

# Tn4560 在圈卷产色链霉菌中的转座及其在尼可霉素生物合成相关基因克隆中的应用\*

曾洪梅<sup>1,2</sup> 谭华荣<sup>2\*\*</sup> 李季伦<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学生物学院 北京 100094) (<sup>2</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要:**采用常规转化方法用来自天蓝色链霉菌 J1501 的质粒 pUC1169(pMT660::Tn4556::*vph*)多次转化尼可霉素产生菌圈卷产色链霉菌野生型 7100 的原生质体,均未得到转化子。采用限制性热衰减法于 50℃,30min 溶菌制备 7100 的原生质体,获得了转化子,但转化频率极低,只有 0.4 个转化子/ $\mu\text{g}$  DNA。用来自 7100 的 pUC1169 再转化不含 pUC1169 的 7100 原生质体,转化频率提高  $10^3 \sim 10^4$  倍。于 39℃,MM/Vio 条件下培养携带有 pUC1169 的 7100 孢子, Tn4560 发生转座,筛选到 4068 个转座菌落,并从中得到 8 株尼可霉素阻断突变株;对这 8 株突变株的总 DNA 进行 Southern 杂交分析表明, Tn4560 至少在 4 个不同的位点插入到 7100 的染色体上。用实验室已获得的与尼可霉素生物合成有关的 30kb DNA 片段为探针和经不同酶切的 8 株突变株的总 DNA 进行 Southern 杂交,结果表明,除阻断突变株 Nik5 有杂交信号且杂交信号大小均同野生型 7100 外,其余 7 株突变株均无任何杂交信号。HPLC 分析表明, 8 株突变株在产生尼可霉素方面可分为两种类型, Nik5 为 1 种类型,其余 7 株为另一种类型。初步推测这 7 株突变株基因组 DNA 与尼可霉素生物合成有关的部分发生了大片段的缺失。以 Tn4560 为探针,构建 Nik5 的部分基因文库,克隆到 Tn4560 侧翼 4.2kb 和 0.6kb 的染色体 DNA 片段,并对这两个 DNA 片段进行了序列分析,结果表明 4.8kb 的 DNA 片段含有两个完整的开放阅读框和一个不完整的开放阅读框,此 DNA 片段已送 GenBank 注册,登记号为 AF349618。

**关键词:**圈卷产色链霉菌, Tn4560, 转座突变, 尼可霉素生物合成基因

中图分类号: Q939.13 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2002) 01-0011-08

圈卷产色链霉菌 7100 是从我国东北土壤中分离到的一株菌株,具有复杂的形态分化周期,并可产生一类核苷肽类抗生素——尼可霉素。尼可霉素与几丁质合成酶的天然底物 UDP-N-乙酰葡萄糖胺结构类似,可竞争性地抑制几丁质的合成<sup>[1]</sup>,从而有效抑制真菌、昆虫、螨虫的生长<sup>[2]</sup>。尼可霉素在自然界中易降解,无残留,对哺乳动物、蜜蜂、植物等相对无毒,是一种理想的农用抗生素;最近的研究结果表明,尼可霉素对人体深部真菌感染也有很好的治疗作用,可开发为抗真菌的医药。尼可霉素由二十多种组分构成,其中尼可霉素 Z 和 X 为主要的生物活性组分<sup>[3]</sup>。已对尼可霉素的生物合成途径进行了初步研究,证明尼可霉素中的吡啶环及其与氨基酸部分相连的碳原子的合成前体是 L-赖氨酸,尼可霉素中的碱基部分分别来源于尿嘧啶和组氨酸,氨基己糖醛酸结构被认为与多氧霉素一

\* 国家杰出青年科学基金(39925002)资助项目

\*\* 通讯联系人

作者简介:曾洪梅(1966—),女,四川内江人,中国农业科学院植物保护研究所副研究员,博士,主要从事链霉菌遗传及农用抗生素的研究工作。

收稿日期:2001-03-08,修回日期:2001-04-18

样是由尿嘧啶核苷与磷酸烯醇式丙酮酸所形成的中间产物衍生而来<sup>[4]</sup>,但人们对整个尼可霉素的生物合成途径及其中起作用的酶尚未十分清楚。因此,克隆与尼可霉素生物合成相关的基因,对阐明尼可霉素的生物合成途径和定向改造菌株的生产能力,具有重要的意义。

