



田平雅,吕苗苗,杨光耀,等.重叠延伸 PCR-酶切连接法构建链霉菌表达载体[J].黑龙江农业科学,2021(1):5-10.

# 重叠延伸 PCR-酶切连接法构建链霉菌表达载体

田平雅,吕苗苗,杨光耀,马次郎,牛 春,张 萍

(宁夏泰瑞制药股份有限公司,宁夏 银川 750101)

**摘要:**在功能基因组学时代,对基因的功能研究将涉及到大量的载体构建,为建立一种链霉菌外源基因多拷贝表达的载体构建方法,本研究采用重叠延伸 PCR 与双酶切结合的连接方法,构建链霉菌表达载体,以红霉素工业生产菌红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*)基因组 DNA 为模板,扩增红霉素合成相关的甲基化酶基因(erythromycin O-methyltransferase, *eryG*)和羟基化酶基因(erythromycin C-12 hydroxylase, *eryK*),以及启动子 *permE* 基因,采用重叠延伸 PCR 及 *EcoR* V、*Not* I 和 *Xba* I 酶切位点相结合的连接方法构建含有多个基因片段的链霉菌重组表达载体。成功构建了携带外源基因的表达载体 pSET001、pSET002 和 pSET003,最终获得含有多个基因的重组质粒。双酶切载体构建时载体或 DNA 片段上可用的限制性酶切位点受到限制,通过结合重叠延伸 PCR 技术,可以利用较少的内切酶快速构建含有多个基因片段的重组载体,为红霉素生产菌的改造提供了重组载体。

**关键词:**重叠延伸 PCR;pSET152 载体;酶切;连接

微生物中代谢产物表达量的高低往往与其生物合成关键基因的拷贝数密切相关<sup>[1]</sup>。通过体外构建多拷贝数基因序列,导入到宿主菌中来实现目标产物增高的相关研究在逐渐增多,而生物合

成关键基因的研究同时涉及到了大量的载体构建,因此载体系统的开发和构建策略的创新对加速基因功能的研究具有重要意义。酶切连接载体构建策略是一种经典的载体构建方法,它依赖于质粒上的多克隆位点,使用限制性内切酶和 DNA 连接酶等实现外源 DNA 片段的插入。酶切连接载体构建策略对少数几个基因的载体构建稳定可靠,但当遇到长片段基因或多基因片段组装到一

收稿日期:2020-09-13

第一作者:田平雅(1993—),女,硕士,助理工程师,从事微生物菌种发酵研究。E-mail: 564967039@qq.com。

## Effects of Pingyangmycin on Mutagenesis of Male and Female Gametes in *Triticum aestivum* L.

LIU Wen-lin<sup>1</sup>, ZHANG Hong-ji<sup>1</sup>, SUN Yan<sup>1</sup>, TANG Jing-quan<sup>1</sup>, YANG Shu-ping<sup>1</sup>, WANG Xiang-yu<sup>1</sup>, ZHANG Bao-hui<sup>2</sup>

(1. Crop Resources Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Tenihe Farm of Hulunbuir of Inner Mongolia Autonomous Region, Hulunbuir 021000, China)

**Abstract:** In order to improve the mutagenic effects of chemical mutagens, pingyangmycin (20, 40 and 80  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were injected into the glume and sheath of two wheat varieties and made a direct effect on wheat gametes by husk and sheath injection. Agronomic traits of wheat genetic offspring was investigated. The results showed that *in vivo* mutagenesis treatment, the emergence rate of the  $M_1$  of both Longfu 06K508 and Longfu 06-6798 decreased with the increase of concentration. There was a difference in the lethal dose between the two varied by glume injection, but the median lethal dose was not achieved by leaf sheath injection. The two treatments showed variation in plant height, growth period and awn type of  $M_1$  and  $M_2$ . Data analysis showed that the plant height, ear length, and spikelet number of  $M_1$  generation was significantly different to CK by glume injection method. However, the method of leaf sheath injection was not significant. Compared with CK, the ear length and spikelet number of the  $M_2$  by leaf sheath injection method changed significantly, while the plant height and spikelet number of the glume injection method changed significantly and extremely significantly compared with CK. It indicated that the glume injection method has direct effect on male and female gametes, it was a good moisturizer and the effect time was long. It could produce abundant variations in mutagenesis progeny and be used in mutation breeding.

