

综述

链霉菌高拷贝质粒pIJ101的分子生物学

邓子新

(华中农业大学土化系农抗研究室, 武汉)

链霉菌基因克隆系统的不断发展和完善, 使人们从分子水平上对链霉菌的认识达到了一个新的境界。这个属的微生物菌落形态和生理分化极其复杂, 因此它是研究细菌基础遗传学, 尤其是研究基因表达在时间和空间上分化调节的重要材料。此外, 链霉菌产生了自然界绝大多数的抗生素^[1], 基因操作使人们有可能探索新的途径去提高抗生素的产量, 产生“杂合抗生素”以及利用链霉菌来生产“外源”基因产物。

如同其他微生物一样, 链霉菌基因克隆系统的发展是以载体、转化和转染技术的发展为核心的。质粒和噬菌体载体在链霉菌遗传工程研究中的重要意义在研究者中间几乎是人人皆知。pIJ101被首先用来进行分子水平的研究不是偶然的, 因为(1)该质粒分子量小(仅8.9kb), 拷贝数高(约300个/染色体)^[2], 使得质粒的分离比较容易(2)该质粒宿主范围十分广泛(3)对该质粒生物学的研究起步较早, 自我转移, 形成麻点(Pock)的功能以及性因子的属性已被揭示^[2](4)由此质粒的基本复制子所衍生的载体是链霉菌基因克隆研究中应用最广泛, 成果最为卓著的载体之一^[3]。

这里, 我将简述pIJ101分子生物学研究的最新进展, 同时还将对这些研究的意义加以讨论。

(一) 基本复制子

保证一个质粒在不断增殖的细胞中以一定的拷贝数稳定遗传的过程与质粒DNA的复制和分离的调控密切相关。DNA的复制是从一个特定的位点起始的, 这个位点通常称作复制起点(ori)。尽管有些革兰氏阴性菌常不止一个复制起点, 但一个复制起点常足以满足100个kb以上大小质粒的正常复制。质粒复制起始的调节决定质粒的拷贝数。一个质粒的基本复制区通常有1.5—2.5kb的长度, 这段DNA不仅包含复制起

点, 而且包含调节基因, 其基因的转录子可以提供调节DNA复制的分子, 这些分子既可以是负作用因子(RNA和(或)蛋白质), 又可能是正作用因子。pIJ101基本复制区大小的上限为2.2kb。由这段基本复制区的DNA(一个Sst I的片段, 图1)所衍生的载体可以独立复制和遗传, 但其拷贝数只占野生型pIJ101的1/3(约50—100)^[4]。然而, 绝大多数由pIJ101所衍生的克隆载体都只是以这段基本复制区为基础的, 如大家所熟知的pIJ702^[5], pIJ58^[2], pIJ350^[2], pIJ385^[5], pIJ680^[5], 启动子探针质粒pIJ424^[5], pIJ425^[5], pIJ486^[6], 和pIJ487^[6], 正选择克隆载体pIJ699^[7], 第一代表达-分泌载体pIJ2020^[8]等。

(二) 转移、扩散

大部分链霉菌质粒都有接合转移的功能, 在培养基平板上形成“麻点”。这种反应因属质粒的转移对受体菌株生长的影响, 故也称为“致死接合反应”(Ltz)^[2]。此属性最初曾广泛用来作为质粒的选择性标记, 不过目前已被抗性基因标记的运用所取代了。

插入和缺失分析揭示, pIJ101上3.1kb的转移功能区由两部分所组成, 其中1.4kb编码菌丝体之间质粒的转移, 1.7kb编码菌丝体内质粒的扩散(spread)(图1)。就是这两个片段一起来确定质粒的Ltz表型; 如果转移区和扩散区均存在, 则质粒显示大麻点(即Ltz⁺)表型; 如果有完整的转移功能区但缺失了扩散功能区, 质粒则显示小麻点(Ltz⁺/-)表型; 如果转移功能区丧失或发生缺陷, 则质粒不能发生转移(Ltz⁻)。尽管pIJ101很小, 它具有进行自我转移和扩散的全套功能, 其转移频率几乎可达100%。同时,

