

## 结合光谱法在 DMIs 类杀真菌剂筛选中的应用

# Application of Binding Spectra in DMIs Fungicide Screening

肖 敏<sup>1</sup> 杨娇艳<sup>1</sup> 肖文精<sup>2</sup> 杨 劭<sup>1\*</sup>

XIAO Min<sup>1</sup>, YANG Jiao-Yan<sup>1</sup>, XIAO Wen-Jing<sup>2</sup> and YANG Shao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079

<sup>2</sup> 华中师范大学化学学院, 武汉 430079

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

<sup>2</sup> College of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

**摘 要** 为建立一种快捷和准确的方法用于新型杀真菌剂的筛选,以外源表达的稻瘟菌羊毛甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶为靶酶,以市售烯唑醇、戊唑醇、三唑醇、三唑酮为 DMIs 类杀真菌剂代表,分析了靶酶活性、靶酶纯度和靶酶浓度对二者结合光谱的影响,并与生物测试结果比较分析其可靠性。结果表明靶酶的高活性、无其他 P450 干扰和合适的靶酶浓度是获得准确结合光谱的必要条件。烯唑醇、戊唑醇、三唑醇、三唑酮与靶酶结合常数( $K_d$ )分别为 0.143 $\mu$ mol/L、0.24 $\mu$ mol/L、0.257 $\mu$ mol/L、0.307 $\mu$ mol/L,该结果与其对稻瘟菌生长抑制能力(120h-EC<sub>50</sub>)显著相关,证明结合光谱法可作为一种简便可靠的 DMIs 类杀真菌剂筛选方法。

**关键词** 结合光谱法,羊毛甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶,杀真菌剂,结合常数

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1129-06

**Abstract** In order to establish a fast and accurate method for novel DMIs fungicide screening, lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase of *Magnaporthe grisea* expressed in *E. coli* was used as target enzyme and the DMI fungicides diniconazole, tebuconazole, triadimenol and triadimefon were used as representative fungicides, the effects of enzyme activity, enzyme purity and concentration on the binding spectra were investigated. The results showed that active enzyme, elimination of interference of other P450s and proper enzyme concentration were necessary for obtaining accurate binding spectra. The  $K_d$  values of diniconazole, tebuconazole, triadimenol and triadimefon were 0.143 $\mu$ mol/L, 0.24 $\mu$ mol/L, 0.257 $\mu$ mol/L and 0.307 $\mu$ mol/L respectively, which significantly correlated to their 120h-EC<sub>50</sub> values on the growth of *Magnaporthe grisea*. The results indicated that the binding spectra of fungicide and lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase can serve as a reliable and fast method for novel fungicide screening.

**Key words** spectrophotometry, CYP51, fungicide, binding constant

羊毛甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶(Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase, P45014DM, CYP51),是真菌麦角甾醇生物合成过程中的一个关键酶<sup>[1]</sup>。羊毛甾醇 14 $\alpha$ -去甲

基化酶抑制剂(DMIs)<sup>[2]</sup>,通过抑制真菌细胞 CYP51 酶的活性,导致羊毛甾醇 14 $\alpha$  位去甲基化反应受阻,麦角甾醇合成减少或被完全阻断,使麦角甾醇的前

Received: March 8, 2007; Accepted: April 2, 2007.

This work was supported by the grants from the National Basic Research Program of China( No. 2004CCA00100 ) and the National Natural Science Foundation of China( No. 30370273 ).

