

郭冬妹, 李笑, 靳亚茹, 等. 引导编辑介导的水稻 *HPPD* 基因原位插入 flag 标签编码序列的遗传材料创制[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(4): 649-658.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.04.001

引导编辑介导的水稻 *HPPD* 基因原位插入 flag 标签编码序列的遗传材料创制

郭冬妹, 李笑, 靳亚茹, 杨郁文

(江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 4-羟基苯丙酮酸双加氧酶(*HPPD*)是生物体内酪氨酸到质体醌和生育酚合成途径中的关键酶,同时也是重要的除草剂靶标。研究水稻 *HPPD* 基因的表达调控机制对于提高水稻非生物逆境抗性和培育抗除草剂品种具有重要意义。本研究通过引导编辑(PE)技术在水稻 *HPPD* 基因的3'端精准插入3×flag 标签编码序列,转基因当代鉴定到3个发生目标片段精准插入的植株。蛋白质印迹法(Western blot)检测结果表明,融合蛋白能够正常表达。自交后代的基因型鉴定结果表明,1个株系的精准插入事件遗传到了下一代,并筛选到不含转基因元件的T₁代纯合精准插入3×flag 标签编码序列的植株。实时定量PCR检测结果表明,在黑暗转光照后的不同时间点,水稻 *HPPD* 基因的转录水平表现出由高到低的变化趋势,而 *HPPD* 蛋白表达丰度在不同时间点没有表现出显著差异。本研究创制的 *HPPD* 蛋白融合原位 flag 标签的水稻种质为研究水稻 *HPPD* 基因转录和 *HPPD* 蛋白表达的调控机制提供了重要的遗传资源和理论参考。

关键词: 水稻; 4-羟基苯丙酮酸双加氧酶(*HPPD*); 引导编辑; flag 标签

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2026)04-0649-10

Generation of rice germplasm with *in situ* flag tag insertion at *HPPD* gene mediated by prime editing

GUO Dongshu, LI Xiao, JIN Yaru, YANG Yuwen

(Institute of Germplasm Resources and Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*HPPD*) is a key enzyme in the synthesis pathway of tyrosine to plastoquinone and tocopherol in organisms, and it is also an important target for herbicide. Investigation of transcriptional and translational regulatory mechanisms of *HPPD* gene is of great significance for improving rice abiotic stress resistance and developing herbicide-resistant rice varieties. In this study, the coding sequence of 3×flag tag was precisely inserted into the 3' end of rice *HPPD* gene through prime editing (PE) technology. Three T₀ generation plants with precise insertion of the coding sequence of 3×flag tag were identified. Western blot results indicated that the fusion protein of *HPPD*-3×flag expressed normally. The genotyping results of self-pollinated T₁ generation plants indicated that the precise insertion event of one T₀ generation plant was inherited to the next generation, and T₁ generation homozygous plants harbouring precise insertion without transgenic elements were identified. The results of real-time quantitative PCR revealed that at different time

points after the transition from dark to light, the transcriptional level of rice *HPPD* gene exhibited a trend from high to low, while the expression abundance of *HPPD* protein was comparable at different time points. The rice germplasm expressing *HPPD*-3×flag fusion protein *in situ* generated in this research provides an important genetic

收稿日期: 2025-11-25

基金项目: 江苏省重点研发计划现代农业项目(BE2022365)

作者简介: 郭冬妹(1988-), 女, 辽宁锦州人, 博士, 副研究员, 主要从事水稻基因编辑技术和抗除草剂育种研究。(E-mail) guodongshuguodong@163.com

material for investigating the regulatory mechanisms of rice *HPPD* gene at translational and post-translational levels.

Key words: rice; 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*HPPD*); prime editing; flag tag

4-羟基苯丙酮酸双加氧酶(*HPPD*)是酪氨酸代谢途径的关键酶,可催化 4-羟基苯丙酮酸(HPPA)生成尿黑酸(HGA),在植物体内,HGA 是合成质体醌和生育酚的前体物质^[1-2]。其中,质体醌是光合作用电子传递链的重要辅助因子,生育酚作为关键抗氧化剂,可参与多个生理过程中活性氧的清除,二者均为植物正常生长发育的必需物质。若 *HPPD* 的功能受到抑制,会直接阻碍 HGA 的生成,进而导致质体醌和生育酚的合成受阻,这一连锁反应会进一步影响植物的光合作用与类胡萝卜素生物合成,最终造成植株白化并死亡^[1-2]。因此,*HPPD* 也是重要的除草剂靶标。研究 *HPPD* 基因的表达调控机理,对提高水稻(*Oryza sativa* L.)非生物逆境胁迫的抗性和培育抗除草剂品种具有重要意义^[1-3]。

有研究表明,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、小麦(*Triticum aestivum*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、莴苣(*Lactuca sativa*)、苜蓿(*Medicago sativa*)等植物中,*HPPD* 基因的转录受多种植物激素、黑暗,以及干旱、盐胁迫等非生物逆境的诱导^[4-8]。最新研究表明,拟南芥 *HPPD* 蛋白的羟基化修饰可调控其对氧化胁迫的响应^[9]。*HPPD* 是除草剂作用的重要靶标,目前关于水稻 *HPPD* 基因的研究多集中于通过基因序列的直接改造或染色体异位等手段,提高 *HPPD* 蛋白对除草剂的抗性和 *HPPD* 基因的表达水平,获得 *HPPD* 抑制剂类除草剂的抗性突变体^[3,10-12],而针对水稻 *HPPD* 基因在转录及翻译水平的调控机理,相关研究仍较少。

研究蛋白质的表达模式和调控机制,需要获得目标蛋白质的特异性抗体。相比商业化程度更高的人类蛋白抗体,制备植物蛋白特异性抗体难度较大,耗时长且成本较高。经过十余年的发展,基因编辑技术已经成为动植物基因功能研究和优化改造的有力工具^[13]。基因编辑介导的精准插入技术可在植物中实现蛋白质标签的原位插入。目前,植物中实现外源片段的原位无缝插入主要有 2 种基因编辑技术,即引导编辑^[14-15]和非同源末端连接途径介导的修饰片段直接插入^[16]。相较于需要基因枪转化的修饰片段直接插入,引导编辑技术只需构建一个植物表达载体,通过农杆菌介导的遗传转化即可实现外源片段的精准

