

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53(2):204-209; 4 February 2013  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## *Salmonella enterica* 硫修饰蛋白 DptC 半胱氨酸定点突变对 Dnd 表型的影响

安贤惠<sup>1,2</sup>, 周秀芬<sup>1</sup>, 汪志军<sup>1</sup>, 邓子新<sup>1\*</sup>, 梁晶丹<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

<sup>2</sup>淮海工学院, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 连云港 222005

**摘要:** 【目的】*Salmonella enterica* serovar Cerro 87 是具有硫修饰现象即 Dnd 表型的细菌之一, 其硫修饰受 *dptBCDE* 基因簇控制, 将 *dptBCDE* 克隆、转化 *Escherichia coli* DH10B 后, 可赋予后者 Dnd 表型, 而当其中 *dptC* 缺失后, Dnd 表型随之丧失。本文探索 *S. enterica* serovar Cerro 87 硫修饰基因 *dptC* 在硫修饰发生过程中的作用。【方法】将 DptC 中 6 个半胱氨酸 (Cys) 在 DNA 水平上逐个定点突变, 转化携带 *dptBCDE* 及其衍生系列的质粒至 *E. coli* DH10B, 检测相应受体菌 Dnd 表型。【结果】在 DptC 的 6 个 Cys 中, 除 C39 外, 其余 5 个突变均可导致 Dnd 表型丧失, 说明 DptC 中 C146、C262、C273、C280 和 C283 均与硫修饰有关。生物信息学分析表明, 这 5 个 Cys 在硫修饰细菌科属间高度保守, 佐证了 *S. enterica* DptC 中这 5 个 Cys 与硫修饰有关的结论。【结论】*S. enterica* DptC 中 C146、C262、C273、C280 和 C283 任何一个的突变, 都会导致受体菌 Dnd 表型丧失。该结果为进一步探索 DNA 硫修饰的发生机制提供了线索。

**关键词:** DNA 硫修饰, *Salmonella enterica*, Dnd 表型, *dpt* 基因簇, 定点突变, 铁硫蛋白

**中图分类号:** Q936   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0001-6209 (2013) 02-0204-06

DNA 磷硫酰化修饰, 简称 DNA 硫修饰, 是指 DNA 骨架上非磷氧桥上的一个氧被硫取代<sup>[1]</sup>的一种 DNA 修饰现象。DNA 发生硫修饰后, 在电泳过程中易被降解 (DNA degradation), 会出现 smearing 现象, 前人将此定义为 Dnd 表型<sup>[2]</sup>。此现象于 1988 年在 *Streptomyces lividans*<sup>[2]</sup> 中首次发现, 现已证明在细菌中广泛存在, 且在科属间有明显的修饰水平差异<sup>[3-5]</sup>。细菌硫修饰是在机体 DNA 复制后发生的一种新型修饰<sup>[2,6-8]</sup>, 是 DNA 双链在特异位点的断裂<sup>[2,6-9]</sup>, 是过氧化物介导的氧化反应和氨基催化共

同作用<sup>[4,6,10-11]</sup>的结果。DNA 硫修饰与宿主专一性限制修饰系统相关<sup>[12]</sup>, 硫修饰的 DNA 可被 IV 型限制性内切酶 ScoMcrA 切割<sup>[13]</sup>, 硫修饰的 DNA 是机体的一种抗氧化机制<sup>[14]</sup>。早期研究表明, Dnd 表型受约 6 Kb、被命名为 *dnd* 的基因簇控制<sup>[2,3,15,16]</sup>, 以 *S. lividans* 为代表的 *dnd* 簇包括 5 个基因, 定名为 *dndA*、*dndB*、*dndC*、*dndD* 和 *dndE*, 其中 *dndA* 为一个独立转录本, 而 *dndB-E* 为与 *dndA* 相反的另一个转录本<sup>[2]</sup>; 而后随着硫修饰在更多细菌中的发现, 则了解到部分细菌中 *dndA* 与 *dndB-E* 转录本方向相

基金项目: 国家自然科学基金 (30870038, 30970624)

\* 通信作者。梁晶丹, Tel: +86-21-62932943, Fax: +86-21-62932418, E-mail: jliang@sjtu.edu.cn; 邓子新, Tel: +86-21-62933404, Fax: +86-21-62932418, E-mail: zxdeng@sjtu.edu.cn

