

## 微生物遗传转化筛选标记及其生物安全性的研究进展

乐易林 孙宇 王洪成 邵蔚蓝\*

(江苏大学环境与安全工程学院 生物质能源研究所 江苏 镇江 212013)

**摘要:** 在分子生物技术中, 筛选标记基因是遗传转化载体所必备的基本元件之一, 其主要功能是在基因操作中进行目标克隆的筛选, 以及应用过程中通过选择压力维持基因重组性状。抗药基因是微生物遗传转化中常用的筛选标记, 大肠杆菌载体和一般穿梭载体中通常带有抗药基因。带有抗药基因的工程菌可以被广泛地应用于酶和有机化学品的发酵生产, 因为工业发酵过程是在封闭系统中进行的, 并且最终产品需要经过提炼。但是当人们需要用基因改良的菌株进行食品和饲料加工、环境修复、病虫害生物防治时, 抗药基因类筛选标记应该被禁止使用。因此, 发展生物安全性筛选标记成为遗传转化技术推广应用中的一个技术关键。本文介绍常用作筛选标记的抗药基因, 以及针对抗药基因的安全性问题而发展的无选择标记的遗传转化技术及生物安全性筛选标记的基因工程技术。葡萄糖胺合成酶基因是近年发展起来的新型生物安全性筛选标记, 它弥补了其他营养缺陷互补型和功能附加型筛选标记的缺陷, 具有广阔的应用前景。

**关键词:** 筛选标记基因, 生物安全性, 葡萄糖胺合成酶基因

## Advances in selection markers and their bio-safety in applications of transformed microorganisms

LE Yi-Lin SUN Yu WANG Hong-Cheng SHAO Wei-Lan\*

(Biofuels Institute, School of Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

**Abstract:** Selection markers are one of the basic parts in a genetic transformation system in molecular biotechnology. The functions of selectable marker genes are selecting transformants from non-transformed cells and maintaining a stress for selective growth of recombinant population. Drug-resistant genes are the most commonly used selectable marker genes, usually as a part of *Escherichia coli* vectors and other shuttle-vectors. It is considered bio-safe to use engineered strains carrying drug-resistant genes in fermentations of enzymes or organic compounds, because the

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31300088, 31170027); PAPD of Jiangsu Higher Education Institutions; The Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (No. 12KJB180002); Zhenjiang Agricultural Science and Technology Support Program (No. NY2012032); Doctoral Scientific Research Foundation of Jiangsu University (No. 10JDG117)

\*Corresponding author: Tel: 86-511-88796122; E-mail: weilanshao@foxmail.com

**Received:** August 14, 2015; **Accepted:** November 11, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 10, 2015

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31300088, 31170027); 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD); 江苏省高校自然科学研究项目(No. 12KJB180002); 镇江市农业科技支撑计划项目(No. NY2012032); 江苏大学高级专业人才培养启动基金项目(No. 10JDG117)

\*通讯作者: Tel: 86-511-88796122; E-mail: weilanshao@foxmail.com

**收稿日期:** 2015-08-14; **接受日期:** 2015-11-11; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-12-10

fermentor systems are closely controlled and the products are to be refined. But the application of drug-resistant genes should be prohibited when genetic modification of the strains to be used for food/feed fermentation, environment remediation, plant bio-protection, and so on. Therefore, the development of bio-safety selection markers has been a key issue in the application of molecular biotechnology. This paper reviews the types and properties of currently used selection markers, and introduces the novelty and advantages of selection marker *GFAT*, a gene coding for a glucosamine synthetase. Selection marker *GFAT* will be useful in natural environments because no need to add or delete any compounds for generating selection stress.

**Keywords:** Selectable markers, Bio-safety, Glucosamine synthetase gene

遗传转化技术能够将经体外重组的基因转入细胞使之获得新的遗传特性;它在工农业、医药等领域的发展,对人类经济的发展和改善做出了重要贡献。在基因转化过程中,为了从数量庞大的受体细胞中快速筛选到转化子,或在转化子的纯培养过程中避免重组基因丢失,人们使用特异性的筛选标记基因使转化子在特定的生长压力下得到选择性的培养<sup>[1]</sup>。微生物细胞的遗传转化中最有效的筛选标记是抗药基因和营养缺陷互补基因。

