

引用格式:

汤雅萍, 程毅, 王吐虹, 陈佳, 高春生, 郭利桃, 宋志强, 唐超, 严准, 李智敏. 基于酿酒酵母的多片段质粒的构建 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(4): 421–427.

TANG Y P, CHENG Y, WANG T H, CHEN J, GAO C S, GUO L T, SONG Z Q, TANG C, YAN Z, LI Z M. Construction of multi-fragments plasmid based on *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(4): 421–427.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



基于酿酒酵母的多片段质粒的构建

汤雅萍, 程毅, 王吐虹, 陈佳, 高春生, 郭利桃, 宋志强, 唐超, 严准, 李智敏*

(中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙 410205)

摘 要: 为避免现有的多片段质粒构建技术的弊端, 提高多片段质粒构建效率, 以构建树干毕赤酵母 *Agglutinin-like* 基因的敲除载体为例, 利用酿酒酵母活体细胞重组系统, 一次性将多个外源 DNA 片段和线性化质粒重组, 形成环状质粒。通过引物设计在相互连接的 DNA 片段之间引入 50 bp 重叠序列, 用 PCR 扩增 DNA 片段后, 与线性化质粒一起转化酿酒酵母, 再用 PCR 和测序等方法鉴定阳性酵母菌落中质粒的正确性。通过本方法构建的多片段质粒正确率高、耗时短。

关 键 词: 质粒构建; 多片段质粒; 酵母同源重组系统

中图分类号: Q782

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)04-0421-07

Construction of multi-fragments plasmid based on *Saccharomyces cerevisiae*

TANG Yaping, CHENG Yi, WANG Tuhong, CHEN Jia, GAO Chunsheng,

GUO Litao, SONG Zhiqiang, TANG Chao, YAN Zhun, LI Zhimin*

(Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410205, China)

Abstract: To enhance the efficiency of multi-fragment plasmid construction and overcome the limitations of current techniques, this study introduced a method that utilized the recombination system within *Saccharomyces cerevisiae* living cell. This approach enabled the simultaneous integration of multiple exogenous DNA fragments with linearized plasmid into a circular plasmid, using the construction of an *Agglutinin-like* gene knockout vector for *Pichia stipitis* as an example. The method involved designing primers to introduce 50 bp overlapping sequences between interconnected DNA fragments, followed by PCR amplifying of these fragments. Subsequently, the linearized plasmids were co-transformed with the DNA fragments into *Saccharomyces cerevisiae* cells. Validation of the plasmids accuracy was then performed in positive yeast colonies through PCR and sequencing. This method offers a high level of precision and considerably reduces the time required for constructing multi-fragments plasmids.

Keywords: vector construction; multi-fragments plasmid; yeast homologous recombination system

基因工程操作中常需要将多个 DNA 片段连接克隆到同一个载体质粒中, 传统的方法是利用 DNA 内切酶酶切后再用 DNA 连接酶将 2 个片段连接起来构建质粒, 每次构建最多只能连接 2 个片段^[1], 下一个 DNA 片段的构入必须以前一个成功构入 DNA 片段的质粒为基础。可见, 传统方法受 DNA

片段内切酶位点的限制, 工作量大, 周期长。Gateway 技术在表达载体构建上不需要人工酶切/连接, 也可以在特定结构的载体上一次构入几个 DNA 片段^[2], 但 Gateway 技术需要在载体上预先设置 attB 重组位点, 也不能随意进行多个 DNA 片段的连接。基于 λ 噬菌体 Red/ET 重组酶系统的质粒

收稿日期: 2022-12-09

修回日期: 2023-07-24

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IBFC-04); 湖南省自然科学基金项目(2015JJ3128); 湖南省植保植检站植物防疫防控科研项目(HNZB202104)

作者简介: 汤雅萍(1997—), 女, 湖北武汉人, 硕士研究生, 主要从事作物黑粉病研究, 82101205263@caas.cn; *通信作者, 李智敏, 博士, 副研究员, 主要从事谷类作物真菌病害研究, lizhimin@caas.cn

构建技术有一定优越性^[3],但该方法需要预先在细菌中表达 Red/ET 系统的多个重组酶后才能用于多片段质粒的构建^[4]。这些技术都有一定的壁垒,应用起来都不够便捷。目前较常用的、操作相对简单的是基于 Gibson assembly 原理的无缝克隆试剂盒商业产品,但该产品对于多个 DNA 片段的质粒构建成功率较低。

