

pBR322-Red 介导的 *E. coli* 染色体基因 敲入、位点及表达研究

陈伟^{1~3}, 李山虎¹, 于梅¹, 王鸣刚², 周建光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; 3. 广东药学院生命科学与生物制药学院, 广州 510240)

摘要:应用 pBR322-Red 介导的重组工程系统, *kan/sacB* 选择反选择系统, 双链线性 DNA 重组技术和重叠引物介导的 DNA 重组技术, 将长度为 1 653 bp 的 *luc* 报告基因分别敲入到 *E. coli* W3110 染色体 *lacZ*、*lacY* 和 *lacA* 基因的位置, 建立了一系列具有新遗传表型的菌株: CWL2、CWL4 和 CWL6。荧光素酶分析表明, 外源报告基因 *luc* 能在这 3 个结构基因处有效的组成型表达。为了进一步确定外源基因的表达情况, 用霍乱毒素 B 亚单位基因 *ctxB* 替换了 *lacZ* 基因, 构建了新菌株 CWD1。证明了以单拷贝形式存在在大肠杆菌染色体 CWD1 上的 *ctxB* 基因能有有效的表达 CTB 蛋白并能将其分泌至细胞外培养液中。结果初步确定了大肠杆菌染色体上的 *lac* 操纵子结构基因位点适合外源基因的敲入和表达。

关键词: pBR322-Red; 重组工程; 基因敲入; 霍乱毒素 B 亚单位

中图分类号: Q87

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)01-0071-07

pBR322-Red Mediated Gene Knockin, Sites and Expression in *E. coli* Chromosome

CHEN Wei^{1~3}, LI Shan-Hu¹, YU Mei¹, WANG Ming-Gang², ZHOU Jian-Guang¹

(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; 3. School of Life Science and Biopharmacology Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, 510240, China)

Abstract: Genes *lacZ*, *lacY* and *lacA* in the *lac* operon of *E. coli* chromosome were respectively substituted with gene *luc* by using plasmid pBR322-Red, selection-counterselection system *kan/sacB* and various strategies of Red homologous recombination including Red mediated linearized double-stranded DNA homologous recombination and Red mediated recombineering with overlapping single stranded DNA oligonucleotides. Then, a series of new strains, CWL2, CWL4 and CWL6, were constructed and we found that they can express protein Luc efficiently. To further study the expression of exogenous genes at the site of *lacZ*, we have constructed a strain named CWD1 by knockin the cholera toxin B subunit (*ctxB*) gene at the *lacZ* site, then we found that CWD1 can express protein CTB efficiently and CTB was secreted out of the cell. So we assured that the sites of structure genes in the *lac* operon of *Escherichia coli* chromosome were suitable for expressing foreign genes.

Key words: pBR322-Red; recombineering; gene knockin; Cholera toxin B subunit

大肠杆菌染色体本身作为一个大载体, 可携带多种外源基因。通过将外源基因敲入其中, 构建一

些带新遗传特性的转基因大肠杆菌菌株, 将为疫苗制备、基因功能研究、细菌代谢研究及新药开发提供

收稿日期: 2004-11-02; 修回日期: 2005-01-16

基金项目: 军队“十五”医药卫生科学基金资助 (编号: 01MA 089) [Supported by Medical Science Foundation of PLA (No. 01MA089)]

作者简介: 陈伟 (1980—), 男, 湖南省益阳人, 硕士。现工作单位: 广东药学院。

通讯作者: 周建光, 女, 教授, 研究方向: 肿瘤分子生物学。E-mail: zhoujgx@public.bta.net.cn; Tel: 010-66931323

