

## Cre 重组酶结构与功能的研究进展

王立霞 王勇 胡鸢雷 高音 林忠平\*

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

**摘要** Cre/loxP 定位重组系统来源于噬菌体 P<sub>1</sub>, 由 Cre 重组酶和 loxP 位点两部分组成。在 Cre 重组酶的介导下, 设定的 DNA 片段可以被切除, 可以发生倒位, 亦可造成定点的整合。由于其作用方式高效简单, Cre/loxP 定位重组系统已在特定基因的删除、基因功能的鉴定、外源基因的整合、基因捕获及染色体工程等方面得到了有效的利用, 在转基因的酵母、植物、昆虫、哺乳动物的体内外 DNA 重组方面成为一个有力的工具。这里就 Cre 重组酶的结构、功能及该定位重组系统的应用等方面的研究进行了综述。

**关键词** Cre 重组酶, loxP 位点, 定位重组

中图分类号 Q55 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)05-0531-05

DNA 的重组是生命世界普遍发生的现象, 它对生命表现形式的多样化具有重要意义。然而 DNA 在什么情况下重组、重组过程遵循什么样的规律, 迄今为止知之甚少。比较简单的一类重组现象称为定位重组(Site specific recombination), 已经研究得比较清楚, 并且发挥了它在 DNA 修饰技术中的一系列作用<sup>[1]</sup>。

定位重组系统是由单个多肽酶识别特定的 DNA 序列而发生重组的遗传操作系统, 现已成功地应用于高等动植物基因组的修饰。研究较多的 4 种定位重组系统是来源于噬菌体 P<sub>1</sub> 的 Cre/loxP 系统、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 2 $\mu$  质粒的 FLP/FRT 系统、接合酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*) pSR 质粒的 R/Rs 系统, 以及噬菌体 Mu 的 Gin/gix 系统<sup>[2]</sup>, 每种重组系统都主要由 2 个部分组成: 重组酶和特异性识别位点。由于这类定位重组系统重组方式的确定性和精确性, 它们在基因控制上具有很大的应用价值。其中以 Cre/lox 定位重组系统的应用最为广泛。

来源于噬菌体 P<sub>1</sub> 的 Cre/loxP 系统包含有 2 个重要的组成: 一个是 loxP 位点, 另一个是识别 loxP 位点的 Cre 重组酶。该系统在噬菌体 P<sub>1</sub> 与宿主细胞相互作用中起着非常重要的作用, 它能维持 P<sub>1</sub> 在宿主细胞中的低拷贝数, 保持宿主细胞分裂之后仍含有一个拷贝的 P<sub>1</sub> 基因组; 另外它还有助于在感染组织中使噬菌体 DNA 迅速环化<sup>[3]</sup>。下面先介绍该系统的 2 个组成元件。

### 1 第一个组成元件——Cre 重组酶

Cre 是一种蛋白质, 其名称来源于 cause recombination, 是

从噬菌体 P<sub>1</sub> 中提取出来, 由噬菌体 P<sub>1</sub> 基因组编码的。依据氨基酸序列的同源性, 来自细菌和酵母的重组酶可以分为整合酶家族和解离-转化酶家族, Cre 重组酶是整合酶家族的一员。整合酶家族重组酶的共同特点是这些酶均由单个多肽构成, 作用于核苷酸序列时, 不需要其它辅助因子的参与, 也不额外消耗能量<sup>[2]</sup>。因这种 DNA 重组过程容易在离体条件下(*in vitro*) 发生, 为研究 Cre 重组酶结构与功能关系提供了有利条件。上述几种定位重组系统中重组酶之间在氨基酸序列上差异较大, 但它们在 C-末端都具有一个“R-H-R-Y” (Arg-His-Arg-Tyr) 的四联体结构, 是整合酶的活性中心。其中第 324 位的酪氨酸 Tyr324 和 DNA 分子共价结合, 形成 3'-磷酸酪氨酸, 将 DNA 链切割; 碱性氨基酸 Arg173、His289、Arg292 在重组反应中起到中和与稳定反应体系中高浓度负电荷的作用<sup>[4]</sup>。

