

# 无选择标记的植物表达载体的构建

辛翠花<sup>1,2</sup>, 刘庆昌<sup>1</sup>, 屈冬玉<sup>1,2\*</sup>, 黄三文<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; <sup>2</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 以二元载体 pB NPLUS为基础, 在 T-DNA 侧翼区通过 2 次特异 PCR、酶切和连接相结合的方法, 构建了 1 个无标记载体 pB NMF (marker-free vector)。通过酶切后测序分析, 这个无标记载体在 T-DNA 左、右边界之间只有 1 个多克隆位点 (multiple cloned sites, MCS)。为了验证该载体的遗传稳定性, 将 *gus* 基因克隆到该载体上并通过农杆菌介导的方法转化番茄栽培品种 ‘MoneyMaker’, 特异 PCR 扩增目的基因和 GUS 组织染色结果表明, *gus* 基因已经整合进入番茄基因组并得以表达。该载体为今后直接获得无标记基因、生物安全的转化体, 尤其可为马铃薯、木薯等无性繁殖材料的无标记基因转化提供可靠、有效的工具。

**关键词:** 无标记转化; 载体构建; 转基因; 番茄

中图分类号: S 641.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 05-0701-06

## The Construction of a Binary Vector for Marker-free Transformation in Plants

XIN Cui-hua<sup>1,2</sup>, LIU Qing-chang<sup>1</sup>, QU Dong-yu<sup>1,2\*</sup>, and HUANG San-wen<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; <sup>2</sup> Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** A marker-free vector (pB NMF) derived from the binary vector pB NPLUS was generated, which only contained a multiple cloned site between left and right borders as validated by restriction analysis and sequencing. In order to identify the efficiency of pB NMF for transformation, the *gus* gene was cloned into the vector and was introduced into the tomato cultivar MoneyMaker via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Gene-specific PCR and GUS stain assay showed that *gus* gene was integrated into the tomato genome and was expressed. This vector could become a reliable and efficient tool for direct generating marker-free transformants in plants, particularly useful for vegetatively propagated crops like potato and cassava.

**Key words:** marker-free transformation; vector construction; transgene; tomato

众所周知, 利用农杆菌介导的转基因频率很低, 因此在转化过程中往往利用标记基因辅助选择来筛选为数很少的阳性转化体。但是由于这些筛选标记基因多数为一些编码抗生素抗性 (Bevan et al, 1983) 和除草剂抗性 (Shah et al, 1986) 的基因, 它们对生态环境和食品安全性的影响引起了消费者和环境学家的普遍关注和担忧。因此有研究者在转化时使用标记基因, 而在得到阳性转化体后通过各种手段将筛选标记基因去除 (Komari et al, 1996; Gleave et al, 1999; Zubko et al, 2000; Ow, 2001; Lutz et al, 2006; Kittiwongwattana et al, 2007), 另外一些研究者则利用无选择标记基因的转化系统, 转化时不使用筛选标记基因 (de Vetten et al, 2003; Jia et al, 2007)。

收稿日期: 2007 - 12 - 20; 修回日期: 2008 - 04 - 30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671319); 中荷园艺作物基因组分析联合实验室运行项目 (1251601001); 国家重点基础研究发展计划项目 (2006cb101907); 中荷战略联盟项目 (2004CB720405)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: dyqu@mail.caas.net.cn; huangsanwen@caas.net.cn)

本研究基于无标记转化系统的理论基础构建了一个在 T-DNA 左、右边界之间只有 1 个多克隆位点的无标记转化载体,一步到位即可获得只导入目的基因的阳性转化体。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

番茄栽培品种 ‘Moneymaker’ 种子、农杆菌菌株 Agl-0、表达载体 pB II 21 和基础载体 pB NPLUS 都来自本实验室;大肠杆菌感受态 DH5 购自 Tiangene 公司;限制性内切酶购自 NEB 公司;Pfu-UI-<sup>TM</sup> 高保真 DNA 聚合酶购自 STRATAGENE 公司;胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。

