

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00177

Cre/lox 位点特异性重组系统在高等真核生物中的研究进展

龙定沛¹, 谭兵^{1,2}, 赵爱春¹, 许龙霞^{1,3}, 向仲怀¹

1. 西南大学蚕学与系统生物学研究所, 农业部蚕学重点开放实验室, 重庆 400716;
2. 中国科学院武汉病毒研究所, 分子病毒学及病毒免疫学学科组, 武汉 430071;
3. 中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031

摘要: 来自于P1噬菌体的Cre/lox系统通过位点特异性重组可以迅速而有效地实现各种生理环境下的基因定点插入、删除、替换和倒位等操作。Cre/lox系统作为目前基因打靶技术的核心工具, 已被广泛应用于拟南芥、水稻、小鼠、果蝇、斑马鱼等高等真核模式生物。文章较为全面地介绍了Cre/lox系统的基本概况及其在高等真核生物中的应用, 讨论了Cre/lox系统在研究中存在的主要问题和今后的发展方向, 为利用该系统在不同高等生物中进行基因操作提供有用的参考。

关键词: Cre/lox重组系统; 基因操作; 位点特异性重组; 基因打靶

Progress in Cre/lox site-specific recombination system in higher eukaryotes

LONG Ding-Pei¹, TAN Bing^{1,2}, ZHAO Ai-Chun¹, XU Long-Xia^{1,3}, XIANG Zhong-Huai¹

1. Institute of Sericulture and Systems Biology, Key Sericultural Laboratory of the Ministry of Agriculture, Southwest University, Chongqing 400716, China;
2. Molecular Virology and Viral Immunology Research Group, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;
3. Shanghai Institute of Biological Sciences, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai 200031, China

Abstract: Cre/lox system derived from P1 bacteriophage can quickly and effectively achieve gene insertion, deletion, replacement, and inversion by means of site-specific recombination. As one of the most important tools for gene targeting at present, Cre/lox system has been widely used in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* L., *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, and other higher eukaryotic organisms. This review roundly described the basic profile of Cre/lox system, and its application in higher eukaryotes. In addition, we also discussed the main problems and developmental trend of the Cre/lox system in this review, which can be a good reference for using Cre/lox system to realize the gene

收稿日期: 2011-06-03; 修回日期: 2011-09-07

基金项目: 重庆市自然科学基金计划重点项目(编号: 2011BA1005), 中央高校基本科研业务费专项(编号: XDJK2010B015)和中国博士后科学基金项目(编号: 20070420722 和 200801221)资助

作者简介: 龙定沛, 硕士研究生, 专业方向: 家蚕转基因及遗传工程研究。Tel: 023-68250793; E-mail: dplong@yeah.net

通讯作者: 赵爱春, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 遗传学。E-mail: zhaoaichun@hotmail.com

网络出版时间: 2012-1-5 10:17:25

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120105.1017.003.html>

manipulations of the different high eukaryotic organisms.

Keywords: Cre/lox recombination system; gene manipulation; site-specific recombination; gene targeting

随着多种生物基因组测序的完成, 生命科学的研究已逐步迈进后基因组时代(Post-genome era)。在这个以基因功能研究为主题的时代, 有效的基因功能研究手段无疑是研究人员关注的焦点。目前, 利用转基因技术通过不同重组方式介导外源DNA整合至宿主染色体上以实现基因敲除(Knock out)、基因敲入(Knock in)和外源蛋白过量表达(Overexpression)等研究目的, 已经成为基因功能研究最为常用和有效的方法之一^[1]。

遗传工程中的重组技术可分为转座重组、非同源重组、同源重组以及位点特异性重组。在高等生物中, 由转座子介导的转座重组尽管有较高的插入效率, 但因无法控制外源DNA的插入位点而不具有靶向性, 易受整合的位置效应影响, 导致该重组技术在基因表达和重要功能基因的突变、沉默等研究方面出现一些无法克服的缺点; 利用病毒等介导随机重组不但重组效率较低, 而且同样具有随机整合而不具有靶向性的缺点; 利用同源重组虽然能克服随机整合而不具有靶向性的缺点, 但单个基因或特定的DNA片段同源重组发生率极低, 高等真核生物相对原核生物的同源重组几率更低, 因此除了能够在小鼠等少数具有胚胎干细胞的动物中通过同源重组原理获得基因敲除动物之外, 目前直接在高等真核生物体内通过同源重组来插入或删除目的基因几乎没有可操作性。

20世纪80年代发展起来的一项基于位点特异性重组(Site-specific recombination)的基因打靶技术, 通过特异位点重组酶(Site-specific recombinases, SSRs)介导重组酶特异识别位点(Recombination target sites, RTs)间的重组, 可实现基因置换、倒置和组织特异性敲除等操作。由于位点特异性重组技术能够有效克服其他类型重组技术的随机整合而不具有靶向性、易受整合的位置效应影响以及重组效率低等缺点, 近年来该项技术逐渐在功能基因研究领域占据了主导地位^[2]。

已知的广泛存在于原核与真核生物中的位点特

异性重组系统多达百种, 根据重组酶介导重组时与DNA靶序列形成共价连接的氨基酸不同, 可将重组系统分为酪氨酸家族(Cre重组酶、FLP重组酶、XerC蛋白等)和丝氨酸家族(Φ C31重组酶、R4、Tn3重组酶等)^[3]。源自于噬菌体P1的Cre重组酶具有广泛的适用性^[4], 能够识别并催化多种拓扑结构的lox序列间的重组反应, 在拟南芥、棉花、水稻、小鼠、果蝇、斑马鱼等多种高等真核生物体内均表现出良好的催化活性。作为目前研究最为深入的位点特异性重组系统, Cre/lox系统逐渐在基因敲除与敲入、点突变、缺失突变、染色体结构改造及基因表达调控等多种基因工程操作中得到了广泛应用。本文概述了Cre/lox位点特异性重组系统在高等真核生物中的应用的研究现状, 并就Cre/lox系统存在的主要问题和今后的发展方向进行了讨论。

1 Cre/lox 位点特异性重组系统概述

1981年, Sternberg和Hamilton^[5]在P1噬菌体中发现了Cre/lox位点特异性重组系统。不同于 λ 、P2等其他温和型噬菌体, P1噬菌体侵染宿主之后, 其基因组DNA在通常情况下并不整合至宿主染色体, 而是以单拷贝可自主复制的环状质粒形式存在于宿主细胞中^[6]。Sternberg等^[5,7]发现P1噬菌体基因组末端的冗余序列包含多拷贝的loxP(locus of crossing over(x), P1)位点, 在P1噬菌体cre(causes recombination)基因编码的环化重组蛋白(Cyclization recombination protein, Cre)作用下, 两个loxP位点之间发生特异性重组, 引起P1噬菌体基因组的环化。

1.1 Cre/lox 系统的重组酶和重组位点

Cre重组酶是一种由343个氨基酸组成的多肽单体蛋白, 其分子量约为38 kDa^[8]。Cre重组酶的343个氨基酸折叠形成两个结构域^[9]: 较小的N-末端结构域(NTD, 由110个氨基酸残基组成)和较大的C-末端结构域(CTD, 由210个氨基酸残基组成)。NTD由5个 α -螺旋(α -helices: A-E)通过环(Loops)连接而

成。CTD由 2 个 β -折叠(β -sheet)和 9 个 α -螺旋(α -helices :F-N)组成, 它包含Cre重组酶的活性中心, 特别是具有切割活性的酪氨酸残基(Tyr324)。Cre重组酶的突变分析以及晶体结构研究显示, 其活性中心主要由一个“ Arg173-His289-Arg292 ”的三联体结构, 两个亲核型氨基酸残基Trp315、Try324, 以及Glu176、Lys201 所共同构成^[9]。当Cre分子结合*lox*位点时, 两个结构域形成类似字母“ C ”的“ 夹子 ”结构, 紧紧地从前方向“ 抓住 ”DNA分子, 使这种蛋白-DNA的作用变得十分紧密。在这个结构中, NTD与*lox*位点交叉区域(Crossover region)附近的大沟结合, CTD则结合在另一侧的大沟和小沟上^[10]。在与*lox*位点作用的氨基酸残基中, Arg259 可能起到了最为重要的作用^[11]。如果Arg259 发生突变, 不仅会降低Cre重组酶的催化活性, 而且会影响Cre重组酶对*lox*位点识别的特异性^[12]。

