

构建定向 T 载体用于基因克隆和表达

钟星^{1,2}, 翟超¹, 陈亮^{1,2}, 余晓岚¹, 蒋思婧¹, 严红¹, 杨登想³, 马立新^{1,2}

1 湖北大学生命科学学院, 湖北 武汉 430062

2 湖北省工业生物技术重点实验室, 湖北 武汉 430062

3 湖北大学知行学院生物工程系, 湖北 武汉 430011

钟星, 翟超, 陈亮, 等. 构建定向 T 载体用于基因克隆和表达. 生物工程学报, 2013, 29(4): 510-519.

Zhong X, Zhai C, Chen L, et al. Construction of directional T vector for gene cloning and expression. Chin J Biotech, 2013, 29(4): 510-519.

摘要: 传统的 T 载体克隆方法需要烦琐的后续步骤来筛选和鉴定重组子, 并且无法实现目的基因的定向克隆。为了克服这些问题, 本研究在 pET-23a(+)的基础上构建了定向 T 载体 pETG, 首先通过定点诱变消除 pET-23a(+)上的两个 *Bfu* I 位点得到 PET-23aM; 设计一对引物在 5'端各引入一个 *Bfu* I 位点, 下游引物紧邻 *Bfu* I 位点引入 13 bp 的部分 LacO 序列, 用该引物从 pHBM2002 上扩增 *Prrn-gfp* 表达盒, 插入 PET-23aM 的 *Nde* I 和 *Xho* I 位点, 得到定向 T 载体 pETG。PCR 扩增的目的基因通过下游引物引入 7 bp 剩余的 LacO 序列, 该基因片段与 *Bfu* I 酶切制备的定向 T 载体连接、转化大肠杆菌 DH10 β 感受态细胞, 通过补加了 X-gal 的平板筛选蓝色重组子。质粒酶切和 PCR 鉴定表明蓝色菌落全部为定向插入的重组子, 重组效率 100%, 利用本方法成功地定向克隆了 103 个人类肝蛋白编码基因 cDNA, 克隆过程无需复杂的步骤筛选鉴定重组子。随机选择了其中的 8 个基因的克隆进行表达, 结果显示 8 个克隆均在大肠杆菌中获得成功表达。该结果表明定向 T 载体构建成功, 并且该载体非常适合基因的克隆和表达。

关键词: TA 克隆, PCR 克隆, 重组子筛选, 蛋白质表达

Received: October 12, 2012; **Accepted:** January 9, 2013

Supported by: Major Research Plan of National Natural Science Foundation of China (No. 2013CB910801), National Natural Science Foundation of China (No. 31172320), Natural Science Foundation of Hubei Province, China (No. 2012FFA034), Youth Foundation of Educational Commission of Hubei Province (Nos. Q20120111, Q20120102).

Corresponding author: Lixin Ma. Tel: +86-27-50865628; Fax: +86-27-88666349; E-mail: malixing@hubu.edu.cn

国家重大科学研究计划 (No. 2013CB910801), 国家自然科学基金 (No. 31172320), 湖北省自然科学基金 (No. 2012FFA034), 湖北省教育厅青年基金 (Nos. Q20120111, Q20120102) 资助。

Construction of directional T vector for gene cloning and expression

Xing Zhong^{1,2}, Chao Zhai¹, Liang Chen^{1,2}, Xiaolan Yu¹, Sijing Jiang¹, Hong Yan¹, Dengxiang Yang³, and Lixin Ma^{1,2}

¹ Faculty of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

² Hubei Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Wuhan 430062, Hubei, China

³ Department of Bioengineering, College of Zhixing, Hubei University, Wuhan 430011, Hubei, China

Abstract: Traditional T vector cloning method requires onerous procedures for identifying recombinant, and directional cloning was impossible. In order to overcome these problems, we have devised a directional T vector pETG based on pET-23a(+). For gene cloning, 7 bp partial LacO sequence was introduced into DNA fragment to reconstitute a full length LacO with *Bfu* I digested T vector. After transformation, blue colonies were selected on LB plate supplemented with X-gal. Restriction enzyme digestion and PCR identification showed that all blue colonies contained the directionally inserted recombinants and the recombinant efficiency was nearly 100%. We have successfully cloned 103 genes from human liver cDNA; in the study complicated procedures for screening of recombinant were not required. Eight pETG clones were picked for protein expression, and all the clones successfully produced corresponding proteins. We demonstrated that the directional T vector was successfully constructed, and it was very suitable for gene cloning and expression.

