

阿维链霉菌 NRRL8165 中 *bldA_a* 的克隆及其对形态分化 与阿维菌素合成的影响

陶韦新¹, 吴 菁¹, 邓子新², 陶美凤^{1*}

(¹ 华中农业大学 农业微生物国家重点实验室 武汉 430070)

(² 上海交通大学 教育部微生物代谢重点实验室 上海 200030)

摘 要: *bldA* 编码天蓝色链霉菌中唯一有效识别 UUA 亮氨酸密码的 tRNA(Leu)UUA。通过构建阿维链霉菌 NRRL8165 基因组文库,筛选得到含有阿维链霉菌 *bldA_a* 及其侧翼序列的克隆。利用 λRED 介导的 PCR targeting 技术构建了 *bldA_a* 的基因置换质粒 pHL358,将其跨属接合转移进入阿维链霉菌 NRRL8165,筛选得到 *bldA_a* 基因置换菌株 TW10。TW10 表现为光秃表型,表明 *bldA_a* 调控阿维链霉菌的形态分化。摇瓶发酵 TW10 菌株并对发酵产物进行 HPLC 分析,发现 TW10 菌株均不合成阿维菌素组分,提示阿维菌素的合成受 *bldA_a* 调控,考察阿维菌素生物合成基因簇,其中 *aveA3* 和 *aveR* 含有 TTA 密码,它们的翻译可能受 *bldA_a* 调控,与实验结果一致。

关键词: *bldA*, 阿维链霉菌, 接合转移, 基因置换, 阿维菌素

中图分类号: Q78, Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0034-05

TTA 是 6 个编码亮氨酸的三联体密码之一,在高 G + C% 的重要抗生素资源菌链霉菌中 TTA 密码非常稀有。*bldA* 基因编码链霉菌中唯一能有效识别稀有 TTA 密码的 tRNA。天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) *bldA* 基因突变株营养生长不受影响,但失去合成放线紫红素等多种抗生素的能力,同时不能形成气生菌丝和产生孢子,从而呈现“光秃”表型^[1]。在放线紫红素生物合成途径中,*bldA* 通过控制含 TTA 密码的调节基因 (*actII-ORF4*) 和抗生菌素输出基因 (*actII-ORF2*) 的表达来调控抗生素的合成^[2]。含 TTA 密码的 *adpA* 则是 *bldA* 调控产孢过程的靶基因^[3,4]。此外,*bldA* 在灰色链霉菌 (*S. griseus*)^[5,6]、球孢链霉菌 (*S. globisporus*)^[7]、白黑链霉菌 (*S. alboniger*)^[8] 和变铅青链霉菌 (*S. lividans*) 中,也调节产孢或抗生素合成。但是也有例外,在棒状链霉菌 (*S. clavuligerus*) 中,尽管棒酸及头霉素生物合成途径特异性调节基因 *ccaR* 中含有 TTA 密码,但这两种抗生素的合成并不受 *bldA* 调节^[9]。

阿维菌素是阿维链霉菌 (*S. avermitilis*) NRRL8165 产生的一组天然的十六元大环内酯类抗生素,有极强的杀体内外寄生虫活性,是目前最为有

效的生物来源杀虫剂之一^[10]。阿维链霉菌基因组测序已完成^[11],在阿维链霉菌中存在 *bldA* 的同源基因 *tRNA57*,本文命名为 *bldA_a*。本研究通过分析阿维菌素生物合成基因簇序列,发现 I 型聚酮合酶基因 *aveA3*、调节基因 *aveR* 均含有 TTA 密码;此外,阿维链霉菌的 *adpA* 同源基因 (*adpA_a*) 也含有 TTA 密码。根据上述分析,推测阿维链霉菌形态分化和阿维菌素的合成都可能受 *bldA_a* 调控。本文根据基因组序列,克隆、中断 NRRL8165 中的 *bldA_a*,通过考察基因中断菌株的表型变化检验上述推测。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:阿维链霉菌 NRRL8165、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α、ET12567 (pUZ8002) 均由华中农业大学农业微生物国家重点实验室链霉菌分室保存;BW25113 (pIJ790)^[12] 由英国 John Innes Centre 的 Chater K 教授惠赠。