酿酒酵母细胞内具有一套严谨且高效的 DNA 同源重组系统,保证了酵母遗传物质的修复和维护^[5]。很多研究利用这一重组系统将外源 DNA 整合到酵母基因组上进行基因表达^[6]或者利用这一重组系统进行酵母内部基因敲除^[7]。有研究人员利用约 50 bp 的同源重组序列在酵母菌活体细胞内成功构建了质粒^[8-9],但该研究只涉及 1 个外源基因片段与 1 个载体的重组连接。KUIJPERS 等^[10]利用酵母的重组系统并通过 60 bp 的重叠序列,实现了几个片段质粒的构建,但 60 bp 的重叠片段还是相对较长,这增加了引物合成的成本。本研究以构建树干毕赤酵母 1 个未知功能基因 *Agglutinin-like* (*Aggl*) 的敲除载体为例,探讨 1 种更高效的多片段质粒构建方法,包括 50 bp 重叠序列引物设计、外源 DNA 片段制备、酿酒酵母转化以及阳性酵母菌落鉴定等 4 个主要步骤,完成该试验操作仅需 3 d 时间即可获得正确的、多片段组装的目标质粒。

1 材料与方法

1.1 试验材料

分别含有 pS300 质粒、p2076 质粒和 pHyg 质粒的 3 个 DH5 α 大肠埃希菌菌株和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)4741 菌株以及树干毕赤酵母 (*Scheffersomyces stipitis*)CBS 6054 菌株由中国农业科学院麻类研究所提供。

初始质粒 pS300 作为构建载体的骨架,其主要结构如图 1 所示。它包含 pMB1 ori、f1 ori 2 个原核细胞复制子和在大肠埃希菌中的筛选标记 Amp 抗性基因,以及可在酵母宿主中自行复制的元件 (CEN/ARS) 和线性化酶切位点 *Hind* III。p2076 质粒中含有 G418 抗性基因,在本次质粒构建中作为酿酒酵母的阳性克隆筛选标记。pHyg 质粒中含有潮霉素筛选标记 Hyg 抗性基因,作为 *Aggl* 基因敲除序列结构中的 1 个元件(在本试验中不作为筛选标

记)。树干毕赤酵母 CBS 6054 菌株则提供 *Aggl* 基因的左、右侧翼片段序列,序列来源分别是 *Pichia stipitis* v2.0 assembly 中的 Picst3|chr_3.1:98395-99420 和 Picst3|chr_3.1:103936-105124(<http://genome.jgi.doe.gov/Picst3/Picst3.home.html>)。

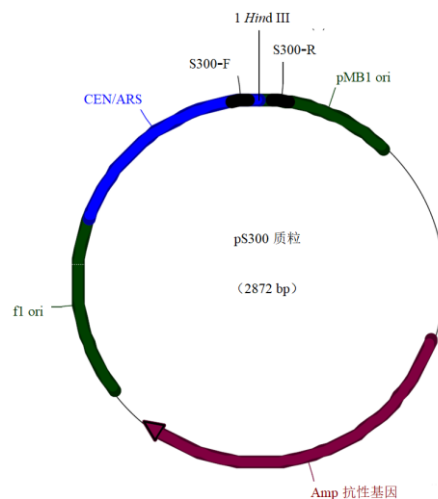


图 1 pS300 质粒的主要结构

Fig. 1 Structural diagram of pS300 plasmid

1.2 方法

1.2.1 引物设计与外源 DNA 片段及初始质粒骨架的制备

试验预期构建的 *Aggl* 基因敲除载体质粒所需外源 DNA 片段和连接方向为 pS300 线性质粒 3'→5'G418 抗性基因 3'→5'*Aggl* 左同源臂 3'→5'Hyg 抗性基因 3'→5'*Aggl* 右同源臂 3'→pS300 线性质粒 5', 如图 2 所示。利用酵母重组系统构建质粒,要求在相邻 2 个 DNA 片段的接头处有约 50 bp 重叠序列。为使这些片段按规定顺序进行连接,用 Primer premier 5.0 设计好各个 DNA 序列的特异引物后在引物上添加相应的 50 bp 重叠序列,具体引物序列如表 1,各片段间的 50 bp 重叠序列区如图 2 所示。各个外源 DNA 片段可通过 PCR 扩增获得。提取 pS300 初始质粒后用 *Hind* III 酶切线性化;各个片段均用 DNA 凝胶试剂盒纯化回收。用 NanoDrop 2000 测定 DNA 片段浓度后,各个 DNA 片段均保存于-20℃冰箱中,备用。为便于后续基因敲除片段的线性化,设计引物时在 *Aggl* 左侧翼片段的左端和 *Aggl* 右侧翼片段的右端均加上 *Pvu* II 酶切位点。引物对 S300-F 和 S300-R 分别位于 pS300 质粒线性化 *Hind* III 酶切位点的左、右两侧(如图 1 所示)。

