

## 研究报告

## 一株产 G418 单组分工程菌的构建

阙新桥 林艺辉 胡育龙 肖剑萍 洪文荣\*

(福州大学 生物科学与工程学院 福建 福州 350116)

**摘要:**【目的】定向改造庆大霉素产生菌绛红小单孢菌 G1008, 获得产 G418 单组分工程菌。【方法】以温敏型穿梭质粒 pKC1139 为载体, 构建敲除基因 *genQ*\*重组质粒 pQB303, 通过接合转移, 导入绛红小单孢菌 G1008 中, 影印筛选和 PCR 鉴定 *genQ*\*框内缺失突变菌, 利用 TLC 和 MS 分析其代谢产物组分。【结果】获得一株 *genQ*\*缺失工程菌 *Micromonospora purpurea* GQ175, 其代谢产物为 G418 单组分, 生物效价达 828 mg/L, 与出发菌 G1008 的产抗能力相当。【结论】工程菌 GQ175 产 G418 单组分, 具有很好的工业开发价值。同时, 证明绛红小单孢菌 G1008 中, 庆大霉素 C-6'脱氢酶基因为 *genQ*\*, 且无其他同功酶基因。

**关键词:** 绛红小单孢菌, G418, 基因敲除, *genQ*\*

## Construction of an engineering strain to produce G418 single component

QUE Xin-Qiao LIN Yi-Hui HU Yu-Long XIAO Jian-Ping HONG Wen-Rong\*

(College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350116, China)

**Abstract:** [Objective] To obtain an engineering strain producing G418 single component by directional reconstruction of *Micromonospora purpurea* G1008 producing gentamicins. [Methods] Using the temperature-sensitive plasmid pKC1139 as vector, the recombinant plasmid pQB303 was constructed and introduced into the *M. purpurea* G1008 by conjugation. The *genQ*\*-disruption mutant was screened out by replica plating and PCR analysis. Use MS and TLC for analysis of metabolites. [Results] A *genQ*\*-disruption strain, named as *M. purpurea* GQ175, was obtained to produce G418 single component. The level of antibiotic production was 828 mg/L, similar to the level of the parent strain. [Conclusion] The engineering strain GQ175 produced G418 single component, which had great value for industrial development. Collectively, these results demonstrated that the C-6' dehydrogenase gene for gentamicin biosynthesis is *genQ*\* and there is no other isoenzyme genes in *M. purpurea* G1008.

**Keywords:** *Micromonospora purpurea*, G418, Gene knock-out, *genQ*\*

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070093); 国家“重大新药创制”科技重大专项项目(No. 2012ZX09201101-008)

\*通讯作者: 信箱: hongwr56@163.com

收稿日期: 2014-06-02; 接受日期: 2014-08-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-03

氨基糖苷类抗生素,如庆大霉素、妥布霉素等,不仅是良好的抗菌药物,而且还具有潜在的治疗人体免疫缺陷<sup>[1]</sup>和消除抗药性质粒功能<sup>[2-3]</sup>。G418 是庆大霉素生物合成的中间体,可作用于真核生物的 80S 核糖体亚基上,有效抑制寄生虫和原生动物的生长;在分子生物学实验中,G418 通常作为细胞转染的筛选标记材料<sup>[4]</sup>。但作为中间体是含量很少,分离提取困难;产 G418 的小单孢菌(*Micromonospora rhodorangea* NRRL 5326)代谢产物也是多组分,分离提取复杂<sup>[5]</sup>,价格昂贵。因此,如果能工程化庆大霉素产生菌绛红小单孢菌 G1008,获得积累单组分 G418 的工程菌,不仅可以完善庆大霉素生物合成途径的研究,而且还有重要的产业化意义。

自庆大霉素问世以来,对其生物合成过程进行了广泛的探索。通过对阻断突变株喂养中间产物,或突变株之间的共合成,以及使用  $^{14}\text{C}$ -、 $^{13}\text{C}$ -甲硫氨酸进行研究,提出了庆大霉素生物合成途径的轮廓<sup>[6-8]</sup>,如图 1 所示。随后分子生物学技术在氨基糖苷类抗生素研究中的广泛应用,为从分子遗传水平阐明生物合成过程奠定了技术基础,如丁酰菌素已经从酶催化水平解析了生物合成的全过程。庆大霉素的生物合成过程也逐步取得突破,GenBank 数

