

李齐东, 高 璐, 蒋建雄, 等. 嗜热内切葡聚糖酶(*E1*) 植物亚细胞定位表达载体的构建及验证[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(6): 1247-1253.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.06.007

嗜热内切葡聚糖酶(*E1*) 植物亚细胞定位表达载体的构建及验证

李齐东, 高 璐, 蒋建雄, 武艳芳, 李 霞, 王永丽, 刘瑶瑶, 孙建中
(江苏大学环境与安全工程学院, 生物质能源研究所, 江苏 镇江 212013)

摘要: 嗜热纤维素降解酶在植物中的表达对促进纤维素降解, 提高生物质资源化利用具有重要作用。本研究采用来源于解纤维素热酸菌(*Acidothermus cellulolyticus*) 的嗜热内切葡聚糖酶基因(*E1*), 基因序列优化后, 构建了5种带有不同亚细胞定位信号肽的目的基因植物表达载体, 分别将嗜热内切葡聚糖酶(*E1*) 定位到细胞质、质外体、内质网、叶绿体和线粒体等亚细胞结构中。通过农杆菌介导的瞬时表达技术, 利用洋葱表皮和烟草叶片进行定位表达研究, 观察到在信号肽的引导下, 基因表达产物在相应的亚细胞结构中正确定位。本研究为进一步探索 *E1* 不同定位表达在秸秆高效转化和资源化利用中的作用奠定了基础。

关键词: 嗜热内切葡聚糖酶; 亚细胞定位; 瞬时表达

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)06-1247-07

Construction and verification of the thermophilic endoglucanase (*E1*) subcellular plant expression vector

LI Qi-dong, GAO Lu, JIANG Jian-xiong, WU Yan-fang, LI Xia, WANG Yong-li, LIU Yao-yao, SUN Jian-zhong

(*Biofuels Institute, School of the Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China*)

Abstract: The expression of thermophilic cellulolytic enzymes in plants plays an important role in promoting the degradation of cellulose and improving the utilization of biomass. In this study, the thermophilic endoglucanase gene (*E1*) derived from *Acidothermus cellulolyticus* was optimized. After optimization of the gene sequence, the thermophilic endoglucanase was localized to the cytoplasm, apoplast, endoplasmic reticulum, chloroplast and mitochondria by five binary plant expression vectors with different subcellular localization signal peptide, respectively. *Agrobacterium*-mediated transient expression technology was used to locate the target gene by using onion epidermis and tobacco. The subcellular localization of the gene expression products was observed under an inverted fluorescence microscope. This study laid the foundation for further exploration of the effects of different localization and expression of thermophilic endoglucanase on efficient transformation and resource utilization of straw.

Key words: thermophilic endoglucanase; subcellular localization; transient expression

收稿日期: 2018-02-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601380、31671754); 江苏省高校优势学科建设工程项目; 江苏大学高级人才基金项目(13JDB017)

作者简介: 李齐东(1992-), 男, 山东聊城人, 硕士研究生, 主要从事秸秆和能源植物的资源化利用研究。(E-mail) rwwyrywy@126.com

通讯作者: 孙建中, (E-mail) jzsun1002@ujs.edu.cn

农作物秸秆是自然界中储量丰富的可再生资源, 具有来源广泛、成本低廉等特点。中国秸秆资源十分丰富, 每年农作物秸秆的总量约为 $6 \times 10^8 \sim 8 \times 10^8 \text{ t}^{[1-2]}$, 约占世界秸秆总量的

20%^[3]。秸秆资源的充分利用,有利于减少秸秆丢弃甚至焚烧带来的环境污染,降低化石能源消耗,对中国国民经济的可持续发展具有重要意义^[4-6]。木质纤维素是农作物秸秆的主要成分,由纤维素、半纤维素和木质素组成,以分子化学键的形式紧密连接,形成天然的抗降解屏障^[7],限制秸秆的降解利用。传统的木质纤维素利用成本较高,效率有限,而且极易造成二次环境污染,阻滞其产业化的快速发展。

纤维素降解酶在植物中表达重组,能够减少木质纤维素转化过程中酶制品的添加量,提高降解酶的作用效率,降低木质纤维素降解的成本,具有重要的应用前景和学术价值。其中,嗜热纤维素降解酶的活性温度远高于植物正常生长的温度^[8],受到相关科研工作者的广泛重视。但仍有研究结果^[9-10]表明,由于嗜热纤维素降解酶在常温下仍有一定活性,在植物中的表达会干扰植物细胞壁组织结构,导致植物抗逆性降低,组织器官坍塌或植株矮化畸形,造成产量下降甚至植株死亡的后果,制约嗜热纤维素降解酶在作物和能源植物遗传改良中的应用。

