

圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成基因 ——*sanH* 和 *sanI* 的研究*

陈 蔚 田宇清 杨海花 谭华荣**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 通过反向遗传学方法克隆到圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成基因簇中约 7.0kb 的 DNA 片段。该片段除含有尼可霉素生物合成基因 *sanF* 外,对 *sanF* 上游约 2.2kb 的 *Bgl* II DNA 片段进行序列测定及分析表明,还含有两个完整的开放阅读框(ORF)。ORF1 由 1233 个核苷酸组成,ORF2 由 195 个核苷酸组成,它们分别编码由 410 个氨基酸残基和 64 个氨基酸残基组成的蛋白质,依次命名为 *sanH* 和 *sanI*。蛋白序列数据库比较结果表明,*SanH* 和 *SanI* 与浅灰链霉菌(*Streptomyces griseolus*)中共转录的细胞色素 P450(cytochrome P450)和铁氧还蛋白(ferredoxin)有较高的同源性,一致性分别为 46% 和 56%,相似性分别为 62% 和 70%。基因功能研究表明,*sanH* 基因的破坏虽不影响圈卷产色链霉菌产生的尼可霉素的生物活性,但该基因可能参与了尼可霉素羟基化反应的生物合成。

关键词 圈卷产色链霉菌,尼可霉素生物合成基因,基因破坏

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2000)06-0598-04

尼可霉素属核苷肽基抗生素,包括二十多种活性单组分,其中 Nikkomycin X 和 Z 为主要生物活性组分。尼可霉素与几丁质合成酶的天然底物 UDP-N-乙酰葡萄糖胺具有类似的结构,而竞争性地抑制几丁质合成酶,表现出抗真菌、杀昆虫和杀螨虫等多种生物活性^[1]。同时,它对哺乳动物、蜜蜂、植物和细菌等无毒害作用或毒性极低且在自然界中易被降解,而被认为是一种理想的农用抗生素。最近的研究表明它对一些危及生命的机会致病真菌也有明显的抑制作用^[2],可用于人体深部真菌感染疾病的治疗。尼可霉素作为农用及医用抗生素的开发研究正在进行中。根据标记前体掺入实验及对阻断突变株产物的分析,表明尼可霉素的肽基和核苷两部分是分开合成,然后通过肽键相连接的。肽基中的吡啶环及羟甲基 C 原子来自 L-赖氨酸,尼可霉素的氨基已糖醛酸部分被认为同多氧霉素一样由来源于尿嘧啶和磷酸烯醇式丙酮酸的辛酸前体衍生而来。核苷部分的碱基分别来源于组氨酸(Nikkomycin X)和尿嘧啶(Nikkomycin Z)^[3]。虽然对尼可霉素生物合成途径有了初步了解,但至今仍未研究清楚,对它的酶学反应也了解甚少,因此克隆与尼可霉素生物合成相关的基因将有助于阐明尼可霉素的生物合成途径。

我国东北土壤中分离到的圈卷产色链霉菌 7100,是尼可霉素高产菌株。它产生的尼可霉素主要组分为 Nikkomycin X 和 Z。本研究组以圈卷产色链霉菌 7100 为研究材料,

* 国家自然科学基金重点资助项目(39830010)

** 通讯作者

作者简介 陈 蔚(1973-),女,湖北武汉人,中国科学院微生物研究所,博士生,主要从事链霉菌分子遗传学的研究

收稿日期:1999-01-10,修回日期:2000-06-06 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

通过反向遗传学方法克隆了尼可霉素生物合成基因簇中约 7.0kb 的 DNA 片段,其中 *sanF* 基因是尼可霉素生物合成中起重要作用的基因(另文待发表)。由于抗生素生物合成基因是紧密连锁的,故推测 *sanF* 基因上游的基因也可能参与了尼可霉素的生物合成。本文报道了 *sanF* 基因上游的 *sanH* 和 *sanI* 两个基因的结构和功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: *E. coli* JM109, *E. coli* JM101, 圈卷产色链霉菌(*Streptomyces ansochromogenes*) 7100 赤星灰霉, 质粒 Bluescript M13⁻, 帮助噬菌体 KO7 及用于基因破坏的质粒 pKC1139 均为本实验室保存。