抗药基因是发展最早、应用最广的一类筛选标记。抗生素类药物对细胞生长的抑制作用主要在于影响细胞壁的形成和细胞膜的功能、抑制核酸或蛋白质的生物合成<sup>[2-4]</sup>。抗药基因编码可使抗生素、除草剂等药物失活的酶,从而使获得该基因的重组细胞可以在含有相应药物的环境中生长<sup>[5]</sup>。这类筛选标记应用方便、选择效率高、功能稳定,在生物遗传转化中已经被广泛应用于植物、动物、微生物等遗传转化。目前,几乎所有基因克隆表达质粒和穿梭质粒都含有用作筛选标记的抗药基因。

营养缺陷互补基因在酵母菌、丝状真菌以及少数细菌中已经得到应用。这类筛选标记应用最成功的基因遗传转化系统包括构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)等科学研究模式菌,以及酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和毕赤酵母(*Pichia anomala*)等基因高效表达体系。但是不难发现,这些遗传转化和表达系统常用的穿梭载体或整合载体都带有大肠杆菌载体的抗药基因。

随着生物技术的发展和应用,生物安全性已经受到人们的广泛关注,这其中包括遗传转化物种本身的安全性及导入物种的筛选标记基因的安全性问题<sup>[6-7]</sup>。大部分的遗传转化技术都得借助抗药基因筛选转化子,这些抗生素筛选标记基因与插入的目的基因片段可以共转化到宿主细胞中,使得抗药基因残存在宿主细胞内<sup>[8]</sup>。但是,抗细菌和抗真菌的药物在人畜疾病治疗和植物病害防治中具有至关重要的作用,现有遗传转化技术的进一步应用可能导致抗药基因在环境中的扩散。因此,避免使用抗药基因类筛选标记已成为阻碍遗传转化技术推广应用的一大难题<sup>[9]</sup>。

目前,世界主要发达国家和部分发展中国家都已采取相应措施,制定各自的管理法规,对遗传转化产品进行安全性评价和监控。发展生物安全性遗传转化技术是当前和未来的趋势。本文对遗传转化过程中常使用的抗药基因筛选标记及其编码的酶进行了总结,并对无选择标记的遗传转化技术和生物安全性筛选标记的发展与应用进行了综述。

## 1 抗药基因类筛选标记的发展和應用

抗药基因编码可使抗生素失活的酶,如潮霉素磷酸转移酶、庆大霉素乙酰转移酶、链丝菌素乙酰转移酶,以及使卡那霉素失活的氨基糖苷磷酸转移酶等,从而使获得该基因的重组细胞可以在含有相应抗生素的筛选平板上生长<sup>[1]</sup>。在植物遗传转化中,还常使用 *bar/pat* 基因编码的膦丝菌素乙酰转移酶,使除草剂草丁膦的有效成分膦丝菌素失活<sup>[5]</sup>。表 1 列举了常用的抗生素筛选标记基因和除草剂筛选标记基因来源及其编码的蛋白酶。

表 1 常用的抗药基因筛选标记  
Table 1 Drug-resistant selection marker genes

筛选剂 Selection agent	基因 Genes	酶 Enzymes	基因来源 Sources	参考文献 References
氨苄青霉 Ampicillin	<i>Amp</i>	$\beta$ -内酰胺酶	大肠杆菌	[10]
卡那霉素 Kanamycin	<i>Kan</i>	氨基糖苷磷酸转移酶	大肠杆菌	[11]
氯霉素 Chloromycetin	<i>Cm</i>	氯霉素乙酰转移酶	大肠杆菌	[12]
链霉素 Streptomycin	<i>Str</i>	链丝菌素乙酰转移酶	链霉菌	[13-14]
四环素 Tetracycline	<i>Tet</i>	特异性蛋白质	肺炎链球菌, 枯草芽孢杆菌, 大肠杆菌	[15]
潮霉素 B Hygromycin B	<i>hpt</i>	磷酸转移酶	吸水链霉菌	[16]
庆大霉素 Gentamicin	<i>aaC3</i>	庆大霉素乙酰转移酶	粘质沙雷菌	[17]
腐草霉素 Phleomycin	<i>Sh ble</i>	糖肽	印度斯坦链异壁菌	[18]
新霉素 Geneticin	<i>neo</i>	磷酸转移酶	红橙小单孢菌	[19]
草丁膦 Glufosinate	<i>bar</i>	草丁膦乙酰转移酶	吸水链霉菌	[5]