为避免转基因对植物正常生长的影响,不少研究者采用定向胞外或细胞器积累表达的策略,目的基因产物被限制在特定的器官、亚细胞结构中^[11]。亚细胞定位对促进蛋白质表达,明确蛋白质功能具有重要作用^[12-13]。利用这一策略能明确嗜热纤维素降解酶定位表达对植物细胞壁的影响及其对植物秸秆降解的效率,保证植物正常生长,以实现秸秆高效降解利用的目的。

本研究拟在植物不同的亚细胞结构中,对来源于解纤维素热酸菌(*Acidothermus cellulolyticus*)的嗜热内切葡聚糖酶基因(*E1*)进行定位表达。通过农杆菌介导的瞬时表达技术,利用洋葱表皮和烟草进行目的基因定位研究,在倒置荧光显微镜下观察基因表达产物的亚细胞定位,以期为进一步探索嗜热内切葡聚糖酶(*E1*)不同的定位表达在秸秆高效转化和资源化利用中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 植物材料 本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)

由云南省烟草农业科学研究院提供。洋葱(*Allium cepa* L.)购于本地菜市场。

1.1.2 试验试剂 限制性内切酶(*Not* I、*Nco* I、*Xba* I和*Sal* I)购自 NEB 有限公司,内质网红色荧光探针(ER-Traker Red, NO. C1041)购自碧云天生物技术有限公司,线粒体红色荧光探针(MitoTraker® Deep Red FM, NO. 40741ES50)购自上海翊圣生物科技有限公司,叶绿体红色荧光染色菌液由江苏省农业科学研究院提供

1.2 试验方法

1.2.1 *E1* 基因序列优化与合成 利用在线软件 Graphical Codon Usage Analyzer 对 *E1* 基因的密码子偏好性进行分析,并根据禾本科模式植物水稻(*Oryza sativa*)的密码子偏好性优化 *E1* 基因序列,确保每个密码子的偏好率均高于 10%,尤其是 N 端密码子的偏好率大于 20%。在 *E1* 基因的 N 端和 C 端分别添加了 *Nco* I 和 *Not* I 酶切位点。

1.2.2 植物亚细胞定位表达载体的构建 优化后的 *E1* 基因经过 *Not* I 和 *Nco* I 双酶切,分别与 5 个不同亚细胞定位信号肽的 ImpactVectors 载体连接,构建成 *E1*-IV1.1~*E1*-IV1.5 系列载体,其中载体编号 1.1 表示不含有信号肽,1.2 表示通过内质网分泌的胞外信号肽,1.3 表示内质网滞留信号肽,1.4 表示叶绿体信号肽,1.5 表示线粒体信号肽。利用 PCR 技术将上述载体中信号肽-*E1* 基因序列扩增。根据载体序列设计的 PCR 扩增引物分别为:正向扩增引物(1.1S) 5'-GTCCATTCCTCCTAAGTATCTAGAA-3',反向扩增引物(1.1A) 5'-GCACGCGTTCGACGCGCGCTCGCGGCGCACGCAA-3',反向扩增引物(1.3A) 5'-GCACGCGTTCGACGAAGTTCGTCCTTGTGA-3' (其中下划线部分表示酶切位点,斜体部分表示保护碱基)。将纯化后的 PCR 产物分别双酶切,然后连接到 Cam35S-GFP 植物表达载体中,构建表达含有信号肽和 *E1*-GFP 融合蛋白质的植物亚细胞器定位表达载体。

1.2.3 农杆菌感受态细胞的制备、转化 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* EHA105)感受态细胞制备和转化参照王关林等^[14]的方法进行,转化后在 YEB 固体选择培养基(含有 50 μg/ml 利福平和 100 μg/ml 卡那霉素)中倒置暗培养 48 h,分别挑取转化的农杆菌单菌落,用材料与方法 1.2.2 中引物 1.1A、1.1S 和 1.3A 进行菌落 PCR 鉴定。

1.2.4 烟草与洋葱表皮细胞的转化及荧光倒置显微镜观察 本研究选用洋葱和烟草 2 种试验材料进行农杆菌介导和亚细胞定位分析。用洋葱表皮细胞进行细胞质和质外体定位表达分析,采用烟草叶片进行内质网、叶绿体和线粒体定位表达分析。

