

## • 药材与资源 •

茯苓细胞色素 P450 基因 *PcCYP* 的克隆与序列分析唐 静<sup>1</sup>, 朱闻君<sup>2</sup>, 刘和平<sup>1</sup>, 苏振佳<sup>1</sup>, 刘金鑫<sup>1</sup>, 舒少华<sup>1\*</sup>

1. 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070

2. 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023

**摘要:**目的 筛选与茯苓 *Poria cocos* 生长发育相关的细胞色素 P450 基因序列, 进一步丰富对茯苓生长发育理解。方法 通过分子克隆到 1 个茯苓细胞色素 P450 基因 *PcCYP*, 并利用在线工具分析其序列, 预测蛋白的理化性质、结构域等分子特征; 利用 MEGA 5.0 分别对氨基酸进行多序列比对和进化关系分析, 并采用 qRT-PCR 方法检测不同发酵培养时间 6、8、10 d 的相对表达量。**结果** 从茯苓中克隆到的 *PcCYP* 存在可变性剪切, 2 个选择性剪切体 *PcCYP1* 和 *PcCYP2* CDS 区长度分别为 1590、1542 bp, 分别编码 529、513 个氨基酸。氨基酸序列分析发现其均具有保守的 P450 结构域, 且具有信号肽和多个磷酸化修饰位点, 属于分泌型的不稳定亲水蛋白。氨基酸序列多重比对及系统发育树结果显示 *PcCYP* 与担子菌 *Coprinopsis cinerea* 的 CYP502 距离最近, 推测 *PcCYP* 和 CYP502 具有相似功能, 即参与调控茯苓子实体的发育。定量 PCR 结果显示, 选择性剪接变体 *PcCYP1* 的表达量较 *PcCYP2* 低, 因此 *PcCYP2* 是 *PcCYP* 基因的主要剪接体。**结论** *PcCYP* 与茯苓子实体的生长发育密切相关, 为进一步研究 *PcCYP* 在茯苓生长发育、遗传规律及育种等方面的生物学功能奠定基础。

**关键词:** 茯苓; 细胞色素 P450; 基因克隆; 生物信息学分析; 基因表达; 生长发育

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)12-3962-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.022

**Cloning, characterization and expression of a novel cytochrome P450 genes *PcCYP* in *Poria cocos***TANG Jing<sup>1</sup>, ZHU Wen-jun<sup>2</sup>, LIU He-ping<sup>1</sup>, SU Zhen-jia<sup>1</sup>, LIU Jin-xin<sup>1</sup>, SHU Shao-hua<sup>1</sup>

1. College of Plant Science and Technology of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2. School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China

**Abstract: Objective** A cytochrome P450 gene sequence related to the growth and development of *Poria cocos* was screened and reported to further enrich the understanding of the growth and development of *P. cocos*. **Methods** In this study, a cytochrome P450 gene *PcCYP* was cloned from *P. cocos*, and some bioinformatics tools were used to predict the physical and chemical properties of the protein, as well as the molecular characteristics of the domain; MEGA 5.0 was used to perform multi-sequence alignment and phylogenetic analysis of amino acids. The gene expression levels at 6d, 8d, and 10d of fermentation were quantified by qRT-PCR. **Results** The results showed that two transcripts of *PcCYP*, *PcCYP1* and *PcCYP2* were founded from *P. cocos* for the first time. They were 1590 bp and 1542 bp in length and encoded 529 and 513 amino acids, respectively. Sequence analysis revealed that they both had a conserved P450 domain, a signal peptide and multiple phosphorylation sites, which secreted unstable hydrophobins; multiple alignments of amino acid sequences and phylogenetic tree results showed that the *PcCYP* was similar to CYP502 of the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*; qPCR results showed that the expression of *PcCYP1* is lower than that of *PcCYP2*, suggesting that *PcCYP2* was the main transcript of *PcCYP*. **Conclusion** Hydrophobin *PcCYP* is closely related to the growth and development of the fruit body of *P. cocos*, which lays a foundation for further research on the biological functions of *PcCYP* in the growth and development, genetic rule and breeding of *P. cocos*.

**Key words:** *Poria cocos* (Schw.) Wolf; CYP450; gene cloning; bioinformatics analysis; gene expression; growth and development

收稿日期: 2022-12-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81872948); 名贵中药资源可持续利用能力建设项目 (2060302-1907-05)

作者简介: 唐 静 (1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事茯苓生长发育及次生代谢与调控方面的研究。E-mail: hzautj@163.com

