

## 积雪草细胞色素 P450 家族 *CaCYP2* 基因克隆及表达分析

刘焕英<sup>1,2</sup>, 雷明<sup>2,3</sup>, 肖潇<sup>2</sup>, 李林轩<sup>2</sup>, 李翠<sup>2,3</sup>, 黄媛<sup>2</sup>, 霍娟<sup>2</sup>, 万凌云<sup>2</sup>, 潘丽梅<sup>2\*</sup>, 张占江<sup>1,2,3\*</sup>

1. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

2. 广西壮族自治区药用植物园/广西道地药材高品质形成与应用重点实验室/国家中医药传承创新中心, 广西 南宁 530023

3. 广西壮族自治区药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023

**摘要:** 目的 克隆积雪草 *Centella asiatica* 中参与三萜皂苷 C-6 $\beta$  羟基化修饰的细胞色素 P450 基因 (*CaCYP2*), 系统解析其分子特征、组织表达模式及亚细胞定位, 并实现原核可溶性表达, 为阐明其在三萜生物合成中的功能提供实验基础。方法 从积雪草 cDNA 中克隆 *CaCYP2* 全长序列, 并进行生物信息学分析, 采用实时荧光定量 PCR 检测其组织特异性表达情况; 利用无缝克隆技术构建酵母双杂交载体、原核表达载体及亚细胞定位载体, 分别进行自激活检测、重组蛋白表达及烟草瞬时定位分析。结果 成功克隆 *CaCYP2* 基因, 其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 1 443 bp, 编码 480 个氨基酸, 属于 CYP716 家族, 命名为 *CYP716E116*。预测蛋白相对分子质量为 54 425.09, 理论等电点 8.98, 呈亲水性, 含典型 CYP90-like 保守结构域及 1 个跨膜结构域。亚细胞定位结果显示, 该蛋白定位于内质网。qRT-PCR 分析表明, *CaCYP2* 在叶片中表达量最高, 是根中表达量的 6.2 倍 ( $P < 0.000 1$ ), 与其他组织存在显著差异; 原核表达结果表明, 经异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG) 诱导后获得相对分子质量约为 91 300 的可溶性重组蛋白 (含 40 300 的标签蛋白); 酵母双杂交实验证实, 酵母双杂交载体无自激活活性, 可用于后续互作蛋白筛选。结论 成功克隆 *CaCYP2* 基因, 明确其分子结构特征、组织表达特异性及内质网定位, 证实其可在原核系统中进行可溶性表达, 为深入研究其催化功能及在积雪草三萜皂苷生物合成途径中的调控作用奠定重要的基础。

**关键词:** 积雪草; *CaCYP2* 基因; 基因克隆; 原核表达; 亚细胞定位

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)07-2718-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.07.023

## Gene cloning and expression analysis of cytochrome P450 family gene *CaCYP2* from *Centella asiatica*

LIU Huanying<sup>1,2</sup>, LEI Ming<sup>2</sup>, XIAO Xiao<sup>2</sup>, LI Linxuan<sup>2</sup>, LI Cui<sup>2,3</sup>, HUANG Yuan<sup>2</sup>, HUO Juan<sup>2</sup>, WAN Lingyun<sup>2</sup>, PAN Limei<sup>2</sup>, ZHANG Zhanjiang<sup>1,2,3</sup>

1. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Guangxi Key Laboratory of High-Quality Formation and Utilization of Dao-Di Herbs, National Center for TCM Inheritance and Innovation, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China

3. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China

**Abstract: Objective** To clone the cytochrome P450 gene (*CaCYP2*) involved in C-6 $\beta$  hydroxylation modification of triterpenoid saponins in *Centella asiatica*, systematically analyze its molecular characteristics, tissue expression pattern and subcellular localization, and achieve prokaryotic soluble expression, so as to provide experimental basis for clarifying its function in triterpenoid biosynthesis. **Methods** The full-length sequence of *CaCYP2* was cloned from *C. asiatica* cDNA and

收稿日期: 2025-10-02

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目 (桂科 ZY24212031); 广西自然科学基金项目 (2026GXNSFBA00640057, 2023GXNSFAA026330); 广西岐黄学者培养项目 (GXQH202402)

作者简介: 刘焕英 (1996—), 硕士研究生, 主要从事中药学研究。E-mail: 17852186681@163.com

\*通信作者: 张占江 (1976—), 研究员, 主要从事药用植物保育学研究。E-mail: zzz1811@163.com

潘丽梅 (1982—), 正高级工程师, 主要从事药用植物资源研究。E-mail: plimeci2006@163.com

subjected to bioinformatics analysis. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed to detect the gene specific expression in different tissues. Seamless cloning technology was employed to construct yeast two-hybrid vector, prokaryotic expression vector and subcellular localization vector for self-activation detection, recombinant protein expression and tobacco transient localization analysis, respectively. **Results** The *CaCYP2* gene was successfully cloned. Its open reading frame (ORF) was 1 443 bp, encoding 480 amino acids, and it belonged to the CYP716 family, hence named *CYP716E116*. The predicted protein had a relative molecular mass of 54 430 and a theoretical isoelectric point of 8.98, showing hydrophilicity. It contained a typical CYP90-like conserved domain and one transmembrane domain. Subcellular localization results indicated that this protein was localized in the endoplasmic reticulum. qRT-PCR analysis showed that the expression level of *CaCYP2* was highest in the leaves, which was 6.2 times higher than that in the roots ( $P < 0.000 1$ ), showing significant differences compared to other tissues. Prokaryotic expression results indicated that a soluble recombinant protein with a relative molecular mass of approximately 91 300 (including a 40 300 tag protein) was obtained after isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) induction. The yeast two-hybrid experiment confirmed that the yeast two-hybrid vector had no self-activating activity and could be used for subsequent screening of interacting proteins. **Conclusion** This study successfully cloned the *CaCYP2* gene and characterized its molecular structure, tissue-specific expression pattern, and endoplasmic reticulum localization. It also confirmed that the protein can be expressed solubly in a prokaryotic system. These findings lay an important foundation for further investigation into its catalytic function and regulatory role in the biosynthetic pathway of triterpenoid saponins in *C. asiatica*.

**Key words:** *Centella asiatica* (L.) Urban.; *CaCYP2*; gene cloning; prokaryotic expression; subcellular localization

积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban. 为伞形科积雪草属植物, 其干燥全草入药, 性寒, 味苦、辛, 具有清热利湿、解毒消肿的功效<sup>[1]</sup>。积雪草广泛分布于全球热带和亚热带地区, 在我国主要分布于长江以南的华南、华东、中南及西南地区<sup>[2]</sup>。三萜类化合物是积雪草中研究最早、应用最广泛的活性成分, 主要包括三萜皂苷和三萜酸, 如积雪草苷 (asiaticoside)、羟基积雪草苷 (madecassoside)、积雪草酸 (asiatic acid) 及羟基积雪草酸 (madecassic acid) 等<sup>[3-6]</sup>。然而, 这些活性成分的含量易受产地和采收期的影响<sup>[7]</sup>, 导致药材质量不稳定, 此外, 积雪草三萜皂苷提取效率低、化学结构复杂等因素, 共同制约了积雪草资源的可持续利用, 难以满足其在医药、食品和化妆品等领域日益增长的市场需求<sup>[8-9]</sup>。因此, 系统解析积雪草三萜类成分的生物合成途径及其分子调控机制, 是通过合成生物学技术提高活性成分产量的关键。

三萜化合物的生物合成主要依赖 2 条代谢途径: 一是多见于原核生物和植物体中的 2-甲基赤藓糖醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径, 二是常见于真核生物和植物细胞质中的甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径<sup>[10-11]</sup>。这 2 条途径在生成  $\alpha$ -香树脂醇 ( $\alpha$ -amyrin) 和  $\beta$ -香树脂醇 ( $\beta$ -amyrin) 之后, 均需经历 2 个关键修饰步骤——细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 介导的氧化反应与糖基转移酶

