

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00857

# 分枝杆菌中基因敲除操作工具研究进展

杜庆林, 樊祥宇, 毛金校, 谢建平

西南大学生命科学学院现代生物医药研究所, 三峡库区生态环境与生物资源省部共建国家重点实验室培育基地, 重庆北碚, 400715

**摘要:** 致病性分枝杆菌仍然是人类健康的重要威胁。相对于传统模式原核生物, 在分枝杆菌中进行基因敲除一直是一个难题。文章介绍了分枝杆菌中用于基因敲除的转载体和序列特异性重组系统的研究进展, 并进一步介绍了新近发展的分枝杆菌重组工程在基因敲除中的应用。最后, 对分枝杆菌基因敲除系统的发展历程进行了回顾, 并对未来的发展方向进行了展望。

**关键词:** 分枝杆菌; 基因敲除; 转载体; 序列特异重组; 重组工程

## Progression on genetic knockout tools in *Mycobacterium*

DU Qin-Lin, FAN Xiang-Yu, MAO Jin-Xiao, XIE-Jian-Ping

Institute of Modern Biopharmaceuticals, State Key Laboratory Breeding Base of Eco-Environment and Bio-Resource of the Three Gorges Area, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Pathogenic mycobacteria were and remain a heavy burden to public health. Unfortunately, genetic manipulation including knockout technologies of *Mycobacterium* is difficult compared with other traditional model organisms. To overcome this obstacle, achievements in *Mycobacterium* knockout technologies were summarized, including delivery vector, sequence-specific recombination system, as well as the recently developed recombinogenic engineering and its application. The future for this tool innovation is also addressed.

**Keywords:** *Mycobacterium*; knockout; delivery vector; sequence-specific recombinase; recombinogenic engineering

致病性分枝杆菌如结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)是人类健康的巨大威胁, 其引起的结核病每年大约导致 200 万人死亡, 上千万新发感染<sup>[1]</sup>。因此, 在分枝杆菌中进行遗传操作, 特别是构建基因敲除突变菌株, 对于了解分枝杆菌生长发

育、分化以及毒力相关基因的功能, 进而开发减毒疫苗, 都具有重要意义<sup>[2]</sup>。

然而, 相对于原核生物常用模式菌 *Escherichia coli* 和 *Bacillus subtilis*, 分枝杆菌遗传操作工具的发展相当滞后, 尤其是用于构建敲除突变株的遗传

收稿日期: 2011-12-07; 修回日期: 2012-04-04

基金项目: 国家重要传染病科技重大专项(编号: 2008ZX10003-006, 2012ZX10003003-004), 国家自然科学基金项目(编号: 81071316), 教育部新世纪优秀人才支持计划(编号: NCET-2011), 中央高校基本科研业务费专项资金(编号: XDJK2009A003, XDJK2011D006)和西南大学研究生科技创新基金项目(编号: kb2010017)资助

作者简介: 杜庆林, 博士研究生, 研究方向: 结核分枝杆菌持续感染的分子遗传基础与免疫遗传学。E-mail: duql@swu.edu.cn

通讯作者: 谢建平, 博士, 教授, 博士生导师。研究方向: 重要致病菌致病耐药分子机理和新干预措施研发。E-mail: georgex@swu.edu.cn

网络出版时间: 2012-5-31 02:27:20

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120531.1427.010.html>

操作工具。因此,用于分枝杆菌中构建基因敲除菌株的各种策略的研究值得我们去关注。本文介绍了同源重组在分枝杆菌基因敲除中的应用,并总结了敲除过程中使用的各种策略如转运载体的开发、序列特异性重组的应用、利用重组工程提高重组效率等。最后,探讨了分枝杆菌中用于基因敲除的遗传操作工具发展趋势。

## 1 分枝杆菌中构建突变的方法

分枝杆菌中构建基因敲除菌株的方法一般是利用同源重组产生等位替换,分为一步法和两步法(图1)<sup>[3]</sup>。一步法是指在分枝杆菌中引入突变体等位基因(Mutant allele)之后,直接和基因组中的等位基因进行替换,得到基因敲除菌株。两步法是指,先进行第一次同源重组得到携带抗性标签的单交换菌株(Single cross-over, SCO),在此基础上,进行第二次同源重组(Second cross-over, DCO),去除抗性标签。

