

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2014.02.04

# 甘蔗细胞色素 P450 还原酶基因的电子克隆与分析

苏炜华, 张玉叶, 黄宁, 肖新换, 黄珑, 罗俊, 阙友雄\*

(福建农林大学农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室/国家甘蔗产业技术研发中心, 福建福州 350002)

**摘要:**旨在为甘蔗细胞色素 P450 还原酶基因的实验克隆、功能鉴定及其应用提供参考。本研究以甘蔗类似细胞色素 P450 还原酶基因的 EST 序列 CF576130.1 为探针, 在甘蔗 EST 数据库中进行检索, 并基于电子克隆技术获得了甘蔗细胞色素 P450 还原酶基因 (Cytochrome P450 reductase) 的一条 cDNA 全长序列, 命名为 ScCYP450。采用生物信息学方法, 对该基因编码蛋白从氨基酸组成、理化性质、亚细胞定位、跨膜结构域、疏水性/亲水性、高级结构及功能域等方面进行预测和分析。结果表明该基因全长 1 821 bp, 包含一个 744 bp 的开放阅读框, 编码 247 个氨基酸, 该基因编码蛋白定位于细胞内质网(膜), 为可溶性碱性蛋白, 不存在信号肽, 二级结构原件多为无规卷曲, 含有多个保守功能域, 主要功能为辅酶因子生物合成和翻译功能。

**关键词:**甘蔗; ScCYP450 基因; 电子克隆; 生物信息学

**中图分类号:**TS242.1; Q753 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2014)-02-099-07

## Electronic cloning and characterization of sugarcane ScCYP450 gene using bioinformatics tools

SU Weihua, ZHANG Yuye, HUANG Ning, XIAO Xinhuan, HUANG Long, LUO Jun, QUE Youxiong\*

(Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University/Sugarcane Research & Development Center, China Agriculture Research System, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The present study aims to provide references for research on the experimental cloning, function identification and its application of sugarcane Cytochrome P450 reductase gene. The full-length cDNA sequence of one sugarcane Cytochrome P450 reductase gene termed ScCYP450, was obtained by in silico cloning using CF576130.1 sequence from sugarcane as the probe sequence. Using bioinformatics methods, several characteristics of ScCYP450 encoding amino acids, including the amino acid composition, physical and chemical properties, the subcellular localization, the transmembrane domain structure, hydrophobic/hydrophilic, advanced structure and forecast and plus the functional domains, were analyzed. The result showed that this gene is 1 821 bp length and contains a 744 bp open reading frame, encoding 247 amino acids, and the encoded protein localizes in cells endoplasmic reticulum (film), as the alkaline soluble protein. There is no signal peptide. The secondary structure mostly consists of random coil. ScCYP450 protein contains several conservative functional domains, and the main function of this protein involved in growth factor biosynthesis and transcription.

**Keywords:** Sugarcane; ScCYP450 gene; In silico cloning; Bioinformatics

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 是由一个基因经过复杂的生物进化历程产生的血红素蛋白基因家族<sup>[1]</sup>。细胞色素 P450 酶系在高等植物中执行着包括植物正常生长发育所必需的初级代谢物和

次级代谢物的生物合成等各种不同功能, 同时还参与许多外源性物质包括除草剂等的生物氧化, 此外细胞色素 P450 还原酶可以通过合成黄酮类、香豆素、生物碱等抑制昆虫、微生物和病毒对植物的侵害

收稿日期: 2013-12-07; 修回日期: 2014-03-18.

基金项目: 国家自然科学基金(31340060); 农业部 948 项目(2014-S18); 教育部博士点基金(20103515120006); 福建农林大学杰出青年基金(xjq201202)资助。

作者简介: 苏炜华, 男, 在读本科生, 研究方向: 作物基因资源挖掘及其功能鉴定; E-mail: 410946470@qq.com.

\* 通信作者: 阙友雄, 男, 硕士, 副研究员, 博士, 研究方向: 甘蔗应用基因组学研究; E-mail: queyouxiong@126.com.

从而达到植物保护的作用<sup>[2-4]</sup>。虽然在水稻、小麦及茄科作物等植物已有相关的研究<sup>[5-7]</sup>,但在甘蔗中尚未见相关报道。由于大多数 P450 还原酶在植物体内的含量很低且不稳定,直接分离纯化 P450 还原酶非常困难,因此在克隆 P450 还原酶基因的基础上,研究该基因的表达特征及功能特性,是研究该基因功能的一种重要途径<sup>[8]</sup>。因此,甘蔗细胞色素 P450 还原酶基因的电子克隆和分析具有一定的理论和实践意义。

