

## 质粒拯救法克隆细菌基因组大片段

王玉飞<sup>\*\*</sup>, 陈泽良<sup>\*\*</sup>, 乔凤, 杜昕颖, 贾雷立, 袁静, 黄留玉<sup>\*</sup>

(军事医学科学院疾病预防控制所, 北京 100071)

**摘要:**【目的】细菌基因组大片段尤其是基因簇的克隆与操作, 是细菌基因功能分析的一个难点。基因组测序工作的不断完成和序列信息的大量积累, 为细菌基因组 DNA 的操作提供了方便。本文报道了利用细菌的全基因组信息和质粒拯救法的原理建立的一种克隆细菌基因组大片段的方法。【方法】首先, 根据基因组序列信息, 在待克隆片段的一侧扩增一段 DNA, 并将其克隆到自杀载体上构建打靶质粒, 然后, 将打靶质粒整合到细菌的基因组中构建重组菌, 提取重组菌的基因组 DNA, 酶切, 自连, 转化, 将自杀质粒与待克隆的目的片段一起拯救出来。最后, 根据需要拯救的 DNA 片段亚克隆到新的载体中。【结果】我们利用该方法克隆了布鲁氏菌中长度为 11kb 的 *virB* 操纵子, 并构建了互补质粒。将该质粒导入到 *virB* 的突变株中后使 *virB* 操纵子的转录活性得到了恢复, 表明该策略切实可行。【结论】这种重组克隆策略给我们提供了一种新的对细菌基因组大片段进行操作的方法。

**关键词:** 质粒拯救; 细菌基因组; 大片段克隆

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2008)04-0532-07

随着各种微生物基因组测序工作的不断完成和序列信息的大量积累, 微生物基因组学研究的重点已从结构基因组学转为功能基因组学, 大量未知功能的基因和基因簇有待于大家去解析<sup>[1, 2]</sup>。在细菌的基因组中, 功能密切相关的基因常聚集在一起, 形成一个大的基因簇或操纵子。很多细菌的基因组中存在基因组岛, 与细菌的毒力、耐药等密切相关, 它们常作为一个整体在细菌之间进行转移。要分析这些基因簇或基因组岛的功能, 需要对整个基因簇或基因组岛进行遗传操作。DNA 克隆是基因功能研究中最为基础和关键的内容。目前, PCR 是 DNA 克隆中最常用的方法。但是, 该方法可在产物中引入突变, 并且, 随着 PCR 产物长度的增加, 突变率也增加<sup>[3]</sup>。因此, PCR 不适合 DNA 大片段的克隆。传统克隆 DNA 大片段的的方法是通过构建科氏质粒文库, 然后从中筛选含有目的片段的克隆而实现的<sup>[4]</sup>。但是, 该方法存

在克隆的随机性、操作步骤复杂、效率低下等缺点, 并且, 在某些情况下, 难以获得所需要的目的克隆。

质粒拯救法是一种经典的分子生物学方法, 目前该方法主要用于转座子或自杀质粒插入位点周围序列的鉴定<sup>[5-8]</sup>。在这些方法中, 转座子或自杀质粒是随机整合到细菌染色体中的。如果能将自杀质粒整合到染色体中的特定位置, 就可以将其周围的目的序列一起拯救出来, 而同源重组则可将自杀质粒整合到基因组的特定位置。因此, 可以利用同源重组将自杀质粒先整合到染色体上的特定位置, 然后利用质粒拯救法, 将该位置附近的 DNA 序列和自杀载体一起拯救出来, 从而提供一种新的 DNA 克隆方法。以布鲁氏菌为例, 我们利用该方法成功的克隆了编码 IV 型分泌系统的 *virB* 操纵子, 将此操纵子克隆到能在布鲁氏菌中复制的质粒上后转入 *virB* 突变株中, 结果发现突变株中 *virB* 操纵子的转录活性得到了恢

基金项目: 自然科学基金(30600024); 国家“863 计划”(2007AA02Z412)

<sup>\*</sup>通讯作者。Tel: +86-10-66933356, E-mail: [huangliuyuly@163.com](mailto:huangliuyuly@163.com)

