

# 去除选择标记基因的 Cre/lox 重组系统在植物中的应用

刘秀明<sup>1</sup>, 孟欣欣<sup>1</sup>, 李海燕<sup>1,2</sup>, 杨晶<sup>1</sup>, 付宏歧<sup>1</sup>, 李校堃<sup>1,3</sup>

1 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 长春 130118

2 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118

3 温州医学院, 温州 325035

**摘要:** 获得无选择标记基因的转基因植物越来越受到研究者的重视。目前, 应用得较广泛的去除选择标记基因的方法有共转化法和位点特异性重组法, 其中位点特异性重组系统中 Cre/lox 重组系统研究最多。以下介绍了 Cre/lox 位点特异性重组系统的原理、特点及其近几年在植物中的应用, 针对本实验室在这一领域的研究情况, 重点阐述了 Cre/lox 系统的应用前景。随着植物反应器研究领域的不断壮大, 去除筛选标记基因是植物反应器研究的必然趋势。

**关键词:** 无选择标记基因, Cre/lox 重组系统, 转基因植物

## Application of the self excision Cre/lox system in plants

Xiuming Liu<sup>1</sup>, Xinxin Meng<sup>1</sup>, Haiyan Li<sup>1,2</sup>, Jing Yang<sup>1</sup>, Hongqi Fu<sup>1</sup>, and Xiaokun Li<sup>1,3</sup>

1 Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2 College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3 School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

**Abstract:** Marker-free plants have been public concern. Co-transformation and site-specific recombination system are more important methods in self-gene excision. We reviewed the Cre/lox site-specific system and its applications in plants, also, we discussed perspectives of the system in according with our experience.

**Keywords:** marker-free gene, Cre/lox site-specific recombination system, transgenic plant

近年来, 随着植物反应器的研究领域的壮大, 利用基因工程手段在植物中导入目的基因加工和生产蛋白的研究越来越多, 这就引起了转基因植物的安全生产问题。在利用植物反应器生产药用蛋白及疫苗的研究中, 常用的植物表达载体均含有选择标记基因和目的基因, 借助选择标记基因来筛选和检

测转化后的植株。而当目的基因被转入植株中后, 选择标记基因的存在对蛋白的提取、纯化及生产却带来了隐患, 人们担心利用植物作为生物反应器生产蛋白会带来非目的产品的基因工程产物, 同时它也引起了消费者和环境学家对生态环境和食品安全性问题的关注和担忧<sup>[1]</sup>。因此, 构建无选择标记基因

**Received:** July 18, 2009; **Accepted:** August 26, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA100503), the Special Program for Research of Transgenic Plants (No. 2008ZX08010-002)

**Corresponding author:** Xiaokun Li. Tel: +86-431-84533348; E-mail: xiaokunli@163.net

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2007AA100503), 国家转基因生物新品种培育重大专项(No. 2008ZX08010-002)资助。

的植物表达载体或消除转化后植物中的标记基因就显得至关重要。

所谓获得无选择标记基因的植物是指直接构建不含有选择标记基因的表达载体,或者构建含有标记基因的载体,然后经过后代的基因重组与分离剔除标记基因。目前,已经在番茄<sup>[1]</sup>、马铃薯<sup>[2]</sup>、烟草<sup>[3]</sup>、油菜<sup>[4]</sup>、玉米<sup>[5]</sup>、大豆<sup>[6]</sup>、小麦<sup>[7]</sup>等多种植物中获得了无选择标记基因的植株。

## 1 无选择标记基因的应用概述

在植物作为生物反应器的研究过程中,主要用抗生素抗性基因或除草剂抗性基因作为标记基因来筛选含有目的基因的植物。但是,一旦目的基因被验证已转入到植物中去,筛选标记基因的存在就显得没有意义了,甚至会产生副作用。因此,无论是含有抗性基因的转基因植物品种改良还是应用在植物反应器中所引入的抗性基因都引起了人们对食品和生物的安全性的怀疑,特别是在利用植物生产药用蛋白的研究中,引入的抗性基因可能会影响到目标蛋白的结构和功能,对投入到田间释放和临床生产中的植物及蛋白更会产生威胁。因此,去除植物中的选择标记基因是今后植物反应器研究领域的必然趋势。

