

利用酵母磷酸甘露糖异构酶基因 作为拟南芥遗传转化的筛选标记

王涛¹ 唐永严² 刘良玉² 张美冬¹ 郑用琰¹ 张方东²

1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

摘要 利用 PCR 反应克隆来自酿酒酵母的磷酸甘露糖异构酶(PMI)基因 *pmi*, 通过农杆菌介导的花序侵染法将 PMI 的基因导入受体拟南芥中, 将转化后的拟南芥种子放在质量浓度为 1 g/L 的甘露糖 MS 培养基上进行筛选培养, 共得到抗性拟南芥植株 4 株。PCR 反应证明酵母 PMI 的基因 *pmi* 已经整合到拟南芥基因组中, RT-PCR 检测证明该基因的内含子能够在拟南芥中被正确剪切, 同时通过 GUS 化学组织染色方法证明了伴随转化的 GUS 基因 *gus* 在拟南芥中得以表达, 以上研究结果说明酵母 PMI/甘露糖系统可以作为拟南芥遗传转化的筛选标记。

关键词 磷酸甘露糖异构酶; 遗传转化; 选择标记; 酵母; 拟南芥

中图分类号 S 511.032 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)05-0541-06

植物基因遗传转化的关键环节之一在于用合适的选择标记基因把极少数的转化子从未转化细胞中筛选出来, 或者是杀死未转化细胞, 或者是给转化细胞以生长优势, 或者使之有明显的表型特征。通常所利用的选择标记基因有潮霉素抗性基因 *hpt*、卡那霉素抗性基因 *npt II*、除草剂抗性基因 *bar*, 这些筛选系统的原理都是未转化细胞被杀死, 转化细胞能将筛选剂分解为无毒物质而得以生存繁殖。但这些筛选系统由于使用抗生素或除草剂及其基因, 已经引起了社会的广泛争议。为了消除这种不利影响, 目前采取的方法有消除选择标记基因, 包括利用共转化系统、位点重组系统、 λ 噬菌体插入/切割系统, 以及转座子转座消除选择标记基因^[1]; 另外的思路是使用安全选择标记基因, 主要有绿色荧光蛋白基因 *gfp*、核糖醇操纵子 *rtl*、磷酸甘露糖异构酶(phosphomannose isomerase, PMI)基因 *pmi*、木糖异构酶基因 *xyl A* 和谷氨酸-1-半醛转氨酶基因 *hemI*^[2], 这些基因一般都编码生物的代谢酶类, 性质明确, 功能清楚。

磷酸甘露糖异构酶(EC. 5. 3. 1. 8)基因 *pmi* 是最近发展起来的一种正向选择标记基因。自然界中 PMI 的基因广泛存在于细菌、酵母、动物和人类。在植物中除了肉桂和其他一些豆科植物外, 都没有

PMI 的基因^[3], 因此, PMI 基因可以作为选择标记应用于植物基因转化。

磷酸甘露糖异构酶基因作为选择标记基因自从在甜菜^[4]中获得成功以来, 已经应用于拟南芥^[5]、水稻^[6]、玉米^[7]、小麦^[8-9]、高粱^[10]、甘蔗^[11]、番茄^[12]等。但是, 以上研究中所用的磷酸甘露糖异构酶基因都是来自于大肠杆菌, 目前还没有利用酿酒酵母的磷酸甘露糖异构酶基因作为拟南芥等植物遗传转化的筛选标记的报道。本研究旨在克隆来源于酿酒酵母的 PMI 基因 *pmi*, 希望利用该基因作为植物遗传转化的筛选标记基因。

1 材料与方法

1.1 试验材料

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株由华中农业大学生命科学技术学院郝勃老师提供, 农杆菌 EHA105 由华中农业大学生命科学技术学院林拥军教授提供, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) N3081(Nossen 生态型)和质粒 pCAMBIA1303 由笔者所在实验室保存。

1.2 试验方法

1) 酿酒酵母 *pmi* 的 PCR 克隆。酵母 DNA 提取参照周小玲等^[13]的方法。根据基因库中酵母

收稿日期: 2011-05-24

基金项目: 国家转基因专项高产转基因玉米新品种培育(2008ZX08003-003)