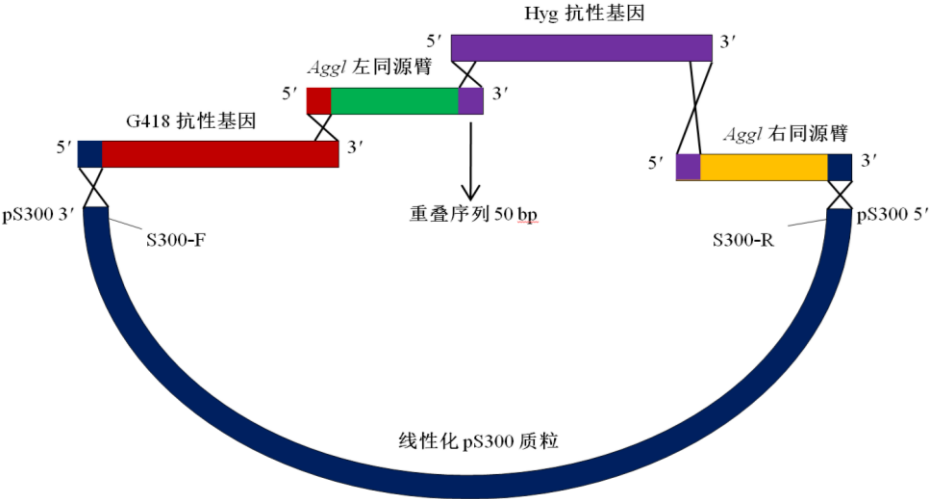


图 2 外源 DNA 片段与 pS300 质粒连接的结构

Fig.2 Structural diagram of the connection between exogenous DNA fragments and pS300 plasmid

表 1 本试验所用的引物

Table 1 Primers used in this study					
引物名称	引物序列(5'-3')	接头处 50 bp 重叠序列来源	扩增的 DNA 片段名称	扩增的 DNA 片段长度/bp	
G418-F	<u>CATTAAAA</u> GATACGAGGCGCGTGTAAGTTACAGGCAAGCGA	pS300 质粒 3' 端	G418 抗性基因	1432	
G418-R	TCCGTCCTAAGATCTGTTTAGCTTGCCTC				
Aggl L-F	GTGAATGCTGGTCGCTATACTGCTGTCGATTTCGATACTAACG	G418 抗性基因 3' 端	AgglI 左同源臂	1026	
Aggl L-R	CCGCCATCCAGCTGTTTTAGACTTTTAGGGCTGGAG				
Hyg-F	GAAGCAGGCCGACGCCAACACGGCAGCGTTGCGCAGGCTG	Hyg 抗性基因 5' 端	Hyg 抗性基因	1867	
Hyg-R	TACACGTATGTGTGATAAATTACAGATGCTACTGG				
Aggl R-F	CATACGTGTACAGCCTGCGC	Hyg 抗性基因 3' 端	AgglI 右同源臂	1189	
Aggl R-R	ATAGCCTTTTGAAAATATATGGGG				
S300-F	TGTAAGTATATGTTTATCTGTAAAATCCCCATATATTTTCAA	pS300 质粒 5' 端	插入 pS300 中的外源片段	5656	
S300-R	AGGCTATAAATACTGAATTTATCGTCCTTTTCG				
	TTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC				
	CGCCTTTTCAGCTGAAATGCTTGCCGTTTGTGTTAG				
	CCATCATTAAGATACGAGGC				
	CTCACATGTTCTTTCCTGCG				

序列单下划线为 50 bp 同源片段，双下划线是在引物中引入的 *Pvu* II 酶切位点。

1. 2. 2 酿酒酵母的转化

根据 GIETZ 等^[11]的“LiAc/SS carrier DNA/PEG”方法制备和转化酵母感受态，但稍有改动：加入的各个 DNA 和质粒溶液的量如表 2 所示，对照样品不加 G418 抗性基因的 DNA 片段，而用 1.6 μL ddH₂O 代替；总体积不超过 10 μL。转化 DNA 片段后加 500 μL 新鲜的 YPD 培养液，在 30 ℃、200 r/min 摇床中活化 4 h；随后取 100 μL 活化的细胞液用于涂皿。G418 抗性基因以抗生素 G418 为筛选药物，制作含有 200 μg/mL G418 的 YPD 固体培养基作为筛选平皿。对照样品涂布于不含 G418 和含 G418 的 2 个培养皿中(以检验 G418 是否有效)，而处理样品涂布于含 G418 的培养皿中；封皿后放于