1.2.4.1 农杆菌介导的洋葱瞬时表达系统 取无菌的洋葱表皮切至大小约 1 cm²,于固体 1/2 MS 培养基中 28 ℃ 暗培养 24 h 后,用含 1/2 MS 渗透培养基 [10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L 2-(*N*-吗啉)乙磺酸, 100 μmol/L 乙酰丁香酮] 重悬后^[13]的重组农杆菌感染 15 min,共培养 48 h (25 ℃, 32 h 光照, 16 h 黑暗)。将洋葱表皮细胞清洗干净,并制片用于荧光倒置显微镜观察。用 30% 蔗糖溶液浸泡感染过的洋葱表皮细胞 10 min,使其发生质壁分离,用于质外体表达融合蛋白质的验证观察。

1.2.4.2 农杆菌介导的烟草瞬时表达系统 离心重组农杆菌,收集,用 1 ml 10 mmol/L 的 MgCl₂ 重新悬浮洗涤菌体后,离心弃去上清液,采用渗透培养基^[13] [10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L 2-(*N*-吗啉)乙磺酸, 100 μmol/L 乙酰丁香酮] 重新悬浮菌体,于 25 ℃ 下避光静置 4 h。选取成熟的烟草叶片,避开叶脉,从下表皮将菌液缓慢均匀地注射入烟草叶片。避光 12 h 后,培养 48 h (温度 25 ℃, 光照 32 h, 黑暗 16 h)。亚细胞定位荧光探针于观察前注射于烟草叶片下表皮,注射后避光 30 min,撕取叶片下表皮细胞,制片,用荧光倒置显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 EI 基因优化

目的基因在异源表达前,通常要进行外源目的基因的优化处理。优化密码子偏好性分析结果(表 1)显示,7 种氨基酸(114 处)的密码子在植物中的相对适应性较低,平均为 45%。通过基因优化后,共计改变了 150 个碱基序列。优化后密码子序列的平均相对适应性提高到 91%,有利于 EI 基因高效稳定表达。

2.2 植物不同亚细胞定位表达载体的构建和验证

以带有不同亚细胞定位信号肽的 ImpactVectors 系列载体为基础,成功构建含有信号肽和 EI-GFP 融合蛋白质的植物亚细胞定位表达载体(图 1)。

表 1 EI 基因优化及密码子的相对适应性

Table 1 EI gene optimization and codon relative adaptability

氨基酸	密码子		相对适应性(%)		氨基酸数量
	优化前	优化后	优化前	优化后	
精氨酸	CGC	CGG	20	26	7
天冬氨酸	GAC	GAT	47	100	20
组氨酸	CAC	CAT	64	100	5
亮氨酸	CTG	CTC	42	65	16
脯氨酸	CCG	CCT	47	100	31
丝氨酸	AGC	TCT	46	100	18
缬氨酸	GTC	GTT	48	100	17