作者简介: <sup>\*\*</sup>共同为第一作者。王玉飞(1978 - ), 女, 安徽太湖人, 博士研究生, 从事病原菌功能基因组学研究。E-mail: [wangyf1618@yahoo.com.cn](mailto:wangyf1618@yahoo.com.cn); 陈泽良(1976 - ), 男, 重庆人, 副研究员, 博士, 从事预防医学研究。E-mail: [zeliangchen@yahoo.com](mailto:zeliangchen@yahoo.com)

收稿日期: 2007-10-31; 修回日期: 2007-12-12

复。该方法的建立给我们提供了一种新的对细菌基因组大片段进行操作的策略。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:**布鲁氏菌 *B. melitensis* M5 购自中国药品生物制品鉴定所; M5Δ*virB* 是本实验室构建的布鲁氏菌 IV 型分泌系统失活突变株<sup>[9]</sup>; DH5α 和 pUC19 为本室保存; pBBR1MCS-5(Gm<sup>r</sup>)质粒是能够在布鲁氏菌中复制的特殊质粒, 由 Kenneth M. Peterson 博士馈赠。

**1.1.2 培养基及主要试剂:**大豆胰蛋白胨琼脂(TSA)和大豆胰蛋白胨肉汤(TSB)购自生物梅里埃公司, 用于布鲁氏菌的培养; LB 培养基用于培养大肠杆菌; GEM 培养基(每升中含 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g, Citric acid, H<sub>2</sub>O 2.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.0g, NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>·4 H<sub>2</sub>O 3.5g, 葡萄糖 20g)主要用于诱导布鲁氏菌 *virB* 的表达。DNA 胶纯化回收试剂盒、质粒提取试剂盒、DNAse I 和 M-MLV 逆转录酶购自 promega 公司, 各种限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司, T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司, Trizol 购自 Invitrogen 公司。

**1.1.3 引物:**从 GenBank 中下载 *B. melitensis* 16M(AE008918)的序列, 使用 Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto)软件进行引物设计, 设计的引物均由上海 Sangon 公司合成。表 1 为引物序列。

### 1.2 质粒拯救克隆的原理及技术路线

质粒拯救克隆分为 4 个步骤(见图 1), 首先是打靶质粒的构建, 在待克隆区域下游选择一个用于构建打靶质粒的 DNA 片段, 并将其克隆到自杀质粒 pUC19 中, 得到打靶质粒。第二步, 将打靶质粒转入布鲁氏菌 M5 中, 得到重组菌株。第三步, 提取重组菌的基因组 DNA, 酶切, 自连, 转化到 DH5 中, 将待克隆片段和自杀质粒一起拯救出来。该方法的最后一步是将 DNA 片段从自杀载体上切下来, 转移到能在宿主菌中复制的克隆载体上。

### 1.3 酶切位点的选择

利用基因组序列信息, 使用 Primer Premier 5 软件分析待克隆区域(*virB*)及两侧序列(*virB-U* 和 *virB-D*)的酶切位点分布, 选取合适的酶切位点。选取的位点必须位于 *virB* 附近, 但 *virB* 操纵子内部和 pUC19 质粒上不能有此酶切位点。

表 1 本研究所用引物  
Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence(5'→3')	Sequence No. of AE008918
IVGT-F	ACGTCGGATCCGAATTCACAGGCATTATCCGCTCGTC	36803-36822
IVGT-R	AGTCGAAGCTTCTCTAGAGCATAGCCAGTAGGTCCAG	37868-37887
IVGT-I-F	CGAATGCGCGTAGCTGCACC	37494-37513
IVGT-I-R	GTCATGAGCATGTATATGC	38092-38111
pBBR1-F	GCGAAAGGGGGATGTGCTGC	
pBBR1-R	AGCGCGCAATTAACCCCTCAC	
pUC19-F	TGTAAAACGACGGCCAGTG	
pUC19-R	CAGGAAACAGCTATGACC	
<i>virB2</i> -F	ATGAAAACCGCTTCCCCCAGC	26014-26034
<i>virB2</i> -R	CCTAAGCAGGTAAGAGGC	26311-26328
<i>virB5</i> -F	ATGAAGAAGATAATTCTCAGC	29195-29215
<i>virB5</i> -R	ATAGCGGCTTCCAGTGC	29891-29908
<i>virB8</i> -F	ATGTTTGGACGCAAACAATCTC	31478-31499
<i>virB8</i> -R	TTGCACCACTCCCATTCTG	32175-32194
<i>virB1-RT</i> -F	AAGCAATCACGACAGCACAG	25013-25032
<i>virB1-RT</i> -R	CGGCGTAGTAACAGGAGAATG	25323-25252
<i>virB8-RT</i> -F	GGGCTTTCGACACCAATTAC	31632-31641
<i>virB8-RT</i> -R	AGCGTGTACCAGTCGTAGG	31824-31842
16sRNA-RT-F	CACTGGACCATTACTGACGC	190440-190459
16sRNA-RT-R	ACTAAGGGCGAGGGTTGC	19814-19831

