

网络出版时间:2012-05-22 16:25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120522.1625.006.html>

位点特异整合酶 ϕ C31 的作用机制及应用

上官陶¹, 朱其军², 孙 涛¹, 李光鹏³, 仲跻峰¹, 何洪彬¹

(1 山东省农业科学院 奶牛研究中心, 山东 济南 250100; 2 山东省泰安市畜牧兽医局, 山东 泰安 271000;

3 内蒙古大学 实验动物研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010021)

[摘 要] 链霉菌噬菌体 ϕ C31 整合酶是一种位点特异整合酶(Site-specific recombinase, SSR), 其能够精确并单向的促进 attP 位点与 attB 位点的重组, 是继 Cre/Loxp、FLP 之后又一个倍受关注的位点特异整合酶, 该整合酶已经成为基因治疗、转基因研究等领域的常用技术手段。现对 ϕ C31 位点特异性整合酶的作用机制、整合位点及其在转基因和基因治疗中的应用进行了综述, 并对其发展前景进行了展望。

[关键词] ϕ C31 整合酶; 位点特异性整合; 转基因; 基因治疗

[中图分类号] S813.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)06-0047-05

Mechanism and application of the site-specific recombinase ϕ C31

SHANGGUAN Tao¹, ZHU Qi-jun², SUN Tao¹, LI Guang-peng³,

ZHONG Ji-feng¹, HE Hong-bin¹

(1 Dairy Cattle Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100, China;

2 Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Taian, Shandong 271000, China;

3 Research Center for Laboratory Animal Science, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010021, China)

Abstract: Streptomyces bacteriophage ϕ C31 is a site-specific integrase, which can catalyze precise unidirectional recombination between attP and attB recognition sites. It is another focus of site-specific recombinase after Cre/Loxp and FLP. The integrase has become a common technique in the field of gene therapy and genetical modification. This paper mainly describes the mechanism, the integrate sites and the application and development prospects in transgenic modification and gene therapy of site-specific recombinase ϕ C31.

Key words: ϕ C31 integrase; site-specific recombinase; transgenic; gene therapy

在转基因动物制备以及基因治疗等转基因研究中, 人们多采用病毒载体、随机整合载体等进行基因转染, 这些载体在基因转染方面虽有一定效果, 但是均面临目的基因不能特异整合的不足。后来发展的打靶载体虽在一定程度上解决了目的基因随机整合的问题, 但是实际操作中打靶效率不高, 同时增加了研究人员的工作量, 在很大程度上限制了打靶载体

的应用及转基因技术的发展^[1]。

位点特异整合酶的出现, 很好地解决了上述问题, 这种酶可以促进 2 条 DNA 链之间特定位点的重组, 达到定点、高效的整合。根据同源性及催化机制的不同, 可以将位点特异整合酶分为 2 类, 即酪氨酸类整合酶和丝氨酸类整合酶, 现在常用的整合酶系统多数属于这 2 大类, 如 Cre/Loxp、FLP、P1 噬

* [收稿日期] 2011-12-07

[基金项目] 国家转基因重大专项(2011ZX08007-002); 山东省科技攻关项目(2009GG20002032); 济南市高校院所自主创新计划项目(201004027); 国家自然科学基金项目(31072160)

[作者简介] 上官陶(1986—), 男, 山西翼城人, 在读硕士, 主要从事转基因技术研究。E-mail: shangtaott@126.com

[通信作者] 何洪彬(1967—), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 研究员, 博士, 主要从事转基因技术及动物疾病防治研究。

E-mail: hongbinh@hotmail.com

菌体等整合系统为酪氨酸类整合酶; ϕ C31、R4、Tn4 等为丝氨酸类整合酶^[2-5]。有研究表明,酪氨酸类整合酶的整合效率低于丝氨酸类整合酶^[6-7]。

ϕ C31 位点特异整合酶作为一种丝氨酸类整合酶,在促进 DNA 链之间位点的特异重组时,不需要借助外援能量或辅助因子,不仅能实现位点的特异整合,而且具有很高的整合效率^[8]。本研究主要就 ϕ C31 位点特异整合酶的作用机制、整合位点分析及其在基因工程中的应用进行综述,并对其发展前景进行了展望,旨在为 ϕ C31 的深入研究与应提供参。