#### 1.1 Cre 重组酶的理化特性

Cre 重组酶是由噬菌体 P<sub>1</sub> 基因组中 1029bp 的一段序列编码的蛋白质, 由 343 个氨基酸组成, 分子量为 38.5kD<sup>[5]</sup>。它不仅具有催化活性, 而且同限制酶相似, 识别特异的 DNA 序列并进行特定的剪切和拼接。在水溶液中该酶以单体形式存在。其热稳定性较 FLP 重组酶强, FLP 的最适反应温度在 30℃ 附近, 高于 39℃ 时几乎检测不到活性; Cre 重组酶的最适反应温度为 37℃, 甚至在 46℃ 仍有活性, 因此 Cre 重组酶适合在生长于这个温度范围内的宿主中使用, 在哺乳动物的遗传操作中 Cre/loxP 这一定位重组系统得到广泛的应用<sup>[6]</sup>。Cre 酶对其底物(两个特定的 DNA 序列)的识别是相当灵活的, 图 1 表示 Cre 重组酶所识别的 DNA 序列——loxP

(Locus of crossing over in  $P_1$ ) 称为 loxP 的两个识别位点可以位于不同的 DNA 分子上,也可以在同一个 DNA 分子上,同一分子上既可以是同向的,也可以是反向的。重组底物既可以是线性 DNA 分子,也可以是环状,甚至是超螺旋的 DNA 分子。在催化重组反应时,不需其它蛋白质、DNA 等辅助因子和额外能量的参与。仅需 nmol 的量即可与 loxP 位点结合,完成体内或体外的 DNA 的重组<sup>[7]</sup>。正是由于这种高效简单的作用方式,Cre/loxP 定位重组系统已成为 DNA 遗传操作的有力工具。另外,由于 Cre 重组酶的序列自身具有核定位信号肽(NLS)因而它能进入真核生物的细胞核,这一过程不是简单的被动扩散,这一特点和能力是许多原核蛋白所没有的<sup>[8]</sup>。所以我们可以直接利用 Cre/loxP 系统进行真核生物的转基因调控。

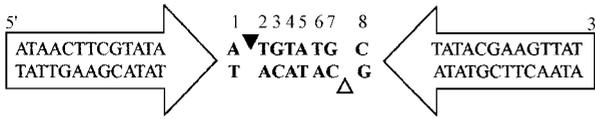


图 1 Cre 重组酶识别的 loxP 位点

Fig.1 The loxP site recognized by Cre recombinase

(The 34-bp loxP site is composed of two 13-bp symmetry elements surrounding an 8-bp asymmetric region)

### 1.2 Cre 重组酶的结构

在研究 Cre 重组酶的结构与功能的过程中,Guo 等<sup>[9]</sup>发现该酶由两个明显的结构域组成——较小的 N-末端结构域和较大的 C-末端结构域,结构域间由一个短链相连。两个结构域在结合位点周围形成“夹子”结构,以和 DNA 分子的大小沟部位充分接触(图 2)。在重组过程中,N-端和序列的识别有关系,C-端和 DNA 的结合及 DNA 链的切割有关系。

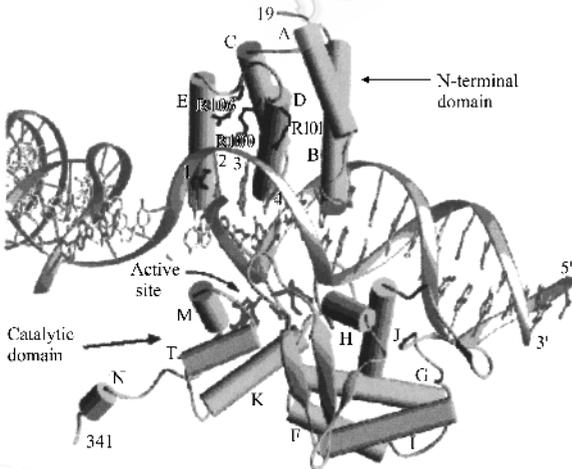


图 2 一个 Cre 重组酶分子与 DNA 结合的模式图(Guo, 1997)

