

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

庞永奇^{1,2} 贾洪革¹ 方荣祥¹ 郭蔼光² 陈晓英^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所植物基因组学国家重点实验室 北京 100080)

(² 西北农林科技大学生命科学学院 杨凌 712100)

摘 要 源自噬菌体 P1 的 Cre 重组酶可以识别 34bp 的靶 DNA 序列 *loxP*, 进行位点特异性的重组反应。为了简便地检测 Cre 酶在大肠杆菌中的重组活性, 分别将 *cre* 基因和上下游带有 *loxP* 的绿色荧光蛋白基因(*gfp*)克隆到具有不同抗性的两种不相容质粒中, 然后将构建的原核表达载体 pET30a-Cre 和 pET23b-*loxGFP* 电击共转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 利用卡那霉素和氨苄青霉素双抗生素抗性进行筛选。通过直接观察转化子的绿色荧光, 便可以显示 Cre 酶的体内重组活性, 并进一步通过 SDS-PAGE 分析、质粒酶切鉴定进行了验证。结果表明: 以 *gfp* 为报告基因、通过两种不相容质粒共转化大肠杆菌可以为研究和改进 Cre/*loxP* 重组系统提供一种简便直观的检测方法。

关键词 Cre 重组酶, 共转化, 不相容性质粒, 绿色荧光蛋白

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)01-0125-04

源自噬菌体 P1 的 Cre/*loxP* 位点特异性重组系统目前已被广泛用于原核生物和真核生物体内、体外的基因操作, 并成为控制外源基因的行为、研究基因的功能等方面的有力工具^[1-4]。为进一步研究和拓展该系统的应用范围, 针对新型 *lox* 位点的研究与应用业已相继展开^[5-9]。与此同时, 随着一些异型 *lox* 位点在酵母菌^[10]和哺乳动物基因组^[11]中先后被发现, 改进和提高 Cre 重组酶对异型 *lox* 位点的重组活性的研究也在不断发展^[12]。

对 Cre/*loxP* 重组系统的检测可以从体外和体内两方面进行。目前体外检测的方法已很成熟, 适用于 Cre 酶作用机理的晶体结构分析, 但难以反映重组效率的真实情况^[13, 14]。体内活性检测则能够很好的反映体内重组效率^[7-9]。但是以往的体内检测大多借助能够稳定表达 Cre 酶的大肠杆菌菌株, 操作繁琐且不适于目前对 Cre 酶进行改造的需要。因此, 有必要建立一种既能用于 *lox* 位点的研究也能用于 Cre 酶改造的简便的检测系统。本研究通过两种不相容性质粒电击共转化大肠杆菌, 利用两种抗生素抗性同时进行筛选, 引入了 Cre 重组酶及其靶 DNA 序列, 借助绿色荧光蛋白的绿色荧光直观地指示了其体内切割重组活性, 为进一步研究和改进 Cre/*loxP* 重组系统提供了一种简便直观的检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 与质粒 pBI221 为

Clontech 公司产品, *E. coli* BL21(DE3) 及质粒 pET30a 和 pET23b 为 Novagene 公司产品, pMM23(D. W. Ow 博士构建) 由林忠平教授惠赠, pBIN35S-*mgfp5-ER* 由 Haseloff 博士惠赠。各种工具酶、pGEM-T 载体以及质粒 DNA 提取试剂盒购自 Promega 公司; *Taq* DNA 聚合酶和 *Taq* Plus DNA 聚合酶购自上海生工生物工程技术有限公司; DNA 片段回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司。

1.2 含 *cre* 基因的原核表达载体的构建

根据已报道的 *cre* 基因序列设计并合成一对引物, 上游引物为: 5'-AATGCATGTCCAATTTACTGACCGTACACC-3'(划线部分为 *Nsi* I 酶切位点); 下游引物为: 5'-ACTCGAGCTAATCGCCATCTCCAGCAG-3'(划线部分为 *Xho* I 酶切位点)。PCR 扩增体系: 模板为质粒 pMM23。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 45s, 56 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。将 PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体中, DNA 测序验证 *cre* 基因的正确性。之后用 *Nsi* I 酶切, *T4* DNA 聚合酶削平, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 再用 *Xho* I 酶切, 回收 1kb 的片段; 用 *Nde* I 酶切 pET30a, *Klenow* 酶补平, 65 $^{\circ}$ C 15min 灭活后, 加入 *Xho* I 继续酶切, 回收 5.2kb 的片段作载体。连接两片段, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选重组质粒, 经酶切鉴定后, 将其命名为 pET30a-Cre。

