



## 专论与综述

## 噬菌体重组酶介导的 DNA 同源重组工程

李瑞娟 赵晓雨 杨润雨 刘洋 颜富 王海龙 张友明 符军\*

山东大学微生物技术国家重点实验室 山东 青岛 266237

**摘要:** 来源于噬菌体的遗传操作工具在基因工程中具有非常重要的地位, 例如位点特异性重组酶、柯斯质粒 DNA 文库及同源重组酶等。其中, 来源于 Lambda 噬菌体的同源重组酶 Red $\alpha$ /Red $\beta$  和来源于 Rac 原噬菌体的同源重组酶 RecE/RecT 能够高效地介导 35–50 bp 短同源臂之间的重组。基于噬菌体同源重组酶 Red $\alpha$ /Red $\beta$  和 RecE/RecT 开发的 DNA 同源重组工程(Recombineering)能够对靶标 DNA 分子进行快速、精准、高效的修饰, 不受限制性内切酶识别位点和 DNA 分子大小限制, 已发展成为一种新型的基因工程技术。本文主要综述了噬菌体同源重组酶及其作用机制、在大肠杆菌及其他细菌中的应用和开发, 以及在微生物次级代谢产物的挖掘、动植物转基因、病毒基因组克隆和修饰等方面的应用。原位激活沉默基因簇需要宿主特异性的 DNA 同源重组工程进行启动子和调控元件的修饰; 异源表达次级代谢产物的首要步骤一般是通过 RecET 直接克隆大的 DNA 片段; 动植物转基因复杂载体的构建效率在有了 Red 同源重组系统以后有了革命性的发展; RecET 直接克隆和 Red 同源重组介导的感染性克隆构建和修饰方法, 不仅有利于病毒基因组功能研究, 同时也为载体疫苗开发提供了最优方案。

**关键词:** 噬菌体同源重组酶, 同源重组工程, Red 系统, RecET 系统, 次级代谢产物, 动植物转基因, 病毒反向遗传学

## Recombineering mediated by bacteriophage recombinases

LI Ruijuan ZHAO Xiaoyu YANG Runyu LIU Yang YAN Fu WANG Hailong  
ZHANG Youming FU Jun\*

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao, Shandong 266237, China

**Abstract:** DNA manipulation tools derived from bacteriophage, such as site-specific recombinases, cosmid libraries, and homologous recombinases, play an important role in genetic engineering. The homologous recombinases Red $\alpha$ /Red $\beta$  from Lambda phage or RecE/RecT from Rac prophage can efficiently mediate the recombination between homologous arms as short as 35–50 bp. Recombineering based on phage homologous recombinases Red $\alpha$ /Red $\beta$  and RecE/RecT can be used to precisely and efficiently modify target DNA molecules without limitation of endonuclease recognition sites and the size

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2019YFA0904000, 2018YFA0900400); Taishan Scholar Project of Shandong Province; Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020MC015); Fundamental Research Funds of Shandong University (2018GN021)

\*Corresponding author: Tel: 86-532-67722918; E-mail: fujun@sdu.edu.cn

Received: 07-05-2021; Accepted: 04-06-2021; Published online: 22-07-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFA0904000, 2018YFA0900400); 山东省泰山学者工程; 山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MC015); 山东大学基本科研业务费(2018GN021)

\*通信作者: Tel: 0532-67722918; E-mail: fujun@sdu.edu.cn

收稿日期: 2021-05-07; 接受日期: 2021-06-04; 网络首发日期: 2021-07-22

of DNA molecule, which has been developed into a new genetic engineering technology. This article reviews the phage homologous recombinases and their functional mechanism, their application and development in *Escherichia coli* and other bacteria. The broad use of recombineering has been demonstrated in the mining of microbial secondary metabolites, animal and plant transgenes, and viral genome cloning and modifications. *In situ* activation of a silent gene cluster accomplished by promoter engineering requires host specific recombineering system. The initial step of heterologous expression of secondary metabolites is direct cloning of large DNA fragment, which is based on RecET. Construction of large transgenic vector for both animal and plant mainly rely on Red recombineering. Generation and modification of infectious clone in *E. coli* mediated by RecET direct cloning and Red recombineering is the most efficient method for functional research of viral genome and vector vaccine development.

**Keywords:** bacteriophage homologous recombinases, recombineering, Red system, RecET system, secondary metabolites, animal and plant transgenesis, virus reverse genetics

在基因工程中, 来源于噬菌体(Bacteriophage)的遗传操作工具具有非常重要的地位, 主要包括位点特异性重组酶、柯斯质粒文库以及同源重组酶等。

溶源性噬菌体在宿主菌染色体上的整合和切离大部分是由噬菌体编码的整合酶完成的。噬菌体整合酶属于位点特异性重组酶(Site-Specific Recombinases)类<sup>[1]</sup>。根据氨基酸同源性及催化残基的不同, 位点特异性重组酶主要分为 2 个家族: 酪氨酸家族和丝氨酸家族<sup>[2-3]</sup>。酪氨酸家族的位点特异性重组酶主要包括 Lambda 整合酶(Lambda Integrase)<sup>[4]</sup>、*E. coli* P1 噬菌体 Cre 重组酶<sup>[5]</sup>、*E. coli* D6 噬菌体 Dre 重组酶<sup>[6]</sup>、酿酒酵母的 FLP 重组酶<sup>[7]</sup>及 *E. coli* 的 XerC 蛋白<sup>[8]</sup>等。丝氨酸家族的位点特异性重组酶主要包括链霉菌  $\Phi$ C31 重组酶<sup>[9]</sup>、链霉菌  $\Phi$ BT1 重组酶<sup>[10]</sup>和肺炎克雷伯菌 Tn3 重组酶<sup>[11]</sup>等。其中, Lambda 整合酶能够介导 attP/attB 位点间的重组<sup>[4]</sup>。目前, 该系统已经被 Invitrogen 公司开发成 Gateway<sup>®</sup>克隆试剂盒, 主要用于高通量质粒的构建<sup>[12]</sup>。Cre 重组酶可以使 2 个 LoxP 位点之间发生特异性重组<sup>[5]</sup>。目前, Cre/lox 系统通过位点特异性重组可以实现基因敲除与敲入、替换、缺失突变、染色体结构改造及基因表达调控等多种基因工程操作, 在原核以及真核生物的遗传工程中得到了非常广泛的应用<sup>[13]</sup>。 $\Phi$ C31 重组酶介导 attP/attB 位点间的重组,

主要用于将外源 DNA 整合到染色体上, 具有高效、不需要辅因子和插入片段大等优点<sup>[14]</sup>。

由人工构建的含有质粒复制子 colEI 和 Lambda 噬菌体 cos 序列的质粒载体, 称为柯斯质粒(Cosmid), 又叫黏粒。其含有 Lambda 噬菌体 cos 位点和质粒复制起始位点, 可以选择性地将 37–50 kb 的 DNA 包裹进噬菌体头部, 兼具了噬菌体载体和质粒载体的优点, 常用于高通量 DNA 文库的构建。

大肠杆菌中早期的同源重组工程依赖于 RecA 蛋白, 需要大于 500 bp 的同源臂, 从而需要中间载体的构建。1998 年, Zhang 等发现在携带 Rac 原噬菌体的 *E. coli* 中, 重组酶 RecE/RecT 能够促进携带短同源臂的线性 DNA 分子进行同源重组<sup>[15]</sup>。1999 年, Muyrers 等发现 Lambda 噬菌体的 Red 操纵子编码的重组酶 Red $\alpha$ /Red $\beta$  也能够介导体内介导高效同源重组<sup>[16]</sup>。基于噬菌体同源重组酶 Red $\alpha$ /Red $\beta$  和 RecE/RecT 建立的同源重组系统分别为 Red 系统和 RecET 系统, 统称为 DNA 同源重组工程(Recombineering), 有文献也称 Red/ET 同源重组工程(Red/ET Recombineering)<sup>[17-24]</sup>。与传统的 RecA 同源重组系统相比, Red/ET 同源重组工程只需要 35–50 bp 的短同源臂就可以实现高效率的同源重组, 对靶标 DNA 分子进行快速、精准、高效的修饰, 因为不受限制性内切酶识别位点和 DNA 分子大小的限制, 极大地提高了目的基因修

饰的效率,已经广泛地应用于生命科学研究的各个领域。

本文主要综述了噬菌体同源重组酶及其作用机制、同源重组工程在 *E. coli* 及其他细菌中的研究进展,以及同源重组工程在细菌次级代谢产物挖掘、动植物转基因、病毒基因组 DNA 的克隆及修饰等方面的应用。

## 1 噬菌体同源重组酶

### 1.1 Red $\alpha$ $\beta$ 重组酶

在大肠杆菌 *recA* 突变株中, Lambda 噬菌体 *red* 突变株缺失了同源重组的能力,从而确定了 Red 操纵子的功能<sup>[25]</sup>。在 Red 操纵子里, *red $\alpha$* 、*red $\beta$*  和 *red $\gamma$*  被 pL 启动子转录,而 pL 启动子受温度敏感的 cI857 所抑制<sup>[26]</sup>。

Red $\alpha$  分子量为 24 kD, 包含 226 个氨基酸,是一种不依赖于 ATP 但需要  $Mg^{2+}$  的 5'→3'双链 DNA 核酸外切酶,其结合在磷酸化的双链 DNA (Double Strand DNA, dsDNA) 末端,将 dsDNA 降解为 3'单链悬突的 DNA<sup>[27]</sup>。Red $\alpha$  只会结合在 dsDNA 的末端,不会作用在 dsDNA 的缺口(Nicks or Gaps)上<sup>[28]</sup>。在催化核酸外切反应时, Red $\alpha$  形成一个环形的同源三聚体,具有一个中心漏斗形通道,通道的入口可以容纳一个 dsDNA 进入,而出口的直径仅有单链 DNA (Single Strand DNA, ssDNA) 的大小<sup>[29]</sup>。因此, Red $\alpha$  的同源三聚体通道入口端与 dsDNA 末端结合后, dsDNA 的 5'末端被三聚体的活性位点降解,使 DNA 分子的 3'末端变成单链悬突(3'-ssDNA Overhang),从同源三聚体通道的出口端退出<sup>[29]</sup>。Red $\alpha$  降解 DNA 的速度大约为每秒 12 个核苷酸<sup>[30]</sup>。DNA 的 GC 含量不同, Red $\alpha$  降解速度会有所变化,因为限速步骤是氢键断裂<sup>[31]</sup>。在酶切过程中,当 Red $\alpha$  遇到 5'-GGCGA-3'序列时会出现长时间的停顿(3.5–11.2 s)<sup>[32]</sup>。

Red $\beta$  分子量为 25.8 kD, 包含 261 个氨基酸,是 ssDNA 退火蛋白,能够与 Red $\alpha$  产生的 ssDNA 结合形成一个 ssDNA-Red $\beta$  复合体,保护暴露出来