据库中,先后公布了棘孢小单孢菌中庆大霉素的生物合成基因簇 *gnt* (登录号: AJ524043)、*gtm* (登录号: AJ575934)和 *gen* (登录号: AJ628149),长度分别为 38 146、32 666 和 84 222 bp。通过生物信息学分析,推测各个基因的功能,结合预测的生物合成代谢途径,形成了完整的庆大霉素代谢网络<sup>[9]</sup>。Park 等<sup>[10]</sup>通过在委内瑞拉链霉菌中异源表达确认了由 6-磷酸葡萄糖至庆大霉素 A2 的最小生物合成基因模块。2012 年,通过接合转移方法将质粒成功导入绛红小单孢菌,并敲除 *genK* 基因,构建了 C1a 产生菌,间接证明其甲基化功能<sup>[11]</sup>。同时, Kim 等<sup>[12]</sup>证明 GenK 是一个钴胺素依赖的 S-腺苷-甲硫氨酸激酶,在体外实现了庆大霉素 X2 转变为 G418 的催化活性,验证了前者的推测。2014 年, Guo 等<sup>[13]</sup>阐明了庆大霉素生物合成分支点处催化酶的专一性和交叉性, GenQ 为双功能酶,同时作用于庆大霉素 X2 和 G418; GenB1 为 C-6'位主要的转氨酶, GenB2 为 C2a 与 C2 的差向异构化酶,而 GenB3 和 GenB4 参与了 C-3',4'的双脱羟基作用,其中 GenB2、GenB3 和 GenB4 也具有 C-6'位转氨作用。

综上所述,利用分子遗传学方法进行定向改造绛红小单孢菌是可行的。2012 年洪文荣等公布了绛

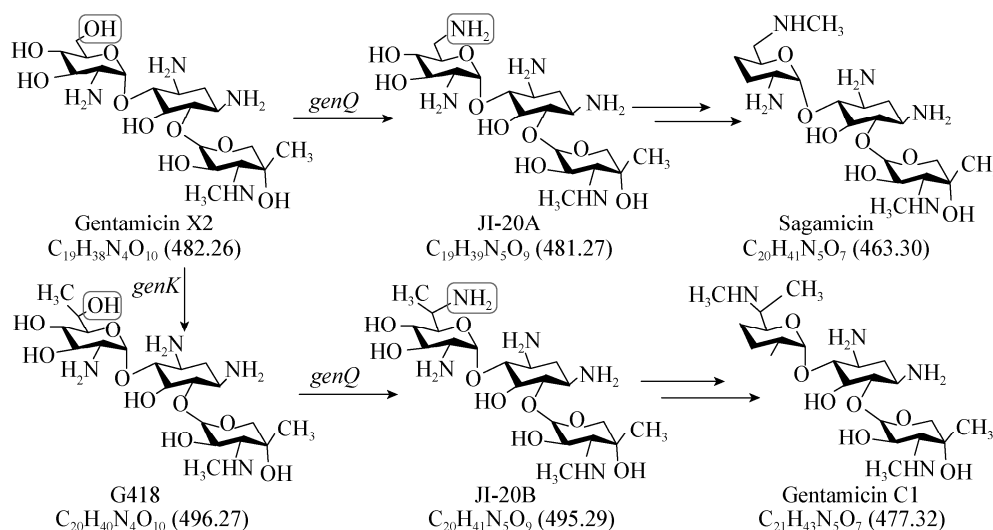


图 1 庆大霉素的部分生物合成途径

Figure 1 The partial biosynthesis pathway of gentamicin

红色小单孢菌 G1008 的庆大霉素生物合成基因簇 (登录号: JQ975418), 其中基因 *genQ*\*与棘孢小单孢菌中 *genQ* 为同源基因, 本研究通过敲除 *M. purpurea* G1008 中 *genQ*\*阻断庆大霉素的生物合成代谢流, 构建一株具有工业应用潜质的 G418 单组分工程菌, 同时验证 GenQ 在绛红小单孢菌中的双功能催化作用及是否有可替代酶。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 绛红小单孢菌 G1008 为庆大霉素产生菌, 大肠杆菌 *E. coli* Top10 为质粒克隆宿主, 大肠杆菌 *E. coli* ET12567 (pUZ8002)为接合转移供体菌, pKC1139 (*aac*(3)*IV*, *oriT*)为大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒, 以上均为本实验室保藏。克隆载体 pMD19-T 购自日本 TaKaRa 公司。

