

杨小林, 杨卫华, 蔡旋, 等. 水稻 CYP81A6 蛋白原核表达与活性检测[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(11): 2081-2087.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.11.001

水稻 CYP81A6 蛋白原核表达与活性检测

杨小林^{1,2}, 杨卫华³, 蔡旋¹, 吕亮¹, 刘新琼⁴, 张佑宏⁵

(1.湖北省农业科学院植保土肥研究所,湖北 武汉 430064; 2.湖北洪山实验室,湖北 武汉 430070; 3.湖北省浠水县农业农村局,湖北 浠水 438200; 4.中南民族大学生命科学学院,湖北 武汉 430074; 5.湖北省生物农药工程研究中心,湖北 武汉 430064)

摘要: 在植物体中,植物细胞色素 P450 基因家族广泛参与了多种生理活动。笔者所在团队前期通过转录组测序发现,CYP81A6 基因的相对表达量受到水杨酸、稻瘟病病菌的诱导而上调。尽管目前已知 CYP81A6 基因具备抗除草剂特性,但是至今还没有关于该基因参与植物产生病害反应的报道。因此,本研究以日本晴水稻叶片作为试验材料,用 PCR 技术对水稻 CYP81A6 基因片段进行扩增操作。随后,将成功扩增的基因片段克隆到 pET32a 原核表达载体上。在上述试验基础上,对该基因进行蛋白质表达与纯化处理。为了获得更多的可溶性重组蛋白,开展 CYP81A6 蛋白诱导条件的筛选试验。结果表明,当温度设定为 16 °C,并用 0.7 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 20 h 时,该蛋白质的表达量达到最佳水平。同时,用 50 mmol/L 咪唑洗脱,能够成功地将 CYP81A6 蛋白洗脱纯化出来。进一步利用纯化得到的 CYP81A6 蛋白与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)进行酶促反应,并通过专业的检测方法测得 CYP81A6 的酶活性为 1.518 U/mL。综上,本研究通过对水稻 CYP81A6 基因的克隆、表达、纯化及酶活性的测定等,为后续深入探究 CYP81A6 基因的功能和作用机制奠定了基础。

关键词: 水稻; CYP81A6; 细胞色素 P450; 原核表达; 蛋白纯化; 稻瘟病

中图分类号: S511.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)11-2081-07

Prokaryotic expression and activity detection of CYP81A6 protein in rice

YANG Xiaolin^{1,2}, YANG Weihua³, CAI Xuan¹, LYU Liang¹, LIU Xinqiong⁴, ZHANG Youhong⁵

(1. Institute of Plant Protection and Soil Science, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China; 2. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China; 3. Bureau of Agriculture and Rural Affairs of Xishui County, Hubei Province, Xishui 438200, China; 4. College of Life Sciences, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China; 5. Hubei Biopesticide Engineering Research Center, Wuhan 430064, China)

Abstract: In plants, the plant cytochrome P450 gene family is involved in a variety of physiological activities. Our previous transcriptome sequencing analysis revealed that the relative expression level of the CYP81A6 gene was up-regulated by the induction with salicylic acid and rice blast fungus. Although it is known that the CYP81A6 gene has herbicide resistance, there have been no reports so far on the involvement of this gene in plant disease resistance responses. Therefore, in this study, rice Nipponbare leaves were used as experimental materials. The CYP81A6 gene fragment of rice was amplified by PCR technology. Subsequently, the successfully amplified gene fragment was cloned into the prokaryotic expression vector pET32a. Based on the above experiments,

收稿日期: 2025-01-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31370306)

作者简介: 杨小林(1971-),女,湖北黄梅人,博士,研究员,主要从事水稻真菌病害研究。(Tel)027-88430557;(E-mail)xiaolin-yangxy@163.com

通讯作者: 张佑宏,(Tel)027-88430557;(E-mail)2430204775@qq.com

the protein expression and purification were performed for this gene. In order to obtain more soluble recombinant protein, screening experiments for the induction conditions of CYP81A6 protein were carried out. The results showed that the optimal protein expression was achieved under induction conditions of 0.7 mmol/L isopropyl- β -D-thiogalacto-

side (IPTG) at 16 °C for 20 h. Meanwhile, the CYP81A6 protein could be successfully eluted and purified under the action of 50 mmol/L imidazole. Further, the purified CYP81A6 protein was used for enzymatic reaction with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and the enzyme activity of CYP81A6 was measured to be 1.518 U/mL by professional detection methods. In summary, this study has laid a foundation for in-depth exploration of the function and mechanism of the CYP81A6 gene in rice through cloning, expression, purification and enzyme activity determination.