作者简介: 安贤惠 (1965-), 女, 教授, 在职博士研究生, 研究方向为细菌 DNA 磷硫酰化修饰和海洋活性物质。E-mail: anhx2006@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-08-12; 修回日期: 2012-09-23

同<sup>[2]</sup>, 如 *Roseobacter denitrificans* OCh114 和 *Mesorhizobium* sp. BNC1 plasmid3, 且以 *Escherichia coli* B7 和 *Pseudomonas fluorescens* Pfo-1 等为代表的 *dnd* 基因簇, 并没有囊括到 Dnd 表型所必需的 *dndA* 基因, 而且这种类型占已报道有 DNA 硫修饰现象细菌的 60%<sup>[4,17]</sup> 以上。

*dnd* 簇的酶学功能研究表明, DndA 具有脱硫酶活性<sup>[16,18]</sup>, 功能与 *E. coli* 中的 IscS 类似; DndB 为一转录调控因子或一种 DNA 拓扑结构修饰蛋白<sup>[8,16]</sup>; DndC 的作用类似于 ATP 硫酸化酶和磷酸腺苷磷硫酸盐还原酶, 含 4Fe-4S 簇, 催化水解 ATP, 过量表达会影响细胞的生存能力<sup>[16,18-19]</sup>; DndD 与 ABC 运载体 ATP 结合蛋白同源, 有 ATP 酶活性, 可催化 ATP 水解, 超量表达也会影响细胞正常生长<sup>[16,19-20]</sup>; DndE 可能与 ATP 合成酶形成复合物<sup>[16]</sup>, 为一个硫转移酶, 在硫修饰形成过程中能与带有切口的 DNA 双链发生作用<sup>[4,21]</sup>。

*Salmonella enterica* serovar Cerro 87 是具有硫修饰 DNA 的细菌之一, 其控制 Dnd 表型的基因簇包括 4 个基因, 被命名为 *dptBCDE*<sup>[12]</sup>。目前对其各基因的功能研究尚无报道。本研究将 *S. enterica dptBCDE* 克隆, 转化 *Escherichia coli* DH10B 后, 发现 *S. enterica dptBCDE* 可赋予 *E. coli* DH10B Dnd 表型。而当 *dptC* 缺失, 则和 *S. lividans* 的 *dndC* 的缺失一样, Dnd 表型丧失。为进一步研究 *dptC* 在硫修饰发生过程中所起的作用, 将 *dptC* 编码的硫修饰蛋白 DptC 中所含的 6 个半胱氨酸逐个定点突变, 检测突变后 Dnd 表型的变化, 确定参与硫修饰的半胱氨酸。为进一步阐明 DptC 的功能、探明硫修饰形成的生理机制提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 菌种 *Salmonella enterica* serovar Cerro 87 和 *Escherichia coli* DH10B, 上海交通大学微生物代谢国家重点实验室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** KOD 高保真 DNA 聚合酶及其相关试剂均为 TOYOBY 产品。pJTU3510 (*dptBCDE*)、pJTU3523 (*dptC*)、pJTU3531 (*dptBDE*) 均由本实验室前期工作构建。QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit, 为美国 Stratagene 公司

产品。限制性内切酶 *Dpn* I 为 Fermentas 产品。突变引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.2 *S. enterica dptBCDE* 及其衍生质粒转化 *Escherichia coli* DH10B

按文献 [22] 中钙转化法, 分别将 pJTU3510 (*dptBCDE*) 及其突变衍生质粒、pJTU3531 (*dptBDE*) 转化 *E. coli* DH10B, pJTU3531 (*dptBDE*, p15A ori) 与 pJTU3523 (*dptC*, Col E1 ori) 共转化 *E. coli* DH10B。

### 1.3 *S. enterica* DptC 半胱氨酸的定点突变

按 Stratagene 公司 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit 使用说明书<sup>[23]</sup> 设计 overlap 引物, 用 KOD 高保真 DNA 聚合酶、经 PCR 合成突变链、*Dpn* I 酶解模板链, 再转化 *E. coli* DH10B, 提取含突变位点的质粒, 送上海鼎安生物科技公司测序。

### 1.4 *E. coli* DH10B 及其衍生菌 Dnd 表型鉴定

按细菌 DNA 常规方法提取 *E. coli* DH10B 及其衍生菌总 DNA, 经含 1% 硫脲的 TAE (10 mmol/L Tris-acetate, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 缓冲液电泳检测。完好无拖尾的 DNA, 用 1% per-acetic acid (PAA) 的 TAE 于 37°C 反应 30 min, 再次电泳鉴定 Dnd 表型。

## 2 结果

### 2.1 沙门氏菌 *S. enterica* serovar Cerro 87) *dptBCDE* 赋予 *E. coli* DH10B Dnd 表型

将本实验室前期工作构建的 pJTU3510 (p15A ori, Cml<sup>r</sup>, *dptBCDE*) 转化 *E. coli* DH10B, 结果如图 1, 可见 *S. enterica dptBCDE* 的转入使无 Dnd 表型的 *E. coli* DH10B (泳道 - -) 出现 Dnd 表型 (泳道 1)。当缺失 *dptC* 的 pJTU3531 (p15A ori, Cml<sup>r</sup>, *dptBDE*) 转化 *E. coli* DH10B 后, 不出现 Dnd 表型 (泳道 2), 再用只含 *S. enterica dptC* 的 pJTU3523 (ColE1 ori, Amp<sup>r</sup>, *dptC*) 与 pJTU3531 共转化 *E. coli* DH10B, 则受体又显现 Dnd 表型 ((泳道 2 + 3))。

### 2.2 *S. enterica* DptC 中半胱氨酸突变的构建

由 2.1 可知, 沙门氏菌 *S. enterica* serovar Cerro 87 中与硫修饰相关基因 *dptC* 的缺失, 使其受体菌 *E. coli* DH10B 丧失了硫修饰表型。*dptC* 编码硫修饰形成必需蛋白之一 DptC, 推测其中的半胱氨酸直接或间接参与硫修饰中硫的掺入, 而 DptC 中有 6 个半胱氨酸, 为了解它们在硫修饰形成过程中的贡献, 本研究以载有 *S. enterica dptBCDE* 基因簇的

pJTU3510 为出发质粒,按 1.2.2 方法分别将这 6 个半胱氨酸进行定点突变,即 C39A、C146A、C262A、

C273A、C280A 和 C283A。测序验证突变结果,从图 2 可以看出,获得目的突变序列。

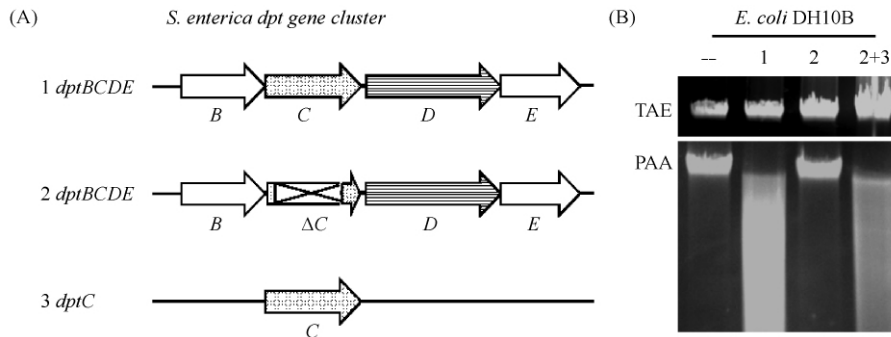


图 1 *S. enterica* *dptBCDE* 及其异源表达

Fig.1 *S. enterica* *dptBCDE* cluster and its heterologous expression in *E. coli* DH10B. A: *S. enterica* *dpt* gene cluster, B: Heterologous expression of *S. enterica* *dpt* gene cluster in *E. coli* DH10B.

	3920	3920	3930	3940	3950	3960	3970	3980	3990
pJTU3510	3920	CTCTGGCCGAATATGTTGCTGAGGTTCAAAGAATTTAT							
C39A	74	CTCTGGCCGAATATGTTGCTGAGGTTCAAAGAATTTAT							
	4230	4230	4240	4250	4260	4270	4280	4290	4300
pJTU3510	4230	CAATTTACTGGGAAAAGGTTATCCGGCCCCAACCCGTAGTTTTCGGTGGT							
C146A	374	CAATTTACTGGGAAAAGGTTATCCGGCCCCAACCCGTAGTTTTCGGTGGT							
	4590	4590	4600	4610	4620	4630	4640	4650	4660
pJTU3510	4589	TGTGGACGTTGTATATGGATTCCTCCGCACAGGGTGAGT							
C262A	1050	TGTGGACGTTGTATATGGATTCCTCCGCACAGGGTGAGT							
	4620	4620	4630	4640	4650	4660	4670	4680	4690
pJTU3510	4620	GGGTGAGTGTCCCTGGTGATCGACGAAAGTACCCCTCT							
C273A	1076	GGGTGAGTGTCCCTGGTGATCGACGAAAGTACCCCTCT							
	4640	4640	4650	4660	4670	4680	4690	4700	4710
pJTU3510	4637	TGATCGACGAAAGTACCCCTCTTGGGGAACTCTCGCTTGGC							
C280A	987	TGATCGACGAAAGTACCCCTCTTGGGGAACTCTCGCTTGGC							
	4650	4650	4660	4670	4680	4690	4700	4710	4720
pJTU3510	4650	TACCCCTCTTGGGGAACTCTCGCTTGGGGAACTCTCGCTTGGC							
C283A	1114	TACCCCTCTTGGGGAACTCTCGCTTGGGGAACTCTCGCTTGGC							

图 2 *S. enterica* DptC 中半胱氨酸的定点突变

Fig.2 Cysteines site-directed mutagenesis in *S. enterica* DptC.

### 2.3 *S. enteric* DptC 的 6 个半胱氨酸中有 5 个与其 DNA 硫修饰有关

将载有 *S. enterica* *dptBCDE* 的 pJTU3510 (p15A ori, Cml<sup>r</sup>, *dptBCDE*) 及含突变位点的衍生质粒分别转化 *E. coli* DH10B, Dnd 表型检测结果如图 3。

从图 3 看出,除 C39 (泳道 2) 外,突变其余 5 个半胱氨酸中的任何一个,均可导致含 *dptBCDE* 的 *E. coli* DH10B 丧失 Dnd 表现即无 smearing 现象,即可以推断 *S. enteric* DptC 中 C146、C262、C273、C280 和 C283 (泳道 3-7) 位点均与 DNA 硫修饰有关。

## 3 讨论

### 3.1 *E. coli* DH10B 中 *dndA* 的同源基因发挥了 DndA 的作用

尽管早期发现的硫修饰细菌 *S. lividans*、*S.*

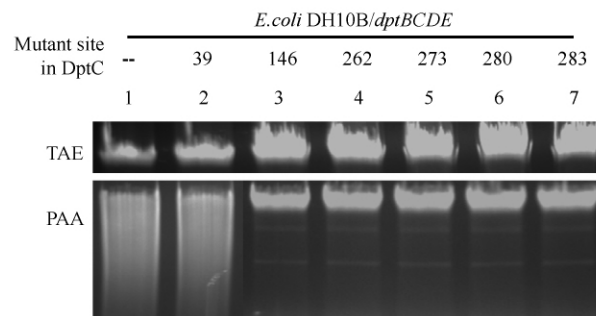


图 3 *S. enterica* DptC 中半胱氨酸的定点突变对 Dnd 表型的影响

Fig.3 Influences on Dnd phenotype of Cysteines site-directed mutagenesis in *S. enterica* DptC. Lane 1 *E. coli* DH10B/*dptBCDE*, Lane 2 *E. coli* DH10B/*dptBCDE*: C39A, Lane 3 *E. coli* DH10B/*dptBCDE*: C146A, Lane 4 *E. coli* DH10B/*dptBCDE*: C262A, Lane 5 *E. coli* DH10B/*dptBCDE*: C273A, Lane 6 *E. coli* DH10B/*dptBCDE*: C280A, Lane 7 *E. coli* DH10B/*dptBCDE*: C283A

*avermitilis* 等 *dnd* 簇包含 5 个基因,但在 He<sup>[3]</sup> 和 Ou<sup>[4]</sup> 等报道的具有硫修饰现象的 31 个细菌和 1 个古细菌中,有 60% 以上菌株的 *dnd* 基因簇只能囊括 4 个基因,即缺少硫修饰发生所必需的 *dndA*。已知 *dndA* 为一脱硫酶基因,与 *E. coli* 两个铁硫蛋白一半胱氨酸脱硫酶 IscS 和 NifS 关系密切<sup>[3]</sup>,可以将 L-Cys 的硫脱下;DndA 还通过激活 DndC 中的辅基 Fe<sup>2+</sup> 催化铁硫簇的组装<sup>[18]</sup>。本研究将缺失 *dndA* 的 *S. enterica* *dptBCDE* 簇转入 *E. coli* DH10B,赋予后

