

## 用绿色荧光蛋白监测转基因植物中选择标记基因的消除

贾洪革<sup>1</sup> 吕玲飞<sup>1,2</sup> 庞永奇<sup>1,3</sup> 陈晓英<sup>1</sup> 方荣祥<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院微生物研究所植物生物技术实验室,北京 100080)

<sup>2</sup>(北京师范大学生命科学学院,北京 100875)

<sup>3</sup>(西北农林科技大学生命科学学院,杨凌 712100)

**摘 要** 绿色荧光蛋白(GFP)可直接进行活体观察,它的这个优点可被用于监测转基因植物中选择标记基因的消除。为此,构建了植物表达载体 pGNG,将绿色荧光蛋白基因(*gfp*)和卡那霉素抗性基因表达盒(NosP-*nptII*-NosT)一起克隆在两个同向的 *lox* 位点间,在第一个 *lox* 位点上游置有 CaMV 35S 启动子以驱动 GFP 表达,第二个 *lox* 位点下游置有不带启动子的大肠杆菌  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶(GUS)基因。首先在含卡那霉素(Kan)的培养基上筛选出转 pGNG 的烟草,借助绿色荧光可容易地检出表达 GFP 的转化体。然后用另一转化载体 pCambia1300-Cre 二次转化表达 GFP 的转基因植物,利用另一选择标记基因-潮霉素抗性基因(*hpt*)进行筛选,在获得的再生植株中,Cre 重组酶的表达消除了转化体中两 *lox* 位点间的 *gfp* 和 *nptII*。实验结果表明可借助 GFP 荧光的消失,快速选出 *nptII* 被消除的二次转化体,同时 GUS(作为目的蛋白)在 CaMV 35S 启动子驱动下获得表达。最后利用后代的分离将 *hpt* 和 *cre* 除去。

**关键词** 选择标记基因,转基因植物,绿色荧光蛋白

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0010-06

近年来,利用转基因技术改良作物的品质或生产有用的蛋白得到快速发展。为了快速、简单的获得含目的基因的转基因植物,通常将一选择标记基因同时转入植物细胞,利用转化体对抗生素或除草剂的抗性,筛选出转基因植物。一旦获得了转化体,选择标记基因就失去了继续存在的必要性,而且选择标记基因的存在还带来了生物安全性问题。另外,由于可利用的选择标记基因数量有限,选择标记基因的存在对同一植物的多次转化不利。上述这些因素都促进了从转基因植物中将选择标记基因消除的研究。目前,利用共转化、转座子、位点特异性重组系统等均可达到此目的,其中以后者中 Cre/*lox* 重组系统应用最为广泛<sup>[1]</sup>。

Cre 重组酶是一个 38kD 的位点特异性重组酶,它可介导在两 *lox* 位点间的 DNA 发生切除、整合或倒位的重组<sup>[2]</sup>。在植物中用 Cre/*lox* 体系消除标记基因是利用 Cre 重组酶可介导两个同向 *lox* 位点间的 DNA 片段切除的特性,将选择标记基因克隆到两个同向 *lox* 位点之间,首先通过抗性筛选得到转化

体,然后将 Cre 基因导入转基因植物中,在 Cre 重组酶作用下将 *lox* 位点间的选择标记基因消除。这种策略首先由 Dale 和 Ow 用杂交或二次转化法稳定表达 Cre 重组酶的方式证实是可行的<sup>[3]</sup>。近年来,科研工作者尝试用瞬间表达或化学诱导表达 Cre 重组酶的方法来消除标记基因并获得成功,这种方式可缩短获得无标记基因转化体的周期<sup>[4,5]</sup>。但是他们的设计都不能直接的、简便的检测选择标记基因的消除。