(glycosyltransferase, GTs) 催化的糖基化反应, 即  $\alpha$ -香树脂醇和  $\beta$ -香树脂醇经 CYP450 催化的多位点氧化修饰生成积雪草酸和羟基积雪草酸等三萜酸, 后经特定的 GTs 对这些三萜酸进行糖基化修饰, 连接上不同的糖链, 最终合成具有生物活性的三萜皂苷<sup>[11-12]</sup>。其中, 细胞色素 P450 酶催化的氧化修饰, 不仅是形成结构多样性三萜皂苷的关键步骤, 也是整个三萜类生物活性物质合成途径的重要调控节点。研究表明, CYP716A、CYP716C、CYP716E、CYP716S、CYP716U 及 CYP716Y 等在内的多个 CYP716 亚家族成员均参与三萜骨架的氧化修饰, 如积雪草的 CYP716E41 的催化特征为 C-6 $\beta$  羟化酶, 能够催化底物齐墩果酸的 C-6 $\beta$  位羟化反应<sup>[13-15]</sup>, 但目前积雪草 CYP 基因家族的系统研究仍较匮乏, 参与三萜皂苷合成的关键 CYP 基因功能尚未完全明确。

本研究聚焦积雪草三萜皂苷合成中的 C-6 $\beta$  羟化修饰步骤, 克隆 *CaCYP2* 基因, 通过生物信息学分析、组织特异性表达检测、亚细胞定位及原核表达等实验, 系统解析其分子特征与表达规律, 为后续功能验证及三萜皂苷合成途径的重构提供理论依据与实验基础。

## 1 材料与试剂

### 1.1 材料

实验材料采自广西药用植物园温室种植培养的积雪草, 经广西壮族自治区药用植物园雷明副研

究员、李林轩正高级工程师鉴定为积雪草 *C. asiatica* (L.) Urban。分别采集积雪草根、茎、叶、花、果、叶柄等材料，液氮速冻后保存于-80 °C冰箱备用。

### 1.2 试剂

RNA 提取试剂盒 (Fast Pure Plant Total RNA Isolation Kit)、高保真酶 (2×Phanta Flash Master Mix)、反转录试剂盒 (HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA wiper)、克隆试剂盒 (5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit) 和同源重组试剂盒 (ClonExpress II One Step Cloning Kit)、GV3101 农杆菌感受态、DH5α 大肠杆菌感受态细胞、胶回收试剂盒 (StarPrep Gel Extraction Kit) 和质粒提取试剂盒 (StarPrep Plasmid Miniprep Kit) 等购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 限制性内切酶 EcoR I、BamH I 购于全式金生物技术有限公司, Easy PAGE® 彩色快速凝胶配制试剂盒 (12.5% SDS-PAGE 凝胶) 购于厦门赛诺邦格生物科技股份有限公司, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 购于艾美捷科技有限公司, 磷酸盐缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 购于北京索莱宝科技有限公司, Y2H Gold Chemically Competent Cell、GV3101 (pSoup-p19) 购于上海唯地生物技术有限公司, 考马斯亮蓝快速染色液、BL21(DE3) Chemically Competent Cell 购于北京酷莱搏科技有限公司, 乙酰丁香酮 (acetosyringone)、2-吗啉

乙磺酸 (2-morpho-linoethanesulphonic acid, MES) 购于 Sigma 公司, LB 培养基购于 OXOID 公司, PBI121-EGFP、pET28a、pGADT7 及 pGBKT7 载体由本实验室保存。由广州天一辉远基因科技有限公司完成引物合成和测序。

## 2 方法

### 2.1 积雪草叶片总 RNA 的提取及反转录

称取积雪草新鲜幼嫩根、茎、叶、花、果、叶柄各 1.0 g, 分别放入液氮预冷的研钵中快速研磨。使用 Fast Pure Plant Total RNA Isolation Kit 试剂盒提取总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并测定 RNA 浓度。使用 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA wiper) 试剂盒将 RNA 转反录为 cDNA, 产物经电泳检测并测定浓度, -20 °C 保存。

### 2.2 积雪草 *CaCYP2* 基因的克隆

分析积雪草转录组数据, 基于 lg(FPKM+1) 值比较 Unigene 的相对表达量, 筛选相对较高表达量的 CYP-like 基因序列, 利用 Primer Premier5.0 设计 3'-RACE (*CaCYP2* CDS F) 和 5'-RACE (*CaCYP2* CDS R) 引物, 以积雪草 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 (表 1)。将回收和纯化后的目的片段与 pCE2 TA/Blunt-Zero 载体链接, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 在 LB (Luria-Bertani) 固体培养基 (含 50 mg/L 卡那霉素) 上筛选。挑取若干菌斑于 LB 液体培养基 (含 50 mg/L 卡那霉素) 中过夜震荡培养, PCR 检测阳性菌落后送公司测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列 (5'-3')	用途
<i>CaCYP2</i> CDS F	ATGGATACTAGTGAGCTTTTCACC	ORF 区克隆
<i>CaCYP2</i> CDS R	ATGGATACTAGTGAGCTTTTCACC	
<i>CaCYP2</i> 121 F	ACCATCACCATCACGATGGATACTAGTGAGCTTTTCAC	亚细胞定位载体构建
<i>CaCYP2</i> 121 R	CTATCGATCAATCAGTTATTTTTGATGAGGCACGAGGC	
<i>CaCYP2</i> AD F	CCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGATACTAGTGAGCTTTTCAC	AD 载体构建
<i>CaCYP2</i> AD R	TGCCACCCGGGTGGAATTCCTATTTTTGATGAGGCACGAGGC	
<i>CaCYP2</i> BD F	TGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGATACTAGTGAGCTTTTCAC	BD 载体构建
<i>CaCYP2</i> BD R	CGACGGATCCCCGGAATTCCTATTTTTGATGAGGCACGAGGC	
<i>CaCYP2</i> PE F	TGGGTCGCGGATCCGAATTCATGGATACTAGTGAGCTTTTCAC	重组蛋白制备
<i>CaCYP2</i> PE R	TGTCGACGGAGCTCGAATTCCTATTTTTGATGAGGCACGAGGC	
<i>CaGAPDH8</i> F	GCGAAGAAGGTTGTCATC	内参基因
<i>CaGAPDH8</i> R	GAGCGAGGCAGTTAGTAG	
<i>CaCYP2</i> F	TTTTCTCTCTCTCTACTTCACCC	实时荧光定量 PCR
<i>CaCYP2</i> R	CACTGCCATTTTTTCGCTA	

### 2.3 生物信息学分析与预测

使用在线工具 NCBI Conserved domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析 *CaCYP2* 结构保守域; ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) 分析 *CaCYP2* 蛋白的开放阅读框; ExPASy ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析 *CaCYP2* 蛋白的亲疏水性; 在线网站 SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) 和 SignalP-6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) 预测蛋白信号肽; TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测跨膜结构域; PSIPRED 在线工具 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 预测 *CaCYP2* 蛋白质二级结构; SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测并构建 *CaCYP2* 蛋白的三级结构模型与拉式图; BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 搜索 *CaCYP2* 基因的同源序列; 利用 DNAMAN 软件比对氨基酸序列同源性, 利用 MEGA12.0 软件构建 *CaCYP2* 蛋白系统进化树; Cell-PLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 对 *CaCYP2* 蛋白进行亚细胞定位<sup>[16]</sup>。

