



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150056

## 雷斯青霉 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因的 克隆及生物信息学分析

贾龙刚, 姜海琪, 郭凯, 许喆, 刘晓光, 路福平

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 工业酶国家工程实验室, 天津市工业微生物重点实验室,  
天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 工业上利用丝状真菌雷斯青霉(*Penicillium raistrickii*)转化生产高效避孕药孕二烯酮的关键中间体 15 $\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮。已知参与雷斯青霉甾体转化反应的关键酶为 P450 羟化酶,该羟化酶体系由细胞色素 P450 羟化酶和 NADPH-细胞色素 P450 还原酶(CPR)组成,但有关其 15 $\alpha$ -羟基化反应的分子基础尚不清楚。根据转录组测序数据库,通过 RT-PCR 扩增克隆了一个雷斯青霉 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因。该基因的开放阅读框为 2 082 bp,编码 694 个氨基酸的多肽链,预测的蛋白相对分子质量为  $7.63 \times 10^4$ ,具有 CPR 蛋白的典型结构域(FMN 结合域、FAD 和 NADPH 结合域)。NCBI BLAST 结果显示雷斯青霉 CPR 与意大利青霉(*P. italicum*)NADPH-细胞色素 P450 还原酶具有较高的同源性,一致性为 93%。

**关键词:** 15 $\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮; 细胞色素 P450 还原酶; 雷斯青霉; RT-PCR

中图分类号: Q781 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2016)01-0027-04

## Cloning and Sequence Analysis of a NADPH-cytochrome P450 Reductase Gene from *Penicillium raistrickii*

JIA Longgang, JIANG Haiqi, GUO Kai, XU Zhe, LIU Xiaoguang, LU Fuping

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Filamentous fungus *Penicillium raistrickii* is employed for commercial production of 15 $\alpha$ -hydroxyl-13-ethyl-estr-4-ene-3, 17-dione, a key intermediate for the production of Gestodene, a potent oral contraceptive. It is documented that steroid 15 $\alpha$ -hydroxylase involved in the transformation is a P450 enzyme which is believed to be composed of the cytochrome P450 hydroxylase and the NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR), although the molecular mechanism is yet to be elucidated. Based on the RNA sequencing data set, a *P. raistrickii* NADPH-cytochrome P450 reductase was cloned through RT-PCR amplification. The full open reading frame of the CPR is 2 082 bp, predicted to encode a polypeptide of 694 amino acids with a molecular weight of  $7.63 \times 10^4$ , which contains the structural domains typical of CPR, such as FMN binding pocket, FAD and NADPH binding pocket. NCBI BLAST search reveals that *P. raistrickii* CPR has the highest homology and 93% identity with *P. italicum*.

**Key words:** 15 $\alpha$ -hydroxyl-13-ethyl-estr-4-ene-3, 17-dione; NADPH-cytochrome P450 reductase; *Penicillium raistrickii*; RT-PCR

新一代孕激素中孕二烯酮避孕效果好、副作用很小,是第三代高效口服避孕药复合片的主要成分<sup>[1-2]</sup>。15 $\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮是合成孕二烯酮的关键

中间体,工业生产主要采取化学合成途径<sup>[3]</sup>,但化学法合成步骤繁琐,副产物多,收率低,成本高。丝状真菌雷斯青霉(*Penicillium raistrickii*)能在左旋乙基甾

收稿日期: 2015-05-06; 修回日期: 2015-05-14

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2011AA02A211)

作者简介: 贾龙刚(1988—),男,河北人,硕士研究生;通信作者: 刘晓光,教授, liu\_xg@tust.edu.cn.

数字出版日期: 2015-10-16; 数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20151016.1506.012.html>.

烯双酮的  $15\alpha$  位引入羟基生成  $15\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮, 该转化反应特异性很高, 几乎无副产物<sup>[4-5]</sup>. 多年来, 研究人员在雷斯青霉转化工艺和菌种选育方面开展了一系列工作<sup>[4-6]</sup>. 为了降低生产成本, 同时减少对环境的污染, 目前工业上已开始利用雷斯青霉转化左旋乙基甾烯双酮生产  $15\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮. 如同黑根霉、赭曲霉的  $C11\alpha$ -羟化酶以及蓝色犁头霉、新月弯孢霉的  $C11\beta$ -羟化酶一样, 雷斯青霉的甾体  $C15\alpha$ -羟化酶也属于 P450 酶. 雷斯青霉  $C15\alpha$ -羟化酶系统由细胞色素 P450 羟化酶和其电子供体 NADPH-细胞色素 P450 还原酶(CPR)组成<sup>[7-9]</sup>. 雷斯青霉 CPR 从 NADPH 得到 2 个电子, 顺序通过 FAD 和 FMN 最终传递给  $C15\alpha$ -羟化酶<sup>[10]</sup>. 为了进一步阐述雷斯青霉甾体  $C15\alpha$ -羟化酶系统的分子催化机制, 本研究根据转录组测序数据库信息, 通过 RT-PCR 首次克隆了雷斯青霉的 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因, 并利用生物信息学对其产物的结构特征进行了分析.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

