

The Research on Biotechnology Improving the Metabolic Product of Marine Habitat Medicinal Actinomycetes

Xiangjun Ma^{1,2}, Zhenping Shi¹, Jiuming Zhang¹, Li Tian^{1,2*}

¹Qingdao University of Science and Technology, Qingdao

²First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao

Email: 15192095101@163.com, tianli@fio.org.cn

Received: Aug. 12th, 2014; revised: Aug. 29th, 2014; accepted: Sep. 1st, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Marine habitat actinomycetes can produce peculiar medicinal compounds, but the amount is not enough to meet the requirements of further study. Protoplast fusion technology is one of the most common methods of breeding to improve strains of actinomycetes. This article combined related progress, analyzed the factors that influenced the actinomycetes protoplast fusion, introduced the screening methods of actinomycetes fusants, and commented on the means as to how to use genetic engineering to increase the titer of actinomycetes medicinal antibiotics.

Keywords

Actinomycetes, Protoplast Fusion, Genetic Engineering, Medicinal Antibiotics

生物技术提高海洋生境药用放线菌代谢产物的研究

马湘君^{1,2}, 史振平¹, 张久明¹, 田黎^{1,2*}

¹青岛科技大学, 青岛

²国家海洋局第一海洋研究所, 青岛

Email: 15192095101@163.com, tianli@fio.org.cn

*通讯作者。

收稿日期：2014年8月12日；修回日期：2014年8月29日；录用日期：2014年9月1日

摘要

海洋生境放线菌可产生较特异的药用化合物，但通常量很少很难满足后续的研究要求，原生质体融合技术是改良放线菌菌株最常用的育种方法之一，本文结合相关研究进展，分析了影响放线菌原生质体制备和融合的因素，介绍了放线菌融合子的筛选方法及应用，并对如何利用融合及基因技术等方法提高放线菌药用抗生素的产量进行了评述。

关键词

放线菌，药用化合物，原生质融合，基因技术

1. 引言

微生物作为药用活性化合物的重要生物资源，不断有新化合物被人类发现，放线菌(*Actinomycetes*)以化合物种类丰富、实用性强而引人注目，放线菌属于原核生物系统进化树上高GC%、革兰氏阳性细菌分支类群，其对人类主要贡献是产生抗生素，现已发现的天然抗生素中约有70%来源于放线菌家族[1][2]。

微生物生境与其产物关系密切，开发新生境的微生物，较容易获得新药用化合物，海洋生境的放线菌由于生境特殊，形成的次级代谢产物在结构及生物活性等方面都与陆生放线菌不同而受到关注[3]，但海洋微生物产生的次级代谢产物量很少，很难满足后续的研究要求，利用生物技术提高海洋放线菌药用代谢产物成为研究和生产亟待解决的问题，而近年来生物技术在微生物尤其在药用放线菌采用中具有很好的优势。

2. 原生质体融合技术

野生菌株产量较低，一般药用菌株开发利用之前，首先需要通过各种育种手段如物理与化学方法诱变、基因杂交育种等方法获得高产菌株，与上述方法相比，原生质体融合技术是较新的方法，并有其独特的优点。它突破种、属等分类界限，使在自然条件下和用常规方法不能接合的菌株发生融合，可在有生产价值的株内、种间甚至属间进行杂交育种。原生质体融合的重组频率高，还可以和其它育种方法相结合，先诱变再融合，或先融合再诱变。而且同基因工程育种相比，它不必对试验菌株进行详细的遗传学研究，也不需要高精尖的仪器设备和昂贵的材料费用。原生质体融合技术起源于20世纪60年代，开始是法国的Karski研究小组在两种不同类型的动物细胞混合培养中发现了自发融合现象。1974年，匈牙利的Ferenczy[4]用离心力诱导的方法报道了白地霉(*Geotrichum candidum*)营养缺陷型突变株的原生质体融合。接着微生物融合由种内融合扩展到界间的融合，如光合细菌与酵母菌的融合。1979年匈牙利的Pesti[5]首先提出了融合育种提高青霉素产量的报告，开创了原生质体融合技术在实际工作中的应用，使原生质体融合技术成为提高抗生素产量的重要手段之一。1983年Yamachita等相继开展了其他多种微生物的原生质体融合，使酵母菌、霉菌、细菌、放线菌等多种微生物原生质体融合技术逐渐形成了一个新的实验体系。近30年来许多产抗生素链霉菌杂交重组相继获得成功[6]。利用链霉菌原生质体融合不仅克服了种、属间杂交的不育性，大大提高了基因间重组的频率，为提高抗生素的产量提供了新的手段，而且可能产生新的抗生素类型。

