

廖卫芳, 赵盛英, 付春华, 刘志国, 缪礼鸿, 赵春芳, 余龙江. 中国红豆杉羟化酶基因 *TcCYP725A22* 的克隆与功能研究 [J]. 植物科学学报, 2019, 37(3): 367~373

Liao WF, Zhao SY, Fu CH, Liu ZG, Miao LH, Zhao CF, Yu LJ. Cloning and functional analysis of hydroxylase gene *TcCYP725A22* from *Taxus wallichiana* var. *chinensis* [J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(3): 367~373

中国红豆杉羟化酶基因 *TcCYP725A22* 的克隆与功能研究

廖卫芳^{1*}, 赵盛英², 付春华², 刘志国¹, 缪礼鸿¹, 赵春芳², 余龙江^{2*}

(1. 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 武汉 430023; 2. 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要: 基于中国红豆杉 (*Taxus wallichiana* var. *chinensis* (Pilger) Florin) 转录组序列, 从中扩增到 1 个新的 P450 羟化酶基因 *TcCYP725A22*, 并对其进行克隆、表达及功能分析。生物信息学分析结果显示: 该基因编码区长 1500 bp, 共编码 499 个氨基酸; 编码蛋白无信号肽, 包含 1 个跨膜区, 具有催化活性中心结构域。进一步将该基因在酿酒酵母 WAT11 中进行异源表达功能研究, 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 实验结果表明, 目的蛋白 *TcCYP725A22* 可在 WAT11 中成功表达; 液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 分析结果显示, 羟化酶 *TcCYP725A22* 对底物紫杉素表现出催化活性。依据质谱结果及反应底物紫杉素的分子结构, 判断其催化产物可能为添加了 2 个羟基的紫杉烷新衍生物。

关键词: 紫杉醇; 生物合成途径; 羟化酶; 红豆杉; 基因功能分析

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2019)03-0367-07

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2019.30367

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Cloning and functional analysis of hydroxylase gene *TcCYP725A22* from *Taxus wallichiana* var. *chinensis*

Liao Wei-Fang^{1*}, Zhao Sheng-Ying², Fu Chun-Hua², Liu Zhi-Guo¹,
Miao Li-Hong¹, Zhao Chun-Fang², Yu Long-Jiang^{2*}

(1. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

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

Abstract: Based on our previous transcriptome analysis, a new P450 hydroxylase gene was identified and named *TcCYP725A22* according to homological analysis. The *TcCYP725A22* cDNA was 1500 bp in length and encoded 499 amino acids. Bioinformatics predicted that the *TcCYP725A22* protein contained a transmembrane region and catalytically active domains but no signal peptide. Functional analysis of *TcCYP725A22* was carried out in *Saccharomyces cerevisiae* strain WAT11. Western blotting results indicated that the target protein was expressed successfully in WAT11. Furthermore, LC-MS analysis showed that *TcCYP725A22* expressed in yeast was able to transform taxusin to its hydroxyl derivative, indicating that it had catalytic activity.

Key words: Taxol; Biosynthetic pathway; Hydroxylase; *Taxus wallichiana* var. *chinensis*; Gene functional analysis

收稿日期: 2018-12-10, 退修日期: 2019-03-04。

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20120142130009); 华中科技大学校自主创新基金(2013TS079)。

This work was supported by grants from the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20120142130009) and Independent Innovation Fund Project of Huazhong University of Science and Technology (2013TS079).

作者简介: 廖卫芳(1989-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为植物次生代谢与调控(E-mail: leesalwf89@126.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence). E-mail: leesalwf89@126.com; yulongjiang@mail.hust.edu.cn。

紫杉醇(Taxol)为红豆杉属(*Taxus*)植物合成的一种二萜类化合物，能促进微管的形成和稳定，并阻止其解聚，从而达到阻止癌细胞分裂的目的，对乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤等都具有明显疗效，其需求量在抗肿瘤药物中居于首位^[1]。由于紫杉醇在红豆杉(*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.)中含量极低，且红豆杉属植物资源稀缺，故天然提取的紫杉醇远远无法满足临床需求^[2,3]。为此，国内外研究者在筛选高产紫杉醇红豆杉品种、细胞培养、化学半全合成及全合成、微生物生产等方面做了大量探索，获得了一定的进展，但离根本解决紫杉醇的供需问题尚有很大差距^[4-8]。