本文于1989年1月23日收到。

它还可以诱动寄主染色体以 10^{-3} 的频率发生重组, 而 Ltz^{-} 的 pIJ101 衍生质粒诱动寄主染色体发生重组的频率却非常低。

最近对 pIJ101 的转移功能区进行研究, 发现了一种 *kil-kor* 系统^[9], 与革兰氏阴性细菌质粒 RK2 的系统颇为类似。这个仅有 8.9kb 的质粒, 竟会有两个不同的 *kil* 基因 (*kilA* 和 *kilB*) 以及相对应的阻遏子基因 *korA* 和 *korB* (图 1)。*kor* 基因编码的产物严格地控制了 *kil* 基因的表达。简而言之, *kil* 功能的存在和 *kor* 功能的丧失对质粒的生存是致死性的, 同时 *korA* 和 *korB* 对 *kilA* 和 *kilB* 的致死效应又基本是分工负责的。这项发现圆满地解释了 Kieser 等^[2] 所观察到的现象: pIJ101 上位于基本复制区以外的一个单一的 *Bgl* I 位点上外源 DNA 的插入对质粒是致死的, 因为这个位点恰好位于 *korA* 功能区。已发现两个 *kil* 基因都与质粒的转移功能有关, *kilA* 的突变使质粒不再显示“麻点”表型 (Ltz^{-}), 而 *kilB* 的突变则产生“小麻点” ($Ltz^{+/-}$)。*korA* 和 *korB* 分别特异性地作用于 *kilA* 和 *kilB* 的启动子而阻止 RNA 转录的起始^[9]。

(三) pIJ101 衍生质粒之间的“强不相容性”

pIJ101 最初是在变铅青链霉菌的菌株 ISP5434 中发现的。除 pIJ101 外, 该菌株还含有另外三个小一些的质粒, 即 pIJ102, pIJ103 和 pIJ104, 其限制内切酶图谱揭示, 它们可能由 pIJ101 发生缺失衍生而来。从不同菌种收藏中心的 ISP5434 菌株中都检测到类似的质粒群体, 这证明四个质粒遗传是稳定的, 也暗示 pIJ101 所衍生的质粒可以共存。然而, 用装有不同抗生素抗性定子的 pIJ101 衍生质粒进行试验, 用一种质粒去转化另一种含质粒的变铅青链霉菌的原生质体发现, 具有不同抗性标记的完整的 pIJ101 之间可以共存; 具有不同抗性标记的 pIJ101 的基本复制子之间也可以共存; 但完整的 pIJ101 的基本复制子之间却不能共存^[4]。在共存的情形中, 分离质粒可以观察到少量重组质粒, 证明两个不同的质粒进入了同一个“细胞室”, 但这种重组质粒很少, 质粒仍大多以亲本质粒的形式存在, 拷贝数也差不多。经过一轮松弛选择性压力的恒温培养以后, 50% 以上的孢子仍含有两个亲本质粒的抗性。而在不能共存的情况下, 含有完整的 pIJ101

DNA 的质粒总是显性的。也就是说, 无论是用含有完整 pIJ101 DNA 的质粒的原生质体去接受外源基本复制子质粒的转化, 或用含有基本复制子质粒的原生质体去接受外源含有完整 pIJ101 DNA 的质粒的转化, 在最终得到的转化子中, 都不可能检测到基本复制子质粒(和其携带的抗性)的存在。

进一步的研究发现, 这种“强不相容性”与野生型 pIJ101 上一段约 200bp 的 DNA (*sti*) 有关。两个质粒要共存, 要么都含 *sti*, 要么都不含 *sti*, *sti*⁺ 与 *sti*⁻ 质粒之间总是不相容的。在这种情况下, *sti*⁺ 质粒在细胞中保留下来, 而 *sti*⁻ 质粒则被消除。*sti* 定子的作用还有很强的方向性, *sti* 与基本复制子方向相对而言, 只有在与野生型 pIJ101 中的方向相一致, *sti* 才有功能。*sti* 反向 (*sti*⁺) 质粒的行为与 *sti*⁻ 质粒一样, 唯一的差别是, *sti*⁺ 与 *sti*⁺ 质粒之间(在单链 DNA 水平上)会以互反向的 *sti* 顺序为媒介, 发生质粒之间的高频重组^[10]。*sti* 功能的方向性说明它是一种顺式作用因子。在这里, 我们引入了“强不相容性”这个新术语来描述这种功能而避免使用传统的不相容性这个术语, 因为不相容性通常意指亲缘关系相近的质粒之间在非选择性条件下不能共存的情形。竞争, 相斥和不相容性三个术语也曾用来描述一个质粒的存在引起另一个质粒的丧失, 它们都与“强不相容性”情形不同甚至完全相反。

