

# 雷公藤 *TwCYP88A1* 基因全长 cDNA 克隆与表达分析

陈上<sup>1</sup>, 王秀娟<sup>1\*</sup>, 张逸风<sup>1,2</sup>, 高伟<sup>1\*</sup>

- (1. 首都医科大学 中医药学院, 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069;
2. 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:研究雷公藤萜类成分的生物合成相关基因,在雷公藤转录组信息数据的基础上,以雷公藤悬浮细胞为研究材料,克隆 *TwCYP88A1* 基因。方法:采用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)克隆雷公藤 *TwCYP88A1* 基因,实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)分析其组织表达谱。结果:*TwCYP88A1* cDNA 全长 1 594 bp,编码 491 个氨基酸,等电点 9.16,相对分子质量 55.957 kDa,具有半胱氨酸铁血素配体信号活性催化位点。植物组织表达分析表明 *TwCYP88A1* 基因在雷公藤叶中的表达量最高,根中最低。结论:从雷公藤悬浮细胞中克隆得到 *TwCYP88A1* 基因全长 cDNA,对其进行生物信息学分析,揭示其组织表达谱,为深入分析雷公藤细胞色素 P450 酶、解析雷公藤萜类化合物的生物合成下游途径奠定基础。

**[关键词]** 雷公藤; *TwCYP88A1*; 组织表达; 聚合酶链式反应; 悬浮细胞; 邻接法; 细胞色素 P450

**[中图分类号]** R282;R931;Q785;Q786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0032-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180606

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171226.1423.029.html>

**[网络出版时间]** 2017-12-27 13:49

## Cloning and Bioinformatics Analysis of *TwCYP88A1* Gene in *Tripterygium wilfordii*

CHEN Shang<sup>1</sup>, WANG Xiu-juan<sup>1\*</sup>, ZHANG Yi-feng<sup>1,2</sup>, GAO Wei<sup>1\*</sup>

- (1. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Collateral Disease Theory Research, School of TCM, Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. State Key Laboratory Breeding Base of Daodi Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study on the genes related to the biosynthesis of diterpenoid in *Tripterygium wilfordii*, based on the transcriptome data, *TwCYP88A1* gene was cloned from *T. wilfordii* suspension cells. **Method:** *TwCYP88A1* was obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE). Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the relative expression profile of *TwCYP88A1* in different tissues of *T. wilfordii*. **Result:** The full-length cDNA of *TwCYP88A1* was 1 594 bp encoding a polypeptide of 491 amino acids. The deduced isoelectric point (pI) was 9.16, a calculated relative molecular weight was about 55.957 kDa. It had active catalytic sites of cysteine hemoglobin ligand signal. Plant tissue expression analysis indicated that *TwCYP88A1* expressed the highest in leaves, while lowest in roots. **Conclusion:** The full-length cDNA of *TwCYP88A1* can be cloned from the suspension cells of *T. wilfordii*.

**[Key words]** *Tripterygium wilfordii*; *TwCYP88A1*; tissue expression; polymerase chain reaction; suspension cells; neighbor-joining method; cytochrome P450

**[收稿日期]** 20170727(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金优秀青年基金项目(81422053);国家自然科学基金面上项目(81373906)

**[第一作者]** 陈上,在读硕士,从事中药资源和分子药理学研究工作,E-mail:18810258791@163.com

**[通信作者]** \*王秀娟,教授,从事中药药效与作用机制及中药资源可持续利用研究工作,Tel:010-83911671,E-mail:wj0517@sina.com;

\*高伟,博士,教授,从事分子药理学研究工作,Tel:010-83916572,E-mail:weigao@ccmu.edu.cn

雷公藤味苦、辛,性凉,有大毒,归肝、肾经,具有祛风除湿、通络止痛、消肿止痛、解毒杀虫<sup>[1]</sup>等多种功效,常用于治疗湿热结节、癌瘤积毒。现代研究表明雷公藤具有抗炎、抗肿瘤和免疫调节等药理活性,临床上治疗麻风病、类风湿性关节炎等疾病。现代毒理研究表明其有效部位中的萜类成分,如雷公藤甲素,具有抑制肿瘤细胞生长的功效<sup>[2]</sup>,正是由于广泛的药理活性,雷公藤萜类活性成分的生物合成研究是现阶段的热点之一。