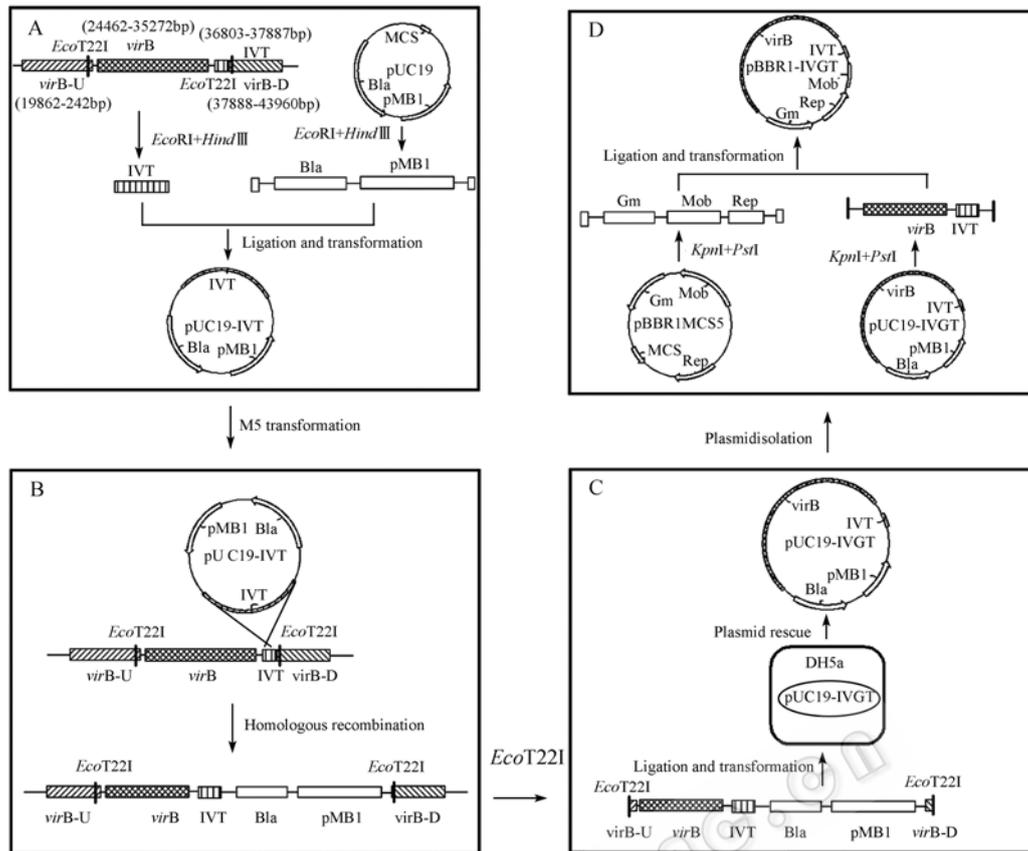


图1 质粒拯救克隆的原理

Fig. 1 Principle of DNA cloning by plasmid rescue. A: Construction of targeting plasmid; B: Construction of recombinant strain; C: *virB* cloning by plasmid rescue; D: Construction of complementary strain.

