

HNNY

湖南省农业技术规程

HNNY487-2026

除草剂靶标 SHMT 酶的表达纯化及活性 测定技术规程

Method for expression, purification and activity determination of
herbicide target Serine Hydroxymethyltransferase (SHMT)

2026-07-08 发布

2026-07-08 实施

湖南省农业农村厅发布

目 次

前言	1
1 范围	2
2 规范性引用文件	2
3 术语和定义	2
4 缩略语	2
5 测定准备	3
6 测定	5
7 档案管理	10
附录 A 相关试剂的配制	11
附录 B SHMT 酶活性抑制效果计算	13
附录 C 统计档案	16

前 言

本文件按《湖南省农业技术规程制定与发布管理规范》相关规定起草。

本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由湖南省农业标准化技术委员会提出并技术归口。

本文件起草单位：湖南省植物保护研究所、河南大学、南通江山农药化工股份有限公司、

祥霖美丰生物科技（淮安）有限公司、浙江天一生物科技有限公司。

本文件起草人：李祖任、张鑫、柏连阳、王应英、杨浪、刘昱彤、柏浩东、王利、宋金华、

樊梅云、曹战强、吴应多。

除草剂靶标 SHMT 酶的表达纯化及活性测定技术规程

1 范围

本文件规定了除草剂靶标SHMT酶表达纯化及测定准备、测定和档案管理。

本文件适用于植物SHMT酶活性的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

NY/T 1155.4 农药室内生物测定试验准则除草剂第 4 部分活性测定试验茎叶喷雾法

NY/T 1276 农药安全使用规范总则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 丝氨酸羟甲基转移酶 serine hydroxymethyl transferase (SHMT)

是除草剂靶标酶，催化四氢叶酸（THF）、甘氨酸、5,10-亚甲基乙二胺（THF）与丝氨酸羟甲基转移和相互转化。

3.2 酶活性 enzyme activity

是指酶催化特定化学反应的能力。酶活力的大小与反应底物和时间相关，通常用单位时间内底物消耗量或产物生成量来衡量。

3.3 丝氨酸羟甲基转移酶活性 SHMT enzyme activity

通过测定DL-β-苯基丝氨酸分解产生的苯甲醛在OD279处的紫外吸收值来衡量SHMT的酶活性。

4 缩略语

下列缩略语适用于本标准：

1) bp: 碱基对；

- 2) DNA: 脱氧核糖核酸;
- 3) dNTPs: 脱氧核糖核苷三磷酸;
- 4) PCR: 聚合酶链式反应;
- 5) RNA: 核糖核酸;
- 6) RT-PCR: 反转录PCR;
- 7) Taq酶: *Thermus Aquaticus* (Taq) DNA聚合酶;
- 8) DEPC: 焦碳酸二乙酯;
- 9) CcSHMT: 小飞蓬丝氨酸羟甲基转移酶;
- 10) SDS-PAGE: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

5 测定准备

5.1 试剂

除另有规定外,所有实验用试剂均为分析纯;实验用水均为超纯水,应符合GB 6682的相关规定:

- 1) pET32a (+) 表达载体;
- 2) 大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞;
- 3) cDNA反转录试剂盒;
- 4) Phanta Maxfidelity DNA 聚合酶;
- 5) 质粒快速提取试剂盒;
- 6) 凝胶回收试剂盒;
- 7) HiScript II 1st Strand cDNA synthesis Kit 试剂盒;
- 8) 3' Full Race Core Set with PrimeScript RTase;
- 9) SMARTer RACE 5' /3' Kit;
- 10) Taq酶;
- 11) T4 DNA酶;
- 12) DNA限制性内切酶;
- 13) DNA 同源重组试剂盒;
- 14) 氯仿;
- 15) 琼脂粉;
- 16) 蛋白胨;
- 17) 酵母粉;
- 18) 盐酸;

- 19) 磷酸二氢钾;
- 20) 氯化钠;
- 21) 氨苄青霉素 (Ampicillin);
- 22) 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG);
- 23) Ni Smart Beads 6FF 填料;
- 24) 三羟甲基氨基甲烷 (Tris);
- 25) 甘氨酸;
- 26) 咪唑;
- 27) 十二烷基硫酸钠 (SDS);
- 28) 考马斯亮蓝 (A045-2);
- 29) 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB);
- 30) DL- β -苯基丝氨酸;
- 31) 96孔UV紫外检测酶标板;
- 32) 引物: 见附录A.18。