细胞色素 P450(CYP450)是广泛存在于动植物和真菌内,能在多种生物过程中发挥广泛而复杂的催化作用的一类酶。植物 CYP450 具有高度保守的 FxxGxRxCxG 结构域,能产生与多种细胞器膜结合的血红素氧化酶系,参与苯丙烷类、生物碱类、萜类、植物激素等重要植物药用活性成分的生物合成<sup>[3-6]</sup>。在萜类的生物合成途径中,植物 CYP450 主要催化萜类骨架上甲基的氧化<sup>[7-8]</sup>,在 CYP450 的后修饰作用下,萜类骨架最终形成了种类众多的单体。CYP88 家族是非常重要的一类 P450 酶,甘草中的 GuCYP88D6 能够催化  $\beta$ -香树脂醇 C-11 位发生两步氧化反应,生成前体物质 11-羰基- $\beta$ -香树脂醇<sup>[9]</sup>,最终生成甘草中的重要三萜皂苷类成分——甘草酸;而在拟南芥赤霉素的生物合成中,CYP88A 亚家族的酶能够催化贝壳杉烯酸  $7\alpha$  位发生连续三步脱氢氧化反应,依次形成  $7\alpha$  羟基, $7\alpha$  醛基和  $7\alpha$  羧酸,形成内根- $7\alpha$  羟基贝壳杉烯酸,继而转化成 GA<sub>12</sub>醛,最终形成 GA<sub>12</sub><sup>[10]</sup>。

本实验以雷公藤悬浮细胞为材料,通过 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)和全长聚合酶链式反应(PCR)技术克隆获得 *TwCYP88A1* 全长 cDNA,分析雷公藤不同组织中 *TwCYP88A1* 基因的表达水平,为深入研究雷公藤 CYP450 酶、解析雷公藤萜类成分生物合成的下游途径奠定基础。

## 1 材料

FUSION-SL 3500-WL 型高级荧光化学发光系统(法国 Vilber Lourmat 公司),MM400 型高通量组织研磨仪(德国 Retsch 公司),QuantStudio™ 5 型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)系统(美国赛默飞世尔科技有限公司)。

雷公藤悬浮细胞[自制,将 MS 基础培养基 40 mL 置于 100 mL 锥形瓶中,加入  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) +  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  激动素(kinetin,KT) +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  吲哚丁酸(IBA),pH 5.8 ~ 6.0,于  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  黑暗条件下悬浮培

养],SMARTer 末端快速扩增技术(RACE)cDNA 扩增试剂盒(amplification kit)(美国 Clontech 公司),菌液 PCR 采用北京全式金生物技术有限公司所产  $2 \times \text{EasyTaq PCR SuperMix}$ ,Phusion 高保真 PCR 预混液(Phusion high-fidelity PCR master mix with HF buffer)购自美国 NEB 公司,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、第一链合成试剂盒和 RNA 纯化试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司,SYBR 快速定量 PCR 试剂盒购自 Kapa Biosystems 公司,质粒提取试剂盒、菌株和质粒(大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞和 pEASY-T3 载体)均由北京全式金生物技术有限公司提供,DNA marker(北京全式金生物技术有限公司,批号 L20305),引物合成及后续测序服务由北京睿博兴科生物技术有限公司完成。

## 2 方法

**2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成** 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取雷公藤悬浮细胞总 RNA,RNA 纯化试剂盒精制 RNA,去除基因组 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量,第一链合成试剂盒合成雷公藤第一链 cDNA。

