

## DNA 重组技术的研究综述

张亚旭

广州复能基因有限公司, 广州 510663

**摘要:** DNA 重组技术,即 DNA 克隆技术的研究和运用是现代生物学发展的一个重要分支,是分子生物学发展的突出领域。本文介绍了 DNA 重组的类型及相关的生物学概念;综述了目前已报道的传统的酶切-连接经典克隆方法、位点特异性重组克隆方法、以及同源重组克隆方法,重点阐述了各自的原理、步骤、特点及实际应用等方面;最后归纳总结了各种方法的优缺点和应用范围,并对该技术的科研成果进行了回顾和对未来的研究进行了展望。

**关键词:** DNA 重组;基因克隆;经典克隆;位点特异性重组克隆;同源重组克隆

**DOI:**10.3969/j.issn.2095-2341.2012.01.11

## Research Summary on DNA Recombination Technology

ZHANG Ya-xu

Guangzhou FuleGen Co., Ltd., Guangzhou 510663, China

**Abstract:** The research and application of DNA recombination technology, i. e. DNA cloning technology is an important branch of the development of modern biology and outstanding area of molecular biology. The paper started from the types and the related biological concepts of DNA recombination, summarized the traditional digestion-ligation classical cloning method, site-specific recombination cloning method and homologous recombination cloning method had been reported at present. The aspects of respective principles, steps, characteristics and practical applications were focused on. Finally, an induction of respective merits and drawbacks and application scopes of these methods and the review for achievements and the prospect for future were described.

**Key words:** DNA recombination; gene cloning; classical cloning; site-specific recombination cloning; homologous recombination cloning

现代生物学研究在很大程度上要依赖于重组 DNA 技术。细胞内发生的 DNA 重组现象,称为体内(*in vivo*)重组。由于新技术的发展,现在可以由人工操作在细胞外进行 DNA 重组,称为体外(*in vitro*)重组。人工重组的 DNA 分子可以送回活细胞里面去<sup>[1]</sup>。

经典遗传学揭示出细胞的染色体上存在着基因(gene),即 DNA 分子上一段特定的核苷酸序列,具有重组、突变、转录和对其他 DNA 片段有调控作用的遗传学功能,它是不同物种以及同一物种的不同个体表现出不同性状的根本原因。基因通过 DNA 复制及细胞分裂把遗传信息传递给下一代,并通过控制蛋白质的合成使遗传信息得以

表达。

如果重组的 DNA 是具有功能的基因,就可以通过表达而使受体表现新性状。所谓基因工程(gene engineering)或生物技术(biotechnology)就是运用重组 DNA 技术改变物种的基因,进而改造出人们所期望的生物性状,并使之稳定地遗传给下一代<sup>[1]</sup>。重组 DNA 技术在细胞分化、生长发育、肿瘤发生等基础研究和工农业生产、医药保健等实际应用两方面均有重要意义。

通过 DNA 的重组获得基因的克隆是研究基因的结构、功能及演化的基础。基因克隆技术,又被称为分子克隆技术、重组 DNA 技术、基因工程、基因操作或基因的无性繁殖等。在整个基因克隆

收稿日期:2011-11-29; 接受日期:2012-01-08

基金项目:国家 863 计划项目(2006AA020903)资助。

作者简介:张亚旭,硕士,主要从事分子生物学相关研究。Tel:020-32290874-502; E-mail:z4693@126.com

的过程中, DNA 的重新组合是一个十分关键的步骤,它直接决定着整个克隆的成功与否。随着时间的推移,研究的深入,越来越多的 DNA 重组方法被应用到生产和科研当中。为了进一步阐明及比较各种 DNA 重组方法的异同和优劣,本文就目前已报道的 DNA 重组技术进行了概述,重点阐述了各自的原理、步骤、特点及实际应用等方面。