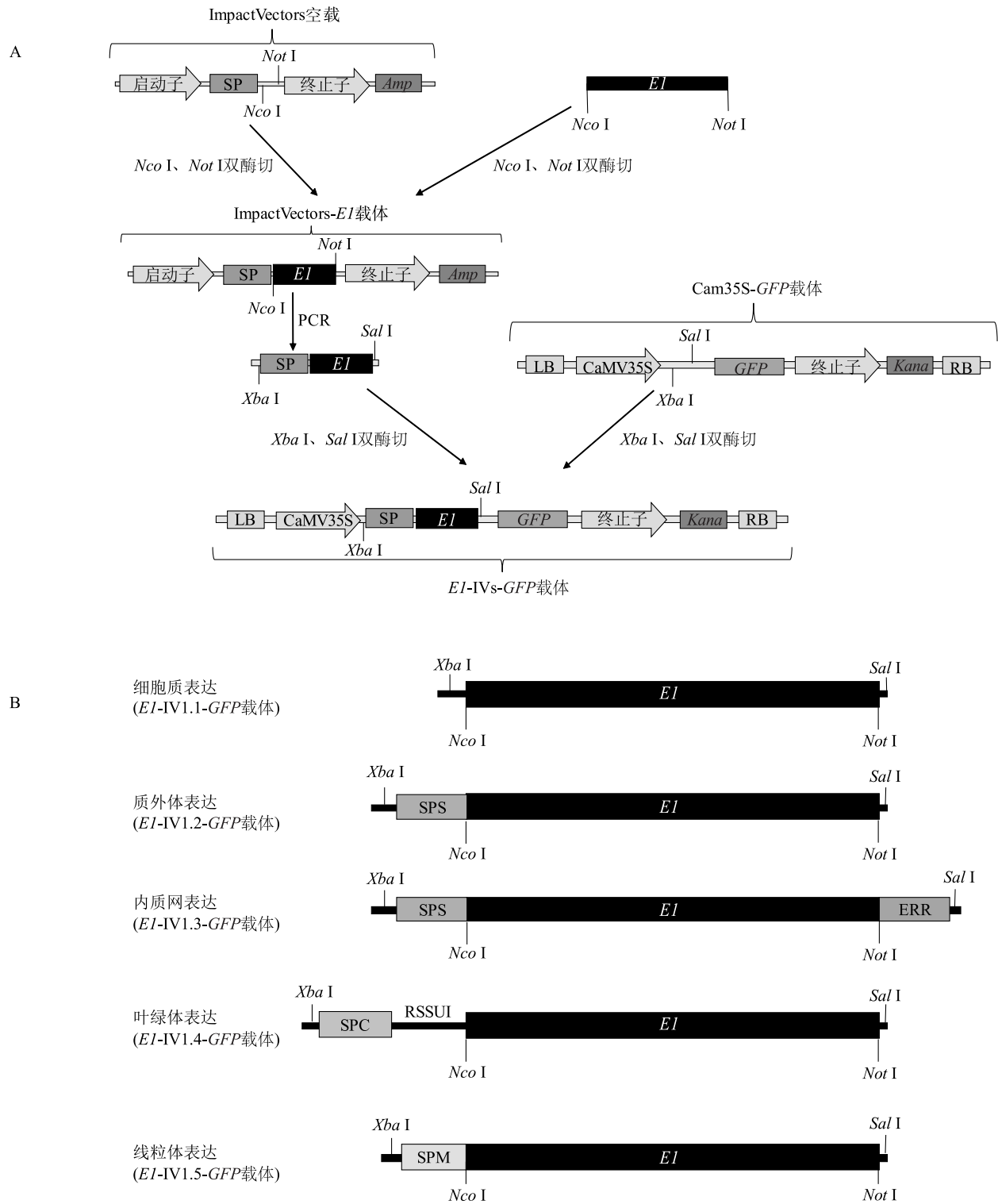
采用双酶切技术对 ImpactVectors-EI 载体进行验证,用 *Not* I 和 *Nco* I 2 种限制性核酸内切酶进行双酶切,酶切产物的琼脂糖凝胶电泳图(图 2A)显示, EI 基因的片段大小为 1 576 bp, ImpactVectors 系列空载体大小约为 4 700 bp,经测序, EI 基因片段已完全插入到 ImpactVectors-EI 融合载体中。对二元植物表达载体 EI-IVs-GFP 进行 PCR 扩增验证(所用引物同材料与方法 1.2.2),琼脂糖凝胶电泳结果(图 2B)表明, EI 基因(带有不同信号肽基因序列)的片段大小约为 1 576 bp,与理论预测结果完全一致。

2.3 亚细胞定位分析

EI 基因已插入到 Cam35S 启动子和绿色荧光蛋白质基因(*GFP*)中,形成融合表达载体。为了确定带有绿色荧光的目的蛋白质是否在细胞中特定部位实现了表达,将融合表达载体利用农杆菌介导法转化到洋葱表皮细胞和烟草叶片中,并用荧光倒置显微镜进行观察。

