



穗花杉中不存在紫杉醇的化学及分子生物学证据

王 帅¹,邵芬娟¹,李 论²,芦 强¹,邱德有^{1*}

(1. 中国林业科学研究院林业研究所,北京 100091;2. 广西桂林小庐山生态农业发展有限公司,广西桂林 541205)

摘要:穗花杉(*Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilger)是红豆杉科穗花杉属的一个种。由于穗花杉与红豆杉属植物具有较近的亲缘关系,有研究者认为穗花杉也可以合成紫杉醇,并利用HPLC法测到其含有紫杉醇。但这仅仅是依靠HPLC中出峰时间来判断,并没有质谱结果。该研究利用LC-MS对穗花杉茎叶的化学提取物分析结果显示,穗花杉的茎叶中均未发现紫杉醇。为了进一步证明穗花杉不能合成紫杉醇,该研究利用欧洲红豆杉(*Taxus baccata* L.)紫杉醇生物合成关键基因-紫杉二烯合成酶基因(*Taxadiene synthase gene, TbTS*)的序列TBLASTN比对穗花杉本地转录组,从中找出并克隆得到与*TbTS*同源性最高的*AarTSL1*基因;利用原核表达分析*AarTSL1*基因的编码蛋白,结果发现该基因不具有紫杉二烯合成酶编码基因的功能。该研究从化学和生物学两个方面均证明穗花杉无法合成紫杉醇,为以后通过植物学和化学分类学等研究穗花杉的分类学地位提供了新的有用信息。

关键词:穗花杉;紫杉醇;紫杉二烯合成酶;LC-MS;原核表达

中图分类号:Q785; Q789 文献标志码:

Chemical and Molecular Biological Evidence Reveals That There Is No Taxol in *Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilger

WANG Shuai¹, SHAO Fenjuan¹, LI Lun², LU Qiang¹, QIU Deyou^{1*}

(1. The Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091 China;2. Guangxi Guilin Xiaolushan Ecological Agriculture Co. Lit, Guilin, Guangxi 541205, China;)

Abstract: *Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilger is one member of *Amentotaxus* in Taxaceae. Due to the close genetic relationship between *A. argotaenia* and *Taxus* sp., some researchers thought that taxol could be synthesized in *A. argotaenia* and testified this hypothesis using HPLC method. This conclusion was just reached based on the retention time of the peak in the extract of *A. argotaenia* corresponding to that of the taxol standard, but not from any mass spectra data. In this study, we analyzed the extraction of the stems and leaves of *A. argotaenia* with LC-MS, and found that there was no taxol in the extraction. In order to prove our hypothesis, *AarTSL1* gene was isolated and cloned by using the taxadiene synthase of *Taxus baccata* to TBLASTN the transcriptome of *A. argotaenia*. Functional analysis of *AarTSL1* with prokaryotic expression showed that the *AarTSL1* protein cannot catalyze GGPP (geranylgeranyl pyrophosphate) to taxadiene, key intermedia in taxol biosynthesis pathway. Taking together, our chemical and molecular biology evidence proved that *A. argotaenia* cannot product taxol. Our results will be helpful to the research work on the taxonomic study of *A. argotaenia*.

Key words: *Amentotaxus argotaenia*; taxol; taxadiene synthase; LC-MS; prokaryotic expression

收稿日期:2016-03-07;修改稿收到日期:2016-04-14

基金项目:中国林业科学研究院林业研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(RIF2014-01)

作者简介:王 帅(1988—),男,在读博士研究生,主要从事次生代谢途径相关基因研究。E-mail: hotboyshuai@126.com

*通信作者:邱德有,男,博士生导师,研究员,主要从事次生代谢研究。E-mail:qiudy@caf.ac.cn

紫杉醇是一种重要的具有抗癌活性的萜类化合物。紫杉醇最早是在紫杉树皮提取物中发现的^[1]。1994年,罗士德等利用高效液相色谱法分析发现除红豆杉属植物具有紫杉醇及其同系物之外,同时发现香榧茎叶中有微量的紫杉醇,大理罗汉松茎叶有巴卡亭Ⅲ^[2]。1996年,周荣汉等^[3]在白豆杉中发现了紫杉醇及短叶醇。根据植物化学系统学概念,在红豆杉科中的穗花杉属植物中也可能具有紫杉醇。2014年,牟利辉等^[4]利用紫外扫描和HPLC相结合的方法测定了穗花杉中紫杉醇的含量。

