

阿维链霉菌 BAC 文库的构建及分析

刘家栋 王革娇 罗美中

华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

摘要 为进一步阐明阿维菌素的生物合成路径和调控途径, 提高阿维菌素的产量, 采用 *Bam*HI 限制性内切酶解阿维链霉菌基因组 DNA 的方法, 构建了阿维链霉菌的细菌人工染色体(BAC)文库。该文库共包含 2 304 个克隆, 平均插入片段为 101 kb, 空载率约 9%, 覆盖了该菌基因组的 25.9 倍。该文库的成功构建可以为其他微生物尤其是基因组具有磷硫酰化修饰的微生物的文库构建提供参考。

关键词 阿维链霉菌; 阿维菌素; 大片段 DNA; 细菌人工染色体(BAC); DNA 的磷硫酰化修饰

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)05-0045-06

阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)是日本北里研究所于 1975 年从日本静冈县的 1 份土壤样品中分离得到并且命名的一种链霉菌。同大多数链霉菌一样, 该菌也产生多种次级代谢产物。1976 年, 美国 Merck 公司的科学家从中分离出了一组具有生物活性的物质, 命名为阿维菌素(avermeectins), 并将其开发为兽药投放市场^[1]。阿维链霉菌发酵产生多种结构相似的十六元环大环内酯类抗生素, 这类抗生素被统称为阿维菌素。根据 C5、C22-C23 和 C26 位结构上的差别, 阿维菌素的天然发酵产物可以被分为 8 个组分, 包括 4 个主要组分(A1a、A2a、B1a、B2a)和 4 个次要组分(A1b、A2b、B1b 及 B2b)^[2]。阿维菌素因其高效、抗虫谱广、低毒、高选择性以及无残留、与环境相容性好等特点^[3], 受到农药界高度重视, 并广泛用于兽用驱虫^[2]。

自阿维链霉菌被发现以来, 对于该菌的研究主要集中在阿维菌素的生物合成领域。虽然阿维链霉菌的全基因组测序已于 2003 年在日本北里研究所完成, 并且阿维菌素的生物合成途径已经基本阐明^[4-6], 相关合成基因也已经被克隆, 但是阿维菌素的生物合成调控途径^[7]、次级代谢物产生的调控和阿维链霉菌形态分化调控等方面还有待深入研究^[8]。提高阿维菌素的产量、选择性地合成活性组分、阿维菌素及其衍生物の利用等始终是人们研究的热点。李萌等^[9]将麦芽糖转运相关基因 *malEFG*

克隆至链霉菌整合型和多拷贝表达载体上, 然后分别将阿维链霉菌野生型菌株 ATCC31267 以及高产菌株 GB165 作为受体菌进行转化, 结果显示, 2 种菌株的转化子—阿维菌素的产量分别提高了 3.0~3.2 倍和 0.4~0.6 倍。阿维链霉菌发酵产生的 8 种组分中, 只有 B1a 和 B1b 两个组分有较高杀虫活性。陈芝等^[8]利用 *aveD* 基因的缺失载体 pCZ8 对阿维链霉菌的 *aveD* 基因进行敲除获得 *aveD* 缺失突变株, 经检测发现该突变株只产生阿维菌素 B 组分。刘丹等^[10]总结了阿维菌素在防治植物线虫中的作用, 评估了不同剂型的阿维菌素在不同环境下的药效差异。

细菌人工染色体(BAC)文库相关技术自诞生以来, 一直在基因组学的研究中扮演着重要的角色。与其他大片段 DNA 文库相比, BAC 文库具有插入 DNA 片段较大、嵌合体少、转化效率高、遗传稳定性强、文库构建过程相对简单等优势, 已被广泛地运用于细菌、植物和动物的基因组文库构建, 并在比较基因组学、物理图谱构建、基因克隆、全基因组测序等研究中得到了诸多应用^[11-13]。由于阿维链霉菌基因组中的磷硫酰化修饰位点众多、在电流下极易降解的特点使得获得高质量的大片段 DNA 十分困难。迄今, 成功构建的具有磷硫酰化修饰基因组物种的大片段 DNA 文库, 尤其是插入片段达 100 kb 以上的文库鲜有报道。华中农业大学基因组资源实验室