更加广阔的途径。

为了方便的目的基因敲入 *E. coli* 染色体特定区域中,不留下任何抗生素基因类筛选标记的痕迹,保证目的基因在细菌中正常表达,并能随细菌稳定遗传而不影响细菌的正常生长,选择合适基因敲入位置和的基因敲入方法成为了关键。我们应用重组工程(Recombineering)新技术^[1]和 Gap-repair 方法^[2],以及通过本研究室新近构建的 pBR322-Red 重组工程系统^[3],选择了大肠杆菌 *lac* 操纵子中的 3 个基因 *lacZ*、*Y*、*A* 为外源基因的敲入的位点。将长度为 1 653 bp 的 *luc* 报告基因分别敲入 W3110 株染色体 *lacZ*、*lacY* 和 *lacA* 处,分析了报告基因的组成型表达情况。并进一步用霍乱毒素 B 亚单位基因(cholera toxin B subunit, *ctxb*)替换 *lacZ* 编码区,分析了 *ctxb* 基因的表达情况。最终确定 *lac* 操纵子结构基因位点适应外源基因表达,为以后在 *E. coli* 染色体上表达特定功能的基因奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

菌株 *E. coli* DH5 α 、W3110、质粒 pBR322 和 pUC19 均为本室保存,质粒 pKO3 为美国国立卫生研究院 Court DL 博士馈赠,质粒 pMM-CTB 为马清均教授馈赠,质粒 pBR322-Red 和菌株 CW4(W3110 Δ *lacI*)为本实验室构建。

1.1.2 工具酶和试剂

Xmn I 为 Biolab 公司产品;*Nde* I、*Sca* I、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品;*Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶、Super *Taq* DNA 聚合酶为申能博彩生物公司产品;质粒提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒荧光素酶分析系统购自 Promega 公司;兔抗 CTB 血清,GM₁ 为军事医学科学院马清钧教授馈赠;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自北京中山生物技术有限公司,PCR 引物为上海博亚公司合成;测序工作提交上海博亚公司完成。

1.2 方法

1.2.1 pUC19-sacB、pUC19-sacB-kan 重组质粒的构建

以质粒 pKO3 为模板,PCR 扩增 *sacB* 基因,产物用 *Nde* I 酶切,回收后与经 *Nde* I 和 *Pvu* II 双酶切的 pUC19 DNA 片段进行连接,再用连接产物转化

E. coli DH5 α ,得到含重组质粒 pUC19-sacB 的阳性克隆菌,测序鉴定序列的正确性。PCR 扩增卡那霉素基因,产物以 *Nde* I 和 *Xmn* I 双酶切,回收后与经相同双酶切的线性质粒 pUC19-sacB DNA 片段进行连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 α ,得到含重组质粒 pUC19-sacB-kan 的阳性克隆菌,最后进行测序鉴定。

1.2.2 感受态的制备与电击转化

将过夜培养的已经事先转化 pBR322-Red 的大肠杆菌 CW4(pBR322-Red)按 50:1 的量接种,震荡培养至 $OD_{600}=0.4\sim 0.6$ 。取 15 mL 培养液于 42 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 7.5 min 后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴 30 min。离心后用去离子水重悬于 4 $^{\circ}\text{C}$,离心收集菌体,用去离子水洗 3~4 次,最后将菌体重悬于 100 μL 冷的去离子水中,取 48 μL 菌液与约 300 ng 的打靶分子 DNA 片段进行电转。电转条件参照 Yu D^[4]等人的方案进行。

1.2.3 引物设计

为了用 PCR 方法扩增出 DNA 打靶分子,需要设计带同源臂的 PCR 引物。引物设计的原则是:引物的 5'端分别带有 36~50 个碱基的同源臂序列,3'端为扩增分子引物序列。具体引物序列如表 1 所示,其中小写字母代表与打靶区同源的序列,正常大写字母代表扩增引物序列,斜体大写字母代表重叠引物序列。对重组菌进行鉴定时,引物设计的一般原则是:一条引物设计在打靶区外围,另外一条则位于线性打靶序列内部。带同源臂引物序列见表 1。

1.2.4 线性双链 DNA 介导的 DNA 重组

按照 1.2.3 方法合成 2 条 PCR 引物,使用高保真 DNA 聚合酶,经 PCR 合成线性双链 DNA 打靶分子(5'同源臂+抗生素标记基因、报告基因或其他目的基因+3'同源臂)。取大约 300 ng 经纯化的打靶分子与约 50 μL 上述感受态细菌混合后进行电击转化。用含筛选标记的 LB 平板筛选发生基因替换的阳性的克隆。

