

综述与专论

Cre/LoxP 系统在转基因小鼠上的应用策略

朱焕章 史景泉

(第三军医大学西南医院病理学研究所, 重庆 400038)

摘要 Cre/LoxP 位点特异重组酶系统已发展为在体内外进行遗传操作的一个新的有力工具. 该系统在转基因小鼠上的应用, 可使转基因的表达或靶基因的缺失/突变的位点特异 DNA 重组不仅发生在小鼠发育的某一阶段或特定的组织器官, 而且, 若与控制 Cre 表达或功能的诱导系统结合, 则可以时空方式体现. 这些基于重组的策略可能对基因功能的研究和人类疾病的动物模型的建立产生深刻影响.

关键词 整合酶/Cre, 重组, 基因表达调控, 转基因, 基因打靶, 小鼠

学科分类号 Q55, Q52, Q7, Q95

转基因小鼠 (transgenic mice, TgM) 主要是通过经受精卵原核的显微注射技术或经胚胎干细胞 (embryonic stem, ES) 的基因打靶技术来制备的. 由显微注射方法所产生的 TgM, 由于转基因既可能被设计用以表达一个新的基因产物, 也可被设计误表达 (misexpress) 一个正常基因, 因此常被用来进行基因功能获得性研究; 而基于同源重组原理的基因打靶技术, 既可通过定点整合产生无效基因 (null allele) 以进行基因功能失去方面研究, 又可特异性地在 ES 细胞基因组中某个已知序列的基因位点引入预定的突变, 以阐明该基因的功能及其与相关疾病发生发展的关系, 因而是建立功能基因组模型以及人类疾病的动物模型的主要途径^[1]. 然而, 这些转基因技术仍存在着某些方面的局限性. 例如, 通过显微注射技术来制备 TgM, 由于某些基因其表达产物常使细胞或胚胎不能耐受, 妨碍了 TgM 家系的建立; 基因敲除 (knockout) 小鼠由于靶基因在所有体细胞的基因组上都存在基因的缺失/突变, 常不能成活, 无法对发育后期的基因功能进行分析等等. Cre/LoxP 位点特异重组酶系统与转基因技术和诱导基因表达或其功能的调控系统的结合, 为上述问题的解决开辟了新的途径. 本文就 Cre/LoxP 系统的特点, 以及在转基因小鼠上的应用策略, 扼要综述如下.

1 Cre/LoxP 重组系统的特点

位点特异重组酶是由酵母或细菌所编码、可识别特异靶位点并在其上催化断裂和重接、从而产生精确的 DNA 重组的一类酶. 根据序列相似性, 重

组酶可分为 Int 家族 (integrase family) 和 resolvase-invertase family. Cre 是来源于 P1 噬菌体 *cre* 基因所编码的一个 38 ku 蛋白, 属于 Int 家族. 它可识别 P1 基因组上由 34 bp 核苷酸序列构成的称为 LoxP 的特异靶位点, 并根据 LoxP 的方向性, 可在各种底物 (超螺旋环状型, 松弛型和线型 DNA 分子) 上介导三种不同的重组事件: a. 同向位点之间序列的缺失 (图 1a); b. 插入序列 (图 1b); c. 两个反向位点之间序列颠倒 (图 1c). 需指出的是, Cre 重组酶所催化的是一个可逆的重组事件, 重组结果代表着正负反应的平衡; 重组的程度与重组酶的表达水平相关. Cre 催化重组的另外一个重要特点是在位点特异重组反应的任何阶段上, 不需要任何辅助因子参与; 该特点使 Cre/LoxP 位点特异重组酶系统成为可在各类种属上进行意向 DNA 操作的有用工具^[1,2].

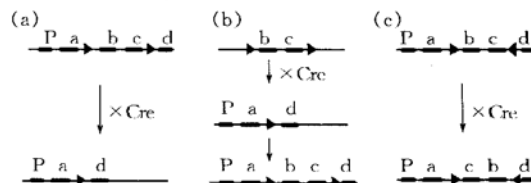


图 1 Cre 介导三种不同的重组事件
P: 启动子; $\blacktriangleleft$: LoxP; a, b, c, d: 基因.