抗药基因类筛选标记可能带来的不良影响近年来受到普遍关注<sup>[8]</sup>。一般认为, 抗药基因产生的安全性问题体现在基因横向转移使病原微生物获得抗药性, 对人类及其生存环境产生潜在的危害<sup>[8]</sup>; 植物遗传转化中使用的除草剂筛选标记基因也有可能改变生物的遗传多样性, 造成生态危害<sup>[8]</sup>。在过去的几十年中, 抗药基因类筛选标记已经被广泛应用于科学研究过程, 在实验室构建各种重组菌研究基因功能和表达调控, 或通过基因重组表达获得各种目标蛋白解析其结构与功能。应该指出的是, 通过抗药基因类筛选标记介导的基因重组与转化, 从而进行的科学研究是生物安全的, 因为实验室或小型生物反应器是封闭系统, 产生的废弃物易于按照要求进行处理。但是可以预见的是, 分子生物技

术将被广泛地应用于发酵、制药、食品/饲料工程、废水处理、环境修复、生物防治等领域的菌株构建或基因改良, 但这些通过基因转化改良的菌株中是不能带有抗药基因的。

## 2 无选择标记的遗传转化技术

针对抗生素筛选标记基因的安全性问题, 当前发展的一个策略是利用无选择标记基因的遗传转化系统直接获取无筛选标记基因受体或者是在转化时使用抗生素筛选标记基因, 之后再剔除该选择标记基因。当前人们已经发展了多种方法来删除抗生素筛选标记基因, 从而获得无选择标记基因的转基因物种<sup>[20]</sup>。删除受体中的筛选标记基因方法有: 共转化法、位点特异性重组等。利用共转化法可同时转入多个基因, 获得无筛选标记基因的转基因植

株<sup>[21]</sup>。陈扬勋等综述了近年来无筛选标记转基因的一些方法<sup>[22]</sup>。比如: 共转化分离法、位点特异性重组系统、利用转座子清除筛选标记、染色体重组消除筛选标记等方法。虽然无选择标记基因技术可以避免使用抗药基因, 但是它在微生物菌株改造中的应用有几方面的局限性: (1) 基因操作程序繁琐, 克隆选择效率很低; (2) 目标基因的拷贝数很低, 表达水平差; (3) 没有选择压力, 丢失目标基因的个体很快成为优势群体。无选择标记基因转化系统如何克服以上不足的问题有待于进一步探索。

### 3 营养缺陷互补型和功能附加型筛选标记

酵母菌和丝状真菌是真核生物, 针对真核生物的抗生素不仅价格比较昂贵, 而且对动植物的毒性也比较强。因此, 酵母和丝状真菌的遗传转化系统中多数采用营养缺陷互补基因作为筛选标记。互补型筛选标记需要有相应的营养缺陷型菌株作为受体宿主, 已经发展起来的基因敲除技术为营养缺陷型菌株的构建提供了精准快速的方法, 使营养缺陷互补型筛选标记的建立和使用更为普及。

构巢曲霉是用于科学研究的一个模式菌种, 常用的营养缺陷型菌株包括 GR5 (FGSC A773)、TN02A3 (FGSC A1149)、TN02A25 (FGSC A1147)、TN02A7 (FGSC A1145)等, 其基因组中有精氨酸(*argB2*)、对氨基苯甲酸(*pabaA6*)或胞嘧啶和尿嘧啶(*pyrG89*)等缺陷型<sup>[23-24]</sup>。构巢曲霉遗传转化载体包括整合型载体 pAL5、pLB01, 以及自主复制型穿梭载体 Prg3-AMA1-NotI 等; 它们的筛选标记基因都是来源于粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)的 *pry4* 基因, 用于回补构巢曲霉的 *pyrG89* 嘧啶营养缺陷型<sup>[25]</sup>。

营养缺陷互补型筛选标记基因在粟酒裂殖酵母中得到了更为广泛的应用: *S. pombe* YHL6381 等营养缺陷型菌株, 其基因型为:  $h^+$  *his3-D1 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210*, 表明它是组氨酸、亮氨酸、尿嘧啶和腺嘌呤的生物合成缺陷型, 近年构建的还有精氨酸、赖氨酸缺陷型菌株<sup>[26]</sup>。用于转化 *S. pombe* YHL6381 的质粒包括 pREP3X 等十多种, 它们分别