2.1. 影响放线菌原生质体制备的因素

细胞融合需要制备原生质体,影响原生质体制备的最大障碍就是细胞壁,现在去除细胞壁的主要方法就是酶解,使用的酶主要为溶菌酶、蜗牛酶、复合酶等。具体根据所用微生物的种类而定,一般放线菌如链霉菌采用溶菌酶去壁。而酶的浓度、温度及作用时间是影响链霉菌原生质体制备的重要因素。因为使用的酶有时含有对原生质体有害的物质,一般来说,随着酶量的增加,有害物质的浓度也会随之增加,当达到一定浓度时,必然会影响原生质体的活性,而且,酶浓度过大,细胞脱壁太彻底,必然降低原生质体的再生率[7]。高浓度的酶制备原生质体时细胞受损伤较大,失去了重新建成原来细胞所必要的因子,影响原生质体的再生。同时,根据酶反应动力学原理,酶解温度直接影响酶促反应的速度。一般放线菌的最适酶解温度为 28℃~37℃。不同微生物的最适酶解时间的差异很大。酶解时间与原生质体形成率成正比,与再生率成反比。酶解时间过短会脱壁不彻底,酶解时间过长,对于一些早期释放的原生质体膜则有破坏作用,影响原生质体膜的稳定性,降低原生质体的再生率[8]。此外,培养基成分的不同也会影响原生质体的制备,原因为不同的培养基成分可导致新合成细胞壁结构的差异,这种差异又导致了细胞壁对酶敏感度的不同,最终导致菌丝细胞释放的原生质体量的差异[9]。在链霉菌的培养基中加入氨基乙酸,可使菌丝体细胞壁形成对裂解酶敏感的结构,进而大幅度提高原生质体的释放,且制备的原生质体质量高,提高了原生质体的再生率[10]。另外,甘氨酸浓度也对链霉菌原生质体的制备产生一定的影响。甘氨酸能阻碍链霉菌细胞壁的合成,提高菌丝体对溶菌酶的敏感性,可以加快脱壁,但同时高浓度的甘氨酸会抑制菌丝生长。因此需找出对菌丝生长及原生质体释放均有利的甘氨酸浓度。此外,渗透压稳定剂的种类和浓度也会对再生率产生影响,有报道认为[11]在高渗再生培养基中加入 0.5 mol/L 的蔗糖较合适不同的微生物种类要求的量不同,就形成率而言,以糖及糖醇类作为渗透压稳定剂比无机盐类更有利于原生质体的再生。

2.2. 影响放线菌原生质体融合的因素

影响链霉菌原生质体融合的因素很多,一般来讲 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 有助于融合。这是因为钙离子和带负电荷的聚乙二醇(PEG)与细胞膜表面分子相互作用,从而使原生质体带电后彼此易于附着发生凝集[12]。在采用 PEG 诱导融合法时,PEG 的分子量对链霉菌原生质体的融合影响较大。微生物不同原生质体融合时使用的 PEG 分子量也不同,分子量大对融合的促进作用越大,但同时细胞的毒性也越大,一般链霉菌原生质融合多采用分子量为 1000~1500。在采用常规分子量 PEG 效果不理想的情况下,本实验室尝试组合 PEG 作为融合剂的方法获得成功,将 PEG1000 与 PEG4000 按照 2:1 的比例混合,在一定程度上提高了链霉菌融合子的得率。这种不同分子量 PEG 的组合既促进了融合,也降低了对细胞的毒性,为原生质体的融合提供了更多的可能性。PEG 的浓度也会影响融合,若 PEG 的浓度过高,会影响原生质体融合体的再生,通常链霉菌会选择 50% 的 PEG 浓度。

