

适用于链霉菌大片段基因组 DNA 克隆和异源表达的细菌人工染色体 (BAC) 载体的构建及应用

黄胜, 李娜, 周俊, 何璟*

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要: 【目的】很多链霉菌来源的天然产物的生物合成基因簇往往很大, 用传统的 cosmid 载体很难完整的克隆和异源表达。本研究通过载体改造, 成功构建出一个新的细菌人工染色体 (BAC) 载体, 用于链霉菌来源的天然产物生物合成基因簇的克隆及异源表达实验。【方法】从复合型载体 pCUGIBAC1 出发, 通过 λ RED 介导的 PCR-targeting 方法, 用链霉素抗性基因替换掉原有的氯霉素抗性基因标记, 同时插入链霉菌中常用的安普拉霉素抗性标记、转移起始位点 *oriT*、 ϕ C31 整合酶基因 *int*、整合位点 *attP* 等元件。【结果】成功构建出可装载链霉菌大片段 DNA 的 BAC 载体 pMSBBACs。使用 pMSBBACs 构建出链霉菌 U27 的基因组 BAC 文库, 平均插入片段大小为 100 kb。选取其中一个大小为 140 kb 的 BAC 质粒进行功能验证, 实验证明通过接合转移和原生质体转化的方法都能够将这个大型 BAC 质粒导入链霉菌模式菌株, 并通过位点特异性重组整合到染色体中进行异源表达。【结论】BAC 载体 pMSBBACs 可成功用于放线菌大片段基因组 DNA 的克隆和异源表达实验。

关键词: 细菌人工染色体 (BAC) 载体, 天然产物, 生物合成基因簇, 链霉菌, 异源表达

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0030-08

由于新型疾病的不断爆发及抗药性菌株的出现, 使得新的活性天然产物的研究工作变得越来越紧迫。链霉菌因能够生产种类众多的活性天然产物而受到广泛的关注。在链霉菌基因组中与某一天然产物生物合成途径相关的基因往往成簇存在, 这为天然产物的生物合成机制的研究提供了便利^[1-2]。基因组测序发现在链霉菌基因组中存在大量的天然产物生物合成基因簇^[3-4], 其中很多 I 型聚酮合酶基因簇和非核糖体多肽合成酶基因簇都比较大 (> 60 kb)。要想完整的克隆这些基因簇, 需要能够

承载大片段 DNA 的载体系统。

目前主要有两种大片段 DNA 克隆体系——酵母人工染色体 (YAC) 和细菌人工染色体 (BAC)^[5]。YAC 克隆技术在 1987 年首次被提出, 但由于该系统存在着较多的缺陷^[6-7], 阻碍了其应用与发展, 使得这种克隆技术最后逐渐被 1992 年引进的 BAC 克隆系统所取代^[8]。BAC 利用衍生的大肠杆菌 F 因子为载体, 以大肠杆菌为宿主, 作为环形质粒形式存在, 所以文库的构建和后续 DNA 的提取变得相对容易和高效。在大肠杆菌中

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30800020, 30970059); 教育部留学回国人员科研启动基金项目 ([2009] 1590); 教育部新世纪人才支持计划项目 (NCET-08-0779); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2009PY006)

* 通信作者。Tel: +86-27-87280163; E-mail: hejingj@yaho.com

作者简介: 黄胜 (1987 -), 男, 湖北省恩施人, 硕士研究生, 研究方向为微生物天然产物的生物合成。E-mail: hs19870604@163.com

收稿日期: 2011-10-31; **修回日期:** 2011-11-22

BAC 载体可有效克隆 200 kb 左右的片段并稳定存在。虽然其克隆片段远远小于 YAC 系统,但正是这种对插入片段大小的限制减少了嵌合体出现的几率。130–200 kb 大小的片段可以在克隆过程中被有效选择,2 个或多个片段重组后克隆效率变得极低^[5]。BAC 文库克隆已广泛应用于真菌、高粱、水稻、甜瓜、番茄、大豆、大麦等高等真核生物的研究中^[9]。天蓝色链霉菌的全基因组测序工作中就利用 BAC 载体构建了基因组文库^[10]。此外, geldanamycin^[11]、daptomycin^[12] 等的生物合成基因簇都是从 BAC 文库中筛选得到。

