

## 皇冠草(*Echinodorus amazonicus*)细胞色素 P450 相似基因的研究

刘林娟,刘会娟,王晓萍

(哈尔滨师范大学生命科学与技术学院,哈尔滨 150025)

**摘要:**为了研究皇冠草基因组内的细胞色素 P450 基因或与 P450 基因相似的序列,根据哺乳动物细胞色素 P450 基因设计 8 条引物,以皇冠草总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。结果表明:共获得了 26 条扩增片段,片段长度 300~1500 bp;将其中 3 条片段进行测序,BLAST 分析表明这些序列与已发表的 16 种植物的细胞色素 P450 基因具有一定的相似性。这表明在皇冠草基因组内存在 P450 基因或者有与 P450 基因相似的序列。

**关键词:**皇冠草;细胞色素 P450;相似基因

中图分类号:Q37

文献标志码:A

论文编号:2010-3442

### Isolation of Cytochrome P450 Gene-analogues from *Echinodorus amazonicus*

Liu Linjuan, Liu Huijuan, Wang Xiaoping

(College of Life science and technology, Harbin Normal University, Harbin 150025)

**Abstract:** In order to study Cytochrome P450 gene of *Echinodorus amazonicus*, PCR amplification was conducted using 8 primers which were designed according to the gene of mammalian cytochrome P450 genes. 26 amplified fragments were obtained and the length varied from 300 to 1500 bp. 3 fragments of them were sequenced. BLAST search analysis revealed that these amplified fragments possessed homologies to other cytochrome P450 genes and proteins in different 16 kinds of plant varieties.

**Key words:** *Echinodorus amazonicus*; cytochrome P450; gene-analogues

### 0 引言

细胞色素 P450 氧化酶(简称 P450),是一类具有多种催化功能、含血红素的氧化酶系<sup>[1]</sup>。自 1958 年首次报道大鼠肝微粒体上存在 P450 之后<sup>[2]</sup>,Strauber 等<sup>[3]</sup>从细菌中克隆到了几个除草剂抗性的 P450 基因,到现在已有 50 多年的研究历史。Frear 等<sup>[4]</sup>在 1969 年首先报道了棉花幼苗微粒体片段中的混合功能氧化酶对灭草隆(monuron)的代谢作用,这为植物细胞色素 P450 酶系参与除草剂的代谢提供了直接证据。随后,大量证据证明了细胞色素 P450 酶系参与了对许多除草剂的代谢和解毒作用<sup>[5-10]</sup>。

植物细胞色素 P450 通过基因重复和保守进化形

成一类庞大的超基因家族,数量远甚于起源于共同祖先的动物和真菌的细胞色素 P450,如:已从拟南芥中获得 272 个 P450 基因(包括 26 个假基因)<sup>[11]</sup>;1990 年第一个植物细胞色素 P450 基因被成功克隆后,到 2002 年年底,已有 600 多个 P450 基因被克隆,有 100 多个基因在细菌、酵母、杆状病毒昆虫细胞等异源表达系统中成功表达并鉴定了功能<sup>[12]</sup>。

皇冠草(*Echinodorus amazonicus*),泽泻科,刺果泽泻属,多年生沉水草本。皇冠草是一种大型水草,它的叶柄粗壮,叶子宽大,叶形优美,繁殖力强,被称为水草之王<sup>[13]</sup>。皇冠草作为水生植物,其基因组中的 P450 基因存在情况尚未见报道,本研究以皇冠草为研究材

**基金项目:**哈尔滨师范大学骨干教师资助计划“水生植物抗除草剂生理特性及抗逆相关基因的研究”(08KXQ-04)。

**第一作者简介:**刘林娟,女,1981 年,硕士研究生,研究方向:植物分子遗传学。Tel: 15045868034, E-mail: liulinjuan\_0921@163.com。

**通讯作者:**王晓萍,女,1972 年,黑龙江人,教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:植物分子生物学。通信地址:150025 黑龙江省哈尔滨师范大学松北校区生命科学与技术学院, Tel: 15846005001, E-mail: dr\_wxp@yahoo.com.cn。

**收稿日期:**2010-11-29, **修回日期:**2011-04-27。

料,为筛选具有除草剂降解作用的水生植物提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间和地点

2008年1月至2009年10月在哈尔滨师范大学进行。

### 1.2 试验材料

植物:皇冠草(*Echinodorus amazonicus*)购于哈尔滨市花卉市场。菌株:由本试验室保存。

### 1.3 试验方法

1.3.1 引物 依据 Yamanaka<sup>[14]</sup>所设计的8条哺乳动物P450引物序列:F1(上游引物):5'-GCC AAG CTT TCT AAC AAT GC-3',F2(上游引物):5'-GAC TCT TGC TAC TCC TGG TT -3',F3(上游引物):5'-TCC TTG TGC TCT GTC TCT CA -3',R1(下游引物):5'-AAG GAC ATG CTC TGA CCA TT -3',R2(下游引物):5'-GGA ATA CAG AGC TGA TGA CT-3',R3(下游引物):5'-CCA TCG ATT CTT GGT GTT CT-3',R4(下