携带 *adel*、*arg3+*、*his3+*、*leu2*、*lys2*、*ura3* 等筛选标记基因回补宿主细胞中的各种基因缺陷; 实施基因转化后在缺乏相应的氨基酸或核苷酸的培养基上能够生长的细胞就是获得了质粒的转化子。

营养缺陷型筛选标记在细菌重组改造中的使用也已经有研究(表 2)。de Vos 等将乳酸乳球菌糖类代谢途径中的关键基因 *lacF* 在宿主菌染色体上失活, 再将该基因克隆到游离表达质粒中, 当质粒导入 *lacF* 缺陷型宿主菌后, 克隆在质粒上的基因表达使宿主菌的乳糖缺陷得到互补, 从而得到一种食品级的选择标记<sup>[27]</sup>。

除了通过敲除糖、氨基酸、核苷酸代谢途径相关基因构建营养缺陷型宿主菌株以外, 研究人员还发展了功能附加型筛选标记, 即: 用质粒携带宿主细胞原本没有的基因, 赋予转化子新的功能, 然后在特定的选择压力下进行转化子的筛选。例如, 在含甘露糖的培养基上, 农杆菌(*Agrobacterium*)细胞内的己糖激酶催化甘露糖为 6-磷酸甘露糖, 质粒携带的磷酸甘露糖异构酶基因将 6-磷酸甘露糖转化为 6-磷酸果糖, 使转化子能够以甘露糖为唯一碳源进行生长<sup>[28]</sup>。除此以外, 一些编码胆盐水解酶、超氧化物歧化酶、金属硫蛋白(Cup1)等抗逆蛋白的基因也被用作筛选标记, 在人工逆境条件下对细菌或酵母转化子进行筛选(表 2)。

从表 2 中可以发现, 运用营养缺陷互补型或附加功能筛选标记进行重组细胞的筛选和选择性培养, 培养基必需符合产生选择压力的条件, 例如培养基中不能含有与缺陷互补的氨基酸或核苷酸、培养基中用作筛选的糖必须是唯一的碳源, 以及在培养基中需添加胆盐或高浓度铜离子等。这些条件在实验室都容易得到满足, 但当需要在分子水平上应用于生产或自然环境的菌株进行改造时, 很难对现有的营养缺陷互补型或附加功能筛选标记建立选择压力。例如, 在天然原料发酵、高密度培养发酵、动物肠道或野外环境中不可避免地存在各种氨基酸、核苷酸或不同的碳源, 从而难以获得维持细

表 2 非抗药基因筛选标记  
Table 2 Non drug-resistant selection marker genes

筛选剂 Selection agent	基因 Genes	基因来源 Sources	酶 Enzymes	筛选机理 Mechanism	参考文献 References
丙氨酸 Alanine	<i>alr</i>	乳酸杆菌	丙氨酸消旋酶	菌体缺失丙氨酸消旋酶基因则需要大量的 D-丙氨酸才能生长, 用不含丙氨酸的平板筛选转化子	[29-30]
腺嘌呤 Adenine	<i>supB</i>	乳酸乳球菌	抑制赭石突变	质粒载体编码的赭石突变抑制基因 <i>supB</i> 可使重组菌在不含腺嘌呤的选择性平板上得到重组子	[31]
嘧啶 Pyrimidine	<i>supD</i>	乳酸乳球菌	抑制琥珀突变	编码琥珀突变(Amber)抑制基因 <i>supD</i> 的质粒, 可使宿主在不含嘧啶培养基中生长重组子	[32]
胸腺嘧啶核苷 Thymidine	<i>thyA</i>	嗜热链球菌 嗜酸乳杆菌	胸腺嘧啶核苷合成酶	含 <i>thyA</i> 编码基因的载体转化 <i>thyA</i> 基因缺陷型菌体, 转化子可以在不含胸苷酸的培养基上生长	[33]
甘露糖 Mannose	<i>manA</i>	大肠杆菌	磷酸甘露糖异构酶	磷酸甘露糖异构酶将 6-磷酸甘露糖转化为 6-磷酸果糖, 能以甘露糖为碳源正常生长	[28]
D-木糖 D-xylose	<i>xylA</i>	高温厌氧芽孢杆菌	木糖异构酶	整合木糖异构酶基因的转化细胞, 将 D-木糖转化为 D-木酮糖作为碳源, 从而获得生长	[34]
蜜二糖 Melibiose	<i>aga</i>	乳酸乳球菌	$\alpha$ -半乳糖苷酶	一些乳酸菌不能直接利用蜜二糖, 而 $\alpha$ -半乳糖苷酶可水解蜜二糖为半乳糖和葡萄糖	[35]
胆盐 Bile salt	<i>bsh</i>	植物乳杆菌	胆盐水解酶	胆盐在脂类乳化和增溶中起重要作用	[36]
百草枯 Paraquat	<i>sod1</i>	乳酸克鲁维酵母	铜锌超氧化物歧化酶突变体	超氧化物歧化酶(SOD)在逆境胁迫下增强表达, 能够提高植物清除活性氧的能力	[37]
铜离子化合物 $\text{Cu}^{2+}$	<i>cup1</i>	酿酒酵母	金属硫蛋白基因	铜离子敏感型酿酒酵母转化含有 <i>cup1</i> 基因的质粒可以在高浓度铜离子培养基中生长	[38]