30 ℃恒温培养箱中培养 36~48 h。在培养 36 h 时拍照。

表 2 酵母转化时各个 DNA 片段的加入量

Table 2 The quantities of each DNA fragment added to yeast competent cells		
DNA 序列名称	DNA 浓度/(ng μL ⁻¹)	转化时的加入量/μL
G418 抗性基因	43.6	1.6
AgglI 左同源臂	30.5	2.2
Hyg 抗性基因	38.2	1.9
AgglI 右同源臂	28.9	2.3
线性化 pS300	32.5	2.0
总体积		10.0

1. 2. 3 阳性菌落的鉴定

从不含 G418 的对照样品平皿上挑取少许菌体接种于不含 G418 的 YPD 培养液中(作为后续阳性

菌落 PCR 鉴定的对照);从处理样品平皿中随机挑取 9 个阳性菌接种于含有 200 $\mu\text{g/mL}$ G418 的 YPD 液体培养基中,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养过夜。采用 PBC 快速 PCR 模板制备方法^[12]制备 PCR 模板。用 S300-F、S300-R 引物(在 pS300 质粒上的位置如图 1 所示)和 CloneAmp HiFi PCR Premix (Clontech)对各个样品模板进行 PCR 扩增,1.2%凝胶电泳检测。如插入片段大小与预期(约 5656 bp)相符,进一步用 Yeast Plasmid Kit (Omega Biotek)提取质粒并将质粒 DNA 通过 CaCl_2 -热激法^[13]转化到大肠埃希菌 DH5 α 中。对阳性 DH5 α 菌落摇菌培养并提取质粒后用 *Pvu* II 和 *Nde* I 分别进行单酶切和双酶切,通过凝胶电泳观察酶切情况,初步判断质粒构建是否正确;通过步移测序(由湖南擎科生物技术有限公司完成)进一步确定多片段载体构建质粒序列的正确性。

1.2.4 作图

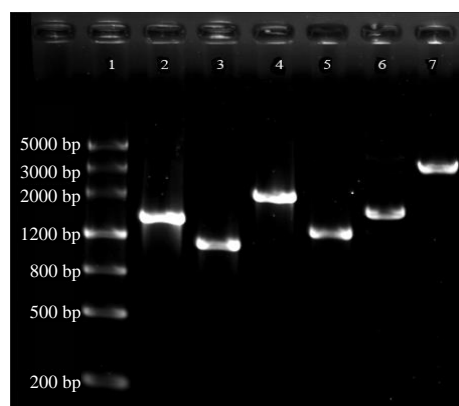
运用 ApE 软件制作圆形质粒图。

2 结果与分析

2.1 各个 DNA 片段和线性化质粒骨架的获取

用相应的引物和 DNA 模板扩增 4 个外源 DNA 片段,1.2%琼脂糖凝胶电泳。结果(图 3)显示:第 2 泳道 G418 抗性基因目的条带位于 2000 bp 和 1200 bp 中间靠下位置,与预期的 1432 bp 片段长度相符;第 3 泳道 *Aggl* 左同源臂、第 4 泳道 *Hyg* 抗性基因和第 5 泳道 *Aggl* 右同源臂的目的条带的大小均与预期长度(表 1)相符,初步证明 PCR 扩增结果正确;从大肠埃希菌提取的 pS300 质粒以超螺旋状态为主(第 6 泳道),证明质粒提取效果良好;pS300 质粒经 *Hind* III 酶切后被线性化,电泳条带大小接近 3000 bp(第 7 泳道),与预期的 2872 bp 长度相符。

经纯化后的各个 DNA 片段的浓度约为 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$,具体浓度如表 2 所示。转化酿酒酵母时,为保证各个片段之间量的比例约为 1,各片段按表 2 取适当体积的 DNA 溶液加入酿酒酵母感受态中混合转化。



泳道 1 DNA ladder;泳道 2 G418 抗性基因;泳道 3 *Aggl* 左同源臂;泳道 4 *Hyg* 抗性基因;泳道 5 *Aggl* 右同源臂;泳道 6 pS300 质粒;泳道 7 *Hind* III 酶切线性化的 pS300 质粒。