1.1.2 培养基和抗生素: 绛红小单孢菌 G1008 固体培养基、种子培养基、发酵培养基及预萌发培养基均参照文献[11]。绛红小单孢菌菌丝体生长培养基和大肠杆菌生长培养基分别为 YEME 培养基<sup>[14]</sup>和 LB 培养基。本研究使用的抗生素及其终浓度分别为: 氨苄青霉素 100 mg/L、安普霉素 100 mg/L、氯霉素 25 mg/L、卡那霉素 50 mg/L、萘啶酸 25 mg/L。

1.1.3 主要试剂: 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自日本 TaKaRa 公司; 溶菌酶、RNase A 酶、Proteinase K 和 DNA 凝胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司; 其他化学试剂均为国产分析纯或色谱纯。732 型阳离子树脂购自上海华震科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计: 根据庆大霉素的生物合成基因簇 (登录号: JQ975418), 使用 Vector NTI 软件设计 *genQ*\*的同源交换臂引物: P1/P2 扩增上游交换臂 B1, P3/P4 扩增下游交换臂 B2。根据同源重组原理设计一对筛选与鉴定突变株引物: P5/P6。以 pKC1139 质粒为模板, 设计安普霉素抗性基因筛选引物: P7/P8。引物序列及其限制酶见表 1。

表 1 本研究所用引物 Table 1 Primers in this work		
引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	限制酶 Restriction enzyme
P1	<u>GAATTC</u> AGGAGGTGCTCACCGACG	<i>EcoR</i> I
P2	<u>AAGCTT</u> AGAACCGGGTGTCCTC G	<i>Hind</i> III
P3	<u>AAGCTT</u> TTCCGTTCGAAGGCGAC C	<i>Hind</i> III
P4	<u>TCTAGAA</u> ACGGCTCGGTGAACTCGTG	<i>Xba</i> I
P5	CATTCTTCGCATCCCGCCTCTG	
P6	TCAGCGGTGGAGTGCAATGTCTG	
P7	TACGACGACTCACGCCAGGTCA	
P8	TGGATCCCTGGGTGAGCTACGA	

1.2.2 分子克隆: 绛红小单孢菌基因组提取方法参照链霉菌遗传操作手册<sup>[14]</sup>。质粒提取、酶切、酶连、PCR 以及大肠杆菌感受态细胞制备及转化等常规操作方法参照分子克隆实验手册<sup>[15]</sup>。孢子 PCR: 刮取少量的绛红小单孢菌孢子, 悬浮于无菌水, 再用振荡器打散至均匀; 以孢子悬浮液作为 PCR 扩增模板, 其余组分及程序与普通 PCR 相同。DNA 测序由金斯瑞公司完成。

1.2.3 接合转移: 绛红小单孢菌与大肠杆菌间接接合转移方法根据 Hong 等<sup>[11]</sup>所述。

1.2.4 代谢产物提取及组分分析: 小单孢菌发酵培养及代谢产物提取参照 Hong 等<sup>[11]</sup>所述, 生物效价测定和 TLC (薄层色谱)参照《中华人民共和国药典》(2010 版)<sup>[16]</sup>。质谱分析方法: 安捷伦 6520 四级杆飞行时间串联质谱仪。参数设置: ESI (+), 100–800 *m/z*; 流速 8.0 L/min; 温度 350 °C; 喷雾器压力 2.07×10<sup>5</sup> Pa; Vcap 3 500 V; 碰撞电压 135 V。

2 结果与分析

2.1 基因 *genQ*\*的功能分析

采用 Vector NTI 软件, 将绛红小单孢菌基因 *genQ*\* (登录号: JQ975418)、棘孢小单孢菌基因 *genQ* (登录号: AJ628149)、丁酰苄菌素生物合成过程的 C-6'脱氢酶基因 *btrQ* (登录号: AJ629247.1)和

新霉素生物合成过程中 C-6'和 C-6'''脱氢酶基因 *neoQ* (登录号: AB066276) 4 个基因 DNA 序列转录成氨基酸序列, 进行氨基酸多序列比对, 结果如图 2 所示, 深灰色代表保守序列, 中灰色代表相同氨基酸, 浅灰色则代表相似氨基酸。其中, GenQ\*与 GenQ 的相似度为 95.5%, 而 4 个基因的氨基酸序

