

Cre/loxP 位点特异性重组系统及其在口腔医学领域中的应用

张文娟综述 于丹妮审校

(天津医科大学第二医院口腔内科 天津 300211)

[摘要] Cre/loxP 位点特异性重组系统由 Cre 重组酶和 loxP 位点组成。Cre 重组酶可识别 loxP 位点并催化 2 个 loxP 位点之间的 DNA 进行精确的位点特异性重组。该系统作用方式简单、重组效率高,可定时、定位地对基因进行修饰,已成为一种定向改变生物活体遗传信息的重要的试验工具。本文主要就 Cre/loxP 系统的结构、重组机制、特点及其在口腔医学领域中的应用作一综述。

[关键词] 位点特异性重组; Cre/loxP 系统; Cre 重组酶

[中图分类号] Q 789 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.01.016

Cre/loxP site-specific recombination system and its application in the field of oral medicine ZHANG Wen-juan, YU Dan-ni. (Dept. of Oral Medicine, The Affiliated Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

[Abstract] Cre/loxP system is composed of Cre recombinase and loxP site. Cre recombinase can recognize loxP site and catalyze precise site-specific recombination of DNA between two loxP sites. The Cre/loxP system can modificate the genes in specific time and site, which acts in simple mode and recombinates in high efficiency. It has become an important tool for experiments that can be used to change the genetic information directionally *in vivo*. In this article, the structure, the mechanism of the recombination, the characteristics of Cre/loxP system and its application in the field of oral medicine have mainly been reviewed.

[Key words] site-specific recombination; Cre/loxP system; Cre recombinase

随着分子生物学的不断发展,口腔致病微生物的可用基因组序列数不断增长,从基因水平研究口腔致病微生物的发病机制已成为热点。目前,人们将位点特异性重组系统与传统的基因修饰技术结合起来,克服了传统的转基因和基因敲除技术在体内研究基因功能时不尽如人意之处。位点特异性重组是指在重组酶的催化下,两段 DNA 序列的特异位点发生整合并共价连接。其中,包括 Cre/loxP、FLP/FRT、R/RS 等,而研究最为深入、应用最为广泛的是 Cre/loxP 系统。

1 Cre/loxP 位点特异性重组系统的结构和重组机制

1.1 Cre/loxP 位点特异性重组系统的结构

Cre/loxP 位点特异性重组系统由 Cre 重组酶和 loxP 位点组成^[1]。Cre 重组酶是由 cre 基因编码

的相对分子质量为 3.85×10^4 的蛋白质,属于位点特异性重组酶整合酶家族。Cre 重组酶属于型拓扑异构酶,是位点特异性重组所需的特异性重组酶,可识别特异 DNA 序列(loxP 位点)并催化 2 个 loxP 位点之间的 DNA 进行精确的位点特异性重组^[2]。该酶由较小的 N 末端和较大的 C 末端结构域组成,结构域间由一个短链相连。在重组过程中,N 末端与 loxP 位点的识别有关;而 C 末端与 DNA 的结合及切割有关,是 Cre 重组酶的活性中心^[3]。在重组反应中,与 2 个 loxP 位点结合的不同 Cre 亚基间 N 端结构相似,而 C 端构象有较明显的差异,即不同 Cre 亚基在重组过程中所起的作用不同。

Cre 重组酶的特异性识别位点 loxP 是一种典型的回文序列结构,长度 34 bp,包括两侧的 2 个 13 bp 的反向重复序列和中间的 8 bp 的非对称间隔序列^[4]: 5'-ATAACTTCGTATAG ▲ CATA CAT TATACGAAGTTAT-3' 3'-TATTGAAGCATATCG-TATGT ★ AATATGCTTCAATA-5'。其中,两侧的

