

# 表达 $\gamma$ - 亚麻酸的无筛选标记转基因大豆的鉴定

张秀春<sup>1</sup>, 林俊扬<sup>2</sup>, 彭明<sup>1</sup>, 郭丽琼<sup>1,3</sup>, 林俊芳<sup>1,3\*</sup>

(1. 中国热带农业科学院热带作物生物技术研究所, 海口 571101; 2. 福建省莆田市农业科学研究所, 福建莆田 351100;  
3. 华南农业大学食品学院生物工程系, 广州 510640)

**摘要:**对所获得的 9 株无筛选标记基因的 T<sub>1</sub> 代莆豆 8008 转基因大豆的 T<sub>2</sub> 代进行了分析。PCR 和 Southern 杂交检测表明标记基因已不存在于转基因株系中, 同时目的基因以纯合或者杂合状态存在于部分株系中, 除草剂抗性分析也表明这些转基因株系已不再具有抗除草剂的能力。Northern 杂交检测表明  $\Delta^6$ - 脂肪酸脱氢酶基因在转基因株系中可以转录。GC 分析表明其中 6 个转基因植株富含 GLA。

**关键词:** 大豆;  $\Delta^6$ - 脂肪酸脱氢酶基因; 无标记基因;  $\gamma$ - 亚麻酸; Southern blot; Northern blot; GC

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)06-0460-07

## Characterization of Marker-free Transgenic Soybeans with $\Delta^6$ -fatty Acid Desaturase Gene Expressing $\gamma$ -linolenic Acid

ZHANG Xiu-chun<sup>1</sup>, LIN Jun-yang<sup>2</sup>, PENG Ming<sup>1</sup>, GUO Li-qiong<sup>1,3</sup>, LIN Jun-fang<sup>1,3\*</sup>

(1. Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2. Putian City's Institute of Agricultural Sciences, Putian 351100, China; 3. Department of Bioengineering, College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Nine lines of T<sub>2</sub> generation of marker-free transgenic soybeans of Pudou 8008 with  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase gene were characterized. PCR and Southern blot indicated that the selective marker gene (*bar*) had been removed from some transgenic soybean progenies, while  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase gene was still in some progenies of these transgenic soybean lines. Northern blot showed that the  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase gene could be transcribed in the marker-free transgenic soybean lines. Gas chromatographic analysis showed that six transgenic soybean lines could produce  $\gamma$ -linolenic acid.

**Key words:** Marker-free transgenic soybean;  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase;  $\gamma$ -linolenic acid; Southern blot; Northern blot; GC

$\gamma$ - 亚麻酸( $\gamma$ -linolenic acid, GLA)是一种多不饱和脂肪酸,分子式 C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>,化学名称为 6,9,12- 十八碳三烯酸,在碳链的第 6、9、12 位各有一个双键。由于  $\gamma$ - 亚麻酸对人体的激素调节和在人体脂肪酸代谢中发挥的重要生理作用,特别是对治疗心血管疾病、糖尿病以及癌症等疾病具有药用价值,因此,近年来  $\gamma$ - 亚麻酸已成为学术界研究的热点之一<sup>[1-5]</sup>。 $\Delta^6$ - 脂肪酸脱氢酶 ( $\Delta^6$ - fatty acid desaturase, D6D)

是  $\gamma$ - 亚麻酸生物合成的关键酶,它以亚油酸为底物,在 C6 和 C7 位之间脱氢形成  $\gamma$ - 亚麻酸,然后通过碳链延长和进一步脱氢作用形成花生四烯酸、前列腺素类和白三烯类生物活性物质。

大豆是最重要的油料作物和粮食作物之一,是世界上食用油和植物蛋白的主要来源,既可以直接食用,也可以用于榨油和加工成许多豆类食品。大豆种子含有大约 40% 的蛋白质和 20% 的油脂,大

收稿日期: 2006-05-24 接受日期: 2006-08-28

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2005B20101009) 资助

\* 通讯作者 Corresponding author

豆油脂富含亚油酸,但不含 $\gamma$ -亚麻酸或其含量极低<sup>[6]</sup>。研究结果表明由于大豆中含有丰富的亚油酸,所以当 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因转入大豆植株后,能够利用大豆中的亚油酸进行脂肪酸代谢。通过对转基因大豆种子的GC分析,检测到了 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因的代谢产物 $\gamma$ -亚麻酸,说明转入的外源基因获得了功能性表达<sup>[6]</sup>。

