庆大霉素 C-6′位氨甲基化修饰基因的研究

胡育龙,洪文荣*

(福州大学生物科学与工程学院,福州 350116)

摘 要 探索庆大霉素 C-6′位氨甲基化修饰作用的基因。首先构建用于 *genT* 基因缺失的同源重组质粒 pFT104,利用接合转移导入绛红色小单孢菌 G1008,筛选获得一株 *genT* 基因缺失工程菌 GT106(Δ*genT*)。其次构建用于 GT106 上 *genN* 基因缺失的重组质粒 pFTN203,通过接合转移导入 GT106,筛选获得一株工程菌 GTN205(Δ*genT* + *genN*)。最后在 *genK* 基因已经明确为 C-6′位甲基化酶基因的基础上,在 GTN205 中敲除 *genK* 基因,筛选获得到一株工程菌 GTNK308(Δ*genT* + *genN* + *genK*)。工程菌发酵产物经质谱分析结果表明,与出发菌 G1008 相比,GT106 组分未发生变化,而 GTN205 不再合成庆大霉素 C1,产物主要积累在庆大霉素 C1a 和 C2,GTNK308 未检测到庆大霉素 C2b。结果说明,*genN* 基因缺失阻断了庆大霉素 C1 与 C2b 的合成,表明 *genN* 基因参与修饰绛红糖胺 C-6′位氨甲基化,而 *genT* 并不参与修饰绛红糖胺 C-6′位氨甲基化。

关键词 庆大霉素;*genT*;*genN*;修饰;C-6′位氨甲基化

中图分类号 Q815 **文献标志码** A **文章编号** 1000 - 5048(2015)01 - 0105 - 06

doi:10.11665/j.issn.1000 - 5048.20150116

C-6′ aminomethylation modification in gentamicin biosynthesis gene cluster

HU Yulong, HONG Wenrong*

School of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China

Abstract This study explored the C-6′ aminomethylation modification in gentamicin biosynthesis gene cluster. Plasmid pFT104 used for the *genT* in-frame deletion was constructed and transformed into *M. purpurea* G1008 by conjugation. Mutant *M. purpurea* GT106 (Δ*genT*) confirmed by apramycin resistance and PCR amplification was then obtained. Next, a recombinant plasmid pFTN203 was constructed for blocking-up *genN*. pFTN203 was introduced into *M. purpurea* GT106 by conjugation. A desired mutant strain GTN205 (Δ*genT* + *genN*) was obtained by PCR analysis. Finally, based on the role of *genK* in C′-6 methylation, the mutant strain GTNK308 (Δ*genT* + *genN* + *genK*) was selected by knocking out *genK*. Metabolites were isolated from the fermentation broths of mutant strains and analyzed by MS. The results indicated that the metabolites of *M. purpurea* GT106 (Δ*genT*) did not change compared with the original strain G1008. The mutant strain GTN205 (Δ*genT* + *genN*) no longer produced gentamicin C1, and yet accumulated in gentamicin C1a and C2. Gentamicin C2b was no longer detected in the metabolites of strain GTNK308 (Δ*genT* + *genN* + *genK*). These results showed that the inactivation of *genN* led to the blocking of the synthesis of gentamicin C1 and C2b. It suggested that *genN* might participate in the modification of aminomethylation at C-6′of purpurosamine, while *genT* was not involved in the C-6′aminomethylation.

Key words gentamicin; *genT*; *genN*; modification; C-6′aminomethylation

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 3107009); and China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2012ZX09201101-008)

庆大霉素是由绛红色小单孢菌和棘孢小单孢菌发酵产生的一种氨基糖苷类抗生素,对众多革兰阳性和革兰阴性菌特别是对绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌具有良好的抗菌作用[1]。目前临床上治疗主要使用的是庆大霉素 C 族复合物。根据庆大霉素绛红糖胺 C-6′位甲基化程度的差异,庆大霉素 C

* **收稿日期** 2014-08-19 * **通信作者** Tel:13705046451 E-mail:hongwr56@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 31070093);国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(No. 2012ZX09201101-008)

