

# 与圈卷产色链霉菌分化有关的一个新基因——*sawD* 的研究\*

刘 钢 田宇清 陈 蔚 谭华荣\* \*\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

K. F. Chater M. J. Buttner

(John Innes Centre, Norwich, England)

**摘 要** 距链霉菌发育分化控制启动子- $P_{TTH}$ 直接控制的下游基因 *proX* 间隔 24 个碱基处存在一个部分开放阅读框(ORF),根据序列分析推测为丝氨酸蛋白酶的一部分。以此部分 DNA 序列为探针,在构建的圈卷产色链霉菌 7100 的 DNA 文库中克隆到一个与链霉菌发育和分化有关的新基因,称之为 *sawD*。序列测定及分析结果表明,在 1320bp 的 DNA 序列中有一个完整的开放阅读框(ORF),翻译起始位点为 210 位碱基处的 GTG,终止密码子 TGA 位于序列的 999 位碱基处。在距翻译起始位点 GTG 上游 4 个碱基间隔处有典型的核糖体结合位点区域 GAGGGA。在计算机蛋白文库中进行了同源性比较研究,结果表明 263 个氨基酸的蛋白产物与 *Caulobacter crescentus* 的依赖于 ATP 的丝氨酸蛋白酶有 44.7% 的同源性,其中存在功能活性区的丝氨酸保守位点(GPSAG)。基因功能研究表明,*sawD* 在圈卷产色链霉菌发育分化中与气生菌丝分隔和色素的合成有关。该基因被阻断或破坏后,使野生型圈卷产色链霉菌的分化停止在气生菌丝阶段,不能形成具有灰色色素的孢子,而出现白色气生菌丝的表现。

**关键词** 链霉菌分化 *sawD* 基因 结构与功能

**分类号** Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0415-21

链霉菌虽属原核生物,但它具有相对复杂的分化生命周期,包括基质菌丝,气生菌丝,孢子分隔及形成孢子等过程。由于可通过相对简单的遗传物质来研究较为复杂的分化过程,使链霉菌成为研究微生物分化的良好模式材料。在链霉菌发育分化过程中,产生大量的蛋白酶,参与蛋白质类氮源的代谢过程。最近研究表明,其中有部分蛋白酶参与链霉菌的形态分化<sup>[1]</sup>。链霉菌的孢子成熟是一个复杂的过程,包括许多基因在时空上的调控。与链霉菌分化相关的蛋白酶可能和孢子的形成有关。

圈卷产色链霉菌除有明显的分化特征外,还能产生一种重要的农用抗生素-Nikkomycin。研究发现,圈卷产色链霉菌光秃型突变株和部分白色突变株均不能产生 Nikkomycin,说明 Nikkomycin 的产生可能与圈卷产色链霉菌的形态分化有关<sup>[2]</sup>。对圈卷产色链霉菌分化的研究,将有助于阐明分化同抗生素产生的关系,为 Nikkomycin 生物合成的调控研究提供重要的理论依据。本实验室早期的研究表明:依赖于链霉菌分化

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39830010)及与英国皇家学会合作研究项目。

\*\* 通讯作者。

关键基因—*whiG* 的发育控制启动子— $P_{TH4}$  所控制的下游基因是一个与抗渗透有关的基因 称为  $proX^{11}$ , 与  $proX$  间隔只有 24 个碱基存在另一基因, 此基因在分化中有什么功能? 这是本领域非常感兴趣的问题, 本文报道这方面的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 大肠杆菌 (*E. coli*) JM109, JM101, 圈卷产色链霉菌 (*Streptomyces ansochromogenes*) 7100 为本实验室收藏。质粒 pBluescript M13<sup>+</sup>, pM13<sup>-</sup>::*orfTH4* (含有约 0.4kb 的 *sawD* 的片段), 帮助噬菌体 KO7 以及用于基因破坏的质粒载体 pKC1139 均为本实验室保存。