1.1.2 质粒:pIJ4642^[13] 为大肠杆菌插入正选择载体,含氯霉素和壮观霉素抗性基因。pHJL401^[13] 为大肠杆菌和链霉菌双功能质粒,链霉菌复制子为 SCP2* 不稳定复制子,含氨基青霉素、硫链丝菌素

基金项目: 国家自然科学基金 (30200005)

* 通讯作者。Tel: 86-27-87283702; E-mail: tao-meifeng@yahoo.com

作者简介: 陶韦新 (1980 -) 男,江苏常熟人,硕士研究生,研究方向为链霉菌分子生物学。E-mail: taoway@webmail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2006-04-20; 接受日期: 2006-05-18; 修回日期: 2006-07-11

抗性基因; pIJ773^[12] 为大肠杆菌质粒, 含氨基青霉素、阿泊拉霉素抗性基因和接合转移起始位点; pHL127(本实验室李文成博士提供) 为链霉菌内整合型载体, 源于 pSET152, 含壮观霉素抗性基因。

1.1.3 试剂: 所用限制性内切酶、高保真 *Taq* 聚合酶 *pyrobest* 和 pMD-18T 载体购于 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶为 Promega 产品; DNA 分子量标记购于华美生物工程公司; DIG DNA 标记和检测试剂盒购于 Roche 公司; 阿维菌素标准品购于 Sigma 公司。

1.1.4 培养基: 大肠杆菌培养基为 LB^[14], 阿维链霉菌固体产孢培养基为 YMS^[15], 液体培养基为 YEME^[13], 大肠杆菌与阿维链霉菌的接合转移培养基、阿维链霉菌的种子培养基和发酵培养基参见文献 [15]; LB 中氨基青霉素使用终浓度为 100 μg/mL, 阿泊拉霉素为 30 μg/mL, 氯霉素为 25 μg/mL, 卡那霉素为 25 μg/mL; YMS 中硫链丝菌素使用终浓度为 10 μg/mL, 阿泊拉霉素为 30 μg/mL, 萘啶酮酸为 25 μg/mL。

1.2 DNA 操作

质粒提取和转化等基本操作见文献 [14]; 链霉菌培养、总 DNA 提取, 大肠杆菌与链霉菌的属间接接合转移方法见文献 [13]; 地高辛标记 DNA 探针和 Southern 杂交参照产品说明书和文献 [14]。

1.3 引物设计和 PCR 技术

根据阿维链霉菌 MA-4680 的序列信息, 参照 PCR targeting 系统^[12], 设计一对引物: F1: 5'-GGC GCTACCCGCCCAAGGTGGTGCACGCACTCGTCCTGATG TAGGCTGGAGCTGCTTC-3'; F2: 5'-GGTCCGGTCCG CGAGGGGAGTGTCTGCTCAGCGGAGGCTGATCCGGGG ATCCGTCGACC-3'。引物 5' 端未划线部分序列分别与 *bldA_a* 上下游序列匹配, 3' 端划线部分序列与 pIJ773 的阿泊拉霉素抗性基因两侧序列相匹配, 可以扩增 pIJ773 的阿泊拉霉素抗性基因及其相邻的接合转移起始位点, 利用 PCR targeting 技术构建 *bldA_a* 基因置换质粒。PCR 条件: 95°C 45s, 60°C 50s, 72°C 2min; 25 个循环。第 2 对引物: F3: 5'-GCAGCGGAAGTCCGAGGAGA-3', F4: 5'-GCCTGGAAG ATGAAGCCGAT-3' 分别与 *bldA_a* 基因置换片段两侧序列匹配, 用于验证基因置换菌株的基因型。PCR 条件: 95°C 45s, 60°C 50s, 72°C 150s; 25 个循环。第三对引物: F5: 5'-GCGACAACGCCAGCTGCTG-3', F6: 5'-CTCCTGTCCGGACGCGGATG-3' 分别与 *bldA_a* 基因两侧序列匹配, PCR 扩增产物包含完整的 *bldA_a* 基因。PCR 条件: 95°C 45s, 60°C 50s, 72°C 80s; 25 个