Keywords: TA cloning, PCR cloning, screening recombinant, protein expression

随着越来越多的物种基因组测序工作被完成,基因组数据库收录的基因组信息日益丰富,由已知序列设计引物扩增 DNA 并克隆,再进行相关结构、功能的研究,加快了生命科学研究的进程^[1-2]。聚合酶链反应 (PCR) 是最强有力的基因克隆方法,为了直接克隆 PCR 产物, T 载体被广泛使用^[3-5]。尤其当面对大量的克隆工作时,使用 T 载体克隆 PCR 产物便成为最经济简便的做法。传统的 T 载体克隆方法利用 *LacZ alpha* 插入失活筛选插入事件^[6],但是由于 *LacZ* 基因的移码、载体自身发生异常重组等事件将导致产生一部分假阳性白色菌落,转化后的白色菌落仍然需要被大量培养进行质粒抽提和鉴定^[7-8];利用传统的 T 载体进行克隆表达时,由于插入片段

的方向具有随机性,无法保证定向克隆,仍然需要筛选定向插入的克隆。

为了克服传统 T 载体克隆方法需要大量鉴定重组子和无法保证定向克隆的缺点,我们设计了一个 *LacZ* 正向筛选方案来实现免鉴定重组子、定向 T 载体克隆基因的方法。如图 1B 所示,在非诱导条件下的 *Lac+* 的宿主菌中, *Lac* 启动子下游 *LacO* 序列被 *LacO* 结合蛋白 *LacI* 所阻遏, *LacZ* 基因的表达处于抑制状态,该菌落在 X-gal 底物平板上显示为白色;如果基于 pBR322 的高拷贝载体上含有 *LacO* 序列,该载体将从 *LacZ* 启动子单元上竞争性吸附宿主菌内源 *LacI* 蛋白,对宿主菌的乳糖启动子去抑制^[9-10],表达 β -半乳糖苷酶并降解 X-gal 底物,使该菌落显示为蓝色

(图 1C)。pET-23a(+)是基于 pBR322 改造的高拷贝载体。我们在 pET-23a(+)的基础上构建了定向 T 载体 pETG, 利用 PCR 片段和定向 T 载体连接重构完整的 LacO 序列 (图 1A), 转化 *Lac*⁺ 菌株, 使含有正确克隆的菌落变蓝来指示定向插入的重组事件 (图 1C)。对转化后平板上的蓝色菌落接种抽提质粒后酶切和 PCR 鉴定表明蓝色菌落全部为定向插入的重组子。本研究利用构建的定向 T 载体成功地克隆了 103 个人类肝蛋白编码基

因, 随机挑选其中 8 个基因的克隆进行蛋白质表达, 均获得成功表达。对比传统方法, 利用该 T 载体进行基因克隆非常简单、高效、可靠, 并且可以实现基因定向插入, 实验过程无需鉴定重组子, 避免了大量抽提质粒和 PCR 鉴定的步骤, 节约了大量的时间和试剂成本, 同时该定向 T 载体还兼容传统 T 载体基因克隆, 该定向 T 载体有大规模高通量的基因克隆和表达的应用前景。