1.2.5 重叠引物介导的 DNA 重组

合成两条 50~60 个碱基长的寡核苷酸作为同源臂,使它们的 3'端 10~30 个碱基序列互补。将各约 100 ng 的上述重叠引物寡核苷酸打靶分子电击转化 W3110(pBR322-Red)感受态,通过合适的遗传表型筛选阳性的克隆。

1.2.6 菌株构建

采用 *kan* / *sacB* 选择反选择方法(图 1)分 3 步

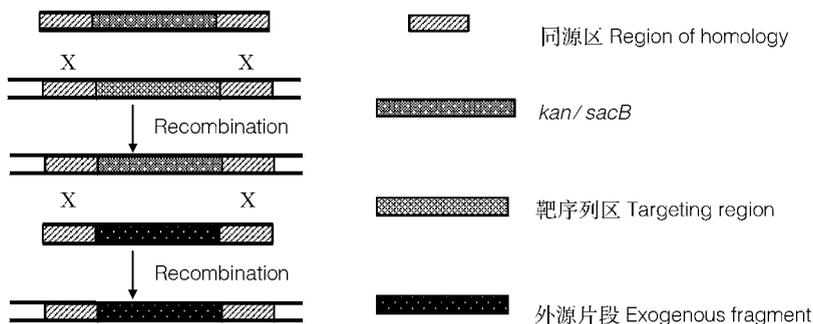
表 1 本研究所用的带同源臂的引物

Table 1 Primers with homologous regions used in this study

编号 Numbers	引物序列 Nucleotide sequences of primers 5'→3'
cwt1	gtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
cwt2	ccttacgcgaaatacgggcagacatggcctgcccggttattaCATCACATATACCTGCCGTTC
cwt9	gccttatccgaccaacatatcataacggagtgatcgcaTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
cwt10	ggcctgataagcgcagcgtatcaggcaattttataatCATCACATATACCTGCCGTTC
cwt13	ggccatgtctgcccgatttcgcgtaaggaaatccattCATCCATATACCTGCCGTTC
cwt14	tcggataaggcctcgcgccatccgacattgattgcTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
cwt30	cgcttatccgaccaacatatcataacggagtgatcgcaATGGAAGACGCCAAAAACATA
cwt31	taggcctgataagcgcagcgtatcaggcaattttataatTTACACGGCGATCTTTCCG
cwt32	aggccatgtctgcccgatttcgcgtaaggaaatccattATGGAAGACGCCAAAAACATA
cwt33	ggtcggataaggcctcgcgccatccgacattgattgcTTACACGGCGATCTTTCCG
cwt37	ttgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG
cwt38	ttacgcgaaatacgggcagacatggcctgcccggttattaTTACACGGCGATCTTTCCGC
cwt43	acgcgaaatacgggcagacatggcctgcccggttattaTTAATTTGCCATACTAATTGCG
cwt44	aattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctAGACCTCTGATGAAATAAAG

构建菌株:(1)电转感受态细菌的制备;(2)以 pUC19-sacB-kan 为 PCR 模板,合成一条含 5'同源臂 + *kan/sacB* + 3'同源臂的线性打靶分子,取大约 300 ng 的经纯化的上述 DNA 片段与 50 μ L 感受态细菌混合后进行电击转化。用含 25 μ g/mL 卡那霉

素的 LB 平板筛选阳性克隆;(3)用重叠引物敲除 *lacI* 位点的 *kan/sacB* (图 2,B)或用 DNA 双链介导的重组方法构建 *luc* 报告基因替换 *lacZ*、*lacY* 和 *lacA* 基因的菌株 (图 2,A),用含 7% 蔗糖的 M63 平板筛选阳性克隆。

图 1 *kan/sacB* 选择反选择系统的策略Fig. 1 Strategies of the selection-counter selection system of *kan/sacB*

