

• 药材与资源 •

远志细胞色素 P450 家族 *PtCYP72A546* 克隆、亚细胞定位与表达分析

罗 瑶¹, 净易尧¹, 胡本祥^{1,2}, 杨冰月¹, 姬海月², 颜永刚¹, 张 岗¹, 赵 璠³, 彭 亮^{1*}

1. 陕西中医药大学 药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心/“秦药”研发重点实验室, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西国际商贸学院, 陕西 咸阳 712046

3. 榆林市第五医院, 陕西 榆林 719000

摘要: **目的** 旨在克隆获得远志 *Polygala tenuifolia* 细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 基因 *CYP72A546* 的基因开放阅读框 (open reading frame, ORF), 并对其理化特性、系统进化关系、组织表达、激素与非生物胁迫下的表达等展开分析。**方法** 基于远志全长转录组文库筛选并克隆远志细胞色素 P450 家族基因 *PtCYP72A546*, 通过生物信息学在线软件分析其编码的氨基酸序列, 预测蛋白理化性质、结构域等分子特征; 利用 MEGA11 分析进化关系, 并采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法检测不同组织、激素及非生物胁迫的相对表达量。**结果** 从远志中成功克隆得到远志细胞色素 P450 家族基因 *PtCYP72A546*, 其 ORF 序列全长共计 1 560 bp, 编码 519 个氨基酸, 相对分子质量为 59 770, 系疏水性稳定蛋白, 含有 1 个保守结构域, 不具有跨膜结构, 二级结构主要为 α -螺旋和无规卷曲, 亚细胞定位分析表明 *PtCYP72A546*-GFP 融合蛋白定位于内质网。qPCR 结果显示, 远志根中 *CYP72A546* 表达量显著高于茎和叶片; 200 $\mu\text{mol/L}$ 脱落酸 (abscisic acid, ABA) 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 壳聚糖 (chitosan, CHT) 处理下, *CYP72A546* 均于 12 h 达峰值, 分别为空白对照的 7.45 倍和 5.49 倍; 在非生物 (干旱、盐) 胁迫处理下, *CYP72A546* 的表达均先受抑制 (6 h), 再上调后缓慢下降。**结论** 通过对远志 *CYP72A546* 基因的克隆、鉴定与分析, 为深入研究其在远志三萜皂苷合成途径的功能奠定基础。

关键词: 远志; 细胞色素 P450; 亚细胞定位; 生物信息学分析; 基因表达

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)03-0919-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.022

Cloning, subcellular localization and expression analysis of CYP72A546 gene of cytochrome P450 family in *Polygala tenuifolia*

LUO Yao¹, JING Yiyao¹, HU Benxiang^{1, 2}, YANG Bingyue¹, JI Haiyue², YAN Yonggang¹, ZHANG Gang¹, ZHAO Fan³, PENG Liang¹

1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine/Shaanxi Engineering Research Center for Application and Development of Chinese Medicine in Qinling Mountains/Key Laboratory of “Qin Medicine” Research and Development, Xianyang 712046, China

2. Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xianyang 712046, China

3. Yulin No.5 Hospital, Yulin 719000, China

Abstract: Objective To clone the open reading frame (ORF) of cytochrome P450 (CYP450) gene *CYP72A546* from Yuanzhi (*Polygala tenuifolia* Willd.), and analyze its physicochemical properties, phylogenetic relationship, tissue expression, expression under hormone and abiotic stress. **Methods** Based on the full-length transcriptome library of *P. tenuifolia*, the cytochrome P450 family gene *PtCYP72A546* of *P. tenuifolia* was screened and cloned. The amino acid sequence encoded by it was analyzed by bioinformatics online software, and the molecular characteristics such as physical and chemical properties and structural domains of the protein were predicted. The evolutionary relationship was analyzed by MEGA11, and the relative expression levels of different tissues, hormones and abiotic stresses were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR). **Results** The cytochrome P450 family gene

收稿日期: 2023-08-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82003899); 陕西省科技厅社发攻关一般项目 (2021SF-364, 2023-YBSF-036); 陕西中医药大学“秦药”品质评价及资源开发学科创新团队项目 (2019-QN01); 陕西省教育厅一般专项 (22JK0279)

作者简介: 罗 瑶 (1997—), 女, 硕士研究生, 从事中药资源质量评价与分子生药学研究。E-mail: 2207256840@qq.com

*通信作者: 彭 亮 (1985—), 男, 教授, 从事中药资源评价与开发利用、分子生药学研究。E-mail: ppengliang@126.com

PtCYP72A546 was successfully cloned from *P. tenuifolia*. The full-length ORF sequence was 1 560 bp, encoding 519 amino acids with a relative molecular mass of 59 770. It was a hydrophobic stable protein with a conserved domain and no transmembrane structure. The secondary structure was mainly α -helix and random coil. Subcellular localization analysis showed that the PtCYP72A546-GFP fusion protein was located in the endoplasmic reticulum. The results of qPCR showed that the expression of CYP72A546 in roots was significantly higher than that in stems and leaves. Under the treatment of 200 $\mu\text{mol/L}$ abscisic acid (ABA) and 200 $\mu\text{mol/L}$ chitosan (CTS), CYP72A546 reached the peak at 12 h, which was 7.45 times and 5.49 times that of CK, respectively. Under abiotic (PEG6000 and NaCl) stress treatments, the expression of CYP72A546 was first inhibited (6 h), then up-regulated and then slowly decreased.

