

· 综述 ·

中药功能基因研究

魏小勇 方 花 李杰芬

摘要 植物中药功能基因研究主要是探寻中药活性成分相关功能基因及表达规律,确定药用成分合成的调控机制,获得中药药用成分关键代谢途径和其中的关键调控因子,为中药现代化奠定基础。本文从模式植物(水稻、拟南芥等)、主要技术策略(基因表达差异、基因表达序列标签、基因芯片技术和基因表达序列分析)和生物信息学方法(比较基因组学等)等三方面对国内外植物功能基因研究作了介绍。还介绍了黄酮类化合物与紫杉醇生物合成基因及植物 P450 基因研究现状。并对本研究室石斛碱功能基因研究情况作了简介。

关键词 功能基因;中药;活性成分

Studies on Functional Genes of Chinese Herbal Medicine WEI Xiao-yong, FANG Hua, LI Jie-feng *College of Basic Medicine, Guangzhou TCM University, Guangzhou (510405)*

In order to establish the foundation for modernization of Chinese herbal medicine, discovery of the functional genes related with the bioactive components of Chinese herbs and the rules of their expression was progressed for determining the regulatory mechanism, obtaining the core metabolic pathway and key regulatory factors of the medicinal components synthesis. In this article, the studies about plant's functional genes at home and abroad was introduced in three aspects: the pattern plants (rice, thaliana, etc.), the main technologic strategy (gene expression differential, sequential tag of gene expression, DNA microarray technique and gene expression sequential analysis) and bio-informative method (comparative genomics). The current status of researches involving biosynthesis genes of flavonoids compounds and taxol, and the plant P450 genes were introduced. And the study of dendrobium functional genes conducted in authors' lab was also reviewed.

Key words functional gene; Chinese herbal medicine; bioactive components

功能基因是后基因时代植物中药基因组研究的最活跃、最核心领域之一。它强调发展和应用整体(基因组水平或系统水平)实验方法分析基因组序列信息,阐明基因功能。其基本策略从过去的单一基因或蛋白质上升到系统角度研究所有基因或蛋白质^[1]。在植物中药功能基因研究中,与基因组 DNA 和 EST 研究相比,最为活跃的研究领域是与活性成分形成关系最密切的生物合成相关基因克隆研究。由于临床上对天然药物的实际需求不断增加,以及基因克隆与表达技术的进步,近年来药用植物功能基因的克隆呈现快速增长的趋势^[2]。

植物中药功能基因组研究方法

功能基因是一个崭新的研究领域,其研究方法较

多,归纳起来可分为正向遗传学(forward genetics,从一个突变体的表型开始,研究其“基因是什么”)和反向遗传学(reverse genetics,从一个突变基因的序列开始,研究引起什么样的表型改变)。主要包括 T-DNA 插入、转座子技术、基因表达分析技术、表达序列标签技术和生物芯片技术等。

1 利用突变体进行基因功能分析技术

1.1 转座子标签技术 转座子是染色体 DNA 上的一段可自我复制和位移的 DNA 序列,其转位插入作用,使被插入的目的基因发生突变失去活性,转座子的剔除又可以使目的基因恢复活性。因此,利用转座子的转位插入作用可对被插入的目的基因进行基因功能的研究,这就是转座子标签技术,目前已成为植物中药基因功能鉴定、分离的有效方法。Aarts 等^[3]人利用该技术从拟南芥中发现了一个雄性不育基因,Hi-rochika 等^[4]在水稻中利用 Tos 17 同源恢复转座子探测基因。Takken 等^[5]利用玉米的 Ac/Dc 转座子标签技术分离了大量番茄基因,包括 Cf-9 和 Cf-4 位点上的

基金项目:广东省中医药管理局资助项目(No. 402003,303005)

作者单位:广州中医药大学基础医学院(广州 510405)

通讯作者:魏小勇, Tel:020-36585474; E-mail: wxyaby@163.com

控制不同种叶霉病抗性的基因;编码细胞色素 P450 家族的 Dwarf 基因^[6];控制叶绿体发育的 DCL 基因^[7];参与代谢和发育的 FEEBLY 基因^[8]。

