

三七细胞色素 P450 酶基因 *PnCyp450_3* 响应丛枝菌根真菌诱导的表达特性分析

曹冠华^{1,2}, 张兴开¹, 柏旭³, 毕悦¹, 殷红伟¹, 张芸¹, 贺森^{1,2*}

1. 云南中医药大学 中药学院暨云南省南药可持续利用重点实验室, 云南 昆明 650500

2. 云南中医药大学 昆明市澜沧区域传统药物资源开发利用研发中心, 云南 昆明 650500

3. 曲靖师范学院 生物资源与食品工程学院, 云南高原生物资源保护与利用研究中心, 云南 曲靖 655000

摘要:目的 基于三七根转录组数据库, 克隆三七皂苷合成关键酶细胞色素 P450 (cytochrome P450, *CYP450*) 基因, 对其进行生物信息学分析, 明确其对丛枝菌根真菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) 诱导的响应, 为进一步研究其催化特性奠定基础。方法 基因 *PnCyp450_3* 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 克隆及克隆载体构建依据相应试剂盒说明书, 通过化学转化法及氨苄青霉素抗性标记筛选阳性克隆。利用各种在线工具或软件完成生物信息学分析及系统发育树构建; 基因表达特性分析采用实时荧光定量 (real-time fluorescence quantitative, qPCR) 技术。结果 成功克隆了 1 个三七细胞色素 P450 超家族基因 *PnCyp450_3*, 其 ORF 全长 1617 bp, 编码 538 个氨基酸, 预测蛋白相对分子质量为 59 690, 等电点 (pI) 为 8.50, 含有 5 个保守结构域。组织表达特性结果显示, 在主根、须根部位, *PnCyp450_3* 均可响应根内球囊霉 (*Glomus intraradices*) 的诱导而显著上调表达 ($P < 0.05$), 其中主根相对表达量最高 (1.85 倍), 须根次之 (1.22 倍)。结论 *PnCyp450_3* 是一个编码 538 个氨基酸的 CYP450 超家族基因, 在主根、须根中均可响应根内球囊霉的诱导而显著上调表达, 为深入研究三七皂苷合成关键酶基因响应生物因子诱导的调控机制提供了数据支持, 具有重要的参考价值。

关键词: 三七; 细胞色素 P450; 丛枝菌根真菌; 生物信息学; 实时荧光定量

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)21-6848-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.023

Expression characteristics of *Panax notoginseng* cytochrome P450 gene *PnCyp450_3* under induction of Arbuscular Mycorrhizal Fungi

CAO Guan-hua^{1,2}, ZHANG Xing-kai¹, BAI Xu³, BI Yue¹, YIN Hong-wei¹, ZHANG Yun¹, HE Sen^{1,2}

1. School of Chinese Materia Medica and Yunnan Key Laboratory of Southern Medicine Utilization, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. Kunming Lancang-Mekong Regional R&D Center for the Development Utilization of Traditional Medicine Resources, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

3. Center for Yunnan Plateau Biological Resources Protection and Utilization, College of Biological Resource and Food Engineering, Qujing Normal University, Qujing 655000, China

Abstract: Objective Based on the *Panax notoginseng* root transcriptome database, the key enzyme cytochrome P450 (*CYP450*) gene of *P. notoginseng* saponin synthesis was cloned and bioinformatically analyzed to clarify its response to the induction of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and to lay a foundation for the further study on catalytic properties. **Methods** The clone of *PnCyp450_3* ORF and the construction of cloning vector were carried out according to the corresponding kit instruction. The

收稿日期: 2022-03-06

基金项目: 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302-2101-24); 国家自然科学基金资助项目(82260743); 云南省科技厅应用基础研究面上项目(202201AT070219, 202001AT070109, 2019FB122); 云南省中医药应用基础研究联合专项(202001AZ070001-010, 202101AZ070001-014); 云南省“万人计划”青年拔尖人才专项(YNWR-QNBJ-2020-279); 昆明市国际(对外)科技合作基地项目(GHJD-2021030)

作者简介: 曹冠华(1985—), 博士, 高级实验师, 主要从事中药资源与菌根微生物的研究。E-mail: cgh20031695@163.com

***通信作者:** 贺森, 博士, 教授, 主要从事中药资源与分子生物学的研究。E-mail: sunbelt123@163.com

positive clone was gained by chemical conversion and ampicillin screening. Bioinformatics analysis and phylogenetic tree were generated by a series of online tools or software, while gene expression characteristics were analyzed by real-time fluorescence quantitative (qPCR). **Results** A *P. notoginseng* cytochrome P450 superfamily gene, *PnCyp450_3*, was successfully cloned with the open reading frame (ORF) of 1617 bp, encoding 538 amino acids. Predicted molecular weight and isoelectric point (pI) was 59 690 and 8.50, respectively. The results of tissue expression characteristics showed that the expression level of *PnCyp450_3* was significantly up-regulated by *Glomus intraradices* ($P < 0.05$) in the rhizomes and fibrous roots with relative expression levels of 1.85 and 1.22. **Conclusion** *PnCyp450_3*, a CYP450 superfamily gene encoding 538 amino acids, was significantly up-regulated in both primary and fibrous roots in response to the induction of *G. intraradices*. This study provides data to support an in-depth study of the regulatory mechanism of biological factors to key enzyme-encoding genes on the notoginsenoside synthesis, which has important reference value.

