

· 研究论文 ·

两种外源二型硫酯酶 TE II对链霉菌 NRRL 8165产生阿维菌素的影响

宁婷婷¹, 唐功利², 陶黎明^{*1}

(1 华东理工大学 药学院, 上海 200237;

2 中国科学院 上海有机化学研究所 生命有机化学国家重点实验室, 上海 200032)

摘要: 利用接合转移的方法将不同来源的二型硫酯酶 (TEII, type II thioesterase) 导入链霉菌 *S. avermitilis* NRRL 8165 中构建了两突变株, 同时研究比较了两种突变株与野生型在等量发酵时阿维菌素产量的变化。结果表明: 导入 Tetrocarcin A 的 TEII 突变株阿维菌素的产量提高了 96.52%; 导入氯丝菌素 (Chlorothricin) 的 TEII 突变株阿维菌素的产量提高了 38.06%。进一步验证了 TEII 对聚酮类次级代谢产物的生物合成具有编辑和纠错功能。

关键词: 链霉菌 NRRL 8165; 二型硫酯酶; 阿维菌素; 突变株; 高效液相色谱

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2009.03.007

中图分类号: S476.1; S482.292

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2009)03-0323-06

Effects of Two Heterogenous TE II on Abamectin Produced by *Streptomyces avermitilis* NRRL 8165

NING Ting-ting¹, TANG Gong-li^{*2}, TAO Liming^{*1}

(1. Pharmaceutical College, East China of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. National Key laboratory of Life Organic Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Two mutations were constructed by the conjugation of two heterogenous (TEII) into *S. avermitilis* NRRL 8165. The effects of TEII on abamectin products were determined by comparing with the wild strain based on the equalized fermentation. The results indicated that the abamectin products increased by 96.52% and 38.06%, respectively, after the TEII of Tetrocarcin A and Chlorothricin was inserted into *S. avermitilis* NRRL 8165 respectively. It further verified the function of editing and error-correcting of TEII on polyketide secondary metabolic production.

Key words: *Streptomyces avermitilis* NRRL 8165; TEII; abamectin; mutation; HPLC

阿维菌素 (abamectin) 对防治人、畜及农林作物的多种寄生虫和昆虫的危害有着重要的意义, 其活性组份共有 8 种, 分别是 A1a、A1b、A2a、A2b、B1a、B1b、B2a 和 B2b, 其中杀虫活性最好的

是 B1a, 因此阿维菌素的生产一般都以 B1a 来定量。

目前 *S. avermitilis* 菌体总基因簇已经过全测序, 且科学家已对整个基因簇进行了详细的分

收稿日期: 2009-01-15; 修回日期: 2009-05-10.

作者简介: 宁婷婷 (1984-), 女, 山西朔州人, 硕士研究生, E-mail: ningtingting2093748@yahoo.com.cn; *通讯作者 (Author for correspondence): 陶黎明 (1958-), 男, 上海人, 教授级高级工程师, 主要从事抗生素研究开发. 联系电话: 021-54925113; E-mail: taolm@sh163.net

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863 计划”) (2008AA09Z407); 上海市优秀学科带头人计划 (08XD14220).

析^[1,2]。Ikeda等使用柯斯质粒文库和 *aveD* 基因,运用染色体步移技术鉴定了与阿维菌素合成相关的主要基因簇^[3],包含 82.0 kb 染色体区域,涉及 18 个开放阅读框架 (ORF)。中心区 4 个阅读框架为聚酮合成酶 (polyketide synthase, PKS) 基因,分为 *aveA1-aveA2* 和 *aveA3-aveA4* 两组,其编码的 PKS 负责合成阿维菌素的聚酮部分。经分析该基因簇中不包括二型硫脂酶 (TEII, type II thioesterase)。

在聚酮合酶 (PKS) 和非核糖体聚肽合酶 (NRPS) 的基因簇中广泛存在着 TEII 编码基因。氨基酸序列同源性比对显示,TEII 属于 α/β 水解酶超级家族的成员,具有该家族特征的 Ser-Asp-His 三联体催化活性位点 (catalytic triad)^[4]。TEII 基因缺失导致聚酮 (PK) 或非核糖体合成聚肽 (NRP) 的产量显著降低^[5~7],从而预示 TEII 与产物的合成效率相关。TEII 并非生物合成过程中不可缺少的单元,但其具有纠错功能。2001 年 Michelle 等人^[8]通过研究 I 型 PKS 合成泰勒霉素 (tylosin) 过程中的一个 TEII (即 TyD) 的作用,第一次阐明了 TEII 的作用机制。TEII 的作用是水解延伸过程中异常脱羧单元与 ACP 结合的酰基-N 乙酰基半胱胺硫酯,使得链的延伸能够正常进行^[8]。