1.1.2 培养基: LB 培养基及 2×YT 按文献[4]配制。赤星灰霉生长用土豆培养基(PDA)按文献[5]配制。链霉菌液体生长培养基(YEME), 原生质体再生培养基(R2YE)及基本培养基(MM)均按文献[6]配制。

1.1.3 酶、抗生素及化学试剂: 实验所用限制性内切酶均为 Boehringer 公司产品, 核酸外切酶 *Exo* III 绿豆核酸酶, T4 DNA 连接酶为华美生物工程公司产品。DNA 测序用 Taq-Track 测序试剂盒为 Promega 公司产品。氨基青霉素、四环素、氯霉素为华美生物工程公司产品, 贮存液浓度分别为 100mg/mL、15mg/mL 和 25mg/mL, 使用终浓度分别为 100 μ g/mL、10 μ g/mL 及 25 μ g/mL。Apramycin(阿普霉素)由加拿大的 Alberta 大学 B. Leskiw 博士赠送, 贮存液浓度为 100mg/mL, 在 YEME 和 MM 培养基中使用浓度为 5 μ g/mL, 在 R2YE 培养基中使用浓度为 50 μ g/mL。所有酶类及抗生素贮存液均于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。聚乙二醇(PEG)1000 购于 Merck-Schuchard 公司, 用于链霉菌原生质体转化。PEG 8000 购于 Sigma 公司, 用于单链 DNA 的制备。X-gal 和 IPTG 用于大肠杆菌中阳性转化子的选择, 在 LB 培养基中的使用浓度为 40 μ g/mL。

1.1.4 放射性同位素及非放射性同位素试剂盒: 用于 DNA 序列测定的 α -³⁵S-dATP 购于 Amersham 公司, 用于 DNA 探针标记的非同位素地高辛(Digoxigenin-11-dUTP)试剂盒购于 Boehringer 公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取和纯化: 染色体 DNA 和质粒 DNA 的提取, DNA 的纯化及回收均按文献[6]方法进行。

1.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化: 按文献[4]方法进行。

1.2.3 链霉菌原生质体的制备和转化: 参照文献[6]方法进行。

1.2.4 单链 DNA 的制备: 按文献[7]进行, DNA 序列测定和分析按文献[7,8]进行。

1.2.5 Southern blotting 杂交: 按文献[7]方法进行。

1.2.6 尼可霉素的检测: 按文献[5]方法进行。

2 结果和分析

2.1 目的 DNA 片段的克隆

尼可霉素是 1976 年首先从唐德链霉菌中分离的[1], 比较野生株和不产尼可霉素的

突变株的总细胞蛋白双向凝胶电泳发现,野生株中有 10 种蛋白(P1-P10),在不产尼可霉素的突变株中都未检测到,预示这 10 种蛋白可能与尼可霉素的生物合成直接相关。其中 6 种蛋白(P1, 2, 4, 5, 6, 8)进行了 N 端氨基酸序列测定^[9]。本文根据唐德链霉菌尼可霉素生物合成相关蛋白 P6 的 N 端氨基酸序列及链霉菌密码子使用的偏好性设计了一对简并引物,并通过 PCR 扩增出一个 111bp 的 DNA 片段。用非放射性同位素地高辛标记,将该片段制备成 DNA 探针。从在大肠杆菌中构建的圈卷产色链霉菌部分基因文库中克隆到包括 *sanF* 基因在内的 7.0kb *KpnI* 片段,重组质粒命名为 pCW7(另文发表)。pCW7 限制性酶切的琼脂糖凝胶电泳结果表明,*EcoRV* 和 *PstI* 酶切后都给出了 2 条 DNA 泳带,说明分别有 2 个 *EcoRV* 和 *PstI* 位点,由于载体上各有一个 *EcoRV* 和 *PstI* 位点,因此 7.0kb DNA 片段中只有一个 *EcoRV* 和 *PstI* 切点。*BamHI* 和 *BglII* 酶切后均给出了 4 条 DNA 泳带,其中一个 *BamHI* 位点来自载体,故片段中有 3 个 *BamHI* 位点和四个 *BglII* 位点(图略),根据上述酶切分析,绘制了 7.0kb DNA 片段的限制性酶切图谱(图 1)。用 *BglII* 酶切 pCW7 后回收了位于 *sanF* 基因上游的 2.2kb DNA 片段。将该片段克隆至质粒 Bluescript M13⁻ 的 *BamHI* 位点上,获得插入方向不同的重组质粒 pCW6 和 pCW11。

