

农杆菌介导注射法建立番茄子叶瞬时表达系统

郎遥玲^{1,2}, 王倩¹, 陈彬¹, 白国辉¹, 管晓燕¹, 刘建国¹

https://doi.org/10.12307/2023.747

投稿日期: 2022-11-03

采用日期: 2022-12-13

修回日期: 2023-01-14

在线日期: 2023-02-20

中图分类号:

R459.9; R318; R781.1

文章编号:

2095-4344(2023)34-05462-07

文献标识码: B

文章快速阅读: 初步建立番茄子叶瞬时表达系统

采用农杆菌介导的注射法, 初步建立番茄子叶瞬时表达系统, 以DOCK8部分片段d₃作为报告基因, 观察转录水平。

课题组前期构建的植物表达载体pCAMBIA-E8-APB-DOCK8转化到农杆菌EHA105。

实验筛选出适合的番茄品种为: 欧洲大红(苹果型)。

文章特点——

采用农杆菌介导的注射法, 初步建立番茄子叶瞬时表达系统, 检测植物表达载体pCAMBIA-E8-APB-DOCK8中外源基因的转录水平。

番茄无菌苗的培育, 筛选出适用此实验的番茄品种。

注射农杆菌浓度A₆₀₀为0.2-0.7, 农杆菌注射量为50 μL, 苗龄为7-10 d, 共培养24-48 h。

文题释义:

植物表达载体pCAMBIA-E8-APB-DOCK8(简称pE8AD3): 为课题组构建, 它是以pCAMBIA2301双元穿梭载体为骨架, 将外源基因果实特异性启动子E8, APB中包含cat、PacA和ctxB基因以及胞质分裂专一蛋白8(DOCK8)依次构建到载体上。

变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*): 是人类最主要的致龋菌, 其中主要的致龋毒力因子是表面蛋白和葡糖基转移酶, 研究针对这2种致龋毒力因子的抗体, 可以有效抑制龋病的发生和发展。

转基因番茄口服防龋疫苗: 番茄果实可直接生食, 在全世界广泛种植且产量高, 以番茄植物系统作为真核生物反应器, 能有效对重组蛋白进行准确地加工和修饰, 是一个理想的外源蛋白表达的工厂, 利用转基因番茄生产口服疫苗能有效激发实验动物的黏膜免疫应答和体液免疫, 具有较大的优势及广阔的应用前景。

摘要

背景: 转基因植物生产口服疫苗具有较大的优势及广阔的应用前景。目前, 关于番茄瞬时表达系统的研究罕见报道, 对番茄瞬时表达条件进行优化, 可使植株的遗传转化效率大幅度提高。

目的: 利用农杆菌介导的注射法, 建立番茄子叶瞬时表达系统, 检测植物表达载体pCAMBIA-E8-APB-DOCK8中外源基因的转录水平。

方法: 通过对番茄无菌苗的培育, 观察不同番茄品种的出芽数、成苗数及农艺学性状的差异显著性, 筛选出适用于此实验的番茄品种, 将前期构建的植物表达载体pCAMBIA-E8-APB-DOCK8转化到农杆菌EHA105中, 通过对番茄子叶、注射农杆菌浓度、农杆菌注射量、生长苗龄以及共培养天数进行筛选, 建立农杆菌介导的番茄子叶瞬时表达系统, 观察报告基因的转录水平。

结果与结论: 初步建立番茄子叶瞬时表达系统, 筛选出适合的番茄品种为欧洲大红(苹果型), 选材部位为番茄的子叶, 注射农杆菌浓度A₆₀₀为0.2-0.7, 农杆菌注射量为50 μL, 苗龄为7-10 d, 共培养24-48 h。该实验为后期外源基因蛋白表达分析研究提供一种方便、快捷和有效的方法。

关键词: 番茄; 农杆菌介导; 瞬时表达系统构建; E8-APB-DOCK8; 植物疫苗; 转录分析

Establishment of transient expression system of eggplant cotyledon by agrobacterium-mediated injection

Lang Yaoling^{1,2}, Wang Qian¹, Chen Bin¹, Bai Guohui¹, Guan Xiaoyan¹, Liu Jianguo¹

¹Guizhou Provincial Key Laboratory of Oral Disease Research in Colleges and Universities and Zunyi Key Laboratory of Oral Disease Research, School of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; ²Guiyang Stomatological Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China
Lang Yaoling, Master, Attending physician, Guizhou Provincial Key Laboratory of Oral Disease Research in Colleges and Universities and Zunyi Key Laboratory of Oral Disease Research, School of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; Guiyang Stomatological Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Corresponding author: Liu Jianguo, MD, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Guizhou Provincial Key Laboratory of Oral Disease Research in Colleges and Universities and Zunyi Key Laboratory of Oral Disease Research, School of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

¹贵州省普通高等学校口腔疾病研究特色重点实验室暨遵义市口腔疾病研究重点实验室, 遵义医科大学口腔医学院, 贵州省遵义市 563000; ²贵阳市口腔医院, 贵州省贵阳市 550002

作者简介: 郎遥玲, 女, 1990年生, 贵州省兴义市人, 布依族, 2016年遵义医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事龋病的免疫学防治研究和牙列错畸形的矫治。

通讯作者: 刘建国, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 贵州省普通高等学校口腔疾病研究特色重点实验室暨遵义市口腔疾病研究重点实验室, 遵义医科大学口腔医学院, 贵州省遵义市 563000

https://orcid.org/0000-0003-2568-5838(郎遥玲)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81260164), 项目负责人: 刘建国; 贵州省委组织部贵州省第六批人才基地(RCID2019-9), 项目负责人: 刘建国; 遵义市首批市级人才基地(遵市科合社字[2017]20号), 项目负责人: 刘建国; 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合KY字[2022]276号), 项目负责人: 陈彬; 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwbkj2021-351), 项目负责人: 陈彬

引用本文: 郎遥玲, 王倩, 陈彬, 白国辉, 管晓燕, 刘建国. 农杆菌介导注射法建立番茄子叶瞬时表达系统[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(34):5462-5468.



Abstract

BACKGROUND: The production of oral vaccines by transgenic plants has great advantages and broad application prospects. At present, there are few reports on the study of the tomato transient expression system. It is necessary to optimize tomato transient expression conditions, which can greatly improve the genetic transformation efficiency of plants.

OBJECTIVE: The transient expression system of eggplant cotyledon was established by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated injection to detect the transcription level of exogenous genes in plant expression vector pCAMBIA-E8-APB-DOCK8.