收稿日期: 2016-01-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31470226)

刘家栋, 硕士研究生. 研究方向: 生物化学与分子生物学. E-mail: 844733281@qq.com

通信作者: 罗美中, 博士, 教授. 研究方向: 植物基因组学. E-mail: mzluo@mail.hzau.edu.cn

(<http://GResource.hzau.edu.cn>) 近年构建了大量动物、植物、微生物的 BAC 文库,其中,玉米^[14]、水稻^[15-17]、稻曲病菌^[18-19]等 BAC 文库已作为公共资源向研究者开放。本研究构建了 1 个阿维链霉菌 BAC 文库,希望借助大片的诸多优势,能够进一步阐明与阿维菌素合成相关的路径,以期提高阿维菌素的产量。

1 材料与方法

1.1 阿维链霉菌的培养

将阿维链霉菌菌株接种于装有 YEME 培养基(蛋白胨 5 g,葡萄糖 10 g,麦芽提取物 3 g,酵母提取物 3 g,蔗糖 103 g,pH 调至 7.2,蒸馏水 1 000 mL,115 °C 灭菌 25 min)的三角瓶内,28 °C 置于摇床培养 3 d。

1.2 高分子量基因组 DNA Plug 的制备

BAC 文库的构建参考 Luo 等^[20-21]的方法进行。取本文“1.1”中培养的菌液,离心收集菌体约 5 mL,用 10.3% 的蔗糖溶液清洗 2 次,然后用适量 TE25ST 溶液(0.3 mol/L 蔗糖,25 mmol/L EDTA,25 mmol/L Tris 和 50 μmol/L 硫脲)重悬。加溶菌酶至终质量浓度为 4 mg/mL,30 °C 条件下反应 50 min,期间不时地轻轻摇动。待反应完成后,将反应产物低速离心 15 min 得到阿维链霉菌的原生质体沉淀,倒掉上层清液,在离心管中加入 40 mL TE25ST 溶液清洗沉淀,轻柔上下颠倒使沉淀重悬,再次离心 15 min,倒掉上层清液,获得清洗后的沉淀。加入少量 TE25ST 溶液重悬原生质体沉淀,在 45 °C 水浴锅中预热 5 min 后,与等体积的 1% 低熔点琼脂糖(用 TE25ST 溶液配制)混合均匀,并快速转移至 Plug 模具中。待 Plug 凝固之后,将 Plug 从模具内小心取出,转移至装有蛋白酶 K 溶液的 50 mL 离心管中,于 55 °C 处理 48 h。经蛋白酶抑制剂 PMSF(苯甲基磺酰氟)处理后,4 °C 保存于 TE 中。

1.3 部分酶解及大片段 DNA 的第 1 次筛选

选择一定浓度的限制性内切酶 *Bam*H I,对阿维链霉菌基因组 DNA 所对应的酶切位点在限定的时间内进行随机酶切反应,以此获得所需大小的 DNA 片段。为找到合适的反应条件,即酶的用量和酶解的反应时间,需要对同批次的 Plug 进行部分预先酶解。本研究使用的方法是:对相同量的阿维链霉菌基因组 DNA,使用不同量的 *Bam*H I 内切酶

