

弗氏链霉菌 *tylF* 基因的克隆及其生物信息学分析

闫明亮 (中国人民解放军海军工程大学电气工程学院, 湖北武汉 430000)

**摘要** [目的]研究弗氏链霉菌 *tylF* 基因的克隆及其生物信息学分析。[方法]利用 RT-PCR 技术、巢式 PCR 技术和 RACE 技术从弗氏链霉菌 B-62169 菌株中克隆获得 *tylF* 基因的全长 cDNA 序列, 并对其生物信息学进行分析。[结果]经 Vector NTI 11.0 软件拼接获得 *tylF* 基因全长 cDNA 序列长度为 1 245 bp, 并带有 19 bp 长的 Poly(A) 尾巴, 包含 927 bp 的开放读码框(ORF), 编码一个含 309 个氨基酸残基的蛋白质。生物信息学分析结果表明, *tylF* 基因编码的酶是大菌素-O-甲基转移酶, 参与分子功能中甲基转移酶活性和生物学途径中甲基化过程。对 *tylF* 基因全长 cDNA 序列进行蛋白质结构域分析, 证实该基因编码 TyIF 蛋白, 并具有 223 个氨基酸蛋白结构域。[结论]该研究为阐明泰乐菌素生物合成过程中甲基化反应机理, 更进一步研究大环内酯类抗生素生物合成代谢途径提供生物信息学数据支持。

**关键词** *tylF*; 泰乐菌素; 弗氏链霉菌; 基因克隆

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)12-126-04

Cloning and Bioinformatics Analysis of *tylF* Gene in *Streptomyces fradiae*

YAN Ming-liang (College of Electrical Engineering, Naval University of Engineering, PLA, Wuhan, Hubei 4300000)

**Abstract** [Objective] To research the cloning and bioinformatics analysis of *tylF* gene in *Streptomyces fradiae*. [Method] The partial cDNA of *tylF* was cloned from *Streptomyces fradiae* B-62169 through RT-PCR technique by specific primers designed on the basis of *tylF* gene in GenBank website. And its bioinformatics analysis was carried out. [Result] A 1245 bp full length cDNA sequence of *tylF* was obtained using nested PCR and RACE technique. The cloned *tylF* cDNA contained an open reading frame (ORF) of 927 bp and was predicted to encode a deduced protein with 309 amino acid residues. Bioinformatics analysis results showed that the gene encoding enzymes was macrocin-O-methyl transferase, which participated in the methylation process of methyltransferase activity and biological pathways in molecular function. Full-length cDNA sequence of the *tylF* structural gene for protein domain analysis confirmed that the gene encoding TyIF protein having 223 amino acids was completed and the protein domains. [Conclusion] This research provides data support for the methylation reaction mechanism of tylosin biosynthetic process, and the further researches on biosynthesis and metabolic pathways of macrolides antibiotics.

**Key words** *tylF*; Tylosin; *Streptomyces fradiae*; Gene cloning

链霉菌(*Streptomyces*)属于放线菌目链霉菌科原核生物, 是一类具有丝状分枝细胞的革兰氏阳性细菌<sup>[1]</sup>。泰乐菌素<sup>[2]</sup>(Tylosin), 又名泰乐星, 是一类 16 元大环内酯类畜禽专用抗生素, 其产生菌<sup>[2]</sup>有弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)、龟裂链霉菌(*Streptomyces romosus*)和吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*), 其中弗氏链霉菌是泰乐菌素的主要产生菌, 同时也是工业化生产泰乐菌素的工程菌株。泰乐菌素是一种畜禽专用抗生素, 其主要用于饲料添加剂和动物治疗如猪气喘病、鸡慢性呼吸道病、动物消化道疾病、地方性动物支气管炎等, 能明显促进禽畜生长、提高饲料利用率<sup>[3]</sup>等, 具有广阔的市场前景。