METHODS: Through the cultivation of tomato bacterial-free seedlings, significant differences in the number of sprouts, seedlings and agronomic traits of different tomato varieties were observed, and the tomato varieties suitable for this experiment were selected. The plant expression vector pCAMBIA-E8-APB-DOCK8 constructed earlier was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, and then the tomato cotyledons, the concentration of *Agrobacterium tumefaciens* injected, the amount of *Agrobacterium tumefaciens* injected, the age of seedlings and the days of coculture were screened. The transient expression system of eggplant cotyledon mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was established to observe the transcriptional level of the reporter gene.

RESULTS AND CONCLUSION: The transient expression system of eggplant cotyledon was preliminarily established. The suitable tomato variety was selected as European Dahong (apple type), and the selected material was tomato cotyledon. The concentration of *Agrobacterium* for injection was A_{600} :0.2–0.7, and the amount of *Agrobacterium* for injection was 50 μ L. The seedling age was 7–10 days, and the total culture time was 24–48 hours. It provides a convenient, fast and effective method for the analysis of exogenous gene protein expression in the later stage.

Key words: tomato; *Agrobacterium* mediated; instantaneous expression system construction; E8-APB-DOCK8; plant vaccine; transcription analysis

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 81260164 (to LJG); Guizhou Provincial Party Committee Organization Department Guizhou Province Sixth Batch of Talent Base, No. RCJD2019-9 (to LJG); First Batch of Municipal Talent Bases in Zunyi, No. ZSKHSZ [2017]20 (to LJG); Youth Science and Technology Talent Growth Project of Guizhou Provincial Department of Education, No. QJHKYZ [2022]276 (to CB); Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Fund Project, No. gzwkj2021-351 (to CB)

How to cite this article: LANG YL, WANG Q, CHEN B, BAI GH, GUAN XY, LIU JG. Establishment of transient expression system of eggplant cotyledon by *agrobacterium*-mediated injection. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(34):5462-5468.

0 引言 Introduction

番茄, 又称洋柿子或西红柿, 属于茄科, 是世界上栽培最为普遍的果蔬之一。美国《时代周刊》杂志曾报道番茄是世界十大功能食品之一^[1]。番茄为一年生, 在热带地区则为多年生草本植物, 产量高, 果实可直接生食。以番茄植物系统作为真核生物反应器, 能有效对重组蛋白进行准确加工和修饰, 是一个理想的外源蛋白表达的工厂^[2]。研究表明转基因植物生产口服疫苗能有效激发实验动物的黏膜免疫应答和体液免疫, 并且对实验动物无不良反应^[3-4]。因此, 转基因植物生产口服疫苗具有较大的优势及广阔的应用前景。

瞬时表达是指将外源基因作为基因组外的遗传物质, 转入宿主细胞中进行转录和翻译, 在转化细胞内累计表达, 所需时间短暂^[5]。瞬时表达存在许多优点: 实验操作简单、实验周期短且表达效率高、对材料的限制性小、生物安全性强^[6-7]。因此, 瞬时表达技术在分子生物学研究领域中广泛应用于外源基因的表达^[8]、启动子和抑制子功能分析^[9-10]、亚细胞定位、蛋白质间相互作用^[11]、转录因子与顺式作用元件的互作等方面^[12]。此外, 该系统也用于药用蛋白的生产, 为生物制药、抗体、疫苗的研发开辟了捷径^[13-16], 瞬时转化表达系统的运用潜力巨大。

通过瞬时表达在植物中导入外源基因的方法有: 基因枪法、聚乙二醇法、植物病毒介导法、电击法、农杆菌渗透法^[17]。其中, 农杆菌渗透法具有操作简便且易于转染、表达效率较高、可携带较大的外源基因片段、可在完整植株上进行表达等优点, 因此使用农杆菌渗透法介导的瞬时表达最为运用广泛^[18], 其基本流程为: 构建二元表达载体系统, 并将目的基因插入 Ti 质粒的 T-DNA 上, 形成重组质粒, 转化农杆菌, 利用农杆菌侵染植物的叶片, 通过辅助性质粒的 Vir 区基因与重组质粒 T-DNA 区的反式作用来激活 T-DNA 的转移, 将目的片段的基因转移至植物细胞的细胞核中^[19-21]。虽然大

部分 T-DNA 并未整合到植物基因组中, 只是暂存在细胞核内, 但仍可利用植物细胞的转录、翻译系统对 T-DNA 上携带的目的基因进行瞬间表达, 从而达到短期基因表达的目的^[22-23]。

番茄是喜温作物, 高温、低温、多雨等都是影响番茄生长的环境因素, 不同的温度条件下生长周期也各不相同, 因此, 稳定的转基因番茄植株在短时间内不易获得。与瞬时表达相比, 植物的稳定遗传表达系统获得转化植株所需的实验周期长, 且蛋白表达量较低, 外源蛋白的表达技术面临瓶颈时期。此外, 关于番茄瞬时表达系统的研究罕见报道, 利用烟草、拟南芥等模式植物瞬时表达系统由于种属差异可能使外源基因的功能不能真实地反映出来。研究表明, 影响农杆菌瞬时表达效果的因素有: 农杆菌菌株的差异^[19]、生长浓度^[24]、植物的种类、侵染的条件、植物与农杆菌共培养的时间^[25]、叶片的生长状况等, 部分植物的转化效率会受到光照和温度的影响^[26]。JELLY 和 AHN 等^[27-28] 研究发现瞬时表达条件的优化可使植株的遗传转化效率大幅度提高。

作为最主要的致龋菌, 变异链球菌主要的致龋毒力因子是表面蛋白和葡糖基转移酶, 针对这 2 种致龋毒力因子的抗体可以有效抑制龋病的发生和发展。基于免疫防龋原理, 课题组针对这 2 种致龋毒力因子成功构建了植物表达载体 pCAMBIA-E8-APB-DOCK8(简称 pE8AD3)。该实验将课题组成功构建的植物表达载体 pE8AD3 作为外源基因^[29], 建立一个快捷、简便的瞬时表达系统, 以初步研究该番茄外源基因在转录水平的表达情况, 为番茄植株遗传转化效率的提高提供参考。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 ①分子生物学设计: 课题组前期构建的植物表达载体 pE8AD3 转化到根癌农杆菌 EHA105 中; ②统计学设计: 通过单因素方差分析, 观察番茄在发芽、成苗及农艺学性状之间的差异显著性。

1.2 时间及地点 实验于2014年7月至2016年2月在遵义医科大学口腔疾病研究特色重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 植物材料 实验所用番茄种子品种有3种:欧洲大红(苹果型)和欧美大红购于西安市新世绿色种子研究所,铁将军(石头型)购于西安市临潼农丰蔬菜研究所。