### 1.2 无标记载体的构建

以双元表达载体 pB NPLUS (图 1) 为基础,在 T-DNA 左边界侧翼序列设计引物 P1 和 P2 并 PCR 扩增出约 2.8 kb 大小的产物,然后用 *Asc* /*Nde* 双酶切扩增产物和 pB NPLUS 质粒,并分别回收酶切产物的大片段,连接、转化和筛选阳性克隆,即构建好左边界只有多克隆位点的表达载体 pB NLD (图 1)。P1: 5'-ACCAGGCGGGTCAAA TCAGG-3', P2: 5'-TTGGCGCGCCAAA TAAAAACGTCGCC-CAATGTGTATTAAG-3', P2 引物在其 5 端增加了 *Asc* 酶切位点 GGCGCGCC。以 pB NLD 为基础载体,在 T-DNA 右边界侧翼序列设计引物 P3 和 P4 并 PCR 扩增出约 1 kb 大小的产物,然后用 *Pac* /*EcoN* 双酶切扩增产物和 pB NLD 质粒,并分别回收酶切产物的大片段,连接、转化和筛选阳性克隆,即构建完毕左、右边界之间只有 1 个多克隆位点的无标记载体 pB NMF (图 1)。P3: 5'-CCTTAATTAAG-GAAACTATCA GTGTTTGACAGGATATA TTGGC-3', P4: 5'-CGACAA TCCCGCGAGTCCC-3', P3 引物在其 5 端增加了 *Pac* 的酶切位点 TTAATTAA。引物由上海生工生物公司合成。

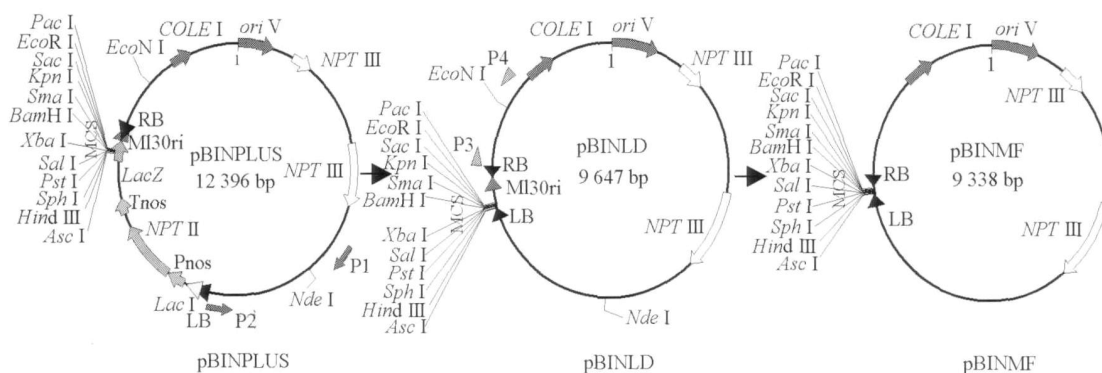


图 1 无标记载体 pBINMF 构建流程图

Fig. 1 Schematic flow of marker-free vector (pBINMF) construction

### 1.3 *gus* 基因克隆到无标记载体 pBINMF

用 *EcoR* /*Hind* 双酶切载体 pB II 21, 回收约 3 kb 的小片段 (包括 35S 启动子、*nos* 终止子和 *gus* 基因)。同样用 *EcoR* /*Hind* 双酶切无标记载体 pB NMF 后回收约 9.3 kb 的大片段并用 *T4* DNA 连接酶与回收的 3 kb 片段连接、转化, 然后通过单菌落 PCR、质粒酶切鉴定获得重组体 pB NMF-*gus* 阳性克隆。

### 1.4 农杆菌介导的遗传转化

将重组载体 pB NMF-*gus* 通过三亲融合的方法转化毒力强的农杆菌 Agl-0 (Lazo et al, 1991), 并通过单菌落 PCR 结合质粒酶切的方法获得阳性克隆。将含有重组载体的农杆菌 Agl-0 接种于附加 50 mg · L<sup>-1</sup> Km (卡那霉素) 和 50 mg · L<sup>-1</sup> Rif (利福平) 的 LB 培养基中, 28 ~ 240 r · min<sup>-1</sup> 摇床上培养

