

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.08.03

弗氏链霉菌双拷贝串联基因 *tylF*、*tylE* 和 *tylCV* 工程菌的构建

陈亚兰,牛春,张萍*

(宁夏泰瑞制药股份有限公司,银川 750101)

[收稿日期] 2021-12-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 08-0016-08 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为提高弗氏链霉菌对泰乐菌素的产素能力,构建了弗氏链霉菌双拷贝串联基因 *tylF*、*tylE* 和 *tylCV* 基因工程菌。本研究以弗氏链霉菌作为出发菌株,并以其全基因组 DNA 为模板分别扩增 *tylF* 和 *tylE* 以及 *tylCV* 基因、以质粒 pSET152 为模板扩增强启动子基因 *permE*,采用重叠延伸 PCR 技术和 *EcoRV*、*XbaI* 双酶切结合的连接方法,构建弗氏链霉菌表达载体 pSET152-*permE*-*tylF*-*tylE*-*tylCV*,并转化至大肠杆菌 ET12567,利用大肠-链霉菌属间接合转移技术获得工程菌株。研究表明,工程菌株摇瓶效价(14580 u/mL)比出发菌株(11318 u/mL)提高了 29%;液相色谱结果显示,工程菌株的泰乐菌素 A 和泰乐菌素 C 相对峰面积显著($P \leq 0.05$)高于出发菌株。增加弗氏链霉菌 *tylF*、*tylE* 和 *tylCV* 的拷贝数可有效提高泰乐菌素的产量,以及优化组分,为泰乐菌素生产菌的遗传改造提供参考。

[关键词] 泰乐菌素;弗氏链霉菌;*tylE* 基因;*tylF* 基因;*tylCV* 基因

Construction of a Double-copy *tylE*, *tylF* and *tylCV* *Streptomyces fradiae* Strain

CHEN Ya-lan, NIU Chun, ZHANG Ping*

(Ningxia Tairui Pharmaceutical Co., LTD., Yinchuan 750101, China)

Corresponding author: ZHANG Ping, E-mail: 18995018336@163.com

Abstract: In order to improve the production capacity of *Streptomyces fradiae* to tylosin, the engineering strains with double copy tandem genes *tylF*, *tylE* and *tylCV* of *Streptomyces fradiae* were constructed. In this study, *Streptomyces fradiae* was used as the original strain and whole genome DNA was used as template to amplify *tylF*, *tylE*, *tylCV* gene, and the plasmid pSET152 was used as template to amplify the promoter *permE*, respectively. The expression vector pSET152-*permE*-*tylF*-*tylE*-*tylCV* was constructed and transformed into *E. coli* ET12567. The engineered strain was obtained by indirect co-transfer of *E. coli* and *Streptomyces*. The results showed that the shaker titer of the engineering strain (14580 u/mL) was 29% higher than that of the original

作者简介: 陈亚兰,硕士,从事工业微生物分子选育方面的研究。

通讯作者: 张萍。E-mail: 18995018336@163.com

strain (11318 u/mL). The HPLC results showed that the relative peak area of the engineering strain was significantly higher than that of the original strain ($P \leq 0.05$). Increasing the copy number of *tylF*, *tylE* and *tylCV* of *Streptomyces fradiae* could effectively improve the yield of tylosin and optimize the composition, providing reference for the genetic modification of tylosin – producing bacteria.

Key words: tylosin; *Streptomyces fradiae*; *tylE* gene; *tylF* gene; *tylCV* gene

泰乐菌素 (Tylosin) 是一种由弗氏链霉菌 (*Streptomyces fradiae*) 产生的大环内酯类兽用抗生素,外观为淡黄色粉末,微溶于水,易溶于有机溶剂,呈弱碱性^[1],由美国研究者 Hamill 等^[2]于 1959 年发现,是国际上目前使用最广泛的兽用抗生素之一^[3-4]。泰乐菌素对革兰阳性菌、某些革兰阴性球菌、支原体、分枝杆菌、螺旋体及原虫等有抑制作用,常用于防治由支原体感染引起的猪气喘病,也可以治疗猪痢疾、萎缩性鼻炎、关节炎、猪丹毒、钩端螺旋体病等^[5]。此外泰乐菌素还可添加到饲料中作为畜禽的抗菌促生长添加剂,促进畜、禽的生长以及对饲料的利用率,被广泛地应用于畜禽生产及兽医治疗,所以国际国内市场需求量极大^[6-8]。目前,在大规模工业生产中,弗氏链霉菌是泰乐菌素的主要生产菌^[9-11]。泰乐菌素主要由泰乐菌素 A、泰乐菌素 B、泰乐菌素 C 和泰乐菌素 D 四种组分构成,其中泰乐菌素 A 为主要组分,且生物活性最强。工业生产上要求 A 组分含量 $\geq 85\%$,四种组分的总含量 $\geq 95\%$ 。

