

甘蔗细胞色素P450还原酶基因的RT-PCR扩增与表达分析*

苏炜华[#] 黄琰[#] 黄宁 刘峰 苏亚春 肖新换 凌辉 阙友雄^{**}

福建农林大学农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室/国家甘蔗产业技术研发中心 福州 350002

摘要 细胞色素P450基因在电子传递链、次生代谢物质合成和对外源化学药物毒性降解中发挥着重要作用,为了深入了解该基因在甘蔗中的功能,通过RT-PCR扩增获得甘蔗细胞色素P450还原酶基因的cDNA全长序列,命名为*ScCPR450* (GenBank Accession Number: KR864841). 该基因全长999 bp, 含有744 bp的完整开放阅读框, 编码247个氨基酸. 亚细胞定位结果显示, *ScCPR450*蛋白分布于细胞质中, 与生物信息学预测结果相符. qRT-PCR表达分析表明, 该基因在甘蔗中组成型表达, 但有组织特异性, 芽中表达量最高, 其次是叶, 而皮中表达量最低. 在脱落酸 (ABA)、水杨酸 (SA)、茉莉酸甲酯 (MeJA)、聚乙二醇 (PEG) 和氯化铜 (CuCl_2) 胁迫诱导过程中, 该基因的表达量呈现不同变化模式, 其中SA胁迫6 h下, *ScCPR450*基因的表达量最高, 约为对照的12.21倍; 在PEG胁迫下, *ScCPR450*基因的表达量上调且表达量稳定, 推测*ScCPR450*基因在甘蔗响应生物和非生物胁迫中发挥一定的作用. 本研究可为该基因家族其它成员的克隆以及深入解析该基因的功能特性奠定基础, 进而为基于基因工程技术对甘蔗品种进行定向改良提供基因资源. (图4 参44)

关键词 甘蔗; *ScCPR450*基因; 亚细胞定位分析; 基因表达模式分析; 胁迫

CLC S566.103.4 : Q78

RT-PCR amplification and expression analysis of a cytochrome P450 reductase gene from sugarcane*

SU Weihua[#], HUANG Long[#], HUANG Ning, LIU Feng, SU Yachun, XIAO Xinhuan, LING Hui & QUE Youxiong^{**}

Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding (Fujian), Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University / Sugarcane Research & Development Center, China Agricultural Technology System, Fuzhou 350002, China

Abstract Cytochrome P450 gene plays an important role in the electron transport chain, secondary metabolite synthesis and degradation of exogenous chemical drug toxicity. In order to understand the function of this gene in sugarcane, this study used the EST CF576130.1 with homologs to a sugarcane cytochrome P450 reductase gene as a probe, performed electric cloning technology combined with RT-PCR amplification, and obtained the full length cDNA sequence of sugarcane cytochrome P450 reductase gene termed as *ScCPR450* (GenBank Accession Number: KR864841). Bioinformatics analysis revealed that the length of *ScCPR450* was 999 bp, which contained a complete open reading frame with a length of 744 bp, encoding 247 amino acid residues. Subcellular localization showed that *ScCPR450* was distributed in the cytoplasm which was in consistence with the bioinformatics prediction result. The qRT-PCR analysis revealed that *ScCPR450* was constitutively expressed and had tissue-specific expression in sugarcane, with the highest expression level in the bud, followed by the leaf and the lowest expression in the epidemis. At the same time, the expression patterns of *ScCPR450* were different after challenging with ABA, SA, MeJA, PEG and CuCl_2 . Under the SA stress for 6 h, the expression level of *ScCPR450* was the highest, about 12.21 times more than that in control. Under the stress of PEG, the transcripts of *ScCPR450* raised and remained stable. The results suggested that *ScCPR450* played a role in response to biotic and abiotic stresses in sugarcane. This study lays a certain foundation for the cloning of other members of *CPR* family genes and also for further analysis of the gene functional characteristics, which ultimately provides gene resource for the directional improvementment of sugarcane varieties through genetic engineering.

Keywords sugarcane; *ScCPR450* gene; subcellular localization analysis; gene expression pattern analysis; stress

收稿日期 Received: 2015-07-19 接受日期 Accepted: 2015-08-17

*国家自然科学基金项目 (31101196)、福建省杰出青年基金项目 (2015J06006)、福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划 (JA14095) 和现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-20) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31101196), the Natural Science Foundation of Fujian Province (2015J06006), the Program for New Century Excellent Talents in Fujian Province University (JA14095) and the Special Funds for Modern Agricultural Industry Technology System Construction (CARS-20)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: queyouxiong@126.com)

#并列第一作者 Joint first authors

细胞色素P450 (Cytochrome P450, CPR) 是一个超基因家族,它在真菌、细菌及动植物中均存在,是目前学术研究的焦点之一^[1]。其中,细胞色素P450还原酶在整个细胞色素P450酶系中起到重要功能作用。