抗生素生物合成包括几十步生化反应,涉及几十个基因,一般的规律是这些基因在染色体上成簇排列<sup>[5]</sup>。利用转座子在链霉菌基因组随机整合的特点,可筛选抗生素阻断突变株,得到转座子侧翼来自宿主基因组的部分 DNA 片断,从而探测与抗生素生物合成相关的结构基因和调节基因。

1987年,Chung 在弗氏链霉菌中首次发现了链霉菌转座子 Tn4556, Tn4556 经人工改造得到转座子 Tn4560 (Tn4556::vph)<sup>[6]</sup>。Tn4560 在变铅青链霉菌中可随机转座,利用 Tn4560 的转座特性,在唐德链霉菌、阿维链霉菌和吸水链霉菌中分别得到了尼可霉素、阿维菌素及抗生素 5102-III 的阻断突变株<sup>[7-9]</sup>。本文初步报道转座子 Tn4560 在圈卷产色链霉菌中的转座、抗生素阻断突变株的获得及其在尼可霉素生物合成相关基因克隆中的应用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种、质粒和转座子:**圈卷产色链霉菌 (*Streptomyces ansochromogenes*) 7100,野生型尼可霉素产生菌;天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) J1501;烟草赤星赤霉 (*Alternaria longipes*),尼可霉素生物测定用菌;大肠杆菌 (*E. coli*) JM109;携带有转座子 Tn4560 的质粒 pUC1169 (Tn4556::vph::pMT660);Bluescript M13<sup>-</sup>。以上菌种和质粒均为微生物所链霉菌分子生物学研究组保存,其中 pUC1169 为温敏性质粒,带有紫霉素和硫链丝菌素抗性,当培养温度高于 34℃时,质粒不能自主复制<sup>[10]</sup>。

**1.1.2 培养基:**链霉菌生长基本培养基(MM)、液体培养基(YEME)、原生质体再生培养基(R2YE)均按文献[10]配制,烟草赤星灰霉生长用培养基(PDA)按文献[11]配制,LB培养基按文献[12]配制,尼可霉素产生的液体培养基(SP培养基)按文献[13]配制。

**1.1.3 酶、抗生素及化学试剂:**实验所用的限制性内切酶均为 Roche 公司产品,T4 DNA 连接酶、Taq 酶为华美生物工程公司产品。紫霉素 (Viomycin)为 Sigma 产品,贮存液浓度为 30mg/mL,使用浓度为 10 $\mu$ g/mL;硫链丝菌素 (Thiostrepton)由美国 Squibb 医学研究所惠赠,该抗生素溶于二甲亚砜,贮存液浓度为 100mg/mL,在 R2YE 培养基中的使用浓度为 30 $\mu$ g/mL,在 YEME 和 MM 培养基中的使用浓度为 7 $\mu$ g/mL;氨苄青霉素为华美生物工程公司产品,贮存液浓度为 100mg/mL,使用浓度为 100 $\mu$ g/mL。所有酶类和抗生素贮存液均置 -20℃保存。聚乙二醇(PEG)1000 购于 Merck-Schuchardt 公司,用于链霉菌原生质体转化。X-gal 和 IPTG 用于大肠杆菌阳性转化子的筛选,在 LB 培养基中的使用浓度为 40 $\mu$ g/mL。

**1.1.4 地高辛试剂盒:**用于 DNA 探针标记的非同位素地高辛 (Digoxigenin-11-dUTP) 试剂盒购于 Roche 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的提取、纯化和回收:**按文献[10]方法进行。

