

转基因植物高效删除标记基因的实用型二元转化载体

A Novel Binary Vector to Get Marker-free Transgenic Plant

李 霞^{1,2}, 翁海波^{2,*}, 韩绍印², 席 宇², 雍克兰¹

LI Xia^{1,2}, WENG Hai-Bo^{2,*}, HAN Shao-Yin², XI Yu² and YONG Ke-Lan¹

1 上海大学生命科学学院, 上海 200436

2 郑州大学生物工程系, 郑州 450001

1 College of Life Sciences of Shanghai University, Shanghai 200436, China

2 Bioengineering Department of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

摘 要 利用雌激素诱导的 Cre/loxP DNA 重组系统, 构建用于转基因植物删除标记基因的实用新型载体, 将所有非目的基因放于两同向 loxP 位点间, 多克隆位点位于两 loxP 位点外, 可插入目的基因, 载体设计非常实用。在插入目的基因 GUS 后转化烟草, 雌激素诱导, 分析诱导前后 DNA 的重组情况、不同时间基因转录水平, 以及目的基因在诱导前后的表达。结果显示, 诱导后染色体 DNA 实现了高效重组, 非目的基因片段消失, 目的基因 GUS 在诱导后表达正常。

关键词 Cre/loxP, 雌激素诱导, XVE, 无标记转基因植物

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0550-05

Abstract A novel practical binary vector to get marker-free transgenic plant was constructed. The estrogen-inducible Cre/loxP DNA recombination system was adopted in this system. All non-target genes located between two identical orientation loxP sites could be excised from the transgenic genome by the Cre expression. In order to analyze this system, the target gene, GUS expression box (CaMV35s :GUS), was inserted in the MCS outside the region flanked by two loxP sites. Then it was introduced into the tobaccos. Results showed that the high-efficiency DNA recombination had take place and the target gene was working order after DNA excitation.

Key words Cre/loxP, estrogen-inducing, XVE, Marker-free Transgenic Plant

随着植物生物技术的发展, 转基因技术以其巨大的应用价值, 正逐步成为一种常规育种手段。但同时, 转基因植物的安全性问题, 也越来越多的受到人们的关注^[1]。

在获得转基因植物后, 一般随同目的基因转入植物的还有非目的基因或 DNA 片段。它们包括标记基因(包括抗性选择基因与报告基因), 启动子序列(如 CaMV35s)等。利用标记基因等可以从大量非转化细胞中将转化细胞筛选出来, 但随着转化植物

的继代, 抗性选择基因变得不再有用, 却仍在植物体内表达。这些基因也可能会进入环境中, 带来安全性问题^[2-4]。强启动子同样存在安全隐患^[5-8]。因此, 如果在获得转基因植物后, 能除去这些非目的基因片段, 可大大提高转基因植物的安全性, 这样的一些植物也称为无标记转基因植物。

实现转基因植物无标记的传统方法为共转化方法^[9-12], 技术上相对比较简单。但是, 它要通多次过继代杂交筛选, 费时较长。而对于一些树木、蔬菜等

由于本身采用无性繁殖,使这种方法的使用受到很大的局限^[13,14]。

DNA 定点重组系统,如 P1 噬菌体的 Cre/loxP 等 DNA 重组系统,被广泛的用于动、植物基因敲除^[15-18]。因此,也可将转基因植物非目的基因从基因组上敲除掉。有些研究利用此系统成功的实现了转基因植物的无标记,相对于传统方法,它更快捷、方便^[19-22]。

我们构建一种实用新型植物无标记双元转化载体 pNCX。参照 Zuo 等人^[23,24]报道,采用了相似的 XVE 诱导系统和 Cre/loxP 重组系统。Cre 重组酶为雌激素诱导表达型,其启动子采用 LexA + 35s(-46 区)启动区, LexA 调控区受 XVE 蛋白的调控,在无雌激素的情况高效阻遏基因的表达,但有雌激素存在时,它与雌激素结合又可高效启动基因表达^[23]。为了彻底实现无标记,在 T-DNA 区内,将所有非目的基因或 DNA 片段(包括 Cre 重组酶基因)放在两同向 loxP 位点间;而在两 loxP 位点外,设有一个多克隆位点,可插入目的基因表达框。当 T-DNA 区插入植物基因组 DNA 后,施加诱导, Cre 重组酶表达,两同向 loxP 位点间所有非目的基因和 DNA 片段将被剔除,只保留插入多克隆位点的目的基因序列。