Xue 等^[9]于 1998 年在紫霉素 (Viomycin) 中发现了第一类 PKS 机制中编码 TEII 的基因 *pikAV*,通过中断该基因发现苦味霉素的产量降低了 5%。1999 年 Tang 等^[10]成功利用 *Streptomyces lividans* 异源表达了苦霉素 (*picromycin*) 和酒霉素 (*methymycin*),并且发现导入 *PikTEII* 基因后苦霉素的产量提高了 3~4 倍。但有趣的是基因缺失实验证实 *pikAV* 与苦霉素的合成效率无关^[9]。最近 Zhou 等^[11]研究了有关链霉菌 *Streptomyces* sp. FR-008 中杀假丝菌素 (candicidin) 的生物合成,发现将其内部的 TEII 中断后该抗生产量下降了 90%。目前普遍认为 TEII 存在的意义是在 PKS 或 NRPS 合成过程中行使纠错功能,即清除不能被 PKS 或 NRPS 延伸利用的中间产物,例如乙酰-ACP (或 PCP)。

以上已有研究结果表明,TEII 能够影响相应次级代谢产物的产量。基于该理论以及前人的研究,笔者利用不同来源的 TEII 对阿维菌素野生菌株进行了改造,研究其对阿维菌素产量的影响,以期验证 TEII 对阿维菌素结构中 PKS 合成的编辑

和纠错功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 *S. avermectilis* NRRL 8165 菌株由上海交通大学提供,常规克隆宿主菌大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、接合转移供体菌 *E. coli* ET12567、红霉素合成启动子 pLL6124、表达载体 pTGV2 和克隆载体 pGEM-3zf 均为上海有机化学研究所生命有机实验室保存。

1.1.2 仪器与试剂 Agilent 1100 Series 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)、Nucleosil C₁₈ HPLC 柱、PCR 扩增仪 (美国 Perkin-Elmer 公司)、培养箱 (上海一恒科技有限公司)。

限制性内切核酸酶购自 New England Biolab 和 Takara 公司, DNA maker、DNA 聚合酶购自北京鼎国生物技术公司,其他常用生化试剂购自华美生物工程公司和生工生物工程公司;化学试剂均为国产分析纯。PCR 实验所需的核苷酸引物由上海生物工程技术有限公司合成。克隆载体试剂盒 (pGEM-T Easy Vector Systems) 购自 Promega 公司。测序由上海英俊生物技术有限公司和上海美季生物技术有限公司完成。

1.1.3 培养基 LB 培养基, YEME 培养基 (L⁻¹): 酵母提取物 3 g、蛋白胨 5 g、麦芽提取物 3 g、葡萄糖 10 g、蔗糖 200 g,调节 pH = 7.5,用双蒸水定容到 1 L。灭菌后加入 2 mL 2.5 mol/L 的六水合氯化镁溶液 (终浓度 5 mmol/mL) 用于阿维链霉菌以及突变株的液体培养。MS 培养基 (生孢子培养基以及发酵培养基): 琼脂 2% (质量浓度,其余同)、甘露醇 2%、黄豆饼粉 (康明威) 2%。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取、纯化和回收 参照 Chen 等^[12]的方法进行。

1.2.2 质粒构建

1) pNTT-08-06-12 是以 TCA TE-F: TTAAAG-CTTTGACCGA TCCCGACGATG 和 TCTE-R: TTT-TCTAGAGGTGCGGAAGGAGGATG 为引物,以小单孢菌 *Micromonospora chalybeata* 中含 Tetrocarcin A TEII^[13]的质粒为模板 PCR 扩增出来的序列,经 HindIII + XbaI 双酶切后连入经同样酶切处理的 pGEM-3zf 而形成的质粒。