插入。引导编辑系统包括 2 个组分,即由 *Cas9* 切口酶和逆转录酶融合而成的引导编辑器蛋白,以及包含单引导 RNA (sgRNA)、引物结合位点(PBS)和逆转录(RT)模板的引导编辑向导 RNA (pegRNA)。在 sgRNA 的引导下,*Cas9* 切口酶切开靶标位点的 DNA 单链,pegRNA 的 PBS 序列与切口处 DNA 的 3'末端互补,引导逆转录酶按照 RT 模板序列合成含有碱基突变或插入缺失的序列,然后通过细胞内 DNA 修复实现目标基因的精准编辑^[14]。已有研究结果证实,引导编辑技术可成功应用于植物蛋白标签的原位插入^[17-18]。本研究拟通过优化后的引导编辑技术创制原位表达水稻 *HPPD* 和 3×flag 标签融合蛋白的水稻种质,并分析水稻 *HPPD* 基因随光周期表达模式的变化趋势,为研究水稻 *HPPD* 基因翻译水平的调控机理和培育抗逆、抗除草剂水稻新种质以及阐明抗性机理提供有价值的遗传材料和理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转基因受体粳稻品种日本晴(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare)由江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所收集保存。在 2025 年水稻生长季,播种于江苏省农业科学院试验田。

1.2 引导编辑载体构建

用于构建水稻引导编辑植物表达载体的基础载体(PE)由上海辰山植物园华凯博士提供。针对水稻 *HPPD* 基因(LOC_Os02g07160)编码区终止密码子附近区域,选取基因编辑靶标位点(序列为 5'-CCCTACAGTTCAAGGATCCT-3');利用在线工具(<http://www.plantgenomeediting.net/>)^[19]设计引导编辑所需的 PBS 与 RT 模板序列,由生工生物工程(上海)股份有限公司直接合成 spacer-gRNA-RT-PBS 融合序列。随后,采用限制性内切酶 *Bsa* I [货号:R3733L,纽英伦生物技术(北京)有限公司产品]对 PE 载体质粒进行线性化处理,通过单片段快速克隆试剂盒[货号:C112-02,南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品]将合成的 spacer-gRNA-RT-PBS 片段连接至线性化的 PE 质粒中。以引物 TLCV-SF 和 *HPPD*-spacer R(序列详见表 1)进行聚合酶链式反

应(PCR)筛选阳性克隆,利用质粒小规模提取试剂盒(货号:DC201-01,南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品)提取质粒后,委托江苏康为世纪生物科技股份有限公司进行纳米孔测序验证,测序结果正确的质粒载体命名为 PE-*HPPD*-Flag。

1.3 农杆菌介导的水稻遗传转化

利用热激法将 PE-*HPPD*-Flag 质粒转入农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 (货号:AC1010,上海唯地生物技术有限公司产品),利用农杆菌介导的遗传转化将引导编辑载体转入日本晴成熟胚诱导的愈伤组织,在含有 50 mg/L 终质量浓度的潮霉素 B 的培养基上筛选约 28 d,在含有 25 mg/L 潮霉素 B 的培养基上分化出潮霉素抗性植株^[20]。

1.4 靶标位点的基因型鉴定

利用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取水稻叶片总 DNA (CTAB 配方:100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB)。利用 flag 标签插入位点侧翼序列的特异性引物 *HPPD*-F 和 *HPPD*-R (表 1) 扩增含有插入位点的片段。PCR 反应体系 (25.00 μ L): 2.00 μ L 基因组 DNA (质量浓度 100 ng/ μ L), 12.50 μ L 2 \times Rapid *Taq* Master Mix (货号:P222,南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品), 0.75 μ L 正向引物 (浓度 10 μ mol/L), 0.75 μ L 反向引物 (浓度 10 μ mol/L), 补去离子水至 25.00 μ L。PCR 程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 随后进行 35 个循环,每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s。PCR 产物直接进行纳米孔测序。

1.5 不含转基因元件的植株鉴定

以水稻叶片总 DNA 为模板,根据潮霉素磷酸转移酶基因表达盒序列设计特异性引物 35S-NTF1 和 *Hyg*-SR, 根据 *Cas9*-*MMLV* 基因表达盒序列设计特异性引物 *nCas9*-SF 和 *MMLV*-SR (表 1), 分别进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (10.00 μ L): 2.00 μ L 基因组 DNA (质量浓度 100 ng/ μ L), 5.00 μ L 2 \times Rapid *Taq* Master Mix, 0.25 μ L 正向引物 (10.00 μ mol/L), 0.25 μ L 反向引物 (10 μ mol/L), 用超纯水补至 10.00 μ L。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 随后进行 35 个循环,每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目标条带。

1.6 基因表达水平检测

根据水稻 *HPPD* 基因的编码序列设计引物 *HPPD*-TF 和 *HPPD*-TR 检测水稻 *HPPD* 基因表达水平,采用水稻 *Ubiquitin* 基因 (LOC_Os03g13170) 作为内参基因,设计检测引物 *OsUBQ*-TF 和 *OsUBQ*-TR (表 1)。不含转基因元件的纯合植株 *HPPD*-Flag-11-10 和转基因受体品种日本晴用于 *HPPD* 基因的表达水平检测。试验材料种植于植物培养箱 (型号:AR41L2, 美国 Percival Scientific 公司产品), 光周期设定为 16 h 光照/8 h 黑暗, 昼夜温度设置为 32 $^{\circ}$ C/28 $^{\circ}$ C。水稻分蘖期的倒数第 1 片叶用于检测, 依次于黑暗转光照后 0 h, 4 h, 8 h, 12 h 和 16 h 剪取同一倒数第 1 张叶的叶片, 液氮速冻后保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱, 待所有样品取样结束, 加入液氮迅速研磨成粉末, 随后利用总 RNA 小量提取试剂盒 (型号:RC411-01, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品) 提取 RNA。利用逆转录试剂盒 (货号:R323-01, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品) 进行逆转录反应。实时定量 PCR 反应体系 (20.0 μ L) 为: 2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master 预混液 (货号:Q312-02, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品) 10.0 μ L, 10 μ mol/L 正向引物 0.5 μ L, 10 μ mol/L 反向引物 0.5 μ L, cDNA 模板 3.0 μ L, 补去离子水至 20.0 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 随后进行 40 个循环的扩增, 每个循环依次为 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 每个循环延伸阶段结束后进行荧光信号读板检测; 扩增循环完成后, 进行熔解曲线分析, 条件为 60 $^{\circ}$ C 缓慢升温至 95 $^{\circ}$ C, 升温过程中每 0.1 $^{\circ}$ C 采集 1 次荧光信号并读数。

