

生防链霉菌 Men-myco-93-63 遗传转化体系的建立和优化

沈凤英¹, 李亚宁¹, 刘力强², 吴伟刚³, 刘大群¹

(¹河北农业大学植物保护学院, 河北省植物病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北保定 071001;

²华北制药集团生物燃料研究所, 石家庄 050035; ³河北北方学院, 河北张家口 075000)

摘要: 玫瑰黄链霉菌 (*Streptomyces roseoflavus*) Men-myco-93-63 是分离自马铃薯疮痂病 (*S. scabies*) 自然衰退土壤中的一株拮抗菌。该菌株及其发酵液对棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*)、瓜类白粉病菌 (*Sphaerotheca fuliginea* Poll.) 等多种重要的植物病原菌具有很强的抑制作用, 有良好的生防应用潜力。为了对玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中一些功能基因进行研究, 得到高产抗生素的工程菌株, 首先应对该菌的遗传转化条件进行优化。作者分别以基因整合型质粒 pSET152 和基因破坏型质粒 pKC1139 为出发质粒, ET12567 (PUZ8002, pSET152/ pKC1139) 为供体, Men-myco-93-63 孢子和菌丝体为受体, 选取 MS、PDA、TSB 琼脂培养基、燕麦培养基为不同的培养基进行接合转移试验。结果表明 MS 培养基为接合转移的最适培养基, 经验证, 已成功地将质粒 pSET152/ pKC1139 转入到了 Men-myco-93-63 中。以孢子为受体时, 孢子预萌发条件为 50 °C 热激 10 min, 37 °C 温育 2.5 h, 转化效率是 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ 。以菌丝体为受体时, 转化效率是 $10^{-7} \sim 10^{-6}$, 但菌丝培养过程中容易出现污染。另外, 抗生素的覆盖时间对接合转移效率的影响较明显, 16~18 h 覆盖效果最好。

关键词: 玫瑰黄链霉菌; 接合转移; 遗传转化; pKC1139; pSET152

中图分类号: S182 文献标识码: A

Optimized of the Conjugal Transfer System of *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63

Shen Fengying¹, Li Yaning¹, Liu Liqiang², Wu Weigang³, Liu Daqun¹

(¹College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei; Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding Hebei 071001;

²North China Pharmaceutical Corporation Biofuel Research Institute, Shijiazhuang 050035;

³North University of Hebei, Zhangjiakou Hebei 075000)

Abstract: *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63 was isolated from potato scab (*S. scabies*) decline soil and its fermentation can inhibit many phytopathogenic fungi and control related important plant diseases such as cotton verticillium wilt (*Verticillium dahliae*) and cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea* Poll.) In order to study a number of functional genes in *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63, and to achieve

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.30800734); 河北省自然科学基金项目 (No.C200900598); 国家高技术研究与发展计划 (863) (No.2006AA10A211) 资助。

第一作者简介: 沈凤英, 女, 1981 年出生, 河北省故城县, 硕士研究生, 研究方向: 主要从事植物病害生物防治研究。通信地址: 071000 河北保定河北农业大学西校区植物保护学院植物病理系 2006 研, E-mail: zhibao200221@163.com。

通讯作者: 李亚宁, 女, 1974 年出生, 河北省石家庄市, 职称: 副教授, 学位: 博士, 硕士生导师, 研究方向: 植物病害生物防治和分子植物病理学。学术成就: 在国内外学术期刊上发表学术论文 20 余篇。通信地址: 071000 河北保定河北农业大学植物保护学院, Tel: 0312-7528500, E-mail: yaning22@yahoo.com.cn。刘大群, 男, 1958 年出生, 河北省石家庄市, 职称: 教授, 学位: 博士, 博士生导师, 研究方向: 植物病害生物防治和分子植物病理学。学术成就: 2006 年获河北省科技进步一等奖一项排名第一。在国内外学术期刊上发表学术论文 100 余篇。通信地址: 071000 河北保定河北农业大学植物保护学院, Tel: 0312-7528500, E-mail: ldq@mail.hebau.edu.cn。

