

转基因植物中标记基因的安全性新策略

赵 艳^{1,2,3}, 王慧中⁴, 于彦春^{1,3}, 黄大年³

(1. 浙江大学生命科学院, 杭州, 310029; 2. 杭州商学院生物工程系, 杭州 310035;

3. 中国水稻研究所生物工程系农业部水稻生物学重点实验室, 杭州 310006; 4. 杭州师范学院生物系, 杭州 310036;)

摘要:转基因植物中的除草剂和抗生素抗性标记基因潜在的生态环境和食用安全性令人担忧。解决转基因植物中抗性标记基因安全性问题有两种途径:一是转化时仍使用抗性标记基因,转基因植物再生成后,在释放大田前将标记基因剔除;二是发展安全性标记基因用于植物遗传转化。本文综述了三种标记基因剔除系统和几种安全性标记基因在植物转化中的应用进展。

关键词:转基因植物; 标记基因; 安全性策略

中图分类号:Q78

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2003)01-0119-04

The New Safe Strategy on the Marker Genes in Transgenic Plant

ZHAO Yan^{1,2,3}, WANG Hui-Zhong⁴, YU Yan-Chun^{1,3}, HUANG Da-Nian³

(1. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Biotechnology Department, Hangzhou Institute of Commerce, Hangzhou 310035, China;

3. Biotechnology Department, Key Laboratory for Rice Biology, Ministry of Agriculture, China National Rice Institute, Hangzhou 310006, China;

4. Biological Department, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310036, China)

Abstract: The presence in transgenic plants of antibiotic and herbicide resistant selective marker genes might be an unpredictable hazard to the ecosystem as well as to human health. There are two applicable strategies can be used to resolve this problem. One is to remove the resistant marker genes before the transgenic plants are released to field. The other is to develop and use safe marker genes to produce transgenic plants. The present paper reviewed three technique systems employed to remove resistant marker genes in transgenic plants and several safe marker genes used in plant transformation.

Key words: transgenic plant; marker gene; safe strategy

抗性标记基因(resistant marker gene)目前广泛应用于植物的遗传转化,可赋予转化细胞除草剂或抗生素抗性,常与目的基因共同转化,被用来区分转化和非转化细胞,这对转基因植株的获得至关重要,但转基因植株一旦再生成功,标记基因便不再有用^[1]。随着转基因植物的商品化种植,抗性标记基因潜在的生态环境和食用安全性一直是颇有争议且悬而未决的问题^[2]。培育无抗性标记基因的转基因植物已成为基因工程育种的重要目标。

解决转基因植物中抗性标记基因安全性问题有两种途

径:(1)转化时仍使用抗性标记基因,转基因植物再生成功后,在释放大田前将抗性标记基因剔除;(2)发展安全性标记基因用于植物遗传转化。本文对标记基因的剔除技术和安全标记基因的最新进展作一综述。

1 抗性标记基因的剔除技术

近年来科学家已发展了多种标记基因剔除技术用来剔除转基因植物中的抗性标记基因,本文对其中三个比较有效的标记基因剔除系统作一介绍。

收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-05-02

作者简介:赵 艳(1970-),女,河北临漳人,博士研究生,专业方向:植物基因工程

通讯作者:黄大年(1938-),男,教授,博导,联系电话:0571-63370483

1.1 共转化和遗传分离策略

将选择标记基因和目的基因分别构建在不同的载体上,共同转化受体细胞,通过筛选和分子鉴定获得转基因共整合的植株作为育种对象,在 F_1 分离世代选择标记基因和目的基因不连锁的植株作为育种对象,即可获得仅含目的基因而不含标记基因的理想转基因株。这种方法比较简单,适用于多种转化体系,但必须保证标记基因和目的基因共整合在受体基因组的同一位点。实际上位于不同转化载体中的转基因共整合频率往往较低,并且常整合在受体基因组的同一位点^[3]。这使共转化和遗传分离策略的应用受到了限制。

