

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.01187

# 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

阮仁余<sup>1,2</sup>, 孔建强<sup>1</sup>, 郑晓东<sup>1</sup>, 张书香<sup>1</sup>, 秦成蕴<sup>1</sup>, 程克棣<sup>1</sup>, 王建明<sup>2</sup>, 王伟<sup>1</sup>

1. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 卫生部天然药物生物合成重点实验室, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100050;
2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040

**摘要:** 细胞色素 P450 还原酶(Cytochrome P450 reductase, CPR)是细胞色素 P450 羟化酶电子传递链的组成部分, 在生物体内起着重要的电子传递作用。文章从中国红豆杉(*Taxus wallichiana* var. *Chinensis*)愈伤组织细胞中克隆 CPR 基因(*TchCPR*), *TchCPR* 含有一个 2 154 bp 碱基的阅读框, 编码 717 个氨基酸残基; 在氨基酸水平上它与裸子植物细胞色素 P450 还原酶的同源性(>82%)高于其他被子植物的细胞色素 P450 还原酶(<74%)。在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达了全长和从 N-端截短不同数目氨基酸残基的 6 个融合肽段, 经亲和层析纯化, 分析了表达的不同长度融合蛋白的电子传递效率。结果表明截短长度大于 61 个氨基酸残基肽段的胞色素 P450 还原酶都能够诱导表达, 在表达水平上无显著差异, 而截短 61 个氨基酸的 CPR 融合蛋白电子传递的催化活性(1.6057 nmol Cyt C<sub>red</sub>/min/μg TchCPR 融合蛋白)高于其他 4 个融合蛋白。

**关键词:** 中国红豆杉; 细胞色素P450 还原酶; 诱导表达

## cDNA cloning, heterologous overexpression and activity analysis of cytochrome P450 reductase of *Taxus Chinensis*

RUAN Ren-Yu<sup>1,2</sup>, KONG Jian-Qiang<sup>1</sup>, ZHENG Xiao-Dong<sup>1</sup>, ZHANG Shu-Xiang<sup>1</sup>,  
QIN Xian-Yun<sup>1</sup>, CHENG Ke-Di<sup>1</sup>, WANG Jian-Ming<sup>2</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products, Ministry of Health of PRC, Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education of PRC, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;
2. Academy of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

**Abstract:** NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR), a partner for P450 monooxygenases, serves as the electron donor to almost all eukaryotic cytochrome P450s. One cDNA (*TchCPR*) encoding cytochrome P450 reductase of *T. chinensis* was isolated from callus cells. The cDNA contains an open reading frame of 2 154 nucleotides which encodes a protein of 717 amino acid residues. The TchCPR has higher similarity to other CPRs of gymnosperms (>82%) than that of angiosperms (<74%). The recombinant full-length TchCPR and a series of N-terminal truncated constructs with N-terminal fusion of His Tag were obtained and induced to express in *E. coli* BL21(DE3), and then purified using affinity chromatography. The truncated forms of N-terminal more than 61 amino acid residues could be efficiently expressed while the truncated mutant of

收稿日期: 2010-03-31; 修回日期: 2010-06-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30772677)和北京市自然科学基金项目(编号: 5072038)资助

作者简介: 阮仁余(1985-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 药剂学。E-mail: rayrenyu@sina.com

通讯作者: 王伟(1970-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 药物生物技术。E-mail: wwang@imm.ac.cn

N-terminal 48 amino acid residues and the wild-type TchCPR were not successfully expressed in *E. coli* cells. The activity of the truncated TchCPR was assayed by measuring the reduction of cytochrome C. The electron transfer activity of the recombinantly purified CPRT61 was 1.6057 nmol of cytochrome C reduced per min per  $\mu\text{g}$  TchCPR reductase, and it is higher than that of the other four truncated forms.

**Keywords:** *T. chinensis*; cytochrome P450 reductase; induced expression

植物能够合成大量具有生物活性的天然产物,目前已鉴定了 20 多万个不同结构的化合物<sup>[1]</sup>。细胞色素 P450 单氧化酶(Cytochrome P450 monooxygenases, P450s)是参与催化天然产物合成的一类含有血红素的氧化酶类,在体内可催化许多初级和次级代谢反应,如植物激素和次生代谢产物的生物合成及除草剂等外源化学物质的脱毒<sup>[2]</sup>。这类酶催化反应是通过电子传递系统,将电子从 NAD(P)H 转移到微粒体系统中的 NADPH-细胞色素 P450 还原酶,或铁氧蛋白还原酶,然后到细胞色素 P450s; 这样使得分子氧( $\text{O}_2$ )还原活化,随后将一个氧原子插入底物。其中细胞色素 P450 还原酶(Cytochrome P450 Reductase, CPR)是细胞色素 P450 酶系中重要的功能单位。在生物体内,细胞色素 P450 还原酶是 P450s 主要的电子供体,它与 P450s 的电子传递反应是 P450s 氧化还原反应的限速步骤。CPR 将电子供体 NAD(P)H 的电子经过 FAD 和 FMN 2 个辅基传递给 P450s, 然后 P450s 才能与底物发生氧化还原反应<sup>[3]</sup>。