2 条件性基因表达

一般情况下, 常选择有表达的或有表型的 TgM 来建立转基因家系. 然而, 对于某些转基因

来说, 当其表达时, 常导致小鼠不孕或胎儿死亡, 因此通过繁殖来建立 TgM 家系是困难的. 另外, 在 TgM 家系建立上, 存在着更为复杂的情况, 如转基因高表达的胚胎死亡后, 那么弱表达的转基因胚胎则被选择, 因而部分表型的观察可能会导致对转基因确切功能的误解. 因此, 若在 TgM 建系之前, 使转基因休眠 (dormant transgene), 当建系之后, 使休眠转基因激活, 即条件性基因表达, 那么就可克服上述问题. 该策略是将 $LoxP^2$ 和含有报告基因 CAT 及 STOP 信号停止序列, 插入转基因与其启动子之间, 运用显微注射技术将该构件导入小鼠受精卵获得 TgM, 然后通过报告基因 CAT 的表达, 选择转基因表达甚至高表达的 TgM 家系来建立首建鼠, 将该鼠与第二个有表达 Cre 蛋白的 TgM 杂交, 经 Cre 介导 STOP 信号移出, 导致休眠转基因的激活 (图 2). Lakso^[3] 将 $LoxP^2STOP$ 序列插入 SV40T-Ag 基因与晶状体特异性启动子之间, 在该构件的 TgM 上, SV40T-Ag 基因是不表达的, 经与带有表达 Cre TgM 交配, 在晶状体上 Cre 蛋白的表达去除了 STOP 序列, 导致 SV40T-Ag 表达, 最后成功地得到了在晶状体上发生肿瘤的 TgM. Wakita^[4] 应用该策略, 建立了条件性表达的丙型肝炎病毒 (HCV) TgM, 为探讨 HCV 的免疫反应及致病机制提供了较好的模型.

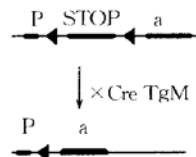


图 2 Cre 介导的条件性基因表达
STOP: 停止信号盒; 其余同图 1 所示.

3 条件性基因打靶

基因打靶技术尽管克服了经受精卵原核显微注射技术引起的, 诸如外源基因随机整合, 其拷贝数不能控制的局限性, 但由于 knockout 小鼠的所有细胞基因组上都存在基因的缺失/突变, 往往引起严重的发育缺陷或胎儿死亡, 不利于在发育后期阶段基因功能的分析. 即使发育完整的突变体小鼠, 对于 knockout 表型的解释常遇到两个困难问题: 一是所有体细胞基因的剔除, 很难将异常的表型归于哪一类细胞或组织, 二是很难排除在成熟动物上由于发育缺陷所引起的异常表型. 另外, 新霉素抗性基因 (neo) 和单纯疱疹病毒的胸腺嘧啶激酶基因 (HSVtk) 为正负选择 (positive and negative

selection) 系统, 是筛选和富集同源重组细胞广泛应用的方法; 该方法虽然使基因打靶技术可适用于任何外源目的基因, 但也有一个严重的缺陷, 即发生同源重组的细胞基因组中总留有外源的选择标记 (neo) 基因; 该基因可能影响相邻基因的表达, 不利于对突变表型的精确分析. 以 Cre/LoxP 系统与基因打靶技术相结合的条件性基因打靶 (conditional gene targeting) 将可克服上述的局限性. 该策略主要是运用 DNA 重组方法来构建打靶基因置于同向 LoxP 之内的打靶载体, 经在 ES 细胞上同源重组及筛选, 将携带该载体的小鼠与受控于组织特异性启动子或诱导性启动子的 Cre 基因的 TgM 交配, 经 Cre 介导重组, 即可获得靶基因在某一组织器官或发育时期上缺失的 knockout 小鼠 (图 3a). Gu^[5] 首先应用该策略在 TgM 体内成功地实现了 DNA 聚合酶 β 基因在 T 细胞上基因打靶. Cre 介导的在脑^[6]、乳腺^[7]、肠^[8]等组织器官的条件性基因打靶小鼠亦相继产生. 因此, 通过对 Cre 基因表达的控制, 即可实现在特定器官或时间上对内源基因的打靶, 使人们不仅能完整理解由于无效突变常导致胚胎死亡的基因在发育后期阶段上的重要功能, 而且有助于精确分析靶基因的失活对某一组织器官的影响.

