

Red/ET 重组在基因打靶载体快速构建中的应用

王军平¹, 张友明²

(1. 第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所、创伤烧伤复合伤国家重点实验室, 重庆 400038;

2. 基因桥研究室, 德累斯顿 01307, 德国)

摘要:通过合理应用 Red/ET 重组技术实现基因打靶载体的快速构建。在 Red/ET 重组介导下, 首先从基因组 DNA 中将靶基因片段亚克隆至打靶质粒载体中, 随后将两端带有 50 bp 同源臂的抗性筛选基因插入并替换靶基因上的目标序列, 如此两步操作即可完成一个传统型基因敲除打靶载体的构建; 结合 Cre-loxP 系统, 在传统型基因敲除打靶载体的基础上, 经过再一轮的 Red/ET 重组就能够成功实现条件性基因敲除打靶载体的构建。整个实验过程不需要 PCR 扩增长、短臂序列, 也不涉及酶切、连接反应, 因此, 不仅省时、省力, 而且所构建的基因打靶载体序列准确, 无突变。实验方法的建立为加速后基因组时代的基因功能研究提供了一条捷径。

关键词:基因打靶载体构建; Red/ET 重组; 基因敲除

中图分类号: R394

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)06-0953-06

The Application of Red/ET Recombination to High Efficient Gene-targeting Vector Construction

WANG Jun-Ping¹, ZHANG You-Ming²

(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: A rapid and high efficient working system for gene-targeting vector construction was developed by using Red/ET recombination. Mediated by Red/ET recombination, the objective genomic DNA was first subcloned into the targeting vector. After insertion of a PCR amplified selectable marker gene flanked with short homology arms into the targeted position, a conventional gene knock-out targeting vector was then constructed. For conditional gene knock-out targeting vector construction, with the co-operation of Cre-loxP site-specific recombination, two rounds of Red/ET recombination was just needed. Being different from PCR and endonuclease-based gene-targeting vector construction, the homologous regions used for gene targeting can be chosen as long as possible. Furthermore, no enzyme digestion, ligation and sequencing identification were involved, so that it is very efficient and labor-saving. Several different gene-targeting vectors were successfully constructed by using this system. The establishment of this working system will accelerate the gene function studies in the post-genome stage.

Key words: gene-targeting vector construction; Red/ET recombination; gene knock-out

基因组测序工程的实施与完成将越来越多的基因序列信息展现在人们面前, 进一步明确这些已知或未知基因的功能是后基因组时代的一个重要研究内容。基因打靶小鼠模型是开展基因功能研究的一

个非常有效途径, 而其实施基础则是首先构建出相应的基因打靶载体^[1,2]。

目前, 基因打靶载体的构建主要依赖于酶切和 PCR 扩增技术。一般情况下, 都是先通过酶切或

收稿日期: 2005-01-21; 修回日期: 2005-03-31

基金项目: 第三军医大学留学回国人员启动基金项目资助 [Supported by the TMMU Foundation for returnee]

作者简介: 王军平 (1972—), 男, 副研究员, 博士, 专业方向: DNA 工程学。Tel: 023-68752283, E-mail: wangjunp@yahoo.com

PCR 方法获得长、短臂基因组同源区,然后再分别与筛选标记基因和打靶质粒骨架进行多次连接、转化^[3,4]。除了操作相对繁琐外,由于大部分实验是在体外实施,操作过程中还具有碱基突变和缺失的危险,因此所构建的基因打靶载体往往需要进行测序验证。所以,用这种方法构建基因打靶载体相对费时、费力。

Red/ET 重组是新近出现的一种基于 λ 噬菌体 Red 操纵子 (Red α /Red β /Red γ) 和 λ 噬菌体 RecE/RecT 重组系统的 DNA 工程技术,通过该技术可以简单、快速地对任意大的 DNA 分子进行插入、敲除、突变等多种修饰,而且还可对长达 80 kb 的 DNA 片段进行亚克隆^[5~7]。由于重组反应的整个过程都是在大肠杆菌细胞内部完成,因此不存在碱基突变危险。该技术已被广泛地用于基因组 DNA 如细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC)、大肠杆菌染色体等的遗传修饰研究中^[8,9]。

