

文章编号: 1005-0906(2005)03-0044-03

可去除选择标记的转 *CpTI* 基因抗虫玉米研究

于海清,渠柏艳,付凤玲,李晚忱

(四川农业大学玉米研究所,四川 雅安 625014)

摘要: 将组成型表达的玉米泛素启动子与豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 *CpTI* 连接,插入根癌农杆菌双 T-DNA 质粒,构建一个 T-DNA 结构域含有抗潮霉素选择标记基因 *hyg*;另一个 T-DNA 结构域含有抗虫基因的双 T-DNA 单子叶植物表达载体,用以转化农杆菌菌株,再通过共培养转化玉米胚性愈伤组织。通过潮霉素培养基抗性筛选,用特异 PCR 扩增和 Southern 杂交检测,从分化再生的 T₀ 代植株中,鉴定出 7 个转化 *CpTI* 基因的阳性植株。目前,正结合进行田间分离纯合和 DNA 分子鉴定,培育去除选择标记基因的转基因抗虫玉米自交系。

关键词: 玉米;转基因;抗虫;选择标记;*CpTI*

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Study on *CpTI* Transgenic Insect Resistant Maize with Removable Selective Marker

YU Hai-qing, QU Bai-yan, FU Feng-ling, LI Wan-chen

(Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Cowpea trypsin inhibitor gene(*CpTI*), promoted by ubiquitin promoter of constitutive expression, was inserted into double T-DNA plasmid of *Agrobacterium tumefactions*. Monocotyledonous expression vector of double T-DNA was constructed with selective marker gene *hyg*(hygromycin resistance) in one T-DNA structural domain and insect resistant gene in another T-DNA domain. *Agrobacterium* strain was transformed with this vector and used to transform embryonic callus of maize by co-culture. Seven *CpTI* transgenic plants were identified from differentiated and regenerated T₀ population through resistant selection on hygromycin medium and molecular detection of specific PCR amplification and Southern hybridization. At present, inbred lines of transgenic insect resistant maize with selective marker gene removed are in separating and inbreeding program assisted by DNA marker detection.

Key words: Maize; Transgene; Insect resistance; Selective marker; *CpTI*

转基因抗虫玉米具有高效、无毒、无污染等许多优点,近年来已在美国等国投入大面积生产。但是,转基因操作过程中使用的抗抗生素和抗除草剂等选择标记基因,随表达载体被导入受体细胞以后,也可随机地整合到受体植物基因组中去。一旦这些选择标记基因在转基因作物中得以表达,就有可能留下环境和食品方面的安全隐患,并给转基因品种的再次转基因改良造成困难。

去除选择标记基因有位点特异性重组、转座子重组、MAT 载体系统、选择标记基因的组织特异性表达、选择标记基因的定点转换、共转化等多种方法。但是,前几种方法的转化率或重组率不高,所以成功的报道不多。共转化是将选择标记基因和外源目的基因分别插入两个不同的 T-DNA 片段内,转化整合到受体植物基因组的不同位点,然后从后代分离群体中筛选只带有目的基因而无除选择标记基因的转化植株。

Mcknight 等(1989)将胭脂碱合成酶基因 *Nos* 和选择标记基因 *npt II*,分别插入两个不同的农杆菌菌株的 T-DNA,用以共同转化烟草,从 3 株共转化植株的后代群体中,选出了 *Nos* 基因与 *npt II* 基因分离的植株。为了提高共转化频率,Komari 等(1996)用两个带有 T-DNA 同源序列的载体转化农杆菌,通

收稿日期: 2004-09-03; 修稿日期: 2004-11-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(30070476)

作者简介: 于海清(1978-),男,博士,主要从事玉米生物技术研究。

Tel:0835-2889457 13882432107

E-mail:yhq78@126.com

责任作者: 李晚忱(1958-),教授,博士生导师,四川省学术带头人,主要从事玉米遗传育种研究。

Hyb 杂交液 37℃ 预杂交 30 min, 然后加入变性的标记探针, 37℃ 杂交 4 h 以上。用 2×SSC 和 0.1% SDS 洗液 35℃ 洗涤 2 次, 再用 0.5×SSC 和 0.1% SDS 洗液室温清洗 2 次。最后, 按试剂盒要求的步骤显色检测。

2 结果与分析

2.1 转 *CpTI* 基因双 T-DNA 单子叶植物表达载体的 PCR 鉴定



pCDMAR-USCK-Hyg 的 PCR 鉴定图谱

图 2 转 *CpTI* 基因双 T-DNA 单子叶植物表达载体

用设计合成的选择标记基因和目的基因的

PCR 引物分别扩增表达载体质粒 pCDMAR-USCK-Hyg, 获得长度为 1094 bp 和 460 bp 的 2 个片段, 分别与 *hyg* 和修饰的 *CpTI* 基因大小一致, 说明表达载体结构正确(图 2)。

2.2 潮霉素筛选时间和浓度的确定

在潮霉素浓度不同的改良 N6 培养基上培养不同时间, 未经转化愈伤组织的褐化率列于表 1。从未添加潮霉素的对照处理来看, 筛选培养 3 周左右, 愈伤组织在不同浓度潮霉素培养基上的褐化率差异明显, 而且可选潮霉素浓度 15 mg/L 时 95.3% 的褐化率作为较为严格的筛选标准。如果筛选培养时间超过 4 周, 在各种不同潮霉素浓度下, 愈伤组织的褐化率均接近 100%, 可能是培养基营养成分消耗或有害代谢产物积累所致。但是, 在实验中也观察到, 潮霉素筛选浓度与愈伤组织生长状态有关。当生长状态较差时, 应适当降低筛选强度。对生长良好的愈伤组织, 以 15 mg/L 的浓度筛选培养 3 周较为适中。