循环。

1.4 发酵液的 HPLC 分析

取 1 mL 发酵液, 加 4 mL 甲醇, 充分振荡浸泡 30 min 后, 离心取上清进行 HPLC 分析。分析条件: C18 反相柱, 内径 4.6 mm, 柱长 300 mm; 流动相为甲醇: 水 (85:15), 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 245 nm^[15]。

2 结果

2.1 阿维菌素生物合成基因簇及 *adpA* 中含有 TTA 密码

根据阿维菌素生物合成基因簇序列^[16], 阿维菌素生物合成过程包括聚酮骨架的合成及其呋喃环形成、夹竹桃糖的合成及聚酮的糖基化等步骤, 有关基因包括 4 个聚酮合酶基因 (*aveA1-4*)、夹竹桃糖 (*oleandrose*) 合成、糖基转移酶和途径特异性调节基因等 18 个基因。分析 18 个基因的遗传密码, 发现 I 型聚酮合酶基因 *aveA3* 的第 2044 个密码、调节基因 *aveR* 的第 464 个密码是 TTA。因此, 阿维菌素的生物合成有可能受 *bldA_a* 基因的调控。此外, 与天蓝色链霉菌 *adpA* 核苷酸序列有 90% 一致性的 *adpA_a* 基因的第 225 个密码也是 TTA, 因此推测阿维链霉菌形态分化也受 *bldA_a* 基因的调控。

2.2 *bldA_a* 的克隆及基因置换载体的构建

2.2.1 基因组亚文库法克隆 *bldA_a*: 根据阿维链霉菌 NRRL8165 基因组序列信息, 分析 *bldA_a* 两侧序列以查找合适的限制性酶切位点, 发现 *bldA_a* 上游 3889 bp、下游 1370 bp 各有一个 *Bam*H I 酶切位点, 实验设计利用 *Bam*H I 来克隆 5345 bp 含有 *bldA_a* 的阿维链霉菌染色体片段。

提取阿维链霉菌 NRRL8165 总 DNA, *Bam*H I 完全酶切, 回收 5 ~ 6 kb 范围片段。将回收的 DNA 片段连入大肠杆菌正选择载体 pIJ4642 的 *Bam*H I 位点, 转化大肠杆菌 DH5α, 收集所有转化子约 1200 个, 即阿维链霉菌基因组亚文库。将转化子分成 30 组 (约 40 个/组)。以每一组混合质粒 DNA 为模板, 利用引物 F3 和 F4 进行 PCR 反应, 筛选得到 11 个质粒组出现 *bldA_a* 阳性信号。从中挑取一组质粒抽提单菌落的质粒 DNA 作为模板进一步 PCR 筛选得到携带有 *bldA_a* 的阳性克隆, 用 *Bam*H I、*Hind* III、*Not* I 酶切验证, 结果与预期完全符合, 命名为 pHL351。对 pHL351 的外源片段进行测序发现 *bldA_a* 序列在 NRRL8165 和 MA4680 中完全一致。

2.2.2 用 PCR targeting 方法构建 $bldA_a$ 基因置换质粒 pHL358 按图 1 所示技术路线构建基因置换质粒 pHL358。BamH I 酶切 pHL351, 回收 5.4kb 包含 $bldA_a$ 的片段, 与 BamH I 酶切的大肠杆菌和链霉菌双功能质粒载体 pHJL401 连接, 得到重组质粒 pHL357。以 pIJ773 质粒 DNA 为模板, F1 和 F2 为引物, PCR 扩增得到 1.4kb 的 $aac(3)IV + oriT$ 片段, 用试剂盒回收纯化 PCR 产物。将此 1.4kb 片段电转化阿拉伯糖诱导表达 λ RED 重组酶的 BW25113 (pIJ790, pHL357) 感受态细胞, 筛选具有阿泊拉霉素抗性的转化子, 得到重组质粒 pHL358, 其中 $bldA_a$ 被 $aac(3)IV + oriT$ 片段置换。以 F3 和 F4 为引物, PCR 验证 pHL357 和 pHL358 中 $bldA_a$ 的基因型, 以 NRRL8165 染色体 DNA 为对照, NRRL8165 和 pHL357 的 PCR 产物为 $bldA_a$ 被置换前的 1.5kb, pHL358 的 PCR 产物则为置换后的 2.1kb, 结果与预期相符。