雷斯青霉 (*Penicillium raistrickii*) TCCC 10490, 来自天津科技大学微生物菌种保藏中心; 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$  由本实验室保存; Trizol 试剂、pUCm-T 载体、*Taq* DNA 聚合酶、PCR 纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、Reverse Transcriptase XL 反转录酶、限制性内切酶购自 Takara 公司.

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 115 °C 灭菌 20 min.

菌体发酵培养基(g/L): 蛋白胨 5, 葡萄糖 20, 酵母膏 5, 大豆粉 10, 调节 pH 6.5, 115 °C 灭菌 20 min.

甾体底物: 左旋乙基甾烯双酮.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌体的培养

28 °C、180 r/min 摇床培养菌体 18 h 后加入 0.01% 左旋乙基甾烯双酮进行诱导, 继续培养 6 h.

#### 1.2.2 RNA 提取、cDNA 合成与 PCR 扩增

Trizol 法提取经质量体积比为 0.01% 的左旋乙基甾烯双酮底物诱导 6 h 的雷斯青霉总 RNA, 根据反转录酶说明书合成第 1 链 cDNA, 1  $\mu$ L cDNA 作为该 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因 PCR 扩增的模板, 设计引物. PRR-F: 5'-TCTAGAATGGCGCAAC TTGACACTC-3', PRR-R: 5'-GGATCCTCATGACCA

AACGTCCTCC-3'. PCR 反应总体系 20  $\mu$ L, 包括 0.2  $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶、2  $\mu$ L buffer、1.6  $\mu$ L dNTP (TaKaRa, 中国大连)、上下游引物各 10  $\mu$ mol、1  $\mu$ L cDNA 以及 13.2  $\mu$ L 水. 该反应过程如下: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环. 提取雷斯青霉菌丝基因组, 以此基因组为模板, 并用同样引物进行 PCR 反应(体系如上), 扩增该基因的基因组全长.

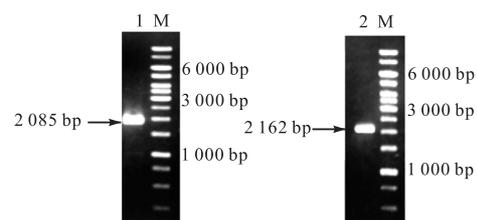
#### 1.2.3 序列生物信息学分析及进化树构建

采用 DNAMAN V6 (Lynnon Biosoft) 进行 DNA 序列及氨基酸序列同源性分析. 在 NCBI 上搜索保守区域, 进化分析利用 MEGA6 软件, 该软件下载网址为 www.megasoftware.net.

## 2 结果与分析

### 2.1 雷斯青霉 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因的克隆

为了克隆  $15\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮羟化酶活性相关的基因, 提取了在双酮底物诱导条件下菌体的总 RNA, 并进行了转录组测序. 从转录组数据库中发现 1 个编码 NADPH-细胞色素 P450 还原酶的基因, 该基因的开放阅读框(ORF) 2 082 bp, 预测编码 694 个氨基酸的多肽. 为克隆其完整的阅读框架, 利用上述总 RNA, 通过反转录合成 cDNA, 并设计了 1 对特异性引物, 扩增出 1 个大约为 2 000 bp 的 cDNA 片段, 电泳结果如图 1 所示. 将 PCR 产物与 T 载体连接, 转化大肠杆菌, 并将重组菌株送华大基因公司进行测序.