电子克隆和电子表达分析技术是一种结合了 EST 技术、计算机运算方法和生物信息学手段为一体的新技术,它不仅具有速度快、实验成本低而且还有能为目标基因的实验克隆提供较为精确的参考序列等诸多优点<sup>[9-10]</sup>。利用 NCBI 上某个植物 EST 数据库结合生物信息学的电子克隆和电子表达分析技术已被广泛地应用于快速、高效地分析基因的海量表达信息<sup>[11-13]</sup>。迄今,已有通过电子克隆技术从甘蔗 EST 数据库中获得二氨基庚二酸异构酶基因<sup>[14]</sup>、天冬氨酰半醛脱氢酶基因<sup>[11]</sup>、过氧化氢酶基因<sup>[12]</sup>和几丁质酶基因<sup>[13]</sup>等基因的报道。本实验应用电子克隆方法,以甘蔗中类似细胞色素 P450 还原酶基因的 EST 序列 CF576130.1 作为查询探针,在甘蔗 EST 序列数据库中进行 blast 比对,拼接,直至不再获得新序列,获得甘蔗 ScCYP450 基因的 cDNA 全长序列;而后,应用生物信息学技术预测该基因的结构及功能,同时利用电子表达分析方法,分析该基因的组织特异性表达或在生物或非生物胁迫后的表达模式,以期为后续甘蔗 ScCYP450 基因的实验克隆和功能研究提供较为全面的参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 电子克隆获得甘蔗 ScCYP450 基因序列

以甘蔗中类似细胞色素 P450 还原酶基因的 EST 序列 CF576130.1 为探针,利用 blast 工具对甘蔗 EST 数据库进行检索,从结果中选择与探针序列同源性较高的甘蔗序列,而后使用在线工具 CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) 进行聚类、拼接、延伸,然后以新的重叠群为新探针继续比对检索直至无新的 EST 可供拼接为止。接着使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 查找其开放阅读框。

### 1.2 甘蔗 ScCYP450 基因的生物信息学分析

应用 ORF Finder、Psort 等在线工具进行核酸及

氨基酸序列组成分析、开放阅读框的查找和翻译以及编码蛋白理化性质分析;应用在线工具 ExPASy-ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 对亲水性/疏水性进行分析;信号肽的预测则采用 SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 软件来完成并用 predict protein 数据库 (<http://www.predictprotein.org>) 进行验证;编码蛋白质的亚细胞定位利用 Psort (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 进行预测;蛋白质二级结构和三级结构分别利用 GORIV ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)) 和 SWISSMODEL ([http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling\\_simple1](http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1)) 进行分析;应用 NCBI 中的 CDD (Conserved Domain Database) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白保守结构域预测;而 DNAMAN 软件和 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线工具则用于核酸和氨基酸序列的同源性分析和使用软件 MEGA 对氨基酸序列进行多重比对,并采用邻接法输出其同源性进化树,进行 bootstrap 验证。

### 1.3 甘蔗 ScCYP450 基因的电子表达分析

对同源对比后甘蔗 EST 数据库中与 ScCYP450 基因同源性较高的甘蔗 EST 序列,采用电子表达分析,根据这些 EST 序列的组织来源及其在不同组织中的出现频率以及来源于生物或非生物胁迫材料分析该基因的组织特异性表达和不同胁迫条件下的表达情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 甘蔗 ScCYP450 基因序列的获得