族分为 C1、C2、C1a 和 C2b 4 个主要组分,其中庆大霉素 C1a 是进一步合成国家一类新药依替米星的母体[2-4]。庆大霉素的生物合成在庆大霉素 X2 产物形成后向两个分支途径进行:一是向 JI-20A 产物方向,生成 C1a,并最终合成庆大霉素 C2b;另一分支则是向 G-418 的方向进行,生成 C2 并进一步合成庆大霉素重要组分 C1。有趣的是,从庆大霉素 C2 到庆大霉素 C1,以及从庆大霉素 C1a 到庆大霉素 C2b 的这两步转化均涉及到绛红糖胺 C-6′位的氨甲基化。

随着分子生物学和生物信息学的快速发展,从理论上对庆大霉素生物合成进行研究成为了可能。2004 年以来,科学家陆续公布了庆大霉素生物合成基因簇(GenBenk: AY524043; AJ628149; AJ575934;JQ975418)[5-7]。2009 年,Kudo 等[8]对庆大霉素的生物合成途径进行了全面分析,理论推测 *genK* 基因可能参与修饰绛红糖胺 C-6′位的甲基化。2012 年,Yan 等[9]通过 *gntK* 基因敲除,阻断了庆大霉素 X2 到 G418 的合成过程,初步阐明了 *gntK* 基因参与修饰绛红糖胺上的 C-6′位甲基化。2013 年,Kim 等[10]通过 *genK* 的表达进一步阐明 GenK 为 C-6′位的甲基化酶,实验结果与理论预测相符。这些研究说明通过基因缺失来阻断基因的表达是可行的。理论推测 *genT* 和 *genN* 基因可能参与修饰绛红糖胺 C-6′位氨甲基化,即负责参与庆大霉素 C2 转变成庆大霉素 C1,以及负责参与庆大霉素 C1a 转变成庆大霉素 C2b。然而,*genT* 基因的研究仍未见报道。张熠等[11]对 *genN* 基因进行了初步的研究,并通过生物信息学对 *genN* 基因作了较为全面的分析,但 *genN* 基因是否参与修饰绛红糖胺 C-6′位氨甲基化未见报道。

本文在前期研究的基础上[12],依据同源重组原理,依次框内缺失 *genT*、*genN* 和 *genK* 基因,其中 *genK* 的缺失起辅助研究的作用。通过分析工程菌次级代谢产物变化,推测 *genT* 和 *genN* 是否参与修饰庆大霉素绛红糖胺 C-6′位氨甲基化。

1 材 料

1.1 质粒与菌株

克隆载体 pMD19-T(TaKaRa 公司);链霉菌-大肠杆菌穿梭质粒 pJTU412 和 pKC1139、质粒 pUC30-apr、穿梭质粒 pFD306 为本课题组构建[9];*E. coli* Top10 以及 *E. coli* ET12567(pUZ8002)为本实验室保存;出发菌绛红小单孢菌 G1008 为本实验室选育和保藏。

1.2 培养基与抗生素

绛红色小单孢菌 G1008 固体培养基、预萌发培养基、种子培养基以及发酵培养基见文献[9];LB 细菌培养基见文献[13];本研究中所使用的抗生素及其终浓度分别为:氨苄青霉素 100 μg/mL、安普霉素 50 μg/mL、氯霉素 25 μg/mL、卡那霉素 25 μg/mL、萘啶酮酸 25 μg/mL。

1.3 试 剂

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶(日本 TaKaRa 公司);溶菌酶、RNase A 酶、Proteinase K,DNA 凝胶回收试剂盒[生工生物工程(上海)有限公司];其他常规试剂见文献[13]。

2 方 法

2.1 引物设计

以 GenBank 公布的庆大霉素生物合成基因簇序列(登记号:AJ628149)为模板,分别设计引物扩增 *genT* 和 *genN* 基因上下游序列作为同源交换臂:P1/P2 扩增 *genT* 上游交换臂 TB1,P3/P4 扩增 *genT* 下游交换臂 TB2;P5/P6 扩增 *genN* 上游交换臂 TNB1,P7/P8 扩增 *genN* 下游交换臂 TNB2。设计引物 P9/P10 用于 *genT* 阻断突变株的筛选与鉴定,P11/P12 用于 *genN* 阻断突变株的筛选与鉴定,P13/P14 用于 *genK* 阻断突变株的筛选与鉴定。本文所用的引物序列及限制酶见表 1。