王涛, 硕士研究生, 研究方向: 植物遗传转化。E-mail: wt2915@163.com

通讯作者: 张方东, 博士, 副教授, 研究方向: 植物遗传转化。E-mail: fdzhang@mail.hzau.edu.cn

pmi 序列 M85238 设计引物,在引物的 5' 端加有 *Xho* I 酶切位点。

上游引物 P1: 5'-GCCTCGAGCCAGAAAATTTTA-AAAACATG-3',

下游引物 P2: 5'-GCCTCGAGATAGAAAAGAAAGCTA-ATTTGG-3'

PCR 扩增程序为: 94 °C 2 min 预变性; 94 °C 30 s 变性, 56 °C 45 s 退火, 72 °C 90 s 延伸, 20 个循环; 72 °C 5 min 保温。将 PCR 产物连接到 pGEM-T 载体 (Promega) 上, 测序由北京奥科公司完成。

2) pPMI 载体的构建。质粒载体 pCAMBIA1303 经限制性内切酶 *Xho*I 酶切纯化质粒, 以切除潮霉素抗性基因。本文“1.2”1) 中的 PCR 产物同样用 *Xho* I 酶切, 产生粘性末端。按 pCAMBIA1303 质粒酶切产物 1 μ L、PCR 酶切产物 3 μ L、T4 DNA 连接酶 (Promega) 0.5 μ L、10 \times buffer 0.5 μ L, 16 °C 连接过夜。1 μ L 连接产物与 50 μ L 大肠杆菌 DH10B 电转化感受态混合, 设置电转化仪电压为 1 800 V, 电击。加入 800 μ L SOC 溶液, 混合后放于 37 °C 保温 5 min, 再在 37 °C 缓慢振荡恢复培养 45~60 min。取 100 μ L 培养物涂在含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 放于 37 °C 烘箱倒置培养 12~16 h。挑取菌斑接种于 500 μ L 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养液中, 37 °C 150 r/min 过夜培养。以 1 mL 菌液为模板, 用引物 P1、P2 检测酵母 *pmi* 是否插入, 用引物 P3: 5'-CCCTTATCTGGGAAC-TACTC-3' 和 P4: 5'-TTCGACAGGTCCTCTGGT-3' 检测插入的方向。引物 P3 设计在载体 pCAMBIA1303 上, 引物 P4 设计在 *pmi* 上, 两引物之间片段大小为 400 bp。培养并保存插入方向正确的克隆。将构建好的载体 (见图 1) 通过电转化导入农杆菌 EHA105。

3) 拟南芥植株的培养。将拟南芥种子装入 1.5 mL 的离心管中, 加少量水湿润, 放于 4 °C 冰箱中处理 3 d。随后先用 75% 的乙醇浸泡种子 5~10 min, 并不停地颠倒混匀, 再用无菌水冲洗 5 遍。将无菌种子播种于无菌滤纸上, (23 °C、16 h)/(18 °C、8 h) 长日照培养。种子发芽 2~3 d 后, 将幼苗移栽到 Hoagland 营养液中, 用海绵固定, (23 °C、8 h)/(18 °C、12 h) 短日照培养。等主花序长到 3~10 cm 时, 从基部剪去主花序, 促进侧枝生长, 1 周后用于转化。

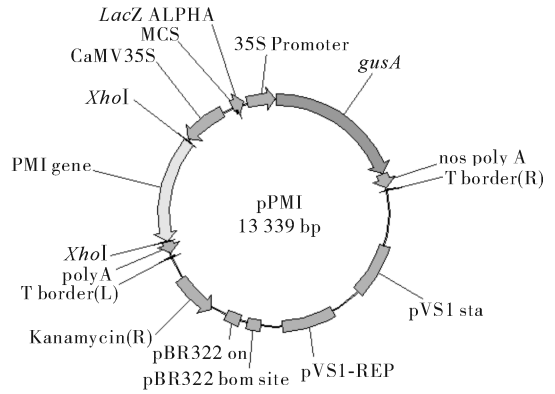


图 1 转化质粒 pPMI 示意图

Fig. 1 The schematic diagram of pPMI transformation vector

4) 拟南芥植株的转化。花序浸染法主要参照 Clough 等^[14]的方法。每隔 1 周浸染 1 次, 共浸染 3 次。农杆菌 $D_{600\text{nm}}$ 值为 0.8, 侵染时间为 10 s, 侵染 4 周后收集成熟的拟南芥种子。