1.7 蛋白质免疫印迹 (WB) 试验

对于含 3 \times flag 标签的纯合植株, 取同一份水稻叶片样品置于液氮中充分研磨成粉末, 分样后分别用于基因表达水平检测和蛋白质表达量检测。向叶片粉末中加入含有 1% 蛋白酶抑制剂 cocktail (货号: S25910, 上海源叶生物科技股份有限公司产品) 的 1 \times PBS 缓冲液 (货号: P1022, 北京索莱宝科技有限公司产品), 混匀后 13 000 g 离心 5 min, 加入 1/4 体积的 5 \times SDS 蛋白质上样缓冲液 (货号: P0015, 上海碧云天生物技术有限公司产品), 经 100 $^{\circ}$ C 金属浴加热 10 min, 室温下 13 000 g 离心 5 min, 取上清液, 采用 4%~20% 梯度凝胶 (货号: M01004, 南京金斯瑞生物科技股份有限公司产品) 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以

120 V 恒压电泳至溴酚蓝指示剂达到凝胶底部,利用伯乐转膜仪将凝胶中的蛋白质转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,以 100 mA 恒流条件转膜 100 min,然后利用含有 5% 脱脂奶粉(货号:A600669,上海生工生物工程股份有限公司产品)的 1×PBST 缓冲液室温封闭 2 h,含有同一组样品的 PVDF 膜分别采用 Anti-flag 单克隆抗体(1:5 000,体积比,货号:F4049,美国 Sigma-Aldrich 公司产品)和 Anti-actin 抗体(1:2 500,体积比,货号:M20009M,上海艾比玛特生物医药科技有限公司产品)室温孵育过夜,

利用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000,体积比,货号:ZB-5305,北京中杉金桥生物技术有限公司产品)溶液室温孵育 40 min,抗体稀释液均为含有 3% 脱脂奶粉的 1×PBST 缓冲液,利用 ECL 发光液(货号:180-501,上海天能科技有限公司产品)显色,利用天能 5200 Multi 全自动化学发光图像分析系统(型号:5200,上海天能科技有限公司产品)采集蛋白质条带图像,采用 ImageJ 软件对蛋白质免疫印迹条带的灰度值进行定量分析,以 Actin 蛋白为内参校正目标蛋白质的相对表达量。

表 1 本研究所用引物序列信息

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
<i>TLCV-SF</i>	TTGGGAAATGTCCACTCACC	植物表达载体及农杆菌菌落 PCR 鉴定
<i>HPPD-spacer R</i>	AGGATCCTTGAACGTAGGG	
<i>HPPD-F</i>	GTGCATGGAGAAGGATGAGAGTG	插入位点基因型鉴定
<i>HPPD-R</i>	GCCAACACTAGGTTACATTCTTG	
<i>35S-NTF1</i>	ACAATCCCACTATCCTTCGCAAG	潮霉素抗性基因表达盒鉴定
<i>Hyg-SR</i>	GTACTTCTACACGCCATCGGTC	
<i>nCas9-SF</i>	ACATCATCCACCTCTTCACC	<i>nCas9-MMLV</i> 基因表达盒鉴定
<i>MMLV-SR</i>	TTGATGGACACCGGTGTGA	
<i>HPPD-TF</i>	ACAGGGATGACCAGGGGTCTTGC	<i>HPPD</i> 基因表达水平检测
<i>HPPD-TR</i>	GCTTGCTTGGCTTCAAGGGATTTCTCA	
<i>OsUBQ-TF</i>	GCTCCGTGGCGGTATCAT	内参基因表达水平检测
<i>OsUBQ-TR</i>	CGGCAGTTGACAGCCCTAG	

2 结果与分析

2.1 引导编辑载体构建

本研究以梗稻品种日本晴作为转基因受体,在水稻 *HPPD* 蛋白羧基端原位精准融合 3 个串联的 flag 蛋白标签(3×flag)。为了利用引导编辑载体在不产生插入缺失的情况下精准插入 3×flag 标签编码序列,本研究在 *HPPD* 基因 3' 端终止密码子附近选择 1 个 20 bp 的基因编辑靶标位点(图 1A)。利用玉米 *Ubiquitin1* 基因启动子驱动优化后的 Cas9 切口酶和逆转录酶融合蛋白的编码基因(图 1B);利用含有花椰菜花叶病毒 35S 增强子、黄化曲叶病毒核心启动子和截短的拟南芥 U6 启动子的复合启动子驱动引导编辑元件表达(图 1B、图 1C);利用花椰菜花叶病毒 35S 启动子驱动潮霉素抗性基因表达(图 1B)。引导编辑元件包含顺序排列的甘氨酸 tRNA 编码序列、基因编辑靶标位点、引导 RNA、RT 模板