弗氏链霉菌泰乐菌素生物合成基因簇 (*tyl* gene cluster) 从抗性基因 *tylB* 延伸至 *tlrC*, 约 85 kb, 含 43 个 ORFs 提供泰乐菌素合成所需完整的结构基因,其中 *tylF* 编码的大菌素 – O – 甲基转移酶 (Macrocinn – O – Methyltransferase) 催化泰乐菌素 C3 位羟基的甲基化反应^[12], 催化泰乐菌素 C 转化为泰乐菌素 A, 泰乐菌素 C3 位羟基的甲基化反应是泰乐菌素生物合成的最后一步,也是限速反应^[13]; *tylE* 编码去甲基大菌素 – O – 甲基转移酶 (Demethylmacrocinn – O – methyltransferase) 催化去甲基大菌素转化为大菌素 (Macrocinn, tylosin C); *tylCV* 编码碳霉糖转移酶 (Mycarosyl transferase), 负责将碳霉糖 (Mycarose) 转移到去甲基拉克亨霉素 (Demethylactinomycin),

合成去甲基大菌素 (Demethylmacrocinn)。

外源基因导入链霉菌的常用方法有 PEG 介导的原生质体法、电转化法和接合转移法^[14-15], 相较于其他两种方法, 接合转移法除了操作简单外, 还可以避开包外核酸酶, 一定程度上能克服链霉菌对外源基因的限制^[16], 在链霉菌遗传操作中广泛应用。链霉菌工程菌构建中常用的载体为 pSET152 整合型表达载体, 含阿泊拉霉素抗性基因, 能通过噬菌体 ϕ C31 的 *attB* 位点特异性整合到链霉菌染色体上^[17-18], 是链霉菌常用的质粒。红霉素抗性基因启动子 (*permE*) 是已知的链霉菌组成型强启动子, 它常用于在链霉菌中提高目的基因 (簇) 的表达水平, 以方便目的基因 (簇) 的表达产物或所生物合成化合物的检测, 以及提高目标化合物的生物合成水平等^[19-20]。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒 弗氏链霉菌、质粒 pSET152 (含有红霉素抗性基因启动子 *permE*) 均由宁夏泰瑞制药股份有限公司保藏。

1.2 载体、限制性内切酶和试剂 质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒、全基因组提取试剂盒和各种酶均购自 TakaRa 公司。

1.3 培养基和抗生素 大肠杆菌的培养基为 LB 培养基; 弗氏链霉菌固体培养基为高氏一号培养基; 大肠杆菌 – 链霉菌接合转移培养基为 MS 培养基; 孢子预萌发培养基为 2 × YT; 发酵培养基采用公司内部培养基^[21]。

LB 中氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 使用量为 25 $\mu\text{g/mL}$, 安普霉素 (Apramycin, Apr) 储存浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 卡那霉素 (Kanamycin, Kan) 的使用量为 25 $\mu\text{g/mL}$, 萘啶酮酸 (Naphthylpyruvic acid, Nap) 的使用量为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.4 目的基因的获取 从 GenBank 下载 *permE*、*tylF*、*tylE* 和 *tylCV* 的基因序列,根据序列使用引物设计软件 Primer Premier 5 分别设计 *permE*、*tylF*、*tylE* 和 *tylCV* 的重叠延伸 PCR 引物(表 1),其中

permE 的上游和 *tylCV* 的下游分别引入 *EcoRV* 和 *XbaI* 酶切位点。以弗氏链霉菌全基因组为模板,PCR 扩增获得所需要的目的基因片段,纯化后置于 -20 ℃ 保存,备用。