者 Dnd 表型,说明 *E. coli* DH10B 中有基因可以替代 *dndA* 的功能。在 *E. coli* 中,*dndA* 的同源基因有 *iscS*、*sulfS* 和 *csdA* 三个<sup>[24-25]</sup>,是其中一个还是几个共同发挥 *dndA* 的功能,这一问题还有待进一步研究。

### 3.2 *S. enterica* DptC 中的 5 个半胱氨酸,在科属间高度保守,很可能与硫修饰有关

*S. enterica* 硫修饰蛋白之一 DptC 中,有 6 个半胱氨酸,分别在 C39、C146、C262、C273、C280 和 C283 位点,生物信息学比较结果如图 4。

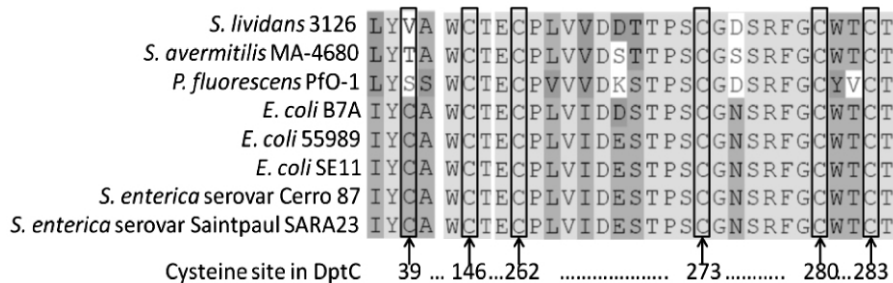


图 4 *S. enterica* DptC 中半胱氨酸的保守性

Fig. 4 Conservatism of Cysteines in *S. enterica* DptC.

从图 4 可见,C39 只在杆菌科中的大肠杆菌、沙门氏菌中保守,而 C146、C262、C273、C280 和 C283 在不同科属的链霉菌、假单胞菌和大肠杆菌、沙门氏菌中均表现高度保守,由此从理论上也支持了 *S. enterica* DptC 中 C146、C262、C273、C280 和 C283 位点的 5 个 Cys 与硫修饰有关的结论。至于这 5 个位点的半胱氨酸中哪一个直接将硫传递到 DNA 骨架上发生硫修饰,而另外的只是通过铁硫蛋白协助这一过程的发生,尚需更多的实验证据来证明。

### 3.3 *S. enterica* DptC 很可能是一种铁硫蛋白

铁硫蛋白<sup>[26-27]</sup> 是一类含有铁-硫簇的蛋白质,铁-硫簇中与硫连接着的有二、三或四个铁中心,并可处于各种变化的氧化态上。铁-硫簇存在于多种金属蛋白之中,例如铁氧还蛋白、氢化酶、辅酶 Q-细胞色素 c 氧化酶、琥珀酸脱氢酶、固氮酶等。铁硫蛋白通常是电子传递途径中的重要成员,这些过程包括呼吸作用、光合作用、羟化作用以及细菌的氢和氮的固定。同时铁硫蛋白也参与生物体含硫化化合物的生物合成中,如生物素<sup>[28]</sup> 合成过程中腺苷甲硫氨酸发生还原性断裂,产生脱氧腺苷自由基,被铁硫簇蛋白捕获传给脱硫生物素。关于控制 DNA 硫修饰发生的蛋白中,You 等<sup>[18]</sup> 报道了 *S. lividans* DndC 是含 1 个 4Fe-4S 簇的硫修饰蛋白,说明其分子中有 4 个

半胱氨酸参与 4Fe-4S 簇的形成。*S. enterica* DptC 与 *S. lividans* DndC 为同源蛋白,都含有 6 个半胱氨酸,其中 5 个高度保守,即 C146、C262、C273、C280 和 C283 位点完全一致。本研究证明 *S. enterica* DptC 中 C146、C262、C273、C280 和 C283 这 5 个位点与硫修饰有关,由此推测 *S. enterica* DptC 同 *S. lividans* DndC 一样含有 1 个 4Fe-4S 簇,是一种铁硫蛋白,C146、C262、C273、C280 和 C283 中的 1 个直接参与硫修饰的形成,另外 4 个参与铁硫簇的形成,结果还暗示硫修饰的发生需要该铁硫簇的协助。

