

利迪链霉菌 A02 细菌人工染色体基因组文库的构建

董丹, 吴慧玲, 张涛涛, 刘伟成

北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097

摘要 利迪链霉菌 A02 是从京郊森林土壤中分离筛选出的植物真菌病害高效生防菌, 其活性产物为安全高效广谱的抗真菌剂纳他霉素。为了克隆纳他霉素生物合成基因簇和调控其表达相关的功能基因, 通过基因改良的方式进行 A02 的定向分子改造, 提高纳他霉素的效价和产量, 提取了利迪链霉菌 A02 的基因组 DNA, 用 *Hind*III 和 *Bam*HI 部分酶解后, 回收了 97~194kb 和 48.5~97kb 大小的高分子量 DNA, 与质粒载体 Copycontrol pCC1BAC 连接, 分别构建了含有 800 个和 1500 个克隆的两个 BAC 文库。从文库中随机挑选 20 个克隆, 酶切检测平均插入片段分别为 133kb 和 65kb, 空载率小于 1%, 假定利迪链霉菌的基因组有 8×10⁹kb, 计算文库基因组覆盖率分别为 12.28 倍和 11.25 倍。因此, 从文库筛选到目标片段的概率达 99.99% 以上。

关键词 利迪链霉菌; BAC 文库; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号 Q785

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.25.008

Construction of Bacterial Artificial Chromosome Library of *Streptomyces lydicus* A02

DONG Dan, WU Huiling, ZHANG Taotao, LIU Weicheng

Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract *Streptomyces lydicus* strains A02 is isolated from the soil of suburban vegetable and forest fields in Beijing (China), which is capable of producing natamycin and has proved to be a potential biocontrol agent to several plant fungal diseases. In order to clone the biosynthetic gene clusters and regulate genes of natamycin, the genomic DNA of *Streptomyces lydicus* A02 is extracted and partially digested with *Hind*III and *Bam*HI to increase the yield of natamycin by gene modification, the 97~194kb and 48.5~97kb high molecular weight DNA are extracted and ligated to pCC1BAC. The ligation mixtures were transformed into EPI300 competent cells. A total of 800 and 1500 colonies are obtained by white-blue screening. The analysis of enzyme digestion shows that the average size of the insert fragments are about 133kb and 65kb, and the frequency of clones without inserts is less than 1%. The libraries can cover 12.28 times and 11.25 times of genome if the *Streptomyces lydicus* A02 contains 8Mb chromosome. Therefore, the probability of screening the target fragment from the libraries is more than 99.99%. This BAC library will be an important resource used in gene cloning, the secondary metabolic pathways and new antibiotics.

Keywords *Streptomyces lydicus*; bacterial artificial chromosomes library; pulsed field gel electrophoresis

0 引言

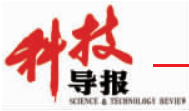
纳他霉素(Natamycin)是一种广谱、高效、低毒的多烯大环内酯类抗生素, 对多种植物病原真菌具有很强的拮抗活性, 能有效地抑制酵母菌和霉菌的生长, 阻止丝状真菌中黄

曲霉毒素的形成^[1,2]。本课题组从北京远郊天然次生林土壤中分离筛选出一株利迪链霉菌(*Streptomyces lydicus*)A02, 合成抗生素纳他霉素。利迪链霉菌通常合成抗生素利迪霉素^[3], 合成纳他霉素为本研究室首次报道^[4]。目前, 利迪链霉菌 A02 经

收稿日期: 2013-04-27; 修回日期: 2013-06-30

基金项目: 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所科研创新基金项目(CXJ12010A03); 北京市科技计划课题(Z121100001212002); 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所科研创新平台项目(CCJZDXM201201-2)

作者简介: 董丹, 助理研究员, 研究方向为微生物分子育种, 电子邮箱: dan20080801@163.com; 刘伟成(通信作者), 研究员, 研究方向为生防微生物资源发掘与利用, 电子邮箱: liuwich@163.com



