

中国红豆杉羟化酶基因 *TcCYP725A22* 的亚细胞定位及过表达作用分析

廖卫芳¹, 付春华², 刘志国¹, 缪礼鸿¹, 余龙江²

1 武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023

2 华中科技大学 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074

廖卫芳, 付春华, 刘志国, 等. 中国红豆杉羟化酶基因 *TcCYP725A22* 的亚细胞定位及过表达作用分析. 生物工程学报, 2019, 35(6): 1109–1116.

Liao WF, Fu CH, Liu ZG, et al. Sub-cellular localization and overexpressing analysis of hydroxylase gene *TcCYP725A22* of *Taxus chinensis*. Chin J Biotech, 2019, 35(6): 1109–1116.

摘要: 抗癌药物紫杉醇生物合成途径中羟化酶的发现是当今研究的热点和难点。文中利用前期分析得到的 1 个新的中国红豆杉羟化酶基因 *TcCYP725A22* (GenBank 登录号: MF448646.1), 构建了亚细胞定位载体 pCAMIBA1303-*TcCYP725A22*-EGFP, 瞬时侵染洋葱表皮细胞, 激光共聚焦显微镜观察结果发现该基因编码蛋白定位在细胞膜。进一步构建了植物表达载体 pBI121-*TcCYP725A22*, 经根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 介导转化到中国红豆杉细胞中过表达后, 利用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和液质联用 (LC-MS) 分析 *TcCYP725A22* 过表达对紫杉醇生物合成的影响。结果显示, 瞬时转化 pBI121-*TcCYP725A22* 的红豆杉细胞中 *TcCYP725A22* 基因的转录水平明显高于 pBI121 空载体对照组。随着 *TcCYP725A22* 基因过表达, 几个已知的紫杉醇合成关键酶基因的表达量也都有不同程度的上调, 且细胞中各紫杉烷的含量普遍提高。这些结果说明羟化酶基因 *TcCYP725A22* 极有可能参与紫杉醇的生物合成路径。

关键词: 紫杉醇, 生物合成途径, 中国红豆杉, 羟化酶, 亚细胞定位, 过表达

Sub-cellular localization and overexpressing analysis of hydroxylase gene *TcCYP725A22* of *Taxus chinensis*

Weifang Liao¹, Chunhua Fu², Zhiguo Liu¹, Lihong Miao¹, and Longjiang Yu²

1 School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei, China

2 School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China

Abstract: The discovery of hydroxylases in the anticancer drug taxol biosynthesis pathway is a hotspot and difficulty in

Received: January 4, 2019; Accepted: April 24, 2019

Supported by: The Doctoral Program of Higher Education (No. 20120142130009).

Corresponding authors: Weifang Liao. Tel: +86-27-83956793; E-mail: leesalwf89@126.com

Longjiang Yu. Tel: +86-27-87792264; E-mail: yulongjiang@mail.hust.edu.cn

高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20120142130009) 资助。

网络出版时间: 2019-06-05

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190604.1520.001.html>

current research. In this study, a new hydroxylase gene *TcCYP725A22* (GenBank accession number: MF448646.1) was used to construct a sub-cellular localization vector pCAMIBA1303-*TcCYP725A22*-EGFP to get the transient expression in onion epidermal cells. Laser confocal microscopy revealed that the protein encoded by this gene was localized in the cell membrane. Furthermore, the recombinant plant expression plasmid pBI121-*TcCYP725A22* was constructed. After transient transformation to the *Taxus chinensis* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, qRT-PCR and LC-MS were utilized to analyze the effects of *TcCYP725A22* overexpression on the synthesis of taxol. The results showed that, in the *TcCYP725A22* overexpressed cell line, expression levels of most defined hydroxylase genes for taxol biosynthesis were increased, and the yield of taxanes were also increased. It was concluded that the hydroxylase gene *TcCYP725A22* is likely involved in the biosynthetic pathway of taxol.