[收稿日期] 2009-09-23; [修回日期] 2010-06-17

[作者简介] 张文娟(1985—),女,山东人,硕士

[通讯作者] 于丹妮, Tel: 022-88328082

反向重复序列是 Cre 重组酶识别和结合的部位，而中间的间隔序列是 DNA 分裂和链交换发生的部位^[5]，即回文序列结构中斜体部分。在重组反应过程中，第 1 次链交换发生在回文序列结构中▲所示的位置，第 2 次链交换发生在回文序列结构中★所示的位置^[6]。当 2 个 13 bp 的反向重复序列发生改变时仍能被识别并发生重组，利用这一特点，人们在构建载体时可根据需要改造 loxP 位点序列，以达到定点修饰染色体上某一基因的目的，增加该系统的应用范围。

loxP 位点中的 8 bp 间隔区是位点中唯一不对称的部位，这种非对称性决定了 loxP 位点具有方向性，进而决定其重组的方向性；而且，Cre 重组酶既能作用在分子内的 loxP 位点，又能作用于分子间的 loxP 位点^[7]。在 Cre 酶的介导下，Cre/loxP 系统共有以下 3 种工作方式^[8]：1) 当 2 个 loxP 位点位于同一个分子上且方向相同时，loxP 位点之间的 DNA 片段被删除；2) 当 2 个 loxP 位点位于同一个分子上且方向相反时，loxP 位点之间的 DNA 片段倒位；3) 当 2 个 loxP 位点分别位于 2 个分子上时，Cre 重组酶可介导 2 条 DNA 链间的交换或染色体易位。

1.2 Cre/loxP 位点特异性重组系统的重组机制

Cre 重组酶介导的位点特异性重组是通过 DNA 底物中每条链的切割和交换来逐步完成的。首先，4 个 Cre 重组酶分子同 2 个 loxP 位点结合形成一个复合体，其中 2 个 Cre 重组酶先发生作用，其保守的酪氨酸残基切割 DNA 链，与 3'-PO₄ 共价结合形成一个 3'-磷酸酪氨酸和一个游离的 5'-OH；继而，磷酸酪氨酸与另一切割部位的 5'-OH 连接，导致第 1 对 DNA 链的交换，形成一个“霍利迪(Holliday)连接体”的中间物；然后，以霍利迪中间物为底物产生结构的异构化，利用剩余的 2 个 Cre 重组酶完成第 2 对 DNA 链的切割和交换，去掉中间物，从而形成重组产物^[9-10]。

2 Cre/loxP 位点特异性重组系统重组效率的测定

Cre/loxP 系统已广泛用于体内外复杂的 DNA 分子的处理，为了进一步描述 Cre/loxP 系统的特征并修饰该系统，需要有一种方便的测定重组效率的方法。庞永奇等^[11]提供了一个简单可视的测定方法：将 cre 基因插入卡那霉素抗性的细菌表达载体中并将其命名为 pET30a-Cre，将被 loxP 位点锚定的绿色荧光蛋白(green fluorescence pro-

tein, GFP)基因克隆到氨苄西林抗性的表达载体中并将其命名为 pET23b-loxGFP，然后将 pET30a-Cre 和 pET23b-loxGFP 共同转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中，在卡那霉素与氨苄西林共同存在的条件下进行培养，在紫外线的照射下，可以较容易地检测到 Cre 介导的重组。该测定方法的精确度已由十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析法和 DNA 序列的限制性酶切法所证实，所以，这种共转化的方法提供了一种可用于修饰 Cre/loxP 系统的直接的测定方法。

3 Cre/loxP 位点特异性重组系统的特点

3.1 作用方式简单

在 Cre/loxP 系统中，Cre 重组酶是比较稳定的蛋白质，且 loxP 位点较小，容易合成。Cre 重组酶在介导重组反应时，不需要其他蛋白质、DNA 等辅助因子和额外能量的参与^[10]，便可将外源性基因定点整合到染色体上或将特定的 DNA 片段删除，完成体内外的 DNA 重组；而 Cre 重组酶可对包含 loxP 位点的各种 DNA 底物进行重组反应。