来源于P1 噬菌体的野生型*lox*位点(*lox*P位点)全长 34 bp, 包含两个 13 bp的反向重复序列(Inverted repeats)和一个 8 bp的非对称间隔区(Spacer)序列^[9, 13, 14](图 1)。13 bp的反向重复序列是Cre重组酶的识别和结合区域, 8 bp的间隔区是DNA链的断裂与重接等重组交换过程的发生区域, 间隔区序列的不对称性显示整个*lox*P位点具有方向性^[15, 16]。虽然反向重复序列部分碱基的修饰并不会对重组效率产生显著影响, 但该区域的碱基缺失会使重组产物形成异常的拓扑结构, 影响Cre重组酶与*lox*位点的结合^[17]。间

隔区序列的碱基突变会使体外重组反应的效率显著降低, 该区域的碱基缺失则将导致重组不能进行^[14, 16]。

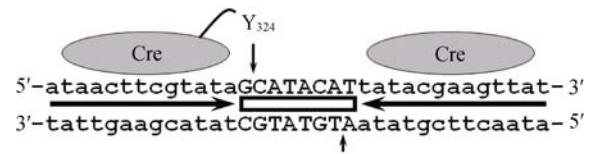


图 1 *lox*P位点的结构(根据文献^[9]、^[13]和^[14]内容整理绘制)

*lox*P 序列包含两个 13 bp 的反向重复序列(水平箭头, 小写字母), 它们共同构成 Cre 特异结合的位点; 两个反向重复序列被一个 8 bp 的非对称间隔区隔开(空方框, 大写字母), 间隔区即为重组发生的区域; 垂直箭头表示断裂发生的两个位置; 如图显示具有活性的 Cre 重组酶分子利用 Tyr324 切割 *lox*P 位点。

Cre/*lox*系统中的突变型*lox*位点可分为反向重复突变型*lox*位点(即*lox*位点两个 13 bp反向识别区域的碱基突变)和间隔区突变型*lox*位点(即*lox*位点 8 bp间隔区域的碱基突变)(表 1)。Cre重组酶可介导左臂突变型*lox*位点(LE mutant *lox* site)与右臂突变型*lox*位点(RE mutant *lox* site)之间的重组反应, 生成一个双臂突变型*lox*位点(Double mutant *lox* site)和一个野生型*lox*P位点^[18]。由于Cre重组酶很难识别新生成的双臂突变型*lox*位点, 因此利用反向重复突变位点可以介导外源基因片段较为稳定的插入。Thomson和Araki等^[19, 20]利用Cre重组酶介导相应的左臂突变型*lox*位点与右臂突变型*lox*位点间

表 1 部分突变型 *lox* 位点

	靶位点	左臂反向重复序列	间隔区域	右臂反向重复序列	参考文献
野生型 <i>lox</i> 位点	<i>lox</i> P	ATAACTTCGTATA	GCATACAT	TATACGAAGTTAT	[7]
	<i>lox</i> 71	<u>taccg</u> TTCGTATA	GCATACAT	TATACGAAGTTAT	[18]
左臂突变型 <i>lox</i> 位点	<i>lox</i> 75	<u>taccggg</u> CGTATA	GCATACAT	TATACGAAGTTAT	[18]
	<i>lox</i> 44	AatgCaTgcTATA	GCATACAT	TATACGAAGTTAT	[18]
	<i>lox</i> 66	ATAACTTCGTATA	GCATACAT	TATACGA <u>acggta</u>	[18]
右臂突变型 <i>lox</i> 位点	<i>lox</i> 76	ATAACTTCGTATA	GCATACAT	TATACG <u>cccggt</u> a	[18]
	<i>lox</i> 43	ATAACTTCGTATA	GCATACAT	TATAgGt <u>AccgAg</u>	[18]
	<i>lox</i> 72	<u>taccg</u> TTCGTATA	GCATACAT	TATACGA <u>acggta</u>	[18]
双臂突变型 <i>lox</i> 位点	<i>lox</i> 78	<u>taccggg</u> CGTATA	GCATACAT	TATACG <u>cccggt</u> a	[18]
	<i>lox</i> 65	AatgCaTgcTATA	GCATACAT	TATAgGt <u>AccgAg</u>	[18]
	<i>lox</i> 511	ATAACTTCGTATA	G <u>t</u> ATACAT	TATACGAAGTTAT	[16]
间隔区突变型 <i>lox</i> 位点	<i>lox</i> 512	ATAACTTCGTATA	GCA <u>c</u> ACAT	TATACGAAGTTAT	[16]
	<i>lox</i> 514	ATAACTTCGTATA	GC <u>g</u> TACAT	TATACGAAGTTAT	[16]

的重组反应比野生型 *loxP* 位点间的重组反应效率提高了 1 000 倍。Cre 重组酶能够介导相同的间隔区突变型 *lox* 位点(如 *lox511* 和 *lox511*, *lox514* 和 *lox514*)之间的重组反应, 而间隔区突变型 *lox* 位点与野生型 *loxP* 位点(如 *lox511* 和 *loxP*, *lox514* 和 *loxP*)或者两个不同的间隔区突变型 *lox* 位点(如 *lox511* 和 *lox512*, *lox512* 和 *lox514*)之间由于具有异种特异性, 其重组效率则非常低^[16]。

1.2 Cre/*lox* 系统的重组机制

Mack 等^[21]利用化学计量法研究表明, 每个 *lox* 位点具有两个非同性的 Cre 重组酶结合域(Binding domain), 一个结合域只能与一个 Cre 分子结合, 因此一个完整的 *lox* 位点最多只能结合两个 Cre 分子。

目前较为公认的 Cre 重组酶介导 *lox* 位点间的重组反应作用机制的模型假说为 Holliday 模型^[9, 10, 22-24], 由于多篇文献对此模型假说已有较为详尽的描述, 故本文在此不再赘述。值得注意的是, Cre 重组酶介导两个野生型 *loxP* 位点发生重组反应时, 每个 *loxP* 位点的最外端 15 bp 序列(包括一个 13 bp 的反向重复序列和邻近的 2 bp 的间隔区序列)分别结合一个 Cre 分子。结合之后的两个 Cre 分子的 NTD 与 *loxP* 位点形成的复合物基本相同, 但 CTD 与 *loxP* 位点形成的复合物却具有明显差异, 呈不对称排列。两个 C-末端复合物所表现的不对称性并非直接由间隔序列的不对称性造成^[9]。这种差异还体现在两个 Cre 分子发挥活性的时间上: 当其中一个 Cre 分子发挥切割活性时, 另一个并不表现活性(图 1)。利用 Cre/*lox* 系统介导的

重组反应仅依赖于 Cre 重组酶及其识别位点 *lox*, 不需要其他辅助因子的参与, 同时也不需要消耗能量^[5, 15]。

Cre 重组酶介导两个 *loxP* 位点间的重组是一个动态、可逆的过程, 重组以反式(In *trans*)作用进行^[25]。如图 2 所示, 参与重组的两个 *loxP* 位点的不同定位形式(同向或反向)决定了 DNA 链的重组方式(切除/插入、倒位或相互易位)^[14, 22]。

2 Cre/*lox* 系统在高等真核生物中的应用

自 Sauer 等^[26]首次利用 Cre/*lox* 系统在小鼠细胞中实现两个 *loxP* 位点之间 DNA 片段的删除以来, Cre/*lox* 系统已经被广泛应用于小鼠、果蝇、斑马鱼、拟南芥、烟草、水稻等多种高等真核生物的遗传改造。利用 Cre/*lox* 系统在高等真核生物中可实现外源基因在宿主染色体的定点整合或敲除、选择标记基因的删除、条件性基因打靶等操作, 有效地推动了功能基因时代的基因组学、发育生物学和疾病治疗等诸多领域研究的快速发展。