### 2.4 *CaCYP2* 蛋白亚细胞定位

设计特异性引物(表1), 在 *CaCYP2* 基因序列两端分别添加 *Bam*H I 酶切位点, 将其构建到 PBI121-EGFP 载体上, 形成 *CaCYP2*-PBI121-EGFP 融合表达载体, 并测序验证。将空载体 PBI121-EGFP 与重组载体 *CaCYP2*-PBI121-EGFP 分别转化农杆菌 GV3101, 菌体用 MES 缓冲液与乙酰丁香酮处理后摇菌, 摇菌后注射本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* 叶片。烟草暗处理 36~48 h 后用激光共聚焦显微镜在 488 nm 波长下观察绿色荧光信号分布情况, 结合叶绿体中叶绿素自发荧光的 RFP 荧光标记, 以确定目标蛋白的亚细胞定位<sup>[17]</sup>。

### 2.5 重组载体 pGADT7-*CaCYP2* 与 pGBKT7-*CaCYP2* 的构建

使用 ClonExpress II 重组反应体系连接载体与目标片段, 设计两端含 *Eco*R I 酶切位点的引物(表1), 以积雪草 cDNA 为模板扩增得到目的片段 *CaCYP2* 基因, 按照 ClonExpress II 重组反应体系试剂盒说明书, 将经过酶切后的 pGADT7、pGBKT7 线性化载体与 *CaCYP2* 基因片段进行连接, 导入 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 以 *CaCYP2* CDS F 和 *CaCYP2*

CDS R 引物进行菌落 PCR, 将扩增出目的条带的菌液送测序, 测序正确即表明重组载体构建完成。

### 2.6 重组质粒 pGBKT7-*CaCYP2* 自激活效应检测

使用质粒提取试剂盒 (StarPrep Plasmid Miniprep Kit), 从测序正确的菌液中提取 pGBKT7-*CaCYP2* 质粒。依据 Y2H Gold Chemically Competent Cell 试剂盒说明书, 分别将 pGBKT7-*CaCYP2*、pGAL4 (阳性对照) 与 pGBKT7 空载体质粒 (阴性对照) 转化至 Y2H Gold 酵母感受态细胞中, 并涂布于 SD/-Trp 平板上, 29 °C 培养 3~5 d。待 SD/-Trp 平板长出合适大小菌落后, 挑取单菌落稀释不同倍数点样于 SD/-Trp/+X- $\alpha$ -gal/+AbA 平板上, 29 °C 培养 3~5 d, 观察菌落生长状况并拍照保存。

### 2.7 重组载体 pET28a-*CaCYP2* 的构建

使用 ClonExpress II 重组反应体系连接载体与目标片段。以 *CaCYP2* 基因的 CDS 序列为模板, 以 *Eco*R I 为酶切位点, 使用全式金无缝克隆网站设计得到 pET28a-*CaCYP2* 引物(表1), PCR 扩增目的片段后回收。使用限制性内切酶 *Eco*R I 酶切 pET28a 质粒, 纯化后使用重组酶 *Exnase* II 将产物与 PCR 扩增产物连接。将重组载体转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞并涂布于 LB 固体培养基 (含 50 mg/L 卡那霉素), 37 °C 过夜培养。挑取独立、饱满的菌落于 LB 液体培养基 (含 50 mg/L 卡那霉素) 中摇菌扩繁, 使用 pET28a-*CaCYP2* 引物进行 PCR 检测, 将含目的片段的阳性菌液送至广州天一辉远基因科技有限公司测序。

### 2.8 *CaCYP2* 原核蛋白表达

选取测序正确的菌落摇菌提取重组质粒, 转入大肠杆菌 BL21(DE3)。待菌液浓度达到  $A_{600}$  为 0.6~0.8 时, 取出 1 mL 菌液离心, 用 PBS 重悬, 变性, 记为样品 A (未诱导前菌体总蛋白)。剩下的菌液加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 18 °C 摇床诱导 16 h。诱导结束后的菌液取出 1 mL 离心, 用 PBS 重悬, 变性, 记为样品 B (诱导后菌体总蛋白)。将剩下的全部菌液离心, 用 PBS 重悬, 后进行超声破碎洗菌, 取上清变性, 记为样品 C (可溶性蛋白)。超声离心后的沉淀用 PBS 缓冲液重悬, 变性, 记为样品 D (不可溶蛋白, 即包涵体), 12.5% SDS-PAGE 凝胶电泳检测后, 经考马斯亮蓝染色脱色观察蛋白表达情况<sup>[18-19]</sup>。

### 2.9 *CaCYP2* 基因特异性表达分析

以积雪草根、茎、叶、花、果、叶柄 6 个不同

组织的 cDNA 为模板, 以 *CaGAPDH8* 基因为内参基因, 并设计 *CaGAPDH8* 基因和 *CaCYP2* 基因的实时荧光定量 PCR 引物 (表 1)。使用 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒 (诺唯赞公司) 在 Quant Studio 3 (赛默飞公司) 仪器上进行 RT-qPCR 反应。实验数据使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析, 重复 3 次, 并使用 GraphPad Prism 10 软件分析 *CaCYP2* 基因在不同组织中基因表达量的差异显著性。

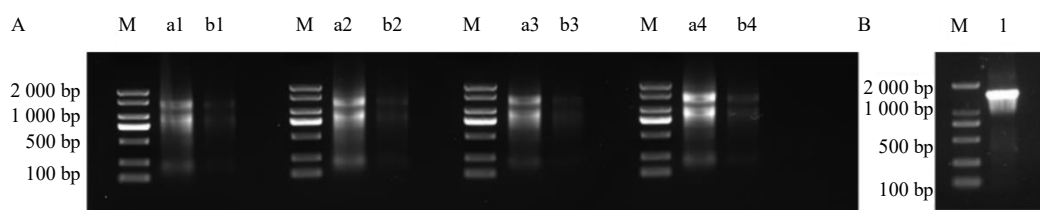
### 3 结果与分析

#### 3.1 积雪草 *CaCYP2* 基因的克隆

从积雪草叶片中提取的总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1-A), 结果显示 28S、18S、5S rRNA 3 条

清晰条带, 其中 28S 与 18S 条带亮度比大于 1, 表明总 RNA 完整性良好, 无明显降解, 符合后续实验要求。

通过逆转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 扩增实验, 获得约 1 500 bp 的目的片段 (图 1-B)。测序结果显示该片段全长为 1 443 bp, 编码 480 个氨基酸。经 NCBI Blast 比对分析, 其氨基酸序列与胡萝卜 *Daucus carota* subsp. *sativus*、小果咖啡 *Coffea arabica*、尤金尼奥德斯咖啡 *Coffea eugenioides*、清脆枝 *Nothapodytes nimmoniana* 等物种 CYP 基因编码的氨基酸同源性均高于 70%。根据序列特征, 将该基因命名为 *CaCYP716E116*。



M-Marker; a1~a4-未稀释; b1~b4-稀释 3 倍; 1-目的基因条带。  
M-Marker; a1—a4-undiluted; b1—b4-3× diluted; 1-target gene band.

