

植物瞬间表达系统与功能基因组学研究

Plant Transient Expression System in Functional Genomics

王华忠^{1*} 陈雅平² 陈佩度³

WANG Hua-Zhong^{1*}, CHEN Ya-Ping² and CHEN Pei-Du³

1 天津师范大学化学与生命科学学院, 天津 300074

2 中山大学生命科学学院, 广州 510275

3 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

1 *Chemistry and Life Science College, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China*

2 *College of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China*

3 *The National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*

摘 要 结构基因组学和功能基因组学的发展使特定植物基因组和转录组序列的获取更为方便和快捷。随之而来的是对各种基因和调控序列的功能注释, 探索植物生长和发育的遗传机理。表达和调控表达是遗传物质的自身语言和动态属性, 因此通过植物细胞内表达来分析目标基因和序列的表达和调控行为是功能分析的主要立足点。除创造转基因植株外, 近几年来植物细胞瞬间表达系统得到了广泛的使用, 与基因重排、病毒诱导基因沉默和 RNA 干扰等新兴技术的结合使其在植物功能基因组研究中扮演了越来越重要的角色。

关键词 瞬间表达, 农杆菌渗透法, RNA 干扰, 病毒诱导基因沉默

中图分类号 Q943 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)03-0367-08

Abstract With the development of structural and functional genomics, nowadays specific plant genome and transcriptome sequences can be cloned much easier and faster. Next step is to identify the functions of different genes and regulating elements to unravel the genetic mechanisms behind plant growth and development. Expression and its regulation are the language and dynamic property of genetic material, so expression and regulation analysis of target genes and sequences in plant cell is the basis for function study. Besides stable genetic transformation, plant transient expression system gains broad application in recent years, and its combination with other new technologies as gene shuffling, VIGS and RNAi plays a more and more important role in plant functional genomics.

Key words transient expression, agroinfiltration, RNAi, VIGS

植物基因组研究的发展使大量未知功能基因的克隆成为可能。接下来, 对这些基因表达行为、产物性质、定位及生理生化功能的认识并建立起与表型

的对应关系将成为功能基因组研究中更具挑战性的内容。上述研究最直接和有效的方式是在植物细胞内操纵相关基因的表达与沉默, 进而开展功能分析

Received: November 6, 2006; Accepted: December 18, 2006.

This work was supported by the grant from the Doctor Foundation of Tianjin Normal University(No.52LX12).

* Corresponding author. Tel: +86-13002234350; E-mail: hsxzywhz@mail.tjnu.edu.cn

天津师范大学博士基金项目(No.52LX12).

和表型变化的研究。除了自然或人工诱变的基因突变体外,现有的基因转化方法使我们能够在完整的生物体水平(稳定转化)和细胞水平(瞬间表达)开展基因表达实验。近几年来,随着植物功能基因组学的快速发展,对开展在植物细胞内表达外源基因进行功能分析的快速性和高效性要求越来越高,而稳定转化技术,特别是一些重要农作物较长的转化周期、较低的转化效率及外源基因表达的不稳定性都使得人们将目光转向外源基因的单细胞瞬间表达系统。

1 植物细胞瞬间表达的原理及方法

1.1 外源基因在植物细胞内的瞬间表达

瞬间表达是指导入到植物细胞后的外源基因作为一种基因组外的遗传物质转录和翻译一定时间(几天到十几天,降解之前),并在转化细胞内积累表达产物^[1]。Prols等^[2]将pRT101 Cat质粒导入烟草叶肉原生质体,培养30min后就能检测到Cat活性,4~24h内Cat活性最强。如果在培养1h内加入转录抑制剂蛹虫草菌素或培养4h内加入转录抑制剂放线菌酮都能抑制Cat活性。在这两个时间之后加入抑制剂并不影响Cat活性,这表明培养1h已转录足够的RNA。1h后加入RNA合成抑制剂,由于已有足够的转录模板,Cat合成照常进行。培养4h合成的Cat能在一段时间内保持Cat的活性。4~24h之间,Cat的合成和降解达到动态平衡。此后Cat活性缓慢降低,10d后完全消失。许多因素影响外源基因在植物细胞内的瞬间表达,包括:1)质粒载体上的基因结构,如基因5'端调控序列及3'端poly(A)序列的存在有利于表达;2)细胞旺盛分裂过程中核膜的消失有利于基因进入细胞核转录^[2];3)线状质粒的导入有利于基因的表达^[3];4)不同组织细胞内源核酸酶的影响^[4,5];5)受体细胞生理状态及其内源基因产物抑制剂的影响(如GUS酶抑制剂)^[4,5]。近些年来,许多实验室报道了在各种植物组织上外源基因的瞬间表达,如双子叶植物中大豆的叶片、子叶,豇豆的叶片,烟草的叶片,拟南芥的叶片以及单子叶植物中水稻、大麦、燕麦的叶片、胚芽鞘和根^[6]。

