

圈卷产色链霉菌分化相关基因 ——*saw1* 的结构和功能*

谭华荣 杨海花 田宇清 马文勃 刘 钢

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 用双脱氧链终止法进行了分化基因——*saw1* 的双链测序。结果表明在 1500bp 的 DNA 片段中有一个完整的开读框架(ORF),其编码区是在 419bp 至 1252bp 处。其产物与已知的天蓝色链霉菌 *whiG* 的氨基酸序列有 89% 的同源性。当把 1500bp 的 *saw1* DNA 片段插入到链霉菌表达质粒载体 pIJ702 后,构建的重组质粒转化天蓝色链霉菌孢子形成缺陷突变株 C71, 可使 C71 形成孢子和灰色色素。用基因破坏的策略进一步研究了该基因的生物学功能,结果表明 *saw1* 在圈卷产色链霉菌气生菌丝到孢子形成的发育转变中有重要作用,是分化中控制孢子发育起始的一个重要基因。

关键词 圈卷产色链霉菌,分化基因,序列分析

分类号 Q78

原核生物发育分化的分子生物学是目前国际上的一个研究热点。链霉菌作为原核生物既有遗传物质结构简单的特点,又有类似真核生物丝状真菌的复杂的发育分化生命周期,故链霉菌已成为微生物发育分化研究的最好模式材料^[1],为研究基因时空表达提供了有利条件。在分子水平阐明发育分化调控机制有重要理论意义,可揭示和解决微生物生命现象中一些重要的基础理论问题。圈卷产色链霉菌是从我国东北土壤中分离的尼可霉素(Nikkomycin)产生菌,它具有链霉菌典型的分化生命周期,即从孢子萌芽形成基质菌丝,气生菌丝,菌丝螺旋(不象天蓝色链霉菌那样高度螺旋,仅有一周螺旋),分隔后形成多细胞和具有灰色色素的游离孢子。我们早期的研究表明,圈卷产色链霉菌能被来自变铅青链霉菌质粒 pIJ702 所转化,但该菌株对 pIJ702 有强的修饰作用而导致转化频率极低。从低频率转化子中提取修饰后的 pIJ702 再转化圈卷产色链霉菌,能得到高频率的转化效果^[2]。紫外诱变得到的圈卷产色链霉菌分化阻断突变株有两种类型,即光秃型和白色突变株,其中,不能形成孢子的白色突变株 W51 经十二次传代培养仍保持稳定的白色气生菌丝的表型。用 W51 作为受体通过互补克隆得到了与圈卷产色链霉菌分化有关的 *saw1* 基因^[3],本文报道该基因的全序列分析,组成元件的结构特性,功能及表达调控研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和噬菌体:大肠杆菌 (*E. coli*) JM101,天蓝色链霉菌 (*Streptomyces*

*国家自然科学基金和中国科学院重点基金资助项目。

收稿日期:1997-08-27

coelicolor) 孢子形成缺陷突变株 C71, 圈卷产色链霉菌 (*Streptomyces ansochromogenes*) 7100, DNA 片段亚克隆及测序载体 Bluescript M13, 单链 DNA 制备帮助噬菌体 KO7, 链霉菌质粒 pIJ702 以及用于基因破坏的质粒载体 pDH5 均由本课题组收藏。

1.1.2 培养基: 大肠杆菌 LB 培养基, 按文献 [4] 方法配制。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 [5] 配制。用于单链 DNA 制备的大肠杆菌生长培养基 2 × YT 按文献 [6] 方法配制。