\*通信作者: 舒少华 (1979—), 男, 副教授, 主要从事药用植物栽培及次生代谢产物代谢与调控等方面的研究。

E-mail: shushaohua@mail.hzau.edu.cn

细胞色素 P450 (CYP450) 广泛分布于生物体中, 是一类具有半胱氨酸-亚铁血红素结构的多功能超基因家族<sup>[1]</sup>, 主要参与到烷基的羟化、烯基的环氧化、炔基的氧化、氧化性脱氨、脱卤和脱氢、氧化性的碳, 碳键断裂及一些还原反应<sup>[2-4]</sup>。研究表明, 在真菌界大约有 2500 多种 CYPs 被发现, 主要参与多环芳烃、烷烃、甾醇类化合物等初级、次级代谢产物的生物合成过程以及农药降解等方面<sup>[5-8]</sup>。在许多真菌来源的药物性分子的生物合成中, CYP 扮演了重要的角色, 如灵芝酸合成途径中 CYP5150L8 催化羊毛甾醇转化为 3-羟基-羊毛甾-8,24-二烯-26-酸 (HLDOA)<sup>[9]</sup>; 梭链孢烷抗生素的生物合成过程中 P450 氧化酶 HelB1、HelB2、HelB4、HelB3 分别催化 C-4 $\beta$  的甲基羧基化、C-16 羟化、C-20 甲基羧基化、C-6 羟化和 C-7 羧基化<sup>[10]</sup>; 葶青霉素合成途径中 PaxP 催化 paspaline 转化为 13-desoxypaxilline<sup>[11]</sup>; 赤霉素合成途径中 P450-1 催化贝壳杉烯酸转化为 GA14<sup>[12]</sup>; 单端孢霉烯的合成过程中 Tri4 催化单端孢霉二烯经由 4 步加氧反应合成单端孢霉烯三醇<sup>[13]</sup>; 去甲基胶霉素的生物合成中 VidE、VidG、VidR 共同作用使 4-methyl-fecosterone 发生 demethoxyviridin 反应等<sup>[14]</sup>。除此之外, 细胞色素 P450 在真菌子实体的形成过程中也具有调控作用, 如通过基因敲除方法证实苹果腐烂病菌 *Valsa mali* 的 *Vmcyp5* 缺失可降低产孢量<sup>[15]</sup>; 通过表达量分析发现 10 种 CYPs 强烈表达有利于牛樟芝 *Antrodia camphorate* L. 子实体形成<sup>[16]</sup>; 利用差异显示方法证实 *cypA* 与双孢蘑菇 *Agaricus bisporus* (Large) Sing. 子实体形成有关等<sup>[17]</sup>, 但关于 P450 调控子实体形成机制的研究鲜有报道。

茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 为多孔菌科药用真菌, 是一种药食同源的大宗药材, 其主要药用活性成分为茯苓多糖和三萜类化合物<sup>[18]</sup>, 但关于其药用成分合成机制的研究较少。另一方面, 由于对茯苓子实体的形成缺乏系统的研究, 导致其遗传基础研究相对薄弱。本实验基于前期构建茯苓菌核和菌丝的转录组文库中发现的具有差异表达的 CYP450 超家族基因的全长开放读码框<sup>[19]</sup>, 克隆获取了 PcCYP1 以及选择性剪切体 PcCYP2 的开放读码框全长序列, 并就该基因的结构特征和功能进行初步分析, 以期为进一步深入研究 PcCYP 基因的功能奠定基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 茯苓 *P. cocos* (Schw.) Wolf 菌株 GIM5.29 购买自广东微生物所; 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  购自上海唯地生物技术有限公司。

**1.1.2 酶和生化试剂** PC82-2 $\times$ A8 FastHiFi PCR MasterMix、Zero Blunt Quick Ligation Kit 均购自北京艾德莱生物科技有限公司; RNAiso Plus 试剂购自大连 TaKaRa 公司; RevertAid<sup>TM</sup> 第一链 cDNA 合成试剂盒购自 Thermo Scientific 公司; Gel Extraction Kit 购自北京康为世纪生物技术有限公司。PCR 引物合成及序列测定由武汉擎科生物技术有限公司完成。其他化学试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 仪器

DHP350 型恒温培养箱 (武汉瑞华有限公司), HNYC-1102CD 型振荡摇床 (天津欧诺有限公司), DL-CJ-2N 型超净工作台 (北京东联哈尔有限公司), 电泳仪和水平电泳槽 (北京六一生物科技有限公司), CFX Connect 荧光定量 PCR 仪、MyCycler 普通 PCR 仪、凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司), NanoDrop (美国 Thermo Fisher 公司), 水浴锅 (武汉鑫科有限公司), 灭菌锅 (上海三申有限公司), 电子天平和 pH 计 (美国奥豪斯公司), 离心机 (美国 Bio-Rad 公司), -80  $^{\circ}$ C 超低温冰箱 (中科美菱有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 培养基和培养条件

LB、PDA 和 PDB 培养基配方参考《基因工程实验指导 (第 2 版)》。茯苓斜面菌株 4  $^{\circ}$ C 保存, 接种于 PDA 平板培养基上的茯苓菌株在 28  $^{\circ}$ C 下培养, 接种于 PDB 液体培养基中的在 28  $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下培养。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  接种于 LB 培养基在 37  $^{\circ}$ C 培养。

### 2.2 RNA 提取及 cDNA 合成

收集在 PDA 平板上培养 7 d 的茯苓菌丝, 在液氮中速冻并充分研磨粉碎后使用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 试剂提取 RNA, 提取方法参考其说明书进行。并用使用 RevertAid<sup>TM</sup> 第 1 链 cDNA 合成试剂盒合成第 1 链 cDNA。获得的 cDNA 测定浓度后 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 2.3 PcCYP 基因的克隆

结合报道的茯苓基因组信息 (<https://www.>

ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/469660165? report= genbank) 和本课题组转录本测序结果筛选出在茯苓菌丝和菌核不同生长阶段差异表达的 *CYP450* 基因, 选择其中一条基因 *PcCYP*, 根据其 CDS 序列设计基因特异性扩增引物 *PcCYP-F1* 和 *PcCYP-R1* (表 1), 以 cDNA 为模板使用高保真酶进行扩增。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L 2 $\times$ A8 PCR MasterMix, 1  $\mu$ L *PcCYP-F1* (10  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L *PcCYP-R1* (10  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L cDNA, 总体积 50 $\mu$ L。PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 32 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 对符合目的大小的条带进行切胶回收。回收产物与 pZERO-Blunt 平末端载体连接, 转化至 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞, 并涂布于含有 50  $\mu$ g/mL 氨苄抗生素的 LB 固体培养基上, 在 37  $^{\circ}$ C 的培养箱中培养 16 h。挑选单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 阳性菌株送于公司测序验证。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

名称	序列 (5'→3')	产物大小/bp
PcCYP-F1	ATGGATCGTATTACGGTCTTTCTTCT	1590
PcCYP-R1	TCAACCAATGACGTCGCGAGTGG	
PcCYP-F2	ATGAGGGATATCGGATTCCAGCG	150
PcCYP-R2	GGACTAAACGCTCTCTGGCTCAGGG	
PcCYP1-F	CGTTGTGGCACAGTGGTTC	156
PcCYP1-R	CCTGCTGTTATTGAGCGCT	
PcCYP2-F	TTGAGAAAGAGTGGCGGGTC	151
PcCYP2-R	CGATCAGAGTAGTTCGCGCT	