5.2 仪器设备

测试所需仪器设备见表1。

表 1 仪器需求

仪器名称	精度要求
高速冷冻离心机	转速: 0-12000rpm 电流: 21A 功率: 4600W
PCR 扩增仪	电压: 85-250V 频率: 50-60Hz 功率: 350VA
核酸电泳仪和水平电泳槽	温/湿要求: 5-40℃/0-80% 电压: 10-600 电流: 1-500mA
超低温冰箱 (-80 ℃)	温度要求: -40℃~-80℃ 电压: 20V 频率: 50Hz 功率: 1000W
凝胶成像系统	电压: 100-230V 频率: 50-60Hz 功率: 120W
通风橱	电流: AC220 10A
微量移液枪	量程范围: 0.5-10 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L
X 射线胶片观片灯	屏幕亮度: $\geq 4000\text{cd/m}^2$ 电压: 220V 频率: 50Hz
隔水式恒温培养箱	温控范围: 0-70℃ 功率: 500W
酶标仪	扫描波长范围: 200-1000nm
细胞破碎仪	电压: 220V 功率: 150W
超净工作台	洁净等级: 100 级@ $\geq 0.5 \mu\text{M}$

6 测定

6.1 基因克隆

6.1.1 叶片RNA的提取

靶标杂草在温室培养7天后，取其鲜嫩叶片，经液氮速冻后研磨成粉，随后根据Trizol法提取总RNA。所提RNA通过琼脂糖凝胶电泳检测核酸质量。

6.1.2 反转录

将经电泳检测质量较好的RNA进行反转录。按照以下反应体系加入各种试剂（表2）。用移液器轻轻吹打混匀。42 ℃ 孵育2 min。用移液器轻轻吹打混匀。按照程序（表3）进行反转录反应，生成cDNA，取2 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

表 2 RT-PCR 反应体系

组分	加样量
RNase free ddH ₂ O	To 16 μL
4 × gDNA wiper Mix	4 μL
Oligo (dT) ₂₃ VN (50 μM)	1 μL
Random hexamers (50 ng/μL)	1 μL
Total RNA	10 pg-1 μg
用移液器轻轻吹打混匀，42 ℃ 2 min。	
组分	加样量
上一步的混合液	16 μL
10 × RT Mix	2 μL
HiScript II Enzyme Mix	2 μL

表 3 RT-PCR 反应程序

温度（℃）	时间
50	15 min
85	2 min

6.1.3 目的基因片段的扩增

依据SHMT基因同源保守序列，设计扩增引物。以反转录cDNA为模板，使用Phanta Maxfidelity DNA聚合酶进行PCR扩增，扩增体系及反应条件见表4和5。

表 4 扩增 SHMT 基因的反应体系

体系组分	加量
ddH ₂ O	17 μ L
2×Phanta Max Buffer	25 μ L
dNTP Mix (10 mM each)	1 μ L
模板 DNA	2 μ L
引物 1 (10 μ M)	2 μ L
引物 2 (10 μ M)	2 μ L
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (1U/ μ L)	1 μ L
合计	50 μ L

表 5 扩增 SHMT 基因的反应程序

温度 (°C)	时间	循环数
95	30 s	1
95	15 s	34
45-55	15 s	
72	1 min	
72	5 min	1

6.1.4 PCR 产物的鉴定

1% 琼脂糖凝胶的制备: 称取0.2 g琼脂糖粉末倒入至20 mL 1×TAE Running Buffer中混合，微波炉加热煮沸直至溶解，待冷却至40 °C，加入浓度为0.5 μ g/mL的溴化乙锭，混合后倒入预制胶架中。

上样：待凝胶凝固后，添加样品。电泳：150 V，10 min。 观察：电泳完成后在254 nm的紫外灯下观察凝胶，根据核酸Marker条带位置确定DNA样品大小。