Keywords: taxol, biosynthetic pathway, *Taxus chinensis*, hydroxylase, sub-cellular localization, overexpression

紫杉醇 (Taxol) 是一种具有显著抗癌活性的二萜类化合物。但其在红豆杉属 (*Taxus*) 植物中的含量极低,天然来源的紫杉醇难以满足临床药用需求^[1-3]。利用合成生物学技术,通过微生物发酵生产紫杉醇是解决其供需矛盾的重要手段^[4-6]。目前,紫杉醇生物合成路径中的大部分相关酶基因已被鉴定出,但其母核有效羟基化途径的分子机制解析仍是当今的研究热点与难点^[7]。

Eisenreich 等^[8]证实紫杉醇母核上所有羟基化修饰均由 CYP450 单加氧酶催化完成。在植物中, CYP450 普遍为膜结合蛋白,广泛参与萜类、黄酮类、植物激素、生物碱类、甾醇类等的合成与代谢途径^[9-11]。CYP450 是一个庞大的超基因家族,在 CYP450 的分类中,为了和其他物种区分开,植物 CYP450 被归为 CYP71-CYP99 和 CYP701-CYP999 家族^[12]。

紫杉醇母核 (紫杉二烯) 到最终形成紫杉醇需要经过 C1、C2、C4、C5、C7、C9、C10、C13 八个位点的有效羟基化^[13]。目前已有 C2、C5、C7、C10 和 C13 位对应的羟基化酶基因被解析^[14-19],但母核上尚有较多 CYP450 羟基化酶基因及其功能未被确认,尤其是母核上 C1、C4 和 C9 位对应的 CYP450 羟基化酶基因尚未发现,是彻底解析紫杉醇生物合成路径的主要瓶颈^[7]。系统分析已从红豆杉属植物中鉴定出紫杉醇生物合成羟基化酶的基因,可以发现它们均隶属于 CYP725 家族。

本研究基于前期从中国红豆杉转录组中分析获得的 1 个新的羟基化酶基因 *TcCYP725A22*^[20],拟对其进行克隆及亚细胞定位分析,并进一步将其在中国红豆杉细胞中过表达,探究该基因与紫杉醇生物合成的关系,为进一步彻底解析紫杉醇生物合成路径奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

中国红豆杉 *Taxus chinensis* 细胞系由中国红豆杉嫩茎诱导的愈伤组织建立,由本实验室保存。于 62[#] 培养基中^[21], 25 °C、黑暗培养。

1.1.2 菌种与质粒

农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404、大肠杆菌 *Escherich coli* DH5 α 由本实验室保存;农杆菌 GV3101 感受态购于 TaKaRa 公司;植物表达载体 pCAMBIA1303、pBI121、质粒 pm-ck CD3-1001 均由本实验室保存; pMD18-T 克隆载体购于 TaKaRa 公司。

1.1.3 试剂

质粒小提、琼脂糖凝胶 DNA 回收等试剂盒均购自天根生化科技有限公司;限制性内切酶均购自 Fermentas 公司; KOD-Plus-Neo 购自 TOYOBO 公司; In-fusion 试剂盒购自 Clontech 公司; T4 DNA ligase 购自 Thermo 公司; 乙酰丁香酮 (AS)、头孢

菌素 (Cef)、卡那霉素 (Kan) 均购自 Biosharp 公司; 引物由奥科鼎盛生物科技有限公司合成; 其他试剂购于国药集团。

1.2 方法

1.2.1 *TcCYP725A22* 基因的克隆

根据中国红豆杉 *TcCYP725A22* 基因序列 (GenBank 登录号: MF448646.1), 采用软件 Primer Premier 5.0 设计特异性引物 (表 1), 以 cDNA 为模板, 使用 KOD-Plus-Neo 进行 PCR 扩增。

PCR 扩增反应体系 (20 μ L) 为: KOD-Plus-Neo 0.5 μ L、10 \times KOD 缓冲液 2 μ L、dNTP 混合物 2 μ L (2.5 mmol/L)、上下游引物各 0.8 μ L (10 μ mol/L)、

Mg²⁺缓冲液 2 μ L、模板适量, 用 ddH₂O 补至 20 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 34 个循环; 最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。胶回收纯化目的基因, 末端加 A 后连接至 pMD18-T 载体中并转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 并进行测序验证。

