

植物选择标记基因剔除技术研究进展

苏月焱, 王旭静, 王志兴*

中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要: 获得无选择标记基因的转基因作物是转基因作物发展的必然趋势。目前剔除选择标记基因的常用方法包括共转化、位点特异性重组、转座子、同源重组等。本文综述了这些常用技术的原理和目前的发展现状, 同时对这些技术的特点进行描述, 并对植物安全转基因技术发展进行展望, 以期推动转基因作物的快速产业化。

关键词: 选择标记基因; 共转化; 位点特异性重组; 转座子; 同源重组

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2013.03.01

Research Progress on Marker-free Plant Transgenic Technology

SU Yue-yan, WANG Xu-jing, WANG Zhi-xing*

Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Under the tendency rapid development of genetically modified organism (GMO), it is necessary to obtain the marker-free transgenic plants. At present, the marker-free transgenic technologies include co-transformation, site-specific recombination, transposons, homologous recombination and so on. This paper summarizes the character, the theories and research progress of marker-free and redundant sequence-free transgenic technologies, which are extensively used in recent research. Then, it also prospects the application potential of the safe transgenic technologies for the rapid commercialization of GMOs.

Key words: selectable marker gene; co-transformation; site-specific recombination; transposons; homologous recombination

随着植物转基因技术的快速发展, 转基因作物种植面积迅速扩大, 到 2012 年已经达到 1.7 亿 hm^2 ^[1]。目前, 转基因作物已经从转化单个基因表达单一性状到转化多个基因表达复合性状的方向发展。在植物转基因技术长足发展中, 转基因复合性状的出现和发展使转基因作物的发展趋势呈现一种新的特点。然而在国际上转基因作物的安全性争论始终不断, 获得安全的转基因作物, 无论是从基因工程技术的长远发展考虑, 还是从生物安全性考虑都具有十分重要的意义。在研究第一代转基因作物逐步转向第二代及第三代^[2]转基因作物的同时, 去除冗余序列和选择标记基因无疑有助于安全转基因作物的获得和发展。在潜在的生物安全风险中, 最为突出的是选择标记基因带来的担忧。目前最常用的选择标记基因是抗

生素类基因, 这类基因可能通过异交作用飘移到近缘种中, 对生态环境产生影响^[3]; 其编码产生的蛋白质还可能会影响人及动物的肠道微生物。目前, 可以利用的选择标记基因有限, 作物的多次转化选择不同的标记基因也难以实现^[4]。因此无选择标记基因作物是转基因技术应用于安全生产发展的必然产物。目前研究去除选择标记基因的方法一般分为共转化法、位点特异性重组系统、转座子和同源重组等。本文将对这些方法和系统进行详细阐述。

1 去除选择标记基因的方法

1.1 共转化法 (co-transformation)

早在 1985 年, Depicker 等^[5]用分别带有不同

收稿日期: 2013-03-19; 接受日期: 2013-04-23

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2011ZX08010-003) 资助。

作者简介: 苏月焱, 硕士研究生, 主要从事转基因生物安全研究。E-mail: alweou@126.com。* 通讯作者: 王志兴, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物基因工程和转基因生物安全研究。E-mail: wangzhixing@caas.cn

T-DNA 区的两种土壤农杆菌菌株同时转化烟草(图 1a),验证了不同的 T-DNA 区可以同时转到一株烟草中,当这些 T-DNA 存在同一个菌株同一个载体上时,转化效率明显高于单独转化的效率。这使得以后得到无选择标记基因的转基因植株成为可能。Daley 等^[6]用含有不同 T-DNA 区(分别含有不同的标记基因)的一种土壤农杆菌转化番茄,证明了一个单独的分生组织中同时含有两个 T-DNA 区。用同样的方法转化烟草,得到了同时含有两个 T-DNA 区的转基因烟草,并且在同一个细胞中的两个 T-DNA 区可以通过转基因烟草的异交发生分离,充分证明两个 T-DNA 区不连锁^[7]。在探索得到无选择标记基因的过程中, Jacob 和 Veluthambi^[8]用含有两种质粒载体的根癌土壤杆菌(图 1b)转化烟草,当以一种质粒的标记基因作为筛选时,另一个质粒也会协同一起转化