Fig.2 One Cre recombinase bound to the specific DNA substrate

N-末端由第 20 至第 120 个氨基酸组成,包含有 5 个  $\alpha$  螺旋——螺旋 A、B、C、D、E。螺旋 C、D、E 形成反向平行束,A、B 螺旋垂直于 3 个反平行束。螺旋 A 没有与 DNA 接触,只是松散地同其它几个螺旋相连,它与重组过程中 Cre 重组酶四聚体的形成有关,螺旋 B、D 与 DNA 的大沟相连,螺旋 B 与

反向平行束的疏水面紧密接触,螺旋 C 未与 DNA 分子相连;螺旋 E 在有剪切活性的 Cre 亚基中与 DNA 的骨架部分形成静电结合,在没有剪切活性的 cre 亚基中它位于两个 LoxP 之间,螺旋 E 也参与了重组过程中 Cre 重组酶四聚体的形成。

C-末端区是 Cre 重组酶的主要活性中心,由第 132 至第 341 个氨基酸组成,共包含 9 个  $\alpha$  螺旋——螺旋 F、G、H、I、J、K、L、M、N,螺旋间有 2 个小的  $\beta$ -折叠片结构。C-端结构域和 DNA 的接触面复杂,大部分的螺旋和连接环均与 DNA 分子的大小沟及主链部位相互作用。螺旋 F 未与 DNA 接触;螺旋 G、H 与 DNA 接触,参与重组反应的 Arg173 位于螺旋 H 上,螺旋 I 没有与 DNA 接触,在该螺旋与螺旋 H、J 之间各有一个  $\beta$ -折叠结构,螺旋 J 与 DNA 的大沟相连,这也是 C 端唯一与 DNA 大沟直接接触的部位,螺旋 K、L 未与 DNA 直接接触,参与重组反应的 His289、Arg292 位于螺旋 K 上,螺旋 L 与螺旋 M 形成一个疏水区,在重组过程中有活性的氨基酸大多数均位于该部位,其中有切割活性酪氨酸(Tyr324)位于螺旋 M 上,该部位是 Cre 重组酶的主要活性中心,螺旋 N 远离其他螺旋,有助于 Cre 亚基间相互接触。

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,而分子间 C-末端构象有很明显的差异,这说明不同 Cre 亚基在重组过程中所起的作用不同。在与 2 个 loxP 位点结合的 4 个 Cre 酶中,只有 2 个有重组活性。

### 1.3 Cre 重组酶的修饰与改造

Wierzbicki<sup>[10]</sup>通过诱变分析研究发现,对酶分子活性区域的氨基酸进行突变,结果发现 Cre 酶活性丧失或降低。而在远离活性中心、距 N-端较近的部位,将 Arg 突变为 Cys,酶的重组活性较野生型提高了 15%。Schaikh 等<sup>[11]</sup>研究得到 3 个 Cre 的突变体,将 Ala36 突变为 Val, Thr41 突变为 Phe, Gly314 突变为 Arg,结果发现,这 3 个突变体均不能进行 DNA 链的切割。由于 cre 基因最初来源于细菌噬菌体  $P_1$ ,为了适应 Cre/loxP 系统在哺乳动物中的广泛应用,Koresawa<sup>[12]</sup>通过采用哺乳动物的偏爱密码子合成 Cre 重组酶基因并检测它在 CHO 细胞中的表达,结果发现 mRNA 的水平和蛋白表达量均有显著提高,经过修饰的 Cre 重组酶对 loxP 位点的重组效率比野生型的更高一些。Shimshek<sup>[13]</sup>通过哺乳动物偏爱密码子来改造 Cre 重组酶,减少 cre 基因序列中的 CpG 的含量,从而提高了 cre 基因在小鼠中的表达,为 Cre 重组酶在转基因小鼠中的应用提供了便利。改进和提高 Cre 重组酶的活性,将更有助于发挥该定位重组系统在 DNA 重组操作方面的潜力。

