

DNA 重组酶 Cre 介导载体间基因的重组转移*

王文棋¹⁾ 盖颖¹⁾ 陆海¹⁾ 李义²⁾ 蒋湘宁^{1)**}

¹⁾北京林业大学生命科学与生物技术学院, 北京 100083;

²⁾Laboratory of Transgene, The University of Connecticut, Connecticut, Unit 3088 Storrs, USA)

摘要 DNA 重组酶 Cre 可以识别 LoxP 位点, 使含有 LoxP 位点的 DNA 分子发生重组: 2 个同向 LoxP 之间的 DNA 片段被删除, 2 个环状 DNA 分子被整合为一个大分子。基于 Cre 酶的这些作用特性, 构建了一套载体间基因的重组转移体系, 在 Cre 酶的作用下, *gfp* 基因被从基因供体 pTLG 上切除下来, 然后转移到基因受体 pET-LoxP 上, 从而快速、简便地完成了 *gfp* 基因高效表达载体 pET-*gfp* 的构建。 *gfp* 基因在大肠杆菌 BL21(DE3) 中被诱导表达, 使菌落产生了可视的绿色荧光。通过对荧光菌落的计数分析, 比较了环状基因供体 pTLG 和线性基因供体 pTLG 对有效重组率的影响, 使繁琐的传统载体构建变为简单的酶促反应, 极大地简化了载体构建步骤, 为 Cre 酶在基因克隆和亚克隆中的应用提供了很好的研究基础。

关键词 DNA 重组酶 Cre, 基因供体 pTLG, 基因受体 pET-LoxP, *gfp* 基因, 绿色荧光菌落

学科分类号 Q783.2

很多噬菌体和酵母都可以编码重组酶, 如噬菌体 P1 编码的 Cre^[1]、发芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的 2 μ 环状质粒编码的 FLP^[2,3] 以及由酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 的 pSR1 质粒编码的重组酶 R^[4] 等。它们的作用很相似, 都可以识别相应的作用位点, 并依据位点的方向, 造成 DNA 序列的插入、删除或反向^[5], 从而在生物体内或者体外实现精确的基因重组。因而重组酶被广泛应用在动物^[6,7]、植物的 DNA 操作中^[8~12], 是近年发展起来的一种强有力的 DNA 操作工具。

那么, 能否将重组酶引入到载体的构建过程中呢? 传统的载体构建需要很多的繁琐步骤和实验人员的技术经验, 而且经常因为找不到合适的酶切位点而使载体构建过程比较困难和缓慢。如果能构建一套由重组酶介导的基因转移构建系统, 将基因供体和基因受体放在试管中, 由重组酶来准确、快速地完成载体的构建, 这将会在很大程度上节约传统构建过程所需的人力、物力和财力, 为科研工作者赢得宝贵的时间。因此, 我们运用重组酶 Cre 对以上设想进行了尝试性的研究。

Cre 酶是由 Sternberg 等^[13] 于 1981 年从 P1 噬菌体中发现的, 由 P1 噬菌体编码的大小为 38 ku 的蛋白质。它能识别 34 bp 大小的 LoxP 位点, 使 2 个同向 LoxP 位点之间的 DNA 被删除, 2 个反向 LoxP 位点之

间的 DNA 被反转, 各带有一个 LoxP 位点的 2 个环状 DNA 分子则被整合为一个大环状分子。重组酶对底物的构型要求不严格, 可以是超螺旋 DNA 也可以是线性 DNA^[14]。基于 Cre 酶的这些反应特性, 本实验构建了基因供体 pTLG 和基因受体 pET-LoxP, 利用重组酶 Cre 的删除作用和整合作用, 实现了 Cre 酶介导的 *gfp* 基因原核高效表达载体 pET-*gfp* 的自动构建。同时, 还进行了环状基因供体和线性基因供体对有效重组率的影响与比较。

1 实验材料

1.1 基因、质粒与菌株

Cre 酶基因和 LoxP 序列购于中国毕龙生物科技公司; pMD-18 T 载体购于大连宝生物工程有限公司; Cre 酶蛋白质、*gfp* 基因、pET-30a 原核高效表达载体、大肠杆菌 JM109 和 BL21(DE3) 均由本实验室保存。

1.2 试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子质

* 国家自然科学基金项目(30271066, 30571512), 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(TG1999016005)和“948”项目(2006-4-C01-03)资助。

** 通讯联系人。Tel: 010-62338063, E-mail: jiangxn@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2007-03-25, 接受日期: 2007-04-29

量标准均购于大连宝生物工程有限公司; DNA玻璃奶回收试剂盒购于博大泰克公司; 其他生化试剂购于国内生化试剂公司。

2 实验方法

2.1 基因供体pTLG的构建

以含有 gfp 基因的质粒为模板进行PCR, 引物如下: P1, 5' GGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGGATATCGATGGTGAGCAAGGGCGAGG 3', P2, 5' GGATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCGATATCCGTTACTTGTACAGCAGCTCGTCC 3'.