*tylF* 基因编码的大菌素-O-甲基转移酶, 催化泰乐菌素 C3 位羟基的甲基化反应<sup>[4]</sup>。泰乐菌素 C3 位羟基的甲基化反应是泰乐菌素生物合成的最后一步, 也是限速反应<sup>[5]</sup>。目前关于弗氏链霉菌 *tylF* 基因克隆的研究较少, 弗氏链霉菌研究主要集中于工程菌株的构建和发酵生产方面, 2012 年范亮等<sup>[6]</sup>利用基因重组技术, 构建了具有双拷贝 *tylF* 基因的泰乐菌素基因工程菌株, 结果比相同条件下未转化菌种生产泰乐菌素的能力提高了 32.7%。但这些研究并未获得 *tylF* 基因全长 cDNA 序列, 只是根据 NCBI 上的序列设计引物进行后续试验。笔者通过对 *tylF* 基因全长序列克隆及其生物信息学分析, 不仅可以从分子角度进一步阐明泰乐菌素的生物合成过程, 还可以更进一步研究大环内酯类抗生素生物合成过

程的未知代谢机理, 明晰抗生素生物合成代谢途径中的未知假定。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 菌种和试剂。**弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae* B-62169)购于北京微生物菌种保藏中心。RNA 提取试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司, RACE 克隆试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司, pMD18-T 载体、RT-PCR 以及大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  等相关试剂购自大宝生物公司。

**1.1.2 培养基。**大肠杆菌的培养基为 LB 培养基, 弗氏链霉菌的固体培养基为 AS-2(Yeast extract)培养基, 弗氏链霉菌的液体培养基为 TSB(Tryptone soya broth)培养基。

## 1.2 方法

**1.2.1 弗氏链霉菌总 RNA 的提取。**将弗氏链霉菌在 AS-2 平板上活化培养, 再从 AS-2 平板上挑取单菌落接种至含有 25 mL TSB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 在培养温度 37  $^{\circ}$ C、摇床 220 r/min 下振荡培养 10~12 h 后, 将三角瓶静止放置 10 min, 然后在 12 000 r/min 下离心 10 min 收集菌体细胞。按照 RNA 提取试剂盒说明书提取弗氏链霉菌总 RNA, 电泳检测 RNA 质量, 并将其保存, 为下一步反转录备用。

1.2.2 *tylF* 基因的克隆。

**1.2.2.1 cDNA 第一条链合成。**参考 Bio-Rad 公司 RevertAid<sup>TM</sup> first strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂说明书进行 cDNA 第一条链的合成, 在 42  $^{\circ}$ C 下反应 1 h, 反应结束后在 70  $^{\circ}$ C 下处理 5 min 使逆转录酶失活, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.2.2 RT-PCR 反应体系。**根据 GenBank 中 *tylF* 基因的

氨基酸保守序列设计该基因简并引物 PF 和 PR, 引物序列见表 1。PCR 反应体系 25.0  $\mu\text{L}$ : 2.0  $\mu\text{L}$  模板 cDNA, 2.5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  *Taq* DNA Polymeras Buffer, 0.9  $\mu\text{L}$  10 mmol/L dNTPs, 1.0  $\mu\text{L}$  引物 F1, 1.0  $\mu\text{L}$  引物 R1, 0.3  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA Polymeras, ddH<sub>2</sub>O 补

齐至 25.0  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 40 s, 59  $^{\circ}\text{C}$  退火 60 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

表 1 弗氏链霉菌 *tylF* 基因克隆的引物

Table 1 Primers used in *Streptomyces fradiae* cloning of *tylF* gene

引物 Primer	序列(5' - 3') Sequence	引物 Primer	序列(5' - 3') Sequence
PF	GCGCATATMRATANGKCTCAACGTAATC	PF3	5' - AGACGAGCGTCTTGGACACGTATAGG - 3'
PR	GCCAACTMTCTAGGCNMGATGGTCGTG	PR4	ATCAGCATGTTAATCGACATCTAGC
PF1	TTGATGTCGTTGCATCGGGTTGAG	PF5	ACAAGTCCTTAATGCCATGTGTATCG
PR2	ACTCTGGTCTAATGGTGATTCATAAC	PR6	CCTATCGTGTGCAACCTAGCTACAT
		UMP	CTAATACGACTCACTATAGGGC

