

# 水稻新型核转化筛选标记基因的鉴定及应用

张娟娟 林拥军 周菲

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/华中农业大学国家植物基因研究中心(武汉), 武汉 430070

**摘要** 将人工合成的来自 *Escherichia coli* 的 *dsdA* 基因与来自 *Schizosaccharomyces pombe* 的 *dao1* 基因, 通过农杆菌侵染方式转化到水稻中花 11 中。对转化植株进行分子生物学检测表明, 目的基因整合到了水稻基因组中, 其中获得转化 *dsdA* 的单拷贝植株 7 个, 转化 *dao1* 的单拷贝植株 6 个。通过对单拷贝转基因家系表达量检测及 T<sub>0</sub> 代种子萌发测验发现, *dao1* 基因在 2 个(编号 6, 7)转基因家系中表达量显著, T<sub>0</sub> 代种子在含 D-Ala 的培养基上, 具有明显抗性。*dsdA* 基因在所有的转基因家系中表达量相对偏低, 在含 D-Ser 的培养基上, T<sub>0</sub> 代种子有一定抗性。

**关键词** 水稻; 转基因; 筛选标记基因; D-氨基酸; 生物安全

**中图分类号** S 511 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)01-0001-08

筛选标记基因在植物基因工程中具有非常重要的作用, 它能够区分转化和非转化的细胞、组织以筛选并鉴定出转基因植株。目前, 转基因植物推向市场的同时, 人们非常担忧其对人类健康及环境等诸多方面可能存在的风险, 因此, 标记基因的生物安全性问题引起了人们的广泛关注。新的标记基因不仅要求能够对转基因植物进行筛选和鉴定, 而且必须对生物和环境都是安全的。

传统的筛选标记基因主要有两大类, 抗生素类标记基因和抗除草剂类标记基因, 例如: *npt II* (新霉素磷酸转移酶基因)<sup>[1]</sup> 所编码的新霉素磷酸转移酶能够耐卡那霉素、G481 等, *hpt* (潮霉素磷酸转移酶基因)<sup>[2]</sup> 所编码的潮霉素磷酸转移酶能够解除潮霉素的毒性, *bar* (草丁膦乙酰转移酶基因)<sup>[3]</sup> 编码的草丁膦乙酰转移酶能够抵抗除草剂的毒性。抗生素类筛选标记基因可以使抗生素类物质失去活性, 对人体的健康有潜在的危险性。有报道表明, 将抗除草剂类标记基因导入到植物中后, 一旦释放到环境中, 可能会发生基因漂流、破坏生态平衡、自然生物种群发生改变等一系列的生物安全性问题<sup>[4]</sup>。因此, 研究新的筛选标记基因迫在眉睫。

来源于大肠杆菌的 *dsdA* 基因编码的 D-Ser 解

氨酶(DSD, EC 4. 2. 1. 14) 能够将 D-型的丝氨酸降解为无毒的酮酸、水和铵, 从而解除这类 D-氨基酸对植物的毒性<sup>[5]</sup>, 因此, 该系统可以作为一种新型的正筛选体系。DSD 催化分解 D-丝氨酸和 D-苏氨酸的动力学参数稳定性表明该酶对催化底物具有特异性, 例如其催化 D-Ser 的 K<sub>m</sub> 值是 0. 086 mmol/L, 而催化 L-Ser 的 K<sub>m</sub> 值是 11. 04 mmol/L, 因此, DSD 仅仅对个别氨基酸有特异的作用, 这也就意味着 *dsdA* 作为筛选标记基因对植物体的内源氨基酸的影响很小。

来源于酵母的 *dao1* 基因编码 D-氨基酸氧化酶 DAAO<sup>[6-7]</sup>, 该酶可以催化一系列 D 型氨基酸的氧化脱氨过程。DAAO 是一种 D-氨基酸氧化脱氨酶, 它是研究得最多的 D-氨基酸代谢的途径之一, 目前在多种真核生物如真菌、酵母、昆虫、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳动物等发现 DAAO 代谢途径<sup>[8]</sup>, 但在植物中没有发现<sup>[9]</sup>。Erikson 等<sup>[5]</sup> 在 2004 年的研究中发现, D-Ala 与 D-Ser 在相对低的浓度时对植物是有毒的, 而 D-Val 和 D-Ile 即使是很高浓度对植物的生长影响也不大。与野生型植物相比, 转 *dao1* 基因的植株对 D-Val 和 D-Ile 是敏感的, 因此 *dao1* 也可以作为一个正筛选系统来检测转基因植

收稿日期: 2013-05-23

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31100945); 教育部博士点新教师项目(20110146120016)

