

利用双 T-DNA 载体系统培育无选择标记转基因大豆^{*}

张秀春¹ 彭 明¹ 吴坤鑫¹ 郭丽琼^{1, 2} 林俊扬³ 林俊芳^{1, 2}

(1. 中国热带农业科学院热带作物生物技术研究所, 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南海口 571101; 2. 华南农业大学食品学院生物工程系, 广州 510640; 3. 福建省莆田市农业科学研究所, 莆田 351100)

摘要 利用 PCR 和 Southern 杂交检测了 161 株转 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因(*D6D*)的 T_1 代植株, 初步筛选出只含有功能基因(*D6D*)而不含有筛选标记基因(*bar*)的转基因大豆植株 9 株, 为获得富含 γ 亚麻酸但不含选择标记基因的转基因大豆奠定了基础, 并为转基因大豆的安全性种植提供了保障。同时对无标记基因的转基因植株进行了叶片涂抹除草剂验证, 探讨了叶片涂抹除草剂结合目的基因 PCR 检测筛选无选择标记转基因植株的可行性。

关键词 双 T-DNA; 无标记基因; 大豆

中图分类号 S 565. 103. 53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2006)04-0369-04

利用转基因技术进行作物品种改良已成为一种有效的育种途径, 将优良的外源基因导入育种材料, 可望培育有生产价值的转基因大豆新品种。随着植物遗传工程的发展, 已经产生了大量具有人们所期望性状的农作物。近几年来, 转基因作物商品化生产和小规模田间释放的不断增加, 转基因作物的安全性问题日益受到人们的重视, 其可能导致的潜在生态风险性成为人们关注与争论的焦点, 这些问题主要由于抗生素或除草剂抗性的选择标记基因存留于转基因植物中引起的。

就目前情况看, 培育无选择标记的转基因作物可以减少生物安全问题带来的疑虑, 也是保证转基因技术安全发展的有效办法之一。所以, 培育无抗性标记基因的转基因作物已成为农作物基因工程育种的重要目标^[1~4]。目前, 培育无抗性标记基因的转基因植物的方法主要有 3 种系统: 共转化系统、特异重组酶转化系统及转座子系统。共转化系统是采用 2 个质粒或 1 个含有两套 T-DNA 表达盒的表达载体共同转化植物, 其中一套表达盒含有抗性选择标记基因, 另一套表达盒含有目的基因。它们转化植物后可能整合到植物基因组的染色体或同

一染色体的不同位置上, 在减数分裂过程中, 标记基因和目的基因有可能发生分离, 从而有可能在转基因后代中筛选到只含有目的基因而不含有选择标记基因的个体。Komari 首先运用这种方法转化植物, 发现转基因后代中约有 40% 的个体选择标记基因与目的基因独立分离, 从而选出无抗性标记基因的转基因植物^[1]。

本研究是利用双 T-DNA 载体系统, 通过 T_1 代转基因大豆 PCR 检测和 Southern 杂交检测, 初步筛选出目的基因与抗性选择标记基因相互分离的转基因后代。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 大豆材料 供试材料 T_1 代莆豆 8008 转基因大豆来自本实验室的先期转化工作^[5]。

1.1.2 质粒 质粒为共转化表达载体 pLIN61, 由本课题组构建^[6]。目的基因玻璃苣 Δ^6 -脂肪酸脱

* 收稿日期: 2006-05-15

基金项目: 广东省科技攻关项目(2005B20101009), 国家自然科学基金(30371000)资助。

作者简介: 张秀春(1972-), 女, 副研究员, 博士, 主要从事植物生物技术研究。

通讯作者: 林俊芳, E-mail: linjf@scau.edu.cn

氢酶(Δ^6 - fatty acid desaturase, *D6D*)和选择标记基因 *bar* 分别插在同一质粒两个相互独立的 T - DNA 内(见图 1)。