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence	Restriction enzyme
P1	5′-GAATTCTGAAGTCCGGCACCTGGA-3′	*Eco*RI
P2	5′-AAGCTTGAGTTCCTCCGTGGTCCA-3′	*Hin*dIII
P3	5′-AAGCTTGTGGTAACTCAGCAGGCG-3′	*Hin*dIII
P4	5′-TCTAGAGTTGACCTCGACGATGCCAC-3′	*Xba*I
P5	5′-TCTAGAACTTCCCCTATTCCCGACGC-3′	*Xba*I
P6	5′-GATATCTACCAACGGTGCTGCACCTC-3′	*Eco*RV
P7	5′-GATATCCAACGAGTTCGTCGACCTGC-3′	*Eco*RV
P8	5′-GAATTCATCAGCGAACTCTCCGCGGT-3′	*Eco*RI
P9	5′-GGATGGTGACGGTACACAATCG-3′	
P10	5′-GTATTCGCCAAGAGGTATCGGG-3′	
P11	5′-TAGCGCATGATCGTCGGAGG-3′	
P12	5′-TGAAGATCTGCACCCGCAGC-3′	
P13	5′-TGCTGTGCTCGACCAGACGT-3′	
P14	5′-GAGATTTTCGACTCCCTCGCC-3′	

2.2　分子克隆

绛红色小单胞菌基因组 DNA 提取见文献[13]。大肠杆菌感受态细胞的制备和转化、质粒 DNA 抽提、酶切、酶连及 PCR 等操作参照文献[14]。引物合成及 DNA 测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。

2.3　接合转移

大肠杆菌与小单孢菌间接合转移方法参照文献[9]。

2.4　发酵培养

对菌株进行分离纯化,获得长势较好的单菌落,转接斜面 37 ℃培养 8 ~ 10 d,待斜面孢子丰满。刮取适量的孢子接种于种子培养基中,37 ℃,280 r/min 振荡培养 30 ~ 36 h,使菌体处于对数生长期。再按照 10% 的接种量接种于发酵培养基中 37 ℃,280 r/min,120 h。

2.5　产物提取与分析

发酵产物的提取精制方法参见文献[9]。精制后产物采用 Agilent 6005 系列四极杆-飞行时间质谱仪进行组分测定。

3　结　果

3.1　重组质粒 pFT104 的构建

以绛红色小单胞菌 G1008 染色体 DNA 为模板,利用引物 P1/P2 经 PCR 扩增 *genT* 基因 2 056 bp 上游交换臂 TB1,P3/P4 扩增 2 037 bp 下游交换臂 TB2。将 TB1 和 TB2 分别克隆至 pMD19-T 上,得到质粒 pFT101 和质粒 pFT102。

质粒 pFT101 和质粒 pFT102 分别经(*Eco*R Ⅰ/*Hin*d Ⅲ)和(*Hin*d Ⅲ/*Xba* Ⅰ)双酶切后回收 TB1 和 TB2 片段,连接经(*Eco*R Ⅰ/*Xba* Ⅰ)双酶切的质粒 pJTU412 上,得到中间质粒 pFT103。最后 *Eco*R Ⅰ酶切含安普霉素抗性基因的质粒 pUC30-apr,回收 1 168 bp 的片段连接到经 *Eco*R Ⅰ酶切的 pFT103 上,得到重组质粒 pFT104,质粒 pFT104 物理图谱见图 1-A。对 pFT104 进行酶切验证,用(*Eco*R Ⅰ/*Hin*d Ⅲ)酶切得到 7 053,2 857,2 050,1 168 bp 的 4 条带;用(*Xba* Ⅰ/*Kpn* Ⅰ)酶切得到 4 912,3 749,2 978,1 130,348,11 bp 的 6 条带;用(*Xba* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ)酶切得到 7 879,4 081,1 141,27 bp 的 4 条带,pFT104 经以上 3 种方式酶切条带大小与理论预测一致,电泳结果见图 1-B,证明重组质粒 pFT104 构建正确。