为了验证系统的有效性,在 pNCX 多克隆位点插入了目的基因—GUS 表达框,以检测目的基因在诱导重组前后能否正常表达。转化烟草后,对 T₀ 代单拷贝转基因植株持续诱导。诱导后检测发现,大部分植株成功实现了基因重组,非目的基因消失,目的基因的表达没有受到影响。利用此雌激素诱导的重组系统非常高效的实现了转基因植物的无标记。

1 材料和方法

1.1 材料

烟草:革新一号(*Nicotiana tabacum* var. *Gexin* No.1) 郑州大学分子生物实验室保存;大肠杆菌菌株 DH5 α 和 HB101、农杆菌菌株 LBA4404、植物表达载体 pCAMBIA 1300、pBI 121、pER 8、pMM23 均为郑州大学分子生物实验室保存。载体构建过程中,PCR 扩增所用的酶均为高保真的 Pfu DNA 聚合酶(购于上海生工),连接反应均采用 T4 DNA 连接酶(购于 TaKaRa 生物工程有限公司),基因克隆引物为上海生工合成,引物名称和序列见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 pNCX 载体构建:以 pCAMBIA1300 为骨架, *hpt II* (*hygromycin phosphotransferase*) 抗性基因改变

为 *npt II* (*neomycin transferase II*) 抗性基因后,先后装入了 Cre 基因和 XVE 基因表达框,如图 1 所示。

在 T 区 LB 内侧端加 loxP 位点,同时 *hpt II* 抗性基因置换为 *npt II* 抗性基因。以质粒 pBI121 为模板扩增 *npt II* 基因,引物 Cnpt-F/Cnpt-R,引物带有 loxP 位点。Xho I 和 Sal I 酶切 PCR 产物,装入 Xho I 单酶切的 pCAMBIA1300 质粒,构建成载体 pN。

Cre 表达框的装入。启动子区,选用载体 pER8 上已有的 LexA + 35s(-46 区)转录调控区^[23],以其为模板,PCR 扩增,引物为 Clex-F/Clex-R。Clex-F 上带有 loxP 位点,并且也带上了 Asc I、I-Ceu I 和 Pac I 等酶切位点组成的多克隆位点(MCS'),如图 1。PCR 产物用 Hind III 和 Xba I 酶切,装入同酶切的 pN 载体上。然后,以质粒 pMM23 为模板,PCR 扩增 Cre 基因,引物为 CCre-F/CCre-R,用 Spe I 和 Kpn I 酶切 PCR 产物,装入 Xba I 和 Kpn I 酶切的 pN 构载体上,构建成载体 pNC。终止序列在下面步骤中加入。

XVE 表达框的装入。以质粒 pER8 为模板,PCR 扩增 XVE 基因,引物为 Cxve-F/Cxve-R。Spe I 酶切 PCR 产物一端,另一端保持平头末端。装入 Xba I 和 EcoR I 酶切后的 pBI121 载体上。用 Apa I 和 EcoR I 切下 XVE 表达框(CaMV35s 启动子 + XVE 编