链霉菌在进行种内原生质体融合时,由于其基因组同源性高,重组频率高,生命力强,融合子遗传稳定。但两亲本菌株亲缘关系近,融合使生物合成的某些基因得到强化或其调控机制得到改变的频率较低,因此重组子代谢产物的单位产量较原始亲本可能提高的幅度较小。如亲本之一为高产菌株,另一亲本为效价比较低的菌株,重组子基本效价可能仅介于两菌株之间,难以有较大提高,[13]而亲缘关系较远的菌株融合,虽然成功率较低,但可能获得较大突破。除此之外,应该考虑到实验中发生融合的情况是复杂的。首先,自身细胞即同一遗传标记的细胞会发生融合。其次,不同遗传标记的原生质体相融合。且融合后的原生质体有一部分是含两个核,有的是 3 个核甚至多个核。Hopwood[14]曾经严格证明了天兰色链霉菌中多个原生质体融合为一个的现象。在亲本的选择方面,我们也尝试通过两株不产所需抗生素

的诱变菌株进行融合，这是基于激活沉默基因的方法。所谓沉默基因是指在自然条件下存在于菌体中的不表达或表达水平极低，并在特定条件下可被激活而表达活性产物的 DNA 序列[15]。此方法产生新抗生素的理论依据是根据微生物次级代谢的特点，即一种微生物可能具有比其直观表现的有更大的产生多种抗生素及生物活性物质的潜力。

2.3. 融合子的筛选方法

融合完成后融合子的选择很重要，融合之前需要对双亲本进行标记，但多数抗药性标记都会影响代谢产物的产量，而原生质体灭活近些年采用的比较多。通过将单亲或双亲的原生质体经紫外线照射、加热或某些化学药剂的处理，使其丧失在再生培养基上生长的能力，两亲株融合后产生的融合子损伤互补，可在再生培养基上生长，虽然融合再生率相对较低，但操作简便，对代谢产物的影响小。在单亲灭活原生质体的融合中，有人认为可以实现遗传物质的单向传递，即被灭活亲株只起供体作用。骆健美等[16]将2株高产褐黄孢链霉菌(*Streptomyces gilvosporeus*) SG-2002-1 和 SG-2002-2 的原生质体分别经过紫外灭活和热灭活后进行融合，得到能够生长繁殖的融合子。

还可通过营养缺陷型标记筛选融合子，其原理是缺陷型的双亲由于丧失了合成某种营养物质的能力，导致它们在基本培养基上不能生长、繁殖。而同一亲本相互融合产生的融合子也不能在基本培养基上形成菌落，只有不同亲本原生质体相互融合后，缺陷的营养物质得到互补才能恢复为野生型，进而在基本培养基上生长形成菌落。也可以利用抗药性标记筛选融合子。Bradshaw 等 1984 年用这种方法检出了融合子。

除此之外，荧光染色法也是一种筛选融合子的有效方法。其机理是在酶解制备原生质体时事先向酶解液中加入荧光色素(如 DAPI, FTTC)进行标记，使双亲原生质体分别带上不同的荧光色素。带上荧光色素的原生质体仍可以发生融合并具有再生能力，然后在显微操作器和荧光显微镜下来挑取同时带有双亲原生质体荧光标记的融合子，将挑选的融合子直接置高渗再生培养基上即可。龙建友等[17]将产秦岭霉素的菌株原生质体用酚藏花红荧光标记，将其诱变株 Ms-24 菌株原生质体用伊文思蓝荧光标记，融合后在荧光显微镜下筛选同时带有红蓝荧光的融合子，再通过进一步发酵产物 HPLC 检测得到三株高产秦岭霉素的融合子。利用某些特殊的生理特征作为标记来筛选融合子，是一种更简单是方法。孙丽娟等[18]将吸水链霉菌 FC904-25 和链霉菌 FCZ0311 融合后直接涂布再生培养基上，多次融合得到 10 株菌落形态不同于亲本的绿色“融合子”且融合子在抗生素代谢与产量方面比亲本更具优势。

3. 基因调控技术

在选育高产菌株的基础上，基因调控技术可以主动的提高目标化合物的产量，放线菌中天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)和阿维链霉菌(*S. avermitilis*)基因组测序已完成，分别发现了 24~30 个编码色素等次级代谢产物的基因簇[19] [20]，这个数字远超过这 2 种链霉菌中已发现的次级代谢产物的数量，说明在现有的培养条件和筛选方法下还有许多的天然产物没有表达和被发现。因此，利用基因工程和代谢调控等手段提高现有抗生素的产量和增加已有抗生素的同系物的种类具有较大的潜力。

