

植物转化中的安全标记基因*

赵艳^{1,2)}**

(¹⁾浙江大学生命科学院, 杭州 310029; ²⁾杭州商学院生物工程系, 杭州 310035)

摘要 转基因植物中的除草剂或抗生素抗性标记基因的生态环境和食用安全性一直颇有争议。糖类分解代谢酶基因作为安全标记基因, 近年来在植物转化中显示了巨大应用潜力。这类标记基因编码产物是筛选剂糖类的分解代谢酶, 使转化细胞能利用筛选剂糖类作为主要碳源从而获得优势生长, 非转化细胞则因饥饿生长被抑制但不被杀死, 故称为正筛选系统 (positive selection system)。目前木糖异构酶基因 (xylose isomerase, *xyIA*) 和磷酸甘露糖异构酶基因 (phosphomannose isomerase, *pmi*) 等安全标记基因已成功应用于植物转化。

关键词 安全标记基因, 糖类分解代谢酶, 植物转化

学科分类号 Q78

标记基因 (marker gene) 在植物的遗传转化过程中用以区分转化和非转化细胞, 须与目的基因共同导入转化细胞, 转基因植株再生成功后, 标记基因便不再有用^[1]。目前广泛应用的标记基因为除草剂抗性基因和抗生素抗性基因。随着转基因植物的商品化种植, 人们担心转基因农作物中的除草剂抗性基因可能会经自然杂交传递至杂草, 转基因食品中的抗生素抗性基因可能通过转染肠道细菌而造成人类对这些抗生素产生抗性^[2], 尽管尚无确凿可信的科学证据, 抗性标记基因 (resistant marker gene) 潜在的生态环境和食用安全性一直颇有争议, 寻找安全标记基因用于植物的遗传转化无疑是解决这一问题的最佳途径。

近几年根据植物细胞对不同糖类的分解代谢能力, 作为筛选剂的正筛选系统 (positive selection system) 得以发展, 并在安全标记基因方面显示出巨大的应用潜力。本文对这类标记基因的作用机理和应用进展作一介绍。

1 糖类代谢酶标记基因的正筛选机理

正筛选是和负筛选相对而言的。抗性标记基因的编码产物通常是分解除草剂或抗生素的酶, 可赋予转化细胞除草剂或抗生素抗性, 从而使转化细胞能够在含有一定浓度除草剂或抗生素的筛选培养基上生长, 非转化细胞在筛选培养基上则被除草剂或抗生素杀死。这种非转化细胞被杀死而转化细胞存活的筛选系统称为负筛选系统 (negative selection system)^[2]。糖类代谢酶标记基因编码产物是某种糖类的分解代谢酶, 转化细胞能利用筛选剂糖类作

为主要碳源, 可在筛选培养基上生长扩增, 而非转化细胞不能利用筛选剂糖类, 处于饥饿状态, 生长受到抑制但不被杀死。这种非转化细胞由于饥饿生长被抑制, 而转化细胞因营养充足获得优势生长的筛选系统称为正筛选系统^[3]。

2 糖类代谢酶标记基因的作用原理及应用

已试用于植物转化的糖类代谢酶标记基因有木糖异构酶基因 (xylose isomerase, *xyIA*) 和磷酸甘露糖异构酶基因 (phosphomannose isomerase, *pmi*) 两种。

2.1 木糖异构酶基因

标记基因 *xyIA* 编码的木糖异构酶催化 D-木糖到 D-木酮糖的可逆转变。马铃薯、烟草和番茄等植物的培养细胞可利用 D-木酮糖但不能利用 D-木糖作为主要碳源。在添加 D-木糖的筛选培养基上, 转化细胞因能利用 D-木糖作为碳源而获得优势生长, 非转化细胞因碳源缺乏生长被抑制, 生长分裂旺盛的细胞团即为转化细胞团。Anna 等^[4]比较了来源于 *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* 的 *xyIA* 标记基因与 *npt-II* 抗性标记基因对植物细胞的筛选效应, 结果表明, D-木糖筛选时马铃薯、番茄的转化率比卡那霉素筛选时显著增高, 烟草的转化率虽比卡那霉素筛选时降低, 但也可以取得良好的筛选效果, 而且 D-木糖筛选的植株生长比较