迄今,已从包括绿豆 (*Vigna radiate*)^[2]、棉花 (*Gossypium hirsutum*)^[3]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[4]、水稻 (*Oryza sativa*)^[5]、小麦^[6]及茄科作物^[7]等在内的111种植物中克隆获得了1 052个细胞色素P450还原酶基因^[8],其中一部分P450基因的功能得到了鉴定^[9]。目前研究内容主要以克隆CPR基因的片段、蛋白质理化性质的分析和电子传递链作用研究为主^[10]。细胞色素P450酶系主要依赖电子传递系统进行催化反应,其中细胞色素P450还原酶通过FAD和FMN辅基将NAD(P)H的电子传递至P450s,从而使P450s同底物产生氧化还原反应,发挥电子供体的作用^[11]。当前关于CPR电子传递能力的活性分析一般需与具有催化活性的P450s于酵母细胞中共表达,然后制备微粒体进行催化反应^[12-13]或将P450s与大肠杆菌构建融合基因进行分析,通过制备融合蛋白进行活性分析^[14-15]。中国红豆杉不同长度TchCPR融合蛋白的诱导表达和纯化研究显示,由于具有疏水性的膜定位肽段相对保守并与N-段FMN结构域相邻,FMN结构域可以维持正确的构向,从而促进FMN结构域同还原型细胞色素C或P450s的结合,最终提高电子传递链的效率^[16-17]。

前人研究表明,细胞色素P450酶系不仅可以对植物体内的外源有害物质进行修饰,而且能够解除这些物质的毒害作用,从而起到保护植物的作用^[6]。Bolwell等通过融合兔P450基因和酵母NADPH-CytP450基因从而得到一个可以利用植物NADPH的杂合蛋白,然后将该融合基因转入烟草中,使烟草抗除草剂绿麦隆的能力增强^[18]。研究还显示,大豆中克隆得到的CPR71A10基因转入烟草后,转基因烟草与非转基因烟草相比,对优草隆、绿麦隆和敌草隆的代谢解毒作用更强^[19-20]。另有报道证实,P450酶系也参与高等植物正常生长发育所必需的初级代谢物和次级代谢物的生物合成,如黄酮类、生物碱等次生代谢物质的合成和对外源化学药物毒性的降解^[21-24]。如Yu等研究发现草本植物*Vulpia bromoides*在细胞色素P450介导的代谢解毒作用下对乙酰乳酸合成酶(ALS)阻抑型除草剂表现出天然抗性^[25-26]。在植物油素内酯的合成与钝化过程中,P450酶发挥至关重要的功能,参与了C-2、C-3、C-6、C-22和C-23位的羟基化和氧化反应^[27]。

综上所述,P450功能主要有三大类,一是参与电子链传递^[17],二是参与生物解毒途径^[18-20, 25-26],三是参与生物合成途径^[21-24]。此外,通过克隆技术方法获得P450还原酶基因,在此基础上研究该基因的表达特征及功能特性,是当前研究该基因功能的一种重要途径^[28]。

我国的食糖总产中约有92%为蔗糖,然而我国的甘蔗主产地多为盐碱地和旱地,每年因干旱、寒害、和土壤污染等逆境对甘蔗产业造成了极大的损失^[29-30]。在获得经功能鉴定、具有自主知识产权的功能基因的基础上,有望利用基因工程技术对特定甘蔗品种进行目标性状的定向改良。课题组前期通过电子克隆方法获得了甘蔗P450还原酶基因的序列,并在未经实验验证的情况下,仅通过生物信息学手段对该基因序列及其编码蛋白的特征和特性进行了初步分析^[24]。迄今,尚未见甘蔗中P450还原酶基因序列的RT-PCR扩增、亚细

胞定位研究和表达分析的研究报道。本研究拟从甘蔗中克隆甘蔗细胞色素P450还原酶基因,并对所验证的序列进行生物信息学分析、亚细胞定位和基因表达模式分析,以期为进一步深入研究甘蔗细胞色素P450还原酶基因的功能奠定基础,进而为甘蔗品种改良提供具有自主知识产权的基因资源。

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理

供试甘蔗品种崖城05-179,种植于福建农林大学农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室。在田间随机选取生长健壮且长势一致的崖城05-179植株,先用清水将根部洗净,幼根材料选用颜色乳白的健康幼根;甘蔗芽、皮和髓取自第七或第八节蔗茎;采用加一叶的方法对叶和叶鞘进行取样。先进行组培苗的培育^[29],然后挑选长势一致健壮的蔗苗,根部洗干净,在蒸馏水中预培养10 d进行炼苗。最后将蔗苗置于相应的实验处理中,并对每个实验组的每个处理时间点均设3株蔗苗作为生物学重复,在平底试管培养。胁迫组处理条件分别为水杨酸(5 mmol/L SA水溶液)、茉莉酸甲酯(100 μmol/L MeJA水溶液)、脱落酸(100 μmol/L ABA水溶液),分别于胁迫后的6 h、12 h和24 h各取3棵蔗苗的蔗叶;聚乙二醇(PEG-8000水溶液25.0%)和氯化铜(100 mmol/L CuCl₂水溶液)培养,分别于胁迫后的12 h、24 h和48 h各取3棵蔗苗的蔗叶;0 h未处理的蔗叶作为对照材料。将上述所有植物材料立即投入液氮中,然后放于-80 ℃冰箱保存以用于RNA提取^[29]。

