

Flg22 重组蛋白的原核诱导及与 flg22 短肽的功能比较

王萌媛^{1,2}, 程 科^{1,2}, 杨 澜^{1,2,3}, 赵惠萍^{1,2*}

1. 海南大学热带农林学院/海南省耐盐作物生物技术重点实验室, 海南海口 570228; 2. 海南大学三亚南繁研究院, 海南三亚 572025; 3. 贵州省园艺研究所/贵州省园艺工程技术研究中心, 贵州贵阳 550025

摘 要: Flg22 是细菌鞭毛蛋白 (flagellin) N 端保守的 22 个氨基酸合成肽段, 在调节植物免疫应答调节中发挥重要作用, 也常被用于免疫细胞功能研究。由于人工合成的 flg22 短肽成本较高, 其规模化应用受限。因此, 本研究拟探究 flg22 蛋白原核诱导表达的适宜条件并验证其功能, 评估其替代商用 flg22 短肽的可行性。本研究通过合成 pET32a-flg22 原核表达载体, 比较 28 °C 与 37 °C 诱导温度下的蛋白表达效率, 并分别检测经 flg22 短肽及不同浓度 flg22 蛋白处理的木薯中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的爆发动态, 验证其功能。结果显示: 28 °C 为 flg22 蛋白诱导的最佳温度; ROS 测定结果表明, 在一定浓度范围内, ROS 峰值强度随 flg22 蛋白浓度增加呈递增趋势。进一步将 60、600 µg/mL 的 flg22 重组蛋白及 2.27 µg/mL flg22 短肽分别外源喷施于木薯叶片, 3 d 后, 接种木薯萎焉致病变种 *Xam* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*, *Xam*) 病原菌, 与无菌水处理相比, 经 flg22 蛋白或 flg22 短肽处理的木薯植株均表现出对 *Xam* 的显著抑菌效果, 且 60、600 µg/mL flg22 蛋白的抑菌效果均显著优于 flg22 短肽。本研究初步筛选出 flg22 重组蛋白的原核表达条件, 并验证其在诱导植物防御响应的功能与短肽具有一致性, 为以 flg22 重组蛋白替代商用短肽提供初步的理论依据。

关键词: 原核诱导表达; flg22; 短肽; 病原菌; ROS

中图分类号: S572; Q943 文献标志码: A

Prokaryotic Induction of Recombinant Flg22 Protein and Functional Comparative Analysis with flg22 Peptide

WANG Mengyuan^{1,2}, CHENG Ke^{1,2}, YANG Lan^{1,2,3}, ZHAO Huiping^{1,2*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Key Laboratory of Biotechnology of Salt Tolerant Crops of Hainan Province, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China; 3. Guizhou Horticultural Institute / Guizhou Research Center of Horticultural Engineering Technology, Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract: Flg22 is an artificially synthesized 22-amino-acid peptide derived from the conserved N-terminal region of bacterial flagellin, playing a crucial role in regulating plant immune responses. Due to the high cost of artificially synthesized flg22 short peptides and limitations for large-scale application, this study aimed to determine the suitable conditions for prokaryotic induction expression of the flg22 protein and to verify its function, thereby determining whether it could replace the commercially used flg22 short peptides. In this study, the pET32a-flg22 prokaryotic expression vector was synthesized, and we then compared protein expression efficiency under induction at 28 °C and 37 °C. Additionally, we detected the dynamic burst of reactive oxygen species (ROS) in cassava treated with flg22 peptides and flg22 proteins at different concentrations to validate the functions. The results indicated that 28 °C was the optimal induction temperature for inducing flg22 protein expression. ROS measurements showed that within a specific concentration range, the peak intensity of ROS increased with the increase in flg22 protein concentration. Furthermore, after spraying cassava leaves with 60 µg/mL and 600 µg/mL of flg22 recombinant proteins, as well as 2.27 µg/mL of flg22

收稿日期 2025-09-21; 接受日期 2025-11-04

基金项目 海南省教育厅项目 (No. Hnky2024-10); 海南大学南繁学院创新创业训练项目 (No. NFJD2024-15)。

作者简介 王萌媛 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 作物遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 赵惠萍 (ZHAO Huiping), E-mail: 996427@hainanu.edu.cn。

peptides, for three days, we inoculated plants with the pathogen *Xam* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Xam*). Compared to treatment with sterile water, both flg22 protein and flg22 peptide treatments showed significant antibacterial effects against *Xam* in cassava plants, with the 60 $\mu\text{g/mL}$ and 600 $\mu\text{g/mL}$ flg22 protein treatments showing notably stronger antibacterial activity than the flg22 peptide. The results preliminarily identified the prokaryotic expression conditions of flg22 recombinant protein and verified that its function in inducing plant defense responses is consistent with that of the peptide, providing a theoretical basis for substituting commercial peptides with flg22 recombinant protein.

