

各种新型疾病的不断出现、耐药性病原菌的扩张以及曾经广泛使用的抗生素在不断被淘汰,使得寻找新的天然产物的研究工作变得越来越紧迫。大规模基因组测序发现放线菌基因组内包含有极丰富的天然产物生物合成基因的资源。为了克隆及研究这些巨大复杂的天然产物生物合成酶体系,近二十年来科学家发展出来一系列适用于放线菌基因组大片段克隆的载体,并且利用基因工程对一些潜在的优良异源表达宿主菌进行了改造。

何璟

放线菌基因组大片段克隆载体及异源表达 宿主改造的研究进展

朱梦奕 何璟*

(华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

摘要: 大规模基因组测序发现放线菌基因组内包含有极丰富的天然产物合成基因,是非常有价值的资源。放线菌基因组中负责天然产物合成的基因通常成簇存在。要想完整地克隆这些较大的基因簇并且进行功能研究,或者通过异源表达激活原本沉默的天然产物合成基因簇,需要大容量的载体系统和合适的异源宿主。本文重点介绍了放线菌中常用于基因组大片段克隆的载体及异源表达宿主改造的研究进展。

关键词: 放线菌, 基因组大片段, 高容量载体, 宿主改造

Cloning vectors and heterologous hosts for large fragments of actinobacteria genomic DNA

ZHU Meng-Yi HE Jing*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270136); 教育部留学回国人员科研启动基金项目(No. [2009] 1590)

*通讯作者: Tel: 86-27-87280163; 信箱: hejingjj@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2013-03-08; 接受日期: 2013-06-17

Abstract: Biosynthetic pathway genes for each natural product are mostly located together on a large and continuous segment of the genome to compose a gene cluster. Actinobacteria genomes usually contain various natural product biosynthetic gene clusters, which are valuable resources of potential applications in medicine, agriculture and industry. Some of these gene clusters are considered to be silent because no related metabolites could be detected under laboratory conditions. For functional analyses of natural product biosynthetic gene clusters, researchers constructed a lot of high-capacity vectors and many heterologous hosts by genetic engineering for cloning and expressing large DNA fragments of actinobacteria genomes in the last two decades.

Keywords: Actinobacteria, Large genomic DNA fragment, High-capacity vector, Heterologous host

随着测序技术的不断发展, 在世界范围内越来越多的实验室对其所研究的生物物种进行了全基因组测序, 生物学研究已经进入了后基因组时代^[1]。对已经全基因组测序的生物进行基因组功能与调控网络的分析成为近年来的研究热点。其中, 克隆技术是基因组研究的基础, 已广泛应用于基因组测序、基因克隆以及基因组图谱的绘制等方面。而选择合适容量的载体则是克隆技术的关键。自 1953 年 DNA 双螺旋结构被阐明以来, 分子生物学经过 60 年的发展, 克隆技术也在通过不断更新来满足人类的需求。在世界范围内各个实验室发展出了多种高容量的载体如: 黏粒(Cosmid)、P1 噬菌体载体(Bacteriophage P1 vector)、P1 人工染色体(P1 artificial chromosome, PAC)、酵母人工染色体(Yeast artificial chromosome, YAC)和细菌人工染色体(Bacteria artificial chromosome, BAC)等等。

放线菌是一类基因组 GC 含量较高的革兰氏阳性细菌, 因能够生产种类繁多的天然产物而受到广泛的关注, 据报道约有 60%–70% 的人用抗生素来源于放线菌^[2]。随着各种新型疾病的不断出现^[3]、耐药性病原菌的扩张以及曾经广泛使用的抗生素在不断被淘汰, 寻找新的天然产物的研究显得十分重要。随着测序技术的进步, 越来越多的实验室对各种放线菌进行了

全基因组序列分析。从已公布的序列及已发表的文献来看, 放线菌基因组内包含有极丰富的天然产物合成基因。例如, 在天蓝色链霉菌的基因组中发现了 20 个次级代谢产物的生物合成基因簇^[4], 而在棒状链霉菌中除了含有已分离到的头霉素 C 和克拉维酸的合成基因簇外^[5–6], 还包含 46 个其他的次级代谢产物的生物合成基因簇, 其中有不少是全新的生物合成酶体系^[7]。这些天然产物的生物合成基因是非常有价值的资源, 具有在医药、农业及其他方面应用的潜力。然而放线菌基因组中负责天然产物合成的基因通常成簇排列(30–100 kb), 并且还有很多天然产物的基因簇在通常状态下是沉默的, 要将这种基因簇较大或者通常沉默的基因簇完整的克隆出来并且进行异源表达和功能研究, 就需要容量较大的载体和理想的异源表达宿主菌。正是由于研究天然产物合成基因簇的需要, 近二十年来科学家发展出来一系列适用于放线菌基因组大片段克隆的载体并且对一些潜在的优良宿主菌进行了基因工程改造。

