

# 负调节基因 *nsdA* 在链霉菌中同源性及激活沉默抗生素合成基因簇的研究 Activation of Silent Antibiotic Synthesis in *Streptomyces lividans* by Disruption of a Negative Regulator *nsdA* , a Gene Conserved in *Streptomyces*

余 贞<sup>1</sup> , 王 茜<sup>1</sup> , 邓子新<sup>2</sup> , 陶美凤<sup>1\*</sup>

YU Zhen<sup>1</sup> , WANG Qian<sup>1</sup> , DENG Zi-Xin<sup>2</sup> and TAO Mei-Feng<sup>1\*</sup>

1 华中农业大学农业微生物国家重点实验室 , 武汉 430070

2 上海交通大学教育部微生物代谢重点实验室 , 上海 200030

1 National Key Laboratory of Agricultural Microbiology , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China

2 Laboratory of Microbial Metabolism , Shanghai Jiaotong University , Shanghai 200030 , China

**摘 要** *nsdA* 基因是在天蓝色链霉菌中发现的抗生素合成负调控基因。以 *nsdA* 基因片段为探针 , 通过 Southern 杂交发现 *nsdA* 存在于多种链霉菌中。根据天蓝色链霉菌和阿维链霉菌的 *nsdA* 序列设计 PCR 引物 , 扩增多种链霉菌中 *nsdA* 基因并测序。发现在不同链霉菌中 *nsdA* 基因的相似性高达 77% ~ 100%。其中变铅青链霉菌与天蓝色链霉菌 A3(2) 的 *nsdA* 序列 100% 一致。变铅青链霉菌通常不合成放线紫红素 , 中断 *nsdA* 获得的突变菌株 WQ2 能够合成放线紫红素 , 在 WQ2 中重新引入野生型 *nsdA* 又失去产抗生素能力。表明 *nsdA* 的中断可以激活变铅青链霉菌中沉默的放线紫红素生物合成基因簇的表达 ; *nsdA* 的广泛存在及其序列高度保守则提示可以尝试用于这些菌种的抗生素高产育种。

**关键词** 链霉菌 , 负调节基因 *nsdA* , 放线紫红素 , 基因中断 , 沉默基因

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)05-0757-06

**Abstract** The global regulatory gene , *nsdA* , negatively regulates antibiotics production in *Streptomyces coelicolor* . Southern blot experiment , using an *nsdA* fragment of *S. coelicolor* as probe , indicated that *nsdA* gene existed in many *Streptomyces* . Primers were designed based on the published sequences of *S. coelicolor* and *S. avermitilis* . PCR amplification and sequencing showed that *nsdA* in *Streptomyces* was conservative and that of *S. lividans* ZX64 has a 100% identity in the nucleotide sequence comparing with that of *S. coelicolor* A3(2) . The *nsdA* disrupted mutant of *S. lividans* was constructed named as WQ2. WQ2 was able to produce actinorhodin but the wild-type strain ZX64 did not , which has a silent gene cluster contributing to the biosynthesis of actinorhodin. However , the ability was lost when another copy of the wild *nsdA* gene was introduced into WQ2. All the results above indicate that *nsdA* homologous gene is widely existent and conserved in *Streptomyces* . And it plays a role in negatively regulating the actinorhodin synthesis in *S. lividans* and disruption of it can activate the silent gene cluster.

**Key words** *Streptomyces* , *nsdA* gene , actinorhodin , gene disruption , silent gene

Received : April 6 , 2006 ; Accepted : May 12 , 2006.

This work was supported by a grant from the Youth Chengguang Project of Science and Technology of Wuhan City of China ( No. 20045006071-32 ).

\* Corresponding author. Tel : 86-27-87283702 ; E-mail : tao-meifeng@mail.hzau.edu.cn

武汉市青年科技晨光计划 No. 20045006071-32 资助。

链霉菌是重要的抗生素产生菌。在链霉菌中, 抗生素合成受到复杂的调控, 由细胞内外小分子信号、全局性调节基因(如光秃基因 *bld*)、抗生素合成的多效性调节基因(*abaA*, *absAB*<sup>[1]</sup>, *afsR-afsK*<sup>[2]</sup>, *cutRS*<sup>[3]</sup>等)和途径专一性调控基因(*actH-4*, *redD*等)<sup>[4]</sup>组成多级层层调控的网络, 最后调节抗生素生物合成结构基因的表达, 从而调控抗生素的合成。

