

## 柑橘青霉菌 CYP51B 基因和上游调控区克隆及 生物信息学分析

牛玉慧<sup>△</sup> 刘婧<sup>△</sup> 齐婷 伍志 秦婷婷 李青 钟靖然 张恒  
王崇武 袁永泽 刘德立\*

(华中师范大学生命科学学院 湖北省遗传与调控重点实验室 湖北 武汉 430079)

**摘要:**【目的】克隆柑橘青霉菌(意大利青霉菌, *Penicillium italicum*) CYP51 的同源基因, 并对基因序列进行生物信息学分析。【方法】通过 PCR 及染色体步移技术得到基因的完整序列及上下游调控序列。通过生物信息学手段对基因的结构进行分析: 使用 NNPP 分析软件预测转录起始位点, 并利用 TFSEARCH1.3 软件分析转录因子结合位点。利用 SWISS-MODEL 在线软件对蛋白进行同源模建。【结果】克隆得到了意大利青霉菌 CYP51 的同源基因, 命名为 *PiCYP51B*。获得的 *PiCYP51B* 及上下游调控区序列总长为 3 496 bp, 包括上游 910 bp 和下游 834 bp 的序列。*PiCYP51B* 基因的开放阅读框全长 1 575 bp, 编码 524 个氨基酸。该基因含有 3 个分别为 74、51、52 bp 的内含子, 分别位于 247 bp 与 320 bp 之间, 519 bp 与 569 bp 之间, 1 635 bp 与 1 686 bp 之间。*PiCYP51B* 5'上游调控区序列的总长为 579 bp。生物信息学分析结果显示: 转录起始位点位于上游 458 bp 处; 上游调控区不仅包含启动子的核心结构序列 TATA 盒(位于-25 bp 处), 也包含多个转录因子结合位点, 如 Abd-B、ADR1、AP-4、GATA-1、CdxA、Clox 和 Oct-1 等。在上游调控序列中嘌呤含量高, 而且从+387 bp 处开始存在 4 个连续高嘌呤含量的热激转录因子特异性结合位点(HSF); 在+106 bp 处开始存在 3 个连续的 CdxA 转录因子结合位点。选用人 CYP51 晶体结构(PDB ID: 3LD6)为模板, 利用 SWISS-MODEL 在线软件构建了意大利青霉菌 CYP51B 蛋白的结构模型。【结论】克隆了意大利青霉 *PiCYP51B* 基因, 其上游含有多个热激应答转录因子特异性结合位点(HSF)表明其参与逆境应答。该基因作为意大利青霉菌 CYP51 的同源基因, 可能与青霉菌对真菌药物的抗药性密切相关。

**关键词:** 意大利青霉菌, *PiCYP51B*, 5'上游调控序列, 同源模建

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31371893, 31071653, 31101595)

\***Corresponding author:** E-mail: deliliu2013@163.com, ldl@mail.ccnu.edu.cn

<sup>△</sup>These authors equally contributed to this work

**Received:** March 27, 2015; **Accepted:** June 19, 2015; **Published online** (www.cnki.net): July 03, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31371893, 31071653, 31101595)

\***通讯作者:** E-mail: deliliu2013@163.com, ldl@mail.ccnu.edu.cn

<sup>△</sup>共同第一作者

收稿日期: 2015-03-27; 接受日期: 2015-06-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-07-03

## Cloning and bioinformatic analysis of CYP51B gene and its upstream regulatory region in *Penicillium italicum*

NIU Yu-Hui<sup>Δ</sup> LIU Jing<sup>Δ</sup> QI Ting WU Zhi QIN Ting-Ting LI Qing  
ZHONG Jing-Ran ZHANG Heng WANG Chong-Wu YUAN Yong-Ze  
LIU De-Li\*

(Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, School of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

**Abstract:** [Objective] This study aimed to clone and characterize a *CYP51* homologous gene in *Penicillium italicum*. [Methods] PCR and Genome walking strategies were used to obtain the gene sequence and its flanking region. Gene structure was analyzed by bioinformatic strategy: Gene transcriptional start site was predicted by NNPP software and TFSEARCH1.3 software was used to predict transcriptional factor binding sites. Homology modeling was performed using human CYP51 protein as the template through the online software SWISS-MODEL. [Results] A *CYP51* homologous gene was successfully cloned from *Penicillium italicum* and named as *PiCYP51B*. A 3 496 bp sequence including 910 bp 5' flanking sequence and 834 bp 3' flanking sequence was obtained. The ORF of *PiCYP51B* is predicted to encode a protein of 525 amino acids. *PiCYP51B* contains three introns length 74, 51 and 52 bp, located between 247 bp and 320 bp, 519 bp and 569 bp, 1 635 bp and 1 686 bp respectively. The transcriptional start site is located 458 bp upstream of the initiation codon; the upstream regulatory region not only contain the core structure TATA box (located at 25 bp and 105 bp upstream of the initiation codon), but also contain several transcriptional factor binding sites such as Abd-B, ADR1, AP-4, GATA-1, CdxA, Clox and Oct-1. The proportion of purine is relatively high in the upstream regulatory region. From 387 bp upstream, there are four consecutive heat shock protein transcriptional factor binding sites (HSF); there are three consecutive CdxA transcriptional factor binding sites from 106 bp upstream. To further analysis the structure of *PiCYP51B*, homology modeling was performed using the online software SWISS-MODEL. [Conclusion] *PiCYP51B*, being the homologous gene of *CYP51* may connect with the resistance to pesticides of *P. italicum*.

**Keywords:** *Penicillium italicum*, *PiCYP51B*, 5' Flanking sequence, Homology modeling

指状青霉(*Penicillium digitatum*)和意大利青霉(*Penicillium italicum*)引起的柑橘绿霉病和青霉病是柑橘采后加工、运输和贮存阶段的主要侵染性真菌病害,导致严重的经济损失<sup>[1-2]</sup>。甾醇14 $\alpha$ -去甲基化酶(CYP51)是重要的药物靶标酶,该酶催化甾醇14 $\alpha$ -去甲基化反应。麦角甾醇的减少会影响真菌细胞膜的流动性、破坏真菌细胞膜结构,从而影响膜结合酶的活性,最终导致真菌死亡<sup>[3-5]</sup>。农业上广泛运用的14 $\alpha$ -去甲基化酶抑制剂(DMIs)就是通过抑制真菌CYP51来发挥作用<sup>[6]</sup>。据文献[4]报道,在多种真菌中发现了CYP51的同源基因:有的真菌仅含有一种CYP51;某些真菌中有CYP51A和CYP51B两种;在有些真菌中还发现了3种CYP51,即CYP51A、