与稳定转化方法相比,单细胞瞬间表达系统导入拷贝数高,没有位置效应,因而表达效率高;无需受体细胞的培养和再生过程,方法简单且表达快速。另外,瞬间表达的实现无需选择标记基因,因而载体可以更小,较大片段和多个基因的转化更容易。据Janssen等^[7]的报道,在矮牵牛叶盘上,外源基因的瞬

间表达水平可以比稳定转化高1000倍。鉴于上述优点,植物瞬间表达技术逐渐在植物功能基因组学研究中扮演了越来越重要的角色。

1.2 瞬间表达系统中的外源基因导入方法

操纵外源基因导入植物细胞进行瞬间表达分析的方法大多与稳定转化方法相同,如目前使用较多的有PEG法^[8]、电击法^[9]、基因枪法^[10]、农杆菌渗透法^[11,12]及植物病毒介导的方法^[13]。

PEG或电激法介导原生质体转化是出现最早的一种植物细胞瞬间表达技术,至今仍有广泛的应用。其特点是培养环境内施加的处理可以直接作用于单个细胞,进而研究处理与外源基因在细胞内表达的互作。但是,由于原生质体培养,尤其是重要农作物原生质体培养的困难,使其应用受到限制。而且,直接利用原生质体表达外源基因,无法对组织、器官特异性基因,发育相关基因以及涉及细胞壁合成、细胞间互作的基因开展研究。

基因枪介导的瞬间表达系统最大的特点是几乎没有物种和组织的限制,尤其是在农杆菌转化效率低和适合开发成载体的病毒稀少的物种方面,应用非常广泛。其缺点是只能靶向组织表面细胞,获得并表达外源基因的细胞数目少,呈点状分布,在目前缺乏有效的从组织表面分离单个细胞技术的情况下,开展Northern blot和Western blot等工作较为困难,且容易受到邻近野生型细胞的影响。

1993年瑞士科学家Rossi等^[11]创建了一种农杆菌介导的外源基因瞬间表达系统,他们采用真空渗透的方法,使诱导后的农杆菌与植物细胞紧密接触,随后将重组质粒上的T-DNA转入植物细胞,通过目标基因的瞬间表达来检测植物中T-DNA转移的效率。后来人们采用针管注射活体植株叶片来代替真空渗透,方便、实用,因此得到更广泛的使用。现在把这两种农杆菌介导的瞬间表达系统统称为农杆菌渗透法(agroinfiltration)^[14]。农杆菌渗透法的优点可以概括为:1)农杆菌Vir基因协助下的T-DNA转移,效率更高,结合真空处理或针管注射可以使农杆菌与植物细胞紧密接触,获得更多且不仅限于组织表面的表达细胞。1997年,Kapila等^[12]通过对烟草瞬间表达过程影响因素的系统分析和优化,获得了20%~90%叶面积的GUS基因表达;2)表达细胞呈块状分布,容易分离进行RNA和蛋白质水平的体外分析;3)该方法可以在完整植株上进行,用于分析生物或非生物胁迫与外源基因表达的互作时,能够真实反应植株体内的基因表达模式;4)T-DNA的转移

还可以携带较大的外源片段。这种方法的缺点是其应用受到物种与农杆菌的亲性和限制,而且至今仍仅限于叶片组织的研究,也正因为如此,在植物与主要侵染叶片的病原之间的抗病分子生物学研究中应用广泛。但在植物抗病性反应研究中应注意农杆菌本身的潜在影响。

植物病毒(大多为 RNA 病毒)载体介导的外源基因瞬间表达系统是近几年来发展较快的一种基因表达技术。其原理是将目标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(农杆菌感染法, agroinfection)等将其导入到植物细胞。病毒在植物细胞间的移动可以使其进入到较大范围甚至整株各种类型的细胞,方便了在植株整体水平开展外源基因的功能研究。病毒在植物细胞内的大量复制,使外源基因的表达量获得显著提高。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,易于提取和分析。此外,鉴于 RNA 病毒在植物细胞内 dsRNA 中间体的形成,使其成为研究 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)机理及通过 RNAi 的方法研究植物基因功能的有利工具^[15]。目前使用比较成功的病毒载体有烟草花叶病毒 TMV^[16]、马铃薯 X 病毒 PVX^[17]、烟草脆裂病毒 TRV^[18]和大麦条斑花叶病毒 BSMV^[19]。这种方法的缺点是:1)病毒侵染后的症状可能会对表型分析造成影响;2)尽管植物种类繁多,且一些病毒可以侵染的宿主范围很宽,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;3)病毒载体所能插入的外源片段较小,且病毒的重组可能会影响到表达产物的稳定。

瞬间表达可以实现多个基因的共表达,如基因枪法中的多个载体混合包裹金粉,农杆菌渗透法中的农杆菌混合侵染,方便了对涉及多基因的代谢通路或多聚体蛋白的研究。此外,外源序列的过量导入可能会造成某种异常转录而产生 dsRNA,引发转录后基因沉默(PTGS)^[20],这可能是外源基因瞬间表达不能持久的主要原因。与 *p19*、*HcPro* 等病毒编码的 PTGS 抑制因子的共表达将十分有助于目标基因表达的增强和持久^[21, 22],便于研究目标基因表达的长效影响及产物定位的变化。基因导入工作完成以后,有时需要直接对转化细胞进行各方面的观察和研究。为了有效区别转化细胞和非转化的野生型细胞,可以伴随外源基因同时共转化或融合表达 *GUS*、*GFP* 等报告基因来标记转化细胞。当然,某些

