

尚书凤, 赵小龙, 杨书洋, 等. 1 α -羟化酶的真核表达和生物信息学特征及其在成年肉鸡组织中的差异表达[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(5): 1286-1297.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.05.016

1 α -羟化酶的真核表达和生物信息学特征及其在成年肉鸡组织中的差异表达

尚书凤¹, 赵小龙², 杨书洋¹, 郭素芬¹, 樊阔¹, 李天¹, 王琦¹

(1. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 汉中市中心医院, 陕西 汉中 723000)

摘要: 旨在构建 1 α -羟化酶(*CYP27C1*)真核表达载体, 在 293T 细胞中重组表达 CYP27C1-mycHis, 探究 *cyp27c1* 基因在成年鸡不同组织中的表达水平, 明确 1 α -羟化酶三级结构特征、与底物识别和活性中心底物结合相关的关键氨基酸。将合成的 *cyp27c1* 的开放阅读框(ORF)插入 pMD18-T 质粒, 并将该质粒命名为 pMD-*cyp27c1*。以改造后的质粒为模板, 通过 PCR 扩增 *cyp27c1* ORF, 将其插入 pcDNATM3.1, 构建真核表达载体 pcDNA-*cyp27c1*。然后分别用 pcDNA-*cyp27c1* 及空载体 pcDNA 瞬时转染 293T 细胞, 48 h 后收集细胞, 提取线粒体, 用 Bradford 法测定蛋白质的质量浓度。1 μ g 线粒体用于 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 以 myc 抗体作为一抗检测重组 CYP27C1 在 293T 细胞中的表达水平。利用实时荧光定量 PCR 检测 *cyp27c1* 在成年鸡组织中的表达水平。通过生物信息学分析 CYP27C1 的理化特性, 并预测其亚细胞定位, 利用同源建模、多序列同源比对和分子对接法研究 CYP27C1 的空间结构特征以及与底物(25-OH D₃)结合和识别相关的关键氨基酸。测序结果显示, 1 608 bp 编码区插入到 pcDNATM3.1, 并成功在其 3' 端融合了载体表达标签 myc-His。在重组表达 CYP27C1-mycHis 的 293T 细胞线粒体中检测到相对分子质量为 58 000 的特异性条带。实时荧光定量 PCR 结果表明, *cyp27c1* 基因在鸡肝、肾、胸肌、腿肌、小肠、胸腺、脾、肾上腺、睾丸、卵巢等组织中均有表达, 并且相对表达量存在组织差异性。*cyp27c1* 基因编码 1 个由 536 个氨基酸组成的细胞色素 P450, 亚细胞定位于线粒体上, 成熟蛋白质 N-末端起始于 V62。同源建模结果显示, CYP27C1 中 α 螺旋、 β 折叠的氨基酸数量分别占蛋白质中总氨基酸数量的 49.15%、5.90%, 具有与其他线粒体细胞色素 P450 相似的开放式三级结构。多序列比对和分子对接结果表明, C482、R135 与血红素形成较强的氢键; A136、K83 是与 25-OH D₃ 识别的关键氨基酸; 活性中心 L343、D347 是与 25-OH D₃ 结合的关键氨基酸。本研究成功构建了 CYP27C1 真核表达载体, 并在 293T 细胞中超表达 CYP27C1, 确定了 CYP27C1 的三级结构和与底物识别及结合相关的关键氨基酸, 为后续深入研究 CYP27C1 结构、功能和催化机制提供了基础。

关键词: 鸡; 细胞色素 P450 27C1; 真核表达; 生物信息学

中图分类号: S831.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)05-1286-12

Eukaryotic expression and bioinformatics characteristics of 1 α -hydroxylase and its differential expression in adult broiler tissues

SHANG Shu-feng¹, ZHAO Xiao-long², YANG Shu-yang¹, GUO Su-fen¹, FAN Kuo¹, LI Tian¹, WANG Qi¹

(1. College of Bioscience and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China; 2. Hanzhong Central Hospital, Hanzhong 723000, China)

收稿日期: 2022-03-30

基金项目: 陕西省教育厅专项科研计划项目(16JK1148); 陕西理工大学人才启动项目[SLGQ13(2)-24]

作者简介: 尚书凤(1978-), 女, 陕西安康人, 博士, 讲师, 主要研究方向为动物生理生化。(E-mail) shangshf@sntu.edu.cn

通讯作者: 王琦, (Tel) 0916-2641576; (E-mail) 412704720@qq.com

Abstract: The aim of this study was to construct pMD-*cyp27c1* eukaryotic expression vector, express recombinant CYP27C1-mycHis in 293T cells, explore the expression levels of *cyp27c1* in different tissues of adult chickens, and confirm the tertiary structure and the key amino acids involved in identifying and binding substrate in

active-center. The open reading frame (ORF) of *cyp27c1* produced artificially was inserted into pMD18-T, which was named pMD-*cyp27c1*. The ORF of *cyp27c1* was amplified by PCR using the modified plasmids as templates, and subsequently inserted into pcDNATM3.1 to construct pcDNA-*cyp27c1* eukaryotic expression vector. The 293T cells were transiently transfected with pcDNA-*cyp27c1* and empty vector pcDNA, respectively. After 48 hours, the cells were collected. The mitochondria were extracted, and the protein concentration was determined by Bradford method. The 1 μ g mitochondria were used for 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) separation. Herein, myc antibody was used to estimate the expression of recombinant CYP27C1 in 293T cells. The expression level of *cyp27c1* in adult chicken was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The physicochemical properties of CYP27C1 were analyzed by bioinformatics, and its subcellular localization was predicted. The structure characteristics and key amino acids involved in identifying and binding substrate (25-OH D₃) were confirmed by homology modeling, molecular docking and multi-sequence homology alignment. The results showed that encoding sequence of 1 608 bp was inserted into pcDNATM3.1. The expression tag myc-His was successfully fused at the 3'end. A specific band with a relative molecular weight of 58 000 was detected in the mitochondria of 293T cells expressing recombinant CYP27C1-mycHis. The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that *cyp27c1* gene was expressed in liver, kidney, chest muscle, thigh, small intestine, thymus, spleen, adrenal gland, testicles and ovary. And mRNA expression levels displayed tissue variability. The *cyp27c1* encoded a mitochondrial cytochrome P450 composed by 536 amino acids. The N-terminal of mature protein started at V62. The alpha-helices and beta-sheets accounted for 49.15% and 5.90% of mature protein, respectively. CYP27C1 protein had a typical open tertiary structure similar to other mitochondrial cytochrome P450. The results of molecular docking and multi-sequence homology alignment indicated that C482 and R135 formed strong hydrogen bonds with heme. A136 and K83 were key amino acids recognizing 25-OH D₃. L343 and D347 in the active centers were key amino acids interacting 25-OH D₃. In this study, the CYP27C1 eukaryotic expression vector is successfully constructed, and CYP27C1 is expressed in 293T cells. The tertiary structure and the key amino acids involved in binding and recognizing the substrate are determined. These results provide a basis for further study on the structure, function and catalytic mechanism of CYP27C1.