的 ssDNA 免受单链核酸酶的攻击,并且可以寻找到 ssDNA 的同源序列<sup>[33]</sup>。Red $\beta$  能够与长度大于 35 bp 的 ssDNA 稳定结合,在催化退火互补形成 dsDNA 后,其仍然与退火的 dsDNA 紧密结合在一起,这种退火的 dsDNA-Red $\beta$  复合物能够抵抗 DNAase I, 比 ssDNA-Red $\beta$  复合物更加稳定<sup>[33]</sup>。当 Red $\beta$  从细胞里分离出来的时候,其和 Red $\alpha$ 、S1 核糖体蛋白以及 NusA 转录延伸因子形成一个复合体<sup>[34]</sup>。Caldwell 等发现 Red $\beta$  可以与大肠杆菌 ssDNA 结合蛋白 SSB 相互作用,并证明了 SSB 羧基端的末端肽在相互作用中的重要性<sup>[35]</sup>。最近, Filsinger 等发现 Red $\beta$  与 SSB 的相互作用主要依赖于对 SSB 羧基端 7 个氨基酸的识别,并且这种相互作用在一定程度上决定了 Red $\beta$  的宿主特异性<sup>[36]</sup>。有些 Red $\beta$  的突变体不仅影响其本身的功能,也影响 Red $\alpha$  的核酸外切酶活性<sup>[25]</sup>。这暗示着 Red 操纵子的功能不仅来源于 Red $\alpha$  和 Red $\beta$  之间的相互作用,而且与宿主中存在的因子相关。在电子显微镜下,当没有 ssDNA 时, Red $\beta$  形成一个大约由 12 个亚基组成的无活性小环;当 ssDNA 存在时, Red $\beta$  则会形成一个大约由 15–18 个亚基组成的有活性大环;退火后的 dsDNA-Red $\beta$  复合体则是一个左手螺旋结构<sup>[37]</sup>。原子力显微镜观察发现,没有 DNA 的时候, Red $\beta$  会形成一个带有右手螺旋结构的缺口椭圆, ssDNA 的存在则破坏了这种结构,当加入第 2 个互补的 ssDNA 时,退火的产物形成一个左手螺旋结构<sup>[38]</sup>。在最新的研究中,研究者用高分辨率质谱分析发现,在不含 DNA 的情况下, Red $\beta$  会形成 12 个亚基的低聚物;在 38 bp 的 ssDNA 存在时, 4–14 个 Red $\beta$  会与之形成复合物;在 38 bp 的退火 dsDNA 上,会有 11 个亚基与之形成更稳定的复合物<sup>[39]</sup>。

*red $\gamma$*  会从不同的翻译起始位点编码 16.1 kD 的 GamL 和 11.4 kD 的 GamS。大肠杆菌核酸酶 RecBCD 复合体虽然在一个细胞内只有 10 个拷贝,但是其对线性 DNA 的破坏力极强,可以清除大多

数线性 dsDNA<sup>[40]</sup>。GamS 二聚体可以与 RecBCD 形成 RecBCD-Red $\gamma$  复合体,从而抑制其核酸外切酶和解旋酶的活性<sup>[41]</sup>。Red $\gamma$  晶体结构显示其二聚体形似于 DNA 的双螺旋,并且外围的  $\alpha$  螺旋富含负电荷,可以模拟 DNA 与 RecBCD 结合,抑制其核酸外切酶活性对外源 DNA 的降解,从而能够提高 Red $\alpha$ /Red $\beta$  的 DNA 同源重组效率<sup>[42]</sup>。Red $\gamma$  并没有完全抑制 RecBCD 的活性,因为表达 Red $\gamma$  的野生菌株和 *recBC* 突变菌株的表型是不同的,表达 Red $\gamma$  的细菌仍然保持很高水平的 DNA 同源重组活性,而 DNA 双链断裂的修复在 RecBCD 敲除菌株中则完全没有<sup>[41]</sup>。这说明,Red $\gamma$  只是改变了 RecBCD 的活性而不是一个完全的 RecBCD 抑制蛋白,这种活性的改变需要 RecF 途径的参与<sup>[9,43]</sup>。

## 1.2 RecET 重组酶

在一些大肠杆菌菌株的基因组中发现了类似 Lambda 的 Rac 前噬菌体,Rac 前噬菌体包含编码同源重组酶功能的 *recE* 和 *recT*,这些基因最初被认为是属于 RecBCD 和 RecF 途径之外的第 3 种大肠杆菌内源性重组途径,因此也被称为 RecE 途径<sup>[44]</sup>。在 *recBC* 的缺陷株中,*sbcA* 的突变可以激活 *recE* 和 *recT* 基因的表达,从而提高了重组水平<sup>[44]</sup>。RecE 在功能上类似于 Red $\alpha$ ,而 RecT 在功能上类似于 Red $\beta$ <sup>[45]</sup>。

RecE 也被称为 ExoVIII DNA 核酸外切酶,与 dsDNA 末端结合,可以非常迅速地从 5'端进行降解,形成 3'端单链 DNA 悬突<sup>[46]</sup>。全长的 RecE 是由 866 个氨基酸组成的 96.4 kD 蛋白,大小约是 Red $\alpha$  的 4 倍,然而最初的一些研究认为其氨基端大约 600 个氨基酸是没有功能的,而羧基端 264 个氨基酸具有全长 RecE 的所有活性<sup>[27,46]</sup>。2012 年,Fu 等发现全长的 RecE 有利于线性 DNA 之间的重组,而氨基端 564 或者 602 个残基缺失的 RecE,对于线性 DNA 之间的重组效率显著降低,而对于环状 DNA 与线性 DNA 之间的重组效率显著提升,但

是 RecE 氨基端的功能目前仍然不清楚<sup>[47]</sup>。全长的 RecE 没有获得晶体结构,羧基端晶体结构显示,它形成一个环形的同源四聚体,与 Red $\alpha$  的三聚体类似,中央有一个锥形通道,其宽度足以在入口端结合 dsDNA 末端,但在出口端仅允许 3'端单链 DNA 通过<sup>[33]</sup>。

RecT 的分子量为 29.7 kD,是一个 ssDNA 退火蛋白,在电镜下观察 RecT 蛋白以及 RecT 蛋白和 DNA 的复合物,发现在没有 DNA 的时候 RecT 蛋白形成棒状聚合物,与 ssDNA 组成的复合物成丝状螺旋结构<sup>[48]</sup>。与 Red $\beta$ 不同的是,RecT 可以稳定地结合 ssDNA 和 dsDNA;但是,RecT 可以促进 ssDNA 的聚集,而不能促进 dsDNA 的聚集<sup>[48]</sup>。对 RecT 促进配对的体外研究表明,RecT 可以介导同源 ssDNA 或者线性 dsDNA 的同源单链末端入侵超螺旋 DNA,带有同源单链末端的线性 dsDNA 类似于 RecE 核酸外切酶消化后的 DNA 底物,这个结果支持了 RecT 可以直接参与 RecE 途径中 DNA 双链断裂修复的假说<sup>[49]</sup>。

免疫共沉淀实验表明,RecE 和 RecT 之间存在特定的蛋白质-蛋白质相互作用,这与 Red $\alpha$ 和 Red $\beta$ 相似。因此,这表明重组需要核酸外切酶与相应的 DNA 退火蛋白之间的协同功能,Red $\alpha$  与 RecT,或者 Red $\beta$  与 RecE 之间没有协同作用,所以他们的组合也没有类似的重组功能<sup>[27,50]</sup>。

## 2 噬菌体同源重组酶作用机制

噬菌体蛋白 Red $\alpha$ /Red $\beta$  和 RecE/RecT 发挥同源重组作用,具有 5'→3'双链 DNA 核酸外切酶活性的 Red $\alpha$  或者 RecE 首先将 dsDNA 分子从 5'端开始进行降解,使 DNA 分子的 3'末端变成单链悬突,或者使较短的 dsDNA 底物形成一个 ssDNA 分子。ssDNA 退火蛋白 Red $\beta$  或者 RecT 与暴露的 ssDNA 结合形成复合物,防止 ssDNA 分子被降解,并且该复合物会在 Red $\beta$  或者 RecT 的介导下寻找同源序列,最终完成 DNA 重组(图 1)。

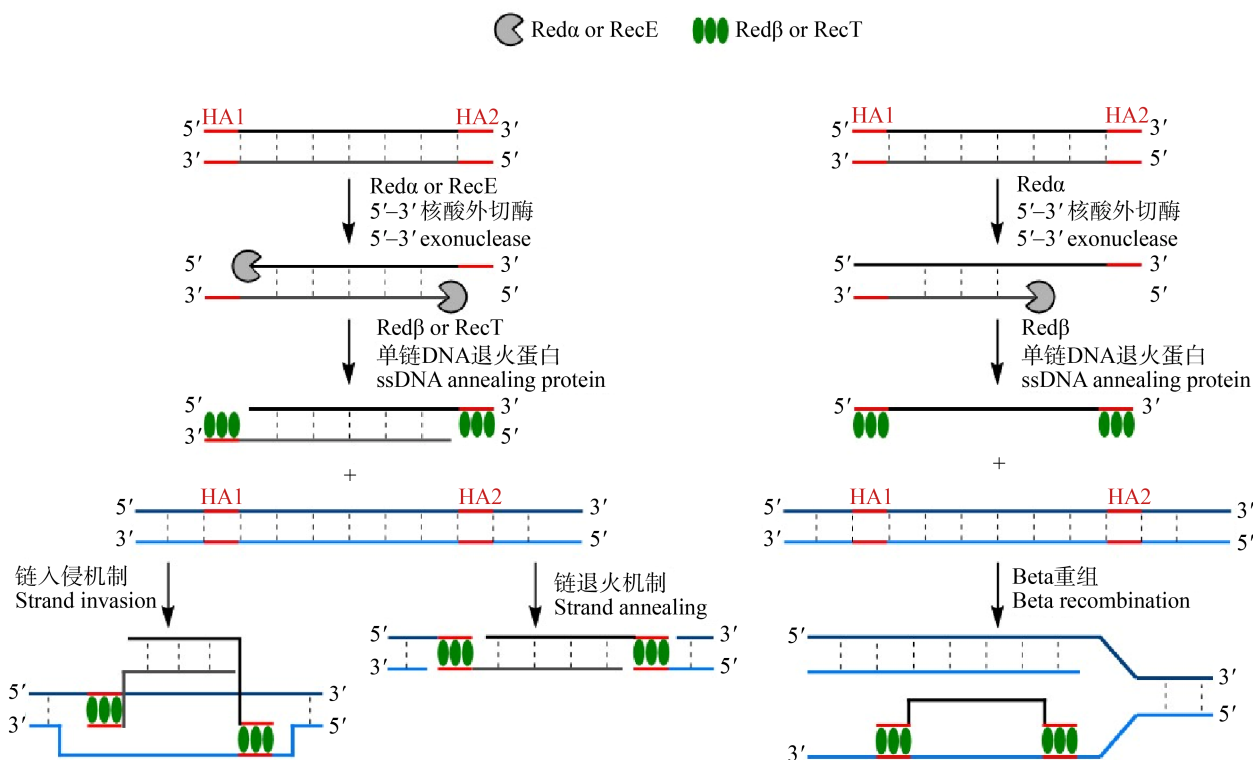


图 1 噬菌体同源重组酶 Red $\alpha$ /Red $\beta$  和 RecE/RecT 作用机制  
Figure 1 Models for Red/ET mediated recombineering

在同源重组工程中, 线性 DNA 片段和环形 DNA 分子之间的重组被称为线环重组 (Linear Plus Circular Homologous Recombination, LCHR) (图 2A), 2 个线性 DNA 分子之间的重组被称为线线重组 (Linear Plus Linear Homologous Recombination, LLHR) (图 2B); Red $\gamma$  只存在于 Red 操纵子中, 但是将其与 RecE/RecT 共表达, 能极大地提高其重组效率; 研究还证实, Red 系统介导线环重组更有效, 全长的 RecET 系统介导线线重组更有效<sup>[47]</sup>。线环重组和线线重组的机理不同, 线环重组更倾向于链入侵 (Strand Invasion) 机制或者 Beta 重组 (Beta Recombination)<sup>[51-52]</sup>, 依赖于 DNA 的复制; 线线重组更倾向于链退火 (Strand Annealing) 机制, 其重组的完成不依赖于 DNA 的复制 (图 1)。实验证明, 在线环重组中, DNA 在复制叉处入侵到滞后链的效率比先导链高。以通过 PCR 得到的 dsDNA 作为底物时, Red $\alpha$  可能仅从 dsDNA 的