\* Corresponding author. Tel: +86-27-67867915; E-mail: yang-shao@tom.com

国家重大基础研究前期研究专项项目( No. 2004CAA00100 )和国家自然科学基金( No. 30370273 )资助。

体化合物羊毛甾醇累积增加,影响真菌细胞膜的流动性,并由此改变膜上许多酶的活性,从而抑制细胞的生长和增殖,发挥抗真菌作用。

衡量 DMIs 类杀真菌剂与其靶酶 CYP51 的结合能力是杀真菌剂筛选的快捷方法。目前测量 DMIs 杀真菌剂与靶酶 CYP51 相互作用的方法有很多,主要有气质联用法<sup>[3,4]</sup>、HPLC<sup>[5]</sup>、同位素标记法<sup>[6]</sup>、薄层色谱扫描法<sup>[7]</sup>和光谱法<sup>[8]</sup>。光谱法用于体外研究,其他四种方法可用于体内和体外研究。这四种方法用于体外研究时,一般先纯化出 CYP51,并通过体外重建去甲基化反应<sup>[9]</sup>,再应用这些方法进行分析。药物对靶酶的作用。其中 HPLC、薄层色谱扫描法、同位素标记法虽然可以达到分离和定性定量的目的,但过程复杂,分离效果不理想,定量误差较大<sup>[3]</sup>。此外,薄层色谱扫描法所需样品的量较大,样品制备时间也较长<sup>[10]</sup>,同位素标记法一般还需要薄层色谱扫描法和放射自显影法辅助才能进行定性定量分析,过程复杂,并且同位素操作会造成污染;气质联用法在分离效果和定性定量方面比这三种方法优越,但同样操作过程较复杂。与这些方法相比,光谱法就较为简单快捷。药物直接作用于活性靶酶后,通过分析药物与靶酶的结合光谱图及  $\Delta A$  (最大吸光度 - 最小吸光度)与药物浓度之间是否存在剂量效应关系,从而判断药物是否与靶酶结合。若药物与靶酶结合,可利用它们的结合常数  $K_d$  来分析二者之间的亲和力,判断药物对靶酶功能的抑制能力,也可利用一系列药物的结合常数  $K_d$  来分析这些化合物的定量构效关系。

本文以稻瘟菌 CYP51 为对象,研究了靶酶活性、靶酶纯度和靶酶浓度对药物与靶酶结合光谱的影响,建立了新型 DMIs 药物筛选的光谱法条件,为进一步大量筛选合成的杀真菌化合物以及研究真菌 DMIs 的定量构效关系提供了技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种及质粒:**水稻稻瘟菌 (*Magnaporthe grisea*) 购自北京植保所;大肠杆菌 BL21( DE3 )菌株由本实验室保藏;pET-30a( + )载体购自 Novagen 公司;异源表达载体由本实验室构建。

**1.1.2 药物及试剂:**杀真菌剂由华中师范大学农药与化学生物学教育部重点实验室提供,纯度 95% 以上,用 DMSO 配置成母液,4℃ 保存备用;PFU DNA 聚合酶、限制性内切酶、连接酶等购自 Promega, TaKaRa

及北京天更公司;IPTG 购自 Promega 公司,其它化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 药物对稻瘟菌生长抑制的测试方法:**参照刘小红<sup>[11]</sup>和周文明<sup>[12]</sup>的实验方法。

**1.2.2 稻瘟菌微粒体的制备<sup>[13,14]</sup>:**刮取稻瘟菌的菌丝,接种于马丁氏液体培养基中,26℃ 振荡培养 5 天,5000 × g, 4℃, 10min 收集菌丝,用磷酸缓冲液 (磷酸钾 100mmol/L, 甘油 20%, EDTA 1mmol/L, pH7.2, 用前加入 DTT 至终浓度 1mmol/L)<sup>[15]</sup>洗 2 次,液氮破碎,重悬于磷酸缓冲液中,超声波破碎 1min, 5000 × g, 4℃, 10min, 取上清液,10000 × g, 4℃, 15min, 取上清液,100000 × g, 4℃, 90min, 弃上清,沉淀重悬于磷酸缓冲液中, -80℃ 保存备用。

**1.2.3 异源表达稻瘟菌 CYP51 膜蛋白的制备:**以稻瘟菌基因组 DNA 为模板,用 PFU DNA 聚合酶 PCR 扩增稻瘟菌 CYP51 基因( MGCYP51F2 ),构建原核表达载体 pET30a-MGCYP51,转化大肠杆菌 BL21( DE3 )表达菌株。37℃ 振荡培养表达 CYP51 的重组菌株,  $OD_{600}$  达到 0.6 ~ 0.8 后,加入诱导剂 IPTG,低温诱导,离心收集菌体,重悬于磷酸缓冲液中,超声波破碎,10000 × g, 4℃, 15min, 收集沉淀,重悬于磷酸缓冲液中, -80℃ 保存备用。