#### 1.4 打靶质粒和重组菌株的构建

用引物 IVGT-F 和 IVGT-R 扩增位于 *virB* 操纵子下游的打靶片段 IVT, *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切后与同样酶切处理的线性 pUC19 质粒连接, 转化 DH5 $\alpha$  得到打靶载体 pUC-IVT。对质粒进行 PCR 和酶切鉴定, 正确后送 Invitrogen 公司进行测序。按参考文献 9 中所述的方法将 pUC19-IVT 转化到 M5 中, 用氨苄青霉素筛选重组子。用引物 IVGT-I-F 和 IVGT-I-R 对抗性克隆进行 PCR 鉴定。得到的重组菌株命名为 M5-IVT。

#### 1.5 *virB* 操纵子的质粒拯救克隆

提取 M5-IVT 的基因组 DNA, 用选取的内切酶进行酶切, 酶切片纯化后用 T4 DNA 连接酶自连, 转化 DH5 $\alpha$ , 涂布含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 平板, 从抗性克隆中提取质粒, 用针对 *virB* 基因 *virB2*、*virB5* 和 *virB8* 的引物进行鉴定, 鉴定正确后送测序公司进行序列测定, 得到的质粒命名为 pUC19-IVGT。

#### 1.6 互补质粒及互补菌株的构建

为了分析 *virB* 的功能, 需要将该操纵子克隆到

其它载体中。对克隆的片段进行了酶切位点分析, 选择 *KpnI* 和 *PstI* 将 *virB* 操纵子亚克隆到能在布鲁氏菌中进行复制的 pBBR1MCS-5 质粒中。pUC19-IVGT 质粒用 *KpnI* 和 *PstI* 双酶切, 切下的含 *virB* 的片段与同样酶切处理的 pBBR1MCS-5 连接, 得到互补载体 pBBR1-IVGT。酶切鉴定正确后, 用测序引物 pBBR1-F 和 pBBR1-R 对互补载体进行测序, 确定克隆片段两端的序列。将 pBBR1-IVGT 转入突变株 M5 $\Delta$ *virB* 中, 涂布庆大抗性平板, 抗性克隆用针对 pBBR1MCS-5 质粒的引物进行 PCR 鉴定。

#### 1.7 互补菌株 *virB* 操纵子转录活性的恢复

为了验证 M5-IVGT 中的 *virB* 操纵子是否恢复了转录活性, 我们分析了 M5、M5 $\Delta$ *virB* 和 M5-IVGT 菌中 *virB* 的转录情况。将这三株菌在 TSB 培养基中培养至对数生长期 ( $OD_{600}=1.0$ ) 后转至 *virB* 高表达的 GEM 培养基中诱导 3h, 采用标准的 Trizol RNA 提取方法抽提 RNA, RNA 用 DNase I 消化, 以随机引物为逆转录引物, 用 M-MLV 逆转录酶逆转录成 cDNA,

用针对 *virB1*、*virB8* 和 16S rRNA 的引物进行 RT-PCR 验证。

## 2 结果

### 2.1 酶切位点的选择

*B. melitensis* 含有两条染色体, *virB* 操纵子位于染色体 II 上。我们对 *virB* 操纵子上游 4kb 的片段、下游 6kb 的片段、*virB* 操纵子和 pUC19 进行了酶切位点比较分析。通过分析, 最终我们选取了 EcoT22I。

### 2.2 打靶质粒和重组菌株的构建

根据酶切位点分析的结果, 在 *virB* 下游选取了一段约 1kb 的片段作为打靶片段, 用引物 IVGT-F 和 IVGT-R 成功扩增出 1087bp 的片段 IVT(图 2-A), 将该片段克隆到 pUC19 质粒, 得到重组质粒 pUC19-IVT, 酶切鉴定正确后(图 2-B), DNA 测序证实, 序列与预期的完全一致。将 pUC19-IVT 电转化到 M5 感受态细胞中, 通过氨苄抗性筛选重组子, 用针对重组子的鉴定引物 IVGT-I-F 和 IVGT-I-R 进行鉴定, 同时以野生株作为对照, 结果野生株能够扩增出 598bp 的条带, 而突变株不能扩增(结果略), 表明