1.2.2 *TcCYP725A22* 亚细胞定位载体的构建及洋葱表皮瞬时表达

以构建好的质粒 pMD18-T-*TcCYP725A22* 为模板, 设计引入酶切位点 *Spe* I 的引物 (表 1), 使用 KOD-Plus-Neo 进行扩增。PCR 产物通过凝胶电泳检测后回收, 回收产物用 *Spe* I 进行酶切, 同时用 *Spe* I 对亚细胞定位载体 pCAMIBA1303 进行酶切, 于 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min。分别回收酶切产物, 用 In-fusion 法将 *TcCYP725A22* 基因连接到 pCAMIBA 1303 载体上, 得到 pCAMIBA1303-*TcCYP725A22*-EGFP 融合表达载体, 转入大肠杆菌 DH5 α 。菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 并提取阳性克隆单菌落质粒, 酶切验证后测序。将测序结果正确的质粒, 及阳性对照植物细胞质膜的 marker 质粒 pm-ck CD3-1001 和阴性对照 pCAMIBA-1303 空载体, 分别转入农杆菌 GV3101。

将含有目标基因质粒 (pCAMIBA1303-*TcCYP725A22*-EGFP)、阳性对照质粒 (pm-ck CD3-1001)、阴性对照质粒 (pCAMIBA-1303) 的农杆菌 GV3101 分别活化, 侵染预处理过的洋葱表皮, 1/2 MS 固体平板培养基上, 25 $^{\circ}$ C、光周期 16 h/8 h 培养 2 d。用无菌水洗涤附着的农杆菌, 压片法制片, 于共聚焦显微镜下观察, 激发光为 488 nm。

1.2.3 *TcCYP725A22* 在中国红豆杉细胞中的过表达

以构建好的质粒 pMD18-T-*TcCYP725A22* 为模板, 设计引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>TcCYP725A22</i> -pCAMIBA1303-F	GGTAGATCTGACTAGTATGC
<i>TcCYP725A22</i> -pCAMIBA1303-R	AAATCGAAATGGATACCT
pm-ck-F	CCTTGCTCACACTAGTAAGT
pm-ck-R	CTGGGAAAAAGTTTAT
EGFP-F	TCTAGAATGGCAAAGGATG
EGFP-R	TGGAAGC
<i>TcCYP725A22</i> -PBI121-F	GGATCCGACGTTGGCAGCA
<i>TcCYP725A22</i> -PBI121-R	CTTCTGA
dl <i>TcCYP725A22</i> -F	ATGGTGAGCAAGGGCGAG
dl <i>TcCYP725A22</i> -R	TTACTTGACAGCTCGTCC
dl <i>TS</i> -F	GGATCCATGCAAATCGAAAT
dl <i>TS</i> -R	GGATACCT
dl <i>T2aH</i> -F	GAGCTCTCAAAGTCTGGGAA
dl <i>T2aH</i> -R	AAAGTTTAT
dl <i>T5aH</i> -F	AGGAAGGCAGGCATGTGG
dl <i>T5aH</i> -R	GGGGTCAACTGGGATGTAGC
dl <i>T7βH</i> -F	ATGCGTTGGAGGGTCTT
dl <i>T7βH</i> -R	CACAGGCAGTGGAGGC
dl <i>T10βH</i> -F	TCATTCCAGTGGGCTCT
dl <i>T10βH</i> -R	ACCCGTCAGTTTCGCT
dl <i>T13aH</i> -F	GCGCTGCAGAGTTACATTG
dl <i>T13aH</i> -R	AGACGATCCTGTTCCTGCTT
dl <i>Actin</i> -F	ATTATTGTGCTCCTCGTCA
dl <i>Actin</i> -R	ACAGTTTTTCCTCGTTGG
	GCCTGCGGGAACAA
	AGTGCGTAAGATGCGATG
	CGAGCACTCCACAGCA
	CGGCAGGTCCACAGA
	GGTATCCACGAGACGA
	ACCCTCCAATCCAGAC

点的引物(表1),使用KOD-Plus-Neo进行PCR扩增。胶回收纯化目的基因,然后利用BamH I和Sac I进行双酶切,将所得酶切目的基因片段与同样经BamH I和Sac I双酶切的载体pBI121使用T4DNA连接酶连接后,转化大肠杆菌感受态细胞,获得表达重组质粒pBI121-*TcCYP725A22*。阳性克隆经菌落PCR、酶切鉴定后测序。将测序结果正确的质粒及阴性对照pBI121空载体,分别转入农杆菌LBA 4404。