Key words: chicken; cytochrome P450 27C1; eukaryotic expression; bioinformatics

还原态细胞色素 P450 (CYP) 与一氧化碳结合后,在 450 nm 处有特殊吸收峰,故命名为 P450。类似 P450 超家族单链蛋白质在生物界中广泛分布[从低等生物(细菌)到高等哺乳动物中均有分布],它们在外源性化合物代谢和外源性疏水化合物(如致癌物、环境污染物、食品添加剂、药物)解毒过程中起重要作用,也在具有生物活性的内源性化合物(如维生素 D)的生物转化过程中起着重要作用^[1-2]。

维生素 D₃ (V_{D₃}) 也叫胆钙化醇,参与鸡体内的钙磷代谢和免疫调节,与鸡骨骼肌生长、骨生长及矿化、生殖等有关^[3-4]。但是,V_{D₃}必须经过连续的两步羟化反应才能生成生物活性最高的代谢产物。首先,肝脏中的多种 P450 在维生素 D₃ 的 C-25 位点羟化使其生成钙二醇(25-OH D₃);然后在 1 α 羟化酶的催化下,以 25-OH D₃ 为底物,在其 C-1 α 位点加羟基,产生活性最高的 1 α ,25-二羟基-维生素 D₃,即 1 α ,25(OH)₂ D₃。鸡 1 α 羟化酶仅作用于羟化 25-OH D₃,不作用于维生素 D₃,因此鸡 1 α 羟化酶是 1 α ,25(OH)₂ D₃ 生成过程的关键限速酶^[5-6]。由于

催化的特异性不同于其他种属动物,鸡 1 α 羟化酶具有很大的应用潜力。目前,人、猪、小鼠等多种脊椎动物细胞色素 P450 1 α 羟化酶已经陆续被克隆和鉴定^[7-8],然而目前尚未见克隆、表达鸡细胞色素 P450 1 α 羟化酶(CYP27C1)的报道。

对鸡细胞色素 P450 基因 *cyp27c1* 编码区(Coding sequence, CDS)序列进行扩增,构建其真核表达载体,再用真核表达载体瞬时转染 293T 细胞,使其在 293T 细胞中高表达。用 qPCR 分析其组织表达特征,用生物信息学方法分析 CYP27C1 蛋白的理化性质、亚细胞定位,用同源建模和分子对接法分析 CYP27C1 的三级结构及其与底物识别、血红素结合相关的关键氨基酸,以期为深入研究 CYP27C1 的结构、功能、催化机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

免疫蛋白 Marker 全式金 Easysee Western Marker 25-90 kDa,购自北京全式金生物技术有限公司;

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞、DNA marker III, 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; KOD FX 高保真 DNA 聚合酶, 购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司; 限制性内切酶 *Not* I、*Kpn* I, 购自宝生物工程大连有限公司; Myc 小鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白 (IgG), 购自上海碧云天生物技术有限公司; 双抗 (链霉素、青霉素)、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 高糖培养基, 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 胎牛血清, 购自浙江天杭生物科技股份有限公司; Servicebio[®] RT First Strand cDNA Synthesis Kit、2 \times SYBR Green qPCR Master Mix, 购自武汉赛维尔生物科技有限公司。293T 细胞、pcDNATM3.1/myc-His(-) A, 由笔者所在实验室保存; 其他常用试剂如氯化钠、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、溴化乙锭、丙烯酰胺、*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺 (Bis)、过硫酸铵 (AP)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、四甲基乙二胺 (TEMED) 等均为分析纯, 购自中国医药集团有限公司。

1.2 基因合成及真核表达载体的构建

根据 GenBank 提供的基因序列 (登录号: XM_422077.2) 编码区, 合成基因 *cyp27c1* 的开放阅读框 (ORF), 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司将 ORF 插入克隆载体 (pMD18-T 载体), 并将该载体命名为 pMD-*cyp27c1*, 经测序验证正确后于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

以质粒 pMD-*cyp27c1* 为模板, 设计引物 (*cyp27c1* F1: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCAATGCTTTCCTCACGCGAGTCTTGAATCCG-3'; *cyp27c1* R1: 5'-CGGGGTACCTTTTCTGTCAGAAAATCTCACATTGATGGAGCCTCC-3'), 在正向 F1 引物的 ATG 前引入限制性酶切位点 *Not* I (用下划线标注), 由于 *Not* I 只有 8 个碱基, 为了避免移码, 在编码区 ATG 前多加了 1 个碱基 A (用斜体字母标注)。在编码区的 3' 端引入 *Kpn* I 位点, 并去掉 TGA, 将 *cyp27c1* 的 ORF 插入 pcDNATM3.1/myc-His(-) A 的 *Not* I/*Kpn* I, 所以 *cyp27c1* 的编码区融合了载体的 myc-His 表达标签, 以载体的 TGA 终止翻译。用 KOD FX 高保真酶扩增 *cyp27c1* 的编码区, 参见说明书配制反应混合液, 分装后上机扩增, 退火温度为 55 $^{\circ}$ C, 共设 30 个循环。将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收目的条带。用 *Not* I、*Kpn* I 配

制双酶切反应液, 加入 DNA 片段和空载体, 于 37 $^{\circ}$ C 反应 6 h。将回收纯化的 *cyp27c1* 和载体的双酶切产物用 T4 DNA 连接酶连接反应过夜, 反应液参照说明书配制。随后用反应液热激转化 *E. coli* DH5 α 感受态, 于 37 $^{\circ}$ C 生长过夜。挑选阳性克隆菌落, 用引物 *cyp27c1* F1、*cyp27c1* R1 及 KOD FX 高保真聚合酶配制 PCR 反应液, 筛选阳性转化子。将质粒进行 DNA 测序, 测序引物用载体通用引物, 经过比对后, 将测序正确的质粒于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 293T 细胞培养和转染

293T 细胞由笔者所在实验室保存, 培养条件: 采用 DMEM 完全培养基 (含 10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素和 100 g/ml 链霉素), 培养温度为 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 质量分数为 5%。293T 细胞转染: 转染前将细胞接种于 10 cm 平皿上, 培养过夜, 待铺板率达到 70%~80% 即可进行转染, 分别用 pcDNA-*cyp27c1*、空载体 pcDNA 瞬时转染 293T 细胞。转染试剂用线性聚乙烯亚胺 (PEI), 详细步骤参见说明书, 转染后培养 48 h (培养温度为 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 质量分数为 5%), 收集细胞。

1.4 蛋白质免疫印迹

用 Tris-HCl (pH 值为 7.4) 悬浮方法 1.3 收集的细胞, 超声破碎 (冰浴, 工作 5 s+暂停 5 s, 共 20 次) 后, 离心 (3 000 g, 4 $^{\circ}$ C)、去上清液, 沉淀用 Tris-Cl (pH 值为 7.4) 重悬。蛋白质浓度的测定用 Bradford 法。将 1 μ g 蛋白质样品用于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 详细步骤参考陈思航等^[9]的方法。

1.5 *cyp27c1* 基因的表达分析

各取 100 mg 2 月龄雌/雄鸡 (青脚麻肉鸡, 购自汉中市石马坡老马家禽店) 的肝、肾、腿肌、胸肌、胸腺、小肠、脾、肾上腺、睾丸、卵巢, 加入匀浆管中, 再分别加入 1 ml RNA 提取液。充分研磨后离心 (12 000 r/min, 10 min)。弃沉淀, 向上清液中加入 250 μ l 三氯甲烷, 充分混匀后于室温静置 3 min, 离心 (4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 10 min)。将上清液转移到 1 个新的离心管中, 加入 0.8 倍体积的异丙醇沉淀 RNA, 用 75% 乙醇洗涤沉淀, 再用 Water Nuclease-Free 溶解 RNA, 最后用 Nanodrop 2000 检测 RNA 的浓度、纯度。参照 Servicebio[®] RT First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书配制逆转录反应体系, 设置逆转录程序, 合成 cDNA。按照 2 \times SYBR Green qPCR