应用 Cre/LoxP 系统, 也可将一个精细突变的打靶基因引入到正常基因组上, 同时实现对标记基因的移出 (图 3b). 假如, 靶基因有 3 个外显子, 若将带有点突变的打靶基因替换靶基因的第三外显子, 首先构建含有微细突变及其标记基因的打靶载体, 在 ES 细胞上经同源重组和 G418 选择, 靶基因上第三外显子可被微细突变的打靶基因所替

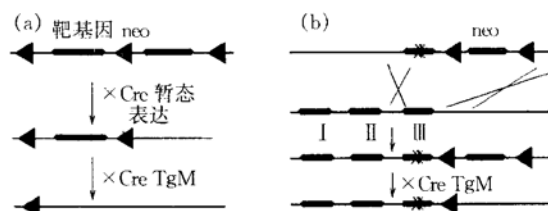


图 3 Cre 介导的条件性基因缺失

(a) 突变打靶基因的引入; (b) $\times$ 示突变打靶基因, 其余同图 1 所示.

代, 经在 ES 细胞上 Cre 暂态表达, 标记基因 neo 即可移出. 当然, 将含 $LoxP^2$ neo 基因的同源重组的 ES 细胞可直接用作产生小鼠, 然后与带有 Cre 蛋白表达的 TgM 交配, 也可实现对标记基因的移出.

Cre 介导的条件性基因打靶策略的一个重要的

特征是同一个 LoxP 标签 (tagged) 小鼠分别与在不同的特定组织或时间内表达 Cre 蛋白的 TgM 交配, 即可得到在不同特定组织上或时间内基因缺失的相应 knockout 小鼠. 由于 LoxP 标签小鼠的策略可节省在 ES 细胞上的基因操作及其后的 knockout 小鼠产生的时间及花费, 因此备受研究者青睐. 最近, Lobe 等^[9]建立的双报告小鼠, 为 Cre 重组酶表达方式及其活性的检测, 提供了更便利可靠的方式.

4 诱导细胞特异性基因打靶

条件性基因打靶能够使靶基因的缺失/突变的位点特异 DNA 重组仅以时间或空间方式发生, 因而具有一定的局限性. 诱导细胞特异性基因打靶是将组织特异性调控和诱导 Cre 表达或功能的调控体系相结合, 以时空的方式实现对靶基因的缺失/突变的调控, 因而是目前较理想的策略. 该策略除了应用组织特异性启动子外, 关键是对 Cre 表达或功能的诱导调控. 基于四环素 (tetracycline, Tet) 的 Tet-off/Tet-on 系统是近新发展起来的高效、无毒的诱导基因表达调控系统, 如 Tet-off 系统是将四环素阻遏蛋白 (tetracycline repressor, Tet R) 的结构基因与单纯疱疹病毒 (HSV) 编码 VP16 C 端 130 个氨基酸的基因片段融合, 构建成置于组织特异性启动子控制下并表达四环素转录激活子 (tetracycline transcriptional activator, tTA) 的质粒; 而含有四环素抗性操纵子 (tetracycline resistance operon, Tet O) 和巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 启动子的四环素反应因子 (tetracycline response element, TRE), 则与被调控的目的基因 cre 融合构建成第二个质粒. 将上述构件通过转基因即可获得在某一组织器官特异性表达 tTA 和 Cre 的 TgM; 然后将该鼠与携带打靶载体的 LoxP 修饰小鼠交配, 所产后代若服用 Tet, 由于 Tet 与 Tet R 的高亲和性, 使 tTA 蛋白构型发生变化, 不能结合 Tet O, 引起 TRE 下游 cre 基因的转录阻断; 如在发育某一阶段上停止服用 Tet, 则 tTA 即可激活 TRE, 引起 TRE 下游 cre 基因在某一组织器官特异性表达, 经 Cre 介导的位点特异重组, 从而通过以时空的方式实现对靶基因的缺失/突变的调控. Stonge 等^[10]运用这一策略, 在 TgM 小鼠上成功地论证了这个设想. 目前, 除了上述 tet 诱导系统外, 如基于蜕皮激素 (ecdysone), RU486 和化学性诱导二聚体 (chemical inducer of dimerization, CIDs) 等新的诱导基因表

