

# 吸水链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus* 17997 中噬菌体基因转移系统的建立及其应用

高慧英 王以光\* 高群杰 尚广东 孙桂芝 杨 樱

(中国医学科学院中国协和医科大学医药生物技术研究所,北京 100050)

**摘 要** 由吸水链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus* 17997 产生的格尔德霉素 geldanamycin (GA) 属安莎类抗生素,具有良好的抗肿瘤和抗病毒活性。本文应用链霉菌温和噬菌体  $\phi$ C31 衍生的 KC515 载体,在吸水链霉菌 *S. hygroscopicus* 17997 中建立并优化了 *S. hygroscopicus* 17997 的基因转染体系。利用所建立的基因转染体系,以基因阻断技术从 *S. hygroscopicus* 17997 基因文库含有多组 PKS 基因柯斯质粒中,鉴定了与 GA PKS 生物合成相关基因的柯斯质粒,该工作为 GA 生物合成基因簇的克隆奠定了基础。

**关键词** 吸水链霉菌,基因阻断,格尔德霉素,生物合成基因

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0407-05

格尔德霉素 Geldanamycin (GA) 于 1970 年由 De-Boer 等<sup>[1]</sup> 研究发现,报道其具有抗菌、抗原虫及抗肿瘤作用。之后又发现它可特异性地与热休克蛋白 Hsp90 结合而影响细胞周期<sup>[2]</sup>。1997 年陶佩珍等<sup>[3]</sup> 又发现其具有良好的抗病毒活性,这些特点显示 GA 有良好的应用前景。格尔德霉素衍生物对实体瘤的治疗作用已在美国 NCI 进行 I 期临床实验<sup>[4]</sup>。有关 GA 生物合成基因的报道很少,在 1994 年有鸟枪克隆法使产生菌部分 DNA 片段在变铅青链霉菌表达而产生 GA 的报道<sup>[5]</sup>,直至 2003 年美国 Kosan 公司发表了 GA 生物合成基因簇的报道<sup>[6]</sup>。本实验室基本是与此同步独立地开展了 GA 生物合成基因克隆的研究。深入研究 GA 生物合成基因及其机理,对于提高产生菌的产量、阐明其构效关系进而改造其结构有重要的意义。

GA 属安莎类抗生素,其聚酮体部分的生物合成由 I 型 PKS (polyketide synthase-聚酮合酶) 所催化。利用 PKS I 型基因的同源性有可能获得其生物合成基因。为了验证所研究基因与 GA 生物合成的相关性,必须在 GA 产生菌中建立合适的基因转移系统。一般在吸水链霉菌中较难形成基因转移系统。质粒 KC515 ( $C^+$ ,  $attP^-$ )<sup>[7]</sup> 由链霉菌温和噬菌体  $\phi$ C31<sup>[8]</sup> 衍生,本文通过研究其在吸水链霉菌 17997 形成溶源

菌的条件,在该菌中成功地建立了基因转移体系。同时,利用所建立的基因转移系统,通过基因阻断技术鉴定了与 GA 相关的 PKS 合成基因,为 GA 生物合成完整基因簇的克隆创造条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和质粒** 变铅青链霉菌 *Streptomyces lividans* 格尔德霉素产生菌——吸水链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus* 17997,大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , pUC18 质粒, tsr (硫链丝菌素-Thio) 抗性基因探针载体 pSW1<sup>[9]</sup> 等由本室保存。链霉菌温和噬菌体  $\phi$ C31 衍生载体 KC515 ( $C^+$ ,  $attP^-$ ),由中国科学院谭华荣研究员惠赠。*S. hygroscopicus* 17997 柯斯质粒基因文库,本实验室构建<sup>[10]</sup>。

**1.1.2 培养基** *S. lividans* 1326 原生质体的制备和再生培养基 R2YE,溶源菌的分离纯化培养基 MM 均按文献 [11] 配制。大肠杆菌培养基 LB 按文献 [12] 配制。噬菌体 KC515 的分离纯化和贮存培养基 DNB 琼脂、SNA、DNB,分别按文献 [11] 配制。*S. hygroscopicus* 17997 斜面培养基(简称 YMG 培养基)SG-GP、合成 V 号培养基按文献 [10] [11] [12]。

**1.1.3 抗生素、工具酶与生化试剂**: 氨苄青霉素

(Ampicillin, Amp) 为华美公司产品。硫链丝菌素 (Thiostrepton, thio) 由美国 Squibb & Sons 公司赠送, 限制酶、碱性磷酸酶、T4DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司, PEG-1000 为英国 Koch-light 公司产品。