到  $OD_{600} = 0.6 \sim 0.7$ 。然后  $6\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $10\text{ min}$ ，用 MS 液体培养基重悬菌体并稀释到  $OD_{600} = 0.3 \sim 0.4$ ，加入终浓度为  $375\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  AS (乙酰丁香酮) 用于侵染。番茄栽培品种 ‘Moneymaker’ 种子播于 MS 培养基， $7 \sim 10\text{ d}$  后待子叶刚伸展即用于转基因，方法参照 Sun 等 (2006) 略有改动。待生根培养基上得到的小苗长出  $5 \sim 6$  片叶时移入温室用于后期 PCR 阳性鉴定和 GUS 组织染色鉴定。

### 1.5 PCR 鉴定

取温室生长  $10 \sim 15\text{ d}$  的转化体和对照叶片  $100 \sim 300\text{ mg}$ ，提取基因组 DNA，以此为模板。以 *gus* 基因序列设计引物，GUS1:  $5\text{'-TCCTGTAGAAACCCCAACCCG-3'}$  和 GUS2:  $5\text{'-CCATC-AGCACGT-TATCGAATCC-3'}$ ，并用这对引物进行 PCR 扩增。反应程序为： $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $4\text{ min}$ ； $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $1\text{ min}$ ， $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $1\text{ min}$ ， $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $1\text{ min}$ ， $30$  个循环；最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $10\text{ min}$ 。取  $10\text{ }\mu\text{L}$  PCR 反应液在  $1\%$  琼脂糖凝胶上电泳检测。

### 1.6 GUS 组织染色鉴定

GUS 组织染色参照 Jefferson (1987) 方法略有改动。取温室生长  $10 \sim 15\text{ d}$  的番茄叶片放于 GUS 染液中 [ $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ Na}_3\text{PO}_4$  (pH 7.0)， $0.1\%$  Triton X-100， $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ EDTA}$ ， $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ， $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ， $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-}\beta\text{-D-GlcUA (X-Gluc)}$ ]， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$   $10\text{ h}$  后将染色的叶片转入  $75\%$  的酒精中脱色以去掉叶绿素。以野生番茄叶片为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 无标记载体的构建

通过两次特异的 PCR 扩增、酶切和连接，成功构建了在 T-DNA 左、右边界之间只有 1 个多克隆位点的无标记载体 pB NMF。对左边界改造后，切去了包括 *Npt* 基因在内的大约  $2.9\text{ kb}$  的序列。用 *Asc* / *Nde* 双酶切载体 pB NLD (图 2, A)，切出的两条带分别与载体 pB NPLUS 酶切所回收的  $7.8\text{ kb}$  大片段和 PCR 产物酶切所回收的  $1.9\text{ kb}$  大片段大小保持一致，初步说明对左边界的改造成功。对右边界改造后，切去了约  $300\text{ bp}$  多余的序列。用 *EcoN* / *Pac* 双酶切载体 pB NMF (图 2, B)，切出的两条带分别与载体 pB NLD 酶切所回收的  $8.5\text{ kb}$  大片段和 PCR 产物酶切所回收的  $864\text{ bp}$  大片段大小保持一致，初步说明右边界改造也可能成功。

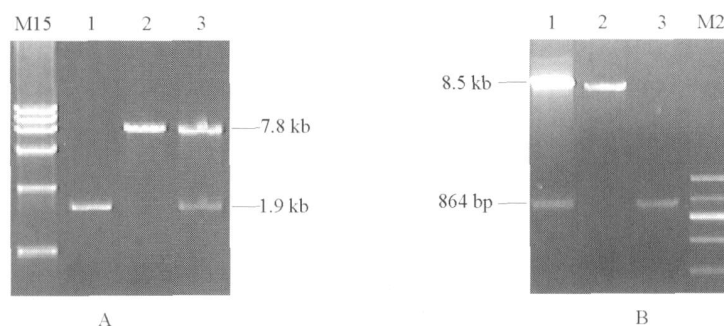


图 2 pB NMF 左 (A)、右 (B) 边界改造后酶切鉴定结果

A: 1、2、3 分别为 PCR 产物、质粒酶切回收的大片段和载体 pB NLD 双酶切 (*Asc* / *Nde*) 结果；

B: 1、2、3 分别为载体 pB NMF 双酶切 (*Pac* / *EcoN*)、质粒和 PCR 产物酶切回收大片段；

M2: Marker ; M15: DNA marker DL 15000。

Fig 2 Enzyme digestion analysis after the reconstruction to left (A) and right (B) border of the vector pB NMF

A: 1, 2. The large recovery of PCR products and the vector pB NPLUS; 3. The enzyme digestion of the vector pB NLD with *Asc* / *Nde* ; B: 1. The enzyme digestion of the vector pB NMF

with *Pac* / *EcoN* ; 2, 3. The large recovery of the vector pB NLD and PCR products;

M2: Marker ; M15: DNA marker DL 15000.

