

紫杉醇合成代谢途径中紫杉烯合成酶 cDNA 的克隆

胡国武 温廷益* 元英进**

(天津大学化工学院天然产物研究所 天津 300072)

摘 要 紫杉烯合成酶(Taxadiene synthase)被认为在紫杉醇合成代谢途径中起着限速酶的作用。为进一步研究紫杉烯合成酶的作用机理和紫杉醇生物合成代谢调控机制,采用 RT-PCR 技术从东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)愈伤组织中获得了紫杉烯合成酶基因片段,将该片段克隆在载体 pGEM-T Easy Vector 上,并转化到大肠杆菌 JM 109 中,经 EcoRI 酶切检测,Southern blotting 及部分 cDNA 序列分析证实该片段确为紫杉烯合成酶基因,与国外报道的从太平洋红豆杉(*Taxus brevifolia*)幼茎中得到的紫杉烯合成酶基因序列具有很高的同源性。

关键词 紫杉醇,紫杉烯合成酶,cDNA 克隆

中图分类号 Q781 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0158-03

近年来研究表明,紫杉醇生物合成将成为解决抗癌新药紫杉醇药源问题可行方法之一^[1],对紫杉醇生物合成途径及其催化酶类,华盛顿大学 Croteau 教授领导的实验室进行了卓有成效的工作,他们不仅论证了从牻牛儿苗基焦磷酸(Geranylgeranyl diphosphate)环化成紫杉-4(5),11(12)-二烯炔(taxa-4(5),11(12)-diene)这个紫杉醇主体骨架的形成过程,并从 *Taxus brevifolia* 幼茎中分离纯化了催化这步反应的紫杉烯合成酶^[2],同时获得了该合成酶的 cDNA 克隆^[3]。本研究是在前人工作的基础上,以东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)愈伤组织为材料,采用 RT-PCR 技术快捷地获得紫杉烯合成酶基因片段,并转化到大肠杆菌 JM109。这项研究为对紫杉醇合成代谢相关的一系列催化酶的基因表达进行有效的调控打下了基础。

1 实验材料与方 法

1.1 材 料

所用的东北红豆杉 TCL-91[#]系本实验室从东北红豆杉幼茎诱导而来。pGEM-T Easy Vector 及 *E. coli* JM109 购自 Promega 公司,pCBMZ 为本实验室构建的紫杉烯合成酶基因 cDNA 克隆。各种限制性酶及试剂购自 Promega 公司,Sigma 公司,Serva 公司,Merck 公司,New England Nuclear 公司,福瑞

生物技术公司或华美生物工程公司。RT-PCR 引物由中科院微生物研究所合成。

1.2 方 法

1.2.1 东北红豆杉细胞总 RNA 的提取及鉴定: 参照 Promega 公司 RNAgents(Total RNA Isolation System 操作手册[4]中的 Modified RNAgents) System Protocol 说明从东北红豆杉愈伤组织中提取总 RNA,并用 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 比值及变性琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的质量。

1.2.2 反转录与聚合酶链式反应(RT-PCR): 根据 GenBank 中发表的紫杉烯合成酶 cDNA 序列合成 primer 1 (5'-ttc ccc tgc ctc tgg aga aat g-3')及 primer 2(5'-ata agt caa ttt atc atg aaa aaa gag g-3')参照 Promega Access RT-PCR System 操作手册,首先进行 cDNA 合成,反应条件为样品加入前 94℃ 水浴 2min,加入反应体系后于 48℃ 保温 45min。通过聚合酶链式反应进行 DNA 扩增,反应参数为:1~4 循环:94℃ 变性 30sec,45℃ 退火 60s,63℃ 延伸 4min,5~40 循环:94℃ 变性 30s,56℃ 退火 60s,63℃ 延伸 4min,最后在 68℃ 继续延伸 8min。

1.2.3 外源基因与载体的连接反应: 用低熔点凝胶对 RT-PCR 产物进行纯化,载体是 Promega 公司生产的 pGEM-T Easy Vector,连接反应条件参见 Promega pGEM-T Easy Vector 操作手册,并设立正

收稿日期:1999-03-15,修回日期:1999-12-21。

基金项目:国家教委“跨世纪优秀人才”基金,中国博士后科学基金和天津市 21 世纪青年科学基金资助。

* 天津市中医学院第一附属医院。

** 通讯联系人。

对照和背景对照组。

1.2.4 转化实验:方法及操作步骤参照文献[5]。

1.2.5 重组质粒的筛选、提取及酶切检测:分别挑选实验组的白色单菌落,对照组的白色单菌落和背景组的蓝色单菌落,接种于 LB/Amp 液体培养基,剧烈振荡,37℃ 培养 14h。质粒的提取方法参照文献[5]所述碱裂解法小量制备质粒 DNA,用 *EcoRI* 进行酶切鉴定。

1.2.6 转化质粒的 Southern blotting:将转化实验中对对照组、背景组和实验组质粒经 *EcoRI* 酶切后的产物,与未经酶切的相应质粒一起电泳,毛细管法转膜,杂交探针制备,杂交及洗膜条件均参照文献[5]。

1.2.7 DNA 序列分析:以 pCBMZ 为模板,以 primer 1 5'-ttc ccc tgc tct tgg aga aat g-3'为测序引物,对该克隆化的 cDNA 5'端进行部分序列测定。

2 结果与讨论

2.1 反转录偶联聚合酶链式反应(RT-PCR)

提取得到的 RNA 样品在加入反应体系前与引物混合在 94℃ 保温 2min,以破坏 mRNA 的二级结构,然后再加入反应体系。以反转录的紫杉烯合成酶基因 cDNA 为模板,在 3.75mmol/L 镁离子浓度下进行 PCR 扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见 2.7kb 左右处出现一条特异条带与预计的片段大小基本吻合,PCR 扩增产物纯度较高,无明显非特异条带,见图 1。

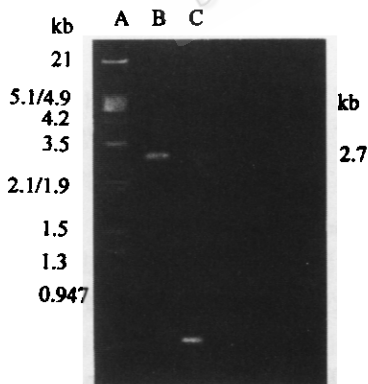


图 1 RT-PCR 扩增产物电泳分析

Fig.1 Analysis of RT-PCR product by agarose gel electrophesis

- A. λ DNA/*EcoRI* *HindIII* markers
B. RT-PCR product of Taxadiene synthase gene
C. RT-PCR product of positive control from promega

否满意,设置一个正对照 DNA 连接,插入片段为 pGEM-T Easy Vector System 中提供的来自 Promega Access RT-PCR 正对照模板扩增产物 542bp DNA 片段。插入片段与载体的摩尔比为 1:1,连接条件与实验组相同,另设置一个背景组,即在连接反应中仅有 T-载体而无插入片段,以检测转化背景^[5]。利用 JM109 High Efficiency Competent Cell 进行转化,其中蓝色菌落约占 20% 左右。背景组经 SOC 10 倍稀释后铺 LB/Amp 板,出现 2 个单一的蓝色菌落,证实连接反应条件合适,连接成功,且所用 JM109 High Efficiency Competent Cell 的转化效率达到 10^8 cfu/ μ g 质粒 DNA。

2.3 转化子的筛选和合成酶基因片段酶切鉴定

分别挑选实验组的白色单菌落、对照组的白色单菌落和背景组的蓝色单菌落, LB/Amp 培养过夜,碱裂解法提取质粒,并用 *EcoRI* 酶切,实验组质粒经酶切后应放出 2.7kb 左右的 DNA 条带,电泳结果与预想吻合如图 2。正对照组和背景组质粒经酶切后产生的片段大小符合实验预想,证实连接和转化实验的成功。

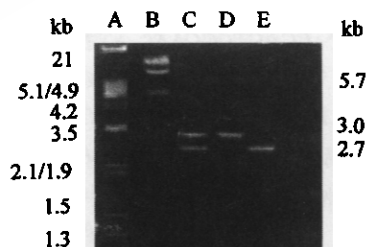


图 2 连接转化质粒的 *EcoRI* 酶切电泳分析

Fig.2 Analysis of pCBMZ digested with *EcoRI* by agarose gel electrophesis

- A. λ DNA/*EcoRI* *HindIII* markers
B. cCBMZ in white clone of experiment group
C. pCBMZ digested with *EcoRI*
D. pGEM-T Vector digested with *EcoRI*
E. RT-PCR product of Taxadiene synthase gene

2.4 转化子的 Southern blotting

为证实插入片段确为紫杉醇合成酶基因的片段,合成位于紫杉烯合成酶基因 2281 处的一段 25bp 长的核苷酸序列作为探针,其序列为 5'-cga cta aca aac gac acc aaa aca t-3',并用多核苷酸激酶将 α -³²P dATP 标记探针的末端,将转化子的酶切电泳凝胶转膜后,进行 Southern blotting 实验,结果证实插

