

中南林业科技大学学报

Journal of Central South University of Forestry & Technology

ISSN 1673-923X，CN 43-1470/S

《中南林业科技大学学报》2026年第5期

Doi:10.14067/j.cnki.1673-923X.2026.05.016

论文标题： 暴马桑黄细胞色素P450家族*CYP6620B1*基因克隆及真核表达分析

作　　者： 肖雯琦，李亚伟，耿楠楠，等

收稿日期： 2025-05-28

引文格式： 肖雯琦,李亚伟,耿楠楠,等.暴马桑黄细胞色素P450家族*CYP6620B1*基因克隆及真核表达分析[J].中南林业科技大学学报,2026,46(5):158-166.

XIAO W Q, LI Y W, GENG N N, et al. Cloning and eukaryotic expression analysis of *CYP6620B1* gene of cytochrome P450 family in *Sanghuangporus baumii*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2026,46(5):158-166.

相关论文推荐

Recommended articles

暴马桑黄*ERG6*基因克隆及不同发育时期差异表达

Cloning and differential expression of *ERG6* from *Sanghuangporus baumii* at different developmental stages

暴马桑黄倍半萜合酶基因*SbTps2*克隆及其响应茉莉酸甲酯的表达分析

Cloning and expression analysis of *SbTps2* in *Sanghuangporus baumii* in response to methyl jasmonate

暴马桑黄赤霉素合成基因*GGPS*的克隆及诱导表达

Cloning and induced expression of GA biosynthesis gene GGPS of *Sanghuangporus baumii*

暴马桑黄SbLSD基因克隆及差异表达分析

Cloning and differential expression analysis of lanosterol 14-alpha-demethylase gene cDNA from *Sanghuangporus baumii*

灰毡毛忍冬花器官发育相关*LmSOC1*基因克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of LmSOC1 gene related to floral organ development in *Lonicera macranthoides*

金丝楸*CbuCYP71D15*基因克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of *CbuCYP71D15* gene from *Catalpa bungei* ‘jinsi’

Doi:10.14067/j.cnki.1673-923x.2026.05.016 http: //qks.csuft.edu.cn

暴马桑黄细胞色素 P450 家族 *CYP6620B1* 基因克隆及真核表达分析

肖雯琦，李亚伟，耿楠楠，司陈缘，邹　莉
（东北林业大学 林学院，黑龙江 哈尔滨 150040）

摘　要：【目的】克隆暴马桑黄三萜类化合物合成下游途径中关键 *CYP6620B1* 基因的全长 cDNA，并对其进行生物信息学分析和真核表达分析，以期为阐明暴马桑黄三萜生物合成途径机制及提高三萜产量提供理论依据。【方法】采用 qRT-PCR 技术检测 *CYP6620B1* 基因在暴马桑黄菌丝体、原基、子实体等不同发育阶段的转录水平。采用 PCR 扩增技术获得目的基因的 cDNA 序列全长，采用生物信息学在线软件分析其蛋白的理化性质和空间结构。采用 LiAC/PEG 法获得重组酿酒酵母菌株 INVSc/pYES2-CYP6620B1，并采用酶标仪法检测其总三萜含量。【结果】*CYP6620B1* 基因在暴马桑黄不同发育阶段的转录水平呈现先上升再下降的趋势，与已报道的暴马桑黄中总三萜含量的变化趋势相吻合，提示其可能参与三萜合成调控，进而克隆获得了 *CYP6620B1* 基因 cDNA 全长，为 1 629 bp，编码 542 个氨基酸，不具有信号肽和跨膜结构，亚细胞定位于细胞质和内质网；系统进化分析结果表明，暴马桑黄 CYP6620B1 蛋白和牛樟芝蛋白同源性最高；分子对接结果显示，CYP6620B1 蛋白与羊毛甾醇的结合能最低并具有良好的对接构象；*CYP6620B1* 基因成功在酿酒酵母菌株 INVSc 中实现表达，且重组酿酒酵母菌株 INVSc/pYES2-CYP6620B1 中总三萜含量显著高于对照菌株。【结论】成功克隆得到可能参与暴马桑黄三萜合成途径的 *CYP6620B1* 基因，并对其进行分析，为深入探究该基因在暴马桑黄三萜生物合成途径中的功能奠定了基础。

关键词：暴马桑黄；细胞色素 P450 酶；基因克隆；真核表达；三萜化合物
中图分类号：S718.43　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1673-923X(2026)05-0158-09

Cloning and eukaryotic expression analysis of *CYP6620B1* gene of cytochrome P450 family in *Sanghuangporus baumii*

XIAO Wenqi, LI Yawei, GENG Nannan, SI Chenyuan, ZOU Li

(College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract:【Objective】To clone the full-length cDNA of *CYP6620B1* gene, which is a key gene in the downstream pathway of triterpenoid synthesis in *S. baumii* and perform bioinformatics analysis and eukaryotic expression analysis of the gene, with a view to providing a theoretical basis for the elucidation of the mechanism of triterpenoid biosynthesis pathway of *S. baumii* and the enhancement of triterpenoid production.【Method】The transcript level of *CYP6620B1* gene was detected by qRT-PCR at different developmental stages of the mycelium, protocorm and zygote of *S. baumii*. The full-length cDNA sequence of the target gene was obtained by PCR amplification, and the physicochemical properties and spatial structure of the protein were analyzed by bioinformatics online software. The recombinant Saccharomyces cerevisiae strain INVSc/pYES2-CYP6620B1 was obtained by LiAC/PEG method, and the total triterpene content of it was detected by microplate reader.【Result】The transcript level of *CYP6620B1* gene in different developmental stages of *S. baumii* showed a trend of increasing and then decreasing, which coincided with the reported trend of total triterpenoids in *S. baumii*, suggesting that it might be involved in the regulation of triterpenoid synthesis, and the full-length cDNA of *CYP6620B1* was cloned and obtained as 1 629 bp, encoding 542 amino acids, without signal peptide and transmembrane structure, and the sub The results of phylogenetic tree showed that the CYP6620B1 protein of *Taiwanofungus camphoratus* had the highest homology with that of *S. baumii*, and the molecular docking results showed that the CYP6620B1 protein had the lowest binding energy and good docking conformation with lanosterol; the *CYP6620B1* gene was successfully expressed in the Saccharomyces cerevisiae strain INVSc, and the