目前已有 50 多个细胞色素 P450 还原酶基因分别从绿豆(*Vigna radiata*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)、长春花(*Catharanthus roseus*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等植物中克隆和鉴定<sup>[4~7]</sup>, 这些酶在氨基酸水平上彼此间具有较高的同源性(65%~80%), 而它们与来自动物和真菌的 CPR 同源性较低(30%~40%)<sup>[8, 9]</sup>。CPR 是一个定位于内质网上的膜结合蛋白,除含有结合 P450 羟基化酶的结构域外,还含有 3 个与辅因子(FMN、FAD、NADPH)结合的结构域及 1 个连接 FMN 结构域和 FAD/NADPH 结构域的连接区。通常 CPR 电子传递能力的活性分析需要与具有催化活性的 P450s 在酵母细胞中共表达,然后制备微粒体进行体外的催化反应<sup>[10, 11]</sup>; CPR 在大肠杆菌中的表达则需要与 P450s 构建成融合基因,然后制备融合蛋白进行活性分析<sup>[12, 13]</sup>; 最近 Guengerich 等<sup>[14]</sup>根据 CPR 结合并传递电子给细胞色素 C(Cytochrome C,

Cyt C)的特点建立了分析 CPR 电子传递活性的方法。

本实验室从中国红豆杉(*Taxus wallichiana* var. *Chinensis*)愈伤组织细胞中成功地克隆了细胞色素 P450 还原酶基因(Cytochrome P450 reductase, TchCPR),它是红豆杉属植物中参与抗肿瘤药物紫杉醇生物合成过程中多步羟基化反应的唯一电子传递 CPR。此前已报道了同属的东北红豆杉(*T. cuspidata*)CPR 基因的克隆及其在酵母中的功能表达<sup>[15]</sup>。本文研究了中国红豆杉 CPR 基因不同长度的片段在大肠杆菌中的诱导表达、纯化及其电子传递活性的分析,为建立具有高效的电子传递和羟基化反应的紫杉醇中间体代谢工程途径奠定理论基础和提供实践借鉴。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

中国红豆杉(*T. chinensis*)培养细胞系由本实验室保存,该细胞系的紫杉烷类化合物含量高达干重的 2%~3%。选取接种 12 d 的愈伤组织细胞用于实验研究。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 中国红豆杉 CPR 基因的克隆

中国红豆杉细胞总 RNA 的提取方法参考文献[16],提取总 RNA,用 Invitrogen 公司 ThermoScript RT-PCR system 逆转录成 cDNA。根据已发表的东北红豆杉 CPR 基因序列设计合成引物(表 1)。以红豆杉细胞 cDNA 为模板,用引物 CPR1/6 配对进行第一轮 PCR,扩增程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 50  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  2.5 min, 30 个循环; 最后再 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。然后以第一轮 PCR 产物为模板,再分别用引物 CPR2/3、CPR4/5 配对进行 NEST-PCR。扩增程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 50  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 30 个循环; 最后再 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。将扩增获

表 1 用于 *CPR* 基因克隆和位点修饰的寡核苷酸引物

| 引物名称    | 引物序列(5 3 )   |
|---------|--|
| CPR1    | CGTACTCAGCTATACTCTGTCCCTC                                    |
| CPR2    | GGGATCCATGCAGGCTAATTCCAACACGGTGG                             |
| CPR3    | AGGTGTATGAAGCTCTCTTCTCACT                                    |
| CPR4    | GCAAAATGGCCAAGCTGTTTATGAT                                    |
| CPR5    | A <u>ACTAGTTC</u> ACCATATATCTCGTAAGTATC                      |
| CPR6    | CGTACTCAGCTATACTCTGTCCCTC                                    |
| CPR7    | AGGATATCGGATCCGAATTCCTCGAGGGTGGCGGTGGCGGTC                   |
| CPR8    | TCCTCGAGGGTGGCGGTGGCGGTCAGGCTAATTCCAACACGGTGG                |
| CPR9    | CAAAGCCGAGCCGGTCATGGCTCCCAGATCCCCTCCCTTGCCGTTCAACA           |
| CPR10   | GCCATGACCGGCTCGGCTTTGATTTTGACGGAAAATTCACAGAATTTGATG          |
| CPR11   | GAGATCAGAAAGCCAAGGCTCCCTCTCCTTGCCC                           |
| CPR12   | GGATTTGCCAAGGCTTTAGCAGAAAGAGGCAAAGGC                         |
| CPR13   | GAGGGAGCCTTGGCTTTCTGATCTCACTTATGGGGTGTTTGG                   |
| CPR14   | GGGTGATGGATATCATAAACAGCTTGGCCATTTTGC                         |
| CPR15   | AGCTGTTTATGATATCCATCACCCCTGCCGCTCTAATGTGGCAGTGCG             |
| CPR16   | GCCGCTCTAATGTGGCAGTGCGTCGCGAGCTTCATACACCTTTGTCTG             |
| CPR17   | TTCCCGGGCTGGGCCCCGTAAACAAGAGCACA                             |
| CPR18   | GTTTACGGGCCC <u>GTTAAC</u> CGGTCGCATTACAAAGGTGTTTGTTCTAACTGG |
| CPR19   | TTCACAAAGGTGTTTGTTCTAACTGGATGAAAAATTCGCTACCCTCAGAAGA         |
| CPR_T48 | TCCGAATTCCTCGAGGGTGGCGGTGGCGGTACGGAATAATTCACAGAATTTGA        |
| CPR_T61 | TCCGAATTCCTCGAGGGTGGCGGTGGCGGTTTGGCTGTTTGGTTGCGTGTG          |
| CPR_T71 | TCCGAATTCCTCGAGGGTGGCGGTGGCGGTTTCGTTTGGAGGAGGGGAGGAT         |
| CPR_T75 | TCCGAATTCCTCGAGGGTGGCGGTGGCGGTAGGGGAGGATCGGATACGCA           |
| CPR_T89 | TCCGAATTCCTCGAGGGTGGCGGTGGCGGTCCTCTGGTGAAGGAGGAAG            |
| CPR_T95 | TCCGAATTCCTCGAGGGTGGCGGTGGCGGTGATGAGGAGGAAGAAGACGAT          |
| CPR20   | GGGCTCCCCATCTCCATACG-3'                                      |