**2.2 cDNA 末端快速扩增** 根据雷公藤转录组得到 *TwCYP88A1* 基因的 cDNA 片段,使用 Primer Premier 5.0 软件设计 5'端特异性引物 TwCYP88A1-5': 5'-CGATCTCCACTCCATCAGCTGGTTT-3'。以 TwCYP88A1-5'和通用引物(UPM)为引物,5'-RACE Ready cDNA 为模板,反应体系为 cDNA  $2.5 \text{ } \mu\text{L}$ , UPM 通用引物( $10 \times$ )  $5 \text{ } \mu\text{L}$ , TwCYP88A1-5'( $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1 \text{ } \mu\text{L}$ , Advantage 2 PCR buffer( $10 \times$ )  $5 \text{ } \mu\text{L}$ , dNTP mix( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1 \text{ } \mu\text{L}$  及 Advantage 2 polymerasemix( $50 \times$ )  $1 \text{ } \mu\text{L}$ ,加 PCR 用水补足至  $50 \text{ } \mu\text{L}$ 。反应程序为  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 5 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 30 s, $68 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 2 min,共进行 35 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 7 min。琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物,连接 pEASY-T3 载体,转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,LB + Amp 固体培养基筛选阳性克隆菌落,菌液 PCR 鉴定,送北京睿博兴科生物技术有限公司测序验证。

**2.3 全长 cDNA 克隆与测序** 对 5'RACE 结果进行拼接,在拼接序列的开放阅读框两端设计全长 cDNA 引物,记为 TwCYP88A1-F: 5'-CCACAATTTTGGGGGG-3', TwCYP88A1-R: 5'-GGAAGACCCTAAAAACACCT-3',以 5'-RACE Ready cDNA 作为 PCR 模板,采用 Phusion high-fidelity PCR master mix with HF buffer 进行 PCR 反应,反应体系  $50 \text{ } \mu\text{L}$ , $2 \times$

Phusion master mix 体积 25  $\mu\text{L}$ , TwCYP88A1-F (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 TwCYP88A1-R (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 2.5  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 双蒸水 19  $\mu\text{L}$ 。反应程序为 98  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共进行 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 8 min。PCR 产物利用试剂盒切胶回收后与 pEASY-T3 载体连接, 转化至大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中并扩增, 筛选并鉴定阳性克隆菌落, 送北京睿博兴科生物技术有限公司测序验证。

**2.4 生物信息学分析与命名** 利用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 在线预测工具 ORF Finder 确定 TwCYP88A1 基因的开放阅读框, 同时通过局部序列比对基本检索工具 (BLAST) 程序在 NCBI 数据库中对 TwCYP88A1 进行同源性检索, DNAMAN 8 软件对筛选得到的相似度比较高的序列进行多重比对, 并在 MEGA 7 中构建系统进化树。相对分子质量、理论等电点通过 ExPASy 的在线服务器进行预测, 利用 TRMHMM Server v 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行跨膜结构分析, PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>) 进行二级结构预测, SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行三维同源建模。

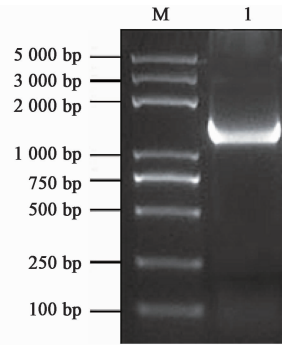
**2.5 TwCYP88A1 基因的组织表达分析** 选择 3 株雷公藤植株, 取其根、茎、叶, 利用 CTAB 法提取总 RNA, 反转得到第一链 cDNA。以 EF1 $\alpha$  为内参基因, 根据 TwCYP88A1 全长序列设计实时荧光定量引物, 进行 TwCYP88A1 基因的组织表达分析。实时荧光定量反应体系为 2  $\times$  SYBR green mix 10  $\mu\text{L}$ , Low Rox 0.4  $\mu\text{L}$ , 正反引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , 加双蒸水补足至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 3 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 40 个循环, 在延伸阶段采集荧光数据, 利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算各组织中 TwCYP88A1 的相对表达量。

