

于一帆,朱小彬,葛会敏,等. 基于绿色荧光蛋白瞬时表达的植物亚细胞定位方法[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):58-61.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.017

# 基于绿色荧光蛋白瞬时表达的植物亚细胞定位方法

于一帆,朱小彬,葛会敏,陈 云

(扬州大学生物科学与技术学院,江苏扬州 225009)

**摘要:**细胞是生命活动的基本单位,各种蛋白质都按照其功能有序地分布在细胞的每个分区中。蛋白质的亚细胞定位是功能基因组学的重要内容。目前植物蛋白质的亚细胞定位方法中应用较普遍的是借助于报告基因表达产物来实现目标蛋白定位的融合报告基因定位法,其中绿色荧光蛋白应用最为广泛。综述了基于绿色荧光蛋白瞬时表达的植物亚细胞定位方法,包括拟南芥原生质体瞬时表达、烟草叶片瞬时表达、洋葱表皮细胞瞬时表达等,同时对上述几种方法进行了比较分析。

**关键词:**蛋白质;亚细胞定位;绿色荧光蛋白;瞬时表达

**中图分类号:** Q-331      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0058-04

蛋白质是生物功能的直接体现者,有序分布、动态调控的蛋白质是保证生命个体正常生长发育的前提。基因表达产物在组织中的亚细胞定位是功能基因组学、蛋白质组学的重要研究内容之一,是系统理解植物形态建成、生长发育以及对逆境的耐受性、抵抗性不可或缺的环节,也是生物学家们初步推断蛋白质生物学功能的重要依据。蛋白质的亚细胞定位可采取多种方法,包括生物信息学预测<sup>[1]</sup>、免疫胶体金标记<sup>[2]</sup>、多肽序列分析<sup>[3]</sup>以及报告基因融合瞬时表达<sup>[4]</sup>等。目前植物蛋白的亚细胞定位应用主要是借助于融合报告基因定位法,其中绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)应用最为广泛。瞬时表达技术结合报告基因,可以有效跟踪融合产物在细胞内的运输、亚细胞定位及代谢<sup>[5]</sup>。GFP 是水母(*Aequorea victoria*)体内的天然蛋白,自 1994 年 Chalfie 等揭示了该蛋白作为报告蛋白的潜在应用价值<sup>[6]</sup>以来,已作为报告蛋白在多种植物、动物、微生物中成功获得表达。由于 GFP 作为报告蛋白不需抗体、辅助因子、酶底物等其他成分,也不影响宿主细胞,因而可以鉴定、跟踪、分选表达 GFP 的细胞;同

时可以在活细胞中进行图像分析,在固定细胞中进行检测<sup>[7]</sup>。瞬时表达(transient expression)是指引入细胞的外源 DNA 与宿主细胞染色体 DNA 并不发生整合,而是随载体进入细胞,约 12 h 左右可表达,基因产物在 2~4 d 内即可被检测出,是 1 种快速研究基因表达、蛋白质亚细胞定位及基因间互动的重要手段。瞬时表达能表达多种外源基因,具有时间短、重复性好等优点,弥补了常规转基因方式中周期长、转化效率低等缺点<sup>[8]</sup>。与传统的转基因相比,瞬时表达不需要整合到染色体上,因此具有简单、快速、周期短、准确等优点<sup>[9]</sup>。瞬时表达不受基因位置效应、基因沉默的影响,表达效率较稳定,转化率高。目前,植物瞬时表达系统已被陆续应用到生物学研究中,如利用该系统进行基因功能的鉴定分析、发现新型强启动子、蛋白质互作、亚细胞定位等。亚细胞定位瞬时表达的宿主载体主要有拟南芥原生质体、烟草叶片、洋葱表皮细胞等。本研究对常用的基于绿色荧光蛋白瞬时表达的植物蛋白质亚细胞定位方法进行总结,并对相关研究进行展望,以期更高效地进行植物蛋白质的亚细胞定位。