本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)栽培方法为将本氏烟种子直接均匀撒到营养土上,保持土壤湿润,等到烟草苗长出两片真叶后移栽到塑料小钵中继续培养,长到6-8叶期用于亚细胞定位实验。烟苗的培养环境均为25 ℃,持续光照培养。

1.2 总RNA提取和cDNA合成

采用TRIzol法提取崖城05-179甘蔗叶、叶鞘、侧芽、皮、髓、根组织和胁迫处理与对照崖城05-179叶片的总RNA,Dnase I处理RNA样品后,采用TaKaRa公司的PrimeScriptTM RT-PCR Kit反转录试剂盒合成cDNA,作为实时荧光定量PCR模板^[31]。

1.3 甘蔗ScCPR450基因的电子克隆及RT-PCR扩增验证

使用NCBI中的blast工具对甘蔗中类似细胞色素P450还原酶基因的EST序列(CF576130.1)在甘蔗EST数据库进行检索,将同源性较高的甘蔗EST序列再次在甘蔗EST数据库中blast,直到不再出现新序列为止^[23]。借助CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>)对检索获得的所有序列进行拼接,得到一条contig序列,将其在NCBI非冗余数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行比对搜索,确认为新的基因序列,命名为ScCPR450。应用Primer 5.0软件对ScCPR450拼接序列进行引物设计,上下游引物序列分别为:5'-TCCCCGATCACAGTGAGGAA-3'和5'-TGAATGTTTATCCCCTGAATACCA-3'。

以崖城05-179未处理的侧芽组织cDNA为模板,参照TaKaRa公司的Ex Taq酶说明书配置反应体系进行RT-PCR扩增。PCR扩增程序为94 ℃预变性4 min;94 ℃变性1 min,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸80 s,35个循环;72 ℃延伸10 min。将克隆

产物连接至pMD19-T载体并送上海生工测序,并与电子克隆序列通过DNAMAN软件进行同源性比对^[32]。

1.4 甘蔗*ScCPR450*基因编码蛋白的亚细胞定位

采用Gateway法构建*ScCPR450*基因载体。*ScCPR450*基因的入门载体引物为CPR-GW-S: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGACAGATTCCCTTCAGCAAA-3'; CPR-GW-A: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACCACCAGACATAGATGT-3'。首先,将*ScCPR450*基因通过Gateway技术的BP反应构建到入门载体Pdnor211载体上,再通过Gateway技术的LR反应将*ScCPR450*构建到亚细胞定位载体pMDC202上,具体操作参考invitrogen的gateway产品说明书。鉴于Gateway载体上有一段致死基因,只有当目的基因导入载体中才能够表达,故本研究中不设置空白对照^[33]。

将携带有目的基因的载体转化到农杆菌感受态细胞中,转化产物涂板于在抗性利福平和卡那霉素的LB固体培养基上,28℃倒置培养2 d。挑取单克隆抗体转移到含有1 mL LB液体培养基、1.4 μL利福平和1.0 μL卡那霉素的试管中,于28℃、200 r/min摇床中培养一天一夜,然后吸取200 μL菌液于10 mL LB、14 μL利福平和10 μL卡那霉素于锥形瓶中活化一昼夜,次日吸取3 mL菌液于40 mL LB、56 μL利福平和40 μL卡那霉素于锥形瓶中进行第二次活化。将活化的菌液放置于50 mL离心管中,经24℃、5 000 g/min离心10 min。弃去上清液后,加入1 mL注射液(现配现用,配制体系为40% D-葡萄糖溶液625 μL, MES 5 mL, Na₃PO₄·H₂O 5 mL, 乙酰丁香酮5 μL),重悬菌液,再于3 000 g/min离心10 min。弃上清后,再加入1 mL注射液混匀,测量菌液OD₆₀₀值并将其调节至0.6^[34],随后进行本氏烟侵染实验。

侵染前将本氏烟草移至白炽灯下(打开气孔),并将侵染用的菌液先放于黑暗中静置1 h。选择健康植株的两片较大的叶片,在其叶片背面进行菌液注射并做好标记,随后将侵染的烟草置于正常条件下培养。48 h后剪取侵染的叶片,背面朝上置于载玻片上,利用德国莱卡TCS SP2激光共聚焦显微镜进行观察。

1.5 甘蔗*ScCPR450*基因表达的实时荧光定量PCR分析

按照SYBR Green PCR Master Mix Kit (Roche)进行qRT-PCR, *ScCPR450*所用上下游引物分别为: 5'-CTGCCGCTGGGAAGGATGA-3'和5'-GGCTTTGCTG-AAGGGAAGT-3'; *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 作为内参基因^[35]。

qRT-PCR扩增程序为: 50℃ 2 min; 95℃ 10 min; 95℃ 15 s、60℃ 1 min, 45个循环; 增加熔解曲线; 实验设置3次技术重复。

1.6 数据处理

在Microsoft Excel工作表中采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 算法^[36]分析实时定量PCR实验结果,画图并计算3次重复数据的标准误差。