## 2 loxP 位点——Cre 重组酶的识别位点

loxP 位点是 Cre 酶的特异性识别位点。loxP 是一段长度为 34bp 的 DNA 序列,由两个 13bp 的反向重复序列和一个 8bp 的不对称间隔区组成(如图 1)。

缺失分析和足迹分析实验表明,此 34bp 的序列是 Cre 重组酶介导重组反应所必需的和充足的条件,其中 8bp 的间隔区是一段重要的核苷酸序列,重组过程中 DNA 链的切割和

连接均在此部位进行。8bp 的间隔区从功能上可分为以下 3 个部分<sup>[7]</sup>。6、7 位是第一次链的交换和连接所必需的;2、5 位的 4 个碱基是第二次链的交换和连接所必需的;1、8 位的碱基改变后,这一突变的 loxP 位点如果同野生型 loxP 位点组合,不会影响重组反应的效率,如果 2 个 loxP 位点均为突变型的,重组效率将大大降低。重组反应进行时,Cre 重组酶先在 7、8 位间切割下面的一条 DNA 链,形成“Holliday 结构”,而后于 1、2 位间切割上面的一条 DNA 链,形成最终的重组产物。

### 3 Cre 重组酶的作用方式

loxP 位点中的 8bp 间隔区是位点中唯一不对称部位,这种非对称性决定了 loxP 位点具有方向性,从而决定了重组的方向性。在 Cre 酶的介导下,Cre/loxP 定位重组系统在细胞内和离体系统中共有以下 3 种工作方式<sup>[13]</sup>:当 2 个 loxP 位点方向相同时,重组反应的结果是 loxP 位点之间的 DNA 片段被删除;当 2 个 loxP 位点的方向相反时,Cre 介导的重组反应使 loxP 位点之间的 DNA 片段倒位;如果 2 个 loxP 位点不在同一分子上,比如一个质粒上带有一个 loxP 位点,而在某个染色体上还有一个 loxP 位点,那么在 Cre 重组酶的介导下,质粒 DNA 便可以整合到染色体中 loxP 所在的位置上。

### 4 Cre/loxP 定位重组系统的作用机制

在重组反应过程中,4 个 Cre 重组酶分子同 2 个 loxP 位点结合形成一个复合体,其中有 2 个 Cre 重组酶分子是有重组活性的,另外 2 个没有重组活性<sup>[14]</sup>。通过对 Cre 重组酶的突变分析证明,Cre 重组酶的 N-末端结构域主要起结合位点的识别作用,而 C-末端结构域在重组反应中完成链的切割作用及链的交换过程,是该酶的重要活性中心。

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。然后 C 末端保守的酪氨酸(Tyr-324)与 DNA 分子的 3'-PO<sub>4</sub> 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'-PO<sub>4</sub> 结合恢复为原来的构型,也可与另一切割部位的 3'-PO<sub>4</sub> 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(如图 3 所示),这样便完成了基因的插入或删除<sup>[15,16]</sup>。

### 5 Cre/loxP 定位重组系统的应用

Cre 重组酶在介导重组反应时,不需要其它蛋白质、DNA 等辅助因子和额外能量的参与,仅需纳摩尔的量即可与 loxP 位点结合,完成体内或体外的 DNA 的重组,将外源基因定点整合到染色体上或将特定的 DNA 片段删除,而且 Cre 重组酶可以对包含 loxP 位点的各种 DNA 底物进行重组反应,如线性的、超螺旋的、有缺口的环状 DNA 分子。正是由于 Cre/loxP 定位重组系统这种高效简单的作用方式,它已在特定基