2) pNTT-08-06-14 是以 CHL TE-f: TTAA-

GCTTAGCGGACCAAGCA TTTTCG 和 CHL TE-R: TTTTCTAGA TACCGTACAGGCGTTTGG为引物,以抗生链霉菌 *Streptomyces antibioticus* 40725 中含 Chlorothricin TEII^[14]的质粒为模板 PCR 扩增出来的序列,经 HindIII + XbaI 双酶切后连入经同样酶切处理的 pGEM -3zf 而形成的质粒。

3) pTGV 2-E 是将 pLL 6124 经过 EcoRI + XbaI 双酶切得到的红霉素启动子片段插入利用 EcoRI + XbaI 双酶切的 pTGV 2 中构建的表达载体。

4) pN TT-08-06-161 是由 pN TT-08-06-12 经 HindIII + XbaI 双酶切得到目的序列后连入经同样酶切处理的 pTGV 2-E 而形成的质粒。

5) pN TT-08-06-19 是由 pN TT-08-06-14 经 HindIII + XbaI 双酶切得到目的序列后连入经同样酶切处理的 pTGV 2-E 而形成的质粒。

1.2.3 *S. avermitilis* NRRL 8165 和大肠杆菌属间的接合转移 取 -80℃冻存的 *S. avermitilis* NRRL 8165 孢子 300 μL,解冻,50℃热激 10 min,37℃下培养 3~5 h,作为受体细胞;将构建的质粒 pTGV 2-E、pN TT-08-06-161、pN TT-08-06-19 分别导入 *E. coli* ET12567,37℃培养至 OD₆₀₀ = 0.4~0.6,作为供体细胞;将 700 μL 的受体细胞与等体积的供体细胞混匀,直接涂布在含 MS 培养基的平板上;30℃培养 16~20 h,用无菌水轻轻洗涤平板表面,以洗去大部分大肠杆菌;在每块平板的表面覆盖含萘啶酮酸 (nalidixic acid) 和适量硫链丝菌素 (Thiostrepton) (终浓度均为 50 ng/μL),30℃培养 5 d 以上挑取接合子。对应的接合子分别为: *S. aver* TE0、*S. aver* TE1、*S. aver* TE2。

1.2.4 *S. avermitilis* NRRL 8165 总 DNA 的提取 参照文献方法^[15]进行。

1.2.5 *S. avermitilis* NRRL 8165 以及突变株的发酵 接种 *S. avermitilis* NRRL 8165 以及突变株于 3 mL 的 YEME 培养基中,30℃摇床试管培养 36 h;取等体积的培养物,离心,弃上清液,余下的菌丝体称湿重,计算原培养物中的菌体浓度;将其等量接种在 MS 培养基上 (突变株的发酵需要添加终浓度为 25 ng/μL 的硫链丝菌素),于 30℃下生长 7 d;收集并切碎培养物 (每平板 20 mL),用等体积的甲醇于 4℃避光浸泡过夜;离心或用滤纸去掉菌体和培养基等各种残渣,剩下的液体浓缩至 500 μL。

1.2.6 HPLC 检测 取溶于甲醇的发酵液提取物 20 L 进样;Nucleosil C₁₈ HPLC 柱 (250 cm × 4.6 mm,

5 μm);检测波长 246 nm;流动相为 H₂O-CH₃OH = 15:85 (体积比);流速 0.85 mL/min。

2 结果与分析

2.1 氯丝菌素、Tetrocarcin A 及阿维菌素中 TEII 在聚酮合成中的作用

其聚酮合成途径见图 1。由图 1 可知,氯丝菌素 (Chlorothricin) 和 Tetrocarcin A 的生物合成过程中均有 TEII,而在阿维菌素的生物合成过程中并没有发现有功能的 TEII。基于这一前提以及前人有关 TEII 的报道,笔者决定利用 Chlorothricin 和 Tetrocarcin A 的 TEII 来研究外源 TEII 对阿维菌素产量的影响。

2.2 含有不同 TEII 的重组质粒、突变株及其鉴定

pN TT-08-06-161 是含有 Tetrocarcin A TEII 的质粒; pN TT-08-06-19 是含有 *Streptomyces* Chlorothricin TEII 的质粒。这两种质粒经过酶切鉴定是正确的。

