

暴马桑黄细胞色素 P450 家族 *CYP5150AW6* 基因克隆及表达分析

李亚伟¹, 刘增才¹, 孙婷婷², 乌木提·巴合提别克¹, 邹莉^{1*}

1. 东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 哈尔滨学院食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150086

摘要:目的 为深入了解细胞色素 P450 家族 *CYP5150AW6* 基因在暴马桑黄 *Sanghuangporus baumii* 生长发育调控中的功能。方法 采用 PCR 技术获得目的基因的 cDNA 序列全长, 通过生物信息学在线软件分析其编码的氨基酸序列; 采用同源重组的方法构建原核表达载体; 采用荧光定量 PCR 技术分析其不同发育阶段的表达特性。**结果** 暴马桑黄中克隆得到的基因开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列全长 1758 bp, 编码 585 个氨基酸, 相对分子质量为 66 080, 经国际 P450 命名委员会命名为 *CYP5150AW6*; 跨膜区预测表明 *CYP5150AW6* 蛋白不具有跨膜结构; 亚细胞定位显示 *CYP5150AW6* 蛋白在细胞质和线粒体中修饰合成; 系统进化分析结果表明, 暴马桑黄 *CYP5150AW6* 蛋白与灵芝 *CYP5150L8* 蛋白亲缘关系最近, 符合物种分类原则; SDS-PAGE 结果证实在 75 000~100 000 出现目的蛋白条带 (包含 20 000 的标签蛋白), 说明所获得的基因能够成功表达出蛋白; 从荧光定量分析结果中可以看出 *CYP5150AW6* 基因转录水平从菌丝体阶段到子实体阶段生长逐渐升高, 并且在子实体阶段达到最高, 说明该基因可能与暴马桑黄的生长发育相关。**结论** 通过对 *CYP5150AW6* 基因的鉴定与分析, 为进一步研究该基因在暴马桑黄生长发育调控过程的功能提供了理论依据。

关键词: 暴马桑黄; 细胞色素 P450 基因; 生长发育; 表达分析; 荧光定量 PCR

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)11-3448-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.11.022

Cloning and expression analysis of *CYP5150AW6* gene of cytochrome P450 family in *Sanghuangporus baumii*

LI Ya-wei¹, LIU Zeng-cai¹, SUN Ting-ting², Wumuti Bahetibieke¹, ZOU Li¹

1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

2. Department of Food Engineering, Harbin University, Harbin 150086, China

Abstract: Objective To explore the function of *CYP5150AW6* gene of cytochrome P450 family in the regulation of growth and development of *Sanghuangporus baumii*. **Methods** The full-length cDNA sequence of target gene was obtained by PCR, and the amino acid sequence was analyzed by bioinformatics online software. Prokaryotic expression vectors were constructed by homologous recombination. The qRT-PCR technology was used to analyze the expression characteristics in different developmental stages. **Results** The total length of the P450 gene (ORF) was 1758 bp, encoding 585 amino acids with a relative molecular weight of 66 080, and it was named *CYP5150AW6* by P450 international naming committee. The prediction of the transmembrane region showed that *CYP5150AW6* protein did not have a transmembrane structure. Subcellular localization showed that *CYP5150AW6* was modified and synthesized in cytoplasm and mitochondria. Phylogenetic analysis showed that *CYP5150AW6* protein was closely related to *CYP5150L8* protein of *Ganoderma lucidum*, which was in accord with the principle of species classification. SDS-PAGE results confirmed the presence of target protein bands between 75 000—100 000 (containing 20 000 of the labeled protein), indicating that the obtained gene could successfully express the protein. According to the results of qRT-PCR analysis, the transcript level of *CYP5150AW6* gene increased gradually from mycelium stage to fruiting body stage, and reached the highest level in fruiting body stage, indicating that this gene may be related to the growth and development of *S. baumii*. **Conclusion** Through the identification and analysis of *CYP5150AW6* gene, it provides a theoretical basis for further study of the function of *CYP5150AW6* gene in the regulation of growth and development of *S. baumii*.