94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min 共30个循环; 72℃ 延伸10 min. 回收PCR产物与pMD18-T载体连接. 测序正确的质粒命名为pTLG.

2.2 基因受体pET-LoxP的构建

以 gfp 基因为模板进行PCR, 引物如下:

5' gGGATCCGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGG 3'; 5' GAAGCTTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCC 3'(下划线示LoxP位点).

反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30个循环; 72℃ 延伸10 min. 将PCR产物连接到pMD-18T载体上. 测序鉴定正确后, 用BamH I 和Hind III 进行双酶切, 产生约2 700 bp大小的载体片段和约800 bp的小片段, 电泳回收小片段, 连接到同样经BamH I 和Hind III 消化过的pET-30a 载体上. 连接上的质粒用EcoR I 消化, 产生约5 500 bp大小的载体片段和约800 bp的小片段, 电泳回收载体片段, T4连接酶连接, 转化大肠杆菌JM109, 提取质粒并送公司测序, 最后得到带有一个LoxP位点的基因受体pET-LoxP.

2.3 Cre酶介导的基因供体pTLG上 gfp 基因的删除

Cre酶是由本实验室表达纯化的, 其过程见参考文献[15].

2.3.1 Cre 酶介导的环状 pTLG 上 gfp 基因的删除. 在5个0.5 ml离心管中分别加入0.1% BSA 1 μ l, 10 $\times$ 反应缓冲液 (20 mmol/L MgCl₂, 700 mmol/L NaCl, 500 mmol/L Tris-HCl pH7.5) 1 μ l, 环状pTLG 30 μ g, Cre酶0.5 μ g、1 μ g、1.5 μ g、2 μ g、2.5 μ g, 最后用双蒸水补足10 μ l反应体系, 37℃反应15 min, 加1% SDS 1 μ l终止反应, 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测.

2.3.2 Cre 酶介导的线性 pTLG 上 gfp 基因的删除. 在离心管中加入0.1% BSA 4 μ l、10 $\times$ 反应缓冲液 4 μ l、线性pTLG质粒150 μ g、Cre酶3 μ g, 用双蒸水补足40 μ l反应体系, 37℃下反应2、5、10、20、60 min时各取8 μ l加1% SDS 0.8 μ l终止反应. 反应全部结束后, 用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测.

2.4 Cre酶介导的 gfp 基因原核高效表达载体pET- gfp 的构建

取0.1% BSA 1 μ l, 基因供体pTLG (环状或者线性) 50 μ g, 基因受体pET-LoxP 10 μ g, 10 $\times$ 反应缓冲液 1 μ l, Cre酶1.0~1.5 μ g, 用双蒸水补足至10 μ l. 37℃ 反应15 min, 65℃ 20 min失活Cre酶, 转化大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞. 在转化过程中, 预培养结束后, 向预培养菌液中加入IPTG至终浓度为1 mmol/L^[16], 将菌液全部铺在一个含有卡那霉素(50 mg/L)的LB平板上, 37℃倒置培养12 h. 然后将平板取出放于4℃冰箱直至绿色荧光显现 (约2~5天).

2.5 荧光菌落的观察统计和测序分析

将长出菌落的平板分别置于暗箱式紫外投射仪(ZF-90型)中和荧光显微镜下进行观察, 统计每个平板上产生的绿色荧光菌落数的比例 (有效重组率), 比较环状pTLG和线性pTLG对有效重组率的影响. 挑取4个绿色荧光菌落和4个非荧光菌落进行质粒酶切分析和测序鉴定.