Key words: *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen; cytochrome P450; arbuscular mycorrhizal fungi (AMF); bioinformatics; real-time fluorescent quantitative (qPCR)

三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 又名田七、参三七，为五加科人参属多年生草本植物，主产于云南文山州、广西等地^[1]。三七以干燥主根入药，性甘、微苦、温，主入肝、胃、大肠经，具有“化瘀止血，消肿止痛”功效。现代药理学研究表明，三七在止血、活血、抗血栓、抗心肌缺血、降血压、抗炎、保肝、抗肿瘤等方面作用显著^[2]。

皂苷是三七中最主要的活性物质，包括人参皂苷 Rb_1 、 Rg_1 和三七皂苷 R_1 ，其中人参皂苷 Rb_1 为 20(S)-原人参二醇型皂苷，人参皂苷 Rg_1 和三七皂苷 R_1 为 20(S)-原人参三醇型皂苷，均为达玛烷型四环三萜皂苷。三七皂苷在体内主要通过乙酸/甲羟戊酸途径合成，由一系列关键酶催化完成，包括鲨烯合成酶 (squalene synthase, SS)、法呢基焦磷酸合成酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, FPS)、鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase, SE)、达玛烯二醇合成酶 (dammarenediol-II synthase, DS)、细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP450) 等^[3]。

CYP450 酶是一类广泛存在于微生物、动植物及人体中与膜结合的血红蛋白类酶，是陆生植物代谢中最大的酶家族，约占植物基因组编码基因的 1%，具有广泛的催化活性，参与植物多种初生代谢和次生代谢产物的生物合成，如苯丙烷类、萜类、生物碱、氰胺、植物激素等^[4]。CYP450 酶在三萜皂苷生物合成中主要修饰三萜骨架官能团的形成和多样化，如羟基氧化，羰基、羧基形成等^[5]。研究表明，CYP450 超家族中的 17 个亚族 (CYP51H、CYP71A/D、CYP81Q、CYP93E、CYP705A、CYP72A、CYP87D、CYP88D/L、CYP708A、CYP716A/C/E/S/U/Y)，约 80 个不同物种的基因均参与催化三萜类化合物的合成^[6-8]。

研究认为，活性物质的合成除受植物自身的代谢调控外，还可响应环境因子、生物因子、无机因子的诱导，其中丛枝菌根真菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) 则是比较重要的一类诱导因子^[9-10]。AMF 是功能相对明确的一大类内生真菌，在 80% 以上的陆生植物中均有定殖，主要包括球囊菌门 (Glomeromycota) 中的多孢囊霉目、原囊霉目、球囊霉目和类球囊霉目^[11]，其在增强宿主营养吸收、促进生长、提高胁迫耐受性及增加次级代谢产物积累方面发挥着重要作用^[12]。通过施加内生真菌菌剂提高药用植物活性物质的含量已多有报道，如 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz.^[13-14]、青蒿 *Artemisia annua* Buch.-Ham. ex Roxb. Hort. Beng.^[15]、藏红花 *Crocus sativus* L.^[16] 等，最高可提高数倍至几十倍，但鲜有在三七中的应用报道，本团队前期调查了云南省文山州 4 个样地的三年生三七根样 AMF 和深色有格内生真菌 (dark septate endophytes, DSE) 定殖情况，结果显示，4 个样地均有着较高的定殖率，AMF 和 DSE 平均定殖率范围分别为 25.18%~32.07%、29.25%~37.58%，且与皂苷含量之间存有较高的相关性，推测 AMF 可能通过提高三七皂苷生物合成关键酶活性、基因表达量等途径来增加皂苷在主根部位的积累^[17]。

目前鲜有关于三七皂苷生物合成关键酶基因响应 AMF 诱导的报道。本实验以此为出发点，基于三七转录组数据库克隆 CYP450 基因，对其生物信息学进行预测和分析，并通过实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR) 实验明确其响应 AMF 诱导的表达特性。本研究对明确三七皂苷合成、积累响应 AMF 诱导的调控机制提供了参考和数据支持，具有重要的理论和实践意义。

1 材料与仪器

1.1 材料

所用三七材料为 AMF 菌剂处理组及相应对照组一年生三七主根、须根和叶。本实验所用 AMF 包括根内球囊霉 *Glomus intraradices* 和幼套球囊霉 *Glomus etunicatum* 2 种, 分别命名为 AMF1、AMF2, 购于长江大学根系生物研究所。AMF 孢子经玉米体系扩繁后, 与营养土按一定比例分别制成 AMF 菌剂, 具体参考 Domokos 等^[18]。处理时间: 2019 年 1 月 16 日—2019 年 6 月 30 日。三七为采自云南省文山州文山县三七规范化种植基地的一年生呈出芽状态的三七块茎(前期调查结果显示, 超过 93% 的一年生三七幼苗无 AMF 定殖); 要求生长一致、无病害、长势良好, 由云南中医药大学赵荣华教授鉴定为三七 *P. notoginseng* (Burk) F. H. Chen 块茎。

1.2 仪器与试剂

YXQ-LS-50S 型立式电热压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限责任公司医疗设备厂; Proflex 型 PCR 扩增仪, 美国应用生物系统公司; 荧光定量 PCR 仪, LightCycler®96, 罗氏生物科技公司; 台式高速小型微量离心机, SCI-12, LAB-BLOGEN 型倍捷科技; SW-CJ-2FD 型超净工作台, 苏净安泰空气技术科技有限公司; TGL-16.5M 型高速冷冻离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; SPX-150B-2 型恒温培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