表 1 目的基因扩增引物及酶切位点

Fig 1 Primers and restriction sites for target gene amplification

引物名称	引物序列(5'→3')	酶切位点
<i>P-f</i>	CGGATATCGGTACCAGCCCGACCCG	<i>EcoRV</i>
<i>P-r</i>	TTCTTCAGCAGCTCGATCCTCCTGCGCCGCAAATTACCAACCGGCACGATTG	
<i>F-f</i>	CAATCGTGCCGGTTGCTAATTTGCGGCCGCAGGAGG	
<i>F-r</i>	TCAGCCGCTGTGCCGCCAATAGGCCTCGGGCGGTGCCGCGTGA	
<i>E-f</i>	TCACGCGGCACGCCCCGAGG	
<i>E-r</i>	ATGGCTGTGCAGAAAGAGGCCACTCACCCGGGCGAAGCCCCGCCAC	
<i>CV-f</i>	GTGGCGGGGCTTCGCCCGGGTG	
<i>CV-r</i>	TCTAGATTCAGGCCGCGGGGACAGAGCCC	<i>XbaI</i>

1.5 重组片段 *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV* 的获得 用重叠延伸 PCR 法连接 *permE*、*tylF*、*tylE* 和 *tylCV* 基因,实验方法为:以 *permE* 和 *tylF* 为模板,用引物 *P-f*/*F-r* 扩增获得 *permE* - *tylF* 基因片段,纯化后 -20 ℃ 保藏;以 *permE* - *tylF* 和 *tylE* 为模板,用引物 *P-f*/*E-r* 扩增获得 *permE* - *tylF* - *tylE* 基因片段,纯化后 -20 ℃ 保藏;以 *permE* - *tylF* - *tylE* 为模板,用引物 *P-f*/*CV-r* 扩增获得 *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV* 基因片段,纯化后 -20 ℃ 保藏。

1.6 构建重组载体 pSET152 - *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV* 使用 *EcoRV* 和 *XbaI* 酶 37 ℃,过夜酶切 pSET152 质粒和 *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV* 基因片段,回收酶切产物。按照目的基因与载体的摩尔比为 7 的比例加入酶切后的 pSET152 质粒和 *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV* 基因片段,16 ℃ 的温度下在 T4 DNA 连接酶的作用下过夜反应。将连接产物转化至 *DH5a* 大肠杆菌后再转入 ET12567 大肠杆菌,筛选阳性克隆子。

1.7 ET12567(pUZ8002, pSET152) 与弗氏链霉菌的接合转移 将转化子的过夜培养物转接在 LB

中,在 50 μg/mL 的安普霉素条件下,37 ℃ 培养转化子,到合适浓度(OD₆₀₀ 在 0.4 ~ 0.6)收集菌体;用等体积新鲜的 LB 洗涤菌体两次洗掉抗生素,0.1 倍体积的 LB 悬浮备用。刮取适量孢子研磨,将研磨液于漏斗中过滤,收集滤液,50 ℃ 热激 10 min,冷却到室温后加入等体积的 2 × YT 孢子预萌发培养基;37 ℃、180 r/min 摇床培养 2 ~ 4 h,3000 r/min 离心收集孢子,并悬浮于 1 mL 的培养液中,打散孢子备用;按照供受比为 10:1(或 1:1)将处理过的转化子培养物和孢子悬液混合,混匀后涂布平板^[22-23]。培养 21 h 后覆盖萘啶酮酸(50 μg/mL)和安普霉素(50 μg/mL)。

1.8 *tylF*、*tylE* 和 *tylCV* 基因双拷贝菌株泰乐菌素效价检测 将适量弗氏链霉菌菌丝体与接合子的菌丝体接种到发酵培养基中,28 ℃、230 r/min 连续培养 7 d 后,取硫酸铝酸化后的上清液检测泰乐菌素效价,检测方法参见文献^[24]。

1.9 接合子的分子水平验证 将出发菌与接合子的菌丝接种到含有 Apr 的 LB 培养基中培养至对数

生长后期,提取全基因组。分别以引物 $P-f/CV-r$ 进行 PCR 扩增。

2 结果与分析

2.1 *permE*、*tylF*、*tylE* 和 *tylCV* 基因的扩增 以弗氏链霉菌全基因组为模板,分别用引物 $P-f/P-r$ 、 $F-f/F-r$ 、 $E-f/E-r$ 、 $CV-f/CV-r$ 扩增强启动子 *permE*、*tylF*、*tylE* 和 *tylCV* 基因,基因片段大小为270 bp (图 1a)、735 bp(图 1b)、1188 bp(图 1c)和 1386 bp(图 1 d),将 PCR 产物纯化后保藏至 -20 ℃ 备用。