1.2.7 荧光素酶分析

参照 Promega 公司荧光素酶分析说明书进行荧光素酶分析。进行分析时保证所取细菌的量基本一致。

1.2.8 GM1-ELISA 分析 CTB 的表达

用浓度为 20 μ g/mL 的 GM1 包被酶联板孔,室温过夜;用 pH7.4 的 PBS 洗 3 次,然后用 1% BSA-PBS 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h;再用 pH7.4 的 Tris-HCl-Tween20

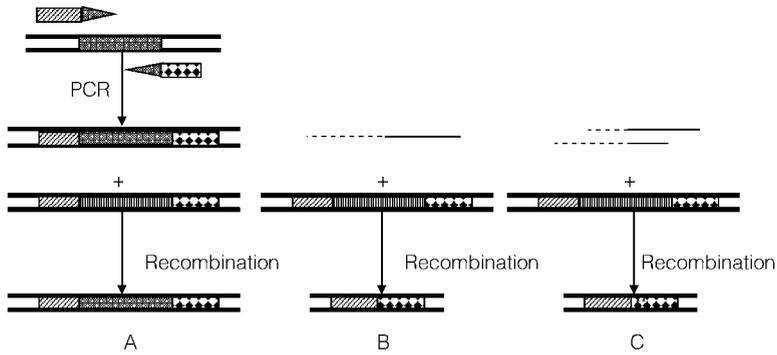


图2 Red同源重组的基本策略

A: DNA双链介导的重组; B: 单链重组; C: 重叠引物介导的重组。

注: ▨▨▨▨和▩▩▩▩表示左侧同源臂; ▧▧▧▧和▦▦▦▦表示右侧同源臂。

Fig.2 Strategies of Red homologous recombination

A: Recombination using double-stranded DNA; B: recombination using oligonucleotides;

C: recombination with overlapping single-stranded DNA oligonucleotides.

Note: Symbols ▨▨▨▨ and ▩▩▩▩ represent left region of homology;

Symbols ▧▧▧▧ and ▦▦▦▦ represent right region of homology.

洗3次,加样品细菌裂解提取液或防无细菌培养液,37℃放置2h;Tris-HCl-Tween20洗后加血清抗体,37℃放置1h;Tris-HCl-Tween20洗后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,37℃放置1h然后加底物液邻苯二胺-奉陪氧化氢显色,然后用2 mol/L H₂SO₄终止反应,用酶联仪检测。

2 结果

2.1 pUC19-sacB、pUC19-sacB-kan 重组质粒的构建与 SacB/kan 选择反选择功能鉴定

以质粒 pUC19 为载体,按照材料与方法中的步骤,构建了质粒 pUC19-sacB 和 pUC19-sacB-kan,酶切片段大小与预期相符(图3),测序表明插入的序列正确。对 sacB/kan 基因功能进行了鉴定,结果表明:转入 pUC19-sacB、pUC19-sacB-kan 以及阳性对照 pKO3 的 DH5α 菌不能在含 7% 蔗糖的 M63 培养基上生长 (sacB^S),而 DH5α 菌能正常生长 (sacB^R) (图4)。转入 pUC19-sacB-kan 的 DH5α 菌同时还表现 Kan^R,证明 sacB/kan 功能正常。

2.2 建立 luc 报告基因定位敲入 lac 操纵子中的重组菌株

选择了大肠杆菌 W3110 株 lac 操纵子上 lacZ、lacY 和 lacA 3 个基因作为外源基因敲入的位置。用 kan/sacB 选择与反选择方法建立了多种携带不