穗花杉(*Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilger),属于穗花杉属,而穗花杉属是红豆杉科中的一个属,也是六大古老孑遗家系之一^[5,6]。穗花杉是常绿小乔木或灌木,有“冰川元老”的美称,主要分布于中国南方地区,以福建、江西、广东等省为主,也是中国三级重点保护的珍稀濒危植物。红豆杉科的分类学问题一直存有争议,何关福等^[7]从化学分类学角度,对红豆杉科各属有关植物成分进行了研究。穗花杉中是否含有紫杉醇,对其分类学地位也有一定的参考意义。

紫杉二烯合酶(Taxadiene synthase, TS)是紫杉醇合成代谢过程中最重要的一个酶,它存在于红豆杉细胞内的质体中^[8],催化GGPP环化形成紫杉二烯,是紫杉醇生物合成途径中的一个限速酶^[9]。只要穗花杉中存在紫杉二烯合酶(TS)基因,那么就为证明穗花杉可以合成紫杉醇提供了重要的证据。

尽管牟利辉在穗花杉中检测到有微量的紫杉醇存在,但是他只是根据HPLC观察到在与紫杉醇标准品相同(近)时间处有峰出现,就确定这个化合物就是紫杉醇,并没有利用质谱技术进行进一步分析。仅仅根据HPLC结果不足以证明穗花杉中是否有紫杉醇。在化学方面,本研究利用LC-MS技术对穗花杉枝叶化学抽提物进行分析。在基因方面,我们利用体外表达技术对穗花杉中紫杉醇合成的关键限速酶紫杉二烯合成酶(TS)基因的同源基因进行功能验证。通过这两个方面的研究对穗花杉是否能合成紫杉醇提供证据,同时也对穗花杉的分类地位研究提供有用的信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

穗花杉材料由桂林小庐山生态农业发展有限公司提供,5年生盆栽实生苗培养在中国林业科学研究院温室中,于8月底取当年生带叶的枝条,采集后

立即放入液氮中,之后存于-80℃冰箱中待用。用于LC-MS分析的10年生穗花杉的茎叶也是由桂林小庐山生态农业发展有限公司在其本地收集并提供,将其烘干,磨成粉,干燥保存待用。

1.2 紫杉醇的抽提

紫杉醇提取方法是根据Bala的方法修改后的^[10]。称取2g用于LC-MS分析的穗花杉的茎叶粉末,用30mL甲醇抽提,超声30min后过夜抽提。过滤抽提甲醇,沉淀继续用30mL甲醇超声30min抽提,收取甲醇抽提液。将2次抽提的甲醇溶液旋蒸浓缩。旋蒸浓缩得到的膏状物用10%的甲醇水溶液溶解。用10mL正己烷萃取2次,去掉正己烷层。水层再用10mL氯仿萃取抽提2次,收集氯仿层。氯仿层旋蒸浓缩,得到膏状物。用2mL甲醇溶解膏状物,过Oasis HLB柱子,得到的甲醇溶液浓缩定容到1mL,待LC-MS分析。

1.3 GC-MS 和 LC-MS 分析

用Thermo Finnigantrace DSQ气相色谱-质谱联用仪完成GC-MS分析。检测所用的色谱柱为DP-5MS(30m×250μm ID×0.25μm),验证所用的色谱柱为HP-5MS(30m×250μm ID×0.25μm)。进样条件相同如下:进样方式为不分流,每次进样1μL。载气为氦气,流速为1mL/min。进样口温度为250℃。分离程序为:80℃,2min;10℃/min的速度升温到210℃;以3℃/min的速度升温至240℃;240℃保持3min。离子源温度为230℃,质谱四级杆检测器温度为150℃。扫描模式为全扫描,溶剂延迟设定为3min。