张娟娟, 硕士研究生。研究方向: 水稻基因工程。E-mail: caoyuanzhimeng001@163.com

通信作者: 周菲, 博士, 副教授。研究方向: 水稻基因工程。E-mail: zhoufei@mail.hzau.edu.cn

物<sup>[7]</sup>。由于 *dao1* 这种独特的性质,既可以作为转基因植物的负向筛选系统又可以作为正向筛选系统,使其成为一种比较理想的筛选标记基因。

*D*-氨基酸酶可以作为解毒剂。日本一个研究小组于 1992 年发现人体血样中含 *D*-脯氨酸、*D*-丙氨酸、*D*-丝氨酸<sup>[10]</sup>。D'Aniello 等<sup>[11]</sup>在不同动物和人体的试验证明 *D*-型氨基酸在体内被肝、肾中的 *D*-氨基酸酶所氧化,产生  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;该研究还发现一些肾脏、肝脏疾病与体内 *D*-氨基酸的水平有关,动物实验表明 *D*-氨基酸能抑制动物的生长,阻断一些重要生理物质的合成,从而推断 *D*-氨基酸是一种有害物质,由胃、肠吸收进入肝、肾中,在这 2 种器官被 *D*-氨基酸氧化酶催化降解为无毒的物质;另外 D'Aniello 等<sup>[11]</sup>还发现 *D*-型氨基酸与 DAAO 之间逆相关,于是猜测 DAAO 在动物体内可能作为解毒剂来降解 *D*-氨基酸,使它们在机体生长过程中不会发生积聚。*D*-氨基酸在众多高等单子叶和双子叶植物中都存在<sup>[12]</sup>,利用植物内源表达基因作为筛选标记,将更加符合转基因生物安全性这一当前消费者极为关注的问题。本研究将人工合成的来自 *Escherichia coli* 的 *dsdA* 基因与来自 *Schizosaccharomyces pombe* 的 *dao1* 基因,通过农杆菌侵染方式转化到水稻品种中花 11 中,探讨 *dsdA*、*dao1* 两个新型筛选标记基因在水稻核转化中的应用,为其后续应用奠定工作基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 TOP10 和根癌农杆菌菌株 EHA105,为作物遗传改良国家重点实验室保存和提供。

转化载体 pCAMBIA1300NU (以下简称 p1300NU)由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室前辈改造自澳大利亚 CAMBIA (the Center of the Application of Molecular Biology to International Agriculture)。

转化受体为梗稻中花 11,原种由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室徐才国教授提供,种植于华中农业大学试验田。

### 1.2 转化载体的构建

*dsdA* 基因 (Gene ID:946837,1 351 bp)来源于大肠杆菌 K-12 菌株,*dao1* 基因 (CS811244,1 129 bp)来源于红冬孢酵母,对这 2 个基因的序列用密

码子偏爱性进行优化并去除基因内部的酶切位点,最后在基因的 5'端加 *Kpn* I 与 *Nde* I 酶切位点,在 3'端加 *Sac* I 与 *Xba* I 酶切位点,然后送至 TaKaRa 公司进行基因合成,将这 2 个基因合成至 pMD18-T Simple 载体中。

用 *Kpn* I 与 *Sac* I 从 pMD18-T Simple 载体中切取 *dsdA* 与 *dao1* 基因,并用同样的酶切 p1300NU 载体,经 DNA 连接酶连接。分别用 *Kpn* I / *Sac* I 和 *Bam*H I / *Sac* I 双酶切检测载体构建是否正确,酶切检测正确的由笔者所在实验室宋华珍老师测序验证,获得重组质粒 p1300NU-*dsdA* 与 p1300NU-*dao1*。将其转入农杆菌菌株 EHA105,制备成转化菌株。

### 1.3 根癌农杆菌介导的水稻遗传转化

将构建好的载体 p1300NU-*dsdA* 与 p1300NU-*dao1* 通过电转化法转入农杆菌中,以梗稻中花 11 成熟种子诱导产生的胚性愈伤组织为受体,用含 p1300NU-*dsdA*、p1300NU-*dao1* 根癌农杆菌的悬浮培养基侵染,共培养后用 50 mg/L 的潮霉素筛选 2 代得到抗性愈伤,经分化、生根后获得转化苗。水稻组织培养、农杆菌介导的遗传转化、抗性愈伤的筛选及植株再生等操作参照 Hiei 等<sup>[13]</sup>建立的梗稻高效遗传转化体系。

### 1.4 T<sub>0</sub>代转基因植株阳性检测

取三叶期转化植株的叶片,小量 DNA 抽提法提取基因组 DNA。用于转化再生植株阳性检测的 PCR 引物均为表达载体上筛选标记基因潮霉素磷酸转移酶基因 (*hpt*) 的内部引物,扩增产物大小为 794 bp。引物序列为: *hpt*-F: ATTTGTGTACGCCGACAGT;