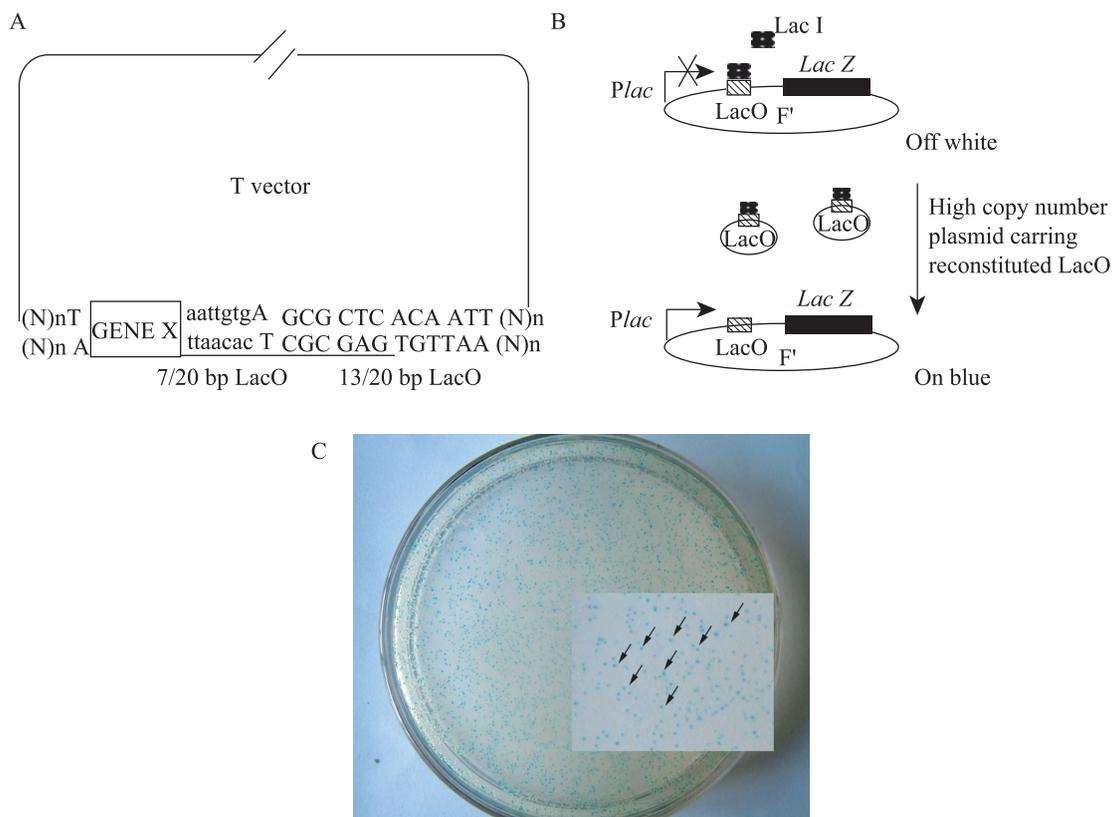


图 1 定向 T 载体克隆原理

Fig. 1 Principle of a directional T vector cloning method. After ligation, the insert and vector will reconstituted a full length of ideal LacO(A); reconstituted full length of ideal LacO occurring on a high copy number plasmid pETG will titrate out of the lac repressors (LacI) which adhered to the LacO sites on F' plasmid, thus *LacZ* transcription is derepressed (B), and the colonies go blue (C). Followed by transformation, the recombinant events were phenotypically selected, transformants with blue color revealed the desired recombinants.

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

表达载体 pET-23a(+), 用于表达的大肠杆菌 BL21(DE3) 购自 Novagen 公司, 用于克隆的大肠杆菌 XL10-Gold 购自 Stratagen 公司, DH10 β [基因型: *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ*M15 *AlacX74deoR recA1 ara Δ 139 (ara, leu) 7697 galU galK λ -rpsL nupG tonA umuc:: pir116 -frit F' (Lac+ pro+ Δ oriT::Tc)] 为哈佛医学院 Stephen J Elledge 教授所赠送^[10], *gfp* 模板质粒 pHBM2002 为本实验室朱德武博士构建^[11]。*

1.2 主要仪器和试剂

DNA 分子量标准、Solution I 连接试剂盒、LA *Taq* 聚合酶和限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I 及 *Stu* I 购自 TaKaRa 公司; 蛋白质分子量标准和限制性内切酶 *Bfu* I 购于 Fermentas 公司; 质粒抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, 引物 (表 1) 均在上海桑尼生物科技有限公司合成。所有的分子克隆操作都按照 Sambrook 等^[12]提供的方法进行。

1.3 方法

1.3.1 定点诱变消除 pET-23a(+) 上的 *Bfu* I 位点

根据 pET-23a(+) 载体序列设计两对突变引物 Mu23aF 和 Mu23aR、MublaF 和 MublaR, 将载体上的两个 *Bfu* I 酶切位点消除突变为 *Stu* I 位点。PCR 分别扩增 *Bfu* I 酶切位点两侧的载体片段, 琼脂糖凝胶回收后共转化 XL10-Gold 感受态细胞, 通过体内定点同源重组^[11], 获得重组中间载体 pET-23aM, 送上海英骏生物公司测序。