收稿日期（Received）：2025-05-28　　**修订日期**（Revised）：2025-07-27
基金项目：国家自然科学基金项目（3217140091）。
第一作者：肖雯琦（10792263089@qq.com），硕士研究生。　　**通信作者：**邹莉（shyj@nefu.edu.cn），教授，博士。
引文格式：肖雯琦 , 李亚伟 , 耿楠楠 , 等 . 暴马桑黄细胞色素 P450 家族 *CYP6620B1* 基因克隆及真核表达分析 [J]. 中南林业科技大学学报 ,2026,46(5):158-166.
XIAO W Q, LI Y W, GENG N N, et al. Cloning and eukaryotic expression analysis of *CYP6620B1* gene of cytochrome P450 family in *Sanghuangporus baumii*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2026,46(5):158-166.
* 本文为第二十八届中国科协年会学术论文成果。
Academic Papers of the 28th Annual Meeting of the China Association for Science and Technology.

total triterpene content of recombinant Saccharomyces cerevisiae strain INVSc/pYES2-CYP6620B1 was significantly higher than that of the control strain.【Conclusion】In this study, the *CYP6620B1* gene, which may be involved in the triterpene synthesis pathway of *S. baumii*, was successfully cloned and analysed, which lays the foundation for an in-depth investigation of the gene's function in the triterpene biosynthesis pathway of *S. baumii*.

Keywords: *Sanghuangporus baumii*; cytochrome P450 enzymes; gene cloning; eukaryotic expression; triterpenoids

暴马桑黄 *Sanghuangporus baumii* 是一类寄生于暴马丁香树上的桑黄真菌，在我国主要分布于东北地区 [1]。该真菌具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖、降血脂等药理活性 [2-4]，其中三萜是其发挥重要药效的主要活性成分 [5-6]。然而，目前从暴马桑黄中直接提取的三萜产量较低，难以满足相关研究与应用需求 [7]。随着分子生物学技术逐渐成熟，通过分子手段解析暴马桑黄三萜生物合成途径机制，进而提高三萜产量，为获得大量暴马桑黄三萜提供了新思路。现有研究表明，暴马桑黄三萜是通过甲羟戊酸途径（Mevalonate pathway，MVA pathway）合成的，由起始物乙酰辅酶 A（acetyl-CoA）经过氧化还原、焦磷酸化、脱羧化等一系列催化反应生成中间三萜产物羊毛甾醇 [8]，这一上游合成路径反应机制已相对清楚，但是羊毛甾醇经多种后修饰酶催化生成各类三萜的下游路径尚未阐明 [7]。

CYP450 是三萜类化合物合成途径中的一类重要后修饰酶 [9]，在真菌中主要通过催化碳环骨架上的不同位置发生氧化反应以形成羟基、羧基、酮基、双键等不饱和基团，从而形成结构丰富与功能各异的三萜类化合物 [10]。随着基因组学的快速发展，目前从真菌基因组中鉴定出超过 85 000 条 *CYP450* 基因，涵盖 805 个家族，并根据系统发育树划分为 32 个基因簇 [11]，但由于 *CYP450* 家族基因种类繁多且序列保守性较低，仅有少数基因的功能得到鉴定，关于暴马桑黄三萜合成的 *CYP450* 基因研究进展相对滞后，这在一定程度上限制了暴马桑黄三萜生物合成途径的深入解析。

为揭示暴马桑黄三萜下游合成途径的分子机制，本研究前期利用 RNA-seq 技术对暴马桑黄不同发育阶段（菌丝体、原基和子实体）转录组进行了分析 [12-13]，发现 *CYP450* 家族基因 *CYP6620B1* 转录水平的变化趋势与暴马桑黄三萜积累趋势相似，推测其可能参与暴马桑黄三萜的合成。为了进一步验证其功能，对 *CYP6620B1* 基因 cDNA 序列全长进行克隆和生物信息学分析，并探究该基因在酿酒酵母中三萜合成的功能，为深入阐明其功能及解析暴马桑黄三萜的生物合成途径奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　菌株与载体

本研究所用的暴马桑黄菌种 DL101（GenBank KP974834）由东北林业大学森林保护学科实验室提供并保藏。大肠杆菌克隆菌株 DH5*α*、酿酒酵母菌表达菌株 INVSc1、酿酒酵母表达载体 pYES2 均购于大连 Takara 生物公司。

1.1.2　试　剂

限制性内切酶 *Hind* Ⅲ、Premix Taq 酶、TB Green ™ Premix Ex Taq ™ Ⅱ（Tli RNaseH Plus）酶、5×In-Fusion HD 试剂盒、Prime Script Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒、Prime Script ™ RT reagent Kit with gDNA Eraser（Perfect Real Time）均购自大连 Takara 公司。植物总 RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购于北京天根生化公司。质粒提取试剂盒购自上海 Omega 公司。聚丙烯酰胺凝胶电泳（dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司。

1.2　暴马桑黄不同发育阶段中 *CYP6620B1* 基因转录水平分析

参照孙婷婷 [8] 的方法，收集暴马桑黄不同时期的菌丝体、原基和子实体，利用植物总 RNA 提取试剂盒分别提取总 RNA，通过反转录试剂盒合成 cDNA，利用 Primer Express3.0 设计特异性引物 CYP6620B1-F3 和 CYP6620B1-R3，以 *α-tubulin* 基因作为内参进行 qRT-PCR 反应，每组设置 3 个重复。根据得到的不同 C_t 值，按照公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算暴马桑黄不同发育阶段基因的相对转录水平 [14]。