2.4 *PcCYP* 基因的序列及系统进化树分析

按照表 2 中的登录号在 NCBI 里下载不同真菌物种的 *CYP450s* 氨基酸序列与本研究克隆得到的 *PcCYPs* 氨基酸序列比对, 采用 MEGA 软件构建系统进化树 (neighbor-joining, NJ), bootstrap 设置为 1000 次<sup>[20]</sup>。

表 2 不同真菌细胞色素 P450 的功能信息及 NCBI 登录号

Table 2 Functional information and NCBI accession number of different fungal cytochrome P450

种名	蛋白	序列号	种名	蛋白	序列号
酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	CYP51A1	NP_011871.1	禾谷镰刀菌 <i>Fusarium graminearum</i>	tri1	AAQ02672.1
	CYP61	P54781.1		tri11	BAC22120.1
构巢曲霉 <i>Aspergillus nidulans</i>	CYP53A3	AAL10516.1		tri4	AAK53584.1
	ppoC	AAT36614.1	拟枝孢镰刀菌 <i>Fusarium sporotrichioides</i>	tri4(CYP58)	AAB72032.1
	ppoA	AAR88626.1	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	fum6	ACB12553.1
	ahbB	AAR15377.1		CYP505	BAA82526.1
	CYP60A2	AAC49196.1		CYP55A1	P23295.2
	CYP62	AAC49192.1	露湿漆斑菌 <i>Myrothecium roridum</i>	tri4	AAC49958.1
	CYP504	CAB43093.1	油菜黑胫病菌 <i>Leptosphaeria maculans</i>	sirB	AAS92544.1
	CYP504B	ABB20530.1		sirC	AAS92547.1
	CYP62	XP_681093.1		sirE	AAS92549.1
甘蓝链格孢 <i>Alternaria brassicicola</i>	orf1	BAI52800.1	草青霉 <i>Penicillium paxilli</i>	paxP	AAK11528.1
集蜂曲霉 <i>Aspergillus nonius</i>	cypA	AAS90045.1		paxQ	AAK11527.1
烟曲霉 <i>Aspergillus fumigatus</i>	CYP51a	ACF17705.1	念珠菌 <i>Candida albicans</i>	dit2	CAK54651.1
	CYP51b	AAK73660.1		alk8	CAA75058.1
	gliC	EDP49542.1		CYP51	ACT21069.2
	gliF	AAW03300.1		CYP51	XP_716761.1
	fimE	BAH23999.1	麦芽糖假丝酵母 <i>Candida maltosa</i>	CYP52	CAA39367.1
	fimC	BAH23996.1		CYP52A4	P16141.4
	fimG	BAH24001.1		CYP52A3b	AAC60531.1
棒曲霉 <i>Aspergillus clavatus</i>	CYP619C2	ACG60892.1	光滑念珠菌 <i>Candida glabrata</i>	CYP61	KTB21909.1
	CYP619C3	ACG60891.1	球毛壳菌 <i>Chaetomium chiversii</i>	radP	ACM42407.1
米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i>	CYP55A5	BAC01275.1	委内瑞拉链霉菌 <i>Streptomyces venezuelae</i>	piKC	AAC68886.1
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	CYP53A1	P17549.1	腐皮镰刀菌 <i>Nectria haematococca</i>	CYP57	AAC01762.1
寄生曲霉 <i>Aspergillus parasiticus</i>	afIU	Q6UEH4.1	皮状丝孢酵母 <i>Trichosporon cutaneum</i>	CYP55A4	BAB60855.1
	afIQ	AAS66031.1	赤霉菌 <i>Gibberella intermedia</i>	CYP503A1	Q701P2.1
新型隐球菌 <i>Cryptococcus neoformans</i>	CYP51A	AAF35366.1		P450 - 1	CAF31353.1
黄曲霉 <i>Aspergillus flavus</i>	CYP51A	EED56341.1	串珠赤霉菌 <i>Gibberella moniliformis</i>	fum2	AAN74815.2
	CYP51B	EED50354.1	解脂耶氏酵母菌 <i>Yarrowia lipolytica</i>	ALK3	BAA31435.1
	putative CYP450	AAT65721.1		ALK8	BAA31440.1
黄孢原毛平革菌 <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	CYP51	ACI23621.1		ALK5	BAA31437.1
灰盖鬼伞菌 <i>Coprinopsis cinereus</i>	CYP502	BAA33717.1	灵芝 <i>Ganoderma lucidum</i>	CYP5150L8	AVZ44872.1

### 2.5 *PcCYP* 基因的基础生物信息学分析

将所得的 *PcCYP* 基因序列和氨基酸序列同源性比对：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>；<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>；*PcCYP* 基因编码蛋白的基本理化性质利用 ExPASy 数据库（[http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.htm](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.htm)）进行分析；利用在线工具 TMHMM Server 2.0（<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>）、SignalP 5.0 Server（<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>）、TargetP 2.0 Server（<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>）、NetPhos 3.1 Server（<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>）分别进行蛋白质跨膜区、信号肽、亚细胞定位、磷酸化位点分析；利用 CDD（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>）进行蛋白质保守结构域的分析。

### 2.6 *PcCYP* 基因不同剪切体的表达量分析

根据 *PcCYP* 基因克隆得到的 2 个不同剪切体（*PcCYP1*、*PcCYP2*）分别设计荧光定量引物 *PcCYP1*-F/*PcCYP1*-R、*PcCYP2*-F/*PcCYP2*-R（表 1）。以 *his3-1* 为内参基因<sup>[21]</sup>，利用 qRT-PCR 测定 *PcCYP* 基因不同转录本在液体发酵培养 6、8、10 d 的菌丝体中的相对表达量。仪器使用 CFX96 实时定量 PCR 仪（美国伯乐公司），qRT-PCR 实验方法按照康为世纪公司 RealSYBR Mixture 的实验说明书进行，每个反应 3 次重复，*PcCYP1*、*PcCYP2* 的相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法处理<sup>[22]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 茯苓 *PcCYP* 基因的克隆