一端开始消化, 产生 ssDNA 中间体, 该中间体将在复制叉处形成单链异双螺旋。因为 Red $\alpha$  核酸外切酶偏好于具有 5' 磷酸化末端的 dsDNA, 而不能降解硫酸基化脱氧核糖核酸存在时形成的硫代硫酸酯键, 所以在设计扩增 dsDNA 底物的引物时可以进行不对称修饰, 使 Red $\alpha$  在体内定向地消化产生与滞后链互补的 ssDNA, 从而提高重组效率<sup>[51]</sup>。外源性线性 DNA 分子进行线环重组时作为冈崎片段参与 DNA 的复制是唯一通过实验验证的机理模型, 称为 Beta 重组<sup>[51]</sup>。

### 3 噬菌体同源重组酶介导的同源重组工程的应用和发展

#### 3.1 同源重组工程的应用

将含有质粒复制位点、选择性标记基因以及相应同源臂的线性 dsDNA 片段转入表达了 Red 系统或者 RecET 系统重组酶的 *E. coli* 中, 通过线环同

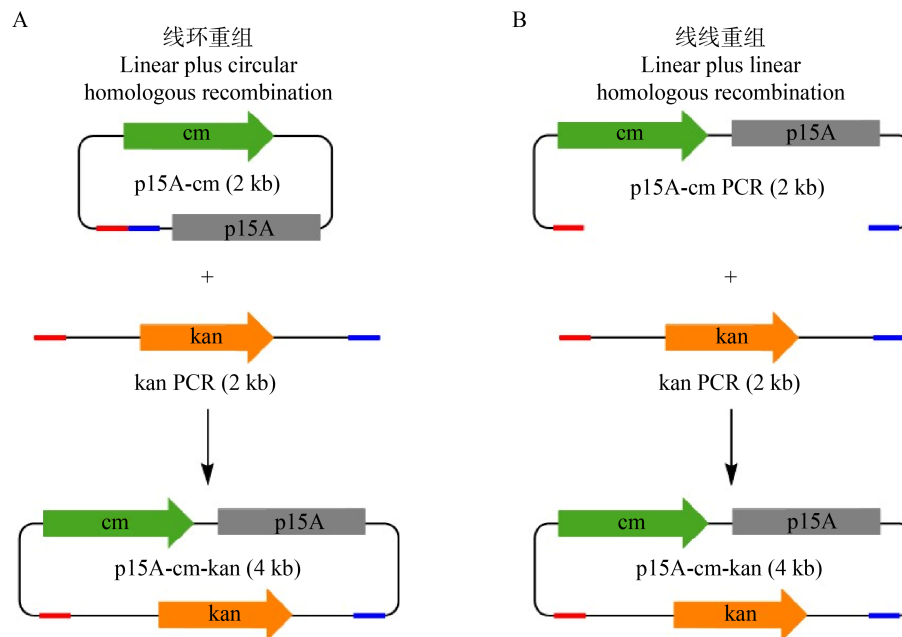


图 2 噬菌体同源重组酶  $Red\alpha/Red\beta$  和  $RecE/RecT$  介导的线环重组(A)和线线重组(B)<sup>[47]</sup>

Figure 2 LCHR (A) and LLHR (B) mediated by phage homologous recombinases  $Red\alpha/Red\beta$  and  $RecE/RecT$ <sup>[47]</sup>

源重组线性 dsDNA 片段可以与细胞内的质粒、细菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosomes, BAC)或者 *E. coli* 染色体上的目的 DNA 形成环状质粒, 此技术称为亚克隆(Subcloning)或者缺口修补(Gap Repair)<sup>[22,53]</sup> (图 3A)。

1998 年, Zhang 等利用同源重组工程在 *E. coli* 中实现了对高拷贝质粒、含有小鼠 *Hoxa* 基因的 P1 载体(>76 kb)以及 *E. coli* 染色体进行修饰, 包括目的 DNA 的插入(Insertion)、敲除(Deletion)以及替换(Replacement)等<sup>[15]</sup> (图 3B)。1999 年, Muylers 等利用同源重组工程在 *E. coli* 中实现了对 BAC 的修饰<sup>[16]</sup> (图 3B)。利用同源重组工程结合 *SacB* 介导的反向筛选技术, Zhang 等实现了对高拷贝质粒的点突变(Point Mutation)修饰<sup>[15]</sup>, Muylers 等实现了对 BAC 的点突变修饰<sup>[24]</sup> (图 3C)。

1998 年, Zhang 等将含有质粒复制位点、选择性标记基因以及相应同源臂的线性 dsDNA 片段和来源于大肠杆菌、酵母或者小鼠胚胎干细胞

的包含目的片段的基因组 DNA 共转化到表达了  $RecET$  系统重组酶的 *E. coli* 中, 通过线线同源重组, 实现了对目的 DNA 片段的直接克隆(Direct Cloning)<sup>[22]</sup> (图 3D)。

在进行 DNA 同源重组时, *recA* 突变的大肠杆菌有利于质粒的稳定, 但是 Wang 等发现在电转化前瞬时表达 *RecA* 可以提高电击后细胞的存活率, 从而提高重组效率<sup>[54]</sup>。

### 3.2 直接克隆技术的发展

2012 年, Fu 等利用全长的 *RecE* 和 *RecT*, 加上 *Red $\gamma$*  和 *RecA* 构建了一个新的直接克隆系统, 对 *Photobacterium luminescens* 中的 10 个次级代谢基因簇进行了直接克隆并在异源宿主中尝试表达, 建立了一个通过直接克隆和异源表达进行生物活性次级代谢产物挖掘的新方法<sup>[47]</sup>。2015 年, Wang 等创建了  $RecET$  直接克隆和 *Red* 重组技术的一体化方案, 在温敏型质粒上通过阿拉伯糖诱导表达  $RecET$  重组酶, 在染色体上通过鼠李糖诱导表达



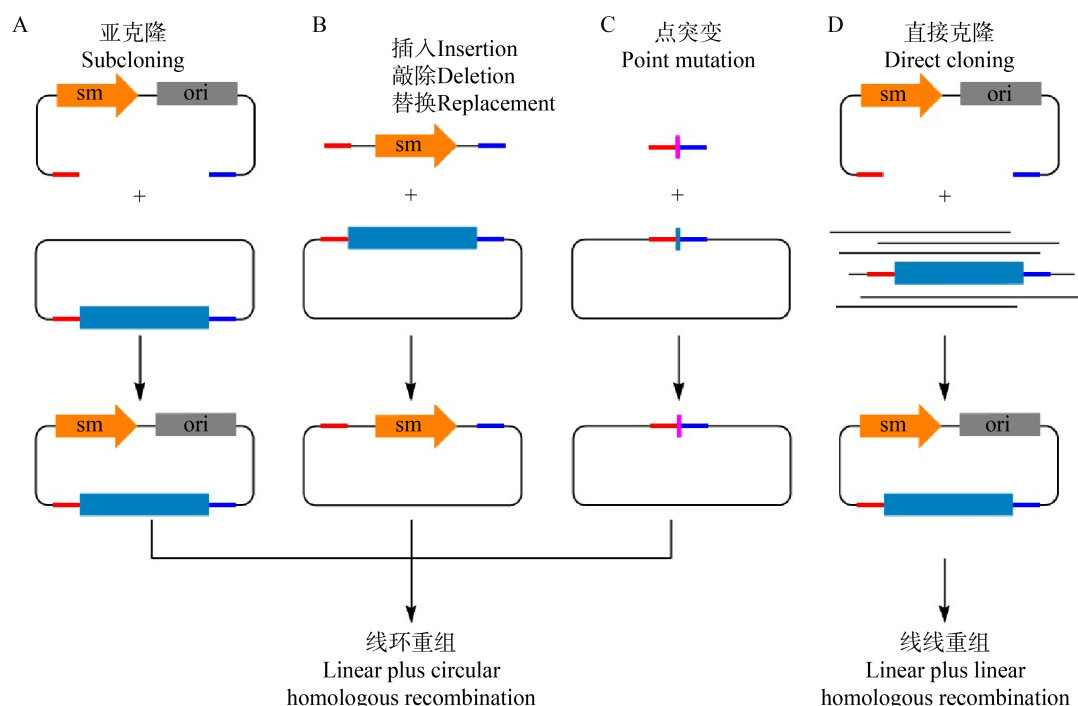


图3 同源重组工程的应用<sup>[15-16,22,24,53]</sup>

Figure 3 Application of homologous recombineering<sup>[15-16,22,24,53]</sup>

注: A: 亚克隆; B: 插入、敲除和替换; C: 点突变; D: 直接克隆

Note: A: Subcloning; B: Insertion, deletion and replacement; C: Point mutation; D: Direct cloning

Red 重组酶, 并对克隆载体和基因平行转移元件进行了标准化, 构建了一个系统的工具箱, 极大地便利了直接克隆技术在微生物基因组挖掘中的应用<sup>[55]</sup>。RecET 介导的直接克隆技术避免了基因文库的构建和筛选, 省时省力, 但是对于原核基因组中的大于 50 kb 的 DNA 片段或者真核基因组中特定基因的克隆效率不高。2018 年, Wang 等在 RecET 直接克隆技术的基础上开发了 ExoCET 技术<sup>[56]</sup>。ExoCET 技术的机理是首先利用 T4 DNA 聚合酶的核酸外切酶活性, 在体外对 2 个 dsDNA 的末端进行降解, 形成 ssDNA 并退火, 随后在体内, 通过 RecET 同源重组形成重组子, 实现复杂基因组的高效直接克隆。在此过程中, 虽然可以形成完全环化分子的数量是有限的, 但是部分分子之间可以实现一端退火, 把 2 个分子组装成一个分子, 突破了 2 个分子共转化效率低的瓶颈。目前, T4 DNA 聚合酶和 RecET 的协同作用是在大肠杆菌中进行直

接克隆最高效的方法<sup>[56]</sup>。

### 3.3 DNA 多片段组装技术

Wang 等开发的 ExoCET 技术还可以用于对多个 DNA 片段进行组装。与酿酒酵母的 TAR 克隆技术相比, ExoCET 技术只需要 3 d 时间就能实现多个 DNA 片段的组装, 而 TAR 克隆则需要至少 2 周; 与商业化的 Gibson 克隆技术相比, ExoCET 技术可以一次性将 20 个 DNA 片段组装成一个 50 kb 的质粒, 而 Gibson 则最多只能组装 5 个 DNA 片段; 而且 ExoCET 对于 DNA 序列的 GC 含量和重复序列不敏感, 适应性更好<sup>[56]</sup>。Song 等利用 ExoCET 技术对多杀菌素的生物合成基因簇进行人工设计以及体外多片段组装, 人工重构的多杀菌素基因簇在异源宿主中的表达产量显著提高<sup>[57]</sup>。

### 3.4 DNA 无痕修饰技术

联合使用反向筛选和同源重组工程可以对 DNA 序列进行无痕修饰, 包括敲除、替换和点突

变等。本文主要介绍利用 *sacB*、*rpsL* 和 *ccdB* 反向筛选标记基因结合同源重组工程进行无痕修饰技术的发展。

来自 *Bacillus subtilis* 的 *sacB* 基因是最早用于同源重组工程的反向筛选标记基因<sup>[15,24]</sup>。在 *E. coli* 细胞内, *sacB* 基因编码的胞外果聚糖蔗糖转移酶可以将蔗糖水解成葡萄糖和果聚糖,而果聚糖的富集对细菌会产生毒性。因为在没有蔗糖的培养基中, *SacB* 已经对细菌产生一定的毒性,从而导致 *sacB* 基因或者细菌染色体 DNA 的自发突变来逃逸毒性,因此产生大量选择本底。很多基因文库是用 pBACe3.6 载体和 pTARBAC 载体构建,其本身含有 *sacB* 基因,因此, *sacB* 不能用来修饰这些 BAC<sup>[24]</sup>。