1.3　*CYP6620B1* 基因克隆

用接种钩从保存的暴马桑黄试管菌种中挑取菌块接种在 PDA 平板中央，待菌丝长满平板，使用直径 1 cm 的打孔器从菌落边缘打取 10 个菌饼，将菌饼接种至装有 250 mL PD 的三角瓶中，在

25 ℃、150 r/min 条件下避光振荡培养 12 d，收集暴马桑黄菌丝体并在液氮中迅速研磨成粉。采用植物总 RNA 提取试剂盒提取暴马桑黄总 RNA，检测其纯度和浓度后，利用反转录试剂盒将暴马桑黄总 RNA 反转录为 cDNA，以反转录的 cDNA 为模板，CYP6620B1-F1 和 CYP6620B1-R1 为引物进行 PCR 扩增（表 1）。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化，纯化产物送哈尔滨擎科生物公司测序。

表 1 引物信息 †
Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列（5′ → 3′） Primer sequence（5′ → 3′）	预测片段大小 Predicted fragment size /bp
CYP6620B1-F1	ATGAATGCCCCGTTGACCTT	1 629
CYP6620B1-R1	TTAATACATGCTTGGAAGCTCTTGG	
CYP6620B1-F2	TCACTATAGGGAATATTAAGCTTATGAATGCCCCGTTGACCTT	1 672
CYP6620B1-R2	GAACCCCCCCATGGTAAGCTTTTAATACATGCTTGGAAGCTCT	
PYE-T7	TAATACGACTCACTATAGGG	329
PYE-CYC	GTGACATAACTAATTACATGATG	
CYP6620B1-F3	ACTTTCTGCTCTGTCGTCCTTGT	149
CYP6620B1-R3	TTTCCCCACTCAGCGAATGTT	
a-tubulin-F	CCAGCAAGCGTTACCGATT	129
α-tubulin-R	TCCACGACGTCCATCGTTC	

† 下划线部分表示同源臂。The underlined part represents the homologous arm.

1.4 *CYP6620B1* 基因生物信息学分析

利用 ORF finder 软件和 Conserved Domains（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）预测 *CYP6620B1* 基因的开放阅读框和保守结构域。利用软件 Prot Param、ExPASY-Prot Scale tool、Net Phos、TMHMM、Signal P、WoLF PSORT 预测 CYP6620B1 氨基酸序列的理化性质、亲疏水性、磷酸化位点、跨膜区、信号肽以及亚细胞定位 [15]。利用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 在线软件分别预测蛋白的二级结构和三级结构，使用 Auto Dock Vina 软件将 CYP6620B1 蛋白与暴马桑黄三萜化合物进行分子对接，并使用 PyMOL 软件进行分析和可视化 [16-17]。用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树 [18]。

1.5 *CYP6620B1* 基因在酿酒酵母中的表达分析

1.5.1 *CYP6620B1* 基因在酿酒酵母中诱导表达

根据 *CYP6620B1* 基因全长序列设计合适的引物 CYP6620B1-F2、CYP6620B1-R2（表 1），并以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。利用限制性内切酶 *Hind* Ⅲ对 pYES2 载体进行单酶切，然后用 SOSoo 试剂盒将纯化回收的线性化 pYES2 载体与 *CYP6620B1* 基因片段进行同源重组，将重组质粒转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞扩增，涂布于含 100 μg·mL^{-1} Amp 的 LB 平板上，37 ℃倒置过夜培养，挑取阳性菌落进行 PCR 检测，将检测正确的阳性菌株摇床培养并提取重组质粒后测定浓度。采用 LiAC/PEG 法将重组质粒 pYES2-CYP6620B1 和 pYES2 载体分别转入酿酒酵母 INVSc1 感受态细胞中，再将转化的酿酒酵母菌液均匀涂布于含 100 μg·mL^{-1} Amp 的 SC/-Ura 固体培养基（SC/-Ura Broth 8 g/L，葡萄糖 20 g/L，琼脂 18 g/L，水 1 L）中，29 ℃倒置培养 48 h，挑取阳性菌株进行 PCR 扩增验证。将正确的重组酵母菌液和对照酵母菌液分别接种于 50 mL 的 SC/-Ura 液体培养基（SC/-Ura Broth 8 g/L，葡萄糖 20 g/L，水 1 L）中，于 29 ℃、180 r/min 振荡培养 2 ～ 3 d 进行扩繁培养，离心，收集菌体并重悬至 200 mL 诱导培养基（SC/-Ura Broth 8 g/L，半乳糖 20 g/L，水 1 L）中，于 29 ℃、180 r/min 诱导培养至 OD_{600} 为 1.5，离心收集酵母菌体，用于产物检测。

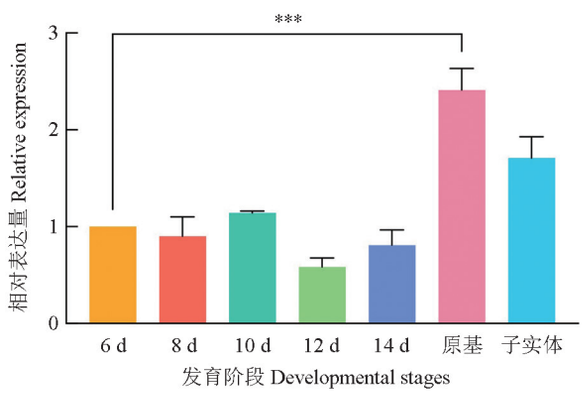
1.5.2 重组酵母菌株中总三萜的提取及测定

将收集的酵母菌体置于 60 ℃烘箱干燥至恒质量，称取 0.1 g 于离心管中，加入溶液（10% KOH+50% 乙醇）10 mL，50 ℃水浴 15 min。之后加入 10 mL 正己烷，充分振荡，吸取上清正己烷相，萃取分离 3 次，合并萃取液，60 ℃水浴蒸干。用乙腈溶解蒸发皿上的残留物，定容至 2.5 mL，即重组酵母菌株中总三萜提取液 [19-21]。吸取 100 μL 重组酵母总三萜提取液置于 10 mL 离心管中，70 ℃水浴蒸干后加入 400 μL 5% 香草醛 - 冰醋酸溶液和 1 mL 高氯酸，混匀后 65 ℃水浴 25 min，迅速冷却至室温，用乙酸乙酯定容至 5 mL 并混匀，利用酶标仪于 551 nm 处测定吸光度值 [12]。