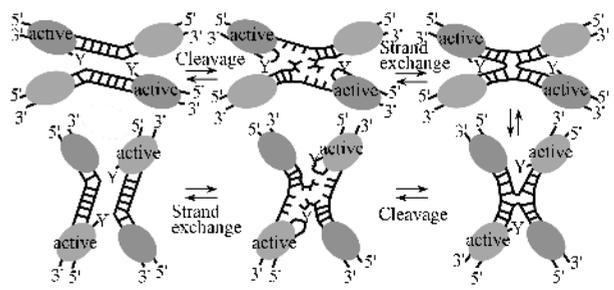


图 3 Cre/loxP 定位重组系统的作用机制(Gopaul,1998)

Fig.3 The mechanism of Cre/loxP site-specific recombination

因的删除、基因功能的鉴定、外源基因的整合、基因捕获及染色体工程等方面得到了有效的利用,在转基因的酵母、植物、昆虫、哺乳动物的体内外 DNA 重组方面成为一个有力的工具。

#### 5.1 在转基因生物中删除特定的基因

选择标记基因在转基因的研究中是一个用于区分转化细胞和非转化细胞的必不可少的重要基因,它的使用大大加速了转基因技术的发展。但选择标记基因也带来了一些不利因素:目前广泛使用的有效标记基因只有少数几种,而在基因工程操作过程中往往需要对同一基因片段进行多次转化,这时不易找到合适的选择标记基因;另外选择标记基因的表达可能会对转化细胞中的其它基因的表达产生负面作用,导致结果分析的复杂化;同时选择标记基因在转基因作物中的存在增加了它们分布环境的不确定性,由此带来转基因动植物的环境安全性问题,这些对转基因动植物的环境释放有很大的制约作用。利用 Cre/loxP 的工作原理,Sauer<sup>[17]</sup>提出用以删除选择标记——*neo* 基因的一种策略:目的基因位于两个同向的 loxP 之间,随后再引入一个同向的 loxP 位点,使 *neo* 基因也位于两个同向的 loxP 之间;Cre 重组酶介导的完全重组反应会将目的基因和选择标记基因 *neo* 基因同时删除,当 Cre 瞬时表达时即可引起部分删除,仅去除 *neo* 基因。

在转基因植物实验系统中发现,当 Cre 重组酶识别 2 个同向的 loxP 位点时,具有最高的重组效率,因此对这种重组方式在转基因植物中的应用是最多的。我们实验室利用 Cre/loxP 系统来控制外源基因的表达已经取得重要进展,下面介绍几个实例。① Cre/loxP 定位重组系统介导的植物雄性不育。将一个因插入阻断序列而不能表达的致死基因导入植物,利用雄性器官特异性表达的启动子驱动 cre 重组酶的表达,使阻断序列在花药或花粉粒中被删除。致死基因在雄性器官中的局部表达就可以造成转基因植物的雄性不育<sup>[18,19]</sup>。② 从食用器官中删除转基因植株中的抗虫基因。利用果实专一性启动子(2a12)驱动 cre 基因在植物果实中的特异表达,并直接作用于果实基因组带有 loxP-PinII-loxP 结构中的 loxP 位点,特异性地删除果实细胞中的抗虫基因 PinII(马铃薯蛋白酶抑制剂 II)<sup>[20]</sup>。另外,我们还利用 Cre/loxP 和 FLP/FRT 这两套定位重组系统对转基因子代中的 Bt 抗虫基因进行删除<sup>[21,22]</sup>,获得无标记基因的转基因植物。构建

一种植物二元表达载体用于携带在植物中表达的质粒,这一载体中选择标记基因(NPTII)的两端带有同向的loxP位点。用这种载体转化的植物与表达cre基因的植物杂交,就可以从转基因植株的后代中删除抗生素标记基因,为继续向这种植物导入新的基因提供便利<sup>[23]</sup>。