最近,我们将 Red/ET 重组技术成功地引入到基因打靶载体构建之中,建立了一种快速、高效的打靶载体构建方法。本文以构建小鼠细胞周期素依赖激酶抑制因子 $p16^{INK4a}$ 第二外显子条件性敲除基因打靶载体为例,展示了该方法的实施策略、操作过程及其优越性。

1 材料和方法

1.1 质粒与菌株

Red/ET 重组依托质粒 pSC101-BAD-gba (Tet)^[7]、含原核和真核双启动子和 SV40polyA 尾的 Neo 基因模板质粒 pR6K-PGK/EM7-neo-SV40pA 以及 pR6K-loxP/FRT-PGK/EM7-neo-SV40pA-FRT 由德国 Gene Bridges 实验室提供。含小鼠 $p16^{INK4a}$ 完整基因组 DNA 的 BAC 克隆由德国德累斯顿工业大学 Stewart AF 教授惠赠。大肠杆菌 HS996 菌株、含有 Red/ET 重组依托质粒的 HS996 感受态菌株由本室保存。含 Cre 重组酶的大肠杆菌 294 菌株^[10] 由德国 Gene Bridges 实验室提供。

1.2 $p16^{INK4a}$ 基因条件性敲除打靶载体的构建(图 1)

1.2.1 Red/ET 重组介导 $p16^{INK4a}$ 基因组 DNA 的亚克隆

首先确定打靶所需 $p16^{INK4a}$ 基因组 DNA 区域,

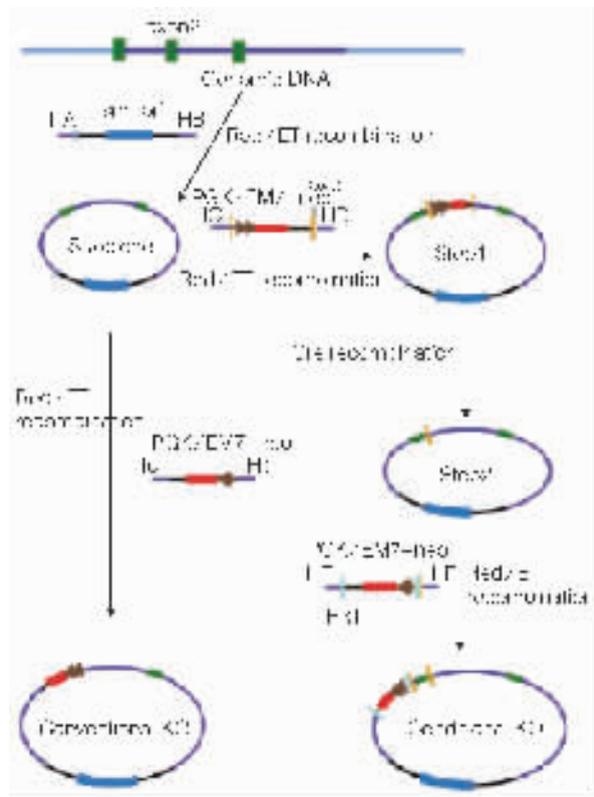


图 1 $p16^{INK4a}$ 基因打靶载体的构建示意图

sm: 抗性筛选标记基因; HA-HF: 同源臂 A-F。

Fig. 1 The sketch map for construction of mouse $p16^{INK4a}$ gene-targeting vector

sm: Selectable marker gene; HA-HF: Homology arms A-F.