1.3.2 质粒及菌种 植物表达载体 pE8AD3 为课题组构建^[29]; 农杆菌感受态细胞 EHA105 菌株购于上海迈其生物科技有限公司。

1.3.3 培养基 按照使用说明配制 MS 固体培养基、MS 液体培养基、YEB 液体培养基、YEB 固体培养基。

1.3.4 主要试剂 卡那霉素(索莱宝,北京);利福平(索莱宝,北京);乙酰丁香酮(索莱宝,北京);反转录试剂盒(TaKaRa,大连);焦碳酸二乙酯(DEPC)(TaKaRa,大连);RNAiso Plus(TaKaRa,大连);次氯酸钠溶液(成都科龙化工试剂厂);无水乙醇(成都科龙化工试剂厂);蔗糖(成都科龙化工试剂厂);氯仿(天津市大茂化学试剂厂);异丙醇(天津市大茂化学试剂厂)。

1.3.5 主要仪器 植物组织培养室[湿度40%~50%,温度(25±3)℃](河南赛诺优农科技有限公司);SCIENTZ-48高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司);150 mL锥形瓶(武汉鼎盛中天实验仪器有限公司);金属接种铲(武汉鼎盛中天实验仪器有限公司);1 mL无菌注射器(Milipore,美国);PCR仪(BIO-RAD,美国);恒温制冷摇床(Thermo,美国);水平电泳仪(六一仪器,北京);微量移液器(Eppendorf,德国);高速冷冻离心机(Thermo,美国);紫外分光光度计(Eppendorf,德国);全自动凝胶成像分析系统(SYNGENE,美国)。

1.4 实验方法 运用农杆菌介导的叶片注射法,将植物表达载体 pE8AD3 转化到根癌农杆菌 EHA105 中,用 1 mL 注射器使农杆菌充分侵染番茄子叶细胞,将大量的 T-DNA 转入植物细胞内,可在短时间内检测到外源基因的表达。农杆菌介导的叶片注射法的技术流程包括:表达载体的构建、农杆菌的培养、注射侵染和瞬时表达。实验技术流程见图 1。

1.4.1 无菌苗的培育 挑选均匀饱满的番茄种子 20 粒,放置于 5 mL 的干净离心管中,加入 4 mL ddH₂O 浸泡番茄种子,将 5 mL 离心管放入到 50~55 °C 水浴中 30 min,期间需上下颠倒 3~5 次,于超净工作台上用小毛刷刷轻轻刷洗种子,目的是去除种子外的绒毛及灰尘,利于种子吸水 and 发芽。用 2 mL 的一次性滴管移出离心管中的液体,加入体积分数为 75% 的乙醇浸泡消毒 30 s,期间可上下颠倒一两次,无菌 ddH₂O 冲洗 1 次,再用 20% 的次氯酸钠(活性氯含量 ≥ 5.5%) 浸泡消毒 15 min,高压灭菌蒸馏水反复冲洗 3~5 次,将消毒后的种子放于灭菌纸上吸干种子表面多余的水分,用无菌金属接种铲将番茄种子均匀接种于装有 MS 固体培养基的锥形瓶中,封口膜密封瓶口。植物室 25 °C 暗培养 3~5 d,待约 60% 的种子萌发出胚根后转移至光照下培养。生长条件:湿度 40%~

50%, 温度 (25±3) °C, 光照 16 h/d, 黑暗 8 h/d, 光照强度为 3 000 Lx。每个品种各培育 5 瓶,每瓶 20 粒。培育 2 周,观察并计算出每个品种的出芽率、成苗率。成苗后记录每个品种植株的子叶片数、叶长、叶宽、叶高、茎粗等,进行农艺学性状的比较,筛选出比较适用于此实验的番茄品种。

1.4.2 重组质粒 pE8AD3 转化农杆菌 EHA105 重组质粒 pE8AD3 DNA 10 μL 加入到农杆菌感受态细胞 EHA105 中,依次放于冰上静置 15 min、-80 °C 5 min、37 °C 水浴 5 min、冰上放置 5 min;加入 700 μL 无抗生素的 YEB 液体培养基,28 °C 振荡培养两三个小时;4 °C 6 000 r/min 离心 1 min,预留 100 μL 上清轻轻吹打重悬菌块混匀,涂布于含 50 μg/mL 卡那霉素的 YEB 固体培养基的平板上,倒置 28 °C 培养一两天;无菌牙签挑取单菌落于装有 700 μL 含有 50 μg/mL 卡那霉素的 YEB 液体培养基中,挑菌多管,28 °C 振荡培养 24 h;进行 PCR 鉴定。

1.4.3 农杆菌转化液的制备 将鉴定后的阳性克隆菌液 200 μL 转接到 10 mL 含卡那霉素 50 μg/mL、利福平 20 mg/mL 的 YEB 液体培养基中,各 3 管,28 °C 振荡培养 12 h,4 °C 10 000 r/min 离心 1 min,收集菌体,所用悬浮液为 MS 液体培养基,侵染液为乙酰丁香酮 100 mg/mL,用悬浮液和侵染液悬浮离心得到的菌体,即为转化液;调节 600 nm 波长处的吸光度值分别为 0.2, 0.5, 0.7 备用。

1.4.4 番茄子叶注射及共培养 将筛选出适用于实验的番茄品种,生长至 3~5 d, 5~7 d, 7~10 d 的番茄子叶作为实验对象,选用子叶背面叶脉分支的位置作为注射部位,将 1 mL 的无菌注射器针头轻轻在子叶背面叶脉分支处扎一下,注意不要完全将子叶捅破,用注射器吸取 600 nm 波长处的吸光度值分别为 0.2, 0.5, 0.7 的转化液,拔掉针头进行注射,注射量分别为 10, 50, 100 μL。将注射后的番茄子叶放于 MS 固体培养基培养皿中共培养,湿度 40%~50%, 温度 (25±3) °C, 光照 16 h/d, 黑暗 8 h/d, 光照强度为 3 000 Lx 条件下分别共培养 24, 48, 72 h。

1.4.5 番茄子叶总 RNA 的提取 取一片共培养的番茄子叶,放入 1 mL 的 RNAiso Plus 液,-80 °C 保存 24 h 后取出,于高通量组织研磨器中研磨,50~60 Hz, 10 s,研磨数次,期间将组织置于冰上降温,直至番茄子叶组织完全裂解;室温下静置 5 min,4 °C 12 000 r/min 离心 5 min,再静置 5 min;取 400 μL 上清液到干净的去酶 1.5 mL EP 管中,加入 1/5 体积的氯仿 80 μL,振荡混匀,上下颠倒 10 次,室温下静置 5 min,4 °C 12 000 r/min 离心 15 min;取 100 μL 上清液到干净的去酶 1.5 mL EP 管中,加入 100 μL 异丙醇,缓慢颠倒 10 次,室温下静置 10 min,4 °C 12 000 r/min 离心 10 min;弃上清,加入无水乙醇与 0.1% DEPC 水配成的体积分数为 75% 乙醇 1 mL,指弹管底数次,4 °C 12 000 r/min 离心 15 min;弃上清,将 1.5 mL EP 管倒置放于滤纸上,滤纸吸干多余的液体,于空气中干燥两三分钟;加入高压灭菌的 0.1% DEPC 水 50 μL,静置 30~60 min;紫外分光光度剂测定 RNA 浓度。