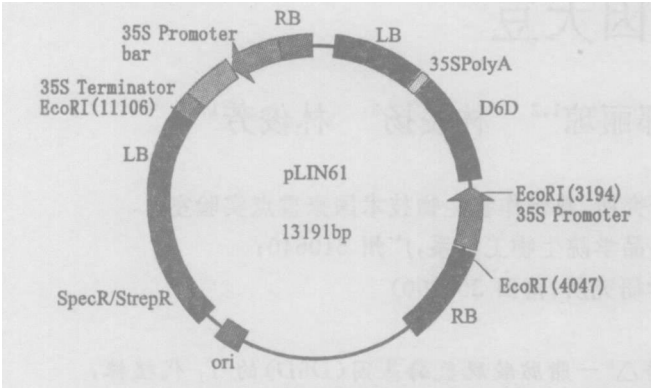


图 1 共转化表达载体 pLIN61

Fig. 1 The plant co transformation expression vector pLIN61

1. 1. 3 试剂 限制性内切酶为 Promega 公司产品, *Taq* 多聚酶、dNTP 等 PCR 试剂购自华美生物工程公司, 寡核苷酸引物由上海 Sangon 公司合成。DIG DNA Labeling and Detection Kit 购自 Roche 公司。除草剂 Glufosinate 购自 Sigma 公司。其他各种试剂为国产分析纯。

1. 2 方法

1. 2. 1 *T*₁ 代转基因植株的 PCR 扩增 采用 CTAB 法提取大豆叶片基因组 DNA, 以其为模板, 进行 PCR 扩增。目的基因 *D6D* 的 PCR 扩增引物为: DesatF(5'-TTT TTC ATC CAT GGC TGC TCA AAT G 3'和 DesatR(5'-TTT TTT CTA GAT TAA CCA TGA GTG TGA AGA GG 3'), PCR 反应条件是: 95℃预变性 5 min, 循环参数: 94℃ 40 s, 52℃ 40 s, 72℃ 60 s, 33 个循环, 72℃延伸 10 min。选择标记基因 *bar* 的 PCR 扩增引物为: P₁(5'ATG AGC CCA GAA CGA CGG 3')和 P₃(5'TCA GAT CTC GGT GAC GGG CA 3'), PCR 反应条件是: 95℃预变性 5 min, 循环参数: 94℃ 40 s, 57℃ 40 s, 72℃ 50 s, 33 个循环, 72℃延伸 10 min。

1. 2. 2 *T*₁ 代转基因植株的 Southern 杂交检测 取 10^μg 大豆基因组 DNA, *Eco*RI 酶切后在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳分离, 植物共转化表达载体 pLIN61 用 *Pst*I 单酶切。采用向下毛细管印迹法将凝胶上的 DNA 转移到尼龙膜上, 采用地高辛标记检测试剂盒进行 Southern 杂交。目的基因 *D6D* 及选择标记基因 *bar* 的探针标记、尼龙膜预杂交和杂交显影等具体步骤参见试剂盒使用说明书。

1. 2. 3 转基因植株除草剂抗性鉴定 选择对照及

转基因大豆比较鲜嫩的叶片涂抹除草剂 glufosinate, glufosinate 浓度梯度设为 0、25、50、75、100、125、150、175、200、225 mg/L, 涂抹后第 7d 观察记录大豆叶片的斑枯情况。