用Thermo Scientific LTQ FTLC-MS完成LC-MS分析。检测用的色谱柱是SunFire TM(4.6mm ID×150mm,颗粒大小5μm,C₁₈),柱温是40℃,流动相是5%的乙腈水溶液以1mL/min的流速流动。在50min时,流动相由5%的乙腈水溶液变为100%的乙腈,并持续到55min。然后在10s内,流动相又变为5%的乙腈水溶液,并且持续到75min。注入的样品体积是10μL,紫外检测器的检测波长是21nm。质谱参数为默认参数。

所有LC-MS和GC-MS的数据都是利用仪器配套的Xcalibur 2.0软件进行采集和分析。

1.4 穗花杉TSL基因的预测、克隆及原核表达载体构建

利用欧洲红豆杉(*Taxus baccata* L.)紫杉醇生物合成关键酶—紫杉二烯合成酶基因(Taxadiene synthase gene, *TbTS*)的氨基酸序列对本地穗花杉转录

组(未发表)进行 TBLASTN 分析,预测到的 unigene 是 C40284,将其命名为 *AarTSL1* 基因^[11]。据此设计 RACE 引物:*AarTSL1*-5'-NEST: CAGGCACCCCTG-CAACCCAGGCA 和 *AarTSL1*-5': CGAACCGTCGC-CCAACCTGGTTTGT。利用 RACE 技术获得该基因全长 cDNA。原核表达载体 pET30a(+)的酶切位点选用 *Nde* I 和 *Xho* I 两个酶切位点,根据中美泰和公司的 Seamless Assemble Cloning Kit 的说明书设计出引物的重组臂(引物中下划线部分)。利用 *AarTSL1*-F: TTTAAGAAGGAGATACAT ATGGCCAGCGC TGCTCGGCT 和 *AarTSL1*-R: CAGTGGTGTTGGTG GTGGTGCTCGAGCTACACTGCAACAGGCTCGAAA AGGCA 将 *AarTSL1* 基因的 ORF 克隆出来,并通过同源重组将 *AarTSL1* 基因重组到 pET30a(+)载体中,构建 pET30a/*AarTSL1* 原核表达载体。

1.5 *AarTSL1* 的原核表达及酶活实验

大肠杆菌中虽然有 MEP 途径,但是 IPP 和 DMPP 的合成很少,Morrone 等^[12]将 MEP 途径中的两个限速酶基因 *DXS* 和 *DXR*,以及 *IDI* 基因剪切信号肽后,重组到 pCDFDuet 载体中,得到的 pIRS 重组质粒转入大肠杆菌能够增加 IPP 和 DMPP 的产量。他们同时将 GGPP 合成酶基因重组到 pACYCDuet 质粒中得到 pGG 重组质粒,可以用来在大肠杆菌中合成 GGPP。其中,pGG、pIRS 质粒是由四川农业大学王强老师提供。

将质粒 pGG、pIRS^[13] 和重组质粒 pET30a/*AarTSL1* 三个质粒共转化原核表达菌株大肠杆菌 BL21 感受态细胞,获得阳性菌株。挑取阳性克隆菌落,接种到 3 mL 含氯霉素、壮观霉素和卡纳霉素的 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 振荡过夜培养。取 500 μL 活化的菌液加入到装有 50 mL TB 培养基的玻璃三角瓶中,在 37 °C、200 r/min 培养约 3 h 到 OD₅₅₀ 约 0.6~0.8。加入 550 μL 50% 的无菌甘油和 5 mL 的 10×磷酸缓冲液,在 18 °C、200 r/min 培养 1 h 使菌液冷却。加 IPTG 至终浓度为 0.2 mol/L,将三角瓶转移到 18 °C 培养箱中设置转速为 200 r/min 继续培养 72 h。50 mL 培养液用等体积的正己烷抽提 8 h,超声 10 min 后,4 °C 下过夜。将正己烷层分离出来,并浓缩定容到 1 mL 待 GC-MS 检测。GC-MS 检测方法同上。

2 结果与分析

2.1 穗花杉中茎叶提取物的 LC-MS 分析

为了验证穗花杉是否能够合成紫杉醇,我们利用 LC-MS 技术分析穗花杉茎叶的化学提取物。LC-MS 结果表明紫杉醇标准品出峰时间是 32.54 min,而穗花杉茎叶提取物在 32.54 min 处没有明显的峰,而在 32.80 min 处有一个小峰(图 1)。通过对 32.80 min 处峰的质谱图分析发现该峰所对应的化合物并不是紫杉醇(图 2)。

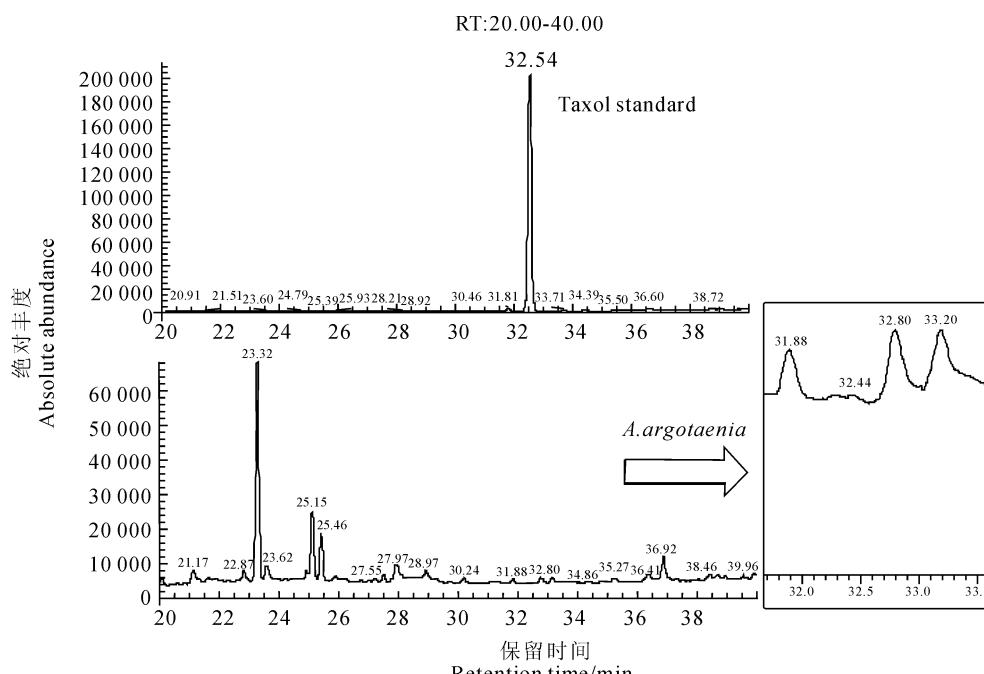
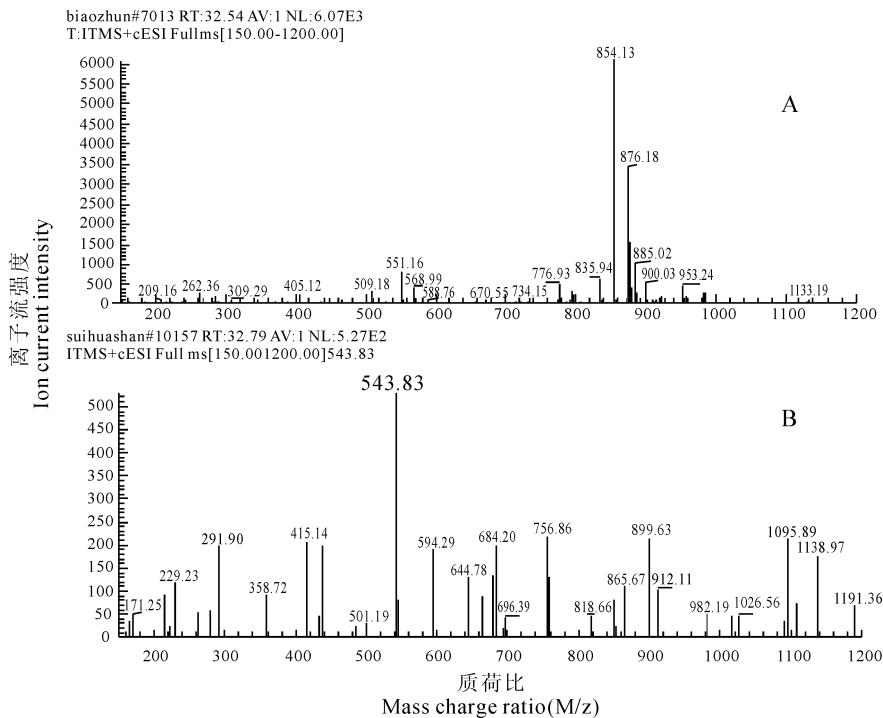


图 1 穗花杉抽提物的 TIC 分析

Fig. 1 The TIC diagram of the extraction of *A. argotaenia*



A. 紫杉醇标准品；B. 样品 32.80min 峰

图 2 紫杉醇标准品峰及样品对应峰质谱的分析

A. The taxol standard at 32.54 min; B. The peak at 32.80 min of the sample

Fig. 2 Mass spectra analysis about the peak of the taxol standard and corresponding peak of sample



M. Marker; A. 特异引物 AarTSL1-5'-NEST;

B. 特异引物 AarTSL1-5'

图 3 AarTSL1 基因的 5'RACE

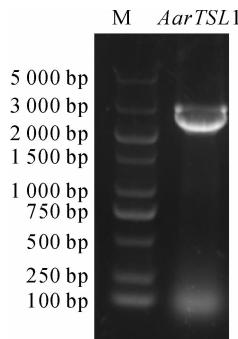
M. Marker; A. The special primer AarTSL1-5'-NEST;

B. The special primer AarTSL1-5'

Fig. 3 The 5' RACE of AarTSL1 gene

2.2 穗花杉中 TSL 基因的预测及克隆

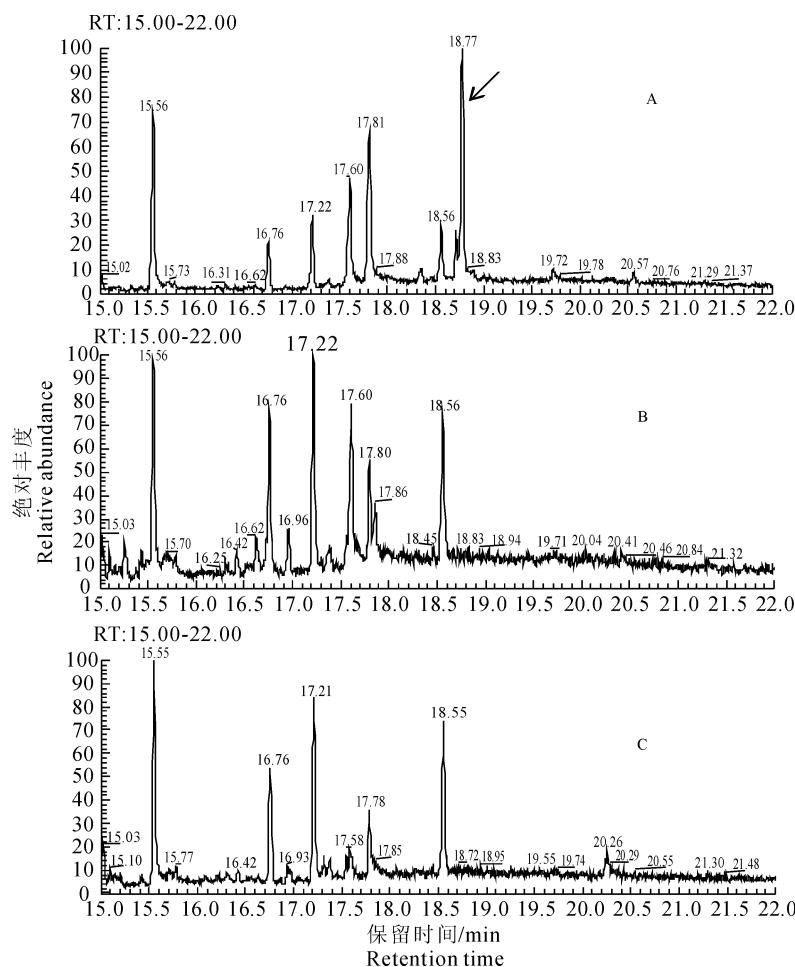
利用欧洲红豆杉 *TbTS* 基因完整的氨基酸序列对本地穗花杉转录组数据进行 TBLASTN 分析, 预测到 13 个 unigene。其中, C40284 的 e-value 值最小, Score 值最高, 所以我们选择它为验证基因。经过对 C40284 的结构域分析, 发现其具有与 *TbTS* 基因相同的结构域, 故将其命名为 *AarTSL1* 基因。穗花杉转录组组装得到的 C40284 没有完整的开放阅读框(ORF), 在 5' 端缺少约 300bp。我们利用 5'-RACE 技术及巢式 PCR 克隆得到 C40284 的 5' 端

