



水稻粒型调控蛋白OsLTPL108的原核表达、纯化及亚细胞定位

彭宇婧^{1,2}, 陈韦韦², 卿冬进², 李经成², 卢柏亦^{1,2}, 周海连², 彭 德²,
周维永², 伍 豪², 戴高兴^{2*}

(¹广西大学农学院, 广西南宁 530004; ²广西农业科学院水稻研究所/广西水稻遗传育种重点实验室, 广西南宁 530007)

摘要:【目的】对调控水稻粒型的脂质转移蛋白(OsLTPL108)进行原核表达、纯化及亚细胞定位,为解析该蛋白的生物学功能及其调控粒型的分子机制提供理论参考。【方法】从UniProt数据库获取*OsLTPL108*基因编码区(CDS)序列,设计其引物进行PCR扩增,并对扩增产物进行电泳检测及测序,采用生物信息学软件预测其编码蛋白的理化性质、跨膜结构域、信号肽、亲/疏水性及亚细胞定位。将*OsLTPL108*基因序列连接至pGEX-2T上,构建原核表达载体pGEX-2T-*OsLTPL108*,并诱导其在大肠杆菌BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL中表达,对纯化的目的蛋白进行免疫印迹杂交验证。同时,构建pRHV-*OsLTPL108*-cGFP亚细胞定位载体,通过转化水稻原生质体后观察其亚细胞定位。【结果】以水稻品种丁香B的cDNA为模板,扩增获得的*OsLTPL108*基因长度为477 bp,与RGAP数据库中梗稻登录号为LOC_Os03g14654的基因序列完全一致。*OsLTPL108*基因编码158个氨基酸残基,蛋白相对分子量为15.66 kD,理论等电点为8.7,N端第1~30位氨基酸含有跨膜结构域,第31~158位为可溶性结构域;N端第1~24位氨基酸构成典型信号肽序列,推测该蛋白属于分泌型蛋白。OsLTPL108蛋白的核心区域(第30~120位氨基酸)含有1个完整的非特异性LTP家族标志性结构域(Pfam登录号PF14368),由8个高度保守的半胱氨酸残基构成。pGEX-2T-*OsLTPL108*原核表达载体转化原核表达系统后,18 °C、0.1 mmol/L IPTG低温诱导过夜,OsLTPL108蛋白的表达量较高。成功获得分子量约39.64 kD的GST-OsLTPL108融合蛋白,且条带单一,无明显的非特异性条带。蛋白质谱鉴定获得3条与OsLTPL108蛋白匹配的特异性肽段,外源表达纯化的OsLTPL108蛋白序列正确。pRHV-*OsLTPL108*-cGFP亚细胞定位载体转化水稻原生质体后,OsLTPL108-EGFP融合表达蛋白的绿色荧光信号呈网状分布,与内质网定位蛋白OsHLP1-mCherry的红色荧光信号完全重叠,证明该蛋白定位于水稻原生质体的内质网上。【结论】OsLTPL108属于分泌型蛋白,通过添加助溶标签GST可利用原核表达系统获得高纯度的可溶性融合蛋白,可用于后续蛋白抗体制备。OsLTPL108蛋白定位于水稻细胞的内质网,由于内质网是植物脂质合成主要场所,推测OsLTPL108蛋白发挥脂质转运的功能。

关键词:水稻; OsLTPL108蛋白; 粒型; 原核表达; 蛋白纯化; 亚细胞定位

中图分类号:S511.035.3

文献标志码:A

文章编号:2095-1191(2026)06-1729-12

Prokaryotic expression, purification, and subcellular localization of rice grain shape regulation protein OsLTPL108

PENG Yu-jing^{1,2}, CHEN Wei-wei², QING Dong-jin², LI Jing-cheng², LU Bai-yi^{1,2},
ZHOU Hai-lian², PENG De², ZHOU Wei-yong², WU Hao², DAI Gao-xing^{2*}

(¹College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China; ²Rice Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Guangxi Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract:【Objective】This study aimed to perform prokaryotic expression, purification, and subcellular localization

收稿日期:2025-09-25

基金项目:广西科技重大专项(桂科AA23073004-4);广西自然科学基金项目(2024GXNSFAA010384);广西农业科学院基本科研业务专项(桂农科2025YP030)

通信作者:戴高兴(1975-), <https://orcid.org/0009-0001-1886-3088>, 博士, 研究员, 主要从事杂交水稻遗传育种研究工作, E-mail: 25266220@qq.com

第一作者:彭宇婧(2001-), <https://orcid.org/0009-0007-2485-7331>, 研究方向为水稻优质化育种, E-mail: pyujing0822@163.com

of the lipid transfer protein (OsLTPL108) of rice grain shape regulation, providing theoretical reference for elucidating its biological functions and its molecular mechanism of grain shape regulation. 【Method】The *OsLTPL108* gene coding sequence (CDS) was obtained from the UniProt database, and primers were designed for PCR amplification. The amplification product was detected by electrophoresis and sequencing. Bioinformatic software were used to predict the physicochemical properties, transmembrane domains, signal peptides, hydrophilicity/hydrophobicity, and subcellular localization of the encoded protein. The *OsLTPL108* gene was ligated into pGEX-2T to construct the prokaryotic expression vector pGEX-2T-*OsLTPL108*, which was then transformed into *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL for induced expression. The purified target protein was verified by immunoblotting. Concurrently, the subcellular localization vector pRHV-*OsLTPL108*-cGFP was constructed and transformed into rice protoplasts to observe its subcellular localization. 【Result】Using cDNA of rice variety Dingxiang B as the template, the amplified *OsLTPL108* gene was 477 bp in length and the sequence was completely consistent with japonica rice whose accession number was LOC_Os03g14654 from the RGAP database. The *OsLTPL108* gene encoded 158 amino acid residues, with its relative protein molecular mass of 15.66 kD, and a theoretical isoelectric point of 8.7; amino acids 1-30 of N-terminal contained a transmembrane domain, and amino acids 31-158 constituted a soluble domain. Amino acids 1-24 of N-terminal formed a typical signal peptide sequence, suggesting the protein was a secretory one. The core region of OsLTPL108 protein (amino acids 30-120) harbored a complete non-specific LTP family domain (Pfam accession number of PF14368) composed of eight highly conserved cysteine residues. After the prokaryotic expression vector pGEX-2T-*OsLTPL108* was transformed into the prokaryotic expression system, low temperature overnight induction at 18 °C with 0.1 mmol/L IPTG resulted in a high expression of OsLTPL108 protein. A GST-OsLTPL108 protein fusion protein with a molecular mass of approximately 39.64 kD was successfully obtained, showing single bands without obvious non-specific bands. Protein mass spectrometry identified three specific peptides matching OsLTPL108 protein, confirming that the sequence of exogenously expressed and purified protein OsLTPL108 was correct. After the subcellular localization vector pRHV-*OsLTPL108*-cGFP was transformed into rice protoplasts, the green fluorescence signal of the OsLTPL108-EGFP fusion protein displayed a reticular pattern and completely overlapped with the red fluorescence signal OsHLP1-mCherry of endoplasmic reticulum-localized protein, proving that the protein localized to the endoplasmic reticulum in rice protoplasts. 【Conclusion】OsLTPL108 is a secretory protein. By utilizing the solubility-enhancing GST tag, highly pure soluble fusion protein can be obtained from the prokaryotic expression system, which can be used for subsequent protein antibody preparation. The OsLTPL108 protein localizes to the endoplasmic reticulum of rice cells, and as the endoplasmic reticulum is the main site of plant lipid synthesis, OsLTPL108 is speculated to function in lipid transport.

Key words: *Oryza sativa* L.; OsLTPL108 protein; grain shape; prokaryotic expression; protein purification; subcellular localization

Foundation items: Guangxi Science and Technology Major Project (Guike AA23073004-4); Guangxi Natural Science Foundation (2024GXNSFAA010384); Basic Scientific Research Project of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (Guinongke 2025YP030)

0 引言

【研究意义】水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上重要的粮食作物之一,世界上一半以上人口均以稻米作为主食,其产量和品质关乎粮食安全与农业可持续发展(Xing and Zhang, 2010; Sun et al., 2018; 郭韬等, 2019)。千粒重作为影响产量的关键指标,与水稻籽粒的粒型(包括粒长、粒宽和长宽比)紧密相关(Ren et al., 2023; He et al., 2024),且粒型也是影响稻米外观品质的重要指标之一(Mao et al., 2010; 黄海祥和钱前, 2017; 刘喜等, 2018; 冯海洋等, 2025),是受多基因网络精细调控的数量性状(Liu et al., 2015a, 2015b, ; Li and Li, 2016; Li et al., 2018)。脂质转移蛋白(Lipid transfer proteins, LTPs)广泛分布于植物、动物和微生物中,占细胞可溶性蛋白的4%(田爱梅和曹家树, 2008; 刘芳和卢长明, 2013)。这类小分子碱性肽含有N端疏水信号肽及8个保守的半胱氨酸残基,共同构成内部疏水腔(Kader et al.,