*nsdA* 是本实验室发现的一个全局性负调节基因。陶美凤发现在天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)的质粒消除衍生菌株 M145 或 J11501 中引入 A3(2)文库质粒 SC7A1 后, 宿主的产素产孢发生延迟, 菌落表面的皱褶加深, 推测 SC7A1 中含有与分化有关的负调控基因。通过一系列的亚克隆, 把这个基因定位于 ORF26(GenBank: SC05582), 命名为 *nsdA* (negative regulator of *Streptomyces* differentiation)。中断天蓝色链霉菌中的 *nsdA* 基因, 则放线紫红素、钙依赖抗生素和次甲基霉素等 3 种抗生素均超量产生(未发表)。本研究希望通过研究其它链霉菌中的 *nsdA* 同源基因, 探索 *nsdA* 用于抗生素基因工程育种的可能性。

变铅青链霉菌(*S. lividans*)与天蓝色链霉菌亲缘关系很近, 但通常只有天蓝色链霉菌产放线紫红素( actinorhodin )<sup>[5]</sup>, 变铅青链霉菌也含有该色素抗生素合成的全套基因, 但其表达通常是沉默的。本文以中断变铅青链霉菌中 *nsdA* 为例, 研究该基因对沉默抗生素合成基因簇的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌株: 天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*) M145、阿维链霉菌(*S. avermitilis*) NRRL8165、变铅青链霉菌(*S. lividans*) ZX64、井岗链霉菌(*S. hygroscopicus*) 5008、金色链霉菌(*S. aureofaciens*) 211、白色链霉菌(*S. albus*) JA3453、庆丰链霉菌(*S. qingfengmyceticus*) A553、吸水链霉菌(*S. hygroscopicus*) 10-22、链霉菌 FR-008(*S. spp.* FR-008)、大肠杆菌 DH5α、ET12567(pUZ8002)<sup>[6]</sup>均由本

实验室保存。

1.1.2 质粒: pHZ2731(应新, 未发表), 在位点特异性整合载体 pJ8600<sup>[7]</sup>中插入天蓝色链霉菌 *nsdA* 基因(图 1)。*nsdA* 基因中断载体 pHZ2718(应新, 未发表)含有接合转移起始位点(*RK2 oriT*)、硫链丝菌素抗性基因(*tsr*)、氨基青霉素抗性基因(*bla*)、*nsdA* 基因及其侧翼序列片段(图 1), 其中 *nsdA* 基因内三个 *Bam*HI 位点之间 870bp 的片段被来自 pHP45Ω 的阿泊拉霉素抗性基因(*aac(3)IV*)片段置换。

1.1.3 培养基: 大肠杆菌培养基为 LB<sup>[8]</sup>。链霉菌液体培养基为 YEME<sup>[9]</sup>, 固体培养基为 MS<sup>[9]</sup>、YMS<sup>[10]</sup> 和 R<sub>2</sub>YE<sup>[9]</sup>。大肠杆菌-链霉菌接合转移培养基为 MS<sup>[9]</sup>。MS 培养基中阿泊拉霉素和硫链丝菌素的使用终浓度分别为 50μg/mL 和 25μg/mL, 接合转移中阿泊拉霉素和萘啶酮酸覆盖浓度均为 50μg/mL。

1.1.4 工具酶和生化试剂: 限制性内切酶 *Stu* I、*Bam*HI 购于 TaKaRa 公司, DIG DNA 标记检测试剂盒购于 Roche 公司, DNA 回收试剂盒购于 Axygen 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取和纯化: 链霉菌总 DNA 的提取、大肠杆菌和链霉菌属间接合转移方法参照文献 [6]; 大肠杆菌质粒提取和转化参照文献 [11]。

