

糖多孢红霉菌同源片段长度与染色体重组率关系的研究

张部昌^{1,2} 赵志虎¹ 王以光³ 于秀琴¹ 刘传暄¹ 马清钧^{1*}

¹(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100850)

²(安徽大学生命科学学院,合肥 230039)

³(中国医学科学院医药生物技术研究所,北京 100050)

摘 要 为了探索同源片段长度与糖多孢红霉菌染色体同源重组率的关系,化学合成或用重叠 PCR 合成带有突变位点、在突变位点两侧长度为(26bp + 27bp)、(500bp + 576bp)和(1908bp + 1749bp)的同源序列,克隆于糖多孢红霉菌同源重组载体 pWHM3 后,分别构建了 pWHM1113、pWHM1116 和 pWHM1119 质粒。以 PEG 介导转化糖多孢红霉菌 A226 原生质体,3 个质粒分别获得每皿 30 个、69 个和 170 个转化子,但 pWHM1113 质粒不能与染色体有效整合, pWHM1116 质粒与染色体整合率为转化子的 2%,而 pWHM1119 质粒与染色体整合率达到转化子的 19%。pWHM1116 和 pWHM1119 质粒均可进行有效的染色体二次重组,将突变位点引入染色体。因此,同源片段长度为(500bp + 576bp)或更长时,可与糖多孢红霉菌染色体进行有效的单重组和双重组。

关键词 糖多孢红霉菌,染色体同源重组,红霉素

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0013-06

基因工程研究中的染色体同源重组主要用于基因失活、基因敲除、基因替换等,是研究基因功能的重要方法,也是研究组合生物合成的主要途径之一。具有一定长度的同源序列是实现同源重组的必要条件,前不久 Lau 报道^[1],在链球菌(*Streptococcus*)中同源片段长度与染色体重组率密切相关,同源片段长度减少一半时,重组率降低 64 倍。

迄今在糖多孢红霉菌(*Saccharopolyspora erythraea*)中用同源重组方法已构建了许多突变体,合成了许多新的红霉素衍生物^[2]。在以往的红霉素基因工程研究中多使用基因文库中同源片段,容易获得较长同源序列,但在使用基因文库中同源序列时,若准确去除或引入聚酮合成酶(Polyketide synthase, PKS)中某一模块(module, M)或某一酶结构域(domain)相应的 DNA 片段却相当困难,因为在大环内酯组合生物合成研究中,往往需要将酶结构域或模块基因片段拼接,或者去除某些氨基酸密码,都需要保持阅读框架的一致,而在目的 DNA 片段间常常没有合适的酶切位点。应用重叠 PCR 方法可以实现目的 DNA 片段的准确拼接,但红霉素生物合成 PKS 基因中 GC 含量超过 70%,而 PCR 扩增长片段高 GC

含量 DNA 很困难^[3]。同源重组中,同源序列越长重组率越高,然而 PCR 扩增片段越长越困难,差错率也越高,因此,研究同源片段长度与染色体重组率的关系,对于通过改造染色体基因研究大环内酯组合生物合成具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒(见表 1)

1.2 培养基、缓冲液和试剂

LB 培养基按 Sambrook 方法^[4],TSB 培养基和 TE 缓冲液按 Hopwood 方法^[7],PEG3350-T 缓冲液和改进 P 缓冲液按 Yamamoto 方法^[8],R3M 培养基按 Summers 方法^[9]。

蛋白酶 K 为 Amresco 公司产品,硫链丝菌肽(Thiostrepton, Thio) PEG3350 为 Sigma 公司产品,溶菌酶为 Fluka 公司产品,TSB 为 Difco 公司产品,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 Biolab 公司产品,pfu DNA 聚合酶为上海生工公司产品,Taq DNA 聚合酶为 MBI 公司产品,DNA Marker DL2000 为大连宝生物公司产品,质粒纯化试剂盒和 PCR 纯化试剂盒为 Promega 公司产品。突变 DNA 序列和 PCR 引物委托