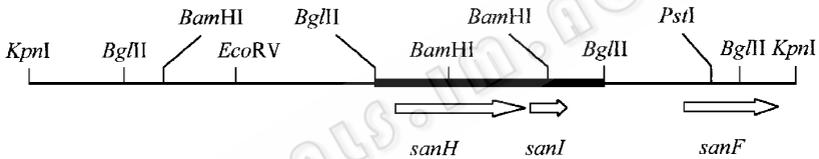


图 1 7.0kb DNA 片段的限制性物理图谱

Fig. 1 Physical map of 7.0kb DNA fragment

2.2 DNA 片段的序列分析

将 pCW6 和 pCW11 分别进行缩小亚克隆,然后挑选长度相差 200bp 的重组质粒,转化大肠杆菌 JM101,在帮助噬菌体 M13KO7 的作用下,制备单链 DNA。通过双脱氧链终止法测定了 2.2kb DNA 片段的全序列(图 2)。结果表明,该序列中含有两个紧密连锁的完整开放阅读框(ORF)(图 3),ORF1 由 1233 个核苷酸组成,ORF2 由 195 个核苷酸组成,它们分别编码由 411 个氨基酸残基和 64 个氨基酸残基组成的蛋白质,依次命名为 *sanH*(*Streptomyces ansochromogenes* nikkomycin gene H)和 *sanI*(*Streptomyces ansochromogenes* nikkomycin gene I)。*sanH* 的翻译起始位点为 297 位碱基处的 ATG,终止密码子为 1527 位碱基处的 TGA,在 ATG 上游 8 个碱基处有可能的核糖体结合位点 GGGAA;*sanI* 的起始密码子 GTG 位于 1546 位碱基处,距 *sanH* 的终止密码子 TGA 有 16 个碱基,终止密码子为 1738 位碱基处的 TGA。在 GTG 上游 8 个碱基处有可能的核糖体接合位点 GAGGG。

蛋白序列数据库比较结果表明,*SanH* 和 *SanI* 分别与许多生物中共转录的细胞色素 P450(cytochrome P450)和铁氧还蛋白(ferredoxin)有较高的同源性。其中与浅灰链霉菌(*Streptomyces griseolus*)的细胞色素 P450 和铁氧还蛋白同源性最高,一致性分别为 46% 和 56%,相似性分别为 62% 和 70%。推断 *sanH* 和 *sanI* 也是共转录的。