鉴于 BAC 载体有装载大片段 DNA 的能力,我们希望能够借助 BAC 的装载能力来进行天然产物的研究。现有的 BAC 载体多以大肠杆菌为宿主,缺乏在链霉菌中进行基因操作的元件,不太适合于链霉菌遗传操作。为解决这一问题,本研究通过载体改造,构建了一个可以用于链霉菌大片段基因组 DNA 克隆与异源表达的 BAC 载体,利用这个载体完成了链霉菌 U27 的 BAC 基因组文库的构建工作并进行了相关功能的验证。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和培养基:质粒 pCUGIBAC1 和 BAC 克隆宿主大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10B-T1 由华中农业大学罗美中教授馈赠;质粒 pIJ778、*E. coli* BW25113 (pIJ790) 由英国 John Innes Centre 研究所 Keith F Chater 教授馈赠^[13],用于 λ RED 介导的 PCR-Targeting 操作;链霉菌整合型 cosmid 载体 pJTU2554 由上海交通大学陶美凤教授馈赠;链霉菌 U27 由华中农业大学周启教授馈赠;大肠杆菌 S17-1 和 ET12567 (pUZ8002) 由本室收藏。大肠杆菌培养基为 LA 固体和 LB 液体培养基,链霉菌培养基为 34% YEME、R5 等培养基^[14]。

1.1.2 主要试剂:本实验所用引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,限制性内切酶购自 Fermentas 公司,T4 DNA 连接酶购自 TOYOBO 公司,DNA marker 及 rTaqDNA 聚合酶购自东盛生物科技有限公司,KOD DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司。普通 DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXYGEM 公司,其余试剂均购自国药集团。

1.2 pMSBBACs 的克隆

以 pCUGIBAC1 为出发载体,使用引物 CMR-F: 5'-AACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAGCTAGCGGTAAGTATGATGCCG-3' 和引物 CMR-R: 5'-TTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTA AAGCTAGCAAGCTTGATGTGTA G-3', pIJ778 经 *Hind* III 和 *Eco*RI 酶切回收的含有链霉素抗性标记的片段为模板,高保真 DNA 聚合酶 KOD 扩增 1167bp 链霉素抗性基因片段,按照 λ RED 介导的 PCR-Targeting 方法的操作步骤^[13],将出发载体的氯霉素抗性标记替换为链霉素抗性标记得到质粒 pHS001。利用引物设计时添加的 *Nhe* I 位点(用下划线表示),可以将链霉素抗性标记完全切下来。

用 *Xba* I 和 *Xho* I 处理载体 pJTU2554 的 DNA,回收得到含有 ϕ C31 整合酶基因的片段 1。以 pJTU2554 为模板, P1: 5'-CATTCTCGAGATAATCGACG-3' 和 P2: 5'-AGCTCTAGATAACTGATGCCGTATTTGC-3' 为引物,用高保真 DNA 聚合酶 KOD 扩增安普拉霉素抗性标记 *Xho*I 位点上游及启动子部分(754bp),然后用 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切处理 PCR 产物得到片段 2。用 *Nhe* I 处理 pHS001,除去链霉素抗性标签部分,得到片段 3。将 3 个片段用 T4 DNA 连接酶进行三片段连接。挑取安普拉霉素抗性菌落,酶切验证载体连接方式后分别命名为 pMSBBAC1 和 pMSBBAC2。

1.3 链霉菌属间接接转移

链霉菌与大肠杆菌之间进行接合转移实验的基本操作参见文献^[14]。将含有 *oriT* 的大肠杆菌—链霉菌穿梭质粒转入大肠杆菌 S17-1 感受态中,得到转化子。将转化子的过夜培养物转接在 LB 中,37°C 培养转化子到合适浓度 (OD_{600} :0.4–0.6) 收集菌体。用等体积新鲜的 LB 洗涤菌体 2 次,0.1 倍体积的 LB 悬浮备用。同时将新鲜的链霉菌孢子悬浮于 5 mL 0.05 mol/L pH 8.0 的 TES,50°C 水浴热激 10 min,冷却到室温后加入等体积孢子预萌发培养基,37°C 摇床培养 2–3 h,离心收集孢子并重新悬浮于适量的水或 TES 中。在振荡器上打散孢子,按 1:1 的比例将处理好的大肠杆菌和孢子混合,均匀涂布在合适的培养基平板上,30°C 培养 13–20 h 左右。用适当浓度的抗生素和萘啶酮酸覆盖,30°C 培养数天后(一般 2–3 d)可得到接合转移子。

1.4 原生质体的制备及质粒 DNA 转化^[14]

1.4.1 链霉菌原生质体的制备:在装有不锈钢弹簧的三角瓶中加 50mL 的 34% YEME (加终浓度 0.2% Glycine), 接种 100 μ L 的孢子悬液, 于 30 $^{\circ}$ C 摇床中培养 36–40 h。收集菌丝体, 将菌丝体悬浮于 15 mL 的 10.3% 的蔗糖溶液中, 1147 \times g 离心 10 min, 弃上清。同此法洗 2 次。取 1mL 菌丝体, 加入 4 mL 的溶菌酶溶液 (溶菌酶母液为 50 mg/mL P Buffer, 终浓度为 1 mg/mL, 用 P Buffer 稀释), 于 30 $^{\circ}$ C 水浴 30–60 min 至上清呈乳状。加入 5 mL 的 P Buffer 并用 5 mL 的吸管吹吸几次, 继续温浴 10 min。用装有脱脂棉的试管过滤, 滤液转入无菌干净的离心管中, 1147 \times g 离心 7 min。原生质体沉淀呈黄色。弃上清, 将原生质体重新悬浮在残留的 P Buffer 中, 分装后 –70 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.2 质粒 DNA 转化:将最多 5 μ L 的 DNA 加于已经装有 50 μ L 原生质体的离心管的管壁上。取 200 μ L 的 25% PEG1000, 将 DNA 冲入原生质体中, 小心抽吸几次使之混匀。将混合物涂布于 R5 平板上。30 $^{\circ}$ C 培养 14–20 h 后, 用含有适当抗生素的 1 mL 无菌水溶液覆盖。培养 1–2 d 后, 可以看到小的转化子菌落长出。