## 1 传统的经典克隆法

经典克隆方法产生于 20 世纪 70 年代初,是最早应用的基因克隆方法,它要求首先需从细胞或组织中分离并获得含有目的基因的 DNA 片段,然后利用能识别特异 DNA 序列的限制性内切核酸酶(restriction endonuclease)切断 DNA 双链,产生两个单链黏性末端(sticky end)或平齐末端(blunt end),如果被插入的载体 DNA 具有相同的末端,那么在适宜的条件下,具有黏性末端的两种片段可经碱基间的氢键互补配对,形成双链 DNA 分子,再在 DNA 连接酶的作用下形成磷酸二酯键,连接成重组 DNA 分子,而具有平齐末端的两种片段也可经 DNA 连接酶的作用而组成重组 DNA 分子,然后在利用重组子转化技术使该分子在宿主细胞中复制,产生多个完全相同的拷贝,即克隆(clone)<sup>[2]</sup>。

这种传统的酶切-连接经典克隆法,是比较通用且常规的方法,一直沿用至今。该方法也在获取基因片段和开发新的载体上不断改进,如 PCR 技术的建立、基于测序和 DNA 合成技术使该法的适用性越来越广,已成为最为基础的分子生物学实验手段之一。目前,研究人员已通过该方法获得了大量包括植物、真菌、哺乳动物、线虫等生物中重要基因和元件的克隆,如:钱丽等<sup>[3]</sup>克隆得到了人肿瘤相关的  $\beta 2m$  基因,并在大肠杆菌中实现了高效表达;张宪银等<sup>[4]</sup>克隆了水稻 *G1* 基因的启动子,并进一步证实该元件具有胚乳特异性表达的功能。然而在实际的实验过程中,这种方法的步骤显得较为繁琐,比较费时,有时对于某些片段失败率较高,且缺乏 DNA 序列的一致性;而且在应用上也有一定的限制,比如从拥有较大且富含重复序列的基因组中克隆某个基因,用这种方法就不太容易找到引物的设计位点和可利用的酶切位点。因此,分子生物学研究迫切需要

新的 DNA 重组技术来快速并系统地进行可利用基因的操作。

## 2 基于重组的克隆方法

### 2.1 位点特异性重组克隆技术

**2.1.1 通用载体质粒融合系统(univector plasmid-fusion system, UPS)** Liu 等<sup>[5]</sup>于 1998 年首次报道了一种基于重组的基因克隆方法——UPS,开启了利用 DNA 序列间直接重组克隆基因的时代。该系统是催化含有目的基因片段的特殊载体——通用载体(pUNI)与含有相关调控信息的宿主载体(pHOST)之间质粒融合。融合质粒经过选择后,使目的基因受控于位于宿主载体上的新的启动子等调控元件,从而完成目的基因-表达载体的构建<sup>[6]</sup>。该克隆过程无需限制性内切核酸酶、DNA 连接酶以及许多针对于亚克隆的体外操作,因而使得重组 DNA 分子的构建过程更为快速和简便。

该系统是建立在噬菌体 P1 的 *Cre-loxP* 位点特异性重组之上的质粒融合系统。*Cre* 基因的转录翻译产物是一种位点特异性重组酶,能够催化两个 34 bp 大小的 *loxP* 位点序列(5'-ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT-3')之间的重组,从而使环状溶原性复制产物 P1 二聚体分解。*Cre* 不仅能在不同生物体如细菌、真菌及哺乳动物的细胞中行使功能,而且在体外也可催化重组反应,因此,这种由 *Cre-loxP* 介导的质粒融合在体内外均可发生。另外,UPS 还能够被用于整个 DNA 文库与新表达载体的融合,从而产生出多个新的文库<sup>[5,6]</sup>。该系统已广泛应用于各种生物中的基因研究,如王弘等<sup>[7,8]</sup>构建了一种以 GFP 为报告基因的酿酒酵母表达载体,并同时验证了其稳定性、高效性和准确性。