3.2 时间特异性

Cre/loxP 系统具有时间特异性，人们可利用该系统并调控 Cre 重组酶的表达，在特定的时间内敲除目的基因，Cre 重组酶的时间调控可利用诱导的方式来实现。目前，多利用化学合成的激素配体与受体相结合的方式诱导 Cre 重组酶的表达。将 cre 基因与激素受体的配体结合域融合形成嵌合型 cre 基因，当化学合成的激素配体与受体结合时可诱导 Cre 重组酶的表达，即可实现在特定时间内敲除目的基因。为了避免体内自然产生的激素的干扰，可对激素受体的配体结合域作一定程度的修饰，使其只能与化学合成的激素配体相结合，以保证重组反应的特异性。Cre/loxP 系统具有时间特异性，将有助于研究那些在不同发育时期都有作用的基因的功能。

3.3 组织特异性

Cre/loxP 系统还具有组织特异性，人们可利用该系统并调控 Cre 重组酶的表达，在特定的组织内敲除目的基因。Cre/loxP 系统是产生特定细胞类型基因失活的最有效的方法^[12]。对 Cre 重组酶的空间调控可利用其组织特异性的启动子来实现，该启动子只在特定的组织中有活性，而在其他组织中却没有活性。将 cre 基因置于该启动子的控制下，当 Cre 重组酶表达时，该组织中的被

loxP 位点锚定的基因片段将被删除。利用 Cre/loxP 系统的组织特异性,可避免传统基因敲除技术导致的胚胎死亡,有助于探测基因在特定的细胞或组织中的功能。

此外,将上述两者结合起来,可在时间与空间上同时调控 Cre 重组酶的表达。Liang等^[13]将 cre 基因与雌激素受体的配体结合域融合,实现了对 Cre 重组酶的时间调控;同时,将 cre 基因置于牛角质素-5 启动子的调控下,实现了对 Cre 重组酶的空间调控。此启动子只在多个器官的复层和假复层上皮组织的基底上皮细胞谱系中有活性。该试验成功构建出了可用于分析基底上皮细胞的功能与可进行遗传修饰的转基因小鼠系,允许对围生期小鼠和成年小鼠的基底上皮细胞谱系进行鉴定并分析其在胚胎形成中的分化。

4 Cre/loxP 位点特异性重组系统在口腔医学领域中的应用

4.1 Cre/loxP 系统在口腔颌面部发生发育研究中的应用

在体外牙釉质形成的研究中,CCAAT/增强子-结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP)- α 参与调节小鼠牙釉质基因的表达。由于釉质形成于小鼠出生之后,而组成性 C/EBP- α 缺失小鼠出生时就已死亡,故 Xu等^[14]用 Cre/loxP 系统表现了特异性敲除 C/EBP- α 小鼠的釉质蛋白表达的特征。他们将 cre 基因置于人角质素-14 启动子的控制下,用 loxP 锚定 C/EBP- α ,并将 loxP 锚定 C/EBP- α 的小鼠与角质素-14-cre 小鼠交配,构建出了 C/EBP- α 条件敲除小鼠。该小鼠只在成釉细胞系中敲除了 C/EBP- α ,克服了组成性 C/EBP- α 敲除小鼠的胚胎致死性缺陷,这样就可可在活体内研究 C/EBP- α 缺失时 C/EBP- δ 的作用。在 C/EBP- α 缺失时, C/EBP- δ 可替代 C/EBP- α 来产生一种釉质基质并可发挥直接的矿化作用。

Lan等^[15]也同样利用 Cre/loxP 系统,在腭间充质形成过程中组织特异性地失活 smo 基因,使其在体内研究声音刺猬蛋白(sonic hedgehog, Shh)调节腭发生的分子和细胞机制成为可能。他们还发现,上皮性表达的直接定向于腭间充质的 Shh 信号通过细胞周期蛋白 D₁(cyclin D₁, Ccnd₁)和 Ccnd₂ 来调节腭间充质细胞的增殖。