上海生工公司合成。

表 1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Source & characteristics
Strains	
<i>S. erythraea</i> A226	A gift from Prof. WANG Y G, producing erythromycin
<i>E. coli</i> DH 5 α	Kept in this laboratory ^[4]
<i>E. coli</i> ET12567	A gift from Prof. WANG Y G ^[5]
<i>S. erythraea</i> 1116	This study
<i>S. erythraea</i> 1116M	This study
<i>S. erythraea</i> 1119	This study
<i>S. erythraea</i> 1119M	This study
Plasmids	
pGEM-T	Purchased from Promega
pUC-mT	Purchased from Sangon (Shanghai)
pWHM χ pCSS)	A gift from Prof. WANG Y G ^[6]
pUC1113	This study
pUC1116	This study
pGEM-1119	This study
pWHM1113	This study
pWHM1116	This study
pWHM1119	This study

1.3 实验方法

1.3.1 大肠杆菌的培养、质粒酶切、连接、转化等：按 Sambrook 方法^[4]质粒提取、PCR 产物纯化按 Promega 产品说明书进行。

1.3.2 糖多孢红霉菌的培养、总 DNA 的提取：按 Hopwood 方法^[7]进行。

1.3.3 染色体同源片段 PCR 扩增：参照文献 [3] 方法。

1.3.4 糖多孢红霉菌 A226 原生质体制备和转化按文献 [10] 方法进行。

1.3.5 不同长度同源片段的设计：

(1) 重组质粒 pWHM1113 中的同源片段：根据文献 [11] 设计去除 NADPH 结合区域中 SRR 三个氨基酸的突变 DNA 序列，相当于去除文献中 18478-18486 核苷酸。这样设计可以使红霉素生物合成过程中 KR6 酶结构域失活，突变体不能合成红霉素，可根据发酵产物抑菌活性对突变体进行筛选。在序列突变位点的 5'-和 3'-端两侧各保留 27 和 26 个核苷酸，合成寡核苷酸序列为：

正向序列(F1)：5'-GCGGGGTGGAGGACCTGCTGCTGGTCCGCTCGACGCTCCCGCCGCGGCCGA；

反向序列(F2)：5'-CGGCCGCGCGGGAGCGTCGAC-

GCCGACCAGCACCAGGTCCTCCACCCCGCA。

两序列退火复性后双链 DNA 在 3'-端各有一个 A 碱基突出。这种设计使该寡核苷酸序列有两个方面用途：一是退火后作为较短的染色体同源序列；二是可作为突变引物进行重叠 PCR 扩增(以下使用)。

(2) 同源重组质粒 pWHM1116 中的同源片段：根据文献 [11] 序列，在上述突变位点 5'-和 3'-端各保留 500bp 和 576bp，设计引物为：

正向引物(S1)：5'-CGGCGCCCTGCGGGAGGTGCCGG

反向引物(S2)：5'-AGCCGACCCGGAAGGCCTCCAGTC

先分别以 F1 和 S2 与 F2 和 S1 为两对引物，糖多孢红霉菌总 DNA 为模板，用 pfu DNA 聚合酶分别扩增突变位点上下游两个片段，用 Promega PCR 纯化试剂盒回收 PCR 产物，再以 S1 和 S2 为引物，上面扩增的两种 PCR 产物混合物为模板，用 Roche 公司 Extend Long Template PCR 系统，扩增出在 KR6 NADPH 结合位点区域基因突变的全长 1076bp 的 DNA 片段。

(3) 同源重组质粒 pWHM1119 的构建：根据文献 [11] 在上述突变位点 5'-和 3'-端各保留 1908bp 和 1749bp，设计引物为：

正向引物(T1) 5'-TACGAATTCAGATCTCATGCGGCTCCTGGAGTCCGCACTGGACG

(斜体为 *Eco* RI 和 *Nde* I 位点)

反向引物(T2) 5'-TTCAAGCTTCTGCAGTCATGAGTTCCTCCGCCCAGCCAG

(斜体为 *Hind* III 和 *Sal* I 位点)