在使用一步法构建突变菌株过程中,往往会使用抗生素标签插入到目标基因内部,以达到破坏该基因功能的目的,因此往往最后得到的突变菌株含有抗性标签。由于抗生素插入可能会引起极性效应,导致被其插入位点下游基因的表达或关闭。而且,将抗生素标记保留在基因组中,也限制了这种抗生

素标记在该菌株中的进一步使用,特别是在分枝杆菌本来就只有很少几种抗生素标签可以使用的情况下,弊端尤为明显。因此,通过两步法,将抗性标签切除掉,构建分枝杆菌无标签缺失突变菌株,在研究分枝杆菌遗传学过程中显得非常重要,也得到了广泛应用<sup>[3~10]</sup>。

## 2 分枝杆菌转运载体

通过同源重组获得目的基因敲除突变株,是了解分枝杆菌基因功能的有力工具。但是,分枝杆菌同源重组的发生率比其他细菌明显低很多,大约为 $10^{-6} \sim 10^{-5}$ <sup>[3]</sup>。因此,开发高效的DNA转运体系显得非常必要。将重组的突变体等位基因转运到分枝杆菌中的转运载体分为两类,即条件复制型质粒(或噬菌体)和自杀型(非复制型)质粒(表1)。

### 2.1 条件复制转运载体

温度敏感型(Temperature sensitive, ts)噬菌体最先被用于构建转座子随机突变体<sup>[4]</sup>,随后便被用于分枝杆菌的基因敲除<sup>[11]</sup>。该方法首先将目的基因用抗生素标签阻断或替换,然后克隆到噬菌体质粒(Phsmid)载体上。该载体可以在*E. coli*中作为质粒进行复制,在分枝杆菌中作为噬菌体进行转染。