## 5.2 基因功能的鉴定

分子生物学技术的发展使得设计精确的遗传修饰成为可能,不仅可以确定引入基因组中核苷酸的变化,还可以使靶基因在时间和空间上表达和缺失。运用同源重组技术在小鼠的胚胎干细胞中可以实现特定基因的破坏和基因敲除;但是当被研究的目的基因在胚胎发育期或在某个特定的细胞、组织和器官中有重要作用时,利用同源重组的基因敲除(Gene knock-out)技术,将会使胚胎发育早期死亡或导致这些基因在胚胎发育的后期及在特定的细胞、组织和器官中的功能无法确定。只有目的基因的条件性突变可以确定特定基因在特定部位的功能。

利用Cre/loxP定位重组系统结合同源重组的基因打靶技术,可以产生时间或空间控制的条件型基因突变来修饰目的基因,实现一定条件下目的基因的替换和敲除<sup>[24,25]</sup>,从而精确确定该基因的功能。运用此技术时,将两侧带有loxP位点的目的基因通过同源重组转入细胞中,然后和带有在特定组织表达的Cre重组酶的细胞杂交,Cre重组酶的表达可以产生基因的组织特异性缺失,也可以通过诱导的方式控制cre基因在特定时间内表达,以实现特定时间内目的基因的敲除。这种条件型基因敲除技术将非常有助于研究那些在不同发育时期都有作用的基因的功能。

利用定位重组系统的条件型基因敲除策略时,可以有2种方式将cre基因引入转基因动物体内。一种是通过杂交方式,先制备由特定细胞或组织启动子控制cre基因的转基因动物,然后与含有loxP序列的转基因动物进行杂交;第二种方式是构建含cre基因的腺病毒载体,在一定的条件下用显微注射的方法将cre基因注入一定的组织或器官中。

## 5.3 外源基因的整合

传统的转基因技术存在的一个主要缺陷是对外源基因的整合位点和拷贝数缺少控制,从而极大地影响外源基因的表达,并且可能对宿主本身的基因表达造成影响。利用Cre/loxP的工作原理,我们可以在基因组上引入一个loxP位点,然后利用带有外源基因的Cre/loxP系统将外源基因定点整合到基因组上。该种定点整合方法有以下优点:①外源基因准确地整合到宿主染色体的设定位点;②减少转基因生物中外源基因的拷贝数,整合上的DNA大多是未发生重排的单拷贝外源基因。正是由于以上优点,Cre/loxP系统在基因工程方面成为一个有力的工具。Cre/loxP定位重组系统能在酵母、植物、哺乳动物中实现外源特定基因的定点整合<sup>[26-28]</sup>。

## 5.4 基因的捕获(Gene-trap)

基因捕获是一种用来分离、克隆与特定功能相关基因的方法。它的基本策略是将特定的基因捕获载体随机插入到基因组中,载体上无启动子的报告基因与细胞中特定的调控

元件融合后,诱导报告基因如lacZ基因、gus基因、gfp基因的表达,以达到分离细胞中特定基因的目的<sup>[27]</sup>。

Fukushige<sup>[29]</sup>设计了一种Cre/loxP定位重组系统介导的基因捕获策略。先将基因组的酶切片段插入到带有单个loxP位点的基因捕获载体中,然后再将这些克隆通过Cre重组酶的作用导入基因组特定位置上的loxP位点侧翼,通过报告基因特异地激活neo基因来筛选重组细胞,重组后通过报告基因的表达即可筛选到特异的启动子序列。