图 1 积雪草叶片 RNA 琼脂糖电泳胶图 (A) 与 *CaCYP2* 基因全长克隆琼脂糖电泳胶图 (B)

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis gel images of RNA from *C. asiatica* leaves (A) and full-length cloning of *CaCYP2* gene (B)

#### 3.2 *CaCYP2* 基因序列的生物信息学分析

**3.2.1 *CaCYP2* 蛋白理化性质分析** 保守结构域分析显示, *CaCYP2* 蛋白含第 66~477 位氨基酸区间的 CYP90-like 保守结构域, 属于 CYP450 超家族 (图 2)。该蛋白由 480 个氨基酸组成, 预测分子式为  $C_{248}H_{386}N_{669}S_{22}$ , 相对分子质量为 54 425.09, 理论等电点 (pI) = 8.98 (>7), 带负电荷氨基酸 (Asp+Glu) 总数为 51 个, 带正电荷氨基酸 (Arg+Lys) 总数为 59 个, 整体呈正电性; 不稳定系数为 40.81 (>40), 属于不稳定碱性蛋白。Cell-PLoc 在线预测显示其定位于内质网, 与跨膜结构预测结果一致。

**3.2.2 *CaCYP2* 蛋白信号肽和跨膜结构分析** ProtScale 分析显示 *CaCYP2* 蛋白中亲水氨基酸 (负值) 数量多于疏水氨基酸 (正值), 平均亲水性值为 -0.217, 整体呈亲水性 (图 3-A)。该蛋白第 15 位氨基酸处的疏水性最强 (2.678), 而第 255 位氨基酸处的亲水性最强 (-3.089)。SignalP-5.0 与 SignalP-6.0 预测结果均显示信号肽预测值 < 0.45 (图 3-B-1、B-2), 表明该蛋白不属于典型的 Sec/SPI 分泌途径, 可能为非分泌蛋白。TMHMM-2.0 跨膜结构预测表明, *CaCYP2* 含有一个跨膜结构域, 结合其亲水性特征, 判定为亲水性跨膜蛋白 (图 3-C)。

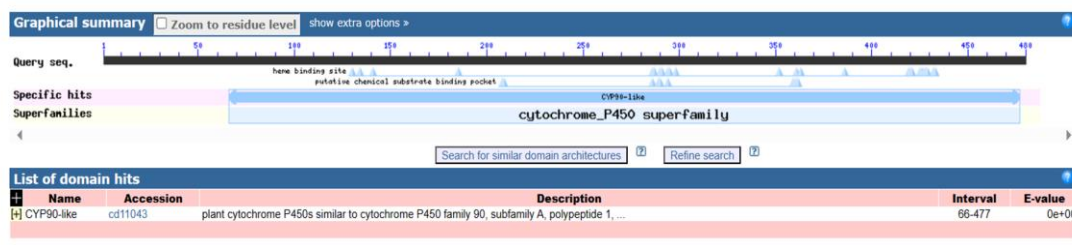


图 2 *CaCYP2* 基因编码蛋白保守结构域分析

Fig. 2 Conserved domain analysis of *CaCYP2*-encoded protein

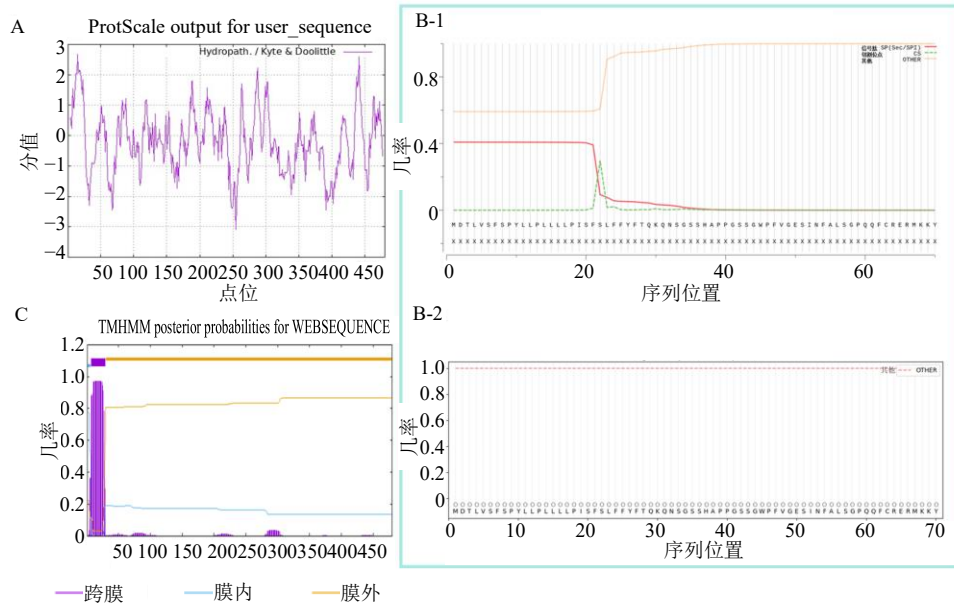


图3 CaCYP2 蛋白亲/疏水性 (A)、信号肽 [B-1 (SignalP-5.0 预测)、B-2 (SignalP-6.0 预测)] 与跨膜结构预测 (C)  
 Fig. 3 CaCYP2 protein hydrophilicity/hydrophobicity (A), signal peptide [B-1 (SignalP-5.0 prediction), B-2 (SignalP-6.0 prediction)], and transmembrane structure prediction (C)

3.2.3 CaCYP2 蛋白质二级结构和三级结构预测 SOPM 在线工具预测显示, CaCYP2 蛋白由 228 个  $\alpha$ -螺旋 (47.50%)、201 个无规卷曲 (41.88%)、51 个延伸链 (10.62%) 组成, 以  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲为主 (图 4-A)。SWISS-MODEL 以细胞色素 P450 (A0A2G9H0W3.1.A) 为模板构建的三级结构模型, 与二级结构预测结果一致。模型 GMQE (global model quality estimate) 评分为 0.89, 序

列一致性 (seq identity) 为 72.84%, 可靠性较高 (图 4-B)。拉氏构象分析 (Ramachandran plot) 显示 (图 4-C), 96.19% 的残基位于有利区域, 仅有 0.42% 的异常值, 涉及 A257 ASP 和 A32 ASN, 表明该蛋白主链构象整体合理。此外, 三级结构预测中识别出的跨膜区段与前述跨膜结构预测结果相符, 为理解该蛋白的膜定位及潜在功能结构研究提供了支撑。

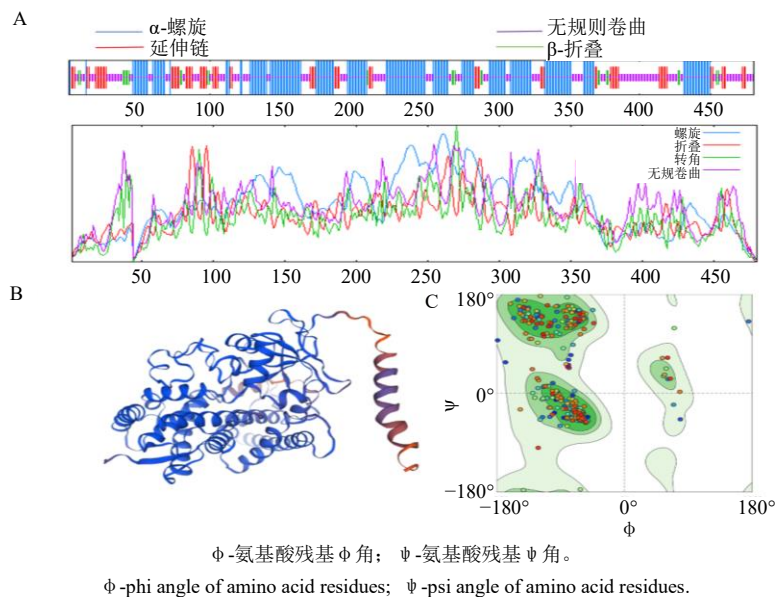


图4 CaCYP2 蛋白二级结构 (A)、三级结构 (B) 与拉氏图 (C) 预测  
 Fig. 4 Predictive analysis of CaCYP2 protein structure: secondary (A), tertiary (B) and Ramachandran plot (C)

### 3.3 CaCYP2 编码蛋白的同源比对及系统进化树构建

基于 NCBI 数据库的 Blast 比对分析, 积雪草 CaCYP2 蛋白所编码的氨基酸序列与胡萝卜 *Daucus carota* subsp. *sativus*、小粒咖啡 *Coffea arabica*、尤金尼奥德斯咖啡 *Coffea eugenoides*、非洲枸杞