2 结果与分析

2. 1 *T*₁ 代转基因植株的 PCR 扩增

表 1 *T*₁ 代转基因植株的基因型分布

Table 1 Genotype distribution in *T*₁ transgenic plants

Event	<i>T</i> ₀		<i>T</i> ₁ ^a			
	<i>D6D</i> ⁻ <i>bar</i> ⁺	<i>D6D</i> ⁺ <i>bar</i> ⁺	<i>D6D</i> ⁻ <i>bar</i> ⁺	<i>D6D</i> ⁻ <i>bar</i> ⁻	<i>D6D</i> ⁺ <i>bar</i> ⁻	
<i>T</i> ₀ -1	+/+	7	1	1	0	
<i>T</i> ₀ -6	+/+	9	3	1	0	
<i>T</i> ₀ -7	+/+	10	2	0	4	
<i>T</i> ₀ -8	+/+	6	5	0	0	
<i>T</i> ₀ -9	+/+	8	0	0	2	
<i>T</i> ₀ -10	+/+	11	0	1	0	
<i>T</i> ₀ -11	+/+	7	0	0	3	
<i>T</i> ₀ -12	+/+	3	5	1	0	
<i>T</i> ₀ -13	+/+	8	3	0	0	
<i>T</i> ₀ -14	+/+	5	1	0	0	
<i>T</i> ₀ -16	+/+	5	0	8	0	
<i>T</i> ₀ -20	+/+	9	1	0	0	
<i>T</i> ₀ -21	+/+	2	1	4	0	
<i>T</i> ₀ -25	+/+	6	3	2	0	
<i>T</i> ₀ -27	+/+	5	6	1	0	
<i>T</i> ₀ -29	+/+	3	7	1	0	

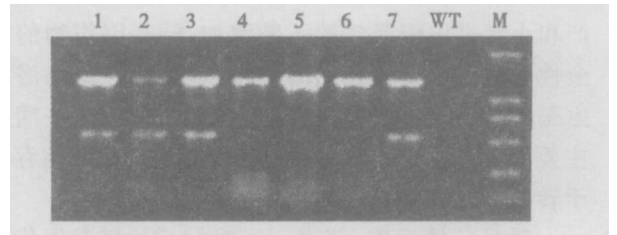


图 2 部分转基因大豆 *T*₁ 植株的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR analysis of *T*₁ progenies from *T*₀ co transformants for Δ^6 desaturase gene (*D6D*) and *bar* genes.

注: 1-6, *T*₀-7 部分的 *T*₁ 代植株的 PCR 产物; 7, 以质粒 pLIN61 为模板的 PCR 产物; WT, 野生型大豆 PCR 产物; M DL2000。

Lane1-6 samples of *T*₁ progenies from *T*₀-7; Lane7, PCR product derived from plasmid pLIN61 template; WT, PCR product derived from non transformed soybean; M, DL2000 DNA ladder.

将 RF-PCR 检测阳性的 16 株莆豆 8008 的 *T*₀ 代转基因单株自交所结的种子全部播种, 采用 CTAB 法从大豆叶片中提取基因组 DNA 进行目的基因 *D6D* 和选择标记基因 *bar* 的 PCR 检测, 部分

结果见图 2。结果表明通过共转化获得的转基因 T_0 代单株自交后在 T_1 代会发生转基因的遗传分离,其基因型分布共有 4 种: $D6D^+ bar^+$ 、 $D6D^- bar^+$ 、 $D6D^- bar^-$ 、 $D6D^+ bar^-$ (表 1)。目的基因 $D6D$ 与选择标记基因 bar 独立分离的有 3 个株系,分离效率为 18.75 %,共获得含目的基因 $D6D$ 而剔除选择标记基因 bar 的 T_1 代植株 9 株。

2.2 T_1 代转基因植株的 Southern 杂交检测

将 PCR 检测目的基因 $D6D$ 与选择标记基因 bar 独立分离的有 3 个株系即 T_0-7 、 T_0-9 和 T_0-11 的 T_1 代转基因植株的首先用 $D6D$ 探针,然后用含 0.1% SDS 的 0.2mol/L NaOH 洗去 $D6D$ 探针再用 bar 探针进行 Southern 杂交检测,部分结果

见图 3。Southern 杂交检测结果与 PCR 扩增结果一致,PCR 检测阳性的植株均能与阳性对照表达载体 pLIN61/PstI (图 3 中的样品 CK^+) 一样出现杂交信号,而没有转化的阴性对照大豆样品没有杂交信号出现 (图 3 中的 CK^-),说明 Southern 杂交检测结果是可靠的。该结果进一步证明 T_1 代转基因植株发生了转基因的遗传分离。本研究共有 9 株 T_1 代转基因植株 $D6D$ 探针 Southern 杂交检测为阳性,而 bar 探针进行 Southern 杂交检测没有杂交信号,说明这 9 株 T_1 代转基因植株含目的基因 $D6D$ 而剔除选择标记基因 bar 。实现了目的基因 $D6D$ 与选择标记基因 bar 分离的目的。