游引物):5'-ACC AAG ACA AAT CCG CTT CCC-3',R5(下游引物):5'-TCC CAC ACA AAT CCG TTT TCC-3'。

1.3.2 皇冠草叶片总DNA的提取 采用CTAB法。

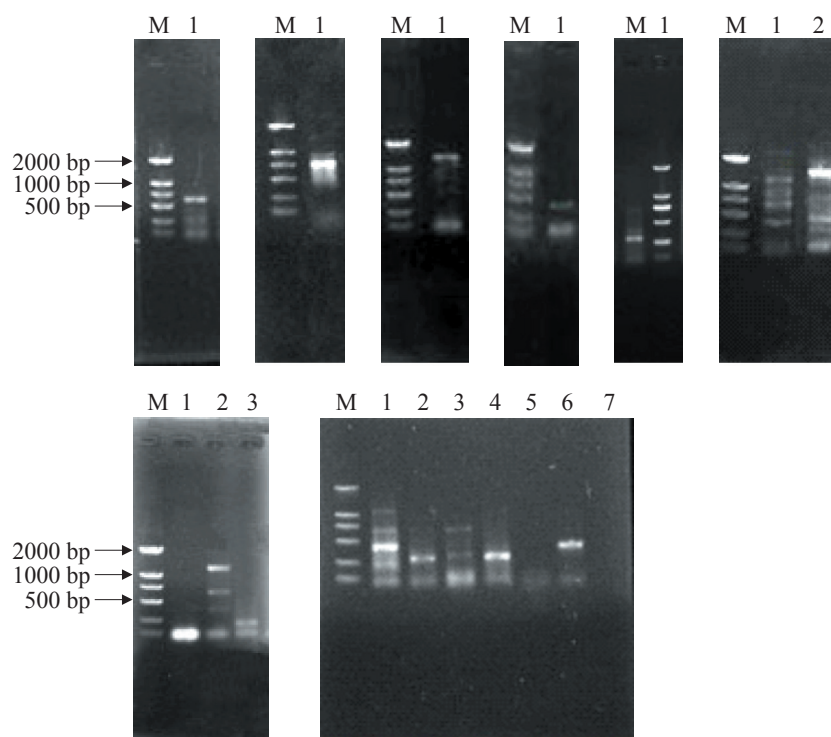
1.3.3 皇冠草细胞色素氧化酶P450基因片段的PCR扩增 PCR反应总体积25 μL,包括DNA模板50 ng,上、下游引物1 μM,dNTP 0.2 mM,Ex Taq polymerase 1 U。反应条件为94℃预变性3 min,94℃变性50 s,50℃退火30 s,72℃延伸1 min,35个循环,最后延伸7 min。

1.3.4 测序结果分析 PCR产物由上海生工进行测序,采用GenBank BLAST程序对皇冠草P450基因相似核苷酸序列进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR扩增结果

取皇冠草幼嫩叶片,用CTAB法提取总DNA作为PCR反应模板,上、下游引物随机组合,共15对引物组合。结果表明有13对引物组合在皇冠草中得到了扩增片段,共获得了26条扩增片段(图1)。



A图: M. DL2000 DNA marker, 下同; 1.引物F1R1扩增片段。B图: 1.引物F2R1扩增片段。C图: 1.引物F3R1扩增片段。D图: 1.引物F3R2扩增片段。E图: 1.引物F3R5扩增片段。F图: 1.引物F2R2扩增片段; 2.F3R4扩增片段。G图: 1.引物F2R2扩增片段; 2.引物F3R3扩增片段; 3.F1R3扩增片段。H图: 1.引物F2R3扩增片段; 2.引物F2R4扩增片段; 3.F1R2扩增片段; 4.F2R5扩增片段; 5.引物F1R5扩增片段; 6.F1R4扩增片段

图1 不同引物组合的PCR扩增结果

### 2.2 测序结果

将利用引物F3R1、F1R4得到3条扩增片段进行测序(上海生工)。引物F3R1的扩增片段长度为

1317 bp,将其命名为F3R1<sub>1317</sub>,引物F1R4的两条扩增片段长度分别为688 bp、433 bp,分别命名为F1R4<sub>688</sub>和F1R4<sub>433</sub>,其核苷酸序列如下:

F3R1<sub>1317</sub>的核苷酸序列:

```

tccttgctctgtctcctcaagacacaggacaaaaatagggggataaggatctcctgttttacgcccttgaagggttgaacgccggctccgtcttcattc
caaagaatggacattcacctcccttgatgatctcactaactcttgataatatttcagggatgccactttatacagggtatctcaataaactccaattcaaatag
tcataggctttggccaaatcaatcttaacagccatccatttacgcccttgacgcttgatgcatgatactgtggataattctgcataagaatgatattatcgtaatgt
gcctgccaggcacaaaagcctctgaaccgggctgatcctgtgtggcaagtaaggctcagctcttccacaattatctttgagatgagttggatgattgttt
agagatataaggtcttagatggtgcatfagaaggtggatacactttggtattaacaccatgaggagctctatgagcctggattcatatcacctccattgaaagct
ttttgcagatattaataacagatgcttgatggtccaatttgctgaggaatgggcatcaatgccgctgtggcctgtgctttaaagggactcatgagccaaa
gggcacatttgattcattatcactaggggtgctccagcgcctataatcagaaggtgaaacaaggaaagaccccactatagttggccactgctgattcgtc
gacattattgtttcgtaaactgagaacaaagatgtcctgactagttgtcggatgtcctcctcattatccatcaaaggccttggtcatttttagctttgtatactt
tgacctcttcgcatattgacatagagtgataaaattcgtatttctcctccaaatgtagccagtcgaggtgagctttctctttgctgccattctccttcac
cagaatatcatctagctcatttgcaactcacaatgagattatcaaggtatcgtataattgctgccaaactgctgagcgtctggatacgttaaggagttatt
cttggtgtaaatctgacagattctttggagtccttaattgccactttagaagaatcttccactgcttcatgaaagtcctatccgggtgccaagcctcagaa
agcatattttaaacttggctcaagctgccaggagccttagtttgaaaataaggtttcgagtagcagaagcagggcgccgctccgagccagatggggcaat
gtcagagcatgctctt

```

F1R4<sub>688</sub>的核苷酸序列:

```

accaagacaaatccgcttcccttgagtgctacggtgaaacaggggccgacaccctgtagtaagaacatcctggagacacaactacaaggggcaccgaaga
ctagagagggctatagtagccgctagcctcccaaaggctactggagaggatgataatagcaagaaggaccactaggctcccactggaatcgacgacagt
cacaacaaccgttgatgagtggtatgggaggaagccgctaggtcggcgacgagatagactctggcagtaaggccagtaaggaggtcgaccgagaata
cttggtgctgcaaccgctggctcccctaggggttactggcctcctcagggtccaatggaggagcagtggtgtggtgatccctcaccggataaggcatt
gtagccgccaaaaataggaagggtgtgtgtgactggattagggaaaacttaggtttttgcttcaataccatgtcaacgcttttccaggaagtgtgtcgtaa
acgggacgactcaactatttataaaaaaaagttgtacaacgtatacgtgtacaaggcacagaaaaaaaggaaaataacaaggaaaataacacatagctaa
cattctggattgaatattcatatagttgacatagtaaggtgtttatgcatggttagaagccttggc

```

F1R4<sub>433</sub>的核苷酸序列:

```

gccaaagcttctaacaatgccacagatatttattatggaagaagttgggttcagtaaccagggttttctaattatgatccaggaaggttagggtaccattaggg
aagtttgaccattgggtggtggtgtgggttttaacctgtaggtcagagccaattttgaggaggagaggtggcaccttagctgacattatcttttatt
gctaaagttaattccatggtgtgtgtaggtatctccatgtcctcatatggcacttcttttgattcaaaactgaatttcaagctcctagaatttctcatcga
ttacctacaatgaatctgcatggtggtgctccactgtagcttccaccagagtgagggaagaagttgtcgaacatgctataggaagcggattgtctgtgt

```

### 2.3 细胞色素 P450 基因相似序列的生物信息学分析

利用 GenBank BLASTN 对 3 条已测序的扩增片段进行相似性检索和系统发育分析。结果发现有 81 条

序列与 F3R1<sub>1317</sub> 具有一定的相似性, 其中相似性大于 90% 的序列和 F3R1<sub>1317</sub> 进行系统发育分析(图 2); 有 78 条序列与 F1R4<sub>688</sub> 具有一定相似性, 其中细胞色素 P450