### 2.1.2 通路克隆系统(Gateway cloning system)

Gateway 系统是 Invitrogen 公司于 1999 年推出的一种新的克隆策略<sup>[9,10]</sup>,是由噬菌体  $\lambda$  整合酶催化的位点特异性重组反应,由 BP 和 LR 两个反应组成,可表示为  $attB \times attP \leftarrow \rightarrow attL \times attR$ 。介导重组反应的 4 个 *att* 位点序列和相关蛋白是 Gateway 克隆技术的基础,它们能被  $\lambda$  和大肠杆菌编码的克隆酶合剂特异识别,双载体发生融合后,产生出新的质粒表达载体<sup>[11]</sup>。BP 反应是利

用由  $\lambda$  基因组编码的整合酶 (integrase, Int) 和由大肠杆菌编码的整合宿主因子 (integration host factor, IHF) 组成的 BP 克隆酶混和物催化一个带有 *attB* 位点的 DNA 片段或表达克隆和一个带有 *attP* 位点的供载体 (donor vector) 之间的重组反应, 把目的片段及其两端部分位点转移至供载体中, 创建一个入门克隆, 其结构为 *attL1*-基因-*attL2*。同时, 供载体中的 *ccdB* 细胞死亡控制基因及其两端部分位点被置换出来, 单独或融合到表达载体中而形成副产物。LR 反应是利用由 Int、IHF 和由  $\lambda$  基因组编码的切除酶 (Xis) 组成的 LR 克隆酶混和物催化一个带有 *attL* 位点的入门克隆和一个带有 *attR* 位点的目的载体之间的重组反应, 使目的片段及其两端部分位点取代目标载体 (destination vector) 的 *ccdB* 基因及其两端部分位点而产生最终的表达克隆, 其结构为 *attB1*-基因-*attB2*。副产物为带有 *attP* 位点的供载体。LR 反应作为 Gateway 克隆的主要反应, 可用来在平行的反应中将一个或多个目的 DNA 片段在不同的表达平台之间克隆、重组和转移。目的 DNA 片段可以是 cDNA、部分或完整的基因或者是基因组 DNA, 可通过用一对含有可利用酶切位点的特异引物进行 PCR, 限制性核酸内切酶的消化来制备, 也可经由设计一对含有 *attB* 位点的基因特异引物进行 PCR 扩增获得。

Gateway 技术作为一种强大且高效的体外操作系统, 可应用于细菌、酵母、昆虫、哺乳动物以及慢病毒等系统中进行分析表达。自 Gateway 技术开发并商业化以来, 在克隆基因及构建蛋白质表达载体等方面发挥了重要的作用。应用该技术, 已成功克隆出拟南芥转录因子<sup>[12]</sup>, 在植物及病毒中构建表达载体也非常便捷<sup>[13~15]</sup>。

能够进行与宿主无关的克隆及亚克隆是该技术的最大特点。由于在克隆的过程中, 重组位点具有高度的专一识别性, 使得重组反应后目的基因的方向和开放阅读框能够保持不变, 而且阳性率高; 克隆酶及位点的不同构成还可直接控制反应的方向<sup>[11]</sup>。另外, 这种新颖的多功能的通用系统也可用于蛋白质表达的优化。因为蛋白质的成功表达和纯化需要大量的宿主评估系统, 没有一个单一的表达系统适合所有蛋白质。优化基因表达的最好方法是在多个系统中分析目的蛋白, 通过比较分析, 选定蛋白质表达的最佳方案。