**1.2.4 蛋白含量测定:**采用 Bradford 的考马斯亮蓝 G250 法<sup>[16]</sup>。

**1.2.5 CYP51 含量测定及活性测定:**参照 K. Venateswarlu<sup>[13]</sup>、许华夏<sup>[16]</sup>、韩雅莉<sup>[17]</sup>的测定方法。

**1.2.6 药物和靶酶结合能力的光谱分析<sup>[8,18]</sup>:**将稀释到合适浓度的酶液加入石英比色皿中,在 350 ~ 500nm 之间扫描基线,然后加入药物,室温下反应 1min,扫描其吸收光谱,再加入药物,室温下反应 1min,扫描,如此反复,至吸光度不再变化即反应达到饱和(反应体系中 DMSO 的体积比含量不超过 0.5%<sup>[19,20]</sup>)。根据公式  $A = A_{max} [ I ] / ( K_d + [ I ] )$ ,其中  $A$  表示不同药物浓度时结合光谱最大吸光度与最小吸光度间的差值,  $A_{max}$  是达到饱和时最大吸光度与最小吸光度间的差值,  $[ I ]$  是药物浓度,  $K_d$  是结合常数,并利用 Hanes-Woolf 作图法<sup>[21]</sup>即以  $[ I ]$  对  $[ I ] / \Delta A$  作图,计算出  $K_d$  值。

## 2 结果

### 2.1 杀真菌剂对稻瘟菌生长抑制作用

为评价方法的准确性,本文选择了商品化的杀

真菌剂烯唑醇、戊唑醇、三唑醇和三唑酮作为实验用 DMI<sub>s</sub> 类杀真菌剂。经验证烯唑醇、戊唑醇、三唑醇和三唑酮对稻瘟菌生长的抑制效果非常显著,50 mg/L 时这四种杀真菌剂对稻瘟菌生长的抑制率可达到 100% (数据未显示),完全抑制稻瘟菌的生长。烯唑醇、戊唑醇、三唑醇和三唑酮对稻瘟菌生长抑制的 120h-EC<sub>50</sub> 依次增大(表 1),烯唑醇的抑制效果最好,120h-EC<sub>50</sub> 为 0.09mg/L,三唑酮的抑制效果较差,120h-EC<sub>50</sub> 达到 6.032mg/L。

表 1 烯唑醇、戊唑醇、三唑醇和三唑酮对稻瘟菌生长的抑制作用

Fungicide	Regressive equation	R <sup>2</sup>	120h-EC <sub>50</sub> (mg/L)
Diniconazole	$y = 0.4531x + 0.4586$	0.9826	0.09
Tebuconazole	$y = 0.3956x + 0.2711$	0.9158	0.579
Triadimenol	$y = 0.1643x + 0.1684$	0.8904	2.018
Triadimefon	$y = 0.0345x + 0.2919$	0.9195	6.032