2 结果与分析

2.1 甘蔗*ScCPR450*基因的RT-PCR扩增

利用甘蔗中类似细胞色素P450还原酶基因的EST序列(CF576130.1)作为探针,经电子克隆拼接获得该基因全长cDNA序列,然后以甘蔗品种崖城05-179未处理侧芽组织

cDNA为模板,利用RT-PCR扩增获得了约999 bp长的单一条带(图1)。

序列分析结果显示,甘蔗*ScCPR450*基因具有完整的开放读码框,并与电子克隆序列有较高的同源性(达99.10%),因此通过电子克隆获得序列而后经RT-PCR扩增验证是获得基因序列的可靠手段。几个碱基的差异可能是电子克隆中序列简并性取舍导致或者是由于拼接来源序列的错误。所获得的基因命名为*ScCPR450*, GenBank Accession Number为KR864841。

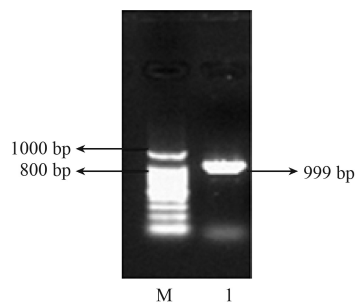


图1 甘蔗*ScCPR450*基因的RT-PCR扩增。M: DNA marker 1 000 bp; 1: RT-PCR产物。

Fig. 1 RT-PCR amplification of *ScCPR450* gene in sugarcane. M: DNA marker 1 000 bp; 1: RT-PCR product.

2.2 甘蔗*ScCPR450*基因的生物信息学分析

鉴于生物信息学分析仅仅是基于软件对基因和蛋白序列的特征和特性进行分析,而本研究中甘蔗*ScCPR450*基因的电子克隆序列和RT-PCR扩增序列之间高度同源,我们有理由相信有关甘蔗*ScCPR450*基因及其编码蛋白的生物信息学分析内容与课题组前期研究结果^[24]是类似的,因此本研究将不再开展这部分分析。这些内容包括编码蛋白质的一级、二级和三级结构、信号肽、疏水性、亲水性、保守结构域、亚细胞定位、功能预测、同源性分析以及系统进化树构建^[24]。

2.3 甘蔗*ScCPR450*蛋白的亚细胞定位

目前关于植物细胞色素P450还原酶亚细胞定位的研究仍较少,但家蚕细胞色素P450基因亚细胞定位结果显示其分布于细胞质中^[37]。本研究中通过德国莱卡TCS SP2激光共聚焦显微镜观察可见,绿色荧光主要分布于细胞质中(图2),表明甘蔗*ScCPR450*蛋白主要定位在细胞质,与前文中采用Psort在线软件预测该蛋白定位于内质网(膜)的结果是相符的,也与前人研究结果^[16]一致。

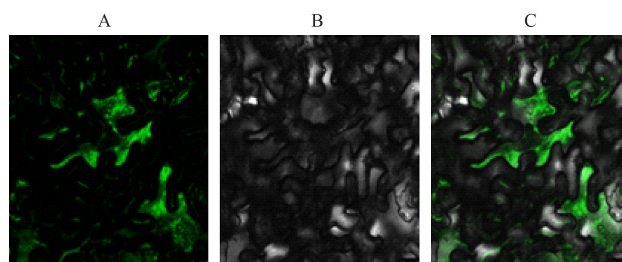


图2 甘蔗*ScCPR450*蛋白亚细胞定位。A: 紫外激发的荧光信号; B: 可见光的信号; C: A和B叠加。

Fig. 2 Subcellular localization of sugarcane *ScCPR450* protein. A: UV-excited fluorescence signals; B: Signals under bright field; C: Merged image.

2.4 甘蔗*ScCPR450*基因表达的qRT-PCR分析

2.4.1 甘蔗*ScCPR450*基因的组织特异性表达 组织特异性表达分析结果(图3)表明,该基因在甘蔗芽、蔗髓、蔗根、叶片和叶鞘中具有不同的表达量,其中在芽中的表达量最高,叶的表达量次之,皮中表达量最低。

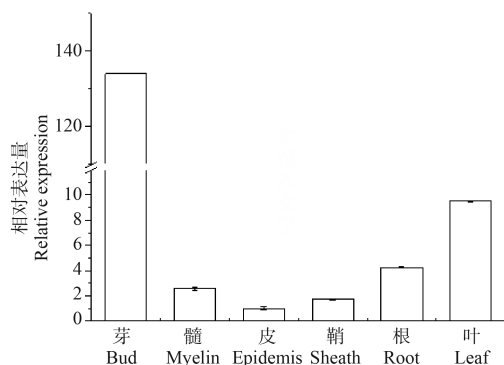


图3 甘蔗*ScCPR450*基因在不同组织中的表达。误差线为每组处理的标准误差($N=3$)

Fig. 3 Relative expression of *ScCPR450* gene in different tissues and organs. Error bars represent the standard error of each treating group ($N=3$)

2.4.2 甘蔗*ScCPR450*基因在不同外源胁迫下的表达特性

应用qRT-PCR技术对甘蔗*ScCPR450*基因在SA、ABA、MeJA、PEG和CuCl₂等胁迫下的应答反应进行分析。由图4可知,受胁迫6 h、12 h和24 h后,该基因表达量相与对照相比具有轻微的上调,在MeJA胁迫下的表达量比ABA上升更多一些,二者表达量都在12 h时间点达到最高。在SA胁迫下,*ScCPR450*基因的表达量在6 h时间点相对于对照上升较快,表达量为对照的12.21倍,其后表达量随胁迫时间呈现下降趋势。

