

## · 医药中间体生物合成 ·

**谢希贤** 天津科技大学教授、博士生导师、学术委员会委员。入选国家“万人计划”科技创新领军人才，科技部中青年科技创新领军人才，天津市中青年科技创新领军人才。现任工业发酵微生物教育部重点实验室主任、合肥和晨生物科技有限公司首席科学家、天津微生物学会理事、天津市食品学会理事。长期从事合成生物学和代谢工程等领域的教学和科研工作，建立并完善了一整套高效的微生物育种平台。坚持产品导向，通过自主知识产权的工程菌构建，以及绿色高效的配套生产工艺开发，实现高附加值发酵产品的生产。与国内多家发酵龙头企业合作，实现多个高附加值发酵产品的产业化，包括千万级项目 2 项。



# 代谢工程改造大肠杆菌生产胸苷

姚卓越<sup>1</sup>，李然<sup>1</sup>，蒋帅<sup>1</sup>，吴鹤云<sup>1,2</sup>，马倩<sup>1,2</sup>，谢希贤<sup>1,2\*</sup>

1 天津科技大学 生物工程学院，天津 300457

2 天津科技大学 工业发酵微生物教育部重点实验室，天津 300457

姚卓越，李然，蒋帅，吴鹤云，马倩，谢希贤. 代谢工程改造大肠杆菌生产胸苷[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2432-2443.  
YAO Zhuoyue, LI Ran, JIANG Shuai, WU Heyun, MA Qian, XIE Hixian. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for thymidine production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2432-2443.

**摘要：**胸苷作为抗艾滋病药物(叠氮胸苷和司他夫定)的关键前体物，在医药行业具有很大的应用潜力。本研究以野生型大肠杆菌(*Escherichia coli*) MG1655 为底盘微生物，采用系统代谢工程策略重构大肠杆菌中胸苷合成途径，构建了一株高效合成胸苷的工程菌株。首先，依次敲除 *deoA*、*tdk*、*udp*、*rihA*、*rihB*、*rihC* 基因，以阻断胸苷的分解途径和补救途径；随后，引入来源于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) F126 的嘧啶核苷操纵子基因，以增强前体物尿苷酸合成途径代谢通量；最后，依次优化胸苷合成途径中尿苷酸激酶、核糖核苷二磷酸还原酶、胸苷酸合酶和 5'-核苷酸酶的表达，以强化尿苷至胸苷合成途径代谢通量。所构建的 THY6-2 工程菌株在 5 L 分批补料发酵试验中胸苷产量为 11.10 g/L、转化率为 0.04 g/g 葡萄糖、生产强度为 0.23 g/(L·h)。本研究构建了以葡萄糖为唯一碳源且不携带质粒的高效合成胸苷工程菌株，为其他嘧啶核苷类产品的研发提供了借鉴。

**关键词：**胸苷；大肠杆菌；代谢工程；从头合成途径

资助项目：国家重点研发计划(2022YFA0911800)；国家自然科学基金(22378315, 32200038)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFA0911800) and the National Natural Science Foundation of China (22378315, 32200038).

\*Corresponding author. E-mail: xixianxie@tust.edu.cn

Received: 2024-01-10; Accepted: 2024-04-19; Published online: 2024-04-24

# Metabolic engineering of *Escherichia coli* for thymidine production

YAO Zhuoyue<sup>1</sup>, LI Ran<sup>1</sup>, JIANG Shuai<sup>1</sup>, WU Heyun<sup>1,2</sup>, MA Qian<sup>1,2</sup>, XIE Xixian<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract:** Thymidine, as a crucial precursor of anti-AIDS drugs (e.g., zidovudine and stavudine), has wide application potential in the pharmaceutical industry. In this study, we introduced the thymidine biosynthesis pathway into the wild-type *Escherichia coli* MG1655 by systems metabolic engineering to improve the thymidine production in *E. coli*. Firstly, *deoA*, *tdk*, *udp*, *rihA*, *rihB*, and *rihC* were successively deleted to block the thymidine degradation pathway and salvage pathway in the wild-type *E. coli* MG1655. Then, the pyrimidine nucleoside operons from *Bacillus subtilis* F126 were introduced to enlarge the metabolic flux of the uridylic acid synthesis pathway. Finally, the expression of uridylate kinase, ribonucleoside diphosphate reductase, thymidine synthase, and 5'-nucleotidase in the thymidine biosynthesis pathway was optimized to enhance the metabolic flux from uridylic acid to thymidine. The engineered THY6-2 strain produced 11.10 g/L thymidine in a 5 L bioreactor with a yield of 0.04 g/g glucose and productivity of 0.23 g/(L·h). In this study, we constructed a strain that used glucose as the only carbon source for efficient production of thymidine and did not harbor plasmids, which provided a reference for the research on other pyrimidine nucleosides.

**Keywords:** thymidine; *Escherichia coli*; metabolic engineering; *de novo* biosynthesis pathway

胸苷作为一种由 2-脱氧核糖和胸腺嘧啶碱基构成的天然核苷，是抗艾滋病药物叠氮胸苷和司他夫定的关键前体物<sup>[1]</sup>。目前，胸苷普遍采用化学合成法或酶法生产。但是，现有生产工艺存在胸苷产量低、环境污染严重和生产成本高昂等问题<sup>[2]</sup>。因此，开发廉价且高效的胸苷生产方法成为满足胸苷市场需求量的关键。随着系统代谢工程与合成生物学技术的迅速发展，基于微生物发酵法的胸苷生产工艺成为近年来的研究热点。其中，构建高效、稳定的胸苷生产细胞工厂是开发绿色、经济胸苷生产工艺的核心。

在微生物中，嘧啶核苷的合成途径主要有两种：一是利用葡萄糖、氮源等基质从头合成嘧啶核苷类物质，称为从头合成途径(*de novo* pathway)；

另一条是核苷酸代谢产生的胸腺嘧啶碱基、脱氧核糖和磷酸重新经过核糖基化、磷酸化生成嘧啶核苷，称为补救途径(*salvage pathway*)。以大肠杆菌为例，胸苷从头合成途径冗长，代谢通量受多种负反馈调节。除此之外，胸苷从头合成途径与 DNA 合成相关，多个关键酶的底物选择性较差，胸苷合成存在较多竞争途径(图 1)。因此，如何优化胸苷从头合成途径代谢通量分布与关键酶表达成为构建胸苷高效生产菌株过程中面临的挑战。近年来，研究人员主要采用阻断胸苷降解途径<sup>[3-4]</sup>、增强前体物供应<sup>[4-7]</sup>、优化胸苷合成途径<sup>[8-9]</sup>、平衡胞内氧化还原平衡<sup>[10]</sup>等策略修饰底盘微生物中胸苷合成途径代谢通量。其中，Kim 等<sup>[6]</sup>以大肠杆菌为出发菌株，通过阻断胸苷分解途径、删

除阻遏蛋白解除反馈抑制、强化异源酶以提高胸苷合成通量、修饰胞内氧化还原平衡等策略,得到的最终菌株以甘油为碳源发酵 120 h 后产生 13.2 g/L 胸苷。然而,现有胸苷工程菌株仍存在产量低、发酵周期长等问题。为了推动胸苷经济化大规模生产,构建高效、稳定的胸苷生产微生物细胞工厂依然是研究人员努力的方向。

本研究以野生型大肠杆菌(*Escherichia coli*) MG1655 为底盘菌株,采用系统代谢工程策略优化胸苷合成途径代谢通量分布及关键酶表达,以期获得高效合成胸苷的微生物细胞工厂。首先,依次敲除 *deoA*、*tdk*、*udp*、*rihA*、*rihB*、*rihC*

基因,以阻断胸苷分解途径和回补途径;随后,引入异源的嘧啶合成操纵子基因,以增强前体物尿苷酸(uridylic acid, UMP)的积累;最后,依次优化胸苷合成途径中尿苷酸激酶、核糖核苷二磷酸还原酶、胸苷酸合酶和 5'-核苷酸酶的表达。在 5 L 发酵罐中,构建的最优 THY6-2 工程菌株胸苷产量、转化率和生产强度分别达到了 11.10 g/L、0.04 g/g 葡萄糖、0.23 g/(L·h)。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

本研究所用的菌株与质粒如表 1 所示。

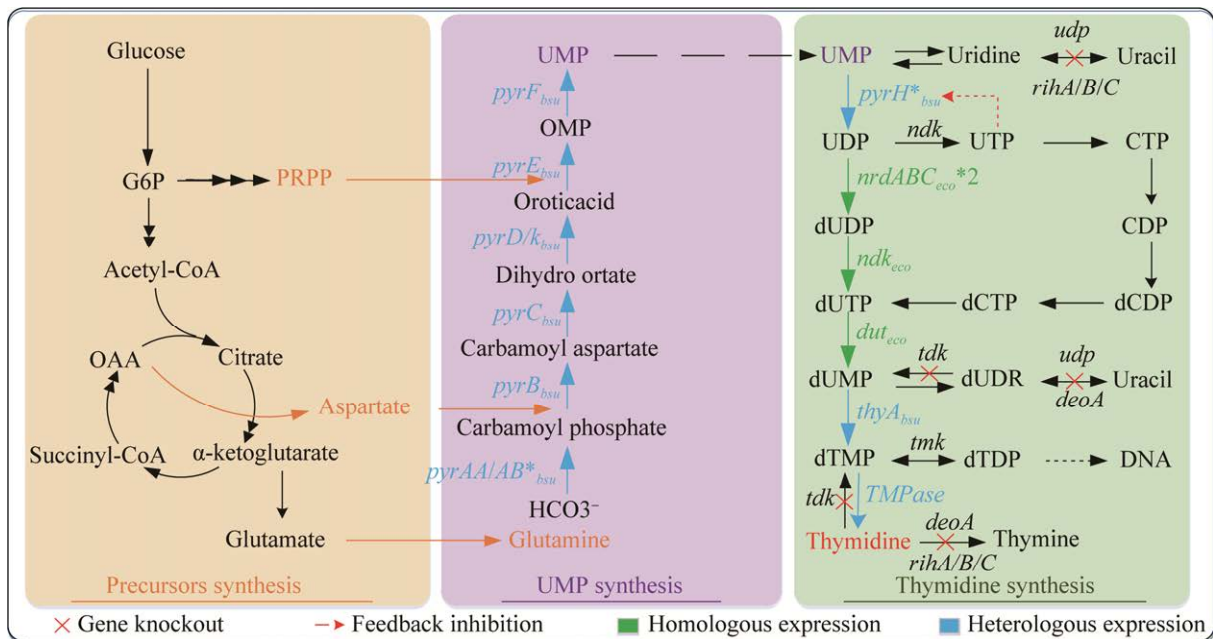


图 1 代谢工程改造大肠杆菌生产胸苷

Figure 1 Metabolic engineering of *Escherichia coli* for thymidine production. Genes and their corresponding enzymes were shown as follows: *pyrAA/AB*: Carbamoylphosphatase; *pyrB*: Aspartate carbamoyl transferase; *pyrC*: Dihydroorotase; *pyrD/K*: Dihydroorotate dehydrogenase; *pyrE*: Orotate phosphoribosyltransferase; *pyrF*: OMP decarboxylase; *pyrH*: Nucleoside phosphate kinase; *nrd*: Nucleotide diphosphate reductase; *ndk*: Nucleoside diphosphate kinase; *dut*: Deoxyribonucleotide triphosphatase; *thyA*: Thymidylate synthase; *TMPase*: PBS TMP phosphohydrolase; *deoA*: Thymidine phosphorylase; *tdk*: Thymidine kinase; *udp*: Uridine phosphorylase; *udk*: Uridine/cytidine kinase; *tmk*: dTMP kinase. Abbreviations: G6P: Glucose 6-phosphate; OAA: Oxaloacetate; OMP: Orotidylic acid; UMP: Uridylic acid; UDP: Uridine 5'-diphosphated; dUDP: 2'-deoxyuridine 5'-diphosphate; UTP: Uridine triphosphate; dUTP: 2'-deoxyuridine triphosphate; CTP: Cytidine triphosphate; dCTP: Deoxycytidine triphosphate; CDP: Cytidine diphosphate; dCDP: 2'-deoxycytidine diphosphate; dUMP: Deoxyuridylic acid; dTMP: Thymidylic acid; dUDR: Deoxyuridine; dTDP: Deoxythymidine 5'-diphosphate; eco: *Escherichia coli*; bsu: *Bacillus subtilis*.

表 1 本研究所用的菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Characteristics	Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Host for cloning	Lab store
<i>Bacillus subtilis</i> F126	Donor of pyrimidine operon genes	[11]
<i>E. coli</i> MG1655	Wild type, starting strain	Lab store
THY1	<i>E. coli</i> MG1655, $\Delta deoA$ , $\Delta tdk$ , $\Delta udp$ , $\Delta rihA$ , $\Delta rihB$ , $\Delta rihC$	This study
THY2	THY1, $yghX::P_{trc-pyr}BCAAAB*KDFE_{bsu}$	This study
THY3-1	THY2, $ybeM::P_{trc-pyr}H^{D90A}_{bsu}$	This study
THY3-2	THY2, $ybeM::P_{trc-pyr}H^{D93A}_{eco}$	This study
THY3-3	THY2, $ybeM::P_{T7-pyr}H^{D90A}_{bsu}$	This study
THY3-4	THY3-1, $ygaY::P_{trc-pyr}H^{D90A}_{bsu}$	This study
THY4-1	THY3-4, $yciQ::P_{trc-nrd}ABC_{T4}$	This study
THY4-2	THY3-4, $yciQ::P_{trc-nrd}ABC_{eco}$	This study
THY4-3	THY4-2, $gapC::P_{trc-nrd}ABC_{eco}$	This study
THY4-4	THY4-3, $yjgX::P_{trc-ndk}_{eco}$	This study
THY4-5	THY4-4, $ycgH::P_{trc-dut}_{eco}$	This study
THY5-1	THY4-5, $ilvG::P_{trc-td}_{T4}$	This study
THY5-2	THY4-5, $ilvG::P_{trc-CDC21}_{sce}$	This study
THY5-3	THY4-5, $ilvG::P_{trc-thyA}_{bsu}$	This study
THY5-4	THY4-5, $ilvG::P_{trc-thyA}_{baz}$	This study
THY6-1	THY5-3, $mbhA::P_{trc-ush}_{eco}$	This study
THY6-2	THY5-3, $mbhA::P_{trc-TMPase}$	This study
THY6-3	THY6-2, $yeeP::P_{trc-TMPase}$	This study
Plasmids		
pREDCas9	Spe <sup>r</sup> , Cas9 and $\lambda$ Red recombinase expression vector	[12]
pGRB	Amp <sup>r</sup> , gRNA expression vector	[12]

Amp<sup>r</sup>: Ampicillin resistance; Spe<sup>r</sup>: Spectinomycin resistance.

## 1.2 菌株构建方法

本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术<sup>[12]</sup>对底盘菌株 *E. coli* MG1655 进行代谢改造, 以构建胸苷工程菌株。CRISPR 系统由 pGRB 质粒、pREDCas9 质粒、DNA 重组片段 3 个元件共同介导完成基因改造。其中 pGRB 质粒包含启动子、gRNA 蛋白结合区域和终止子, 携带氨苄青霉素抗性(50  $\mu$ g/mL, 37  $^{\circ}$ C 培养); pREDCas9 质粒包含 RED 重组酶、Cas9 蛋白以及阿拉伯糖诱导的 pGRB 质粒消除系统, 携带奇霉素抗性(50  $\mu$ g/mL, 32  $^{\circ}$ C 培养)。基因重组过程由 pGRB 质粒表达特异性 gRNA 识别目的

基因靶序列与 pREDCas9 质粒表达的 Cas9 蛋白共同介导实现靶序列的精准切割, 随后在 RED 重组酶作用下将 DNA 片段以同源重组的方式对切割位点进行修复, 最后依次消除两个工具质粒, 获得无质粒工程菌。本研究在基因编辑过程中使用的引物与 gRNA 序列已提交至国家微生物科学数据中心(登录号: NMDCX0000277)。

## 1.3 工程菌株发酵

斜面培养基(g/L): Yeast Extract 5.0, Tryptone 10.0, NaCl 5.0, 牛肉膏 10.0, 葡萄糖 5.0, 琼脂粉 20.0。

种子培养基(g/L): Yeast Extract 5.0,

Tryptone 3.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.0,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01,  $V_{\text{B}1}$ 、 $V_{\text{B}3}$ 、 $V_{\text{B}5}$ 、 $V_{\text{B}12}$ 、 $V_{\text{H}}$  各 0.001。

发酵培养基(g/L): Yeast Extract 4.0, Tryptone 5.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7.0, 柠檬酸 2.0, 甲硫氨酸 1.0,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01,  $V_{\text{B}1}$ 、 $V_{\text{B}3}$ 、 $V_{\text{B}5}$ 、 $V_{\text{B}12}$ 、 $V_{\text{H}}$  各 0.001。

### 1.3.1 摇瓶发酵

将菌株接种到斜面培养基培养 12 h 后, 转接至装有 30 mL 种子培养基的 500 mL 锥形瓶, 220 r/min、37 °C 培养 8–10 h。待菌体  $OD_{600}$  为 4 左右时, 以 10% 的接种量(3 mL)转接至装有 26 mL 的 500 mL 挡板瓶发酵培养基中, 并且补加 1 mL 葡萄糖(60%, 质量体积比), 220 r/min、37 °C 连续培养发酵 24 h。发酵过程中通过添加氨水(25%, 体积比)来维持整体 pH 在 7.0 左右, 补加葡萄糖维持菌体生长与胸苷生产。

### 1.3.2 发酵罐发酵

菌株进行两次斜面培养基活化后, 用无菌水将斜面上菌落冲洗下来制成菌悬液, 全部接种到装有 3 L 种子培养基的 5 L 发酵罐中进行扩大培养, 当种子  $OD_{600}$  达到 10–16 时, 按 15% 的接种量(450 mL)接入装有 3 L 发酵培养基的发酵罐中发酵培养, 初始发酵培养基中葡萄糖为 10 g/L, 通过自动控制流加氨水维持 pH 在 7.0 左右, 发酵温度保持在 35 °C, 溶氧控制在 25%–35%。当罐中的葡萄糖耗尽时, 以一定速率流加葡萄糖(80%, 质量体积比), 发酵过程中残留葡萄糖浓度维持在 0.1–3.0 g/L。

## 1.4 分析方法

生物量: 将待测样品稀释适当浓度后, 采用紫外分光光度仪在 600 nm ( $OD_{600}$ )处检测吸光度值。

残糖浓度: 将待测样品稀释适当浓度后, 采用 SBA 生物传感仪检测发酵液中残留葡萄糖浓度。

嘧啶类核苷酸检测: 使用高效液相色谱仪 Thermo U3000; 色谱柱 Titank C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈:三氟乙酸:水=5:0.05:94.5; 柱温 30 °C; 流速 1 mL/min; 紫外检测波长 260 nm; 进样量 20 μL。

数据统计学分析: 发酵数据代表 3 组平行发酵数据的均值与标准差。利用 *t* 检验双尾分布对两组发酵数据进行单向方差分析。当  $0.01 < P < 0.05$  时用“\*”标示, 表示数据差异显著; 当  $P < 0.01$  时用“\*\*”标示, 表示数据差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 胸苷分解途径及回补途径的阻断

在大肠杆菌中, 核苷水解酶(由 *rihA/B/C* 基因编码)具有催化胸苷分解为胸腺嘧啶的能力<sup>[13]</sup>, 阻断胸苷分解途径是实现胸苷积累的关键之一。除此之外, 由于嘧啶核苷的结构类似, 大肠杆菌中存在多个酶可以同时催化胸苷与其他核苷之间相互转化。其中, 胸苷磷酸化酶(由 *deoA* 基因编码)催化胸苷与胸腺嘧啶的可逆转化; 胸苷激酶(由 *tdk* 基因编码)催化胸苷与胸苷酸(thymidylic acid; dTMP)的可逆转化; 尿苷磷酸化酶(由 *udp* 基因编码)可同时催化尿苷和胸苷裂解为相应的嘧啶和(脱氧)核糖-1-磷酸。先前的研究表明, 依次敲除 *deoA*、*tdk*、*udp* 可以有效地降低胸苷与其他核苷之间的相互转化, 进而提高胸苷的积累量<sup>[3-4]</sup>。

本研究依次敲除野生型 *E. coli* MG1655 菌株基因组中 *deoA*、*tdk*、*udp*、*rihA*、*rihB*、*rihC* 基因, 构建了 THY1 菌株。摇瓶发酵结果显示, 野生型 *E. coli* MG1655 菌株中尿嘧啶产量为 0.09 g/L, 没有检测到尿苷积累,  $OD_{600}$  值为 55.5; THY1 菌株中无尿嘧啶积累, 但尿苷积累量达到 2.10 g/L,  $OD_{600}$  值为 52.3 (图 2)。发酵数

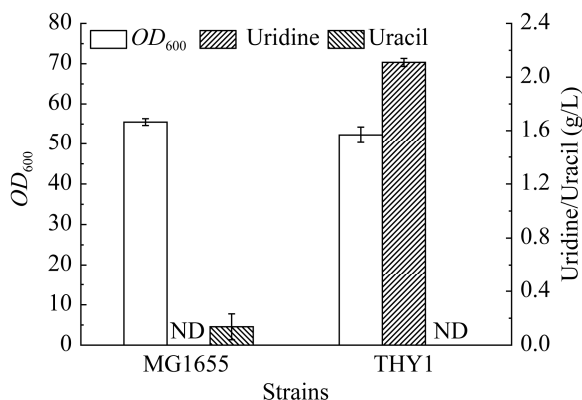


图2 阻断胸苷降解途径和回补途径对细胞生长与胸苷生产的影响

Figure 2 Effect of blocking the degradation pathway and salvage pathway on cell growth and thymidine production. MG1655 indicates the wild-type *E. coli* MG1655. The genotype of THY1 strain: MG1655,  $\Delta deoA$ ,  $\Delta tdk$ ,  $\Delta udp$ ,  $\Delta rihA$ ,  $\Delta rihB$ ,  $\Delta rihC$ . ND: Not detected.

据表明,阻断胸苷降解途径和回补途径并未对菌株生长表型造成不利影响,副产物尿嘧啶消失,同时检测到尿苷积累。但是,发酵样品中并未检测到胸苷积累,可能是由于其合成途径冗长,且合成途径代谢通量受严格反馈调控机制控制,导致胸苷合成途径代谢通量不足。

## 2.2 增强前体物 UMP 的供应

在大肠杆菌中,尿苷酸(UMP)是合成胸苷的关键前体物,其生物合成途径由8步酶(分别由 *carA/B*、*pyrB/I*、*pyrC*、*pyrD*、*pyrE*、*pyrF* 基因编码)催化反应组成,且合成途径代谢通量受严格的反馈调控机制控制。其中,*pyrBI*、*pyrE* 和 *pyrF* 操纵子转录受 UMP 的反馈抑制;*pyrC* 和 *pyrD* 操纵子转录受三磷酸胞苷(cytidine triphosphate, CTP)和三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)的共同调控;*carAB* 操纵子表达受到嘧啶核苷和精氨酸的共同调控<sup>[13-15]</sup>。在先前的研究中,Fan 等<sup>[11]</sup>以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 为出发菌株,采用 ARTP 随机诱变结合高通量筛选策略得到尿苷高产突变菌株 *B. subtilis* F126,该

菌株中 UMP 合成途径代谢通量显著增强。

为了增强嘧啶核苷前体物 UMP 的合成途径代谢通量,本研究将来源于 *B. subtilis* F126 中的 *pyr* 操纵子基因整合至 THY1 菌株中 *yghX* 假基因位点,由  $P_{trc}$  启动子控制,构建了 THY2 菌株。摇瓶发酵结果显示(图3),THY2 菌株中尿苷产量为 5.60 g/L,较对照 THY1 菌株提升 166.7%;胸苷产量为 0.18 g/L。发酵数据表明,引入异源嘧啶核苷操纵子基因可以显著增强 UMP 合成途径代谢通量,从而为下游产物胸苷合成提供充足的前体物。除此之外,THY2 菌株中胸苷产量远低于前体物 UMP 的产量,表明从 UMP 至胸苷的合成途径代谢通量强度较弱。因此,强化 UMP 至胸苷的合成途径代谢通量是进一步提高胸苷合成效率的关键。

## 2.3 胸苷合成途径关键酶的优化表达

### 2.3.1 尿苷磷酸酶的强化表达

在大肠杆菌中,尿苷酸激酶(由 *pyrH* 基因编码)催化尿苷酸(UMP)生成二磷酸尿苷(uridine diphosphate, UDP),是尿苷酸流向胸苷合成途

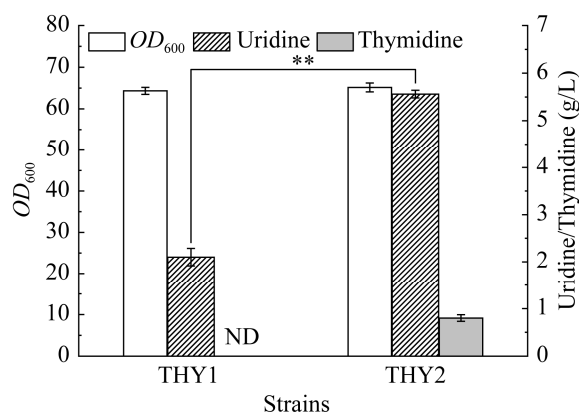


图3 增强前体物 UMP 供应对细胞生长与胸苷生产的影响

Figure 3 Effect of enhancing the supply of precursor UMP on cell growth and thymidine production. The genotype of strains were THY2: THY1, *yghX*:: $P_{trc}$ -*pyrBCAAAB*\**KDFE*<sub>bsu</sub>; THY1, MG1655,  $\Delta deoA$ ,  $\Delta tdk$ ,  $\Delta udp$ ,  $\Delta rihA$ ,  $\Delta rihB$ ,  $\Delta rihC$ . ND: Not detected. The \*\* represents  $P < 0.01$ .

径中的第一步反应。尿苷酸激酶活性受到 GTP 的变构激活和 UTP 的反馈抑制。有研究表明,尿苷酸激酶突变体 *pyrH<sup>D93A</sup>* 可以显著减弱 UTP 触发的反馈抑制机制<sup>[16]</sup>。除此之外,枯草芽孢杆菌作为嘧啶核苷的优势底盘菌株<sup>[17-18]</sup>其天然嘧啶核苷代谢更强,来自 *B. subtilis* 168 的代谢酶可能比 *E. coli* MG1655 具有更高的催化活性。因此,本研究尝试将 *pyrH<sub>bsu</sub>* 蛋白序列第 90 位天冬氨酸突变为丙氨酸(D90A),以评估修饰后的尿苷酸激酶对胸苷合成的影响。

本研究分别将修饰后的 *pyrH<sup>D90A</sup><sub>bsu</sub>*、*pyrH<sup>D93A</sup><sub>eco</sub>* 基因整合至 THY2 菌株的 *ybeM* 基因位点,并由  $P_{trc}$  启动子控制,分别构建了 THY3-1 和 THY3-2 菌株。摇瓶发酵结果显示,与对照 THY2 菌株相比,THY3-1 菌株  $OD_{600}$  值提高 4.4%,胸苷产量为 0.31 g/L,较对照菌株(0.18 g/L)提高了 72.2%。除此之外,THY3-1 菌株中副产物尿苷的产量降低了 90.7% (由 5.60 g/L 降低至 0.52 g/L) (图 4A)。THY3-2 菌株中胸苷产量为 0.21 g/L,较对照菌株提升了 16.7%,尿苷产量为 2.80 g/L,较对照菌株降低了 50.0% (图 4A)。发酵数据表明,与大肠杆菌本源的 *pyrH<sup>D93A</sup><sub>eco</sub>* 相比,来源于枯草芽孢杆菌的 *pyrH<sup>D90A</sup><sub>bsu</sub>* 更利于提高胸苷合成效率。

为了进一步优化异源 *pyrH<sup>D90A</sup><sub>bsu</sub>* 基因的转录表达,本研究采用  $P_{T7}$  强启动子控制 *pyrH<sup>D90A</sup><sub>bsu</sub>* 表达,同样将其整合至 THY2 菌株的 *ybeM* 基因位点,构建了 THY3-3 菌株。摇瓶发酵结果显示,与 THY3-1 菌株相比,THY3-3 菌株中胸苷产量未见显著变化(图 4A)。随后,为了进一步强化异源 *pyrH<sup>D90A</sup><sub>bsu</sub>* 基因的表达,本研究将  $P_{trc}$  启动子控制的 *pyrH<sup>D90A</sup><sub>bsu</sub>* 基因整合至 THY3-1 菌株基因组中的 *ygaY* 基因位点,构建了 THY3-4 菌株。摇瓶发酵结果显示,与 THY3-1 菌株相比,THY3-4 菌株中胸苷产量为 0.35 g/L,较对照菌株提高了 12.9%;尿苷产量为 0.02 g/L,较

对照菌株降低了 96.2% (图 4A)。发酵数据表明,优化异源尿苷酸激酶表达可以显著提升胸苷合成效率。但是,THY3-4 菌株中前体尿苷转化为胸苷的比例仍较低,推测可能是从尿苷到胸苷仍存在尚未打通的代谢流节点,同时还可能是其他前体物如甲基供应不足等限制了胸苷合成。因此,强化 UDP 至胸苷合成途径代谢通量是进一步提高胸苷合成效率的关键。

### 2.3.2 核糖核苷二磷酸还原酶的优化表达

二磷酸尿苷(UDP)可以通过多种途径生成三磷酸脱氧尿苷(deoxyuridine triphosphated, UTP),其中常见的有两条:一条是由核糖核苷二磷酸还原酶(由 *nrd* 基因编码)和核苷二磷酸激酶(由 *ndk* 基因编码)通过脱羟基和磷酸化两步反应生成 dUTP;另一条是由核苷二磷酸激酶(由 *ndk* 基因编码)、CTP 合酶(由 *pyrG* 基因编码)、核糖核苷二磷酸还原酶(由 *nrd* 基因编码)、dCTP 脱氨酶(由 *dcd* 基因编码)通过繁杂的胺化去胺化,磷酸化去磷酸化和脱羟基反应生成 dUTP。尽管第 2 条反应途径较长,但是细胞内 70%–80% 的 dUTP 由该途径合成<sup>[19]</sup>。

作为 DNA 合成的关键反应之一,过表达 *nrdABC* 能够使 UDP 更多地流向胸苷合成途径而不是胞苷合成途径。为了减少碳流无益消耗,本研究分别将来源于 T4 噬菌体<sup>[4]</sup>和大肠杆菌本源的 *nrdABC* 基因引入 THY3-4 菌株基因组中的 *yciQ* 基因位点,使用  $P_{trc}$  启动子控制,分别构建了 THY4-1 和 THY4-2 菌株。摇瓶发酵结果显示,与对照 THY3-4 菌株相比,THY4-2 菌株中胸苷产量为 1.00 g/L,较对照提高了 185.7%,且未对菌株生长表型造成不利影响(图 4B)。THY4-1 菌株中胸苷产量较对照菌株相比未见明显变化(图 4B),该结果与先前的研究<sup>[3]</sup>不一致,可能是由于 T4 噬菌体来源的核糖核苷二磷酸还原酶在大肠杆菌中底物亲和力和较差。随

后, 为了进一步强化 *nrdABC<sub>eco</sub>* 基因的表达, 本研究将 *P<sub>trc</sub>* 启动子控制的 *nrdABC<sub>eco</sub>* 基因整合至 THY4-2 菌株基因组中的 *gapC* 基因位点, 构建了 THY4-3 菌株。发酵结果显示, 与对照 THY4-2 菌

株相比, THY4-3 菌株胸苷产量为 1.11 g/L, 较对照菌株提升了 11.0%, 且 *OD<sub>600</sub>* 值为 70.8 (图 4B)。发酵数据表明, 强化核糖核苷二磷酸还原酶表达可以显著提升胸苷合成效率。

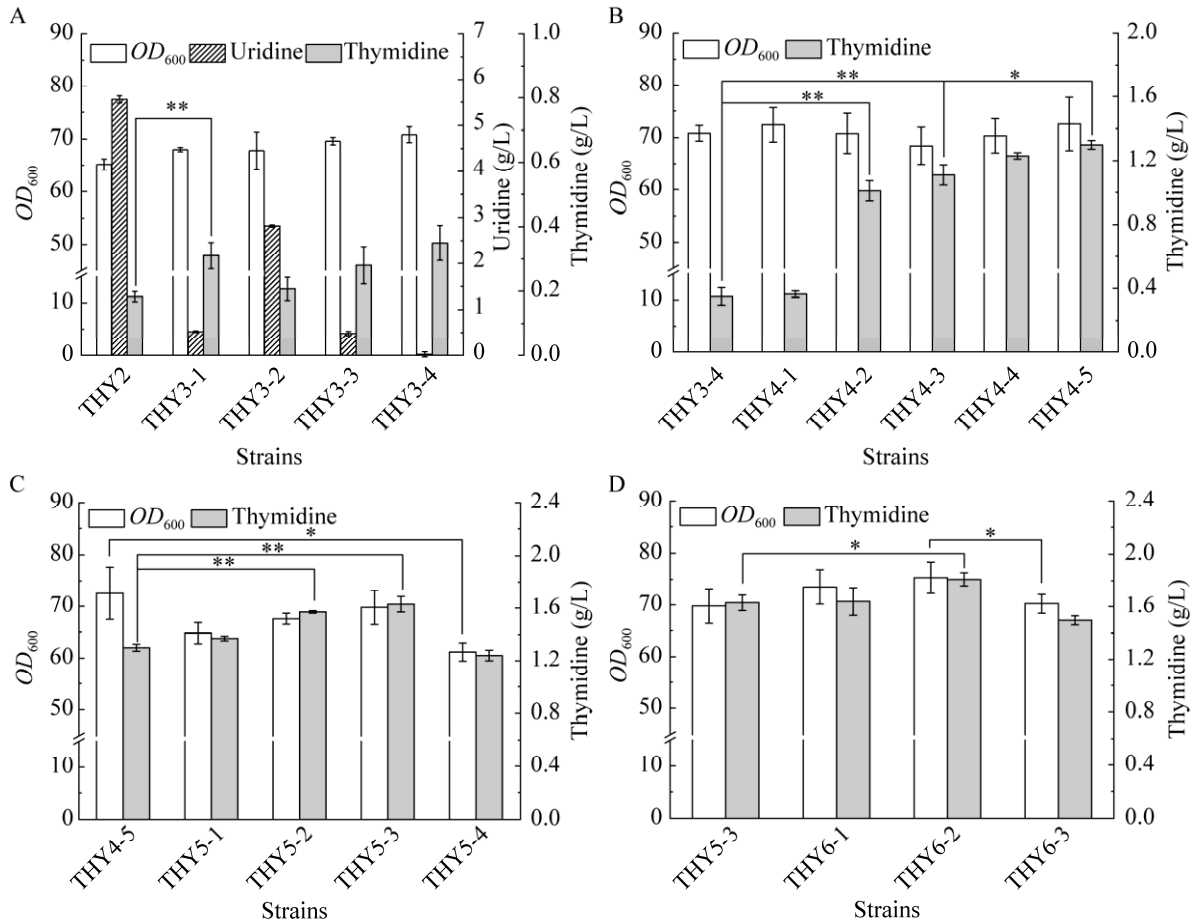


图 4 优化胸苷合成途径对细胞生长与胸苷生产的影响

Figure 4 Effect of optimization of the thymidine synthesis pathway on cell growth and thymidine production. A: The effect of optimization uridine phosphatase on cell growth and thymidine production. The genotype of strains were THY3-1: THY2, *ybeM::P<sub>trc</sub>-pyrH<sup>D90A</sup><sub>bsu</sub>*; THY3-2: THY2, *ybeM::P<sub>trc</sub>-pyrH<sup>D93A</sup><sub>eco</sub>*; THY3-3: THY2, *ybeM::P<sub>T7</sub>-pyrH<sup>D90A</sup><sub>bsu</sub>*; THY3-4: THY3-1, *ygaY::P<sub>trc</sub>-pyrH<sup>D90A</sup><sub>bsu</sub>*. B: The effect of optimization nucleotide diphosphate reductase, nucleoside diphosphate kinase and deoxyribonucleotide triphosphatase on cell growth and thymidine production. The genotype of strains were THY4-1: THY3-4 *yciQ::P<sub>trc</sub>-nrdABC<sub>T4</sub>*; THY4-2: THY3-4, *yciQ::P<sub>trc</sub>-nrdABC<sub>eco</sub>*; THY4-3: THY4-2, *gapC::P<sub>trc</sub>-nrdABC<sub>eco</sub>*; THY4-4: THY4-3, *yjgX::P<sub>trc</sub>-ndk<sub>eco</sub>*; THY4-5: THY4-4, *ycgH::P<sub>trc</sub>-dut<sub>eco</sub>*. C: The effect of optimization thymidylate synthase on cell growth and thymidine production. The genotype of strains were THY5-1: THY4-5, *ilvG::P<sub>trc</sub>-td<sub>T4</sub>*; THY5-2: THY4-5, *ilvG::P<sub>trc</sub>-CDC21<sub>see</sub>*; THY5-3: THY4-5, *ilvG::P<sub>trc</sub>-thyA<sub>bsu</sub>*; THY5-4: THY4-5, *ilvG::P<sub>trc</sub>-thyA<sub>baz</sub>*. D: The effect of optimization of 5'-nucleotidase on cell growth and thymidine production. The genotype of strains were THY6-1: THY5-3, *mbhA::P<sub>trc</sub>-ushA<sub>eco</sub>*; THY6-2: THY5-3, *mbhA::P<sub>trc</sub>-TMPase*; THY6-3: THY5-3, *yepP::P<sub>trc</sub>-TMPase*. The \* represents  $0.01 < P < 0.05$ , and the \*\* represents  $P < 0.01$ .



### 2.3.3 核苷二磷酸激酶和 dUTP 二磷酸酶的强化表达

核苷二磷酸激酶(由 *ndk* 基因编码)催化五磷酸脱氧尿苷(deoxyuridine pentaphosphate, dUDP) 转化为三磷酸脱氧尿苷(dUTP), dUTP 二磷酸酶(由 *dut* 基因编码)催化 dUTP 转化为一磷酸脱氧尿苷(dUMP)。为了消除胸苷下游合成途径的限制, 将 dUDP 转化为 dUMP, 本研究迭代强化 *ndk* 和 *dut* 的表达: 将  $P_{trc}$  启动子控制的大肠杆菌本源的 *ndk* 基因整合至 THY4-3 菌株基因组的 *yjgX* 基因位点, 构建了 THY4-4 菌株; 进一步将大肠杆菌本源的 *dut* 基因整合至 THY4-4 菌株基因组的 *ycgH* 基因位点, 且由  $P_{trc}$  启动子控制表达, 构建了 THY4-5 菌株。摇瓶发酵结果显示(图 4B), 与对照 THY4-3 菌株相比, THY4-4 菌株胸苷产量为 1.23 g/L, 较对照菌株提高了 10.8%, 生长表型无显著变化。与对照 THY4-4 菌株相比, THY4-5 菌株胸苷产量为 1.30 g/L, 较对照菌株提高了 5.7%, 且  $OD_{600}$  值为 72.6, 较对照菌株提高 3.2%。此外, 与 THY4-3 菌株相比, THY4-4 菌株的胸苷产量显著提升了 17.1%。发酵数据表明迭代强化表达核苷二磷酸激酶和 dUTP 二磷酸酶可以将 dUDP 转化至 dUMP, 显著提高了胸苷合成效率。

### 2.3.4 胸苷酸合酶的强化表达

胸苷酸合酶(由 *thyA* 基因编码)催化一磷酸脱氧尿苷(dUMP)和 5,10-亚甲基四氢叶酸甲基化生成胸苷酸(dTMP)和二氢叶酸。胸苷酸合酶作为 dUMP 合成 dTMP 的关键酶, 在大肠杆菌中与其对应的 mRNA 会直接结合, 受严格反馈抑制调控<sup>[20]</sup>。为了提高 dUMP 合成 dTMP 的代谢通量, 本研究采用蛋白预测软件筛选来源不同宿主的胸苷酸合酶(国家微生物科学数据中心登录号: NMDCX0000277)。依据前期研究<sup>[6]</sup>与蛋白预测结果, 本研究将来源于噬菌体(phage) T4、

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) S288c、*B. subtilis* 168 和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) TA208 菌株中的胸苷酸合酶引入 THY4-5 菌株的 *ilvG* 基因位点, 并用  $P_{trc}$  启动子控制, 分别构建了 THY5-1、THY5-2、THY5-3 和 THY5-4 菌株。摇瓶发酵结果显示, 与对照 THY4-5 菌株相比, THY5-2 和 THY5-3 菌株中胸苷产量分别为 1.57 g/L、1.63 g/L, 较对照菌株分别提高了 20.7%、25.4% (图 4C)。此外, 与对照 THY4-5 菌株相比, THY5-1 菌株中胸苷产量未见显著变化, 且  $OD_{600}$  值较对照菌株下降了 10.7%, 推测可能是酶的无义表达造成了生长负担; THY5-4 菌株中胸苷产量和  $OD_{600}$  值较对照菌株分别下降了 4.6%和 15.7%, 推测可能是异源同工酶的酶活过高引起中间产物积累, 造成了局部代谢阻遏, 扰乱胞内代谢平衡。发酵数据表明, 异源 *B. subtilis* 胸苷酸合酶的表达可以有效地提高菌株合成胸苷的效率。

### 2.3.5 5'-核苷酸酶的强化表达

5'-核苷酸酶是催化胸苷酸水解生成胸苷的关键酶。参与该步反应的酶(由 *ushA*、*umpH*、*umpG*、*yfbR*、*yjjG* 基因编码)对于大多数嘧啶或嘌呤核苷的生成都能够起到同样的催化作用, 可以催化尿苷酸生成尿苷、胞苷酸生成胞苷, 催化肌苷酸生成肌苷、腺苷酸生成腺苷等。但该酶的底物特异性不佳, 对于胸苷酸偏好性差。

为了评估不同来源的 5'-核苷酸酶对于胸苷合成的影响, 本研究分别将大肠杆菌本源的 *ushA* 基因<sup>[4]</sup>和枯草芽孢杆菌噬菌体 PBS 的 *TMPase* 基因<sup>[8]</sup>整合至 THY5-3 菌株基因组中的 *mbhA* 基因位点, 并用  $P_{trc}$  启动子控制, 构建了 THY6-1 和 THY6-2 菌株。摇瓶发酵结果显示, 与对照 THY5-3 菌株相比, THY6-2 菌株的  $OD_{600}$  值为 75.3, 胸苷产量 1.80 g/L, 较对照菌株胸苷产量提升 10.4%, 生物量提升 7.9% (图 4D)。

THY6-1 菌株的  $OD_{600}$  值 73.5, 胸苷产量 1.64 g/L, 与对照菌株无显著差别(图 4D)。发酵结果表明, 过表达噬菌体 PBS 来源的 *TMPase* 基因可以显著提高胸苷合成效率。为了进一步优化异源 5'-核苷酸酶表达, 本研究将  $P_{trc}$  启动子控制的异源 *TMPase* 基因整合至 THY6-2 菌株基因组中的 *yeeP* 基因位点, 构建了 THY6-3 菌株。发酵结果显示, 与对照 THY6-2 菌株相比, THY6-3 菌株  $OD_{600}$  值 70.2, 较对照菌株下降了 6.7%; 胸苷产量为 1.50 g/L, 较对照菌株下降了 16.7% (图 4D)。发酵数据表明单拷贝 *TMPase* 基因已能够满足当前菌株胸苷合成代谢需求, 过量的 *TMPase* 表达会导致代谢负担。

## 2.4 分批补料发酵生产胸苷

为了进一步测试 THY6-2 菌株的生产性能, 本研究在 5 L 生物反应器中进行了分批补料发酵试验, 并实时检测发酵过程 pH、溶氧、葡萄糖消耗量等发酵参数。发酵结果显示, THY6-2 菌株在 10 h 后进入快速生长阶段, 28 h 后进入稳定生长期, 40 h 菌体生物量达到最高值。发酵 10 h 后, 胸苷快速积累, 发酵 48 h 胸苷产量为 11.10 g/L, 葡萄糖转化率为 0.04 g/g 葡萄糖, 生产强度为 0.23 g/(L·h) (图 5)。

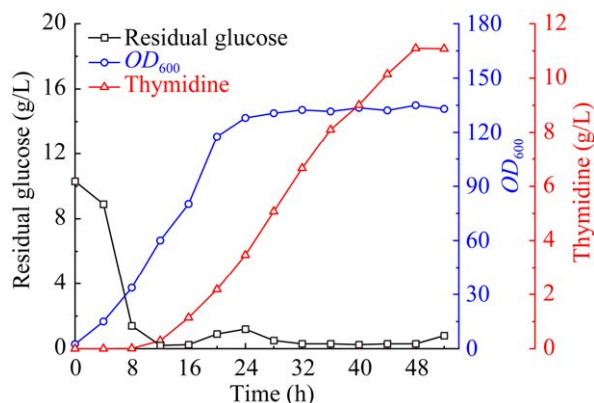


图 5 工程菌 THY6-2 在 5 L 发酵罐中的分批补料发酵曲线

Figure 5 Fed-batch fermentation profiles of the engineered strain THY6-2 in 5 L bioreactor.

## 3 讨论与结论

嘧啶核苷及其衍生物具有抗菌<sup>[21]</sup>、抗病毒<sup>[22]</sup>和治疗肿瘤<sup>[23]</sup>的作用, 在医药行业广泛应用。现阶段, 开发廉价且高效的胸苷生产方法成为满足胸苷市场需求的关键。大肠杆菌具有基因编辑效率高、遗传背景清晰、发酵周期短等优势, 是构建高效胸苷生产微生物细胞工厂的优良底盘微生物。本研究以野生型 *E. coli* MG1655 为出发菌株, 采用系统代谢工程策略优化胸苷从头合成途径代谢通量分布, 构建了高效合成胸苷的工程菌株。

首先, 本研究阻断了胸苷降解途径和回补途径, 失活胸苷磷酸化酶和核苷水解酶可以有效阻断胸苷向胸腺嘧啶转化; 失活胸苷激酶可以阻断胸苷磷酸化为 dTMP; 失活尿苷磷酸化酶可以阻断尿苷和胸苷向相应的嘧啶和(脱氧)核糖-1-磷酸的裂解。其次, 增强了前体 UMP 供应, 引入 *B. subtilis* F126 中 *pyr* 操纵子基因, 解除反馈抑制, 增强了前体物 UMP 合成途径代谢通量。最后, 对胸苷合成模块的 4 个关键酶进行表达优化, 发现来源于 *B. subtilis* 的尿苷酸激酶突变体可以强而有效地将尿苷的代谢通量导向胸苷的合成途径之中; 过表达 *E. coli* 自身的核糖核苷二磷酸还原酶, 避免了代谢通量在胞苷途径的消耗, 使胸苷产量增加了 2.7 倍, 显著提高了胸苷的积累; 通过蛋白预测, 对胸苷酸合酶催化的甲基化反应进行多来源同工酶的异源表达测试, 筛选到来源 *B. subtilis* 菌株的胸苷酸合酶可以显著促进胸苷产量提高 25.4%; 最后, 本研究引入来源枯草芽孢杆菌噬菌体 PBS 的胸苷酸水解酶(由 *TMPase* 基因编码)以强化胸苷酸脱磷酸化生成胸苷, 使胸苷产量显著提高至 1.80 g/L。

本研究中的重编程策略主要集中在理性代谢工程改造, 平衡细胞内氧化还原平衡和改变辅

因子水平可能是进一步提高胸苷生产的方法, 还需进一步探究。在胸苷的合成途径中, 存在两步酶催化反应消耗辅因子 NADPH, 即二磷酸尿苷(UDP)还原为二磷酸脱氧尿苷(dUDP)和一磷酸脱氧尿苷(dUMP)到胸苷酸(dTMP)的甲基循环中二氢叶酸向四氢叶酸的转化。在大肠杆菌中, 可以通过吡啶核苷酸转氢酶, 即膜结合转氢酶(PntAB)和可溶性转氢酶(UdhA), 来维持胞内 NADH 和 NADPH 之间的平衡, 维持代谢系统的还原当量池、保护细胞免受损害。同样地, 强化

磷酸戊糖途径中 NADP<sup>+</sup>依赖性葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Zwf)、应激反应因子(stress response factors, RpoS)和大肠杆菌噬菌体休克蛋白 A (PspA)的表达, 也有助于减轻细胞的应激反应。

与现有报道的胸苷生产菌株相比(表 2), THY6-2 菌株发酵周期为 48 h, 胸苷生产强度为 0.23 g/(L·h), 是 *E. coli* HLT026 菌株的 1.1 倍, 较报道菌株具有明显优势, 本研究为大肠杆菌高效合成胸苷的合成生物学研究提供了优异的底盘菌株。

表 2 不同微生物生产胸苷

Table 2 Production of thymidine by different microorganisms

Microorganism	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/(L·h))	References
<i>E. coli</i> BS08	1.25	12.50×10 <sup>-3</sup>	0.02	[4]
<i>E. coli</i> HLT026	13.20	0.26×10 <sup>-3</sup>	0.11	[6]
<i>E. coli</i> BLdtugRPA24	5.20	NA	0.08	[24]
<i>E. coli</i> THY6-2	11.10	40.30×10 <sup>-3</sup>	0.23	This study

NA: Not available.

