

利用 FLP/*frt* 重组系统产生无选择标记的转基因烟草植株 Produce of Marker-free Transgenic Tobacco Plants by FLP/*frt* Recombination System

单晓映, 李蓓, 张举仁*

SHAN Xiao-Yi, LI Bei and ZHANG Ju-Ren*

山东大学生命科学院, 济南 250100

School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China

摘要 在植物转基因植株产生过程中, 对转化细胞进行抗性筛选是通用程序, 转化细胞的抗性一般是抗生素抗性 or 除草剂抗性, 将赋予转化细胞抗性的选择标记基因删除是提高转基因植物生物安全性的重要措施。来自于啤酒酵母的 FLP/*frt* 位点特异性重组系统可有效删除同向定点重组位点 *frt* 之间的基因。通过多步骤重组, 建立了可在植物中广泛应用的 FLP/*frt* 位点特异性重组系统。该系统包括含有 *frt* 位点的植物表达载体 pCAMBIA1300-*betA-frt-als-frt* 和含有由热诱导启动子 *hsp* 启动的 FLP 重组酶基因的植物表达载体 pCAMBIA1300-*hsp-FLP-hpt*。利用二次转化的方式将二者先后转入烟草植株, 热激处理后, 热诱导型启动子 *hsp* 调控的重组酶 FLP 基因的表达催化位于选择标记基因 *als* 两侧同向 *frt* 位点间的重组反应, 有效地删除了选择标记基因 *als*。41% 的经热激处理的二次转化植株发生了选择标记基因的删除, 表明该系统在获得无选择标记基因的转基因植株中有很好的应用价值。

关键词 选择标记基因, FLP/*frt* 位点特异性重组系统, *hsp* 热诱导启动子

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)05-0744-07

Abstract Selectable marker genes that usually encode antibiotic or herbicide resistances are widely used for the selection of the transgenic plants, but they become unnecessary and undesirable after transformation selection. An important strategy to improve the transgenic plants' biosafety is to eliminate the marker genes after successful selection. In the FLP/*frt* site-specific system of the 2 μ m plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*, the FLP enzyme efficiently catalyzes recombination between two directly repeated FLP recombination target (*frt*) sites, eliminating the sequence between them. By controlled expression of the FLP recombinase and specific allocation of the *frt* sites within transgenic constructs, the system can be applied to eliminate the marker genes after selection. Through a series of procedures, the plant FLP/*frt* site-specific recombination system was constructed, which included the *frt* containing vector pCAMBIA1300-*betA-frt-als-frt* and the FLP expression vector pCAMBIA1300-*hsp-FLP-hpt*. The FLP recombinase gene was introduced into transgenic (*betA-frt-als-frt*) tobacco plants by re-transformation. In re-transgenic plants, after heat shock treatment, the marker gene *als* flanked by two identical orientation *frt* sites could be excised by the inducible expression of FLP recombinase under the control of *hsp* promoter. Excision of the *als* gene was found in 41% re-transgenic tobacco plants, which indicated that this system could make a great contribution to obtain the marker free transgenic plants.

Key words Selectable marker genes, FLP/*frt*, site-specific recombination system, *hsp* promoter

Received: April 28, 2006; Accepted: May 29, 2006.

This work was supported by Grants from National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2002AA212071).

* Corresponding author. Tel: 86-531-88564350; E-mail: jrzhang@sdu.edu.cn

国家高技术研究与发展项目(No.2002AA212071)资助。

以转基因技术为代表的植物基因工程技术为农业的可持续发展提供了强有力的支持,但是用以有效筛选转基因植物的选择标记基因(如抗生素抗性基因、除草剂抗性基因等)的使用却引发了人们对转基因植物安全性的隐忧^[1-4]。因此,培育具有安全选择标记基因或无选择标记基因的转基因植物成为提高转基因植物安全性的有效手段^[5]。其策略之一是在转化植株筛选完成后,采取一系列措施将选择标记基因删除。

来自于啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞核内 2 μ m 质粒的 FLP/*frt* 位点特异性重组系统中重组酶 FLP 可催化位于同一分子上两个同向 *frt* 位点间 DNA 片段的切除^[6],其重组功能已在烟草^[7]、拟南芥^[8]、和水稻细胞^[9]、玉米细胞中^[9,10]得到验证,利用该系统可实现筛选完成后选择标记基因的删除。

