

cre 基因在大肠杆菌中的表达及表达蛋白活性的检测

王立霞¹ 张珠强¹ 胡晓倩² 胡鸢雷¹ 高音¹ 林忠平^{1*}

(¹北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室; ²北京大学生物及分子生物学系 北京 100871)

摘 要 Cre 重组酶来自噬菌体 P1, 可以识别特异的 loxP 位点的 DNA 序列, 并进行专一性的剪切和拼接。利用 PCR 技术将 cre 基因克隆至原核表达载体 pET-29a, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 得到了高效表达。采用 DEAE-52 柱层析的方法对表达蛋白进行了纯化。体外生物学活性检测表明, 表达蛋白对含有同向 loxP 位点的质粒有切割活性。

关键词 Cre 重组酶, 基因表达, 剪切活性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0497-04

Cre 重组酶是来源于噬菌体 P1 的 cre 基因编码的一个 38.5kD 的蛋白, 是位点特异性重组酶中最重要和应用最广泛的一种重组酶^[1]。该酶是 cre/loxP 定位重组系统的关键因子, 其活性的大小直接影响到重组效率的高低。它可以识别一段 34bp 的 loxP 位点, 不需其它蛋白质、DNA 等辅助因子和额外能量的参与, 便可在体内对线性、环状、甚至超螺旋的 DNA 分子进行重组反应^[2]。正是由于这种简单高效的作用方式, Cre/loxP 定位重组系统在遗传操作中发挥了重要的作用。该系统在 Cre 重组酶的介导下, 可使特定的 DNA 片段从基因组中有效地切除、倒位, 亦可造成 DNA 片段定点的整合: 当 2 个 loxP 位点方向相同, loxP 位点间的 DNA 片段被删除; 当 2 个 loxP 位点方向相反时, loxP 位点间的 DNA 片段被倒位; 如果两个 loxP 位点不在同一分子上, 比如一质粒上带有一个 loxP 位点, 而在某染色体上还有一个 loxP 位点, 那么在 Cre 重组酶的介导下, 质粒 DNA 便可整合到染色体上 loxP 所在位置^[3,4]。近年来, 该系统已成为分子生物学研究的有力工具, 它可用于控制外来基因的行为、精确研究基因的功能、分离新的基因等^[5-7]。本文在大肠杆菌中成功地表达了 Cre 重组酶基因, 并在体外对表达产物的生物活性进行了检测。该研究将为 Cre 重组酶结构与功能的研究提供便利, 为 Cre 重组酶的体外应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 *E. coli* DH5 α 及 BL21(DE3), 本实验室保存。pET-29a 是带有 T7 启动子的原核表达质粒, 本实验室保存。pMM23 质粒由美国农业部 David ow 馈赠。pGLGFP 质粒带有两个同向的 loxP 位点, 由本实验室构建保存。

1.1.2 酶和试剂: 限制酶 *Bgl* II、*Nde* I 及 T4 DNA 连接酶、pGEM-T Easy vector 均购自 Promega 公司; Taq Plus 购自鼎国公司; 玻璃奶回收试剂盒购自原平皓公司; DEAE-52 纤维素层析介质购自 Whatman 公司; IPTG 购自 Merck 公司, 其他均为 Sigma 公司或国产分析纯生化试剂。

1.1.3 PCR 引物:

P1 5' CGA TATA CAT ATG TCC AAT TTA CTG ACC GTA CAC 3'
Nde I

P2 5' TCG AGA TCT TGC TAA TCG CCA TCT TCC AG 3'
Bgl II

PCR 引物由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的酶切、连接、转化等常规分子生物学操作按文献 [8] 进行。

1.2.2 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 P1 和 P2。用此引物, 以质粒 pMM23 为模板进行 PCR 扩增。

