

研究报告

CMP 羟甲基化酶 MilA 中与甲基羟化过程
相关的关键氨基酸定点突变分析高土玲^{1,2} 陈诚² 赵功² 邓子新² 胡申才^{1*} 贺新义^{2*}

(1. 武汉工业学院 生物与制药工程学院 湖北 武汉 430023)

(2. 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:【目的】米多霉素生物合成起始反应的 MilA 蛋白可以使底物胞苷酸单磷酸(CMP)的胞嘧啶碱基 C5 位上形成羟甲基化, 形成羟甲基化胞苷酸(HmCMP), MilA 是迄今发现的首个能够高效利用 CMP 的羟甲基化酶。MilA 属于脱氧胸苷酸合成酶(TS)和脱氧胞苷酸羟甲基化酶(CH)蛋白超家族, 通过三维结构预测发现它们的三维结构非常相似, CH94 上的丝氨酸曾被证明与胞嘧啶上甲基变成羟甲基过程有关, MilA102 上对应的氨基酸为苏氨酸, TS91 上对应的氨基酸为脯氨酸。因此, 突变 MilA 上第 102 位的苏氨酸, 考察该氨基酸对 CMP 和脱氧胞苷酸(dCMP)羟甲基化反应的影响。【方法】通过定点突变技术, 将 MilA 第 102 位的保守氨基酸苏氨酸(Threonine, T)分别点突变成缬氨酸(Valine, V)和亮氨酸(Leucine, L)。【结果】体外酶活实验结果显示, 相对于 MilA, MilA T102V 对于 CMP 的催化活性下降 87.1%, 对于 dCMP 的催化活性没有影响; 而 MilA T102L 均丧失了对于两种底物的活性。【结论】这表明 Thr102 对于 MilA 催化底物 CMP 形成 HmCMP 至关重要; 同时, 失去活性的仅比缬氨酸和野生型苏氨酸的链长多出了一个碳原子, 暗示其在与底物结合时形成了一定的空间位阻效应。Thr 在 102 位点的功能经过自然进化的微调有可能已经达到最优化。

关键词: 胞苷酸羟甲基化酶 MilA, 定点突变, 脱氧胞苷酸羟甲基化酶, 体外催化反应

Analysis of key amino acid involved in hydroxylation of methyl group
of CMP in CMP hydroxymethylase MilA by site-directed mutagenesisGAO Tu-Ling^{1,2} CHEN Cheng² ZHAO Gong² DENG Zi-Xin² HU Shen-Cai^{1*}
HE Xin-Yi^{2*}

(1. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China)

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

Abstract: [Objective] MilA, a cytidine 5'-monophosphate (CMP) hydroxymethylase which can

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2012CB721004)

*通讯作者: 贺新义: Tel: 86-21-62932943-2131; 邮箱: xyhe@sjtu.edu.cn

胡申才: Tel: 86-27-65023046; 邮箱: hushencai@163.com

收稿日期: 2013-01-28; 接受日期: 2013-03-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

convert CMP to 5-hydroxymethylcytidine-5'-monophosphate (HmCMP), was discovered and characterized in the mildiomycin biosynthetic pathway. MilA belongs to the superfamily of thymidylate synthase (TS) and cytidylate hydroxymethylase (CH), and was the only enzyme to date that was able to efficiently convert CMP other than dCMP to HmCMP. Three-dimensional structure prediction of MilA revealed high similarity to that of CH and TS. Ser94 of CH was proved to be a key residue mediating hydroxylation of the 5'-methyl cytosine of dCMP, corresponding residue is Thr102 in MilA and Pro92 in TS, respectively. In order to study the role of Thr102 in MilA, we constructed mutants MilA T102V and MilA T102L. **[Methods]** Based on above analysis, Thr102 of MilA was site-mutated into valine (Val, V) and leucine (Leu, L) to assay their catalytic efficiency. **[Results]** Compared to the wild type, activity of MilA T102V for CMP was significantly reduced by 87.1%, while that for dCMP was maintained at a similar level. By contrast, MilA T102L could not use CMP and dCMP any more. As for MilA T102L, the side chain of Leu102 was one carbon atom longer than both of Val102 and Thr102, implying that steric hindrance effect was involved in the substrate binding by MilA T102L. **[Conclusion]** The results demonstrated that Thr102 in MilA was essential for HmCMP formation. The function of MilAT102 may have reached optimization after naturally evolutionary fine-tuning.