1 载体

1.1 Cosmid 载体

Cosmid 是最早运用于基因组研究的高容量载体^[8], 其容量为 30–40 kb, 特点是包含了

一段 λ 噬菌体 DNA 的序列即黏性末端位点 (*cos*)。该位点使得带有外源片段的 Cosmid 能够通过 *cos* 位点包装成为噬菌体颗粒进而通过转导进入大肠杆菌^[9]。由于构建 Cosmid 文库操作简单并且已经有成熟的商业化服务, 所以成为了克隆单基因或者小型基因簇的优先选择。根据其组成及在放线菌中存在状态的不同可将 Cosmid 载体分为以下 3 种类型。

1.1.1 自杀型: 通常为大肠杆菌载体, 含有可以在大肠杆菌及放线菌中进行筛选的抗性标记, 不含有放线菌的复制元件。这一类型的载体在放线菌中会因无法复制而逐渐丢失, 只有通过所携带的外源片段与染色体之间的同源重组, 才能插入到染色体中从而稳定的遗传下去, 所以常用于制作物理图谱及后期功能分析中的基因中断和敲除。如 1996 年 Matthias Redenbach 等利用 Stratagene 公司的 SuperCos1 构建了天蓝色链霉菌 A3(2)的基因组文库并制作出详细的遗传物理图谱^[10]。2002 年 Bentley S. D. 等将该文库中能够覆盖绝大部分染色体的 305 个重叠的 Cosmid 进行了测序分析, 另外加上 19 个 BAC 和 1 个质粒的序列得到了天蓝色链霉菌全基因组的序列信息^[4]。

1.1.2 自主复制型: 多为大肠杆菌—放线菌穿梭型载体, 含有两套复制系统, 可以在大肠杆菌和放线菌中以质粒形式存在。这一类型的载体多是由天然分离得到的放线菌质粒通过改造, 加入大肠杆菌的复制子及筛选标记而形成。如来源于链霉菌质粒 pIJ101 的 Cosmid 载体 pHZ1358, 来源于温敏型质粒 pSG5 的载体 pHZ132, 来源于高致育性链霉菌质粒 SCP2* 的载体 pKC505 和 pKJ01 等。2003 年 Sun Yuhui 等使用 pHZ1358 构建了南昌链霉菌的基因组文库并克隆到南昌霉素(Nanchangmycin)的生物合成基因簇^[11-12]。几年后, He Yunlong 等又从该

文库中克隆到梅岭霉素(Meilingmycin)的生物合成基因簇^[13]。2004 年 Kathrin Jacobi 等使用 pKJ01 构建了 *Streptomyces resistomycificus* 的基因组文库并通过异源表达筛选的方法找到了抗霉素(Resistomycin)的生物合成基因簇^[14]。

1.1.3 整合型: 来源于放线菌噬菌体, 保留了噬菌体的整合酶基因(*int*)及整合位点(*attP*), 加入了大肠杆菌的复制子及筛选标记, 同样属于大肠杆菌—放线菌穿梭型载体。在大肠杆菌中以高拷贝质粒形式存在, 进入放线菌后在整合酶和整合位点的作用下识别染色体上的 *attB* 位点并插入其中。这种位点特异性整合的频率比同源重组要高得多, 而且进入放线菌以后载体携带着外源片段整合到染色体上, 使得细胞内外源 DNA 的拷贝数为 1-2, 与自主复制型载体相比, 具有更好的遗传稳定性。2011 年 Sheng Huang 等利用整合型 Cosmid 载体 pJTU2554 构建了棒状链霉菌的基因组文库, 克隆到 18 kb 大小的二硫吡咯酮类抗生素全霉素(Holomycin)的生物合成基因簇并在白色链霉菌中成功地进行了异源表达^[15]。