Key words: rice; CYP81A6; cytochrome P450; prokaryotic expression; protein purification; rice blast

水稻作为全球重要的粮食作物,在生产上极易遭受稻瘟病病菌(*Magnaporthe oryzae*)的感染。稻瘟病在世界各水稻产区均被视为一种极为严重的病害,给水稻的产量、品质造成很大影响^[1-2]。尽管目前化学防治手段在稻瘟病的防控中仍占据重要地位,但是由于众多化学农药存在作用位点单一的问题,加上在实际生产中的不合理使用,导致抗药性问题日益突出,同时还引发了环境污染、农药残留等一系列问题。因此,深入挖掘并充分利用水稻自身的抗病基因,对于推动水稻抗病育种工作具有极其重要的意义^[3-4]。

细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP450) 基因超家族广泛分布于真核、原核生物中,是参与细胞多种生理活动的关键基因群^[5-6]。在植物体内, CYP450 氧化酶发挥着至关重要的作用,其催化的次级代谢反应种类繁多,已知的就已超过 50 种,反应底物不仅涵盖黄酮、异黄酮、萜类、植物激素、生物碱、色素等内源性化合物,还有除草剂、农药等外源物质^[7-8]。其中, CYP81A6 作为水稻 CYP450 基因家族中的一员,位于水稻第 3 染色体上,主要在水稻根、叶部表达,其编码的蛋白质定位于内质网^[9]。现有研究发现, CYP81A6 基因对苯达松、苯磺隆 (BSM) 这 2 类除草剂具有耐药性^[10],并且 CYP81A6 基因在拟南芥、烟草、油菜和番茄等植物中的异源表达,使这些植株获得了苯达松抗性。 CYP81A6 基因还可以作为油菜、棉花等敏感作物遗传转化体系中的标记基因,用于筛选抗药性^[11]。此外, CYP81A6 基因在三系杂交稻中也可用于去除父本^[12-13]。由此可见, CYP81A6 基因在农业领域具有极为广阔的应用前景。然而,目前尚未有关于 CYP81A6 基因用于水稻抗病反应的报道。

本研究团队在前期的研究中,通过转录组测序技术分析发现, CYP81A6 基因在水杨酸的诱导下呈现显著的上调表达趋势。为了进一步探究该基因的表达模式,分别对植物激素、稻瘟病病菌诱导下 CYP81A6 基因的表达情况进行了详细分析。结果表明,无论是

水杨酸胁迫处理,还是稻瘟病病菌诱导,都能使 CYP81A6 基因的相对表达量显著提升。这一发现提示, CYP81A6 基因极有可能参与到水杨酸信号通路中,进而在水稻产生稻瘟病抗性的过程中发挥重要作用。基于上述研究结果,本研究拟克隆水稻 CYP81A6 基因,并将其构建至原核表达载体中。随后,在大肠杆菌表达系统中进行 CYP81A6 基因的蛋白质表达及酶活性测定试验,以期为深入探索水稻 CYP81A6 基因的功能及其分子作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大肠杆菌菌株 DH5 α 和 BL21、表达载体 pET32a、水稻品种日本晴均由中南民族大学植物遗传与发育学术团队提供。

1.2 试验试剂

质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒均购自 Axygen 公司。限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam* H I、TR-Izol 试剂、反转录试剂盒(产品名: PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser)等均购自 TaKaRa 公司。引物合成及阳性克隆测序由北京擎科生物科技股份有限公司完成。

1.3 试验方法

1.3.1 CYP81A6 基因的克隆 根据 GenBank 公布的 CYP81A6 基因序列号为 AK066760.1 的 cDNA 序列与 pET32a 的多克隆位点,设计目的基因的特异性引物,引物序列见表 1。以日本晴叶片 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增水稻的 CYP81A6 基因,采用的扩增体系如下: 25 μ L 2 \times PhanataMax Master Mix, 2 μ L *Kpn* I P450F (10 μ mol/L), 2 μ L *Bam* H I P450R (10 μ mol/L), 3 μ L 日本晴 cDNA,加 ddH₂O 补足体积至 50 μ L。PCR 反应程序: 94 °C 4.0 min; 94 °C 0.5 min, 60 °C 0.5 min, 72 °C 1.5 min, 35 个循环;最后 72 °C 延伸 7.0 min。PCR 反应程序按照标准的三步法进行,退火温度为 60 °C,反应设置 35 个