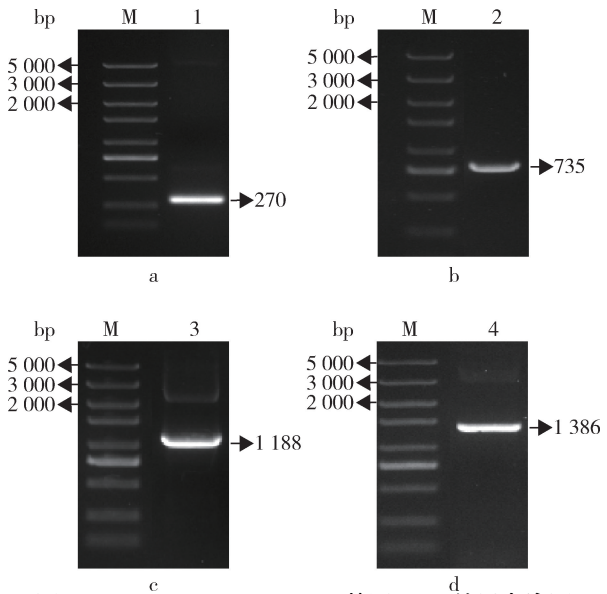


图 1 *permE*、*tylE*、*tylF*、*tylCV* 基因 PCR 结果电泳图

Fig 1 *permE*, *tylE*, *tylF*, *tylCV* gene PCR results electropherogram

2.2 重叠延伸 PCR 法连接 *permE*、*tylF*、*tylE* 和 *tylCV*基因 通过重叠延伸 PCR 法获得重组基因片段 *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV*,大小约为 3500 bp,电泳结果如图 2 所示,在 3500 bp 处出现单一、清晰的条带,说明重组片段连接正确,可用于后续实验。将该片段胶回收后于 -20 ℃ 保藏备用。

2.3 供体菌的构建 筛选到一株阳性克隆子,提取质粒进行 PCR 验证(图 3)和酶切验证(图 4),在约 3500 bp 处扩增出了目的条带,使用 *EcoRV* 和 *XbaI* 也切出了约 3500 bp 大小的片段,结合空载体的酶切结果(图 5),初步说明 pSET152 - *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV* 重组载体构建成功,测序结果表明 *tylF*、*tylE* 和 *tylCV* 基因均与 GenBank

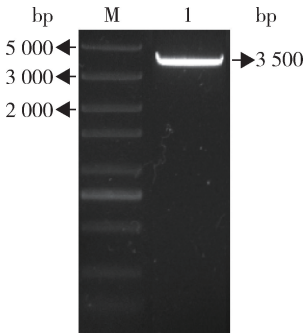


图 2 重组基因片段 *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV* 电泳图

Fig 2 Electrophoretic diagram of recombinant gene fragment *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV*

上发表的序列相同。至此,pSET152 - *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV* 重组载体构建成功,可用于后续实验。

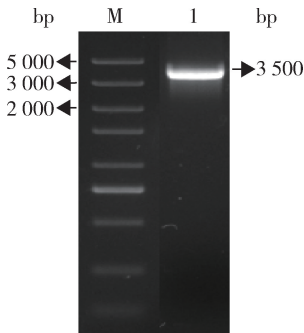


图 3 pSET152 - *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV*

重组载体 PCR 验证结果

Fig 3 PCR verification results of recombinant vector

pSET152 - *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV*

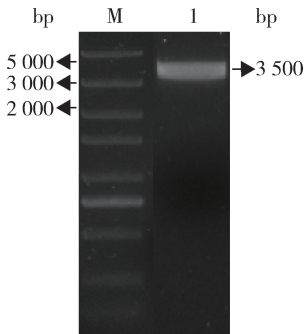


图 4 pSET152 - *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV*

重组载体酶切验证结果

Fig 4 Results of enzyme digestion verification of recombinant vector pSET152 - *permE* - *tylF* - *tylE* - *tylCV*