**1.2.2.3 3' - RACE 克隆。**按照 RACE 克隆试剂盒(美国 Bio - Rad 公司)说明书进行 RACE 克隆。利用试剂盒合成 3' - Ready cDNA 并根据 RT - PCR 获得的已知序列设计 2 条反向嵌套 PCR 引物 PF1、PR2(表 1)。正向引物为试剂盒中所带 UMP。用引物 UMP 和 PF1 配对对 3' - Ready cDNA 进行第 1 轮 PCR; 并取第一轮 PCR 产物 1.0  $\mu\text{L}$  为模板, 用引物 UMP 和 PR2 配对进行第 2 轮 PCR。

**1.2.2.4 5' - RACE 克隆。**按照 RACE 克隆试剂盒(美国 Bio - Rad 公司)说明书进行 RACE 克隆。利用试剂盒合成 5' - Ready cDNA 并根据 RT - PCR 获得的已知序列设计 2 条反向嵌套 PCR 引物 PF3、PR4(表 1)。正向引物为试剂盒中所带 UMP。用引物 UMP 和 PF3 配对对 5' - Ready cDNA 进行第 1 轮 PCR; 并取第一轮 PCR 产物 1.0  $\mu\text{L}$  为模板, 用引物 UMP 和 PR4 配对进行第 2 轮 PCR。

**1.2.2.5 全长 cDNA 的扩增。**将 3' - RACE 和 5' - RACE 扩增获得的 3' 端和 5' 端 cDNA 序列在软件 Vector NTI 11.0 上进行序列拼接, 通过软件拼接获得全长 cDNA 序列, 并利用获得的序列设计两端引物 PF5、PR6(表 1)扩增 *tylF* 基因全长的 cDNA 序列。PCR 反应体系 25.0  $\mu\text{L}$ : 2.0  $\mu\text{L}$  模板 cDNA, 2.5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  *Taq* DNA Polymeras Buffer, 0.9  $\mu\text{L}$  10 mmol/L dNTPs, 1.0  $\mu\text{L}$  引物 F1, 1.0  $\mu\text{L}$  引物 R1, 0.5  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA Polymeras, ddH<sub>2</sub>O 补齐至 25.0  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 40 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 60 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

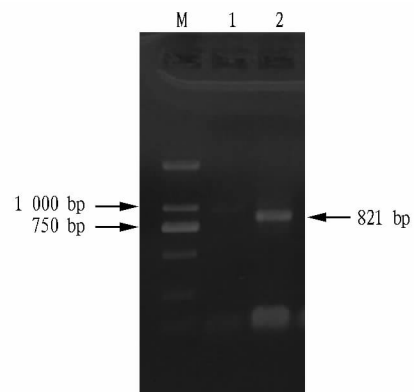
**1.2.2.6 测序及序列生物信息学分析。**PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下切下目的条带, 采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收后, 将纯化回收的目的基因片段与 pMD18 - T 载体连接。将连接好的产物转化大肠杆菌感受态细胞进行蓝白斑筛选, 并进行 PCR 验证。将验证成功转化感受态的菌液应用 M13 通用引物进行测序, 测序由上海生物工程技术服务公司完成。

**1.2.3 测序及测序结果生物信息学分析。**将测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对, 利用 Blast2go 软件<sup>[7-8]</sup> (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) 进行生物信息学分析, 利用 Pfam 在线软件<sup>[9]</sup> (<http://pfam.xfam.org/>) 进行蛋白质结

