

# 灰红链霉菌 AL7 基因组文库 及异源表达文库的构建

刘培<sup>1</sup> 俞燕飞<sup>1</sup> 陶美凤<sup>1,2</sup>

1. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070;

2. 上海交通大学生命科学技术学院/微生物代谢国家重点实验室, 上海 200030

**摘要** 灰红链霉菌 AL7 对多种植物病原真菌和细菌都具有明显的抑菌活性。本研究在通用的大肠杆菌克隆宿主基础上, 构建获得 Dcm 甲基化缺陷菌株, 再引入接合转移辅助质粒 pUZ8002 得到菌株 LP3。以 LP3 为宿主构建灰红链霉菌 AL7 的基因组粘粒文库, 平均插入片段大小 40 kb。用高通量接合转移的方法将文库转到变铅青链霉菌 TK24 中, 得到了异源表达文库, 并从表达文库中初筛获得一些表型特异的克隆, 如光秃表型、产素提前表型、产孢提前表型等。

**关键词** 灰红链霉菌 AL7; 基因组文库; 高通量接合转移; 异源表达; 甲基化缺陷菌株

**中图分类号** S 476.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)05-0547-06

链霉菌是重要的抗生素产生菌, 能够通过次级代谢途径合成各种结构和活性多样的小分子化合物, 广泛用作医药、农药和兽药<sup>[1-2]</sup>。随着更多耐药病菌的出现, 对微生物新药的需求日益增多, 如何有效地从链霉菌中筛选出新的化合物、新基因簇以及调控链霉菌分化和次级代谢的新功能基因, 成为新药筛选和研发的关键瓶颈<sup>[3]</sup>。

针对通用的链霉菌基因克隆、异源表达工具和方法的各个环节的缺陷, 笔者所在课题组开展了系统的研究和改造, 对大容量克隆宿主 DH10B、基因组粘粒文库宿主 XL1-Blue MR 进行了优化改造, 并在前人基础上建立了高通量接合转移和异源表达新方法, 应用于棒状链霉菌和毒三素链霉菌功能基因的克隆<sup>[4-5]</sup>。

灰红链霉菌 *Streptomyces griseoruber* CCTCC AA94052(代号 AL7) 是分离自湖北省神农架小当阳地区土壤样品的链霉菌菌株, 对多种植物病原真菌和细菌具有良好的生物活性。

本研究进一步优化克隆宿主 XL1-Blue MR, 用改造的宿主构建灰红链霉菌 AL7 的基因组粘粒文库, 并利用高通量接合转移方法构建异源表达文库, 为后续的功能基因筛选奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1) 菌株、质粒和引物。本研究用到的菌株和质粒见表 1。引物均来自文献<sup>[5]</sup>。

2) 培养条件。大肠杆菌培养基为 LB<sup>[6]</sup>, 于 37 °C 培养; 灰红链霉菌 AL7 液体培养基为 YEME<sup>[8]</sup>, 固体培养基为 MS<sup>[8]</sup>, 于 30 °C 培养; 用于大肠杆菌与链霉菌接合转移培养基为 MS; 2 × YT<sup>[6]</sup> 用于接合转移过程中孢子热激处理; 链霉菌固体发酵培养基为 MS、NA<sup>[12]</sup> 和 R5<sup>[8]</sup>。

3) 抗生素。在大肠杆菌中抗生素使用质量浓度为 50 mg/L 卡那霉素、25 mg/L 氯霉素、50 mg/L 阿泊拉霉素、100 mg/L 壮观霉素; 链霉菌接合转移子筛选用 50 mg/L 阿泊拉霉素; 接合转移平板另外覆盖 50 mg/L 三甲氧苄氨嘧啶 (trimethoprim, TMP) 用于抑制大肠杆菌供体菌。

### 1.2 dcm 基因置换

通过 PCR-targeting 技术<sup>[9]</sup>, 将大肠杆菌 XL1-Blue MR 中 *dcm* 读码框内 762 bp 序列置换成壮观霉素抗性基因 (*aadA*)。用于 PCR-targeting 的引物 *dcmaadAf*、*dcmaadAr* 以及用于验证 *dcm* 基因置换