1.2.2 链霉菌原生质体的制备和转化:按文献[10]进行。

1.2.3 转座子诱变方法:收集携带有 pUC1169 的 7110 孢子,制成孢子悬液,然后以一定的稀释度涂布到含有紫霉素的基本培养基上使其长出单菌落,先在 28℃ 培养过夜,使孢子萌发,然后将平板置 39℃ 培养 4~5d,待菌落生孢后,再分别影印到含有紫霉素或硫链丝菌素的基本培养基上,得到的  $\text{Vio}^R\text{Thio}^S$  的菌落即为 Tn4560 发生了转座的个体。

1.2.4 尼可霉素的生物检测:按文献[11]进行。

1.2.5 Southern blotting 杂交:按文献[12]进行。

1.2.6 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化:按文献[12]进行。

1.2.7 尼可霉素的 HPLC 分析:参照文献[14]进行,流动相:30mmol/L 庚烷磺酸钠,1mmol/L 甲酸铵,pH4.7;流速:1mL/min;检测波长:290nm;RP C-18 柱。

1.2.8 DNA 序列测定:DNA 序列测定由大连 Takara 公司完成, DNA 序列开放阅读框分析用 FramePlot2.3.1 程序,蛋白质序列同源性比较用 BlastX 程序。

## 2 结果

### 2.1 携带有 Tn4560 的重组质粒 pUC1169 在圈卷产色链霉菌中的转化

采用常规转化、碱变性、热变性方法<sup>[15]</sup>,用来自天蓝色链霉菌 J1501 中的质粒 pUC1169(pMT660::Tn4556::vph)多次转化尼可霉素产生菌圈卷产色链霉菌野生型 7100 的原生质体,均未得到转化子,说明 7100 对外源 DNA 存在较强的限制与修饰作用。采用限制性热衰减法<sup>[16]</sup>于 50℃,30min 溶菌制备 7100 的原生质体,获得了转化子,但转化频率极低,50μg DNA 只得到 20 个转化子,即 0.4 个转化子/μg DNA。在 50℃,20~40min 溶菌均可制备 7100 的原生质体,溶菌 40min 制备的原生质体高温时间较长,成活率较低,但转化频率相对较高;而溶菌 20min 制备的原生质体成活率较高,但转化频率相对较低。实验表明,高温时间越长,7100 体内限制修饰酶的活性越低,外源 DNA 越易转化成功。用来自 7100 的 pUC1169 再转化不含 pUC1169 的 7100 原生质体,转化频率提高  $10^3 \sim 10^4$  倍,为 400~500 个转化子/μg DNA。说明 7100 虽对外源 DNA 存在较强的限制作用,而一旦外源 DNA 转化成功后,宿主将对其进行修饰,使其免受限制与修饰系统的作用。因此,从宿主本身提取的 pUC1169 再次转化 7100 时,转化频率大大提高。

### 2.2 尼可霉素生物合成阻断突变株的获得

pUC1169(pMT660::Tn4556::vph)为携带有 Tn4560 的温敏性重组质粒,它在 28℃ 能自主复制( $\text{Vio}^R\text{Thio}^R$ ),在 34℃ 以上不能自主复制,在高温和选择压力下,Tn4560 发生转座,整合到宿主染色体上( $\text{Vio}^R\text{Thio}^S$ )。将携带有 pUC1169 的 7100 孢子悬液稀释到一定浓度,涂布到含有紫霉素(10μg/mL)的 MM 上,先置 28℃ 温箱过夜使孢子萌发,然后置 39℃ 培养 4~5d,即可见成熟的菌落,确定菌落为 Tn4560 发生了转座的个体后,将其逐一转接至 R2YE 培养基上,28℃ 培养 4~5d 后,用直径为 8mm 的打孔器打取表面长有菌层的琼脂块,将琼脂块放在含有烟草赤星灰霉的 PDA 培养基上,测定其产生尼可霉素的能力。从 4068 个转座个体中筛选得到 8 株尼可霉素的阻断突变株 Nik1~Nik8。

