

Cre/*loxP*位点特异性重组系统在植物中应用的研究进展

孙家利, 闫晓红, 王力军, 魏文辉

(中国农业科学院油料作物研究所基因组学与分子生物学研究室/农业部油料作物生物学重点开放实验室, 武汉 430062)

摘要: Cre/*loxP*位点特异性重组系统自发现以来, 在植物基因重组领域得到了广泛应用, 已成为提高转基因植物安全性的有效方法。本文介绍了该系统的基本概况及其在转基因植物表达载体构建方面的应用, 尤其是在基因删除、定点整合、多基因表达以及杂种优势利用等方面的应用做了重点阐述。

关键词: Cre/*loxP*系统; 位点特异性重组; 转基因; 载体构建

Progress in the Application Study of Cre/*loxP* Site-Specific Recombination System in Plants

SUN Jia-li, YAN Xiao-hong, WANG Li-jun, WEI Wen-hui

(Department of Genomics and Molecular Biology, Oil Crops Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Oil Crop Biology of the Ministry of Agriculture, Wuhan 430062)

Abstract: The Cre/*loxP* site-specific recombination system has been widely applied to gene recombination in plants, and it has become a powerful tool to enhance the safety of transgenic plants. The present review describes an overview of the basic profile of Cre/*loxP* system and its applications in the construction of plant expression vector, especially in gene deletion, site-specific gene integration, multi-gene expression and heterosis application.

Key words: Cre/*loxP* system; site-specific recombination; transgene; construction of vector

0 引言

位点特异性重组技术是通过 DNA 特定序列进行准确切割和重新连接, 从而在基因或染色体水平上对生物进行遗传改造的一种技术。位点特异性重组系统为双组分系统, 由位点特异性重组酶基因及其特异性识别位点组成。该系统有多种类型, 如 Cre/*loxP* 系统、FLP/*FRT* 系统、R/RS 系统以及 I/Sce I 系统等, Cre/*loxP* 系统的应用最为广泛。Cre/*loxP* 系统中的 Cre 重组酶专一地识别由 34 个碱基对组成的特异序列 (*loxP* 位点), 使 2 个片段之间的基因或 DNA 序列发生重组, 在植物中介导的重组频率可高达 100%^[1]。Cre/*loxP* 位点特异性重组系统自 1981 年从 P1 噬菌体中发现以来, 越来越受到科研工作者的青睐, 人们利用 Cre/*loxP* 系统对基因的敲除、激活、倒转和易位等

特性, 将其成功应用于植物表达载体构建中, 使该系统能够进行定点基因插入、控制转入基因的拷贝数、进行组织特异性表达、按照人们的意愿定时对目的基因进行表达启动与关闭等^[2]。本文就 Cre/*loxP* 位点特异性重组系统在转基因植物定点整合、基因删除、多基因植物表达载体构建、人工雄性不育及恢复系创建等方面的应用研究进展进行了概述。

1 Cre/*loxP*位点特异性重组系统

在重组酶的催化下, 2 段 DNA 序列的特异位点发生整合并共价连接, 称之为位点特异性重组。Steinberg 等^[3]首先在大肠杆菌噬菌体 P1 中发现 Cre/*loxP* 位点特异性重组系统由 Cre 重组酶和 *loxP* 位点 2 部分组成。Cre 重组酶是一种由 343 个氨基酸组成的单体蛋白, 属于 λ Int 酶超基因家族。它不仅具有催化活性, 而且

收稿日期: 2009-09-07; 接受日期: 2009-12-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30671312)、武汉市青年科技晨光计划项目 (200750731300)

作者简介: 孙家利, 硕士研究生。Tel: 027-86722567。通信作者魏文辉, 副研究员, 博士。Tel/Fax: 027-86817881; E-mail: whwei@oilcrops.cn

与限制酶相似，能识别特异的 DNA 序列，即 *loxP* 位点，使 *loxP* 位点间的基因序列被删除或重组。*Cre* 重组酶有 70% 的重组效率，不借助任何辅助因子，可作用于多种结构的 DNA 底物，如线形、环状甚至超螺旋 DNA^[4-5]。该蛋白由较小的 N-末端和较大的 C-末端 2 个结构域组成，N-末端与 *loxP* 位点的识别有关。C-末端具有一个“Arg-His-Arg-Tyr”的四联体结构，是 *Cre* 基因的活性中心，与 DNA 的结合及 DNA 的切割有关^[6]。*Cre* 酶的特异识别位点 *loxP* 是一种典型的回文序列结构，长 34 bp，由 2 个 13 bp 的反向重复序列和 8 bp 的非对称间隔序列构成^[7]。8 bp 的间隔序列同时也确定了 *loxP* 的方向。*Cre* 酶在催化 DNA 链交换过程中与 DNA 共价结合，13 bp 的反向重复序列是 *Cre* 酶的结合域。其序列如下：

5'-ATAACTTCGTATA-ATGTATGC-TATACGA
AGTTAT-3';

3'-TATTGAAGCATAT-TACATACG-ATATGCT
TCAATA-5'.