3.2　重组质粒 pFTN203 的构建

以绛红色小单胞菌 GT106 基因组为模板,利用引物 P5/P6 扩增 *genN* 基因 2 074 bp 上游交换臂 TNB1,P7/P8 扩增 2 004 bp 下游交换臂 TNB2。将扩增的交换臂 TNB1 和 TNB2 分别克隆至 pMD19-T 上,获得中间质粒 pFTN201 和 pFTN202。pFTN201 和 pFTN202 分别经(*Xba* Ⅰ/*Eco*R Ⅴ)和(*Eco*R Ⅴ/*Eco*R Ⅰ)双酶切,回收 TNB1 与 TNB2 片段,同时连接到经(*Xba* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ)双酶切的质粒 pKC1139 上,得到重组质粒 pFTN203,质粒 pFTN203 物理图谱见图 2-A。对 pFTN203 进行酶切验证,用(*Xba* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ)酶切得到 6 446,4 066 bp 的两条带;用(*Bam*H Ⅰ/*Hin*d Ⅲ)酶切得到成 6 546,3 511,455 bp 的 3 条带;用(*Bam*H Ⅰ/*Bgl* Ⅱ)酶切得到 6 116,2 719,1 677 bp 的 3 条带;用(*Kpn* Ⅰ/*Xho* Ⅰ)酶切得到 5 246,2 660,1 624,982 bp 的 4 条带,酶切电泳结果见图 2-B,大小与理论预测一致,证明重组质粒 pFTN203 构建完成。

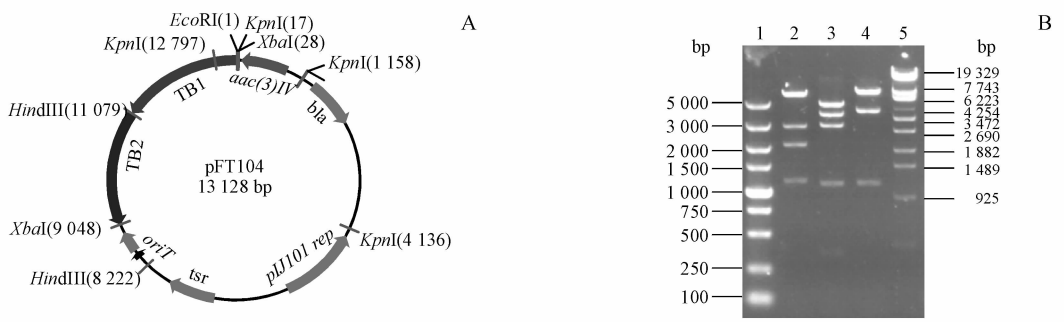

Figure 1　Composition of the recombinant plasmid pFT104 (A), and verification of pFT104 by restriction enzyme (B)
1:DL5000 maker;2:pFT104/(*Eco*RI/*Hin*dIII);3:pFT104/(*Xba*I/*Kpn*I);4:pFT104/(*Xba*I/*Eco*RI);5:λ-*Eco*T14 I digest DNA Marker