2.2 RT-PCR 产物连接及转化

为判定所用连接条件是否合适以及转化效率是

入片段可与探针杂交。如图 3 所示,说明克隆为紫杉烯合成酶基因。

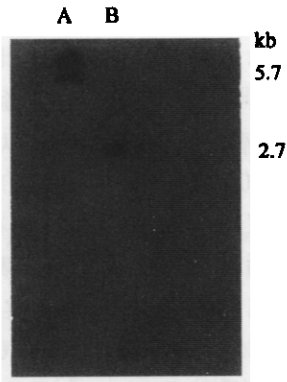


图 3 重组质粒的 Southern blotting 结果

Fig.3 The result of Southern blotting of recombinant

A. pCBMZ in white clone of experiment group
B. pCBH in white clone of experiment group
digested with *Eco*RI

2.5 紫杉烯合成酶 cDNA 序列分析结果

为进一步确定所克隆的序列,测定了紫杉烯合成酶 cDNA 5'端的部分序列,其长度为 660bp,在所测序列中发现 13 个碱基变异,与 GenBank 报道的部分序列符合率为 98.03%。

应用 RT-PCR 技术,可以无须建立 cDNA 文库而方便快捷地获得目的基因的 cDNA 克隆,进而可将合成酶基因在原核生物中表达以获得大量的廉价催化剂。使紫杉醇生产真正摆脱对红豆杉属植物或植物细胞培养^[6]的依赖。

近年来,一些植物抗病基因相继被克隆,抗病基因的调控成为当前极为活跃的研究领域^[7]。本研究应用 RT-PCR、DNA 体外重组和转化等技术成功地得到了紫杉烯合成酶基因片段克隆,不仅为探索利用分子生物学的手段研究紫杉醇合成代谢调控提供了一个可行的工作路线,而且为今后植物抗病基因的分子生物学研究打下了一定的基础。

所测克隆的序列结果如下:TTCCCTGCC TCTCTGGAGA AATGGCTCAG CTCTCATTA ATGCAGCGCT
GAAGATGAAC GCATTGGGGA ACAAGGCAAT CCACGATCCA ACGAATTGTA GAGCCAAATC TGAGCGCCAA
ATGATGTGTG GTTTGCTCCA GATCAGGGCG AACCAGAGTA AAATGTCGAG AGGAAGTGGT GGTCTGGTC
CTGTCGTAAT GATGAGCAGC AGCACGGGCA CTAGCAAGGT GGTTCGAG ACTTCCAGTA CCATTGTGGA
TGATATCCCT CGACTCGCAA ATTATTAGGA TGGCCAGGCG TGGCACCACA ATGTTATACA AACTCTGGAG
ACACCGTTTC GTCAGAGTTC TACTTACCAA GAACGGGCAG ATGAGCTGGT TGTGAAAATT AAAGATATGT
TCAATGCGCT AGGAGACGGA GATATCAGTC CGTCTGCATA CGACACTGCG TGGGTGGCGA GGCTGGCGAC
CGGTCACTCT GATGGATCTG AGAAGCCACG GTTTCCTCAG GCCCTCAACT GGGTTTTCAA CAACCAGCTC
CAGGATGGAT CGTGGGGTAT CGAATCGCAC TTTAGTTTAT GCGATCGATT GCTTAACACG ACCAATTCTG
TTATCGCCCT CTCGGTTTGG AAAACAGGGC ACAGCCAAGT ACAACAAGGT

参 考 文 献

- [1] Yuan Y J, Hu G W, Wang C G *et al.* *Journal of Rare Earths*. 1998, 16(4):300~306
- [2] Lin X, Hezari M, Koepf A E *et al.* *Biol chem*, 1996, 35:2968
- [3] Mark R W, Croteau R. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(16):9201
- [4] Access RT-PCR System Technical Bulletin, Promega, 1997, No. 220
- [5] Sambrook J, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 2nd edition. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989
- [6] 吴兆亮, 元英进, 刘家新等. *植物学报*, 1999, 41(10):1108~1113
- [7] Keen N T, *Plant Mol Bio*, 1992, 19:109

Cloning of Taxadiene Synthase cDNA from the Cell Line of *Taxus cuspidata*

HU Guo-Wu MA Zheng WEN Ting-Yi YUAN Ying-Jin
(Nature Products Institute of Biochemistry, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract Taxadiene synthase plays an important role in taxol biosynthesis. RT-PCR was used for cloning taxadiene synthase cDNA fragment from the cells of *T. cuspidata*. The cDNA was cloned into vector pGEM and transformed to *E. coli* J M109. The cloned cDNA named pCBMZ was further confirmed by Southern blotting assay and was sequenced. The result showed that taxadiene synthase cDNA of *Taxus cuspidata* was highly homologous with that of *Taxus brevifolia*.

Key words Taxol, taxadiene synthase, cDNA cloning