胞基因重组状态的选择压力。因此, 这些筛选标记的应用虽然可以避免抗药基因, 但是由于产生选择压力的条件近乎苛刻, 它们在实验室以外场合的适用范围和应用效果受到了很大的限制。

#### 4 葡萄糖胺合成酶筛选标记的发展与应用

葡萄糖胺合成酶(Glucosamine synthetase)催化氨基己糖合成代谢途径中的第一步反应, 即氨基在谷氨酰胺和6-磷酸果糖之间转移产生6-磷酸葡萄糖胺, 因而又称谷氨酰胺: 6-磷酸果糖氨基转移酶(GFAT)<sup>[39-40]</sup>。葡萄糖胺合成酶几乎存在于每个物种和组织中, 是生命活动所必需的酶, 其编码基因的破坏会使细胞失去在自然条件下生长的能力, 只有在添加外源葡萄糖胺的培养基上才能生长<sup>[40-41]</sup>。2011年Wu等运用葡萄糖胺合成酶基因作筛选标记,

成功介导了酵母和细菌的遗传转化, 这是首次用试验证明葡萄糖胺合成酶基因在真菌和细菌中都是稳定有效的新型筛选标记<sup>[41]</sup>。

研究人员敲除了大肠杆菌的葡萄糖胺合成酶编码基因*glmS*和粟酒裂殖酵母的葡萄糖胺合成酶编码基因*gfa1*, 分别构建了葡萄糖胺合成酶编码基因缺失型的菌株*E. coli*  $\Delta$ *glmS*和 *S. pombe*  $\Delta$ *gfa1*。这些菌株在不添加葡萄糖胺的培养基中不能正常生长。当我们用带有*glmS*基因的大肠杆菌质粒pHsh-*glmS*转化菌株*E. coli*  $\Delta$ *glmS*后, 含有质粒的大肠杆菌细胞得到成功筛选。同样, 用带有*gfa1*的粟酒裂殖酵母质粒pREP-*gfa1*转化菌株*S. pombe*  $\Delta$ *gfa1*菌株, 能够使它重新获得在不添加葡萄糖胺的培养基上生长的能力<sup>[41]</sup>。

裂殖酵母穿梭质粒含有分别在大肠杆菌和裂殖酵母进行复制和筛选的两套筛选标记和复制元件。以*gfaI*基因取代营养缺陷互补基因*leu2*后, 穿梭质粒还含有作为大肠杆菌筛选元件的抗药基因。邵蔚蓝等对如何构建无抗药基因酵母穿梭载体的问题展开了研究, 研究人员通过建立一个大肠杆菌和裂殖酵母共用的启动子用以调控来自裂殖酵母的葡萄糖胺合成酶基因*gfaI*的表达, 成功构建了一个生物安全性裂殖酵母穿梭载体pGFA<sup>[42]</sup>。图1展示了新型质粒的基本结构, 与其原始质粒pREP3X相比, pGFA质粒的大小从8 781 bp缩减到7 007 bp, 原质粒中的氨苄抗性基因和LEU2两个筛选标记被删除, 取而代之的是一个供两种宿主共同使用的筛选标记——*gfaI*基因。这种结构不仅丢弃了抗药基因和大肠杆菌的抗生素筛选方法, 而且使重组酵母菌能够在富含蛋白胨和酵母粉的培养基中得到稳定的选择性培养, 克服了其他营养缺陷互补型筛选标记对培养基成分的限制<sup>[42]</sup>。裂殖酵母质粒中常用的控制外源基因表达的启动子是*nmt*启动子, 这个启动子的功能受酵母粉中的维生素B1 (或称硫胺素, Thiamine)的抑制。为了使外源基因的表达水平同时摆脱对加富培养基的限制, Wang等研发了高水平表达的持家基因启动子, 并且在pGFA中运用了*eno*启动子(图1)<sup>[42-43]</sup>。