1.5 pHS002 的克隆及接合转移

pMSBBACs 经 *Bam*HI 酶切处理, 移除 2.7 kb 小片段, 将 11.5 kb 大片段进行自连。挑取克隆、提取质粒酶切检测, 得到质粒 pHS002。将该质粒转化大肠杆菌 S17-1, 与白色链霉菌进行接合转移, 统计接合转移频率。挑取接合子, 提取总 DNA 作为模板, 用引物 AprF: CGCTCGTCATGCCCTCGTGGTC 和 AprR: CGGCATCGCATTCTTCGCATCC 进行 PCR 扩增, 以验证接合子的正确性。

1.6 文库的构建

链霉菌 U27 在 YD (酵母提取物 4 g/L, 麦芽提取物 10 g/L, 葡萄糖 4 g/L, 氯化镁 2 g/L, 氯化钙 1.5 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 7.2) 固体培养基上产孢, TSB (Oxoid tryptone soya borth powder 30 g/L) 液体培养基中富集菌丝体。培养温度均为 30 $^{\circ}$ C, 180 r/min 液体培养。菌丝体的包埋及预处理参见文献 [15]。包埋块的部分酶切、大量酶切参见文献 [16]。载体的制备、gDNA 的筛选、回收、连接、脱盐、转化、BAC DNA 的提取参见文献 [9]。大肠杆菌感受态的制备参见文献 [17]。具体操作如下: 将

链霉菌 U27 孢子接种 50 mL TSB 中培养 24 h 后, TE25S 洗菌丝体 2 遍后, 用 1% 的低熔点琼脂糖制备包埋块 (约 50 个)。先后使用 1 mg/mL 溶菌酶和 1 mg/mL 蛋白酶 K 进行原位裂解和蛋白消化后, 加入不同浓度的 *Bam*HI 进行部分酶切处理, 通过 PFGE 检测部分酶切的结果。选取最佳的部分酶切条件 (酶切后片段大小集中在 90–250 kb) 进行大量酶切。利用 PFGE 处理大量酶切样品, 将不同大小片段进行分离, 将包含 90–250 kb 片段的凝胶切割下来, 再次包埋到 1.0% 的琼脂糖凝胶中, 通过 PFGE 对大片段进行第二次筛选。经过 2 次分离后, 将包含大片段的胶条切割下来, 装入透析袋中并加入 200 μ L 1 \times TAE buffer, 尽量赶走所有气泡后, 开始进行电洗脱。洗脱结束后将洗脱液吸出, 与处理好的载体进行连接, 利用脱盐胶除盐后, 电转化高效的大肠杆菌感受态细胞, 得到转化子。随机挑取 19 个白斑, 提取的 BAC DNA, 经 *Hind*III 处理以验证插入片段的大小, 经 *Bam*HI 酶切以验证载体的存在。部分酶切及第一次筛选的 PFGE 电泳条件为: 1–50 s, 19 h, 6 V/cm, 120 $^{\circ}$, 14 $^{\circ}$ C; 第二次筛选的 PFGE 电泳条件为: 4–4 s, 18–20 h, 6 V/cm, 120 $^{\circ}$, 14 $^{\circ}$ C; *Hind*III 酶切后检测 PFGE 电泳条件为 1–25 s, 22 h, 6 V/cm, 120 $^{\circ}$, 14 $^{\circ}$ C。 *Bam*HI 酶切后检测 PFGE 电泳条件 1–40 s, 6 h, 6 V/cm, 120 $^{\circ}$, 14 $^{\circ}$ C。

1.7 质粒 pHS003 的接合转移及原生质体转化

大量抽提 BAC 质粒 pHS003 的 DNA, 以载体 pMSBBACs 的 DNA 为对照, 分别转化变铅青链霉菌 ZX1 的原生质体, 统计转化频率。提取转化子的总 DNA, 使用引物 AprF 和 AprR 进行 PCR 扩增来验证接合子。