Keywords: CMP hydroxymethylase, Site-directed mutagenesis, Deoxycytidylate hydroxymethylase, *In vitro* catalytic reaction

米多霉素是一类肽核苷类抗生素,对细菌和真菌都具有抑制活性,尤其对植物的白粉病具有很强的抑制活性^[1]。目前,市场上销售的是日本武田药业(TAKADA)生产的米多霉素可湿性粉剂,它具有杀灭真菌作用。

米多霉素的生物合成基因簇被克隆,其起始合成步骤被阐明,如图 1 所示,在 MilA 的催化作用下, CMP 转化成 HmCMP, 随后 MilB 将 HmCMP 水解,形成米多霉素的生物合成前体物 5-羟甲基胞嘧啶(5-hmC)^[2]。体外实验同时揭示,它 also 具有微弱转化 dCMP 形成 HmdCMP 的能力^[3],它是迄今发现的首个能够高效利用核糖底物的羟甲基化酶。MilA 蛋白序列分析表明,该酶属于胸苷酸合成酶(TS)和脱氧胞苷酸羟甲基化酶(CH)超家族^[2]。

TS 是一类广泛存在于自然界的保守酶类。它利用亚甲基四氢叶酸作为甲基供体,以 Cys198 作为亲核氨基酸与 dUMP 的 C6 形成共价键,从而诱发随后的 dUMP C5 位置的甲基化反应,生成 dTMP,后者再被磷酸化形成 DNA 合成中的重要底物 dTTP。这个过程是 dTTP 从头合成的唯一途径^[4]。MilA 所在超家族中的一个典型蛋白就是存在于噬菌体中的脱氧胞苷酸羟甲基化酶

(Deoxycytidylate hydroxymethylase, CH), 它也是利用亚甲基四氢叶酸作为甲基供体,催化 dCMP C5 位置的甲基化反应,生成 HmdCMP,后被磷酸化形成 HmdCTP,用于组装噬菌体 DNA^[5]。这种羟甲基化修饰的噬菌体 DNA 能够躲过宿主的限制修饰系统,使得噬菌体得以感染宿主并繁殖^[6]。Graves 等于 1992 年利用定点突变技术,发现 dCMP 羟甲基化酶与胸苷酸合成酶的催化机制类似,它们都利用活性口袋中的 Cys 作为重要的亲核氨基酸^[7]。Butler 等于 1994 年利用 ¹⁸O 交换实验,首次证明 dCMP 羟甲基化酶是利用溶剂水作为底物^[8], Song 等于 1999 年解析了 CH 与底物 dCMP 的共结晶结构,发现位于胞嘧啶 C6 位附近的一个水分子在最后一步羟化过程中被加载到 C7 亚甲基中间体上,其中 Ser94 位在水分子结合和加载上起到关键作用(图 2)^[9]。陈诚等通过生物信息学软件预测发现, MilA 三维结构与 CH 晶体结构相似^[3],并随后利用同位素标记的 H₂¹⁸O 喂养实验验证实在 MilA 的催化反应中羟基的供体也是水分子(图 3)^[10]。该结果证明 MilA 与 CH 具有相似的催化机制。从 CH 和 MilA 的氨基酸序列的比对结果中可以看出,CH 在 94 位上的氨基酸为丝氨酸,而 MilA

在对应的位置上是苏氨酸, 同为带有羟基的氨基酸, 并且都是短侧链氨基酸。而只能形成甲基化的胸苷酸合成酶 TS 对应的位置却是脯氨酸(图 4)。本研究尝试将 MilA 的 102 位上的保守氨基酸(苏氨酸)

单突变成结构与其相近但不含羟基的氨基酸即缬氨酸和亮氨酸(图 5), 来考察其对 CMP 和 dCMP 羟甲基化反应的影响。同时期望能够阻止羟甲基化的发生, 以获得具有甲基化酶活性的新酶。