1 ϕ C31 位点特异整合酶的作用机制

ϕ C31 整合酶是一种位点特异整合酶,是一种由链霉菌噬菌体衍生的丝氨酸类整合酶,可以介导噬

菌体自身约 40 bp 的 attP 位点与宿主菌基因组中类似大小 attB 位点间发生特异重组,同时形成 attL 和 attR 2 个新的杂合位点,这 2 个新的位点不能作为 ϕ C31 位点特异整合酶的重组位点,不能被 ϕ C31 位点特异整合酶再次识别,因此由 ϕ C31 位点特异整合酶介导的位点特异性重组具有单向性。当 att 位点位于不同的 DNA 序列中时, ϕ C31 位点特异整合酶会促进 att 位点间的整合(图 1);当 att 位点位于同一个 DNA 序列中时,在 ϕ C31 位点特异整合酶的作用下,att 位点间会发生整合,进而发生基因删除或者倒置^[9-11](图 2)。另外, ϕ C31 位点特异整合酶介导的整合重组过程不需要借助外界辅助工具,具有自主作用的特点。



图 1 ϕ C31 位点特异整合酶对位于不同 DNA 序列中的 att 位点的整合作用

Fig. 1 Integration of att sites located in different DNA sequence under the action of ϕ C31 site-specific recombinase



图 2 ϕ C31 位点特异整合酶对位于相同 DNA 序列中的 att 位点的整合作用

Fig. 2 Integration of att sites located in the same DNA sequence under the action of ϕ C31 site-specific recombinase

2 ϕ C31 位点特异整合酶所识别的位点

ϕ C31 位点特异整合酶系统虽然是在原核生物链霉菌属噬菌体中发现的,但是研究者多倾向于利用其位点特异整合活性,将其应用到哺乳动物中。有研究指出,在哺乳动物的基因组中, ϕ C31 位点特异整合酶也可以有效介导 att 位点间的整合,人们通过将携带有 attB 位点的载体和能够表达 ϕ C31 位点特异整合酶的载体共转染哺乳动物细胞,发现 attB 位点与一些类似野生型的 attP 位点间发生整合,该位点被称为“假 attP”位点,这些位点已经在小鼠、兔子、牛等动物以及人的基因组中被发现^[12-16]。在人的基因组中发现的“假 attP”位点与野生型 attP 位点只有一部分同源性且数量有限,但也可以作为 ϕ C31 位点特异整合酶的识别位点与 attB 位点发生

重组,这可能是由于“假 attP”的同源序列中含有 ϕ C31 位点特异整合酶所能识别的最短的反向重复序列(att 位点),另外, ϕ C31 位点特异整合酶识别的重组位点与 DNA 序列的二级结构、GC 含量、发夹结构等没有直接关系,只与 DNA 序列有关,但在与基因组发生重组的过程,也可能受到染色质结构及转录环境的影响^[17-18]。

3 ϕ C31 位点特异整合酶系统的优势

在转基因方面,常用到的整合载体主要包括一些病毒载体(如禽类白血病病毒载体、鼠类白血病病毒载体、人类免疫缺陷病毒载体、腺病毒载体等)以及转座子系统,这些载体介导的基因整合机制不完全相同。逆转录病毒经常会整合到基因组的外显子部分,宿主基因组会因此受到影响;人类免疫缺陷病毒载体对基因组上的序列具有相同的整合效率,而

鼠白血病病毒载体倾向于基因的 N-端;腺相关病毒只会整合到基因组中的转录活性位点。转座子系统可以携带一段基因序列并将其整合到基因组中,但这个过程也是随机性的。这些整合系统有的没有序列特异性,有的具有序列特异性,但其所识别的序列在基因组中的数量均大于 10^7 ,因此这些系统都被认为是随机性的^[19-20]。另外,从生物安全角度来讲,病毒载体可能存在安全隐患。作为一种位点特异整合酶, φ C31 只特异性地介导 attB 位点与 attP 位点间的重组,在一定程度上解决了以上各系统在整合过程中导致的随机性大的问题,与这些系统相比, φ C31 位点特异整合酶具有较明显的优势。

4 φ C31 位点特异整合酶系统的应用

由于 φ C31 位点特异整合酶具有位点特异整合的特点,很多研究者将其用于基因治疗、制备转基因生物、生产药用蛋白、基因功能研究、IPS 细胞制备等领域,并取得了一定的成果。