将 pHS003 导入大肠杆菌 S-17, 获得 *E. coli* S-17/pHS003。以 *E. coli* S-17/pHS002 和 *E. coli* S-17/pHS003 为供体菌, 分别与白色链霉菌和变铅青链霉菌 ZX1 进行接合转移, 统计接合转移子频率。提取接合子的总 DNA, 使用引物 AprF 和 AprR 进行 PCR 扩增来验证接合子。

2 结果

2.1 载体 pMSBBACs 的构建

为了引入合适的克隆位点, 我们首先通过 λ

RED 介导的 PCR-Targeting 技术, 将出发 BAC 载体 pCUGIBAC1 中的氯霉素抗性基因替换为链霉素抗性基因 (方便筛选), 并在链霉素抗性基因的两端添加了 *Nhe* I 位点, 得到过渡载体 pHS001。 *Nhe* I 和 *Xba* I 为同尾酶。利用 PCR 扩增和酶切将来源于 pJTU2554 载体的链霉菌属间接合转移起始位点

oriT, 位点特异性整合的相关元件— ϕ C31 整合酶基因 (ϕ C31 *int*) 及 *attP* 位点, 安普拉霉素抗性标记 (*aac*(3) *IV*) 通过三片段连接, 置换掉质粒 pHS001 中的链霉素抗性基因, 得到预期的载体 pMSBBACs (包括 pMSBBAC1 和 pMSBBAC2) (图 1)。

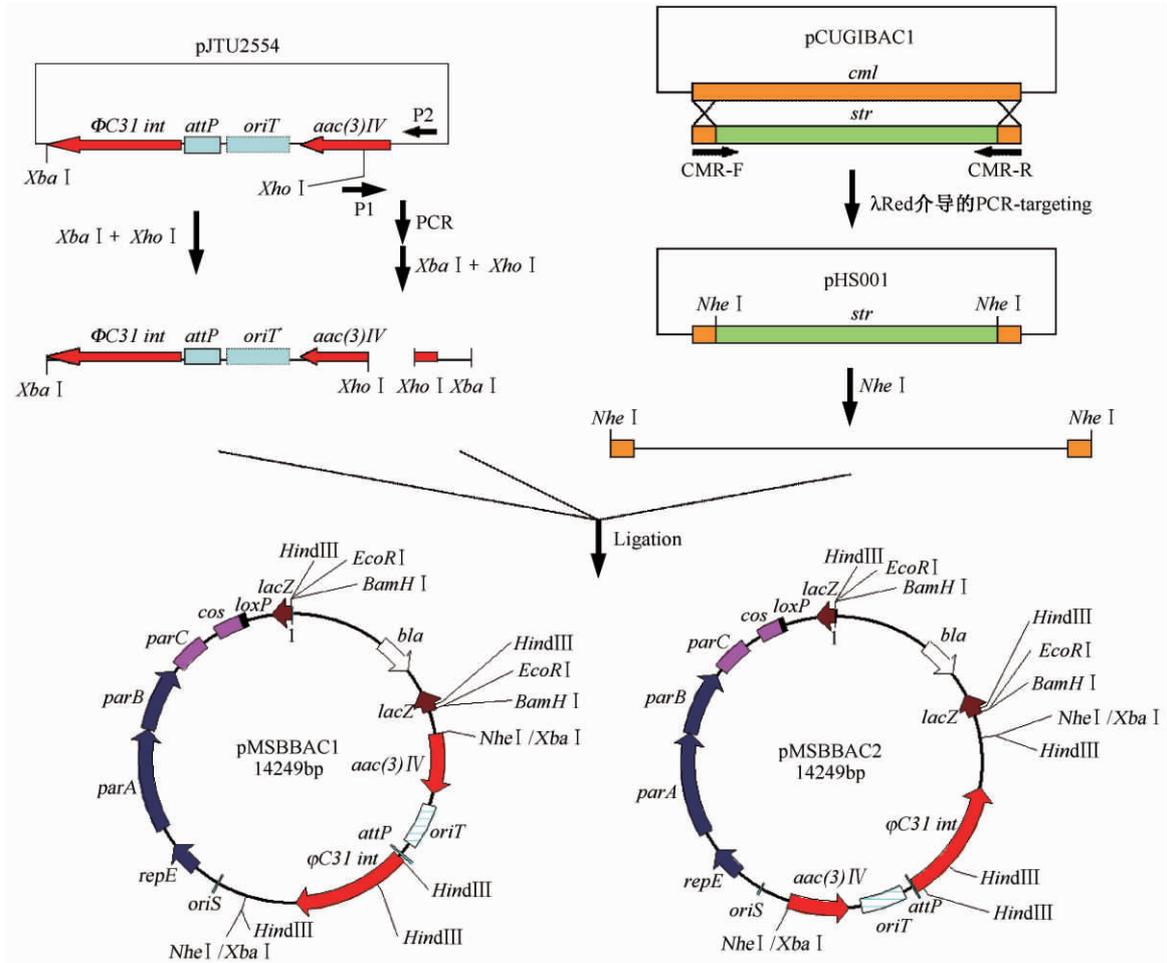


图 1 pMSBBACs 的构建流程图

Fig. 1 Construction of pMSBBACs.