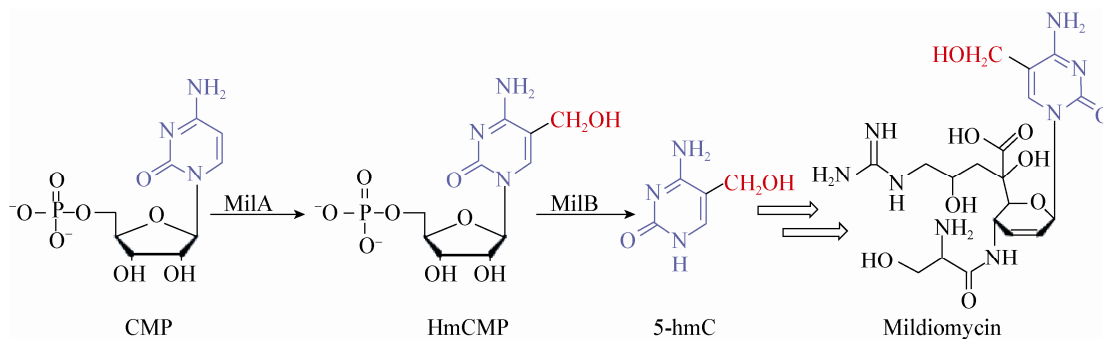


图 1 MilA 催化反应形成米多霉素的前体物 HmCMP

Figure 1 Precursor HmCMP was synthesized by MilA

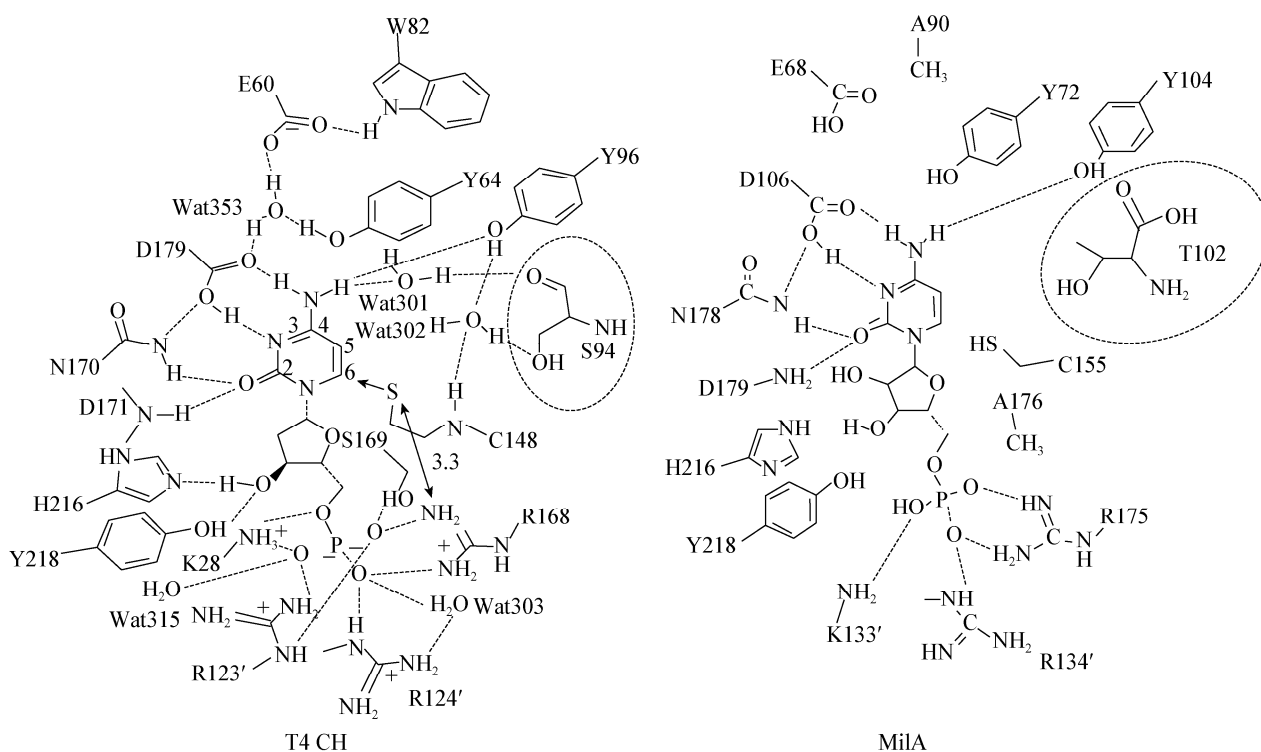


图 2 dCMP 羟甲基化酶^[9]和预测的 MilA 底物结合位点处的氢键网络

Figure 2 Schematic diagram of the hydrogen-bond network in the active sites of dCMP hydroxymethylase^[9] and predicted MilA

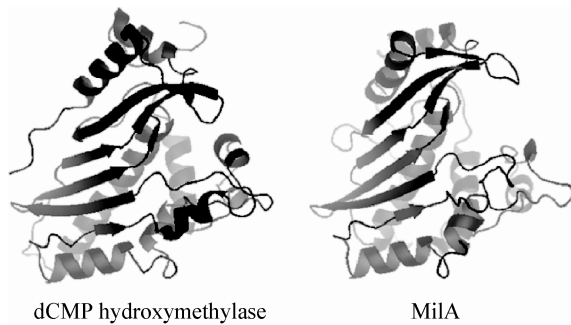


图 3 dCMP 羟甲基化酶晶体结构^[9]和 MilA 的预测结构^[3]

Figure 3 Crystal structure of dCMP hydroxymethylase^[9] and predicted structure of MilA^[3]

	102
TS1:	WDEWADENG-----DLGPNYKQWRAPWT---
TS2:	WDEWADENG-----DLGPNYKQWRAPWT---
TS3:	WDEWADENG-----DLGPNYKQWRAPWT---
TS4:	WDEWADENG-----DLGPNYKQWRAPWT---
TS5:	WDANGSRDFLDLGFSTREEG-DLGPNYKQWRHFGAEYR
TSP1:	WDENYENQAKD-LGYHSG---ELGPNYKQWRDFG---
TSP2:	WDQNFEEAQQRA-LGYVDG---ELGPNYKQWRDFG---
TSP3:	WDANYEEQAIN-LGYSDG---YLGPNYKQWRQFGN---
C1:	WQQVASSKG-----EINSNYG---WAIWSE---
C7:	WQQVASSKG-----EINSNYG---WAIWSE---
milA:	AAYSADGRT-----LRGTAYGPRIFRHPA---
A1:	RKYSMDGRT-----LTGTAYGAKLFRFGG---
A2:	PSYSMNKKT-----LTGTAYGPKIFEFNG---
A3:	PDYSMDGQT-----LTGTAYGKKLFHFGE---
A4:	KKYSMDGKT-----LTGTAYGPKIFSFEY---
A5:	ARYSPDGKT-----LPGTGYGARLLHFGD---
A6:	ARYSPDGKH-----LPGTGYGARLLHYGE---

图 4 MilA 及其同源蛋白与胸苷酸合成酶以及 dCMP 羟甲基化酶的部分氨基酸序列比对

Figure 4 Alignment of a MilA segment and its homologs with known thymidylate synthases and cytidylate hydroxymethylases

注: TS1-TSP3: 胸苷酸合成酶同源蛋白; C1、C2: dCMP 羟甲基化酶同源蛋白; A1-A6: MilA 同源蛋白. 蓝色氨基酸残基被证明与羟甲基化相关. 红色部分氨基酸残基被认为与羟甲基化过程有关.

Note: TS1-TSP3: Homologs of thymidylate synthase; C1, C2: Two cytidylate hydroxymethylases; A1-A6: Six putative MilA homologs. Residue in blue is essential for hydroxylation; Residue Thr102 in red is considered as critical in the hydroxylation process.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 本实验所用的菌株和质粒分别见表 1 和表 2。

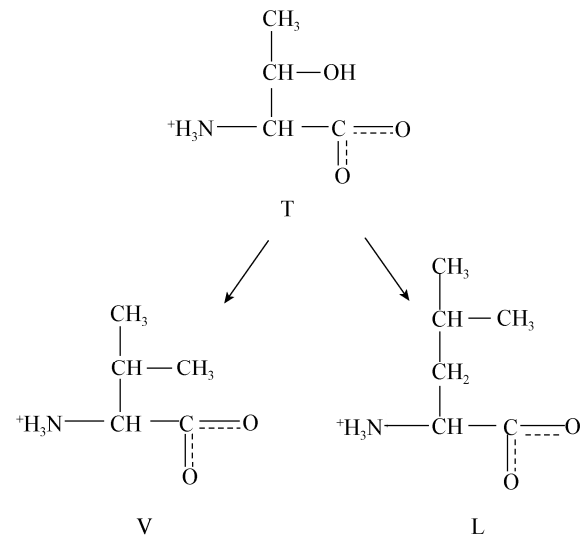


图 5 苏氨酸(T)和缬氨酸(V)及亮氨酸(L)的化学结构

Figure 5 Chemical structure of threonine, valine and leucine

1.1.2 酶与试剂: 聚合酶链式反应(PCR)所用试剂, 限制性内切酶, T4 连接酶, 购于 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒, 胶回收试剂盒, PCR 产物回收试剂盒 购于 Qiagen 公司; 点突变试剂盒 (QuickChange@Site-Directed Mutagenesis Kit) 购于 Stratagene 公司; 镍离子纯化预装柱 (Hisrap@FFcrude1mE) 为 Pharmacia 产品, 购于 GE 公司; 咪唑购于 Sigma 公司。

LB (Luria-Bertani) 培养基^[11]用于培养大肠杆菌。

1.1.3 寡聚核苷酸引物: 设计 T102V、T102L 的突变引物(表 3), 引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 MilA 定点突变: 以 MilA 野生型表达质粒 pJTU2955 作为模板, 用引物 T102V、T102L 分别进行反向 PCR, 扩增后得到的产物经过 Dpn 酶切消化后, 转化 DH10B 感受态。转化子送去测序, 然后从测序正确的转化子中提取相应的质粒转化 BL21(DE3)感受态得到 MilA T102V 和 MilA T102L 的大肠杆菌表达菌株。

表 1 研究中所用菌株及主要特征
Table 1 Strains used in this study

大肠杆菌 <i>E. coli</i>	特征 Characteristics	来源或出处 Source or reference
DH10B	F ⁻ , recA, lacZ, ΔM15	GIBCO BRL
BL21(DE3)	F ⁻ ompT rB ⁻ mB ⁻ (λDE3) pLysE Cmr	Novagen
MilA	MilA 表达菌株	陈诚
MilA T102V	引入 T102V 突变的 MilA 表达菌株	本研究
MilA T102L	引入 T102L 突变的 MilA 表达菌株	本研究

表 2 研究中所用质粒及主要特征
Table 2 Plasmids used in this study

质粒 Plasmids	特征 Characteristics	来源或出处 Source or reference
pJTU2955	MilA 插入到 pET28a 的 <i>Nde</i> I 和 <i>Xho</i> I 的位点上	李力
pJTU485	以 pJTU2955 为模板进行反向 PCR 引入突变 T102V	本研究
pJTU486	以 pJTU2955 为模板进行反向 PCR 引入突变 T102L	本研究

表 3 本实验所用 PCR 引物
Table 3 PCR primers used in this study

Primers	Forward (F, 5' → 3')	Reverse (R, 5' → 3')
T102V	GACCCTGCGGGGCCAGGCCTACGGGCCCCG	CGGGGCCCCGTAGGCCTGGCCCCGCAGGGTC
T102L	GACCCTGCGGGGCGAGGCCTACGGGCCCCG	CGGGGCCCCGTAGGCCTCGCCCCGCAGGGTC

1.2.2 融合蛋白的表达与纯化 :含有融合表达质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)接种到含氯霉素(25 mg/L)和卡那霉素(50 mg/L)的 LB 培养基中 37 °C 培养过夜。然后以 1%的接种量接种到 1 L 的含相应抗生素的 LB 培养基中培养至 *OD*₆₀₀=0.6, 将培养温度降至 20 °C, 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 20 °C 培养过夜。

收集菌体, 利用超声破碎仪将细胞破碎, 高速离心后取细胞裂解液上清过镍重力柱, 用洗脱液 A (20 mmol/L 磷酸钠, 0.5 mol/L NaCl, 120 mmol/L 咪唑, pH 7.4)冲去杂质, 再用洗脱液 B (20 mmol/L 磷酸钠, 0.5 mol/L NaCl, 0.3 mol/L 咪唑, pH 7.4)冲出目标蛋白, 收集后用 12% SDS-PAGE 电泳鉴定。纯化后的蛋白用 30 kD 的超滤离心管于 3 000 r/min 离心 2 遍, 置换为 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.4)缓冲液, 加入甘油至浓度 50%,

保存于-80 °C, 以备用于催化反应。蛋白定量采用 Bradford 方法 (Bradford Protein Assay Kit, Bio-Rad 公司)。

1.2.3 MilA 及其突变蛋白的体外催化反应 :反应体系为 200 μL: Tris-HCl buffer (pH 7.5) 100 mmol/L, 多聚甲醛(Paraformaldehyde) 15 mmol/L, β-巯基乙醇 (2-Mercaptoethanol) 50 mmol/L, 四氢叶酸 (Tetrahydrofolate) 2 mmol/L, CMP 或 dCMP 1 mmol/L, MilA 或突变 MilA 100 μg。反应温度为 37 °C, 反应时间为 2 h, 到预定时间, 加入三氯乙酸(终浓度 4%)冰上放置 30 min 终止反应。产物和底物的分析采用 Agilent 1100 series LC/MSD Trap system。所用色谱柱为 Agilent TC-C18 (5 μm, 4.6 mm×250 mm)反向柱, 流动相为 20 mmol/L 乙酸氨 pH 5.5/HPLC 级乙腈(Merck 公司) (98:2, 体积比), 紫外吸收波长为 272 nm, 流速为 0.3 mL/min。

2 结果与分析

2.1 MilA 定点突变株的获得

以 MilA 野生型表达质粒 pJTU2955 作为模板, 用引物 T102V、T102L 分别进行反向 PCR, 扩增后得到的产物约 6.5 kb 的线性条带, 琼脂糖凝胶电泳结果如图 6 所示, 说明获得了相应的突变产物。将该产物转化 DH10B 感受态, 在含氯霉素(25 mg/L) 的 LA 平板上 37 °C 过夜培养, 得到转化子后转接入含有氯霉素抗生素(25 mg/L) 的 LB 培养基中, 220 r/min 摇床中 37 °C 培养。培养 4–5 h 后取 1 mL 菌液送公司测序。测序结果表明, 相应位点的碱基序列由 ACC 分别突变成 GTC (对应缬氨酸的密码子) 和 CTC (对应亮氨酸的密码子)。提取相应的质粒转化 BL21(DE3) 感受态得到 MilA T102V 和 MilA T102L 的大肠杆菌表达菌株。

2.2 突变蛋白的表达和纯化

为了进一步确认突变酶 T102V 和 T102L 能够正常表达, 对具有这些突变位点的突变株进行 100 mL 培养, 并进行目标蛋白的表达和纯化, 从图 7 中可以看出: 纯化得到的两个突变酶和亲本酶都大约在 38 kD 处显示出单一的电泳条带, 说明尽管发生了突变, 但是并没有影响目标蛋白的正常表达。

2.3 突变酶体外催化功能的分析

2.3.1 MilA 及其突变蛋白体外催化 CMP: 利用高效液相-质谱分析(LC-MS)分别检测 MilA、T102V 和 T102L 的催化反应产物, 检测结果如图 8

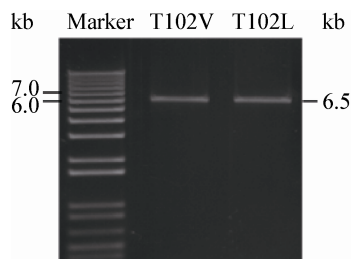


图 6 引入突变的反向 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Figure 6 The agarose electrophoresis of reverse PCR products containing mutation

所示。与我们预期的不同, 突变蛋白 T102L 和 T102V 并没有能够将 CMP (核质比为 324) 转化成甲基化 CMP (核质比为 338) 的功能。同时, 在 T102L 的催化反应产物中没检测到 HmCMP (核质比为 354), 这说明 T102L 丧失了催化 CMP 的能力。相对于 T102L、T102V 表现出了微弱的酶活力, 在

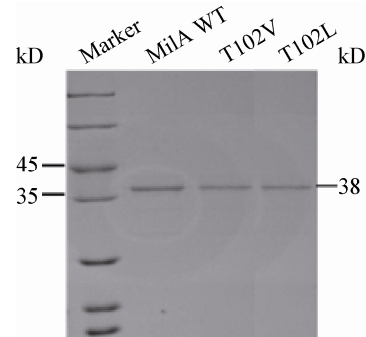


图 7 重力柱 300 mmol/L 咪唑洗脱蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Figure 7 SDS-PAGE analysis of proteins eluted by 300 mmol/L imidazole

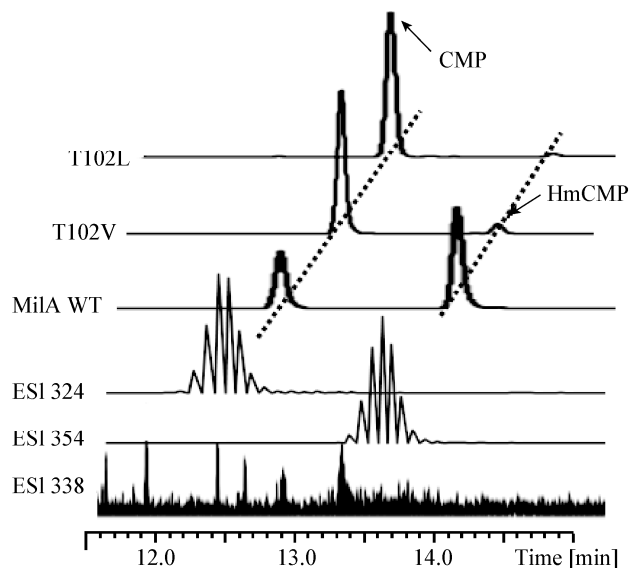


图 8 LC-MS 检测 MilA 及其突变酶与 CMP 的体外反应产物

Figure 8 LC-MS analysis of reaction products by MilA and its mutants with CMP

注: ESI: 电喷雾离子化; 虚线连接峰: 底物 CMP 和产物 HmCMP.