3 结 果

3.1 基因供体pTLG与基因受体pET-LoxP的构建

要实现Cre酶介导的 gfp 基因原核高效表达载体的自动构建, 必须提供带有一个LoxP位点的环状基因和带有一个LoxP位点的原核高效表达载体. 因而构建了基因供体pTLG和基因受体pET-LoxP, 通过PCR引物, 给 gfp 基因的两端各引入一个方向相同的LoxP位点, 得到pTLG, 通过PCR引物给普通pET-30a原核高效表达载体的多克隆位点处引入一个LoxP位点 (方向与pTLG的一致) 得到pET-LoxP. 在Cre酶的作用下, pTLG上的2个同向LoxP位点之间的 gfp 基因将被删除, 产生带有一个LoxP位点的环状 gfp 基因, 这个基因可以被整合到pET-LoxP上形成 gfp 基因的原核高效表达载体pET- gfp .

测序结果表明, pTLG和pET-LoxP的序列与设计完全一致.

3.2 Cre酶介导的基因供体pTLG上gfp基因的删除

在进行Cre酶介导的基因转移、载体构建之前, 必须保证pTLG上的gfp基因能被有效地切除下来.

3.2.1 Cre 酶介导的环状 pTLG 上gfp 基因的删除. 环状pTLG在Cre酶的作用下, 2个同向LoxP位点之间的gfp基因被删除, 产生一个环状的gfp基因和一个环状的载体, 见示意图1. 实验结果见图2.

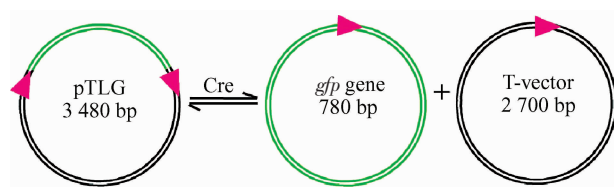


Fig. 1 Schematic of DNA excision between two direct repeat LoxP sites on circular pTLG mediated by Cre recombinase

Recombination between two direct repeat LoxP sites (showed by red arrow) on circular pTLG will excise *gfp* gene (showed by green solid lines) and generate two circular DNA molecules.

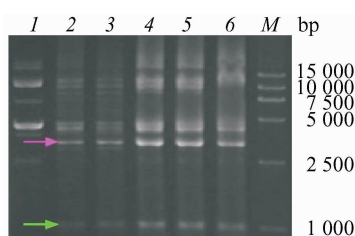


Fig. 2 The result of circular pTLG's recombination mediated by Cre

Lane 1 indicates circular pTLG without adding Cre recombinase. Lane 2, 3, 4, 5, 6 corresponding to the recombination of pTLG mediated by 0.5 μ g, 1.0 μ g, 1.5 μ g, 2.0 μ g, 2.5 μ g Cre recombinase, and all of them generated 2700 bp band (showed by red arrow) and 780 bp *gfp* gene band (showed by green arrow). M: Marker.

由图2可以看出, 在Cre酶的作用下, 环状pTLG上的gfp基因被删除, 产生了780 bp条带, 且随着Cre酶量的增加, 产生的gfp基因的量也有所增加. 此反应产生的分子都是环状的, 因而条带位置偏高.

3.2.2 Cre 酶介导的线性 pTLG 上gfp 基因的删除. 在Cre酶的作用下, 线性pTLG上的gfp基因被删除, 产生一个环状的gfp基因和一个线性载体分子, 示意图3, 实验结果见图4.

由图4可以看出, 在Cre酶的作用下, 线性pTLG上的gfp基因被删除, 产生了780 bp条带, 且随着反应时间的延长, 产生的gfp基因的量也有所增加.

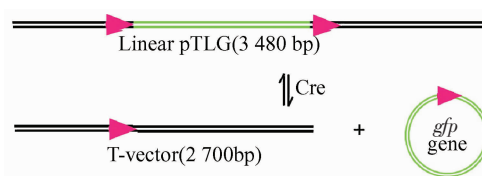


Fig. 3 Schematic of DNA excision between two direct repeat LoxP sites on linear pTLG mediated by Cre recombinase

Recombination between two direct repeat LoxP sites (showed by red arrow) on linear pTLG substrate will excise *gfp* gene (showed by green solid lines) and generate one circular *gfp* gene and one linear molecule.