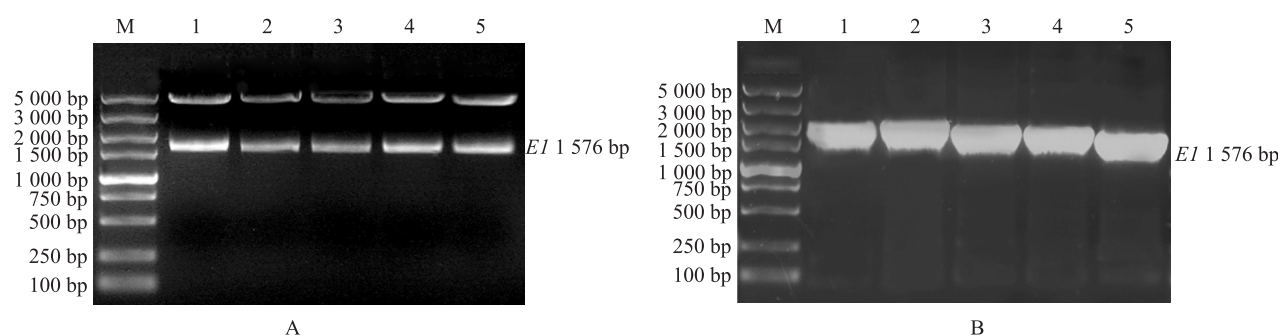
2.3.1 EI 基因的细胞质定位表达分析 不带有信号肽的 EI 融合蛋白质在洋葱表皮细胞中的定位表达如图 3 显示,荧光倒置显微镜观察发现,不带有信号肽的 EI-IV1.1-GFP 表达载体在洋葱表皮细胞的细胞质中均实现了表达。由于洋葱表皮细胞中含有液泡,故 GFP 绿色荧光蛋白质在细胞膜内侧近膜区域表达较为充分。

2.3.2 EI 基因的质外体定位表达分析 带有分泌表达信号肽的 EI 融合蛋白质在洋葱表皮细胞中的定位表达如图 4 显示,荧光倒置显微镜观察发现,带有分泌表达信号肽的 EI-IV1.2-GFP 表达载体在洋葱表皮细胞的细胞壁上实现了表达,与分泌表达信号肽的定位位置完全一致,说明目的蛋白质已分泌至膜外区域。



A: 植物表达载体构建流程; B: 含有不同信号肽的 *E1* 基因结构。Not I、Nco I、Xba I 和 Sal I 均表示限制性核酸内切酶的酶切位点; CaMV35S: 35S 启动子; GFP: 绿色荧光蛋白基因; LB: left border 载体导入基因片段的左侧边界; RB: right border 载体导入基因片段的右侧边界; Kana: 抗卡那霉素的基因片段; Amp: 抗氨苄青霉素的基因片段; SP: 信号肽; SPS: 分泌型信号肽; ERR: 内质网滞留信号肽; SPC: 叶绿体信号肽; RSSUI: Rubisco 小亚基蛋白质内含子; SPM: 线粒体信号肽。

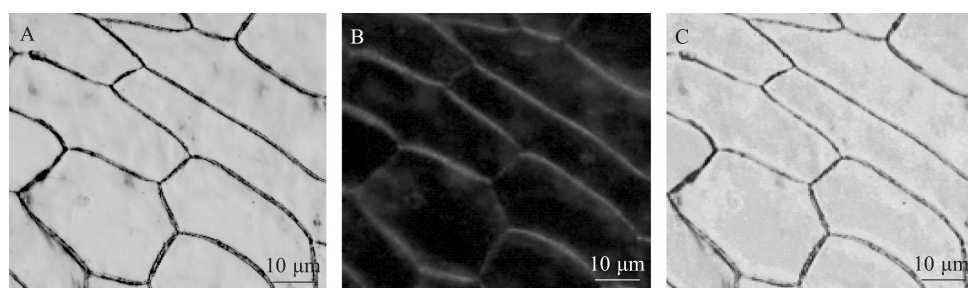
图 1 植物表达载体的构建
Fig.1 The construction of plant expression vectors



A: ImpactVectors-*E1* 质粒双酶切产物琼脂糖凝胶电泳; B: *E1*-IVs-*GFP* 质粒 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳。

图2 酶切及 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

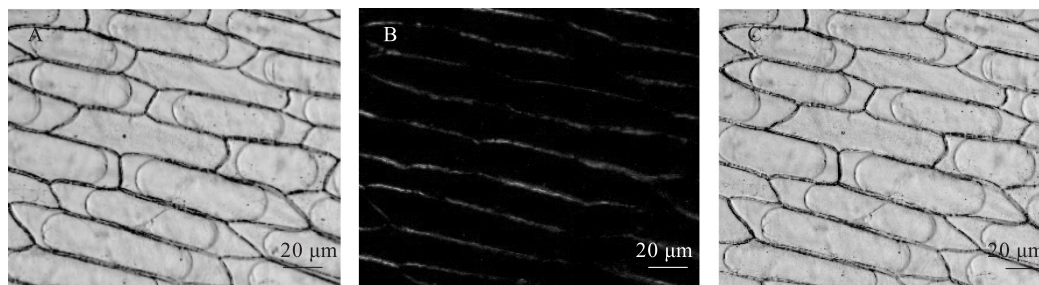
Fig.2 The enzyme digestion and PCR products agarose gel electrophoresis



