

玉米特异表达启动子驱动下结核 *esat-6* 抗原基因植物表达载体的构建及鉴定

李君武^{1*}, 宋 东¹, 王珊珊¹, 胡建广², 刘 艳¹, 黄清华¹

(1. 暨南大学 医学院微生物免疫学教研室, 广东广州 510632; 2. 广东省农业科学院 作物研究所, 广东广州 510640)

摘 要: 以本实验室构建的 pEGHLE 为模板经聚合酶链反应(PCR)扩增出 *Esat-6* 基因, 连接到含有玉米特异性启动子 globulin-1 的 pCR2.1 载体上, 将 globulin-1-*Esat6* 联合片断切下连到含有抗除草剂基因 *bar* 的 pCAMBIA1300 载体中, 构建植物双元表达质粒 pCAMBIA1300GEsat-6, 电击法将重组质粒转化到农杆菌 LBA4404 中。通过对 pC1300GEsat-6 质粒酶切鉴定和测序分析表明克隆的 *Esat-6* 与预期相符, 酶切从农杆菌中所提的质粒, 条带大小与预期结果相符合。

关键词: 结核分支杆菌; *Esat-6*; Globulin-1

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2009)03-0107-04

Construction of Vector for Expression of *Esat-6* Gene Driven by a Maize Endosperm-specific Promoter

LI Junwu^{1*}, SONG Dong², WANG Shanshan¹,
HU Jianguang², LIU Yan¹ and HUANG Qinghua¹

(1. Department of Microbiology and Immunology, Medical College of Jinan University, Guangzhou Guangdong 510632, China; 2. Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou Guangdong 510640, China)

Abstract: To construct the plant expression plasmid containing *Mycobacterium tuberculosis* *Esat-6* genes, and transform the recombined vector into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. The DNA of *Esat-6* amplified from pEGHLE by polymerase chain reaction (PCR) were cloned into the vector pCRG2.1, The combine fragment of promoter globulin and the target gene *Esat-6* which get from doubled enzymes digestion of the recombined plasmid pCRGEsat-6 was inserted into the plant express vector pCAMBIA1300 which contain the *bar* gene for herbicide resistance. The recombinant plasmid was analyzed by restriction enzyme digestion and the inserted target genes in the pC1300GEsat-6 were verified by nucleotide sequencing. Then transformed pC1300GEsat-6 into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by electroporation. The binary expression plasmid, which could express *ESAT-6*, was correctly constructed by digestion and sequencing. Digested plasmid which was extracted from *Agrobacterium tumefaciens*, fragments were also correct. The recombinant vector containing *Mycobacterium tuberculosis* *Esat-6* is constructed successfully and transformed into LBA4404, and lays a foundation for further study on its immunity effectiveness against MTB.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; *Esat-6*; Globulin-1

结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 是一种专性胞内寄生菌。机体抗结核杆菌的感染是以 T 细胞介导的细胞免疫为主。因此能否有效地激发机体的 T 细胞, 尤其是 CD4⁺

收稿日期: 2008-12-29 修回日期: 2009-02-11

基金项目: 广东省科技计划重大专项(编号: 2006A20101006); 广东省科技计划重点项目(编号: 2004B31201019)。

作者简介: 李君武(1949—), 男, 湖北武汉人, 教授, 博士, 研究方向: 感染免疫及分子、细胞免疫。E-mail: ljw6610@163.com

Th1 细胞免疫反应是疫苗研制的关键所在。BCG 是世界上使用最广泛的疫苗,也是目前唯一在人体上使用的抗结核疫苗,但其保护效果不稳定(保护率为 0~80%^[1])。因此发展一种保护作用优于 BCG 的结核病新型防治疫苗就成了各国科研工作者们的重要任务之一。近年来,对结核研究最多的抗原主要有 Esat-6, Hsp65, Ag85B 和 MPT64 等^[2,7-8]。