5) 转化子的筛选。拟南芥种子先用 75% 的乙醇浸泡 5 min, 再用 5% 次氯酸钠水溶液浸泡 5 min, 然后用无菌水冲洗 5 次, 放在 4 °C 冰箱中处理 3 d。用 0.1% 的琼脂糖悬浮种子, 播种于甘露糖质量浓度为 1 g/L 的筛选 MS 培养基上, 在 (23 °C、16 h)/(18 °C、8 h) 长日照的培养箱中培养。2 周之后将转基因植株移栽到 Hoagland 营养液中, 培养方法同上。

6) 拟南芥转化植株的检测。分别采用 CTAB 法和 Trizol 法提取抗性拟南芥植株叶片的基因组 DNA 和总 RNA, 采用 TOYOBO 试剂盒 First strand cDNA synthesis Kit 进行 RNA 反转录, 得到 cDNA, 使用引物 P1、P2 分别对基因组 DNA 和 cDNA 进行扩增检测。叶片的 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 染色配方参见文献^[15]。

2 结果与分析

2.1 酵母 *pmi* PCR 克隆及测序

利用引物 P1、P2, 以酵母总 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增得到了约 1.5 kb 的特异性条带, 与酵母 *pmi* 的实际大小相符合。测序结果 (图 2) 进一步证明了得到的扩增序列确实是酵母 *pmi*^[16]。与公布的序列 AAA34872 相比存在 99.4% 的同源性。共有 9 个与公布序列不一致的碱基, 其中 8 个存在于外显子, 1 个存在于内含子。这些变

化没有导致阅读框的改变。蛋白质氨基酸与公布序列不一致的共有 4 个,分别是第 15 位的氨基酸由非解离极性氨基酸 Y(酪氨酸)变为非解离极性氨基酸 S(丝氨酸),第 25 位由碱性氨基酸 R(精氨酸)变为非极性氨基酸 A(丙氨酸),第 141 位由非极性氨基

酸 V(缬氨酸)变为酸性氨基酸 E(谷氨酸),第 214 位由碱性氨基酸 K(赖氨酸)变为酸性氨基酸 E(谷氨酸)。从最终的结果来看,这些氨基酸的变化没有使 PMI 酶的活性丧失,其序列的差异可能与不同的酵母菌株有关。