选择该区域头、尾端的 50 bp 序列作为同源臂 A 和 B(图 1),以 ColE1 来源的打靶用载体质粒为模板,用加载了同源臂的上、下游引物 PCR 扩增其中 ColE1 + bla(编码 Amp 抗性基因)骨架部分,然后以此 PCR 产物为受体,以含有 $p16^{INK4a}$ 基因组 DNA 的 BAC 为供体,通过依托质粒 pSC101-BAD-gba(四环素抗性)介导实施 Red/ET 重组反应^[6],经 Amp 37°C 过夜筛选获得重组克隆,然后再对重组子进行酶切鉴定。

所用 PCR 上游引物序列为: CCTGAGGGAAG-GCAAGGCAGGAAGCTCAAGCTGTACAG GAACCTG-CAGGAA TTCGATATCAAGCTTATCGATAC,其中 5' 端的 50 bp 序列为同源臂 A,3' 端斜体部分为 ColE1 + bla 片段的上游特异性引物;下游引物序列为: AGATAGGCTTCCCTGTTATTTATTTCACTGTACAT AAAATAATTAGCCGATCCACTAGTTCTAGAGCGG,其中 5' 端的 50 bp 序列为同源臂 B,3' 端斜体部分为

ColE1 + bla 片段的下游特异性引物。

1.2.2 Red/ET 重组介导 loxP-PGK/EM7-*neo*-loxP-*Xba* I 的定点插入

根据研究需要确定第一个 loxP 序列的插入位置(位于第二个外显子后面),选择该位置前、后各 50 bp 序列作为同源臂 C 和 D(图 1),以自杀性质粒 pR6K-PGK/EM7-*neo*-SV40pA 为模板,用加载了同源臂 A + loxP 序列的上游引物和加载了同源臂 B + *Xba* I + loxP 序列的下游引物 PCR 扩增 PGK/EM7-*Neo*-SV40pA 基因片段,然后以此 PCR 产物为受体,以前面获得阳性亚克隆重组质粒 DNA 为供体,共转化含有 Red/ET 依托质粒的 HS996 感受态细胞,经卡那霉素 37°C 过夜筛选获得重组克隆,然后再对重组子进行酶切鉴定。

所用 PCR 上游引物序列为:AGAAGAAGCAAC-CCAAATGAGCCTGAGAACATGGAC ACCCATAAGT TCCCATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAG TTATATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGC,其中 5' 端的 50 bp 序列为同源臂 C,中间黑体部分的 34 个碱基为 loxP 序列,3' 端斜体部分为 PGK/EM7-*Neo*-SV40pA 的上游特异性引物;下游引物序列为: TGCTGGTACCCAGCCTAGGCCTTGACCAGGAGC-CAGCGGGTGGGTAAAA TTCTAGA AIAACTTCGTATAA TGTATGC TATACGAAGTTATAACGCCAAGCTGGC GCGCCGCAC,其中 5' 端的 50 bp 序列为同源臂 D,中间黑体部分的 34 个碱基为 loxP 序列,带下划线的 6 个碱基为 *Xba* I 内切酶识别位点(加入 *Xba* I 位点目的是为了便于阳性克隆的酶切鉴定与 ES 细胞的 Southern 鉴定),3' 端斜体部分为 PGK/EM7-*Neo*-SV40pA 的下游特异性引物。

1.2.3 Cre 重组删除 PGK/EM7-*neo*

将上一步所获得插入有 loxP-PGK/EM7-*neo*-loxP 的阳性重组质粒转化大肠杆菌 294 细胞,37°C 过夜培养,在 Cre 重组酶作用下两个方向相同 loxP 序列之间的 PGK/EM7-*neo*-SV40pA 基因即被删除,从而仅留下单一的 loxP 位点和一个 *Xba* I 位点,对经 Cre 重组后的质粒进行酶切鉴定。

1.2.4 第二个 loxP 序列的定点插入

根据插入位置选择不同的同源臂序列,再次通过 Red/ET 重组将 loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT 定点插入到 $p16^{INK4a}$ 基因第二外显子之前。这里,*Neo* 基因两侧附带 FRT 位点的目的是