*rpsL* 基因编码的核糖体蛋白 S12 亚基是链霉素的作用靶标。2011 年, Bird 等在 *E. coli* 细胞内利用 *rpsL-neo* 对 BAC 进行反向筛选修饰的时候,发现 *Redα* 的表达增加了分子内重复序列之间的重组概率,造成极高的筛选本底,而且仅表达 *Redβ* 和 *Redγ*,没有 *Redα* 也可以较低效率地完成 dsDNA (*rpsL-neo* PCR)和 BAC 的重组;继而在仅表达 *Redβ* 的情况下,用 ssDNA (合成的寡核苷酸)替换 BAC 上的反向筛选元件,可以有效解决重复序列的影响<sup>[58]</sup>。但是 *rpsL* 反向标记本身也具有 3 个缺点:

(1) 链霉素对光敏感导致选择不良,在选择菌落下常有本底生长;(2) 由于其需要伴随正向选择抗性基因,因此在插入反向选择基因组件后,需要对反向选择基因进行功能检测,排除突变;(3) *rpsL* 基因的自然突变概率为  $10^{-6}$ ,平板选择有明显的时间窗口,没有经验的技术人员往往会错过最佳时间。

2014 年, Wang 等将 *ccdB* 反向筛选与同源重组工程相结合,建立了新型无痕修饰系统,可对多拷贝质粒、BAC 和 *E. coli* 染色体等进行点突变和模块替换等无痕修饰<sup>[59]</sup>。*ccdB* 反向筛选具有的良好选择性源于其编码的 *CcdB* 毒性蛋白能够攻击 DNA 旋转酶 A 亚单位基因(*gyrA*),从而阻止 DNA

的复制,并且该系统不需要任何特殊的培养基或者试剂。因此,基于 *ccdB* 反向筛选与同源重组工程相结合的 DNA 无痕修饰技术,为科学工作者对 DNA 分子进行点突变和模块替换等修饰提供了有力的工具。然而有些 DNA 存在大量重复序列,如聚酮类和非核糖体多肽类化合物的生物合成基因簇,导致利用上述无痕修饰技术进行基因点突变和结构域替换等操作极具挑战性。2020 年, Song 等开发了 RedEx 基因编辑技术,该技术是将 *Redαβ* 蛋白介导的线环重组、*CcdB* 介导的反向筛选和核酸外切酶介导的体外同源重组结合到一起:首先,使用 *Redαβ* 蛋白介导线环重组,将设计的 DNA 片段与侧翼有独特限制性位点的正反向选择标记(抗生素抗性基因和 *ccdB* 反向筛选标记基因)一起插入基因簇的靶位点;然后,用限制性内切酶将载体线性化,以暴露两端 20 bp 同源臂;最后,通过核酸外切酶介导的体外退火,将末端重叠的线性 DNA 分子环化<sup>[60]</sup>。Song 等利用该技术成功对绿色生物农药多杀菌素聚酮合酶基因进行了异源结构域插入,获得了表达杀虫性能更好的丁烯基多杀菌素的生物合成基因簇<sup>[60]</sup>。

#### 4 噬菌体同源重组酶在其他细菌中的应用和开发

来源于 Lambda 噬菌体的同源重组酶 *Redα/Redβ* 或来源于 *Rac* 原噬菌体的同源重组酶 *RecE/RecT*,不仅能在 *E. coli* 中介导高效率的同源重组,而且能在与 *E. coli* 亲缘关系较近的菌株中发挥一定的重组功能(表 1)。

2003 年,胡堃等将表达 Lambda Red 重组系统的质粒转入 *Shigella flexneri* 中,并且利用带有 50 bp 同源臂的抗性基因替换掉其染色体上的 *alkA* 基因<sup>[61]</sup>。2003 年, Derbise 等将 Lambda Red 重组系统转入 *Yersinia pseudotuberculosis* 中,利用带有 500 bp 同源臂的抗性基因失活了其染色体上的目的基因<sup>[62]</sup>。利用 Lambda Red 重组系统进行遗传操作的菌株还涉及 *Serratia marcescens*<sup>[63]</sup>、*Salmonella*



*enterica* Serovar Typhimurium<sup>[64]</sup>、*Pseudomonas aeruginosa*<sup>[65]</sup>、*Burkholderia thailandensis*<sup>[66]</sup>、*B. pseudomallei*<sup>[66]</sup>、*Klebsiella pneumoniae*<sup>[67]</sup>、*Agrobacterium tumefaciens*<sup>[68]</sup> 以及 *Escherichia albertii*<sup>[68]</sup>。

Lambda Red 重组系统可以在与 *E. coli* 亲缘关系比较近的菌株中进行重组，但是在与 *E. coli* 亲缘关系较远的菌株中一般不能发挥重组功能。因此，寻找细菌本身的噬菌体同源重组酶，并建立其自身同源重组系统进而开发具有种属特异性的同源重组工程成为近年来的研究趋势(表 1)。

2007 年，Van Kessel 等在 *Mycobacterium tuberculosis* 的噬菌体 Che9c 基因组中找到了 RecE/RecT 同源蛋白对 Gp60/Gp61，并在此基础上建立了结合分枝杆菌的同源重组工程系统<sup>[70-71]</sup>。用同样的方法开发了重组系统的菌株，涉及 *P. syringae* pv. tomato DC3000<sup>[72]</sup>、*Lactococcus reuteri*<sup>[73-74]</sup>、*L. lactis*<sup>[73-74]</sup>、*Clostridium acetobutylicum*<sup>[75]</sup>、*B. subtilis*<sup>[76]</sup>、*Photobacterium luminescens*<sup>[77]</sup>、*Xenorhabdus stockiae*<sup>[77]</sup>、*Lactobacillus plantarum* WCFS1<sup>[78-79]</sup>、*Schlegelella brevitalea* DSM 7029<sup>[80-81]</sup>、*P. aeruginosa*<sup>[82]</sup>、*B. glumae*<sup>[83]</sup>和 *B. plantarii*<sup>[83]</sup>。

表 1 噬菌体同源重组酶在其他细菌中的应用和开发  
Table 1 Application and development of Red/ET in other bacteria

Species	Proteins				References
	5'→3' exonuclease	ssDNA annealing protein	Host exonuclease inhibitor	ssDNA binding protein	
<i>Shigella flexneri</i>	Redα (phage lambda)	Redβ (phage lambda)	Redγ (phage lambda)		[61]
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Redα (phage lambda)	Redβ (phage lambda)	Redγ (phage lambda)		[62]
<i>Serratia marcescens</i>	Redα (phage lambda)	Redβ (phage lambda)	Redγ (phage lambda)		[63]
<i>Salmonella enterica</i>	Redα (phage lambda)	Redβ (phage lambda)	Redγ (phage lambda)		[64]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Redα (phage lambda)	Redβ (phage lambda)	Redγ (phage lambda)		[65]
<i>Burkholderia thailandensis</i>	Redα (phage lambda)	Redβ (phage lambda)	Redγ (phage lambda)		[66]
<i>B. pseudomallei</i>	Redα (phage lambda)	Redβ (phage lambda)	Redγ (phage lambda)		[66]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Redα (phage lambda)	Redβ (phage lambda)	Redγ (phage lambda)		[68]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Redα (phage lambda)	Redβ (phage lambda)	Redγ (phage lambda)		[68]
<i>Escherichia albertii</i>	Redα (phage lambda)	Redβ (phage lambda)	Redγ (phage lambda)		[69]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Gp60 (phage Che9c)	Gp61 (phage Che9c)			[70-71]
<i>Pseudomonas syringae</i>	RecEPsy ( <i>P. syringae</i> )	RecTPsy ( <i>P. syringae</i> )			[72]
<i>Lactococcus reuteri</i>		RecTI ( <i>L. reuteri</i> )			[73-74]
<i>Lactococcus lactis</i>		RecTI ( <i>L. reuteri</i> )			[73-74]
<i>Clostridium acetobutylicum</i>		Cpf0939 ( <i>C. perfringens</i> )			[75]
<i>Bacillus subtilis</i>		GP35 (phage SSP1)			[76]
<i>Photobacterium luminescens</i>	Plu2936 ( <i>P. luminescens</i> )	Plu2935 ( <i>P. luminescens</i> )	Plu2934 ( <i>P. luminescens</i> )		[77]
<i>Xenorhabdus stockiae</i>	Plu2936 ( <i>P. luminescens</i> )	Plu2935 ( <i>P. luminescens</i> )	Plu2934 ( <i>P. luminescens</i> )		[77]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lp_0642 ( <i>L. plantarum</i> )	Lp_0641 ( <i>L. plantarum</i> )	Lp_0640 ( <i>L. plantarum</i> )		[78-79]
<i>Schlegelella brevitalea</i>	Redα7029 ( <i>S. brevitalea</i> )	Redβ7029 ( <i>S. brevitalea</i> )			[80-81]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A (phage Ab31)	B (phage Ab31)	Redγ (phage lambda)	S (phage Ab31)	[82]
<i>Pseudomonas putida</i>	A (phage Ab31)	B (phage Ab31)	Redγ (phage lambda)	S (phage Ab31)	[82]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	A (phage Ab31)	B (phage Ab31)	Redγ (phage lambda)	S (phage Ab31)	[82]
<i>Pseudomonas syringae</i>	A (phage Ab31)	B (phage Ab31)	Redγ (phage lambda)	S (phage Ab31)	[82]
<i>Burkholderia glumae</i>	RecE <sub>YI23</sub> ( <i>B. cordobensis</i> YI23)	RecT <sub>YI23</sub> ( <i>B. cordobensis</i> YI23)			[83]
<i>Burkholderia plantarii</i>	RecE <sub>YI23</sub> ( <i>B. cordobensis</i> YI23)	RecT <sub>YI23</sub> ( <i>B. cordobensis</i> YI23)			[83]

## 5 基于噬菌体同源重组酶的 DNA 重组工程技术的应用

### 5.1 噬菌体同源重组酶在微生物中用于次级代谢产物的挖掘

微生物次级代谢产物一直以来都是新药发现的重要来源。近年来,随着基因测序技术、基因组学和生物信息学的快速发展,在许多微生物的基因组中发现了大量沉默次级代谢产物的生物合成基因簇(Biosynthetic Gene Clusters, BGCs),其在实验室生长条件下无法表达或者表达量很低。因此,通过基因组挖掘来发现更多新颖的微生物次级代谢产物用于新药先导化合物的筛选成为一个研究热点。对于沉默生物合成基因簇的基因组挖掘主要有 2 个策略:第 1 个是在原宿主菌中靶向激活沉默生物合成基因簇,这种策略的前提是原宿主菌具有遗传操作系统或者能够在原宿主菌中构建一套遗传操作系统,然后通过启动子和调控元件修饰将沉默生物合成基因簇进行激活表达;第 2 个

是将沉默生物合成基因簇克隆至载体上,然后将其稳定地转移到一个合适的异源底盘宿主中进行表达(图 4)。

2015 年, Yin 等在 *P. luminescens* 和 *X. stockiae* 中构建了一套基于其原噬菌体同源重组酶的重组工程系统,并利用该系统在非核糖体多肽合成酶基因簇 *plu2670* 的前面插入了四环素诱导型启动子,进而成功地激活了该基因簇<sup>[77]</sup>。2018 年, Wang 等利用在 *Schlegella brevitalea* DSM 7029 中构建的同源重组工程系统成功地激活了 5 个沉默的生物合成基因簇<sup>[81]</sup>。Li 等在 *Burkholderia* 中构建了一套同源重组工程系统,并且利用该系统在伯克氏菌中成功激活了 3 个生物合成基因簇,并鉴定得到了一系列新的脂肽类化合物<sup>[83]</sup>。在细菌中构建同源重组工程系统,并将其应用于同属的菌株中对沉默生物合成基因簇进行激活,从而发现新的次级代谢产物已经成为基因组挖掘的一个新的研究方向(图 4)。

