

## 粉防己细胞色素 P450 基因 *StCYP80G* 的克隆与生物信息学分析

高雨<sup>1,2</sup>, 李姚婷<sup>2</sup>, 冯郁涵<sup>2</sup>, 康云<sup>2</sup>, 黄建明<sup>2\*</sup>, 翁伟宇<sup>1\*</sup>

1. 华东理工大学药学院, 上海市新药设计重点实验室, 上海 200237

2. 复旦大学药学院, 上海 201203

**摘要:** 目的 克隆粉防己 *Stephania tetrandra* 苜基异喹啉类生物碱生物合成途径中的细胞色素 P450 基因 *StCYP80G*, 进行生物信息学分析、表达载体构建和组织特异性表达分析。方法 设计特异性引物, 从粉防己 cDNA 中克隆得到 *StCYP80G* 编码蛋白的基因序列; 利用生物信息学在线工具预测 *StCYP80G* 蛋白的结构域、理化性质和跨膜区等分子特征; 利用 MEGA11.0 对氨基酸进行多序列比对和系统进化关系分析; 通过同源重组法构建含有 *StCYP80G* 基因的重组质粒; 采用实时荧光定量 PCR 技术分析该基因在粉防己不同组织中的相对表达量。结果 *StCYP80G* 基因开放阅读框长度为 1 458 bp, 编码 485 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量为 54 770, 预测其具有 CYP450 的保守结构域, 含有跨膜结构域, 可能定位在内质网上。氨基酸序列比对与系统进化树分析显示, *StCYP80G* 与莲 *NnCYP80G*、智利桂 *LsCYP80G* 的序列具有同源性且一致度较高, 推测 *StCYP80G* 与这 2 条序列具有相似的功能。*StCYP80G* 基因在粉防己叶中表达量显著高于根中。质粒序列分析结果表明, 重组质粒 pESC-Leu-*StCYP80G* 构建成功。结论 *StCYP80G* 基因的克隆、生物信息学分析、重组质粒的构建、以及组织表达特异性的研究结果, 为进一步探究其在苜基异喹啉类生物碱生物合成途径中的功能奠定了基础。

**关键词:** 粉防己; 细胞色素 P450; 基因克隆; 生物信息学分析; 基因表达; 荧光定量 PCR

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4508-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.022

## Cloning and bioinformatics analysis of a cytochrome P450 gene *StCYP80G* from *Stephania tetrandra*

GAO Yu<sup>1,2</sup>, LI Yaoting<sup>2</sup>, FENG Yuhan<sup>2</sup>, KANG Yun<sup>2</sup>, HUANG Jianming<sup>2</sup>, WENG Weiyu<sup>1</sup>

1. Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China

**Abstract: Objective** To clone the cytochrome P450 gene, *StCYP80G*, involved in the benzyloquinoline alkaloid biosynthetic pathway in *Stephania tetrandra*, and to characterize the gene by bioinformatics analysis, expression vector construction, and tissue-specific expression analysis. **Methods** Specific primers were designed to clone the gene sequence of *StCYP80G* encoding protein from cDNA of *S. tetrandra*. Online bioinformatics tools were utilized to predict the molecular characteristics of *StCYP80G* protein, including its structural domain, physicochemical properties, and transmembrane regions. Multi-sequence alignment and phylogenetic analysis of amino acids were performed using MEGA 11.0. A recombinant plasmid with *StCYP80G* gene was constructed using homologous recombination. The relative expression of the gene in different tissues was analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The open reading frame of *StCYP80G* gene was 1 458 bp in length, encoding 485 amino acids, and the relative molecular weight of protein was 54 770. It was predicted that *StCYP80G* gene has a conserved CYP450 domain, including a transmembrane domain, and possibly localized in the endoplasmic reticulum. Amino acid sequence alignment and phylogenetic analysis revealed that *StCYP80G* had high homology and consistency with CYP80Gs from *Nelumbo nucifera* (*NnCYP80G*) and *Laurelia sempervirens* (*LsCYP80G*), suggesting *StCYP80G* had functional similarity with these two sequences. The expression of *StCYP80G* was significantly higher in leaves compared to roots. Sequence analysis of the plasmid confirmed the successful construction

收稿日期: 2023-12-05

作者简介: 高雨, 硕士研究生, 主要从事天然产物生物合成研究。E-mail: gaoyu202120212021@163.com

\*通信作者: 黄建明, 副教授, 主要从事植物活性成分及其生物合成途径研究。E-mail: jmhuang@shmu.edu.cn

翁伟宇, 副教授, 主要从事制药工程与新型给药系统研究。E-mail: wyweng@ecust.edu.cn

of the recombinant plasmid pESC-Leu-*StCYP80G*. **Conclusion** The successful cloning, bioinformatics analysis, recombinant plasmid construction, and tissue-specific expression analysis lay the groundwork for further functional research on *StCYP80G* in the benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis.