1996; Liu et al., 2015a)。已有研究表明,LTPs在细胞壁延伸、种子发育和品质形成等多种生物学过程中发挥重要作用(Nieuwland et al., 2005; Wang et al., 2015; Zhao et al., 2020; Long et al., 2023)。因此,对水稻LTPs蛋白进行外源表达及亚细胞定位,是制备抗体、深入解析该蛋白在水稻粒型形成过程中所参与的脂质信号传导机制的关键前提。【前人研究进展】LTPs已被证明在多种生物学过程中发挥重要作用,包括蜡质体组装(Hollenbach et al., 1997)、细胞壁延伸(Nieuwland et al., 2005)、减数分裂后花药发育(Zhang et al., 2010)、花粉管顶端生长与受精(Chae et al., 2009)、种子发育与品质(Fujino et al., 2008; Wang et al., 2015; Li et al., 2023b, 2023c)、病原体防御反应(Ahmed et al., 2017)及植物对非生物胁迫的响应。Wang等(2012)已从水稻全基因组序列中发现53个非特异性LTPs基因。Liu等(2013)研究发现,*OsLTP6*基因受启动子正、负调控元件调控,在花药特异性表达,推测其通过介导脂质转运参与花药

角质层及花粉外壁形成。Chen等(2022)研究发现, *OsLTP47* 基因功能缺失会导致花药脂质代谢紊乱、发育异常及花粉壁缺陷, 最终造成水稻雄性不育, 说明该基因在花粉壁发育中具有重要作用。LTPL (LTP-like) 是LTP家族的一个亚类(Tao et al., 2021)。Zhao等(2020)研究发现, *OsLTPL159* 基因的等位基因表达可提高过氧化物酶活性, 以清除活性氧, 促进细胞壁纤维素沉积, 并积累脯氨酸、可溶性糖等渗透调节物质, 维持叶绿体结构完整性, 从而显著增强水稻幼苗早期的耐寒性。孙琳琳(2021)研究证实, *OsLTPL14* 基因高表达可降低褐飞虱繁殖力, 参与水稻对褐飞虱的防御反应。Li等(2023b)研究发现, *OsLTPL23* 基因通过调控淀粉—糖转化和脱落酸(ABA)来控制胚乳合成, 从而影响种子活力和幼苗生长。研究发现LTPs广泛分布于细胞壁(Thoma et al., 1993)、细胞质(Guo et al., 2013)、细胞质膜(Eds-tam et al., 2014)。Lin等(2017)在水稻中鉴定出5个盐胁迫诱导型LTP基因(*LtpII.3/5/6*、*LtpV.1/2*)及2个LTPL基因(*LtpL1/2*), 这些基因的表达受盐胁迫、干旱胁迫、氧化胁迫等非生物胁迫调控, 且通过ABA途径实现组织特异性表达, 其编码蛋白均亚细胞定位于内质网。刘晓灿等(2006)研究发现, 水稻非特异LTP蛋白(OSDIR)经过外源诱导表达及纯化, 获得高纯度重组 OSDIR 蛋白。本课题组前期通过 Tandem Mass Tags(TMT)标记定量蛋白质组学方法挖掘到1个粒型调控蛋白B8AKC9, 通过构建转基因材料证明其可影响粒型(Qing et al., 2023)。B8AKC9对应水稻参考基因组注释网站(<https://www.ricedata.cn/gene/>)的基因为 *OsLTPL108*, 是一个植物非特异性脂质转移蛋白家族的分泌蛋白。【本研究切入点】前人通过定量蛋白质组筛选与功能验证证实, *OsLTPL108* 蛋白具有调控水稻粒长的生物学功能, 是粒长正调控蛋白 *OsLTPL108*, 但未对其进行外源表达及亚细胞定位研究。【拟解决的关键问题】解析粒型调控蛋白 *OsLTPL108* 的特性, 制备 *OsLTPL108* 蛋白并明确其亚细胞定位, 构建其原核表达体系, 为深入解析该蛋白调控水稻粒型的分子机制提供关键依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻品种丁香B(保持系)由广西农业科学院水稻研究所保存。原核表达载体 PGEX-2T[含谷胱甘肽S-转移酶(GST)标签, 且多克隆位点含 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切位点]购自武汉淼灵生物科技有限公司;

亚细胞定位载体 pRHV-cGFP[含增强绿色荧光蛋白(EGFP), 且多克隆位点含 *Bam*H I 酶切位点]为实验室保存; 二元载体 pCambia1300-*OsHLP1*-mCherry(含内质网定位基因 *OsHLP1* 及 mCherry 红色荧光标签)由广西大学邱永福教授实验室馈赠。主要试剂: 2×Phanta Taq Master Mix、FastPure Plant Total RNA Isolation Kit、HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit、ClonExpress II One Step Cloning Kit、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、DL5000 DNA Marker 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 感受态细胞购自北京博迈德生物技术有限公司; DL2000 DNA Marker 购自北京兰杰柯科技有限公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、T4 DNA 连接酶均购自美国 NEB 公司; Glutathione Agarose Beads 4FF 树脂、GST-Protein Elution Buffer 购自江苏千株松生物科技有限公司。主要仪器设备: Triple TOF5600 质谱仪(AB SCIEX 公司)、人工气候箱(RXM 型, 宁波江南仪器厂)、一体式凝胶成像系统(北京六一生物科技有限公司)、FC 型酶标仪(ThermoFisher Scientific 公司)、超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、电泳转印系统(BIO-RAD 公司)、C1000 Touch Thermal Cycler(BIO-RAD 公司)。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

种子处理流程: 饱满种子 28 °C 避光清水浸泡 24 h, 37 °C 避光保湿(毛巾包裹, 湿度 80%)催芽 48 h, 播种至营养土(泥炭土: 蛭石=3:1), 25 °C 人工气候箱培养, 光周期 16 h 光照/8 h 黑暗, 光照强度 300 μ mol/(m²·s), 相对湿度 70%; 三叶期取地上部组织, 液氮速冻后 -80 °C 保存, 用于 RNA 提取。

取丁香 B 三叶期的地上部组织, 使用液氮研磨成粉, 用植物 RNA 试剂盒提取总 RNA; 通过 Nano-Drop 2000 检测 RNA 纯度 (OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 为 1.8~2.0), 1% 琼脂糖凝胶电泳 (120 V, 20 min) 验证完整性 (28S rRNA、18S rRNA 条带清晰, 无明显降解)。以 1 μ g 总 RNA 为模板反转录合成 cDNA。反应体系 20.0 μ L: 5×RT Buffer 4.0 μ L, dNTP Mix (10 mmol/L) 2.0 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L, Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) 1.0 μ L, oligo (dT) Primer (10 μ mol/L) 1.0 μ L, RNA 模板 1.0 μ g, RNase-free H₂O 补足至 20.0 μ L。反应条件: 42 °C 30 min, 85 °C 5 min 终止反应, -20 °C 保存用于后续试验。

1.3 *OsLTPL108* 基因克隆

从 UniProt 数据库获取 *OsLTPL108* 基因编码区 (CDS) 序列, 设计其引物 (上游引物 KC9-F: 5'-ATGGC

AAGCAAACAGGCAAT-3';下游引物 KC9-R: 5'-TTAAACACAACTACAGCGGAGAC-3')。以丁香 B 的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系 25.0 μ L: 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, cDNA 模板 2.0 μ L, ddH₂O 补足至 25.0 μ L。扩增程序: 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 进行 38 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 使用 DNA 回收试剂盒回收纯化目的片段。

1.4 OsLTPL108 蛋白生物信息学分析

借助 SMART 数据库与 Pfam 数据库对 OsLTPL108 蛋白进行预测分析, 明确其保守结构域分布及关键功能位点, 重点聚焦非特异性 LTP 家族特有的标志性结构域(8 个半胱氨酸组成的保守骨架)。采用 SignalP 6.0 预测 OsLTPL108 蛋白的信号肽和潜在切割位点。通过 ExPASy 数据库中的 ProtParam 工具计算 OsLTPL108 蛋白的相对分子量、理论等电点、氨基酸组成及稳定性指数等理化参数。采用 TMHMM-2.0 对 OsLTPL108 蛋白进行跨膜结构域预测, 设定跨膜概率阈值 > 0.5 作为潜在跨膜区域的判定标准(Krogh et al., 2001)。

1.5 OsLTPL108 基因原核表达载体构建

为消除跨膜结构域对原核表达的干扰, 本研究选取非跨膜结构域对应的 CDS 序列进行重组表达载体的构建。结合 pGEX-2T 载体多克隆位点, 设计含 BamH I、EcoR I 酶切位点的特异性引物(上游引物 KC9-F: 5'-CGGGATCCTGCCAAGCACCGGCACCAA-3'; 下游引物 KC9-R: 5'-CGGAATTCAACACA AACTACAGCGGAGAC-3')。用 BamH I 和 EcoR I 双酶切 OsLTPL108 基因片段和 pGEX-2T 载体, 分别切胶回收酶切产物, 按基因片段: 载体 = 8: 1 (分子个数比) 混合, 加入 T4 连接缓冲液和 T4 连接酶, 16 $^{\circ}$ C 水浴连接过夜。连接产物通过热激法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12~16 h。选取单菌落接种至 LB 液体培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养 12 h, 取菌液进行 PCR 鉴定。将 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行测序, 确保目的基因片段准确插入 pGEX-2T 载体。

