

## 柑橘无标记转基因转化体系的建立

李琳洁<sup>1,2,3</sup>, 杨莉<sup>1,2,3</sup>, 李芳<sup>1,2,3</sup>, 谢玉明<sup>1</sup>, 曾柏全<sup>4</sup>, 邓子牛<sup>1,2,3\*</sup>

(1.湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128; 3.国家柑橘改良中心 长沙分中心, 湖南 长沙 410128; 4.中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004)

**摘要:** 采用1个结合化学诱导系统 XVE 和位点专一性重组系统 *Cre/LoxP* 的标记基因剔除载体, 对柑橘进行无标记转基因研究。此载体可通过  $\beta$ -雌二醇诱导表达系统控制重组酶系统 *Cre* 基因表达来剔除标记基因 *npt II*。将侵染后糖橙节间茎段接种在 (MS+3 mg/L BA) 培养基上, 共培养(暗培养)3 d 后转移到筛选培养基 (MS+75 mg/L Kan+500 mg/L Cef) 中。在筛选抗性再生芽后, 切下带 1~2 mm 外植体的抗性芽, 转移至含有  $\beta$ -雌二醇的化学诱导培养基 (MS+3 mg/L BA+ 500 mg/L 头孢霉素+2  $\mu$ mol/L  $\beta$ -雌二醇) 上诱导, 15 d 后用荧光显微镜观察, 成功观测到绿色荧光。进行试管嫁接, 30 d 后, 提取接穗基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 检测到 DNA 的切除现象。研究结果表明此化学诱导切除标记基因系统应用在柑橘上是可行的。

**关键词:** 柑橘; 无标记转基因体系; 化学诱导; 标记基因;  $\beta$ -雌二醇

中图分类号: Q943.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)06-0649-04

## Marker-free transgenic system of *Citrus*

LI Lin-jie<sup>1,2,3</sup>, YANG Li<sup>1,2,3</sup>, LI Fang<sup>1,2,3</sup>, XIE Yu-ming<sup>1</sup>, ZENG Bo-quan<sup>4</sup>, DENG Zi-niu<sup>1,2,3\*</sup>

(1.College of Horticulture and Landscape, HNAU, Changsha 410128, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory of Corp Germplasm Innovation and Utilization, Changsha 410128, China; 3.National Center for Citrus Improvement, Changsha 410128, China; 4. Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, China)

**Abstract:** The marker-free transgenic *Citrus* was investigated by combining application of a chemical regulated induction system XVE with, *Cre/loxP*-mediated site-specific DNA recombination in a single transformation to remove carriers. The system can remove marker gene (*npt II*) by expression of *Cre* recombinase system, which was tightly controlled by a system upon induction by  $\beta$ -estradiol. The infected internodal stem segments of 'Succari' sweet orange as explants were cultured on co-cultivation medium (MS+ 3 mg/L BA), After 3 d, they were transformed onto selection medium (MS+75 mg/L Kan+500 mg/L Cef). After selection, regeneration buds grow, with 1~2 mm explants were cut and transferred onto chemical-inducible medium (MS+ 3 mg/L BA + 500 mg/L Cef+ 2  $\mu$ mol/L  $\beta$ -estradiol). After 15 d of continuous culture, the express of *gfp* could be observed successfully by fluorescence microscope. Finally, Molecular detection indicated that the DNA recombination and excision in transgenic *Citrus* had already occurred after 30 d grafted *in vitro*. The feasibility that this chemical-inducible excising marker gene system could be applied onto *Citrus* was proved and therefore, an efficient marker-free transgenic system in *Citrus* could be established.

**Key words:** *Citrus*; marker-free transgenic system; chemical-inducible; marker gene;  $\beta$ -estradiol

随着商业化转基因植物新品种的不断出现, 人们对转基因植物安全性问题的争论和担忧日益增加。在植物基因转移过程中, 用于筛选转化细胞和组织的筛选标记基因虽然给转基因工作带来了很

收稿日期: 2010-02-21

基金项目: 国家农业部“948”专项(2010-Z47); 国家转基因专项(JY04-B-02); 作物种质创新与资源利用重点实验室科学基金开放项目(62162021200014)

作者简介: 李琳洁(1985—), 女, 土家族, 湖南张家界人, 硕士, 主要从事生物技术在果树上的应用研究, lilingjie\_007@126.com;