列相似度高达 90.8%。同时, 通过在线软件 SWISS-MODEL (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/>) 分析 GenQ\*蛋白的结构域, 存在一个 FAD 依赖的氧化还原结构域和两个 GMC (Glucose-methanol-choline) 氧化还原结构域, 推测基因 *genQ\** 为绛红小单孢菌 G1008 中庆大霉素生物合成的脱氢酶基因。

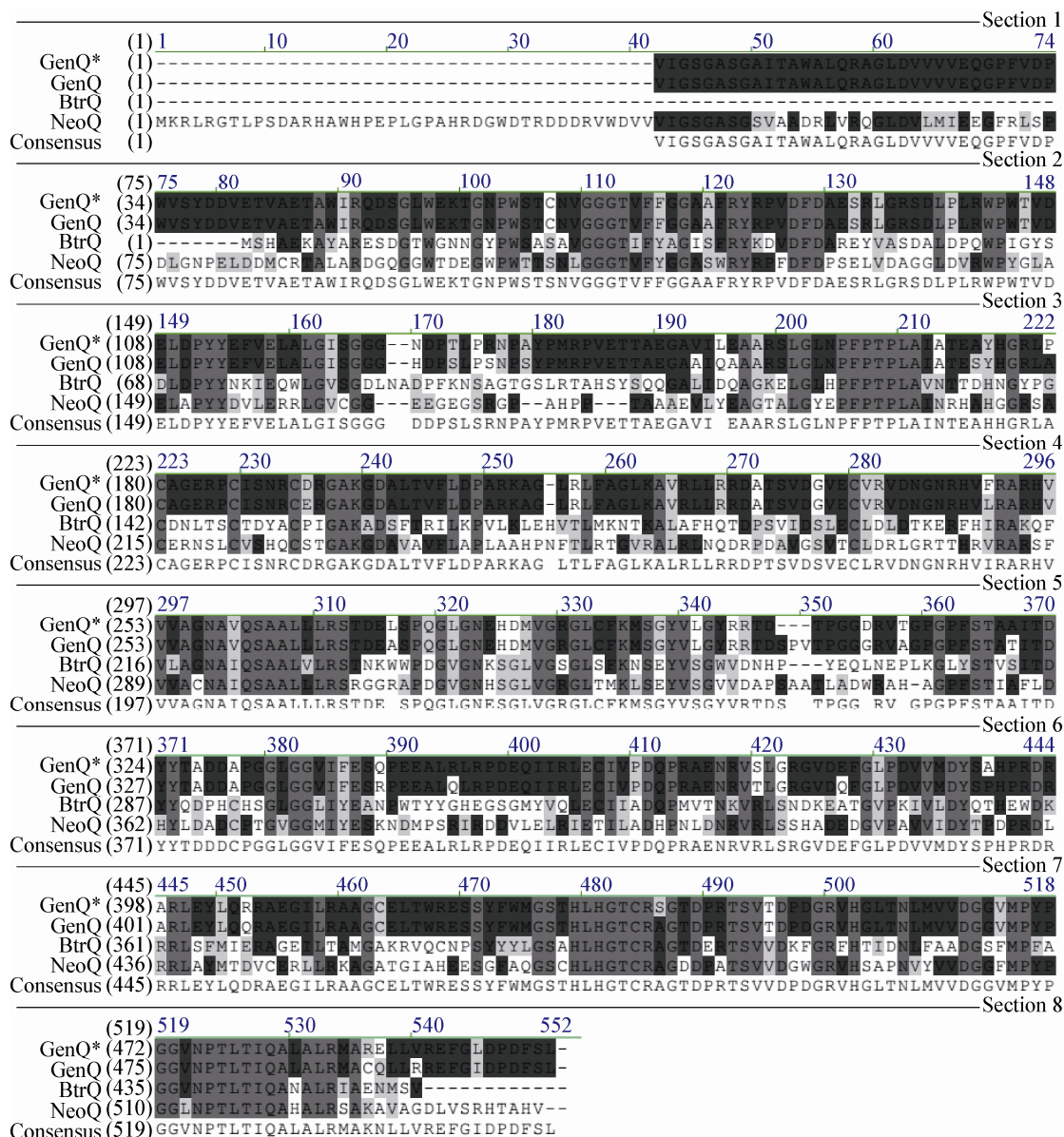


图 2 GenQ\*、GenQ、NeoQ 和 BtrQ 的氨基酸序列比对

Figure 2 Amino acid sequence alignment of GenQ\*, GenQ, NeoQ and BtrQ

2.2 重组质粒 pQB303 的构建

参照方法 1.2.1, 扩增 *genQ*\*的上游交换臂 B1 (1 995 bp)和下游交换臂 B2 (1 917 bp), 分别克隆至 pMD-19T 上,得到中间质粒 pQB301 和 pQB302, 经酶切验证正确。质粒 pQB301 经 *Hind* III/*Eco*R I 双酶切, 回收 B1 片段; 质粒 pQB302 经 *Hind* III/*Xba* I 双酶切, 回收 QB2 片段; 与此同时, pKC1139 经 *Eco*R I/*Xba* I 双酶切, 回收 6 477 bp 片段, 与交换臂 B1、B2 混合酶连, 克隆得到重组质粒 pQB303。重组质粒图谱(图 3A)中存在 6 个 *Sac* I 酶切位点, 可以将质粒切割成 6 214、1 606、1 217、751、531 和 82 bp 6 个线性片段, 其中 82 bp 因太小, 电泳检测未能清楚观察到; 2 个 *Hind* III 限制酶酶切位点, 可以切割成 8 457 和 1 944 bp 两个片段; 而经 *Eco*R I/*Xba* I 双酶切, 则可以切割成 6 477 和 3 924 bp 两个片段。