通过测序分析 (图 3) 进一步证明了这个 T-DNA 左、右边界之间只有 1 个多克隆位点的无标记载体已经成功构建。从测序结果来看, 在 T-DNA 左、右边界确实仅有 1 个多克隆位点, 没有任何多余序列。但在多克隆位点与两边界之间分别多了 TT 和 GG 两个碱基, 这是我们在设计引物时加入的保护碱基。另外在右边界发现有一个碱基突变, 由 A 变为 G, 左边界没有碱基的突变。

```

Predicated  T AACACATTGCGGACGTTTTT AAT . . GGC GCGCCAAGCTTGCATGCTGCAGGT CGACT
Sequenced   T AACACATTGCGGACGTTTTT AATTT GGC GCGCCAAGCTTGCATGCTGCAGGT CGACT
Consensus   taacacattgcggacgTTTTT aat  ggcgcgccaaagctt gcatgctgcagggtcgact

Predicated  C AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCTTAATTAA . . AAAC TATCAGTGTGTTGA
Sequenced   CTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCTTAATTAA GGAAC TATCAGTGTGTTGA
Consensus   ct agaggatccccgggt accgagct cgaatt ctt aatt aa  aaact atcagt gttt ga

Predicated  CAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTMTTAGAAT AATCGGATAT
Sequenced   CAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTMTTAGAAT AATCGGATAT
Consensus   caggatataatt ggcgggtaaacctaagagaaaagagcgttt att aga ataatcggatat

Predicated  TTAAAAGGGCGTGAAGGGTTTATCCGTTCTGTCATTGTATGTGTCATGCCAACACAG
Sequenced   TTAAAAGGGCGTGAAGGGTTTATCCGT CGTCCATTGTATGTGTCATGCCAACACAG
Consensus   ttaaaaggcggtgaaa gggtttatccgtt cgtccatttgtatgtgcatgccaaaccacag
  
```

图 3 无标记载体 (pBINMF) T-DNA 部分测序序列

左边界 (LB)、多克隆位点 (MCS) 和右边界 (RB) 分别以粉色、红色和棕色表示。

Fig. 3 The partial sequenced sequence of T-DNA of the vector pBINMF

The sequence of left border (LB), multiple cloned sites (MCS) and right border (RB) are highlighted in pink, red and brown respectively.

## 2.2 *gus* 基因克隆到无标记载体 pBINMF

将卡那抗性平板上的阳性克隆经过单菌落 PCR 鉴定后, 将 PCR 鉴定的阳性克隆摇菌提取质粒, 并用 *EcoR* /*Hind* 和 *Sac* /*Xba* 分别双酶切, 结果如图 4。*EcoR* /*Hind* 双酶切后, 切出两条带。预期应该切下包括启动子、终止子和 *gus* 基因共约 3 kb 大小的条带和约 9.3 kb 大小的 pBINMF 空载体; *Sac* /*Xba* 双酶切后, 切出两条带。预期应该切下只包括 *gus* 基因在内的约 2 kb 大小的条带和包括空载体 pBINMF、35S 启动子和 *nos* 终止子共约 10.3 kb 大小的条带。从图 4 可见, 所切条带与理论预期酶切结果完全一致, 说明 *gus* 基因已经克隆到无标记载体 pBINMF 上, 成功构建了重组载体 pBINMF-*gus*。

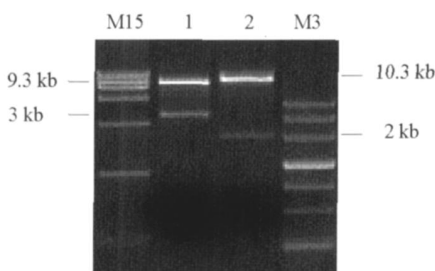


图 4 重组载体 pBINMF-*gus* 酶切鉴定结果

1. 重组载体 *EcoR* /*Hind* 双酶切; 2. 重组载体 *Sac* /*Xba* 双酶切; M3. Marker ; M15. DNA marker DL 15000.