*Bg*III

1 AGATCTCTGCTCGCCGAGCACCCCTTGTGCGGGCGGTTCGGCGGTCGCGATGCCGCAC
61 CCGGTGTGGGGGAGACGGTCTGCGTCTTCGCGGTCCCCCTCCGACCCGGAGCAGCAGCCG
121 ACGCTGCTCGGCCTGCGCGCTTCTCACCAGCGCGGCATCGCCAGTACAACTGCC
181 GAGGACATAAGGGTGGTCGACGCCCTGCCGATGATCGCGCTCGCAAGATCAACCGGTC
241 GCGTCCGTGCGGCGCAGCGGACCCGCGAGGAGGAACCGGAACCCACCCCATGA
RBS⁺ ORF1 → M
301 CCGAGGCTTCGACCACGACATCCCGTTCGTTCCCATGGCCCCGAGTGCCCCATGCAC
T E A F D H D I P S F P M A R E C P M H
361 CGCCCCCGAGTATCGCGAAGTTCGCTGGGCAGGAGCCGGTTCAGCCGGTCCGCATGCCCG
P P A E Y R E L R G Q E P V S R V R M P
421 ACGGTTCAGGTGGCTGGCTTCAAGCACGCTCTGCCCCGCAAGTGTCTCGCCGACC
D G Q V A W L V L K H A L A R K L L A D
481 CGCGGTCAGCGCCGACCGCTGCACCCGGCGTTCGGGGCCGGTTCAGCCCGGAGCAGC
P R V S A D R L H P A F P G R L T A E Q
541 GCGCGCGACCGAGCGCTCCGCGGCTCACCACCGCGGTCATGATCCACCTGGAGC
R A A T E R V R R L T T R R S M I H L D
601 GGGACGACCGGGGCTCACCAGGATCCTGACCGGAGTTCCTGCTGCGCCGGATCG
G D E H G A H R R I L T G E F S L R R I
661 CCGCGCAGCGCCGCTGTCCAGGAGATCGTCGACCGTAGCATCGACGAGATGCTGGCCG
A A Q R P R V Q E I V D R S I D E M L A
721 CGCCGACCGCGGACCTCGTQEGAGCAGTGTTCGAGGCGGTGCCGTTCGTTGGTGTCT
A P Q P A D L V E H V S Q A V P S L V I
781 GCGAGTGTGGCGTCCCGCAGCAGCGCGGTGACTTCCACGAGTGGCGGGCATGC
C E L L G V P H E Q R R D F H E W A G M
841 TGGTCAGCCGGTCCGTCTCGATACAGGAGCGCGCGGCGCTCCGACGGCTCAACGACT
L V S R S V S I Q E R A A A S D A L N D
901 TCCTGGAGCCCTCGTACCAGGAGGAGCGGGGCGAGCCCGCCAGCAGCTGATCGGCC
F L E A L V T E K E R G E P A D D L I G
961 GGCTCATCGCGCGACCCGGCAGCGCGGTGATGACCGACGACGAGATCGTGGGCACCG
R L I A R N A R Q T P V M T H D E I V G T
1021 CCGTCATGCTGCTGGTTCGCGGGCACCAGACCACCGCGAATGATCTCGTGGCGGTGG
A V M L L V A G H Q T T A N M I S L G V
1081 TGGCGTCTGGAGAACCCGGAGCAGGACCGGATCGCGCCGACTCCTCGTCTGCTG
V A L L E N P E H K A R I A A D S S L C
1141 CCCCAGCGATCGAGGAGATGCTGCGCTACTTCAGCGTCTGGAGAACCGCGCCCGCGGG
P P A I E E M L R Y F S V V E N A P A R
1201 TCGCCACCGAGGACATCGCGATCGGCGCGTGCACATCCGCAAGAACGAGGGCATCGTCG
V A T E D I A I G G V I I R K N E G I V
1261 TGTCCGGGTGGCCCGGACTGGGACGACGAGTCTTCGGGACCCGACCGGCTCGACT
V S G L A A D W D D E V F G H P O R L D
1321 TCGAACCGGCGCGCCACCACGTGCGCTTCGGGTACGGAGTCCACCAGTGCCTCGGGC
F E R G G A R H H V A F G Y G V H Q C L G
1381 AGAACCTGGCCGGTGGAGTGGAGATCGTGTTCGAGACGTGTGTCGCCGGTTCGGG
Q N L A R V E L E I V F E T L L R R V P
1441 GCCTGTCTGGCCGTCGCCCGGAGGACTGCCGTACAAGGACGACCGCGGATCTACG
G L S L A A D V P A E E L P Y K L D D A G I Y
1501 GCATCTACCGGTGCCGTTGAATGCTGAGGAGAGGGGACGCGCCGTGCACATACCCGG
G I Y R V P V N C * -RBS⁺ ORF2 → V H I T A
1561 GACAGGGGCGTTCGTCGGCGCCGAGTGCCTGCTGGTGGCCCGCCGCTTCGAC
D R G R C V G A A Q C V L V A P A V F D
1621 CAGGACGAGGAGGGGTGGTCGCGCCGTCACGTTGGATCCGGCGGGCGGATCGGGCCG
Q D E E G L V T P V T V D P A G A D R P
1681 GCGTCCGTACGGGTTCCACCTGTGCCGTCGTCGGCCATCCGGATCGACGAGGATTGA
A C V R A Q A C V H A L C P S S A I R I D E D *
1741 CGCGGCGGACCGCGTCCGAGCAGTCCGCGCGGCTTCGTTCTGTCGGCGGCTCG
1801 GTGTACGGTTGGGGTTCGCGGTCACTCGAAGAAGGCATGGCGACCCACCGCCGACCA
1861 GGCCCGCCCGCGCTGACCGCGCCATCCGGTCCAAGACGAGGGCGACCGCCAGTAGA
1921 CCGAGCGGTGCCTCCGTCGGAAGCATGCTCGAGGCGGGCGCGCCGAGTGTCCGGC
1981 CGACCACTACTCCTGTTCCCGCCGCTCGCGCCGAGTGCCTGTTGGTGTGCAGTA
2041 CGAAGCGAGTCTCTTGTGCTGTTGCCACGCTGAGGTCTCGAAGTCCCGCTCGTGGT
2101 GGTGGTACATCT