### 3 结果与分析

**3.1 雷公藤悬浮细胞总 RNA 的提取与检测** 使用 CTAB 法提取的雷公藤总 RNA, 28 S 与 18 S 的比值约为 2, 未发生降解, 基因组已完全去除, 核酸定量仪检测  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  和 RNA 浓度。结果样品的浓度、完整性、纯度、片段大小均符合后续实验要求。

**3.2 雷公藤 TwCYP88A1 全长 cDNA 的获得** 通过 cDNA 末端快速扩增技术克隆得到 TwCYP88A1 全长 cDNA 序列, 设计全长引物进行全长克隆 PCR。TwCYP88A1 cDNA 全长 1 594 bp, 见图 1, 开放阅读

框长 1 476 bp, 编码 491 个氨基酸。



M. DNA marker; 1. TwCYP88A1

图 1 TwCYP88A1 全长基因克隆凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of full-length cDNA of TwCYP88A1

**3.3 同源性比对及分子系统进化分析** BLAST 结果显示, TwCYP88A1 与桃 (*Prunus persica*) 相似度 65%, 与梅 (*P. mume*), 苹果 (*Malus domestica*) 和梨 (*Pyrus bretschneideri*) 的相似度均为 64%。通过 DNAMAN 8 将其与其他 14 种植物的 CYP88 氨基酸序列进行多重比对, 相似度 75.19%。结合 InterProScan 结构域分析, TwCYP88A1 蛋白有图 2 中 A, B, C 所示的 3 个结构域。A 结构域为 AGHESGH 序列, 研究表明其能与氧分子结合; B 存在高保守的 ETxR 序列, 用来定位血红素口袋; C 结构域为 FxxGxRxCxG 序列, 具有半胱氨酸铁血红素配体信号活性催化位点, 是血红素的结合区。

将 TwCYP88A1 与 GenBank 中的 13 种已知功能的蛋白进行比对分析, 在软件 MEGA 7 平台上采用相邻连接法 (neighbor-joining, NJ) 构建 TwCYP88A1 的系统进化树进行聚类关系分析, 见图 3。结果发现 TwCYP88A1 与大戟科植物麻风树 (*Jatropha curcas*, XP\_012080198.1) 的亲缘关系最近, 与玉米 (*Zea mays*, XP\_008665991.1) 和铁皮石斛 (*Dendrobium catenatum*, XP\_020702950.1) 等单子叶植物的亲缘关系较远。

**3.4 理化性质与结构预测** ExPASy 在线服务器的 Compute pI/Mw 显示 TwCYP88A1 的相对分子质量为 55.957 kDa, 等电点 (pI) 9.16。跨膜域分析表明 TwCYP88A1 具有跨膜结构域, 编码的蛋白为跨膜蛋白。二级结构预测表明 TwCYP88A1 蛋白主要由无规则卷曲和  $\alpha$ -螺旋结构构成, 其中又以  $\alpha$ -螺旋结构为主, 占 45.42%, 无规则卷曲占 31.98%,  $\beta$ -折叠占 5.91%。三维同源模型见图 4, TwCYP88A1 基因编码蛋白质二级结构与三级结构预测结果相符合,