重组反应是在 DNA 的 2 个 *loxP* 位点间进行，整个过程没有 DNA 的合成和丢失。重组反应既可以发生在体内、体外的细胞中，也可以在无细胞体系中进行。*Cre/loxP* 重组的作用机制是一个识别、切割、重组、连接、分离的过程，其过程如图 1 所示^[8]。*Cre* 重组酶先和 DNA 结合，但开始结合力较弱，当遇到 *loxP* 位点时结合力大大增强。其 C-末端保守的酪氨酸（Tyr-324）与 DNA 分子的 3'-PO₄ 共价结合形成 3'-磷酸酪氨酸，导致 DNA 链的切割，切割后产生的 5'-OH 既可与同一断裂部位的 3'-PO₄ 结合恢复为原来

的构型，也可与另一切割部位的 3'-PO₄ 结合，发生链的交换，形成一个“Holliday 结构”的中间产物，继而产生结构的异构化，这时第一次切割的 2 个 *Cre* 酶不再起切割作用，而是由另外 2 个 *Cre* 酶进行第二次链的切割和交换，去掉中间产物发生重组。

Cre/loxP 系统可以介导位点特异性的插入、倒位、易位、切除等，且 *Cre* 重组酶介导 2 个 *loxP* 位点间的重组是一个动态、可逆的过程。根据 2 个 *loxP* 位点是否位于同一分子及 *loxP* 位点方向不同，可以分成 3 种情况：（1）2 个 *loxP* 位点处于同一分子并方向相反时，2 个 *loxP* 位点间的 DNA 片段重组后发生倒位；（2）2 个 *loxP* 位点处于同一个分子并方向相同时，2 个 *loxP* 位点之间的 DNA 片段重组后被剔除；（3）2 个 *loxP* 位点在不同分子上，则可使 DNA 发生交换或易位（图 2）^[9]。

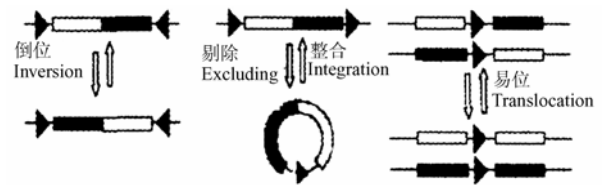


图 2 *Cre/loxP* 位点特异性重组系统的重组模式^[9]
Fig. 2 Recombination pattern of *Cre/loxP* site-specific recombination system

另外，*Cre* 不仅可以识别 *loxP* 的 2 个 13 bp 的反向重复序列和 8 bp 的间隔区域，而且当一个 13 bp 的反向重复序列或者 8 bp 的间隔区发生改变时仍能识别并发生重组^[10]。利用这一特点，人们在构建载体时可以根据需要改造 *loxP* 位点序列，以用于特定的基因突变或修复，拓宽了该系统的应用范围。

2 利用 *Cre/loxP* 系统进行转基因定点整合及控制转基因整合的拷贝数

当外源基因被导入受体植物中后，不同转基因植株中其表达水平常有很大差异，这主要是由于外源基因在受体植物基因组内插入位点不同而造成，即所谓的“位置效应”。为消除位置效应，使外源基因都能够整合在植物基因组的转录活跃区，在目前的表达载体构建策略中通常会考虑到核基质结合区以及定点整合技术的利用。

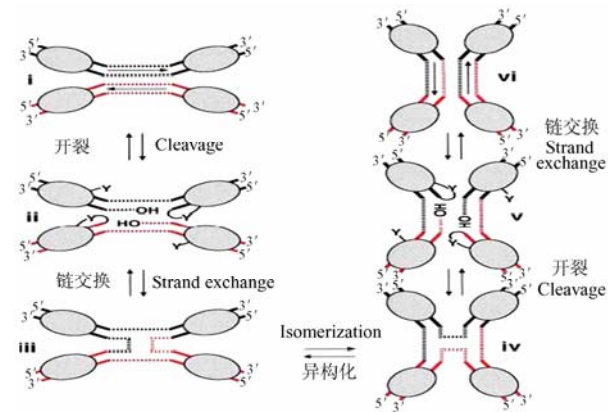


图 1 *Cre/loxP* 位点特异性重组系统的作用机制^[8]
Fig. 1 The mechanism of *Cre/loxP* site-specific recombination system

定点整合技术的主要原理是当转化载体含有与宿主染色体同源的 DNA 片段时, 外源基因可以通过同源重组定点整合于染色体的特定部位。实际操作时首先要分离染色体转录活性区域的 DNA 片段, 然后构建植物表达载体。在微生物的遗传操作中, 同源重组定点整合已成为一项常规技术, 在动物中外源基因的定点整合已获得成功, 而在植物中同源重组的频率很低, 只有 10^{-3} — 10^{-6} ^[11], 这种低频率限制了同源重组在转基因植物中的应用。Cre/loxP 位点特异性重组系统既可以提高外源基因的整合效率, 又可以提高整合位置的准确性, 可实现外源基因与植物基因组间的重组与定点整合, 在植物转基因中已有很多成功的报道。

1995 年 Albert 等^[12]在烟草的原生质体中率先验证了利用 Cre/loxP 位点特异性重组系统进行外源基因定点整合的可行性, 即将目的基因构建在 2 个野生型或突变型的 loxP 位点间, 采取了置换 Cre 基因的启动子及瞬时表达 Cre 基因这 2 种策略来消除整合反应后的 Cre 基因的活性。研究结果显示, 采取启动子置换策略在突变型 loxP 中观察到整合反应, 而野生型 loxP 中则没有, 在瞬时表达 Cre 基因策略中, 突变型及野生型的 loxP 位点均观察到整合反应。