*Bg*III

图 2 2.2 kb DNA 片段的全序列测定

Fig. 2 Nucleotide sequence of a 2.2kb DNA fragment

RBS : Ribosome binding site ; ORF : Open reading frame.

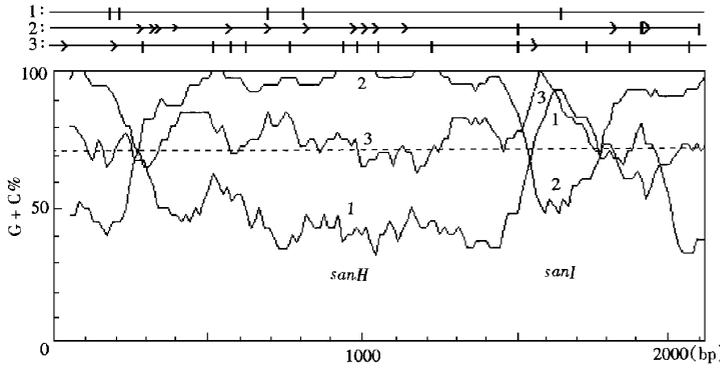


图 3 2.2kb DNA 片段的开放阅读框

Fig. 3 The open reading frame of 2.2kb DNA fragment

1 2 3 : the triplets startign from the first , second and third base at 5 ' to 3 ' end respectively.

2.3 基因功能研究

2.3.1 sanH 基因的破坏 :

由于 *sanH* 和 *sanI* 是共转录的,故破坏位于上游的 *sanH* 后 *sanI* 也不能表达。将 *sanH* 基因内部的 680bp 的 *SmaI* 片段亚克隆至载体 pKC1139 的 *EcoRV* 位点上 构建为用于基因破坏的重组质粒 pKC1139:: Δ *sanH* (图 4)。先转化大肠杆菌 ET12567,以消除重组质粒在大肠杆菌 JM109 中可能发生的修饰,然后转化圈卷

产色链霉菌 7100 的原生质体,得到 112 个转化子。随机挑选 12 个转化子提取质粒并经酶切验证均正确。将其中之一接种到加有阿普霉素的 MM 培养基上 28℃ 培养 7d,制备孢子悬液。约 10^6 的孢子悬液涂布在含有阿普霉素抗性的 MM 平皿上,39℃ 培养,每个平皿上得到约 100 个破坏子。

2.3.2 破坏子的 Southern blotting 杂交验证 : 随机挑选 3 个可能的破坏子于 39℃ 培养后提取总 DNA,以圈卷产色链霉菌野生型菌株 7100 总 DNA 为对照,分别用 *Bgl*II 酶切,经琼脂糖凝胶电泳和 Southern 转移

后,以地高辛标记的 680bp *SmaI* 片段为探针进行 Southern blotting 杂交。结果表明来自野生型菌株的总 DNA 只出现 1 条 2.2kb 的阳性杂交信号带,而来自破坏子的总 DNA 分