*hpt*-R: GGATATGTCCTGCGGGTAAA。

### 1.5 T<sub>0</sub>代转基因植株拷贝数检测

对 PCR 检测为阳性的植株用 CTAB 法提取基因组总 DNA,总 DNA 上样量为 8  $\mu\text{g}$ ,用 *Hind*III 或 *Bam*H I 酶切,以 *hpt* 内部序列的 PCR 产物为杂交探针(引物同 PCR 阳性检测),鉴定单拷贝植株。杂交及检测方法采用同位素标记方法。

### 1.6 RNA 的抽提和表达量的检测

总 RNA 的抽提采用 TRIzol Reagent (Life Technologies, Gaithersbur Maryland, USA),按照试剂说明书操作;总 RNA 的反转录是利用 Super-script III reverse transcriptase (SSIII, Invitrogen),具体方法参照 SSIII 的使用说明以及笔者所在实验

室反转录实验操作方法,用去离子水将 20  $\mu\text{L}$  反转录产物稀释至 200  $\mu\text{L}$ 。分别通过 RT-PCR 与 Real-time 实时荧光定量 PCR 检测 *dsdA* 与 *dao1* 的表达量与相对表达量。取 2  $\mu\text{L}$  用于 RT-PCR 反应,利用 Real-time 实时荧光定量进行相对表达量检测,内参基因为 *actin*,采用 Roche 公司的试剂盒,引物为 RT-PCR 引物,操作参照试剂盒说明书。PCR 所用引物如表 1 所示。

表 1 PCR 检测引物序列  
Table 1 Primers sequences for PCR

目的基因 Target gene	引物名称 Primer	引物序列 Primers sequence
<i>dsdA</i>	RT <i>dsdA</i> -F	5'- TCATTGCTTCTTTGCTGAACCTAC-3'
	RT <i>dsdA</i> -R	5'- CCTTCTTCTTGAGCTAACCATCCT-3'
<i>dao1</i>	RT <i>dao1</i> -F	5'- TGGATTCTTCTGATCCTGCTTCTC-3'
	RT <i>dao1</i> -R	5'-GCTTCAACTCTAGGTCCTCTCT-3'
<i>actin</i>	actin-F	5'-CTGCAACTCAGAAGACCGTTG-3'
	actin-R	5'-CCTGTTGTCACCTGGAAGTC-3'

1.7 种子萌发试验

将野生型中花 11 的种子分别在含不同浓度(0、1、3、5、10、20、30 mmol/L)的 *D*-Ala 与 *D*-Ser 上萌发,萌发培养基为笔者所在实验室配制的梗稻生根

培养基配方。根据种子的萌发情况确定 2 种 *D*-型氨基酸的致死浓度;用确定好的致死浓度验证转化植株的萌发筛选,方法为:将转化 *dsdA* 片段获得的单拷贝  $T_0$  代种子分别在含潮霉素和含 *D*-Ala 的培养基上萌发,比较转化植株在这 2 种筛选底物上的萌发情况;将转化 *dao1* 片段获得的单拷贝  $T_0$  代种子分别在含潮霉素和含 *D*-Ser 的培养基上萌发,比较转化植株对这 2 种物质的抗性。

2 结果与分析

2.1 转化载体的构建

人工合成的经密码子优化后的 *dsdA* 基因大小为 1 351 bp, *dao1* 基因大小为 1 129 bp,经过 *Sac* I / *Kpn* I 构建到转化载体 p1300NU 中,获得 p1300NU-*dsdA* 和 p1300NU-*dao1* (图 1)。目的基因用 Ubiquitin 启动子启动,终止子为 Nos。由图 2 可知,经 *Kpn* I / *Sac* I 和 *Bam*H I / *Sac* I 双酶切验证, *dsdA* 及 *dao1* 基因片段大小均正确,同时基因测序结果显示序列完全正确,可用于后续的转变。

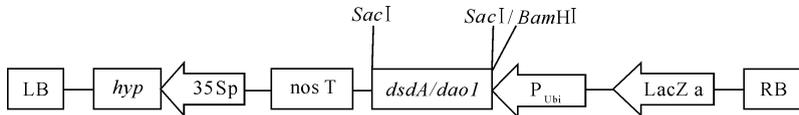
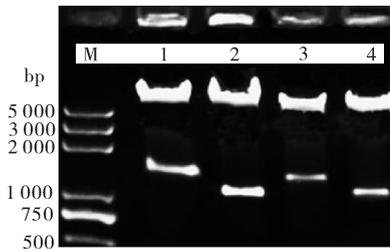


图 1 p1300NU-*dsdA* 和 p1300NU-*dao1* 的 T-DNA 区结构

Fig. 1 T-DNA structure of plasmid p1300NU-*dsdA* and p1300NU-*dao1*



M: DNA Marker; 1: p1300NU-*dsdA* (11.3 kb + 1.3 kb), *Sac* I / *Kpn* I; 2: p1300NU-*dao1* (11.3 kb + 1.1 kb), *Sac* I / *Kpn* I; 3: p1300NU-*dsdA* (11.3 kb + 1.3 kb), *Sac* I / *Bam*H I; 4: p1300NU-*dao1* (11.3 kb + 1.1 kb), *Sac* I / *Bam*H I.