**1.1.4 试剂盒:** 地高辛试剂盒购于 Roche 公司。DNA 回收试剂盒: 用 Geneclean 公司 Bio101<sup>R</sup> kit。噬菌体 DNA 提取试剂盒: Qiagen 公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的提取及体外操作:** 噬菌体 DNA 提取、噬菌体的分离、纯化、及贮存和链霉菌总 DNA 提取及菌落杂交参考文献 [13]。大肠杆菌中质粒的提取、酶切、回收、连接按文献 [14] 进行。

**1.2.2 Southern 杂交按文献 [13] 进行。**

**1.2.3 变铅青链霉菌原生质体的制备和转化按文献 [13]。**

**1.2.4 溶源菌发酵培养及产物提取和 TLC 分析按文献 [10]。**

**1.2.5 GA 的 HPLC 分析条件:** 岛津 LC-10A, C18 反相柱, 流动相为甲醇:水 (80:20), 流速 1mL/min, 紫外波长 304nm 处检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *S. hygroscopicus* 17997 中 PKS 基因的克隆与分析

GA 属安莎类抗生素, 其特征是由一个芳香环与脂肪族安莎链以酰胺键连接形成的环状结构。已知的安莎类抗生素, 如力复霉素等生物合成基因研究表明, 其脂肪族安莎链的生物合成是由 PKS I 型酶

系催化乙酸和丙酸缩合而成的。因此利用 PKS I 基因同源性有可能获得参与 GA 生物合成的 PKS 基因。根据红霉素、竹桃霉素等 PKS I 型合酶 KS/AT 保守域, 设计简并性引物:

1. KS specific: 5' GCTCTAGAGCRATCTCRCCCTGCGARTG 3' (R = G/A)
2. AT specific: 5' GCTCTAGACGGTSAAGTCSAACATCGG 3' (S = G/C)
3. KS specific: 5' GCTCTAGAGCTGYTCGTCGTCGCTGGTSGCG 3' (Y = C/T, S = G/C)

1 与 2, 3 与 2 分别配对, 以 GA 产生菌 *S. hygroscopicus* 17997 总 DNA 为模板, 在高严谨条件下 PCR 扩增得到 0.9 kb 和 1.3kb 片段, 测序分析表明二者均与典型的 PKS I 型基因簇有较高的同源性, 前者与竹桃霉素 PKS 模块 5 和 6 的一致性为 50%, 后者与红霉素 PKS 模块 1 和 2 的一致性为 36%。以 0.9kb 片段为探针, 与 *S. hygroscopicus* 17997 基因文库在严谨条件下进行菌落杂交, 将阳性克隆的 DNA 经 *Bam*HI 酶切后进行 Southern 杂交 (图略), 有阳性杂交信号的片段, 以 *Bam*HI 酶切片段亚克隆至 pUC18 载体后测序, 结果见表 1。由此可见, 利用 PKS I 型基因同源性从 GA 产生菌 *S. hygroscopicus* 17997 中至少获得了 6 个与 PKS 相关 DNA 片段。而且它们之间经 *Bam*HI 酶切电泳分析没有发现很好的重叠性。推测 *S. hygroscopicus* 17997 中可能含 1 个以上 I 型 PKS 基因簇, 此现象在微生物中很普遍。据此我们决定通过基因阻断实验从中鉴定与 GA 相关的 PKS 生物合成基因。

表 1 PKS 基因探针获得柯斯质粒的克隆及序列分析结果

Table 1 Blast result of the DNA sequence hybridized with the PKS gene probe in the cosmids

Cosmids	Subcloned <i>Bam</i> HI fragment	Subcloned plasmids	Blast result
pCGBK2	1.6kb	pSC124	PKS I-oleandomycin module 5 and 6
pCGBK 4	1.8kb	pSC130	PKS I-oleandomycin module 5 and 6
pCGBK 6	2.5kb	pSC115	PKS I-pickromycin module 3 and 4
pCGBK 10	2.0kb	pSC116	PKS I-pickromycin module 5 and 6
pCGBK 11	4.0kb	pSC118	PKS I-erythromycin module 1 and 2
pCGBK 18	1.0kb	pSC123	PKS I-erythromycin module 3 and 4