1.4.6 RNA 反转录为 cDNA 运用反转录试剂盒，参照使用说明书将 RNA 反转录为 cDNA。反应条件：37 °C，15 min；85 °C，5 s；4 °C，forever；-20 °C 保存。

1.4.7 PCR 检测不同条件下番茄子叶中 DOCK8 部分片段 d₃ 瞬时表达情况 PCR 检测 DOCK8 部分片段 d₃(612 bp) 在不同条件下番茄子叶中瞬时表达情况，利用 DNA man 软件将 d₃ 基因序列导入设计引物，d₃ 引物序列见表 1，反应条件为 95 °C，10 min；94 °C，30 s；58 °C，45 s；72 °C，30 s；34 cycles；72 °C，5 min；12 °C，forever。以重组质粒 pE8AD3 的 DOCK8 部分片段 d₃ PCR 作为阳性对照组，以野生型没有注射转化液的番茄子叶提取的总 RNA 反转录为 cDNA 的 DOCK8 部分片段 d₃ PCR 作为阴性对照组。

表 1 | 鉴定引物序列

Table 1 | Identification of primer sequences

引物名称	引物序列 (5'-3')	产物大小
d ₃ F	TTT TGG TGC CGA GTT TGT	612 bp
d ₃ R	CGC TGC TCT GCG GTA ATG	612 bp

1.5 主要观察指标 ①观察并计算出每个品种的出芽率、成苗率；成苗后记录每个品种植株的子叶片数、叶长、叶宽、叶高、茎粗等，进行农艺学性状的比较；②重组质粒 pE8AD3 转化农杆菌 EHA105，PCR 鉴定是否成功转化；③以 DOCK8 部分片段 d₃ 为报告基因，观察转录水平。

1.6 统计学分析 番茄无菌苗每个品种各 5 瓶，每瓶 20 粒，利用 SPSS 19.0 分析软件进行单因素方差分析，P < 0.05 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过岳昌武专家审核。

2 结果 Results

2.1 无菌苗的生长过程 正常番茄种子的形状为肾形或扁平卵圆形，颜色呈黄褐色或灰褐色，种子的表面覆盖有一层细绒毛，种子消毒时用小毛刷轻轻将种子上的绒毛搓掉，利于种子的吸水和发芽。将消毒后的番茄种子接种于含 MS 固体培养基的锥形瓶中，由于番茄种子的发芽具有好暗性，在 25 °C 下暗培养 3-5 d，番茄种子吸水膨大，胚根逐渐萌出，当胚根萌出至 60% 时，将种子转入光照下培养，7-12 d 可见子叶逐渐萌出，舒展成双子叶，色绿，种子皮脱落，茎直立生长变粗。在幼苗生长前期，子叶是进行光合作用的主要器官；14 d 真叶显露生长；18 d 后无菌苗可长至瓶高。从种子萌动到子叶展开，第 1 片真叶显露，此期成为发芽期，其完成需要 14 d 左右。无菌苗生长过程见图 2，无菌苗子叶及真叶见图 3。

2.2 种子出芽数、成苗数及植株形态的统计学分析 无菌苗每个品种各 5 瓶，每瓶 20 粒。结果显示，适合于实验用的番茄品种为欧洲大红 (苹果型)。出芽数见表 2；成苗数见表 3；14 d 植株的子叶数、叶长、叶宽、茎高和茎粗的均值见表 4。

表 2 | 不同番茄品种无菌苗的出芽数

Table 2 | Budding number of aseptic seedlings of different tomato varieties

品种	出芽数 (瓶号)					均值
欧洲大红	20.0(1)	18.0(2)	18.0(3)	19.0(4)	20.0(5)	19.0 ^a
欧美大红	13.0(1)	14.0(2)	16.0(3)	17.0(4)	8.0(5)	13.6
铁将军	15.0(1)	12.0(2)	18.0(3)	16.0(4)	15.0(5)	15.2

表注：与欧美大红、铁将军两两比较有显著性差异，^aP < 0.05

表 3 | 不同番茄品种无菌苗的成苗数

Table 3 | Number of aseptic seedlings of different tomato varieties

品种	成苗数 (瓶号)					均值
欧洲大红	20.0(1)	18.0(2)	18.0(3)	19.0(4)	20.0(5)	19.0 ^a
欧美大红	13.0(1)	13.0(2)	16.0(3)	17.0(4)	7.0(5)	13.2
铁将军	14.0(1)	12.0(2)	18.0(3)	15.0(4)	15.0(5)	14.8

表注：与欧美大红、铁将军两两比较有显著性差异，^aP < 0.05

表 4 | 不同番茄品种无菌苗成苗后的农艺性状

Table 4 | Agronomic characters of aseptic seedlings of different tomato varieties

品种	14 d				
	子叶数 (个)	叶长 (mm)	叶宽 (mm)	茎高 (mm)	茎粗 (mm)
欧洲大红	34.20	16.00	7.36	77.20	1.46
欧美大红	26.40	13.20	6.32	69.56	1.30
铁将军	29.60	21.40	7.70	70.4	1.38

表注：两两比较无显著性差异，P > 0.05

2.3 重组质粒 pE8AD3 转化农杆菌 EHA105 及 PCR 鉴定结果 APB 片段 apb PCR 的扩增片段为 468 bp，D₃ 片段 d₃ PCR 的扩增片段为 612 bp，E8 片段 e8 PCR 的扩增片段为 513 bp。结果显示：与预期大小一致，条带单一，证明农杆菌 EHA105 中含有阳性载体质粒。农杆菌 EHA105 培养见图 4，电泳结果见图 5。

2.4 mRNA 水平检测 DOCK8 在番茄中的表达 以生长至 3-5 d，5-7 d，7-10 d 的番茄子叶作为实验对象，用 1 mL 的无菌注射器吸取 600 nm 波长处的吸光度值分别为 0.2，0.5，0.7 的转化液，注射量分别为 10，50，100 μL，共培养 24，48，72 h。从番茄子叶中提取总 mRNA，反转录成 cDNA，以 cDNA 为模板，利用引物进行 PCR 扩增，反应产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明：在农杆菌介导下，在 612 bp 处出现目的条带，条带深浅不一，而未经农杆菌介导的野生型番茄子叶作为阴性对照组未出现目的条带，表明 DOCK8 mRNA 在番茄植株中成功表达，表达量之间可能存在差异。PCR 电泳结果见图 6-10。