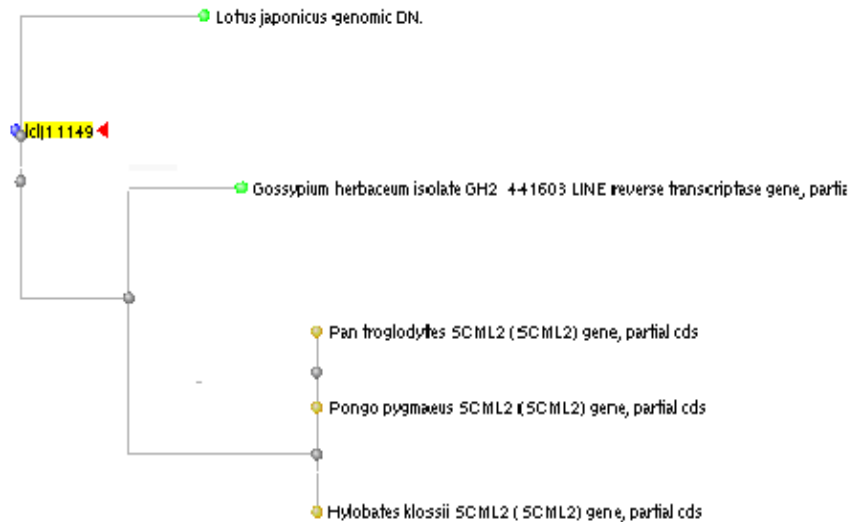


图 2 F3R1<sub>1317</sub> 核苷酸序列的系统发育分析



泛的植物品种。为进一步阐明水生植物对水环境中除草剂等污染物的净化提供理论基础。

把所得到的26条片段同Yamanaka扩增出的51种陆生植物的片断相比较,发现皇冠草有与其他物种共有的片段,例如:约600 bp、400 bp的片段,也有与其他物种不同的特异片断例如:约1300 bp、1100 bp的片段,这也更进一步证明了P450基因具有种属特异性。

现在在分子水平上分析植物遗传多样性已经使用了很多的分子标记,如同功酶、RFLP、RAPD、AFLP、SSR和ISSR等,这些标记既有缺点亦有缺点,但无论怎样都提供了遗传多样性信息,特别是那些遗传中性区域<sup>[15]</sup>。通过Yamanaka和本文的研究,根据PCR分析的结果,表明P450基因类似片断在植物种间表现出多态性,能够利用P450类似片断的多态性标记评估遗传多样性,也意味着利用这些引物评价植物遗传多样性的可行性。然而,不是所有序列都和植物P450基因相关,但至少有一些扩增片段被认为是和植物P450相关的片段,其他片段与一些已经报导的基因相关,可以用来作为遗传多样性研究中的功能基因组标记。

### 参考文献

- [1] Bernhardt R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts [J]. J Biotechnol.2006,124(1):128-145.
- [2] Omura T. Forty years of cytochrome P450 [J]. Biochem Biophys Res Commun. 1999,266(3):690-698.
- [3] Strauber H, Müller R H, Babel W. Evidence of cytochrome P450-catalyzed cleavage of the ether bond of phenoxybutyrate herbicides in Rhodococcus erythropolis K2-3 [J]. Biodegradation. 2003,14(1):41-50.
- [4] Frear D S. Wheat microsomal cytochrome P450 monooxygenases: characterization and importance in the metabolic detoxification and selectivity of wheat herbicides[J]. Drug Metabol Drug Interact. 1995, 12(3-4):329-357.
- [5] Powles S B, Yu Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides [J]. Annu Rev Plant Biol. 2010, 61:317-347.
- [6] Werck-Reichhart D, Hehn A, Didierjean L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance [J]. Trends Plant Sci. 2000,5(3): 116-123.
- [7] Abhilash P C, Jamil S, Singh N. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics [J]. Biotechnol Adv. 2009,27(4):474-488.
- [8] Kawahigashi H, Hirose S, Ohkawa H, et al. Herbicide resistance of transgenic rice plants expressing human CYP1A1 [J]. Biotechnol Adv. 2007, 5(1):75-84.
- [9] Durst F. Biochemistry and Physiology of Plant Cytochrome P450. Ruckpaul, K. et al (eds) .Microbial and Plant Cytochrome P450 [M]. London: Taylor and Francis,1991,191-233.
- [10] Yu S J, et al. Detection and Biochem characterization of Insecticide Resistance in the Diamondback Moth. Pestic. Physiol. 1992 (44): 74-81.
- [11] Riechmann J L, Heard J, Martin G, et al. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science,2001,290:2105-2110.
- [12] Robert F O, Pandhal J, Wright P C. Exploiting cyanobacterial P450 pathways [J]. Curr Opin Microbiol. 2010,13(3):301-306.
- [13] 吉醒.迷人的沉水观叶植物——皇冠草[J].花木盆景(花卉园艺版), 2006,(09):45-46.
- [14] Yamanaka S, Suzuki E, Tanaka M, et al. Assessment of cytochrome P450 sequences offers a useful tool for determining genetic diversity in higher plant species [J]. Theor Appl Genet. 2003,108(1): 1-9.
- [15] Fleury D, Jefferies S, Kuchel H, et al. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat[J]. J Exp Bot. 2010,3211-3222.