注：下划线表示用于 DNA 亚克隆的限制性内切酶位点，分别是：CPR2 为 *Bam*H I，CPR5 为 *Spe* I，CPR7 为 *Xho* I，CPR14 为 *Eco*R V，CPR15 为 *Eco*R V，CPR17 为 *Sma* I，CPR18 为 *Hpa* I，既方便于 DNA 片段的定向亚克隆，又实现了基因编码的同义突变。

得的 DNA 片段克隆到 pGEM-T (Promega 公司)载体上，选取阳性克隆进行测序。

1.2.2 系统进化分析

根据克隆基因的碱基序列推测其编码的氨基酸残基序列，利用 GenBank Protein blast 进行比对分析，寻找序列相似性较高的物种的 *CPR* 基因，采用 ClustalX1.83 进行多序列比对，然后把比较结果输入 PAUP\*4.0b10，采用 Neighbor-Joining(NJ)法进行系统进化分析。

1.2.3 融合表达载体的构建

克隆的 *CPR* 基因含有多个常用的限制性内切酶位点，为方便 DNA 片段的亚克隆和后续研究，设计合成引物 CPR7-CPR19(表 1)以获得具有适宜位点不同长度的基因片段，过程如图 1 所示：首先利用引

物 CPR8/9、CPR10/11 配对扩增，然后纯化扩增片段进行补平反应，再以补平反应的产物为模板，用引物 CPR7/11 配对扩增得到 5'-端的 600 bp 的 DNA 片段。中间 1 224 bp 的 DNA 片段的获得是利用引物 CPR12/11、CPR13/14、CPR16/17 配对扩增，其中引物 CPR15 与 CPR16 有重叠序列需要利用引物 CPR15/17 配对，以引物对 CPR16/17 扩增的产物为模板再次 PCR 扩增，这 3 个片段补平反应后再用引物 CPR12/17 配对扩增得到 *CPR* 基因中间的 DNA 片段。同样方法扩增得到 3'-端的 594 bp 的 DNA 片段，通过上述 PCR 扩增得到的 DNA 片段分别利用限制性内切酶 *Nhe* 、*Eco*R 、*Sma* /*Hpa* 依次进行拼接得到完整的 *CPR* 基因阅读框；然后用内切酶 *Bam*H 和 *Sal* 亚克隆到用 *Bam*H 和 *Xho* 酶切的表达载体 pET-32a(+) (Novagen 公司)中，得到表达

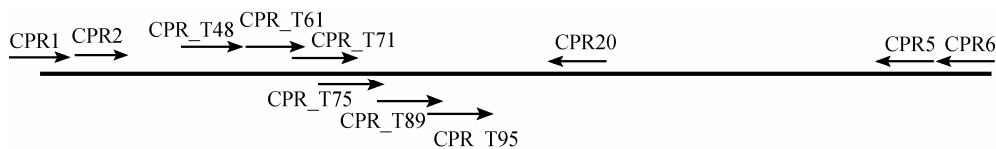


图 1 中国红豆杉 CPR 基因不同长度 DNA 片段的 PCR 扩增策略

载体 pET-CPR; 利用 PCR 方法在 CPR 的 N-端引入了 5 个甘氨酸肽段, 包括载体自身的融合肽段在内诱导表达的 CPR 融合蛋白的 N-端融合了 174 个氨基酸残基。N-端截短的 CPR 融合表达载体的构建采用引物 CPR\_T48/CPR20、CPR\_T61/20、CPR\_T71/20、CPR\_T75/20、CPR\_T89/20、CPR\_T95/20(表 1)配对 PCR 扩增, 利用限制性内切酶 *Xho* 和 *Nhe* 酶切质粒 pET-CPR 置换相应的 DNA 片段, 得到 6 个截短不同长度肽段的表达载体 pET-CPRT48、pET-CPRT61、pET-CPRT71、pET-CPRT75、pET-CPRT89、pET-CPR T95。把上述融合表达载体转化宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3)进行融合蛋白的诱导表达。