## 1 拟南芥原生质体瞬时表达

拟南芥瞬时表达系统由 Jen Sheen 教授实验室建立并完善<sup>[10]</sup>。该方法在蛋白定位、启动子研究以及蛋白质相互作用等方面很有效。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)是 1 种模式植物,一直以来,拟南芥原生质体都是植物基因工程、植物细胞研究的经典材料。原生质体作为 1 种细胞水平的研究系

收稿日期:2014-02-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:30970249)。

作者简介:于一帆(1989—),男,江苏常州人,硕士,研究方向为植物细胞信号转导。E-mail: yuyifan916@gmail.com。

通信作者:陈 云,博士,副教授,研究方向为植物细胞信号转导。  
E-mail: yunchen@yzu.edu.cn。

[5] Harwood C R, Cutting S M. Molecular biological methods for *Bacillus*; vol. 707[M]. New York: Wiley, 1990.

[6] Ye R Q, Kim J H, Kim B G, et al. High level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 62(1): 87-96.

[7] Lin X, Wong S L, Miller E S, et al. Expression of the bacillus licheniformis PWD-1 keratinase gene in *B. subtilis* [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1997, 19(2): 134-138.

[8] Yang S, Huang H, Zhang R, et al. Expression and purification of extracellular penicillin G acylase in *Bacillus subtilis* [J]. Protein

Expression and Purification, 2001, 21(1): 60-64.

[9] Stülke J, Hillen W. Regulation of Carbon catabolism in *Bacillus species* [J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54(1): 849-880.

[10] Braaz R, Wong S L, Jendrosseck D. Production of PHA depolymerase A (PhaZ5) from *Paucimonas lemoignei* in *Bacillus subtilis* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 209(2): 237-241.

[11] Gat O, Inbar I, Aloni - Grinstein R, et al. Use of a promoter trap system in *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* for the development of recombinant protective antigen - based vaccines [J]. Infection and Immunity, 2003, 71(2): 801-813.

统,由于没有细胞壁等特点,它可以排除细胞之间的相互影响,单独考察 1 个细胞的全能性。原生质体是 1 个均一性程度很好的群体,并且在短时间内就能获得大量原生质体。原生质体是 1 个理想的试验系统,由于不受植物细胞壁的限制,其质膜经一定处理可以摄取外源物质(如细胞器、病毒、DNA 等),是遗传转化的理想受体系统<sup>[11]</sup>。研究表明,不同植物材料所得到的原生质体可以保持原组织的生理生化特性,可以取代植物组织作为理想的试验材料。

### 1.1 PEG - Ca<sup>2+</sup> 介导转化法

聚乙二醇(PEG)作为 1 种高分子化合物,20% ~ 50% 的浓度能对原生质体产生瞬间冲击效应,使原生质体很快发生收缩。PEG 也能连接 Ca<sup>2+</sup> 等阳离子,Ca<sup>2+</sup> 可在带负电荷的质粒 DNA、PEG 之间形成桥,从而促使质粒进入原生质体。PEG - Ca<sup>2+</sup> 介导的转化是拟南芥瞬时表达体系最常用的方法。该方法的技术流程是:拟南芥土培 3 ~ 4 周,生长过程中要求光周期较短(11 ~ 12 h)。用解剖刀将符合要求的叶片切成细小的小段,溶于 15 mL 酶液中(纤维素酶 0.225 g,离析酶 0.112 5 g,甘露醇 1.641 g,pH 值为 5.7 的 MES 1.5 mL,55 ℃ 10 min,冷却至室温,再加入 1 mol/L CaCl<sub>2</sub> 15 μL、β - 巯基乙醇 5.25 μL、牛血清白蛋白 BSA 150 μL,加 dd H<sub>2</sub>O 至 15 mL)。避光抽真空 1 h,40 r/min 慢摇 4 h,然后 80 r/min 摇 5 min 使小片段完全酶解。用等体积 W5 溶液(0.9% NaCl、10% CaCl<sub>2</sub>、0.037% KCl,2% pH 值为 5.7 的 MES)稀释,过 2 层 300 目细胞筛,用 W5 溶液补体积至 40 ~ 50 mL,100 g 平甩离心 5 min。弃上清后,用 10 mL W5 溶液轻柔清洗原生质体。用 1 mL Mmg 溶液(10.93% 甘露醇、0.304% MgCl<sub>2</sub>、4% MES)重悬原生质体。100 μL 原生质体加 10 μg 质粒,然后加入等体积 PEG/Ca<sup>2+</sup> 溶液(9.1% 甘露醇、10% CaCl<sub>2</sub>、40% PEG 4000),缓慢轻柔混匀,25 ℃ 暗培养 10 ~ 15 min。逐滴加入 440 μL W5 溶液。加 1 mL WI 溶液(10.93% 甘露醇、4% MES、0.03% KCl)重悬,枪头轻打混匀。镜检计数后置于培养板 25 ℃ 过夜培养,使用荧光倒置显微镜观察荧光<sup>[12]</sup>。