Master Mix (None ROX) 试剂盒说明书配制 qPCR 反应液,分装后上机。定量 PCR 扩增的程序:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 30 s,40 个循环;65 °C → 95 °C,每升温 0.5 °C 采集 1 次荧光信号。qPCR 扩增 *cyp27c1* 的引物序列:*cyp27c1* F2, 5'-TCGTGGCAGGAATACAGAGA-3'; *cyp27c1* R2, 5'-ACTGCCACATCTTTGGGTTT-3'。qPCR 扩增 *actin* 的引物序列:*actin*F, 5'-CTGACTGACCGCGTTACTCC-3'; *actin*R, 5'-TTGCACATACCGGAGCCATT-3'。 $\Delta Ct = cyp27c1$ 的 Ct 值 - *actin* 的 Ct 值。求出各样本的平均 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 后,用样本的平均 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ /肝样本的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示各组织与参照(肝)相比的表达倍数。

1.6 *cyp27c1* 基因的生物信息学分析

cyp27c1 基因编码的蛋白质一级结构用 BioEdit 软件进行分析,用在线网站 expasy 的 protparam 程序 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质的相对分子质量和等电点。

用在线软件 TargetP-1.1 预测蛋白质的亚细胞定位,粘贴 CYP27C1 的氨基酸序列(fasta 格式),选择“Non-plant”,提交序列。用 PPM 3.0 软件在线预测线粒体膜插入序列(Membrane insertion sequences, MIS),具体步骤:用 SWISS-MODEL 在线预测插入序列的三级结构→下载 pdb 文件→在 OPM 网站选择 PPM 服务器 3.0,添加 pdb 文件→提交预测。同时用 ClustalX2 软件进行多重序列的同源性比对,分析鸡 CYP27C1 与线粒体细胞色素 P450 的 MIS 序列差异。

用于比对的基因:猪 *cyp27b1* (登录号:NM_213995.1),小鼠 *cyp27b1* (登录号:NM_010009),人 *cyp27b1* (登录号:NM_000785.3)、*cyp27a1* (登录号:NM_000784.4)、*cyp11b2* (登录号:NM_000498)、*cyp11a1* (登录号:NM_000781.3),大鼠 *cyp24a1* (登录号:NM_201635.3)。

用 ClustalX 进行多序列比对,分析活性位点的关键氨基酸,要点如下:将需要比对的氨基酸序列放在 1 个文本文件内,打开程序,点击 File→Load Sequence→选择序列文件(包含多个 FASTA 格式的序列)→Alignment→Do Complete Alignment →输出 .aln 格式文件。为了得到效果更好的图片,用 DnaMan 作图,步骤如下:打开 DnaMan 并依次点击 File→Open special→Multiple Alignment→后缀为“.aln”的文件→Options→Preferences→设置参数。输出图像

的步骤:依次点击 File→Output→Graphic (EMF) File→保存图像。

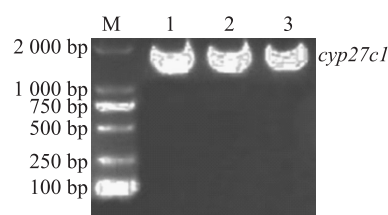
搜索 SWISS-MODEL 序列库发现,大鼠 CYP24A1(3k9v.2.A)与鸡 CYP27C1 的相似度最高,氨基酸序列的相似度达 33%,以大鼠 CYP24A1 为模板进行同源建模,在 SWISS-MODEL 网站(<http://swissmodel.expasy.org/>)上预测 CYP27C1 的三级结构,用 Ramachandran Plot 评估三级结构的稳定性。

分子对接(docking)方法:用 Autodock-tools 4.2 对接,受体为上述已建模的 CYP27C1(pdb),配体为血红素(pubchemCID:455658)、25-羟基维生素 D₃(pubchemCID:88810851)。下载 df 文件,通过 open babel GUI 进行格式转换,得到 pdb 文件。将 CYP27C1 与血红素对接,保存 pdb 文件,然后用此 pdb 格式的受体与配体 25-羟基维生素 D₃进行对接,对接 50 次,选取具有最低结合能的构象用作后续分析。分子对接结果用 pyMOL 软件进行可视化分析。

2 结果与分析

2.1 *cyp27c1* 真核表达载体的构建

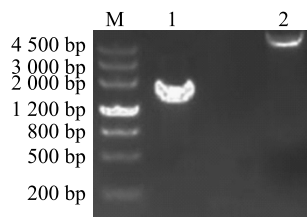
以 pMD18-*cyp27c1* 载体为模板,在扩增的 PCR 产物中检测到大小约为 1 600 bp 的单一一条带,详见图 1。将切胶回收的 DNA 片段和空载体分别用 *Not* I、*Kpn* I 双酶切,然后将双酶切产物经电泳分离后通过凝胶成像进行检测鉴定。图 2 结果显示,酶切后的 DNA 片段条带单一,未出现非特异切割。用连接产物热激转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态,通过菌液 PCR 筛选阳性克隆,共挑选出 9 个克隆,筛选出 4 个阳性克隆,详见图 3。随意挑选 2 个阳性克隆质粒进行测序,对测序结果进行比对分析,发现无移码突变,且在 3'末端融合了载体的 myc-his 标签,详见图 4。



M: DNA marker DL 2000; 1~3: *cyp27c1* 的 PCR 产物。

图 1 *cyp27c1* PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

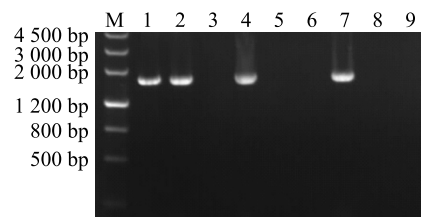
Fig.1 Results of 1% agarose gel electrophoresis of PCR products of *cyp27c1*



M: DNA marker III; 1: *cyp27c1* 的酶切产物; 2: pcDNA3.1 的酶切产物。

图2 *cyp27c1* 和 pcDNA3.1 酶切产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 Results of 1% agarose gel electrophoresis of digested products of *cyp27c1* and pcDNA3.1



M: DNA marker III; 1~9: *cyp27c1* 的 PCR 产物。

图3 *cyp27c1* PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.3 Results of 1% agarose gel electrophoresis of PCR products of *cyp27c1*