6.1.5 目的片段回收

按照凝胶回收试剂盒操作将大小正确对目标条带进行切胶回收，回收完成后留待载体构建使用。

6.2 原核表达载体构建

6.2.1 目的片段和载体片段的连接

回收得到目的基因SHMT的PCR产物与6.1.5中的回收片段进行连接。首先使用限制性内切酶BamHI对pET32a载体进行酶切，经纯化回收后，与SHMT的PCR产物进行同源重组连接，反应物留待转化使用，反应体系及条件见表6和7。混匀上述反应液，4000 rpm 离心1 min，于37 °C反应30 min，冰上冷却。

表 6 酶切反应体系

组分	体积
10×K 或 10×L Buffer	2 μL
载体质粒	5 μL
BamHI 或 HindIII	2 μL
ddH ₂ O	Up to 40

表 7 PCR 产物与载体 pET32a 连接体系

组分	体积
线性化载体	4 μL
插入片段	1 μL
5×CE II Buffer	2 μL
Exnase II	1 μL
ddH ₂ O	补足 10 μL

6.2.2 转化大肠杆菌DH5 α

通过热激将连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞，具体流程如下：将大肠杆菌DH5 α 于冰上直解冻后加入10 μ L连接产物，冰浴30 min。42 $^{\circ}$ C水浴中90 s，冰浴中2 min。加入800 μ L无抗LB液体培养基，于37 $^{\circ}$ C 200 rpm 60 min。6000 rpm离心3 min。吸取100 μ L混合液加至含氨苄青霉素抗性LB固体培养基上，37 $^{\circ}$ C倒置培养12 h~16 h。挑取抗性菌落37 $^{\circ}$ C，2 h，180 rpm扩大培养。取1 μ L菌液进行PCR阳性检测。菌液PCR反应体系见表8，反应程序见表9。

表 8 扩增 SHMT 基因的反应体系

体系组分	加量
ddH ₂ O	9.5 μ L
2 $\times$ Taq mix	12.5 μ L
菌液	1 μ L
引物 1 (10 μ M)	1 μ L
引物 2 (10 μ M)	1 μ L
合计	25 μ L

表 9 扩增 SHMT 基因的反应程序

温度 ($^{\circ}$ C)	时间	循环数
95	3 min	1
95	15 s	34
57	15 s	
72	1 min	
72	5 min	1

6.2.3 重组质粒阳性克隆的筛选

选择PCR阳性转化子，通过摇晃培养细菌，并提取质粒送测序，测序匹配正确的克隆菌落为转化成功大肠杆菌菌落。提取阳性菌株质粒备用。

6.3 原核表达

6.3.1 转化大肠杆菌BL21

阳性重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞。感受态BL21(DE3)细胞于冰上溶解，溶解后将质粒移入至细胞悬液中，冰浴30 min。42 °C热激75 s，冰浴2 min。加入750 μL无抗LB液体培养基，37 °C 200 rpm 50 min。室温3000 rpm 离心1 min。100 μL转化产物加至含氨苄青霉素的LB固体培养基上，37 °C倒置培养12 h~16 h。

6.3.2 SHMT蛋白的诱导表达

将阳性克隆子接种至含氨苄青霉素的LB液体培养基内，37 °C 200 rpm 12 h~16 h摇床活化菌种。

将活化完成的LB培养基以1: 100的比例接种于含氨苄青霉素的LB液体培养基中，在37 °C 200 rpm的恒温摇床中培养至OD600在0.6~0.8之间。

加入终浓度0.5 mM的异丙基硫代-β-D 半乳糖苷(IPTG)，于16 °C恒温摇床中110 rpm过夜诱导12 h~14 h。收集并离心诱导完成的大肠杆菌菌液，留沉淀待用。

6.4 SHMT蛋白的分离纯化

6.4.1 细胞破碎

将收集菌体重悬于10 mL细胞裂解液中，冰浴条件下超声波破碎。超声细胞破碎功率20%~25%，5*5 min(5 s破碎，5 s停止)，细胞悬液充分破碎至乳白色水滴状，破碎完成后4 °C 12000 rpm离心30 min，收集上清。

6.4.2 分离纯化

柱平衡：将Ni Smart Beads 6FF填料摇晃混匀，吸取2 mL混合液至层析柱内，待填料与乙醇分层后将乙醇流出。向层析柱中依次加入10 mL的去离子水及20 mL Binding Buffer平衡层析柱。