Keywords: prokaryotic induced expression; flg22; peptide; pathogen; reactive oxygen species

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.02.008

在生长环境复杂多变的条件下,植物不仅有抵御病原菌的天然屏障,还进化出了一套与病原菌相互作用的先天免疫反应^[1]。先天免疫是植物的第一道防线,主要依赖于细胞内和细胞表面的免疫受体^[2]。植物细胞外模式识别受体识别保守的病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)后可以激活 PAMP 触发免疫(PAMP-triggered immunity, PTI)^[3],在宿主与病原体共同进化的过程中,植物已经进化出了 R(resistance)蛋白^[4],通过直接互动或者间接识别,能够特异性识别病原菌传递的效应因子,从而诱导植物的防御反应,称为效应物触发免疫(effector-triggered immunity, ETI)^[3]。其中 PTI 是植物防御病原菌的第一层防御系统,例如,病原菌某些保守的鞭毛蛋白、几丁质等可以被植物的模式识别受体识别,进而激活植物的免疫反应^[5]。

细菌鞭毛作为细菌运动的核心细胞器,其主要组成成分是鞭毛蛋白^[6]。研究人员发现经热失活的丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*, *Pst*)粗提物中的免疫反应是由鞭毛蛋白触发的。随后对各种致病细菌的鞭毛蛋白序列进行分析,发现细菌鞭毛蛋白的 N 端存在一段高度保守的区域,即 flg22^[7]。当 flg22 被植物免疫系统识别后,可迅速激活下游信号通路,并在数分钟内引发活性氧(reactive oxygen species, ROS)爆发,该反应兼具直接抗菌和系统性信号传导功能的早期防御反应,被视为植物抵御病原体入侵的“第一道防线”^[8]。因此,于植物免疫相关研究中,flg22 通常替代鞭毛蛋白模拟细菌病原菌并刺激植物^[9]。在拟南芥中,野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, *Xcc*)鞭毛蛋白中的 N 端(fl22)是唯一能触发拟南芥防御反应的区域,拟南芥通过其鞭毛蛋白感知受体 FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2) 识别 flg22,

从而启动防御机制^[10]。flg22 作为植物免疫系统的重要识别信号,也被用作植物免疫诱导剂^[10]。已有研究证实,外源施加 flg22 可显著提升植物的抗病性^[11]。例如,经 flg22 处理的拟南芥幼苗可激活 MAPK 级联反应调控超过 1200 个基因的转录,其中吲哚族芥子油苷生物合成代谢途径相关的大部分基因显著上调表达,表明 flg22 通过诱导次生代谢产物合成参与植物防御以抵御病原菌侵染^[9]。同时, *gmlmm1* 突变体可通过增强 flg22 诱导的 ROS 爆发,显著提升本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)对丁香假单胞菌的抗性^[12]。

当 flg22 诱导植物先天免疫中的作用已被广泛证实^[11],但其商业化合成短肽的价格仍高昂^[13-14]。基于此,本研究聚焦于利用原核表达系统生产 flg22 重组蛋白替代短肽的可行性。通过优化诱导条件、分析蛋白功能,并与商品化短肽进行对比,旨在为评估 flg22 重组蛋白替代短肽的可行性提供基础数据支撑。本研究对重组蛋白与短肽功能的一致性进行了初步探索,为后续深入研究提供可行性依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料木薯为华南 124,烟草为本氏烟草。构建的原核表达载体 pET32a-flg22 购自深圳华大基因科技有限公司(以下简称“华大公司”)、flg22 短肽购自上海万生昊天生物技术有限公司(以下简称“万生生物公司”)。

1.2 方法

1.2.1 flg22 蛋白载体的合成 通过华大公司合成 pET32a-flg22 蛋白表达载体,提取 pET32a-flg22 质粒,以质粒为模板,扩增 pET32a-flg22 的片段,琼脂糖凝胶电泳验证片段大小。

1.2.2 flg22 蛋白的诱导 将合成的 pET32a-flg22 载体质粒转入大肠杆菌 DE3 中,菌落 PCR 验证

阳性克隆后加入 5 mL LB (100 mg/mL 氨苄抗生素) 液体培养基, 置于 37 °C、150 r/min 摇床中过夜培养 10 h, 取适量菌液加入至 20 mL LB (100 mg/mL 氨苄抗生素) 液体培养基中, 将菌液 OD₆₀₀ 调整至 0.1~0.2 后, 放入 37 °C、150 r/min 的摇床继续培养至 OD₆₀₀ 值为 0.5~0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 分别于 28 °C 和 37 °C、150 r/min 条件下诱导培养 0 h 和 6 h。收集菌液, 超声破碎后离心分离上清液与沉淀, 用于后续蛋白检测。