pcDNA-CYP27C1 CYP27C1	MSFLTRVLESERTYFQHALFVSRFHQAPGLSGSQSLEVRSGAENKAARPGELEPSPLG MSFLTRVLESERTYFQHALFVSRFHQAPGLSGSQSLEVRSGAENKAARPGELEPSPLG *****
pcDNA-CYP27C1 CYP27C1	RVKSLHEMPGPNNTLYNLYEFFWKDGFGRHIEIQKHTQYEGKIFKSHFGPQFVVSIAARD RVKSLHEMPGPNNTLYNLYEFFWKDGFGRHIEIQKHTQYEGKIFKSHFGPQFVVSIAARD *****
pcDNA-CYP27C1 CYP27C1	MVAQVLRSEGRAPQRANMESWQYRDRLRGRATGLISAEQEWLKMRSVLRQKILKPKDVA MVAQVLRSEGRAPQRANMESWQYRDRLRGRATGLISAEQEWLKMRSVLRQKILKPKDVA *****
pcDNA-CYP27C1 CYP27C1	VYSGGVNEVITDLIKRIYTLRSQEDGETVTNVNLFYKYSMEGVATILYECRLGCLENN VYSGGVNEVITDLIKRIYTLRSQEDGETVTNVNLFYKYSMEGVATILYECRLGCLENN *****
pcDNA-CYP27C1 CYP27C1	VPQQTVEYIEALELMFSMFKTTMYAGAIPRWLRPFIPKPWFRCRSWDGLFKFSQIHVDN VPQQTVEYIEALELMFSMFKTTMYAGAIPRWLRPFIPKPWFRCRSWDGLFKFSQIHVDN *****
pcDNA-CYP27C1 CYP27C1	KLKSIQSQDLQGEVNGGLTYLLVSKELTLEIYANMTEMLLAGVDTTSTLSWAIYML KLKSIQSQDLQGEVNGGLTYLLVSKELTLEIYANMTEMLLAGVDTTSTLSWAIYML *****
pcDNA-CYP27C1 CYP27C1	AKHPEVQQRVYEEIINKLGDQAPVARDVPKLPILIRAVLKETLRILYPLPGNGRVTQKDL AKHPEVQQRVYEEIINKLGDQAPVARDVPKLPILIRAVLKETLRILYPLPGNGRVTQKDL *****
pcDNA-CYP27C1 CYP27C1	VVGGYLIPKGTQLALCHYTTSYSEENFPMANFRPERWLRKDNLDNRVDFGSIPFGYGR VVGGYLIPKGTQLALCHYTTSYSEENFPMANFRPERWLRKDNLDNRVDFGSIPFGYGR *****
pcDNA-CYP27C1 CYP27C1	SCIGKRVAELEIHLALQLLQNFIEIKSPKTAPVHAKTHGLTTPGGSINVRFSRDKLGP SCIGKRVAELEIHLALQLLQNFIEIKSPKTAPVHAKTHGLTTPGGSINVRFSRDKLGP *****
pcDNA-CYP27C1 CYP27C1	EQKLISEEDLNSAVDHHHHHH --Myc-Tag --- His Tag

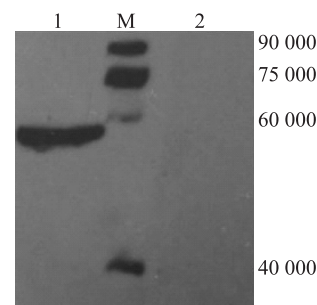
* 表示序列一致的氨基酸。

图4 pcDNA-CYP27C1 氨基酸序列比对结果

Fig.4 Amino acid sequence alignment of pcDNA-CYP27C1

2.2 Western blot 检测重组蛋白质在 293T 细胞中的表达

将重组表达的蛋白质样品通过 12% SDS-PAGE 分离后,以 myc 抗体作一抗进行 Western blot。结果表明:在重组表达的 293T 细胞线粒体中检测到相对分子质量约为 58 000 的特异条带,与 CYP27C1 的大小相符。CYP27C1 的理论相对分子质量约为 61 200, C 末端融合载体表达标签为 mys-His (相对分子质量为 3 452), 总相对分子质量为 64 652。但是 CYP27C1 是线粒体蛋白质,在 293T 细胞中表达后进行翻译后修饰,切割信号肽,成熟 CYP27C1 的相对分子质量约为 58 000,而对照样品中未检测到相应条带(图 5)。



M: 蛋白质 marker; 1: 来自 pcDNA-*cyp27c1* 转染 293T 细胞的线粒体; 2: 来自 pcDNA 转染 293T 细胞的线粒体。

图5 CYP27C1 在 293T 细胞中表达的 Western blotting 检测结果

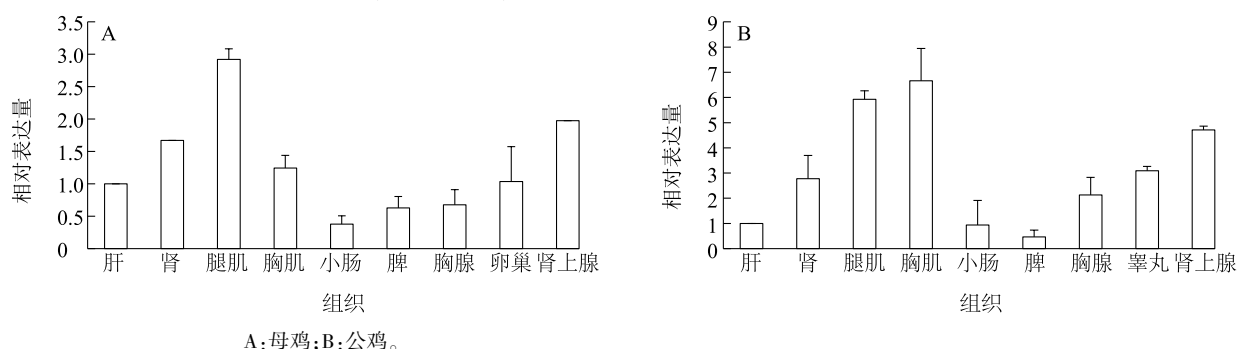
Fig.5 Western blotting detection of CYP27C1 expression in 293T cells

2.3 *cyp27c1* 基因的组织表达分析

qPCR 试验结果表明, *cyp27c1* 基因对应的 mRNA 在鸡的肝、肾、小肠、腿肌、胸肌、胸腺、脾、肾上腺、睾丸或卵巢中均有表达, 且存在组织表达差异 (图 6)。以肝为参照, *cyp27c1* 基因在成年期母鸡腿肌中的相对表达倍数最高, 达到 2.92 倍, 在肾、肾上腺中的相对表达倍数分别达到 1.66 倍、1.97 倍, 在胸肌、胸腺中的相对表达倍数分别为 1.24 倍、0.67 倍, 在卵巢中也有表达 (图 6A)。

由图 6B 可以看出, *cyp27c1* 基因在公鸡各组织中的相对表达量趋势类似于母鸡, 不同的是, 与肝相

比, *cyp27c1* 基因在公鸡胸肌、腿肌中的相对表达倍数较高, 分别达到 6.6 倍、5.9 倍, 推测可能与公鸡肌肉组织较发达相关。此外, 与肝相比, *cyp27c1* 基因在鸡生殖器官睾丸中的相对表达倍数也较高, 达到 3.08 倍, 而在母鸡卵巢中的相对表达倍数为 1.03 倍, 推测可能与 2 月龄母鸡发育状态相关。最早报道的 1 月龄鸡中的羟化酶在肾中表达, 后来 Shanmugasundaram 等^[6]报道, 1 α 羟化酶也在肾外组织中表达, 这与本试验结果一致。本试验填补了 1 α 羟化酶在生殖器官中表达的信息。



A: 母鸡; B: 公鸡。

图 6 *cyp27c1* 在 2 月龄鸡不同组织中的相对表达量

Fig.6 Relative expression of *cyp27c1* in different organs of two-month-old chickens

2.4 CYP27C1 的生物信息学分析

2.4.1 CYP27C1 氨基酸序列及其理化特性分析

用 expasy 的 protparam 程序分析基因 *cyp27c1* 的编码区, 发现其核苷酸序列包括 1 611 个碱基, 终止子为 TGA, 编码 536 个氨基酸。CYP27C1 蛋白的 N 端氨基酸是甲硫氨酸, 相对分子质量为 61 275.57, 等电点为 8.81; CYP27C1 蛋白包括 67 个强碱性氨基酸 (精氨酸和赖氨酸)、61 个强酸性氨基酸 (天冬氨酸和谷氨酸)、263 个疏水性氨基酸 (甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸)、133 个极性氨基酸 (天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸), 分子式为 $C_{2761}H_{4335}N_{755}O_{787}S_{18}$ 。CYP27C1 在哺乳动物细胞、酵母细胞、大肠杆菌细胞内的半衰期分别约为 30 h、20 h、10 h。