2.1 Cre/*lox* 系统在哺乳动物中的应用

Cre/*lox* 系统是在哺乳动物基因工程研究领域应用最为成熟与广泛的位点特异性重组系统。特别是利用 Cre/*lox* 系统在哺乳动物细胞和转基因小鼠中建立的条件性基因打靶技术, 通过对基因靶位点时空

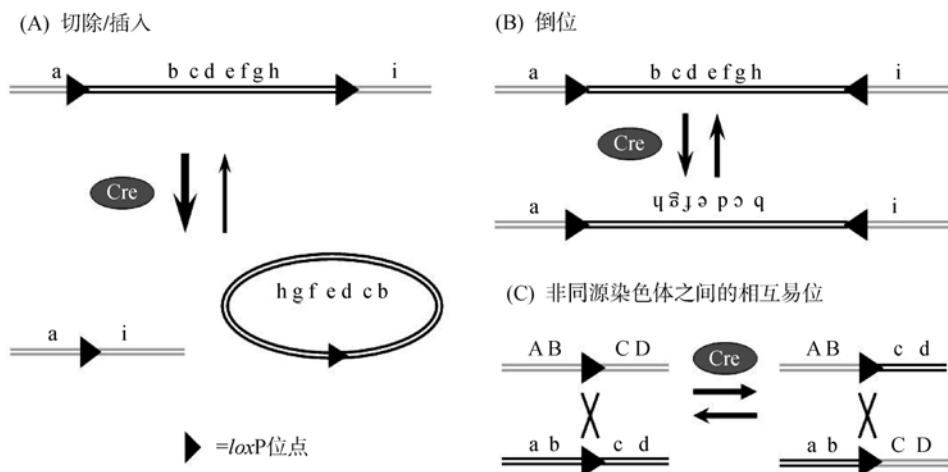


图 2 Cre 重组酶介导的重组反应

黑色和灰色的线条表示染色体 DNA 链, DNA 链的方向用字母 a~i 或者 A~D 表示; 黑色箭头显示重组反应的进行具有可逆性。

上的精确调控, 可实现在特定细胞和组织的特定发育阶段敲除目的基因以研究其功能, 有效地避免了完全的基因敲除导致的胚胎致死^[27]。

利用条件性基因打靶技术实现基因功能研究的原理和方法具有普遍性: 将待研究的哺乳动物细胞或小鼠的目的基因或目的基因的调控序列用 lox 位点锚定(称为“floxed”), 建立转基因系; 然后在转基因细胞或转基因小鼠的特定发育时期或特定类型组织器官中引入 Cre 重组酶, Cre 重组酶介导被 lox 位点锚定序列的切除、替换或倒位, 从而实现目的基因的敲除、灭活或激活操作。哺乳动物细胞或小鼠基因组中的 lox 位点可通过同源重组、转座元件和病毒载体介导等方法引入; Cre 重组酶则可采用添加纯化的 Cre 蛋白、编码 Cre 蛋白的 mRNA、cre 基因的表达载体、与表达 Cre 重组酶的转基因小鼠杂交等方式引入。1992 年, Lakso 等^[28]建立了晶体蛋白启动子控制 SV40 大 T 抗原基因(Large tumor-antigen gene)表达的转基因小鼠系, 基因序列与启动子之间含有一段被 loxP 位点锚定的终止序列。Lakso 将该转基因小鼠与表达 Cre 重组酶的转基因小鼠交配, 最终获得了晶状体发生肿瘤的转基因小鼠模型。Gu 等^[29]将构建的 pol β 条件基因打靶小鼠与由 lck 启动子调控 cre 基因表达的转基因小鼠杂交, 使 Cre 重组酶介导的 pol β 基因第一外显子的切除仅发生于 T 细胞。Bajenaru 等^[30]用人神经胶质酸性蛋白(GFAP)启动子调控 cre 基因的表达, 使 Cre 重组酶介导的重组反应特异性地发生于成年小鼠的星形胶质细胞。

近年来, 国内科研人员已自主研制了包括软骨细胞特异性^[31]、成骨细胞特异性^[32]、角质层细胞特异性^[33]、胰腺组织特异性^[34]和肝组织特异性^[35]在内的 10 余种组织特异性 Cre 重组酶转基因小鼠, 为国内的转基因小鼠条件基因打靶研究的开展奠定了良好基础。2006 年, Zhang 等^[36]利用 Cre/lox 系统建立了睾丸管周收缩细胞(Peritubular myoid cells)雄性激素受体(Androgen receptor, AR)基因组织特异性敲除小鼠模型(PM-AR^{-y})。Zhang 等通过表型分析证实 PM-AR^{-y}小鼠与 WT AR(AR^{+y})小鼠相比除了血清睾丸素浓度不同以外并无明显区别, 对 PM-AR^{-y}小鼠的进一步研究证明 AR 对于维持睾丸支持细胞(Sertoli)功能和管周收缩细胞收缩性具有重要作用。

2011 年, Li 等^[37]构建了世界首例脑血管内皮细胞特异性 Cre 重组酶基因敲除小鼠, 通过阻断脑血管内皮细胞对重要信号通路的反应性, 以研究该信号通路在脑血管组织发育和稳态维持中的生理功能及其分子机制, 进而揭示了胚胎发育后期脑血管完整性维持的新机制。

在不同发育阶段小鼠的特定类型组织或器官中, 利用可诱导的组织特异型启动子调控 Cre 重组酶的表达, 是最常用的通过 Cre/lox 系统实现对靶基因删除或修饰的时空二维性调控的方法。1995 年, Kühn 等^[38]建立了首个含有 Cre 重组酶诱导表达系统的 Mx1-Cre 转基因小鼠系, 利用干扰素(IFN)诱导 Mx1 启动子启动 Cre 重组酶的表达, 特异性地在转基因小鼠的肝脏和免疫相关组织器官中实现了目的基因的剔除。目前, 基于 Cre/lox 系统的条件性基因打靶技术对哺乳动物功能基因研究的热点主要集中在两个方面^[39]: (1) 将四环素诱导调控系统(Tetracycline-dependent regulatory system, TetR)与 Cre/lox 系统相结合应用于靶基因的时空二维性调控; (2) 将 Cre 重组酶与某种受体的配体结合域(Ligand-binding domain, LBD)融合, 形成配体依赖型重组酶复合物(如 CreER^[40])来实现对 Cre 重组酶表达的调控。Guo 等^[41]将 Tet-on 基因诱导表达系统与肝细胞特异型启动子结合, 利用强力霉素(Doxycycline, Dox)在小鼠肝脏中激活肝细胞特异型启动子, 实现了 Cre 重组酶在肝细胞中的特异性表达。Ronzaud 等^[42]建立了利用小鼠的水通道蛋白 2(AQP2)基因元件来调控 CreER^{T2} 融合蛋白表达的转基因小鼠(AQP2CreER^{T2}), 用于探究盐皮质激素受体(Mineralocorticoid receptor, MR)在肾上皮钠通道蛋白(EnaC)介导钠的重吸收过程中发挥的作用, 其中 AQP2 基因调控元件有效地限制了 Cre 重组酶在肾主细胞中表达所带来的影响。Ronzaud 利用三苯氧胺(Tamoxifen)在发育早期的 MR^{AQP2CreERT2} 小鼠体内诱导 Cre 重组酶表达, 实现对 MR 基因的删除。随后 Ronzaud 在低盐食物喂养的成年 MR 基因删除小鼠的集合管和肾小管中观察到了钠消耗, 从而证实小鼠肾脏中钠的消耗与早期发生的 MR 基因删除有关。

2.2 Cre/lox 系统在昆虫中的应用

Cre重组酶比来源于酵母的FLP重组酶具有更好的热稳定性^[43]。Cre重组酶在 46℃时仍具有较高活性, FLP重组酶在高于 39℃后就很难再显示出催化活性。但是在昆虫研究领域, FLP/FRT系统却比 Cre/lox系统的应用更为成熟与广泛。一个很重要的原因在于两种酶不同的最适反应温度影响了其在昆虫体内的酶活性^[43]。昆虫的最适生长温度多为 20℃~30℃, 而Cre和FLP重组酶的最适反应温度分别为 37℃和 30℃。因此与FLP/FRT系统相比, 相对较低的重组效率极大地限制了Cre/lox系统在昆虫研究领域的应用。目前仅有Cre/lox系统应用于果蝇(*Drosophila*)和埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)的相关报道。