### 1.2 电击穿孔法

在适宜的高压电脉冲作用下,原生质体细胞膜形成可修复的微孔,亲水性物质通过这些微孔进入细胞。Langridge 等采用电击技术分别把 Ti 质粒、CAT 基因等导入胡萝卜原生质体并获得瞬间表达<sup>[13-14]</sup>。此后,在烟草、油菜、大豆、水稻、小麦、高粱、玉米等植物中都实现了原生质体的电击基因转移及其表达。就操作而言,电击法技术简单方便。但是影响电击基因导入、表达的因素却是相当复杂的<sup>[15]</sup>。

### 1.3 脂质体介导转化法

脂质体介导转化法是将质粒 DNA 包裹在脂质体中,然后与原生质体接触融合而把外源 DNA 带入原生质体的 1 种方法。脂质体是 1 种由磷脂、胆固醇、脂肪酸等脂类分子组成的球形膜囊结构,可将 DNA、RNA 等大分子物质包在脂质体内,免受细胞内核酸酶的降解。脂质体可做单层、双层或多层。脂质体进入原生质体主要发生在脂质体与原生质体共培养的起始 2 h,共培养 90 min 后,加入一定浓度的 PEG 能提高脂质体、原生质体融合的频率。

### 1.4 植物病毒载体介导法

植物病毒大多为 RNA,病毒载体介导的外源基因瞬时表

达系统原理是将目的基因克隆到植物病毒基因组载体上的启动子下游,通过体外转录后的直接侵染,或借助基因枪、农杆菌等将其导入植物细胞。病毒在植物细胞间移动可以确保其进入较大范围甚至是整株细胞中,方便在植株整体水平开展外源基因功能研究。病毒在植物细胞内的大量复制,使外源基因的表达式获得显著提高,而且外源基因与病毒外壳蛋白的融合可以将外源基因产物展示在病毒颗粒表面,易于提取、分析<sup>[16]</sup>。植物病毒载体介导法的缺点是尽管植物种类繁多,且一些病毒可以侵染的宿主细胞范围很宽,但是目前成功开发为转化载体的病毒还很少,一些重要的作物类型还无法使用病毒侵染;病毒载体所能插入的外源片段较小,且病毒重组可能会影响表达产物的稳定。

### 1.5 其他转化方法

其他遗传转化技术如激光微素法<sup>[17]</sup>、显微注射法<sup>[18]</sup>、超声波法<sup>[19]</sup>等也正被逐步应用到植物原生质体的遗传转化上来。

## 2 烟草叶片瞬时表达

烟草生长周期短、转基因技术成熟,且转基因过程简单易操作,常被用做试验材料进行外源功能基因的亚细胞定位,加快了功能基因的研究进程。将定位载体导入农杆菌,利用注射法在烟草表皮细胞实现蛋白的亚细胞定位<sup>[20-22]</sup>,使基因功能研究更加经济快捷。在烟草细胞或组织中瞬时表达外源基因,当农杆菌细胞渗透至叶片的细胞间隙时,可以高效率地将 T - DNA 导入植物细胞核内,达到表达外源基因并分析外源基因功能的目的<sup>[5]</sup>。采用在烟草叶片中表达外源基因的方法,最大的优点是简便快捷,且容易操作,但是表达外源基因的效率要低于转基因等方法<sup>[23]</sup>。