3.1. 共培养增加次生代谢产物的多样性

抗生素产生多以单一的纯菌种进行发酵培养，而自然生态环境中的微生物往往处于多菌种共存的状态。因此，模拟微生物野生生境，研究两种或多种微生物的共培养，可能增加次生代谢产物的多样性及新生物活性物质的发现，共培养由于其复杂性，目前对于得到的新活性组分的产生机理还不清楚。根据前人在共培养研究方面的相关文献，可以推测是营养条件的改变或竞争胁迫诱导产生。两菌共培养时，

由于一种菌生长繁殖速度较快成为优势菌,使培养基中的营养成分被大量消耗而迅速达到寡营养状态。寡营养条件的形成可能会导致产物的变化。还有一种说法是“沉默基因”的激活[21][22]。在普通条件下放线菌中许多抗生素合成相关基因不表达或表达水平极低,共培养过程中另一菌产生的代谢产物可能激活了放线菌的某些沉默基因,从而产生了新的代谢产物。黄兵等[23]利用链霉菌 FXJ2.014 与枯草芽孢杆菌进行共培养产生了在相同条件下单培养时没有的生物活性组分 FXJ2.014-HB,其抗菌、抗肿瘤活性良好,且细胞毒性明显降低,有可能成为低毒性的候选抗生素。Kurosawa 等[24]利用链霉菌(*Streptomyces padanus*)与红球菌(*Rhodococcus fascians*)共培养发现了 2 种新的抗生素 Rhodostreptomycins A 与 B。由此可见,利用 2 种不同菌株的共培养充分利用了菌种资源,在增加次生代谢产物多样性方面具有一定的价值。

3.2. 代谢调控提高抗生素产量

链霉菌次级代谢调控有三个层次,分别为:途径特异性调控(pathway-specific regulation)、多效调控(pleiotropic regulation)和全局调控(global regulation)。在这三个层次的调控中有一类自动调控因子(Autoregulator),作为胞外信号分子控制着链霉菌次级代谢物的产生或其形态分化,它们在微生物菌体中扮演着类似动物“激素”的角色,如有着特殊 2,3-二替代- γ -丁酸内酯框架,被称作 γ -丁酸内酯自动调控因子[25]。截止目前已经在 7 类链霉菌中鉴定了 14 种 γ -丁酸内酯[26],根据 C-2 位结构的细微差别可分为三种类型: A 因子型,含 6-酮基; VB 型(Virginiae butanolides, VBs),含 6-A 羟基; IM-2 型,含 6-B 羟基。现只对 A 因子型对微生物的次级代谢与形态分化的调控作用进行简单阐明。A 因子由一种甘油衍生物和一种 B-酮酸衍生物缩合而成[27],是一种小分子,当它浓度低至 10^{-9} mol/L 即可恢复其缺陷型突变株的链霉素产生和孢子形成能力。AfsA 是 A 因子生物合成的关键酶,在菌体生长初期,当 A 因子浓度很低时 ArpA 结合 AdpA 启动子区域抑制其转录,随着菌体的生长,A 因子不断积累,当浓度达到阈值时,A 因子结合 ArpA 并从 AdpA 启动子解离下来,诱发 AdpA 的转录。AdpA 控制着一系列参与形态分化和次级代谢基因的转录,形成一个 AdpA 控制的调控网络。有关实验证明 A 因子突变株相对于野生株提前产生链霉素并且产量提高了 10 倍[28]。我们可以尝试人为提高 A 因子的浓度进而增加我们理想的次级代谢产物的产量,或者尝试敲除 ArpA 基因的数量,因为它对链霉素的产生和形态分化起着阻遏作用。

3.3. 改造抗生素生物合成基因簇

微生物控制次级代谢产物合成和调节的基因通常成簇存在于染色体上,称为生物合成基因簇。随着分子生物学的发展,许多生物合成基因簇已了解的比较清楚。如纤维堆囊菌(*Sorangium cellulosum*)存在长 92 kb 的 Chivosazol 生物合成基因簇,它包含 4 个聚酮合成酶(PKS)基因和调控基因[29]。改造抗生素生物合成基因簇可分为增加基因簇的拷贝数、改造调控基因和自身抗性基因以及异源表达等。增加基因簇的拷贝数可分为插入抗生素生物合成基因或是增加限速酶基因的拷贝数来提高抗生素的产量。Hung 等[30]将克拉维酸链霉菌(*S. clavuligerus*)中 cas2 基因整合进染色体,增加其拷贝数,从而使克拉维酸增产 1.6~5 倍。不同生物合成基因簇的调控基因同源性一般很高,建立了改造某个调控基因的方法后,即可利用调控基因的同源性,将该方法扩展到其他菌种中。调控因子是一类在转录水平调节基因表达的蛋白质,它们能特异性结合到该基因簇中的核酸调控元件,激活或阻碍抗生素结构基因的转录。通常来说,过量表达编码激动子的基因和失活编码阻遏子的基因,是增加抗生素产量最直观的方法。链霉菌抗生素的生物合成基因簇转录起始普遍依赖全局或途径特异调控蛋白的调控。全局调控蛋白主要有双组分调控系统,如 AbsA1/A2、PhoR/P、AfsQ1/Q2 和 DraR-K [31];途径特异性调控蛋白主要包括链霉菌抗生素调控蛋白 SARP (*Streptomyces antibiotic regulatory protein*)家族,SARP 对抗生素生物合成起正调控作用[32]。在链霉

菌的调控网络中 TetR 家族作为非常重要的成员在链霉菌形态分化、初级代谢以及次级代谢中发挥着重要的作用。TetR 家族转录调节因子(TetR family transcriptional regulator, TFR)是最常见的原核转录调控因子之一,因其家族中结构和功能研究最为清楚的四环素抗性阻遏蛋白(Tet repressor, TetR)而得名[33]。TetR 家族成员通常发挥着负调控作用,对于 TFRs 的传统研究通常是采用基因敲除的方法,期望通过解除阻遏从而达到激活沉默的基因簇或者提高低产抗生素产量的目的。但近年来不断有研究报道发现 TFRs 作为正调控因子参与次级代谢调控的例子[34]。这又揭示了 TFRs 调控因子的多样性。在抗生素生物合成基因簇内有一个或多个基因来负责编码修饰抗生素靶点酶系统,包括抗生素失活酶和转运酶等,它们可使菌株产生抗生素抗性,被称为自身抗性基因(self-defense gene)。抗性基因可以提高菌株自身的抗性,使其免受产物的毒性作用,因此,通过表达自身抗性基因,能够促进抗生素的合成。Yanai 等[35]在卡那霉素链霉菌中复制了整个卡那霉素基因簇,这其中包含 3 个自身抗性基因,结果使卡那霉素增产 3.5 倍。我们还可以通过基因工程技术,将目的生物合成基因簇转移至同源或不同的异源宿主中表达,不仅可以提高抗生素的产量还可激活沉默的生物合成基因簇,利用不同的表达体系生产更多结构新颖、功能独特的抗生素。Eustáquio 等[36]在 *S. coelicolor* M512 中表达天蓝色链霉菌的全部新生霉素合成基因簇并引入调控基因 novG,使新生霉素产量提高了 300%。

3.4. 核糖体改造工程提高抗生素产量

核糖体工程选用作用于核糖体的抗生素,通过抗性筛选等相关实验来筛选得到代谢能力得到改造的突变株。链霉素等抗生素的靶点为核糖体组分,当抗生素生物合成基因簇发生突变时,会编码某些突变的核糖体蛋白,抗生素无法作用于突变的核糖体蛋白或 rRNA,因而使该菌种能够对外界抗生素等表现抗性,促进抗生素的合成[37]。国外核糖体工程研究主要围绕的是提高产能和选育高产菌株,并取得突破性进展[38]-[39],有文章记载抗性突变可使突变株代谢和生产原始菌所不生产的已知抗生素[40]-[41]。一般核糖体工程中定向突变编码核糖体蛋白 S12 的染色体 *rpsL* 基因的报道较多。当 *rpsL* 发生突变时,它对链霉素、菲特霉素(Fredericamycin)等次级代谢产物产生抗性[42]。采用该方法已实现菲特霉素和十一烷基菌产量的提高。通过核糖体改造工程实现抗生素产量提升的途径还有突变核糖体 rRNA 或者利用诱变育种随机突变核糖体蛋白等方法。随机突变核糖体蛋白的方法较为简便,突变完成后只需筛选带有抗生素抗性的菌株,然后进行发酵产物的 TLC 和 HPLC 的检测分析即可高频率地检测到目标产物的高产突变株。韩小贤等[43]曾利用此方法以 3 株具有抗肿瘤活性的产生菌,两株陆地放线菌 YN17707、18522 和一株海洋放线菌 007 为出发菌,得到高产原始菌所产化合物的突变株 87 株(41%)和可产新产物的突变株 22 株(10%)。

