



研究报告

变铅青链霉菌体内游离胞嘧啶的发现及检测

张丽娜 罗祥坤 邓子新 贺新义*

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 200030

摘要:【背景】胞嘧啶(cytosine, C)是核酸分子 4 种基本碱基之一。胞嘧啶首先是以胞苷三磷酸(cytosine triphosphate, CTP)的形式合成,在核酸基础代谢中没有形成游离胞嘧啶的特定途径。杀稻瘟菌素(blasticidin S, BS)和谷氏菌素生物合成途径均以游离的胞嘧啶为前体,前者的生物合成基因簇中包含一个能水解胞苷单磷酸(cytidine monophosphate, CMP)生成胞嘧啶的水解酶 BlsM,后者的生物合成基因簇及其产生菌的基因组中均没有这个水解酶对应的同源蛋白。【目的】检测不同细菌中是否普遍存在游离的胞嘧啶,探究是否存在能产生游离胞嘧啶的同工酶或新途径。【方法】在 BS 异源表达菌株 *Streptomyces lividans* WJ2 中敲除 *blsM*,高效液相色谱(HPLC)检测突变株和 WJ2 发酵产物;液相色谱-质谱联用(LC-MS)检测 10 个经过分级纯化的微生物细胞裂解液上清中是否存在游离的胞嘧啶。【结果】突变株 WJ2 Δ *blsM* 菌株仍能合成杀稻瘟菌素,但各组分产量与 WJ2 菌株相比均明显降低;除了变铅青链霉菌,在 10 株被检测的菌株中,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、地中海拟无枝酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)也检测到了含量较高的游离胞嘧啶。【结论】WJ2 Δ *blsM* 菌株仍具有产生 BS 的能力,说明野生型 *Streptomyces lividans* 菌株内存在一种未曾发现的游离胞嘧啶的产生方式,可以满足次级代谢的需求。另外,不同微生物中游离胞嘧啶的含量不同。

关键词: 游离胞嘧啶, 变铅青链霉菌, 杀稻瘟菌素, 高效液相色谱, 液相色谱-质谱联用

Discovery and detection of free cytosine in *Streptomyces lividans*

ZHANG Li-Na LUO Xiang-Kun DENG Zi-Xin HE Xin-Yi*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract: [Background] Cytosine is one of the four basic bases of nucleic acids. Cytosine is firstly synthesized in the form of cytosine triphosphate. There is no specific primary pathway for the formation of free cytosine in nucleic acid primary metabolism. The biosynthetic pathways of blasticidin S and gougertin both utilize free cytosine as the precursor. The biosynthetic gene cluster of blasticidin S contains a hydrolase BlsM that can hydrolyze cytidine monophosphate into cytosine, while gougertin producer doesn't encode a homolog to BlsM. [Objective] To detect the existence of free cytosine in different bacteria, and to explore whether there is an isoenzyme or a new pathway to produce free cytosine. [Methods] *blsM* was knocked out in blasticidin S heterologous producer *Streptomyces lividans* WJ2, its

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901200)

*Corresponding author: Tel: 86-21-62932418; E-mail: xyhe@sjtu.edu.cn

Received: 02-01-2020; Accepted: 06-03-2020; Published online: 03-06-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901200)

*通信作者: Tel: 021-62932418; E-mail: xyhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-01-02; 接受日期: 2020-03-06; 网络首发日期: 2020-06-03

fermentation products of the mutant strain and WJ2 were detected by high performance liquid chromatography. Free cytosine in the supernatant of 10 fractionated cell lysates was measured by LC-MS. **[Results]** The mutant WJ2 Δ *blsM* strain still synthesizes blasticidin S, but the yield of each component is significantly lower than that of WJ2. In addition to *Streptomyces lividans*, free cytosine was detected in *Staphylococcus aureus*, *Amycolatopsis mediterranei* and *Bacillus subtilis*. **[Conclusion]** WJ2 Δ *blsM* still produces blasticidin S, indicating that wild-type *Streptomyces lividans* has an uncovered pathway for synthesis of free cytosine to meet blasticidin S synthesis. The content of free cytosine varies in different microorganisms.

Keywords: Free cytosine, *Streptomyces lividans*, Blasticidin S, HPLC, LC-MS

胞嘧啶(cytosine, C)是在芳香杂环上带有两个取代基的嘧啶衍生物(图 1A), 同腺嘌呤(adenine, A)、鸟嘌呤(guanine, G)、胸腺嘧啶(thymine, T)及尿嘧啶(uracil, U)一起构成 DNA 及 RNA 的主要碱基^[1]。胞嘧啶也是农药、精细化工和医药的重要中间体^[2], 尤其是在医药及化工领域具有广泛的应用前景, 可以用于研究抗乙肝药物拉米夫定^[3], 合成抗癌药物地西他滨^[4]、抗艾滋病药物^[5]、疫苗佐剂^[6]及 5-氟胞嘧啶^[7]等。在生物体内胞嘧啶并不是直接从头合成, 游离的胞嘧啶不是嘧啶形成过程中的中间体, 其产生于由三磷酸尿苷(uridine triphosphate, UTP)氨基化形成的三磷酸胞苷(cytosine triphosphate, CTP)^[1,8], 其合成途径首先是从氨甲酰磷酸开始逐步形成乳清苷酸, 经脱羧生成

尿嘧啶核苷酸(uridine monophosphate, UMP), 进而形成 UTP, 最后在 CTP 合酶的作用下经氨基化生成 CTP(图 1B)。

在生物体内以游离形式存在的碱基含量很少, 主要以核苷酸形式存在^[9]。微生物可通过以下几种方式产生少量游离的碱基: (1) 正常或烷基化的碱基会从 DNA 或 RNA 上自发脱落^[10]。以大肠杆菌为例, 其双链 DNA 在翻译过程中每天会发生 10 余次嘌呤碱基的自发脱落, 而嘧啶碱基的脱落频率是嘌呤碱基脱落频率的 1%^[11]; (2) 受损伤的碱基或者错误插入的碱基会被 DNA N-糖苷酶(N-glycosylases)切除^[10], 包括胞嘧啶错误脱氨产生的尿嘧啶^[12]、5-甲基胞嘧啶错误脱氨后形成的胸腺嘧啶^[13]等; (3) 当细菌生长进入稳定期后 rRNA 会发生降解,