1.3 含 *gfp* 基因(无 *loxP* 位点)的原核表达载体的构建

根据已报道的 *gfp* 基因序列设计并合成一对引物, 上游引物为 5'-TGGATCCAACAATGAGTAAAGGAGAAGAACCTTTTC-3'

基金项目: 国家 863 计划 (2002AA227031)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62522109; E-mail: xiaoying@hotmail.com

作者简介: 庞永奇 (1978 -), 男, 河北省容城县人, 硕士研究生, 主要从事应用 Cre/*lox* 系统消除标记基因的研究。E-mail: pangyongqi@126.com

收稿日期: 2004-05-10, 修回日期: 2004-07-16

(划线部分为 *Bam*H I 酶切位点);下游引物为 5'-CGAGCTCTTATTGTATAGTTCATCCATGCC-3' (划线部分为 *Sac* I 酶切位点)。PCR 扩增体系:模板为质粒 pBIN35S-*mgfp5-ER* 扩增条件 94°C 3min 94°C 45s 54°C 45s 72°C 45s, 30 个循环 72°C 10min。回收 PCR 产物连接到 pGEM-T 载体, DNA 测序验证 *gfp* 基因的正确性。将其用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切,切下的片段连接到同样双酶切的表达载体 pET-23b 中,构建含 *gfp* 基因片段的原核表达载体 pET23b-GFP。

1.4 含 *gfp* 基因(两侧带有同向 *loxP* 位点)的原核表达载体的构建

用 *Bgl* II 和 *Sac* I 双酶切 pET23b-GFP,回收约 900bp 的片段,克隆到同样双酶切的 pBI221 *lox*-MCS-*lox* (质粒构建过程参见文献[15])中,得到 pBI221-M23bG。再用 *Hind* III 酶切 pBI221-M23bG, Klenow 酶补平,灭活后加入 *Eco*R I 继续酶切,回收约 1kb 的片段;*Bgl* II 酶切 pET23b, Klenow 酶补平,灭活后加入 *Eco*R I 继续酶切,回收约 3.5kb 的片段。将两片段连接,构建成带有两个同向 *loxP* 位点的 *gfp* 基因的原核表达载体 pET23b-*loxGFP*。

1.5 重组质粒在大肠杆菌中的转化及荧光检测

将 pET23b-GFP 或 pET23b-*loxGFP* 分别与等量的 pET30a-Cre 对大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞进行电击共转化,在同时含有 100mg/L 氨苄青霉素(Amp)和 50 mg/L 卡那霉素(Kan)的双抗生素 LB 平板(不含 IPTG 诱导剂)上筛选单菌落,37°C 过夜培养后,在可见光下或用手提式长波紫外灯(UV Products, model B-100AP)观察所得转化子,并用数码相机(Nikon Coolpix995)进行拍照。

3 种质粒各自单独转化大肠杆菌 BL21(DE3),分别涂布含相应抗生素 Amp 或 Kan 的 LB 平板,37°C 过夜培养,荧光观

察。

1.6 共转化菌株中蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 分析

在上述各平板中分别挑取单克隆接种含相应抗生素的 3mL 液体 LB 培养基。37°C 过夜振荡培养后,按 1:100 接种量转接到含相应抗生素的 3mL 液体 LB 培养基中(各接两管),37°C 振荡培养至 OD_{600} 值为 0.5~0.7,各取一管加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,另一管作为对照,37°C 继续培养 4h 后,室温 5000g 离心 2min 收集菌体。SDS-PAGE(分离胶浓度为 12%)检测共转化子经诱导表达后绿色荧光蛋白的表达情况。