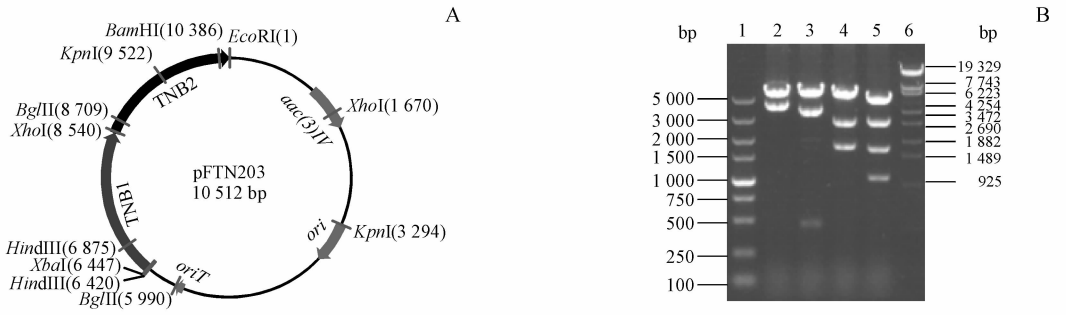

Figure 2 Composition of the recombinant plasmid pFTN203 (A), and verification of pFTN203 by restriction enzyme (B)
1: DL5000 maker; 2: pFTN203/(*Xba*I/ *Eco*RI); 3: pFTN203/(*Bam*HI/*Hin*dIII); 4: pFTN203/(*Bam*HI/*Bgl*II); 5: pFTN203/(*Kpn*I/*Xho*I); 6: λ-*Eco*T14 I digest DNA Marker

3.3 *genT* 基因阻断突变株的筛选与验证

将 pFT104 转化 *E. coli* ET12567 (pUZ8002),得到含重组质粒的供体菌 *E. coli* ET12567 (pUZ8002,pFT104),然后通过接合转移的方式转化绛红色小单孢菌 G1008,37 ℃培养 22 h 后用安普霉素和萘啶酸水溶液覆盖,继续培养 3 ~4 d,待接合子长出。选择其中一株长势较好的,命名为绛红小单孢菌 GDT105,简称 GDT105。根据同源重组模型见图 3-A,以 GDT105 基因组为模板,用引物 P9/P10 进行 PCR 扩增,电泳结果见图 3-B,与理论一致,证明 GDT105 为单交换菌株。

单交换菌株具有遗传不稳定性,容易发生第二次同源重组,形成目的基因缺失的阻断突变株。将 GDT105 在不含抗生素的斜面上松弛培养 4 代后,开始分离单菌落,并将单菌落影印至含安普霉素平板和无抗平板上,得到 1 株安普霉素敏感菌株,命名为绛红小单孢菌 GDT106,简称 GDT106。提取其染色体 DNA,利用引物 P9/P10 进行 PCR 扩增,电泳结果见图 3-B,条带大小与理论一致,经测序比对,证明 GT106 确实为 *genT* 基因阻断突变株。

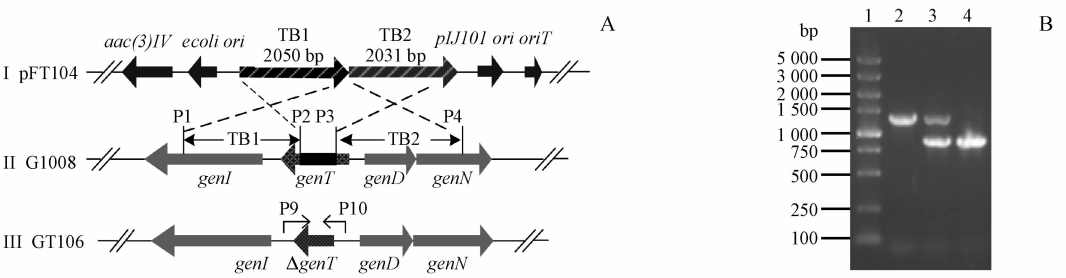

Figure 3 Sketch map of homologous recombination of the *genT* in *M. purpurea* G1008 (A), and PCR verification of the mutants (B)
1: DL5000; 2: G1008/(P9/P10); 3: GDT105/(P9/P10); 4: GT106/(P9/P10)

3.4 *genN* 基因阻断突变株的筛选与验证

参照"2.3"项方法,将 pFTN203 导入绛红色小单胞菌 GT106,获得 1 株安普霉素抗性菌株,初步判定为单交换菌株,命名为绛红色小单胞菌 GDTN204,简称 GDTN204。以 GDTN204 基因组为模板,用引物 P11/P12 进行 PCR,电泳结果见图 4-A,与理论相符,GDTN204 为单交换菌株。单交换菌株经影印筛选得到 1 株安普霉素敏感型菌株,命名为绛红色小单胞菌 GTN205,简称 GTN205。以其基因组为模板,用引物 P11/P12 进行 PCR 扩增,电泳结果见图 4-B,条带大小与预期相符,经测序比对,GTN205 确定为 *genN* 基因阻断突变株。