Conclusion The cloning, identification and analysis of the CYP72A546 gene in *P. tenuifolia* laid a foundation for further study on its function in the synthesis pathway of triterpenoid saponins in *P. tenuifolia*.

Key words: *Polygala tenuifolia* Willd.; cytochrome P450; subcellular localization; bioinformatics analysis; gene expression

远志是远志科多年生草本植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd.或卵叶远志 *P. sibirica* L.的干燥根, 始载于《神农本草经》, 味苦、辛, 性温, 具有安神益智、交通心肾、祛痰、消肿的功效^[1]。远志为我国 85 种传统出口大宗药材及 42 种重点保护的三级野生品种之一, 是临床益智药处方中名列前 3 位的单味中草药, 被视为养命之要药^[2]。远志广泛分布于中国西北、华北和东北地区, 以陕西、山西量大质优, 是一种适应性极强的中旱生植物耐干旱而怕水涝^[3]。远志中的主要活性成分为齐墩果烷型三萜皂苷, 具有增强学习记忆、镇静、抗抑郁等药理作用^[4]。在高等植物中, 齐墩果烷型三萜类化合物的生物合成历经前体供应、骨架合成、萜类合成 3 个阶段。第 3 阶段由 β -香树脂醇合成酶 (β -amyrin synthase, β -AS) 催化 2,3-氧化鲨烯 (2,3-oxidosqualene, OS) 形成 β -香树脂醇, 然后 β -香树脂醇在 CYP450 作用下使 C-28 氧化生成齐墩果酸, 最终由 CYP450 和 UGTs 催化产生官能化反应形成复杂多样的三萜类成分^[5-6]。细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 是植物体内最大的酶家族^[7], 具有半胱氨酸-亚铁血红素结构^[8], 因其可以催化氧分子进行还原性分离从而具有广泛的催化活性, 主要参与萜类、生物碱、脂类、植物激素等的生物合成^[9], CYP450 催化的结构修饰是实现三萜皂苷多样化和功能化的关键, 系三萜类成分生物合成途径的关键酶^[10]。P450 基因在植物的生长及发育过程具有关键作用, 可提高植物对各种生物及非生物胁迫的抗性^[11], 杨杰等^[12]研究表明白桦细胞色素 P450 具有组织特异性以及激素诱导表达特性, 可能在白桦生长发育、抵御胁迫及代谢物合成中发挥重要作用。植物激素在植物生长发育及抵御、适应逆境环境中发挥重要作用。

本实验通过 PCR 克隆得到了远志 CYP72A546 基因, 并对其进行生物信息学、激素和非生物胁迫响应分析, 有助于深入探讨 CYP450 基因在远志植

株防御反应中的重要作用, 为科学阐明远志皂苷类成分生物合成途径及调控机制提供证据及通过遗传工程改良药材品质奠定了基础, 可为进一步探索远志 CYP450 基因功能提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品于 2021 年 10 月陕西中医药大学药用植物园 (陕西咸阳) 采集, 经陕西中医药大学胡本祥教授鉴定为 3 年生远志 *P. tenuifolia* Willd. 及其成熟种子。

1.2 酶和主要试剂

脱落酸 (abscisic acid, ABA)、壳聚糖 (chitosan, CHT) (购自上海源叶生物科技有限公司); Trizol 总 RNA 提取试剂盒、大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、ddH₂O 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, Rapid Taq Master Mix (2 \times)、HiPure Plasmid Micro Kit C 质粒小提试剂盒均购自诺唯赞生物科技股份有限公司 (南京), PrimeScriptTM II 1st strand cDNA Synthesis Kit、TB Green[®] Premix Ex TaqTM、T-Vector pMDTM19、UEDNA 凝胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 本实验所用引物由武汉金开瑞生物公司合成; 序列测定由杨凌奥科生物科技有限公司完成。

1.3 仪器

ZQPW-70 型全温振荡培养箱 (天津市莱玻特瑞公司), HFsafe-1200LC 型超净工作台 (上海力申公司), Centrifuge5424 型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司), T100TM Thermal Cycler PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), DYY-6D 型电泳仪 (北京六一公司), StepOnePlusTM Real-Time PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司), SYNGENE GBOX 凝胶成像系统 (基因有限公司), NanoDropTM 2000 型分光光度计 (美国 Thermo-Fisher 公司), K5800 型自动检测微量分光光度计 (凯奥公司), HH-B11-360-BS 型电热

恒温培养箱、GR60DA 型高温灭菌锅(美国 Zealway 公司), 分析天平(上海舜宇恒平公司), -80 °C 超低温冰箱(中科美菱公司)。

2 方法

2.1 样品处理

取生长一致的3年生远志3株, 将根、茎、叶等量混合进行全长转录组测序分析。在相同条件下, 采集远志不同组织(根、茎、叶)用于进一步分析。综合课题组前期实验结果结合相关研究, 分为激素处理组: 壳聚糖(CHT, 200 μmol/L)、脱落酸(ABA, 200 μmol/L); 非生物胁迫处理组: 干旱(PEG 6000, 10%)、盐(NaCl, 100 mmol/L); 喷施无菌水作为对照组(Mock), 所有样品均于处理后0、6、12、24和48h进行取样, 以0h为空白对照, 每个处理组的每个处理时间点做3个样本重复, 经液氮速冻后储存于-80 °C冰箱。

2.2 RNA 提取及 cDNA 合成

取3株远志植株充分混合后, 液氮速冻并充分粉碎后使用 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 提取方法参照其说明书进行, 并用使用 Prime Script™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA 后于-20 °C 保存备用。