**Key words:** *Stephania tetrandra* S. Moore; cytochrome P450; gene cloning; bioinformatics analysis; gene expression; qRT-PCR

粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 为防己科千金藤属植物, 其根为传统中药材防己, 具有祛风止痛、利水消肿的作用, 用于治疗风湿痹痛、水肿脚气、小便不利等症状<sup>[1-4]</sup>。苜基异喹啉类生物碱 (benzylisoquinoline alkaloid, BIA) 是粉防己的主要活性成分, 包括双苜基异喹啉型、单苜基异喹啉型、阿朴啡型等类型, 具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗肝纤维化、抗耐药等药理作用<sup>[1-7]</sup>, 药用价值高。目前, BIA 的生产主要来源于从植物提取或提取前体后进行化学改造, 但这类化合物在植物中的含量通常较低, 并存在植物资源有限等问题, 因此, 研究 BIA 生物合成机制, 对高效地从植物或利用微生物获得这类生物碱具有重要意义<sup>[8]</sup>。

细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP450) 为一类在生物体中分布广泛、含有亚铁血红素的氧化酶, 是参与生物碱类、萜类、黄酮类等多种植物次生代谢物合成的关键酶<sup>[9-13]</sup>。由于植物 CYP450 一般丰度很低, 不稳定, 其基因克隆及功能鉴定具有很大的挑战性。在 BIA 生物合成途径中, 主要有 3 个 CYP450 家族参与, 包括 CYP719、CYP80 和 CYP82, 催化 C-C 偶联、C-O 偶联和羟基化等多种反应<sup>[14-18]</sup>。CYP80 亚家族中的 CYP80G 催化单苜基异喹啉类生物碱的分子内 C-C 偶联反应, 是 BIA 下游合成途径的关键酶。目前, *CYP80G* 基因已在日本黄连 (*CjCYP80G2*)<sup>[19]</sup>、莲 (*NnCYP80G*) 与智利桂 (*LsCYP80G*)<sup>[20]</sup> 被成功克隆、鉴定。关于粉防己中功能基因的研究报道较少<sup>[21-23]</sup>, 尚未有该植物 *CYP80G* 全长基因的相关报道。

本实验对前期基于粉防己转录组筛选得到的 P450 候选基因<sup>[24]</sup>进行克隆, 获得了 1 条 *StCYP80G* 全长基因, 对其进行生物信息学分析、表达载体构建、以及组织表达模式分析, 为进一步研究 *StCYP80G* 基因的功能, 解析粉防己 BIA 的生物合成途径奠定基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 植物材料

粉防己植株样品于 2020 年采自江西省宜春市, 经复旦大学药学院康云讲师鉴定为粉防己 *S.*

*tetrandra* S. Moore。

### 1.2 试剂

组织 RNA 常温保存液、50×TAE buffer、Yeast extract、Tryptone、NaCl、氨苄青霉素、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒和 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒均购买于上海生工生物工程有限公司; Hifair II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、琼脂糖凝胶、核酸染料、DNA loading buffer、Hieff Clone Plus Multi One Step Cloning Kit、Hifair III 1st Strand cDNA Synthesis Supermix for qPCR、Hieff UNICON Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix 及大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞均购买于翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; PrimeSTAR MAX Premix 和 DNA marker 购于大连 Takara 公司; 植物 RNA 提取试剂盒购于上海 Omega 公司; 限制性内切酶 *NotI* 和 *SacI* 购自北京 New England Biolabs 公司; 引物合成及序列测定均由上海生工生物工程有限公司完成。

### 1.3 仪器

Nanodrop 2000c 分光光度计 (Thermo Scientific 公司); PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 电泳电源、凝胶成像仪 (上海 Tanon 公司); 电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); 高压蒸汽灭菌锅 (上海申安医疗器械); 高速冷冻离心机 (Appendorf 公司)。

## 2 方法

### 2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

取粉防己植株根与叶, 分别用液氮研磨至细粉状, 采用 OMEGA 植物 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证其完整性, Nanodrop 分光光度计测定 RNA 纯度与浓度, 利用反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA, 测定浓度, 存于 -80 °C 备用。

### 2.2 *StCYP80G* 基因克隆及重组质粒构建

依据筛选出的粉防己 *CYP80G* 序列, 运用 Primer 5.0 软件设计上游引物 *StCYP80G*-F1 和下游引物 *StCYP80G*-R1 (表 1)。以 cDNA 为模板, 通过高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 采用 20  $\mu$ L 反

应体系: Prime STAR Max Premix(2×)10 μL, DMSO 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 5 μL, cDNA 模板 2 μL, 上游与下游引物各 0.5 μL (浓度 10 μmol/L)。PCR 反应程序: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 进行 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min; 12 °C 30 s, 4 °C 冷却。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 对初步判断的目的基因条带进行切胶回收, 并检测其浓度及纯度。使用限制酶 (*NotI* 和 *SacI*) 对 pESC-Leu 载体进行双酶