### 2.1 注射法

采用注射器直接将农杆菌注射至叶片下表皮细胞间隙方法的技术流程是:烟草植株 21 ℃ 土培 5 ~ 6 周,光周期为 14 h/d。挑取农杆菌单菌落于 4 mL YEB 培养基中,28 ℃ 200 r/min 过夜培养。吸取 1 ~ 1.5 mL 菌液置于 50 mL YEB 培养基中,28 ℃ 继续培养 8 h。室温下 2 200 g 离心 10 min。弃上清,用 50 mL 渗透液(250 mg D - 葡萄糖、5 mL 50 mmol/L MES、5 mL 2 mmol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O、5 μL 1 mol/L 乙酰丁香酮)重悬至 D<sub>600 nm</sub> 为 1.0,室温放置至少 3 h。用无菌 1 mL 医用注射器吸取菌液,将针头刺入下表皮,轻轻将菌液注射进下表皮空隙中。烟草注射菌液后继续在 22 ~ 24 ℃ 下培养,36 h 后进行荧光检测<sup>[24-25]</sup>。

### 2.2 浸染法

将含有重组质粒的农杆菌单菌落培养至 D<sub>600 nm</sub> 为 1.0,烟草嫩叶用 HgCl<sub>2</sub> 溶液消毒后剪成小块或打孔,浸入菌液 3 ~ 5 min,均匀摇晃,置于固体 MS 培养基表面,暗培养 24 ~ 72 h,撕表皮,用荧光倒置显微镜观察荧光<sup>[26]</sup>。

## 3 洋葱表皮细胞瞬时表达

洋葱表皮细胞结构清晰,取材方便,是观察细胞部分功能、外源基因瞬时表达的好材料。洋葱表皮细胞中瞬时表达外源基因的方法主要有农杆菌介导法、基因枪轰击法 2 种。

### 3.1 农杆菌介导法

农杆菌介导的植物遗传转化系统作为 1 种天然的植物基

因转化系统,已经成为当今植物遗传转化的主流方法<sup>[27]</sup>。农杆菌介导的瞬时表达快速有效,其原理是将目的基因插入载体,转化到农杆菌中,采用真空渗透或注射等方法使农杆菌与植物材料细胞接触,大部分 T-DNA 进入细胞核内进行瞬时表达,几天后即可检测到外源基因的表达<sup>[28]</sup>。农杆菌渗入法的技术流程包括载体构建、农杆菌培养、针管注射浸润、瞬时表达等部分。针对洋葱表皮细胞的农杆菌介导方法主要是先将含重组质粒的农杆菌单菌落培养至  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.6, 2 800 g 离心 10 min,弃上清,用 MS(10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、100  $\mu\text{mol/L}$  乙酰丁香酮)重悬菌液。取洋葱球茎内 4~7 层表皮灭菌,撕 1  $\text{cm}^2$  内表皮置于农杆菌液中 20 min,将内表皮平铺于 MS 固体培养基上暗培养 16 h。用荧光倒置显微镜观察荧光<sup>[29]</sup>。

### 3.2 基因枪轰击法

基因枪法(gene gun)介导的瞬时表达应用较早,技术也较成熟。基因枪法原理是利用高速飞行的微米或亚微米级惰性粒子(钨或金粉),将包被其外的目的基因直接导入受体细胞,并释放出外源 DNA,使 DNA 在受体细胞中获得短暂的高水平表达,从而实现对受体细胞的瞬时转化。目前,基因枪转化包括钨粉准备、DNA 包裹钨粉微粒以及基因枪轰击等步骤<sup>[30-31]</sup>。