到烟草中,这为选择标记基因和目的基因的分离奠定了基础。但是在实际的研究中两种质粒的共转化效率很低,工作量很大,为了提高共转化效率,“超级二元载体”成为一时研究的热点。Chen 等^[9]构建了一个带有两个 T-DNA 区的植物表达载体(图 1c),一个 T-DNA 区中含有表达绿色荧光蛋白的 *mgfp5* 基因和卡那霉素抗性基因,另一个 T-DNA 区含有 *gus* 基因,转化结果表明两个 T-DNA 区的共转化效率达到 62.1%,远远高于用两个菌株共转化效率的 9.1%。通过异交得到两个 T-DNA 分离的比率是 25.9%,也远远高于两个菌株共转化的 4.5%。双 T-DNA 超级二元载体成为获得无选择标记基因植株的一种高效工具^[10]。共转化法可以通过后代的异交分离得到无选择标记的转基因植株,选择标记基因可以和目的基因完全分离,去除效率为 100%。

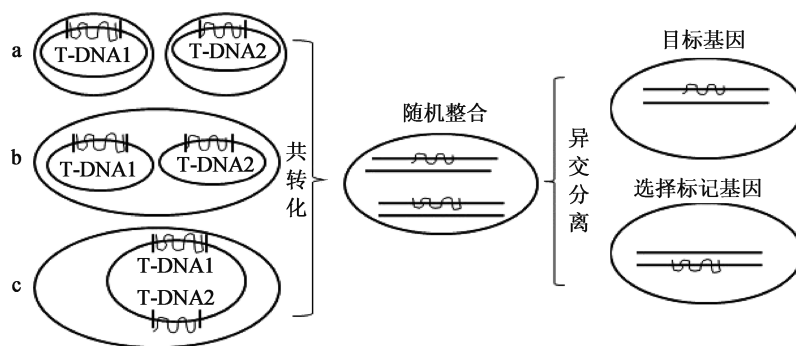


图 1 共转化体系

Fig. 1 Co-transformation system.

1.2 特异位点重组系统 (site-specific recombination)

特异位点重组系统就是重组酶催化特异性 DNA 识别序列使其发生重组^[11]。特异位点重组系统在去除选择标记基因的研究中发挥重要的作用,它可以删除同向特异识别序列间的 DNA 片段,使得在目的基因与选择标记基因连锁的情况下单独删除选择标记基因成为现实。这类系统的应用广泛,在多种植物中都有的报道^[12~14]。目前在植物中应用广泛的特异位点重组系统是来源于 P1 噬菌体的 CRE/*loxP* 重组系统和来源于啤酒酵母 2 μ 质粒的 FLP/*FRT* 重组系统。

重组酶 CRE 是整合酶家族中的一员,大小为 38 kDa,它能够识别两个相互独立的特异性识别序列 *loxP*,介导特异性识别位点间基因序列的重

组。特异性识别序列 *loxP* 大小为 34 bp,由大小为 13 bp 的两个发夹结构和大小为 8bp 决定方向的间隔序列组成^[15,16]。当在两个特异性识别序列的方向相同、相反、或不在一条染色体上时,两个特异性识别位点间的序列分别会发分删除、倒置和染色体的交换。Gleave 等^[17]用瞬时表达 *Cre* 基因的方法使得靶基因序列删除并得到无选择标记的转基因烟草。在此试验中使用了二次转化的方法,得到了 773 株烟草,得到无选择标记基因的效率为 0.25%,此系统获得完全无选择标记转基因植株的频率很低,但能证明在瞬时表达的情况下,CRE 酶能催化重组反应的进行。Lambert 等^[18]利用 CRE/*loxP* 系统在植物乳杆菌中完成了多个基因和选择标记基因的删除,在简单遗传背景下删除效率可以达到 99.4%。Mlynárová 等^[19]

