

Cre/loxP 介导的伤寒杆菌染色体上插入基因的切除*

钱 锋 潘卫庆** 杜景伶

(第二军医大学病原生物学教研室, 上海 200433)

摘要 来源于 P1 噬菌体的位点专一性重组系统 loxP/Cre, 已成为一种新的 DNA 操作的有用工具, 在体内外都获得了成功的应用. 为了将四环素诱导表达系统引入减毒伤寒杆菌 CVD908 株中, tetR-loxP-neo 串联基因已通过同源重组被定位插入在 CVD908 株的 $\Delta aroC$ 位点中. 构建一 Cre 酶表达受启动子 $P_{LtetO-1}$ 控制的自杀质粒 pJG9/Cre, 以切除 CVD908 株 $\Delta aroC$ 中同向 loxP 序列之间的 neo 基因. 质粒 pJG9/Cre 电转化入菌中, 加入去水四环素诱导 Cre 酶表达, 通过重组切除 neo 基因, 再通过自杀质粒上 SacB 基因的启动, 使质粒清除出菌细胞. 抗生素鉴定和 PCR 扩增都证明, CVD908 株 $\Delta aroC$ 位点中的 neo 基因被成功切除.

关键词 Cre, loxP, 位点专一性重组, 基因切除, 伤寒杆菌

学科分类号 Q784

位点专一性重组系统 loxP/Cre 来源于 P1 噬菌体. 在 P1 噬菌体生活史中, 当噬菌体进入大肠杆菌后, 该系统使噬菌体 DNA 成环; 双体 DNA 成为单体以增加分离的 DNA 数并防止其丢失^[1]. loxP 为一 34 bp 的 DNA 序列, 有一 8 bp 的核心区和两侧的回文结构. Cre 酶为一分子质量为 38 ku 的重组酶, 识别 loxP 序列, 通过重组可切除同向排列的 loxP 序列之间的靶基因; 使相对排列的 loxP 序列之间的靶基因倒置; 分子间重组使环状 DNA 插入到其他 DNA 分子中. 这些作用不需要其他酶或蛋白质因子的参与, 也不论其作用靶是超螺旋结构、松弛结构还是线性结构. 由于 loxP 序列短, Cre 酶使用简便和有效, 使得 loxP/Cre 系统已成为一种新的 DNA 操作的有用工具, 不仅在体外试管中, 而且在活的生物体内都获得了成功的应用^[2~4]. 减毒伤寒杆菌 CVD908 菌株 (*Salmonella typhi* CVD908) 是通过 aroC、aroD 双基因缺失突变而减毒的伤寒杆菌疫苗株^[5], 并已广泛用作外源抗原的传递载体^[6,7]. 在该菌株中建立体内诱导表达系统可望克服在应用该疫苗载体时遇到的表达质粒易丢失、表达水平低的问题. tetR 基因 (四环素阻遏物基因) 与 neo 基因 (新霉素磷酸转移酶基因, 提供卡那霉素抗性) 以 tetR-loxP-neo 的串联形式通过同源重组被定位插入在 CVD908 株的 $\Delta aroC$ 位点中. 本文通过表达 Cre 酶的自杀质粒, 成功地切除了插入在伤寒杆菌 CVD908 染色体上同向 loxP 序列之间的 neo 基因, 产生了不含抗性标

记、但能进行外源基因四环素诱导表达的 CVD908 疫苗菌株.

1 材料方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α Z1、质粒 pZE11 由德国海德堡大学 Bujard 教授提供. DH5 α Z1 菌在其染色体 attB 位点上插有壮观霉素抗性基因和 tetR 基因^[8]. 自杀质粒 pJG9 由美国马里兰州立大学 Lavine 教授提供, 含 cat 基因 (氯霉素转乙酰基酶基因, 提供氯霉素抗性) 和 SacB 基因. 质粒 pBlue 和 pBlue/Cre 由本室构建和保存.

1.2 DNA 操作

DNA 的酶切、回收、连接、粘性末端的修平, 质粒的抽提及氯化钙转化, 细菌基因组 DNA 的抽提, 琼脂糖电泳等, 为常规操作方法. 电穿孔转化按 Dower 等^[9]方法进行, 制备电穿孔转化感受态菌, 取 40 μ l 菌液与适量质粒混匀后加入电极杯中, 转化参数为 2.5 kV、200 Ω 、25 μ F. PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s、53 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s、28 个循环, 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 5 min.

* 国家“863”计划 (102-07-04-04) 和国家自然科学基金 (39780024) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-25070250, E-mail: malaria@guomai.sh.cn

收稿日期: 2000-10-17, 接受日期: 2000-12-12

1.3 诱导表达

1 ml 过夜菌转接 50 ml TB 培养基 (thioglycollate broth), 30 °C 摇菌至 A_{600} 约为 0.5, 加入去水四环素 (anhydrotetracycline, aTc), 使终浓度为 100 $\mu\text{g/L}$, 转 37 °C 继续摇菌 4 h. 因 pJG9 的复制最佳温度在 30 °C, 所以常规培养在 30 °C 进行.