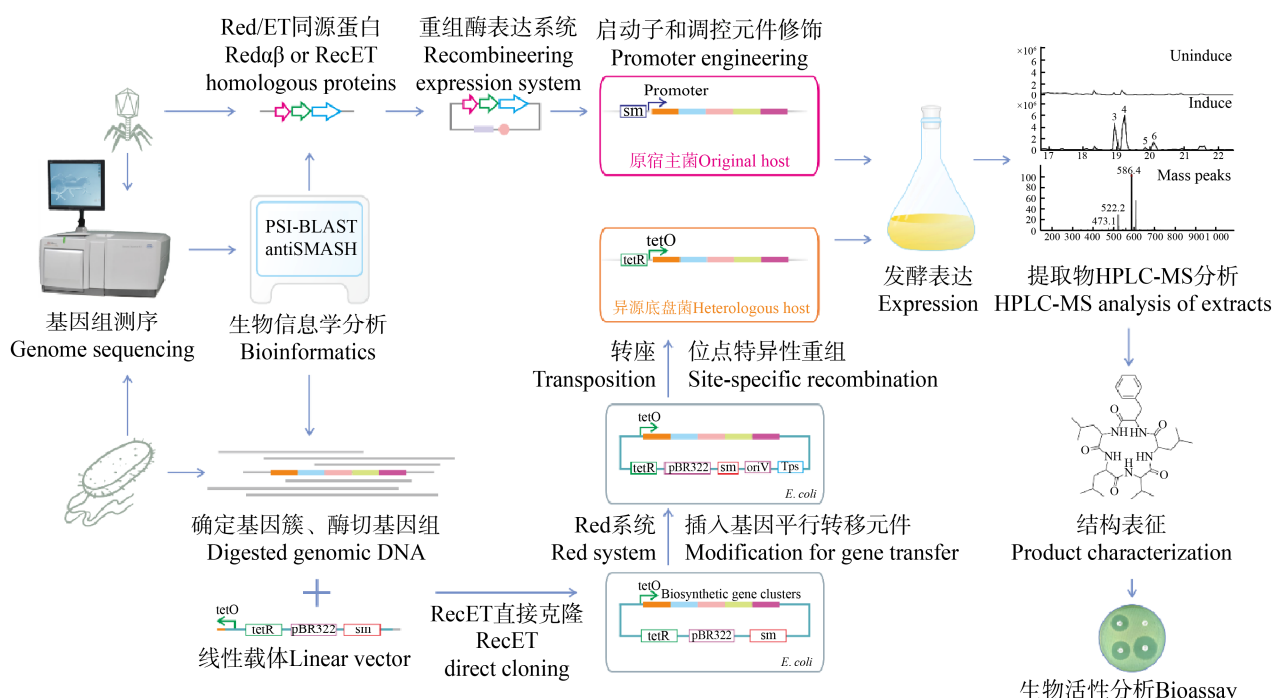


图 4 微生物沉默生物合成基因簇的基因组挖掘策略

Figure 4 Strategy of genome mining of silent biosynthetic gene clusters of microorganisms

目前,还有很多微生物没有可以利用的遗传操作系统,或者有的微生物存在培养非常困难的问题。因此,通过基因组序列分析发现的新的沉默生物合成基因簇只能通过异源表达的方式进行激活。此策略主要是通过直接克隆或者化学合成的方式得到生物合成基因簇,然后将生物合成基因簇克隆到表达载体上,并将其稳定转移到合适的底盘宿主中进行表达。Fu 等报道了全长 RecE 和 RecT 能够对较大的 DNA 片段进行直接克隆,利用这一技术, Fu 等从发光杆菌中直接克隆得到了 10 个沉默基因簇(10–50 kb),其中 2 个基因簇 *plu3263* (15.6 kb) 和 *plu1881–plu1877* (18.3 kb) 在大肠杆菌中实现了异源表达,得到了 Luminmides 和 Luminmycin 这 2 种化合物<sup>[47]</sup>。对于比较大的基因簇,可以采取分段克隆的手段先得到较小的片段,然后再利用同源重组工程将其组装到一个表达载体上。例如, Yin 等首先利用直接克隆技术从白色链霉菌 (*Streptomyces albus*) DSM41398 中得到盐霉素生物合成基因簇(106 kb)的 3 个片段(F1, 43 kb; F2, 33 kb; F3, 30 kb),然后利用 DNA 组装技术将 3 个片段组装到一个表达载体上,最终得到了盐霉素的完整生物合成基因簇并在天蓝色链霉菌 (*S. coelicolor*) A3(2)中实现了异源表达<sup>[85]</sup>。Xu 等在济南游动放线菌 (*Actinoplanes tsinanensis*) 中利用同源重组工程克隆了创新霉素的生物合成基因簇 (11 kb),并且在天蓝色链霉菌 (*S. coelicolor*) A3(2) 中实现了异源表达<sup>[86]</sup>。在直接克隆技术开发之前,获得大片段次级代谢产物生物合成基因簇的 DNA 需要柯斯质粒文库的构建,然后通过 Red 重组系统缝合 2 个柯斯质粒,在一个载体上获得完整的基因簇,从而完成 DNA 平行转移和异源表达<sup>[87–89]</sup>,整个工作费时费力。

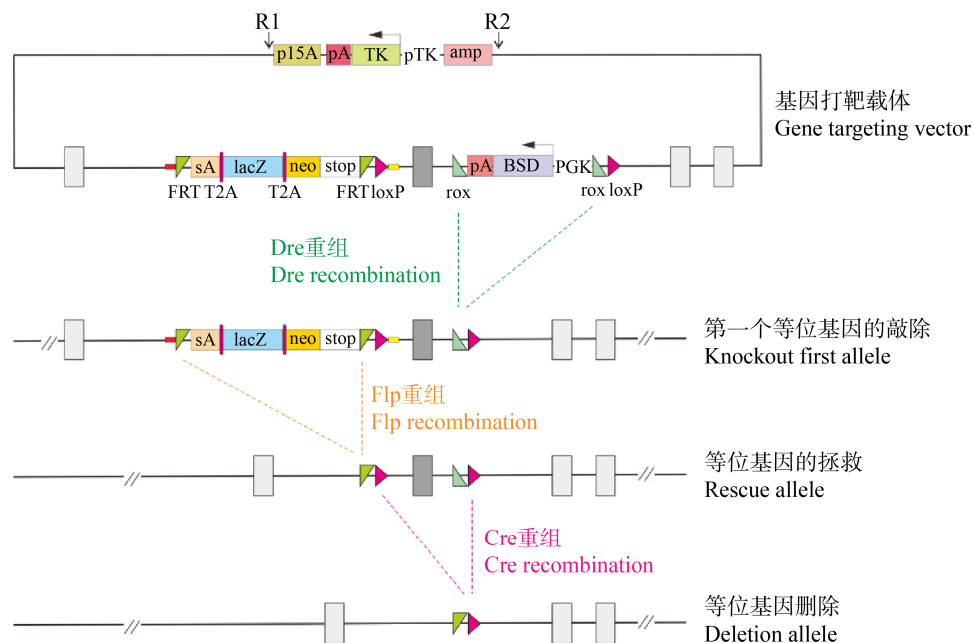
同源重组工程能够用于微生物中次级代谢产物的挖掘,通过对生物合成基因簇进行改造,尤其是启动子工程改造,可以极大地提高次级代谢产物的产量<sup>[90]</sup>。除此之外,利用同源重组工程开发的无痕修饰技术可以对次级代谢产物生物合成基因

簇的模块、结构域进行替换或者点突变,改变次级代谢产物的结构,发掘新的衍生物<sup>[60]</sup>。

## 5.2 动物和植物转基因载体的构建

在人类基因组计划完成以后,生命科学进入后基因组时代,其以揭示蛋白编码基因的功能以及调控机制为主要目标,其中重要的技术手段就是构建基因修饰的小鼠模型。基因打靶是定向改变生物活体遗传信息的技术,包括基因失活、缺失突变和点突变及外源基因定点引入等,使修饰后的遗传信息在生物活体内遗传并表达突变性状,从而研究基因功能,并提供相关疾病治疗和药物筛选评价模型<sup>[91]</sup>。目前,在胚胎干细胞中进行同源重组的技术已于 2007 年获得诺贝尔生理学或医学奖,该技术首先需要在大肠杆菌内构建基因打靶载体<sup>[92]</sup>,目前已经成为对小鼠染色体进行基因打靶的常规技术。

2003 年,Testa 等首先利用噬菌体重组酶介导的同源重组工程构建基因打靶载体,获得了混合性白血病 *Mil* 基因的条件敲除小鼠<sup>[18]</sup>。2010 年, Fu 等建立了利用同源重组工程高通量构建条件基因打靶载体的技术流程,从含有小鼠基因的 BAC 修饰开始到获得最终的基因打靶载体(图 5),需要 4 步 Red $\alpha$ /Red $\beta$  介导的 DNA 同源重组,整个实验可以在 9 d 内完成,重组子的选择在液体培养基里进行,因此可以扩展到 96 孔板的高通量模式<sup>[53]</sup>。欧洲条件性基因突变小鼠项目(European Conditional Mouse Mutagenesis Consortium, EUCOMM)利用该技术,构建了 12 000 个基因打靶载体,获得了 9 000 个条件性基因突变细胞系,建立了小鼠胚胎干细胞条件敲除突变资源库<sup>[93]</sup>。2016 年, Baker 等利用 RecET 介导的同源重组工程,一步将 4 个片段或者 5 个片段的 DNA 组装成一个质粒,快速构建基因打靶载体<sup>[94]</sup>。2017 年, Baker 等利用 Red 同源重组工程构建鼠源序列和人源序列嵌合 BAC 载体,在 Cas9 人工核酸酶的辅助下进行基因打靶,实现了 42 kb 人源基因序列和小鼠同源基因序列的原位替换,构建了 KMT2D 人源化小鼠模型<sup>[95]</sup>。

图 5 条件基因打靶策略和基因打靶载体<sup>[53]</sup>Figure 5 Conditional knockout strategy and gene targeting vector<sup>[53]</sup>

人和小鼠的 BAC 文库是含有人或小鼠基因随机片段的重组 DNA 克隆群体, BAC 克隆一般插入 150–220 kb 的外源 DNA, 对于大部分人或小鼠基因, 可以筛选到含有完整编码序列以及调控元件的 BAC 克隆, 是转基因技术的重要资源。2012 年, Rostovskaya 等利用 Red $\alpha$ /Red $\beta$  介导的 DNA 同源重组将 PiggyBac 和 Sleeping Beauty 转座酶识别的反向重复序列(Inverted Repeats, IR)精准插入 BAC 载体, 将修饰的 BAC 载体与转座酶表达质粒共转染, 首次实现人胚胎干细胞的 BAC 转基因<sup>[96]</sup>。利用 BAC 转座载体与 PiggyBac 转座酶 mRNA 一起进行小鼠受精卵的原核显微注射, 可以快速获得转基因小鼠<sup>[97]</sup>。