目标基因产物或其细胞内引起的变化可以直接起到标记转化细胞的目的。

2 瞬间表达系统的应用

几年以前,瞬间表达一直只是一种利用报告基因的表达来优化转化参数、对不同的转化方法进行比较以及选择最适和再生培养基的方法,并没有得到足够的重视。最近,关于瞬间表达技术应用的文章越来越多,涉及植物功能基因组学研究的方方面面,代表性的研究单位有英国 John Innes 中心、德国的 IPK 和澳大利亚的 CSIRO。研究内容涉及转录因子与启动子之间的互作、启动子分析、基因产物的亚细胞定位、抗病基因的克隆以及 RNAi 介导的基因沉默等。

2.1 植物抗病基因克隆

在植物抗病反应过程中,寄主抗病基因与病原无毒基因产物之间的识别是引起包括过敏反应在内的一系列抗病反应的关键。基于这一特点,特别是在病原激发子基因已经分离的情况下,可以根据专一性过敏反应的有无进行抗病基因的分离。2000年, Bendahmana 等^[23]参照马铃薯抗 PVX 基因 *Rx1* 序列设计引物扩增获得 200 个 *Rx2* 基因的候选克隆,随后将候选克隆在稳定转化有 *Rx2* 专一性病原激发子(病毒外壳蛋白)的烟草植株叶片上利用农杆菌渗透法进行瞬间表达实验,根据过敏反应的有无,成功筛选到了 *Rx2* 基因,并通过 *Rx2* 基因与激发子的共表达引发的过敏反应验证了 *Rx2* 基因的获得。反过来,类似的方法同样可以用于病原激发子基因的筛选和克隆,抗病基因同样也可以通过是否能赋予植物细胞专一性的抗性表型来克隆。Zhou 等^[24]在大麦抗白粉病基因 *Mla1* 的克隆中,对候选基因组克隆和亚克隆利用瞬间表达技术进行逐级筛选。他们使用的瞬间表达技术称为三元件测验(three-component test),即利用基因枪同时将报告基因 *GFP*、*Mlo* 基因和候选克隆导入到 *mlo* 型感病大麦叶片表皮细胞中,通过 *GFP* 基因标识表达细胞, *Mlo* 基因的表达恢复了表达细胞的感病表型,使其表面接种的白粉菌孢子能够正常侵入和生长而明显区别于周围的野生型细胞,此时,候选克隆的 *Mla1* 基因的存在,能够与接种的 *Mla1* 基因专一性白粉菌小种相互识别,使转化细胞呈现抗性表型。他们利用这样的方法,通过对抗、感表型转化细胞的统计和比较,成功地筛选到了含真正 *Mla1* 基因的亚克隆。

上述基因克隆实验还可以推广到对抗病基因类

似物 (RGA) 或其它候选基因文库直接进行表达和功能筛选。

2.2 转录元件和转录因子的克隆与分析

利用瞬间表达系统结合报告基因的使用可以十分方便地对植物基因的增强子、启动子等转录元件和转录因子进行功能分析。这也是瞬间表达系统应用较早和较成功的一领域。

Kapila 等在建立农杆菌渗透法时就推测该瞬间表达系统可以应用于启动子的功能分析。Sidorenko 等^[25]利用基因枪介导的瞬间表达系统对玉米花器官特异性着色调节基因 *P-rr* 的启动子区段进行了分析,发现上游的两个增强子元件独立存在都能显著增强 *P-rr* 基础启动子驱动 *GUS* 基因转录的能力,只保留近端增强子元件和基础启动子部分就可以实现 *P-rr* 的花器官特异性表达。他们的实验还同时验证了内含子的使用在驱动外源基因高效表达中的显著作用。Song 等^[26]则首次成功地将农杆菌渗透法应用于重要单子叶作物水稻的启动子分析,研究发现器官特异性启动子光捕获叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *Cab* 的启动子在水稻 3 天龄的幼苗上也能启动报告基因的表达。启动子的时间、空间特异性及诱导表达性和各种响应元件的研究则可以通过在不同生长阶段、不同组织类型上瞬间表达,或表达前后的生物、非生物胁迫处理加以研究。如 Yang 等^[27]报道了利用农杆菌渗透法以 *GUS* 为报告基因,辅助生物或非生物胁迫处理验证了逆境响应元件 *as-1*、热休克元件和酵母 *GAL4* 转录活性系统。

在转录因子的作用方面,战淑欣、王道文等^[28]利用基因枪介导的瞬间表达系统,将不同转录因子基因与 *Hsp70* 启动子驱动的 *GUS* 基因共转化豌豆叶片,分析两个豌豆种传花叶病毒基因 *P1* 和 *P3* 对豌豆 *Hsp70* 基因启动子激活能力的差异。上述实验可以推广到转录因子与启动子及转录元件的关系研究。