CYP51B 和 CYP51C。如烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)等有2种;指状青霉(*P. digitatum*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)等有3种<sup>[7-10]</sup>。随着CYP51的同源基因相继发现,这些同源基因也成为研究的热点。研究表明:在烟曲霉中,CYP51A和CYP51B基因对其生长和毒性并不是必需的;但是同时使这两个基因失活,对于烟曲霉是致命的<sup>[11]</sup>。通过分别敲除禾谷镰刀菌的CYP51A、CYP51B、CYP51C基因,发现并不影响其营养生长<sup>[12]</sup>。

随着抗真菌剂的广泛使用,真菌的抗药性现象日益普遍。由真菌 CYP51 介导的对 DMIs 类杀菌剂

抗性主要表现在3个方面：(1) CYP51 基因超量表达导致的对 DMIs 类杀菌剂产生抗性；(2) 由于 CYP51 基因突变引起的对杀菌剂抗药性的增加；(3) 含有2个或多个靶标 CYP51 基因共同参与调节。指状青霉对 DMIs 抗性机制被广泛研究，如在指状青霉对 DMIs 抗性菌株中，CYP51 基因上游出现一个串联重复5次的126 bp的插入序列，而敏感性菌株中只含有一个该序列<sup>[13]</sup>。还发现在指状青霉抗性菌株 *PdCYP51* 基因上游126 bp插入序列的中部出现了一个199 bp的插入序列<sup>[14]</sup>。与此同时，有研究报道，*PdCYP51* 的同源基因 *PdCYP51B* 与指状青霉对 DMIs 的抗性相关；*PdCYP51B* 上游启动子区199 bp片段的插入导致了 *PdCYP51B* 的过量表达<sup>[9]</sup>。为进一步明确湖北地区指状青霉抗性菌株的耐药性分子机制，2014年本课题组检测了78株咪唑胺抗性菌株 *CYP51A* 和 *CYP51B* 基因的序列，结果发现在 *CYP51B* 中出现了4个位点的突变可能与菌株对咪唑胺产生不同抗性水平相关。为了解释 *CYP51B* 中出现的突变点作用，分别对 *CYP51B* 野生型蛋白和突变体蛋白进行同源建模，并用所得 *CYP51B* 及突变体三维结构与咪唑胺进行分子对接，结果显示 Y136H、G459S 突变与菌株抗药性密切相关<sup>[15]</sup>。

本文以意大利青霉菌为研究对象，参照 *PdCYP51B* 序列与产黄青霉某推定蛋白序列的比对结果，通过巢式 PCR 扩增得到保守序列，并利用染色体步移技术获得了 *PiCYP51B* 基因及上下游调控序列。结合生物信息学方法，对其5'上游调控序列进行了预测分析；并对 *PiCYP51B* 蛋白进行同源建模分析。为深入研究意大利青霉菌 *CYP51B* 结构与功能的关系奠定了良好基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

意大利青霉菌从患病柑橘(采自湖北武汉)上分离得到；大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)为本实验室保存菌种。染色体步移试剂盒(Genome Walking Kit)、克隆载体pMD18-T、*Taq* DNA聚合酶、限制性内切

酶和Trizol，购自大连宝生物公司；T4 DNA连接酶购自东盛生物公司；RNA反转录试剂盒，购自GeneCopoeia公司。其余试剂均为国产分析纯。

LB (Luria-Bertani)液体培养基(g/L)：酵母提取物5，胰蛋白胨10，NaCl 10， $1\times 10^5$  Pa灭菌20 min。

LB固体培养基：在LB液体培养基的基础上，琼脂粉含量为15%， $1\times 10^5$  Pa灭菌20 min。

PDA固体培养基：马铃薯200 g，加800 mL自来水煮沸后双层纱布过滤，取滤液，葡萄糖20 g，琼脂粉20 g，定容至1 L， $0.9\times 10^5$  Pa灭菌25 min。

PDB液体培养基：马铃薯200 g，加800 mL自来水煮沸后双层纱布过滤，取滤液，葡萄糖20 g，定容至1 L， $0.9\times 10^5$  Pa灭菌25 min。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 青霉菌基因组 DNA 的提取、纯化及质量鉴定：**将从患病柑橘分离纯化得到的意大利青霉菌接种于 PDB 液体培养基中，25  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养3 d后，采用 CTAB 法提取总基因组 DNA<sup>[15]</sup>。琼脂糖凝胶电泳检测总基因组 DNA 纯度，并用 Nanodrop (ND-1000, Gene Company Limited)检测其含量。

**1.2.2 *PiCYP51B* 基因及其上下游调控序列的克隆：**将指状青霉的 *CYP51B* 蛋白序列(Protein ID: AEK21498.1)在 NCBI 中进行 BLAST 比对，结果显示与产黄青霉一个推定的蛋白相似性较高，为92%；根据 *PdCYP51B* 蛋白序列与产黄青霉蛋白(No. XM\_002563357.1)序列比对结果，参照 *PdCYP51B* 基因序列，分别在上游和下游各设计3条 PCR 引物(表1)。回收目的片段，连接 pMD18-T 并转化 DH5 $\alpha$ ；挑单克隆提质粒并测序。将测序结果与 *PdCYP51B* 基因序列进行比对，最终得到保守序列。

根据所得保守序列，设计3对特异性引物，即：5GSP1、5GSP2、5GSP3、3GSP1、3GSP2、3GSP3(表1)，引物 AP1-AP4 由试剂盒提供。染色体步移参照 Genome Walking Kit 说明书进行，并做相应修改。以意大利青霉菌敏感性菌株 HSPi-1 的基因组 DNA 为模板，采用 AP1-AP4/GSP14 对引物进行第1轮 PCR 反应后，筛选出能扩增出特异性条带的上