将LBA 4404阳性克隆接种到10 mL含有Kan抗性的LB液体培养基中,28℃、180 r/min恒温培养1~2 d;再取500 μ L菌液至50 mL含有Kan抗性的LB液体培养基中,28℃、180 r/min恒温培养5~8 h,至菌液 OD_{600} 达到0.8~1.0;4℃、6 000 r/min离心收集菌体。用0.5 mL 62[#]培养基将菌体重悬,将悬浮的农杆菌接到50 mL 1/6 62[#]培养基中(蔗糖浓度改为5 g/L),再加入20 μ L 1 mol/L的乙酰丁香酮(AS),混匀后加入约5 g红豆杉细胞,25℃、125 r/min黑暗条件下共培养2 d。用真空泵将共培养的红豆杉细胞和农杆菌通过砂芯漏斗分离,用无菌水洗3次,洗掉红豆杉细胞中残留的农杆菌。挑取0.3 g红豆杉细胞快速冻存,放于-80℃冰箱,用于超表达后基因表达量分析。将剩余的红豆杉细胞接种至新的50 mL 62[#]液体培养基中(含有300 μ g/mL Cef, 100 μ g/mL Kan);25℃、125 r/min黑暗条件下培养10 d后,用砂芯漏斗抽滤,收集细胞,-80℃保存,用于紫杉烷含量的测定。以转入pBI121空载体的LBA4404菌株介导的转化作为对照。

1.2.4 *TcCYP725A22* 过表达鉴定及紫杉醇合成关键基因的qRT-PCR分析

农杆菌介导的瞬时转化培养2 d后的红豆杉细胞用来提取总RNA,并检测关键酶基因的表达水平。利用特定引物对*TcCYP725A22*以及紫杉醇生物合成途径的关键酶基因紫杉二烯合酶基因

(*TS*)、紫杉烷2 α -羟化酶基因(*T2 α H*)、紫杉烷5 α -羟化酶基因(*T5 α H*)、紫杉烷7 β -羟化酶基因(*T7 β H*)、紫杉烷10 β -羟化酶基因(*T10 β H*)和紫杉烷13 α -羟化酶基因(*T13 α H*)进行qRT-PCR分析,以actin作为内参,使用引物如表1所示。

1.2.5 *TcCYP725A22* 过表达红豆杉细胞中紫杉烷含量的检测

将培养10 d后的红豆杉细胞取出,50℃烘干,充分研磨,均称取0.15 g粉末于洁净的10 mL锥形瓶中,加入冰冷的10 mL/g二氯甲烷和10 mL/g甲醇,冰水中超声助溶30 min,4℃提取过夜后,9 000 r/min离心10 min,取上清,用氮吹仪吹干,再加入预冷的5 mL/g超纯水和5 mL/g二氯甲烷,充分振荡混匀。4℃、6 000 r/min离心15 min,吸取下层二氯甲烷相,氮吹仪吹干,最后用500 μ L色谱纯乙腈溶解,过0.22 μ m滤膜,使用安捷伦液质联用仪1100 LC/MSD XCD Trap检测紫杉醇、巴卡亭III、10-去乙酰基-巴卡亭III、10-去乙酰-紫杉醇、7-表-10-去乙酰紫杉醇、三尖杉宁碱和7-表-紫杉醇7种紫杉烷物质的含量。

色谱条件:色谱柱为Agilent Zorbax SB-Phenyl (4.6 mm \times 250 mm \times 5 μ m),柱温为30℃;流动相为乙腈和水,时间与梯度(乙腈含量)变化具体为T(min)/%B:0/5,10/10,11/50,20/60,30/70,40/90,45/100。流速为1 mL/min;进样量为20 μ L;紫外检测波长为227 nm。

质谱条件:ESI正离子源,电压为3.5 kV,氮气40 psi,辅助气流10 L/min,毛细管电流10 nA,毛细管温度325℃,离子碎片分析范围为100~1 000 m/z 。

2 结果与分析

2.1 *TcCYP725A22* 基因的克隆

以中国红豆杉细胞cDNA为模板,以特异性引物扩增*TcCYP725A22*基因全长,经琼脂糖凝胶

电泳检测后,在 1 500 bp 左右处出现单一条带,与目的基因大小一致。片段连接载体 pMD18-T 测序后,经 Clustal 软件分析与 NCBI 中的序列一致。