1.3.2 构建定向 T 载体 pETG

设计一对引物在 5' 端各引入 pET-23aM 同源臂和一个 *Bfu* I 位点, 下游引物紧邻 *Bfu* I 位点引入 13 bp 的部分 LacO 序列。用该引物从 pHBM2002 上扩增得到 *Prrn-gfp* 表达盒片段。载体 pET-23aM 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后, 琼脂糖凝胶回收大片段。将回收的载体片段与 *prrrn-gfp* 表达盒片段共转化大肠杆菌 XL10-Gold 感受态细胞, 通过体内定点同源重组, 获得定向 T 载体 pETG, 送上海英骏生物公司测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Mu23aF	TTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTC
Mu23aR	CCGGTAAGCGGCAGGGTC
MublaF ^a	GACCCTGCCGCTTACC AGGCCTCTGTCCGCTTTCTCC
MublaR ^a	TGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATAT AGGCCTGCTCATG
GFPF ^b	AAGGAGATATACATATGCACCATCATCATCATTCTT CGGATACGCCGTTGCTGTGTCGCA
GFPR ^b	GGTGGTGGTGCTCGAGAATTGTGAGCGCTCTAG AGGATACTTCACTTGTACAGCTCGTCCATGC
ATF5F	ATGTCACCTCTGGCGACCC
ATF5R ^c	CACAATTCTAGCAGCTACGGGTCCTCTG

Note: the oligonucleotides in bold font in a, b and c indicated the *Stu* I site, *Bfu* I site and 7 bp partial LacO sequence, respectively.

1.3.3 *Bfu* I 酶切制备 T 载体

Bfu I 酶切载体 pETG, 琼脂糖凝胶回收完全酶切后的大片段, -20°C 冻存。

1.3.4 PCR 扩增目的基因和 T 载体克隆

根据 NCBI 数据库核苷酸序列查询, 选择感兴趣的基因 (如 *ATF5*), 利用 Genetool 软件设计一对引物, 在所有的下游引物 5' 端额外补加 7 bp 部分 LacO 序列 (5'-CACAAATT-3', 如表 1 所示)。利用该引物和 LA *Taq* DNA 聚合酶扩增目的基因, 并琼脂糖凝胶回收目的片段。用连接酶试剂盒连接~60 ng PCR 产物和~20 ng 线性化定向 T 载体, 连接反应参见试剂盒说明。连接物转化大肠杆菌 DH10 β 感受态细胞, 涂布含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄西林钠和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-gal 的 LB 平板。在 37°C 培养箱中避光培养 10 h 后, 挑取蓝色转化子抽提质粒。

1.3.5 蛋白质表达和 SDS-PAGE 检测

测序正确的克隆转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 蛋白质表达和 SDS-PAGE 检测方法参见分子克隆手册^[12]。

1.3.6 目的蛋白质质谱鉴定

将目的蛋白质条带从 SDS-PAGE 胶上割下, 按文献^[13]进行胶内消化与质谱鉴定分析。

2 结果

2.1 定向 T 载体的构建

以质粒 pET-23a(+) 为模板, 引物 Mu23aF 和 Mu23aR、MublaF 和 MublaR 分别扩增获得预期的~2.1 kb 和~1.5 kb 片段, 琼脂糖凝胶回收后共转化大肠杆菌 XL10-GOLD 感受态细胞, 获得重组中间载体 pET-23aM。由于实验设计是将两个 *Bfu* I 位点消除并诱变成 *Stu* I 位点, *Stu* I 酶切

鉴定 pET-23aM 可以切出约 1.5 kb 小片段, 而 pET-23aM 经 *Bfu* I 酶切无法切出小片段, 该酶切鉴定结果表明 pET-23a(+) 上面的 *Bfu* I 酶切位点被成功诱变消除 (图 2)。

以质粒 pHBM2002 为模板, 引物 GFPF 和 GFPR 扩增获得预期的 1 098 bp *prrn-gfp* 表达盒片段, 琼脂糖凝胶回收后通过同源重组插入 pET-23aM 中 *Nde* I 和 *Xho* I 位点, 获得定向 T 载体 pETG (图 3)。pETG 经 *Bfu* I 酶切得到约 1 kb 和 3.6 kb 的两个片段 (图 4), 该结果表明 *gfp* 表达盒已成功插入载体 pET-23aM 中, 两个 *Bfu* I 酶切位点均被正确引入。

2.2 制备线性化定向 T 载体

超纯质粒抽提试剂盒抽提 pETG 质粒, *Bfu* I 完全酶切 pETG 后, 琼脂糖凝胶回收约 3.6 kb 的 T 载体片段 (图 4), 制备线性化定向 T 载体完成, 该 T 载体可以用于下游连接反应。