1.1.3 酶, 抗生素及化学试剂 实验所用酶 *Hind*III, *Sac*I, 核酸外切酶 *Exo*III, Klenow 及 T4 DNA 连接酶均为 Boehringer 公司产品。DNA 测序用 T7 DNA 聚合酶及测序 kit 为 Pharmacia 生物工程公司产品。羧苄青霉素贮藏液浓度为 100mg/ml, 使用浓度为 50 μ g/ml, 硫链丝菌素由美国 SQUIBB 医学研究所惠赠, 该抗生素溶于二甲基亚砷 (DMSO) 溶剂中, 其贮备液浓度为 50mg/ml, 在 R2YE 培养基中使用浓度为 50 μ g/ml, 在 MM 中使用浓度为 10 μ g/ml, 潮霉素贮备液浓度为 50mg/ml, 在 R2YE 中使用浓度为 200 μ g/ml, 在 MM 中使用浓度为 15 μ g/ml。上述抗生素贮备液均置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。聚乙二醇 (PEG) 1000 购于 Merk-Schachardt 公司, 用于链霉菌原生质体转化实验。X-gal 和 IPTG 用于大肠杆菌转化子的选择, 在 LB 培养基中使用浓度均为 40 μ g/ml。

1.1.4 同位素: 用于 DNA 序列测定的 α ³²PdCTP 购于北京亚辉生物医学工程公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取和纯化: 质粒 DNA 提取及 DNA 纯化: 按文献 [4~6] 方法进行。

1.2.2 大肠杆菌感受态细胞制备及转化: 按文献 [4, 6] 方法进行。

1.2.3 链霉菌原生质体制备, 再生及转化: 按文献 [5, 6] 方法进行。

1.2.4 单链 DNA 制备及序列分析: 含有重组质粒的大肠杆菌 JM101 单菌落接种于 2 × YT 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。转接 75 μ l 的过夜培养菌到新鲜的含有 100 μ g/ml 羧苄青霉素的 1.5ml 2 × YT 试管中, 37 $^{\circ}$ C 培养 1h 后加入 7.5 μ l 的帮助噬菌体 KO7 继续培养 1h, 然后加入 15 μ l 新鲜配制的卡那霉素 (7mg/ml) 于上述培养菌中, 过夜培养 14~16h。离心收集上清噬菌体, 并用 1/4 体积的 20% 的 PEG 进行单链 DNA 的提取。经乙醇沉淀和干燥后的 DNA 溶于 TE 缓冲液中备用。DNA 序列测定按文献 [7] 方法进行。

1.2.5 基因表达及功能测定: 以孢子形成缺陷突变株为受体, 通过功能互补法研究基因的表达。即将 *saw1* 基因亚克隆到链霉菌的质粒表达载体 pIJ702 后转化相应的突变株, 观察表型的恢复。同时用基因破坏 (Gene disruption) 的策略研究基因的功能, 即将 *saw1* 结构基因亚克隆到质粒 pDH5 上, 此质粒的复制区来自大肠杆菌, 故在链霉菌中不能复制, 只能通过插入的链霉菌的基因片段与宿主染色体上的同源基因重组而整合。pDH5 质粒载体上有氨苄青霉素和硫链丝菌素抗性基因, 有噬菌体 F1, 在帮助噬菌体 (Helper phage) M13 KO7 的作用下可进行单链 DNA 的包装。同时在 *saw1* ORF1 中间部位插入了潮霉素抗性基因。构建的重组质粒以单链形式转化野生型圈卷产色链霉菌 7100 后, 在硫链丝菌素和潮霉素抗性选择下, 通过同源交换 (Crossover) 使染色体上的同源基因破坏 (Gene disruption) 而获得重组突变体, 通过观察突变体生长特征, 形态与生理分化的改变来确定 *saw1* 的生物功能。通过基因互补实验研究基因功能, 即把完整的 *saw1* 结构基因亚克隆到链霉菌表达载体 pIJ702 上, 在以甘露醇为碳源的 MM 上筛选具有野生型表型的转化子。