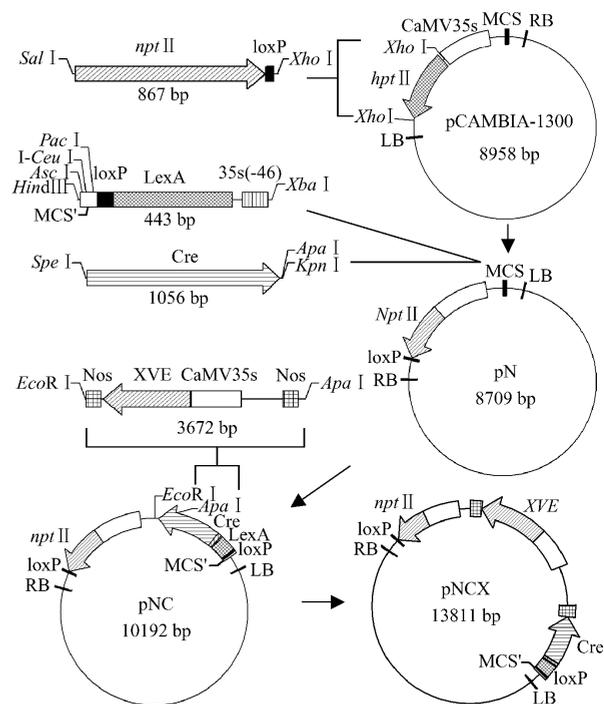


图 1 载体 pNCX 的构建

Fig. 1 Construction of the vector pNCX

MCS: Multiple Cloning Site of pUC18; MCS': Multiple Cloning Site (Restriction sites: Pac I, I-Ceu I and so on).

码区 + Nos 终止子), 这段序列前面额外带有 Nos 终止子(Nopaline synthase terminator)片段, 作为 *Cre* 基因表达框的终止序列。将其装入同酶切的 pNCX 载体上, 载体 pNCX 构建完成。构建流程图见图 1。

为了验证目的基因在诱导前后的表达情况, 在多

克隆位点(MCS')插入 GUS 表达框。以 pBI121 载体为模板, PCR 扩增上的 GUS 表达框(CaMV35s 启动子 + GUS 编码区 + Nos 终止子)。引物为 Gus-F/Gus-R。PCR 扩增产物经 *Ase*I、*Pac*I 双酶切后, 装入同酶切的 pNCX, 最终构建了含有目的基因的载体。

表 1 PCR 引物(下划线 酶切位点 边框: loxP 位点)
Table 1 Primers used for PCR (Underline: restriction site; Frame: loxP site)

Primers	Sequence
Cnpt-F	5'-AAGTCGACGCCACCATGATTGAACAAGATGGATTGCACG-3'
Cnpt-R	5'-AACTCGAGCTTGTGCGATCGAC ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT TTATCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGCGG-3'
Clex-F	5'-AAAAGCTTGGCGCGCCTTCGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTACGTTATTAA ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT AGCTTGGGCTGCAGGTCG-3'
Clex-R	5'-AATCTAGAGACTAGCTTCAGCGTGCCTCTCC-3'
CCre-F	5'-ACTAGTATGTCCAATTTACTGACCGTACACC-3'
CCre-R	5'-GGTACCGGGCCCTAATCGCCATCTTCCAGCAGG-3'
Cxve-F	5'-AAAAGCTAGTATGAAAGCGTTAACGGCCAGG-3'
Cxve-R	5'-TCAGACTGTGCCAGGAAACC-3'
Gus-F	5'-AAAAGCGCGCCAGCTATGACCATGATTACGCCAAG-3'
Gus-R	5'-AAAATTAATTAAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGT-3'

1.2.2 烟草转化: 三亲杂交法转化根癌农杆菌 LBA4404^[25], 然后以叶盘法转化烟草^[26]。取幼嫩的无菌烟叶, 农杆菌感染 5 ~ 10min, 放置在 MSB(含 1mg/L 6-BA 的 Murashige-Skoog 培养基)上。28℃ 2d 后, 转至含有 500 μ g/mL Ce(头孢霉素), 250 μ g/mL Cb(羧苄青霉素)和 150 μ g/mL Kan(卡那霉素)的 MSB 培养基上, 每 2 周继代一次。芽长到 2 ~ 3cm 时, 转至在 MS 中加入 Cef 100 μ g/mL, Kan 150 μ g/mL 的生根培养基上培养备用。

1.2.3 筛选转基因烟草: PCR 扩增 *Cre* 基因初步检测筛选转基因植株。提取转基因植物 DNA, 用限制酶 *Eco*R I 完全酶切后, Southern blot 杂交分析。 α -P³²-dCTP 标记 *Cre* 基因为探针, 标记用随机引物法。采用了 Sambrook 等分子克隆实验指南(第二版)^[27] 的杂交方法。