植物基因启动子是重要的顺式作用元件,处于基因转录调控的中心环节^[11]。多数生物对外界环境温度升高最明显的反应是热激蛋白的表达,同时抑制体内原有的大部分 mRNA 和蛋白质的合成^[12]。由于热激蛋白启动子中热诱导元件和热激因子的保守性,热诱导蛋白启动子可被来自异源植物的热激因子所识别^[13]并调控其启动基因的表达^[14-16]。

本工作构建出可有效去除转基因植物中选择标记基因的 FLP/*frt* 位点特异性重组系统:含有 *frt* 位

点的植物表达载体 pCAMBIA1300-*betA-frt-als-frt* 和含有由热诱导启动子 *hsp* 启动的 FLP 重组酶基因的植物表达载体 pCAMBIA1300-*hsp-FLP-hpt*。利用二次转化的方式将二者先后转入烟草植株,经热激处理后,重组酶 FLP 基因的表达可催化位于选择标记基因 *als* 两侧同向 *frt* 位点间的重组反应,从而有效去除选择标记基因 *als*,产生无选择标记的转基因耐盐耐旱烟草植株。

1 材料与方法

1.1 实验材料

烟草(*Nicotiana tabacum*)品种 Wisconsin 38。质粒 p35S-*als*、pCAMBIA1300-*betA-hpt*、pCAMBIA1300-*hsp-GUS-hpt* 由本实验室构建。质粒 pROK II、大肠杆菌 DH5 α 、根癌农杆菌 LBA4404、啤酒酵母 AS2399 由本实验室保存。质粒 pCAMBIA1300 购自澳大利亚。各种 DNA 限制酶和 DNA 修饰酶及其相应缓冲液购自 TaKaRa 公司。载体 pGEM-T-Easy Vector 购自 Promega 公司。DIG 标记试剂盒、DIG 检测试剂盒及尼龙膜购自 Roche 公司。DNA 片段玻璃奶回收试剂盒购自博大泰克公司。除草剂绿黄隆购自沈阳农药厂(有效浓度 25%)。质粒重组中用到的各种 DNA 序列及转基因植株检测中用到的各种引物序列(如表 1 所示)由上海博亚公司合成。

表 1 实验过程中所用到的 DNA 序列
Table 1 DNA sequences used in these experiments

Sequence name	Sequence
Primers of <i>FLP</i>	FLP1 5' CGAACCTGCGGGCCGTCTAAAA 3'
	FLP2 5' CGGGATCCAACAATGCCACAATTTGGTATATTATG 3'
	FLP3 5' GGGGTACC TTATATGCGTCTAATTTATGATAGATGA 3'
	FLP4 5' TCGCGAGGCGGATGAAGGATTG 3'
Primers of <i>als</i>	A1 5' GAGGACAGGCTGAAATCACC 3'
	A2 5' GCATCAGGGTTAGCA ACAG 3'
Primers of <i>betA</i>	B1 5' CGTACAGGGTAAACGCTACAAC 3'
	B2 5' CCTCAGGCTGCGAATAAATCC 3'
Primers of <i>hsp</i>	H1 5' CGGGATCCTATTTATTTATTCTGGACAG 3'
	H2 5' CGGGATCCACGAGGACGA AGGGATAC 3'
Primers of deletion assay	D1 5' CAAAATGGTTACGACGAGATG 3'
	D2 5' AAGGAAGGTGGCACCTACAA 3'
	D3 5' GAACCCTAATTCCTTATCTGG 3'
Sequences of <i>frt</i>	<i>frt</i> 1 5' <u>CATGCCATGG</u> GAAGTTCCTATTCGGAAGTTCCTATTTCTAGAAA 3'
	<i>frt</i> 2 5' <u>CCGCTCGAG</u> GAAGTTCCTATACCTTTCTAGA 3'
	<i>frt</i> 3 5' <u>CCGCTCGAG</u> ATTCCGAAGTTCCTATTTCTAGAAA 3'
	<i>frt</i> 4 5' <u>AAACTGCAG</u> GAAGTTCCTATACCTTTCTAGA 3'

1.2 植物表达载体的构建

1.2.1 含重组酶 *FLP* 基因的植物表达载体的构建 以啤酒酵母 AS2399 总 DNA 为模板,利用嵌套 PCR 方法克隆得到重组酶 *FLP* 基因编码区并连入 pT-easy vector 进行测序。第一步 PCR 反应使用引物 FLP1、FLP4,程序为:预变性 95°C 5min;变性 95°C 1min,退火 56°C 1min,延伸 72°C 3min,循环 30 次,过度延伸 7min。嵌套 PCR 反应使用引物 FLP2、FLP3,程序为:预变性 95°C 5min;变性 95°C 1min,退火 56°C 1min,延伸 72°C 1.5min,循环 30 次,过度延伸 7min。