去除植物中选择标记基因的方法主要有共转化法、转座子技术、位点特异性重组法及直接构建不含有选择标记基因和载体骨架的载体<sup>[8]</sup>。共转化法是指将目的基因和选择标记基因分别构建到不同载体或同一载体的不同区域,将多种载体同时转化同一受体植物,进而筛选出共转化植株的方法<sup>[9]</sup>。转座子技术是利用基因组中一段可移动的DNA序列,通过切割、重新整合等一系列过程从基因组的一个位置“跳跃”到另一个位置。位点特异性重组系统主要包括 Cre/lox<sup>[10]</sup>、FLP/frt<sup>[11]</sup>、R/RS<sup>[12-13]</sup>。在这些方法中,应用最多最广泛的是共转化法和 Cre/lox 位点特异性重组系统。

## 2 Cre/lox 位点特异性重组系统

### 2.1 原理

Cre/lox 重组系统主要通过 Cre 重组酶对 lox 序

列进行切割和重新连接,介导 lox 序列发生特异性重组。Cre 重组酶通过一定的途径被激活后,即可通过诱导型启动子诱导,专一性地识别 34 bp 的 lox 位点,进而同向 lox 位点之间的全部 DNA 序列会由于发生重组而被剔除。通常情况下,在构建表达载体时,将目的基因以外的其他基因(筛选标记基因和报告基因)定位在同向的 2 个 lox 位点之间,通过 Cre 重组酶的引入剔除 lox 位点之间的基因。利用位点特异性重组系统培育无选择标记基因植株的一般步骤是先获得含有目的基因的抗性植株,二次转化导入重组酶基因实现筛选标记基因的删除和重组酶的分

### 2.2 特点

Cre/lox 重组系统的特点:1)在不同物种中的重组功能稳定;2)不需要任何辅助因子,仅需要 Cre 和 lox 的识别位点;3)lox 位点是 Cre 酶的专一识别位点,导入 Cre 重组酶后会使 lox 位点间的全部序列剔除掉。基于以上特性,Cre/lox 重组系统已被成功应用于烟草、番茄、大豆、马铃薯、水稻等多种植物的无筛选标记基因的研究中。

## 3 Cre/lox 重组系统在植物中的应用

多数研究表明,Cre 重组酶需要通过不同的诱导启动子启动而发挥作用,常用的诱导方法有热激诱导、组织特异性启动子及化学方法等,不同的研究方法已经被应用到不同植物中。对于报告基因的启动表达,应用最多的是 CaMV 35S 启动子,一般放于 lox 位点前<sup>[14-16]</sup>。

将 Cre/lox 重组系统应用在烟草上的技术已经成熟,无论是质体转化还是核转化均有报道。Lutz KA 等<sup>[17]</sup>利用 Cre/loxP 位点特异性重组系统获得了无标记基因的转化烟草。用基因枪法转化烟草的叶片,通过将来自核基因的 Cre 蛋白定向到质体中,达到选择标记基因的自动消除。Chakraborti D 等<sup>[18]</sup>也在烟草中进一步证实了利用 Cre/lox 位点特异重组系统在转化植株后代中去除标记基因的有效性和可行性。作者分别用含有 lox 位点和 Cre 基因的双元载体转化烟草,通过 T0 代植株的杂交,在 T1 代植株中获得了 19.2%的选择标记基因的消除效率。宋

洪元等<sup>[19]</sup>利用 Cre/lox 位点特异性重组系统转化烟草, 导入 Cre 重组酶基因后剔除了筛选标记基因, 通过植株开花后自交又使重组酶发生分离而获得无选择标记基因的植株。

