

基于同尾酶技术构建 CCL3L1 基因串联重组质粒的方法 *

乔录新¹ 张世杰² 石 英¹ 陈德喜^{1△}

(1 首都医科大学附属北京佑安医院感染科 北京 100069 2 首都医科大学附属北京佑安医院病理科 北京 100069)

摘要 目的 利用同尾酶技术将 CCL3L1 基因重复连续插入 pcDNA6.2-GW/miR 载体,构建含有 CCL3L1 基因串联体的重组质粒,实现小片段 CCL3L1 有效延长。方法 PCR 扩增 CCL3L1 基因并在引物的两端设有同尾酶 *Bam*HI 和 *Bgl*II 限制性内切酶位点,纯化 PCR 产物插入 pMD18-T 载体,阳性克隆命名为 pMD18T-CCL3L1。*Bam*HI 和 *Bgl*II 双酶切 pMD18T-CCL3L1 和 pcDNA6.2-GW/miR 载体后将第一个 CCL3L1 片段插入 pcDNA6.2-GW/miR 载体命名为 pcDNA6.2-CCL3L1-1。由于载体本身在 *Bgl*II 位点后带有 *Xho*I 酶切位点利用 *Bam*HI 和 *Xho*I 切割 pcDNA6.2-CCL3L1-1 回收 CCL3L1 片段,*Bgl*II 和 *Xho*I 切割 pcDNA6.2-CCL3L1-1 回收大片段做载体重组形成含有两个连续 CCL3L1 片段的质粒命名为 pcDNA6.2-CCL3L1-2,重复此步骤可得到含有 N 个 CCL3L1 基因串联体的重组质粒 pcDNA6.2-CCL3L1-X。结果 经酶切和测序证实成功构建含有 4 个 CCL3L1 基因串联体的重组质粒 pcDNA6.2-CCL3L1-4,并同时产生含有 1 个和 2 个 CCL3L1 基因串联体的重组质粒。结论 利用同尾酶技术可以快速有效地构建 CCL3L1 基因串联重组质粒,实现目的片段的无限扩大,为小片段基因表达的研究奠定基础。

关键词 同尾酶 CCL3L1 基因串联

中图分类号 Q75 Q78 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)02-239-03

A Novel Method for Constructing Recombinant Plasmid of CCL3L1 Tandem Repeats Via Isocaudamer Technology*

QIAO Lu-xin¹, ZHANG Shi-jie², SHI Ying¹, CHEN De-xi^{1△}

(1 Department of Infectious Diseases of Capital Medical University Affiliated Beijing Youan Hospital, Beijing, 100069 China;

2 The pathology department of Capital Medical University Affiliated Beijing Youan Hospital, Beijing, 100069 China)

ABSTRACT Objective: To construct the recombinant plasmid containing CCL3L1 tandem repeats by continuous and repeated inserting CCL3L1 gene into pcDNA6.2-GW/miR vector by isocaudamer technology, resulting in effective extension of a small fragment of CCL3L1. **Methods:** Firstly, CCL3L1 gene was amplified by using the primers with two ends of *Bam*HI and *Bgl*II restriction enzyme sites, then the purified PCR products were inserted into pMD18-T vector. Secondly, the positive clone products, named pMD18T-CCL3L1, and pcDNA6.2-GW/miR were digested by *Bam*HI and *Bgl*II. Then the first CCL3L1 fragment was inserted into pcDNA6.2-GW/miR, and the correct plasmid was named pcDNA6.2-CCL3L1-1. There was a *Xho*I behind the *Bgl*II in the vector, so pcDNA6.2-CCL3L1-1 could be digested by *Xho*I and *Bgl*II to obtain linear CCL3L1, then pcDNA6.2-CCL3L1-1 was digested by *Bam*HI and *Bgl*II to obtain linear vector. The two fragments were ligated and the correct plasmid which contained two consecutive CCL3L1 fragments was named pcDNA6.2-CCL3L1-2. Repeating this step, the recombinant plasmid pcDNA6.2-CCL3L1-X which contained N-series body of CCL3L1 gene could be obtained. **Results:** Enzyme digestion and sequencing confirmed that the recombinant plasmid pcDNA6.2-CCL3L1-4 was successfully constructed, which contained four consecutive CCL3L1 fragments, and also produced and two recombinant plasmids containing 1 or 2 CCL3L1 tandem repeats. **Conclusion:** The recombinant plasmid of CCL3L1 tandem repeats would be constructed quickly and efficiently with Isocaudamer. A method for unlimited expansion of the fragment was established, providing a basis for the study about small fragments' expression.