1.7 重组质粒的酶切鉴定

分别从单独转化及共转化获得的转化体中提取质粒,用 *Xho* I 进行酶切,在 1% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定重组反应结果。

2 结果和分析

2.1 共转化子绿色荧光的观察

单独用 pET23b-GFP 或 pET23b-*loxGFP* 转化 BL21(DE3)大肠杆菌时,均可观测到绿色荧光,表明这两个载体均能有效地表达绿色荧光蛋白。将 pET30a-Cre 和 pET23b-GFP 共同转化大肠杆菌 BL21(DE3),得到的大肠杆菌克隆在可见光下呈黄绿色,当用长波紫外光激发时,均能观察到绿色荧光,表明 GFP 依然能够有效表达;而将 pET30a-Cre 和 pET23b-*loxGFP* 共同转化大肠杆菌 BL21(DE3),如预期所料,绝大多数克隆无绿色荧光。由此可以推断:pET23b-*loxGFP* 与 pET30a-Cre 共转化所得转化子体内发生了 Cre 酶介导的高效率的切除重组。Cre 酶介导的质粒重组反应如图 1 所示。

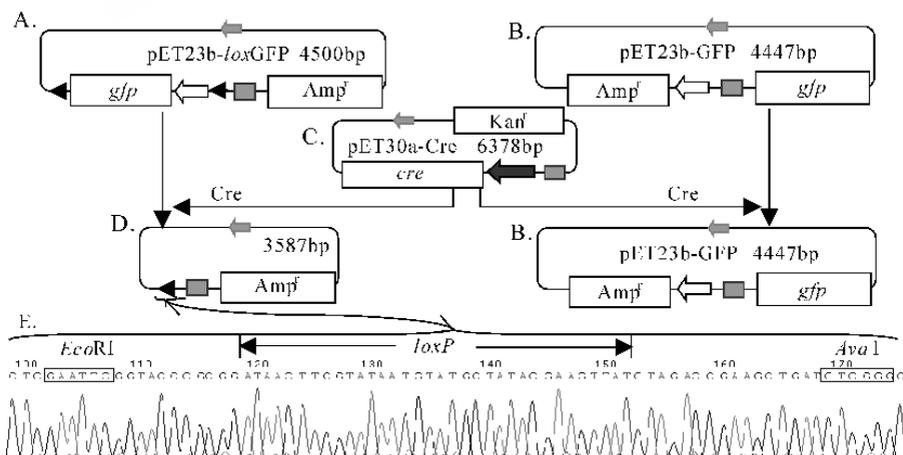


图 1 Cre 介导重组反应的质粒结构示意图

Fig. 1 Schematic diagrams depicting the Cre-mediated recombination event

A: pET23b-*loxGFP*; B: pET23b-GFP; C: pET30a-Cre; D: The *gfp* gene has been excised from pET23b-*loxGFP* upon the action of Cre;

E: DNA sequence analysis of the recombined site. The arrowheads mark *loxP* sites, the open arrows mark the T7 promoter, the closed arrow marks the T7lac promoter, the shaded arrows denote the pBR322 origin, the shaded boxes denote the fl origin.

2.2 共转化菌株中的蛋白电泳结果分析

从 SDS-PAGE 图谱(图 2)上可以看出,经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导后,含有单个质粒 pET23b-GFP、pET23b-*lox*GFP 的大肠杆菌在 27kD 处有一条明显的蛋白表达带,含有单个质粒 pET30a-Cre 的大肠杆菌在 38kD 处有一条明显的蛋白表达带,表明外源目的基因均能有效表达;含有 pET30a-Cre 和 pET23b-GFP 两个质粒的大肠杆菌在 27kD 和 38kD 处各有一条明显的蛋白表达带,表明用不相容性双质粒共转化大肠杆菌时可以实现目的蛋白的共表达;而含有 pET30a-Cre 和 pET23b-*lox*GFP 两个质粒的大肠杆菌仅在 38kD 处有一条明显的蛋白表达带。由此可以推断:所表达的 Cre 重组酶已经有效地切除了质粒 pET23b-*lox*GFP 上两 *loxP* 位点间的 *gfp* 序列。