### 2.2 吸水链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus* 17997 中噬菌体基因转移方法的建立

为研究相关基因在 GA 生物合成中的作用, 必须在 GA 产生菌中建立基因转移系统。为此我们对链霉菌温和噬菌体转染吸水链霉菌 *S. hygroscopicus* 17997 的条件进行了研究。野生型  $\phi$ C31 噬菌体, 一

般是通过染色体上的 attP 位点整合到宿主菌染色体上而形成溶源。由其衍生的噬菌体载体 KC515 (含有硫链丝菌素 *tsr* 抗性基因) 缺失了特殊的整合位点 attP, 外源 DNA 片段可通过与宿主染色体的同源重组整合到染色体的某位点上, 从而形成溶源, 并以载体上含有的完整的阻遏基因, 维持溶源状态。采

用硫链丝菌素抗性标记可筛选出整合有原噬菌体的溶源菌。

司樾东<sup>[15]</sup>研究了溶源菌形成条件发现,宿主菌细胞溶源化与噬菌体感染时的环境条件及宿主菌细胞的生理状态相关。我们在不同培养基中研究了  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  离子对重组噬菌体 ph258 转染 *S. hygroscopicus* 17997 形成溶源菌的影响,结果见表 2。由表 2 中结果可见  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  离子对转导效率均有一定影响,其影响作用与培养基有关;DBA 培养基中加入  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  离子均不能发生转导;SGGP 和 MM 培养基中已含有  $Mg^{2+}$  离子,但不能形成转导,再加入 10mmol/L  $MgSO_4$  可形成一定转导效率;而在已含有  $Mg^{2+}$  离子的合成 V 号培养基中,再加入 10mmol/L  $MgSO_4$  并不能形成转导,而且  $Mg^{2+}$  离子促进转导效率较为明显, $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  离子同时加入也不能进一步提高转导效率(数据略)。

在 YMG 培养基中加入 10mmol/L  $MgSO_4$  可得到  $10^3/\mu g$  噬菌体 DNA 的高转导效率,但加入 30mmol/L  $MgSO_4$  转导频率反而降低,可见噬菌体形成溶源状态时对镁离子的浓度比较敏感。 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  离子对噬菌体感染时形成溶源菌的确切作用尚不清楚。

表 2 不同培养基中添加  $Mg^{2+}$  离子对噬菌体转导效率的影响

Table 2 The effect of  $Mg^{2+}$  concentration on transduction efficiency in different culture media

Medium with 10mmol/L $MgSO_4$	Transduction efficiency/ $\mu g$ DNA	Medium without $MgSO_4$	Transduction efficiency/ $\mu g$ DNA
YMG	$1 \times 10^3$	YMG	0
SGGP	$1.7 \times 10^2$	SGGP	0
DBA	0	DBA	0
MM	$1.7 \times 10^2$	MM	0
Synthetic medium V	0	Synthetic medium V	0

表 3 不同培养基中添加  $Ca^{2+}$  对噬菌体转导效率的影响

Table 3 The effect of  $Ca^{2+}$  concentration on transduction efficiency in different culture media

Medium with 8mmol/L $Ca(NO_3)_2$	Transduction efficiency/ $\mu g$ DNA	Medium without $Ca(NO_3)_2$	Transduction efficiency/ $\mu g$ DNA
YMG	$1.7 \times 10^2$	YMG	0
SGGP	$1.7 \times 10^2$	SGGP	0
DBA	0	DBA	0
MM	$1.7 \times 10^2$	MM	0
Synthetic medium V	0	Synthetic medium V	0

由此,我们在 *S. hygroscopicus* 17997 中建立了一个稳定的噬菌体转导基因系统,一般在含 10mmol

$MgSO_4$  的 YMG 培养基中,重组噬菌体转导频率均达到  $10^2 \sim 10^3/\mu g$ DNA 的水平。

### 2.3 重组噬菌体构建

由于 KC515 能容纳外源片段的大小为 4.0kb 左右,我们将 pSC123、pSC115、pSC116、pSC124、pSC130 以 *Bam*HI 消化与经 *Bam*HI 酶切并去磷酸化后的 KC515 载体连接,连接反应混合物转化新鲜制备的 *S. lividans* 1326 原生质体,以 R2YE 再生培养基铺平板,用含有 *S. lividans* 1326(约  $10^7$  孢子/mL)的软质 R2YE 覆盖皿上层。28℃ 培养 16h,挑取分隔良好的单个噬菌斑制备噬菌体悬液,提取噬菌体 DNA,*Bam*HI 酶切鉴定重组子结果如图 1,获得相应的重组噬菌体 ph105、ph287、ph16、ph111 和 ph258。