Key words: Isocaudamer; CCL3L1; Tandem repeats

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)02-239-03

前言

紧接着又发现了协助 M 嗜性 HIV-1 毒株进入靶细胞的受体: CCR5 和 CCR3^[2-3]。人类 CC3 配体样蛋白 1(CCL3L1 蛋白)作

自从 HIV-1 第一个趋化因子辅助受体 CXCR4 发现后^[1], 为一种趋化性细胞因子是一类低分子量多肽,其受体为

* 基金项目 国家自然科学基金面上项目(30870853) 国家自然科学基金国际(地区)合作交流项目(30910103915);

北京市自然科学基金面上项目(7092045)

作者简介 乔录新(1985-) 女 硕士研究生 主要研究方向 感染性疾病 电话 :15201488498 E-mail:qiaolx2006@163.com

张世杰(1969-) 男 实验员 主要研究方向 感染性疾病 电话 :13439316273

△通讯作者 陈德喜 E-mail: Dexi09@yahoo.com

(收稿日期 2011-5-30 接受日期 2011-06-25)

CCR5 属于 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体超家族成员^[4]。CCL3 蛋白也是 HIV-1 辅助受体 CCR5 的配体,但是 CCL3L1 蛋白与 CCR5 的亲合力更强,而且它可以被 CD26 裂解,裂解后的变异体与 CCR5 的亲合力更高,目前被认为是 HIV-1 病毒进入细胞的天然抑制剂^[5-6]。有研究进一步发现 CCL3L1 趋化因子基因拷贝数在基因水平上对 HIV 感染及艾滋病进程起着重要的决定作用,并强调趋化因子系统在 HIV 感染过程中的具有重要作用 - 即其可抑制 HIV 侵入细胞又可调节抗病毒免疫应答^[7-9]。因此 CCL3L1 基因及蛋白的研究已经成为艾滋病治疗的研究热点,但是由于其本身分子量小,体外利用生物工程制备和纯化难度大,本研究利用同尾酶技术将 CCL3L1 的片段大小有效地延长,有利于其蛋白的制备纯化,为其相关研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Xho*、*Bam*H、*Bgl*II、T4 DNA 连接酶购自 takara 公司,DNA 分子量标准(Marker)、琼脂糖凝胶回收试剂盒为北京博迈德生物技术有限公司产品,PCR 引物由上海生工(北京)生物技术有限公司合成,测序由北京博迈德生物科技有限公司完成。

1.2 质粒与菌种

模板质粒 pGEX-4T-CCL3L1 质粒为本实验室构建,pcDNA6.2-GW/miR 载体购自 invitrogen 公司,pMD18T 购自 takara 公司,大肠杆菌 DH5 α 为北京全式金生物科技有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 pMD18T-CCL3L1 质粒构建 PCR 扩增 CCL3L1 目的片段:引物 CCL3L1-BamHI-S:GTTCGCGTGGATCCCCG-GAATTC CCL3L1-linker-BglII-as:TCAGTCAGAGATCTTCG-GCCTTCGATAGAATTC。

模板 pGEX-4T-CCL3L1 质粒 条件 pGEX-4T-CCL3L1 质粒 50ng,引物各 200nmol,DNA 聚合酶 0.5 μ l,dNTP 200nM 总体积 50 μ l,94 $^{\circ}$ C 5 分钟;94 $^{\circ}$ C 20 秒,57 $^{\circ}$ C 1 分钟,72 $^{\circ}$ C 30 秒,30 个循环纯化回收 PCR 产物参照琼脂糖凝胶回收试剂盒说明进行。酶切、连接、转化,质粒提取方法参照分子生物学方法进行^[10]。阳性克隆鉴定经 PCR 和 *Bam*HI、*Bgl*II 双酶切验证阳性重组子 pMD18T-CCL3L1 质粒。