#### 1.2.4 Tch 融合蛋白的诱导表达和纯化

TchCPR 融合蛋白的诱导表达和纯化按照本实验室建立的诱导表达条件进行<sup>[17]</sup>。分别挑取含有全长基因及 6 个不同长度基因片段的重组菌单克隆接种到氨苄青霉素浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 20 mL LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养约 6 h, 按 1% 接种量转接到 100 mL LB 培养基(含氨苄青霉素浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )中继续培养至  $OD_{600}$  为 0.6~1, 加入 IPTG(异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷)至终浓度为 0.5 mmol/L, 在 16  $^{\circ}\text{C}$  诱导培养 16~20 h, 离心收集菌体。

为检测 TchCPR 融合蛋白表达情况, 取出 1.5 mL 培养物离心得到沉淀, 用 150  $\mu\text{L}$  无菌水重悬沉淀, 超声波破碎细胞, 12 000 r/min 离心去沉淀, 取 10  $\mu\text{L}$  可溶蛋白在 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴变性 5 min, 用 SDS-PAGE 电泳分析, 电泳结束后进行银染。

根据每个融合蛋白表达情况, 进行大量地诱导培养, 然后离心收集菌体, 沉淀用裂解缓冲液(5%甘油, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L DTT, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)洗涤一次, 按培养物的 1/10 体积加入裂解缓冲液重悬菌体, 超声波破碎细胞, 12 000 r/min 离心去沉淀; 上清部分经过 ProBond Resin (Invitrogen 公司)亲和层析柱纯化, 用咪唑进行梯度洗脱,

最后用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测其纯度。

#### 1.2.5 细胞色素 P450 还原酶活性测定

纯化的融合蛋白以牛血清蛋白(BSA)为标准品, 采用 Bio-rad Bradford 法进行蛋白浓度测定。纯化的 TchCPR 电子传递活性测定是通过还原型细胞色素 C(Reduced cytochrome C, Cyt  $C_{\text{red}}$ )在 550 nm 光吸收值的变化来测定。将酶标仪测定波长设至 550 nm, 灵敏度为 1.0 nm, 最大吸收值为 1。在 96 孔酶标板的孔内加入 16  $\mu\text{L}$  的 0.5 mmol/L 马心脏 Cyt C (10 mmol/L PBS, pH 7.7)、等量的融合蛋白样品, 混匀。然后用 0.3 mol/L 的 PBS(pH 7.7)补足体积至 0.198 mL, 混匀。然后加入 2  $\mu\text{L}$  的 10 mmol/L NADPH, 快速混匀, 记录反应时间内(5 min)的  $A_{550}$  吸收值, 直至吸收值不再变化为止, 反应时间是从加入 NADPH 开始记录。每个样品重复 3 组, 然后求得每个时间点的光吸收值的平均值。单位时间内生成 Cyt  $C_{\text{red}}$  的量采用下列公式计算<sup>[14]</sup>:  $\text{nmol Cyt } C_{\text{red}}/\text{min} = \Delta A_{550}/\text{min}/0.021$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 中国红豆杉 TchCPR 基因的克隆与序列分析

鉴于中国红豆杉参与紫杉醇生物合成相关基因的克隆研究表明红豆杉属植物之间相同功能基因的同源性非常高<sup>[17]</sup>, 参照已报道的东北红豆杉 *TcuCPR* 基因设计引物, 利用 NEST-PCR 方法获得 TchCPR 基因 5'-和 3'-端 2 个 cDNA 片段, 测序结果表明获得的 cDNA 片段具有一个完整的 2 154 bp 编码框 (GenBank 登录号: AY959320)。利用 BlastN 比较分析, 结果表明 TchCPR 与东北红豆杉 CPR 在核苷酸水平和氨基酸水平上都有高达 99% 的同源性。TchCPR 基因编码 717 个氨基酸残基, 理论分子量为 79.7 kDa; 通过与其他物种的 CPR 分析表明, TchCPR 含有结合 P450 羟甲基化酶和辅因子 FMN、FAD、NADPH 的保守结构域(图 2)。