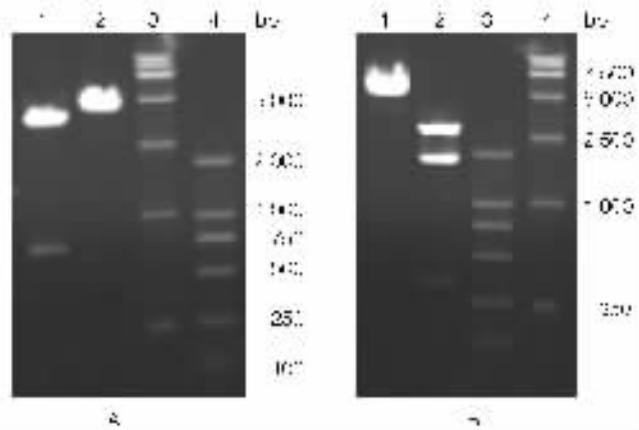


图3 质粒 pUC19-sacB 和 pUC19-sacB-kan 的酶切鉴定

Fig.3 Restriction analysis of plasmids pUC19-sacB and pUC19-sacB-kan

A: pUC19-sacB. 1: Nde I / Sca I; 2: Nde I; 3: DL15 000;

4: DL2 000. B: pUC19-sacB-kan. 1: Sca I;

2: Cla I / Nco I; 3: DL2 000; 4: DL15 000.

同遗传特性的菌株,其中 CW4 为 lacI 基因被敲除的菌株;CWL2、CWL3 和 CWL4 为将报告基因 luc 分别敲入和替换 CW4 中 lacZ、lacY 和 lacA 基因位置的菌株(图5)。关于各个菌株详细的叙述见表(表2)。其中 A<>B 代表 A 基因被 B 基因替换。敲入 luc 基因长度为 1 653 bp。PCR 方法鉴定上述菌株基因型正确,sacB 功能鉴定表型正确。

2.3 报告基因表达分析

对菌株 CWL2、CWL4 和 CWL6 的 *luc* 基因的表达进行分析:每次每个菌株至少测了 3 次值,每个菌株至少进行了 3 次重复实验。为增加结果的可信度进行分析时所取细菌的量基本一致。最后进行统计学分析,结果如图 6。实验表明无阻遏基因 *lacI* 存在时,报告基因 *luc* 在 *lacZ*, *lacA* 和 *lacY* 位置上表达差别不太明显,没有呈倍数关系。

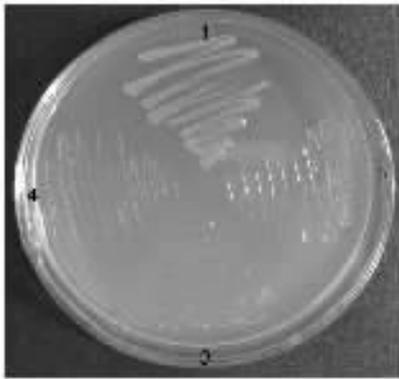


图 4 含质粒 pKO3、pUC19-sacB 和 pUC19-sacB-kan 的菌 DH5 α 的 *sacB* 功能鉴定

1:野生型 DH5 α ;2:pKO3 ;3:pUC19-sacB;4:pUC19-sacB-kan。

Fig.4 Identification of the function of gene *sacB* in plasmids pKO3, pUC19 – *sacB* and pUC19-*sacB*-kan

1: Wild type DH5 α ;2:pKO3;3:pUC19-*sacB*;4:pUC19-*sacB*-kan.