## 2.2 靶酶活性对结合光谱的影响

与 CO 结合后在 450nm 有吸收是所有细胞色素

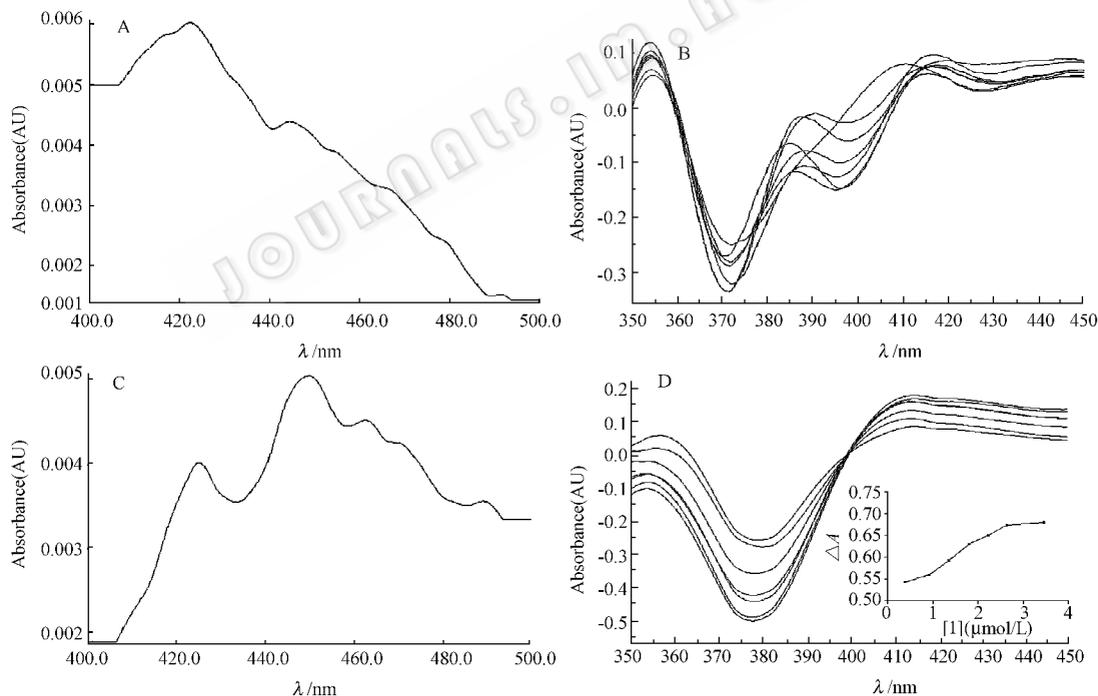


图 1 CO 差光谱及烯唑醇与酶的结合光谱(蛋白含量均为 1mg/mL)

Fig. 1 Reduced difference CO spectrum and CYP51 binding spectra( protein content 1mg/mL)

A : inactive CYP51 ; B : difference spectra of diniconazole binding to inactive CYP51 ;

C : active CYP51 ; D : difference spectra of diniconazole binding to active CYP51 .

## 2.3 靶酶纯度对结合光谱的影响

不同浓度的戊唑醇与蛋白含量为 1mg/mL 微粒体不结合(图 2A),结合光谱在 375~385nm 既有波峰也有波谷,并且随着药物浓度的增加,ΔA<sub>410-375</sub> 的变化没有规律,与药物浓度没有剂量效应关系,这可

P450 的共同特性,这种特性常用于检测细胞色素 P450 的活性。本实验室克隆表达的稻瘟菌 CYP51 通过多序列比对,与青霉菌 CYP51 同源性达到 60% 以上,且具有 CYP51 的显著特征(另文发表)。无活性的 CYP51(图 1A)在与 CO 结合后,仅 420nm 附近有吸收峰,450nm 附近没有 P450-CO 复合物的吸收峰,有活性 CYP51 的 CO 结合光谱如图 1C,在 450nm 附近有典型的还原型细胞色素 P450-CO 复合物的吸收。无活性 CYP51 与烯唑醇的结合光谱(图 1B)较紊乱,ΔA<sub>410-375</sub> 与药物浓度间无剂量效应关系,即烯唑醇与无活性 CYP51 不结合。但有活性 CYP51 与烯唑醇的结合光谱(图 1D)在 375~380nm 处有波谷,在 410~415nm 处有吸收峰,是典型的 II 型 P450 的结合光谱,并且随着药物浓度的增加,吸收光谱发生变化,ΔA<sub>410-375</sub> 与药物浓度有剂量效应关系。这表明,用结合光谱法研究药物与靶酶的结合,靶酶的活性是影响光谱结合的关键因素。靶酶有活性,药物与靶酶才能结合。

能是由于稻瘟菌微粒体中包含多种 P450 的缘故,而 *E. coli* 中并无 CYP51,用 *E. coli* 异源表达获得的 CYP51 测定结合光谱,提高了 CYP51 的纯度,可以减少其他 P450 的干扰,光谱结果显示戊唑醇与蛋白含量为 1mg/mL 异源表达的稻瘟菌 CYP51 有结合(图