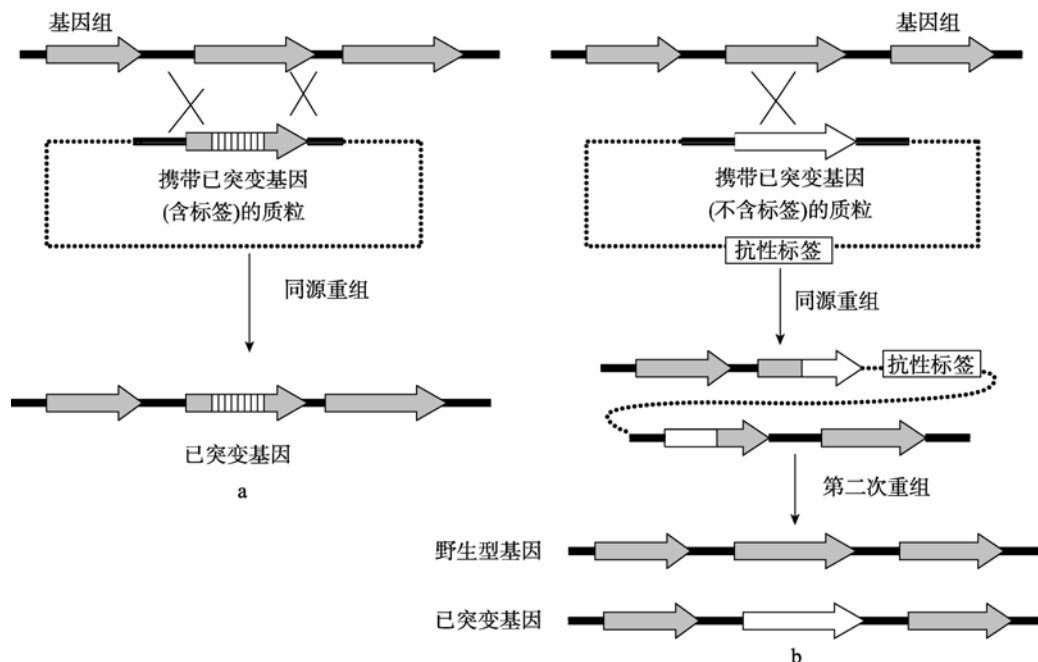


图1 同源重组法构建分枝杆菌基因敲除突变株<sup>[3]</sup>

a: 使用一步法构建突变株; b: 使用两步法构建无标记敲除菌株。

该噬菌体含有 ts 突变, 仅能在低温(30 )下复制, 不能在高温(37 )下复制。因此, 将该重组噬菌体在高温下侵染分枝杆菌, 能够将突变体等位基因转运到细菌体内。

条件复制型质粒。为了提高载体转运的效率, 需要先让载体在分枝杆菌体内进行复制增加浓度, 以提高发生同源重组的效率。在发生重组以后, 再将质粒从细菌体内移除掉。ts 质粒的引入可以实现这一目标。ts 型 pAL5000 质粒在 *E. coli* 中所有的温度下都能够复制, 但是在 *M. smegmatis* 中只有 30 能够复制, 41 不能复制<sup>[5]</sup>, 因此该质粒可以被用于定点整合和突变<sup>[6]</sup>。另外, 尽管 ts 载体在 *M. smegmatis* 中可以高效工作, 但是到了 *M. tuberculosis* 中就不敏感了, 因为后者的生长温度很受限制。因此, 来源于 *B. subtilis* 的反选基因 *sacB* 基因就成为很好的选择。*sacB* 的弊端是很容易突变。联合 ts 和 *sacB* 的载体已经用来构建快生型<sup>[6]</sup>和慢生型分枝杆菌<sup>[7,8]</sup>敲除突变株。

2.2 自杀型转运载体

自杀型(非复制)质粒是指能够在 *E. coli* 中复制但不能在分枝杆菌中复制的质粒。因此, 可以将目的基因用抗生素标签阻断或替换后克隆到自杀质粒上, 在 *E. coli* 中进行复制, 然后通过电击转化到分枝杆菌中。由于该质粒在分枝杆菌中不能够复制, 只能通过同源重组整合到分枝杆菌基因组上才能保留所带抗性筛选标记。因而通过抗性筛选就可以得到通过同源重组实现的目的基因阻断或敲除的突变株。

1995 年 Reyrat 等<sup>[9]</sup>用分枝杆菌的自杀转运载体在 *M. bovis* BCG 中构建了 *ureC* 基因敲除菌株, 该方法用抗生素标签破坏了 *ureC* 的功能。另一个应用广泛的自杀载体系统是 pNIL/pGOAL 系列质粒, 用于

构建无标记缺失突变菌株<sup>[10,11]</sup>。pNIL 系列质粒含有 p1NIL 和 p2NIL, 两者的区别是多克隆位点的酶切位点不同。pGOAL 系列质粒含有 pGOAL17 和 pGOAL19 两种质粒, 携带不同的选择标签。pGOAL17 标签含有 P<sub>Ag85</sub>-lacZ, P<sub>hsp60</sub>-sacB; pGOAL19 标签为潮霉素抗性标签 Hyg, P<sub>Ag85</sub>-lacZ 和 P<sub>hsp60</sub>-sacB。首先将目的基因及其侧翼序列克隆到 pNIL 质粒, 然后对该序列进行突变。进行突变的方法可以是将目的基因上游和下游的侧翼序列拼接在一起, 构建为缺失突变序列。然后用 PacI 酶切带有已突变目的基因的 pNIL 质粒, pGOAL 质粒上切下来的抗性标签插入到 pNIL 质粒。通过两步法筛选得到无标记缺失突变菌株。该系统的改进质粒 pNILRB5 对目的基因的插入位点进行了改造, 简化了构建突变序列的流程<sup>[1,2]</sup>。

3 引入序列特异性重组系统高效切除抗性标签

尽管可以直接通过同源重组切除已经整合到基因组中的抗性标签, 但是由于实际操作中利用宿主自身的同源重组切除标签往往比较困难。那么, 引入序列特异性重组酶切除抗性标签则可以明显提高效率。

