

DOI: 10.13376/j.cblls/2017060

文章编号: 1004-0374(2017)05-0462-06

## 病毒重组细菌人工染色体构建、突变及应用

刘立涛, 孙洪磊, 刘金华\*

(中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

**摘要:** 如何快速、方便地保存和修饰基因组较大的 DNA 和 RNA 病毒核酸一直是病毒学研究的重点。细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 为解决这两个问题提供了便利, 它可以容纳 300 kb 的基因序列, 能够通过大肠杆菌诱变技术进行有效修饰, 目前已经成为编辑大基因组病毒基因的有效工具。DNA 病毒, 如疱疹病毒和痘病毒的基因组已被克隆到 BAC 载体上。此外, 一些 RNA 病毒, 如冠状病毒和黄病毒科病毒等也建立了基于 BAC 的反向遗传操作系统。现概述不同病毒重组 BAC 构建策略, 总结了常用的对 BACs 进行基因修饰的技术, 介绍了 BAC 载体重组病毒的拯救以及将 BAC 序列从病毒基因组中删除的方法, 简述了病毒重组细菌人工染色体的应用。

**关键词:** 病毒重组细菌人工染色体; 构建; 突变; 重组

**中图分类号:** Q782      **文献标志码:** A

## Viral bacterial artificial chromosomes: construction, mutagenesis and application

LIU Li-Tao, SUN Hong-Lei, LIU Jin-Hua\*

(College of Veterinary Medicine, China Agriculture University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Maintenance and manipulation of large DNA and RNA virus genomes have been a focus for virological research. Bacterial artificial chromosome (BAC) vectors provides a solution as they can harbor large DNA sequences and can efficiently be modified using well-established mutagenesis techniques in *Escherichia coli*, and has become an effective tool for editing large genomes. Numerous DNA virus genomes of herpes virus and pox virus were cloned into BAC vectors. In addition, several reverse genetic systems for RNA viruses such as members of *Coronaviridae* and *Flaviviridae* could be established based on BAC constructs. In this paper, we provide an overview on the strategies used for the generation of virus BAC vectors and also on systems currently available for various virus species. Furthermore, we address common mutagenesis techniques that allow modification of BACs and review the reconstitution of viruses from BAC vectors and strategies of removing the bacterial sequences from the virus genome. Finally, we briefly discuss the application of viral bacterial artificial chromosomes.

**Key words:** viral bacterial artificial chromosomes; construction; mutagenesis; recombination

大型 DNA 病毒基因组的遗传修饰非常繁琐。传统方法是在真核细胞中进行同源重组, 此方法首先构建两侧含有同源序列且包含选择标记基因的质粒, 然后将质粒与病毒全长基因组共转染易感真核细胞进行重组和筛选。通过此方法可以删除或突变病毒基因组中的目的基因, 然而, 这种传统的病毒基因修饰方法存在诸多问题。首先, 目的基因与病

毒基因组发生重组的概率极低; 其次, 产生的重组病毒不易被纯化, 需要多次重复筛选, 而且连续传代过程中的持续选择压易导致病毒基因组发生恢复

收稿日期: 2016-09-12; 修回日期: 2016-10-09

基金项目: 国家高科技研究发展计划(“863”计划)“家禽病毒病基因工程疫苗创制”