1.6 OsLTPL108 蛋白外源表达及纯化

参考卿冬进等(2025)的方法: 将测序正确的 pGEX-2T-OsLTPL108 质粒通过热激法转化大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 感受态细胞, 涂布于 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h; 挑选单菌落接种至 5 mL LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养 12 h; 按 1: 100 体积比将种子菌液转接至 200 mL LB

液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 扩大培养至 OD_{600 nm} 为 0.6~0.8; 加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 18 $^{\circ}$ C、160 r/min 诱导表达 12~16 h。诱导结束后, 4 $^{\circ}$ C、10000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 40 mL GST Binding Buffer 重悬, 冰浴下超声波破碎细胞; 4 $^{\circ}$ C、10000 r/min 离心 20 min 收集上清液, 取 10 μ L 上清液与等体积 2 $\times$ 蛋白上样缓冲液混合, 用于 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测。

取 0.8 mL Glutathione Agarose Beads 4FF 树脂装入 15 mL 层析柱, 释放出保护缓冲液, 用 5~10 mL GST Binding Buffer 平衡树脂; 将蛋白上清液缓慢上柱, 收集流出液(穿流液); 用 5~10 mL 1 $\times$ GST Wash Buffer 洗脱杂蛋白, 再用 2 mL GST-Protein Elution Buffer(含 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽)洗脱目标蛋白。取纯化后目标蛋白洗脱液、菌体破碎上清液、过层析柱后的穿流液、pGEX-2T-OsLTPL108 未诱导菌体蛋白及 pGEX-2T-OsLTPL108 加 IPTG 诱导表达菌体蛋白各 10 μ L, 用于 SDS-PAGE 检测, 考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h, 脱色液脱色至条带清晰, 观察蛋白表达情况。

1.7 OsLTPL108 蛋白免疫印迹杂交验证

取纯化后目标蛋白洗脱组分(E1、E2)、纯化前菌体破碎上清液、pGEX-2T-OsLTPL108 未诱导菌体蛋白, 及 pGEX-2T-OsLTPL108 加 IPTG 诱导表达菌体蛋白各 20 μ L, 分别与 2 $\times$ Loading Buffer 按 1: 1 体积比混匀, 每份样品上样 2 μ L 进行 SDS-PAGE 检测, 将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜, 转膜结束后, 用含 1 $\times$ TBST 的 5% 脱脂奶粉在室温条件下封闭 2 h, 以达到封闭非特异性结合位点的目的。之后加入 GST 标签一抗(以含 1% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液稀释至 1: 5000), 常温孵育 1 h; 次日用 1 $\times$ TBST 缓冲液振荡洗涤 3 次, 每次 15 min。再加入 Mouse 二抗(用含 1% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液稀释至 1: 50000), 室温孵育 1 h 后用 1 $\times$ TBST 缓冲液振荡洗涤 3 次, 每次 10 min。最后使用增强型化学发光(ECL)试剂盒显影, 经显影仪曝光得到目标胶片。

1.8 OsLTPL108 蛋白质谱鉴定

SDS-PAGE 检测后切取 40~60 kD 的目标蛋白条带, 参考 Li 等(2009)的方法进行胶内胰酶消化, 获得蛋白多肽; 用 Triple TOF5600 质谱仪分析多肽氨基酸序列, 将其与水稻蛋白质数据库进行比对, 验证目标蛋白的正确性。

1.9 OsLTPL108 蛋白亚细胞定位

参考未丽和刘建利(2021)的方法, 将 OsLTPL108 基因全长序列中去除终止子 TAA 后的序列(474 bp)

用于亚细胞定位载体构建。根据克隆得到的 *OsLTPL108* 基因序列,设计含 *Bam*H I 酶切位点的 *OsLTPL108* 基因全长的引物(上游引物 KC9-cGFP-F: 5'-ATATCCAGATCCAGTGGGATCCATGGCAAGCAAACAGGCAAT-3';下游引物 KC9-cGFP-R: 5'-TTGGTACCGAGCTCACCCGGGGATCCAACACAACTACAGCGGAGACT-3')。以丁香 B 的 cDNA 为模板,PCR 扩增 *OsLTPL108* 基因全长序列,PCR 产物用 *Bam*H I 酶切后纯化回收,与同样 *Bam*H I 酶切后的 pRHVcGFP 载体连接。连接产物通过热激法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h;挑选单菌落进行 PCR 鉴定,取阳性菌液,抽提其质粒并测序,测序正确的载体命名为 pRHV-*OsLTPL108*-cGFP。

选取培养 10~16 d 的黄化水稻苗,切成 0.5 mm 小段,加入甘露醇中孵育 10 min;过滤后加入 10 mL 酶解液,避光孵育 5 h;加入 5 mL W5 溶液(含 154 mmol/L NaCl, 125 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L KCl, 2 mmol/L MES, pH 5.7),振荡 15 s 后过滤,100 $\times$ g 离心 5 min 收集原生质体;用 W5 溶液重悬原生质体,再次 100 $\times$ g 离心 5 min,最终用 1 mL Mannitol-Magnesium solution (MMG) 溶液(含 0.4 mol/L 甘露醇, 15 mmol/L MgCl₂, 4 mmol/L MES, pH 5.7)重悬。将 pRHV-*OsLTPL108*-cGFP 载体(10 μ g)与内质网 Marker(已知的内质网的蛋白融合 RFP 标签的载体 pCAMBIA1300-*OsHLP1*-mCherry)(10 μ g)共同转入原生质体,避光培养 16 h;取原生质体滴于载玻片上,用激光共聚焦显微镜观察荧光信号。激光共聚焦显微镜检测参数:GFP 通道最大激发波长为 488 nm,发射波长为 509 nm;mCherry 通道最大激发波长为 587 nm,发射波长为 610 nm。

2 结果与分析

2.1 *OsLTPL108* 基因克隆及测序结果

提取水稻品种丁香 B 的总 RNA,结果(图 1-A)显示,28S rRNA 与 18S rRNA 条带清晰,无明显降解,OD_{260 nm}/OD_{280 nm}=1.92,说明总 RNA 质量合格,可用于 cDNA 合成。以 cDNA 为模板、KC9-F 和 KC9-R 为引物对 *OsLTPL108* 基因进行 PCR 扩增,结果(图 1-B)显示,PCR 扩增获得单一条带,长度约 500 bp。将 PCR 产物测序后进行序列比对,结果显示,*OsLTPL108* 基因片段长度为 477 bp,与 RGAP 数据库中粳稻登录号为 LOC_Os03g14654 的基因 CDS 序列完全一致。

2.2 *OsLTPL108* 基因生物信息学分析结果

OsLTPL108 基因编码 158 个氨基酸残基,蛋白相对分子量为 15.66 kD,理论等电点为 8.7。*OsLTPL108* 蛋白的核心区域(第 30~120 位氨基酸)含有 1 个完整的非特异性 LTP 家族标志性结构域(Pfam 登录号 PF14368),包含 8 个高度保守的半胱氨酸残基,这些残基可通过 4 个二硫键维系蛋白的疏水空腔构象,为其潜在的脂质结合与转运功能提供结构基础,与 LTP 家族蛋白的典型结构特征一致,推测这些保守的半胱氨酸残基对其维持稳定的三级结构及发挥生物学功能至关重要。由图 2-A 可知,*OsLTPL108* 蛋白的 N 端第 1~30 位氨基酸区域预测为跨膜结构域;第 31~158 位氨基酸区域预测为非跨膜结构域。仅 N 端有 1 个疏水区,这个区域可能是疏水信号肽,不代表该蛋白是膜蛋白。利用 SignalP 6.0 进行信号肽预测分析,结果(图 2-B)显示,*OsLTPL108* 蛋白的 N 端第 1~24 位氨基酸构成典型信号肽序列,预测概率为 0.99,推测该蛋白属于分泌型蛋白。亚细胞定位预测结果也显示,*OsLTPL108* 蛋白定位于细胞外。

2.3 *OsLTPL108* 基因原核表达载体构建结果

为了防止该疏水区域对蛋白表达产生影响,选取第 31~158 位氨基酸对应的编码基因序列(384 bp)用于原核表达载体构建。PCR 扩增获得的 *OsLTPL108* 基因和 pGEX-2T 载体均用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切,将目的片段与 pGEX-2T 载体纯化后,用 T4 连接酶连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。挑选单菌落扩大培养后,提取质粒进行 PCR 鉴定,结果(图 3)显示,目的基因片段约为 500 bp,与预期结果相符。测序结果显示,载体上插入的基因序列正确,表明成功构建原核表达载体 pGEX-2T-*OsLTPL108*,可用于后续目的蛋白的纯化试验。