构域预测。

## 2 结果与分析

**2.1 弗氏链霉菌 *tylF* 基因保守序列 cDNA 克隆与分析** 以弗氏链霉菌的 cDNA 为模板, 利用设计好的引物 PF 和 PR 进行 RT - PCR, 结果获得片段约为 800 bp 的目的条带。将该片段纯化后转化至大肠杆菌感受态中, 筛选阳性菌落进行 PCR 检验和测序分析, 结果表明, RT - PCR 获得的目的片段长度为 821 bp(图 1)。将该片段的核苷酸序列与 NCBI 中的序列进行比对, 其结果与耻垢分枝杆菌和鸟型分枝杆菌中的 *tylF* 基因同源性分别达 70% 和 76%, 初步说明已经成功获得了 *tylF* 基因的部分序列。



注: M. DL2 000 Marker, 1. 阴性对照, 2. *tylF* 基因保守序列阳性克隆。

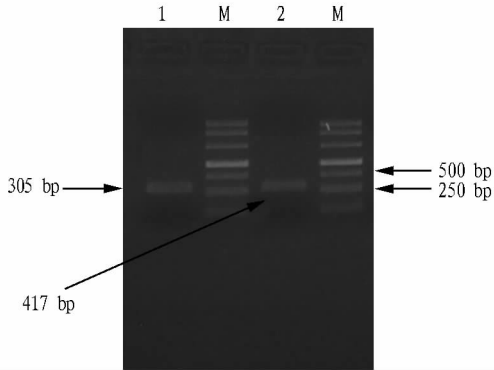
Note: M. DL2 000 Marker, 1. Negative control, 2. Positive clone of *tylF* gene conserved sequence.

图 1 *tylF* 基因保守序列电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoretic analysis of *tylF* gene PCR products

**2.2 弗氏链霉菌 *tylF* 基因全长 cDNA 序列的克隆与分析** 由图 2 可知, 利用 3' - RACE 技术克隆获得 cDNA 片段长度为 417 bp, 其中有 196 bp 与已经克隆获得的 821 bp 中间片段具有重叠区, 同时带有 19 bp 长的 Poly(A) 尾巴。利用 5' - RACE 技术克隆获得 cDNA 片段长度为 305 bp, 其中有 102 bp 与已经克隆获得的 821 bp 中间片段具有重叠区。通过 Vector NTI 11.0 软件对已经获得的 3' - RACE 片段序列、

5' - RACE 片段序列以及 RT - PCR 片段序列进行比对和拼接,从而获得弗氏链霉菌 *tylF* 基因全长 cDNA 序列。由图 3 可知,弗氏链霉菌 *tylF* 基因全长 cDNA 序列全长为 1 245 bp,并带有 19 bp 长的 Poly(A),*tylF* 基因起始密码子 ATG 位于 203 nt 处,终止密码子 TAG 位于 1 130 nt 处。全长 1 245 bp 序列中包含 203 bp 的 5' 端非翻译区(UTR, untranslated region)和 115 bp 的 3' 端非翻译区,以及 927 bp 的开放读码框(ORF),编码一个含 309 个氨基酸残基的蛋白质,经预测编码 TyIF 蛋白。

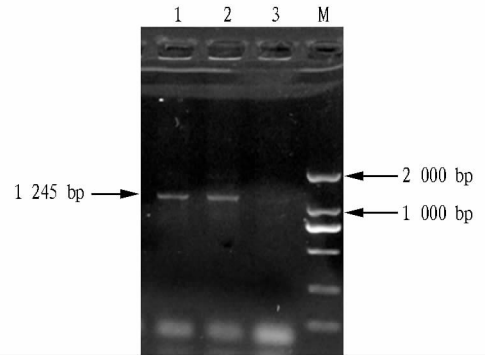


注:M. DL 2 000 Marker,1. 5' - RACE PCR 产物,2. 3' - RACE PCR 产物。

Note:M. DL 2 000 Marker,1. 5' - RACE PCR products,2. 3' - RACE PCR products.