以甘蔗中类似细胞色素 P450 还原酶基因的 EST 序列 (CF576130.1) 作为查询探针,从甘蔗 EST 数据库中比对检索到 16 条与探针序列同源性较高的甘蔗 EST 序列。选择与查询探针同源性最高的甘蔗 CA087647.1 序列,对该 EST 序列聚类 (UniGene) 的 16 条非冗余甘蔗 EST,利用 CAP3 进行拼接组装,然后将获得的 contig 重叠群进行分析及反复检索拼接,最终得到一个 cDNA 全长为 1 821 bp 的甘蔗 P450 基因,记为 ScCYP450。ORF 软件分析显示,该 cDNA 序列包含一个 744 bp 的完整开放阅读框,编码 247 个氨基酸,说明拼接得到了一条完整的 cDNA 序列。图 1 为电子克隆所得的 ScCYP450 基因全长序列。

```

1  GGCAATCGACAGTATGAGCATTTCACCAAGGTTGCCAAGTGGTTGATGATATCCTAACAGACAAGGTGGAAGCGCCTTGTCCAGT
91  TGTCTTGGAGACGATGACCAATGCATTGAGGATGACTTCAACACATGGAAAGAGCTCTCTGGCCAGAGTTGGATCGATTACTCGGGA
181  TGAANAATGATGTCTCTACAGCCACTACATACACAGCTGCTATTCCTGAATACCGAGTTGAATTCATCAAACTGAGGAGCCAGCTCATT
271  GAGAGGAACCTTCAGCCCTTGCAAAATGGCCATGCAGTCCATGATGCCAGCATCCTTGCCAGGCTAATGTGGCTGTGCAGCGGGAGCTCCAC
361  ACTCCTGCTTCTGATCGTTTATGCACTCATTGGAGTTCGACATTGCTGGAAGTGGTCTCACGTATGAAACTGGCGACCATGTTGGTGTA
451  TACACTGAGAACTGCCGTAGGTTGTAGAGGAGCAGAGAGGTTGTGGGCTACTCACCAGACACATTTTCCACCATCCATGCAGACAAA
541  GAGGATGGTACTCCACTAAGTGGTAGTTCTCTGTCTCCATTCCCTCCCGATCACAGTGAGGAATGCATTTGCTAGATATGCCGAC
631  CTTCTAAATTCACCGAAGAAGACTTCTCTGGTTGCATTAGCTACTTATGCTTTCAGATCTGCTGAGGCTGAGCGCTGAGATTCTGGCC
721  TCTGCCGTGGGAAGGATGAGTACGCTCAATGGTGTGGCAAGTCAAAGGAGCCTGGTGGAAATCATGGCAGAGTCCCTTCAGCAAAG
    M A E F P S A K
811  CCTCCACTAGGAGTCTTCTTTCGACGTGTTGCCCTCGTCTTCAACCAAGATATTATTCTATTTCATCTTCCACATGATGGCAGCAACC
    P P L G V F F A A V A P R L Q P R Y Y S I S S S P S M A A T
901  AGGATTCATGTCACATGTGCGCTCGTGCAGAAACAACCCGCTGGAAGGATACATAAGGGAGTCTGCTCAGCTTGGATTAAAGATGCT
    R I H V T C A L V H E T T P A G R I H K G V Q K E S G A E L
991  GTTCCATCGGAAGAGACAAAGGATTGCAGCTGGGCTCCGATATTTGTGAGGCAATCAAACCTCAAACCTACCCGCTGATCCTTCAGTGCCA
    V P S E E S K D C S W A P I F V R Q S N F K L P A D P S V P
1081  ATTATCATGATTGGCCCTGGGACCGGTCTTGCACCTTCCGCGGCTTCTTGCAGGAGAGACTAGCTCAAAAAGAATCTGGAGCTGAGCTT
    I I M I G P G T G L A P F R G F L Q E R L A Q K E S G A E L
1171  GGTCCATCTGTGTTCTTCTTGGATGCAGAAATAGCAAGATGGACTTCATCTATGAGGATGAGCTGAACAATTTCTTGGACAGGAGCA
    G P S V F F F G C R N S K M D F I Y E D E L N N F L E Q G A
1261  CTGCTGAGCTGGTCTCGCCTTCTCGCGTCAAGGAAATATGTCACAAACAGAAATGGCAGAGATGTCACATGAGTCTGAAATCTGG
    L S E L V L A F S R Q G P T K E Y V Q H K M A Q K A S E I W
1351  GACATGATCTCAAAGGTGCTTACATCTATGCTGTGGTGTGCGAAAGGATGGCCAGAGATGTACATAGAGTTCTCCACACCATGTT
    D M I S K G A Y I Y V C G D A K G M A R D V H R V L H T I V
1441  CAGGAGCAGGCTCCCTCGACAGTCTAAAGCCGAGAGCTTTGTGAAGAATCTCCAAATGGAGGCGAGATATCTGAGGGATGTGTGGTAA
    Q E Q G S L D S S K A E S F V K N L Q M E G R Y L R D V W *
1531  AAGGGGAGACGATGTTGAAATATGAAAAAACTGGTATTTCAGGGGATAAATTCATTTCGATTTACACATGTGTACAACATTACCAGGA
1621  AGAGTACTGACAATGGACTAGATCTGATATTTTATGGTTCTGATTTTATTTTATTTTATTTTCTCTCTTTTGTCTTTTGTCTTTT
1711  CTCAAGAGTTTTTTTATTTCTTTTGTCTTTGAGGTTCTCTCAAGAGTTTTTTTTTACCTATGATTATATATTCTTTATATTATGTATAA
1800  GATGAGGACAATTTTGGCAAT
    
```

图 1 电子克隆获得的甘蔗 ScCYP450 基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列 (\* 终止密码子)

Fig.1 Nucleotide acid sequence and deduced amino acid sequence of sugarcane ScCYP450 gene obtained by in silico cloning (\* stop codon)

### 2.2 甘蔗 ScCYP450 基因编码氨基酸的一级结构预测

甘蔗 ScCYP450 基因编码氨基酸的一级结构预测见表 1。从表 1 中可以看出,该基因等电点 (PI) 为 8.24,不稳定系数为 46.40,平均疏水性 (GRAVY) 为 -0.174。由于当一个蛋白质的不稳定系数 > 40 时,蛋白质不稳定,故甘蔗 ScCYP450 基因编码的蛋白质为亲水的不稳定碱性蛋白质。

### 2.3 甘蔗 ScCYP450 蛋白二级结构预测和分析

通过在线软件 GORIV 对甘蔗 ScCYP450 蛋白进行二级结构预测,结果显示该蛋白质二级结构主要为无规则卷曲,无规则卷曲占的比例为 47.37%, $\alpha$ -螺旋和延伸链分别占 36.44 和 16.19% (见图 2、表 2)。