\*通信作者: E-mail: ljh@cau.edu.cn

性突变;同时,基因突变后要求子代病毒在体外能够有效复制,因此不易筛选出删除关键病毒基因的自然重组病毒<sup>[1]</sup>。

为克服传统重组方法的缺点,研究人员发展了病毒重组细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)的方法,该方法是将病毒基因组插入到BAC中,并借助细菌人工染色体进行基因组的保存和修饰。该方法有许多优势:一方面由于病毒启动子在细菌中不能正常工作,因此,病毒基因必须借助细菌聚合酶在大肠杆菌中复制,此过程中病毒基因组没有选择压,不会发生基因突变,确保了病毒基因的准确性<sup>[2]</sup>;另一方面,BAC可以容纳300 kb外源基因,这对于大的DNA和RNA病毒基因组克隆来说是必需的,且BAC载体上的细菌抗生素耐药性基因方便在大肠杆菌中筛选。同时,许多BAC载体除了复制和保存所需的基本序列之外还拥有荧光基因,能够在转染细胞中可视化表达,方便在哺乳动物细胞中筛选包含BAC的重组病毒<sup>[3]</sup>。此外,BAC在大肠杆菌中编码最小性因子(mini-F),保证了病毒基因组的准确性<sup>[4]</sup>。近年来快速发展的重组技术,如转座子诱变、基于Rec-A的重组系统、基于Red的重组系统以及Cre/loxP和FLP/FRT重组系统等可以在BACs中快速插入、删除和突变特定序列,便于研究病毒基因功能<sup>[3,5-6]</sup>。

## 1 病毒重组BAC构建

### 1.1 哺乳动物细胞中同源重组

常用的BAC载体中插入DNA病毒基因组的方法是在哺乳动物细胞中重组,这需要首先构建转移载体,即在BAC两侧插入与病毒靶位点两侧序列相同的同源臂序列<sup>[7]</sup>。BAC插入病毒基因组位点的选择至关重要,需要保证插入后不影响病毒复制必需基因<sup>[8]</sup>。同时,转移载体中需要含有筛选基因,如腺嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(eco-gpt)、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)或者潮霉素、新霉素等抗性基因等。然后,将环状或线性化转移载体转染到病毒感染的细胞,或将转移载体与病毒基因组DNA共转染细胞,通过在细胞内重组将BAC序列插入病毒基因组中。病毒重组后通过标记基因筛选和纯化重组病毒,提取病毒环状DNA并转化重组缺陷菌株以获得能够稳定遗传的克隆。

多数情况下,使用赫特法<sup>[9]</sup>提取病毒DNA,即使用SDS和NaCl分级沉淀,从感染病毒的细胞中分离出病毒DNA。残留的细胞DNA可以应用病

毒基因组中没有的限制性内切酶切割,并将切割产生的线性化DNA使用 $\lambda$ 核酸外切酶酶切消化,从而纯化富集环状病毒DNA<sup>[10]</sup>。将富集的环状DNA电转化到DH10B菌株,含有BAC的细菌利用抗生素抗性基因进行筛选<sup>[2]</sup>。构建克隆成功后可以通过限制性内切酶酶切后片段长度多态性分析法(RFLP)鉴定,以检测病毒基因组的完整性,并通过在插入位点BAC基因PCR扩增和测序以确定重组的过程中是否突变。

### 1.2 基于黏粒的方法

黏粒(cosmid)是一类人工构建的含有 $\lambda$ DNA黏性末端COS序列和质粒复制子的杂合质粒载体,由质粒pBR322和 $\lambda$ 噬菌体的COS黏性末端构建而成,大小约4.6 kb,容量约29 kb。它是为克隆和增殖真核基因组DNA的大区段而设计的,是组建真核生物基因文库及从多种生物中分离基因的有效手段。

将病毒DNA分段插入到黏粒中,且插入的DNA相互重叠,同时,将BAC也插入一个黏粒中,并在BAC两侧插入病毒靶位点两侧的同源臂序列。将相互重叠的黏粒转染真核细胞,病毒同源序列之间进行重组,进而获得重组病毒。在这个过程中,所有产生的病毒都含有BAC,获得的重组病毒不需要筛选。提取病毒环状DNA并转化大肠杆菌,筛选包含完整病毒基因组的克隆<sup>[10]</sup>。

### 1.3 体外连接

最近研究证明,BAC复制子通过酶切和连接方法可以直接插入疱疹病毒基因组中。即分离疱疹病毒感染细胞的环状病毒DNA,并使用限制性内切酶单一切割成线性病毒基因组,最后产生的全长病毒基因组与线性化BAC载体连接。这个策略已经成功地应用于人类疱疹病毒6(HHV-6A)的BAC系统构建。然而,这个方法存在许多缺陷:首先,该策略需要进行完整病毒基因组测序以确定潜在用于连接的限制性内切酶位点,但许多病毒基因组没有一个独特的限制性酶切位点;其次,BAC插入位点仅限于独特的限制性酶切位点处,插入到开放阅读框(orf)或病毒基因组的启动子处可能会减弱,甚至丧失BAC病毒的感染性;更重要的是,对于大型BAC载体,连接和转化效率非常低,这些因素都阻碍了使用该方法构建克隆<sup>[11]</sup>。

