

# 橡胶树 *HbbZIP74* 基因的表达分析及 蛋白原核表达纯化

刘梓权<sup>1#</sup>, 朱家红<sup>2,3,4</sup>, 王 颖<sup>2,3,4</sup>, 李辉亮<sup>2,3,4</sup>,

李玉姬<sup>2,3</sup>, 唐燕琼<sup>1\*</sup>, 郭 冬<sup>2,3,4\*</sup>

(1. 海南大学 生命健康学院, 海南 海口 570228 中国; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101 中国; 3. 热带作物生物育种国家重点实验室, 海南 三亚 572024 中国; 4. 中国热带农业科学院 三亚研究院, 海南 三亚 572024 中国)

**摘要:** 为研究巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)bZIP 转录因子在天然橡胶生物合成中的作用, 本研究在实验室前期工作基础上, 从橡胶树中克隆了 1 个 bZIP 类转录因子 *HbbZIP74* 基因, 并对其进行了生物信息学分析和表达分析, 成功构建 pET28-HbbZIP74 原核表达载体, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)菌株中进行异源表达并对重组蛋白进行纯化。结果表明, *HbbZIP74* 基因开放阅读框(ORF)为 486 bp, 编码 161 个氨基酸, 含有 bZIP 结构域, 属于 bZIP 类转录因子 S 亚家族。*HbbZIP74* 在胶乳和叶片中表达量较高, 茉莉酸、脱落酸、乙烯和水杨酸可诱导胶乳中 *HbbZIP74* 表达。*HbbZIP74*-His 重组蛋白异源表达最佳条件为 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG, 37 °C 诱导 3 h, 但主要存在于包涵体中。通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化获得大小约 22 kDa 的重组蛋白, 与预期结果一致。该研究为进一步探究 *HbbZIP74* 在天然橡胶生物合成中的功能奠定了基础。

**关键词:** 橡胶树; bZIP 转录因子; 基因克隆; 基因表达; 蛋白纯化

中图分类号: S794.1;Q78 文献标志码: A 文章编号: 1674-7054(2026)03-0399-11

刘梓权, 朱家红, 王颖, 等. 橡胶树 *HbbZIP74* 基因的表达分析及蛋白原核表达纯化[J]. 热带生物学报 (中英文), 2026, 17(3): 399–409. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250015 CSTR: 32425.14.j.cnki.rdswwb.20250015



巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)是天然橡胶最主要的商业来源。天然橡胶是在橡胶树乳管细胞中橡胶粒子上合成的一种重要次生代谢产物, 以甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径或丙酮酸/磷酸甘油醛(methylerythritol phosphate, MEP)途径生成的异戊烯基焦磷酸(IPP)为前体, 经过一系列的酶促反应, 形成以顺-1,4-聚异戊二烯为主要成分的天然高分子化合物<sup>[1]</sup>。早期对天然橡胶生物合成的研究主要集中在对合成途径中酶的特性分析、基因克隆、表达和功能分析<sup>[2]</sup>。Tang 等<sup>[3]</sup>在橡胶树基因组中鉴定了 20 个基因家族共 89 个橡胶生物合成相关基因。转录因子是调节次生代谢产

物的生物合成途径的重要基因<sup>[4]</sup>, 一些调控橡胶生物合成途径的转录因子也被相继鉴定<sup>[5-14]</sup>, 但对橡胶生物合成的调控机制仍缺乏深入了解。

bZIP 转录因子家族是植物中规模最大、种类最丰富的转录因子家族之一。bZIP 转录因子具有 60~80 个氨基酸组成的高度保守的 bZIP 结构域, 由 1 个位于结构域 N 端保守的碱性区域, 和 1 个位于 C 端的亮氨酸拉链区域组成<sup>[15]</sup>。碱性区域由 16~20 个氨基酸残基组成, 包含 1 个核定位信号, 和 1 个固定的 N-x7-R/K 基序, 可以识别并特异结合启动子中的特定序列<sup>[16]</sup>。亮氨酸拉链区域由 1 个或多个 7 肽重复单元, 每个单元的末位为



收稿日期: 2025-01-15

修回日期: 2025-02-20

**基金项目:** 国家自然科学基金面上基金项目(32471926, 31970620); 热带作物生物育种全国重点实验室科研项目(NKLTCBZRJJ6); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630052022-009)

**\*第一作者:** 刘梓权(1998—), 男, 海南大学 2022 级硕士研究生。E-mail: liziquan@hainanu.edu.cn

**\*通信作者:** 唐燕琼(1968—), 女, 博士, 教授。研究方向: 种质资源及分子遗传学。E-mail: 990804@hainanu.edu.cn  
郭冬(1978—), 男, 博士, 研究员。研究方向: 植物分子生物学。E-mail: guodong@itbb.org.cn

亮氨酸或疏水氨基酸,该区域参与 bZIP 转录因子同源或异源二聚体的形成<sup>[17-18]</sup>。植物 bZIP 蛋白主要结合 ACGT 为核心序列的顺式作用元件,如 ABRE、G-box、C-box 和 A-box 等<sup>[19]</sup>,调节下游基因表达,在植物生长发育、逆境胁迫应答及次生代谢产物生物合成过程中发挥重要作用。目前,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[16]</sup>、大豆(*Glycine max*)<sup>[20]</sup>、番茄(*Solanum lycopersicum*)<sup>[21]</sup>、烟草(*Nicotiana tabacum*)<sup>[22]</sup>、棉花(*Gossypium hirsutum*)<sup>[23]</sup>、木薯(*Manihot esculenta*)<sup>[24]</sup>等许多植物鉴定到 bZIP 家族成员。研究表明,bZIP 转录因子广泛参与植物次生代谢产物生物合成的调控。青蒿 AabZIP1 激活下游 *ADS* 和 *CYP71AV1* 的表达,调控青蒿素的生物合成<sup>[25]</sup>。短角蒲公英 TbbZIP1 通过促进 *TbSRPP* 的表达,调节天然橡胶生物合成<sup>[26]</sup>。喜树(*Camptotheca acuminata*)bZIP 转录因子 CaLMF 负调控喜树碱合成相关基因 *CaTDC1*、*CaG8O*、*CaCYC1* 和 *Ca7DLS* 表达,抑制喜树碱的生物合成<sup>[27]</sup>。橡胶树 bZIP 转录因子 HbTGA1 调控 *HbHMGS2*、*HbHMGR2*、*HbCPT6*、*HbCPT8* 和 *HbSRPP2* 等多个橡胶生物合成基因转录,参与天然橡胶生物合成调控<sup>[28]</sup>。

本研究前期在橡胶树胶乳 cDNA 文库中筛选到与法尼基焦磷酸合酶、橡胶转移酶、小橡胶粒子蛋白和橡胶延长因子等橡胶生物合成相关酶和蛋白基因启动子结合的转录因子 HbbZIP74,推测其可能参与天然橡胶生物合成调控。本研究通过 PCR 克隆了 *HbbZIP74* 基因,并进行生物信息学分析,构建 pET28-HbbZIP74 原核表达载体,在大肠杆菌中异源表达,优化诱导表达条件并成功纯化重组蛋白,旨在为下一步研究 *HbbZIP74* 在天然橡胶生物合成中的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 实验材料为 7 年生未开割巴西橡胶树无性系“热研 7-33-97”组培苗植株,种植于中国热带农业科学院试验场。茉莉酸、脱落酸、乙烯和水杨酸处理参照 Guo 等<sup>[9]</sup>的方法。橡胶树根、树皮、叶和花等组织同时采样后立即用液氮研磨或保存在 -80 °C。胶乳用液氮速冻后收集到离心管,再放入液氮中,用于 RNA 的提取。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3)菌株分别购买于天根生物科技有限公司(北京)和上海唯地