1.2.2 Southern 杂交: 按 DIG DNA 标记检测试剂盒的操作方法, 杂交温度为 65℃。

1.2.3 引物设计和 PCR 扩增反应: 为获得 *nsdA* 完整序列, 采用巢式 PCR, 根据已测序的天蓝色链霉菌 A3(2) 和阿维链霉菌 MA-4680 中 *nsdA* 序列, 在该基因外部和内部各设计了一对 PCR 扩增引物(图 1), 其中 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 序列分别为: 5'-CTCATGGACGAGCTGGGCAA-3' 和 5'-TCCTTGATCTCGTCCGAGCCG-3'; P<sub>3</sub> 和 P<sub>4</sub> 序列分别为 5'-CCCTGGACGGGCCCCGCA GAC-3' 和 5'-CAGCTCGGCCTCGGAGAAGA-3'; 引物 P<sub>3</sub>P<sub>4</sub> 扩增 PCR 反应条件为 96℃, 5min; 94℃, 1min; 55℃, 50s; 72℃, 45s; 25 个循环; 72℃ 延伸 5min。序列测定由大连 TaKaRa 公司完成。

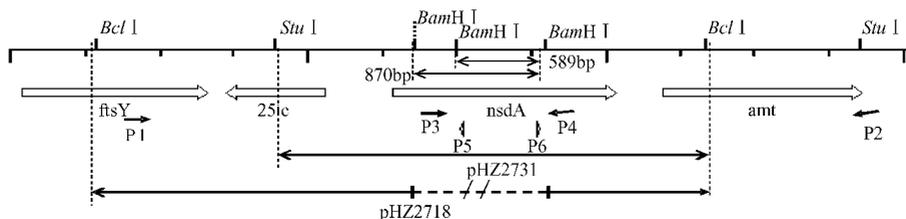


图 1 *nsdA* 基因、引物及质粒载体外源片段在染色体上的示意图

**1.2.4 变铅青链霉菌 *nsdA* 基因中断菌株的构建与筛选** :将 pHZ2718 通过属间接转移导入变铅青链霉菌 ZX64 中 ,方法请见文献<sup>[9]</sup>。基于基因同源重组 ,通过抗性筛选获得发生双交换的 *nsdA* 基因中断菌株。

**1.2.5 PCR 验证基因中断菌株** :根据已测序的 ZX64 *nsdA* 基因序列 ,在 *nsdA* 基因中的三个 *Bam*HI 酶切位点之外设计一对引物(图 3) ,ZX-L 为 :5'-CGACGGTCTTGC GGATGCGG-3' ; ZX-R 为 5' ACCACATCTCCACCGACACC-3'。PCR 反应条件为 :94℃ ,5min ;94℃ ,50 s ,57℃ ,1min ;72℃ ,2.5min ;25 个循环 ;72℃ 延伸 5min。野生型菌株 PCR 扩增片段大小为 1250bp。

## 2 结果

### 2.1 Southern 杂交验证 *nsdA* 基因存在于多种链霉菌中

pHZ2730 用 *Bam*HI 完全酶切后 ,回收 589bp 的部分 *nsdA* 片段(图 1) ,经地高辛标记后作为探针 ,8 种链霉菌的总 DNA 用 *Stu*I 酶切 ,跑胶分离后与探针进行 Southern 杂交。其中天蓝色链霉菌 M145 菌株的总 DNA 用作阳性对照。杂交结果如图 2 所示 :阳性对照 M145 菌株显示大小为 3.9kb 的杂交带 ,与预计相符 ;其它链霉菌显示出清晰的带 ,其中阿维链霉菌 NRRL8165、井岗链霉菌 5008、金色链霉菌 211、变铅青链霉菌 ZX64 和吸水链霉菌 10~22 的杂交带大小跟天蓝色链霉菌 M145 菌株相似 ,约为 3.9kb ;而白色链霉菌 JA3453 的杂交带大小为 6.6kb 左右(泳道 5) ;链霉菌 FR-008 的杂交带大小约为 5.5kb ,且杂交信号比较弱(泳道 2)。实验结果表明 *nsdA* 的同源基因存在于多种链霉菌中。

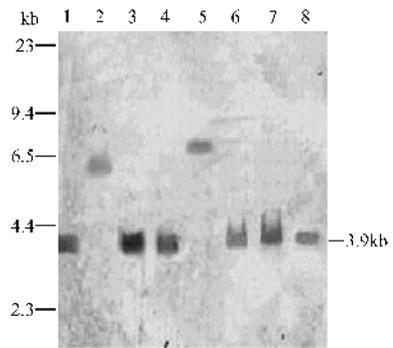


图 2 链霉菌 *nsdA* 同源基因的 Southern 杂交分析

Fig.2 Southern analysis of *nsdA* homologous genes of different *Streptomyces*

1~8 : the total DNA of *S. hygroscopicus* 10~22、*S. spicies* FR-008、*S. lividans* ZX64、*S. aureofaciens* 211、*S. albus* JA3453、*S. hygroscopicus* 5008、*S. avermitilis* NRRL8165 and *S. coelicolor* M145 were digested with *Stu*I , respectively .