2 结果

2.1 *saw1* 基因的亚克隆及单链制备

约 4.5kb 的 *saw1* DNA 片段被亚克隆到 *Pst*I 和 *Kpn*I 酶切后的 pUC18 载体上, 构建的重组质粒命名为 pTH1000。用 *Hind*III 和 *Sac*I 进一步酶切 pTH1000 得到 2kb 和 2.5kb 的两个片段, 它们被分别连接到链霉菌表达载体 pIJ702 后, 转化天蓝色链霉菌孢子形成缺陷突变株 C71, 转化子表型结果表明 *saw1* 位于 2.5kb 的 DNA 片段内, 而 2kb 的 DNA 片段不具有使 C71 恢复野生型表型的功能。因此 2.5kb 的 DNA 片段进一步被亚克隆到大肠杆菌测序载体 Bluescript M13⁻ 上, 构建的重组质粒命名为 pTH1001。用外切核酸酶 *Exo*III 进行了 pTH1001 的缩小, 每 40s 取样终止, 在 12 个时间点内把重组质粒缩小到接近于载体本身的大小。各时间点的样品用 Mung bean 酶切, Klenow 酶填补, T4 DNA 连接酶连接, 然后分别转化大肠杆菌 JM101。通过质粒的提取筛选出适合大小的重组质粒(图略)。在 KO7 的作用下, 经单链 DNA 制备, 在琼脂糖凝胶电泳上清楚可见只有单链 DNA 的泳带(图略)。

2.2 *saw1* 的全序列测定和分析

用双脱氧链终止法进行了分化基因 *saw1* 的双链测序。结果表明 *saw1* 基因可定位在 2505bp DNA 片段中的 1500bp 内(图 1), G + C 含量为 72% 左右, 推测 *saw1* 基因在 236~279 碱基区域处是启动子的活性区。从序列 5' 到 3' 端的第二个碱基(N2 >)开始的 280 至 1250 碱基位置处有一个完整的开读框架(ORF)(图 2)。在起始密码子(ATG)上游 3 个碱基的间隔处有一个比较典型的核糖体结合位点(RBS)。以 DNA 序列推测出的 ORF 的氨基酸序列, 在计算机蛋白文库中进行了比较, 结果表明 *saw1* 基因产物与天蓝色链霉菌 *whiG* 的产物 σ^{whiG} 的氨基酸序列有 89% 的同源性, 与金霉素链霉菌和灰色链霉菌类似 *whiG* 的 σ^{whiG} 产物分别也有 87% 和 86% 的同源性(图 3)。

2.3 *saw1* 基因的表达调控及功能研究

当含有 *saw1* 的 2.5kb 的 DNA 片段亚克隆到链霉菌质粒表达载体 pIJ702 后, 得到的重组质粒命名为 pTH1002, 转化天蓝色链霉菌孢子形成缺陷突变株 C71 后, 得到的转化子在 MM 平板上培养 8d 后进行观察, 转化子能形成有灰色色素的孢子, 在光学显微镜下能清楚地看到游离的孢子和链孢子。而只含载体 pIJ702 的 C71 仍是白色气生菌丝的表型, 光学显微镜下只见到长而直的气生菌丝, 未看到有孢子形成的特征。结果表明 *saw1* 基因能互补天蓝色链霉菌 C71 的突变基因。

为了在分子水平更进一步了解 *saw1* 的功能, 用基因破坏的方法进行了这一研究。在 *saw1* 编码区内有两个 *Sal*I 位点, 酶切后得到 0.6kb 的 DNA 片段, 此片段经电泳纯化后被亚克隆到 pDH5 质粒上, 得到重组质粒 pTH1003, 当其转化圈卷产色链霉菌野生株 7100 后, 得到了不能形成孢子的白色表型的转化子或破坏子(Disruptants), 结果表明由于重组质粒 pTH1003 中插入的 0.6kb 的部分 *saw1* 基因与染色体上同源基因的交换使染色体上的 *saw1* 基因被阻断, 从而失去了控制孢子形成的能力, 使野生型灰褐色的圈卷产色链霉菌 7100 变成了只有白色气生菌丝的表型, 此破坏子被称为 7100-3(图 4-B)。破坏子和作为对照的野生株的总 DNA 被提取, 用适合的限制性内切酶进行酶切, 琼脂糖凝胶电泳后, DNA 被转移到尼龙膜上进行 Southern blot 杂交, 结果验证了重组质粒 pTH1003 确实整合到了野生株 7100 的染色体上(图略), 表明 *saw1* 在链霉菌孢子形成中有重要作用。为了进