收稿日期: 2011-05-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870073)

刘培, 硕士研究生, 研究方向: 链霉菌分子生物学. E-mail: liupeio534@yahoo. cn

通讯作者: 陶美凤, 研究员. 研究方向: 链霉菌分子生物学. E-mail: tao\_meifeng@sjtu. edu. cn

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Characteristics	来源 Source
<b>大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	$\Delta lacU169(\Phi 80lacZ\Delta M15) recA1$	[6]
ET12567/pUZ8002	<i>dam13::Tn9 dcm6 hsdM hsdR ara lacY recF zjj::Tn10 rpsL galK galT xyl leuB thi tonA hisG tsx mtlI glnV</i>	[7]
XL1-Blue MR	$\Delta mcrA \Delta (mrr-hsdRMSmc rBC) lac recA1 endA1 gyrA (Nd^R) relA supE44 thi1$	Stratagene
LP3	XL1-Blue MR $\Delta dcm$ , 带有质粒 pUZ8002 XL1-Blue MR $\Delta dcm$ with pUZ8002	本研究 This study
<b>链霉菌属 <i>Streptomyces</i></b>		
灰红链霉菌 AL7	野生型 Wild type	武汉大学 CCTCC
<i>S. griseoruber</i> AL7		CCTCC of Wuhan University
天蓝色链霉菌 M145	野生型 Wild type	[8]
<i>S. coelicolor</i> M145		
天蓝色链霉菌 YF11	<i>S. coelicolor</i> M145 衍生菌株, $\Delta act \Delta redL$	俞燕飞, 未发表
<i>S. coelicolor</i> YF11	<i>S. coelicolor</i> M145 derivative $\Delta act \Delta redL$	YU Yan-fei, unpublished
变铅青链霉菌 TK24	野生型, SLP2 <sup>-</sup> SLP3 <sup>-</sup> Wild type, SLP2 <sup>-</sup> SLP3 <sup>-</sup>	[8]
<i>S. lividans</i> TK24		
<b>质粒 Plasmids</b>		
pIJ790	<i>Cat</i> (Cm <sup>R</sup> ), <i>repA101</i> 温敏型复制子, 受 <i>ara</i> 操纵子调控的 $\lambda$ -RED 重组酶基因 ( <i>exo.bet, gam</i> ) <i>Cat</i> (Cm <sup>R</sup> ), <i>repA101</i> (ts), <i>araB<math>\beta</math>-gam-be-exo</i>	[9]
pMM1	pSET152 衍生质粒, 包含放线紫红素基因簇 pSET152 derivative carrying <i>act</i>	王业民, 未发表 WANG Ye-min, unpublished
pJTU2554	pSET152 衍生质粒, 带有 <i>cos</i> 位点 pSET152 derivative carrying <i>cos</i> sites	[10]
pUZ8002	Km <sup>R</sup> Tet <sup>R</sup> , 不能自我转移的 RK2 衍生质粒, 能诱导 <i>oriT</i> 质粒接合转移 Km <sup>R</sup> Tet <sup>R</sup> , RK2 derivative which is not self-transmissible but can mobilise other <i>oriT</i> plasmids efficiently	[11]
pIJ4642	<i>aadA</i>	[8]