M. 1 000 bp DNA ladder; 1. P450 还原酶 cDNA; 2. P450 还原酶基因组 DNA

图 1 雷斯青霉 P450 还原酶基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of P450 reductase gene from *P. raistrickii*

为研究雷斯青霉 CPR 的基因组结构, 以雷斯青霉菌株基因组 DNA 为模板, 用扩增完整 ORF 的引物扩增 CPR 基因, 获得大约 2 100 bp 的 PCR 产物, 送华大基因公司进行全长测序. 结果表明: CPR 基因的基因组序列大小为 2 162 bp, 与 cDNA 序列进行比

对,发现雷斯青霉 CPR 基因含有 1 个内含子,大小为 77 bp,位于基因的 1 788 ~ 1 865 bp 之间.

### 2.2 雷斯青霉 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因序列分析

#### 2.2.1 雷斯青霉 CPR 序列分析

委托华大基因公司测序,将测序结果在 NCBI GenBank 数据库中进行 BLAST 搜索,发现雷斯青霉 CPR 与下列真菌 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因具有很高的同源性,包括意大利青霉(*P. italicum*) CPR (KGO76390.1)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*) RIB40(XP\_001821060.1)、土曲霉(*Aspergillus terreus*) NIH2 624(XP\_001214242.1)、黑曲霉(*Aspergillus niger*) CBS 513.88(XP\_001392901.1)、皮炎芽生菌-

(*Blastomycosis dermatitidis*) SLH14 081 (XP\_002623101.1)、黄丝曲霉(*Talaromyces*) ATCC 18224 (XP\_002150062.1)、柄杆菌(*Caulobacter*) ATCC 10500(XP\_002484207.1)、红色毛癣菌(*Tricho-phyton rubrum*) CBS 118892 (XP\_003237066.1)、扩展青霉氧化还原酶(KGO39386.1). 其中与意大利青霉 P450 还原酶的氨基酸序列一致性最高,达到 93%,其高度保守区域如图 2 所示,其中 B、C、D 区域高度保守,但区域 A 的保守性相对较低.

用 NCBI-CDD 软件对雷斯青霉 CPR 结构进一步分析发现其具有 CPR 蛋白的典型结构域,包括 FMN 结合域、FAD 和 NADPH 结合域,其中 FMN 结合域和 FAD 结合域如图 3 所示.

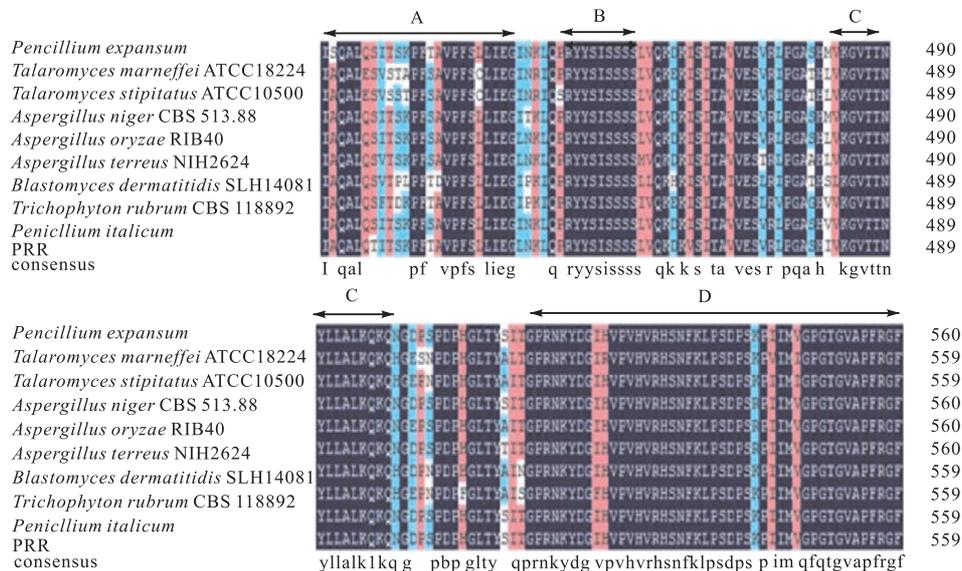


图 2 雷斯青霉 CPR 氨基酸序列与其他菌种 CPR 氨基酸序列的多重比对, A、B、C、D 表示 4 个亚结构域  
Fig. 2 Multiple sequence alignment of the *P. raistrickii* CPR protein with other filamentous fungal CPR, A, B, C, D represent four subdomains



图 3 雷斯青霉和意大利青霉 CPR 高度保守区域序列比对  
Fig. 3 Highly conserved flavodoxin domain between the CPRs of *P. raistrickii* and the *P. italicum*