生物技术有限公司,蛋白表达载体 pET28a 由实验室保存,DNA Marker、pMD19T 载体、高保真酶 PrimeSTAR 和 T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司(大连),质粒提取试剂盒、RNA 抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒来自 FOREGENE 公司(成都),反转录试剂盒和荧光定量试剂来自 NOVA 公司(苏州)。引物合成和测序由中美泰和生物技术有限公司完成。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因 CDS 区克隆** 根据 *HbbZIP74* 基因(基因编号:LOC110658634)在 NCBI 中橡胶树参考序列 XM\_021816336.2,使用 SnapGene 软件设计基因特异性扩增引物(正向引物 SPF: 5'-ATGGCATCCTCCAGTGGAAA-3',反向引物 SPR: 5'-ATACCGAAAGAAATCTGGAG-3')。以橡胶树胶乳 cDNA 为模板扩增目的序列,PCR 扩增体系: 2  $\mu$ L 模板、上下游引物各 1  $\mu$ L、25  $\mu$ L 2 $\times$  PrimeSTAR HS(Premix)、ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 38 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经凝胶回收纯化后克隆到 pMD19T 载体中, pMD19T-*HbbZIP74* 经 PCR(正向引物 M13-F: 5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3',反向引物 M13-R: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3')扩增筛选阳性克隆,将阳性克隆抽提质粒后测序。

**1.2.2 生物信息学分析** 在 NCBI 网站查找 *HbbZIP74* 基因编码的氨基酸序列,利用 ExPASy-ProtParam tool(<http://web.expasy.org/protparam/>)在线软件分析 *HbbZIP74* 蛋白质分子量、等电点、稳定性和平均亲水系数;采用 SMART 在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白保守结构域;采用 Plant-mPLoc 在线工具(<https://www.ncbiwww.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/PlantmPLoc.cgi>)进行蛋白亚细胞定位预测;分别采用 SOPMA([https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html))和 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)分析 *HbbZIP74* 蛋白的二级结构和三级结构。利用 Clustal 在线网站(<https://www.genome.jp/tools-bin/clustal>)进行多序列比对,再通过 ESPript 网站(<https://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>)将序列比对结果可视化;在拟

南芥中 bZIP 的各基因亚家族各选取 1~2 个 bZIP 转录因子, 将 *HbbZIP74* 蛋白序列通过 Clustal 进行多序列比对, 并用 MEGA 构建进化树。

**1.2.3 橡胶树总 RNA 提取和 cDNA 合成** RNA 的提取采用 FOREGENE 公司(成都)的植物总 RNA 提取试剂盒(多糖多酚含量高的样本), 并参照说明书操作。cDNA 第一链的合成使用 NOVA 公司(苏州)的去基因组与逆转录一管化三代预混液试剂盒, 按照说明书进行操作。

**1.2.4 qRT-PCR 和数据分析** 采用 NOVA 公司(苏州)的 Taq SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Premix(Universal) 试剂盒, 使用 BIO-RADCFX96 Real-time PCR 系统(Bio-Rad, USA), 进行 qRT-PCR 分析。*HbbZIP74* 的引物为: *qbZIP74-F*: 5'-GGGCACAGATGATGGA ACTTA-3'; *qbZIP74-R*: 5'-CAGCAGCAACAGCAC TTATTT-3'。采用 *Actin* 为内参基因, 引物为: *Actin-F*: 5'-CAGTGGTCGTACAACACTGGTAT-3'; *Actin-R*: 5'-ATCCTCCAATCCAGACACTGT-3'。qRT-PCR 的反应体系(20  $\mu$ L): 1  $\mu$ L 模板、正反向引物(10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)各 1  $\mu$ L、10  $\mu$ L Taq SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Premix、ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。qRT-PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。每个样品进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复实验, 结果采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 法分析基因的相对表达量, 使用 SPSS 分析样本间的差异显著性。

**1.2.5 原核表达载体构建** 根据 pET28a 载体图谱和 *HbbZIP74* 的 CDS 序列设计正向引物 F: 5'-TCGCGGATCCGAATTCATGGCATCCTCCAGT GGAAAT-3', 反向引物 R: 5'-GGTGGTGGTGTCT CGAGATACCGAAAGAAATCTGGAGAAGCC-3', 以构建成功的 pMD19T-*HbbZIP74* 的质粒为模板, 通过 PCR 扩增目的片段并挖胶回收纯化。使用同源重组的方法将扩增产物片段连接到已经酶切完成的 pET28a 载体上, 转化后大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 经过 PCR 验证(正向引物 T7-F: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', 反向引物 T7-R: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'), 挑选具有单一明亮条带的菌落进行质粒提取后, 将测序验证的重组表达载体命名为 pET28-*HbbZIP74*。

**1.2.6 重组蛋白的最佳诱导表达条件确定** 将 pET28-*HbbZIP74* 质粒转入 BL21(DE3)菌株中, 挑

取单菌落接种于含有 50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C, 200 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 培养 16 h。按菌体体积 1:100 的比例将菌液接种于含有 50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 卡那霉素的 5 mL LB 液体培养基, 在 37  $^{\circ}$ C, 180 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.6, IPTG 的终浓度分别为 0.1、0.3、0.5、1.0 和 2.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>, 然后 37  $^{\circ}$ C 振荡培养 5 h; 在 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> IPTG 浓度下, 分别 16、20、28 和 37  $^{\circ}$ C 振荡培养 5 h; 在 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> IPTG、37  $^{\circ}$ C 条件下, 分别诱导 1、2、3、4 和 5 h。对不同条件的诱导样品进行 SDS-PAGE 电泳, 确定最佳诱导表达条件。

**1.2.7 重组蛋白的纯化** 根据上述摸索的最佳诱导表达条件, 将诱导的 200 mL 菌液 8 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后, 用 PBS 缓冲液重悬后离心, 再用 30 mL 洗涤液(体积分数为 1%的 TritonX-100, 500 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> NaCl, 2 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 脲, 50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH7.5, 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> EDTA)重悬, 加入终浓度(质量浓度)为 1.5 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>的溶菌酶, 在冰上摇过夜。冰上超声破碎细胞, 4  $^{\circ}$ C, 9 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 用洗涤液重悬, 重复 2 次。再用裂解液(50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH8.5, 8 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 脲, 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> DTT)按称重溶解为 10~20 g $\cdot$ L<sup>-1</sup> 重悬, 静置 30 min 至沉淀溶解。用 0.45  $\mu$ m 水系滤膜过滤裂解液后上镍柱进行纯化, 依次用洗脱液(8 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 脲, 50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH8.5, 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> DTT), 10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 咪唑洗脱液, 50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 咪唑洗脱液, 100 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 咪唑洗脱液进行洗脱后, 对收集的样品进行 SDS-PAGE 电泳。洗脱液装入透析袋, 置于复性液(50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> EDTA, 2.2 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> GSH, 1.1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> GSSG, 体积分数 5% 甘油, pH8.5)中, 4  $^{\circ}$ C 静置透析过夜。再将透析袋放入新的透析液(50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> EDTA, pH8.5)中透析, 换液 3 次。透析完后收集透析袋中液体, 并分装存于-20  $^{\circ}$ C 冰箱。

