

## 两种不同选择标记的转化效率比较

唐微<sup>1,2</sup>

(1. 鄖阳医学院生化教研室,湖北 十堰 442000; 2. 太和医院生命科学研究所以,湖北 十堰 442000)

**摘要:**为了弄清两个选择标记在相同条件下的转化效率,为转基因选择遗传标记时提供参考,以优良恢复系明恢63为受体材料,采用农杆菌介导的遗传转化法,分别以 *hpt* 和 *bar* 基因为选择标记进行了转化。结果显示:1 500 块胚性愈伤共培养后获得 214 块抗性愈伤,转化效率为 14.3%;5 400 块胚性愈伤共培养后获得 156 块抗性愈伤,转化效率为 2.9%;两者的分化率分别为 79.0%和 80.7%。此外,以 *hpt* 和 *bar* 为选择标记,从胚性愈伤诱导到获得转基因植株分别需要 75 天和 125 天。因此,以 *hpt* 为选择标记的遗传转化,比较适合基因功能验证和共培养培育无选择标记水稻植株;如果是培育商品化的转基因水稻植株,则最好以 *bar* 为选择标记基因。

**关键词:**农杆菌介导的遗传转化; *hpt* 基因; *bar* 基因; 水稻

中图分类号:Q785

文献标识码:A

### 0 引言

1983 年,首例转基因作物问世。由于采用转基因方法培育作物新品种,可以大大地缩短育种周期,提高育种效率,因此转基因技术在作物遗传改良中取得飞速的发展。在培育转基因作物时,常规的转化系统通常要在培养基里加入筛选剂,以便从大量的非转基因苗中筛选获得转基因植株。常用选择标记基因有两类<sup>[1]</sup>:一类是编码抗生素抗性的基因,如新霉素磷酸转移酶(neomycin phosphotransferase)基因 II(*npt II*)、潮霉素磷酸转移酶(hygromycin phosphotransferase)基因(*hpt*)和二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase)基因(*dhfr*)等;另一类是编码除草剂抗性的基因,如草丁腈乙酰转移酶(phosphinothricin acetyltransferase)基因(*bar*)、5-烯醇丙酮酰草酸 3 磷酸合成酶(5-enolpyruvate shikimate 3-phosphate synthase)基因(*epsps*)等。目前,科学家们已经利用这些抗性基因在不同的实验中分别得到相应的转基因水稻植株<sup>[2,3]</sup>。

*hpt* 基因和 *bar* 基因是水稻遗传转化中应用最多的两种选择标记基因。本研究采用农杆菌介导的遗传转化法,对两种标记的转化效率进行了比较,以为水稻的遗传转化选择标记基因时提供依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 植物材料及菌株

转基因受体品种为明恢 63 (*Oryza sativa* L.),明恢 63 是一个优良的三系杂交水稻恢复系。转化菌株为根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*),两者均由本室保存。

#### 1.2 转化载体 pHpt 和 pBar

载体 pCambia1300(简称为 pIIpt)由“澳大利亚分子生物学技术应用于世界农业研究中心”惠赠,其 T-DNA 区有潮霉素 B 磷酸转移酶基因(hygromycin B phosphotransferase)可使潮霉素(hygromycin B) $\alpha$  位的磷酸转移至第 4 位羟基上而失活,从而提供对潮霉素的抗性<sup>[8]</sup>(图 1A)。

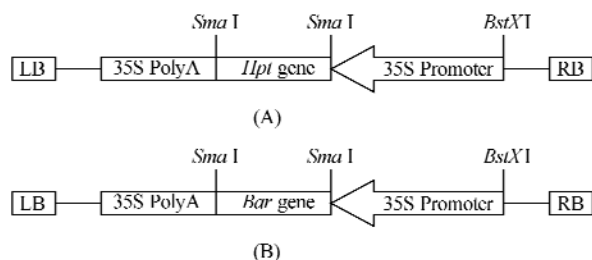
载体 pBar(图 1B)由 pCambia1300 载体衍生而来:即以 *bar* 基因取代了其中的潮霉素抗性基因。*bar* 基因来源于吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*),对除草剂 PPT(phosphinothricin)具有抗性<sup>[9-10]</sup>。