Key words: *Sanghuangporus baumii* (Pilát) L. W. Zhou & Y. C. Dai; cytochrome P450 gene; growth and development; expression analysis; qRT-PCR

收稿日期: 2021-10-12

基金项目: 中央高校基本科研业务费资助项目 (2572020DF06)

作者简介: 李亚伟, 男, 硕士研究生, 现从事食用菌技术研究。E-mail: 2664508708@qq.com

*通信作者: 邹莉, 女, 博士, 教授, 主要从事食用菌技术研究。E-mail: 13903650896@163.com

桑黄是一种非常珍贵且具有广阔研究与开发价值的药用真菌,因被发现多寄生在桑树的枝干上,子实体颜色为黄褐色,故而得名,民间也称桑臣、桑耳等^[1]。桑黄是一类传统的药用真菌,东汉时期《神农本草经》中记载:“桑耳,黑者,主女子漏下赤白汁,血病癥瘕积聚,阴痛,阴阳寒热无子。”桑耳即为桑黄。“桑黄”一词最初出现在隋唐时期甄权编著的《药性论》中,把桑耳与“桑黄”合二为一,并首次记载桑黄药性平,无毒^[2]。桑黄有“森林软黄金”的美称,近年来由于诸多文献报道,桑黄在抗肿瘤、降血糖、抗氧化、增强免疫力等方面具有良好的效果,且不会出现不良反应,因此受到广大消费者的喜爱和追捧^[3]。桑黄中的三萜、黄酮、多糖、酚类等化合物是其发挥药用效果的主要活性成分^[4]。药用真菌中活性成分的含量和生物合成途径中相关基因的表达量有着密切的联系,随着分子生物学技术的不断进步与发展,使用现代生物技术对药用真菌的功能基因进行鉴定已成为目前研究的热点。

细胞色素 P450 (CYP450) 是广泛存在于动物、植物、真菌及细菌中的含有血红素和巯基的多功能蛋白^[5]。其功能大致可分为 2 类:一是参与催化激素、脂肪酸、甾醇类及萜类化合物等一些具有重要功能的内源物质的生物合成代谢过程^[6];如研究证明桑黄^[4, 7-8]、灵芝^[9-12]、茯苓^[13]、猪苓^[14]等药用真菌中部分细胞色素 P450 基因能参与萜类及甾醇类化合物的合成。二是参与多种外源物质的生物氧化过程,如除草剂、杀虫剂、药物及有毒物质等,如青霉菌^[15]解磷能力及白腐真菌^[16-17]对有机污染物和农业废弃物的降解作用。目前,对真菌 CYP450 基因功能的研究多集中于萜类及甾醇类化合物的生物合成代谢过程,而对于激素的合成代谢以及生长调控相关基因的研究相对较少,但在植物中有研究证明 CYP450 能参与生物体的生长调控,杨杰等^[18]发现白桦 *BpCYP4*、*BpCYP5* 及 *BpCYP14* 3 个基因具有组织特异性和激素诱导表达特异性,在白桦的生长发育和抵御胁迫中起着重要作用。

目前,对于暴马桑黄中 CYP450 基因的研究报道相对较少。本实验以一种生长于暴马丁香树上的桑黄—暴马桑黄 *Sanghuangporus baumii* (Pilát) L. W. Zhou & Y. C. Dai 为研究对象。通过克隆暴马桑黄 CYP450 家族的 CYP5150AW6 基因,并对其进行生物信息学分析以及不同发育阶段的基因表达水平分析,丰富对暴马桑黄 CYP450 基因功能的研究,

同时为进一步研究该基因在暴马桑黄生长调控中的作用奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

试验所用的菌株为暴马桑黄菌种 DL101 (登录号为 KP974834)、大肠杆菌 *E. coli* 克隆菌株 DH5 α 、表达菌株 BL21 (DE3) 和原核表达载体 pET-32a(+) 均保藏于东北林业大学森林保护学科实验室。

1.2 试剂

QuickCut *EcoR* I、QuickCut *Hind* III、PremixTaq 酶、TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseHPlus)、5 $\times$ In-Fusion HD 试剂盒、PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 和 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 均从大连 Takara 公司购买得到。植物总 RNA 提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购于北京天根生化公司。质粒提取试剂盒购于上海 Omega 公司。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 试剂盒购买于北京索莱宝公司。

2 方法

2.1 试验引物

本实验中所用到的引物序列如表 1 所示。

2.2 CYP5150AW6 基因克隆

暴马桑黄菌丝体总 RNA 使用植物总 RNA 提取试剂盒进行提取,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用分光光度计检测其浓度和质量,然后快速反转录为 cDNA。之后用 cDNA 作为模板,以 CYP5150AW6-F1、CYP5150AW6-R1 (表 1) 作为引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增的产物经凝胶电泳检测后,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行纯化回收,再用琼脂糖凝胶电泳检测回收产物的浓度,并送哈尔滨擎科生物有限公司进行测序。