1.2 BAC 载体

对于基因组较大的生物而言, Cosmid 的容量明显不足。1987 年 David T. Burke 等发展的 YAC^[16]在结构上模拟酵母的线性染色体, 将基因组 DNA 插入 YAC 的两个臂中间, 导入酵母形成重组菌以构建文库。Cosmid 的容量取决于噬菌体的包装容量, 而 YAC 则没有这一限制, 因此大多数 YAC 文库所包含的外源片段的平均长度为 250-400 kb, 实际操作时可包含 2 000 kb 甚至更大的片段^[9]。但是 YAC 在使用中存在外源片段易重组丢失、易产生嵌合体等问题, 同时 YAC 系统建立于真核细胞, 多用于真核生物的研究, 而对属于原核微生物的放线菌而言, 更适于采用细菌人工染色体(BAC)载体系统。细

菌人工染色体衍生于大肠杆菌的 F 因子, 为闭环状 DNA 分子, 可以通过电转化的方法导入大肠杆菌并以低拷贝的形式存在。BAC 的容量为 120–300 kb^[9], 应用范围很广, 已用于基因组测序、遗传图谱的绘制、文库的构建及筛选、转基因研究、BAC 阵列分析等等^[17]。1989 年 Michael O'Connor 等从大肠杆菌中的 F 因子出发改造出了一系列可装载大片段的载体, 其中包括 pMBO131^[18]。1992 年加州理工学院的 Hiroaki Shizuya 等基于 pMBO131, 改造出第一个细菌人工染色体 pBAC108L^[19]。pBAC108L 保留了 F 因子上的 *parA* 和 *parB* 以保证 BAC 能分配到每个子代细胞, 保留 *oriS* 和 *repE* 以确保 BAC 能正确复制, 以氯霉素抗性基因作为筛选标记, 可以装载 300 kb 左右的大片段。1996 年加州理工学院的 Ung-Jin Kim 等随后发展的第二代 BAC 载体 pBeloBAC11 引入了 *lacZa*, 可以通过蓝白斑直观的筛选克隆^[20], 因此得到了广泛的应用。

Shikun Dai 等利用 Epicentre 公司的商业化载体 pIndigoBAC-5 构建了 *Streptomyces autolyticus* JX-47 的文库, 并得到了覆盖有全部格尔德霉素(Geldanamycin)生物合成基因簇的克隆^[21]。pIndigoBAC-5 衍生于 pBeloBAC11, 蓝白斑筛选效果更明显, 但是由于缺乏在放线菌中操作的相关元件, 所以不能在放线菌中存在, 作用有限。2004 年 Asuncion Martinez 等将来源于链霉菌噬菌体 Φ C31 的 *attP-int* 整合酶系统^[22]、阿伯拉霉素抗性基因及用于筛选的蔗糖致死基因 *sacB* 引入 pBeloBAC11, 构建了一系列可在大肠杆菌和链霉菌之间穿梭的 pMBD 载体。由这类型载体构建出来的 BAC 质粒在大肠杆菌中以低拷贝环状细菌人工染色体的形式存在, 进入链霉菌后在整合酶 Int 的作用下, 通过位点特异性重组插入到链霉菌基因组的 *attB* 位点中

而稳定的遗传下来。研究者利用 pMBD 载体在大肠杆菌中成功表达了抗细菌抗生素 MG1.1 的合成基因簇, 在变铅青链霉菌中成功表达了榴菌素(Granaticin)合成基因簇^[23]。

1.3 PAC 载体

P1 噬菌体载体是 1990 年 Sternberg 等基于 P1 噬菌体构建的, 与 Cosmid 原理相似的高容量载体, 可容纳 70–100 kb 的外源片段^[24]。外源片段与载体连接后进行体外包装, 通过转导入能表达重组酶 Cre 的大肠杆菌后, 线状的外源片段及载体在 *loxP* 位点处环化。1994 年 Ioannou 等构建的 pCYPAC1 是第一个 P1 人工染色体(PAC)载体, 容量为 60–150 kb^[25]。P1 噬菌体载体通过转导进入宿主, 而 PAC 则可以通过转导或者电转化进入宿主。P1 噬菌体载体及 PAC 的容量均大于 Cosmid, 嵌合及重组率较低。但是与 λ 噬菌体相比, P1 噬菌体的包装效率较低, 从而造成相应的 P1 噬菌体载体及 PAC 包装的效率不高。