**1.1.2 培养基:** LB 培养基按照文献 [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) 和基本培养基 (MM) 均按文献 [5] 方法配制。

**1.1.3 酶, 抗生素及化学试剂:** 实验所用的限制酶和 T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司; 外切核酸酶 III 以及绿豆核酸酶购自 Promega 公司; T7 测序试剂盒和 TaqTrack 测序试剂盒分别购自 Pharmacia 和 Promega 公司。氨苄青霉素储存液浓度为 100mg/mL, 在 LB 培养基中使用浓度为 50 $\mu$ g/mL; Apramycin 由加拿大 Leskiw 博士惠赠, 溶于水, 储存浓度为 100mg/mL, 在 R2YE 培养基中使用浓度为 30 $\mu$ g/mL, 在 MM 培养基中使用浓度为 7 $\mu$ g/mL, 在 YEME 液体培养基中使用浓度为 7 $\mu$ g/mL。上述抗生素的储存液均保存在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中。PEG 1000 购自 Merck-Schuchard 公司, 用于链霉菌原生质体转化。用于 *E. coli* 转化子筛选的 X-gal 和 IPTG 使用浓度均为 40 $\mu$ 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  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 购于北京亚辉生物医学工程公司, 杂交用非放射性地高辛-11-dUTP 试剂盒购自德国宝灵曼公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的提取和纯化:** 质粒和染色体 DNA 的提取参照文献 [5] 进行; DNA 片段的纯化和回收按文献 [4] 的方法进行。

**1.2.2 探针的制备:** DNA 探针的制备参照文献 [4, 5] 进行。

**1.2.3 DNA Southern 杂交:** 按照文献 [4, 5] 的方法进行。

**1.2.4 菌落杂交和点杂交:** 基本按文献 [3, 4] 的方法进行。

**1.2.5 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化:** 参照文献 [4] 的方法进行。

**1.2.6 链霉菌原生质体的制备和转化:** 按照文献 [5] 的方法进行。

**1.2.7 单链 DNA 的制备和 DNA 序列测定:** 单链 DNA 的制备按照文献 [4, 6] 的方法操作; DNA 的序列测定和分析按照文献 [6, 7] 的方法进行。

**1.2.8 基因功能研究:** 采用基因破坏的策略进行基因功能研究。将结构基因内部的部分 DNA 片段插入到温敏型穿梭质粒载体 pKC1139 中 (该质粒在链霉菌中 28 $^{\circ}$ C 培养时能独立复制, 而在 39 $^{\circ}$ C 时不能复制) 构建成基因破坏用的重组质粒。将该质粒转化圈卷产色链霉菌, 得到的转化子在 39 $^{\circ}$ C 培养时, 质粒 pKC1139 上插入的 DNA 片段与野生株染色体上的同源基因进行交换或重组而阻断目的基因, 从而研究基因的功能。

## 2 结 果

### 2.1 圈卷产色链霉菌 7100 DNA 文库的构建

用 *Xho*I 和 *Hind*III 双酶切 pM13<sup>-</sup>::*orf*TH4 重组质粒,经琼脂糖凝胶电泳分离并用 DEAE 膜回收约 0.4kb 的链霉菌基因的 DNA 片段,用非放射性同位素地高辛进行标记,制备成 DNA 探针。用多种限制酶酶切圈卷产色链霉菌的总 DNA,经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后转移到尼龙膜上,用制备的探针进行 Southern 杂交,结果表明经 *Pst*I 酶切总 DNA 后 Southern blot 杂交给出约 4.5kb 的单一信号带,此 DNA 片段大小适合于构建以质粒为载体的文库。因此选用 *Pst*I 大量酶切圈卷产色链霉菌的总 DNA,并用 DEAE 膜回收 4.5kb 区域的 DNA 片段,将此部分的 DNA 片段连接到 M13<sup>-</sup>载体上,转化大肠杆菌 JM109,得到了约 4000 个菌落的文库。通过菌落杂交和质粒的大量提取,从中得到了 88 个插入片段大小适合的转化子,点杂交进一步确定了 4 个具有阳性信号的转化子(图略)。

### 2.2 Southern blot 杂交验证

得到的 4 个阳性转化子进一步进行重组质粒 DNA 的提取,并用 *Pst*I 进行酶切,电泳结果表明来自 4 个转化子的重组质粒中均插入约 4.5kb 左右的片段。经转移到尼龙膜上进行 Southern 杂交,其中只有一个转化子的重组质粒中的 4.5kb 插入片段仍呈强的阳性信号,见图 1 第 4 泳道。由此进一步证明克隆到了圈卷产色链霉菌的目的 DNA 片段。