循环。PCR 扩增完成后用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳并纯化目的片段。

表 1 引物序列

Tabel 1 Primer sequences

引物名称	序列(5'→3')
<i>Kpn</i> I P450F	CGGGGTACCATGATGGATAACGCCTACATTATTGCCA
<i>Bam</i> H I P450R	GCGGGATCCTCAGACGAGCTCGCGAAGAACA
32a-T7F	TAATACGACTCACTATAGGG
32a-T7R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

1.3.2 原核表达载体 pET32a-CYP81A6 的构建 PCR 扩增得到 CYP81A6 基因片段后,利用 *Kpn* I 和 *Bam* H I 分别对目的片段和 pET32a 空载体进行双酶切,纯化后连接。连接体系如下:纯化的 PCR 目的片段 3 μ L,线性空载体 1 μ L,高效连接酶 4 μ L,16 $^{\circ}$ C 连接 12 h。连接完成后进行转化,通过抗性平板进行筛选培养。初步筛选出的单克隆扩大培养后提取质粒进行 PCR 检测与酶切鉴定,将鉴定成功的阳性克隆送至生物公司测序。将构建成功的重组载体命名为 pET32a-CYP81A6。

1.3.3 融合蛋白的诱导表达 用重组表达质粒 pET32a-CYP81A6 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,提取的阳性克隆的质粒 DNA 经 PCR 检测成功后,将重组菌株转入含氨苄青霉素(Amp)的 LB 液体培养基中扩大培养至 OD_{600} (600 nm 波长下的吸光度) \approx 0.6,分别在不同浓度异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、不同诱导时间以及不同诱导温度条件下对 CYP81A6 蛋白进行诱导表达^[14]。

(1)不同 IPTG 浓度试验设置:培养 5 mL 菌液,以不加入 IPTG 的 pET32a 空载体作为对照,重组载体分别加 0 mmol/L、0.1 mmol/L、0.3 mmol/L、0.4 mmol/L、0.5 mmol/L、0.6 mmol/L、0.7 mmol/L、0.9 mmol/L 8 个不同 IPTG 浓度进行诱导表达,温度设为 20 $^{\circ}$ C,诱导时间为 12 h。

(2)不同诱导温度试验设置:培养 5 mL 菌液,设置 IPTG 使用浓度为 0.7 mmol/L,pET32a 空载体诱导温度为 20 $^{\circ}$ C,分别用 12 $^{\circ}$ C、16 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C 3 个不同诱导温度诱导重组蛋白,诱导时间为 12 h。

(3)不同诱导时间试验设置:培养 5 mL 菌液,设置 IPTG 使用浓度为 0.7 mmol/L,将对照 pET32a 空载体于 20 $^{\circ}$ C 诱导 12 h,在 20 $^{\circ}$ C 下分别设置 4 h、

8 h、12 h、16 h、20 h、24 h 等 6 个不同重组蛋白诱导时间。

诱导完成后,将 5 mL 菌液于 4 $^{\circ}$ C、4 200 r/min 离心 10 min。收集菌体,加入 600 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬菌体,反复冻融 3 次以增强细胞的裂解效果。使用超声波进一步破碎菌体,然后于 4 $^{\circ}$ C、4 200 r/min 离心 15 min,收集上清液。在上清液和混合样品(可溶性 CYP81A6 蛋白与变性 CYP81A6 蛋白的混合物)中分别加入十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液,并将这些样品在 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。冷却并离心后,取 10 μ L 样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。在确定 pET32a-CYP81A6 蛋白的最佳表达条件后,进行蛋白质印记试验(Western Blotting)检测,以验证蛋白质的表达情况。

1.3.4 融合蛋白的纯化 pET32a-CYP81A6 蛋白诱导完成后,用含组氨酸标签(His-tag)的镍柱试剂盒对该蛋白质进行纯化。由于蛋白质的洗脱效果不佳,加入 β -巯基乙醇并用 2 mmol/L、10 mmol/L、50 mmol/L 浓度梯度的咪唑进行洗脱。进行 SDS-PAGE 分析后,用考马斯亮蓝 R-250 染色,用 Western Blotting 进行检测,以确定最优洗脱条件。

1.3.5 CYP81A6 酶活性检测 制备 300 mL 菌液,对 CYP81A6 进行大量诱导表达及纯化,收集纯化后的上清液,得到粗酶液。利用紫外可见分光光度计检测烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)的酶促反应,从而确定 CYP81A6 的酶活性。配制不同浓度梯度的 NADPH 标准样品,将样品摇匀后,用紫外可见分光光度计测定样品在 340 nm 波长下的吸光度(OD_{340}),同时以 NADPH 标准溶液浓度为横坐标、 OD_{340} 为纵坐标绘制 NADPH 标准曲线,以灭菌 ddH₂O 为空白对照。