	bp
GAGCTCCGAGCGCTTGGCTATGTCTGAACGACACGGCGATGGCTGGAAGTTGACACGCCAG	60
GCGGTGATCTCGGTCCCGATGGTCACCCGCCGTGCTGACCGACCGTGTTCGGCCGTC	120
GGGGAACCCCGACAGCCTTGGGGTTCCCGGAGTTGACACATCCGGCCGGTCACGCAGA	180
GCGAACCATGGCCCGGTACCCGCCCGGTGAGCCCCGCGCACGAGTGGAGCCCTCT	240
<u>TGTTGCGACACCGGACTCCGCGAGTCCAGTACGCTCACGAAGGTGCCGACGCAGACCGCG</u>	300
<u>TCAACCCGACATCAAGACCGACACCTCACCCAGTACGCCCTTCTCCGCACCGACCCAC</u>	360
TCCCTCCCCTTACAGCACATCACGGCACTTACGGCAGAACGGCACAAAGGCGACGAAT	420
	480
GCCCCAGCACACCTCCGGTCCGACCGGGCGGCGATCCCCCAGCCGCCCGGACGGTGG	480
M P Q H T S G S D R A A I P P A A R D G	
CAGCGCCGACCGCCCGACCCCTCGACGCTCGACGAGCTGTGGCGGTGCTACAAGGCGAC	540
G S A R P P A P S T L D E L W R S Y K A	
GGGGACGACCGGCTGCGGGACGAAGTATCCTGCACTACTCGCCGCTGGTCAAGTACGT	600
T G D D R L R D E L I L H Y S P L V K Y	
GCGGGCCGGGTGAGCGTCCGGCTGCCGCCAATGTGGAGCAGGCCGACTTCGTCTCCTC	660
V A G R V S V G L P P N V E Q A D F V S	
GGGGTGTTCGGGCTGATCGACCGATCGAGAAGTTCGACATCGACCGGGAGATCAAGTT	720
S G V F G L I D A I E K F D I D R E I K	
CGAGAGTACCGGATCACCCGGATCCGCGGCCCATGATCGACGAGCTGCGGGCGGCTGGA	780
F E T Y A I T R I R G A M I D E L R R L	
CTGGATCCCGCTCGGTCCGGCAGAGGCGCAACGTCGAGCGTGCCTACGCCACCCT	840
D W I P R S V R Q K A R N V E R A Y A T	
GGAGCGCGGCTGCCGACGCCGACGGAGGCGAGGTCGCCGCGGAGCTGGGCATGGAGT	900
L E A R L P D A D G E V A A E L G M E	
CGACGAAGTGCACGCCGTGTTACCCGTGTCGCTGGCCAACGTGGTCCGCCCTGGAGGAGCT	960
V D E L H A V F T V S L A N V V A L E E	
GCTGCACGTCGGCGGCGAGGGCGGGACCGGCTCAGCCTGATGGACACGCTGGAGGACAC	1020
L L H V G G E G G D R L S L M D T L E D	
CGCCGCCGACAACCCGGTGGAGGTGGCCGAGGACCGGAGCTGCGGGCGCTTCCTGGCCCC	1080
T A A D N P V E V A E D R E L R R F L A	
GCGATCAACACCCTGCCGAGCGGGAGAAGACCGTCTGTCACCCCTACTACTACGAGGG	1140
R A I N T L P E R E K T V V T L Y Y Y E	
GCTCACCCCTCGCCGAGATCGGCAATGTCTCGGCGTCACCGAGAGCCGGGTGACCCAGAT	1200
G L T L A E I G N V L G V T E S R V S Q	
CCACACCAAGTCCGTGCTCCAGCTGCGGGCCAAGCTGGCGCCTTCGGGGTGAGTCTCCCG	1260
I H T K S V L Q L R A K L A P S G *	
TTCGCCGGGGCGGAGTCCGTAAGTGGTGGCGTGCCAAGGATTCGAGCGGCCCTCCGTGG	1320
CAACACCGGTGATGCAGCGAGCCGCCCTGCTGGACGGGCTCGGACCCTGCTGTCCGAG	1380
GGCGGGACGGAGGCGCTGACCTTCCCGCGCTGGCCGAGCGGACGGGACTGGCGCGGTGCG	1440
TCCGTGTACGAGTACTTCGCTCCCGGGCCGCGGTGGTTCGAGGAGCTGTGCGCGGTGCGACT	1500

图1 *saw1* 基因的 DNA 全序列测定与分析

RBS: 核糖体结合位点, 长方形块中标记的序列为推测的启动子区域; ORF: 开放阅读框。

Fig.1 The full-length DNA sequences of *saw1* gene

RBS: Ribosome Binding Site, the sequence marked by rectangle

indicates the promoter region; ORF: Open Reading Frame.