切, 胶回收线性化载体, 检测浓度及纯度。利用同源重组法, 按 Hieff Clone Plus Multi One Step Cloning Kit 试剂盒说明, 将全长克隆基因回收产物与 pESC-Leu 线性化载体相连接, 得到 pESC-Leu-*StCYP80G* 重组质粒, 然后转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于 LB 固体培养基上, 于 37 °C 培养, 挑取单克隆菌落进行质粒提取, 用引物 *StCYP80G-F2* 与 *StCYP80G-R2* (表 1) 进行 PCR 检测, 将 PCR 结果显示阳性的质粒送测序验证。

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>StCYP80G-F1</i>	ATGGCAGCAGTAGTAGTTGTCCTAC	1 458
<i>StCYP80G-R1</i>	TTAGCAAGATCTAACGAGTTTGGGC	
<i>StCYP80G-F2</i>	TCACTAAAGGGCGCCGCATGGCAGCAGTAGTAGTTGTCCTAC	1 493
<i>StCYP80G-R2</i>	TTGTTAATTAAGAGCTCTTAGCAAGATCTAACGAGTTTGGG	
<i>StCYP80G-F3</i>	TGAACGAGTCCTGGGCTAA	162
<i>StCYP80G-R3</i>	TCGACGTGCTGGTGTCC	
<i>Actin-F</i>	TGGATTTGCTGGAGATGA	135
<i>Actin-R</i>	ATACCACGCTTGGATTGA	

### 2.3 生物信息学分析

利用 NCBI ORF Finder 工具对 *StCYP80G* 基因序列开放阅读框 (open reading frame, ORF) 进行预测, 并翻译成相应的氨基酸序列; 利用 CDD 在线软件分析蛋白的保守结构域; 通过 ProtParam 预测分析 *StCYP80G* 基因编码蛋白质的理化性质; 使用 ProtScale 预测 *StCYP80G* 基因编码蛋白质的亲/疏水性; 利用在线工具 NetPhos3.1、NetNGlyc-1.0、Plant-mPLoc、SignalP 5.0 Server 和 TMHMM Server 2.0 分别预测蛋白的磷酸化位点、糖基化位点、亚细胞定位、信号肽以及跨膜结构域, 蛋白质的二级与三级结构分别使用 SOPMA 和 Swiss-Model 软件进行预测与构建; 利用 Blast 和 GenBank 筛选注释的候选基因, 运用 MEGA11.0 软件对 *StCYP80G* 与参比氨基酸序列进行 ClustalW 多序列比对, 以及构建邻接 (neighbor-joining, NJ) 系统进化树。

### 2.4 *StCYP80G* 的组织特异性表达分析

采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 测定 *StCYP80G* 基因在粉防己根与叶中的相对表达量。选取粉防己 *Actin* 基因作为内参基因, 内参引物 (*Actin-F* 与 *Actin-R*) 与 *StCYP80G* qRT-PCR

引物 (*StCYP80G-F3* 与 *StCYP80G-R3*) 见表 1。取“2.1”项下制备的 cDNA, 应用 qRT-PCR 仪进行 PCR 扩增。反应体系 (20 μL): Heff UNICON Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix (1×) 10 μL、上游和下游引物各 0.4 μL、cDNA 2 μL、ddH<sub>2</sub>O 7.2 μL。PCR 程序: 95 °C、30 s; 95 °C、3 s, 60 °C、20 s, 40 次循环; 实验采取三重原则, 基因的相对表达水平用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  方法来计算结果<sup>[25]</sup>。

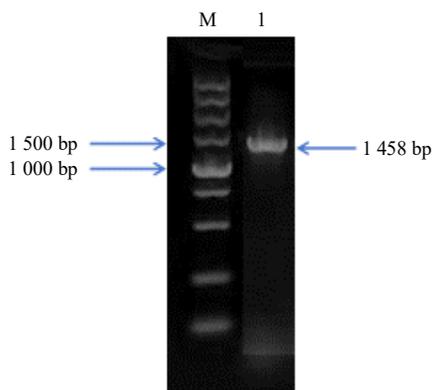
## 3 结果与分析

### 3.1 *StCYP80G* 基因的克隆与序列分析

以粉防己总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 经 PCR 扩增得到目的片段, 电泳条带在 1 000~1 500 bp, 与目的基因的长度 (1 458 bp) 相符 (图 1)。利用 ORF 对 *StCYP80G* 基因的 cDNA 序列进行分析, *StCYP80G* 基因开放阅读框为 1 458 bp, 编码 485 个氨基酸。

### 3.2 生物信息学分析

**3.2.1 *StCYP80G* 基因编码蛋白理化性质预测** 利用 CDD 在线软件中分析 *StCYP80G* 基因编码蛋白的保守结构域信息, 结果显示该蛋白为 CYP450 超家族成员, 保守结构域分析如图 2 所示, *StCYP80G*



M-Marker; 1-*StCYP80G* 基因全长。  
M-Marker; 1-full length of *StCYP80G*.