2 结果与分析

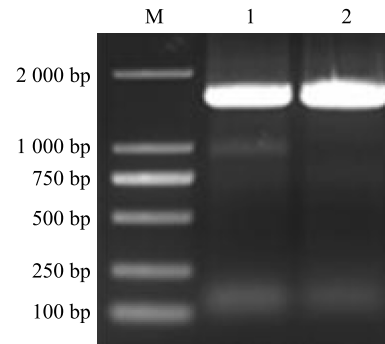
2.1 CYP81A6 目的基因片段的扩增

以日本晴的 cDNA 为模板,使用高保真酶进行 PCR 扩增,成功得到 CYP81A6 基因片段,该片段全长 1 542 bp(图 1),编码长度为 513 个氨基酸的多肽,推测蛋白质的相对分子量为 56 400。对正确的条带进行切胶回收。

2.2 pET32a-CYP81A6 阳性克隆的鉴定

首先,用 *Kpn* I、*Bam* H I 分别对 CYP81A6 基

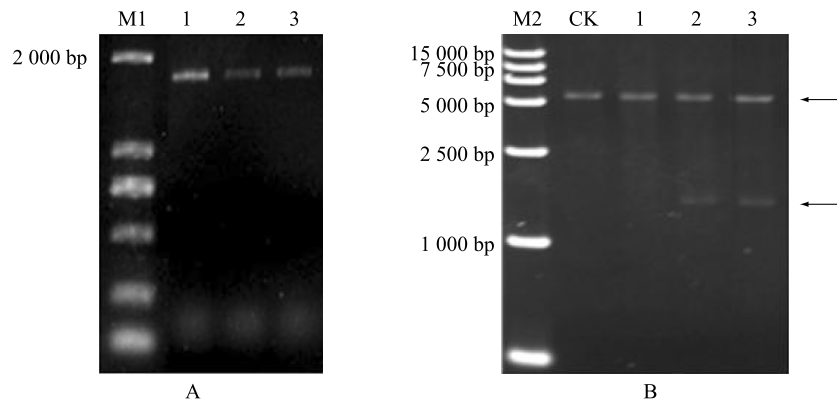
因片段、pET32a 载体进行双酶切。酶切完成后,进行清洁纯化处理,得到高纯度的酶切产物。随后,将处理好的目的片段和载体进行连接、转化和筛选,从而获得阳性克隆。使用引物 32a-T7F、*Bam* H I P450R 对重组质粒 pET32a-CYP81A6 进行 PCR 检测。通过 PCR 反应扩增得到长度约为 1 700 bp 的目的片段(图 2A)。随后,用 *Kpn* I、*Bam* H I 酶对重组质粒 pET32a-CYP81A6 进行双酶切鉴定,可以得到长度约为 5 900 bp、1 542 bp 的片段(图 2B)。最后,进行单克隆测序验证,结果显示序列正确,表明重组质粒构建成功。



M:DL2000;1,2:日本晴 cDNA。

图 1 *CYP81A6* 目的片段扩增结果

Fig.1 Amplification results of the *CYP81A6* target fragment



A:pET32a-CYP81A6 重组质粒的 DNA PCR 鉴定结果; B:pET32a-CYP81A6 重组质粒的双酶切鉴定结果。M1:DL2000;M2:DL15000;1~3:重组载体质粒;CK:pET32a 空载体;箭头所指为目标条带。

图 2 pET32a-CYP81A6 阳性克隆鉴定结果

Fig.2 Identification of pET32a-CYP81A6 positive clones

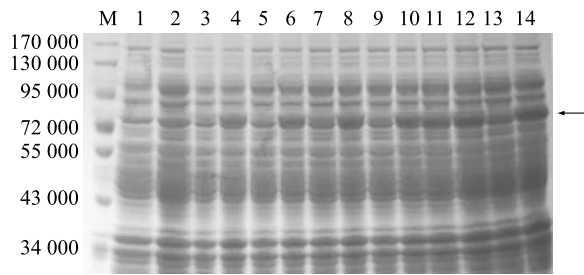
2.3 CYP81A6 蛋白的诱导表达

将重组质粒 pET32a-CYP81A6 转化 BL21 后,在 IPTG 诱导下,在预期相对分子量为 74 800 附近有 1 条明显的蛋白质条带,详见图 3。可见在大肠杆菌中,重组质粒 pET32a-CYP81A6 被成功诱导并表达出 CYP81A6 蛋白。