合成生物技术的发展将是解决紫杉醇供需矛盾的重要途径。近年来，青蒿素、人参皂甙等重要次生代谢产物已成功实现异源大量合成^[9-11]。围绕解析紫杉醇合成途径的分子机制，并利用代谢工程手段合成紫杉醇的研究日益成为科学的研究热点^[12-14]。解析紫杉醇生物合成途径的分子机理具有重要科学意义，可为利用合成生物技术大规模、低成本地生产紫杉醇提供理论依据。

目前，紫杉醇生物合成路径中的大部分酶基因已被确认，但细胞色素P450羟化酶基因及其功能尚未完全解析，尤其是紫杉醇母核上C1、C4和C9位对应的细胞色素P450羟化酶基因尚未被发现，这是目前研究紫杉醇合成生物技术的热点和难点。本研究基于前期中国红豆杉((*T. wallichiana* var. *chinensis*(Pilger) Florin))转录组序列数据，分析得到的1个P450羟化酶新基因TcCYP725A22^[15]，并对其进行了克隆、表达及功能分析，旨在为后续进一步解析紫杉醇的生物合成途径奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

中国红豆杉细胞系由其嫩茎诱导的愈伤组织建立，于华中科技大学资源生物学与生物技术研究所保存。在62#培养基中^[16]，25℃下黑暗传代培养。大肠杆菌(*Escherich coli*)DH5α、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)WAT11均由本实验室保存；酵母表达载体pESC-TRP购于Agilent公司(Agilent, USA)。KOD-Plus-Neo酶购于TOYOB0公司(Japan)；山梨醇(Sorbitol)、半乳

糖(Galactose)、氨苄青霉素(Amp)购于Bio-sharp公司(中国)；酿酒酵母营养缺陷型选择培养基SC-trp(FunGenome, China)；用于蛋白质免疫印迹(Western blot)检测的一抗Myc-Tag Rabbit mAb与二抗Anti-rabbit IgG(HRP-linked Antibody)均购于Cell Signaling Technology公司(USA)。

1.2 TcCYP725A22基因的克隆

根据中国红豆杉转录组序列信息，设计特异性引物(F: 5'-CGGCTCGAGATGCAAATCGAAATGGATACCT-3'；R: 5'-CCGGCTAGCTAA AGTCT-GGGAAAAAGTTTAT-3')。提取中国红豆杉总RNA，反转录为cDNA。以单链cDNA为模板，用KOD-Plus-Neo酶进行PCR扩增。20 μL反应体系包含：KOD-Plus-Neo 0.5 μL、10 × KOD Buffer 2 μL、上、下游引物各0.8 μL(10 μmol/L)、Mg²⁺ buffer 2 μL、dNTP混合物2 μL(2.5 mmol/L)、模板适量。反应程序为：94℃预变性2 min, 98℃变性30 s, 55℃退火30 s, 68℃延伸1 min；共34个循环，最后68℃延伸10 min。PCR产物回收、接连后转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞，阳性克隆鉴定后送测序。

1.3 TcCYP725A22编码蛋白特征分析

利用Clustal X和GeneDoc程序进行蛋白质多序列比对；目的蛋白的信号肽使用SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行预测；蛋白的跨膜结构采用TMHMM2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行预测；利用SOPMA工具预测蛋白的二级结构。

1.4 TcCYP725A22蛋白在酵母中的异源表达

分别将质粒pESC-TRP和目的基因TcCYP725A22用限制性内切酶Xho I、Nhe I于37℃双酶切10 min。酶切产物经分离、回收目的片段，经T4 DNA连接酶于4℃连接过夜。将连接产物热激转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞，选取阳性克隆扩大培养后提取重组质粒pESC-TRP-TcCYP725A22并进行双酶切鉴定。

利用LiAc/ssDNA/PEG法制备酿酒酵母WAT11感受态细胞，并进行上述pESC-TRP-TcCYP725A22重组质粒的转化。PCR检验阳性转化子。挑取阳性酵母转化子于10 mL含有2%葡萄糖的SC-trp液体培养基中，30℃、200 r/min培养至OD₆₀₀=1.5~2.0。离心收集菌体，用无菌水清洗3次，