研究发现 MTB 培养上清滤液蛋白(culture filtrate protein, CFP)中 Esat-6 能刺激机体产生保护性免疫反应^[3-4],是机体抗结核感染的有效靶抗原。Esat-6 是 MTB 短期培养滤液中纯化分离出的一种低分子量分泌性蛋白,只在致病菌株中表达^[5],具有多个 T、B 细胞表位,能诱导机体产生以 Th1 型为主的细胞免疫应答,结核杆菌感染具有免疫保护性^[6];此外,Esat-6 还可刺激 TB 病人的外周血单核细胞的 T 细胞增殖,促进 IFN- γ 释放^[9],在动物实验中,它可激活 CD4⁺ T 细胞和主要组织相容性抗原复合物(MHC) I 类分子限制性 CD8⁺ T 细胞,Esat-6 蛋白的编码基因存在于分枝杆菌毒株中而减毒株中缺失^[10]。另外,Esat-6 的基因无信号肽序列,它可能是通过一种非信号肽依赖方式分泌到细胞外的,但这种分泌方式可能效率不够高,因为除了在培养物滤液中外,结核菌细胞浆和细胞壁上也检测到了 Esat-6 的存在^[11]。

本研究将编码 Esat-6 的基因在植物表达载体中构建,并且转入到可将外源基因导入植物愈伤组织的根瘤农杆菌中,以期利用植物反应器生产抗结核口服疫苗。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

质粒 pEGFPHsp65-Esat6、大肠杆菌 Top10 为本实验室保存;中间载体 pCR2.1-globulin-1,植物表达载体 pCAMBIA1300bar-nos 由广东省农业科学院提供。

1.2 主要试剂

Ex Taq DNA 聚合酶, *T₄* DNA 连接酶,限制性内切酶 *Spe* I, *Xba* I, *Hind* III, 1 kbp DNA Ladder marker, DL-2000 ladder marker, CIAP 购自大连宝生物公司;Omega PCR 产物清洁试剂盒, Omega 质粒提取试剂盒, Omega DNA 胶回收纯化试剂盒购自广州瑞扬生物科技有限公司;

PCR 引物合成由上海生工生物工程公司完成;重组质粒上目的基因的序列测定由广州拓谱公司完成。

1.3 目的片断的扩增

根据发表的人结核分支杆菌 H37Rv 株 *Esat-6* 基因的 CDS 序列设计基因 *Esat-6* 引物,上游引物序列为: P1 5' GC ACTAGT ATGACAGAG-CAGCAGTGGAA - 3', 含 *Spe* I 酶切位点和起始密码子 ATG;下游引物序列为 P2 5'- GC TCTAGA CTATGCGAACATCCCAGTGAC - 3', 含 *Xba* I 酶切位点和终止密码子 CTA。以质粒 pEGFPHsp65-Esat6 为模板,用引物 P1, P2 进行 PCR 扩增 *Esat-6*, 反应体系为 50 μ L, 其中上下游引物各 1 μ L, dNTP 4 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 10 $\times$ *Ex Taq* Buffer 5 μ L, *Ex Taq* 0.3 μ L, ddH₂O 3.7 μ L, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 50 s, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。得到的 PCR 产物用胶回收试剂盒回收。

1.4 重组质粒 pCRGEsat6 的构建

PCR 产物胶回收后用 *Spe* I 内切酶和 *Xba* I 内切酶对 PCR 纯化产物及质粒 pCRG 进行双酶切,酶切产物再进行琼脂糖凝胶电泳分离及 DNA 胶回收纯化。回收的产物经 CIAP 去磷酸化后按一定比例用 *T₄* 连接酶进行连接反应, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化低温 CaCl₂ 制备的大肠杆菌感受态细胞 Top10, 涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素及 50 μ g/mL 四环素的 LB 平板中, 次日挑单菌落, 分别接种于 3 mL 含卡那霉素和四环素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 下 150 r/min 振荡培养过夜, 先取少量菌液煮沸作为模板进行菌落 PCR 检测是否有 *Esat-6* 的存在, 将菌落 PCR 筛选呈阳性的菌落抽提质粒 DNA 并用 *Spe* I 和 *Xba* I 进行双酶切鉴定, 以 1 kb DNA ladder marker 为分子量参照, 筛选出克隆产物为阳性的菌液。

