

# Streptomyces sahachiroi ATCC 33158 中 启动子 P<sub>aziU1</sub> 的克隆及表达

周俊何璟

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 为鉴定和分析 *aziU1* 基因的启动子 P<sub>aziU1</sub>, 将该基因上游 183 bp 的 DNA 片段和组成型强启动子 P<sub>ermE\*</sub> (作为阳性对照) 分别克隆到启动子探针载体 pIJ8660 中, 以增强型的绿色荧光蛋白基因 (*egfp*) 作为报告基因, 通过检测菌丝体中绿色荧光的强弱, 对 P<sub>aziU1</sub> 的启动子活性进行了定性和定量分析。P<sub>aziU1</sub> 在 3 种不同的链霉菌 *Streptomyces sahachiroi*、*Streptomyces lividans* ZX1 和 *Streptomyces albus* 中均表现出启动子活性。P<sub>aziU1</sub> 的启动子活性在初始培养的 36 h 略低于 P<sub>ermE\*</sub>, 在培养 48 h 后, P<sub>aziU1</sub> 的表达活性高于 P<sub>ermE\*</sub>。结果表明, P<sub>aziU1</sub> 与 P<sub>ermE\*</sub> 一样, 是一个可以在链霉菌中组成型表达的强启动子。

**关键词** *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158; P<sub>ermE\*</sub>; 启动子探针载体; P<sub>aziU1</sub>; 增强型绿色荧光蛋白 (EGFP); 组成型强启动子

中图分类号 Q 939.9 文献标识码 A 文章编号 1000-2421(2014)05-0026-06

链霉菌是能够产生丰富多样活性天然产物的重要微生物类群, 其代谢过程由一个非常复杂、相互偶联的多层次调控系统所控制。根据其调控范围可细分为全局性调控和途径特异性调控 2 类。全局性调控是在整体水平上对产生菌进行全方位的控制, 通常是因为营养降低等外界环境因素所引起, 具有多效性; 不仅影响产生菌形态的发育和分化, 而且影响多种次级代谢合成过程。途径特异性调控则是对某一个代谢合成途径具有特异性调节作用。途径特异性调控因子通常位于某个次级代谢产物生物合成基因簇内, 通过特异性的激活或者抑制基因簇中某些结构基因的表达, 从而影响该次级代谢物的产生<sup>[1]</sup>。无论是哪一种类型的调控, 启动子和其他顺式作用元件都是整个调控系统中最基础的构成部件。

链霉菌中发现的启动子序列差异较大, 很少具有保守性<sup>[2]</sup>。根据启动子区域的核酸序列分析一般可分为 3 类: 第 1 类启动子与大肠杆菌的启动子类似, 具有典型的-10 和-35 区域, 称作链霉菌-大肠杆菌启动子 (SEP), 这类启动子在大肠杆菌中有活性, 而在链霉菌中可能不显示活性<sup>[3-5]</sup>; 第 2 类启动子

的-10 区与大肠杆菌相似, 但-35 区却存在较大的差别, 有的甚至没有-35 区<sup>[6]</sup>; 第 3 类启动子则与枯草芽胞杆菌的启动子有较高的相似性<sup>[7]</sup>。除了以上 3 类以外, 还有很多链霉菌的启动子与已知的启动子序列没有任何的同源性, 甚至有些随机克隆的片段也可能具有启动子的活性, 继而启动下游基因的表达<sup>[8]</sup>。除了结构上的多样性以外, 链霉菌启动子在转录模式上也很复杂。很多基因含有多重启动子的调控区, 经常受多样化启动子、相互重叠转录本和/或多顺反子转录本的协同调控。这种调控作用, 可以是正调控, 也可以是负调控。如红色糖多孢菌中红霉素抗性基因 *ermE*<sup>[9]</sup>、弗氏链霉菌中新霉素抗性基因 *aph*<sup>[10-11]</sup>、天蓝色链霉菌中十一烷基灵菌红素生物合成调控基因 *redD*<sup>[12-13]</sup>、圈卷产色链霉菌中调节尼可霉素生物合成和孢子形成的调控基因 *sanG*<sup>[14]</sup> 的启动子都含有多个转录起始位点, 这类特殊结构的启动子与链霉菌复杂的调控模式紧密相关。