重组质粒 pQB303 经过以上 3 种方式酶切验证, 电泳检测结果如图 3B 所示, 电泳条带大小与理论分析一致, 并经测序证明得到目的质粒正确, 可用于后续的接合转移。

2.3 *genQ*\*阻断突变株的筛选和验证

*genQ*\*大小为 1 515 bp, 根据同源重组模型, 如

图 4A 所示, 敲除基因 621 bp (412–1 032 bp), 并限制酶 *Hind* III (AAGCTT)序列替代。设计双交换筛选引物 P5/P6, 单交换菌株可以扩增出 561 和 1 183 bp, *genQ*\*阻断突变株可以扩增出 561 bp, 而回复突变或亲株 G1008 则只能扩增出 1 183 bp。同时, 设计安普霉素抗性基因扩增引物(P7/P8), 引物序列见表 1。

参照方法 1.2.3, 将同源重组质粒 pQB303 导入到绛红小单孢菌 G1008 中。质粒 pQB303 携带链霉菌温敏型复制起始位点 *psG5 ori*, 只有温度低于 34 °C 时, 才能在绛红小单孢菌 G1008 中游离存在。因此在 37 °C 及安普霉素和萘啶酸两种抗生素筛选下, 只有质粒 pQB303 整合到 G1008 基因组中, 能在固体平板上生长, 即为单交换菌株。选择其中一株长势较好的, 命名为绛红小单孢菌 GQ1, 用于双交换菌株的筛选。GQ1 转点至含有安普霉素 100 mg/L 和萘啶酸 25 mg/L 的固体平板中, 培养 3 代, 彻底清除可能夹杂的大肠杆菌和 G1008。再提取 GQ1 基因组为模板, 用筛选引物 P5/P6 和安普霉素抗性引物 P7/P8 进行 PCR 扩增, PCR 产物电泳如图 4B 所示, 与理论一致, 进一步证明 GQ1 为目的单交换菌株。