### 2.3 圈卷产色链霉菌 *sawD* 基因的序列测定和分析

#### 2.3.1 DNA 片段的缩小、亚克隆及单链 DNA 的制备:为测定目的片段的 DNA 全序列,

将 4.5kb 的目的片段亚克隆到 pBluescript M13<sup>+</sup>载体上,然后用外切核酸酶 III(*Exo*III)在 37℃ 条件下定向缩小。每隔 1 min 取样终止,共取 12 个时间点的样品。通过琼脂糖凝胶电泳检测缩小结果,确定用于测序的样品。用 *Exo*III 缩小后,以绿豆核酸酶(Mung Bean)将两端补平。用 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 JM101 感受态细胞,从中挑选重组质粒大小合适的转化子,以 KO7 帮助噬菌体制备单链 DNA。

#### 2.3.2 DNA 序列测定和分析:以制备的单链 DNA 为模板,以 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 为标记底物,通过双脱氧链终止法测定了包括目的基因在内的 1.3kb 双链 DNA 片段的序列(图 2)。

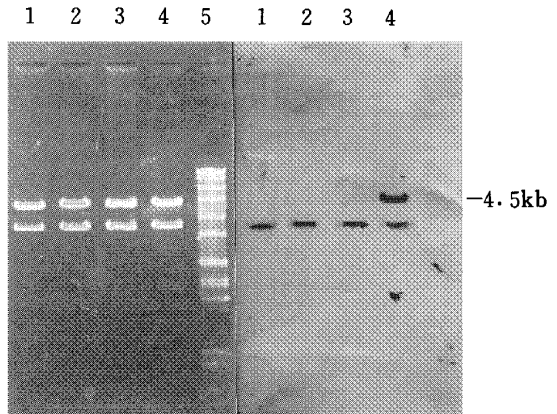


图 1 重组质粒 *Pst*I 酶切后的琼脂糖凝胶电泳(A)及 Southern 杂交(B)

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis and southern hybridization of recombinant plasmids after *Pst*I digestion

1-4. Recombinant plasmids from four transformants;  
5. *spp*I *Eco*RI digestion

```

1  GGAGCCGGCGCGACGGGGGCCCGCCGCCGCTGGTGGGGTACCGGCGTCGAGGGCAG
61  CGTGGGCGTGGTGTGCTGGCCGACGCCGTACCGGAGCGGGTCGGCGAGCGGGTGGTGA
121 AGCGGCCCGCGAGGTCGCGGAAGCACTGCCTGACCGCGCGGCCCGGACACGGCGAGGCC
      BRS           ORF →
181  CCCC GGCCCTCACGTTAGAGGGATTCCGTGCTCTCACGTCTCACACGCCCCAGGCC
      V L S R L T R P Q A
241  TCGCCGTACAGCGCTGCCCGTTCGTGGCCCTGCTCGCCACGGCGCGTTCGCGCCGCTGC
      L A V S A L P V V A L L A T A A F A P L
301  CGTTCTCCGTGGCGCAGCCGGGCTCGACGGCGAACGTGCTCGGCAGAACCCAGGGCACCC
      P F S V A Q P G S T A N V L G E N Q G T
361  CGGTGATCACGGTCTCCGGCACGCCGACCCGCAAGACCAGCGGGCAGCTGCGGATGACCA
      P V I T V S G T P T R K T S G Q L R M T
421  CGATCGTGGCGACCGGCCCGGACGCCCGGGTCTCCCTCGGGGACGTGGTGGCGACTGGT
      T I V A T G P D A R V S L G D V V G D W
481  TCCGCACCGACCGGGCCGTGATGCCGCGGACTCGGTCTATCCGAAGGGCGACCCGTCA
      F R T D R A V M P R D S V Y P K G D T V
541  AGGAGATCGAGAAGCACAACTGGCACAGATGCGCGAGTCCCAGGACTCGGCCACCCAGG
      K E I E K H N L A Q M R E S Q D S A T Q
601  CGGCCCTGAAGCACCTCGGGCTCAGGCCGCCACAAGGTCAAGGTACGCTGCGCCTCGCCG
      A A L K H L G L R R H K V K V T L R L A
661  ACGTGGGCGGGCCAGCGCGGGCCTGCTGTTCAGCCTCGGCATCATCGACAAGCTGGACG
      D V G G P S A G L L F S L G I I D K L D
721  GCGACGGCAGCGGGCGGACCTCACGGGCGGCCGACCATCGCCGGTACGGGCACGATCG
      G D G S G G D L T G G R T I A G T G T I
781  ACGGCTCCGGCAAGGTGCGCGCGGTGCGGGGGTGGGCTGAAGACCCAGGCCGCGCGCC
      D G S G K V G A V G G V G L K T Q A A R
841  GGGACGGGGCGACCGTGTTCCTGGTGCCGAAGGCGGAGTGCGCCGAGGCCGGGGCCGAGC
      R D G A T V F L V P K A E C A E A G A E
901  TGCCCGAGGGGCTGCGCCTGGTGCCTGACCACGCTCAAGGGCGCGTTCGACGCCCTGG
      L P E G L R L V P V T T L K G A V D A L
961  TGGCGCTGGAGAAGGGCAAGGGCGACGTCCCAGCTGCTGAGCCCCCGCGAAACCCCGG
      V A L E K G K G D V P S C *
1021 CCGCGCGCGCCGCTCACCTCCCCTCCC GCGCGCCTGTTCACCAGCGGGATCACCCGCA
1081 GCGGTACCGGTGTCTCCATCACGGATCTGTCGGTGGAGGCCCGGACGATGCCGTGCAAGC
1141 CCCACCACCGGTGATCACCGTTGCAGATCGGCGTTTCAGCGGGCCACCGCGCGCA
1201 CAGCATGTCCCCTTCCCGTGGTGGTTCAGCAGTTCCAGCACCTCCGGCACCGGTGCGCC
1261 AGGGTGC GCGGACGTGCGCGCCTGGCCCTGGCGGATCTGGAGGTGGCGAACGCGGTG