**2.1.3 有关 Gateway 克隆技术的发展** 于 2004 年推出且拥有美国 GeneCopoeia 公司及其合资企业广州复能基因有限公司自主知识产权的 RecJoin 专利克隆技术是对 Gateway 技术的一个发展<sup>[16,17]</sup>, 即目的基因与目的载体的结合处一端采用 Gateway 重组的方法, 即目的载体一端保留 *attR* 位点; 另一端采用经典克隆的方法, 即另一端 *attR* 位点被替换成酶切位点的序列, 克隆的步骤大致为“酶切 - 连接 - 重组”。此方法首先在重组 *att* 位点与目的 DNA 片段之间设计适宜数量的核苷酸以构成可利用且不影响基因与载体元件表达的酶切位点, 它们与基因特异序列连在一起构成基因特异引物, 与重组位点连在一起构成接头引物, 这样利用两步 PCR 将重组位点引入到目的基因的两端, 无需设计较长的含有 *att* 位点序列的基因特异引物。得到的线性 DNA 产物既可以用来进行 BP 反应构建入门克隆, 而后通过 RecJoin 反应将目的基因装入表达载体中而获得最终克隆; 也可以直接进行 RecJoin 反应获得表达克隆。利用该技术构建的标签 - ORF 融合蛋白表达克隆, 由于标签与 ORF 之间有时不会有重组位点, 这样就可以减少由于多余氨基酸的产生而对融合蛋白造成的影响。目前已有研究证实了运用此基因克隆技术对于相关目的蛋白表达的可靠性<sup>[18]</sup>。

## 2.2 同源重组克隆法

同源重组是生物界普遍存在的生理现象, 从噬菌体、细菌到真核生物都有能发生同源重组的种类<sup>[19,20]</sup>。宏观上讲, 它有助于增加生物体的变异程度, 从而推动物种的进化; 从微观上看, 它有利于细胞对体内坏基因的修复。如何把同源重组的方法应用到基因克隆中成为近年来国内外生物学家研究的热点之一。

**2.2.1 辅助交配遗传整合型克隆法 (mating-assisted genetically integrated cloning, MAGIC)** Li 和 Elledge<sup>[21]</sup> 在 2005 年首次报道了一种快速构建重组 DNA 分子的体内克隆基因的方法——MAGIC。此方法首先将携带含有目的 DNA 片段的供体质粒的一个细菌菌株和携带受体质粒的细菌菌株进行交配, 使两个质粒位于同一个细胞内; 然后, 供体和受体质粒经核酸内切酶 I——*Sce I* 的消化, 各形成两个线性片段, 进而催化同源替换重组, 导致重组后该 DNA 片段受控于受体质粒中新的调控元件。不仅如此, Li 和 Elledge 还利用电穿

孔的方法将 PCR 产物转化到受体细胞中经过 MAGIC 的模式获得了该产物的表达克隆。在细菌、酵母和哺乳动物中,通过 MAGIC 的方法也均能获得目的基因与其他元件构成的重组质粒表达的融合蛋白<sup>[21]</sup>。

MAGIC 构建重组 DNA 不需要 DNA 的制备,也不需使用位点特异性重组酶,而且整合后非重组背景的水平较低。此方法最有前景的用途是全基因组中的基因操作。因为物种测序完成后,根据鉴定到的基因,能够通过 MAGIC 的方法将它们转换成任何表达文库<sup>[21]</sup>。这不仅有助于功能基因组学的研究,而且有助于从基因组工程到蛋白质组工程的研究。另外,Paddison 等<sup>[22]</sup>已运用该克隆方法成功构建了一系列短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的表达载体。

### 2.2.2 不依赖基因序列和连接反应克隆法(sequence and ligation-independent cloning, SLIC)

Li 和 Elledge<sup>[23]</sup>在 2007 年报道了一种不依赖基因序列和连接反应的 SLIC 基因克隆方法。此方法通过 RecA 介导的体外同源重组 (*in vitro* homologous recombination) 和不依赖 RecA 的单链退火 (single-strand annealing, SSA) 途径可以将 DNA 片段整合在一个反应体系中。体外同源重组过程利用 T4 DNA 聚合酶的 5'→3' 外切核酸酶活性在插入片段以及载体片段的末端产生单链 DNA 突出末端,通过同源序列在体外完成交换重组,达到 DNA 片段的重新组合,进而完成基因克隆的目的。不仅如此,他们还发现了 SILC 可有效地同时将 5 个或者 10 个 DNA 片段整合在一起<sup>[23]</sup>。SILC 的应用,不仅避开了一些传统重组方法对序列的要求,而且当在较低的 DNA 浓度时,用 RecA 催化同源重组依然能够很有效地发挥其作用,这种灵活性将为今后的合成生物学研究重组 DNA 的产生提供更多的可能性。