绿色荧光蛋白基因 (green fluorescent protein gene, *gfp*) 作为报告基因可用来检测基因的表达效率, 把 *gfp* 基因连接到待检测启动子的下游, 通过测

收稿日期: 2013-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30800020, 31270136)、教育部留学回国人员科研启动基金项目 ([2009] 1590) 和教育部新世纪人才支持计划项目 (NCET-08-0779)

周俊, 硕士研究生, 研究方向: 微生物天然产物的生物合成。E-mail: jennifer0601@163.com

通信作者: 何璟, 博士, 教授, 研究方向: 微生物天然产物的生物合成。E-mail: hejingji@mail.hzau.edu.cn

定 GFP 的荧光强度就可以对该基因的表达水平进行检测<sup>[15]</sup>。增强型的绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 是由 GFP 改造而来, 将编码 *gfp* 基因中的 TTA 密码子突变成富含 GC 的密码子。经改造后的 EGFP 较之于原始的 GFP, 光漂白现象大为降低, 荧光强度和溶解度增加, 最大激发波长由 395 nm 变为 488 nm, 最大发射波长由 509 nm 变为 507 nm, 更为重要的是可以在基因组中富含 GC 的微生物细胞中表达<sup>[16-18]</sup>。Sun 等<sup>[19]</sup>在此基础上构建了适用于链霉菌的启动子探针载体 pIJ8660。pIJ8660 是由 pSET152 改造而来, 最显著的特征是包含 1 个缺乏启动子的 *egfp* 基因。如果在 *egfp* 基因上游克隆 1 个有活性的启动子, 那么就可以启动下游 *egfp* 基因的表达。通过检测绿色荧光蛋白的表达情况, 可以判断克隆的基因片段是否具有启动子活性。

链霉菌 *S. sahachiroi* ATCC33158<sup>[20]</sup> 因能够产生抗肿瘤药物 azinomycin B 而受到关注。在分析 azinomycin B 生物合成基因簇<sup>[21]</sup>时, 依据各基因功能及其在生物合成途径中的作用, 初步推测基因 *aziU1U2U3* 构成了一个独立的转录单元, 与上游同一转录方向的其他基因不属于同一操纵子。本研究利用启动子探针载体 pIJ8660, 对基因 *aziU1* 上游的启动子区域进行克隆, 得到一个高活性的启动子  $P_{aziU1}$ ; 为了评价  $P_{aziU1}$  的启动子活性, 将它与已知的链霉菌组成型强启动子  $P_{ermE^*}$  在不同的链霉菌宿主中进行了比较分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1) 菌种和质粒。启动子探针载体 pIJ8660 由华中师范大学李爱英副教授馈赠; 质粒 pWHM4\* 和 pIJ2925 由笔者所在实验室收藏; 克隆宿主大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10B-T1 由华中农业大学罗美中教授馈赠; 接合转移供体菌大肠杆菌 S17-1、异源表达宿主 *S. albus* 和 *S. lividans* ZX1 由笔者所在实验室收藏; 菌株 *S. sahachiroi* ATCC 33158 购自 American Type Culture Collection (ATCC)。

2) 培养基和抗生素。大肠杆菌培养基为 LA 固体和 LB 液体培养基; *S. lividans* ZX1 产孢培养基为 2CM, *S. albus* 的产孢培养基为 MS, *S. sahachiroi* 的产孢培养基为 PS5; 接合转移固体培养基为 M-ISP4, 接合转移液体培养基为 TSB<sup>[22]</sup>。在 LB 中安