表 1 ScCYP450 的一级结构预测分析

Table 1 Primary structure analysis of ScCYP450

| ScCYP450 一级结构特性  | 预测结果                                   |
|------------------|--|
| 编码的氨基酸数 (个)      | 247                                    |
| 等电点 (PI)         | 8.24                                   |
| 分子量 (MW) /Da     | 27 394.4                               |
| 负电荷残基 (Asp+Glu)  | 25                                     |
| 正电荷残基 (Arg +Lys) | 27                                     |
| 分子式              | $C_{1229}H_{1905}N_{333}O_{352}S_{13}$ |
| 不稳定系数 (II)       | 46.40                                  |
| 平均疏水性 (GRAVY)    | -0.174                                 |
| 脂肪系数 (AI)        | 77.04                                  |

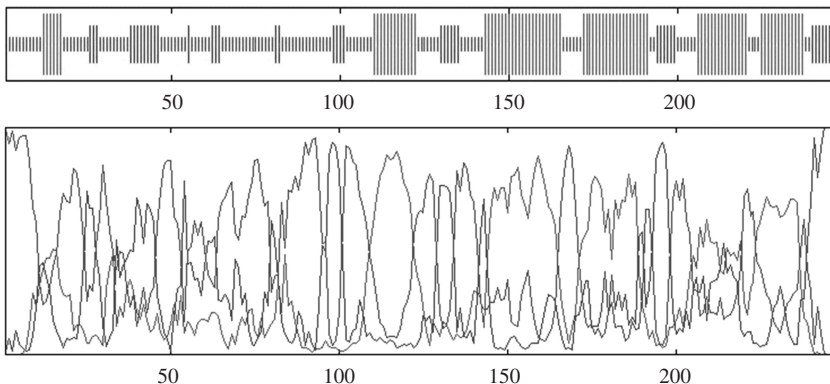


图 2 甘蔗 ScCYP450 蛋白二级结构预测

Fig.2 Predicted secondary structure of sugarcane ScCYP450 protein

表2 甘蔗 ScCYP450 蛋白二级结构预测分析

Table 2 Secondary structure prediction of sugarcane ScCYP450 protein

| 二级结构类型  | 氨基酸残基数目(个) | 百分比(%) |
|---------|------------|--------|
| α-螺旋    | 90         | 36.44  |
| Beta 折叠 | 40         | 16.19  |
| 无规则卷曲   | 117        | 47.37  |
| Beat 转角 | 0          | 0      |

## 2.4 甘蔗 ScCYP450 蛋白信号肽预测和分析

使用 SignalP 4.0 Server 软件对甘蔗 ScCYP450 蛋白进行信号肽预测,结果如图 3 和表 3 所示,预测 ScCYP450 基因所编码的蛋白不含有信号肽,说明此蛋白为非分泌蛋白且不具有信号识别功能。该结果与 PredictProtein 数据库(<http://www.predicprotein.org>)分析的结果一样。

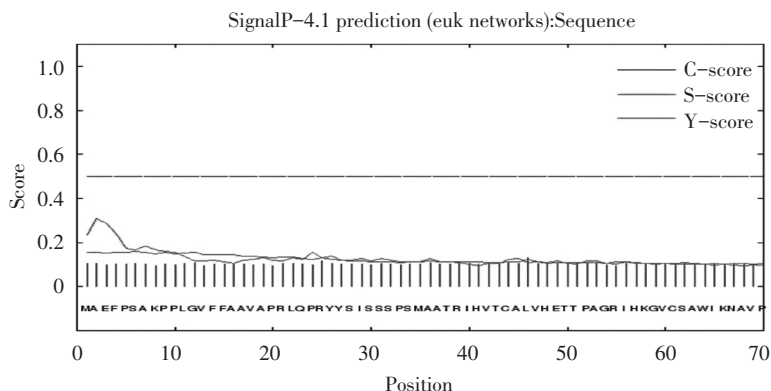


图3 甘蔗 ScCYP450 蛋白信号肽预测

Fig.3 Signal P-NN prediction for sugarcane ScCYP450 protein

表3 甘蔗 ScCYP450 蛋白信号肽预测

Table 3 Signal P-NN prediction for sugarcane ScCYP450 protein

| 指标     | 位点  | 分值 | 有无信号肽 |
|--------|-----|----|-------|
| max.C  | 1   | 0  |       |
| max.S  | 1   | 0  |       |
| max.Y  | 1   | 0  |       |
| mean S | 1-0 | 0  |       |
| D      | 1-0 | 0  | NO    |

注: C score:原始剪切位点的分值; S score:信号肽的分值; Y score:综合剪切位点的分值; S-mean :信号肽分值的平均值; D score: S mean 和 Y-max 的加权平均值。

Notes: C score:scores of putative cleavage site; S score: scores of signal peptide; Y score: scores of synthesis cleavage site S-mean: the average of the S-score; D score: the weighted average of the S-mean and the Y-max scores.