分别选取 A₆₀₀ 为 0.2，0.5，0.7 的农杆菌制成转化液，对生长 3-10 d 的番茄子叶进行注射，共培养 24-72 h。为确保实验的准确性，以未经农杆菌注射的番茄子叶作为阴性对照组。结果显示：在 A₆₀₀ 为 0.2-0.7 时，报告基因均有表达。分别注射 10，50，100 μL 的转化液，结果显示：当苗龄在 5-7 d 时，注射量为 10 μL 和 100 μL，共培养至 72 h 未见报告基因的表达。因此，农杆菌注射量过多或过少，均会对实验结果产生影响。该实验最适转化液注射量为 50 μL。

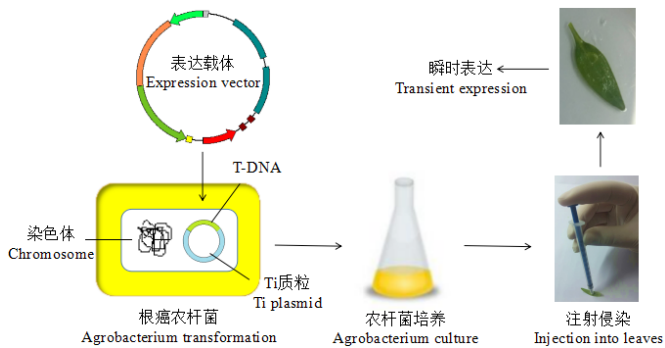
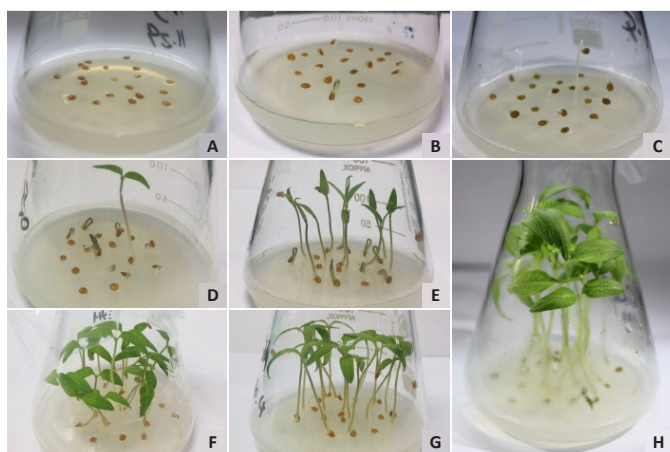


图1 | 农杆菌介导的瞬时转化系统技术流程
Figure 1 | Technical process of Agrobacterium-mediated transient transformation system



图注: 图A为番茄种子消毒后接种于含MS固体培养基的锥形瓶中; B, C为暗培养3 d, 番茄种子的胚根开始萌出; D为暗培养5 d, 番茄种子的胚根萌出60%; E-G为转入光照下培养, 7-12 d子叶逐渐萌出, 舒展成双子叶, 色绿, 种皮脱落, 茎直立生长变粗; H为14 d后真叶显露生长
图2 | 无菌苗的生长过程

Figure 2 | Growth process of bacterial-free seedlings



图3 | 无菌苗的子叶和真叶
Figure 3 | Cotyledons and true leaves of bacterial-free seedlings

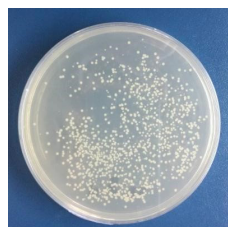
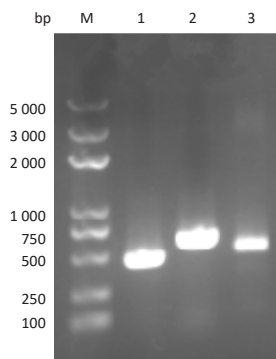
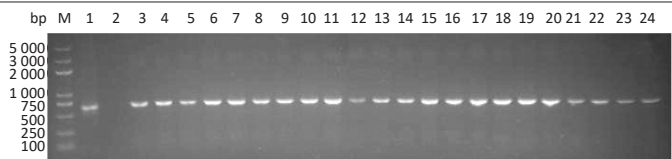


图4 | 农杆菌 EHA105 培养
Figure 4 | Agrobacterium tumefaciens EHA105 culture

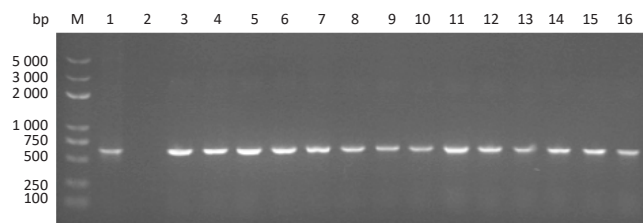


图注: M 为 BM5000 DNA Marker; 泳道 1-3 分别为 apb、d₃、e8 PCR 扩增产物
图5 | 农杆菌 EHA105 apb、d₃、e8 PCR 检测分析
Figure 5 | PCR detection and analysis of Agrobacterium EHA105 apb, d₃, and e8



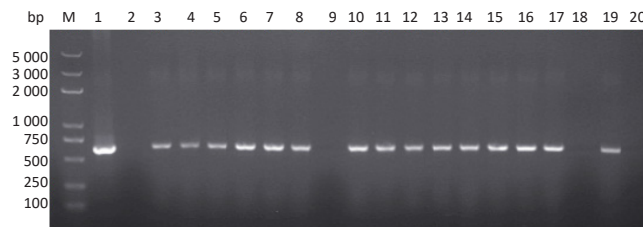
图注: M 为 BM5000 DNA Marker; 泳道 1 为阳性对照组; 泳道 2 为野生型阴性对照组; 泳道 3-5 为: 苗龄 3-5 d, A₆₀₀ 为 0.2, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 24 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 6-8 为: 苗龄 3-5 d, A₆₀₀ 为 0.2, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 48 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 9-11 为: 苗龄 3-5 d, A₆₀₀ 为 0.2, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 72 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 12-14 为: 苗龄 3-5 d, A₆₀₀ 为 0.5, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 24 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 15-17 为: 苗龄 3-5 d, A₆₀₀ 为 0.5, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 48 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 18-20 为: 苗龄 3-5 d, A₆₀₀ 为 0.5, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 72 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 21-23 为: 苗龄 3-5 d, A₆₀₀ 为 0.7, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 24 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 24 为: 苗龄 3-5 d, A₆₀₀ 为 0.7, 注射 10 μL, 48 h d₃ PCR 扩增产物
图6 | 农杆菌转染苗龄为 3-5 d 番茄子叶共培养 24, 48, 72 h 后 DOCK8 部分片段 d₃ PCR 检测结果

Figure 6 | Detection results of d₃ PCR of partial DOCK8 fragments in eggplant cotyledons cocultured for 24, 48 and 72 hours after Agrobacterium tumefaciens transfection for 3-5 days