1.2.3 考马斯亮蓝染色 取诱导后的蛋白样品与 5×上样缓冲液 (含 SDS、β-巯基乙醇) 按体积比为 4 : 1 混合后, 95 °C 煮沸 5 min, 冰上冷却后进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后, 凝胶经考马斯亮蓝染色液 (0.1% 考马斯亮蓝 R-250, 50% 甲醇, 10% 冰乙酸) 染色约 30 min, 然后再用考马斯亮蓝染色脱色液 (50% 冰乙酸, 50% 乙醇) 进行脱色, 直至可清晰观察到凝胶上的蛋白条带, 拍照留存。

1.2.4 蛋白质免疫印迹 (western blot) 参照 SDS-PAGE 方法处理蛋白样品, 电泳结束后, 将 SDS-PAGE 凝胶转移到 PVDF 膜上 (每张膜 280 mA, 15 min), 将 PVDF 膜放入 1×TBS 溶液 (含 5% 脱脂奶粉) 中封闭约 1 h, 然后与一抗孵育 2 h, 接着与二抗孵育 1 h, 每步用 1×TBS 洗涤 3 次 (轻柔摇动), 每次 5 min, 结束后使用显影液处理 PVDF 膜 1 min, 采用超灵敏 ECL 化学发光法于凝胶成像系统中显影。

1.2.5 ROS 爆发检测 用打孔器制备直径 6 mm

的木薯叶原基, 叶片背面划伤后置于灭菌水中避光预处理 12 h。将叶原基转移至 96 孔黑色酶标板, 每孔加入 200 μL 反应液 [含 0.2 μmol/mL 鲁米诺、10 g/mL 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 及 flg22 蛋白/短肽], 其中 flg22 短肽的浓度为 1 μmol/L (根据相对分子质量换算为 2.27 μg/mL), flg22 蛋白的浓度为 60、120、240、360、480、600、720 μg/mL, 然后将酶标板置于化学发光仪中测定化学发光情况, 统计测定数据并绘制 ROS 爆发曲线。

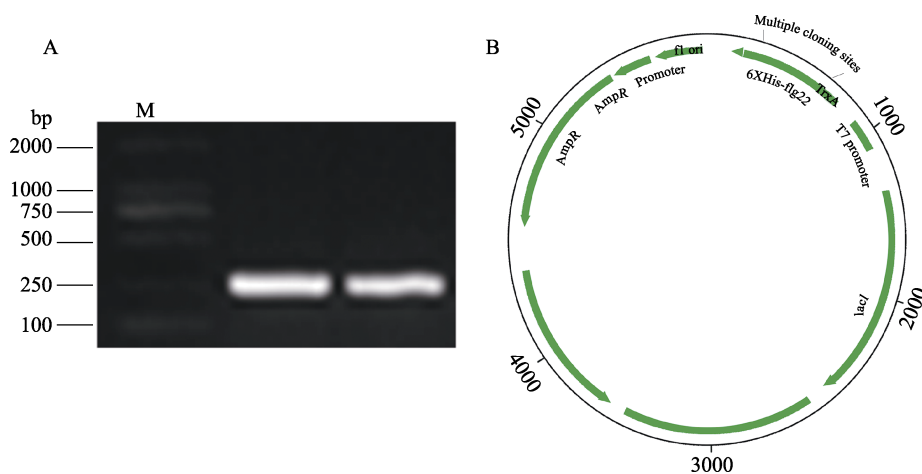
1.2.6 病原菌接种及细菌数测定 将 *Xam* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*, *Xam*) 菌株使用液体 LB 培养基在 28 °C、150 r/min 摇床培养 12 h, 离心收集菌体, 用悬浮液 (含 1 mol/L MgCl₂) 重悬菌体至 OD₆₀₀ 值为 0.8, 使用注射器将悬浮液注入木薯叶片中, 分别于接种后 0 d 及 6 d 取直径 12 mm 叶片组织, 研磨匀浆后梯度稀释, 涂布于 LB 固体平板, 28 °C 培养 12 h 后计数单菌落。

1.2.7 病斑面积统计 在木薯叶片上接种 *Xam* 菌株 6 d 后, 对不同处理组叶片发病区域拍照, 每组处理选取 20 个接种点, 使用 ImageJ 软件 (v1.50i) 测量病斑面积, 并进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 pET32a-flg22 载体的合成

pET32a-flg22 载体由华大公司合成, 以载体质粒为模板扩增目的片段, 并采用琼脂糖凝胶电泳方法进行验证, 如图 1A、图 1B 所示, 扩增产



A: 以 pET32a-flg22 质粒扩增的 PCR 产物, M: DL 2000 bp DNA Marker; B: pET32a-flg22 载体图谱。
A: PCR product amplified from the pET32a-flg22 plasmid, M: DL 2000 bp DNA Marker; B: Vector map of pET32a-flg22.