在本研究中,我们将 *gfp* 作为报告基因与选择标记基因连锁,置于两个同向的 *lox* 位点之间,通过 Cre 重组酶的稳定表达将 *gfp* 和选择标记基因一起消除。这种实验设计利用 GFP 可直接进行活体检测的特点,通过监测 GFP 荧光的消失,指示转基因植物中选择标记基因的消除,这种方法比较直观、简便。通过筛选 GFP 高表达的转基因植物株系,也有助于获得消除了选择标记基因的、可有效表达目的蛋白的转基因植物,从而避免因“基因沉默”或染色体位置效应而使目的蛋白在植物中不能有效表达的

缺点。

1 材料和方法

1.1 材料

烟草品种 SR1、农杆菌 LBA4404 由本实验室保存；大肠杆菌表达的 GFP 和 GFP 抗体由本实验室制备。质粒 pX6-GFP<sup>[5]</sup>、pBIN35S-*mgfp5-ER*<sup>[6]</sup>和 pMM23 (Ow D W 博士构建)分别由 Zuo J 博士、Haseloff 博士和林忠平教授惠赠，用酶切的方法从 pX6-GFP 切出 Nos P-*nptII*-Nos T，从 pMM23 切出 35S P-*cre*-Nos T，用 PCR 的方法从 pBIN35S-*mgfp5-ER* 扩增出 *gfp*。

1.2 植物表达载体的构建

植物表达载体 pGNG 在 pBI121 基础上改建，其特点是两个同向 *lox* 位点间有 *gfp* 和 *nptII*，GFP 的表达受 35S 启动子控制，*nptII* 受 Nos 启动子控制(图 1A)；在 Cre 重组酶作用下切除 *gfp* 和 *nptII* 后，GUS 基因受 35S 启动子调控(图 1B)。pGNG 的构建过程简述如下。人工合成 131bp 的含有两个同向 *lox* 位点和多个酶切位点的 *lox*-MCS-*lox*，其两端分别含 *Hind*Ⅲ和 *Eco*RⅠ切点。用 *lox*-MCS-*lox* 置换掉 pBI121 的 RB 和 LB 间 *Sac*Ⅱ-*Eco*RⅠ片段(含 Nos P-*nptII*-Nos T-35S P-*gus*-Nos T)，生成 pBI121 *lox*-MCS-*lox*(*lox*-MCS-*lox* 两侧的 *Hind*Ⅲ和 *Eco*RⅠ切点仍保留)。另将 *lox*-MCS-*lox* 片段用 *Hind*Ⅲ和 *Eco*RⅠ酶切后，克隆到同样酶切的 pBI221 中，构建 pBI221 *lox*-MCS-*lox*。分别将 35S 启动子和 GUS 基因克隆到 *lox*-MCS-*lox* 前后，构建 p221-35S-*lox*-MCS-*lox*-GUS。 *Hind*Ⅲ + *Eco*RⅠ酶切 p221-35S-*lox*-MCS-*lox*-GUS 回收 35S-*lox*-MCS-*lox*-GUS 片段，克隆到同样酶切的 pBI121 *lox*-MCS-*lox*，构建 pBI121-35S-*lox*-MCS-*lox*-GUS。然后在 MCS 中依次插入 *gfp* 和 Nos P-*nptII*-Nos T，构建成植物转化载体 pGNG。将 pGNG 转化农杆菌 LBA4404，在含利福霉素(30mg/L)、链霉素(50mg/L)、Kan(50mg/L)的 LB 培养基上得到转化子，并进一步经 PCR 鉴定 *gfp*，选出含有 pGNG 的菌株。

载体 pCambia1300-Cre 在 pCambia1300 基础上构建(图 1D)，*Hind*Ⅲ + *Sac*Ⅰ酶切 pMM23，回收 35S P-*cre*-Nos T 片段，克隆到用同样酶切的 pCambia1300 中得到载体 pCambia1300-Cre，转化农杆菌 LBA4404，在含利福霉素(30mg/L)、链霉素(50mg/L)、Kan(50mg/L)的 LB 培养基上得到转化子，并经 PCR 鉴定 Cre 基因选出阳性克隆。