取适量菌体接种于 10 mL 含 2% 半乳糖的 SC-trp 培养基中, 使菌体的初始浓度为 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$, 再于 30℃、250 r/min 诱导培养至 $OD_{600} = 3.5 \sim 4.5$ 。离心收集菌体, 经直径 0.5 mm 的玻璃珠破壁, 5000 r/min 离心 3 min, 吸取上清液进行 Western blot 检测。以转入 pESC-TRP 空载体的 WAT11 菌株作为对照。

1.5 TcCYP725A22 蛋白的功能分析

将酵母阳性转化子接种到 5 mL 含 2% 葡萄糖的 SC-trp 液体培养基中, 于 30℃、200 r/min 培养过夜, 再转接于 10 mL 培养基中培养至 $OD_{600} = 0.8$, 于 4℃、7000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 等体积 ddH₂O 冲洗 3 次后用 10 mL 的含 2% 半乳糖的 SC-trp 培养基重悬, 同时加入终浓度为 100 μ mol/L 的紫杉素(Taxusin)作为反应底物, 重复 3 次。再于 30℃、200 r/min 诱导培养 48 h。以转入 pESC-TRP 空载体的 WAT11 菌株及不添加反应底物的实验组作为对照。将诱导培养后的菌液使用等体积正己烷:乙酸乙酯 ($V:V = 4:1$) 抽提 2 次, 合并抽提液, 自然吹干后用 500 μ L 的乙腈溶解, 于 0.22 μ m 滤膜后用于液相色谱-质谱联用(LC-MS)分析。

LC-MS 检测条件为: 液质联用仪 1100 LC/MSD XCD Trap(安捷伦)进行产物检测; 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-Phenyl (4.6 mm × 250 mm × 5 μ m); 流动相为乙腈和水, 梯度设置为(乙腈含量)5% ~ 100%、50 min, 流速为 1 mL/min; 进样量 20 μ L、柱温 30℃; 紫外检测器的波长设置为 210 nm。质谱分析为 ESI 源, 正离子模式。

2 结果和分析

2.1 TcCYP725A22 基因的克隆

以中国红豆杉 cDNA 为模板, PCR 扩增结果显示, 1500 bp 处有明显的条带(图 1), 与预期大小相符, 目的条带测序结果与转录组数据一致, 说明基因克隆成功。经同源性分析后将其命名为 Tc-CYP725A22(NCBI 登录号: MF448646.1), 其编码区长 1500 bp, 具有完整的开放阅读框, 编码 499 个氨基酸, 编码蛋白分子量为 57.24 kD, 等电点为 8.77。

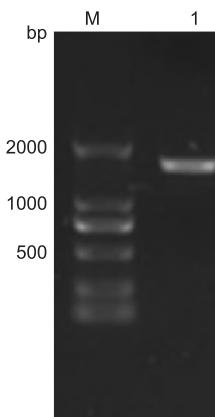


图 1 TcCYP725A22 基因 PCR 扩增电泳检测
Fig. 1 Electrophoresis of TcCYP725A22 gene fragments

2.2 TcCYP725A22 编码蛋白特征分析

本研究将 TcCYP725A22 氨基酸序列与中国红豆杉中已知的紫杉烷羟化酶, 包括: 紫杉烷 2 α -羟化酶(T2OH)、紫杉烷 5 α -羟化酶(T5OH)、紫杉烷 7 β -羟化酶(T7OH)、紫杉烷 10 β -羟化酶(T10OH)和紫杉烷 13 α -羟化酶(T13OH)氨基酸序列进行比对分析。结果显示(图 2), TcCYP725A22 与已知的紫杉烷 P450 羟化酶序列相似, 都具有典型的 PSRF、EXXR 和 PFG 等结构域。

蛋白信号肽的预测结果显示, TcCYP725A22 无信号肽。采用 TMHMM 在线工具进行 Tc-CYP725A22 的跨膜区预测, 发现该蛋白只有 1 个跨膜区(21 ~ 43 aa), 在此之前的区域位于膜内(1 ~ 20 aa), 之后的区域位于膜外(44 ~ 499 aa)(图 3)。TcCYP725A22 蛋白二级结构预测结果表明, 蛋白序列中 α 螺旋占 48.50%、 β 转角占 4.01%、扩展束占 12.63%、无规则卷曲占 34.87%。