2.3 基因性质、功能及互作分析

2.3.1 基因表达研究

自然状态下细胞内大多数基因表达都有组织特异性和诱导表达性,人为操纵外源基因的导入和表达称之为异位表达 (ectopic expression)。功能性外源基因的异位表达势必对细胞造成一定的影响,这种影响可以是多方面的,随基因的功能和细胞类型的不同而不同。结合表型、生理生化分析以及免疫杂交、免疫荧光、转录组分析、蛋白质组分析等分子手段,就可以开展对基因功能、多个基因联合作用的功能以及基因调节网络的研究。

究。

2000 年, Kirschner 等^[29]利用 PEG 介导的烟草叶肉细胞原生质体瞬间表达系统,结合瞬间表达产物的免疫印迹、免疫荧光技术和电镜技术研究了热胁迫诱导条件下两种类型的异源热激蛋白多聚体化、凝集形成热胁迫颗粒过程中的相互作用及诱导前后产物亚细胞定位的变化。Escobar 等^[30](2003)则报道了使用 PVX 病毒载体在烟草叶片细胞内过量表达拟南芥 *APX3* 基因,结合 Northern blot 和 Western blot 分析了该基因的瞬间表达情况和产物的酶活分析,显示了植物瞬间表达代替原核表达来分析外源基因产物性质的前景。同一年, Selth 等^[31]使用 TMV 病毒载体在烟草叶片细胞内分别表达了烟草卷叶病毒 (TLCV) 的全部六个基因,发现他们分别引起 PR 反应、叶片坏死、抑制 PTGS、类病毒侵染症状及植株矮化,说明了侵染过程中病毒基因与宿主基因复杂的相互作用。

在植物的抗病反应过程中一类被称作病程相关蛋白基因 (pathogenesis related protein genes, PR genes) 表达的增强是一个比较普遍的现象,在抵抗病原入侵和抑制其发展的过程中扮演了极为重要的角色。在抗病基因的克隆较为困难的情况下,如何利用目前已分离的众多 PR 基因开展植物抗病分子育种成为目前的一个热门研究领域。在开展稳定的转化之前,对候选 PR 基因的功能、作用方式和具体的抗病效果进行恰当的分析是十分必要的。在这方面,使用瞬间表达技术有着明显的优势,尤其是在研究麦类作物与相应的白粉菌互作中,十分受欢迎。该技术的主要过程为:首先将目标基因构建于高效表达载体,然后使用基因枪将其随机导入到离体植物叶片表皮细胞中,并同时共表达一种报告基因来标记阳性转化细胞,转化后高密度接种白粉菌孢子,培养一段时间后在单细胞基础上分析阳性细胞内抗病相关基因的表达对白粉菌侵染的影响。王华忠等^[32,33]成功地利用该技术对几类重要的小麦抗病相关基因的抗病性功能进行了评价。到目前为止,利用瞬间表达技术研究的互作类型涵盖了抗病相关基因诱发的基础防卫反应、CC-NBS-LRR 类抗病基因的小种特异性抗性、大麦 *mlo* 突变体产生的广谱抗性以及白粉菌与非寄主之间的非寄主抗性^[34]。

2.3.2 基因沉默研究

植物内源基因沉默 (gene silencing) 包括 DNA 和 RNA 两种水平。前者可以通过基因敲除 (knock out) T-DNA 或转座子插入突变等技术来实现,但工作量大,随机且低效。RNA 水

平的基因功能丧失(RNA沉默),主要发生在转录水平和转录后水平(PTGS)两种。转录水平主要是指siRNA(small interfering RNA)介导的启动子甲基化修饰,转录后水平包括mRNA的降解或造成翻译的抑制。RNA沉默由两类小分子RNA介导:siRNA和miRNA(microRNA),dsRNA或具有局部dsRNA结构的hpRNA(hairpin RNA)是诱发RNA沉默的主要因子。dsRNA的来源可以是体外合成后的直接导入,也可以设计dsRNA转录载体^[35],还可以利用植物RNA病毒作为转化载体。RNA病毒在植物细胞内的复制会形成dsRNA中间结构,引发基因沉默(称为Virus-induced gene silencing, VIGS)^[36]。利用RNAi技术还可以同时转化多个不同的dsRNA激活因子达到同时沉默多个基因的目的,研究基因的联合效应及信号转导途径、生化途径和代谢途径^[37]。