1.3.2 pcDNA6.2-CCL3L1-1 质粒构建 限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Bgl*II 双酶切 pMD18T-CCL3L1 和 pcDNA6.2-GW/miR 载体后琼脂糖凝胶回收 CCL3L1 小片段大概 311bp 和载体大片段 5kb,T4 DNA 连接酶连接参照说明书进行,转化,质粒提取方法参照分子生物学进行,经 *Bam*HI、*Bgl*II 双酶切验证阳性重组子 pcDNA6.2-CCL3L1-1 质粒。

1.3.3 pcDNA6.2-CCL3L1-2 质粒构建 由于 pcDNA6.2-GW/miR 载体本身在 *Bgl*II 位点后带有 *Xho*I 酶切位点,利用 *Bam*HI 和 *Xho*I 切割 pcDNA6.2-CCL3L1-1 回收 CCL3L1 片段,*Bgl*II 和 *Xho*I 切割 pcDNA6.2-CCL3L1-1 回收大片段做载体,T4 DNA 连接酶连接参照说明书进行,转化,质粒提取参照分子生物学进行,经 *Bam*HI、*Bgl*II 双酶切验证阳性重组子 pcDNA6.2-CCL3L1-2 质粒。

1.3.4 pcDNA6.2-CCL3L1-4 质粒构建 利用 *Bam*HI 和 *Xho*I 切

割 pcDNA6.2-CCL3L1-2 回收 CCL3L1 片段,*Bgl*II 和 *Xho*I 切割 pcDNA6.2-CCL3L1-2 回收大片段做载体,T4 DNA 连接酶连接参照说明书进行,转化,质粒提取参照分子生物学进行,经 *Bam*HI、*Bgl*II 双酶切验证阳性重组子由于载体上含有 4 个 CCL3L1 重复串联基因片段故阳性重组子命名为 pcDNA6.2-CCL3L1-4 质粒,测序验证读码框。

2 结果

2.1 pMD18T-CCL3L1 质粒的获得

PCR 扩增得到 CCL3L1 片段大小为 311bp,pMD18T 载体大小约为 2.7kb,用 *Bam*HI、*Bgl*II 双酶切重组子,经 1%普通琼脂糖凝胶电泳紫外成像仪下观察得到两条条带分别位于 311bp、2.7kb,试验所得结果与预期结果相符,得到阳性重组子 pMD18T-CCL3L1 图 1。

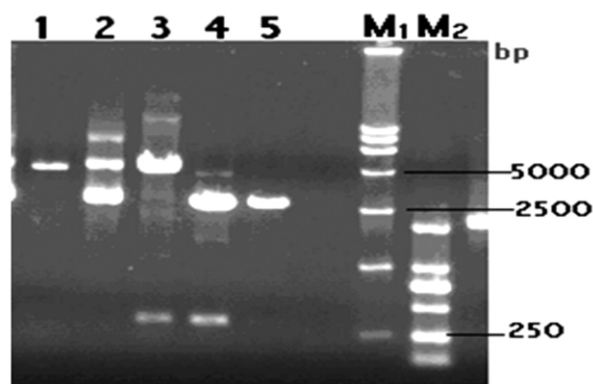


图 1 重组质粒 pMD18T-CCL3L1 和 pcDNA6.2-CCL3L1-1 酶切鉴定 M1 :15000 标记 M2 2000 标记;1: pcDNA6.2-GW/miR 质粒经 *Bam*HI 和 *Bgl*II 酶切 2: pcDNA6.2-GW/miR 质粒 3: pcDNA6.2-CCL3L1-1 经 *Bam*HI 和 *Bgl*II 酶切 4: pMD18T-CCL3L1 经 *Bam*HI 和 *Bgl*II 酶切 5: pMD18T 线性载体