已对质粒 pIJ101 的 *sti* 功能进行了精确定位, 它位于 pIJ101 的 *Bcl* I - E 片段上^[4] (图 1)。

(四) 拷贝数的控制

质粒的不相容性往往与质粒的拷贝数相关, 在 pIJ101 系统中, 这种相关性又显得那么直接。

最初研究 pIJ101 及其衍生质粒的拷贝数时, 发现它的拷贝数范围甚大, 在 40—300 之间。当时认为, 拷贝数的这种较大变异与培养物生长的生理菌龄有关。在研究质粒的“强不相容性”过程中对不同 pIJ101 衍生质粒的拷贝数进行分析时发现: *Bcl* I - E 片段以其上 *sti* 的功能方向插入基本复制子中时, 衍生质粒的拷贝数可达 300。而没有 *Bcl* I - E 片段或 *Bcl* I - E 片段以其上的 *sti* 以非功能方向插入时, 衍生质粒的拷贝数只在 50—100 之间, 这意味着 pIJ101 衍生质粒的拷贝数至少部分地受到 *sti* 功能的制约。

Bcl I-E片段上除了含有sti功能以外,还有另一因子cop, cop可能是负作用调节子,它在 sti⁺ cop⁺质粒上的缺失产生了一个更高拷贝的突变质粒,其拷贝数可达1000。cop⁻可能是反式作用因子,因为sti⁺ cop⁺质粒的存在可以大大降低sti⁺ cop⁻质粒的拷贝数。估计它是通过控制 sti 功能起调控作用的,因为它对 sti⁻ 的质粒无效。这样, sti⁻ cop⁻的质粒(基本复制子)的拷贝数约为50—100, sti⁺ cop⁺的质粒(即野生型pIJ101类质粒)的拷贝数为300左右,而 sti⁺ cop⁻的质粒的拷贝数可高达1000。

(五) pIJ101的复制方式

sti因子作用的方向性与pIJ101 DNA的复制方式有关^[4]。与枯草杆菌和金色葡萄球菌的某

些质粒一样, pIJ101的某些衍生质粒也以单链形式在细胞中积累,单链DNA可能是DNA复制的一种中间物质。

测定35个不同的pIJ101的衍生质粒在体内积累单链DNA的情况时发现, sti⁺质粒积累很少单链DNA,而sti⁻则在细胞中大量积累单链DNA, sti⁺也与 sti⁻质粒的情形一样。用特异性的单链DNA放射性探针所做的试验证明,这些单链DNA只是双链质粒中的一股,在原始绘制的pIJ101图谱上,是以反时针方向(5'→3')累积在细胞中的(图2)。这充分证明sti位点与质粒从单链DNA向双链DNA转化有关,可能是第二条链合成的起始位点。