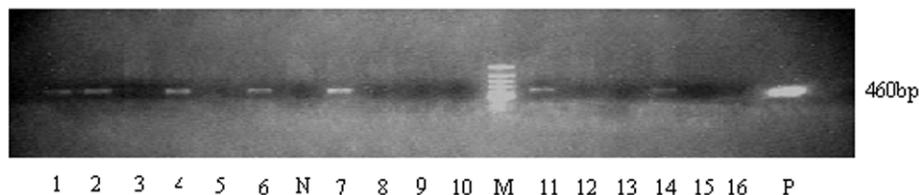
表 1 愈伤组织在潮霉素浓度不同的培养基上培养不同时间的褐化率

培养时间(d)	潮霉素浓度(mg/L)					%
	0	5	10	15	20	
7	0.0	10.1	13.6	45.9	69.4	78.2
14	0.0	43.3	30.0	83.3	76.7	82.3
21	1.8	66.7	78.3	95.3	98.5	100.0
28	83.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

2.3 再生植株 PCR 和 Southern 检测结果

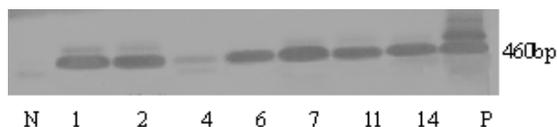
对 T_0 代植株的 PCR 检测结果如图 3 所示, 从第 1、2、4、6、7、11 和 14 株的基因组 DNA 中, 扩增出 460bp 的特异性片段, 可能是转化导入的外源目的基因。

对 PCR 检测表现阳性的 7 个植株, 进一步进行 Southern 杂交检测的结果如图 4 所示, 第 1、2、4、6、7、11 和 14 株仍表现为阳性, 4 号植株杂交信号较弱。由此说明, 外源 *CpTI* 基因已整合到这 7 个植株的基因组中。



M 为 Φ X174-Hinc II 分子量标记, 1~16 为被检测植株, N 为阴性对照, P 为阳性对照

图 3 T_0 代植株 PCR 检测



N 为阴性对照, P 为阳性对照, 1、2、4、6、7、11 和 14 为转化植株

图 4 T_0 代植株的 Southern 杂交检测

3 讨论

本研究所获再生植株有 43 株, 从中鉴定出 7 株整合了外源 *CpTI* 基因的阳性植株, 并自交收获了

T_1 代种子。但是, 由于时间和取样方面的原因, 尚未对选择标记基因进行 DNA 分子检测。目前, 正结合田间自交分离, 进一步对外源 *CpTI* 基因和抗潮霉素标记基因进行 DNA 分子检测, 以期分离选择出只整合 *CpTI* 基因, 而去除了选择标记基因的自交家系。

参考文献:

- [1] 贾士荣. 转基因植物食品中标记基因的安全评价[J]. 中国农业科学, 1997, 30(2): 1-15.

(下转第 52 页)

- [2] 付凤玲,张莉萍,朱 祯. 玉米优良自交系转基因受体系统建立及转化后的筛选与再生[J]. 四川农业大学学报, 2000, 18(2):97-99, 108.
- [3] 付凤玲,李晚忱,荣廷昭,潘光堂. 提高 N6 培养基钙浓度对玉米幼胚培养的影响[J]. 西北农林科技大学学报, 2003, 31(1):81-84.
- [4] 李向拓,毛建昌,吴权明. 分子标记在玉米育种中的应用[J]. 玉米科学, 2004, 12(1):26-29.
- [5] 滕海涛,赵久然,郭景伦,等. 抗虫转基因玉米研究初报[J]. 玉米科学, 2002, 11(2):14-16.
- [6] Dale E C, Ow D W. Gene transfers with subsequent removal of the selection gene from the host genome [J]. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1991, 88: 10558-10562.
- [7] Zechendorf B. What the public thinks about biotechnology[J]. Biotechnology, 1994, 12: 870-871, 873-875.
- [8] Dekeyser R, Claes B, Marichal M, et al. Evaluation of selectable markers for rice transformation[J]. Plant Physiol., 1998, 90: 217-223.
- [9] Cleave A P, Mitra D S, Mudge S R, Morris B A M. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene [J]. Plant Mol. Biol., 1999, 40: 223-235.
- [10] Russell S H, Hoopes J L, Odell JT. Directed excision of a transgene from the plant genome [J]. Mol. Gen. Genetic., 1992, 234: 49-59.
- [11] Goldsbrough A P, Lastrella C N, Yoder J I. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato [J]. Bio. Technol., 1993, 11: 1286-1292.
- [12] Yoder J I, Goldsbrough A P. Transformation system for generating marker-free transgenic plants [J]. Bio. Technol., 1994, 12: 263-267.
- [13] Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E, Ebinuma H. A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency [J]. Plant J., 2000, 22 (5): 461- 469.
- [14] Mcknight T D, Lillis M T, Simpson R B. Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate agrobacterium strains [J]. Plant Mol. Biol., 1989, 13: 533 - 540.
- [15] Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers [J]. Plant J., 1996, 10: 165-174.
- [16] Armstrong C L, Green C E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and involvement of L-proline [J]. Planta, 1985, 164: 207-214.