以培养 7 d 的茯苓菌丝体为材料提取 RNA，从电泳检测结果（图 1）可知 28 S 条带的亮度大约是 18 S 的 2 倍，表明 RNA 没有降解，完整性较好，可以用于后续实验。

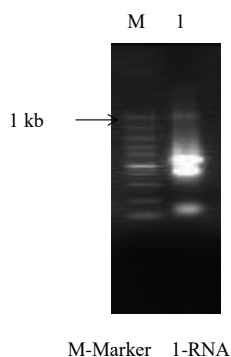


图 1 RNA 凝胶电泳图

Fig. 1 RNA quality detection by gel electrophoresis

根据从转录组和基因组信息中获取的 *PcCYP* 基因 CDS 序列设计特异性引物，以反转录的 cDNA 为模板进行扩增，得到 1 个 1600 bp 左右的特异性条带，结果见图 2。回收目的产物，克隆到平末端载体后送测序，测序结果显示 *PcCYP* 基因的 CDS 有 2 种序列，其中较长的 1 条序列长度为 1590 bp，编码 529 个氨基酸，而另 1 条较短的序列长度为 1542 bp，编码 513 个氨基酸，初步推测 *PcCYP* 基因可能存在选择性剪切。将该基因与由 NCBI 中茯苓基因组（<https://mycocosm.jgi.doe.gov/cgi-bin/dispGeneModel?db=Wolco1&id=131022>）进行比对，发现 *PcCYP* 中共含有 9 个内含子和 11 个外显子，其中第 9 个外显子中的 48 bp 可能存在选择性剪切，当该区域在转录过程中被剪切，就会形成新的转录本即 *PcCYP2*（图 3）。为了进一步验证是否存在选择性剪切，在该区段的上下游设计特异性引物 *PcCYP*-F2、*PcCYP*-R2（表 1）进行扩增，PCR 产物采用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 4 所示。在 100 bp 和 150 bp 附近有 2 条条带，其中 150 bp 的 *PcCYP1* 基因片段亮度较弱，而 100 bp 的 *PcCYP2* 基因片段亮度较明亮，因此验证了选择性剪切的的存在。

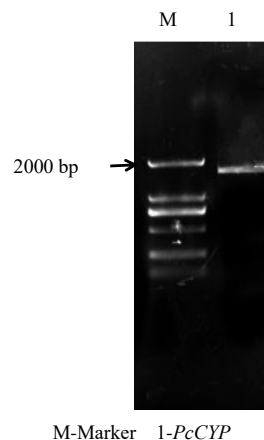


图 2 *PcCYP* 基因 PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳检测  
Fig. 2 1% Agarose gel electrophoretogram of *PcCYP* PCR amplification product

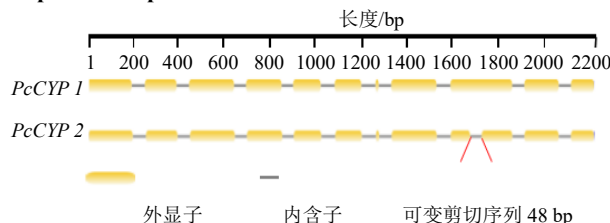


图 3 *PcCYP* 基因结构示意图

Fig. 3 Structure diagram of *PcCYP* gene model

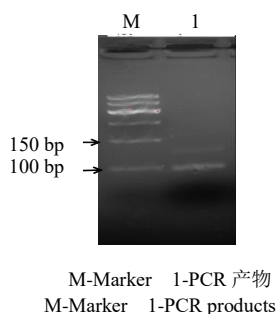


图4 *PcCYP* 基因选择性剪切片段的 2.5%琼脂糖凝胶检测  
Fig. 4 Identification of *PcCYP* alternative splicing fragment by 2.5% Agarose gel electrophoresis

### 3.2 *PcCYP* 系统发育分析

为了推测 *PcCYPs* 的家族分类以及功能, 本研究从真菌细胞色素 P450 数据库中下载了来自不同物种且功能明确的 60 条 *CYPs* 氨基酸序列, 并利用 Clustal、Mega 软件与 *PcCYP* 氨基酸序列进行比对分析和系统进化树的构建。结果如图 5 所示, 来源于不同物种的 *CYP51*、*CYP52*、*CYP55*、*CYP53*、*CYP503* 等分别聚为一支, *PcCYP* 与灰拟鬼伞菌 *Coprinosopsis cinerea* 中 *eln2* 编码的 *CYP502* 比较相近, 因此推测 *CYP* 可能属于 *CYP502* 家族基因。