Pmi01	9	CCAGAAAATTTAAAAACATGTCACCAAGCTGTTCCAGGTTAGATCCAGGTATGTGCCATT	68
PMI40	312	CCAGAAAATTTAAAAACATGTCACCAAGCTGTTCCAGGTTAGATCCAGGTATGTGCCATT	371
Pmi01	69	TTTCGTCAAAATATTTGAATACITTCAGTATTTTTTTTTTTTTTTGGTACACTAACT	127
PMI40	372	TTTCGTCAAAATATTTGAATACITTCAGTATTTTTTTTTTTTTTTGGTACACTAACT	431
Pmi01	128	AACGGGTACGACTCTATGTAGGCTACCAACAATTCGACTGGGGTAAAAATCGGCTCTCTCT	187
PMI40	432	AACGGGTACGACTCTATGTAGGCTACCAACAATTCGACTGGGGTAAAAATCGGCTCTCTCT	491
Pmi01	188	CATGTCGCGTCAATTTGCTGCCCATCTCGACCCCTCTGTGTCAAAATGGAACAAGATAAAC	247
PMI40	492	CATGTCGCGTCAATTTGCTGCCCATCTCGACCCCTCTGTGTCAAAATGGAACAAGATAAAC	551
Pmi01	248	CATATGCAGAGTTATGGATGGGTAACCCACAGCAAGATGCCCTTCCTACAACCATGAGTCTA	307
PMI40	552	CATATGCAGAGTTATGGATGGGTAACCCACAGCAAGATGCCCTTCCTACAACCATGAGTCTA	611
Pmi01	308	AGGAAATCCCTGAGAGATAATCATCTCCAAAGAACCCCTCTGCCATGTTAGGTAAAGGACATTA	367
PMI40	612	AGGAAATCCCTGAGAGATAATCATCTCCAAAGAACCCCTCTGCCATGTTAGGTAAAGGACATTA	671
Pmi01	368	TTGATAAGTTCCHCGCCACAAAATGAAATGCCCCCTCTCTTTTCAAAGTTTGTGTCATGAAA	427
PMI40	672	TTGATAAGTTCCHCGCCACAAAATGAAATGCCCCCTCTCTTTTCAAAGTTTGTGTCATGAAA	731
Pmi01	428	AAGTCTTGTCTATTCGAAGCACATCCCGACAAACCCCTTGGGTAAAAATATTGCACGCTCAAG	487
PMI40	732	AAGTCTTGTCTATTCGAAGCACATCCCGACAAACCCCTTGGGTAAAAATATTGCACGCTCAAG	79
Pmi01	488	ATCCTAAGAAGTATCTCTGATGATATTCACAAACCTTGAAAATGGCCATCGCTGIGACTGACT	547
PMI40	792	ATCCTAAGAAGTATCTCTGATGATATTCACAAACCTTGAAAATGGCCATCGCTGIGACTGACT	851
Pmi01	548	TTGAAAGTTCCTGCGGGTTCGAAACCTTTGCAAGAGATTCGAGATGAATTTGAAACGTAATC	607
PMI40	852	TTGAAAGTTCCTGCGGGTTCGAAACCTTTGCAAGAGATTCGAGATGAATTTGAAACGTAATC	911
Pmi01	608	CTGAAATACGCAACATTTGTTGGTGAAGAAAACCTCCAGGAAATTTATTTGAGAAACATTCAC	667
PMI40	912	CTGAAATACGCAACATTTGTTGGTGAAGAAAACCTCCAGGAAATTTATTTGAGAAACATTCAC	971
Pmi01	688	CTTCTGCTCAGAAAAGTTCCTCCAGAAAGATGAGCAAAAACAAAAGCTATTGCCAAGCTGTTT	727
PMI40	972	CTTCTGCTCAGAAAAGTTCCTCCAGAAAGATGAGCAAAAACAAAAGCTATTGCCAAGCTGTTT	1 031
Pmi01	728	TCAGCAGGGTTCATGAACGCTTCGGATGACATAAATCAAGATTCAGCTCCGCTCCCTGGCTG	787
PMI40	1 032	TCAGCAGGGTTCATGAACGCTTCGGATGACATAAATCAAGATTCAGCTCCGCTCCCTGGCTG	1 091
Pmi01	788	AAAGATCAAGAAATTCCTCCATCAGACTTTAAACAAACCTGATTTACCGAATTAATTCAAA	847
PMI40	1 092	AAAGATCAAGAAATTCCTCCATCAGACTTTAAACAAACCTGATTTACCGAATTAATTCAAA	1 151
Pmi01	848	GACTGAATAAACACAGTTCCTCGAIGACGTGGGTTTGTGTTTGTGGATGTTATGTTGTAATC	907
PMI40	1 152	GACTGAATAAACACAGTTCCTCGAIGACGTGGGTTTGTGTTTGTGGATGTTATGTTGTAATC	1 211
Pmi01	908	ACTGCAGATTGAAATGCTGGTGAAGCCATCTTTTTAAGAGCTAAGGATCCCTACGCCCTATA	967
PMI40	1 212	ACTGCAGATTGAAATGCTGGTGAAGCCATCTTTTTAAGAGCTAAGGATCCCTACGCCCTATA	1 271
Pmi01	968	TAAGCCGGTATATTTATGGAATGATGCGTCTCTTCGACAAAGTATGAGGACAGGCTTCA	1 027
PMI40	1 272	TAAGCCGGTATATTTATGGAATGATGCGTCTCTTCGACAAAGTATGAGGACAGGCTTCA	1 331
Pmi01	1 028	CTCCAAAATTCAGGATGTTAAAAACTTGGTTCCTCATGTTAACCTATACATATGATCCCTG	1 087
PMI40	1 332	CTCCAAAATTCAGGATGTTAAAAACTTGGTTCCTCATGTTAACCTATACATATGATCCCTG	1 391
Pmi01	1 088	TGGAAAAGCAAAAAATGACGCCITTAAGTTCGACAGGTCCTCTGTTAACGGTAAAGTCAG	1 147
PMI40	1 392	TGGAAAAGCAAAAAATGACGCCITTAAGTTCGACAGGTCCTCTGTTAACGGTAAAGTCAG	1 451
Pmi01	1 148	TTTTATATACCCCTCCAAATCGAAGAAATTTGCTGATTTGGAGACTACTTTTGTGAGAAAAC	1 207
PMI40	1 452	TTTTATATACCCCTCCAAATCGAAGAAATTTGCTGATTTGGAGACTACTTTTGTGAGAAAAC	1 511
Pmi01	1 208	TTGGTCAAAAGGCATTTTGAAGGIGTTGATGGTCCAAAGTATCTTAAATCATTACAAAAGGTA	1 267
PMI40	1 512	TTGGTCAAAAGGCATTTTGAAGGIGTTGATGGTCCAAAGTATCTTAAATCATTACAAAAGGTA	1 571
Pmi01	1 268	ATGGTTACATTAAGACAGATGGCCAAAAATTTGAAAGCTGAACCCGGTITTTGCTTTTTC	1 327
PMI40	1 572	ATGGTTACATTAAGACAGATGGCCAAAAATTTGAAAGCTGAACCCGGTITTTGCTTTTTC	1 631
Pmi01	1 328	TGCTCCACATTTGCTGTTGATTTGGAAGCTGAAGATGAGGCGTTTACTACCTATAGAG	1 387
PMI40	1 632	TGCTCCACATTTGCTGTTGATTTGGAAGCTGAAGATGAGGCGTTTACTACCTATAGAG	1 691
Pmi01	1 388	CCITTTGGAAACCAAAATAGCTTCTTTCTAT	1 419
PMI40	1 692	CCITTTGGAAACCAAAATAGCTTCTTTCTAT	1 723