利用 CRE/*loxP* 系统在烟草中验证了外源基因和选择标记基因的删除,效率可达到 99.976%。

重组酶 FLP 是目前已知的 λ 整合酶家族中唯一的真核成员。在 DNA 序列上与原核成员的差异较大,但是这些酶具有相同的催化机理,包括诱导外源 DNA 的插入,改变基因的表达形式,促进复制子的分离等^[20,21]。和 Cre 重组酶一样,它们都可以根据特异性识别位点的方向在很多生物体中完成染色体倒位、删除或 DNA 片段的插入^[22]。Lyznik 等^[23]将 FLP/*FRT* 系统用于水稻和玉米的原生质体转化证明了酵母中的 FLP/*FRT* 系统可以在植物细胞中行使功能。目前重组酶 FLP 已经被广泛运用于烟草、拟南芥、水稻、玉米等多种植物中进行特异性重组的研究,但是在不同的植物中重组效率差别较大,拟南芥中特异性识别位点间报告基因的重组效率为 20%^[24];转基因烟草中删除特异识别位点间的 *gus* 基因的效率为 37.4%^[25];玉米基因组中利用 FLP/*FRT* 系统删除选择标记基因,得到无选择标记基因的比率为 40.7%^[26];水稻的重组效率为 25.6%^[27]。FLP/*FRT* 系统的可逆反应会影响其重组效率,限制了其在植物中的广泛应用。Luo 等^[28]建立了一种高效的转基因删除技术,将 CRE/*loxP* 和 FLP/*FRT* 系统中的特异性识别位点进行融合,得到 *loxP*/*FRT* 融合位点,单独表达 CRE 和 FLP,使 *loxP*/*FRT* 融合位点重组的效率大大提高。以花粉和种子特异性启动子驱动的重组酶 FLP 介导 *loxP*/*FRT* 融合位点重组,对其 25 000 株当代转基因烟草的重组效率进行检测,在其花粉和种子中删除效率接近 100%。Nandy 等^[29]利用 FLP/*FRT* 系统介导的重组将外源基因片段插入到水稻基因组中,然后利用 CRE/*loxP* 系统介导的 DNA 重组删除选择标记基因,删除效率超过 50%。

此外,Zhou 等^[30]利用 CinH-RS2/ParA-MRS 系统在番茄基因组中完成了目的基因片段的删除。Thomson 等^[31]利用 Bxb1 重组酶系统在拟南芥中删除了相应的目的基因,验证了该系统可以作为研究无选择标记基因的一种有效工具。2010 年,Thomson 等^[32]还在拟南芥中证明了 phiC31 系统可以作为得到无选择标记基因的一种有效工具。

1.3 转座子(transposons)

转座子又称跳跃基因,是一类可以移动的遗

传因子,能在细胞内不同的 DNA 之间转移,分为反转录转座子和 DNA 转座子。植物转座子有 Ac、Ds、Spm/En、Tam、dTphl 和 Tos17 等,常用的植物转座子 Ac/Ds 系统来源于玉米,由自主因子 Ac 和非自主因子 Ds 组成,Ac 因子具有自身切除和转座的能力,Ds 因子只有在同一族因子(如 Ac 因子)存在时才能发生转座。Ac 因子的长度为 4.6 kb,末端的 11 bp 为不完整的反向重复序列。Ds 末端也为 11 bp 长的不完整反向重复序列。该系统已成功应用于转基因番茄中,并删除了选择标记基因^[33]。1997 年,Ebinuma 等^[34]利用 Ac 转座子,以 *gus* 基因和新霉素磷酸转移酶基因(*nptII*)为报告基因,以异戊烯基转移酶基因为选择标记基因(*ipt*)构建了 MAT 载体系统,通过土壤农杆菌 LBA4404 转化烟草,成功获得了无选择标记基因(*ipt*)的转基因烟草植株。金维正等^[35]将含有目的基因 *bar* 的 Ds 元件和 *hptII* 标记基因的 T-DNA 以及单独含有 Ac 元件的 T-DNA 分别转入到不同的水稻植株,再将含有 Ac 元件的转基因植株与含 Ds 元件的转基因植株杂交得到同时含有 Ac 和 Ds 元件的 F₁代植株,将 F₁自交,在 F₂植株中转座后的 Ds 元件与其 T-DNA 分离,在总共 100 株 F₂水稻植株中筛选得到 2 株只含有 *bar* 基因而无 *hptII* 标记基因的转基因水稻植株。Xuan 等^[36]利用 Ac/Ds 系统诱导基因组重排,在水稻基因组中得到较高的删除、倒置、复制等基因组重排效率。转座子在染色体中的转座可以使得选择标记基因与目的基因摆脱连锁,最终得到无选择标记基因的转基因植株。

1.4 同源重组(homologous recombination)

同源重组发生在含有同源序列的 DNA 分子之间,但在高等真核细胞内外源 DNA 与靶细胞 DNA 发生同源重组的机率非常低。噬菌体 λ 能整合进入大肠杆菌基因组中是通过其 attP 序列与大肠埃希氏菌中 attB 区域发生同源重组完成的。Zubko 等^[37]在两个同源序列 attP 中间插入了一个包括有选择标记基因 *nptII*、*gfp* 基因和 *tms2* 基因的 5.9 kb 的片段,在转基因烟草的愈伤组织中,通过 attP 序列的染色体同源重组成功地删除了选择标记基因。Day 等^[38]发现在叶绿体中同源重组删除选择标记基因简单而且高效。