## 4 讨论

目前,上述几种方法常被用于植物蛋白质亚细胞定位瞬时表达研究。笔者对这几种方法分别进行比较、总结,并对各种方法的不足之处提出改进。

### 4.1 以拟南芥为宿主载体

拟南芥作为模式植物,在生物学研究中十分重要。利用拟南芥进行原生质体相关研究,能够克服植物细胞工程领域的许多困难。原生质体细胞作为遗传转化的理想受体,可用于转入基因的表达定位、功能分析等研究。除了可以摄取核酸大分子外,原生质体还可以吞噬或融合细胞器以及细菌、病毒等微生物,这有可能开辟植物细胞工程研究的新领域<sup>[32]</sup>。然而该系统也有不足的地方:一方面是植物细胞壁被酶解掉了,因此不适合研究外膜蛋白,更无法研究细胞壁;另一方面,原生质体本身存活时间一般不超过 72 h,不能连续培养,因此不能进行长期观察,也不能用来研究与细胞周期有关的问题。应用最广泛的 PEG- $\text{Ca}^{2+}$  介导转化法的不足之处也是很明显的。首先,用于提取原生质体的拟南芥叶片只能选取符合要求的,且叶片需要切成 1 mm 条状,因此要求操作技巧较高。另外还需要长时间的抽真空、摇床慢摇等,耗时长。针对这些问题,前人提出的借助胶带提取原生质体的方法显然更为高效,该方法对叶片的选择没有任何限制,而且无需对叶片进行切割,无需抽真空处理,水平慢摇也仅需 20~60 min,相比上述方法省略了大量操作,节约了时间,叶片表皮也能较好地剥离,提取原生质体的效率更高。

### 4.2 以烟草为宿主载体

采用在烟草叶片中表达外源基因的方法最大的优点是简便快捷,不需要酶解制备原生质体,但是表达外源基因的效率远远低于转基因等方法。烟草叶盘较大,注射时操作简单,目的基因与对照组可在同一张叶片上进行试验,可以更好地控制变量,但是受侵染液浓度、侵染时间影响较大。传统的注射法中,注射烟草叶片都是撕取烟草叶片的下表皮,制成临时装

片置于荧光倒置显微镜下观察。然而撕取烟草叶片下表皮需要较高的技巧、较长的时间,表皮一旦撕得不好会造成大量叶肉细胞附着,严重影响试验结果,且观察到叶肉细胞自发荧光的可能性极高,对定位结果干扰较大。笔者认为,使用打孔器对转化的烟草叶片进行打孔,或切下 5 mm×5 mm 的小块,移至加满水的 10 mL 注射器中,用手指堵住出口处,用力抽吸几下,让叶片中充满水,将叶片置于荧光倒置显微镜下直接观察下表皮即可。该方法操作简便,无需撕取表皮,节省了时间,且观察时消除了叶肉细胞、自发荧光对定位结果的干扰。浸染法中,对烟草的瞬时表达体系优化为:农杆菌的  $D_{600\text{ nm}}$  值为 0.6 左右,侵染 6 min,共培养 2 d,在共培养培养基中添加 120  $\mu\text{mol/L}$  乙酰丁香酮,能得到较高的烟草瞬时表达率。

### 4.3 以洋葱为宿主载体

基因枪技术的优点主要是不受宿主限制、受体类型广泛。该法不仅可以原生质体作为受体材料,而且可以完整细胞、组织等(如叶片、茎或根的切段、幼胚、愈伤组织、花粉细胞等)作为受体材料进行轰击转化,可控度高。基因枪轰击过程中,可根据需要将射弹射入特定层次(位置)的细胞,有利于提高转化效率。基因枪法的缺陷也是显而易见的,首先是费用较高,基因枪轰击对于植物伤害较大,轰击位置不均匀,细胞容易因为部分受伤害过大而死亡;其次该方法还存在转化效率低、外源基因向植物中插入不够精确等缺点。对于基因枪法的优化,不同植物品种之间存在较大差异。例如在水稻中,选用金粉,通过减小射击距离,轰击前用甘露醇进行预处理,可以提高转化率<sup>[33]</sup>。在小麦中,通过大幅度降低金粉用量,进行渗透压处理,同时选择合适的受体,可以提高转化率<sup>[34]</sup>。在大豆中,金粉尺寸为 0.6  $\mu\text{m}$ ,轰击时氦压力值为 1 100 psi,真空压力数为 27 In·Hg,轰击距离为 9 cm<sup>[35]</sup>。在玉米中,最佳轰击参数为:1 350 psi 氦气压力,25 In·Hg 真空度,6 cm 射击距离<sup>[36]</sup>。目前常以洋葱表皮细胞作为转化材料,采用农杆菌侵染法,从侵染液中乙酰丁香酮的浓度、农杆菌菌液浓度和侵染时间、共培养时间等方面探索最适转化条件,但是该方法的不足之处在于对膜蛋白无法做到精准定位,需要使用 30% 蔗糖继续进行质壁分离试验才能进一步验证定位结果<sup>[37]</sup>。