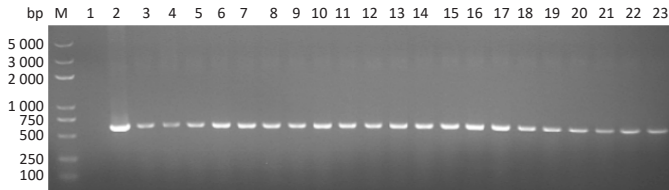
图注: M 为 BM5000 DNA Marker; 泳道 1 为阳性对照组; 泳道 2 为野生型阴性对照组; 泳道 3, 4 为: 苗龄 3-5 d, A₆₀₀ 为 0.7, 注射量分别为 50, 100 μL, 48 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 5-7 为: 苗龄 3-5 d, A₆₀₀ 为 0.7, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 72 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 8-10 为: 苗龄 5-7 d, A₆₀₀ 为 0.2, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 24 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 11-13 为: 苗龄 5-7 d, A₆₀₀ 为 0.2, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 48 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 14-16 为: 苗龄 5-7 d, A₆₀₀ 为 0.2, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 72 h d₃ PCR 扩增产物
图7 | 农杆菌转染苗龄为 3-5 d, 5-7 d 番茄子叶共培养 24, 48, 72 h 后 DOCK8 部分片段 d₃ PCR 检测结果

Figure 7 | Detection results of d₃ PCR of partial DOCK8 fragments after culture of eggplant cotyledons for 24, 48 and 72 hours at 3-5 days and 5-7 days after Agrobacterium tumefaciens transfection



图注: M 为 BM5000 DNA Marker; 泳道 1 为阳性对照组; 泳道 2 为野生型阴性对照组; 泳道 3-5 为: 苗龄 5-7 d, A₆₀₀ 为 0.5, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 24 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 6-8 为: 苗龄 5-7 d, A₆₀₀ 为 0.5, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 48 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 9-11 为: 苗龄 5-7 d, A₆₀₀ 为 0.5, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 72 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 12-14 为: 苗龄 5-7 d, A₆₀₀ 为 0.7, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 24 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 15-17 为: 苗龄 5-7 d, A₆₀₀ 为 0.7, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 48 h d₃ PCR 扩增产物; 泳道 18-20 为: 苗龄 5-7 d, A₆₀₀ 为 0.7, 注射量分别为 10, 50, 100 μL, 72 h d₃ PCR 扩增产物
图8 | 农杆菌转染苗龄为 5-7 d 番茄子叶共培养 24, 48, 72 h 后 DOCK8 部分片段 d₃ PCR 检测结果

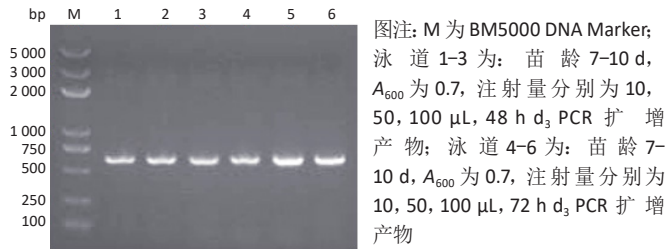
Figure 8 | Detection results of d₃ PCR of partial DOCK8 fragments in eggplant cotyledons cocultured for 24, 48, 72 hours after Agrobacterium tumefaciens transfection for 5-7 days



图注: M 为 BM5000 DNA Marker; 泳道 1 为野生型阴性对照组; 泳道 2 为阳性对照组; 泳道 3-5 为: 苗龄 7-10 d, A_{600} 为 0.2, 注射量分别为 10, 50, 100 μL , 24 h d_3 PCR 扩增产物; 泳道 6-8 为: 苗龄 7-10 d, A_{600} 为 0.2, 注射量分别为 10, 50, 100 μL , 48 h d_3 PCR 扩增产物; 泳道 9-11 为: 苗龄 7-10 d, A_{600} 为 0.2, 注射量分别为 10, 50, 100 μL , 72 h d_3 PCR 扩增产物; 泳道 12-14 为: 苗龄 7-10 d, A_{600} 为 0.5, 注射量分别为 10, 50, 100 μL , 24 h d_3 PCR 扩增产物; 泳道 15-17 为: 苗龄 7-10 d, A_{600} 为 0.5, 注射量分别为 10, 50, 100 μL , 48 h d_3 PCR 扩增产物; 泳道 18-20 为: 苗龄 7-10 d, A_{600} 为 0.5, 注射量分别为 10, 50, 100 μL , 72 h d_3 PCR 扩增产物; 泳道 21-23 为: 苗龄 7-10 d, A_{600} 为 0.7, 注射量分别为 10, 50, 100 μL , 24 h d_3 PCR 扩增产物

图 9 | 农杆菌转染苗龄为 7-10 d 番茄子叶共培养 24, 48, 72 h 后 DOCK8 部分片段 d_3 PCR 检测结果

Figure 9 | Detection results of d_3 PCR of partial DOCK8 fragments in eggplant cotyledons cocultured for 24, 48 and 72 hours after *Agrobacterium tumefaciens* transfection for 7-10 days



图注: M 为 BM5000 DNA Marker; 泳道 1-3 为: 苗龄 7-10 d, A_{600} 为 0.7, 注射量分别为 10, 50, 100 μL , 48 h d_3 PCR 扩增产物; 泳道 4-6 为: 苗龄 7-10 d, A_{600} 为 0.7, 注射量分别为 10, 50, 100 μL , 72 h d_3 PCR 扩增产物

图 10 | 农杆菌转染苗龄为 7-10 d 番茄子叶共培养 48, 72 h 后 DOCK8 部分片段 d_3 PCR 检测结果

Figure 10 | Detection results of d_3 PCR of partial DOCK8 fragments in eggplant cotyledons cocultured for 48 and 72 hours after *Agrobacterium tumefaciens* transfection for 7-10 days

分别注射苗龄为 3-5 d, 5-7 d, 7-10 d 的番茄子叶。结果显示: 苗龄为 3-10 d 的番茄子叶均有表达。考虑过于幼嫩的子叶对农杆菌的毒性抵抗力较弱, 因此选择生长 7-10 d 的子叶比较适宜于此实验。