1.3 pGNG 转化烟草的筛选

借助农杆菌介导的叶盘转化法，用 pGNG 转化

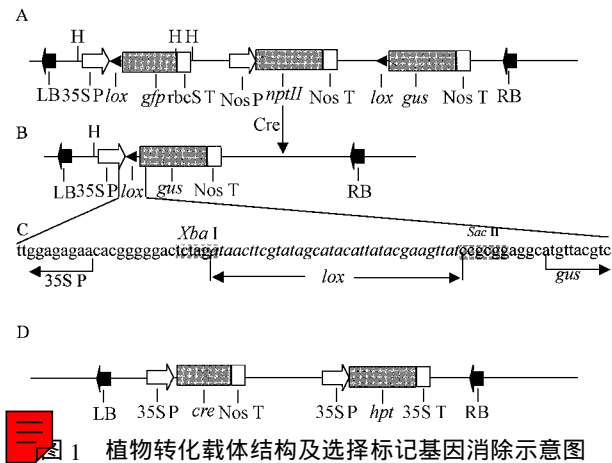


图 1 植物转化载体结构及选择标记基因消除示意图  
Fig. 1 Elimination of the selectable marker gene in plant transformation vector

A :plasmid pGNG with *gfp* and *nptII* between two *lox* sites in the same orientation ;B :*cre*-mediated recombination of DNA between the two *lox* sites after re-transformation ;C :DNA sequence between 35S promoter and *gus* after the *Cre*-mediated recombination ;D :plasmid pCambia1300-Cre used for re-transformation with *hpt* as a selectable marker gene

烟草品种 SR1，在含 Kar(300mg/L)的培养基上筛选。外植体上出现愈伤组织后，用长波长紫外光激发，在荧光显微镜(Olympus SZX9, Japan)下挑出有绿色荧光的愈伤组织，及早将其转到新的分化培养基，等分化出幼苗后，在荧光显微镜下挑选有绿色荧光的转化体再生成植株。

1.4 pGNG 转化烟草的分子检测

采用 CTAB 法提取植物总 DNA，取 100 ng DNA 作模板，在 20  $\mu$ L 体系中进行 *gfp* 的 PCR 检测。所用引物为 *gfp* 序列特异的 P1(5'-TGGATCCAACAAT-GAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTC-3')和 P2(5'-CGAG-CTCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC-3')。PCR 扩增的程序为：94℃ 预变性 3 min，按以下程序进行扩增：94℃ 1 min 55℃ 1 min 72℃ 45 s 35 个循环，循环结束后 72℃ 延伸 10 min。

用 *Hind*Ⅲ 酶切 50  $\mu$ g 植物总 DNA 进行 Southern 杂交分析，操作过程如下：将酶切后的样品在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳，毛细管法转至 Hybond-N<sup>+</sup> 膜，以 P<sup>32</sup> 标记的 *gus* 编码区片段作为探针。65℃ 杂交过夜，洗膜后进行放射自显影。

转基因植物的 Western blot 分析：提取的植物总蛋白样品约 100  $\mu$ g 进行 SDS-PAGE(15% 的分离胶和 4% 的浓缩胶)后，电转移至 PVDF 膜，封闭液为 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5) 500 mmol/L NaCl，1 mmol/L EDTA，0.1% Tween-20 和 5% 脱脂奶粉，室温封闭过夜。一抗为兔抗 GFP 血清(1:3000 稀释)，二抗为羊

抗兔 IgG-AP ;NBT/BCIP 显色。

取 Western blot 检测 GFP 有表达的 6 株  $T_0$  代 pGNG 转化烟草的种子和野生型 SR1 烟草的种子,经表面消毒后播种于含 Kan(100 mg/L)的 MS 培养基上进行抗性分离实验。种子萌发后,分别统计绿苗数和白化苗数。