收稿日期: 2009-04-22, **修回日期:** 2009-05-04。

some engineering strain which produces of some important antibiotics. We must find the optimized of the Conjugal Transfer System of this strain. In this article, The genetic integrate plasmid pSET152 and genetic damage plasmid pKC1139 used as the starting plasmid, ET12567 (PUZ8002, pSET152) and ET12567 (PUZ8002, pKC1139) used as the donor, Men-myco-93-63 spores and hyphae used as the receptor, respectively, the system for the conjugal transfer of pSET152 or pKC1139 from *Escherichia coli* in to Men-myco-93-63 has been developed. Different medium, such as MS, PDA, TSB agar, oats medium were selected for conjugal transfer, respectively. The results showed that MS medium is fit for conjugal transfer between Men-myco-93-63 and ET12567 (PUZ8002), and it was confirmed that plasmid pSET152 and pKC1139 had been successfully transferred to the Men-myco-93-63, respectively. When spores were used as the receptor, the pre-conditions of the germination of spores were 50 °C heat shock 10 min, 37 °C incubated 2.5 h in MS medium, and the conversion efficiency was 10^{-7} to 10^{-6} . If the mycelium were used as the receptor, the conversion efficiency was 10^{-7} to 10^{-6} , but the mycelium pollution can not be avoided. In addition, the coverage time on antibiotics effected the joint transfer efficiency significantly, 16 to 18 hours was best.

Key words: *S. roseoflavus*, conjugal transfer, genetic transformation, pKC1139, pSET152

0 引言

随着现代生物学技术的发展,生防链霉菌分子遗传学的研究日益成为链霉菌生物防治领域的热点,建立宿主自身的基因转移系统是链霉菌中基因鉴定、分析和进行其他分子遗传操作的前提^[1]。以往在研究链霉菌利用其原生质体进行外源DNA转化时遇到了很多困难,常发生不能利用链霉菌原生质体直接转化,主要是因为链霉菌对外源DNA具有限制-修饰作用,包括质粒的不相容性、DNase活力、限制内切酶等^[2]。这些因素限制了外源DNA在链霉菌中的转化。近年来,接合转移作为一种基因转移技术已在多种链霉菌中得到成功应用^[3]。接合转移可以避开胞外核酸酶,使DNA免遭核酸酶的降解,克服宿主对外源DNA的限制性修饰,从而提高转化效率,而且操作程序更简便。pKC1139和pSET152是链霉菌分子遗传学中常用的两种重要质粒。pKC1139质粒属于基因组破坏型质粒^[4],可用于基因阻断试验,实现对基因功能的验证,并可通过阻断一些负调控序列提高某些链霉菌中抗生素的产量或产孢活性^[5]。pSET152是存在于变铅青链霉菌中的一个穿梭型质粒^[6],该质粒可用于基因互补^[7],实现链霉菌中正调控序列的克隆、功能验证和在目的菌株中的超量表达等^[5]。

玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 是分离自马铃薯疮痂病自然衰退土壤中的一株拮抗菌。该菌株及其发酵液对棉花黄萎病菌、瓜类白粉病菌等多种重要的植物病原菌具有很强的抑制作用,有良好的生防应用潜力^[8]。该生防菌遗传转化体系的研究尚未见报道。我们已探明了玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 原生质体形成和再生条件^[9],进行了玫瑰黄链霉菌 Men-my-

co-93-63 原生质体直接转化,但转化率很低,可能是由于菌株自身存在着限制修饰系统,使外源DNA很难进入。

为了对玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中一些功能基因进行研究,以及实现该生防菌的遗传改造,此试验采用接合转移技术,将质粒 pKC1139/pSET152 分别转入大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)中,获得供体菌 ET12567(pUZ8002, pKC1139/pSET152),将供体菌和预处理过的菌株孢子悬浮液进行混合培养,使 pKC1139/pSET152 分别转入到 Men-myco-93-63 中去。并且从大肠杆菌与玫瑰黄链霉菌属间接转移的最适培养基、孢子预萌发及温浴时间、抗生素最适覆盖时间出发,选择最合适的条件,建立和优化该生防菌株的遗传转化体系,为进一步研究该生防菌的功能基因和其他分子操作提供必不可少的平台,为研究该生防菌抗生素合成代谢途径、调控机理、遗传改良等奠定重要的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株(Bacterial stains)

玫瑰黄链霉菌(*Streptomyces roseoflavus*) Men-myco-93-63、大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、DH5 α 、ET12567 (pUZ8002)^[8]均由河北农大生防实验室保存。ET12567(pUZ8002)为接合转移去甲基化供体,整合有 *tra* 基因。