## 2 结果与分析

**2.1 *HbbZIP74* 基因的克隆** 以橡胶树胶乳 cDNA 为模板, 通过特异引物 SPF 和 SPR 扩增, 得到长度约为 500 bp 的片段(图 1), 条带清晰且单一, 与预期 *HbbZIP74* ORF 长度相符。将目的片段连接至 pMD19T 载体后转化到 DH5 $\alpha$  菌株中, 经

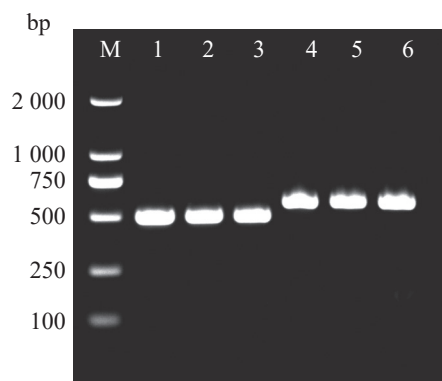


图 1 *HbbZIP74* 全长克隆

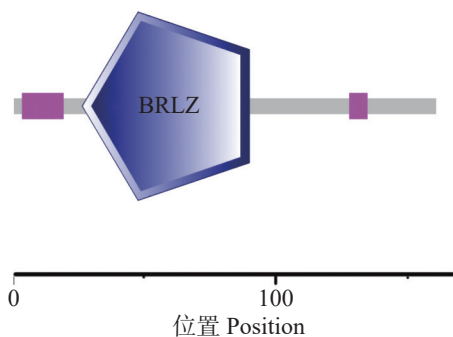
Fig. 1 Full-length cloning of *HbbZIP74*

注: M. 1 500 bp DNA Maker; 1~3. *HbbZIP74* 的克隆基因片段; 4~6. pMD19T-*HbbZIP74* 连接转化后的阳性克隆验证。

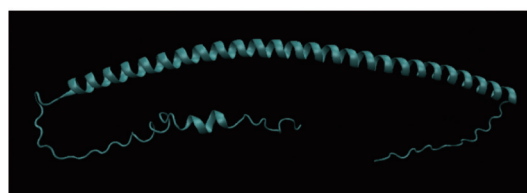
Note: M. 1 500 bp DNA Marker; 1-3. Cloning fragments of *HbbZIP74*; 4-6. Positive clone verification of pMD19T-*HbbZIP74* after ligation and transformation.

菌液 PCR 筛选获得阳性克隆(图 1), 抽提质粒经测序, 确定扩增片段为 486 bp, 与 NCBI 数据库中 *HbbZIP74*(登录号: XM\_021816336.2)的 ORF 序列完全一致。重组质粒命名为 pMD19T-*HbbZIP74*。

A



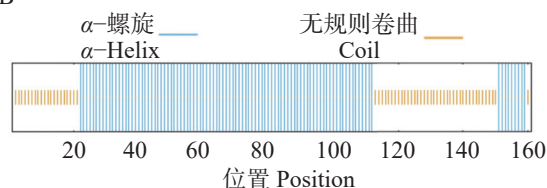
C



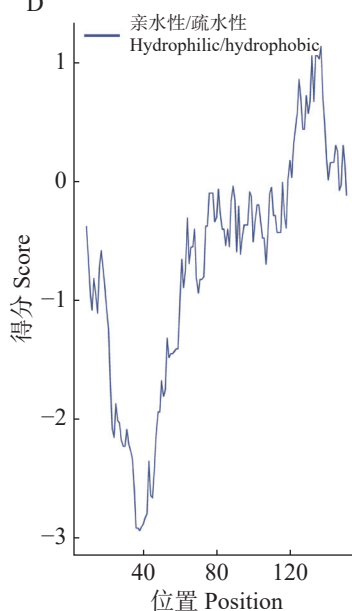
**2.2 *HbbZIP74* 的理化性质和结构域分析** *HbbZIP74* 的 ORF 全长 486 bp, 共编码 161 个氨基酸; 相对分子质量为 18.28 kDa; 理论等电点为 6.51; 不稳定指数为 54.54, 平均亲水系数为 -0.673, 表明该蛋白为不稳定亲水蛋白。该蛋白包含一个碱性亮氨酸拉链结构域, 位于第 26~90 个氨基酸(图 2-A)。*HbbZIP74* 蛋白二级结构预测结果显示, 100 个氨基酸 (62.11%) 参与形成  $\alpha$ -螺旋, 61 个氨基酸 (37.89%) 参与形成无规则卷曲(图 2-B); 三级结构预测结果显示, *HbbZIP74* 蛋白主要由  $\alpha$ -螺旋和形成无规则卷曲组成(图 2-C); 与二级结构预测结果相符, 约在 40 kDa 前为亲水区域, 41~130 kDa 左右为疏水区域(图 2-D), *HbbZIP74* 蛋白亚细胞定位预测位于细胞核。

**2.3 *HbbZIP74* 编码蛋白的多序列比对** 将橡胶树 *HbbZIP74*(XP\_021672028.1)氨基酸序列与拟南芥 *AtbZIP44*(NP\_177672.2)、小麦 *TabZIP2*(XP\_044406621.1)、水稻 *OsbZIP11*(XP\_015622690.1)、

B



D



A. a *HbbZIP74* 蛋白保守结构域示意图; B. *HbbZIP74* 蛋白二级结构示意图; C. *HbbZIP74* 蛋白三级结构预测示意图; D. *HbbZIP74* 亲水/疏水性分析图。

A. Schematic diagram of conserved domains in *HbbZIP74* protein; B. Schematic diagram of secondary structure of *HbbZIP74* protein; C. Predicted tertiary structure of *HbbZIP74* protein; D. Hydrophilicity/hydrophobicity analysis of *HbbZIP74* protein.

图 2 *HbbZIP74* 蛋白结构分析

Fig. 2 Structural analysis of *HbbZIP74* protein

西红柿 SlbZIP53(XP\_004240572.1)、玉米 ZmbZIP58 (AQK74499.1)、毛果杨 PtbZIP43(XP\_024461072.1) 和木薯 MebZIP4(XP\_021631325.1)的氨基酸序列进行多序列比对分析,氨基酸序列相似性分别为

52.53%、34.43%、42.57%、42.22%、36.11%、31.75% 和 33.33%。比对结果显示,每个蛋白都含有 N-x7-R/K 基序,以及 2~3 个不等的 x6-L 的 7 肽重复序列(图 3),表明 *HbbZIP74* 属于 bZIP 基因家族。