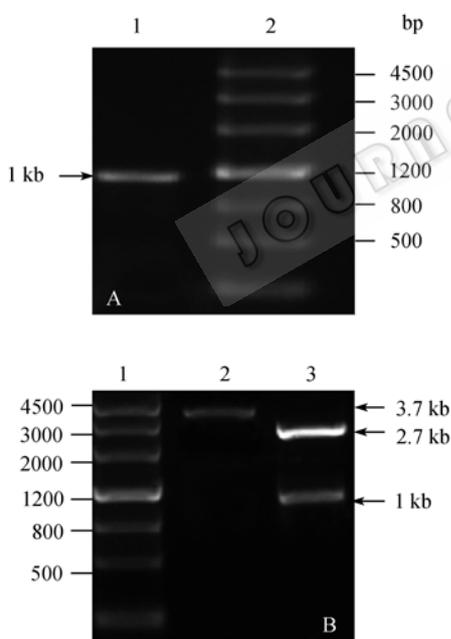


图 2 打靶质粒的构建

Fig. 2 Construction of targeting plasmid. A: The PCR amplification of IVT. 1: IVT; 2: Marker. B: Enzyme digestion verification of the plasmid pUC-IVT. 1: Marker; 2: pUC-IVT/*EcoRI*; 3: pUC-IVT/*EcoRI* + *HindIII*.

pUC19-IVT 成功整合到了正确的位置, 得到了重组菌株 M5-IVT。

### 2.3 *virB* 的拯救克隆和验证

M5-IVT 基因组用 EcoT22I 酶切后自连, 转化到 pUC19 质粒能够复制的 DH5 中得到拯救质粒 pUC19-IVGT。用针对 *virB2*、*virB5* 和 *virB8* 的引物对拯救质粒进行 PCR 扩增验证, 结果能扩增出预期大小的 DNA 条带(图 3-A), 初步表明 *virB* 已被成功的拯救克隆出来。为了进一步验证拯救克隆的 DNA 是否是 *virB* 操纵子, 以及拯救的 DNA 片段是否与预期的一致, 首先对扩增的 *virB* 基因产物进行测序, 结果显示与 *virB* 基因的序列完全一致(结果略)。利用位于 pUC19 多克隆位点两侧的测序引物进行测序, 结果显示, 测定的两个序列是布鲁氏菌的序列(结果略)。利用 DNASTAR 软件的 Seqman 程序对测定的几个序列进行拼接, 结果显示, 这些序列与羊布鲁氏菌的含有 *virB* 的一段序列一致(图 3-B), 它们分别位于 *virB* 内部和两侧的不同位置(图 3-C)。这些数据表明, 利用质粒拯救克隆, 成功克隆了含有 *virB* 操纵子的一个大小为 14530bp 的 DNA 片段。

### 2.4 互补质粒及互补菌株的构建

将 *virB* 操纵子从 pUC19-IVGT 中亚克隆到 pBBR1MCS-5 质粒中构建互补质粒 pBBR1-IVGT, 并对其进行了 PCR 和酶切鉴定, 互补质粒中能够扩增出 *virB* 的基因, 可以酶切出预期大小的条带(图 4-A), 表明互补质粒构建成功。鉴定正确后将互补质粒转入 *virB* 突变株中, 利用针对 pBBR1MCS-5 特异的引物和 *virB* 启动子的引物进行 PCR 鉴定, 结果表明, 互补菌和野生株一样, 能够扩增出预期大小的产物, 而突变株没有扩增(图 4-B), 说明互补菌株 M5-IVGT 构建成功。

### 2.5 突变株中 *virB* 基因转录的恢复

为验证构建的互补质粒是否具有功能活性, 对互补菌株中 *virB* 基因的转录进行了分析。野生株、突变株和互补菌株在能够诱导 *virB* 基因高表达的 GEM 培养基中作用 3h 后, 用半定量 RT-PCR 比较分析这 3 个菌株中 *virB* 基因的转录活性变化。为了比较它们的相对转录丰度, 以转录相对保守的 16SrRNA 基因作为内参。结果显示, 野生株和互补菌株中有 *virB* 基因的转录, 而突变株中没有(图 5), 表明互补菌株中 *virB* 基因的转录得到了恢复, 构建的互补质粒是具有功能活性的。