图 2 载体酶切鉴定

Fig. 2 Identification of vector by the restriction enzyme digestion

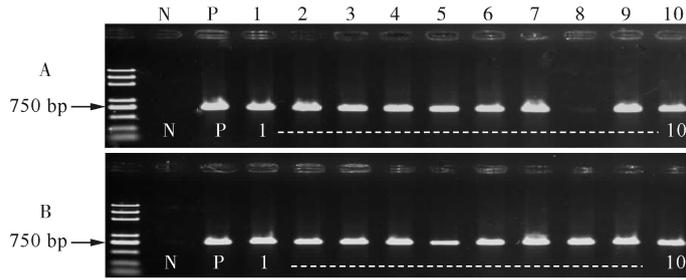
2.2  $T_0$  代转化植株的阳性检测

2 个目的基因片段经遗传转化、两轮筛选、分

化、生根后获得的转化植株,通过 PCR 的方法进行阳性检测(图 3),转化成功的植株有对应的扩增条带,而未转化成功的植株没有相应的条带, *dsdA* 片段获得 49 株转化苗,阳检结果显示有 38 株为阳性,阳性率为 77.6%; *dao1* 片段获得 48 株转化苗,阳检结果显示有 38 株为阳性,阳性率为 79.2%。

2.3  $T_0$  代植株的拷贝数检测

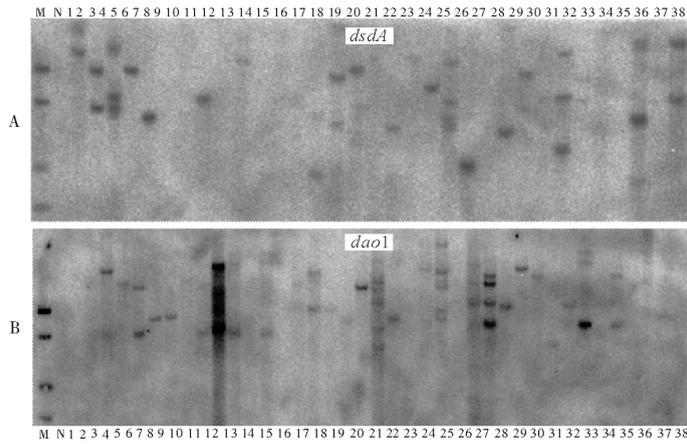
对 PCR 检测阳性植株提取基因组 DNA,用 *Hind* III 酶切基因组 DNA, Southern blotting 杂交结果显示转基因阳性植株有 1 到数条特异的杂交条带(图 4)。挑取单拷贝以及看不清楚的植株 (*dsdA* 有 13 株, *dao1* 有 12 株) 将其 DNA 用 *Bam*H I 酶切,再次做 Southern blotting 杂交以确保单拷贝的准确性。最终转 *dsdA* 的获得 7 个单拷贝,转 *dao1* 的获得 6 个单拷贝植株(图 5)。



A: 转化 p1300NU-dsdA 获得的部分 T<sub>0</sub> 代植株 PCR 鉴定 The part of T<sub>0</sub> generation plants which transformed p1300NU-dsdA were identified by PCR; B: 转化 p1300NU-dao1 获得的部分 T<sub>0</sub> 代植株 PCR 鉴定 The part of T<sub>0</sub> generation plants which transformed p1300NU-dao1 were identified by PCR; N: 阴性对照 Negative control; P: 阳性对照 Positive control; 1~10: 转化植株 Transgenic plants.

### 图 3 转基因植株的 PCR 鉴定

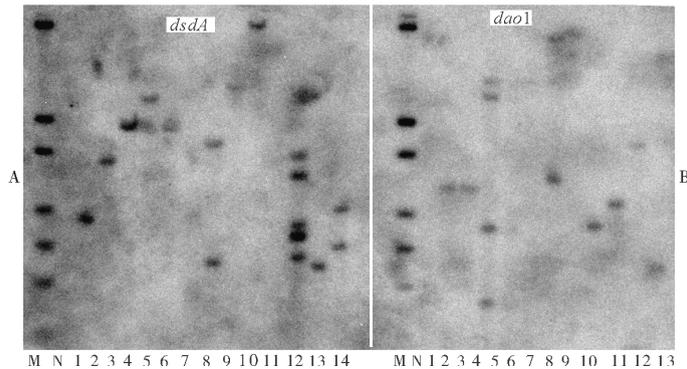
Fig. 3 Identification of the transgenic plants by PCR



A: 转化 *dsdA* 片段 T<sub>0</sub> 代植株 DNA 的 Southern 杂交扫描图 (*Hind* III 酶切) The Southern hybridization scan of T<sub>0</sub> transgenic plants which transformed *dsdA* gene (*Hind* III digested); B: 转化 *dao1* 片段 T<sub>0</sub> 代植株 DNA 的 Southern 杂交扫描图 (*Hind* III 酶切) The Southern hybridization scan of T<sub>0</sub> transgenic plants which transformed *dao1* gene (*Hind* III digested); M: DNA marker; N: 阴性对照 Negative control; 1~38: 转化植株 Transgenic plants.