SDS-PAGE 结果显示,使用不同浓度 IPTG 诱导时,蛋白质的表达量表现出不同的变化。随着 IPTG 浓度的升高,蛋白质的表达量逐步升高;当 IPTG 浓度达到 0.7 mmol/L 后,总蛋白质的表达量的增幅不再显著变化(图 3)。同时,本研究也分析了不同培养温度对蛋白质表达量的影响。由图 4 可以看出,在各个温度条件下进行蛋白质的诱导时,一开始蛋白质的表达量稳步上升,当温度达到 16 ℃ 时,蛋白质的表达量达到最高值;随后,尽管温度继续升高,但蛋白质的表达量基本保持不变。此外,本研究分析了不同诱导时

间对蛋白质表达量的影响。由图 5 可以看出,在 6 个不同诱导时间点,蛋白质的表达量先稳步增加,之后基本趋于稳定。因此我们可以推测,当诱导时间为 20 h 时,蛋白质的表达量达到最高值。

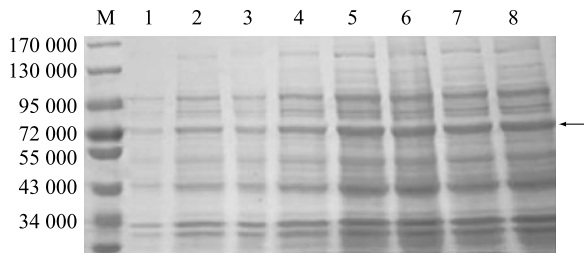
不同诱导温度、不同诱导时间和不同 IPTG 浓度对重组蛋白的表达具有显著影响。为了获得最佳表达条件,笔者进行了一系列试验来优化上述参数。首先,我们测试了不同诱导时间对 CYP81A6 蛋白表达量的影响,发现随着诱导时间的延长,重组蛋白的表达量逐渐增加。当诱导时间为 20 h 时,重组蛋白的表达量达到最高值。其次,我们研究了不同诱导温度对重组蛋白表达量的影响,发现低温诱导(如 16 ℃)比高温诱导(如 20 ℃)更有效。再次,本研究还发现,在较低温度下诱导重组蛋白,其可溶性也更好。最后,本研究分析了不同 IPTG 浓度对重组蛋白表达量的影响。结果显示,随着 IPTG 浓度的增



M: 蛋白质分子量标准; 1: pET32a 空载混合液; 2: 不加 IPTG 混合液; 3: 0.1 mmol/L IPTG 上清液; 4: 0.3 mmol/L IPTG 混合液; 5: 0.4 mmol/L IPTG 上清液; 6: 0.4 mmol/L IPTG 混合液; 7: 0.5 mmol/L IPTG 上清液; 8: 0.5 mmol/L IPTG 混合液; 9: 0.6 mmol/L IPTG 上清液; 10: 0.6 mmol/L IPTG 混合液; 11: 0.7 mmol/L IPTG 上清液; 12: 0.7 mmol/L IPTG 混合液; 13: 0.9 mmol/L IPTG 上清液; 14: 0.9 mmol/L IPTG 混合液; 箭头所指为目标条带。

图3 不同浓度异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 于 20 °C 诱导 12 h 后 CYP81A6 的表达情况

Fig.3 Expression levels of CYP81A6 after 12 h induction with different concentrations of isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) at 20 °C



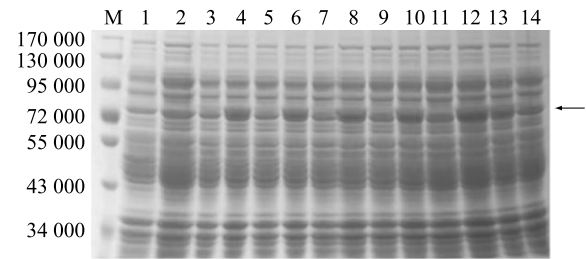
M: 蛋白质分子量标准; 1: pET32a 空载混合液; 2: 不加 IPTG 诱导混合液; 3: 12 °C 上清液; 4: 12 °C 混合液; 5: 16 °C 上清液; 6: 16 °C 混合液; 7: 20 °C 上清液; 8: 20 °C 混合液; 箭头所指为目标条带。

图4 0.7 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 在不同温度下诱导 CYP81A6 的表达情况

Fig.4 Expression levels of CYP81A6 induced by 0.7 mmol/L isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) at different temperatures

加, 重组蛋白的表达量逐渐上升。然而, 当 IPTG 浓度超过 0.5 mmol/L 时, 重组蛋白的表达量不再增加。因此, 我们选择 0.7 mmol/L 作为最佳 IPTG 诱导浓度。