\*通讯作者, deng7009@163.com

大的方便，但在获得转基因植株之后，标记基因的存在对转基因食品和环境安全带来隐患<sup>[1-2]</sup>，且不利于相同标记基因用于多重转化<sup>[3-4]</sup>。如何解决因标记基因所引起的转基因植物和食品的安全性问题，已成为当今转基因研究中的重要课题。目前，人们通过转座途径<sup>[5]</sup>、染色体内同源重组<sup>[6]</sup>、目标基因与标记基因共转化<sup>[7]</sup>、位点专一性重组<sup>[8]</sup>等措施来剔除标记基因，其中应用最广泛为位点专一重组途径，而Cre/LoxP是应用比较成熟的系统<sup>[9]</sup>。为加强对基因剔除时间的控制，近年来，利用化学诱导系统或诱导启动子结合位点专一性重组系统控制剔除时间的研究，已在不同模式植物和作物中开展，包括拟南芥<sup>[10]</sup>、水稻<sup>[11]</sup>、烟草<sup>[12]</sup>、番茄<sup>[13]</sup>等。Alida Ballester等<sup>[14]</sup>利用秋水仙素诱导启动子(*GST-II-27*)，结合MAT载体在柑橘上进行了标记基因的剔除研究，因柑橘对秋水仙素的高度敏感性，所有经秋水仙素诱导处理的抗性芽全部死亡。至今，化学诱导结合位点专一性重组系统在柑橘基因工程上的应用还少见报道。

本试验中采用1个化学诱导剔除载体进行柑橘无标记转基因研究，它由基于雌激素受体的类固醇诱导系统(XVE系统)和Cre/LoxP位点特异性重组系统组成。通过化学诱导剂β-雌二醇诱导XVE系统启动重组酶基因Cre的表达，引起2个重组位点LoxP间序列(包括标记基因*npt II*和Cre基因)的剔除。这种可诱导的自主切除途径不仅简化了操作步骤，控制了切除时间，并无需在标记基因去除之后再经过遗传分离将重组酶基因去除，一步获得目的植株，适宜无性繁殖的木本植物进行标记基因剔除。以糖橙为研究对象，利用这种化学诱导的Cre/LoxP自主剔除，旨在建立一套柑橘无标记转基因转化体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 载体系统

载体p35s-gfp(图1)由华中农业大学叶志彪老师提供。在该载体中，以*npt II*作为标记基因，由CaMV35S驱动，重组酶Cre基因置于*OLexA-46*启动子下游，表达受“雌激素受体反式激活因子”XVE的

严格控制。由于*OLex-46*启动子在细菌中能部分表达，因此，在Cre编码序列中插入了一段短的内含子序列阻止其在细菌中发生非诱导的背景表达。当β-雌二醇诱导XVE表达时，Cre被XVE激活，Loxp序列之间的3个转录单元被删除。下游的gfp报告基因在CaMV35S启动子的控制下表达，通过gfp的表达可以检测重组反应的发生。

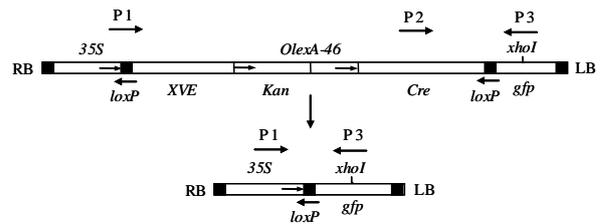


图1 载体 p35s-gfp 的 T-DNA 结构及其诱导重组  
Fig.1 T-DNA structure of p35s-gfp and its inducible recombination

#### 1.1.2 植物材料

在无菌环境下，将30d龄的糖橙实生苗上胚轴切成约1cm长的茎段，作为再生及转化材料备用。

#### 1.2 遗传转化

将准备好的茎段置于农杆菌悬浮液(OD值为0.6~1.0)中浸泡15min，用无菌滤纸吸掉多余的菌液，接种在MS+3mg/L 6-BA培养基上暗培养3d，转移到筛选培养基(MS+75mg/L Kan+500mg/L Cef)中。培养温度26~28℃，光照度1200~1600lx，光照时间16h。

以未侵染的接种在MS培养基上的甜橙外植体作为转基因材料的阴性对照。一部分再生芽不进行诱导，作为重组反应的阴性对照。

#### 1.3 化学诱导剂诱导

切下筛选出的抗性再生芽，并带有1~2mm长的外植体，转移至化学诱导培养基(MS+3mg/L 6-BA+500mg/L Cef+2μmol/L β-雌二醇)，启动p35S-gfp中诱导表达系统的表达。

#### 1.4 植株再生

抗性芽诱导45d后，以14d苗龄暗培养的卡里佐枳橙为砧木，进行试管茎尖嫁接。待其在试管中生长约30d，萌发出3~5片新叶时，再二次嫁接到温室1年生盆栽枳壳上。

### 1.5 转基因植株的检测

抗性芽进行诱导后,通过倒置荧光显微镜和体视荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达,检测转化苗中重组反应的发生与否。

