

# 无选择标记转基因植物的研究进展

郝金凤, 哈斯阿古拉

(内蒙古大学生命科学学院生物工程中心, 内蒙古自治区牧草与特色作物生物技术重点实验室, 呼和浩特 010021)

**摘要:** 为了避免选择标记基因的使用对环境及植物体的生长发育带来的不利影响, 消除人们对转基因植物中选择标记基因的安全性顾虑, 培育无选择标记的转基因植物目前已成为植物基因工程研究的热点。现主要综述几种剔除选择标记基因方法在转基因植物中的研究进展。

**关键词:** 选择标记基因; 转基因植物; 剔除

**中图分类号:** Q 788 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2006)06-0043-03

目前转基因植物技术中, 研究人员可以利用多种转化方法, 尤其是农杆菌介导法将外源基因转化到各种植物体内。这种 DNA 的递送过程都是在组织水平上进行, 转化后的植物组织中只有部分细胞的基因组整合进了外源 DNA, 可以成为稳定的转化细胞, 所以同时还存在着未转化的细胞。通常用标记基因将转化细胞筛选出来, 在选择压力下, 非转化细胞不具备选择抗性而死亡, 因此, 在转基因研究中, 抗性标记基因对于从大量非转化细胞中选择转化细胞是至关重要的。目前使用的抗性标记基因大多数是抗生素或除草剂抗性基因, 当目的基因导入植物基因组后, 标记基因并不参与植物的性状改良, 在完成筛选后, 标记基因就完成了使命<sup>[1]</sup>。

选择标记基因的应用使植物基因工程成为可能。然而随着转基因植物的商品化, 抗性标记基因潜在的生态和食用安全性备受关注。首先, 在转化细胞的筛选过程中, 大量生长受到抑制的未转化细胞会阻碍转化细胞对营养物质的吸收, 并且还可能分泌一些有毒的物质抑制转化细胞的生长。其次, 标记基因滞留在植物体内并持久表达不仅给植物的生长发育带来负担, 而且给其他有利性状基因的表达带来不确定的影响。同时, 对于环境释放或商品化生产的转基因植物而言, 标记基因最令人关注的方面还在于其潜在的流动——基因的水平迁移与基因逃逸可能产生的安全性问题: 作为标记基因的抗生素抗性基因一旦流动到危害人类健康的微生物中就会为其提供抗药性, 而除草剂抗性基因如果流动到危害粮食作物生长的杂草中就会使其获得除草剂抗性而成为“超级杂草”。再者, 用重转化方法进行基因堆积时, 每一次转基因的插入都需要进行转化筛选; 但可用于植物转基因筛选的标记基因只有少数几个, 这给在植物中再次导入外源基因带来限制。有人提出将不同的转基因株系杂交获得转多价基因的转基因植

株, 然而多拷贝的标记基因可能引发基因沉默, 很多情况下标记基因的沉默可能引起邻近目的基因的沉默, 导致转基因遗传改良的失败。

总而言之, 解决由选择抗性基因引起的上述问题的途径, 就是要回避或剔除转基因植物中的抗性标记基因。建立无选择标记植物转化系统, 培育无选择标记的转基因植物无论是从安全性考虑, 还是从转基因技术本身考虑均有重要意义。

培育无抗性标记基因植物的策略主要有两种: 回避策略和剔除策略。

## 1 回避策略

回避策略即在转化阶段不使用标记基因或采用安全性标记基因筛选转基因植株。不使用标记基因直接筛选法由于转化植株的筛选工作量巨大, 成功的可能性小, 直到最近才在马铃薯研究<sup>[2]</sup>中见到相关报道。

2003 年, de Vetten 等<sup>[3]</sup>直接以无选择标记基因的载体结构通过农杆菌转化在无选择压的培养基上再生马铃薯, 然后进一步以 PCR 的方法筛选再生植株。在含有强毒性区域的农杆菌菌株 AGLO 侵染获得的再生植株中, 平均 4.5% 表现 PCR 阳性, 转化植株中有 45% 的目的基因活性被完全抑制。该研究直接利用 PCR 筛选转化体, 避免了标记基因的使用, 于其他途径相比, 有其自身的优势: 首先, 不需要有性繁殖进行遗传分离。这对于无性繁殖为主的作物特别有利于保持其杂合性, 减少优良性状的分离。其次, 这种利用毒性根癌农杆菌菌株和 PCR 检测方法的选择效率高, 可以获得大量转化植株, 进而选择只含有目的基因而不含有载体序列并且具有期望的农艺性状的植株。其他途径如转座子或同源重组效率不高, 需要新一轮的筛选。为了避免使用抗生素或除草剂等抗性标记基因, 越来越多的安全性标记基因被用于植物遗传转化。该系统的原理与抗生素或除草剂作为标记基因相同, 非转化细胞被杀死, 而转化细胞由于获得代谢或发育优势存活下来。但是安全性标记基因作为一种外源 DNA 片段存在于植物基因组中, 同样会限制多价外源基因导入, 所以还需要不断发展标记剔除策略。