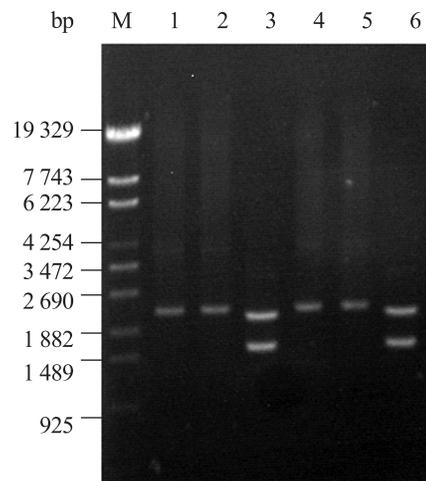


图 2 酶切鉴定 pET23aM

Fig. 2 Identification of pET23aM by restriction enzyme digestion. M: DNA marker; 1: pET23aM; 2: pET-23a(+); 3: pET23aM digested with *Stu* I; 4: pET23aM digested with *Bfu* I; 5: pET-23a(+) digested with *Stu* I; 6: pET-23a(+) digested with *Bfu* I.

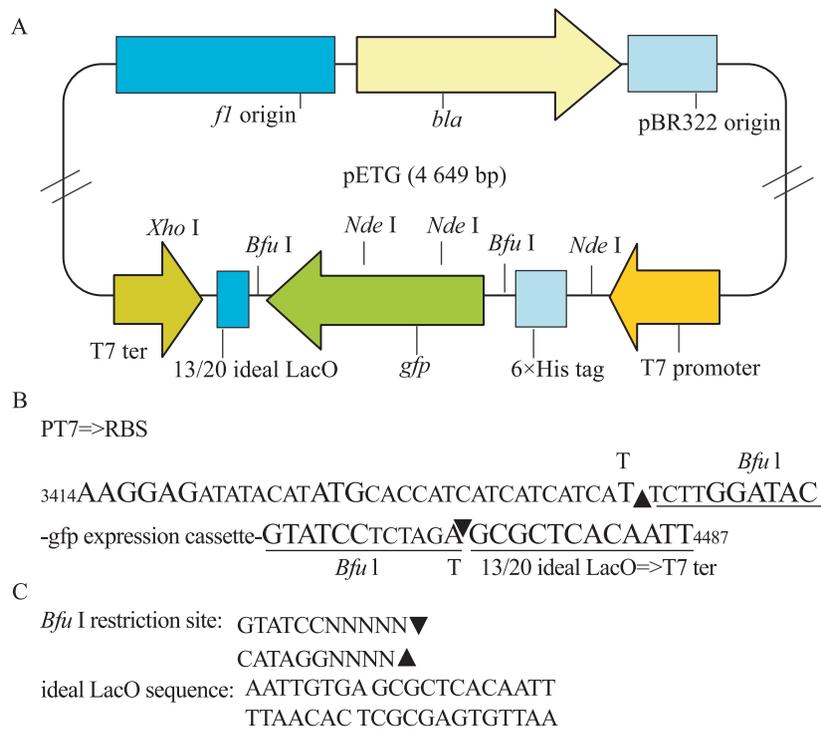


图 3 pETG 载体图谱及部分关键序列

Fig. 3 A plasmid map of pETG and key sequences. (A) *gfp* expression cassette flanked by 6×his tag-*Bfu* I sites and *Bfu* I sites-13/20 LacO sequence was inserted into *Nde* I-*Xho* I site of pET-23aM. (B) The key sequence of pETG was indicated. (C) *Bfu* I restriction site and a full length of LacO sequence were showed, N stands for any base.

2.3 连接转化和分析重组率

PCR 扩增的基因片段连接线性化定向 T 载体,转化大肠杆菌 DH10β,从转化平板(图 1)上随机挑取 10 个蓝色单菌落,抽提质粒并进行酶切和 PCR 鉴定分析重组率。由于 T 载体末端设计有 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点,可以利用该酶将插入片段 *ATF5* (849 bp) 切除下来,质粒的酶切鉴定结果显示从随机挑取的 10 个蓝色的单菌落抽提出来的质粒都切出目的基因大小的片段,与预期结果相符(图 5A),同时利用基因特异性的上游引物和载体通用引物 T7ter 进行 PCR 扩增表明,10 个质粒都含有目的基因插入,并且均为正向插入,扩增片段大小都和预期结果相符(图 5B),重组率为 100%。

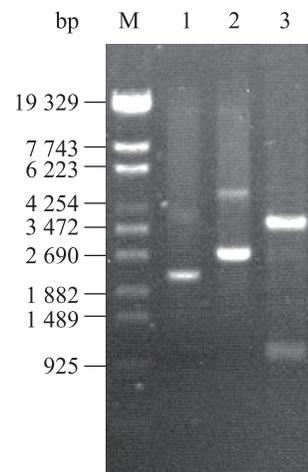


图 4 定向 T 载体 pETG 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 4 Identification of directional T vector pETG by agarose gel electrophoresis. M: DNA marker; 1: pET23aM (3 666 bp); 2: pETG (4 649 bp); 3: pETG digested with *Bfu* I.