Trizol 裂解液, 上海钰博生物科技有限公司; cDNA 第一链合成试剂盒、反转录试剂盒、长链高保真酶、荧光定量试剂盒, 宝日医生物技术有限公司; 大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态, 全式金生物技术有限公司; 质粒小提试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 酵母浸粉, 青岛高科园海博生物技术有限公司; 琼脂糖, 昆明硕阳科技有限公司; DEPC, 西格玛里奇(上海)贸易有限公司; 琼脂粉, 易德生物技术有限公司; 无水乙醇, 广东光华科技技术有限公司。

2 方法

2.1 样品处理

每个处理设置 8 个重复, 每个重复含 3 棵三七。在每棵三七根系周围放置 30 g AMF 菌剂, 约含 200 个 AMF 孢子^[18], 每隔 5 d 浇施 1 次 1/4 Hoagland 营养液, 处理周期为 6 个月, 期间避免阳光直射。处理结束后, 检测 AMF 定殖率, 发现 AMF1、AMF2 处理组定殖率均大于 40%, 说明实验效果良好, 可用于下一步分析^[15]。将三七根、茎、叶迅速清洗干净, 用滤纸小心除去附着的水, 分开称定质量, 记录; 主根、须根分开剪成小段, 与茎、叶一起于液氮中快速冷冻。之后取 1 份须根、主根混合样送武汉迈特维尔生物科技有限公司进行转录组测序, 剩余的样品保存于-80℃冰箱, 备用。

2.2 *PnCyp450_3* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)克隆及生物信息学分析

基于转录组测序结果, 筛选出与对照组呈显著差异表达的三七皂苷合成关键酶 *CYP450* 基因 *PnCyp450_3* 进行深入研究。*PnCyp450_3* ORF 克隆: 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成分别参考 Cao 等^[19]方法。引物见表 1, 反应体系参考 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Takara, 日本)说明书。PCR 扩增程序: 预变性(×1): 98℃、10 s; 变性(×35): 98℃、10 s; 退火 60℃、10 s; 延伸 72℃、10 s; 终延伸(×1): 72℃、7 min。扩增后采用琼脂糖凝胶电泳检测, 并送北京擎科生物科技有限公司测序验证。*PnCyp450_3* 序列已经提交至 NCBI 基因库, GenBank 登录号为 MZ871443。

开放阅读框(open reading frame, ORF)的确认通过 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> 提供的在线软件完成。*PnCyp450_3* 编码蛋白亲水性、等电点、蛋白相对分子质量、跨膜结构域等性质预测由 <http://expasy.org/tools/protscale.html> 提供的在线工具包完成。磷酸化位点分析通过在线软件 <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1> 完成。氨基酸序列比对分析利用软件 DNAMAN

表 1 *PnCyp450_3* ORF 扩增及 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers of *PnCyp450_3* for ORF clone and qRT-PCR

引物名称	引物序列 (5'→3')	用途
<i>PnCyp450_3</i>	F: ATGGATTTGAGTGTGGTTTCA R: CTAAGATGGAACATTCCTTGTTATG	ORF 扩增
q <i>PnCyp450_3</i>	F: CTCATCTCTTCGCACCCAG R: TCCTTAACGTGACCAACCCG	qRT-PCR
26S-2 (内参基因)	F: CAGTATTTAGCCTTGGACGGAATT R: CGGGTTGTTTGGGAATGC	qRT-PCR

v6.0 (Lynnon Biosoft, 美国) 完成。系统发育树由软件 MEGA v7.0 (Mega Limited, 新西兰) 构建。

2.3 不同组织部位 *PnCyp450_3* 响应 AMF 诱导的表达特性分析

以处理组和对照组三七主根、须根、叶为材料, 提取总 RNA, 并按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara 公司, 日本) 说明书反转录成 cDNA 第一链。*PnCyp450_3* 及内参基因 *26S-2* (reference gene) [19] 引物见表 1, PCR 产物长度约为 120 bp。qRT-PCR 采用相对实时荧光定量技术, 每个处理组设 3 个生物学重复, 每个生物学重复含 3 次技术重复, 反应体系为 20 μL, 具体参考 Takara TB Green® Premix Ex Taq™ II (Takara, 日本) 说明书。qRT-PCR 扩增体系采用两步法, 具体为, 预变性 (×1): 95 °C、30 s, 20 °C/s; 变性 (×40): 95 °C、5 s, 20 °C/s; 60 °C、30 s, 20 °C/s。相对定量水平通过公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算 [20]。

2.4 数据处理

每个处理重复数均 ≥ 3。数据分析采用软件 Microsoft Excel 2010, SPSS 17.0, Sigmaplot 12.0。当影响因子 ≥ 3, 采用单因素方差分析中的

Turkey HSD 检验进行差异显著性分析; 当分析 2 个因子差异时, 采用独立样本 *T* 检验。采用软件 Sigmaplot 12.0 进行作图。

3 结果与分析

3.1 *PnCyp450_3* ORF 基因克隆、氨基酸序列比对及系统发育树分析

经 PCR 扩增、测序分析和 NCBI 比对, 获得了 *PnCyp450_3* ORF, 全长共计 1617 bp (图 1), 编码 538 个氨基酸, 含有 CYP450 保守结构域, 证实其属于 CYP450 酶超家族基因。与其他物种氨基酸序列比对分析发现 (图 2), *PnCyp450_3* 与