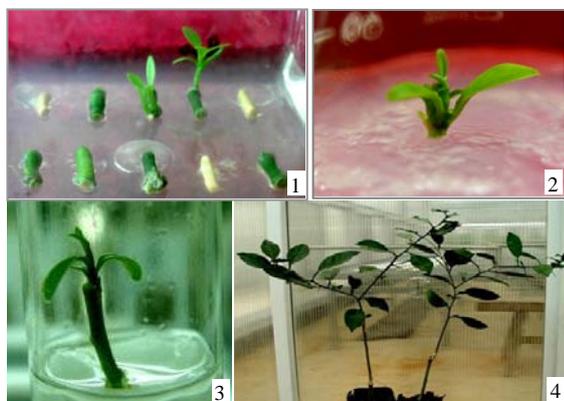
嫁接苗生长 30 d 后,取接穗的叶片,采用 CTAB 法微量提取基因组 DNA。设计 2 对引物 P1/P3、P2/P3(上游引物 P1: 5'-GATGTGATATCTCCACT GAC-3'; 上游引物 P2: 5'-CTGGACACAGTGCC CGTGTCGGA-3'; 下游引物 P3: 5'-AGCACGCTG AGGTGAAGATT-3'), 同时进行 PCR 扩增。当没有发生重组反应时, P1 和 P3 引物之间约有 6 kb 在 PCR 反应条件下不能正常扩增, 只有 P2 和 P3 组成的引物对之间能正常扩增出约 911 bp 的片段产物。当发生剔除反应时, 由于 *LoxP* 位点间区域被剔除, 使得 P1 和 P3 位置靠近, 此时 P1 和 P3 引物对可扩增出大约 417 bp 片段产物。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L, 包含 4  $\mu$ L dNTPs (1 mmol/L), 3  $\mu$ L Buffer(10 $\times$ ), 0.5  $\mu$ L *Taq*-DNA polymerase(2.5 U/ $\mu$ L), 2.5  $\mu$ L 每条引物(2.5  $\mu$ mol/ $\mu$ L) 和 50~100 ng DNA。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 70 s, 72  $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min, 共 35 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗性芽的再生与嫁接

#### 2.1.1 抗性芽的再生

进行筛选培养的实生态上胚轴 21 d 左右可以观察到抗性芽的萌发(图 1-1)。本研究共转化实生态上胚轴 175 个, 获得 18 个抗性芽, 抗性芽再生率为 10.3%。



1 筛选培养基上抗性芽的萌发; 2 对抗性芽进行诱导培养; 3 诱导抗性芽试管嫁接; 4 温室生长的转基因苗。

图 1 p35S-gfp 对糖橙的遗传转化

Fig.1 Genetic transformation of Succari sweet orange with p35S-gfp

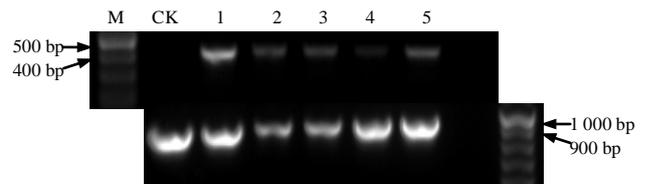
#### 2.1.2 诱导抗性芽的嫁接

因大多数柑橘品种离体培养中生根比较困难, 所以通常采用试管茎尖嫁接法获得再生植株。嫁接成活率高低与砧木生长状况有关。砧木越粗壮, 根系越发达, 嫁接苗成活率越高。砧木苗越纤细, 抗性芽(接穗)与砧木的伤口不易愈合, 则嫁接苗会逐渐萎焉, 直至死亡。本试验中共嫁接的 18 个诱导抗性芽(图 1-2)中, 有 16 株成活(图 1-3), 嫁接成活率达 88.9%。诱导抗性芽通过试管嫁接 30 d 后, 需要二次嫁接到 1 年生盆栽砧木上, 实现抗性芽的顺利移植。目前 16 株再生植株在温室中生长良好(图 1-4)。

### 2.2 标记基因诱导剔除

p35S-gfp 转化的糖橙抗性芽进行诱导后, 通过倒置荧光显微镜和体视荧光显微镜能够观察到绿色荧光蛋白的表达, 而未进行诱导的抗性芽一直未观测到绿色荧光(封三图 1)。

诱导 45 d 后, 取转化再生苗的叶片提取基因组 DNA, 利用 P1、P2、P3 引物进行 PCR 分子检测。由图 5 可以看出, 所获得转基因植株系中, 未进行诱导的株系(CK)只能扩增到 1 条 911 bp 条带, 表明切除没有发生; 1、2、3、4、5 号可以扩增到 2 条带(911、417 bp), 表明 P1 与 P3 位点间发生了重组, 但切除并不完全, 出现了嵌合体现象。