*Lycium ferocissimum*、大花四照花 *Cornus florida* 和芝麻 *Sesamum indicum* 等多个物种的 CYP 蛋白序列一致性均超过 80%, 利用 DNAMAN 软件进行多序列比对, 结果显示 CaCYP2 与其他物种 CYP 蛋白的整体一致性达到 83.62% (图 5), 表明该蛋白在进化过程中具有较高的保守性。

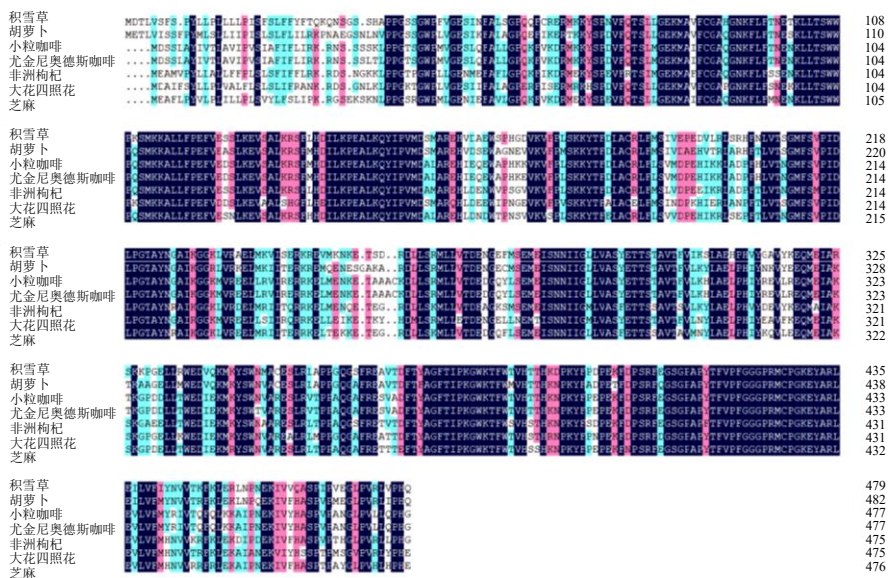


图 5 CaCYP2 蛋白与其他物种 CYP 氨基酸序列的同源性比对结果

Fig. 5 Homology comparison results of amino acid sequence between CaCYP2 protein and CYP from other species

利用 MEGA12.0 构建系统发育树显示, 积雪草的 CYP 蛋白与胡萝卜 *Daucus carota* subsp. *sativus*、野胡萝卜 *Daucus carota*、旱芹 *Apium graveolens* 和索斯诺

夫斯基大豕草 *Heracleum sosnowskyi* 等伞形科植物的 CYP 蛋白亲缘关系较近 (图 6), 推测其功能与近缘物种 CYP 蛋白具有相似性, 可能具有相似性功能。

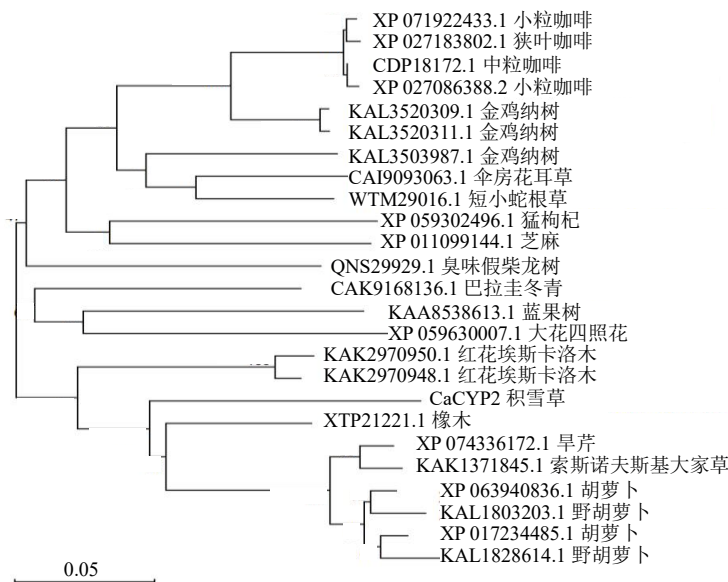


图 6 CaCYP2 蛋白与其他植物 CYP 同源蛋白的系统进化分析

Fig. 6 Phylogenetic analysis of CaCYP2 and CYP homologous protein from other plants

### 3.4 CaCYP2 蛋白的亚细胞定位

本氏烟草叶肉细胞瞬时表达分析显示(图7),在PBI121-EGFP空载对照组中,绿色荧光信号均匀分布在细胞膜与细胞核,说明游离EGFP蛋白无特定亚细胞定位;而在CaCYP2-PBI121-EGFP融合表达组中,

绿色荧光呈现离散点状分布于细胞核周围的内质网上,与叶绿体位置不重合,与对照组差异较大,推测目标基因编码的蛋白主要定位于内质网,与Cell-PLoc在线预测的亚细胞定位结果一致;同时该蛋白在细胞其他部位也有分布,推测其可能具有多重生物学功能。

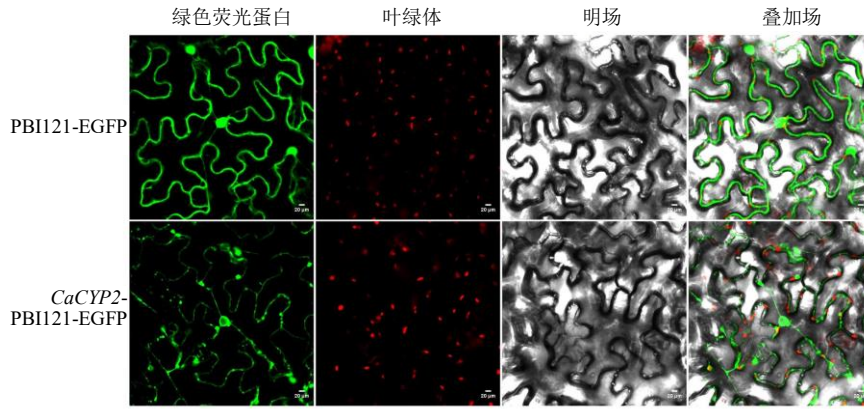


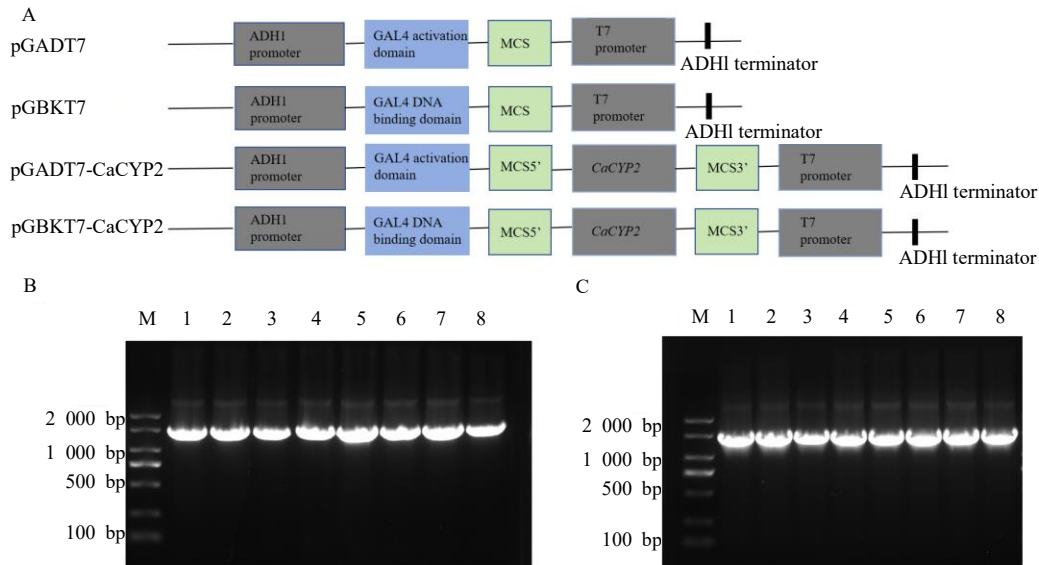
图7 CaCYP2 蛋白在烟草叶肉细胞的定位

Fig. 7 Localization of CaCYP2 protein in tobacco mesophyll cells

### 3.5 重组载体 pGADT7-CaCYP2 与 pGBKT7-CaCYP2 的构建

使用 ClonExpress II 重组体系将目的片段与质粒连接,获得 pGADT7-CaCYP2 与 pGBKT7-CaCYP2 重组质粒(图8-A),菌液 PCR 及琼脂糖

凝胶电泳验证后,获得长度约为1500 bp左右的片段(图8-B、C),与目标基因大小一致。测序比对获得序列与目标序列一致,说明重组载体 pGADT7-CaCYP2 与 pGBKT7-CaCYP2 构建成功,该载体可用于下一步的自激活检测及蛋白互作分析。



M-Marker; 1~8-菌液 PCR 条带。

M-Marker; 1—8-PCR bands of bacterial liquid.