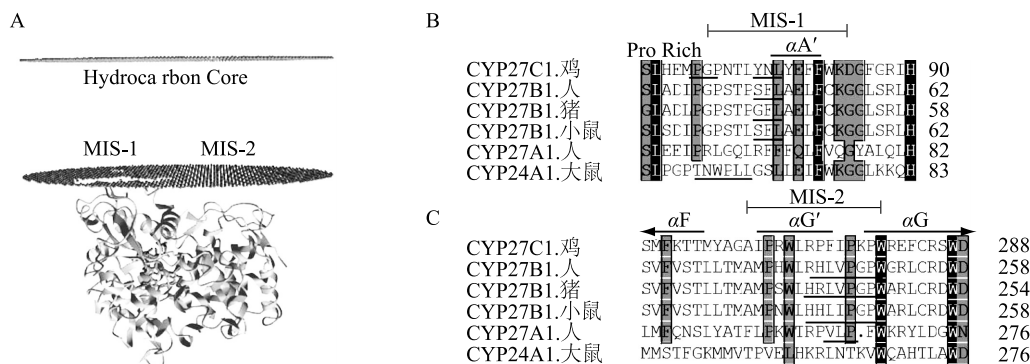
2.4.2 CYP27C1 的亚细胞定位预测及 MIS 序列分析 根据 CYP27C1 的 N 末端氨基酸序列, 用 TargetP-1.1 服务器在线预测 CYP27C1 的亚细胞定位, 结果显示, CYP27C1 存在线粒体靶向序列 (mitochondrial targeting peptide, mTP) 的可能性为

69.5%, 推测 CYP27C1 可能是线粒体细胞色素 P450。多重序列比对和 OPM 3.0 在线分析结果显示, 在 CYP27C1 氨基末端有线粒体引导序列和 1 个线粒体内膜插入区 (MIS)。MIS1 序列是 $\alpha A'$ 螺旋的 LYNL (74~77 位点) 和 FW (81~82 位点), 嵌入内膜的深度是 4.4 Å (图 7A)。然而, 人、小鼠、猪的 1 α 羟化酶有 2 个 MIS (图 7B、图 7C)。MIS 序列不仅将 P450 插入线粒体内膜, 还提供底物进入活性中心的通道 (位于 A'-A 螺旋和 F-G loop 之间)。因此, 推测鸡 1 α 羟化酶不同于人、小鼠、猪 1 α 羟化酶底物特异性的原因之一是鸡 CYP27C1 的 MIS2 区有 2 个带电荷的氨基酸 R273、K278, R、K 的疏水参数分别是 -4.5、-3.9, 是亲水性较强的 2 个氨基酸, 不利于 $\alpha G'-G$ 螺旋疏水性氨基酸序列插入膜的疏水核心。然而, 人、小鼠、猪的 1 α 羟化酶的 MIS2 区位于 $\alpha G'$ 和 G 螺旋之间, 由疏水性氨基酸形成, 有利于插入到膜的疏水核心 (图 7C)。

2.4.3 同源序列比对 大鼠细胞色素 P450 24A1 是与维生素 D₃ 代谢相关的 P450, 并且是已经获得晶体结构的线粒体 P450。人、小鼠和猪 CYP27B1

是已经克隆并且功能得到鉴定的 1α 羟化酶,其中人 CYP27A1 是代谢维生素 D_3 的关键 P450 之一,人 CYP11A1、CYP11B2 是研究得比较早的线粒体细胞

色素 P450。因此,本研究用上述 7 个 P450 蛋白氨基酸序列与鸡 CYP27C1 进行同源比对,分析 CYP27C1 的结构域及功能。



A: 鸡 CYP27C1 与脂质分子层之间的相互作用(MIS1 位于 $\alpha A'$ 螺旋内);B: 多序列比对预测的 MIS-1;C: 多序列比对预测的 MIS-2,其中细线标注的氨基酸为与膜结合的关键氨基酸。

图 7 鸡 CYP27C1 与线粒体膜结合氨基酸序列的预测结果

Fig.7 Prediction results of amino acid sequence of chicken CYP27C1 binding to mitochondrial membrane

线粒体引导序列在 CYP27C1 转运过程中被切割,成熟的 P450 27C1 从 V62 开始,紧接着是 1 个非常保守的脯氨酸(P),是 PGP motif 的第 1 个富含脯氨酸的保守结构域,在比对的这 7 个 P450 中均保守。PGP motif 是人 CYP27A1 和 CYP11A1 及大鼠 CYP2C11 正确折叠和血红素辅基结合所必需的^[10-11]。

细胞色素 P450 含有血红素辅基,血红素结合所必需的氨基酸是保守的。因此,本研究通过同源比对,参考人线粒体 CYP27B1、CYP27A1 和大鼠 CYP24A1 的结构和功能,分析 CYP27C1 底物识别、结合以及血红素结合相关的关键氨基酸^[12-14],推测 R135、L126、W162、R166、R480、C482、H437 是与血红素结合相关的关键氨基酸,非常保守,在所比对的 P450 中均保守(图 8 中的 8 个序列均相同)。K83、Q93、H90、Q111、V113、S115、A136 是与底物识别相关的关键氨基酸,其中 H90 非常保守,在所比对的 P450 中均保守(图 8 中的 8 个序列均相同),Q93 在 CYP27 家族中保守(图 8 中的 5 个序列均相同),A136、V113 和 S115 不同于其他 3 个 1α 羟化酶,V113、S115 位于 β -1b 折叠片,处于底物结合腔,与底物识别、底物进入通道相关。A136 位于 B'-B 片段,与底物进入通道相关。已知鸡 1α 羟化酶(CYP27C1)只能在 25-OH D_3 的 C- 1α 发生羟化,不能作用于 Vit D_3 的 C- 1α 使其转化为 $1\alpha(OH)D_3$ 。然而,人、小鼠、猪的 1α 羟化酶(CYP27B1)既可以催化 25-OH D_3 的 C- 1α 发生羟化,也可以催化 D_3 的 C-

1α 发生羟化,推测可能与鸡 1α 发生羟化酶底物识别位区的 3 个氨基酸(V113、S115、A136)有关。

通过多序列比对及预测发现, L343、A344、M258、L521 与 25-OH D_3 的侧链结合相关,人 CYP27B1 的 L316、大鼠 CYP24A1 的 L325 与 25-OH 作用相关^[12-13]。I 螺旋上与甾醇侧链作用的 L-氨基酸在线粒体 P450 中相当保守(6 个序列中有 5 个相同),其中 A136、M138、W141、N412、T261、L409 与 25-OH D_3 的 A-C-D 环结合相关(图 8)^[12]。K 螺旋的 E401、R404 与 meander 区的 R457 通过氢键作用形成三联体,在比对的 P450 中均保守(8 个序列均相同)。

综上,由多序列比对结果可以看出, CYP27C1 二级结构以 α 螺旋、 β 折叠、无规则卷曲为主,与其他线粒体 P450 的二级结构相似。参与血红素结合的关键氨基酸依然保守,在所有比对的 P450 中均保守。ERR 三联体与 P450 氧化还原反应过程中电子传递体(肾上腺)皮质铁氧还蛋白的相互作用有关,ERR 三联体在 CYP27C1 中也是保守的。