### 1.5 二次转化及再生植株的检测

选择 pGNG 转化株系 G1、G4、G6 的有 GFP 荧光的  $T_1$  代无菌苗各一株进行二次转化。用含 pCam-bial300-Cre 农杆菌感染上述转化体的叶片,在含潮霉素(Hyg)20mg/L 的分化培养基上筛选出转化体。在荧光显微镜(Olympus SZX9, Japan)下挑选绿色荧光消失的二次转化体,并取其叶片用 1 mmol/L 5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸(X-Gluc)进行 GUS 的组织化学染色,37℃ 反应过夜,然后用 70% 乙醇 65℃ 脱色 1h。再生植株进行 PCR 检测,操作与 1.4 中叙述的相同,用与 35S 启动子序列相应的引物 P3(5'-CTCAGAAGACCAAAGGGC-3')和与 *gus* 序列相应的引物 P4(5'-CACGGTTGGGGTTTCTACAGG-3')进行扩增,并将 PCR 产物克隆入 pGEM-T vector 连接后进行测序。用 Cre 基因特异的引物 P5(5'-AATGCATGTCCAATTTACTGACCGTACACC-3')和 P6(5'-ACTCGAGCTAATCGCCATCTTCCAGCAG-3')进行 PCR 扩增以检测二次转化体中 *cre* 的存在。

### 1.6 pGNG 转化烟草的后代和二次转化体的后代的 GFP 荧光检测和 GUS 染色

在含 Kan(100 mg/L)的 MS 培养基上萌发 G1 的  $T_0$  代种子。选择再次转化 G1 的  $T_1$  代苗获得的、PCR 及测序证实已发生重组的二次转化体 R1,共 8 株,称为 R1-1、R1-2...R1-8。在不含抗生素的 MS 培养基上萌发 R1-1 和 R1-2 的  $T_0$  代种子。在荧光显微镜(Olympus SZX9, Japan)下观察幼苗的绿色荧光;GUS 的组织化学染色与 1.5 中叙述的相同。

### 1.7 无选择标记的转基因植物的获得

在含 Kan(100mg/L)的 MS 培养基上萌发 R1-1 和 R1-2 的  $T_0$  代种子,然后统计绿苗和白化苗的分离比例。在含 Hyg(30mg/L)的 MS 培养基上萌发 R1-1 和 R1-2 的  $T_0$  代种子,萌发后观察绿苗和白化苗的分离,将白化苗转至不含抗生素的 MS 培养基上转绿后,用 *cre* 基因特异的引物 P5 和 P6 扩增以检测 *cre* 的存在,并用 1mmol/L X-Gluc 进行 GUS 的组织化学染色。

## 2 结 果

### 2.1 pGNG 转化体的 GFP 绿色荧光观察

在有 Kan 的选择培养基上长出的愈伤组织,只有少数有绿色荧光,将其及早继代至新的分化培养基,可利于有 GFP 表达的转化体的分化,这样得到的转化体中约 60% 可观测到绿色荧光(数据未显示)。

### 2.2 pGNG 转化体的检测

选出的再生植株用 *gfp* 的特异引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增都可获得约 730bp 的特异的条带(数据未显示)。用 GFP 的抗体对获得的 6 株再生植株的可溶蛋白作 Western blot 分析,均可观察到一条特异性的蛋白带,证实了转基因植物中 GFP 的有效表达(图 2)。

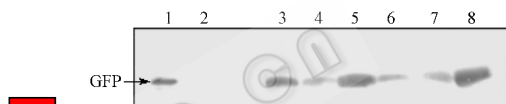


图 2 Western blot 分析转 pGNG 烟草中表达的 GFP

Fig.2 Western blot of GFP expressed in tobacco plants transformed with pGNG

1: *E. coli*-expressed GFP; 2: wild-type *N. tabacum* var. SR1 plant; 3~8: pGNG-transformed SR1 plant lines G1-G6