普拉霉素终质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 固体平板中安普拉霉素和萘啶酮酸终质量浓度均为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3) 主要试剂。本研究所用限制性内切酶购自 Fermentas 公司, T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司, KOD DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司, *rTaq* DNA 聚合酶和 DNA marker 购自东盛生物科技有限公司, 普通 DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXYGEM 公司, 其余试剂均购自国药集团。引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

### 1.2 方法

1) 分子生物学操作。大肠杆菌质粒的提取、载体与片段的酶切酶连反应、感受态细胞的制备、质粒的转化、琼脂糖凝胶电泳以及 PCR 扩增反应等分子生物学基本操作参照文献<sup>[23]</sup>进行。

2) 阳性对照 pZJerm 的构建。利用 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切从质粒 pWHM4\* 得到含有红霉素抗性基因启动子  $P_{ermE^*}$  的片段 (173 bp), 与具有相同粘性末端的载体 pIJ2925 进行连接。在筛选得到正确的转化子后用 *Bgl* II 酶切处理, 得到具有 *Bgl* II 粘性末端的  $P_{ermE^*}$  片段, 与同样用 *Bgl* II 处理好的 pIJ8660 连接, 筛选正确的转化子, 并验证  $P_{ermE^*}$  的插入方向。将  $P_{ermE^*}$  正向插入的克隆子命名为 pZJerm。

3) 质粒 pZJU1 的构建。以 *S. sahachiroi* 总 DNA 为模板, 使用引物 AAA GGA TCC ATA GGT GCA GTA TTT GTA GTA TTG T 和 AAA TCT AGA GCC CAA CCG TGC TGA GCG AAG TGA T, 利用 KOD DNA 聚合酶扩增 *aziU1* 基因上游 DNA 片段 (183 bp)。经 *Bam* H I 和 *Xba* I 双酶切后, 与具有同样粘性末端的载体 pIJ8660 连接, 得到包含有 *aziU1* 基因上游启动子基因片段的克隆子 pZJU1。

4) 大肠杆菌-链霉菌属间接转移。参照文献<sup>[23]</sup>进行。将 pIJ8660、pZJerm 和 pZJU1 分别转入大肠杆菌 S17-1 的感受态细胞中, 筛选正确的转化子过夜培养。将过夜培养物转接到新鲜并含有合适抗生素的 LB 中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养到  $D_{600}$  为 0.4~0.6 时收集菌体。用等体积新鲜的 LB 洗涤菌体 3 次, 用 0.1 倍体积的 LB 悬浮备用。同时将新鲜的链霉菌孢子悬浮于 1 mL TSB 中, 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴热激 10 min, 冷却到室温后放置在 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床培养 2~3 h, 离心收集孢子并重新悬浮于适量的 TSB 中, 在振荡器上打散孢子。按 1:1 (体积比) 将处理好的大肠杆菌和孢子混

合,均匀涂布在合适的培养基平板上。将平板放置于 30 °C 培养 13~20 h 后,用适当浓度的抗生素和萘啶酮酸覆盖,30 °C 继续培养 2~3 d 后观察接合转移子。

5) 链霉菌基因组 DNA 的抽提。参照文献[23]进行。收取 50 mL 链霉菌培养物的菌丝体沉淀悬浮于 4 mL 的 TE25S Buffer 中,然后加入 500  $\mu$ L 20 mg/mL 的溶菌酶,振荡打散。37 °C 温浴 2~3 h,每 30 min 翻转几次直至悬液成乳状。加 2 mL 10% SDS,37 °C 温浴 30 min,每 5 min 翻转 1 次,直至悬液变澄清。加入 6 mL 苯酚-氯仿混合物振荡 30 s,6 500 r/min 离心 10 min,将上清液转入 15 mL 离心管,重复抽提直到蛋白质去除得比较干净。加入 6 mL 氯仿振荡 30 s,6 500 r/min 离心 10 min。将上清液转入 15 mL 离心管,加 700  $\mu$ L 3 mol/L 的乙酸钠和 5 mL 的异丙醇。轻轻旋转离心管,看到 DNA 析出,用枪头将丝状的 DNA 卷起,再用 70% 乙醇清洗后在空气中晾干。将晾干的 DNA 溶于 500  $\mu$ L TE, -20 °C 保存。