2.4.4 同源建模和分子对接 应用基于同源建模的 SWISS-MODEL 程序预测 CYP27C1 的三级结构,搜索 SWISS-MODEL 序列库发现,大鼠 CYP24A1 (3k9v.2.A)与鸡 CYP27C1 氨基酸序列的相似度最高,氨基酸序列相似度达 33%,因此以 CYP24A1 为模板进行同源建模。N 末端从 V62 氨基酸开始,C 末端终止于 R535。CYP27C1 与其他线粒体 P450

有如下共同的三级结构特征:开放式结构,大部分 α 螺旋位于分子的一侧,多数反向平行的 β 折叠则位于另一侧。从 N 末端到 C 末端,包含的 α 螺旋依次为 A、B、B'、C、D、E、F、G'、G、H、I、K、K'、L 等 15

个螺旋,4 个 3/10 螺旋(A'、J'、K''、K'''),包含的 10 个 β 折叠片依次为 β -1a、 β -1b、 β -2a、 β -3a、 β -3b、 β -2b、 β -4a、 β -5a、 β -5b、 β -4b,与大鼠的 CYP24A1 和人的 CYP27B1 三级结构^[11-12]相似。参与形成 α 螺旋的氨基酸共 233 个,占总氨基酸数的 49.15%,参与形成 β -折叠片的氨基酸共 28 个,占总氨基酸数的 5.90%。E、I、J、K 和 L 螺旋形成分子的核心, F-G loop 包含 1 个 G'-loop,缺少 1 个 F'-loop(图 9A)。CYP27C1 不同于微粒体细胞色素 P450 2R1,与大鼠线粒体细胞色素 P450 24A1^[12-15]相似。

利用 PROCHECK 程序对 CYP27C1 的三级结构中氨基酸残基的二面角是否在合理区进行评价,用 ψ 、 ϕ 表示每个氨基酸的二面角,分别以 ϕ 、 ψ 作为横坐标、纵坐标绘制的二维图形称为拉氏图(图 9D)。利用拉氏图对 ψ 、 ϕ 作可视化分析,是评估蛋白质结构模型稳定性最通用的方法^[16]。在最佳合理区和额外合理区,构象可以稳定存在;在一般合理区,构象可以存在,但是不稳定;在不合理区,构象则不能存在。一般来说,当最佳合理区和额外合理区内的氨基酸残基数量占比高于 90%时,即可认为该模型可以稳定存在,符合立体化学规则^[17]。由 CYP27C1 三级结构的拉氏图可以看出,最佳合理区和额外合理区的氨基酸数量占比达到 94.71%(图 9D)。

利用已建模的 CYP27C1 的三级结构(pdb 格式)与血红素进行分子对接,然后再将含有血红素的 CYP27C1 三级结构与底物(25-OH D₃)进行分子对接,结果显示:血红素和底物深埋于分子内,血红素 I-helix 和底物(25-OH D₃)呈三明治状(图 9A)。I 螺旋贯穿整个分子,血红素附近螺旋内氢键的局部畸变,导致产生 1 个扭转,是质子转移到氧分子上必需的,在哺乳动物、细菌的 P450 中均存在 I 螺旋扭转。I 螺旋中还有 1 个高度保守的 Thr348,在所有比对的序列中均保守,推测可能与活性位点的质子转移有关^[15]。

CYP27C1 与 25-OH D₃形成具有较强氢键的氨基酸,包括 L343 和 D347,L343 的侧链与 25-OH D₃的碳-25 羟基相互作用(图 10A)。通过分子对接发现,与血红素形成较强氢键的氨基酸包括 B-B' loop(R135)、B-C 环(L154)、K-L loop(C482)、 β 3(N412)(图 10B),这与大鼠 CYP24A1 和人 CYP27B1 的分子对接结果一致^[12-13]。上述结果与前面多序列比对的结果(L343 与 25-OH D₃的侧链作用)一致,说明本研

究所得建模及分子对接结果可靠。

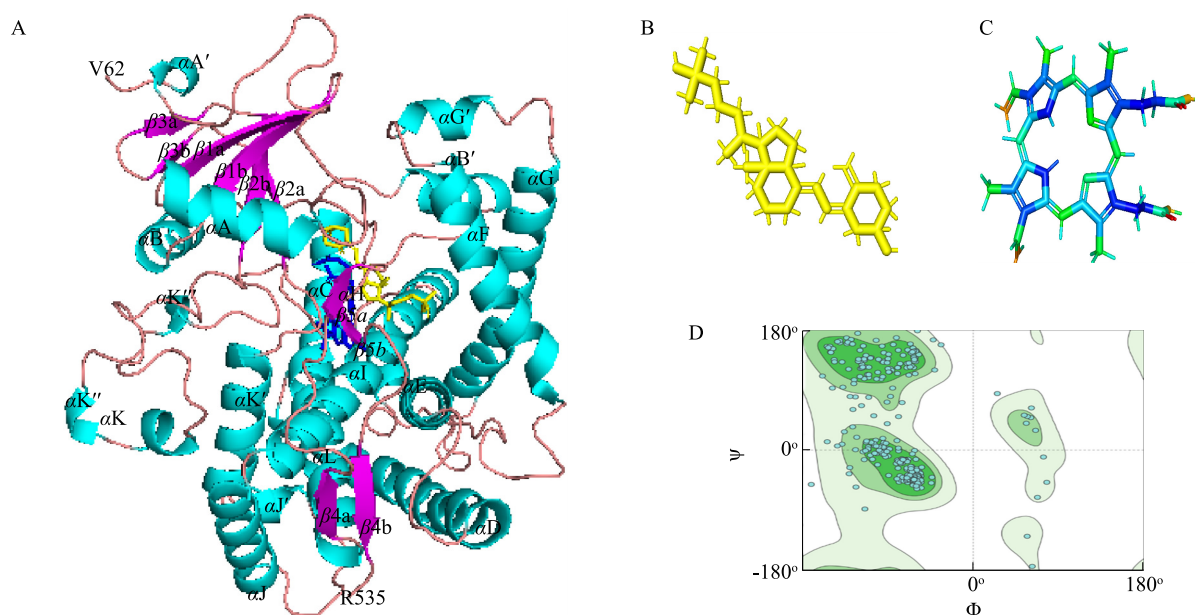
K-helix 与周围二级结构相互作用形成 1 个 ERR 三联体,将 ERR 三联体锚定在血红素区,能够起到稳定血红素结合的作用^[16]。K-helix 的三联体核心氨基酸 E401、R404 通过氢键结合到 R457(图 10C)。R457 中前面的 22 个氨基酸形成 1 个 meander 结构区,将 ERR 三联体包裹在高度协调的氢键网络中,在 P450 结合(肾上腺)皮质铁氧还蛋白的过程中起到重要作用^[18]。上述结果与多序列比对结果一致,说明本研究所建模型的可信度较高。

同源比对的结果显示,A-A'和 β 1 与底物识别和进入通道相关,在这一区域与 25-OH D₃对接,预测 A136、K83、S106 和 H107 与底物形成强的氢键(图 10D)。上述多序列比对结果也表明,A136、K83 与底物识别相关。因此,推测 A136、K83 是与底物识别相关的关键氨基酸。

底物结合腔包括 β 1、 β 5、B-C loop 环和 E、F、G、I、K 螺旋,其中 B-C loop 紧密靠近 G、G'螺旋。B 螺旋(W141、Y144)、F 螺旋(T261)、G 螺旋(F283、W287、F291)形成芳香簇(图 10E)。R145、E340 形成盐桥,芳香簇最主要的作用是为活性中心提供疏水环境,这些结构相当保守,是起到稳定 CYP27C1 作用的开放式结构。