Schweizer等^[35]利用基因枪介导的瞬间表达技术将体外合成的dsRNA或双链发夹结构RNA转录载体导入小麦、玉米、大麦叶片表皮细胞,成功地实现了共转化报告基因GFP或内源基因(A1, Ant18)的沉默。Burton等^[38]利用体外转录PVX病毒RNA载体直接接种的VIGS方法鉴定了一个克隆自烟草的基因与细胞壁合成紧密相关,可能是一个纤维素合成酶基因(CesA)。2001年,Ratcliff等^[18]开发了基于烟草脆裂病毒TRV的VIGS载体,该载体使用农杆菌渗透法在植物细胞内表达病毒RNA。与基于TMV、PVX等病毒的载体相比,TRV侵染后症状较轻,不影响目标基因沉默效果的观察;可以侵染相邻的大片细胞,降低了未侵染细胞对VIGS效果的影响;可以靶向生长点细胞的mRNA,便于研究与植物组织决定基因和发育相关的基因。Peart等^[39]利用Ratcliff开发的VIGS载体系统地研究了烟草NbSGT1基因在植物抗病信号转导过程中的重要作用。他们发现,无论是依赖植物专一性抗性基因(NBS-LRR类)的抗性反应还是非寄主抗性反应,NbSGT1基因都是必须的。2002年,Holzberg等开发了基于大麦条斑花叶病毒BSMV的VIGS载体^[19],BSMV的寄主包括许多重要单子叶农作物,包括大麦、小麦、燕麦和玉米等,最近该载体系统在大麦^[40]和小麦^[41]上的成功应用证明其必将极大地推动相关农作物功能基因组学的发展。

影响RNAi的因素很多,包括适合的dsRNA诱导物的类型、浓度、长度及序列,细胞活性Dicer-like蛋白和RdRp蛋白的存在,RNAi抑制基因的表达等等。Panstruga等^[42]设计了包括Reporter载体和

Effector载体的基因枪共转化RNAi分析系统。Reporter载体上含有GFP表达盒和可以融合目标基因的RFP表达盒,Effector载体含有启动子控制下的目标基因同源序列的一对反向重复,中间以内含子隔开。Effector转录出的RNA在剪切掉内含子后,可以形成dsRNA,靶向Reporter载体的RFP融合基因mRNA,诱导RNAi。通过对转化细胞绿色荧光和红色荧光的比较,可以快速、非破坏性和半定量的分析不同组织和细胞内RNAi的发生和强度。同时利用该系统还可以筛选引发RNAi的最适序列。

2.4 基因产物定位分析

基因的表达产物蛋白质必须经过正确折叠和修饰并精确地定位在亚细胞结构处,才能发挥其应有的作用。瞬间表达技术和报告基因使用的结合,可以有效跟踪融合产物在细胞内的运输、亚细胞定位以及代谢。报告基因的使用以GFP为多,这主要因为GFP的活体表达特性便于观察和研究。植物材料大多使用洋葱表皮细胞,洋葱单层表皮细胞容易转化,且细胞较大,没有色素,容易观察。

鉴于转座元件的调节基因必须在定位到细胞核内才能发挥作用,Ono等^[43]使用洋葱表皮细胞和基因枪介导的瞬间表达技术对调节玉米Mu转座元件的两个关键基因MURA和MURB的核定位情况进行了分析。Barrell^[44]用同样的方法对一个拟南芥Lea蛋白(late embryogenesis-abundant protein, Lea protein)基因Atrab28的定位情况进行了分析,鉴定一个新的5个氨基酸的核定位信号。Li等^[45]通过将两个乙酰辅酶A结合蛋白定位于原生质膜上,从而确定其功能为质膜相关的乙酰辅酶A运输/代谢蛋白。Boudart^[46]在烟草叶片细胞中瞬间表达一个菜豆炭疽病原菌内多聚半乳糖醛酸酶基因(endoPGs)植物endoPGs是一类参与细胞壁降解的基因,降解产物寡聚糖可能在诱导植物的防卫反应中发挥了重要作用。结果表明,这个来自病原物的基因,其产物必须正确定位到烟草细胞壁,才能引起细胞壁降解和表达部位的坏死。活性氧检测发现endoPGs确实可以诱导防卫反应。到目前为止,利用瞬间表达技术进行亚细胞定位的类型包括细胞核定位^[47],叶绿体定位^[48],线粒体定位^[49-50],细胞骨架定位^[51-52],高尔基体定位^[53],内质网定位^[54]和原生质膜定位^[55]。

2.5 基因结构与功能的关系

基因功能的实现最终是通过其产物蛋白质来完成的,而蛋白质定位、识别和催化等功能的实现又决

定于特定的序列组成及高级结构的形成。物种内或物种间功能相同或相近的基因之间经常会含有一些相似的序列单元(motif)或功能域(domain),体现了进化上的保守性,一个氨基酸的变化有时都会影响正常功能的行使。利用瞬间表达的研究方法,主要结合体外重组、定点突变、结构域交换(domain wrapping)和基因重排(gene shuffling)等技术分析基因结构与功能的关系。

在前述 Kirschner 等的研究中,也同时涉及到结构与功能的关系分析,类型 II 热激蛋白完整 C 末端的存在对其多聚物的形成,热胁迫条件下的自凝集和对类型 I 热激蛋白的征集至关重要。Wulff 等^[56]利用农杆菌渗透法介导的瞬间表达技术,在无毒基因 *Avr4* 和 *Avr9* 的转基因烟草叶片细胞中瞬间表达经结构域交换或基因重排后 *Cf4* 和 *Cf9* 基因的各种嵌合克隆,通过 HR 反应鉴定,揭示了番茄抗叶霉病基因 *Cf4* 和 *Cf9* 序列中决定与各自的无毒基因专一性识别的关键序列和编码产物的关键氨基酸。