### 2.2 PCR 扩增多种链霉菌中的 *nsdA* 基因及其序列比较

以天蓝色链霉菌 M145、变铅青链霉菌 ZX64、井岗链霉菌 5008、金色链霉菌 211、白色链霉菌 JA3453、吸水链霉菌 10-22、链霉菌 FR-008、庆丰链霉菌 A553 的总 DNA 作模板 ,引物 P<sub>3</sub> 和 P<sub>4</sub> 扩增 *nsdA* 内部 791bp 的片段 ,分别将 PCR 产物纯化后测序。再根据已测序列在 *nsdA* 保守区设计两个引物 P<sub>5</sub> 和 P<sub>6</sub>(图 1) ,序列分别为 5'-CGCTGCATGGGCTCGA TGAG-3'和 5'-ATGCTGTATGCCATGGAGGC-3'。以 P<sub>1</sub> 和 P<sub>5</sub> 扩增上述链霉菌中 *nsdA* 基因上游序列(约 2kb) ,P<sub>2</sub> 和 P<sub>6</sub> 扩增下游序列(约 2.2kb) ,再分别将 PCR 产物回收纯化 ,测序 ,拼接获得完整的 *nsdA* 同源基因序列 ,并将序列递交 GenBank ,序列号见表 1。

测序结果表明 ,变铅青链霉菌 ZX64 的 *nsdA* 基因为 1503bp ,与天蓝色链霉菌 *nsdA* 基因序列完全一

表 1 多种链霉菌中 *nsdA* 基因序列比较

Table 1 Comparison of *nsdA* homologous genes of different *Streptomyces*

	GenBank accession numbers	Length of gene/protein (bp/amino acid)	Similarity with <i>nsdA</i> of <i>S. coelicolor</i>	
			Nucleotide	Amino acid
<i>S. avermitilis</i> MA-4680	SAV2652	1476/491	85%	84%
<i>S. lividans</i> ZX64	DQ478681	1503/500	100%	100%
<i>S. hygroscopicus</i> 5008	DQ478679	1527/508	85%	85%
<i>S. hygroscopicus</i> 10-22	*	1527/508	85%	85%
<i>S. aureofaciens</i> 211	*	1527/508	85%	85%
<i>S. albus</i> JA3453	DQ478678	1473/490	84%	83%
<i>S. spicies</i> FR-008	DQ478677	1485/494	77%	72%
<i>S. qingfengmyceticus</i> A553	DQ478680	1503/500	79%	75%

\* have 100% identity in nucleotide sequence with *S. hygroscopicus* 5008.

致。另外井岗链霉菌 5008、金色链霉菌 211 和吸水链霉菌 10-22 的 *nsdA* 均为 1527bp, 基因序列 100% 一致。ClustalW 程序分析, 发现在核苷酸水平上, 与天蓝色链霉菌 *nsdA* 基因序列相似性最小的是链霉菌 FR-008 (77%); 翻译成氨基酸序列后, 与天蓝色链霉菌的 *NsdA* 氨基酸序列相比, 相似性最小的是 FR-008 的 *NsdA* (72%) (表 1)。说明在测序的几种链霉菌中, *nsdA* 基因具有很高的同源性。

### 2.3 变铅青链霉菌 ZX64 中 *nsdA* 基因的中断

**2.3.1 *nsdA* 基因中断菌株的筛选:** 从测序结果可知菌株 ZX64 与天蓝色链霉菌 A3 (2) 的 *nsdA* 核苷酸序列 100% 一致, 因此本研究以天蓝色链霉菌 *nsdA* 基因及其侧翼序列构建的中断载体 pHZ2718 来尝试中断变铅青链霉菌的 *nsdA* 基因。基因中断原理基于同源序列的重组, pHZ2718 所携带的 *nsdA* 左右两臂序列分别与染色体相应的同源区域发生同源重组, 阿泊拉霉素抗性基因置换染色体上的部分 *nsdA* 基因, 使染色体上的 *nsdA* 基因被中断 (图 3)。在 pHZ2718 中, 载体部分带有 *tsr* (硫链丝菌素抗性基因), 外源片段中带有 *aac(3)IV* (阿泊拉霉素抗性基因), 因此双交换菌株应为阿泊拉霉素抗性而硫链丝菌素敏感 ( $Am^R$  Thio<sup>S</sup>), 单交换菌株为  $Am^R$  Thio<sup>R</sup>。通过筛选分别得到单交换菌株, 命名为 WQ1; 双交换菌株命名为 WQ2。

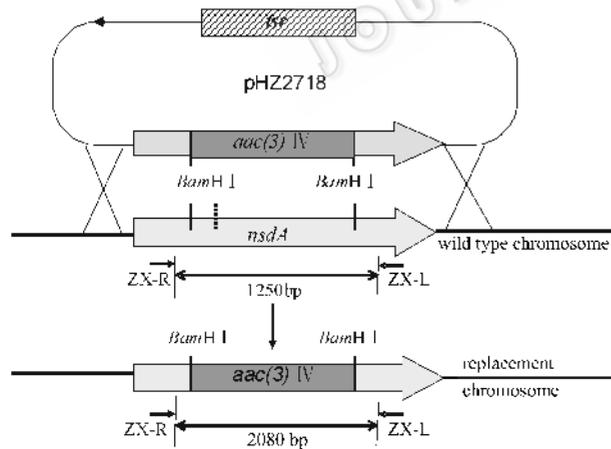


图3 pHZ2718 与链霉菌染色体同源区域发生双交换的模式图

Fig.3 Schematic showing of gene replacement between plasmid pHZ2718 and chromosomes

*tsr*: the thiostrepton resistance gene; *aac(3)IV*: the apramycin resistance gene.

**2.3.2 *nsdA* 基因中断的 PCR 验证:** 以野生型菌株 ZX64 和单交换菌株 WQ1 作对照, 验证 WQ2 菌株的基因型。理论上, 在单交换菌株 WQ1 中, 染色体上

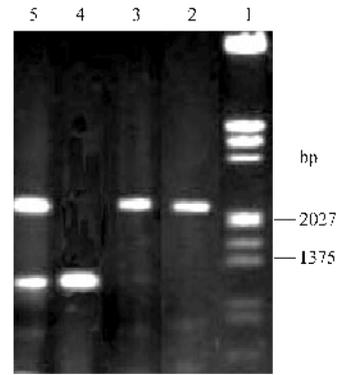


图4 *nsdA* 基因中断菌株的 PCR 验证

Fig.4 Verification of the *nsdA* disruption by PCR

1:  $\lambda$ phage DNA digested with *EcoRI* + *HindIII* as molecular weight standard; 2 and 3: PCR products of WQ2; 3 and 4: PCR products of wild strain and WQ1, respectively.

存在野生型 *nsdA* 基因和来自 pHZ2718 的基因置换型片段这两种拷贝; 在 WQ2 中 *nsdA* 基因两个外侧 *BamHI* 位点之间的 870bp 片段被 1.7kb 的 *aac(3)IV* 片段置换 (图 3)。在 PCR 扩增反应中, 引物 ZX-L、ZX-R 位于 *nsdA* 基因外侧的两个 *BamHI* 位点之外, 以中断菌株 WQ2 总 DNA 为模板的 PCR 产物大小为 2080bp, 比野生型菌株的特征带 1250bp 大 830bp (图 3), 而单交换菌株则扩增出 2080bp 和 1250bp 两条带, 结果与预计相符 (图 4)。PCR 扩增结果表明, 挑取的 2 株  $Am^R$  Thio<sup>S</sup> 菌株中, *nsdA* 基因均已被正确中断。

**2.3.3 *nsdA* 基因中断对沉默放线紫红素基因簇的激活作用:** 观察 *nsdA* 基因中断菌株 WQ2 的生物学表型, 发现在  $R_2$  YE 培养基上培养 4~8d, 可产生红色或蓝紫色色素, 而野生型菌株 ZX64 不产色素 (图 5A)。放线紫红素是一种色素类抗生素, 随着 pH 值的改变呈现不同的颜色, 在酸性条件下呈现红色, 碱性条件下呈现蓝紫色。将上述产色素的平板分别用浓盐酸和氨水熏蒸数小时, 在用浓盐酸熏蒸条件下该色素呈现红色而在氨水熏蒸条件下呈蓝色, 从而确定 WQ2 产生的色素为放线紫红素。为排除染色体上其它基因自发突变或极性效应可能引起的表型差异, 设计了相应的基因互补实验, 用 pHZ2731 来互补 WQ2 菌株, 它含有来自天蓝色链霉菌完整的 *nsdA* (图 1)。将 pHZ2731 导入 WQ2 菌株中, 接合转移子 WQ3 不再产生放线紫红素, 其表型恢复到野生型状态, 而将 pHZ2731 中的载体部分 pIJ8600 导入 WQ2 菌株则表型没有变化 (图 5B)。由此表明, WQ2 产生放线紫红素是由 *nsdA* 被中断所引起, 该基因中断导致沉默的放线紫红素合成基因簇被激活。

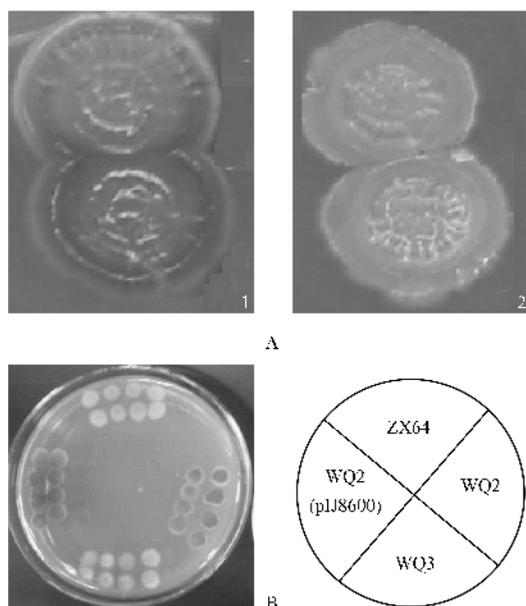


图5 不同菌株在  $R_2$  YE 培养基上的表型观察

Fig. 5 The phenotype of different strains on  $R_2$  YE agar media  
A : Production of actinorhodin by WQ2 ; 1. disruption strain WQ2 ; 2. wild type strain ZX64 ; B : The different phenotype of *S. lividans* caused by *nsdA* : on  $R_2$  YE agar media , 30°C , 5 days . The name of the strains inoculated on each part of the plate was shown to the right .

### 3 讨论

本研究基于我们首次在已测序的天蓝色链霉菌基因组中发现的一个对形态分化和抗生素合成均具有负调节作用的基因——*nsdA*。有关该基因在天蓝色链霉菌中的多效性负调节功能我们将另行报道。

本研究旨在探索 *nsdA* 用于抗生素基因工程育种的潜力。Southern 杂交实验表明, *nsdA* 基因存在于多种链霉菌中, 测序结果则表明该基因序列保守性很高, 基因序列高度保守通常暗示其功能的保守性。*nsdA* 的广泛存在为抗生素产生菌高产菌株的构建提供了新的靶标。进一步的研究将能揭示, 这些同源基因在各个链霉菌中是否对抗生素合成具有负调节作用, 中断这些基因是否能够使菌株提高抗生素产量。

变铅青链霉菌与天蓝色链霉菌 *nsdA* 核苷酸序列 100% 一致。虽然变铅青链霉菌具有完整的放线紫红素合成基因簇, 但在通常培养条件下并不产生放线紫红素。*nsdA* 基因是否调节放线紫红素的生物合成是我们的研究兴趣所在。基于序列完全一致, 我们以天蓝色链霉菌 *nsdA* 及其侧翼序列构建的基因中断载体, 中断了变铅青链霉菌中的 *nsdA* 基因。与野生型相比中断菌株的表型发生了很大的变

化——通常培养条件下, 在野生型菌株 ZX64 中沉默的放线紫红素却在中断菌株 WQ2 中被激活。造成这种表型突变有两种可能: 一是由 *nsdA* 基因的中断引起; 二是来自天蓝色链霉菌中的其余 2.6kb 的片段可能与变铅青链霉菌相应区域存在较大的差异, 这些差异重组到变铅青链霉菌中导致的突变。但是中断菌株 WQ2 能够被来自天蓝色链霉菌的完整的 *nsdA* 互补, 这样就排除了后者。以上结果暗示在野生型菌株中 *nsdA* 基因对放线紫红素合成基因簇具有负调控作用, 我们推测 *NsdA* 可能抑制了途径专一性激活蛋白的表达, 使放线紫红素的合成基因簇处于沉默状态。