把 sti 因子插入到一个异源的链霉菌高拷贝

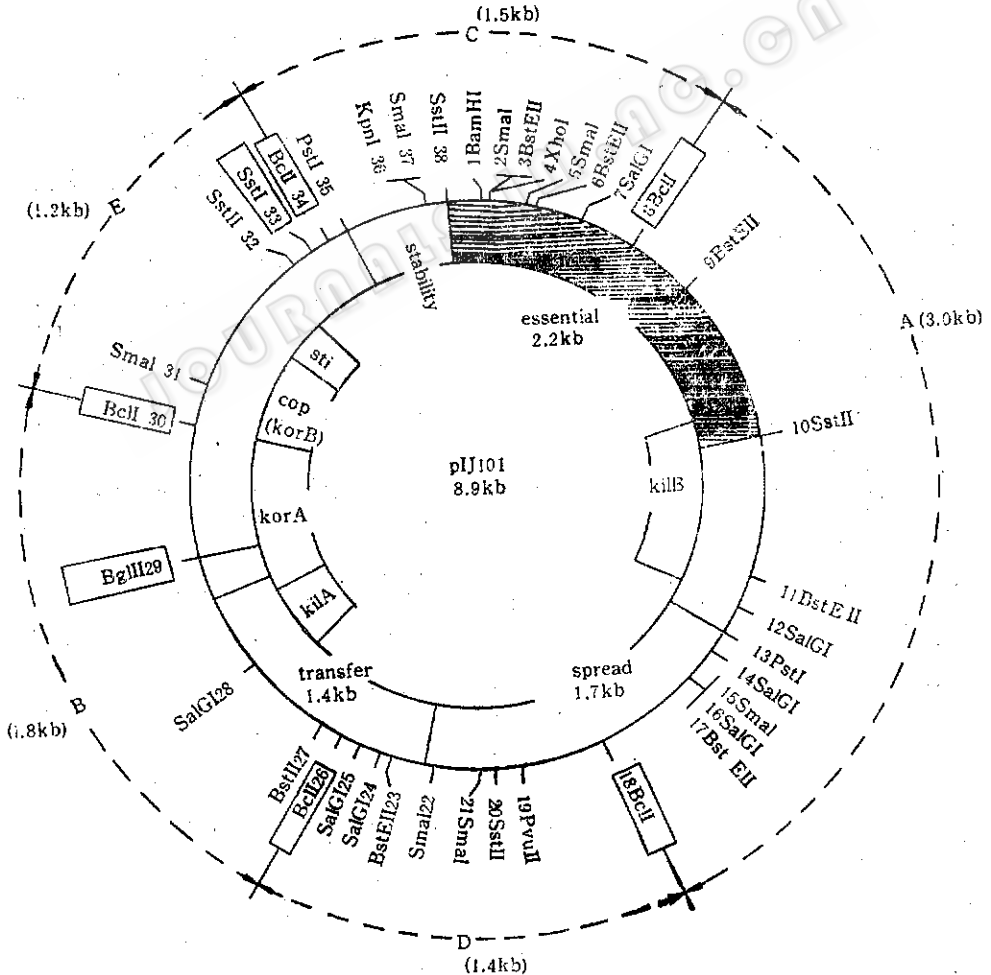


图1 pIJ101的限制性图谱以及生物学功能

阴影区为基本复制区, Bcl I 酶解片段的大小用数字标出 (kb), 部分单一酶切点和 Bcl I 酶切点用方框表示

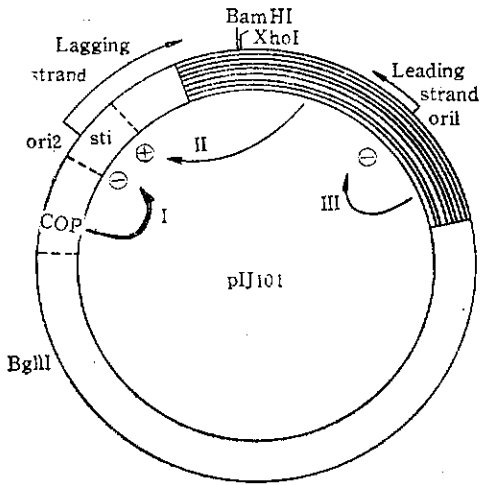


图2 pIJ101上 sti, cop 和基本复制子之间相互关系的模型

箭头 I 标出作用于 sti 上影响滞后链合成的抑制子；
箭头 II 标出由基本复制区 DNA 所编码的一种扩散性物质它是滞后链合成的起始所必须的一种激活子；
箭头 III 表示 sti⁺和 sti⁻质粒均所需要的一种扩散性物质，
⊕ 或 ⊖ 分别表示正或负作用

质粒 pWOR120 中，与 sti 在 sti⁻ 的 pIJ101 衍生质粒中的情况一样，sti 因子只在一种方向时大大提高了质粒的拷贝数。pWOR120 也在细胞中累积单链 DNA，而且在 DNA 上与 pIJ101 有一定同源性，这一发现使得人们有可能测定 pWOR120 衍生质粒中 sti 与单链质粒 DNA 的关系。结果发现，处于功能方向的 sti 使 pWOR120 的单链 DNA 在体内几乎难以检测到了。这项实验证明 sti 因子增加质粒拷贝数的效应并不依赖于它本身的复制子，也可以在异源复制子中表达^[4]。同时暗示，pIJ101 的复制方式至少在高拷贝链霉菌质粒中带有普遍性。目前，我们手头上尚无携带有不同抗性标记的 pWOR120 的衍生质粒，所以尚不能确定 sti 决定 pWOR120 衍生质粒之间“强不相容性”的情况。不过，已知 pIJ101 衍生质粒和 pWOR120 衍生质粒之间没有明显的“强不相容性”关系，这也说明 sti 在 pIJ101 衍生质粒之间引起“强不相容性”有 pIJ101 上另一个或多个因子的参与。