多次常规理化诱变、筛选和发酵条件的优化,其效价已经大幅度提高,但仍不能满足大规模生产的要求。因此,鉴定和克隆利迪链霉菌 A02 中合成纳他霉素和调控其表达相关的功能基因,并通过基因改良的方式进行 A02 的定向分子改造,以提高纳他霉素的效价及产量变得非常重要。构建利迪链霉菌 A02 的大片段基因组文库是目前鉴定和克隆纳他霉素合成基因簇的一个重要基础。2000 年, Aparicio 等^[1,5]使用纳塔尔链霉菌 (*Streptomyces natalensis*) ATCC27448 黏粒文库 (cosmid library) 和起始于 pimS0 的 DNA 片段,通过基因组步移方法对纳他霉素生物合成基因簇进行了鉴定,一个含 16 个开放读码框,849856p 基因簇的连续 DNA 序列被测定,其 GC 含量占 72.8%,PKS 分配在 5 个巨大的多酶系统 (PIMS0-PIMS4)。BAC 文库与其他文库相比具有容量适中、稳定性好、嵌合率低、容易分离等特点^[6],因此,本研究以利迪链霉菌 A02 为研究材料构建了两个高质量的 BAC 文库,为进行利迪链霉菌基因组测序、生物合成基因簇的图位克隆及功能研究等奠定了一定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

利迪链霉菌 A02 (*Streptomyces lydicus* A02), 本实验室分离、保存。

BAC 载体选用 Copycontrol pCC1BAC, 购自 Epicentre 公司。

感受态选用 TransforMax™ EPI300 *E. coli*, 购自 Epicentre 公司。

1.2 BAC 文库的构建

1.2.1 利迪链霉菌 A02 高分子量 DNA 的制备

1.2.1.1 菌体的培养

浓度为 10^8 /mL 的孢子悬液,以 10% 的接种量接入 50mL A02 种子培养基 (1.75% 葡萄糖,1.5% 蛋白胨,1% 氯化钠,50mL 装液量/500mL 三角瓶)中,29℃,240r/min 摇床培养 24h 后,3000r/min 转速下离心 10min 收集培养液。弃上清液,保留菌丝体。

1.2.1.2 原生质体包埋法

原生质体制备参考王艳婷等^[7]褐黄孢链霉菌原生质体制备的方法,原生质体沉淀用 P 缓冲液^[8]悬浮,血球计数板计数,调整浓度至 10^9 /mL。将原生质体与等体积的 1% 低熔点琼脂糖^[9]混合,注入凝胶片模板,冰上凝固,制备好的琼脂糖凝胶块转移到 5 倍体积的含 1mg/mL 蛋白酶 K 的 NDS buffer (186.1g EDTA·Na₂,20g NaOH,10mL 1mol/L Tris-HCl,10g 月桂酰肌氨酸钠,溶于 900mL 水,3mol/L NaOH 调 pH 值至 9.0,定容至 1000mL)中,50℃ 孵育 24h,期间每 8h 更换 1 次 NDS buffer,再将胶块转移到 10mL 冰预冷的 TE (10mmol/L Tris-HCl,1mmol/L EDTA,含 0.1mmol/L 苯甲基磺酰氟)中,4℃ 放置 1h 以钝化蛋白酶 K,之后用 TE 洗涤胶块 3 次,每次 1h,然后

将琼脂糖凝胶块置于 4℃ 保存备用。

1.2.1.3 菌丝体包埋法

HMW DNA 的提取参考 Kieser 等的方法^[10],并适当改进。收集到的菌丝体悬浮于 5mL TE25 suc buffer (102.7g 蔗糖溶于 900mL 水,加入 25mL 1mol/L Tris-HCl,50mL 0.5mol/L EDTA·Na₂,3mol/L NaOH 调 pH 值至 8.0,定容至 1000mL)中。将上述菌丝体悬浮液与等体积的 1.5% 低熔点琼脂糖^[11]混合,注入凝胶片模板,冰上凝固,将凝固的胶块转移到 5mL 含有 1mg/mL 溶菌酶的 TE25 suc buffer 中,37℃ 孵育 2h,之后转移到 5 倍体积的含 1mg/mL 蛋白酶 K 的 NDS buffer 中,余下步骤同 1.2.1.2 节。