2 展望

转基因技术的迅速发展推动了转基因作物的迅速商业化。反之,转基因作物的商业化也推动了转基因技术的发展,使其在社会发展中产生了重要的作用。但目前的生物技术可能存在潜在的生物安全风险,也成为其进一步发展的阻力。去除选择标记基因植株是转基因技术发展中经历的必然阶段。共转化法是在筛选过程中,工作量较大,选择标记基因和目的基因的分离需要通过杂交才能实现,周期过长,但是分离效率能够达到100%。在位点特异性重组中,重组酶可以精确的定位到识别序列,但是在删除效率上,不同植物体现不同的删除效率,而且效率几乎都达不到100%,无法在实际生产中应用。虽然利用FLP重组酶和 $loxP/FRT$ 融合位点在模式植物烟草中的删除效率可以达到100%,但是该系统在其他植物中的删除效率还需要进一步的验证。另外在位点特异性重组系统中,在完成删除时都会留下一个特异识别序列,影响了二次转化。转座子系统的应用也需要有性杂交和进一步的分离才能得到无选择标记的转基因植株,同时也限制了该系统在无性繁殖的材料中应用。天然的同源重组效率很低,在实际应用中工作量大,但是技术间的相结合有助于提高重组效率。Zu等^[39]利用TALEN介导的基因打靶技术通过同源重组对斑马鱼基因组成功完成定向改造。在目前的转基因技术中,借助于土壤农杆菌介导的转化方法是最常用的转化方法之一,它除了可以把目的基因和标记基因的表达框整合到植物基因组的同时也把包括边界序列等冗余序列在内的外源序列带到植物基因组中,在以上的方法中都不能解决在完成其功能后去除外源序列的问题。因此一方面需要在转基因技术的发展中去探索新的转基因技术,以达到安全转基因的目的。另一方面,可以通过研究TALEN、锌指核酸酶定点整合等新技术与其他常用技术结合,在得到用土壤农杆菌介导转化的转基因植株后,通过基因打靶等技术将转基因植物中的冗余序列、选择标记基因和目的基因等所去外源基因定点去除,得到实际意义上的安全转基因植株。

总之,虽然转基因作物对环境和健康的影响

存在争论,但是转基因作物在全世界的发展一直呈现持续增长的态势。相信随着转基因技术的进一步发展,在完成功能后彻底的去除外源基因序列,得到安全的转基因植物将会成为现实,这也将给人类带来更大的经济和社会效益。

参 考 文 献

- [1] Clive J. 2012 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(2): 1-8.
- [2] 刘治先, 乔峰, 张铭堂, 等. 世界转基因农作物的应用现状和发展趋势[J]. 山东农业科学, 2008, (7): 113-115.
- [3] 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.
- [4] Yoder J I, Goldsbrough A P. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants [J]. Nat. Biotechnol., 1994, 12(3): 263-267.
- [5] Depicker A, Herman L, Jacobs A, et al.. Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium*/plant cell interaction[J]. Mol. Gen. Genetics, 1985, 201(3): 477-484.
- [6] Daley M, Knauf V C, Summerfelt K R, et al.. Cotransformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants[J]. Plant Cell. Rep., 1998, 19:489-496.
- [7] 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., 1987, 8(6): 439-445.
- [8] Jacob S S, Veluthambi K. Generation of selection marker-free transgenic plants by cotransformation of a cointegrate vector T-DNA and a binary vector T-DNA in one *Agrobacterium tumefaciens* strain [J]. Plant Sci., 2002, 163(4): 801-806.
- [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-DNA binary vector system[J]. Plant Cell Rep., 2005, 23(9): 625-631.
- [10] Lei S, Zhou L, Lu M, et al.. Marker-free transgenic *Chrysanthemum* obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation with twin T-DNA binary vectors[J]. Plant Mol. Biol. Rep., 2009, 27(1): 102-108.
- [11] Hirano N, Muroi T, Takahashi H, et al.. Site-specific recombinases as tools for heterologous gene integration[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, 92(2): 227-239.
- [12] Moon H S, Abercrombie L L, Eda S, et al.. Transgene excision in pollen using a codon optimized serine resolvase CinH-RS2 site-specific recombination system[J]. Plant Mol. Biol., 2011, 75(6): 621-631.
- [13] Gidoni D, Srivastava V, Carmi N. Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol.