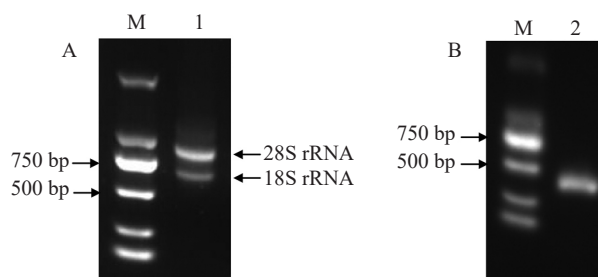


图1 总 RNA 提取(A)及 *OsLTPL108* 基因扩增产物检测(B)
Fig. 1 Total RNA extraction (A) and amplification product detection of *OsLTPL108* gene (B)
M: DL2000 DNA Marker; 1: 总 RNA 样品; 2: *OsLTPL108* 基因 PCR 产物
M: DL2000 DNA Marker; 1: Total RNA sample; 2: PCR product of *OsLTPL108* gene

2.4 OsLTPL108蛋白外源表达及纯化

将 pGEX-2T-OsLTPL108 质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,筛选出阳性单克隆菌落,接种到 5 mL 液体 LB 培养基中,37 °C 过夜培养后,再取 2 mL 菌液转接至 200 mL 的液体 LB 培养基中扩大培养,至 $OD_{600\text{nm}}$ 为 0.6~0.8 时,添加 IPTG 使终浓度达到 0.1 mmol/L,18 °C 过夜培养以诱导目的蛋白的高效表达。SDS-PAGE 电泳检测结果(图4)显示,加入 IPTG 的菌液样品与未加 IPTG 诱导的菌液样品在 41 kD 附近区域内存在明显的蛋白条带差异。将培养的 200 mL 菌液离心后收集沉淀,加入 1×GST Bind Buffer 溶解菌体,用超声波破碎仪破碎细菌细胞,离心后收集上清蛋白,与 Glutathione Agarose Beads 4FF 树脂结合后加入 1×GST Wash Buffer 洗脱非特异性结合的蛋白,用 GST-Protein Elution Buffer 洗脱 GST-OsLTPL108 融合蛋白,用 1.5 mL 收集管收集。取超声破碎的上清液、过层析柱后的穿流液

和洗脱液(2管,标记为 E1 和 E2)各 10 μL 进行 SDS-PAGE 检测,结果(图4)显示,GST-OsLTPL108 融合蛋白可与 Glutathione Agarose Beads 4FF 树脂结合,并能被洗脱,表明外源表达并纯化的 OsLTPL108 蛋白可用于后续蛋白抗体制备。

2.5 OsLTPL108蛋白免疫印迹杂交验证结果

为进一步了解亲和层析纯化获得的 GST-OsLTPL108 融合蛋白特异性和纯度,采用蛋白免疫印迹杂交试验进行验证,结果(图5)显示,超声破碎后的上清液在 41 kD 附近区间出现较弱的特异性条带,与 SDS-PAGE 结果一致,该条带为未纯化的 GST-OsLTPL108 融合蛋白,而纯化后的洗脱液在 41 kD 左右出现特异性条带,与 GST-OsLTPL108 融合蛋白的理论分子量(39.64 kD)相符,呈现出清晰且单一的特异性条带,未出现杂带干扰现象;超声破碎后的上清液中 25 kD 附近出现微弱的特异性条带,与 GST 蛋白大小相符,31 kD 附近出现的特异性条带为 GST-

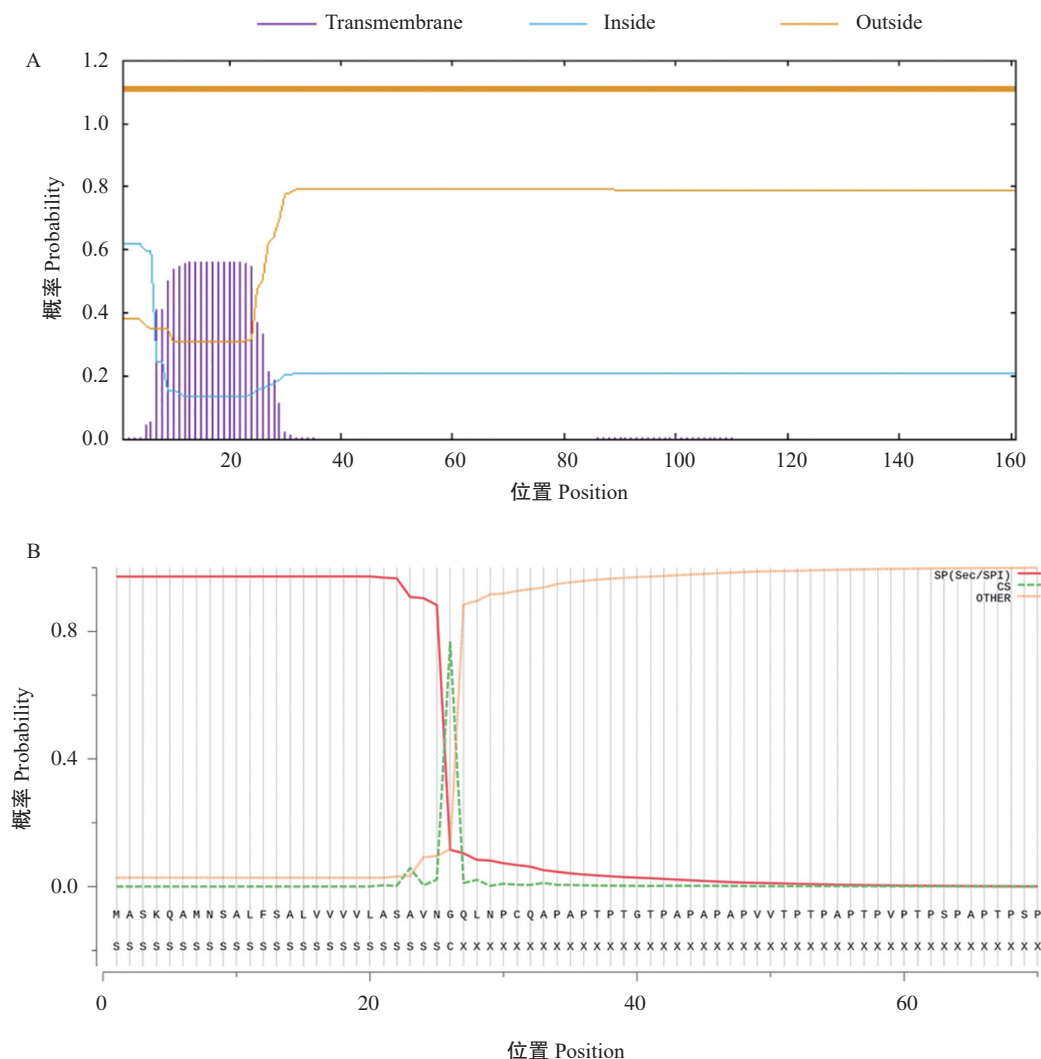


图2 OsLTPL108蛋白跨膜结构域(A)及信号肽(B)预测

Fig. 2 Prediction of transmembrane domain (A) and signal peptide (B) of OsLTPL108 protein

OsLTPL108融合蛋白降解后形成的片段。上述结果表明通过谷胱甘肽亲和层析纯化得到的蛋白即为目标 GST-OsLTPL108 融合蛋白,且蛋白纯度较高,能排除杂蛋白污染的可能性,同时进一步印证了 SDS-PAGE 检测结果的可靠性,为后续 OsLTPL108

蛋白多克隆抗体制备及蛋白互作研究提供了合格的蛋白样品。

2.6 OsLTPL108 蛋白质谱鉴定

为进一步验证纯化获得的外源表达蛋白是否正确,将纯化的 GST-OsLTPL108 融合蛋白进行 SDS-PAGE 检测,切取 41 kD 区域凝胶最明显的一条蛋白条带,用胶内胰酶消化方法处理后获得的多肽样品用于蛋白质谱定性分析。GST-OsLTPL108 融合蛋白上的胰蛋白酶酶切位点共计 36 个,其中包括 26 个赖氨酸(K)位点、10 个精氨酸(R)位点。通过蛋白质谱仪上获取的氨基酸序列与水稻蛋白质数据库进行比对分析,结果(图 6)显示,质谱鉴定到 35 条特异性匹配 GST-OsLTPL108 融合蛋白的肽段,其中覆盖 OsLTPL108 蛋白的目的肽段(即 212 个氨基酸残基),占融合蛋白氨基酸总数(365 个)的 58.08%。在水稻蛋白质数据库中搜索肽段对应的水稻蛋白编号,结果显示,3 条肽段(CPLALINLK、VNALVNVN-NVKVNIPDILK、VNALVNVNNVK)与数据库的 OsLTPL108 蛋白匹配。质谱鉴定到的肽段属于 GST-OsLTPL108 融合蛋白,证明外源表达纯化的目标蛋白完全正确。