1.2 质粒(Plasmids)

自主复制型穿梭载体 pKC1139 具有温度敏感型复制子 *rep*^[4]和整合型穿梭载体 pSET152^[6]由河北农业大学生物防治实验室保存。均含安普霉素抗性基因(*aac*(3)IV)和接合转移位点(*oriT*)。

1.3 限制性内切酶和试剂

酶类均购于 TaKaRa 公司;DNA 分子量标准物购于北京泽星公司;DNA 回收试剂盒购于 TaKaRa 公司;安普霉素(Apramycin, Am)、萘啶酮酸(Nalidixic acid, NA)购自 Sigma 公司,卡那霉素(Kpramycin, Km)氯霉素(Chloramphenicol, Cm)购自国内试剂公司。其他常规试剂参见文献[5-10]。

1.4 培养基和抗生素

大肠杆菌培养基为 LA、LB 和 SOC^[10];接合转移则分别选用了 TSB 琼脂、PDA、燕麦培养基、R₂YE、和 MS 培养基;玫瑰黄链霉菌固体产孢培养基为 PDA, 菌丝培养基为液体培养基 TSB、YEME^[8]。LB 中安普霉素使用量为 50 μg/ml, 氯霉素为 25 μg/ml, 卡那霉素为 25 μg/ml;接合转移培养基中安普霉素使用量为 50 μg/ml, 萘啶酮酸为 40 μg/ml。

1.5 安普抗生素引物^[7-11]

PAM-1: 5'-TCT TCG CAT CCC GCC TCT GG-3'

PAM-2: 5'-GCA ATA CGA ATG GCG AAA AG-3'

PAM-3: 5'-CTT CAG GAT GGC AAG TTG GT-3'

PAM-4: 5'-TCA TCT CGT TCT CCG CTC AT-3'

均由上海生工合成。

1.6 大肠杆菌与玫瑰黄链霉菌属间接合转移体系

1.6.1 Men-myco-93-63 孢子和菌丝体对接合转移效率的影响 分别以 Men-myco-93-63 孢子和菌丝体作受体进行接合转移转化试验,具体方法参见文献[5]。

1.6.2 供体 受体对接合转移效率的影响 供体大肠杆菌细胞量保持 10⁸ 不变, Men-myco-93-63 菌丝体量或

孢子的量(按稀释平板后长出的单菌落量换算)从 10⁵~10⁹ 以 10 倍递增。以形成肉眼可分辨的转化子为准。接合效率用转化子数除以菌丝体量或孢子量表示。

2 结果与分析

2.1 Men-myco-93-63 接合转移系统的建立和优化

分别以 Men-myco-93-63 孢子和菌丝体为受体, ET12567(pUZ8002, pKC1139/pSET152)为供体, 选取不同的接合转移培养基, 包括 TSB 琼脂、PDA、燕麦培养基、R₂YE、和 MS 培养基, 结果表明:以孢子为受体时, 孢子预萌发条件为 50 °C 热激 10 min, 37 °C 温育 2.5 h 在 MS 培养基上的转化效率是 10⁻⁷~10⁻⁶, 在其他培养基上接合转移子少或得不到接合子。以菌丝体为受体时, 在 MS 培养基上转化效率是 10⁻⁷~10⁻⁶, 但菌丝培养过程中极容易被污染, 而使得到的转化子不易纯化。因此, 确定 MS 培养基为玫瑰黄链霉菌接合转移最适培养基。

另外, 由于玫瑰黄链霉菌孢子成熟后细胞壁较厚, 直接用作受体或温浴时间短时, 均不易与大肠杆菌发生接合转移; 而孢子温浴时间大于 2.5 h, 孢子萌发管太长, 接合转移受体容易集结在一起, 形成萌发孢子团, 影响转化频率, 并使得假阳性率高, 且转化子数不易记数。

试验还发现, 抗生素覆盖时间对接合转移效率影响明显。在这个试验条件下, 16~18 h 覆盖效果最佳(见表 1)。时间少于 16 h, 接合转移不完全, 而且基内菌丝生长不牢固, 抗生素覆盖时菌丝容易被刮掉。时间长于 18 h(如在 19 h), 菌丝体生长过旺, 容易混在一起, 难于分辨单菌落。