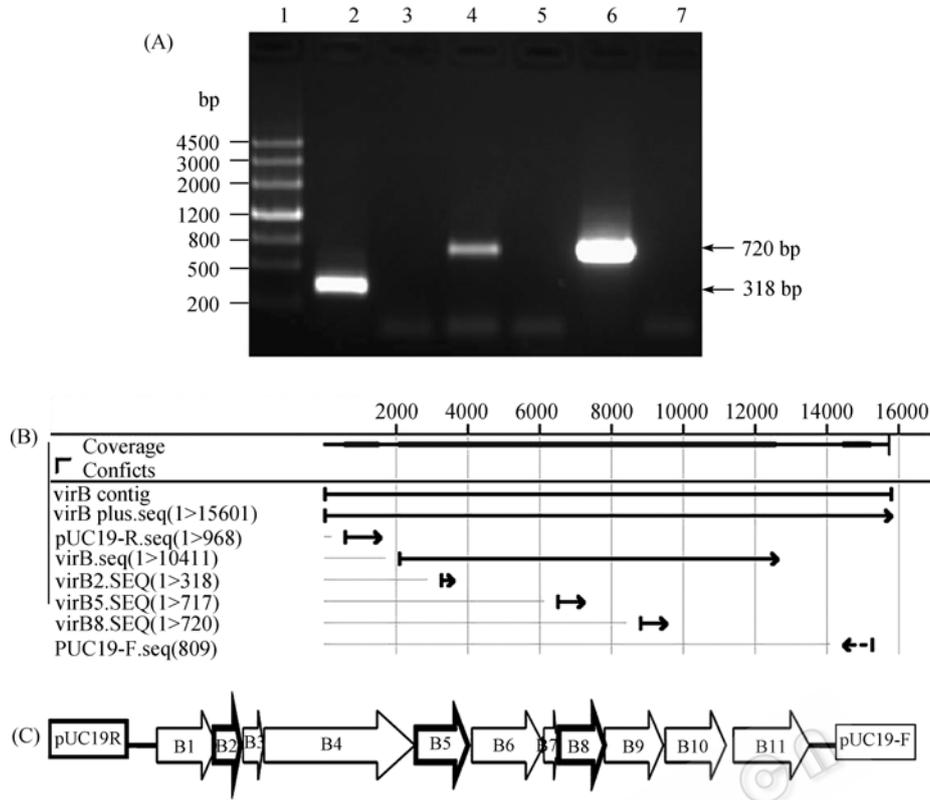


图 3 *virB* 操纵子拯救序列的验证

Fig. 3 Confirmation of the rescued *virB* operon. A : PCR verification of the rescued *virB* operon of pUC-IVGT. 1. Marker III; 2. *virB2* (pUC-IVGT); 3. *virB2* (pUC19); 4. *virB5* (pUC-IVGT); 5. *virB5* (pUC19); 6. *virB8* (pUC-IVGT); 7. *virB8* (pUC19). B: Assembly of the sequenced fragments. C: Distribution of the fragment pUC19-F and pUC19-R and the 11 *virB* genes on the rescued DNA fragment. Blacked ones represents the sequenced fragments.

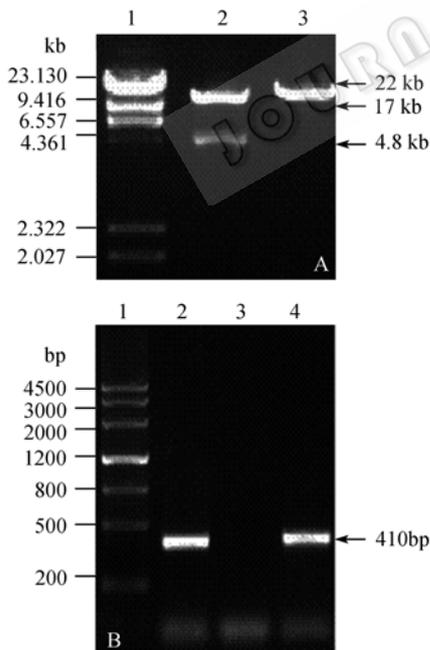


图 4 M5-IVGT 的验证

Fig. 4 Verification and confirmation of M5-IVGT. A: Enzyme digestion verification of the plasmid pBBR1-IVGT; 1. DNA marker  $\lambda$ HindIII; 2. pBBR1-IVGT/*KpnI*+*PstI*; 3. pBBR1-IVGT/*PstI*. B: PCR verification of M5-IVGT. 1. DNA marker III; 2. M5; 3. M5 $\Delta$ *virB*; 4. M5-IVGT.