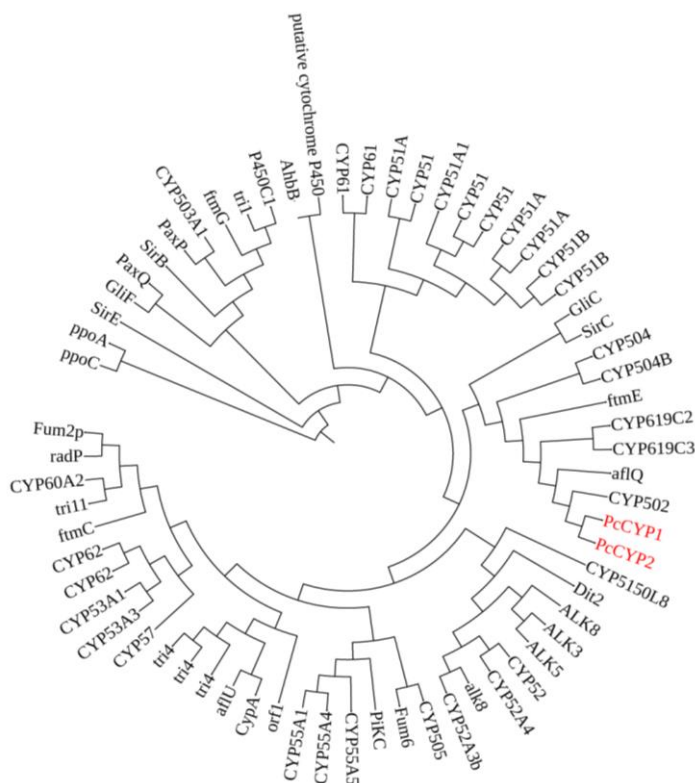


图5 *PcCYP* 蛋白序列的系统进化分析  
Fig. 5 Phylogenetic analysis tree of *PcCYP* protein

### 3.3 *PcCYP* 生物信息学分析

分别根据 *PcCYP1* 和 *PcCYP2* CDS 序列, 翻译得到相应的 2 条氨基酸序列。使用 ExPASy-ProtParam tool 预测其蛋白基本理化性质, 结果如表 3 所示, *PcCYP1* 和 *PcCYP2* 相对分子质量分别为 59 568.35 和 57 675.34, 参考工具定义, 当不稳定系数低于 40 时预测为稳定蛋白, 超过 40 为不稳定蛋白, 平均疏水性值为 -2~2, 负值表明该蛋白为亲水性蛋白, 正值表示为疏水性, 因此 *PcCYP1* 和 *PcCYP2* 均为不稳定亲水蛋白。同时, 利用在线工具 ProtScale 预测蛋白一级结构上的亲疏性, 结果(图 6)表明大部分区域打

表 3 *PcCYP* 理化性质预测

理化指标	预测结果	
	<i>PcCYP1</i>	<i>PcCYP2</i>
相对分子质量	59 568.35	57 675.34
氨基酸数/个	529	513
等电点 (pI)	6.18	6.04
分子式	C <sub>2683</sub> H <sub>4152</sub> N <sub>720</sub> O <sub>767</sub> S <sub>25</sub>	C <sub>2603</sub> H <sub>4031</sub> N <sub>693</sub> O <sub>740</sub> S <sub>25</sub>
不稳定系数	41.99	40.21
平均疏水性	-0.156	-0.112
负电荷残基数 (Asp+Glu) /个	60	59
正电荷残基数 (Arg+Lys) /个	54	52

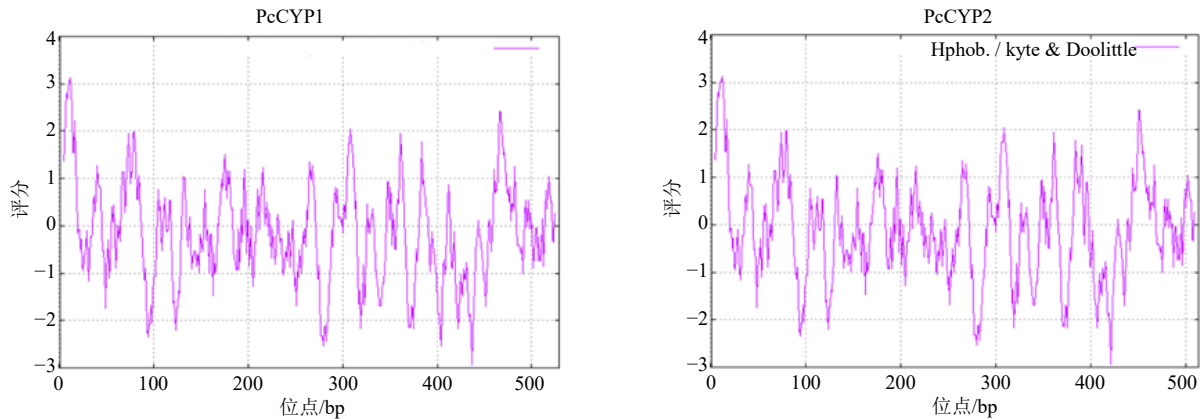


图6 PcCYP 氨基酸疏水性预测

Fig. 6 Hydrophobicity prediction analysis of amino acid sequence of PcCYP

分为负值，即表现为亲水性，与表3的结果一致。信号肽预测结果表明第1~17氨基酸为信号肽（图7）。跨膜结构域预测结果（图8）表明 PcCYP1 和 PcCYP2 均无跨膜结构。亚细胞定位预测结果表明 PcCYP1 和 PcCYP2 均存在于线粒体中。由于蛋白质磷酸化修饰在调节基因转录及改变蛋白质的功能方面具有重要作用，预测结果显示 PcCYP1 和 PcCYP2 均存在多个磷酸化位点，其中 PcCYP1 中包含苏氨酸（T）位点 23 个、丝氨酸（S）位点 22 个、酪氨酸（Y）位点 11 个；而 PcCYP2 基因由于缺失 48 bp，所以预测的磷酸化位点包括苏氨酸（T）位点 23 个、丝氨酸（S）位点 19 个、酪氨酸（Y）位点 10 个（图9）。保守结构域分析如图10所示，PcCYP1 的第 295~473 位和 PcCYP2 的 295~457 位氨基酸与 CYP450 超家族蛋白保守相似，属于 CypX 多保守域蛋白。此外，PcCYP1、PcCYP2 均与 pfam00067、PTZ00404 具有部分相似位点，而由于选择性剪切氨基酸序列还与环二肽合