1.2.4 转基因烟草的诱导: 对 4 株 T₀ 单拷贝插入的转基因植株 S2、S13、S17 和 S31, 分别施加诱导。诱导剂 17- β -雌二醇溶于二甲基亚砜(DMSO)中, 以 10mmol/L 的储存液浓度冻存于 -20℃ 环境中。取转基因单拷贝插入的植株, 生根培养约 2 周后, 移入 MS 无抗液体培养基上。培养基中加入终浓度为 5 μ mol/L 的 17- β -雌二醇, 然后每隔 2d 喷诱导剂 1 次, 共持续诱导了 19d。

1.2.5 诱导后分析: 提取植株 S2、S13、S17 和 S31 诱

导前与诱导 19d 后的基因组 DNA, PCR 扩增 *Cre* 基因。同时, 提取诱导前后的基因组 DNA, *Hind* III 完全酶切后, α -P³²-dCTP 标记 *Cre* 基因为探针, Southern blot 杂交分析^[27]。提取诱导植株不同诱导时期叶片的总 RNA, RT-PCR 扩增 *XVE*、*Cre* 和 *GUS* 基因。诱导前和诱导后, 采集植株 S2、S13、S17 和 S31 的叶子, GUS 染色^[28]。

2 结果与讨论

2.1 pNCX 载体构建

我们参照 Zuo 等人^[23, 24]报道, 也采用了相似的 XVE 诱导系统和 *Cre/loxP* 重组系统, 如图 1。XVE 诱导系统为高效的雌激素诱导表达系统, 可用于植物基因的诱导表达^[23]。获得转基因植物后, 施加诱导, 将位于 loxP 位点间所有非目的基因或 DNA 片段从染色体基因组上切下, 只留下 loxP 位点外装入多克隆位点(MCS')的目的基因, 实现无标记。

多克隆位点由 *Ase* I、*Pac* I 和 *I-Ceu* I 等 8 或 12 切点的酶切位点构成, 尽量避免在插入目的基因表达框时会有酶切位点的冲突, 使载体更为实用。在 T-DNA 区靠近 LB 端加上 loxP 位点的同时, 将 *hpt* II 基因置换为相对更经济且同样高效的 *npt* II 基因, 如图 1。

© 中国科学出版社 2006 年 12 月出版

GUS 表达框的载体构建成功,转化烟草,验证此载体系统的有效性。

2.2 转基因烟草获得

PCR 鉴定初步鉴定 T_0 代转基因烟草后,进行 Southern blot 检测,22 株检测阳性。其中,单拷贝转基因植株为 4 株,分别是 S2、S13、S17、S31(结果未显示)。

2.3 诱导分析

我们选择了单拷贝转基因植株进行诱导分析。由于多拷贝插入的转基因植株,染色体上存在多个 loxP 位点(大于 2 个),重组酶作用下 loxP 位点间可能会发生重组,导致染色体重排或大片段缺失。并

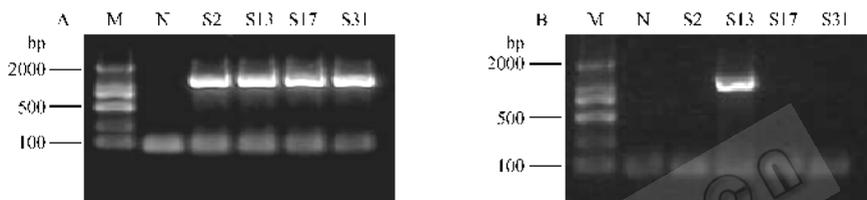


图 2 诱导 19d 后 *Cre* 基因扩增结果

Fig. 2 Amplification results of *Cre* before and after 19 days' induction

A: before induction; B: after 19 days' induction. Line N: Non-transgenic tobacco control; Lines S2, S13, S17 and S31: single-copy transgenic tobaccos; DL 2000 was used as molecular weight (MW) markers; fragments: 2000, 1000, 750, 500, 250 and 100 base pairs.