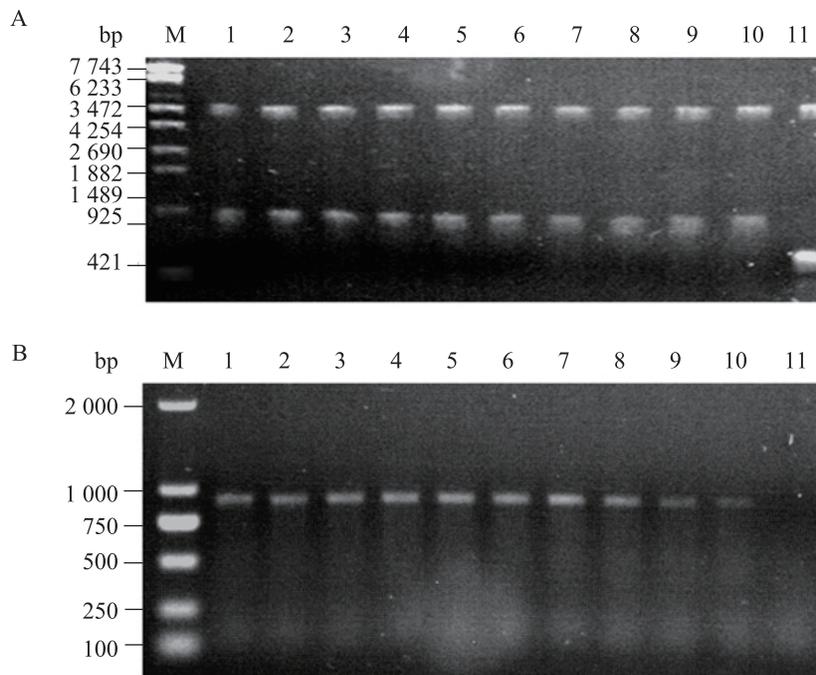


图5 重组子的酶切 (A) 和 PCR (B) 鉴定

Fig. 5 Identification of recombinants by restriction enzyme digestion and PCR. (A) Identification of recombinants by *Nde* I-*Xho* I restriction digestion. M: DNA marker; 1-10: *Nde* I-*Xho* I digested plasmids isolated from 10 blue colonies, respectively; 11: PETG digested by *Nde* I-*Xho* I. (B) The plasmid DNA from 10 independent blue colonies was amplified by PCR, PCR products were separated on a 1.5% agarose gel and visualized after EB staining. M: DNA marker; 1-10: PCR products of 10 recombinants isolated from 10 blue colonies, respectively; 11: PCR product of vector PETG.

2.4 蛋白质表达和分析

本研究利用定向 T 载体成功地克隆了 103 个人类肝蛋白编码基因, 从中随机挑选 8 个基因的克隆 (基因名称和克隆效率见表 2), 转化大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导蛋白质表达后, SDS-PAGE 分析如图 6 所示, 8 个 pETG 克隆经诱导后在理论大小处均有蛋白条带变粗, 表明有目标蛋白质表达 (图 6), 重组蛋白质条带割胶后经质谱鉴定证明为对应的目标蛋白质。

3 讨论

在当代分子生物学研究当中, 无论研究的是

已知基因还是未知基因, 往往需要将扩增的目的基因克隆入适当的载体中, 以便用于各种分析。T 载体克隆 PCR 产物虽然已经得到了广泛的应用, 但是由于存在假阳性的问题, 大量的资源和时间被浪费在后续重组子筛选鉴定中; 对于某些基因的特定功能研究还需要进行蛋白质表达, 由于基因插入 T 载体的方向是随机的, 反向插入基因无法正常表达, 理论上传统 T 载体克隆方法最高只有 50% 的几率获得定向插入的重组子, 利用传统 T 载体进行基因克隆和表达仍然需要耗费大量时间、人力和物力用来抽提质粒、鉴定基因的插入方向^[7-8]。如何实现高通量基因克隆和表