4.2 Cre/loxP 系统在口腔变异链球菌中的应用

目前,由于缺乏先进的遗传研究工具,因而

有关口腔变异链球菌的遗传分析仍受限制。传统的基因敲除技术皆需要引进一个选择性标志来促进突变体的选择,但当需要多基因缺失时,突变基因的数目通常与菌株染色体中选择性标志的数目相关联^[16]。方便且可选择的标志基因少之又少,故应用这些技术的可行性较小。解决这一问题的有效途径是使用 Cre/loxP 系统,从基因组中删除选择性标志基因。即用 2 个同向的 loxP 位点锚定选择性标志基因(loxP-Ab^r-loxP),当 Cre 重组酶表达时就可删除选择性标志基因。然而,当该系统应用于多基因缺失时,野生型 loxP 位点又可能会出现。这是因为来自不同的 loxP-Ab^r-loxP 标志基因盒的 2 个 loxP 位点之间存在着 Cre 重组酶介导的潜在重组,当多个 loxP 位点整合入基因组时,会致基因组不稳定。Araki等^[17]认为,使用突变型 loxP 位点(loxP*)可解决上述问题。

为此, Banerjee等^[18]对该系统进行了改良。他们选择了 2 个突变位点, lox71 和 lox66。在 Cre 重组酶表达时, lox71 和 lox66 突变体的重组会产生 loxP 双重突变位点 lox72,而 lox72 在两侧的重复序列中都包含突变体,对 Cre 重组酶的亲和力大大降低^[19]。Banerjee等^[18]将此 Cre/loxP* 改良系统应用于口腔变异链球菌中,并选择其 htrA 和 clpP 两个基因进行分析。他们利用 lox71-Ab^r-lox66 删除 htrA 基因,并删除选择标志基因,在 htrA 缺陷株中同样地删除 clpP 基因时, htrA 缺陷株中的 lox72 位点与新引进的 lox71/lox66 位点彼此分离, lox72 与 lox71/lox66 位点间的重组率极低。

Lambert等^[20]在对植物乳杆菌的研究中证实:当 lox71 或 lox66 位点非常接近 lox72 位点时,由 Cre 重组酶介导的在 lox71 和 lox66 位点间的重组率为 99.4%。因此,不论 lox71 和 lox66 位点与 lox72 位点的位置是远还是近, Cre 重组酶介导的首选的在 lox71 和 lox66 位点间的重组几乎是唯一的。这充分彰显了该改良系统的 Cre 重组酶的选择性以及相对于野生型 loxP 位点的优点。该改良系统将在构建多基因缺陷株中发挥更大的优势,并且更有利于对多个基因功能的鉴定。

5 展望

Cre/loxP 位点特异性重组系统具有作用方式简单、时间特异性和组织特异性的特点,已广泛应用于基因功能鉴定^[21]、动物^[22]、植物^[23]和微生物^[24-26]基因组的修饰等。相信 Cre/loxP 系统在口腔

医学领域,尤其是在口腔变异链球菌中的应用,将极大地促进对变异链球菌的遗传分析,推动从基因水平研究其致龋机制,有助于探索从根本上治疗龋病的新途径。鉴于 Cre/loxP 系统在鉴定基因的功能方面的极大优势,其在口腔其他方面的应用也将会越来越广泛,譬如对牙周病和口腔肿瘤发病机制的研究等。