蛋白的洗脱：将破碎后的上清液过层析柱使蛋白挂柱，使用15倍柱体积Binding Buffer冲洗层析柱，再分别使用2 mL~3 mL含不同咪唑浓度的Elution Buffer重复进行三次梯度洗脱，经SDS-PAGE检测洗脱效果。

封柱：洗脱完成后，依次使用500 mmol/L咪唑浓度的洗脱液，10 mL去离子水平衡层析柱，加入5 mL 20%乙醇平衡封柱后保存至4 °C冰箱。

6.4.3 SDS-PAGE蛋白检测

通过SDS-PAGE检测目的蛋白是否表达。参照A9配方制备10 % SDS-PAGE分离胶和5 % SDS-PAGE浓缩胶，待凝胶聚合后，取20 μL待测样品加入5 μL的5×蛋白上样缓冲液，上样前在沸水中煮沸5 min，方可上样。蛋白上样量为10 μL，起始电压为80 V，电泳15 min~20 min，直至溴酚蓝处于同一水平线且到达分离胶时将电压调为120 V，持续电泳90 min~120 min，

直至溴酚蓝到达分离胶底部，完成电泳。电泳完成后，将分离胶于考马斯亮蓝染色液中30 min，脱色液过夜脱色直至清亮，于X射线胶片观片灯观察。

6.5 SHMT酶活性测定

6.5.1 绘制苯甲醛标准曲线

配置浓度分别为1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、30 mmol/L、40 mmol/L的苯甲醛标准溶液，测定OD279吸光值，标准曲线以吸光值与苯甲醛浓度关系绘制，得出回归方程。

6.5.2 SHMT酶活性反应

加入1 mL SHMT底物反应液，底物反应液应现用现配。加入50 μ L含纯蛋白的溶液。恒温水浴锅中37 $^{\circ}$ C保温反应15 min。

6.5.3 SHMT酶反应产物测定

上述反应结束后13000 rpm 离心3 min。离心完成后，取200 μ L加至96孔UV紫外检测酶标板中，酶标仪上测定OD279值。以苯甲醛标准曲线回归方程计算逆向酶活。

7 档案管理

应建立档案记录，记录应清晰、完整、详细，见附录C和D；档案应专人负责，并保存2年以上。

附 录 A
(规范性)
相关试剂的配制

A.1 LB 培养基: 称取酵母粉 5 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 10 g, 在固体培养基中加入 15 琼脂粉, 用超纯水定容至 1 L。

A.2 50 mg/mL 氨苄青霉素溶液 (母液): 称取氨苄青霉素 0.5 g, 加水定容 10 mL, 0.22 μ M 滤膜过滤除菌后分装, -20℃冰箱保存待用。

A.3 20% 0.8 mol/L IPTG 母液: 称取 IPTG 2 g, 加超纯水 8 mL 定容至 10 mL, 0.22 μ M 滤膜过滤除菌后分装, -20℃冰箱保存待用。

A.4 考马斯亮蓝脱色液: 甲醇 30 mL, 乙酸 10 mL, 加水 60 mL 定容至 100 mL, 室温保存。

A.5 考马斯亮蓝染色液: 称取考马斯亮蓝 0.05 g, 甲醇 50 mL, 乙酸 10 mL, 加入纯水 40 mL 定容至 100 mL, 使用滤纸过滤后室温保存。

A.6 5×SDS-PAGE 电泳缓冲液: 称取 Tris 15 g, 甘氨酸 72 g, SDS 5 g 加水定容至 1L, 使用时按 1: 4 的比例稀释, 室温下保存。

A.7 细胞裂解液: 1M Tris-HCl (pH=8.0) 50 mmol/L; 咪唑 10 mmol/L。

A.8 可溶性蛋白与包涵体蛋白纯化缓冲液配方见表 A.1。

表 A.1 可溶性蛋白与包涵体蛋白纯化缓冲液配方

成分	1M Tris-HCl (pH 7.9)	1M 咪唑	3M 氯化钠	尿素/盐酸胍
可溶性蛋白 Binding Buffer	20 mM	10 mM	0.5 M	-
可溶性蛋白 Elution Buffer	20 mM	50-500 mM	0.5 M	-
包涵体蛋白 Binding Buffer	20 mM	10 mM	0.5 M	8M/6M
包涵体蛋白 Elution Buffer	20 mM	50-500 mM	0.5 M	8M/6M