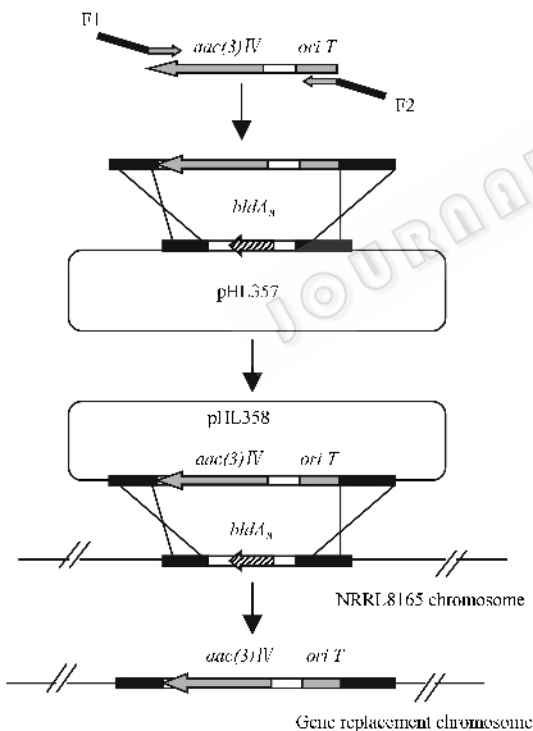


图 1 基因置换质粒 (pHL358) 的构建及 NRRL8165 染色体上 $bldA_a$ 的置换

Fig. 1 Construction of the gene replacement plasmid (pHL358) and replacement of $bldA_a$ in NRRL8165.

2.3 阿维链霉菌 $bldA_a$ 基因置换菌株的筛选及其基因型验证

基因置换原理如图 1 所示, 在阿维链霉菌中, pHL358 携带的 $bldA_a$ 两侧 DNA 序列通过与染色体

上同源片段发生两次同源重组, 使染色体上的 $bldA_a$ 被 $aac(3)IV + oriT$ 片段所取代。将质粒 pHL358 转化到大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002), 利用属间接合转移将 pHL358 跨属转移到阿维链霉菌 NRRL8165 中。挑取阿泊拉霉素抗性的接合转移子, 划线转接至含萘啶酮酸的 YMS 培养基分离纯化, 将纯化后的接合转移子在无抗生素的 YMS 培养基上松弛培养至产孢。收集孢子稀释培养形成单菌落, 筛选得到 3 株阿泊拉霉素抗性、硫链丝菌素敏感的重组菌株, 命名为 TW10。

用 Southern 杂交验证 3 株 TW10 菌株染色体上 $bldA_a$ 是否被 $aac(3)IV + oriT$ 片段置换的。提取 NRRL8165 (野生型菌株) 3 个 TW10 菌株及 1 株阿泊拉霉素抗性、硫链丝菌素抗性的单交换菌株 TW11 的染色体 DNA, 用 Bcl I 完全酶切, 经琼脂糖凝胶分离, 进行 Southern 杂交。以 F3 和 F4 为引物、NRRL8165 菌株总 DNA 为模板 PCR 扩增的 1.5kb 片段为探针。根据序列, 野生型菌株 NRRL8165 的染色体序列出现一条 3560bp 的杂交带; TW10 的 $bldA_a$ 片段被 $aac(3)IV + oriT$ 片段置换, 出现一条 4134bp 的杂交带; 而单交换菌株 TW11 则出现 3560bp、4134bp 两条杂交带, 杂交结果与预期相符 (图 2)。杂交结果说明在 NRRL8165 中 $bldA_a$ 已经被正确置换。