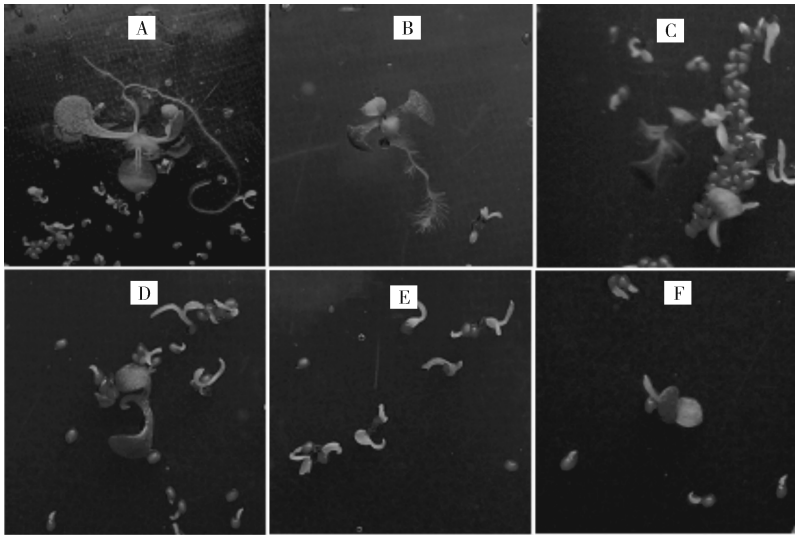
图 2 酵母 *pmi* 测序结果(Pmi01)与 NCBI 数据库中的 PMI40(登记号:M85238)核苷酸比对结果(差异核苷酸用方框标明)

Fig. 2 The result(Pmi01) of the sequencing of yeast *pmi* and the nucleotides blast result between the Pmi01 and PMI40(ACCESSION:M85238), the marked box displayed the difference between the Pmi01 and PMI40

2.2 拟南芥转化植株的筛选

在甘露糖质量浓度为 1 g/L 下,未转化的拟南芥种子大部分能够发芽,但生长 2 周后就白化死亡,易于检测。因此,选用含 1 g/L 的甘露糖培养基筛选转化子。在此筛选压下,大部分种子发芽初期都具有绿色的子叶,但只有转基因幼苗能够 2 周之后保持绿色。从近万粒由花序浸染法转化得到的种子中筛选得到近百株绿色的幼苗,但仅有 4 株幼苗生

长正常(图 3-A、B),具有发达的根系和绿色的真叶。少数具有 2 片较小的绿色真叶(图 3-C),根系生长严重受阻。大部分没有真叶出现(图 3-D),根系停止生长,白化死亡(图 3-E),也有部分只有 1 片绿色子叶(图 3-F),它们往往远离培养基,可能因此避免了甘露糖的抑制作用。这种甘露糖抑制未转化拟南芥种子萌发和生长的现象,特别是根部的表现,与 Todd 等^[5]的结果完全一致。



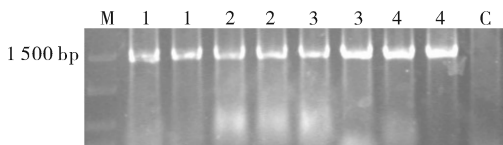
幼苗都在含有 1 g/L 甘露糖的 MS 培养基中生长 2 周 The seedlings growth two weeks on the MS selective medium containing 1 g/L mannose; A、B:生长正常的幼苗 A、B stand for the normal seedlings; C:具有真叶,但根生长受阻的幼苗 Seedling had leaves but its roots were blocked; D:真叶和根都生长受阻的幼苗 Seedling's leaves and roots were blocked; E:无甘露糖抗性的幼苗 Seedling didn't have the resistance to the mannose; F:子叶发育不对称的幼苗 Seedling had the asymmetric of cotyledon on the medium.