## 5.5 染色体工程——染色体的易位和缺失

位点特异性重组系统在染色体工程这一领域有着重要的用途,它可以造成染色体的易位和缺失。Ow等<sup>[30]</sup>提出利用转座子系统和位点特异性重组系统联合使用的策略,即在转座子内部含有一个重组酶的识别位点,转座子外部有另外一个同向的重组酶识别位点,它们作为一个整体整合入染色体后,在转座酶的作用下,转座子连同起内部的重组位点通常转移到与原来位点相连锁的位点上。如果这两个位点仍然是同向的,在重组酶的介导下,两个重组位点之间的染色体片段就会发生缺失。这套系统导入不同植株,可以整合到基因组的不同位点上,同一位点的转座和重组又可以导致不同染色体的缺失,这样可以构建一个有利于新基因的染色体缺失突变库。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] LIN Z R(林忠平),HU Y I(胡鸾雷),GAO Y(高音) et al. Applications of site-specific recombination to plant genetic engineering. *Scientific Agriculture(科学农业)*, 2000, **48**(3A): 53~57
- [2] Odell J, Russell S H. Use of site-specific recombination systems in plants: Homologous recombination and gene silencing in plants. J Paszkowski ed. Kluwer Academic Publishers, 1994, pp. 219~270
- [3] Abremski K, Wierzbicki A, Formmer B et al. Bacteriophage P1 Cre-loxP site-specific recombination. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, **261**: 391~396
- [4] Nunes-Duby S E, Kwon H J, Tirumalai R S et al. Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Research*, 1998, **26**(2): 391~406
- [5] Sternberg N, Sauer B, Hoess R et al. Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region: evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *Journal of Molecular Biology*, 1986, **187**: 197~212
- [6] Buchholz F, Ringrose L, Angrand P O et al. Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Research*, 1996, **24**(21): 4256~4262
- [7] Lee G, Satio I. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene*, 1998, **216**: 55~65
- [8] Le Y Z, Gagneten S, Tombaccini D et al. Nuclear targeting determinants of the phage P1 Cre DNA recombinase. *Nucleic Acid Res*, 1999, **27**(24): 4703~4709
- [9] Guo F, Gopaul D N, Van D. Structure of Cre recombinase complexed with DNA. *Nature*, 2000, **403**: 913~917