Fig.1 Identification of recombinant plasmid pMD18T-CCL3L1 and pcDNA6.2-CCL3L1-1.M1:15000 marker; M2:2000 marker; 1: pcDNA6.2-GW/miR digested by *Bam*HI and *Bgl*II; 2: pcDNA6.2-GW/miR plasmid; 3: pcDNA6.2-CCL3L1-1 digested by *Bam*HI and *Bgl*II; 4: pMD18T-CCL3L1 digested by *Bam*HI and *Bgl*II; 5: pMD18T linear vector

2.2 pcDNA6.2-CCL3L1-1 质粒获得

pcDNA6.2-GW/miR 载体经 *Bam*HI、*Bgl*II 双酶切后大概有 5.0kp,*Bam*HI、*Bgl*II 双酶切 pcDNA6.2-CCL3L1-1 阳性重组质粒后电泳在 311bp 和 5.0kb 有两条带(图 1)证明得到含有一个 CCL3L1 片段的重组子。

2.3 pcDNA6.2-CCL3L1-2 质粒获得

由于 pcDNA6.2-GW/miR 载体本身在 *Bgl*II 位点后带有 *Xho*I 酶切位点,*Bam*HI 和 *Xho*I 切割 pcDNA6.2-CCL3L1-1 回收 CCL3L1 片段,*Bgl*II 和 *Xho*I 切割 pcDNA6.2-CCL3L1-1 回收大片段重组形成含有两个连续 CCL3L1 片段的质粒,*Bam*HI、*Bgl*II 双酶切后将两个 CCL3L1 串联体切下故电泳会在 622bp 和 5.0kb 有两条带,试验结果与预期结果相符(图 2),将阳性克隆命名为 pcDNA6.2-CCL3L1-2。

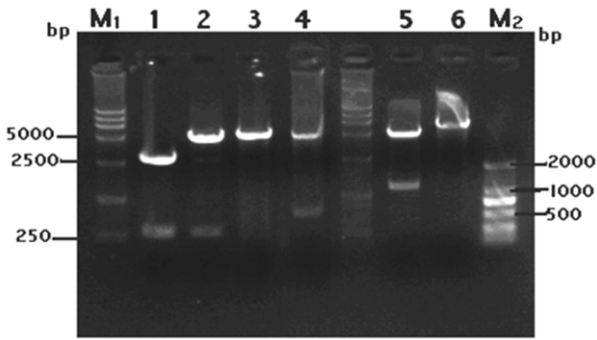


图 2 pcDNA6.2-CCL3L1-2 和 pcDNA6.2-CCL3L1-4 质粒鉴定
M1 :15000 标记 ;M2 2000 标记 ;1 pMD18T-CCL3L1 经 *Bam*HI 和 *Bgl*II 酶切 2 pcDNA6.2-CCL3L1-1 经 *Bam*HI 和 *Bgl*II 酶切 3 : pcDNA6.2-CCL3L1-1 经 *Xho*I 和 *Bgl*II 酶切 4 pcDNA6.2-CCL3L1-4 经 *Bam*HI 和 *Bgl*II 酶切 5 pcDNA6.2-CCL3L1-4 质粒经 *Xho*I 和 *Bgl*II 酶切

Fig.2 Identification of pcDNA6.2-CCL3L1-2 plasmid M1:15000 marker; M2:2000 marker; 1: pMD18T-CCL3L1 digested by *Bam*HI and *Bgl*II; 2: pcDNA6.2-CCL3L1-1 digested by *Bam*HI and *Bgl*II; 3: pcDNA6.2-CCL3L1-1 plasmid digested by *Xho*I and *Bgl*II; 4: pcDNA6.2-CCL3L1-2 digested by *Bam*HI and *Bgl*II; 5: pcDNA6.2-CCL3L1-4 digested by *Bam*HI and *Bgl*II; 6: pcDNA6.2-CCL3L1-4 plasmid digested by *Xho*I and *Bgl*II

2.4 pcDNA6.2-CCL3L1-4 质粒获得

利用 *Bam*HI、*Bgl*II、*Xho*I 将两个 CCL3L1 串联体重新插入 pcDNA6.2-CCL3L1-2 后 ,*Bam*HI、*Bgl*II 双酶切电泳会在 1244bp 和 5.0kb 有两条带 ,试验结果如图 2 ,与预期相符表明得到含有四个 CCL3L1 基因串联体的重组子 ,经测序验证读码框正确。