基于 1994 年 Ioannou 等构建的 PAC 载体 pCYPAC2, 2000 年 Margherita Sosio 等将 Φ C31 的 *attP-int* 整合酶系统引入 pCYPAC2 构建出能够在大肠杆菌和链霉菌之间穿梭的载体 pPAC-S1 和 pPAC-S2。这两个载体可以携带外源片段整合到链霉菌染色体上^[26], 这种载体也被称为 ESAC (*Escherichia coli-Streptomyces artificial chromosome*)。Margherita Sosio 等利用 pPAC-S1 构建了天蓝色链霉菌 M145 的基因组文库, 最大外源插入片段超过 100 kb。2003 年 Rosa Alduina 等利用该载体成功构建了天蓝色链霉菌 A3(2)及游动双孢菌属 *Planobispora rosea* 的基因组文库, 证实除了链霉菌以外该载体还可以在其他的放线菌中使用^[27]。2005 年 Rosa Alduina 等又使用 pPAC-S2 构建了放线菌

Nonomuraea sp. ATCC39727 基因组文库, 并通过反转录 PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 和飞行时间质谱蛋白质组学分析 (Proteomic approaches MALDI-TOF analysis) 证实 *Nonomuraea* 基因可以在变铅青链霉菌中进行异源表达^[28]。

2 宿主改造

除了载体, 合适的异源表达宿主也是克隆及研究放线菌中天然产物合成基因所必不可少的工具之一。目前各实验室多使用天蓝色链霉菌、变铅青链霉菌、除虫链霉菌及白色链霉菌等少数几种常用的宿主进行异源表达^[29]。主要是因为这几种宿主研究的较早, 遗传及代谢背景比较清楚, 有简便的遗传操作方法, 次级代谢非常旺盛。虽然已经有一些成功的例子, 但是总体而言异源表达的成功率并不是很高, 而且产量与野生型相比要低很多。为此, 研究者从以下几个方面尝试对异源表达宿主进行了改造。

2.1 敲除本底的次级代谢途径

宿主本身所产的次级代谢产物, 可能会影响及干扰到异源表达产物的产生及检测。敲除这些原有的次级代谢产物的合成基因可能会使得宿主菌的代谢背景更加简单清楚, 并有可能减少底物的竞争从而提高异源表达的产量。例如, 天蓝色链霉菌作为放线菌的模式菌株, 已经被全基因组测序。该菌最明显的特征就是能产生多种有颜色的抗生素, 包括放线紫红素 (Actinorhodin) 和灵菌红素 (Prodiginines), 同时还能产生包括钙依赖抗生素 (CDA) 在内的其他丰富的天然产物^[4]。Jay T. Fitzgerald 等在已经敲除了聚酮类抗生素—放线紫红素生物合成基因簇的天蓝色链霉菌 CH999 中, 将同为笨丙异色烷醌类抗生素的富伦菌素 (Frenolicin) 合成基

因与放线紫红素合成基因进行组合, 共表达得到了聚酮类抗寄生虫抗生素 Frenolicin B 的类似物^[30]。

与天蓝色链霉菌亲缘关系很近的变铅青链霉菌基因组中同样包含有放线紫红素、灵菌红素及钙依赖抗生素的生物合成基因簇。2004 年 Asuncion Martinez 等将敲除了放线紫红素及灵菌红素合成基因簇的变铅青链霉菌作为异源宿主, 从环境宏基因组文库中筛选得到新的天然产物^[23]。2006 年 Julia Penn 等通过同源双交换的方法敲除了变铅青链霉菌 TK23 中的部分放线紫红素基因簇, 并利用该宿主菌成功的表达出达托霉素 (Daptomycin)^[31]。

除虫链霉菌能产生有重要应用价值的抗虫抗生素阿维菌素, 是重要的工业生产菌株。日本科学家 Satoshi Omura 等对除虫链霉菌基因组测序后进行分析, 发现其基因组中包含有丰富的聚酮合酶 (PKS)、非核糖体多肽合酶 (NRPS) 等 25 个次级代谢产物的生物合成酶体系^[32]。2009 年 Mamoru Komatsu 等利用同源双交换及 *Cre-loxP* 整合酶系统, 将除虫链霉菌中的次级代谢产物合成基因簇及一些不重要的基因大片段进行了删除, 构建了一系列代谢背景较为清晰的突变株。在这些突变菌株中成功地异源表达了来源于灰色链霉菌的链霉素 (Streptomycin) 基因簇及来源于棒状链霉菌的头霉素 (Cephamicin C) 基因簇^[33]。