引物 *dcmout1, dcmout4* 均参照文献[5]进行。

### 1.3 链霉菌的培养和总 DNA 的提取

链霉菌培养、总 DNA 提取、大肠杆菌与链霉菌属间接合转移等基本操作参照文献[8]进行。

### 1.4 灰红链霉菌 AL7 cosmid 基因组文库的构建

1) 载体的处理。以 pJTU2554 为建库载体。提取 pJTU2554 质粒 25  $\mu\text{g}$  以上, *Hpa* I 完全酶切后, 琼脂糖凝胶电泳, 切下目标片段, 用 DNA 回收试剂盒回收。回收产物用 FastDigest Ap 去磷酸化, 沉淀纯化。再用 *Bam*H I 完全酶切, 沉淀纯化, 溶于适量 TE, 使 DNA 质量浓度达到 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2) 基因组 DNA 的处理。基因组 DNA 用 *Sau*3A I 部分酶切, 用 1% 的低熔点琼脂糖进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)分离, 设置参数为 120°, 转换时间 1~6 s, 电压 6 V/cm, 电泳时间 15 h, 缓冲液温度 14 °C。在凝胶的两侧切下胶条用 EB 染色, 根据 DNA Marker 的位置在 DNA 片段大小约 60 kb 处做记号, 在未染色凝胶的相应位置切下约 1 cm 宽的含总 DNA 的胶条。琼脂糖酶处理溶解低熔点琼脂糖, 沉淀 DNA, 溶于适量 TE 使 DNA 质量浓度达

1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 进行去磷酸化处理, 37 °C 水浴 15 min, 75 °C 热失活 10 min。

3) 连接与包装。按 CopyControl Kit (EPI-CENTER) 说明书的连接体系, 连接处理好的总 DNA 和 pJTU2554 载体, 16 °C 处理 2 h 以上, 可过夜。将 10  $\mu\text{L}$  酶连体系加入到 25  $\mu\text{L}$  包装蛋白中, 轻轻混匀避免产生气泡, 30 °C 水浴 90 min。再将剩下的 25  $\mu\text{L}$  包装蛋白加入, 30 °C 水浴 90 min。用 PDB buffer (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 将包装产物定容至 1 mL。加入 25  $\mu\text{L}$  氯仿, 颠倒混匀后 4 °C 保存。

4) 转染。接种大肠杆菌宿主单菌落至 5 mL LB (含有 10 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 和 0.2% 麦芽糖) 中, 37 °C 过夜培养。1 : 100 转接到 50 mL LB (含有 10 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 和 0.2% 麦芽糖) 中, 37 °C 振荡培养至  $D_{600\text{nm}}$  接近 1.0。收集菌体, 用 10 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 悬浮, 至  $D_{600\text{nm}}$  约为 1.0, 4 °C 保存。预转染 3 管, 25  $\mu\text{L}$  菌悬液混合 25  $\mu\text{L}$  包装产物, 室温放置 30 min。加入 200  $\mu\text{L}$  LB, 37 °C 水浴 45 min, 每隔

15 min 轻轻摇匀 1 次。离心菌悬液,用 50  $\mu$ L LB 重新悬浮。将菌悬液涂布在含有阿泊拉霉素及卡那霉素的 LA 抗性平板上,37  $^{\circ}$ C 培养过夜。对长出的克隆计数,计算所有的包装产物能长出多少克隆。随机挑取 20 个克隆,抽质粒,用 *Bam*H I 酶切,计算文库平均插入片段的大小。计算达到 99% 的完备性并覆盖整个基因组 2 遍所需的克隆数,计算公式为: $N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f)$ ,其中  $N$  代表基因组文库克隆总数, $P$  为所需机率, $f$  为平均插入片段与基因组 DNA 长度之比。

按照同上的方法大量转染,挑取长出的克隆,置于 300  $\mu$ L 96 孔浅孔板中,每个孔中装有 120  $\mu$ L 含有阿泊拉霉素及卡那霉素的 LB 培养基。37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,向每个孔中加入等体积的 40% 甘油,混匀,文库置 -70  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.5 基因组文库的高通量接合转移

基因组文库的高通量接合转移参照文献[3]进行。接种灰红链霉菌 AL7 的 cosmid 基因组文库于 300  $\mu$ L 96 孔浅孔板,每孔加 120  $\mu$ L 含有阿泊拉霉素及卡那霉素的 LB 培养基,接种 20  $\mu$ L 菌种。37  $^{\circ}$ C 振荡培养 6~8 h,至  $D_{600\text{nm}}$  接近 0.6。3 500 r/min 离心 5 min,吸除上清,余 15  $\mu$ L 左右的菌液。用无菌棉签收集 MS 平板上已经产孢的链霉菌孢子,用无菌水打散,离心去上清,加适量 2 $\times$ YT 悬浮孢子,50  $^{\circ}$ C 热激 10 min。将热激好的孢子倒入无菌平板中,每孔用排枪加 35  $\mu$ L 到上述 96 孔板中,保证每孔约  $10^5$  个孢子。悬液约 50  $\mu$ L 即为孢子和大肠杆菌的混合液。用 48 孔复制器蘸取孢子和大肠杆菌的混合液,印在 MS 接合转移平板上。在每块