4. 结 论

针对目前海洋放线菌产生次级代谢产物药用价值高,但产量很低,较难在短期内提高的现状,本文就目前可能的操作方法进行了论述,原生质融合是一种提高产量行之有效的育种方法,但操作过程中需要注意诱导剂、亲本菌株的亲缘关系及融合后的筛选等问题,适当的调节和选择将可能获得较大的突破;模仿放线菌的野生状态,采用共培养方法提高产量,虽然重复性不好但具有简便易操作的优势;改造生物合成基因簇和利用代谢调控因子调控,是提高放线菌次级代谢产物产量的主动的方法,但需要较高的技术操作和研究成本,核糖体改造工程虽然成本相对较低,后续的筛选工作量会比较大。

基金项目

“十二五”国家科技支撑计划(2011BAE06B04);国家高技术“863”研究发展计划(2011AA10A202-2)。

参考文献 (References)

- [1] 殷瑜, 戈梅, 陈代杰 (2013) 新方法新技术与新型抗生素发现. *微生物学通报*, **10**, 1874-1884.
- [2] Berdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, **58**, 1-26.
- [3] 李巧连, 李可, 谢明杰, 曹旭鹏 (2010) 海洋放线菌次级代谢产物及其活性研究进展. *中国海洋药物*, **5**, 57-65.
- [4] Ferencezy, L., Kevei, F. and Zsolt, J. (1974) Fusion of fungal Protoplast. *Nature*, **248**, 793-794.
- [5] Pesti, M., Konszky, E. and Polga, J. (1979) *Fifth International Protoplast Symposium*, Willams and Wilkins, Baltimore, **54**.
- [6] 王春平, 韦强, 鲍国连, 等 (2008) 微生物原生质体融合技术研究进展. *动物医学进展*, **29**, 64-67.
- [7] 张振鲁, 杜茜, 周幸, 等 (2013) 不吸水链霉菌公主岭变种 769 原生质体制备条件初探. *中国农学通报*, **29**, 155-158.
- [8] 毛雨, 王丹, 李强, 等 (2010) 产琥珀酸放线杆菌的原生质体制备与再生. *中国生物工程杂志*, **30**, 103-108.
- [9] 张禹, 毛淑红, 路福平, 等 (2013) 原生质体融合技术选育分解草酸乳酸菌菌株的研究. *生物技术通报*, **1**, 186-190.
- [10] Luo, J.M., Li, J.S., Wang, Y.T., et al. (2009) Protoplast formation and regeneration conditions of *Streptomyces gilvosporeus*. *Bioinformatics and Biomedical Engineering*.
- [11] 李丽, 房杰, 黄洁洁, 付瑞燕 (2012) 单亲灭活德氏乳杆菌和乳酸乳球菌原生质体融合条件优化. *食品科学*, **5**, 193-198.
- [12] 张欢, 张燕, 王立梅 (2012) 多亲本原生质体融合构建高产谷胱甘肽菌株. *食品科技*, **11**, 18-22.
- [13] 曾洪梅, 张震霖, 石义萍, 林德炘 (1995) 原生质体融合提高农抗武夷菌素的效价. *微生物学报*, **5**, 375-380.
- [14] Hopwood, D.A. (1989) Antibiotics: Opportunities for genetic manipulation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences*, **324**, 549-562.
- [15] Ochi, K. and Hosaka, T. (2013) New strategies for drug discovery: Activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 87-98.
- [16] 骆健美, 李建妹, 王艳婷, 王敏 (2008) 褐黄孢链霉菌双亲灭活原生质体融合的研究. *现代化工*, **S2**, 49-53.
- [17] 龙建友, 唐世荣, 吴文君 (2007) 原生质体融合技术对秦岭霉素产量提高的影响. *中国农业科学*, **7**, 1416-1421.
- [18] 孙丽娟 (2007) 西罗莫司产生菌吸水链霉菌 FC904-25 与他克莫司产生菌链霉菌 FCZ0311 的原生质体融合. 福建医科大学, 福州.
- [19] Balagurunathan, R., and Shanthi, J. (2012) New approaches for novel secondary metabolites production from actinomycete. *Journal of Pharmacy Research*, **5**, 434-438.
- [20] 雷秀清, 李力, 黄建忠 (2014) 提高放线菌次级代谢产物产量方法的研究进展. *生物技术通报*, **5**, 45-51
- [21] 郭鹏飞, 靳艳, 张海涛, 虞星炬, 张卫 (2006) 共培养海绵微生物诱导抗菌活性物质的研究. *微生物学通报*, **1**, 33-37.
- [22] Vogel, J. (2014) A bacterial seek-and-destroy system for foreign DNA. *Science*, **344**, 972-973
- [23] 黄兵, 刘宁, 黄英, 陈劲春 (2009) 放线菌与枯草芽孢杆菌的共培养及其对活性次生代谢产物的影响. *生物工程学报*, **6**, 932-940
- [24] Kurosawa, K., Ghiviriga, I., Sambandan, T.G., Lessard, P.A., Barbara, J.E., Rha, C., et al. (2008) Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 1126-1127.
- [25] Horinouchi, S. (2002) A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, **7**, 2045-2057.
- [26] Kitani, S., Doi, M., Shimizu, T., Maeda, A. and Nihira, T. (2010) Control of secondary metabolism by farX, which is involved in the γ -butyrolactone biosynthesis of *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *Archives of Microbiology*, **192**, 211-220.
- [27] Lee, Y.J., Kitani, S. and Nihira, T. (2010) Null mutation analysis of an *afsA*-family gene, *barX*, that is involved in biosynthesis of the γ -butyrolactone autoregulator in *Streptomyces virginiae*. *Microbiology*, **156**, 206-210.
- [28] van Wezel, G.P. and McDowall, K.J. (2011) The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: New links and experimental advances. *Natural Product Reports*, **28**, 1311-1333.
- [29] Perlova, O., Gerth, K., Kaiser, O., Hans, A. and Müller, R. (2006) Identification and analysis of the chivosazol biosynthetic gene cluster from the myxobacterial model strain *Sorangium cellulosum* Soce56. *Journal of Biotechnology*, **121**,