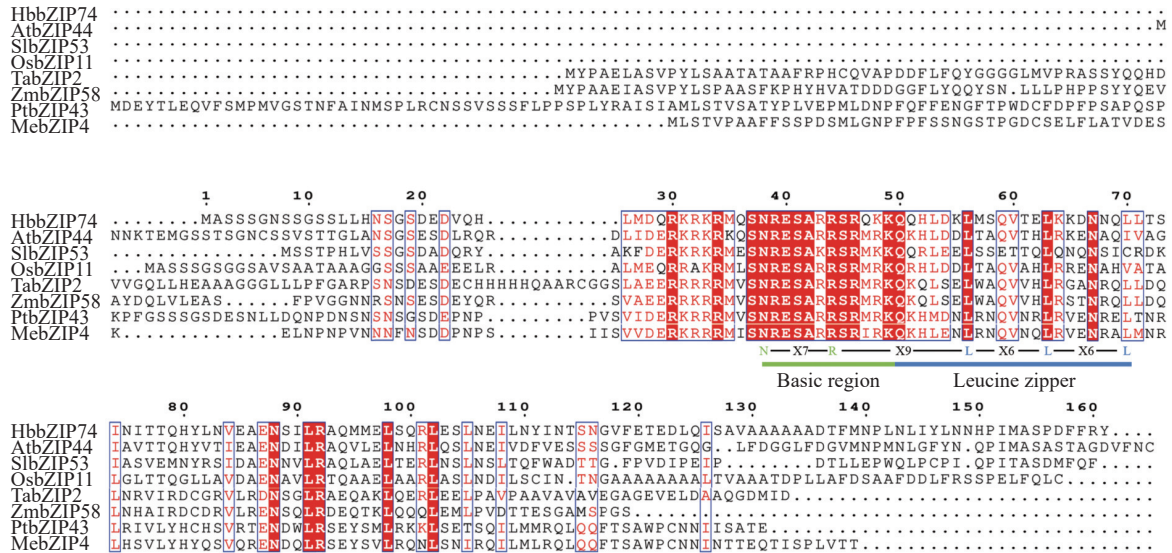


图 3 *HbbZIP74* 与其他物种氨基酸序列同源比对

Fig. 3 Homologous alignment of *HbbZIP74* amino acid sequences with other species

注: Basic region, 高度保守的 N-x7-R/K 基序; Leucine zipper, 亮氨酸/疏水氨基酸拉链。

Note: Basic region, Highly conserved N-x7-R/K motif; Leucine zipper, Leu/hydrophobic amino acid zipper.

**2.4 *HbbZIP74* 系统发育分析** 将拟南芥中的多个 bZIP 氨基酸序列与 *HbbZIP74* 进行序列比对,并构建进化树。结果发现,拟南芥 bZIP 依然被分为 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、M 和 S 等共 13 个亚家族, *HbbZIP74* 与 *AtbZIP2* 和 *AtbZIP11*

处于一个分支,属于 S 亚家族(图 4)。

**2.5 *HbbZIP74* 在橡胶树组织中的表达** 利用 qRT-PCR 检测了 *HbbZIP74* 在橡胶树根、树皮、叶片、花和胶乳等组织的表达情况。从图 5 可知, *HbbZIP74* 在胶乳中的表达水平最高,树皮中次之,

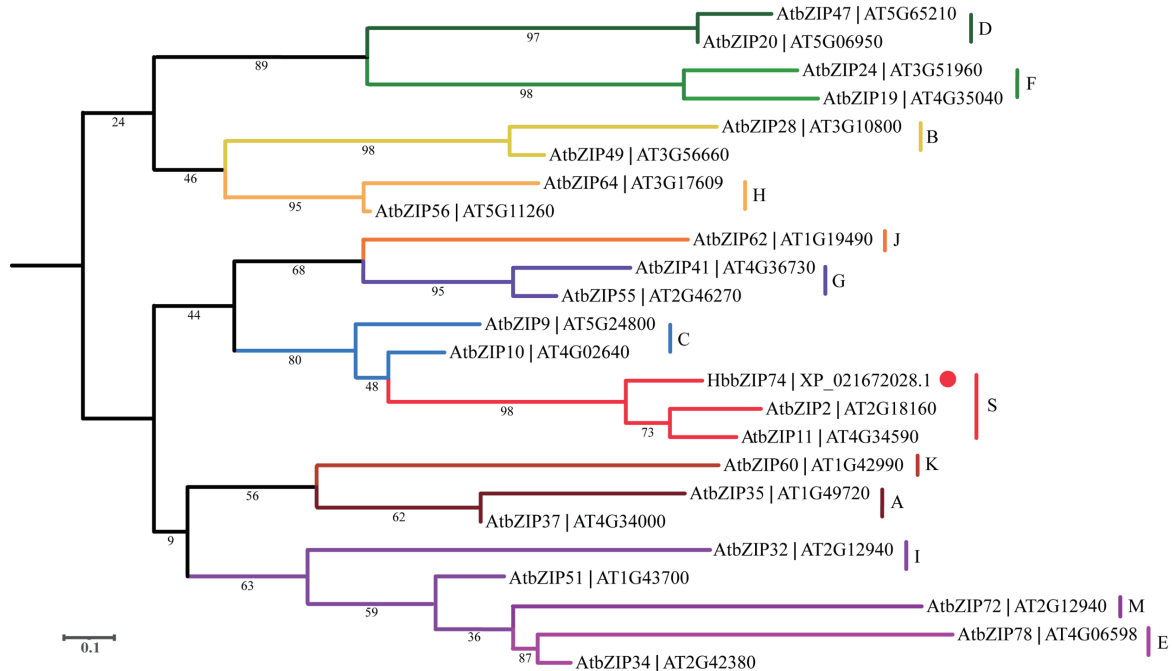


图 4 *HbbZIP74* 系统进化树  
Fig. 4 Phylogenetic tree of *HbbZIP74*

分别为根中表达量的 7.66 和 4.48 倍, 在叶中的表达量和根相当, 在花中的表达量最低。

## 2.6 在激素处理下的胶乳中 *HbbZIP74* 的表达

激素处理在天然橡胶的生物合成中起着重要的调控作用, 因此检测了茉莉酸、脱落酸、乙烯和水杨

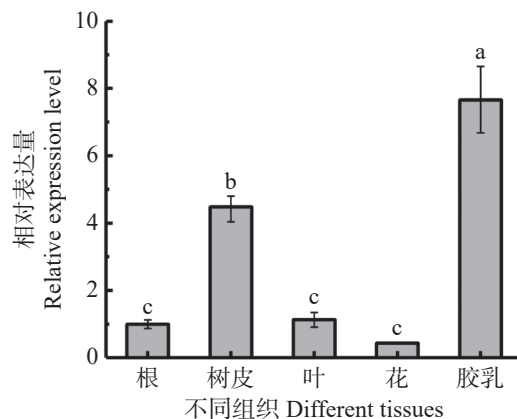


图 5 橡胶树不同组织 *HbbZIP74* 表达情况

Fig. 5 Expression of *HbbZIP74* in different tissues of the rubber tree

注: 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

Note: Different lowercase letters indicated significant difference ( $P < 0.05$ ), similarly hereinafter.