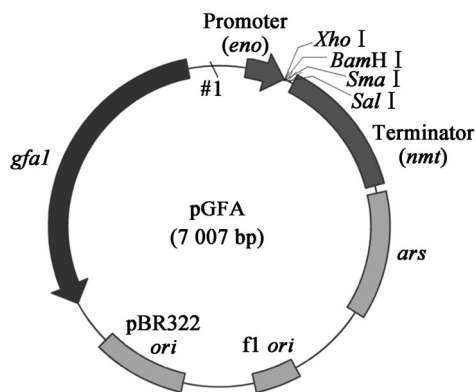


图1 新型裂殖酵母穿梭载体 pGFA 的结构图<sup>[42]</sup>

Figure 1 The structure of shuttle vector pGFA for *S. pombe*<sup>[42]</sup>

敲除宿主菌株基因组中的葡萄糖胺合成酶编码基因, 然后用质粒携带这类基因回补宿主缺失的功能, 这在原理上与前面所述的营养缺陷互补型筛选标记有些雷同。所不同的是, 葡萄糖胺不是宿主菌代谢所需的营养成分, 而是生物合成中的一种功能性中间体; 尤其重要的是, 它不像氨基酸、核苷酸或糖那样大量存在于自然生物材料中。因此, 在运用葡萄糖胺合成酶基因代替氨基酸或核苷酸筛选标记后, 敲除了*gfaI*的裂殖酵母宿主菌在含有0.5%酵母粉的YES培养基中显示了明确的筛选效果<sup>[41]</sup>。大肠杆菌对培养基中所含的葡萄糖胺比较敏感, 培养基中添加1%蛋白胨不影响葡萄糖胺合成酶的筛选标记功能; LB培养基中的酵母粉含有少量葡萄糖胺, 能够支持葡萄糖胺合成酶缺陷菌株*E. coli*  $\Delta$ glmS生长至 $OD_{600}$ 约为0.2, 但是随后就形成了选择压力, 只有得到含*glm*或*gfa*筛选标记的质粒转化的细胞才能够继续生长<sup>[41-42]</sup>。

葡萄糖胺合成酶作为筛选标记的应用研究为生物安全性遗传转化技术开创了一个新的方向。因为葡萄糖胺合成酶几乎存在于所有物种并且为生命活动所必需, 所以它有着广阔的应用空间。将来基因工程技术的应用会越来越普遍, 如果需要对益生菌、乳酸菌、饲料发酵、病虫害生物防治或环境修复等菌株进行遗传转化, 人们不能使用抗药基因, 也不能在这些菌株的应用环境中减少或添加某种成分以满足营养缺陷型或功能附加型筛选标记的要求, 此时选用葡萄糖胺合成酶筛选标记将是一个很实用的策略。另外, 现有的嗜热细菌的遗传转化系统中, 往往由于所用的抗药性筛选标记基因编码的蛋白在高温下容易失活, 转化的质粒不能稳定存在, 这些高温菌自身的葡萄糖胺合成酶应该是耐受相应高温的筛选标记。用重组工程菌进行大规模发酵生产时, 应用葡萄糖胺合成酶筛选标记可以避免大量使用抗菌素和产生抗药基因, 但生物安全性筛选标记对杂菌没有抑制作用, 发酵过程对无菌操作的要求较高。

## 5 结论

从现代生物技术的快速发展可以预见, 经过遗传转化改良的微生物菌株将走出实验室, 在发酵罐以外的各种复杂环境中发挥作用。伴随着生物技术的发展, 遗传转化的生物安全性受到人们的广泛关注。抗药基因筛选标记介导的重组微生物在实验室和发酵罐内使用是安全的, 但是遗传转化所用的抗菌素和抗药基因都不应当被动物摄入或释放到自然环境中。目前所用的无选择标记、营养缺陷互补型和功能附加型筛选标记等遗传转化技术在选择压力的形成和对重组细胞的选择性培养方面都有一些局限性。葡萄糖胺合成酶基因是各种微生物生长的必需基因, 也是最新建立的一种生物安全筛选标记。这种新型筛选标记既适用于真菌又适用于细菌, 不仅可以取代细菌质粒和穿梭载体中的抗药基因, 而且能够弥补营养缺陷互补型和功能附加型筛选标记的不足, 具有重要的应用前景。