A: 明场图; B: 绿色荧光图; C: 叠加图。

图3 不带有信号肽的 *E1*- *GFP* 融合蛋白质在洋葱表皮细胞中的定位

Fig.3 Localization of *E1*-*GFP* fusion protein without signal peptide in onion epidermal cells



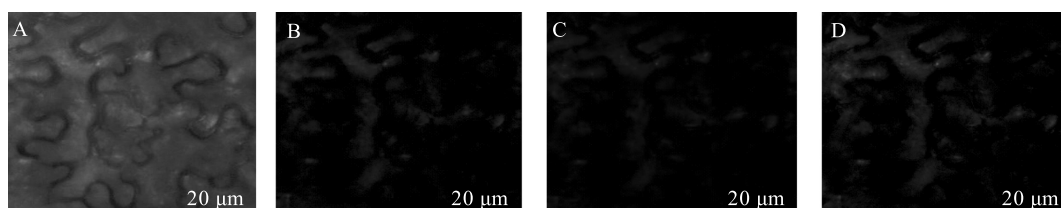
A: 明场图; B: 绿色荧光图; C: 叠加图。

图4 带有分泌表达信号肽的 *E1*-*GFP* 融合蛋白质在洋葱表皮细胞中的定位

Fig.4 Localization of *E1*-*GFP* fusion protein with secreted signal peptide in onion epidermal cells

2.3.3 *E1* 基因的内质网定位表达分析 带有内质网定位信号肽的 *E1* 融合蛋白质在洋葱表皮细胞中的定位表达如图 5 显示,将带有内质网定位蛋白质的 *E1*-IV1.3-*GFP* 表达载体导入烟草叶片中,采用 ER-Traker Red 内质网红色荧光探针进行细胞染色。荧光倒置显微镜观察发现,绿色荧光蛋白质的分布范围与红色荧光完全一致,表明带有 *GFP* 荧光标记的目的蛋白质的主要表达位置是内质网。

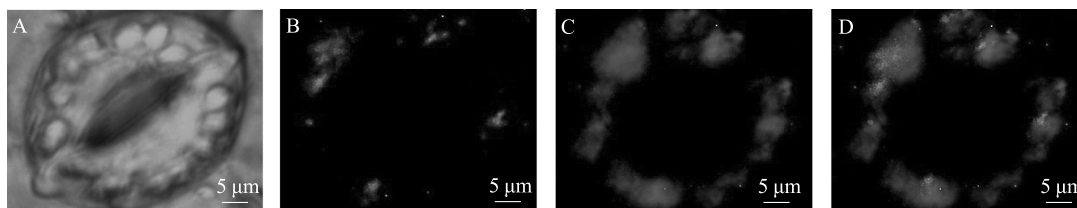
2.3.4 *E1* 基因的叶绿体定位表达分析 带有叶绿体表达信号肽的 *E1* 融合蛋白质在烟草叶肉细胞中的定位表达如图 6 显示,将带有叶绿体定位信号肽序列的 *E1*-IV1.4-*GFP* 表达载体导入烟草叶片中,采用叶绿体红色荧光探针进行细胞染色,荧光倒置显微镜观察发现,绿色荧光蛋白质的分布范围与红色荧光完全一致,说明带有 *GFP* 荧光标记的目的蛋白质在叶绿体上获得了充分表达。



A: 明场图; B: 绿色荧光图; C: 红色荧光图; D: 红色荧光与绿色荧光叠加图。

图 5 带有内质网表达信号肽的 E1-GFP 融合蛋白质在洋葱表皮细胞中的定位

Fig.5 Localization of E1-GFP fusion protein with endoplasmic reticulum signal peptide in onion epidermal cells



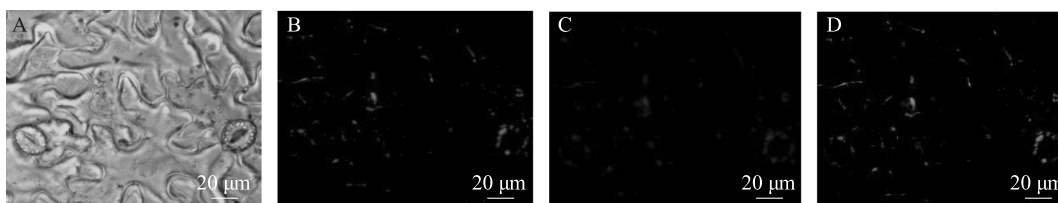
A: 明场图; B: 绿色荧光图; C: 红色荧光图; D: 红色荧光与绿色荧光叠加图。