### 图 4 转基因植株的 Southern blotting 分析 (*Hind* III 酶切)

Fig. 4 Southern blotting analyses of transgenic plants (*Hind* III digested)



A: 转化 *dsdA* 片段 T<sub>0</sub> 代植株 DNA 的 Southern 杂交扫描图 (*Bam*H I 酶切) The Southern hybridization scan of T<sub>0</sub> transgenic plants which transformed *dsdA* gene (*Bam*H I digested); B: 转化 *dao1* 片段 T<sub>0</sub> 代植株 DNA 的 Southern 杂交扫描图 (*Bam*H I 酶切) The Southern hybridization scan of T<sub>0</sub> transgenic plants which transformed *dao1* gene (*Bam*H I digested); M: DNA marker; N: 阴性对照 Negative control; 1~14(A)/ 1~13(B): 转化植株 Transgenic plants.

### 图 5 单拷贝转化植株 Southern blotting 分析 (*Bam*H I 酶切)

Fig. 5 Southern blotting analyses of single copy transgenic plants (*Bam*H I digested)

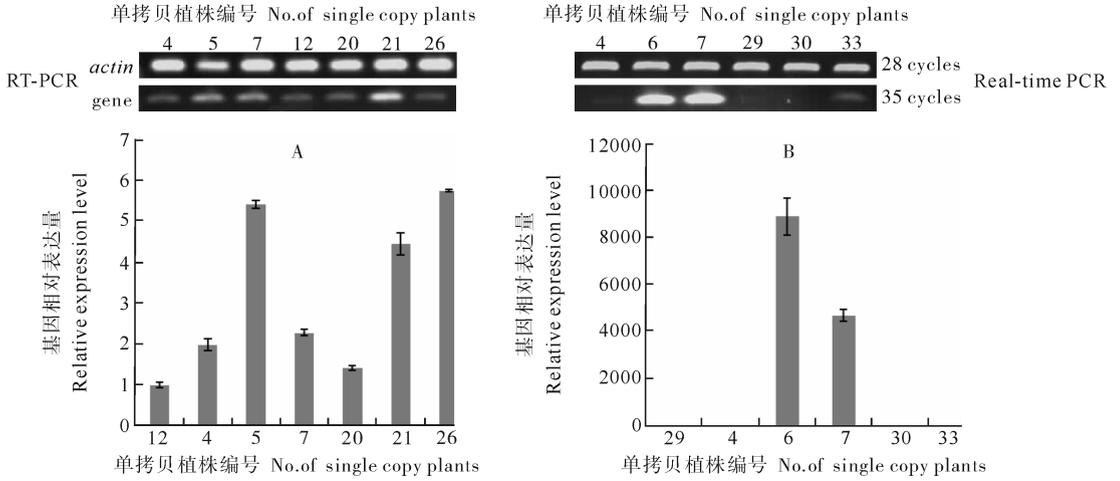
### 2.4 T<sub>0</sub>代单拷贝植株表达量检测

根据 Southern blotting 分析的结果,取单拷贝植株叶片抽提 RNA,分别通过 RT-PCR 与 Real-time 实时荧光定量 PCR 检测 *dsdA* 与 *dao1* 的表达量与相对表达量,其中内参基因为 *actin*。RT-PCR 时 *actin* 扩增 28 个循环,基因扩增 35 个循环;Real-time 实时荧光定量 PCR 分析时,*dsdA* 基因相对表达量以表达量最低的 12 号植株作为对照,*dao1* 基因相对表达量以表达量最低的 29 号植株作为对照。

结果(图 6)表明, *dsdA* 基因的表达量偏低,*dao1* 基因有 2 个植株(编号为 6,7)的表达量显著。

### 2.5 种子萌发试验结果

萌发测试结果(图 7)表明:水稻种子能够吸收 *D*-氨基酸, *D*-Ala 和 *D*-Ser 能够作为筛选试剂; *D*-Ala 浓度为 20 mmol/L 时,能够抑制种子的萌发,子叶为白色; *D*-Ser 浓度为 10 mmol/L 时,能抑制种子的萌发,且子叶为黄色。



A:转化 *dsdA* 片段的单拷贝植株基因表达量 Expression levels of single copy transgenic plants which transformed *dsdA* gene; B:转化 *dao1* 片段的单拷贝植株基因表达量 Expression levels of single copy transgenic plants which transformed *dao1* gene.