2.7 OsLTPL108 蛋白亚细胞定位结果

以 cDNA 为模板、KC9-cGFP-F 和 KC9-cGFP-R 为上、下游引物,对 *OsLTPL108* 基因进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测发现,呈现单一特异性条带,其相对分子量约为 500 bp(图 7-A)。将 PCR 产物连接至 pRHVcGFP 载体,并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取单菌落,提取其质粒进行菌液 PCR 鉴定,结果显示,扩增条带大小约为 500 bp(图 7-B),与预期相符。经进一步测序鉴定证明 *OsLTPL108* 基因序列已连接至载体 pRHVcGFP 载体上,成功构建 pRHV-*OsLTPL108*-cGFP 亚细胞定位载体。

取培养 7 d 的黄花水稻苗提取原生质体,利用 PEG4000 介导的方法将 pRHV-*OsLTPL108*-cGFP 载体转化水稻原生质体,黑暗培养 12~16 h 后制片,在激光共聚焦显微镜下观察,结果发现,含空载体 pRHVcGFP 的水稻原生质体中绿色荧光信号呈弥散分布;而含 pRHV-*OsLTPL108*-cGFP 的水稻原生质体中绿色荧光信号呈网状分布,且与含 pCAM-BIA1300-*OsHLP1*-mCherry 的水稻原生质体中红色荧光信号完全重叠(图 8),表明 OsLTPL108 蛋白定位于水稻细胞的内质网,由于内质网是植物脂质合成主要场所,推测为 OsLTPL108 蛋白发挥脂质转运的功能。

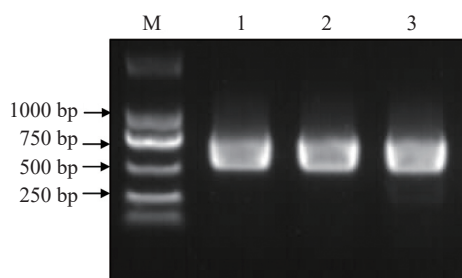


图 3 pGEX-2T-*OsLTPL108* 重组质粒 PCR 检测结果
Fig. 3 PCR detection results of recombinant plasmids of pGEX-2T-*OsLTPL108*

M: DL2000 DNA Marker; 1~3: pGEX-2T-*OsLTPL108* 重组质粒 PCR 产物

M: DL2000 DNA Marker; 1~3: PCR product of recombinant plasmid pGEX-2T-*OsLTPL108*

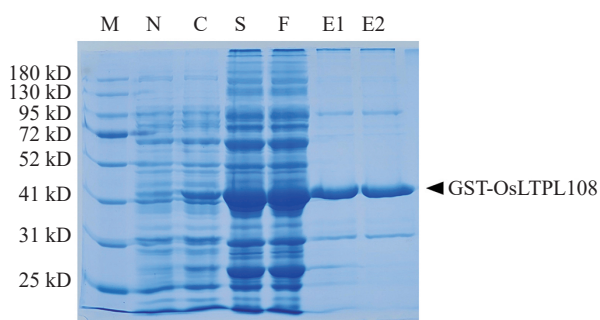


图 4 SDS-PAGE 检测 OsLTPL108 蛋白外源表达情况

Fig. 4 Exogenous expression of OsLTPL108 protein detected by SDS-PAGE

M: 蛋白 Marker; N: 未加 IPTG 诱导的菌液样品; C: 加入 IPTG 的菌液样品; S: 超声破碎后的上清液; F: 过层析柱后的流穿液; E1 和 E2: 洗脱液管 1 和洗脱液管 2。图 5 同

M: Protein Marker; N: Bacterial culture sample without IPTG induction; C: Bacterial culture sample with IPTG; S: Supernatant after ultra-sonication; F: Flow-through after chromatography; E1 and E2: Elution tube 1 and Elution tube 2. The same was applied in Fig. 5

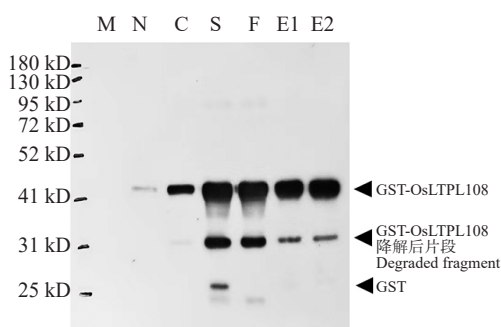


图 5 OsLTPL108 蛋白特异性和纯度检测

Fig. 5 Detection of specificity and purity of OsLTPL108 protein

3 讨论

脂质转移蛋白广泛分布于植物、动物和微生物中,是植物生命活动中一类重要的活性蛋白,能参与植物信号转导、花粉发育及种子发育成熟等多种生物学进程,而影响水稻种子发育及稻米品质的LTPs报道很少(赵敏章等,2025)。本课题组前期通过TMT定量蛋白组学方法发现,OsLTPL108蛋白在广

西长粒水稻保持系中高表达(Qing et al.,2023),推测其参与粒型调控。本研究将OsLTPL108蛋白在原核表达系统中进行表达,并纯化目的蛋白,用于蛋白免疫印迹杂交试验。大肠杆菌因操作简便、繁殖周期短,是外源蛋白表达的常用宿主,但水稻疏水蛋白的可溶性表达常受跨膜结构域、蛋白折叠效率限制(朱红裕和李强,2006;刘新琼等,2015;冉乐等,2024)。为突破这一瓶颈,本研究通过TMHMM-2.0

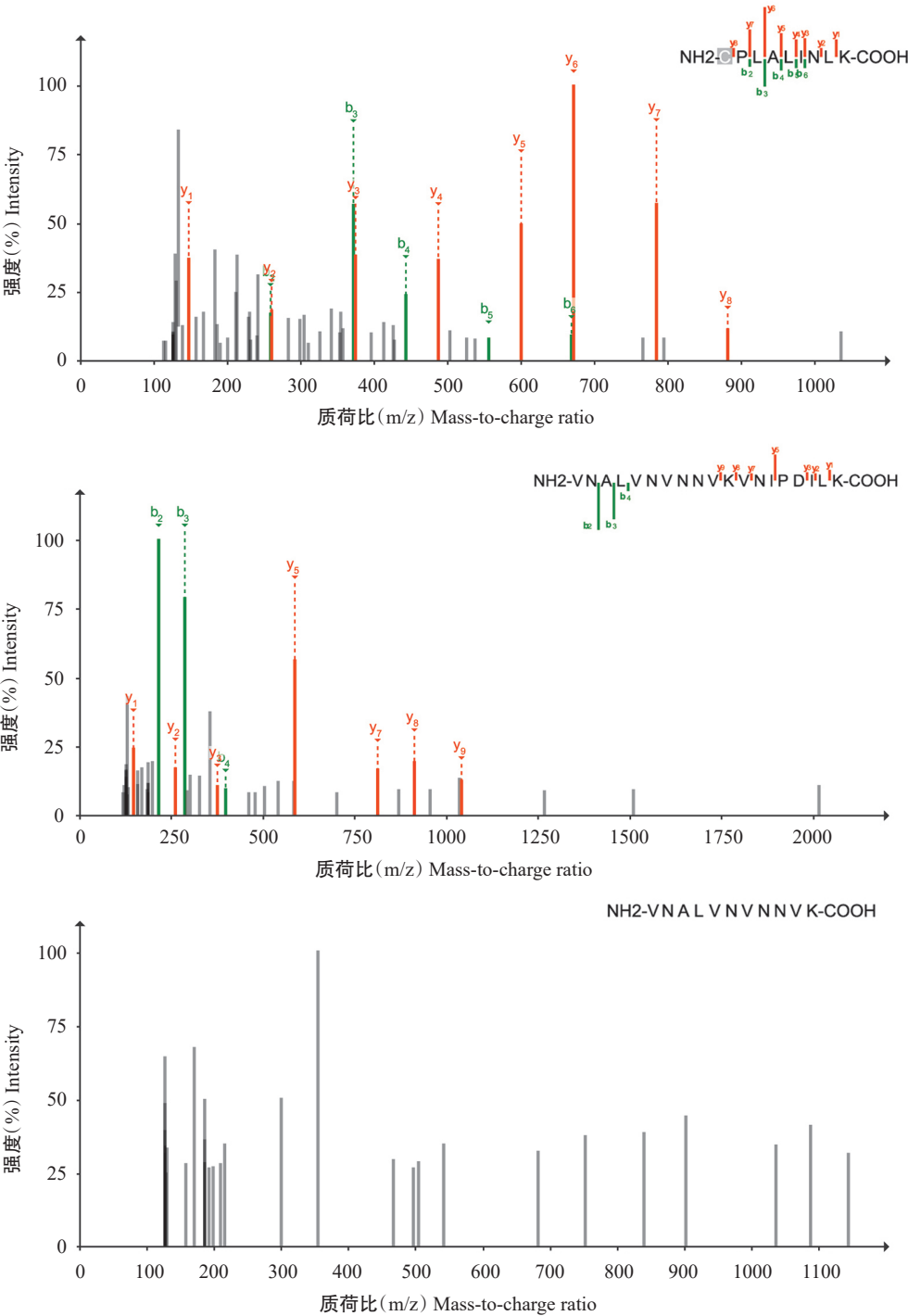


图6 质谱分析鉴定的多肽二级图谱

Fig.6 Secondary spectrum of polypeptides identified by mass spectrometry analysis