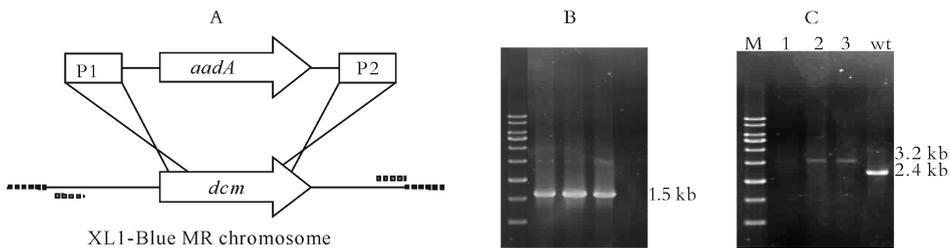
平板剩余空白处滴加 1 滴热激处理过的孢子液作阴性对照。30  $^{\circ}$ C 温箱培养 12~16 h。用 2 mL 含有阿泊拉霉素和三甲氧苄啶的无菌水覆盖接合转移平板。30  $^{\circ}$ C 继续培养 2~7 d,即可观察到接合转移子。接合转移子产孢后,用复制器转印到含有阿泊拉霉素和三甲氧苄啶的 MS 平板上进行抗性验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 大肠杆菌克隆宿主的优化

通用的 cosmid 文库克隆宿主 XL1-Blue MR 对 DNA 具有甲基化作用,也不能直接用于大肠杆菌接合转移,对上述 2 个缺点分别进行如下优化。首先,采用 PCR-targeting 方法用壮观霉素/链霉素抗性基因 *aadA* 置换 XL1-Blue MR 中的甲基化基因 *dcm* 读码框第 139 个碱基开始的 762 bp 片段。2 条引物(*dcmaadAf*、*dcmaadAr*)5' 端的 45 bp 序列与 *dcm* 待敲除区域两侧序列同源,引物 3' 端序列与 pIJ4642 中侧翼序列互补<sup>[5]</sup>。以 *dcmaadAf/dcmaadAr* 为引物,以 pIJ4642 的酶切回收片段为模板,扩增 *aadA* 片段,获得 1 558 bp 扩增产物。电转入 XL1-Blue MR/pIJ790 感受态,用壮观霉素在 37  $^{\circ}$ C 进行筛选,得到壮观霉素抗性( $\text{Sp}^{\text{cR}}$ )菌株,并通过菌落 PCR 验证基因置换(图 1-B,C),得到 *dcm* 缺失菌株 XL1-Blue MR  $\Delta dcm$ 。

将 RK2 衍生的接合转移辅助质粒 pUZ8002 转化到上述菌株,得到 *Dcm* 甲基化缺陷且可以直接介导接合转移的克隆宿主 XL1-Blue MR  $\Delta dcm$ /pUZ8002,命名为 LP3。



A. XL1-Blue MR 染色体 *dcm* 基因置换示意图,P1 和 P2 分别为 *dcm* 上游和下游 45 bp 同源片段,虚线表示引物 *dcmtout1* 和 *dcmtout4* 的位置 Schematic showing of the replacement of *dcm* by *aadA* in the XL1-Blue MR chromosome. P1 and P2 represent the 45 bp homologous fragments. Dashed lines represent primer *dcmtout1* and *dcmtout4*; B. 引物 *dcmaadAf* 和 *dcmaadAr* 进行 PCR 验证 *dcm* 区域 PCR amplification of the *dcm* region by primer *dcmaadAf* and *dcmaadAr*; C. 引物 *dcmtout1* 和 *dcmtout4* 进行 PCR 验证 *dcm* 区域; 1,2,3:XL1-Blue MR  $\Delta dcm$ ; wt:XL1-Blue MR; M:1 kb DNA ladder (Invitrogen). PCR amplification of the *dcm* region by primer *dcmtout1* and *dcmtout4*. 1,2,3:XL1-Blue MR  $\Delta dcm$ ; wt:XL1-Blue MR; M:1 kb DNA ladder (Invitrogen).