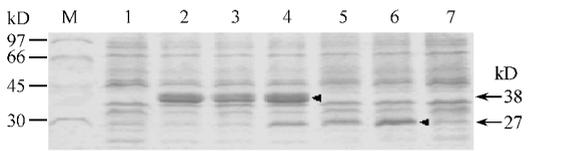


图 2 共转化子中 GFP 和 Cre 蛋白诱导表达后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of GFP and Cre proteins in *E. coli* cotransformants

M. Low molecular weight protein marker; 1. BL21 harboring pET30a; 2. BL21 harboring pET30a-Cre; 3. BL21 harboring pET30a-Cre and pET23b-*lox*GFP; 4. BL21 harboring pET30a-Cre and pET23b-GFP; 5. BL21 harboring pET23b-GFP; 6. BL21 harboring pET23b-*lox*GFP; 7. BL21 harboring pET23b. The arrowhead marks the GFP band.

2.3 提取质粒的酶切鉴定

用在所有测试质粒中均具有单一切点的 *Xho* I 对提取的质粒进行酶切,结果显示 pET30a-Cre 和 pET23b-GFP 共转化菌株中所含质粒大小未发生变化,而 pET30a-Cre 和 pET23b-*lox*GFP 共转化菌株中所含质粒中的一个减小到与 pET23b 大小相当(图 3),回收该条带(图 3 中箭头所示)进行测序,结果表明在 *loxP* 位点附近的序列与预期发生重组后所形成的结构(图 1-D、E)完全相同,证明 pET30a-Cre 表达的 Cre 酶已经准确地切除了共转化菌株中质粒 pET23b-*lox*GFP 的 *gfp* 基因。因此确证本文所描述的不相容性双质粒系统可以用于 Cre 酶体内重组活性及其所识别的 *loxP* 位点的鉴定,并用于 Cre/*loxP* 重组系统的改造研究。

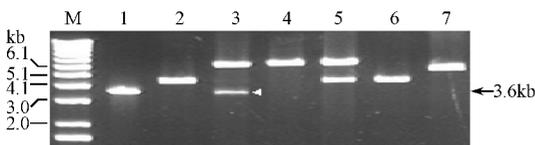


图 3 共转化子中重组质粒的酶切图谱

Fig. 3 Restriction analysis of the plasmids in *E. coli* cotransformants

M. 1 kb marker (Gibco-BRL); 1. pET23b; 2. pET23b-*lox*GFP; 3. pET30a-Cre; 4. pET30a-Cre + pET23b-*lox*GFP; 5. pET30a-Cre + pET23b-GFP; 6. pET23b-GFP; 7. pET30a. All the plasmids were digested with *Xho* I. The arrowhead indicates the plasmid to be sequenced.

3 讨论

随着 Cre/*loxP* 重组系统的广泛应用,对该系统的改进研究也在不断发展,完善一种快速简便的检测方法势在必行。本研究着重从两个方面对其体内检测方法进行了改进:一是采用绿色荧光蛋白作为唯一的监测重组反应发生与否的指示剂具有更加快速、简便的优点;二是利用不相容质粒共转化系统分别对 *cre* 基因及 *lox* 位点进行控制,从而便于对二者分别进行改造。

在对 Cre/*lox* 重组系统进行体内研究时,常用的指示重组发生与否的策略有抗性基因的缺失或获得^[5,12]、*lacZ* 基因的切除(类似于蓝白斑筛选)^[11],以及 *gfp* 的缺失同时伴有 *lacZ* 的表达(无绿色荧光且转为蓝斑)^[7]等策略。由于抗性的缺失与否难以直观显示,严格操作中需要将转化后的菌落逐一涂布含有用于指示重组反应发生的相应抗生素平板,操作困难且相对繁琐。*lacZ* 的使用则需要平板上添加底物才能显示,相比之下,GFP 的绿色荧光在长波紫外光激发下即可进行直接观察,甚至在可见光下也可以分辨出表达绿色荧光蛋白的菌落,从而可以直观地指示重组反应的发生。本实验借鉴前人的经验,采用 *gfp* 作为唯一的监测重组反应发生与否的指示剂,从而使该检测系统只需通过绿色荧光的直接观察即可判定重组反应是否发生,极大地简化了检测过程。