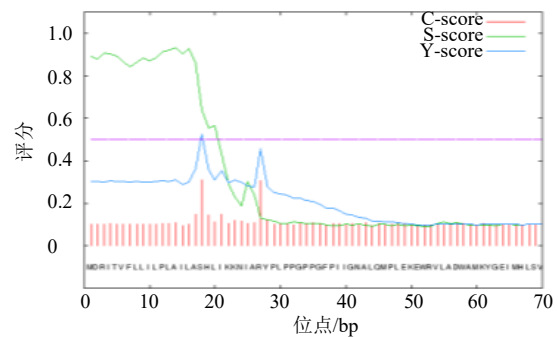


图7 PcCYP 蛋白信号肽预测

Fig. 7 Signal peptide prediction of PcCYP protein

成的 CYP450 (TIGR04538) 具有相似位点。因此结合以上结果推测 PcCYP1 和 PcCYP2 经过不同的剪切方式翻译成不同的酶可能参与到线粒体中不同的反应途径。

### 3.4 PcCYP1 和 PcCYP2 的表达分析

分别针对 PcCYP1 和 PcCYP2 基因设计 2 对引物进行荧光定量 PCR，由于 PcCYP1 比 PcCYP2 转

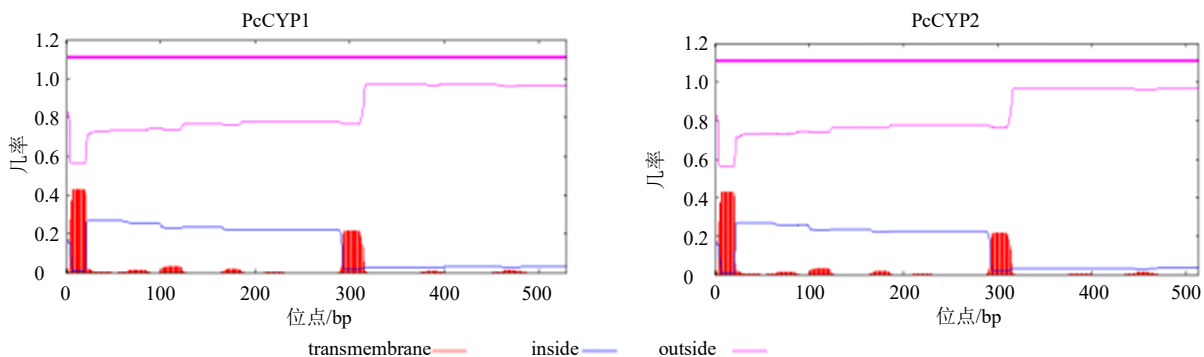


图8 PcCYP 蛋白跨膜结构域预测

Fig. 8 Transmembrane structure prediction of PcCYP protein.



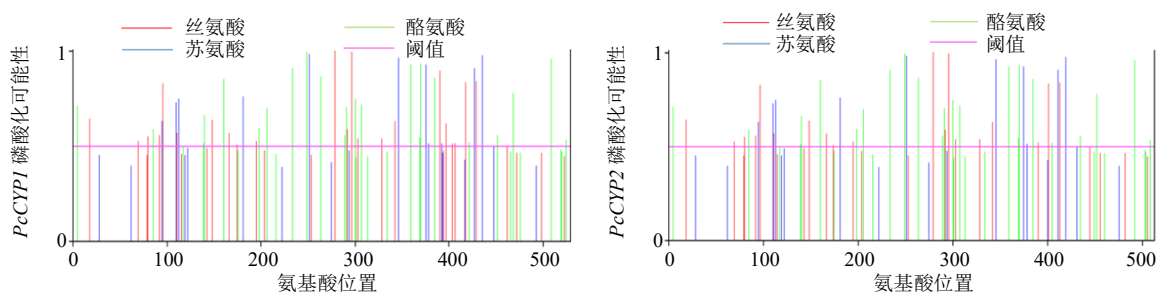


图9 PcCYP 磷酸化位点预测

Fig. 9 Prediction of phosphorylation sites of PcCYP

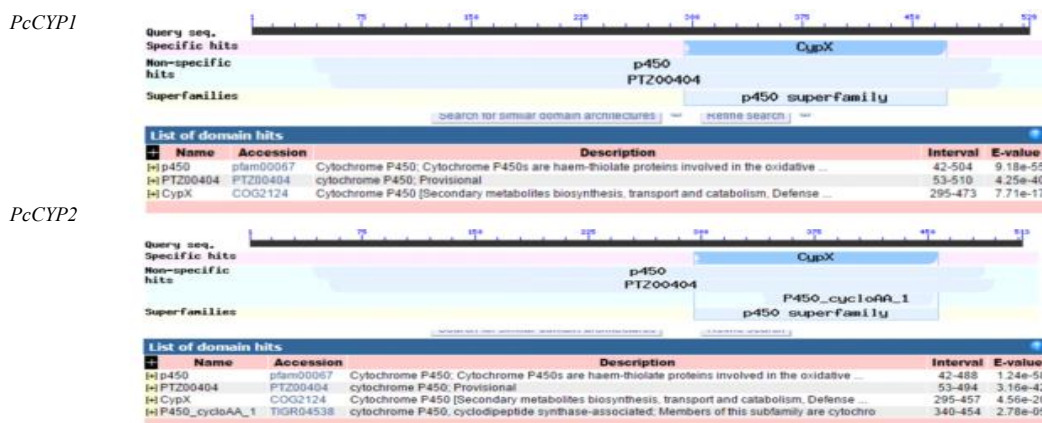


图10 PcCYP 蛋白保守结构域分析

Fig. 10 Analysis of conserved domain of PcCYP protein

录本多 1 个 48 bp 的内含子，因此，在此内含子中设计 PcCYP1R，定量结果代表 *PcCYP1* 转录本 的表达量。在 *PcCYP1* 和 *PcCYP2* 转录本的公共外显子区设计引物 (PcCYP2F 和 PcCYP2R) 的定量 PCR 结果代表 2 个转录本表达量之和，减去前面 *PcCYP1* 定量 PCR 的结果后，则为 *PcCYP2* 转录本真实的表达量。由图 11 表明，*PcCYP1* 在 3 个时间段的表达量无显著性差异。*PcCYP2* 在不同发酵培养时间下的表达量具有显著差异，在培养 10 d 时 *PcCYP2* 表达量最高，而在培养 8 d 时表达量最低。与 *PcCYP1* 的表达量相比，在 6、8 d 时，*PcCYP1* 与 *PcCYP2* 的表达量无显著差异，但 10 d 时 *PcCYP2* 表达量显著高于 *PcCYP1*。