2　结果与分析

2.1　*CYP6620B1* 基因在不同发育阶段的转录水平

基于转录组数据筛选得到 *CYP6620B1* 基因，对其进行转录水平分析，以反转录后得到的 cDNA 为模板，采用 qRT-PCR 检测 *CYP6620B1* 基因在暴马桑黄中不同发育阶段的转录水平。*CYP6620B1* 基因在菌丝体、原基和子实体中均有表达，其中在原基阶段转录水平最高，显著高于菌丝体 6 d 阶段（$P < 0.001$），且该基因转录水平在不同发育阶段整体呈现先上升后下降的趋势（图 1），其变化趋势与暴马桑黄在不同发育阶段总三萜含量的变化趋势相似 [22]。



“***”代表在 $P < 0.001$ 水平下显著差异。
“***” represents significant difference at $P < 0.001$ level.

图 1　不同发育阶段 *CYP6620B1* 基因的转录水平
Fig. 1　Transcript levels of the *CYP6620B1* gene at different developmental stages

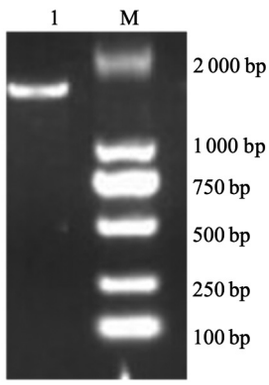
2.2　*CYP6620B1* 基因克隆

以暴马桑黄总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板，以引物 CYP6620B1-F1 和 CYP6620B1-R1 进行 PCR 扩增，结果（图 2）显示，在 1 000 ～ 2 000 bp 之间出现单一扩增条带，其片段大小与预期结果相符。将该条带回收后进行测序，测序结果与 *CYP6620B1* 基因全长序列一致，表明该基因克隆成功。

2.3　*CYP6620B1* 基因生物信息学分析

2.3.1　CYP6620B1 蛋白理化性质预测

利用生物信息学软件对 *CYP6620B1* 基因及其编码蛋白的保守结构域、相对分子质量、等电点、亲疏水性、跨膜结构域、磷酸化位点等进行预测分析。结果（图 3A）显示，*CYP6620B1* 基因 ORF 序列全长 1 629 bp，编码 542 个氨基酸，具有 P450 超家族的保守结构域。CYP6620B1 蛋白相对分子质量为 61 166 Da，分子式为 $C_{2767}H_{4284}N_{748}O_{777}S_{22}$，原子总数为 8 598，理论等电点为 7.00，不稳定系数为 45.77，亲水系数为 −0.177，为不稳定的亲水蛋白（图 3B）。该蛋白含有多个磷酸化位点，包括 31 个丝氨酸位点、28 个苏氨酸位点以及 16 个酪氨酸位点（图 3C），且不具有跨膜结构和信号肽（图 3D、E）；其定位于细胞质、内质网、线粒体、过氧化物酶体、液泡膜和细胞外基质的比例依次为 15∶4∶3∶2∶2∶1，表明该蛋白主要在细胞质和内质网中完成加工与修饰。



1. *CYP6620B1* 基因；M. Marker DL 2000。
1. *CYP6620B1* gene; M. Marker DL 2000.

图 2　*CYP6620B1* 基因 PCR 的电泳结果
Fig. 2　PCR results of *CYP6620B1* gene

2.3.2　CYP6620B1 蛋白三级结构预测及分子对接分析

使用 SPOMA 在线软件对 CYP6620B1 蛋白的二级结构进行预测分析，结果（图 4A）显示，有 42.99% 处于 α 螺旋状态，8.67% 处于延伸状态，48.34% 处于无规则卷曲状态，表明 α- 螺旋和无规则卷曲是 CYP6620B1 蛋白的主要二级结构单元。使用 SWISS-MODEL 在线软件对 CYP6620B1 蛋白三维结构进行预测分析，结果（图 4B）显示，CYP6620B1 蛋白结构预测图是以 Cytochrome P450 2B4（1suo.1.A）为模板构建的。使用 Auto Dock Vina 软件将 CYP6620B1 蛋白与 2,3- 氧化鲨烯、羊毛甾醇等 5 种暴马桑黄三萜类化合物进行分子对接分析 [12,23]，结果（表 2）显示，5 种化合物与 CYP6620B1 蛋白的自由结合能均低于 −5.0 kcal/mol，其中与羊毛甾醇的结合能最低，为 −8.39 kcal/mol，自由结合效果显著。随后采用 Pymol 1.5 软件将羊毛甾醇与 CYP6620B1 蛋白的分子对接结果进行可视化分析，结果（图 4C、D）显示，蛋白存在一个较大的活性空腔，可容纳底物羊毛甾醇，在其活性口袋的周围排列着 250 位的酪氨酸、253 位的赖氨酸、254 位的丙氨酸、207 位的亮氨酸，以及 214 位和 247 位的精氨酸，这些氨基酸可能对控制底物通过活性口袋进入蛋白空腔有着极其重要的作用。



A. CYP6620B1 蛋白保守结构域；B. CYP6620B1 蛋白亲 / 疏水性预测；C. CYP6620B1 蛋白磷酸化位点预测；D. CYP6620B1 蛋白跨膜结构预测；E. CYP6620B1 蛋白信号肽结构预测。

A. CYP6620B1 protein conserved structural domains; B. CYP6620B1 protein hydrophilic/hydrophobicity prediction; C. CYP6620B1 protein phospho-site prediction; D. CYP6620B1 protein transmembrane structure prediction; E. CYP6620B1 protein signaling peptide structure prediction.