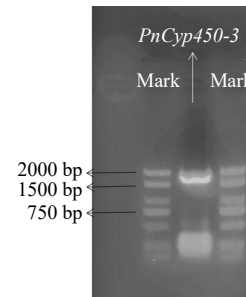
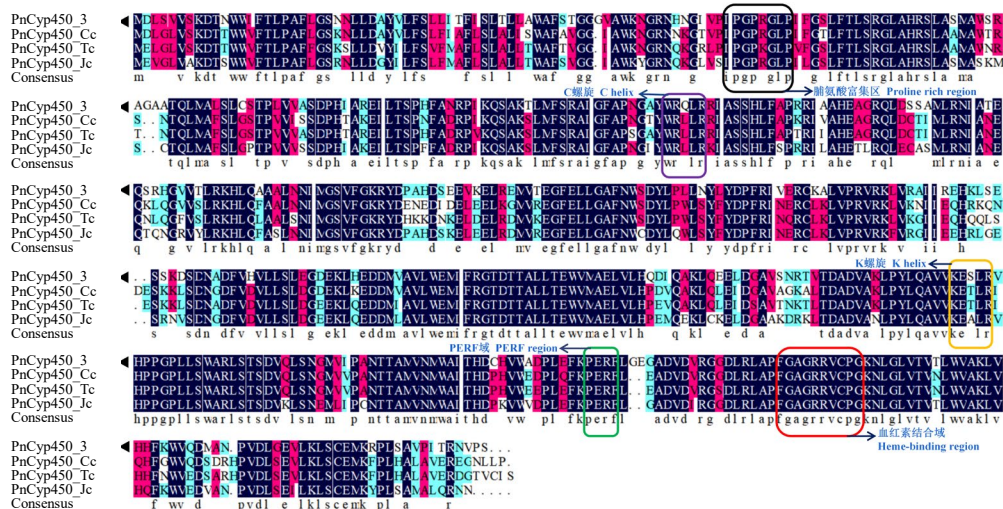


图 1 *PnCyp450_3* ORF PCR 扩增结果琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification results of *PnCyp450_3* ORF



深蓝色为 100% 相同, 暗红色为 75% 相同, 蓝色为 50% 相同, ▲ 用于标识目的基因, 黑色圆角矩形框表示脯氨酸富集区 [(P/I)PGP×(G/P)×P], 紫色圆角矩形框表示 C 螺旋保守结构 (W×××R), 黄色圆角矩形框表示 K 螺旋保守结构 (E×××R), 绿色圆角矩形框表示 PERF 域 (PERF), 红色圆角矩形框表示细胞色素识别序列血红素结合域 (F××G×R×C×G)

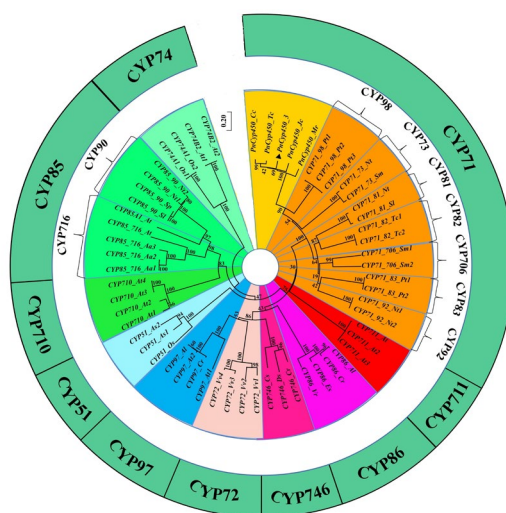
Identical peptides are highlighted in dark blue with 100% consistency, and conservative substitutions are highlighted in dark red (75% consistency) and blue (50% consistency), symbol of ▲ is used to identify the target gene, the black rounded rectangle box represents the proline rich region [(P/I)PGP×(G/P)×P]. The purple rounded rectangle box represents the C-helix conserved structure (W×××R), yellow rounded rectangle box represents K-helix conserved structure (E×××R), green rounded rectangle box represents PERF domain (PERF), red rounded rectangle box represents cytochrome recognition sequence heme binding domain (F××G×R×C×G)

图 2 *PnCyp450_3* 编码氨基酸序列与其他物种 CYP450 氨基酸同源性比对及保守结构域序列标识分析

Fig. 2 Alignments of *PnCyp450_3* and peptide sequences from other species and identification analysis of conserved domains

PnCyp450_Cc (黄麻 *Corchorus capsularis* L., GenBank 登录号: OMO55946.1,) 一致性最高, 为 79.33%; 其次为 PnCyp450_Tc (可可树 *Theobroma cacao* L., EOX92273.1), 一致性为 78.40%。对其保守结构域分析发现, PnCyp450_3 及其他物种氨基酸序列均含有脯氨酸富集区[(P/I) PGP× (G/P) ×P]、C 螺旋保守结构 (W×××R)、K 螺旋保守结构 (E×××R)、PERF 域 (PERF) 及血红素结合域 (F××G×R×C×G) 标签序列^[21]。此外, 以 PnCyp450_3 氨基酸序列和其他物种 CYP450 序列构建了系统发育树进一步明确其分类进化关系 (图 3)。系统发育树结果显示, CYP450 超家族主要由 CYP71、CYP711、CYP86、CYP746、CYP72、CYP97、CYP51、CYP710、CYP85 和 CYP74 10 个亚族组成, 其中 CYP71 亚族构成较为复