表 1 抗生素不同覆盖时间对 ET12567(PUZ8002/ pSET152/ pKC1139)⁽¹⁾与 Men-myco-93-63 接合转移的影响

| 质粒 | 抗生素覆盖时间/h | 受体孢子量 ⁽²⁾ | 接合子量 ⁽³⁾ | 接合效率 ⁽³⁾ |
|---------|-----------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| pSET152 | 13 | 10 ⁹ | 79 | 7.90×10 ⁻⁸ |
| | 16 | 10 ⁹ | 144 | 1.44×10 ⁻⁷ |
| | 17 | 10 ⁸ | 235 | 2.35×10 ⁻⁶ |
| | 18 | 10 ⁸ | 280 | 2.80×10 ⁻⁶ |
| | 19 | 10 ⁸ | - | - |
| pKC1139 | 13 | 10 ⁹ | 64 | 6.43×10 ⁻⁸ |
| | 16 | 10 ⁹ | 107 | 1.07×10 ⁻⁷ |
| | 17 | 10 ⁸ | 170 | 1.70×10 ⁻⁶ |
| | 18 | 10 ⁸ | 170 | 1.70×10 ⁻⁶ |
| | 19 | 10 ⁸ | - | - |

注: (1)在所有试验中供体大肠杆菌 *E. coli* ET12567(PUZ8002)量都为 10⁸/ml; (2)孢子量按梯度稀释后在平板上长出的单菌落数量来换算; (3)接合转移效率用接合子量/受体孢子量表示, 数据取 3 次试验平均值。表中“-”符号表示不可数[菌丝体生长过旺连成片无法计数]。

2.2 pSET152/ pKC1139 在 Men-myco-93-63 接合转移转化子中的稳定性

为了检测质粒 pSET152/ pKC1139 在接合转移转

化子中的稳定性, 将转化子接种在没有安普霉素的 MS 培养基上生长, 待产孢后, 转接到不含安普霉素的 MS 培养基上生长, 连续转接 4 次, 再挑取 300 个单菌

落分别转接到含有安普霉素和不含抗生素的MS培养基上,未发现抗性消失的菌落。表明质粒 pSET152/pKC1139 在 Men-myco-93-63 中可以稳定的遗传。

2.3 接合转移转化子的检测

2.3.1 pKC1139 接合转移转化子的检测 将质粒 pKC1139 接合转移转化子接种到含安普霉素和萘啶酮酸的SGGP液体培养基中培养,提取链霉菌质粒,电泳检测没有明显的条带,将提取物浓缩转入 *E.coli* JM109 感受态细胞中,分离得到的质粒与转入 ET12567(pUZ8002, pKC1139) 中的 pKC1139 大小一致(图1)。泳道 M 为 Marker(λ DNA-HindIII),泳道 2 为从 *E.coli* JM109 中分离得到的质粒,泳道 3 为保存的 pKC1139。说明 Men-myco-93-63/pKC1139 接合转移转化子中提取的质粒就是 pKC1139,即该质粒已被成功转入到 Men-myco-93-63 中。

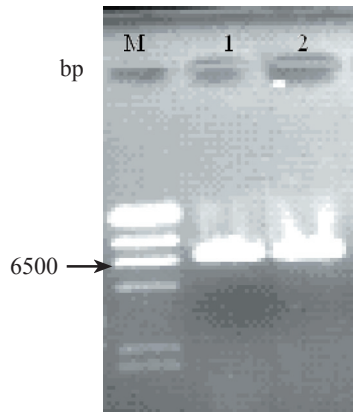


图1 pKC1139 接合转移转化子的验证

M.Marker (λ DNA-HindIII); 1:pKC1139(from zygospers);
2:pKC1139(control)

2.3.2 pSET152 接合转移转化子的检测 pSET152 属于基因整合性质粒,转入到链霉菌中后,不能单独存在于细胞质中,而是整合到菌株的基因组上^[6]。因此选择在 Men-myco-93-63 中不存在,而在 pSET152 中存在的安普霉素(aac(3)IV)抗性基因的两对引物,分别以 pSET152 质粒和 pSET152 接合转移转化子的基因组,以及野生型 Men-myco-93-63 基因组为模板进行扩增,发现以 PAM-1 和 PAM-2 为引物时,前两者中均能扩出 700 bp 的片段,以 PAM-3 和 PAM-4 为引物时,前两者均能扩增出 286 bp 的片段,而野生型 Men-myco-93-63 在上述两种情况下均没有扩增片段。由此证实了质粒 pSET152 已成功地转入到玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中(图2)。