2.6 创造植物组织生物反应器

除稳定转化技术外,植物瞬间表达技术同样可以应用于植物生物反应器的开发^[13]。首先,利用瞬间表达技术,可以在大规模的稳定转化之前,快速地鉴定重组蛋白的功能和稳定性,避免盲目转化。其次,瞬间表达技术导入的外源基因拷贝数高、没有染色体上的位置效应,结合转化水平的提高和强启动子的使用,完全可以达到生产的规模。再次,瞬间表达可以在植株较高的发育阶段和特定的组织(主要上叶片)进行,避免了重组蛋白对植株发育的负面影响。

在利用瞬间表达开发植物生物反应器方面,以农杆菌渗透法和植物病毒介导的方法应用较多,因为这两种方法操作容易,获得并表达外源基因的细胞数目多,且可以大规模使用。Vaquero 等^[57]将分别含有抗体重链和轻链基因载体的农杆菌混合渗入植物叶片,结果两个基因同时获得瞬间表达并组装成了全长的功能性抗体。而在稳定转化中需要不同转化体的杂交获得,耗时、费力。2004 年,Medicago 公司的研究人员在苜蓿上开展瞬间表达生产重组蛋白,规模达到每星期 7500 张叶片,获得毫克级的重组蛋白。通常,使用农杆菌渗透法可以获得 10mg/kg 的重组蛋白产量。病毒载体在这方面的应用更具优势,因为病毒的系统侵染和在植物细胞内的大规模复制可以使产量更高,而且,病毒侵染操作容易,可以在植株间扩展,获得大面积植株的瞬间表达。美

国的 Biosource Technologies 已经开始使用烟草花叶病毒载体 GEnewaresm 进行瞬间表达来生产 Hepatitis B 表面抗原、单链抗体(scFvs)和其他重组蛋白。与病毒外壳蛋白融合的重组蛋白可以随病毒粒子的分离而获得,产量可以达到每千克植物叶片 1~3g 病毒。

另外,外源基因的高水平瞬间表达,特别是病毒载体的使用,可能会诱导针对外源基因自身的基因沉默。这可能是外源基因瞬间表达不能持久和表达量随时间下降的主要原因。Baucombe 与其同事通过与外源基因共表达 *p19* 基因成功的将表达水平提高 50 倍,*p19* 基因克隆自番茄丛矮病毒,其产物蛋白是一个基因沉默抑制因子。

3 瞬间表达系统应用中注意的问题

1) 过量表达(偏离了细胞正常生理状态下的浓度)和报告基因的融合都可能会影响到产物的定位和正常功能。

2) 报告基因或其它非目标基因的表达可能对细胞转录组和蛋白质组的模式产生影响^[58],掩盖了目标基因的效果。

3) 使用瞬间表达开展基因沉默研究的时候,应注意产物蛋白比靶 mRNA 的降解需要更长时间的代谢,短时间内可能观察不到表型的变化。

4) 瞬间表达的效率仍需提高(包括转化细胞数目的提高、表达水平的提高和瞬间表达时间的延长),以便持续跟踪和研究外源基因表达的影响,表达量的提高使分子分析和生化分析都更容易。

5) 尽管没有稳定转化上存在的外源基因和选择标记基因潜在的扩散风险和安全性问题,仍然要对细菌和病毒操作过程中的安全性提高警惕。

4 瞬间表达系统的应用前景

近五年来文献检索发现,植物瞬间表达技术和 RNAi、VIGS 等技术相结合,极大地推动了植物功能基因组学的研究进程。今后的发展,需要在转化细胞及基因产物的可视技术和分析手段上加以提高。可视技术包括了各种报告基因、荧光探针物质的合理开发和使用及与激光共聚焦显微镜、电镜等显微技术相结合;分析手段上则可结合单细胞激光捕获微分离^[59]等技术对阳性细胞进行分离后的生理、生化及转录组、蛋白组分析,排除野生型细胞的干扰。