3.5 *genK* 基因阻断突变株的筛选与验证

参照"2.3"项方法,将 pFD306 导入绛红色小单胞菌 GTN205,得到一株安普霉素抗性菌株,命名为绛红色小单胞菌 GDTNK307,简称 GDTNK307。以 GDTNK307 基因组为模板,用引物 P13/P14 进行 PCR,电泳结果见图 5-A,条带大小与理论相符,证明 GDTNK307 为单交换菌株。单交换菌株经影印筛选得到一株安普霉素敏感型菌株,命名为绛红色小单胞菌 GTNK308,简称 GTNK308。以 GTNK308 基因组为模板,利用引物 P13/P14 进行 PCR,电泳结果见图 5-B,条带大小与理论相符,经测序比对,证明 GTNK308 为 *genK* 阻断突变株。

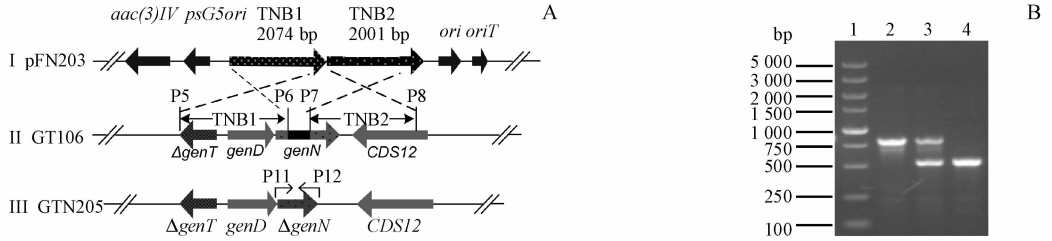

Figure 4　Sketch map of homologous recombination of the *genN* in *M. purpurea* GT106 (A), and PCR verification of the mutants (B)
1:DL5000;2:GT106/(P11/P12);3:GDTN204/(P11/P12);4:GTN205/(P11/P12)

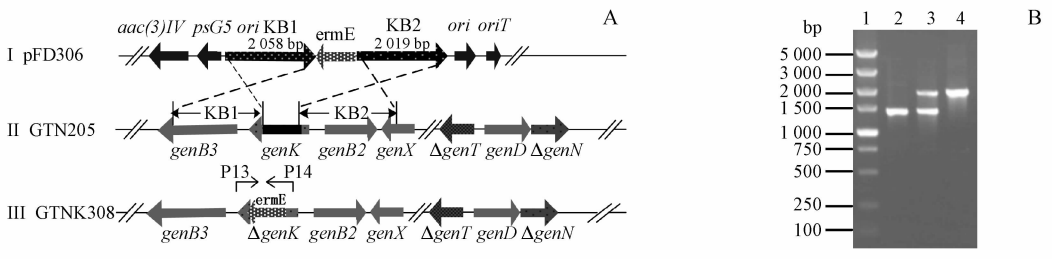

Figure 5　Sketch map of homologous recombination of the *genK* in *M. purpurea* GTN205 (A), and PCR verification of the mutants (B)
1:DL5000;2:GTN205/(P13/P14);3:GDTNK307/(P13/P14);4:GTNK308/(P13/P14)