1996年, Siegal和Hartl^[44]首次将Cre/lox应用于昆虫研究领域, 利用果蝇内源性热激蛋白启动子 *Hsp70* 启动Cre重组酶基因表达, 在果蝇染色体组实现了位于两个loxP位点之间的*white*报告基因的删除。Heidmann和Lehner^[45]建立了基于*UAS/GAL4*系统调控的组织特异性Cre重组酶转基因果蝇系(*UAS-cre*)。他们在研究过程中发现Cre重组酶的持续表达会在转基因果蝇细胞增生过程中产生毒性。为解决这一问题, Heidmann和Lehner建立了人雌激素受体依赖性Cre重组酶复合物转基因果蝇系(*UASP-cre-EBD*), 利用人雌激素来诱导调控Cre重组酶的表达, 有效地避免了Cre重组酶累积对果蝇细胞产生的毒害作用。

Cre/lox和FLP/FRT系统曾在果蝇中被联合应用于研究两个基因在基因组相同位置时的功能^[46]。Oberstein等^[47]利用Cre-RMCE(Cre重组酶介导的盒式交换)技术实现了果蝇染色体特定位点基因序列与外源供体质粒携带的基因序列之间的定点替换(图3)。Oberstein设计的供体质粒(Donor vector)含有一段由两个不同种类的lox位点组成的盒式区域(Cassette)。这两个不同种类的lox位点之间包含一个果蝇*white*基因表达框。将一个果蝇*yellow*基因表达框与供体质粒相同的lox位点锚定构成用于替换的盒式结构, 通过果蝇转基因技术, 利用P转座因子将构建的盒式结构插入到果蝇染色体特定位点建立转基因靶品系。在Cre辅助质粒(Cre helper)产生的Cre重组酶的介导下, 供体质粒与靶品系相同类型的两

个lox位点之间发生重组, 从而实现*white*基因与位于靶序列两个lox位点之间的*yellow*基因的替换。Oberstein利用5种不同的具有异种特异性的lox位点对(分别为loxP-lox511、loxP-loxM2、loxP-lox2272、lox66/71-loxM2和lox66/71-lox2272位点对)进行了盒式交换实验, 结果证实这5种不同的lox位点对均能用于实现外源序列与靶序列之间的定点替换, 重组效率为5%~9%。Oberstein基于Cre/lox系统不同种类突变位点的异种特异性建立的RMCE技术, 可有效消除插入位置效应对基因表达的影响, 为果蝇的不同蛋白表达研究、基因功能研究等提供了一个良好的技术平台。

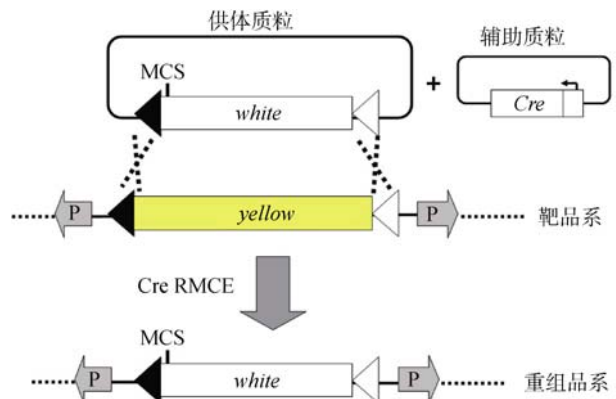


图3 Cre重组酶介导的盒式交换(Cre-RMCE)(根据文献^[47]内容整理绘制)

供体质粒含有一个由同向平行的具有异种特异性的野生型lox位点(空心箭头)和突变型lox位点(实心箭头)组成的盒式区域; Cre重组酶识别位点之间包含一个*white*基因表达框和一个用于插入外源片段的多克隆位点(MCS); 靶品系是利用P因子介导一个与供体盒式区域相似的盒式结构插入果蝇染色体所建立的转基因品系, 盒式结构由一个与供体质粒相同的lox位点锚定的*yellow*基因表达框构成; 辅助质粒表达的Cre重组酶介导相同种类的lox位点对之间发生重组反应, 从而实现外源供体质粒上的*white*基因与靶序列*yellow*基因间的精确替换; 由于野生型lox位点和突变型lox位点具有异种特异性, 盒式交换被认为是不可逆的反应。

2003年, Jasinskiene等^[48]将Cre/lox系统应用于埃及伊蚊染色体标记基因的删除, 利用Cre重组酶在33.3%的转基因伊蚊系染色体实现了位于两个loxP位点间标记基因的删除, 在某一特定转基因系的子代个体中, 标记基因的删除效率高达99.4%。Nimmo等^[49]比较了Cre/lox系统和ΦC31-Int系统在埃及伊蚊染色体实现外源基因定点插入的效率, 利用piggyBac转座子分别建立了含有lox71位点和attP位

点的埃及伊蚊转基因系,通过显微注射将供体质粒 pBattB[3×P3-DsRed2nls]lox66 导入转基因伊蚊G₀代受精卵。结果显示在Cre重组酶存在的条件下,并没有观察到发红色眼荧光的G₁代阳性伊蚊重组子个体,而ΦC31 重组酶介导供体质粒在G₁代阳性伊蚊染色体中的平均插入效率达到了23%。

2.3 Cre/lox 系统在植物中的应用

近年来,Cre/lox系统在植物中的应用热点主要集中于以下3个方面^[50]:(1)转基因定点整合及控制转基因整合的拷贝数。在植物基因组的某个确定位置导入单个lox位点作为外源基因定点插入和表达的靶位点,利用Cre重组酶介导外源基因在靶位点的精确整合,有效地消除了位置效应对外源基因表达水平的影响。(2)删除选择标记基因。用两个同向排列的lox位点锚定选择标记基因,通过有性杂交或二次转化的方法引入Cre重组酶介导选择标记基因的删除,为解决转基因植物的标记基因安全性问题提供了有效的途径。(3)创建人工雄性不育系及恢复系。在转基因植物的不育基因上游阻遏片段或者不育基因两侧插入两个同向的lox位点,利用Cre重组酶介导不育基因或者不育基因阻遏片段的删除,通过该方法建立的人工可控雄性不育系或恢复系转基因植物,有效克服了常规育种获得的雄性不育系的育性不稳定、不育性容易丢失及难以鉴定植物表型等缺点。

自从Dale和Ow^[51]于1990年首次将Cre/lox系统应用于烟草细胞原生质体实现位点特异性重组反应以来,Cre重组酶已经被广泛运用于包括拟南芥、烟草、水稻、番茄、大豆、马铃薯等多种转基因植物中进行外源基因的定点整合与选择标记基因的删除研究。

1995年,Albert等^[18]利用Cre/lox系统率先在烟草的原生质体中实现了外源基因的定点整合。Vergunst等^[52]在拟南芥中介导Cre重组酶表达,将带有lox位点的T-DNA定点插入到预先设定的拟南芥基因组靶位点。重组反应之后,T-DNA携带的新霉素磷酸转移酶(Neomycin phosphotransferase)基因被激活,同时通过阻断cre基因表达的方式来降低可逆反应的发生,获得的插入重组效率为89%。除了通过失活Cre重组酶来抑制可逆反应的进行,利用突变型

lox位点提高外源序列在植物基因组中的定点插入或替换效率的方案也已经被广泛采用。Juan等^[53]在转基因玉米中利用Cre重组酶介导lox71和lox66位点之间的重组反应,实现了外源基因在玉米基因组特定位点稳定的单拷贝插入。Jolanda等^[54]利用反向重复突变型lox位点实现的外源载体片段和植物乳杆菌染色体中目标基因的替换效率高达99%。Louwerse等^[55]利用间隔区突变型lox5171位点与野生型loxP位点,实现了根癌农杆菌T-DNA携带的外源基因与拟南芥基因组目标基因之间稳定的盒式交换,重组替换效率为44%。