2.3 TcCYP725A22 的酵母异源表达与检测

本研究将选择的高拷贝、诱导型酿酒酵母表达载体 pESC-TRP 和构建好的重组质粒 pESC-TRP-TcCYP725A22, 分别转化到 WAT11 菌株中, 选取阳性克隆子进行诱导表达。Western blot 检测结果显示(图 4), 目的蛋白在约 55 kD 处出现明显的单一条带, 而阴性对照(pESC-TRP 空载体转化菌株)无条带出现, 表明目的蛋白在酿酒酵母 WAT11 菌株中成功表达。

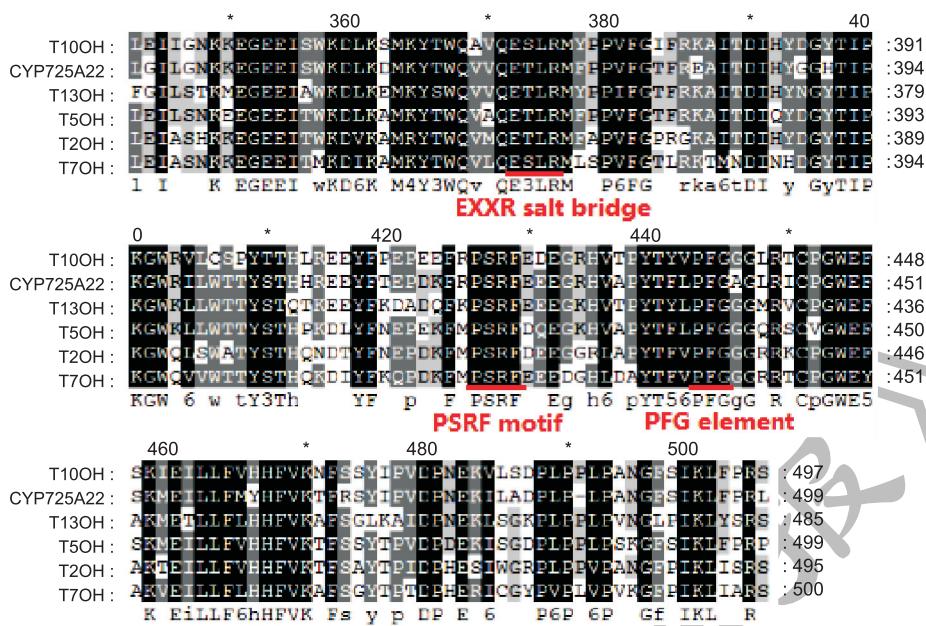
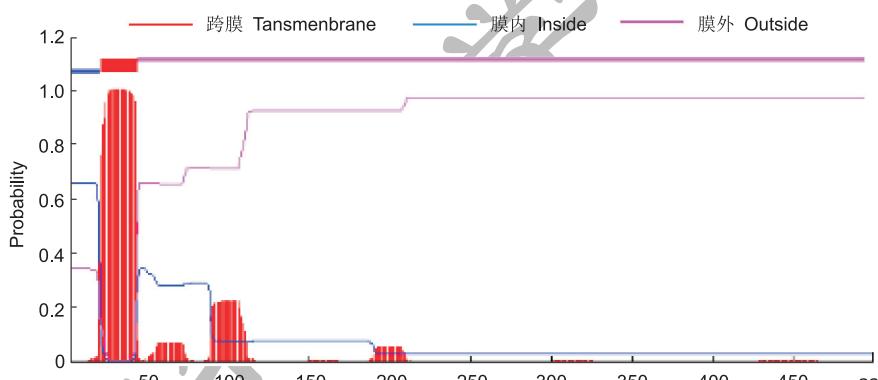
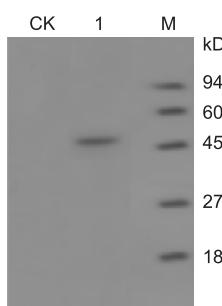


图2 TcCYP725A22与其他已知紫杉烷羟化酶的多序列比对

Fig. 2 Sequence alignments of TcCYP725A22 with acquired taxoid hydroxylases

图3 TcCYP725A22的跨膜区预测
Fig. 3 Prediction results of TcCYP725A22

M: 蛋白预染 Marker III; CK: 含 pESC-TRP 空载体菌株; 1: 含 pESC-TRP-TcCYP725A22 的菌株。

M: Protein pre-stained Marker III; CK: Strain containing pESC-TRP vector; 1: Strain containing pESC-TRP-TcCYP725A22 vector.