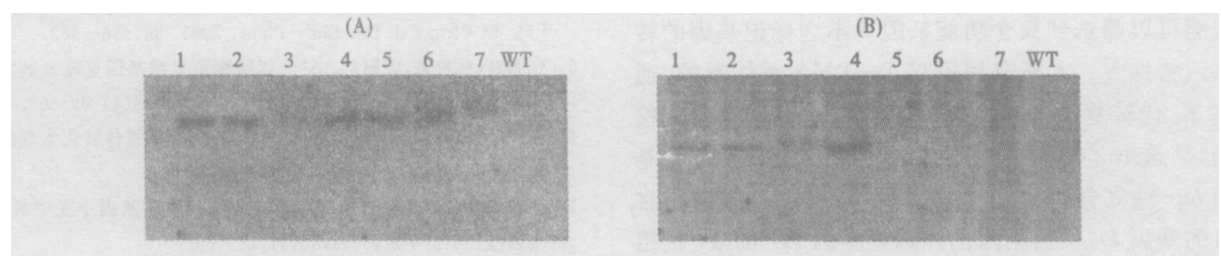


图 3 转基因大豆 7 号的部分 T_1 植株 Southern 杂交鉴定(A) $D6D$ 探针; (B) bar 探针

Fig. 3 Characterization of progeny derived from soybean transformation event T_0-7
(A) $D6D$ probe; (B) bar probe

注: 1. 转化植株 T_0-7 ; 2-7, T_0-7 的部分 T_1 代转基因植株; WT, 野生型大豆
Lane1, sample of T_0-7 ; lane2-7, samples of T_1 progenies from T_0-7 ; WT, non transgenic soybean.

2.3 无选择标记转基因植株除草剂抗性鉴定

大豆叶片涂抹除草剂 glufosinate 后第 7d 观察,发现阴性对照莆豆 8008 及基因型为 $D6D^- bar^-$ 、 $D6D^+ bar^-$ 的株系在 glufosinate 浓度为 0 mg/L、25 mg/L、50 mg/L 时叶片无反应,75 mg/L 时叶片部分有黄色斑点,随着 glufosinate 浓度依次增加,叶片斑枯程度明显加剧。而基因型为 $D6D^+ bar^+$ 、 $D6D^- bar^+$ 的转基因大豆叶片 glufosinate 浓度为 0、25、50、75、100、125 mg/L 和 150 mg/L 时叶片均无明显反应,glufosinate 浓度达到 175 mg/L 时,绝大部分叶片有黄色斑点,小部分叶片无明显反应,随着 glufosinate 浓度的增加,大豆叶片斑枯程度明显增加,但其斑枯程度明显比阴性对照、基因型为 $D6D^- bar^-$ 、 $D6D^+ bar^-$ 的小,通过我们的 glufosinate 涂抹实验,可以初步证明基因型为 $D6D^+ bar^+$ 、 $D6D^- bar^+$ 的转基因大豆具有一定的除草剂 glufosinate 抗性,能忍耐的 glufosinate 浓度约为 150 mg/L,而基因型为 $D6D^- bar^-$ 、 $D6D^+ bar^-$ 的转基因大豆在耐受除草剂 glufosinate 方面和阴性对照没有明显区别,从而解决了转基因大豆中 bar

基因带来的生物安全性问题,为无选择标记转基因大豆的进一步利用打下良好的基础。

3 讨论

外源基因能否在转基因植株的后代中稳定遗传和表达是基因工程技术研究中人们普遍关注的问题,转基因整合到植物基因组后产生的遗传效应是多样的,外源基因在受体植株中的遗传行为是非常复杂的,在许多方面有别于经典的遗传规律。研究表明,转基因在许多转化体中都能稳定整合,正常表达,并呈常见的孟德尔遗传规律,也有一些由于转基因整合的方式和拷贝数不同,或者由于损伤或丢失导致不规则的遗传^[7]。本研究通过 T_1 代转基因的 PCR 检测表明,功能基因和选择标记基因并不符合孟德尔遗传规律,可能是发生了转基因丢失、截短、重排等过程,也可能是本实验的样本群体太小不足以进行统计学分析。