杂, 包含 CYP98、CYP73、CYP81、CYP82、CYP706、CYP83 和 CYP92 7 个簇; CYP85 包含 CYP716 和 CYP90 2 个簇。PnCyp450_3 则与黄麻 PnCyp450_Cc、可可树 PnCyp450_Tc、杨梅 *Morella rubra* Lour. (KAB1210391.1) PnCyp450_Mr、麻风树 *Jatropha curcas* L. (XP_012075225.1) PnCyp450_Jc 分类关系较近, 聚为一枝, 同属 CYP71 亚族。利用 MEGA7.0 邻位相接法构建系统发育树, 重复 1000 次计算引导值, 用于标识目的蛋白 PnCyp450_3, 其与黄麻 (OMO55946.1) PnCyp450_Cc、可可树 (EOX92273.1) PnCyp450_Tc、杨梅 (KAB1210391.1) PnCyp450_Mr、麻风树 (XP_012075225.1) PnCyp450_Jc 聚为一枝, 属 CYP71 亚族, 均具有典型保守结构域。



圆环内空心圆不同颜色区域分别表示 CYP450 酶不同家族或家族簇; 大括号表示同一家族或家族簇下 CYP450 酶不同亚家族; 外环不同区域内字符对应空心圆不同家族或家族簇的名称

Different color regions of the hollow circle inside the ring represent different families or family clusters of CYP450. Braces indicate different subfamilies of CYP450 under the same family or family cluster. Characters in different regions of the outer ring correspond to the names of different families or family clusters of the hollow circle

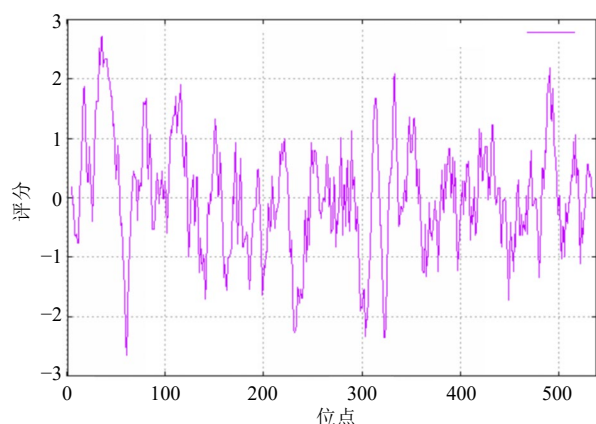
图 3 PnCyp450_3 氨基酸序列与其他物种 CYP450 氨基酸序列系统发育关系

Fig. 3 Phylogenetic relationships among PnCyp450_3 and other plant CYP450s based on peptide sequences

3.2 基因 *PnCyp450_3* 其他生物信息学分析

在上述遗传信息的基础上, 本实验从蛋白亲疏水性、等电点、蛋白相对分子质量、跨膜结构域、磷酸化位点等方面对 *PnCyp450_3* 编码蛋白进行了多方位预测分析。明确生物学信息和遗传背景对其催化特性和作用机制具有重要的参考价值。等电点和蛋白相对分子质量预测结果显示, PnCyp450_3 蛋白相对分子质量为 59 690, 理论等电点为 8.5。蛋白质处于等电点时, 净电荷为零, 分子间作用力和溶解度最小, 易形成沉

淀, 明确该特性有利于后期分离纯化蛋白。亲疏水性预测显示, 蛋白 PnCyp450_3 亲水性氨基酸和疏水性氨基酸在数量上相差不多, 呈交叉分布 (图 4)。磷酸化位点分析显示, 蛋白 PnCyp450_3 共含有 45 个磷酸化位点, 其中丝氨酸 29 个, 苏氨酸 14 个, 酪氨酸 1 个 (图 5)。蛋白构象、亚细胞定位以及信号蛋白分子间的相互作用等都受蛋白磷酸化和去磷酸化平衡的调节, 因此明确蛋白质磷酸化水平及磷酸化位点对进一步研究蛋白特性具有重要的参考意义^[22]。



正高值越大氨基酸疏水性越高, 负低值越小说明亲水性越高
Higher positive values indicated that amino acid residues had higher hydrophobicity, while lower negative values represent that amino acid residues had higher hydrophilicity

图 4 *PnCyp450_3* 编码蛋白亲疏水性氨基酸预测分析
Fig. 4 Predicted hydrophilic and hydrophobic amino acid sequences of protein encoded by gene *PnCyp450_3*

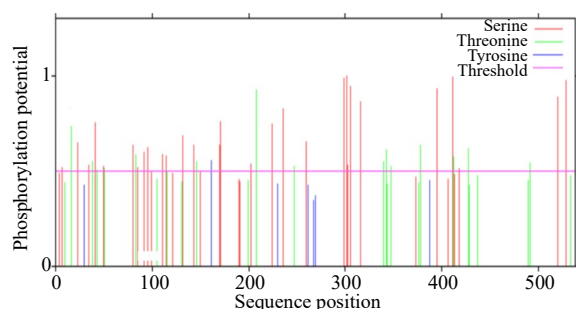


图 5 *PnCyp450_3* 编码蛋白磷酸化位点预测分析
Fig. 5 Prediction analysis of phosphorylation potential of protein encoded by gene *PnCyp450_3*

蛋白跨膜结构域在细胞转运、胞内信号转导、生长调节等方面发挥重要作用^[23]。如图 6 所示, 蛋白 *PnCyp450_3* 仅含有 2 个跨膜结构域, 为非典型跨膜蛋白。蛋白二级结构的预测可为研究蛋白质功能与结构关系提供参考。蛋白二级结构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, 主要包括 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲等形式。由图 7 可知, 蛋白 *PnCyp450_3* α -螺旋结构包含 293 个氨基酸, 占比 54.46%, 延伸主链结构共计 42 个氨基酸, 占比 7.81%, 无规则卷曲结构共计 203 个氨基酸, 占比 37.73%, 无 β -折叠和 β -转角。