原核生物中已经开发了多种序列重组系统可以切除抗性标签。例如, 在 *E. coli* 中使用了很多位点特异性重组系统包括来自于细菌噬菌体 P1 的 Cre/ loxP 系统<sup>[13]</sup>, 转座子  $\gamma$   $\delta$  的 TnpR/res 系统<sup>[14]</sup>, *Saccharomyces cerevisiae* 的 Flp/FRT 系统<sup>[15]</sup>。这些系统最近也都成功应用到了分枝杆菌中 (表 2)。TnpR/res 系统只能在快生型分枝杆菌中使用, Flp/FRT 和 Cre/ loxP 系统在快生型和慢生型分枝杆菌里面都能够高效工作。

表 1 分枝杆菌中使用的转运载体

转运载体	复制子来源	抗性标签*	特点	参考文献
phAE77	D29	kan	源于温度敏感性噬菌体 D29 和, Tn5367 转运载体	[4]
phAE94	TM4	kan	源于温度敏感性噬菌体 TM4 和, Tn5367 转运载体	[4]
pPR27	pAL5000	Gm	携带温度敏感性复制子 <i>oriM</i> 和 <i>sacB</i> 反选标签	[5]
pNIL and pGOAL series	自杀性载体	Kan, Hyg	用于分枝杆菌基因的克隆, 提供多种选择标签(如 <i>sacB</i> , <i>lacZ</i> , <i>hyg</i> )	[11]
pNILRB5	自杀性载体	kan	源于 pNIL, 用于非连接依赖的克隆(ligation-independent cloning)	[12]

\* Gm : 庆大霉素(gentamycin) 抗性; Hyg : 潮霉素(hygromycin)抗性; Kan : 卡那霉素(kanamycin)抗性。

### 3.1 TnpR/res 系统

依赖于转座子 $\gamma$   $\delta$ 的位点序列特异性重组系统是使用解离酶TnpR切除两个res(Resolvase recognition target)位点之间的序列<sup>[16]</sup>。该方法首先构建pCG122质粒, 该质粒的卡那霉素抗性基因(KAN)两侧加上了两个res位点(res-KAN-res cassette), 使得解离酶TnpR可以识别这两个位点。同时构建了温敏质粒pWM19, 使得tnpR基因在分枝杆菌中表达。因此, 含有res-KAN-res cassette的pCG122质粒首先在分枝杆菌中产生插入突变, 然后再通过在突变株中转入pWM19质粒, 表达解离酶TnpR, 使得res-KAN-res cassette能够被高效地从插入位点切除。

### 3.2 Flp/FRT 系统

使用Flp系统构建分支杆菌缺失突变菌株的方案如下<sup>[17]</sup>: 首先将Flp识别的FRT序列构建到潮霉素抗性标签(hyg)两端, 形成FRT-hyg-FRT cassette, 然后将这个cassette构建到自杀型等位重组质粒中, 形成pMN252质粒。该质粒还含有氨基青霉素抗性标签, 但是不含分枝杆菌复制起始位点。另外, 在该质粒上加上一个来源于pAL5000的温度敏感性复制起始位点, 构建了pML001, 该质粒可以在分枝杆菌中进行复制。该系统的另一个质粒是能够表达Flp的质粒pMN234, 该质粒同时具有rpsL+反选基因, 在发生了等位交换的突变菌株中可以通过识别FRT位点, 切除hyg抗性标签。