先分别以 F1 和 T2 与 F2 和 T1 为两对引物，糖多孢红霉菌总 DNA 为模板，用 pfu DNA 聚合酶分别扩增突变位点上下游两个片段。用 Promega PCR 回收试剂盒回收 PCR 产物，再以 T1 和 T2 为引物，上面扩增的产物混合物为模板，用 Roche 公司 Extend Long Template PCR 系统，扩增出在 KR6 NADPH 结合位点基因突变的全长 3657bp 的 DNA 片段。

1.3.6 染色体整合体的筛选和鉴定：按照文献 [12] 方法。

1.3.7 染色体二次同源重组体的筛选：按照文献 [12] 方法。

1.3.8 发酵产物生物活性检验：按文献 [12] 方法。

2 结果与分析

2.1 同源重组质粒 pWHM1113 的构建

将 F1 和 F2 序列进行退火后与 pUC-mT 载体相

连转化 *E. coli* DH5 α 构建了 pUC1113 质粒。序列分析表明 pUC1113 克隆序列与设计寡核苷酸序列完全一致(如图 1)。用 *Eco*RI 和 *Hind* III 双酶切 pUC1113 质粒,分离小片段后与 pWHM3 相应酶切位点连接,转化 *E. coli* ET12567,构建了同源重组质粒 pWHM1113。

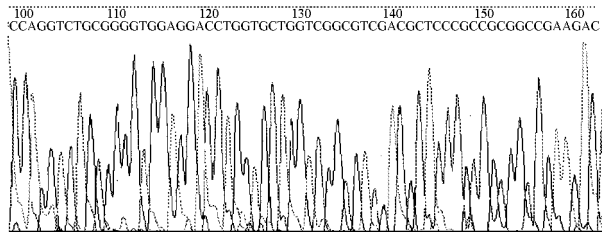


图 1 pUC1113 质粒克隆片段测序(106bp-158bp)

Fig.1 Sequencing of the cloned fragment in pUC1113

2.2 同源重组质粒 pWHM1116 的构建

先分别以 F1 和 S2 与 F2 和 S1 为两对引物,糖多孢红霉菌总 DNA 为模板,用 pfu DNA 聚合酶分别扩增突变位点上下游两个片段。Promega PCR 纯化试剂盒回收 PCR 产物,再以 S1 和 S2 为引物,上面扩增的两种 PCR 产物混合物为模板,用 Roche 公司 Extend Long Template PCR 系统,扩增出在 KR6 NADPH 结合位点基因突变的全长 1076bp 的 DNA 片段(如图 2)。

将 PCR 产物分离纯化后与 pUC-mT 载体直接相连,转化 *E. coli* DH 5 α ,构建了 pUC1116 质粒。用 *Eco*RI 和 *Hind* III 酶切 pUC1116,分离小片段后与 pWHM3 相应酶切位点连接,转化 *E. coli*ET12567 构建了同源重组质粒 pWHM1116。

2.3 同源重组质粒 pWHM1119 的构建

先分别以 F1 和 T2 与 F2 和 T1 为两对引物,糖多孢红霉菌总 DNA 为模板,用 pfu DNA 聚合酶分别扩增突变位点上下游两个片段(如图 3 A)。Promega PCR 回收试剂盒回收 PCR 产物,再以 T1 和 T2 为引物,上面扩增的产物混合物为模板,用 Roche 公司 Extend Long Template PCR 系统,扩增出在 KR6 NADPH 结合位点基因突变的全长 3657bp 的 DNA 片段。将 PCR 产物与 pGEM-T 载体直接相连,转化 *E. coli* DH 5 α ,构建了 pGEM1119 质粒。用 *Eco*RI 和 *Hind* III 对 pGEM1119 进行双酶切鉴定(如图 3 B)结果与预期结果相一致。分离大片段后与 pWHM3 相应酶切位点连接,转化 *E. coli* ET12567 构建了同源重组质粒 pWHM1119。