6) 荧光显微镜检测 EGFP 的表达。收集培养一定时间的链霉菌菌丝体制成玻璃装片(菌丝体的浓度不要太高,铺满盖玻片即可),将装片放置到荧光显微镜(Zeiss Axiophot)的载物台上,同时打开可见光灯和荧光灯(荧光灯使用前需预热 15 min)。先使用可见光观察并寻找合适的视野,物镜倍数从 5 $\times$ 、10 $\times$ 到 20 $\times$ 。在寻找到合适视野后,关闭可见

光圈,选择 EGFP 滤光片,即可见发出绿色荧光的菌丝体,观察拍照,记录观测结果。

7) 利用 EGFP 报告系统检测基因的表达情况。在平底 96 孔板(Corning)中加入加热融化后的 GYM 固体培养基(200  $\mu$ L/孔),待其凝固后在超净工作台吹 0.5~1.0 h。待培养基充分干燥后,接种等量的链霉菌孢子( $10^5 \sim 10^6$  个/孔)到 96 孔板中,放置到 30 °C 培养箱中培养。培养一定时间后将 96 孔板放置到 BioTeck 酶标仪中,选择 488 nm/528 nm 滤光片对荧光值进行测定。每个待测样品做 8 个重复,每次测量均带包含 pIJ8660 空载的菌株作为空白对照。为消除培养基等其他因素对测量结果的影响,数据处理过程中测量样品荧光值减去空载样品荧光值即为测量的有效数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 启动子 $P_{aziU1}$ 的克隆

利用在线分析软件(PromoterScan; Promoter 2.0; NNPP),对  $aziU1$  基因上游可能的启动子区域进行预测,发现该区域含有部分启动子特征序列。为了证实该区域的启动子活性,设计特异性的引物扩增得到  $aziU1$  基因上游 183 bp 大小的 DNA 片段,并克隆到启动子探针载体 pIJ8660 上得到质粒 pZJU1(图 1)。同时选取红霉素抗性基因的启动子  $P_{ermE^*}$  作为阳性对照,同样克隆到载体 pIJ8660 上,得到质粒 pZJerm(图 1)。

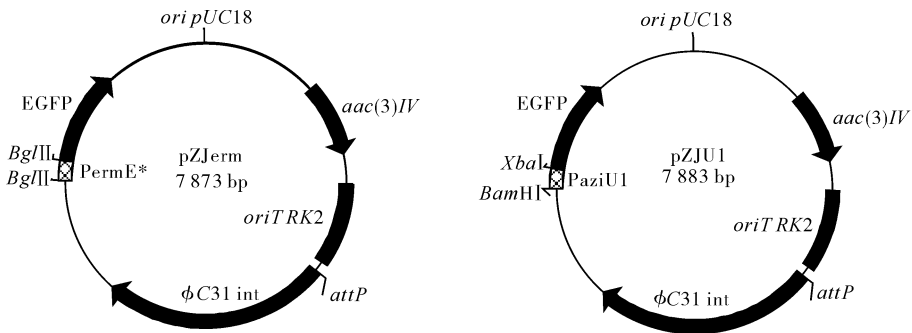


图 1 质粒 pZJerm 和 pZJU1 酶切图谱

Fig. 1 Restriction map of the plasmids pZJerm and pZJU1

### 2.2 原宿主菌中 $P_{aziU1}$ 启动子活性的检测

将质粒 pZJU1、pZJerm(阳性对照)和空载体 pIJ8660(阴性对照)通过接合转移分别导入到 *S. sahachiroi* 中,得到正确的接合子 *S. saha* :: pZJU1、*S. saha* :: pZJerm 和 *S. saha* :: pIJ8660。将 3 个菌株等量( $10^6$  个孢子)接种到液体培养基 GYM 中进