分别共培养 24, 48, 72 h。结果显示: 部分只在 24, 48 h 表达, 72 h 未见表达, 因此最适表达时间为 24-48 h。

3 讨论 Discussion

以植物作为生物反应器主要包括: 稳定遗传转化表达系统和瞬时表达系统^[30]。除了植物的稳定遗传转化外, 瞬时表达同样值得关注。TZFIRA 等^[31]将农杆菌介导转化过程分为 7 步: ①农杆菌与宿主细胞的识别和吸附; ②农杆菌激发植物信号; ③毒性基因激活; ④可移动 T-DNA 复合体形成; ⑤ T-DNA 从农杆菌细胞中输出; ⑥ T-DNA 导入植物的细胞核中; ⑦ T-DNA 整合到寄主基因组当中。农杆菌的 *Vir* 基因提高 T-DNA 的转移效率, 使用农杆菌注射法能增加侵染菌与宿主细胞的接触。目前常用的农杆菌菌株有 GV3101、LBA4404、EHA105 等, DIAMOS 等^[32]发现农杆菌菌株 EHA105 具有更强的侵染性。

根据相关文献查阅, 植物瞬时表达系统通常是使用叶片来进行转化的, 因番茄的子叶与真叶相比, 子叶周期短, 易于获得, 具有相对疏松的细胞排列特点, 易于注射及农杆菌的转化, 表明子叶更适合于番茄瞬时表达系统的建立。由于不同生长周期的农杆菌对植物的侵染力不同, 该实验对不同生长时期的农杆菌进行了筛选。研究报道, 菌液 A_{600} 大于 0.1, 会引起组织变黄枯萎, 随着农杆菌浓度的上升, 转化效率呈下降趋势^[6, 33]。因细胞表面积和受体的数目有限, 所以对农杆菌中的基因转入也有一定限制, 不同时期的番茄子叶细胞对转化液的吸收程度是不同的。当植物的组织过于幼嫩, 组织细胞对农杆菌的毒性抵抗力则较差, 对质粒的转化速率也较慢。反之, 当植物生长时间较长, 容易变黄萎焉, 不利于注射。在创伤部位, 通常农杆菌在 16 h 后才能将 T-DNA 成功转移到植物细胞中进行表达, 持续时间为 80 h 左右^[34]。共培养的时间过短或过长均会影响目的基因的表达, 此外目的基因表达产物的稳定性也会受到影响^[35]。研究结果发现, 生长 7-10 d 的番茄子叶注射 50 μL A_{600} 为 0.2-0.7, 共培养 24-48 h, 外源基因均有表达。此方法操作简单, 不需要昂贵的试剂和仪器, 为后期分析功能基因、抗体、疫苗提供了理论依据。

国内外运用瞬时表达的植物多种多样, 农作物中小麦、玉米和水稻等均有运用^[36-40], 园艺观赏植物中长春花及香蒲等均可被用于相应的瞬时表达体系^[41-44]。对于难以发展遗传转化系统的物种, 瞬时表达系统的构建具有重要意义。利用农杆菌介导的瞬时表达系统生产药用蛋白获得的产品主要是疫苗和单克隆抗体。番茄作为生物反应器用于多种疫苗的制造, 如霍乱毒素 B 亚单位疫苗^[45-46]、乙肝病毒和艾滋病毒双价口服疫苗^[47]、肠道病毒 71 型疫苗以及狂犬病疫苗等^[48-49]。除了农杆菌介导的瞬时表达系统外, 利用病毒瞬时表达系统研究治疗生产霍奇金淋巴瘤的疫苗, 是以烟草花叶病毒为载体进行研究的, 合成重组单链抗体, 该实验目前已进入临床试验评估阶段^[50]。此外, 以烟草为宿主植物, 利用烟草花叶病毒为载体, 生产甲型流感病毒 H5N1 亚型疫苗的研究已进入临床测试阶段^[51]。该实验初步建立番茄子叶瞬时表达系统, 但仍存在局限性, 可能造成转化植株的生长停滞, 不能反映外源基因表达量之间的差异。目前, 如何提高植物体内蛋白质含量是瞬时表达研究的重点和难点之一^[52-53], 由此造成的植物生长停滞是否会对基因功能分析产生不利影响, 需进一步研究。

致谢: 感谢刘建国、岳昌武、白国辉、范樊的指导和帮助; 感谢贵州省普通高等学校口腔疾病研究特色重点实验室暨遵义市口腔疾病重点实验室全体工作人员; 感谢遵义医科大学口腔医学院正畸二组全体教师对实验的大力支持。