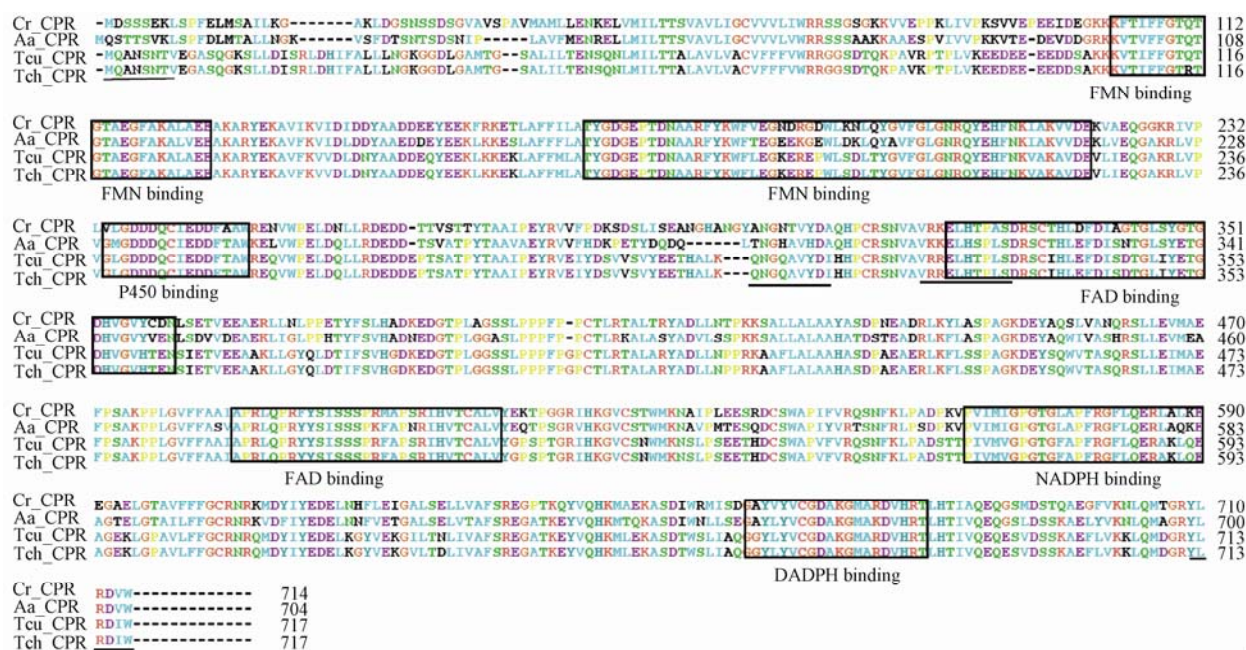


图 2 细胞色素 P450 还原酶氨基酸序列的比对分析

*Cr*: 长春花(*C. roseus*), CPR GenBank 登录号为 X69791; *Aa*: 青蒿(*A. annua*), CPR GenBank 登录号为 EF197890; *Tcu*: 东北红豆杉(*T. cuspidate*), CPR GenBank 登录号为 AY571340; *Tch*: 中国红豆杉(*Taxus wallichiana* var. *Chinensis*), CPR GenBank 登录号为 AY959320。保守的 P450 结合域、FMN、FAD、NADPH 结合域用方框标记, 下划线是设计合成引物的位置。

分析了 30 种植物 CPR 的氨基酸序列, 它们的同源性在 68%~85% 之间, 其中 N-端膜定位区变化较大, 但都含有大约 20 个疏水氨基酸。NJ 方法构建系统树, 系统分析表明中国红豆杉的 CPR 与裸子植物亲缘关系最近(图 3)。

## 2.2 中国红豆杉 TchCPR 融合蛋白的表达和纯化

利用 SDS-PAGE 凝胶电泳分析 TchCPR 融合蛋白的诱导表达, 结果表明 5 个截短的 CPR 融合蛋白, 即 CPRT61、CPRT71、CPRT75、CPRT89、CPRT95 在宿主菌 BL21(DE3)能够诱导表达, 如图 4A 是融合蛋白 CPRT75 的诱导表达, 总上清中能够清晰地看到 96.8 kDa 左右有明显增强的蛋白条带, 亲和层析纯化获得纯度大于 95% 的目的蛋白, 这与预期理论上 CPRT75 融合蛋白分子量一致; 图 4B 是 5 个截短融合蛋白的咪唑梯度洗脱样品的 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 结果表明 40 mmol/L 的咪唑洗脱效果最好, 能得到纯度较高的融合蛋白。

## 2.3 中国红豆杉细胞色素 P450 还原酶活性分析

根据 CPR 能够与 Cyt C 相互作用并传递电子给 Cyt C 使其被还原; 而 Cyt C<sub>red</sub> 在 550 nm 有特征吸收

峰, 以每分钟 Cyt C<sub>red</sub> 在 550 nm 光吸收值的变化表示 CPR 的电子传递活性。图 5 是 5 个含有等量融合蛋白的反应体系中在加入了 NADPH 后, 550 nm 光吸收值的变化曲线。可以看出 5 个截短的细胞色素 P450 还原酶催化活性有一定的区别。计算 0.7 min 反应时间内 Cyt C<sub>red</sub> 的生成量, 其中截短 61 个氨基酸的 CPRT61 融合蛋白的催化活性最高(1.6057 nmol Cyt C<sub>red</sub> /min/μg TchCPR 融合蛋白)(表 2)。

## 3 讨论

中国红豆杉细胞色素 P450 还原酶 cDNA 克隆是红豆杉属植物中报道的第 2 个 CPR 基因, 与裸子植物白云杉(*Picea glauca*)和北美黄杉(*P. menziesii*)的 CPR 基因的同源性分别为 84% 和 82%<sup>[18]</sup>, 而其他被子叶植物的 CPR 基因同源性在 72%~74%<sup>[3]</sup>。

有关 CPR 的功能鉴定多是在酿酒酵母细胞内与其耦联的 P450 氧化酶共表达, 然后制备微粒体建立体外的催化系统<sup>[3, 7, 15]</sup>。也有报道用大肠杆菌表达系统进行 CPR 和 P450 融合表达检测活性的例子<sup>[12, 13]</sup>。