图 3 各个 DNA 片段的电泳结果

Fig.3 Agarose gel electrophoresis results of DNA fragments

2.2 转化酿酒酵母后获得的阳性克隆及 PCR 验证

将 G418 抗性基因、*Aggl* 左同源臂、*Hyg* 抗性基因、*Aggl* 右同源臂和线性化 pS300 质粒等 5 个外源 DNA 片段共同转化酿酒酵母 4741 菌株感受态,转化结果如图 4 所示。对照样品的 2 个皿中,不含 G418 的平皿上长满了酵母菌体(图 4-a),而含有 G418 的平皿上没有长出任何菌落(图 4-b)。加 G418 抗性基因的处理样品长出了超过 100 个克隆的阳性菌落(图 4-c)。可见缺少 G418 抗性基因的对照样品不能形成带有 G418 抗性的质粒,而加有 G418 抗性基因的处理样品平皿中的单菌落在酵母活体细胞同源重组系统作用下形成了环状化的带有 G418 抗性的质粒。

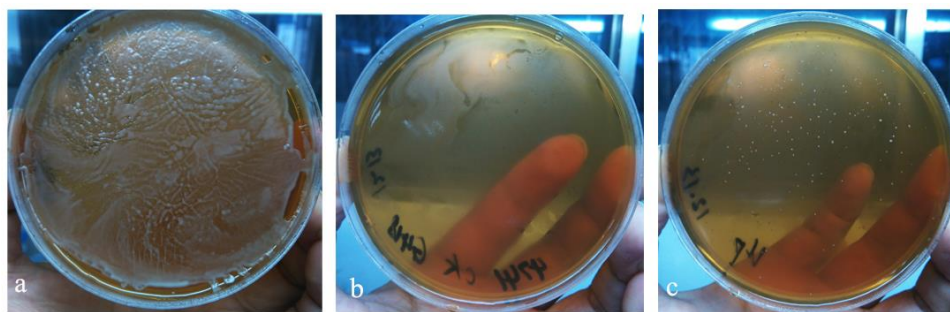
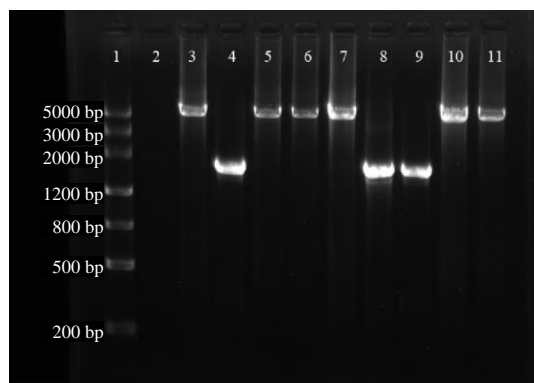


图 4 多片段共转化酿酒酵母的平皿筛选结果

Fig.4 Plate screening results of multiple DNA fragments transformation into *Saccharomyces cerevisiae*

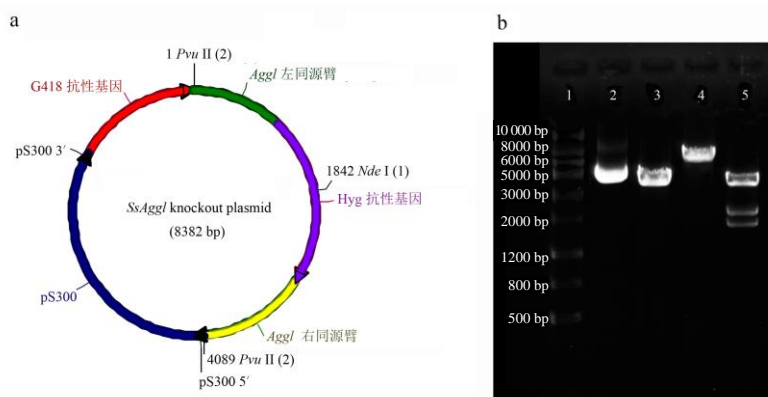
在处理样品皿(图 4-c)上随机挑取 9 个阳性菌落进行 PCR 鉴定,结果显示:对照菌没有扩增出任何条带(图 5 泳道 2);而随机挑取的 9 个阳性菌落中有 6 个(图 5 泳道 3、5、6、7、10 和 11)能扩增出稍大于 5000 bp 的目的条带,该条带的大小与预期的 4 个 DNA 片段(G418 抗性基因、*Aggl* 左同源臂、*Hyg* 抗性基因和 *Aggl* 右同源臂)的大小之和(约 5656 bp)相符;另外 3 个阳性菌落的 PCR 扩增片段(图 4 泳道 4、8 和 9)大小约 1600 bp,与预期不符。初步证明已经成功构建了由 4 个外源 DNA 片段与质粒组成的复杂载体,多片段质粒构建成功率约为 66.7%。由于构建好的质粒在酵母细胞中的拷贝数较低,为获得较多的质粒,将图 5 第 3 泳道对应的菌株 DNA 转化大肠埃希菌 DH5 α 菌株,用于下一步酶切和测序验证,并将该质粒命名为 *SsAggl* knockout plasmid。