Vergunst 等^[13]报道了利用 Cre/loxP 位点特异性重组系统在拟南芥染色体中预先设定的位点上准确整合外源基因的研究。其构建了整合载体 plox-npt II-lox, 转化后, 在 Cre 酶作用下整合载体中融合有 npt II 基因的片段被删除后变成环状双链 DNA, 在 Cre 重组酶的作用下, 含有一个 loxP 位点的环状双链 DNA 与拟南芥染色体上已导入的单个 loxP 位点发生定点整合反应, 整合后利用失活 Cre 重组酶方式抑制可逆反应的进行。结果表明, 89% 的重组子发生了定点整合。

含有较少的 T-DNA 拷贝数对于基因稳定表达以及研究转基因的整合特性是非常有利的, 多拷贝的转基因与单拷贝的转基因相比, 更易于基因失活, 使转基因沉默。转基因技术在导入外源基因时, 遗传转化过程中通常在一个位置上会出现多个拷贝 DNA 片段的插入^[14], 而多拷贝的转基因又会导致功能和结构的不稳定^[15]。通过杂交减少转化株中基因拷贝数的几率比较小, 利用 Cre/loxP 系统, 可将外源基因准确整合到设定的基因组位置, 且整合的 DNA 是未发生重排的单拷贝。其原理可用图 3 来表示^[16]。多拷贝转基因最远端的重组酶识别位点, 在重组酶的催化作用下发生重组, 最终留下一个单拷贝的转基因和一个残余

的重组酶识别位点。这种方法在 Srivastava 等^[17]所做的小麦转化试验中得到证实, 在 4 个多拷贝位置利用定点整合系统都成功地实现了单拷贝插入。

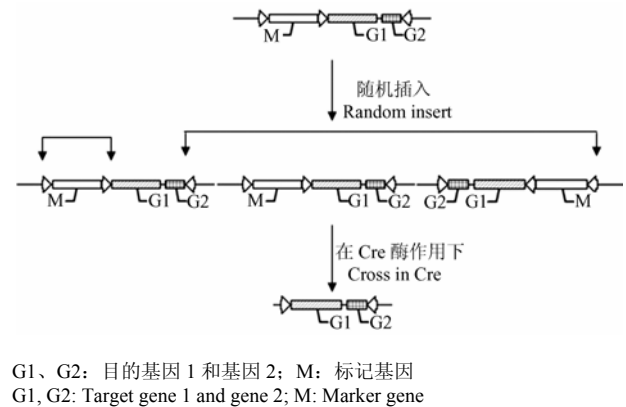


图 3 利用 Cre/loxP 系统获得单拷贝转基因的原理

Fig. 3 The principle of producing single-copy transgene using the Cre/loxP system

利用 Cre/loxP 系统, 在烟草中可获得约 1/3 的转基因植株为单拷贝插入^[12,18], 在水稻中可获得约一半的转基因植株为单拷贝插入^[19,20], 该几率远大于通过普通方法得到单拷贝转基因植株的几率^[21]。

Buck 等^[22]利用 Cre/loxP 系统有效地解决了在多个复杂 T-DNA 插入位点得到单拷贝转化子的问题, 他们构建了一个 SB-loxP-T-DNA 结构, 这个结构包含 2 个反向的 loxP 位点。7 个转化 SB-loxP-T-DNA 的植株与能表达 Cre 基因的植株杂交, 其中 3 个杂交后代是单拷贝插入, 复杂的 T-DNA 插入区域在后代分离去掉 Cre 基因后发现只有单一的 T-DNA 位点。此系统利用 Cre/loxP 解决了复杂的 T-DNA 单拷贝插入的问题, 为解决植物转化中因多拷贝产生的基因沉默现象提供了一种有效方法。

运用基因打靶技术也可以实现目的基因的定点单拷贝插入。Juan 等^[23]构建了含有 Cre/loxP 位点特异性重组框的 BIBAC 载体转化玉米, 通过单 lox 基因打靶策略实现基因的定点单拷贝插入。其主要是利用 lox 位点和同源臂实现定点插入, 利用 LoxP 突变体 lox66/lox71 提高重组效率。lox66 和 lox71 分别是左右突变体, 当在重组酶的作用下发生重组, 就会在植物基因组和载体上分别形成双突变型和野生型 lox 位点, 二者重组效率极低, 从而实现了外源基因的定点单拷贝插入。

3 利用 Cre/*loxP* 系统删除选择标记基因

自转基因技术诞生以来,有关转基因产品的安全性争论却始终没有达成共识。虽然目前尚无确切证据表明转基因食品对人体有害,但转基因作物释放到自然界后,目的基因及筛选标记基因等外源基因对自然界物种和人类本身存在着潜在的风险,如抗除草剂基因可能造就自然界的超级杂草,抗生素抗性标记基因可能造成人类对某些抗生素药物的不敏感等。因此,转基因植物的安全性问题日益受到重视,并已成为影响转基因植物产业健康发展的主要瓶颈^[24]。

目前,在解决转基因植物可能存在的安全性问题中,人们首先考虑删除的外源基因是选择标记基因(如 *NPTII* 或 *Bar* 等)。在植物遗传转化过程中,选择标记基因通常作为筛选阳性转化子的工具和目的基因一起被导入,然而一旦获得转基因植株,这些基因就失去了其功能意义,对转基因植物来说也就成为多余,而且这些标记基因的存在还可能带来生物安全性问题。另外,由于选择标记基因数量有限,这就限制了通过多次转化的方法对转基因作物进一步的改良^[25]。因此近年来一些删除选择标记基因技术先后发展起来,其中主要包括转座子方法^[26]、共转化技术^[27]和重组酶系统^[28]等。这些技术中,重组酶系统是应用较广泛、删除效率相对较高的一种,目前在转基因研究中已得到广泛的应用^[29-33]。