### 1.4 RNA病毒重组BAC构建

BAC载体也可以用来保存和修饰RNA病毒基因组,如冠状病毒和黄病毒科的病毒重组BAC已

构建成功<sup>[11]</sup>。对于不分节段的 RNA 病毒, 首先提取病毒的 RNA, 反转录成 cDNA, 并连接到 BAC 克隆中。如果全长 cDNA 过长, 可以模仿 DNA 病毒, 通过转染病毒核酸到真核细胞进行重组来构建。RNA 病毒基因组的表达可以通过人类巨细胞病毒 (HCMV) 主要早期启动子控制, 并利用细胞 RNA 聚合酶 II 完成<sup>[12]</sup>。另外, T7 启动子也可以用来驱动病毒 RNA 的表达。Boehme 等<sup>[13]</sup> 研究发现, 完整的病毒 RNA 也可以体外利用 T7 启动子转录/聚合酶系统, 使用病毒 BAC 克隆为模板进行转录。

目前, 一些实验室正在研究分节段 RNA 病毒 BAC 系统构建, 通过将病毒 RNA 片段的 cDNA 克隆到或直接合成到 BAC 中构建 BACs。转录分节段病毒基因组 RNA, 可以利用类似如上所述的不分节段 RNA 病毒启动子/终止子系统获得重组病毒, 如将甲型流感病毒所有 8 个基因组片段克隆到 BAC 中, 这个系统在真核细胞可以更有效地进行病毒拯救, 该技术已经用于重组流感疫苗的生产<sup>[14]</sup>。

## 2 病毒重组BAC的突变

### 2.1 转座子诱变

BAC 系统的一个主要优点是其作为一个行之有效的遗传工具, 可以随机或特异地在大肠杆菌中对病毒基因组进行修改。BAC 修饰的一个方法是转座子 (Tn) 介导的无预定目标突变。转座子随机整合到 BAC 病毒中, 干扰病毒基因和序列转录及表达。转座子诱变系统中 Tn 的整合是通过转座酶 (tnpA) 和游离酶 (tnpR) 转座子系统介导的, 其中 Tn 序列中抗生素耐药基因可筛选成功重组 BAC 的克隆, 载体中含有的热敏复制启动子可以快速去除转座子载体。为了确保 Tn 转座到 BAC 中, 而不是细胞基因组中, 成功构建了偏嗜环状的 DNA 转座子 Tn1721, 优化的转座子系统可以用于生成重组 BAC 库。

### 2.2 基于Rec-A的突变

为了更好地研究病毒基因的功能, 需要对特定目标序列进行修改。然而, BAC 基因组的连接和转化效率非常低, 为了克服这一障碍, 大部分病毒重组 BAC 的修饰使用大肠杆菌同源重组技术, 成熟的 RecA 和 Red/RecET 重组系统可以快速修饰 BAC。RecA 系统利用细菌表达的重组酶 RecA 进行重组修饰, 为了诱发 RecA 重组, 需要 500 bp~3 kb 的同源序列。然而, 疱疹病毒存在许多重复序列, RecA 表达可能导致病毒 BAC 克隆的不稳定,