但是, 这个体系最初只能在*M. smegmatis*中使用, 并不能在慢生型分枝杆菌中使用, 极大地限制了该系统的应用。可能的原因是慢生型分枝杆菌平均G+C含量往往大于65%, 而*flp*的G+C含量却只有38%, 所以*flp*在慢生型分枝杆菌中不能表达。通过按照慢生型分枝杆菌密码子偏好性改造*flp*基因, 使其G+C含量上升到61%, 能够显著提高Flp在慢生型分枝杆菌中切除FRT-hyg-FRT cassette的能力<sup>[18]</sup>。该改进系统的整合质粒pML116使用另外加上了源于L5噬菌体整合酶的attP位点, 能够将带有FRT-hyg-FRT

cassette的片段整合到基因组上。同时具有经改造后能够适应慢生型分枝杆菌密码子偏好性的*flp*携带质粒pML597能够将基因组上的抗性标签切除掉。

### 3.3 Cre/loxP 系统

另外, 在慢生型分枝杆菌中可以使用Cre重组酶进行替代<sup>[19]</sup>。该系统的等位交换质粒为pML399, 含有loxP-hyg-loxP cassette。也可以将分枝杆菌温敏型复制起始位点构建到该质粒上, 形成条件复制型质粒。该系统的另一个质粒pCreSacB1含有表达Cre的重组酶的*flpe*基因, 另外还含有*sacB*反选基因, 能够在*E. coli*中进行复制的复制起始位点oriE, 源于质粒pAL5000的分枝杆菌复制起始位点oriM, 以及卡那霉素抗性基因*aph*。

### 3.4 Xer-cise 系统

然而, 引入外源水解酶切除抗性标签的方法需要将外源水解酶构建到复制型表达载体, 然后转入到分枝杆菌中才能发挥作用, 并且在切除抗性标签之后还要将该表达载体消除掉。这比较耗时, 尤其是在慢生型分枝杆菌中。解决这一问题的一种策略是利用细菌本身的编码的重组酶对抗性基因进行敲除。*E. coli*和*B. subtilis*自身编码的内生Xer重组酶(Xer-cise)可用于无标记基因敲除<sup>[20]</sup>。Xer-cise系统中的XerC和XerD对细胞分裂期间其染色体之间分离过程中发挥作用, 通过识别复制末端的28 bp的*dif*序列, 催化染色体二聚体解聚, 形成单聚体<sup>[21]</sup>。因为Xer-cise系统在所有革兰氏阴性和阳性细菌中都非常保守<sup>[22]</sup>, 因此这个系统在最近被应用到分枝杆菌中<sup>[23]</sup>。该系统将两个*dif*位点添加到Hyg标签两边, 形成dif-hyg-dif cassette, 在整合进基因组后, 通过分枝杆菌基因组编码的重组酶XerC和XerD切除抗性标签, 构建无标记敲除菌株。

表 2 分枝杆菌中使用的序列特异性重组系统

系统	来源	特性	应用	参考文献
TnpR/res	$\gamma$ $\delta$ 转座子	TnpR 能够识别并切除 res-KAN-res cassette	仅快生型分枝杆菌	[24]
Flp/FRT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Flp 能够识别并切除 FRT-hyg-FRT cassette	快生、慢生型分枝杆菌	[17,18]



Cre/loxP	细菌噬菌体 P1	Cre 能够识别并切除 loxP-hyg-loxP cassette	快生、慢生型分枝杆菌	<a href="#">[19]</a>
Xer-cise	宿主细菌基因组	XerC 和 XerD 能够识别并切除 dif-hyg-dif cassett	快生、慢生型分枝杆菌	<a href="#">[23]</a>

## 4 分枝杆菌重组工程系统

重组工程(Recombineering, recombination-mediated genetic engineering)是利用噬菌体重组酶介导的体内同源重组,它主要对DNA进行体内操作且不受其长度影响,已成为研究基因功能的主流工具。Marinelli等<sup>[25]</sup>将分枝杆菌噬菌体Che9c编码的重组酶gp60和gp61克隆到含诱导型乙酰胺酶启动子的质粒上,将此质粒(pJV53)电转到相应分枝杆菌中,然后制备重组工程菌感受态细胞。另一方面,构建缺失基因的相应等位交换底物(Allelic exchange substrates, AESs),将其电转化至重组工程菌内即可将突变体等位基因转运到细菌体内。典型的AESs包括靶标基因、抗生素抗性基因(或其他筛选基因)、底物上游和下游同源臂<sup>[26]</sup>。现已利用此方法在*M. smegmatis*中构建出多个基因置换突变菌株,其重组效率可提高10~100倍,达到 $10^{-4}$ <sup>[27]</sup>。