表 1 本研究所用的引物  
Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')	用途 Functionality
SPF1	GTCGGAAGCACCGTCAGCTATG	<i>PiCYP51B</i> 保守序列的扩增
SPF2	AGTATGGTGACATTTTCACGTTG	<i>PiCYP51B</i> 保守序列的扩增
SPF3	CCA ACTCTAAGCTCATGGAGCAG	<i>PiCYP51B</i> 保守序列的扩增
SPR1	CGAAAGGCAGATAAGGACTGTTG	<i>PiCYP51B</i> 保守序列的扩增
SPR2	AATCAATCTGCTCCTCATCTTCATC	<i>PiCYP51B</i> 保守序列的扩增
SPR3	GCATGACATCAAGTTCAGACC	<i>PiCYP51B</i> 保守序列的扩增
5GSP1	TAGACGACGTGACGACCAAAGACG	<i>PiCYP51B</i> 上游序列的扩增
5GSP2	CTAGGTAGACGGTGGTCTTCTTGC	<i>PiCYP51B</i> 上游序列的扩增
5GSP3	CATCTGCGATCGACATACCTTTGC	<i>PiCYP51B</i> 上游序列的扩增
3GSP1	ACTCCAGAAGCTCGACTTGC ACTC	<i>PiCYP51B</i> 下游序列的扩增
3GSP2	CGTGGAGGGCACTTCTTACGTTATC	<i>PiCYP51B</i> 下游序列的扩增
3GSP3	TCCCTGAACCTCTGAAGTGAATCC	<i>PiCYP51B</i> 下游序列的扩增
PiCYP51B-F	CTTTC ACTCTCTCCTTTTATCGTCC	<i>PiCYP51B</i> 扩增
PiCYP51B-R	GGGAATCTTTTCTAAAACCTAACTC	<i>PiCYP51B</i> 扩增

游正向引物,再用 AP1-AP4/GSP2 进行第 2 轮 PCR 反应,最后用 AP1-AP4/GSP3 进行第 3 轮 PCR 反应。对获得的目的片段进行克隆和回收并测序。

第 1 次染色体步移时,热不对称 PCR 反应条件如下: 94 °C、98 °C 1 min; 94 °C 30 s, 68 °C 1 min, 72 °C 2 min, 5 个循环; 25 °C 3 min, 1 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 1 min, 72 °C 2 min (进行 2 次), 改变退火温度 44 °C 1 min (进行 1 次)为 1 组循环, 重复 15 次; 72 °C 10 min。第 2 次染色体步移以第 1 轮 PCR 产物为模板, AP/GSP2 为引物进行。94 °C 30 s, 68 °C 1 min, 72 °C 2 min (进行 2 次), 改变退火温度 44 °C 1 min (进行 1 次)为 1 组循环, 重复 15 次; 72 °C 延伸 10 min。第 3 次染色体步移以第 2 轮 PCR 产物为模板, 再用 AP/GSP3 为引物。PCR 程序同第 2 轮。

第 3 轮 PCR 产物纯化回收后克隆至 pMD-18 载体。连接转化、质粒 DNA 的提取、纯化、酶切

鉴定等操作均参照对应试剂盒说明书。DNA 测序由南京金斯瑞公司完成。

**1.2.3 PiCYP51B 的同源模建:** 以 PiCYP51B 的蛋白质序列为探针, 在 NCBI 数据库中利用 BLASTp 程序搜索 Brookheaven 蛋白质晶体数据库, 得到模板蛋白人的细胞色素 P450 甾醇 14- $\alpha$ -脱甲基酶 (CYP51) 的三维结构, 收录号为 3LD6<sup>[16]</sup>。利用 ClusterW 程序<sup>[17]</sup>进行序列比对, 确定模板与序列之间的残基匹配。

**1.2.4 CYP51B 基因及其上游调控序列分析:** 采用 NNPP 在线分析软件 (<http://www.fruitfly.org/seq.tools/promoter.html>) 预测 PiCYP51B 基因 5' 上游区的转录起始位点。TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 及 Match (<http://www.Gene-regulation.com/pub/programs.html/match>) 对转录因子数据库 TRANSFAC (<http://trans-fac.gbf.de/TRANSFAC/>) 进行搜索, 寻找

PiCYP51B 基因上游调控区各转录因子结合位点<sup>[18-19]</sup>。

首先利用 DNASTar 软件对克隆得到的意大利青霉 CYP51B 基因进行开放阅读(ORF)分析, 并与意大利青霉 CYP51A、指状青霉 CYP51B 基因序列进行比对, 结合以 cDNA 为模板得到的无内含子的 PiCYP51B 基因序列, 以确定该基因的编码区和内含子序列位点; 将翻译后所得氨基酸序列输入 BLAST 进行比对, 下载与其同源性较高的菌种的氨基酸序列, 通过 MEGA 6.0 软件, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 PiCYP51B 基因及其侧翼序列的克隆

将 PdCYP51B 蛋白序列放在 NCBI 中进行 BLAST 比对后, 发现在产黄青霉中, 一种推定蛋白序列(XP\_002563403.1)与该序列相似性高达 92%; 依据 PdCYP51B 蛋白序列与产黄青霉蛋白序列比对结果, 得到 3 段保守序列, 参照 PdCYP51B 基因序列, 分别在保守序列的上游和下游各设计 3 条 PCR 引物(表 1)。以意大利青霉敏感性菌株 HSPi-1 的基因组 DNA 为模板, 采用多种引物组合进行 PCR 扩增(图 1)。由图 1 可知, 不同的引物组合均可扩增出特异性条带。选取 SPF1/SPR1 引物进行 PCR 扩增, 最终获得 1 221 bp 的保守序列。将所得保守序列在 NCBI 中进行 BLAST 比对, 结果显示, 该保守序列与指状青霉的 CYP51B 序列的相似性达 94%。由此推测, 该序列为意大利青霉 CYP51B 的部分序列。

在得到保守序列的基础上, 在其上、下游各设计 3 条 Walking 巢式 PCR 特异性引物以扩增 PiCYP51B 基因 5'及 3'侧翼序列(表 1)。利用染色体步移技术扩增 PiCYP51B 基因 5'侧翼序列。第 1 次步移分别以 AP1-AP4 为正向引物, 5GSP1 为反向引物, 敏感性菌株 HSPi-1 基因组 DNA 为模板进行热不对称 PCR。其中, 以 AP3 和 AP4 为正向引物, 可扩增出非特异性条带。第 2 轮 PCR 反应以 AP1-AP4 为正向引物, 5GSP2 为反向引物, 第

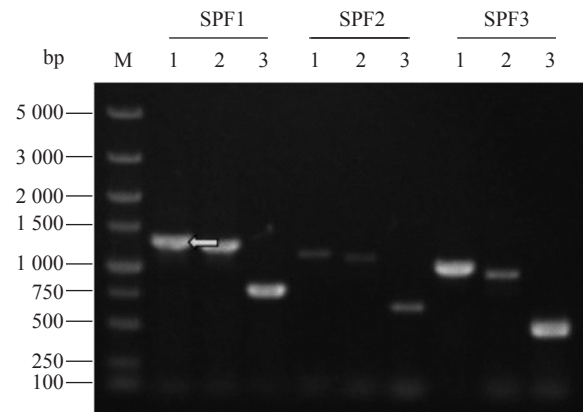


图 1 *PiCYP51B* 基因保守序列的扩增

### Figure 1 Cloning of the conserved sequence of *PiCYP51B*

注: M: DS5000 marker; 1: SPR1 为反向引物; 2: SPR2 为反向引物; 3: SPR3 为反向引物。

Note: M: DS5000 marker; 1: SPR1 as the reversed primer; 2: SPR2 as the reversed primer; 3: SPR3 as the reversed primer.