图 2 *tylF* 基因 RACE 扩增电泳图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoretic analysis of *tylF* gene RACE PCR products



注:M. DL2 000 Marker,1 和 2. *tylF* 基因全长 cDNA 序列阳性克隆,3. 阴性对照。

Note:M. DL 2 000 Marker,1 and 2. The cDNA sequence positive cloning of the whole *tylF* gene,3. Negative control.

图 3 *tylF* 基因全长 cDNA 序列电泳图谱

Fig. 3 Agarose gel electrophoretic analysis of *tylF* gene cDNA sequence

**2.3 弗氏链霉菌 *tylF* 基因全长 cDNA 序列生物信息学分析** 将已经获得的弗氏链霉菌 *tylF* 基因全长序列编辑成 fasta 格式文件,利用生物信息学软件 Blast2go 对 *tylF* 基因进行功能注释分析和 KEGG 代谢途径分析。由图 4 可知,*tylF* 基因被功能注释为大菌素 - O - 甲基转移酶。同时 GO 功能注释结果显示,其被注释到参与分子功能中甲基转移酶活性和生物学途径中甲基化过程。由图 5 可知,*tylF* 基因被注释上的酶标号为 EC 2.1.1.101,是大环内酯类衍生物合成过程中的关键酶基因。由图 6 可知,获得的 *tylF* 基因全长 cDNA 序列包含了整个 TyIF 蛋白保守结构域,其长度为 223 个氨基酸。