图4 重组蛋白 TcCYP725A22 的 Western blot 检测

Fig. 4 Western blot detection of recombinant TcCYP725A22 protein

2.4 TcCYP725A22 基因的功能分析

本研究以紫杉素为底物,分别对TcCYP725A22重组蛋白、空载体表达蛋白和不添加底物对照组的催化反应情况进行测定,并对提取反应后的产物进行LC-MS检测。TcCYP725A22蛋白催化紫杉素转化反应的总离子流峰图显示,与空载体相比,实验组在31.7 min出现了新的色谱峰1(图5: A),该组分的一级质谱出现了1个主要的558.7 m/z的分子离子峰(图5: B),且不添加底物的对照组在此处无特征峰。TcCYP725A22重组蛋白催化转

化反应前底物在此LC-MS条件下呈现 $[M + Na] +$ 峰(504 + 23)。因此,推测558.7 m/z可能是 $[536 + Na]$ 的分子离子峰。因此,峰1的分子量推测为536。依据反应底物紫杉素的分子结构(图5: C),推测分子量为536的紫杉烷可能为添加了2个羟基的紫杉烷新衍生物(图5: D)。以上结果表明,通过酵母真核表达的TcCYP725A22羟化酶在酵母体内具有反应活性,但其羟基在紫杉烷母核上的具体位置尚需通过核磁共振等方法进一步确认。