表 2 已表达的 8 个基因的克隆效率和理论蛋白分子量

Table 2 Clone efficiency and protein theoretical molecular weight of 8 gene

Gene	GenBank Accession No.	Length (bp)	Clone efficiency	Molecular weight (kDa)
<i>PTPRA</i>	BC027308	2382	100% (9/9)	89.7
<i>ZNF597</i>	NM_152457	1275	100% (12/12)	48.0
<i>ZNF24</i>	BC003566	1107	100% (10/10)	42.1
<i>ATF2</i>	BC026175	630	100% (10/10)	23.0
<i>ATF5</i>	BC005174	849	100% (10/10)	30.7
<i>JNKK</i>	BC060764	1200	100% (10/10)	44.4
<i>IRF1</i>	NM_002198	978	100% (24/24)	36.5
<i>ZNF435</i>	NM_025231	1047	100% (10/10)	41.0

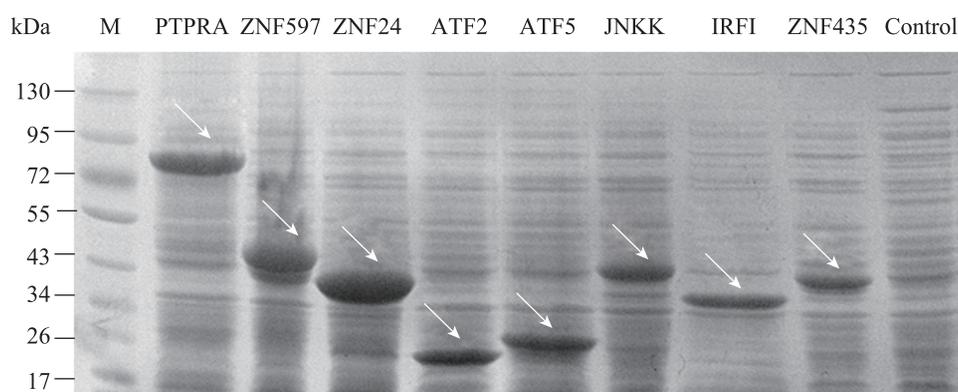


图 6 SDS-PAGE 分析重组蛋白

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins. M: molecular mass standard protein. Control: BL21(DE3)/pETG.

达，避免繁琐的筛选重组子工作、降低实验研究的工作强度一直是分子生物学研究者所希望的。

目前利用传统的 T 载体进行基因克隆存在两大问题，一是假阳性问题无法避免，需要大量抽提转化子进行鉴定；二是基因插入方向不能定向，仍然需要大量人工筛选转化子进行插入方向鉴定。传统方法利用 *GFP*^[14]，*KillerRed*^[8,15] 或者 *LacZ*^[6] 等基因的表型缺失来淘汰不完全酶切的载体背景，该方法在一定程度上降低了筛选重组

子的工作量，但是仍然无法避免线性化 T 载体异常重组和反向插入基因造成的背景干扰；商品化的 Topo[®] TA 克隆试剂盒可以实现基因的定向克隆，重组效率大约在 90%，该方法同样存在背景污染的问题，克隆仍然需要大量抽提质粒并鉴定重组子，并且载体只能一次性使用，需要购买昂贵的试剂盒。本研究利用自制的定向 T 载体和 PCR 片段连接重构 20 bp LacO 序列来一步法表型筛选基因的插入和定向双重事件。当 T 载体和

基因片段发生正确的连接反应时, T 载体上的 13 bp 部分 LacO 序列将和 PCR 片段上的 7 bp 部分 LacO 序列重构完整的 20 bp LacO 序列, 重构的 LacO 序列将竞争性吸附宿主菌中的 LacO 结合蛋白 (LacI), 对宿主菌的 *LacZ* 基因表达去抑制 (图 1), 该单菌落在 X-gal 底物平板上将变蓝。该方法筛选重组子的方式比传统 T 载体使用的 *LacZ alpha* 插入失活的遗传筛选方式更为严谨, T 载体自环化产生的转化子、反向插入转化子、T 载体背景和 *LacZ* 自发移码转化子都不会被筛选到, 而仅仅只有目的基因定向插入, 且 20 bp LacO 序列成功重构的重组子可以被筛选到。由于该筛选方案是基于可见的表型获得筛选, 不同于传统的表型缺失筛选, 该筛选方法保证了克隆筛选的唯一正确性, 如图 1 所示的蓝色转化子抽提质粒进行鉴定后显示定向插入重组效率为 100%, 所有被抽提的蓝色转化子质粒都含有定向插入的目的基因。