1 轮 PCR 产物为模板进行 PCR, 可获得 1 600、2 500、1 200 bp 左右的 DNA 片段。第 3 次步移以 AP1-AP4 为正向引物, 5GSP3 为反向引物, 第 2 轮 PCR 产物为模板进行 PCR, 最终获得了 2 500 bp 的 DNA 片段(图 2)。将目的片段克隆至 pMD18-T 并测序比对。结果显示, 该序列为 PiCYP51B 基因的部分序列及 5'侧翼序列。参照同样的方法扩增 *PiCYP51B* 3'侧翼序列, 其中第 1 轮 PCR 以 3GSP1 为正向引物, 第 2 次步移以 3GSP2 为正向引物, 第 3 轮 PCR 以 3GSP3 为正向引物, 结果如图 3。根据电泳结果分析, 以 AP1、AP2、AP3 为反向引物, 第 3 轮均出现了单一条带, 结合目的条带的大小, 推测以 AP1 为反向引物扩增出目的条带。将目的片段克隆至 pMD18-T 后测序比对, 结果显示, 该序列为 PiCYP51B 基因的部分序列及 3'侧翼序列。

### 2.2 PiCYP51B 基因序列分析

经测序后, 5'端得到大小为 2 314 bp 的片段, 3'端得到大小为 1 194 bp 的片段。与保守序列拼接, 最终获得包含上下游调控序列在内的 3 496 bp 的完整序列。分别以基因组 DNA 和 cDNA 为模板, 以 PiCYP51B-F/PiCYP51B-R 为引物, 扩增 PiCYP51B

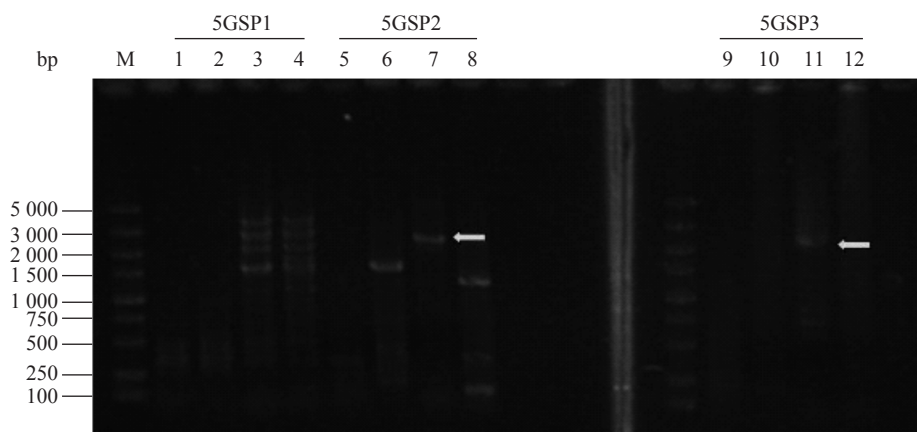


图 2 PiCYP51B 基因及其上游序列的扩增  
Figure 2 Cloning of PiCYP51B and its upstream sequence

注: M: DS5000 marker; 1-4: 引物依次为 AP1、AP2、AP3、AP4 的 1st PCR 反应产物; 5-8: 引物依次为 AP1、AP2、AP3、AP4 的 2nd PCR 反应产物; 9-12: 引物依次为 AP1、AP2、AP3、AP4 的 3rd PCR 反应产物.

Note: M: DS5000 marker; 1-4: 1st PCR production, AP1, AP2, AP3, AP4 are primers in the order; 5-8: 2nd PCR production, AP1, AP2, AP3, AP4 are primers in the order; 9-12: 3rd PCR production, AP1, AP2, AP3, AP4 are primers in the order.

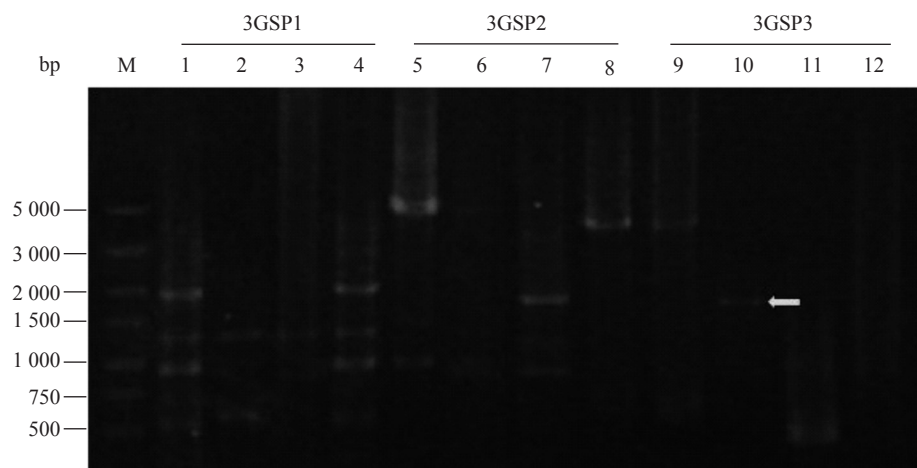


图 3 PiCYP51B 基因及其下游序列的扩增  
Figure 3 Cloning of PiCYP51B and its downstream sequence

注: M: DS5000 marker; 1-4: 引物依次为 AP1、AP2、AP3、AP4 的 1st PCR 反应产物; 5-8: 引物依次为 AP1、AP2、AP3、AP4 的 2nd PCR 反应产物; 9-12: 引物依次为 AP1、AP2、AP3、AP4 的 3rd PCR 反应产物.

Note: M: DS5000 marker; 1-4: 1st PCR production, AP1, AP2, AP3, AP4 are primers in the order; 5-8: 2nd PCR production, AP1, AP2, AP3, AP4 are primers in the order; 9-12: 3rd PCR production, AP1, AP2, AP3, AP4 are primers in the order.