## 2 剔除策略

剔除策略有数种途径, 包括转座子介导、位点特异性重组系统介导、共转化、同源重组及其他一些方法等。根据不同原理, 剔除标记基因的方法可以分为两类: 分离剔除和重组剔



**第一作者简介:** 郝金凤, 女, 1977 年生, 助理研究员, 在读博士, 2002 年硕士毕业后, 在内蒙古大学生命科学学院留校任教, 从事科研工作, 主要研究方向为植物分子生物学及基因工程, 先后参加国家自然科学基金项目三项, 内蒙古自然科学基金

项目两项, 内蒙古农业部重点项目一项。

收稿日期: 2006-06-10

除。

## 2.1 标记基因的分离剔除法

分离剔除法主要以共转化为主,就是将标记基因和关注基因分别构建在不同载体或同一载体的不同 T-DNA 区域,共转化受体细胞时,可以获得共整合有关关注基因和选择标记基因的植株<sup>[3]</sup>。由于 T-DNA 的插入是随机的,因此插入后的标记基因与关注基因可能分别位于不同的染色体上,即非连锁位点上,或位于同一染色体相距较远的位点上,后代植株即可发生分离而获得无选择标记的转化植株。

Mcknight 等<sup>[4]</sup>用分别含有 nptII 基因和胭脂碱合成酶基因(nos)的两个载体共转化烟草,在 3 株共整合转基因烟草后代中这两个基因发生了分离,这一结果说明,共转化是培育无选择标记转基因植物的可行方法。为了提高获得无选择标记转基因植物的效率,一些研究人员对共转化方法进行了改进。Komari 等<sup>[5]</sup>通过农杆菌体内同源重组构建了含有 2 个 T-DNA 的 Ti 质粒载体,两个 T-DNA 分别携带选择标记基因 hpt 和报告基因 gusA,用此载体转化烟草和水稻,有一半以上的共转化植株发生了分离,得到了 GUS 阳性但无选择标记基因活性的后代植株。Dalley 等<sup>[6]</sup>用含有 nptII 和 gusA 不同质粒的农杆菌转化油菜和烟草,在后代植株中约 50% 的株系发生了 gusA 与 nptII 的分离。De neve 等<sup>[7]</sup>用分别含有 nptII 和 hpt 的双元载体的根癌农杆菌混合转化烟草和拟南芥,有 72% 的共转化植株 T-DNA 连锁。吕慧娟等<sup>[8]</sup>构建了一个带双右边界序列的双元载体,获得带有水稻齿裂矮缩病毒基因组的第 5 个基因片段 S5 关注基因的无选择标记转基因水稻。陈松彪等<sup>[9]</sup>采用体外重组技术在通用植物表达载体基础上建立了一个双 T-DNA 载体系统。载体中的 Ti 质粒携带 2 个分离的 T-DNA 区域,分别包含标记基因和关注基因,以此转化烟草,41.7% 的后代植株产生了无选择标记的转基因烟草植株。

近年来一个新的报告基因绿色荧光蛋白基因(gfp)已用于植物基因工程,将 gfp 与选择标记基因构建在同一个 T-DNA 结构域上,在转化过程中,GFP 可以辅助筛选标记提高转化的效率<sup>[9]</sup>。在共转化植株的自交分离后代中,由于 gfp 基因和选择标记基因位于同一 T-DNA 结构域上,二者在转基因后代植株中连锁遗传,因此通过简单检测 GFP 的表达就能初步剔除含有选择标记基因的后代植株,结合 PCR 对剩下的植株进行检测就能高效的获得无选择标记的转基因植株。

## 2.2 标记基因的重组剔除法

2.2.1 转座子 目前已经报道的用于转基因植物标记基因剔除的转座系统是来源于玉米的 Ac/Ds 系统。Yoder 等<sup>[10]</sup>应用 Ac/Ds 转化体系在相连的两个基因整合后,将标记基因或关注基因转移到新的位点上,二者相距足够远的话,通过杂交能够将目的基因与选择标记基因分离,在子代水平上可以得到无选择标记的转基因植株。Goldsbrough 等<sup>[11]</sup>把标记基因插入到 Ds 的反向重复序列之间,把 gusA 构建到 Ds 反向序列之外,以此载体转化番茄,后代植株中获得了只带 gusA 基因而无抗性标记 nptII 基因的植株。Ebinuma 等<sup>[12]</sup>和 Cotsaftis 等<sup>[13]</sup>利用 Ac/Ds 系统也分别在烟草和水稻上获得了无选择标记的转基因植株。转座子途径可以不需要再次转化或杂交引入重组酶。但是该途径也存在一些弊端,如效率较低,