### 2.3 阻断突变株总 DNA 的 Southern 杂交分析

提取 Nik1~Nik8 以及 7100 的总 DNA,用 *Xho*I 酶切,并进行琼脂糖凝胶电泳,以

pUC1169 中约 9.0kb 的 *Kpn*I 片段(包括大部分 Tn4560)为探针进行 Southern 杂交(图 1)。Tn4560 中有一个 *Xho*I 位点,酶切后为 3.45kb 和 5.35kb 两部分,故杂交信号也应出现至少大于 3.45kb 的两条带,而野生型 7100 中无 Tn4560,故应无任何杂交信号出现。从图 1 的结果来看,Tn4560 均出现在 8 株阻断突变株中,8 株阻断突变株至少包括有 4 种不同的杂交信号,虽然 Nik1、Nik2、Nik4、Nik5 和 Nik8 出现的杂交信号大小相同,但不能证明它们就是相同或不同的 *Xho*I 片段,也即 Tn4560 至少转座到 7100 染色体上 4 个不同的位点,说明 Tn4560 转座到 7100 染色体上是随机的。

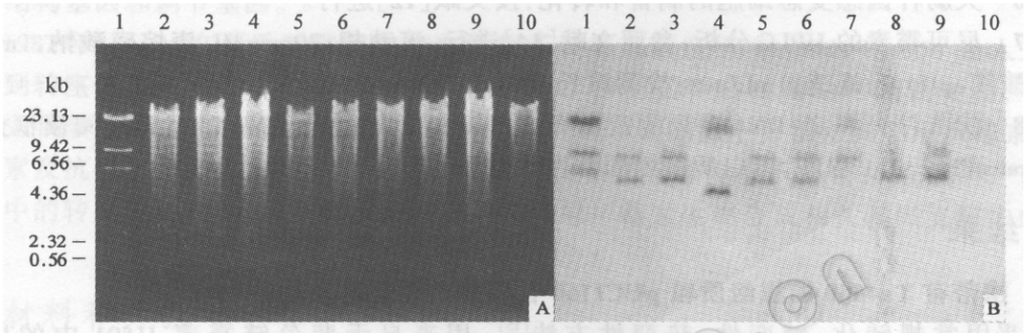


图 1 总 DNA *Xho*I 酶切后的琼脂糖凝胶电泳(A)及 Southern blotting 杂交(B)

Fig.1 Agarose gel electrophoresis(A) and Southern blotting hybridization of total DNA digested with *Xho*I(B)

1.  $\lambda$ DNA/*Hind*III MW marker; 2 ~ 9: Total DNA from nikkomycin non-producing mutants Nik1 ~ Nik8; 10: Total DNA from wild type strain 7100.

## 2.4 阻断突变株产物的 HPLC 分析

将 8 株阻断突变株和野生型 7100 于 SP 培养基中培养 64h, 4000r/min, 10min 离心收集上清, 进行 HPLC 分析。野生型菌株产生的尼可霉素以 X 和 Z 为主要活性组分。在流动相为 30mmol/L 庚烷磺酸钠, 1mmol/L 甲酸铵, pH4.7, 流速为 1mL/min, 检测波长为 290nm 的条件下, 温度为 20℃时, 野生型 7100 的主要活性组分在 RP C-18 柱上的滞留时间在 21 ~ 28min 之间, 而 8 株阻断突变株除 nik5 以外, 其余 7 株在滞留时间 10min 以后均无明显吸收峰。8 株阻断突变株可分为 2 种类型: Nik5 为一种类型, 其余 7 株为另一种类型。Nik5 的吸收峰与野生型虽很相似, 但无生物活性组分 X 和 Z 的吸收峰(图 2)。