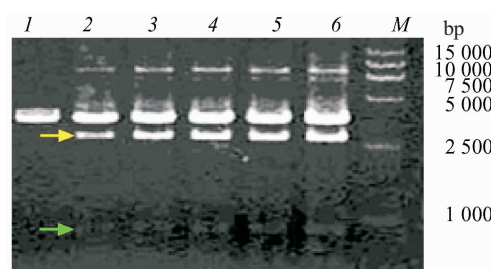


Fig. 4 The result of linear pTLG's recombination mediated by Cre

Lane 1 indicates linear pTLG without adding Cre recombinase. Lane 2, 3, 4, 5, 6 corresponding to incubating 0.5 μ g Cre recombinase and 30 μ g pTLG for 2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 60 min, and all of them generated 2700 bp band (showed by yellow arrow) and 780 bp *gfp* gene band (showed by green arrow). M: Marker.

3.3 Cre酶介导的gfp基因在pTLG和pET-LoxP之间的重组转移

基因供体pTLG在Cre酶的作用下, 所产生的带有一个LoxP位点的环状gfp基因与基因受体pET-LoxP发生整合, 产生新的环状分子pET-gfp, 即gfp基因的原核高效表达载体. 这里的gfp基因符合pET-LoxP的读码框, 在IPTG的诱导下, gfp基因得以正确表达, 并产生绿色荧光菌落 (图5).

3.4 荧光菌落数的统计和测序鉴定

3.4.1 荧光菌落数的统计.

以环状或者线性 pTLG 为基因供体, 都可以得到绿色荧光菌落, 但这2种不同构型的底物对荧光菌落数所占的比例 (这里称之为重组率) 有着明显的影响, 结果见图 6.

由图 6可以看出, 以环状pTLG为基因供体时, 重组率最高为23.68%, 平均为9.5%, 而以线性pTLG为供体时, 重组率则明显降低, 重组率最高仅为4.17%, 平均为3.25%.

3.4.2 荧光菌落的酶切分析和测序鉴定. 提取荧光菌落和非荧光菌落中的质粒进行验证分析, 以鉴定

得到的新质粒是否与预期一致. 4个绿色荧光菌落 G_1 、 G_2 、 G_3 和 G_4 以及3个非绿色荧光菌落 NG_1 、 NG_2 和 NG_3 的酶切分析结果见图7.

由图7可以看出, 绿色荧光菌落中的 pET-*gfp* 质粒并不一致, 4个菌落中只有 G_3 和 G_4 的酶切结果完

全正确. 测序结果表明: G_1 中, pTLG的全部序列都连接在 pET 的 T7 启动子之后, *gfp* 基因在前、载体部分在后; G_2 除了 *gfp* 基因还含有其他的 DNA 片段, 但测序结果则很乱, 结果不明确; G_3 和 G_4 序列完全正确, 得到了 pET-*gfp* 载体.

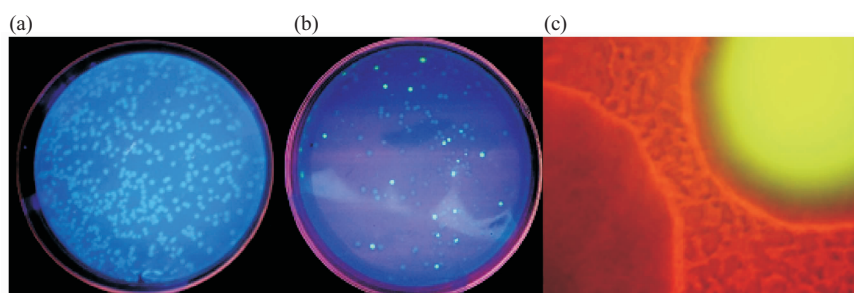


Fig. 5 Green fluorescent colonies

(a) Photo obtained through ZF-90 UV apparatus shows colonies who just containing pET-LoxP. (b) Photo obtained through ZF-90 UV apparatus shows the result of recombination between pET-LoxP and pTLG. Apparently *gfp* gene was transferred from pTLG to pET-loxp and generated green fluorescent colonies. (c) Photo obtained from fluorescent microscope shows common colonies and green fluorescent colonies.