图 1 *StCYP80G* 基因 PCR 结果  
Fig. 1 PCR results of *StCYP80G* gene

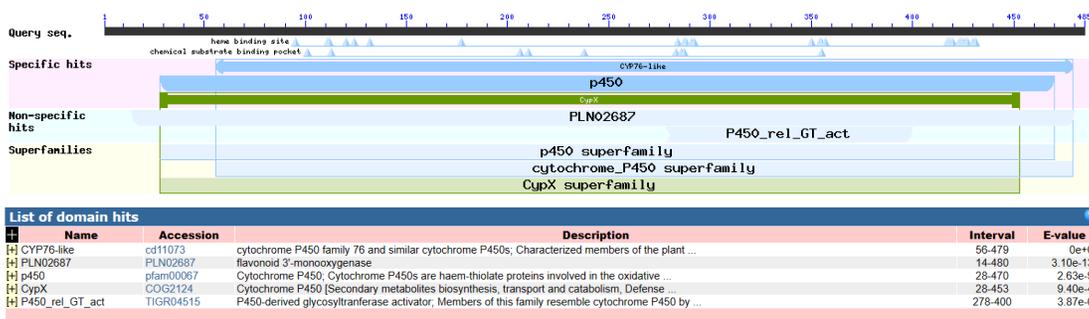


图 2 *StCYP80G* 蛋白保守结构域分析

Fig. 2 Conserved domain analysis of *StCYP80G* protein

-0.046, 推测为亲水蛋白。使用 ProtScale 在线软件分析蛋白一级结构上的亲/疏水性, 结果表明最大疏水值为 3.989, 位于第 8 个氨基酸; 最大亲水值为 -2.633, 位于第 389 个氨基酸, 处于负值区域的亲水性氨基酸数量相对较多, 故推测 *StCYP80G* 为亲水蛋白(图 3), 与该蛋白理化性质中的推测结果一致。

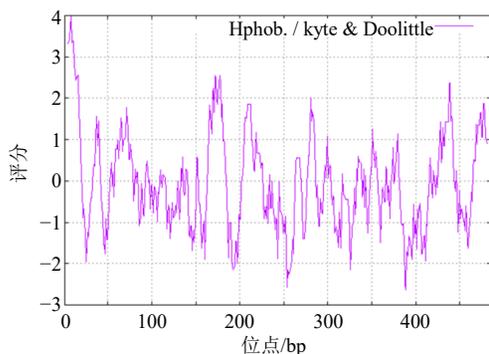


图 3 *StCYP80G* 氨基酸序列的亲/疏水性预测  
Fig. 3 Hydrophilic and hydrophobic prediction of *StCYP80G* amino acid sequence

的第 28~453 位氨基酸与 CYP450 超家族蛋白保守区域相似, 属于 CypX 多保守域蛋白; *StCYP80G* 与 pfam00067、PLN02687 具有较多相似位点; *StCYP80G* 的第 278~400 位氨基酸与 P450 衍生糖基转移酶激活剂具有相似位点, 推测对蛋白质糖基化具有重要作用。

利用 ProtParam 分析 *StCYP80G* 蛋白的理化性质, 结果表明其分子式为 C<sub>2471</sub>H<sub>3931</sub>N<sub>669</sub>O<sub>685</sub>S<sub>25</sub>, 相对分子质量为 54 770, 理论等电点为 8.49; 含有的氨基酸中, 亮氨酸 (Leu) 占 12.2%, 缬氨酸 (Val) 占 9.1%, 丙氨酸 (Ala) 占 7.0%, 精氨酸 (Arg) 占 6.8%, 正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys) 有 60 个, 负电荷氨基酸残基 (Asp+Glu) 有 56 个; 不稳定指数为 40.22, 推测为不稳定蛋白; 脂肪族指数为 99.26, 亲水性总平均值为

3.2.2 磷酸化位点和糖基化修饰 蛋白质的磷酸化作为一种常见的翻译后修饰, 在蛋白质发挥相应功能时可能起到关键作用。通过在线工具 NetPhos 3.1 预测 *StCYP80G* 基因编码蛋白中 3 类氨基酸 (丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸) 的磷酸化位点, 结果显示 *StCYP80G* 蛋白中存在 39 个可能的氨基酸磷酸化位点, 其中丝氨酸 23 个、苏氨酸 10 个、酪氨酸 6 个 (图 4)。糖基化修饰也是蛋白质翻译后修饰的一种形式, 糖基化位点的预测对分析蛋白质的结构与功能具有重要意义。NetNGlyc-1.0 预测结果显示, 处于 271 和 367 位的天冬酰胺为 *StCYP80G* 蛋白潜在的糖基化位点。