2.2 *TcCYP725A22* 蛋白的亚细胞定位

将测序成功的 pCAMIBA1303-*TcCYP725A22*-EGFP 重组载体转入 GV3101 感受态中,菌落 PCR 进行阳性克隆鉴定,电泳检测在 1 500 bp 左右处出现单一条带,符合目的基因大小,证明载体构建成功。并成功将 pm-ck CD3-1001 及 pCAMIBA1303 空载体转入 GV3101 中,菌落 PCR 结果为阳性。

农杆菌介导的洋葱表皮细胞瞬时表达结果表明, pCAMIBA1303 空载体对照组细胞内各部分均可见绿色荧光 (图 1)。融合表达蛋白 *TcCY*

P725A22-EGFP 在质膜上有荧光信号,其他部位几乎没有荧光,在 EGFP-pm-ck-Overlay 组图中,可看到绿色荧光与蓝色荧光位置重合,即目的基因蛋白的表达位置与细胞膜的位置重合 (图 2),可确定 *TcCYP725A22* 定位于细胞膜。

2.3 过表达载体 pBI121-*TcCYP725A22* 的构建与转化

分别对 pMD18T-*TcCYP725A22* 和植物表达载体 pBI121 用 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行双酶切,分别回收酶切产物,用 T4 DNA 连接酶进行连接后转化大肠杆菌 DH5 α 。提取阳性克隆质粒,双酶切产物电泳结果显示在 1 500 bp 和 13 000 bp 左右处出现了两条特异性条带,分别与目的基因及

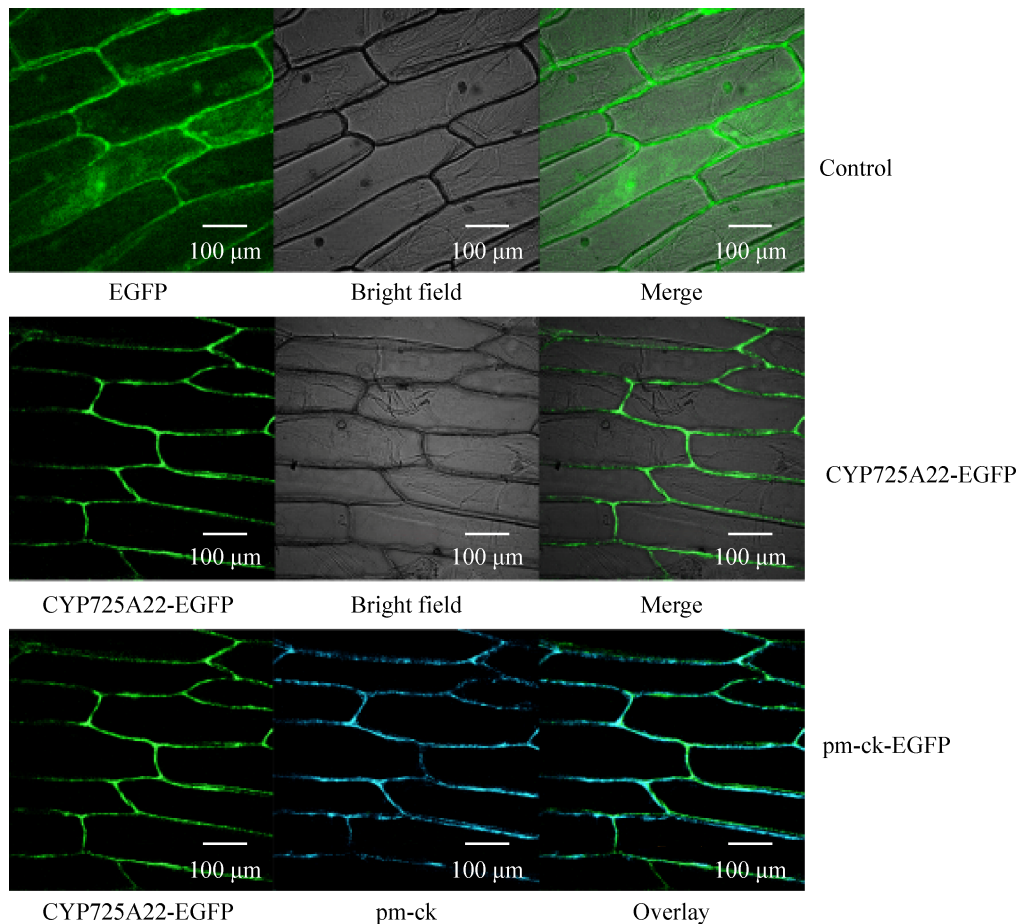


图 1 *TcCYP725A22* 蛋白在洋葱表皮细胞的定位

Fig. 1 The location of *TcCYP725A22* in onion epidermal cells.