自 20 世纪 80 年代末期引入靶位点特异性重组 Cre/*loxP* 系统以来,由于其自身的优点,在基因删除方面越来越受到科学家的青睐和重视,去除筛选标记基因是 Cre/*loxP* 位点特异性重组系统的重要应用^[34]。笔者将其发展过程大致划分为 3 个阶段:简单删除阶段、控制删除阶段及高效删除阶段。

简单删除阶段就是将 Cre 重组酶基因和 2 个同向的 *loxP* 构建到 2 个载体上,2 个 *loxP* 之间是选择标记基因,分别转化不同植株或同一植株,即通过有性杂交或二次转化的方法删除筛选标记基因。其缺点是在转基因植物中引入了 Cre 重组酶基因,对转基因作物不利,且工作量较大,删除效率较低。Dale 等^[9]最早在烟草细胞中进行了位点特异性重组的研究,为 Cre/*loxP* 系统应用于转基因植物研究开辟了先河。Dale 等^[35]将一个嵌合体的荧光素酶 (*Luc*) 基因作为报告基因插入到含有选择标记基因 (*hpt*) 的载体中,

2 个相同方向的 *loxP* 序列位于 *hpt* (潮霉素磷酸转移酶基因) 两侧,发生在 *loxP* 间的重组使 *hpt* 被切除。Cre 重组酶基因与 *npt II* (新霉素磷酸转移酶基因) 同时连接到另一质粒上,通过第 2 次转化,进入第一次的转化体中,在 Cre 基因表达的重组酶蛋白作用下,2 个同向 *loxP* 间重组, *hpt* 被删除频率可达 90.9%; 而转 *hyg* 基因植株与转 Cre 基因植株杂交时,删除频率为 53.8%。李雷等^[36]运用 Cre/*lox* 系统共转化烟草,证明共转化烟草中确实发生了精确的定位重组。原来的 2 个 *lox* 位点在 Cre 重组酶的作用下切除中间的阻断序列,仅剩下一个 *lox* 位点, *lox* 位点及其两侧序列无一改变。Russell 等^[37]以 GUS 基因作为报告基因,将编码磺胺脲 (sulfonyleurea) 抗性的选择标记 (acetolactate synthase, *als*) 基因插入到 2 个同向 *loxP* 序列之间转化烟草,随后通过农杆菌介导的二次转化和有性杂交引入 Cre 基因,其删除频率分别为 95% 和 34.78%。通过有性杂交引入 Cre 基因后 *als* 基因被删除,转化体不再抗磺胺脲,而 GUS 基因仍然可以表达。不同的杂交 F₁ 代中,标记基因被删除的效率不同,与含有 Cre 基因的亲本有关。许多 F₁ 代个体是杂合体,所以 F₂ 代个体中仍然有一些个体对磺胺脲有抗性。相比较而言,二次转化法引入 Cre 基因,删除掉 *als* 基因的效率较高。Gleave 等^[38]利用 Cre/*loxP* 重组系统通过二次转化删除筛选标记基因,证明了通过二次转化法删除标记基因是有效的。

控制删除阶段主要策略是把 Cre 基因和选择标记基因构建在 2 个同向 *loxP* 位点间,选择特定的启动子控制 Cre 基因的表达,从而控制基因的删除。通过二次转化和有性杂交将 Cre 基因导入转化有 *loxP* 结构的植株中剔除选择标记基因,均需要通过自交分离进一步去掉重组酶基因及转化重组酶基因时所带入的另一个选择标记基因,使得无选择标记转基因作物的选育过于复杂,周期过长。针对以上缺点,研究者改变了载体构建策略,将 Cre 重组酶基因和目的基因、*loxP* 位点、选择标记基因等都构建到同一个植物表达载体上,将要删除的基因和 Cre 重组酶基因置于 2 个同向的 *loxP* 位点间,采用特异性启动子,如化学诱导或热诱导等诱导型启动子、种子或花等组织特异性启动子等,来启动 Cre 重组酶基因的表达,实现目的基因的删除^[39-42]。Zuo 等^[43]提出了一种化学诱导与特异性位点重组相结合的高效 DNA 切除系统,命名为 CLX 系统。该系统打破了“删除标记基因-引入 Cre 基因”的系统模式。Ma 等^[44]采用水杨酸诱导启动子启动 Cre

基因的表达,在转基因西红柿中删除标记基因,删除效率达到 47%。采用诱导型启动子虽然克服了以前载体构建设计的不足,但由于启动子能力不足或者重组酶表达量较小,造成删除效率普遍较低,这就在很大程度上限制了诱导删除系统在获得无选择标记转基因植物中的应用。