应用大肠杆菌表达系统研究中国红豆杉不同长度 TchCPR 融合蛋白的诱导表达和纯化。结果发现

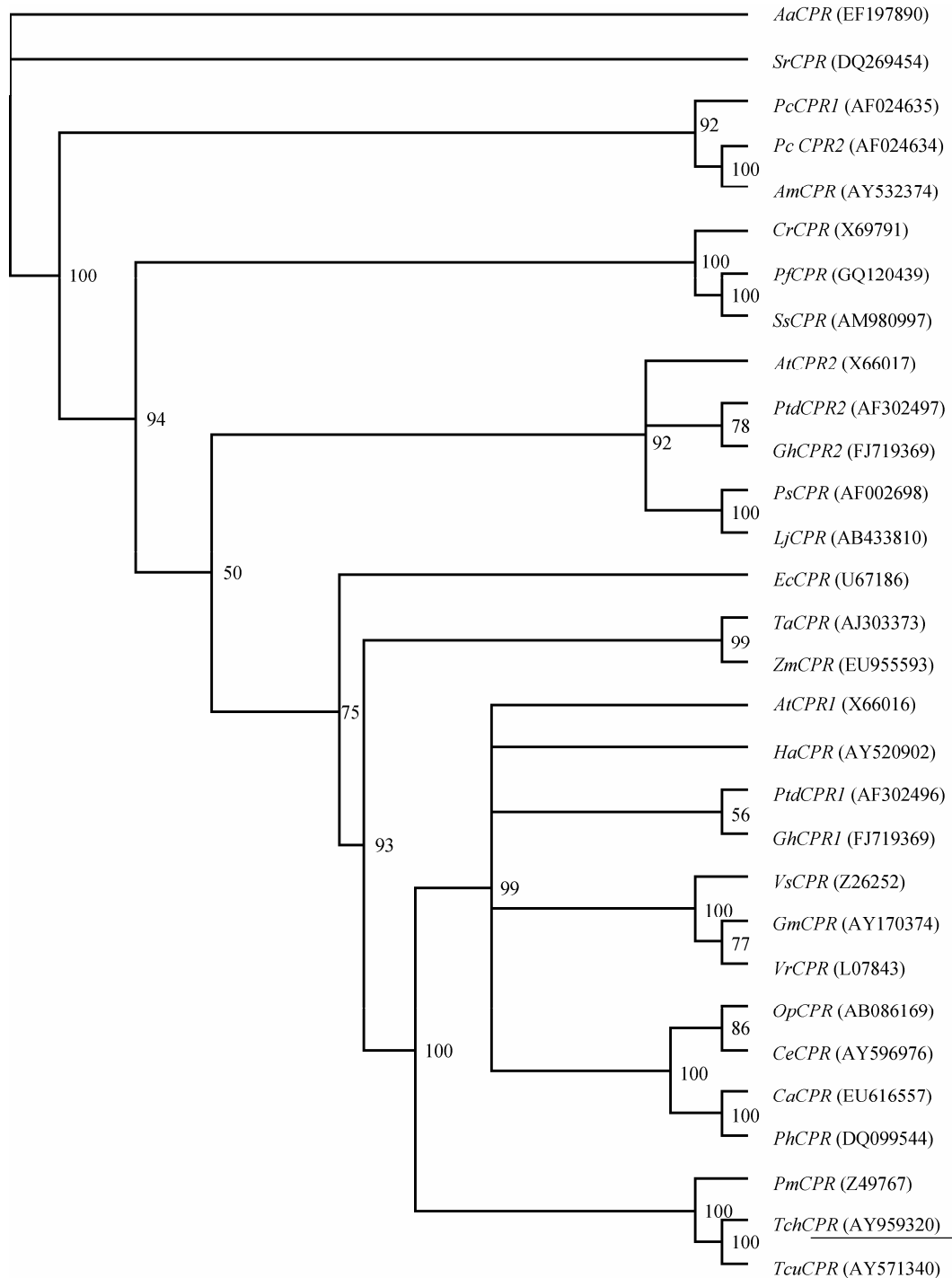


图 3 中国红豆杉 CPR 与 GenBank 中有较高同源性的植物 CPR 的系统分析

Bootstrap 分析重复 1 000 次, Bootstrap 值大于 50%时在结点位置标示出来。下划线显示中国红豆杉 *TchCPR* 的系统进化位置。Aa: 青蒿 (*Artemisia annua*), Sr: 甜菊 (*Stevia rebaudiana*), Pc: 洋茺蓼 (*Petroselinum crispum*), At: 拟南芥菜 (*A. thaliana*), Ptd: 杂交杨 (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoids*), Ps: 豌豆 (*Pisum sativum*), Cr: 长春花 (*C. roseus*), Ec: 花菱草 (*Eschscholzia californica*), Vs: 野绿豆 (*Vicia sativa*), Op: 短小蛇根草 (*Ophiorrhiza pumila*), Ca: 甜椒 (*Capsicum annuum*), Gm: 大豆 (*Glycine max*), Gh: 棉花 (*G. hirsutum*), Tcu: 东北红豆杉 (*T. cuspidate*), Pm: 北美黄杉 (*Pseudotsuga menziesii*), Ph: 矮牵牛 (*Petunia x hybrida*), Ce: 矢车菊 (*Centaurium erythraea*), Lj: 百脉根 (*Lotus japonicus*), Vr: 绿豆 (*V. radiata*), Ha: 金丝桃 (*Hypericum androsaemum*), Pf: 紫苏 (*Perilla frutescens*), Ta: 小麦 (*Triticum aestivum*), Zm: 玉米 (*Zea mays*), Am: 雪珠花 (*Ammi majus*), Ss: 彩叶草 (*Solenostemon scutellarioides*)。图中括号内的文字表示 GenBank 登录号。