白帆等<sup>[24]</sup>在 2008 年通过大肠杆菌的蓝白斑落筛选和对重组子的酶切分析,验证了利用 SLIC 方法克隆 pUC18 中的 *LacZ* 基因片段的可靠性,结果证明 SLIC 能够使 DNA 片段在设计位点处发生精确的重组。王中山等<sup>[25]</sup>也通过 SLIC 的途径克隆得到了大肠杆菌编码细胞周质底物结合蛋白 *gsiB* 基因。

### 2.2.3 等温的单反应方法(isothermal, single-reaction method) Gibson 等<sup>[26]</sup>在 2009 年报道了另

外一种 DNA 体外重组方法——等温的单反应方法。它要求在 50℃ 条件下首先利用 T5 核酸外切酶 5' 端的外切活性在设计需要片段连接处产生单链 DNA 突出末端,然后利用 Phusion DNA 聚合酶和 *Taq* DNA 连接酶在单链 DNA 互补区域特异退火,从而将多个具有重叠区域的 DNA 分子重组在一起<sup>[26]</sup>。这种整合方法在两段线性 DNA 含有 40 bp 以上的同源序列即可进行,不仅可用于无缝构建合成的或固有的基因,而且可以进行大片段 DNA 的人工合成,是一种非常有用的分子克隆工具。

### 2.2.4 In-Fusion 和 CloneEZ 克隆法

Clontech 公司出产的 In-Fusion PCR Cloning Kit 和 GenScript 公司出产的 CloneEZ PCR Cloning Kit 都是运用拥有各自专利的酶产品来进行线性 DNA 末端有 15 个碱基同源序列的多个目的片段的重组结合<sup>[27-29]</sup>。二者原理基本相同,以 In-Fusion 方法为例,当发生 PCR 克隆时,来源于痘病毒的 In-Fusion DNA 聚合酶通过其 3'→5' 外切核酸酶活性从 3' 端切除核苷酸,使 PCR 产物和载体末端暴露出具有重叠区域序列的单链突出末端,然后启动 SSA 反应,快速将目的片段定向精确地插入到线性载体中,最后转化到感受态细胞中通过修复产生出目的克隆。这也是一个无缝反应,不会另外添加其他的核苷酸。

此克隆技术操作简单方便,首先,通过限制性单酶切、双酶切或 PCR 获得线性载体,设计并合成与线性载体末端至少有 15 个碱基同源序列的基因特异引物,扩增目的基因;然后,加入 *Dpn* I 处理模板,胶回收获得纯化的 PCR 产物,与自备的线性载体以 2:1 的摩尔比混和,加入 In-Fusion 酶和其指定缓冲液进行培育;最后,用 TE 缓冲液稀释反应产物,转化并筛选出目的克隆。整个反应通常只需要 5~20 ng 的线性 DNA 即可进行,而且不论片段大小都有较高的重组效率,转化后也很少会有非线性的载体背景出现。

In-Fusion PCR 克隆是目前最为简便有效的体外构建重组表达载体的 DNA 重组方法。整个过程不需要限制性酶、连接酶及磷酸酶,所以不用考虑目的片段中含有的特殊位点;而且不需要附加特定的重组位点,就能够高通量的将任何插入片段克隆到任何自备载体中,这有助于实现分子克隆的自动化操作<sup>[30]</sup>。研究人员已将该技术应

用于炭疽杆菌蛋白质结构的研究、目的基因序列中引入点突变、融合蛋白表达载体的构建、抗体可变区的快速克隆及重组单克隆抗体的表达等方面<sup>[31~34]</sup>。但是由于经济成本的原因,许多科研人员目前都未把它当作大规模生产克隆的首选方法。