在对 Cre 酶的重组效率进行体内检测时,传统方法中大多将带有 *lox* 位点的载体直接转入稳定表达 Cre 酶的大肠杆菌菌株,之后再行相应检测^[5,8];或者借助带有 *lox* 位点的噬菌粒(phagemid)转染稳定表达 Cre 的菌株,待重组发生后,提取噬菌粒感染大肠杆菌,利用重组后的表型进行检测^[7]。在对 Cre 突变体的研究中 Rüfer 等先通过 λ 噬菌体载体将异型 *lox* 位点转入大肠杆菌并筛选阳性克隆,之后再转入带有 *cre* 基因的质粒,借助不同抗性使二者在同一菌株中共存^[12]。这些方法虽然能灵敏地反映 Cre 酶的重组活性,但是从操作上看显得过于繁琐,且工作量较大。我们所采用的双质粒共转化系统只需将构建好的两种质粒共转化大肠杆菌,涂布含两种抗生素的 LB 平板(不需加入 IPTG 诱导剂或反应底物),经过夜培养后便可用于观测重组发生情况。因为 *cre* 基因和 *lox* 位点分别位于不同的载体,所以本系统便于对二者单独处理或进行不同组合,从而选出所需要的新型 Cre/*lox* 重组系统,大大加快了对该系统的研究进程。

目前常用的双质粒系统可以分为复制子相同的不相容性双质粒和复制子不同的相容性双质粒两类。在同一大肠杆菌中不相容性双质粒难以共存基本上已达成共识,因此目前所使用双质粒体系多为相容性双质粒体系^[16,17]。由于现在商品化的表达载体大多为 ColE1 或 pMB1 复制子,因此不易获得两种相容性质粒进行实验。传统概念中对质粒不相容性的定义是就无选择压力的情况下而言的,并未考虑到外加选择压力对质粒拷贝数的影响。当具有相同复制子的两种质粒分别具有不同的抗性时,在两种抗生素选择压力同

时存在的情况下,只有具有这两种质粒的子代细菌才能存活,理论上可以实现二者在同一细菌中的共存。我们实验结果即可证明可以实现两不相容质粒的共存,并均能有效表达所携带的外源基因。近期也有研究表明借助两种不相容性质粒可以在大肠杆菌中共表达目的蛋白^[18-20]。

本研究一方面建立了一种简便直观的检测体内 Cre/lox 重组系统的方法,可用于 Cre/lox 系统改造的研究;另一方面也证实了不相容双质粒系统可以用来实现不同蛋白质在大肠杆菌中的共表达。

参 考 文 献

- [1] Kilby N J , Snaith M R , Murray J A . Site-specific recombinases : tools for genome engineering . *Trends Genet* ,1993 **9** : 413 - 421 .
- [2] Kuhn R , Schwenk F , Aguet M , et al . Inducible gene targeting in mice . *Science* ,1995 **269** : 1427 - 1429 .
- [3] Zuo J , Nui Q W , Moller S G , et al . Chemical-regulated , site-specific DNA excision in transgenic plants . *Nat Biotechnol* 2001 **19** : 157 - 161 .
- [4] Joubes J , De Schutter K , Verkest A , et al . Conditional , recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures . *Plant J* 2004 **37** : 889 - 896 .
- [5] Hoess R H , Wierzbicki A , Abremski K . The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination . *Nucl Acids Res* ,1986 **14** : 2287 - 2300 .
- [6] Lee G , Saito I . Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination . *Gene* ,1998 **216** : 55 - 65 .
- [7] Siegel R W , Jain R , Bradbury A . Using an *in vivo* phagemid system to identify non-compatible loxP sequences . *FEBS Lett* 2001 **499** : 147 - 153 .
- [8] Langer S J , Ghafoori A P , Byrd M , et al . A genetic screen identifies novel non-compatible loxP sites . *Nucl Acids Res* 2002 **30** : 3067