在相同的时间内进行酶解反应,从而获得最佳的反应条件。

本研究预酶解实验设置的 *Bam*H I 酶浓度梯度为 0.5、1.0、1.5、2.0 U/(1/2 Plug),酶解的反应体系为:10 μL 10× Buffer、25 μL ddH₂O、10 μL 40 mmol/L 亚精胺(Sigma)、5 μL 不同浓度的 *Bam*H I 酶和切碎的 1/2 Plug。将反应体系置于 37 °C 恒温水浴锅中,反应 8 min。待反应完成后立刻将反应体系置于冰上,并在每个体系中加入 10 μL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0),静置 15 min 后通过脉冲场凝胶电泳对各个体系的酶解效果进行检测。脉冲场凝胶电泳所用的缓冲液为 0.5×TBE,参数设为 1~50 s、120°、6 V/cm,在 14 °C 下电泳 18 h。根据电泳的结果,按照酶解效果最优的体系进行 16 个相同的酶解反应,在相同的脉冲场凝胶电泳条件下对不同大小的 DNA 片段进行分离,即第 1 次筛选。电泳结束后,沿点样孔两侧向内各 0.5 cm 的地方将胶块切割成 3 份,取两边的胶块用溴化乙锭溶液染色,经漂洗后,和作为参照的透明直尺一齐放入凝胶成像仪进行成像分析。

1.4 第 2 次筛选和 DNA 的电洗脱回收

根据凝胶成像分析的结果,从未经溴化乙锭染色的中部胶块切下 100~280 kb 之间宽约 2 cm 的胶块,并平均分成 a、b(a<b)2 个胶条。将这 2 个胶条再次进行脉冲场凝胶电泳,电泳参数(固定值)设为 4 s、120°、6 V/cm,4 °C 电泳 18 h。电泳结束后,按照第 1 次筛选时的方法进行凝胶成像分析,并回收胶条 a₁、a₂、b₁、b₂(a₁<a₂,b₁<b₂)。

将回收的胶条存放在 1×TAE 缓冲液中,浸泡过夜后,通过电洗脱回收胶条内的大片段 DNA,并检测洗脱产物的浓度。

1.5 载体的制备

用于构建阿维链霉菌 BAC 文库的克隆载体由华中农业大学基因组资源实验室构建,其高拷贝复合载体 pHZAUBAC1 经酶切除去高拷贝复制子后获得克隆载体 pIndigoBAC536-S^[19,22]。使用 Qia-gen 质粒提取试剂盒抽提 pHZAUBAC1 质粒后,用限制性内切酶 *Bam*H I 进行酶解,然后用 CIAP(NEB)去磷酸化,用氯仿/异戊醇抽提法回收,自连过夜后通过脉冲场凝胶电泳分离载体片段即 pIndigoBAC536-S,切下胶条,电洗脱回收低拷贝载体。回收的载体通过紫外分光光度计测定浓度,加入约 15% 的甘油后保存于 -80 °C 冰箱,而后与 λ DNA

的 *Bam*H I 酶解产物连接并转化,以此检测载体的质量是否合格。

1.6 BAC 文库的构建

将本文“1.4”中洗脱产物与载体进行连接反应,反应体系为:84 μ L DNA、4 μ L 载体、10 μ L T4 连接酶 Buffer、2 μ L T4 连接酶,于 4 $^{\circ}$ C 反应 16 h。反应完成后,将连接产物置于 65 $^{\circ}$ C 干浴锅 15 min 使 T4 连接酶失活。连接产物转移至脱盐胶(1%琼脂糖和 2%葡萄糖)内,脱盐 1 h 后吸出。将 2 μ L 脱盐产物与 18 μ L 大肠杆菌感受态细胞 DH10B T1 Phage-Resistant(Invitrogen)充分混合后加入转化杯进行电转化,转化产物于 500 μ L SOC 培养基中于 37 $^{\circ}$ C 复苏 55 min,之后涂布于含有 Chloramphenicol (12.5 mg/L)、IPTG(100 mg/L)、X-gal(80 mg/L)的 LB 固体培养基(胰蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,氯化钠 10 g/L,琼脂粉 15 g/L)上,37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养过夜。从每个培养皿上各挑取一定数量的白斑进行插入片段的检测,若达到要求则将与之对应的连接产物进行大量转化,将所有白斑挑拣至灌有冰冻培养基的 384 孔板中,培养并复制 1 份拷贝后,一起冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