M 100 bp DNA Marker; CK 未诱导株系; 1~5 诱导株系。

图 2 PCR 分子检测标记基因的切除情况

Fig.2 Marker-gene excising detection by PCR

## 3 结论与讨论

本试验初步建立了一套无标记转基因体系, 并转化实生态糖橙, 通过观测 *gfp* 表达, 获得了标记基因已切除的转基因株系, 证实了此自主诱导切除标记基因系统及无标记转基因体系应用在柑橘上的可行性。但试验中发现, 经过诱导的芽还存在嵌合体现象, 这可能是由于化学诱导物  $\beta$ -雌二醇的活性不稳定, 容易降解, 且诱导时间过短。系统的诱导

删除效率在不同阶段、不同器官组织中差异巨大,所以可能会面临更多的嵌合体,即不完全删除细胞的存在<sup>[10-15]</sup>。张于洋<sup>[13]</sup>采用改进CLX系统对番茄进行标记基因切除,发现在进行含有目的基因 $cryIAC$ 的转化时, $T_0$ 转基因植株当代,通过PCR筛选没有检测到重组反应的发生,在 $T_1$ 代通过杂交获得了完全切除的株系。柑橘是通过无性繁殖育种的植物,无法通过子代进行分离,所以,必须不断优化无标记转基因研究中的各个环节,以获得完全无标记基因。下一步试验将优化诱导条件,如减小再生芽开始诱导时的长度,提高 $\beta$ -雌二醇的浓度,增加诱导时间等,以提高诱导效果,保证标记基因的完全切除,获得更完善的柑橘无标记转基因体系。

2000年,Zuo等<sup>[15]</sup>建立了基于人雌激素受体的化学诱导植物基因表达系统XVE。XVE的序列由细菌LexA阻遏物的DNA结合区X、VP16的酸性反式激活区V和人的雌激素受体调控区E融合构建,表达产物可作用于靶启动子CaMV35S中的LexA操纵子,从而使靶启动子的表达受 $\beta$ -雌二醇的高效诱导和严格控制。他们将XVE系统与Cre/LoxP位点专一性重组系统结合,发展了另一标记基因剔除系统CLX(Cre/loxP DNA excision system),在拟南芥上的研究表明,经 $\beta$ -雌二醇诱导后,CLX对受体植株标记基因区(包括XVE、重组酶基因Cre和标记基因 $npt II$ )的切除率达100%。该系统不仅可精确控制切除时间,而且不依赖于 $ipt$ 表型筛选,同时适用于无性繁殖的植物品种。

在本实验室,甜橙实生态遗传转化技术体系已经得到完善,并申请了专利,不需要对共培养和筛选培养条件再进行摸索,提高了试验的进度,以致于抗性芽的获得及诱导重组的发生能在短时间内完成。

#### 参考文献:

- [1] Nielsen K M, Elsas J D, Smalla K. Transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 (Pfg4D  $npt II$ ) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformation[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 1237-1242.
- [2] 董志峰, 马荣才, 彭于发, 等. 转基因植物中外源目的基因片段的生物安全研究进展[J]. 植物学报, 2001(7): 661-672.
- [3] Daniell H. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 581-586.
- [4] 魏兵强. 无选择标记转基因植物研究进展[J]. 长江蔬菜, 2009(10): 5-7.
- [5] Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene as selectable marker[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 2117-2121.
- [6] Zubko E, Scutt C, Meyer P. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes[J]. Nature Biotech, 2000, 18: 442-445.
- [7] Daley M, Knauf V C, Summerfelt K R. Cotransformation with the one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants[J]. Plant Cell Rep, 1998, 17: 489-496.
- [8] Hoa T T, Bong B B, Huq E. Cre/lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 518-525.
- [9] Dale E C, Ow D W. Gene transfer and subsequent removal of the selection gene from the host genome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 10558-10562.
- [10] Zuo J, Niu Q W, Moller S G. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19: 157-161.
- [11] Sreekala C, Wu L, Gu K. Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre/loxP system[J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 86-94.
- [12] Wang Y, Chen B J, Hu Y L. Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the Cre/lox site-specific recombination system[J]. Transgenic Research, 2005, 14: 605-614.
- [13] Zhang Y Y, Li H, Ouyang B. Chemical-induced autoexcision of selectable marker gene in elite tomato plants transformed with gene conferring resistance to lepidopteran insects[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(16): 1247-1253.
- [14] Alida B, Magdalena C, Leandro P. Evaluation of selection strategies alternative to  $npt II$  in genetic transformation of *Citrus*[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(6): 1005-1015.
- [15] Zuo J, Niu Q-W, Chua N H. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants[J]. Plant J, 2000, 24(2): 265-273.

责任编辑: 王赛群  
英文编辑: 罗文翠