2.5 pcDNA6.2-CCL3L1-X 构建流程图(图 3)

3 讨论

同尾酶是一组来源不同的酶 ,但是他们切割 DNA 产生的末端相同 ,同尾酶之间的识别序列可以相同也可以不同 ,但基因工程中识别序列不同的同尾酶的应用性最大 ,主要是由于他们切割后片段能够识别并连接 ,一旦连接后就会形成不可被两种酶识别的新序列即杂种位点^[11-12] ,同尾酶与非同尾酶的联合应用既保证了定向克隆又保证了基因串联体的完成 杨涛等^[13] 姚玲玲等^[14]都曾利用同尾酶完成多个片段的载体插入 ,本研究也是基于此原理利用同尾酶 *Bam*HI、*Bgl*II 酶切连接后形成新序列 GGATCT ,并结合非同尾酶 *Xho*I 使得 CCL3L1 基因片段能够定向连续插入载体。

pcDNA6.2-GW/miR 载体是由 invitrogen 公司开发的一款能够通过位点特异识别进行重组的质粒 ,其 *Bam*HI、*Bgl*II 两端有 attB 识别位点与含有 attL 位点的 pDONR 质粒经 BP 反应后插入 attB 识别位点内的目的基因转移到 pDONR 质粒上形成入门克隆 ,同理入门克隆经 LR 反应后就可将目的基因重组到各种表达载体上 ,该重组系统大大地简化了基因克隆和亚克隆的步骤 ,同时典型的克隆效率高达 95%或更高。当基因在目的表达载体之间快速简便的穿梭时 ,还可以保证正确的方向和

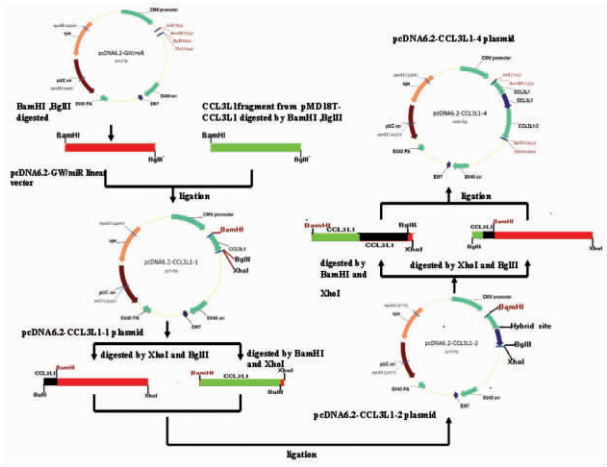


图 3 pcDNA6.2-CCL3L1-X 构建流程图
1 pcDNA6.2-GW/miR 质粒与 CCL3L1 片段连接重组形成 pcDNA6.2-CCL3L1-1
2 pcDNA6.2-CCL3L1-1 质粒中借助同尾酶再次插入 CCL3L1 片段重组形成 pcDNA6.2-CCL3L1-2
3 pcDNA6.2-CCL3L1-2 质粒借助同尾酶同时插入两个 CCL3L1 片段重组形成 pcDNA6.2-CCL3L1-4

Fig.3 Protocol of construction of pcDNA6.2-CCL3L1-X 1:CCL3L1 fragment was inserted into pcDNA6.2-GW/miR to form the recombinant plasmid pcDNA6.2-CCL3L1-1 2: CCL3L1 fragment was inserted into pcDNA6.2-GW/miR again by Isocaudamer to form the recombinant plasmid pcDNA6.2-CCL3L1-2 3: two CCL3L1 fragments were inserted into pcDNA6.2-GW/miR at the same time by Isocaudamer to form the recombinant plasmid pcDNA6.2-CCL3L1-4

阅读框 ,有助于进行带不同数目纯化和检测标签蛋白的表达^[15]。该载体也可以利用载体上下游的限制性酶切位点经普通分子克隆技术进行目的片段转移。因此本研究所构建串联重组体不但有效延长了目的片段的长度 ,为其表达产物的稳定性提供保证 ,而且经位点特异识别重组可以将其构建到各种表达载体上 ,为多肽的制备 ,纯化 ,及其相关功能的全面研究提供便捷工具 ,同时此构建技术为载体的构建提供了新的思路和方法。