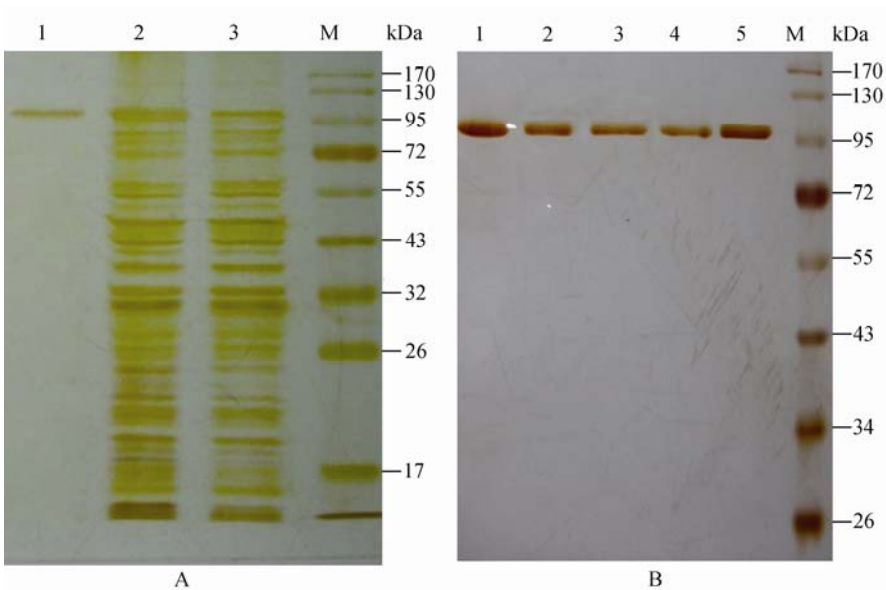


图 4 中国红豆杉 CPR 融合蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 分析  
A: 融合蛋白 CPRT75 诱导表达的 SDS-PAGE 分析。1~3 分别是纯化的 CPRT75 融合蛋白、BL21(DE3)/pET-CPRT75 的诱导表达、大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-32a 的对照; M: 蛋白 Marker。B: 截短 CPR 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析。1~5 分别是 40 mmol/L 的咪唑洗脱的融合蛋白 CPRT61、CPRT71、CPRT75、CPRT89、CPRT95; M: 蛋白 Marker。

表 2 中国红豆杉细胞色素 P450 还原酶活性测定

| 样品名称   | 蛋白量( $\mu\text{g}$ ) | $\Delta A_{550}(0.7\text{ min})$ | 1 $\mu\text{g}$ TchCPR 还原酶 1min 催化 Cyt C <sub>red</sub> 的生成量(nmol) |
|--------|----------------------|----------------------------------|--|
| CPRT61 | 6.3                  | 0.1487 $\pm$ 0.0043              | 1.6057 $\pm$ 0.0466  |
| CPRT71 | 6.3                  | 0.1029 $\pm$ 0.0092              | 1.1111 $\pm$ 0.0988  |
| CPRT75 | 6.3                  | 0.0904 $\pm$ 0.0053              | 0.9761 $\pm$ 0.0572  |
| CPRT89 | 6.3                  | 0.0946 $\pm$ 0.0069              | 1.0215 $\pm$ 0.0749  |
| CPRT95 | 6.3                  | 0.101 $\pm$ 0.0145               | 1.0906 $\pm$ 0.1568  |

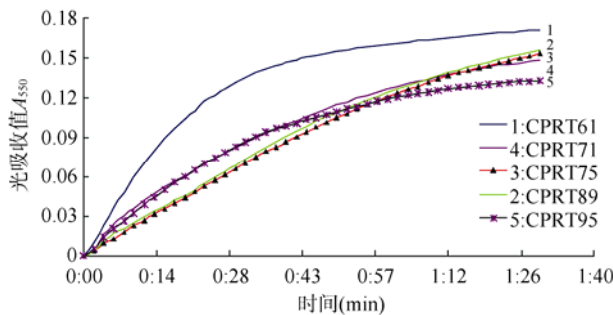


图 5 Cyt C<sub>red</sub> A<sub>550</sub> 吸收值和时间变化关系

在大肠杆菌中能够诱导表达中国红豆杉 CPR 截短了 N-端内质网膜定位肽段的融合蛋白, 但全长和 N-端截短了 48 个氨基酸残基的融合基因没有表达; 利用 CPR 能够把电子从 NADPH 传递给 Cyt C 并使其还原的特性, 检测 TchCPR 融合蛋白的电子传递活性, 研究结果表明 N-端融合了 174 个氨基酸残基的肽段对

其电子传递活性没有抑制作用, 截短 61 个氨基酸残基的 CPR 融合蛋白的电子传递活性比其他 4 个融合蛋白的活性高; 其原因可能是与 N-端 FMN 结构域相邻的具有疏水性的膜定位肽段相对保守, 有利于维持 FMN 结合结构域的正确构象, 促进 FMN 结构域与 Cyt C 或 P450s 的结合, 从而提高电子传递效率<sup>[19]</sup>。