**2.2.5 DNA 共转化 (co-transformation) 及表达载体的正负向选择克隆法** 大多数已公布的克隆系统都需要涉及外源插入片段和载体的体外操作,而 Olieric 等<sup>[35]</sup>在 2010 年则报道了一种自动快速且低成本的体内构建表达克隆的方法。该方法要求线性载体和插入片段的末端要有 13~20 个核苷酸的重叠区域,然后将经 PCR 扩增和胶纯化的插入片段和经限制性内切酶消化并胶纯化的线性载体以 2.5:1 的质量比混合进行共转化,在大肠杆菌感受态细胞内发生同源重组并整合成表达质粒。

该研究使用的载体不但可以进行有插入片段的正向选择或者是只有空载体分子的负向选择,而且在 N 端和 C 端位置都有可利用的标签,可以在大肠杆菌感受态细胞中启动目的基因编码蛋白

质的高效表达。通过测试,将 6 个不同来源、长度及功能的靶序列克隆到 8 个上述载体中,结果靶蛋白被检测到有表达信号<sup>[35]</sup>。

由于该方法中在处理片段和载体这一步需要做胶回收,因此,这种方法还不能实现完全意义上分子克隆的自动化操作,但是此方法建立了共转化和正负向选择的自动克隆平台,可像 Gateway 或 LIC 一样作为高通量的克隆系统应用。

综上,这些基于重组的基因克隆技术建立了一个新的分子生物学的发展方向,为相关科研工作者们快速且有效地研究出体外重组 DNA 提供了一个崭新的思路,同时也为染色体基因组的基础研究开拓了更为宽广的视野。

### 3 结语及展望

作为分子生物学走向广泛应用的重要方面,分子克隆实验已经是现代生物学实验室所必备的常规实验技能。回顾 DNA 重组技术的发展历程,每一种 DNA 重组方法在发挥其自身优势的同时,也都存在着或多或少的不足(表 1)。因此在设计

表 1 不同 DNA 重组技术的比较

Table 1 Comparison of different DNA recombination technology.

克隆方法	优势	不足	应用范围或条件
经典克隆法	平齐末端也可连接	比较费时且缺乏 DNA 序列的一致性	载体的多克隆位点处有对于插入片段可利用的酶切位点
UPS	体内外均可发生	需要位点特异性重组酶	在体外、细菌、真菌及哺乳动物的细胞中均可发生
Gateway	进行与宿主无关的克隆	需要位点特异性重组克隆酶	在体外、细菌、酵母、昆虫、哺乳动物以及慢病毒等系统中均可分析表达
RecJoin	有助于融合蛋白表达	构建克隆步骤增加	在细菌、酵母、昆虫、哺乳动物以及慢病毒等系统中均可表达
MAGIC	体内同源重组,不需要 DNA 的制备	需要准备供试菌株	在细菌、酵母和哺乳动物中均可表达
SLIC	体外同源重组,多片段整合	需要聚合酶	需要 T4 DNA 聚合酶产生单链 DNA 突出末端
Isothermal, single-reaction	体外同源重组	需要聚合酶和连接酶且有温度限定条件	两段线性 DNA 含有 40 bp 以上的同源序列
In-Fusion 和 CloneEZ	无缝反应,操作简单	专利产品经济成本较高	线性 DNA 末端有 15 个碱基同源序列
DNA 共转化	快速,成本低	还未实现完全自动化	线性载体和插入片段的末端要有 13~20 个核苷酸的重叠区域