1.2.1.4 胶块质量检测

取 1/8 胶块直接进行脉冲场电泳观察 DNA 片段大小及降解情况,取 1/4 胶块用限制性内切酶酶切 15min 后进行脉冲场电泳观察酶切片段大小。脉冲电泳以 Low Range PFG Marker 和 Lambda Ladder PFG Marker 为标准,电泳条件为:14℃,0.5×TBE (0.045mol/L Tris-硼酸,0.001mol/L EDTA),电压 6V/cm,角度 120°,起始脉冲 15s,终止脉冲 15s,电泳时间 16h。电泳结束后,用 0.5μg/mL EB 水溶液染色,凝胶成像系统检测。

1.2.2 最佳酶切条件的确定

1.2.2.1 确定最适内切酶

不同内切酶对不同物种基因组 DNA 酶切效率不同,选用的内切酶种类会影响 BAC 克隆的代表性,由于后续实验选用了 pCC1BAC 载体,该载体具有 *EcoRI*、*BamHI* 和 *HindIII* 3 种克隆位点,所以使用这 3 种酶分别酶切利迪链霉菌 A02 的基因组 DNA,酶切结束后,向每个离心管加入 1/10 体积的 0.5mol/L EDTA (pH 值 8.0) 终止酶反应,酶切完成后,立即用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 1% 低熔点琼脂糖脉冲电泳确定最适内切酶,脉冲电泳条件同上。

1.2.2.2 部分酶切最佳酶用量的确定

根据上述实验结果,取 7 块胶,将每个胶块用干净的盖玻片切成大小相等的两块,将 14 个半块胶块转移至酶切缓冲液 I (10×Enzyme buffer 100μL,1mol/L Spermidine 100μL,0.1mg/mL BSA 10μL,胶块约 100μL,无菌水补至 1000μL)中,冰上平衡 1h,小心去除缓冲液 I,更换新鲜配制的酶切缓冲液 I,冰上平衡 1h,分别转移到 14 个 1.5mL 的离心管中,每管加入 200μL 酶切缓冲液 II (10×Enzyme buffer 100μL,1mol/L Spermidine 100μL,0.05mg/mL BSA 10μL,胶块约 100μL,无菌水补至 1000μL),向 14 个离心管中分别加入最适内切酶 7.5、10、12.5、15、17.5、20、22.5U,混匀后,冰上平衡 1h,让酶渗入到胶块中,37℃ 酶切。酶切结束后,向每个离心管加入 20μL 0.5mol/L EDTA (pH 8.0) 终止酶反应。酶切完成后,立即加到 1% 的低熔点琼脂糖上进行脉冲电泳分离,确定部分酶切最适酶用量和最适酶切时间。电泳条件如下:12.5℃,0.5×TBE,电压 6V/cm,角度 120°,起始脉冲 5s,终止脉冲 15s,电泳时间 16h。

1.2.3 高分子量 DNA 的大量制备

根据上述最适酶切条件对 A02 胶块进行大量酶切,酶切后立即进行脉冲场电泳,电泳条件同上。电泳结束后切下 Marker 及少量酶切条带,用 EB 染色,然后根据 Marker 选择合适的酶切 DNA 片段,装入已经处理好的透析袋中,进行 DNA 的电洗脱回收。电洗脱条件为:12.5°C,0.5×TBE,电压 6V/cm,角度 120°,起始脉冲 30s,终止脉冲 30s,电泳时间 4h;4h 后,将透析袋水平翻转 180°,电泳 2min,使洗脱下来的高分子量 DNA 脱离透析袋壁,将透析袋放入 500mL 预冷的 0.5×TE 缓冲液中,冰浴透析 1h,重复 1 次,用剪掉尖的大枪头小心地将透析袋中的溶液吸出,浓缩备用。

1.2.4 BAC 载体与大片段 DNA 的连接

连接体系为:BAC 载体 (25ng/μL)25ng,大片段 DNA 100ng,T4 DNA 连接酶 (10U/μL)3μL,10×连接酶缓冲液 10μL,无菌 ddH₂O 补至 100μL,16°C 连接过夜,置于 65°C 恒温器上 5min,使 T4 DNA 连接酶完全失活。连接反应液转至 VSWP 膜上于 1/4 TE 溶液,4°C 透析 3h。