174-191.

- [30] Hung, T.V., Malla, S., Park, B.C., Liou, K., Lee, H.C. and Sohng, J.K. (2007) Enhancement of clavulanic acid by replicative and integrative expression of *ccaR* and *cas2* in *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**, 1538-1545.
- [31] 芦银华, 姜卫红 (2013) 链霉菌次级代谢调控相关的双组分系统研究进展. *微生物学通报*, **10**, 1847-1859.
- [32] Martín, J.F. and Liras, P. (2010) Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, **13**, 263-273.
- [33] Hu, B. and Lidstrom, M. (2012) CcrR, a TetR family transcriptional regulator, activates the transcription of a gene of the ethylmalonyl coenzyme A pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Journal of Bacteriology*, **194**, 2802-2828.
- [34] 韩晓伟, 沈月毛 (2013) TetR 家族调控链霉菌次级代谢的机制. *微生物学通报*, **10**, 1831-1846.
- [35] Yanai, K., Murakami, T. and Bibb, M. (2006) Amplification of the entire kanamycin biosynthetic gene cluster during empirical strain improvement of *Streptomyces kanamyceticus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 9661-9666.
- [36] Eustáquio, A.S., Gust, B., Galm, U., Galm, U., Li, S.M., Chater, K.F., et al. (2005) Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 2452-2459.
- [37] 蔡成平, 王远山, 郑裕国 (2012) 核糖体工程与微生物次级代谢产物合成. *生物技术通报*, **9**, 51-58.
- [38] Ochi, K., Okamoto, S., Tozawa, Y., Inaoka, T., Hosaka, T., Xu, J., et al. (2004) Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Advances in Applied Microbiology*, **56**, 155-184.
- [39] Ochi, K. (2007) From microbial differentiation to ribosome engineering. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **71**, 1373-1386.
- [40] Baltz, R. (2012) *Streptomyces* temperate bacteriophage integration systems for stable genetic engineering of actinomycetes (and other organisms). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **39**, 661-672.
- [41] Inaoka, T. and Ochi, K. (2011) Activation of dormant secondary metabolism neotrehalosadiamine synthesis by an RNA polymerase mutation in *Bacillus subtilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**, 618-623.
- [42] Olkkola, S., Juntunen, P., Heiska, H., Hyytiäinen, H. and Hänninen, M.L. (2010) Mutations in the *rpsL* gene are involved in streptomycin resistance in *Campylobacter coli*. *Microbial Drug Resistance*, **16**, 105-110.
- [43] 韩小贤, 崔承彬, 姚志伟, 杨明 (2010) 陆地与海洋来源放线菌次级代谢能力的核糖体工程改造. *中国海洋大学学报*, **5**, 47-52.