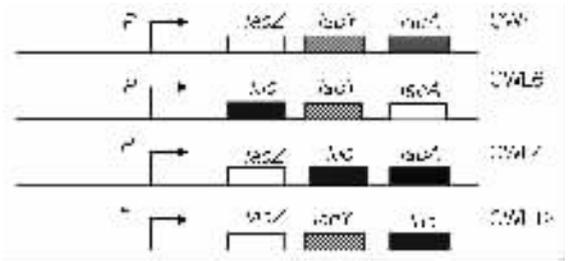


图 5 部分菌株基因型示意简图

Fig.5 Sketch maps of recombinated strains

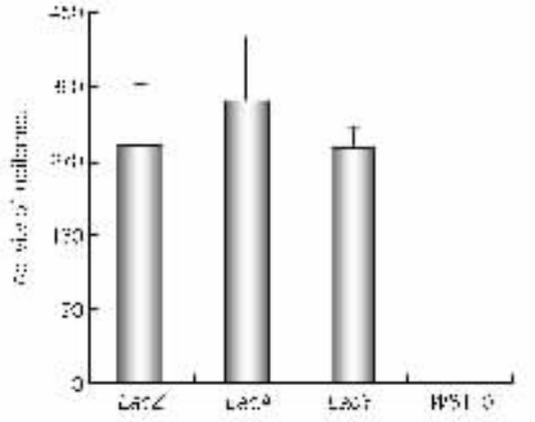


图 6 荧光素酶活性分析

Fig.6 Analysis of the activity of luciferase

表 2 菌株基因型及构建时所用带同源臂的引物

Table 2 Genotypes of strains and primers with homologous regions

菌株 Strains	基因型 Genotype	菌株母体 Parent strain	引物 Primers	
			1	2
CWL1	W3110 Δ <i>lacI</i> [<i>lacA</i> <> <i>kan/sacB</i>]	CW4	cwt11	cwt12
CWL2	W3110 Δ <i>lacI</i> [<i>lacA</i> <> <i>luc</i>]	CWL1	cwt30	cwt31
CWL3	W3110 Δ <i>lacI</i> [<i>lacY</i> <> <i>kan/sacB</i>]	CW4	cwt15	cwt16
CWL4	W3110 Δ <i>lacI</i> [<i>lacY</i> <> <i>luc</i>]	CWL3	cwt32	cwt33
CWL5	W3110 Δ <i>lacI</i> [<i>lacZ</i> <> <i>kan/sacB</i>]	CW4	cwt1	cwt2
CWL6	W3110 Δ <i>lacI</i> [<i>lacZ</i> <> <i>luc</i>]	CWL5	cwt37	cwt38
CWD1	W3110 <i>lacZ</i> <> <i>ctxb</i>]	CWL5	cwt43	cwt44
CWB1	W3110 <i>lacZ</i> <> <i>kan/sacB</i>	W3110	cwt1	cwt2
CWB2	W3110 <i>lacZ</i> <> <i>ctxb</i>	CWB1	cwt43	cwt44

2.4 *ctxb* 基因敲入 *lacZ* 位置及其组成型表达分析

为了进一步探讨大肠杆菌染色体携带外源基因的表达情况,我们以霍乱毒素 B 亚单位高表达质粒

pMM-CTB 为模板,PCR 合成了一个含 1 064 bp DNA 序列的打靶分子,将含调控序列和 *ctxb* 结构基因的 DNA 片段敲入到大肠杆菌 CW4 中的 *lacZ*

位置,建立了重组大肠杆菌 CWD1。我们对大肠杆菌 CWD1 的无细胞培养液和细胞裂解提取液进行 ELISA 分析了(图 7),结果表明细胞裂解液中检测不到 CTB 的存在,样品 OD 值(P)与阴性对照 OD 值(N)的比值 P/N 小于 2,为阴性;无细胞培养液中 P/N 均超过 10,明显为阳性,但表达量低于质粒 pMM-CTB。上述结果表明我们所构建的 CWD1 能表达 CTB,且有效地分泌到细胞外。

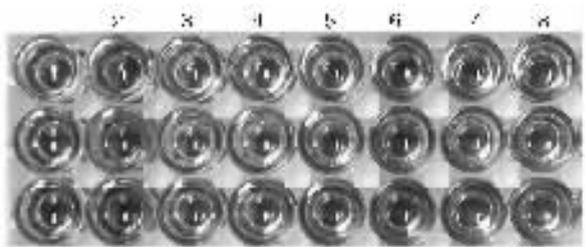


图 7 ELISA 检测菌株 CWD1 中 CTB 的表达

1: W3110(pMM-CTB)裂解液; 2: W3110(pMM-CTB)细胞培养液;
3: W3110 裂解液; 4: W3110 细胞培养液; 5: CWD1 裂解液;
6: CWD1 细胞培养液; 7, 8: 空白对照。

Fig. 7 The expression of CWD1 tested by ELISA

1: Cell extract of W3110(pMM-CTB); 2: Supernatant of W3110(pMM-CTB); 3: Cell extract of W3110;
4: Supernatant of W3110; 5: Cell extract of CWD1; 6: Supernatant of CWD1; 7, 8: Blank control.