1.2.5 电激转化及阳性克隆的保存

电激转化方法参考 Liu 等方法^[2],系统参数设置为:1.5kV,200Ω,25μF。转化子以单克隆的形式转于 96 孔板中,每孔装 50μL 的含 12.5μg/mL 的氯霉素的 LB 培养液,37°C 培养过夜后,-80°C 保存。

1.2.6 重组克隆的分析

随机挑取 BAC 克隆,分别接种至装有 5mL LB 培养基的试管中(含 12.5μg/mL 的氯霉素),37°C、220r/min 培养过夜。采用碱裂解法提取质粒 DNA,内切酶酶切后进行脉冲电泳检测插入片段大小。根据插入片段计算基因组覆盖率。基因组覆盖率计算公式^[1]: $N = \ln(1-P) / \ln(1 - \frac{I}{GS})$ 。其中,P 为文库覆盖率;I 为 BAC 克隆平均插入片段大小;GS 为基因组 DNA 大小;N 为阳性克隆数。覆盖基因组倍数计算公式^[1]: $W = N \cdot I / GS$ 。其中,W 为覆盖基因组倍数。

2 结果与分析

2.1 BAC 文库的构建

构建高质量 BAC 文库的关键之一是获得高质量的大分子量 DNA。利迪链霉菌 A02 菌丝体经过原生质体分离,去除残余菌丝体后制备得到浓度为 2×10⁹mL 的原生质体液,直接包埋制备而成的大片段 DNA 胶块在脉冲场电泳中大小在 800kb 左右,降解很厉害,菌丝体直接包埋法制备的大片段虽有少量降解,但 DNA 大小集中在 800kb 以上(图 1),与天蓝色链霉菌基因组大小接近 8667507bp^[3]。用 *Hind*III 和 *Bam*HI 对两种 DNA 胶块酶切 15min 后进行脉冲场电泳也表明,菌丝体包埋法制备的 DNA 胶块大片段更集中,小片段干扰小(图 2)。综上,菌丝体直接包埋法制备的 DNA 纯度较高,降解较少,能被限制性内切酶消化,符合构建 BAC 文库的要求。

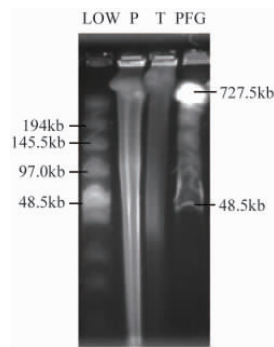


图 1 原生质体包埋法和菌丝体包埋法制备的 DNA 胶块脉冲电泳图

Fig. 1 PFGE of DNA prepared by protoplasts and mycelium embedding methods

注:图中 P 为原生质体包埋法制备的 DNA 胶块;T 为菌丝体包埋法制备的 DNA 胶块;LOW 为低范围脉冲场凝胶电泳标记;PFG 为脉冲场凝胶电泳标记。

Notes: P, protoplasts embedding DNA; T, mycelium embedding DNA; LOW, low range PFG Marker; PFG, lambda ladder PFG Marker.

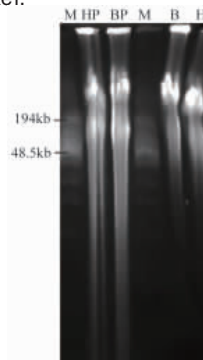


图 2 原生质体包埋法和菌丝体包埋法制备的 DNA 胶块的酶切电泳图

Fig. 2 Protoplasts and mycelium embedding methods for preparation of DNA digestion electrophoresis

注:图中 HP、BP 分别表示 *Hind*III、*Bam*HI 酶切原生质体包埋法 DNA 胶块;H、B 分别表示 *Hind*III、*Bam*HI 酶切菌丝体包埋法胶块;M 表示低范围脉冲场凝胶电泳标记。

Notes: HP, BP, protoplasts embedding DNA with *Hind*III and *Bam*HI; H, B, mycelium embedding DNA with *Hind*III and *Bam*HI; M, low range PFG Marker.