图 1 flg22 载体构建

Fig. 1 flg22 vector construction

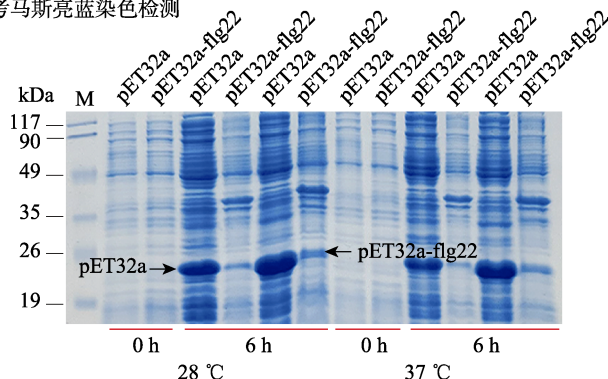
物条带大小与预期一致,表明 flg22 编码序列已正确插入 pET32a 载体,载体构建成功。

2.2 flg22 蛋白的原核诱导表达

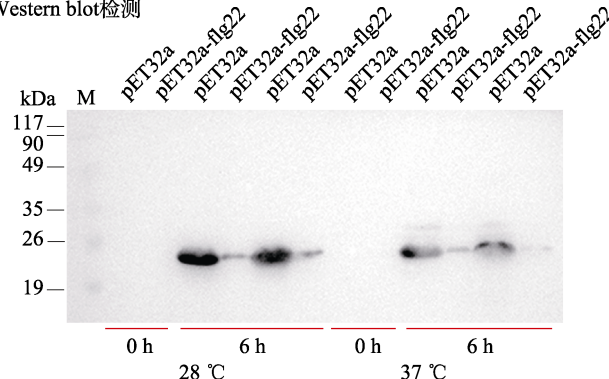
如图 2 所示,考马斯亮蓝染色(图 2A)与 Western blot(图 2B)分析显示不同的温度均能诱

导 pET32a-flg22 目标蛋白表达,其中在 28 ℃ 条件下诱导表达的 flg22 目标蛋白条带亮度显著高于 37 ℃ 诱导的蛋白。结果表明,在 28 ℃ 条件下更适合 pET32a-flg22 蛋白的诱导表达,初步确定 28 ℃ 为 pET32a-flg22 的最佳诱导表达温度。

考马斯亮蓝染色检测



Western blot检测



M: 预染蛋白质分子量标准(19~117 kDa), 箭头指示目的蛋白。

M: Pre-stained protein molecular weight marker (19~117 kDa), and the arrow indicates the target protein.

图 2 pET32a-flg22 在不同温度下的蛋白诱导表达

Fig. 2 Protein induction and expression of pET32a-flg22 at different temperatures

2.3 flg22 调控 ROS 产生

本研究采用化学发光法检测了不同浓度 pET32a-flg22 蛋白(60、120、240、360、480、600、720 $\mu\text{g/mL}$)与 2.27 $\mu\text{g/mL}$ 短肽处理木薯叶片后 ROS 爆发的动态变化。以无菌水为对照,短肽及 flg22 蛋白均能触发 ROS 爆发。进一步比较短肽与 flg22 蛋白。如图 3A、图 3B 所示,当 flg22 蛋白浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$ 时,其诱导的 ROS 爆发水平与 flg22 短肽相近。随着 flg22 蛋白浓度升高,ROS 爆发强度增强,但在 600 $\mu\text{g/mL}$ 后呈下降趋势。结果表明,在一定浓度范围内,ROS 爆发强度与 flg22 蛋白浓度呈正相关,且可达到与 flg22 短肽相似的效果。