用限制酶 *Bam*H I 和 *Kpn* I 从带有 *FLP* 基因的 pGEM-T easy 载体上切下测序正确的 *FLP* 基因全长编码区,同时质粒 pROK II 也经 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切,电泳分离后回收载体 DNA,与 *FLP* 重组酶基因定向连接,重组得到含有 *FLP* 重组酶基因的植物表达载体 pROK II-*FLP*。然后用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切质粒 pROK II-*FLP* 和 pCAMBIA1300,分别回收带有 nos 终止子的 *FLP* 基因全长编码区和载体序列,将二者定向连接,重组得到质粒 pCAMBIA1300-*FLP*-nos。最后,用 *Bam*H I 切质粒 pCAMBIA1300-*hsp*-*GUS*-*hpt* 和 pCAMBIA1300-*FLP*-nos,分别回收 *hsp* 启动子和载体序列,将二者连接后鉴定正反向,得到含有由热诱导启动子 *hsp* 启动的重组酶 *FLP* 基因的植物表达载体 pCAMBIA1300-*hsp*-*FLP*-*hpt*。

1.2.2 含重组位点 *frt*/*frt* 植物表达载体的构建 合成的寡核苷酸单链 *frt*1 与 *frt*2、*frt*3 与 *frt*4 按照图 1 所示构建双链 *frt* 位点,然后将它们作为接头定向连接在用 *Nco* I 和 *Pst* I 双酶切质粒 p35S-*als* 产生的选择标记基因 *als* 两端。

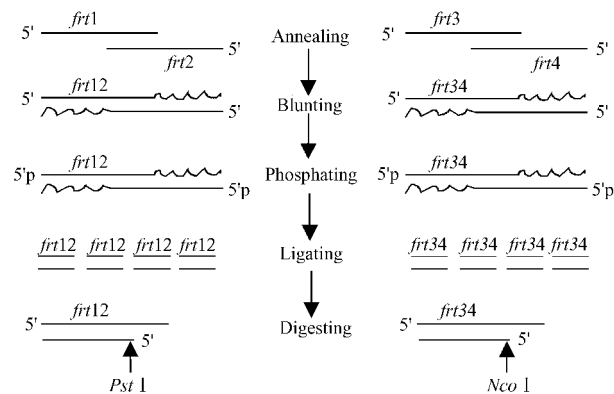


图 1 *frt* 位点构建的技术路线

Fig.1 Construction of the *frt*

经测序,*als* 基因片段两端带有正确的 *frt* 位点序列。将带有重组酶作用位点 *frt* 的 *als* 基因用

Xho I 酶切后回收,同时质粒 pCAMBIA1300-*betA*-*hpt* 也用 *Xho* I 酶切回收载体,将二者连接后鉴定正反向,构建得到选择标记基因 *als* 两侧带有同向 *frt* 位点的植物表达载体 pCAMBIA1300-*betA*-*frt*-*als*-*frt*,并通过限制性内切酶酶切鉴定重组质粒。

1.3 烟草转化

用携带植物表达载体 pCAMBIA1300-*betA*-*frt*-*als*-*frt* 的农杆菌 LBA4404 感染烟草叶盘,以除草剂绿黄隆为筛选剂筛选转化植株。取转入 *betA* 和 *als* 基因的烟草植株叶盘,用携带植物表达载体 pCAMBIA1300-*hsp*-*FLP*-*hpt* 的农杆菌 LBA4404 进行再次转化,以潮霉素和除草剂绿黄隆为筛选剂筛选转化植株。

1.4 转基因植株的分子检测

CTAB 法提取烟草叶片 DNA,对转化植株进行 PCR 和 Southern 杂交检测。检测 *als*、*betA*、*FLP* 基因和 *hsp* 启动子的 PCR 引物见表 1,其反应程序为:预变性 95°C 5min;变性 95°C 1min,退火 56°C 1min,延伸 72°C 1.5min(检测 *hsp* 启动子时为 30s),循环 30 次,过度延伸 7min。

限制酶 *Kpn* I 单酶切或限制酶 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切二次转化植株基因组 DNA,用探针 *FLP* 基因片段与之杂交。*FLP* 基因片段的标记和杂交过程见 DIG 标记和检测试剂盒说明书。