## 参考文献

- [1] Geraskina NV, Butov IA, Yomantas YA, et al. The *dtl* gene from *Bacillus amyloliquefaciens* encodes a putative D-tyrosyl-tRNA<sup>Tyr</sup> deacylase and is a selectable marker for *Bacillus subtilis*[J]. Microbiological Research, 2015, 171: 90-96
- [2] Xu CX, Lin XM, Ren HX, et al. Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline[J]. Proteomics, 2006, 6(2): 462-473
- [3] Peng XX, Xu CX, Ren HX, et al. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa* responding to ampicillin, kanamycin, and tetracycline resistance[J]. Journal of Proteome Research, 2005, 4(6): 2257-2265
- [4] Li H, Wang BC, Xu WJ, et al. Identification and network of outer membrane proteins regulating streptomycin resistance in *Escherichia coli*[J]. Journal of Proteome Research, 2008, 7(9): 4040-4049
- [5] Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, et al. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*[J]. EMBO Journal, 1987, 6(9): 2519-2523
- [6] Jiang YM, Hu XN, Huang HY. Recent patents on biosafety strategies of selectable marker genes in genetically modified crops[J]. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture, 2014, 6(1): 3-15
- [7] Tuteja N, Verma S, Sahoo RK, et al. Recent advances in development of marker-free transgenic plants: regulation and biosafety concern[J]. Journal of Biosciences, 2012, 37(1): 167-197
- [8] Ramessar K, Peremarti A, Gómez-Galera S, et al. Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics[J]. Transgenic Research, 2007, 16(3): 261-280
- [9] Yang F, Njire MM, Liu J, et al. Engineering more stable, selectable marker-free autoluminescent mycobacteria by one step[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119341
- [10] Balbás P, Bolívar F. Back to basics: pBR322 and protein expression systems in *E. coli*[J]. Methods in Molecular Biology, 2004, 267: 77-90
- [11] Carrer H, Hockenberry TN, Svab Z, et al. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation into tobacco[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1993, 241(1/2): 49-56
- [12] Harwood J, Smith DH. Catabolite repression of chloramphenicol acetyl transferase synthesis in *E. coli* K12[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1971, 42(1): 57-62
- [13] Joshi PB, Webb JR, Davies JE, et al. The gene encoding streptothricin acetyl transferase (*sat*) as a selectable marker for *Leishmania* expression vectors[J]. Gene, 1995, 156(1): 145-149
- [14] Jelenska J, Tietze E, Tempé J, et al. Streptothricin resistance as a novel selectable marker for transgenic plant cells[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(3): 298-303
- [15] Lacks SA, Lopez P, Greenberg B, et al. Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1[J]. Journal of Molecular Biology, 1986, 192(4): 753-765
- [16] Xu YB, Liu N, Huang YM. Construction of a hygromycin phosphotransferase as a selectable marker plasmid and the expression of LL37[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 39(4): 86-90 (in Chinese)  
徐义兵, 刘娜, 黄毓茂. 潮霉素抗性基因筛选标记质粒的构建及 LL37 的表达[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(4): 86-90
- [17] Hayford MB, Medford JI, Hoffman NL, et al. Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamicin acetyltransferases[J]. Plant Physiology, 1988, 86(4): 1216-1222
- [18] Mulsant P, Gatignol A, Dalens M, et al. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker in CHO cells[J]. Somatic Cell and Molecular Genetics, 1988, 14(3): 243-252
- [19] Huang Y, Jin H, Xue YR, et al. Effects of different concentrations of G418 on ear fibroblast cells of sheep[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2014, 35(7/8): 14-15 (in Chinese)  
黄洋, 靳辉, 薛艳蓉, 等. 不同浓度 G418 对绵羊耳成纤维细胞的影响[J]. 畜牧与饲料科学, 2014, 35(7/8): 14-15
- [20] Gao XQ, Zhou JZ, Li J, et al. Efficient generation of marker-free transgenic rice plants using an improved transposon-mediated transgene reintegration strategy[J]. Plant Physiology, 2015, 167(1): 11-24
- [21] Kapusi E, Hensel G, Coronado MJ, et al. The elimination of a selectable marker gene in the doubled haploid progeny of co-transformed barley plants[J]. Plant Molecular Biology, 2013, 81(1/2): 149-160
- [22] Chen YX, Zhang ZG, Lu TG. Review of marker-free transgenic crop[J]. Biotechnology Bulletin, 2012(12): 1-7 (in Chinese)  
陈扬勋, 张治国, 路铁刚. 无筛选标记转基因作物的研究进展[J]. 生物技术通报, 2012(12): 1-7
- [23] Hoffmann B, Eckert SE, Krappmann S, et al. Sexual diploids of *Aspergillus nidulans* do not form by random fusion of nuclei in the heterokaryon[J]. Genetics, 2001, 157(1): 141-147
- [24] Nayak T, Szewczyk E, Oakeley CE, et al. A versatile and efficient Gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*[J]. Genetics, 2006, 172(3): 1557-1566
- [25] Liu B, Morris NR. A Spindle pole body-associated protein, SNAD, affects septation and conidiation in *Aspergillus nidulans*[J]. Molecular and General Genetics MGG, 2000, 263(3): 375-387
- [26] Hoffman RL, Hoffman CS. Cloning the *Schizosaccharomyces pombe* *lys2<sup>+</sup>* gene and construction of new molecular genetic tools[J]. Current Genetics, 2006, 49(6): 414-420
- [27] de Vos WM. Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 1999, 9(1): 3-10