作者贡献: 郎遥玲负责实验实施、论文撰写及实验数据分析处理, 王倩、陈彬、白国辉、管晓燕、刘建国负责数据和文章的校对。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] HESSER A. Tomato Preserves. *New York Times Magazine*. 2008;8(24):49.
- [2] CUNNINGHAM C, PORTER JR. Recombinant proteins from plants: Production and Isolation of clinically useful compounds. *J Nat Prod*. 1998;61(11):1452.
- [3] METT V, LYONS J, MUSIYCHUK K, et al. A plant-produced plague vaccine candidate confers protection to monkeys. *Vaccine*. 2007;25(16):3014-3017.
- [4] RODE B, ENDRES C, RAN C, et al. Large-scale production and homogenous purification of long chain polysialic acids from *E. coli* K1. *J Biotechnol*. 2008; 135(2):202-209.
- [5] LEUZINGER K, DENT M, HURTADO J, et al. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *J Vis Exp*. 2013; (77):50521.
- [6] WROBLEWSKI T, TOMCZAK A, MICHELMORE R. Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnol J*. 2005;3(2):259-273.
- [7] WYDRO M, KOZUBEK E, LEHMANN P. Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochim Pol*. 2006;53(2):289-298.
- [8] JOH LD, VANDERGHEYNST JS. Agroinfiltration of plant tissues for production of high-value recombinant proteins: an alternative to production in transgenic crops. *J Sci Food Agric*. 2006;86(13):2002-2004.
- [9] SONG GQ, YAMAGUCHI KI. Efficient Agroinfiltration-mediated transient GUS expression system for assaying different promoters in rice. *Plant Biotechnology*. 2003;20(3):235-239.
- [10] KATAYA AR, SULIMAN MN, KALANTIDIS K, et al. Cucurbit yellow stunting disorder virus p25 is a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Virus Res*. 2009;145(1):48-53.
- [11] ZHANG Y, CHEN M, SIEMIATKOWSKA B, et al. A Highly Efficient Agrobacterium-Mediated Method for Transient Gene Expression and Functional Studies in Multiple Plant Species. *Plant Commun*. 2020;1(5):100028.
- [12] JONES HD. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *J Cereal Sci*. 2005;41(2):137-147.
- [13] CHEN Q, LAI H, HURTADO J, et al. Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Adv Tech Biol Med*. 2013;1(1):103.
- [14] HITZEROTH II, VAN ZYL AR. Transient Expression of Viral Proteins in Plants Using Agrobacterium tumefaciens. *Methods Mol Biol*. 2016;1404:581-595.
- [15] BIDARIGH FARD A, DEHGHAN NAYERI F, HABIBI ANBUHI M. Transient expression of etanercept therapeutic protein in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Int J Biol Macromol*. 2019;130:483-490.
- [16] PHOOLCHAROEN W, BHOO SH, LAI H, et al. Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnol J*. 2011; 9(7):807-816.
- [17] 赵文婷, 魏建和, 刘晓东, 等. 植物瞬时表达技术的主要方法与应用进展 [J]. *生物技术通讯*, 2013,24(2):294-300.
- [18] 李晓君, 王绍梅, 谢艳兰, 等. 农杆菌渗透法转化烟草条件的优化 [J]. *江苏农业科学*, 2014,42(9):45-47.
- [19] 黎茵, 张以顺. 农杆菌注射渗透法转化烟草实验研究 [J]. *实验技术与管理*, 2010,27(11):50-52.
- [20] 邱扔, 陶刚, 李奇科, 等. 农杆菌渗入法介导的基因瞬时表达技术及应用 [J]. *分子植物育种*, 2009,7(5):1032-1039.
- [21] 刘兆明, 刘宗旨, 白庆武, 等. Agroinfiltration 在植物分子生物学研究中的应用 [J]. *生物工程学报*, 2002,18(4):411-414.
- [22] DHADI SR, DESHPANDE A, RAMAKRISHNA W. A novel nonwounding transient expression assay for cereals mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2012;30(1):36-45.
- [23] KAPILA J, DE RYCKE R, VAN MONTAGU M, et al. An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*. 1997; 122(1):101-108.
- [24] 吴英杰, 姜波, 张岩, 等. 农杆菌介导的烟草瞬时表达试验条件优化 [J]. *东北林业大学学报*, 2010,38(9):110-112.
- [25] 贾永芳, 马玉坤, 郭余龙, 等. 农杆菌介导的半夏 GUS 基因瞬时表达 [J]. *华北农学报*, 2007,22(4):42-45.
- [26] MCINTOSH KB, HULM JL, YOUNG LW. A rapid Agrobacterium-mediated Arabidopsis thaliana transient assay system. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2004;22(1): 53-61.
- [27] JELLY NS, VALAT L, WALTER B, et al. Transient expression assays in grapevine: a step towards genetic improvement. *Plant Biotechnol J*. 2014;12(9):1231-1245.
- [28] AHN YK, YOON MK, JEON JS. Development of an efficient Agrobacterium-mediated transformation system and production of herbicide-resistant transgenic plants in garlic (*Allium sativum* L.). *Mol Cells*. 2013;36(2):158-162.
- [29] 郎遥玲. PCAMBIA-E8-APBDOCK8 融合基因表达质粒中标记基因的去除及瞬时转化番茄的研究 [D]. 遵义: 遵义医学院, 2016.
- [30] MARILLONNET S, THOERINGER C, KANDZIA R, et al. Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol*. 2005;23(6):718-723.
- [31] TZFIRA T, CITOVSKY V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the Agrobacterium-plant cell interaction. *Mol Plant Pathol*. 2000;1(4):201-212.
- [32] DIAMOS AG, ROSENTHAL SH, MASON HS. 5' and 3' Untranslated Regions Strongly Enhance Performance of Geminiviral Replicons in *Nicotiana benthamiana* Leaves. *Front Plant Sci*. 2016;7:200.
- [33] 李静, 陈敏, 刘现伟, 等. 苜蓿高效瞬时表达体系的建立 [J]. *园艺学报*, 2006,33(2):405-407.
- [34] 陶均, 李玲. 农杆菌转化的分子生物学 [J]. *植物生理学通讯*, 2002,38(6): 639-644.
- [35] 孙春莲, 王洪洋, 田振东. 农杆菌介导的 pCB302-3 载体在本氏烟中瞬时表达条件优化 [J]. *华中农业大学学报*, 2015,34(3):8-12.
- [36] VICKERS CE, XUE G, GRESSHOFF PM. A novel cis-acting element, ESP, contributes to high-level endosperm-specific expression in an oat globulin promoter. *Plant Mol Biol*. 2006;62(1-2):195-214.
- [37] HAMILTON DA, ROY M, RUEDA J, et al. Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. *Plant Mol Biol*. 1992;18(2):211-218.
- [38] SCHEFFLER B, FRANKEN P, SCHÜTT E, et al. Molecular analysis of C1 alleles in *Zea mays* defines regions involved in the expression of this regulatory gene. *Mol Gen Genet*. 1994;242(1):40-48.
- [39] LI WJ, DAI LL, CHAI ZJ, et al. Evaluation of seed storage protein gene 3'-untranslated regions in enhancing gene expression in transgenic rice seed. *Transgenic Res*. 2012;21(3):545-553.
- [40] 彭昊, 翟英, 张芊, 等. 水稻高效 RNA 干涉体系的建立及其功能分析 [J]. *中国农业科学*, 2006,9(9):1729-1735.
- [41] DE LANGE P, DE BOER GJ, MOL JN, et al. Conditional inhibition of beta-glucuronidase expression by antisense gene fragments in petunia protoplasts. *Plant Mol Biol*. 1993;23(1):45-55.
- [42] DI FIORE S, HOPPMANN V, FISCHER R, et al. Transient gene expression of recombinant terpenoid indole alkaloid enzymes in *Catharanthus roseus* leaves. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2004;22(1):15-22.
- [43] 金建平, 林左军, 邓余, 等. α -CGRP 融合基因的高效表达及载体蛋白长度对表达的影响 [J]. *自然科学进展*, 1994,4(5):589-594.
- [44] NANDAKUMAR R, CHEN L, ROGERS SMD. Factors affecting the Agrobacterium-mediated transient transformation of the wetland monocot, *Typha latifolia*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2004;79(1):31-38.
- [45] JANI D, MEENA LS, RIZWAN-UL-HAQ QM, et al. Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Res*. 2002;11(5):447-454.
- [46] JIANG XL, HE ZM, PENG ZQ, et al. Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice. *Transgenic Res*. 2007;16(2):169-175.
- [47] SHCHELKUNOV SN, SALYAEV RK, REKOSLAVSKAYA NI, et al. The obtaining of transgenic tomato plant producing chimerical proteins TBI-HBsAg. *Dokl Biochem Biophys*. 2004;396:139-142.
- [48] CHEN HF, CHANG MH, CHIANG BL, et al. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. *Vaccine*. 2006;24(15):2944-2951.
- [49] MCGARVEY PB, HAMMOND J, DIENELT MM, et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology (N Y)*. 1995;13(13): 1484-1487.
- [50] MCCORMICK AA, REDDY S, REINL SJ, et al. Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(29):10131-10136.
- [51] D'AOUST MA, COUTURE MM, CHARLAND N, et al. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol J*. 2010;8(5):607-619.
- [52] CHEN Q. Expression and purification of pharmaceutical proteins in plants. *Biological Engineering Transactions*. 2008;1(4):291-321.
- [53] DORAN PM. Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol*. 2006;24(9):426-432.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)