在PEG胁迫诱导下,*ScCPR450*基因的表达量相对于对照具有一定程度的上调,且表达量呈稳定状态。而在CuCl₂胁迫下,该基因的表达模式呈现,胁迫12 h后,*ScCPR450*表达量为对照的1.79倍,而在胁迫24 h后,*ScCPR450*表达量仅为对照的0.47倍,在48 h后,表达量上调为对照的1.08倍。

3 讨论与结论

细胞色素P450基因是一种在真菌、细菌及动植物中普遍

存在的超基因家族^[1]。前人研究表明,该基因家族在电子传递链、次生代谢物质合成和对外源化学药物毒性降解中发挥重要作用^[11, 21-24]。本研究基于电子克隆技术,并结合RT-PCR方法成功克隆获得了一个甘蔗*ScCPR450*基因的全长cDNA序列,该基因具有完整的开放读码框,与课题组前期通过电子克隆获得的序列高度同源(99.10%),因此基于电子克隆和RT-PCR结合获得基因序列的策略是可靠的。

蛋白质只有在特定亚细胞位置上才能起功能作用^[38],因此深入研究目标蛋白的亚细胞定位具有一定的理论和实践意义。本研究应用荧光显微法对甘蔗*ScCPR450*蛋白进行亚细胞定位分析,结果显示该蛋白分布于细胞质中,这与生物信息学预测结果相一致,也与前人对家蚕细胞色素P450蛋白定位结果^[37]是一致的。有关如何区分叶绿体的自发荧光和GFP的荧光信号问题,进一步的实验可以通过叶绿体自带基因进行荧光区别,但本文中我们是综合生物信息学预测和烟草叶片瞬时表达分析来确定亚细胞定位的,故不影响结果的准确性。此外,针对该蛋白功能及其与亚细胞定位结果间存在的特定的联系及其影响因素还有待进一步探究。

已有报道表明,植物P450广泛地参与多种次生代谢并可催化多种化学反应,其中P450蛋白结构域中的FNR_like superfamily已被证明参与氮气固定、类固醇羟基化、脂肪酸代谢等多种代谢途径和参与电子传递的功能^[16, 39]。前人研究还显示,细胞色素P450还原酶基因在保护生物抵御逆境危害中发挥着重大的作用^[40]。本研究中,qRT-PCR表达分析结果显示,甘蔗*ScCPR450*基因在不同组织和器官中存在鲜明的组织表达特异性,其表达量主要集中在芽,出现该结果的原因还有待进一步探究。此外,根据甘蔗*ScCPR450*基因在不同外源胁迫下的表达结果可以知道,该基因在SA、ABA和MeJA胁迫下,表达量均呈现不同程度的上调;在受到SA胁迫后,呈现较明显的随时间延长表达量骤降的表达模式,推测其原因是*ScCPR450*基因仅在SA胁迫早期发挥抗性作用,而后SA传递胁迫信号受阻,导致表达量下降。在ABA作用下,*ScCPR450*基因的表达量呈现略微上调的趋势。由于ABA本身与植物抗逆性有关^[41],因此表达量上调可能是因为该基因与植物抗逆性物质合成有关。MeJA对植物衰老具有强烈的促进作用^[42],它能促使植物呼吸放慢,叶绿素降解,而甘蔗*ScCPR450*蛋白具有完整的FNR_like superfamily保守结构域^[24],而FNR_like superfamily保守结构域具有叶绿体还原酶

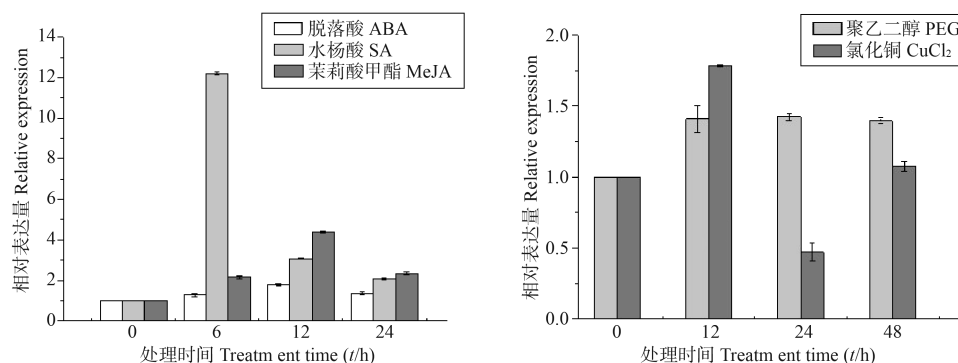


图4 甘蔗*ScCPR450*基因在不同外源胁迫下的表达。误差线为每组处理的标准误差($N=3$)。

Fig. 4 *ScCPR450* gene expression of sugarcane under different exogenous stress. Error bars represent the standard error of each treatment ($N=3$).