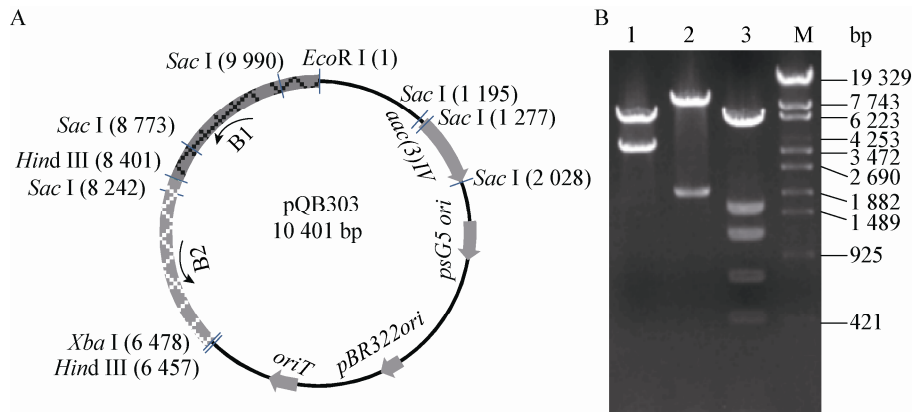


图 3 质粒 pQB303 的物理图谱和验证

Figure 3 The feature map of pQB303 and verification

Note: A: Map showing composition of the recombinant plasmid pQB303; B: Verification of pQB303 by restriction enzyme. 1: pQB303/(*Eco*R I/*Xba* I); 2: pQB303/*Hind* III; 3: pQB303/*Sac* I; M: Marker ( $\lambda$ -*Eco*T14).



单交换菌株具有遗传不稳定性, 在没有筛选压力下, 容易在同源交换臂上发生第二次重组, 依据这一特性即可筛选得到阻断突变株。单交换菌株 GQ1 经松弛培养 3 代后, 开始分离单菌落直至第 8 代, 单菌落影印至含有阿泊拉霉素平板和无抗平板上, 得到 11 株安普霉素敏感菌株, 这些菌落可能为阻断突变菌株, 也可能为回复突变菌株。经孢子 PCR 初步检测, 有两株可能为阻断突变株。对两株进行斜面培养, 观察其生长形态和孢子丰厚度, 并进行发酵和生物效价测定, 选择生长状态好及生物效价高的一株, 提取其基因组 DNA, 采用引物(P5/P6)进行 PCR 扩增, PCR 产物电泳结果如图 4B, 与理论大小 561 bp 一致, 经 DNA 测序, 结果准确, 最终得到了目标菌株, 即 *genQ*\*基因缺失工程菌, 命名为绛红小单孢 GQ175。

工程菌 GQ175 经斜面培养 3 代, 其形态特征没有发生明显变化, 生长良好, 产孢丰富, 说明其遗传性状稳定。对 GQ175 进行摇瓶发酵, 并以亲株 G1008 作对照, 发酵完成后, 对 GQ175 和 G1008 两者发酵液进行预处理, 检测生物效价。结果显示, GQ175 的生物效价为 828 mg/L, 与亲株 G1008 的 930 mg/L 相当, 说明其产抗能力没有因为 *genQ*\*缺失而受到影响。

## 2.4 绛红小单孢菌 GQ175 的代谢产物分析

将预处理的发酵液经 732 氨型树脂吸附, 洗脱

后再用乙醇沉淀, 得到粗制样品。粗制样品通过 TLC 和 MS 检测, GQ175 的代谢产物与亲株 G1008 进行比较, 分析基因 *genQ*\*缺失对庆大霉素代谢流的影响。TLC 检测结果如图 5 所示, GQ175 不再合成庆大霉素 C 族组分, 只产生了一种与 G418 标准品迁移率一样的物质, 初步判定为 G418。经 MS 进一步分析, G1008 代谢产物质谱图有 3 个主峰: 分子量为 450.3 (C1a)、464.3 (C2、C2a、C2b) 和 478.3 (C1), 而 497.3 (G418) 分子强度峰极低; 而 GQ175 代谢产物的质谱图主峰为 497.3, 与 G418 的分子量吻合, 322.2 的峰为碎片峰, 249.1 的为双电荷峰。因此, 阻断突变株 GQ175 不再合成庆大霉素 C 族组分, 只合成 G418 单一组分。

## 3 讨论

氨基糖苷类抗生素具有抗菌谱广、杀菌完全等特征, 是临床上应用广泛的抗感染药物。获得单组分高产菌株是从根源上降低其工业生产成本的主要措施, 但不管是传统的育种还是基因工程定向育种都难以取得良好的效果。如 Hong 等<sup>[17]</sup>敲除了黑暗链霉菌 Tt-49 中 *aprH-M* 基因模块, 得到了一株氨基糖苷类抗生素单组分产生菌, 但可能是由于破坏的菌株基因模块太大, 其整体的产抗能力不如亲株。

绛红小单孢菌 G1008 中庆大霉素生物合成基因 *genQ*\*, 与棘孢小单孢菌中庆大霉素 C-6'脱氢酶 GenQ 氨基酸序列相似高达 95.5%, 其长度则相差 3