3.2.3 *StCYP80G* 信号肽是引导新合成的蛋白质向分泌通路转移的短肽链, 一般在蛋白质的 N 端<sup>[26]</sup>。通过 SignalP-5.0 在线软件预测 *StCYP80G* 存在信号肽的几率为 22.76%, 无信号肽的几率为 77.24%, 预测该蛋白不含有信号肽, 表明其为非分泌蛋白 (图 5)。

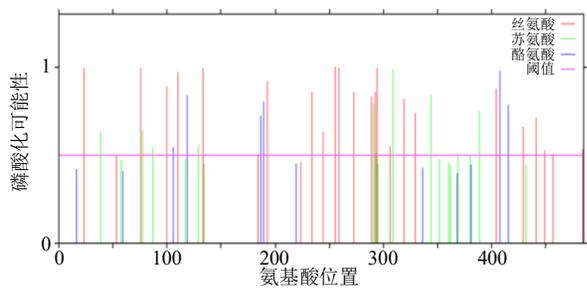


图 4 StCYP80G 蛋白磷酸化位点预测

Fig. 4 Prediction of phosphorylation sites of *StCYP80G* protein

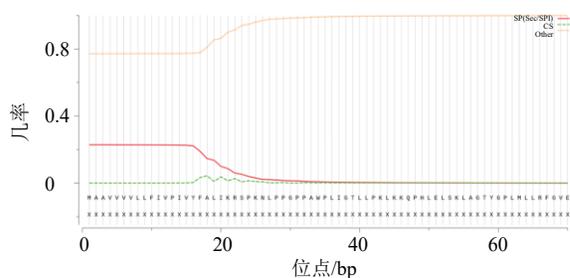


图 5 StCYP80G 蛋白信号肽预测

Fig. 5 Prediction of signal peptide of *StCYP80G* protein

蛋白质的亚细胞定位是了解其性质、功能等的关键<sup>[27]</sup>。通过 Plant-mPLoc 在线软件预测 *StCYP80G* 蛋白的亚细胞定位，推测该蛋白可能定位于内质网上。

**3.2.4 StCYP80G 蛋白跨膜结构域预测** 蛋白跨膜区是蛋白序列中能够穿过细胞膜的区域，具有信号传递或物质交换等功能<sup>[28]</sup>。TMHMM 2.0 预测蛋白跨膜结构域的结果显示，*StCYP80G* 在第 2~20 位氨基酸之间形成一个跨膜区（图 6）。

**3.2.5 StCYP80G 蛋白二级和三级结构分析** 蛋白质二级结构的预测可为其功能与三级结构研究提供重要参考。采用 SOPMA 分析 *StCYP80G* 蛋白二级

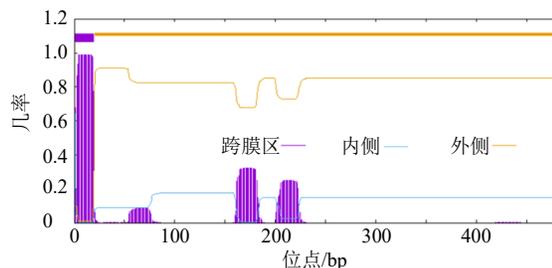


图 6 StCYP80G 蛋白跨膜区预测

Fig. 6 Prediction of transmembrane region of *StCYP80G* protein

结构的结果显示， $\alpha$ -螺旋结构有 232 个氨基酸，占比最高，为 47.84%；其次是由 162 个氨基酸组成的无规卷曲，占 33.40%，延伸链由 64 个氨基酸构成，占 13.20%； $\beta$ -转角由 27 个氨基酸组成，占 5.57%（图 7）。

通过 Swiss-Model 在线工具结合 PyMOL 软件构建 *StCYP80G* 蛋白三级结构模型（图 8），该氨基酸序列与模板序列（PDB: 5ylw.1.A）相似度为 33.41%，GMQE 值为 0.76（GMQE 的可信度范围为 0~1，值越大质量越好），表明该模型可以较好预测 *StCYP80G* 蛋白的三级结构。

**3.2.6 StCYP80G 氨基酸序列同源比对与系统进化树构建** 选取其他物种已功能验证的 CYP80G，包括日本黄连 *CjCYP80G2*（GenBank 登录号：BAF80448）<sup>[19]</sup>、莲 *NnCYP80G* 与智利桂 *LsCYP80G*<sup>[20]</sup>，与 *StCYP80G* 的氨基酸序列在 MEGE11.0 软件中进行多序列比对，结果表明 *StCYP80G* 氨基酸序列与比对序列的一致度较高，其中与 *NnCYP80G* 和 *LsCYP80G* 氨基酸序列一致度分别达到 76.40%和 75.15%，与 *CjCYP80G2* 的一致度为 49.17%。*StCYP80G* 编码的蛋白中含有 4 个保守基序，分别为血红素结合域 F××G×R×C×G、