2.2 改变调控因子

将负责合成天然产物的途径专一性调控因子敲除, 使得原有的基因簇沉默, 同样也能够起到消除宿主体内本底天然产物干扰的作用。在天蓝色链霉菌 A3(2) 中, 放线紫红素及灵菌红素生物合成基因簇分别受途径专一性调控因子 *redD* 和 *actII-ORF4* 的调控^[34]。Alessandra 等将 *redD* 和 *actII-ORF4* 基因敲除得到天蓝色链霉

菌 M512, 利用该菌株成功的异源表达出氨基香豆类抗生素 Novobiocin 和 Clorobiocin^[35]、核苷类抗生素 Caprazamycin^[36]和 Iso-Migrastatin^[37]。2010 年 Volker Dangel 等又将 Novobiocin 基因簇中的两个天然启动子更换为四环素诱导的启动子 *tcp830*, 从而进一步提高了 Novobiocin 的产量, 使得该异源表达体系得到了优化^[38]。在棒状链霉菌中, 调控因子 *ccaR* 负责调控头霉素及克拉维酸(Clavulanic acid)的生物合成^[39], 将 *ccaR* 敲除后的棒状链霉菌成为了超量表达 β -内酰胺类抗生素的优良宿主菌。

2.3 增强次级代谢水平

1996 年 Jun Shima 发现在天蓝色链霉菌中负责编码核糖体蛋白 S12 的基因 *rpsL* 中引入点突变, 可以促进天蓝色链霉菌中抗生素的生物合成^[39]; 2002 年 Hu Haifeng 发现在天蓝色链霉菌中负责编码 RNA 聚合酶 β 亚基的基因 *rpoB* 中引入点突变, 也可以达到相同的效果^[40]。2011 年 Juan Pablo Gomez-Escribano 等在敲除了天蓝色链霉菌原有的 4 个天然产物合成基因簇后, 进一步在基因 *rpoB* 和 *rpsL* 中引入突变, 得到菌株 M1154。比较发现氯霉素(Chloramphenicol)及纺锤菌素(Congocidine)基因簇在该菌株中异源表达的产量要明显高于野生型及原天然产物合成基因簇缺失的菌株^[40]。

2.4 增加底物和前体物含量

天然产物异源表达失败或产量较低可能是由于宿主内缺乏所需底物的合成途径。要想提高产量, 可以通过组合生物合成的方法改变宿主的代谢途径以适应异源表达的需求。如果说敲除和沉默原有基因簇的手段是“节流”, 那么增加底物和前体物含量的方法就可以称为“开源”, 这种方法需要对放线菌的整个代谢网络有比较深入的了解, 才能够进行合理的改造。2006 年 Anja Freita 等为了改变在天蓝色链霉菌

M512 中异源表达 Clorobiocin 产量较低的情况, 将另一抗生素 Elloramycin 基因簇中负责合成鼠李糖的基因导入异源表达系统, 提高了细胞内前体物 dTDP-鼠李糖的含量, 从而将 Clorobiocin 的产量提高了 26 倍^[41]。2010 年 Sushila Maharjan 等通过基因工程方法使委内瑞拉链霉菌中丙酰辅酶 A 的含量增加, 构建出适宜于表达聚酮类天然产物的宿主委内瑞拉链霉菌 YJ028^[42]。

3 展望

随着科学技术的发展, 新的高容量载体克隆技术不断出现: 可在大肠杆菌与农杆菌之间穿梭的双元细菌人工染色体(Binary bacteria artificial chromosome, BIBAC)^[43]、可转化的人工染色体(Transformation-competent artificial chromosome, TAC)^[44]、哺乳动物人工染色体(Mammalian artificial chromosome, MAC)^[47]及人类人工染色体(Human artificial chromosome)^[48]等, 这些高容量载体都是为研究基因组含量较大的真核生物而发展起来的。相比较而言绝大多数放线菌研究者近十年来仍然沿用传统的 Cosmid (用于小型基因簇)和 BAC (用于大型基因簇)载体来克隆及异源表达天然产物的生物合成基因。作者研究团队先后使用过这两种不同类型的载体, 发现各有利弊。Cosmid 虽然操作简便, 但是容量有限; BAC 的容量虽然足够, 但操作困难。BAC 文库的构建需要借助脉冲电泳技术, 周期长, 对技术人员的技术要求比较高, 其中高质量的 DNA 大片的获得、载体的处理和保存及高效电转化感受态细胞的制备都是重要的技术环节。同时很多实验操作的细节都会影响 BAC 文库的质量, 像已构建好的 BAC 文库的转化子不能在 4 °C 存放超过 1 个星期, 否则会出现插入片段丢失的现象等。这些问题在文献报道和操作流程中都没