参考文献(References)

[1] Feng Y, Bfoder CC, Kennedy PE, et al. HIV-1 enlry cofactor functional cDNA cloning of a seven transmembrane, G protein-coupled feceptor [J]. Science, 1996, 272: 872-877
[2] Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP 1 alpha,MIP-1 beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1[J]. Science, 1996, 272: 19S5-19S8
[3] Choe H, Farzan M, Sun Y, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates [J]. Cell, 1096, 85: 1135-1148
[4] Menten P, Wuyts A, Van Darmne J. Macrophage inflammatory protein-1[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(6): 455-481
[5] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity[J]. Immunity, 2000, 12 (2) : 121-127
[6] Modi W S. CCL3L1 and CCL4L1 chemokine genes are located in a segmental duplication at chromosome 17q121[J]. Genomics, 2004, 83 (4) : 735-738
(下转第 234 页)

表达升高。Bax 广泛分布于人体组织和细胞,在多数肿瘤表达下降。

在实验中我们利用 AO/EB 染色法,从形态学方面观察了细胞凋亡的变化。荧光染色观察到,未干预的 K562 细胞核染色质着绿色并呈圆形或椭圆形,DADS 处理后的细胞核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状。为了进一步验证 DADS 对 K562 凋亡的影响,采用 DNA 琼脂糖凝胶电泳观察基因凋亡,结果显示,DNA 琼脂糖凝胶电泳观察到典型的 DNA 梯形条带。

Bcl-2 家族是在细胞凋亡中有重要作用的一类蛋白质,Bcl-2 家族的表达和调控是影响细胞凋亡的关键因素之一,而 Bag-1 与 Bax 又分别是 Bcl-2 家族中重要的抗凋亡基因和促凋亡基因^[10]。有报道,Bag-1 与 Bax 表达水平与肿瘤发生与转移密切相关^[6]。我们的实验结果表明,Bax 在 K562 细胞中表达水平较低,Bag-1 在 K562 细胞中表达水平较高。不同浓度 DADS 作用 K562 细胞 48h 后,Bax 表达水平较对照组增加 ($P < 0.01$); Bag-1 表达水平较对照组减少 ($P < 0.01$),提示线粒体途径中的 Bcl-2 家族在诱导 K562 细胞凋亡中起着重要作用。

由此我们认为,DADS 可在体外呈浓度依赖性诱导人白血病 K562 细胞凋亡,其凋亡机制可能是通过上调 Bax,下调 Bag-1 表达,激活线粒体通路实现的。

参考文献(References)