2.3 CYP5150AW6 基因序列分析

测序结果提交到 NCBI,并对目的基因序列进行开放阅读框 (open reading frame, ORF) 和保守结构域预测;利用生物信息学软件预测和分析 CYP5150AW6 基因编码的氨基酸序列:用 ProtParam 软件预测目的蛋白的理化性质;用组普生物在线工具预测目的蛋白的跨膜区;用 SignalP 5.0 server 预测目的蛋白的信号肽;用 PSORT II 预测目的蛋白的亚细胞定位;用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 分别预测目的蛋白的二级结构和

表 1 引物序列与预测片段大小

Table 1 Primer sequences and predicted fragment size

引物名称	引物序列 (5'-3')	预测片段大小/bp
<i>CYP5150AW6</i> -F1 (PCR)	AAACGGCCAATGGAATTGTCTA	1800
<i>CYP5150AW6</i> -R1	TGTGTCACAACCTCTCCTCGAGTG	
<i>CYP5150AW6</i> -F2 (PCR)	<u>TATCGGATCCGAATTC</u> ATGGAATTGTCTACCGCCGGG	1790
<i>CYP5150AW6</i> -R2	<u>GTGCGGCCGCAAGCTTT</u> CACAACCTCTCCTCGAGTGC	
pET-32a-F (RT-PCR)	TAATACGACTCACTATAGGG	712
pET-32a-R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
<i>CYP5150AW6</i> -F3 (qRT-PCR)	CACTCGGGGACCATCACCGCAAACA	155
<i>CYP5150AW6</i> -R3	GTCAAACCTCCTTCGTCCCACCTCGC	
α -tubulin-F (qRT-PCR)	CCAGCAAGCGTTACCGATT	129
α -tubulin-R	TCCACGACGTCCATCGTTC	

下划线部分表示同源臂

The underlined part represents the homologous arm

三级结构；用 MEGA 5.2.2 预测目的蛋白系统进化关系^[7, 19-21]。

2.4 *CYP5150AW6* 基因原核表达载体构建

以 *CYP5150AW6*-F1、*CYP5150AW6*-R1 为引物扩增产物，纯化回收得到 DNA，以 DNA 模板，以 *CYP5150AW6*-F2、*CYP5150AW6*-R2 为引物，通过 PCR 得到 *CYP5150AW6* 基因开放阅读框。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 对 pET-32a 质粒进行双酶切，酶切产物纯化回收后，用 In-Fusion HD 试剂盒将其与 *CYP5150AW6* 基因 ORF 进行同源重组，得到 pET-32a-*CYP5150AW6* 重组质粒，随后转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。从转化后的大肠杆菌中提取质粒，用引物 pET-32a-F、pET-32a-R（表 1）进行 PCR 检测。之后，将 PCR 检测结果中显示阳性的质粒送哈尔滨擎科生物公司测序。

2.5 *CYP5150AW6* 基因诱导表达及检测

将检测结果中正确的 pET-32a-*CYP5150AW6* 质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞后进行菌落 PCR 检测，将阳性菌落接种到 LB 液体培养基（含 Amp 质量浓度为 100 μ g/mL）中 37 $^{\circ}$ C 过夜振荡培养，取 50 μ L 菌液加入新鲜 LB 液体培养基（含 Amp 质量浓度为 100 μ g/mL）中振荡培养，当 A_{600} 达到 0.6~0.8 时收集阴性对照菌液，在剩余的菌液中加入 IPTG（终浓度为 1 mmol/L）诱导表达，收集不同诱导时间段的菌液进行 SDS-PAGE 检测。

2.6 荧光定量检测

将长满培养皿的暴马桑黄菌株接种至 PD 液体培养基中振荡培养，分别收集 6、8、10、12 和 14 d 的菌丝。同时将暴马桑黄菌株接种到栽培袋中，收集原基和子实体^[8]。将收集得到的暴马桑黄材料利

用植物总 RNA 提取试剂盒，分别提取总 RNA，之后，利用反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA，以 α -tubulin 基因作为内参，每组设置 3 个重复。在核酸扩增荧光检测仪上进行 qRT-PCR 反应，反应程序：95 $^{\circ}$ C、3 min；95 $^{\circ}$ C、30 s，56 $^{\circ}$ C、30 s，72 $^{\circ}$ C、1 min，40 个循环；95 $^{\circ}$ C、10 s，55 $^{\circ}$ C、30 s，95 $^{\circ}$ C、30 s。根据得到的不同 C_t 值，按照公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 对暴马桑黄不同发育阶段基因相对转录水平进行计算^[22]。