1.2 T-DNA 插入 随着农杆菌介导的转基因技术的不断完善,T-DNA 方法已成为快速构建插入突变库的主要方法。T-DNA 的插入通过阻断正常基因的表达可引起植物基因敲除突变。通过对 T-DNA 两侧基因序列作特异扩增等方法可分离到野生型的基因^[9]。这种方法可在预先不知基因的产物和表达的情况下分离基因。其主要优点是基因组 T-DNA 的插入稳定、不具有位点特异性,可构建饱和的 T-DNA 插入突变库^[10]。其具体研究策略为将 NPT II、GUS 等标记基因克隆到 T-DNA 区段上,利用农杆菌等载体介导的 T-DNA 转染植物组织,从转基因后代中寻找突变体、增强子和启动子,从而分离、鉴定若干基因。王景雪等利用 T-DNA 插入获得了玉米雄性不育突变体^[11]。

2 DNA 序列直接分析法

2.1 基因表达系统分析技术(SAGE) 是一种非常有效的快速分析基因技术,它是以转录子(cDNA)上特定区域 9-10bp 的寡核苷酸序列作为标签来特异性代表该转录子,然后通过连接酶将多个标签(一般为 20-60 个)随机串联并克隆到载体上,建立 SAGE 文库,通过对双标签的序列分析,获得基因转录分布^[11]。其具体操作方法是:首先将 mRNA 把转录成 cDNA;其次用锚定酶酶切,将所得 cDNA 分别与含锚定酶和标签酶酶切位点的接头 A 和接头 B 连接;然后用标签酶酶切产生的连有接头的 cDNA 片段连成双标签有进行 PCR 扩增;再用锚定酶酶切扩增产物,分离双标签并克隆;最后用 SAGE 软件分析,并与 Genbank 及 EST-database 等数据库比较,获得转录物丰度的数据信息及新的表达基因。

2.2 表达序列标签测序技术(ESTs) 是研究功能基因的最佳途径之一。EST 标签技术即高通量的 cDNA 测序技术。药用植物中含有大量 ESTs,ESTs 能提供准确的基因定位信息,当单个 EST 对应两个或更多外显子时,ESTs 标签还能提供内含子的定位信息,结合软件分析技术,利用 ESTs 在具有较大基因组的物种中发现基因和研究基因功能。ESTs 在基因定位、寻找同源基因等方面得到广泛应用^[12]。建立正常的 cDNA 文库,通过与数据库中来源不同植物和组织条件下的 ESTs 比较,揭示不同药用植物在基因序列上的多态性。Bevan 等^[13]研究表明,拟南芥基因组的 56% 基因均可有 EST 对应找出。利用 EST 和全序列

与所有来自其他植物的 EST 资料进行比较,可帮助认识、了解植物中药的功能基因组。

2.3 利用同源序列分析基因功能 序列同源比较就是利用待检基因与相应的已知基因的同源性,来预测未知基因的功能,它是得到新基因后预测其功能的第一步。将待检的新基因序列到 DNA 和蛋白质序列数据库中进行同源检索后,得到一系列与新基因同源性较高的基因或片段,这些基因和片段的已知的功能信息为新基因功能提供了向导。易图永等^[14]比较观察已发现的 20 多个植物抗病基因所编码蛋白质的基因序列,结果发现这些抗病基因大多含有特殊核苷酸结合位点,富含亮氨酸的重复序列、亮氨酸拉链结构和跨膜结构等保守结构域,根据这些保守结构域结合 PCR 引物,扩增大量抗病基因同源序列(RGA),然后,利用这些 RGA 作探针,从基因文库中获取抗病功能基因。美国基因组研究协作组已集中了他们获得的拟南芥、水稻、松叶菊、大麦、鲜叶卷柏和盐藻等植物功能基因组研究进展,并提供了一个利用 pipeonline 数据分析的连接^[15]。

3 利用生物芯片进行基因功能研究

生物芯片是指通过微加工技术和微电子技术在固体表面上构建的微型生物化学分析系统,结合软件分析,可准确、快速分析大量生物信息。目前已经用于中药功能基因研究的生物芯片主要包括为基因芯片和蛋白质芯片。