图 3　CYP6620B1 蛋白质的理化性质

Fig. 3　Physicochemical properties and phosphate site prediction of CYP6620B1 protein

2.3.3　CYP6620B1 蛋白系统进化分析

从 NCBI 数据库中挑选与暴马桑黄 CYP6620B1 氨基酸序列具有一定同源性的细胞色素 P450 家族氨基酸序列，使用 MEGA 软件构建 CYP6620B1 蛋白系统进化树。结果（图 5）显示，暴马桑黄 CYP6620B1 蛋白与牛樟芝 AEB40217.1 蛋白聚为一支，两者亲缘关系较近，符合物种进化规律。

2.4　*CYP6620B1* 基因在酿酒酵母中的诱导表达

2.4.1　重组质粒 pYES2-CYP6620B1 的构建

将线性化的 pYES2 载体和 *CYP6620B1* 基因片段重组后，得到 pYES2-CYP6620B1 重组质粒，以 PYE-T7、PYE-CYC（表 1）为引物进行 PCR 扩增检测。结果（图 6）显示，在 2 000 bp 附近出现特异性条带，与预测目的片段大小一致，将获得的重组质粒命名为 pYES2-CYP6620B1。

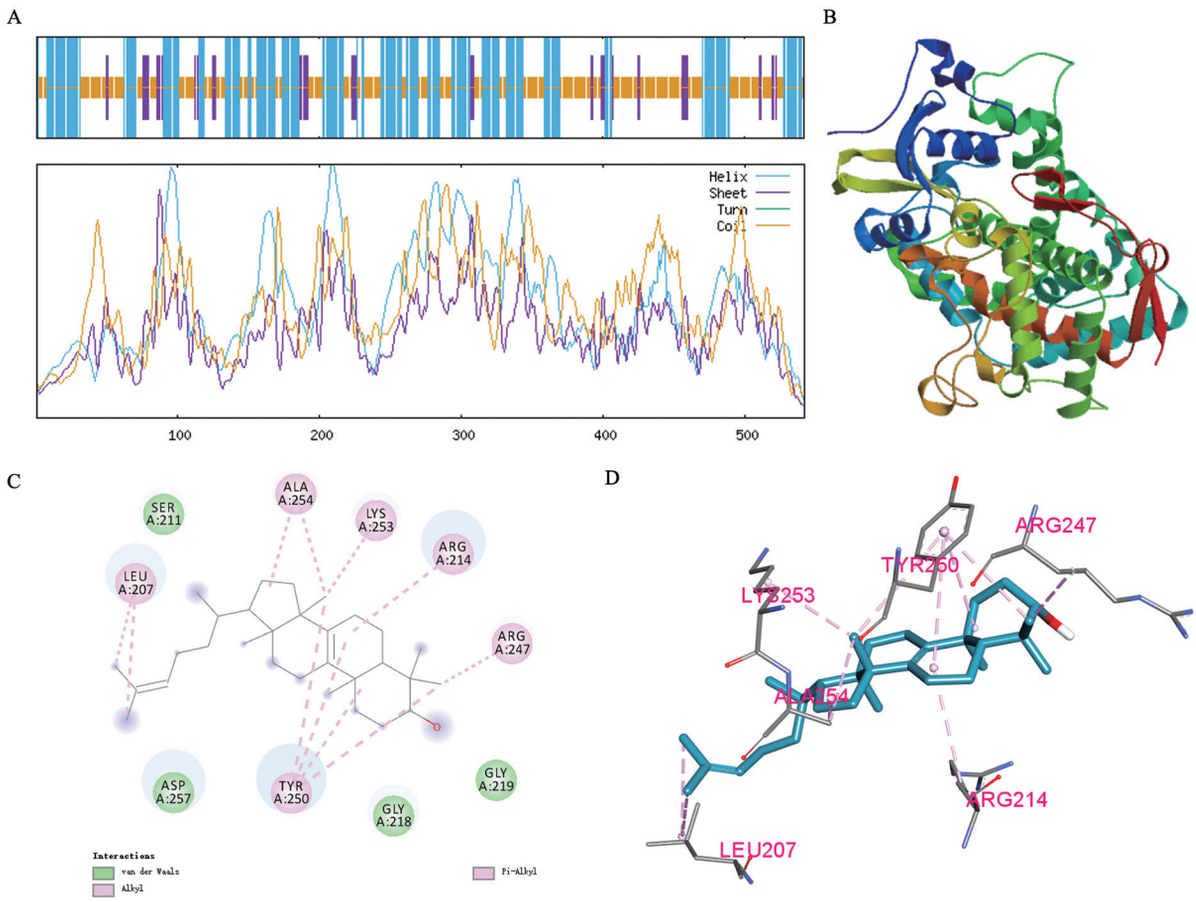
2.4.2　重组酵母总三萜含量的测定

将 pYES2-CYP6620B1 载体及 pYES2 载体以 LiAC/PEG 方法转入酿酒酵母感受态细胞中，将获得的重组酿酒酵母菌株命名为 INVSc/pYES2-CYP6620B1。收集诱导培养后的重组酵母和对照酵母菌体，提取总三萜并利用酶标仪检测含量。结果（图 7）表明，重组酿酒酵母菌株 INVSc/pYES2-CYP6620B1 总三萜含量为（11.64±0.32）mg/L，是对照组菌株（5.52±0.05）mg/L 的 2.11 倍，推测 CYP6620B1 可能参与暴马桑黄三萜合成后修饰途径，进而提高酿酒酵母总三萜含量。

表 2　暴马桑黄三萜化合物与 CYP6620B1 蛋白的自由结合能

Table 2　Free binding energies of triterpene compounds to CYP6620B1 protein

序号 No.	化合物 Chemical compound	分子式 Molecular formula	CAS 编号 CAS No.	结合能 Binding energy /（kcal·mol^{-1}）
1	2,3- 氧化鲨烯	$C_{30}H_{50}O$	7200-26-2	−7.77
2	二氢羊毛甾醇	$C_{30}H_{52}O$	911660-54-3	−7.62
3	羊毛甾醇	$C_{30}H_{50}O$	79-63-0	−8.39
4	熊果酸	$C_{30}H_{48}O_3$	77-52-1	−7.69
5	达玛烯二醇 Ⅱ	$C_{30}H_{52}O_2$	14351-29-2	−7.77



A. CYP6620B1 蛋白二级结构；B. CYP6620B1 蛋白三级结构；C. 分子对接 2D 结构图；D. 分子对接 3D 结构图。
A. Secondary structure of CYP6620B1 protein; B. Tertiary structure of CYP6620B1 protein; C. Molecularly docked 2D structure; D. Molecularly docked 3D structure.