## REFERENCES

- [1] FURMAN PA, FYFE JA, ST CLAIR MH, WEINHOLD K, RIDEOUT JL, FREEMAN GA, LEHRMAN SN, BOLOGNESI DP, BRODER S, MITSUYA H. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(21): 8333-8337.
- [2] REESE CB, SANGHVI YS. Conversion of 2'-deoxyuridine into thymidine and related studies[J]. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1983(16): 877-879.
- [3] LEE HC, KIM JH, KIM JS, JANG W, KIM SY. Fermentative production of thymidine by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(8): 2423-2432.
- [4] 李思梦, 李晓静, 陈涛. 代谢工程方法改造大肠杆菌生产胸苷[J]. 生物工程学报, 2015, 31(1): 105-114. LI SM, LI XJ, CHEN T. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for thymidine production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(1): 105-114 (in Chinese).
- [5] BECKER J, KLOPPROGGE C, ZELDER O, HEINZLE E, WITTMANN C. Amplified expression of fructose 1,6-bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases *in vivo* flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8587-8596.
- [6] KIM JS, JEONG MK, KOO BS, LEE HC. Development of a novel plasmid-free thymidine producer by reprogramming nucleotide metabolic pathways[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(22): 7708-7719.
- [7] WU HY, LI YJ, MA Q, LI Q, JIA ZF, YANG B, XU QY, FAN XG, ZHANG CL, CHEN N, XIE XX. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield uridine production[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 248-256.
- [8] LEE HC, AHN JM, LEE SN, KIM JH. Overproduction of thymidine by recombinant *Brevibacterium helvolum* amplified with thymidine monophosphate phosphohydrolase gene from bacteriophage PBS2[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(4): 265-268.

- [9] ZHU H, YANG SM, YUAN ZM, BAN R. Metabolic and genetic factors affecting the productivity of pyrimidine nucleoside in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 54.
- [10] LEE HC, KIM JS, JANG W, KIM SY. High NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio improves thymidine production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 149(1/2): 24-32.
- [11] FAN XG, WU HY, LI GL, YUAN H, ZHANG HC, LI YJ, XIE XX, CHEN N. Improvement of uridine production of *Bacillus subtilis* by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0176545.
- [12] LI YF, LIN ZQ, HUANG C, ZHANG Y, WANG ZWTANG YJ, CHEN T, ZHAO XM. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing[J]. Metabolic Engineering, 2015, 31: 13-21.
- [13] PIÉRARD A, GLANSDORFF N, GIGOT D, CRABEEL M, HALLEUX P, THIRY L. Repression of *Escherichia coli* carbamoylphosphate synthase: relationships with enzyme synthesis in the arginine and pyrimidine pathways[J]. Journal of Bacteriology, 1976, 127(1): 291-301.
- [14] SCHWARTZ M, NEUHARD J. Control of expression of the *pyr* genes in *Salmonella typhimurium*: effects of variations in uridine and cytidine nucleotide pools[J]. Journal of Bacteriology, 1975, 121(3): 814-822.
- [15] PAULUS TJ, SWITZER RL. Characterization of pyrimidine-repressible and arginine-repressible carbamyl phosphate synthetases from *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1979, 137(1): 82-91.
- [16] YANG K, LI ZM. Multistep construction of metabolically engineered *Escherichia coli* for enhanced cytidine biosynthesis[J]. Biochemical Engineering Journal, 2020, 154: 107433.
- [17] QUINN CL, STEPHENSON BT, SWITZER RL. Functional organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic operon[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(14): 9113-9127.
- [18] ASAH I S, TSUNEMI Y, DOI M. Improvement of a cytidine-producing mutant of *Bacillus subtilis* introducing a mutation by homologous recombination[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995, 59(11): 2123-2126.
- [19] JOHANSSON E, THYMARK M, BYNCK JH, FANØ M, LARSEN S, WILLEMOËS M. Regulation of dCTP deaminase from *Escherichia coli* by nonallosteric dTTP binding to an inactive form of the enzyme[J]. The FEBS Journal, 2007, 274(16): 4188-4198.
- [20] VOELLER DM, CHANGCHIEN LM, MALEY GF, MALEY F, TAKECHI T, TURNER RE, MONTFORT WR, ALLEGRA CJ, CHU E. Characterization of a specific interaction between *Escherichia coli* thymidylate synthase and *Escherichia coli* thymidylate synthase mRNA[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(5): 869-875.
- [21] 董金娇, 朱昕悦, 冯思冉, 张超超, 刘振明, 乔晓强, 宋亚丽. 7-苯基-6H,7H-1,3,4-噻二唑并[3,2-a]-噻吩并[4,3-d]嘧啶类化合物的合成及抗真菌活性研究[J]. 有机化学, 2021, 41(6): 2467-2475.
- DONG JJ, ZHU XY, FENG SR, ZHANG CC, LIU ZM, QIAO XQ, SONG YL. Synthesis and antifungal activity of 7-phenyl-6H, 7H-1,3,4-thia-diazolo[3,2-a]-thiochromeno[4,3-d]pyrimidine compounds[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2021, 41(6): 2467-2475 (in Chinese).
- [22] 罗云龙, 沈明贵, 蔡照胜, 商士斌, 宋湛谦. 脱氢枞酸酰胺基-3,4-二氢嘧啶酮衍生物的合成与抗病毒活性研究[J]. 林产化学与工业, 2019, 39(2): 46-52.
- LUO YL, SHEN MG, CAI ZS, SHANG SB, SONG ZQ. Synthesis and antiviral activity evaluation of dehydroabietic acid amide derived 3,4-dihydropyrimidinethiones[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2019, 39(2): 46-52 (in Chinese).
- [23] ISLAM F, QUADERY TM, BAI RL, LUCKETT-CHASTAIN LR, HAMEL E, IHNAT MA, GANGJEE A. Novel pyrazolo[4,3-d]pyrimidine microtubule targeting agents (MTAs): synthesis, structure-activity relationship, *in vitro* and *in vivo* evaluation as antitumor agents[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2021, 41: 127923.
- [24] KOO BS, HYUN HH, KIM SY, KIM CH, LEE HC. Enhancement of thymidine production in *E. coli* by eliminating repressors regulating the carbamoyl phosphate synthetase operon[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(1): 71-78.

(本文责编 陈宏宇)