3.3 不同组织部位 *PnCyp450_3* 响应 AMF 诱导的表达特性分析

通过 qRT-PCR 实验确定目标基因在不同处理

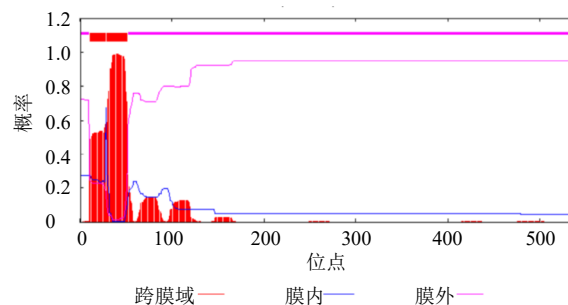


图 6 *PnCyp450_3* 编码蛋白跨膜结构域预测分析
Fig. 6 Prediction analysis of transmembrane domain of protein encoded by gene *PnCyp450_3*

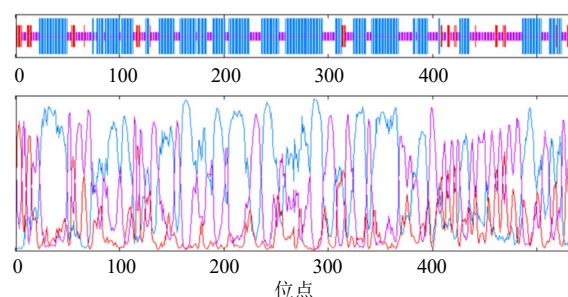
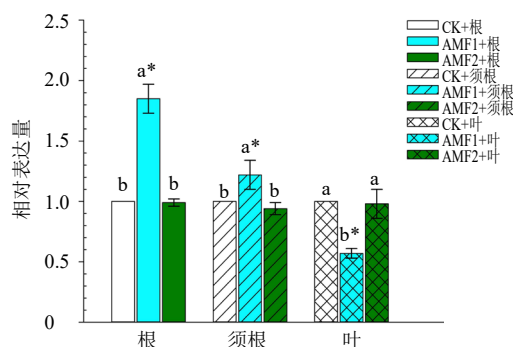


图 7 *PnCyp450_3* 编码蛋白二级结构预测分析
Fig. 7 Prediction analysis of secondary structure of protein encoded by gene *PnCyp450_3*

条件下不同植物组织中表达量, 是研究其转录层面表达特性的重要手段。在实验中, 基因 *PnCyp450_3* 和内参基因 26S-2 扩增溶解曲线峰值单一, 无干扰和杂峰, 说明本实验 qPCR 结果可靠。

由图 8 可知, 在 AMF1 诱导下, 与相应对照相比, *PnCyp450_3* 在三七主根、须根、叶中的表达量均呈显著差异 ($P < 0.05$), 其中主根的相对表达量最高, 为 1.85 倍, 其次为须根的 1.22 倍, 叶中最低, 为 0.57 倍, 呈下调表达。在 AMF2 诱导下, 与相应对照相比, *PnCyp450_3* 在主根、须根、叶中的表达倍数分别为 0.99、0.94、0.98 倍, 均为无显著差异 ($P > 0.05$)。

以无 AMF 菌剂处理组为空白对照, 横向比较主根、须根、叶部位基因 *PnCyp450_3* 对 AMF1、AMF2 诱导响应的差异。由图 8 可知, 无论是在主根部位还是须根部位, AMF1 诱导下, *PnCyp450_3* 表达量均显著高于 AMF2 和对照组 ($P < 0.05$), 且后两者之间则无显著差异。在叶部位中, 经 AMF1、AMF2 诱导处理后, *PnCyp450_3* 表达量均呈下调趋势, 且 AMF1 组下调倍数更大, 二者差异显著 ($P < 0.05$)。



*表示 *PnCyp450_3* 表达量在处理组与相应对照组之间差异显著, $P < 0.05$ 。不同的小写字母代表 *PnCyp450_3* 表达量在不同处理组 (含对照组) 之间差异显著, $P < 0.05$

*indicates that the expression levels of *PnCyp450_3* present significant difference between the treatment group and the corresponding control group, $P < 0.05$. Different lowercase letters represent that the difference of *PnCyp450_3* expression levels are significant among different treatment groups (including control group), $P < 0.05$

图 8 AMF1、AMF2 诱导处理下三七不同组织部位 *PnCyp450_3* 表达特性分析

Fig. 8 Expression characteristic analysis of *PnCyp450_3* in different tissues of *P. notoginseng* under the induction of AMF1 and AMF2