**Keywords:** wheat (*Triticum aestivum* L.); chemical mutagenesis; pingyangmycin; character variation



个目的载体上的时候,最大的缺陷是载体或 DNA 片段上可用的限制性内切酶酶切位点受到限制<sup>[2-3]</sup>。虽然,目前可供研究者选择使用的商业化的 II 型内切酶在逐渐增多,但依然无法解决 DNA 片段上限制性酶切位点受限的问题。重叠延伸 PCR(Overlap Extension PCR,OE-PCR)技术,该技术利用末端互补的引物,进行 PCR 反应,使 PCR 产物末端形成重叠链,在之后的扩增反应中通过重叠链的延伸,可以将两个或者是两个以上的 DNA 片段拼接成一个 DNA 片段<sup>[4-5]</sup>。重叠延伸 PCR 技术成功的关键是重叠互补引物的设计、PCR 反应条件和 DNA 聚合酶的选择<sup>[6]</sup>。尽管重叠延伸 PCR 技术显示出许多优势,但在应用中仍存在某些不足,如在实际操作过程中产生目的条带弥散、目的 DNA 扩增量少或者非特异性扩增的现象,尤其当扩增序列有特殊结构如局部高 GC 含量、含有重复序列,更容易使第二轮 PCR 时产生非特异性扩增,甚至得不到目的 DNA 片段,影响后续试验<sup>[7]</sup>。

目的片段连入载体的方式主要有:依赖于限制性内切酶和修饰酶进行的酶切连接载体构建;依赖于长粘性末端连接的载体构建;依赖于同源重组的载体构建和基于 PCR 的载体构建等。通过分析每一种策略,发现均存在问题,为此研究者采取了多种策略结合进行重组载体的构建,通过将不同的策略两两或多种结合使用,避免单独使用的弊端,试验采用重叠延伸 PCR 与双酶切结合的连接方法,能够更好地把目的基因组与目标载体进行重组,可以利用较少的内切酶快速构建含有多个基因片段的重组载体,进而用于后续生物发酵的改造。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株及质粒 本研究以 pSET152 为载体,它以安普抗性基因 *acc(3)IV* 为抗性标记, pSET152 载体能够将外源基因整合进入链霉菌基因组中,是链霉菌基因组高表达特定基因时常用的基因导入载体。本研究中相关菌株及质粒具体信息详见表 1。

表 1 试验所用菌株及质粒

菌株/质粒	主要特征	来源
红色糖多孢菌	红霉素工业生产菌株	本实验室保存
大肠杆菌 <i>E. coli</i> DH5α	基因克隆宿主菌	本实验室保存
pSET152	安普抗性基因 <i>acc(3)IV</i>	本实验室保存

1.1.2 试验材料及试剂 细菌基因组提取试剂盒、凝胶回收试剂盒以及质粒小提试剂盒(均购自美国 Omega Bio-Tek 公司);Gelstain DNA 染料和 2×Power *Taq* MasterMix(购自北京全式金生物技术有限公司);6×Loading Buffer 和 DNA Marker(北京天根生化科技有限公司);2×*Taq* Plus Master mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);琼脂糖(上海玉博生物科技有限公司);限制性核酸内切酶 *EcoR* V、*Not* I、*Xba* I(购自 New England Biolabs(NEB)公司);胰蛋白胨和酵母提取物(购自美国 OXOID 公司);琼脂粉(国药集团化学试剂有限公司);大豆蛋白胨(北京奥博星生物技术有限责任公司);氯化钠(天津市凯通化学试剂有限公司)。

LB 培养基:1.0%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,1.0%NaCl,pH 自然。

TSBY 培养基:1.5%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,0.5% NaCl,0.5%大豆蛋白胨,pH 自然。