在变铅青链霉菌中, 我们已经清楚了一些调控放线紫红素生物合成的基因: 用高拷贝载体额外引入途径专一性激活基因 *actII-4*<sup>[12]</sup> 或多效性调节基因 *afsR*<sup>[2]</sup> 都能够激活放线紫红素的合成; 中断途径专一性负调节基因 *actVB-10*<sup>[13]</sup> 及铜离子利用的双组分系统基因 *cutRS*<sup>[3]</sup> 也导致变铅青链霉菌合成放线紫红素; 多聚磷酸盐激酶基因 (*ppk*)<sup>[14]</sup> 和双组分系统 *phoR-phoP*<sup>[15]</sup> 通过调控细胞内无机磷酸盐浓度而同时影响初级代谢和次级代谢, *ppk*、*phoR* 和 *phoR-phoP* 的突变菌株均能产生放线紫红素。

*nsdA* 基因是继 *actII-4*、*actVB-10*、*cutRS*、*ppk*、*phoR-phoP* 等基因之后发现的又一个能调节变铅青链霉菌产素的基因, 但 *nsdA* 基因负调控的具体分子机制尚待进一步研究。

### REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Brian P, Riggle PJ, Santos RA *et al.* Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system. *J Bacteriol*, 1996, **178** : 3221 - 3231
- [ 2 ] Vogli M, Chang PC, Cohen SN. *afsR2* : a previously undetected gene encoding a 63-amino-acid protein that stimulates antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol*, 1994, **14** ( 4 ) : 643 - 653
- [ 3 ] Chang HM, Chen MY, Shieh YT *et al.* The *cutRS* signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin. *Mol Microbiol*, 1996, **21** ( 5 ) : 1075 - 1085
- [ 4 ] Bibb MJ. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 ( 2 ). *Microbiol*, 1996, **142** : 1335 - 1344
- [ 5 ] Wright LF, Hopwood DA. Actinorhodin is a chromosomally determined antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3 ( 2 ). *J Gen Microbiol*, 1976, **96** : 292 - 297
- [ 6 ] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ *et al.* *Practical Streptomyces*

- [ 7 ] Sun J , Kelemen GH , Fernandez-Abalos JM *et al.* Green fluorescent protein as a report spatial and temporal gene expression in *streptomyces coelicolor* A3( 2 ). *Microbiol* , 1999 , **145** : 2221 – 2227
- [ 8 ] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular cloning : A Laboratory manual* . 2<sup>nd</sup> ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [ 9 ] Hopwood DA , Bibb MJ , Chater KF *et al.* Genetic manipulation of *Streptomyces* . London : The John Innes Foundation , 1985 , 5
- [ 10 ] Mac Neil DJ , Klapko LM. Transformation of *Streptomyces avermitilis* by plasmid DNA. *Ind Microbiol* , 1987 , **2** : 209 – 213
- [ 11 ] Sambrook J , Russell DW. *Molecular cloning : A laboratory manual* . 3rd ed. Huang PT ( 黄培堂 ) , translated. Beijing : Science and Technology Press ( 北京科技出版社 ) 2002
- [ 12 ] Bruheim P , Sletta H , Bibb MJ *et al.* High-yield actinorhodin production in fed-batch culture by a *Streptomyces lividans* strain overexpressing the pathway-specific activator gene *actIII-ORF4* . *J Ind Microbiol Biotechnol* , 2002 , **28** : 103 – 110
- [ 13 ] Oscar HM , Angel JM , Eduardo M *et al.* An additional regulator gene for actinorhodin production in *Streptomyces lividans* involves a LysR-Type transcriptional regulator. *J Bacteriol* , 1999 , **181** : 4353 – 4364
- [ 14 ] Hichem C , Marie JV. The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans* . *Mol Microbiol* , 2002 , **43** : 919 – 930
- [ 15 ] Sala-landa A , Moura RS , Martin JF. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans* . *PANS* , 2003 , **100** : 6133 – 6138