在转基因植物中,剔除选择标记基因将提高转基因植物的食用安全性和对环境的安全性,更易为

广大消费者所接受,也有利于对同一个植物品种进行多次转基因操作。共转化方法作为一种剔除标记基因方法不需要附加的选择标记或切除系统,相对来说比较简单,但需后代植株经过有性杂交及减数分裂过程,目的基因和选择标记基因才能被分开,花费时间较长,不适合于马铃薯、甘蔗等无性繁殖植物的转化。此外,共转化的效率必须相当高,并且共转化的 DNA 整合在染色体组的非连锁位点上。将目的基因和选择标记基因插入到同一质粒的两个相互独立的 T-DNA 内,农杆菌转化后他们可能整合到植物不同染色体或同一染色体的不同位置上,在减数分裂过程中,标记基因和目的基因将发生分离,从而可以剔除选择标记基因,通过 PCR 及 Southern 检测可以筛选到只含功能基因而不含标记基因的转基因植株^[8]。本研究利用双 T-DNA 载体系统,通过 T₁ 代转基因大豆 PCR 检测和 Southern 杂交检测,筛选出 3 个株系其目的基因 *D6D* 与选择标记基因 *bar* 独立分离的,分离效率为 18.75%,共获得含目的基因 *D6D* 而剔除选择标记基因 *bar* 的 T₁ 代植株 9 株。这为获得富含 γ 亚麻酸但不含选择标记基因的转基因大豆奠定了基础,并为转基因大豆的安全性种植提供了保障。

参 考 文 献

- 1 Komari T, Hiei Y, Saito Y, et al. Vectors 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(1): 165-174.
- 2 Holger P. Removing selectable marker genes: taking shortcut [J]. *Trends in Plant Sci*, 2000, 5(7): 273-274.
- 3 Elena Z, Charles S, Peter M. Intra-chromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes [J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 442-445.
- 4 Xing AQ, Zhang YZ, Shirley S, et al. The use of the two T-DNA binary system to derive marker-free transgenic soybeans [J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2000, 36: 456-463.
- 5 张秀春, 林俊芳, 郭丽琼. Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因克隆及其共转化表达载体的构建 [J]. *热带作物学报*, 2004, 25(4): 63-67.
- 6 张秀春, 郭丽琼, 吴坤鑫, 等. 双 T-DNA 表达载体转化大豆的研究 [J]. *大豆科学*, 2005, 24(4): 291-295.
- 7 张新梅, 徐惠君, 杜丽璞, 等. 共转化法剔除转基因小麦中的 *bar* 基因 [J]. *作物学报*, 2004, 30(1): 26-30.
- 8 Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, et al. A system for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker [J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 383-392.

GENERATING MARKER FREE TRANSGENIC SOYBEAN PLANTS BY AGROBACTERIUM MEDIATED TRANSFORMATION WITH DOUBLE T-DNA BINARY VECTOR

Zhang Xiuchun¹ Peng Ming¹ Wu Kunxin¹ Guo Liqiong^{1,2} Lin Junyang¹ Lin Junfang^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101; 2 Department of Bioengineering, College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510640; 3 Putian City's Institute of Agricultural Sciences, Putian 351100)

Abstract Transgenic crops have developed in commercialized scale in some countries, but their biosafety have attracted public concerns in the world at the same time. Therefore, it is becoming more and more important to eliminate the selective genes because of their negative functions, such as antibiotics resistance and herbicide resistance. 161 T₁ transgenic soybean of pudou 8008 containing Δ^6 -fatty acid desaturase gene and *bar* selection gene, which were obtained by biolistic particle co-transformation, were analyzed by PCR and southern blot in this study, and 9 plants only with the target gene were identified finally. Moreover, leaf painting of herbicide was applied to confirm the marker free transgenic plants. It could be more efficient to combine leaf painting and PCR, Southern blot to select *bar* free transgenic soybean.

Key words Double T-DNA; Marker free; Soybean