4.1 基因治疗

φ C31 位点特异整合酶作为一种高效的位点特异整合酶,可以很好地取代随机整合载体,降低临床治疗中的致癌风险,被认为是基因治疗中最具潜力的工具^[21-22]。以往的基因治疗多依赖于腺病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体和慢病毒载体等,但容易引起免疫应答反应,同时这些载体的非特异性以及随机整合带来的风险,极大地限制了其在基因治疗中的应用。 φ C31 位点特异整合酶系统可以特异性地催化携带有 attB 位点的载体与哺乳动物基因组中的“假 attP”位点特异整合,降低随机整合的风险,在基因治疗中发挥了很大的作用,现在已成为一种非病毒性的基因治疗工具^[23-26]。有学者用 φ C31 位点特异整合酶表达载体(φ C31-int)和携带有 attB 位点的表达人凝血因子 IX(hFIX)的载体共转染小鼠肝脏,检测发现转染动物血清中 hFIX 的量较转染前高出了近 40 倍,可以有效提高血友病 B 型患者血清中的 hFIX 浓度^[27-30]。Annahita 等^[31-32]利用 φ C31 位点特异整合酶技术在小鼠神经元细胞中长期高效表达了绿色荧光蛋白,为 φ C31 位点特异整合酶系统用于神经系统疾病的基因治疗奠定了理论基础。

4.2 转基因动物制备

φ C31 位点特异整合酶可以介导 2 种不同 DNA 中 att 位点间的整合,用于插入或者删除某基因片段,这种非随机性的整合能够有效提高外源基因的

整合效率,为制备转基因生物提供了新方法^[33]。2003 年,有研究人员将携带有绿色荧光蛋白(GFP)基因的质粒与 φ C31 位点特异整合酶表达载体和 φ C31 位点特异整合酶 mRNA 分别组合,利用显微注射的方法转染小鼠 FVB/NacFBR 单细胞胚胎,最终得到了能够表达 GFP 的胚胎,将 GFP 阳性胚胎植入代孕母鼠子宫,最终得到了 GFP 阳性小鼠,证实 mRNA 与质粒共转染效果更好^[34-37]。2004 年,Groth 等^[38]利用 φ C31 位点特异整合酶系统成功获得了转基因果蝇后代。

4.3 药用蛋白生产

Wu 等^[39]通过对红色糖多孢菌 HL3168 E3 的基因进行改造,用 $8 \times$ attB 暗盒取代了 *nrps* 基因,将 attB 位点引进到 HL3168 E3 基因组中,利用 φ C31 位点特异整合酶系统将外源性或者内源性的调控红霉素 A(Er-A)表达的基因整合到 attB 位点,不仅使 Er-A 的产量有所增加,同时还降低了 Er-B、Er-C 等的产量,克服了以往基因操作中非同源性 & 非特异性整合等引起的问题。该技术也可以用于其他基因组中缺少 attB 位点的菌株,以生产更多的功能蛋白。

4.4 基因功能研究

φ C31 整合酶作为一种高效的位点特异整合酶,能够特异并有效地介导相同或者不同 DNA 序列中 attB 位点与 attP 位点的整合,可以高效地导入/敲除特定基因中的某段基因,因此其在某些基因功能与特性的研究中也发挥很重要的作用。Meredith 等^[40]利用该系统将抗疟疾的基因转入疟蚊中,从而有效控制了病原虫的感染。

4.5 IPS 细胞研究

IPS 的研究近年来受到了人们的广泛关注,出现了很多制备 IPS 细胞的方法。Lin 等^[41]基于 φ C31 位点特异整合酶的位点特异整合特性,将 φ C31 位点特异整合酶表达载体与含有 attB 位点及 4 个干性转录因子的质粒共转染小鼠胎儿成纤维细胞和人体细胞,最终得到了小鼠和人的 IPS 细胞,这为制备 IPS 细胞提供了新的思路。

5 展 望

φ C31 整合酶作为一种位点特异整合酶,在介导基因之间 att 位点的整合时不需要借助其他辅助因子,只与 att 位点序列有关,同时具有很好的特异性^[4-5],为在转基因技术或者基因操作过程中克服随机整合问题提供了很好的解决方案。另有研究表

明, φ C31 位点特异整合酶在介导外源基因与哺乳动物基因组整合的过程中, 75% 以上的整合位点位于基因组的内含子区域, 不会影响基因的正常功能^[10-11]。