## 2.5 甘蔗 ScCYP450 蛋白疏水性\亲水性的预测和分析

根据蛋白的平均疏水性(GRAVY)值对甘蔗 ScCYP450 蛋白质进行预测,GRAVY 值通常在 2~-2, 当该值大于零时,蛋白为疏水蛋白;当该值小于零时,蛋白为亲水蛋白。使用 ExPASy-ProtScale 在线软件,对 ScCYP450 基因所编码氨基酸序列的疏水性/亲水性进行预测,结果显示:ScCYP450 蛋白的 GRAVY 值为-0.174,推测该蛋白为一种亲水蛋白,其中第 15 位具有最高分值,为 2.533,疏水性最强;第 171 位具有最低分值,-2.244,亲水性最强。

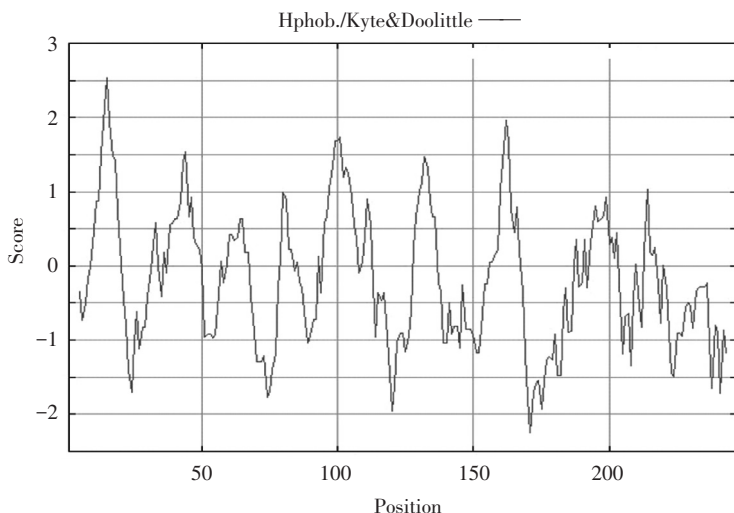


图4 甘蔗 ScCYP450 蛋白氨基酸疏水性/亲水性预测

Fig.4 Predicted hydrophobicity/hydrophilicity of the amino acid sequence of sugarcane ScCYP450 protein

### 2.6 甘蔗 ScCYP450 蛋白三级结构预测

使用 PyMOLWin 软件查看 SWISS-MODEL 工具的预测模型,结果如图 5 所示:ScCYP450 蛋白的空间结构以无规则卷曲和螺旋为主。比较 Sc-

CYP450、高粱、玉米和粟米蛋白的三级空间结构虚拟图,结果显示甘蔗 ScCYP450 的三级空间结构与高粱、玉米和粟米蛋白的三级空间结构高度相似。

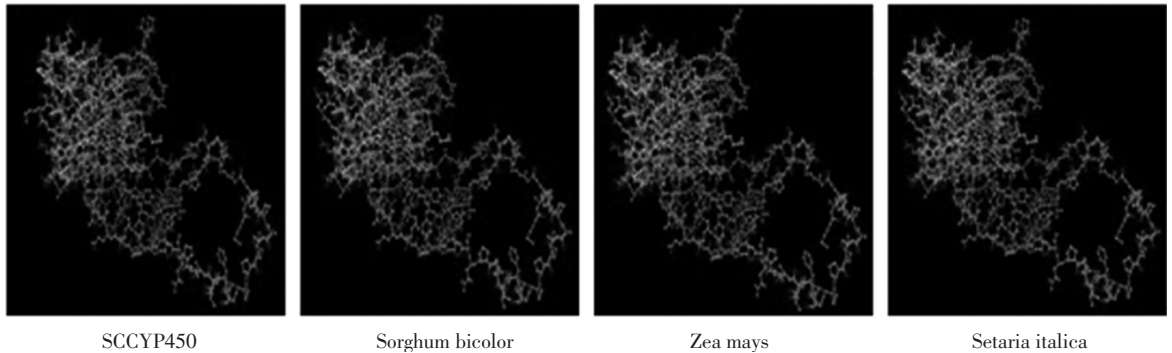


图 5 甘蔗 ScCYP450 蛋白三级结构预测

Fig.5 Predicted third structure of sugarcane ScCYP450 protein

### 2.7 甘蔗 ScCYP450 蛋白的功能预测

使用 Profun 2.2 Server 对甘蔗 ScCYP450 及相似性高近缘的高粱 CYP450 蛋白进行功能预测,结果如表 4 所示,CYP450 蛋白在甘蔗和高粱中功能预测结果都是为生长因子的可能性最高,转录功能次之。故推测甘蔗 ScCYP450 蛋白具有生长因子及转录功能,高粱蛋白在功能上亦具有相似性与其亲缘关系相符,表明该蛋白在功能上具有一定的保守性。