图 6 单拷贝植株基因表达量检测

Fig. 6 Expression levels of single copy transgenic plants

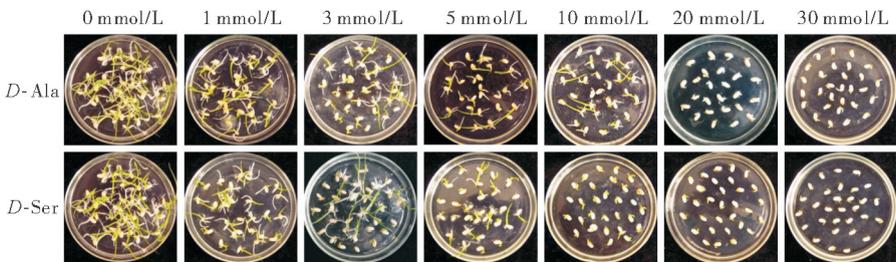


图 7 野生型中花 11 的种子在不同浓度的 *D*-Ala, *D*-Ser 培养基上的萌发状态(7 d)

Fig. 7 Growth of Zhong 11 in different concentrations of *D*-Ala, *D*-Ser medium(7 d)

转化 *dsdA* 片段获得的单拷贝转化植株 T<sub>0</sub>代种子分别在含 50 mg/L 潮霉素和 10 mmol/L *D*-Ser 的培养基上培养,萌发 7 d 的生长状况检测结果(图 8)显示,编号为 5、7、26 的转化植株既能在含 50 mg/L 潮霉素的培养基上萌发,也能在含 10 mmol/L *D*-Ser 的培养基上萌发,显示其对 *D*-Ser 有一定抗性。

转化 *dao1* 片段获得的单拷贝转化植株 T<sub>0</sub>代种子分别在含 50 mg/L 潮霉素和 20 mmol/L *D*-Ala 的培养基上培养,萌发 7 d 的生长状况检测结果(图 9)显示,其中编号为 6、7、30 的转化植株既能在含 50 mg/L 潮霉素的培养基上萌发,也能在含 20 mmol/L *D*-Ala 的培养基上萌发,显示其对 *D*-Ala 具有明显抗性。

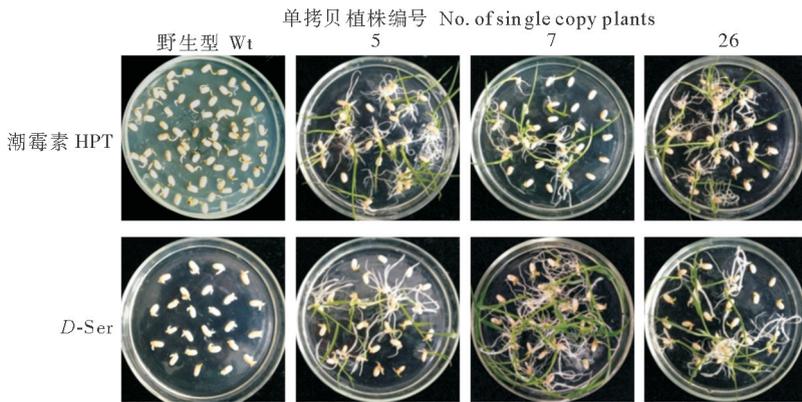


图 8 转化 *dsdA* 片段获得的单拷贝植株  $T_0$  代种子在含潮霉素和 *D-Ser* 培养基上的萌发状态

Fig. 8 Resistance analysis of the single copy transgenic plants (*dsdA*) to hygromycin or *D-Ser*, respectively (7 days post germination)

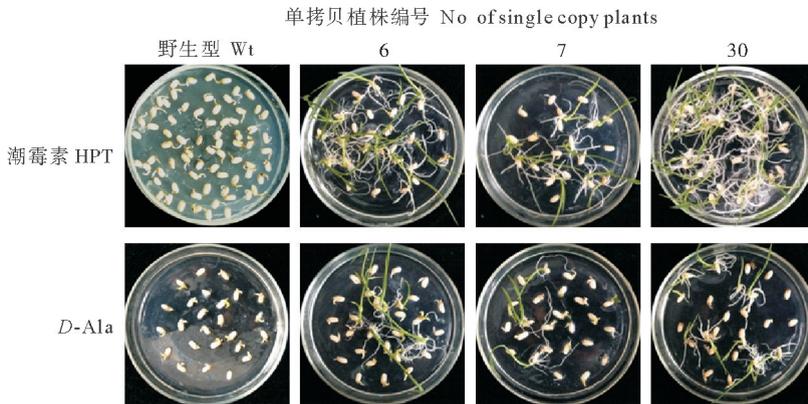


图 9 转化 *dao1* 片段获得的单拷贝植株  $T_0$  代种子在含潮霉素和 *D-Ala* 培养基上的萌发状态

Fig. 9 Resistance analysis of the single copy transgenic plants (*dao1*) to hygromycin or *D-Ala*, respectively (7 days post germination)