2.4 外源 flg22 蛋白对细菌繁殖的影响

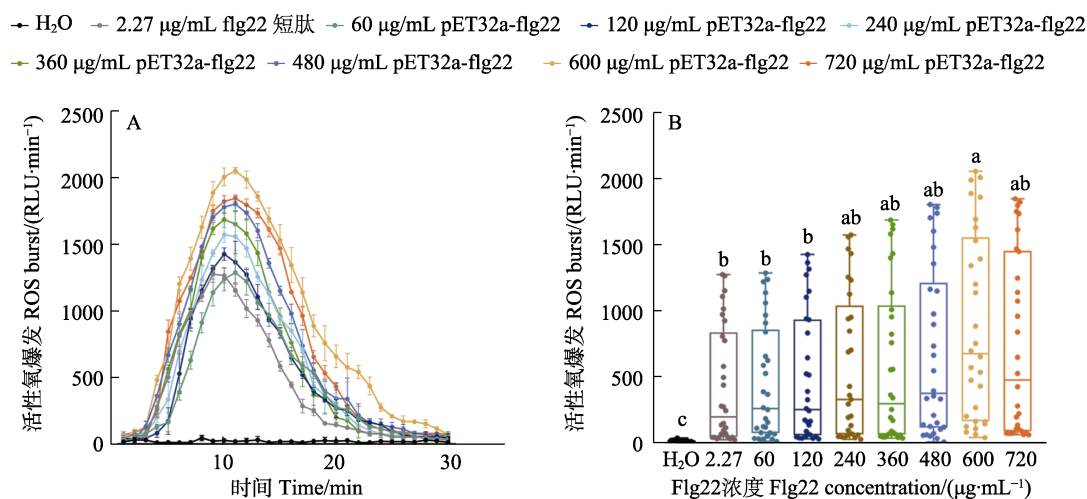
本研究通过在木薯叶面定量喷施无菌水(CK)、flg22 短肽(2.27 $\mu\text{g/mL}$)、不同浓度(60、600 $\mu\text{g/mL}$)的 flg22 蛋白,3 d 后接种 *Xam* 细菌,观察 0 d 和 6 d 的叶片细菌数量及病斑面积变化。结果显示,flg22 短肽及 flg22 蛋白处理后的叶片的细菌数量及病斑面积相比 CK 有显著下降,且随喷施浓度(60、600 $\mu\text{g/mL}$)增加,flg22 蛋白处理组的细菌数量与病斑面积均显著低于 flg22 短肽(图 4)。以上结果表明,flg22 蛋白和 flg22 短肽均具有抑菌效果,不同浓度的 flg22 蛋白的抑

菌效果显著优于 flg22 短肽,并且 flg22 蛋白的抑菌效果随着其浓度的增加而升高。

3 讨论

在植物体中由 flg22 诱导的免疫反应在植物抵抗病原菌侵染的过程中起关键作用,可诱导植物多层次的防御反应,包括活性氧爆发、防御相关基因的表达以及系统性信号传导等^[15-16],因此,flg22 短肽常被用作植物抗病研究中的高效诱导剂^[17-18],但其制备工艺复杂且商品价格较高,限制其规模化应用^[13]。因此,本研究通过筛选 flg22 蛋白原核表达的适宜诱导条件,并与商品化的 flg22 短肽在诱导活性氧爆发的强度上进行对比,旨在研究 flg22 商品化短肽的替代产品,为植物抗病防控提供经济有效的新途径。

温度是影响诱导蛋白过程的关键因素,不同的温度对蛋白的表达和功能起决定性作用^[19],研究表明 37 ℃ 诱导蛋白易致包涵体形成,而 20~28 ℃ 可提高可溶性重组蛋白产量^[19-20]。本研究结果表明,28 ℃ 为 flg22 蛋白适宜的诱导温度,此结果与多项原核蛋白表达研究一致,例如在木薯 MeCREB、小麦 TaWTG1、丹参 Sm14-3-3 中均表明 28 ℃ 为诱导蛋白的适宜温度^[21-23]。在明确 flg22 蛋白的最适宜诱导温度后,需进一步验证其

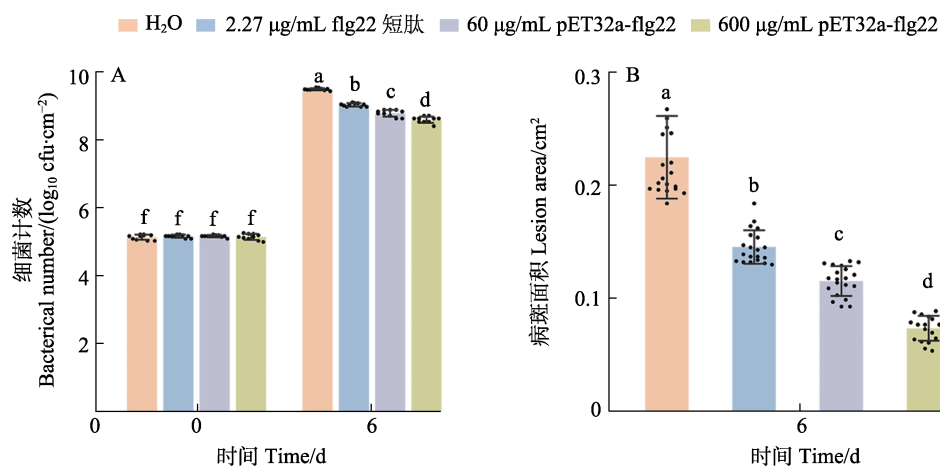


不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 3 flg22 蛋白对木薯 ROS 水平的影响

Fig. 3 Effect of flg22 protein on ROS levels in cassava



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 4 外源喷施 flg22 蛋白对木薯细菌数、病斑面积水平的影响

Fig. 4 Effects of exogenous spraying of flg22 protein on bacterial counts and lesion areas level in cassava