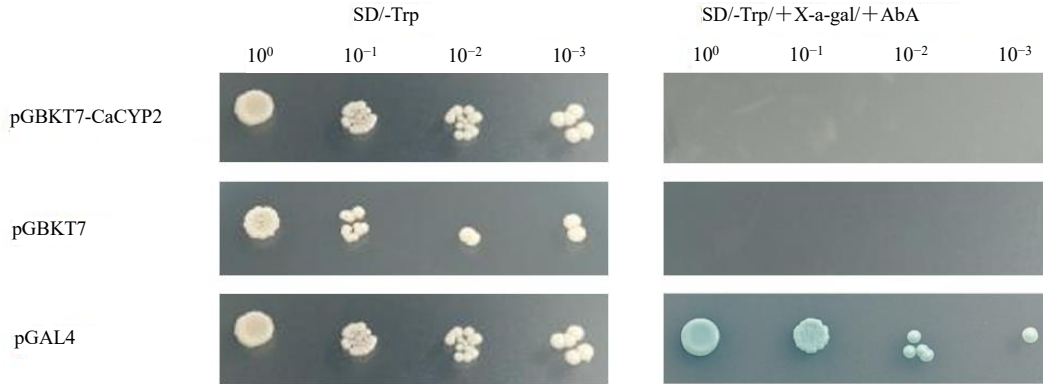
图8 pGADT7-CaCYP2 与 pGBKT7-CaCYP2 重组载体示意图(A)及 pGADT7-CaCYP2(B) 与 pGBKT7-CaCYP2(C) 菌液 PCR 验证电泳图

Fig. 8 Schematic diagram of recombinant vector construction of pGADT7-CaCYP2 and pGBKT7-CaCYP2 (A), and the electrophoretogram of bacterial liquid PCR verification for pGADT7-CaCYP2 (B) and pGBKT7-CaCYP2 (C)

### 3.6 重组载体自激活效应检测

在自激活检测实验中，将分别转化了重组载体 pGBKT7-CaCYP2、空载 pGBKT7 及阳性对照 pGAL4 的酵母感受态细胞，分别点板于 SD/-Trp 与 SD/-Trp/X- $\alpha$ -gal/AbA 培养基。结果显示(图 9)，pGBKT7-CaCYP2 重组载体和 pGBKT7 载体的酵母细胞均在 SD/-Trp 培养基上长出白色菌落，且

生长速度和状态均正常，而在 SD/-Trp/+X- $\alpha$ -gal/+AbA 培养基上菌落不能正常生长；转化了 pGAL4 载体的酵母细胞在 SD/-Trp 培养基上长出白色菌落，在 SD/-Trp/+X- $\alpha$ -gal/+AbA 平板上长出蓝色菌落。上述结果表明 125 ng/mL 的 AbA 可以抑制 CaCYP2 基因的自激活，该体系可用于后续酵母双杂实验。



SD-营养缺陷型培养基；AbA-金担子素 A；X- $\alpha$ -gal：5-溴-4-氯-3-吡啶基- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷；SD/-Trp-缺失色氨酸的营养缺陷型培养基；SD/-Trp/+AbA/+X- $\alpha$ -gal：添加了 40 mg·L<sup>-1</sup> X- $\alpha$ -gal 和 125 ng/mL AbA 的色氨酸的营养缺陷型培养基。

SD-synthetic dropout；AbA-aureobasidin A；X- $\alpha$ -gal-5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside；SD/-Trp-SD medium without Trp；SD/-Trp/+AbA/+X- $\alpha$ -gal- SD medium without Trp but with 40 mg·L<sup>-1</sup> X- $\alpha$ -gal and 125 ng/mL AbA.

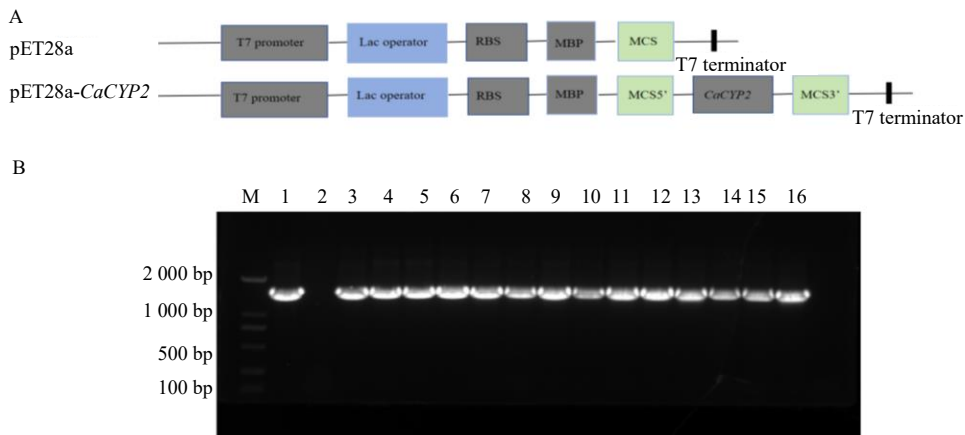
图 9 CaCYP2 蛋白的转录自激活检测

Fig. 9 Transcriptional self-activation detection of CaCYP2 protein

### 3.7 重组载体 pET28a-CaCYP2 的构建

构建原核表达重组载 pET28a-CaCYP2 (图 10-A)，基于 CaCYP2 的 CDS 序列设计特异性引物，通过 PCR 扩增获得 CaCYP2 目的片段。对 pET28a 空载进行酶切，并通过重组试剂盒将酶切线性化载体与

CaCYP2 片段进行连接，转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞，经菌液 PCR 验证，获得约 2 000 bp 的条带(图 10-B)。对阳性克隆进行测序分析，结果显示其序列与目标序列完全一致，表明重组载体 pET28a-CaCYP2 构建成功，可用于后续 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。



M-Marker；1~16-菌液 PCR 条带，其中泳道 2 为假阴性。

M-Marker；1—16-PCR bands of bacterial liquid, among which lane 2 is a false negative.