```

图 2 1.3kb DNA 片段的全序列测定

Fig. 2 Nucleotide sequence of a 1.3kb DNA fragment

RBS—Ribosome binding site ;

ORF—Open reading frame ; \* —Stop codon

序列测定结果表明,包括目的基因在内的 DNA 序列共为 1320bp,其中(G+C)%约为 74%。用 FRAMEplot 程序对该序列进行了分析,发现在 210~999 碱基位置处为一个完整的开放阅读框架(ORF)(图略)。从 DNA 序列推出,该 ORF 编码 263 个氨基酸的一个蛋白,其氨基酸序列在 NCBI 的计算机蛋白文库中进行同源性比较,发现从第 81 到 254 位氨基酸的序列与 *Caulobacter crescentus* 的依赖于 ATP 的丝氨酸蛋白酶在 589~759 的区域处有 26.7% 的氨基酸完全相同,有 44.7% 的氨基酸类似(图略),尤其是存在有功能活性区的丝氨酸保守位点(GPSAG)。因而推测该基因编码的产物很可能是一种丝氨酸蛋白酶,将该基因命名为 *sawD*(*Streptomyces ansochromogenes whi* gene No. 4)。

## 2.4 基因功能研究

**2.4.1 *sawD* 基因的破坏:**为阐明 *sawD* 基因的生物学功能,实验采用了基因破坏的策略。用 *Pvu*II 和 *Hinc*II 双酶切 *sawD* 基因,得到一个 542bp 的 DNA 片段,由序列可知,此片段位于 *sawD* 基因的内部。将此 DNA 片段插入到温敏型穿梭质粒 pKC1139 的 *Eco*RV 位点中,构建出用于基因破坏的重组质粒 pKC1139::*sawD*(图 3)。将该重组质粒转化圈卷产色链霉菌,获得 10 个转化子,分别提取质粒,并经酶切验证转化子中的重组质粒是正确的。将该转化子接种于基本培养基上,在 28℃ 培养 10d 后制备孢子悬液。用无菌水将孢子悬液稀释为  $10^8$ /mL 个菌落,取 0.1mL 涂布含有 Apramycin 抗性的基本培养基平板,39℃ 培养,每块平板可以获得 100 个左右的破坏子(图略)。