在基因打靶成功后可以通过 Flp-FRT 系统将 *Neo* 基因清除。最终所得阳性克隆即为 $p16^{INK4a}$ 第二外显子条件性敲除基因打靶载体。

1.2.5 $p16^{INK4a}$ 条件性敲除基因打靶载体的初步验证

将最终所获得的 $p16^{INK4a}$ 第二外显子条件性敲除基因打靶载体质粒转化大肠杆菌 294 细胞,37°C 过夜培养,次日提取质粒进行酶切鉴定。如果 $p16^{INK4a}$ 基因的第二外显子能够被删除,则证实条件性基因打靶载体构建成功。

2 结果

2.1 $p16^{INK4a}$ 基因组 DNA 的亚克隆

由于选择 $p16^{INK4a}$ 基因的第二外显子(约 500 bp)作为条件性敲除的靶目标,于是我们便对第二外显子连同前面约 1 kb(短臂)和后面约 6.3 kb(长臂)的基因组 DNA 片段进行了亚克隆。打靶质粒骨架的 PCR 结果显示,经 PCR 扩增后获得长约 3.0 kb 的 DNA 条带(图 2a),比 ColE1 + bla 原始片段(2.9 kb)长 100 bp,提示 Red/ET 重组所需的同源臂 A 和 B 已被加载到 ColE1 + bla 片段的两端。Red/ET 重组后所获得的氨苄青霉素抗性克隆,经 *Xba*I/*Xho*I 双酶切可见 5 316 bp、2 898 bp、2 566 bp

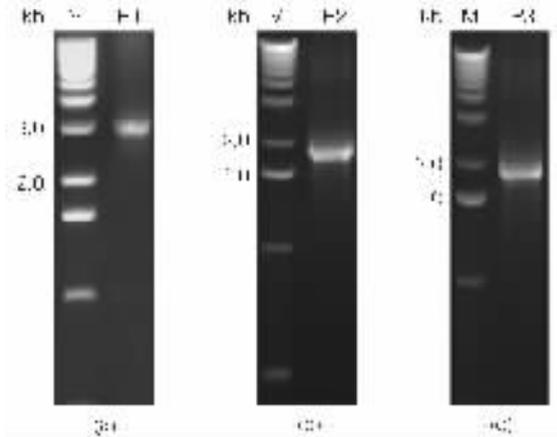


图 2 两端带有同源臂的 PCR 产物电泳图

M: 1 kb DNA marker; P1: ColE1 + bla PCR 产物;

P2: loxP-PGK/EM7-*neo*-loxP-*Xba* I PCR 产物;

P3: loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT PCR 产物。

Fig. 2 PCR amplified fragments with homology arms

M: 1 kb DNA marker; P1: ColE1 + bla PCR product;

P2: loxP-PGK/EM7-*neo*-loxP-*Xba* I PCR product;

P3: loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT PCR product.

3 条 DNA 片段(图 3),与亚克隆前的 PCR 产物相

比, 5 316 bp 和 2 566 bp 为新增条带, 两者之和为 7 882 bp, 与预期结果一致, 表明目标基因片段已从基因组 DNA 中成功克隆至打靶质粒载体内。由于只有重组体才能形成环状质粒并进行复制, 所以在含 Amp LB 平板上生长的克隆几乎都为阳性重组体。

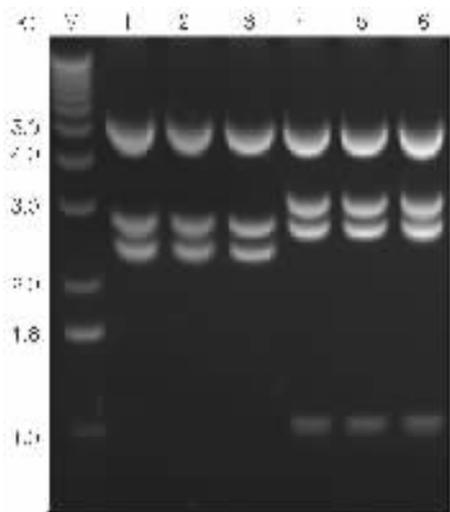


图 3 $p16^{INK4a}$ 基因片段亚克隆及 loxP-PGK/EM7-neo-loxP-Xba I 插入修饰后 Xba I / Xho I 酶切鉴定结果