2B) 在 375 ~ 380nm 处有波谷, 在 410 ~ 415nm 处有吸收峰,  $\Delta A_{410-375}$  随着药物浓度的增加而增大, 有剂量效应关系。这表明, 靶酶纯度影响药物与靶酶的光谱结合。可见 *E. coli* 异源表达的 CYP51 膜蛋白, 尽管并不是单一蛋白, 但靶酶纯度的提高降低了其他 P450 的干扰, 即可获得准确的结合光谱信息。

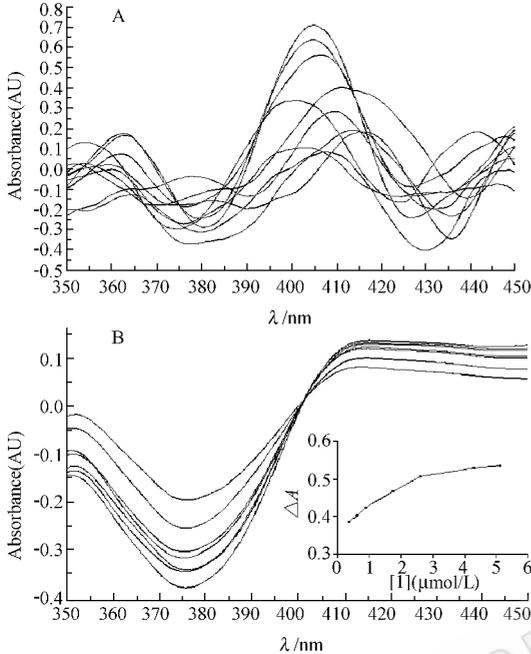


图 2 戊唑醇与微粒体和 CYP51 的结合光谱 (蛋白含量 1mg/mL)

Fig. 2 Difference spectra of tebuconazole binding to microsomes and CYP51 (protein content 1mg/mL)  
A : microsomes ; B : CYP51.

### 2.4 靶酶浓度对结合光谱的影响

以不同浓度的酶液(0.5、1.0、2.0mg/mL)与烯唑醇作用, 发现当靶酶浓度为 0.5mg/mL 时, 烯唑醇与酶不结合(图 3A), 它们的吸收光谱在 395nm 处有波谷, 但没有出现吸收峰, 曲线呈上升趋势; 烯唑醇与蛋白浓度为 1mg/mL 酶结合(图 3B), 在 375 ~ 380nm 处有波谷, 在 410 ~ 415nm 处有吸收峰, 药物浓度改

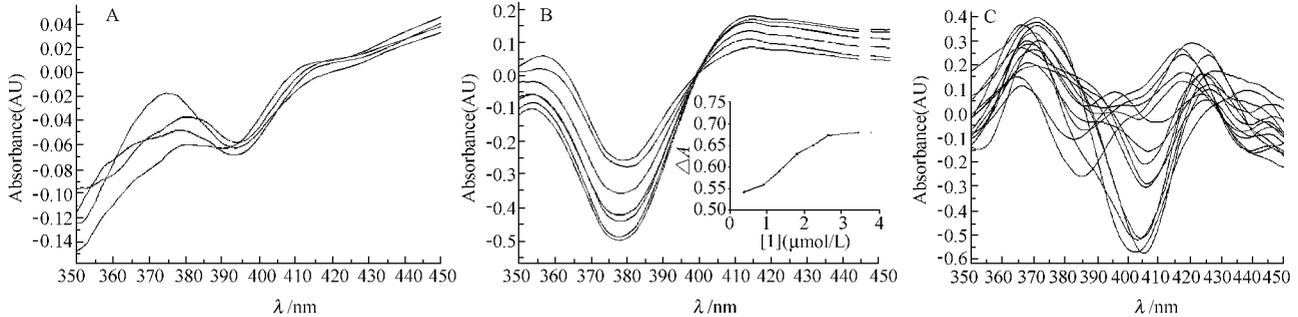


图 3 烯唑醇与不同浓度酶液的结合光谱

Fig. 3 Difference spectra of diniconazole binding to CYP51 with difference content  
A : 0.5mg/mL ; B : 1mg/mL , C : 2mg/mL.