## 5 展望

蛋白质的亚细胞定位与其功能发挥密切相关。细胞行使功能需要由特定空间分布的蛋白质种类、含量、修饰的动态变化来体现。随着多种蛋白质亚细胞定位技术的建立与发展,目前已经实现了从单个蛋白质的亚细胞定位到高通量进行蛋白质亚细胞定位的技术创新,并且从静态定位研究发展到活体动态研究<sup>[38]</sup>。各种定位方法的综合运用积累了大量亚细胞定位数据,使人们了解细胞内不同分区中蛋白质分布的大致轮廓成为可能。近年来,水稻的细胞分区、蛋白质组亚细胞定位研究已经展开<sup>[39]</sup>。有学者尝试用荧光共振能量转移(FRET)显微测量技术来研究活细胞蛋白质的空间分布,包括对共定位于活细胞特定部位的蛋白质相互作用的研究,以此实时跟踪特定蛋白质在细胞生长发育过程中的表达、调控机制等<sup>[40-41]</sup>。蛋白质亚细胞定位数据的积累完善,将为深入阐明蛋白质的功能提供依据。

## 参考文献:

- [1] 张松, 黄波, 夏学峰, 等. 蛋白质亚细胞定位的生物信息学研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(6): 573-579.
- [2] 冯志敏. 免疫金标记技术在植物蛋白质亚细胞定位中的应用[J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2006, 16(1): 105-108.
- [3] 李凤敏. 蛋白质亚细胞定位的序列分析和理论预测算法研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2004.
- [4] 夏玉凤. 以 *gfp* 为报告基因研究蛋白亚细胞定位[J]. 生物技术通报, 2006(2): 11-13.
- [5] 邱 仍, 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.
- [6] Chalfie M. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Trends in Genetics, 1994, 10(5): 151.
- [7] 张俊莲, 王 蒂, 张金文, 等. 用绿色荧光蛋白和洋葱表皮细胞检测拟南芥 *rd29A* 基因启动子活性的方法[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(6): 815-819.
- [8] 周丹丹, 俞嘉宁. 植物细胞中瞬时表达系统的建立及研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(24): 151-156.
- [9] 徐 恒, 黎万奎, 谢志健, 等. 苜蓿愈伤组织诱导及 *GUS* 基因瞬时表达[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2001, 38(6): 905-908.
- [10] Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. Nature Protocols, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [11] Vidal S, Eriksson A R, Montesano M, et al. Cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora* cooperate in the salicylic acid-independent induction of a plant defense response[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11(1): 23-32.
- [12] Chen Y, Ji F F, Xie H, et al. Overexpression of the regulator of G-protein signalling protein enhances ABA-mediated inhibition of root elongation and drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(9): 2101-2110.
- [13] Langridge W H, Li B J, Szalay A A. Electric field mediated stable transformation of carrot protoplasts with naked DNA[J]. Plant Cell Reports, 1985, 4(6): 355-359.
- [14] Fromm M, Taylor L P, Wallbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985, 82(17): 5824-5828.
- [15] 徐华强, 蔡国平, 吴 逸, 等. 大白菜和黄瓜原生质体电击基因转移的研究[J]. 植物学报, 1991, 33(1): 7-13.
- [16] 孙琳琳. 拟南芥原生质体制备及葡萄 ERFs 调控 GCC-box 的瞬时表达分析[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2009.
- [17] 崔丽华, 张明浩, 陈凌娜, 等. 激光微束在植物外源基因转化上的应用[J]. 激光生物学报, 2005, 14(2): 156-161.
- [18] 刘艳红, 肖调义, 苏建明, 等. 用显微注射法将绿色荧光蛋白基因导入金鱼受精卵中表达[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(2): 102-105.
- [19] 章力建, 陈乐玖, 袁 静, 等. 超声波法直接导入外源基因——高效烟草转化系统的建立[J]. 中国农业科学, 1991, 24(2): 83-89, 98.