2.3 基因克隆

以 cDNA 作为模板, 以 CYP72A546-F/R(表1)

作为引物进行 PCR 扩增。25 μL 标准体系: Rapid Taq Master Mix (2×) 12.5 μL、Forward Primer 1 μL、Reverse Primer 1 μL 和 DNA 模板 1 μL, ddH₂O 9.5 μL 补齐。反应程序为 95 °C、3 min; 95 °C、15 s, 55 °C、30 s, 72 °C、1 min, 30 个循环数; 72 °C、5 min, 12 °C 保温。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, DNA 胶回收试剂盒纯化回收目的片段后, 与 pMD19T 连接并转化 DH5α, 挑取阳性克隆送杨凌奥科完成测序。

2.4 生物信息学分析

利用软件及在线工具(表2)对远志 CYP72A546 进行生物信息分析预测。

2.5 基因表达模式

利用 qPCR 检测 CYP72A546 在远志不同样品中的相对表达量, 以 GAPDH 为内参基因^[13], 引物序列见表1。反应体系 20 μL: TB Green® Premix Ex Taq™ II (TliRNaseHPlus) (2×) 10 μL、Forward/Reverse Primer 各 0.8 μL、DNA 模板 2 μL、ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL、ddH₂O 6 μL。反应程序: 95 °C、30 s; 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 60 °C、34 s, 40 个循环; 之后绘制熔解曲线, 条件为 95 °C、15 s, 60 °C、1 min, 95 °C、15 s, 3 次重复。基因相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 计算^[14], SPSS 27.0 统计分析, P<0.05 代表有显著性差异。

表1 PtCYP72A546 基因克隆及表达分析引物序列

Table 1 Primer sequences for gene cloning and expression analyses of PtCYP72A546

引物名称	引物序列 (5'→3')	用途	扩增产物大小/bp
PtCYP72A546	F: ATGGGACTATCATCATTGGCCACC R: TCACAGTTTCCGTAAAATGATAT	开放阅读框扩增	1 560
qPtCYP72A546	F: CTCGGACAGCATTGGGAGT R: TGTCGGCAGAAACCTCCATC	qPCR	128
GAPDH (内参基因)	F: ACAGCAACGTGCTTCTCACC R: CCCTTCATCACCACCGACTA	qPCR	128

表2 PtCYP72A546 基因生物信息软件及网站

Table 2 Bioinformatics software and websites for analyses of PtCYP72A546

生物信息	相关软件及网站
开放阅读框	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
理化性质预测	ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/)
亚细胞定位	WoLFPSORT (https://www.genscript.com/wolf-psort.html)
蛋白结构域预测	ExPASy(https://prosite.expasy.org/prosite.html)
二级结构预测	SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)
三级结构预测	SWISS-MODEL(https://swissmodel.expasy.org/interactive/qakFDp/models/)
信号肽预测	SignalP-5.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0)
跨膜信息预测	TMHMM (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0)
进化树构建及美化	MEGA11 Chiplot (https://www.chiplot.online/tvbot.html)

3 结果与分析

3.1 基因克隆

基于课题组前期的远志全长转录组测序及注释结果, 获得一个 *PtCYP450* 基因, 经 PCR 扩增、测序分析和 NCBI 比对, 获得了全长 1 560 bp 的远志基因 *CYP72A546*, 编码 519 个氨基酸, 含有 CYP450 的保守结构域, 证实其为 *CYP450* 家族基因 (图 1~3)。