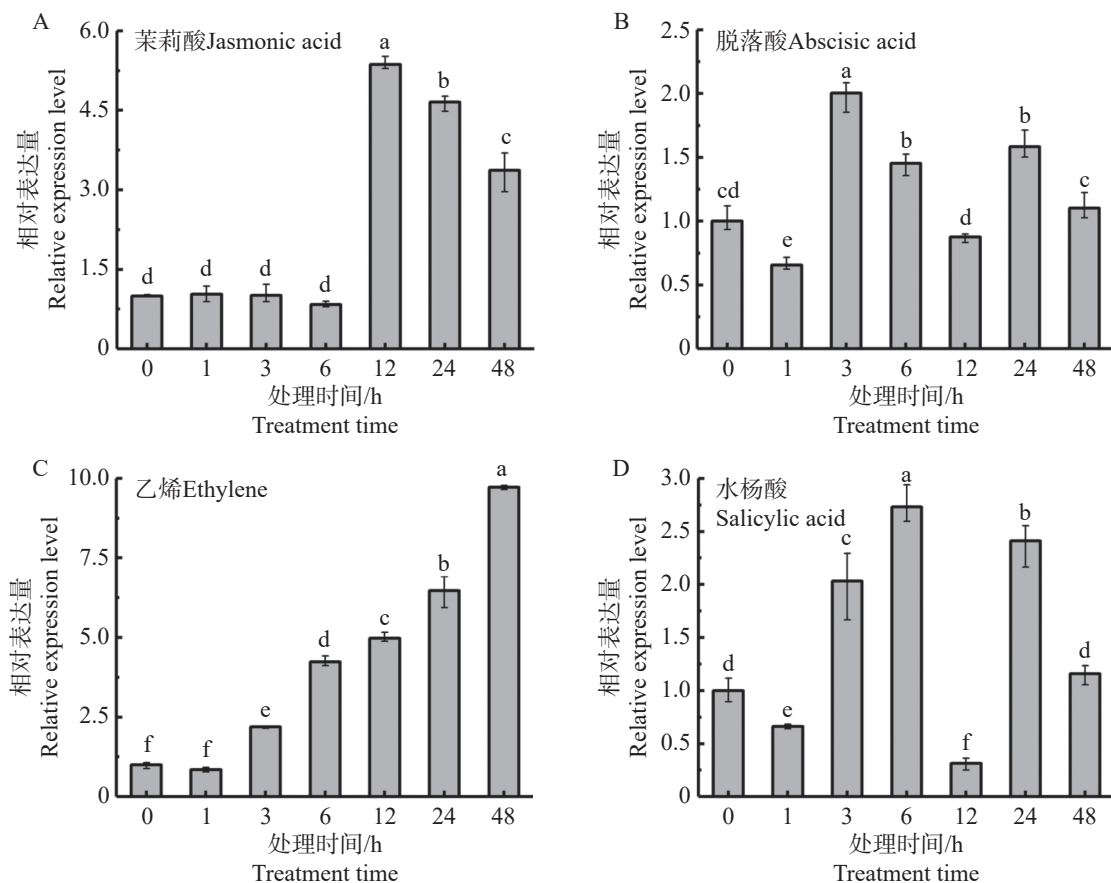


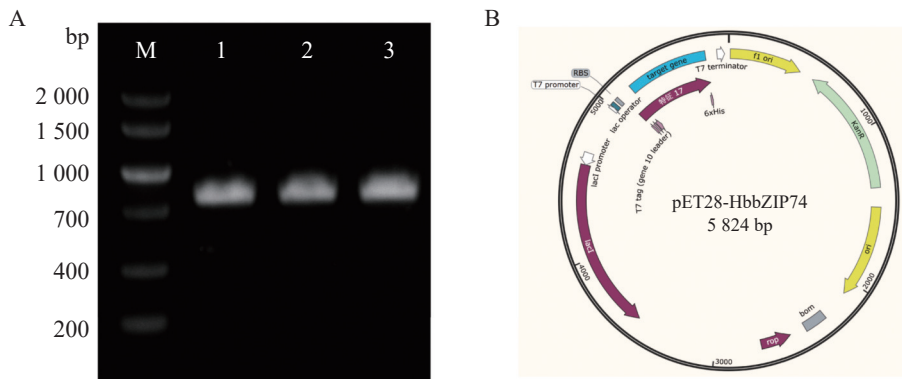
图 6 激素处理对胶乳中 *HbbZIP74* 表达的影响

Fig. 6 Expressions of *HbbZIP74* in latex under different hormone treatments

酸处理的胶乳中 *HbbZIP74* 的表达情况。qRT-PCR 结果显示, 4 种激素处理均能诱导 *HbbZIP74* 的表达 (图 6)。茉莉酸在处理 6 h 内, *HbbZIP74* 的表达水平基本没有变化, 12 h 的表达量达到最高值, 是正常表达水平的 5.36 倍 (图 6-A), 脱落酸、乙烯和水杨酸在处理 3 h 均使 *HbbZIP74* 的表达超过正常水平的 2 倍 (图 6-B—D)。

**2.7 *HbbZIP74* 蛋白原核表达载体构建** 以 pMD19T-*HbbZIP74* 质粒为模板, 使用引物 NCF 和 NCR 进行 PCR 扩增得到目标片段, 通过同源重组将目标片段连接到线性化后的 pET28a 载体上, 转化大肠杆菌。通过菌液 PCR 检测获得阳性克隆, 结果如图 7-A 所示。阳性单克隆提取质粒, 经测序与 *HbbZIP74* 的 CDS 序列一致, 表明 *HbbZIP74* 蛋白原核表达载体构建成功, 重组质粒命名为 pET28-*HbbZIP74*, 重组载体如图 7-B 所示。

**2.8 *HbbZIP74*-His 蛋白最佳诱导表达条件的确定** 将 pET28-*HbbZIP74* 重组质粒转入 BL21 (DE3) 菌株中, 37 °C 扩大培养至  $OD_{600}$  为 0.6 时, 分别加入终浓度为 0.1、0.3、0.5、1.0、2.0  $mmol \cdot L^{-1}$



A. M为2 000 bp DNA Maker; B. pET28-HbbZIP74重组载体图谱。  
A. M means 2 000 bp DNA Marker; B. Map of the recombinant vector pET28-HbbZIP74.

### 图7 重组载体 pET28-HbbZIP74 的构建

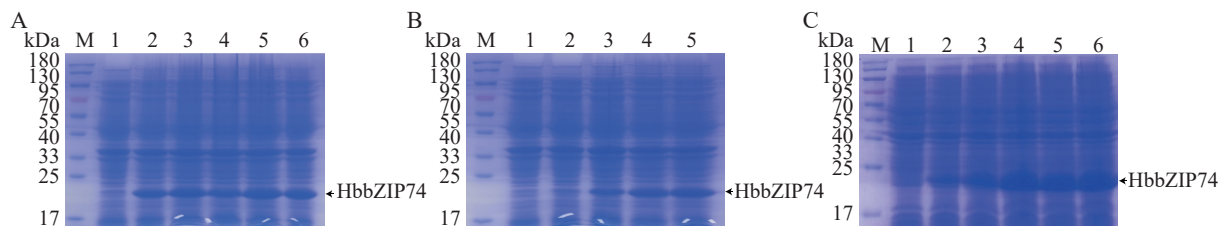
**Fig. 7 Construction of recombinant vector pET28-HbbZIP74**

注: 1~3 为 pET28-HbbZIP74 同源重组转化后的阳性克隆验证。

Note: 1-3 means positive clone verification after homologous recombination and transformation of pET28-HbbZIP74.