基因及其编码区序列。利用 DNAMAN 和 DNASTar 软件与 PdCYP51B 基因序列进行比对分析,发现 PiCYP51B 基因的开放阅读框全长 1 575 bp, 编码 524 个氨基酸; PiCYP51B 基因中含有 3 个分别为 74、51、52 bp 的内含子, 分别位于 247 bp 与 320 bp 之间、519 bp 与 569 bp 之间、1 635 bp 与 1 686 bp 之间。

为深入了解意大利青霉 PiCYP51A/B 蛋白与其他 CYP51 蛋白在进化上的关系, 将 PiCYP51A 和 PiCYP51B 蛋白序列输入 NCBI 数据库中, 进行了 BLAST 同源分析; 并利用 MEGA 6.0 软件, 采用 Neighbor-Joining 法建构系统发育树。结果显示, 意大利青霉 PiCYP51A、PiCYP51B 两个蛋白处于进化的 2 个分支, 同一菌中的两个蛋白彼此之间亲缘关系较远, 相似性为 57.14%; 指状青霉 PdCYP51B 和意大利青霉 PiCYP51B 则处于进化的同一个分支, 两者的相似度高达 96% (图 4, 表 2)。意大利青霉 PiCYP51B 与扩展青霉中的某种假定蛋白的相似性达 92%, 与其他真菌 CYP51B 的相似性在 70%–80% 之间(表 2)。

### 2.3 PiCYP51B 基因 5'-上游调控区的序列分析

对获得的意大利青霉菌 CYP51B 基因 5'端总长为 579 bp 的上游调控序列进行了分析。采用 NNPP 在线分析软件 (<http://www.fruitfly.org/seq.tools/promoter.html>) 预测 CYP51B 基因 5'上游区的转录起始位点; TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 及 Match (<http://www.Gene-regulation.com/pub/programs.html/match>) 对转录因子数据库 TRANSFAC (<http://trans-fac.gbf.de/TRANSFAC/>) 进行搜索, 寻找 CYP51B 基因上游调控区各转录因子结合位点。结果显示: 转录起始位点位于上游 458 bp 处; 上游调控区不仅包含启动子的核心结构序列 TATA 盒(位于 -25 bp 处), 亦包含多个转录因子结合位点, 如 Abd-B、ADR1、AP-4、GATA-1、CdxA、Clox 和 Oct-1 等。在上游调控序列中嘌呤含量高, 而且从 +387 bp 处开始存在 4 个连续高嘌呤含量的热激

转录因子特异性结合位点(HSF), 在 +106 bp 处开始存在 3 个连续的 CdxA 转录因子结合位点(图 5)。

### 2.4 PiCYP51B 基因的同源模建分析

人的 CYP51 晶体结构自 2010 年被解析后, 常被用作同源模建分析的模板, 预测某些真菌的 CYP51 晶体结构。将 PiCYP51B 蛋白序列进行 BLAST 序列比对后, 发现与其他已经报道的 CYP51 晶体结构的物种相比, PiCYP51B 蛋白与人类 CYP51 蛋白最相近, 相似性为 34.63% (表 3)。选用人 CYP51 晶体结构(PDB ID: 3LD6)为模板, 利用 SWISS-MODEL 在线软件构建了意大利青霉菌 CYP51B 蛋白的结构模型(图 6)。

从 PiCYP51B 的三维结构模型(图 6A)可以看出, 它包含 12 个主要的  $\alpha$  螺旋, 4 个反向平行的  $\beta$  折叠, 以及大量无规卷曲。 $\alpha$  螺旋 B'、F、G、I 等保守二级结构共同围绕成了 PiCYP51B 的活性中心, 而血红素的铁原子与邻近的半胱氨酸通过巯基相连接, 并被固定于活性中心的下方。由 PROCHECK 程序评估得到的 Ramachandran 图显示氨基酸残基位于合理区的共占 99.3% (其中最佳区域的占 87.7%, 一般允许区占 11.0%, 勉强允许区占 0.5%), 不允许区仅占 0.7%。以上评估结果表明, 构建的模型在立体结构上合理; 根据 ProSA 程序计算得到该模型的 Z-Score 值为 -8.47, 表明该模型在能量上比较合理; 模型与模板叠合后的均方根偏差为 0.6 Å, 说明构建的模型与模板蛋白晶体结构比较相似(图 6B)。通过同源模建获得 PiCYP51B 的三维结构, 有利于研究蛋白的结构和功能, 预测蛋白与药物分子间的相互作用方式。

## 3 结论

研究发现, CYP51 是唯一广泛存在于在细菌、真菌等微生物以及高等植物、动物体内的一类 P450 酶<sup>[5,20]</sup>。DMIs 类杀菌剂作为目前使用最广泛的一类杀菌剂, 通过抑制 CYP51 来发挥其杀菌作用。据文献[21]报道, 许多真菌中含有多种 CYP51 基因。随着 CYP51A 基因的发现及广泛研究, CYP51A 的

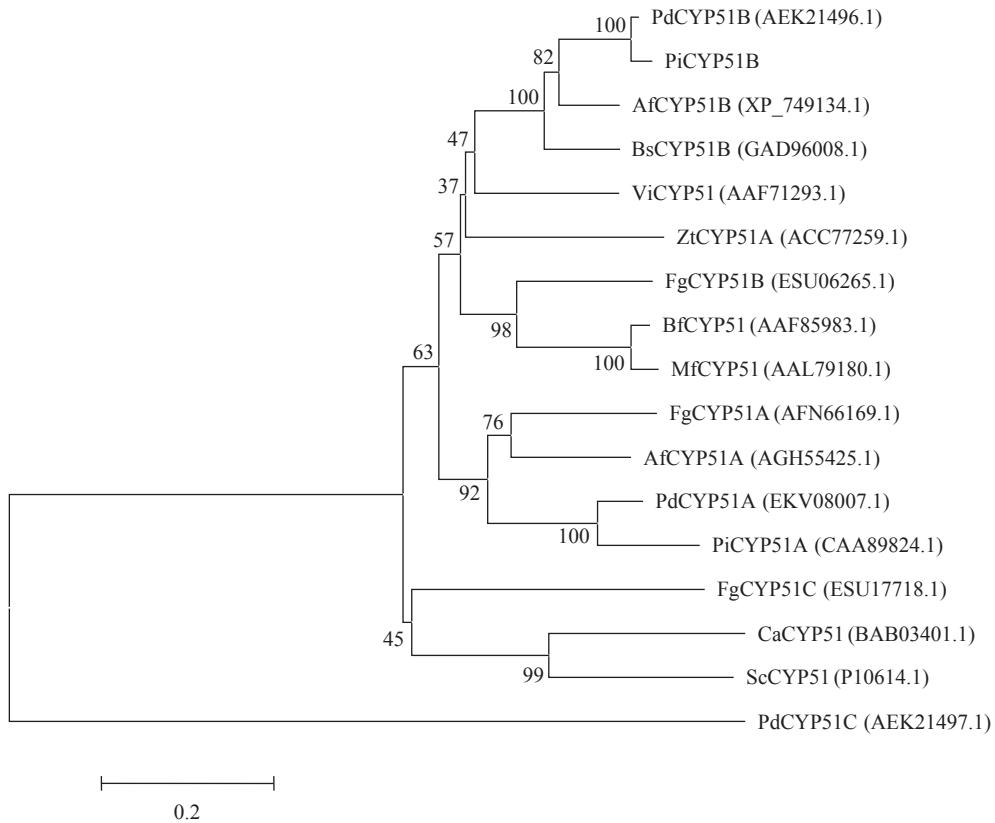


图 4 意大利青霉 CYP51A/B 蛋白与其它 CYP51 蛋白的系统发育树(Neighbor-Joining 法)  
 Figure 4 CYP51A/B protein of *Penicillium italicum* and the phylogenetic tree