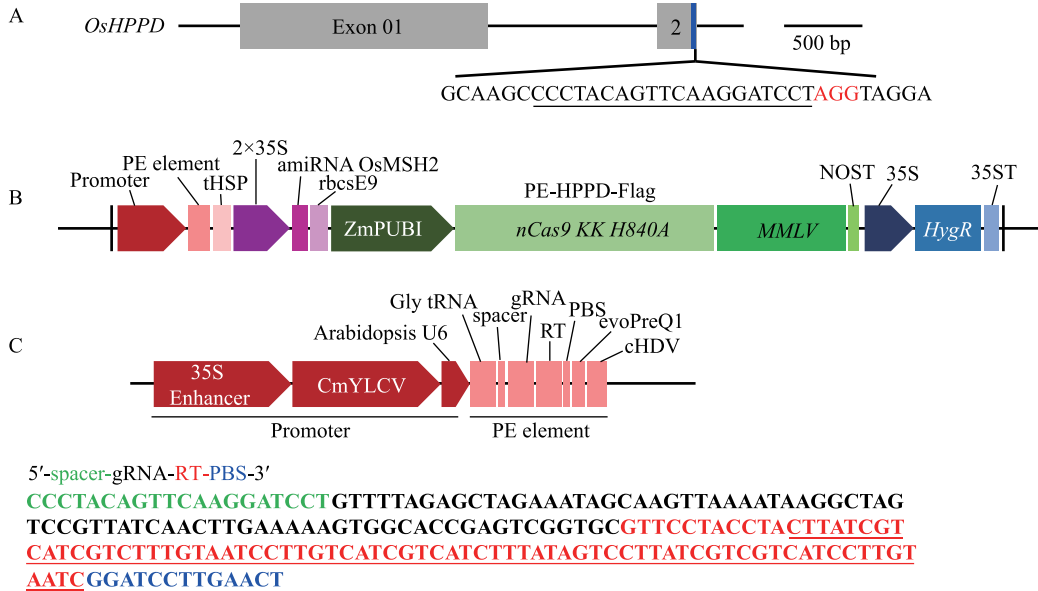
序列、PBS 序列、evoPreQ1 基序和丁型肝炎病毒(HDV)核酶序列(图 1B、图 1C)。合成 spacer-gRNA-RT-PBS 序列,连入线性化的引导编辑终载体,构建用于 3×flag 标签编码序列插入的引导编辑载体 PE-*HPPD-Flag*。引导编辑载体采用农杆菌介导的遗传转化转入水稻品种日本晴。

2.2 转基因当代植株基因型鉴定

本研究共获得 21 株具有潮霉素抗性的 T₀ 代转基因植株。提取转基因植株叶片总 DNA,利用插入位点两侧序列特异性引物扩增含有插入位点的片段,进行基因型鉴定。如图 2A 所示,在 21 个被测植株中,均观察到长度约为 356 bp 的条带,与野生植株基因型预期大小相近,同时,在第 1、第 2 和第 11 号植株的扩增产物中观察到 2 个大于野生型的条带。将第 1、第 2 和第 11 号植株对应的 PCR 产物进行纳米孔测序,尽管琼脂糖电泳观察到 3 条条带,但测序结果仅检测到两种基因型,一种基因型的测序结果表明在

HPPD 基因的 3'端发生了3×flag 标签编码序列的精准插入(图 2C),另一种基因型的序列与野生型一致,测序 Read 长度分布图中也仅观察到 2 个峰,表明 PCR 产物仅包含两种基因型对应的条带(图 2B)。上述结果表明,第 1、第 2 和第 11 号转基因植株 *HPPD* 基因

的 3'端发生了预期的3×flag 标签编码序列的精准插入,由于同时可以检测到野生型条带,表明这 3 个植株中蛋白质标签的插入可能以杂合或嵌合的形式存在。3 个检测到精准插入事件的植株分别命名为 HPPD-Flag-1、HPPD-Flag-2 和 HPPD-Flag-11。



A: 水稻 *HPPD* 基因结构; B: 引导编辑载体 T-DNA 区段示意图; C: 引导编辑元件区序列示意图。图 A 中灰色方框表示 2 个外显子, 外显子间的黑色短线代表内含子, 蓝色竖线显示基因编辑靶标位点的位置, 带下划线的字母表示基因编辑靶标位点序列, 红色字母表示原间隔相邻基序(PAM)序列; 图 B 中 ZmPUBI 为玉米 *Ubiquitin1* 基因启动子, *nCas9 KK H840A* 为优化后的 *Cas9* 切口酶编码基因, *MMLV* 为逆转录酶编码基因, *NOST* 为 NOS 终止子, *amiRNA OsMSH2* 为针对水稻 *MSH2* 基因的 *amiRNA* 元件, *rbcS9* 为豌豆 (*Pisum sativum* L.) 核酮糖-1, 5 二磷酸羧化酶小亚基 *E9* 基因的终止子, *35S* 为花椰菜花叶病毒 (*CaMV*) *35S* 启动子, *HygR* 为潮霉素抗性基因, *35ST* 为 *35S* 终止子, *Promoter* 为引导编辑元件启动子, *PE element* 为引导编辑元件, *tHSP* 为热休克蛋白终止子; 图 C 中 *Promoter* 和 *PE element* 对应 B 中相应区域, *35S Enhancer* 为 *CaMV35S* 增强子, *CmYLCV* 为黄化曲叶病毒核心启动子, *Arabidopsis U6* 为截短的拟南芥 *U6* 启动子, *Gly tRNA* 为甘氨酸 tRNA 编码序列, *spacer* 为 *HPPD* 基因编辑靶标位点, *gRNA* 为引导 RNA, *RT* 为逆转录模板, *PBS* 为引物结合位点, *evoPreQ1* 为工程化的 *preQ1* 核糖开关适配体基序, *cHDV* 为丁型肝炎病毒核酶序列。示意图下方为 PE 元件的序列, 绿色字母代表 *spacer* 序列, 黑色字母代表 *gRNA* 序列, 红色字母代表 *RT* 序列, 下划线标注的为 3×flag 标签编码序列, 蓝色字母代表 *PBS* 序列。

图 1 水稻 *HPPD* 基因结构及引导编辑载体 T-DNA 区元件示意图

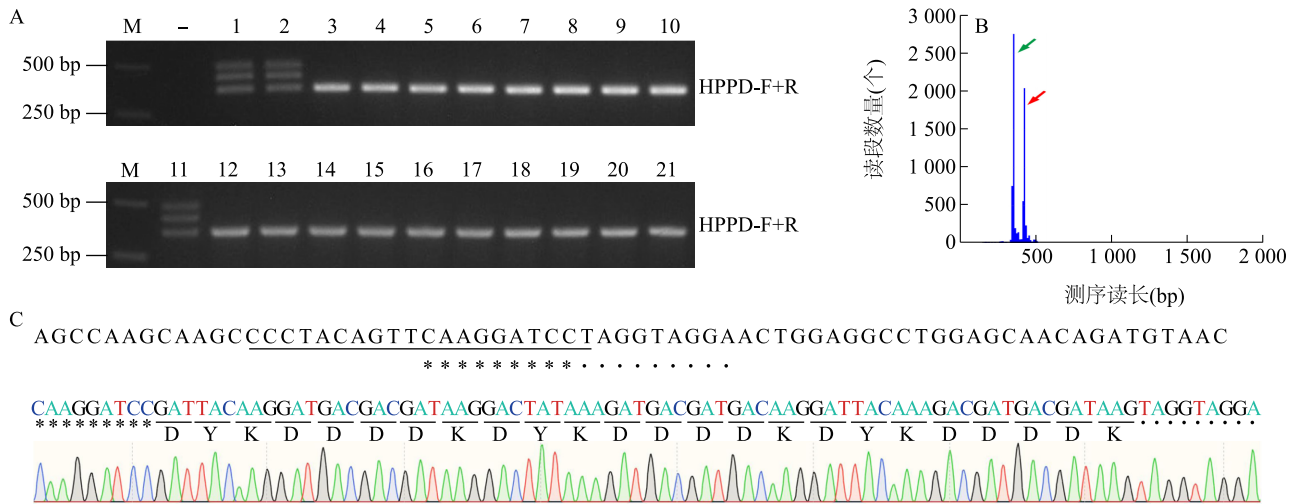
Fig.1 Schematic diagrams of rice *HPPD* gene structure and T-DNA region of prime editing vector