pCC1BAC 载体具有 *Eco*RI、*Bam*HI 和 *Hind*III 3 种克隆位点,使用这 3 种酶分别酶切利迪链霉菌 A02 的基因组 DNA。琼脂糖凝胶电泳表明:A02 中 *Hind*III 酶切位点较少,*Eco*RI 次之,*Bam*HI 最多(图 3);脉冲场凝胶电泳表明:3 种内切酶均可以完全酶切利迪链霉菌 A02 的基因组 DNA(图 4),其中 *Hind*III 酶切片断比较集中,*Bam*HI 片段酶切比较彻底,代表性较强,所以确定最适内切酶为 *Hind*III 和 *Bam*HI。回收 97~194kb 之间片段,*Hind*III 最适酶用量是 20U,最佳酶切时间为 30min;回收 48.5~97kb 之间片段,*Bam*HI 最佳酶用量是 20U,最佳酶切时间为 30min(图 5、图 6)。

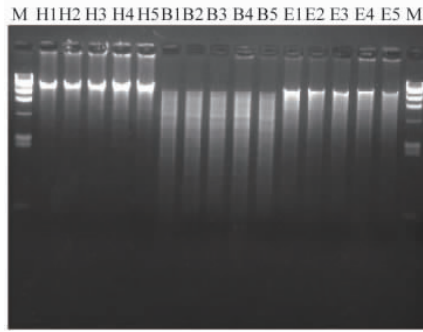
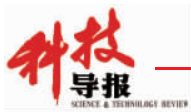


图3 A02 最适内切酶

Fig. 3 Restriction enzyme for A02

注: M, λ HindIII Marker; H1~H5, HindIII 酶切 15min、30min、45min、1h、2h; B1~B5, BamHI 酶切 15min、30min、45min、1h、2h; E1~E5, EcoRI 酶切 15min、30min、45min、1h、2h。

Notes: M, λ Hind III Marker; H1-H5, digested 15min, 30min, 45min, 1h, 2h with HindIII; B1-B5, digested 15min, 30min, 45min, 1h, 2h with BamHI; E1-E5, digested 15min, 30min, 45min, 1h, 2h with EcoRI.

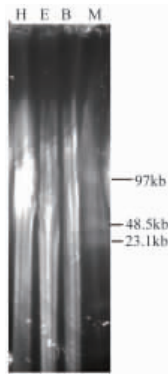


图4 A02 内切酶脉冲电泳图

Fig. 4 PFGE of restriction enzyme for A02

注: H, HindIII; E, EcoRI; B, BamHI; 酶切 2h。M, 低范围脉冲场凝胶电泳标记。

Notes: H, HindIII; E, EcoRI; B, BamHI; digested 2h. M, low range PFG Marker.

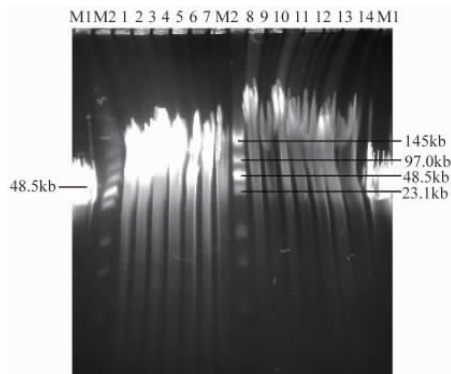


图5 A02 最佳酶用量

Fig. 5 Restriction endonuclease dosages for A02

注: M1, λ DNA; M2, 低范围脉冲场凝胶电泳; 1~7, HindIII 7.5、10、12.5、15、17.5、20、22.5U; 8~14, BamHI 7.5、10、12.5、15、17.5、20、22.5U。

Notes: M1, λ DNA; M2, low range PFG marker; 1-7, HindIII 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5U; 8-14, BamHI 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5U.

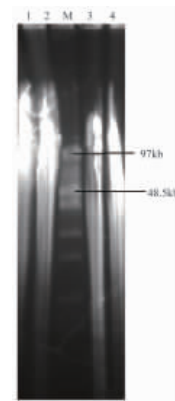


图6 A02 最适酶切时间

Fig. 6 Restriction time for A02

注: M, 低范围脉冲场凝胶电泳标记; 1, HindIII 酶切 30min; 2, HindIII 酶切 1h; 3, BamHI 酶切 15min; 4, BamHI 酶切 30min。

Notes: M, low range PFG Marker; 1, digested 30min with HindIII; 2, digested 1h with HindIII; 3, digested 15min with BamHI; 4, digested 30min with BamHI.