6 参考文献

- [1] Sternberg N. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Strand exchange during recombination at lox sites[J]. J Mol Biol, 1981, 150(4) :603-608.
- [2] Bucholtz F. Principles of site-specific recombinase(SSR) technology[J]. J Vis Exp, 2008, 29(15) :718.
- [3] Guo F, Gopaul DN, van Duyne GD. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse [J]. Nature, 1997, 389 (6646) :40-46.
- [4] Hoess RH, Ziese M, Sternberg N. P1 site-specific recombination : Nucleotide sequence of the recombining sites[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982, 79(11) :3398-3402.
- [5] Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K. The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination[J]. Nucleic Acids Res, 1986, 14(5) :2287-2300.
- [6] Lee L, Sadowski PD. Sequence of the loxP site determines the order of strand exchange by the Cre recombinase[J]. J Mol Biol, 2003, 326(2) :397-412.
- [7] Langer SJ, Ghafoori AP, Byrd M, et al. A genetic screen identifies novel non-compatible loxP sites[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(14) :3067-3077.
- [8] Shimshek DR, Kim J, Hübner MR, et al. Codon-improved Cre recombinase(iCre) expression in the mouse [J]. Genesis, 2002, 32(1) :19-26.
- [9] Gopaul DN, Guo F, van Duyne GD. Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination[J]. EMBO J, 1988, 17(14) :4175-4187.
- [10] Guo F, Gopaul DN, van Duyne GD. Asymmetric DNA bending in the Cre-loxP site-specific recombination synapse[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(13) :7143-7148.
- [11] 庞永奇, 贾洪革, 荣祥. 利用不相容质粒共转化大肠杆菌对Cre重组酶体内重组活性的可视检测[J]. 微生物学报, 2005, 45(1) :125-128.
- [12] Parkitna JR, Engblom D, Schütz G. Generation of Cre recombinase-expressing transgenic mice using bacterial artificial chromosomes[J]. Methods Mol Biol, 2009, 530 :325-342.
- [13] Liang CC, You LR, Chang JL, et al. Transgenic mice exhibiting inducible and spontaneous Cre activities driven by a bovine keratin 5 promoter that can be used for the conditional analysis of basal epithelial cells in multiple organs[J]. J Biomed Sci, 2009, 16 2.
- [14] Xu Y, Zhou YL, Gonzalez FJ, et al. CCAAT/enhancer-binding protein delta(C/EBP delta) maintains amelogenin expression in the absence of C/EBP alpha *in vivo*[J]. J Biol Chem, 2007, 282(41) :29882-29889.
- [15] Lan Y, Jiang R. Sonic hedgehog signaling regulates reciprocal epithelial-mesenchymal interactions controlling palatal outgrowth[J]. Development, 2009, 136(8) :1387-1396.
- [16] Leibig M, Krismer B, Kolb M, et al. Marker removal in staphylococci via Cre recombinase and different lox sites [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(5) :1316-1323.
- [17] Araki K, Araki M, Yamamura K. Site-directed integration of the cre gene mediated by Cre recombinase using a combination of mutant lox sites[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(19) :e103.
- [18] Banerjee A, Biswas I. Markerless multiple-gene-deletion system for *Streptococcus mutans*[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(7) :2037-2042.
- [19] Yan X, Yu HJ, Hong Q, et al. Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis* [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(17) :5556-5562.
- [20] Lambert JM, Bongers RS, Kleerebezem M. Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(4) :1126-1135.
- [21] Speck NA, Iruela-Arispe ML. Conditional Cre/LoxP strategies for the study of hematopoietic stem cell formation [J]. Blood Cells Mol Dis, 2009, 43(1) :6-11.
- [22] Kuwata H, Nakao K, Harada T, et al. Generation of RGS8 null mutant mice by Cre/loxP system[J]. Kobe J Med Sci, 2008, 53(6) :275-281.
- [23] Bai X, Wang Q, Chu C. Excision of a selective marker in transgenic rice using a novel Cre/loxP system controlled by a floral specific promoter[J]. Transgenic Res, 2008, 17(6) :1035-1043.
- [24] Forment JV, Ramón D, MacCabe AP. Consecutive gene deletions in *Aspergillus nidulans* : Application of the Cre/loxP system[J]. Curr Genet, 2006, 50(3) :217-224.
- [25] Pomerantsev AP, Sitaraman R, Galloway CR, et al. Genome engineering in *Bacillus anthracis* using Cre recombinase[J]. Infect Immun, 2006, 74(1) :682-693.
- [26] Suzuki N, Inui M, Yukawa H. Site-directed integration system using a combination of mutant lox sites for *Corynebacterium glutamicum*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 77(4) :871-878.

(本文编辑 汤亚玲)