3.2 生物信息学分析

3.2.1 理化性质预测 从蛋白的相对分子质量、等电点、亲疏水性、跨膜结构域、磷酸化位点等方面对 *PtCYP72A546* 编码蛋白进行多方位预测分析。

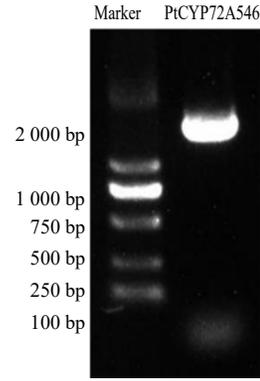


图 1 *PtCYP72A546* 基因 PCR 结果
Fig. 1 PCR results of *PtCYP72A546*

```

1 atggactatcaccattgcccacattgcaagcccttcaatgattgttgcagtcctgacatggataggagtggttaactg gatatggctgaagccg aagaagctag ag ag g tgc
M G L S S L A T I A A L S V I V F A V L T W I W S V V N W I W L K P K K L E R C
121 ctgagacaacaaagtttcaaggcaatccatcacatttcttgcgacatgaacag aatagaacgtgttcatggaggccaatc taagccaatcctggc gatg atacagtg
L R Q Q G F Q G N P Y S I F F A D M K Q N R N V F M E A K S K P I N L G D D T V
241 cctctatcttccctatg gctgcaaacctgacagaaatagtgtaaaaaatttccatgctgttggggccaattccaagg gtagcctttagatccg atcaaga aatitita
P R I F P H G L Q T V Q K Y G K N S F T W L G P I P R V T L M D P D Q I K E I L
361 atcaagatafacgacttcaaaagccatcaatcccttgc tcaaaattctgctactgctctgcaagtta tagaggctcagaaatgg cctagacatagaagaattatcaatccag ct
I K I Y D F Q K P T S N P L V K I L A T G L A S Y E G Q K W A R H R K I I N P A
481 ttcaacctggagaaattaaagatatgttatcaacttttatgaaagcaaatggatagattggcaccatgggaagg gtagatctgcagacag tctgtagaattagatg tggcca
F N L E K L K I M L S T F Y E S T M D M I G T W E G M I S A D S S C E L D V W P
601 talctacagaaactttacttggatgattctctggacagcattggagtagctacaggaaggaaagggcaattttgagcttctgaagaactagctgagctgcaaatcaagg t g a t a
Y L Q N F T C D V I S R T A F G S S Y E E G R R I F E L L K E L A E L T I K V I
721 cagttcttataatccggg atgg agt ttc tgc gacaaatcccaacagaaagatgaagaatctgacagagaataga tcc tca ctgaagaatattatcaacaaaagagaagaagcg
Q F V Y I P G W R F L P T N T N K K M K E I D R E I R S S L K N I I N K R E K A
841 aggaagcag gagaacccgaa taacg agg atttgctag gcaatcttggcaatcaatcaaaagaaatcaagaatcagaaag gtagttgg aatgaccatccatg atgtgatt
R K A G E P N N E D L L G I L L E S N H K E I K D H D N R K E V G M T I H D V I
961 gaaagaa g taagctattttacttctggacaaagacaacatctgttttctggtatgg accatg gtagttgag tag gtagctcttattgg caagt g c a t g c a a g g a a g g t c t t g
E E C K L F Y F A G Q E T T S V L L V W T M V L L S R Y P Y W Q V H A R E V L
1081 cagg ttttg aag acc g a a g c c a g a t t t c g a t g g c c t c a g c c a c t c a a a t t g a a c c a t g a t t c t g a t g a g t t c g a g a t t a t a c c c c t g a a t c t c t c a a c a g a a g t t i
Q V F E D R K P D F D G L S H L K I V T M I L Y E V L R L Y P P V I V L N R S V
1201 caagaggagacaaaacttg aaaaactgacattgctctggaggatgcaaatcttccctgtaactttgttcaatagtc atg aactatg ggg tagcgaatgtaag gaatttaacca
Q E E T K L G K L T L P S G V Q I S F P V L L V H H S H E L W G D D A K E F N P
1321 gagaggtttctg aagg aatttg a a g c a a c a a g c c a g g t t t c a t t c c a t t g a t g g g t c t c g c a t t g c a t a g a c a a c t t g c o t t g t g a a g c t a a a t g c a
E R F S E G I L K A T K G Q V S F P F G W G P R I C I G Q N F A L L E A K M A
1441 ttg c a c t g a t t c a a c a g t t t c t t t g a g t t t c c a t c a t a c t a c a t g c c c c a c a c t g t a a t t a c a c t c a g c c t c a a c a t g g t g c t a t a t c a t t t a c g g a a a c t g a
L A L I L Q R F S F E L S P S Y T H A P T T V I T L Q P Q H G A H I I L R K L .
    
```

图 2 *PtCYP72A546* 基因 cDNA 序列全长及其编码的氨基酸序列
Fig. 2 Complete cDNA and deduced amino acid sequences of *PtCYP72A546*

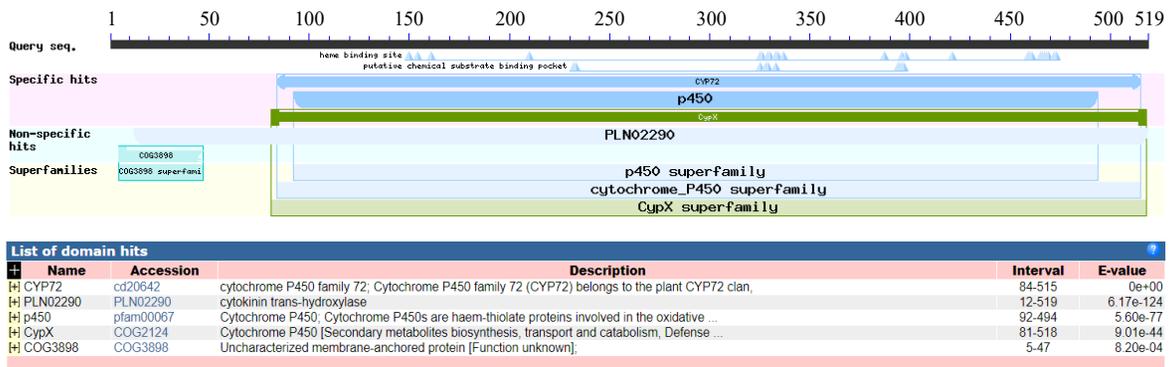


图 3 *PtCYP72A546* 蛋白的结构域分析
Fig. 3 Domain analysis of *PtCYP72A546* protein

结果表明, PtCYP72A546 蛋白相对分子质量为 59 770, 分子式为 $C_{2740}H_{4287}N_{713}O_{748}S_{18}$, 原子总数为 8 506, 理论等电点为 5.02, 属酸性蛋白。亲疏水性预测显示, PtCYP72A546 蛋白的亲水系数为 0.774, 不稳定系数为 39.13, 系稳定性疏水性蛋白(图 4)。明确目标蛋白磷酸化位点及水平可为该蛋白特性研究提供重要参考^[15], PtCYP72A546 蛋白磷酸化位点预测表明其存在多个磷酸化位点, 丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的位点个数分别为 32、28 和 14 (图 5)。