表 5 甘蔗 ScCYP450 蛋白的亚细胞定位

Table 5 Subcellular location of ScCYP450 prptein

| 亚细胞定位   | 概率    |
|---------|-------|
| 内质网(膜)  | 0.550 |
| 微小体     | 0.202 |
| 溶酶体     | 0.190 |
| 内质网(内腔) | 0.100 |

表 4 甘蔗 ScCYP450 及高粱的蛋白功能预测

Table 4 Function prediction for sugarcane ScCYP450 protein and Sorghum bicolor

| 基因本体论范畴 | ScCYP450 | 高粱    |
|---------|----------|-------|
| 生长因子    | 0.742    | 0.372 |
| 转录      | 0.403    | 0.325 |
| 信号传感器   | 0.349    | 0.246 |
| 离子通道    | 0.317    | 0.201 |

### 2.9 甘蔗 ScCYP450 蛋白的保守结构域分析

使用 NCBI 中的 CDD (Conserved Domain Database) 数据库,对 ScCYP450 蛋白的保守结构域进行预测分析,结果如图 6 所示:该蛋白属于 CysJ 多区域蛋白中的类似铁氧还蛋白还原酶基因超家族 (FNR\_like superfamily),含有多个非特异性的保守结构域,如 NADPH cytochrome p450 reductase (CYPOR)、Cytochrome p450-like alpha subunits of E. coli sulfite reductase (SiR)、Human methionine synthase reductase (MSR) 等。其中 NADPH cytochrome p450 reductase (CYPOR) 含有黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 结合位点<sup>[16]</sup>。

### 2.8 甘蔗 ScCYP450 蛋白的亚细胞定位

使用 Psort 在线软件,对 ScCYP450 蛋白进行亚细胞定位,结果如表 5 所示:甘蔗 ScCYP450 蛋白可能定位于内质网(膜)中,这与红豆杉 P450 还原酶定位于内质网上的结论是一致的<sup>[15]</sup>。

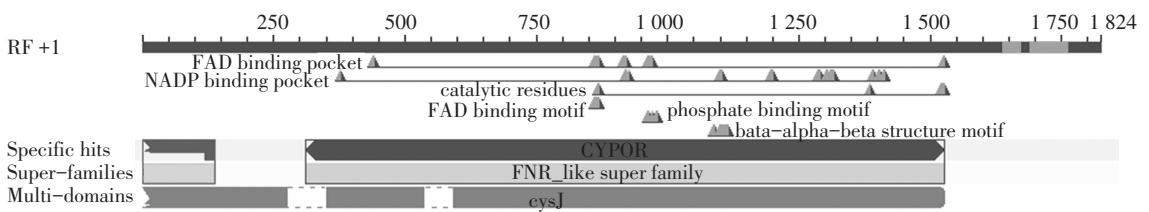


图 6 甘蔗 ScCYP450 蛋白的保守结构域分析

Fig.6 Conserved domain prediction of ScCYP450 protein

## 2.10 甘蔗 ScCYP450 蛋白的氨基酸序列同源性分析和系统进化树构建

使用 NCBI 中的 Blastp 程序,对甘蔗 ScCYP450 蛋白的氨基酸进行同源性分析,结果显示该蛋白与高粱 (*Sorghum bicolor* | XP 002444097.1 |)、玉米 (*Zea mays* | NP 001136741.1 |)、粟米 (*Setaria italica* | XP 004973052.1 |)、水稻 (*Oryza sativa* Japonica Group | BAD05443.1 |)、碧桃 (*Prunus persica* | EMJ28645.1 |)、桑属 (*Morus notabilis* | EXB54742.1) 和三角叶杨 (*Populus trichocarpa* | ERP49886.1 |) 蛋白的氨基酸序列相似性分别为 99%、96%、96%、92%、86%、85%

和 84%。

使用软件 MEGA 软件对甘蔗 ScCYP450 蛋白的氨基酸序列与上述 8 个近缘物种的氨基酸序列进行多重比对,并采用邻接法输出其同源性进化树,进行了 bootstrap 验证。结果显示甘蔗 ScCYP450 蛋白与高粱中该蛋白的亲缘关系最近,相似性达到 99%,而与双子叶植物碧桃、桑属、三角叶杨的亲缘关系相对较远(见图 7)。在前文高粱的蛋白功能以及蛋白三级结构上与甘蔗 ScCYP450 蛋白具有较高的相似性,从侧面反映了二者的具有较高的同源性和较近的亲缘关系。