- 1997, **389**: 40 ~ 46
- [ 10 ] Wierzbicki A , Kendall M , Abremski K *et al.* A mutational analysis of the bacteriophage P1 recombinase Cre. *Journal of Molecular Biology* , 1987, **195**: 785 ~ 794
- [ 11 ] Shaikh A C , Sadowski P D. Trans complementation of variant Cre proteins for defects in cleavage and synapsis. *J of Biological Chemistry* , 2000 , **275**( 29 ) : 30186 ~ 30195
- [ 12 ] Koresawa Y , Miyagawa S , Ikawa M *et al.* Synthesis of a new Cre recombinase gene based on optimal codon usage for mammalian system. *Journal of Biochemistry* , 2000 , **127**: 367 ~ 372
- [ 13 ] Shimshek D R , Kim J , Hubner M R *et al.* Codon-improved Cre recombinase ( iCre ) expression in mouse. *Genesis* , 2002 , **32**( 1 ) : 19 ~ 26
- [ 14 ] Kilby N J , Snaith M R , Murray J A. Site-specific recombinases : tools for genome engineering. *Trends Genetic* , 1993 , **9**( 12 ) : 413 ~ 421
- [ 15 ] Guo F , Gopaul D N , Van D. Asymmetric DNA bending in the Cre-loxP site-specific recombination synapse. *Proceeding of National Academic Science USA* , 1999 , **96**: 7143 ~ 7148
- [ 16 ] Gopaul D N , Van D. Structure and mechanism in site-specific recombination. *Current Opinion in Structural Biology* , 1999 , **9**: 14 ~ 20
- [ 17 ] Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre-lox system. *Methods* , 1998 , **14**( 4 ) : 381 ~ 392
- [ 18 ] LIN Z P ( 林忠平 ) , LI I ( 李雷 ) , HU Y I ( 胡鸢雷 ) *et al.* Methods of getting male sterity. Patent No.98126146.9
- [ 19 ] LI I ( 李雷 ) , LIU S M ( 刘松梅 ) , HU Y I ( 胡鸢雷 ) *et al.* Co-transformation to tobacco of Cre/lox site-specific recombinationsystem and its precise recombination. *Chinese Science Bulletin* , 1999 , **44**: 2291 ~ 2295
- [ 20 ] LIN Z P ( 林忠平 ) , ZHEN W ( 甄伟 ) , HU Y I ( 胡鸢雷 ) . Methods of deletion transgene in secific organs using site-specific recombination. Patent No.00122803-X
- [ 21 ] LIN Z P ( 林忠平 ) , CHEN Y J ( 陈扬坚 ) , HU Y I ( 胡鸢雷 ) . Deletion specific transgene using two series of site-specific recombinations. Patent No.991262182
- [ 22 ] LIN Z P ( 林忠平 ) . Deletion of insect-resistant genes in transgenic cotton filial generation : Transgenic Cotton , Jia S R ( 贾士荣 ) , Guo S I ( 郭三堆 ) *et al* ed , Science Press , pp 240 ~ 243
- [ 23 ] ZHEN W ( 甄伟 ) , WANG Y M ( 汪阳明 ) , DING W ( 丁伟 ) *et al.* Cre/loxP-mediated deletionoftransgene in transgenic tobacco. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis* , 2001 , **37**( 4 ) : 475 ~ 482
- [ 24 ] Disanto J P , Muller W , Guy-Grand D *et al.* Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor  $\gamma$  chain. *Proceeding of National Academic Sciences USA* , 1995 , **92**: 377 ~ 381
- [ 25 ] Sunaga S , Maki K , Komagata Y *et al.* Efficient removal of loxP-flanked DNA sequences in a gene-uated locus by transient expression of cre recombinase in fertilized eggs. *Molecular Reproduction and Development* , 1996 , **46**: 109 ~ 113
- [ 26 ] Sauer B. Function expression of the Cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cellular Biology* , 1987 , **7**: 2087 ~ 2096
- [ 27 ] Sauer B , Henderson N. Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequence placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Research* , 1989 , **17**( 1 ) : 147 ~ 161
- [ 28 ] Vergunst A C , Jansen L E , Hooykaas P J. Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis* mediated by Cre recombinase. *Nucleic Acids Research* , 1998 , **26**( 11 ) : 2729 ~ 2734
- [ 29 ] Fukushige S *et al.* Trapping of mammlian promoters by Cre-lox site-specific recombination. *DNA research* , 1996 , **3**: 73 ~ 80
- [ 30 ] Ow D W. Recombinase-directed chromosome engineering in plants. *Current Opinion in Biotechnology* , 1996 , **7**: 687 ~ 670

## Progress in the Study of the Structure and Function of Cre Recombinase

WANG Li-Xia WANG Yong HU Yuan-Lei GAO Yin LIN Zhong-Ping\*

( National Key Laboratory of Protein Engineering and Plant Molecular Biology of Peking University , Beijing 100871 , China )

**Abstract** The Cre recombinase , an integrase from bacteriophage P<sub>1</sub> , catalyzes site-specific recombination between 34-bp repeats termed loxP sites , in the absence of any additional cofactors and energy . Mediated by Cre recombinase , specific DNA fragments can be excised , inversed or integrated depending on the orientation or position of loxP sites *in vitro* or *in vivo* . Because of its simplicity and high efficiency , Cre/loxP site-specific recombination system has been widely used in gene deletion and function identification , gene site-specific integration , gene trapping and chromosome engineering . It has been used as a useful tool for DNA recombination in transgenic yeast , plants , insects and mammals . Here progress in the study of the structure and function of Cre recombinase is discussed .

**Key words** Cre recombinase , loxP sites , site-specific recombination

Received : 06-07-2002

This work was supported by Grant from 863 High-Tech Project ( No. 010-04-03-01 ) .

\* Corresponding author . Tel : 86-10-62753062 ; Fax : 86-10-62759652 ; E-mail : hmp@pku.edu.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn