

doi:10.11835/j.issn.1000-582X.2017.07.012

增强大肠杆菌 MEP2 通路发酵生产抗癌药物紫杉醇前体

黄晓斌, 仲蕾蕾

(重庆大学 生命科学学院, 重庆 400044)

摘要:用合成生物学的方法构建模块,使大肠杆菌遗传背景发生改变,生产红豆杉次生代谢产物紫杉醇前体物质——4(5),11(12)紫杉二烯(Taxadiene)。首先,用基因工程操作手段构建 MEP2(2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphate,2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸途径)模块,这个模块包括4个基因:ispC、ispE、ispH和ispG,4个基因的表达产物属于大肠杆菌固有途径中的几个酶蛋白;模块构建好后,通过电穿孔的方式把MEP2转化到已含有上游MEP1模块和下游TG模块的大肠杆菌中,改变大肠杆菌固有的遗传信息。再用异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导所转入基因的表达,最后用气相色谱-质谱(GC-MS)方法检测表达情况。成功构建MEP2模块;通过与MEP1模块和TG模块的组合实验,MEP2模块能加强菌株表达紫杉二烯。结果表明,微生物大肠杆菌可以通过基因工程改造手段来生产植物天然药物紫杉醇前体物质4(5),11(12)紫杉二烯以及其他中间体。

关键词:合成生物学;生物发酵;4(5),11(12)紫杉二烯

中图分类号:O652.1

文献标志码:A

文章编号:1000-582X(2017)07-091-08

Enhancing MEP2 Pathway of E.coli to Produce taxol precursor

HUANG Xiaobin, ZHONG Leilei

(School of Life Sciences, Chongqing University, Chongqing 400044, P.R.China)

Abstract: Building module with synthetic biology to change the genetic background of E.coli and produce the 4(5),11(12)-Taxadiene that originally comes for Taxus chinensis as a secondary metabolite. First, MEP2(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) module is built and it includes four inherent enzymes, i.e. ispC, ispE, ispH and ispG. The four genes all belong to the MEP upstream pathway. Then, the MEP2 module is transferred into E. coli which contains the upstream MEP1 and downstream TC by electroporation. Finally, these gene expresses are induced with using IPTG and the products are detected by GC-MS. The MEP2 gene module is built successfully and MEP2 is convinced to enhance the production of taxadiene through several combination experiments continually. E. coli can be rebuilt to produce the botanical drug taxol precursor taxadiene and other intermediates by genic engineering.

Keywords: synthetic biology; fermentation; 4(5), 11(12)-taxadiene

收稿日期:2016-12-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31100029);中央高校基本科研业务费(CQDXWL)。

Supported by National Nature Science Foundation of China (31100029), the Fundamental Research Funds for the Central Universities(CQDXWL).

作者简介:黄晓斌(1980-),男,重庆大学博士,主要从事肿瘤发生机理、抗癌药物生物合成研究,(E-mail)xiaobinhuang@cqu.edu.cn。

自从紫杉醇(taxol, 商品名 Paclitaxel)被发现有抗癌作用以来^[1],人们对它的各个方面均展开了研究,但紫杉醇的生产量成了医药应用上的一大瓶颈。目前,获得紫杉醇的方式仍然主要是直接从红豆杉树皮或叶子中获取而来。但红豆杉生长非常缓慢,而且其紫杉醇含量很低,即使是采用现在紫杉醇含量最高的曼地亚红豆杉品种,含量也才最多万分之六、七。所以要得到一针剂量的紫杉醇,就需要大量的红豆杉树皮或者针叶,这对红豆杉资源和生态环境都提出了挑战。除了直接从植物中提取出微量紫杉醇外,目前生产紫杉醇主要还有几种方法:1)化学全合成;2)化学半合成,用植物代谢中间产物巴卡亭 III(baccatin III)来合成紫杉醇;3)通过培养红豆杉细胞的方法生产紫杉醇;4)通过微生物发酵生产^[2]。化学半合成的方法虽然可以应用,但必须从中间产物巴卡亭 III 这一步开始,其它几种方法都还处于实验阶段。因紫杉醇化学结构复杂,虽然现在可以用化学全合成的方法来合成,但产量太低,而且要用到剧毒原料;而培养植物红豆杉细胞也会面临老化的问题;从自然界中分离能产紫杉醇的真菌培养,又出现不稳定及产量太低的问题^[3-5]。

紫杉醇的自然合成过程非常复杂,经过多年研究,现在大部分过程都逐渐得到阐明,一些关键的酶基因被鉴定出并已得到克隆和表达^[6-10]。紫杉醇在植物化学分类中属于多萜类化合物,其第一步成环反应和紫杉二烯合成酶的 DNA 序列早在 1995 年就被 Hezari 等相继确定^[11-14]。特别是美国华盛顿州立大学的 Croteau 教授实验组对紫杉醇通路做了大量系统的研究,逐步解析了紫杉醇合成的生物学过程^[15]。在植物红豆杉中,以牻牛儿苗磷酸(GGPP)为合成前体物质,至少需要经过 20 多步的酶促生物化学反应,才能得到紫杉醇。随着合成生物学和生物发酵工程的发展,人们认识到对微生物的改造来发酵生产药物或者中间体,既安全又环保。2005 年,加州大学伯克利分校的 J.Keasling 实验室开始改造酵母天然的甲羟戊酸途径(Mevalonate, MVA),使 MVA 途径被用来大量产生中间体法尼焦磷酸盐(FPP),而法尼焦磷酸盐接下来可被青蒿基因在酵母中表达的甜苦艾酶催化产生青蒿酸,而正常情况下该途径是通过糖类代谢产生的乙酰辅酶 A 来合成甾醇,这一成果发表在 2006 年的 Nature 杂志上^[16]。利用酵母菌对其改造后生产青蒿素的成功,对人们是一个很大的鼓舞。人们也在尝试生产其它中间体^[17-20]。麻省理工学院的 Stephanopoulos 教授实验组展开了相关的研究,并于 2010 年在 Science 上发表了其最新研究结果^[21]。

紫杉醇作为一种对卵巢癌、乳腺癌、子宫癌、肺癌、食道癌、前列腺癌以及直肠癌等多种癌症都非常有效的天然药物,它有着独特的作用机制:主要作用于癌细胞中的微管蛋白,使微管蛋白复合物结构稳定,而不能得到解聚,从而使癌细胞的有丝分裂异常或停止,最终导致肿瘤细胞的死亡,达到有效地治疗效果^[22-26]。

大肠杆菌作为一种被常规研究的微生物,人们对其遗传背景及生长规律都了解很清楚。其实,在大肠杆菌其本身也包含有紫杉醇生物合成的上游途径,虽然和真核生物不一样,但仍然有合成前体物质异戊烯焦磷酸(IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)的能力,称之为 MEP 途径,此途径也是大肠杆菌正常生长所需要的,只是表达水平比较低而已。因此,理论上可以根据需要对大肠杆菌进行改造,改变其基因表达的强弱,使它可以适合萜类的合成^[21,27-29]。文中主要集中对上游途径的 MEP2 模块进行构造,然后与 MEP1 模块和下游模块一起互相调节,使菌株既能正常生长,又能稳定表达紫杉醇中间体 4(5),11(12)-紫杉二烯。

1 实验材料

1.1 细胞株

大肠杆菌菌株 EDE3-Ch1T_{rc}-MEP1-T7TG(实验室保存)、EDE3-Ch1T₅-MEP1-T7TG(实验室保存)、EDE3-Ch1T₇-MEP1-T7TG(实验室保存)、DH5a 大肠杆菌感受态细胞(Invitrogen 公司)。

1.2 质粒

pcl2009-ispC, pcl2009-ispH, pcl2009-ispE, pcl2009-ispG(Invitrogen 公司);pACYCDuet-TXS-GGPP-kmFRP(实验室保存)。

1.3 所用试剂

限制性内切酶:NdeI(NEB);Xho I(NEB);AseI;Nae I(NEB);PstI(NEB);ScaI(NEB);Apa(NEB);

XbaI(NEB);Not I (NEB);Hind III (NEB);Sal I (NEB);T4DNA 连接酶(NEB);去磷酸化酶(NEB);质粒提取试剂盒(Qiagen);快速 DNA 凝胶回收试剂盒(QIAGEN);Taq DNA 聚合酶(Invitrogen 公司);普通 PCR 试剂盒(Invitrogen 公司);高保真 PCR 试剂盒(Invitrogen);DNA Maker(Invitrogen 公司);PCR 产物回收试剂盒(Qiagen);Glycerol(Sigama 公司)。其它分子生物学试剂及各种限制性内切酶也从 NEB 公司购买。

2 实验方法

2.1 创建 MEP2 模块

1) 根据所要操作的基因序列设计好带酶切位点的引物,如图 1 所示。

IspCFrwNdeI:TAGCGCCATATGAAGCAACTCACCATTCTGGGC
IspCRevXhoI:TAGCGCCTCGAGCTCAGCTTGGGACCGCATCAC
IspHFrwAseI: TAGCGCATTAAATGCAGATCCTCTGGCCAAAC
IspHRecXhoI: TAGCGCCTCGAGGCTGCTCAATGACTTAATCGACTTCACC
IspEFrwNdeI: TAGCGCATATGCGGACACAGTGGCCCTCTC
IspERevXhoI:TAGCGCCTCGAGCGGCTTAAAGCATGGCTCTGTCC
IspGFrwNdeI:TAGCGCCATATGCATGCGCAGGCTCCAATTCAAC
IspGRevXhoI:GCGCCTCGAGGCTTCCATCACGTTATTATTTTCAACC

图 1 MEP2 模块 4 种基因引物

Fig.1 Four gene primers of MEP2 module

2) 把基因 *ispH* 接入质粒 *ipcl2009ispC* 中。

首先,以质粒 *pcl2009ispH* 作为模板,用 PCR 方法高保真扩增基因 *ispH*,继而在 37 °C 的温箱中用 *XhoI* 与 *PstI* 两种限制性内切酶分别充分双酶切质粒 *pcl2009ispC* 和 *ispH* PCR 产物,为了使酶切彻底,切 4 h。然后把质粒 *pcl2009ispC* 酶切产物去磷酸化处理。用试剂盒分别纯化 DNA 酶切产物。16 °C 水浴连接过夜后,转化 DH5a 感受态细胞。经过抗生素筛选,挑取阳性克隆菌,提取质粒,进行酶切、测序分析。最后得到连接成功的 *ipcl2009ispCH* 质粒。

3) 把基因 *ispE* 接入质粒 *ipcl2009ispCH* 中。

以质粒 *pcl2009ispE* 作为模板,PCR 高保真扩增 *ispE* 基因,在 37 °C 的温箱中用 *PstI* 与 *XbaI* 分别充分双酶切所构建质粒 *pcl2009ispCH* 和 *ispE* PCR 产物 4 h。把质粒 *pcl2009ispCH* 酶切产物去磷酸化。再分别用试剂盒纯化 DNA 酶切产物。16 °C 水浴连接过夜,转化 DH5a 感受态细胞。经过抗生素筛选,挑取阳性克隆菌,提取质粒,进行酶切、测序分析。最后得到连接成功的 *ipcl2009ispCHE* 质粒。

4) 把基因 *ispG* 接入质粒 *ipcl2009ispCHEG* 中。

用基因质粒 *pcl2009ispG* 作为模板,PCR 高保真扩增 *ispG* 基因,在 37 °C 的温箱中用 *XbaI* 与 *SalI* 充分双酶切 *pcl2009ispCHE* 和 *ispG* PCR 产物 4 h。把质粒 *pcl2009ispCHE* 酶切产物去磷酸化。再分别用试剂盒纯化 DNA 酶切产物。16 °C 连接过夜,转化 DH5a 感受态细胞。经过抗生素筛选,挑取阳性克隆菌,提取质粒,进行酶切、测序分析。最后得到连接成功的 *ipcl2009ispCHEG* 质粒。

5) 把抗生素 Km(Kanamycin)基因接入质粒 *ipcl2009ispCHEG* 中。

用高保真 PCR 试剂盒和带有 *ScaI* 和 *XhoI* 酶切位点的引物,从 *pACYCDuet-TXS-GGPP-kmFRP* 质粒上扩增-FRP-Km gene-FRP 基因盒;然后在 37 °C 的温箱中用 *XhoI* 酶和 *ScaI* 酶下双酶切 PCR 产物至少 4 h,产物用 DNA 纯化试剂盒纯化;再用 *SalI* 酶和 *NaeI* 酶在 37 °C 条件下双酶切新得到的质粒 *ipcl2009ispCHEG* 4 h;待双酶切完全后,加入去磷酸化酶及缓冲液(Buffer)在 37 °C 培养箱中去磷酸化反

应 1 h; 继而跑 DNA 胶后, 切割小质粒条带, 酶切完后的线性质粒用纯化试剂盒纯化; 最后把双酶切下的-FRT-Km-FRT 基因盒与酶切后的线性质粒质粒 ipcl2009ispCHEG 连接: 加入连接酶 1 μL , 相应 buffer 2 μL , 总反应体积为 20 μL , 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中连接过夜; 取 2 μL 过夜连接产物转化进入 50 μL DH5a 细胞; 然后铺卡那霉素板筛选, 挑取培养皿板上的阳性克隆提取质粒进行 PCR、特异酶切以及精确测序进行分析进而得到确认。最后得到 ipcl2009ispCHEGKm 质粒。

2.2 把得到的质粒模块 ipcl2009ispCHEGKm 转入到含有 MEP1 模块和下游模块的菌种中

首先用氯化钙的方法分别制作菌株感受态细胞: EDE3-Ch1T_{rc}-MEP1-T7TG1、EDE3-Ch1T5-MEP1-T7TG1、EDE3-Ch1T7-MEP1-T7TG1, 然后按操作规程将质粒 ipcl2009ispCHEGKm 分别转进 3 个菌株中: 分别向 3 种菌株中加入质粒 DNA 溶液(200 ng 左右), 摇匀, 放置冰上 10 min。42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中热击 45 s, 迅速置于冰上冷却 2 min。再加入 250 μL LB 培养基, 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 1 h。将上述菌液摇匀后取 150 μL 涂布于抗生素筛选平板上, 向上放置 0.5 h, 菌液完全干后倒置培养皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 直到克隆长出。

2.3 用 IPTG 诱导改造菌小发酵生产 4(5), 11(12) 紫杉二烯

同样, 每种质粒挑取 5 个克隆来检测: 先用灭菌牙签挑取少许克隆接种到 3 mL 含 1% 葡萄糖 LB 溶液中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 200 r/min 生长过夜; 当生长到 OD₆₀₀ 值超过到 2OD 时, 鲜配发酵培养基(Taxadiene 培养基, 加入适当抗生素, 并加入 IPTG, 使其终浓度到 0.1 M, 搅拌器上充分混合); 分别加入 50 μL 菌液到 2 mL 发酵培养基的玻璃试管中, 旋紧塑料瓶塞, 插入小针管透气; 放到 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 200 r/min 转速连续培养 6 d。

2.4 气相色谱质谱联用(GC-MS)测 4(5), 11(12) 紫杉二烯浓度

当菌株生长到第 6 d 时, 从各个玻璃管中取出 500 μL 菌液, 测定其 OD₆₀₀ 值, 计算其生长情况。接着用管内另外的 1.5 mL 菌液来提取紫杉二烯: 向管中加入正己烷 1 mL, 盖紧; 振荡器上大力度震荡 30 min; 2 000 r/min 转速离心 20 min; 小心取 200 μL 上清液到 GC-MS 管中待测 Taxadiene 浓度, 同时用正己烷作为空白对照和洗涤用, 设定好方法, 运行程序进行检测。

3 实验结果

3.1 成功创建另一上游模块, 并成功添加 Km 选择基因: MEP2-ispCHEG-Km

因大肠杆菌 MEP 上游途径除了 dxs、ispD、idi、ispF 4 种关键酶基因外, 还有 ispC、ispE、ispH、ispG 4 种酶基因。虽然大肠杆菌已有这 4 种基因本底水平的表达以供自己正常生长需要, 但为了增加前体物质 IPP 和 DMAPP 的供应量, 需要让上游每个步骤的前体物质充分表达。为了成功构建 MEP2-ispCHEG-Km 模块, 采用逐步连接法, 从基因 ispc 开始, 先连接 ispH, 然后再连接 ispE, 继而连接 ispG, 最后接上 Km 基因以供转化后抗性筛选。克隆过程如图 2 所示, 构建成功的模块质粒图如图 3 所示。