变时  $\Delta A_{410-375}$  随之变化, 与药物浓度存在剂量效应关系, 烯唑醇与蛋白浓度为 2mg/mL 酶也不结合(图 3C) 吸收光谱比较紊乱,  $\Delta A_{410-375}$  与药物浓度之间不存在剂量效应关系。结果表明酶浓度对药物与靶酶的结合光谱影响明显。

### 2.5 杀真菌剂的光谱分析结果与生长抑制 120h-EC<sub>50</sub> 的关系

以 Hanes-Woolf 作图法(图 4)分析烯唑醇、戊唑醇、三唑醇和三唑酮与异源表达的有活性 CYP51 的结合能力, 它们的结合常数  $K_d$  逐渐增大, 分别为 0.143 μmol/L, 0.24 μmol/L, 0.257 μmol/L, 0.307 μmol/L, 与异源表达 CYP51 的亲合力逐渐减小, 即烯唑醇 > 戊唑醇 > 三唑醇 > 三唑酮, 这与杀真菌剂对稻瘟菌的生长抑制效果相似, 这四种杀真菌剂对稻瘟菌生长抑制的 120h-EC<sub>50</sub> 为烯唑醇 > 戊唑醇 > 三唑醇 > 三唑酮(表 1)。lgEC<sub>50</sub> 与  $K_d$  显著相关(线性回归方程为  $y = 11.189x - 2.6985, R^2 = 0.9613, P < 0.05$ ) (图 5), 说明结合光谱法获得的杀真菌剂与靶酶直接结合能力与其抑制真菌生长的能力是一致的。

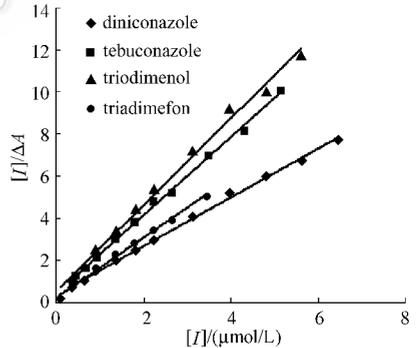


图 4 烯唑醇、戊唑醇、三唑醇和三唑酮与 CYP51 的结合能力分析(Hanes-Woolf 作图法)

Fig. 4 Hanes-Woolf plot for diniconazole, tebuconazole, triadimenol and triadimefon binding to CYP51

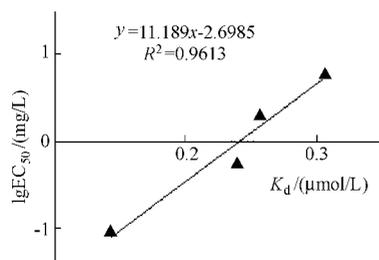
图5 120h-EC<sub>50</sub>与 K<sub>d</sub> 线性回归分析

Fig. 5 The linear regression analysis between 120h-EC<sub>50</sub> and K<sub>d</sub>

### 3 讨论

结合光谱法分析药物与靶酶的结合是以 P450 与底物复合物结合光谱特性为依据的,根据此特性, P450 分为三类:Ⅰ型最大吸收 390nm,最小吸收 420nm;Ⅱ型最大吸收 430nm,最小吸收 400nm;Ⅲ型最大吸收 420nm,最小吸收 390nm<sup>[22]</sup>。异源表达稻瘟菌 CYP51 与烯唑醇、戊唑醇、三唑醇和三唑酮的结合光谱,最大吸收在 410~415nm,最小吸收在 375~380nm,接近于典型的Ⅱ型结合光谱,结合光谱蓝移的原因可能是酶液中含有其他膜成分和膜结合杂蛋白的干扰所致。