对于植物转基因, 噬菌体重组酶介导的 DNA 同源重组工程对于高效构建转基因载体也发挥了积极的作用。2020 年, Brumos 等开发了用于高通量植物转基因载体构建的 DNA 同源重组工程工具箱, 他们以 BAC 载体为基础, 利用 Red $\alpha$ /Red $\beta$  介导的 DNA 同源重组, 对 62 个与生长素相关的基

因融合了蛋白标签, 随后通过 Flp 介导的盒式交换技术(Recombinase Mediated Cassette Exchange, RMCE)将 BAC 载体替换为二元载体(Binary Vectors), 最终通过农杆菌介导的植物转基因技术获得拟南芥突变株(图 6)<sup>[98]</sup>。

### 5.3 病毒基因组的克隆和修饰

病毒反向遗传学是采用病毒的遗传材料在培养的细胞中重新拯救出活病毒, 该技术一般需要在细菌质粒中克隆病毒基因组的 DNA 拷贝或者 cDNA 序列, 构建感染性克隆能够用于病毒基因功能研究, 开发病毒载体疫苗或者构建基因治疗载体。

病毒基因组的大小可以超过 200 kb, 例如疱疹病毒的基因组在 105–235 kb 之间。DNA 同源重组工程成功突破了大型病毒基因组修饰的局限性, 牛痘病毒、疱疹病毒和杆状病毒的基因组在 BAC 上可以直接修饰。随后, 将 BAC 转染到哺乳动物细胞中进行病毒拯救, 这样可以直接获得纯净的重组病毒, 然而在细胞内通过基因打靶获得的重组病毒需要烦琐的纯化步骤。

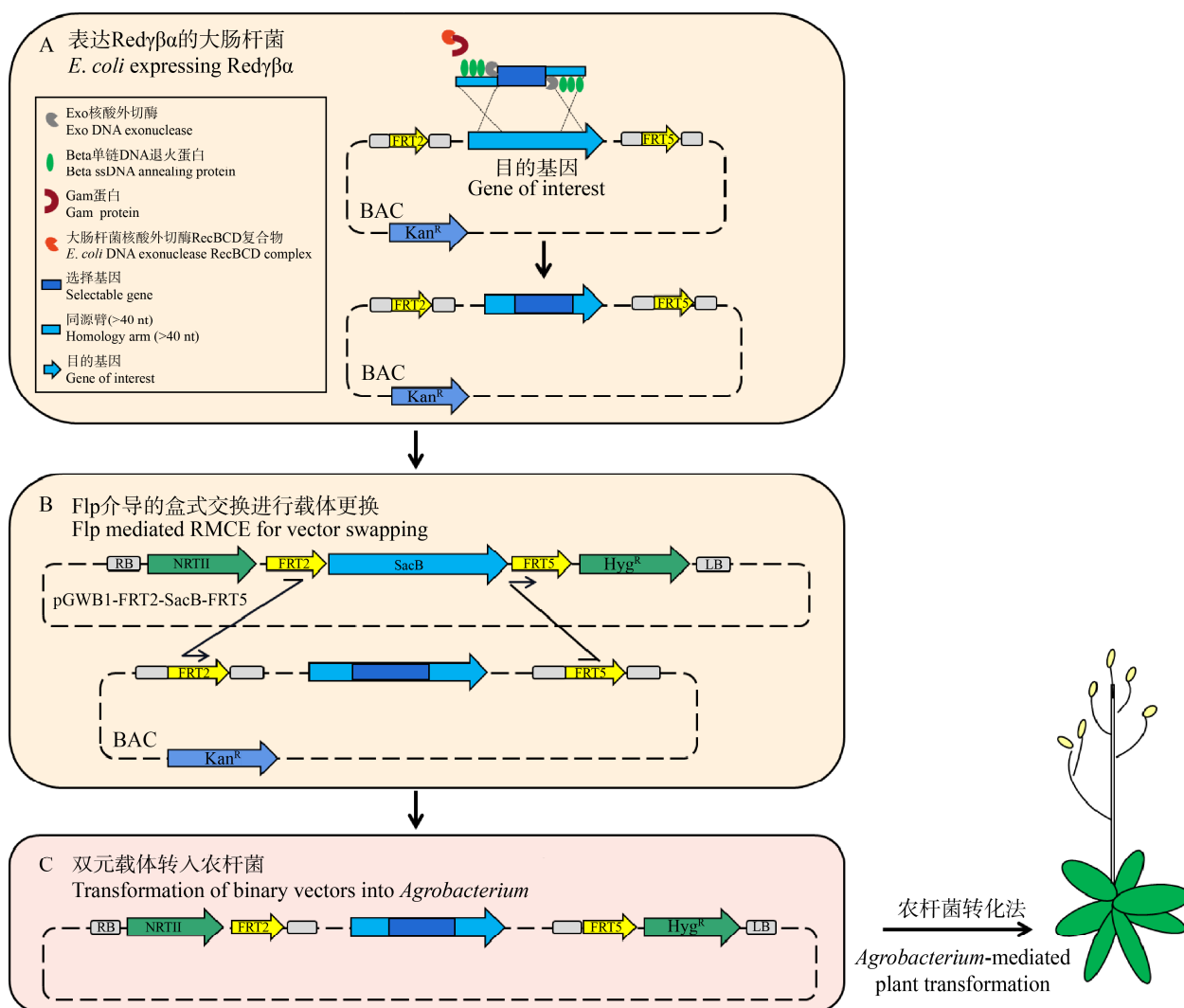


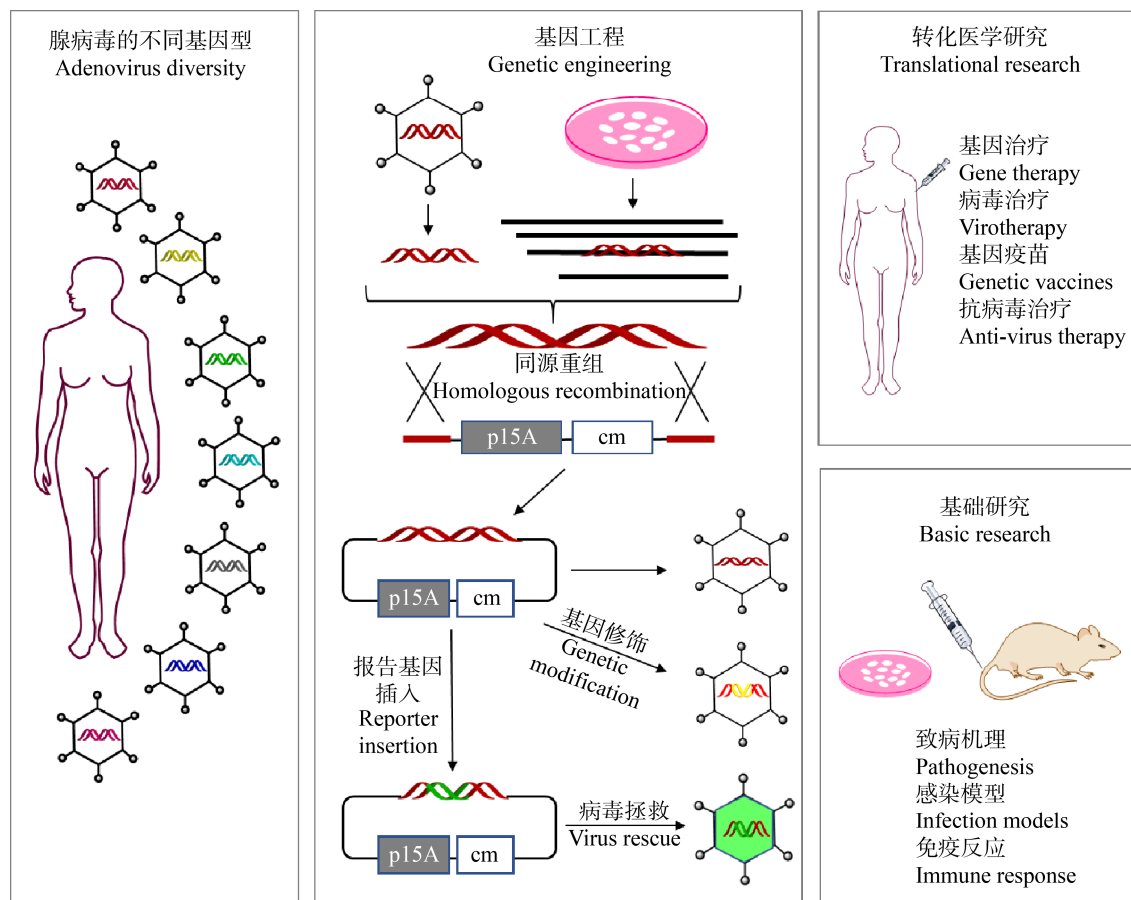
图6 利用同源重组工程技术构建植物转基因载体的方案<sup>[98]</sup>  
Figure 6 An improved recombineering toolset for plants<sup>[98]</sup>

2017年, Zhang等<sup>[98]</sup>利用RecET直接克隆技术构建了首个人腺病毒DNA文库, 包括32个基因型。RecET重组酶可以将完整的人腺病毒DNA直接克隆在p15A质粒上, 利用Red重组酶在E3区克隆CAG启动子表达绿色荧光蛋白和荧光素酶基因, 拯救出带有双报告基因的病毒, 感染小鼠并进行活体成像, 示踪不同基因型病毒的组织特异性<sup>[99]</sup>(图7)。由于RecET直接克隆的高效性, 可以从临床样本中直接将腺病毒DNA克隆到p15A质粒上进行分析, 为快速病例诊断提供了新方法<sup>[99]</sup>。

对噬菌体的遗传改造不仅是为了研究其基因功

能, 开发人工噬菌体用于细菌的精准控制、检测和诊断, 作为人、动物、植物及食物的生物抑菌剂, 而且人工噬菌体可以超越其抗菌作用, 作为药物的载体或者疫苗。噬菌体的遗传操作包括体外改造和体内改造, 其中体外改造包括人工合成全长噬菌体核酸<sup>[100]</sup>、在酵母里进行噬菌体基因的组装<sup>[101]</sup>, 以及体外转录和翻译的无细胞体系里进行噬菌体的同源重组<sup>[102]</sup>。噬菌体的体内改造可以利用细菌自身的同源重组系统<sup>[103]</sup>, CRISPR-Cas系统可以作为反向筛选降解未被遗传修饰的噬菌体<sup>[104]</sup>, 来源于噬菌体的重组酶也被用来进行噬菌体的同源重组。



图 7 人腺病毒基因组文库及其广泛的应用<sup>[99]</sup>Figure 7 An engineered human adenovirus library and its broad applications<sup>[99]</sup>

利用噬菌体重组酶介导的同源重组工程对噬菌体进行遗传改造,目前主要是针对大肠杆菌和沙门氏菌的噬菌体,其方法是將 RecE/RecT 或 Red $\alpha$ /Red $\beta$  在细菌里进行调控表达,然后将噬菌体 DNA 和用于同源重组的 DNA 共同电转化。2012 年, Fehér 等利用 RecE/RecT 同源重组工程删除 P1 噬菌体的转座子 IS1,发现删除 IS1 的噬菌体生物学特性没有改变,从而构建了一个没有潜在转座子污染的大肠杆菌基因工程载体<sup>[105]</sup>。2014 年, Shin 等用 RecE/RecT 同源重组工程对沙门氏菌温和噬菌体 SPN9CC 进行遗传修饰,发现 cl 敲除的噬菌体由温和转为烈性,为人工将温和噬菌体改造成用于生物防治的烈性噬菌体提供了新方法<sup>[106]</sup>。2004 年, Oppenheim 等应用 Red $\alpha$ /Red $\beta$