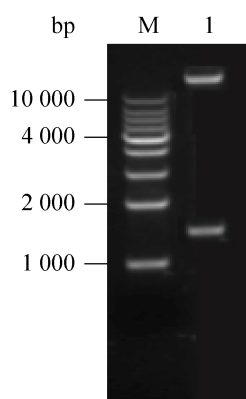


图2 重组载体 pBI121-*TcCYP725A22* 的酶切验证

Fig. 2 Restriction enzyme digestion of recombinant vector pBI121-*TcCYP725A22*. M: 1kb DNA marker, 1: *Bam*H I and *Sac* I digestion of pBI121-*TcCYP725A22*.

pBI121 载体大小一致,表明 *TcCYP725A22* 基因已被成功克隆到 pBI121 质粒中 (图2)。

将构建好的重组质粒 pBI121-*TcCYP725A22* 转入农杆菌 LBA4404 中,利用菌落 PCR 鉴定阳性克隆子。使用特异性引物扩增,在 1 500 bp 处产生特异条带,与 *TcCYP725A22* 基因大小一致,说明重组质粒成功转入农杆菌 LBA 4404 中。

2.4 *TcCYP725A22* 过表达促进红豆杉细胞中紫杉醇合成途径关键酶基因的表达

将转入 pBI121-*TcCYP725A22* 的农杆菌扩大培养后,侵染红豆杉细胞 2 d 后,收集细胞提取 RNA,采用 qRT-PCR 法检测了 *TcCYP725A22* 及紫杉醇生物合成相关关键酶基因 *TS*、*T2aH*、*T5aH*、*T7βH*、*T10βH* 和 *T13aH* 的响应情况。以转入 pBI121 空载体的农杆菌侵染为对照组,且每实验重复 3 次。

结果表明,实验组中 *TcCYP725A22* 的相对表达量是对照组的 30.95 倍,说明 *TcCYP725A22* 基因在红豆杉细胞中成功过表达。且 *TcCYP725A22* 的过表达诱导了紫杉醇生物合成路径中相关酶基因的表达 (图3)。其中, *TS* 的表达量略微上调,为对照组的 1.3 倍; *T7βH* 和 *T13aH* 上调了 2 倍;

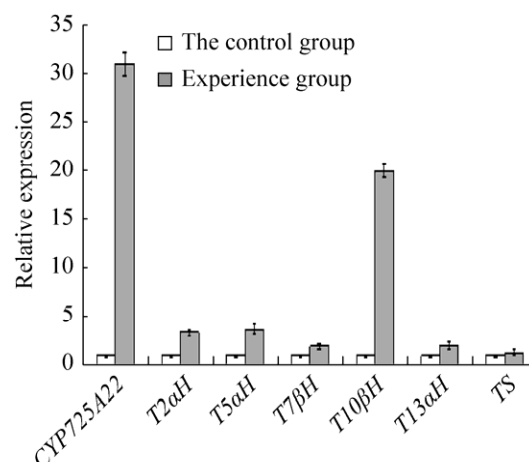


图3 *TcCYP725A22* 过表达红豆杉细胞中基因的 qRT-PCR 分析

Fig. 3 Gene expressions in overexpression *TcCYP725A22* *Taxus* cells. Error bars indicate the mean (SEM). Three independent biological samples were tested by Student's *t* test.

T2aH 上调 3.42 倍; *T5aH* 上调 3.67 倍; *T10βH* 的响应最为显著,上调了 20 倍。

2.5 *TcCYP725A22* 过表达促进红豆杉细胞中紫杉烷物质的积累

采用 LC-MS 检测 *TcCYP725A22* 过表达后,红豆杉细胞中 10-去乙酰基-巴卡亭 III (DAB)、巴卡亭 III (B-III)、10-去乙酰-紫杉醇 (DAT)、三尖杉宁碱 (CEP)、7-表-10-去乙酰紫杉醇 (EDT)、紫杉醇 (Taxol) 和 7-表-紫杉醇 (ETOL) 7 种紫杉烷物质的含量变化。对照这 7 种紫杉烷物质标准品液相色谱的出峰时间和质谱的分子离子峰可以确定它们的保留时间依次为 15.6 min、17.0 min、19.0 min、20.7 min、21.4 min、21.5 min 和 24.3 min,根据峰面积计算出 *TcCYP725A22* 过表达红豆杉细胞系中这 7 种紫杉烷的含量分别为 5.54、6.57、4.22、15.19、15.13、9.04、5.62 μg/g,均高于对照组 (图4),其中 DAB 的含量增加最为显著,含量为对照组的 1.5 倍。说明 *TcCYP725A22* 基因的过表达促进了紫杉醇的合成。