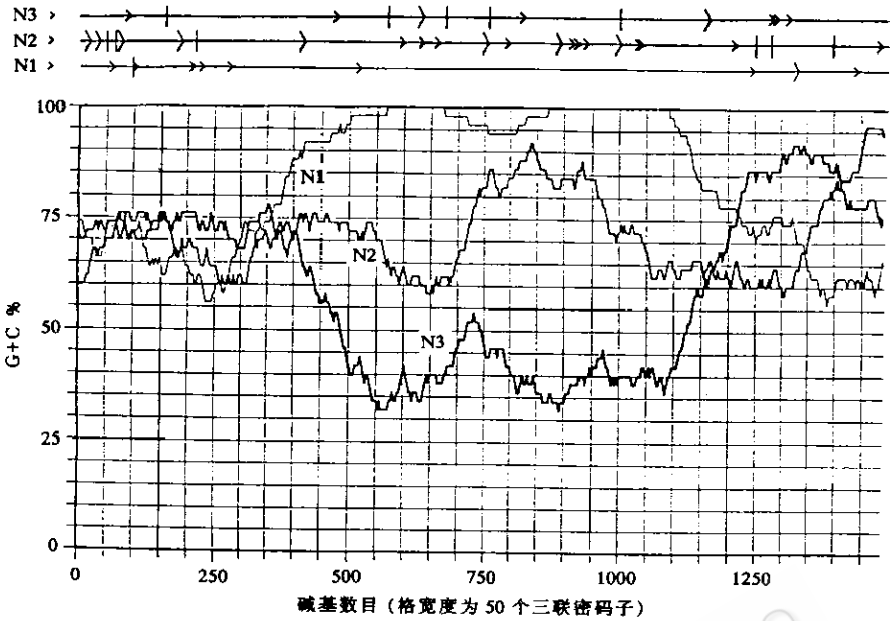


图2 saw1 基因的读码框架(ORF)

N1: 从 5' 到 3' 端以第一个碱基开始的密码子; N2: 从 5' 到 3' 端以第二个碱基开始的密码子;
 N3: 从 5' 到 3' 端以第三个碱基开始的密码子。

Fig.2 The analysis of open reading frame of saw1 gene

N1: Codons started as first base position from 5'-3' end; N2: Codons started as second base position from 5'-3' end; N3: Codons started as third base position from 5'-3' end.

一步证明 saw1 的功能, saw1 被连接到质粒 pIJ702 上, 构建的重组质粒被命名为 pTH1004, 当其转化圈卷产色链霉菌孢子 7100-3 后, 得到了具有野生型 7100 的灰色孢子表型的恢复子(图 4-D), 而 pIJ702 转化 7100-3 后得到的转化子仍是白色气生菌丝的表型(图 4-C)。此结果表明 saw1 确与孢子形成有关, 是圈卷产色链霉菌分化中的一个重要基因。