M: 1 kb DNA marker; 1~3: $p16^{INK4a}$ 基因片段亚克隆;
4~6: loxP-PGK/EM7-neo-loxP-Xba I 阳性克隆。

Fig. 3 Xba I / Xho I digestion of $p16^{INK4a}$ subclone and the insertion of loxP-PGK/EM7-neo-loxP-Xba I

M: 1 kb DNA marker; 1~3: $p16^{INK4a}$ positive clones;
4~6: loxP-PGK/EM7-neo-loxP-Xba I positive clones.

2.2 第一个 loxP 序列的插入

利用 Cre-loxP 系统进行条件性基因敲除时, 需要在目标序列的两侧各插入一个方向相同的 loxP 序列。由于不能进行抗性筛选, 所以应用 Red/ET 重组很难将单一 loxP 序列直接插入到指定位置。在这里我们采用了两步法, 首先经 Red/ET 重组将两个方向一致的 loxP 序列连同 Neo 基因一同插入到指定位置。由于 Neo 基因的存在使得同源重组后的阳性克隆表现出卡那霉素抗性, 阳性克隆经 Xba I / Xho I 双酶切后电泳结果显示 5 316 bp、3 266 bp、2 898 bp、1 078 bp 4 条 DNA 片段, 与插入修饰前相比新增 3 266 bp 和 1 078 bp 两条 DNA 带, 同时 2 526 bp 条带消失(图 3), 酶切片段相加后比原来质粒增大 1 818 bp, 其大小正好与去掉两个同源臂 (100 bp) 的 loxP-PGK/EM7-neo-loxP-Xba I PCR 产物(1 918 bp)一致(图 2b), 表明 loxP-PGK/

EM7-neo-loxP 已插入到指定位置。

经 Cre 重组后可见原有的 3 266 bp DNA 条带丢失, 新增一个 1 488 bp DNA 条带, 两者之差(1 778 bp)与 PGK/EM7-neo-loxP 大小一致(1 918 - 34 - 6 = 1 778, 图 4)。平板划线实验结果表明 Cre 重组后所得克隆的卡那霉素抗性已丢失, 进一步说明 PGK/EM7-neo-loxP 基因片段已被删除, 仅留下一个 loxP 和 Xba I 位点。

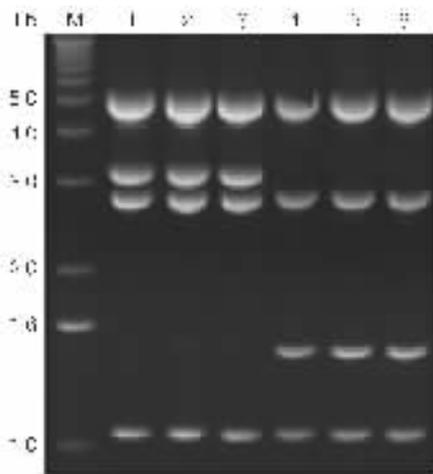


图 4 Cre 重组后的阳性克隆 Xba I / Xho I 酶切鉴定结果

M: 1 kb DNA marker; 1~3: loxP-PGK/EM7-neo-loxP-Xba I 阳性克隆; 4~6: Cre 重组后 loxP-Xba I 阳性克隆。

Fig. 4 Xba I / Xho I digestion of positive clones after Cre recombination

M: 1 kb DNA marker; 1~3: loxP-PGK/EM7-neo-loxP-Xba I positive clones; 4~6: loxP-Xba I positive clones.