1 2 3 4 5 6 7

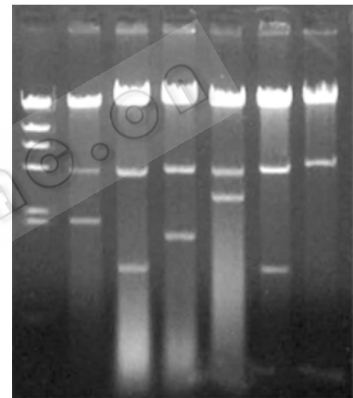


图 1 含外源片段的重组噬菌体的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction analysis of recombinant phages DNA

### 2.4 基因阻断实验以鉴定与格尔德霉素生物合成相关基因

将上述构建的 5 个重组噬菌体以双层固体平皿法进行分离纯化,并制备高效价重组噬菌体(浓度约为  $10^9$  pfu/mL),将重组噬菌体与 *S. hygroscopicus* 17997 孢子( $10^9$ /mL)混合、涂布于含 10mmol/L  $MgSO_4$  的 YMG 平皿,28℃ 培养 16h 后,以硫链丝菌素覆盖( $10\mu g/mL$ ),继续培养 7~8d,将孢子影印于 MM 培养基平皿(含  $10\mu g/mL$  thio),28℃ 培养 7~8d 后,挑取单菌落进行分离纯化。重组噬菌体中外源片段以单交换形式与宿主菌发生同源重组,并整合于 *S. hygroscopicus* 17997 染色体,形成稳定的溶源菌,并转导其硫链丝菌素抗性。经纯化分离获得了稳定的溶源菌 G287、G116 和 G258。

提取溶源菌总 DNA,经 *Bam*HI 酶切、电泳,以 *tsr* 基因为探针进行杂交,结果显示 G116、G258、G287 菌株总 DNA 中均显示阳性信号,而野生型 *S. hygroscopicus* 17997 中没有显示阳性信号条带(图

略),说明三株溶源菌总 DNA 中确实整合有来自噬菌体的 *tsr* 抗性基因,排除了自发抗性的可能性。

以 *S. hygroscopicus* 17997 原株发酵产物提取液及 GA 纯品作为对照(Rf 值为 ~0.53),将各溶源菌发酵产物提取液进行 TLC 分析,发现只有溶源菌 G116 产物的 TLC 板上未发现相应的斑点。HPLC 分析结果显示 GA 组分在 C18 柱上的保留时间在 5.188~5.367min 之间,而 G116 在该时间范围内无明显吸收峰。结果见图 2。表明在 G116 中 *ph116* 的整合使 GA 的生物合成阻断,证明重组噬菌体 *ph116* 中 *Bam*HI2.0kb 片段可能含有与 GA 生物合成相关基因。

本研究涉及的柯斯质粒、相关亚克隆质粒、重组噬菌体及溶源菌列于表 4。

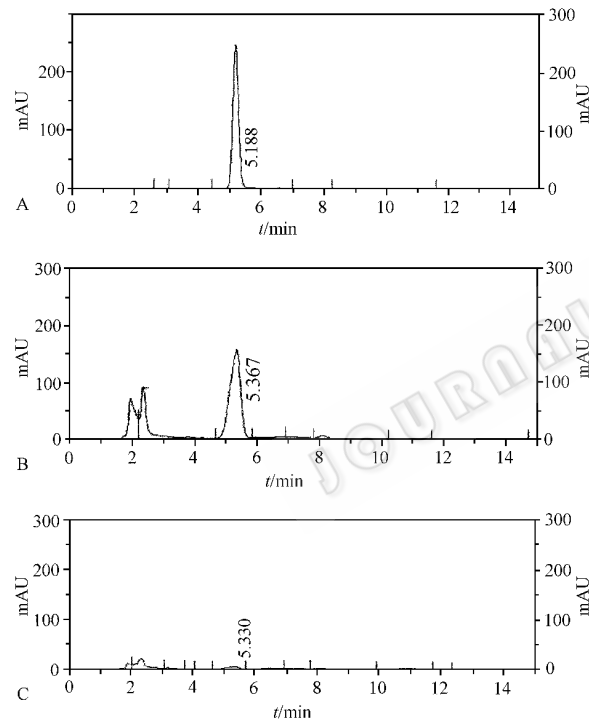


图 2 G116 基因阻断株发酵产物 HPLC 的分析

Fig.2 HPLC analysis of fermentation product of gene disruptant of G116

表 4 本文涉及的柯斯质粒、亚克隆质粒、重组噬菌体及溶源菌

Table 4 The cosmids, subcloned plasmids, recombinant phages and lysogens mentioned in this paper