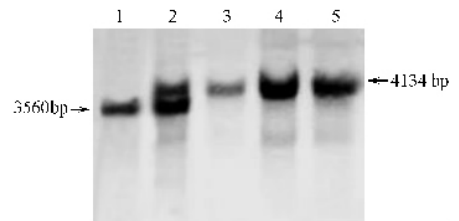


图 2 重组菌株 Southern 杂交验证

Fig. 2 Southern blot confirmation of the recombinant strains. 1. *S. avermitilis* NRRL8165; 2. TW11; 3. TW10 (1[#]); 4. TW10 (4[#]); 5. TW10 (6[#]).

2.4 $bldA_a$ 基因置换菌株的遗传互补

以阿维链霉菌 NRRL8165 染色体 DNA 为模板, F5、F6 为引物, PCR 扩增 801bp 包含有完整 $bldA_a$ 的片段, 装载入 pMD-18T 得到克隆 pHL360。BamH I、Pst I 双酶切 pHL360, 回收 $bldA_a$ 片段连入 pHL127 的 BamH I、Pst I 位点, 得到 $bldA_a$ 互补载体 pHL362。将质粒 pHL362 从大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002) 跨属接合转移至阿维链霉菌 TW10, 从平板上挑取接合转移子转接到含有萘啶酮酸、阿泊拉霉素、壮观霉素的 YMS 培养基上, 筛选得到具有抗

阿泊拉霉素、抗壮观霉素的 *bldA_a* 互补菌株,命名为 TW13。

在 YMS 培养基上, TW10 的形态表现为光秃,即不产生气生菌丝和孢子。与 TW10 相比 TW13 同样培养条件下恢复产生气生菌丝(图 3),说明是 *bldA_a* 的置换导致 NRRL8165 中气生菌丝产生的缺陷,表明 *bldA_a* 在阿维链霉菌中调控形态分化过程。

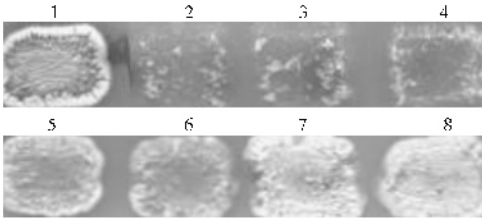


图 3 NRRL8165、TW10 和 TW13 表型观察

Fig. 3 Phenotype of NRRL8165, TW10 and TW13. 1. NRRL8165; 2. TW10(1#); 3. TW10(4#); 4. TW10(6#); 5. TW13(1#); 6. TW13(2#); 7. TW13(3#); 8. TW13(4#).

2.5 阿维菌素的合成严格依赖于 *bldA_a* 的表达

阿维菌素生物合成基因簇内的 I 型聚酮合酶基因 *aveA3* 和调节基因 *aveR* 中含有 TTA 密码,是 *bldA_a* 潜在的靶基因,有可能 *bldA_a* 能通过调节 *aveA3* 和 *aveR* 的表达从而调控抗生素阿维菌素的合成。摇瓶发酵 3 株 *bldA_a* 基因置换菌株 TW10,同时发酵野生型菌株 NRRL8165 作为对照,用甲醇萃取发酵

液并进行 HPLC 分析。在 NRRL8165 发酵产物中出现 B2b、B2a、A2a、B1a、A1a 等 5 个阿维菌素组分,而 3 株 TW10 都没有出现相应的组分,图 4 中显示一株 TW10 的 HPLC 分析结果,其它 TW10 菌株发酵液 HPLC 图谱与之相似。发酵结果表明 NRRL8165 中阿维菌素的合成依赖于 *bldA_a*。