1.5 重组质粒 pCAMBIA1300GEsat6 的构建

将已测序正确的菌液 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后提取质粒, 用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切, 进行琼脂糖凝胶电泳分离, DNA 凝胶回收纯化得到的 1.7 kb 的 globulin-Esat6 片断。同时提取含有 *bar* 和 *nos* 基因的 pCAMBIA1300 质粒, 用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切, 回收的产物按一定比例用 *T₄* 连接酶进行连接反应, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化低温 CaCl₂ 制备的大肠杆菌感受态细胞

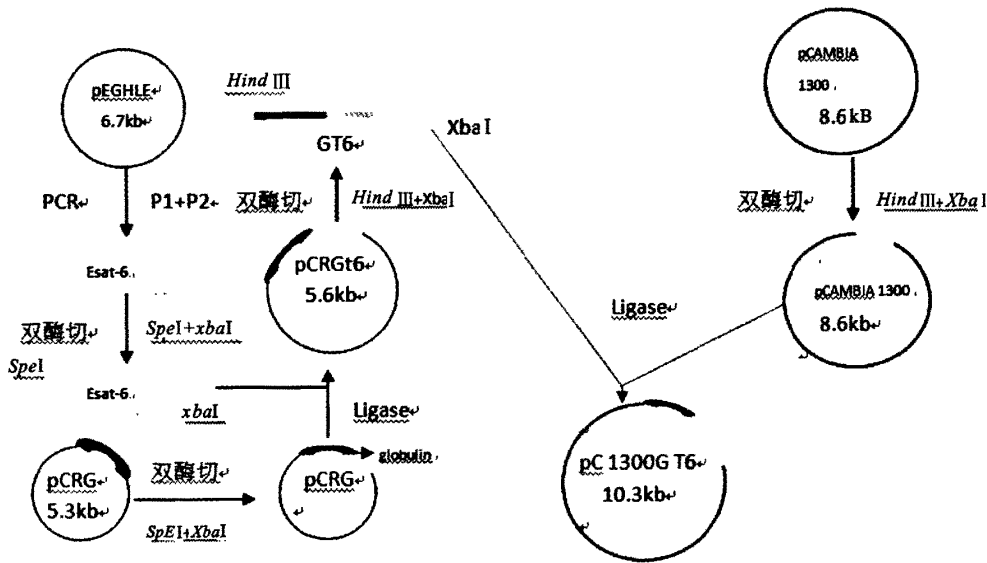
Top10,涂布于含 50 μg/mL 卡那霉素及 50 μg/mL 四环素的 LB 平板中。挑取单菌落于 LB 液体培养液中 37℃ 过夜培养。提取质粒后进行单酶切,通过琼脂糖电泳与非重组质粒的单酶切产物比大小,取比非重组质粒大的重组质粒再进行双酶切鉴定,最终得到 10.3 kb 正确克隆的重组子,送广州拓谱生物有限公司完成测序。

1.6 转化农杆菌 LBA4404

首先制备农杆菌的电感受态,方法参照卢圣栋《现代分子生物学实验技术》。取一管感受态细胞于冰上融化,加入 2 μL 约 50 ng 的 pCAMBIA1300GEsat6 质粒混匀,将样品放入已于冰上

预冷的 0.1 cm 宽的电极杯中,电压 1.8 kV,电容 25 u FD,电阻 200 Ω,电击 5 ms。加入 600 μL YEB 培养基,轻轻吹洗电极杯,将电击后的样品一并移入 1.5 mL EP 管中 28℃ 220 r/min 培养 4 h 后铺于含有卡那霉素(50 μg/mL)和链霉素(50 μg/mL)的 YEB 平板上,28℃ 培养 2~3 d。挑取单菌落于 YEB 液体培养液中 28℃ 过夜培养。提取菌落 PCR 阳性的质粒进行双酶切鉴定,最终确定重组质粒 pCAMBIA1300GEsat6 转入到 LBA4404 中。

1.7 构建流程图



2 结果与分析

2.1 Esat-6 基因 PCR 扩增产物电泳分析

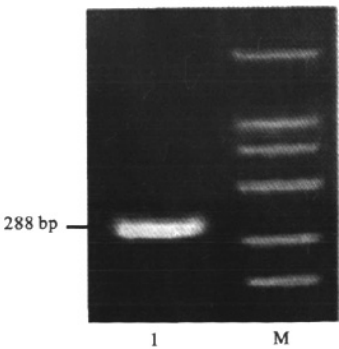
琼脂糖凝胶电泳结果显示,PCR 产物为 288 bp 的特异性片段,与预期 Esat-6 基因大小相符(图 1)。