3 讨论

链霉菌是一类具有重要经济价值的革兰氏阳性细菌,(G+C)%含量一般高达70%以上,能产生多种抗生

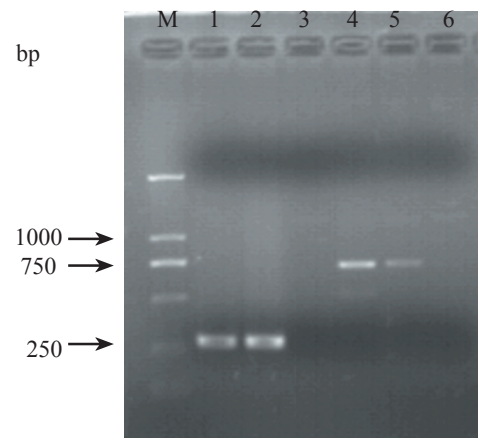


图2. pSET152 接合转移转化子的验证

M.DL2000 marker;1-3:PAM-3 和 PAM-4 为引物;4-6: PAM-1 和 PAM-2 为引物;1,4.pSET152 接合转移子总 DNA 为模板;2,5.pSET152 质粒为模板;3,6.Men-myco-93-63 基因组为模板。

素和生物活性物质^[12],其自身基因转移系统的建立是进行抗生素合成基因等功能性基因鉴定、分析和其他遗传操作的前提^[13]。如对抗生素生物合成基因簇中单个基因进行功能分析,可对亲本宿主中的该基因进行破坏或置换,然后观察和检测基因被破坏后亲本菌株产生抗生素的变化情况^[13],因此建立宿主自身的基因转移系统是必不可少的。原生质体转化是一种常规的基因转移方法,但其操作复杂,易受胞外核酸酶和一些重金属离子的影响,难掌控,而且由于很多链霉菌都具有限制性系统,外源基因或质粒很难直接转化或转化效率极低。接合转移作用依赖于顺式作用(cis_acting)的转移起始位点(oriT)和 IncP 群质粒 RK4 以反式方式(intrans)提供转移基因(tra)的转移功能^[14],程序相对简单,宿主范围广泛。通过非甲基化供体菌能消除甲基化影响,显著提高基因导入效率。大肠杆菌-链霉菌接合转移是通过细胞之间物理接触,质粒转移至目的链霉菌中^[15]。链霉菌 FR-008 接合转移试验^[16]表明,接合转移过程与直接转化不同,可以不受宿主限制-修饰系统的影响。同时,链霉菌是一个高度分化的菌属,不同菌种之间有很大的差异,适用于一种链霉菌的转化方法不一定适用于其它链霉菌,即使同一种链霉菌的不同菌株由于遗传背景的不同,转化效率也差别很大,而且不是每一种链霉菌都能够进行转化,因此需要根据目的菌株的情况,探索适合的转化方法。

试验中发现以新培养的玫瑰黄链霉菌菌丝为受体时,菌丝的培养时间以及摇菌过程的污染问题对接合转移效率的影响较大,菌丝的培养时间决定着菌丝的幼嫩程度,越是幼嫩的菌丝越有利于接合转移的发生,但由于用 TSB 液体培养基培养玫瑰黄链霉菌菌丝时

摇菌过程中很难掌握菌丝的断裂程度,使得到的接合子假阳性比率较高,而且接合转移平板容易被细菌污染从而不易筛选出转化子。当用玫瑰黄链霉菌的孢子进行接合转移试验时,孢子的浓度和萌发程度是影响接合转移效率的关键,孢子的浓度须高于大肠杆菌的浓度,因为两者混合培养时会相互竞争,且玫瑰黄链霉菌的生长速度明显慢于大肠杆菌,如果作为供体的大肠杆菌用量过大,则受体菌的孢子就难以生长,致使接合转移率显著下降甚至失败,因此大肠杆菌的量不宜过大。孢子的预萌发过程中采用50℃热激10 min,37℃温育2.5 h显微镜下观察玫瑰黄链霉菌孢子不再呈圆形,微微有芽管突出时转化效率最好。热激的时间不宜过长,否则会有大量的孢子死亡,温育的时间在2~2.5 h接合转移效率差异不大。