### 3.1 Cre 重组酶的热激诱导

热激诱导是一种诱导 Cre 基因产生重组酶的常用方法, 利用热诱导可以消除 lox 位点间的选择标记基因, 再通过后代的 PCR 筛选产生无选择标记基因的植物。Cuellar W 等<sup>[20]</sup>将 Cre/lox 重组系统应用到马铃薯上, 构建了新型植物转化载体 pCIP54/55, 即是通过热诱导技术最终消除了 Cre 及 2 个 lox 位点之间的 *npt II* 基因, 消除效率达到了 4.7%。段小瑜等<sup>[21]</sup>利用来自大豆基因组 DNA 中的热激蛋白启动子 *gmhsp17.5 c*, 目的是通过热诱导来启动 Cre 基因的表达, 构建了一套组成型植物无标记转化的诱导表达 Cre/lox 重组系统。

### 3.2 应用组织特异性启动子启动 Cre 基因表达

在 Cre/loxP 位点特异性重组系统中发展较快的是在构建表达载体时加入组织特异性启动子, 这在转基因后代中可以特异地删除标记基因。Li 等<sup>[22]</sup>从拟南芥中克隆了胚特异性启动子 *app1*, 并将此启动子与选择标记基因一起被克隆到 loxP 位点之间, 以 *GUS* 作为报告基因, 用于启动 Cre 重组酶基因的表达, 在大豆转化植株的后代分离中发现有 30% 的无标记基因的植株。Verweire D 等<sup>[23]</sup>在构建 Cre/lox 重组系统的载体中引入了种特异性启动子, 主要是依据不同种系间功能上的差异来启动 Cre 基因的表达, 最终获得了不含有选择标记基因的纯和株系。Bai 等<sup>[24]</sup>首先从水稻中克隆了花的特异性启动子 *OsMADS45*, 然后将其构建到 Cre/loxP 重组系统中, 利用 *OsMADS45* 启动子诱导 Cre 重组酶表达, 将构建好的表达载体利用农杆菌介导法转化水稻, 在 T1 代中就检测到了无标记基因的植株。Moravčíková J 等<sup>[25]</sup>尝试了用拟南芥的种子特异性启动子构建 Cre/lox 系统的表达载体用于转化烟草, 正常情况下应该在种子中才能消除标记基因, 但在研究中发现 T0 代植株中就检测到了嵌合体。

### 3.3 化学诱导法

通过化学方法诱导 Cre 基因的表达也有报道。

Zhang 等<sup>[26]</sup>就用雌二醇诱导的位点特异性 DNA 消除选择标记基因的 Cre/lox 系统, 成功地获得了具有抗逆性的无筛选标记的烟草植株。Sreekala C 等<sup>[27]</sup>利用化学方法调节 Cre/loxP 位点特异性重组系统, 在转基因后代中获得了 11.7% 的无选择标记基因的水稻植株。

## 4 小结与展望

随着 Cre/lox 系统研究的不断深入, 这项技术已经在植物反应器研究的各个领域日渐成熟。Cre/lox 位点特异性重组技术使转基因植株中筛选标记基因的去除成为可能, 此系统已被广泛的采纳和使用, 应用的难点在于如何启动 Cre 重组酶的表达进而消除 lox 位点间的序列, 尽管组织特异性启动子的应用已被成功报道, 但其诱导机制还有待进一步的研究, 不过这并没有限制 Cre/lox 在植物中的应用, 特别是在今后的植物反应器的研究领域, Cre/lox 位点特异性重组系统将会发展成为去除筛选标记基因的首要手段。