Southern 杂交结果表明 pGNG 的 T-DNA 已稳定整合到植物的基因组中(图 3)。G1 为单拷贝 T-DNA 整合,因为有两近似的条带,所以不能确定 G2、G3、G4 是否也为单拷贝 T-DNA 整合。Kan 抗性实验表明,野生型 SR1 烟草苗全部白化,而 pGNG 转化体的一部分  $T_1$  代苗有卡那霉素抗性( $Kan^r$ )。经  $\chi^2$  测验表明,在转基因植株 G1、G4、G6 的  $T_1$  代苗中, $Kan^r$  的植株数与对卡那霉素敏感( $Kan^s$ )的植株数之间的比例均为 3:1(表 1)。结合 Southern 杂交的结果,确证 G1 含有单拷贝 T-DNA,故选择它的  $T_1$  代苗进行二次转化消除 *nptII* 的操作,同时也对可能是单拷贝 T-DNA 插入的转基因株系 G4 和 G6 的  $T_1$  代苗进行二次转化。选择有单拷贝 pGNG T-DNA 插入的转化体进行 Cre/*lox* 介导的 DNA 重组的理由是:由于 Cre 重组酶介导的两个同向 *lox* 位点间的 DNA 发生重组后还在染色体中留有一个 *lox* 位点,所以在多拷贝 T-DNA 整合的情况下,留在不同染色体上的两个或两个以上 *lox* 位点在 Cre 重组酶的介导下可引起染色体发生易位,有可能影响后代的存活<sup>[7]</sup>;另外,对含单拷贝 T-DNA 的转化体进行操作,随后的实验结果的分析比较简单。

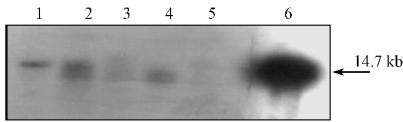


图 3 转 pGNG 烟草的 Southern 杂交分析

Fig.3 Southern blot of tobacco plants transformed with pGNG  
1~4: pGNG-transformed SR1 plant lines G1-G4; 5: wild-type *N. tabacum* var. SR1 plant; 6: *Hind*III-digested plasmid pBI121 as a reference

表 1 pGNG 转基因烟草 T<sub>1</sub> 代中卡那霉素抗性基因的分离情况

Table 1 Segregation of kanamycin resistance in T<sub>1</sub> progenies of pGNG-transformed tobacco plants

Line	No. of Kan <sup>r</sup> plants	No. of Kan <sup>s</sup> plants	Ratio	$\chi^2$	$\chi^2_{0.05}$
G1	130	43	3:1	0.002	3.841
G2	164	34	5:1	0.036	3.841
G3	142	10	15:1	0.028	3.841
G4	124	48	3:1	0.775	3.841
G5	160	8	20:1	0	3.841
G6	116	38	3:1	0.009	3.841
SR1	0	187	—	—	—

2.3 检测二次转化体中 *nptII* 和 *gfp* 的消除

转化体 G1、G4 和 G6 的 T<sub>1</sub> 代苗经二次转化后，共获得 24 棵二次转化体，其中 18 棵植物中 GFP 荧光消失，另外 6 棵仍然有 GFP 绿色荧光，它们可能是未被二次转化的逃逸体，或者是虽被二次转化但 *cre* 基因由于基因沉默未表达。这 18 棵无 GFP 绿色荧光的二次转化体，8 棵来自 G1，5 棵来自 G4，5 棵来自 G6，它们的叶片都可用 X-Gluc 染成蓝色（数据未显示）；它们的基因组 DNA 用引物 P5 和 P6 可扩增出 *cre* 基因（数据未显示）；而用引物 P3 和 P4 可扩增出约 450bp 的片段（部分转化体的 PCR 检测结果如图 4），表明在这些二次转化体中两个 *lox* 位点间的 *gfp* 和 *nptII* 已被切除。将用引物 P3 和 P4 扩增的片段克隆到 pGEM-T vector 中，测序结果表明两 *lox* 位点间的 DNA 在 Cre 重组酶的作用下发生了正确的重组（图 1C）。这说明，确实可用 GFP 荧光的消失方便快捷地监测与之连锁的选择标记基因的消除。

2.4 二次转化体的 T<sub>1</sub> 代幼苗中 GFP 表达的消失和 GUS 的表达

G1 的 T<sub>0</sub> 代种子在含 Kan 的培养基上萌发后，Kan<sup>r</sup> 的 T<sub>1</sub> 代幼苗在荧光显微镜下可观测到绿色荧光，而 Kan<sup>s</sup> 的幼苗无 GFP 荧光，说明 Kan<sup>r</sup> 与 GFP 绿