#### 4 讨论

细胞色素 P450 超家族基因广泛存在于生物体内，参与多种内源、外源物质的代谢途径中。随着真菌基因组学技术的发展，目前有 399 种 CYP 基因家族在 2500 种真菌中发现<sup>[23]</sup>。真菌 CYP450 分为 CYP52、53、54、64 等 4 个集团，各个集团又包含许多家族。而 CYP51、56、59、61、67 等家族是不归属于以上任何集团，其中 CYP51 和

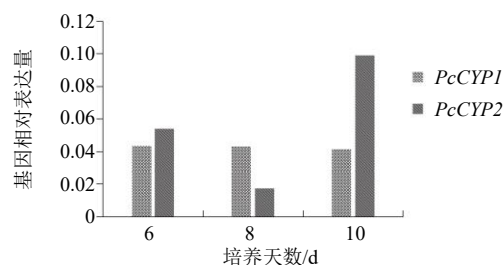


图11 *PcCYP1*、*PcCYP2* 基因的表达量分析

Fig. 11 Expression quantity analysis of *PcCYP1* and *PcCYP2*

CYP61 的进化较为保守，功能研究较透彻，主要参与到麦角甾醇的代谢途径中<sup>[24-25]</sup>。

本研究基于课题组前期筛选出的具有差异表达的 *CYP450s* 基因，选择其中 1 条 *PcCYP* 基因进行了深入研究。本研究在对茯苓 *PcCYP* 转录本的克隆中首次得到了它的 2 个转录本：*PcCYP1* (第 9 个外显子完整) 和 *PcCYP2* (缺失 48 bp)，编码的蛋白质大小分别为 59 560 和 57 660。通过与 60 种功能明确的真菌 P450 氨基酸序列进行比对和系统进化分析可知，PcCYPs 与腐生菌灰盖鬼伞菌 *Coprinopsis cinerea* 的 CYP502 氨基酸序列相似度

最大, 进化分析也属于同一分枝, 同属于伞菌纲。研究表明 CYP502 蛋白主要参与到 *Coprinospinaria cinerea* 的子实体发育过程中, 当编码 CYP502 蛋白的基因 *eln* 发生突变时, 子实体的原基菌柄分化受到影响, 菌柄细胞伸长能力减弱, 菌柄变得短小<sup>[26]</sup>。因此推测 PcCYP 可能在茯苓子实体的生长发育过程中具有调节作用, 但具体的功能需要进一步的实验验证。进一步对 PcCYPs 的基本特性分析得出 PcCYP1 和 PcCYP2 均属于 P450 超基因家族酶, 且属于分泌型的不稳定的疏水蛋白。亚细胞定位分析发现 PcCYP 可能位于线粒体中, 同时对其进行蛋白质修饰位点分析发现 PcCYP 具有多个磷酸化修饰位点。研究表明, 真菌 CYP450 蛋白质在其氨基酸序列的氨基端 (N 端) 具有一段疏水性螺旋区域和一段富含脯氨酸的区域, 这种特征能够使蛋白很准确地锚定在细胞器 (膜) 上<sup>[27]</sup>, 另一方面, 分泌型的疏水蛋白可以通过水溶状态进行亲水/疏水两性分子界面的自我组装, 从而在子实体的形成过程中发挥重要作用<sup>[28]</sup>。蛋白质磷酸化是在蛋白激酶催化作用下, 供体分子磷酸基团与蛋白质侧链中含有羟基的氨基酸发生酯化反应的可逆过程, 属于翻译后修饰加工过程<sup>[29]</sup>。蛋白磷酸化修饰可以改变蛋白质的结构、活性及其与其他分子相互作用的能力, 是一种动态的生物调节过程, 在信号传导、基因表达、细胞分裂等许多生物学过程的调控中起着重要作用<sup>[30]</sup>。因此, 结合 PcCYP 蛋白系统进化和基本特性分析, 本课题组可知 PcCYPs 有极大可能参与到茯苓子实体的形成过程中, 且在对 *PcCYP1*、*PcCYP1* 超表达菌株培养过程中, 也偶然发现茯苓超表达菌株子实体的产生, 但关于 *PcCYP1*、*PcCYP1* 基因在茯苓子实体形成过程中的具体作用, 这需要后期更深入的基因功能研究加以佐证。另一方面, *PcCYP1*、*PcCYP1* 的这些基本特性增加了其进行外源表达的难度, 特别是大肠杆菌表达系统, 因为原核生物缺乏翻译后修饰系统, 所以 CYP450 在大肠杆菌中不表达或表达量低且不具有活性, 但可以通过优化序列, 变该酶的拓扑结构, 实现该蛋白在原核系统中的表达<sup>[31-32]</sup>。

前体 mRNA 的选择性剪切是真核生物转录后重要的加工环节, 通过对外显子和内含子的选择性去除和保留, 可以使一个基因产生多个成熟的 mRNA, 进而翻译成具有不同功能的蛋白质, 参与到不同的生物过程<sup>[33]</sup>。通过 qRT-PCR 分析 *PcCYP*