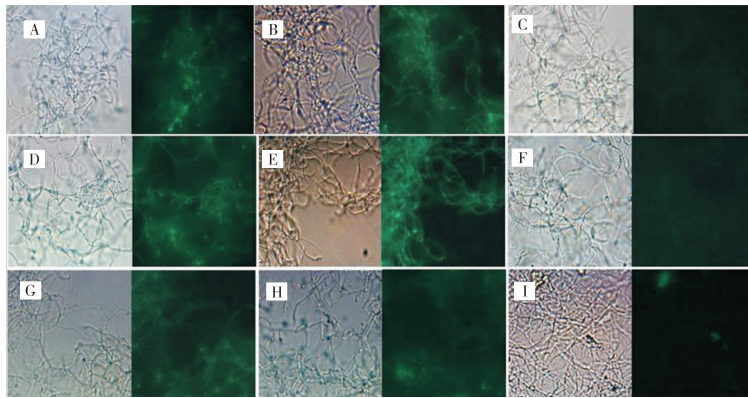
行培养,每隔 24 h 收集少量菌丝体样品在荧光显微镜下进行检测。结果显示,*S. saha* :: pZJU1(图 2A)和阳性对照菌株 *S. saha* :: pZJerm(图 2B)在 24 h 后开始出现绿色荧光,而阴性对照菌株 *S. saha* :: pIJ8660(图 2C)一直没有绿色荧光产生。说明所克隆的  $aziU1$  基因上游 DNA 片段具有启动

子活性,在原宿主菌中可以启动下游绿色荧光蛋白基因的表达式,将该启动子命名为  $P_{aziU1}$ 。

### 2.3 $P_{aziU1}$ 在异源宿主中的启动子活性检测

为了进一步研究  $P_{aziU1}$  的启动子活性范围,以常用的 2 种链霉菌 *S. albus* 和 *S. lividans* ZX1 为异源宿主进行检测。同样利用接合转移的方法将 pZJU1、pZJerm 和 pIJ8660 分别导入 *S. albus* 和

*S. lividans* ZX1,得到接合子 *S. albus* :: pZJU1、*S. albus* :: pZJerm、*S. albus* :: pIJ8660 和 ZX1 :: pZJU1、ZX1 :: pZJerm、ZX1 :: pIJ8660。荧光显微镜检测显示含有 pZJU1 和 pZJerm 的菌株在 24 h 后开始产生绿色荧光(图 2D-H),而含有 pIJ8660 的菌株一直没有产生绿色荧光(图 2F-I)。说明  $P_{aziU1}$  在 *S. albus* 和 *S. lividans* ZX1 中均具有启动子活



A: *S. saha* :: pZJU1; B: *S. saha* :: pZJerm; C: *S. saha* :: pIJ8660; D: *S. albus* :: pZJU1; E: *S. albus* :: pZJerm; F: *S. albus* :: pIJ8660; G: ZX1 :: pZJU1; H: ZX1 :: pZJerm; I: ZX1 :: pIJ8660。所有样品左为普通光镜图片,右为荧光图片 Left: Bright field image, Right: Fluorescence micrographs.