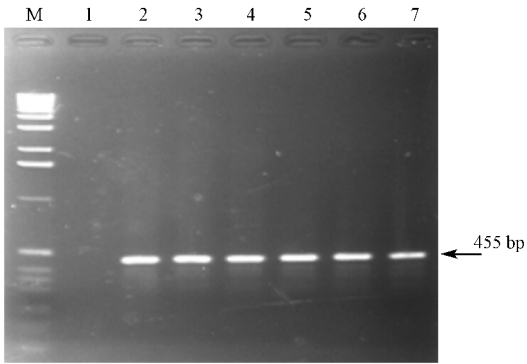


图 4 用 PCR 检查二次转化体中 *gfp* 和 *nptII* 的消除

Fig.4 PCR assay for elimination of *gfp* and *nptII* in re-transformed plants

M: 1kb marker (Gibco-BRL); 1: wild-type *N. tabacum* var. SR1 plant; 2~7: re-transformed plant lines: R1-1 to R1-6

色荧光是同时存在或消失，但无论是 Kan<sup>r</sup> 还是 Kan<sup>s</sup> 的幼苗均不能用 X-Gluc 染成蓝色（图 5），表明在 G1 的 T<sub>1</sub> 代幼苗中无 GUS 表达。在不含抗生素的 MS 培养基上，R1-1 和 R1-2 的 T<sub>0</sub> 代种子萌发后，所有 T<sub>1</sub> 代幼苗在荧光显微镜下都观测不到绿色荧光，其中大部分幼苗可用 X-Gluc 染成蓝色（图 5）。尽管二次转化体 R1-1 和 R1-2 中可检测到 GUS 活性，但它们的 T<sub>1</sub> 代幼苗并不能用 X-Gluc 染成蓝色，表明用于二次转化的 G1 的 T<sub>1</sub> 代苗为杂合体。而大部分幼苗可用 X-Gluc 染成蓝色说明二次转化体中发生重组后形成的预期结构可遗传给后代（图 1B），结果就是在 35S 启动子直接驱动下 GUS 得到了表达，而 GFP 的表达消失了。

2.5 不含任何选择标记基因的转基因植物的获得

在含 Kan 的培养基上，R1-1 和 R1-2 的 T<sub>0</sub> 种子萌发后，幼苗全部白化，说明它们都失去了 Kan 抗性。结合 2.4 的结果即 R1-1 和 R1-2 的 T<sub>1</sub> 代幼苗均观测不到 GFP 荧光，说明可用绿色荧光指示 *nptII* 的消除。当然 R1-1 和 R1-2 的 T<sub>1</sub> 代幼苗中包括那些因 G1 的 T<sub>1</sub> 代苗是杂合体而后代分离后形成的并无 pGNG T-DNA 插入的烟草幼苗。在含 Hyg 的培养基上，有一部分幼苗发生白化，说明这部分幼苗中已无 *hpt*；如果将白化的幼苗转至 MS 培养基上，可慢慢恢复正常生长，这部分幼苗用 Cre 基因特异的引物 P5 和 P6 不能扩增出 *cre*，但其中有的幼苗可用 GUS 的组织化学染色检测到 GUS 活性（数据未显示）。因此得到的这部分幼苗既不含任何选择标记基因也不含 *cre*，但可表达 GUS。

图 5 转基因 SR1 烟草幼苗的 GFP 观察(A)和 GUS 组织化学染色(B)

Fig.5 GFP detection(A) and GUS histochemical staining(B) of transgenic SR1 seedlings