3 讨论

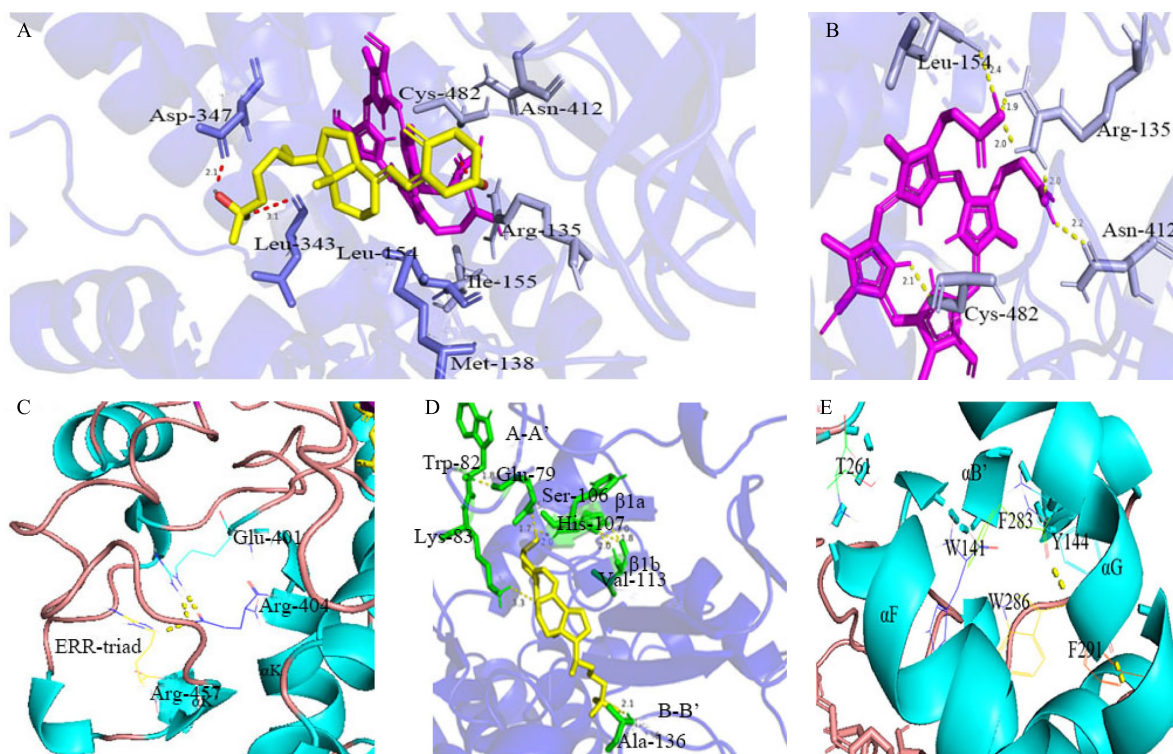
依据传统分类法,可将细胞色素 P450 分为两大类,I 类 P450 包括细菌 P450 和线粒体 P450,II 类是真核膜结合 P450。其中 I 类包括大多数细菌 P450 和线粒体 P450,这类 P450 催化体系由依赖于黄素嘌呤二核苷酸(FAD)的铁氧还蛋白还原酶(FDXR)、铁氧还蛋白(FDX)和 P450 构成。I 类 P450 又可分为 Ia、Ib,其中 Ia 是原核细胞质 P450,Ib 是结合到线粒体内膜的 P450,在代谢类固醇激素和维生素 D 的过程中起重要作用^[19-20]。哺乳动物线粒体基因组仅能编码 2% 的自身蛋白质,其余蛋白质由细胞核基因编码,前体蛋白质由细胞质游离核糖体合成,随后被转运进入线粒体中,经翻译后加工、释放。线粒体 P450 进入线粒体通过线粒体信号肽通路,这类信号肽序列富含具有正电荷、两亲的 α 螺旋结构,能被线粒体外膜转位酶复合物(TOM)受体识别,随后信号肽被转运给线粒体内膜转位酶(TIM),被释放到基质或者内膜中,然后信号肽被线粒体蛋白酶切割^[21]。



A: CYP27C1 的三级结构; B: 25-OH D₃ 的 3D 结构; C: 血红素的 3D 结构; D: CYP27C1 三级结构的拉氏图(绿色区域为最合理区, 浅绿色区域为额外合理区, 灰色区域为一般合理区, 白色为不合理区)。

图 9 CYP27C1 三级结构建模及模型评估结果

Fig.9 Tertiary structure model of CYP27C1 and model evaluation



A: 结合血红素的 CYP27C1 与 25-OH D₃ 分子对接示意。其中活性中心 L343、D347 与 25-OH D₃ 形成较强的氢键(红色)。B: 结合血红素的关键氨基酸(包括 L154、C482、N412、R135)示意。C: ERR 三联体的氢键。D: 底物识别区关键氨基酸(A136、K83、S106、H107)与 25-OH D₃ 形成较强氢键(黄色)示意。E: 底物结合腔芳香簇氨基酸(T261、W141、F283、Y144、W286、F291)。

图 10 CYP27C1 分子对接及形成 ERR 和底物结合腔的关键氨基酸

Fig.10 Docking of CYP27C1 and the key amino acids of ERR and substrate binding cavity

利用在线软件 TargetP-1.1 预测 CYP27C1 的亚细胞定位发现,CYP27C1 可能定位于线粒体。OPM 3.0 在线预测结果显示,CYP27C1 的氨基端有 1 个插入线粒体内膜序列(MIS),推测 CYP27C1 在线粒体中表达。将真核表达载体 pcDNA-cyp27c1 瞬时转染 293T 细胞并表达 48 h,随后提取线粒体组分,以 CYP27C1 融合表达标签 myc 抗体作为一抗,在线粒体中检测到单一条带,与预测结果一致。异源表达 P450 有多种方法,包括真核表达和原核表达。293T 细胞是常用的哺乳动物真核表达细胞系,是通过基因工程方法改造的 HEK293 细胞系,含有 SV40 大 T 抗原的复制起始点及启动子区,能稳定转染-表达 SV40 大 T 抗原^[22]。pcDNA 3.1 中含有 SV40 病毒的起始复制位点,可以在 293T 细胞系中复制,大大提高了外源基因的表达量。CYP27C1 蛋白的理化性质分析结果显示,CYP27C1 蛋白在哺乳动物细胞中的半衰期最长,相对于酵母、大肠杆菌,CYP27C1 在哺乳动物细胞中较为稳定。因此,构建 cyp27c1 的真核哺乳动物细胞表达载体 pcDNA-cyp27c1,在 293T 细胞中表达具有较大意义。Western-blotting 结果表明,cyp27c1 在 293T 细胞中高表达。

在鸡胚胎期,1 α 羟化酶在肾 mRNA 中的相对表达量最高,其次是在腿肌和胸肌中的相对表达量,在扁桃体、胸腺中的相对表达量居中,在肝中的相对表达量最少^[6]。本试验结果表明,成年鸡 1 α 羟化酶的组织表达分布与胚胎期不同,成年鸡的 1 α 羟化酶在肌肉组织(腿肌、胸肌)中的相对表达量最高,其次是在肾、肾上腺及生殖器官(睾丸、卵巢)中的相对表达量,在脾和胸腺等免疫器官中也有表达,这与有关报道提到的维生素 D₃ 与骨骼肌生长发育、生殖和免疫有关的结论一致^[3-4]。由此可见,本试验结果填补了 1 α 羟化酶在生殖器官中表达的信息。