由于转基因作物中筛选标记基因可能带来潜在的安全性问题,所以,培育无选择标记的转基因作物可以提高生物安全性,是保证转基因技术安全发展的有效办法之一,且已成为农作物基因工程育种的重要目标<sup>[7-10]</sup>。目前,培育无抗性标记基因的转基因植物的方法主要有三种系统:共转化系统、特异重组酶转化系统及转座子系统。共转化系统是采用两个质粒或一个含有两套T-DNA表达盒的表达载体共同转化植物,其中一套表达盒含有抗性选择标记基因,另一套表达盒含有目的基因。它们转化植物后可能整合到植物基因组的同一染色体或同一染色体的不同位置上,在减数分裂过程中,标记基因和目的基因有可能发生分离,从而有可能在转基因后代中筛选到只含有目的基因而不含有选择标记基因的个体。Komari首先运用这种方法转化植物获得无抗性标记基因的转基因植物<sup>[7]</sup>。特异重组酶转化系统是由位点特异重组酶和其靶序列组成,从而剔除位于靶序列之间的标记基因。转座子系统的原理是植物中可移动的转座子系统能分解为不移动的转座酶基因和可移动的末端重复序列,它几乎能在所有的异源植物寄主细胞中自由转座。有时转座作用并不伴随再次插入而是该转座子丢失。基于以上原理,转座子系统被开发用于转化系统来培育安全的、无标记基因的转基因植株<sup>[11]</sup>。

本研究在前期研究的基础上<sup>[12-13]</sup>,对所获得的9株无标记T<sub>1</sub>代莆豆8008转基因大豆的T<sub>2</sub>代进行除草剂抗性分析、PCR检测、Southern杂交、Northern杂交检测以及脂肪酸的气相色谱分析,以鉴定富含GLA( $\gamma$ -linolenic acid)的无筛选标记转基因大豆。

## 1 材料和方法

**植物材料** 无标记T<sub>1</sub>代莆豆8008转基因大豆来自本实验室的先期工作所得<sup>[13]</sup>。即利用含有筛

选标记基因和目的基因 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因的双T-DNA共转化表达载体pLIN61,经农杆菌EHA101介导,采用子叶节转化法转化大豆,使用除草剂Glufosinate作为筛选剂,获得了一批携带有玻璃苣 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因的T<sub>0</sub>转基因大豆。T<sub>0</sub>转基因大豆自交产生的T<sub>1</sub>代种子播种后,利用PCR和Southern杂交检测了161株转 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因(D6D)的T<sub>1</sub>代植株,初步筛选出只含有功能基因(D6D)而不含有筛选标记基因(bar)的转基因大豆植株9株。

**PCR检测** 采用CTAB法提取大豆叶片基因组DNA。

目的基因D6D的PCR扩增引物为DesatF(5'-TTT TTC ATC CAT GGC TGC TCA AAT C-3')和DesatR(5'-TTT TTT CTA GAT TAA CCA TGA GTG TGA AGA GC-3')。PCR反应条件:95℃预变性5 min,94℃ 40 s,52℃ 40 s,72℃ 60 s,33个循环,72℃延伸10 min。扩增的片段大小为1 370 bp。

选择标记基因bar的PCR扩增引物为ZH1(5'-ATG AGC CCA GAA CGA CGC-3')和ZH2(5'-TCA GAT CTC GGT GAC GGG CA-3'),PCR反应条件:95℃预变性5 min,94℃ 40 s,57℃ 40 s,72℃ 50 s,33个循环,72℃延伸10 min。扩增的片段大小为456 bp。

**转基因植株的Southern杂交检测** 取10  $\mu$ g大豆基因组DNA,EcoRI酶切后在1%的琼脂糖凝胶上电泳分离,植物共转化表达载体pLIN61用PstI单酶切。采用向下毛细管印迹法将凝胶上的DNA转移到尼龙膜上,采用Roche公司产的地高辛标记检测试剂盒进行Southern杂交。目的基因D6D及选择标记基因bar的探针标记、尼龙膜预杂交和杂交显影等具体步骤参见试剂盒使用说明书。