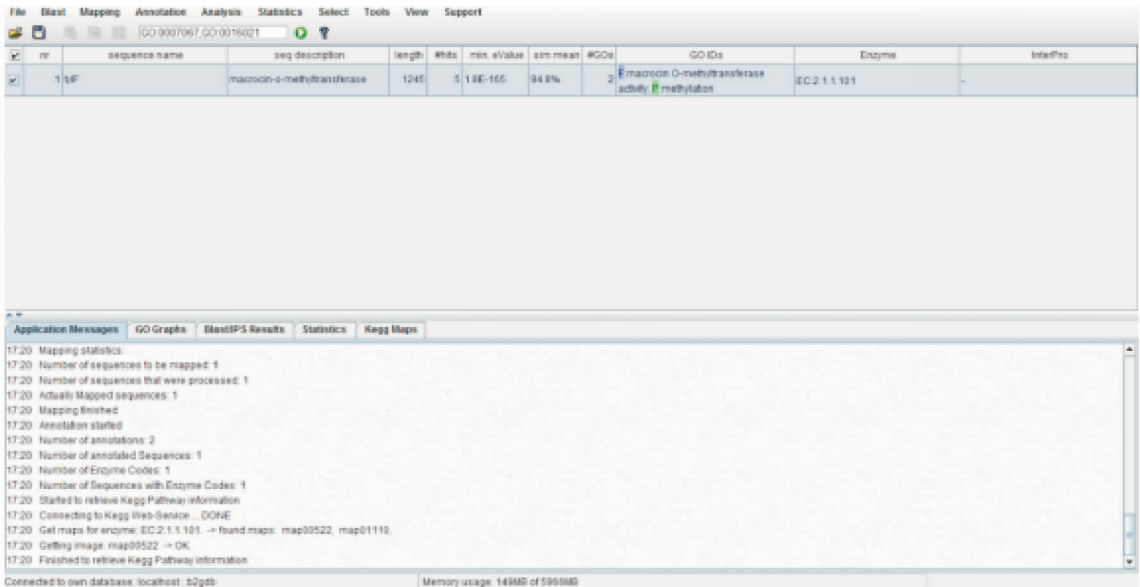


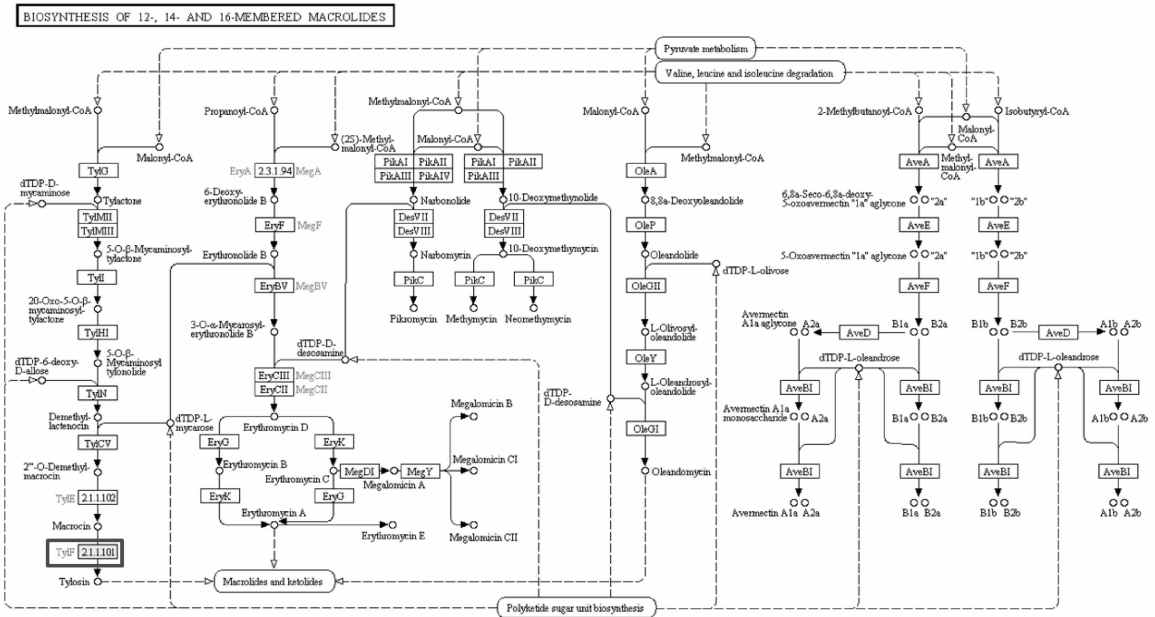
图 4 *tylF* 注释信息

Fig. 4 *tylF* gene annotation information

### 3 结论与讨论

该研究利用 RT - PCR 技术从弗氏链霉菌 B - 62169 菌株中克隆获得 *tylF* 基因的保守序列,同时利用巢式 PCR 技术、3' - RACE 和 5' - RACE 技术获得 *tylF* 基因的全长 cDNA 序列。通过 Vector NTI 11.0 软件拼接获得的弗氏链霉菌

*tylF* 基因全长 cDNA 序列全长为 1 245 bp,并带有 19 bp 长的 poly(A)尾巴,该基因起始密码子 ATG 位于 203 nt 处,终止密码子 TAG 位于 1 130 nt 处,全长序列中包含 203 bp 的 5' 端非翻译区和 115 bp 的 3' 端非翻译区,以及 927 bp 的开放读码框(ORF),编码一个含 309 个氨基酸残基的蛋白质,经预测

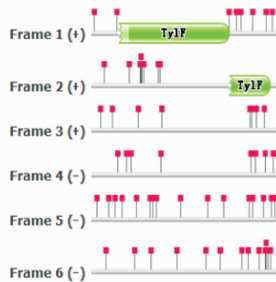


注:红色框标记为 *tylF* 基因所参与大环内酯类衍生物合成的作用位置。

Note: The red box was the interaction site of *tylF* gene participated in macrolide derivatives synthesis.

图 5 大环内酯类衍生物合成途径

Fig. 5 Biosynthesis of meberde macrolides



Show the DNA and protein sequences, and the URL for bookmarking these results.

Return to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

Show or hide all alignments. Toggle between amino-acid and DNA sequence coordinates.