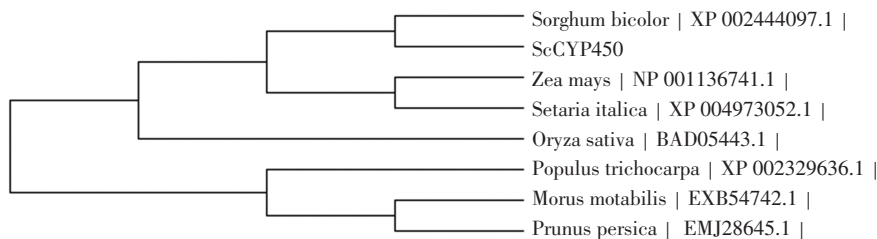


图 7 用邻接法(NJ)构建的八个物种ScCYP450蛋白的系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree of ScCYP450 protein sequence from 8 different plants

## 2.11 甘蔗 ScCYP450 基因的电子表达分析

电子表达分析结果表明,甘蔗 ScCYP450 基因在甘蔗根尖、种子、分生组织和茎中组成型表达,其中在分生组织中的表达量比其他组织类型中表达量高(见表 6,图 8)。说明该基因的表达可能与植物的生理功能或生长机制有关。

表 6 甘蔗 ScCYP450 基因电子表达分析的 EST 分类结果

Table 6 EST classification results analysis

| 基因名      | EST 序列 | 组织类型 | 数量 |
|----------|--------|------|----|
| ScCYP450 | 16     | 根    | 4  |
|          |        | 种子   | 3  |
|          |        | 分生组织 | 7  |
|          |        | 茎    | 3  |

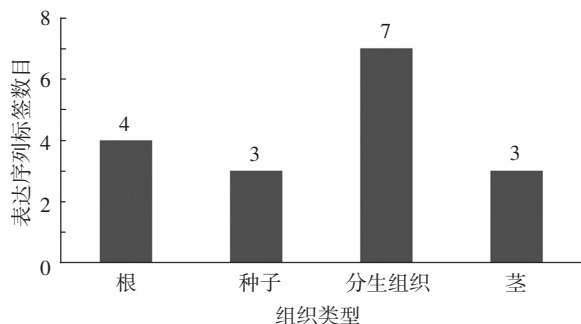


图 8 甘蔗 ScCYP450 基因电子表达分析结果

Fig.8 The electronic expression analysis result of ScCYP450 gene

## 3 结论

本研究应用电子克隆技术并结合生物信息学分析技术,得到甘蔗细胞色素 P450 还原酶基因的 cDNA 全长。该基因全长 1 821 bp,编码 247 个氨基酸,等电点为 8.24,分子量为 2.73 kDa。其二级结构主要为无规则卷曲和  $\alpha$  螺旋,与小麦 Cyp450 基因的电子克隆与生物信息学分析报道中的蛋白二级结构以无规则卷曲(33.86%)和  $\alpha$  螺旋(48.14%)为主的结果相一致<sup>[17]</sup>。结合该蛋白等电点、不稳定系数及信号肽等分析结果可推测,该蛋白为不含信号肽的不稳定碱性蛋白。ScCYP450 蛋白属于铁氧还蛋白还原酶基因超家族(FNR\_like superfamily),具有叶绿体还原酶活性,参与电子传递,已经被证明参与氮同化,氮气固定、类固醇羟基化,脂肪酸代谢等多种代谢途径<sup>[18]</sup>。甘蔗 CYP450 蛋白与已研究的中国红豆杉中细胞色素 P450 还原酶结果大致相同,并有着相同的亚细胞定位结果:定位在内质网中;在研究结果中还提到该蛋白起着电子传递的作用<sup>[15]</sup>。根据细胞色素 P450 还原酶的相关报道及本研究软件分析结果推测该基因编码的蛋白质功能定位于生长因子和转录功能。蛋白质氨基酸同源性分析并对进化树进行 bootstrap 验证,可知甘蔗 ScCYP450 蛋白与高粱蛋白亲缘关系最为接近且二者之间的三级

结构、蛋白功能相似度较高,这也从一定程度上验证了高粱与甘蔗的亲缘关系最近,聚为一类,同为禾本类植物该类蛋白氨基酸序列总体上较为保守且蛋白功能上也较为保守。此外,在对该基因电子表达分析中,结果表明其主要表达在分生组织中,推测该基因可能与细胞分裂生长或植物生长调节有关。但是,由于目前甘蔗 EST 数据库中没有检索到该基因在生物或非生物逆境胁迫下特异表达的 EST 序列,也就无法通过电子表达分析技术探讨该基因在生物或非生物逆境胁迫下的表达特征或特性,需待 EST 数据库不断丰富结合试验进行验证。综上,本研究为后续甘蔗 ScCYP450 基因的实验克隆和功能研究及其进一步的应用提供一定的参考依据。