## REFERENCES

- [1] Xin CH, Liu QC, Qu DY, *et al.* The construction of a binary vector for marker-free transformation in plants. *Acta Hort Sin*, 2008, **35**(5): 701-706.  
辛翠花, 刘庆昌, 屈冬玉, 等. 无选择标记的植物表达载体的构建. *园艺学报*, 2008, **35**(5): 701-706.
- [2] Bai YF, Zhang WF, Bai DM, *et al.* Development of potato high efficiency marker-free transgenic technology. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2007, **27**(12): 2361-2365.  
白云凤, 张维锋, 白冬梅, 等. 一种马铃薯高效无标记转基因技术的建立. *西北植物学报*, 2007, **27**(12): 2361-2365.
- [3] Wei BQ, Zhao CZ, Lu L, *et al.* Construction of the a2ACO1 gene of sweet melon expression vector with marker-free and its co-transformation to tobacco. *J Gansu Agri Univ*, 2007, **42**(5): 68-72.  
魏兵强, 赵长增, 陆璐, 等. 无选择标记的甜瓜 a2ACO1 基因植物表达载体的构建及对烟草的共转化效果. *甘肃农业大学学报*, 2007, **42**(5): 68-72.
- [4] Li LY, Chen W, Yang QH, *et al.* Research on RNA interference and marker-free transformation of *Fad2* gene in *Brassica napus*. *Agri Res Arid Areas*, 2007, **11**(5): 32-34.