基因 2 种转录本在不同培养时间的表达量可知, *PcCYP1* 的表达量随着培养时间的延长并没有显著变化, *PcCYP2* 的表达量则是先降低再增加, 但整体上 *PcCYP2* 的表达量是明显高于 *PcCYP1*, 因此推测 *PcCYP2* 可能是主要的选择性剪切体。选择性剪切是在 RNA 水平上调控基因表达的机制至之一, 一个基因可通过选择性剪切产生多个转录本编码不同结构和功能的蛋白质, 它们分别在细胞或个体分化发育不同阶段, 在不同的组织, 有各自特异的表达和功能<sup>[34]</sup>。因此推测 *PcCYP1* 和 *PcCYP2* 可能与茯苓不同培养时期的组织特异性有关, 至于 *PcCYP* 的可变剪接受到的调控机制以及它是否参与调控茯苓子实体的生长发育, 后期可以通过基因超表达和沉默等方法进行深入的研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes [J]. *J Biol Chem*, 1962, 237: 1375-1376.
- [2] de Montellano P R O, De Voss J J. Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450 [J]. *Nat Prod Rep*, 2002, 19(4): 477-493.
- [3] Meunier B, de Visser S P, Shaik S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzyme [J]. *ChemInform*, 2004, 35(46): 123.
- [4] Sono M, Roach M P, Coulter E D, et al. Heme-containing oxygenases [J]. *Chem Rev*, 1996, 96(7): 2841-2888.
- [5] da Silva M, Cerniglia C E, Pothuluri J V, et al. Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2003, 19(4): 399-405.
- [6] Hunter A C, Bergin-Simpson H. Distinct metabolic handling of 3beta-hydroxy-17alpha-oxa-D-homo-5alpha-androstan-17-one by the filamentous fungus *Aspergillus tamarii* KITA: Evidence in support of steroid/hydroxylase binding hypothesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1771(9): 1254-1261.
- [7] Kasai N, Ikushiro S, Hirose S, et al. Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387(1): 103-108.
- [8] Kullman S W, Matsumura F. Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(2): 593-600.
- [9] 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.
- [10] Mitsuguchi H, Seshime Y, Fujii I, *et al.* Biosynthesis of steroidal antibiotic fusidane: Functional analysis of oxidosqualene cyclase and subsequent tailoring enzymes from *Aspergillus fumigatus* [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(18): 6402-6411.
- [11] Saikia S, Parker E J, Koulman A, *et al.* Defining paxilline biosynthesis in *Penicillium paxilli*: Functional characterization of two cytochrome P450 monooxygenases [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(23): 16829-16837.
- [12] Malonek S, Rojas M C, Hedden P, *et al.* Functional characterization of two cytochrome P450 monooxygenase genes, P450-1 and P450-4, of the gibberellic acid gene cluster in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella fujikuroi* MP-D) [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(3): 1462-1472.
- [13] McCormick S P, Alexander N J. *Myrothecium roridum* *Tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for three oxygenation steps [J]. *Can J Microbiol*, 2007, 53(5): 572-579.
- [14] Wang G Q, Chen G D, Qin S Y, *et al.* Biosynthetic pathway for furanosteroid demethoxyviridin and identification of an unusual pregnane side-chain cleavage [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1838.
- [15] 高明煜, 吴玉星, 朱百涛, 等. 苹果树腐烂病菌细胞色素 P450 基因 *Vmcyp5* 的功能 [J]. *微生物学报*, 2018, 58(2): 274-283.
- [16] Hsu K H, Lee Y R, Lin Y L, *et al.* Cytochrome P450 genes in medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea* T.T. Chang *et al.* (higher basidiomycetes) are strongly expressed during fruiting body formation [J]. *Int J Med Mushr*, 2011, 13(6): 513-523.
- [17] de Groot P W J, Schaap P J, van Griensven L J L D, *et al.* Isolation of developmentally regulated genes from the edible mushroom *Agaricus bisporus* [J]. *Microbiology (Reading)*, 1997, 143(Pt 6): 1993-2001.
- [18] 刘惠知, 吴胜莲, 张德元, 等. 茯苓药物成分提取分离及其药用价值研究进展 [J]. *中国食用菌*, 2015, 34(6): 1-6.
- [19] Shu S H, Chen B, Zhou M C, *et al.* *De novo* sequencing and transcriptome analysis of *Wolfiporia cocos* to reveal genes related to biosynthesis of triterpenoids [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71350.
- [20] Córdova P, Gonzalez A M, Nelson D R, *et al.* Characterization of the cytochrome P450 monooxygenase genes (P450ome) from the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 540.
- [21] Zhang X, Xu Z C, Xu J, *et al.* Selection and validation of reference genes for normalization of quantitative real-time reverse transcription PCR analysis in *Poria cocos* (Schw.) Wolf (Fuling) [J]. *Chin Med*, 2016, 11: 8.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] Ichinose H. Molecular and functional diversity of fungal cytochrome P450s [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(6): 833-837.
- [24] Nelson D R, Kamataki T, Waxman D J, *et al.* The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature [J]. *DNA Cell Biol*, 1993, 12(1): 1-51.
- [25] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 26.
- [26] Hajime H, Muraguchi Z. A mutation in the *eln2* gene encoding a cytochrome P450 of *Coprinus cinereus* affects mushroom morphogenesis [J]. *Fungal Genet Biol*, 2000, 29(1): 49-59.
- [27] Ichinose H, Hatakeyama M, Yamauchi Y. Sequence modifications and heterologous expression of eukaryotic cytochromes P450 in *Escherichia coli* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2015, 120(3): 268-274.
- [28] 孟虎. 茯苓性不亲和模式的初步研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [29] Kim J H, Lee J, Oh B, *et al.* Prediction of phosphorylation sites using SVMs [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(17): 3179-3184.
- [30] 姜铮, 王芳, 何湘, 等. 蛋白质磷酸化修饰的研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(2): 233-237.
- [31] 麦婉莹, 洪葵. 真菌细胞色素 P450 在大肠杆菌中的表达 [J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 1092-1099.
- [32] Zelasko S, Palaria A, Das A. Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using *Escherichia coli* expression systems [J]. *Protein Expr Purif*, 2013, 92(1): 77-87.
- [33] Aaronson Y, Meshorer E. Stem cells: Regulation by alternative splicing [J]. *Nature*, 2013, 498(7453): 176-177.
- [34] Nissim-Rafinia M, Kerem B. Splicing regulation as a potential genetic modifier [J]. *Trends Genet*, 2002, 18(3): 123-127.