1.5 二次转化植株的热激处理和选择标记基因 *als* 切除的分子检测

取呈 *betA*、*als*、*hsp* 和 *FLP* 阳性的二次转化植株叶片进行热激处理。将烟草叶片切成 0.5cm² 的叶盘,浸没于 1/2 MS (Murashige and Skoog) 液体培养基中,置于 42°C 水浴振荡热激 2h。取出叶盘置于 1/2 MS 固体培养基上 25°C 恢复培养 12h,再次置于 42°C 水浴振荡热激 2h。然后取出叶盘置于加有 6-BA (1mg/L) 和 IAA (0.1mg/L) 的 MS 固体培养基上诱导不定芽发生。产生小苗后,对小苗进行选择标记基因 *als* 是否切除的分子检测。其引物分别为 D1、D2、D3(见表 1) 结合位点如图 2 所示。

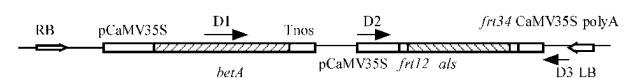


图 2 检测选择标记基因 *als* 被切除的引物结合位点

Fig.2 The binding sites of primers that detected whether the *als* was eliminated

反应程序为:采用引物 D1 和 D3 时,预变性 95°C 5min;变性 95°C 1min,退火 56°C 1min,72°C 延

伸 1.5min,循环 30 次,过度延伸 7min。采用引物 D2 和 D3 时,预变性 95℃ 5min;变性 95℃ 1min,退火 56℃ 1min,延伸 72℃ 30s,循环 30 次;过度延伸 7min。回收引物 D2、D3 的 PCR 扩增产物,连入 pT-easy vector 进行测序。

2 结果及分析

2.1 植物表达载体的构建

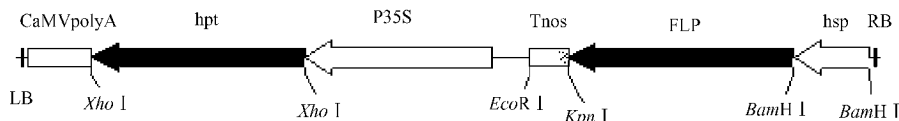


图 3 植物表达载体 pCambia1300-hsp-FLP-hpt 的 T-DNA 区

Fig.3 T-DNA region of the plant expression vector pCambia1300-hsp-FLP-hpt

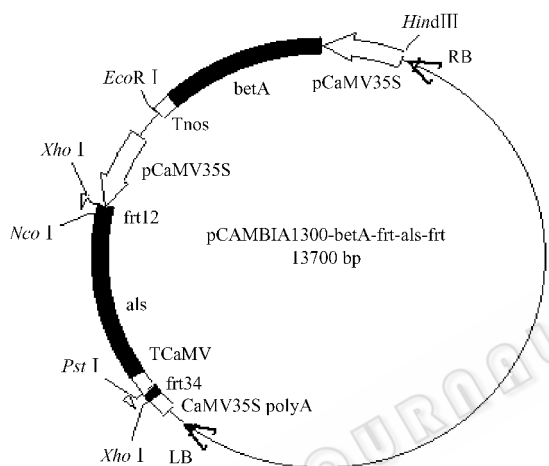


图 4 植物表达载体 pCambia1300-betaA-frt-als-frt 的结构图

Fig.4 Construction of plant expression vector pCambia1300-betaA-frt-als-frt

frt 位点的测序结果为:

frt12: GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTT CGGAATAGGAACTT 全长的重组酶识别位点 48bp, 包含由两段 13bp 反向重复序列和一段 8bp 的不对

称序列组成的核心重组序列和与之相邻的 13bp 序列及二者之间的碱基 G) frt34: GAAGTTCCT ATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAAT(截短的重组酶识别位点 39bp, 包含由两段 13bp 反向重复序列和一段 8bp 的不对称序列组成的核心重组序列和与之相邻的 5bp 序列 GGAAT)。

利用分子重组技术成功的构建了含有同向 frt 位点的植物表达载体 pCambia1300-betaA-frt-als-frt, 其质粒结构图如图 4 所示。

称序列组成的核心重组序列和与之相邻的 13bp 序列及二者之间的碱基 G) frt34: GAAGTTCCT ATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAAT(截短的重组酶识别位点 39bp, 包含由两段 13bp 反向重复序列和一段 8bp 的不对称序列组成的核心重组序列和与之相邻的 5bp 序列 GGAAT)。

2.2 转基因植株的分子检测

用检测 betA 和 als 基因的引物分别对一次转化植株和对照植株(未转化叶盘产生的植株)的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。转入外源 als 基因的植株扩增出 1.7kb 片段(图 5-A),转入 betA 基因的植株扩增出 0.9kb 片段(图 5-B),而对照植株未扩增出目的条带。