可以预见,未来的瞬间表达技术与其他各种新

技术相结合,将从现在的一维(基因表达/灭活)研究发展到从多维的时间和空间的角度跟踪和分析植物细胞内外源基因表达后发生的分子事件,并以单细胞为平台,以互动的方式干预单细胞内的生理生化过程,加快探索生命奥秘的进程。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Werr W, Lörz H. Transient gene expression in a Gramineae cell line: A rapid procedure for studying plant promoters. *Molecular Genetics and Genomics*, 1986, **20**(3): 471 - 475.
- [2] Pröls M, Töpfer R, Schell J, et al. Transient gene expression in tobacco protoplasts: I. Time course of CAT appearance. *Plant Cell Reps*, 1988, **7**(4): 221 - 224.
- [3] Bekkaoui F, Pilon M, Laine E, et al. Transient gene expression in electroporated *Picea glauca* protoplasts. *Plant Cell Reps*, 1988, **7**(7): 481 - 484.
- [4] Arias-Garzon DI, Sayre RT. Differential inhibition of transient gene expression in cassava root and leaf tissues. Roca WM, Thro AM, eds. Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology. In Network, 1993, pp. 239 - 243.
- [5] Arias-Garzon DI, Sayre RT. Tissue specific inhibition of transient gene expression in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) tissues. *Plant Sci*, 1993, **93**: 121 - 130.
- [6] Nelson AJ, Bushnell WR. Transient expression of anthocyanin genes in barley epidermal cells: potential for use in evaluation of disease response genes. *Transgen Res*, 1997, **6**: 233 - 244.
- [7] Janssen BJ, Gardner RC. Localized transient expression of *GUS* in leaf discs following cocultivation with agrobacterium. *Plant Mol Biol*, 1989, **14**: 61 - 72.
- [8] Maas C, Werr W. Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplasts. *Plant Cell Reps*, 1989, **8**: 148 - 151.
- [9] Lindsey K, Jones MGK. Transient gene expression in electroporated protoplasts and intact cells of sugarbeet. *Plant Mol Biol*, 1987, **10**: 43 - 52.
- [10] Klein TM, Wolf ED, Wu R, et al. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 1987, **327**: 70 - 71.
- [11] Rossi L, Escudero J, Hohn B, et al. Efficient and sensitive assay for T-DNA-dependent transient gene expression. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, **11**: 220 - 229.
- [12] Kapila J, Ryeck DR, Montagu MV, et al. An agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci*, 1997, **122**: 101 - 108.
- [13] Fischer R, Vaquero-Martin C, Sack M, et al. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in the plants. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, **30**: 113 - 116.
- [14] Liu ZM(刘志明), Liu ZZ(刘宗旨), Bai QW(白庆武), et al. Agroinfiltration, a useful technique in plant molecular biology research. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2002, **18**(4): 411 - 414.
- [15] Voinnet O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet*, 2001, **17**(8): 449 - 459.
- [16] Kumagai MH, Donson J, Della-Cioppa G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 1697 - 1683.
- [17] Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 1998, **10**: 937 - 946.
- [18] Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J*, 2001, **25**(2): 237 - 245.
- [19] Holzberg S, Brosio P, Gross C, et al. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant Journal*, 2002, **30**(3), 315 - 327.
- [20] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, **2**(4): 279 - 289.
- [21] Voinnet O, Rivas S, Mestre P, et al. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*, 2003, **33**: 949 - 956.
- [22] Tenllado F, Barajas D, Atencio FA, et al. Transient expression of homologous hairpin RNA causes interference with plant virus infection and is overcome by a virus encoded suppressor of gene silencing. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2003, **16**(2): 149 - 158.
- [23] Bendahmana A, Querci M, Kanyuka K, et al. Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J*, 2000, **21**(1): 73 - 81.
- [24] Zhou F, Kurth J. Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a *Rar1*-independent signaling pathway. *Plant Cell*, 2001, **13**(2): 337 - 350.
- [25] Sidorenko L, Li X, Tagliani L, et al. Characterization of the regulatory elements of maize *P-rr* gene by transient expression assays. *Plant Mol Biol*, 1999, **39**: 11 - 19.
- [26] Song GQ, Yamaguchi K. Efficient agroinfiltration-mediated transient *GUS* expression system for assaying different promoters in rice. *Plant Biotech*, 2003, **20**(3): 235 - 239.
- [27] Yang YN, Li RG, Qi M. *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J*, 2000, **22**(6): 543 - 551.
- [28] Zhan SX(战淑欣), Wang DW(王道文). Development of a transient assay for investigating the activation of pea *Hsp70* gene promoter by potyviral cistrons. *Acta Botanica Sinica(植物学报)*, 2000, **42**(4): 433 - 437.
- [29] Kirschner M, Winkelhaus S, Thierfelder JM, et al. Transient expression and heat-induced co-aggregation of endogenous and heterologous small heat-stress proteins in tobacco protoplasts. *Plant J*, 2000, **24**(3): 1 - 17.
- [30] Escobar C, Hernander LE, Jimenez A, et al. Transient expression of *Abacidopsis thaliana* ascorbate peroxidase 3 in *Nicotiana benthamiana* plants infected with recombinant potato virus X. *Plant*