图 10 pET28a-CaCYP2 重组载体构建过程示意图 (A) 及菌液 PCR 验证电泳图 (B)

Fig. 10 Schematic diagram of pET28a-CaCYP2 recombinant vector construction (A) and electrophoretogram of bacterial liquid PCR verification (B)

### 3.8 pET28a-CaCYP2 重组载体的原核蛋白表达

将测序验证正确的重组质粒 pET28a-CaCYP2 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 采用终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 在 18 °C 摇床诱导 16 h。SDS-PAGE 电泳结果 (图 11), 泳道 A 为未诱导蛋白, 在诱导 16 h 后, 泳道 B (诱导后总蛋白)、C (上清蛋白)、D (沉淀蛋白) 均在 72 000~100 000 内出现一致的蛋白条带, 其表观相对分子质量约为 93 100 (其中包含 40 300 的标签蛋白), 与预期大小相符。该结果进一步证实重组质粒 pET28a-MBP-CaCYP2 构建成功, 并能够在 IPTG 诱导的原核系统中有效表达目的蛋白。

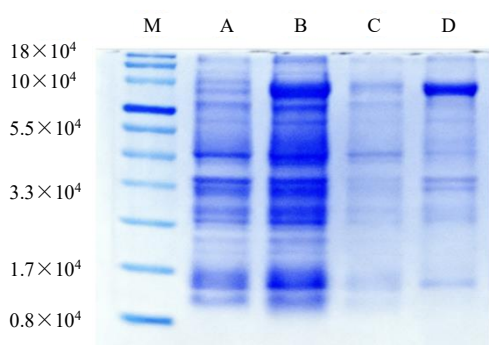


Fig. 11 SDS-PAGE analysis of prokaryotic protein expression of pET28a-CaCYP2 recombinant vector

图 11 pET28a-CaCYP2 重组载体原核蛋白表达 SDS-PAGE 检测

### 3.9 CaCYP2 基因在积雪草不同组织中的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 技术分析 CaCYP2 基因在积雪草不同组织中的表达特征。结果显示 (图 12), CaCYP2 基因在积雪草不同组织中差异表达, 叶片中的表达量最高, 其次是叶柄、茎、花和果实, 根中表达量相对最低, 且根与其他组织的表达差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。

### 4 讨论

本研究成功克隆积雪草 CaCYP2 基因, 其 ORF 全长 1 443 bp, 编码 480 个氨基酸, 命名为 CYP716E116, 属于 CYP716 家族。CYP716 家族是植物三萜合成中的关键氧化酶家族, 该家族已被证

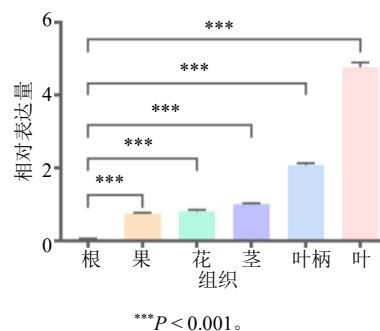


图 12 CaCYP2 基因在不同组织的表达分析

Fig. 12 Expression analysis of CaCYP2 gene in different tissues

实是植物三萜皂苷氧化修饰的核心功能家族, 在桔梗 *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC.、夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 等药用植物中, CYP716 亚家族成员可通过催化三萜骨架特定位点羟化, 推动皂苷元结构多样化<sup>[20-21]</sup>, 在积雪草相关研究中, 已有研究表明积雪草 CYP716A83、CYP716A86 为 C-28 氧化酶, CYP716C11 为 C-2 $\alpha$  羟化酶, CYP716E41 为 C-6 $\beta$  羟化酶<sup>[12, 22]</sup>。本研究中 CaCYP2 (CYP716E116) 与 CYP716E41 相似系数达 74.98, 推测其可能同样具有 C-6 $\beta$  羟化酶活性, 参与齐墩果酸向 6 $\beta$ -羟基齐墩果酸的转化, 为积雪草三萜皂苷合成的关键步骤提供催化作用。

生物信息学分析表明, 该蛋白为亲水性跨膜蛋白, 含 CYP90-like 保守结构域, 推测定位于内质网。通常而言, 跨膜蛋白的跨膜区域结构特征对亚细胞定位具有影响, 具有特定跨膜结构的蛋白更倾向定位在细胞膜、内质网等膜性细胞器中。Song 等<sup>[23]</sup>报道的积雪草三萜合成相关的 CYP 蛋白的亚细胞定位与内质网作为三萜皂苷氧化修饰关键场所等特征; Park 等<sup>[24]</sup>和 Lu 等<sup>[25]</sup>研究发现 CYP 蛋白主要在内质网有功能, 与 CYP450 酶的经典定位一致, 为其与其他合成酶形成代谢复合体、高效完成氧化修饰提供了空间条件。结合上述研究结果, 推测本研究 CaCYP2 蛋白可能定位于内质网, 下一步需进一步证实 CYP 的定位与三萜皂苷氧化修饰关键场所的功能特性。聚类分析结果显示积雪草 CaCYP2 蛋白与伞形科植物 CYP 蛋白亲缘关系较近, 而积雪草作为伞形科较早分化的物种, 其 CYP716 家族的扩增是三萜皂苷生物合成途径进化的重要驱动力, 提示 CYP716E116 可能通过物种特异性进化形成了适配积雪草皂苷合成的功能特性, 推测其参与三萜

皂苷的氧化修饰。组织特异性表达分析发现, *CaCYP2* 在叶片中表达量最高, 推测 *CYP* 基因可能在积雪草皂苷合成中发挥关键作用。在桔梗中, 高表达的 *PgCYP716A* 基因与对应时期根中高含量的皂苷成分表现出正相关表达模式<sup>[20]</sup>。Wang 等<sup>[26]</sup>和 Yang 等<sup>[27]</sup>研究发现关键酶基因 (*CYP450*、*UGT*、*OSC*) 呈现组织/细胞特异性表达, 且表达峰值与皂苷积累峰值时空同步。由于三萜皂苷在积雪草叶中大量积累<sup>[28]</sup>, 推测积雪草三萜皂苷合成和积累都主要在叶片中进行, 与前人的研究结果一致, 积雪草的三萜皂苷倾向于叶中的特异合成和积累<sup>[1]</sup>。鉴于此, 可开展质谱成像技术与单细胞转录组分析进一步探究积雪草三萜类物质合成与积累的规律。

酵母双杂交载体在 125 ng/mL AbA 条件下无自激活活性, 该结论可作为 *CaCYP2* 基因功能验证的研究基础, 为后续筛选互作蛋白奠定基础。原核表达实验证实, *CaCYP2* 蛋白可实现可溶性表达, 为后续酶活验证提供了蛋白材料。原核表达系统因其操作简便、易于吸收血红蛋白、内源 P450 背景干扰小、表达水平高且适合大规模培养等优势而被广泛应用, 在不少植物研究中也实现了 *CYP* 蛋白的原核表达<sup>[29-32]</sup>。基于课题组前期原核表达实验探索, 采用终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 在 18 °C 诱导 16 h 的最佳表达条件, 使用 *CaCYP2* 基因与 MBP 标签 (Maltose-Binding Protein Tag) 融合表达。MBP 标签的优势是通过空间位阻抑制目标蛋白聚集, 促进正确折叠, 提高异源蛋白在大肠杆菌中的溶解度, 适合难溶性蛋白表达, 且适配原核表达系统, 其不足是相对分子质量较大、可能影响目标蛋白功能需额外去除<sup>[33-34]</sup>。原核表达系统缺乏真核细胞特有的膜结构, 难以满足 P450 等膜蛋白的定位需求, 无法进行翻译后修饰或共翻译修饰, 且不能保证蛋白质正确折叠, 易导致目标蛋白形成包涵体或被降解<sup>[35-36]</sup>。本研究中 *CaCYP2* 蛋白虽可在原核系统中表达, 但上清蛋白 (泳道 C) 目的条带较浅, 结合该蛋白存在跨膜结构的预测结果与原核表达系统的不足, 推测诱导后仅少量蛋白正确折叠并整合到膜结构中成为存在于上清液中的可溶性蛋白。为减弱上述问题对表达结果的影响, 可采取添加外源 *CPR1* 基因或将 P450 与 *CPR* 进行融合表达等方法<sup>[35]</sup>。在真核表达系统中, 使用酿酒酵母 WAT11 整合拟南芥 *CPR1* 基因, 能够实现植物 *CYP* 与 *CPR* 的共表达, 有效提高电子传递效率, 因而被认为是更适用于植物