### 3 讨论

水稻作为全球重要的农作物之一,其单位产量的提高将是世界粮食安全的有利保障,因此利用转基因技术研究水稻基因功能并在分子育种中应用乃大势所趋。尽管目前水稻的核转化体系基本成熟,但是可以运用的筛选标记基因多为抗生素抗性基因,如抗潮霉素的 *hygromycin*;或是耐除草剂基因 (*bar, espes*),可供选择性小,且在生物安全性上存在一定的隐患。更为遗憾的是,尽管叶绿体转化体系具有可以高效表达目的基因及由于母系遗传而避免由于花粉传播带来的基因飘逸的生物安全性问题等诸多优越性<sup>[14]</sup>,其在烟草、西红柿等双子叶植物中得到了极大的应用<sup>[15]</sup>,但到目前为止单子叶植物

的质体转化技术仍不成熟。至今,世界上只有 3 篇关于水稻质体转化的报道<sup>[16-18]</sup>,其转化效率非常低,且所得到的转化植株是异质体植株,尚未达到同质化。其中一个重要的原因就是缺少一个有效的筛选系统且可选用的筛选标记有限,尤其是缺少一种可以适用所有植物物种转化的筛选标记基因,这已经成为扩展植物质体转化技术发展的重要的技术问题之一。

*dsdA*、*dao1*/*D*-氨基酸筛选系统植物转化体系具有多种优越性,目前这 2 个筛选标记基因在拟南芥的核转化<sup>[7]</sup>以及烟草的叶绿体转化<sup>[19]</sup>中已有报道。Erikson 等<sup>[7]</sup>将 *dsdA* 基因通过农杆菌侵染转化到拟南芥中,用 3 mmol/L 的 *D-Ala* 进行筛选获得转化植株,其筛选效率与用卡那霉素筛选的差不

多,且相对稍高;该研究中还发现该筛选系统不会对拟南芥的生长产生负面影响,这是用卡那霉素筛选时无法避免的。Gisby 等<sup>[19]</sup>将来源于 *Schizosaccharomyces pombe* 的 *dao1* 基因构建到含有 *aadA* 筛选标记基因的 pUM20 载体上,通过基因枪转化整合到烟草叶绿体基因组中,然后用壮观霉素筛选获得 4 株达到同质化的转化植株。转化植株的叶片在含 2.5 mmol/L *D*-Ala 的 RMOP 培养基上能正常生长,在含 6 mmol/L *D*-Val 的 RMOP 培养基上不能生长发育,然而野生型的叶片正好相反。野生型与转化植株的 T<sub>1</sub> 代种子在含 *D*-Ala 与 *D*-Ser 的 RM 培养基上萌发时获得类似的结果,该研究表明 *dao1* 基因可以用于叶绿体转基因工程中,同时既可以作为正向筛选来获得转化植株又可以作为负向筛选来管理转化植株。

本研究用 *D*-氨基酸确定筛选浓度时发现水稻愈伤组织对 *D*-Ala 与 *D*-Ser 有自身抗性,2 种氨基酸浓度在 25 mmol/L 以下时,水稻愈伤组织在筛选培养基上生长 1 个月,大部分能正常生长并长出新的愈伤,少部分发生褐化但仍能长出新的愈伤。当浓度提高 1 倍,达到 50 mmol/L 时,筛选培养基上生长 30 d 的愈伤仍跟 25 mmol/L 的生长情况差不多。然而,在确定 *D*-氨基酸对烟草叶片的筛选浓度时,结果显示,烟草叶片对 *D*-Ala 很敏感,浓度为 1 mmol/L 时,有些叶片就不能诱导出愈伤,最适筛选浓度为 5 mmol/L;而 *D*-Ser 的最适筛选浓度为 25 mmol/L。由此可以推断,水稻愈伤组织对这 2 种 *D*-型氨基酸不敏感,所以该筛选系统或不能用于以水稻愈伤组织为受体的遗传转化,但该筛选系统可以应用到以叶片为转化受体的水稻叶绿体转基因系统中。

本研究中, *dsdA* 基因的表达量检测结果显示该基因的表达量不高,由于该基因由组成型启动子 Ubiquitin 来启动,理论上翻译的 *D*-氨基酸解氨酶(DSD)也不多,然而有 3 个单拷贝植株的种子都能在含 *D*-Ser 的培养基上萌发,因此可以认为该体系中 DSD 酶不需要高量表达即能够起到解毒作用,应用前景广阔。

本研究初步探索了 *dsdA* 和 *dao1* 在水稻核转化中的应用,表明这 2 个新型筛选标记基因可以被运用到水稻核转化体系中,用于正向筛选。由于 *D*-型氨基酸在众多高等单子叶和双子叶植物中都存在<sup>[12]</sup>,没有植物种类的限制,既可作为植物核基因