2.3 T_0 代精准插入植株融合蛋白表达检测

为了检测 HPPD-3×flag 融合蛋白是否能够正常表达,本研究首先利用 Anti-flag 单克隆抗体对 3 个 T_0 代鉴定到精准插入 3×flag 标签编码序列的植株 (HPPD-Flag-1、HPPD-Flag-2 和 HPPD-Flag-11) 的总蛋白质进行 Western blot 检测。利用 Vector NTI 软件预测 HPPD-3×flag 融合蛋白的相对分子量约为 50 000。如图 3 所示, HPPD-Flag-1、HPPD-Flag-2 和 HPPD-Flag-11 3 个植株中均检测到大小与预测相对分子量相近的条带,说明在本研究所得 T_0 代发生精准插入的植株中, HPPD-3×flag 融合蛋白可以正常表达。

2.4 不含转基因元件的纯合插入植株的鉴定

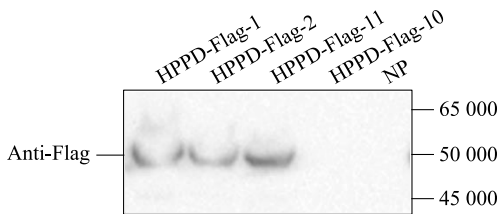
将 HPPD-Flag-1、HPPD-Flag-2 和 HPPD-Flag-11 3 个检测到 3×flag 标签编码序列精准插入事件的 T_0 代转基因植株移栽到田间, 分别收获自交 T_1 代种子。每个株系随机选取 30 个 T_1 代单株进行基因型鉴定, 结果表明 HPPD-Flag-11 的 T_1 代植株中可以检测到与精准插入 3×flag 标签编码序列对应的较长条带, 而 HPPD-Flag-1 和 HPPD-Flag-2 的 T_1 代植株只检测到与野生型序列长度对应的短条带。如图 4 所示, 在 30 个 HPPD-Flag-11 的自交 T_1 代单株中, 有 7 个单株检测到了与精准插入 3×flag 标签编码序列对



A: T₀代基因编辑植株基因型鉴定 PCR 产物琼脂糖电泳结果; B: T₀代基因编辑植株 HPPD-Flag-11 的基因型鉴定 PCR 产物纳米孔测序 Read 长度分布图; C: 发生3×flag 标签编码序列精准插入的 T₀代基因编辑植株的有代表性的测序峰图。图 A 中 M 表示 DNA 碱基序列长度标准, 1~21 分别为 T₀代转基因植株样品编号; 图 B 中红色和绿色箭头分别指示两个主峰; 图 C 中上方序列为野生型(WT)基因序列, 其中带下划线的字母为基因编辑的靶标区域; 下方序列为编辑后序列, 其下划线标注的大写字母为3×flag 标签编码序列的三联密码子, 密码子下方对应的大写字母为其编码的氨基酸, 野生型序列和编辑后序列下方的 * 和 · 分别标记了相同的碱基对应的位置, 可直观对比野生型与编辑后序列的碱基差异。

图 2 T₀代基因编辑植株基因型鉴定结果

Fig.2 Genotyping results of T₀ generation transgenic plants



NP 为空白对照; HPPD-Flag-10 为阴性植株对照。

图 3 T₀代精准插入3×flag 标签编码序列植株中 HPPD-3×flag 融合蛋白蛋白质印迹法检测结果

Fig.3 Western blot results of HPPD-3×flag fusion protein in T₀ generation transgenic plants harbouring precise insertion of the 3×flag tag coding sequence

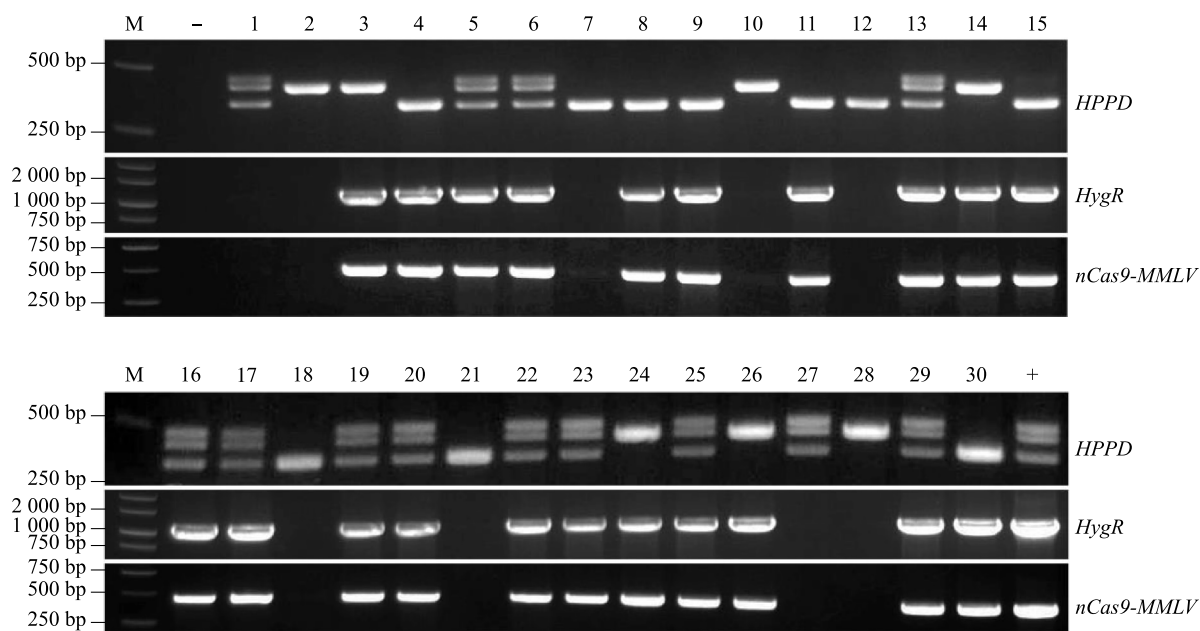
应的单一条带, 10 个单株检测到了与野生型相对应的单一条带; 另有 13 个单株检测到了与 T₀代引导编辑阳性植株相似的 3 个条带。上述结果表明, HPPD-Flag-11 的 3×flag 标签编码序列精准插入事件遗传到 T₁代。