Note: ESI: Electrospray ionization; The peaks linked by dotted line: Substrate CMP and product HmCMP, respectively.

其催化产物中不但能够检测到核质比为 354 的 HmCMP 分子量,而且还检测到了相应的紫外吸收峰。由此可知, T102V 保留了对 CMP 的识别作用。

在反应体系一致的情况下,比较了 MilA 和 T102V 对底物 CMP 的催化活性,如表 4 所示, MilA 催化生成 HmCMP 的量与初始 CMP 总量之比达到了 47.2%,而 T102V 仅为 6.1%。相对于 MilA, T102V 对于 CMP 的催化活性下降了 87.1%。

上述实验结果表明,突变酶的活性相比于亲本酶都有了大幅下降,但是突变酶 T102V 仍保留较小的活性, T102L 却完全丧失了催化 CMP 的转化能力。这可能是由于亮氨酸比缬氨酸的侧链长(图 5),其所形成的底物结合口袋更小,使 CMP 难于与 T102L 结合。

由于 MilA 与 CH 具有相似的催化机制,并且在 CH 中对应的 94 位上的丝氨酸位于底物结合口袋中,与水分子形成氢键。因此,根据以上实验结果,我们推测 MilA 的 Thr102 是形成 MilA 底物结合口袋的关键氨基酸。这个位点处由于苏氨酸侧链较小,使得 MilA 底物结合口袋较大,对于底物 CMP 没有空间阻碍,从而能够识别并高效利用 CMP。而将 Thr102 分别突变为 3 碳链长的缬氨酸和 4 碳链长的亮氨酸后,其侧链逐渐增大,减小了底物结合口袋,从而使 CMP 与底物结合口袋形成空间位阻,在不同程度上抑制了催化反应的进行。

2.3.2 MilA 及其突变蛋白体外催化 dCMP: 为了进一步分析这 2 个突变酶的功能,将 MilA 及两个突变酶分别与 dCMP 进行体外反应。结果如图 9 所示,相对于 MilA, T102V 催化 dCMP 反应生成 HmdCMP 的能力微弱的提高。而 T102L 突变完全

使其丧失了催化 dCMP 的活性, MS 结果中无法检测到产物 HmdCMP 的形成。该实验更进一步证实了当把 MilA 的 Thr102 单突变成亮氨酸时,该突变株完全丧失催化 CMP 和 dCMP 活性。

根据 Song 等于 1999 年绘制的 dCMP 羟甲基化酶活性位点处关键氨基酸与 dCMP 的氢键网络,同时结合陈诚对 MilA 的三维结构与 dCMP 羟甲基化酶比较的结果,预测出 MilA 与底物 CMP 可能存在的氢键作用,如图 2 所示,虚线圈中的氨基酸是本研究试图突变的目标氨基酸(T102)。该氨基酸的侧链带有亲水性的羟基,能与 H₂O 分子形成氢键,而突变后的缬氨酸和亮氨酸的侧链均属于疏水的 R 基氨基酸,无法与水分子形成氢键,可能也是导致 T102V 和 T102L 活力大幅下降的主要原因。

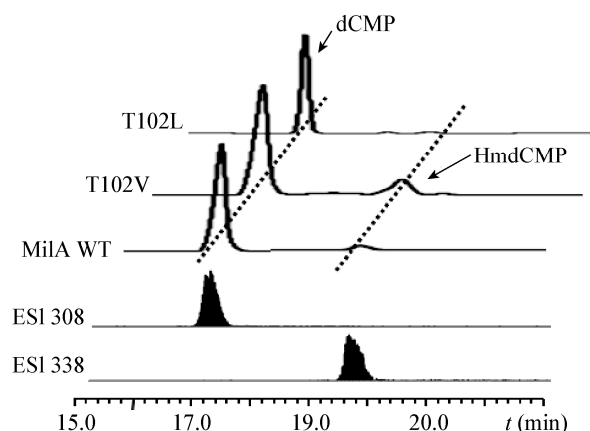


图 9 LC-MS 检测 MilA 及其突变酶与 dCMP 的体外反应产物

Figure 9 LC-MS analysis of reactions of MilA and mutants with dCMP

注: ESI: 电喷雾离子化; 虚线连接峰: 底物 dCMP 和产物 HmdCMP.