## 5 结语和展望

除了在分枝杆菌中进行正向遗传学操作获得诸如过表达等效果,通过基因敲除从另一个角度证实基因的功能也非常必要。因为在通过高表达增强基因功能的同时,我们还需要看看敲除该基因是否会缺失该功能。当然,探索分枝杆菌敲除技术的过程是非常艰难的。分枝杆菌重组效率低是制约敲除技术发展的瓶颈。在突破这个瓶颈的过程中,我们采取了多种策略:(1)通过改造转载体增加分枝杆菌细胞内携带等位交换物质粒的量,包括使用ts质粒、ts噬菌体进行转运等;(2)在抗性标签两端引入序列特异性重组位点,通过外源导入或细菌基因组本身编码的重组酶(水解酶)切除掉抗性标签;(3)通过重组工程系统,引入分枝杆菌噬菌体的重组酶增强同源重组的效率。

分枝杆菌中用于基因敲除的遗传操作工具已经取得了巨大进步,但相对于传统的*E. coli*和*B. subtilis*操作工具,其效率仍然需要大力提高。在未来的分枝杆菌缺失突变操作工具的发展中,除了进一步开发高效转载体以增强其转运能力,寻找更

加有效的外源重组酶(如来自于新的噬菌体)进行重组工程,也是一个值得努力的方向。

## 参考文献(References):

- [1] WHO. Worl Health Organization Report 2010, Global tuberculosis control. 2010. [DOI](#)
- [2] Machowski EE, Dawes S, Mizrahi V. TB tools to tell the tale-molecular genetic methods for mycobacterial research. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(1): 54–68. [DOI](#)
- [3] Muttucumaru DG, Parish T. The molecular biology of recombination in Mycobacteria: what do we know and how can we use it? *Curr Issues Mol Biol*, 2004, 6(2): 145–157. [DOI](#)
- [4] Bardarov S, Kriakov J, Carriere C, Yu SW, Vaamonde C, McAdam RA, Bloom BR, Hatfull GF, Jacobs WR Jr. Conditionally replicating mycobacteriophages: a system for transposon delivery to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(20): 10961–10966. [DOI](#)
- [5] Guilhot C, Gicquel B, Martin C. Temperature-sensitive mutants of the mycobacterium plasmid pAL5000. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 77(1–3): 181–186. [DOI](#)
- [6] Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Generation of unmarked directed mutations in mycobacteria, using sucrose counter-selectable suicide vectors. *Mol Microbiol*, 1996, 20(5): 919–925. [DOI](#)
- [7] Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Positive selection of allelic exchange mutants in *Mycobacterium bovis* BCG. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, 144(2–3): 161–166. [DOI](#)
- [8] Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol*, 1998, 28(3): 413–420. [DOI](#)
- [9] Reyrat JM, Berthet FX, Gicquel B. The urease locus of *Mycobacterium tuberculosis* and its utilization for the demonstration of allelic exchange in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(19): 8768–8772. [DOI](#)
- [10] Parish T, Stoker NG. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* tlyA plcABC mutant by gene replacement. *Microbiology*, 2000, 146(Pt 8): 1969–1975. [DOI](#)
- [11] Parish T, Gordhan BG, McAdam RA, Duncan K, Mizrahi V, Stoker NG. Production of mutants in amino acid biosynthesis genes of *Mycobacterium tuberculosis* by homologous