利用可诱导的组织特异型启动子诱导Cre重组酶表达,以实现选择标记基因删除的时空二维性调控,逐渐成为近年来转基因植物研究的热点。Zhang等^[56]通过化学诱导法,利用β雌二醇(β-estradiol)诱导Cre重组酶表达,介导位于转基因番茄基因组两个loxP位点之间的选择标记基因和cre基因的删除,同时激活苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)类毒素基因cryIac表达,获得的T₁代高效表达类毒素的转基因番茄植株中无选择标记的转基因植株比率为15%。Qiu等^[57]通过农杆菌转化法和化学诱导法,利用Cre/lox系统获得了无选择标记的组织特异性表达Bt类毒素基因的转基因水稻。Ma等^[58]利用水杨酸诱导启动子启动Cre重组酶表达,对转基因番茄中选择标记基因的删除效率为41%。Khatti等^[59]以GUS基因作为报告基因,通过有性杂交的方式引入cre基因,并利用大豆热诱导型启动子Hsp17.5E诱导Cre重组酶的表达,删除了位于转基因水稻染色体中两个loxP位点之间作为选择标记的新霉素磷酸转移酶II(Neomycin phosphotransferase II, nptII)基因。除了利用诱导型启动子启动重组酶表达,Cre/lox系统还曾与FLP/FRT系统联合运用于删除转基因植物的选择标记基因。Djukanovic等^[60]将编码Cre和FLP重组酶基因的CDS序列融合表达,得到了同时具有Cre和FLP重组酶活性的新型融合蛋白Cre::FLP。实验结果显示,Cre::FLP蛋白介导转基因玉米基因组两个同向loxP位点或FRT位点间黄色荧光蛋白报告基因(YFP)的删除效率均达到了40%。

1990年,Mariani等^[61]率先利用基因工程技术获得了烟草与油菜的雄性不育植株,此后植物基因工程雄性不育系的创建和利用逐渐成为世界范围内的

研究热点。近年来,国内的科研工作者将Cre/lox系统运用于植物基因工程雄性不育研究领域,利用Cre/lox系统调控细胞毒素基因**barnase**在植物雄性器官发育特定时期的组织特异性表达,从而达到控制植物育性的目的^[62]。2009年,宋洪元等^[63]将TA29驱动下的反义豌豆卷须肌动蛋白基因置于两个同向lox位点之间并与**barnase**基因连锁,转化烟草Wisconsin 38后获得抗除草剂Basta的转基因植株。将cre基因导入烟草Wisconsin 38建立雄性不育工程恢复系。反义Actin转基因植株与cre转基因植株杂交获得F₁代,通过Cre重组酶将F₁代中的反义肌动蛋白基因表达盒删除以实现育性的恢复。同年,宋洪元等^[64]和Liu等^[65]借助Cre/lox系统通过相类似的方法,分别在转基因番茄和辣椒中建立了雄性不育恢复系。

2.4 Cre/lox 系统在其他高等真核生物中的应用

除了被应用于哺乳动物、昆虫和植物,Cre/lox系统在诸如斑马鱼(*Danio rerio*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)等其他种类的高等真核生物也有着较为广泛与深入的研究。

2004年,Dong和Stuart^[66]率先证实Cre重组酶在斑马鱼体内具有介导位点特异性重组的活性。Pan等^[67]在斑马鱼体内利用Cre重组酶实现了对肌肉组织特异表达的绿色荧光蛋白报告基因(*GFP*)的删除。Yoshikawa等^[68]则借助于Cre/lox系统实现了在爪蟾延伸因子*EF1a*(*Xenopus* elongation factor 1 alpha)基因启动子调控下的斑马鱼体色由绿色(*GFP*)到红色(*RFP*)的变化。Liu等^[69]利用Cre重组酶介导lox71和lox66位点之间的重组反应,实现了外源载体在转基因斑马鱼基因组特定位点稳定的单拷贝插入。

近年来,Cre/lox系统逐渐被广泛应用于斑马鱼发育生物学和遗传学研究领域,有效地推动了斑马鱼作为模式生物在功能基因研究领域的发展。Langenau等^[70]通过显微注射将编码Cre重组酶的mRNA导入斑马鱼胚胎,以斑马鱼为疾病模型研究利用Cre/lox系统介导的条件基因打靶调控T细胞急性白血病的发生率为13%。随后,Feng等^[71]改进了Langenau的方法,建立了斑马鱼内源性热诱导型启动子*Hsp70*启动Cre重组酶表达的转基因斑马鱼,通过杂交的方式在子代转基因斑马体内引入Cre重组

酶的表达,诱导疾病的发生率达81%。Jopling等^[72]将Cre/lox系统应用于斑马鱼心脏再生研究领域,利用建立的三苯氧胺可诱导的Cre/lox系统来实现对斑马鱼再生心肌细胞的遗传标记,进而发现这些能再进入细胞周期的心肌细胞并不是来自心脏的干细胞,而是由原本的心肌细胞通过逆分化与复制而来。

为验证Cre和FLP重组酶在爪蟾体内的重组活性,Werdien等^[73]通过显微注射将编码Cre(或FLP)重组酶的mRNA导入爪蟾胚胎,表达之后的Cre(或FLP)重组酶删除了两个同向loxP(或*FRT*)位点之间的*GFP*报告基因序列,同时激活下游的*lacZ*基因表达。Ryffel等^[74]证实Cre重组酶在爪蟾体细胞中的重组效率要高于FLP重组酶介导的重组,而这两种重组酶在爪蟾体细胞中的表达均不会对爪蟾的发育产生影响。Werdien等^[75]建立了首个组织特异性表达Cre重组酶的转基因爪蟾。Werdien通过两性杂交的方式,在含有相应报告基因(*EYFP*, *DsRed2* 或*lacZ*)的转基因爪蟾F₁代中引入cre基因,利用心脏肌动蛋白启动子启动Cre重组酶表达,在F₁代爪蟾的肌细胞中特异性地实现了对相应报告基因的敲除。2009年,Roose等^[76]借助Cre/lox系统建立了首个可用于爪蟾器官发生学研究的二元可诱导性基因表达系统。Roose利用爪蟾内源性热激蛋白启动子*Hsp70*启动Cre重组酶在发育至原肠胚时期的爪蟾胚胎表达,Cre重组酶介导转基因爪蟾基因组中两个同向loxP位点之间的*EGFP*基因删除,激活下游的突变型转录因子HNF1 β 在原肠胚阶段的过量表达。表型分析显示,突变型HNF1 β 的过量表达导致爪蟾的前肾、肠、胃和尾巴等器官的发育畸形,并出现由于肾功能不全而诱发的大量水肿现象。

3 Cre/lox 系统存在的问题及展望

3.1 Cre 重组酶对靶基因重组效率的差异性

Cre/lox系统在许多高等真核生物中应用的有效性已经通过对报告基因的研究得以证实。但是由于重组的发生依赖于Cre重组酶对lox位点的识别,而识别位点所在的染色体构型、DNA甲基化程度和重组酶的转录活性等都将影响重组效率,因此研究人员并不能根据Cre/lox系统对某一特定报告基因的重组结果来准确地预测该系统对其他

基因的作用效果^[77]。Cre重组酶在不同物种或者同一物种的不同类型细胞或组织中介导lox位点发生重组的效率差异较大,目前对导致这种现象产生的内在机理尚不清楚,有文献推测这可能是由于Cre重组酶对处于不同类型细胞和不同发育时期的染色质中lox位点的识别能力不同所致^[39,78]。

3.2 Cre/lox 系统的毒性

有研究表明,在酵母、小鼠和果蝇天然基因组中均存在一些与野生型loxP位点具有同源性的序列,这些序列被称为隐蔽lox位点(Cryptic lox)^[79]或伪lox位点(Pseudo-lox)^[80]。Cre重组酶亦可识别并介导伪lox位点发生重组,进而诱发宿主基因组DNA链断裂、染色体重排等DNA损伤。Cre重组酶在细胞核中的高表达可能会对细胞产生毒害作用^[81],在小鼠脑和睾丸中的高表达则可导致脑组织结构的损害^[82]和雄性小鼠不育^[83]。利用可诱导的组织特异型启动子来实现对Cre重组酶表达的调控,能够较好地解决Cre重组酶表达的时段问题,从而减少Cre重组酶对细胞的毒害作用。值得注意的是,某些可诱导的组织特异性Cre重组酶的诱导物也可能具有细胞毒性。早期曾有报道指出,三苯氧胺(Tamoxifen)作为雌激素受体配体依赖型Cre重组酶复合物(CreER^{T2})的诱导物,在成年小鼠体内的短期作用会对小鼠产生轻微的急性毒性^[84]。