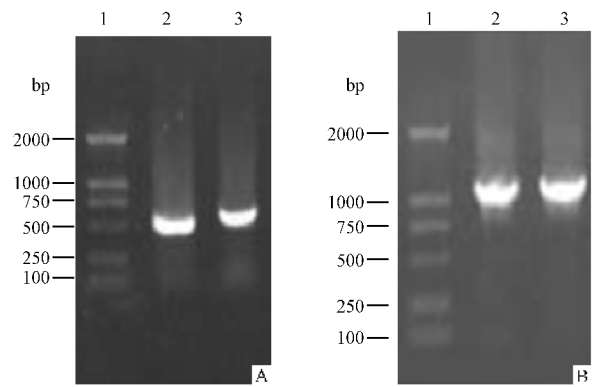


图 2 pUC1116 中同源片段 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of the homologous fragment in pUC1116

A. PCR amplification of upstream and downstream fragments of the mutant locus in pUC1116 B. Overlap PCR amplification of homologous fragment in pUC1116

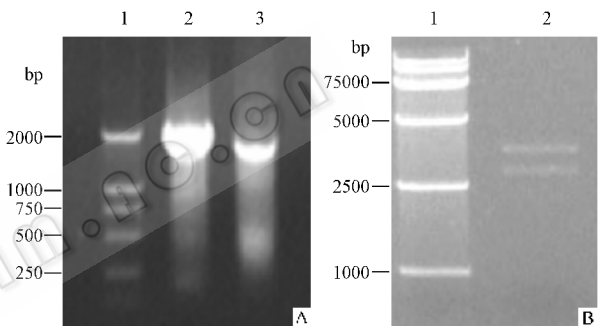


图 3 pGEM1119 中同源片段 PCR 扩增和双酶切鉴定

Fig.3 Homologous fragment PCR amplification (A) and Double-enzyme-cut identification (B) of pGEM1119

A. Upstream (lane 2) and downstream (lane 3) fragments of the mutant locus in pGEM1119 B. Enzymatic products of pGEM1119 by *Hind* III and *Eco*RI

2.4 糖多孢红霉菌 A226 原生质体转化

将 1mL 冻存的糖多孢红霉菌 A226 菌丝体,接种到 50 mL TSB 培养基,在 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 48h,制备原生质体,分别用 pWHM1113、pWHM1116 和 pWHM1119(50 ~ 100 μ g/mL)转化,各涂 9 个 R3M 固体培养基平皿,约 40h 后,用含 Thio 的无菌水覆盖,使培养基中 Thio 的浓度为 25 μ g/mL。在培养箱中继续放置 72h 后,计每平皿中菌落数,结果如表 2,可以看出,同源片段长度与转化子数量成正相关,同源片段越长转化子数量也越多。

2.5 染色体整合体的筛选和鉴定

由于 pWHM3 衍生质粒在糖多孢红霉菌菌体中不能稳定存在^[6],只有当质粒整合到染色体上才能赋予菌体对 Thio 稳定的抗性,在含 Thio 的 R3M 培养基上正常生长。从 pWHM1113、pWHM1116 和 pWHM1119 质粒转化平皿上分别随机挑取 150 个

200个和100个菌落,涂含 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ Thio的R3M斜面。各转化平板挑取菌落在Thio斜面上生长结果如表3。

表2 不同长度同源片段对转化结果的影响

Table 2 Effect on transformation with various lengths of homologous sequences

Plates	pWHM1113 (26bp + 27bp)	pWHM1116 (500bp + 576bp)	pWHM1119 (1908bp + 1749bp)
1	35	83	138
2	31	95	174
3	37	75	184
4	39	85	244
5	31	75	151
6	40	88	211
7	25	82	235
8	31	61	149
9	25	46	219
Average values	29.4	69	170.5

表3 不同长度同源片段对染色体整合结果的影响

Table 3 Effect on chromosomal integration with various lengths of homologous sequences

Plasmids	pWHM1113	pWHM1116	pWHM1119
Lengths of homologous fragments	26bp + 27bp	500bp + 576bp	1908bp + 1749bp
Number of colonies picked up	150	200	100
Number of Thio ^r colonies	0	4	19
Percentage of homologous integration	0	2%	19%