Fig. 4 Enzyme digestion analysis of the recombinant vector pBINMF-*gus*

1, 2. The enzyme digestion of pBINMF-*gus* with *EcoR* /*Hind* and

*Sac* /*Xba* respectively; M3. Marker ; M15. DNA marker DL 15000.

### 2.3 转 *gus* 基因番茄的 PCR 鉴定

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测证明, *gus* 基因已经成功地通过该无标记转化载体整合到番茄基因组中, 结果如图 5。转化株系和阳性质粒对照都扩增出了理论上为 928 bp 大小的条带, 而阴性未转基因对照和其它假阳性转化体都没有扩增出此条带。

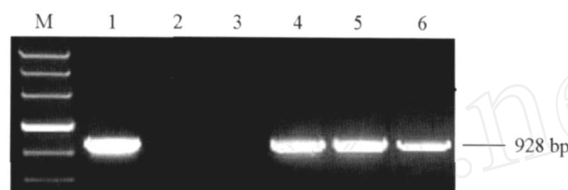


图 5 部分转 *gus* 基因番茄 PCR 检测

1. 携带 *gus* 基因的质粒 pB II21 阳性对照; 2, 3. 阴性对照和假阳性转化体;  
4~6. 成功的阳性转化体, 扩增出了大约 928 bp 大小的条带; M. Marker。

Fig 5 The specific PCR of *gus* gene for partial transgenic tomatoes

1. pB II21 carrying the *gus* gene; 2, 3. The wild tomatoes and pseudo-positive transformant;  
4 - 6. Positive transgenic tomatoes; M. Marker。

### 2.4 GUS 组织染色鉴定

GUS 叶片染色结果证明, *gus* 基因已经成功整合进入番茄基因组中并在转录水平上得以表达, 结果见图 6。

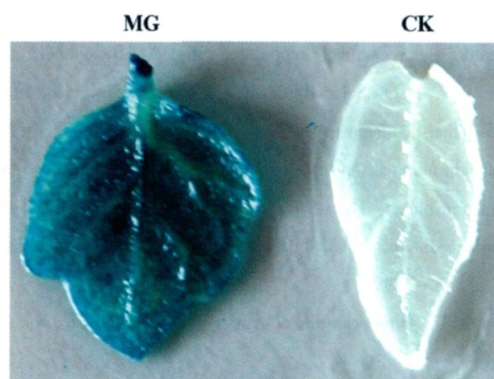


图 6 无标记转基因番茄与对照未转基因番茄叶片 GUS 染色

MG 转 *gus* 基因番茄叶片; CK 未转基因番茄叶片。

Fig 6 GUS stain of leaves for transgenic and non-transgenic tomatoes by marker-free transformation

MG *gus*-transgenic leaf; CK Non-transgenic leaf

## 3 讨论

在过去几年里, 消费者和环境学家从生态安全和食物安全的角度出发, 讨论了抗生素和除草剂抗性基因在遗传转化中的安全性问题。这些问题主要集中在: (1) 带有抗生素或除草剂抗性标记基因的转基因植物可能会变成有害的杂草; (2) 选择标记基因传播到野生亲缘种中, 可能会使杂草获得这些基因而使现有的除草剂无法将杂草杀掉; (3) 选择标记基因传播到其它生物体中, 可能会破坏生态系统的平衡。利用更安全的无标记转化 (marker-free transformation) 可能会给转基因生物 (genetically modified organism, GMO) 带来一个全新的概念, 提高人们对转基因产品的接受程度。

本研究通过酶切结合测序结果证明无标记载体 pB NMF 构建成功。该载体大小为 9.347 kb, 比基础载体 pB NPLUS 约小 3 kb。与以往获得无标记转化体 (Komari et al, 1996; Jia et al, 2006; Lutz et al, 2006; Ballester et al, 2007) 不同, 利用该载体可以一步到位直接获得无标记基因的转化体, 不