有相关的描述,只能依靠经验的积累,严格把握每个技术环节的质量才能较好的完成 BAC 文库的构建工作。未来如果在原核生物体系中能够出现容量大又操作简便的载体,将会有力地推动原核生物基因组大片段克隆和功能分析的研究。

目前放线菌基因簇的异源表达主要是在天蓝色链霉菌、变铅青链霉菌、除虫链霉菌及白色链霉菌等少数几种常用宿主菌中进行。但是这几种菌的生物合成能力毕竟有限,体内所包含的代谢途径不可能满足所有天然产物异源表达的需求,可能会因为缺乏某种特殊的前体物合成途径或激活因子而导致异源表达的失败。现在很多放线菌已经被全基因组测序,人类对细胞内的各种生化反应及代谢途径的认识和理解也越来越深刻,更多不同类型的放线菌随着研究的逐渐深入将可能发展成为表达某一类型天然产物合成基因的异源宿主。例如,能够产生 β -内酰胺类抗生素的棒状链霉菌经过改造后,用来表达多种不同类型的 β -内酰胺类天然产物^[33]。基因工程改造过的恶臭假单胞菌可用于异源表达来源于粘细菌的聚酮-非核糖体多肽杂合的抗生素埃博霉素(Epothilone)^[45]和 Myxochromide^[46]等。随着技术的进步,天然产物的异源表达不应局限于少数几个宿主菌,可以尝试开发具有各种专长的宿主,让它们做自己最擅长的事,表达最擅长表达的天然产物。

宿主菌的改造可以从敲除原基因簇入手,也可以从改变调控因子入手,或者从增加基因拷贝和表达水平入手等等。这些方法虽然各不相同,但是在一定程度上都起到了相应的效果。如果能够将这些方法结合在一起,既开源又节流,发挥它们的叠加效应,将有可能进一步的优化异源表达体系,提高天然产物的产量。

参 考 文 献

- [1] Young DB. A post-genomic perspective[J]. Nature medicine, 2001, 7(1): 11-12.
- [2] Berdy J. Bioactive microbial metabolites[J]. The Journal of Antibiotics, 2005, 58(1): 1-26.
- [3] Cohen ML. Changing patterns of infectious disease[J]. Nature, 2000, 406(6797): 762-767.
- [4] Bentley S, Chater K, Cerdeno-Tarraga A-M, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Nature, 2002, 417(6885): 141-147.
- [5] Alexander DC, Jensen SE. Investigation of the *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster and its regulation by the CcaR protein[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(16): 4068-4079.
- [6] Hodgson JE, Fosberry AP, Rawlinson NS, et al. Clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*: gene cloning and characterization[J]. Gene, 1995, 166(1): 49-55.
- [7] Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, et al. The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways[J]. Genome Biology and Evolution, 2010, 2: 212-224.
- [8] Collins J, Hohn B. Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable *in vitro* in bacteriophage lambda heads[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978, 75(9): 4242-4246.
- [9] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Redenbach M, Kieser HM, Denapaite D, et al. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome[J]. Molecular Microbiology, 1996, 21(1): 77-96.
- [11] 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(2): 361-371.