泳道 1 DNA ladder; 泳道 2 对照 4741 菌株; 泳道 3~11 处理样品的阳性菌落。

图 5 阳性菌落的 PCR 鉴定结果

Fig.5 PCR identification results of positive colony



a 4 个 DNA 片段与 pS300 质粒连接的结构与酶切位点示意图; b 构建完成后的质粒酶切电泳情况。泳道 1 DNA ladder; 泳道 2 *SsAggl* knockout plasmid; 泳道 3 *Pvu* II 酶切; 泳道 4 *Nde* I 酶切; 泳道 5 *Pvu* II 和 *Nde* I 双酶切。

图 6 多片段质粒构建示意图及质粒构建完成后的酶切结果

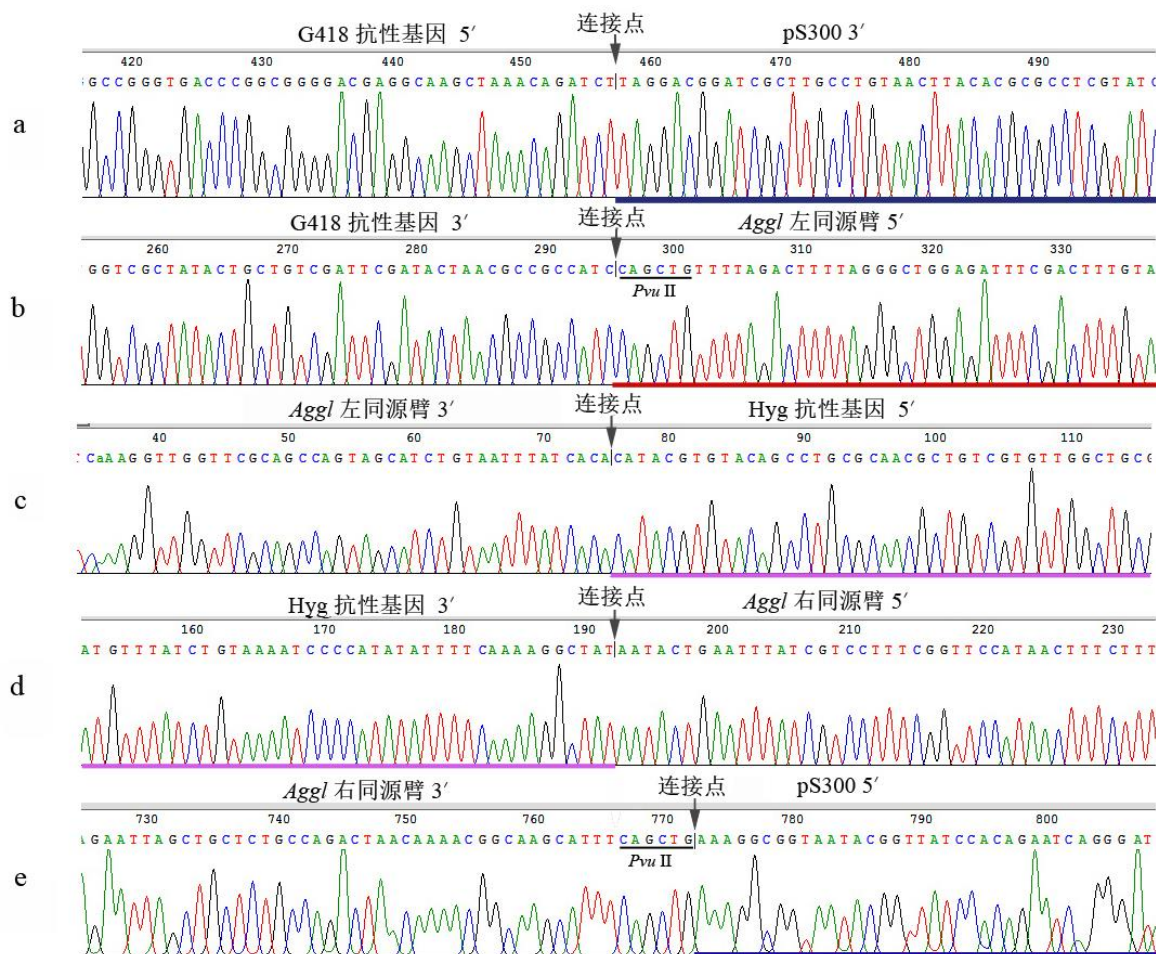
Fig.6 Construction diagram of the multiple fragments plasmid and the enzyme digestion results of constructed plasmid