1.1.3 PCR 扩增引物 在 GenBank 中查找限速酶基因 *eryK* 和 *eryG* 序列以及启动子 *permE* 基因序列,并结合 pSET152 载体序列利用引物设计软件 Primer premier 5.0 设计试验所用的所用引物,送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成序列,试验中各引物序列详见表 2,并根据相应的引物对,以出发菌株基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增获得 *permE*、*eryK* (1)、*eryK* (2) 和 *eryG* 基因片段,其 PCR 反应体系及常用反应程序(20 μL 反应体系)为:1 L 模板 DNA,10 μL 2×*Trans Taq* H Fi PCR Super Mix,正反向 PCR 引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 0.4~0.8 μL,双蒸水补至 20 μL。

反应程序:退火温度根据目的基因片段实际 Tm 值来确定,95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s;50~72℃退火 30 s;72℃延伸 1 min(第二步到第四步进行 30~32 个循环);72℃延伸



10 min,降温至 4 ℃,进行 1% 的琼脂糖凝胶检测,并在凝胶成像仪中拍照分析,根据条带大小,在紫外灯下将单一的目的 DNA 条带切下,放入干净的离心管中并称其重量,利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段,并利用核酸微量检测仪测定其浓度。

表 2 引物序列信息

扩增片段名称	引物名称	引物序列
<i>permE</i> 基因	P1-F	5'-TAGATATCGGTACCAGCCCGACCCGAGC-3'
	P1-R	5'-CGTTTCAGCCTCCTTACCAACCGGCACGAT-3'
<i>eryK</i> (1)基因	K1-F	5'-TTGACCACCATCGACGAAG-3'
	K1-R	5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCGGACCTGGAGACCGCC-3'
<i>eryK</i> (2)基因	K2-F	5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCCACCGCCACCGCGGAAG-3'
	K2-R	5'-GCTCTAGAGGACCTGGAGACCGCC-3'
<i>eryG</i> 基因	G-F	5'-ATCAGCTGTGCGCAGGTGCTGTTGCCGTC-3'
	G-R	5'-GCTCTAGACGCCGACTACCGCGTGCTGC-3'
<i>permE-eryK</i> (1)重复序列	PK1-F	5'-CGGGAACCTTCGTCGATGGTGTC AACGTTTCAGCCTC-3'
	PK1-R	5'-GGT AAGGAGGCTGAAACGTTGACCACGATCGAC-3'
<i>eryK</i> (2)- <i>eryG</i> 重复序列	KG1-F	5'-CGCAGTAGACGTACTTGCACTGCCCCGGCGTGCGCAGGTGCTGTTGCCGTC-3'
	K2G-R	5'-GGGCGCAGGGACGGCAACAGCACCTGCGCACCGCGGGGCAGTGCAAGTACGTCTA-3'

1.2 方法

1.2.1 *permE-eryK*(1)基因片段的获取 采用重叠延伸 PCR,第一轮 PCR:A.以回收备用的 *permE* 基因为模板,选择引物对 P1-F/PK1-R 扩增 *permE* 基因片段加与 *eryK*(1)基因重叠的片段 *permE*+,并将 PCR 产物进行电泳检测;B.以获得的 *eryK*(1)基因片段为模板利用引物对 PK1-F/K1-R 扩增 *eryK*(1)基因加与 *permE* 基因重叠的片段 *eryK*(1)+,PCR 反应体系及反应条件同 *eryK*(1)基因扩增一样,同样进行电泳检测;第二轮 PCR:A.分别用凝胶回收试剂盒回收第一轮 PCR 产物,测定其浓度,调整相近的浓度值,以 *permE*+和 *eryK*(1)+混合样作为模板,以 P1-F/K1-R 为引物进行第二轮 PCR,经 PCR 扩增后的目的片段 *permE-eryK*(1)进行凝胶回收,并检测其浓度和纯度,获得高质量的产物,用于后续酶切连接。

1.2.2 pSET001 重组载体的构建 ①酶切:将获得的 *permE-eryK*(1)基因片段,通过酶切的连接方式与载体进行连接,选用 50 μL 的双酶切体系:*EcoR* V 和 *Not* I 内切酶各 1 μL,共用缓冲液 Buffer 5 μL,载体与目的片段分开进行酶切胶回收,各 1 μg,补充水至 50 μL;37 ℃水浴酶切 4~5 h或过夜,65 ℃ 20 min 使酶失活,凝胶回收酶