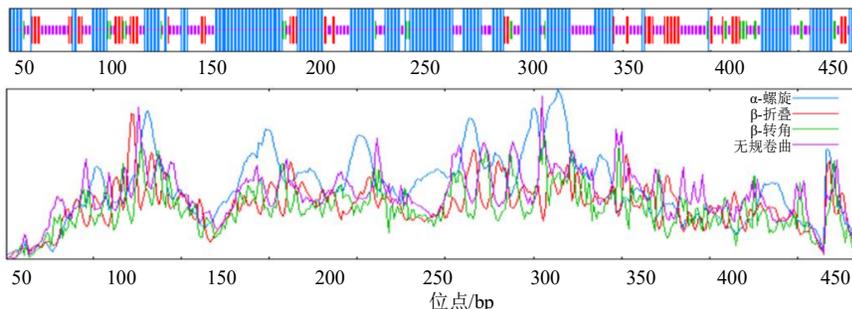


图 7 StCYP80G 蛋白的二级结构预测

Fig. 7 Secondary structure prediction of *StCYP80G* protein

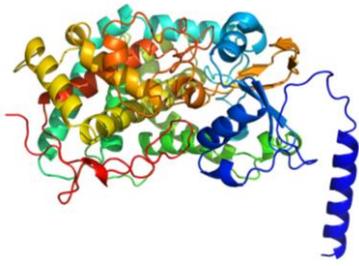


图 8 *StCYP80G* 蛋白的三级结构预测

Fig. 8 Tertiary structure prediction of *StCYP80G* protein

电子传递通道残基 PERF、螺旋 C 区中的 W×××R 和螺旋 K 区中的 E×××R 残序(图 9); 其中, 血红素结合域和螺旋 K 区是 CYP80 的主要特征序列<sup>[29]</sup>。

选择与 CYP80G 具有一定同源性的 P450 氨基酸序列, 与 *StCYP80G* 构建系统进化树, 建树采用 Bootstrap 检验, 重复次数为 1 000。结果显示 *StCYP80G* 处于 CYP80 家族分支上, 且与 *NnCYP80G* 和 *LsCYP80G* 聚为一支(图 10), 因此推测其属于 CYP80G 亚族。

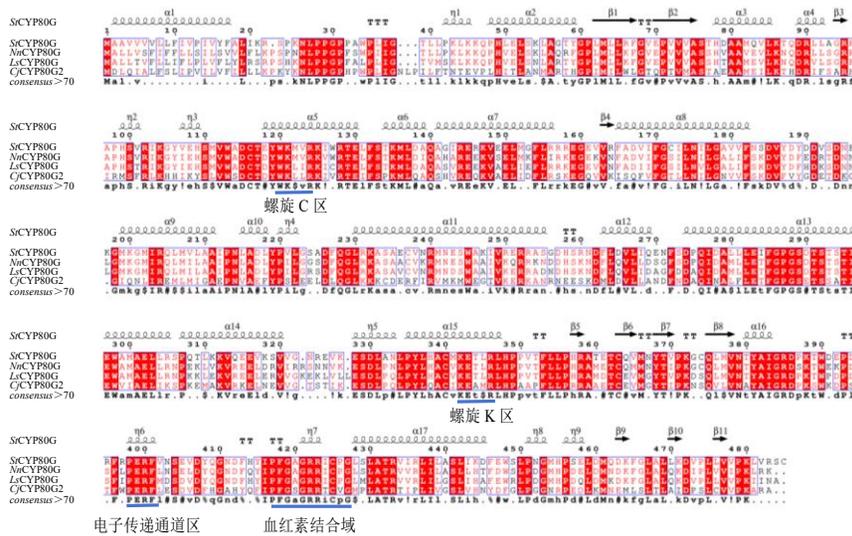


图 9 *StCYP80G* 氨基酸序列与其他物种 CYP80G 氨基酸同源比对

Fig. 9 Homologous alignment between *StCYP80G* amino acid sequence and CYP80G amino acid from other species

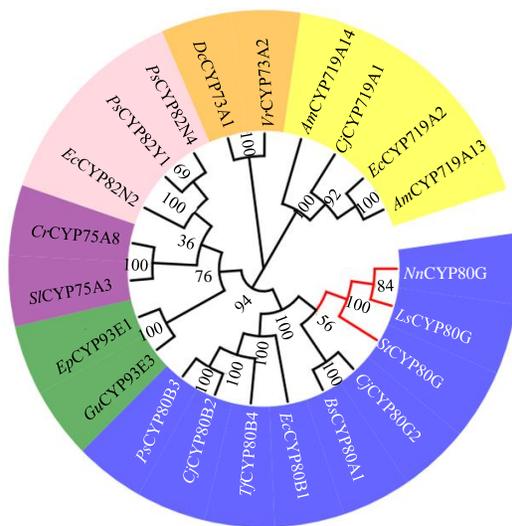


图 10 *StCYP80G* 氨基酸序列系统进化树

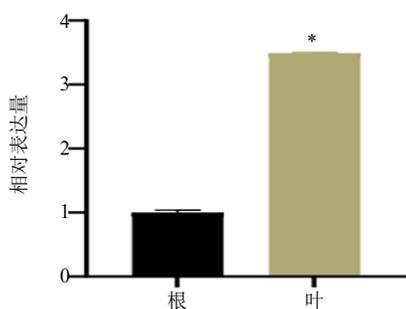
Fig. 10 Phylogenetic tree of *StCYP80G* amino acid sequence