图 2 链霉菌菌丝体的显微镜观察图片(20×)

Fig. 2 Microscope images of *Streptomyces* mycelia

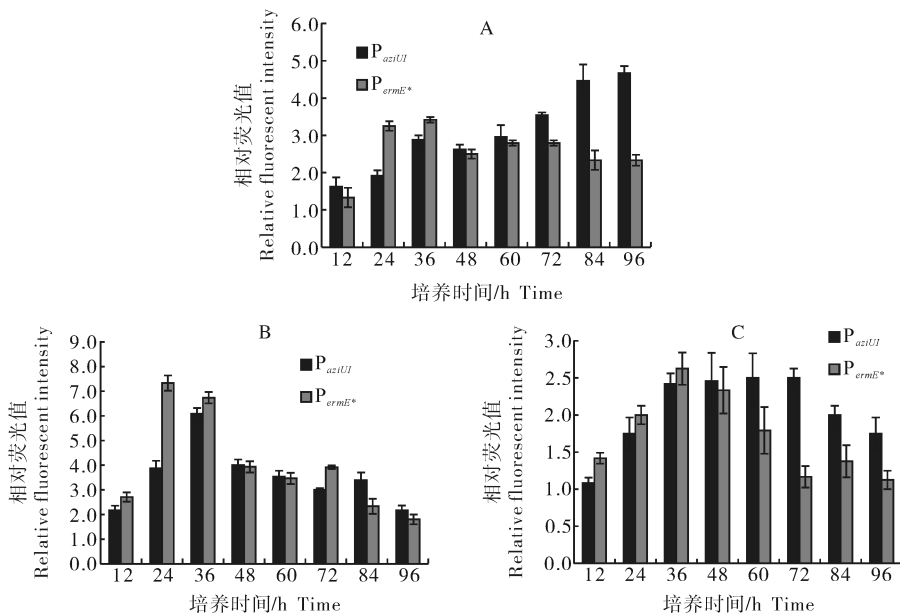


图 3 启动子  $P_{aziU1}$  和  $P_{ermE^*}$  在 *S. sahachiroi* (A)、*S. albus* (B) 和 *S. lividans* ZX1 (C) 中不同培养时间表达活性的比较

Fig. 3 Relative promoter activities of  $P_{aziU1}$  and  $P_{ermE^*}$  at different incubation time in *S. sahachiroi* (A), *S. albus* (B) and *S. lividans* ZX1 (C)

性,可以启动下游绿色荧光蛋白基因的表达。

### 2.4 $P_{aziU1}$ 和 $P_{ermE^*}$ 启动子活性的比较

本研究中所使用的启动子探针载体 pIJ8660 来

源于位点特异性整合型载体 pSET152,进入链霉菌以后会以单拷贝的形式整合到宿主的染色体中,因此 *egfp* 报告基因表达水平的不同能够直接反映出

上游所克隆的启动子活性的强弱。

将含有 pZJU1 和 pZJerm 的菌株等量接种到平底 96 孔板中,分别在培养 12、24、36、48、60、72、84 和 96 h 后进行荧光强度的测定。以 *S. sahachiroi* (图 3A)、*S. albus*(图 3B)和 *S. lividans* ZX1(图 3C)为异源表达宿主,不同培养时间下荧光强度测定的结果表明  $P_{aziU1}$  的启动子活性在初始培养的 36 h 中略低于  $P_{ermE^*}$ ,而在培养 48 h 后, $P_{aziU1}$  的启动子活性与  $P_{ermE^*}$  相当或高于  $P_{ermE^*}$ 。