活性^[24], 故该基因在MeJA胁迫下表达量具有上调的趋势, 推测该基因的表达与JA胁迫存在一定的响应机制。在PEG胁迫下, 该基因的表达量呈现出上调趋势, 且表达量在各个时间点无明显变化。在前人对小白菜抗氧化机制的研究中提到, 水分胁迫可能损害电子链^[43], 而ScCPR450基因保守结构域显示其与电子传递链相关^[16], 故根据该基因在PEG胁迫下的表达量上调, 推测其在抵御干旱逆境可能具有一定的调节功能。此外, CuCl₂对电子传递链有即时抑制作用^[44], 而ScCPR450基因与电子传递链有密切关系^[16], 故在CuCl₂胁迫下, 该基因表现出“扬一抑一扬”的表达模式, 所以在中间时间段表达量受到一些影响而出现下调, 而后又有所上升。

综上, 本研究为甘蔗ScCPR450基因功能的后续研究积累了一定的基础数据, 同时也为最终利用基因工程技术对甘蔗品种进行目标性状的定向改良提供了基因功能信息, 具有较好的理论和实践意义。

参考文献 [References]

- 赵剑, 杨文杰, 朱蔚华. 细胞色素P450与植物的次生代谢[J]. 生命科学, 1999, **11** (3): 127-131 [Zhao J, Yang WJ, Zhu WH. Cytochrome P450 and plant secondary metabolism [J]. *Chin Bull Life Sci*, 1999, **11** (3): 127-131]
- Shet MS. Relevance of cytochrome P450s in plants: also one of Ron Estabrook's research interests [J]. *Drug Metab Rev*, 2007, **39** (2-3): 273-280
- Yang CQ, Lu S, Mao YB, Wang LJ, Chen XY. Characterization of two NADPH: cytochrome P450 reductases from cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Phytochemistry*, 2010, **71** (1): 27-35
- Urban P, Mignotte C, Kazmaier M, Delorme F, Pompon D. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5 [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272** (31): 19176-19186
- 刘惠君, 徐冬梅, 田宝莲, 熊明瑜. 水稻细胞色素P450对酰胺类除草剂催化代谢研究[G]//中国化学会环境化学专业委员会主编. 第四届全国环境化学学术大会论文集汇编. 南京: 南京大学环境学院, 2007: 263-264 [Liu HJ, Xu DM, Tian BL, Xiong MY. Study the cytochrome P450 metabolic amide herbicide catalytic reaction from rice [G]// Environmental Chemistry Professional Committee of Chinese Chemical Society. The fourth Session of National Environmental Chemistry Academic Conference of Collection of Papers. Nanjing: School of Environment, Nanjing University, 2007: 263-264]
- 张斌, 秦岭, 郭凤丹, 杨连群, 边斐, 范仲学, 李娜娜, 宫永超, 蒲艳艳, 丁汉凤, 彭振英. 小麦细胞色素P450(*TaP450*)基因的克隆与序列分析[J]. 麦类作物学报, 2014, **34** (7): 877-884 [Zhang B, Qin L, Guo FD, Yang LQ, Bian F, Fan ZX, Li NN, Gong YC, Pu YY, Ding HF, Peng ZY. Cloning and sequence analysis of a cytochrome P450(*TaP450*) gene from wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *J Tritic Crops*, 2014, **34** (7): 877-884]
- 张昊, 戴素明, 谢丙炎. 细胞色素P450在茄科作物中的研究进展[J]. 作物研究, 2007, **21** (2): 132-136 [Zhang H, Dai SM, Xie BY. The research development of cytochrome P450 in solanaceae crops. *Crop Res*, 2007, **21** (2): 132-136]
- O'Keefe DP, Romesser JA, Leto KJ. Plant and bacterial cytochromes P450 involvement in herbicide metabolism [J]. *Recent Adv Phytochem*, 1987 **21**: 151-173
- 吴翠霞, 吴小虎, 张晓芳, 刘冰, 刘君良. 细胞色素P450酶系对除草剂代谢作用的研究进展[J]. 农药研究与应用, 2008, **12** (6): 8-12 [Wu CX, Wu XH, Zhang XF, Liu B, Liu JL. A review on cytochrome P450s and metabolisms of herbicides. *Agrochem Res Appl*, 2008, **12** (6): 8-12]
- 凌淑萍, 张会敏, 苏闪闪, 张晓溯, 刘雪艳, 潘桂芳, 袁艺. 洋甘菊细胞色素P450还原酶基因(*CPR*)的分子克隆及表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2014, **22** (5): 580-589 [Ling SP, Zhang HM, Su SS, Zhang XS, Liu XY, Pan GF, Yuan Y. Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 reductase gene(*CPR*) full-length in *Matricaria recutita* [J]. *J Agric Biotechnol*, 2014, **22** (5): 580-589]
- Jensen K, Moller BL. Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases [J]. *Phytochemistry*, 2010, **71** (2-3): 132-141
- Eberle D, Ullmann P, Werck-Reichhart D, Petersen M. cDNA cloning and functional characterization of CYP98A14 and NADPH: cytochrome P450 reductase from *Coleus blumei* involved in rosmarinic acid biosynthesis [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, **69** (3): 239-253
- Ro DK, Ehltling J, Douglas CJ. Cloning, functional expression, and subcellular localization of multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from hybrid poplar [J]. *Plant Physiol*, 2002, **130** (4): 1837-1851
- Hull AK, Celenza JL. Bacterial expression and purification of the *Arabidopsis* NADPH-cytochrome P450 reductase ATR2 [J]. *Protein Express Purif*, 2000, **18** (3): 310-315
- Hotze M, Schroder G, Schroder J. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus* and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in *Escherichia coli* [J]. *FEBS Lett*, 1995, **374** (3): 345-350
- 阮仁余, 孔建强, 郑晓东, 张书香, 秦咸蕴, 程克棣, 王建国, 王伟. 中国红豆杉细胞色素P450还原酶的基因克隆、表达与活性分析[J]. 遗传, 2010, **32** (11): 1187-1194 [Ruan RY, Kong JQ, Zheng XD, Zhang SX, Qin XY, Cheng KD, Wang JM, Wang W. cDNA cloning, heterologous overexpression and activity analysis of cytochrome P450 reductase of *Taxus chinensis* [J]. *Hereditas*, 2010, **32** (11): 1187-1194]
- Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Mastres BS, Kim JJ. Three dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase of prototype for FMN- and FAD-containing enzymes [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, **94** (16): 8411-8416
- Bolwell GP, Bozak k, Zimmerlin A. Plant cytochrome P450 [J]. *Phytochemistry*, 1994, **37** (6): 1491-1506
- Didierjean L, Gondet L, Perkins R, Lau SC, Schaller H, O'Keefe DP, Werck-Reichhart D. Engineering herbicide metabolism in tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a cytochrome P450 enzyme from *Jerusalem artichoke* [J]. *Plant Physiol*, 2002, **130** (1): 179-189
- 李明, 曾任森, 骆世明. 细胞色素P450酶系与植物的化学防御[J]. 中国植保导刊, 2006, **26** (11): 13-15 [Li M, Zeng RS, Luo SM. Cytochrome P450s and plant chemical defense [J]. *China Plant Prot*, 2006, **26** (11): 13-15]
- Chefson A, Auclair K. Progress towards the easier use of P450 enzymes [J]. *Mol Biosys*, 2006, **2** (10): 462-469
- Chefson A, Zhao J, Auclair K. Replacement of natural cofactors by selected hydrogen peroxide donors or organic peroxides results in improved activity for CYP3A4 and CYP2D6 [J]. *ChemBiochem*, 2006, **7** (6): 916-919
- Chefson A, Auclair K. CYP3A4 activity in the presence of organic cosolvents, ionic liquids, or water-immiscible organic solvents [J].