切产物进行连接。②连接体系一般为 10 μL,重组质粒与片段之间摩尔比 1:3 连接,其中质粒 DNA 50 ng,目的 DNA 150 ng,5×*T*<sub>4</sub> DNA Buffer 2 μL,*T*<sub>4</sub> DNA 连接酶 1 μL,补加 ddH<sub>2</sub>O 至 10 μL,16 ℃过夜连接。③转化:在 100 μL 的 DH5α 大肠杆菌感受态细胞中加入 10 μL 的连接产物,温和混匀,冰上孵育 30 min;42 ℃水浴 60 s,冰浴 2 min;加入 890 μL LB 液体培养基,37 ℃摇床摇 1 h;5 000 r·min<sup>-1</sup> 简短离心,弃部分上清,留 200 μL 的沉淀溶液涂布于含 Apr(70 μg·mL<sup>-1</sup>) 的 LB 培养皿,37 ℃培养 12~16 h,观察结果,通过 PCR 扩增电泳检测,初步确定阳性重组载体,选择一到两株阳性菌株扩大培养,利用质粒提取试剂盒提取质粒 DNA,选择 50 μL 的双酶切体系进行 37 ℃水浴过夜酶切,酶切产物进行琼脂糖电泳检测,验证目的条带大小;随后将酶切鉴定确定的菌株送样至生工生物工程(上海)股份有限公司进行目的基因核酸序列检测,将测序结果与原始目的序列进行比对,相似率为 100%,则说明重组载体构建成功。

1.2.3 pSET002 重组载体的构建 利用 *Not* I 和 *Xba* I 双酶切连接重组载体 pSET001 与目的片段 *eryK*(2),构建获得重组载体 pSET002,试验过程同 1.2.2 所示。

1.2.4 基因大片段 *permE-eryK(1)-eryK(2)-eryG* 的获取 同样采用重叠延伸 PCR, 分别以重组载体 pSET002 质粒 DNA 和获得的 *eryG* 基因为模板, 采用引物对 P1-F/K2G-R 和引物对 KG1-F/G-R 进行第一轮 PCR, 并以第一轮 PCR 产物等浓度混匀为模板, 以 P1-F/G-R 为上下游引物对, 进行第二轮 PCR 延伸连接, 最终获得基因片段 *permE-eryK(1)-eryK(2)-eryG*, 具体操作过程与 1.2.1 相同。

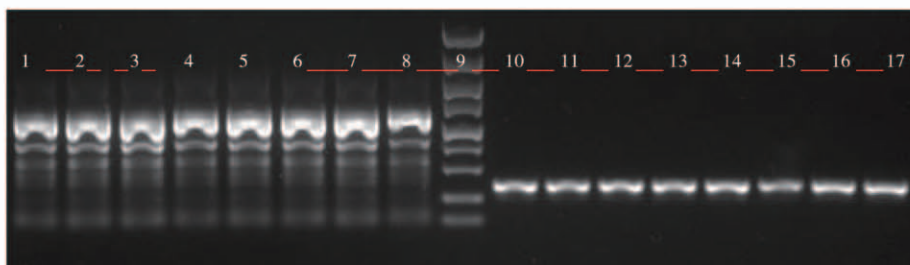
1.2.5 pSET003 重组载体的构建 利用 *EcoR V* 和 *Xba I* 双酶切连接 pSET152 载体与基因大片

段片段 *permE-eryK(1)-eryK(2)-eryG*, 构建获得重组载体 pSET003, 试验过程同 1.2.2。

## 2 结果与分析

### 2.1 *permE*、*eryK(1)*、*eryK(2)* 及 *eryG* 基因片段的获取

以红色糖多孢菌全基因组 DNA 为模板, 扩增 *eryG* 大小为 1 455 bp; *permE* 大小为 284 bp; *eryK(1)* 大小为 1 233 bp; *eryK(2)* 大小为 1 657 bp 的 4 个基因片段, 最终完整获得高浓度以及高纯度的 *eryG*、*permE*、*eryK(1)*、*eryK(2)* 基因片段(图 1 和图 2)。



1~8: *eryK(1)* 基因片段(1 233 bp); 9: 100~5 000 bp DNA Ladder; 10~17: *permE* 基因片段(284 bp)