2.3 第二个 loxP 序列的插入

这是一步简单的 Red/ET 重组, 结果可见恢复了卡那霉素抗性后的质粒经 Xba I / Xho I 双酶切后, 新出现一个 3 300 bp DNA 条带, 原有 1 488 bp DNA 条带则消失(图 5), 说明 5' 端连有 loxP 和 FRT 序列以及 3' 端连有 FRT 序列的 PGK/EM7-neo 基因(图 1, 图 2c)已成功插入到指定位置。这样需要敲除的第二外显子前后分别被插入了一个 loxP 序列, 同时 Neo 基因两侧也各带了一个 FRT 序列。至此, 便完成了条件性 $p16^{INK4a}$ 基因打靶载体的构建。

将最终得到的条件性基因打靶载体质粒转染含有 Cre 重组酶的大肠杆菌细胞, 经过 Cre 重组后可见原来 3 300 bp 的 DNA 条带消失, 新出现一条 2 836 bp DNA 条带(在电泳图上与 2 898 bp 条带重合形成一个 DNA 双带), 说明位于两个 loxP 序列之间

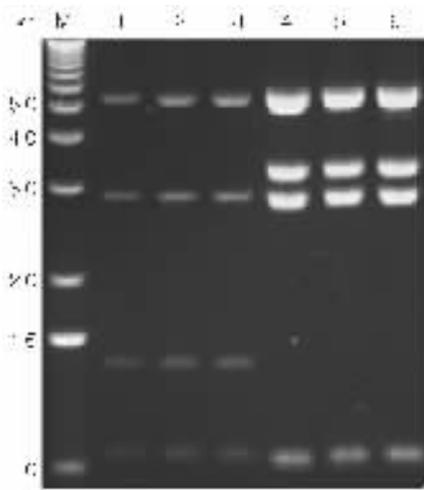


图 5 loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT

插入修饰后 *Xba* I / *Xho* I 酶切鉴定结果

M: 1 kb DNA marker; 1~3: Cre 重组后 loxP-*Xba* I 阳性克隆;

4~6: loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT 阳性克隆。

Fig.5 *Xba* I / *Xho* I digestion of positive clones after the insertion of loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT

M: 1 kb DNA marker; 1~3: loxP-*Xba* I positive clones;

4~6: loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT positive clones.

的 $p16^{INK4a}$ 基因第二个外显子 (约 500 bp) 已被删除 (图 6)。从而进一步证明条件性 $p16^{INK4a}$ 基因打靶载体构建是成功的。

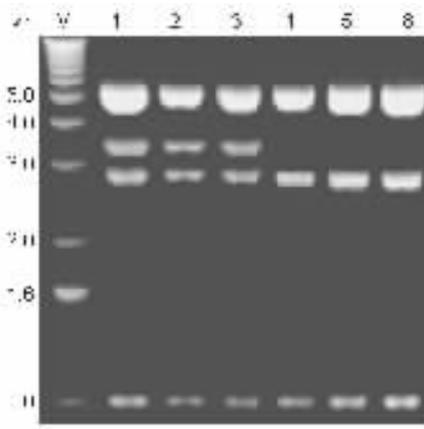


图 6 loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT 阳性克隆经 Cre 重组后的 *Xba* I / *Xho* I 酶切鉴定结果

M: 1 kb DNA marker; 1~3: loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT 阳性克隆; 4~6: Cre 重组后的 loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT 克隆。

Fig.6 *Xba* I / *Xho* I digestion of loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT positive clones after Cre recombination

M: 1 kb DNA marker; 1~3: loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT positive clones; 4~6: loxP/FRT-PGK/EM7-*neo*-SV40pA-FRT clones after Cre recombination.