1.7 文库质量的检测与分析

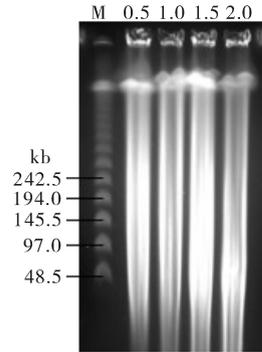
从整个文库中随机挑取一定数量的克隆,在含有 Chloramphenicol(12.5 mg/L)的 LB 液体培养基中培养过夜,用碱裂解法提取质粒,经 I -*Sce* I 酶切 3.5 h 后,通过脉冲场凝胶电泳分析插入片段的大小、空载率等信息,电泳参数设为 5~15 s、120 $^{\circ}$ 、6 V/cm,4 $^{\circ}$ C 电泳 18 h。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA Plug 的制备及部分酶解

经过多次尝试,本研究得到了阿维链霉菌的原生质体。为避免 BAC 克隆插入片段的偏好分布,增强克隆的随机性,对阿维链霉菌基因组序列进行了分析,选择了其位点在阿维链霉菌基因组 DNA 上分布密度非常高的 *Bam*H I 进行酶解反应。按照 0.5、1.0、1.5、2.0 U/(1/2 Plug) *Bam*H I 酶浓度梯度进行预酶解,结果如图 1。由于阿维链霉菌基因组 DNA 含有磷硫酰化修饰,在电泳缓冲液中加入硫脲。电泳图谱显示,阿维链霉菌基因组 DNA 对 *Bam*H I 比较敏感,0.5 U/(1/2 Plug) 的 *Bam*H I 的酶切效果已十分显著,在 100~150 kb 段的 DNA 量比较多;而加入 2.0 U/(1/2 Plug) 的

*Bam*H I 时,DNA 酶解明显过度,大部分酶解后的 DNA 聚集在 50 kb 左右。因此,0.5 U/(1/2 Plug) 的酶浓度被选用进行大量酶解。

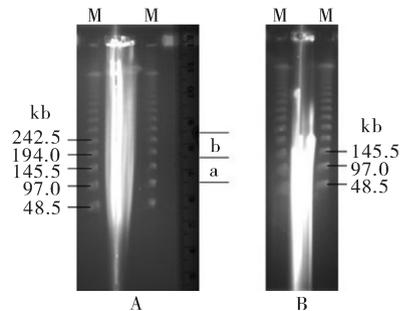


每 1/2 Plug 分别加 0.5、1.0、1.5、2.0 U *Bam*H I 于 37 $^{\circ}$ C 酶解 8 min; M 为 λ ladder PFG 分子标记 (NEB) Each half plug was digested with 0.5、1.0、1.5、2.0 U *Bam*H I, respectively, at 37 $^{\circ}$ C for 8 min; M: λ ladder PFG DNA Marker (NEB).

图 1 阿维链霉菌基因组 DNA 预先部分酶解
Fig.1 Pilot partial digestion of the *Streptomyces avermitilis* genomic DNA

2.2 大片段 DNA 的 2 次筛选和回收

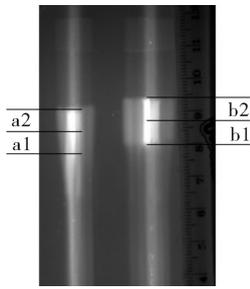
用 0.5 U/(1/2 Plug) 的 *Bam*H I 于 37 $^{\circ}$ C 酶解 8 min 的条件进行 16 个相同反应,并进行第 1 次筛选。图 2A 显示,第 1 次分离的结果与预先酶解的效果相一致。图 2B 显示的是在相同条件下,TBE 缓冲液中未加硫脲的电泳结果,可以明显看到 DNA 的降解现象非常严重,说明硫脲在抑制 DNA 的降解中发挥重要作用。将图 2A 中 100~180 kb(a)和 180~280 kb(b)大小范围的胶条切下进行第 2 次分离筛选(图 3)。由于 DNA 的浓度比较高,在 a、b 段中仍会夹杂一些小片段 DNA,在第 2 次筛选中能够



A:缓冲液中加硫脲; B:缓冲液中未加硫脲; M 为 λ ladder PFG 分子标记 (NEB)。A: The TBE buffer with thiourea; B: The TBE buffer without thiourea; M: λ ladder PFG DNA Marker (NEB).