从而使病毒基因组缺失。因此, BAC 通常保存在 RecA 缺失的大肠杆菌菌株, RecA 重组酶的表达通过瞬时转化进行<sup>[1]</sup>。

常见的基于 RecA 的诱变技术为穿梭突变, 需要两次重组来完成。第一次重组中, 穿梭质粒两侧需要含有与修饰靶位点两侧相同的序列作为重组同源臂。同源重组是通过穿梭载体表达的 RecA 进行的, 该表达载体含有正向和反向选择标记 (通常是热敏启动), 将该表达载体转化到含有 BAC 的大肠杆菌并进行诱变表达 RecA, 促进穿梭质粒上同源序列与 BAC 上相同目标序列的重组, 重组了穿梭质粒的细菌使用正向筛选标记进行筛选。可以通过温度依赖的方式调控质粒复制, 从而将成功重组 BAC 的细菌质粒进行富集。第二次重组将穿梭质粒从 BAC 载体中切除, 可以通过含有穿梭载体两侧同源臂序列的载体与 BAC 重组而获得。如果第二次重组利用的同源臂序列不是第一步重组中的同源臂序列, 那么突变序列将留在 BAC 载体中。反向筛选标记基因, 如 *rspL*、*sacB* 和 *tetR* 可以用来抑制未重组 BAC 的复制。穿梭突变的主要优势是它可以用于各种突变, 并且不会留下任何不必要的选择标记或其他细菌序列; 其次, 删除或修改 BAC 的目标序列可以在短时间内完成; 另外, 特定目标位点的标准穿梭质粒可快速生成和修改, 并可以对单个位点进行各种不同突变; 此外, 该系统允许插入长的或者短的序列, 可用于研究载体疫苗。然而, RecA 系统也有很多缺点, 最主要的是在重组过程中 BAC 不稳定, 往往出现 BAC 大片段缺失, 使用反向选择标记筛选时往往产生不必要的重组; 而且, 对 BAC 多个位点进行修饰时, 构建穿梭质粒非常费力<sup>[1]</sup>。

### 2.3 基于Red的突变

另一个大肠杆菌的 BAC 修饰系统是 Red 和 RecE/T 重组。该系统与 RecA 系统相似, 都利用双链 DNA (dsDNA) 作为底物。Red 和 RecE/T 重组系统由 3 个组件组成: 第一个组件是  $\gamma$  蛋白, 可以保护 dsDNA 末端免受细菌降解; 第二个组件是 5'-3' 核酸外切酶  $\alpha$  或 RecE, 产生单链 3' DNA 突出末端并不受  $\gamma$  蛋白的影响; 最后一个组件是单链 DNA 结合蛋白  $\beta$  或 RecT, 该蛋白可以结合单链 DNA 并保护其不被降解。Red 或 RecE/T 的主要优势是重组需要的同源臂序列缩短为 30~50 bp, 很少出现错误重组或重排。用 pKD46 将 Red 或 RecE/T 系统的组件通过质粒转化的形式转进大肠杆菌, 诱导  $\alpha$ 、 $\beta$

和  $\gamma$  蛋白表达并重组, 一旦诱变过程完成, pKD46 可以通过热敏复制机制从细菌中去除。一种更方便的方法是, 使用含有编码  $\lambda$  噬菌体原染色体的细菌, 如大肠杆菌菌株 DY380 及其衍生菌株, 在这种情况下,  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  可以以温度依赖方式诱导表达<sup>[1,16]</sup>。

Red 或 RecE/T 重组系统通常利用 PCR 产物进行重组, 通过引物合成方式把 BAC 重组所需的短的同源序列插入到 5' 突出端, 然后将 PCR 产物电转化到含有所需 BAC 的大肠杆菌中, 重组后的克隆可以通过选择标记筛选出来。而多点突变技术通常是把 Red 或 RecE/T 与其他重组系统和策略联合使用, 删除不必要的序列。

Cre/loxP 系统来自噬菌体 P1, Cre 重组酶识别两个 34 bp 的 loxP 位点, 该位点顺序不同将产生不同的重组效果<sup>[16]</sup>; Flp 重组系统来源于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 与 Cre/loxP 系统类似, 是基于 FLP 的重组酶, 利用 FRT 识别位点重组<sup>[17]</sup>。存在于一个载体上的两个同向 loxP 或 FRT 位点之间的序列会被切除, 可用于 Red 或 RecE/T 重组系统引入的多余序列或选择标记的移除。Cre/loxP 和 FLP/FRT 系统还可以用于插入序列, 如 BAC 上的一个 loxP 或 FRT 位点与插入序列上的 loxP 或 FRT 重组从而插入序列。