- 3077 .
- [9] Schnütgen F , Doerflinger N , Calléja C , et al . A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse . *Nat biotechnol* 2003 **21** : 562 - 565 .
- [10] Sauer B . Multiplex Cre/lox recombination permits selective site-specific DNA targeting to both a natural and an engineered site in the yeast genome . *Nucl Acids Res* ,1996 **24** : 4608 - 4613 .
- [11] Thyagarajan B , Guimaraes M J , Groth A C , et al . Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites . *Gene* ,2000 **244** : 47 - 54 .
- [12] Rüfer A W , Sauer B . Non-contact positions impose site selectivity on Cre recombinase . *Nucl Acids Res* 2002 **30** : 2764 - 2771 .
- [13] Ghosh K , Van Duyne G D . Cre-loxP biochemistry . *Methods* 2002 **28** : 374 - 383 .
- [14] 王立霞 , 张珠强 , 胡晓倩 , 等 . cre 基因在大肠杆菌中的表达及表达蛋白活性的检测 . *生物工程学报* 2002 **18** : 497 - 500 .
- [15] 贾洪革 , 吕玲飞 , 庞永奇 , 等 . 用绿色荧光蛋白监测转基因植物中选择标记基因的消除 . *生物工程学报* 2004 **20** : 10 - 15 .
- [16] Sun L , Ghosh I , Paulus H , et al . Protein trans-splicing to produce herbicide-resistant acetolactate synthase . *Appl Environ Microbiol* , 2001 **67** : 1025 - 1029 .
- [17] Wang H , Chong S . Visualization of coupled protein folding and binding in bacteria and purification of the heterodimeric complex . *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 **100** : 478 - 83 .
- [18] 杨 巍 , 张 岚 , 卢智刚 , 等 . 利用两种不相容质粒在大肠杆菌中共表达 DFF45 和 DFF40 . *生物化学与生物物理学报* , 2001 **33** : 238 - 242 .
- [19] 范立强 , 袁勤生 , 吴祥甫 . 双质粒系统共表达大肠杆菌肉碱脱水酶基因 *caiB* 及其辅酶合成基因 *caiE* . *生物化学与生物物理学报* 2002 **34** : 104 - 108 .
- [20] Pashley C A , Parish T , McAdam R A , et al . Gene replacement in mycobacteria by using incompatible plasmids . *Appl Environ Microbiol* 2003 **69** : 517 - 523 .

A simple and visible assay for cre recombinase activity in *Escherichia coli* by using two incompatible plasmids

PANG Yong-qi^{1,2} JIA Hong-ge¹ FANG Rong-xiang¹ GUO Ai-guang² CHEN Xiao-ying^{1*}

(¹National Key Laboratory of Plant Genomics , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

(²College of Life Sciences , Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry , Yangling 712100 , China)

Abstract : The Cre/loxP system derived from bacteriophage P1 is widely used to carry out complex manipulations of DNA molecules both *in vitro* and *in vivo* . In order to further characterize and modify the Cre/loxP system , a convenient method for assaying the recombination efficiency is needed . A simple and visible assay is described , in which two incompatible plasmids , separately carrying the cre gene and loxP-flanked *gfp* gene , were co-transferred into *E. coli* . The cre gene was inserted into a kanamycin-resistant bacterial expression vector , designated pET30a-Cre . The *gfp* gene , flanked by directly repeated loxP sites , was cloned into an ampicillin-resistant expression vector to generate pET23b-loxGFP . *E. coli* BL21(DE3) was cotransformed with pET30a-Cre and pET23b-loxGFP , and cultured in the presence of both ampicillin and kanamycin . Under UV illumination , the Cre-mediated recombination events can be easily detected . The fidelity of recombination was verified by SDS-PAGE analysis and restriction analysis followed by DNA sequencing . Thus , this cotransformation method provides a straightforward assay that can be used to modify the Cre/loxP system .

Key words : Cre recombinase , Cotransformation , Incompatible plasmids , Green fluorescent protein

Foundation item : National Programs for High Technology Research and Development of China (2002AA227031)

* Corresponding author . Tel : 86-10-62522109 ; E-mail : xiaoying@hotmail.com

Received date : 05-10-2004