图 3 甘露糖筛选效果

Fig. 3 The selective effect chart of mannose

2.3 拟南芥转化植株的检测

1) 拟南芥转化植株的 PCR 检测。将所得到的 4 株转基因拟南芥植株基因组 DNA 进行 PCR 扩增,检测结果证明酿酒酵母磷酸甘露糖异构酶 (PMI) 基因 *pmi* 已经整合到拟南芥的基因组中(图 4)。



M, DNA marker; 1~4 分别代表不同的阳性植株 1-4 stand for different positive plant; C, 阴性未转化植株 Negative plant.

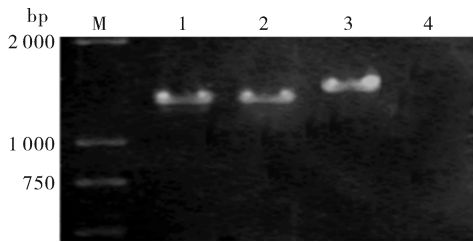
图 4 植物转化后进行 PCR 检测的结果

Fig. 4 The result of PCR detection after transformation

2) 拟南芥转化植株的 RT-PCR 检测。将所得

到的转基因拟南芥植株叶片总 RNA 经反转录得到的 cDNA 进行 PCR 扩增,检测结果证明酿酒酵母磷酸甘露糖异构酶基因 *pmi* 在拟南芥中得到转录。从大小来判断,比从基因组 DNA 扩增的产物小约 100 bp,证明发生了剪接过程。真核生物内含子一般特征是在内含子和外显子交界处分别有 2 个高度保守的碱基,5'端为 GT(mRNA 为 GU),3'端为 AG。酵母 *pmi* 长 93 bp 的内含子序列 (GTATGTGC-CATTTTTCGT CAAATATTTTGAATACTTTGAG-TATTTTTTTTTTTTTTTT -TTTGGTACACTA-ACTAACGCGTACGACTCT-ATGTAG) 符合这个特征。凝胶电泳和 cDNA 克隆测序(结果没有列出)的结果说明,来源于酵母的 *pmi* 可以被植物转录生成 RNA,其中的内含子序列可以被植物的剪接系统所识别并能够正确地完成加工过程,得到成熟

的 mRNA,这与在酵母中的 *pmi* 的加工情况完全一致^[16]。



M:Marker; 1,2:转化植株 The transformed plant; 3:以 pPMI 质粒为模板的阳性对照 The pPMI plasmid as the positive control; 4:阴性对照 The negative control.

图5 转化植物的 RT-PCR 检测

Fig.5 The RT-PCR detection of the transformation plant

3)拟南芥转化植株的 GUS 检测。将拟南芥转化植株的叶片进行 GUS 染色,只有转化的植株叶片被染色,结果证明与 *pmi* 一同转化的 GUS 基因 *gus* 在转化拟南芥植株的后代中得到表达(图6)。



图6 拟南芥转化植株叶片的 GUS 化学组织染色

Fig.6 The GUS chemical staining result of the leave from *Arabidopsis* transgenic plants

3 讨论

本研究从酿酒酵母中克隆了 *pmi*,该基因全序列约为 1 500 bp,含有 1 个 93 bp 的内含子。通过实验证明了该基因能够在高等植物拟南芥中表达,并且利用 PMI/甘露糖完成了筛选过程,说明 *pmi* 能够作为拟南芥的遗传转化选择标记。另外还把该基因转入了水稻愈伤组织,作为水稻遗传转化的筛选标记(结果待发表)。随着工作的深入,可能其他一些植物也能够利用这个酵母 *pmi* 完成遗传转化。

本研究所利用的 *pmi* 来自于酵母,而不是大肠杆菌。酵母 *pmi* 序列与大肠杆菌 *pmi* 序列差别很大^[17],但它们的功能都一样,编码磷酸甘露糖异构酶,该酶能够将 6-磷酸甘露糖转化为 6-磷酸果糖,