* 杭州商学院重点资助项目 (01-08)。

** 通讯联系人, 杭州商学院生物工程系, 杭州 310035。

Tel: 0571-63370483, E-mail: zyn918@mail.hz.zj.cn

收稿日期: 2001-10-23, 接受日期: 2001-12-20

旺盛。农杆菌介导转化马铃薯细胞时, 以来源于 *Streptomyces rubiginosus* 的 *xylA* 作为标记基因, 报告基因 *gus* 作为目的基因, 结果再生植株中 *gus* 转化率达 32%, 比利用 *npt- II* 作标记基因时提高了 9 倍^[5]。

2.2 磷酸甘露糖异构酶基因

pmi 作为标记基因, D-甘露糖作为筛选剂的选择机理如下: D-甘露糖由植物细胞内源的己糖激酶催化转变为 6-磷酸-甘露糖 (M-6-P), 反应消耗 ATP; *pmi* 编码的磷酸甘露糖异构酶 (PMI) 再将 M-6-P 催化转变为植物细胞可代谢的 6-磷酸果糖 (F-6-P)。在含 D-甘露糖的筛选培养基上, 细胞不断将甘露糖转变成 M-6-P, 但非转化细胞因缺乏 PMI, 不能继续代谢, 造成细胞内 M-6-P 的积累, 伴随着 ATP 和磷酸基的大量消耗, 从而生长受到抑制; 转化细胞则能将 M-6-P 转变为 F-6-P, 可继续代谢为细胞提供能量, 同时避免了筛选剂衍生物 M-6-P 的积累, 因此能在筛选培养基上利用甘露糖作为碳源进行生长和扩增^[6]。

来源于 *E. coli* 的 *pmi* 作为标记基因已成功应用于甜菜^[7]、玉米^[8]和水稻^[9]的遗传转化。农杆菌介导转化玉米幼胚时, 用甘露糖筛选, 获得的再生植株中标记基因 *pmi* 的转化率为 30%, 且能按孟德尔方式稳定遗传给后代^[8]。转化水稻幼胚时, 转基因植株中标记基因 *pmi* 的转化率为 41%, 其中 85% 的植株为 *gus* 阳性, 对标记基因而言, *pmi* 要比潮霉素抗性基因 *npt- II* 的转化率高一倍以上^[9]。

3 糖类代谢酶标记基因筛选培养基的碳源

以糖类代谢酶基因作植物转化的标记基因时, 通常使用 MS 基本培养基, 筛选程序与负筛选相似, 但筛选培养基中碳源的配比及筛选压的添加程序与负筛选不同。

xylA 作为标记基因, D-木糖作为筛选剂对转化细胞筛选时, 筛选培养基中所需总碳源量常低于 30 g/L 且不同植物对 D-木糖的耐受性不同。仅用筛选剂 D-木糖为碳源时, 马铃薯和烟草转化细胞不能生长, 只有在筛选培养基中加入适量蔗糖后, 细胞才能正常生长分化, 马铃薯和烟草细胞的筛选培养基中碳源最佳组合分别为 7.5 g/L 蔗糖 + 3.75 g/L 木糖和 5 g/L 蔗糖 + 20 g/L 木糖。番茄细胞对 D-木糖却具有较高的耐受性, 转化细胞能在仅含 15 g/L 木糖的筛选培养基上正常生长分

化^[4]。由 D-木糖筛选获得的转基因植株中木糖异构酶的活性与对照植株相比, 增高幅度在 2~19 倍之间, 且不依赖于筛选压的高低, 试验表明, 木糖异构酶的活性只要增加 2 倍, 就能降低木糖对转化细胞的毒性, 并为之提供足够的木酮糖碳源, 可能 *xylA* 基因表达的木糖异构酶和植物细胞内源的木糖异构酶位于细胞中的不同部位, 二者具有累加效应^[4]。