2.2 载体 pMSBBACs 的功能验证

pMSBBACs 含有大肠杆菌高拷贝复制子, 便于大量提取载体 DNA。使用时将高拷贝复制子区切除, 连接上插入片段就可形成低拷贝的 BAC 质粒。在构建 BAC 文库之前, 我们先对载体 pMSBBACs 进行了功能验证, 检测新构建的 BAC 载体所包含的各个元件是否能正常行使功能。通过 *Bam*HI 酶切移除载体高拷贝功能区部分, 自连转化, 得到不含有插入片段的 BAC 质粒 pHS002。抽提质粒 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测 (图 2-A), 发现 pHS002 按照

预期变为低拷贝质粒, 说明新引入的基因操作元件并没有影响 BAC 质粒的形成, 与 BAC 形成相关的元件基本能正常工作。将质粒 pHS002 转化大肠杆菌 S17-1, 以白色链霉菌和变铅青链霉菌 ZX1 为受体菌分别进行接合转移实验, 接合转移效率 (10^{-4} - 10^{-5} 接合子/受体菌) 与阳性对照质粒 pJTU2554 几乎相同。接合子 PCR 验证结果 (图 2-B) 显示, 所有接合子都能扩增出来源于载体的安普拉霉素抗性基因的条带 (588bp), 表明质粒 pHS002 能够通过接合转移进入链霉菌并在其中稳定存在, 载体

pMSBBACs 中与链霉菌遗传操作相关元件能够正常行使功能。

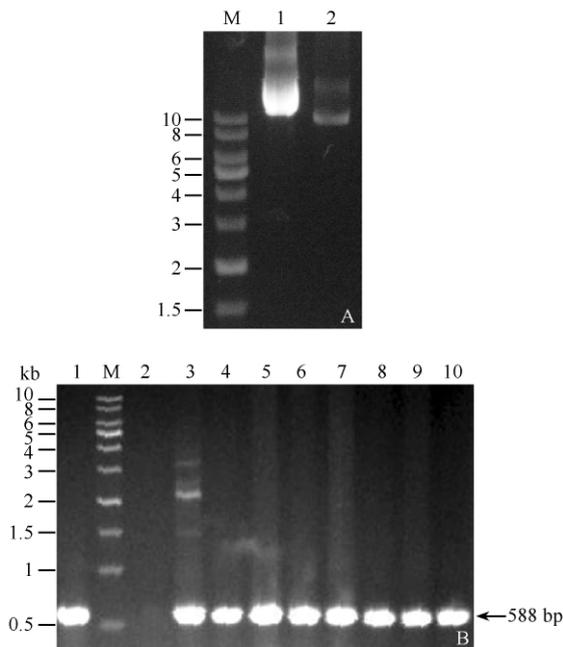


图2 质粒 pHS002DNA 凝胶电泳分析(A) 及其接合子的 PCR 验证(B)

Fig. 2 Electrophoresis analysis of pHS002 DNA and PCR results for confirmation of pHS002 transfer into *Streptomyces albus* by conjugation. (A) pMSBBAC1 (lane 1) and pHS002 (lane 2) DNA were isolated from 4mL overnight culture, dissolved in 20 μ L TE buffer and detected by electrophoresis with the loading volume of 5 μ L. M: 1 kb ladder. (B) Using primers AprF and AprR, the expected 588bp band of apramycin resistance gene was amplified from genomic DNA of putative conjugants (lane 3 - 10) and pHS002 DNA (lane 1, as the positive control), but not from the wild type *Streptomyces albus* (lane 2, as the negative control). Size markers are the 1 kb ladder (lane M).

2.3 BAC 文库的构建及检测

链霉菌 U27 是从土壤中分离得到的具有很强抗细菌抗真菌活性的吸水链霉菌变种,前期研究发现该链霉菌的次生代谢产物非常丰富,基因组中可能含有多个未知的聚酮类和非核糖体多肽类化合物的生物合成基因。为研究其产生的丰富的天然产物,并同时验证 pMSBBACs 载体克隆大片段的能力,选取该链霉菌作为实验对象构建了基因组 BAC 文库。

自制的大肠杆菌感受态效率约为 10^{10} CFU/ μ gDNA(实验质粒为 pOJ260)。BAC 文库转化效率

为 2.5×10^4 转化子/微克 DNA,蓝斑率约为 15/1000。随机挑取 19 个白斑,提取 BAC 质粒后,进行酶切检测(*Hind*III 酶切检测插入片段的大小(图 3-B)),*Bam*HI 酶切验证载体(图 3-A))。文库共包含 2304 个 BAC 质粒,插入片段大小在 90 kb - 130 kb 之间,平均插入片段大小为 100 kb,可覆盖链霉菌基因组(约 8Mb) 28.8 倍。

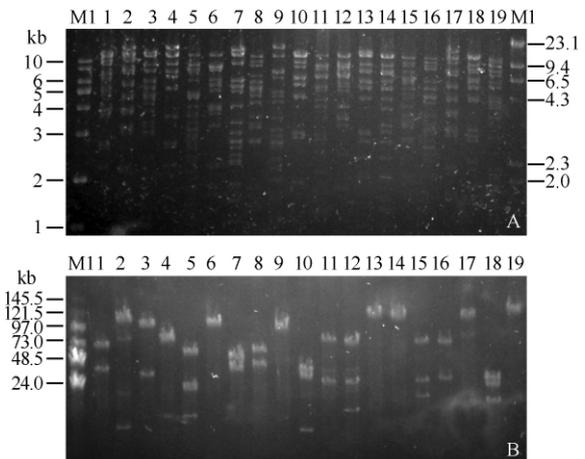


图3 PFGE 检测 BAC 质粒的大小

Fig. 3 PFGE results for analyzing the insert size of clones in the *Streptomyces* U27 genomic BAC library. DNA of 19 randomly selected BAC clones was respectively digested by *Bam*HI (A) and *Hind*III (B). M1: 1 kb DNA ladder; M2: λ DNA/*Hind*III; M3: NEB PFGE MarkerII; 1 - 19: BAC clones/*Bam*HI (A) or *Hind*III (B).

2.4 大型 BAC 质粒接合转移及原生质体转化效率的检测

装载了外源片段的 BAC 质粒都比较大。为了检测大型 BAC 质粒进入链霉菌异源宿主的能力,我们从文库中挑选出一个 140 kb 的 BAC 质粒 pHS003,分别进行了原生质体转化及接合转移实验。以白色链霉菌和变铅青链霉菌 ZX1 为受体菌进行接合转移时,发现与质粒 pHS002 相比,pHS003 的接合转移效率(10^{-5} - 10^{-6} 接合子/受体菌)下降了约 10 倍。在转化变铅青链霉菌 ZX1 的原生质体时,虽然获得了正确的转化子,但转化效率偏低(9 转化子/微克 DNA),与 pHS002 (10^3 转化子/微克 DNA)相比,转化效率下降幅度(>100 倍)比较大。以上结果表明所构建的载体 pMSBBACs 装载了大片段 DNA 后,仍然能够顺利进入异源宿主。

2.5 链霉菌 U27 基因组 BAC 文库的筛选

将链霉菌 U27 基因组 BAC 文库中的质粒,通过

接合转移或原生质体转化的方法分别导入白色链霉菌和变铅青链霉菌 ZX1 中进行异源表达实验, 筛选具有抗细菌 (以 *E. coli* 为指示菌) 或抗真菌 (以 *Saccharomyces cerevisiae* 为指示菌) 活性的接合子或转化子。目前发现 BAC 质粒 1G1、22B10、24F7 在变铅青链霉菌 ZX1 中异源表达时表现出抑制 *E. coli* BL21 的活性。3 株转化子的抗菌谱基本相同, 除了可抑制 *E. coli* BL21 的生长外, 对细菌性条斑病强致病菌株 RH3 (*Xanthomonas oryzae pv oryzicola* strain RH3) 也表现出较好的抑菌效果 (图 4), 但是没有抗真菌的活性。酶切图谱分析发现这 3 个 BAC 质粒中插入的基因组片段大小分别为 120、90 和 97 kb (图 5-B), 存在着较多的重叠片段 (图 5-A), 可能覆盖染色体上某一相同的区域。实验结果说明这些 BAC 质粒上可能含有具有抗细菌活性的天然产物的生物合成基因簇。

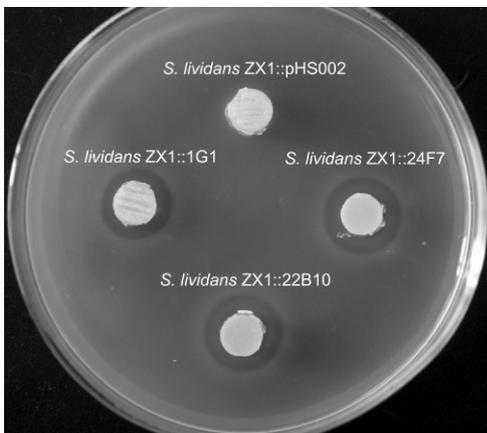


图 4 3 株转化子抗细菌活性的测定

Fig. 4 Determination of the antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae pv oryzicola* strain RH3 of the three *S. lividans* ZX1 transformants respectively from 1G1, 22B10 and 24F7.