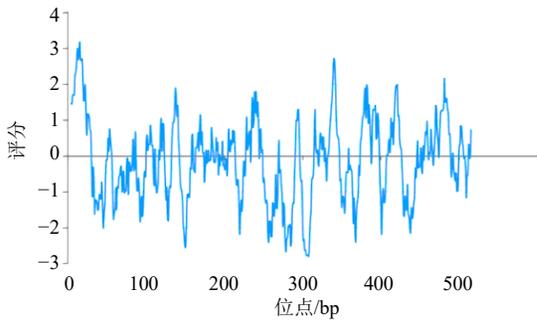


图 4 PtCYP72A546 氨基酸疏水性预测

Fig. 4 Hydrophobicity prediction analysis of amino acid sequence of PtCYP72A546

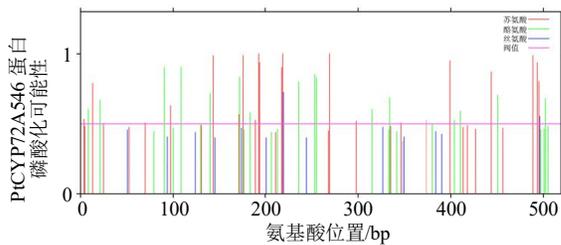


图 5 PtCYP72A546 磷酸化位点预测

Fig. 5 Prediction of phosphorylation sites of PtCYP72A546

3.2.2 PtCYP72A546 蛋白跨膜区及信号肽分析 蛋白跨膜结构域在细胞转运、胞内信号转导、生长调节等方面具有重要作用, 信号肽则是引导新合成的蛋白质分泌通路转移的短肽链, 序列长度多数含有 5~30 个氨基酸^[13, 16], 结果表明, PtCYP72A546 蛋白仅有 1 个跨膜结构域且不存在信号肽(图 6、7)。

3.2.3 CYP72A546 蛋白二级结构及分析 蛋白二级结构为多肽主链骨架原子沿一定的轴盘旋或折叠而形成的特定构象, 有 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲等几种主要形式, 二级结构的预测可为研

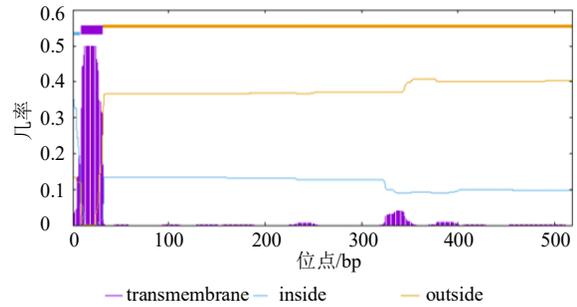


图 6 PtCYP72A546 编码蛋白跨膜结构域预测分析

Fig. 6 Prediction analysis of the transmembrane domain of protein encoded by gene PtCYP72A546

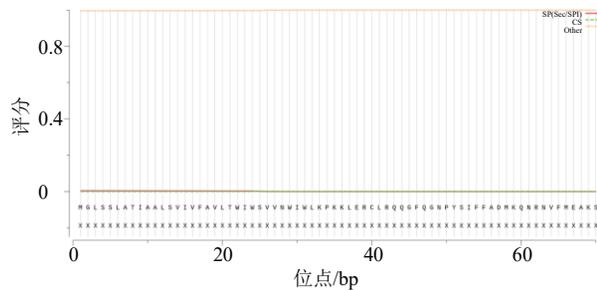


图 7 PtCYP72A546 蛋白信号肽预测结果

Fig. 7 Prediction of a signal peptide for PtCYP72A546 protein

究蛋白质功能与结构关系提供参考依据^[17]。PtCYP72A546 蛋白的二级结构预测结果见图 8, 结合表 3 分析可知, PtCYP72A546 蛋白 α -螺旋结构、延伸主链结构、无规则卷曲结构和 β -转角氨基酸数目分别为 271、59、155、34 个, 占比依次为 52.20%、11.37%、29.87%和 6.55%。

3.2.4 CYP72A546 蛋白三级结构及分析 使用 SWISS-MODEL 在线软件预测分析 PtCYP72A546 蛋白三维结构, 用 Cytochrome P4504B1 (SMTL ID: 6c94.1) 为模板, 蛋白覆盖率为 100%, 预测结果见图 9。

3.3 系统进化分析

从 NCBI 数据库中下载拟南芥(模式植物)及与远志 CYP72A546 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[甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、大豆 *Glycine max* (L.) Merr.、百脉根 *Lotus corniculatus* Linn.、豆科植物 *Gastrolobium bilobum*、苜蓿 *Medicago sativa* L.、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.、喜树 *Camptotheca acuminata* Decne.、芝麻 *Sesamum indicum* L.、烟草 *Nicotiana tabacum* L.]共 11 条。利用 MEGA11 中的邻接法构