从表3可以看出:当突变位点两侧同源片段长度小于(26bp + 27bp)时,质粒几乎不能与染色体有效整合;染色体整合率与同源片段长度正相关,同源片段越长有效整合子也越多;无论同源片段长还是短,绝大多数转化子都是假阳性。

为什么糖多孢红霉菌染色体同源重组时会出现如此多的假阳性呢?Vara^[6]曾认为,质粒的少量复制是糖多孢红霉菌染色体同源重组的必要条件,似乎质粒的少量复制是假阳性的原因。但为什么同源片段越长假阳性的数目也越多呢?从本研究的结果推测,带有同源片段的质粒与染色体有一个短暂的不稳定整合过程,使Thio抗性基因得以短时表达,同源片段越长,短暂整合的数目也越多。一旦质粒从染色体上分离,便不再赋予菌体对抗生素的抗性,因而该菌落表现为假阳性。

从表3分析,同源序列长度达到(500bp + 576bp)时,可以获得有效的染色体整合;同源序列长

度为(1908bp + 1749bp)时,可获得较高比例的整合体。

2.6 染色体整合体的鉴定

2.6.1 PCR鉴定:Thio抗性基因存在于pWHM3上,只有整合到染色体上才能随染色体共同复制,所以可通过检测基因组DNA上Thio抗性基因判断pWHM3衍生质粒是否整合到染色体上。

根据文献[7]设计Thio抗性基因(*tsr*)引物为:正向引物:5'-CCTGAATTCATGACTGAGTTGGACAC-CATCGCA(斜体为EcoRI位点);反向引物:5'-TCTAAGCTTGGAAACGTTGAGAACTC-GGTCTC(斜体为HindIII位点)。

扩增出来的DNA片段长度应为768bp。

随机选择pWHM1116和pWHM1119整合体各两个克隆,接种于含 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ Thio的TSB中,在30℃振荡培养48h,提取总DNA。以总DNA为模板,用Taq酶和*tsr*引物进行PCR扩增,结果4个克隆都有768bp附近的PCR片段(如图4),表明挑选克隆中pWHM1116和pWHM1119质粒已整合到了染色体上。将pWHM1116和pWHM1119整合体分别称为糖多孢红霉菌1116(*S. erythraea* 1116)和糖多孢红霉菌1119(*S. erythraea* 1119)。

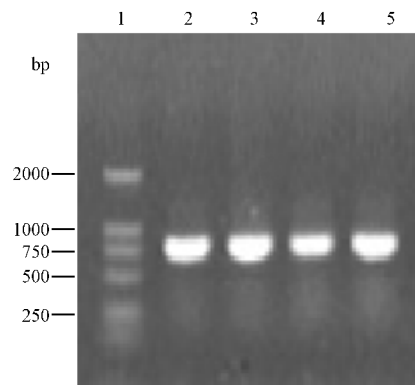


图4 整合体的PCR鉴定

Fig. 4 PCR identification of integrants

1. DNA marker; 2, 3. *S. erythraea* 1116; 4, 5. *S. erythraea* 1119

2.6.2 对枯草杆菌的抑制试验:将糖多孢红霉菌1116和糖多孢红霉菌1119菌丝体分别接种到含 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ Thio的TSB的液体中,在30℃振荡培养72h。把过夜培养的枯草杆菌涂LB固体平板,在培养基表面放上无菌滤纸片,再将 $10\mu\text{L}$ 上面整合体培养液直接加到平板滤纸上,放37℃恒温箱培养7h以上,结果上述发酵液均没有抑菌活性,表明在糖多孢红霉菌1116和糖多孢红霉菌1119菌丝体中,pWHM1116和pWHM1119质粒已分别整合到了染色

体上红霉素生物合成基因位点。

2.7 二次重组体的筛选

同源重组质粒在染色体上不稳定,在没有抗生素选择压力的情况下,经过几代生长后部分质粒会经染色体二次重组从染色体上脱落,菌株便失去对 Thio 的抗性,因而可通过检验菌株对 Thio 的抗性判断其上质粒是否从染色体上脱落。