为进一步鉴定不含转基因元件的插入株系, 设计潮霉素和 nCas9-MMLV 基因表达盒的特异性引物, 对 30 个 HPPD-Flag-11 的 T₁代自交单株进行 PCR 扩增。如图 4 所示, 在 30 个被测单株中, 有 11 个单株用两对引物均不能扩增出条带, 表明这 11 个

单株应为不含转基因元件的植株。综合基因型鉴定结果和转基因元件鉴定结果, 共获得 3 个不含转基因元件的纯合 3×flag 编码序列精准插入植株, 随机选取 HPPD-Flag-11-10 进行后续试验。

2.5 长日照条件下 HPPD 基因转录水平

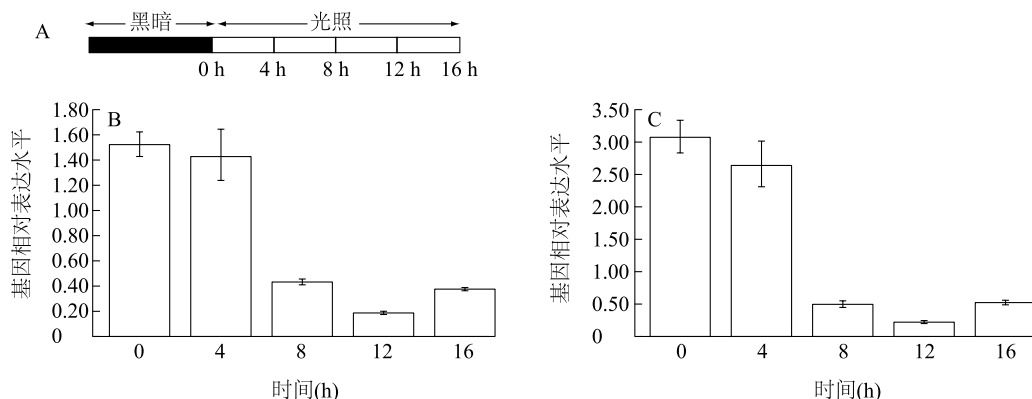
为了探究水稻 HPPD 基因的转录本水平是否与光周期存在相关关系, 本研究在光照培养箱中设置长日照光周期, 种植野生型植株和不含转基因元件的精准插入 3×flag 标签编码序列植株 HPPD-Flag-11-10 至分蘖期, 在黑暗转光照后每 4 h 采集 1 次叶片样本(图 5A), 利用实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)检测野生型和 HPPD-Flag-11-10 在黑暗转光照后不同时间点的 mRNA 水平。如图 5B 所示, 野生型植株中 HPPD 基因的表达水平随光照时长表现出从高到低的变化趋势, 在黑暗转光照 0 h 和 4 h 2 个时间点表达水平高, 12 h 时达水平最低。在 HPPD-Flag-11-10 植株中, HPPD 基因随光周期的表达水平表现出与野生型植株一致的变化趋势(图 5C)。上述结果表明, 在水稻 HPPD 基因的 3'端精准插入 3×flag 标签编码序列不影响 HPPD 基因的表达模式, 且水稻 HPPD 基因与拟南芥 HPPD 基因表现出相似的与光周期相关的表达模式^[4]。



M 表示 DNA 碱基序列长度标准,1~30 分别为 T_1 代转基因植株样品编号。

图 4 精准插入 $3\times flag$ 标签编码序列植株 HPPD-Flag-11 自交后代基因型和转基因元件鉴定结果

Fig.4 Results of genotyping and transgene element identification of T_1 generation plants from HPPD-Flag-11 with precise insertion of the $3\times flag$ tag coding sequence



A:长日照处理及取样点示意图;B:野生型植株不同时间点 *HPPD* 基因的相对表达水平;C:HPPD-Flag-11-10 植株不同时间点 *HPPD* 基因的相对表达水平。图 B 和图 C 中相对表达水平为 *HPPD* 基因相对于内参基因 *Ubiquitin1* 的表达倍数,误差线表示 3 次重复的标准差。

图 5 野生型植株和不含转基因元件的纯合 $3\times flag$ 标签编码序列精准插入植株 HPPD-Flag-11-10 中 *HPPD* 基因表达水平检测结果

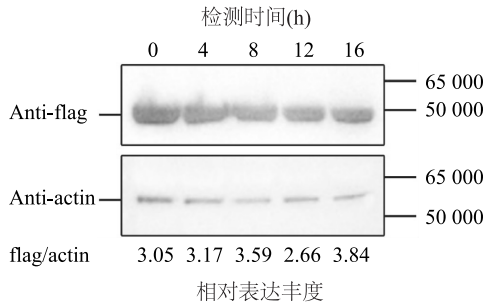
Fig.5 Detection results of *HPPD* gene expression levels in wild-type rice plants and HPPD-Flag-11-10 rice plants with precise insertion of the $3\times flag$ tag coding sequence and free of transgene elements

2.6 长日照条件下 *HPPD* 蛋白表达丰度

蛋白质是酶功能的直接执行者,利用本研究创制的含有 $3\times flag$ 标签编码序列精准插入的植株 HPPD-Flag-11-10进一步分析水稻 *HPPD* 蛋白随光周期的表达丰度变化。利用与 qPCR 检测相同的样