综上所述, 通过优化诱导条件, 我们成功地提高了重组蛋白 pET32a-CYP81A6 的表达水平。在诱导时间为 20 h、诱导温度为 16 °C、IPTG 浓度为 0.7 mmol/L 的条件下, 重组蛋白的表达量达到最高值

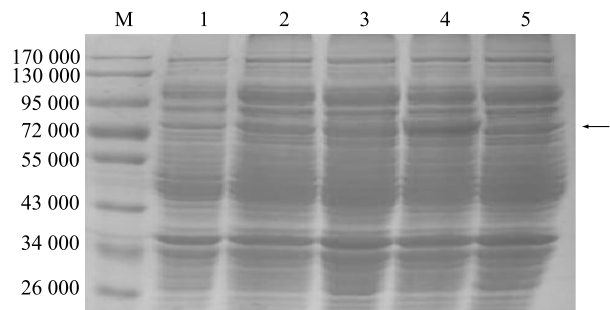


M: 蛋白质分子量标准; 1: pET32a 空载混合液; 2: 不加 IPTG 混合液; 3: 4 h 上清液; 4: 4 h 混合液; 5: 8 h 上清液; 6: 8 h 混合液; 7: 12 h 上清液; 8: 12 h 混合液; 9: 16 h 上清液; 10: 16 h 混合液; 11: 20 h 上清液; 12: 20 h 混合液; 13: 24 h 上清液; 14: 24 h 混合液; 箭头所指为目标条带。

图5 20 °C 条件下 0.7 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导不同时间后 CYP81A6 的表达情况

Fig.5 Expression levels of CYP81A6 after induction with 0.7 mmol/L isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) at 20 °C across multiple time points

(图6), 这一结果与 Western blotting 分析结果(图7)一致。



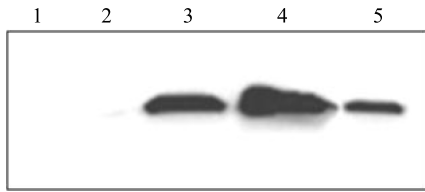
M: 蛋白质分子量标准; 1: pET32a 空载混合液; 2: 不加 IPTG 混合液; 3: 上清液; 4: 混合液; 5: 沉淀; 箭头所指为目标条带。

图6 16 °C 条件下 0.7 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导 20 h 后 CYP81A6 蛋白表达情况

Fig.6 CYP81A6 protein expression induced by 0.7 mmol/L isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) at 16 °C for 20 h

2.4 CYP81A6 蛋白的纯化

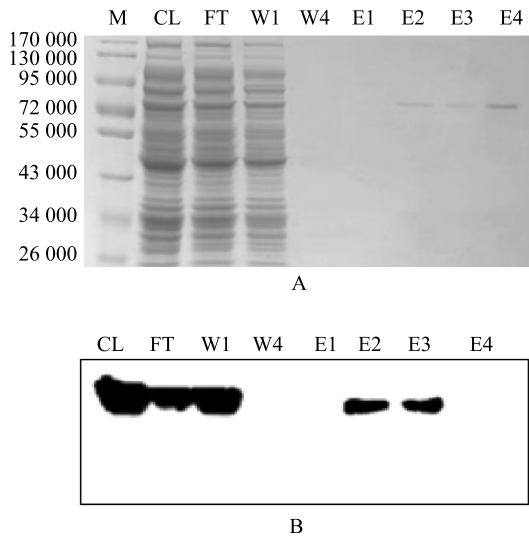
用不同浓度梯度咪唑洗脱液对目标蛋白 CYP81A6 进行洗脱, 使用 His 蛋白纯化介质进行分析纯化, 对收集的洗脱组分进行 SDS-PAGE 检测。考马斯亮蓝染色结果显示, 当用 50 mmol/L 咪唑进行第 2 次洗脱时, 在约 74 800 位置出现 1 条特异的蛋白质条带(图 8A)。考马斯亮蓝染色、Western blotting 检测结果表明, CYP81A6 在该条件下被成功纯化(图 8B)。



1: pET32a 空载混合液; 2: 不加 IPTG 混合液; 3: 上清液; 4: 混合液; 5: 沉淀。

图 7 16 °C 条件下 0.7 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导 20 h 后 CYP81A6 蛋白表达的 Western blotting 结果

Fig.7 Western blotting analysis of CYP81A6 expression induced by 0.7 mmol/L isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) at 16 °C for 20 h



A: 考马斯亮蓝染色检测结果; B: Western blotting 检测结果。CL: 细菌裂解液; FT: 上样穿流液; W1、W4: 洗涤液; E1~E4: 洗脱液; M: 蛋白质分子量标准。