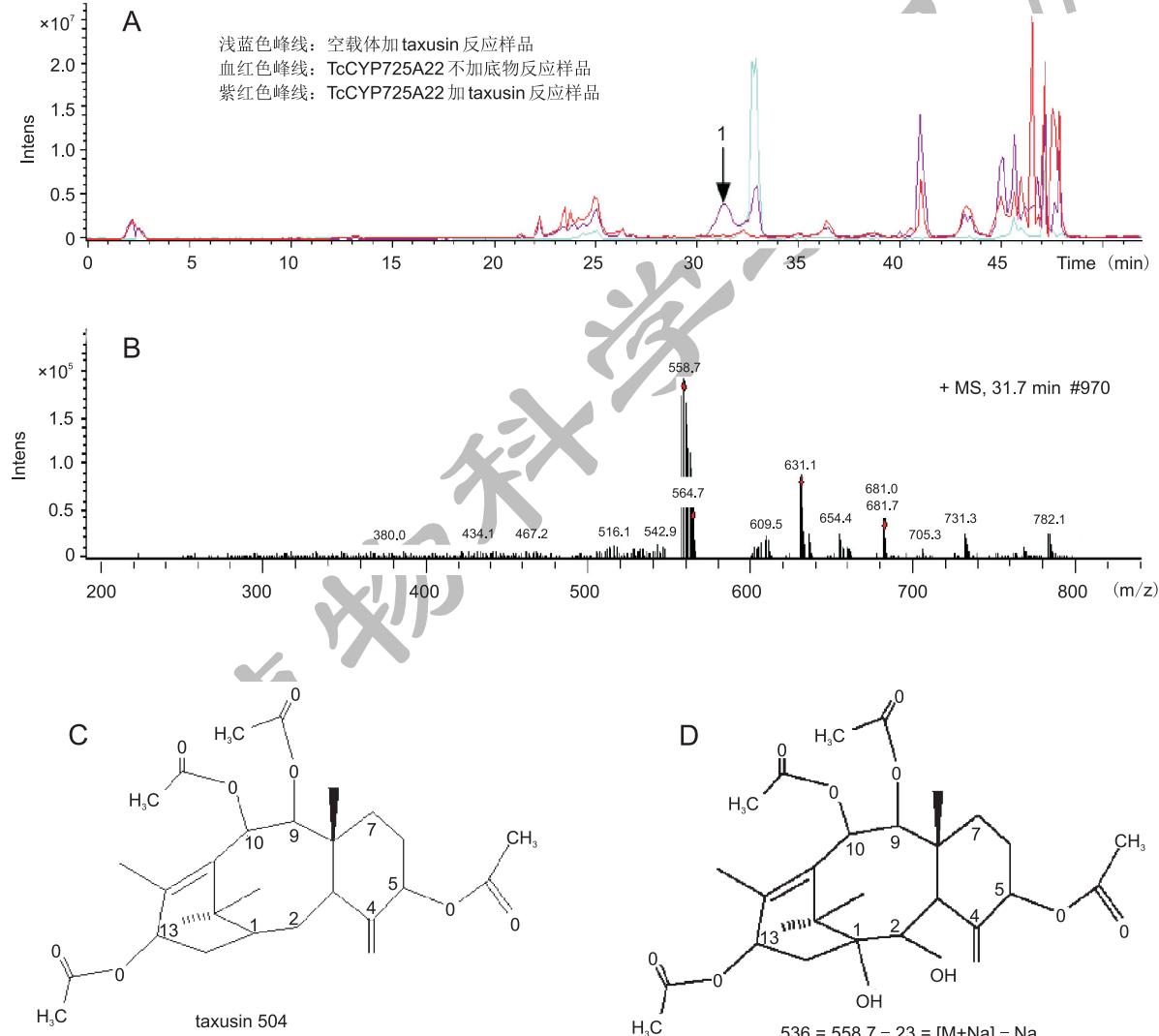


图5 羟化酶TcCYP725A22催化紫杉素反应结果
Fig. 5 Analysis of TcCYP725A22 protein to taxusin

3 讨论

紫杉醇是红豆杉中的重要活性成分，具有很好的抗肿瘤作用。紫杉醇的生物合成途径较为复杂，需经历不少于 20 步酶的催化反应，其中多步为 CYP450 酶介导的氧化反应^[17]。紫杉醇母核紫杉二烯发生了 8 个位点的有效羟基化，即位点 C1、C2、C4、C5、C7、C9、C10 和 C13^[18]。目前，已鉴定出位点 C2、C5、C7、C10 和 C13 对应的 1 个或多个羟化酶基因^[19–23]。但母核上尚有较多的 CYP450 羟化酶基因功能未被确认，尤其是 C1、C4 和 C9 位对应的 CYP450 羟化酶基因尚未被发现，这些已成为彻底解析紫杉醇生物合成途径的主要瓶颈^[24]。因此，挖掘红豆杉中新的羟化酶基因具有重要意义。本研究以中国红豆杉为材料，克隆新的 P450 羟化酶基因 *TcCYP725A22*，并首次在酵母中进行表达和功能研究，实验结果显示，表达后 *TcCYP725A22* 蛋白能将底物紫杉素催化形成添加了 2 个羟基的新紫杉烷衍生物，具有明显的生物学活性。而从底物紫杉素的结构上来看，其母核上保留有 C1、C2 和 C7 3 个未被氧化修饰的位点，因此 *TcCYP725A22* 可能在其中的 2 个位点上具有羟化作用。

Eisenreich 等^[25]的研究表明，紫杉烷母核上所有羟基氧化反应均由细胞色素 P450 氧化酶类催化完成。至今在红豆杉中鉴定出的与紫杉醇生物合成相关的 P450 羟化酶基因均属于 CYP725A 亚家族^[19–23]。*TcCYP725A22* 也属 CYP725A 亚家族蛋白，序列比对分析结果发现，该蛋白与已知的 C10 位羟化酶相似性最高，达到 71%，且其序列中具有 PSRF、EXXR 和 PFG 等 P450 典型的保守结构域。因此 *TcCYP725A22* 极有可能参与紫杉醇的生物合成。

在紫杉醇的生物合成途径中，紫杉二烯合酶催化形成三环二萜的基本骨架结构紫杉 4(5),11(12) 二烯后，需要进行一系列羟基化、酰基化等的修饰。而酰基化反应的原理是将酰化酶催化、活化的乙酰基结合到其配基底物的羟基上，因此，有效的羟基化是酰化成紫杉醇的前提^[26, 27]。本研究获得了具有催化活性的羟化酶基因 *TcCYP725A22*，对最终彻底解析紫杉醇的生物合成途径具有重要意义。