#### 1.3 组织培养及其转化

农杆菌介导的遗传转化过程中的愈伤组织的诱导、继代、预培养、共培养、浸染、工程菌的制备等参考文献<sup>[11]</sup>,其基本过程如下。

**1.3.1 胚性愈伤的诱导** 取明恢 63 的成熟种子去壳,先用质量分数为 75%的酒精浸泡 1 min,再用质量分数为 0.15%的  $HgCl_2$  浸泡 18 min,最后

用无菌水冲洗 4~5 次,然后接种到诱导培养基上,在 26 ℃ 培养 45 d 左右。



注:*hpt* 基因和 *bar* 基因均由 CaMV 35S 启动子驱动, LB: T-DNA 区的左边界, RB: T-DNA 区的右边界。

图 1 转化载体 pHpt(A) 和 pBar(B) 的 T-DNA 区结构  
Fig. 1 T-DNA region of transformation vectors pHpt (A) and pBar (B).

1.3.2 愈伤组织的继代 用镊子将生长紧实的胚性愈伤分离后接到继代培养基上。由于愈伤生长过程中有次生物质的产生,消耗大量的营养物质,因此继代时间不能太长,一般以 30 d 左右为宜。

1.3.3 愈伤组织的浸染及共培养 将活化的工程菌株刮入悬浮培养基上,摇约 2 h 后倒入已装有愈伤的 100 mL 的圆筒中,浸泡愈伤 30 min,之后,倒去菌液,用灭菌吸水纸吸干愈伤表面菌液,然后接入共培养基上培养 3 d。

1.3.4 选择继代 将浸染后的愈伤放在选择继代培养基上进行继代,每 30 d 继代一次,继代 3 次后,将黄豆大小的抗性愈伤进行预分化。

1.3.5 分化及生根 预分化 7 d 后,转到分化培养基中进行分化培养,分化苗长到 4~5 cm 时,转到生根培养基中进行生根,当再生苗的根系长到 3~4 cm 时转至温室或直接移栽到大田。

#### 1.4 阳性植株的分子鉴定

采用 CTAB 小量法<sup>[12]</sup>提取转化植株叶片 DNA,然后用一对特异的引物在 PCR 仪(GeneAmp PCR system 2700)上进行扩增。如果出现预期的带,认定为阳性转化子,否则为非转化子。扩增时,除了两者的引物不同外,其反应体系及反应程序一致。

*hpt* 基因的引物为 5'-gctcaacacatgagcgaaac-3' (Forward)和 5'-cgcaaatcccactatcctt-3' (Reverse),产物大小为 734 bp。

*bar* 基因的引物为 5'-gctcaacacatgagcgaaac-3' (Forward)和 5'-cgcaaatcccactatcctt-3' (Reverse),产物大小为 615 bp。

PCR 反应体系:总体系为 20  $\mu$ L, DNA 模板 50~100 ng, 10  $\times$  buffer 2  $\mu$ L, 2 mmol dNTP

1.5  $\mu$ L, 25 mmol MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol 引物(F/R)各 0.4  $\mu$ L, Taq 酶 1 单位,加灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。

PCR 反应程序:94 ℃,变性 3 min; 94 ℃,变性 1 min, 57 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。

PCR 产物检测:扩增产物在 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外分析仪观察并照相。

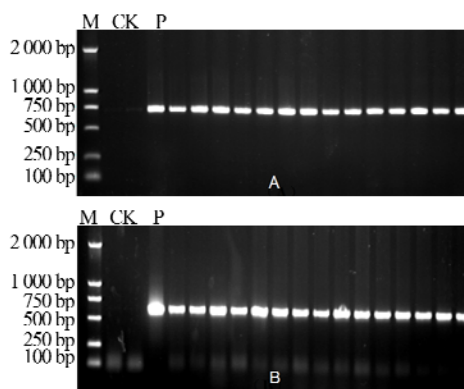
## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤诱导及农杆菌介导的遗传转化

成熟种子在黑暗中诱导 7 d 后,胚和胚乳之间长出淡黄色的胚性愈伤。分离的胚性愈伤在继代培养基上快速增殖,25 d 约增长 5 倍。共培养后,以潮霉素(50 mg/L)作为筛选剂,在抗性愈伤筛选第二代开始出现较明显的淡黄色抗性愈伤,第三代筛选完成后即可进行预分化。所以,以 *hpt* 作选择标记,从胚性愈伤的诱导到抗性愈伤的获得只需 75 d 时间。以 *bar* 作为筛选标记,一般要筛选 5 代即约 125 d 以后,才能获得抗性愈伤。这说明不同的选择标记,获得抗性愈伤的难易程度存在较大的差异。