预测 OsLTPL108 蛋白的跨膜结构域,选取第 31~158 位氨基酸对应的编码基因序列(384 bp)进行原核表达载体构建,经转化诱导后发现 *OsLTPL108* 蛋白在大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 菌株中诱导表达效果较好,最优诱导条件为 18 °C、0.1 mmol/L IPTG 低温诱导过夜。这一表达策略与卿冬进等(2023)研究水稻冷胁迫响应蛋白 OsCML16 的思路基本一致,即低温减缓翻译速率,降低蛋白错误折叠概率(张建军等, 2021; De Coninck et al., 2025),且大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 菌株的稀有密码子补充系统可提升可溶性蛋白的表达效率。然而,本研究在蛋白纯化过程中发现,过层析柱穿流液中仍残留大量的融合蛋白,推测与层析柱的结合容量不足有关,后续可通过增加层析柱中树脂用量及优化上样流速进行改善。此外,本研究蛋白免疫印迹杂交试验发现,除 41 kD 的目标条带外,31 kD 左右出现小分子条带,该降解产物可被 GST 抗体识别,暗示切割位点位于 OsLTPL108 蛋白片段内部

而非 GST 标签,这一机制与 Li 等(2005)在番茄 LEACS2 蛋白研究中观察到的蛋白酶切割导致功能域分离现象类似,该研究发现番茄金属蛋白酶可切割 LEACS2 的羧基端产生截短片段。因此,推测该条带与 OsLTPL108 蛋白第 102~110 位的脯氨酸—丙氨酸重复序列易被蛋白酶降解有关。

本研究质谱鉴定结果显示,虽然 GST 标签蛋白序列覆盖较完整,但仅检测到 3 条 OsLTPL108 特异性肽段,结合胰蛋白酶酶切位点分析发现,OsLTPL108 蛋白存在 2 段长达 34 个氨基酸的连续无酶切位点序列。已有研究表明,肽段长度超过 30 个氨基酸时,其在质谱中的离子化效率与碎裂效率会显著下降(Li et al., 2009),可能导致该区域无法被有效检测。类似现象在玉米 LTP 蛋白质质谱鉴定中也有报道(Fang et al., 2023),后续可尝试 Lys-C 单酶切或胰蛋白酶与 Lys-C 组合酶切,以覆盖更多蛋白区域、提升鉴定完整性。

本研究亚细胞定位结果显示,OsLTPL108-GFP 融合蛋白的荧光信号与内质网标记蛋白 OsHLP1-mCherry 明显重叠,表明 OsLTPL108 蛋白主要定位于水稻细胞的内质网。这一定位特征与水稻其他粒型调控蛋白的亚细胞定位结果相互印证,如 Li 等(2023a)研究发现,内质网相关降解途径的 E2 泛素结合酶 SMG3 与 E3 泛素连接酶 DGS1 共定位于内质网,通过调控油菜素内酯(BR)受体 BRI1 的稳定性参与粒型调控;Zhou 等(2023)则研究发现,MATE 家族转运蛋白 SMG4 主要定位于内质网,并通过 COP II 囊泡转运通路调控颖壳细胞扩张,进而影响籽粒大小,据上述研究推测内质网是水稻粒型调控蛋白的重要功能场所之一。从功能关联来看,内质网是植物脂质合成与转运的关键细胞器,而定位于内质网的 LTPs 可能通过调控细胞壁合成所需脂质的供应,影响植物细胞的分裂和伸长,而水稻粒型的形成直接依赖于颖壳细胞的分裂和伸长(Zhou et al.,

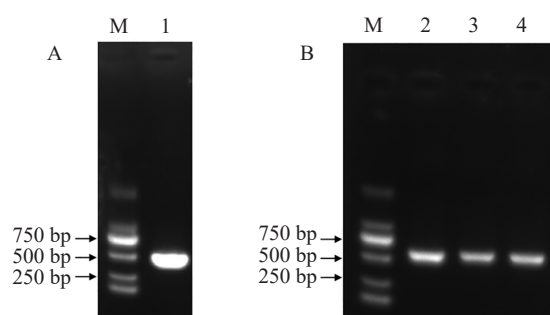


图 7 *OsLTPL108* 基因全长扩增(A)及其亚细胞定位载体验证(B)结果

Fig. 7 Results of full-length amplification of *OsLTPL108* gene (A) and verification of its subcellular localization vector (B)

M: DL2000 DNA Marker; 1: *OsLTPL108* 基因扩增产物; 2~4: pRHV-*OsLTPL108*-cGFP 亚细胞定位载体扩增产物

M: DL2000 DNA Marker; 1: Amplification product of *OsLTPL108* gene; 2~4: Amplification product of subcellular localization vector pRHV-*OsLTPL108*-cGFP

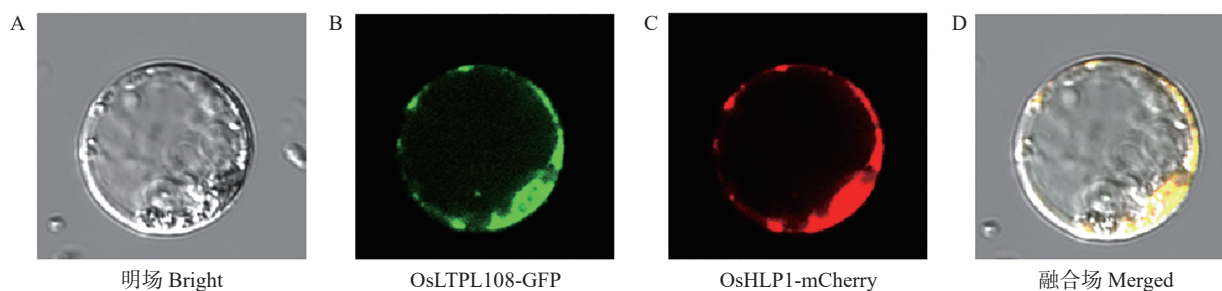


图 8 *OsLTPL108* 蛋白在水稻原生质体中亚细胞定位分析

Fig. 8 Subcellular localization analysis of *OsLTPL108* protein in rice protoplast

2023; Guo et al., 2025)。OsLTPL108 含有 LTP 家族典型的脂质结合结构域及 1 个疏水性的 N 端信号肽, 该信号肽的主要功能是引导新生肽链进入内质网腔, 并促进成熟蛋白向胞外分泌。因此推测内质网主要负责该蛋白的合成和初步加工, 而其最终行使功能的场所可能在细胞外、细胞膜或其他特定区。在此基础上推测, OsLTPL108 蛋白通过在特定功能位点介导脂质转运, 从而间接调控水稻颖壳细胞的发育和形态建成, 并最终影响籽粒的粒型。后续将 pRHV-OsLTPL108-cGFP 融合蛋白载体遗传转化水稻材料, 在转基因材料中观察荧光位置, 从而在水稻植株体内分析 OsLTPL108 蛋白的表达部位。

4 结论

OsLTPL108 属于分泌型蛋白, 通过添加助溶标签 GST 可利用原核表达系统获得高纯度的可溶性融合蛋白, 可用于后续的植物抗体制备。OsLTPL108 蛋白定位于水稻细胞的内质网, 由于内质网是植物脂质合成主要场所, 推测 OsLTPL108 蛋白发挥脂质转运的功能。

参考文献(References):

冯海洋, 刘康伟, 代强, 王冷静, 王孝峰, 张超, 于恒秀. 2025. 水稻粒型调控研究进展[J]. 江苏农业科学, 53(21): 10-16. [Feng H Y, Liu K W, Dai Q, Wang J L, Wang X F, Zhang C, Yu H X. 2025. Research progress on grain shape regulation of rice [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 53(21): 10-16.] doi: 10.15889/j.issn.1002-1302.2025.21.002.

郭韬, 余泓, 邱杰, 李家洋, 韩斌, 林鸿宣. 2019. 中国水稻遗传学研究进展与分子设计育种[J]. 中国科学: 生命科学, 49(10): 1185-1212. [Guo T, Yu H, Qiu J, Li J Y, Han B, Lin H X. 2019. Advances in rice genetics and breeding by molecular design in China [J]. Scientia Sinica (Vitae), 49(10): 1185-1212.] doi: 10.1360/SSV-2019-0209.