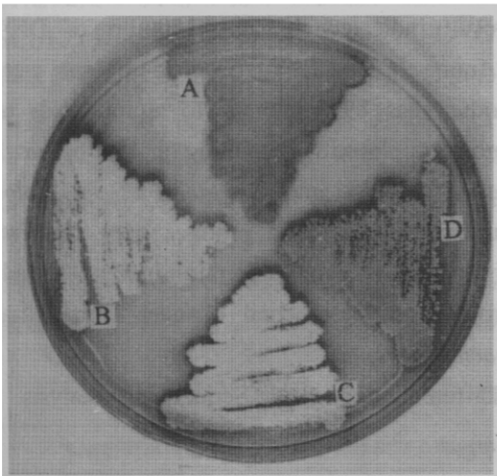
3 讨论

天蓝色链霉菌形态分化基因 whiG 的产物为 σ 因子称之为 σ^{whiG} , 它在孢子形成的起始阶段有重要作用, 控制气生菌丝到孢子形成的发育转变。saw1 基因与 whiG 基因的产物有 89% 的同源性, 并能互补天蓝色链霉菌 whiG 的缺陷突变株 C71, 说明来自不同链霉菌与分化有关的同源基因, 虽然结构有异但功能相同。与之相反, σ^{whiG} 与枯草芽孢杆菌的 σ^D 在氨基酸的组成结构上有约 42% 的同源性, 但二者在功能上完全不同, σ^D 主要与枯草芽孢杆菌细胞的游动性和趋化性有关而与分化中内孢子的形成无关, 说明原核生物基因结构与功能具有多样性。whiG 在分化中的转录调控研究得比较深入, σ^{whiG} 与核心酶 ($\alpha_2\beta\beta'$) 结合成全酶 ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) 识别相关基因的特异启动子, 使基因转录开始。是什么因子使 σ 因子在分化中处于有序的控制中, 目前所知抗-Sigma 因子或抗-抗-Sigma 因子在基因时空表达调控中有重要作用。在枯草芽孢杆菌中对抗-Sigma 因子开展了一些研究^[8]。而在链霉菌中, 有关抗-Sigma 因子的研究至今未见报道。为了进一步阐明链霉菌分化基因作用

a	MPQHTSGSDR	AAVPPAAR	GSVRSTAPSS	LEVLRYSYK	D	38
b	MPQHTSGSDR	AAA PPAAR	GAARPPAPST	LDELWRSYK	A	38
c	MPQHTSGSDR	AAI PPAAR	GSVRPPAPST	LDELWRSYK	T	40
d	MPQHTSGSDR	AAI PPAAR	GSARPPAPST	LDELWRSYK	A	40
a	SGDERLREQ	ILHYSPLVKY	VAGRVSVGLP	PNVEQADFVS		78
b	SGDERLREQ	ILHYSPLVKY	VAGRVSVGLP	PNVEQADFVS		78
c	TGDERLREQ	ILHYSPLVKY	VAGRVSVGLP	PNVEQADFVS		80
d	TGDDRLRDEL	ILHYSPLVKY	VAGRVSVGLP	PNVEQADFVS		80
a	SGVFGLIDAI	EKFDIERSTK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL		158
b	SGVFGLIDAI	EKFDPARAIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL		113
c	SGVFGLIDAI	EKFDVDR EIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL		120
d	SGVFGLIDAI	EKFDIDREIK	FETYAITRIR	GAMIDELRLRL		120
a	DWIPRSVRQK	ARAVERAYAT	LEAQLRRTPT	EGEVAGEMGI		158
b	DWIPRSVRQK	ARAVERAYAT	LEAELRRTPT	EAEVAAEMGI		158
c	DWIPRSVRQK	ARNVERAYAT	LEARLRRTPS	ESEVAVEMGI		160
d	DWIPRSVRQK	ARNVERAYAT	LEARL.PDAD	GGEVAAELGM		159
a	GVEELH TVFS	QLSLANVVAL	EELLVGGEG	GDRLSLMDTL		198
b	AL EELH SVFS	QLSLANVVAL	EDLLHAGDEG	GERLSLMDTL		198
c	AVE DLH AVFS	QLSLANVVAL	EELLVGGEG	GGRLSLMDTL		200
d	EVD ELH AVFT	.VSLANVVAL	EELLVGGEG	GDRLSLMDTL		198
a	EDHAAD DPVE	VAEDRELRR	LARAIN TLPE	REKTVVTLYY		238
b	EDTAAD DPVE	VAEDRELRR	LARAIN TLPE	REKTVVTLYY		238
c	EDTAAD NPVE	VAEDRELRR	LARAIN TLPE	REKTVVTLYY		240
d	EDTAAD NPVE	VAEDRELRR	LARAIN TLPE	REKTVVTLYY		238
a	YEGLTLAEIG	NVLGVTSRV	SQIHTKSVLQ	LRAKLA DVGR		278
b	YEGLTLAEIG	QVLGVTSRV	SQIHTKSVLQ	LRAKLA DVGR		278
c	YEGLTLAEIG	NVLGVTSRV	SQIHTKSVLQ	LRAKLA GFGR		280
d	YEGLTLAEIG	NVLGVTSRV	SQIHTKSVLQ	LRAKLA PPSG*		277