1.4 自杀质粒的清除

挑取单个菌落入 50 ml 含 10% 蔗糖的 LB 培养基, 30 °C 摇菌过夜, 转接 LB 平皿, 37 °C 培养过夜.

2 结果与讨论

2.1 表达 Cre 基因的自杀质粒 pJG9/Cre 的构建

扩增 pBlue/Cre 上的 Cre 基因, 两个扩增引物的 5' 端分别加有 *Kpn* I 和 *Pst* I 酶切位点, 扩增产物经双酶切后克隆入 pBlue 质粒的相同的酶切位点之间, 构建成 pBlue/Cre* 质粒, 并进行序列测定. 测序正确的 pBlue/Cre* 用 *Kpn* I 和 *Pst* I 双酶切, 克隆入 pZE11 的相同的酶切位点之间. *Kpn* I 和 *Pst* I 对 pZE11 的双酶切, 切除了 pZE11 上的起始密码子 ATG, Cre 基因上的起始密码子替代了 pZE11 上原有的起始密码子位置. 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α Z1, 抽提转化子中的质粒, 用 *Kpn* I 和 *Pst* I 双酶切后上样 1% 琼脂糖凝胶电泳. 结果见图 1a, 2.3 kb 条带为 pZE11 质粒, 1 kb 条带为 Cre 基因, 因此插入正确. 该重组质粒定名为 pZE11/Cre.

用 *Xho* I、*Sty* I 对 pZE11/Cre 进行双酶切, 如此的双酶切可将 pZE11 上四环素诱导的启动子 $P_{\text{LtetO-1}}$ 、转录终止子 T1 以及 Cre 以 $P_{\text{LtetO-1}}$ -Cre-T1 串联子形式一并切下, 用 Klenow 片段修平串联子

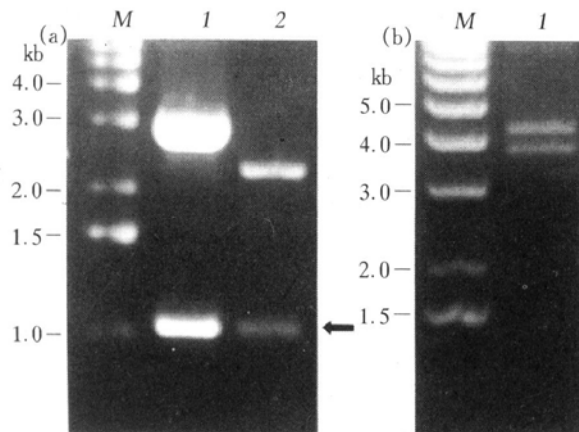


Fig. 1 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmids

(a) Digestion with *Kpn* I and *Pst* I. M: 1 kb marker; 1: pBlue/Cre*; 2: pZE11/Cre. The arrow indicates the Cre gene. (b)

Digestion with *Pst* I. M: 1 kb marker; 1: pJG9/Cre.

两端, 插入自杀质粒 pJG9 的 *Sma* I 位点中, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α Z1, 抽提质粒, 用 *Pst* I 单切. 在 pJG9 和串联子上各有一个单一的 *Pst* I 位点, 使重组质粒含有两个 *Pst* I 位点. 上样 1% 琼脂糖电泳, 结果见图 1b, 切出了两条分别为 3.9 kb 和 4.3 kb 条带, 因此构建正确, 并且插入方向如图 2 所示. 将此质粒定名为 pJG9/Cre.