转座子切除有时并不精确,可能会改变周围基因的结构<sup>[14]</sup>;转座后往往偏向于原来的附近位置重新插入;需要有性分离途径,只适用于有性繁殖以及生活周期短的植物。这些限制了其在标记剔除策略上的应用。

2.2.2 位点特异性重组 这一系统是利用重组酶催化两个短的、特定的 DNA 序列间的重组,以去除选择标记基因。已发现的在植物中有效的位点特异性重组系统有 Cre/lox 系统、R/RS 系统、FLP/FRTs 系统等。Dale 等<sup>[15]</sup>首次利用位点特异性重组系统在转基因植物中实现了标记基因的去除。他们利用大肠杆菌噬菌体 P1 的重组酶 Cre 精确去除两侧有 lox 序列的标记基因 hpt,然后将 Cre 编码区域分离出去,从而获得无标记基因的转化植株。Russell 等<sup>[16]</sup>利用同样的系统,以编码磺酰脲抗性的 als 基因为选择标记, gusA 为报告基因,获得了无标记基因的转化植株。Gleave 等<sup>[17]</sup>用含有 Cre 表达载体的农杆菌侵染含有 loxP 元件的转基因烟草,无选择压下获得再生芽,其中不到 3% 的再生芽发生了 loxP 之间的重组,且并未发生 Cre 基因的整合。这种方法省略了分离步骤,但是频率低,需要二次转化,限制了实际应用。研究还发现,Cre 重组酶基因在植物中一直高水平表达,导致植物形态和产量改变<sup>[14]</sup>。Zuo 等<sup>[18]</sup>发展了一个化学诱导表达——基于反式激活系统 XVE 的位点特异性重组系统,以 XVE 控制 Cre 基因的表达,从而剔除 lox 序列之间的选择标记基因,获得了高频率的无选择标记的转基因拟南芥。Onouchi 等<sup>[19]</sup>用含 R 重组酶基因的转化植株与含有标记基因位于 RS 位点间的植株进行杂交,获得了无标记基因的拟南芥转基因植株。Sugita 等<sup>[20]</sup>先于 Zuo 发展了化学诱导表达的位点特异性重组系统,他们利用 R/RS 系统建立了 GST-MAT 载体,将 R 基因构建于除草剂“Safener”诱导表达的启动子 GST-II-27 下,两侧有重组序列 RS。这样获得了 14% 仅含有报告基因 gusA 的无选择标记植株,其中多数为单拷贝整合。这种化学诱导表达的位点特异性重组系统的引入,可以特异瞬时的表达重组酶基因,高效切除标记基因和重组酶本身,简化了操作步骤;防止重组酶提前表达过早切除选择标记;同时控制重组酶表达至一定水平,再切除标记基因和重组酶基因,避免重组酶过量表达带来对植物的潜在危害。

2.2.3 同源重组 同源重组在理论上就是在没有重组酶活性的情况下,利用重组系统去除标记基因。Zubko 等<sup>[21]</sup>利用 attP 同源序列介导的染色体同源重组剔除了选择标记基因,得到了无标记基因的转基因烟草植株。其机理与位点特异性重组相同,但也有其自身的特点:它不需要辅助蛋白参与,因而也不会对植物基因组造成可能的伤害,也省去了遗传分离的环节。但是其重组频率低,也限制了它的广泛应用。

## 3 小结

综上所述,不同的剔除标记基因的方法各有利弊,相比较而言,位点特异性重组是目前研究和应用较多的方法。尤其是后来发展起来的化学诱导位点特异性重组系统不仅简化了培育无标记基因转基因植物的程序,还适合于无性繁殖的植物。同时它也有不足之处,它介导标记基因剔除时会在受体植物染色体中留下一个特异识别序列,从而影响同一位点特异性重组系统在受体植物中的再次应用。因此,选择何种转化系统要根据植物自身的特点而定。