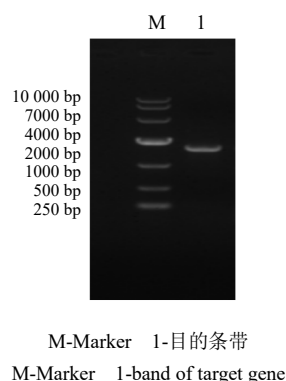
3 结果与分析

3.1 *CYP5150AW6* 基因全长获得

以暴马桑黄菌丝总 RNA 反转录得到的 cDNA 作为模板，使用所设计的引物在 1000~2000 bp 扩增出单一的 1 条 *CYP5150AW6* 基因条带，与预测目的基因大小（1800 bp）基本一致（图 1）。纯化回收的产物送哈尔滨擎科生物公司测序。

3.2 生物信息学分析

3.2.1 理化性质预测 利用 NCBI 网站上的 ORF Finder 进行 ORF 查找，结果显示 *CYP5150AW6* 基

图 1 *CYP5150AW6* 基因 PCR 结果Fig. 1 PCR results of *CYP5150AW6* gene

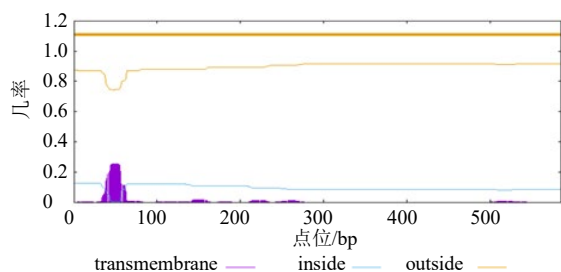


图 4 CYP5150AW6 蛋白的跨膜区预测结果

Fig. 4 Prediction of transmembrane region for CYP5150AW6 protein

3.2.3 CYP5150AW6 蛋白信号肽分析 信号肽是引导新合成的蛋白质分泌通路转移的短肽链，序列长度多数为 5~30 个氨基酸^[24]。使用 SignalP 5.0 sever 进行信号预测，结果显示 CYP5150AW6 蛋白不存在信号肽（图 5）。

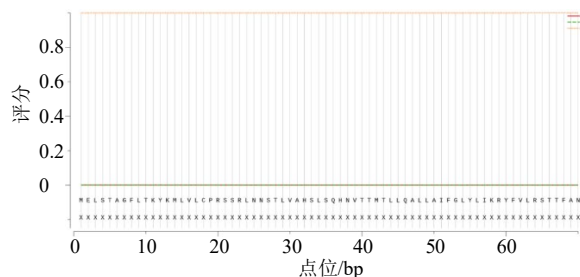


图 5 CYP5150AW6 蛋白信号肽预测结果

Fig. 5 Prediction of signal peptide for CYP5150AW6 protein

3.2.4 CYP5150AW6 蛋白亚细胞定位分析 蛋白质是构成细胞的基本有机物，是植物生命活动的物质基础和主要体现者。蛋白质亚细胞的定位预测对蛋白质功能的研究具有重要的价值，更是生物信息学分析的重要环节，通过对蛋白质的亚细胞定位预测分析，有利于深入了解该蛋白的功能性值^[25]。使用在线软件 PSORT II 分析 CYP5150AW6 蛋白的亚细胞定位，结果显示其主要定位于细胞质、线粒体、内质网、细胞核、高尔基体和过氧化物酶体，其依次比例大约为 10:6:2:2:1:1。因此，表明 CYP5150AW6 蛋白主要在细胞质和线粒体中完成蛋白质的加工与修饰。

3.2.5 CYP5150AW6 蛋白二级结构及分析 蛋白质二级结构（secondary structure of protein）是指多肽主链骨架原子沿一定的轴盘旋或折叠而形成的特定的构象，即肽链主链骨架原子的空间位置排布，不涉及氨基酸侧链。蛋白质二级结构主要包括 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲四种形式。蛋白质二级结构预测对蛋白质三级结构的预测和构建起到重要的作用^[26]。使用 SPOMA 在线软件对 CYP5150AW6 蛋白的二级结构进行预测分析（图 6），结果显示有 49.06% 的 CYP5150AW6 蛋白处于 α 螺旋状态，有 12.14% 处于延伸状态，有 5.30% 处于转角状态，有 33.50% 处于无规则卷曲状态，表明