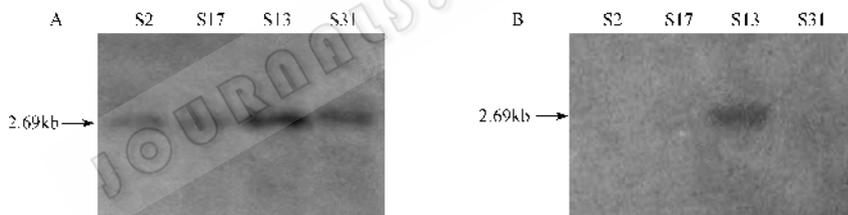


图 3 诱导 19d 后基因组以 *Cre* 基因为探针 Southern 杂交

Fig. 3 Southern blot of the genomic DNA digested with *Hind*III before and after 19 days' induction, using *Cre* probe

A: before induction; B: after 19 days' induction. Lines S2, S13, S17 and S31: single-copy transgenic tobaccos; MW: λ DNA/*Eco*T14 I marker.

从 PCR 和 Southern blot 杂交结果看,4 株植物诱导后有 3 株发生了有效剪切重组,此系统是非常高效的。而株系 S13 没有发生有效剪切重组,可能是诱导不充分,或者也可能是 T-DNA 插入引起的 DNA 重排或部分丢失而导致内部基因失活。

采集株系 S2 不同诱导时期 RNA,RT-PCR 分析 *XVE*、*Cre* 和 *GUS* 基因转录情况,如图 4。结果显示,诱导 48h 后 *Cre* 基因开始转录,而 *XVE* 一直正常转录。当诱导持续 15d 时,已检测不到两基因转录产物,说明 DNA 已发生剪切重组。目的基因 *GUS* 在诱导前后一直正常转录,诱导对于目的基因的转录没有影响。对株系 S17 分析也有相似结果。

诱导后,对目的基因-*GUS*,进行了 *GUS* 染色。结果显示 4 株都能正常染色,如图 5。因此,在诱导

且,一般获得转基因植株后, T_0 代也要进行单拷贝筛选,然后继代,筛选可稳定遗传的转基因植株。因此,对 T_0 代单拷贝插入的转基因植株进行诱导分析也具有重要意义。

选择了 4 株单拷贝插入转基因烟草,采集诱导前与诱导 19d 后的叶片,提取基因组 DNA,PCR 扩增 *Cre* 基因,结果如图 2。

提取的 DNA 用 *Hind*III 进行完全酶切,以 *Cre* 基因为探针, Southern blot 杂交分析。由于插入植物染色体的 T-DNA 区内 *Cre* 基因两端分别有一个 *Hind*III 酶切位点,所以杂交后会有相同大小的条带,结果如图 3。

基因重组过程中,目的基因的表达没有受到影响。

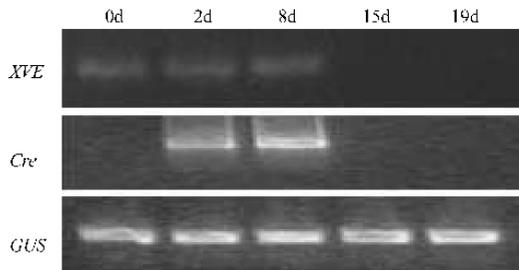


图 4 植株 S2 不同诱导时间 *XVE*、*Cre* 和 *GUS* 基因的转录情况

Fig. 4 Transcription level of *XVE*, *Cre* and *GUS* in Strain S2 in the different time of induction

以上结果表明, $pNCX$ 载体系统是高效、实用的,它适用于植物的遗传转化。利用此系统可快捷、高效的获得无标记转基因植物。

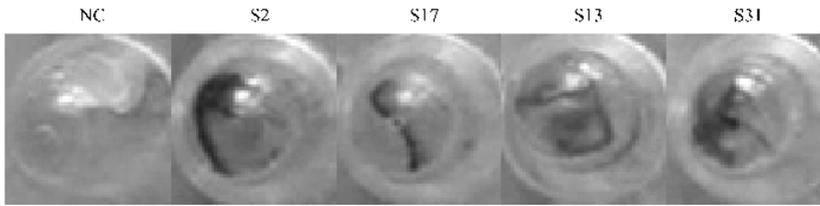


图5 诱导 19d 后 GUS 染色

Fig.5 GUS strain after 19 days' induction

S2, S13, S17 and S31 : single-copy transgenic tobaccos ;NC : non-transgenic tobacco control.