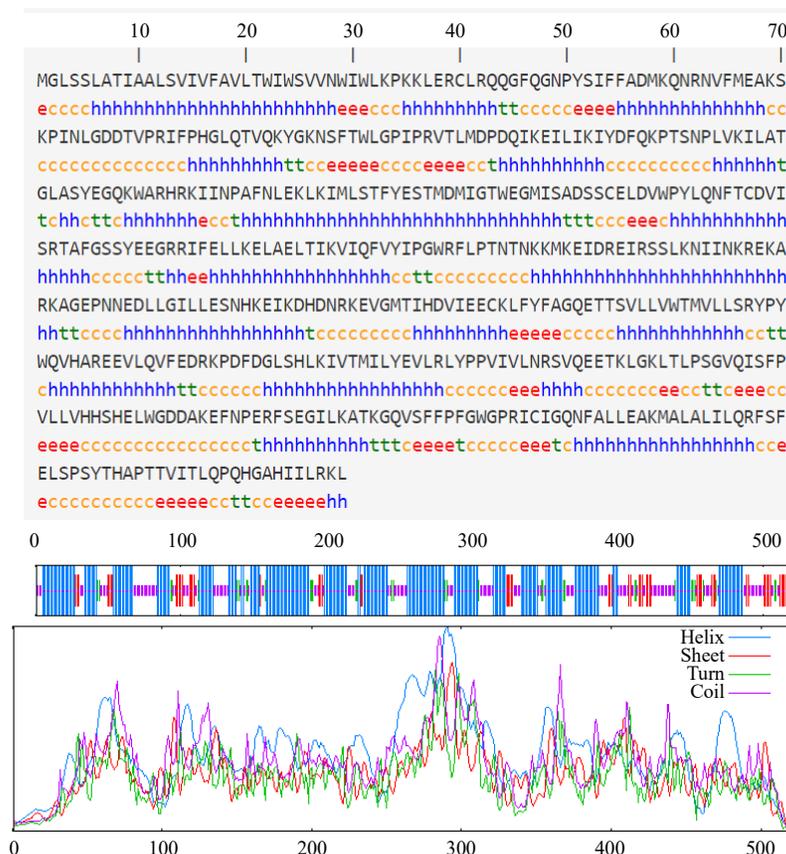


图 8 PtCYP72A546 蛋白的二级结构预测

Fig. 8 Secondary structure prediction of PtCYP72A546 protein



图 9 PtCYP72A546 蛋白的三级结构预测

Fig. 9 Prediction of tertiary structure of PtCYP72A546 protein

建系统进化树，见图 10。本研究所有 CYP72A 亚家族基因编码的蛋白聚为一大支，远志和 大豆、甘草、苜蓿、百脉根聚为一个分支，同源性较高。

3.4 PtCYP72A546 蛋白亚细胞定位分析

为研究 PtCYP72A546 蛋白在细胞中的作用位置，构建 pBWA(V)HS-PtCYP72A546-GLOSGFP 质粒瞬时转化烟草叶片观察其亚细胞定位情况。通过激光共聚焦显微镜下观察叶片表皮细胞发现，PtCYP72A546-GFP 融合蛋白在内质网上具有明显



图 10 CYP72A546 系统进化分析

Fig. 10 Phylogenetic analysis of CYP72A546

信号 (图 11)。

3.5 PtCYP72A546 的表达模式

以远志叶为参考样本，qPCR 检测 CYP72A546 基因在远志根、茎和叶中的表达情况 (图 12)。结果显示，CYP72A546 在根中的表达显著高于其他组织，分别为茎、叶的 6.61、3.52 倍，说明 PtCYP72A546 主要在根中发挥生物学功能。

PtCYP72A546 响应外源激素 (CHT、ABA) 处理不同时间点 (6、12、24、48 h) 的表达情况见图 13-A，以 0 h (CK) 为空白对照；Mock 在处理 6 h

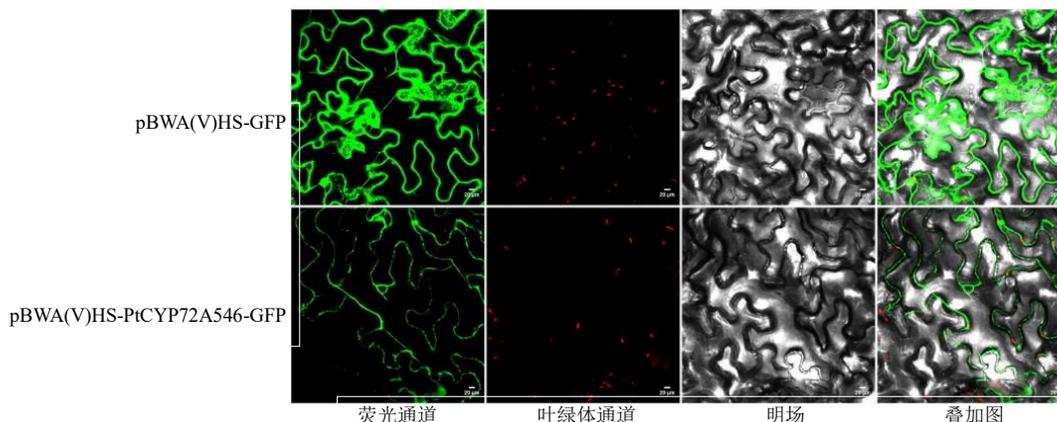
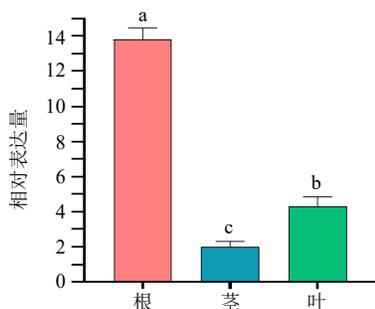


图 11 PtCYP72A546 蛋白在烟草叶片下表皮细胞中的亚细胞定位

Fig. 11 Subcellular localization of PtCYP72A546 protein in lower epidermal cells of tobacco leaves



列上方的不同小写字母代表不同组织之间具有统计学意义差异 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters above the column represent statistically significant differences between different tissues ($P < 0.05$).