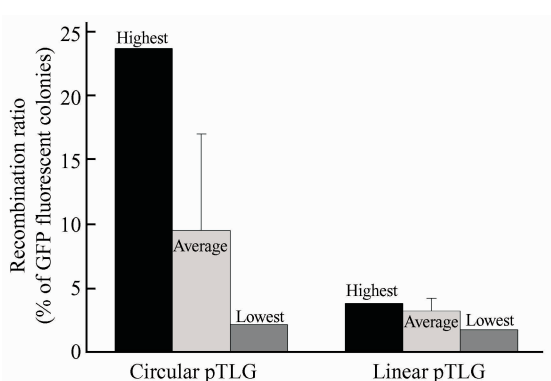


Fig. 6 Recombination ratios affected by circular pTLG and linear pTLG

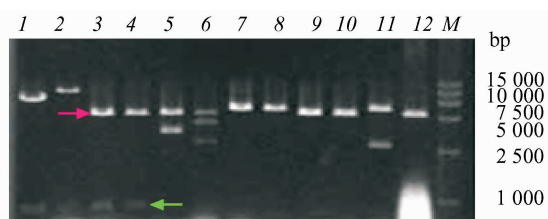


Fig. 7 Plasmids from green fluorescent colonies and common colonies were digested by restriction enzyme

1~4: Plasmids $G_1 \sim G_4$ digested by *EcoR* V which should generate 5 400 bp band (showed by red arrow) and 720 bp band (showed by green arrow); 5~8: Plasmids $G_1 \sim G_4$ digested by *EcoR* I which should generate 6 120 bp band; 9~11: Plasmids $NG_1 \sim G_3$ digested by *EcoR* I which should generate single 5 400 bp band; 12: pET-30 was digested by *EcoR* I which should generate single 5 400 bp band as ck; M: Marker.

4 讨 论

构建载体 pET-LoxP 的引物比较特殊: 一个引物带有 LoxP 位点, 另一个没有. 2 个引物相差 34 个碱基, 因而 PCR 产生了较多的非特异性条带, 但通过纯化回收, 得到了预期的序列.

重组结果的多样化是因为底物上总共带有 3 个 LoxP 位点: pET-LoxP 上 1 个; pTLG 上 2 个. 这 3 个位点之间的相互随机重组, 再加上 Cre 介导的反应是一个可逆反应^[7], 导致了重组结果的多样化. 我们希望能够降低这种干扰, 最大限度地提高有效重组率, 提高这套系统的实用价值. 因而我们从以下 2 方面尝试来解决这个问题:

a. 通过改变各底物的量来调控反应的方向, 使其尽可能地向着所需的方向进行(数据不在本文中).

b. 分别以线性 pTLG 和环状 pTLG 作为基因供体, 进行 *gfp* 基因的重组转移. 由图 1 和图 3 可以看出, 环状 pTLG 和线性 pTLG 在 Cre 酶的作用下会产生不同构型的分子: 环状的都产生环状分子, 线性的产生线性载体分子和环状 *gfp* 基因. 环状质粒能够被有效地转化进大肠杆菌并产生菌落, 而线性分子则不能. 因而, 我们认为线性的基因供体 pTLG 更有利于提高有效重组率: 新产生的线性载体分子不能被转化, 从而使总菌落数、无荧光菌落数减少, 绿色荧光菌落数的比例得以提高. 但实验结果

并非和我们设想的一致, 经过各10次以上的重复实验表明, 线性pTLG不仅不能有效地提高重组率和降低非荧光菌落数, 反而还会使有效重组率明显降低. 这说明我们的推测并不是完全正确的.

本实验运用重组酶Cre进行了*gfp*基因在基因供体pTLG和基因受体pET-LoxP之间的重组转移, 实现了Cre酶介导的*gfp*基因原核高效表达载体pET-*gfp*的自动构建, 省略了传统载体构建过程所需的酶切、回收、连接等繁琐步骤, 极大地简化了载体构建过程. 因而, 希望能用这套体系进行任何基因的原核高效表达载体的构建, 但前提条件是必须构建相应的基因供体, 这必然会降低这套体系的实用价值, 因为LoxP位点含有34个碱基, 且含有2个13bp的反向重复序列, 如果每次给引物加入LoxP位点, 在PCR中是比较容易出错的, 而且引物的成本也很高. 所以, 如果能够将LoxP位点固定在T载体上, 用这样的T载体与PCR产物连接, 就会很容易地达到给基因两端添加LoxP位点的目的, 这是我们下一步要进行的实验内容.