图 2 大片段 DNA 的第 1 次筛选

Fig.2 The first screening of large fragment DNA



左边条带为第 1 次筛选中 a 胶条分离结果,右边条带为第 1 次筛选中 b 胶条分离结果。The left strip is gel fraction a from the first screening,the right strip is gel fraction b from the first screening.

图 3 阿维链霉菌基因组 DNA 的第 2 次筛选

Fig.3 The second screening of large fragment DNA

得到比较好的分离。按照第 1 次分离筛选的方法,分别切下胶条 a1、a2 ($a_1 < a_2$),b1、b2 ($b_1 < b_2$)。

将 4 段胶条分别进行电洗脱回收大片段 DNA,并检测其浓度。结果显示 a1、a2 的质量浓度较低,不到 1 mg/L,b1、b2 的质量浓度为 2~3 mg/L,基本达到大片段 DNA 克隆要求。

2.3 载体制备

经酶切、去磷酸化、自连、电泳分离、电洗脱后获得 BAC 载体 pIndigoBAC536-S,经紫外分光光度计检测,质量浓度约为 16 mg/L,加入 15% 甘油后储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

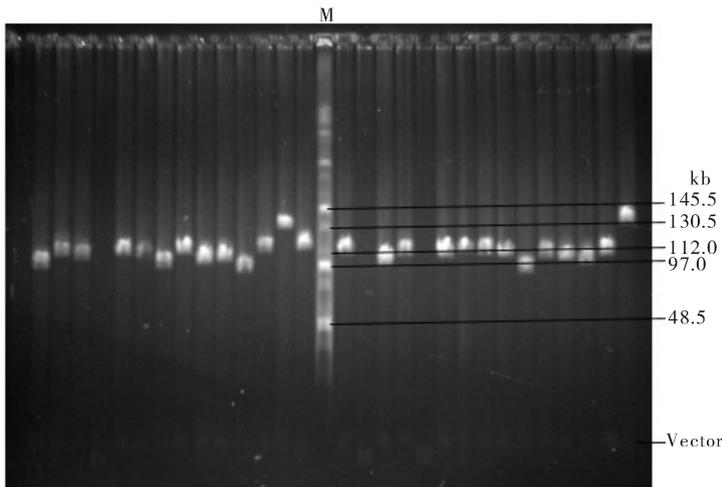
载体的好坏会影响连接反应的效果,最终体现在转化的效率以及整个文库的空载率上,因此,优质的载体对整个文库来说是十分重要的。为检测载体的质量,将不同量的载体与用同种酶(*Bam*H I)酶

解后的 λ DNA 连接转化,同时设置载体的自连对照组。结果显示,当载体与 λ DNA 以 42 ng : 60 ng 的质量比加入时,白斑(重组克隆)的数量最多,达 5 000 个以上。自连对照组产生的白斑数量少于 5 个(为载体损坏后自连的结果),没有蓝斑。说明该批载体可用于 BAC 文库的构建。

2.4 文库构建及其质量检测

将电洗脱回收获得的基因组大片段 DNA 与载体连接,连接产物脱盐后吸取 2 μL 进行预转化,涂皿培养后,统计白斑的数量计算转化效率。结果显示 a1、a2 两个片段的连接产物的转化效率比较高 ($E_{a_1} > E_{a_2} > 300$)。从这 2 个片段所对应的转化中各随机挑取部分白色克隆,检测插入片段的大小,结果显示 a1、a2 的平均插入片段大小均在 100 kb 左右,且空载率相似。鉴于 a1 片段的连接产物转化效率更高,故选择 a1 片段的连接产物进行大量转化。经涂皿、挑拣后,文库构建完成,共包含 6 块 384 孔板,复制 1 个拷贝后,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