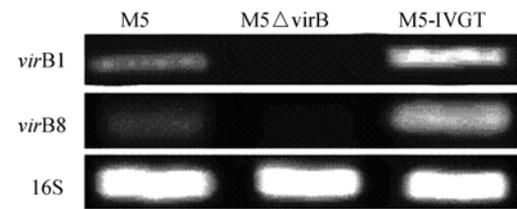


图 5 M5-IVGT 中 *virB* 操纵子转录活性的恢复

Fig. 5 Restoration of the transcription of the *virB* operon in M5-IVGT.

### 3 讨论

DNA 克隆是微生物功能基因组研究中最为基础和关键的一步。细菌基因组一个重要的特点是一些功能相关的基因常聚集成簇，要分析这些基因的功能，需要将它们作为一个整体来进行分析。目前 PCR 是 DNA 克隆中最常用的方法，但是在克隆大片段时存在容易突变的缺点。传统的克隆 DNA 大片段的方法存在操作复杂、效率低，有时甚至无法成功克隆等缺点，从而限制了对基因簇等 DNA 大片段的功能分析。

基因组测序的完成为细菌的遗传操纵提供了新的便利。本研究中,我们利用基因组信息,结合同源重组和质粒拯救的原理,建立了一种质粒拯救克隆的方法来克隆细菌的基因组大片段。为了证实该方法的可行性,我们以布鲁氏菌的 *virB* 操纵子为例,利用质粒拯救克隆法对其进行克隆。布鲁氏菌的 *virB* 操纵子含有 11 个 ORFs,长 11kb<sup>[10]</sup>。利用传统的 PCR 方法,要正确无误的克隆这么大的 DNA 片段存在一定的困难。利用质粒拯救克隆的原理,我们成功的克隆了 *virB* 操纵子,证实了质粒拯救克隆方法的可行性。

根据质粒拯救克隆的原理,首先是确定需要克隆的 DNA 区段,利用同源重组的方法,将一个打靶质粒整合到该区域的下游。然后利用质粒拯救的原理,将质粒的周边序列一起拯救出来,从而实现拯救克隆的目的。由于同源重组是一种依赖于序列的准确重组,因此,可以将自杀质粒整合到任意我们需要的位置,这就为定位克隆所需的目的序列提供了可能。另一方面,由于基因组的序列信息是已知的,我们可对序列信息进行分析,确定待克隆区段的大小和周边序列的范围,这为我们克隆设计带来了便利。利用克隆的序列,可以构建不同的载体,用于各类功能分析。在本研究的实例中,我们只是验证了克隆的 *virB* 操纵子的功能活性,实际上,利用克隆的 DNA 大片段,可以开展各类功能分析。

利用质粒拯救法克隆基因组大片段,酶的选择是关键。酶选择的原则是选取的内切酶要位于目的片段附近,但在待克隆片段和自杀载体内部不能有此酶的切点。在本研究中,我们选择的是六碱基的内切酶,由于其出现频率相对较低,所以在克隆 *virB* 操纵子时,我们仅找到一个合适的内切酶 EcoT22I,而且该酶的切点离 *virB* 操纵子有一定的距离。这样,在克隆 *virB* 操纵子时,同时也克隆了 *virB* 邻近的一些不必要的序列。我们发现,用 4 碱基的酶来取代 6 碱基的酶就可以克服此缺点。此外,克隆的 DNA 片段大小还与自杀质粒的容量有关。因此,自杀载体的选择也可影响拯救克隆的效率。质粒拯救克隆的方法也有其局限之处,如:该菌要有合适的遗传转化方法;该菌要易于同源重组等。