重组系统电转化人工合成的寡核苷酸,通过 80 个核苷酸的 ssDNA 在 Lambda 噬菌体上实现了点突变,同时也尝试了基因删除和置换,验证了 Red 重组系统对于噬菌体修饰的有效性<sup>[107]</sup>。

## 6 总结

基于噬菌体同源重组酶 Red $\alpha$ /Red $\beta$  和 RecE/RecT 开发的 DNA 同源重组工程在 1998 年被开发出来,是分子生物学技术的一个里程碑。该技术能够对靶标 DNA 分子进行快速、精准、高效的修饰,包括直接克隆、亚克隆、插入、删除、替换、点突变等,具有不受限制性内切酶识别位点和 DNA 分子大小限制的优势。同源重组工程不仅仅在大肠杆菌中对 DNA 进行修饰,在其他细菌中也开发了基于具有种属特异性的噬菌体同源重组酶的高效遗传操作



系统,促进了生物功能基因的研究。

近年来, DNA 同源重组工程延伸开发了一系列技术,包括可以对 DNA 大片段进行直接克隆以及可以用于多片段 DNA 组装的 ExoCET 技术,可以对 DNA 尤其是具有大量重复序列的生物合成基因簇进行无痕修饰的 RedEx 基因编辑技术等。这为微生物基因组挖掘以及次级代谢产物生物合成机理的研究提供了有力的工具。作为分子生物学源头技术,同源重组工程在生命科学领域的方方面面都发挥了重要作用,尤其是在动植物转基因以及病毒基因组克隆和修饰方面取得了显著成效。

## REFERENCES

- [1] Groth AC, Calos MP. Phage integrases: biology and applications[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 335(3): 667-678
- [2] Smith MCM, Thorpe HM. Diversity in the serine recombinases[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 44(2): 299-307
- [3] Esposito D, Scocca JJ. The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(18): 3605-3614
- [4] Enquist LW, Kikuchi A, Weisberg RA. The role of  $\lambda$  integrase in integration and excision[J]. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1979, 43: 1115-1120
- [5] Austin S, Ziese M, Sternberg N. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons[J]. *Cell*, 1981, 25(3): 729-736
- [6] Anastasiadis K, Fu J, Patsch C, Hu SB, Weidlich S, Duerschke K, Buchholz F, Edenhofer F, Stewart AF. Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in *E. coli*, mammalian cells and mice[J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2009, 2(9/10): 508-515
- [7] Broach JR, Guarascio VR, Jayaram M. Recombination within the yeast plasmid 2 $\mu$  circle is site-specific[J]. *Cell*, 1982, 29(1): 227-234
- [8] Colloms SD, Sykora P, Szatmari G, Sherratt DJ. Recombination at ColE1 *cer* requires the *Escherichia coli xerC* gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(12): 6973-6980
- [9] Kuhstoss S, Rao RN. Analysis of the integration function of the streptomyces bacteriophage  $\phi$ C31[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1991, 222(4): 897-908
- [10] Zhang L, Ou XJ, Zhao GP, Ding XM. Highly efficient *in vitro* site-specific recombination system based on *Streptomyces* phage  $\phi$ BT1 integrase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(19): 6392-6397
- [11] Krasnow MA, Cozzarelli NR. Site-specific relaxation and recombination by the Tn3 resolvase: recognition of the DNA path between oriented res sites[J]. *Cell*, 1983, 32(4): 1313-1324
- [12] Katzen F. Gateway<sup>®</sup> recombinational cloning: a biological operating system[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2007, 2(4): 571-589
- [13] Long DP, Tan B, Zhao AC, Xu LX, Xiang ZH. Progress in Cre/lox site-specific recombination system in higher eukaryotes[J]. *Hereditas*, 2012, 34(2): 177-189 (in Chinese) 龙定沛, 谭兵, 赵爱春, 许龙霞, 向仲怀. Cre/lox 位点特异性重组系统在高等真核生物中的研究进展[J]. *遗传*, 2012, 34(2): 177-189
- [14] Thomason LC, Calendar R, Ow DW. Gene insertion and replacement in *Schizosaccharomyces pombe* mediated by the *Streptomyces* bacteriophage  $\phi$ IC31 site-specific recombination system[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 265(6): 1031-1038
- [15] Zhang YM, Buchholz F, Muylers JPP, Francis Stewart A. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*[J]. *Nature Genetics*, 1998, 20(2): 123-128
- [16] Muylers JPP, Zhang YM, Testa G, Stewart AF. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(6): 1555-1557
- [17] Zhang Y, Yin YB, Chen YJ, Gao G, Yu P, Luo JC, Jiang Y. PCAS: a precomputed proteome annotation database resource[J]. *BMC Genomics*, 2003, 4(1): 42
- [18] Testa G, Zhang YM, Vintersten K, Benes V, Pijnappel WWMP, Chambers I, Smith AJH, Smith AG, Stewart AF. Engineering the mouse genome with bacterial artificial chromosomes to create multipurpose alleles[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(4): 443-447
- [19] Muylers JPP, Zhang YM, Stewart AF. Techniques: recombinogenic engineering-new options for cloning and manipulating DNA[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, 26(5): 325-331
- [20] Ellis HM, Yu D, DiTizio T, Court DL. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(12): 6742-6746
- [21] Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2(10): 769-779
- [22] Zhang YM, Muylers JPP, Testa G, Francis Stewart A. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(12): 1314-1317
- [23] Muylers JP, Zhang Y, Buchholz F, Stewart AF. RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners[J]. *Genes & Development*, 2000, 14(15): 1971-1982
- [24] Muylers JP, Zhang Y, Benes V, Testa G, Ansorge W,

- Stewart AF. Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination[J]. *EMBO Reports*, 2000, 1(3): 239-243
- [25] Shulman MJ, Hallick LM, Echols H, Signer ER. Properties of recombination-deficient mutants of bacteriophage lambda[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1970, 52(3): 501-520
- [26] Remaut E, Stanssens P, Fiers W. Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the PL promoter of coliphage lambda[J]. *Gene*, 1981, 15(1): 81-93
- [27] Little JW, Lehman IR, Kaiser AD. An exonuclease induced by bacteriophage  $\lambda$ [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242(4): 672-678
- [28] Masamune Y, Fleischman RA, Richardson CC. Enzymatic removal and replacement of nucleotides at single strand breaks in deoxyribonucleic acid[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1971, 246(8): 2680-2691
- [29] Zhang JJ, McCabe KA, Bell CE. Crystal structures of lambda exonuclease in complex with DNA suggest an electrostatic ratchet mechanism for processivity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(29): 11872-11877
- [30] Subramanian K, Rutvisuttinunt W, Scott W, Myers RS. The enzymatic basis of processivity in lambda exonuclease[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(6): 1585-1596
- [31] Van Oijen AM. Single-molecule kinetics of exonuclease reveal base dependence and dynamic disorder[J]. *Science*, 2003, 301(5637): 1235-1238
- [32] Perkins TT, Dalal RV, Mitsis PG, Block SM. Sequence-dependent pausing of single lambda exonuclease molecules[J]. *Science*, 2003, 301(5641): 1914-1918
- [33] Karakousis G, Ye N, Li Z, Chiu SK, Reddy G, Radding CM. The beta protein of phage  $\lambda$  binds preferentially to an intermediate in DNA renaturation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 276(4): 721-731
- [34] Venkatesh TV, Radding CM. Ribosomal protein S1 and NusA protein complexed to recombination protein beta of phage lambda[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(6): 1844-1846
- [35] Caldwell BJ, Zakharova E, Filsinger GT, Wannier TM, Hempfling JP, Chun-Der L, Pei DH, Church GM, Bell CE. Crystal structure of the Red $\beta$  C-terminal domain in complex with  $\lambda$  exonuclease reveals an unexpected homology with  $\lambda$  Orf and an interaction with *Escherichia coli* single stranded DNA binding protein[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(4): 1950-1963
- [36] Filsinger GT, Wannier TM, Pedersen FB, Lutz ID, Zhang JL, Stork DA, Debnath A, Gozzi K, Kuchwara H, Volf V, et al. Characterizing the portability of phage-encoded homologous recombination proteins[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(4): 394-402
- [37] Passy SI, Yu X, Li Z, Radding CM, Egelman EH. Rings and filaments of protein from bacteriophage suggest a superfamily of recombination proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(8): 4279-4284
- [38] Erler A, Wegmann S, Elie-Caille C, Bradshaw CR, Maresca M, Seidel R, Habermann B, Muller DJ, Stewart AF. Conformational adaptability of Red $\beta$  during DNA annealing and implications for its structural relationship with Rad52[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 391(3): 586-598
- [39] Caldwell BJ, Norris A, Zakharova E, Smith CE, Wheat CT, Choudhary D, Sotomayor M, Wysocki VH, Bell CE. Oligomeric complexes formed by Red $\beta$  single strand annealing protein in its different DNA bound states[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(6): 3441-3460
- [40] Taylor A, Smith GR. Unwinding and rewinding of DNA by the RecBC enzyme[J]. *Cell*, 1980, 22(2): 447-457
- [41] Murphy KC. Lambda Gam protein inhibits the helicase and Chi-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(18): 5808-5821
- [42] Murphy KC. The  $\lambda$  gam protein inhibits RecBCD binding to dsDNA ends[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 371(1): 19-24
- [43] Paškvan I, Salaj-Šmic E, Ivančić-Baće I, Zahradka K, Trgovčević Ž, Brčić-Kostić K. The genetic dependence of RecBCD-Gam mediated double strand end repair in *Escherichia coli*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 205(2): 299-303
- [44] Barbour SD, Nagaishi H, Templin A, Clark AJ. Biochemical and genetic studies of recombination proficiency in *Escherichia coli*, II. rec<sup>+</sup> revertants caused by indirect suppression of rec-mutations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1970, 67(1): 128-135
- [45] Joseph JW, Kolodner R. Exonuclease VIII of *Escherichia coli*. II. Mechanism of action[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258(17): 10418-10424
- [46] Chang HW, Julin DA. Structure and function of the *Escherichia coli* RecE protein, a member of the RecB nuclease domain family[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(49): 46004-46010
- [47] Fu J, Bian XY, Hu S, Wang HL, Huang F, Seibert PM, Plaza A, Xia LQ, Müller R, Francis Stewart A, et al. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 440-446
- [48] Thresher RJ, Makhov AM, Hall SD, Kolodner R, Griffith JD. Electron microscopic visualization of RecT protein and its complexes with DNA[J]. *Journal of Molecular Biology*,