## 参考文献(References)

- [1] GUENGERICH F P. Cytochrome p450 and chemical toxicology[J]. Chem. Res. Toxicol, 2008, 21(1): 70-83.
- [2] CHEFSON A, AUCLAIR K. Progress towards the easier use of P450 enzymes[J]. Mol Biosyst, 2006, 10(10): 462-469.
- [3] CHEFSON A, ZHAO J, AUCLAIR K. Replacement of natural cofactors by selected hydrogen peroxide donors or organic peroxides results in improved activity for CYP3A4 and CYP2D6[J]. Chembiochem, 2006, 6(6): 916-919.
- [4] CHEFSON A, AUCLAIR K. CYP3A4 activity in the presence of organic cosolvents, ionic liquids, or water-immiscible organic solvents[J]. Chembiochem, 2007, 10(10): 1189-1197.
- [5] 刘惠君,徐冬梅,田宝莲,等.水稻细胞色素 P450 对酰胺类除草剂催化代谢研究[A].第四届全国环境化学学术大会论文汇编[C].南京:南京大学环境学院,2007. LIU Huijun, XU Dongmei, TIAN Baolian, et al. Metabolic studies of cytochrome P450 catalytic rice amide herbicides [A]. Fourth National Conference of Environmental Chemistry Academic Paper Series[C]. NanJing: School of Environment, Nanjing University, 2007.
- [6] 高宗军.甲基二磺隆敏感与耐性小麦细胞色素 P450 对比研究[D].北京:中国农业大学,2005. GAO Zongjun. Takatoshi sense dimethyl sulfur comparative study with cytochrome P450 cell tolerance in wheat [D]. BeiJing: China Agricultural University, 2005.
- [7] 张昊,戴素明,谢丙炎.细胞色素 P450 在茄科作物中的研究进展[J].作物研究,2007,21(2): 132-136. ZHANG Hao, DAI Suming, XIE Bingyan. Progress in cytochrome P450 solanaceae crops [J]. Crop Research, 2007, 21(2): 132-136.
- [8] CHAPPLE C. Molecular genetic analysis of plant cytochrome p450 dependent monooxygenases [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 311-343.
- [9] 陈儒钢,巩振辉,逯明辉,等.植物基因克隆技术的发展与展望[J].长江蔬菜,2009,(20): 13-18. CHEN Rugang, GONG Zhenhui, LU Minghui, et al. Development and prospect of plant cloning technology [J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2009, (20): 13-18.
- [10] 王冬冬,朱延明,李勇,等.电子克隆技术及其在植物基因工程中的应用[J].东北农业大学学报,2006,37(3): 403-408. WANG Dongdong, ZHU Yanming, LI Yong, et al. Electronic cloning technology and its application in plant genetic engineering [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2006, 37(3): 403-408.
- [11] 黄宁,张玉叶,苏亚春,等.甘蔗天冬氨酰半醛脱氢酶基因的电子克隆与分析[J].生物信息学,2013,11(2): 91-99. HUANG Ning, ZHANG Yuye, SU Yachun, et al. Sugarcane aspartyl semialdehyde dehydrogenase gene cloning and analysis of electronic [J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2013, 11(2): 91-99.
- [12] 陈珊珊,郭晋隆,李国印,等.甘蔗过氧化氢酶基因的电子克隆及生物信息学分析[J].生物信息学,2012,10(1): 65-70. CHEN Shanshan, GUO Jinlong, LI Guoyin, et al. Electronic cloning and bioinformatics analysis of sugarcane catalase gene [J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2012, 10(1): 65-70.
- [13] 苏亚春,李国印,阙友雄,等.甘蔗几丁质酶基因的电子克隆与生物信息学分析[J].生物信息学,2011,9(4): 322-330. SU Yachun, LI Guoyin, QUE Youxiong, et al. Electronic cloning and bioinformatics analysis of sugarcane chitinase genes [J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2011, 9(4): 322-330.
- [14] 黄宁,张玉叶,凌辉,等.甘蔗二氨基庚二酸异构酶基因的克隆与表达分析[J].热带作物学报,2013,(11): 2200-2208. HUANG Ning, ZHANG Yuye, LING Hui, et al. Cloning and expression analysis of genes cane diamino pimelate isomerase [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2013, (11): 2200-2208.
- [15] 阮仁余,孔建强,郑晓东,等.中国红豆杉细胞色素 P450 还原酶的基因克隆、表达与活性分析[J].遗传,2010,32(11): 1187-1194. RUAN Renyu, KONG Jianqiang, ZHENG Xiaodong, et al. Cloning Chinese yew cytochrome P450 reductase, expression and activity analysis [J]. Hereditas, 2010, 32(11): 1187-1194.
- [16] MARCHLER-BAUER A, LU S, ANDERSON J B, et al. A conserved domain database for the functional annotation of proteins [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(D): 225-229.
- [17] 武安泉,王俊生,张玉玺,等.小麦 Cyp450 基因的电子克隆与生物信息学分析[J].中国农学通报,2013,(18): 38-44. WU Anquan, WANG Junsheng, ZHANG Yuxi, et al. Electronic cloning and bioinformatics analysis of genes in wheat Cyp450 [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, (18): 38-44.
- [18] MARCHLER-BAUER A, ZHENG C, CHITSAZ F, et al. Conserved domains and protein three-dimensional structure [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(D1): 384-352.