图 8 CYP81A6 蛋白纯化结果

Fig.8 CYP81A6 protein purification

2.5 CYP81A6 酶活性的测定

取 50 mmol/L 咪唑条件下第 2 次洗脱的纯化蛋白样品 (E2) 作为酶液, 分别稀释 10 倍、50 倍、100 倍后测定酶活性。

根据测得的 NADPH 标准曲线, 得到如下公式: $Y=0.013 9x+0.306 8$, $R^2=0.997 0$ (图 9)。将上述酶活性测定组 3 个样品的平均 ΔOD (吸光度) 值代入公式后, 测得 CYP81A6 酶活性为 1.518 U/mL。

3 讨论与结论

植物细胞色素 P450 (CYP450) 在植物体内扮演

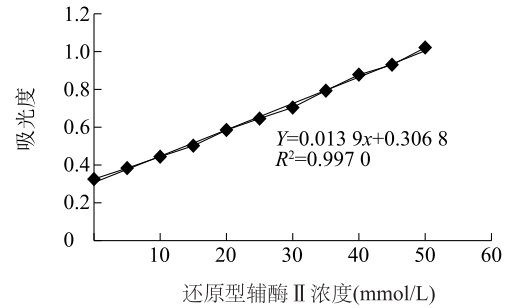


图 9 蛋白酶活性的标准曲线

Fig.9 The standard curve of protease activity

着重要的角色^[15-16], 它能够催化多种物质 (包括脂肪酸、萜类化合物、氰苷、植物激素及酚类化合物等^[17-18]) 的生物合成过程。在植物的代谢网络中, 茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA)、脱落酸 (ABA) 及赤霉素 (GA) 等植物激素信号途径之间相互作用, 在萜类化合物的代谢过程中发挥着重要调控作用^[19-20]。另外, 细胞色素 P450 基因家族成员还能积极响应茉莉酸、水杨酸、脱落酸及赤霉素等植物激素的诱导, 从而参与到植物应对逆境胁迫的过程中^[14, 21]。在三萜皂苷合成代谢途径中, *OSC2*、*SS*、*FPS* 和 *DS* 等合成相关基因会响应 JA、GA 的诱导而上调表达, 进而诱导下游 *CYP450* 基因的相对表达量上调^[17, 22]。水稻的 *CYP76M*、*CYP71Z* 亚家族基因成员分别参与了抗真菌、抗细菌植保素的合成^[23-24]。

本研究成功从水稻中克隆出 *CYP81A6* 基因, 它隶属于多基因 *CYP450* 家族中的 *CYP81* 亚家族, 是一类与植物抗逆性相关的功能蛋白质。前期研究还发现, 该基因在水杨酸、稻瘟病菌的诱导下会上调表达。在本研究中, 我们利用日本晴品种克隆获得了 *CYP81A6* 基因, 并将其成功构建到 pET32a 原核表达载体中。通过 IPTG 诱导表达菌株, 尝试了大量表达目的蛋白。我们用 0.4 mmol/L IPTG 在 25 °C 诱导 20 h, 但菌体浓度高且 SDS-PAGE 检测结果显示条带很弱, 蛋白质浓度很低。为了进一步验证蛋白质的表达情况, 我们用蛋白质印记试验 (Western blotting) 对载体上的 His 标签进行了检测。结果显示, 确实存在预期大小的目的蛋白质。通过对重组蛋白质诱导条件进行优化, 我们发现当诱导时间为 20 h、诱导温度为 16 °C、IPTG 浓度为 0.7 mmol/L 时, 重组蛋白质的表达量达到最高值。随后, 我们对目的蛋白质进行了纯化。由于初始洗脱效果不佳,

我们加入了 β -巯基乙醇来打开蛋白质的二硫键,以增强蛋白质与纯化柱的结合能力,并尝试用不同浓度梯度的咪唑进行洗脱,最终确定在 50 mmol/L 浓度咪唑作用下,蛋白质能够得到纯化。目的蛋白质的成功表达和纯化为进一步研究 CYP81A6 基因在水稻抗病反应中的作用奠定了坚实的基础。

参考文献:

- [1] PATEL J K, MADAAN S, ARCHANA G. Antibiotic producing endophytic *Streptomyces* spp. colonize above-ground plant parts and promote shoot growth in multiple healthy and pathogen-challenged cereal crops[J]. *Microbiological Research*, 2018, 215: 36-45.
- [2] 齐中强,于俊杰,张荣胜,等. 江苏省2016-2020年水稻新品种(系)和主栽品种对稻瘟病的抗病性评价[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(1): 91-96.
- [3] 任海,吕小红,杜萌. 多抗水稻分子标记辅助育种方法[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(19): 154-158.
- [4] 张金霞,张倩倩,王书玉,等. 94份水稻骨干材料抗稻瘟病基因和恢复基因的分子检测与分析[J]. *江苏农业科学*, 2024, 52(5): 58-64.
- [5] WEI K F, CHEN H Q. Global identification, structural analysis and expression characterization of cytochrome P450 monooxygenase superfamily in rice[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 35.
- [6] POCHAPSKY T C. A dynamic understanding of cytochrome P450 structure and function through solution NMR[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 69: 35-42.
- [7] DELPLACE F, HUARD-CHAUVEAU C, BERTHOMÉ R, et al. Network organization of the plant immune system: from pathogen perception to robust defense induction[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2022, 109(2): 447-470.
- [8] WERCK-REICHHART D. Promiscuity, a driver of plant cytochrome P450 evolution? [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(2): 394.
- [9] FANG Y Z, LU H P, CHEN S, et al. Leaf proteome analysis provides insights into the molecular mechanisms of bentazon detoxification in rice[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2015, 125: 45-52.
- [10] PAN G, ZHANG X Y, LIU K D, et al. Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene CYP81A6 that confers resistance to two different classes of herbicides[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(6): 933-943.
- [11] LIU N K, XU Y Z, LI Q, et al. A lncRNA fine-tunes salicylic acid biosynthesis to balance plant immunity and growth[J]. *Cell Host & Microbe*, 2022, 30(8): 1124-1138.
- [12] YAN B J, ZHANG Y H, LI J, et al. Transcriptome profiling to identify cytochrome P450 genes involved in penoxsulam resistance in *Echinochloa glabrescens* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2019, 158: 112-120.
- [13] YAO X, WANG Y Q, YUE X P, et al. Generation of tribenuron-methyl herbicide-resistant *OsCYP81A6*-expressing rapeseed (*Brassica napus* L.) plants for hybrid seed production using chemical-induced male sterility [J]. *Plant Breeding*, 2016, 135(3): 349-354.
- [14] ZHOU J H, LI Z Y, XIAO G Q, et al. CYP71D8L is a key regulator involved in growth and stress responses by mediating gibberellin homeostasis in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(3): 1160-1170.
- [15] 那日松,杨莹,王孟豪,等. 番茄 CYP450 基因家族鉴定及病原菌胁迫相关成员的生物信息学分析[J]. *江苏农业科学*, 2024, 52(17): 34-46.
- [16] 阮彦楠,吕本春,杨伟,等. 不同光叶苕子用量对娃娃菜生长发育与吸收镉的影响[J]. *江苏农业科学*, 2024, 52(11): 160-172.
- [17] KITAOKA N, ZHANG J, OYAGBENRO R K, et al. Interdependent evolution of biosynthetic gene clusters for momilactone production in rice[J]. *The Plant Cell*, 2021, 33(2): 290-305.
- [18] LI R Q, ZHANG J, LI Z H, et al. Dissecting the labdane-related diterpenoid biosynthetic gene clusters in rice reveals directional cross-cluster phytotoxicity [J]. *The New Phytologist*, 2022, 233(2): 878-889.
- [19] GAO H S, HUANG H Q, LU K F, et al. *OsCYP714D1* improves plant growth and salt tolerance through regulating gibberellin and ion homeostasis in transgenic poplar[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 168: 447-456.
- [20] CORNET F, PILLOT J P, LE BRIS P, et al. Strigolactones (SLs) modulate the plastochron by regulating KLUH (KLU) transcript abundance in *Arabidopsis* [J]. *The New Phytologist*, 2021, 232(5): 1909-1916.
- [21] HOU L X, YUAN X C, LI S, et al. Genome-wide identification of CYP72A gene family and expression patterns related to jasmonic acid treatment and steroidal saponin accumulation in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(20): 10953.
- [22] LI W Q, WANG F Q, WANG J, et al. Overexpressing CYP71Z2 enhances resistance to bacterial blight by suppressing auxin biosynthesis in rice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119867.
- [23] YE Z F, YAMAZAKI K, MINODA H, et al. In planta functions of cytochrome P450 monooxygenase genes in the phytocassane biosynthetic gene cluster on rice chromosome 2 [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2018, 82(6): 1021-1030.
- [24] SHEN Q Q, PU Q Y, LIANG J, et al. CYP71Z18 overexpression confers elevated blast resistance in transgenic rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2019, 100(6): 579-589.

(责任编辑:徐艳)