若将筛选标记基因和目的基因分别插入到同一质粒中两个相互独立的 T-DNA 区内,构建成含有两个 T-DNA 的农杆菌超级双元载体,能使这一问题得到缓解。Komari 等将卡那霉素抗性基因 *nptII* 或潮霉素抗性基因 *hpt* 和报道基因 *gus* 构建成农杆菌超级双元载体,分别转化烟草和水稻,转基因植株中标记基因和报道基因的共整合频率约为 50%,对转基因株 F_1 代的分离分析表明,60%以上的株系可获得无标记基因的 *gus* 转基因植株^[4]。不过,标记基因和目的基因的遗传分离必须经过有性世代才能实现,这不仅会增加育种时间,而且无法应用于无性繁殖的植物品种。

1.2 位点专一性重组系统切除法

位点专一性重组是通过重组酶的作用在 DNA 专一性位点间实现同源交换,重组是双向的,可以把外源基因整合到染色体上,也可以从染色体上把外源基因切除。该反应系统由重组酶及其识别位点组成,当两个识别位点正向排列时,重组酶催化两位点之间序列的切除^[5]。目前应用于植物遗传转化的重组酶系统有三种:源于大肠杆菌噬菌体 P1 的 Cre/lox、源于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 2um 质粒的 FLP/frt 和源于接合糖酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 的 pSR1 质粒的 R/Rs 重组系统^[1]。

1991 年, Dale 等报道将标记基因 *hpt* 置于两个 loxP 位点之间,通过表达 Cre 重组酶可将之从转基因植物基因组中切除^[6]。这需要在受体基因组内引入重组酶基因,剔除标记基因后还必须经有性世代的遗传分离去除重组酶基因,操作程序繁琐,应用受到很大限制。Koichi 等于 1999 年发展的农杆菌 MAT 载体系统 (muti-autotransformation, MAT) 使位点专一性重组在切除标记基因方面的应用曙光重现^[7], 该载体系统的主要特征是:将重组酶基因 *R* 与筛选标记基因 *ipt* (isopentenyl transferase, 异戊烯基转移酶) 置于两个正向排列的 Rs 位点之间构成标记基因区,与 *gus* 共构建到农杆菌 T-DNA 中。*ipt* 的编码产物是细胞分裂素生物合成的重要限速酶,它的过量表达使转基因苗表型异常,即产生 *ipt* 表型芽,以此作为初步筛选标记。重组酶基因 *R* 的表达将同时切除标记基因 *ipt* 和重组酶基因 *R*, 因此从 *ipt* 芽系中再生的表型正常苗即为无标记基因的转基因苗。以 MAT 载体转化烟草时,26%的 *ipt* 表型芽系中获得了无标记基因

区的转 *gus* 基因植株。但由于重组酶基因 *R* 被组成型启动子 (cauliflower mosaic virus 35S promoter, CaMV35S) 驱动,在转基因细胞形成较大的愈伤和 *ipt* 表型芽之前即将标记基因区切除,故得到的多数转基因植株中 *gus* 基因在 3 个拷贝以上。改进后的 GST-MAT 载体将重组酶基因 *R* 由可诱导启动子 GST-11-27 (glutathione-S-transferase) 驱动,其表达可被除草剂解毒剂“Safer”诱导,因此能精确控制标记基因区的切除时间。以 GST-MAT 载体转化烟草, *ipt* 表型芽再生率为 88%, 经“Safer”诱导培养后分化的转基因植株中, *gus* 基因整合而标记基因区被剔除的植株再生率达 14%, 其中 86% 以上的转基因植株中 *gus* 基因为单拷贝整合^[8]。2000 年, Zuo 等建立了基于人雌激素受体的化学诱导植物基因表达系统 XVE, XVE 的序列由细菌 LexA 阻遏物的 DNA 结合区 X、VP16 的酸性反式激活子区 V 和人的雌激素受体调控区 E 融合构建,表达产物可作用于靶启动子 CaMV35S 中的 LexA 操纵子,从而使靶启动子的表达受 β -雌二醇的高效诱导和严格控制^[9]。他们将 XVE 系统与 Cre/lox 剪切系统结合发展了另一标记基因剔除系统 CLX (Cre/loxP DNA excision system), 在拟南芥上的研究表明,经 β -雌二醇诱导后, CLX 对受体植株标记基因区 (包括 XVE、重组酶基因 *cre* 和标记基因 *nptII*) 的切除率达 100%! 该系统不仅可精确控制切除时间,而且不依赖于 *ipt* 表型筛选,同时适用于无性繁殖的植物品种^[10]。因此,通过构建合适的载体,位点专一性重组系统可用来高频再生不含标记基因的单拷贝转基因植株,这正是植物基因工程育种的理想策略之一。