表 2 意大利青霉 PiCYP51B 蛋白与其他 CYP51 蛋白的相似性  
 Table 2 The similarity among PiCYP51B protein and other CYP51 proteins

菌株 Strains	蛋白 Protein	登录号 Accession number	相似性 Similarity (%)
指状青霉 <i>Penicillium digitatum</i>	CYP51B	AEK21496.1	96
扩展青霉 <i>Penicillium chrysogenum</i>	假定蛋白	XP_002563403.1	92
草酸青霉 <i>Penicillium oxalicum</i>	假定蛋白	EPS31310.1	81
烟曲霉 <i>Aspergillus fumigatus</i>	CYP51B	XP_749134.1	78
新萨托菌 <i>Neosartorya fischeri</i>	CYP51B	XP_001261295.1	78
白曲霉 <i>Aspergillus kawachii</i>	CYP51B	GAA89598.1	78
丝霉菌 <i>Byssoschlamys spectabilis</i>	CYP51B	GAD96008.1	74

注：相似性是指序列比对过程中检测序列和目标序列之间相同碱基或氨基酸残基序列所占比例的大小。

Note: Similarity represents the proportion of identical amino acids between the sequence and target sequence.



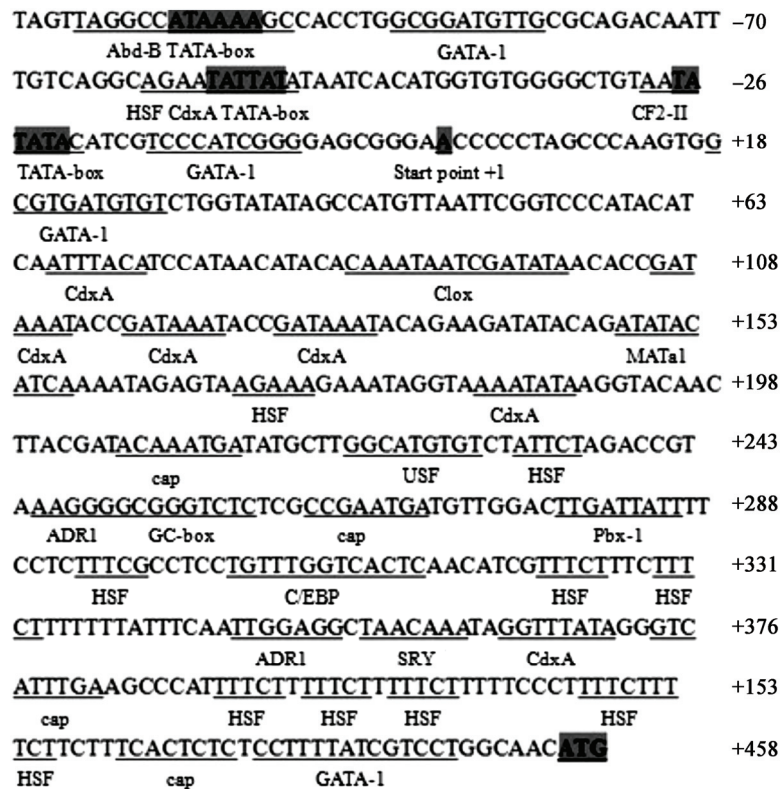


图 5 意大利青霉 CYP51B 基因的 5'-上游调控序列分析  
Figure 5 Analysis of 5'-upstream regulation sequence of PiCYP51B

注：加黑及下划线部分为转录因子结合位点。

Note: Transcription factor binding sites (with black and underlined).

表 3 PiCYP51B 与已知晶体结构的 CYP51 蛋白序列比对结果  
Table 3 Aligment of PiCYP51B and other CYP51 with known crystal structure

不同物种 CYP51 Species	人 Human (%)	利什曼原虫 <i>Leishmania</i> (%)	布氏锥虫 <i>Trypanosoma brucei</i> (%)	克氏锥虫 <i>Trypanosoma cruzi</i> (%)	结核分枝杆菌 <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> (%)
PiCYP51B	34.63	26.13	24.95	22.59	26.19

同源基因也相继被发现并逐渐成为研究热点。如在镰刀菌属中，同源基因 *CYP51C* 可以作为鉴定镰刀菌属的一个可靠标记基因，更优于 ITS 和  $\beta$ -Tubulin 序列鉴定方法。目前在指状青霉中已经发现了 3 种 CYP51 基因，分别为 *PdCYP51A*、*PdCYP51B* 和 *PdCYP51C*；其中 *PdCYP51A* 和 *PdCYP51B* 被证明与指状青霉抗真菌药物的抗性密切相关。而此前在意大利青霉中并未发现 CYP51 基因的同源基因。本研究首次克隆获得了意大利青霉 PiCYP51B 基因

及其上下游调控序列，为深入研究 PiCYP51B 的结构与功能及其对 DMIs 类抗真菌剂的抗性机制奠定了良好基础。

PiCYP51B 基因的开放阅读框全长 1 575 bp，编码 524 个氨基酸，PiCYP51B 基因中含有 3 个分别为 74、51、52 bp 的内含子。序列比对分析显示，*PiCYP51B* 与 *PdCYP51B* 基因的相似性高达 96%；与多种真菌 CYP51B 基因的相似性在 70%–80% 之间。为了更深入研究 PiCYP51B 基因的上游调控序