从而使生物体能够利用甘露糖作为碳源。酿酒酵母常被用于酿酒和发酵,是多种食物的组成成分。用来自于酵母的基因作为选择标记,避免了人们心理上的担忧,易被人们接受。酵母 *pmi* 含有内含子,是一种真核生物,而大肠杆菌是一种原核生物,其 *pmi* 没有内含子。这种类似的基因结构以及较近的亲缘关系可能会使它更容易在同样是真核生物的高等植物中表达,有着更高的活性,在植物的遗传转化时可能比来源于大肠杆菌的 PMI 有着更高的筛选效率。当然,这种设想需要大量的植物转化试验加以证明。从本文的试验结果看来,酵母 *pmi* 有望成为植物遗传转化的选择标记之一。

参 考 文 献

- [1] BARBARA H, AVRAHAM A L, HOLGER P, et al. Elimination of selection markers from transgenic plants[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001, 12(2): 139-143.
- [2] 王兴春, 杨长登. 转基因植物生物安全标记基因[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 19-22.
- [3] LEE B T, MATHESON N K. Phosphomannoisomerase and phosphoglucosomerase in seeds of cassia coluteoides and some other legumes that synthesize galactomannan[J]. Phytochem, 1984, 23: 983-987.
- [4] MORTEN J, IAIN D, JETTE K, et al. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet[J]. Mol Breed, 1998, 4(2): 111-117.
- [5] TODD R, TAGUE B W. Phosphomannose isomerase: a versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germ-line transformation[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, 19(4): 307-319.
- [6] LUCCA P, YE X D, POTRYKUS I. Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent[J]. Molecular Breeding, 2001, 7(1): 43-49.
- [7] WANG A S, EVANS R A, ALTENDORF P R, et al. A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(7): 654-660.
- [8] GADALETA A, GIANCASPRO A, BLECHL A, et al. Phosphomannose isomerase, *pmi*, as a selectable marker gene for durum wheat transformation[J]. Journal of Cereal Science, 2006, 43: 31-37.
- [9] WRIGHT M, DAWSON J, DUNDER E, et al. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker[J]. Plant Cell Rep, 2001, 20(5): 429-436.
- [10] GAO Z, XIE X, LING Y, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated sorghum transformation using a mannose selection

- system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2005, 3(6): 591-599.
- [11] JAIN M, CHENGALRAYAN K, ABOUZID A, et al. Prospecting the utility of a PMI/mannose selection system for the recovery of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 26(5): 581-590.
- [12] SIGAREVA M, SPIVEY R, WILLITS M G, et al. An efficient mannose selection protocol for tomato that has no adverse effect on the ploidy level of transgenic plants[J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 23(4): 236-245.
- [13] 周小玲, 沈微, 饶志明, 等. 一种快速提取真核染色体 DNA 的方法[J]. *微生物通报*, 2004, 31(4): 89-92.
- [14] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1999, 16(6): 735-743.
- [15] 萨母布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2005.
- [16] SMITH D J, PROUDFOOT A, FRIEDLI L, et al. PMI40, an intron-containing gene required for early steps in yeast mannosylation[J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(7): 2924-2930.
- [17] MILES J S, GUEST J R. Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli* [J]. *Gene*, 1984, 32(1/2): 41-48.

Phosphomannose isomerase gene from *Saccharomyces cerevisiae* as a selectable marker for *Arabidopsis* gene transformation

WANG Tao¹ TANG Yong-yan² LIU Liang-yu² ZHANG Mei-dong¹
ZHENG Yong-lian¹ ZHANG Fang-dong²

1. College of Life Science and Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Plant Science and Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Phosphomannose isomerase (PMI) gene from *Saccharomyces cerevisiae* was cloned by PCR, and transformed into *Arabidopsis* via floral dip method. The seeds were collected and germinated on selecting MS medium which mannose concentration was 1 g/L. Four positive plants were obtained. PCR for genome DNA and RT-PCR for RNA proved the PMI gene had integrated into the genome of *Arabidopsis* and was transcribed. The intron of yeast *pmi* was removed successfully in *Arabidopsis*. GUS activity also was detected in the transgenic plants. All the results means PMI gene from yeast can be used as a selectable marker in *Arabidopsis* transformation.

Key words PMI; transformation; selectable marker; yeast; *Arabidopsis*

(责任编辑: 陆文昌)