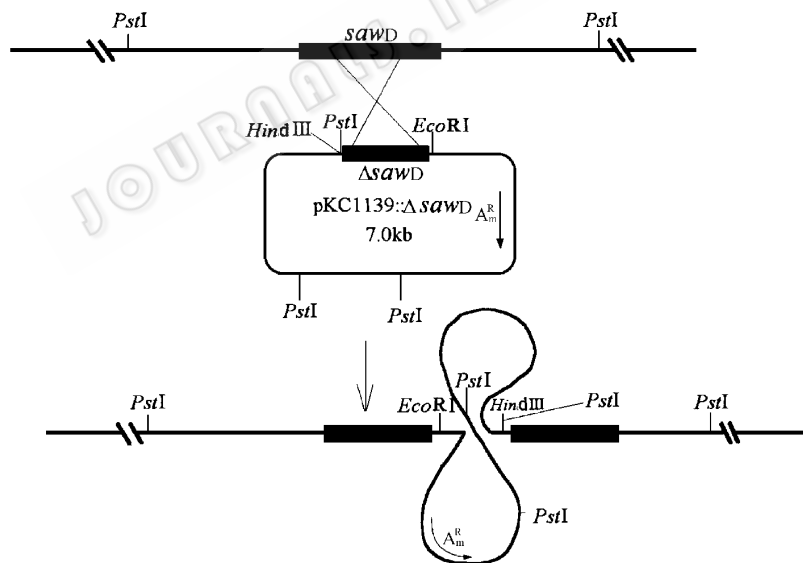


图 3 重组质粒 pKC1139::*sawD* 介导的基因破坏示意图

Fig. 3 The sketch of gene disruption resulted from recombinant plasmid pKC1139::*sawD*

**2.4.2 Southern 杂交验证:**随机选取 3 株 *sawD* 基因破坏阻断突变株和一株野生型菌株,分别提取总 DNA,用 *Pst*I 进行酶切,然后以 542bp 的 DNA 片段作为探针进行 Southern 杂交(图 4)。由杂交结果可见,野生型菌株仅得到一条 4.6kb 的信号带,而 3 株 *sawD* 基因破坏阻断突变株分别得到 6.4kb 和 2.9kb 的两条信号带,其分子量大小与理论计算

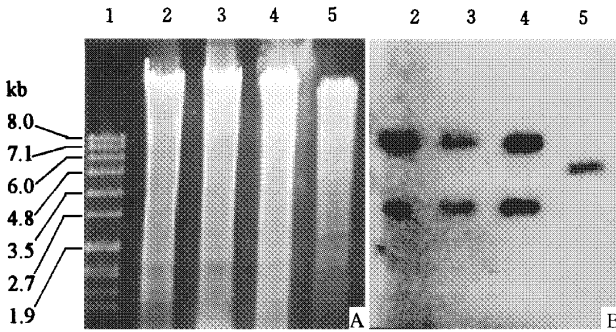


图4 总DNA *Pst*I 酶切后的琼脂糖凝胶电泳(A)及 Southern blot 杂交

Fig.4 Agarose gel electrophoresis and southern blot hybridization of total DNA after *Pst*I digestion

1. *spp*I *Eco*RI digestion ; 2~4. Total DNA from different disruptants 5. Total DNA from wild type strain

的大小一致。说明得到的 *sawD* 基因破坏阻断突变株的染色体DNA与重组质粒间确实发生了同源交换,使 *sawD* 基因内部插入了 pKC1139。

**2.4.3 *sawD* 基因的生物学功能:** 将 *sawD* 基因阻断突变株分别接种在以葡萄糖和甘露醇为碳源的 MM 培养基上,培养 10d 后进行观察,突变株仅出现白色的表型(图 5),且色素产量明显增加。在相同培养条件下,野生型菌株 7100 能形成丰富的灰色孢子(图 5)。经光学显微镜观察,突变株只有长而直的气生菌丝且气生菌丝都无分隔,未观察到像野生型那样

的圆形孢子。抗生素检测表明 Nikkomycin 的产生未受影响。由此推测 *sawD* 基因可能控制圈卷产色链霉菌由气生菌丝到孢子形成的发育转变,尤其是在气生菌丝分隔阶段有重要作用。