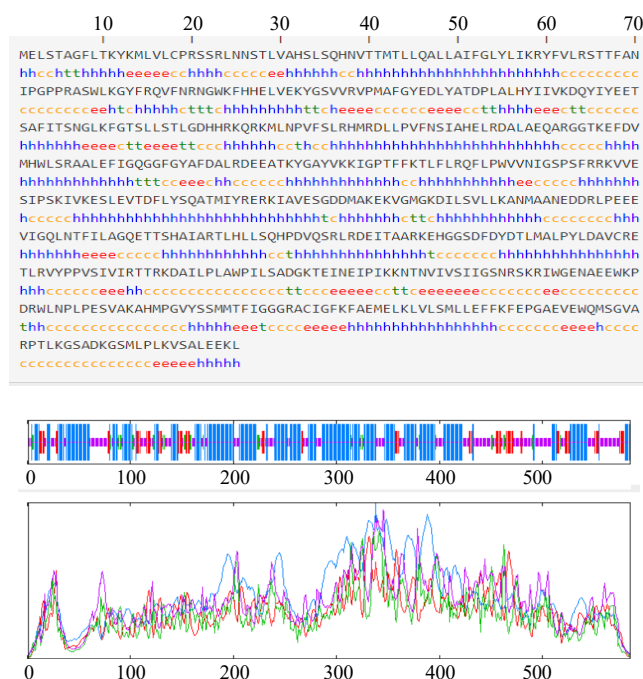


图 6 CYP5150AW6 蛋白的二级结构预测

Fig. 6 Secondary structure prediction of CYP5150AW6 protein

目的蛋白大部分的氨基酸都处于卷曲状态。

3.2.6 CYP5150AW6 蛋白三级结构及分析 使用 SWISS-MODEL 在线软件对 CYP5150AW6 蛋白三维结构进行预测分析, 用 Cytochrome P450 3A4 (SMTL ID: 4ny4.1.A) 为模板, 预测结果见图 7。

3.2.7 CYP5150AW6 系统进化分析 从 NCBI 数据库中挑选与暴马桑黄 CYP5150AW6 氨基酸序列具有一定同源性的细胞色素 P450 家族的氨基酸序列, 使用 MEGA5.2.2 软件构建 CYP5150AW6 蛋白系统进化树。结果如图 8 所示, 所有的 CYP450 家族基因编码的蛋白聚为一大分支, 说明其具有一个共同的起源。随后又大致分为 2 个小分支, ERG24 家族基因编码的蛋白聚为一支, 其它的聚为一支。在次一级的分支中, 暴马桑黄 CYP5150AW6 蛋白与灵芝 CYP5150L8 蛋白聚为一支, 说明两者亲缘关系相对较近, 可能因为两者都为多孔药用真菌。以上结论符合物种分类原则。



图 7 CYP5150AW6 蛋白的三级结构预测

Fig. 7 Prediction of tertiary structure of CYP5150AW6 protein

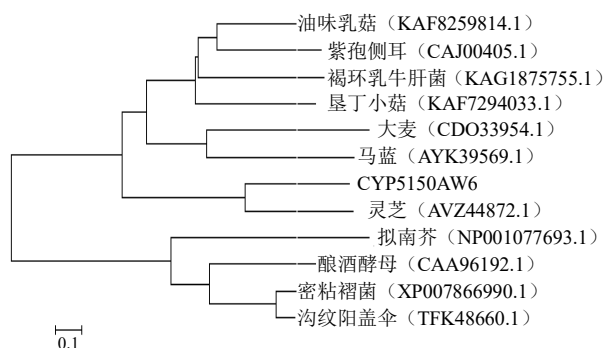


图 8 CYP5150AW6 系统进化分析

Fig. 8 Phylogenetic analysis of CYP5150AW6

3.3 pET-32a-CYP5150AW6 重组质粒的获得

将线性化的 pET-32a 质粒和 CYP5150AW6 基因 ORF 重组后, 得到 pET-32a-CYP5150AW6 重组质粒, 以 pET-32a-F、pET-32a-R (表 1) 为引物进行 PCR 扩增检测。结果显示在 2000~4000 bp 出现明显条带, 与预测目的片段大小一致 (图 9)。阳性质粒送至哈尔滨擎科生物公司测序后得到电子序列, 序列分析结果表明重组质粒 pET-32a-CYP5150AW6 构建成功。