利用该定向 T 载体进行基因克隆非常简单、高效、可靠, 不用购买商业的 T 载体试剂盒, 还可以实现基因的定向插入; 实验过程避免了繁琐的筛选鉴定重组子工作; 并且该定向 T 载体还可以实现基因的无缝克隆, 表达的蛋白质不会融合额外的非必要氨基酸序列。常规方法利用 *Xcm* I、*Ahd* I、*EcoR* V 制备 T 载体均会在克隆序列附近残留部分酶切位点碱基序列, 无法实现无缝克隆, 当进行蛋白质表达时, 蛋白序列上会附加额外的氨基酸序列, 该序列可能会对蛋白质的表达或者功能表征有一定负面影响。本研究利用限制性内切酶 *Bfu* I 酶切 T 载体实现了基因的无缝克隆, 避免了非必要序列的融合。*Bfu* I 属于 IIS 型限制性内切酶, 其切割位点在识别位点之外, 并

且切割位点为识别位点下游第 5 位任意的碱基 (图 3C), 通过 PCR 扩增 *prn-gfp* 引入两个背向插入的 *Bfu* I 位点, 其识别位点临近 *prn-gfp*, 当制备线性化的 T 载体时, 该限制性酶切位点被全部切除, 不会残留任何酶切位点序列, 从而实现了基因的无缝融合, 当进行蛋白质表达时不会给蛋白质序列融合额外的氨基酸序列, 保证了蛋白质序列的天然忠实性。

本实验成功构建了一种新颖的定向 T 载体, 利用该 T 载体成功的定向克隆了 103 个人类肝蛋白编码基因。随机挑选了其中 8 个基因的克隆进行蛋白质表达显示 8 个基因对应的蛋白质均获得成功表达。利用该定向 T 载体进行基因的克隆和表达非常简单、高效, 不仅省去了大量复杂的鉴定重组子工作, 实现了基因的定向插入、基因的无缝融合表达, 还可以节约大量宝贵的科研时间, 降低克隆成本, 同时该定向 T 载体还兼容传统的 T 载体基因克隆, 有高通量大规模基因克隆和表达的应用前景。

REFERENCES

- [1] Eisenberg D, Marcotte EM, Xenarios I, et al. Protein function in the post-genomic era. *Nature*, 2000, 405(6788): 823–826.
- [2] Vukmirovic OG, Tilghman SM. Exploring genome space. *Nature*, 2000, 405(6788): 820–822.
- [3] Cha J, Bishai W, Chandrasegaran S. New vectors for direct cloning of PCR products. *Gene*, 1993, 136(1/2): 369–370.
- [4] Jeung JU, Cho SK, Shim KS, et al. Construction of two pGEM-7Zf(+) phagemid T-tail vectors using *Ahd* I-restriction endonuclease sites for direct cloning of PCR products. *Plasmid*, 2002, 48(2): 160–163.
- [5] Holton TA, Graham MW. A simple and efficient

- method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(5): 1156.
- [6] Choi YJ, Wang TT, Lee BH. Positive selection vectors. *Crit Rev Biotechnol*, 2002, 22(3): 225–244.
- [7] Ito Y, Suzuki M, Husimi Y. A T-extended vector using a green fluorescent protein as an indicator. *Gene*, 2000, 245(1): 59–63.
- [8] Liu X, Liu X, Zhou Y, et al. T vector bearing KillerRed protein marker for red/white cloning screening. *Anal Biochem*, 2010, 405(2): 272–274.
- [9] Cranenburgh RM, Lewis KS, Hanak JA. Effect of plasmid copy number and lac operator sequence on antibiotic-free plasmid selection by operator-repressor titration in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2004, 7(4): 197–203.
- [10] Li MZ, Elledge SJ. MAGIC, an *in vivo* genetic method for the rapid construction of recombinant DNA molecules. *Nat Genet*, 2005, 37(3): 311–319.
- [11] Zhu D, Zhong X, Tan R, et al. High-throughput cloning of human liver complete open reading frames using homologous recombination in *Escherichia coli*. *Anal Biochem*, 2010, 397(2): 162–167.
- [12] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [13] Chen X, Zhai C, Kang L, et al. High-level expression and characterization of a highly thermostable chitosanase from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(4): 689–694.
- [14] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263(5148): 802–805.
- [15] Liu X, Shi R, Zou D, et al. Positive selection vector using the KillerRed gene. *Anal Biochem*, 2011 412(1): 120–122.

(本文责编 郝丽芳)