从 6 块 384 孔板中随机挑取 155 个克隆,通过摇菌、提取质粒、I-*Sce* I 酶切和脉冲电泳检测插入片段大小(图 4)。统计检测的 155 个 BAC 克隆插入片段大小得到图 5,可以看出,该文库的插入片段大小的分布比较集中,大部分在 100~120 kb。从挑取的克隆中,共发现 14 个空载,由此估算该文库的空载率约为 9%,平均插入片段大小为 101 kb,按阿维链霉菌基因组 9 M 来推算,该文库覆盖全基因组达 25.9 倍。



M 是分子标记 Middle range PFG marker, Vector 是 pIndigoBAC536-S 载体带。M: Middle range PFG marker; Vector: pIndigoBAC536-S vector.

图 4 阿维链霉菌文库随机 BAC 克隆插入片段检测(部分)

Fig.4 Insert size estimation of randomly selected BAC clones of the *Streptomyces avermitilis* library

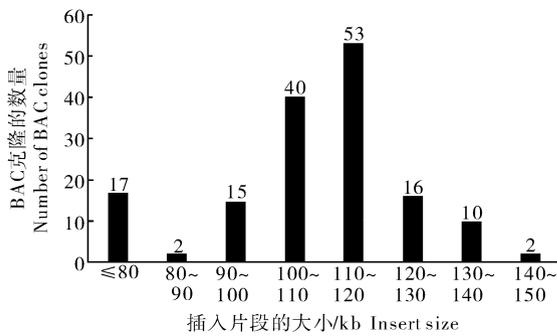


图 5 阿维链霉菌 BAC 文库插入片段大小分析

Fig.5 Insert size analysis of the *Streptomyces avermitilis* library(155 clones)

3 讨论

阿维链霉菌自发现以来已有 40 多年,对于它的研究主要集中在阿维菌素的生物合成领域。阿维菌素因其诸多优点在农业和畜牧业中的应用十分广泛^[23]。对阿维菌素的生物合成途径及其调控途径的研究,将对提高阿维菌素的产量、降低生产成本等具有重要意义。

本研究成功构建了阿维链霉菌的基因组 BAC 文库。在文库的构建过程中,高质量大片段 DNA 的制备尤为重要。动物基因组大片段 DNA 的制备一般采用直接包埋细胞的方法;而对于植物基因组大片段 DNA 的制备,由于细胞壁的存在以及细胞中酚类物质和叶绿体、线粒体 DNA 的干扰,通常采用包埋细胞核的方法。阿维链霉菌具有细胞壁并且属于原核生物,因此,既不能采用制备动物基因组大片段 DNA 的方法也不能采用制备植物基因组大片段 DNA 的方法。本研究采用制备和包埋阿维链霉菌原生体的方法获得高质量的大片段 DNA。此外,不同于一般植物、动物和普通细菌的基因组 DNA,阿维链霉菌基因组 DNA 上存在许多磷硫酰化修饰的位点^[24]。DNA 骨架磷硫酰化修饰是指在天然 DNA 骨架上发现的 P-O 键被 P-S 键替换的化学修饰,具有磷硫酰化修饰的 DNA 在 Tris 缓冲体系中电泳时容易降解。有报道表明,在电泳缓冲液中加入少量还原性试剂,尤其是含硫试剂如硫脲, DNA 降解的现象能得到明显抑制^[25]。本研究在所有缓冲液中都添加了一定浓度的硫脲,从而成功获得了质量较高的阿维链霉菌基因组大片段 DNA。同时,由于阿维链霉菌基因组的 G+C 含量高达 70.7%^[26], Bam H I 的酶切位点(GGATCC)非常丰富,而 Hind III (AAGCTT)和 Eco R I (GAATTC)