## 2.5 转座子侧翼 DNA 片段的克隆

在转座突变中, 野生型基因受到破坏, 克隆转座子侧翼 DNA 可以提供对该野生型基因特异的探针。但是整合到基因组的转座子一端的缺失也可能导致邻近转座子的基因组的部分缺失, 这样, 邻近转座子缺失端的侧翼 DNA 可能就不是一个可靠的探针<sup>[7]</sup>。因此, 当使用转座子插入后转座子两侧 DNA 作为野生型基因文库的探针时, 最好先进行 PCR 分析以确定转座子末端确实存在。根据 Tn4560 两个末端的 DNA 序列, 分别设计 2 对引物, 其序列分别为 PN1: 5'-GAGGAACATCCGAACGAAA-3' 和 PN2: 5'-GTCCACCACGCTGACCAG-3', PN3: 5'-GATCGACTTTCTGCGTGC-3' 和 PN4: 5'-GAGGAACATCCGAACGAAA-3', 以阻断突变株和野生型的总 DNA 为模板扩增 Tn4560 两末端的序列, 8 株阻断突变株都分别扩增出预期的 1.38kb 和 1.27kb 的 DNA 片段, 而野生型菌株 7100 未扩增任何 DNA 片段(图

略),说明 8 株阻断突变株中 Tn4560 的末端均存在。

通过互补克隆、反向遗传学方法<sup>[11,18]</sup>,本实验室已获得了与尼可霉素生物合成有关的 30kb DNA 片段,以 30kb 中 6.0kb *Bgl*II、7.5kb *Kpn*I、7.0kb *Bam*HI 和 10.5kb *Pst*I 片段为探针,分别与上述 4 种相同内切酶酶切后的 8 株阻断突变株的总 DNA 及 7100 的总 DNA 进行 Southern 杂交,结果除 Nik5 有杂交信号,且不同酶切的杂交信号大小均同野生型外,其它阻断突变株均未出现任何杂交信号(图略),说明 Nik5 含有 30kb 的 DNA 片段,而其余 7 株阻断突变株无此 30kb 的 DNA 片段。初步推测这 7 株阻断突变株染色体 DNA 发生了至少包括这 30kb 的 DNA 大片段的缺失。Southern 杂交和 HPLC 图谱(图 1、图 2)的初步分析表明,两个结果有一定的相关性,缺失 30kb DNA 片段的阻断突变株其发酵液 HPLC 图谱中滞留时间 10min 以后无吸收峰,而 30kb DNA 片段完整的 Nik5 其 HPLC 图谱中滞留时间 10~28min 间仍然有吸收峰,和野生型的主要差异为 Nik5 没有活性组分 X 和 Z 的吸收峰。

在确定了 Nik5 中 Tn4560 两个末端及有关尼可霉素的生物合成基因的存在后,选择阻断突变株 Nik5,以 Tn4560 为探针,克隆 Nik5 中 Tn4560 侧翼的染色体 DNA 片段。根据图 1 的杂交结果,用 *Xho*I 酶切 Nik5 的总 DNA,分别回收 8~9kb 和 5~6kb 的 DNA 片段,将其与 M13<sup>-</sup>的 *Xho*I 酶切片段连接,连接物转化 *E. coli* JM109,进行蓝白菌落筛选,将所得到的白色转化子转接到 LB 平板上,待菌落长至直径为 1~2mm 时,进行菌落杂交。从约 3000 个白色转化子中筛选到 6 个阳性克隆,经质粒提取及酶切验证,6 个阳性克隆中 3 个重组质粒是正确的。进一步的 Southern 杂交证明,这 3 个质粒均正确,将其中一个插入片段为 8~9kb 的重组质粒命名为 pZH258,另外 2 个插入片段为 5~6kb 的分别命名为 pZH378 和 pZH459。

分析重组质粒 pZH258 和 pZH378, pZH378 中插入片段除去 Tn4560 部分,染色体的 DNA 片段只有 500~600bp,而 pZH258 中染色体 DNA 片段约有 4~5kb。对 pZH258 做了限制性酶切分析,并进行亚克隆,将其所携带的染色体 DNA 部分进