2.3 酶切和测序进一步检验构建的多片段质粒

为验证 *SsAggl* knockout plasmid 质粒中是否含有预设的 2 个 *Pvu* II 酶切位点以及 1 个 *Nde* I 酶切位点(*Hyg* 抗性基因本身带有该酶切位点),对从大肠埃希菌中提取的 *SsAggl* knockout plasmid 质粒进行酶切和电泳分析。各个外源 DNA 片段拼接的预期质粒结构和设置的酶切位点如图 6-a 所示。在序列位置 1 bp 和 4089 bp 位置设有酶切位点 *Pvu* II(表 1),在 1842 bp 位置有酶切位点 *Nde* I。用 *Pvu* II 和 *Nde* I 分别对 *SsAggl* knockout plasmid 质粒进行单酶切和双酶切的结果如图 6-b 所示。*Pvu* II 的单酶切产物在电泳图上有 1 条带位于 3000~5000 bp(图 6-b,第 3 泳道),这个结果与预期相符。因为在预期的圆形质粒上有 2 个 *Pvu* II 位点,能将质粒切成 4089 bp 和 4292 bp 2 个片段,这 2 个片段长度较大且片段大小接近,在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳上难以分开而只形成一条带。用 *Nde* I 进行单酶切后有单一的条带,条带位置远大于 DNA ladder 的 5000 bp 条带(图 6-b,第 4 泳道),与预期的 *SsAggl* knockout plasmid 质粒 8382 bp 相符。用 *Pvu* II 和 *Nde* I 对该质粒进行双酶切,结果产生 3 条带:一条带在 3000~5000 bp,另外 2 条带分别在 DNA ladder 2000 bp 带的上、下位置。从质粒结构图谱上可知 *Pvu* II 和 *Nde* I 双酶切可以形成 3 个片段,片段大小分别为 4292、2247、1842 bp。可见,双酶切的结果也与预期相符。酶切结果进一步说明由多个 DNA 片段组合的质粒已经构建成功。

为验证构建的质粒中各个外源 DNA 片段的连接是否正确,进一步对 *SsAggl* knockout plasmid 质粒进行测序分析。步移测序分析结果显示:线性化 pS300 质粒的 3'端(G418-F 引物上的同源序列)与 G418 抗性基因的 5'端成功连接(图 7-a, 测序结果为反向互补序列);下一个连接点的测序峰图结果显示 G418 抗性基因 3'端与 *Aggl* 左同源臂的 5'端连接正确(图 7-b); *Aggl* 左同源臂 3'端与 Hyg 抗性基因 5'端成功正确连接(图 7-c); Hyg 抗性基因的 3'端与

Aggl 右同源臂的 5'端成功正确连接(图 7-d); *Aggl* 右同源臂的 3'端也与 pS300 5'端重组位置一致(图 7-e)。测序结果的连接处序列与表 1 中各个 DNA 片段头、尾处的 50 bp 重叠序列的碱基均一致,说明连接方向为 pS300 3'→5'G418 抗性基因 3'→5'*Aggl* 左同源臂 3'→5'Hyg 抗性基因 3'→5'*Aggl* 右同源臂 3'→pS300 5'的树干毕赤酵母 *Aggl* 基因敲除载体质粒构建成功。



a 线性化 pS300 3'与 G418 抗性基因 5'端的连接点(反向互补序列); b G418 抗性基因 3'端与 *Aggl* 左同源臂 5'端的连接点; c *Aggl* 左同源臂 3'端与 Hyg 抗性基因 5'端的连接点; d Hyg 抗性基因 3'和 *Aggl* 右同源臂 5'端的连接点; e *Aggl* 右同源臂 3'和 pS300 5'端的连接点。彩色粗线段标记的是引物重叠序列。

图 7 *SsAggl* knockout plasmid 质粒中的各个 DNA 片段之间连接点的测序结果

Fig.7 Sequencing results of the connection points between multiple DNA fragments in the *SsAggl* knockout plasmid

3 结论与讨论

本研究中,以构建树干毕赤酵母 *Agglutinin-like* 基因的敲除载体为例,利用酿酒酵母活体细胞重组系统,一次性将多个外源 DNA 片段和线性化质粒重组形成环状质粒,用该方法构建多片段质粒的阳性酵母菌落中,大部分能够形成正确重组连接的质

粒,而少数阳性菌落含有错误连接。这些错误质粒仅连接了 G418 抗性基因片段,可能是由于非同源末端连接修复(NHEJ)引起的^[14]。虽然最终转化有少数错误的质粒,但是这种多片段质粒的构建方法仍是非常简便而高效的。在笔者多次用不同的多片段构建质粒的试验中(相关数据未在本文中显示),阳

性克隆的正确率均在 50% 以上, 且只要适当增加阳性菌落的检测数量, 即可从中获得正确组装的重组质粒。

本试验介绍的多片段质粒构建方法包含 3 个主要步骤: 1) 含 50 bp 重叠序列的引物的设计; 2) 外源 DNA 片段的制备和酿酒酵母转化; 3) 阳性酵母菌落的鉴定。这一过程只需 3 d 时间。可见, 本试验描述的多片段质粒构建方法的成功率和效率都相对较高。由于本方法属于同源重组, 片段之间还可以实现“无缝”连接或者按需求添加酶切位点。虽然克隆单一外源片段的商业化无缝克隆试剂盒效果相对稳定, 但是面对多片段质粒构建时用此类试剂盒仍然需要分步进行、多次克隆才能实现, 构建周期大幅增加。细菌 Red/ET 重组方法也需要大约 50 bp 的重叠序列, 且需要预先在宿主菌中协同高效表达重组系统相关的酶 (Red α /Red β 或 RecE/RecT 等)^[15], 相对本方法的材料要求更高。而 Gateway 技术只能在特定序列位点进行重组^[16], 难以用于有序的多片段组装: 因此, 本研究的多片段质粒构建方法相对更为简便而高效, 可以广泛用于构建各种复杂片段或载体质粒。

参考文献:

- [1] 胡蓉, 汪慧慧, 刘勇, 等. 甘蓝型油菜 *BnaLPAT2* 基因在拟南芥中的种子特异性表达及过表达分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(1): 17–22.
- [2] MAGNANI E, BARTLING L, HAKE S. From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event[J]. BMC Molecular Biology, 2006, 7: 46.
- [3] MARESCA M, ERLER A, FU J, et al. Single-stranded heteroduplex intermediates in λ red homologous recombination[J]. BMC Molecular Biology, 2010, 11: 54.
- [4] 付喜爱, 张德显, 周维, 等. 细菌 λ Red 重组技术的应用及其影响因素[J]. 动物医学进展, 2015, 36(1): 91–95.
- [5] KROGH B O, SYMINGTON L S. Recombination proteins in yeast[J]. Annual Review of Genetics, 2004, 38: 233–271.
- [6] 胡翰, 于宾宾, 何启盖. 猪 β 防御素 2 成熟肽在酵母中的表达[J]. 微生物学报, 2011, 51(5): 704–709.
- [7] RUNGUPHAN W, KEASLING J D. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals[J]. Metabolic Engineering, 2014, 21: 103–113.
- [8] 陈向岭, 袁汉英, 何炜, 等. 通过同源重组构建酿酒酵母新型表达质粒[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2005, 35(1): 37–43.
- [9] FANG F, SALMON K, SHEN M W Y, et al. A vector set for systematic metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 2011, 28(2): 123–136.
- [10] KUIJPERS N G A, SOLIS-ESCALANTE D, BOSMAN L, et al. A versatile, efficient strategy for assembly of multi-fragment expression vectors in *Saccharomyces cerevisiae* using 60 bp synthetic recombination sequences[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 47.
- [11] GIETZ R D, SCHIESTL R H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. Nature Protocols, 2007, 2(1): 31–34.
- [12] LIU Y Y, CHEN J, CHENG Y, et al. A simple and rapid technique of template preparation for PCR[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1024827.
- [13] 王世伟, 李旭业, 张伟伟. 优化感受态细胞制备方法提高转化效率的研究[J]. 齐齐哈尔大学学报(自然科学版), 2009, 25(2): 86–90.
- [14] CHEN S Y, LEE L D, NAILA T, et al. Structural basis of long-range to short-range synaptic transition in NHEJ[J]. Nature, 2021, 593: 294–298.
- [15] MURPHY K C. λ recombination and recombinering[J]. EcoSal Plus, 2016, 7(1), doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0011-2015.
- [16] KARIMI M, INZÉ D, DEPICKER A. GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(5): 193–195.

责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳 正