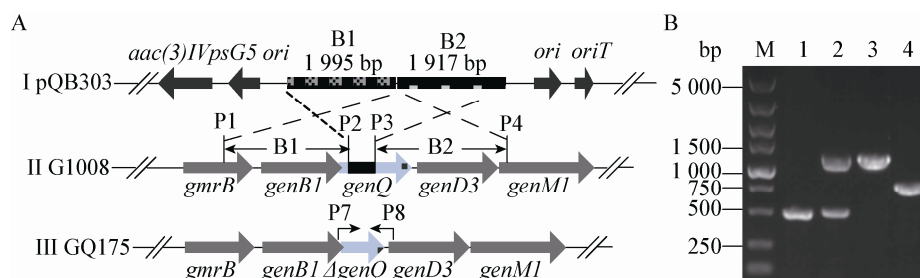


图 4 绛红小单孢菌 G1008 中 *genQ*\*的敲除

Figure 4 Disruption of the *genQ*\* in *M. purpurea* G1008

Note: A: Schematic diagram showing the homologous recombination; B: The PCR verification of the mutants. M: DL5000; 1: GQ175/(P7/P8); 2: GQ1/(P7/P8); 3: G1008/(P7/P8); 4: GQ1/(P5/P6).

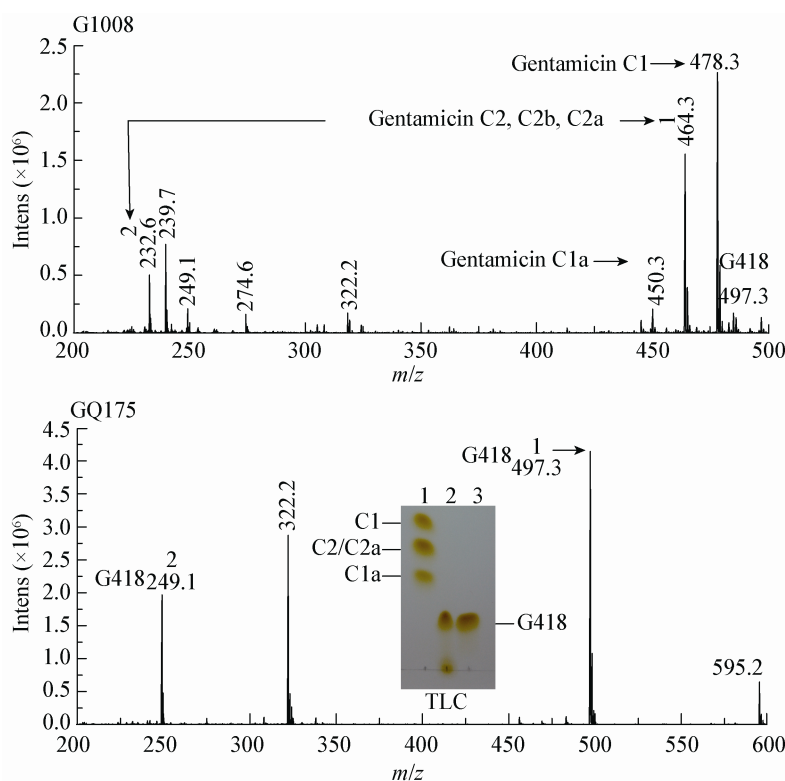


图 5 突变株 GQ175 与亲株 G1008 发酵代谢产物 TLC 和 MS 分析

Figure 5 The TLC and MS analysis of products from mutants GQ175 and parent strain G1008

Note: TLC: 1: Gentamicin standard; 2: Products from *M. purpurea* GQ175; 3: G418 standard.

个氨基酸。本研究通过破坏绛红小单孢菌 G1008 中 *genQ*\* 的功能, 构建 G418 单组工程菌。为了尽量避免对菌株的损伤以及影响 *genQ*\* 上下游基因的表达, 选择敲除 *genQ*\* 1/3 (621 bp) 的中间序列, 得到一株 G418 单组分工程菌 *M. purpurea* GQ175 (CGMCC No. 8543), 不积累庆大霉素 X2 及其他庆大霉素组分。生物效价测定, GQ175 的发酵单位为 828 mg/L, 与亲株 G1008 的 930 mg/L 相当, 说明工程菌保持了亲株的产抗能力。然而 G418 的抑菌效率比 C 族复合物低得多, 因此工程菌产 G418 的物质质量已经超过了亲株产 C 族复合物的物质质量。可能是由于庆大霉素生物合成中左支路物质流量也流向了 G418 的合成, 或者庆大霉素 C 族终产物抑制效应的解除。此外, 工程菌 GQ175 和亲株 G1008 代谢产物 MS 分析中, 其分子峰强度可以粗略反映物质的含量, 其中 G418 分子峰的强度已经高于庆