M. Marker;
图 4 *AarTSL1* 基因的克隆
M. Marker;Fig. 4 The clone of *AarTSL1* gene

片段分别约为 460 bp 和 730 bp(图 3)。载体构建扩增的 *AarTSL1* 基因的 ORF 为 2 565 bp(图 4)。

2.3 穗花杉中 TSL 基因的功能验证

将 pGG、pIRS 和 pET30a/AarTSL1 三个质粒共转入大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株, 并进行发酵, 使用正己烷萃取发酵产物, 使用 GC-MS 进行产物检测分析。以 pGG、pIRS 和 pET30a 为阴性对照; 以 pGG、pIRS 和 pET30a/TchTS 为阳性对照。阳性对照的离子流图中紫杉二烯的出峰时间为 18.77 min。然而, 样品的离子流图中 18.77 min 处则没有出峰(图 5)。这说明, *AarTSL1* 蛋白并不具



A. 南方红豆杉紫杉二烯合成酶基因 *TchTS*(阳性对照);B. 穗花杉 *AarTSL1*(样品);C. pET30a(+)载体(阴性对照)

图 5 *AarTSL1* 原核表达产物的 TIC 分析

A. *TchTS* of *Taxus chinensis* (positive control); B. *AarTSL1* of *A. argotaenia* (sample); C. pET30a(+) vector (negative control).

Fig. 5 TIC diagram of the prokaryotic expression of *AarTSL1*

有紫杉二烯合成酶的功能。

3 讨 论

穗花杉是红豆杉科穗花杉属的一个种。因为它从被发现以来在分类学地位上存在较大争论,所以穗花杉具有很高的学术研究价值。中国植物学者在过去 70 多年里先后从植物形态学、胚胎学、解剖学、孢粉学、植物化学等方面对穗花杉的系统分类地位进行了广泛的研究^[14]。其中,1985 年马忠武发现红豆杉科中的红豆杉属和榧树属都含有双黄酮类成分,而穗花杉属未检测到此类成分^[15]。因此,他对穗花杉属是否归于红豆杉科提出怀疑。牟利辉 2014 年在穗花杉中发现紫杉醇。如果这个研究结果是正确的,将对穗花杉属的分类地位提供很有力的证据。但是他只根据 HPLC 出峰时间来判断是否含有紫杉醇,这样不足以证明这个结论。本研究

利用 HPLC 对穗花杉的茎叶化学提取物进行分析,发现在紫杉醇的标准品出峰时间 32.54 min 处并没有明显的峰出现,而在 32.80 min 处有一个小峰。通过对 32.80 min 处峰的质谱图的分析发现其并不是紫杉醇。因此,从化学分析方面来说,穗花杉并不能合成紫杉醇。

为了进一步证明穗花杉无法合成紫杉醇,我们从基因表达和酶的层面对其进一步分析。紫杉二烯合成酶是紫杉醇生物合成途径中最重要的一个限速酶。我们利用欧洲红豆杉中的紫杉二烯合成酶的氨基酸序列 BLAST 本地穗花杉转录组,得到同源性最高的 *AarTSL1* 基因,通过原核表达验证其功能,发现所表达的酶并不具备合成紫杉二烯的功能,这进一步从分子水平说明了穗花杉并不能合成紫杉醇。本研究的结果也为今后穗花杉分类地位的深入研究提供了一些有用的信息。