3 讨论

在天蓝色链霉菌中,光秃基因对形态分化和抗生素合成都有调控作用。其中 *bldA* 基因通过调节含 TTA 密码的基因翻译从而调节抗生素合成和形态分化。本文通过分析阿维菌素生物合成基因簇序列,发现 I 型聚酮合酶基因 *aveA3*、调节基因 *aveR* 均含有 TTA 密码,此外,阿维链霉菌的 *adpA* 同源基因 (*adpA_a*) 也含有 TTA 密码。推测阿维链霉菌形态分化和阿维菌素的合成都可能受 *bldA_a* 调控。在链霉菌中有些基因尽管含有 TTA 密码,但其表达并不受 *bldA* 调控^[9]。

通过分析基因组中 *bldA_a* 及其侧翼序列,本研究克隆了 *bldA_a* 基因,并构建了阿维链霉菌的 *bldA_a* 基因置换菌株 TW10。分别筛选获得的 3 株 TW10 同时都显示气生菌丝产生缺陷,及阿维菌素合成的阻断。而遗传互补菌株 TW13 恢复产生气生菌丝,说明是 *bldA_a* 的中断导致了气生菌丝产生的缺陷,即阿维链霉菌的 *bldA* 能够调控形态分化。在灰色链霉菌和天蓝色链霉菌中已找到一个直接受 *bldA* 调控且与气生菌丝产生相关的基因 *adpA*, *adpA* 被发现是一类广泛存在于链霉菌且与气生菌丝合成相关的 AraC 类转录调控因子^[6]。阿维链霉菌中同样存在着 *adpA* 的同源基因^[11],而且编码序列中也含有 TTA 密码,因此 TW10 中气生菌丝产生缺陷可能是因为 *bldA_a* 的中断阻断了 *adpA* mRNA 中 UUA 的翻译而造成的。在灰色链霉菌中气生菌丝、链霉素和黄色素的产生都依赖于 *adpA*,天蓝色链霉菌中气生菌丝的产生主要受到 *adpA* 的控制,但是十一烷基灵菌红素的合成不受 *adpA* 的影响^[3],而且 *adpA* 在这两种链霉菌分化中的作用也有所不同^[17]。TW10 中阿维菌素合成的阻断可能直接由 *aveA3* 和 *aveR* 基因不能有效翻译所导致;至于 *bldA_a* 是否还通过控制 *adpA_a* 从而调控阿维菌素的表达,还有待于进一步的研究。

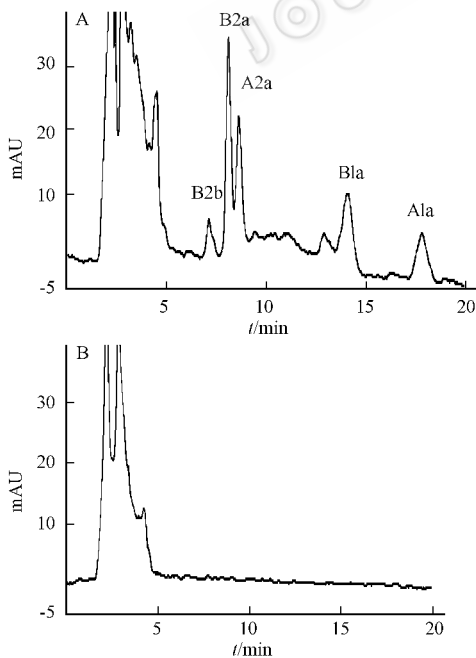


图 4 阿维链霉菌 NRRL8165(A) 和 *bldA_a* 基因置换菌株 TW10(B) 发酵产物的 HPLC 分析

Fig. 4 HPLC analysis of *Streptomyces avermitilis* NRRL8165(A) and *bldA_a* gene replacement strain TW10(B).