REFERENCES (参考文献)

- [1] Liu Q, Zhu XQ. Biosafety. Beijing : Science Press, 2000
- [2] Yoder JI, Goldsbrough AP. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Bio Technol*, 1994, **12** : 263 - 267
- [3] Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** : 2117 - 2121
- [4] Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Endo S, Yamada K, Komamine A. System for the removal of a selection maker and their combination with a positive marker. *Plant Cell Rep*, 2001, **20** : 383 - 392
- [5] Ho MW, Ryan A, Cummins J. Cauliflower mosaic viral promoter - a recipe for Disaster? *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1999, **11** : 194 - 197
- [6] Ho MW, Ryan A, Cummins J. Hazards of transgenic plants with the cauliflower mosaic viral promoter. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2000, **12** : 6 - 11
- [7] Ho MW, Ryan A, Cummins J. CaMV35S promoter fragmentation hotspot confirmed and it is active in animals. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2000, **12** : 189
- [8] Cummins J, Ho MW, Ryan A. Hazardous CaMV promoter? *Nat Biotechnol*, 2000, **18** : 263
- [9] De BM, Debrouwer D. Two T-DNAs co-transformed into Brassica napus by a double Agrobacterium tumefaciens infection are mainly integrated at the same locus. *Theor Appl Genet*, 1991, **82** : 257 - 263
- [10] Daley M, Knauf VC, Summerfelt KR, Turner JC. Co-transformation with one Agrobacterium tumefaciens strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 1998, **17** : 489 - 496
- [11] Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T. Vector carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J*, 1996, **10** : 165 - 174
- [12] Lu HJ, Zhou XR, Gong ZX, Upadhyaya NM. Generation selectable marker-free transgenic rice using double right-border (DRB) binary vector. *Aust J Plant Physiol*, 2001, **28** : 241 - 248
- [13] Gleave AP, Mitra DS *et al.* Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing : transient expression of Cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol Biol*, 1999, **40** : 223 - 235
- [14] Hajdukiewicz PTJ, Gilbertson L, Staub JM. Multiple pathways for Cre/lox site-specific recombination system. *Plant J*, 2001, **27** : 161 - 170
- [15] Austin S, Ziese M, Sternberg N. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell*, 1981, **25** (3) : 729 - 736
- [16] Abremski K, Hoess R, Sternberg N. Studies on the properties of P1 site-specific recombination : evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell*, 1983, **32** : 1301 - 1311
- [17] Medberry SL, Dale E, Qin M, Ow DW. Intra-chromosomal rearrangements generated by Cre-lox site-specific recombination. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23** (3) : 485 - 490
- [18] Rossant J, McMahon A. "Cre"-ating mouse mutants-a meeting review on conditional mouse genetics. *Genes Dev*, 1999, **13** (2) : 142 - 145
- [19] Chen M, Wang LX *et al.* Gene Expression Controlled by Heat-Inducible Site-Specific Recombination in Tobacco. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45** (12) : 1481 - 1488
- [20] Srivastava V, Ow DW. Marker-free site-specific gene integration in plants. *Trends Biotechnol*, 2004, **22** (12) : 627 - 629
- [21] Jia HG, Lu LF, Pang YQ *et al.* Using green fluorescent protein as a reporter to monitor elimination of selectable marker genes from transgenic plants. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2004, **20** (1) : 10 - 15
- [22] Wang Y, Chen B, Hu Y *et al.* Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the cre/lox site-specific recombination system. *Transgenic Res*, 2005, **14** (5) : 605 - 614
- [23] Zuo JR, Niu QW, Chua NH *et al.* An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plant. *Plant J*, 2000, **24** (2) : 265 - 273
- [24] Zuo JR, Niu QW, Moller SG, Chua NH. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic Plants. *Nat Biotechnol*, 2001, **19** : 157 - 161
- [25] Draper J, Scott R, Armitage P *et al.* Plant genetic transformation and gene expression. Oxford : Blankwell. 1988
- [26] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 1962, **15** : 473 - 497
- [27] Sambrook, J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd edn, Cold Spring Harbor, New York. 1989
- [28] Jefferson RA. Assaying chimeric genes in plants : The GUS gene