### 2.2.2 雷斯青霉 CPR 基因的进化树分析

为了更好地探索所克隆的雷斯青霉 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因与其他真菌相关基因之间的关系,采用 MEGA6 软件对预测的 9 个与其具有高度

保守的 CPR 基因进行亲缘关系分析,结果如图 4 所示。雷斯青霉 CPR 基因与意大利青霉和黑曲霉的 CPR 基因在进化上高度相关。

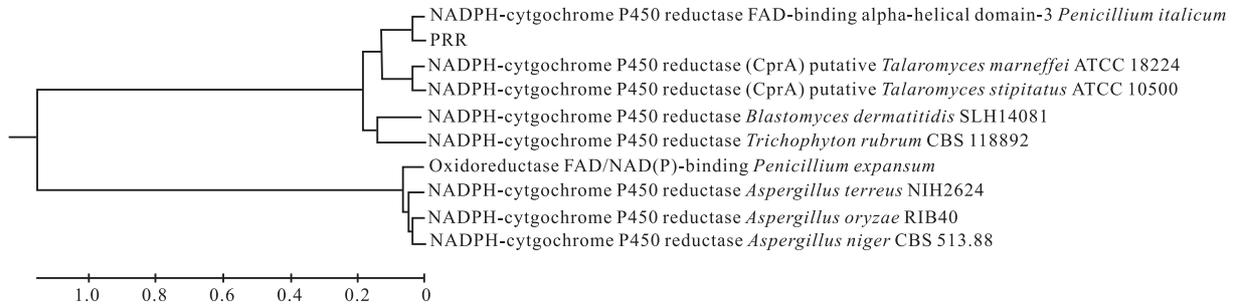


图 4 雷斯青霉 CPR 基因与其他 9 个丝状真菌 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因之间的亲缘关系

Fig. 4 The phylogenetic relationship of NADPH-cytochrome P450 reductases between *P. raistrickii* and 9 other filamentous fungal species

## 3 结 语

本文克隆了一个新的雷斯青霉 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因,该基因开放阅读框为 2 082 bp,预测编码 694 个氨基酸,与意大利青霉的 CPR 具有高达 93% 的一致性。

真菌微粒体的细胞色素 P450 氧化酶需要其相应的 NADPH-细胞色素 P450 还原酶作为电子供体为其提供还原力,从而在甾体母核的特定位点引入羟基。雷斯青霉 CPR 的克隆将有助于阐述其甾体 15 $\alpha$ -羟化酶系统羟化反应的分子机理,从而为利用基因工程手段改进现有雷斯青霉工业菌株的甾体羟化效率以及构建新的异源甾体 15 $\alpha$ -羟化系统奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Fotherby K, Caldwell A D. New progestogens in oral contraception[J]. Contraception, 1994, 49(1): 1-32.
- [2] Lemus A E, Zaga V, Santillán R, et al. The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites[J]. Journal of Endocrinology, 2000, 165(3): 693-702.
- [3] 陈绍怡, 杨秀, 秦玉静. 手性药物合成中的生物转化[J]. 生物工程进展, 2000, 20(4): 60-63.
- [4] Schlosser D, Irrgang S, Schmauder H P. Steroid hydroxy-

lation with free and immobilized cells of *Penicillium raistrickii* in the presence of  $\beta$ -cyclodextrin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 39(1): 16-20.

- [5] 段少军, 杜连祥, 别松涛, 等. 雷斯青霉转化左旋乙基甾烯双酮 15 $\alpha$ -羟化反应工艺研究[J]. 天津科技大学学报, 2008, 23(2): 34-38.
- [6] 邱强, 杜连祥. N<sup>+</sup>离子注入选育高转化 15 $\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮雷斯青霉菌株的研究[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(9): 57-60.
- [7] Kristan K, Rižner T L. Steroid-transforming enzymes in fungi[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 129(1/2): 79-91.
- [8] Donova M V, Egorova O V. Microbial steroid transformations: Current state and prospects[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(6): 1423-1447.
- [9] Irrgang S, Schlosser D, Fritsche W. Involvement of cytochrome P-450 in the 15 alpha-hydroxylation of 13-ethylgon-4-ene-3, 17-dione by *Penicillium raistrickii*[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 60(5/6): 339-346.
- [10] Hannemann F, Bichet A, Ewen K M, et al. Cytochrome P450 systems: Biological variations of electron transport chains[J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects, 2007, 1770(3): 330-344.

责任编辑: 郎婧