1,3:T<sub>1</sub> seedling of G1;2,4:T<sub>1</sub> seedling of R1-1

### 3 讨 论

绿色荧光蛋白基因是目前应用最广的报告基因之一,GFP有如下的优点:检测方便,只需激发光源,不需任何底物或辅助因子;材料可活体观测,无需预处理;植物本身无绿色荧光,不会有假阳性。因此,它目前在动物、植物、微生物的研究中已得到广泛的应用。利用 *gfp* 作为唯一的标记基因,最近已成功筛选出了几种植物的转化体<sup>[8-10]</sup>。利用 GFP 可在活体上直接观察的优点,我们构建了植物表达载体 pGNG,用 GFP 作为卡那霉素抗性选择标记的可视辅助标记,试图解决两个问题,一是如何方便检测选择标记基因的消除,二是如何保证消除了选择标记基因的二次转化体可有效的表达目的蛋白。本实验通过对 3 个 pGNG 转基因植物株系(单拷贝 T-DNA 插入)中 GFP 荧光的出现和二次转化后 GFP 荧光的消失的检测,建立了 GFP 荧光与 *nptII* 的存在和消除的相关性,证实了可用 GFP 绿色荧光监测与之连锁的选择标记基因;第二是证实了经二次转化消除 *nptII* 和 *gfp* 后,目的蛋白(GUS)得到有效表达并且可稳定遗传给后代。

利用 Cre/*lox* 重组系统消除标记基因的技术已经比较成熟,早在 10 年前就获得成功<sup>[3]</sup>,但新型报告基因(如 *gfp*)的出现为现有方法的改进提供可能。最近 Zuo *et al* 利用雌激素诱导型启动子控制 Cre 重组酶的表达实现选择标记基因和 *cre* 基因的共消除<sup>[5]</sup>,在他们的研究中应用了 *gfp* 作为目的基因,这样选择标记基因消除后,就可观测到 GFP 的表达。但若在表达其它目的蛋白时,就不便直接观察消除了选择标记基因的植物。此外,目前存在的方法主要注重去除选择标记基因的可行性,但没有

考虑消除标记基因后目的基因在转基因植物中的有效表达,而本文中描述的策略可在一定程度上弥补现存方法的不足。

尽管我们已经实现了简便地检测选择标记基因的消除和目的基因有效表达,但我们的策略还需进一步的完善。一是选择转 pGNG 植物后代的纯合系进行二次转化。如果二次转化时用的是转基因杂合体,则获得的二次转化体因分离使部分后代既无 *gfp* 和选择标记基因,也不表达目的蛋白,我们的实验结果就说明了这个问题。但是使用杂合体进行二次转化实验并不影响本策略的可行性。在转基因的拟南芥中,利用 GFP 绿色荧光的强弱,可从 T<sub>1</sub> 代幼苗中选出纯合系<sup>[11]</sup>,这个方法也许亦可用在筛选转 pGNG 烟草的后代的纯合系。二是用合适的表达方法提供 Cre 重组酶以避免利用周期较长的后代分离操作来获得无任何选择标记的转化体。三是进一步建立 GFP 绿色荧光强弱与重组后目的蛋白表达水平的高低之间的相关性,这种在消除转基因植物中选择标记基因的同时使外源蛋白获得高效表达的策略,对生产有用蛋白的转基因植物的研究特别有利;特别是有些以植物为载体的口服疫苗包含小肽或抗原决定簇,其分子量小,还有的蛋白没有商品化的抗体,而其抗体的制备又比较麻烦,检测这些目的蛋白在转基因植物中的表达都比较困难。相信在进一步完善后利用 pGNG 获得无选择标记的转基因植物的策略会有广泛的应用价值。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Hohn B, Levy AA, Puchta H. Elimination of selection markers from transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12:139-143
- [2] Craig N. The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu Rev Genet* 1988, 22:77-105