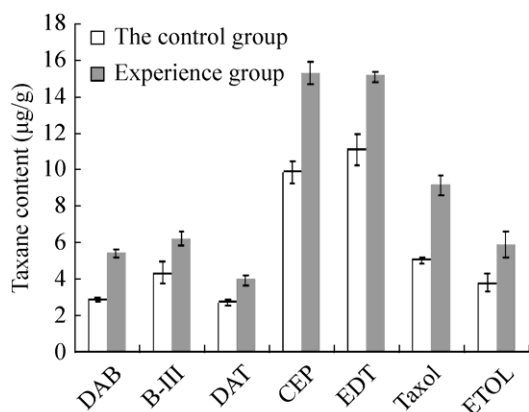


图4 *TcCYP725A22* 过表达细胞系的紫杉烷含量分析
Fig. 4 Taxane content analysis in overexpression *TcCYP725A22* *Taxus* cells. Error bars indicate the mean (SEM). Three independent biological samples were tested by Student's *t* test.

3 讨论

紫杉醇 (Taxol) 是一种具有显著抗肿瘤活性的三环二萜类化合物, 结构十分复杂, 其生物合成路径中母核的羟基化修饰过程至今尚未完全解析。本研究对新羟化酶基 *TcCYP725A22* 进行了亚细胞定位和过表达功能分析, 发现该基因极可能与紫杉醇生物合成相关。

随着功能基因组学的研究, 蛋白质亚细胞定位、蛋白质与蛋白质相互作用以及蛋白质的动态变化等成为生物学家们关注的热点。其中, 蛋白质的亚细胞定位研究对于系统地理解蛋白的动态变化、蛋白行使功能的原理及蛋白与蛋白间的相互作用是不可或缺的环节, 也是功能基因组学的重要内容。植物基因的编码蛋白是由其自身的序列所含有的定位信息制导定位到细胞的特定部位。本研究中 *TcCYP725A22* 基因编码蛋白定位在细胞膜, 这与先前报道的植物 CYP450 普遍为膜结合蛋白一致^[10]。

目前, 研究植物 CYP450 酶基因功能的主要方法之一是通过转基因技术, 将目的基因进行本体或异源过表达后, 分析性状或化学成分的差异来探究其生物学功能^[22-23]。Zheng 等^[24]在拟南芥

中过表达大豆 GmCYP707A1 可降低对 ABA 的敏感性, 起到 ABA 8'-羟化酶的功能。Han 等^[25]将苹果类黄酮 3'-羟化酶基因 (F3'H) 在烟草中过表达, 转基因烟草的花红色加深。在青蒿中, 过量表达黄酮 3'-羟化酶基因(AaF3H), 青蒿素合成相关紫穗槐-4,11-二烯氧化酶基因(AaCYP71AV1)、紫穗槐-4,11-二烯合成酶基因(AaADS) 等表达量显著提高, 且提高了青蒿素的含量^[26]。本研究发现, 将 *TcCYP725A22* 在中国红豆杉细胞中过表达后, 紫杉醇合成途径中的关键酶基因 *TS*、*T2aH*、*T5aH*、*T7βH*、*T10βH* 和 *T13aH* 的表达量在转基因红豆杉细胞中均有所提高。此外, 在 *TcCYP725A22* 过表达细胞系中, 多种紫杉烷物质的含量均增加, 可以推测 *TcCYP725A22* 羟化酶基因在紫杉醇的合成中有重要作用。这些结果为彻底解析紫杉醇生物合成路径奠定了基础。