具体实验时应该综合考虑发生环境、序列特征、经济成本、花费时间、筛选效率及克隆成功率等多方面因素,灵活运用多种技术来解决问题。

DNA 重组技术的创立和发展,开启了人类能动改造生物界的新阶段,推动了医学和整个生命科学的进步。40 年来所获得的丰硕成果已经把人们带进了一个梦幻般的科学殿堂<sup>[36~38]</sup>,不仅使人类获得了打开生命奥秘之门的金钥匙,还使人们有可能去深入探索更重大的一些课题。1985 年提出的全球性生物学研究——人类基因组计划 (Human Genome Project, HGP) 的实施就是以 DNA 重组为主要手段进行的。

DNA 重组技术极大地促进了分子生物学的迅速发展,为生产对健康有益的转基因食品,加快改良和培育农作物新品种,发展基因诊断、基因治疗,研发新一代重组疫苗等基因工程药物,以及研究分子进化工程等开辟了道路,给人类探索自身及其他生命奥秘展示了光明的前景。

另一方面,目前自然界中还有相当数量的物种的基因组序列尚未获得,在已经公布的生物基因组序列中,有很多它们的功能至今仍属未知。相信随着现代生物学研究的不断深入,DNA 重组技术也会不断的更新和完善,越来越多新的更高效的 DNA 重组技术或者多种 DNA 重组方法的结合技术将会产生并应用,这将会使人们对各个物种全基因组序列的获得及分析的能力得到进一步增强。

### 参 考 文 献

- [1] 李阜棣,胡正嘉. 微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,2000,79-80.
- [2] 朱 军. 遗传学[M]. 北京:中国农业出版社,2002,215-217.
- [3] 钱 丽,钱书兵,钱关祥. 人  $\beta 2m$  基因的克隆及表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2001,17(4):384-385.
- [4] 张宪银,薛庆中. 水稻胚乳特异性启动子 *G1l* 的克隆及其功能验证[J]. 作物学报,2002,28(1):110-114.
- [5] Liu Q, Li M Z, Leibham D, *et al.*. The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes[J]. *Curr. Biol.*, 1998,8: 1300-1309.
- [6] 王 弘,于淑娟,杨连生,等. 通用载体质粒融合系统——一种快速的 DNA 重组技术[J]. 生命的化学,2002,22(5): 481-484.
- [7] 王 弘,郑文岭,马文丽,等. 一种以 GFP 为报告基因的酿酒酵母表达载体构建的新方法[J]. 昆明医学院学报,2003,1:13-16.
- [8] 王 弘,郑文岭,杨太成,等. 以 UPS 构建的重组酿酒酵母表达载体及其稳定性研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(8):4-7.
- [9] Hartley J L, Brasch M A. Recombinational cloning using engineered recombination sites [P]. US005888732A, 1999-03-30.
- [10] Hartley J L, Brasch M A. Recombination cloning using engineered recombination sites [P]. US006143557A, 2000-11-07.
- [11] 汪宗桂,郑文岭,马文丽. 通路克隆系统:DNA 重组技术的新进展[J]. 中国生物工程杂志,2003,23(7):24-27.
- [12] 梅文倩,宋文强,潘 怡,等. 利用 Gateway 克隆技术大规模克隆拟南芥转录因子[J]. 分子植物育种,2004,2(3):358-364.
- [13] 佟友丽,赵 飞,冯君伟,等. 转录因子 DREB1A 基因的克隆与 Gateway 克隆技术构建植物表达载体[J]. 生物技术通讯,2007,8(2):205-208.
- [14] 晏立英,许泽永,陈坤荣,等. Gateway 重组系统快速构建花生条纹病毒 *cp* 基因反向重复序列载体[J]. 农业生物技术学报,2007,15(2):356-357.
- [15] 徐品三,白建芳,刘纪文,等. Gateway 技术快速构建百合双价抗病毒 RNAi 表达载体[J]. 中国农学通报,2011,27(04):144-147.
- [16] Yang S W. Methods and nucleic acid vectors for rapid expression and screening of cDNA clones [P]. US20040115812A1, 2004-06-17.
- [17] Yang S W. Method and compositions for rapidly modifying clones [P]. US20060166334A1, 2006-07-27.
- [18] 王晓辉,郭 杰,王菊芳,等. 小泛蛋白样修饰物双荧光融合蛋白及其特异性蛋白酶的原核表达及鉴定[J]. 生物工程学报,2009,25(5):701-707.
- [19] 张秀海,孙勇如. 植物基因同源重组研究现状[J]. 植物学通报,2000,17(2):137-140.
- [20] 李山虎,洪 鑫,于 梅. Gap-Repai 方式建立一种基于 pBR322-Red 的新型重组工程系统[J]. 遗传学报,2005,32(5):533-537.
- [21] Li M Z, Elledge S J. MAGIC, An *in vivo* genetic method for the rapid construction of recombinant DNA molecules [J]. *Nat. Genet.*, 2005,37(3):311-319.
- [22] Paddison P J, Silva J M, Conklin D S, *et al.*. A resource for large-scale RNAi based screens in mammals [J]. *Nature*, 2004,428(25):427-431.
- [23] Li M Z, Elledge S J. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA *via* SLIC [J]. *Nat. Method*, 2007,4(3):251-256.
- [24] 白 帆,刘 殉,张义正. 一种新的基因克隆方法 SLIC 的可靠性分析[J]. 四川大学学报,2008,45:33-36.
- [25] 王中山,向泉桔,王海燕,等. 大肠杆菌细胞周质底物结合蛋白 *gsiB* 基因的克隆及其表达条件的优化[J]. 遗传,