通过接合转移构建了 3 种不同的突变株,分别为 *S. aver* TE0: 将 pTGV 2-E 导入 *S. avermitilis* NRRL 8165 构成的突变株, *S. aver* TE1: 将 pN TT-08-06-161 导入 *S. avermitilis* NRRL 8165 构成的突变株, *S. aver* TE2: 将 pN TT-08-06-19 导入 *S. avermitilis* NRRL 8165 构成的突变株。

通过提取 *S. aver* TE0、*S. aver* TE1、*S. aver* TE2 3 种突变株的总 DNA,并利用相应的引物进行 PCR 扩增鉴定其是正确的。

2.3 发酵结果

野生型与突变株的等量发酵 (发酵的菌丝体量均为 1.013 4 g) HPLC 检测结果如图 2 所示。

HPLC 检测分析发现,野生型与突变株均有阿维菌素的 4 种组份 (A2a、B1b、B1a、A1a) 生成。通过面积积分的方法比较产量的变化发现:突变株 *S. aver* TE0 与野生型发酵所产生的阿维菌素的总量相当,表明空载体对于阿维菌素的产量没有影响;突变株 *S. aver* TE1 与 *S. aver* TE0 相比,4 种阿维菌素组份的总产量提高了 96.52%,表明导入 *Micromonospora chalybeata* 中 Tetrocarcin A 的 TEII 使得阿维菌素的总产量得到了提高;突变株 *S. aver* TE2 与 *S. aver* TE0 相比,4 种阿维菌素组份的总产量提高了 38.06%,表明导入 *Streptomyces antibioticus* 40725 中 Chlorothricin 的 TEII 也使得阿维菌素的总产量得到了提高,但提高的程度不