**Northern检测** 提取PCR和Southern杂交鉴定为阳性的转基因植株和未转基因植株幼嫩种子的总RNA,取大约15  $\mu$ g在1%甲醛变性胶上进行电泳分离,转膜后与D6D基因探针进行Northern杂交检测,具体实验步骤见Roche公司产的地高辛标记检测试剂盒使用说明书。

**转基因大豆的气相色谱分析** 取转基因大豆T<sub>2</sub>代种子,50℃烘干,研碎后用索氏提取器抽提3 h;加入1 g无水硫酸钠,10 000 rpm离心20 min;取上清液,蒸发乙醚;取0.1 ml上述提取的油,加

1 ml 2:1 乙醚-正乙烷和 1 ml 5%KOH-甲醇, 反应 10 min, 加水定容至 10 ml; 取上层进行气相色谱分析或 4℃ 保存备用。以 Sigma 公司生产的 GLA 甲酯为标准品; 正己烷为溶剂; 仪器为岛津 GC-9A; 柱子 SE-52/25 m; 载气 N<sub>2</sub> 50 ml min<sup>-1</sup>; 气室温度 280℃; 柱温 210℃; 氢火焰离子化检测器; 分析软件: 色谱工作站, 津瑞公司。

## 2 结果和分析

### 2.1 T<sub>2</sub> 代转基因植株的除草剂抗性鉴定和 PCR 扩增

将无标记基因的 T<sub>1</sub> 代转基因植株的种子即 T<sub>2</sub> 代播种, 叶片涂抹除草剂 glufosinate 100 mg L<sup>-1</sup> 后第 7 天观察, 发现均不抗除草剂 glufosinate (表 1)。

提取微量 DNA, 分别用 *desaF*、*desaR* 和 ZH1、ZH2 两对引物进行目的基因 *D6D* 和选择标记基因 *bar* 的 PCR 检测。检测结果 (表 1) 表明: 9 株无标记基因的 T<sub>1</sub> 代转基因植株的 T<sub>2</sub> 代中, 选择标记基因 *bar* PCR 均为阴性, 与除草剂 glufosinate 抗性实验结果一致, 进一步证明这 9 个株系是无标记基因的转基因大豆, 部分结果见图 1、2 (各样品两对引物 PCR 产物等量混匀后点样)。并且有 5 个株系的 T<sub>2</sub> 后代的目的基因 *D6D* 发生分离即有些植株能扩增出目的片段, 有些植株不能扩增出目的片段 (图 1); 有 4 个株系的 T<sub>2</sub> 后代的目的基因 *D6D* 没有发

表 1 转基因 T<sub>2</sub> 代的除草剂抗性及其基因型分析

Table 1 Herbicide sensitivity and genotypes in T<sub>2</sub> transgenic soybean from T<sub>1</sub> seeds

无标记基因 T <sub>1</sub> 代株系 Marker-free lines from T <sub>1</sub> seeds	植株数目 Number of plants	除草剂抗性 Herbicide sensitivity	基因型 Genotype	
			<i>bar</i>	<i>D6D</i> +/ <i>D6D</i> -
7-6	29	全 S	-	18/11
7-8	63	全 S	-	全 <i>D6D</i> +
7-9	53	全 S	-	39/14
7-16	43	全 S	-	全 <i>D6D</i> +
11-5	27	全 S	-	15/12
11-9	13	全 S	-	7/6
11-10	32	全 S	-	全 <i>D6D</i> +
9-7	39	全 S	-	全 <i>D6D</i> +
9-9	51	全 S	-	29/22
合计 Total	350			

+; 阳性植株 Positive; -; 阴性植株 Negative; S; 对除草剂敏感 Sensitive.