3.6　工程菌的发酵,代谢产物提取及分析

以绛红小单孢菌 G1008 为对照,工程菌 GT106、GTN205、GTNK308 同时参照“2.4”项方法进行摇瓶发酵。

参照“2.5”项方法提取代谢产物,并进行质谱分析,质谱检测结果见图 6。

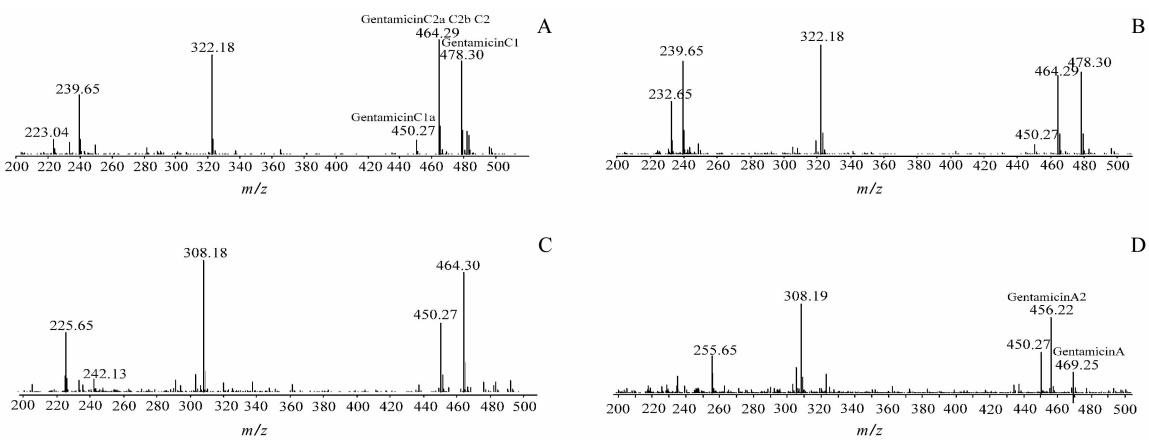

Figure 6　MS analysis of metabolites from G1008 (A) and its mutant strains GT106 (B), GTN205 (C) and GTNK308 (D)

质谱分析结果显示,亲株 G1008 发酵产物主要包含 *m/z* 450[M+H]$^+$、*m/z* 464[M+H]$^+$ 和 *m/z* 478[M+H]$^+$ 3 个分子离子峰,分别对应庆大霉素 C1a、庆大霉素 C2a、C2b、C2 和庆大霉素 C1,*m/z* 322[M+H]$^+$ 的峰为碎片峰。工程菌 GT106 与出发菌株 G1008 比较,发酵产物组分无明显差异,质谱仍检测到 *m/z* 450[M+H]$^+$、*m/z* 464[M+H]$^+$ 和 *m/z* 478[M+H]$^+$ 3 个分子离子峰。工程菌 GTN205 发酵提取液中检测到 *m/z* 450[M+H]$^+$ 和 *m/z* 464[M+H]$^+$ 的分子离子峰,*m/z* 308[M+H]$^+$ 的峰为碎片峰,但是未检测到 *m/z* 478[M+H]$^+$ 的分子离子峰,即工程菌不再合成庆大霉素 C1。工程菌 GTNK308 发酵提取液检测到 *m/z* 450[M+H]$^+$、*m/z* 456[M+H]$^+$ 和 *m/z* 469[M+H]$^+$ 3 个分子离子峰,但是未检测到 *m/z* 464[M+H]$^+$ 的分子离子峰,其中 *m/z* 456[M+H]$^+$ 和 *m/z* 469[M+H]$^+$ 分