- [ 3 ] Dale EC , Ow DW . Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1991 , **88** :10558 – 10562
- [ 4 ] Gleave AP , Mitra DS , Mudge SR *et al.* . Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing : transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene . *Plant Mol Biol* , 1999 , **40** :223 – 235
- [ 5 ] Zuo J , Nui QW , Geir MS *et al.* . Chemical-regulated , site-specific DNA excision in transgenic plants . *Nat Biotechnol* , 2001 , **19** :157 – 161
- [ 6 ] Haseloff J , Siemering KR , Prasher DC *et al.* . Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1997 , **94** :2122 – 2127
- [ 7 ] Qin M , Bayley C , Stockton T *et al.* . Cre recombinase-mediated site-specific recombination between plant chromosome . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1994 , **91** :1706 – 1710
- [ 8 ] Zhang CL , Chen DF , McCormac AC *et al.* . Use of the GFP reporter as a vital marker for Agrobacterium-mediated transformation of sugar beet ( *Beta vulgaris* L. ) . *Mol Biotechnol* , 2001 , **17** :109 – 117
- [ 9 ] Kaeppler HF , Carlson AR , Menon GK . Routine utilization of green fluorescent protein as a visual selectable marker for cereal transformation . *In Vitro Cell Dev Biol* , 2001 , **37** :120 – 126
- [ 10 ] Carlson AR , Letarte J , Chen J *et al.* . Visual screening of microspore-derived transgenic barley ( *Hordeum vulgare* L. ) with green fluorescent protein . *Plant Cell Rep* , 2001 , **20** :331 – 337
- [ 11 ] Niwa Y , Hirano T , Yoshimoto K *et al.* . Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic , S65T-type green fluorescent protein in living plants . *Plant J* , 1999 , **18** :455 – 463

## Using Green Fluorescent Protein as a Reporter to Monitor Elimination of Selectable Marker Genes from Transgenic Plants

JIA Hong-Ge<sup>1</sup> LÜ Ling-Fei<sup>1 2</sup> PANG Yong-Qi<sup>1 3</sup> CHEN Xiao-Ying<sup>1</sup> FANG Rong-Xiang<sup>1 \*</sup>

<sup>1</sup>( Laboratory of Plant Biotechnology , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

<sup>2</sup>( College of Life Sciences , Beijing Normal University , Beijing 100875 , China )

<sup>3</sup>( College of Life Sciences , Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry , Yangling 712100 , China )

**Abstract** In genetic modification of plants , once the transformants are obtained , selection markers are no longer required in mature plants . At present , the Cre/lox site-specific recombination system is most widely used to eliminate the selectable marker genes from the transgenic plants . In this study , attempt was made to favour the selection of marker-free plants in the re-transformation method . Green fluorescent protein ( GFP ) can be directly visualized in living cells , tissues or organisms under UV illumination . This advantage of GFP is exploited in the development of a practical approach in which GFP is used as a visual marker to monitor the removal of the selectable marker gene from transgenic plants . For that purpose , the pGNG binary vector was constructed , in which the GFP gene ( *gfp* ) was linked to the expression cassette Nos P-*nptII*-NosT and the two units were cloned between two directly-orientated *lox* sites . The CaMV 35S promoter was placed before the first *lox* site and used to drive GFP expression . The  $\beta$ -glucuronidase gene ( *gus* ) of *Escherichia coli* was cloned behind the second *lox* site without a promoter , thus would not be expressed in this position . Tobacco plants were first transformed with pGNG and selected on kanamycin ( Kan )-containing media . Regenerated transgenic shoots were readily singled out by GFP fluorescence . The GFP-expressing plants were then re-transformed with pCambia1300-Cre containing hygromycin phosphotransferase gene ( *hpt* ) as a selectable marker gene . The Cre-mediated recombination resulted in the elimination of *lox*-flanked genes , herein *gfp* and *nptII* , from the plant genome and brought the GUS gene next to the 35S promoter . Our data demonstrated that transgenic plants free of *nptII* were easily selected by monitoring the loss of green fluorescence , and at the same time , GUS ( here as a target protein ) was expressed in the *nptII*-free plants . Finally , *hpt* and *cre* were removed from the progenies of the *nptII*-free plants by gene segregation .

**Key words** selectable marker genes , transgenic plants , green fluorescent protein

Received : 06-10-2003

This work was supported by the National Hi-Tech Research and Development Program of China ( No.2002AA27031 ) .

\* Corresponding author . Tel : 86-10-62548243 ; Fax : 86-10-62548243 ; E-mail : fangrx@sun.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>