PCR 扩增参数为 :94℃ ,5min ;94℃ ,30s ;56℃ ,1min ;72℃ ,1min ,25 个循环 ;最后 72℃ 延伸 10min。PCR 扩增完毕后 ,电泳检测并用 DNA 纯化 kit——玻璃奶回收 1kb 的 PCR 产物。通过 T-A 克隆法将 PCR 产物克隆至 pGEM-T Easy 载体中 ,重组质粒 (命名为 pTeasy-cre) 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 ,在含有氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上筛选阳性克隆。重组质粒经 PCR 和酶切分析正确后 ,送上海博亚公司测序。

用 *Nde* I 和 *Bgl* II 双切 pTeasy-cre 和原核表达载体 pET-29a ,分别回收 1kb 的 *cre* 基因片段和载体 pET-29a 5.3 kb 的片段。在 T4 连接酶的作用下 ,将 *cre* 基因片段亚克隆到原核表达载体 pET-29a 中 ,转化大肠杆菌 DH5 α ,构建含 *cre* 基因片段的原核表达载体 pET-cre。

1.2.3 *cre* 基因在原核表达载体中的表达 :将构建好的重组质粒 pET-cre 转化子转化 *E. coli* 宿主菌 BL21(DE3) ,挑取单克隆分别接种含相应抗生素的液体 LB 培养基中。37℃ 过夜振荡培养后 ,以 1:100 分别稀释至含 Kan(50mg/L) 的 LB 培养基中 ,37℃ 振荡培养至 OD 值为 0.4~0.6 ,加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1mmol/L ,37℃ 继续培养 4h 后 ,4℃ 5000g 10min 离心收集菌体。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测 *cre* 基因在原核表达载体中的表达情况。

1.2.4 表达产物的可溶性分析 :用缓冲液悬浮经 IPTG 诱导的 pET-cre 的菌体 ,超声波破碎后 ,4℃、10000g 离心 10min ,分别收集上清液和沉淀。SDS-PAGE 检测表达蛋白是否以可溶的形式存在。将 *cre* 基因在 pET-29a 载体中的表达蛋白命名为 CRE。

1.2.5 表达蛋白的分离纯化 :将表达的菌体收集后 ,用 0.05mol/L 的 Tris-HCl (pH7.8) 缓冲液悬浮 ,经超声波破碎 ,离心后的上清液为待纯化样品。纯化采用阴离子纤维素交换层析 ,DEAE-52 的处理方法参考文献 [9] 将处理好的 DEAE-52 装柱 ,用 0.05mol/L 的 Tris-HCl (pH7.8) 缓冲液平衡 4-5 个柱体积 ,将待纯化样品上柱 ,用相同的缓冲液流洗至基线 ,然后改用含 1mol/L NaCl 的 0.05mol/L 的 Tris-HCl (pH7.8) 缓冲液进行线性梯度洗脱 ,流速 0.8mL/min ,自动部分收集器收集洗脱样品 ,5min 收集一管 ,备电泳检测和生物学活性的检测。

1.2.6 表达蛋白生物学活性的检测 :活性检测采用体外测定的方法。用表达蛋白来切割含有同向 loxP 位点的质粒——pGLGFP (图 1) ,于 37℃ 切 30min (具

体作用条件另文发表) ;然后 70℃ 保温 10min ,以使表达蛋白变性 ;用酚/仿抽提 2 次 ,乙醇沉淀质粒 ;再用 pGLGFP 中 loxP 位点外侧的 *Cla* I 酶 (在 pGLGFP 质粒上仅有一个切点) 单切上述质粒 ,37℃ 酶切 2h ,琼脂糖电泳检测酶切结果。

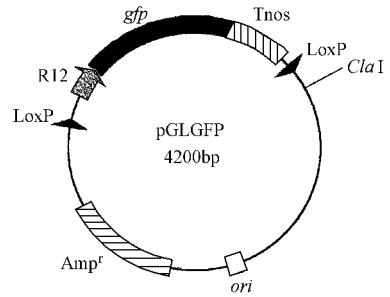


图 1 质粒 pGLGFP 的结构图

Fig. 1 Construction of plasmid pGLGFP

2 结果与分析

2.1 原核表达质粒的构建

采用 PCR 技术从 pMM23 质粒扩增 1kb 的 *cre* 基因片段 ,克隆至载体 pGEM-T Easy 中。经测序 ,与已报道序列一致^[10]。进而构建了原核表达质粒 pET-cre (图 2)。