高效删除阶段主要是通过采用强启动子或改进载体构建策略,如在载体中连入促进重组酶和特异性位点识别或结合的序列,提高删除效率。Ex 等^[45]利用拟南芥研究了 7 种幼胚特异性启动子启动 Cre 酶基因的表达来稳定删除 *lox* 盒的效率,发现采用 *CLAVATA3* 启动子的删除效率达到了 100%,而且所报道的 7 种启动子的删除效率要比 *CaMV35S* 启动子稳定。Luo 等^[46]利用同向融合 *loxP* 与 *frr2* 个特异识别位点构成一个新的杂合识别位点 *loxPfrt*,增强重组酶蛋白 Cre 或 Flp 对识别位点序列的识别、结合以及切割作用,提高位点特异性重组酶系统在转基因植物中对外源基因的删除效率,建立了一个高效的基因删除系统。为解决转基因植物的标记基因安全性问题提供了一种目前较为有效的途径。

4 利用 Cre/loxP 系统改进表达载体

传统的载体构建步骤繁琐,且常因找不到合适的酶切位点而使其应用受到限制。王文棋等^[47]利用 Cre/loxP 系统将 2 个同向 *loxP* 之间的 DNA 片段删除,并将 2 个环状 DNA 分子整合为一个大分子,成功将其引入到载体构建中,使繁琐的酶切连接反应变为简单的酶促反应,为植物表达载体的构建提供了新思路。但该方法目前还处于探索阶段,有效重组率较低,许多条件还有待改善。

植物的生理功能都是依靠多个基因的协调作用来实现,因此,如果想通过转基因方法获得能合成特定物质或者具特定生理特征的植株,就需将全部相关基因转化入同一植株中。植物多基因转化通常采用构建多基因表达载体的方法,并通过一次转化来实现,即多基因单载体转化法。而目前构建植物多基因表达载体所采用的方法,是利用多克隆位点中的内切酶位点,将所需的数个基因逐个连入同一个载体中。可是采用这种方法存在着多克隆位点中合适的内切酶位点有限的问题,因此,目前的多基因共转化大多只能转化 2—3 个基因。

Lin 等^[48]将 Cre/loxP 重组系统引入多基因表达载体的构建中,实现了多个目的基因在载体上的插入,

替代了传统的酶切连接法,避免了有限内切酶位点所带来的局限。整个系统分为 3 个部分:受体载体 pYLTAC747、供体载体 pYLVS 和 pYLSV、及含有 Cre 重组酶基因的大肠杆菌 NS3529。其过程是先将目的基因及启动子构建到 2 个供体载体上,之后将供体载体上带有的目的基因依次组装到受体载体 pYLTAC747 上。其基本过程如下:第 1 轮循环是 pYLVS-基因 1 和 pYLTAC747 共转化大肠杆菌 NS3529,使 2 种质粒在其细胞内发生重组整合。用卡那霉素和氯霉素双抗筛选,再混收质粒转化到 DH10B,得到共整合质粒 pYLTAC747-VS-基因 1,用 *I-Sce I* 切除 pYLVS 骨架,有约 2 kb 的供体载体片段切离,用 T4 DNA 连接酶把整合载体和人工合成的寡核苷酸接头 LS(内设有 1 个 *Not I* 切点)连接成环状质粒,转化 DH10B,先用含卡那霉素的培养基选择抗卡那霉素的克隆,再用含氯霉素的培养基,鉴定出不抗氯霉素的克隆,这一步骤完成后获得新质粒 pYLTAC747NH-基因 1,用 *Not I* 进行酶切鉴定。此质粒依靠供体载体又重新引回 *PI-Sce I* 位点,成为第 2 轮循环的受体载体,依此类推,可得到整合了多个基因的植物表达载体。Lin 等^[48]已成功利用这套系统将 10 个外源基因转化入水稻基因组中。继此之后,其它多基因植物表达载体也相继构建完成^[49-50]。

5 利用 Cre/loxP 系统创建人工雄性不育系及恢复系

杂种优势是生物界一种普遍现象,利用杂种优势大幅度提高作物产量是 20 世纪作物育种的一个重大突破。杂交玉米、杂交水稻、杂交油菜的育成和推广足以说明杂交育种的意义。对于一些自花授粉作物和常异花授粉作物,由于其花器小,人工去雄操作费时、费工,而且所得种子也较少,难以在生产上应用。利用天然杂交制种又由于杂交率不高,影响子一代杂种的整齐率及增产效果。因此,创建雄性不育系和恢复系则成为杂种优势利用的有效途径。但常规育种中获得的雄性不育系常存在难以鉴定的植物表型、育性不稳定及不育性容易丢失等缺点和限制因素。利用转基因方法创造不育系的途径有很多种^[51],自 1990 年 Mariani 等^[52]利用基因工程技术获得雄性不育系以来,基因工程雄性不育系的创建和利用开始显示出广阔的应用前景。

在基因工程雄性不育研究中,一些科研工作者把

Cre/loxP 位点特异性重组系统运用其中。早在 2005 年,德国拜耳公司 (Bayer) 和美国阿美拉达赫斯公司 (Hess) 就通过 Cre/loxP 位点特异性重组系统使转 *barnase* 的不育烟草育性得以恢复。Liu 等^[53]利用 Cre/loxP 位点特异性重组系统和 *barnase*, 将 2 个同向 loxP 位点放在 *barnase* 两端, 采用烟草花药绒毡层启动子 TA-29 启动 *barnase* 的表达, 成功得到了辣椒的不育系和恢复系。另外, 当利用重组酶识别 2 个同向的识别位点时, 则对识别位点之间的 DNA 片段进行精确删除, 利用该系统可使一个被阻断的基因重新恢复功能的特性, 将 Cre 基因与特定花粉启动子构成嵌合基因, 同时构建将阻遏片段置于 loxP 位点之间, 其后连有细胞毒性基因如 *barnase* 的以花粉启动子驱动的嵌合基因, 将它们分别转化具有优良农艺性状的农作物, 这样所得到的 2 种转基因作物都是雄性可育的, 但当它们进行杂交后, 则 Cre 重组酶特异性地识别 loxP 位点并删除位点间片段, 其 F₁ 代表现为雄性不育, 进而可将其作为杂交育种的母本应用于生产实践^[54]。