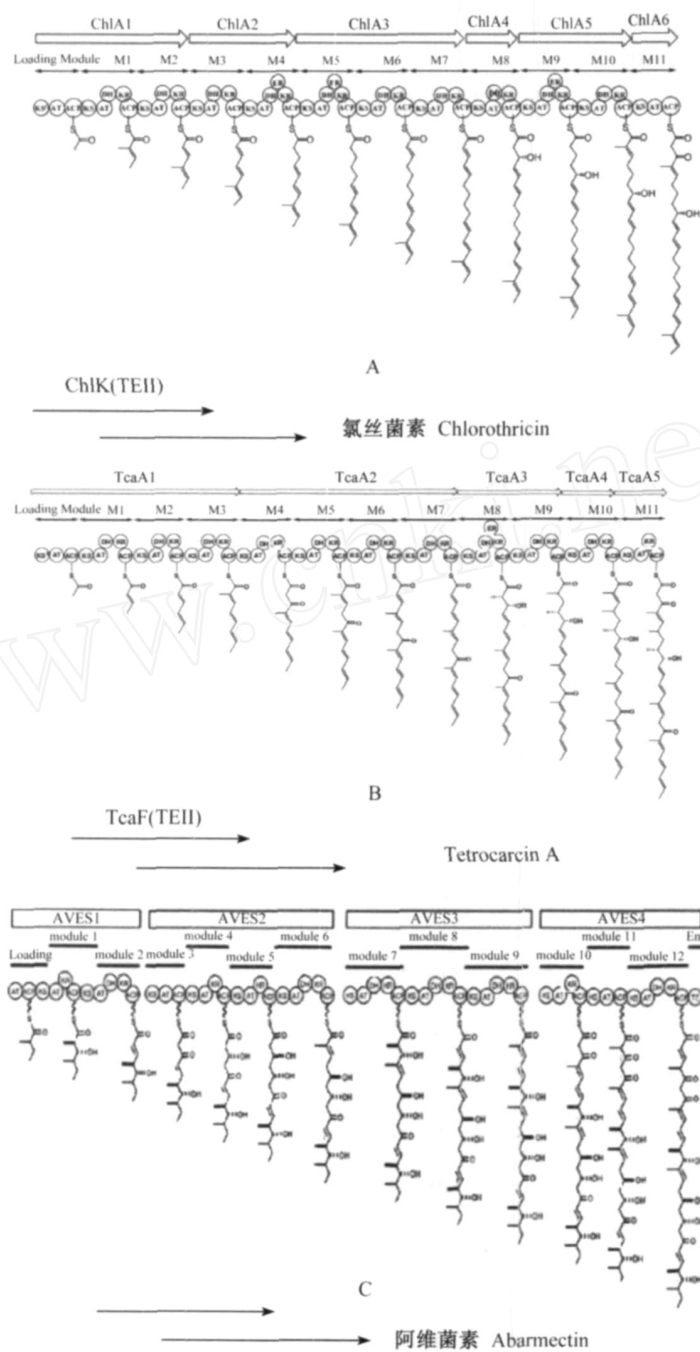


图 1 三种抗生素的聚酮合成骨架

Fig 1 The polyketide syntheses of three antibiotics

A 为氯丝菌素^[15]生物合成中的聚酮骨架; B 为 Tetrocarcin A^[14]生物合成中的聚酮骨架; C 为阿维菌素^[3]生物合成中的聚酮骨架

A. The polyketide syntheses of chlorothricin; B. The polyketide syntheses of tetrocarcin A; C. The polyketide syntheses of abamectin

及导入 *Micromonospora chalybeata* 中 Tetrocarcin A 的 TEII。

3 讨论

本研究通过构建异源 TEII 的突变株以及其与

野生型对比发酵分析得知, TEII 选择性地水解清除聚酮链延伸过程中不可以利用的中间产物, 从而确保了聚酮的合成效率。阿维菌素生物合成基因簇中不含 TEII, 但它可以利用外源的 TEII 提高其产量。在聚酮合酶 (PKS) 或非核糖体聚肽合酶

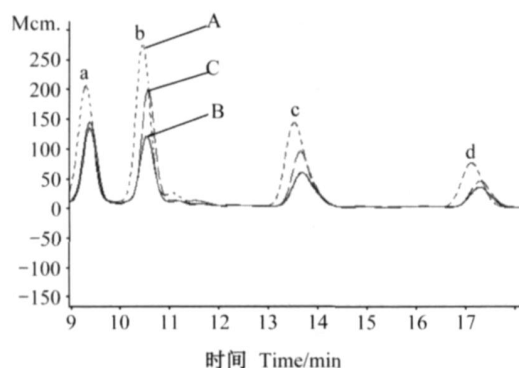


图 2 突变株的 HPLC 检测图

Fig 2 HPLC chromatogram of mutations

A. S. aver TE1; B. S. aver TE0; C. S. aver TE2

a A2a 9.378 min; b B1b 10.531 min;

c B1a 13.674 min; d A1a 17.286 min

(NRPS)的催化反应过程中,会不可避免地产生一些不能被 PKS 或 NRPS 延伸所利用的中间产物,例如乙酰基和丙酰基^[16~20],因此,需要一个硫脂酶把这些无用的中间产物通过水解硫脂键反应从 ACP(或 PCP)上清除,从而确保聚酮或聚肽生物合成的高效运转。目前已在许多 PKS 或 NRPS 基因簇中发现了额外的硫酯酶编码基因,即二型硫脂酶 (TEII)基因,这正契合了纠正 PKS 或 NRPS 合成过程中潜在错误的需求。阿维菌素产量提高的主要原因是 TEII 具有纠错功能,它能够水解阿维菌素生物合成过程中聚酮合成酶中与 ACP 错误结合的单元,保证链的延伸正常,从而使阿维菌素的合成得以顺利进行,最终表现为阿维菌素的产量比野生型有所提高。这与前人的一些研究结果相符。如 Yukiko 等人^[21]报道了在 *Amycolatopsis mediterranei* S699 中将利福霉素 (rifamycin) 生物合成过程中的 *riiR* 基因敲除后利福霉素的产量降低了 30%~60%,其中 *riiR* 基因即是利福霉素生物合成过程中的 TEII; Butler 等人^[22]研究了泰勒霉素生物合成中 TEII 的作用,发现敲除 TEII 后产量降低了 85%,回补后产量恢复。

在 PKS 和 NRPS 合成途径中,TEII 的功能似乎是不可或缺的,这是因为在很多 PKS 和 NRPS 基因簇中都发现存在 TEII 基因^[10, 11, 23~26];而且在这些 PKS 和 NRPS 合成途径中都存在着内在的出错机制,需要 TEII 行使修复功能^[6, 7, 27, 28]。同时也发现在另外一些 PKS 或 NRPS 基因簇中不存在 TEII 基因^[8, 29],估计这一空缺可以被染色体上其他同类基因簇中的 TEII 回补。现已发现许多链霉