### 3 讨论

来源于红色糖多孢菌的红霉素抗性基因启动子  $P_{ermE}$  是一种组成型表达的链霉菌强启动子。 $P_{ermE}$  在转录起始的方向上有 2 个转录起始位点,同时也包含了 2 对-10 和-35 区,2 个-35 区间隔 74 bp。其中第 2 个转录起始位点的-10 和-35 区保守序列的间隔符合原核生物强启动子的最佳间隔(17±1) bp。具有 2 个转录起始位点以及间隔合适的-10 和-35 区都说明  $P_{ermE}$  具有强启动子的序列特征。 $P_{ermE^*}$  是将  $P_{ermE}$  I-35 区的 TGG 密码子缺失突变后获得的突变体,启动子活性更强。研究者为了研究目标基因的功能,经常用  $P_{ermE^*}$  代替目标基因原有的启动子来进行基因的互补、异源表达和超量表达等实验<sup>[4,24-25]</sup>。在链霉菌 *S. sahachiroi* ATCC33158 中,我们克隆并证实了  $P_{aziU1}$  的启动子活性。在 *S. sahachiroi*、*S. lividans* ZX1 和 *S. albus* 这 3 种不同的链霉菌宿主菌中,无论是培养初期还是后期稳定生长的阶段, $P_{aziU1}$  都能够行使启动子的功能,启动报告基因 *egfp* 的表达,并且与强启动子  $P_{ermE^*}$  处于同一活性水平。以 *S. sahachiroi* 和 *S. lividans* ZX1 为表达宿主时, $P_{aziU1}$  启动子的活性在初始培养的 36 h 中要略低于  $P_{ermE^*}$ ,但在培养 48 h 后, $P_{aziU1}$  的活性逐渐赶上并超过  $P_{ermE^*}$ ,表明  $P_{aziU1}$  与  $P_{ermE^*}$  一样是一个组成型表达的链霉菌强启动子,具有应用于链霉菌遗传学及分子生物学的潜力。

链霉菌中含有丰富多样的  $\delta$  因子。 $\delta$  因子是原核生物 RNA 聚合酶全酶的一个重要组成部分,负责识别特异性的启动子,并启动目的基因的转录。链霉菌中  $\delta$  因子根据其功能可分为初级  $\delta$  因子和次级  $\delta$  因子 2 类,在不同的生长周期中由不同的  $\delta$  因子调控启动不同基因的表达。同一启动子的表达活性可能会随着菌体内不同生长阶段所含有的  $\delta$  因子不同而发生变化<sup>[5,25-26]</sup>。通过生物信息学分析,我

们在  $P_{aziU1}$  中只预测到 1 个转录起始位点,未找到典型的强启动子的-10 和-35 区序列特征。 $P_{aziU1}$  的强启动子活性是源于多个转录起始位点,还是间隔合适的-10 和-35 区,亦或是其启动子区域的结构易于被链霉菌中的多个  $\delta$  因子所识别,这一切都有待于进一步的研究来解释和说明。

### 参 考 文 献

- [1] BIBB M J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes[J]. Current Opinion in Microbiology, 2005, 8(2): 208-215.
- [2] STROHL W R. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters[J]. Nucleic Acids Research, 1992, 20(5): 961-974.
- [3] SMITH C P, CHATER K F. Cloning and transcription analysis of the entire glycerol utilization (*gylABX*) operon of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and identification of a closely associated transcription unit [J]. Molecular and General Genetics MGG, 1988, 211(1): 129-137.
- [4] WARD J M, JANSSEN G R, KIESER T, et al. Construction and characterization of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1986, 203(3): 468-478.
- [5] ZHANG J, WOLFE S, DEMAINE A L. Ammonium ions repress  $\delta$ -(1- $\alpha$ -aminoadipyl)-l-cysteiny-l-d-valine synthetase in *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1989, 35(3): 399-402.
- [6] MANOME T, HOSHINO E. Cloning of DNA fragments containing *Streptomyces* promoter activity[J]. The Journal of Antibiotics, 1987, 40(10): 1440.
- [7] WESTPHELING J, RANES M, LOSICK R. RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor* [J]. Nature, 1985, 313(5997): 22.
- [8] 杨闰英, 胡志浩. 链霉菌表达系统的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(3): 260-268.
- [9] BIBB M J, JANSSEN G R, WARD J M. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene *ermE* of *Streptomyces erythraeus* [J]. Gene, 1985, 38(1): 215-226.
- [10] BIBB M(e.) J, BIBB M(a.) J, WARD J M, et al. Nucleotide sequences encoding and promoting expression of three antibiotic resistance genes indigenous to *Streptomyces* [J]. Molecular and General Genetics MGG, 1985, 199(1): 26-36.
- [11] JONES R, JASKULA J, JANSSEN G. *In vivo* translational start site selection on leaderless mRNA transcribed from the *Streptomyces fradiae* aph gene [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(14): 4753-4760.
- [12] NARVA K E, FEITELSON J S. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor*