Castanea_mollissima	VPT..KKKDDMDALIDVDEENGRKLTDEEIIDLLMYLNAGHESSGHTMMWATIFLNQHPPEYLOKAKKEQ	328
Cucurbita_maxima	..WAPKRKDDMDCLIDVDEENGRKLTDEEIIDLLMYLNAGHESSGHTMMWATIFLNQHPPEYLOKAKKEQ	332
Glycine_soja	.LPG.KAKDDMDALIDLEDEE.RKLSDEEIIDIMLYLNAGHESSGHITMMWATFFLOKHPPEYLOKAKAEQ	333
Helianthus_annuus	..QGMKRDLALLETEDENGRKLDDEEIIDTLVLYLNAGHESSGHVTMMWATIFLOSHPPEYFKIAKBEQ	332
Jatropha_curcas	.MS.SKKRDMMDALIDVDEENGRKLSDEEIVDVLVLYLNAGHESSGHITMMWATIFLOEHPPEYLOKAKBEQ	329
Medicago_truncatula	LLPGQKAKDDMDALIDVDEENGRKLDDEEIIDIMLYLNAGHESSGHVTMMWATFFLOKHPPEYFKIAKBEQ	328
Morus_notabilis	NVSSTKKDDMDALIDVDEENGRKLTDEEIIDVLLMYLNAGHESSGHTMMWATFFLOKHPPEYFKIAKAEQ	332
Pisum_sativum	PAPGKAKDDMDSLIDVDEENGRKLDDEEIIDIMLYLNAGHESSGHITMMWATFFLOKHPPEYFKIAKBEQ	329
Populus_trichocarpa	.VTNTKKDDMDSLIDVDEENGRKLTDEEVIDIMLYLNAGHESSGHITMMWATIFLODHPPEYFKIAKBEQ	329
Pyrus_communis	NYV.VKKDDMDALIDVDEDDGRKLNDEEIIDVLLMYLNAGHESSGHTMMWATFFLOANPEAFQRAKAEQ	339
Scoparia_dulcis	..PPTAKDDMDALMDAKDENGLITDEEIIDVLYLNAGHESSGHTMMWATFFLOKHPPEYFKIAKAEQ	326
Sesamum_indicum	..PPTVKDDMDALIDVDADEHGRKLTDEEIIDLLMYLNAGHESSGHVTMMWATFFLOKHPPEYFKIAKAEQ	324
Triticum_aestivum	.....AGVDDMDRLIAAEDEGGRLQDEEIIDVLYLNAGHESSGHITMMWATFFLOENPDILAKAKAEQ	328
TwCYP88A1	..GAEKTNIDLMGDMIKDEQGNLSDTEVINENSMGLVIGCYESTSLATMIVVYVQAKYENVLQKLRREN	335
Consensus	kkkddmdal d edengrkl deeiidillmylnaghessgh twmat flq hpe fqakeeq	
A		
Castanea_mollissima	EEIVRRKRLPEQKGLTLKEIREMEYLSKVIDETLRLVITFSLTVFREAKQDVNIAAGYTIIPKGRVILVWFRSV	398
Cucurbita_maxima	EAIVRNRPAQGTGLTLKECRDMEYLSKVIDETLRYVSFSLVVFREAKQDMVNLNGYLIIPKGRVILVWFRSV	402
Glycine_soja	EEIIRRRPSTQKGLTLKEVREMDFLYKVIDETLRLVITFSLVVFREAKTDVNIINGYIVPKGRVILVWFRSV	403
Helianthus_annuus	ERIAKDDPQGLTLKEFRQMEYLSKVIDETLRLVITFSLMVFREAKKVDIKRGYLIIPKGRVILVWFRSV	401
Jatropha_curcas	EEIIRRRPSTQKGLTLKEVREMDFLYKVIDETLRLVITFSLTVFREAKANLNNGYLIIPKGRVILVWFRSV	399
Medicago_truncatula	EEIIRRRPSTQKGLKLEDVRKMDYLSKVIDETLRLVITFSLVVFREATSDVNIINGYLIIPKGRVILVWFRSV	398
Morus_notabilis	VEIIRKRPPTQKGLSLKEIREMDFLYKVIDETLRLVITFSLTVFREAKQDVQVGYTIIPKGRVILVWFRSV	402