图 6 带有叶绿体表达信号肽的 E1-GFP 融合蛋白质在烟草叶肉细胞中的定位

Fig.6 Localization of E1-GFP fusion protein with chloroplast signal peptide in tobacco mesophyll cells

2.3.5 *E1* 基因的线粒体定位表达分析 带有线粒体定位表达信号肽的 *E1* 融合蛋白质在烟草叶肉细胞中的定位表达如图 7 显示,将带有线粒体定位信号肽序列的 *E1-IV1.5-GFP* 表达载体导入烟草叶片

中,采用 MitoTracker 线粒体红色荧光探针进行细胞染色,荧光倒置显微镜观察发现,绿色荧光蛋白质的分布范围与红色荧光完全一致,表明带有 GFP 荧光标记的目的蛋白质在线粒体上获得了充分表达。



A: 明场图; B: 绿色荧光图; C: 红色荧光图; D: 红色荧光与绿色荧光叠加图。

图 7 带有线粒体表达信号肽的 E1-GFP 融合蛋白质在烟草叶肉细胞中的定位

Fig.7 Localization of E1-GFP fusion protein with mitochondrial signal peptide in tobacco mesophyll cells

3 讨论

植物中木质纤维素的难降解性是生物质能源商业可行性的主要限制因素。近几年,植物基因工程技术得到了广泛重视,成为改造能源植物以及促进木质纤维素高效降解的重要手段^[15]。*E1* 基因是嗜热纤维素降解酶基因家族中的关键基因^[11],对 *E1* 基因亚细胞的定位表达进行研究具有重要意义。相关研究结果^[11,16]表明,在实际生产应用过程中,*E1* 蛋白质重组纤维素酶的最适活性温度在 60 ℃ 以上,其贮存稳定性和热稳定性均较好。

本研究成功构建了带有 5 种不同信号肽编码序列 *E1-IVs-GFP* 系列植物表达载体,并在植物体内实现了不同的亚细胞定位表达。细胞质和细胞间隙是植物细胞生命活动的重要场所^[17]。耐高温纤维素降解酶在玉米细胞的质外体中表达,重组纤维素酶的表达量占可溶性总蛋白质的 2.1%,并获得了 845 mU/mg 总蛋白质的酶活性,这是迄今为止得到的较高活性^[18]。本研究结果为嗜热内切葡聚糖酶在细胞质和细胞间隙中的蛋白质功能和表达效果研究奠定了基础。内质网作为重要的植物细胞器,密切参与蛋白质的合成过程,是重要的蛋白质运输通道。内质网定

位信号肽(KDEL)可以使蛋白质从高尔基体回流到内质网,从而使蛋白质定位于内质网中^[19]。本研究采用KDEL定位信号,取得了较好的内质网定位效果。线粒体与细胞呼吸、细胞凋亡^[20]等关系密切,某些蛋白质通过破坏细胞线粒体的功能从而影响植物的正常生长^[21],因此关于线粒体的研究是嗜热内切葡聚糖酶对植物生长发育影响研究的重要组成部分。本研究利用酵母菌CoxIV分泌信号在线粒体基质中传递蛋白质^[22],将目的蛋白质与酵母CoxIV信号肽的前4个氨基酸融合,以保证目的蛋白质的正确定位。叶绿体是植物细胞进行光合作用的细胞器,是植物进行糖类合成的重要场所,在植物的生长发育过程中起着不可替代的作用。导入叶绿体的外源基因必须在适当调控蛋白质^[23]的控制下才能在叶绿体中表达,本研究利用菊花小亚基蛋白质的分泌信号将蛋白质输送到叶绿体基质中,与Rubisco蛋白质的前11个氨基酸融合,确保信号肽的正确加工。

本研究结果表明,EI-GFP融合蛋白质集中分布在信号肽所对应的细胞器内,在细胞质和线粒体中表达荧光强度较高,具有较好的表达效果。以上研究结果为EI基因在植物中的不同亚细胞定位表达及植物木质纤维素的高效降解利用提供了理论依据和研究基础。