(六) sti, cop 和基本复制子之间相互关系的模型

实验证据表明，作为复制子的 pIJ101 衍生质粒是以形成单链 DNA 分子为复制机理的。先进行

链的合成，以图2所示的逆时针方向（5'→3'）进行，环形的单链 DNA 中介物向双链 DNA 的转化速率受到一种复制控制因子（rep）的负调控（图2 II 所示），使拷贝数只达到约100。在基本复制子中加入 sti 因子即提供了第二条链（即滞后链）合成起始的高效信号，因而大大增加双链 DNA 的拷贝数。可以想象，sti 在单链 DNA 上要作为一个信号而被识别，它的效果是有方向性的。

与 sti 相邻的区域有一 cop 基因，编码一个可以扩散的调节子而抑制以 sti 为起点进行第二条链的合成（图2- I 所示），但这个产物对基本复制子上低效的滞后链起始位点不起作用。此外，基本复制区还可能编码一个可以扩散的正作用因子（图2- II 所示），促进第二条链从 sti 位点的起始。外界通过转化导入的 sti⁺ 质粒可以利用寄主中 sti⁻ 质粒上的这个激活子而迅速使自己的拷贝数增加，因而在与 sti⁻ 质粒的竞争中变成显性的。sti 位点与基本复制区竞争复制控制因子 rep（图2- III）的结果即会引起“强不相容性”。

(七) 核苷酸顺序组成与功能的关系

已经确定了 pIJ101 全部的核苷酸顺序^[11,12]，分析了开读框架（ORF）^[11]，并分析了各项特征与定位的遗传表型的关系^[11]，整个质粒有 8829 个核苷酸，分子呈环形，其 GC 含量为 72.98%，呈现典型的链霉菌 DNA 的特征。其中 7 个 ORF 已基本与其功能对号，而另外 4 个 ORF 的功能仍不能确定。

有两个 ORF 与 korA 和 korB 有关。编码的阻遏子可控制质粒上的好几个启动子的表达。从核苷酸顺序所衍生的氨基酸顺序表明，它与任何已知蛋白的氨基酸顺序都无同源性，不过，korA 的氨基酸序列具有与许多 DNA 结合蛋白中与 DNA 结合区域所共有的 α-螺旋形成区。SDS-PAGE 电泳已初步揭示了与预计 korA 和 korB 蛋白分子量相符合的分子的存在。

已鉴别出 4 个与质粒转移有关的 ORF，tra 可以编码一个 Mr77000 的大蛋白分子，外源 DNA 在这个 ORF 上的插入可以阻止作为质粒转移标志的“麻点”的形成。在所有其它 ORF 上，外源 DNA 的插入都不可能产生这种明显的效果，这一点说明这个 ORF 编码了质粒转移所必需的主要蛋白分子。从氨基酸顺序的一级结构上，目前尚

难以推导质粒转移的机理。此蛋白没有明显的疏水区。这说明它并不是膜附着蛋白。同时, 它还与其它已知的蛋白或蛋白质上与 DNA 的结合区不相似。不过, 它和有些酶, 如 ATPase 上与核苷酸结合的折叠区有些相似性。

外源 DNA 在其它 3 个 ORF (spdA, spdB 和 ki1B) 上的插入产生 spd 表型。潜在的 spdB 蛋白在 N 端半边分子中有一段很强的疏水区, 因此估计是膜附着蛋白。在 spdA 上也发现了一段疏水区, 而 ki1B 上疏水区疏水性程度次于 spdB 和 spdA。

在 2.2kb 的 Sst I 片段 (即基本复制区) 上, 有一个较大的 ORF, 暂称为 rep。这个 rep 与其它质粒上已知的 rep 蛋白毫无相似性, 所以对此蛋白的结构信息, 我们仍几乎一无所知, 因为在这个 Sst I 片段上还有另一个较小的 ORF, 所以尚不清楚, 除了 rep (和复制起点 ori1) 以外, 是否还有其它蛋白参与了基本复制子的独立复制。Sst I 片段上有一段明显的非编码区, 先行链的复制起点 (ori1) 可能位于这里。sti 区显然也不是编码区, 它可能是 pIJ101 上的另一复制起点 ori2 (滞后链的复制起点)^[4]。这段 DNA 很独特, 有高度的对称性, 具有许多 5—10 个核苷酸的正向或反向重复序列, 其单链 DNA 具有形成发夹式结构的潜力, 这个区域的核苷酸顺序与噬菌体 ϕ X174 和大肠杆菌质粒 pBR322 的 H 链上第二条链合成的起始位点有一定程度的相似性, 因此这种结构可能是第二条链合成的起始所需要的^[12]。cop 区与 korB 的 ORF 在一起, 这个阻遏子蛋白可能具有双重功能, 对 sti 和 ki1B 均起负调控作用^[12]。

tra, ki1B, korA 和 korB 的启动子都得到了定位。BclI-E 片段上另两个启动子也已定位, 但精确的功能还不太清楚。pIJ101C^[13]。pIJ101A^[14] (ki1B) 和 pIJ101B^[14] (tra) 的启动子均可在大肠杆菌中表达, 并在同一核苷酸上起始 RNA 的转录。这些启动子的核苷酸顺序都与大肠杆菌保守性启动子的“-10”和“-35”区域的核苷酸顺序以及两区域之间的间隔距离有不同程度的相似性^[13, 14], 估计是由同一类 RNA 聚合酶所识别的, 这也许是它们在大肠杆菌中表达的原因之一。

目前在 pIJ101 上唯一已经定位的一个终止子

恰好位于以不同单链为模板转录的 korA 和 korB 两个基因的末端, 在链霉菌中这个终止子在两个方向都有终止作用, 可以阻止这两个基因转录通读所造成的相互干扰。这个终止子具有富含 GC 并可形成发夹结构的对称区, 但不含大肠杆菌中不依赖于 rho 因子那种终止子中常见的多聚 U。值得提到的是, 这个终止子也可在大肠杆菌中表达并在同一核苷酸上终止 RNA 的转录^[15]。在 rep, ki1B, tra, spdA, spdB 和一些未定功能的 ORF 末端也见到了类似终止子顺序的存在, 这暗示着这些顺序都有可能在转录终止方面起作用。

pIJ101 一级核苷酸顺序的确定, 对阐明该质粒的分子生物学将起很大作用, 除了促进新一代 pIJ101 衍生载体的组建以外, 同时还有助于其它链霉菌质粒复制和转移的机理以及 pIJ101 上基因表达的开关的研究。

(八) pIJ101 分子生物学的意义

在过去几年中, 链霉菌基因克隆载体的发展十分迅速^[5, 6, 16-24], 用这些载体克隆的基因包括抗生素抗性基因、与主代谢有关的基因、可向细胞外分泌酶类的合成基因、与形态分化有关的基因以及许多与抗生素生物合成有关的基因簇^[25]。在那些广泛使用的载体中, 从 pIJ101 衍生的载体是最重要的一类。用这类载体克隆的基因包括卡那霉素^[26]、嘌呤霉素^[27]、泰乐菌素^[28]抗性基因、甘油代谢基因^[29]、A 因子基因^[30]、琼脂酶基因^[31]、 α -淀粉酶基因^[32]、酪蛋白酶基因^[33]、木质素酶基因^[34]以及放线菌素^[35]、bialaphos^[36]克拉维酸^[37]、土霉素^[38]、四环素^[39]和十一烷基灵菌红素^[40, 41]等抗生素的生物合成基因簇。

pIJ101 衍生载体的发展和利用仅停留在对 pIJ101 基本复制区的利用。因为一直没有意识到基本复制子的复制在每个细胞中所产生的质粒的拷贝数仅占野生型 pIJ101 的 1/3, 在这类载体中加入 sti 因子并去除 cop 阻遏子后, 载体的拷贝数可达 1000。因此目前广泛应用的 pIJ101 衍生载体的拷贝数只有 50—100。虽许多基因克隆到这类载体后, 基因产物产量已大大提高, 在载体上加入 sti 后, 产量的提高可能更为可观。用 pIJ101 基本复制子为载体, 已使牛生长激素和人类的白细胞介素在变铅青链霉菌中合成^[42, 43], 用上面描述

的方法也可能更进一步地提高它们的产量。不过,基因产物量的提高不是无限度的,尤其是基因产物对细胞可能有毒时更是如此。

另一方面,大部分只含有基本复制子的 pIJ101 衍生载体在细胞中累积单链 DNA,细胞中与单链 DNA 互补的 mRNA 分子可以与其杂交,使 mRNA 不能用于翻译而降低基因剂量。这一点

可以解释某些克隆基因产物产量比野生型菌株产量还要低的原因。在原核生物和真核生物中常可见到通过互补的转录子(也称反义 RNA)来抑制翻译以调节基因表达的情况。在这方面,细胞中单链 DNA 也可起反义 RNA 的作用。因此很有必要对这类 pIJ101 载体进行改造,以适应更广泛的用途。