菌染色体上存在多个基因簇,其中就包括 PKS 和 NRPS 类型的基因簇^[30~33],某些同类基因簇之间可能存在一些功能上的互补关系。显然,对 TEII 的有效操作可以被用于促进 PKS 或 NRPS 类抗生素的生物合成效率,从而为商业化生产该类抗生素提供了潜在的可能性。

参考文献:

- [1] IKEDA H, ISHIKAWA J, HANAMOTO A, et al Genome Sequence of an Industrial Microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the Ability of Producing Secondary Metabolites [J]. PNAS, 2001, 98: 12215-12220.
- [2] IKEDA H, ISHIKAWA J, HANAMOTO A, et al Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Industrial Microorganism *Streptomyces avermitilis* [J]. Nature Biotechnology, 2003, 21: 526-531.
- [3] IKEDA H, OHMURA S. Avermectin Biosynthesis [J]. Chem Rev, 1997, 97: 2591-2609.
- [4] LINNE U, SCHWARZER D, SCHROEDER G N, et al Mutational Analysis of a Type II Thioesterase Associated with Nonribosomal Peptide Synthesis [J]. Eur J Biochem, 2002, 269: 1536-1545.
- [5] BUTLER A R, BATE N, CUNDLiffe E. Impact of Thioesterase Activity on Tylosin Biosynthesis in *Streptomyces fradiae* [J]. Chem Bio, 1999, 16: 287-292.
- [6] KATAYAMA D Y, YOON Y J, CHOIC Y, et al Thioesterases and the Premature Termination of Polyketide Chain Elongation in Rifamycin B Biosynthesis by *Amycolatopsis mediterranei* S699 [J]. J Antibiot (Tokyo), 2000, 53: 484-495.
- [7] SCHNEIDER A, MARAHIEL M A. Genetic Evidence for a Role of Thioesterase Domains, Integrated in or Associated with Peptide Synthetases, in Non-ribosomal Peptide Biosynthesis in *Bacillus Subtilis* [J]. Arch Microbiol, 1998, 169: 404-410.
- [8] MICHELLE L H, JAMES S, PETER F. Leadlay Role of Type II Thioesterases: Evidence for Removal of Short Acyl Chains Produced by Aberrant Decarboxylation of Chain Extender Units [J]. Chemistry & Biology, 2001, 8: 207-220.
- [9] XUE Y, ZHAO L, LIU H W, et al A Gene Cluster for Macrolide Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: Architecture of Metabolic Diversity [J]. PNAS, 1998, 95: 12111-12116.
- [10] TANG L, FU H, BETLACH M C, et al Elucidating the Mechanism of Chain Termination Switching in the Picromycin/Methymycin Polyketide Synthase [J]. Chemistry & Biology, 1999, 6: 553-558.
- [11] ZHOU Y J, MENG Q Q, YOU D L, et al Selective Removal of Aberrant Extender Units by a Type II Thioesterase for Efficient FR-008/Candicidin Biosynthesis in *Streptomyces* sp. Strain FR-008 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74: 7235-7242.