REFERENCES

- [1] de Furia MD. Paclitaxel (Taxol®): a new natural product with major anticancer activity. *Phytomedicine*, 1997, 4(3): 273–282.
- [2] Ketchum RE, Wherland L, Croteau RB. Stable transformation and long-term maintenance of transgenic *Taxus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(7): 1025–1033.
- [3] Julsing MK, Koulman A, Woerdenbag HJ, et al. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomol Eng*, 2006, 23(6): 265–279.
- [4] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KEJ, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330(6000): 70–74.
- [5] Zhou K, Qiao KJ, Edgar S, et al. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. *Nat Biotech*, 2015, 33(4): 377–383.
- [6] Biggs BW, Lim CG, Sagliani K, et al. Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated Taxol precursor synthesis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(12):

- 3209–3214.
- [7] Chen QP, Liao WF, Fu CH, et al. Research progress in hydroxylase in taxol biosynthetic pathway. *Chin J Biotech*, 2016, 32(5): 554–564 (in Chinese).
陈清浦, 廖卫芳, 付春华, 等. 紫杉醇生物合成途径中羟化酶的研究进展. *生物工程学报*, 2016, 32(5): 554–564.
- [8] Eisenreich W, Menhard B, Lee MS, et al. Multiple oxygenase reactions in the biosynthesis of taxoids. *J Am Chem Soc*, 1998, 120(37): 9694–9695.
- [9] Korte F, Kvesitadze G, Ugrehelidze D, et al. Organic toxicants and plants. *Ecotox Environ Saf*, 2000, 47(1): 1–26.
- [10] Schuler MA. Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit Rev Plant Sci*, 1996, 15(3): 235–284.
- [11] Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, et al. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770(3): 330–344.
- [12] Paquette SM, Bak S, Feyereisen R. Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Cell Biol*, 2000, 19(5): 307–317.
- [13] Croteau R, Ketchum REB, Long RM, et al. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochem Rev*, 2006, 5(1): 75–97.
- [14] Jennewein S, Long RM, Williams RM, et al. Cytochrome P450 taxadiene 5 α -hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of taxol biosynthesis. *Chem Biol*, 2004, 11(3): 379–387.
- [15] Schoendorf A, Rithner CD, Williams RM, et al. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 β -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(4): 1501–1506.
- [16] Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, et al. Taxol biosynthesis: taxane 13 α -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13595–13600.
- [17] Chau M, Croteau R. Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2 α -hydroxylase involved in taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 427(1): 48–57.
- [18] Chau M, Jennewein S, Walker K, et al. Taxol biosynthesis: molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 7 β -hydroxylase. *Chem Biol*, 2004, 11(5): 663–672.
- [19] Guerra-Bubb J, Croteau R, Williams RM. The early stages of taxol biosynthesis: an interim report on the synthesis and identification of early pathway metabolites. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(6): 683–696.
- [20] Liao WF, Zhao SY, Zhang M, et al. Transcriptome assembly and systematic identification of novel cytochrome P450s in *Taxus chinensis*. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1468.
- [21] Zhang CH, Mei XG, Liu L, et al. Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol Lett*, 2000, 22(19): 1561–1564.
- [22] Lee MH, Jeong JH, Seo JW, et al. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(8): 976–984.
- [23] Kim OT, Kim SH, Ohyama K, et al. Upregulation of phytosterol and triterpene biosynthesis in *Centella asiatica* hairy roots overexpressed ginseng farnesyl diphosphate synthase. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(4): 403–411.
- [24] Zheng Y, Huang YY, Xian WH, et al. Identification and expression analysis of the glycine max *cyp707a* gene family in response to drought and salt stresses. *Ann Botany*, 2012, 110(3): 743–756.
- [25] Han YP, Vimolmangkang S, Soria-Guerra RE, et al. Ectopic expression of apple *F3'H* genes contributes to anthocyanin accumulation in the arabidopsis *tt7* mutant grown under nitrogen stress. *Plant Physiol*, 2010, 153(2): 806–820.
- [26] Zhang TT, Ma JW, Wang LY, et al. Improving artemisinin content of *Artemisia annua* L. through overexpression of flavanone 3-hydroxylase gene (*AaF3H*). *Curr Biotech*, 2018, 8(1): 55–62 (in Chinese).
张婷婷, 马嘉伟, 王路尧, 等. 过量表达黄烷酮 3-羟化酶基因(*AaF3H*)提高青蒿中青蒿素的含量. *生物技术进展*, 2018, 8(1): 55–62.

(本文责编 郝丽芳)