参 考 文 献

- [1] Berdy, J.; *Process Biochemistry*, Oct/Nov, 28—35, 1980.
- [2] Kieser, T.; *M.G.G.*, 185:223—238, 1982.
- [3] Hopwood, D.A. et al.; *Methods in Enzymology*, Vol. 153, pp. 116—166, 1987.
- [4] Deng, Z. et al.; *M.G.G.*, 214:286—294, 1988.
- [5] Hopwood, D.A. et al.; *Genetic Manipulation of streptomyces*, 1985.
- [6] Ward, J. et al.; *M.G.G.*, 203:468—478, 1986.
- [7] Kieser, T. et al.; *Gene*, 65:83—91, 1988.
- [8] Buttner, M.J.; 私人交流.
- [9] Kendall, K.J. and Cohen, S.N.; *J. Bact.*, 169:4177—4183, 1987.
- [10] Deng, Z. et al.; 英国遗传学会第 218 次学术会议文摘集, p46, 1988.
- [11] Kendall, K.J. and Cohen, S.N.; *J. Bact.*, 170:4634—4651, 1988.
- [12] Deng, Z. and thesis, D.; University of East Anglia, 1987.
- [13] Deng, Z. et al.; *Gene*, 43:225—300, 1986.
- [14] Buttner, M.J. and Brown, N.J.; *Gene*, 51:179—186, 1987.
- [15] Deng, Z. et al.; *Nucleic Acids Research*, 15(6):2665—2675, 1987.
- [16] Chater, K.F. et al.; *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 96:69—95, 1982.
- [17] Bibb, M.J. et al.; *Experimental Manipulation of Gene Expression*, pp. 52—83, 1983.
- [18] Bailey, C.R. et al.; *J. Gen. Microbiol.*, 172:2071—2078, 1986.
- [19] Chater, K.F. et al.; *Microbiology-1985*, ASM, pp. 421—426, 1985.
- [20] Fayerman, J.T. et al.; *Microbiology-1985*, ASM, pp. 414—420, 1985.
- [21] Horinouch, S. and Beppu, T.; *J. Bact.*, 162:406—412, 1985.
- [22] Lydiate, D.J. et al.; *Gene*, 35:223—235, 1985.
- [23] Ohnuki, T. et al.; *Gene*, 25:155—159, 1983.
- [24] Rodicio, M.R. et al.; *Gene*, 34:283—292, 1985.
- [25] Hopwood, D.A.; *Proceedings of Sixth International symposium on Actinomycetes Biology*, pp. 3—14, 1985.
- [26] Nakano, M.M. et al.; *J. Bact.*, 157:79—83, 1984.
- [27] Vara, J. et al.; *Gene* 35:197—206, 1985.
- [28] Birmingham, V.A. et al.; *M.G.G.*, 204:532—539, 1986.
- [29] Seno, J. et al.; *M.G.G.*, 193:119—128, 1984.
- [30] Horinouchi, S. et al.; *J. Bact.*, 158:481—487, 1984.
- [31] Kendall, K. and Cullum, J.; *Gene*, 25:315—321, 1984.
- [32] Hoshiko, S. et al.; *J. Bact.*, 169:1029—1036, 1987.
- [33] Katz, E. et al.; *J. Gen. Microbiol.*, 129:2703—2714, 1983.
- [34] Iwasaki, A.; *J. Antibiotics*, 39:985—993, 1986.
- [35] Jones, G. and Hopwood, D.A.; *J. Biological chemistry*, 259:14151—14164, 1984.
- [36] Murakami, T. et al.; *M.G.G.*, 205:42—50, 1986.
- [37] Bailey, C.R. et al.; *Biotechnology*, Sept. 308—311, 1984.
- [38] Bulfer, et al.; *GIM-1986*, p. 161, 1986.
- [39] Motamedi, H. et al.; *GIM-1986*, p. 159, 1986.
- [40] Feitelson, J. and Hopwood, D.A.; *M.G.G.*, 190:394—398, 1983.
- [41] Feitelson, J. et al.; *J. Gen. Microbiol.*, 131:2431—2441, 1985.
- [42] Gray, G. et al.; *Gene*, 32:21—30, 1984.
- [43] Munoz, A. et al.; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 133:511—519, 1985.