Pisum_sativum	VEMLKRRPSTQKGLKLEDVRKMEYLSKVIDETLRVVVTFSLMVFROARNDVKNVNGYLIIPKGRVILVWFRSV	399
Populus_trichocarpa	BQIIRKRLTQKRLSLKEVREMDFLYKVIDETLRLVITFSLTVFREAKTDFCMNGYTIIPKGRVILVWFRSV	399
Pyrus_communis	EEIIRKRPPTQKGLTLKEVREMDFLYKVIDETLRLVITFSLTVFREAKKDVKINGYTIIPKGRVILVWFRSV	409
Scoparia_dulcis	EEIIRRRPSTQKGLTLKEVREMDFLYKVIDETLRLVITFSLTVFREAKKDVNNGYTIIPKGRVILVWFRSV	396
Sesamum_indicum	EEIVRRNRPDQKGLTLKEIRKMEYLNKVIDETLRLVITFSLVVFREAKKDVNNGYTIIPKGRVILVWFRSV	394
Triticum_aestivum	EAIMRSPPTQKGLTLRDRFKMEYLSQVVIDETLRFVNISFVVFROATRDVFNNGYLIIPKGRVILVWFRSV	398
TwCYP88A1	HAKMKKPEDF..ITSEVSKLKYTNKVVESLRMANTVAFVFRSVAKETEFGYRIIPKGRVILVWFRSV	403
Consensus	eei k rpp qkgtlkevr meylskvidetlrvvtfsl vfreak dvn ngv ipkgwkvilvwfrsv	
B		
Castanea_mollissima	HLDPEIYENPEKKEFESRDWNTPKAGAFLEFGAGTRLCPGNDLAKLEISIFLHFFLLNQLERLNPEGSFS	468
Cucurbita_maxima	HYDSEVYDPEKKEFESRDWNTPKAGAFLEFGAGTRLCPGNDLAKLEISIFLHFFLLNQLEWLPDGEI	472
Glycine_soja	HLDPEIYDPEKKEFENRW.N.KEHKAGELEFPGGSRLCPGNDLAKMEIAVFLHFFLLNRFQHNPCPV	472
Helianthus_annuus	HHNPDIIYDPEKKEFENRW.DNLVVPKPGTLEFGAGTRLCPGNDLAKLEISIFLHFFLLNQLEVRNPACPM	471
Jatropha_curcas	HLDPEIYDPEKKEFENRW.DNRIVKAGTLEFGAGSRMCPGNDLAKLEISIFLHFFLLNQLEQLNPEGSL	469
Medicago_truncatula	HLDPEIYDPEKKEFENRW.ESEVHVRAGELEFGVGTTRLCPGNDLAKLEISVFLHFFLLNQLEQINPEKSFV	468
Morus_notabilis	HLDPEIYDPEKKEFENRW.DNYTPRAGSELEFGAGSRLCPGNDLAKLEISIFLHFFLLNQLEKRNPDPCPL	472
Pisum_sativum	HFDSELYDPEKKEFENRW.VVRKAGELEFGAGTRLCPGNDLAKLEISVFLHFFLLNQLEQLNPEKSPI	468
Populus_trichocarpa	HLDPEVYDPEKKEFENRW.DYTPKAGTLEFGAGSRLCPGNDLAKLEISIFLHFFLLNQLEQINPEKSEI	466
Pyrus_communis	HYDSELYDPEKKEFENRW.DNTPKAFSELEFGAGSRHLCPGNDLAKLEISIFLHFFLLNQLEKERTNPGCPL	479
Scoparia_dulcis	HYDEIYDPEKKEFESRDWNTPKAGAFLEFGGSRLCPGNDLAKLEISIFLHFFLLNQLEQRNPASEV	466
Sesamum_indicum	HFDPEIYDPEKKEFESRDWNTPKAGTLEFGGSRLCPGNDLAKLEISVFLHFFLLNQLEQINPEKSEI	464
Triticum_aestivum	HMDQVYDPEKKEFESRWEGPPRAGTLEFGGLTRLCPGNDLAKLEISVFLHFFLLNQLEKLRNPNCRV	468
TwCYP88A1	HTNSEYDDELCEENRW.D.EPAKAGTEQVFGCPRLCPGNTLARMSEIAVFLHFLHSIGKQWELVNPEDAGV	472
Consensus	h dpe ydpdkefnpsrwd pkgag flpfgagsrlcpgndlakleisiflhhffllny ler np cp	
C		