虽然研究者利用 φ C31 位点特异整合酶系统取得了较好的效果, 但人们对动物基因组中 att 位点的分布情况还不是很了解, 这在一定程度上限制了 φ C31 位点特异整合酶系统的应用。随着人们对 φ C31 位点特异整合酶整合系统研究的深入以及相关研究的展开, φ C31 位点特异整合酶系统的整合机制将会更加明确, 其在基因工程领域及药用蛋白生产方面的应用前景将会更加广阔。

[参考文献]

- [1] 吴民耀, 文瑞丽, 师红, 等. φ C31 位点特异整合酶系统研究进展 [J]. 重庆理工大学学报: 自然科学版, 2010, 24(7): 30-36.
Wu M Y, Wen R L, Shi H, et al. Research of φ C31 site specific integrase system [J]. Journal of Chongqing University of Technology: Natural Science, 2010, 24(7): 30-36. (in Chinese)
- [2] Christopher S, Raymond, Philippe S. High-efficiency FLP and φ 31 site-specific recombination in mammalian cells [J]. PLoS One, 2007, 2(1): 162.
- [3] Belteki G, Gertsenstein M. Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing phiC31 integrase [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(3): 321-324.
- [4] Andreas S, Schwenk F, Kuter-Luks B, et al. Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase; Activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(11): 2299-2306.
- [5] Liu J, Jeppesen I, Nielsen K, et al. Phic31 integrase induces chromosomal aberrations in primary human fibroblasts [J]. Gene Ther, 2006, 13(15): 1188-1190.
- [6] Groth A C, Calos M P. Phage integrases: Biology and applications [J]. J Mol Biol, 2004, 335: 667-678.
- [7] Annahita K, Solomon L, Bhaskar T, et al. Mutational derivatives of PhiC31 integrase with increased efficiency and specificity [J]. Molecular Therapy, 2008, 1(17): 112-120.
- [8] Satoshi W, Shingo N, Takayuki S, et al. Improvement of a phiC31 integrase-based gene delivery system that confers high and continuous transgene expression [J]. New Biotechnology, 2011, 28(4): 312-319.
- [9] Groth A C, Olivares E C, Thyagarajan B, et al. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(11): 5995-6000.
- [10] Kuhstoss S, Rao R N. Analysis of the integration function of the streptomyces bacteriophage φ C31 [J]. J Mol Biol, 1991, 222(4): 897-908.
- [11] Thorpe H M, Smith M C. *In vitro* site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(10): 5505-5510.
- [12] Thyagarajan B, Olivares E C, Hollis R P, et al. Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage φ C31 integrase [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(12): 3926-3934.
- [13] Masataka S, Kazue K, Yoshinaga S, et al. Plasmid DNA sequences present in conventional herpes simplex virus amplicon vectors cause rapid transgene silencing by forming inactive chromatin [J]. J Virol, 2006, 80(7): 3293-3300.
- [14] Quenneville S P, Chapdelaine P, Rousseau J, et al. Dystrophin expression in host muscle following transplantation of muscle precursor cells modified with the phiC31 integrase [J]. Gene Therapy, 2007, 14(6): 514-522.
- [15] Held P K, Olivares E C, Aguilar C P, et al. *In vivo* correction of murine hereditary tyrosinemia type I by φ C31 integrase-mediated gene delivery [J]. Mol Ther, 2005, 11(3): 399.
- [16] Thyagarajan B, Guimaraes A C, Groth M P, et al. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites [J]. Gene, 2000, 244(1/2): 47-54.
- [17] Chalberg T W, Joylette L, Olivares E C, et al. Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome [J]. J Mol Biol, 2006, 357(1): 28-48.
- [18] Thyagarajan B, Liu Y, Shin Y, et al. Creation of engineered human embryonic stem cell lines using phiC31 integrase [J]. Stem Cells, 2008, 26(1): 119-126.
- [19] 孙志东, 詹林盛. 高效位点特异性链霉菌 φ C31 噬菌体整合酶的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2007, 18(6): 1036-1038.
Sun Z D, Zhan L S. Advance on φ C31 integrase research as a high efficiency tool for site-specific integration [J]. Letters in Biotechnology, 2007, 18(6): 1036-1038. (in Chinese)
- [20] Yoshinori I, Nobuyuki T, Kazuhiro M, et al. Phage φ C31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cell lines [J]. The Journal of Gene Medicine, 2006, 8(5): 646-653.
- [21] Li Z, Fang Y, Wang R, et al. Preliminary study on the DNA-binding properties of phage φ C31 integrase [J]. Gene, 2011, 484(2): 47-51.
- [22] Nynne S, Brian M, Trine D, et al. Regulated gene insertion by steroid-induced φ C31 integrase [J]. Nucl Acids Res, 2008, 36(11): 67.
- [23] Portlock J L, Keravala A, Bertoni C, et al. Long-term increase in mVEGF164 in mouse hindlimb muscle mediated by phage phiC31 integrase after nonviral DNA delivery [J]. Hum Gene Ther, 2006, 17(8): 871-876.
- [24] Annahita K, Joylette L P, Joan A, et al. PhiC31 integrase mediates integration in cultured synovial cells and enhances gene expression in rabbit joints [J]. The Journal of Gene Medicine, 2006, 8(8): 1008-1017.
- [25] Woodard L E, Hillman R T, Keravala A, et al. Effect of nuclear localization and hydrodynamic delivery-induced cell division on φ C31 integrase activity [J]. Gene Therapy, 2010, 17(2): 217-226.