图 12 PtCYP72A546 在不同组织部位表达分析

Fig. 12 Expression analysis of PtCYP72A546 in different tissues

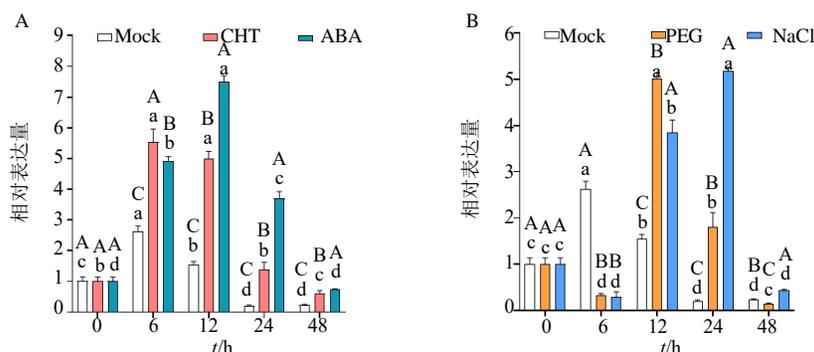
内迅速上调并达到峰值 (为 CK 的 2.60 倍), 后开始下调, 处理 48 h 后为 CK 的 0.18 倍; CHT 处理组与 Mock 变化趋势一致, 处理 6 h 上调至峰值 (为 CK 的 5.49 倍), 为同时间点 Mock 和 ABA 的 2.11 和 1.12 倍。ABA 处理下 PtCYP72A546 的相对表达量随时间推移呈现先上升后下降的变化趋势, 在 12 h 达到最高 (为 CK 的 7.45 倍), 为同时间点下 Mock 和 CHT 的 4.86 和 1.50 倍。PtCYP72A546 响应胁迫处理不同时间点的表达见图 13-B。CYP72A546 在 PEG6000 处理下, 相对表达量于 12 h 达峰值 (为 CK 的 4.98 倍), 为同时间点 Mock 和 NaCl 的 3.25 和 1.30 倍; NaCl 处理 24 h 显著诱导 (为 CK 的 5.14 倍), 为同时间点 Mock 和 PEG 的 19.61 和 2.87 倍。

4 讨论

细胞色素 P450 家族基因参与多种内源、外源

物质的代谢途径, 广泛存在于生物体内, 目前已在植物中发现 127 个 CYP450 家族, 在系统发生树上被分为 11 个具有明显进化枝的簇^[18]。相关研究表明, 细胞色素 P450 基因除了参与萜类及甾醇类化合物的合成, 还可以催化生物体的生长发育^[16]。近年来, 关于 P450 家族基因的筛选和挖掘, 尤其是在药用植物三萜皂苷生物合成途径中的功能解析引发强烈关注^[19]。

本实验利用 PCR 技术克隆得到远志 CYP72A546 基因的全 cDNA 序列, 并对其进行了相关生物信息学分析。结果表明, PtCYP72A546 基因具有完整的 ORF, 并具有 P450 家族的保守结构域, 确定其为 P450 家族基因; PtCYP72A546 蛋白具有 1 个跨膜区但不存在信号肽, 系疏水性稳定蛋白; 亚细胞定位结果显示该蛋白主要位于内质网中。进化树分析主要用于研究基因家族成员分类和进化关系, 有助于推测亲缘关系密切相关的蛋白家族成员的生物学功能^[20], PtCYP72A546 与其他 9 种植物 CYP72 亚家族的分子进化关系分析表明, PtCYP72A546 编码的蛋白属于 CYP72A 亚家族, 主要与豆科植物 GuCYP72A153、LjCYP72A68、GmCYP72A68、GbCYP72A68、MtCYP72A68 聚为一支, 推测可能具有相似的生物学功能。研究表明, 远志^[21]、苜蓿^[22]和大豆^[23]等都含有齐墩果烷型三萜皂苷成分, 且根据 Biazzi 等^[24]的报道, 齐墩果烷型三萜皂苷物质的合成通常由 CYP72 和/或 CYP85 家族簇参与, 如苜蓿 CYP72A61、CYP72A63、CYP72A67、CYP72A6 和甘草 CYP72A154 都参与齐墩果烷三萜骨架的催化合成^[25], 推测远志 CYP72A546 基因可能具有参与齐墩果烷型三萜皂苷生物合成相



列上方的不同小写字母代表不同激素和不同胁迫之间具有统计学意义的差异 ($P < 0.05$); 不同大写字母代表不同处理时间之间具有统计学意义差异 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters above the columns represent statistically significant ($P < 0.05$) differences among different hormones and different stresses; different capital letters represent statistically significant differences between different processing times ($P < 0.05$).