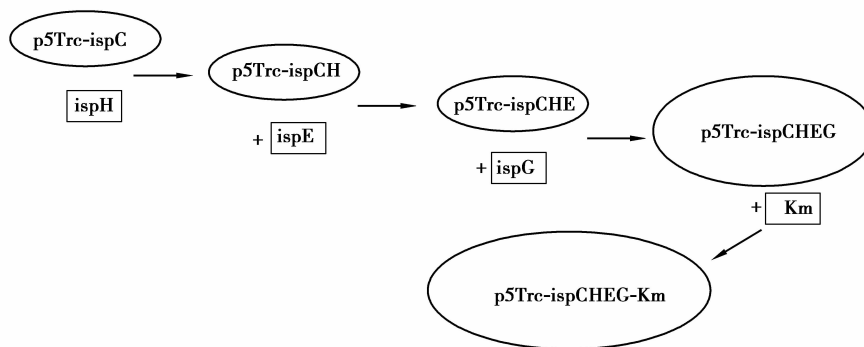


图 2 MEP2 模块逐渐克隆过程

Fig.2 the clone process of MEP2 module

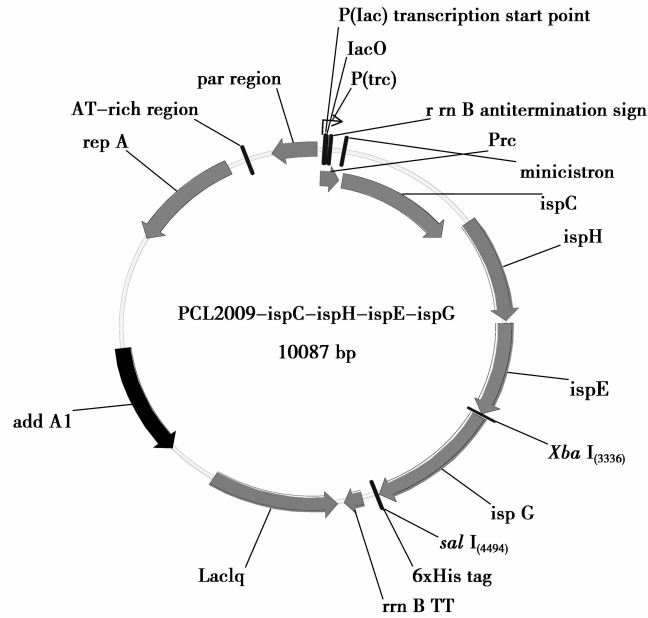


图 3 成功克隆的 MEP2 模块质粒图谱
Fig.3 the plasmid map of MEP2

3.2 把 MEP2 模块成功转入含 MEP1 和 TG 模块的菌株中

因实验室在前期把上游 MEP1 模块和下游 TG 模块整合进入 EDE3 菌株,已经得到 3 个稳定表达的菌株:EDE3-Ch1Trc-MEP1-T7TG1、EDE3-Ch1T5-MEP1-T7TG1、EDE3-Ch1T7-MEP1-T7TG1,微发酵后,产生紫杉二烯的最高浓度为 30 mg/L。考虑到大肠杆菌染色体的容量,先不把 MEP2 模块整合进入大肠杆菌染色体,而是以质粒的方式转入到上述 3 种菌株中。成功得到新的 3 种菌株,组成示意图如图 4 所示。

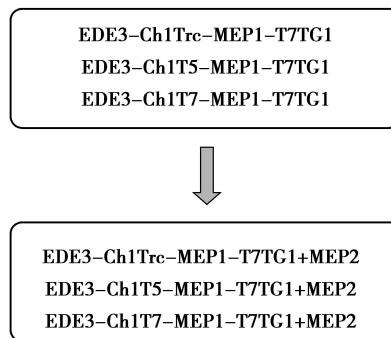


图 4 构建含上下游 3 个模块的菌株示意图
Fig.4 Schematic diagram of strain including 3 modules of upstream and downstream

3.3 MEP2 以质粒的方式在大肠杆菌中可稍稍提高产紫杉二烯的量

当大肠杆菌只含有上游 MEP1 模块和下游模块 TG 时,菌株已能发酵产生紫杉二烯了,大肠杆菌本身含有模块 MEP2 中的所有基因,只是表达量比较低。所以,就再人为地增加这些基因的表达量,把 MEP2 以质粒的方式转入 EDE 菌株中。结果显示转入的 MEP2 能帮助增加紫杉二烯的合成量,通过微发酵后使产生的紫杉二烯的最高浓度达到最高 40 mg/L,如图 5 所示。

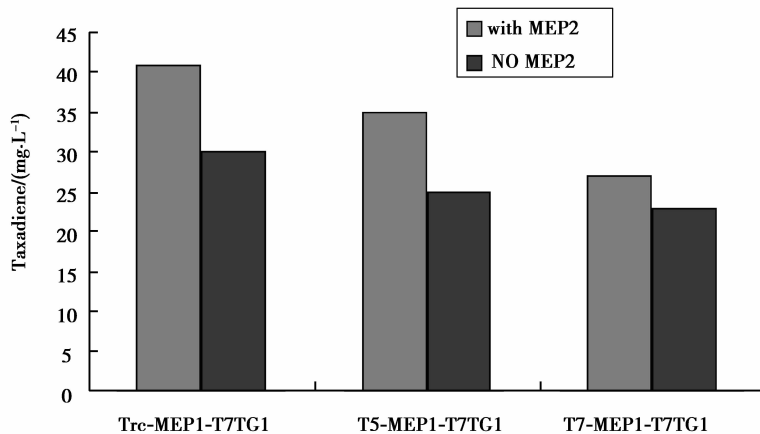


图 5 含 MEP1、MEP2、TG 3 个模块菌株生产紫杉二烯

Fig.5 The taxadiene production in the strain including MEP1, MEP2 and TG modules

4 讨 论

随着紫杉醇医疗需求量的增加,现有植物资源已不能满足需求。目前,紫杉醇依然主要从红豆杉植物直接提取,资源消耗太大。红豆杉属于生长慢的树种,所以科学家们都在寻求从其它途径生产紫杉醇的可能性。自从可以用酵母菌来发酵生产青蒿素以来,似乎已经看到了可以用微生物发酵生产紫杉醇的前景^[30]。紫杉醇与青蒿素一样都属于萜类化合物,青蒿素属于倍半萜类,结构和生物合成途径更简单。而紫杉醇属于二萜类化合物,生物合成途径复杂得多。但紫杉醇和青蒿素的生物合成有共同的上游部分,都是以 GGPP 为反应底物。理论上,用改造了的微生物来发酵生产紫杉醇是可以的。因为其复杂结构及合成的复杂过程,各大实验室都还处于探索阶段,没有实质性的突破。