图 1 *dcm* 基因置换

Fig. 1 *dcm* gene replacement

## 2.2 大肠杆菌克隆宿主的功能验证

以 pMM1 的接合转移来测试 LP3 的甲基化缺陷及其诱动接合转移的功能。pMM1 (45 kb) 是 pSET152 的衍生质粒, 含有接合转移顺式元件 *oriT*、阿泊拉霉素抗性基因 *aac(3)IV*、来自噬菌体  $\phi$ C31 的链霉菌染色体整合功能区 *int/attP* 以及完整的放线紫红素生物合成基因簇。放线紫红素是一种聚酮类抗生素, 在碱性条件下呈蓝色, 在酸性条件下呈红色, 通过蓝色放线紫红素的合成可以判断质粒是否完整地进入接合转移子中。将 pMM1 质粒转化到大肠杆菌 LP3 作为供体菌, 以放线紫红素生物合成缺陷的天蓝色链霉菌 YF11 为受体菌, 测试接合转移效率, 结果表明 LP3 可以有效地将大质粒 pMM1 接合到 YF11; 接合转移效率比 *dcm<sup>-</sup>dam<sup>-</sup>* 供体菌株 ET12567/pUZ8002 低 50 倍。88.5% 的天蓝色链霉菌接合子能够恢复合成放线紫红素, 表明大多数接合子接受了完整的 pMM1。对于无甲基化限制的变铅青链霉菌, LP3 接合转移效率与 ET12567/pUZ8002 相近。

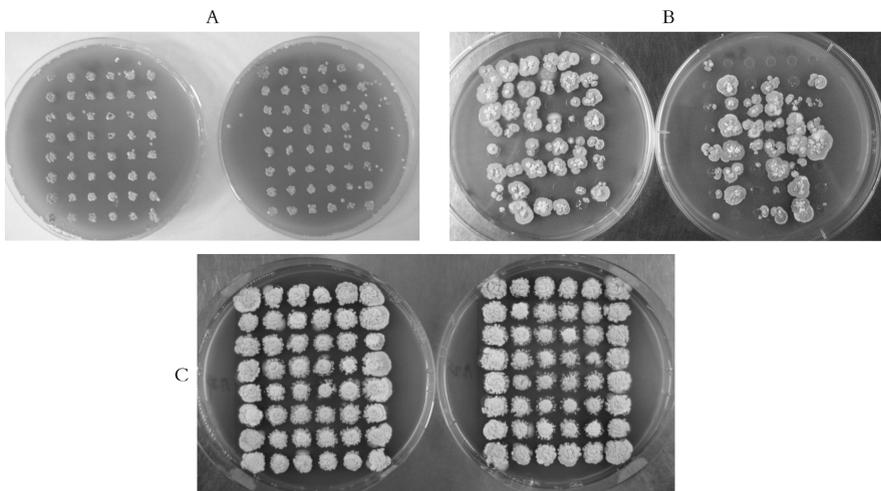
## 2.3 高质量灰红链霉菌基因组文库的构建

$\lambda$ 噬菌体包装片段长度有一定的选择范围, 一般载体加外源片段长度为 35~53 kb, 为尽可能提高插入片段长度, 以提高中等大小基因簇完整克隆的机率。灰红链霉菌总 DNA 经部分酶切后, 采用 3 轮脉冲电泳回收的方法纯化合适大小的片段, 去磷

酸化处理后与载体连接, 然后包装、转染, 得到灰红链霉菌 cosmid 基因组文库。随机挑取 40 个粘粒, 酶切跑胶分离, 根据酶切片段估算平均插入片段长 40 kb, 其中 20 个粘粒插入片段  $\geq 40$  kb, 最大插入片段约为 46 kb。计算达到 99% 的完备性并覆盖整个基因组 1 遍所需的克隆数为 1 062, 共需挑取 2 124 个克隆保存。

## 2.4 异源表达文库的构建及特殊表型表达的筛选

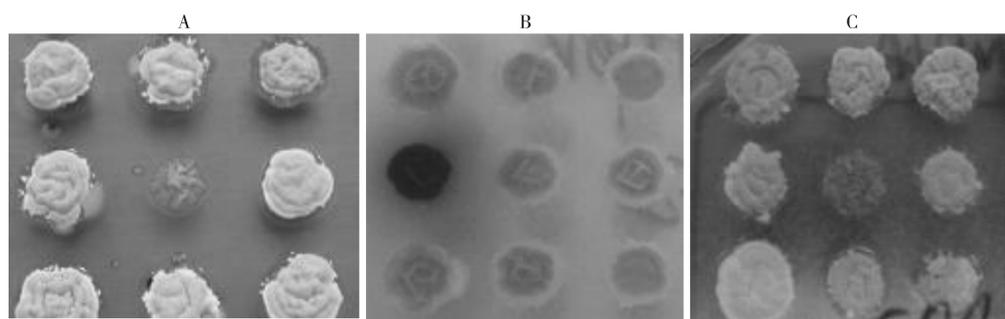
采用转接在 1 块 96 孔板的文库克隆尝试进行高通量接合转移, 受体菌分别为天蓝色链霉菌 M145、YF11 和变铅青链霉菌 TK24。如图 2 所示, 在 M145 和 TK24 为受体的接合转移板上, 所有克隆均得到接合子; 而 YF11 为受体菌的试验中, 36 个克隆 (占 38%) 没有得到生长良好的接合子。因此, 选用接合转移效率较高的变铅青链霉菌 TK24 作为文库异源表达宿主。将 50 块 96 孔板的粘粒文库克隆全部高通量接合转移到变铅青链霉菌 TK24 中, 接合转移子经抗性验证后转印到含有阿泊拉霉素的 MS 平板上保存, 构建获得变铅青链霉菌 TK24 为宿主的异源表达文库。表达文库在 MS 平板进行抗性验证的过程中观察表型变化, 有的接合子表现光秃表型 (图 3-A), 有的接合子提前产放线紫红素而变深蓝色 (图 3-B), 有的接合子产孢提前 (图 3-C)。



A: 天蓝色链霉菌 M145 为受体 *S. coelicolor* M145 as the conjugation receiver; B: 天蓝色链霉菌 YF11 为受体 *S. coelicolor* YF11 as the conjugation receiver; C: 变铅青链霉菌 TK24 为受体 *S. lividians* TK24 as the conjugation receiver.

图 2 文库高通量接合转移

Fig. 2 High-throughput conjugation of the library



A: 光秃表型(24G9) Bald phenotype(24G9); B: 产素提前(21E12) Precocious antibiotic production(21E12); C: 产孢提前(22B2) Precocious sporulation(22B2).

图3 部分代表性的特殊表型表达克隆

Fig. 3 Some representative clones with specific phenotypes

### 3 讨论

本研究对常用于构建基因组粘粒文库的大肠杆菌菌株 XL1-Blue MR 进行了两个方面的优化,即敲除 DNA 甲基化基因 *dcm* 以及引入接合转移辅助质粒 pUZ8002。获得的新宿主菌 LP3 含有 pUZ8002 辅助质粒,可以直接作接合转移供体,而不需要先从文库克隆中提取粘粒 DNA,转化到 ET12567/pUZ8002 中再进行接合转移;LP3 是 Dcm 甲基化缺陷菌株,和 XL1-Blue MR/pUZ8002 相比,可以向甲基化限制的链霉菌宿主(如天蓝色链霉菌、阿维链霉菌等)做接合转移,拓宽了表达宿主的选择范围,为基因簇的成功克隆表达提供了 1 个高效有利的工具。因此,采用 LP3 构建链霉菌基因组文库有 2 个优势:一是文库克隆可以直接用作接合转移的供体,从而方便异源表达文库的构建;二是文库除了可以转移到无限制性的链霉菌表达宿主外,也可以转移到限制性宿主菌中。LP3 菌株还存在着待改进的地方。由于 *dam* 基因没有敲除掉,仍有甲基化修饰作用,虽然可以向甲基化限制的链霉菌宿主做接合转移,但和 ET12567/pUZ8002 相比,接合转移效率较低,操作大规模接合转移时需在一定程度上加大工作量。可对其阿拉伯糖操纵子进行改造,进而敲除 *dam* 基因,构建甲基化缺陷的 XL1-Blue MR 衍生菌,弥补接合转移效率的不足。另外,游离的 pUZ8002 会对质粒的提取、酶切产生干扰,尤其是影响测序质量。将 pUZ8002 整合到染色体上是一种理想的方案。敲除 *dcm* 留下的抗性基因会影响克隆策略,不利于在文库克隆宿主中直接进行遗传改造,可以通过合理的遗传方法将抗性基因除去,减