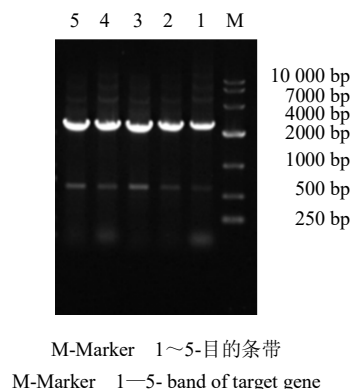


图 9 重组质粒 pET-32a-CYP5150AW6 PCR 检测结果

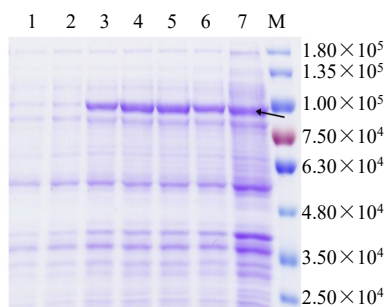
Fig. 9 Results of PCR detection for recombinant plasmid pET-32a-CYP5150AW6

3.4 重组质粒 pET-32a-CYP5150AW6 原核表达分析

将测序结果正确的重组质粒 pET-32a-CYP5150AW6 转入到大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3) 后, 利用终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导重组蛋白表达。SDS-PAGE 检测结果中显示, 在 IPTG 诱导 2、4、6、8 和 10 h 后, 均在 75 000~100 000 表达出一条较一致的蛋白条带, 大小为 86 080 bp (包含 20 000 bp 的标签蛋白), 表明蛋白的表达量随诱导时间变化不大, 且蛋白表达量都处于较高水平 (图 10)。进一步证明重组质粒 pET-32a-CYP5150AW6 构建成功, 并能通过 IPTG 诱导成功表达出目的蛋白。

3.5 CYP5150AW6 基因在桑黄不同发育阶段的表达水平

提取不同发育阶段 (菌丝体、原基、子实体) 的暴马桑黄材料的总 RNA, 反转录得到 cDNA, 以 cDNA 作为模板, 采用 qRT-PCR 技术检测 CYP5150AW6 基因的表达水平。结果见图 11, 可以看出 CYP5150AW6 基因表达水平在不同的发育阶段呈现依次上升趋势, 且在子实体阶段达到最高, 约为起始阶段 (菌丝阶段第 6 天时) 的 12 倍。



1-空白对照: 质粒 pET-32a 未经诱导表达的菌体蛋白 2~7-质粒 pET-32a-*CYP5150AW6* 经 1 mmol/L IPTG 诱导 0、2、4、6、8、10 h 表达的菌体蛋白 M-Marker 箭头指示为目的蛋白

Lane 1 is the blank control, *E. coli* BL21 (DE3) harbouring pET-32a plasmid without IPTG was added; lanes 2—7 are induced at 0, 2, 4, 6, 8, 10 h, respectively, *E. coli* BL21(DE3) harbouring plasmid pET-32a-*CYP5150AW6* with 1 mmol·L⁻¹ IPTG was added; lane M is the protein marker; The arrow indicates the target protein

图 10 SDS-PAGE 分析 *CYP5150AW6* 基因诱导表达结果
Fig. 10 Results of expression of *CYP5150AW6* gene by SDS-PAGE analysis

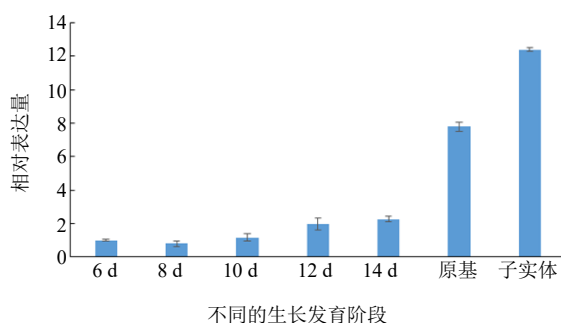


图 11 *CYP5150AW6* 基因在暴马桑黄不同发育阶段的转录水平

Fig. 11 Transcript level of *CYP5150AW6* gene in *S. baumii* at different developmental stages