用检测 betA、FLP 基因及 hsp 启动子的引物分别对二次转化植株和对照植株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。转入 betA 基因的植株扩增出 0.9kb 片段(图 6-A),转入 FLP 基因的植株扩增出 1.3kb 片段(图 6-B),转入 hsp 启动子的植株扩增出 0.3kb 片段(图 6-C),未转基因对照植株未扩增出目的条带。

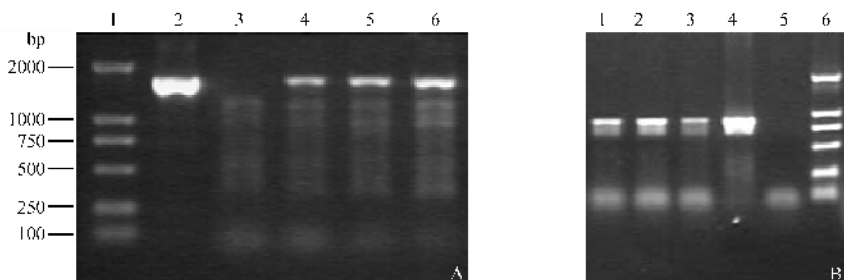


图 5 转基因植株的 PCR 检测

Fig.5 PCR assay of the transgenic tobacco plantlets

5-A: PCR assay for als, 4-6: transgenic plants; 3: untransformed plant; 2: is result from plasmid DNA; 1: DNA Marker DL2000.

5-B: PCR assay for betA, 1-3: transgenic plants; 4: result from plasmid DNA; 5: untransformed plant; 6: DNA Marker DL2000.

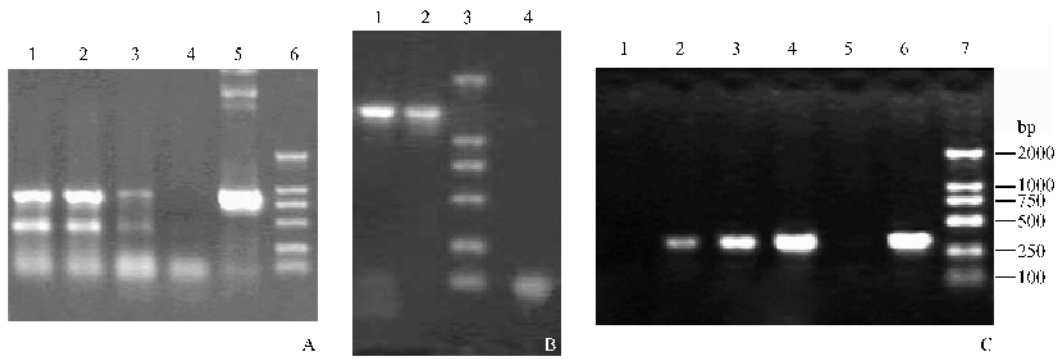


图6 二次转化植株的 PCR 检测

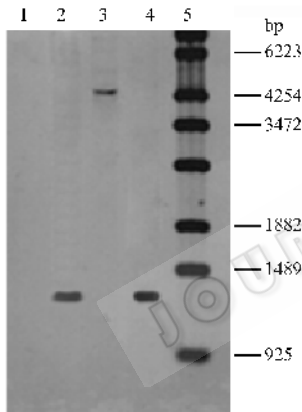
Fig. 6 PCR assay of the re-transgenic tobacco plantlets

6-A : PCR assay for *betaA* ; 1-3 : transgenic plants , 4 : untransformed plant 5 : result from plasmid DNA ; 6 : DNA Marker DL2000 ;

6-B : PCR assay for *FLP* , 1 : result from plasmid DNA , 2 : transgenic plant , 3 : DNA Marker DL2000 ; 4 : untransformed plant ; 6-C : PCR assay for *hsp* ;

1 : untransformed plant ; 2-5 : transgenic plants ; 6 : result from plasmid DNA ; 7 : DNA Marker DL2000.