3 讨论

本研究所构建的 BAC 载体 pMSBBACs 综合了传统 BAC 载体稳定性好和链霉菌整合型载体的优势。空载体含有大肠杆菌高拷贝质粒的复制子, 方便获得大量的载体 DNA; 含有 $\phi C31$ 整合酶基因及 *attP* 位点, 可通过位点特异性整合将所携带的外源基因插入目标宿主染色体中稳定保留下来; 含有安普拉霉素抗性标记, 在大肠杆菌和链霉菌中都可以

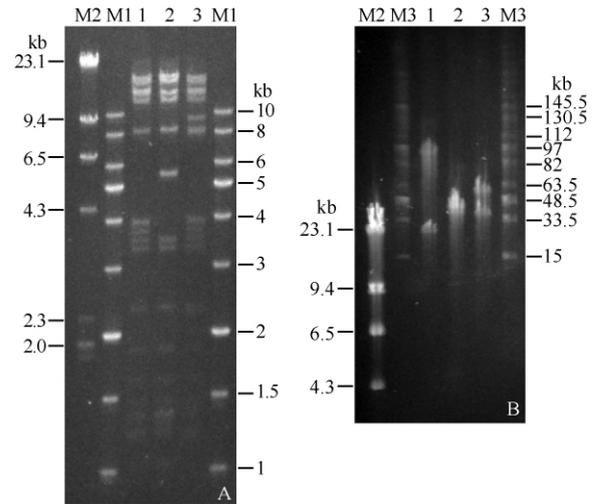


图 5 3 个 BAC 质粒的酶切图谱分析

Fig. 5 PFGE results for analyzing the insert size of 1G1, 22B10 and 24F7 respectively digested by *Bam*HI (A) and *Hind*III (B). M1: 1 kb DNA ladder; M2: λ DNA/*Hind*III; M3: NEB MidRange PFGE MarkerI; 1: 1G1; 2: 22B10; 3: 24F7.

进行筛选; 带有转移起始位点 (*oriT*), 可以在转移功能区 (*transfer*) 的帮助下通过接合转移将大片段 DNA 从大肠杆菌转移到链霉菌中去。接合转移系统可以避开链霉菌严格的限制系统, 操作比较简单, 且转移频率受 DNA 大小影响幅度较小, 更利于大片段 DNA 的操作。

我们通过成功构建链霉菌 U27 的基因组 BAC 文库及文库质量的分析, 证明了载体 pMSBBACs 在大片段克隆及文库构建方面的能力。构建 BAC 文库对实验操作技能要求比较高, 根据我们的经验需要注意如下几个方面: (1) 操作时所使用的器具要尽量洁净无菌, 处理时动作要轻柔, 最大限度减少 gDNA 的降解。(2) 载体的处理是一个关键, 酶切和脱磷酸化处理的好坏直接影响连接效率。载体的空载频率应 < 5%。(3) 回收到的 gDNA 的浓度对文库构建能否成功也十分关键, 在电洗脱时, 往往会出现液体变多, 胶条缩水的现象。所以在装透析袋时要根据胶条的大小适当调整加入透析袋中 TAE 的量 (约 1/7 胶体积), 以尽量小的体积获得洗脱 DNA。gDNA 洗脱出来后尽量放置在冰上或 4℃ 冰箱, 操作时吸管的尖头要去掉, 以减少操作过程中的机械剪切作用。(4) 大肠杆菌感受态细胞的效率对文库的构建也起着决定性的作用, 获取高效感受态细胞是构建好 BAC 文库的关键环节。

对于一些遗传操作比较容易的菌株来说,可以在原宿主体内进行天然产物生物合成的研究。但是对于遗传操作系统困难或难以培养的菌株,甚至是未培养微生物来说,将目标基因(簇)导入遗传背景较为清晰的异源宿主中进行异源表达无疑是最佳的选择。目前最常使用 cosmid 载体系统来进行文库的构建和基因克隆。该系统操作相对比较简单、有商业化的产品,因而得到了广泛的应用,但是 cosmid 载体最大只能承载30-40 kb的插入片段。链霉菌中发现的天然产物生物合成基因簇绝大多数在30-100 kb,特别是I型聚酮合酶基因簇和非核糖体多肽合成酶基因簇往往都大于60 kb^[18-19],远远超过了 cosmid 载体的承载能力。而我们利用载体 pMSBBACs 构建的 BAC 文库的插入片段大小平均就有100 kb,目前观测到的最大插入片段为140 kb。从装载能力的大小看是有可能完整的包含绝大多数的天然产物生物合成基因簇。目前正在继续对链霉菌 U27 的 BAC 文库进行大规模的异源表达及筛选,用以寻找新的天然产物的生物合成基因。