图 4　CYP6620B1 蛋白结构预测
Fig. 4　CYP6620B1 protein structure prediction

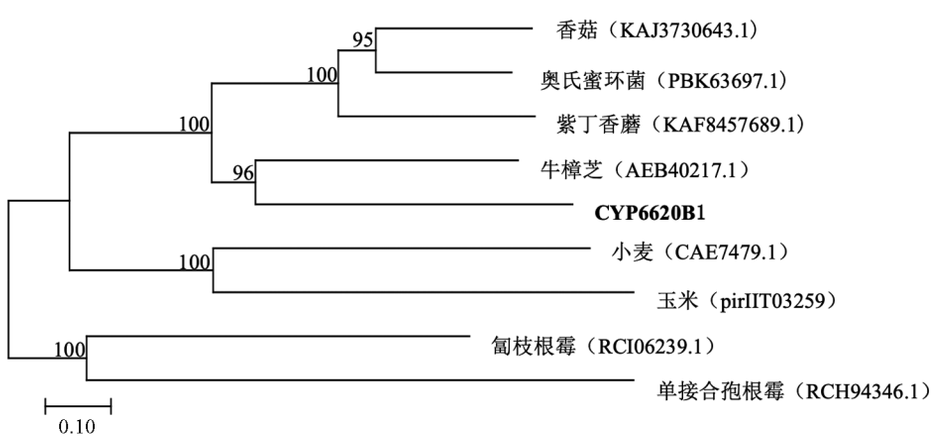
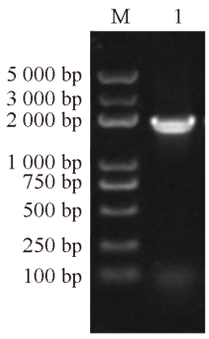


图 5　CYP6620B1 系统进化分析
Fig. 5　Phylogenetic analysis of CYP6620B1

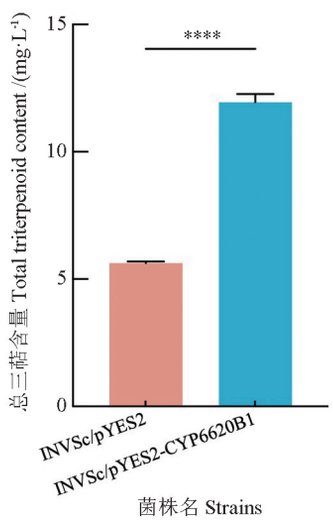
3　结论与讨论

CYP450 超家族基因拥有极强的催化多样性，是自然界核心生物催化剂 [24]，广泛存在于动物、植物和微生物中。已有研究表明，*CYP450s* 在真菌萜类及甾醇类等多种次级代谢产物的合成中发挥关键作用 [25-28]。本研究基于暴马桑黄转录组数据筛选得到 *CYP6620B1* 基因，在测定其在暴马桑黄不同发育阶段的转录水平的过程中发现，其变化趋势与三萜积累趋势一致，推测 *CYP6620B1* 基因可能参与暴马桑黄三萜合成途径。为进一步探究 *CYP6620B1* 基因在暴马桑黄三萜合成中的功能，利用 PCR 技术克隆得到了暴马桑黄 *CYP6620B1* 基因的全 cDNA 序列，并对其进行生物信息学分析，



1. 目的条带；M. Marker DL 5000。
1: The band of target gene; M: Marker DL 5000.

图 6 重组质粒 pYES2-CYP6620B1 PCR 检测结果
Fig. 6 PCR results of recombinant plasmid pYES2-CYP6620B1



“****”代表在 $P < 0.000\ 1$ 水平下显著差异。
“****” represents significant difference at $P < 0.000\ 1$ level.

图 7 重组酵母中总三萜的含量
Fig. 7 Content of total triterpenes in recombinant yeasts

结果显示，CYP6620B1 蛋白具有 *CYP450* 超家族的保守结构域，为 *CYP450* 家族基因；CYP6620B1 蛋白不具有跨膜区和信号肽，属于亲水的不稳定蛋白；亚细胞定位结果显示，该蛋白主要位于细胞质和内质网中，与大多数 CYP450 的定位结果一致 [15,19,29-31]，表明其主要在细胞质和内质网中发挥功能；系统进化分析发现，暴马桑黄 CYP6620B1 蛋白与牛樟芝蛋白（AEB40217.1）聚为一支，具有较高同源性，符合生物进化规律；分子对接分析发现，CYP6620B1 蛋白与暴马桑黄重要三萜类化合物均具有良好的结合能力，其中与羊毛甾醇的结合能最低，并具有良好的对接构象，表明 CYP6620B1 对底物羊毛甾醇具有一定催化作用的可能性，从而参与暴马桑黄三萜的生物合成。

近年来，酿酒酵母在真菌 *CYP450* 真核表达以及萜类化合物合成相关研究中被广泛应用 [32]。酿酒酵母作为典型的真核表达系统，不仅具有遗传操作简便、培养周期短等技术特点，更重要的是具备完整的亚细胞结构，可有效支持膜结合型 *CYP450* 的正常功能发挥 [33]，且酿酒酵母的甲羟戊酸途径还可以产生三萜类化合物的直接前体——异戊烯焦磷酸（isopentenyl diphosphate，IPP）和二甲基丙烯基二磷酸（dimethylallyl pyrophosphate，DMAPP），为萜类化合物的生物合成研究提供了有利条件 [34]。基于酿酒酵母表达系统的优势，本研究将含有 *CYP6620B1* 基因的酵母表达载体 pYES2-CYP6620B1 转入酿酒酵母 INVSc1 中，成功获得重组酿酒酵母菌株 INVSc/pYES2-CYP6620B1。结果显示，与对照菌株相比，重组酿酒酵母菌株中总三萜含量显著增加，推测 *CYP6620B1* 基因参与暴马桑黄三萜化合物的生物合成途径，可促进三萜化合物的积累。