别对应庆大霉素生物合成途径中间产物庆大霉素A2和庆大霉素A。

4 讨 论

在庆大霉素生物合成过程中,修饰甲基化基因的探索一直是研究的热点,其中修饰庆大霉素C-6′位甲基化的 *genK* 基因已经被阐明。本论文旨在研究修饰庆大霉素绛红糖胺C-6′位上氨甲基化的基因。通过生物信息学分析及理论推测 *genT* 和 *genN* 基因可能参与修饰绛红糖胺C-6′位氨甲基化,在此基础上,通过基因框内敲除实验及工程菌代谢产物变化对这两个基因的功能进行研究。通过阻断绛红小单孢菌G1008中的 *genT* 基因,得到工程菌GT106,质谱分析表明,与亲株G1008相比,GT106代谢产物未发生变化,说明 *genT* 基因不参与修饰绛红糖胺C-6′氨甲基化,与理论预测不符。进一步失活GT106中的 *genN* 基因,得到工程菌GTN205。GTN205不再合成庆大霉素C1,而积累庆大霉素C2,说明 *genN* 基因的失活阻断了庆大霉素C1的合成。结果表明 *genN* 基因参与修饰庆大霉素C2到C1绛红糖胺C-6′氨甲基化。由于从庆大霉素C1a到庆大霉素C2b同样要经绛红糖胺C-6′氨甲基化,而庆大霉素C2和C2b同质,因此无法确定 *genN* 基因是否参与该过程。然而,*genK* 基因失活能够有效阻断从庆大霉素X2到庆大霉素C2、C1的生物合成,因此在GTN605上敲除 *genK* 基因。如果失活 *genK* 基因后,不再有 m/z 464 $[M+H]^+$ 的分子离子峰,则说明GTN605的代谢产物不存在庆大霉素C2b,进而证明 *genN* 同样参与从庆大霉素C1a到庆大霉素C2b的生物合成过程。经筛选得到工程菌GTNK308,该工程菌代谢产物未检测出 m/z 464 $[M+H]^+$ 的分子离子峰,与理论预测相符,说明 *genN* 基因同样参与从庆大霉素C1a到C2b的转化。

本研究通过基因框内失活 *genT*、*genN*、*genK* 基因及分析所得工程菌代谢产物变化。结果表明,*genN* 基因的敲除能有效阻断庆大霉素C1和C2b的生物合成,说明 *genN* 基因在修饰庆大霉素绛红糖胺C-6′氨甲基化中起关键作用。

参 考 文 献

[1] Becker B, Cooper MA. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century[J]. *ACS Chem Biol*, 2013, **8**(1): 105 - 115.

[2] Lei S, Chen JS, Wang CX, *et al*. Characterization of a key aminoglycoside phosphotransferase in gentamicin biosynthesis[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, **23**(5): 1438 - 1441.

[3] Park SR, Park JW, Ban YH, *et al*. 2-Deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways[J]. *Nat Prod Rep*, 2013, **30**(1): 11 - 20.

[4] Zhao M, Fan J. Idea of screening new aminoglycoside antibiotics and developing of etimicin[J]. *Chin J Antibiot*(中国抗生素杂志), 2000, **6**(25): 229 - 232.

[5] Unwin J, Standage S, Alexander D, *et al*. Gene cluster in *Micromonospora echinospora* ATCC15835 for the biosynthesis of the gentamicin C complex[J]. *J Antibiot*, 2004, **57**(7): 436 - 445.

[6] GenBank Database. *Micromonospora echinospora* genomic region of the gentamicin biosynthesis gene cluster, strain DSM 43036[DB/OL]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/85813995.

[7] Park JW, Hong JSJ, Parajuli N, *et al*. Genetic dissection of the biosynthetic route to gentamicin A2 by heterologous expression of its minimal gene set[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, **105**(24): 8399 - 8404.

[8] Kudo F, Eguchi T. Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics[J]. *J Antibiot*, 2009, **62**(9): 471 - 481.

[9] Hong WR, Yan LB. Identification of *gntK* a gene required for the methlation of purpurosamine C-6′ in gentamicin biosythesis[J]. *J Genappl Microbiol*, 2012, **58**(5): 349 - 356.

[10] Kim HJ, McCarty RM, Ogasawara Y, *et al*. The GenK-catalyzed C-6′ methylation in the biosynthesis of gentamicin: isolation and characterization of a cobalamin-dependent radical SAM enzyme[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(22): 8093 - 8096.

[11] Zhang Y, Hong WR. Knockout of *genN* in gentamicin biosynthetic gene cluster[C]//Proceedings of the 12th National Conference on Antibiotics. Chengu: Chinese Journal of Antibiotics Press, 2013: 298 - 303.

[12] Chen ZQ, Lin Q, Hu YL, *et al*. Research of genD1 in gentamicin biosynthesis gene cluster[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2014, **45**(6): 720 - 725.

[13] Tobias K, Bibb MJ, Mark JB, *et al*. *Practical Streptomyces Genetics*[M]. Norwich, England: The John Innes Foundation, 2000.

[14] Sambrook JF, Green MR. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 4th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013.