3.3 Cre/lox 系统广泛的实践应用前景

尽管存在一些缺点与限制,Cre/lox系统仍然是一个相对完美的基因操作工具。Cre/lox系统的出现推动了位点特异性重组技术在基因工程研究领域的发展,使基于位点特异性重组的基因打靶技术在理论研究与实践应用方面都日趋成熟。利用Cre/lox系统能够实现目的基因的定点插入、敲除、BAC克隆及BAC骨架的去除、λ载体的自动亚克隆、染色体易位、重组酶介导的盒式交换、基因捕获、构建特异基因差异的生物模型等多种基因工程操作。

在转基因动物研究领域,利用Cre/lox系统克服外源基因随机整合所带来的不确定性,建立不同的基因缺陷型小鼠作为人类疾病动物模型,将对人类疾病的临床及病理研究提供极大的便利。利用Cre/lox系统建立起含有特定接纳位点(lox位点)的转

基因动物系,通过Cre重组酶介导待研究的外源基因在接纳位点的定点整合,从而有效地克服位置效应对基因功能研究的影响。另外,通过Cre/lox系统克服位置效应的影响,也将在构建稳定、高效的转基因表达系,推动诸如家蚕^[85]等昆虫作为蛋白质生物反应器的发展研究等方面发挥重要作用。利用Cre/lox系统来介导转基因植物中筛选标记基因的删除,以达到提高转基因作物的安全性的目的。利用基于Cre/lox系统在内的多个位点特异性重组系统发展起来的基因叠加(Gene stacking)技术^[86],能有效地缩短农作物新品种研发和市场化年限。此外,利用Cre/lox系统建立可诱导的组织特异性Cre重组酶表达系统来实现对基因靶位点时空上的精确调控,为发育生物学、遗传学、免疫学及医学等学科领域提供了全新的研究手段。

随着家蚕基因组框架图、精细图和40个突变品种重测序的完成^[87-89],标志着家蚕基因组研究已逐步进入了功能基因组时代。有效的功能基因组研究平台的建立对推动家蚕功能基因组研究和模式生物化的发展具有重要意义。位点特异性重组技术作为一项十分有效的、高靶向性的基因功能研究和遗传改造的方法体系,应用于家蚕基因功能研究中的相关研究报道却极为少见。目前仅有Tomita等^[90]在家蚕细胞和胚胎中运用FLP/FRT系统实现了质粒之间的重组,Nakayama等^[91]利用ΦC31-Int系统在培养的家蚕BmN4细胞系中实现了染色体上和染色体外识别位点间的重组,而在家蚕个体基因组水平上的位点特异性重组技术体系尚未见报道。本研究小组在综合应用其他高等真核生物位点特异性重组技术体系研究成果的基础上,目前正在开展Cre/lox、FLP/FRT和ΦC31-Int这3种位点特异性重组系统在家蚕个体基因水平的基因定点敲入和敲除的研究。到目前为止我们已经成功建立了多个在基因组不同位置含有重组酶特异识别位点(包括loxP、FRT、attB或attP位点)的转基因家蚕系(即靶品系),现正在开展对靶品系的定点敲入和敲除的打靶研究。

4 结 语

Cre重组酶催化的插入、删除与倒位过程看似简单,却在基因工程操作中发挥着极大作用,为后基因组时代的基因功能研究提供了极大便利。随着技

术的进步与发展, Cre/lox 位点特异性重组系统必将在定向改造生物遗传信息、创造具有特异遗传差异的生物品种、生产具有商业价值的转基因动物和植物、揭示疾病发生机理和探寻疾病预防与诊疗方法等多方面的生物工程应用领域发挥重要的作用。

参考文献(References):

- [1] 滕艳, 杨晓. 基因打靶技术: 开启遗传学新纪元. *遗传*, 2007, 29(11): 1291–1298. [DOI](#)
- [2] 谷欣, 黎燕. 位点特异性重组技术研究进展. *生物技术通讯*, 2005, 16(4): 417–419. [DOI](#)
- [3] Landy A. Coming or going it's another pretty picture for the λ -Int family album. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(13): 7122–7124. [DOI](#)
- [4] Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 2000, 26(2): 99–109. [DOI](#)
- [5] Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, 1981, 150(4): 467–486. [DOI](#)
- [6] Abremski K, Hoess R, Sternberg N. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell*, 1983, 32(4): 1301–1311. [DOI](#)
- [7] Sternberg N. Demonstration and analysis of P1 site-specific recombination using λ -P1 hybrid phages constructed *in vitro*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1979, 43(Pt 2): 1143–1146. [DOI](#)
- [8] Sternberg N, Sauer B, Hoess R, Abremski K. 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. [DOI](#)
- [9] Guo F, Gopaul DN, van Duyne GD. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*, 1997, 389(6646): 40–46. [DOI](#)
- [10] van Duyne GD. A structural view of Cre-loxP site-specific recombination. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2001, 30: 87–104. [DOI](#)
- [11] Kim ST, Kim GW, Lee YS, Park JS. Characterization of Cre-loxP interaction in the major groove: hint for structural distortion of mutant Cre and possible strategy for HIV-1 therapy. *J Cell Biochem*, 2001, 80(3): 321–327. [DOI](#)
- [12] Hartung M, Kisters-Woike B. Cre mutants with altered DNA binding properties. *J Biol Chem*, 1998, 273(36): 22884–22891. [DOI](#)
- [13] Hoess RH, Ziese M, Sternberg N. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(11): 3398–3402. [DOI](#)
- [14] Hoess RH, Abremski K. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(4): 1026–1029. [DOI](#)
- [15] Abremski K, Hoess R, Sternberg N. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell*, 1983, 32(4): 1301–1311. [DOI](#)
- [16] Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K. The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucl Acids Res*, 1986, 14(5): 2287–2300. [DOI](#)
- [17] Abremski K, Hoess R. Phage P1 Cre-loxP site-specific recombination: Effects of DNA supercoiling on catenation and knotting of recombinant products. *J Mol Biol*, 1985, 184(2): 211–220. [DOI](#)
- [18] Albert H, Dale EC, Lee E, Ow DW. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *Plant J*, 1995, 7(4): 649–659. [DOI](#)
- [19] Thomson JG, Rucker EB III, Piedrahita JA. Mutational analysis of LoxP sites for efficient Cre-mediated insertion into genomic DNA. *Genesis*, 2003, 36(3): 162–167. [DOI](#)
- [20] Araki K, Okada Y, Araki M, Yamamura K. Comparative analysis of right element mutant lox sites on recombination efficiency in embryonic stem cells. *BMC Biotechnol*, 2010, 10: 29. [DOI](#)
- [21] Mack A, Sauer B, Abremski K, Hoess R. Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site. *Nucl Acids Res*, 1992, 20(17): 4451–4455. [DOI](#)
- [22] Hoess RH, Abremski K. Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *J Mol Biol*, 1985, 181(3): 351–362. [DOI](#)
- [23] Martin SS, Pulido E, Chu VC, Lechner TS, Baldwin EP. The order of strand exchanges in Cre-LoxP recombination and its basis suggested by the crystal structure of a Cre-LoxP Holliday junction complex. *J Mol Biol*, 2002, 319(1): 107–127. [DOI](#)
- [24] Gopaul DN, Guo F, Van Duyne GD. Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination. *EMBO J*, 1998, 17(14): 4175–4187. [DOI](#)
- [25] Shaikh AC, Sadowski PD. The Cre recombinase cleaves the lox site in *trans*. *J Biol Chem*, 1997, 272(9): 5695–5702. [DOI](#)
- [26] Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(14): 5166–5170. [DOI](#)
- [27] 李湘平, 徐慰倬, 李宁. 动物基因敲除研究的现状与展