总体来看, *PnCyp450_3* 对 AMF1 诱导响应效果优于 AMF2, 尤其是在主根和须根部位, 推测 AMF1 更易诱导三七皂苷的合成。

4 讨论

本实验克隆获得了一个三七 CYP450 酶基因 *PnCyp450_3*, 对其结构和功能信息进行了梳理和分析。*PnCyp450_3* 氨基酸序列含有该家族 5 个典型保守结构域, 其中“F××G×R×C×G”为血红素结合域, 是 CYP450 蛋白主要特征序列, 与解敏敏等^[24]、李成磊等^[25]在烟草 *Nicotiana tabacum* L. CYP74B、CYP94A、CYP71D 和苦荞 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. FtP450-R4 中的发现一致。此外, 有研究认为, 依据 PERF 结构域可将 CYP450 家族分为 A-type 和 non-A-type 2 种类型, 且 A-type CYP450 序列不含 I 螺旋这一保守结构, 主要归属于 CYP71 亚族^[26], 正好印证了 *PnCyp450_3* 氨基酸系统发育树结果 (图 3)。李臻等^[27]则将水稻 *OsDWARF48* “PWRW (P×R×)” 序列标识为“PERF”结构域, 与本实验结果及廖卫芳^[26]研究均不一致, 推测在该结构域中只有脯氨酸和精氨酸高度保守。

本实验通过 AMF 回接实验发现, 根内球囊霉的定殖可以促进基因 *PnCyp450_3* 在主根和须根中

显著上调表达, 说明提高皂苷合成关键酶基因表达量是 AMF 诱导三七皂苷合成、积累的主要机制之一, 这与 Battini 等^[28]、Aseel 等^[29]、Li 等^[30]研究一致, 罗勒 *Ocimum basilicum* L. var. *basilicum*、番茄 *Solanum lycopersicum* L.、滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. 分别经根内球囊霉、摩西管柄囊霉 *Funneliformis mosseae* 及混合 AMF (珠状巨孢囊霉 *Gigaspora margarita*、巨紫荆巨孢囊霉 *G. gigantea*、美丽盾巨孢囊霉 *Scutellospora calospora*、薄翅猪毛菜盾巨孢囊霉 *S. pellucida*、近明球囊霉 *Claroideoglomus claroideum*) 诱导后, 叶中迷迭香酸合成关键酶基因 *tyrosine amino-transferase* (TAT)、黄酮合成关键酶基因 *CHS*、*CHI2*、*FLS1* 及根中重楼皂苷合成关键酶基因 *PpSE* 均显著上调, 且活性物质含量明显增加。

研究认为, 宿主植物活性物质合成与 AMF 种类、初始孢子密度密切相关。不同 AMF 对同一植物代谢产物合成促进效果并不一致, 而同一 AMF 对不同植物代谢产物亦有着不同促进效果^[31]。本实验发现, 根内球囊霉对三七皂苷合成关键酶基因 *PnCyp450_3* 表达促进效果呈显著差异, 与 Battini 等^[28]研究结果一致, 均为正促进作用。幼套球囊霉对基因 *PnCyp450_3* 表达促进作用则不显著, 与 Khodavandi 等^[32]研究结果相反, 其发现在油棕 *Elaeis guineensis* Jacq. 根部接种幼套球囊霉可以显著促进脂肪酸合成酶基因乙酰辅酶 A 基因 *ACC*, β -酮乙基-酰基载体蛋白合酶基因 *KAS II*, *KAS III*, 3-磷酸-甘油酰基转移酶基因 *ACT* 显著上调表达, 约为 3 倍。Janoušková 等^[33]认为在近明球囊霉 *G. claroideum* 共存条件下, 会促进根内球囊霉定殖发育及生物活性, 但尚无根内球囊霉与幼套球囊霉协同作用或拮抗的报道。此外, *PnCyp450_3* 基因表达具有显著组织差异性, 与张力鹏等^[21]对西藏大花红景天基因 *Rccyp450 71A* 研究结果相似, 均表现为地下部分 (主根、须根) 远远高于地上部分 (叶), 推测与其催化功能和活性物质主积累部位有关。

PnCyp450_3 是一个含有 1617 bp、编码 538 个氨基酸, 属于 CYP450 超家族、CYP71 亚族的三七皂苷合成关键酶基因, 与黄麻、可可树的氨基酸序列一致性较高, 含有 5 个保守区序列。表达特性分析发现, *PnCyp450_3* 在主根、须根、叶中均有表达, 且在主根和须根中均可响应根内球囊霉 (AMF1) 的诱