品提取叶片总蛋白质,用 Anti-*flag* 单克隆抗体进行 Western blot 检测,并以 Anti-actin 抗体检测 actin 蛋白表达丰度作为蛋白质定量分析的内参。如图 6 所示,在黑暗转光照后的 5 个时间点,HPPD- $3\times flag$ 融合蛋白对应的 Anti-*flag* 条带没有表现出明显的强度

变化。以 Anti-flag 条带的灰度与 Anti-actin 条带的灰度的比值表示 HPPD-3×flag 融合蛋白的相对表达强度,结果表明在黑暗转光照后的不同时间点,HPD 蛋白表达丰度相近,且没有表现出与 HPPD 基因转录水平相似的从高到低的变化趋势。



图上方数字表示黑暗转光照后检测时间点,图下方数字表示相同时间点样品 Anti-flag 条带灰度和 Anti-actin 条带灰度的比值。

图6 不含转基因元件的纯合3×flag 标签编码序列精准插入植株 HPPD-Flag-11-10 中 HPPD 蛋白表达丰度分析结果

Fig.6 Analysis results of HPPD protein expression abundance in HPPD-Flag-11-10 with precise insertion of the 3×flag tag coding sequence and free of transgene elements

3 讨论

植物内源蛋白的抗体制备存在难度大、周期长、成本高的问题,且部分内源抗体无法有效区分同源蛋白。因此,为目标植物蛋白质添加蛋白质标签,借助成熟稳定、成本低廉的商业化抗体检测生理条件下内源蛋白的天然状态,是一种高效且经济的研究策略。本研究利用基因编辑介导的引导编辑技术,成功为水稻内源 HPPD 蛋白添加了原位 3×flag 标签,并筛选鉴定出无转基因元件的纯合株系。蛋白质免疫印迹试验结果表明,HPPD-3×flag 融合蛋白可在水稻中正常表达,且该株系中 HPPD 基因的表达模式与野生型植株保持一致。该水稻遗传材料可进一步用于 HPPD 蛋白丰度、蛋白质修饰及蛋白质稳定性等方面的检测分析,为解析水稻 HPPD 基因转录和 HPPD 蛋白表达的调控机制提供了有价值的试验材料。

本研究共获得 21 株转基因当代潮霉素抗性植株,其中 3 株检测到 3×flag 标签编码序列的精准插入。在 3 个阳性株系的自交后代中,仅 1 个株系的精准插入事件可稳定遗传至下一代。这一结果表

明,转基因当代植株中检测到的精准插入事件可能以嵌合体形式存在^[21]。为提升可遗传精准插入突变体的获得效率,可提高独立转基因单株的获得数量,或尝试优化引导编辑载体的元件与编辑策略。已有研究结果证实,对引导编辑的核心元件进行优化可有效提升引导编辑效率,且相同元件对不同物种或不同基因编辑位点的增效作用存在差异^[17],而采用双重引导编辑(DualPE)策略,选取 2 个基因编辑靶标位点,利用引导编辑技术产生相互重叠的编辑序列,也可进一步提高引导编辑精准插入的效率^[18,22]。

值得注意的是,对于发生精准插入的 3 个转基因当代植株,基因型鉴定 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳均检测到 2 个大于野生型的条带,其中 1 个条带的大小与发生精准插入事件的序列长度相仿,在精准插入条带上方另有 1 个条带,起初推测该条带可能为目标序列的非特异性整合产物。由于包含野生型条带在内的 3 条带大小相近,不易切胶分离,本研究采用纳米孔测序技术对 PCR 样品进行测序。根据纳米孔测序原理,纳米孔偶联的马达蛋白会把 DNA 解旋成单链后再进行测序^[23]。纳米孔测序结果表明,含有 3 条带的 PCR 产物仅能检测到对应两种 Read 长度的峰,分别对应野生型和精准插入两种基因型。在 HPPD-Flag-11 的 T₁代,对应纯合插入和野生型基因型的植株中仅检测到相应的单一条带,且仍可检测到扩增产物呈现 3 个条带的植株。理论上,在不含转基因元件的自交后代中,同一基因位点最多有两种基因型。因此,综合纳米孔测序和自交后代基因型分离结果,猜测最长的条带可能为野生型条带与含有精准插入的条带退火后形成的具有二级结构的 DNA 双链,造成电泳迁移率变低,表现为比两种单一基因型更长的条带,后续需要进行更深入的研究以验证这一猜想。

另有研究通过基因枪轰击供体片段,实现外源片段的精准插入。插入片段通过非同源末端连接(NHEJ)机制整合到目标位点。对外源片段进行末端 5'磷酸化和硫代磷酸化修饰可以提高外源片段的插入效率^[16]。但该方法存在外源片段插入方向随机的问題,易产生非预期的反向插入事件,且插入位点两侧常伴随碱基的插入或缺失,若插入的是蛋白标签的编码序列,还可能导致融合蛋白发生移码突变。此外,基因枪转化技术所需的设备与耗材成

本较高,该方法对植物基因组的损伤较大,转化后代中还易出现外源片段的碎片化随机整合。因此,针对较短蛋白质标签的插入需求,农杆菌介导的引导编辑系统更具应用优势。

作为重要的除草剂靶标基因,水稻 *HPPD* 基因的相关研究主要集中在直接改造编码区或染色体异位,通过提高蛋白质的除草剂抗性或基因表达水平,获得对 *HPPD* 抑制剂类除草剂抗性提高的突变体^[3,10-12],对 *HPPD* 基因的转录和翻译调控机理研究较少。另有研究通过基因编辑技术改造水稻 *HPPD* 基因的 3'非翻译区,获得了抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂的突变体,但其抗性调控的具体分子机制尚未明确^[24]。为阐明抗性的作用机理、实现多种抗性突变的理性聚合,同时规避所得抗除草剂突变体在不同生理状态或环境条件下可能产生的潜在副作用,系统解析 *HPPD* 基因在转录和翻译水平的调控机制具有重要的研究价值。