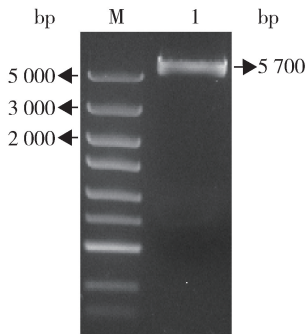


图 5 pSET152 载体酶切结果

Fig 5 pSET152 vector digestion result

2.4 重组菌株的摇瓶发酵验证 从接合转移培养皿中共挑选了 20 个单菌落,并将其于试管斜面培养,培养 12 d 后仅有 13 个单菌落斜面长势较好,斜面孢子层较厚,呈白色。刮取适量带有少量培养基的斜面孢子接种于发酵培养基进行摇瓶发酵验证,培养 7 d 后测定效价(连续培养 3 批),结果如表 2 所示。其中 3、6、7、8、9、10 和 13 号连续三批的效价趋于稳定,且高于出发菌株,分别高出约 12%、9%、9%、18%、23%、29% 和 21%。用液相色谱仪分析 3、6、7、8、9、10 和 13 号单菌落的发酵液,结果如表 3 所示。通过表 2 可得,7、8、9、10、13 号单菌落发酵液中泰乐菌素 A 的含量显著($P\leq 0.05$)高于出发菌,其中 10 号单菌落泰乐菌素 A 在 10.778 min 出峰(图 6),相对峰面积为 59.07%,高出出发菌 11.66%。同样,10 号单菌落的泰乐菌素 C 也显著($P\leq 0.05$)高于其它 4 株菌和出发菌,而泰乐菌素 B 和泰乐菌素 D 的变化不显著,说明增加 *tylE* 和 *tylCV* 基因的拷贝数可有效提高泰乐菌素 C 的含量,增加 *tylF* 基因的拷贝数可积累泰乐菌素 A。

2.5 工程菌株的 PCR 验证 提取 RTL21-10 单菌落的全基因组,并以该全基因组为模板,用引物 *P-f/CV-r* 扩增 *permE-tylF-tylE-tylCV* 片段,电泳结果如图 7 所示,在 3500 bp 处有单一、清晰的条带,说明弗氏链霉菌 *tylF*、*tylE*、*tylCV* 双拷贝工程菌构建成功。

表 2 连续 3 批发酵摇瓶效价测定情况

Tab 2 Determination of fermentation titer for three consecutive batches of shaker

单菌落号	第一批效价/ (u · mL ⁻¹)	第二批效价/ (u · mL ⁻¹)	第三批效价/ (u · mL ⁻¹)
1	11018 ± 532	11444 ± 574	11870 ± 331
2	11494 ± 681	11274 ± 754	11054 ± 244
3	11251 ± 195	10480 ± 345	10709 ± 241
4	11535 ± 572	11619 ± 341	11703 ± 256
5	11420 ± 441	11864 ± 467	12307 ± 136
6	12266 ± 588	12371 ± 346	12475 ± 189
7	12323 ± 367	12149 ± 863	11975 ± 383
8	13069 ± 347	13716 ± 246	13579 ± 362
9	13975 ± 478	13796 ± 211	13954 ± 513
10	14580 ± 274	14368 ± 314	14845 ± 113
11	9860 ± 436	11412 ± 111	13059 ± 156
12	15414 ± 233	12192 ± 135	10787 ± 178
13	13474 ± 462	13702 ± 313	12987 ± 319
出发菌	11318 ± 268		

表 3 各单菌落发酵液组分

Tab 3 Components of fermentation broth of each single colony

单菌落号	各组分相对峰面积/%			
	A 组分	B 组分	C 组分	D 组分
6	45.27 ± 0.28 ^c	1.05 ± 0.06	20.10 ± 0.52 ^b	1.68 ± 0.02
7	54.81 ± 0.30 ^b	1.61 ± 0.03	24.65 ± 0.61 ^{ab}	2.29 ± 0.02
8	53.52 ± 0.23 ^{bc}	1.19 ± 0.07	24.78 ± 0.39 ^{ab}	2.29 ± 0.03
9	55.12 ± 0.61 ^b	1.20 ± 0.06	24.20 ± 0.52 ^{ab}	2.40 ± 0.05
10	59.07 ± 0.55 ^a	1.32 ± 0.01	26.69 ± 0.49 ^a	1.98 ± 0.05
13	54.85 ± 0.45 ^b	1.22 ± 0.05	25.70 ± 0.55 ^{ab}	1.96 ± 0.07
出发菌	52.9 ± 0.58 ^{bc}	1.07 ± 0.02	23.17 ± 0.40 ^{ab}	2.13 ± 0.08