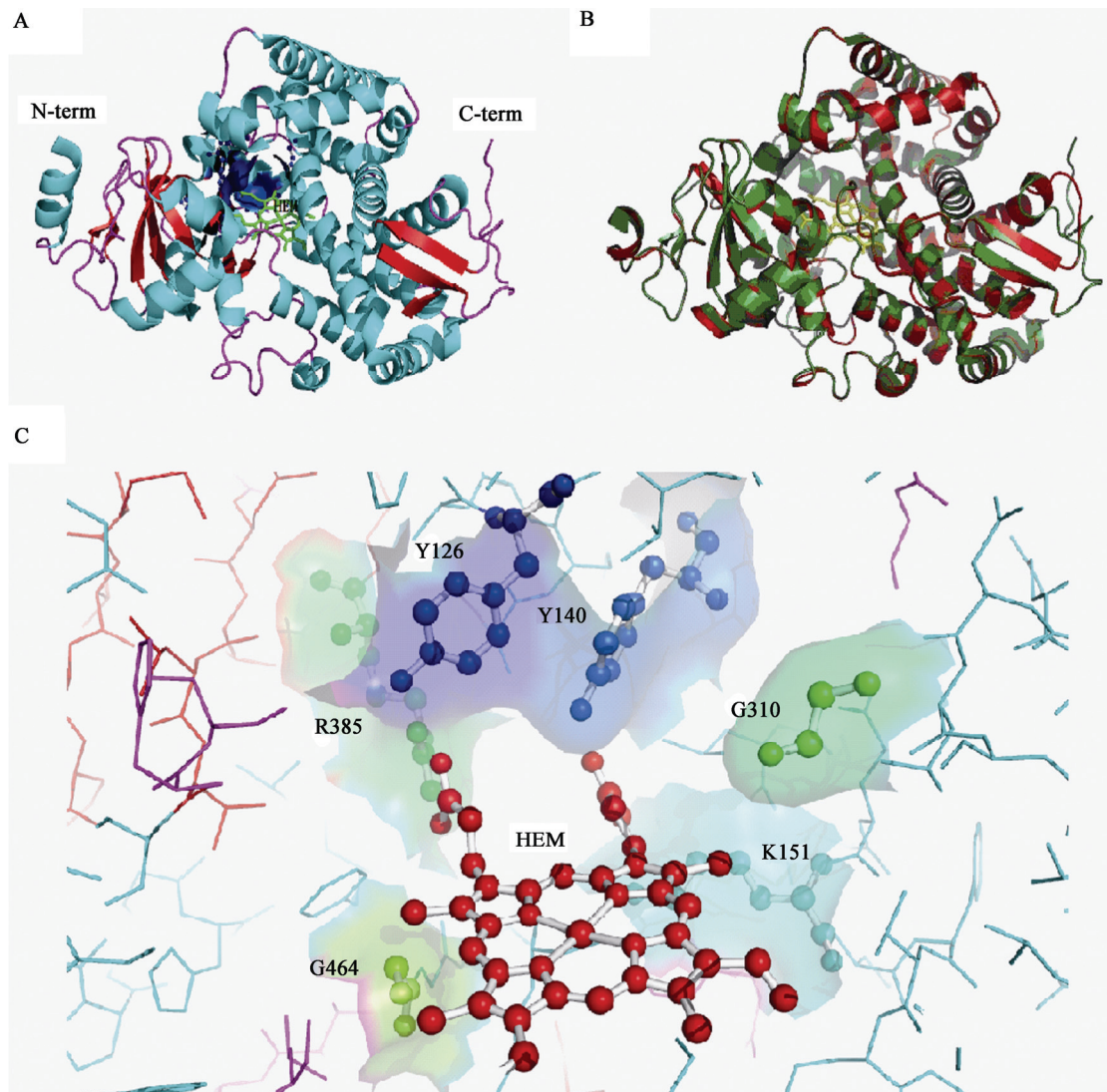


图 6 PiCYP51B 的同源模型及与模板人类 CYP51 晶体结构的叠合图

Figure 6 A homology model of PiCYP51B and the composite map of PiCYP51B and human CYP51 crystal structure

注: A: PiCYP51B 的三维结构.  $\alpha$  螺旋用亮蓝色标出,  $\beta$  折叠用品红色标出; B: PiCYP51B 同源模型与模板叠合图. 绿色为 PiCYP51B, 红色为模板; C: PiCYP51B 活性中心示意图.

Note: A: Three-dimensional structure of PiCYP51B. The  $\alpha$ -helix was marked by bright blue; the  $\beta$ -pleated sheet was marked by red; B: A homology model of PiCYP51B and the composite map of PiCYP51B and human CYP51 crystal structure. PiCYP51B was marked by green; the template was marked by red; C: The active site of PiCYP51B.

列, 本文利用在线启动子分析软件及转录因子结合位点预测软件, 对 PiCYP51B 基因的上游区域进行分析。结果发现, 该上游调控区不仅有启动子的核心结构序列 TATA 盒, 也包含多个反应元件和转录因子结合位点, 如 Abd-B、ADR1、AP-4、GATA-1、CdxA、Clox 和 Oct-1 等。在 *PdCYP51A* 基因启动子

区含有 126 bp 片段的串联重复, 引起了指状青霉对 DMIs 抗真菌剂的抗性; 分析该片段发现, 其中包含 4 个真菌转录因子的结合位点(如 HSF、ADR1); 15 个脊椎动物转录因子的结合位点(如 CdxA、GATA-1、GATA-2); 该片段可能作为增强子起作用<sup>[14]</sup>。细胞色素 P450 的转录调控是顺式作用元件

和反式作用因子相互作用的结果,这一转录调控机制与其他真核生物基因是一致的;而存在于基因上游区域的顺式作用元件与反式作用因子结合,共同调控基因的转录<sup>[5]</sup>。在该基因上游调控序列中,嘌呤含量较高,从+387 bp处开始,存在4个连续高嘌呤含量的热激转录因子特异性结合位点(HSF);在+106 bp处开始存在3个连续的CdxA转录因子结合位点;而在抗性菌株中则存在4个连续的CdxA转录因子结合位点。推测这些结合位点可能参与基因转录调控,且PiCYP51B基因的启动子活性较强。

本文选用人的CYP51蛋白晶体结构为模板,利用SWISS-MODEL在线软件构建了意大利青霉菌PiCYP51B蛋白的结构模型。由PROCHECK程序评估得到的Ramachandran图显示氨基酸残基位于合理区的共占99.3%;根据ProSA程序计算得到该模型的Z-Score值为-8.47;说明构建的模型在立体结构和能量上均合理。与模板叠合证明构建的模型与模板蛋白晶体结构相似(图6B)。PiCYP51B的三维结构的获得有助于研究蛋白的结构与功能,以及预测蛋白与药物分子的相互作用方式。