图 1 *permE* 和 *eryK(1)* 基因电泳检测结果



泳道 1~4: *eryG* 基因片段(1 455 bp); 5: 500~4 000 bp DNA Ladder; 6~13: *eryK(2)* 基因片段(1 657 bp)

图 2 *eryK(2)* 和 *eryG* 基因电泳检测结果

### 2.2 *permE-eryK(1)* 基因片段的获取

采用延伸 PCR 的方法成功连接了 *permE* 和 *eryK(1)* 得到 *permE-eryK(1)* 基因片段为 1 517 bp(图 3)。



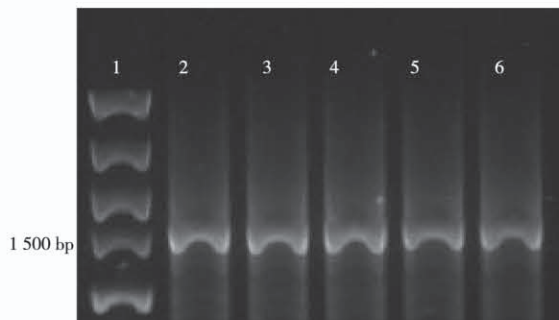
泳道 1~2: *permE-eryK(1)* 基因片段(1 517 bp); 3: 500~4 000 bp DNA Ladder

图 3 *permE-eryK(1)* 基因电泳检测结果

### 2.3 pSET001 重组载体的构建

将 *permE-eryK(1)* 基因片段纯化回收后, *EcoRV* 和 *Not I* 分别对 *permE-eryK(1)* 和 pSET152 载体进行双酶切, 纯化回收酶切片段, 检测回收 DNA 浓度并进行连接反应。连接产物

转化至大肠杆菌中, 涂布至 LB 固体培养皿中 37 °C 培养 12~16 h 后挑取单克隆进行菌液 PCR 验证, 结果如图 4 所示, 将有目的条带的菌株并扩大培养, 提取质粒 DNA 进行双酶切验证, 将初步确定的重组载体送样至生工生物测序, 测序结果经过 SnapGene 软件与 Genbank 原序列比对, 比对结果显示为 99.92% 的相似性, 说明成功构建 pSET001 重组载体。



泳道 1: 100~5 000 bp DNA Ladder; 2~6: *permE-eryK(1)* 基因片段(1 517 bp)

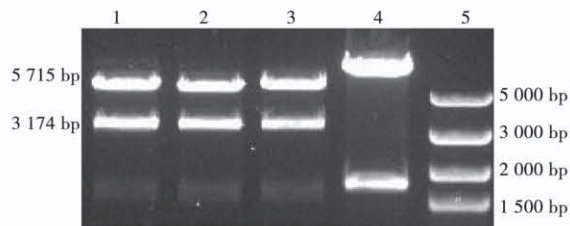
图 4 重组载体菌液 PCR 鉴定电泳检测结果

### 2.4 pSET002 重组载体的构建

扩大培养重组载体 pSET001, 提取质粒 DNA, 用 *Xba I* 和 *EcoR V* 分别对纯化回收后的



*eryK*(2)基因片段和重组质粒 pSET001 进行双酶切,回收纯化酶切片段,检测回收 DNA 浓度并进行连接反应。连接产物转化至大肠杆菌中,涂布至 LB 固体培养皿中 37 ℃ 培养 12~16 h 后挑取单克隆进行菌液 PCR 验证,将有目的条带的菌株扩大培养,提取质粒 DNA 进行 PCR 扩增 *eryK*(2)基因,同时用 *Xba* I 和 *EcoR* V 双酶切验证重组载体 pSET002,结果如图 5 所示,将初步确定的重组载体送样至生工测序,测序结果经过 SnapGene 软件与 Genbank 原序列大小为 3 174 bp 的 *permE-eryK*(1)-*eryK*(2)相似性比对,比对结果显示为 99.94% 的相似性,说明成功构建 pSET002 重组载体。



泳道 1~3: *EcoR* V 和 *Xba* I 双酶切验证重组载体 pSET002; 4: *eryK*(2)基因片段(1 657 bp); 5: 100~5 000 bp DNA Ladder