- 李兰玉, 陈苇, 杨清辉, 等. 甘蓝型油菜 *Fad2* 基因 RNAi 载体无选择标记转化研究. 干旱地区农业研究, 2007, **11**(5): 32–34.
- [5] Yang AF, Su Q, An LJ. Generation of vector backbone-free and selectable marker-free transgenic maize (*Zea mays* L.) via ovary-drip method. *Hereditas*, 2009, **35**(1): 95–100.  
杨爱馥, 苏乔, 安利佳. 利用子房滴注法获得无载体骨架序列和选择标记的转基因玉米. 遗传, 2009, **35**(1): 95–100.
- [6] Zhang XC, Peng M, Wu KX, *et al.* Generating marker-free transgenic soybean plants by Agrobacterium mediated transformation with double T-DNA binary vector. *Soybean Sci*, 2006, **25**(4): 369–373.  
张秀春, 彭明, 吴坤鑫, 等. 利用双 T-DNA 载体系统培育无选择标记转基因大豆. 大豆科学, 2006, **25**(4): 369–373.
- [7] Zhang XM, Xu HJ, Du LP, *et al.* Excision of bar gene from transgenic wheat obtained by biolistic co-transformation. *Acta Agron Sin*, 2004, **30**(1): 26–30.  
张新梅, 徐惠君, 杜丽璞, 等. 共转化法剔除小麦中的 bar 基因. 作物学报, 2004, **30**(1): 26–30.
- [8] Yang A, Su Q, An L. Ovary-drip transformation: a simple method for directly generating vector and marker-free transgenic maize (*Zea mays* L.) with a linear GFP cassette transformation. *Planta*, 2009, **229**(4): 793–801.
- [9] Yan L, Cui JZ, Zhang L, *et al.* Co-transformation and its application in plant genetic engineering. *Biotechnol Bull*, 2008, **1**: 91–94.  
燕丽, 崔继哲, 张亮, 等. 共转化法及其在植物基因工程中的应用. 生物技术通报, 2008, **1**: 91–94.
- [10] Qiu SP, Chen ZJ, Wang F. Application of Cre/loxP site-specific recombination technology on transgenic plants. *Fujian J Agri Sci*, 2008, **23**(2): 211–217.  
邱淑萍, 陈在杰, 王锋. Cre/loxP 位点特异性重组系统在转基因植物中的应用. 福建农业学报, 2008, **23**(2): 211–217.
- [11] Woo HJ, Cho HS, Lim SH, *et al.* Auto-excision of selectable marker genes from transgenic tobacco via a stress inducible FLP/FRT site-specific recombination system. *Transgenic Res*, 2009, **18**(3): 455–465.
- [12] Kondrák M, van der Meer IM, Bánfalvi Z. Generation of marker-and backbone-free transgenic potatoes by site-specific recombination and a bi-functional marker gene in a non-regular one-border Agrobacterium transformation vector. *Transgenic Res*, 2006, **15**(6): 729–737.
- [13] Saelim L, Phansiri S, Suksangpanomrung M, *et al.* Evaluation of a morphological marker selection and excision system to generate marker-free transgenic cassava plants. *Plant Cell Rep*, 2009, **8**(3): 445–455.
- [14] Jia HG, Lü LF, Pang YQ, *et al.* Using green fluorescent protein as a reporter to monitor elimination of selectable marker genes from transgenic plant. *Chin J Biotech*, 2004, **20**(1): 10–15.  
贾洪革, 吕玲飞, 庞永奇, 等. 用绿色荧光蛋白监测转基因植物中选择标记基因的消除. 生物工程学报, 2004, **20**(1): 10–15.
- [15] Wang Y, Chen B, Hu Y, *et al.* Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the Cre/loxP site-specific recombination system. *Transgenic Res*, 2005, **14**(5): 605–614.
- [16] Jia H, Pang Y, Chen X, *et al.* Removal of the selectable marker gene from transgenic tobacco plants by expression of Cre recombinase from a tobacco mosaic virus vector through agroinfection. *Transgenic Res*, 2006, **15**(3): 375–384.
- [17] Lutz KA, Svab Z, Maliga P. Construction of marker-free transplastomic tobacco using the Cre-loxP site-specific recombination system. *Nat Protoc*, 2006, **1**(2): 900–910.
- [18] Chakraborti D, Sarkar A, Mondal HA, *et al.* Cre/loxP system to develop selectable marker-free transgenic tobacco plants conferring resistance against sap sucking homopteran insect. *Plant Cell Rep*, 2008, **27**(10): 1623–1633.
- [19] Song HY, Ren XJ, Si J, *et al.* Construction of marker-free GFP transgenic tobacco by Cre/loxP site-specific recombination system. *Sci Agri Sin*, 2008, **41**(10): 2973–2982.  
宋洪元, 任雪松, 司军, 等. 利用 Cre/loxP 定位重组系统获得无选择标记 GFP 转基因烟草. 中国农业科学, 2008, **41**(10): 2973–2982.
- [20] Cuellar W, Gaudin A, Solórzano D, *et al.* Self-excision of the antibiotic resistance gene *nptII* using a heat inducible Cre-loxP system from transgenic potato. *Plant Mol Biol*, 2006, **62**(1/2): 71–82.
- [21] Duan XY, Zhang LX, Ma C, *et al.* Construction of selectable marker-free plant transformation vectors using inducible Cre/loxP site-specific recombination system. *J Shihezi Univ (Natural Science)*, 2008, **26**(1): 30–34.  
段小瑜, 张录霞, 马超, 等. 植物无标记转化的诱导表达 Cre/loxP 重组系统的构建. 石河子大学学报(自然科学版), 2008, **26**(1): 30–34.
- [22] Li Z, Xing A, Moon BP, *et al.* A Cre/loxP-mediated self-activating gene excision system to produce marker gene free transgenic soybean plants. *Plant Mol Biol*, 2007, **65**(3): 329–341.
- [23] Verweire D, Verleyen K, De Buck S. Marker-free transgenic plants through genetically programmed auto-excision. *Plant Physiol*, 2007, **145**(4): 1220–1231.
- [24] Bai X, Wang Q, Chu C. Excision of a selective marker in transgenic rice using a novel Cre/loxP system controlled by a floral specific promoter. *Transgenic Res*, 2008, **17**(6): 1035–1043.
- [25] Moravčíková J, Vaculková E, Bauer M, *et al.* Feasibility

of the seed specific cruciferin C promoter in the self excision Cre/loxP strategy focused on generation of marker-free transgenic plants. *Theor Appl Genet*, 2008, **117**(8): 1325-1334.