### 3.3 pESC-Leu-*StCYP80G* 重组质粒的构建

将胶回收得到的线性化 pESC-Leu 载体和 *StCYP80G* 基因重组后提取质粒, 得到 pESC-Leu-*StCYP80G* 重组质粒, 送至上海生工生物工程有限公测序后得到电子序列, 序列分析结果与目的基因序列一致, 无突变序列, 表明重组质粒 pESC-Leu-*StCYP80G* 构建成功。

### 3.4 *StCYP80G* 组织特异性表达分析

利用 qRT-PCR 技术分析 *StCYP80G* 基因在粉防己根、叶不同组织的表达水平。结果显示, *StCYP80G* 在根和叶中都有表达, 在叶中的表达量显著高于根, 表明该基因具有组织表达特异性 (图 11)。



\*表示差异在  $P < 0.05$  水平上显著。

\* indicates significant difference at the level of  $P < 0.05$ .

图 11 *StCYP80G* 在粉防己不同组织中的相对表达水平

Fig. 11 Relative expression level of *StCYP80G* in different tissues of *S. tetrandra*

## 4 讨论

CYP80G 作为一个细胞色素 P450 超家族中 CYP80 亚家族的酶, 在阿朴啡和原阿朴啡型 BIA 的下游生物合成中起着关键的作用。BIA 的生物合成起始于 *L*-络氨酸, 经过一系列酶催化反应可生成 (*R*)-*N*-methylcoclaurine 和 (*S*)-reticuline 等单苄基异喹啉类生物碱, 再经 CYP80G 催化分子内芳基偶联可形成阿朴啡或原阿朴啡型 BIA。目前, 已被鉴定的 CYP80G (CjCYP80G2、NnCYP80G、LsCYP80G) 所催化的底物和获得的产物不同: CjCYP80G2 催化 (*S*)-reticuline 生成阿朴啡型 BIA (*S*)-corytuberine<sup>[19]</sup>, 而 NnCYP80G 和 LsCYP80G 催化 *D*-甲基乌药碱生成原阿朴啡型生物碱 Glaziovine<sup>[20]</sup>。本研究获得的 *StCYP80G* 经多序列比对与系统进化树分析表明, *StCYP80G* 与 NnCYP80G 和 LsCYP80G 氨基酸序列的一致度较高, 进化分支也属于同一分支中, 推测其与这 2 条序列的功能相似。蛋白保守结构域的分析结果显示, *StCYP80G* 氨基酸序列中具有血红素结合域、螺旋 K 区等 CYP450 的保守基序, 也预测

其归属 CYP450 家族基因。以上结果为深入研究 *StCYP80G* 的功能提供了重要信息。

本研究成功构建了重组质粒 pESC-Leu-*StCYP80G*, 为研究 *StCYP80G* 基因的功能及分子机制奠定了实验基础。CYP450 蛋白属于膜蛋白, 难以在大肠杆菌等原核体系中表达, 需要通过序列改造等方法才能实现在原核系统的异源表达; CYP450 的表达常采用酵母等真核体系或烟草等植物系统。在后续工作中, 将开展该重组质粒的表达与功能研究。