生分离, 所有植株均能扩增出目的片段 (图 2), 这些目的基因没有分离的 4 个株系的植株可能已经是 *D6D* 基因纯合系。

### 2.2 T<sub>2</sub> 代转基因植株的 Southern blot 检测

随机取上述目的基因没有分离的 7-8、11-10、9-7 的 T<sub>2</sub> 代植株各 5 株, 大量提取基因组 DNA 后, 用限制性内切酶 *EcoRI* 进行酶切。转膜后首先用 *desaF* 和 *desaR* 扩增质粒 pLIN61 产物标记的探针

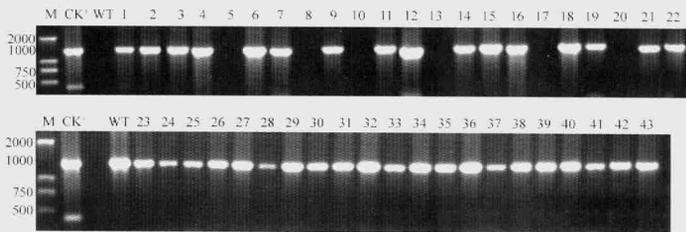


图 1 9 个无标记转基因大豆株系的 T<sub>2</sub> 代植株的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR analysis of the DNA from T<sub>2</sub> progenies derived from 9 marker-free transgenic soybean lines

M: Marker DL2000; CK: 质粒 pLIN61; WT: 野生型大豆; 1-5: 株系 7-6; 6-10: 株系 7-9; 11-15: 株系 11-5; 16-19: 株系 11-9; 20-22: 株系 9-9; 23-27: 株系 7-8; 28-32: 株系 7-16; 33-37: 株系 11-10; 38-43: 株系 9-7. M.: Marker DL2000; CK: Plasmid pLIN61; WT: Wild-type soybean; Lanes 1-5: T<sub>2</sub> progenies from line 7-6; Lanes 6-10: T<sub>2</sub> progenies from line 7-9; Lanes 11-15: T<sub>2</sub> progenies from line 11-5; Lanes 16-19: T<sub>2</sub> progenies from line 11-9; Lanes 20-22: T<sub>2</sub> progenies from line 9-9; Lanes 23-27: T<sub>2</sub> progenies from line 7-8; Lanes 28-32: T<sub>2</sub> progenies from line 7-16; Lanes 33-37: T<sub>2</sub> progenies from line 11-10; Lanes 38-43: T<sub>2</sub> progenies from line 9-7.

即 *D6D* 探针进行 Southern 杂交检测, 然后用含 0.1% SDS 的 0.2 mol/L NaOH 洗去 *D6D* 探针再用 ZH1 和 ZH2 扩增质粒 pLIN61 产物标记的探针即 *bar* 探针进行 Southern 杂交检测, 结果见图 2。Southern 杂交检测结果表明: 所有转基因植株用 *D6D* 探针均能与阳性对照表达载体 pLIN61/PsI (图 2 中的样品 CK<sup>+</sup>) 一样出现目的基因 *D6D* 的特异性条带, 而没有转化的阴性对照大豆样品没有杂交信号出现 (图 2 中的 WT); 但所有转基因植株用 *bar* 探针均与没有转化的阴性对照大豆样品一样没有杂交信号出现, 这进一步说明, 我们得到的转基因植株后代是去除了标记基因的纯合系。

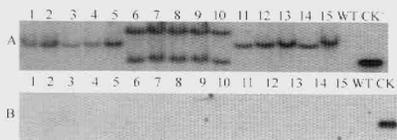


图 2 无标记基因的转基因大豆 T<sub>2</sub> 代种子 7-8、11-10、9-7 的部分 T<sub>2</sub> 代植株 Southern 杂交

Fig. 2 Southern blot analysis of genomic DNA from T<sub>2</sub> plants from marker-free transgenic soybean lines of 7-8, 11-10 and 9-7

A: *D6D* 探针; B: *bar* 探针; 1-5: 7-8 的部分 T<sub>2</sub> 代转基因植株; 6-10: 11-10 的部分 T<sub>2</sub> 代转基因植株; 11-15: 9-7 的部分 T<sub>2</sub> 代转基因植株; WT: 野生型大豆; CK: 表达载体 pLIN61, 以 *Pst*I 单酶切。Panel A: Probed with *D6D*; Panel B: Probed with *bar*; Lanes 1-5: T<sub>2</sub> progenies from line 7-8; Lanes 6-10: T<sub>2</sub> progenies from line 11-10; Lanes 11-15: T<sub>2</sub> progenies from line 9-7; WT: Wild-type soybean; CK: pLIN61/PsI