经方差分析, 5 组截短肽段的中国红豆杉 P450 还原酶对电子传递的活性有影响, 其差别有些显著性 ( $P < 0.05$ );  $q$  检验结果表明 CPRT61 与其它 4 组相比,  $P$  值都小于 0.01, 有非常显著性意义, 其它 4 组两两间活性的对比,  $P$  值都大于 0.05 不具有显著性意义。

综上所述, 鉴于细胞色素 P450 羟基化酶与细胞色素 P450 还原酶构成的电子传递链在天然产物合成及化合物结构修饰中的重要作用, 本研究对中国

红豆杉 CPR 的融合表达和电子传递活性研究不仅为表达制备 CPR 融合蛋白和建立体外的酶促催化系统; 而且为 P450 羟基化酶构建融合表达系统, 获得一个高效的电子传递系统提供了依据, 可促进细胞色素 P450 酶类的应用与合成生物学研究。

#### 参考文献(References):

- [1] Hartmann T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 2007, 68(22–24): 2831–2846. [\[DOI\]](#)
- [2] Schuler MA, Werck-Reichhart D. Functional genomics of P450s. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 629–667. [\[DOI\]](#)
- [3] Jensen K, Møller BL. Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry*, 2010, 71(2–3): 132–141. [\[DOI\]](#)
- [4] Shet MS. Relevance of cytochrome P450s in plants: also one of Ron Estabrook's research interests. *Drug Metab Rev*, 2007, 39(2–3): 273–280. [\[DOI\]](#)
- [5] Yang CQ, Lu S, Mao YB, Wang LJ, Chen XY. Characterization of two NADPH: cytochrome P450 reductases from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Phytochemistry*, 2010, 71(1): 27–35. [\[DOI\]](#)
- [6] Meijer AH, Lopes Cardoso MI, Voskuilen JT, de Waal A, Verpoorte R, Hoge JHC. Isolation and characterization of a cDNA clone from *Catharanthus roseus* encoding NADPH: cytochrome P-450 reductase, an enzyme essential for reactions catalysed by cytochrome P-450 mono-oxygenases in plants. *Plant J*, 1993, 4(1): 47–60. [\[DOI\]](#)
- [7] Urban P, Mignotte C, Kazmaier M, Delorme F, Pompon D. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J Biol Chem*, 1997, 272(31): 19176–19186. [\[DOI\]](#)
- [8] Shephard EA, Phillips IR, Santisteban I, West LF, Palmer CNA, Ashworth A, Povey S. Isolation of a human cytochrome P-450 reductase cDNA clone and localization of the corresponding gene to chromosome 7q11.2. *Ann Hum Genet*, 1989, 53(Pt 4): 291–301. [\[DOI\]](#)
- [9] He F, Chen YT. Cloning and heterologous expression of the NADPH cytochrome P450 oxidoreductase genes from an industrial dicarboxylic acid-producing *Candida tropicalis*. *Yeast*, 2005, 22(6): 481–491. [\[DOI\]](#)
- [10] Eberle D, Ullmann P, Werck-Reichhart D, Petersen M. cDNA cloning and functional characterisation of CYP98A14 and NADPH: cytochrome P450 reductase from *Coleus blumei* involved in rosmarinic acid biosynthesis. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(3): 239–253. [\[DOI\]](#)
- [11] Ro DK, Ehlting J, Douglas CJ. Cloning, functional expression, and subcellular localization of multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from hybrid poplar. *Plant Physiol*, 2002, 130(4): 1837–1851. [\[DOI\]](#)
- [12] Hull AK, Celenza JL. Bacterial expression and purification of the *Arabidopsis* NADPH-cytochrome P450 reductase ATR2. *Protein Expr Purif*, 2000, 18(3): 310–315. [\[DOI\]](#)
- [13] Hotze M, Schröder G, Schröder J. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P<sub>450</sub> proteins as translational fusions with P<sub>450</sub> reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 1995, 374(3): 345–350. [\[DOI\]](#)
- [14] Guengerich FP, Martin MV, Sohl CD, Cheng Q. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat Protoc*, 2009, 4(9): 1245–1251. [\[DOI\]](#)
- [15] Jennewein S, Park H, DeJong JM, Long RM, Bollon AP, Croteau RB. Coexpression in yeast of *Taxus* cytochrome P450 reductase with cytochrome P450 oxygenases involved in Taxol biosynthesis. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89(5): 588–598. [\[DOI\]](#)
- [16] Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem*, 1987, 163(1): 16–20. [\[DOI\]](#)
- [17] Wang W, Shi Q, Zhu P, Ouyang T, Li N, Cheng KD. cDNA cloning, expression and characterization of taxadiene synthase, a diterpene cyclase from *Taxus chinensis*. *Acta Bot Sin*, 2002, 44(2): 181–187.
- [18] Tranbarger TJ, Forward BS, Misra S. Regulation of NADPH-cytochrome P450 reductase expressed during Douglas-fir germination and seedling development. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(2): 141–153. [\[DOI\]](#)
- [19] Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BSS, Kim JJP. Three dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(16): 8411–8416. [\[DOI\]](#)