参 考 文 献

- 1 Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between LoxP sites. *J Mol Biol*, 1981, **150** (4): 467~468
- 2 Gronostajski Rm, Sadowski P D. The FLP recombinase of the *Saccharomyces cerevisiae* 2 microns plasmid attaches covalently to DNA via a phosphotyrosyl linkage. *Mol Cell Biol*, 1985, **5** (11): 3274~3279
- 3 Vetter D, Andrews B J, Roberts-Beatty L, *et al.* Site-specific recombination of yeast 2-micron DNA *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**(23): 7284~7288
- 4 Onouchi H, Yokoi K, Machida C, *et al.* Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19** (23): 6373~6378
- 5 Kilby N J, Snaith M R, Murray J A. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet*, 1993, **9** (12): 413~421
- 6 Nq P, Cummings D T, Eveleigh C M, *et al.* Yeast recombinase FLP functions effectively in human cells for construction of adenovirus vectors. *Biotechniques*, 2000, **29** (3): 524~528
- 7 Kolb A F. Genome engineering using site-specific recombinases. *Cloning Stem Cells*, 2002, **4** (1): 65~80
- 8 Odell J, Caimi P, Sauer B, *et al.* Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. *Mol Gen Genet*, 1990, **223** (3): 369~378
- 9 Qin M, Bayley C, Stockton T, *et al.* Cre recombinase-mediated site-specific recombination between plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(5): 1706~1710
- 10 Hoa T T, Bong B B, Hug E, *et al.* Cre/lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. *Theor Appl Genet*, 2002, **104** (4): 518~525
- 11 Lyznik L A, Mitchell J C, Hirayama L, *et al.* Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21** (4): 969~975
- 12 Dale E C, Ow D W. Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene*, 1990, **91** (1): 79~85
- 13 杨晓, 黄培堂, 黄翠芬. 基因打靶技术. 北京: 科学出版社, 2003. 25~30
Yang X, Huang P T, Huang C F. Technology of Gene Targeting. Beijing: Science Press, 2003. 25~30
- 14 Hoess R, Abremski K, Sternberg N, *et al.* The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site LoxP. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1984, **49**: 761~768
- 15 王文棋, 盖颖, 陆海, 等. 重组酶Cre基因在大肠杆菌中的高效表达及其一步纯化和活性检测. 北京林业大学学报, 2006, **28** (3): 57~60
Wang W Q, Gai Y, Lu H, *et al.* Journal of Beijing Forestry University, 2006, **28** (3): 57~60
- 16 陆海, 吴薇, 曾庆银, 等. 大肠杆菌BL21(DE3)中表达重组蛋白的研究. 北京林业大学学报, 2001, **23** (6): 1~4
Lu H, Wu W, Zeng Q Y, *et al.* Beijing Forestry University, 2001, **23** (6): 1~4
- 17 Buchholz F, Ringrose L, Angrand P O, *et al.* Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implication for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Research*, 1996, **24** (21): 4256~4262

Recombinase Cre Mediated DNA Recombination and Gene's Transferring Between Vectors*

WANG Wen-Qi¹⁾, GAI Ying¹⁾, LU Hai¹⁾, LI Yi²⁾, JIANG Xiang-Ning¹⁾**

(¹⁾College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

²⁾ Laboratory of Transgene, The University of Connecticut, Connecticut, Unit 3088 Storrs, USA)

Abstract DNA recombinase Cre can recognize LoxP sites and result in recombination of DNA molecules. Recombination between two directly oriented LoxP sites excises the inserted DNA. And recombination between two circular DNA molecules, which contains a directly oriented LoxP site each one, generates a cointegrate. Based on these traits of Cre recombinase, a gene-transfer and gene sub-cloning system was constructed. *gfp* gene was excised from gene-donor vector pTLG and transferred directly to gene-receiving vector pET-LoxP mediated by Cre recombinase, completing the construction of pET-*gfp* very quickly and simply. Afterwards, *gfp* gene was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and generated visible green fluorescence colonies. It extremely simplified traditional courses of vector construction to only a reaction mediated by recombinase. Recombination ratios affected by circular gene-donor vector pTLG and linear pTLG were quantified and compared with. A good reference was provided for gene easy cloning or sub-cloning mediated by Cre recombinase.

Key words DNA recombinase Cre, gene-donor vector pTLG, gene-receiving vector pET-LoxP, *gfp* gene, green fluorescence colonies

* This work was supported by a grant from The of National Nature science Foundation of China (30271066,30571512), National Important Base Research Program of China (TG1999016005) and "948 Project" (2006-4-C01-03).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62338063, E-mail: jiangxn@bjfu.edu.cn

Received: March 25, 2007 Accepted: April 29, 2007