生物学功能。本研究以 ROS 爆发为检测指标,检测 flg22 蛋白是否具有与 flg22 短肽相同的高效诱导作用。flg22 作为典型的 PAMP,其诱导的、由 NADPH 氧化酶介导的 ROS 爆发是植物免疫反应的早期核心反应,检测 ROS 爆发可直接反映 flg22 是否具有激活植物免疫反应的功能^[24]。因此,本研究通过 flg22 蛋白是否可诱导 ROS 爆发来检验该蛋白的有效性。结果表明,本研究诱导的 flg22 蛋白与商品化短肽均能触发木薯叶片的 ROS 爆发,且一定浓度范围内 ROS 爆发水平随着 flg22 蛋白浓度的增加而升高,这与多数使用单一浓度的研究不同,EMONET 等^[25]在解析 flg22 诱导的植物防御信号通路时,以 1 μmol/L 的 flg22 处理拟

南芥幼苗,观察下游基因表达变化,发现不同细胞类型对 flg22 的响应模式存在差异。GUO 等^[26]在研究 TaARPC5 在小麦抗 Pst 中的作用时,用 500 nmol/L flg22 处理小麦,发现 TaARPC5 基因表达上调,表明其参与了小麦对条锈病菌的抗病过程。本研究设置了 7 个 flg22 蛋白浓度梯度(60、120、240、360、480、600、720 μg/mL),60 μg/mL 的 flg22 蛋白与 2.27 μg/mL 的 flg22 短肽处理木薯叶片均能诱导产生相近水平的 ROS,且随着 flg22 蛋白浓度的增加,600 μg/mL 时 ROS 峰值最高,720 μg/mL 时则呈下降趋势。这可能是由于过高浓度的 flg22 蛋白导致植物免疫反应过度激活,引起细胞稳态失衡,进而抑制 ROS 的产生。例如,

在水稻中,水稻受体样激酶 *OsRLCK185* 正向调控 flg22 诱导的 ROS 爆发,但其过量表达反而减少 ROS 积累,表明过度激活的免疫信号可能激发 ROS 清除机制^[27]。

基于以上研究结果,在进行 flg22 蛋白的抑菌效果验证实验中,分别选择低浓度组(60 $\mu\text{g/mL}$)、高浓度组(600 $\mu\text{g/mL}$)和 flg22 短肽(2.27 $\mu\text{g/mL}$)为实验组,以无菌水为对照组,验证抑菌效果可知:相对于无菌水处理,3 个实验组的处理均对 *Xam* 均表现出显著的抑菌效果($P<0.05$),flg22 蛋白对木薯 *Xam* 的抑制效果随着蛋白浓度的升高而增强,且低浓度组(60 $\mu\text{g/mL}$)与高浓度组(600 $\mu\text{g/mL}$) flg22 蛋白的抑菌效果显著优于 flg22 短肽,具体表现为木薯叶片中 *Xam* 细菌数量和病斑面积的显著减少。这与 LI 等^[28]在研究橡胶树 *HbLFG1* 在植物免疫中的功能时所得结果相似,用 20 $\mu\text{mol/L}$ flg22 处理拟南芥和本氏烟草后,发现胼胝体的合成减少,表明 *HbLFG1* 可抑制由 flg22 诱导的免疫反应。进一步对原核表达制备方法与商用 flg22 短肽的价格进行综合分析发现,原核表达的 flg22 蛋白在制备成本上均表现出显著优势。以 1 L 培养体系计算,大肠杆菌表达系统的试剂与耗材成本约为 120 元,可获得约 15 mL 粗提蛋白液,其单位成本约为 2.0~2.67 元/mg,而商品化 flg22 短肽(购自于万生生物公司,纯度>95%)为 600 元/mg,成本差距达 225~300 倍,此外,从规模化生产角度考虑,原核表达系统可通过大规模培养进一步降低单位成本^[29]。综合成本与生产优势,flg22 重组蛋白在农业规模化应用中具有更高的经济可行性和实用价值。

综上所述,在既定实验条件下,原核表达的 flg22 蛋白表现出与商品化短肽等效的免疫诱导效能,且具备低成本、易制备、可规模化生产的显著优势,为开发基于 flg22 的植物免疫诱抗剂奠定关键基础。未来研究可通过优化蛋白纯化工艺,提升其稳定性,推动其市场转化与应用。