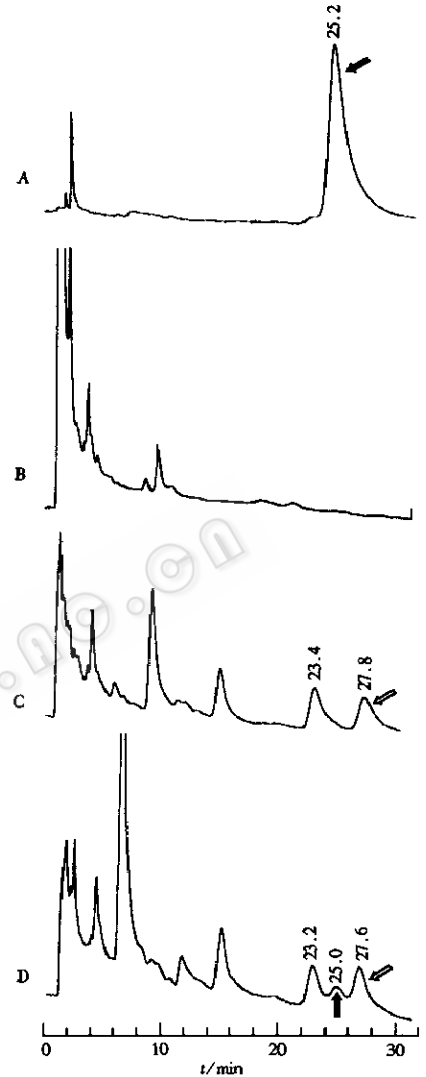


图 2 阻断突变株和野生型培养液的 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC analysis of the culture filtrates from mutants and wild type strain

A: Nikkomycin Z & X; B: Sample from mutant Nik3; C: Sample from mutant Nik5; D: Sample from wild type strain 7100.

→: solid array represents nikkomycin X and Z; ∅: empty array represents nikkomycin I and J.

序列测定。Tn4560 转座将会引起靶点 5bp 的序列倍增,序列分析结果表明, Nik5 中 Tn4560 所引起的靶点倍增序列为 GGACA。将 pZH258 和 pZH378 中插入的染色体 DNA 序列进行正确拼接,得到 4848bp 的 DNA 片段(GenBank 登录号为 AF349618)。用 FramePlot2.3.1 软件进行分析,4848bp 含有 2 个完整的开放阅读框(ORF1 - 2)和一个不完整的开放阅读框(ORFX)(图 3)。ORFX 为 Tn4560 转座所插入的开放阅读框架,命名为 *sanAG*, ORF1 和 ORF2 命名为 *sanAG1* 和 *sanAG2*。有关 *sanAG* 全序列的获得及 *sanAG1* 和 *sanAG2* 功能的研究,本实验室正在进行之中,结果将另文发表。

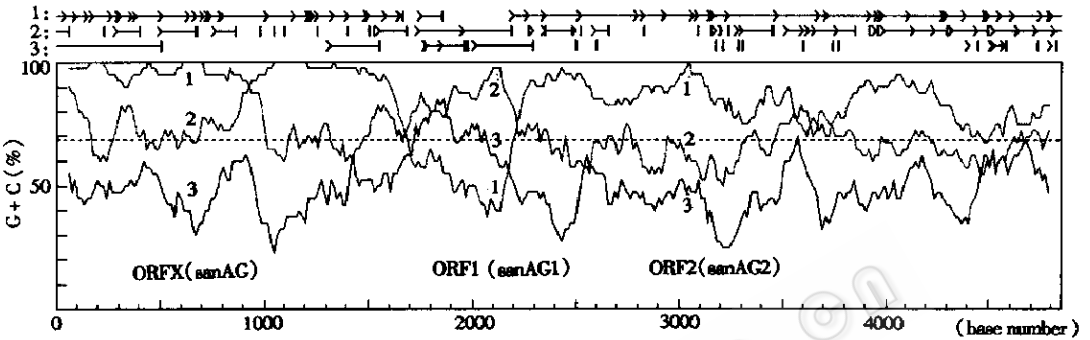


图 3 4.848kb DNA 片段的开放阅读框

Fig.3 The open reading frame of 4.848kb DNA fragment

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

### 3 讨论

转座突变是一种克隆目的基因的有用方法,与传统的诱变方法相比,转座突变具有突变频率高、随机性强及可标记需要克隆的基因等优点。为充分发挥这些优点,我们将携带有 Tn4560 的温敏性质粒 pUC1169 导入具有复杂形态分化并产生尼可霉素的圈卷产色链霉菌中,建立了转座子 Tn4560 在圈卷产色链霉菌中的转化系统,并将其应用到抗生素生物合成有关基因的研究中;同时,使今后有可能应用到圈卷产色链霉菌的形态分化基因或其它基因的研究中。