以重组酶基因 *FLP* 片段为探针对二次转化 PCR 检测阳性的植株进行 Southern 杂交分析,转基因植株显示了预期杂交条带,而非转基因的对照植株没有信号(图 7)。

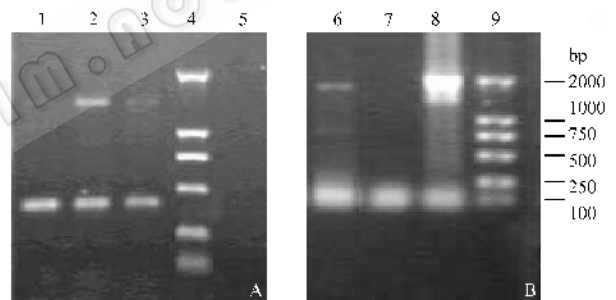
图7 二次转化植株 *FLP* 基因的 Southern 检测Fig. 7 Southern blot for *FLP* of the re-transgenic tobacco plantlets

3 : transgenic plant (genomic DNA was digested with *Kpn* I) ; 2 : transgenic plant (genomic DNA was digested with *Bam*H I and *Kpn* I) ; 4 : result from plasmid DNA ; 1 : untransformed plant ; 5 : DNA Marker λ *Eco*T14 I .

2.3 二次转化植株选择标记基因 *als* 切除的分子检测

当二次转化产生的同时含有目的基因 *betaA* 和重组酶基因 *FLP* 的转基因植株经过热激处理后, *FLP* 重组酶基因的表达可切除位于两个同向 *frit* 位点间的选择标记基因 *als*。选择标记基因 *als* 未发生切除时,延伸时间有限的 PCR 反应无法高效扩增引物 D1 和 D3 之间、D2 和 D3 之间的片段;选择标记基因 *als* 精确切除后,可扩增得到 D2 和 D3 间的 0.4kb 的目的片段(图 8-A) 引物 D1 和 D3 间约

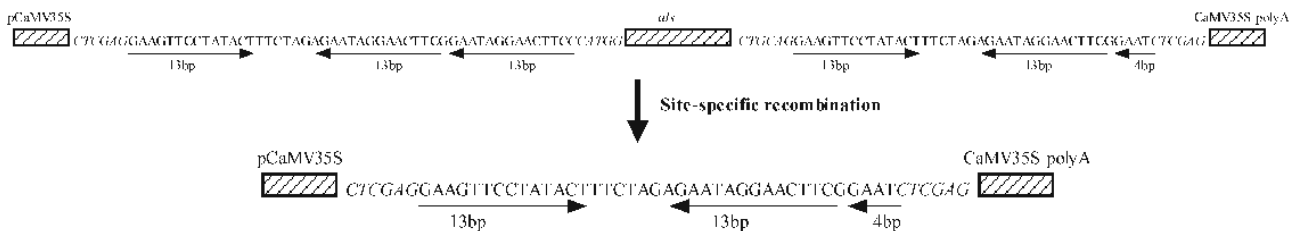
1.7kb 的目的片段(图 8-B)。在二次转化的植株中,在用引物 D2 与 D3 进行 PCR 扩增时,还可扩增出 pCAMBIA1300-*hsp-FLP-hpt* 中 *hpt* 基因片段,该片段约 1.4kb(图 8-A)。

图8 二次转化植株中选择标记基因 *als* 被切除的 PCR 检测Fig. 8 PCR assay for the elimination of *als* in the re-transgenic tobacco plantlets

1-3 : the re-transgenic tobacco plantlets that the selectable marker gene was eliminated ; 5, 7 : the re-transgenic tobacco plantlets that the selectable marker gene was not eliminated ; 8 : result from plasmid DNA ; 4, 9 : DNA Marker DL2000.

用引物 D1、D3 对经热激处理的 127 株二次转化植株和对照植株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 41% (52/127) 的植株扩增出 1.7kb 的条带,表明在这些植株中发生了选择标记基因 *als* 被切除的事件,而 59% (75/127) 的植株 PCR 扩增产物中不出现 1.7kb 的条带,表明其选择标记 *als* 基因未被切除。

PCR 扩增 8 株去选择标记基因的植株的 D2、D3 间的 DNA,产物回收后连入 pT-easy vector 进行测序,通过序列分析,确定 *FLP* 重组酶催化了两个同向 *frit* 位点间选择标记基因 *als* 的精确切除,在去选择标记基因的植株中两个特异性重组位点 *frit* 12, *frit* 34

图9 检测选择标记基因 *als* 切除的 PCR 产物测序结果Fig.9 The sequencing result of the PCR product that detected whether the *als* was eliminated

The result indicated that the structure of the integrated *flr* site was indeed chimeric exactly as expected from FLP-mediated site-specific recombination reaction.