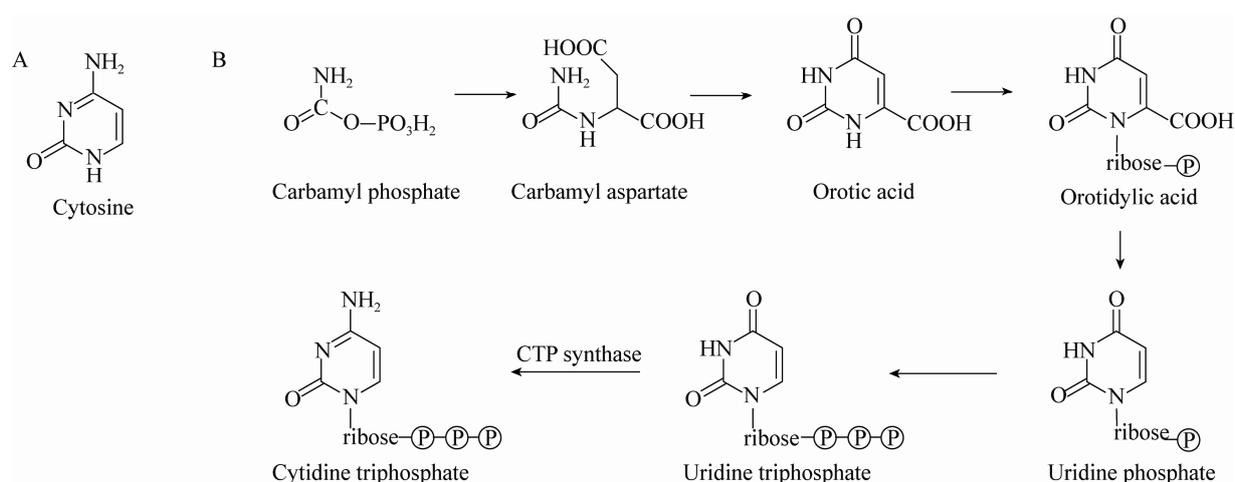


图 1 胞嘧啶结构式(A)及生物体内胞嘧啶的合成过程(B)

Figure 1 The chemical structure of cytosine (A) and the process of cytosine synthesis in organisms (B)

造成细胞内外游离碱基含量升高,其中主要为尿嘧啶、黄嘌呤及次黄嘌呤^[14]; (4) 核糖或脱氧核糖从嘧啶碱基向嘌呤碱基转移的过程中会产生游离的尿嘧啶或胸腺嘧啶^[15]。大部分微生物都含有活性很高的胞嘧啶脱氨酶(deaminase),导致其体内的胞嘧啶或含有胞嘧啶的核苷会先转化成尿嘧啶或含尿嘧啶的核苷,再进行之后的代谢^[16]。在少数微生物体内不含有类似的脱氨酶,以乳酸杆菌(*Lactobacillus* spp.)为例,其体内存在很特殊的反式-N-脱氧核苷酶(trans-N-deoxyribosylase),在进行核糖或脱氧核糖的转移过程中就会产生游离的胞嘧啶^[17-18]。因而,微生物在基础代谢过程中只会产生痕量游离的胞嘧啶,并且主要以CTP的形式存在^[16]。

杀稻瘟菌素(blasticidin S, BS)、精霉素(arginomycin)、米多霉素(mildiomyacin)及谷氏菌素(gougerotin)同属于肽核苷类抗生素,其核苷骨架部分均有胞嘧啶基团(图2),具有广谱的生物活性(抗真菌、抗细菌、杀虫、抗肿瘤等)^[19]。前3种抗生素的合成基因簇分别编码BlsM、ArgD及MilB蛋

白,负责水解胞苷单磷酸(cytidine monophosphate, CMP)或羟甲基胞苷单磷酸(5-hydroxymethyl cytidine monophosphate, hmCMP),提供游离的碱基前体^[20-22]。其中MilB具有水解CMP及hmCMP的能力,因此,在米多霉素的产生菌——生裂链轮丝菌(*Streptoverticillium rimofaciens*)中可检测到去羟甲基米多霉素(dHM-mildiomyacin)及米多霉素两种产物;将米多霉素原始产生菌的*milB*基因敲除后,两种产物均无法生成^[23]。由此表明在生裂链轮丝菌原始菌株中游离胞嘧啶含量极低,无法供给米多霉素的合成需要。因此,对于生裂链轮丝菌来讲,MilB是米多霉素合成所必需的。但是,在谷氏菌素的产生菌禾粟链霉菌(*Streptomyces gramineus*)的合成基因簇上虽然没有特定的CMP水解酶基因,却能产生谷氏菌素^[24]。为探究这两种细菌差异现象产生的原因及其普遍性,我们以稳定表达BS的异源表达菌株*Streptomyces lividans* WJ2^[25]为研究对象,以期揭示游离胞嘧啶的可能来源及产生途径提供理论依据。

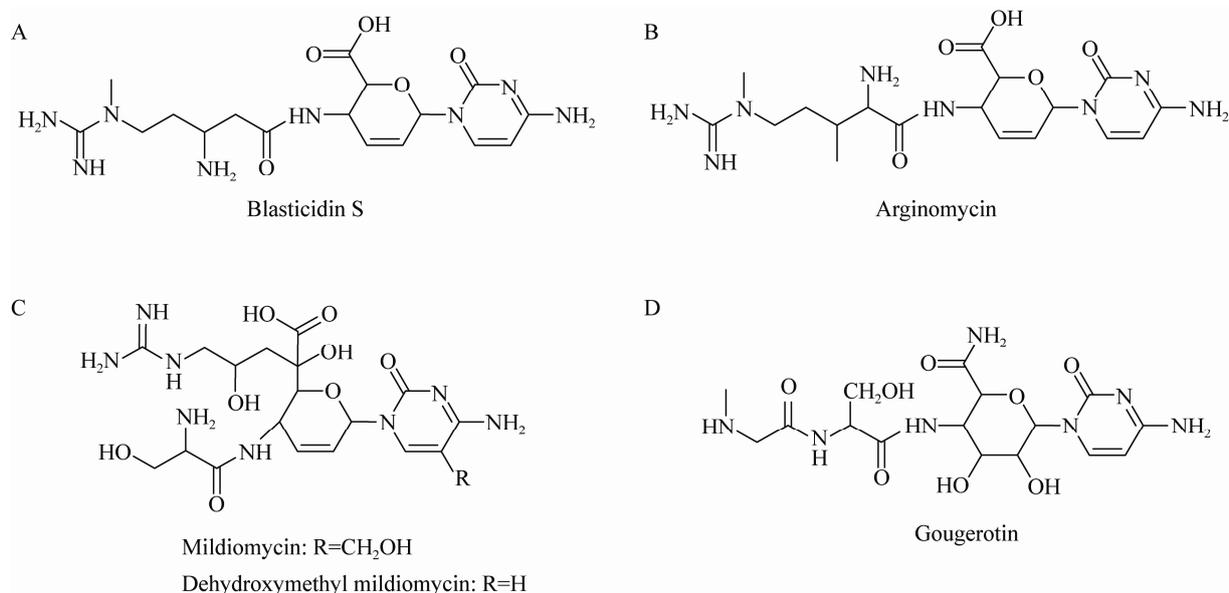


图2 杀稻瘟菌素(A)、精霉素(B)、米多霉素(C)及谷氏菌素(D)的化学结构式

Figure 2 The chemical structures of blasticidin S (A), arginomycin (B), mildiomycin (C) and gougerotin (D)

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒

大肠杆菌 MG1655、ET12567/pUZ8002^[26]和 BW25113^[27], 变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans* 1326)和含有 BS 合成基因簇的变铅青链霉菌 WJ2 (*Streptomyces lividans* WJ2), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213), 耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis* MC² 155), 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens* Pfo-1), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633), 地中海拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis mediterranei* U32), 红色糖多孢菌 (*Saccharopolyspora erythraea* HOE107), 肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica* serovar. Cerro 87), 深红酵母 (*Rhodotorula rubra* ACCC 20252), 禾谷镰孢菌 (*Fusarium graminearum* ATCC 200362), 均由上海交通大学分子微生物学实验室保存。

研究所用质粒为 pJTU1780^[25] (以 *Spe* I 和 *Xba* I 酶切粘粒 7D11 得到一段 35 kb 的片段, 将该片段与 pJTU1289 连接而得) 与 pZLN02 (用 PCR-targeting 的方式将 pJTU1780 上的 *blsM* 替换成 *aadA* 及 *oriT*)。

1.1.2 培养基^[28]

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、荧光假单胞菌、枯草芽孢杆菌及肠道沙门氏菌的液体培养基为 LB 培养基; 耻垢分枝杆菌的液体培养基为 LB 中加入终浓度为 1% (体积比) 的甘油; 深红酵母及禾谷镰孢菌的液体培养基为 YEME 培养基。链霉菌、红色糖多孢菌及地中海拟无枝酸菌的液体培养基为 TSBY 培养基, 固体培养基为 SFM 培养基。2×YT 预萌发培养基 (g/L): 酵母提取物 10.00, 水解酪蛋白氨基酸 10.00, 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min 后添加 5 mol/L CaCl₂ 使其终浓度为 10 mmol/L。发酵所需种子培养基 (g/L): 葡萄糖 20.00, 黄豆饼粉 30.00, 酵母提取物 5.00, MgSO₄·7H₂O 0.50, CaCO₃ 3.00, (NH₄)₂SO₄ 1.00,

NaOH 调 pH 至 7.2–7.4; 发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 80.00, 黄豆饼粉 40.00, MgSO₄·7H₂O 0.60, CaCO₃ 10.00, (NH₄)₂SO₄ 1.00, FeSO₄ 0.05, K₂HPO₄ 0.40, N,N-二甲基-乙酰胺 (N,N-dimethyl acetamide) 10.00, 用 NaOH 调 pH 至 7.2–7.4。

1.1.3 PCR-targeting 引物

为了敲除 WJ2 菌株中的 *blsM*, 并对敲除结果进行验证, 设计了两对特异性引物, 引物合成由苏州金唯智科技有限公司完成。Tar-*blsM*-F: 5'-TACATCCAGTGTCTTCTACAAGGACTGAGGGAACCTCGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'; Tar-*blsM*-R: 5'-CCCGTCACGCGGGGCACGATCGGTGCACGGTTCGGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'; Con-*blsM*-F: 5'-AAGCCCGAGCTGCGCTGGCAGTACG-3'; Con-*blsM*-R: 5'-CCGGCCGGCGGAACGACCG-3'。

1.1.4 主要试剂和仪器

聚合酶链式反应 (PCR) 所用试剂、限制性内切酶, TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司。阳离子交换小柱 (Supelclean LC-SCX, 500 mg/3 mL), Supelco 公司; 涡漩振荡仪, 上海琪特分析仪器有限公司; 高效液相色谱仪 (Agilent 1260 infinity HPLC)、液相色谱-质谱联用仪 (Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC MS), 安捷伦科技有限公司; Innoval C18 柱 (4.6×250 mm, 5 μm), Agela 公司; AQ 柱 (4.6×250 mm, 5 μm), YMC 公司; 超声波细胞破碎仪, Qsonica 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因中断

基因敲除采用的是 PCR-targeting 方法^[27]。

1.2.2 大肠杆菌与链霉菌的接合转移

将 PCR 扩增的含有 *aadA* 基因、两端带有 *blsM* 两侧同源末端的 DNA 片段电转入含有 pJTU1780 (包含整个杀稻瘟菌素的生物合成基因簇, 其中包含 *blsM* 基因) 及重组辅助质粒 pIJ790 的大肠杆菌 BW25113 中, 重组获得的 *blsM* 基因敲除质粒

pZLN02 再转化至 ET12567/pUZ8002 中,以消除 DNA 甲基化限制的影响,并在辅助质粒 pUZ8002 的协助下,基因置换质粒通过接合转移导入变铅青链霉菌 WJ2 中。取少量 WJ2 孢子于室温、6 000 r/min 离心 2 min 除去甘油,用 TES 缓冲液洗涤 2 次并重悬于 500 μ L TES 缓冲液中,50 $^{\circ}$ C 水浴热激 10 min。3 500 r/min 离心 5 min 收集孢子,加入 1 mL 2 \times YT 预萌发培养基,在 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 摇床预萌发 2–2.5 h;取 200 μ L OD_{600} 值约 0.6 的大肠杆菌培养液,5 500 r/min 离心 1 min,用液体 LB 培养基洗 2 遍去除氯霉素、卡那霉素及壮观霉素,重悬于 600 μ L 液体 LB 培养基中,与萌发后的链霉菌孢子混匀后涂于 SFM 平板上,30 $^{\circ}$ C 静置培养 14–16 h 后,用壮观霉素和三甲氧苄氨嘧啶(trimethoprim, TMP)各 50 μ g/mL 覆盖,待平板吹干后,30 $^{\circ}$ C 继续培养 2–3 d,即可挑取接合子。

1.2.3 基因置换突变株的筛选及确认

从接合转移平板上挑出的接合子在无抗 SFM 平板上进行松弛培养,培养产孢后再在无抗 SFM 平板上稀释培养成单菌落,并挑取单菌落分别在只含有壮观霉素(50 μ g/mL)或硫链丝菌素(10 μ g/mL)的 SFM 单抗平板上对应划线。若发生双交换,目的基因被成功置换的突变株只会在含壮观霉素的抗性平板上生长,而在含有硫链丝菌素的平板上不生长,挑取这样的单克隆菌块接种至 TSBY 培养基中培养 48 h,提取总 DNA,用敲除 *blsM* 的验证引物进行 PCR 验证。根据目的基因与置换片段之间大小的差异可以看到基因置换突变株与野生型不同,从而进一步确定基因置换是否发生。

1.2.4 BS 异源表达菌株 WJ2 及其突变株 WJ2 Δ *blsM* 的发酵及发酵液纯化

将菌块或孢子接种至 30 mL TSBY 培养基中,48 h 后以 10%接种量转接到 30 mL 种子培养基中,再培养 48 h 后继续以 10%接种量转接到 30 mL 发酵培养基继续培养 6 d,培养条件均为 30 $^{\circ}$ C、220 r/min。

发酵液 5 000 r/min 离心 10 min,收集上清,用饱和草酸调 pH 至 3.0–5.0,静置 10 min 以上,10 000 r/min 离心 15 min 去除沉淀备用。用阳离子交换小柱处理发酵液:小柱先用 3 mL 甲醇活化,再用 5 mL 纯水去除甲醇;将发酵液上样至阳离子交换小柱后,先用 5 mL 纯水洗涤未挂柱的发酵液,再用 5 mL 0.5%的氨水洗涤杂质,最后用 5%的氨水洗脱目标组分,待分析测定。

1.2.5 发酵液中 BS 及其衍生物的高效液相色谱法(HPLC)分析

使用 Innoval C18 柱在 Agilent 1260 上进行 HPLC 分析。流动相 A 相选用含有 0.1%三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)的水溶液, B 相为甲醇,样品以 0.3 mL/min 的流速洗脱,缓冲液 B 的浓度在 40 min 内从 5%升至 40%,检测波长为 275 nm^[29]。

1.2.6 用于胞嘧啶含量检测的无细胞内溶物(cell free extract, CFE)的样本制备与处理

收集 TSBY 或 YEME 液体培养基中培养 48 h 的变铅青链霉菌、深红酵母、禾谷镰孢菌、红色糖多孢菌和地中海拟无枝酸菌菌体,以及 LB 液体培养基培养 24 h 的其余细菌菌体各 100 mL,4 $^{\circ}$ C、4 500 r/min 离心 15 min 后弃上清,用缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0)洗涤菌体 2 遍。用 15 mL 缓冲液重悬菌体后于-40 $^{\circ}$ C 保存备用。制备 CFE 时,在深红酵母、金黄色葡萄球菌、禾谷镰孢菌及枯草芽孢杆菌的细胞样品中加入终浓度 2 mg/mL 的溶菌酶溶液,混合均匀后于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅放置 1 h,所有细胞样品均于冰上进行超声破碎,除深红酵母的超声条件为 30% Amp I、1 h 外,其余细胞样品均为 25% Amp I、30 min。破碎后于 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 1 h,上清液体即为制备好的 CFE。

取 CFE 按照 1:1 比例加入异丙醇,混合均匀后于-40 $^{\circ}$ C 放置过夜。取出后于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min,去除 DNA 沉淀,上清置于旋转蒸发器中,1 000 r/min、30 $^{\circ}$ C、5 h 旋干异丙醇。剩余

液体中按照 1:1 比例加入苯酚-氯仿混合液, 涡漩振荡仪振荡 1 min 充分混匀后, 12 000 r/min 离心 15 min, 小心吸取上清, 过 0.22 μm 有机相滤膜后放于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.7 LC-MS 法检测游离胞嘧啶

使用 AQ 柱在 Agilent 6530 上进行 LC-MS 分析。流动相 A 相选用含有 0.05% 甲酸的水溶液, B 相为含有 0.05% 甲酸的甲醇溶液, 样品以 0.3 mL/min 的流速洗脱, 在 75 min 内缓冲液 B 的浓度均为 0%, 检测波长为 275 nm。

2 结果与分析

2.1 WJ2 Δ *blsM*(ZLN1)菌株的构建结果

通过 PCR-targeting 的方法构建了基因置换质粒 pZLN02, 基因置换过程如图 3A 所示。将 pZLN02 通过接合转移导入 WJ2 中, 得到 *blsM* 的基因置换菌株 ZLN1 并进行了 PCR 验证, 验证结果如图 3B 所示。

2.2 *Streptomyces lividans* 1326、WJ2 及 ZLN1 菌株发酵结果与分析

将 *Streptomyces lividans* 1326、WJ2 及 ZLN1 发酵后检测发酵产物, 检测结果如图 4 所示。

从发酵产物检测结果来看, *blsM* 被敲除后, ZLN1 菌株仍能产生 BS 及其他 3 种最终组分, 但是产量较出发菌株 WJ2 有明显下降。说明 *Streptomyces lividans* 宿主本身在缺少 *blsM* 的情况下仍可以为 BS 的合成提供游离的胞嘧啶。

2.3 游离胞嘧啶 LC-MS 检测方法的建立

为了证实野生型变铅青链霉菌体内能够生成游离的胞嘧啶, 首先需要建立一种灵敏的细胞液胞嘧啶含量的检测方法。第一步是制作胞嘧啶质量浓度的标准曲线, 使用蠕动泵优化 Tune 文件, 降低检测线, 最终确定标准品浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 。在正离子模式下, 结果如图 5 所示。

从检测结果可以看出, 在保留时间 9.02 min 时, 可以检测到质荷比 m/z 为 112 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准分子离子峰, 响应强度为 9.72×10^3 , 同时可以检测到 m/z 223 $[\text{2M}+\text{H}]^+$, 响应强度约为 m/z 112 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的 1/3, 在数量上呈现一定比例的对应关系。

为了防止在标准品洗脱峰附近从样品中检测到 m/z 112 $[\text{M}-\text{X}+\text{H}]^+$, 选取常温下糖苷键易自发水解生成游离胞嘧啶的 1 $\mu\text{mol/L}$ CMP 标准品为对照, 在该条件下进行分析, 结果如图 6 所示。

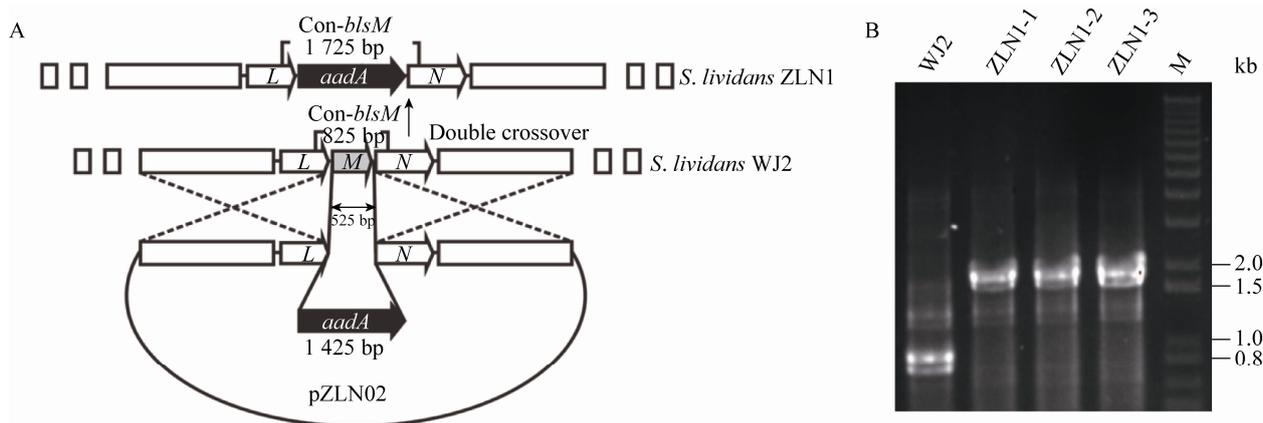


图 3 WJ2 Δ *blsM* 菌株的构建及验证

Figure 3 Construction and confirmation of WJ2 Δ *blsM* mutant strains

注: A: 图示通过基因置换用 *aadA* 抗性基因和 *oriT* 位点置换 *blsM* 得到突变株 ZLN1; B: PCR 验证突变株 ZLN1。

Note: A: Schematic representation of gene replacement of *blsM* with *aadA* & *oriT* cassette to produce *S. lividans* ZLN1; B: Confirmation of mutant ZLN1 by PCR with primers Con-*blsM*.

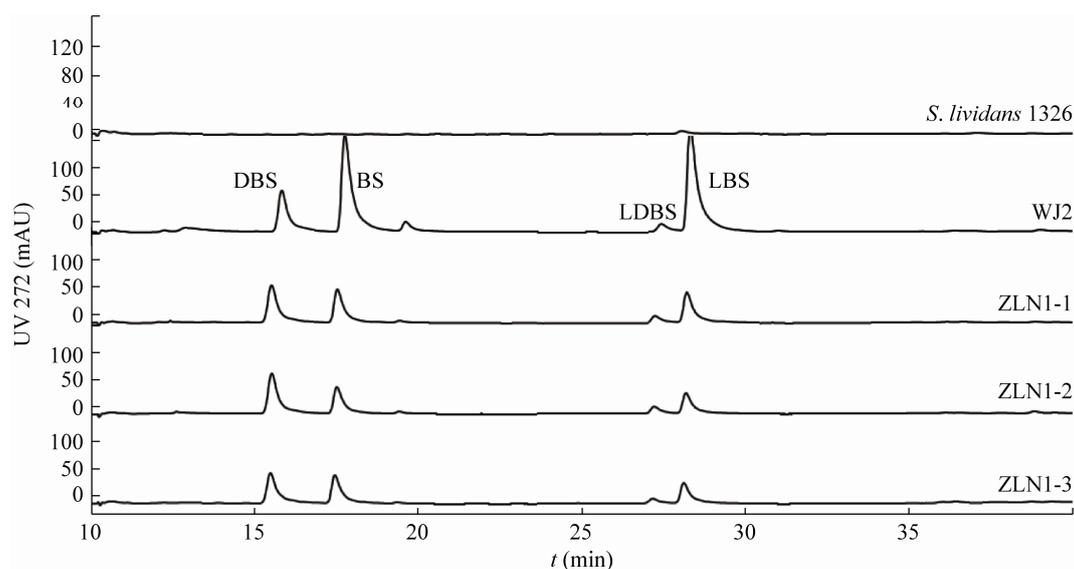


图4 突变株 ZLN1 发酵产物的 HPLC 检测

Figure 4 HPLC analysis of fermentation broth of *Streptomyces lividans* ZLN1

注：以上各菌株均为在种子/发酵培养基中的发酵结果。

Note: Each of the above strains were fermented in seed/fermentation medium.

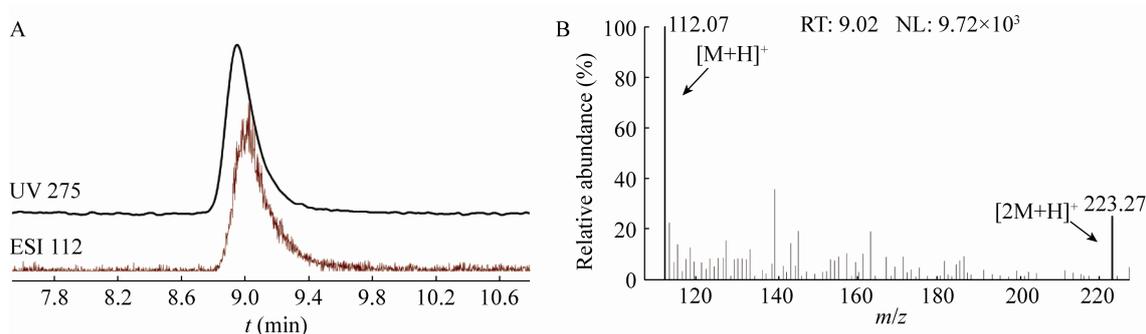


图5 LC-MS 对胞嘧啶标准品的检测

Figure 5 LC-MS analysis of cytosine standard

注：A：胞嘧啶标准品的液相图及提取离子流色谱图；B：胞嘧啶标准品的质谱图。

Note: A: Liquid chromatogram and extracted ion chromatogram of cytosine standard; B: Mass spectrum of cytosine standard.

由 CMP 的 LC-MS 分析结果可见，在保留时间 11.52 min 时，可以检测到 m/z 324 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰，响应强度为 4.81×10^3 ，但是并不能检测到明显的 m/z 112 $[M-X+H]^+$ 碎片峰，表明在该条件下 CMP 的糖苷键不会断裂。由此推断，在进行样品分析时，在与胞嘧啶标准品保留时间相同的位置检测到的 m/z 112 一定是游离胞嘧啶的分子离子峰，而不是其他物质的碎片峰。因此，该

方法具有可行性，可以用来检测 *Streptomyces lividans* 及其他菌体 CFE 样品中游离胞嘧啶是否存在。

2.4 *Streptomyces lividans* CFE 样品中游离胞嘧啶的检测结果

通过上述方法使用 LC-MS 对处理好的 *Streptomyces lividans* CFE 样品进行检测，结果如图 7 所示。

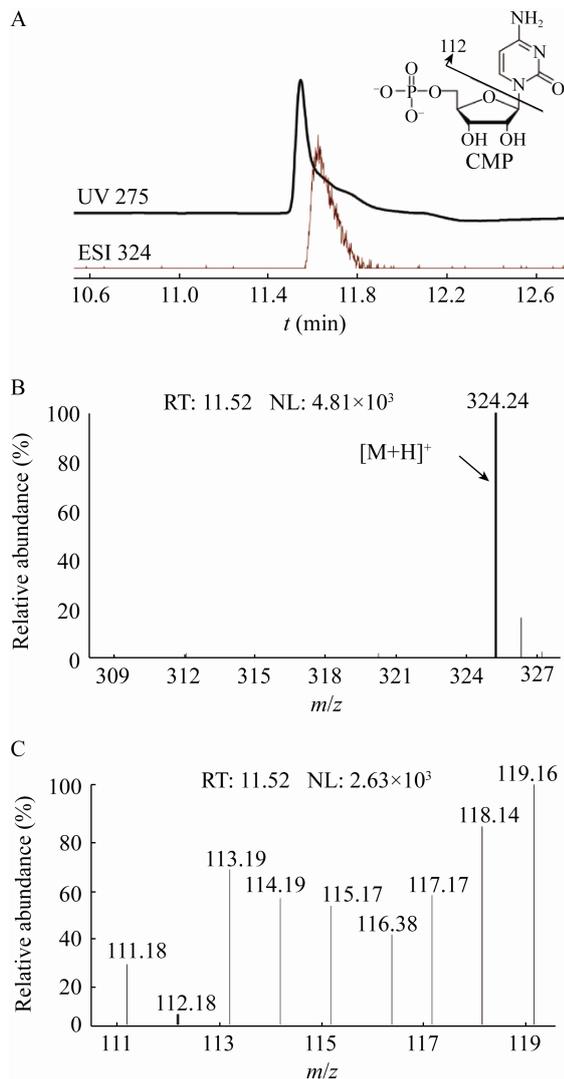


图6 CMP结构式及LC-MS对CMP标准品的检测
Figure 6 The chemical structure of CMP and LC-MS analysis of CMP standard

注: A: CMP标准品的液相图及提取离子流色谱图; B、C: CMP标准品的质谱图。

Note: A: Liquid chromatogram and extracted ion chromatogram of CMP standard; B, C: Mass spectrum of CMP standard.

由图7结果可见,在保留时间9.19 min时可以检测到 m/z 112 $[M+H]^+$, 响应强度为 4.38×10^3 , 同时也可以检测到 m/z 223 $[2M+H]^+$, 响应强度为 2.04×10^3 , 两者响应强度之间满足胞嘧啶标准品所表现出来的比例关系。表明 *Streptomyces lividans* 体内确实存在游离的胞嘧啶。

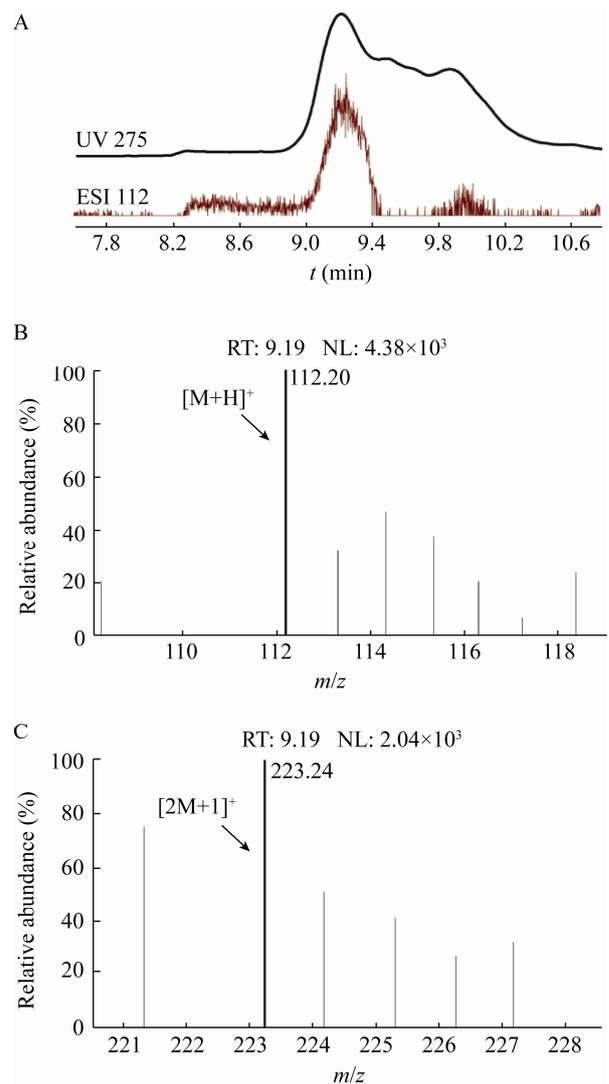


图7 LC-MS对Streptomyces lividans CFE样品的检测
Figure 7 LC-MS analysis of Streptomyces lividans CFE

注: A: Streptomyces lividans CFE样品的液相图及提取离子流色谱图; B、C: Streptomyces lividans CFE样品的质谱图。

Note: A: Liquid chromatogram and extracted ion chromatogram of Streptomyces lividans CFE; B, C: Mass spectrum of Streptomyces lividans CFE.

2.5 对其他几种菌体CFE中游离胞嘧啶的检测

采用上述方法,从10种常见微生物中筛选出了游离胞嘧啶含量比较高的细菌菌株,分别为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、地中海拟无枝酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*)及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),检测结果如图8-10所示。

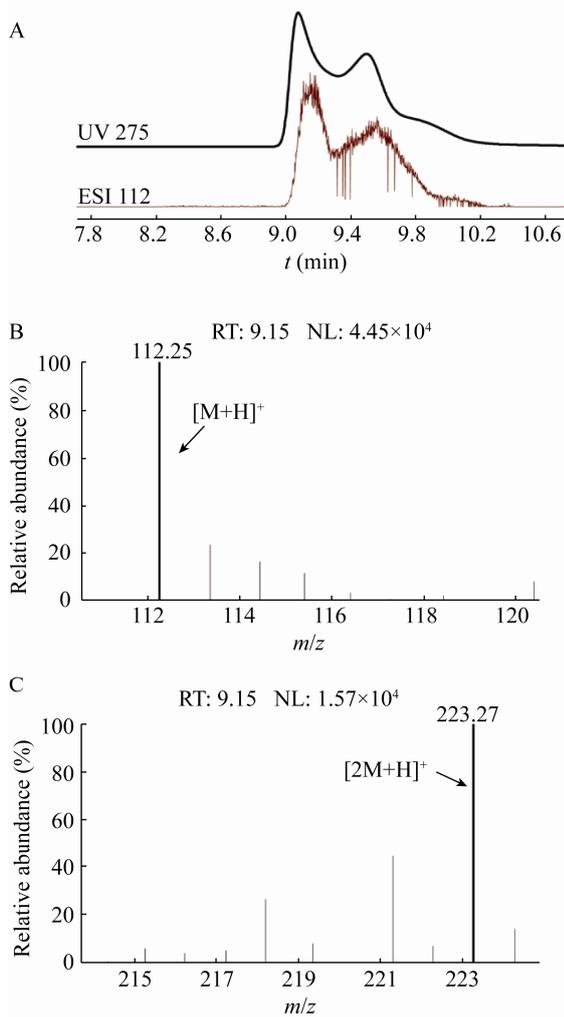


图 8 LC-MS 对 *Staphylococcus aureus* CFE 样品的检测
Figure 8 LC-MS analysis of *Staphylococcus aureus* CFE

注: A: *Staphylococcus aureus* CFE 样品的液相图及提取离子流色谱图; B、C: *Staphylococcus aureus* CFE 样品的质谱图。

Note: A: Liquid chromatogram and extracted ion chromatogram of *Staphylococcus aureus* CFE; B, C: Mass spectrum of *Staphylococcus aureus* CFE.

由图 8-10 可见, 3 种细菌的 CFE 处理样品在胞嘧啶标准品的对应位置均可检测到响应强度在 1×10^3 以上的 m/z 112 $[M+1]^+$, 而且也可以检测到符合响应比例的 m/z 223 $[2M+1]^+$, 证明这 3 种细菌中存在游离的胞嘧啶。

3 讨论与结论

大部分微生物细胞内有活性很高的胞嘧啶脱

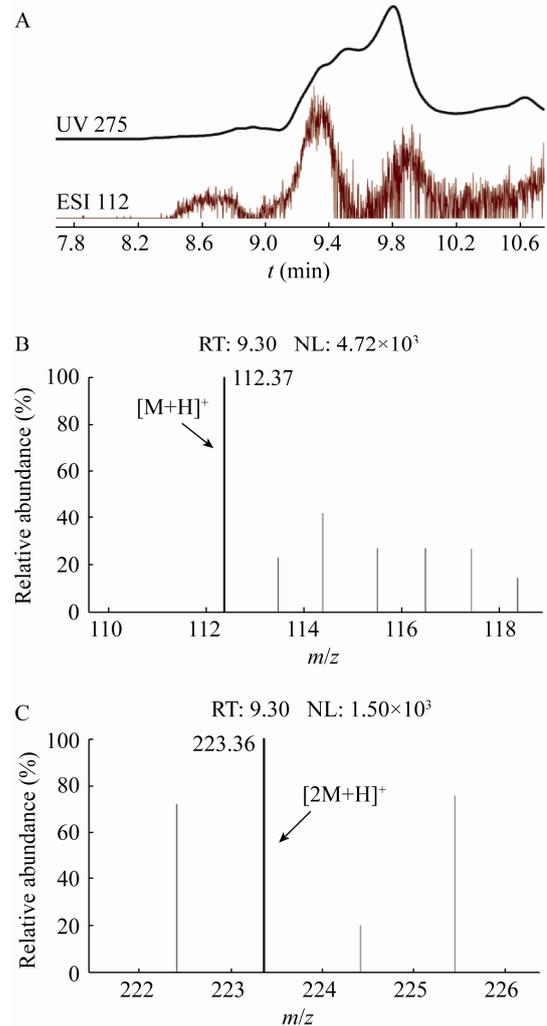


图 9 LC-MS 对 *Amycolatopsis mediterranei* CFE 中胞嘧啶的检测

Figure 9 LC-MS analysis of *Amycolatopsis mediterranei* CFE

注: A: *Amycolatopsis mediterranei* CFE 样品的液相图及提取离子流色谱图; B、C: *Amycolatopsis mediterranei* CFE 样品的质谱图。

Note: A: Liquid chromatogram and extracted ion chromatogram of *Amycolatopsis mediterranei* CFE; B, C: Mass spectrum of *Amycolatopsis mediterranei* CFE.

氨酶, 致使含胞嘧啶的核苷或脱氧核苷很快被转化成对应的尿嘧啶产物, 再进入后续的核酸代谢或充当 C/N 源^[16,30]。因此, 多数微生物细胞内游离的胞嘧啶很少, 只有少部分缺少脱氨酶的微生物会在核苷或脱氧核苷转移的过程中产生少量的游离胞嘧

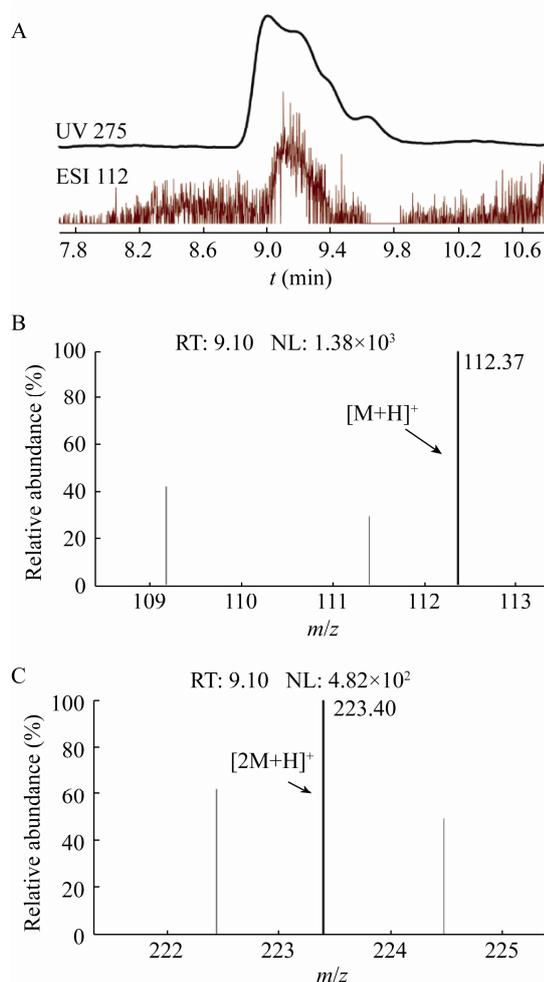


图 10 LC-MS 对 *Bacillus subtilis* CFE 样品的检测

Figure 10 LC-MS analysis of *Bacillus subtilis* CFE

注: A: *Bacillus subtilis* CFE 样品的液相图及提取离子流色谱图; B、C: *Bacillus subtilis* CFE 样品的质谱图.

Note: A: Liquid chromatogram and extracted ion chromatogram of *Bacillus subtilis* CFE; B, C: Mass spectrum of *Bacillus subtilis* CFE.

啶^[16]。Grochowski 等克隆并表征了一个 CMP 水解酶 BlsM, 可以形成游离的胞嘧啶^[20], 后者与葡萄糖醛酸缩合生成杀稻瘟菌素的核心结构——胞嘧啶葡萄糖醛酸(cytosylglucuronic acid, CGA)^[31]。米多霉素与杀稻瘟菌素的结构类似, 其原始产生菌 *Streptoverticillium rimofaciens* ZJU5119 中编码了与 BS 合成途径中 BlsM 同源的蛋白 MilB^[23], *milB* 缺失突变株不能产生米多霉素, 从侧面说明了 *Streptoverticillium rimofaciens* 体内游离胞嘧啶含量

极低。与此相反的是, 我们在 BS 异源表达菌株 *Streptomyces lividans* WJ2 中敲除 *blsM*, 突变株的发酵产物中依然能检测到 BS 及其他 3 种最终组分, 但是产量较出发菌株 WJ2 下降了约 70%。这表明 *Streptomyces lividans* 与 *Streptoverticillium rimofaciens* 相比, 其体内存在较多的游离胞嘧啶, 足够供给 BS 的生物合成。本文基于 LC-MS 建立了一种灵敏的细胞液胞嘧啶含量的检测方法, 证明了 *Streptomyces lividans* 体内游离胞嘧啶的存在, 打破了人们认为微生物细胞内游离胞嘧啶含量很少的认知。这个发现表明少部分微生物的初级代谢产物可以参与到次级代谢过程中。通过该方法, 我们又筛选到了体内游离胞嘧啶含量较高的另外 3 种细菌, 分别为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、地中海拟无枝酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*)及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 这为寻找其他游离胞嘧啶含量较高的特殊菌株奠定了基础, 同时也为探究少数微生物体内游离胞嘧啶含量较高的原因提供了理论依据。

3.1 *Streptomyces lividans* 体内游离胞嘧啶的来源及产生方式

因为微生物体内的胞嘧啶并不是直接从头合成的^[8,16], 所以推测 *Streptomyces lividans* 体内游离的胞嘧啶来源有两种。一是类似 BS 核苷部分的胞嘧啶, 来自于 CMP 的水解; 二是来自于其他包含胞嘧啶的核苷或核苷酸, 包括胞苷、脱氧胞苷、脱氧胞苷单磷酸(deoxycytidine monophosphate, dCMP)、胞苷二磷酸(cytidine diphosphate, CDP)、脱氧胞苷二磷酸(deoxycytidine diphosphate, dCDP)、CTP 及/或脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate, dCTP)等。针对底物来源的不同, 我们推测 *Streptomyces lividans* 可能存在 BlsM 的同工酶, 或存在作用于其他含胞嘧啶底物的酶。

3.2 *Streptomyces lividans* 体内游离胞嘧啶存在的意义

大部分微生物体内的嘧啶代谢过程并不会产生游离的胞嘧啶, 含有胞嘧啶的核苷或核苷酸会

在脱氨后进一步水解成游离的尿嘧啶，再进行分解代谢，或重新进入到核苷酸的合成过程中^[16]。少数微生物具有反式-N-脱氧核苷酶(trans-N-deoxyribosylase)，其可以独立催化脱氧核糖糖基在嘌呤碱基与嘧啶碱基之间转移，因而在核酸代谢过程中会产生游离的胞嘧啶^[17-18]。因此，*Streptomyces lividans* 体内的核酸代谢可能与大部分微生物不同，存在类似的反式脱氧核糖核酸酶，在核酸代谢过程中会生成游离的胞嘧啶，致使其含量一直保持在较高水平。

3.3 金黄色葡萄球菌等细菌中游离胞嘧啶的产生方式及意义

通过对 10 种微生物 CFE 处理液进行 LC-MS 检测，发现其中金黄色葡萄球菌、地中海拟无枝酸菌及枯草芽孢杆菌体内存在游离的胞嘧啶，并且金黄色葡萄球菌体内游离胞嘧啶含量很高。我们推测这 3 种细菌核酸代谢途径中拥有共同点，可能存在特殊的酶水解主代谢中含胞嘧啶的底物，或在进化过程中存在一定的亲缘关系。