黄海洋, 钱前. 2017. 水稻粒形遗传与长粒型优质粳稻育种进展[J]. 中国水稻科学, 31(6): 665-672. [Huang H X, Qian Q. 2017. Progress in genetic research of rice grain shape and breeding achievements of long-grain shape and good quality japonica rice [J]. Chinese Journal of Rice Science, 31(6): 665-672.] doi: 10.16819/j.1001-7216.2017.7115.

刘芳, 卢长明. 2013. 植物非特异脂质转运蛋白研究现状与展望[J]. 遗传, 35(3): 307-314. [Liu F, Lu C M. 2013. An overview of non-specific lipid transfer protein in plant [J]. Hereditas (Beijing), 35(3): 307-314.] doi: 10.3724/SP.J.1005.2013.00307.

刘喜, 牟昌铃, 周春雷, 程治军, 江玲, 万建民. 2018. 水稻粒型基因克隆和调控机制研究进展[J]. 中国水稻科学, 32(1): 1-11. [Liu X, Mu C L, Zhou C L, Cheng Z J, Jiang L, Wan J M. 2018. Research progress on gene cloning and regulatory mechanisms of rice grain shape genes [J]. Chinese Journal of Rice Science, 32(1): 1-11.] doi: 10.16819/

j.1001-7216.2018.7016.

刘晓灿, 汪笑峰, 葛晓春, 曹凯鸣. 2006. 水稻类非特异脂质转移蛋白 OSDIR 的表达和纯化[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 24(1): 75-78. [Liu X C, Wang X F, Ge X C, Cao K M. 2006. Expression and purification of a rice non-specific lipid transfer protein homologue OSDIR [J]. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition), 24(1): 75-78.] doi: 10.16088/j.issn.1001-6600.2006.01.020.

刘新琼, 徐玮玉, 刘早利, 陈亚红, 程钢. 2015. 水稻 OsAAA1 蛋白的原核表达载体构建及其可溶性表达研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 34(2): 18-22. [Liu X Q, Xu W Y, Liu Z L, Chen Y H, Cheng G. 2015. Research on the construction and soluble expression of prokaryotic expression vector of OsAAA1 protein from rice [J]. Journal of South-Central Minzu University (Natural Science Edition), 34(2): 18-22.] doi: 10.3969/j.issn.1672-4321.2015.02.005.

卿冬进, 邓国富, 戴高兴, 潘英华, 陆春菊, 李经成, 周维永, 陈韦韦, 梁海福, 陈荣林. 2023. 水稻冷胁迫响应蛋白 OsCML16 的外源表达、纯化及质谱验证[J]. 西南农业学报, 36(6): 1150-1156. [Qing D J, Deng G F, Dai G X, Pan Y H, Lu C J, Li J C, Zhou W Y, Chen W W, Liang H F, Chen R L. 2023. Exogenous expression, purification and mass spectrometry validation of rice cold stress responsive protein OsCML16 [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 36(6): 1150-1156.] doi: 10.16213/j.cnki.scjas.2023.6.004.

卿冬进, 卢柏亦, 彭宇婧, 戴高兴, 陈韦韦, 李经成, 周维永, 黄所生, 潘英华, 黄娟, 邓国富. 2025. 水稻抗褐飞虱基因 Bph3 调控蛋白 B8AK41 的外源表达、纯化及亚细胞定位[J]. 西南农业学报, 38(1): 107-114. [Qing D J, Lu B Y, Peng Y J, Dai G X, Chen W W, Li J C, Zhou W Y, Huang S S, Pan Y H, Huang J, Deng G F. 2025. Exogenous expression, purification and subcellular localization of the rice brown planthopper resistant gene Bph3 regulated protein B8AK41 [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 38(1): 107-114.] doi: 10.16213/j.cnki.scjas.2025.1.012.

冉乐, 郭小浩, 黄冉涛, 舒庆尧, 郭芾. 2024. 水稻 OsAFB4 蛋白原核表达体系创建[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 50(6): 827-837. [Ran L, Guo X H, Huang R T, Shu Q Y, Guo F. 2024. Establishment of the prokaryotic expression system for OsAFB4 protein in rice [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 50(6): 827-837.] doi: 10.3785/j.issn.1008-9209.2023.10.312.

孙琳琳. 2021. 参与防御褐飞虱的水稻 nsLTPs 基因的筛选克隆及功能初探[D]. 杭州: 浙江大学. [Sun L L. 2021. Selection, cloning and functional analysis of rice nsLTPs genes involved in brown planthopper defense [D]. Hangzhou: Zhejiang University.] doi: 10.27461/d.cnki.gzjdx.2021.003103.

田爱梅, 曹家树. 2008. 植物脂质转移蛋白[J]. 细胞生物学杂志, (4): 483-488. [Tian A M, Cao J S. 2008. Lipid transfer proteins in plants [J]. Chinese Journal of Cell Biology, (4): 483-488.] doi: 10.3969/j.issn.1674-7666.2008.04.015.

未丽, 刘建利. 2021. 植物蛋白质亚细胞定位相关研究概述[J]. 植物科学学报, 39(1): 93-101. [Wei L, Liu J L. 2021. Overview of research on protein subcellular localization in

- plants[J]. *Plant Science Journal*, 39(1): 93-101. doi: 10.11913/PSJ.2095-0837.2021.10093.
- 张建军, 胥华伟, 周晓垂, 王玉琪, 彭新湘. 2021. 水稻乙醇酸氧化酶基因 *OsGLO1* 的原核表达及多克隆抗体制备[J]. *华南农业大学学报*, 31(3): 113-115. [Zhang J J, Xu H W, Zhou X C, Wang Y Q, Peng X X. 2021. Prokaryotic expression and preparation of polyclonal antibody of glycolate oxidase gene *OsGLO1* from rice [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 31(3): 113-115.] doi: 10.3969/j.issn.1001-411X.2010.03.028.
- 赵敏章, 常忠原, 许守领, 洪丽兰. 2025. 非特异性脂质转运蛋白在水稻中的研究进展[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 51(2): 327-336. [Zhao M Z, Chang Z Y, Xu S L, Hong L L. 2025. Research progress of non-specific lipid transfer proteins in rice[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 51(2): 327-336.] doi: 10.3785/j.issn.1008-9209.2024.03.182.
- 周炎, 樊帆, 雷东阳, 卢学丹. 2021. 水稻逆境响应蛋白OsSGL的生物信息学分析及原核表达条件优化[J]. *分子植物育种*, 19(5): 1531-1540. [Zhou Y, Fan F, Lei D Y, Lu X D. 2021. Bioinformatics analysis and optimization of protein expression in prokaryotic system of rice stress responsive protein OsSGL[J]. *Molecular Plant Breeding*, 19(5): 1531-1540.] doi: 10.13271/j.mpb.019.001531.
- 朱红裕, 李强. 2006. 外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达策略[J]. *过程工程学报*, 6(1): 150-155. [Zhu H Y, Li Q. 2006. Strategies for expression of soluble heterologous proteins in *Escherichia coli* [J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 6(1): 150-155.] doi: 10.3321/j.issn: 1009-606X.2006.01.034.
- Ahmed S M, Liu P, Xue Q H, Ji C A, Qi T, Guo J, Guo J, Kang Z S. 2017. TaDIR1-2, a wheat ortholog of lipid transfer protein AtDIR1 contributes to negative regulation of wheat resistance against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 8: 521. doi: 10.3389/fpls.2017.00521.
- Chae K, Kieslich C A, Morikis D, Kim S C, Lord E M. 2009. A gain-of-function mutation of *Arabidopsis* lipid transfer protein 5 disturbs pollen tube tip growth and fertilization[J]. *The Plant Cell*, 21(12): 3902-3914. doi: 10.1105/tpc.109.070854.
- Chen L B, Ji C H, Zhou D G, Gou X, Tang J N, Jiang Y J, Han J L, Liu Y G, Chen L T, Xie Y Y. 2022. *OsLTP47* may function in a lipid transfer relay essential for pollen wall development in rice [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 49(5): 481-491. doi: 10.1016/j.jgg.2022.03.003.
- De Coninck T, Vanhaeren H, Van Damme E J M. 2025. The achilles heel of protein biochemistry: Insolubility of recombinant proteins-A case study about producing a rice enzyme[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(18): 8974. doi: 10.3390/ijms26188974.
- Edstam M M, Laurila M, Höglund A, Raman A, Dahlström K M, Salminen T A, Edqvist J, Blomqvist K. 2014. Characterization of the GPI-anchored lipid transfer proteins in the moss *Physcomitrella patens* [J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 75: 55-69. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.12.001.
- Fang C W, Wu S W, Li Z W, Pan S S, Wu Y R, An X L, Long Y, Wei X, Wan X Y. 2023. A systematic investigation of lipid transfer proteins involved in male fertility and other biological processes in maize [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2): 1660. doi: 10.3390/ijms24021660.
- Fujino K, Sekiguchi H, Matsuda Y, Sugimoto K, Ono K, Yano M. 2008. Molecular identification of a major quantitative trait locus, *qLTG3-1*, controlling low-temperature germinability in rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34): 12623-12628. doi: 10.1073/pnas.0805303105.
- Guo L, Yang H B, Zhang X Y, Yang S H. 2013. *Lipid transfer protein 3* as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 64(6): 1755-1767. doi: 10.1093/jxb/ert040.
- Guo X L, Li Y, Song J Y, Xu K, Xu C X, Li H T, Zhang B M, Yuan W Y. 2025. *PDIL2-3* encoding a protein disulfide isomerase-like enzyme is essential for grain yield and appearance quality in rice [J]. *Crop Journal*, 13(3): 727-739. doi: 10.1016/j.cj.2025.02.011.
- He L, Chen T, Liang W H, Zhao C F, Zhao L, Yao S, Zhou L H, Zhu Z, Zhao Q Y, Lu K, Wang C L, Zhu L, Zhang Y D, Fajkus J. 2024. The RING-type domain-containing protein GNL44 is essential for grain size and quality in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1): 589. doi: 10.3390/ijms25010589.
- Hollenbach B, Schreiber L, Hartung W, Dietz K J. 1997. Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: Implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly [J]. *Planta*, 203(1): 9-19. doi: 10.1007/s00050159.
- Kader J C. 1996. Lipid-transfer proteins in plants [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1): 627-654. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.627.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer E L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes [J]. *Journal of Molecular Biology*, 305(3): 567-580. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315.
- Li H, Wong W S, Zhu L, Guo H W, Ecker J, Li N. 2009. Phosphoproteomic analysis of ethylene-regulated protein phosphorylation in etiolated seedlings of *Arabidopsis* mutant *ein2* using two-dimensional separations coupled with a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer [J]. *Proteomics*, 9(6): 1646-1661. doi: 10.1002/pmic.200800420.
- Li J F, Qi R, Qu L H, Mattoo A K, Li N. 2005. Cleavage of the carboxyl-terminus of LEACS2, a tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase isomer, by a 64-kD tomato metalloprotease produces a truncated but active enzyme [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(11): 1352-1363. doi: 10.1111/j.1744-7909.2005.00162.x.
- Li J, Zhang B L, Duan P G, Yan L, Yu H Y, Zhang L M, Li N, Zheng L Y, Chai T Y, Xu R, Li Y H. 2023a. An endoplasmic reticulum-associated degradation-related E2-E3 enzyme pair controls grain size and weight through the brassinosteroid signaling pathway in rice [J]. *The Plant Cell*, 35(3): 1076-1091. doi: 10.1093/plcell/koac364.
- Li N, Li Y H. 2016. Signaling pathways of seed size control in plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 33: 23-32.