- 2010,32(5):505-511.
- [26] Gibson D G, Young L, Chuang R Y, *et al.*. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases [J]. *Nat. Method*,2009,6(5):343-345.
- [27] Evans D H, Willer D O, Yan X D. DNA joining method[P]. US 7575860 B2,2009-08-18.
- [28] Liu W Q, Yang P, Wang T, *et al.*. Homologous recombination-based DNA cloning methods and compositions [P]. US20100062495A1,2010-03-11.
- [29] Sleight S C, Bartley B A, Lieviant J A, *et al.*. In-Fusion BioBrick assembly and re-engineering [J]. *Nucl. Acids Research*,2010,38(8):2624-2636.
- [30] 余 钗,史 惠,赖汉漳. 高通量的基因克隆[J]. *动物医学进展*,2008,29(1):100-103.
- [31] Au K, Berrow N S, Blagova E, *et al.*. Application of high-throughput technologies to a structural proteomics-type analysis of *Bacillus anthracis* [J]. *Acta Cryst.*, 2006, D62: 1267-1275.
- [32] Shiraia M, Imanaka-Yoshidab K, Schneider M D, *et al.*. T-box 2, a mediator of Bmp-Smad signaling, induced hyaluronan synthase 2 and Tgf  $\beta$ 2 expression and endocardial cushion formation[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,2009,106(44):18604-18609.
- [33] Jones M L, Seldon T, Smede M, *et al.*. A method for rapid, ligation-independent reformatting of recombinant monoclonal antibodies[J]. *J. Immu. Method*,2010,354,85-90.
- [34] 林朝贵,范 林,陈良龙. 利用 In-Fusion 技术构建存活素-增强型绿色荧光蛋白融合基因重组慢病毒表达载体[J]. *心血管康复医学杂志*,2010,1:10-13.
- [35] Olieric N, Kuchen M, Wagen S, *et al.*. Automated seamless DNA co-transformation cloning with direct expression vectors applying positive or negative insert selection [J]. *BMC Biotechnol.*,2010,10:56.
- [36] 丁 彤,伍亚民,张 燕. 现代生物技术医学领域的应用及其对护理的影响[J]. *护理研究*,2004,18(11):1898-1900.
- [37] 曹军平. 现代生物技术在农业中的应用及前景[J]. *安徽农业科学*,2007,35(3):671-674.
- [38] 孔 君,刘 箐,韩跃武,等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景[J]. *免疫学杂志*,2011,27(2):170-173.