为了提高 BAC 克隆插入片段的大小, 本文采用两次脉冲电泳分离、回收大片段 DNA^[14]。100kb 以上 DNA 按照载体与插入 DNA 质量比 1:4 转化, 电转时电压调整为 1.1kV; 48.5~97kb 按照载体与插入 DNA 质量比 1:8 转化, 电转电压 1.5kV^[15], 转化效率明显提高, HindIII 酶切构建的 BAC 文库获得白色克隆子 800 个, BamHI 酶切构建的 BAC 文库获得白色克隆子 1500 个。

2.2 文库的鉴定

为了鉴定 BAC 文库插入片段大小, 随机挑取 20 个阳性克隆, 提取质粒, 经 HindIII 或 BamHI 酶切, 脉冲场电泳检测 (图 7), 结果发现 HindIII 文库插入片段大小分布在 97~145kb 之间, 平均插入片段大小为 133kb, 空载率小于 1%。假定利迪链霉菌 A02 基因组大小与天蓝色链霉菌基因组大小 (8667507bp)^[13] 相同, 计算出文库覆盖率为 99.99%, 覆盖基因组 12.28 倍; BamHI 文库插入片段大小分布在 45~97kb 之间, 平均插入片段大小为 65kb, 空载率小于 1%, 文库覆盖率 99.99% 以上, 覆盖基因组 11.25 倍。上述表明, 本文构建的 BAC 文库是高质量的。

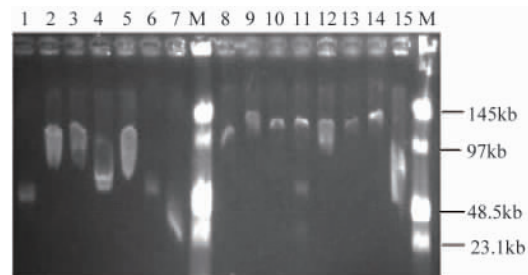


图7 脉冲电泳检测插入片段大小

Fig. 7 PFGE for detecting the size of insert fragment

注: M, 低范围脉冲场凝胶电泳; 1~7, BamHI 酶切; 8~15, HindIII 酶切。

Notes: M, low range PFG Marker; 1-7, digested with BamHI; 8-15, digested with HindIII.

3 讨论

A02 菌株为革兰氏阳性菌,在制备 HMW DNA 时使用了 1mg/mL 的溶菌酶消化细胞壁使 DNA 得以释放。溶菌酶必须在使用 LMP 琼脂糖包埋菌丝体之后加入,若先使用溶菌酶将菌丝体制成原生质体,再用 LMP 琼脂糖包埋,则制备的 HMW DNA 降解很严重,可能是由于链霉菌基因组中存在较多的 S 修饰^[6],没有细胞壁的保护,链霉菌基因组 DNA 容易被氧化而发生降解。

考虑到基因组中特定限制性内切酶的切割位点分布并不随机,并且不同位点的切割效率不同,仅用一种酶切构建的基因组 BAC 文库不可能包含所有的基因组序列,而且 100~200kb 插入片段后续连接难度较大。为提高实验成功率和文库的覆盖率,选用了 *Hind*III 和 *Bam*HI 两种酶进行部分酶切,随着酶量的加大,所得片段逐渐变小,*Hind*III 20U,酶切 30min 时片段大小集中在 97~194kb;*Bam*HI 20U,酶切 30min 时片段大小集中在 48.5~97kb,48kb 左右的克隆能在很大程度上包含候选基因的编码序列和调控序列以及侧翼序列,或可能包含基因簇;97kb 以上序列可以更好的满足染色体步移、图位克隆、物理图谱构建的需要。

评价一个 BAC 文库主要的标准有文库中克隆数量的多少、插入片段的大小、空载率的高低以及基因组的覆盖率等。本研究构建了基于两种酶切位点的 BAC 文库,文库覆盖率均在 99.99% 以上,覆盖基因组 10 倍以上,可以说基本覆盖了利迪链霉菌 A02 的全基因组,从该文库中筛选单拷贝或多拷贝基因的概率几乎为 100%^[7]。