**致谢** 感谢上海交通大学微生物代谢国家重点实验室邓子新团队的所有成员,特别感谢白林泉教授、林双君教授和黄婷婷博士、殷俊博士在实验中给予的大力支持与帮助。

### 参考文献

- [1] Wang L, Chen S, Xu T, Taghizadeh K, Wishnok JS, Zhou X, You D, Deng Z, Dedon PC. Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(11):709-710.
- [2] Zhou, X, Deng Z, Firmin JL, Hopwood DA, Kieser T. Site-specific degradation of *Streptomyces lividans* DNA during electrophoresis in buffers contaminated with ferrous

- iron. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16 (10) : 4341-4352.
- [3] He X, Ou H, Yu Q, Zhou X, Wu J, Liang J, Zhang W, Rajakumar K, Deng Z. Analysis of a genomic island housing genes for DNA S-modification system in *Streptomyces lividans* 66 and its counterparts in other distantly related bacteria. *Molecular Microbiology*, 2007, 65: 1034-1048.
- [4] Ou H, He X, Shao Y, Tai C, Rajakumar K, Deng Z. dnd DB: A Database Focused on Phosphorothioation of the DNA Backbone. *PLoS ONE*, 2009, 4(4) : e5132.
- [5] Wang L, Chen S, Vergin KL, Giovannoni SJ, Chan SW, DeMott MS, Taghizadeh K, Cordero OX, Cutler M, Timberlake S, Alm EJ, Polz MF, Pinhassi J, Deng Z, Dedon PC. DNA phosphorothioation is widespread and quantized in bacterial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011 Feb 15, 108 (7) : 2963-2968.
- [6] Evans M. , Frank S. , Kim S. , Dyson P. Characterization of a *Streptomyces-lividans* type site-specific DNA modification system in the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* permits investigation of two novel giant linear plasmids, pSA1 and pSA2. *Microbiology*, 1994, 140:1367 ~ 1371.
- [7] Dyson P, Evans, M. Novel post-replicative DNA modification in *Streptomyces*: analysis of the preferred modification site of plasmid pIJ101. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26: 1248-1253.
- [8] Boybek A, Ray TD, Evans MC, Dyson P. Novel site-specific DNA modification in *Streptomyces*: analysis of preferred intragenic modification sites present in a 5.7 kb amplified DNA sequence. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26:3364-3371.
- [9] Liang J, Wang Z, He X, Li J, Zhou X, Deng Z. DNA modification by sulfur: analysis of the sequence recognition specificity surrounding the modification sites. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: 2944-2954.
- [10] Ray T, Weaden J, Dyson P. Tris-dependent site-specific cleavage of *Streptomyces lividans* DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 96: 247-252.
- [11] Ray T, Mills A, Dyson P. Tris-dependent oxidative DNA strand scission during electrophoresis. *Electrophoresis*, 1995, 16:888-894.
- [12] Xu T, Yao F, Zhou X, Deng Z, You D. A novel host-specific restriction system associated with DNA backbone S-modification in *Salmonella*. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(20) : 7133-7141.
- [13] Liu G, Ou H, Wang T, Li L, Tan H, Zhou X, Rajakumar K, Deng Z, He X. Cleavage of Phosphorothioated DNA and Methylated DNA by the Type IV Restriction Endonuclease ScoMcrA. *PLoS Genetics*, 2010, 6(12) : e1001253.
- [14] Xie X, Liang J, Pu T, Xu F, Yao F, Yang Y, Zhao Yi, You D, Zhou X, Deng Z, Wang Z. Phosphorothioate DNA as an antioxidant in bacteria. *Nucleic Acids Research*, 2012: 1-10.
- [15] Zhou X, He X, Li A, Lei F, Kieser T, Deng Z. *Streptomyces coelicolor* A3 (2) Lacks a Genomic Island Present in the Chromosome of *Streptomyces lividans* 66. *Applied And Environmental Microbiology*, 2004, 70(12) : 7110-7118.
- [16] Zhou X, He X, Liang J, Li A, Xu T, Kieser T, Helmann JD, Deng Z. A novel DNA modification by sulphur. *Molecular. Microbiology*, 2005, 57(5) : 1428-1438.
- [17] <http://db-mml.sjtu.edu.cn/dndDB>. 2012-09-22.
- [18] You D, Wang L, Yao F, Zhou X, Deng Z. A Novel DNA Modification by Sulfur: DndA Is a NifS-like Cysteine Desulfurase Capable of Assembling DndC as an Iron-Sulfur Cluster Protein in *Streptomyces lividans*. *Biochemistry*, 2007, 46: 6126-6133.
- [19] Xu T, Liang J, Chen S, Wang L, He X, You D, Wang Z, Li A, Xu Z, Zhou X, Deng Z. DNA phosphorothioation in *Streptomyces lividans*: mutational analysis of the dnd locus. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 41.
- [20] Yao F, Xu T, Zhou X, Deng Z, You D. Functional analysis of spfD gene involved in DNA phosphorothioation in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *FEBS Letters*, 2009, 583:729-733.
- [21] Hu W, Wang C, Liang J, Zhang T, Hu Z, Wang Z, Lan W, Li F, Wu H, Ding J, Wu G, Deng Z, Cao C. Structural insights into DndE from *Escherichia coli* B7A involved in DNA phosphorothioation modification. *Cell Research*, 2012, 22: 1203-1206.
- [22] J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989, 1st edition.
- [23] Instruction manual. QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit. Stratagene technical services. 2007.
- [24] Mihara H, Kurihara T, Yoshimura T, Soda K, Esaki N. Cysteine sulfinate desulfinate, a NIFS-like protein of