宋洪元等^[55]结合 Cre/loxP 系统和杂种一代的育种特点, 构建了反义肌动蛋白雄性不育基因表达载体 pCABARTAACT 及相应的恢复基因表达载体 pBINPLUSCre。将位于质粒 pSTAACT 中的反义肌动蛋白雄性不育基因表达盒 (含 TA29 启动子、反向插入 TA29 启动子下游的 Actin 基因及 Nos 终止子) 切下, 插入到中间克隆载体 pGloxp 的 2 个同向 loxP 位点之间, 再将上述表达盒连同 loxP 位点切下插入 pCAMBar, 获得以除草剂 Basra 为筛选剂的反义肌动蛋白雄性不育基因表达载体 pCABARTAACT。PCR 方法从溶原菌 BM25.8 基因组 DNA 扩增出 Cre 基因, 克隆测序验证无误后插入 PBI525 CaMV35S-35S 双启动子和 Nos 终止子之间, 再将表达盒切下插入 pBINPLUS 质粒相应位点, 得到恢复基因植物表达载体 pBINPLUSCre。宋洪元等^[56]还构建了雄性不育基因表达载体 pCABARTABn 和相应的恢复基因表达载体 pBINPLUSCre。雄性不育基因表达载体 pCABARTABn 含有雄性不育基因表达盒 (含 TA29 启动子、*barnase* 及 Nos 终止子)。将控制核不育的基因转化植物获得不育系, 而将 Cre 基因转化植物就可作为其恢复系, 当二者进行有性杂交时 Cre 基因被引入不育系, 不育基因被删除, 育性得以恢复。

Cre/loxP 系统由于其短小精悍、Cre 酶作用的绝对专一性及无需其它辅助因子等特点, 使其在转基因植

物遗传操作中具有无可比拟的优越性, 因此, 在转基因载体构建中值得引入该序列, 而不影响基因的正常表达与调控, Cre/loxP 的应用可为转基因的遗传调控开辟出一条全新的途径。

6 展望

尽管 Cre/loxP 系统具有其独特的优势, 但目前其应用主要限于标记基因的删除或者是外源基因的定点整合, 该系统在整合与删除方面也仍存在缺陷。虽然标记基因选择性地被切除, 使之不能在转基因植物的种子、果实等食用部位中表达, 但在 Cre 酶切口处留下了一段 34 个碱基对长的 loxP 位点, 这样就仍然含有冗余的外源 DNA 序列。该系统融合 2 个位点的反应机制还缺乏理论依据。在商业化生产应用中, 直到 2007 年, 世界上才诞生了第一个被允许进行商业化生产的该系统转基因作物^[57], 这主要是由于位点特异性重组酶有限的利用效率以及知识产权受限的缘故。尽管 Cre/loxP 系统还可用于植物其它多方面的研究, 如定位并克隆基因、研究植物的发育及生理、建立大片段物理图谱等, 但其应用均是独立的, 很少有将几种应用策略结合起来研究的报道。值得高兴的是, 近年来许多学者开始对这些问题进行更加深入的研究^[32,58]。

总之, Cre/loxP 位点特异性重组系统已使精确设计的遗传修饰成为可能, 不仅可以精确地引入外源基因, 还可以设定遗传开关在时空上控制外源基因的表达与缺失, 显示了巨大的应用前景。虽然目前其研究和应用仍存在诸多不足, 但随着技术的发展, 这一系统定会日臻完善, 其应用亦会更加广泛。

References

- [1] Odell J, Caimi P, Sauer B, Russell S. Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. *Molecular and General Genetics*, 1990, 223: 369-378.
- [2] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第2版). 北京: 科学出版社, 2002: 631-636.
Wang G L, Fang H J. *Plant Genetic Engineering(Second Edition)*. Beijing: Science Press, 2002: 631-636. (in Chinese)
- [3] Steinberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination I. recombination between loxP sites. *Journal of Molecular Biology*, 1981, 150: 467-486.
- [4] Trinh K R, Morrison S L. Site-specific and directional gene replacement mediated by Cre recombinase. *Journal of Immunological*