A.9 SDS-PAGE 浓缩胶和分离胶的制备见表 A.2。

表 A.2 SDS-PAGE 浓缩胶和分离胶的制备表

成分 (mL)	10 mL 10 % 分离胶	4 mL 5 % 浓缩胶
纯水	4.17	2.24
30 Acr-Bis (29:1)	3.33	0.68

SDS-PAGE Separating Gel buffer (4×)	2.5	1
10% APS	0.1	0.04
TEMED	0.004	0.004

A. 10 0.2 mol/L (pH=7.6) 磷酸缓冲液：取磷酸二氢钾 27.22 g，加水溶解成 1 L，取 50 mL，加 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 42.4 mL，加水稀释至 1 L。

A. 11 Inclusion body binding buffer: 20 mM Tris-HCl (7.9)，10 mM 咪唑，0.5 M 氯化钠，8 M 尿素/6 M 盐酸胍。

A. 12 Inclusion body elution buffer: 20 mM Tris-HCl (7.9)，200 mM 咪唑，0.5 M 氯化钠，8 M 尿素/6 M 盐酸胍。

A. 13 1% 咪唑：0.1 g 咪唑加入 9.9 mL 纯水。

A. 14 1 M Tris-HCl (pH=7.6) 缓冲液：50 mL 0.1 mol/L Tris 溶液与 38.5 mL 0.1 mol/L HCl 混匀后，加水稀释至 100 mL。

A. 15 10×CTAB: 0.03 g CTAB 定容至 100 mL。

A. 16 10×PLP: 0.13 g PLP 定容至 100 mL。

A. 17 50 mL 底物反应液：苯基丝氨酸 1.81 g，1% 咪唑 1.25 mL，10×CTAB 5 mL，10×PLP 5 mL，0.2 mol/L 磷酸缓冲液定容至 50 mL。

A. 18 引物检测引物序列如下：

- 1) SHMT-F 5'-gccatggctgatatcggatccATGGCCATGGCTCTTGCC-3'；
- 2) SHMT-R 5'-acggagctcgaattcggatccTTAGTTTTGTACTTCATTGTTTCCTTCT-3'。

引物合成后冻存于-20 ℃。待用时应稀释至10 μmol/L浓度。扩增时2条引物在同一体系中，扩增结束后出现目的片段。

附录 B（资料性）
SHMT 酶活性抑制效果计算

B.1 苯甲醛标准曲线的绘制

配置浓度分别为1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、30 mmol/L、40 mmol/L的苯甲醛标准溶液，测定OD279吸光值，标准曲线以吸光值与苯甲醛浓度关系绘制，得出回归方程。

表 A.3 苯甲醛标准吸光值

苯甲醛浓度 mmol/L	1	5	10	20	30	40
OD279	0.1395	0.512	0.911	1.7795	2.527	3.118

以OD279的吸光度值为纵轴、苯甲醛浓度为横轴绘制苯甲醛标准曲线，线性回归方程为 $Y=0.0773X+0.1321$ ，相关系数 R^2 平方值为0.9953，结果如图所示，该方程可作为苯甲醛与OD279间线性关系的计算。

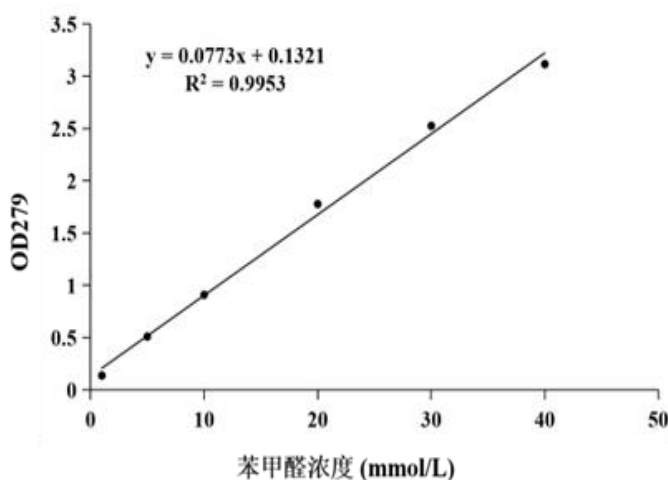


图 A.1 苯甲醛标准曲线

B.2 SHMT1 逆向酶活的测定

逆向酶活测定方法：抑制物浓度梯度处理。抑制物设置0.63、0.95、1.26、1.58、1.90、2.53、3.16、6.32、9.48、12.64、15.80、18.96、22.12、25.28、28.44、31.60、34.76、37.92、41.08、44.24 mM十二个浓度处理，以非靶标物质壬酸作为阳性对照，Tris-HCl作为空白对照，加入至1.5 mL离心管中。