- recombination. *Microbiology*, 1999, 145(Pt 12): 3497–3503. [DOI](#)
- [12] Balhana R, Stoker NG, Sikder MH, Chauviac FX, Kendall SL. Rapid construction of mycobacterial mutagenesis vectors using ligation-independent cloning. *J Microbiol Methods*, 2010, 83(1): 34–41. [DOI](#)
- [13] Hasan N, Koob M, Szybalski W. Escherichia coli genome targeting, I. Cre-lox-mediated *in vitro* generation of *ori* plasmids and their *in vivo* chromosomal integration and retrieval. *Gene*, 1994, 150(1): 51–56. [DOI](#)
- [14] Tsuda M. Use of a transposon-encoded site-specific resolution system for construction of large and defined deletion mutations in bacterial chromosome. *Gene*, 1998, 207(1): 33–41. [DOI](#)
- [15] Merlin C, McAteer S, Masters M. Tools for characterization of *Escherichia coli* genes of unknown function. *J Bacteriol*, 2002, 184(16): 4573–4581. [DOI](#)
- [16] Reed RR. Transposon-mediated site-specific recombination: a defined *in vitro* system. *Cell*, 1981, 25(3): 713–719. [DOI](#)
- [17] Stephan J, Stemmer V, Niederweis M. Consecutive gene deletions in *Mycobacterium smegmatis* using the yeast FLP recombinase. *Gene*, 2004, 343(1): 181–190. [DOI](#)
- [18] Song HH, Niederweis M. Functional expression of the FLP recombinase in *Mycobacterium bovis* BCG. *Gene*, 2007, 399(2): 112–119. [DOI](#)
- [19] Malaga W, Perez E, Guilhot C. Production of unmarked mutations in mycobacteria using site-specific recombination. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 219(2): 261–268. [DOI](#)
- [20] Bloor AE, Cranenburgh RM. An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(4): 2520–2525. [DOI](#)
- [21] Hendrickson H, Lawrence JG. Mutational bias suggests that replication termination occurs near the *dif* site, not at Ter sites. *Mol Microbiol*, 2007, 64(1): 42–56. [DOI](#)
- [22] Recchia GD, Sherratt DJ. Conservation of *xer* site-specific recombination genes in bacteria. *Mol Microbiol*, 1999, 34(5): 1146–1148. [DOI](#)
- [23] Cascioferro A, Boldrin F, Serafini A, Provvedi R, Palu G, Manganello R. Xer site-specific recombination, an efficient tool to introduce unmarked deletions into mycobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(15): 5312–5316. [DOI](#)
- [24] Bardarov S, Bardarov Jr S Jr, Pavelka Jr MS Jr, Sambandamurthy V, Larsen M, Tufariello J, Chan J, Hatfull G, Jacobs Jr WR Jr. Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology*, 2002, 148(Pt 10): 3007–3017. [DOI](#)
- [25] Marinelli LJ, Piuri M, Swigoňová Z, Balachandran A, Oldfield LM, van Kessel JC, Hatfull GF. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *PLoS One*, 2008, 3(12): e3957. [DOI](#)
- [26] van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. Recombineering mycobacteria and their phages. *Nature Rev Microbiol*, 2008, 6(11): 851–857. [DOI](#)
- [27] van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods*, 2007, 4(2): 147–152. [DOI](#)

## • 综合信息 •

### 慢病毒与泡沫病毒分子生物学

ISBN : 978-7-03-034123-5/Q·2906

编著者：耿运琪等 定价：260 装帧：精装

读者对象：本书可供从事反转录病毒，特别是慢病毒和泡沫病毒研究的科技工作者及相关专业的研究生参考。

内容提要：慢病毒和泡沫病毒同属反转录病毒科。前者的某些成员，如人免疫缺陷病毒，可引发严重威胁人类健康的艾滋病；而后者，迄今尚未发现它与宿主的任何疾病相关。本书介绍了作者在慢病毒和泡沫病毒方面的部分研究成果，内容包括慢病毒基因组的结构和功能、潜伏感染机制、动物慢病毒在艾滋病防控方面的潜在价值、泡沫病毒独特的基因表达调控方式及其在进化中的重要地位等。目前有关动物慢病毒和泡沫病毒的研究相对滞后于其他致病性病毒，作者所在的实验室是国际上长期从事牛免疫缺陷病毒和泡沫病毒系统研究的主要实验室之一，因此，本书的内容部分反

映了该领域的研究进展。

联系人：科学出版社科学销售中心 周文宇

电话：010-64017301 E-mail: [zhouwenyu@mail.sciencep.com](mailto:zhouwenyu@mail.sciencep.com)