### 2.3 无标记基因 T<sub>2</sub> 代种子的 Northern 杂交检测

大量提取经检测为无标记基因的 T<sub>1</sub> 代植株所结嫩豆莢的总 RNA, 经电泳, 转膜后, 与用 *desaF* 和

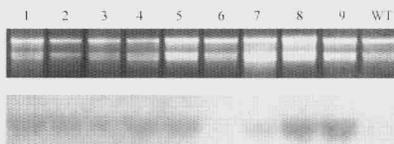


图 3 无标记基因转基因大豆 T<sub>2</sub> 代种子 Northern 杂交鉴定

Fig. 3 Northern blot of the mRNA from marker-free transgenic T<sub>2</sub> seeds

WT: 野生型大豆; 1-9: 依次为无筛选标记的转基因大豆 T<sub>2</sub> 代株系 7-6、7-8、7-9、7-16、11-5、11-9、11-10、9-7 和 9-9 的种子; WT: Wild-type soybean; Lanes 1-9: Seeds of T<sub>2</sub> lines of 7-6、7-8、7-9、7-16、11-5、11-9、11-10、9-7 和 9-9, respectively.

*desaR* 扩增质粒 pLIN61 产物标记的探针即 *D6D* 探针进行 Northern 杂交检测, 结果见图 3, 除样品 11-9 (泳道 6) 外其余转基因植株均有明显的杂交信号, 而未转基因植株没有。综上所述, 上述检测结果证明: 本研究已获得无选择标记的转基因大豆, 并且在转录水平 mRNA 上得到表达。

### 2.4 转基因大豆脂肪酸的气相色谱 (GC) 分析

把经过 PCR、Southern 和 Northern 杂交检测为阳性, 并且鉴定为无标记基因转基因大豆的 7-6、7-8、7-16、9-7、9-9、11-10 所结 T<sub>2</sub> 代种子, 用索氏提取法进行油脂提取, 甲酯化后, 进行脂肪酸的 GC 分析, 部分结果如图 4、表 2 所示。从图中可知, 与野生型大豆相比: 1) 无标记基因转基因大豆 T<sub>2</sub> 代种子中出现了一个特殊峰 (箭头表示), 出峰时间分别为 8.148、8.204、8.139、8.146、8.136、8.143 min, 与 GLA 含量为 9.0% 的脂肪酸标准品中 GLA 的出峰时间 8.137 min (箭头表示) 相对应, 而未转化野生型植株的种子中没有这一特殊峰, 说明 *D6D* 在无标