需要得到转基因株系后再通过各种手段将筛选标记基因去除, 省时、省力。尤其是为一些无性繁殖材料无标记基因的转化提供了可靠的技术平台。该无标记转化系统也不同于以往的无标记转化系统 (de Vetten et al, 2003; Jia et al, 2007), 以往无标记转化系统都只是将编码抗生素抗性的基因失活, 在 T-DNA 左、右边界之间仍有很多细菌的骨架序列没有被切除, 这些序列会随同外源目的基因一起被转入受体植物中, 可能会导致一些负面影响。本研究中的无标记转化系统导入植物的只有外源目的基因, 不含任何多余序列, 从生物安全和食品安全的角度考虑更容易被接受, 也更有应用前景。

本研究在构建无标记载体时部分序列为 PCR 引入, 有 3 处发生了碱基突变, 其中一处突变位于 pB NMF 载体 T-DNA 右边界区域, 右边界在遗传转化中比左边界更重要 (Hepburn & White, 1985; Jen & Chilton, 1986); 所构建的载体切除了 T-DNA 左、右边界之间所有多余细菌序列, 只保留 1 个多克隆位点。为了证明这些突变碱基和切去的细菌多余序列不会影响遗传转化, 本研究将小而易于操作的 *gus* 基因利用该载体介导转入番茄栽培品种 ‘Moneymaker’, 随后的 PCR 检测和 GUS 染色证明, 碱基突变和多余序列切除不影响载体 pB NMF 的遗传转化效果。

## References

- Ballester A, Cervera M, Pena L. 2007. Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of the marker gene by site-specific recombination. *Plant Cell Rep*, 26 (1): 39 - 45.
- Bevan M W, Flavell R B, Chilton M D. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304: 184 - 187.
- de Vetten N, Wolters A M, Raemakers K, van der Meer I, ter Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser R. 2003. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nat Biotechnol*, 21 (4): 439 - 442.
- Gleave A P, Mitra D S, Mudge S R, Morris B A. 1999. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: Transient expression of *Cre* recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol Biol*, 40 (2): 223 - 235.
- Hepburn A G, White J. 1985. The effect of right terminal repeat deletion on the oncogenicity of the T-region of pTiT37. *Plant Mol Biol*, 5: 3 - 11.
- Jefferson R A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep*, 5: 387 - 405.
- Jen G C, Chilton M D. 1986. The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation. *Proc Natl Acad Sci*, 83: 3895 - 3899.
- Jia H, Liao M, Verbelen J P, Vissenberg K. 2007. Direct creation of marker-free tobacco plants from agroinfiltrated leaf discs. *Plant Cell Rep*, 26 (11): 1961 - 1965.
- Jia H, Pang Y, Chen X, Fang R. 2006. 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*, 15 (3): 375 - 584.
- Kittiwongwattana C, Lutz K, Clark M, Maliga P. 2007. Plastid marker gene excision by the phiC31 phage site-specific recombinase. *Plant Mol Biol*, 64 (1 - 2): 137 - 143.
- Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T. 1996. Vectors carrying two separate T-DNA s for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J*, 10 (1): 165 - 174.
- Lazo G R, Stein P A, Ludwig R A. 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology (N Y)*, 9 (10): 963 - 967.
- Lutz K A, Svab Z, Maliga P. 2006. Construction of marker-free transplastomic tobacco using the *Cre-loxP* site-specific recombination system. *Nat Protoc*, 1 (2): 900 - 910.
- Ow D W. 2001. The right chemistry for marker gene removal? *Nat Biotechnol*, 19 (2): 115 - 116.
- Shah D M, Horsch R B, Klee H J, Kishore G M, Winter J A, Turner N E, Hironaka C M, Sanders P R, Gasser C S, Aykent S, Siegel N R, Rogers S G, Fraley R T. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science*, 233 (4762): 478 - 481.
- Sun H J, Uchii S, Watanabe S, Ezura H. 2006. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol*, 47 (3): 426 - 431.
- Zubko E, Scutt C, Meyer P. 2000. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. *Nat Biotechnol*, 18 (4): 442 - 445.