除了特定识别位点的重组, 还有其他方法完全删除引入的标记序列, 其中一种是结合正向和反向选择标记。Red 重组的第一步, 将双重选择基因插入到目标位点, 得到的克隆含有正向选择标记, 进而被筛选出来。第二步, 使用 5' 端含有 BAC 同源臂的引物扩增目的片段, 并将回收的 PCR 产物与 BACs 进行同源重组, 进而替换正向筛选标记。所需克隆可以通过反向选择标记进行富集, 但该系统的一个缺点是反向筛选效率低, 而且反向筛选标记的突变能产生耐反向标记的克隆。类似地, 删除反向标记而没有插入修改序列时, 可能会导致假阳性克隆<sup>[1]</sup>。

另一种方法是使用双向选择标记, 如半乳糖激酶 (GalK)<sup>[18]</sup>。在一些大肠杆菌菌株中, *galK* 基因可以作为正向选择标记, 如 SW102 不含 *galK* 基因, 不含半乳糖操纵子, 因此, 不能利用半乳糖作为碳源。在重组的第一步, 将 *galK* 基因引入 BAC, 重组成功的克隆在只含有半乳糖作为能源的基础培养基中进行正向筛选。然而, 也可以使用 *galK* 作为反向选择标记, 因为其可以转换 2-脱氧-半乳糖 (DOG) 为有毒代谢物 2-脱氧-半乳糖-1-磷酸, 从

而抑制细菌生长。该特性用于第二步重组, 克隆可以在 *galK* 被所需序列修改后生长<sup>[18]</sup>。除了 *galK* 之外, 另外两个双向选择标记 *thyA* 和 *tolC* 可用于对缺乏相应基因的细菌进行筛选。

第三种基于 Red 的重组方法“顺道诱变”, 可以删除最初引入的选择标记<sup>[15]</sup>。Red 重组第一步时, 插入的选择标记两侧各插入一个 18 bp 的归位内切酶 I-SceI 识别位点。在重组的第二步, 归位内切酶 I-SceI 可以切除插入的修饰序列, 但是残留一个 I-SceI 识别位点<sup>[15]</sup>, 这个重组系统可以将片段插入到任何位置。这种重组方法的优点是可以删除阳性筛选基因, 并可以用于插入多个片段。

### 3 重组病毒拯救及BAC删除

#### 3.1 重组病毒拯救

病毒重组 BAC 拯救病毒可以通过转染纯化 BACs 或体外转录的 RNA 到易感真核细胞, 启动病毒蛋白表达和病毒复制。在某些情况下, 需要共转染表达转录激活物的质粒来刺激病毒重组 BAC 的 DNA 复制, RNA 病毒重组 BAC 表达依赖转染细胞的 T7 DNA 聚合酶。对于痘病毒, 重组病毒拯救需要在转染之前或之后感染辅助病毒<sup>[19-20]</sup>。

#### 3.2 BAC序列定点切除

DNA 病毒重组修饰完成后, BAC 序列通常留在病毒的基因组中, 可能不利于病毒的复制。此外, 残留的细菌序列往往不利于一些应用, 如对减毒活疫苗的研发许可和认证。出于这个原因, 需要切除 BAC 序列, 常用的方法是利用 Cre/loxP 或 FLP/FRT 重组系统。为了去除 BAC 序列, 在 BAC 序列的两端插入 loxP 或 FRT 位点, 共转染病毒的 BAC 和 Cre/FLP 表达质粒可以瞬时表达重组酶, 识别 Cre/FLP 位点并切除 BAC 序列, 只留下单个 loxP 或 FRT 的 34 bp 位点<sup>[2]</sup>。2016 年, Richards 等<sup>[21]</sup>利用 loxP 位点, 使用 Cre 重组酶“自我剪接”方式对切除插入病毒基因组中的 BAC 序列的效率进行了深入研究。

#### 3.3 同源序列的回返替换

该方法使用真核细胞的重组机制切除 BAC, 对于这种方法, 修复载体 (或线性 PCR 产物) 包含 1~4 kb 的最初用于病毒 BAC 重组的同源片段, 然后, 共转染载体与病毒 DNA BAC 到易感细胞。在转染细胞中, 修复载体的同源序列可以与病毒同源上游和下游序列重组, 从而去除 BAC 序列。缺失了 BAC 序列的病毒噬斑失去荧光蛋白标记, 因此可以