### 2.2 初级转化子的 PCR 验证

转基因 T<sub>0</sub> 植株 DNA 的 PCR 分析结果显示:转 *hpt* 基因植株中,除对照外,均出现预期 734 bp 大小 DNA 带(图 2A);转 *bar* 基因植株中,除了对照,均出现预期中 615 bp 大小 DNA 带(图 2B),初步表明 *hpt* 基因和 *bar* 基因分别整合到水稻基因组上。



注: M 为 2000 bp DNA Marker; CK 为非转基因对照; P 为阳性质粒。

图 2 pIpt 载体(A)和 pBar 载体(B)转基因植株的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of transgenic bar and hpt genes plants

### 2.3 两个表达载体的转化结果

转化实验结果(表 1)显示, 1500 块愈伤组织与 pHpt 载体进行了共培养,获得抗性愈伤块 214

块,抗性愈伤率为14.3%;5400块愈伤组织与pBar载体进行了共培养,获得抗性愈伤块156块,抗性愈伤率为2.9%,两者的分化率分别为79.0%以及80.7%,没有太大的差异。

表1 两个表达载体的转化结果

Table 1 Agrobacterium-mediated transformation of two expression vectors

表达载体	pHpt	pBar
侵染愈伤块数/块	1500	5400
获得抗性愈伤块/块	214	156
抗性愈伤率/%	14.3	2.9
分化成苗数/块	168	126
分化率/%	79.0	80.7
移栽成活苗数/株	159	120

### 3 讨论

研究结果显示:相同的转化程序,不同的选择标记,其转化效率是完全不同的,其中以hpt为选择标记的转化效率高。因此,不同的转化目的,应选择不同的选择标记。以hpt为选择标记的转化效率高,而且对植株的分化影响小,但其安全性还没有得到验证,因此不适合转基因商品化作物的选择标记,但适合共转化培育无选择标记转基因植株及突变体建库时的遗传转化。目前,两种转基因标记的后代已种植到第9代,抗性试验及PCR仍能检测到相关的目标基因,说明这两个选择标记基因的遗传稳定性都较好。

以hpt为选择标记<sup>[13-14]</sup>和以bar为选择标记<sup>[15-17]</sup>的遗传转化研究较多,但至今没有学者将两者进行系统比较,因而单独转化所得出的结果没有可比性。本研究中,抗性愈伤率、分化率等转化参数都是在相同条件下所得到的结果,因而能真实地反映了两者的差异。

以bar为目标基因的转基因作物早已大面积商品化,因此,从转基因作物商品化的安全角度来说,bar基因是一个合适的选择标记。但是,以bar作为筛选标记基因,其转化效率低、抗性愈伤筛选时间长。由于抗性愈伤率低,要选择到同样多的阳性转化子,则需要大量的愈伤进行共培养,增加了工作量。利用bar基因作为选择标记基因的优势不仅仅作选择标记基因,而且还作目标基因。

#### 参考文献:

[1] Daniel H, Khan M S, Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology[J]. Trends Plant Sci, 2001(7):84-91.  
[2] Rathmore K S, Chowdhury V K, Hodges T K. Use

of bar as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts[J]. Plant Mol Biol, 1993, 21: 871-884.