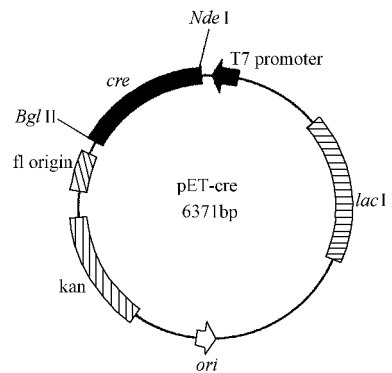


图 2 原核表达质粒 pET-cre 结构图

Fig. 2 Construction of plasmid pET-cre

2.2 *cre* 基因在原核表达载体中的高效表达

含有质粒 pET-cre 的大肠杆菌经 IPTG 诱导表达 4h ,收集菌体进行 SDS-PAGE (分离胶的浓度为 12%)。考马斯亮蓝染色的结果见图 3。从电泳图谱上可以看出 ,经 IPTG 诱导后 ,含有质粒 pET-cre 的大肠杆菌在分子量 38kD 处有一条明显的蛋白表达带 ,表达量约占总蛋白的 30%。由此可见 ,*cre* 基因在 pET-29a 这一载体中得到了高效表达。

2.3 表达蛋白的纯化

表达的菌体经超声波破碎 ,离心后蛋白质电泳结果表明表达蛋白主要以可溶的形式存在。CRE

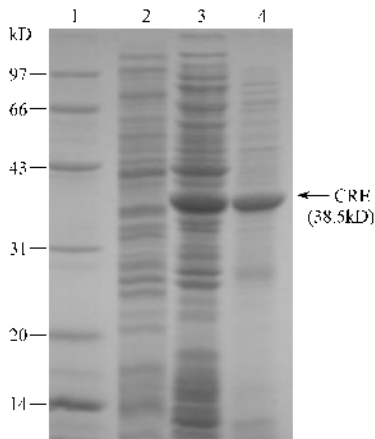


图 3 *cre* 基因表达产物的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE of expression product of *cre* gene

1. Protein Marker 2. Non-induced 3. IPTG-induced 4. Purified products

的纯化采用 DEAE-52 柱层析的方法,洗脱曲线如图 4。样品经盐梯度洗脱,得到洗脱峰 I、II。电泳检测发现 CRE 在峰 I 的洗脱液中;经该柱层析纯化后,CRE 的纯度达 80% 以上(图 3)。