1.3 染色体内同源重组诱导缺失法

两个同源序列之间发生染色体内重组 (intrachromosomal homologous recombination, ICR) 可诱导 DNA 片段缺失,这一现象为标记基因的剔除提供了另一种技术基础。但自然条件下植物细胞内的 ICR 频率很低,以烟草为例,一株 6 周龄的烟草植株的全部细胞内 ICR 的平均出现频率低于 10 次^[11],使之无法应用于植物中标记基因的缺失。令人振奋的是,最近 Elena 等^[2] 构建的农杆菌 attP-ICR 载体系统,使烟草再生植株的 ICR 频率显著提高,成功诱导了标记基因的缺失。

细菌噬菌体在 *E. coli* 基因组中的整合是通过噬菌体附着序列 attP (phage attachment) 和细菌附着序列 attB (bacterial attachment) 之间的重组实现的^[12]。attP-ICR 载体系统的筛选标记基因构建策略如下:将三个标记基因绿色荧光蛋白基因 *gfp*、茶乙醛胺醛基转移酶 (催化生长素前体茶乙醛胺 NAM 转化成生长素 NAA) 基因 *tms-2* 和卡那霉素抗性基因 *nptII* 表达框依次串联,然后插入两个 352bp 的 attP 序列之间,并在紧邻左侧 attP 序列的上游加上一转化促进序列 TBS (transformation booster sequence) 以提高异常 ICR 的频率,从而诱导标记基因的缺失,水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂 I (oryzacystatin-I) 基因作为目的基因连接在 TBS 的

上游,整个构建物插入到农杆菌的 T-DNA 区,即建成 attP-ICR 载体系统。由农杆菌介导转化烟草叶片外植体,得到局部缺失 *gfp* 基因的绿色-白色嵌合体愈伤,白色愈伤经 NAM 和 NPT 筛选鉴定,分化成的转基因植株中,约有 50% 植株全部缺失三种标记基因,其中 10% 的植株完整保留了目的基因的整合,其他植株目的基因区也发生了重排或缺失^[2]。这表明,尽管 ICR 反应并不精确地限定在两个 attP 序列之间,attP-ICR 载体系统不需额外的重组蛋白,确实能通过 ICR 剔除植物中两个 attP 序列之间的筛选标记基因!虽然作用机制仍有待阐明,但这为培育不含标记基因的转基因植株提供了捷径。

基因植物中筛选标记基因的剔除技术近几年取得了突破性进展,但尚处于探索阶段,所用载体局限于农杆菌的 T-DNA 载体,试验对象也主要集中在模式植物烟草和拟南芥上,要使这些技术成功地应用于植物育种,还需要做大量的研究工作,并针对不同植物建立相应的标记基因剔除系统。此外,外源基因在受体基因组内的整合与剪切机制也有待阐明。

2 安全性标记基因

寻找安全性标记基因用于植物遗传转化是基因工程发展的必然趋势,目前有应用前景的安全标记基因主要包括化合物解毒酶基因和糖类代谢酶基因两类。

2.1 化合物解毒酶基因

这种标记基因的作用机制和抗性标记基因相似,也属于负筛选(opposite selection),标记基因编码产物是酶,可催化对细胞生长有毒的化合物转变成无毒的化合物,从而使转化细胞能在含有毒化合物的培养基上生长,而非转化细胞被杀死。

来源于藜科高等植物的甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)基因,已作为目的基因用于提高水稻^[13]、烟草^[14]等重要作物的抗逆境胁迫能力。由于 BADH 在植物中能催化有毒的甜菜碱醛转变成无毒的甜菜碱,BADH 基因在安全标记基因方面具有极大的潜在优势:(1)基因来源及产物安全。(2)催化的终产物有益。甜菜碱是高等植物天然的渗透调节物质,溶解性高,不带净电荷,高浓度对植物的许多酶无害或有保护作用。(3)筛选程序简单。只要在培养基中添加适量的甜菜碱醛提供筛选压即可,无须其他辅助设备。Daniell 等在这方面进行了有益的尝试,转化烟草叶绿体基因组时,以菠菜的甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因作为标记基因,由甜菜碱醛提供筛选压,与利用抗生素壮观霉素筛选时相比,不仅得苗快,转化频率高,而且 BADH 基因稳定整合到转基因烟草植株的全部叶绿体基因组中,得到了同质化(homoplasmy),转基因植株中的 BADH 酶活性比对照提高了 15~18 倍^[15]。这表明 BADH 基因确实可以作为植物转化的安全标记基因,只是在植物转化上的应用还须作进一步验证。