结合光谱已经被用于抗真菌药物和靶酶相互作用的分析<sup>[8,48]</sup>。但由于 DMI<sub>s</sub> 类杀真菌剂靶酶——真菌 CYP51 蛋白为膜结合蛋白,直接纯化后水溶性低,无法进行结合光谱分析,所以发表的相关研究通常采用纯化的亲水性原核 CYP51 蛋白作为替代靶酶。但是原核和真菌 CYP51 蛋白结构存在一定差异,这种替代性做法不可避免会造成结果误差。本研究中以真菌 CYP51 为靶酶用于结合光谱法分析,采用异源表达稻瘟菌 CYP51 的 *E. coli* 膜碎片作为研究材料,*E. coli* 本身并无膜结合的细胞色素 P450,避免了干扰,可获得足够量且有活性的真菌靶酶 CYP51,使二者的结合光谱更能准确直接反映杀真菌剂对其靶酶的作用。

经研究发现,用结合光谱法研究药物与靶酶的作用时,靶酶的活性、纯度及浓度均为影响因素。首先靶酶的活性是药物与靶酶结合的首要条件,靶酶一旦失去活性,药物与靶酶就不能结合;其次靶酶的纯度是影响结合的因素之一,靶酶的纯度高,可以减少其它蛋白对结合光谱的影响,但获得单一的真菌 CYP51 纯蛋白代价较高,且需提高其亲水性才能用于杀真菌剂筛选,技术上较复杂。研究表明通过 *E. coli* 表达的 CYP51 膜结合蛋白用于光谱分析已足够获得准确数据,再次靶酶浓度也会影响药物与靶酶

的结合,靶酶浓度低,暴露在空气中容易失去活性,靶酶浓度过高,酶溶液比较混浊,浊度过高遮盖了结合光谱的变化。

结合光谱法分析结果表明,四种杀真菌剂与 CYP51 的亲合力的大小依次是烯唑醇 > 戊唑醇 > 三唑醇 > 三唑酮,不仅顺序与生长抑制实验结果相吻合,而且结合常数 K<sub>d</sub> 也与杀真菌剂对稻瘟菌的生长抑制能力 120h-EC<sub>50</sub> 具有显著相关性 (P < 0.05),这说明结合常数直接反映了杀真菌剂对靶酶功能的抑制能力,利用结合光谱法测定的结合常数反映杀真菌药物的杀菌潜力是真实和可靠的。本文证明表达异源 CYP51 的 *E. coli* 膜碎片用于光谱分析已足够获得准确数据,为新型杀真菌药物筛选提供一条简捷的途径,对大量筛选合成新型高效、低毒、高选择性的药物具有重要的意义。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Ji HT(季海涛),Zhang WN(张万年),Zhou YJ(周有骏). Lanosterol 14a-demethylase: target of the antifungal drugs. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展),1999, **26**(2):108-113.
- [2] Imre J Holba, Guido Schnabel. Differential effect of triazoles on mycelial growth and disease measurements of *Monilinia fructicola* isolates with reduced sensitivity to DMI fungicides. *Crop Protection*, 2007, **26**: 753-759.
- [3] Liu HI(刘洪涛),Gao PH(高平挥),Cao YB(曹永兵), et al. Inhibitory effect of fluconazole on sterol biosynthesis in *Candida albicans* studied by gaschromatography-mass spectrometry. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology* (中国药理学与毒理学杂志),2002, **16**(5) 368-371.
- [4] Zhao Q, Zhang JD, CAO YB, et al. The effect of TTS-12 on ergosterol bio-synthetic pathway in *Candida albicans* determined quantitatively with GC-MS method. *Pharm Care & Res*, 2005, **5**(2): 144-147.
- [5] Han R(韩平),Liu XI(刘西莉),Liu PF(刘鹏飞), et al. Effect of novel fungicide 5-(4-chlorophenyl)-2, 3-dimethyl-3 (pyridine-3)-oxazoline on ergosterol biosynthesis in *botrytis cinerea* by high performance liquid chroma tography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (分析化学), 2006, **34**(10):1467-1470.
- [6] Yan XW(晏秀伟),Liu HI(刘洪涛),Cao YB(曹永兵), et al. Determination of CYP51 activity in azole-resistant *Candida albicans* by the incorporation of 14C. *China New Medicine* (中国新医药), 2004, **36**(6):1-3.
- [7] Cao YB(曹永兵),Jiang YY(姜远英),Yin M(殷明), et al. Effect of fluconazole on ergosterol biosynthesis in fungi by TLC. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1999, **20**(5): 312-315.