- [26] Carmen B, Sohail J, Thurman M, et al. Enhancement of plasmid-mediated gene therapy for muscular dystrophy by direct-plasmid integration [J]. PNAS, 2006, 103(2): 419-424.
- [27] Olivares E C, Hollis R P, Chalberg T W, et al. Site-specific genomic integration produced therapeutic factor IX levels in mice [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(11): 1124-1128.
- [28] Rausch H, Lehmann M. Structural analysis of the actinophage φ C31 attachment site [J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(19): 5187-5189.
- [29] Lisa V, Tsui, Michael K, et al. Production of human clotting factor IX without toxicity in mice after vascular delivery of a lentiviral vector [J]. Nature Biotechnology, 2002, 20(1): 53-57.
- [30] Joylette L P, Annahita K, Carmen B, et al. Long-term increase in mVEGF164 in mouse hindlimb muscle mediated by phage φ C31 integrase after nonviral DNA delivery [J]. Human Gene Therapy, 2002, 17(8): 871-876.
- [31] Annahita K, Brandi K O, Palmer, et al. Long-term transgene expression in mouse neural progenitor cells modified with φ C31 integrase [J]. Journal of Neuroscience Methods, 2008, 173(2): 299-305.
- [32] Annahita K, Amy C, Groth, et al. A diversity of serine phage integrases mediate site-specific recombination in mammalian cells [J]. Mol Gen Genomics, 2006, 276(2): 135-146.
- [33] Chalberg T C, Genise H L, Vollrath D, et al. φ C31 integrase confers genomic integration and long-term transgene expression in rat retina [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2005, 46(2): 2140-2146.
- [34] Roger P H, Stephanie M, Christopher R, et al. Phage integrases for the construction and manipulation of transgenic mammals [J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2003, 11(7): 1-11.
- [35] Chen J Z, Ji C N, Xu G L, et al. DAXX interacts with phage φ C31 integrase and inhibits recombination [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(21): 6298-6304.
- [36] Christopher L, Annahita K, Lauren E, et al. Kinetics and longevity of φ C31 integrase in mouse liver and cultured cells [J]. Human Gene Therapy, 2010, 21(10): 1287-1297.
- [37] Matthew C A, Rob T, Kevin B, et al. Synapsis and DNA cleavage in φ C31 integrase-mediated site-specific recombination [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(8): 2607-2617.
- [38] Groth A C, Matthew F, Roel N, et al. Construction of transgenic drosophila by using the site-specific integrase from phage φ C31 [J]. Genetics, 2004, 166(4): 1775-1782.
- [39] Wu J, Zhang Q, Deng W, et al. An artificial attB site for specific recombination facilitates genetic manipulations towards improving the erythromycin production in an industrial *Saccharopolyspora erythraea* strain [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(21): 7508-7516.
- [40] Meredith J M, Basu S, Nimmo D D, et al. Site-specific integration and expression of an anti-malarial gene in transgenic *Anopheles gambiae* significantly reduces Plasmodium infections [J]. PloS One, 2011, 6(1): 14587.
- [41] Lin Y, Chang J C. Generation of induced pluripotent stem cells using site-specific integration with phage integrase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(45): 19467-19472.