已融合为一个 *flr* 34 位点 (图 9)。

在少数用引物 D1、D3 扩增出现 1.7kb 条带的植株中,当采用 *als* 特异性引物 A1 和 A2 进行 PCR 扩增时可产生 1.7kb 条带,这表明在这些植株中只有部分细胞的选择标记基因 *als* 被切除。分析其原因可能有:1. 在本工作中,使用了热诱导蛋白启动子来启动 *FLP* 重组酶基因的表达,由于是对二次转化后阳性植株的叶盘进行热激处理来诱导 *FLP* 基因表达,而来自叶盘边缘的小苗可能起源于数个细胞,其中一些细胞在热激处理后未去除选择标记基因;2. 选择标记基因的多拷贝整合或切除后的重新整合导致切除反应未能达到预期效果;3. 重组酶 *FLP* 的最适反应温度是 23~30℃,42℃ 的重复热激可能对它的活性有一定的影响。

3 讨论

目前,选择标记基因被广泛应用于植物细胞的遗传转化,用以区分转化和非转化细胞,这对于转化植株的高效获得是至关重要的。但是当筛选完成后,选择标记基因则不再有用,将之从转基因植物中去除有着显而易见的优点:第一,大大提高了转基因植物的生物安全性;第二,为多基因转化使用同一选择标记基因提供了可能性;第三,降低了对转入的目的基因进行表达结果分析的复杂性;最后,减少了转入的外源 DNA 的序列,提高了基因组的稳定性。

位点特异性重组系统为双组分系统,其中组分一编码重组酶,催化组分二即两个短的特性的靶 DNA 序列之间的重组,利用该系统的特性,可以将靶序列之间的 DNA 序列删除^[17],达到去除选择标记基因的目的。目前应用最为广泛,方法上较为成熟的位点特异性重组系统为来自噬菌体 P₁ 的 Cre/*lox* 系统。Sauer^[18]等人首先在哺乳动物细胞中验证了该系统可以介导位点特异性重组。Dale^[19]等人以烟草原生质体为材料用瞬时表达证明了 Cre 可以介

导染色体外的 DNA 剪切、倒位和整合反应。2001 年 Zu^[20]等人构建了一种化学诱导自主切除系统 CLX (Cre/*lox* DNA excision system),该系统转化拟南芥结果表明经 β-雌二醇诱导后,CLX 系统对受体植株标记基因区的切除效率高达 100%。另外,我国林忠平等人也利用该系统获得无标记基因的转基因植物^[21-22],证明了该系统的精确性及高效性。

来自于啤酒酵母的 FLP/*flr* 位点特异性重组系统也有较多的报道。在已报道的工作中,采用报告基因 GUS 或抗生素抗性基因验证了 *FLP* 重组酶基因的组成型表达可以实现位于两同向 *flr* 位点间的基因删除,在烟草中删除效率为 19%(23/121)^[7],在拟南芥中几乎达到 100%^[8]。但利用 FLP/*flr* 位点特异性重组系统删除选择标记基因的效率因 *FLP* 序列的差异和植物材料不同而出现明显的差异^[7-10],而且重组酶 *FLP* 在转基因植物中的表达强度和 *flr* 位点序列长度的改变均会在一定程度上影响该系统在植物中的重组效率。在本实验中,为有效提高 *FLP* 重组酶在转基因植物中的表达强度,在 *FLP* 重组酶基因编码区起始密码子 ATG 前加入 AACA 使之含有植物核糖体易识别的起始翻译序列。Lyznik 等^[9]以玉米和水稻原生质体为受体的报告基因瞬时表达实验发现 *flr* 位点序列长度的改变同样会影响 FLP/*flr* 位点特异性重组系统在植物中的重组效率。1996 年,Lyznik 等^[10]在玉米的稳定转化细胞中使用全长的 *flr* 位点和由核心重组序列构成的截短的 *flr* 位点,DNA 片段的切除效率较高。依据以上研究结果,为了提高 FLP/*flr* 位点特异性重组系统在转基因植物中删除选择标记基因的效率,在构建含有 *flr* 位点的植物表达载体时,位于选择标记基因两侧的 *flr* 位点一个是全长的 *flr* 位点,另一个为截短的 *flr* 位点。

为了使 *FLP* 重组酶能够在烟草植株中于特定时期发挥作用,本实验在 *FLP* 重组酶基因前连接大

豆热激蛋白 Gmhspl7.5E 的启动子,使其在热激条件下能够特异表达。相对于其它诱导型启动子,热诱导蛋白启动子具有诱导简便、反应灵敏、作用高效、对植物生长发育危害小、重复性好等优点。这同时也避免了因为不同基因(目的基因和选择标记基因)使用相同启动子而引起的基因“共抑制”现象的发生^[23]。在本工作获得的二次转化植株中,有 41% 发生了位点特异性重组反应,其选择标记基因 *als* 被切除,得到了无选择标记的转基因烟草植株。