参考文献

- [1] 巩雪峰,许艺,宋占锋,陈鑫,陈琼,侯思皓. 几丁质和 flg22 诱导的辣椒幼苗先天免疫生理响应特征[J]. 西北植物学报, 2024, 44(8): 1190-1200.
GONG X F, XU Y, SONG Z F, CHEN X, CHEN Q, HOU S H. Characteristics of innate immune physiological response induced by chitin and flg22 in pepper seedlings[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2024, 44(8): 1190-1200. (in Chinese)
- [2] 王晓宇. 植物天然免疫分子机理研究进展[J]. 现代农业研究, 2023, 29(8): 116-119.
WANG X Y. Research progress on molecular mechanism of plant immune system[J]. Modern Agriculture Research, 2023, 29(8): 116-119. (in Chinese)
- [3] CHEN H, LI M, QI G, ZHAO M, LIU L Y, ZHANG J Y, CHEN G Y, WANG D W, LIU F Q, FU Z Q. Two interacting transcriptional coactivators cooperatively control plant immune responses[J]. Science Advances, 2021, 7(45): eabl7173.
- [4] 李金玉,李冠,赵惠新,王贤雷,杜钰. 植物抗病分子机制研究进展[J]. 种子, 2006(2): 45-50.
LI J Y, LI G, ZHAO H X, WANG X L, DU Y. Research progress on the molecular mechanisms of plant disease resistance[J]. Seed, 2006(2): 45-50. (in Chinese)
- [5] 严霞,牛晓磊,陶钧. 病原菌诱发的植物先天免疫研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(3): 821-831.
YAN X, NIU X L, TAO J. Research advances on pathogen-induced plant innate immunity[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(3): 821-831. (in Chinese)
- [6] 项婷婷,马淑敏,沃恩康. 细菌鞭毛蛋白作为疫苗佐剂应用的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2023, 36(6): 764-768.
XIANG T T, MA S M, WO E K. Research progress of bacterial flagellin as a vaccine adjuvant[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2023, 36(6): 764-768. (in Chinese)
- [7] FELIX G, DURAN J D, VOLKO S M, BOLLER T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin[J]. The Plant Journal, 1999, 18(3): 265-276.
- [8] 于欣鑫,高晋君,李勇,李晶. flg22 诱导的拟南芥转录组分析及芥子油苷代谢途径的变化[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(5): 30-38.
YU X X, GAO J J, LI Y, LI J. Transcriptome analysis of *Arabidopsis thaliana* and changes of glucosinolates metabolism pathway induced by flg22[J]. China Biotechnology, 2014, 34(5): 30-38. (in Chinese)
- [9] 于欣鑫. Flg22 处理后拟南芥转录组及芥子油苷代谢途径的分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
YU X X. Analysis of *Arabidopsis thaliana* transcriptome and glucosinolates metabolism induced by Flg22[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [10] SUN W X, DUNNING F M, PFUND C, WEINGARTEN R, BENT A F. Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of *Arabidopsis* *FLAGELLIN SENSING2*-dependent defenses[J]. The Plant Cell, 2006, 18(3): 764-779.