- [1] Brasky TM, Kristal AR, Navarro SL, et al. Specialty Supplements and Prostate Cancer Risk in the VITamins And Lifestyle (VITAL) Cohort [J]. Nutr Cancer, 2011 May;63(4):573-582
- [2] Huang YS, Xie N, Su Q, et al. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of HT-29 human colon cancer cells by inducing differentially expressed genes[J]. Mol Med Report, 2011 May-Jun;4(3):553-559
- [3] Powolny AA, Singh SV, Melov S, et al. The garlic constituent diallyl trisulfide increases the lifespan of *C. elegans* via skn-1 activation[J]. Exp Gerontol, 2011 Jun;46(6):441-452
- [4] Huang YS, Xie N, Su Q, et al. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of HT-29 human colon cancer cells by inducing differentially expressed genes[J]. Mol Med Report, 2011 May-Jun;4(3):553-559
- [5] Wu PP, Chung HW, Liu KC, et al. Diallyl sulfide induces cell cycle arrest and apoptosis in HeLa human cervical cancer cells through the p53, caspase- and mitochondria-dependent pathways [J]. Int J Oncol, 2011 Jun;38(6):1605-1613
- [6] Tsubura A, Lai YC, Kuwata M, et al. Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2011 Mar 1;11(3):249-253
- [7] Kanno S, Hiura T, Shouji A, et al. Resistance to Ara-C up-regulates the activation of NF-kappaB, telomerase activity and Fas expression in NALM-6 cells[J]. Biol Pharm Bull, 2007 Nov;30(11):2069-2074
- [8] Lin M, Xie HL, Su Q, et al. Effects of diallyl disulfide on differential expression of apoptosis-associated genes in leukemia cell line HL-60 [J]. 2007 Apr;26(4):351-356(Chinese)
- [9] 刘杨, 邓婷, 胡春宏,等.选择性环氧化酶-2 抑制剂对乳腺癌细胞的化疗增敏作用[J]. 现代生物医学进展,2007,9(9):1684-1686
- [10] Liu Yang, Deng Ting, Hu Chun-hong, et al. Effect of selective COX-2 inhibitors on chemotherapy sensitization for breast cancer cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007,9(9):1684-1686
- [11] Antoku K, Master WJ, Scully J, et al. Isolation of bcl-2 binding proteins that exhibit homology with BAG-1 and suppressor of death domains protein [J].Biochem Biochem Biophys Res Commun, 2001, 286(5): 1003-1010
- [12] 陈宏. 基因工程原理与应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 16-25
- [13] Chen Hong. Genetic Engineering Principles and Applications [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 16-25
- [14] 杨涛, 杨利军, 程牛亮,等.一种构建多拷贝串联小分子多肽基因的方法[J].生物技术通讯, 2006, 15(6) 974-977
- [15] Yang Tao, Yang Li-jun, Cheng Niu-liang, et al [J].letters in biotechnology, 2006, 15(6):974-977
- [16] 姚玲玲, 王家宁, 黄永章,等. 利用同尾酶技术构建 pET15b-PEP-1-CAT 重组质粒[J].邵阳医学院学报, 2006, 25(1):1-5
- [17] Yao Ling-ling, Wang Jia-ning, Huang Zhang, et al. To construct the recombinant plasmid pET15b- PEP-1-CAT with isocaudamer technique [J]. Journal of yunyang medical college, 2006,25 (1) :1-5
- [18] Praznovszky T. Chromosome Engineering with Lambda-Integrase Mediated Recombination System: The ACE System[J]. Methods Mol Biol,2011, 738:141-149

(上接第 241 页)

- [7] O'Brien SJ,Nelson GW. Human genes that limit AIDS [J]. Nature genetics, 2004, 36, 565 - 574
- [8] Charles R. CCL3L1 dose and HIV-1 susceptibility [J]. Trends in Molecular Medicine, 2005, 11(5): 203-206
- [9] Kumar V, Prakash O, Manpreet S, et al. Genetic basis of HIV-1 resistance and susceptibility: An approach to understand correlation between human genes and HIV-1 infection[J]. Indian journal of Experimental biology, 2006, 44: 683-692
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 243-260
- [11] 吴乃虑.基因工程原理(上册)[M].2 版.北京: 科学出版社, 1998: 131-149
- [12] Wu Nai-lv. The principle of genetic engineering (Volume) [M]. 2. Beijing: Science Press, 1998: 131-149

- [12] 陈宏. 基因工程原理与应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 16-25
- [13] Chen Hong. Genetic Engineering Principles and Applications [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 16-25
- [14] 杨涛, 杨利军, 程牛亮,等.一种构建多拷贝串联小分子多肽基因的方法[J].生物技术通讯, 2006, 15(6) 974-977
- [15] Yang Tao, Yang Li-jun, Cheng Niu-liang, et al [J].letters in biotechnology, 2006, 15(6):974-977
- [16] 姚玲玲, 王家宁, 黄永章,等. 利用同尾酶技术构建 pET15b-PEP-1-CAT 重组质粒[J].邵阳医学院学报, 2006, 25(1):1-5
- [17] Yao Ling-ling, Wang Jia-ning, Huang Zhang, et al. To construct the recombinant plasmid pET15b- PEP-1-CAT with isocaudamer technique [J]. Journal of yunyang medical college, 2006,25 (1) :1-5
- [18] Praznovszky T. Chromosome Engineering with Lambda-Integrase Mediated Recombination System: The ACE System[J]. Methods Mol Biol,2011, 738:141-149