*StCYP80G* 基因在粉防己植物中的表达存在组织特异性, 在叶中表达量显著高于根。我们前期对该植物不同部位生物碱分布的比较结果表明, 叶中主要含有阿朴啡型生物碱, 种类比根中更多<sup>[5]</sup>, 与基因表达模式一致, 这为深入阐明粉防己中 *CYP80G* 在 BIA 生物合成途径中的时空分布规律提供了有利线索。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 莫柳英, 张帆, 郝二伟, 等. 基于化学成分、药理作用及网络药理学的防己质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6283-6295.
- [2] Jiang Y P, Liu M, Liu H T, *et al.* A critical review: Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Stephania tetrandra* S. Moore (Fen Fang Ji) [J]. *Phytochem Rev*, 2020, 19(2): 449-489.
- [3] 赖信宏, 谢孟姣, 陈海燕, 等. 防己化学成分和药理活性研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 42(3): 244-252.
- [4] 刘嘉琪, 张雅男, 赵婉, 等. 粉防己化学成分及药理学研究进展 [J]. 中医学报, 2017, 45(3): 100-103.
- [5] Xue J Y, Liu S, Kang Y, *et al.* An integrated strategy for characterization of chemical constituents in *Stephania tetrandra* using LC-QTOF-MS/MS and the target isolation of two new biflavonoids [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 226: 115247.
- [6] Zhang Y L, Qi D L, Gao Y Q, *et al.* History of uses, phytochemistry, pharmacological activities, quality control and toxicity of the root of *Stephania tetrandra* S. Moore: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260: 112995.
- [7] 刘顺, 李姚婷, 沈思懿, 等. 粉防己根的化学成分研究 [J]. 中药材, 2022, 45(6): 1368-1371.
- [8] 林芝, 胡致伟, 瞿旭东, 等. 苄基异喹啉类生物碱的微生物合成研究进展及挑战 [J]. 合成生物学, 2021, 2(5): 716-733.
- [9] 马莹, 蔡媛, 马晓晶, 等. 药用植物活性成分生物合成中 P450 的研究进展 [J]. 药学学报, 2020, 55(7): 1573-

- 1589.
- [10] Hu B D, Zhao X R, Wang E D, *et al.* Efficient heterologous expression of cytochrome P450 enzymes in microorganisms for the biosynthesis of natural products [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2023, 43(2): 227-241.
- [11] 费丹丹, 王军伟, 吴小媚, 等. 细胞色素P450基因家族参与植物硫代葡萄糖苷生物合成的研究进展 [J]. 中国蔬菜, 2023(5): 30-41.
- [12] Hansen C C, Nelson D R, Møller B L, *et al.* Plant cytochrome P450 plasticity and evolution [J]. *Mol Plant*, 2021, 14(10): 1772.
- [13] Dastmalchi M, Park M R, Morris J S, *et al.* Family portraits: The enzymes behind benzyloisoquinoline alkaloid diversity [J]. *Phytochem Rev*, 2018, 17(2): 249-277.
- [14] Ikezawa N, Iwasa K, Sato F. Molecular cloning and characterization of methylenedioxy bridge-forming enzymes involved in stylophine biosynthesis in *Eschscholzia californica* [J]. *FEBS J*, 2007, 274(4): 1019-1035.
- [15] Ikezawa N, Tanaka M, Nagayoshi M, *et al.* Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38557-38565.
- [16] Dang T T T, Facchini P J. CYP82Y1 is *N*-methylcanadine 1-hydroxylase, a key noscapine biosynthetic enzyme in opium poppy [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(4): 2013-2026.
- [17] Kraus P F, Kutchan T M. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbaminine synthase, a C-O phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(6): 2071-2075.
- [18] Pauli H H, Kutchan T M. Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (*S*)-*N*-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis [J]. *Plant J*, 1998, 13(6): 793-801.
- [19] Ikezawa N, Iwasa K, Sato F. Molecular cloning and characterization of CYP80G2, a cytochrome P450 that catalyzes an intramolecular C-C phenol coupling of (*S*)-reticuline in magnoflorine biosynthesis, from cultured *Coptis japonica* cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(14): 8810-8821.
- [20] Pyne M E, Gold N D, Martin V J J. Pathway elucidation and microbial synthesis of proaporphine and bis-benzyloisoquinoline alkaloids from sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) [J]. *Metab Eng*, 2023, 77: 162-173.
- [21] Li K L, Chen X F, Zhang J B, *et al.* Transcriptome analysis of *Stephania tetrandra* and characterization of norcoclaurine-6-*O*-methyltransferase involved in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 874583.
- [22] Li Q S, Bu J L, Ma Y, *et al.* Characterization of *O*-methyltransferases involved in the biosynthesis of tetrandrine in *Stephania tetrandra* [J]. *J Plant Physiol*, 2020, 250: 153181.
- [23] Li X Y, Li Q S, Jiao X, *et al.* Phylogenetic analysis and functional characterization of norcoclaurine synthase involved in benzyloisoquinoline alkaloids biosynthesis in *Stephania tetrandra* [J]. *J Cell Physiol*, 2023: 89-103.
- [24] Zhang Y Y, Kang Y, Xie H, *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals candidate genes involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Stephania tetrandra* [J]. *Planta Med*, 2020, 86(17): 1258-1268.
- [25] 叶友杰, 谢德金, 杨德明, 等. 巴戟天实时荧光定量PCR内参基因的选择 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 1060-1068.
- [26] 张维洵, 潘小勇, 沈红斌. 基于深度学习与领域规则建模的蛋白质信号肽及其切割位点预测 [J]. 南京理工大学学报, 2020, 44(3): 278-287.
- [27] 李佳楠, 李卓, 滕小华, 等. 基于机器学习的蛋白质亚细胞定位预测方法 [J]. 安徽农业科学, 2022, 50(16): 198-204.
- [28] 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.
- [29] 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]