遗传转化的筛选标记又可作为质体基因遗传转化的筛选标记<sup>[5,7,19]</sup>。由于水稻的质体转化体系尚不成熟,本研究通过农杆菌侵染的方式将 *dsdA/dao1* 整合到水稻核基因组, T<sub>1</sub> 代转化植株表型与野生型相比没有出现明显的变异,说明该筛选系统同样可以用水稻的质体转化中,相信随着科研工作者的不懈努力,在不久的将来 *dsdA*、*dao1* 会得到广泛的应用。

## 参 考 文 献

- [1] BEVAN M W, FLAVELL R B, CHILTON M. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation[J]. *Nature*, 1983, 304: 184-187.
- [2] ORRITZ J P A, REGGIARDO M, RAVIZZINI R, et al. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15 (12): 877-881.
- [3] THOMPSON C, MOVVA N R, TIZARD R, et al. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus* [J]. *The EMBO Journal*, 1987, 6 (9): 2519-2523.
- [4] JAIWAL P, SAHOO L, SINGH N D, et al. Strategies to deal with the concern about marker genes in transgenic plants: some environment-friendly approaches [J]. *Current Science*, 2002, 83(2): 128-136.
- [5] ERIKSON O, HERTZBER G M, NASHOLM T. The *dsdA* gene from *Escherichia coli* provides a novel selectable marker for plant transformation[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57 (3): 425-433.
- [6] FEDERIUK C, BAYER R, SHAFER J. Characterization of the catalytic pathway for *D*-serine dehydratase: evidence for variation of the rate-determining step with substrate structure[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258(9): 5379-5385.
- [7] ERIKSON O, HERTZBER G, NASHOLM T. A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(4): 455-458.
- [8] FRIEDMAN M. Chemistry, nutrition, and microbiology of *D*-amino acids[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(9): 3457-3479.
- [9] PILONE M. *D*-amino acid oxidase: new findings[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, 57(12): 1732-1747.
- [10] NAGATA Y, MASUI R, AKINO T. The presence of free *D*-serine, *D*-alanine and *D*-proline in human plasma[J]. *Experientia*, 1992, 48(10): 986-988.
- [11] D'ANILLO A, D'ONOFRIO G, PISCHETOLA M, et al. Biological role of *D*-amino acid oxidase and *D*-aspartate oxidase: effects of *D*-amino acids[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(36): 26941-26949.

- [12] BRUCKNER H, WESTHAUSER T. Chromatographic determination of *L*- and *D*-amino acids in plants[J]. *Amino Acids*, 2003, 24(1): 43-55.
- [13] HIEI Y, OHTA S, KOMARI T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *The Plant Journal*, 1994, 6(2): 271-282.
- [14] BOCK R. Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(2): 100-106.
- [15] RUF S, HERMANN M, BERGER I J, et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(9): 870-875.
- [16] KHAN M S, MALIGA P. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(9): 910-915.
- [17] LEE S, KANG K, CHUNG H, et al. Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny[J]. *Molecules and Cells*, 2006, 21(3): 401-410.
- [18] 李轶女, 孙丙耀, 苏宁, 等. 水稻叶绿体表达体系的建立及抗PPT叶绿体转化植株的获得[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(9): 1849-1855.
- [19] GISBY M F, MUDD E A, DAY A. Growth of transplastomic cells expressing *D*-amino acid oxidase in chloroplasts is tolerant to *D*-alanine and inhibited by *D*-valine[J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(4): 2219-2226.

## Identification and application of new selectable marker genes for rice nuclear transformation

ZHANG Juan-juan LIN Yong-jun ZHOU Fei

*National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement /  
National Center of Plant Gene Research (Wuhan),  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** Two new selectable marker gene *dsdA* and *dao1* from *Escherichia coli* and *Schizosaccharomyces* were synthesized by codon-optimization, and then transformed into japonica rice cultivar zhonghua 11 through *Agrobacterium* mediated gene transformation. Southern hybridization of the DNA transformants showed that 7 single-copy plants of *dsdA* gene and 6 single-copy plants of *dao1* gene were obtained. Results of detecting expression levels of the single-copy transformants and the germination tests of  $T_0$  generation seeds showed that there were two single-copy gene transformants (numbered as 6 and 7) of *dao1* gene, indicating high expression levels and consistent with seed germination testing on *D*-Ala. In all single-copy transformants of *dsdA* gene, the expression levels of *dsdA* were relatively low. Test of seed germination showed that there was the resistance to *D*-Ser. This study initially explored the application of *dsdA*, *dao1* as new selectable marker genes for rice nuclear transformation, and will lay the foundation for its extensive applications.

**Key words** rice; transgene; selectable marker genes; *D*-amino acid; biosafety

(责任编辑:张志钰)