- Chembiochem*, 2007, **8** (10): 1189-1197
- 24 苏炜华, 张玉叶, 黄宁, 肖新换, 黄琰, 罗俊, 阙友雄. 甘蔗细胞色素P450还原酶基因的电子克隆与分析[J]. 生物信息学, 2014, **12** (2): 99-105 [Su WH, Zhang YY, Huang N, Xiao XH, Huang L, Luo J, Que YX. Electronic cloning and characterization of sugarcane *ScCYP450* gene using bioinformatics tools [J]. *Chin J Bioinformatics*, 2014, **12** (2): 99-105]
 - 25 Yu Q, Friesen LJS, Zhang XQ, Powles SB. Tolerance to acetolactate synthase and acetyl-coenzym A carboxylase inhibiting herbicides in *Vulpia bromoides* is conferred by two co-existing resistance mechanisms [J]. *Pest Biochem Physiol*, 2004, **78** (1): 21-30
 - 26 张山, 李平, 刘德立. 细胞色素P450酶系与除草剂代谢[J]. 中国生物工程杂志, 2004, **24** (10): 18-21 [Zhang S, Li P, Liu DL. Cytochrome P450s and metabolisms of herbicides [J]. *China Biotechnol*, 2004, **24** (10): 18-21]
 - 27 Nafisi M, Sonderby IE, Hansen BG, Geu-Flores F, Auis HHNED, Norholm MHH, Jensen NB, Li J, Halkier BA. Cytochromes P450 in the biosynthesis of glucosinolates and indole alkaloids [J]. *Phytochem Rev*, 2006, **5** (2): 331-346]
 - 28 Chapple C. Molecular genetic analysis of plant cytochrome P450 dependent monooxygenases [J]. *Physiol Plant Mol Biol*, 1998, **49** (1): 311-343
 - 29 黄琰, 苏炜华, 张玉叶, 黄宁, 凌辉, 肖新换, 阙友雄, 陈如凯. 甘蔗 *CIPK* 基因的同源克隆与表达[J]. 作物学报, 2015, **41** (3): 499-506 [Huang L, Su WH, Zhang YY, Huang N, Ling H, Xiao XH, Que YX, Chen RK. Cloning and expression analysis of *CIPK* gene in sugarcane. *Acta Agron Sin*, 2015, **41** (3): 499-506]
 - 30 肖新换, 黄宁, 张玉叶, 杨宗锋, 凌辉, 黄琰, 苏炜华, 阙友雄. 甘蔗光合系统 I 亚基 O 基因的克隆与表达分析[J]. 应用与环境生物学报, 2015, **21** (2): 208-214 [Xiao XH, Huang N, Zhang YY, Yang ZF, Ling H, Huang L, Su WH, Que YX. Cloning and expression of photosystem I subunit O gene from sugarcane [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, **21** (2): 208-214]
 - 31 肖新换, 黄琰, 黄宁, 张玉叶, 凌辉, 刘峰, 苏炜华, 阙友雄. 甘蔗 *ScBAK1* 基因及其可变剪接体的克隆与表达分析[J]. 应用与环境生物学报, 2015, **21** (5): 872-881 [Xiao XH, Huang L, Huang N, Zhang YY, Ling H, Liu F, Su WH, Que YX. Cloning and expression analysis of *ScBAK* gene and its alternative spliceosome gene in sugarcane [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, **21** (5): 872-881]
 - 32 阙万才, 黄宁, 刘峰, 肖新换, 凌辉, 张玉叶, 苏炜华, 苏亚春, 吴期滨, 阙友雄. 甘蔗真核生物翻译起始因子 5A 基因的克隆与表达分析[J]. 应用与环境生物学报, 2015, **21** (5): 1120-1127 [Que WC, Huang N, Liu F, Xiao XH, Ling H, Zhang YY, Su WH, Su YC, Wu QB, Que YX. Isolation and expression analysis of a eukaryotic translation initiation factor 5A gene from sugarcane [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, **21** (5): 1120-1127]
 - 33 Gottschamel J, Waheed MT, Clarke JL, Loss AG. A novel chloroplast transformation vector compatible with the Gateway recombination cloning technology [J]. *Transgenic Res*, 2013, **22** (6): 1273-1278