总之, 培育无标记转基因植物是发展转基因植物的安全策略, 并且此项研究已经取得很大的进展, 展示了其巨大的应用前景, 这对未来转基因植物的生物安全性问题有着重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] 陈松彪, 李旭刚, 王锋, 等. 无选择标记转基因植物的培育[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(2): 1-7.
- [2] de Vetten N, Wolters A M, Raemakers K, et al. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop[J]. Nature Biotech., 2003, 21: 439-442.
- [3] 吕慧娟, 龚祖. 转基因植物中标记基因的剔除[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(2): 121-126.
- [4] McKnight T D, Lillis M T, Simpson R B. Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate *Agrobacterium* strains[J]. Plant Mol Biol., 1989, 13: 533-540.
- [5] Komari T, Hiei Y, Saito Y, et al. Vectors carrying two separate T-DNA for co-transformation of higher plants mediated by and segregation of transformants free from selection marker[J]. Plant J., 1996, 10: 165-174.
- [6] Daley M, Knauf V C, Summerfelt K R, et al. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plant[J]. Plant Cell Rep., 1998, 17: 489-496.
- [7] de Neve M, de Buck S, Jacobs A, et al. T-DNA integration patterns in co-transformation plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs[J]. Plant J., 1997, 11: 15-29.
- [8] Lü H J, Zhou X R, Gong Z X, et al. Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-border (DRB) binary vectors[J]. Aust. J. Plant Physiol., 2001, 28: 241-248.
- [9] Chen S, Li X, Liu X, et al. Green fluorescent protein as a vital elimination marker to easily screen marker-free transgenic progeny derived from plants co-transformed with a double T-DNAs binary vector system[J]. Plant Cell Rep., 2004, 22.
- [10] Yoder J I, Goldsbrough A P. Transformation systems for gener-

ating marker-free transgenic plants[J]. Biotechnology, 1994, 12: 263-267.

- [11] Goldsbrough A P, Lastrella C N, Yober J I. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato[J]. Biotechnology(NY), 1993, 11: 1286-1292.
- [12] Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, et al. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 2117-2121.
- [13] Cotsaftis O, Sallaud C, Breidler J C, et al. Transposon-mediated generation of T-DNA and marker-free rice plants expressing a Bt endotoxin gene[J]. Mol Breed., 2002, 10: 165-180.
- [14] 张余洋, 欧阳波, 叶志彪. 无抗性标记基因转基因植物研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 589-596.
- [15] Dale E C, Ow D W. Gene transfer and subsequent removal of the selection gene from the host genome[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 10558-10562.
- [16] Russell S H, Hoopes J L, Odell J T. Directed excision of a transgene from the plant genome[J]. Mol. Gen. Genet., 1992, 234: 49-59.
- [17] Gleave A P, Mitra D S, Mudge S R, et al. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene[J]. Plant Mol. Biol., 1999, 40: 223-235.
- [18] Zuo J, Niu Q W, Geir M S, et al. Chemical regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants[J]. Nature Biotech., 2001, 19: 157-161.
- [19] Onouchi H, Nishihama R, Kudo M, et al. Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*[J]. Mol. Gen. Genet., 1995, 247: 653-660.
- [20] Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E, et al. A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency[J]. Plant J., 2000, 22: 461-469.
- [21] Zubko E, Scutt C, Meyer P. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes[J]. Nature Biotech., 2000, 18: 442-445.

## 欢迎订阅《中外葡萄与葡萄酒》杂志

《中外葡萄与葡萄酒》杂志创办于1976年, 由中国酿酒工业协会和山东省酿酒葡萄科学研究所主办, 为全国自然科学核心期刊, 是中国唯一刊载葡萄与葡萄酒专业知识的科技期刊。杂志内容丰富、实用, 科技文章水平高, 信息量大。包括试验研究、栽培技术、病虫害防治、酿酒工艺、设备辅料、中外资讯、鉴赏品评等精品栏目。杂志面向生产和市场, 普及中外葡萄、葡萄酒科学知识, 推广新品种、新技术、新工艺、新设备, 交流科技、文化、市场信息, 是一份内容丰富、技术先进、可读性强的国内优秀期刊。

杂志为国内外公开发行, 双月刊, 单月发行, 大16开, 铜版印刷, 装帧精美, 每期定价12.5元, 全年75.0元。订户可到当地邮局办理订阅。邮发代号: 24-73。未能从邮

局订上本刊的读者, 全年都可随时直接汇款到杂志社订阅。

另外杂志社尚有2004、2005年合订本(每套75元含邮费)及部分往年杂志和“中国葡萄、葡萄酒50年特刊”(每本30元含邮费), 如订户需要可直接寄款到本刊杂志社。汇款时用正楷字体详细写明您的邮政编码、地址、姓名、定数及杂志年份。如需要发票请注明。

《中外葡萄与葡萄酒》杂志社

地址: 山东省济南市历城区工业南路103号, 邮编: 250100;

出版发行部电话: 0531-85598005, 传真: 0531-85598000;

联系人: 徐平、席连华;

E-mail: cf.1976@163.com, cf@sdvw.cn

网址: <http://www.VW1976.cn>, [www.grapevinewine.com.cn](http://www.grapevinewine.com.cn)

杂志社开户行: 中国建设银行济南高新技术产业开发区支行, 帐号: 37001618816050036521。