*CYP* 异源表达的体系<sup>[37-38]</sup>。综上, 真核系统可能更适合 *CYP* 等膜蛋白的表达, 下一步将围绕 *CYP* 蛋白的酶学功能与调控通路, 通过真核表达系统将拟南芥 *CPR* 列为优先候选互作蛋白进行共表达, 进一步验证其羟基化活性。

综上, 本研究明确了 *CaCYP2* 基因的分子特征、表达模式及亚细胞定位, 实现了原核可溶性表达, 并开展了酵母自激活检测, 为深入解析其催化功能及三萜皂苷合成的分子调控网络提供了关键依据和宝贵的基因资源。后续可通过多基因共表达策略, 在异源系统中重构积雪草三萜皂苷的完整合成途径, 为解决积雪草资源供需矛盾提供新方案。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 336.
- [2] 黄晓玲, 陈文, 王湘, 等. 黎药积雪草植物药用成分研究进展 [J]. 内江科技, 2021, 42(3): 112-113.
- [3] 秦慧真, 林思, 邓玲玉, 等. 积雪草苷的药理作用及机制研究进展 [J]. 中国药房, 2021, 32(21): 2683-2688.
- [4] 古宝浚, 史俊豪, 刘晓芳, 等. 积雪草化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2025, 27(7): 35-43.
- [5] 王迎迎, 顾永政. 积雪草苷对代谢相关脂肪性肝病大鼠 Nrf2、ROS 通路表达的影响 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(4): 810-815.
- [6] Diniz L R L, Calado L L, Duarte A B S, et al. *Centella asiatica* and its metabolite asiatic acid: Wound healing effects and therapeutic potential [J]. *Metabolites*, 2023, 13(2): 276.
- [7] 林琛, 王斌, 刘巨钊, 等. 积雪草化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物预测分析 [J]. 中医药信息, 2023, 40(8): 70-77.
- [8] 魏艺聪, 陈建雄, 黄泽豪, 等. 基于 *matK* 序列的积雪草与其易混品的分子鉴定方法分析 [J]. 世界中医药, 2016, 11(5): 900-902.
- [9] 曹柯科, 刘智谋, 张胜, 等. 低共熔溶剂提高积雪草有效成分提取效率的研究 [J]. 湖南林业科技, 2023, 50(1): 10-14.
- [10] Khalili H M, Mirjalili M H, Mohajeri M. Boosted centellosides production in Gotu kola (*Centella asiatica*) transgenic hairy roots elicited by gold and zinc nanoparticles [J]. *Ind Crops Prod*, 2025, 227: 120796.
- [11] 曹策, 杨丽丽, 宋鉴书, 等. 积雪草苷调控 PIK3C3/DYNC2H1/TUB 减轻转化生长因子-β1 诱导的心肌成纤维细胞活化 [J]. 中草药, 2025, 56(14): 5108-5118.
- [12] Kim O T, Um Y, Jin M L, et al. A novel multifunctional C-

- 23 oxidase, CYP714E19, is involved in asiaticoside biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(6): 1200-1213.
- [13] 朱灵英, 郭娟, 张爱丽, 等. 参与植物三萜生物合成的细胞色素 P450 酶研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(22): 5597-5610.
- [14] 田荣, 谷巍, 韦陈彬, 等. 植物三萜类成分生物合成中氧鲨烯环化酶与细胞色素 P450 的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(2): 303-310.
- [15] 杨成佳, 成旭, 胡冰, 等. P450 酶在植物三萜化合物生物合成中的催化与调控 [J]. 生物加工过程, 2023, 21(1): 39-49.
- [16] 覃雅, 雷明, 李林轩, 等. 积雪草 CaPDS 基因克隆、表达模式分析及过表达载体构建 [J]. 中药材, 2025, 48(8): 58-78.
- [17] 张顺仓, 刘肖宇, 邱琳, 等. 丹参 SmCYP76S7 基因的克隆、亚细胞定位和表达分析 [J]. 中草药, 2024, 55(13): 4500-4507.
- [18] 温丽翠. 亚洲璃眼婢源 CYP450 基因克隆表达及其功能分析 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2024.
- [19] 刘越圳, 聂小山, 尚进, 等. 茅苍术细胞分裂素羟化酶基因 (*AICYP735A*) 的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2025, 56(9): 3253-3262.
- [20] Yu H W, Wang H X, Liang X, *et al.* Telomere-to-telomere gap-free genome assembly provides genetic insight into the triterpenoid saponins biosynthesis in *Platycodon grandiflorus* [J]. *Hortic Res*, 2025, 12(5): uhaf030.
- [21] Zhang S X, Meng F Q, Pan X, *et al.* Chromosome-level genome assembly of *Prunella vulgaris* L. provides insights into pentacyclic triterpenoid biosynthesis [J]. *Plant J*, 2024, 118(3): 731-752.
- [22] Miettinen K, Pollier J, Buyst D, *et al.* The ancient CYP716 family is a major contributor to the diversification of eudicot triterpenoid biosynthesis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14153.
- [23] Song W L, Chen B Z, Feng L, *et al.* Telomere-to-telomere genome assembly and 3D chromatin architecture of *Centella asiatica* insight into evolution and genetic basis of triterpenoid saponin biosynthesis [J]. *Hortic Res*, 2025, 12(5): uhaf037.
- [24] Park J W, Reed J R, Backes W L. The localization of cytochrome P450s CYP1A1 and CYP1A2 into different lipid microdomains is governed by their N-terminal and internal protein regions [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(49): 29449-29460.
- [25] Lu H P, Edwards M, Wang Q Z, *et al.* Expression of cytochrome P450 CYP81A6 in rice: Tissue specificity, protein subcellular localization, and response to herbicide application [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16(2): 113-122.
- [26] Wang R B, Zhang L Y, Li X, *et al.* Single-cell sequencing and mass spectrometry imaging reveal the multicellular compartmentalization map of plant triterpenes: A ginsenoside in *Panax ginseng* example [J]. *Plant Biotechnol J*, 2025, 23(10): 4461-4476.
- [27] Yang L F, Yang Z, Liu M, *et al.* Integrated single-cell transcriptomics and spatial metabolomics unveil cellular differentiation and ginsenosides biosynthesis in *Panax* root tips [J]. *Hortic Res*, 2025, 12(11): uhaf202.
- [28] 李娇珍, 孙正海, 蔡起航, 等. 基于 LC-MS 积雪草不同部位中化学成分分析 [J]. 西部林业科学, 2022, 51(4): 75-79.
- [29] Sheibani N. Prokaryotic gene fusion expression systems and their use in structural and functional studies of proteins [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 1999, 29(1): 77-90.
- [30] Porowińska D, Wujak M, Roszek K, *et al.* Prokaryotic expression systems [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2013, 67: 119-129.
- [31] 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.
- [32] 赵桂红, 张妮妮, 高帅帅, 等. 菘蓝 CYP83A1 基因的克隆、表达特性及原核表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(1): 302-312.
- [33] 何昕雨, 逢雨, 张远洋, 等. 高产乳糖-N-三糖 II 大肠杆菌菌株的构建 [J]. 生物技术通报, 2025, 41(11): 143-152.
- [34] 周金龙. 针对常见融合标签的结合蛋白从头设计与亲和力表征 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2024.
- [35] 周小洁, 邱星辉, 曾晓芃. 细胞色素 P450 原核功能表达系统概述 [J]. 毒理学杂志, 2021, 35(3): 241-245.
- [36] 王世山, 陈艳可, 杨俊. 膜蛋白原核表达的基因序列优化 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(12): 50-55.
- [37] 孟凡琦. 北马兜铃阿朴啡类生物碱骨架形成相关 CYP80 的鉴定及功能分析 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2024.
- [38] 李可鑫. 白桦 CYP450 基因的表达特性及在三萜合成中的功能鉴定 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2022.

[责任编辑 时圣明]