 - 34 朱海龙, 程光远, 彭磊, 柴哲, 郭晋隆, 许莉萍, 徐景升. 甘蔗条纹花叶病毒 P3 蛋白与甘蔗 Rubisco 大亚基互作研究[J]. 西北植物学报, 2014, **34** (4): 676-681 [Zhu HL, Cheng GY, Peng L, Cai Z, Guo JL, Xu LP, Xu JS. Interaction between sugarcane streak mosaic virus P3 and rubisco large subunit from sugarcane [J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 2014, **34** (4): 676-681]
 - 35 阙友雄, 许莉萍, 徐景升, 张积森, 张木清, 陈如凯. 甘蔗基因表达定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. 热带作物学报, 2009, **30** (3): 274-278 [Que YX, Xu LP, Xu JS, Zhang JS, Zhang MQ, Chen RK. Selection of control genes in Real-time qPCR analysis of gene expression in sugarcane [J]. *Chin J Trop Crops*, 2009, **30** (3): 274-278]
 - 36 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25** (4): 402-408
 - 37 王东, 李兵, 林超, 陈玉华, 许雅香, 沈卫德. 家蚕细胞色素P450基因 *CYP6AE21* 的克隆、表达分析及亚细胞定位[J]. 昆虫学报, 2011, **54** (1): 1-8 [Wang D, Li B, Lin C, Chen YH, Xu YX, Shen WD. Cloning, expression analysis and subcellular location of P450 gene *CYP6AE21* from *Bombyx mori* [J]. *Acta Entomol Sin*, 2011, **54** (1): 1-8]
 - 38 李立奇, 万瑛. 蛋白质的亚细胞定位预测研究进展[J]. 免疫学杂志, 2009, **25** (5): 602-604 [Li LQ, Wan Y. Advancement of predicting protein subcellular localization sites [J]. *Immunol J*, 2009, **25** (5): 602-604]
 - 39 贺丽虹, 赵淑娟, 胡之璧. 植物细胞色素P450基因与功能研究进展[J]. 药物生物技术, 2008, **15** (2): 142-147 [He LH, Zhao SJ, Hu ZB. Gene and function research progress of plant cytochrome P450s [J]. *Pharm Biotechnol*, 2008, **15** (2): 142-147]
 - 40 张松煊, 李明泽, 张军, 李春奇. 植物细胞色素P450基因的克隆策略及鉴定方法[J]. 安徽农业科学, 2009, **37** (11): 4911-4914 [Zhang SH, Li MZ, Zhang J, Li CQ. Cloning strategies and identification methods of plant cytochrome P450 gene [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2009, **37** (11): 4911-4914]
 - 41 吴耀荣, 谢旗. ABA 与植物胁迫抗性[J]. 植物学通报, 2006, **23** (5): 511-518 [Wu YR, Xie Q. ABA and plant stress response [J]. *Chin Bull Bot*, 2006, **23** (5): 511-518]
 - 42 马崇坚, 柳俊, 谢丛华. 茉莉酸类物质的功能与胁迫防御[J]. 华中农业大学学报, 2001, **20** (6): 603-608 [Ma CJ, Liu J, Xie CH. Jasmonic acid class material defense function and stress [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 2001, **6**: 603-608]
 - 43 唐红枫. 甲胺磷胁迫下小白菜抗氧化机制研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2006 [Tang HF. Study on the anti-oxygen mechanism of Chinese cabbage under methamidophos [J]. Wuhan: Central China Normal University, 2006]
 - 44 孙学娟. CuCl₂ 胁迫对烟草 BY-2 悬浮细胞死亡的诱导[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012 [Sun XJ. Cell death induced by CuCl₂ stress in tobacco BY-2 cells [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2012]