Note: ESI: Electrospray ionization; The peaks linked by dotted line: Substrate CMP and product HmCMP, respectively.

表 4 野生型 MilA 及其突变酶 T102V 对 CMP 催化效率

Table 4 Catalytic efficiency of MilA and MilA T102V on CMP

酶 Enzyme	初始 CMP 的峰面积 The peak area of initial CMP	生成 HmCMP 的峰面积 Peak area of HmCMP	催化效率 Catalytic efficiency (%)
MilA	6 987.9	3 300.7	47.2
T102V	6 989.3	427.8	6.1

3 结论

异源表达并纯化了 2 个单突变酶 MilA T102V 和 T102L, 这 2 个突变都引入了侧链较长的氨基酸, 即减小了 MilA 底物结合口袋的大小。体外实验表明, T102V 保留了亲本酶原有的对 dCMP 的催化能力, 而相对于亲本酶 MilA, 其对 CMP 的催化活性下降了 87.1%; T102L 对 CMP 和 dCMP 的催化活性几乎丧失。说明 Thr102 在 MilA 与底物 CMP 结合中具有重要的作用, 仅将侧链改变却使突变酶的活性急剧下降, 表明 Thr 在 102 位点的功能经过自然进化的微调可能已经达到最优化, 也证明了 Thr 在 102 位点的保守性可能是由于维持功能的需要。而且 MilA 酶活力表现出了对亲水残基很强的偏好性, 说明在 102 位点具有亲水残基的 Thr 比具有疏水残基 Val 和 Leu 更适合酶与底物 CMP 的结合。

参考文献

- [1] Iwasa T, Suetomi K, Kusaka T. Taxonomic study and fermentation of producing organism and antimicrobial activity of mildiomycin[J]. Journal of Antibiot (Tokyo), 1978, 31(6): 511-518.
- [2] Li L, Xu Z, Xu X, et al. The mildiomycin biosynthesis: initial steps for sequential generation of 5-hydroxymethylcytidine 5'-monophosphate and 5-hydroxymethylcytosine in *Streptovercillium rimofaciens* ZJU5119[J]. ChemBioChem, 2008, 9: 1286-1294.
- [3] 陈诚. 胞苷酸羟甲基化酶 MilA 的酶学特性研究及改造[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2012.
- [4] Hardy LW, Finer-Moore JS, Montfort WR, et al. Atomic structure of thymidylate synthase: target for rational drug design[J]. Science, 1987, 235(4787): 448-455.
- [5] Lam N, Wang Y, Mathews CK, et al. Deoxycytidylate hydroxymethylase gene of bacteriophage T4[J]. European Journal of Biochemistry, 1988, 172(3): 553-563.
- [6] Greenberg GR, He P, Hilfinger J, et al. Deoxyribonucleoside triphosphate synthesis and phage T4 DNA replication[M]. Molecular Biology of Bacteriophage T4, 1994, 14-27.
- [7] Graves KL, Butler MM, Hardy LW. Roles of Cys148 and Asp179 in catalysis by deoxycytidylate hydroxymethylase from bacteriophage T4 examined by site-directed mutagenesis[J]. Biochemistry, 1992, 31(42): 10315-10321.
- [8] Butler MM, Graves KL, Hardy LW. Evidence from ^{18}O exchange studies for an exocyclic methylene intermediate in the reaction catalyzed by T4 deoxycytidylate hydroxymethylase[J]. Biochemistry, 1994, 33: 10521-10526.
- [9] Song HK, Sohn SH, Suh SW. Crystal structure of deoxycytidylate hydroxymethylase from bacteriophage T4, a component of the deoxyribonucleoside triphosphate-synthesizing complex[J]. The EMBO Journal, 1999, 18: 1104-1113.
- [10] Chen C, Gao T, Zhao G, et al. Evidence from ^{18}O feeding studies for hydroxyl group donor in the reaction catalyzed by cytidylate hydroxymethylase MilA[J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(8): 864-868.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是:(1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。