参考文献

- [1] Hopwood DA. Genetic engineering of *Streptomyces* to create hybrid antibiotics. *Current Opinion in Biotechnology*, 1993, 4(5): 531-537.
- [2] Hopwood DA. Cracking the polyketide code. *PLoS Biology*, 2004, 2(2): E35.
- [3] Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(5): 526-531.
- [4] Song JY, Jeong H, Yu DS, Fischbach MA, Park HS, Kim JJ, Seo JS, Jensen SE, Oh TK, Lee KJ, Kim JF. Draft genome sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a producer of diverse secondary metabolites. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(23): 6317-6318.
- [5] 王晓虹, 金黎明. 细菌人工染色体文库的构建及应用. *生物技术通讯 (Letters in Biotechnology)*, 2005, 16(006): 668-671.
- [6] Anderson C. Genome shortcut leads to problems. *Science*, 1993, 259(5102): 1684-1687.
- [7] Zhang HB, Wing RA. Physical mapping of the rice genome with BACs. *Plant Molecular Biology*, 1997, 35(1): 115-127.
- [8] Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(18): 8794.
- [9] Luo M, Wing RA. An improved method for plant BAC library construction. *Methods in Molecular Biology*, 2003, 236: 3-20.
- [10] Bentley S, Chater K, Cerdeno-Tarraga AM, Challis G, Thomson N, James K, Harris D, Quail M, Kieser H, Harper D. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 2002, 417(6885): 141-147.
- [11] Rascher A, Hu Z, Viswanathan N, Schirmer A, Reid R, Nierman WC, Lewis M, Hutchinson CR. Cloning and characterization of a gene cluster for geldanamycin production in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3602. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 218(2): 223-230.
- [12] Penn J, Li X, Whiting A, Latif M, Gibson T, Silva CJ, Brian P, Davies J, Miao V, Wrigley SK. Heterologous production of daptomycin in *Streptomyces lividans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2006, 33(2): 121-128.
- [13] Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2003, 100(4): 1541-1546.
- [14] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical streptomyces genetics. UK: The John Innes Foundation Norwich, 2000.
- [15] Kieser HM, Kieser T, Hopwood DA. A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(17): 5496-5507.
- [16] Peterson DG, Tomkins JP, Frisch DA, Wing RA, Paterson AH. Construction of plant bacterial artificial chromosome (BAC) libraries: an illustrated guide. *Journal of Agricultural Genomics*, 2000, 5: 1-100.
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- [18] Hu YF, Phelan VV, Farnet CM, Zazopoulos E, Bachmann BO. Reassembly of anthramycin biosynthetic gene cluster by using recombinogenic cassettes.

- Chembiochem*, 2008, 9 (10) : 1603-1608.
- [19] Waldron C, Matsushima P, Rosteck PR, Jr., Broughton MC, Turner J, Madduri K, Crawford KP, Merlo DJ, Baltz RH. Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. *Chemistry & Biology*, 2001, 8 (5) : 487-499.

Construction of a new bacterial artificial chromosome (BAC) vector for cloning of large DNA fragments and heterologous expression in *Streptomyces*

Sheng Huang, Na Li, Jun Zhou, Jing He*

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

Abstract: [Objective] Many natural product biosynthetic gene clusters are too large to be entirely cloned into one cosmid for heterologous expression. Because bacterial artificial chromosome (BAC) vectors are well known for their capacity of cloning large DNA fragments, we constructed a new BAC vector for cloning and heterologous expression of natural product biosynthesis gene clusters in *Streptomyces*. [Methods] The chloramphenicol resistance gene on the original BAC vector pCUGIBAC1 was substituted with a streptomycin resistance gene via λ RED-mediated PCR-targeting technique. The streptomycin resistance gene was then excised by digestion with *Nhe*I and the left gap was filled with the origin of transfer (*oriT*), the ϕ C31 integrase gene, the integrating *attP* site, and an apramycin resistance gene. [Results] We achieved the final BAC vector pMSBBACs. To test the newly established vector, pMSBBACs was used to build up a genomic BAC library of *Streptomyces* U27. The average size of inserts in the library is about 100kb. A 140 kb BAC plasmid as a representative was successfully introduced into heterologous hosts, *S. lividans* and *S. albus*, by either conjugation or protoplast transformation. It demonstrated that the BAC plasmids constructed by pMSBBACs could be integrated into chromosomes via site-specific recombination for heterologous expression. [Conclusion] The newly constructed pMSBBACs was verified to be a good BAC vector for cloning of large DNA fragments and heterologous expression in *Streptomyces*.

Keywords: bacterial artificial chromosome (BAC) vector, natural products, biosynthesis gene cluster, *Streptomyces*, heterologous expression

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800020, 30970059), by the New Century Excellent Talents grant from the Ministry of Education of China (NECT-08-0779), by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, (SRF for ROCS, SEM) ([2009]1590) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2009PY006)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87280163; E-mail: hejingj@ yahoo.com

Received : 31 October 2011 / Revised: 22 November 2011