### 3 讨论

链霉菌在孢子萌发和孢子形成过程中都会产生大量的蛋白酶。传统上认为某些蛋白酶用于分解蛋白质类复合物,以提供菌体生长所必需的氮源和能源<sup>[8]</sup>。近期的研究表明,部分蛋白酶还参与链霉菌的形态分化。在 *Streptomyces albidoflavus* 的形态分化过程中,类胰凝乳蛋白酶的蛋白酶(CTP)与气生菌丝的生长密切相关,而类胰蛋白酶的蛋白酶(TLP)和金属蛋白酶(MTP)与孢子的形成相关<sup>[1]</sup>。在链霉菌产生的诸多蛋白酶中,丝氨酸蛋白酶是其中重要的一种,而有关丝氨酸蛋白酶类在链霉菌中参与形态分化的研究尚未见报道。本文克隆到的 *sawD* 基因经 DNA 序列分析和同源比较,认为可能编码一个与圈卷产色链霉菌孢子形成相关的类丝氨酸蛋白酶。

Ramesh 等<sup>[9]</sup>曾报道,在 *Aspergillus flavus* 中,通过基因破坏的方法或加入抑制物使丝氨酸蛋白酶缺失或活性受阻,可以影响 MTP 的基因的转录或表达。因而推测,在圈卷产色链霉菌中, *sawD* 基因的破坏,使孢子不能形成而保持白色菌丝的表型。据此推测, *sawD* 基因

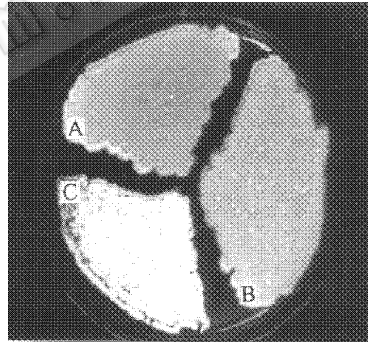


图5 *sawD* 基因对圈卷产色链霉菌孢子形成的影响

Fig.5 Effect of *sawD* gene on the differentiation of *Streptomyces ansochromogenes*

A. *Streptomyces ansochromogenes* 7100 (wild type);

B. *Streptomyces ansochromogenes* 7100/pKC1139;

C. *sawD* gene blocked mutant

基因可能通过控制相关蛋白酶基因的转录或表达影响孢子的形成。有关 *sawD* 基因作用的分子机制尚在进一步的研究之中。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] S. G. Kang ,K. J. Lee. *Microbiology* ,1997 ,**143** :2709~2714.
- [ 2 ] 谭华荣 ,吴 畏 ,田宇清等 . *微生物学报* ,1994 ,**34** :398~402.
- [ 3 ] Tan H ,Yang H ,Tian Y *et al.* *Gene* ,1998 ,**212** :137~146.
- [ 4 ] J. Sambrook ,E. F. Fritxch ,T. Maniatis. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory ,1989.
- [ 5 ] D. A. Hopwood ,M. J. Bibb ,K. F. Chater *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces . A Laboratory Manual*. Norwich England :John Innes Foundation ,1985.
- [ 6 ] Tan H ,K. F. Chater. *J. Bacteriol* ,1993 ,**175**( 4 ) :933~940.
- [ 7 ] M. J. Bibb ,P. R. Findlay ,M. W. Johnson. *Gene* ,1984 ,**30** :157~166.
- [ 8 ] K. F. Chater. *Trends Genet* ,1989 ,**5** :372~376.

## A Novel Gene—*sawD* Related to the Differentiation of *Streptomyces ansochromogenes*\*

Liu Gang Tian Yuqing Chen Wei Tan Huarong

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

K. F. Chater M. J. Buttner

( *John Innes Centre , Norwich , England* )

**Abstract** A 1.3kb DNA fragment was cloned from total DNA library of *Streptomyces ansochromogenes* by Southern hybridization. Nucleotide sequencing analysis indicated that the 1320bp DNA fragment contains a complete open reading frame ( ORF ). In search of databases ,the deduced product of ORF containing 213 amino acids ,is homologous to the serine protease of *Caulobacter crescentus* , and a conserved serine-catalytic active site ( GPSAG )is existent. The gene was designated as *sawD* (*Streptomyces ansochromogenes whi* gene No. 4 ). The function of this gene was studied with the strategy of gene disruption and the result showed that the *sawD* may be related to sporulation and especially to the sporulation septation in *Streptomyces ansochromogenes*. The preliminary result indicated that *sawD* mutant could produce abundant pigment in contrast with wild type ,it seems that *sawD* gene may be involved in pigment biosynthesis ,and also this gene is dispensable for biosynthesis of nikkomycin in *Streptomyces ansochromogenes*.

**Key words** *Streptomyces* differentiation ,*sawD* gene structure and function