参考文献:

- [1] 王久臣,戴林,田宜水,等. 中国生物质能产业发展现状及趋势分析[J]. 农业工程学报,2007,23(9):276-282.
- [2] 毕于运,王亚静,高春雨. 中国主要秸秆资源数量及其区域分布[J]. 农机化研究,2010,327(3):1-7.
- [3] 陈树人,蒋成宠,姚勇,等. 水稻秸秆压块热值模型构建及其影响因素相关性分析[J]. 农业工程学报,2014,30(24):200-208.
- [4] 常志州,靳红梅,黄红英,等. “十三五”江苏省秸秆综合利用策略与秸秆产业发展的思考[J]. 江苏农业学报,2016,32(3):534-541.
- [5] 蒋建雄,孙建中,李霞,等. 我国草本纤维素类能源作物产业化发展面临的主要挑战与策略[J]. 生物产业技术,2015(2):22-31.
- [6] 李国志,王焱冰. 农户秸秆资源化利用的影响因素分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(16):291-294.
- [7] SUN J Z, DING S Y, DORAN-PETERSON J. Biological conversion of biomass for fuels and chemicals: exploration from natural utilizations systems [M]. Cambridge: Royal Society of Chemistry Publishing, 2013:14-24.
- [8] ZIEGELHOFFER T, RAASCH J A, AUSTIN-PHILLIPS S. Expression of *Acidothermus cellulolyticus* E1 endo- β -1, 4-glucanase catalytic domain in transplastomic tobacco [J]. Plant Biotechnology Journal, 2009, 7(6):527-536.
- [9] BONAWITZ N D, KIM J I, TOBIMATSU Y, et al. Disruption of Mediator rescues the stunted growth of a lignin-deficient *Arabidopsis* mutant [J]. Nature, 2014, 509(7500):376-377.
- [10] MARCIA M O, FESCEMYER H W. Modification of esterified cell wall phenolics increases vulnerability of tall fescue to herbivory by the fall armyworm [J]. Planta, 2012, 236(2):513-523.
- [11] BISWAL A K, SOENO K, GANDLA M L, et al. Aspen pectate lyase *PxtPL1-27* mobilizes matrix polysaccharides from woody tissues and improves saccharification yield [J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1):11.
- [12] NAKAMURA A, FUKUDA A, SAKAI S, et al. Molecular cloning, functional expression and subcellular localization of two putative vacuolar voltage-gated chloride channels in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant & Cell Physiology, 2006, 47(1):32-42.
- [13] CHEN L, SHIOTANI K, TOGASHI T, et al. Analysis of the Rac/Rop small GTPase family in rice: expression, subcellular localization and role in disease resistance [J]. Plant & Cell Physiology, 2010, 51(4):585-595.
- [14] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社,2002:698-700.
- [15] BHATIA R, GALLAGHER J A, GOMEZ L D, et al. Genetic engineering of grass cell wall polysaccharides for biorefining [J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15:1071-1092.
- [16] WANG X L, XUE Q H, JIANG B, et al. Cloning, expression and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* 11B glucose isomerase [J]. Science & Technology of Food Industry, 2011, 32(3):192-194.
- [17] 张付云,陈士云,赵小明,等. NtSKPI-GFP植物表达载体的构建及亚细胞定位[J]. 西北农业学报,2009,18(4):144-148.
- [18] BISWAS G C G, RANSOM C, STICKLEN M. Expression of biologically active *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase in transgenic maize plants [J]. Plant Science, 2006, 171(5):617-623.
- [19] WANG H, SHAO Y, ZHANG W, et al. Molecular characterization of two novel molecular chaperones in bacterial-challenged *Apostichopus japonicus* [J]. Gene, 2015, 570(1):141-149.
- [20] GOMEZ M, SCALES S J, KREIS T E, et al. Membrane recruitment of coatomer and binding to dilysine signals are separate events [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(37):29162-29169.
- [21] CARNEIRO L A, TRAVASSOS L H, SOARES F, et al. *Shigella* induces mitochondrial dysfunction and cell death in nonmyeloid cells [J]. Cell Host & Microbe, 2009, 5(2):123-126.
- [22] KÖHLER S, DELWICHE C F, DENNY P W, et al. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites [J]. Science, 1997, 275(5305):1485-1489.
- [23] KHAN M S, MALIGA P. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(9):910-915.

(责任编辑:王妮)