2.2 糖类代谢酶基因

近几年根据植物细胞对不同糖类碳源的代谢能力,所发展的利用糖类作为筛选剂的正筛选系统(positive selection system),在安全标记基因方面显示出巨大的应用潜力。这类标记基因的编码产物是某种糖类的分解代谢酶,转化细胞能利用筛选剂糖类作为主要碳源,可在筛选培养基上生长扩增,而非转化细胞则处于饥饿状态,生长被抑制但不被杀死,依此可以区分转化与非转化细胞。已试用于植物转化的此类标记基因有木糖异构酶(xylose isomerase, *xylA*)基因和磷酸甘露糖异构酶(phosphomannose isomerase, *pmi*)基因。

木糖异构酶催化 D-木糖到 D-木酮糖的可逆转变。马铃薯、烟草和番茄的培养细胞可利用 D-木酮糖但不能利用 D-木糖作为主要碳源。Anna 等比较了来源于 *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* 的标记基因 *xylA* 与抗性标记基因 *nptII* 对植物细胞的筛选效应,结果表明,D-木糖筛选时马铃薯、番茄的转化率比卡那霉素筛选时显著增高,烟草的转化率虽比卡那霉素筛选时降低,但也可以取得良好的筛选效果^[16],以来源于 *Streptomyces rubiginosus* 的 *xylA* 作为标记基因农杆菌介导转化马铃薯细胞时,再生植株中报道基因 *gus* 转化率比利用 *nptII* 作标记基因时提高了 9 倍^[13]。来源于 *E. coli* 的 *pmi* 作为标记基因,甘露糖作为筛选剂已成功应用于甜菜、玉米^[14]和水稻^[15]的遗传转化。转化水稻幼胚时,转基因植株中标记基因 *pmi* 的转化率为 41%,其中 85% 的植株为 *gus* 阳性,对标记基因而言,*pmi* 要比潮霉素抗性基因 *nptII* 的转化率高一倍以上。

以糖类为筛选剂的正筛选系统标记基因产物安全(编码的酶已广泛应用于食品工业)、筛选剂价格低廉、筛选程序简单、效果显著,而且转基因植株生长比较旺盛,有望成为安全性标记基因筛选系统的主流。

参 考 文 献 (References):

- [1] Holger Puchta. Removing selectable marker genes: taking shortcut[J]. Trends in Plant Sci, 2000, 5(7): 273~2742.
- [2] Elena Zubko, Chartes Scutt, Peter Meyer. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18, 442~445.
- [3] lock M, Debrouwer D. Two T-DNAs co-transformed into Brassica napus by a double Agrobacterium infection are mainly integrated at the same locus[J]. Theor Appl Genet, 1991, 82, 257~263.
- [4] Komari T, Hiei Y, Saito Y, et al. Vector carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers[J]. Plant J, 1996, 10, 165~174.
- [5] 李育阳主编. 基因表达技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 168~169.
- [6] Dale E C, Ow D W. Gene transfer with subsequent removal of