表 2 无标记基因转基因大豆 T<sub>2</sub> 代种子的脂肪酸的气相色谱 (GC) 分析

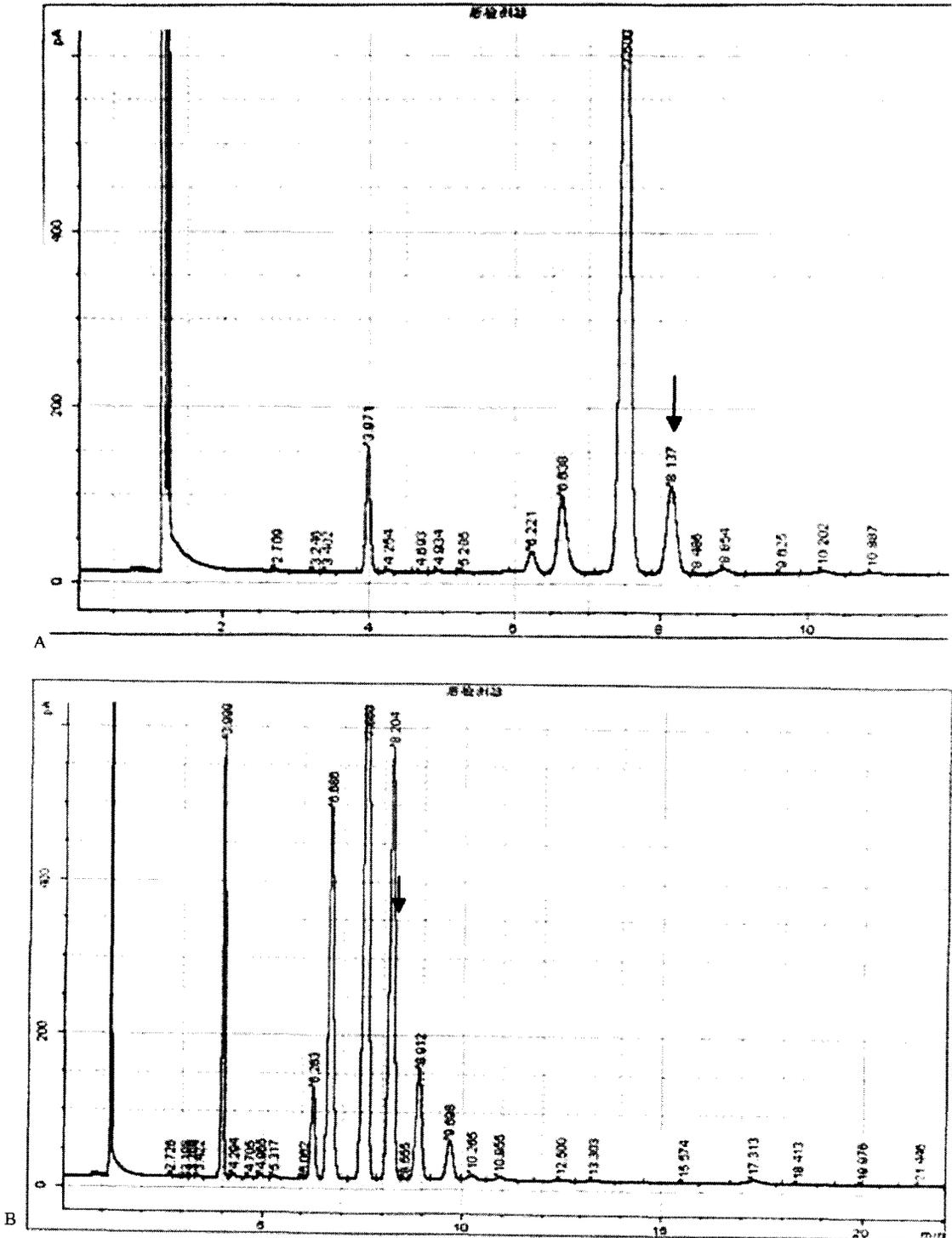
Table 2 Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters of total lipids

无标记基因 T <sub>2</sub> 代株系 Marker-free lines from T <sub>2</sub> plants	亚油酸/总脂肪酸 Oleic/fatty acid (w/w, %)	GLA/总脂肪酸 GLA/fatty acid (w/w, %)	GLA/大豆种子 GLA/weight of soybean (w/w, %)
9-7	31.54	27.26	5.2
7-16	35.96	22.38	4.2
7-8	38.16	19.48	3.4
11-10	35.65	15.87	3.2
7-6	33.40	14.89	2.9
9-9	48.59	5.02	1.0
WT	49.64	0	0

记基因转基因大豆 9-7、7-16、7-8、11-10、7-6、9-9 中获得表达, 其表达量在总脂肪酸中的比例分别为 27.26%、22.38%、19.48%、15.87%、14.89%、5.02%; 在大豆中的比例分别为 5.2%、4.2%、3.4%、3.2%、2.9%、1.0%。从表 2 中可知 GLA 的出现与亚油酸含量的降低明显一致, 未转化野生型植株的种子中亚

油酸含量为 49.64%, 而无标记基因转基因大豆 T<sub>2</sub> 代种子中, 亚油酸含量为 31.54%–48.59%, 并且 GLA 含量越高, 亚油酸含量越低。

