of recombinant plasmid

### 2.3 重组质粒的有效性鉴定

在大肠杆菌的基因组 DNA 中含有野生型的 rpsL 基因,这种基因的存在将会导致该菌株对链霉素敏感.而常用的大肠杆菌工程菌株如 DH10B、HS996、TOP10 等均含有突变的 rpsL 基因,因而对链霉素有抗性.如果将野生型的 rpsL 基因导入到含有突变的 rpsL 基因的大肠杆菌菌株中,该菌株又会表现为链霉素敏感型.所以本文将 rpsL 基因构建到克隆载体中,利用这一特点使其成为反相筛选标记.

为了鉴定所构建的 pRC 载体中 rpsL 反选择标记的有效性,将 DH5 $\alpha$ 、HS996、HS996/pRC 分别涂布于含链霉素(Str, 50  $\mu$ g/mL)的 LB 平板,37  $^{\circ}$ C 培养过夜,次日观察各菌的生长状况. DH5 $\alpha$ 、HS996、HS996/pRC 在 Str(50  $\mu$ g/mL)平板上的生长状况如图 5 所示.在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  的基因组 DNA 中含有野生型的 rpsL 基因,这种

基因的存在将会导致该菌株对 Str 敏感,因此 DH5 $\alpha$  在 Str 平板上不生长;大肠杆菌菌株 HS996 中,由于 rpsL 基因突变而失活,HS996 对链霉素有抗性,能在 Str 平板上生长;而 HS996/pRC 由于 pRC 中含有野生型的 rpsL 基因,该基因在 HS996 菌株中得到表达,HS996/pRC 也应该对 Str 敏感.3 种菌株的表型与预期结果完全一致,证明所构建的 rpsL-Cat 正反选择标记具有很好的选择性.另外,对其他重组载体抗性表型的有效性也分别进行了验证,结果如表 2 所示.



图 5 pRC 的表型鉴定

Fig. 5 Phenotype identification of pRC

表 2 Red/ET 重组质粒的抗性表型鉴定

Tab. 2 Resistance phenotype identification of recombinant plasmid by Red/ET

| 质粒   | Cm | Kan | Am | Amp | Tet |
|------|----|-----|----|-----|-----|
| pRC  | +  |     |    | +   |     |
| pMT  |    | -   | +  |     |     |
| pCT  | +  | -   |    |     |     |
| p184 | +  |     |    |     | -   |

### 3 结 论

本研究中所采用的 Red/ET 同源重组技术简便有效,克隆效率高且不会有任何突变.引物设计简单直接,所选择的靶载体的范围可以涵盖 PAC、BAC、cosmid、plasmid 等.利用本研究可以任意构建载体,其中包括一步融合、精确替换、定点插入等;所构建的载体可以广泛地应用于基因的克隆操作中.本研究中所构建的正反选择标记,可以运用该系统进行任意基因精确替换或敲除.以抗性基因 Cat 和反选择基因 rpsL 为例,第 1 轮以带短同源臂的线性打靶序列 rpsL-Cat 替换靶序列区的目的基因,通过氯霉素抗性筛选重组子;第 2 轮以外源目的基因替换 rpsL-Cat,由于表达 rpsL 的细菌不能在含链霉素的培养基上生长,原菌不能生长,而 rpsL-Cat 被替换了的重组菌能存活,通过 rpsL 基因的反选择作用可以筛选得到重组菌.运用正反选择标记可以对 DNA 片段进行不留痕迹的修饰,大大简化了筛选过程.另外,本

研究中所构建的蛋白表达载体 pCT、pMT 和 p184 均可以独立或者共同表达外源蛋白,为外源基因的表达提供了方便快捷的手段与途径。

**致谢:**感谢张友明教授、包永明教授、尚广东博士的馈赠与建议;感谢赵新清教授的论文修改建议。

### 参考文献:

- [1] ZHANG Y, Buchholz F, Muylers J P P. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli* [J]. **Nature Genetics**, 1998, **20**(1):123-128.
- [2] 王军平,张友明. Red/ET 重组及其在生物医学中的应用[J]. 生物工程学报, 2005, **21**(3):502-506. WANG Jun-ping, ZHANG You-ming. Red/ET recombination and its biomedical applications[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2005, **21**(3):502-506. (in Chinese)
- [3] ZHANG Y, Muylers J P P, Rientjes J. Phage annealing proteins promote oligonucleotide directed mutagenesis in *Escherichia coli* and mouse ES cells [J]. **BMC Molecular Biology**, 2003, **16**(1):1-14.
- [4] Anthony R P. Involvement of DNA replication in phage lambda Red-mediated homologous recombination [J]. **Molecular Microbiology**, 2008, **68**(1):66-74.
- [5] Vetcher L, TIAN Zong-qiang, McDaniel R, *et al.* Rapid engineering of the geldanamycin biosynthesis pathway by Red/ET recombination and gene complementation [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, **71**(4):1829-1835.
- [6] YU D G, Ellis H M, Lee E C, *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli* [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2000, **97**(11):5978-5983.
- [7] Court D L, Sawitzke J A, Thomason L C. Genetic engineering using homologous recombination [J]. **Annual Review of Genetics**, 2002, **36**:361-388.
- [8] Perlova O, FU Jun, Kuhlmann S, *et al.* Reconstitution of the *Myxothiazol* biosynthetic gene cluster by Red/ET recombination and heterologous expression in *Myxococcus xanthus* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, **72**(12):7485-7494.
- [9] Muylers J P P, ZHANG Y, Testa G. Rapid modification of bacterial artificial chromosome by ET-recombination [J]. **Nucleic Acids Research**, 1999, **27**(6):1555-1557.
- [10] Muylers J P P, ZHANG Y, Benes V. Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination [J]. **EMBO Reports**, 2000, **1**(3):239-243.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

## Rapid construction of plasmid vector by Red/ET mediated in vivo homologous recombination

SU Chun<sup>\*1</sup>, YU Jia<sup>2</sup>, QIU Rong-guo<sup>2</sup>, TANG Li<sup>1</sup>

( 1. School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

2. School of Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China )

**Abstract:** Red/ET recombination technology developed in recent years is a novel genetic engineering technique, which facilitates rapid and easy genetic manipulation based on efficient in vivo homologous recombination. Streptomycin resistance gene and chloramphenicol resistance gene are cloned to pUC19 by one-step gene fusion to construct a new vector with both positive and negative selectable markers, which is designated as pRC. Besides, kanamycin resistance gene of pET-28b is replaced by apramycin or chloramphenicol resistance gene to create pMT and pCT for more flexible screening in different hosts. Finally, expression vector pACYC184 is modified by inserting a promoter and a terminator sequence, respectively. The vectors constructed provide basis for versatile gene clone and protein expression in different host *E. coli* strains.

**Key words:** Red/ET technology; homologous recombination; resistance gene; one-step gene fusion; positive-negative selectable marker; cloning