酶切位点很少,因此,在 BAC 载体上仅有的 3 个克隆位点中,本研究选择 Bam H I 来构建 BAC 文库。尽管硫脲的添加使 DNA 的降解得到了有效抑制,但依然存在部分降解仍会影响到 BAC 文库的构建。笔者所在实验室以往构建的其他物种的 BAC 文库,空载率常在 2.5% 以下,而阿维链霉菌 BAC 文库的空载率偏高,最大的可能是与大片段 DNA 的降解有关。此外,由于阿维链霉菌基因组 DNA 上 Bam H I 酶切位点非常丰富,导致 DNA 对该酶十分敏感,只需极少量的酶就能达到所需的酶切效果,给实验操作带来了一定难度。经过多次尝试,本研究成功获得了高质量的 BAC 文库。

当前在生物基因组研究领域, BAC 文库已经成为了一种不可缺少的重要工具和资源。本研究所构建的阿维链霉菌 BAC 文库平均插入片段达 101 kb,覆盖该菌基因组 25.9 倍。该文库的成功构建为阿维菌素生物合成及调控途径方面的研究提供了资源,也将为研究阿维链霉菌基因簇之间或基因簇与其他基因之间的相互作用^[27]提供帮助。同时,由于 DNA 的磷硫酰化修饰现象广泛存在于微生物中^[25],该文库的构建也将为其他具有磷硫酰化修饰的基因组 BAC 文库构建提供一定的参考。

致谢 本研究在阿维链霉菌的培养及原生质体制备等方面得到了武汉大学药学院赵昌明副教授的指导与帮助,谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] MROZIK H, ESKOLA P, LINN B O, et al. Discovery of novel avermectins with unprecedented insecticidal activity[J]. *Experientia*, 1989, 45(3): 315-316.
- [2] 张毅, 胡西洲. 阿维菌素及其衍生物的研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2007, 46(5): 845-848.
- [3] 刘娟娟, 汪康游, 金媛媛, 等. SPSS 方差分析在阿维菌素培养基优化中的应用[J]. *中国抗生素杂志*, 2015, 40(4): 251-255.
- [4] IKEDA H, OMURA S. Avermectin biosynthesis[J]. *Chemical reviews*, 1997, 97: 2591-2609.
- [5] IKEDA H, XONOMIYA T, ZSAMI M, et al. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*[J]. *PNAS*, 1999, 96: 9509-9514.
- [6] IKEDA H, XONOMIYA T, OMURA S. Organization of the biosynthetic gene cluster for avermectin in *Streptomyces avermitilis*: analysis of enzymatic domains in four polyketide synthases[J]. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 2001, 21: 110-116.