4 讨论

CYPs 在微生物和动植物体内广泛存在, 并参与到生物体的能量交换和物质代谢过程中, 具有多种催化功能, 被誉为万能的催化剂^[6]。近些年来, 对于 P450 家族基因的研究越来越引起广大研究者的关注。本实验利用 PCR 技术克隆得到了 *CYP5150AW6* 基因的全 cDNA 序列, 并进行生物信息学分析, 结果表明 *CYP5150AW6* 基因具有完整的 ORF; *CYP5150AW6* 蛋白具有 P450 超家族的保守结构域, 是 P450 家族基因; *CYP5150AW6* 蛋白不具有跨膜区和信号肽, 属于亲水的稳定蛋白。亚细胞定位结果显示该蛋白主要位于细胞质和线粒体中, 表明其在细胞质和线粒体中修饰合成。系统进化分析显示, 暴马桑黄 *CYP5150AW6* 蛋白与灵芝

CYP5150L8 蛋白聚为一支, 说明两者亲缘关系较近。推测暴马桑黄 *CYP5150AW6* 基因的功能可能与灵芝 *CYP5150L8* 基因功能相似。

本实验基于 *CYP5150AW6* 基因全长, 以 pET-32a 作为表达载体, 构建了重组质粒 pET-32a-*CYP5150AW6*, 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 并成功诱导表达出目的蛋白, 说明该基因能够表达出蛋白。同时进行了不同 IPTG 诱导时间蛋白表达量测定, 结果显示不同诱导时间蛋白表达量变化不大。说明在原核表达系统中, 诱导时间长短与 *CYP5150AW6* 蛋白表达量没有明显的相关性, 而在真核表达中两者的相关性还有待于进一步检测验证。通过对 *CYP5150AW6* 基因在暴马桑黄不同发育阶段的表达水平检测, 发现该基因的转录水平从菌丝阶段到子实体阶段不断增加, 说明该基因可能与暴马桑黄的生长发育过程有关。

目前随着研究的深入, 超过 30 万种的 CYPs 基因在生物体内被发现。在真菌中, 有约 8.5 万种 CYPs 基因被发现, 可分为 32 个 Clan, 805 个 Family, 且功能多种多样^[13, 27]。有研究证明细胞色素 P450 基因除了能参与萜类和甾醇类化合物的合成, 还具有参与催化生物体生长发育的作用。在植物中, 母洪娜等^[28]研究发现, “橙红丹桂”中的 *OjCYP82C4* 基因在花器官中的表达量最高, 且从铃梗期开始逐渐升高。王蕾等^[29]发现烟草 CYP71D 亚家族基因在根、叶、花中特异表达, 部分能参与 IAA 激素、温度等逆境胁迫反应。张杰等^[30]克隆了马铃薯中的 *CYP734As* 基因, 此基因在根中表达量最高, 能使油菜素甾醇 (BR) 失活, 进而调节植株生长发育, 此外, 在拟南芥中也已证明 *AtCYP734A1* 和植株生长发育有关^[31]。上述研究结果表明 *CYP450* 基因能参与生物体生长发育的调控, 但当前在真菌中关于 *CYP450* 基因的研究报道相对较少, 且多集中于萜类、甾醇的合成相关基因的研究。在暴马桑黄中参与生长调控的 *CYP450* 基因尚未见报道。本试验通过克隆, 分子鉴定和差异表达分析初步判断 *CYP5150AW6* 基因可能与暴马桑黄的生长发育有关, 但其具体调控途径和作用机制有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 常堃, 蔡婧, 李军, 等. 桑枝栽培食药菌研究综述 [J]. 湖北农业科学, 2017, 56(24): 4681-4684.
- [2] 包海鹰, 杨烁, 李庆杰, 等. “桑黄”的本草补充考证