- [20] Li H, Zhou S Y, Zhao W S, et al. A novel wall-associated receptor-like protein kinase gene, *OsWAK1*, plays important roles in rice blast disease resistance[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69(3): 337-346.
- [21] Brandizzi F, Frangne N, Marc-Martin S, et al. The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain[J]. The Plant Cell, 2002, 14(5): 1077-1092.
- [22] Friedrichsen D M, Joazeiro C A, Li J, et al. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase[J]. Plant Physiology, 2000, 123(4): 1247-1256.
- [23] 周善跃. 三个烟草品种瞬时表达 *OsWAK1::GFP* 的差异[J]. 中国农学通报, 2009, 25(8): 58-61.
- [24] Sparkes I A, Runions J, Kearns A, et al. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants[J]. Nature Protocols, 2006, 1(4): 2019-2025.
- [25] 朱 霞. 甘蓝型油菜中 *RGS* 基因(*BnRGS1*)的克隆及功能研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- [26] 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.
- [27] 姚 冉, 石美丽, 潘沈元, 等. 农杆菌介导的植物遗传转化研究进展[J]. 生物技术进展, 2011, 1(4): 260-265.
- [28] 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.
- [29] Xu K D, Huang X H, Wu M M, et al. A rapid, highly efficient and economical method of *Agrobacterium*-mediated in planta transient transformation in living onion epidermis[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e83556.
- [30] 赵军锋, 高英杰, 刘玉良, 等. 重组质粒在洋葱表皮细胞的转化[J]. 衡水学院学报, 2013, 15(1): 31-34.
- [31] 徐启江, 崔成日. 用基因枪法介导 *OSISAPI* 基因遗传转化洋葱[J]. 植物生理与分子生物学报, 2007, 33(3): 188-196.
- [32] 梁大伟. 拟南芥叶肉原生质体分离及瞬时表达体系的建立[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [33] 赵 彬, 薛庆中. 基因枪在水稻遗传转化中的应用及其转化技术的优化[J]. 生物技术, 1998, 8(1): 4-6.
- [34] 周森平, 沈晓蓉, 章静娟, 等. 小麦基因枪法转化技术的改进[J]. 江苏农业学报, 1999, 15(1): 64-66.
- [35] 叶 美, 张 敏, 杨素欣, 等. 大豆成熟种子胚尖基因枪法转化体系的优化[J]. 大豆科学, 2011, 30(1): 20-23.
- [36] 贾玮琨, 杨丽莉, 周小梅, 等. 基因枪转化玉米愈伤组织参数的优化[J]. 华北农学报, 2001, 16(4): 77-80.
- [37] 马 亮, 梅晓宏, 许文涛, 等. 玉米 *In5-2* 启动子功能区域在洋葱瞬时表达系统中的分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(6): 1073-1078.
- [38] 邢浩然, 刘丽娟, 刘国振. 植物蛋白质的亚细胞定位研究进展[J]. 华北农学报, 2006, 21(增刊): 1-6.
- [39] Tanaka N, Fujita M, Handa H, et al. Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartments[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 271(5): 566-576.
- [40] Heijnen H F, Waaijenborg S, Crapo J D, et al. Colocalization of eNOS and the catalytic subunit of PKA in endothelial cell junctions: a clue for regulated NO production[J]. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2004, 52(10): 1277-1285.
- [41] Voss T C, Demarco I A, Day R N. Quantitative imaging of protein interactions in the cell nucleus[J]. BioTechniques, 2005, 38(3): 413-424.