- [ 8 ] Kristy JM, Ker RM, Alison R, *et al.* Azole antifungals are potent inhibitors of cytochrome P450 mono-oxygenases and bacterial growth in mycobacteria and streptomycetes. *Microbiology*, 2002, **148**:2937 - 2949.
- [ 9 ] Venkateswarlu K, David CL, Daine EK, *et al.* The N-terminal membrane domain of yeast NADPH-cytochrome P450 ( CYP ) oxidoreductase is not required for catalytic activity in sterol biosynthesis or in reconstitution of CYP activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**( 8 ):4492 - 4496.
- [ 10 ] Cao YK(曹永兵), Gao PH(高平挥), Zhang JD(张军东), *et al.* Effect of fluconazole on ergosterol biosynthesis in fungi by measuring incorporation of [<sup>14</sup>C]-labeled ergosterol. *Acad J Sec Mil Med Univ(第二军医大学学报)* 2004 **25**( 7 ):751 - 754.
- [ 11 ] Liu XH(刘小红), Li JQ(李健强), Zhou LG(周立刚), *et al.* Inhibition effect of dimboia on *Fusarium graminearum* and *bipolaris maydis*. *Mycosystema(菌物学报)* 2004 **23**( 1 ):109 - 114.
- [ 12 ] Zhou WM(周文明), Wang CZ(王昌钊), Li CJ(李长杰), *et al.* Synthesis and fungicidal activities of new triazole compounds. *Journal of Northwest Sci-Tech Univ of Agri and For( Nat Sci Ed)(西北农林科技大学学报)* 2005 **33**( 6 ):147 - 150.
- [ 13 ] Venateswarlu K, Daine EK, Nigel JM, *et al.* NADPH cytochrome P-450 oxidoreductase and susceptibility to ketoconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998 **42**( 7 ):1756 - 1761.
- [ 14 ] Stephen MG DuV, Jennifer Davila-Aponte, Rebecca Thompson. The development of a medium throughput assay for lanosterol synthase from *Leptosphaeria nodorum*: Comparison of the enzyme from *L. nodorum*, *Saccharomyces cerevisiae*, and two species of *Fusarium*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2005, **83**: 97 - 106.
- [ 15 ] David CL, Daine EK, Nigel JM, *et al.* Purification, reconstitution, and inhibition of cytochrome P-450 Sterol  $\Delta^{22}$ -desaturase from the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, **43**( 7 ):1725 - 1728.
- [ 16 ] Xu HX(许华夏), Li PJ(李培军), Liu Y(刘宛), *et al.* Interrelationship between cytochrome P450 in fungi and contents and degradation rates of PAHs. *Journal of Agro-Environment Science(农业环境科学学报)* 2004 **23**( 5 ):972 - 976.
- [ 17 ] Han YL, Deng RP, Zhou XP. Spectral analysis and study of the microsomal cytochrome P450 aromatase of *thais clavigera*. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, **26**( 1 ):130 - 133.
- [ 18 ] Hebe M Guardiola-Diaz, Lisa-Anne F, Darren M, *et al.* Azole-antifungal binding to a novel cytochrome P450 from *Myobacterium tuberculosis*: implications for treatment of tuberculosis. *Biochemical Pharmacology*, 2001, **61**:1463 - 1470.
- [ 19 ] Venateswarlu K, Denning DW, Manning NJ, *et al.* Comparison of D0870 a new triazole antifungal agent, to fluconazole for inhibition of *Candida albicans* cytochrome P-450 by using *in vitro* assays. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, **40**( 6 ):308 - 314.
- [ 20 ] Masaru M, Kazuya I, Akihiro K, *et al.* Strong antifungal activity of SS750, a new triazole derivative, is based on its selective binding affinity to cytochrome P450 of fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, **46**( 3 ):308 - 314.
- [ 21 ] Zhou XY(周晓云). *Enzymology Principle and Enzyme Engineering*. Beijing: China Light Industry Press(中国轻工业出版社) 2005.
- [ 22 ] Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Molecular Pharmacology*, 1967, **3**:113 - 123.