- [31] Selth A , Randles JW , Rezaian MA . Host responses to transient expression of individual genes encoded by tomato leaf curl virus . *Mol Plant-Microbe Interact* , 2004 , **17** (1) : 27 - 33 .
- [32] Wang HZ(王华忠) , Niu JS(牛吉山) , Chen PD(陈佩度) . Analysis of the functions of wheat resistance-related genes by a transient expression system . *Acta Genetica Sinica*(遗传学报) , 2005 , **32** (9) : 30 - 936 .
- [33] Wang HZ(王华忠) , Xing L(邢莉萍) , Li WL(李万隆) , et al . Disease-resistance function analysis of wheat chitinase and β -1 , 3-glucanase genes by a transient expression system . *Journal of Triticeae Crops*(麦类作物学报) , 2006 , **26** (1) : 7 - 12 .
- [34] Panstruga R . A golden shot : how ballistic single cell transformation boosts the molecular analysis of cereal-mildew interactions . *Mol Plant Pathol* , 2004 , **5** (2) : 141 - 148 .
- [35] Schweizer P , Pokorny J , Schulze-Lefert P , et al . Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals . *Plant J* , 2000 , **24** (6) : 895 - 903 .
- [36] Baulcombe DC . Fast forward genetics based on virus induced gene silencing . *Curr Opin Plant Biol* , 1999 , **2** : 109 - 113 .
- [37] Waterhouse PM , Helliwell CA . Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing . *Nature Genetics* , 2003 , **4** (1) : 29 - 38 .
- [38] Burton RA , Gibeaut DM , Bacic A , et al . Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene . *Plant Cell* , 2000 , **12** (5) : 691 - 705 .
- [39] Peart JR , Lu R , Sadanandom A , et al . Ubiquitin ligase-associated protein *SGT1* is required for host and nonhost disease resistance in plants . *Proc Natl Acad Sci USA* , 2002 , **99** (16) : 10865 - 10869 .
- [40] Hein I , Barciszewska-Pacak M , Hrubikova K , et al . Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley . *Plant Physiol* , 2005 , **138** : 2155 - 2164 .
- [41] Scofield SR , Huang L , Brandt AS , et al . Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the *Lr21*-mediated leaf rust resistance pathway . *Plant Physiol* , 2005 , **138** : 2165 - 2173 .
- [42] Panstruga R , Kim MC , Cho MJ , et al . Testing the efficiency of RNAi constructs *in vivo* : A transient expression assay based on two fluorescent proteins . *Mol Biol Reps* , 2003 , **30** : 135 - 140 .
- [43] Ono A , Kim SH , Walbot V . Subcellular localization of MURA and MURB proteins encoded by the maize MuDR transposon . *Plant Mol Biol* , 2002 , **50** : 599 - 611 .
- [44] Borrell A , Cutanda C , Lumbreras V , et al . *Ababidopsis thaliana* Atrab28 : a nuclear targeted protein related to germination and toxic cation tolerance . *Plant Mol Biol* , 2002 , **50** : 249 - 259 .
- [45] Li HY , Chye ML . Membrane localization of *Arabidopsis* acyl-CoA bonding protein *ACBP2* . *Plant Mol Biol* , 2003 , **51** : 483 - 492 .
- [46] Boudart G , Charpentier M , Lafitte C , et al . Elicitor activity of a fungal endopolygalacturonase in tobacco rRequires a functional catalytic site and cell wall localization . *Plant Physiol* , 2003 , **131** : 93 - 101 .
- [47] Kohler RH , Cua J , Zipfel WR , et al . Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids . *Science* , 1997a , **276** : 2039 - 2042 .
- [48] Hibberd JM , Linley PJ , Khan MS , et al . Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment . *Plant J* , 1998 , **16** : 627 - 632 .
- [49] Kohler RH , Zipfel WR , Webb WW , et al . The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria *in vivo* . *Plant J* , 1997b , **11** : 613 - 621 .
- [50] Galvez S , Roche O , Bismuth E , et al . Mitochondrial localization of a NADP dependent isocitrate dehydrogenase isoenzyme by using the green fluorescent protein as a marker . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1998 , **95** : 7831 - 7818 .
- [51] Heinlein M , Epel B , Padgett HS , et al . Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton . *Science* , 1995 , **270** : 1983 - 1985 .
- [52] Kost B , Spielhofer P , Chua NH . A GFP-mouse talin fusion protein labels plant action filaments *in vivo* and visualizes the action cytoskeleton in growing pollen tubes . *Plant J* , 1998 , **16** : 393 - 401 .
- [53] Boevink P , Oparka K , Santa Cruz S , et al . Stacks on tracks : the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network . *Plant J* , 1998 , **15** : 441 - 447 .
- [54] Heinlein M , Padgett GS , Gens JS , et al . Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection . *Plant Cell* , 1998 , **10** : 1107 - 1120 .
- [55] Ivanchenko M , Vejlupekova Z , Quatrano RS , et al . Maize *ROP7* GTPase contains a unique , CaaX box-independent plasma membrane targeting signal . *Plant J* , 2000 , **24** : 79 - 90 .
- [56] Wulff BBH , Thomas CM , Smoker M , et al . Domain swapping and gene shuffling identify sequences required for induction of an avr-dependent hypersensitive response by the tomato *Cf-4* and *Cf-9* proteins . *Plant Cell* , 2001 , **13** (2) : 255 - 272 .
- [57] Vaquero C , Sack M , Chandler J , et al . Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1999 , **96** : 11128 - 11133 .
- [58] Page A , Angell S . Transient expression of reporter proteins can alter gene expression . *Plant Sci* , 2002 , **163** : 431 - 437 .
- [59] Kerk NM , Ceserani T , Tausta SL , et al . Laser capture microdissection of cells from plant tissues . *Plant Physiol* . 2003 , **132** (1) : 27 - 35 .