

权 利 要 求 书

1、一种 *CYP71Z18* 基因的编码蛋白在调节和生产植物二萜类化合物中的应用，其特征在于，包括以下步骤：

5 将 *pGGsC/pGGeC*、*pDEST14-OsKSL* 与 *pCDF- AtCPR1-CYP71Z18* 三种重组质粒各 100-150ng 同时加入 40 μ L 大肠杆菌 C41(DE3)感受态细胞中，冰浴 20min，42 $^{\circ}$ C 热激 1min30s，冰上冷却 2min 后加入液体 LB 培养基 200 μ L 复苏 2h，再涂布于同时含有氯霉素 50mg/L、硫酸卡那霉素 50mg/L 和盐酸壮观霉素 50mg/L 的固体 LB 培养基平板上；37 $^{\circ}$ C 过夜培养，第二天挑选平均菌落，置于同时含有氯霉素 50mg/L、硫酸卡那霉素 50mg/L 和盐酸壮观霉
10 素 50mg/L 的 5mL 液体 LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C，过夜摇菌制备得到 6 种菌种；这些菌种为大肠杆菌 C41(DE3)背景株系，且每个菌种分别含有三种质粒：

- ① *pGGsC*，*pDEST14-OsKSL4*，*pCDF- AtCPR1-CYP71Z18*；
- ② *pGGsC*，*pDEST14-OsKSL8*，*pCDF- AtCPR1-CYP71Z18*；
- ③ *pGGsC*，*pDEST14-OsKSL10*，*pCDF- AtCPR1-CYP71Z18*；
- 15 ④ *pGGsC*，*pDEST14-OsKSL11*，*pCDF- AtCPR1-CYP71Z18*；
- ⑤ *pGGeC*，*pDEST14-OsKSL7*，*pCDF- AtCPR1-CYP71Z18*；
- ⑥ *pGGeC*，*pDEST14-OsKSL10*，*pCDF- AtCPR1-CYP71Z18*；

次日取 1mL 菌种置于 50mL TB 液体培养基，培养基中加入相应的抗生素，37 $^{\circ}$ C，200rpm 培养，菌液养至 A_{600} 达到 0.8-1.0，向其中加入 1 mM 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷诱导表达，并在诱导表达时加入细胞色素 P450
20 反应所需辅因子 75mg/L δ -氨基乙酰丙酸，1mM 硫胺素，5mg/L 核黄素；然后转至 16 $^{\circ}$ C，200rpm 诱导培养 72 h；72 h 后用等体积的正己烷萃取萜类产物；所有的产物都经过叠氮甲烷甲基化后用于 GC-MS 检测羧酸类产物，制备得到羧酸类产物；

25 ~~2、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述液体 LB 培养基具体为：酵母提取物 5g，胰蛋白胨 10g，NaCl 10g，去离子水 1L，用 1mol/L 的 NaOH 调 PH 值至 7.0；高压灭菌，4 $^{\circ}$ C 保存；固体 LB 培养基在灭菌前加上 15g/L 的琼脂。~~

~~3、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，~~所述 TB 液体培养基具体为：NaCl 5g，MgSO₄·7H₂O 2g，酵母提取物 24g，水解酪蛋白 12g，甘油 20mL，去离子水 900mL；10×TB 缓冲液：KH₂PO₄2.31g，K₂HPO₄12.54g，去离子水 100mL；高压灭菌，4℃保存，使用时加入 10×TB 缓冲液 100mL。

5 | 42、权利要求 1 所述的 *CYP71Z18* 基因的编码蛋白在水稻育种中的应用，所述 *CYP71Z18* 基因的编码蛋白如 SEQ ID NO.2 所示。