- 1) 抑制物时间梯度处理。抑制物设置0、1、3、5、7、10、13、15、18分钟9个时间处理，以非靶标物质壬酸作为阳性对照，Tris-HCl作为空白对照。
- 2) 加入1 mL SHMT底物反应液，底物反应液应现用现配。
- 3) 加入50 μ L含纯蛋白的溶液。

- 4) 恒温水浴锅中37 ℃保温反应15分钟。
- 5) 反应结束后12000 g 离心3分钟。
- 6) 离心完成后, 取200 μL加至96孔UV紫外检测酶标板中, 酶标仪上测定OD279值。
- 7) 以苯甲醛标准曲线回归方程计算逆向酶活。

B. 3 SHMT1 抑制物浓度梯度处理下的酶活性

抑制物设置0、3.26、6.32、9.48、12.64、15.8、18.96、22.12、25.28、28.44、31.6、44.24 mM十二个浓度处理, 以非靶标物质壬酸作为阳性对照, Tris-HCl作为空白对照, 对比SHMT1在抑制物胁迫下的响应曲线, 结果如图2所示。

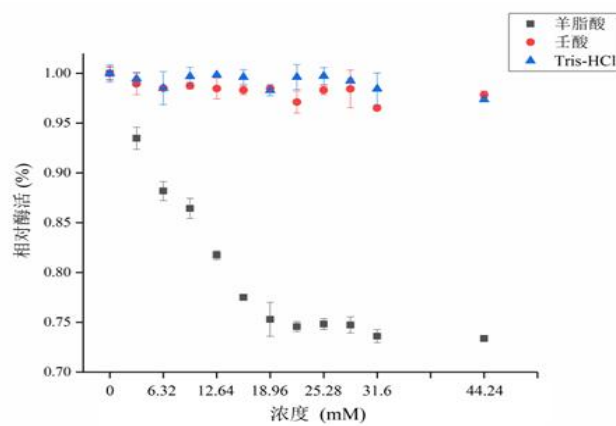


图 A. 2 SHMT1 在抑制物胁迫下的相对酶活力变化

B. 4 SHMT1 抑制物时间梯度处理下的酶活性

在18.96 mM的抑制物浓度下, 设置0、1、3、5、7、10、13、15、18分钟9个时间处理, 以非靶标物质壬酸作为阳性对照, Tris-HCl作为空白对照, 结果如图3所示

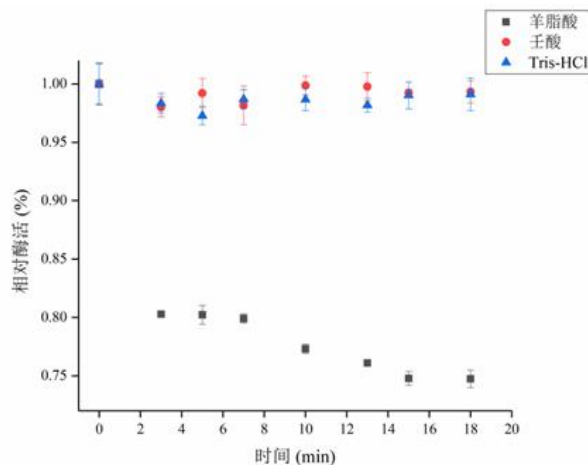


图 A. 3 SHMT1 在抑制物胁迫下的相对酶活力变化

B.5 酶活性抑制效果计算公式

不同化合物对SHMT酶活性抑制效果，按以下公式计算各处理的活性抑制率（%）：

$$E=100\times (C-T) /C$$

式中：

E ——为活性抑制率；

C ——为对照区酶活性；

T ——为化合物处理后酶活性。

附 录 C
(资料性)
统计档案

表 B.1 XX 年不同化合物对 SHMT 酶活性抑制效果统计档案

处理	化合物 a	化合物 b	化合物 c
抑制效 果 (%)			