达系统已显示出更加诱人的应用前景, 它们的推出, 势必拓宽对诱导调控系统的选择范围^[11]. 此外, 与上述调控 Cre 基因转录策略不同的另一个策略, 是通过将 Cre 与雌激素受体 (ER) 的配体结合域 (LBD) 融合来控制 Cre 的功能. Brocard^[12]及其同事在这方面做了系列研究. 他们首先将 ER 的 LBD 与 Cre 重组酶融合产生一个嵌合重组酶 (Cre-ER). 在培养细胞中论证了该酶活性则依赖于雌激素或 Tamoxifen 的存在. 由于机体内源性激素的存在, 因此他们将 Cre 与突变 LBD 融合构成嵌合体 Cre-ER¹ 蛋白, 该蛋白仅能与外源配体结合不与内源激素结合, 而外源配体也仅与突变的 ER¹ 结合, 使这一策略能在小鼠上实施. 结果显示了在 CMV 启动子控制下的表达 Cre-ER¹ 的 TgM, 服用 Tamoxifen 后, 导致 Cre 介导的重组在预定时间内的多数组织上发生. Schwenk^[13]将置于 B 细胞特异性表达启动子 E_u/P_{sv40} 控制下的表达 Cre-ER¹ 蛋白的基因构件, 通过显微注射技术注入小鼠受精卵原核, 得到仅在 B 细胞特异性表达 Cre-ER¹ 蛋白的 TgM, 该鼠若服用 Tamoxifen, Cre 重组酶的活性被激活, 即可导致 Cre 介导的重组在预定时间内和特定的组织细胞类型上发生. 因此, 诱导细胞特异性基因打靶策略使人们在动物生命的任何时间上来研究特定基因在特定的细胞亚群上的作用成为可能.

综上所述, Cre/LoxP 系统已发展为在体内或体外进行遗传操作的一个有力的新工具. 它与显微注射技术和基因打靶技术的结合, 可允许转基因的表达或靶基因的缺失/突变仅发生在小鼠发育的某一阶段或特定的组织器官; 若与控制 Cre 表达或功能的诱导调控系统以及转基因技术联合应用, 则使转基因的表达或靶基因的缺失/突变仅出现在小鼠生命期的特定时间和特定的细胞类型. 故此策略的应用必将对精确分析基因的功能及其与表型的关系, 建立高级的人类疾病动物模型产生深远的影响. 为了更加广泛应用 Cre/LoxP 系统, 应考虑如下几个问题: a. 为了减少 Cre 在非靶组织累积的背景活性, 很有必要寻找更为合适的组织特异性表达启动子, 以及应用新的诱导表达体系. b. 与 FLP 重组酶的联合使用, 可以克服单一酶无法解决的问题. c. 使实现这些目的实验操作变得更为简单且能为更多实验室所掌握. 目前, 国外关于 Cre/LoxP 系统在 TgM 上应用文献已逐年增加 (<http://www.mshri.on.ca/develop/nagy/cre.htm>). 国内尚未见这方面报道, 所幸已有不少实验室着手

对该技术的引进和追踪, 这对我国生命科学的发展是十分必要的.