大霉素 C 族复合物; 单从 G418 来比较, 工程菌已经高于亲株约 200 倍。

敲除棘孢小单孢菌 ATCC15835 中基因 *genQ* 序列 1 494 bp (全序列 1 524 bp) 获得一株突变菌  $\Delta$ genQ, 主产 G418 (比野生菌高 100 倍) 并积累少量庆大霉素 X2<sup>[13]</sup>。与突变株  $\Delta$ genQ 相比, 工程菌 GQ175 除去了庆大霉素 X2 这一杂质组分, 并且产 G418 增长倍数也比较高。产生这种区别的原因可能是敲基因序列的量不一样, 也有可能是棘孢小单孢菌与绛红小单孢菌菌株的区别。此外, 结果证明绛红小单孢菌中庆大霉素 C-6' 脱氢酶基因只有 *genQ*\*, 不存在其他可替代基因, 与棘孢小单孢菌一样, 说明不同菌种间存在保守性。

## 参考文献

- [1] Ennifar E, Aslam MW, Strasser P, et al. Structure-guided discovery of a novel aminoglycoside conjugate targeting HIV-1 RNA viral genome[J]. ACS Chemical Biology, 2013(8):

- 2509-2517
- [2] DeNap JC, Thomas JR, Musk DJ, et al. Combating drug-resistant bacteria: small molecule mimics of plasmid incompatibility as antiplasmid compounds[J]. American Chemical Society, 2004(126): 15402-15404
- [3] Thomas JR, Hergenrother PJ. Targeting RNA with small molecules[J]. Chemical Society Reviews, 2008, 108(4): 1171-1224
- [4] Vicens Q, Westhof E. Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide[J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 326: 1175-1188
- [5] Waitz JA, Sabatelli F, Menzel F, et al. Biological activity of antibiotic G-418, a new *Micromonospora*-produced aminoglycoside with activity against Protozoa and Helminths[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1974, 6(5): 579-581
- [6] Testa RT, Tilley BC. Biotransformation, a new approach to aminoglycoside biosynthesis: II. Gentamicin[J]. The Journal of Antibiotics, 1976, 29(2): 140-146
- [7] Testa RT, Tilley BC. Biosynthesis of sisomicin and gentamicin[J]. The Japanese Journal of Antibiotics, 1979, 32: S47-S59
- [8] Kase H, Odakura Y, Nakayama K. Sagamicin and the related aminoglycosides: fermentation and biosynthesis. I. biosynthetic studies with the blocked mutants of *Micromonospora sagamiensis*[J]. The Journal of Antibiotics, 1982, 35(1): 1-9
- [9] Kudo F, Eguchi T. Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics[J]. The Journal of Antibiotics, 2009(62): 471-481
- [10] Park JW, Hong JS, Parjiuli N, et al. Genetic dissection of the biosynthetic route to gentamicin A2 by heterologous expression of its minimal gene set[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(5): 8399-8404
- [11] Hong WR, Yan LB. Identification of *gntK*, a gene required for the methylation of purpurosamine C-6' in gentamicin biosynthesis[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2012, 58(5): 349-356
- [12] Kim HJ, McCarty MR, Ogasawara Y, et al. GenK-catalyzed C-6' methylation in the biosynthesis of gentamicin: isolation and characterization of a cobalamin-dependent radical SAM enzyme[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(22): 8093-8096
- [13] Guo JH, Huang FL, Huang C, et al. Specificity and promiscuity at the branch point in gentamicin biosynthesis[J]. Chemistry & Biology, 2014, 21(5): 608-618
- [14] Kieser T, Bibb MJ, Mark J, et al. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Norwich, England: The John Innes Foundation, 2000: 162-170
- [15] Sambrook JF, Russell DW. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 27-99
- [16] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia: Part 2[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: Appendix 93-98 (in Chinese)  
国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 第2部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录93-98
- [17] Hong WR, Yan SD. Engineering *Streptomyces tenebrarius* to synthesize single component[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(1): 33-39

## 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) 我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。