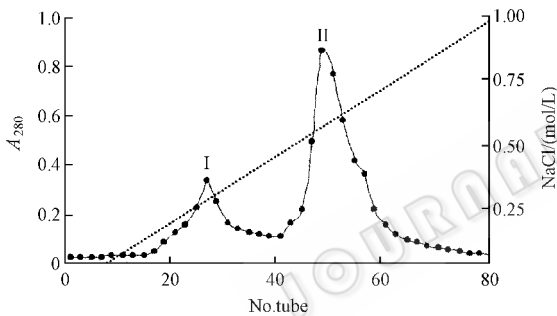


图 4 表达蛋白 CRE 的 DEAE-52 柱层析图

Fig.4 CRE purified by DEAE-52 chromatography

2.4 表达产物的活性检测

用 *cre* 基因的表达蛋白来切质粒 pGLGFP(图 5) 结果在载体 pET-29a 中表达的 CRE 有切割活性。在 CRE 的作用下,部分的质粒 pGLGFP(4.2kb)被酶切为不含 *gfp* 基因的 3.1kb 的质粒和一个含有 *gfp* 基因的 1.1kb 的片段;然后在 *Cla* I 的作用下,未被 CRE 酶切的质粒和 3.1kb 的质粒分别被单切为 4.2kb 和 3.1kb 的线性片段。这样经 CRE 和 *Cla*I 双切,质粒 pGLGFP 被切成 4.2kb、3.1kb 和 1.1kb 3 条带。而在仅用 *Cla* I 单切的对照试验中,质粒 pGLGFP 仅被单切为 4.2kb 的线性片段。另外活性检测过程中,我们将 CRE 酶切后不含 *gfp* 基因的 3.1kb 的 DNA 回收,直接转化大肠杆菌,得到了许多转化菌落,提取质粒后用 *Cla* I 单切,均能切出 3.1kb 的一条带,由此证明该 DNA 以质粒形式存在。

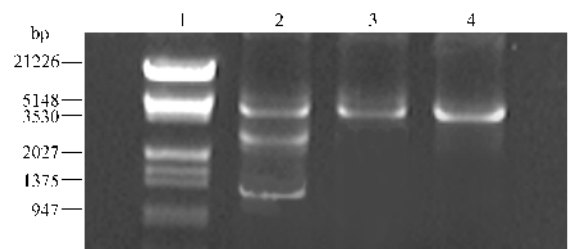


图 5 质粒 pGLGFP 的酶切图谱

Fig.5 Plasmid pGLGFP digested by CRE and *Cla* I

1. Marker(λ DNA/*Hind* III + *Eco*R I); 2. pGLGFP(CRE + *Cla* I); 3 4. pGLGFP(*Cla* I)

3 讨论

当克隆技术被利用以来,大多数克隆载体都以大肠杆菌作为它们的宿主。大肠杆菌由于具备操作简易和能在廉价培养基上生长的特性和优点,成为用于表达多种蛋白的理想工具,这也为研究蛋白质的结构与功能提供了便利。本文选用大肠杆菌的高效表达载体 pET-29a 作为接受载体,*cre* 基因得到了高效表达,蛋白的表达量约占总蛋白的 30%。而国外的学者大多将 *cre* 基因克隆到表达载体 pRK 中,蛋白表达量为总蛋白的 7% 左右^[1]。Cre 重组酶在大肠杆菌的大量表达,将为其结构与功能研究提供便利,同时还有助于更好地进行 Cre 重组酶的体外应用研究。

在实验过程中,我们利用 pET-cre 的菌细胞破碎后的上清,未经纯化而直接进行活性检测,结果质粒 pGLGFP 被全部降解,分析原因可能是由于破碎后的上清液中有降解质粒的核酸酶存在。用 DEAE-52 柱层析对 Cre 重组酶进行了部分的纯化,纯化后的 CRE 对质粒 pGLGFP 有很好的切割活性;由此可以推测,此步的纯化可能已去除了核酸酶。

Cre 重组酶的重组过程是可逆的^[10]。在其作用下,带有同向 *loxP* 位点的质粒被切割成两部分——含有一个 *loxP* 位点的质粒和带有另一个 *loxP* 位点的片段;这时两个 *loxP* 位点位于不同的分子上,在 Cre 重组酶的作用下,还可以发生分子间的整合,于是又形成了原来的质粒 pGLGFP,因此 Cre 重组酶的重组过程是一个可逆的动态平衡过程。本研究得到的结果恰好证实了这一作用原理,从图 5 可以看出,Cre 重组酶对质粒 pGLGFP 的切割效率只有 50% 左右,研究中发现即使增加 Cre 重组酶的用量或延长作用时间,其作用效率也基本上没有变化。

REFERENCES(参考文献)