[26] Zhang Y, Liu H, Li B, *et al.* Generation of selectable marker-free transgenic tomato resistant to drought, cold

and oxidative stress using the Cre/loxP DNA excision system. *Transgenic Res*, 2009, **5**.

[27] Sreekala C, Wu L, Gu K, *et al.* Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre/loxP system. *Plant Cell Rep*, 2005, **24**(2): 86-94.



### 2010 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表

刊物名称	邮发代号	刊期	年价(元)	网址	E-mail
大豆科学	14-95	双月刊	60	http://ddkx.periodicals.net.cn/gyjs.asp?ID=4606693	dadoux@sina.com
动物学研究	64-20	双月刊	150	www.zoores.ac.cn	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	210	http://dwzxx.ioz.ac.cn	journal@ioz.ac.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	120	www.jgswxb.net	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	http://journals.im.ac.cn/jwxtcn	jwxt@im.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	150	www.ent-bull.com.cn	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月刊	300	www.linyekexue.net	linyxx@forestry.ac.cn
人类学学报	2-384	季刊	100	www.ivpp.ac.cn	acta@ivpp.ac.cn
山地农业生物学报	66-66	双月刊	100	http://web.gzu.edu.cn/jou/jou/	Sd.xb@163.com
生命科学	4-628	月刊	360	www.lifescience.net.cn	cbls@sibs.ac.cn
生物工程学报	82-13	月刊	780	http://journals.im.ac.cn/cjbcn	cjb@im.ac.cn
生物技术通报	18-92	月刊	300	http://swjstb.periodicals.net.cn/gyjs.asp?ID=4615630	biotech@mail.caas.net
生物技术通讯	82-196	双月刊	150	http://swtx.chinajournal.net.cn	swtx@263.net
生物信息学	14-14	季刊	48	xxsw.chinajournal.net.cn	cjbioinformatics@yahoo.cn
微生物学报	2-504	月刊	660	http://journals.im.ac.cn/actamicrocn	actamicro@im.ac.cn
微生物学通报	2-817	月刊	576	http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn	tongbao@im.ac.cn
武汉植物学研究	38-103	双月刊	180	http://whwxxyj.cn	editor@rose.whiob.ac.cn
畜牧兽医学报	82-453	月刊	240	www.xmsyxb.com	xmsyxb@263.net
遗传	2-810	月刊	600	www.chinagene.cn	yczz@genetics.ac.cn
遗传学报	2-819	月刊	600	www.jgenetgenomics.org	jgg@genetics.ac.cn
营养学报	6-22	双月刊	108	http://yyxx.chinajournal.net.cn	yyxx@chinajournal.net.cn
云南植物研究	64-11	双月刊	150	http://journal.kib.ac.cn	bianji@mail.kib.ac.cn
植物遗传资源学报	82-643	双月刊	120	http://www.zwyczy.cn	Zwyczyxb2003@sina.com Zwyczyxb2003@163.com
中国农业科学(中文)	2-138	半月刊	1188	www.ChinaAgriSci.com	zgnykx@mail.caas.net.cn
中国农业科学(英文)	2-851	月刊	432	www.ChinaAgriSci.com	zgnykx@mail.caas.net.cn
中国实验动物学报	2-748	双月刊	120	www.calas.org.cn	A67761337@126.com
中国生态农业学报	82-973	双月刊	210	www.ecoagri.ac.cn	editor@sjziam.ac.cn
中国生物工程杂志	82-673	月刊	960	www.biotech.ac.cn	biotech@mail.las.ac.cn
中国水产科学	18-250	双月刊	180	www.fishscichina.com	zgsckx@cafs.ac.cn
中国水稻科学	32-94	双月刊	90	www.ricesci.cn	cjrs@263.net
作物学报	82-336	月刊	600	www.chinacrops.org/zwxp	xbzw@chinajournal.net.cn