综上所述，本研究对暴马桑黄 *CYP6620B1* 基因及其编码蛋白进行了初步探究，并进行了真核表达分析，初步证实 *CYP6620B1* 基因可能参与暴马桑黄三萜生物合成后修饰路径。然而，*CYP6620B1* 基因编码蛋白参与三萜类化合物合成的具体步骤有待进一步研究。

参考文献：

[1] 包海鹰，杨烁，李庆杰，等.“桑黄”的本草补充考证 [J]. 菌物研究，2017,15(4):264-270.
BAO H Y, YANG S, LI Q J, et al. Supplementary textual research on “Sanghuang”[J]. Journal of Fungal Research,2017,15(4):264-270.

[2] QU Y H, ZHANG P P, CUI J, et al. Extraction optimization, structure analysis and antioxidant activity of Polysaccharide from *Sanghuangporus baumii*[J]. Current Analytical Chemistry,2024, 20(4):264-274.

[3] 张林芳，孙婷婷，邹莉. 鲍姆纤孔菌总三萜的提取及其体外抗乳腺癌细胞 MCF-7 活性 [J]. 药物评价研究，2015,38(5): 497-502.
ZHANG L F, SUN T T, ZOU L. Extraction of total triterpenoids from *Inonotus baumii* and its inhibitory activity on breast cancer cells(MCF-7) *in vitro*[J]. Drug Evaluation Research,2015,38(5): 497-502.

[4] FENG H, ZHANG S J, WAN J M, et al. Polysaccharides extracted from *Phellinus linteus* ameliorate high-fat high-fructose diet induced insulin resistance in mice[J]. Carbohydrate Polymers, 2018,200:144-153.

[5] 孙恺婧，刘馨泽，金鑫，等. 暴马桑黄的抗肿瘤活性成分及其作用机制研究进展 [J]. 生物技术进展，2024,14(6):929-936.
SUN K J, LIU X Z, JIN X, et al. Research progress on antitumor active constituents and their mechanism of action of traditional

Chinese medicine *Sanghuangporus baumii*[J]. Current Biotechnology, 2024,14(6):929-936.

[6] ZHENG X D, PU M J, GUO Z F, et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of *Sanghuangporus baumii* fermented cultures[J]. Phytochemistry,2025,234:114441.

[7] 刘增才 , 王世新 , 孙婷婷 , 等 . 暴马桑黄 *SbLSD* 基因克隆及差异表达分析 [J]. 中南林业科技大学学报 ,2020,40(11):100-108.
LIU Z C, WANG S X, SUN T T, et al. Cloning and differential expression analysis of lanosterol 14-alpha-demethylase gene cDNA from *Sanghuangporus baumii*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2020,40(11):100-108.

[8] 孙婷婷 . 桑黄三萜生物合成途径关键酶基因的挖掘及分析 [D]. 哈尔滨 : 东北林业大学 ,2017.
SUN T T. Analysis and systematic mining of genes involved in the biosynthetic pathway of triterpenoids in *Sanghuangporus baumii*[D]. Harbin: Northeast Forestry University,2017.

[9] 占慧慧 , 刘媛 , 孟俊华 , 等 . 真菌三萜生物合成途径关键后修饰酶研究进展 [J]. 中成药 ,2024,46(1):187-192.
ZHAN H H, LIU Y, MENG J H, et al. Research progress on key post-modifying enzymes of triterpenoid biosynthesis pathway in fungi[J]. Chinese Traditional Patent Medicine,2024,46(1):187-192.

[10] MAK P J, DENISOV I G. Spectroscopic studies of the cytochrome P450 reaction mechanisms[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics,2018,1866(1):178-204.

[11] NELSON D R. Cytochrome P450 diversity in the tree of life[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2018,1866(1):141-154.

[12] 刘增才 . 暴马桑黄三萜合成相关基因挖掘及关键基因功能研究 [D]. 哈尔滨 : 东北林业大学 ,2022.
LIU Z C. Mining of genes related to triterpenoids synthesis and study of key gene functions in *Sanghuangporus baumii*[D]. Harbin: Northeast Forestry University,2022.

[13] LIU Z C, TONG X Y, LIU R P, et al. Metabolome and transcriptome profiling reveal that four terpenoid hormones dominate the growth and development of *Sanghuangporus baumii*[J]. Journal of Fungi, 2022,8(7):648.

[14] 庾蕾 , 刘建平 , 庄志雄 , 等 . 实时 RT-PCR 基因表达相对定量 REST© 软件分析与 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法比较 [J]. 热带医学杂志 , 2007,7(10): 956-958.
YU L, LIU J P, ZHUANG Z X, et al. Quantitative analysis of real-time PCR expression production by REST© and $2^{(-\Delta\Delta CT)}$[J]. Journal of Tropical Medicine,2007,7(10):956-958.

[15] 孔雅婷 , 柴学丽 , 李永华 , 等 . 茅苍术细胞色素 P450 基因克隆及生物信息学分析 [J/OL]. 分子植物育种 , https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240923.1522.010.
KONG Y T, CHAI X L, LI Y H, et al. Cloning and bioinformatics analysis of cytochrome P450 gene in *Atractylodes lancea*[J/OL]. Molecular Plant Breeding, https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240923.1522.010.

[16] 程严 , 刘学贵 , 李丹琦 , 等 . 基于活性指导的金樱子果实三萜类化合物分离研究 [J]. 当代化工 ,2024,53(6):1282-1286.
CHENG Y, LIU X G, LI D Q, et al. Isolation of triterpenoids from fruit of *Rosa laevigata* Michx. based on activity guidance[J]. Contemporary Chemical Industry,2024,53(6):1282-1286.