- Methods*, 2000, 244: 185-193.
- [5] Yang X, Huang P T, Huang C F. Progress of gene targeting in mouse. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46: 265-271.
- [6] Guo F, Gopaul D N, Van Duyne G D. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*, 1997, 389: 40-46.
- [7] Hoess R H, Abremski K. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site *loxP*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, 81: 1026-1029.
- [8] Gopaul D N, Guo F, Van Duyne G D. Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-*loxP* site-specific recombination. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 1998, 17(14): 4175-4187.
- [9] Dale E C, Ow D W. Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene*, 1990, 91: 79-85.
- [10] Aoyama M, Agari K, Sun-Wade G H, Futai M, Wada Y. Simple and straightforward construction of a mouse gene knockout vector using *in vitro* transposition reactions. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(5): e52.
- [11] Morton R, Hooykaas P J J. Gene replacement. *Molecular Breeding*, 1995, 1: 123-132.
- [12] Albert H, Dale E C, Lee E, Ow D W. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant *lox* sites placed in the plant genome. *The Plant Journal*, 1995, 7(4): 649-659.
- [13] Vergunst A C, Jansen L E T, Hooykaas P J J. Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* mediated by Cre recombinase. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(11): 2729-2734.
- [14] Assaad F F, Tucker K L, Siger E R. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22: 1067-1085.
- [15] Srivastava V, Ow D W. Single-copy primary transformants of maize obtained through the co-introduction of a recombinase-expressing construct. *Plant Molecular Biology*, 2001, 46: 561-566.
- [16] Ow D W. Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48: 183-200.
- [17] Srivastava V, Anderson O D, Ow D W. Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 11117-11121.
- [18] Day C D, Lee E, Kobayashi J, Holappa L D, Albert H, Ow D W. Transgene integration into the same chromosomal location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Development*, 2000, 14: 2869-2880.
- [19] Srivastava V, Ow D W. Biolistic mediated site-specific integration in rice. *Molecular Breeding*, 2001, 345-350.
- [20] Srivastava V, Ariza-Nieto M, Wilson A J. Cre-mediated site-specific gene integration for consistent transgene expression in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 2004, 2: 169-179.
- [21] Terada R, Urawa H, Inagaki Y, Tsugane K, Iida S. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nature Biotechnology*, 2002, 20: 1030-1034.
- [22] Buck D S, Peck I, Wilde C D, Marianac G, Nolf J, de Paep A, Depicker A. Generation of single-copy T-DNA transformants in *Arabidopsis* by the CRE/*loxP* recombination-mediated resolution system. *Plant Physiology*, 2007, 145: 1171-1182.
- [23] Juan M V, Yu W C, Han F P, Akio K, Eric M P. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize (*Zea mays*) with Cre-*lox* site specific recombination cassettes in BIBAC vectors. *Plant Molecular Biology*, 2008, 66: 587-598.
- [24] Hare P D, Chua N H. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 2002, 20: 575-580.
- [25] 陈颖, 姜鸿, 王兴智. 无选择标记基因植物转化系统研究进展. *生物工程进展*, 2001, 21(2): 4-7.
- Chen Y, Jiang H, Wang X Z. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Progress in Biotechnology*, 2001, 21(2): 4-7. (in Chinese)
- [26] Komari T, Hiei Y, Saito Y, Kumashiro T. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *The Plant Journal*, 1996, 10: 165-174.
- [27] Nakagawa Y, Machida C, Machida Y, Toriyama K. A system to induce the deletion of genomic sequences using R/RS site-specific recombination and the *Ac* transposon in transgenic rice plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102: 1136-1141.
- [28] Lyznik L A, Ryan R D, Ritchie S W, Hodges T K. Stable co-transformation of maize protoplasts with *gusA* and *neo* genes. *Plant Molecular Biology*, 1989, 13: 151-161.
- [29] Ballester A, Cervera M, Pena L. Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of the marker gene by site-specific recombination. *Plant Cell Reports*, 2006, 26: 39-45.
- [30] Cao M X, Huang J Q, Yao Q H, Liu S J, Wang C L, Wei Z M. Site-specific DNA excision in transgenic rice with a cell-permeable Cre recombinase. *Molecular Biotechnology*, 2006, 32: 55-63.