- [11] 张双喜, 崔浪军, 张美祥, 安玉艳. 植物病原细菌保守分子模式及其诱导的免疫研究进展[J]. 植物病理学报, 2025, 55(4): 700-714.
- ZHANG S X, CUI L J, ZHANG M X, AN Y Y. Research advances in pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) of phytopathogenic bacteria and their induced immune responses[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2025, 55(4): 700-714. (in Chinese)
- [12] 刘会如, 逯佳琪, 沈汝彬, ANJAGO W M, 薛宇威, 魏利辉, 纠敏, 王楠. 群结腐霉 PmCA1 抑制植物 PTI 免疫反应促进病原菌侵染[J]. 植物病理学报, 2025, 55(1): 65-75.
- LIU H R, LU J Q, SHEN R B, ANJAGO W M, XUE Y W, WEI L H, JIU M, WANG N. PmCA1 inhibits plant PTI immune response and promotes pathogen infection[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2025, 55(1): 65-75. (in Chinese)
- [13] KOU E F, LUO Z X, YE J Y, CHEN X, LU D, LANDRY M P, ZHANG H L, ZHANG H. Sunlight-sensitive carbon dots for plant immunity priming and pathogen defence[J]. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(6): 2150-2161.
- [14] YANG B, YANG S, ZHENG W Y, WANG Y C. Plant immunity inducers: from discovery to agricultural application[J]. Stress Biology, 2022, 2(1): 5.
- [15] CZÉKUS Z, MARTICS A, POLLÁK B, KUKRI A, TARI I, ÖRDÖG A, POÓR P. The local and systemic accumulation of ethylene determines the rapid defence responses induced by Flg22 in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)[J]. Journal of Plant Physiology, 2023, 287: 154041.
- [16] YUAN M H, JIANG Z Y, BI G Z, NOMURA K, LIU M H, WANG Y P, CAI B Y, ZHOU J M, HE S Y, XIN X F. Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity[J]. Nature, 2021, 592(7852): 105-109.
- [17] CHI Y, WANG C, WANG M Y, WAN D, HUANG F F, JIANG Z H, CRAWFORD B M, VO-DINH T, YUAN F, WU F H, PEI Z M. Flg22-induced Ca^{2+} increases undergo desensitization and resensitization[J]. Plant, Cell & Environment, 2021, 44(12): 3563-3575.
- [18] TAKAI R, ISOGAI A, TAKAYAMA S, CHE F S. Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice[J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2008, 21(12): 1635-1642.
- [19] THAPA A, SHAHNAWAZ M, KARKI P, DAHAL G R, SHAROAR M G, SHIN S Y, LEE J S, CHO B, PARK I. Purification of inclusion body-forming peptides and proteins in soluble form by fusion to *Escherichia coli* thermostable proteins[J]. Biotechniques, 2008, 44(6): 787-796.
- [20] 王元元, 刘姣, 王硕, 符少萍, 李瑞梅, 姚远, 胡新文, 郭建春. 木薯 *MeAHL31* 基因克隆及其在原核细胞中的表达与优化[J]. 分子植物育种, 2019, 17(5): 1430-1437.
- WANG Y Y, LIU J, WANG S, FU S P, LI R M, YAO Y, HU X W, GUO J C. Molecular cloning of cassava *MeAHL31* gene and its expression and condition optimization in prokaryotic cells[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(5): 1430-1437. (in Chinese)
- [21] 王硕, 刘姣, 符少萍, 段瑞军, 李瑞梅, 姚远, 胡新文, 郭建春. 木薯 *MeCREB* 基因的分子克隆及其在原核细胞中的表达和优化[J]. 分子植物育种, 2018, 16(10): 3168-3173.
- WANG S, LIU J, FU S P, DUAN R J, LI R M, YAO Y, HU X W, GUO J C. Molecular cloning of cassava *MeCREB* gene and its expression and condition optimization in prokaryotic cells[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(10): 3168-3173. (in Chinese)
- [22] 张文静, 陈海超, 郭利建, 刘香利, 赵惠贤. 小麦 TaWTG1 的原核表达、纯化及去泛素化酶活性分析[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(10): 1711-1719.
- ZHANG W J, CHEN H C, GUO L J, LIU X L, ZHAO H X. Prokaryotic expression, purification and deubiquitinase activity assay of TaWTG1 in wheat (*Triticum aestivum*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(10): 1711-1719. (in Chinese)
- [23] 时晨晶, 王世威, 彭佳铭, 许海玉. 丹参 Sm14-3-3 蛋白基因克隆、诱导模式及原核表达分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(18): 4886-4894.
- SHI C J, WANG S W, PENG J M, XU H Y. Gene cloning, induction, and prokaryotic expression of a Sm14-3-3 protein from *Salvia miltiorrhiza*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(18): 4886-4894. (in Chinese)
- [24] MACHO A P, BOUTROT F, RATHJEN J P, ZIPFEL C. Aspartate oxidase plays an important role in Arabidopsis stomatal immunity[J]. Plant Physiology, 2012, 159(4): 1845-1856.
- [25] EMONET A, ZHOU F, VACHERON J, HEIMAN C M, TENDON V D, MA K W, SCHULZE-LEFERT P, KEEL C, GELDNER N. Spatially restricted immune responses are required for maintaining root meristematic activity upon detection of bacteria[J]. Current Biology, 2021, 31(5): 1012-1028.
- [26] GUO J, PENG H, QI T, XU S D, ISLAM M A, DAY B, MA Q, KANG Z S, GUO J. TaARPC5 is required for wheat defense signaling in response to infection by the stripe rust fungus[J]. The Crop Journal, 2022, 10(1): 2214-5141.
- [27] WANG J C, LIU X, ZHANG A, REN Y L, WU F Q, WANG G, XU Y, LEI C L, ZHU S S, PAN T, WANG Y F, ZHANG H, WANG F, TAN Y Q, WANG Y P, JIN X, LUO S, ZHOU C L, ZHANG X, LIU J L, WANG S, MENG L Z, WANG Y H, CHEN X, LIN Q B, ZHANG X, GUO X P, CHENG Z J, WANG J L, TIAN Y L, LIU S J, JIANG L, WU C Y, WANG E T, ZHOU J M, WANG Y F, WANG H

- Y, WANG J M. A cyclic nucleotide-gated channel mediates cytoplasmic calcium elevation and disease resistance in rice[J]. Cell Research, 2019, 29(10): 820-831.
- [28] LI X, LI S P, LIU Y H, HE Q G, LIU W B, LIN C H, MIAO W G. HbLFG1, a rubber tree (*Hevea brasiliensis*) lifeguard protein, can facilitate powdery mildew infection by suppressing plant immunity[J]. Phytopathology, 2021, 111(9): 1648-1659.
- [29] MAINALI P, CHUA M S W, TAN D J, LOO B L W, OW D S W. Enhancing recombinant growth factor and serum protein production for cultivated meat manufacturing[J]. Microbial Cell Factories, 2025, 24(1): 41.