- Purification and properties of the Cre recombinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1984, **259**:1509 ~ 1514
- [2] Guo F, Gopaul D N, Van D. Structure of cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*, 1997, **389**:40 ~ 46
- [3] Lee G, Satio I. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene*, 1998, **216**:55 ~ 65
- [4] Dell J, Russell S H. Use of site-specific recombination systems in plants. In: Homologous recombination and gene silencing in plants, 1994, pp219 ~ 270
- [5] Sunaga S, Maki K, Komagata Y *et al.* Efficient removal of loxP-flanked DNA sequences in a gene-targeted locus by transient expression of cre recombinase in fertilized eggs. *Molecular Reproduction and Development*, 1996, **46**:109 ~ 113
- [6] Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre-lox system. *Methods*, 1998, **14**(4):381 ~ 392
- [7] Fukushige S *et al.* Trapping of mammalian promoters by Cre-lox site-specific recombination. *DNA research*, 1996, **3**:73 ~ 80
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (2nd ed), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998
- [9] ZHANG L X (张龙翔), ZHANG T K (张庭芳), LI L Y (李令媛). *Experimental Methods and Technologies on Biochemistry* (生物化学实验方法和技术), Beijing: Higher Education Press, 1997
- [10] Kilby N J, Snaith M R, Murray J A. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genetic*, 1993, **9**(12):413 ~ 421

Expression of cre Gene in *Escherichia coli* and Bioassay Its Expression Product

WANG Li-Xia¹ ZHANG Zhu-Qiang¹ HU Xiao-Qian² HU Yuan-Lei¹ GAO Yin¹ LIN Zhong-Ping^{1*}

¹(National Key Laboratory of Protein Engineering and Plant Molecular Biology of Peking University,

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing 100871, China)

Abstract The Cre recombinase from bacteriophage P1 can recognize specific DNA sequences, cleave DNA at specific target sites, and then ligate it to the cleaved DNA of a second site. In this study, cre gene was cloned into the pGEM-T Easy vector via PCR procedure. Then the cre gene was inserted into an expression vector pET-29a and expressed in *E. coli* BL21(DE3). A 38kD soluble protein was expressed and named CRE. CRE was purified by DEAE-52 chromatography. Bioassay of the partially purified product showed that CRE can cleave the plasmid pGLGFP which contains two loxP sites with the same direction.

Key words Cre recombinase, gene expression, DNA cleavage

Received: 02-28-2002

This work was supported by Grant from the State 863 High Technology R&D Project of China (No. 010-04-03-01).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62753062; Fax: 86-10-62759652; E-mail: linzp@pku.edu.cn

骨髓干细胞的多能性及其应用

《成年人骨髓干细胞研究》在上期《生物工程学报》(2002, No.3)已作了简介,这里再作些补充。骨髓干细胞的多能性,可以说是组织工程种子细胞的重要来源,对它的研究开发有着非常重要的实用价值。(1)具有分化为骨骼的潜力:日本奈良县医科大学与日本产业技术研究所研究人员用骨髓干细胞(指间质干细胞)于体外培养再生骨骼,并首次用于移植手术实验取得成功,未发生排异反应;在日本,也有用非骨髓干细胞即蚕茧的丝蛋白高效率培养软骨细胞的报道。(2)培育并分化为神经细胞:德国埃森大学一个科研小组成功地从人体骨髓中培育神经细胞,将其植入患者体内不产生排异反应。研究者首先是从骨髓中分离出成人干细胞,随后在培养过程中使其分化能力扩大,最终培育出神经细胞;也有可能使骨髓干细胞分化成各种用途的细胞或组织;用老鼠的骨髓在大脑中发育成类似的神经细胞;在加拿大,研究人员用实验鼠骨髓干细胞培育成心肌细胞,将有望用于人心脏病治疗,这些基础研究均需要加强。(3)造血干细胞(Hematopoietic stem cell,简称HSC)通常指骨髓中的干细胞,它的前体远祖细胞来自骨髓,造血干细胞和骨髓干细胞(指间质干细胞,Matrix stem cell)分别在脑组织环境中能分化出神经细胞,这是一方面;另一方面,特别是后者更具有分化的多能性,有可能分化出造血细胞、骨骼或软骨、肌肉、脂肪、肝细胞和脑组织的星状细胞等等。

总之,骨髓干细胞的多能性有其巨大的潜能,这样使研究开发多种组织器官成为可能,为临床用于移植手术展现了光明的未来。