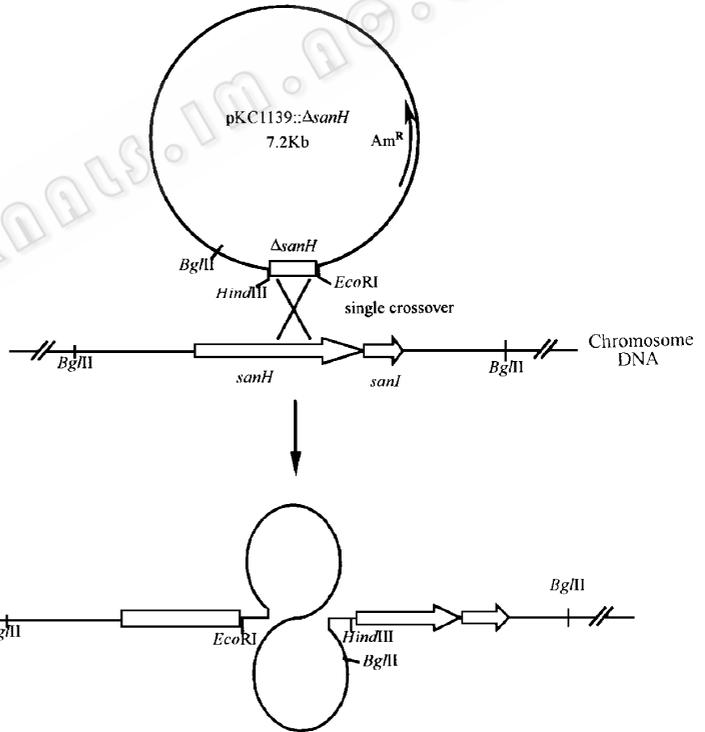


图 4 重组质粒 pKC1139:: Δ *sanH* 介导的基因破坏示意图

Fig. 4 The sketch of gene disruption resulted from recombinant plasmid pKC1139:: Δ *sanH*

别出现 1.7kb 和 7.6kb 的 2 条阳性杂交信号带(图 5),其分子量与理论计算的大小是一致的,说明已获得了正确的破坏子。

2.3.3 破坏子的尼可霉素检测 将 3 个正确的破坏子分别划线接种在加有阿普霉素的 R2YE 平皿上,在 28℃ 培养 3.5,7d 后进行了尼可霉素产生的测定。结果表明所有破坏子在测定时间内同野生型菌株一样明显地抑制赤星灰霉的生长(图略)。说明 *sanH* 基因的破坏不影响圈卷产色链霉菌产生的尼可霉素的生物活性。

3 讨论

在链霉菌的分子生物学研究中,抗生素生物合成基因的研究是该领域的一个热点。在分子水平上研究抗生素生物合成基因的结构及功能将有助于了解抗生素生物合成的途径,有利于阐明底物的进入及产物的释放之间的确切关系,从而可揭示各组分之间的结构及作用机制。

抗生素的生物合成是多基因控制的,一般涉及紧密连锁的 20~30 个基因。尼可霉素有 20 多种活性单组分,其生物合成途径相当复杂。要了解其复杂的生物合成途径,就必需对其生化合成途径相关的各基因的结构、功能及各基因之间的相互关系进行深入研究。本实验室近期克隆到一个与尼可霉素生物合成相关的 7.0kb DNA 片段,部分序列测定表明其中含有三个开放阅读框,分别命名为 *sanF*, *sanH* 和 *sanI*。已证明 *sanF* 为圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成中起重要作用的基因。因而推测位于 *sanF* 基因上游的 *sanH* 和 *sanI* 也是尼可霉素生物合成基因簇中的一员。虽然 *sanH* 基因破坏的阻断突变株同野生菌株一样能抑制抗生素检测指示菌赤星灰霉的生长,但这并不意味着它们产生的尼可霉素活性组分是完全一样的。从结构上看, *SanH* 和 *SanI* 与参与链霉菌中呼吸链电子传递的细胞色素 P450 和铁氧还蛋白有很高的同源性,因此它们在圈卷产色链霉菌中可能也是起电子传递的作用。从尼可霉素的结构看,在其肽基组分中有两个羟基,它们都可能是电子传递后的产物。而羟基缺失后的尼可霉素组分 Nikkomycin Lx 和 Lz 仍有高的抗真菌活性^[10]。另外,据最新文献报道^[10],在唐德链霉菌中也已克隆到了与细胞色素 P450 和铁氧还蛋白编码基因高度同源的 *nikF* 和 *nikG*。*nikF* 基因被破坏的阻断突变株产生的尼可霉素组分为具高抗真菌活性的 Nikkomycin Lx 和 Lz。这进一步说明本文对 *sanH* 和 *sanI* 基因功能的推测是正确的。但是,要更深入地了解 *sanH* 和 *sanI* 在尼可霉素生物合成途径中的作用机制,还需分离纯化并鉴定蛋白质,利用 HPLC 等手段检测破坏子积累的中间产物等。虽然 *sanH* 基因的破坏不影响圈卷产色链霉菌产生的尼可霉素的生物活性,但进行该基因的结构与功能的研究有利于阐明尼可霉素生物合成的途径。