图3 *saw1* 基因产物与其它链霉菌 *whiG* 产物的同源性比较

a: 金霉素链霉菌; b: 灰色链霉菌; c: 天蓝色链霉菌; d: 圈卷产色链霉菌。

Fig.3 Homologous comparison of *saw1* gene product with *whiG* products of other *Streptomyces*a: *Streptomyces aureofaciens*; b: *Streptomyces griseus*;
c: *Streptomyces coelicolor*; d: *Streptomyces ansochromogenes*.图4 *saw1* 基因的破坏对圈卷产色链霉菌分化的影响

A: 圈卷产色链霉菌野生株 7100; B: 圈卷产色链霉菌突变株 7100-3; C: 圈卷产色链霉菌突变株 7100-3/pIJ702; D: 圈卷产色链霉菌突变株 7100-3/pTH1004.

Fig.4 The effect of *saw1* gene disruption on the differentiation of *Streptomyces ansochromogenes*
A: *Streptomyces ansochromogenes* 7100 (wild type);
B: *Streptomyces ansochromogenes* 7100-3 (disruptant);
C: *Streptomyces ansochromogenes* 7100-3/pIJ702;
D: *Streptomyces ansochromogenes* 7100-3/pTH1004.

的分子机制,开展抗-Sigma因子的研究是一个前沿研究课题,也是目前研究基因表达调控的一个闪光点。本实验室已克隆和测序的含有 *saw1* 基因的 DNA 片段为 2505bp,在 *saw1* 基因的下流比天蓝色链霉菌 *whiG* 的下流多出约 700bp 的 DNA 序列,有一个小的编码基因(ORF2),其转录和翻译方向与 *saw1* 相反,继续该基因的生物功能及其与 *saw1* 基因的相互关系研究将为分化调控网络的阐明提供更多的证据。

参 考 文 献

- [1] Chater K F, Bruton C J, Plaskitt K A *et al.* *Cell*, 1989, 59:133~143.
- [2] 谭华荣,吴 畏,田宇清等. 微生物学报,1994,34(5):398~402.
- [3] 谭华荣,王 垒,田宇清等. 微生物学报,1997,37(5):393~396.
- [4] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [5] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces, A laboratory Manual*, Norwich, England: John Innes Foundation, 1988.
- [6] Tan H R, Yang H H, Tian Y Q *et al.* *Science in China (Series C)*, 1996, 39(6):608~616.
- [7] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74:5463~5467.
- [8] Brown K L, Hughes K T. *Mol Microbiol*, 1995, 16(3):397~404.

STRUCTURE AND FUNCTION OF *SAW1*—A GENE RELATED TO DIFFERENTIATION OF *STREPTOMYCES ANSOCHROMOGENES*

Tan Huarong Yang Haihua Tian Yuqing Ma Wenbo Liu Gang

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

Abstract The DNA sequence of double strands of *saw1* gene was determined by the method of chain-termination inhibitors. The result indicated that the 1500 bp of DNA fragment displayed a complete open reading frame (ORF), the encoding regions were located in 419 to 1252bp positions, *saw1* product has 89% identity to amino acids of σ^{whiG} of *Streptomyces coelicolor*. When recombinant plasmid containing a 1500bp *saw1* DNA fragment insert in plasmid pIJ702 was introduced into *Streptomyces coelicolor* C71, the sporulation deficient mutant C71 could form spore and produce grey pigment. The gene function was studied by using the method of gene disruption and the result showed that the *saw1* played an important role in developmental changes from aerial hypha to spore formation of *Streptomyces ansochromogenes*.

Key words *Streptomyces ansochromogenes*, Differentiation gene, Sequencing analysis