参 考 文 献

- 1 Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/Lox system. *Methods*, 1998, **14** (4): 381~ 392
- 2 Guo F, Gopaul D N, Duyne G D. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*, 1997, **389** (6646): 40~ 46
- 3 Lakso M, Sauer B, Mosinger B, *et al.* Targeted oncogene activation by site specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (14): 6232~ 6236
- 4 Wakita T, Taya C, Katsume A, *et al.* Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J Biol Chem*, 1998, **273** (15): 9001~ 9006
- 5 Gu H, Marth J D, Orban P C, *et al.* Deletion of DNA polymerase β gene segment in T cell using cell type specific gene targeting. *Science*, 1994, **265** (5168): 103~ 106
- 6 Kellendonk C, Troche F, Casanova E, *et al.* Inducible site-specific recombination in the brain. *J Mol Biol*, 1999, **285** (1): 175~ 182
- 7 Wagner K U, Wall R J, St Onge L, *et al.* Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (21): 4323~ 4330
- 8 Shibata H, Toyama K, Shioya H, *et al.* Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science*, 1997, **278** (5335): 120~ 123
- 9 Lobe C G, Koop K E, Kreppner W, *et al.* Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Dev Biol*, 1999, **208** (2): 281~ 292
- 10 Stange L, Urth P A, Gruss P. Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24** (19): 3875~ 3877
- 11 Saez E, No D, West A, *et al.* Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr Opin Biotech*, 1997, **8** (3): 608~ 616
- 12 Brocard J, Warot X, Wendling O, *et al.* Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (26): 14559~ 14563
- 13 Schwenk F, Kuhn R, Angrand P O, *et al.* Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (6): 1427~ 1432

Strategies and Applications of the Cre/LoxP System in Transgenic Mice. ZHU Huan-Zhang, SHI Jing-Quan (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China).

Abstract Cre site-specific DNA recombinase system has been developed as a novel powerful tools for manipulating DNA both *in vitro* and *in vivo*. It has been used in transgenic mice to induce site-specific DNA recombination leading to gene expression or deletion/ mutation not only in a tissue-specific or at a certain stage of development, by combining with inducible systems for controlling Cre expression or function, but also in temporally and spatially manner. These recombination-based strategies are likely to have a profound impact on study of gene function and the generation of animal models of human diseases.

Key words integrase/Cre, recombination, gene expression regulation, transgene, gene targeting, mice

绿色荧光蛋白

刘默芳 王恩多

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 来源于水母 *Aequorea victoria* 的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 现已成为在生物化学和细胞生物学中研究和开发应用得最广泛的蛋白质之一. 其内源荧光基团在受到紫外光或蓝光激发时 ($\lambda_{\max} = 395 \text{ nm}$, 小峰在 479 nm) 可高效发射清晰可见的绿光. GFP 的高分辨率晶体结构为了解和研究蛋白质结构和光谱学功能关系提供了一个极好的机会. GFP 已成为一个监测在完整细胞和组织内基因表达和蛋白质定位的理想标记. 通过突变和蛋白质工程构建的 GFP 嵌合蛋白在生理指示剂、生物传感器、光化学领域以及生产发光纤维等方面展示了广阔前景.

关键词 水母, 绿色荧光蛋白, 生色团, 变种

学科分类号 Q785

绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 是一类存在于包括水母、水螅和珊瑚等腔肠动物体内的生物发光蛋白. 当受到紫外或蓝光激发时, GFP 发射绿色荧光. 其独特之处在于: 它产生

荧光无需底物或辅因子, 发色团是其蛋白质一级序列固有的^[1]. 来源于水母 (*Aequorea victoria*) 的

Tel: (021) 64374430-241, E-mail: wed@server.shnc.ac.cn

收稿日期: 1999-04-08, 修回日期: 1999-08-24