质粒从染色体上脱落需经染色体二次重组,这两种方式,一是二次重组位点与第一次重组位点位于突变位点的同一侧,二次重组后染色体恢复到第一次重组前状态,菌株恢复红霉素合成能力;二是二次重组发生在与第一次重组的不同一侧,二次重组后,在染色体上引入了突变位点,使菌株不能合成红霉素,发酵液将失去抑制枯草杆菌活性。将糖多孢红霉菌 1116 和糖多孢红霉菌 1119 在无 Thio 的 R3M 斜面上生长 3 代后,制备原生质体,涂无抗生素 R3M 固体培养基平皿。分别挑取 75 个和 141 个菌落,每个菌落依次涂在含 Thio 的 R3M 斜面和不含 Thio 的 R3M 斜面上。在 30℃ 恒温箱放置 72h,结果糖多孢红霉菌 1116 所接种的 75 个菌落均不能在含 Thio 的斜面上生长,表明质粒已全部从染色体上脱落。但从糖多孢红霉菌 1119 接种的 141 个菌落,仅有 73 个不能在 Thio 斜面上生长,表明糖多孢红霉菌 1119 整合体在无抗生素斜面上生长 3 代后,有近一半菌株染色体上质粒都未脱落下来。说明带有同源片段短的质粒更容易从染色体上脱离,其中的原因还不清楚,推测带有较长同源片段质粒从染色体上脱落后,可能更容易再次与染色体重组。

将仅能在无 Thio 的斜面上生长的菌株接种 5mL TSB 摇管,30℃ 振荡培养 72h。按上述方法进行抑菌活性实验,结果 75 个失去 Thio 抗性的糖多孢红霉菌 1116 中,有 21 只摇管发酵液失去抑菌活性,而 73 个失去 Thio 抗性的糖多孢红霉菌 1119 中有 32 只摇管发酵液失去抑菌活性,说明同源片段长度越长二次重组时更易于在染色体上引入突变位点;在突变位点一侧同源片段长度达到 500bp 时可进行有效的二次重组。

3 讨论

近年来,随着人类基因组和许多模式生物基因组测序研究工作的完成,功能基因组的研究已摆在了重要位置,随之有关同源重组方法的研究也较多,特别在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[13,14]、*Schizosaccharomyces pombe*^[15]、大肠杆菌(*Escherichia*

coli)^[16-18]、链球菌属(*Streptococci*)^[1]、丝状真菌(*Ashbya gossypii*)^[19],甚至在哺乳动物^[20],已经建立了比较完善的基因敲除或敲入系统。迄今为止,对于酵母和大肠杆菌,借助于 PCR 扩增技术,在目的基因两翼只需连接 30~50bp 的同源序列,并在同源序列间连上某种抗生素抗性基因,将线形 DNA 导入目的菌株,即可将染色体上目的基因敲除或进行基因替换。但这些系统除了用于同源重组的 DNA 片段而外,还需要一些配套的体系,如酵母中 Cre 表达系统、大肠杆菌中 Red 表达系统,目前这些系统在放线菌中还没有建立起来。另一方面,在酵母或大肠杆菌中建立起来的这些染色体重组方式,对于组合生物合成研究也不完全适用,如在酵母基因敲除系统中 Cre-loxP 系统,最后在染色体上必须保留 loxP 序列,大肠杆菌 Red 系统也在染色体上保留一个 FRT (FLP recognition target) 重复序列。这些序列对于一个单功能基因,可能不影响基因功能的研究,而对于 PKS 酶结构域或模块基因敲除或替换,loxP 或 FRT (FLP recognition target) 重复序列的存在,可能影响阅读框架结构或影响后续基因产物的活性。因此,在放线菌中利用两步同源重组进行基因敲除或替换,仍是大环内酯组合生物合成的重要途径之一。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Lau P C Y, Sung C K, Lee Janet H *et al.* PCR ligation mutagenesis in transformable streptococci: application and efficiency. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, **49**(2): 193-205
- [2] ZHANG B C (张部昌), ZHAO Z H (赵志虎), MA Q (马清钧). Research progresses in erythromycin genetic engineering. *Journal of Chinese Biotechnology* (中国生物工程杂志) 2002, **22**(3): 40-44
- [3] ZHANG B C (张部昌), ZHAO Z H (赵志虎), YU X Q (于秀琴) *et al.* Optimizing conditions for PCR amplification of DNA with rich GC. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences* (军事医学科学院院刊) 2002 (4) (in press)
- [4] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [5] MacNeil D J, Gewain K M, Ruby C L *et al.* Analysis of *Streptomyces avermilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 1992, **111**: 61-68
- [6] Vara J, Lewandowska-Skarbek M, Wang Y G *et al.* Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *J Bacteriol*, 1989, **171**(11): 5872-5881
- [7] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*. England: The John Innes Foundation, 1985