目前国内外还没有对利迪链霉菌进行 BAC 文库的构建,没有利迪链霉菌的全基因组测序的报道,本研究是国内外第 1 次构建利迪链霉菌 BAC 文库,也是国内外第 1 次构建纳他霉素产生菌 BAC 文库,该文库可为利迪链霉菌一些相关研究提供基础,在比较基因组学上有借鉴意义,也可为开展纳他霉素产生菌重要性状基因的图位克隆、基因组测序、功能基因研究等应用提供重要的基因组资源,为纳他霉素产生菌基因改良、分子定向育种奠定基础。

4 结论

以利迪链霉菌 A02 为材料,利用 pCC1BAC 载体和 EPI300 感受态构建了两个 A02 BAC 文库,分别得到 800 个和 1500 个克隆。随机挑取 20 个克隆,测得平均插入片段分别为 133kb 和 65kb,空载率小于 1%,文库基因组覆盖率分别为 12.28 倍和 11.25 倍,从文库筛选到目标片段的概率在 99.99% 以上。

参考文献 (References)

[1] Aparicio J F, Fouces R, Mendes M V, et al. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in

- Streptomyces natalensis*[J]. *Chemistry and Biology*, 2000, 7(11): 895-905.
- [2] Oostendorp J G. Natamycin[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1981, 47(2): 170-171.
- [3] Gomez C, Olano C, Mendez C, et al. Three pathway-specific regulators control streptolydigin biosynthesis in *Streptomyces lydicus*[J]. *Microbiology*, 2012, 158(10): 2504-2518.
- [4] 隋勤,刘伟成,卢彩鸽,等.利迪链霉菌 A02 抗真菌活性产物的分离和结构鉴定[J].*生物工程学报*, 2009, 25(6): 840-846.
Sui Qin, Liu Weicheng, Lu Caige, et al. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(6): 840-846.
- [5] Aparicio J F, Colina A J, Angel J C, et al. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(15): 10133-10139.
- [6] Shizuya H, Bitten B, Kim U J, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector[J]. *PNAS*, 1992, 89(18): 8794-8797.
- [7] 王艳婷,骆健美,王敏.褐黄孢链霉菌原生质体制备与再生[J].*微生物学杂志*, 2008, 28(1): 59-63.
Wang Yanting, Luo Jianmei, Wang Min. *Journal of Microbiology*, 2008, 28(1): 59-63.
- [8] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F, et al. *General manipulation of streptomyces: A laboratory manual*[M]. Norwich: John Innes Foundation Press, 1985.
- [9] Rosa A, Simona G, Dolce L, et al. Artificial chromosome libraries of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Planobispora rosea* 1 [J]. *FEMS Microbiology*, 2003, 218(1): 181-186.
- [10] Kieser M, Kieser T, Hopwood D. A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome [J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(17): 5496-5507.
- [11] 王万群.武夷菌素产生菌 CK-15 细菌人工染色体(BAC)文库构建[D].北京:中国农业科学院, 2008.
Wang Wanqun. *Construction of BAC genomic library of Streptomyces albulus var. Wuyiensis CK-15* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008.
- [12] Liu Y G, Liu H M, Chen L T, et al. Development of new transformation-competent artificial chromosome vectors and rice genomic libraries for efficient gene cloning[J]. *Gene*, 2002, 282(1-2): 247-255.
- [13] Bentley S D, Chater K F. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Nature*, 2002, 417(6885): 141-147.
- [14] Strong S J, Ohta Y, Litman G W, et al. Marked improvement of PAC and BAC cloning is achieved using electroelution of pulsed-field-gel-separated partial digests of genomic DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(19): 3959-3961.
- [15] 耿士忠,潘志明,张玉红.细菌人工染色体基因组文库构建方法的改进[J].*生物技术通讯*, 2006, 17(5): 728-730.
Geng Shizhong, Pan Zhiming, Zhang Yuhong. *Letters in Biotechnology*, 2006, 17(5): 728-730.
- [16] Zhou X F, He X Y, Liang J D, et al. A novel DNA modification by sulphur[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(5): 1428-1438.
- [17] Baker A, Cotton M. Delivery of bacterial artificial chromosomes into mammalian cells with psoralen-inactivated adenovirus carrier [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(10): 1950-1957.

(责任编辑 吴晓丽)