- [12] CHEN S, ROBERTS J B, XUE Y, et al The Streptomyces Venezuelae PikAV Gene Contains a Transcription Unit Essential for Expression of Enzymes Involved in Glycosylation of Narbonolide and 10-Deoxymethynolide [J]. Gene, 2001, 263: 255-264.
- [13] KIESER T, BBB M J, BUTTNER M S, et al Practical Streptomyces Genetics [K]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [14] FANG J, ZHANG Y P, HUANG L J, et al Cloning and Characterization of the Tetrocarcin A Gene Cluster from Micromonpora chalcea NRRL 11289 Reveal a Highly Conserved Strategy for Tetrionate Biosynthesis in Spirotetronate Antibiotics [J]. J Bacteriology, 2008, 190: 6014-6025.
- [15] JIA X Y, TIAN Z H, SHAO L, et al Genetic Characterization of the Chlorothricin Gene Cluster as a Model for Spirotetronate [J]. Chemistry & Biology, 2006, 13: 575-585.
- [16] SAMBROOK J, FRITSH E F, MANIATIS T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd [K]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [17] HEATHCOTE M L, STAUNTON J, LEADLAY P F. Role of Type II Thioesterases: Evidence for Removal of Short Acyl Chains Produced by Aberrant Decarboxylation of Chain Extender Units [J]. Chem Biol, 2001, 8: 207-220.
- [18] KIM B S, CROPP T A, BECK B J, et al Biochemical Evidence for an Editing Role of Thioesterase II in the Biosynthesis of the Polyketide Pikromycin [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 48028-48034.
- [19] LAMBALOT R H, GEHRING A M, FLUGUL R S, et al A New Enzyme Superfamily—the Phosphopantetheinyl Transferases [J]. Chem Biol, 1996, 3: 923-936.
- [20] QUADRIL E, WENREB P H, LEIM, et al Characterization of Sfp, a Bacillus Subtilis Phosphopantetheinyl Transferase for Peptidyl Carrier Protein Domains in Peptide Synthetases [J]. Biochemistry, 1998, 37: 1585-1595.
- [21] YUKIKO DOI-KA TAYAMA, YEO JOON YOON, CHA-YONGCHOI, et al Thioesterases and the Premature Termination of Polyketide Chain Elongation in Rifamycin B Biosynthesis by Amycolatopsis mediterranei S699 [J]. J Antibiot, 2000, 53: 484-495.
- [22] BUTLER A R, BATE N, CUNDLIFFE E, et al Impact of Thioesterase Activity on Tylosin Biosynthesis in Streptomyces fradiae [J]. Chemistry & Biology, 1999, 6: 287-292.
- [23] CHEN S, HUANG X, ZHOU X, et al Organizational and Mutational Analysis of a Complete FR-008/Candidin Gene Cluster Encoding a Structurally Related Polyene Complex [J]. Chem Biol, 2003, 10: 1065-1076.
- [24] CHEN S, ROBERTS J B, XUE Y, et al The Streptomyces Venezuelae PikAV Gene Contains a Transcription Unit Essential for Expression of Enzymes Involved in Glycosylation of Narbonolide and 10-Deoxymethynolide [J]. Gene, 2001, 263: 255-264.
- [25] HU Z, PFEIFER B A, CHAO E, et al A Specific Role of the Saccharopolyspora Erythraea Thioesterase II Gene in the Function of Modular Polyketide Synthases [J]. Microbiology, 2003, 149: 2213-2225.
- [26] KOTOWSKA M, PAWLICK K, BUTLER A R, et al Type II Thioesterase from Streptomyces Coelicolor A3 (2) [J]. Microbiology, 2002, 148: 1777-1783.
- [27] SCHWARZER D, MOOTZ H D, LINNE U, et al Regeneration of Mispripped Nonribosomal Peptide Synthetases by Type II Thioesterases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 14083-14088.
- [28] KOHLIR M, BRUNER S D, WALSH C T, et al Type II Thioesterase Restores Activity of a NRPS Module Stalled with an Aminoacyl-S-enzyme that Cannot be Elongated [J]. ChemBiochem, 2004, 5: 1290-1293.
- [29] ZHAO C, JU J, CHRISTENSON S D, et al Utilization of the Methoxymalonyl-acyl Carrier Protein Biosynthesis Locus for Cloning the Oxazomycin Biosynthetic Gene Cluster from Streptomyces Albus JA3453 [J]. J Bacteriol, 2006, 188: 4142-4147.
- [30] BENTLEY S D, CHATER K F, CHALLIS G L, et al Complete Genome Sequence of the Model Actinomycete Streptomyces Coelicolor A3 (2) [J]. Nature, 2002, 417: 141-147.
- [31] OLINYK M, SAMBORSKY M, LESTER J B, et al Complete Genome Sequence of the Erythromycin-producing Bacterium Saccharopolyspora Erythraea NRRL23338 [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25: 447-453.
- [32] OMURA S, IKEDA H, ISHIKAWA J, et al Genome Sequence of an Industrial Microorganism Streptomyces Avenitilis: Deducing the Ability of Producing Secondary Metabolites [J]. PNAS, 2001, 98: 12215-12220.
- [33] SUN Y, ZHOU X, LIU J, et al 'Streptomyces Nanchangensis', a Producer of the Insecticidal Polyether Antibiotic Nanchangmycin and the Antiparasitic Macrolide Meilingmycin, Contains Multiple Polyketide Gene Clusters [J]. Microbiology, 2002, 148: 361-371.

(Ed. TANG J)