3 讨论

本研究成功构建了一株双拷贝 *tylE*、*tylF* 和 *tylCV* 基因的高产泰乐菌素工程菌株,以上三个基因由强启动子 *permE* 启动表达,以确保发酵过程中工程菌的稳定性,强化双拷贝的 *tylF*、*tylE* 和 *tylCV* 基因的表达。采用以上策略,获得一株弗氏链霉菌工

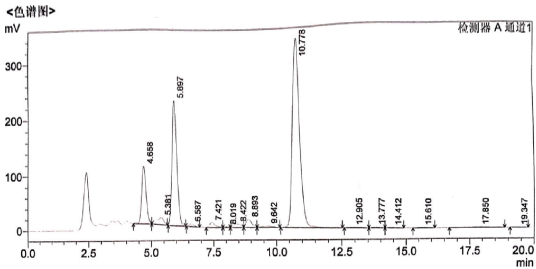


图 6 RTL21 - 10 单菌落发酵液液相色谱峰图

Fig 6 Liquid chromatographic peak of fermentation broth of RTL21 - 10 single colony

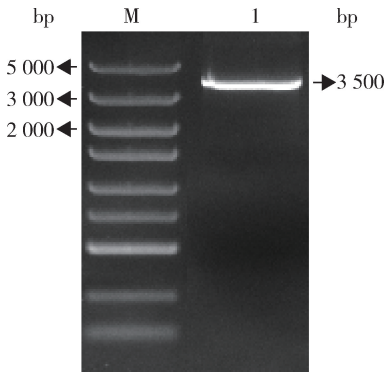


图 7 RTL21 - 10 号单菌落 PCR 验证结果

Fig 7 PCR verification results of RTL21 - 10 single colony

程菌,单菌落编号为 RTL21 - 10,效价比出发菌高出 29%,利用液相色谱对 RTL21 - 10 单菌落的发酵液进行分析,各组分均优于对照菌株。由此可见,增加泰乐菌素合成途径中的相关基因的拷贝数可提高抗生素的产量,也可优化组分。本研究成功构建了高产泰乐菌素工程菌株,该方法为弗氏链霉菌的遗传改造提供参考,具有重要的研究意义。

增加合成代谢途径中关键酶基因的拷贝数是链霉菌代谢工程育种的有效手段^[25],*tylF* 基因编码的大菌素 - O - 甲基转移酶是限速酶,可催化泰乐菌素 C3 位羟基的甲基化反应^[26]。范亮等^[27]构建具有双拷贝 *tylF* 基因的泰乐菌素基因工程菌,以解决泰乐菌素基因生物合成的限速环节,重组菌株泰乐菌素的发酵单位较出发菌株提高 32.7%。马次郎^[28]等人构建了双拷贝 *tylD*、*tylF*、*tylJ* 基因的泰乐菌素工程菌,泰乐菌素发酵摇瓶效价较出发菌株提高了 28.1%,该菌株 *tylD*、*tylF*、*tylJ* 表达水平高于

出发菌株,并且在进入稳定后期表达量达到最大值。何翔宇^[29]利用 Red/ET 同源重组技术构建含有完整泰乐菌素生物合成基因簇的质粒 pBAC - *tyl*,并将该质粒在白色链霉菌 J1074 (*Streptomyces albus* J1074)中进行异源表达,泰乐菌素的发酵产量达到 14.6 mg/L。此外,陈文青^[30]利用红霉素抗性基因启动子 *permE* 在弗氏链霉菌中异源表达 *vhb* 基因,在 5L 发酵罐条件下研究发现,VHb 蛋白的表达显著促进了泰乐菌素合成与菌体的生长,这种作用越是在限氧条件下,表现的越是明显。但是,在工业生产过程中,随着泰乐菌素产量的不断提高,部分泰乐菌素被还原为雷诺霉素 (Relomycin)——一种严重影响泰乐菌素产品质量的副产物,Huang 等^[31]从弗氏链霉菌中纯化了该酶,并对其性质进行了初步研究,确定了泰乐菌素还原酶隶属于醛酮还原酶家族,朱慧等^[32]的研究结果也证实了醛酮还原酶可催化还原泰乐菌素。

本研究成功构建了高产泰乐菌素的工程菌株,但对 *tylE*、*tylF* 以及 *tylCV* 基因的表达情况还需进一步研究,以更深入的了解弗氏链霉菌工程菌株的代谢途径。同时,在泰乐菌素的工业生产中,一方面可通过增加关键基因的拷贝数以提高泰乐菌素的产量,另一方面可通过抑制醛酮还原酶的活性以达到积累泰乐菌素的目的。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典,2000 年版,第一部[S].
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of the Republic of China, 2000, Vol. 1, Beijing: Chemical Industry Press[S].

[2] Hamill R L. Tylosin, a new antibiotic [J]. Antibiotics & Chemotherapy, 1960, 11: 328 - 334.

[3] 张 晶. 石墨烯复合材料的构筑及其对泰乐菌素光解特性 [D]. 安徽理工大学, 2016.
Zhang J. Construction of graphene composites and their photolysis properties to Tylosin [D]. Anhui University of Science and Technology, 2016.

[4] Prats C, Francesch R, Arboix M, et al. Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid

- chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2002, 766(1): 57–65.
- [5] Teeter J S, Meyerhoff R. Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta [J]. Environmental Research, 2003, 93: 45–51.
- [6] 彭平彩, 吴银宝. 兽药泰乐菌素的生态毒理学研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2011, 43(09): 90–94.
- Peng P C, Wu Y B. Progress in ecotoxicology of veterinary drug Tallosin [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2011, 43(09): 90–94.
- [7] 任玉琴, 裴丞军, 吴望君. HPLC 法同时测定磺胺二甲嘧啶含量和泰乐菌素组分[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(07): 64–71.
- Ren Y Q, Qiu C J, Wu W J. Simultaneous determination of sulfadimethazine and tylosin by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2018, 52(07): 64–71.
- [8] 闵勇. 弗氏链霉菌及耐热链霉菌的遗传改造[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- Min Y. Genetic modification of *Streptomyces freund* and heat-resistant *Streptomyces* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006.
- [9] Jensen A L, Darken M A, Schultz J S, et al. Relomycin: Flask and tank fermentation studies [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1963, 161(1): 49–53.
- [10] Pape H, Brillinger G U. Metabolic products of microorganisms. 113. Biosynthesis of thymidine diphospho mycarose in a cell-free system from *Streptomyces rimosus* [J]. Archiv Für Mikrobiol, 1973, 88(1): 25–35.
- [11] Seno E T, Pieper R L, Huber F M. Terminal stages in the biosynthesis of tylosin[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1977, 11(3): 455–461.
- [12] Arisawa A, Kawamura N, Tsunekawa H, et al. Cloning and nucleotide sequences of two genes involved in the 4"-O-acylation of macrolideantibiotics from *Streptomyces thermotolerans* [J]. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57: 2020–2025.
- [13] Arisawa A, Tsunekawa H, Okamura K, et al. Nucleotide sequenceanalysis of the carbomycin biosynthetic genes including the 3-O-acyltrans-ferase gene from *Streptomyces thermotolerans*[J]. Biosci Biotech Biochem, 1995, 59: 582–588.
- [14] 侯艳华. 4 株海洋放线菌遗传转化体系的研究[D]. 山东青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2006.
- Hou Y H. Genetic transformation system of four *Marine actinomycetes* strains [J]. Qingdao, Shandong: Graduate University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2006.
- [15] 方志锴, 洪文荣, 严凌斌, 等. 金色链霉菌接合转移体系的构建[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2011, 40(5): 521–524.
- Fang Z K, Hong W R, Yan L B, et al. Construction of conjugated transfer system of *Streptomyces aureus* [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2011, 40(5): 521–524.
- [16] 武立清, 孙玲, 黄丽丽, 等. *Streptomyces yanglingensis* KM-1-2 遗传转化体系的建立及 km790 的过表达[J]. 西北农业学报, 2020, 29(09): 1430–1439.
- Wu L Q, Sun L, Huang L L, et al. Establishment of *Streptomyces yanglingensis* KM-1-2 genetic transformation system and its overexpression of KM790 [J]. Journal of Northwest Agricultural Sciences, 2020, 29(09): 1430–1439.
- [17] 刘雪娇, 牛铭山, 邱荣国, 唐莉. Fostriecin 产生菌 *Streptomyces pulveraceus* 遗传转化体系的建立与优化[J]. 微生物学通报, 2012, 39(03): 371–377.
- Liu X J, Niu M S, Qiu R G, et al. Establishment and optimization of the elemental transformation system of Fostriecin-producing bacterium *Streptomyces pulveraceus* [J]. Chinese Journal of Microbiology, 2012, 39(03): 371–377.
- [18] Kuhstoss S, Rao R N. Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage ΦC31 [J]. Journal of Molecular Biology, 1991, 222(4): 897–908.
- [19] Malla S, Niraula N P, Liou K, et al. Enhancement of doxorubicin production by expression of structural sugar biosynthesis and glycosyltransferase genes in *Streptomyces peucetius* [J]. J Biosci Bioeng, 2009, 108(2): 92–98.
- [20] 杨永红, 赫卫清, 李瑞芬, 等. 利用强启动子 PermE~* 提高 4"-异戊酰基转移酶基因在变铅青链霉菌 TK24 中对螺旋霉素的 4"-异戊酰化水平[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(11): 826–830.
- Yang Y H, He W Q, Li R F, et al. Improvement of the 4"-isovalyl transferase gene against Spiramycin in *Streptomyces pneumoniae* TK24 by using strong promoter PermE~* [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2010, 35(11): 826–830.
- [21] 王义, 任勇, 刘建成, 等. 一种泰乐菌素基因工程菌及其应用[P]. 宁夏: CN102690775A, 2012–09–26.
- Wang Y, Ren Y, Liu J C, et al. The invention relates to a tallosin gene engineering bacterium and its application [P]. Ningxia: CN102690775A, 2012–09–26.
- [22] Kieser T, Bibb M J, Buttner M, et al. Practical *Streptomyces genetics* [M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [23] 何群香. 提高耐热链霉菌转化泰乐菌素能力的分子育种改造