- Plant, 2008, 44(6): 457–467.
- [14] Srivastava V, Gidoni D. Site-specific gene integration technologies for crop improvement[J]. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2010, 46(3): 219–232.
- [15] Hoess R H, Abremski K. Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system[J]. *J. Mol. Biol.*, 1985, 181(3): 351–362.
- [16] Abremski K, Hoess R, Sternberg N. Studies on the properties of P1 site-specific recombination; evidence for topologically unlinked products following recombination[J]. *Cell*, 1983, 32(4): 1301–1311.
- [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(2): 223–235.
- [18] Lambert J M, Bongers R S, Kleerebezem M. Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum* [J]. *App. Environ. Microbiol.*, 2007, 73(4): 1126–1135.
- [19] Mlynárová L, Conner A J, Nap J P. Directed microspore - specific recombination of transgenic alleles to prevent pollen - mediated transmission of transgenes[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2006, 4(4): 445–452.
- [20] Esposito D, Scoeca J J. The integrase family of tyrosine recombinases; evolution of a conserved active site domain[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25(18): 3605–3614.
- [21] Nunes-Düby S E, Kwon H J, Tirumalai R S, *et al.*. Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1998, 26(2): 391–406.
- [22] Nagy A. Cre recombinase; the universal reagent for genome tailoring[J]. *Genesis*, 2000, 26(2): 99–109.
- [23] Lyznik L A, Mitchell J C, Hirayama L, *et al.*. Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21(4): 969–975.
- [24] Sonti R V, Tissier A F, Wong D, *et al.*. Activity of the yeast FLP recombinase in *Arabidopsis*[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1995, 28(6): 1127–1132.
- [25] 高媛媛, 赵德刚, 罗克明, 等. 热诱导 FLP 重组酶删除转基因烟草外源基因[J]. *高技术通讯*, 2007, 17(2): 180–184.
- [26] Li B, Li N, Duan X, *et al.*. Generation of marker-free transgenic maize with improved salt tolerance using the FLP/*FRT* recombination system[J]. *J. Biotechnol.*, 2010, 145(2): 206–213.
- [27] Hu Q, Kononowicz-Hodges H, Nelson-Vasilchik K, *et al.*. FLP recombinase-mediated site-specific recombination in rice[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2008, 6(2): 176–188.
- [28] Luo K, Duan H, Zhao D, *et al.*. ‘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[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2007, 5(2): 263–374.
- [29] Nandy S, Srivastava V. Marker-free site-specific gene integration in rice based on the use of two recombination systems[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2012, 10(8): 904–912.
- [30] Zhou Y, Yau Y Y, Ow D W, *et al.*. Site-specific deletions in the tomato genome by the CinH-RS2 and ParA-MRS recombination systems[J]. *Plant Biotechnol. Rep.*, 2012, 6(3): 225–232.
- [31] Thomson J G, Chan R, Smith J, *et al.*. The Bxb1 recombination system demonstrates heritable transmission of site-specific excision in *Arabidopsis* [J]. *BMC Biotechnol.*, 2012, 12(1): 9.
- [32] Thomson J G, Chan R, Thilmony R, *et al.*. PhiC31 recombination system demonstrates heritable germinal transmission of site-specific excision from the *Arabidopsis* genome[J]. *BMC Biotechnol.*, 2010, 10(1): 17.
- [33] Goldsbrough A P, Lastrella C N, Yoder J I. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato[J]. *Nat. Biotechnol.*, 1993, 11(11): 1286–1292.
- [34] 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(6): 2117–2121.
- [35] 金维正, 段瑞君, 张帆, 等. 利用 Ac/Ds 转座子系统在水稻中获得无选择标记转基因植株的方法[J]. *生物工程学报*, 2003, 19(6): 668–673.
- [36] Xuan Y H, Zhang J, Peterson T, *et al.*. Ac/Ds-induced chromosomal rearrangements in rice genomes [J]. *Mob. Genet. Elements*, 2012, 2(2): 67–71.
- [37] Zubko E, Scutt C, Meyer P. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18(4): 442–445.
- [38] Day A, Kode V, Madesis P, *et al.*. Simple and efficient removal of marker genes from plastids by homologous recombination[J]. *Methods Mol. Biol.*, 2004, 286: 255–270.
- [39] Zu Y, Tong X, Wang Z, *et al.*. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish [J]. *Nat. Methods*, 2013, 10(4): 329–331.