综上所述, D6D 在无标记基因转基因大豆中成功表达, 产生了预期产物 GLA, 获得表达 GLA 的无筛选标记转基因大豆。



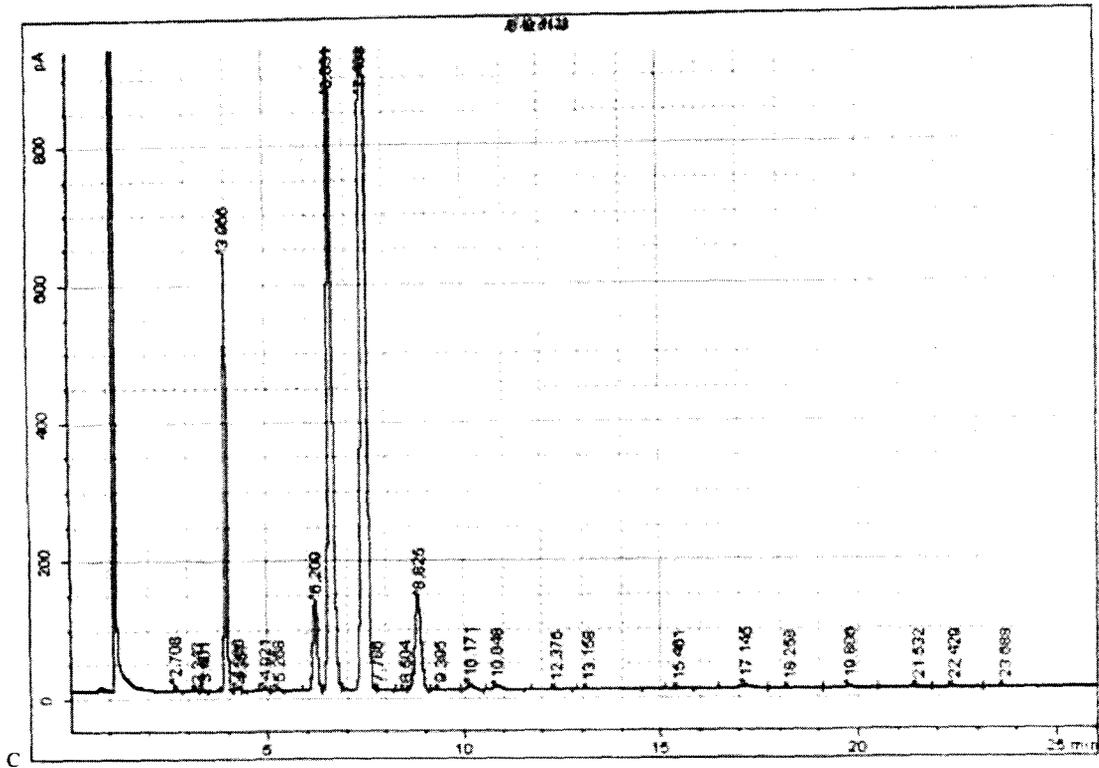


图 4 无标记转基因大豆脂肪酸的气相色谱 (GC) 分析

Fig. 4 Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters in seeds of marker-free transgenic soybean

A: GLA 含量为 9.0% 脂肪酸标准品; B: 7-8 所结的 T<sub>2</sub> 代种子; C: 野生型大豆种子。

Panel A: 9.0%  $\gamma$ -Linolenate standard; Panel B: Seed of line 7-8; C: Wild-type soybean.

### 3 讨论

在转基因植物中, 剔除选择标记基因将提高转基因植物的食用安全性和对环境的安全性, 更易为广大消费者所接受, 也有利于对同一个植物品种进行多次转基因操作。共转化方法作为一种剔除标记基因方法, 不需要附加选择标记或切除系统, 相对来说比较简单, 但需后代植株经过有性杂交及减数分裂过程, 目的基因和选择标记基因才能被分开, 花费时间较长, 不适用于马铃薯、甘蔗等无性繁殖植物的转化。此外, 共转化的效率必须相当高, 并且共转化的 DNA 要整合在染色体组的非连锁位点上。将目的基因和选择标记基因插入到同一质粒的两个相互独立的 T-DNA 内, 农杆菌转化后他们可能整合到植物不同染色体或同一染色体的不同位置上, 在减数分裂过程中, 标记基因和目的基因将发生分离, 从而可以剔除选择标记基因, 通过 PCR 及 Southern 检测可以筛选到只含功能基因而不含标记基因的转基因植株<sup>[14-17]</sup>。

外源基因能否在转基因植株的后代中稳定遗传和表达是基因工程技术研究中人们普遍关注的问题, 转基因整合到植物基因组后产生的遗传效应是多样的, 外源基因在受体植株中的遗传行为是非常复杂的, 在许多方面有别于经典的遗传规律。研究表明, 转基因在许多转化体中都能稳定整合, 正常表达, 并呈常见的孟德尔遗传规律, 也有一些由于转基因整合的方式和拷贝数不同, 或者由于损伤或丢失导致不规则的遗传<sup>[7]</sup>。本研究通过 T<sub>1</sub> 代转基因的 PCR 检测表明功能基因和选择标记基因并不符合孟德尔遗传规律, 可能是发生了转基因丢失、截短、重排等过程, 也可能是本实验的样本群体太小不足以进行统计学分析。