- streptomycetes erythraeus. *J Antibiotics*, 1986, **39**(9), 1304 – 1313
- [9] Summers R G, Donadio S, Staver M J *et al.* Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. *Microbiol*, 1997, **143**(10) 3251 – 3262
- [10] ZHANG B (张部昌), ZHAO Z H (赵志虎), WANG Y (王以光) *et al.* Protoplast transformation and homologous chromosomal integration of *Saccharopolyspora erythraea* A226. *Letters in Biotechnology*(生物技术通讯) 2002, **13**(2): 107 – 111
- [11] Donadio S, Staver M J, McAlpine J B *et al.* Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science*, 1991, **252**(5006) 675 – 679
- [12] ZHANG B (张部昌), ZHAO Z H (赵志虎), WANG Y (王以光) *et al.* Construction of *Saccharopolyspora erythraea* M Synthesizing a Novel Ketolide 3-Deoxy-3-oxo-erythronolide B. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2002, **18**(1): 198 – 203
- [13] Lorenz M C, Muir R S, Lim E *et al.* Gene disruption with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1995, **158**(1): 113 – 117
- [14] Guldener U, Heck S, Fielder T *et al.* A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24**(13) 2519 – 2524
- [15] Kaur R, Ingavale S S, Bachhawat A K. PCR-mediated direct gene disruption in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(5): 1080 – 1081
- [16] Datsenko K A, Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**(12) 6640 – 6645
- [17] Murphy K C, Campellone K G, Poteete A R. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene*, 2000, **246**(1–2): 321 – 330
- [18] Poteete A R. What makes the bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, **201**(1): 9 – 14
- [19] Wendland J, Ayad-Durieux Y, Knechtle P *et al.* PCR-based gene targeting in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Gene*, 2000, **242**(1–2) 381 – 391
- [20] Kühn R, Schwenk F. Advances in gene targeting methods. *Current Opinion in Immunology*, 1997, **9**(2): 183 – 188

Study on Relationship Between Length of Homologous Sequences and Chromosomal Recombination Rate in *Saccharopolyspora erythraea*

ZHANG Bu-Chang^{1,2} ZHAO Zhi-Hu¹ WANG Yi-Guang³ YU Xiu-Qin¹ LIU Chuan-Xuan¹ MA Qing-Jun^{1*}

¹(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850, China)

²(School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China)

³(Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS, Beijing 100050, China)

Abstract In order to study the relationship between lengths of homologous fragments and chromosomal recombination rate in *Saccharopolyspora erythraea*, three homologous sequences, with mutant loci and different flanking sequences, (26bp + 27bp), (500bp + 576bp) and (1908bp + 1749bp), were synthesized by chemical reaction or PCR amplification, and cloned into pWHM3 to construct homologous recombination plasmids, pWHM1113, pWHM1116 and pWHM1119. When the plasmids were transformed into protoplast of *Saccharopolyspora erythraea* A226 under PEG mediated, on an average 30, 69 and 170 transformants grew on each plate for the three plasmids respectively, but chromosomal integration frequency were 0, 2% and 19% among corresponding transformants. Both pWHM1116 and pWHM1119 could take double crossover recombination, and exchange the mutant loci in the chromosome. It was concluded that when the flanking sequences were equal or more than (500bp + 576bp), they could take effective single and double recombination with *Saccharopolyspora erythraea* chromosome.

Key words *Saccharopolyspora erythraea*, chromosomal homologous recombination, erythromycin