Frame (sense)	Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
					Start	End	Start	End	From	To					
1 (+)	Ty1F	Macrocin-O-methyltransferase (Ty1F)	Domain	CL0063	63	307	85	307	28	249	249	357.2	3.3e-107	n/a	Show
2 (+)	Ty1F	Macrocin-O-methyltransferase (Ty1F)	Domain	CL0063	309	398	313	398	167	249	249	57.0	1.4e-15	n/a	Show

图 6 Ty1F 蛋白保守域分析

Fig. 6 Analysis protein domain of Ty1F gene

编码 Ty1F 蛋白。通过生物信息学分析软件对该基因进行了全面系统的分析, *tylF* 基因编码的酶是大菌素 - O - 甲基转移酶, 对该基因功能注释结果显示其参与分子功能中甲基转移酶活性和生物学途径中甲基化过程。 *tylF* 基因在 KEGG 代谢过程中被注释的酶标号为 EC 2. 1. 1. 101, 是大环内酯类衍生物合成过程中的关键酶基因。将获得 *tylF* 基因全长 cDNA 序列进行蛋白质结构域分析, 证实该基因编码 Ty1F 蛋白, 并具有 223 个氨基酸蛋白结构域。

在 NCBI 尚未公布有关弗氏链霉菌中 *tylF* 基因全长 cDNA 序列的信息, 仅有耻垢分枝杆菌、鸟型分枝杆菌等分枝杆菌中 *tylF* 基因 mRNA 序列。该研究结合生物学知识和生物信息学分析, 更进一步对 *tylF* 基因信息进行研究, 重点从转

录组学层面上解释了 *tylF* 基因参与大环内酯类衍生物合成途径中的关系, 明晰了泰乐菌素抗生素合成代谢的积累机制, 为今后定向提高大环内酯类抗生素的产量提供参考。

参考文献

- [1] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. Practical streptomyces genetics [M]. Norwich, UK: John Innes Foundation Norwich, 2000.
- [2] HAMILL R L. Tylosin, a new antibiotic [J]. Antib&Chemoth, 1960, 11: 328 - 334.
- [3] 闫勇. 弗氏链霉菌及耐热链霉菌的遗传改造 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [4] ARISAWA A, KAWAMURA N, TSUNEKAWA H, et al. Cloning and nucleotide sequences of two genes involved in the 4'-O-acylation of macrolide antibiotics from *Streptomyces thermotolerans* [J]. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57: 2020 - 2025.

式中,  $X_m$  为最大剂量的对数;  $i$  为组距, 相邻 2 组剂量对数值之差;  $p$  为各剂量组死亡率;  $q$  为各剂量组存活率;  $\Sigma p$  为各剂量组死亡率之和;  $n$  为各组动物数;  $S_{X_{50}}$  为  $\lg LD_{50}$  的标准误差。

## 2 结果与分析

**2.1 预试验结果** 根据五氯柳胺原料药急性毒性预试验得到的最小致死剂量 ( $LD_{100}$ ) 为 3.375 g/kg, 最大耐受剂量 ( $LD_0$ ) 为 0.667 g/kg。因此, 确定正式试验的组数 ( $N$ ) 为 5, 各组之间的剂量比值  $r$  为 1.5。

## 2.2 急性毒性试验结果

**2.2.1 临床症状以及剖检病理变化。** 据观察, 给药后动物表现出的症状如下: 给药后出现精神沉郁, 伏卧不动, 眼睛微

闭, 被毛凌乱, 食欲减退, 给药 3 h 后出现死亡现象, 死亡时间集中在 3 ~ 12 h, 死亡前出现全身震颤、侧翻现象, 大约持续 5 min 死亡。给药 36 h 后, 再无死亡现象, 但高剂量存活小鼠依然表现为精神沉郁, 3 d 后逐渐恢复饮食、饮水。但是, 将存活小鼠体重变化与空白组进行对比发现, 给药组小鼠体重增长缓慢。第 8 天后, 对全部小鼠进行剖检, 与空白对照组相比, 发现给药组肝有出血点、脾肿大、肾的质地脆且易碎、胃壁薄而透明等现象, 且高剂量组症状明显。

