



# ECF- $\sigma^5$ 因子参与阿维链霉菌中阿维菌素合成和环境胁迫的研究

罗帅, 孙地, 陈芝, 文莹\*

中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

**摘要:** 【目的】研究阿维链霉菌中ECF- $\sigma^5$ 因子对阿维菌素合成、形态分化和环境胁迫的调控, 为揭示阿维菌素生物合成的调控机制和ECF- $\sigma$ 因子的调控网络提供依据。【方法】构建*sig5*基因缺失、回补和过表达菌株, 通过形态观察和摇瓶发酵实验初步确定 $\sigma^5$ 对形态分化、菌体生长和阿维菌素合成的影响。进一步通过RT-qPCR、EMSA和ChIP实验寻找确定 $\sigma^5$ 的靶基因, 再通过胁迫实验揭示 $\sigma^5$ 可能参与的胁迫反应。【结果】对*sig5*相关突变株的摇瓶发酵和形态观察结果表明,  $\sigma^5$ 对阿维菌素合成具有抑制作用, 但不影响菌体生长和形态分化。*sig5*基因缺失导致阿维菌素生物合成途径特异性正调控基因*aveR*和结构基因*aveA1*的转录水平提高, 但 $\sigma^5$ 并不与*aveR*和*aveA1*的启动子区结合。 $\sigma^5$ 能结合在自身基因及附近基因*SAV612*、*SAV615*、*SAV618*的启动子区, 正调控这些基因及所在操纵子的表达。胁迫实验暗示 $\sigma^5$ 可能参与渗透压引起的胁迫反应。【结论】ECF- $\sigma^5$ 因子在转录水平间接负调控阿维菌素的合成。

**关键词:** 阿维链霉菌, 阿维菌素, ECF- $\sigma$ 因子,  $\sigma^5$

阿维链霉菌是一类高G+C含量的革兰氏阳性土壤丝状细菌, 最初是1975年由日本北里研究所位于静冈县的一个土壤样品中分离得到的, 因其可产生杀虫抗生素阿维菌素而闻名<sup>[1-2]</sup>。阿维菌素(avermectins)是一组结构相似的十六元环大环内酯类抗生素, 具有高效、低毒、广谱的杀线虫、节肢动物和寄生虫等的活性, 在农业、畜牧业和医药领域具有广阔的市场, 是目前使用最为广泛的杀虫药物, 全世界的年销售额高达8.5亿美元。由于阿维菌素从根本上降低了盘尾丝虫症(河盲症)

和淋巴丝虫病(象皮病)的发病率, 它的发现者Omura<sup>[1]</sup>和Campbell<sup>[2]</sup>因此获得了2015年的诺贝尔生理学或医学奖。

经过40年的研究, 阿维菌素的生物合成途径已经阐明, 其生物合成基因簇全长82 kb, 含有18个ORF, 这些基因的功能已基本明确<sup>[3-6]</sup>。2001年, Omura等又完成了阿维链霉菌标准菌株的全基因组测序工作<sup>[7]</sup>, 序列分析表明在其染色体上存在37个可能的次级代谢产物的生物合成基因簇, 但仅有阿维菌素、寡霉素、菲律宾菌素等

基金项目: 国家自然科学基金(31170045)

\*通信作者: Tel: +86-10-62732715; E-mail: wen@cau.edu.cn

收稿日期: 2015-12-04; 修回日期: 2015-12-28; 网络出版日期: 2015-12-31

少数几种次级代谢产物得到分离鉴定,也暗示该菌具有合成更多抗生素的潜力。目前对阿维菌素生物合成的调控因子及其作用机理仍知之不多。本实验室和日本Kitani等证实*aveR*是阿维菌素生物合成途径特异性正调控基因<sup>[8-9]</sup>。Chen等发现,正调控天蓝色链霉菌放线紫红素合成的*atrA*同源基因*aveI*却间接负调控阿维菌素的合成<sup>[10]</sup>。 $\gamma$ -丁酸内酯受体同源蛋白AvaR3正调控阿维菌素的合成,然而它是如何调控阿维菌素合成的并不清楚<sup>[11]</sup>。本实验室研究表明,TetR家族转录调控因子SAV151、SAV576、SAV577和SAV7471间接负调控阿维菌素的合成<sup>[12-15]</sup>,而AveT(SAV3619)间接正调控阿维菌素合成<sup>[16]</sup>;ECF- $\sigma^{25}$ 、ECF- $\sigma^6$ 因子间接负调控阿维菌素的合成<sup>[17-18]</sup>;双组份调控系统PhoR/PhoP中的调控蛋白PhoP通过与*aveR*转录起始位点下游的PHO box 结合,直接负调控阿维菌素合成<sup>[19]</sup>。Zhuo等报道持家 $\sigma$ 因子 $\sigma^{hrdB}$ 可识别*aveR*的启动子区,通过构建*hrdB*基因的突变文库,获得了阿维菌素产量大幅度提高的突变株<sup>[20]</sup>。