图 5 pSET002 重组质粒 PCR 及双酶切验证电泳检测结果

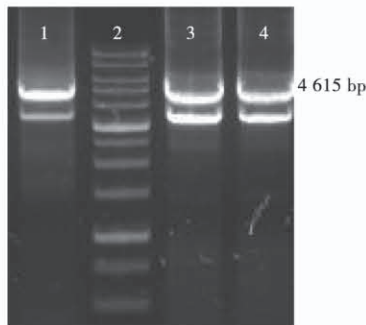
## 2.5 基因大片段 *permE-eryK*(1)-*eryK*(2)-*eryG* 的获取

利用重叠延伸 PCR 扩增技术获得大小大约为 4 615 bp 的 *permE-eryK*(1)-*eryK*(2)-*eryG* 基因大片段,如图 6 所示,同时为了提高大片段的质量,选择将其先转化至克隆载体中,使其进行复制,后期能更好的获得酶切片段,便于酶切连接。

## 2.6 pSET003 重组载体的构建

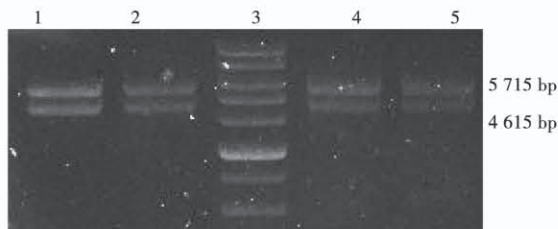
扩大培养重组载体 pSET002,提取质粒 DNA,用 *EcoR* V 和 *Xba* I 分别对纯化回收后的 *permE-eryK*(1)-*eryK*(2)-*eryG* 基因片段和原始载体 pSET152 进行双酶切,回收纯化酶切片段,检测回收 DNA 浓度并进行连接反应。连接产物转化至大肠杆菌中,涂布至 LB 固体培养皿中 37 ℃ 培养 12~16 h 后挑取单克隆进行菌液 PCR 验证,将有目的条带的菌株扩大培养,提取质粒 DNA 进行 PCR 扩增和酶切验证,酶切结果

如图 7 所示,将初步确定的重组载体送样至生工测序,测序结果经过 SnapGene 软件与 Genbank 原序列 *permE-eryK*(1)-*eryK*(2)-*eryG* 相似性比对,比对结果显示为 99.90% 的相似性,说明成功构建 pSET003 重组载体。



泳道 1、3、4: *permE-eryK*(1)-*eryK*(2)-*eryG* 基因大片段(4 615 bp); 2: 250~10 000 bp DNA Ladder

图 6 *permE-eryK*(1)-*eryK*(2)-*eryG* 基因大片段电泳检测结果



泳道 1~2 和 4~5: *EcoR* V 和 *Xba* I 双酶切验证重组载体 pSET003,条带分别为 5 715 bp 的原始载体和 4 615 bp 的 *permE-eryK*(1)-*eryK*(2)-*eryG* 基因大片段; 3: 250~10 000 bp DNA Ladder

图 7 pSET003 重组载体酶切验证电泳检测结果

## 3 结论与讨论

载体构建是分子生物学研究常用的手段之一,在整个载体的构建过程中,任何一种突变载体的构建方法都可能有其优缺点和最适宜的使用范围,遇到难以构建的基因突变载体时,可根据实验要求选择合适的克隆方法,最大程度地利用每种方法的优点。为了避免每一种策略的不足,将多种方法结合在一起互补使用能有效获得重组载体。本文建立的重叠延伸 PCR-酶切连接法,整合了双酶切连接与重叠延伸 PCR 连接的优点,克服了限制性酶切位点受限于超长片段与载体的构建的问题,在构建过程中通过延伸 PCR 将单个目的片段连接,即获得 *permE-eryK*(1)片段,再通过合适的酶切位点,利用 *EcoR* V 和 *Not* I 双酶切,通过 T<sub>4</sub>

DNA连接酶成功将获得的 *permE-eryK* (1) 基因大片段与 pSET152 载体构建, 获得重组载体 pSET001, 依次将 *eryK* (2) 和 *eryG* 与 pSET152 载体连接, 最终获得 pSET002 和 pSET003 重组载体, 整个过程只用了 3 个酶切位点, 成功避免了多片段载体构建时酶切位点受限的问题, 同时, 最后一步大片段与载体通过酶切位点连接, 同样避免了重叠延伸 PCR 大片段连接的短板, 成功的获得了预期的重组载体。