- or A3 (2) [J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(1): 326-333.
- [13] TAKANO E, GRAMAJO H, STRAUCH E, et al. Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) [J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(19): 2797-2804.
- [14] LIU G, TIAN Y, YANG H, et al. A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes* that also influences colony development [J]. Molecular Microbiology, 2005, 55(6): 1855-1866.
- [15] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. Science, 1994, 263(5148): 802-805.
- [16] LESKIW B, BIBB M, CHATER K. The use of a rare codon specifically during development [J]. Molecular Microbiology, 1991, 5(12): 2861-2867.
- [17] HAAS J, PARK E C, SEED B. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein [J]. Current Biology, 1996, 6(3): 315-324.
- [18] CORMACK B P, VALDIVIA R H, FALKOW S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) [J]. Gene, 1996, 173(1): 33-38.
- [19] SUN J, KELEMEN G H, FERNANDEZ-ABALOS J M, et al. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) [J]. Microbiology, 1999, 145(9): 2221-2227.
- [20] 李华, 鲁慧茵, 何璟. *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 中 II 型聚酮合酶基因 *sahA* 的功能分析 [J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(2): 12-17.
- [21] ZHAO Q, HE Q, DING W, et al. Characterization of the azinomycin B biosynthetic gene cluster revealing a different iterative type I polyketide synthase for naphthoate biosynthesis [J]. Chemistry & Biology, 2008, 15(7): 693-705.
- [22] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. Practical *Streptomyces* genetics [M]. UK: The John Innes Foundation, 2000.
- [23] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [24] SCHMITT-JOHN T, ENGELS J W. Promoter constructions for efficient secretion expression in *Streptomyces lividans* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, 36(4): 493-498.
- [25] RECIO E, COLINAS Á, RUMBERO Á, et al. PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimaricin production in *Streptomyces natalensis* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(40): 41586-41593.
- [26] NEWELL K V, THOMAS D P, BREKASIS D, et al. The RNA polymerase-binding protein RbpA confers basal levels of rifampicin resistance on *Streptomyces coelicolor* [J]. Molecular Microbiology, 2006, 60(3): 687-696.

## Cloning and expression of a strong promoter P<sub>aziU1</sub> from *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158

ZHOU Jun HE Jing

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

**Abstract** To identify and analyze the promoter region of the gene *aziU1* (P<sub>aziU1</sub>) in *Streptomyces sahachiroi* ATCC33158, the 183 bp DNA fragment upstream of *aziU1* and the strong constitutive promoter P<sub>ermE\*</sub> (as the positive control) were cloned into the promoter-probe vector pIJ8660. The enhanced green fluorescent protein gene (*egfp*) was used as a qualitative and quantitative reporter of gene expression driven by the cloned promoters, P<sub>aziU1</sub> and P<sub>ermE\*</sub>, with fluorescent intensity assay of mycelia. P<sub>aziU1</sub> exhibited high level of promoter activities in three streptomycetes, *Streptomyces sahachiroi*, *Streptomyces lividans* ZX1 and *Streptomyces albus*. In the early growth phase (up to 36 h), the activities of P<sub>aziU1</sub> were a little bit lower than those of P<sub>ermE\*</sub>. However, by 48 h, the activities of P<sub>aziU1</sub> equaled and even exceeded those of P<sub>ermE\*</sub>. Therefore, that P<sub>aziU1</sub> cloned from *S. sahachiroi* was identified as a strong constitutive promoter the same as P<sub>ermE\*</sub>.

**Key words** *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158; P<sub>ermE\*</sub>; promoter-probe vector; P<sub>aziU1</sub>; enhanced green fluorescent protein (EGFP); constitutive strong promoter

(责任编辑:张志钰)