IPTG 后, 37 °C 诱导 5 h, SDS-PAGE 蛋白电泳检测结果如图 8-A 所示, 添加 IPTG 的菌液均诱导出分子质量约 22 kDa 蛋白, 与预测的 HbbZIP74-His 重组蛋白分子质量大小一致, 表明

HbbZIP74-His 蛋白在大肠杆菌 BL21 中成功诱导表达。泳道 5 和 6 诱导蛋白量相当且明显高于泳道 2~4, 说明 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 为诱导重组蛋白表达的最适浓度。



A. IPTG浓度对重组蛋白表达的影响; B. 不同温度对重组蛋白表达的影响; C. 不同诱导时间对重组蛋白表达的影响。  
A. Effect of IPTG concentration on recombinant protein expression; B. Effect of different temperatures on recombinant protein expression; C. Effect of different induction times on recombinant protein expression.

### 图8 HbbZIP74 蛋白诱导表达条件筛选

**Fig. 8 Screening of conditions for expression of HbbZIP74 protein by inducing**

注: M, 蛋白分子质量 Marker; 泳道 1 均未加 IPTG; A 泳道 1~6, IPTG 终浓度分别为 0、0.1、0.3、0.5、1.0、2.0 mmol·L<sup>-1</sup>; B 泳道 1 (16 °C, 0 mmol·L<sup>-1</sup>), 泳道 2~5, 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 在 16、20、28、37 °C 诱导。C 泳道 1~6, 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导 0、1、2、3、4、5 h。

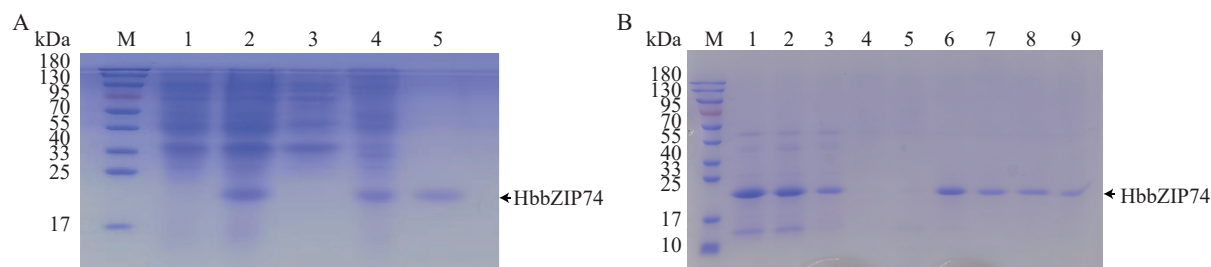
Note: M, Protein molecular weight marker; Lane 1 all none IPTG; Lanes 1-6 in A, IPTG final concentrations of 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, and 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>, respectively; Lane 1 (16 °C, 0 mmol·L<sup>-1</sup>), lanes 2-5 in B, induced by 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG at 16, 20, 28, and 37 °C, respectively; Lanes 1-6 in C, induced by 1 mmol·L<sup>-1</sup> for 0, 1, 2, 3, 4, and 5 h, respectively.

将 OD<sub>600</sub> 为 0.6 的菌液加入 1 mmol·L<sup>-1</sup> 终浓度的 IPTG, 分别在 16、20、28、37 °C 诱导 5 h, SDS-PAGE 蛋白电泳检测结果(图 8-B)表明, 泳道 2 蛋白量最少, 泳道 5 诱导蛋白表达量最高, 表明在 37 °C 重组蛋白表达效果最佳。

将 OD<sub>600</sub> 为 0.6 的菌液加入 1 mmol·L<sup>-1</sup> 终浓度的 IPTG, 在 37 °C 分别诱导 1、2、3、4、5 h, SDS-PAGE 蛋白电泳检测结果(图 8-C)表明, 蛋白在 1 h 就检测到了表达, 在 3 h 的表达量达到最大, 继续增加诱导时间蛋白表达量没有明显增多。因此, 确定 HbbZIP74-His 重组蛋白的最佳诱

导条件为在 37 °C 使用终浓度 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导 3 h。

**2.9 重组蛋白可溶性鉴定与纯化** HbbZIP74-His 重组蛋白的可溶性进行鉴定如图 9-A 所示, 诱导样品上清液中(泳道 3)无目的重组蛋白, 而沉淀中(泳道 4)包含目的蛋白, 说明 HbbZIP74-His 重组蛋白主要以不可溶的包涵体形式存在。将沉淀中的包涵体蛋白进行纯化, SDS-PAGE 电泳检测, 在裂解液洗涤后杂蛋白基本被洗除, 在洗脱液和 10 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑洗脱液中则无明显的条带, 在 50 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑洗脱液泳道出现目的条带, 后续纯



A. HbbZIP74蛋白诱导表达; B. HbbZIP74蛋白纯化。

A. Induced expression of HbbZIP74 protein; B. Purification of HbbZIP74 protein.

图9 HbbZIP74 蛋白诱导表达及纯化

Fig. 9 Induced expression and purification of HbbZIP74 protein

注: M, 蛋白分子质量 Marker; A) 泳道 1, 未诱导样品; 泳道 2, 诱导样品全菌液; 泳道 3, 诱导样品上清; 泳道 4, 诱导样品沉淀; 泳道 5, 纯化后的蛋白。B) 1, 蛋白裂解液; 2, 裂解液过滤后蛋白; 3, 上柱流穿液; 4, 洗脱液; 5, 10 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑洗脱液; 6~7, 50 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑洗脱液; 8~9, 100 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑洗脱液。

Note: M, Protein molecular weight marker; A) Lane 1, Uninduced sample; Lane 2, Induced sample whole cell lysate; Lane 3, Induced sample supernatant; Lane 4, Induced sample pellet; Lane 5, Purified protein; B) 1, Protein lysate; 2, Protein after lysate filtration; 3, Flow-through after column; 4, Elution buffer; 5, 10 mmol·L<sup>-1</sup> imidazole elution buffer; Lanes 6–7, 50 mmol·L<sup>-1</sup> imidazole elution buffer; Lanes 8–9, 100 mmol L<sup>-1</sup> imidazole elution buffer.

化可用 50 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑洗脱液进行洗脱(图 9-B)。洗脱后收集蛋白经透析后可获得纯化复性后的 HbbZIP74 蛋白(图 9-A, 泳道 5)。

### 3 讨论

bZIP 转录因子作为植物中最大的转录因子家族之一, 在植物生长发育、种子成熟和萌发、花发育、应对生物和非生物胁迫响应调控中的重要作用已有深入研究, 在参与植物次生代谢, 调控植物次生代谢产物的生物合成中也发挥了极其重要的作用。大量研究表明, bZIP 转录因子可有效调节植物萜类化合物、黄酮类化合物和生物碱的生物合成。青蒿(*Artemisia annua*)中, 除 AabZIP 外<sup>[25]</sup>, AabZIP9 也可以通过促进 ADS 和 CYP71AV1 的表达, 正向调控青蒿素的积累<sup>[29]</sup>。GbbZIP08 和 GbbZIP15 参与了银杏青花素的合成<sup>[30]</sup>。雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)bZIP 转录因子 TwTGA1 可以调节雷公藤内酯和倍半萜吡啶生物碱的生物合成<sup>[31]</sup>。天然橡胶是产胶植物体内合成的次生代谢产物, 短角蒲公英(*Taraxacum brevicorniculatum*)和橡胶树中已有 bZIP 转录因子促进天然橡胶生物合成基因的表达, 调节橡胶生物合成的报道<sup>[2,26]</sup>。本课题组前期通过酵母单杂交技术, 在胶乳 cDNA 文库中筛选到与法尼基焦磷酸合酶、橡胶转移酶、小橡胶粒子蛋白和橡胶延长因子等橡胶生物合成相关酶和蛋白基因互作的 bZIP 转录因子 HbbZIP74, 表明其可能与天然橡胶生物合成调控相关。蛋白多序列比对显示, HbbZIP74 具有 bZIP