- [31] Cuellar W, Gaudin A, Solorzano D, Casas A, Nopo L, Chudalayandi P, Medrano G, Kreuze J, Ghislain M. Self-excision of the antibiotic resistance gene *nptII* using a heat inducible Cre-*loxP* system from transgenic potato. *Plant Molecular Biology*, 2006, 62: 71-82.
- [32] Hu Q, Kononowicz-Hodges H, Nelson-Vasilchik K, Viola D, Zeng P Y, Liu H B, Kausch A P, Chandlee J M, Hodges T K, Luo H. FLP Recombinase-mediated site-specific recombination in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6: 176-188.
- [33] Thomson J G, Yau Y Y, Blanvillain R, Chiniquy D, Thilmony R, Ow D W. ParA resolvase catalyzes site-specific excision of DNA from the *Arabidopsis* genome. *Transgenic Research*, 2009, 18: 237-248.
- [34] Gidoni D, Srivastava V, Carmi N. Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2008, 44: 457-467.
- [35] Dale E C, Ow D W. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88: 10558-10562.
- [36] 李 雷, 刘松梅, 胡鸾雷, 林忠平. Cre/*lox* 定位重组系统共转化烟草及其精确重组. *科学通报*, 1999, 21: 2291-2295.
Li L, Liu S M, Hu Y L, Lin Z P. Cre/*lox* site-specific recombinases system co-transformation of tobacco and exact recombinases. *Chinese Science Bulletin*, 1999, 21: 2291-2295. (in Chinese)
- [37] Russell S H, Hoopes J L, Odell J T. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Molecular and General Genetics*, 1992, 234: 49-59.
- [38] Gleave A P, Mitra D S, Mudge S R, Morris B A M. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: Transient expression of Cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40: 223-235.
- [39] Schiemann J, Weber A, Commandeur U, Knoblauch M, van Bel A J E, Fischer R, Prüfer D, Hausmann L, Töpfer R, Hehl R, Luehrs R, Reichmann M, Tacke E. Minimizing transgenic DNA while maximizing function. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*. University Extension Press, Saskatoon, Canada, 2000: 131-145.
- [40] Cuellar W, Gaudin A, Solorzano D, Casas A, Nopo L, Chudalayandi P, Medrano G, Kreuze J, Ghislain M. Self-excision of the antibiotic resistance gene *nptII* using a heat inducible Cre-*loxP* system from transgenic potato. *Plant Molecular Biology*, 2006, 62: 71-82.
- [41] Kopertekh L, Broer I, Schiemann J. Developmentally regulated site-specific marker gene excision in transgenic *B. napus* plants. *Plant Cell Reports*, 2009, 28: 1075-1083.
- [42] Verweire D, Verleyen K, De Buck S, Claeys M, Angenon G. Marker-free transgenic plants through genetically programmed auto-excision. *Plant Physiology*, 2007, 145: 1220-1231.
- [43] Zuo J R, Niu Q W, Moller S G, Chuan N H. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 157-161.
- [44] Ma B G, Duan X Y, Niu J X, Ma C, Hao Q N, Zhang L X, Zhang H P. Expression of stilbene synthase gene in transgenic tomato using salicylic acid-inducible Cre/*loxP* recombination system with self-excision of selectable marker. *Biotechnology Letters*, 2009, 31: 163-169.
- [45] Ex F V, Verweire D, Claeys M, Depicker A, Angenon. Evaluation of Seven promoters to achieve germline directed Cre-*lox* recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 2009, 28: 1509-1520.
- [46] Luo K M, Duan H, Zhao D G, Zheng X L, Deng W, Chen Y Q, Jr Stewart C N, Avoy R M, Jiang X N, Wu Y H, He A G, Pei Y, Li Y. GM-gene-deletor: Fused *loxP-FRT* recognition sequences dramatically improve the efficiency of FLP or CRE recombinase on transgene excision from pollen and seed of tobacco plants. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5: 263-374.
- [47] 王文棋, 盖 颖, 陆 海, 李 义, 蒋湘宁. DNA 重组酶 Cre 介导载体间基因的重组转移. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34: 1210-1215.
Wang W Q, Gai Y, Lu H, Li Y, Jiang X N. Recombinase Cre mediated DNA recombination and gene's transferring between vectors. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2007, 34: 1210-1215. (in Chinese)
- [48] Lin L, Liu Y G, Xu X P, Li B J. Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100: 5962-5967.
- [49] 阮小蕾, 李华平. 经修饰的烟草几丁酶基因的克隆及多基因香蕉转化载体构建. *华南农业大学学报*, 2008, 29: 23-27.
Ruan X L, Li H P. Cloning of a modified chitinase I gene from tobacco and construction of a plant multiple gene expression vector. *Journal of South China Agricultural University*, 2008, 29: 23-27. (in Chinese)
- [50] 王 亮, 苏 乔, 安利佳. 利用 Cre/*loxP* 重组系统构建甜菜碱合成酶多基因表达载体. *高技术通讯*, 2007, 17: 749-754.
Wang L, Su Q, An L J. Construction of multi-gene expression vector encoding enzymes for glybet synthesis by using Cre/*loxP* recombination system. *High Technology Letters*, 2007, 17: 749-754.

- (in Chinese)
- [51] 李新奇, 赵昌平, 肖金华, 谢放鸣. 基因转化创造植物杂种优势利用新方式的途径分析. 科技导报, 2006, 24: 39-44.
Li X Q, Zhao C P, Xiao J H, Xie F M. Technical analysis of utilization of spontaneous and artificial genic male sterility in molecular breeding of hybrid crops. *Science and Technology Review*, 2006, 24: 39-44. (in Chinese)
- [52] Mariani C, Beuckeleer M, Trueteer J, leemans J, Goldberg R B. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, 1990, 347: 737-741.
- [53] Liu J X, Yu Y X, Lei J J, Chen G J, Cao B H. Study on *Agrobacterium*-mediated transformation of pepper with *Barnase* and *Cre* gene. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(8): 947-955.
- [54] 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: 557-558.
Wang Y, Li J F, Lin Z P. Studies on the application of Cre/loxP site specific recombination system on plant male sterility and hybrid heterosis. *Molecular Plant Breeding*, 2003, 1: 557-558. (in Chinese)
- [55] 宋洪元, 曹必好, 丁建刚, 雷建军, 宋 明. 利用 Cre/loxP 定位重组系统构建雄性不育基因和恢复基因表达载体. 农业生物技术学报, 2004, 12(4): 396-400.
Song H Y, Cao B H, Ding J G, Lei J J, Song M. Constructions of male sterility gene and fertility restoring gene expression vectors by Cre/loxP site-specific recombination system. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12(4): 396-400. (in Chinese)
- [56] 宋洪元, 丁建刚, 曹必好, 雷建军, 宋 明. 人工雄性不育基因及恢复基因表达载体的构建. 西南农业大学学报, 2004, 26(3): 249-253.
Song H Y, Ding J G, Cao B H, Lei J J, Song M. Construction of the expression vectors for artificial male sterility gene and fertility restoring gene. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2004, 26(3): 249-253. (in Chinese)
- [57] Ow D W. GM maize from site-specific recombination technology, what next? *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18: 115-120.
- [58] Yang S H, Bergo M O, Farber E, Qiao X, Fong L G, Young S G. Caution! Analyze transcripts from conditional knockout alleles. *Transgenic Research*, 2009, 18(3): 483-489.

(责任编辑 李 莉)