筛选分离没有荧光标记的病毒，用于进一步研究。该方法的主要优点是可删除所有细菌序列，无 loxP 或 FRT 位点残存。然而，获得纯化的去除 BAC 的单克隆病毒费时费力<sup>[1]</sup>。

### 3.4 重复序列删除BAC

另一种完全切除 BAC 复制子的方法是将插入 BAC 序列时两端的同源臂序列设计为重复序列，通过病毒复制时从 BAC 一侧直接跳到另一端进行复制进而将 BAC 序列删除。然而，此方法存在一些缺陷，病毒重组 BAC 在细菌内复制时可以作为细菌重组酶的底物，复制过程中容易产生重组，导致 BAC 在大肠杆菌中不稳定<sup>[22]</sup>。为了避开这一问题，插入的重复序列可以改为倒置方向。

## 4 病毒重组细菌人工染色体应用

自 1997 年建立重组 BAC 系统，BAC 技术对解析 DNA 和 RNA 病毒的生命周期发挥了重要作用。研究人员已经开发出一些方便 BAC 序列插入病毒基因组中的技术，这使得对病毒基因组较大的疱疹病毒、痘病毒、冠状病毒和黄病毒等病毒基因特性有了深入研究<sup>[23]</sup>。同时，利用基因修饰技术，构建含有外源基因的重组病毒，作为重组或载体疫苗，也已应用到临床实践中<sup>[24]</sup>。目前研究发现 DNA 病毒几乎不会将自己的基因插入到宿主基因组中，不会引起宿主基因组变化；同时在选择疫苗载体时，一般选择毒力低、免疫性好的毒株，不会导致疾病产生；再次，构建活载体疫苗的病毒多为疱疹病毒等，基本属于细胞结合型病毒，排毒、散毒能力相对较低，生物安全性相对较好。BAC 载体保存病毒基因组的主要优势是其在在大肠杆菌中成熟的诱变技术，在过去的 10 年里，已经开发出许多方法来对病毒基因组进行突变，可以快速插入、删除基因或序列元件。相应地，也发展了许多技术应用：构建 BAC 文库，结合深度测序，对较大基因组进行测序<sup>[25-26]</sup>；将外源基因插入到基因组序列中，进而通过检测标记基因来检测病毒蛋白表达<sup>[27]</sup>；将可视化报告基因，如绿色荧光蛋白 (GFP) 插入到病毒基因组中，在体内或体外可视化感染细胞，或与病毒蛋白融合来确定其在活细胞的定位，还可以插入荧光素酶报告基因来跟踪病毒在动物体内的分布<sup>[28]</sup>。

然而，BAC 系统依然存在一些缺陷，如其病毒环状 DNA 较大，转化 BAC 重组病毒到细菌中效率低下。虽然现在已经改进转染方法和富集环状

DNA 的方法，但是低效率的转染依然阻碍着研究的步伐。而且反向筛选假阳性高、片段删除不完全、耐药株产生等依然阻碍着 BACs 系统的发展，迫切需要新的修饰筛选方法来提高阳性率。