本研究对前期获得的 9 株无标记基因的转基因 T<sub>2</sub> 代种子进行 Northern 分子杂交分析, 显示该基因在无标记基因的转基因植株中的 mRNA 水平得到表达。GC 分析在种子中检测到 D6D 的产物 GLA, 证明该基因在无标记转基因大豆得到了表达, 说明该基因能够稳定的遗传给后代。

## 参考文献

- [1] Robert K F, Ronald G R, Christina M S, et al. Oral administration of gamma-linolenic acid, an unsaturated fatty acid with anti-inflammatory properties, modulates interleukin- $\beta$  production by human monocytes [J]. *J Clin Immunol*, 2002, 22(2):83-91.
- [2] Undurti N Das. Abrupt and complete occlusion of tumor-feeding vessels by  $\gamma$ -linolenic acid [J]. *Nutrition*, 2002, 18(9):767-771.
- [3] Maiké M B, Dooper W, Boet van Riel, et al. Dihomo- $\gamma$ -linolenic acid inhibits tumour necrosis factor- $\alpha$  production by human leucocytes independently of cyclooxygenase activity [J]. *Immunology*, 2003, 110: 348-357.
- [4] Ajay B, Debabrata M, Asha B, et al.  $\gamma$ -linolenic acid therapy of human gliomas [J]. *Nutrition*, 2003, 19(4):305-309.
- [5] Van Gool C J A W, Zeegers M P A, Thijs C. Oral essential fatty acid supplementation in atopic dermatitis—a meta-analysis of placebo-controlled trials [J]. *British J Dermatol*, 2004, 150:728-740.
- [6] Li M C (李明春), Bu Y P (卜云萍), Wang G K (王广科), et al. Heterologous expression of *Mortierella isabellina* fatty acid desaturase gene in soybean [J]. *Acta Gene Sin (遗传学报)*, 2004, 31(8):858-863. (in Chinese)
- [7] Komari T, Hiei Y, Saito Y. 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(1):165-174.
- [8] Holger P. Removing selectable marker genes: taking shortcut [J]. *Trend Plant Sci*, 2000, 5(7):273-274.
- [9] Elena Z, Chartes S, Peter M. Intra-chromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes [J]. *Nat Biotech*, 2000, 18:442-445.
- [10] Xing A Q, Zhang Y Z, Shirley S, et al. The use of the two T-DNA binary system to derive marker-free transgenic soybeans [J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2000, 36:456-463.
- [11] Zuo J, Niu Q W, Moiler S G, et al. Chemical regulated site specific DNA excision in transgenic plants [J]. *Nat Biotech*, 2001, 19(2): 115-116.
- [12] Zhang X C (张秀春), Lin J F (林俊芳), Guo L Q (郭丽琼). Cloning of  $\Delta^6$ -desaturase gene and construction of its cotransformation expression vector [J]. *Chin J Trop Crops (热带作物学报)*, 2004, 25(4):63-67. (in Chinese)
- [13] Zhang X C (张秀春), Guo L Q (郭丽琼), Wu K X (吴坤鑫), et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean with the expression vector carrying two separate T-DNAs [J]. *Soybean Science (大豆科学)*, 2005, 24(4):291-295. (in Chinese)
- [14] Dong Z F (董志峰), Ma R C (马荣才), Peng Y F (彭于发), et al. Advances in the biosafety research of non-target DNA in transgenic plants [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 2001, 43(7): 661-672. (in Chinese)
- [15] John I Yoder, Andrew P Goldsbrough. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants [J]. *Bio Tech*, 1994, 12: 263-267.
- [16] Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, et al. Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker [J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20:383-392.
- [17] Zhang X M (张新梅), Xu H J (徐惠君), Du L P (杜丽璞). Excision of bar gene from transgenic wheat obtained by biolistic co-transformation [J]. *Acta Agronomica Sin (作物学报)*, 2004, 30(1):26-30. (in Chinese)