限制修饰作用在链霉菌中普遍存在,致使外源 DNA 转化难以成功,外源 DNA 片段越大,成功率越低。提高转化频率有碱变性、热变性、通过限制作用弱的中间宿主或利用其它宿主的限制修饰作用来克服目的宿主的限制性障碍等方法。为克服圈卷产色链霉菌对外源 DNA 强烈的限制修饰作用,本文参考 Engel 的限制性热衰减法用高浓度的 DNA 转化 7100 的原生质体获得成功。此方法简便易行,不仅使 14.6kb 的大质粒 pUC1169 成功地转入圈卷产色链霉菌中,也找到了显著提高外源 DNA 转化圈卷产色链霉菌频率的有效方法,该方法在研究圈卷产色链霉菌有关抗生素生物合成基因及发育分化基因等工作中得到借鉴。

抗生素的生物合成包括几十步生化反应,涉及的与生物合成有关的酶也有几十个,包括结构基因、抗性基因和调节基因,链霉菌中这些基因大都成簇存在。利用此特性,在随机而稳定的转座突变中,先以转座子为探针,克隆与抗生素生物合成有关的基因,再以此

基因为探针,进一步克隆形成多顺反子的全部基因簇。由于转座子转座的随机性,不仅可克隆到与抗生素生物合成有关的结构基因,也可克隆到调节基因。本文所克隆的 4848bp 用 BlastX 程序在蛋白质序列数据库中进行同源性比较,结果表明,虽目前所克隆的 *sanAG* 是一个不完整的开放阅读框,但其 1600 ~ 1700bp 所编码的产物和天蓝色链霉菌 ATP/GTP 结合蛋白的 794 个氨基酸残基到 1317 个氨基酸残基有 60% 的同源性 (Identities) 和 71% 的相似性 (Positives)。根据天蓝色链霉菌 ATP/GTP 结合蛋白的氨基酸残基数推测,完整的 *sanAG* 约 4000bp,即至少仍需再克隆 2200bpDNA 片段,才能获得完整的 *sanAG*。初步推测 *sanAG* 可能与尼可霉素生物合成有关,完整的 *sanAG* 基因的结构及其功能的研究,目前本实验室正在进行之中。