- Escherichia coli* with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities—Gene cloning, purification, and characterization of a novel pyridoxal enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 22417-22424.
- [25] Mihara H, Maeda M, Fujii T, Kurihara T, Hata Y, Esaki. A nifS-like gene, *csdB*, encodes an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase—Gene cloning, purification, characterization and preliminary x-ray crystallographic studies. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 14768-14772.
- [26] Beinert H. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *Journal Of Biological Inorganic Chemistry*, 2000, 5 (1): 2-15.
- [27] Beinert H, Kiley PJ. Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Current Opinion In Chemical Biology*, 1999, 3 (2): 152-157.
- [28] Marquet A, Bui BT, Florentin D. Biosynthesis of biotin and lipoic acid. *Vitamins & Hormones*, 2001, 61: 51-101.

## Mutagenesis of cysteine residues in *dptC* from *Salmonella enteric* serovar Cerro 87 and its effects on DNA phosphorothioate modification

Xianhui An<sup>1,2</sup>, Xiufen Zhou<sup>1</sup>, Zhijun Wang<sup>1</sup>, Zixin Deng<sup>1\*</sup>, Jingdan Liang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

<sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China

**Abstract:** [Objective] DNA phosphorothioate modification (DNA sulfur modification, a non-bridging oxygen swapped with a sulfur) exists in diverse bacteria. *Salmonella enterica* serovar Cerro 87 is one of the bacteria that harbor the DNA sulfur modification. The modification is carried out by the products of a four-membered gene cluster, *dptBCDE*. Transformation of *Escherichia coli* DH10B with the *dptBCDE* gene cluster endows the strain with DNA sulfur modification capability. Deletion of *dptC* abolished the modification. Here, we studied the function of *dptC* in DNA sulfur modification. [Methods] Six cysteine residues in *dptC* were mutated individually within the *dptBCDE* gene cluster. Mutants were then tested for DNA sulfur modification. [Results] Among the 6 cysteine mutations (C39, C146, C262, C273, C280, and C283), 5 abolished DNA modification except for C39, suggesting that C146, C262, C273, C280, and C283 are essential for DNA sulfur modification. Sequence alignment shows that these five cysteine residues are conserved among different strains. [Conclusion] Mutation at anyone of C146, C262, C273, C280 and C283 of *dptC* abolished DNA modification. Our results shed light on further study of DNA sulfur modification biochemical pathway.

**Keywords:** DNA S-modification, *Salmonella enteric*, Dnd phenotype, *dpt* gene cluster, site-directed mutagenesis, iron-sulfur protein

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundations of China (30870038,30970624)

\* Corresponding authors. Tel: +86-21-62932943, Fax: +86-21-62932418, E-mail: jdliang@sjtu.edu.cn; Tel: +86-21-62933404, Fax: +86-21-62932418, E-mail: zxdeng@sjtu.edu.cn

Received: 12 August 2012 / Revised: 23 September 2012