2.2 重组质粒 pCRGEsat-6 限制性内切酶消化鉴定

pCRGEsat6 经 Hind III 和 XbaI 双酶切后,电泳后回收目的片段为 1.7 kb 的条带(图 2)。

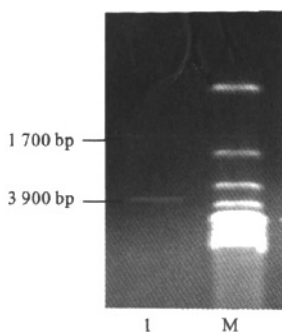
2.3 重组质粒 pC1300GEsat-6 限制性内切酶消化鉴定

质粒 pC1300GEsat-6 经 Hind III 和 XbaI 双酶切后,得到 1.7 kb 和 8.6 kb 两条特异性条带,大小相符(图 3)。



M, DNA marker DL-2000;1, PCR product

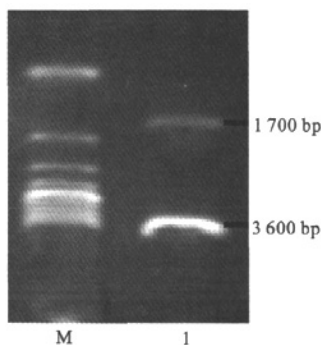
图 1 Esat-6 基因的 PCR 扩增产物的电泳分析
Fig. 1 Electrophoretic file of PCR product of Esat-6 gene



M. 1 kb DNA ladder marker; 1. pCRGEsat-6/*Hind* III + *Xba* I

图 2 pCRGEsat-6 的双酶切鉴定

Fig. 2 Restriction map of recombinant plasmid pCRGEsat-6



M. 1 kb DNA ladder marker; 1. pC1300GEsat-6/*Hind* III + *Xba* I

图 3 pC1300GEsat-6 的双酶切鉴定

Fig. 3 Restriction map of recombinant plasmid pC1300GEsat-6

2.4 序列分析鉴定

对质粒 pC1300GEsat-6 的启动子 globulin 后的 DNA 序列进行序列分析鉴定, 结果与结核分支杆菌 H37Rv 株的 *Esat-6* 基因序列完全相同 (NCBI 登陆号: AF420491)。

3 讨论

在载体构建的过程中, 由于插入的 *globulin-1* 基因已消除了原始质粒 pCR2.1 的大多数酶切位点, 表达载体 pCambia1300 也已被改造为插入了 *nos* 基因和 *bar* 基因, 其 MCS 的大部分位点亦被消除, 而且目的基因 *Esat-6* 上存有多酶切位点, 针对这种情况, 我们在设计实验方案的过程中采用了唯一能使用的同尾酶 *Spe* I 和 *Xba* I 的酶切位点, 给基因克隆带来了一定的难度。

转基因植物疫苗是当今疫苗研制的热点之一。可直接食用的果蔬如番茄、香蕉等作为新型

疫苗分子表达系统, 可口服接种, 免除了打针带来的经济负担和疼痛, 这些较其他生物有着不可比拟的优势^[12]。至今, 利用转基因植物表达的疫苗和功能蛋白达 100 种以上。烟草、马铃薯、大豆、香蕉、莴苣、羽扇豆等作为生物反应器生产口服疫苗, 得到了人们的广泛关注, 国内外对此进行了大量的研究工作, 并取得了一定的成果^[13-14]。玉米等禾谷类作物种子中蛋白质含量高, 储存时间较长而不降解, 干种子方便储藏和运输, 是特别合适的疫苗载体^[15]。