试验选取TSB琼脂、PDA、燕麦培养基、R₂YE琼脂、和MS等培养基作为接合转移培养基,其中TSB、R₂YE为培养菌丝的液体培养基,PDA、燕麦培养基、MS为获得链霉菌孢子的培养基。由于PDA上大肠杆菌速度过快,使得到的转化子常常被细菌污染,干扰转化子的正常生长。而燕麦培养基上几乎得不到转化子。最终确定MS培养基为接合转移最适培养基。此外,抗生素的覆盖时间对接合转移效率的影响明显。时间少于16 h,接合转移还不完全,基内菌丝生长还不牢固,当抗生素覆盖时菌丝极易被刮断,时间长于18 h,菌丝生长过旺,容易生长到一起,难以分辨但菌落,同时假阳性很高,未转化进质粒的链霉菌孢子由于生长过剩而漏筛。

玫瑰黄链霉菌Men-myc-93-63接合转移体系的建立及优化是一些调控基因和次级代谢产物合成基因功能验证的必要前提。同时,使有目的地定向改造基因、提高基因的表达水平以改造菌种的生产能力、基因重组产生新化合物等成为可能^[17]。为实现基因工程菌株的构建和提高生防菌的产抗能力奠定了重要基础。

参考文献

[1] Trien-Cuot P, Carlier C, Maruin P, et al. Plasmid transfer by con-

- jugatio From. *Escherichia coli* o.gram - positive.bacteria[J].FEMS-Microbiology.Letters,1987, 328,172-175.
- [2] 吴胜.黑暗链霉菌基因转移系统的研究[D].沈阳药科大学.中国,2001.
- [3] Trien-Cuot P, Carlier C, Maruin P, et al. Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria[J].FEMS Microbiology Letters,1987,48:289-294.
- [4] 陈蔚,田宇清,杨海花,等.圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成基因-*san H*和*san I*的研究[J].生物学报.2000,40(6):598-604.
- [5] Tobias K, Bibb M J, Mark J B, et al. Practical *Streptomyces* Genetics (M). Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [6] 李晓华,龙慈凡,周秀芬,等.链霉菌质粒pSET152电转化稀有放线菌小单孢菌的研究[J].微生物学报,2007,47(4):718-720.
- [7] 王茜.链霉菌分化负调节基因*nsdA*在杭生素高产育种上的应用[D].武汉:华中农业大学生命科学技术学院,2004.
- [8] Liu D Q. Biological control of *Streptomyces scabies* and other plant pathogens[D]. PhD Thesis, The University of Minnesota, USA, 1992.
- [9] 刘金艳,张立荣,李亚宁,等.玫瑰黄链霉菌Men-myc-93-63原生质体形成和再生条件的初探.中国农学通报,2007,23(6):473-476.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual(M). 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] 李智山,邓三季,杨燕,等.铜绿假单胞菌氨基糖苷类修饰酶基因分子流行病学研究[J].中华医院感染学杂志.2005,15(2):134-136.
- [12] 陈芬,熊伟,闵勇,等.肉桂地链霉菌接合转移体系的构建及*nsdA*基因中断对其次级代谢的影响[J].农业生物技术学报.2007,15(6):1042-1047.
- [13] 夏焕章,吴胜.黑暗链霉菌DNA转移系统的建立[J].微生物学报,2000,42(2):181-185.
- [14] Donald G, Guiney, Emanuel Jakobson. Location and nucleotide sequence of the transfer origin of the broad host range plasmid RK2[J].Proc Natl Acad Sci USA,1983,80:3595-3598.
- [15] 莫宏波,白林泉,王胜兰,等.大肠杆菌-链霉菌高效接合载体的构建及其应用[J].生物工程报,2004,20(5):662-666.
- [16] 邓子新,周秀芬.质粒在大肠杆菌和链霉菌FR-008之间的属间接合转移[J].遗传,1994,16(6):7-10.
- [17] 吴胜,夏焕章.链霉菌基因转移的方法[J].生物工程进展,2002,22(1):91-94.