3 讨论

2000 年, Yu 等发现 λ -噬菌体重组酶 Red 能介导线性双链 DNA 打靶分子与 *E. coli* 染色体 DNA 之间的高效同源重组,所需同源臂长度仅为 35~50 bp, PCR 方法即可产生这样的打靶分子,由此建立了重组工程(Recombineering)技术^[1]。近年来,多项重组工程技术——双链线性 DNA 重组、单链 DNA 重组、重叠引物介导的 DNA 重组等的应用^[5,6],比较有效的解决了对 *E. coli* 染色体等大分子 DNA 的基因敲除、克隆、定点突变等基因修饰问题^[3,7]。Yu D^[1]等建立的 DY330、DY331 等菌株能提供相当高的重组效率,但由于 Red 重组酶基因整合到 *E. coli* 染色体中,限定了基因修饰只能在该菌株内完成。本研究的前期工作中,用 Gap-Repair 体内克隆技术,将长度 6.7 kb 的携带 Red 基因的缺陷型 λ -噬菌体 DNA 从 *E. coli* 染色体上克隆到 pBR322 中,建立了可转移的重组工程系统 pBR322-Red。

为进一步探索外源基因敲入到大肠杆菌染色体

中的合适位点,我们运用 pBR322-Red 系统,将报告基因 *luc* 分别敲入到 *lacZ*、*lacA* 和 *lacY* 位置上,分析了荧光素酶的表达情况。据报道,在自然状态下, *lacZ*、*lacY* 和 *lacA* 在细胞中表达比例为 1.0:0.5:0.2。本实验中 *luc* 报告基因在 *lacZ*、*lacA* 和 *lacY* 位置上表达差别不明显。提示原核生物中基因表达与基因本身的序列和结构关系较大。另外,我们把 *luc* 基因克隆进多拷贝质粒 pUC19,由可诱导的 *lac* 启动子控制,发现其表达产量不及 *luc* 基因在 *lacZ* 基因在染色体上的组成型表达。提示在除去阻遏基因 *lacI* 后,外源基因有可能在 *lac* 操纵子的结构基因处高效表达。此外我们的初步观察表明,敲除 *lacI* 后外源基因组型表达对细菌的生长速率无显著影响,至少在 *lac* 操纵子上组成性表达 *luc* 基因对细菌的毒害不大。为了进一步探讨大肠杆菌染色体携带外源基因的表达情况,我们将含调控序列和 *ctxb* 编码序列的 DNA 片段敲入到大肠杆菌 CW4 中的 *lacZ* 位置上,建立了重组大肠杆菌 CWD1。结果表明,CTB 能够在 CWD1 菌株中有效表达,产物基本上分泌到细胞外,我们成功地构建了能有效在正常大肠杆菌染色体上表达 CTB 的菌株,这在国内还是首次报导。同时我们研究发现,若不将阻遏基因 *lacI* 去掉,仅仅将含调控序列的 *ctxb* 替换 *lacZ* 编码区后,则在细胞裂解液和无细胞培养液中均不能检测到 CTB 的表达,当有诱导物 IPTG 的存在时 CTB 能有效分泌到胞外(数据未给出),说明 CWD1 中 *lac* 启动子能促进 CTB 的表达。已有结果表明 *ctxb* 的启动子是一个高效启动子,其活性不需要特殊诱导^[8,9],这与我们的结果有些出入。具体原因将有待分析。

总体说来, *lac* 操纵子上的 3 个结构基因位置可能是适合外源基因表达的候选位点之一,尤其是需要在染色体上同时高效地表达几种外源基因时,可以考虑该位点。

参考文献(References):

- [1] Court D L, Sawitzke J A, Thomason L C. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet*, 2002, 36: 361~388.
- [2] Lee E C, Yu D, Martinez de Velasco J, Tessarollo L, Swing D A, Court D L, Jenkins N A, Copeland N G. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Ge-*

nomics, 2001, 73(1):56~65.