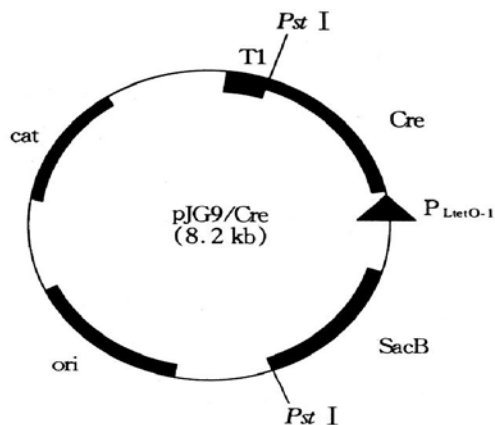


Fig. 2 Structure of suicide plasmid pJG9/Cre

2.2 切除减毒伤寒杆菌 CVD908 诱导株染色体上的 neo 基因

为在减毒伤寒杆菌 CVD908 株中建立四环素诱导表达, *tetR* 基因必须定向插入该菌株染色体 Δ aroC 位点. 我们未发表的结果表明, 由于同源重组的效率很低, 在没有抗性筛选标记存在时, 很难筛选到重组成功的克隆. 对此, 我们将 *tetR* 基因与 *neo* 基因串联一并插入 *aroC* 位点, 这样可利用该筛选标记很容易筛选到目的克隆. 但由于 *neo* 抗性基因的存在会影响该菌株在人体的应用, 因此有必要将 *neo* 基因从该菌株染色体中切除. 对此, 我们在 *neo* 基因两侧插入同向的 *loxP* 序列, 成为 *tetR-loxP-neo* 串联基因. 将该串联基因插入到自杀载体 pJG12 上的 Δ aroC 序列中, 产生 pJG12/*tetR-loxP-neo* 重组质粒, 用电穿孔转化法转化 CVD908 株, 通过同源重组, 使 *tetR-loxP-neo* 序列插入在该菌株 Δ aroC 位点中, 获得 CVD908/*tetR-loxP-neo* 菌株 (未发表结果). Δ aroC 及 *tetR-loxP-neo* 的总长度约为 2.9 kb.

将自杀质粒 pJG9/Cre 电转化入 CVD908/*tetR-loxP-neo* 株, pJG9/Cre 上控制 Cre 表达的 $P_{\text{LtetO-1}}$ 启动子受宿主菌染色体上 *tetR* 基因表达的阻遏蛋白的调控. 加入去水四环素进行诱导, aTc 与阻遏蛋白结合, $P_{\text{LtetO-1}}$ 启动子开放, 表达 Cre 酶, 表达的

Cre 酶识别 neo 基因两端的同向 loxP 序列, 启动位点专一性重组, 可切除 CVD908/tetR-loxP-neo 株染色体上 Δ aroC 位点中的 neo 基因. 将经诱导的菌划线含氯霉素的 LB 平皿, 经 37 °C 培养后筛选有氯霉素抗性但无卡那霉素抗性的菌落.

经筛选, 挑到符合这一条件的菌落. 经 PCR 鉴定, 在该菌落染色体中只存在 tetR 基因, 表明 neo 基因已被切除. 但在该菌株中仍存在 pJG9/Cre 质粒, 有必要将此质粒清除出菌体, 对此, 我们进行自杀质粒的清除. 自杀质粒上含有一 SacB 基因, 来源于枯草杆菌, 长约 2.6 kb, 表达蔗糖-6-果糖基转移酶 (levansucrase), 水解蔗糖, 在有蔗糖存在时, 该基因的启动可杀毁多种革兰氏阴性宿主菌, 包括沙门氏伤寒杆菌^[10]. 因此, 在有蔗糖存在时, 只有清除了含 SacB 基因的质粒 (即 pJG9/Cre), 宿主菌才能存活下来. 因此将该菌落接种入 50 ml 含 10% 蔗糖的 LB 培养基, 30 °C 摇菌, 进行自杀质粒的清除. 培养后划线 LB 平皿, 在平皿上挑取若干菌落进行抗生素抗性的鉴定. 经鉴定, 所挑取的菌落既无氯霉素也无卡那霉素抗性, 这表明所取菌落已清除了 pJG9/Cre 自杀性质粒.

抽取既无卡那霉素也无氯霉素抗性菌的基因组 DNA, 引物用 N32、N33 (N32: 5' atggcaggaaacacaattgga3'; N33: 5' ccagcgtggaatctgtctt3') 和 Tet1、Tet2 (Tet1: 5' gaagatctggcccttctgttccctc3'; Tet2: ctgctagcaagaccactttcacatttaag3') 进行扩增, 引物 N32、N33 和 Tet1、Tet2 分别匹配 aroC 基因和 tetR 基因两端序列. 若 tetR 和 neo 共存在于 CVD908 株的 Δ aroC 位点, 则用引物 N32 和 N33 可扩增到一条约 2.9 kb 条带; 若只有 tetR 存在, 则扩增条带为 1.4 kb. 图 3 第 2 泳道显示 N32 和 N33 扩增条带大小为 1.4 kb. 此外引物 Tet1、Tet2 扩增到 800 bp 的条带, 与 tetR 基因大小一致 (图 3 第 1 泳道). 这表明 neo 基因确已被切除, 而 tetR 基因依然存在于 CVD908 菌的染色体上.