本工作虽然通过改变 *frit* 位点序列的长度和在 *FLP* 基因前添加植物最适翻译修饰序列等方法尝试构建高效去除选择标记基因的定点重组系统,但同已报道的工作相比,该系统的切除效率仍然较低。在今后的工作中可通过改变 *frit* 位点序列数目和优化热诱导 *FLP* 重组酶高效表达的条件等方法探索在转基因植物中高效去除选择标记基因的途径。利用热诱导启动子还可构建基于 *FLP/frit* 系统的热诱导自主切除系统,将热诱导启动子调控的 *FLP* 重组酶基因和选择标记基因同时置于两同向的 *frit* 位点之间,热激诱导 *FLP* 重组酶基因表达,启动 *FLP* 基因和选择标记基因的切除步骤,简化去除选择标记基因的程序,从而最大程度地减少植物基因组中整合的外源基因数目,提高选择标记基因去除的效率和稳定性。

在今后的工作中可利用该定点重组系统,采用二次转化或有性杂交的方法获得去除选择标记基因的转基因植株,有效提高转基因植物的安全性,对于经济作物的遗传转化具有较高的实际应用价值。

REFERENCES (参考文献)

[1] Charles PS, Elena Z, Peter M. Techniques for the removal of marker genes from transgenic plants. *Biochimie*, 2002, **84**: 1119 - 1126

[2] Bertolla F, Kay E, Simonet P. Potential dissemination of antibiotic resistance genes from transgenic plants to microorganisms. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2000, **21**: 390 - 393

[3] Qian Y. Analysis of advantages and disadvantages on transgenic crops. *Biotechnology Information*, 1999, **5**: 7 - 11

[4] Dale PJ. Spread of engineered genes to wild relatives? *Plant Physiol*, 1992, **100**: 13 - 15

[5] Holger P. Marker-free transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, **74**: 123 - 134

[6] Jayaram M. Holliday Junctions in FLP Recombination: Resolution by Step-Arrest Mutants of FLP Protein. *Proc Natl Acad Sci*, 1985, **82**: 5875 - 5879

[7] Lloyd AM, Davis RW. Functional expression in the yeast *FLP/frit*

site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. *Mol Gen Genet*, 1994, **242**: 653 - 657

- [8] Luo H, Lyznik LA, Gidoni D, Hodges TK. FLP-mediated recombination for use in hybrid plant production. *Plant J*, 2000, **23**: 423 - 430
- [9] Lyznik LA, Mitchell JC, Hirayama L *et al.* Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucl Acids Res*, 1993, **214**: 969 - 975
- [10] Lyznik LA, Rao KV, Hodges TK. FLP-mediated recombination of *frit* sites in the maize genome. *Nucl Acids Res*, 1996, **24**: 3784 - 3789
- [11] Lu J, Zhao HY, He YK, Song YR. Advances and progresses of high promoter research and its application. *Natural Science Progresses*, 2004, **14**: 856 - 862
- [12] Lindquist S. The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 1986, **55**: 1151 - 1191
- [13] Neumann D, Nover L *et al.* Heat shock and other stress response systems of plants. *Biologisches Zentralblatt*, 1989, **108**: 1 - 156
- [14] Medford JJ, Horgan R *et al.* Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plant using a chimaeric isopentenyl transferase gene. *Plant Cell*, 1989, **1**: 403 - 413
- [15] Schoffl F, Rieping M *et al.* The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric gene in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet*, 1989, **217**: 246 - 253
- [16] Sturtmutter G, Chua NH. Artificial combination of two *cis* regulatory elements generates a unique pattern of expression in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci*, 1987, **84**: 8986 - 8990
- [17] Cregg JM, Madden KR. Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. *Mol Gen Genet*, 1989, **219**: 320 - 323
- [18] Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, **85**: 5166 - 5170
- [19] Dale EC, Ow DW. Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene*, 1990, **91**: 79 - 85
- [20] Zuo J, Niu QW, Moller SG, Chua NH. Chemical-regulated site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 2001, **19**: 115 - 116
- [21] Li L (李雷), Liu SM (刘松梅), Hu YL (胡鸞雷) *et al.* Cotransformation to tobacco of Cre/lox site-specific recombination system and its precise recombination. *Chinese Science Bulletin*, 1999, **44**: 2291 - 2295
- [22] Zhen W (甄伟), Wang YM (汪阳明), Ding W (丁伟) *et al.* Cre/loxP-mediated deletion of transgene in transgenic tobacco. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2001, **37**(4): 475 - 482
- [23] Flavell RB. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, **91**: 2490 - 2496