致谢 本研究使用的 PCR-Targeting 技术及其菌株由英国 IAC 研究所 Chater K 教授惠赠,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Lawlor EJ, Baylis HA, Chater KF. Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genes Dev*, 1987, **1**(10):1305–1310.
- [2] Fernandez-Moreno MA, Caballero JL, Hopwood DA, *et al.* The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell*, 1991, **66**(4):769–780.
- [3] Takano E, Tao M, Long F, *et al.* A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 2003, **50**:475–486.
- [4] Nguyen KT, Tenor J, Stettler H, *et al.* Colonial differentiation in *Streptomyces coelicolor* depends on translation of a specific codon within the *adpA* gene. *J Bacteriol*, 2003, **185**(24):7291–7296.
- [5] Kwak J, McCue LA, Kendrick KE. Identification of *bldA* mutants of *Streptomyces griseus*. *Gene*, 1996, **171**(1):75–78.
- [6] Ohnishi Y, Kameyama S, Onaka H, *et al.* The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol Microbiol*, 1999, **34**(1):102–111.
- [7] Rebets YV, Ostash BO, Fukuhara M, *et al.* Expression of the regulatory protein LndI for landomycin E production in *Streptomyces globisporus* 1912 is controlled by the availability of tRNA for the rare UUA codon. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **256**(1):30–37.
- [8] Tercero JA, Espinosa JC, Jimenez A. Expression of the *Streptomyces alboniger* pur cluster in *Streptomyces lividans* is dependent on the *bldA*-encoded tRNA^{Leu}. *FEBS Lett*, 1998, **421**(3):221–223.
- [9] Trepanier NK, Jensen SE, Alexander DC, *et al.* The positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* is mistranslated in a *bldA* mutant. *Microbiology*, 2002, **148**:643–656.
- [10] Burg RW, Miller BM, Baker EE, *et al.* Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organisms and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979, **15**:361–367.
- [11] Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(5):505–506.
- [12] Gust B, Kieser T, Chater KF. PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2). UK: The John Innes Foundation, 2002.
- [13] Tobias K, Bibb MJ, Mark JB, *et al.* Practical *Streptomyces* Genetic. UK: The John Innes Foundation, 2000.
- [14] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] Zhu HJ, Zheng YH. Study on C5-O-methyltransferase gene cloning, sequencing and replacement replacement. *J China Antibiotics*, 2003, **28**(1):1–5.
- [16] Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, *et al.* Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *PNAS*, 1999, **96**(17):9509–9514.
- [17] Chater KF, Horiniuch S. Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. *Mol Microbiol*, 2003, **48**(1):9–15.

Cloning of *bldA_a* and the effect on morphological differentiation and avermectins production in *Streptomyces avermitilis* NRRL8165

TAO Wei-xin¹, WU Jing¹, DENG Zi-xin², TAO Mei-feng^{1*}

(¹ State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(² Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: *bldA* encodes the only tRNA that efficiently translates the rare UUA leucine codon in *Streptomyces coelicolor*. *bldA* inactivation led to defection in morphological development and production of two of four known antibiotics in *S. coelicolor*. A *bldA* homologue, termed *bldA_a*, has been identified in the sequenced genome of *Streptomyces avermitilis* MA4680. To investigate the function of *bldA_a*, genomic DNA of *S. avermitilis* NRRL8165 was digested with *Bam*H I and the 5~6kb was fractioned and ligated with the *Bam*H I digested *E. coli* plasmid vector pIJ4642 to yield a sub-library. A clone containing *bldA_a* and its flanking sequence was obtained by screening from this genome sub-library. pHL358, a *bldA_a* replacement plasmid, was constructed using the λRED mediated PCR-targeting technique, and conjugated into *S. avermitilis* NRRL8165. Three *bldA*-disruption mutant strains (named TW10) were obtained, which showed a bald phenotype, indicating that *bldA_a* controlled the morphological differentiation of *S. avermitilis*. HPLC analysis of the TW10 fermentation culture showed that TW10 did not synthesize avermectins anymore, suggesting that the synthesis of avermectins were dominated by *bldA_a*. There are TTA codons within *aveA3* and *aveR* of the avermectin biosynthesis gene cluster, suggesting that the translation of the two genes may depend on *bldA_a*, which were consistent with the experimental results.

Keywords: *bldA*; *Streptomyces avermitilis*; Conjugation; Gene replacement; Avermectins

Foundation item: National Natural Science of Fund of China(30200005)

* Corresponding author. Tel 86-27-87283702; E-mail tao-meifeng@yahoo.com

Received 20 April 2006/Accepted 18 May 2006/Revised 11 July 2006

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