导而显著上调表达,尤其是在主根中。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu H B, Lu X Y, Hu Y, *et al.* Chemical constituents of *Panax ginseng* and *Panax notoginseng* explain why they differ in therapeutic efficacy [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161: 105263.
- [2] Xie W J, Meng X B, Zhai Y D, *et al.* *Panax notoginseng* saponins: A review of its mechanisms of antidepressant or anxiolytic effects and network analysis on phytochemistry and pharmacology [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): E940.
- [3] 李泽东, 赵荣华, 张兆传, 等. 三七皂苷合成及调控机制的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(14): 207-213.
- [4] Zhang L Y, Xu X Q, Badawy S, *et al.* A review: Effects of macrolides on CYP450 enzymes [J]. *Curr Drug Metab*, 2020, 21(12): 928-937.
- [5] Cheng Y, Liu H B, Tong X J, *et al.* Identification and analysis of CYP450 and UGT supergene family members from the transcriptome of *Aralia elata* (Miq.) Seem reveal candidate genes for triterpenoid saponin biosynthesis [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 214.
- [6] Shang Y, Ma Y S, Zhou Y, *et al.* Plant science. biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1084-1088.
- [7] Ghosh S. Biosynthesis of structurally diverse triterpenes in plants: The role of oxidosqualene cyclases [J]. *Proc Indian Natn Sci Acad*, 2016, 82(4): 1189-1210.
- [8] Ghosh S. Triterpene structural diversification by plant cytochrome P450 enzymes [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1886.
- [9] Sepahvand T, Etemad V, Matinzade M, *et al.* Symbiosis of AMF with growth modulation and antioxidant capacity of Caucasian Hackberry (*Celtis Caucasica* L.) seedlings under drought stress [J]. *Cent Asian J Environ Sci Technol Innov*, 2021, 2(1): 20-35.
- [10] Kapoor R, Anand G, Gupta P, *et al.* Insight into the mechanisms of enhanced production of valuable terpenoids by arbuscular mycorrhiza [J]. *Phytochem Rev*, 2017, 16(4): 677-692.
- [11] Bueno de Mesquita C P, Sartwell S A, Ordemann E V, *et al.* Patterns of root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes across a mostly-unvegetated, high-elevation landscape [J]. *Fungal Ecol*, 2018, 36: 63-74.
- [12] Christian N, Sedio B E, Florez-Buitrago X, *et al.* Host affinity of endophytic fungi and the potential for reciprocal interactions involving host secondary chemistry [J]. *Am J Bot*, 2020, 107(2): 219-228.
- [13] 王骞, 张辉菊, 杨敏, 等. 28 种 AM 真菌对滇重楼中薯蓣皂苷元含量的影响 [J]. 大理大学学报, 2018, 3(10): 22-25.
- [14] Pan X, Zhang J, Lu F, *et al.* Correlation of active ingredients in the roots of *Paridis Rhizoma* genus plants with mycorrhizal infection rate and soil nutrients [J]. *China Pharmacy*, 2016, 27(22): 3037-3040.
- [15] Mandal S, Upadhyay S, Wajid S, *et al.* Arbuscular mycorrhiza increase artemisinin accumulation in *Artemisia annua* by higher expression of key biosynthesis genes via enhanced jasmonic acid levels [J]. *Mycorrhiza*, 2015, 25(5): 345-357.
- [16] Caser M, Victorino Í, Demasi S, *et al.* Saffron cultivation in marginal alpine environments: How AMF inoculation modulates yield and bioactive compounds [J]. *Agronomy*, 2018, 9(1): 12.
- [17] 曹冠华, 张雪, 陈迪, 等. 三七丛枝菌根真菌(AMF)和深色有隔内生真菌(DSE)定殖调查及与皂苷含量相关性分析 [J]. 中药材, 2019, 42(7): 1509-1512.
- [18] Domokos E, Bíró-Janka B, Bálint J, *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* influences *Artemisia annua* plant parameters and artemisinin content under different soil types and cultivation methods [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(6): E899.
- [19] Cao G H, Li Z D, Wang X F, *et al.* Phosphate transporters, PnPh1;1 and PnPh1;2 from *Panax notoginseng* enhance phosphate and arsenate acquisition [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 124.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T}(-Delta Delta C(T)) method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-410.
- [21] 张力鹏, 韩祥艳, 成璐路, 等. 西藏大花红景天 cyp450 基因的分离与表达分析 [J]. 北方园艺, 2019(18): 116-127.
- [22] 丛小骥. 基于蛋白质组学技术的磷酸化修饰和酰化修饰交互调控的机制与功能研究 [D]. 上海: 中国科学院大学(中国科学院上海药物研究所), 2020.
- [23] 曹冠华. 嗜鱼外瓶霉(*Exophiala pisciphila*)ABC 转运蛋白基因与宿主重金属耐性的研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2017.
- [24] 解敏敏, 龚达平, 李凤霞, 等. 烟草细胞色素 P450 的基因组学分析 [J]. 遗传, 2013, 35(3): 379-387.
- [25] 李成磊, 赵海霞, 温国琴, 等. 苦荞细胞色素 CYP81 家族同源基因 FtP450-R4 的克隆、分子鉴定及其功能分析 [J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(2): 181-192.
- [26] 廖卫芳. 紫杉醇生物合成相关 P450 羟化酶基因的挖掘

- 及功能研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
- [27] 李臻, 王庆国, 潘教文, 等. 水稻细胞色素 P450 基因 OsDWARF48 调控株高的功能分析 [J]. 山东农业科学, 2018, 50(11): 1-9.
- [28] Battini F, Bernardi R, Turrini A, *et al.* *Rhizophagus intraradices* or its associated bacteria affect gene expression of key enzymes involved in the rosmarinic acid biosynthetic pathway of basil [J]. *Mycorrhiza*, 2016, 26(7): 699-707.
- [29] Aseel D G, Rashad Y M, Hammad S M. Arbuscular mycorrhizal fungi trigger transcriptional expression of flavonoid and chlorogenic acid biosynthetic pathways genes in tomato against tomato mosaic virus [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9692.
- [30] Li H L, Xu L, Zhao S, *et al.* Mycorrhizas affect polyphyllin accumulation of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* through promoting PpSE expression [J]. *Internat J Experiment Bot*, 2021(5): 1535-1547.
- [31] Johnny L, Cahill D M, Adholeya A. AMF enhance secondary metabolite production in ashwagandha, licorice, and marigold in a fungi-host specific manner [J]. *Rhizosphere*, 2021, 17: 100314.
- [32] Khodavandi A, Alizadeh F. Gene expression profiling of fatty acid biosynthetic pathway during interaction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) with the mutualistic fungus *Glomus etunicatum* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2015, 37(11): 1-9.
- [33] Janoušková M, Seddas P, Mrnka L, *et al.* Development and activity of *Glomus intraradices* as affected by co-existence with *Glomus claroideum* in one root system [J]. *Mycorrhiza*, 2009, 19: 393-402.

[责任编辑 时圣明]