- the selection gene from the host genome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 23, 10558~10562.
- [7] Sugita k, Matsunaga E, Ebinuma H. Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing [J]. Plant Cell Reports, 1999, 18, 941~947.
- [8] Koichi Sugita, Takehide Kasahara, Etsuko Matsunaga, *et al.* A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency [J]. The Plant Journal, 2000, 22(5): 461~469.
- [9] Zuo J, Niu Q-W, Chua N H. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants[J]. Plant J. 2000, 24(2): 265~273.
- [10] Zuo J, Niu Q-W, Simon Geir Moller, *et al.* Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants [J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(2): 157~161.
- [11] Puchta H, Swoboda P, Gal S, *et al.* Somatic intrachromosomal homologous recombination events in population of plant siblings [J]. Plant Mole Biol, 1995, 28: 281~292.
- [12] Craig N L, Nash H A. The mechanism of phage lambda site-specific recombination; site-specific breakage of DNA by Int topoisomerase [J]. Cell, 1984, 39: 707~716.
- [13] 郭岩, 张莉, 肖岗, 等. 甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中的表达及转基因植株的耐盐性研究[J]. 中国科学(C辑), 1997, 27(2): 151~155.
- [14] 刘风华, 郭岩, 谷冬梅, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究[J]. 遗传学报, 1997, 24(1): 54~58.
- [15] Daniell H, Muthukumar B, Lee S B. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection[J]. Curr Genet, 2001, 39(2): 109~116.
- [16] Anna Haldrup, Steen Guldager Petersen, Finn Thyge Okkels. The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 37: 287~296.
- [17] Haldrup A, Petersen S G, Okkels F T. Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 76~81.
- [18] Negrotto D, Jolley M, Beer S, *et al.* The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 798~803.
- [19] Paola Lucca, Xudong Ye, Ingo Potrykus. Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent[J]. Molecular Breeding, 2001, 7: 43~49.

“纪念 DNA 模型发表 50 周年暨《遗传学报》创刊 30 周年学术研讨会”报名通知

1953 年 4 月 25 日, 英国《自然》杂志发表了沃森和克里克的文章“核酸的分子结构——脱氧核糖核酸的一个结构模型”。DNA 双螺旋结构模型的建立, 标志着人类在揭示生命的遗传奥秘方面迈出了具有里程碑意义的一步。

《遗传学报》是中国遗传学会和中国科学院遗传与发育生物研究所主办、科学出版社出版的高级学术刊物, 中国自然科学核心期刊, 全国优秀期刊, 全国期刊方阵“双百期刊”, 国家期刊奖重点期刊, 创刊以来, 发表论文 2337 篇, 为发展中国遗传学事业做出了重要贡献。已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MED)等 30 余种国内外重要检索系统和数据库收录。为了纪念 DNA 模型发表 50 周年暨《遗传学报》创刊 30 周年, 特举办本次学术研讨会。大会主题是: 从 DNA 模型到基因组。

1. 主办单位: 中国遗传学会, 中国科学院遗传与发育生物研究所, 东南大学

承办单位: 《遗传学报》、《遗传》杂志编辑室, 东南大学医学院遗传学研究中心

2. 大会主席: 中国遗传学会理事长 赵寿元;
《遗传学报》、《遗传》杂志主编 朱立煌
东南大学校长 顾冠群

大会副主席: 《遗传学报》副主编 陈竺、吴常信、李家洋、张启发

中国科学院遗传与发育生物研究所副所长 薛勇彪 东南大学副校长 浦跃朴

大会秘书长: 李绍武、谢维

3. 日期与地点: 2003 年 4 月 20~24 日, 南京丁家桥;

东南大学医学院

4. 收费标准: 2003 年 3 月 20 日之前报名并交注册费, 每人 400 元, 会上交注册费, 每人 600 元。欢迎公司企业参展, 国内公司 2000 元, 外商公司 3000 元。

5. 会议内容:

(1) 纪念 DNA 双螺旋结构模型发表 50 周年学术报告, 优秀征文颁奖

(2) 《遗传学报》30 年回顾与展望; 表彰优秀编委; 推荐下届编委人选

(3) 会后协助组织参观黄山

6. 征文范围: 遗传学、发育生物学、基因组学、分子进化等领域有创新性的原始研究论文。2003 年 3 月 30 日截止。征文一式两份, 注明“会议征文”, 免收审稿费。收稿后及时回执, 及时审理。经送审录用的征文优先在《遗传学报》发表, 择优安排作大会报告, 从中评选优秀论文, 颁发证书和奖金。

有无征文均可报名参加会议。2003 年 3 月发报到通知。

7. 报名方式:

(1) 网上报名: www.Chinagene.org (2) E-mail: byliu@genetics.ac.cn (3) 请寄回执表

回执及汇款地址: 北京市安定门外大屯路 917 大楼《遗传学报》编辑部 刘波勇收

邮政编码: 100101 咨询电话: 010-64889354 请任选一种方式报名。

《遗传学报》编辑部
2002 年 1 月 10 日