- [D]. 华中农业大学, 2008.
- He Q X. Molecular breeding to improve the ability of heat – resistant *Streptomyces* to convert Tylosin [D]. Huazhong Agricultural University, 2008.
- [24] 徐红梅. 泰乐菌素高产菌株的推理选育及发酵工艺优化 [D]. 华东理工大学, 2013.
- Xu H M. Inference breeding and fermentation process optimization of a strain with high production of thielectin [D]. East China University of Science and Technology, 2013.
- [25] 黄蔚, 徐春燕, 牛春, 等. 泰乐菌素高产菌株选育研究进展 [J]. 生物技术通报, 2013(11): 34 – 39.
- Huang W, XU C Y, Niu C, *et al.* Research progress on the breeding of a strain with high production of thielensin [J]. Biotechnology Bulletin, 2013(11): 34 – 39.
- [26] 闫明亮. 弗氏链霉菌 *tylF* 基因的克隆及其生物信息学分析 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(12): 126 – 129, 149.
- Yan M L. Cloning and bioinformatics analysis of *tylF* gene from *Streptomyces fraseri* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(12): 126 – 129 + 149.
- [27] 范亮, 杜宝华, 陈光, 等. 泰乐菌素基因工程菌的构建[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(5): 398 – 401.
- Fan L, Du B H, Chen G, *et al.* Construction of tallosin gene engineering bacteria [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2012, 29(5): 398 – 401.
- [28] 马次郎, 陈奕公, 刘晓明, 等. 双拷贝 *tylD*、*tylF* 和 *tylJ* 弗氏链霉菌工程菌株构建及其发酵性能研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(08): 915 – 919.
- Ma C L, Chen Y G, Liu X M, *et al.* Construction of double – copy *tylD*, *tylF* and *tylJ* strain and its fermentation Performance [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2019, 44(08): 915 – 919.
- [29] 何翔宇. 泰乐菌素生物合成的异源表达及其改造 [D]. 天津大学, 2020.
- He X Y. Allogenic expression and modification of tallosin biosynthesis [D]. Tianjin University, 2020.
- [30] 陈文青. 透明颤菌血红蛋白基因在弗氏链霉菌中的克隆与表达 [D]. 华中农业大学, 2004.
- Chen W Q. Cloning and expression of vitreoscilla hBA1c gene in *Streptomyces frutensis* [D]. Huazhong Agricultural University, 2004.
- [31] Huang S L, Hassell T C, Yeh W K. Purification and properties of NADPH – dependent tylosin reductase from *Streptomyces fradiae* [J]. J Biol Chem, 1993, 268(25): 18987 – 18993.
- [32] 朱慧, 马次郎, 岳思君, 等. 弗氏链霉菌泰乐菌素还原酶原核表达及结构功能研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(06): 538 – 544.
- Zhu H, Ma C L, Yue S J, *et al.* Prokaryotic expression and structural function of Tylosin – reductase in *Streptomyces fraseri* [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2021, 46(06): 538 – 544.

(编辑:陈希)