**2.2.2 半数致死量 ( $LD_{50}$ ) 及 95% 置信区间。** 五氯柳胺混悬剂试验组的死亡数如表 1 所示。小鼠口服五氯柳胺的  $LD_{50}$  为 1.130 g/kg, 95% 的置信区间为 0.940 ~ 1.359 g/kg。

表 1 五氯柳胺原料药正式试验结果

Table 1 The result of acute toxicity of Oxyclozanide in mice

组别 Group	动物数 The number of animals 只	剂量 Dosage g/kg	剂量对数值 The logarithm of dosage	死亡动物数 The number of dead animals 只	死亡率 The mortality rate//%	存活率 The Survival rate//%	$pq$
1	10	3.375	0.528 27	10	100	0	0
2	10	2.250	0.352 18	9	90	10	0.09
3	10	1.500	0.176 09	7	70	30	0.21
4	10	1.000	0.000 00	6	60	40	0.24
5	10	0.667	-0.175 87	0	0	100	0

## 3 讨论

该试验选用 SPF 级昆明系小鼠为实验动物, 保证实验动物本身清洁无污染, 有效消除试验误差。在给药过程中, 严格按照灌胃给药的操作, 以防由于灌胃方法不当而导致小鼠死亡, 影响试验结果的准确性。

由于五氯柳胺不溶于水, 所以在配制供试品过程中加入羧甲基纤维素钠作为助悬剂, 配制五氯柳胺供试品浓度为 0.2 g/mL。但考虑到小鼠的胃容量, 一般给药量为每 10 g 体重的给药量为 0.1 ~ 0.2 mL<sup>[4]</sup>。因此, 在给药过程中, 因为给药体积过大, 需要进行多次给药, 2 次给药时间间隔 1 ~ 2 h, 给药体积不得超过 0.4 mL, 防止小鼠因灌胃受试物的体积过大而撑死。

五氯柳胺作为一种高效抗肝片吸虫化学合成药物, 临床

驱虫效果显著。但是, 因其水溶性差, 有一定的毒性, 限制了其临床应用。研究开发一种或几种五氯柳胺的上市制剂, 对兽医临床防治肝片吸虫病具有重要意义。该试验结果可为今后五氯柳胺新制剂的开发和临床安全有效用药提供参考依据。

## 参考文献

- [1] 刘祥宜, 朱建民, 张建峰, 等. 五氯柳胺的合成[J]. 浙江化工, 2010, 41(8): 11 - 12.
- [2] SANABRIA R, MORENO L, ALVAREZ L, et al. Efficacy of oxyclozanide against adult *Paramphistomum leydeni* in naturally infected sheep[J]. Veterinary parasitology, 2014, 206: 277 - 281.
- [3] ARIAS M S, SANCHIS J, FRANCISCO I, et al. The efficacy of four anthelmintics against *Calicophoron daubneyi* in naturally infected dairy cattle[J]. Veterinary parasitology, 2013, 197: 126 - 129.
- [4] 农业部兽药评审中心. 兽药研究技术指导原则汇编[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 11.

(上接第 129 页)

- [5] ARISAWA A, TSUNEKAWA H, OKAMURA K, et al. Nucleotide sequence analysis of the carbomycin biosynthetic genes including the 3-O-acyltransferase gene from *Streptomyces thermotolerans*[J]. Biosci Biotech Biochem, 1995, 59: 582 - 588.
- [6] 范亮, 杜宝华, 陈光, 等. 泰乐菌素基因工程菌的构建[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(5): 398 - 401.
- [7] CONESA A, GOTZ S, GARCA-GOMEZ J M, et al. Blast2go: A universal

tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. Bioinformatics, 2005, 21(18): 3674 - 3676.

- [8] APARICIO G, GOTZ S, CONESA A, et al. Blast2go goes grid: Developing a grid-enabled prototype for functional genomics analysis[J]. Stud Health Technol Inform, 2006, 120: 194 - 204.
- [9] FINN R D, BATEMAN A, CLEMENTS J, et al. Pfam: The protein families database[J]. Nucleic acids research, 2014, 42: 222 - 230.