- [7] 陈芝, 宋渊, 文莹, 等. 阿维菌素的生物合成研究进展与展望[J]. 自然科学进展, 2007, 17(3): 290-296.
- [8] 陈芝, 文莹, 宋渊, 等. 阿维链霉菌中 *aveD* 基因缺失对阿维菌素合成的影响[J]. 微生物学报, 2002, 42(5): 534-538.
- [9] 李萌, 张选, 文莹, 等. 麦芽糖转运相关基因的表达对阿维菌素合成的影响[J]. 中国农业科技导报, 2014, 16(1): 71-75.
- [10] 刘丹, 颜冬冬, 毛连纲, 等. 阿维菌素防治植物线虫的研究进展[J]. 湖南农业大学学报, 2013, 39(1): 83-87.
- [11] 李海权, 刁现民. 基因组细菌人工染色体文库(BAC)的构建及应用[J]. 生物技术通报, 2005(1): 6-11.
- [12] 任斐. 细菌人工染色体基因组文库的构建及应用[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2010, 38(1): 44-48.
- [13] 王晓虹, 金黎明. 细菌人工染色体文库的构建及应用[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(6): 668-671.
- [14] WANG C, SHI X, LIU L, et al. Genomic resources for gene discovery, functional genome annotation, and evolutionary studies of maize and its close relatives[J]. Genetics, 2013, 195: 723-737.
- [15] LIN H Y, XIA P, WING Q A, et al. Dynamic intra-japonica subspecies variation and resource application[J]. Molecular plant, 2012, 5: 218-230.
- [16] PAN Y L, DENG Y, LIN H Y, et al. Comparative BAC-based physical mapping of *Oryza sativa* ssp. *indica* var. 93-11 and evaluation of the two rice reference sequence assemblies[J]. The plant journal, 2014, 77: 795-805.
- [17] WANG X M, KUDMA D A, PAN Y L, et al. Global genomic diversity of *Oryza sativa* varieties revealed by comparative physical mapping[J]. Genetics, 2014, 196: 937-949.
- [18] WANG X M, LIU Q L, WANG H, et al. A BAC based physical map and genome survey of the rice false smut fungus *Villosiclava virens*[J]. BMC genomics, 2013, 14: 883.
- [19] 刘庆丽, 王晓明, 王革娇, 等. 稻曲病菌 UV-2 菌株细菌人工染色体文库构建及分析[J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1715-1722.
- [20] LUO M Z, WING R A. An improved method for plant BAC library construction[J]. Methods in molecular biology, 2003, 236: 1-19.
- [21] LUO M Z, WANG Y H, FRISCH D, et al. Melon bacterial artificial chromosome (BAC) library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon *Fusarium wilt* (Fom-2)[J]. Genome, 2001, 44: 154-162.
- [22] SHI X, ZENG H Y, XUE Y D, et al. A pair of new BAC and BIBAC vectors that facilitate BAC/BIBAC library construction and intact large genomic DNA insert exchange[J]. Plant methods, 2011, 7: 33.
- [23] 谢显传, 张少华, 王冬生, 等. 阿维菌素对蔬菜地土壤微生物及土壤酶的生态毒理效应[J]. 土壤学报, 2007, 44(4): 740-743.
- [24] EVANS M, KACZMAREK F S, STUTZMAN-ENGWALL K, et al. Characterization of a *Streptomyces lividans*-type site-specific DNA modification system in the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* permits investigation of two novel giant linear plasmids, pSA1 and pSA2[J]. Microbiology, 1994, 140: 1367-1371.
- [25] 胡中培, 王呈坤, 蓝文贤, 等. DNA 骨架磷硫酰化修饰的研究进展[J]. 化学学报, 2013, 71(4): 501-507.
- [26] IKEDA H, ISHIKAWA J, HANAMOTO A, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*[J]. Nature biotechnology, 2003, 21: 526-531.
- [27] ZHAO C M, HUANG T T, CHEN W Q, et al. Enhancement of the diversity of polyoxins by a thymine-7-hydroxylase homolog outside the polyoxin biosynthesis gene cluster[J]. Applied and environmental microbiology, 2010, 76(21): 7343-7347.

Construction and analysis of a BAC library of *Streptomyces avermitilis* genome

LIU Jiadong WANG Gejiao LUO Meizhong

College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract To further clarify the biosynthesis and regulation pathways of avermectins and to increase its production, a bacterial artificial chromosome (BAC) library was constructed using the *Bam*H I-digested genomic DNA of *Streptomyces avermitilis*. The *Streptomyces avermitilis* BAC library was consisted of 2 304 clones with an average insert size of 101 kb, empty clone rate of about 9%, and 25.9-fold coverage of the whole genome. The DNA phosphorothioation of the *Streptomyces avermitilis* genome made it very difficult to construct a BAC library. The successful construction of this BAC library will provide a reference for constructing BAC libraries of other microorganisms, especially those with DNA phosphorothioation.

Keywords *Streptomyces avermitilis*; avermectins; large fragments genomic DNA; bacterial artificial chromosome(BAC); DNA phosphorothioation

(责任编辑: 张志钰)