- 望. 遗传, 2003, 25(1): 81–88. DOI
- [28] Lakso M, Sauer B, Mosinger B Jr, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(14): 6232–6236. DOI
- [29] Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossman H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 1994, 256(5168): 103–106. DOI
- [30] Bajenaru ML, Zhu Y, Hedrick NM, Donahoe J, Parada LF, Gutmann DH. Astrocyte-specific inactivation of the neurofibromatosis 1 gene (*NF1*) is insufficient for astrocytoma formation. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(14): 5100–5113. DOI
- [31] 侯宁, 王剑, 李文龙, 张继帅, 杨晓. 心脏和软骨细胞特异性表达Cre重组酶转基因小鼠的基因型鉴定. 生物技术通讯, 2005, 16(3): 262–264. DOI
- [32] 程莹, 翁士军, 谭晓红, 侯宁, 王健, 林福玉, 黄培堂, 杨晓. 成骨细胞特异性表达Cre重组酶转基因小鼠的建立. 遗传, 2007, 29(10): 1237–1242. DOI
- [33] 毛春明, 杨晓, 程莹, 吕娅歆, 周江, 黄翠芬. 角质细胞特异性表达Cre重组酶转基因小鼠的建立. 遗传学报, 2003, 30(5): 407–413. DOI
- [34] Zhou J, Cheng X, Lu YX, Huang CF, Yang X. A transgenic mouse that targets the expression of Cre recombinase in pancreatic tissue. *Chin J Biotechnol*, 2002, 18(3): 286–290. DOI
- [35] 王友亮, 程莹, 崔芳, 程竞, 吕娅歆, 杨晓. 肝细胞特异性表达Cre重组酶转基因小鼠的建立. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(3): 163–166. DOI
- [36] Zhang CX, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, Wang RS, Chang YJ, Mendis-Handagama C, Hu LQ, Lardy H, Chang C. Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(47): 17718–17723. DOI
- [37] Li FF, Lan Y, Wang YL, Wang J, Yang G, Meng FW, Han H, Meng AM, Wang YP, Yang X. Endothelial Smad4 maintains cerebrovascular integrity by activating N-cadherin through cooperation with notch. *Dev Cell*, 2011, 20(3): 291–302. DOI
- [38] Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science*, 1995, 269(5229): 1427–1429. DOI
- [39] Birling MC, Gofflot F, Warot X. Site-specific recombinases for manipulation of the mouse genome. *Methods Mol Biol*, 2009, 561(Pt 2): 245–263. DOI
- [40] Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(15): 6991–6995. DOI
- [41] Guo ZM, Xu K, Yue Y, Huang B, Deng XY, Zhong NQ, Hong X, Chen XG, Xiao D. Temporal control of Cre recombinase-mediated *in vitro* DNA recombination by Tet-on gene expression system. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, 37(2): 133–138. DOI
- [42] Ronzaud C, Löffing J, Gretz N, Schütz G, Berger S. Inducible renal principal cell-specific mineralocorticoid receptor gene inactivation in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300(3): F756–F760. DOI
- [43] Buchholz F, Ringrose L, Angrand PO, Rossi F, Stewart AF. Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucl Acids Res*, 1996, 24(21): 4256–4262. DOI
- [44] Siegal ML, Hartl DL. Transgene coplacement and high efficiency site-specific recombination with the Cre/loxP system in *Drosophila*. *Genetics*, 1996, 144(2): 715–726. DOI
- [45] Heidmann D, Lehner CF. Reduction of Cre recombinase toxicity in proliferating *Drosophila* cells by estrogen-dependent activity regulation. *Dev Genes Evol*, 2001, 211(8–9): 458–465. DOI
- [46] Siegal ML, Hartl DL. Application of Cre/loxP in *Drosophila*. Site-specific recombination and transgene coplacement. *Methods Mol Biol*, 2000, 136: 487–495. DOI
- [47] Oberstein A, Pare A, Kaplan L, Small S. Site-specific transgenesis by Cre-mediated recombination in *Drosophila*. *Nat Meth*, 2005, 2(8): 583–585. DOI
- [48] Jasinskiene N, Coates CJ, Ashikyan A, James AA. High efficiency, site-specific excision of a marker gene by the phage P1 CRE-loxP system in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(22): e147. DOI
- [49] Nimmo DD, Alphey L, Meredith JM, Eggleston P. High efficiency site-specific genetic engineering of the mosquito genome. *Insect Mol Biol*, 2006, 15(2): 129–136. DOI
- [50] 孙家利, 闫晓红, 王力军, 魏文辉. Cre/loxP位点特异性重组系统在植物中应用的研究进展. 中国农业科学, 2010, 43(6): 1099–1107. DOI
- [51] Dale EC, Ow DW. Intra- and intramolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene*, 1990, 91(1): 79–85. DOI
- [52] Vergunst AC, Jansen LET, Hooykaas PJJ. Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* mediated by Cre recombinase. *Nucl Acids Res*, 1998, 26(11): 2729–2734. DOI
- [53] Vega JM, Yu WC, Han FP, Kato A, Peters EM, Zhang ZJ, Birchler JA. *Agrobacterium*-mediated transformation of

- maize (*Zea mays*) with Cre-lox site specific recombination cassettes in BIBAC vectors. *Plant Mol Biol*, 2008, 66(6): 587–598. [DOI](#)
- [54] Lambert JM, Bongers RS, Kleerebezem M. Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(4): 1126–1135. [DOI](#)
- [55] Louwse JD, van Lier MCM, van der Steen DM, de Vlaam CMT, Hooykaas PJJ, Vergunst AC. Stable recombinase-mediated cassette exchange in *Arabidopsis* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 2007, 145(4): 1282–1293. [DOI](#)
- [56] Zhang YY, Li HX, Ouyang B, Lu YE, Ye ZB. Chemical-induced autoexcision of selectable markers in elite tomato plants transformed with a gene conferring resistance to lepidopteran insects. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(16): 1247–1253. [DOI](#)
- [57] Qiu CX, Sangha JS, Song FS, Zhou ZY, Yin A, Gu KY, Tian DS, Yang JB, Yin ZC. Production of marker-free transgenic rice expressing tissue-specific *Bt* gene. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(10): 1097–1107. [DOI](#)
- [58] Ma BG, Duan XY, Niu JX, Ma C, Hao QN, Zhang LX, Zhang HP. Expression of stilbene synthase gene in transgenic tomato using salicylic acid-inducible Cre/loxP recombination system with self-excision of selectable marker. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(1): 163–169. [DOI](#)
- [59] Khattri A, Nandy S, Srivastava V. Heat-inducible Cre-lox system for marker excision in transgenic rice. *J Biosci*, 2011, 36(1): 37–42. [DOI](#)
- [60] Djukanovic V, Lenderts B, Bidney D, Lyznik LA. A Cre::FLP fusion protein recombines *FRT* or *loxP* sites in transgenic maize plants. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6(8): 770–781. [DOI](#)
- [61] Mariani C, de Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, 1990, 347(6395): 737–741. [DOI](#)
- [62] 王勇, 李景富, 林忠平. Cre/loxP定位重组系统在植物雄不育和杂种优势中的利用研究. *分子植物育种*, 2003, 1(4): 557–558. [DOI](#)
- [63] 宋洪元, 任雪松, 罗庆熙, 雷建军, 宋明. 利用Cre/lox重组系统建立反义基因工程雄性不育恢复系. *西北植物学报*, 2009, 29(11): 2198–2206. [DOI](#)
- [64] 宋洪元, 任雪松, 司军, 李成琼, 宋明, 雷建军. 利用Cre/lox重组系统建立番茄基因工程雄性不育恢复系. *中国农业科学*, 2009, 42(10): 3581–3591. [DOI](#)
- [65] Liu JX, Yu YX, Lei JJ, Chen GJ, Cao BH. Study on *Agrobacterium*-mediated transformation of pepper with *Barnase* and *Cre* gene. *Agric Sci Chin*, 2009, 8(8): 947–955. [DOI](#)
- [66] Dong J, Stuart GW. Transgene manipulation in zebrafish by using recombinases. *Methods Cell Biol*, 2004, 77: 363–379. [DOI](#)
- [67] Pan XF, Wan HY, Chia W, Tong Y, Gong ZY. Demonstration of site-directed recombination in transgenic zebrafish using the Cre/loxP system. *Transgenic Res*, 2005, 14(2): 217–223. [DOI](#)
- [68] Yoshikawa S, Kawakami K, Zhao XC. G2R Cre reporter transgenic zebrafish. *Dev Dyn*, 2008, 237(9): 2460–2465. [DOI](#)
- [69] Liu WY, Wang Y, Qin Y, Wang YP, Zhu ZY. Site-directed gene integration in transgenic zebrafish mediated by cre recombinase using a combination of mutant *lox* sites. *Mar Biotechnol*, 2007, 9(4): 420–428. [DOI](#)
- [70] Langenau DM, Feng H, Berghmans S, Kanki JP, Kutok JL, Look AT. Cre/lox-regulated transgenic zebrafish model with conditional myc-induced T cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(17): 6068–6073. [DOI](#)
- [71] Feng H, Langenau DM, Madge JA, Quinkertz A, Gutierrez A, Neuberger DS, Kanki JP, Look AT. Heat-shock induction of T-cell lymphoma/leukaemia in conditional Cre/lox-regulated transgenic zebrafish. *Br J Haematol*, 2007, 138(2): 169–175. [DOI](#)
- [72] Jopling C, Sleep E, Raya M, Marti M, Raya A, Belmonte JCI. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*, 2010, 464(7288): 606–609. [DOI](#)
- [73] Werdien D, Peiler G, Ryffel G U. FLP and Cre recombinase function in *Xenopus* embryos. *Nucl Acids Res*, 2001, 29(11): e53. [DOI](#)
- [74] Ryffel GU, Werdien D, Turan G, Gerhards A, Gooßes S, Senkel S. Tagging muscle cell lineages in development and tail regeneration using Cre recombinase in transgenic *Xenopus*. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(8): e44. [DOI](#)
- [75] Waldner C, Sakamaki K, Ueno N, Turan G, Ryffel GU. Transgenic *Xenopus laevis* strain expressing cre recombinase in muscle cells. *Dev Dyn*, 2006, 235(8): 2220–2228. [DOI](#)
- [76] Roose M, Sauert K, Turan G, Solomentsew N, Werdien D, Pramanik K, Senkel S, Ryffel GU, Waldner C. Heat-shock inducible Cre strains to study organogenesis in transgenic *Xenopus laevis*. *Transgenic Res*, 2009, 18(4): 595–605. [DOI](#)
- [77] Vooijs M, Jonkers J, Berns A. A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that *LoxP* recombination is position dependent. *EMBO Rep*, 2001, 2(4): 292–297. [DOI](#)
- [78] 林福玉, 杨晓. 条件基因打靶研究存在的主要问题及对策. *遗传*, 2011, 33(5): 469–484. [DOI](#)