- 1995, 254(3): 364-371
- [49] Noirot P, Gupta RC, Radding CM, Kolodner RD. Hallmarks of homology recognition by RecA-like recombinases are exhibited by the unrelated *Escherichia coli* RecT protein[J]. The EMBO Journal, 2003, 22(2): 324-334
- [50] Muniyappa K, Radding CM. The homologous recombination system of phage lambda. Pairing activities of beta protein[J]. Journal of Biological Chemistry, 1986, 261(16): 7472-7478
- [51] Maresca M, Erler A, Fu J, Friedrich A, Zhang YM, Stewart AF. Single-stranded heteroduplex intermediates in lambda Red homologous recombination[J]. BMC Molecular Biology, 2010, 11: 54
- [52] Lim SI, Min BE, Jung GY. Lagging strand-biased initiation of red recombination by linear double-stranded DNAs[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 384(5): 1098-1105
- [53] Fu J, Teucher M, Anastassiadis K, Skarnes W, Stewart AF. A recombineering pipeline to make conditional targeting constructs[J]. Methods in Enzymology, 2010, 477: 125-144
- [54] Wang JP, Sarov M, Rientjes J, Hu J, Hollak H, Kranz H, Xie Y, Stewart AF, Zhang YM. An improved recombineering approach by adding RecA to  $\lambda$  Red recombination[J]. Molecular Biotechnology, 2006, 32(1): 43-53
- [55] Wang HL, Li Z, Jia RN, Hou Y, Yin J, Bian XY, Li AY, Müller R, Stewart AF, Fu J, et al. RecET direct cloning and Red $\alpha\beta$  recombineering of biosynthetic gene clusters, large operons or single genes for heterologous expression[J]. Nature Protocols, 2016, 11(7): 1175-1190
- [56] Wang HL, Li Z, Jia RN, Yin J, Li AY, Xia LQ, Yin YL, Müller R, Fu J, Stewart AF, et al. ExoCET: exonuclease *in vitro* assembly combined with RecET recombination for highly efficient direct DNA cloning from complex genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(5): e28
- [57] Song CY, Luan J, Cui QW, Duan QY, Li Z, Gao YS, Li RJ, Li AY, Shen YM, Li YZ, et al. Enhanced heterologous spinosad production from a 79-kb synthetic multioperon assembly[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(1): 137-147
- [58] Bird AW, Erler A, Fu J, Hériché JK, Maresca M, Zhang YM, Hyman AA, Francis Stewart A. High-efficiency counterselection recombineering for site-directed mutagenesis in bacterial artificial chromosomes[J]. Nature Methods, 2012, 9(1): 103-109
- [59] Wang HL, Bian XY, Xia LQ, Ding XZ, Müller R, Zhang YM, Fu J, Stewart AF. Improved seamless mutagenesis by recombineering using ccdB for counterselection[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(5): e37
- [60] Song CY, Luan J, Li RJ, Jiang CJ, Hou Y, Cui QW, Cui TQ, Tan L, Ma ZC, Tang YJ, et al. RedEx: a method for seamless DNA insertion and deletion in large multimodular polyketide synthase gene clusters[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(22): e130
- [61] Hu K, Shi ZX, Wang HL, Feng EL, Huang LY. Study on gene knockout using red system in *Shigella flexneri*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(6): 740-746 (in Chinese)  
胡堃, 史兆兴, 王恒樑, 冯尔玲, 黄留玉. Red 重组系统在痢疾杆菌基因敲除中的应用研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(6): 740-746
- [62] Derbise A, Lesic B, Dacheux D, Ghigo JM, Carniel E. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2003, 38(2): 113-116
- [63] Rossi MS, Paquelin A, Ghigo JM, Wandersman C. Haemophore-mediated signal transduction across the bacterial cell envelope in *Serratia marcescens*: the inducer and the transported substrate are different molecules[J]. Molecular Microbiology, 2003, 48(6): 1467-1480
- [64] Karlinsey JE, Hughes KT. Genetic transplantation: *Salmonella enterica* serovar typhimurium as a host to study Sigma factor and anti-Sigma factor interactions in genetically intractable systems[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(1): 103-114
- [65] Lesic B, Rahme LG. Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. BMC Molecular Biology, 2008, 9: 20
- [66] Kang Y, Norris MH, Wilcox BA, Tuanyok A, Keim PS, Hoang TT. Knockout and pullout recombineering for naturally transformable *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia pseudomallei*[J]. Nature Protocols, 2011, 6(8): 1085-1104
- [67] Wei D, Wang M, Shi JP, Hao J. Red recombinase assisted gene replacement in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(8): 1219-1226
- [68] Hu SB, Fu J, Huang F, Ding XZ, Stewart AF, Xia LQ, Zhang YM. Genome engineering of *Agrobacterium tumefaciens* using the lambda Red recombination system[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(5): 2165-2172
- [69] Egan M, Ramirez J, Xander C, Upreti C, Bhatt S. Lambda red-mediated recombineering in the attaching and effacing pathogen *Escherichia albertii*[J]. Biological Procedures Online, 2016, 18(1): 3
- [70] Van Kessel JC, Hatfull GF. Efficient point mutagenesis in *Mycobacteria* using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets[J]. Molecular Microbiology, 2008, 67(5): 1094-1107
- [71] Van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Nature Methods, 2007, 4(2): 147-152
- [72] Swingle B, Bao ZM, Markel E, Chambers A, Cartinhour S. Recombineering using RecTE from *Pseudomonas syringae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010,

- 76(15): 4960-4968
- [73] Van Pijkeren JP, Neoh KM, Sirias D, Findley AS, Britton RA. Exploring optimization parameters to increase ssDNA recombineering in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus reuteri*[J]. Bioengineered, 2012, 3(4): 209-217
- [74] Van Pijkeren JP, Britton RA. High efficiency recombineering in lactic acid bacteria[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(10): e76
- [75] Dong HJ, Tao WW, Gong FY, Li Y, Zhang YP. A functional recT gene for recombineering of *Clostridium*[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 173: 65-67
- [76] Sun ZP, Deng AH, Hu T, Wu J, Sun QY, Bai H, Zhang GQ, Wen TY. A high-efficiency recombineering system with PCR-based ssDNA in *Bacillus subtilis* mediated by the native phage recombinase GP35[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(12): 5151-5162
- [77] Yin J, Zhu HB, Xia LQ, Ding XZ, Hoffmann T, Hoffmann M, Bian XY, Müller R, Fu J, Stewart AF, et al. A new recombineering system for *Photobacterium* and *Xenorhabdus*[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(6): e36
- [78] Ventura M, Canchaya C, Kleerebezem M, De Vos WM, Siezen RJ, Brüssow H. The prophage sequences of *Lactobacillus plantarum* strain WCFS1[J]. Virology, 2003, 316(2): 245-255
- [79] Yang P, Wang J, Qi QS. Prophage recombinases-mediated genome engineering in *Lactobacillus plantarum*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 154
- [80] Tang B, Yu YC, Liang JH, Zhang YM, Bian XY, Zhi XY, Ding XM. Reclassification of '*Polyangium brachysporum*' DSM 7029 as *Schlegelella brevitalea* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(9): 2877-2883
- [81] Wang X, Zhou HB, Chen HN, Jing XS, Zheng WT, Li RJ, Sun T, Liu JQ, Fu J, Huo LJ, et al. Discovery of recombinases enables genome mining of cryptic biosynthetic gene clusters in *Burkholderiales* species[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(18): E4255-E4263
- [82] Yin J, Zheng WT, Gao YS, Jiang CJ, Shi HB, Diao XT, Li SS, Chen HN, Wang HL, Li RJ, et al. Single-stranded DNA-binding protein and exogenous RecBCD inhibitors enhance phage-derived homologous recombination in *Pseudomonas*[J]. iScience, 2019, 14: 1-14
- [83] Li RJ, Shi HB, Zhao XY, Liu XQ, Duan Q, Song CY, Chen HN, Zheng WT, Shen QY, Wang MQ, et al. Development and application of an efficient recombineering system for *Burkholderia glumae* and *Burkholderia plantarii*[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(4): 1809-1826
- [84] Bian XY, Plaza A, Zhang YM, Müller R. Luminmycins A-C, cryptic natural products from *Photobacterium luminescens* identified by heterologous expression in *Escherichia coli*[J]. Journal of Natural Products, 2012, 75(9): 1652-1655
- [85] Yin J, Hoffmann M, Bian XY, Tu Q, Yan F, Xia LQ, Ding XZ, Francis Stewart A, Muller R, Fu J, et al. Direct cloning and heterologous expression of the salinomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces albus* DSM41398 in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 15081
- [86] Xu XK, Zhou HB, Liu Y, Liu XT, Fu J, Li AY, Li YZ, Shen YM, Bian XY, Zhang YM. Heterologous expression guides identification of the biosynthetic gene cluster of chuangxinmycin, an indole alkaloid antibiotic[J]. Journal of Natural Products, 2018, 81(4): 1060-1064
- [87] Fu J, Wenzel SC, Perlova O, Wang JP, Gross F, Tang ZR, Yin YL, Stewart AF, Müller R, Zhang YM. Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(17): e113
- [88] Perlova O, Fu J, Kuhlmann S, Krug D, Stewart AF, Zhang YM, Müller R. 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
- [89] Wenzel SC, Gross F, Zhang YM, Fu J, Stewart AF, Müller R. Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in pseudomonads via Red/ET recombineering[J]. Chemistry & Biology, 2005, 12(3): 349-356
- [90] Tu Q, Herrmann J, Hu SB, Raju R, Bian XY, Zhang YM, Müller R. Genetic engineering and heterologous expression of the disorazol biosynthetic gene cluster via Red/ET recombineering[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 21066
- [91] Gurumurthy CB, Saunders T, Ohtsuka M. Designing and generating a mouse model: frequently asked questions[J]. The Journal of Biomedical Research, 2021, 35: 76-90
- [92] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells[J]. Cell, 1987, 51(3): 503-512
- [93] Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function[J]. Nature, 2011, 474(7351): 337-342
- [94] Baker O, Gupta A, Obst M, Zhang YM, Anastassiadis K, Fu J, Stewart AF. RAC-tagging: recombineering and Cas9-assisted targeting for protein tagging and conditional analyses[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 25529
- [95] Baker O, Tsurkan S, Fu J, Klink B, Rump A, Obst M, Kranz A, Schröck E, Anastassiadis K, Stewart AF. The contribution of homology arms to nuclease-assisted genome engineering[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(13): 8105-8115

- [96] Rostovskaya M, Fu J, Obst M, Baer I, Weidlich S, Wang HL, Smith AJH, Anastassiadis K, Stewart AF. Transposon-mediated BAC transgenesis in human ES cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(19): e150
- [97] Rostovskaya M, Naumann R, Fu J, Obst M, Mueller D, Stewart AF, Anastassiadis K. Transposon mediated BAC transgenesis via pronuclear injection of mouse zygotes[J]. *Genesis*, 2013, 51(2): 135-141
- [98] Brumos J, Zhao C, Gong Y, Soriano D, Patel AP, Perez-Amador MA, Stepanova AN, Alonso JM. An improved recombineering toolset for plants[J]. *Plant Cell*, 2020, 32(1): 100-122
- [99] Zhang WL, Fu J, Liu J, Wang HL, Schiwon M, Janz S, Schaffarczyk L, Von Der Goltz L, Ehrke-Schulz E, Dörner J, et al. An engineered virus library as a resource for the spectrum-wide exploration of virus and vector diversity[J]. *Cell Reports*, 2017, 19(8): 1698-1709
- [100] Smith HO, Hutchison CA, Pfannkoch C, Venter JC. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(26): 15440-15445
- [101] Ando H, Lemire S, Pires DP, Lu TK. Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing[J]. *Cell Systems*, 2015, 1(3): 187-196
- [102] Shin J, Jardine P, Noireaux V. Genome replication, synthesis, and assembly of the bacteriophage T7 in a single cell-free reaction[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1(9): 408-413
- [103] Loessner MJ, Rees CE, Stewart GS, Scherer S. Construction of luciferase reporter bacteriophage A511: for rapid and sensitive detection of viable *Listeria* cells[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(4): 1133-1140
- [104] Kiro R, Shitrit D, Qimron U. Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system[J]. *RNA Biology*, 2014, 11(1): 42-44
- [105] Fehér T, Karcagi I, Blattner FR, Pósfai G. Bacteriophage recombineering in the lytic state using the lambda red recombinases[J]. *Microbial Biotechnology*, 2012, 5(4): 466-476
- [106] Shin H, Lee JH, Yoon H, Kang DH, Ryu S. Genomic investigation of lysogen formation and host lysis systems of the *Salmonella* temperate bacteriophage SPN9CC[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(1): 374-384
- [107] Oppenheim AB, Rattray AJ, Bubunenko M, Thomason LC, Court DL. *In vivo* recombineering of bacteriophage  $\lambda$  by PCR fragments and single-strand oligonucleotides[J]. *Virology*, 2004, 319(2): 185-189