- [J]. 菌物研究, 2017, 15(4): 264-270.
- [3] 陈万超, 杨焱, 张劲松, 等. 桑黄类真菌活性代谢产物的研究进展 [J]. 食用菌学报, 2020, 27(4): 188-201.
- [4] 于忠洋, 姜洋, 翟明霞, 等. 桑黄麦角甾醇生物合成关键酶 PIERG24 基因克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2020, 51(22): 5825-5832.
- [5] 解敏敏. 烟草重要基因篇: 8.烟草 P450 基因 [J]. 中国烟草科学, 2015, 36(2): 118-120.
- [6] 王海燕, 图力古尔, 陈强, 等. 真菌细胞色素 P450 研究进展 [J]. 食用菌学报, 2010, 17(2): 97-102.
- [7] 刘增才, 王世新, 孙婷婷, 等. 暴马桑黄 SbLSD 基因克隆及差异表达分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2020, 40(11): 100-108.
- [8] 孙婷婷. 桑黄三萜生物合成途径关键酶基因的挖掘及分析 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017.
- [9] 曾欣宜, 朱英杰, 李滢, 等. 基于全基因组的紫芝细胞色素 P450 分析 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(12): 1555-1559.
- [10] Wang W F, Xiao H, Zhong J J. Biosynthesis of a ganoderic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by expressing a cytochrome P450 gene from *Ganoderma lucidum* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(7): 1842-1854.
- [11] 方星, 师亮, 徐颖洁, 等. 灵芝甾醇 14 α -脱甲基酶基因的克隆及超量表达对三萜合成的影响 [J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 242-248.
- [12] Lan X T, Yuan W, Wang M, *et al.* Efficient biosynthesis of antitumor ganoderic acid HLDOA using a dual tunable system for optimizing the expression of CYP5150L8 and a *Ganoderma* P450 reductase [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(12): 3301-3311.
- [13] 唐静. 茯苓细胞色素 P450 基因 PcCYPs 的克隆及功能分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [14] 刘蒙蒙, 邢咏梅, 郭顺星. 药用真菌猪苓菌核细胞色素 P450 基因的克隆、序列分析及表达差异的鉴定 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(11): 918-923.
- [15] 张建峰, 王冠雄, 黄佳, 等. 温度和干旱胁迫下绳状青霉菌 P1 的溶磷能力研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2021, 49(3): 86-92.
- [16] 殷茹, 刘依林, 王剑桥, 等. 白腐真菌降解持久性有机污染物的研究进展 [J]. 地球与环境, 2020, 48(6): 747-757.
- [17] 代广辉. 白腐真菌降解农业废弃物秸秆的研究进展 [J]. 辽宁科技学院学报, 2020, 22(3): 17-19.
- [18] 杨杰, 孙璐, 王思瑶, 等. 3 个白桦细胞色素 P450 基因生物信息学及表达分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2018, 42(6): 27-34.
- [19] 周彩霞, 赵治巧, 唐宇佳, 等. 产木聚糖酶嗜热真菌鉴定、酶基因克隆及生物信息学分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(1): 197-203.
- [20] 周延清, 邵露蓉, 郭萌萌, 等. 地黄 C3H 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 广西植物, 2020, 40(9): 1281-1287.
- [21] 徐子娟, 朱云国, 李珊, 等. 冬虫夏草菌 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因的生物信息学分析 [J]. 菌物研究, 2021, 19(1): 54-62.
- [22] 庾蕾, 刘建平, 庄志雄, 等. 实时 RT-PCR 基因表达相对定量 REST 软件分析与 2^(- $\Delta\Delta$ CT)法比较 [J]. 热带医学杂志, 2007, 7(10): 956-958.
- [23] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes [J]. *J Mol Biol*, 2001, 305(3): 567-580.
- [24] Almagro Armenteros J J, Tsirigos K D, Sønderby C K, *et al.* SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(4): 420-423.
- [25] 陈行健, 胡雪娇, 薛卫. 基于多层次稀疏编码预测蛋白质亚细胞定位 [J]. 生物工程学报, 2019, 35(4): 687-696.
- [26] Jones D T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices [J]. *J Mol Biol*, 1999, 292(2): 195-202.
- [27] Nelson D R. Cytochrome P450 diversity in the tree of life [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Proteins Proteom*, 2018, 1866(1): 141-154.
- [28] 母洪娜, 樊蕾, 叶缘铭, 等. 桂花 OfCYP82C4 基因的克隆及表达分析 [J]. 分子植物育种: 2021, 2: 1-11.
- [29] 王蕾, 赵泽玉, 陈明丽, 等. 烟草 CYP71D 亚家族的生物信息学分析 [J]. 中国烟草科学, 2020, 41(2): 79-85.
- [30] 张杰, 邓孟胜, 蔡诚诚, 等. 马铃薯 StCYP734A1 基因克隆、表达模式及生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(15): 4883-4893.
- [31] Youn J H, Kyun M. ARF7 increases the endogenous contents of castasterone through suppression of BAS1 expression in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Phytochemistry*, 2016, 122: 25.

[责任编辑 时圣明]