少其抗性背景。

本研究采用 LP3 成功构建了高质量的灰红链霉菌基因组文库,并以变铅青链霉菌为受体构建异源表达文库,从文库中筛选获得多种表型变化的克隆,为进一步研究抗生素合成的调控奠定基础。

### 参 考 文 献

- [1] BERDY J. Bioactive microbial metabolites[J]. *Antibiot*, 2005, 58(1):1-26.
- [2] 吴竹华,王明艳,何璟. 吸水链霉菌 ATCC 29253 产 Hygrocin 的条件优化[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(22):4596-4600.
- [3] WALSH C T, FISCHBACH M A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules[J]. *Am Chem Soc*, 2010, 132(8): 2469-2493.
- [4] 陈黎. 高通量异源表达技术及其在链霉菌次级代谢调控研究中的应用[D]. 武汉:华中农业大学图书馆, 2011.
- [5] 周豪. 限制修饰缺失大肠杆菌的构建及其在微生物次级代谢研究中的应用[D]. 上海:上海交通大学图书馆, 2011.
- [6] SAMBROOK J, RUSSELL D. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [7] MACNEIL D J, GEWAIN K M, RUBY C L, et al. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector[J]. *Gene*, 1992, 111:61-68.
- [8] KIESER T, BIBB M, BUTTNER M, et al. *Practical Streptomyces genetics: a laboratory manual*[M]. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [9] GUST B, CHALLIS G L, FOWLER K, et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:1541-1546.
- [10] LI L, XU Z, XU X, et al. The mildiomycin biosynthesis: initial

steps for sequential generation of 5-hydroxymethylcytidine 5'-monophosphate and 5-hydroxymethylcytosine in *Streptococcus rimofaciens* ZJU5119[J]. *ChemBiochem*, 2008, 9: 1286-1294.

[11] FLETT F, MERSINIAS V, SMITH C P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia*

*coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 155: 223-229.

[12] FARNET C M, MCALPINE J B, BACHMANN B O, et al. System, knowledge repository and computer-readable medium for identifying a secondary metabolite from a microorganism: USA, US 2008/0010025 A1[P]. 2008-01-10.

## Construction of genomic library and heterologous expression library of *Streptomyces griseoruber* AL7

LIU Pei<sup>1</sup> YU Yan-fei<sup>1</sup> TAO Mei-feng<sup>1,2</sup>

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

2. State Key Laboratory of Microbial Metabolism/School of Life Science and Biotechnology,  
Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China

**Abstract** *Streptomyces griseoruber* AL7 has been shown to display strong bioactivity against various plant pathogenic fungi and bacteria. The *Escherichia coli* was modified to clone host XL1-Blue MR to yield LP3, a new cloning host strain holding a Dcm DNA methylation deficient mutation and the conjugation helper plasmid pUZ8002. LP3 was used to construct the *S. griseoruber* AL7 genomic cosmid library with an average insert size of 40 kb. The cosmid library was then transformed into *S. lividans* TK24 via high-throughput conjugation to yield a heterologous expression library. A few expression clones with interesting phenotype were obtained, such as bald phenotype, precocious antibiotic production phenotype, precocious sporulation phenotype and so on.

**Key words** *Streptomyces griseoruber* AL7; genomic library; high-throughput conjugation; heterologous expression; methylation deficient strains

(责任编辑:陆文昌)