[17] 乌木提 • 巴合提别克 , 李亚伟 , 佟鑫宇 , 等 . 暴马桑黄倍半萜合酶基因 *SbTps2* 克隆及其响应茉莉酸甲酯的表达分析 [J]. 中南林业科技大学学报 ,2022,42(10):158-167.
WUMUTI BAHETIBIEKE, LI Y W, TONG X Y, et al. Cloning and expression analysis of *SbTps2* in *Sanghuangporus baumii* in response to methyl jasmonate[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2022,42(10):158-167.

[18] 佟鑫宇 , 乌木提 • 巴合提别克 , 李亚伟 , 等 . 暴马桑黄 *ERG6* 基因克隆及不同发育时期差异表达 [J]. 中南林业科技大学学报 , 2023,43(9):144-152.
TONG X Y, WUMUTI BAHETIBIEKE, LI Y W, et al. Cloning and differential expression of *ERG6* from *Sanghuangporus baumii* at different developmental stages[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2023,43(9):144-152.

[19] 景纳良 . 茯苓酸生物合成途径中 *CYP* 基因的克隆及产羊毛甾烷型三萜的酿酒酵母工程菌构建 [D]. 武汉 : 华中农业大学 , 2023.
JING N L. Cloning of *CYP* gene involved in the biosynthetic pathway of pachymic acid and construction of engineered *Saccharomyces cerevisiae* producing lanosterane-type triterpenes[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University,2023.

[20] 张玉琦 . *BpCYP49*、*BpCYP71* 基因在白桦脂醇合成中的功能鉴定 [D]. 哈尔滨 : 东北林业大学 ,2021.
ZHANG Y Q. Function identification of *BpCYP49* and *BpCYP71* genes in betulin synthesis[D]. Harbin: Northeast Forestry University,2021.

[21] 梅月菊 . 远志 CYP88A85 在酿酒酵母体内的功能研究 [D]. 太原 : 山西大学 ,2020.
MEI Y J. Study on the function of *Polygala tenuifolia* CYP88A85 in *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Taiyuan: Shanxi University,2020.

[22] 刘增才 , 孙婷婷 , 孙健 , 等 . 暴马桑黄甲羟戊酸激酶基因的克隆及差异表达分析 [J]. 吉林农业大学学报 ,2023,45(5):547-552.
LIU Z C, SUN T T, SUN J, et al. Cloning and differential expression of mevalonate kinase gene from *Sanghuangporus baumii*[J]. Journal of Jilin Agricultural University,2023,45(5):547-552.

[23] 刘坤 , 付鑫垚 , 郭彤 , 等 . 桑树桑黄总三萜的提取纯化及其生物活性研究 [J]. 广西植物 ,2025,45(2):217-227.
LIU K, FU X Y, GUO T, et al. Extraction, purification and biological activity of total triterpenes from *Sanghuangporus sanghuang*[J]. Guihaia,2025,45(2):217-227.

[24] HUSSAIN R, AHMED M, AHMAD KHAN T, et al. Fungal P450 monooxygenases - the diversity in catalysis and their promising roles in biocontrol activity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2020,104(3):989-999.

[25] PERMANA D, KITAOKA T, ICHINOSE H. Conversion and synthesis of chemicals catalyzed by fungal cytochrome P450 monooxygenases: a review[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2023,120(7):1725-1745.

[26] WANG W F, XIAO H, ZHONG J J. Biosynthesis of a novel ganoderic acid by expressing CYP genes from *Ganoderma lucidum* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2022,106(2):523-534.

[27] 谢泽昊 . 茯苓三萜修饰相关细胞色素 P450 酶及短链脱氢酶的挖掘 [D]. 武汉 : 华中农业大学 ,2024.
XIE Z H. Exploration of *Poria cocos*(schw.) wolf triterpenoid modifying cytochrome P450 enzymes and short-chain dehydrogenase[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University,2024.

[28] ZHANG Y Q, ZHANG M, WANG Z L, et al. Identification of key post-modification enzymes involved in the biosynthesis of lanostane-type triterpenoids in the medicinal mushroom *Antrodia camphorata*[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2025, 64(7):e202420104.

[29] 徐晓兰 . 灵芝三萜和金银花绿原酸生物合成途径关键酶基因的挖掘及分析 [D]. 北京 : 北京协和医学院 ,2013.
XU X L. Mining and analysis of key enzyme genes in chlorogenic acid biosynthesis pathway of *Ganoderma lucidum* triterpenoids and *Lonicera japonica* Thunb.[D]. Beijing: Peking Union Medical College,2013.

[30] 刘和平 . 茯苓酸生物合成途径中 *CYP450* 基因的克隆与功能验证 [D]. 武汉 : 华中农业大学 ,2022.
LIU H P. Cloning and function of *CYP450* gene involved in the biosynthetic pathway of pachymic acid in *Poria cocos*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University,2022.

[31] 李亚伟 , 刘增才 , 孙婷婷 , 等 . 暴马桑黄细胞色素 P450 家族 *CYP5150AW6* 基因克隆及表达分析 [J]. 中草药 ,2022,53(11): 3448-3455.
LI Y W, LIU Z C, SUN T T, et al. Cloning and expression analysis of CYP5150AW6 gene of cytochrome P450 family in *Sanghuangporus baumii*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2022,53(11):3448-3455.

[32] ZHANG F S, ZHANG X, WANG Q Y, et al. Cloning, yeast expression, and characterization of a *β*-amyrin C-28 oxidase (CYP716A249) involved in triterpenoid biosynthesis in *Polygala tenuifolia*[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin,2020, 43(12):1839-1846.

[33] WANG W F, XIAO H, ZHONG J J. Biosynthesis of a ganoderic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by expressing a cytochrome P450 gene from *Ganoderma lucidum*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018,115(7):1842-1854.

[34] LIU J H, LI Y Y, XU X H, et al. Multiplexed engineering of cytochrome P450 enzymes for promoting terpenoid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* cell factories: a review[J]. Biotechnology Advances,2025,81:108560.

[本文编校：谢荣秀]