本实验将玉米胚乳特异性表达的启动子 *globulin-1* 基因与所选的优势抗原一起构建到植物二元表达载体 pCambia1300 中, 以期通过农杆菌的诱导, 转入玉米基因组中, *globulin* 和 CaMV35S 双启动子作用诱导外源基因的大量表达。本实验所选用的植物表达载体 pCambia1300 是经过基因加工修饰的, 以 288 bp 的乙酰转移酶基因 *bar* 取代了大约 1 kb 的潮霉素 *Hygromycin* 基因, 用于筛选重组玉米植株的选择标记基因。下一步可将已转入目的抗原基因的农杆菌转化玉米幼胚和愈伤组织, 获得转基因植株。

参考文献:

- [1] Mustafa A S. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis[J]. Molecular Immunology, 2002, 39(1-2):113-119.
- [2] Lowrie D B, Tascon R E, Bonato VLD, *et al.* Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination[J]. Nature, 1999, 400:269-271.
- [3] Buddle B M, Wards B J, Frank E A, *et al.* Influence of sensitization to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis[J]. Vaccine, 2002, 20(7-8):1126-1133.
- [4] Doherty T M, Demissie A, Olobo J, *et al.* Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis* specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(8):704-706.
- [5] Lalvani A, Brookes R, Wilkinson R, *et al.* Human cytolytic and interferon- γ secreting CD8⁺ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*[J]. PNAS, 1998, 95(1):270-275.

(下转第 140 页)

- [6] 陈炳东, 张建平, 党占海. 胡麻产量及主要经济性状的杂种优势[J]. 甘肃农业科技, 1998, 12: 15-16.
- [7] Titok V, Yurenkova S, Titok M. Characterization of Energy Metabolism during Ontogenesis of Fiber Flax in Heterosis[J]. Russian Journal of Genetics, 2005, 41(5): 539-544.
- [8] Bateson W, Cairdner A E. Male sterility in flax [J]. J. Genet., 1921, 11: 269-275.
- [9] Cairdner A E. Male sterility in Flax. A case of reciprocal crosses differing in F_2 [J]. J. Genet., 1929, 21: 117-124.
- [10] Kumar S, Singh S P. Inheritance of male sterility in some introduced varieties of linseed (*Linum. usitatissimum* L.) [J]. Indian. J. A. agric. Sci, 1970, 40: 184-191.
- [11] Thompson T E. Cytoplasmic male sterility flax with open corollas[J]. J. Hered., 1977, 68: 185-187.
- [12] 陈鸿山. 核不育亚麻研究初报[J]. 华北农学报, 1986, 1(1): 87-91.
- [13] 张 辉. 显性核不育亚麻的雄性不育性研究[J]. 北京农业大学学报, 1993, 19(增刊).
- [14] 党占海, 张建平, 余新城. 抗生素诱导油用亚麻雄性不育研究[J]. 中国油料作物学报, 2000, 22(1): 46-48.
- [15] 党占海, 张建平, 余新城. 温敏型雄性不育亚麻的研究[J]. 作物学报, 2002, 28(6): 861-864.
- [16] 张建平, 党占海. 亚麻新型雄性不育系的温敏效应及杂种优势初探[J]. 西北农业学报, 2002, 11(4): 22-24, 27.
- [17] 张建平, 党占海. 油用亚麻两系杂交种产量表现及不育株率对产量的影响[J]. 西北农业学报, 2005, 15(4): 3: 78-80.
- [18] 王利民, 党占海, 张建平. 温敏雄性不育亚麻在云南的育性表现及温敏特性研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(4): 31-34.
- [19] 朱英国, 杨代常. 光周期敏感核不育水稻研究与利用[J]. 武汉: 武汉大学出版社, 1992.
- [20] 龙俐华, 舒 琨. 提高杂交稻异交率研究[J]. 湖南农业学报, 2000, 26(3): 167-170.
- [21] 卫 丽, 孟昭桂, 程相武. 谷子开花习性与结实率关系的研究[J]. 中国农学通报, 1999, 15(3): 79-80.
- [22] 陈世雷, 何蓓如, 宋喜悦. 多效唑和赤霉素对小麦不育系柱头生活力的影响[J]. 华北农学报, 2008, 23(2): 118-122.