Cosmids	Subcloned plasmids	Recombinant phages	Lysogens
pCGBK2	pSC124	ph111	G111
pCGBK 4	pSC130	ph258	G258
pCGBK 6	pSC115	ph287	G287
pCGBK 10	pSC116	ph116	G116
pCGBK 18	pSC123	ph105	G105

*ph116* 中 *Bam*HI2.0kb 片段来源于柯斯质粒

pCGBK10 表明通过噬菌体介导的基因阻断实验,我们在 *S. hygroscopicus* 17997 中从 5 个与 PKS I 型基因同源的柯斯质粒中,鉴定了一个可能含有与 GA 生物合成相关基因的柯斯质粒,该质粒外源片段的大规模测序正在进行中。

将 pCGBK10 柯斯质粒与本实验室利用 3-氨基 5-羟基苯甲酸(AHBA)探针杂交得到的其它两个阳性柯斯质粒(pCGBA1 和 pCGBA17)分别转化 *S. lividans* TK24 转化子进行联合共培养,能够产生完整的 GA,直接证明含有 pSC116 *Bam*HI2.0kb 片段的柯斯质粒 pCGBK10 的基因与 GA 生物合成相关(另文发表)。本实验所建立的 *S. hygroscopicus* 17997 基因阻断系统,对来自大的转录单位的 DNA 片段尤其适用,因为在这样的转录单位中,得到一个内部片段的机会较大,在这种情况下,插入片段的大小一般在 1~4kb 之间。基因阻断技术验证的目的 DNA 片段,不仅对生物合成基因簇克隆提供明确的依据,而且通过“阻断”所验证的 DNA 片段可作为探针,进一步用于生物合成基因簇的筛选。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] DeBoer C, Meulman P A, Wnuk R J. Geldanamycin: a new antibiotic. *The J of Antibiotics*, 1970, **23**: 442-447
- [2] Supko J G, Hickman R L, Grever M R. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995, **36**(4): 305-315
- [3] TAO P X(陶佩珍), LOU Z X(娄志贤), YAO T J(姚天爵) et al. Antiviral Study on the broad spectrum antiviral antibiotic 17997 *in vitro* and *in vivo*. *Chinese Journal of Antibiotics*(中国抗生素杂志), 1997, **22**(5): 368-372
- [4] Nimmanapalli R, O'Bryan E, Bhalla K. Geldanamycin and its analogue 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer research*, 2001, **61**: 1799-1804
- [5] Allen I W, Ritchie D A. Cloning and analysis of DNA sequences from *Streptomyces hygroscopicus* encoding geldanamycin biosynthesis. *Mol Gen Genet*, 1994, **243**: 593-599
- [6] Andreas Rascher, Zhihao Hu, Nina Viswanathan et al. Cloning and characterization of a gene cluster for geldanamycin production in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL3602. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, pp. 1-8
- [7] Rodicio M R, Bruton C J, Chater K F. New derivatives of the *Streptomyces* temperate phage $\phi$ C31 useful for the cloning and functional analysis of *Streptomyces* DNA. *Gene*, 1985, **34**: 283-292
- [8] Lomovskaya N D, Mkrtumian NM et al. Isolation and characteristics of *Streptomyces coelicolor* actinophage. *Genetika*. 1970, **6**: 135-137.
- [9] Shang Guangdong, Dai Jianlu, Wang Yiguang. Construction and physiological studies on a stable bioengineered strain of Shengjimycin. *The J of Antibiotics*, 2001, **54**(1): 66-73
- [10] Gao Qunjie(高群杰), Shang Guangdong(尚广东), Yang Ying(杨樱) et al. Cloning and analysis of Geldanamycin biosynthetic genes from *S. hygroscopicus* 17997. *Chinese J of Antibiotics*(中国抗生素杂志) 2002, **27**(1): 1-6