图 13 PtCYP72A546 响应激素 (A) 和非生物胁迫处理 (B) 的表达模式

Fig. 13 Expression pattern of PtCYP72A546 in response to hormones (A) and abiotic stress treatments (B)

关的生物学功能。

P450 基因参与调控植物体内的多种新陈代谢反应, 在维持植物的正常生长发育及胁迫响应调控生理机制中具有主导作用。*P450* 基因的表达调控主要在转录水平, 并具有组织器官的特异性, 叶片直接暴露于大气中, 主要受环境变化影响, 而根主要受土壤微生物生态的影响较为显著, 这势必导致 *P450* 基因在表达水平做出一定响应, 从而可能在植物适应环境和介导次生代谢产物合成等方面发挥重要作用^[26]。PtCYP72A546 主要在根中高表达, 推测其可能通过调控远志药用部位根的生长发育及次生代谢进而影响远志药材品质。内源激素在调节植物体生理生化反应中起重要信号转导的作用, 而植物 *CYP450* 基因表达也与激素密切相关。PtCYP72A546 响应 ABA 及 CHT 诱导, 受激素诱导后表达量有明显升高, 旱、盐胁迫均提高了 PtCYP72A546 表达水平, 表明它们可能通过参与多种生物学过程的调节影响远志的生理和代谢。

本实验通过基因克隆和生物信息学研究, 初步判断 *CYP72A546* 基因可能与合成远志齐墩果烷型三萜皂苷下游反应有关, 但其具体调控途径和作用机制有待进一步研究。本研究有助于进一步对参与远志齐墩果烷型三萜皂苷合成的 *CYP450* 基因进行功能鉴定, 也为远志三萜皂苷类成分合成调控及遗传改良提供科学支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Lin Z H, Gu J, Xiu J, *et al.* Traditional Chinese medicine for senile dementia [J]. *Evid Based Complement*

Alternat Med, 2012, 2012: 692621.

- [2] 薛英, 李晓伟, 李震宇, 等. 采用 UPLC/Q-TOF MS 与 NMR 代谢组学技术研究生长年限对远志药材质量的影响 [J]. *药学报*, 2015, 50(3): 340-347.
- [3] 彭亮, 杨冰月, 张岗, 等. 干旱胁迫对远志种子萌发及幼苗生长和生理特性的影响 [J]. *西北植物学报*, 2018, 38(4): 741-749.
- [4] Lacaille-Dubois M A, Delaude C, Mitaine-Offer A C. A review on the phytopharmacological studies of the genus *Polygala* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112417.
- [5] Sandeep, Misra R C, Chanotiya C S, *et al.* Oxidosqualene cyclase and CYP716 enzymes contribute to triterpene structural diversity in the medicinal tree Banaba [J]. *New Phytol*, 2019, 222(1): 408-424.
- [6] Fanani M Z, Fukushima E O, Sawai S, *et al.* Molecular basis of C-30 product regioselectivity of legume oxidases involved in high-value triterpenoid biosynthesis [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1520.
- [7] Liu X J, Gong Q, Zhao C N, *et al.* Genome-wide analysis of cytochrome P450 genes in *Citrus clementina* and characterization of a CYP gene encoding flavonoid 3'-hydroxylase [J]. *Hortic Res*, 2023, 10(2): uhac283.
- [8] Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes [J]. *J Biol Chem*, 1962, 237: 1375-1376.
- [9] Yu J Y, Tehrim S, Wang L H, *et al.* Evolutionary history and functional divergence of the cytochrome P450 gene superfamily between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica* species uncover effects of whole genome and tandem duplications [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 733.
- [10] Mak P J, Denisov I G. Spectroscopic studies of the

- cytochrome P450 reaction mechanisms [J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2018, 1866(1): 178-204.
- [11] Laffaru Singpho N, Sharma J G. Importance of Cytochrome P450 gene family from metabolite biosynthesis to stress tolerance: A review [J]. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*, 2021, 775(1): 012012.
- [12] 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.
- [13] Gao Z H, Wei J H, Yang Y, *et al.* Selection and validation of reference genes for studying stress-related agarwood formation of *Aquilaria sinensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(9): 1759-1768.
- [14] 李娟, 孔冉冉, 梅月菊, 等. 栽培远志 qRT-PCR 内参基因筛选与 P450s 基因的时空表达分析 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 6084-6090.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 李亚伟, 刘增才, 孙婷婷, 等. 暴马桑黄细胞色素 P450 家族 CYP5150AW6 基因克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2022, 53(11): 3448-3455.
- [18] Ghosh S. Triterpene structural diversification by plant cytochrome P450 enzymes [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1886.
- [19] Das A, Begum K, Akhtar S, *et al.* Genome-wide investigation of Cytochrome P450 superfamily of *Aquilaria agallocha*: Association with terpenoids and phenylpropanoids biosynthesis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 234: 123758.
- [20] 赵霞, 李元敏, 李依民, 等. 掌叶大黄 4 个 MYB 转录因子的分子克隆及胁迫表达 [J/OL]. 西北农业学报, [2024-01-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20230911.1249.004.html>.
- [21] 张陶珍, 荣巍巍, 李清, 等. 远志的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2381-2389.
- [22] 李小云, 刘庆, 田光辉. 苜蓿中生物活性成分研究进展 [J]. 饮料工业, 2012, 15(12): 8-10.
- [23] Yano R, Takagi K, Takada Y, *et al.* Metabolic switching of astringent and beneficial triterpenoid saponins in soybean is achieved by a loss-of-function mutation in cytochrome P450 72A69 [J]. *Plant J*, 2017, 89(3): 527-539.
- [24] Biazzi E, Carelli M, Tava A, *et al.* CYP72A67 catalyzes a key oxidative step in *Medicago truncatula* hemolytic saponin biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(10): 1493-1506.
- [25] 杨杰, 詹亚光, 肖佳雷, 等. 细胞色素 P450 在植物三萜和甾醇骨架修饰中的功能研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(10): 1065-1083.
- [26] 高世玺, 戎梅, 彭俊祥, 等. 白木香细胞色素 P450 基因 AsCYP71D1 的克隆及表达分析 [J]. 药学学报, 2023, 58(10): 3123-3129.

[责任编辑 时圣明]