链霉菌除具有产生抗生素的能力、复杂形态分化周期及线性染色体外,还具有染色体遗传不稳定性的重要特性<sup>[19]</sup>。本文得到的 8 株尼可霉素阻断突变株,其中 7 株的染色体都发生了与转座子 Tn4560 不相邻但至少包括与尼可霉素生物合成有关的 30kb 在内的 DNA 大片段缺失。在链霉菌中,迄今只用转座突变方法得到抗生素阻断突变株的报道,尚未见用该方法克隆到抗生素生物合成基因的报道,也许其他研究者在研究中也碰到了与本文类似的情况。本文尚不能确定 7 株突变株 DNA 缺失发生在染色体上何处、是否与转座子有关,但用转座突变的方法克隆与抗生素生物合成有关的基因或其它基因时,链霉菌染色体不稳定的现象值得注意。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Müller H, Further R, Zähler H, et al. *Arch Microbiol*, 1981, **130**:195 ~ 197.
- [ 2 ] Hector R F, Zimmer B L, Pappagianis D. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, **34**:587 ~ 593.
- [ 3 ] Decker H, Zähler H, Heitsch H, et al. *J Gen Microbiol*, 1991, **137**:1805 ~ 1813.
- [ 4 ] Schütz T C, Fiedler H P, Zähler J. *Antibiot*, 1992, **45**:199 ~ 206.
- [ 5 ] Martin J F, Liras P. *Annu Rev microbiol*, 1989, **43**:173 ~ 206.
- [ 6 ] Chung S-T. *J Bacteriol*, 1987, **169**:4436 ~ 4441.
- [ 7 ] Engel P, Wright M S. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, **109**:257 ~ 262.
- [ 8 ] Ikeda H, Takada Y, Pang C, et al. *J Bacteriol*, 1993, **175**:2077 ~ 2082.
- [ 9 ] 邓子新,周秀芬. *微生物学报*, 1994, **34**:428 ~ 433.
- [ 10 ] Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, et al. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [ 11 ] Jia J, Li W, Chen W, et al. *Science in China (Series C)*, 2000, **43**:30 ~ 38.
- [ 12 ] Sambrook J, Fritsch E. F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [ 13 ] Bormann C, Kálmánzhelyi A. *J Antibiot*, 1999, **52**:102 ~ 108.
- [ 14 ] Engel P, Dischinger H C, Ullah A H J. *Prep Biochem*, 1989, **19**:321 ~ 328.
- [ 15 ] Oh S, Chater K. *J Bacteriol*, 1997, **179**:122 ~ 127.
- [ 16 ] Engel P. *Appl Environ Microbiol* 1987, **53**:1 ~ 3.
- [ 17 ] Engel P, Lax A R. *Lett Appl Microbiol*, 1997, **25**:225 ~ 228.
- [ 18 ] Chen W, Zeng H, Tan H. *Curr Microbiol*, 2000, **41**:312 ~ 316.
- [ 19 ] Volf J N, Alterbuchner J. *Mol Microbiol*, 1998, **27**:239 ~ 246.

## Tn4560 Transposition in *Streptomyces ansochromogenes* and Its Application for Cloning of Genes Involved in Nikkomycin Biosynthesis\*

Zeng Hongmei<sup>1,2</sup> Tan Huarong<sup>2</sup> Li Jilun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(<sup>2</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** No transformant was obtained when pUC1169(pMT660::Tn4556::vph) from *S. coelicolor* J1501 was used to transform the protoplast of *S. ansochromogenes* by general transformation for many times. Transformants were obtained when the protoplast of *S. ansochromogenes* was prepared at 50°C for 30min by heat attenuation of restriction. But the transformation frequency is very low, only 0.4 transformant per  $\mu\text{g}$  DNA. Transformation frequency increased  $10^3 \sim 10^4$  times when the protoplast of *S. ansochromogenes* was transformed by pUC1169 from itself. With Tn4560 transposition, 8 mutants lost ability to produce nikkomycin were screened from 4068 colonies with Vio<sup>H</sup>-Thio<sup>S</sup>. Southern blotting suggested that Tn4560 was inserted in at least 4 positions of chromosomal DNA in *S. ansochromogenes*. By using the cloned 30kb DNA fragment involved in nikkomycin biosynthesis as a probe, southern hybridization was carried out with 8 mutant total DNA digested with different enzymes. Only total DNA from Nik5 displayed signals, which were the same as those of the wild type. With HPLC analysis, 8 mutants could be classified into two types for nikkomycin production, one is Nik5, the other is Nik1,2,3,4,6,7 and Nik8. As deduced preliminarily, the deletion of large chromosomal DNA fragment involved in nikkomycin biosynthesis took place in the 7 mutants. The partial gene library of Nik5 was constructed, the 4.2kb and the 0.6kb chromosomal DNA fragment flanking Tn4560 were cloned. Sequence analysis showed that the 4.8kb DNA fragment (GenBank accession number: AF349618) contains two complete ORFs and one partial ORF.

**Key words:** *Streptomyces ansochromogenes*, Tn4560, Transpositional mutation, Nikkomycin biosynthetic gene

\* Chinese National Science Fund for Outstanding Youths(39925002)