- [ 11 ] WANG Y G , LI R F . Cloning and sequencing the isopenicillin N synthetase( IPNS ) gene from *S. cattleya* . *Acta Microbiologica Sinica* 1996 , 36 ( 2 ) : 87 - 92
- [ 12 ] WANG Y G , GONG L M . Plasmid DNA in midecamycin-producing strain *S. mycarofaciens* 1748 . *Proc. CAMS and PUMC* , 1986 , 1 ( 1 ) : 37 - 44
- [ 13 ] Kieser T , Bibb M J , Buttner M J *et al.* . *Practical Streptomyces Genetics* . The John Innes Foundation , Norwich , 2000
- [ 14 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . *Molecular cloning : a laboratory manual* . 2<sup>nd</sup> ed . New York : Cold Spring Harbor laboratory , 1989 .
- [ 15 ] Si Xidong ( 司 樾 东 ) . *Phage ( 噬菌体学 )* , Science Press ( 科学出版社 ) , 1991 .

## Establishment of Gene Transduction System in Geldanamycin Producer—— *Streptomyces hygroscopicus* 17997 and its Application for Gene Disruption Experiment

GAO Hui-Ying   WANG Yi-Guang\*   GAO Qun-Jie   SHANG Guang-Dong   SUN Gui-Zhi   YANG Ying  
( *Institute of Medicinal Biotechnology , CAMS & PUMC , Beijing , 100050 , China* )

**Abstract** *Streptomyces hygroscopicus* 17997 produces the antiviral and antitumor ansamycin antibiotic , geldanamycin . Studies on geldanamycin biosynthetic pathway will provide good tools for genetic manipulation of the antibiotic-producing strain to improve the productivity or to facilitate making novel geldanamycin analogs . The structural similarities between geldanamycin and ansamycins such as rifamycin or ansatrienin suggest that both geldanamycin and ansamycins has a closely related pathways of biosynthesis and that biosynthetic system for geldanamycin is similar to the one of type I polyketide synthase ( PKS ) enzyme system . To explore the possible PKS genes involved in geldanamycin biosynthesis , the degenerate primers were designed according to the conserved sequence of KS-AT region from erythromycin and oleandomycin type I PKS genes . Cosmids containing multiple PKS genes ( pCGBK2 , 4 , 6 , 10 , 11 , 18 ) were obtained by hybridization with the PCR products , which were amplified from *S. hygroscopicus* 17997 genomic DNA . The designed primers above were used for PCR . Development of a *Streptomyces* temperate phage  $\Phi$ C31-derivative KC515 ( *tsr<sup>R</sup>* ) transduction system was carried out for identification of cosmids containing the PKS gene related to biosynthesis of geldanamycin .

Several factors , mainly the  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{+}$  concentrations in different culture media affecting the frequency of gene transfection , were optimized . Transfection efficiency could reach up to  $10^3/\mu g$  DNA on YMG medium supplemented with 10mmol/L  $MgSO_4$  . Reversely , the transfection efficiency decreased when YMG medium was supplemented with 30mmol/L  $MgSO_4$  . Gene transfection system based on the integration-defective phage KC515 had been established for *S. hygroscopicus* 17997 . Recombinant phages ( ph111 , 258 , 287 , 116 , 105 ) were constructed by insertion of the homologous to PKS gene fragments into the KC515 phage vector . Gene disruption experiments were performed by transduction of recombinant phages into *S. hygroscopicus* 17997 genome , and disruption of geldanamycin production was observed as a result of homologous recombination between the cloned insert in recombinant phage and the *S. hygroscopicus* 17997 genome by integration . Thiostrepton resistant transductants were selected and integration event was analyzed by Southern hybridization . The fermentation broth extracts from five resistant transductants were analyzed by TLC and HPLC . The results showed that only G16 mutant failed to produce geldanamycin . This result showed that the integration of the insert DNA fragment in recombinant phage ph16 into the chromosome of *S. hygroscopicus* disrupted the expression of the geldanamycin biosynthetic genes . The original cosmid pCGBK10 containing this cloned insert was predicted to encode PKS genes in the geldanamycin biosynthesis . This study laid the foundation for cloning the PKS genes involved in geldanamycin biosynthetic gene cluster from *S. hygroscopicus* 17997 .

**Key words** *Streptomyces hygroscopicus* , gene disruption , geldanamycin biosynthetic genes

Received : 01-05-2003

This work was supported by Grant from Minister of NST under 973 Preliminary Research Project Program ( No. 2001CCA00500 )

\* Corresponding author . Tel : 86-10-63038137 , Fax 86-10-63038137 , E-mail : wangyh456@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>