图 2 TwCYP88A1 氨基酸序列多重序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of deduced amino acid sequence of TwCYP88A1

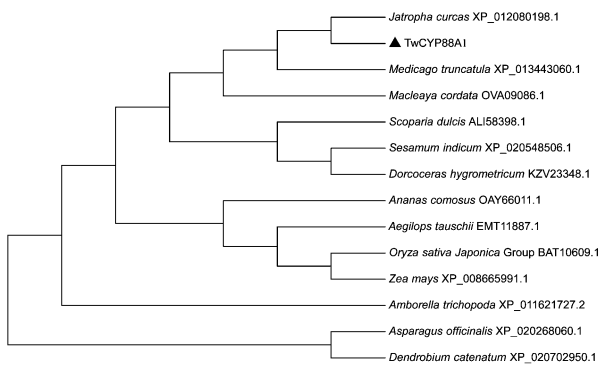


图 3 TwCYP88A1 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of TwCYP88A1

TwCYP88A1 三维同源模型以 c2x2nB 蛋白为模板, 用于建立该模型的氨基酸残基范围为 51 ~ 490 位, 序列同源性 89.00%。

**3.5 TwCYP88A1 基因的组织表达分析** 研究发现 TwCYP88A1 基因在雷公藤根、茎、叶中均有表达, 在叶中表达最强, 是茎中表达量的 7.95 倍, 是根中表

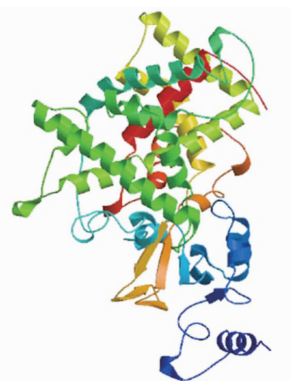


图 4 TwCYP88A1 蛋白质三级结构预测

Fig. 4 Prediction of 3D structure of TwCYP88A1 protein

达量的 35 倍。

#### 4 讨论

CYP450 是萜类化合物生物合成下游途径的关键酶, 萜类骨架在 CYP450 的作用下, 合成萜类单体活性成分。通过 RACE 和全长 PCR 技术, 从雷公藤

悬浮细胞中克隆得 *TwCYP88A1* 基因。*TwCYP88A1* cDNA 全长 1 594 bp, 编码 491 个氨基酸, 预测蛋白的 pI = 9.16, 相对分子质量 55.957 kDa。通过氨基酸多重序列比对发现, *TwCYP88A1* 具有半胱氨酸铁血红素配体信号活性位点, 可能编码具有功能的蛋白。