- doi:10.1016/j.pbi.2016.05.008.
- Li N, Xu R, Duan P G, Li Y H. 2018. Control of grain size in rice[J]. *Plant Reproduction*, 31(3): 237-251. doi: 10.1007/s00497-018-0333-6.
- Li Q L, Zhai W X, Wei J P, Jia Y F. 2023b. Rice lipid transfer protein, OsLTPL23, controls seed germination by regulating starch-sugar conversion and ABA homeostasis [J]. *Frontiers in Genetics*, 14: 1111318. doi: 10.3389/fgene.2023.1111318.
- Li Y Y, Guo L N, Cui Y, Yan X, Ouyang J, Li S B. 2023c. Lipid transfer protein, OsLTPL18, is essential for grain weight and seed germination in rice[J]. *Gene*, 883: 147671. doi: 10.1016/j.gene.2023.147671.
- Lin K C, Wu T M, Chandrika N N P, Chou S J, Hong C Y. 2017. Molecular characterization and subcellular localization of salt-inducible lipid transfer proteins in rice[J]. *Biologia Plantarum*, 61(3): 501-510. doi: 10.1007/s10535-016-0671-x.
- Liu F, Zhang X B, Lu C M, Zeng X H, Li Y J, Fu D H, Wu G. 2015a. Non-specific lipid transfer proteins in plants: Presenting new advances and an integrated functional analysis [J]. *Journal of Experimental Botany*, 66(19): 5663-5681. doi: 10.1093/jxb/erv313.
- Liu S Y, Hua L, Dong S J, Chen H Q, Zhu X D, Jiang J E, Zhang F, Li Y H, Fang X H, Chen F. 2015b. OsMAPK6, a mitogen-activated protein kinase, influences rice grain size and biomass production [J]. *The Plant Journal*, 84: 672-681. doi: 10.1111/tpj.13025.
- Liu X H, Shangguan Y Y, Zhu J J, Lu Y Q, Han B. 2013. The rice *OsLTP6* gene promoter directs anther-specific expression by a combination of positive and negative regulatory elements[J]. *Planta*, 238(5): 845-857. doi: 10.1007/s00425-013-1934-9.
- Long Q, Qiu S C, Man J M, Ren D H, Xu N, Luo R. 2023. *OsAAIL* increases rice yield and drought tolerance dependent on ABA-mediated regulatory and ROS scavenging pathway[J]. *Rice*, 16(1): 35. doi: 10.1186/s12284-023-00650-3.
- Mao H L, Sun S Y, Yao J L, Wang C R, Yu S B, Xu C G, Li X H, Zhang Q F. 2010. Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45): 19579-19584. doi: 10.1073/pnas.1014419107.
- Nieuwland J, Feron R, Huisman B A H, Fasolino A, Hilbers C W, Derksen J, Mariani C. 2005. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco[J]. *The Plant Cell*, 17(7): 2009-2019. doi: 10.1105/tpc.105.032094.
- Qing D J, Zhou Y, Pan Y H, Yang X H, Li J C, Zhou W Y, Liang H F, Chen W W, Chen L, Lu C J, Dai G X, Deng G F. 2023. TMT-based quantitative proteomic analysis of *indica* rice cultivars reveals that novel components of the signaling pathways might play a role in grain length regulation[J]. *Journal of Proteomics*, 270: 104745. doi: 10.1016/j.jprot.2022.104745.
- Ren D Y, Ding C Q, Qian Q. 2023. Molecular bases of rice grain size and quality for optimized productivity[J]. *Science Bulletin*, 68(3): 314-350. doi: 10.1016/j.scib.2023.01.026.
- Sun S Y, Wang L, Mao H L, Shao L, Li X H, Xiao J H, Ouyang Y D, Zhang Q F. 2018. A G-protein pathway determines grain size in rice[J]. *Nature Communications*, 9(1): 851. doi: 10.1038/s41467-018-03141-y.
- Tao Y, Zou T, Zhang X, Liu R, Chen H, Yuan G Q, Zhou D, Xiong P P, He Z Y, Li G W, Zhou M L, Liu S J, Deng Q M, Wang S Q, Zhu J, Liang Y Y, Yu X M, Zheng A P, Wang A J, Liu H N, Wang L X, Li P, Li S C. 2021. Secretory lipid transfer protein OsLTPL94 acts as a target of EAT1 and is required for rice pollen wall development[J]. *The Plant Journal*, 108(2): 358-377. doi: 10.1111/tpj.15443.
- Thoma S, Kaneko Y, Somerville C. 1993. A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein[J]. *The Plant Journal*, 3(3): 427-436. doi: 10.1046/j.1365-3113X.1993.t01-25-00999.x.
- Wang N J, Lee C C, Cheng C S, Lo W C, Yang Y F, Chen M N, Lyu P C. 2012. Construction and analysis of a plant non-specific lipid transfer protein database (nsLTPDB) [J]. *BMC Genomics*, 13(S1): S9. doi: 10.1186/1471-2164-13-S1-S9.
- Wang X, Zhou W, Lu Z H, Ouyang Y D, Su C O, Yao J L. 2015. A lipid transfer protein, OsLTPL36, is essential for seed development and seed quality in rice[J]. *Plant Science*, 239: 200-208. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.07.016.
- Xing Y Z, Zhang Q F. 2010. Genetic and molecular bases of rice yield [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 421-442. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112209.
- Zhang D S, Liang W Q, Yin C S, Zong J, Gu F W, Zhang D B. 2010. *OsC6*, encoding a lipid transfer protein, is required for postmeiotic anther development in rice[J]. *Plant Physiology*, 154(1): 149-162. doi: 10.1104/pp.110.158865.
- Zhao J, Wang S S, Qin J J, Sun C Q, Liu F X. 2020. The lipid transfer protein OsLTPL159 is involved in cold tolerance at the early seedling stage in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 18(3): 756-769. doi: 10.1111/pbi.13243.
- Zhou C L, Lin Q B, Ren Y L, Lan J, Miao R, Feng M, Wang X, Liu X, Zhang S Z, Pan T, Wang J C, Luo S, Qian J S, Luo W F, Mou C L, Nguyen T, Cheng Z J, Zhang X, Lei C L, Zhu S S, Guo X P, Wang J, Zhao Z C, Liu S J, Jiang L, Wan J M. 2023. A CYP78As-small grain4-coat protein complex II pathway promotes grain size in rice[J]. *The Plant Cell*, 35(12): 4325-4346. doi: 10.1093/plcell/koad239.

(责任编辑: 陈 燕)