转录因子的保守结构域, 属于 bZIP 转录因子家族成员。亚细胞定位预测 HbbZIP74 定位于细胞核中, 符合转录因子的一般特征。系统发育分析显示, HbbZIP74 属于 bZIP 家族的 S 亚家族, 该家族基因包含一类无内含子基因, 编码蛋白分子质量一般约 20 kDa, 和 C 亚家族能形成同源和异源二聚体, 在参与植物胁迫应答中发挥重要功能<sup>[15]</sup>。

橡胶树乳管细胞是特异化合成和储存天然橡胶的场所, 上下贯通分布于橡胶树树皮的韧皮部。乳管的数量是决定天然橡胶产量的关键因素<sup>[32]</sup>, 天然橡胶生物合成相关基因在乳管细胞中高丰度表达<sup>[33]</sup>。HbbZIP74 在胶乳中的表达量最高, 树皮中次之, 都显著高于根、叶和花等组织中的表达, 暗示 HbbZIP74 可能与天然橡胶合成存在密切关系。目前, 已经证实茉莉酸<sup>[14]</sup>、乙烯<sup>[34]</sup>、脱落酸和水杨酸<sup>[35]</sup>等激素在天然橡胶生物合成中起着重要的调控作用。本研究发现, 茉莉酸、乙烯、脱落酸和水杨酸均能显著诱导胶乳中 HbbZIP74 的表达, 乙烯对其影响最为显著, 并可以持续到 48 h, 茉莉酸也使其表达量提高 5 倍多; 脱落酸和水杨酸对 HbbZIP74 影响趋势比较一致, 能使 HbbZIP74 的表达提高 2~3 倍, 但在 12 h 时 HbbZIP74 表达量有明显的下降, 显示激素对基因的调控存在复杂的机制。综上所述, HbbZIP74 可能通过茉莉酸、乙烯、脱落酸和水杨酸信号途径参与对天然橡胶生物合成的调控。

转录因子编码蛋白的表达和纯化是开展其转录调控功能研究的基础, 纯化蛋白可通过凝胶阻

滞实验确定与靶基因启动子 DNA 的体外结合, 以及结合部位, 通过 pull-down 实验鉴定转录因子的互作蛋白。本研究成功构建了 *HbbZIP74* 的原核表达载体, 并对 *HbbZIP74*-His 重组蛋白的最优表达条件进行摸索。除基因本身特性外, 诱导剂浓度、诱导温度和时间都是影响蛋白表达的因素。本研究共使用 5 种浓度的 IPTG 诱导蛋白表达, 结果表明, IPTG 浓度的提高有助于蛋白表达量的增加, 当浓度到  $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 重组蛋白表达水平达到峰值; 温度对重组蛋白的表达影响较大,  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  下细菌生长较慢, 5 h 几乎没有重组蛋白表达,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  均有重组蛋白表达, 且  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  重组蛋白表达量最高, 这与  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  是大肠杆菌最适生长温度有关; *HbbZIP74*-His 重组蛋白在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  对诱导响应较快, 在 1 h 就有较多表达, 3 h 后达到稳定表达状态。目前认为, 包涵体的形成是由于蛋白在细胞内积累速率过快, 没有正确折叠而聚集沉淀, *HbbZIP74*-His 重组蛋白在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  表达速率较快, 可溶性检测显示主要以包涵体形式存在。本研究尝试降低诱导温度至  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 降低诱导剂 IPTG 浓度为  $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 延长诱导时间至 20 h, 仍然无法获得可溶重组目的蛋白, 推测形成包涵体可能与蛋白自身结构有较大关系。由于无法获得可溶重组蛋白, 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  使用终浓度  $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG 诱导 3 h 即为 *HbbZIP74*-His 蛋白快速高效表达的最优化条件。

通常包涵体蛋白缺乏生物活性, 需要分离、纯化和复性用于后续研究。本研究中使用碱性缓冲液溶解包涵体, 上清液经滤膜过滤后, 使用 Ni-NTA 柱进行亲和纯化, 咪唑洗脱后获得目标重组蛋白, 洗脱液使用透析复性、富集, 获得可用于下一步研究的 *HbbZIP74*-His 纯化蛋白。这一结果将为验证 *HbbZIP74* 与靶标基因启动子结合, *HbbZIP74* 与其他蛋白相互作用提供了前提, 也为深入研究转录因子 *HbbZIP74* 在天然橡胶生物合成中的功能奠定了基础。

本研究克隆了 *HbbZIP74* 基因, qRT-PCR 分析结果显示, *HbbZIP74* 在橡胶树胶乳和树皮中的表达水平较高, 茉莉酸、脱落酸、乙烯和水杨酸处理, 可以诱导胶乳中 *HbbZIP74* 的表达。通过构建 pET28-*HbbZIP74* 原核表达载体, 在大肠杆菌 (*E. coli*) BL21(DE3) 菌株中进行异源表达和重组蛋白

纯化, 筛选出 *HbbZIP74*-His 重组蛋白的最佳表达条件为  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  诱导 3 h, 重组蛋白主要存在于包涵体中。通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化获得大小约 22 kDa 的 *HbbZIP74*-His 重组蛋白, 为进一步探究 *HbbZIP74* 在天然橡胶生物合成中的功能奠定基础。

## 参考文献:

- [1] Cherian S, Ryu S B, Cornish K. Natural rubber biosynthesis in plants, the rubber transferase complex, and metabolic engineering progress and prospects [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(11): 2041–2061. <https://doi.org/10.1111/pbi.13181>
- [2] Bangrak P, Chotigeat W. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cystatin from *Hevea* rubber latex [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, 49(3): 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.12.007>
- [3] Tang C, Yang M, Fang Y, et al. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation [J]. *Nature Plants*, 2016, 2(6): 16073. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.73>
- [4] De G N, Gholami A, Goormachtig S, et al. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism [J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(6): 349–359. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.001>
- [5] Wang Y, Guo D, Li H L, et al. Characterization of HbWRKY1, a WRKY transcription factor from *Hevea brasiliensis* that negatively regulates *HbSRPP* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 71: 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.07.020>
- [6] Guo D, Yi H Y, Li H L, et al. Molecular characterization of HbCZF1, a *Hevea brasiliensis* CCCH-type zinc finger protein that regulates *hmg1* [J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(9): 1569–1578. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1809-6>
- [7] Li H L, Wei L R, Guo D, et al. HbMADS4, a MADS-box transcription factor from *Hevea brasiliensis*, negatively regulates *HbSRPP* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1709.
- [8] Li H L, Qu L, Guo D, et al. Histone deacetylase interacts with a WRKY transcription factor to regulate the expression of the small rubber particle protein gene from *Hevea brasiliensis* [J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 145: 111989. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111989>
- [9] Guo D, Li H L, Wang Y, et al. A myelocytomatosis transcription factor from *Hevea brasiliensis* positively regulates the expression of the small rubber particle protein gene [J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 133: 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.052>
- [10] Wang Y, Zhan D F, Li H L, et al. Transcriptome-wide