pmi 作为标记基因, 甘露糖作为筛选剂对转化细胞筛选时, 常需要在培养基中添加蔗糖, 最适筛选压要比负筛选时低。在甜菜, MS 基本培养基, 添加 30 g/L 蔗糖, 与不同浓度 D-甘露糖组合按苗再生率做筛选梯度曲线, 结果当甘露糖浓度达 2.5~3 g/L 时, 苗再生被完全抑制, 转化时以此浓度筛选未获得转基因植株, 获得最佳转化率的甘露糖筛选浓度却在 1.25 g/L 左右^[7]。此外采用逐轮递增筛选压的方式效果较好。转化甜菜时, 筛选培养基中蔗糖添加量 (30 g/L 蔗糖) 保持不变, 在三轮筛选中, D-甘露糖的浓度由 2.0 g/L 渐增至 10 g/L, 可使总植株再生率增加, 并显著降低假阳性植株的比例^[7]。转化水稻时则采用筛选压不变 (30 g/L 甘露糖), 而将蔗糖含量由 30 g/L 逐轮递减至 5 g/L^[9]。转化玉米时筛选培养基中碳源最佳组合为 5 g/L 蔗糖 + 10 g/L 甘露糖^[8]。

综上所述, 糖类代谢酶标记基因用于植物遗传转化时, 不同植物对所需的筛选压最适浓度差别很大, 对总碳源量及配比的要求也不甚相同, 与抗性标记基因一样存在不容忽视的品种差异, 目前以糖类为筛选剂的正筛选系统在绝大多数植物上的效应还有待进一步验证和完善。尽管如此, 正筛选系统标记基因产物安全 (编码的酶已广泛应用于食品工业)、筛选剂价格低廉、筛选程序简单、而且不影响转化植物的代谢平衡, 转基因植株生长旺盛, 不利变异少, 筛选效果显著, 有望发展成植物转化中的主导筛选系统。

参 考 文 献

- 1 Holger P. Removing selectable marker genes: taking shortcut. Trends in Plant Sci, 2000, 5 (7): 273~274
- 2 Elena Z, Chartes S, Peter M. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. Nature Biotechnology, 2000, 18 (4): 442~445
- 3 Joersbo M, Okkels F T. A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. Plant Cell Reports, 1996, 16 (3/4): 219~221
- 4 Anna H, Steen G P, Finn T O. The xylose isomerase gene

- from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. *Plant Molecular Biology*, 1998, **37** (2): 287~ 296
- 5 Haldrup A, Petersen S G, Okkels F T. Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. *Plant Cell Reports*, 1998, **18** (1): 76~ 81
- 6 Joersbo M, Peterson S G, Okkels F T. Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet. *Physiol Plant*, 1999, **105** (1): 109~ 115
- 7 Joersbo M, Daonelson I, Kreiberg J, *et al.* Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Molecular Breeding*, 1998, **4** (2): 111~ 117
- 8 Negrotto D, Jolley M, Beer S, *et al.* The use of phosphomannose isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium transformation*. *Plant Cell Reports*, 2000, **19** (8): 798~ 803
- 9 Paola L, Ye X, Ingo P. Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Molecular Breeding*, 2001, **7** (1): 43~ 49

The Safe Marker Genes Used in Plant Transformation*

ZHAO Yan^{1,2)}**

¹⁾ College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

²⁾ Biological Engineering Department, Hangzhou Institute of Commerce, Hangzhou 310035, China)

Abstract Concerns have been raised that the presence of selectable marker genes such as antibiotic or herbicide resistant genes might be unpredictable hazard to the ecosystem as well as to human health. The genes coding enzymes that catalyze special sugars have showed big practical potency in plant transformation as safe marker genes. This kind of sugar catabolic maker genes can give plant cells the ability to use selective agent sugars such as xylose or mannose, therefore the transformed cells could get sufficient energy and grow dominantly while the untransformed cells are starved and inhibited from growing but not be killed. It is called positive selection system. Now the safe marker genes such as *xyIA* (xylose isomerase gene) and *pmi* (phosphomannose isomerase gene) have been successfully used in plant transformation.

Key words safe marker gene, sugar catabolic enzymes, plant transformation

* The study is supported by Hangzhou University of Commerce Key Program (01-08).

** Corresponding author. Tel: 86-571-63370483, E-mail: zyn918@mail.hz.zj.cn

Received: October 23, 2001 Accepted: December 20, 2001