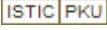
(上接第 110 页)

- [6] Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG[J]. Infect Immun, 1996, 64(1): 16-22.
- [7] 师长宏, 范雄林, 柏银兰, 等. 结核分枝杆菌 Ag85B-ESAT6 融合蛋白在小鼠体内诱导的免疫应答及其保护力[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(18): 1633-1636.
- [8] 师长宏, 安家泽, 唐小凤, 等. 结核分枝杆菌 MPT64-ESAT6 融合蛋白在小鼠体内诱导的免疫应答及其保护力[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(9): 769-771.
- [9] Arend S M, Geluk A, Meijgaarden K E, et al. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* - specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides [J]. Infect Immun, 2000, 68(6): 3314-3321.
- [10] Doherty T M, Demissie A, Olobo J, et al. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis* specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(8): 704-706.
- [11] Sorensen A L, Nagai S, Houen G, et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immun, 1995, 63(5): 1710-1717.
- [12] 李 林, 佳 飞. 转基因植物口服疫苗的免疫机制研究进展[J]. 国外医学免疫学分册, 2004, 27(6): 354-357.
- [13] 张金波, 祝建波, 彭晓明, 等. 产肠毒素大肠杆菌 K88-STII-LTA2/LTB 融合基因在烟草中的表达[J]. 西北农业学报, 2007, 16(5): 135-140, 154.
- [14] 郝浩永, 尉亚辉, 朱建光, 等. 转基因番茄表达口服乙肝疫苗[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 201-204.
- [15] 陈 珍, 陈文莉, 朱诚, 等. 转基因植物口服疫苗研究的新进展[J]. 细胞与分子免疫, 2006, 22(6): 831-833.

玉米特异表达启动子驱动下结核esat-6抗原基因植物表达载体的构建及鉴定

作者：[李君武](#)，[宋东](#)，[王珊珊](#)，[胡建广](#)，[刘艳](#)，[黄清华](#)，[LI Junwu](#)，[SONG Dong](#)，[WANG Shanshan](#)，[HU Jianguang](#)，[LIU Yan](#)，[HUANG Qinghua](#)

作者单位：[李君武](#)，[宋东](#)，[王珊珊](#)，[刘艳](#)，[黄清华](#)，[LI Junwu](#)，[SONG Dong](#)，[WANG Shanshan](#)，[LIU Yan](#)，[HUANG Qinghua](#) (暨南大学, 医学院微生物免疫学教研室, 广东广州, 510632)，[胡建广](#)，[HU Jianguang](#) (广东省农业科学院, 作物研究所, 广东广州, 510640)

刊名：[西北农业学报](#) 

英文刊名：[ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA](#)

年，卷(期)：2009, 18(3)

被引用次数：1次

参考文献(15条)

1. [Mustafa A S](#) Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis[外文期刊] 2002(1-2)
2. [Lowrie D B](#);[Tascon R E](#);[Bonato VLD](#) Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination[外文期刊] 1999(6741)
3. [Buddle B M](#);[Wards B J](#);[Frank E A](#) Influence of sensitization to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis[外文期刊] 2002(7-8)
4. [Doherty T M](#);[Demissie A](#);[Olobo J](#) Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients[外文期刊] 2002(08)
5. [Lalvani A](#);[Brookes R](#);[Wilkinson R](#) Human cytolytic and interferon- γ secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis 1998(01)
6. [Harboe M](#);[Oettinger T](#);[Wiker HG](#) Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG 1996(01)
7. [师长宏](#);[范雄林](#);[柏银兰](#) 结核分枝杆菌Ag85B-ESAT6融合蛋白在小鼠体内诱导的免疫应答及其保护力[期刊论文]-第四军医大学学报 2004(18)
8. [师长宏](#);[安家泽](#);[唐小凤](#) 结核分枝杆菌MPT64-ESAT6融合蛋白在小鼠内诱导的免疫应答及其保护力[期刊论文]-第四军医大学学报 2006(09)
9. [Arend S M](#);[Geluk A](#);[Meijgaarden K E](#) Antigenic equivalence of human T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides[外文期刊] 2000(06)
10. [Doherty T M](#);[Demissie A](#);[Olobo J](#) Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients[外文期刊] 2002(08)
11. [Sorensen A L](#);[Nagai S](#);[Houen G](#) Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis[外文期刊] 1995(05)
12. [李林](#);[佳飞](#) 转基因植物口服疫苗的免疫机制研究进展[期刊论文]-国外医学(免疫学分册) 2004(06)
13. [张金波](#);[祝建波](#);[彭晓明](#) 产肠毒素大肠杆菌K88-STII-LTA2 /LTB融合基因在烟草中的表达[期刊论文]-西北农业学报 2007(05)
14. [郝浩永](#);[尉亚辉](#);[朱建光](#) 转基因番茄表达口服乙肝疫苗[期刊论文]-食品科学 2007(06)