目前，微生物体内存在的能产生游离胞嘧啶的酶可分为两类，分别是嘧啶主代谢中所需的酶，包括负责在嘌呤与嘧啶之间转移核糖或脱氧核糖的反式-N-脱氧核苷酶；以及在次级代谢产物生物合成基因簇中所涉及到的酶，包括 BS 合成基因簇中编码的 BlsM^[20]、精霉素合成基因簇中编码的 ArgD^[21]、米多霉素合成基因簇中编码的 MilB^[22] 及巨杆菌素(bacimethrin)合成基因簇中编码的 BcmB^[32]等。在变铅青链霉菌和金黄色葡萄球菌等 4 种细菌体内发现的游离胞嘧啶，可能来源于主代谢中含胞嘧啶的底物，其被特殊的酶水解以满足核酸代谢的需求，但游离胞嘧啶确切的来源及存在意义仍需后续研究进行探索。对 *Streptomyces lividans* 等细菌体内游离胞嘧啶来源的研究，能完善细菌体内嘧啶代谢途径，增强对微生物体内核酸代谢的认识，对于研究微生物次级代谢中主代谢的协同作用提供了一定的借鉴意义。

REFERENCES

- [1] Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Essential Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2008: 479 (in Chinese)
王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 479
- [2] Xu JF, Du XN, Wang W, et al. Synthesis of isotope labeled cytosine[J]. Chemical Reagents, 2016, 38(6): 572-574,578 (in Chinese)
徐建飞, 杜晓宁, 王伟, 等. 同位素标记胞嘧啶的合成研究[J]. 化学试剂, 2016, 38(6): 572-574,578
- [3] Chakraborty S, Ganguly S, Desiraju GR. Synthon transferability probed with IR spectroscopy: cytosine salts as models for salts of lamivudine[J]. CrystEngComm, 2014, 16(22): 4732-4741
- [4] Hu TJ, Gong AQ, He Q. Synthesis of decitabine[J]. Guangdong Chemical Industry, 2013, 40(15): 47-48 (in Chinese)
扈田进, 龚爱琴, 何秋. 地西他滨的合成[J]. 广东化工, 2013, 40(15): 47-48
- [5] Colacino E, Converso A, Liguori A, et al. Simple and efficient routes for the preparation of isoxazolidinyl nucleosides containing cytosine and 5-methyl-cytosine as new potential anti-HIV drugs[J]. Tetrahedron, 2001, 57(40): 8551-8557
- [6] Wang YL, Wang ZH, Zeng XY. Progress on vaccine adjuvant CpG ODN[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2011, 38(6): 49-52 (in Chinese)
王亚丽, 王振华, 曾宪垠. 疫苗佐剂胞嘧啶—鸟嘌呤寡脱氧核苷酸的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(6): 49-52
- [7] Perumalla SR, Pedireddi VR, Sun CC. Design, synthesis, and characterization of new 5-fluorocytosine salts[J]. Molecular Pharmaceutics, 2013, 10(6): 2462-2466
- [8] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry[M]. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2002: 1033-1035
- [9] Neuhaard J, Nygaard P. Purines and pyrimidines[A]//Neidhardt FC. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology[M]. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987: 445-473
- [10] Otterlei M, Kavli B, Standal R, et al. Repair of chromosomal abasic sites *in vivo* involves at least three different repair pathways[J]. The EMBO Journal, 2000, 19(20): 5542-5551
- [11] Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid[J]. Biochemistry, 1972, 11(19): 3610-3618
- [12] Lindahl T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1974, 71(9):

- 3649-3653
- [13] Maiti A, Drohat AC. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CPG sites[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(41): 35334-35338
- [14] Rinas U, Hellmuth K, Kang R, et al. Entry of *Escherichia coli* into stationary phase is indicated by endogenous and exogenous accumulation of nucleobases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(12): 4147-4151
- [15] Imada A, Igarasi S. Ribosyl and deoxyribosyl transfer by bacterial enzyme systems[J]. *Journal of Bacteriology*, 1967, 94(5): 1551-1559
- [16] O'Donovan GA, Neuhaud J. Pyrimidine metabolism in microorganisms[J]. *Bacteriological Reviews*, 1970, 34(3): 278-343
- [17] Macnutt WS. The enzymically catalysed transfer of the deoxyribosyl group from one purine or pyrimidine to another[J]. *Biochemical Journal*, 1952, 50(3): 384-397
- [18] Lampen JO, Wang TP. The mechanism of action of *Lactobacillus pentosus* nucleosidase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1952, 198(1): 385-395
- [19] Isono K. Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1988, 41(12): 1711-1739
- [20] Grochowski LL, Zabriskie TM. Characterization of BlsM, a nucleotide hydrolase involved in cytosine production for the biosynthesis of blasticidin S[J]. *ChemBioChem*, 2006, 7(6): 957-964
- [21] Feng J, Wu J, Gao J, et al. Biosynthesis of the β -methylarginine residue of peptidyl nucleoside arginomycin in *Streptomyces arginensis* NRRL 15941[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(16): 5021-5027
- [22] Zhao G, Wu G, Zhang Y, et al. Structure of the *N*-glycosidase MilB in complex with hydroxymethyl CMP reveals its Arg23 specifically recognizes the substrate and controls its entry[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(12): 8115-8124
- [23] Li L, Xu ZN, Xu XY, et al. The mildiomycin biosynthesis: initial steps for sequential generation of 5-hydroxymethylcytidine 5'-monophosphate and 5-hydroxymethylcytosine in *Streptovorticillium rimofaciens* ZJU5119[J]. *ChemBioChem*, 2008, 9(8): 1286-1294
- [24] Niu GQ, Li L, Wei JH, et al. Cloning, heterologous expression, and characterization of the gene cluster required for gougerotin biosynthesis[J]. *Chemistry & Biology*, 2013, 20(1): 34-44
- [25] Li L, Wu J, Deng ZX, et al. *Streptomyces lividans* blasticidin S deaminase and its application in engineering a blasticidin S-producing strain for ease of genetic manipulation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(7): 2349-2357
- [26] Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, et al. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 204-211
- [27] Gust B, Challis GL, Fowler K, et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4): 1541-1546
- [28] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. *Practical Streptomyces Genetics*[M]. 2nd ed. Norwich: The John Innes Foundation, 2000
- [29] Wang XK, Du AQ, Yu GY, et al. Guanidine *N*-methylation by BlsL is dependent on acylation of beta-amine arginine in the biosynthesis of blasticidin S[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1565
- [30] Neuhaud J. Pyrimidine nucleotide metabolism and pathways of thymidine triphosphate biosynthesis in *Salmonella typhimurium*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1968, 96(5): 1519-1527
- [31] Gould SJ, Guo JC. Cytosylglucuronic acid synthase (cytosine: UDP-glucuronosyltransferase) from *Streptomyces griseochromogenes*, the first prokaryotic UDP-glucuronosyltransferase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(5): 1282-1286
- [32] Sikowitz MD, Cooper LE, Begley TP, et al. Reversal of the substrate specificity of CMP *N*-glycosidase to dCMP[J]. *Biochemistry*, 2013, 52(23): 4037-4047