3 讨 论

随着基因打靶小鼠模型的广泛应用,如何快速、有效地构建基因打靶载体越来越引起人们的重视。已知,一个完整的传统型基因敲除打靶载体一般包括:基因组同源区长、短臂,可进行原核及真核筛选的标记基因,以及打靶质粒骨架等组成部分;条件性基因敲除打靶载体除了以上的组成部分外,还需连接两侧附带 loxP 或 FRT 位点的打靶序列。目前比较常用的基因打靶载体构建方法是:先通过 PCR 扩增各组分,然后再分别进行酶切、连接和转化筛选。运用这种方法,即便是最普通的传统型基因敲除打靶载体也需要至少 3 次酶切、连接和转化反应^[3,4]。不仅操作相对烦琐,而且多次的体外酶切与连接反应还增加了 DNA 突变的危险。

本实验介绍的基因打靶载体构建方法是从另外一种角度出发,即运用 Red/ET 重组技术对目标基因组 DNA 直接进行修饰。Red/ET 重组是近年来新创建的一种 DNA 工程技术,其原理是借助 λ 噬菌体的 RecE/RecT 或 λ 噬菌体的 Red α /Red β 系统来介导实施同源重组反应,从而达到修饰目标 DNA 的目的^[5~7]。与其他类型同源重组不同的是,Red/ET 重组所需同源臂仅为 35~50 bp,且其重组效率非常高。35~50 bp 的同源臂可以通过 PCR 反应直接加载到目标 DNA 分子的两侧。经 Red/ET 重组,两端带有同源臂的供体分子就能直接插入到受体 DNA 分子的同源区部位,从而实现对接受体靶分子进行插入、剪切等多种目的的修饰。同理,如果同源臂序列放在线性质粒载体的两端,通过该系统还可直接克隆或亚克隆 DNA 靶分子。由于同源臂可以人为选择,而且同源重组本身又不受酶切位点和 DNA 分子大小的限制,所以运用 Red/ET 重组可以对任意大的 DNA 分子进行操作。

$p16^{INK4a}$ 是细胞周期素依赖激酶 CDK4 的抑制因子,具有阻止细胞过度分裂和癌变的作用。为了进一步明确其生物学功能,人们需要对该基因的不同区域进行敲除研究^[4,11]。本实验则是通过构建 $p16^{INK4a}$ 基因第二外显子的条件性敲除打靶载体,旨在向人们展示一种由 Red/ET 重组介导构建基因打靶载体的新方法。在此之前,我们构建了多个配套模板质粒,除了本实验中使用的 Neo 基因模板质粒,还有 Hygromycin 基因模板质粒,以及这两种抗

性筛选基因与 EGFP 或 LacZ 融合的模板质粒等。这样,针对不同的靶基因,在应用 Red/ET 重组进行该基因打靶载体构建时只需要更换相应的同源臂即可。之所以将这些抗性筛选基因模块装入 R6K 来源的质粒中,是因为这种质粒在正常的大肠杆菌 *E. coli* K12 中不能复制^[12],从而避免操作中模板质粒的污染问题。从本实验中该技术的具体实施方案看,一个看似复杂的条件性基因打靶载体,只需 3 步 Red/ET 重组和一步 Cre 重组即可构建成功。值得一提的是,当 $p16^{INK4a}$ 基因组 DNA 亚克隆成功后,如果第一次的 loxP-PGK/EM7-*neo*-loxP 插入位置不是在目标序列的前面,而是直接将目标序列区替换(只需在 PCR 扩增 loxP-PGK/EM7-*neo*-loxP 时更换对应的同源臂),那么两步操作即可实现一个传统性基因打靶载体的构建(图 1)。由此可见,与传统依赖于酶切和 PCR 扩增进行基因打靶载体构建相比^[3, 4, 13],这种基于 Red/ET 重组的方法要简单、快速的多。

已知,基因打靶效率的高低往往与打靶载体中所用基因组同源区的长短有关,同源区越长所介导的基因打靶效率就会越高。然而,如果用 PCR 扩增来获得基因的同源区,那么同源区越长就越难得到 PCR 产物,同样 PCR 产物越大产生突变的几率也就越高。由于 Red/ET 重组不受 DNA 分子大小限制,可以对长达 80 kb 的 DNA 进行亚克隆,所以应用 Red/ET 重组进行打靶载体构建时可以按需要随意改变同源区的长度。在本实验中我们亚克隆的基因组 DNA 全长约 8 kb,其中包括约 1 kb 的短臂同源区和 6.5 kb 的长臂同源区。