雷公藤的根、茎、叶均可作为药用, 目前临床上大多使用干燥根的木质部, 其根、茎、叶中的活性成分含量有较大区别, 张敏<sup>[11]</sup>和张少燕等<sup>[12]</sup>通过 HPLC 比较了雷公藤根和叶中 3 种萜类药用活性成分雷公藤甲素、雷公藤内酯甲、雷公藤红素的含量, 结果发现根中这 3 种成分的含量均高于叶。但 *TwCYP88A1* 基因的组织表达分析结果表明, 与雷公藤萜类药用活性成分的分布规律不同, *TwCYP88A1* 基因在叶中的表达量远远高于其他组织, 说明 *TwCYP88A1* 可能并未参与上述 3 种萜类药用活性成分的积累。同时, 在多重序列比对和系统进化分析中发现, *TwCYP88A1* 与赤霉素生物合成途径中关键酶<sup>[13]</sup>——贝壳杉烯酸氧化酶 (KAO) 具有很高相似度。赤霉素是植物生长发育过程中必不可少的一类植物激素, 在种子萌发<sup>[14]</sup>、叶与花的形成和发育<sup>[15]</sup>、果实的成熟<sup>[16]</sup>等生长发育过程中发挥重要作用。参与赤霉素生物合成和代谢的相关基因的表达具有明显的组织特异性, 在不同组织部位表达水平各不相同, 在赤霉素合成较为旺盛的组织中表达量较高<sup>[17-18]</sup>, 如种子和叶, *TwCYP88A1* 基因在雷公藤不同组织中的表达水平与赤霉素的分布特征一致。结合生物信息学和组织表达分析的结果, 可以推测 *TwCYP88A1* 参与了赤霉素的生物合成。本研究成功克隆得到雷公藤 *TwCYP88A1* 的全长 cDNA, 为进一步研究雷公藤 CYP450 的功能和解析其萜类次生代谢产物的生物合成途径奠定了基础。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 4134.  
[2] 骆永伟, 施畅, 廖明阳. 雷公藤甲素抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 35 (16): 2024-2026.  
[3] Ehrling J, Hamberger B, Million-Rousseau R, et al. Cytochromes P450 in phenolic metabolism [J]. Phytochem Rev, 2006, 5(2/3): 239-270.  
[4] Tanaka Y, Brugliera F. Flower colour and cytochromes P450 [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013, 368(1612): 20120432.  
[5] Ralston L, YU O. Metabolons involving plant cytochrome

P450s [J]. Phytochem Rev, 2006, 5(2/3): 459-472.  
[6] Bourgaud F, Hehn A, Larbat R, et al. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes [J]. Phytochem Rev, 2006, 5(2/3): 293-308.  
[7] Rohmer M, Knani M, Simonin P, et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate [J]. Biochem J, 1993, 295 (Pt2): 517-524.  
[8] Newman J D, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1999, 34(2): 95-106.  
[9] Seki H, Ohyama K, Sawai S, et al. Licorice beta-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(37): 14204-14209.  
[10] Helliwell C A, Chandler P M, Poole A, et al. The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(4): 2065-2070.  
[11] 张敏. 不同产地雷公藤根、叶的主要活性成分研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.  
[12] 张少燕, 范永升, 沈炜, 等. 雷公藤不同部位中 6 个单体成分的含量比较 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(5): 1122-1125.  
[13] Khlestkina E K, Kumar U, Röder M S. Ent-kaurenoic acid oxidase genes in wheat [J]. Mol Breed, 2010, 25(2): 251-258.  
[14] Malonek S, Bömke C, Bornberg-Bauer E, et al. Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex [J]. Phytochemistry, 2005, 66(11): 1296-1311.  
[15] XIE Q, CHEN G, LIU Q, et al. Dual silencing of DmCPD and DmGA20ox genes generates a novel miniature and delayed-flowering *Dendranthema morifolium* variety [J]. Mol Breed, 2015, 35(2): 67.  
[16] Mariotti L, Picciarelli P, Lombardi L, et al. Fruit-set and early fruit growth in tomato are associated with increases in indoleacetic acid, cytokinin, and bioactive gibberellin contents [J]. J Plant Growth Regul, 2011, 30(4): 405-415.  
[17] 袁媛, 黄璐琦, 崔光红, 等. 赤霉素及其合成抑制剂对丹参酮类活性物质含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(6): 1-3.  
[18] 欧春青, 姜淑琴, 王斐, 等. 梨贝壳杉烯酸氧化酶基因 *PcKAO1* 的克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2013, 40(5): 849-858.

[责任编辑 刘德文]