本研究组在2012年至2014年分离了大量的柑橘霉菌,其中包括78株指状青霉菌。对这些菌株的咪唑胺 $EC_{50}$ 值进行了测定,结果显示其中32%的菌株对咪唑胺具有抗药性。说明真菌抗药性的问题已经变得越来越严重,指状青霉抗药性机制的研究具有重要的意义。对这78株不同抗性菌株的CYP51A、B、C基因进行了克隆及测序,结果显示指状青霉CYP51B基因编码区的点突变与指状青霉对咪唑胺的抗药性相关,没有发现CYP51A基因的突变与菌株抗药性之间有直接的关联<sup>[15]</sup>。意大利青霉也是柑橘类水果采摘后贮藏期间感染最严重的真菌病害之一,然而目前有关其抗药性机制的报道还很少。本研究结果显示指状青霉CYP51B和意大利青霉CYP51B处于进化的同一个分支,两者具有很高的相似性(表2)。因此,推测意大利青霉的CYP51B与指状青霉的CYP51B蛋白具有相似的功能,

也可能与菌株对唑类药物的抗性相关。本文克隆了PiCYP51B基因的完整序列并进行了序列分析及基因的功能预测,为深入研究该基因功能打下了良好基础。

## 参 考 文 献

- [1] Zhang YT, Liu HM. The present situation, influencing factors and Countermeasures of international competitiveness of China fresh orange fruit[J]. World Agriculture, 2009(4): 48-51 (in Chinese)  
张玉婷, 刘宏曼. 中国柑橘鲜果国际竞争力的现状、影响因素及对策[J]. 世界农业, 2009(4): 48-51
- [2] Zhang ZF, Zhu ZR, Ma ZH, et al. A molecular mechanism of azoxystrobin resistance in *Penicillium digitatum* UV mutants and a PCR-based assay for detection of azoxystrobin-resistant strains in packing- or store-house isolates[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 131(2/3): 157-161
- [3] Oerke EC, Dehne HW, et al. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection[J]. Crop Protection, 2004, 23(4): 275-285
- [4] Becher R, Wirsal SGR. Fungal cytochrome P450 sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(4): 825-840
- [5] Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—General Subjects, 2007, 1770(3): 467-477
- [6] Yang JY, Liao MJ, Yang S. Advances in sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(10): 1681-1688 (in Chinese)  
杨娇艳, 廖明军, 杨劭. 甾醇14 $\alpha$ -去甲基化酶(CYP51)的研究进展[J]. 生物工程学报, 2008, 24(10): 1681-1688
- [7] Becher R, Weihmann F, Deising HB, et al. Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses[J]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 52
- [8] Yan X, Ma WB, Li Y, et al. A sterol 14 $\alpha$ -demethylase is required for conidiation, virulence and for mediating sensitivity to sterol demethylation inhibitors by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48(2): 144-153
- [9] Sun XP, Wang JY, Feng D, et al. *PdCYP51B*, a new putative sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene of *Penicillium digitatum* involved in resistance to imazalil and other fungicides inhibiting ergosterol synthesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(4): 1107-1119
- [10] Liu X, Jiang JH, Shao JF, et al. Gene transcription profiling of *Fusarium graminearum* treated with an azole fungicide tebuconazole[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(4): 1105-1114
- [11] Hu WQ, Sillaots S, Lemieux S, et al. Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*[J]. PLoS Pathogens, 2007, 3(3): e24
- [12] Liu X, Yu FW, Schnabel G, et al. Paralogous *cyp51* genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors[J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48(2): 113-123
- [13] Hamamoto H, Hasegawa K, Nakaune R, et al. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (*CYP51*) in *Penicillium digitatum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3421-3426

- [14] Ghosop JM, Schmidt LS, Margosan DA, et al. Imazalil resistance linked to a unique insertion sequence in the *PdCYP51* promoter region of *Penicillium digitatum*[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, 44(1): 9-18
- [15] Wang JL, Yu JH, Liu J, et al. Novel mutations in CYP51B from *Penicillium digitatum* involved in prochloraz resistance[J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(9): 762-770
- [16] Strushkevich N, Usanov SA, Park HW. Structural basis of human CYP51 inhibition by antifungal azoles[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 397(4): 1067-1078
- [17] Chaichoompu K, Kittitornkun S, Tongsima S. MT-ClustalW: multithreading multiple sequence alignment[A]//Proceedings of the 20th International Parallel and Distributed Processing Symposium. Parallel and Distributed Processing Symposium. Rhodes Island: IEEE, 2006
- [18] Zhou YJ, Yang YH, Wu SW, et al. Cloning and sequence analysis of the 5'-upstream region of cytochrome P450 gene CYP9A12 of *Helicoverpa armigera* (Hübner)[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2008, 51(2): 120-125 (in Chinese)
- 周颖君, 杨亦桦, 武淑文, 等. 棉铃虫细胞色素 P450 CYP9A12 基因 5'-上游区的克隆及序列分析[J]. *昆虫学报*, 2008, 51(2): 120-125
- [19] Li C, Zhang H, Han R, et al. Cloning and sequence analysis of upstream region of cyp51 gene from *Ustilago maydis*[J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2009, 36(6): 517-521 (in Chinese)
- 黎晨, 张华, 韩睿, 等. 玉米黑粉菌 cyp51 基因上游调控区克隆及生物信息学分析[J]. *植物保护学报*, 2009, 36(6): 517-521
- [20] Črešnar B, Petrič S. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2011, 1814(1): 29-35
- [21] Fernández-Ortuño D, Loza-Reyes E, Atkins SL, et al. The *CYP51C* gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the *Fusarium* species complex and a novel target for species-specific PCR[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 144(2): 301-309

## 2016 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
1	鼠疫菌生态与遗传研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	3 月	100	北京	
2	2016 年全国微生物毒素与急危重症学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	4 月	400	上海	陈德昌 13901674318
3	生物过程优化与放大研讨会	中国微生物学会生化工程模型化与控制专业委员会	4 月	260	湖北宜昌	尤舸浩 13908607687
4	第四届全国食用昆虫与微生物转化废弃物及高效利用研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	5 月 13-15 日	120	湖北武汉	吴悦 027-87287254
5	第二届噬菌体学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	5 月	150	湖北武汉	童贻刚 133611272813
6	第二届合成微生物学与生物制造学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	6 月	200	浙江杭州	李永泉 13735591622
7	第七届传染病基础与技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	6 月	400	待定	吕相征 lvxz@cma.org.cn
8	酿造食品的营养化学学术研讨会	中国微生物学会酿造分会	6 月	120	浙江杭州	张秀梅 13503213265
9	第十届全国海洋生物技术与创新药物学术讨论会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	8 月	250	江苏南京	王梁华 13386271017
10	工业企业微生物安全控制技术与实践研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	8 月	200	北京	010-53218310
11	第八届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	8 月 22-25 日	400	内蒙古 呼和浩特	阮志勇 13001101231
12	第二届真菌感染与宿主免疫学术研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	9 月	200	浙江宁波	李祥 13811495603