- [28] Duan YB, Zhai CG, Li H, et al. An efficient and high-throughput protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation based on phosphomannose isomerase positive selection in *Japonica* rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(9): 1611-1624
- [29] Nguyen TT, Mathiesen G, Fredriksen L, et al. A food-grade system for inducible gene expression in *Lactobacillus plantarum* using an alanine racemase-encoding selection marker[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(10): 5617-5624
- [30] Lu WW, Kong J, Kong WT. Construction and application of a food-grade expression system for *Lactococcus lactis*[J]. *Molecular Biotechnology*, 2013, 54(2): 170-176
- [31] Dickely F, Nilsson D, Hansen EB, et al. Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning vector[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 15(5): 839-847
- [32] Sørensen KI, Larsen R, Kibenich A, et al. A food-grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1253-1258
- [33] Sasaki Y, Ito Y, Sasaki T. *ThyA* as a selection marker in construction of food-grade host-vector and integration systems for *Streptococcus thermophilus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(3): 1858-1864
- [34] Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT. 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(2): 287-296
- [35] Xu B, Cao YS, Chen Y, et al. Construction of food-grade inducible expression system in *Lactococcus lactis* and expression of fusion OprF/H from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(4): 604-609
- [36] Yin S, Zhai ZY, Wang GH, et al. A novel vector for lactic acid bacteria that uses a bile salt hydrolase gene as a potential food-grade selection marker[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 152(1/2): 49-53
- [37] Li WF. Directed evolution of Cu/Zn-superoxide dismutase and use as a safe selectable marker in plant transformation[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2010
- 李文凤. 铜锌超氧化物歧化酶的体外定向进化及其作为安全标记应用于植物转基因的研究[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2010
- [38] Sheng GY, Zhuge B, Zong H, et al. Construction and application of the high sensitivity expression system of copper-resistant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2014, 20(3): 357-362 (in Chinese)
- 盛冠一, 诸葛斌, 宗红, 等. 高灵敏度铜抗性酿酒酵母表达系统的构建与应用[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(3): 357-362
- [39] Dutka-Malen S, Mazodier P, Badet B. Molecular cloning and overexpression of the glucosamine synthetase gene from *Escherichia coli*[J]. *Biochimie*, 1988, 70(2): 287-290
- [40] Ram AFJ, Arentshorst M, Damveld RA, et al. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall[J]. *Microbiology*, 2004, 150(Pt10): 3315-3326
- [41] Wu GG, Sun Y, Qu W, et al. Application of GFAT as a novel selection marker to mediate gene expression[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e17082
- [42] Shao WL, Wang HC. Construction and application of yeast-bacterial shuttle vector without drug-resistant selection marker genes: China, CN201310191146.4[P]. 2014-04-30 (in Chinese)
- 邵蔚蓝, 王洪成. 无抗药基因的酵母-细菌穿梭载体的构建和应用: 中国, CN201310191146.4[P]. 2014-04-30
- [43] Wang HC, Wang HY, Wang M, et al. Identification and refinement of two strong constitutive promoters for gene expression system of *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(6): 1809-1817