本研究中引入的 *eryK* 基因和 *eryG* 基因是红色糖多孢菌中红霉素合成相关的两个关键限速酶基因, 希望同时强化 *eryK* 基因和 *eryG* 基因的表达, 以实现既去除支路代谢, 又能够进一步减少中间代谢产物的累积<sup>[8-9]</sup>。采用重叠延伸 PCR 及 *EcoR* V、*Not* I 和 *Xba* I 酶切位点相结合的连接方法构建含有多个基因片段的链霉菌重组表达载体, 成功构建了携带外源基因的表达式载体 pSET001、pSET002 和 pSET003, 最终获得含有多个基因的重组载体。后续研究将构建的重组载体 pSET001、pSET002 和 pSET003 通过属间接合转移转入至红色糖多孢菌中, 改变红霉素 A 生物合成过程中的代谢流, 提高红霉素 A 的产量。

#### 参考文献:

[1] 吴声栋, 方志锴, 郑柏娇, 等. 一种多拷贝串联基因的链霉菌

表达载体的构建方法[J]. 海峡药学, 2016, 28(2): 249-251.

[2] 马凯, 胡红霞, 于婧, 等. 双酶切和同源重组方法构建 pMIR-reporter 载体的比较[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(6): 495-499.

[3] 王敏敏, 赵婕, 常亚磊, 等. 双酶切和无缝克隆方法构建 HCV CORE 表达载体的比较[J]. 山西医药杂志, 2017, 46(3): 267-270.

[4] 李国亮, 钱伟, 张淑江, 等. 利用改良 SOE-PCR 技术定点突变 TuMVC4-VPg 基因[J]. 中国蔬菜, 2017(10): 39-44.

[5] Hilgarth R S, Lanigan T M. Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction[J]. MethodsX, 2020, 7: 100759.

[6] 杨林, 王柳月, 李慧美, 等. 改进的多片段重叠延伸 PCR 制作基因多位点突变[J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(8): 52-58.

[7] 孟祥亮. 改进重叠延伸 PCR 法构建高山被孢霉重组载体[D]. 山东: 山东农业大学, 2013.

[8] 李学志, 钱江潮, 陈云, 等. 重组工业红色糖多孢菌优化红霉素发酵液组分[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(3): 152-155, 180.

[9] Chen Y, Deng W, Wu J Q, et al. Genetic modulation of the overexpression of tailoring genes *eryK* and *eryG* leading to the improvement of erythromycin a purity and production in *Saccharopolyspora erythraea* fermentation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(6): 1820-182.

## Construction of *Streptomyces* Expression Vector by Overlap Extension PCR-Enzyme Ligation

TIAN Ping-ya, LYU Miao-miao, YANG Guang-yao, MA Ci-lang, NIU Chun, ZHANG Ping

(Ningxia Tairui Pharmaceutical Company Limited, Yinchuan 750101, China)

**Abstract:** In the era of functional genomics, a large number of vectors constructed were involved. Therefore, in order to establish a multi-copy tandem expression of exogenous genes in *Streptomyces*, the study use a combination method of overlap extension PCR and double enzyme digestion to construct the expression vector of *Streptomyces*. Genomic DNA of *Saccharopolyspora erythraea* was used as a template to amplify synthesis-related methylase genes of erythromycin O-methyltransferase (*eryG*) and C-12 hydroxylase (*eryK*), and with the promoter (*permE*), a combination of overlap extension PCR and *EcoR* V, *Not* I and *Xba* I restriction sites use to construct a expression vector in *Streptomyces* with multiple gene fragments. Expression vectors pSET001, pSET002 and pSET003 which carry with exogenous genes were successfully constructed, and obtained recombinant plasmids containing multiple genes. When constructing a double digestion vector, the available restriction sites on the vector or DNA fragments are limited. By combining overlap extension PCR technology, it is possible to quickly construct recombinant vector containing multiple genes using less restriction endonuclease, provided a recombinant vector for the transformation of erythromycin-producing bacteria.

**Keywords:** overlap extension PCR; pSET152 Vector; restriction enzymes; ligation