- [3] 朱冰,黄大年,杨炜.利用基因枪法获得可遗传的抗除草剂转基因水稻植株[J].中国农业科学,1996,29(6):15-20.  
[4] Zhang S Q, Tong H H, Xue Y. Improving purity in hybrid rice seed production by introducing bar gene to restorers[J]. Scientia Agricul Sinica, 1998, 31(6): 33-37.  
[5] Wang M B, Peter M W. A rapid and simple method of assaying plants transformed with hygromycin and PPT resistance genes[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15: 209-215.  
[6] 周玲艳,姜大刚,吴豪,等.潮霉素和PPT对水稻愈伤组织筛选效果的比较[J].仲恺农业技术学院学报, 2003, 16(2): 10-15.  
[7] 施利利,孙宗修,王松文,等.农杆菌介导的抗除草剂基因bar转入北方粳稻恢复系的研究[J].沈阳农业大学学报, 2004, 35(3): 161-164.  
[8] Gritz L, Davies J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae[J]. Gene, 1983, 25(2): 179-188.  
[9] Block M D, Botterman J, Vandewiele M, et al. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme[J]. EMBO J, 1987(6): 2513-2518.  
[10] Thompson C J, Movva N R, Crameri R, et al. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from streptomyces hygroscopicus[J]. EMBO J, 1987(6): 2519-2523.  
[11] Lin Y J, Zhang Q. Optimizing the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice[J]. Plant Cell Rep, 2005, 35: 540-547.  
[12] Liu K D, Wang J, Li H B, et al. A genome-wide analysis of wide-compatibility in rice and the precise location of the S5 locus in the molecular map. Theor Appl Genet, 1995, 95: 809-814.  
[13] 王锐,陈松彪,卓勤,等.转基因水稻中标记基因hpt表达行为的研究[J].卫生研究, 2005, 34(4): 460-462.  
[14] 何龙飞,莫长明,李创珍,等.转sck和hpt基因对水稻不育系及其组合农艺性状的影响评论推荐[J].分子植物育种, 2008, 6(2): 227-232.  
[15] 肖国樱,唐俐,袁定阳,等.转Bar基因抗除草剂两系杂交早稻恢复系Bar68-1的培育研究[J].杂交水稻, 2007, 22(6): 57-62.  
[16] 王为民,赵倩,朱登云,等.高赖氨酸蛋白质基因和

bar 基因导入水稻及转基因植株的检测[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(4): 363-368.

纯系的选育及在杂种优势上的应用[J]. 上海农业学报, 2007, 23(4): 21-24.

[17] 王新其, 李建刚, 殷丽青, 等. 梗稻恢复系 bar 基因

## Comparison of transformation efficiency between selective markers *hpt* and *bar*

TANG Wei<sup>1,2</sup>

(1. Yongyang Medical College, Biochemistry Department, Shiyan 442000, China;

2. Research Institute of Life Sciences, Taihe Hospital, Shiyan 442000, China)

**Abstract:** *hpt* and *bar* genes were mostly used as selectable markers in rice transformation. In order to understand the transformation efficiency with these two markers under the same condition for references, in the study, elite restorer MII63 was used as a receptor material to be transformed via *Agrobacterim* with *hpt* and *bar* as selective marker, respectively. Results displayed that 214 and 156 of resistant calli were obtained from 1 500 and 5 400 calli, respectively and their transformation efficiencies were 14.3% and 2.9%, respectively. Their differentiation efficiencies have no obvious difference. Besides, it took 75 days produce transgenic plantlets from calli using *hpt* as selectable marker and 125 days using *bar* as marker. Therefore, *hpt* is suitable for the culture of marker free transgenic plants or confirmation of gene function, while *bar* is suitable for culture of commercialized transgenic plants.

**Key words:** genetic transformation via *Agrobacterim*; *hpt* gene; *bar* gene; *Oryza sativa* L.

本文编辑: 张 瑞



(上接第 4 页)

## Study on the occurrence state of metallic elements in Geermu mixed crude oil

LI Yang<sup>1</sup>, ZHU Jian-hua<sup>1</sup>, WU Ben-cheng<sup>1</sup>, DANG Hai-ping<sup>2</sup>, LI Hong-yang<sup>2</sup>

(1. College of Chemical Engineering, China University of Petroleum, Beijing 102200, China;

2. Geermu Refinery, Qinghai Oilfield, PetroChina, Geermu 816000, China)

**Abstract:** For the mixed crude oil from Geermu refinery, the density, viscosity, water content and content of metallic elements were determined. The occurrence state of main metallic elements in the mixed crude oil was investigated. The experimental results indicated that Na in Geermu mixed crude oil existed mainly in the form of water-soluble metallic compounds, and Fe, Ca, Cu, Ni existed in the form of organic metallic compounds. The 93% Na existed in the form of water-soluble metallic compounds; and 33.3% of Ca existed in the form of water soluble metallic compounds and 37.1% existed in the form of petroleum acid metallic compounds; the 33.4% of Fe existed in the form of water-soluble metallic compounds and petroleum acid metallic compounds, 66.6% existed in the form of porphyrin and complicated macro-molecular compounds; Cu existed mainly in the form of porphyrin and complicated macro molecular compounds; the 52.6% of Ni existed in the form of porphyrin and 36.1% existed in the form of complicated macro-molecular compounds.

**Key words:** mixed crude oil; occurrence state; extraction; porphyrin

本文编辑: 张 瑞