- identification and characterization of *MYB* transcription factor genes in the laticifer cells of *Hevea brasiliensis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1974. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01974>
- [11] Wang Y, Zhan D F, Li H L, et al. Identification and characterization of the *MADS*-box genes highly expressed in the laticifer cells of *Hevea brasiliensis* [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 12673. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48958-9>
- [12] Qu L, Li H L, Guo D, et al. HbWRKY27, a group IIe WRKY transcription factor, positively regulates HbFPS1 expression in *Hevea brasiliensis* [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 20639. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77805-5>
- [13] Guo D, Yang Z P, Li H L, et al. The 14-3-3 protein HbGF14a interacts with a RING zinc finger protein to regulate expression of the rubber transferase gene in *Hevea brasiliensis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(8): 1903–1912. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery049>
- [14] Deng X, Guo D, Yang S, et al. Jasmonate signalling in the regulation of rubber biosynthesis in laticifer cells of rubber tree, *Hevea brasiliensis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(15): 3559–3571. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery169>
- [15] Dröge-laser W, Snoek B L, Snel B, et al. The *Arabidopsis* bZIP transcription factor family: an update [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2018, 45: 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.05.001>
- [16] 张瑜, 原淑佳, 李瑞锋, 等. 植物 bZIP 转录因子生物学功能研究进展 [J]. *山西中医药大学学报*, 2023, 24(2): 221–225.
- [17] Ellenberger T E, Brandl C J, Struhl K, et al. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex [J]. *Cell*, 1992, 71(7): 1223–1237. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80070-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80070-4)
- [18] Landschulz W H, Johnson P F, Mcknight S L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins [J]. *Science*, 1988, 240(4860): 1759–1764. <https://doi.org/10.1126/science.3289117>
- [19] Guo Z, Dzinyela R, Yang L, et al. bZIP transcription factors: structure, modification, abiotic stress responses and application in plant improvement [J]. *Plants*, 2024, 13(15): 2058. <https://doi.org/10.3390/plants13152058>
- [20] Zhang M, Liu Y, Shi H, et al. Evolutionary and expression analyses of soybean basic Leucine zipper transcription factor family [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 159. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4511-6>
- [21] Li D, Fu F, Zhang H, et al. Genome-wide systematic characterization of the bZIP transcriptional factor family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 771. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1990-6>
- [22] Duan L, Mo Z, Fan Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the bZIP transcription factor family genes in response to abiotic stress in *Nicotiana tabacum* L [J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 318. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08547-z>
- [23] Zhang B, Feng C, Chen L, et al. Identification and functional analysis of bZIP genes in cotton response to drought stress [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(23): 14894. <https://doi.org/10.3390/ijms232314894>
- [24] Hu W, Yang H, Yan Y, et al. Genome-wide characterization and analysis of bZIP transcription factor gene family related to abiotic stress in cassava [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22783. <https://doi.org/10.1038/srep22783>
- [25] Zhang F, Fu X, Lv Z, et al. A basic leucine zipper transcription factor, AabZIP1, connects abscisic acid signaling with artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(1): 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.004>
- [26] 赵同, 张盛敏, 曹杰, 等. 橡胶草 bZIP 基因家族鉴定及胶乳高表达基因功能分析 [J]. *南方农业学报*, 2025, 56(9): 2723–2735. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-1191.2025.09.003>
- [27] Chang C, Liu Z, Wang Y, et al. A bZIP transcription factor, CaLMF, mediated light-regulated camptothecin biosynthesis in *Camptotheca acuminata* [J]. *Tree Physiology*, 2019, 39(3): 372–380.
- [28] Guo D, Li H L, Zhu J H, et al. HbTGA1, a *TGA* transcription factor from *Hevea brasiliensis*, regulates the expression of multiple natural rubber biosynthesis genes [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 909098. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.909098>
- [29] Shen Q, Huang H, Zhao Y, et al. The transcription factor Aabzip9 positively regulates the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1294. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01294>
- [30] Han H, Xu F, Li Y, et al. Genome-wide characterization of bZIP gene family identifies potential members involved in flavonoids biosynthesis in *Ginkgo biloba* L. [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 23420. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02839-2>
- [31] Han J, Liu H T, Wang S C, et al. A class I *TGA* transcription factor from *Tripterygium wilfordii* Hook.f. modulates the biosynthesis of secondary metabolites in both native and heterologous hosts [J]. *Plant Science*, 2020, 290: 110293. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110293>
- [32] 史敏晶, 张世鑫, 晁金泉, 等. 橡胶树 1981'IRRDB 野生种质预割诱导次生乳管分化的比较分析 [J]. *热带作物学报*, 2022, 43(2): 303–310. <https://doi.org/10.3969/j.>

issn.1000-2561.2022.02.010

00621

- [33] 张豪, 张华, 黎晓思, 等. 橡胶树无性系热研 879 胶乳 HbPPO2 基因克隆及表达分析 [J]. 南方农业学报, 2025, 56(9): 2793–2804. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-1191.2025.09.009>
- [34] Gao L, Sun Y, Wu M, et al. Physiological and proteomic analyses of molybdenum- and ethylene-responsive mechanisms in rubber latex [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 621. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00621>
- [35] Tungngoen K, Viboonjun U, Kongsawadworakul P, et al. Hormonal treatment of the bark of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) increases latex yield through latex dilution in relation with the differential expression of two aquaporin genes [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(3): 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.009>

## Expression analysis and prokaryotic expression purification of *HbbZIP74* gene in rubber tree

Liu Ziquan<sup>1#</sup>, Zhu Jiahong<sup>2,3,4</sup>, Wang Ying<sup>2,3,4</sup>, Li Huiliang<sup>2,3,4</sup>, Li Yuji<sup>2,3</sup>,  
Tang Yanqiong<sup>1\*</sup>, Guo Dong<sup>2,3,4\*</sup>

(1. School of Life and Health, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding, Sanya, Hainan 572024, China; 4. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572024, China)

**Abstract:** In order to assess the role of the bZIP transcription factor in the biosynthesis of natural rubber in *Hevea brasiliensis*, *HbbZIP74* gene was successfully cloned based on previous work in our laboratory. Bioinformatics analysis and expression pattern analysis were performed. The pET28-HbbZIP74 expression vector was constructed, and the recombinant protein was expressed in the strain *Escherichia coli* BL21 (DE3) and then purified. The results showed that the open reading frame (ORF) of the gene *HbbZIP74* is 486 bp, encoding 161 amino acids, with a bZIP domain, classifying it as a bZIP transcription factor S subgroup. The expression level of *HbbZIP74* is higher in latex and leaves, and its expression can be induced by jasmonic acid, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid in latex. The optimal condition for the heterologous expression of the HbbZIP74-His recombinant protein was induced at 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG and 37 °C for 3 h. The recombinant protein was mainly accumulated in inclusion bodies. The recombinant protein, approximately 22 kDa in size, was purified using Ni-NTA affinity chromatography, which was consistent with expectations. This study lays the foundation for further exploration of the role of *HbbZIP74* in the biosynthesis of natural rubber.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis*; bZIP transcription factor; gene cloning; gene expression; protein purification

(责任编辑: 潘学峰)