- [79] Semprini S, Troup TJ, Kotelevtseva N, King K, Davis JRE, Mullins LJ, Chapman KE, Dunbar DR, Mullins JJ. Cryptic *loxP* sites in mammalian genomes: genome-wide distribution and relevance for the efficiency of BAC/PAC recombining techniques. *Nucl Acids Res*, 2007, 35(5): 1402–1410. [DOI](#)
- [80] Thyagarajan B, Guimarães MJ, Groth AC, Calos MP. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene*, 2000, 244(1–2): 47–54. [DOI](#)
- [81] Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB, Allak BA, van Drunen E, Kanaar R, Berns A, Jonkers J. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(16): 9209–9214. [DOI](#)
- [82] Forni PE, Scuoppo C, Imayoshi I, Tauli R, Dastrù W, Sala V, Betz UAK, Muzzi P, Martinuzzi D, Vercelli AE, Kageyama R, Ponzetto C. High levels of Cre expression in neuronal progenitors cause defects in brain development leading to microencephaly and hydrocephaly. *J Neurosci*, 2006, 26(37): 9593–9602. [DOI](#)
- [83] Schmidt EE, Taylor DS, Prigge JR, Barnett S, Capecchi MR. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(25): 13702–13707. [DOI](#)
- [84] Furr BJA, Jordan VC. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther*, 1984, 25(2): 127–205. [DOI](#)
- [85] Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(1): 52–56. [DOI](#)
- [86] Halpin C. Gene stacking in transgenic plants—the challenge for 21st century plant biotechnology. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3(2): 141–155. [DOI](#)
- [87] Biology Analysis Group, Xia QY, Zhou ZY, Lu C, Cheng DJ, Dai FY, Li B, Zhao P, Zha XF, Cheng TC, Chai CL, Pan GQ, Xu JS, Liu C, Lin Y, Qian JF, Hou Y, Wu ZL, Li GR, Pan MH, Li CF, Shen YH, Lan XQ, Yuan LW, Li T, Xu HF, Yang GW, Wan YJ, Zhu Y, Yu MD, Shen WD, Wu DY, Xiang ZH, Genome Analysis Group, Yu J, Wang J, Li RQ, Shi JP, Li H, Li GY, Su JN, Wang XL, Li GQ, Zhang ZJ, Wu QF, Li J, Zhang QP, Wei N, Xu JZ, Sun HB, Dong L, Liu DY, Zhao SL, Zhao XL, Meng QS, Lan FD, Huang XG, Li YZ, Fang L, Li CF, Li DW, Sun YQ, Zhang ZP, Yang Z, Huang YQ, Xi Y, Qi QH, He DD, Huang HY, Zhang XW, Wang ZQ, Li WJ, Cao YZ, Yu YP, Yu H, Li JH, Ye JH, Chen H, Zhou Y, Liu B, Wang J, Ye J, Ji H, Li ST, Ni PX, Zhang JG, Zhang Y, Zheng HK, Mao BY, Wang W, Ye C, Li SG, Wang J, Wong GKS, Yang HM. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 2004, 306(5703): 1937–1940. [DOI](#)
- [88] The International Silkworm Genome Consortium. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2008, 38(12): 1036–1045. [DOI](#)
- [89] Xia QY, Guo YR, Zhang Z, Li D, Xuan ZL, Li Z, Dai FY, Li YR, Cheng DJ, Li RQ, Cheng TC, Jiang T, Becquet C, Xu X, Liu C, Zha XF, Fan W, Lin Y, Shen YH, Jiang L, Jensen J, Hellmann I, Tang S, Zhao P, Xu HF, Yu C, Zhang GJ, Li J, Cao JJ, Liu SP, He NJ, Zhou Y, Liu H, Zhao J, Ye C, Du ZH, Pan GQ, Zhao AC, Shao HJ, Zeng W, Wu P, Li CF, Pan MH, Li JJ, Yin XY, Li DW, Wang J, Zheng HS, Wang W, Zhang XQ, Li SG, Yang HM, Lu C, Nielsen R, Zhou ZY, Wang J, Xiang ZH, Wang J. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*). *Science*, 2009, 326(5951): 433–436. [DOI](#)
- [90] Tomita S, Kanda T, Imanishi S, Tamura T. Yeast FLP recombinase-mediated excision in cultured cells and embryos of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl Entomol Zool (Jpn)*, 1999, 34(3): 371–377. [DOI](#)
- [91] Nakayama G, Kawaguchi Y, Koga K, Kusakabe T. Site-specific gene integration in cultured silkworm cells mediated by ϕ C31 integrase. *Mol Genet Genomics*, 2006, 275(1): 1–8. [DOI](#)

• 综合信息 •

关于申报首届“吴旻医学遗传奖”延长受理时间的通知

中国遗传学会将 2011 年 10 月 9 日至 11 月 30 日受理“吴旻医学遗传奖”申请和推荐的时间延长到 2012 年 4 月 30 日。请推荐人和申请人仔细阅读章程、申请书、推荐书和奖项章程(详见“关于申报首届“吴旻医学遗传奖”的通知”的附件)。欢迎符合申请和推荐要求的医学遗传科学工作者积极申请该奖项。

申请者请将申请书或推荐信纸质版一式 2 份于 2012 年 4 月 30 日前邮寄到中国遗传学会办公室, 同时将电子版发至 geneticsociety@163.com。

地址: 北京市朝阳区北辰西路一号院 2 号

邮编: 100101 联系电话: (010)64889611; (010)64853199

联系人: 王长城

中国遗传学会办公室

2012 年 1 月 9 日