我们构建的 pJG9/Cre 质粒成功地切除了 CVD908 菌染色体上同向 loxP 序列之间的 neo 基因. 但 pJG9/Cre 质粒的复制起始点是低拷贝的, 若更换成高拷贝的复制起始点, 可增加 Cre 酶的表达量, 有可能提高重组的效率. pJG9/Cre 上控制 Cre 基因表达的 $P_{LtetO-1}$ 启动子受 tetR 基因表达的阻遏蛋白的调控, 这要求使用的宿主菌需含有 tetR 基因. 若将启动子更换成诸如热诱导的启动子, 并

能较高效地表达, 则可扩大宿主菌的使用范围. 此外, 将 SacB 一类的基因与 loxP 之间的靶基因串联使用, 则可通过正选择筛选重组成功的菌落, 可大大提高筛选效率.

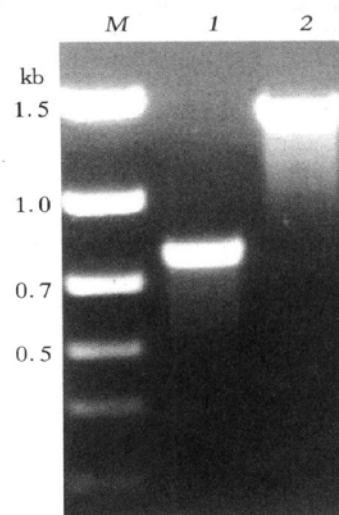


Fig. 3 PCR identification of chromosome of *S. typhi*

M: PCR marker; 1: PCR product with primer Tet1, Tet2;

2: PCR product with primer N32, N33.

参 考 文 献

- 1 Sternberg N, Sauer B, Hoess R, *et al.* Bacteriophage P1 Cre gene and its regulatory region evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *J Mol Biol*, 1986, **187** (2): 197 ~ 212
- 2 Yoon Y G, Cho J H, Kim S C. Cre/loxP-mediated excision and amplification of large segments of the *Escherichia coli* genome. *Genet Anal*, 1998, **14** (3): 89~ 95
- 3 Brecht S, Erdhart H, Soete M, *et al.* Genome engineering of *Toxoplasma gondii* using the site-specific recombinase Cre. *Gene*, 1999, **234** (2): 239~ 247
- 4 Kolb A F, Ansell R, McWhir J, *et al.* Insertion of a foreign gene into the β -casein locus by Cre-mediated site-specific recombination. *Gene*, 1999, **227** (2): 21~ 31
- 5 Hone D M, Harris A M, Chatfield S, *et al.* Construction of genetically defined double aro mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine*, 1991, **9** (11): 810~ 816
- 6 Gonzalez C, Hone D, Noriega F R, *et al.* *Salmonella typhi* vaccine strain CVD908 expression the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J Infect Dis*, 1994, **169** (4): 927~ 931
- 7 Gomez-Duarte O G, Galen J, Chatfield S N, *et al.* Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CVD908 vaccine strain. *Vaccine*, 1995, **13** (16): 1596~ 1602
- 8 Lutz R, Bujard H. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (6): 1203~ 1210
- 9 Dower W J, Miller J F, Ragsdale C W. High efficiency

transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res, 1988, **16** (13): 6127~ 6145

for entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria. J Bacteriol, 1985, **164** (2): 918~ 921

10 Gay P, LeCoq D, Steinmetz M, *et al.* Positive selection procedure

Cre/loxP Mediated Excision of Inserted Gene Fragment from *Salmonella typhi* Genome*

QIAN Feng, PAN Wei-Qing**, DU Jing-Ling

(Department of Etiological Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Site-specific DNA recombinant system Cre/loxP from bacteriophage P1 has been developed as a novel tool for DNA manipulation, and used successfully both *in vitro* and *in vivo*. Here a protocol for effective excision of neo gene located on chromosome of *Salmonella* have been developed. In order to establish a tetracycline-induced expression system in the attenuated *Salmonella typhi* CVD908 strain, a fused DNA fragment consisting of genes of tetracycline repressor (tetR) as well as neo gene flanked by two loxP sequences in same orientation has been integrated into a defined Δ aro C locus of CVD908 strain via homologous recombination. To excise the neo gene from the locus, the suicide plasmid pJG9/Cre expressing Cre recombinase under the control of tetracycline response promoter PL_{tetO-1} was constructed and electropolated into the CVD908 strain. The expression of the Cre recombinase induced by anhydrotetracycline successfully excised the neo gene. Since the suicide plasmid contains SacB gene encoding an enzyme that is lethal to G⁻ bacteria in the presence of sucrose, growing of the bacteria in a medium containing 10% sucrose cured the pJG9/Cre plasmid. Both antibiotic and PCR identification demonstrated the successful excision.

Key words Cre, loxP, site-specific recombination, gene excision, *Salmonella typhi*

* This work was supported by grants from National "863" Program of China (102-07-04-04) and the National Natural Science Foundation of China (39780024).

** Corresponding author. Tel: 86-21-25070250, E-mail: malaria@guomai.sh.cn

Received: October 17, 2000 Accepted: December 12, 2000