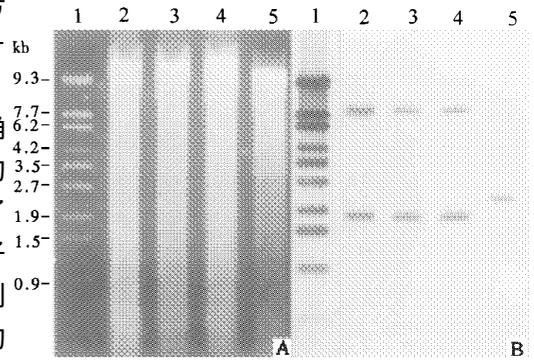


图 5 总 DNA *Bgl*II 酶切后的琼脂糖凝胶电泳(A)及 Southern blotting 杂交(B)

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blotting hybridization of total DNA digested with *Bgl*II (B)
1 λ DNA/*Eco*T141 MW marker; 2~4: Total DNA from different disruptants; 5: Total DNA from wild type strain.

参 考 文 献

- [1] Fiedler H P , Kurth R , Delzer J *et al.* *J Chem Tech Biotechnol* , 1982 , **32** :271~280.
- [2] Graybill J R , Najvar L K , Bocanegra R , *et al.* *Antimicrob Agents Chemother* , 1998 **A2** :2371~2374.
- [3] Bormann C , Mattern S , Schrempf H , *et al.* *J Antibiot* , 1989 **A2** :913~918.
- [4] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* , 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory , 1989.
- [5] 贾君永 李文利 陈 蔚 等. 中国科学(C辑) 2000 **30** :1~8.
- [6] Hopwood D A , Bibb M J , Chater K F , *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces. A laboratory manual.* Norwich , England : John Innes Foundation , 1988.
- [7] Tan H , Yang H , Tian Y , *et al.* *Gene* , 1998 **212** :137~146.
- [8] Bibb M J , Findlay P R , Johnson M W. *Gene* , 1984 **30** :157~166.
- [9] Möhrle V , Roos U , Bormann C. *Mol Microbiol* , 1995 , **15** :561~571.
- [10] Bormann C , Lauer B , Kálmánchelyi A , *et al.* *J Antibiot* , 1999 **52** :582~585.

STUDIES ON *sanH* AND *sanI*—GENES RELATED TO NIKKOMYCIN BIOSYNTHESIS OF *STREPTOMYCES ANSOCHROMOGENES* *

Chen Wei Tian Yuqing Yang Haihua Tan Huarong

(*Institute of Microbiology , The Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080*)

Abstract : A 7.0kb DNA fragment was cloned by reverse genetics , which was located in the gene cluster of nikkomycin biosynthesis of *Streptomyces ansochromogenes* . Besides *sanF*——a gene related to nikkomycin biosynthesis of *S. ansochromogenes* , the sequence of a 2.2kb *Bgl*II DNA fragment upstream *sanF* was determined. This 2.2kb DNA fragment contains two complete open reading frames (ORF). ORF1 consists of 1233 base pairs , ORF2 consists of 195 base pairs , and they encode proteins with 410 amino acids and 64 amino acids respectively , which were designated as *sanH* and *sanI* . In search of databases , the deduced products of *sanH* has 46% amino acid identities and 62% amino acid similarities in comparison with the cytochrome P450 of *Streptomyces griseolus* , and the deduced protein of *sanI* has 56% amino acid identities and 70% amino acid similarities with the ferredoxin of *S. griseolus* . The function of *sanH* gene was studied using strategy of gene disruption , and the result showed that the disruption of *sanH* didn't influence nikkomycin biological activity in *S. ansochromogenes* .

Key words : *Streptomyces ansochromogenes* , Genes related to nikkomycin biosynthesis , Gene disruption