参考文献:

- [1] WANI M C, TAYLOR H L, WALL M E, et al. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel anti-leukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1971, **93**(9): 2325-2327.
- [2] 罗士德, 宁冰梅. 红豆杉及其近缘植物中紫杉醇与同系物的高效液相色谱分析[J]. 植物资源与环境学报, 1994, **3**(2): 31-33.
- LUO S D, NING B M. HPLC analysis of taxol and related compounds from *Taxus* and its related plants[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 1994, **3**(2): 31-33.
- [3] 周荣汉, 朱丹妮. 紫杉醇及短叶醇在白豆杉中的存在[J]. 中国药科大学学报, 1994, **25**(5): 259-261.
- ZHOU R H, ZHU D N. The occurrence of taxol and brevifoliol in *Pseudotaxus chienii* Cheng[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 1994, **25**(5): 259-261.
- [4] 牟利辉, 成益韶, 郑钦生. 穗花杉树皮中紫杉醇的提取与含量测定[J]. 广东化工, 2014, **41**(4): 97-97.
- MOU L H, CHENG Y S, ZHENG Q S. Extraction and determination of paclitaxel content in the cortices of *Amentotaxus angotaenia* (Hance) Pilger[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2014, **41**(4): 97-97.
- [5] GADEK P A, ALPERS D L, HESLEWOOD M M, et al. Relationships within Cupressaceae sensu lato: a combined morphological and molecular approach[J]. *American Journal of Botany*, 2000, **87**(7): 1044-1057.
- [6] FARJON A. World Checklist and Bibliography of Conifers [M]. Royal Botanic Gardens, Kew, England. 2001.
- [7] 何关福, 马忠武, 印万芬, 等. 香榧树叶精油成分与化学分类[J]. 植物分类学报, 1986, **24**(6): 454-457.
- HE G F, MA Z W, YIN W F, et al. Study on essential oil composition in leaves of *Torreya grandis* cv. 'MERRILLII' and chemotaxonomy[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1986, **24**(6): 454-457.
- [8] WALKER K, CROTEAU R. Taxol biosynthetic genes[J]. *Phytochemistry*, 2001, **58**(1): 1-7.
- [9] KOEPP A E, HEZARI M, ZAJICEK J, et al. Cyclization of geranylgeranyl diphosphate to tax-4(5), 11(12)-diene is the committed step of taxol biosynthesis in pacific yew[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**(15): 8686-8690.
- [10] BALA S, UNIYAL G C, CHATTOPADHYAY S K, et al. Analysis of taxol and major taxoids in Himalayan yew, *Taxus wallichiana*[J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, **858**(2): 239-244.
- [11] KÖKSAL M, JIN Y, COATES R M, et al. Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis[J]. *Nature*, 2011, **469**(7328): 116-120.
- [12] MORRONE D, LOWRY L, DETERMAN M K, et al. Increasing diterpene yield with a modular metabolic engineering system in *E. coli*: comparison of MEV and MEP isoprenoid precursor pathway engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, **85**(6): 1893-1906.
- [13] CYR A, WILDERMAN P R, DETERMAN M, et al. A modular approach for facile biosynthesis of labdane-related diterpenes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**(21): 6684-6685.
- [14] 何飞, 刘兴良, 马钦彦, 等. 珍稀濒危植物穗花杉的研究进展[J]. 四川林业科技, 2007, **28**(6): 31-38.
- HE F, LIU X L, MA Q Y, et al. Advances in research on the endangered plant *Amentotaxus argotaenia*[J]. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology*, 2007, **28**(6): 31-38.
- [15] 马忠武, 何关福, 印万芬. 双黄酮成分在红豆杉科各属、种中的分布[J]. 植物分类学报, 1985, **23**(3): 192-195.
- MA Z W, HE G F, YIN W F. The distribution of bisflavones in Taxaceae[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1985, **23**(3): 192-195.

(编辑:潘新社)