目前,用微生物改造来生产紫杉醇及前体物质的实验室基本上都是采取这种上下游策略^[2,19-20]:改变微生物原有的上游途径;改变微生物的下游途径;降低其它的需消耗 IPP 和 DMAPP 的旁路途径。思路虽然简单,但是要想在微生物正常发酵生长的前提下改变这么多通路,确实也是一个挑战。通过研究发现,并不是上游表达强度越强越好,但是上游某些酶基因表达弱了肯定影响下游表达。就要找这个平衡点,既不要表达过少,也不要过多。所以,就只有通过不同的启动子和表达量的多少来控制最终表达量,找到各方面都比较平衡的状态。

实验的创新之处在于把大家容易忽视的另外几个基因 *ispC*、*ispE*、*ispH* 和 *ispG4* 整合成一个操纵子模块转入到大肠杆菌中加强上游表达水平。*ispC*、*ispE*、*ispH* 和 *ispG4* 虽然不是 MEP 通路的限速酶基因,但他们表达量的多少也可能对下游途径造成影响。如果表达量很低的话,有可能会减少下游产量,如果能增加其表达量,或许可以增加下游的表达量。但大肠杆菌作为一种简单生长菌,不能同时容纳太多质粒生长,所以,实验把 *ispC*、*ispE*、*ispH* 和 *ispG4* 这 4 个基因以串联的方式控制在同一个启动子下表达,以期增加 IPP 和 DMAPP 供应量,进而提高紫杉二烯表达水平。实验结果虽然不是很明显,但也初步证明了设想,当把上游 MEP2 转入进菌株后,紫杉二烯的表达量有所提高。至于为什么没有大幅度提高,可能是因为还没有找到其最佳平衡点。这也是今后研究中会进一步加强的地方。在下一步研究中,把 MEP2 模板的启动子换成表达强度更强的启动子,同时增加下游外来途径的表达量水平,从多方面来改造大肠杆菌以加强紫杉二烯的表达量,从而使大肠杆菌为人类医药发展服务。

参考文献:

- [1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1971, 93(9): 2325.
- [2] Li J, Wang C. Advances of taxol combinatorial biosynthesis[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2014, 30(3): 355-367.
- [3] Doi T, Fuse S, Miyamoto S, et al. A formal total synthesis of taxol aided by an automated synthesizer[J]. *Chemistry-Asian Journal*, 2006, 1(3): 370-383.
- [4] Karliga B, Schilling J K, Kingston D G, et al. Synthesis and biological evaluation of N-(arylsulfanyl)carbonyl analogues of paclitaxel (taxol)[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2006, 3(4): 396-404.
- [5] Ganesh T, Norris A, Sharma S, et al. Design, synthesis, and bioactivity of simplified paclitaxel analogs based on the T-Taxol bioactive conformation[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006, 14(10): 3447-3454.
- [6] Li H, Horiguchi T, Croteau R, et al. Studies on taxol biosynthesis; preparation of taxadiene-diol-and triol-derivatives by deoxygenation of taxusin[J]. *Tetrahedron*, 2008, 64(27): 6561-6567.
- [7] Jin Q W, Williams D C, Hezari M, et al. Stereochemistry of the macrocyclization and elimination steps in taxadiene biosynthesis through deuterium labeling[J]. *Journal of Organic Chemistry*, 2005, 70(12): 4667-4675.
- [8] Hampel D, Mau C J D, Croteau R B. Taxol biosynthesis; identification and characterization of two acetyl CoA:taxoid-O-acetyl transferases that divert pathway flux away from Taxol production[J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2009, 487(2): 91-97.
- [9] Horiguchi T, Rithner C D, Croteau R, et al. Studies on Taxol biosynthesis. Preparation and tritium labeling of biosynthetic intermediates by deoxygenation of a taxadiene tetra-acetate obtained from Japanese yew[J]. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals*, 2003, 51(9): 325-328.
- [10] Guo B H, Kai G Y, Gong Y F, et al. Molecular cloning and heterologous expression of a 10-deacetylbaaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus x media*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2007, 34(2): 89-95.
- [11] Guerrabubb J, Croteau R, Williams R M. The early stages of taxol biosynthesis; an interim report on the synthesis and identification of early pathway metabolites[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(6): 683-696.
- [12] Kong J Q, Wang W, Zhu P, et al. *Acta Pharmaceutica Sinica*[J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2007, 42(4): 358-365.
- [13] Hezari M, Lewis N G, Croteau R. Purification and characterization of taxa-4(5),11(12)-diene synthase from Pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, 322(2): 437-444.
- [14] Walker K, Ketchum R E, Hezari M, et al. Partial purification and characterization of acetyl coenzyme A: taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol O-acetyl transferase that catalyzes the first acylation step of taxol biosynthesis[J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1999, 364(2): 273-279.
- [15] Dejong J H M, Liu Y L, Bollon A P, et al. Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2006, 93(2): 212-224.
- [16] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [17] Ohto C, Muramatsu M, Obata S, et al. Production of geranylgeraniol on overexpression of a prenyl diphosphate synthase fusion gene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(4): 1327-1334.
- [18] Akbari V, Moghim S, Mofid M R. Comparison of epothilone and taxol binding in yeast tubulin using molecular modeling[J]. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2011, 3(4): 167-175.
- [19] Dahm P, Jennewein S. Introduction of the early pathway to taxol biosynthesis in yeast by means of biosynthetic gene cluster construction using SOE-PCR and homologous recombination[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 643: 145-163.

- [20] Engels B, Dahm P, Jennewein S. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production[J]. *Metabolic engineering*, 2008, 10(4): 201-206.
- [21] Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E J, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. *Science*, 2010, 330(6000): 70-74.
- [22] Weaver B A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2014, 25(18): 2677-2681.
- [23] Lin Y H, Chen B Y, Lai W T, et al. The Akt inhibitor MK-2206 enhances the cytotoxicity of paclitaxel (Taxol) and cisplatin in ovarian cancer cells[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2015, 388(1): 19-31.
- [24] Li W, Liu J, Jackson K, et al. Sensitizing the therapeutic efficacy of taxol with shikonin in human breast cancer cells[J]. *Plos One*, 2014, 9(4): 94079.
- [25] Kim Y W, Kim E Y, Jeon D, et al. Differential microRNA expression signatures and cell type-specific association with Taxol resistance in ovarian cancer cells[J]. *Drug Design Development & Therapy*, 2014, 8(1): 293-314.
- [26] Kim J H, Yoon E K, Chung H J, et al. p53 acetylation enhances Taxol-induced apoptosis in human cancer cells.[J]. *Apoptosis*, 2013, 18(1): 110-120.
- [27] Ajikumar P K, Tyo K, Carlsen S, et al. Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2008, 5(2): 167-190.
- [28] Liu T, Khosla C. A balancing act for Taxol precursor pathways in *E. coli*[J]. *Science*, 2010, 330(6000): 44-45.
- [29] Loncaric C, Merriweather E, Walker K D. Profiling a Taxol pathway 10 β -acetyltransferase: assessment of the specificity and the production of baccatin III by in vivo acetylation in *E. coli*[J]. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(3): 309-317.
- [30] Westfall P J, Pitera D J, Lenihan J R, et al. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinin acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(3): 111-118.

(编辑 陈移峰)