- [3] LI Shan-Hu, HONG Xin, YU Mei. Development of a new recombineering system by gap-repair. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(5):533~537.
李山虎, 洪 鑫, 于 梅. Gap-Repair 方式建立一种基于 pBR322-Red 的新型重组工程系统. *遗传学报*, 2005, 32(5):533~537.
- [4] Yu D, Ellis H M, Lee E C, Jenkins N A, Copeland N G, Court D L. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(11):5978~5983.
- [5] CHEN Wei, ZHOU Jian-Guang, WANG Ming-Gang. A new Red-based recombineering system used for modifying chromosome and BACs in *Escherichia coli*. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2004, 28(5):476~479.
陈 伟, 周建光, 王鸣刚. 一种基于 Red 的在大肠杆菌中修饰染色体和 BAC 的新型重组工程系统. *军事医学科学院院刊*, 2004, 28(5):476~479.
- [6] Yu D, Sawitzke J A, Ellis H, Court D L. Recombineering with o-

verlapping single-stranded DNA oligonucleotides: testing a recombination intermediate. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100(12):7207~7212.

- [7] 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.
- [8] FANG Hong-Qing, ZHAO Si-Qing, YU Gong-Yi, MA Qing-Jun. Relation of lac promoter and the expression of cholera toxin subunit B gene in recombinant *Escherichia coli* MM2. *Acta Microbiologica Sinica*, 1997, 37(4):265~269.
方宏清, 赵四清, 于公义, 马清钧. 霍乱毒素 B 亚单位工程菌 MM2 的表达与 lac 启动子的关系. *微生物学报*, 1997, 37(4):265~269.
- [9] CAO Cheng, SHI Cheng-Hua, LI Ping, MA Qing-Jun. A promoter responsible for over-expression of cholera toxin B subunit in cholera toxin A subunit structure gene. *Acta Genetica Sinica*, 1997, 24(1):78~86.
曹 诚, 石诚华, 李 平, 马清钧. 霍乱毒素基因具有自己的启动子. *遗传学报*, 1997, 24(1):78~86.

《2005 年版中国科技期刊引证报告》在京发布

【本刊讯】2005 年 12 月 6 日,《2005 年版中国科技期刊引证报告》在北京发布,这是中国科学技术信息研究所根据“中国科技论文引文数据库”1608 种统计源期刊 2004 年度的引文情况得出的统计结果。现将 2004 年影响因子前 20 位的生物学类期刊的几项指标予以转载,仅供读者参考。

2004 年生物学类期刊影响因子和总被引频次排序表

排 名	期 刊 名 称	影响因子	总被引频次	基金论文比	他引率
1	生态学报	1.414	3614	0.97	0.78
2	植物生态学报	1.373	2008	0.95	0.93
3	应用生态学报	1.342	3468	1.00	0.67
4	生物多样性	1.295	656	0.94	0.89
5	遗传学报	1.076	1373	0.93	0.90
6	动物学报	1.061	945	0.80	0.71
7	昆虫学报	0.900	1019	0.86	0.78
8	Cell Research	0.791	163	0.67	0.87
9	生物磁学	0.734	225	0.08	0.03
10	植物生理与分子生物学报	0.716	1220	0.92	0.95
11	植物学报	0.705	2944	0.91	0.92
12	生物工程学报	0.692	805	0.74	0.93
13	中国科学 C	0.658	359	0.92	0.92
14	中国生物化学与分子生物学报	0.638	667	0.87	0.79
15	遗传	0.631	800	0.80	0.85
16	微生物学报	0.630	741	0.82	0.91
17	应用与环境生物学报	0.629	715	0.83	0.86
18	生物化学与生物物理学报	0.601	605	0.76	0.92
19	兽类学报	0.574	509	0.89	0.74
20	生态学杂志	0.559	1051	0.94	0.89