### [参 考 文 献]

- [1] Tischer BK, Kaufer BB. Viral bacterial artificial chromosomes: generation, mutagenesis, and removal of mini-F sequences. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 472537
- [2] Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, et al. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 14759-63
- [3] Tischer BK, Von EJ, Kaufer B, et al. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques*, 2006, 40: 191-7
- [4] Adachi S, Hori K, Hiraga S. Subcellular positioning of plasmid mediated by dynamic localization of sopA and sopB. *J Mol Biol*, 2006, 356: 850-631
- [5] Rosas CT, König P, Beer M, et al. Evaluation of the vaccine potential of an equine herpesvirus type 1 vector expressing bovine viral diarrhoea virus structural proteins. *J Gen Virol*, 2007, 88: 748-57
- [6] Rosas CT, Tischer BK, Perkins GA, et al. Live-attenuated recombinant equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces a neutralizing antibody response against (WNV). *Virus Res*, 2007, 125: 69-78
- [7] Brunnemann AK, Liermann K, Deinhardt-Emmer S, et al. Recombinant herpes simplex virus type 1 strains with targeted mutations relevant for aciclovir susceptibility. *Sci Rep*, 2016, 6: 29903
- [8] Trapp S, Osterrieder N, Keil GM, et al. Mutagenesis of a bovine herpesvirus type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome: analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants. *J Gen Virol*, 2003, 84: 301-6
- [9] Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol*, 1967, 26: 365-9
- [10] Tischer BK, Kaufer BB, Sommer M, et al. A self-excisable infectious bacterial artificial chromosome clone of varicella-zoster virus allows analysis of the essential tegument protein encoded by ORF9. *J Virol*, 2007, 81: 13200-8
- [11] Stobart CC, Hotard AL, Jia M, et al. Reverse genetics of respiratory syncytial virus. *Methods Mol Biol*, 2016, 1442: 141-53
- [12] Almazán F, Gonzalez JM, Pénczes Z, et al. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 2339-47
- [13] Boehme KW, Ikizler M, Kobayashi T, et al. Reverse genetics for mammalian reovirus. *Methods*, 2011, 55: 109-13

- [14] Neumann G, Kawaoka Y. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 16825-9
- [15] Tischer BK, Smith GA, Osterrieder N. En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol Biol*, 2010, 634: 421-30
- [16] Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, 1981, 150: 467-86
- [17] Mcleod M, Craft S, Broach JR. Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 microns circle. *Mol Cell Biol*, 1986, 6: 3357-67
- [18] Warming S, Costantino N, Court DL, et al. Simple and highly efficient BAC recombineering using *galk* selection. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 36
- [19] Cottingham MG, Andersen RF, Spencer AJ, et al. Recombination-mediated genetic engineering of a bacterial artificial chromosome clone of modified vaccinia virus Ankara (MVA). *PLoS One*, 2008, 3: e1638
- [20] Roth SJ, Höper D, Beer M, et al. Recovery of infectious virus from full-length cowpox virus (CPXV) DNA cloned as a bacterial artificial chromosome (BAC). *Vet Res*, 2011, 42: 1-13
- [21] Richards AL, Sollars PJ, Smith GA. New tools to convert bacterial artificial chromosomes to a self-excising design and their application to a herpes simplex virus type 1 infectious clone. *BMC Biotechnol*, 2016, 16: 64
- [22] Wussow F, Fickenscher H, Tischer BK. Red-mediated transposition and final release of the mini-F vector of a cloned infectious herpesvirus genome. *PLoS One*, 2009, 4: e8178
- [23] Tai SH, Holz C, Engstrom MD, et al. *In vitro* characterization of felid herpesvirus 1 (FHV-1) mutants generated by recombineering in a recombinant BAC vector. *Virus Res*, 2016, 221: 15-22
- [24] Mays JK, Black-Pyrkosz A, Spatz S, et al. Protective efficacy of a recombinant bacterial artificial chromosome clone of a very virulent Marek's disease virus containing a reticuloendothelial virus long terminal repeat. *Avian Pathol*, 2016, 45: 657-66
- [25] Xu M, Wang Y, Zhao Z, et al. Functional genome mining for metabolites encoded by large gene clusters using heterologous expression of a whole genomic BAC library in *Streptomyces* spp. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82: 5795-805
- [26] Lv L, Liang XF, Tian C, et al. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library for mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky). *Genes Genet Syst*, 2016, 91: 189-91
- [27] Rosas CT, König P, Beer M, et al. Evaluation of the vaccine potential of an equine herpesvirus type 1 vector expressing bovine viral diarrhoea virus structural proteins. *J Gen Virol*, 2007, 88: 748-57
- [28] Luker GD, Bardill JP, Prior JL, et al. Noninvasive bioluminescence imaging of herpes simplex virus type 1 infection and therapy in living mice. *J Virol*, 2002, 76: 12149-61