另外,由于 Red/ET 重组反应是在细菌体内完成,所以在操作工程中不会产生碱基突变或缺失。我们应用该方法成功构建了多个不同类型基因敲除打靶载体,经测序验证从未发现碱基突变和缺失等错误。所以,运用该方法进行基因打靶载体的构建不仅省时、省力,而且高效、安全。此技术方法的建立为加速后基因组时代基因功能的研究提供了一条捷径。

参考文献(References):

[1] Feng G, Lu J, Gross J. Generation of transgenic mice. *Methods Mol Med*, 2004, 99(1): 255~267.

- [2] Li Xiang-Ping, XU Wei-Zhuo, LI Ning. Research progress and prospect of animal gene targeting. *Hereditas* (Beijing), 2003, 25(1): 81~88.
李湘萍,徐慰倬,李 宁. 动物基因敲除研究的现状与展望. 遗传, 2003, 25(1): 81~88.
- [3] LIU Hong-Quan, DAI Ji-Xun, YU Wen-Gong, YANG Kun-Feng. Progress on gene targeting. *Hereditas* (Beijing), 2002, 24(6): 707~711.
刘红全,戴继勋,于文功,杨堃峰. 基因打靶技术的研究进展. 遗传, 2002, 24(6): 707~711.
- [4] GONG Zhen-Ming, LI Jian, FU Ji-Liang. $p16^{INK4a}$ exon 1 α knockout in mouse embryonic stem cells. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(1): 21~25.
龚振明,李 坚,傅继梁. 小鼠胚胎干细胞 $p16^{INK4a}$ 基因外显子 1 α 打靶研究. 遗传学报, 2002, 29(1): 21~25.
- [5] Zhang Y, Buchholz F, Muyrers J P P, Stewart A F. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*, 1998, 20(1): 123~128.
- [6] Zhang Y, Muyrers J P P, Testa G, Stewart A F. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biotech*, 2000, 18(12): 1314~1317.
- [7] Zhang Y, Muyrers J P P, Rientjes J, Stewart A F. Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in *Escherichia coli* and mouse ES cells. *BMC Mol Biol*, 2003, 16(1): 1~14.
- [8] Muyrers J P P, Zhang Y, Benes V, Testa G, Stewart A F. Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. *EMBO Rep*, 2000, 1(3): 239~243.
- [9] Jamsai D, Orford M, Nefedov M, Fucharoen S, Williamson R, Ioannou P A. Targeted modification of a human β -globin locus BAC clone using GET Recombination and an I-SceI counterselection cassette. *Genomics*, 2003, 82(1): 68~77.
- [10] Buchholz F, Angrand P O, Stewart A F. A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(15): 3118~3119.
- [11] Kamijo T, Zindy F, Roussel M F, Quelle D E, Downing J R, Ashmun R A, Grosveld G, Sherr C J. Tumor suppression at the mouse *INK4a* locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, 1997, 91(5): 649~659.
- [12] Filutowicz M, Rakowski S A. Regulatory implications of protein assemblies at the origin of plasmid R6K: A review. *Gene*, 1998, 223(1-2): 195~204.
- [13] GONG Zhen-Ming, ZHENG Jing-Min, FU Ji-Liang. Conditional targeting of $p16^{INK4a}$ exon 1 α in mouse embryonic stem cells. *Chin J Med Genet*, 2002, 19(4): 285~289.
龚振明,郑敬民,傅继梁. 小鼠 $p16^{INK4a}$ 基因外显子 1 α 胚胎干细胞条件打靶研究. 中华医学遗传学杂志, 2002, 19(4): 285~289.