参考文献：

- [1] Sun NK, Kohli A, Huang SL, Chang TC, Chao CCK. Androgen receptor transcriptional activity and chromatin modifications on the ABCB1/MDR gene are critical for taxol resistance in ovarian cancer cells [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8760–8775.
- [2] Ketchum RE, Wherland L, Croteau R. Stable transformation and long-term maintenance of transgenic *Taxus* cell suspension cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26 (7): 1025–1033.
- [3] Julsing MK, Koulman A, Woerdenbag HJ, Quax WJ, Kayser O. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites [J]. *Biomol Eng*, 2006, 23 (6): 265–279.
- [4] Malik S, Cusido RM, Mirjalili MH, Moyano E, Palazon J, et al. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review [J]. *Process Biochem*, 2011, 46(1): 23–34.
- [5] Mirjalili MH, Farzaneh M, Bonfill M, Rezadoost H, Ghassempour A. Isolation and characterization of *Stemphylium sedicola* SBU-16 as a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus baccata* grown in Iran [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 328(2): 122–129.
- [6] Yang N, Pan X, Chen G, Sarsaiya S, Yu J, et al. Fermentation engineering for enhanced paclitaxel production by *Taxus media* endophytic fungus MF-5 (*Alternaria* sp.) [J]. *J Biobased Mater Bio*, 2018, 12(6): 545–550.
- [7] Tijen AJ, Verweij J, Loos WJ, Sparreboom A. Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2003, 42 (7): 665–685.
- [8] Matoba H, Watanabe T, Nagatomo M, Inoue M. Convergent synthesis of taxol skeleton via decarbonylative radical coupling reaction [J]. *Org Lett*, 2018, 20 (23): 7554–7557.
- [9] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440 (7086): 940–943.
- [10] Yan X, Fan Y, Wei W, Wang P, Liu QF, et al. Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast [J]. *Cell Res*, 2014, 24(6): 770–773.
- [11] Awasthi D, Wang L, Rhee MS, Wang Q, Chauliac D, et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for production of D-lactic acid [J]. *Biotech Bioeng*, 2018, 115 (2): 453–463.
- [12] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. *Science*, 2010, 330

- (6000): 70–74.
- [13] Zhou K, Qiao K, Edgar S, Stephanopoulos G. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products [J]. *Nature Biotech*, 2015, 33(4): 377–383.
- [14] Biggs BW, Lim CG, Sagliani K, Shankar S, Stephanopoulos G, et al. Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated Taxol precursor synthesis in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(12): 3209–3214.
- [15] Liao WF, Zhao SY, Zhang M, Dong KG, Chen Y, et al. Transcriptome assembly and systematic identification of novel cytochrome P450s in *Taxus chinensis* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1468.
- [16] Zhang CH, Mei XG, Liu L, Yu LJ. Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* [J]. *Biotechnol Lett*, 2000, 22(19): 1561–1564.
- [17] Roberts SC. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(7): 387–395.
- [18] Howat S, Park B, Oh IS, Jin YW, Lee EK, et al. Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects [J]. *New Biotechnol*, 2014, 31(3): 242–245.
- [19] Jennewein S, Long RM, Williams RM, Croteau R. Cytochrome P450 taxadiene 5 α -hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of taxol biosynthesis [J]. *Chem Biol*, 2004, 11(3): 379–387.
- [20] Schoendorf A, Rithner CD, Williams RM, Croteau R. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 β -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(4): 1501–1506.
- [21] Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, Croteau R. Taxol biosynthesis: taxane 13 α -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13595–13600.
- [22] Chau M, Croteau R. Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2 α -hydroxylase involved in taxol biosynthesis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 427(1): 48–57.
- [23] Chau M, Jennewein S, Walker K, Croteau R. Taxol biosynthesis: molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 7 β -hydroxylase [J]. *Chem Biol*, 2004, 11(5): 663–672.
- [24] 陈清浦, 廖卫芳, 付春华, 赵春芳, 余龙江. 紫杉醇生物合成途径中羟化酶的研究进展 [J]. 生物工程学报, 2016, 32(5): 554–564.
- Chen QP, Liao WF, Fu CH, Zhao CF, Yu LJ. Research progress in hydroxylase in taxol biosynthetic pathway [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2016, 32(5): 554–564.
- [25] Eisenreich W, Menhard B, Lee MS. Multiple oxygenase reactions in the biosynthesis of taxoids [J]. *J Am Chem Soc*, 1998, 120(37): 9694–9695.
- [26] Walker K, Schoendorf A, Croteau R. Molecular cloning of a taxane-4(20),11(12)-dien-5 α -ol-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 374(2): 371–380.
- [27] Walker K, Croteau R. Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane 2 α -O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(25): 13591–13596.

(责任编辑:周媛)