3.1 基因芯片 基因芯片是按特定的排列方式将大量基因探针/基因片段固定在硅片、玻片、塑料片上,与标记的样品进行杂交,通过检测每个探针分子的杂交信号而获取样品的序列信息。根据制备方法不同可分为:DNA 芯片、微点阵和电子芯片。

基因芯片技术主要应用于基因表达谱分析、新基因发现、基因突变、多态性分析及监测基因组整体转录表达情况。Seki 等^[16,17]利用 cDNA 芯片已对松叶菊、水稻等植物的基因表达谱进行了研究,获得了大量基因表达信息;对功能缺陷的突变体进行分析,获得了代谢和信号机制与抗性密切相关的决定因子。Schena 等^[18]将 45 个拟南芥 cDNA 和 3 个对照 cDNA 构建 cDNA 微阵列,在根和叶中检测到 26 个基因表达的差异。Philippe 等^[19]利用拟南芥 150 个 ESTs 序列的 cDNA 芯片发现了一个受虫咬诱导的新基因。Aharoni 等^[20]分离 1701 个 cDNA 片段构建芯片,研究果实不同成熟期果色与成熟度的关系,发现 401 个基因在绿、白和红色果实中表达显著差异,其中之一是草莓乙酰基转移酶基因,在草莓成熟的特殊物质的合成中起重

要作用。Lu G 等^[21]结合 cDNA 和 SSH 技术(抑制性扣除杂交技术)分离并鉴定了一个与稻瘟病亲和和非亲和性反应有关的新基因。方志俊等^[22-25]用人白细胞 cDNA 文库构建了含 2 400 个基因的 DNA 芯片,对阿藿烯处理的人早幼粒白血病细胞株 HL60 细胞基因表达的改变进行了观察,显示阿藿烯的作用与胃肠道及白血病等抗癌作用有关。

3.2 蛋白质芯片 蛋白质芯片是将多肽或从 cDNA 表达文库中提取的蛋白质点样固定在固相介质表面上制备而成。将其与多种抗原样本杂交,使芯片上的抗体捕获相应的抗原,然后再与标记的多种抗体杂交,根据杂交信号的有无、多少进行定性、定量分析,从而研究蛋白质结构与功能的关系,并提供快速而有意义的带有充足家族分类检索结果的数据库检索系统。

2000 年 11 月耶鲁大学的 Zhu 等研究小组首次报道了利用蛋白质芯片克隆功能基因。他们表达和纯化了酵母的 5 800 种蛋白质,并将这些蛋白质点样固定在载玻片上,制作了酵母蛋白质组微阵列芯片,筛选能与特定蛋白质和磷脂相互作用的蛋白质,发现了新的能与钙调蛋白和磷脂相互作用的蛋白质。这些蛋白质微阵列芯片可以用于筛选与蛋白质相互作用的药物,还可以用于检测蛋白质翻译后的修饰。他们的研究成果证实了制作和使用蛋白质组微阵列芯片进行功能分析检测的可行性,并向人们预示了蛋白质微阵列芯片在药物开发领域的广阔应用前景。

4 利用蛋白质组技术进行基因功能的研究

4.1 蛋白质组研究技术 蛋白质组是指 1 个基因、1 种生物或 1 种细胞/组织所表达的全套蛋白质。蛋白质组研究是将组织或细胞所有蛋白质进行分离并鉴定。用于蛋白质分离的技术主要有双向凝胶电泳和双向高效柱层析。用于蛋白质鉴定的技术有 Edman 降解法测 N 端序列、质谱分析技术、氨基酸组成分析和肽质谱指纹图技术。其中质谱分析技术应用最广、发展最快。

4.2 药用植物蛋白质组研究 目前随着蛋白质组研究技术的不断发展,利用蛋白质双向电泳技术对基因敲除突变体或转基因重组体与野生型个体间双向电泳蛋白图谱差异进行对比分析,从而对目的基因功能进行研究,1998 年 Damerval 分析玉米 Opaque 2 基因等位基因系之间的双向电泳蛋白图谱的差异,分离、克隆了 1 个新的转录激活因子基因。利用双向电泳凝胶技术鉴定拟南芥发育突变体,发现 1 个突变体中细胞分裂素过量表达^[26]。

植物中药功能基因克隆情况

截止 2003 年 9 月底,国内外已在 32 属 42 种药用植物中共注册功能基因序列 255 条^[27]。其中长春花(46)、甘草(28)、青蒿(28)及薄荷(17)是注册基因数量多的植物中药,红豆杉、紫草、藏红花等 12 种植物分别注册基因 4~15 条,天麻、银杏、雪莲、毛地黄、葛根等 16 属 16 种植物注册的基因数分别在 4 条以下,其他 16 属 26 种植物共注册基因 233 条。从国别而言,植物中药基因研究较多国家主要是日本、美国、德国和中国。我国注册的植物中药基因共有 27 种,主要是青蒿素合成相关基因,其次是紫杉醇合成相关基因和黄芪中多糖合成相关基因等。德国科学家克隆对象主要是包括长春花和萝芙木中的主要合成酶基因与吲哚生物碱合成有关的基因。日本科学家克隆基因的主要对象是黄连、杜仲、甘草、紫草、黄芩、人参以及莨菪烷生物碱产生植物天仙子等。美国科学家主要克隆红豆杉、薄荷与黄芪的有关功能基因,最有特色的工作当数华盛顿州立大学 R. Croteau 实验室,他们在萜类化合物特别是紫杉醇生物合成相关基因克隆工作中卓有成效,走在世界的前沿。

1 黄酮合成相关基因及植物 P450 细胞色素氧化酶基因克隆 黄酮化合物有多种药理活性,又与花色有密切关系,因此黄酮化合物的生物合成途径研究开始较早,并取得了很大进展,对黄酮化合物生物合成步骤、催化各步反应的酶及其基因都有初步研究,对包括拟南芥、金鱼草、松、桃、矮牵牛及葡萄在内的 26 种植物的黄酮合成基因的统计表明,至少已有 103 个黄酮合成相关基因被克隆,主要克隆的基因有:查耳酮合酶、催化黄酮母核羟基化的酶类及与糖苷转变有关的酶类等^[27]。

另一类研究得较多的基因是植物细胞色素 P450,这是一类具有多种催化功能含血红素蛋白的氧化酶系,植物 P450 在植物体内具有重要的功能,可以催化许多初级和次级代谢反应。由于在次级代谢及植物抗逆性(抗除草剂)中的重要作用及在生物除污方面的可能应用,这一类酶的研究特别受到关注。目前,600 多个 P450 基因被克隆,其中 100 多个基因在细菌、酵母、杆状病毒等异源表达系统中成功表达并鉴定了功能^[28,29]。除模式植物拟南芥外,长春花中的 P450 酶类研究得较多。

2 紫杉醇生物合成基因的克隆 紫杉醇生物合成途径基因的克隆是植物中药功能基因克隆最典型的实例,代表了天然产物化学后基因组时代研究和应用的趋势^[27]。美国华盛顿州立大学 R. Croteau 实验室不

仅克隆了 42 个与薄荷、冷杉中萜类化合物合成相关的酶类基因,而且还克隆表达了 11 个与抗癌药物紫杉醇生物合成相关的基因。他们应用同源引物 PCR 方法、红豆杉细胞培养结合差异显示及反向遗传(reverse genetics)的方法,从不同种的红豆杉中克隆了 11 个紫杉醇合成相关基因,包括紫杉醇母核形成基因、催化母核氧取代的 3 个羟基化酶基因和 5 个与侧链形成有关的酰基转移酶基因。这些基因均在大肠杆菌、酵母或昆虫表达系统中得到表达并鉴定了表达产物的功能。在此基础上确定了从二萜类化合物共同前体合成紫杉醇至少有 20 个步骤,对有 8 个氧取代基团的紫杉醇生物合成途径进行了阐述,用不同的底物确定了重组酶的特异性及各取代基团在生物合成途径中的顺序^[30-36]。

展 望

“中药基因组计划”是将分子生物学、生物信息学等现代生物技术与其他现代科学技术相结合研究开发中药,美国相继提出“人类基因组计划”(HGP)、“植物基因组计划”(PGP)、“微生物基因组计划”(MGP)都取得了突破性进展。我国提出和实施“中药基因组计划”是中药现代化研究与开发政策的重大战略措施,其中功能基因的研究是“基因组计划”中最重要的研究内容之一。通过功能基因组和蛋白质组的研究,建立和完善我国药用植物重要功能基因组的研究与重要功能基因发现的技术体系,体现我国中草药的深刻内涵,获得具有我国自主知识产权、功能明确和有应用前景的重要基因,在了解中药遗传信息表达和调控规律的基础上,对有效成分的关键基因进行调控,促进其表达,从而提高目标产物的含量;同时通过控制遗传信息来分析和合成中药有效成分,阐明中药或复方的作用机制,为中药现代化并走向国际市场奠定基础。并带动相关制药产业的发展,为人类健康事业发展作出贡献。

在植物中药功能基因研究中,与基因组测序和 ESTs 测序相比,药用活性成分生物合成相关基因的研究更受到重视,克隆基因的数量呈上升趋势,预示了天然产物后基因组时代的开启及一些天然产物生产方式的可能变革,人们对生物技术方法寄予的厚望可能通过基因工程与化学工程的有机结合而形成的新工艺得到实现。

我们在对铁皮石斛多年研究的基础上,着手对石斛药用相关功能基因进行研究。利用化学诱变剂 EMS (ethyl methane sulfonic acid) 定向诱发组培石斛原球茎突变,获得了稳定的石斛碱缺失的突变体,通过差异显示、反义 RNA 技术和转基因技术来克隆并鉴定石斛碱合成相关功能基因。现已完成部分工作:从

铁皮石斛突变体及正常材料中分别提取总 mRNA、以选定的 3' 端锚定引物作逆转录合成第一链 cDNA、用 5' 端随机引物和 3' 端锚定引物组成引物对在底物标记情况下进行 PCR 扩增,已建立了差减 cDNA 文库,目前正在进行测序分析。

参 考 文 献

- 1 王景雪,孙毅,徐培林,等.植物功能基因组研究进展.生物技术通报 2004;20(1):18—22.
Wang JX, Sun Y, Xu PL, et al. Research progress in functional plant genomics. Biotechnol Bull 2004;20(1):18—22.
- 2 Andy P, Brandle S, Kehr J, et al. Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser induced fluorescence detection. Transgenic Res 2000;9:245—260.
- 3 Aarts MG, Dirkse WG, Stiekema WJ, et al. Transposon tagging of a male sterility gene in Arabidopsis. Nature 1993;363(6431):715—717.
- 4 Hirochika H, Fukuda, Nakamura, et al. Function intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter for rice. Plant Mol Biol 1997;35:231—240.
- 5 Takken FL, Schipper D, Nijkamp HJ, et al. Identification and Ds-tagged isolation of a new gene at the Cf-4 locus of tomato involved in disease resistance to Cladosporium fulvum race 5. Plant J 1998;14(4):401—411.
- 6 Bislop GJ, Harrison K, Jones JDG, et al. The tomato Dwarf gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. Plant Cell 1996;8(6):959—969.
- 7 Keddle JS, Carroll B, Jones JD, et al. The DCL gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. EMBO J 1996;15(16):4208—4217.
- 8 van der Biezen EA, Brandwat BF, van Leeuwen W, et al. Identification and isolation of the FEEBLY gene from tomato by transposon tagging. Mol Gen Genet 1996;251(3):267—280.
- 9 Mathur J, Saedler, Painer, et al. Actin control over microtubules suggested by distorted. Plant J 1998;13(5):707—716.
- 10 Gonzalez CR, Carrasco SS, Roman RR, et al. Effect of static and dynamic exercise on heart rate and blood pressure variabilities. Med Sci Sports Exerc 2000;32(10):1719—1728.
- 11 熊勇华,许杨.基因表达的系列分析方法研究进展.生物工程学报 2002;18(3):377—380.
Xiong YH, Xu Y. Technological advances of serial analysis of gene expression. Chin J Biotechnol 2002;18(3):377—380.

- 12 Pertea M, Antonescu C, Salzberg S, et al. Exonomy and unveil: three abinitio eukaryotic genefinder. *Plant Mol Biol* 2002;48:39—48.
- 13 Bevan M, Bancroft I, Bent E, et al. Analysis of 1.9Mb contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 1998;391:485—488.
- 14 易图永. 植物抗病基因同源序列及其在抗病基因克隆与定位中的应用. *生物技术通报* 2002;18(2):16—20.
Yi TY. Application of plant resistance gene analogs in cloning and mapping resistance genes. *Biotechnol Inform* 2002; 18(2):16—20.
- 15 Ayoubi P, Jin X, Leits S, et al. Pipeonline 2.0: automated EST processing and functional data sorting. *Nucleic Acid Res* 2002;30:4761—4769.
- 16 Seki M, Narusaka M, Abe H, et al. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 2001;13(1):61—72.
- 17 Ozturk ZN, Talame V, Deyholos M, et al. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol Biol* 2002;48(5—6):551—573.
- 18 Sechena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467—470.
- 19 Reymond P, Weber H, Damond M, et al. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2000;12(5):707—720.
- 20 Haroni A, Keizer LCP, Harrigan G, et al. Metabolic profiling: pathways in drug discovery. *Plant Cell* 2000;12(5):647—661.
- 21 Lu G, Jantasuriyarat C, Zhou B, et al. An integrated approach to medicago functional genomics. *Theor Appl Genet* 2003;11:207—212.
- 22 Wang J, Huang MH, Zeng ZX, et al. Gene expression profiling in multidrug resistant KB cells using cDNA microarrays. *Chin J Cancer Res* 2002;14(1):5—10.
- 23 Dirsch VM, Vollmar AM. Ajoene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-like properties? *Biochem Pharmacol* 2001;61(5):587—589.
- 24 Scharfenberg K, Wagner R, Wagner KG. The cytotoxic effect of ajoene, a natural product from garlic, investigated with different cell lines. *Cancer Lett* 1990;53(2—3):103—108.
- 25 Fang ZJ, Huang WX, Huang MH, et al. Gene expression profiling of human promyelocytic leukemia HL-60 cell treated by ajoene. *Chin J Cancer Res* 2002;14(1):11—17.
- 26 Damerval C, Le Guilloux M. Characterization of novel proteins affected by the O2 mutation and expressed during maize endosperm development. *Mol Gen Genet* 1998;257(3):354—361.
- 27 朱平, 王伟, 程克棣. 药用植物功能基因. *中国生物工程杂志* 2004;24(2):3—8.
Zhu P, Wang W, Cheng KD. Progress in the functional gene research of medicinal plants. *Chin Biotechnol* 2004;24(2):3—8.
- 28 涂君, 朱平, 程克棣. 植物细胞色素 P450 基因的异源表达系统研究进展. *中国生物工程杂志* 2003;23(7):32—37.
Tu J, Zhu P, Cheng KD. Heterologous expression systems of plant cytochrome P450. *Chin Biotechnol* 2003;23(7):32—37.
- 29 Schoendorf A, Rithner CD, Williams RM, et al. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 beta-hydroxylase cDNA from *taxus* and functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(4):1501—1506.
- 30 Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, et al. Taxoid metabolism: taxoid 14beta-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Arch Biochem Biophys* 2003;413(2):262—270.
- 31 Walker K, Ketchum RE, Hezari M, et al. Partial purification and characterization of acetyl coenzyme A: taxa-4(20), 11(12)-dien-5alpha-ol-O-acetyl transferase that catalyzes the first acylation step of taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 1999;364(2):273—279.
- 32 Walker K, Schoendorf A, Croteau R. Molecular cloning of a taxa-4(20), 11(12)-dien-5alpha-ol-O-acetyl transferase cDNA from *taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 2000;374(2):371—380.
- 33 Walker K, Croteau R. Molecular cloning of a 10-deacetylba-cation III-10-O-acetyl transferase cDNA from *taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(2):583—587.
- 34 Walker K, Croteau R. Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane 2alpha-O-benzoyltransferase cDNA from *taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(25):13591—13596.
- 35 Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, et al. Taxol biosynthesis: taxane 13 alpha-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(24):13595—13600.
- 36 Walker K, Long R, Croteau R. The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *taxus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(14):9166—9171.

(收稿:2004-09-08 修回:2004-11-14)