- [12] Sun Y, Zhou X, Dong H, et al. A complete gene cluster from *Streptomyces nanchangensis* NS3226 encoding biosynthesis of the polyether ionophore nanchangmycin[J]. *Chemistry & Biology*, 2003, 10(5): 431–441.
- [13] He Y, Sun Y, Liu T, et al. Cloning of separate meilingmycin biosynthesis gene clusters by use of acyltransferase-ketoreductase didomain PCR amplification[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(10): 3283–3292.
- [14] Jakobi K, Hertweck C. A gene cluster encoding resistomycin biosynthesis in *Streptomyces resistomycificus*; exploring polyketide cyclization beyond linear and angucyclic patterns[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(8): 2298–2299.
- [15] Huang S, Zhao Y, Qin Z, et al. Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus*[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(3): 811–816.
- [16] Burke DT, Carle GF, Olson MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors[J]. *Science*, 1987, 236(4803): 806–812.
- [17] Shizuya H, Kouros-Mehr H. The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system[J]. *Keio Journal of Medicine*, 2001, 50(1): 26–30.
- [18] O'Connor M, Peifer M, Bender W. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*[J]. *Science*, 1989, 244(4910): 1307.
- [19] Shizuya H, Birren B, Kim UJ, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(18): 8794–8797.
- [20] Kim UJ, Birren BW, Slepak T, et al. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library[J]. *Genomics*, 1996, 34(2): 213–218.
- [21] Dai S, Ouyang Y, Wang G, et al. *Streptomyces autolyticus* JX-47 large-insert bacterial artificial chromosome library construction and identification of clones covering geldanamycin biosynthesis gene cluster[J]. *Current Microbiology*, 2011, 63(1): 68–74.
- [22] Kuhstoss S, Rao RN. Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage ϕ C31[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1991, 222(4): 897–908.
- [23] Martinez A, Kolvek SJ, Yip CLT, et al. Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(4): 2452–2463.
- [24] Sternberg N. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87(1): 103–107.
- [25] Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, et al. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments[J]. *Nature Genetics*, 1994, 6(1): 84–89.
- [26] Sosio M, Giusino F, Cappellano C, et al. Artificial chromosomes for antibiotic-producing actinomycetes[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(3): 343–345.
- [27] Alduina R, Grazia S, Dolce L, et al. Artificial chromosome libraries of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Planobispora rosea*1[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 218(1): 181–186.
- [28] Alduina R, Giardina A, Gallo G, et al. Expression in *Streptomyces lividans* of *Nonomuraea* genes cloned in an artificial chromosome[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(5): 656–662.
- [29] Baltz RH. *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2010, 37(8): 759–772.
- [30] Fitzgerald JT, Ridley CP, Khosla C. Engineered biosynthesis of the antiparasitic agent frenolicin B

- and rationally designed analogs in a heterologous host[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2011, 64(12): 759–762.
- [31] Penn J, Li X, Whiting A, et al. Heterologous production of daptomycin in *Streptomyces lividans*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2006, 33(2): 121–128.
- [32] Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, et al. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(21): 12215–12220.
- [33] Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, et al. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(6): 2646–2651.
- [34] Fujii T, Gramajo H, Takano E, et al. *redD* and *actIII-ORF4*, pathway-specific regulatory genes for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), are transcribed *in vitro* by an RNA polymerase holoenzyme containing *hrdD*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(11): 3402–3405.
- [35] Eustáquio AS, Gust B, Galm U, et al. Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(5): 2452–2459.
- [36] Flinspach K, Westrich L, Kaysser L, et al. Heterologous expression of the biosynthetic gene clusters of coumermycin A1, clorobiocin and caprazamycins in genetically modified *Streptomyces coelicolor* strains[J]. *Biopolymers*, 2010, 93(9): 823–832.
- [37] Feng Z, Wang L, Rajska SR, et al. Engineered production of *iso*-migrastatin in heterologous *Streptomyces* hosts[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17(6): 2147–2153.
- [38] Dangel V, Westrich L, Smith MC, et al. Use of an inducible promoter for antibiotic production in a heterologous host[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(1): 261–269.
- [39] Pérez-Llarena FJ, Liras P, Rodriguez-Garcia A, et al. A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both beta-lactam compounds[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(6): 2053–2059.
- [40] Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters[J]. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(2): 207–215.
- [41] Freitag A, Méndez C, Salas JA, et al. Metabolic engineering of the heterologous production of clorobiocin derivatives and elloramycin in *Streptomyces coelicolor* M512[J]. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(6): 653–661.
- [42] Maharjan S, Park JW, Yoon YJ, et al. Metabolic engineering of *Streptomyces venezuelae* for malonyl-CoA biosynthesis to enhance heterologous production of polyketides[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(2): 277–282.
- [43] Hamilton CM, Frary A, Lewis C, et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(18): 9975–9979.
- [44] Liu YG, Shirano Y, Fukaki H, et al. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(11): 6535–6540.
- [45] Fu J, Wenzel SC, Perlova O, et al. Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(17): e113–e113.
- [46] Wenzel SC, Gross F, Zhang Y, et al. Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in pseudomonads via red/ET recombineering[J]. *Chemistry & Biology*, 2005, 12(3): 349–356.