本研究利用创制的原位表达 *HPPD*-3×flag 融合蛋白的水稻材料分析了光周期对于 *HPPD* 基因转录水平和蛋白质表达水平的影响。与拟南芥中的研究结果相似^[4],水稻 *HPPD* 基因同样表现出在黑暗转光照后的高表达,随着光照时间的延长,转录水平显著下降。值得注意的是,根据本研究结果,虽然黑暗转光照后8~16 h *HPPD* 基因表达水平显著下降,但最低值出现在 12 h,拟南芥中没有表现出这一现象,可能与取样时间间隔较长有关。为了更精确地研究水稻 *HPPD* 基因的表达调控机制,可以进一步缩小取样时间的间隔。与 *HPPD* 基因转录水平变化趋势不同的是,在黑暗转光照后的所有时间点,*HPPD* 蛋白表达丰度的变化不大,这与 *HPPD* 是质体醌和生育酚合成途径中的关键酶,在光合作用中具有重要作用这一生理功能相一致。转录和蛋白质水平随光周期的变化趋势不同,暗示水稻 *HPPD* 基因在蛋白质的翻译、降解或稳定性等方面可能存在复杂的调控机制。原位表达 *HPPD*-3×flag 融合蛋白的水稻株系后续可用于水稻 *HPPD* 基因转录和 *HPPD* 蛋白表达的调控机制研究,有助于创制 *HPPD* 蛋白表达水平或活性提高的水稻种质。

4 结论

本研究利用引导编辑技术创制出原位表达 *HPPD*-3×flag 融合蛋白的不含转基因元件的纯合水

稻种质。精准插入到 *HPPD* 基因 3'端的3×flag 标签编码序列不影响 *HPPD* 基因的表达模式。转录水平分析结果表明,水稻 *HPPD* 基因在黑暗转光照后的不同时间点的转录水平表现出从高到低的变化趋势,而 *HPPD* 蛋白表达丰度在黑暗转光照后所有被测时间点变化不大,暗示水稻 *HPPD* 基因在蛋白质水平可能存在复杂的调控机制。本研究创制的水稻遗传材料,为深入解析 *HPPD* 基因转录及 *HPPD* 蛋白表达水平的调控机制提供了宝贵的遗传材料,同时为提升水稻非生物逆境耐受性和除草剂抗性提供了潜在的应用基础。

参考文献:

- [1] NDIKURYAYO F, MOOSAVI B, YANG W C, et al. 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors: from chemical biology to agrochemicals [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(39): 8523-8537.
- [2] MITCHELL G, BARTLETT D W, FRASER T E, et al. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize [J]. *Pest Management Science*, 2001, 57(2): 120-128.
- [3] YANG Y W, ZHOU Z Z, LIU T L, et al. Multisite mutagenesis of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*HPPD*) enhances rice resistance to *HPPD* inhibitors and its carotenoid contents [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(40): 22063-22072.
- [4] PARK T K, KANG I A, PARK C H, et al. Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase expression by brassinosteroid reduces carotenoid accumulation in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(5): 1415-1428.
- [5] SHAHRIARI A G, MAJLÁTH I, ALIAKBARI M, et al. Identifying critical regulators in the viral stress response of wheat (*Triticum aestivum* L.) using large-scale transcriptomics data [J]. *Agronomy*, 2023, 13(10): 2610.
- [6] FALK J O N, KRAUB N, DÄHNHARDT D, et al. The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2002, 159(11): 1245-1253.
- [7] REN W W, ZHAO L X, ZHANG L D, et al. Molecular cloning and characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene from *Lactuca sativa* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(10): 1076-1083.
- [8] JIANG J S, CHEN Z H, BAN L P, et al. P-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Medicago sativa* is involved in vitamin E biosynthesis and abscisic acid-mediated seed germination [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40625.
- [9] YU X H, WEN X, DONG J Q, et al. Hydroxylation of *HPPD* facilitates its PUB11-mediated ubiquitination and degradation in re-

- response to oxidative stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant Communications*, 2025, 6(11):101521.
- [10] CHEN L, LIU R, TAN Q, et al. Improving the herbicide resistance of rice 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by DNA shuffling basis-directed evolution[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(41):15186-15193.
- [11] WANG M G, ZHONG Y L, HE Y X, et al. Identifying resistant mutations in the herbicide target site of the plant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2025, 23(1):75-77.
- [12] LU Y, WANG J Y, CHEN B, et al. A donor-DNA-free CRISPR/Cas-based approach to gene knock-up in rice [J]. *Nature Plants*, 2021, 7(11):1445-1452.
- [13] WANG Y, PHELPS A, GODBEHERE A, et al. Revolutionizing agriculture with CRISPR technology: applications, challenges, and future perspectives [J]. *Biotechnology Journal*, 2025, 20(9):70113.
- [14] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576:149-157.
- [15] HUA K, JIANG Y W, TAO X P, et al. Precision genome engineering in rice using prime editing system [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(11):2167-2169.
- [16] LU Y M, TIAN Y F, SHEN R D, et al. Targeted, efficient sequence insertion and replacement in rice [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(12):1402-1407.
- [17] LI J, DING J, ZHU J Y, et al. Prime editing-mediated precise knockin of protein tag sequences in the rice genome [J]. *Plant Communications*, 2023, 4(3):100572.
- [18] ZHAO Y D, HUANG Z W, ZHOU X M, et al. Precise deletion, replacement and inversion of large DNA fragments in plants using dual prime editing [J]. *Nature Plants*, 2025, 11(2):191-205.
- [19] LIN Q P, JIN S, ZONG Y, et al. High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants [J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(8):923-927.
- [20] MIAO J, GUO D S, ZHANG J Z, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system [J]. *Cell Research*, 2013, 23(10):1233-1236.
- [21] 靳亚茹, 陈斌, 王歆凯, 等. 利用基因编辑产生长片段缺失创制低谷蛋白水稻种质 [J]. *中国农业科学*, 2025, 58(6):1052-1064.
- [22] LIU X X, WANG Y Y, WANG H Z, et al. Generating herbicide resistant and dwarf rice germplasms through precise sequence insertion or replacement [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(2):293-295.
- [23] WANG Y H, ZHAO Y, BOLLAS A, et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications [J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(11):1348-1365.
- [24] WU Y Y, XIAO N, CAI Y, et al. CRISPR-Cas9-mediated editing of the OsHPPD 3' UTR confers enhanced resistance to HPPD-inhibiting herbicides in rice [J]. *Plant Communications*, 2023, 4(5):100605.

(责任编辑:黄克玲)