15. [陈珍;陈文莉;朱诚](#) [转基因植物口服疫苗研究的新进展](#)[期刊论文]-[细胞与分子免疫学杂志](#) 2006(06)

本文读者也读过(10条)

1. [胡建广, 李余良, 方志伟, 刘建华, 邱道寿](#) [超甜玉米自交系幼胚高效成株系统的建立](#)[期刊论文]-[中国农学通报](#) 2004, 20(2)
2. [李余良, 胡建广, 苏菁, 刘建华, 李敦松, LI Yuliang, Hu Jianguang, Su Jing, Liu Jianhua, Li Dunsong](#) [基因枪法转Bt/GNA基因超甜玉米植株的获得及抗虫性鉴定](#)[期刊论文]-[分子植物育种](#)2007, 5(4)
3. [李君武, 王珊珊, 宋东, 刘艳, 黄清华, LI Jun-wu, WANG Shan-shan, SONG Dong, LIU Yan, HUANG Qing-hua](#) [玉米特异启动子驱动下结核Hsp65与Esat-6融合基因表达载体的构建及鉴定](#)[期刊论文]-[华北农学报](#)2009, 24(3)
4. [李余良, 胡建广, 方志伟, 刘建华, 肖妙玲](#) [粤甜9号种植密度对产量及效益的影响](#)[期刊论文]-[中国农学通报](#) 2003, 19(4)
5. [李高科, 胡建广, 刘建华, 祁喜涛, Li Gaoke, Hu Jianguang, Liu Jianhua, Qi Xitan](#) [优质、抗逆甜玉米群体配合力及遗传势分析](#)[期刊论文]-[中国农学通报](#)2008, 24(9)
6. [胡建广, 李余良, 祁喜涛, 刘建华, HU Jian-guang, LI Yu-liang, QI Xi-tao, LIU Jian-hua](#) [基因枪介导超甜玉米幼胚转化研究](#)[期刊论文]-[玉米科学](#)2005, 13(4)
7. [徐立华, 张举仁, 许方佐, 周柱华, 邱登林, 邢燕菊, 阴卫军](#) [基因枪法获得玉米转基因植株的研究](#)[会议论文]-2006
8. [李余良, 胡建广, 王子明, 刘建华, LI Yu-liang, HU Jian-guang, WANG Zi-ming, LIU Jian-hua](#) [广东甜玉米品种主要性状表现及品种选育方向](#)[期刊论文]-[佛山科学技术学院学报\(自然科学版\)](#) 2010, 28(2)
9. [胡建广, 方志伟, 刘建华, 李余良, HU Jian-guang, FANG Zhi-wei, LIU Jian-hua, LI Yu-liang](#) [优质高产多抗超甜玉米粤甜11的选育](#)[期刊论文]-[玉米科学](#)2007, 15(z1)
10. [胡建广, 杨金水, HU Jian-Guang, YANG Jin-Shui](#) [染色质结构与基因表达调控](#)[期刊论文]-[遗传](#)1999(1)

引证文献(1条)

1. [李君武, 叶秋萍, 刘艳, 黄清华, 王珊珊, 宋东](#) [乙肝病毒大包膜蛋白基因植物表达载体的构建及鉴定](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2010(6)

引用本文格式: [李君武, 宋东, 王珊珊, 胡建广, 刘艳, 黄清华, LI Junwu, SONG Dong, WANG Shanshan, HU Jianguang, LIU Yan, HUANG Qinghua](#) [玉米特异表达启动子驱动下结核esat-6抗原基因植物表达载体的构建及鉴定](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2009(3)