目前,人们对禽 CYP 基因的识别和表达特征的认识还很有限,主要研究对象是 CYP1-3 亚家族。CYP1-3 亚家族的成员是异源化合物的代谢酶基因,主要在肝脏中表达^[23]。目前,关于鸡线粒体细胞色素 P450 基因克隆表达的研究还未见报道。Gray 等^[24-26]研究粗提的线粒体羟化 25-OH D₃ 发现,鸡 1 α 羟化酶只能在 25-OH D₃ 的 C-1 α 位加氧生成 1 α , 25(OH)₂ D₃,不能使维生素 D₃ 羟化生成 1 α -OH D₃,作用底物具有特异性。然而,人、猪、小鼠的 1 α 羟化酶既可以作用于 25-OH D₃,也可以作用于维生素

D₃。鸡 1 α 羟化酶具有重要的应用价值,但是目前尚未见克隆和表达鸡 1 α 羟化酶基因的报道。因此,克隆和表达 1 α 羟化酶基因具有重要意义。笔者利用生物信息学方法预测了线粒体膜插入序列,还通过多序列比对、同源建模、分子对接预测了 CYP27C1 与血红素结合、底物识别和结合的关键氨基酸。

4 结 论

本研究通过合成基因 cyp27c1 编码区,构建真核表达载体 pcDNA-cyp27c1,在 293T 细胞中重组表达 CYP27C1-myc-His,通过 Western-blot 在线粒体中检测到了特异的相对分子质量约为 58 000 的目的条带。CYP27C1 与其他线粒体细胞色素 P450 具有相似的开放式三级结构,以 α 螺旋、 β 折叠为主。C482、R135 与血红素形成较强的氢键;A136、K83 则是与 25-OH D₃ 识别相关的关键氨基酸;活性中心 L343、D347 是与 25-OH D₃ 结合相关的关键氨基酸。上述研究结果为后续应用定点突变深入研究 CYP27C1 底物特异性机制与催化机制提供了基础。

参考文献:

- [1] SHUMYANTSEVA V V, KUZIKOV A V, MASAMREKH R A, et al. From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450 [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 121: 192-204.
- [2] GUENGERICH F P, WATERMAN M R, EGLI M. Recent structural insights into cytochrome P450 function[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2016, 37(8): 625-640.
- [3] HUTTON K C, VAUGHN M A, LITTA G, et al. Effect of vitamin D status improvement with 25-hydroxycholecalciferol on skeletal muscle growth characteristics and satellite cell activity in broiler chickens[J]. Journal of Animal Science, 2014, 92(8): 3291-3299.
- [4] SHOJADOOST B, BEHBOUDI S, VILLANUEVA A I, et al. Vitamin D3 modulates the function of chicken macrophages[J]. Research in Veterinary Science, 2015, 100: 45-51.
- [5] KOTTEROVÁ J, KORÉNEKOVÁ B, SIKLENKA P, et al. The effect of Cd and vitamin D3 on the solidity of eggshell[J]. European Food Research and Technology, 2001, 212(2): 153-155.
- [6] SHANMUGASUNDARAM R, SELVARAJ R K. Vitamin D-1 α -hydroxylase and vitamin D-24-hydroxylase mRNA studies in chickens[J]. Poultry Science, 2012, 91(8): 1819-1824.
- [7] YOSHIDA T, YOSHIDA N, NAKAMURA A, et al. Cloning of porcine 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase and its regulation by cAMP in LLC-PK1 cells[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 1999, 10(5): 963-970.

- [8] UCHIDA E, KAGAWA N, SAKAKI T, et al. Purification and characterization of mouse CYP27B1 overproduced by an *Escherichia coli* system coexpressing molecular chaperonins GroEL/ES[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(2): 505-511.
- [9] 陈思航, 尚书凤, 王杨科, 等. 细胞色素 P450 3A7 羟化维生素 D₃ 的功能研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(1): 30-36.
- [10] KUSANO K, KAGAWA N, SAKAGUCHI M, et al. Importance of a proline-rich sequence in the amino-terminal region for correct folding of mitochondrial and soluble microbial P450s[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2001, 129(2): 271-277.
- [11] KAZUTOMI K, MASAO S, NORIO K, et al. Microsomal P450s use specific proline-rich sequences for efficient folding, but not for maintenance of the folded structure[J]. *Journal of Biochemistry*, 2001, 129(2): 259-269.
- [12] ANNALORA A J, GOODIN D B, HONG W X, et al. Crystal structure of CYP24A1, a mitochondrial cytochrome P450 involved in vitamin D metabolism[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 396(2): 441-451.
- [13] YAMAMOTO K, MASUNO H, SAWADA N, et al. Homology modeling of human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase (CYP27B1) based on the crystal structure of rabbit CYP2C5[J]. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2004, 89/90 (1/2/3/4/5): 167-171.
- [14] PROSSER D E, GUO Y D, JIA Z C, et al. Structural motif-based homology modeling of CYP27A1 and site-directed mutational analyses affecting vitamin D hydroxylation[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 90(10): 3389-3409.
- [15] STRUSHKEVICH N, USANOV S A, PLOTNIKOV A N, et al. Structural analysis of CYP2R1 in complex with vitamin D₃[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 380(1): 95-106.
- [16] TAM B, SINHA S, WANG S M. Combining Ramachandran plot and molecular dynamics simulation for structural-based variant classification: using TP53 variants as model[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2020, 18(2): 4033-4039.
- [17] 刘阳星月, 张迪, 姚亚亚, 等. 大豆过敏原 11S 球蛋白 G2 中 A2 链结合表位的预测[J]. *食品科学*, 2018, 39(18): 152-158.
- [18] HASEMANN C A, KURUMBAIL R G, BODDUPALLI S S, et al. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures[J]. *Structure*, 1995, 3(1): 41-62.
- [19] HANNEMANN F, BICHET A, EWEN K M, et al. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects*, 2007, 1770(3): 330-344.
- [20] FINNIGAN J D, YOUNG C, COOK D J, et al. Cytochromes P450 (P450s): a review of the class system with a focus on prokaryotic P450s[J]. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 2020, 122: 290-322.
- [21] 柳惠琳. Pyroxd2 在线粒体的定位及相关机制的研究[D]. 杭州: 杭州师范大学, 2017.
- [22] BAE D H, MARINO M, IAFFALDANO B, et al. Design and testing of vector producing HEK 293T cells bearing a genomic deletion of the SV40 T antigen coding region[J]. *Methods & Clinical Development*, 2020, 18: 631-638.
- [23] REN J X, YANG L Y, LI Q L, et al. Global investigation of cytochrome P450 genes in the chicken genome[J]. *Genes*, 2019, 10(8): 617-633.
- [24] GRAY R W, OMDAHL J L, GHAZARIAN J G, et al. 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase: subcellular location and properties[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1972, 247(23): 7528-7532.
- [25] CHENG J B, MOTOLA D L, MANGELSDORF D J, et al. De-orphanization of cytochrome P450 2R1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(39): 38084-38093.
- [26] TANG E K Y, TIEU E W, TUCKEY R C, et al. Expression of human CYP27B1 in *Escherichia coli* and characterization in phospholipid vesicles[J]. *The FEBS Journal*, 2012, 279(19): 3749-3761.

(责任编辑:徐 艳)