在本研究中,我们以布鲁氏菌为例,利用质粒拯救法克隆了基因组的大片段。实际上该方法还可应用于其它的细菌。本研究中,我们利用了布鲁氏菌全基因组的序列。实际上,只要目的片段以及两侧的序列信息已知,即可进行质粒拯救克隆。因此,该方法也可用于那些只知道部分序列的细菌的 DNA 大片段的克隆。因此,质粒拯救克隆的方法为我们提供了一种新的可供选择的对细菌基因组大片段进行操作的方法。

## 参 考 文 献

- [1] Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, 277: 1453-1474.
- [2] Adams MD, Celniker SE, Holt RA, *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 2000, 287: 2185-2195.
- [3] Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(18): 3546-3551.
- [4] Sun TQ, Fernstermacher DA, Vos JM. Human artificial episomal chromosomes for cloning large DNA fragments in human cells. *Nat Genet*, 1994, 8: 33-41.
- [5] Perucho M, Hanahan D, Lipsich L, *et al.* Isolation of the chicken thymidine kinase gene by plasmid rescue. *Nature*, 1980, 285: 207-210.
- [6] Tsang P, Merritt J, Nguyen T, *et al.* Identification of genes associated with mutacin I production in *Streptococcus mutans* using random insertional mutagenesis. *Microbiology*, 2005, 151: 3947-3955.
- [7] Hersberger M, Kirby K, Phillips JP, *et al.* A plasmid rescue to investigate mutagenesis in transgenic *D. melanogaster*. *Mutat Res*, 1996, 361: 165-172.
- [8] Bijlsma JJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Phadnis SH, *et al.* Identification of virulence genes of *Helicobacter pylori* by random insertion mutagenesis. *Infect Immun*, 1999, 67: 2433-2440.
- [9] 王玉飞, 陈泽良, 赵红庆, 等. 以克隆载体为自杀载体快速构建布鲁氏菌的无痕缺失突变株. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2007, 34: 642-645.
- [10] Boschirolu ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, *et al.* The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 1544-1549.

## Recombinational Cloning of Large DNA Fragments of Bacterial Chromosome by Plasmid Rescue

Yufei Wang<sup>\*\*</sup>, Zeliang Chen<sup>\*\*</sup>, Feng Qiao, Xinying Du, Leili Jia, Jing Yuan, Liuyu Huang<sup>\*</sup>

(Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

**Abstract:** [Objective] To develop a new method to clone large DNA fragment by combining whole genome sequence information and the principle of plasmid rescue. [Methods] First, we amplified a fragment downstream the region to be cloned and cloned the fragment into a suicide plasmid to construct targeting plasmid, which was then targeted into chromosome by homologous recombination. Then, genomic DNA was isolated, digested with appropriate enzyme, re-ligated and transformed into host bacteria to rescue the plasmid and the large DNA fragment. The rescued DNA fragment was sub-cloned into new plasmids for special purposes. [Results] Using this method, we successfully cloned the 11kb *virB* operon of *Brucella* and constructed complementary plasmid. The transcription of the disrupted *virB* operon was restored with the complementary plasmid, validating the feasibility of the strategy. [Conclusion] This recombinational cloning strategy provides us a new method to modify large DNA fragment of bacteria.

**Keywords:** plasmid rescue; bacterial chromosome; large DNA fragment

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600024) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA02Z412)

<sup>\*\*</sup> These authors contribute equally to this work.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-10-66933356; Fax: +86-10-66933356; E-mail: huangliuyuly@163.com

Received: 31 October 2007/Revised: 12 December 2007

### 2008年《微生物学报》改用新的“稿件远程处理系统”

自2006年本刊开通使用了“稿件远程处理系统”，因软件使用不畅，本刊决定2008年改用新的稿件处理系统，随之也不得不更换网站名称。由此会给作者和专家带来不便，敬请谅解！

2007年12月31日之前的来稿，在旧版网页中进行查询和审稿，进入新网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>)中点击“旧版入口”即可。2008年1月1日以后，所有投稿将在新系统下进行。

2008年1月1日以后的投稿，将在新网页上操作，原有的“作者库”将全部导入新的系统，凡是进行过网上投稿的作者仍然可以使用原来的“用户名”和“口令”，不必再重新注册。新系统使用起来会非常方便！欢迎大家进行在线投稿、查询、修稿和审稿。

衷心感谢广大读者、专家对本刊的支持！