ECF(extracytoplasmic function)- $\sigma$ 因子是属于 $\sigma^{70}$ 家族的可选择性 $\sigma$ 因子,与 $\sigma^{70}$ 相比只含有 $\sigma_2$ 和 $\sigma_4$ 两个结构域,分别识别启动子的-10和-35区。ECF- $\sigma$ 因子在细菌适应不同的生存环境和抵抗外界不断变化的压力胁迫中起到了非常重要的作用,它们所调节的细胞生理反应非常广泛,包括极端温度、极端pH、光照、压力、碳氮源营养饥饿、氧化还原和渗透压胁迫等<sup>[21]</sup>。在阿维链霉菌中有60个 $\sigma$ 因子,其中47个属于ECF- $\sigma$ 因子,除ECF- $\sigma^{25}$ 、ECF- $\sigma^6$ 外,其它ECF- $\sigma$ 因子的功能还未见报道。本实验室前期通过多次诱变获得1株阿维菌素高产菌株76-02-e,为揭示其高产原因,利用Agilent表达谱芯片对阿维链霉菌野生型菌株ATCC31267和76-02-e的基因表达差异进行分析,筛选到大量表达水平差异显著(2倍以上)的基因。*sig5*(SAV614)编码ECF- $\sigma^5$ 因子,它在76-02-e中发酵第2天的表达量相较于野生型下降了8.9倍,在

第6天下降了3.2倍,推测 $\sigma^5$ 可能参与了阿维菌素生物合成的调控。目前大部分研究揭示,ECF- $\sigma$ 因子一般参与响应外界的环境胁迫反应,而对细胞次级代谢的影响及调控次级代谢合成机制的研究报道较少。本工作在实验室前期芯片数据分析基础上开展ECF- $\sigma^5$ 因子功能的研究,结果表明,ECF- $\sigma^5$ 因子在转录水平间接负调控阿维菌素的合成,但不影响菌体生长和形态分化, $\sigma^5$ 还可能参与渗透压引起的胁迫反应。本研究将为揭示阿维菌素生物合成的调控机制和阿维链霉菌中ECF- $\sigma$ 因子的调控网络提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和引物:** 本实验所用的菌株和质粒见表1,引物见表2。

**1.1.2 培养基和培养条件:** 大肠杆菌的培养用LB培养基,培养温度37 °C。阿维链霉菌的培养温度为28 °C,固体产孢培养基为YMS<sup>[24]</sup>,原生质体再生培养基用RM14<sup>[22]</sup>,液体培养基YEME<sup>[25]</sup>(含25%蔗糖)用于培养菌丝体以制备原生质体或提取DNA,发酵所用的种子和发酵培养基FM-I参见文献[26],由于FM-I中含有不可溶成分,故用可溶的发酵培养基FM-II<sup>[8]</sup>(阿维菌素发酵单位低于FM-I)培养菌体以测定生长曲线和进行ChIP实验。

### 1.2 sig5缺失、回补及过表达菌株的构建

以阿维链霉菌野生型菌株基因组DNA为模板,PCR扩增*sig5*基因的上下游同源臂。上游同源臂为从*sig5*基因起始密码子上游1078 bp至118 bp处全长961 bp的DNA片段,下游同源臂为从*sig5*基因终止密码子下游1087 bp至上游63 bp的长1150 bp的DNA片段。两个同源臂经酶切纯化回收后,与潮霉素抗性基因片段*hyg*共同连接到质粒pKC1139上,并转入大肠杆菌JM109中得到*sig5*缺失载体pDsig5。将pDsig5经大肠杆菌ET12567去甲

表1. 菌株和质粒  
Table 1. Strains and plasmids

Strains or plasmids	Description	Source
Strains		
<i>S. avermitilis</i>		
ATCC31267	Wild-type strain (WT), avermectin producer	Laboratory stock
$\Delta sig5$	<i>sig5</i> deletion mutant	This study
$\Delta sig5/pSET152-sig5$	<i>sig5</i> -complemented strain	This study
WT/pSET152- <i>erm</i> p- <i>sig5</i>	<i>sig5</i> -overexpressing strain	This study
<i>E. coli</i>		
<i>E. coli</i> JM109	General cloning host for plasmid manipulation	Laboratory stock
<i>E. coli</i> ET12567	Methylation-deficient strain	[22]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Host for overexpression of recombinant His <sub>6</sub> -tagged protein	Novagen
Plasmids		
pKC1139	Multiple-copy, temperature-sensitive <i>E. coli-Streptomyces</i> shuttle vector used for gene deletion	[23]
pSET152	Integrative <i>E. coli-Streptomyces</i> shuttle vector	[23]
pET-28a(+)	Vector for overexpression of His <sub>6</sub> -tagged protein in <i>E. coli</i>	Novagen
pDsig5	<i>sig5</i> deletion vector based on pKC1139	This study
pSET152- <i>sig5</i>	<i>sig5</i> -complemented vector based on pSET152	This study
pSET152- <i>erm</i> p- <i>sig5</i>	<i>sig5</i> -overexpressing vector based on pSET152	This study
pET28- <i>sig5</i>	<i>sig5</i> -overexpressing vector based on pET-28a(+)	This study

基化后, 转入阿维链霉菌野生型菌株原生质体中, 按文献[27]所述方法筛选双交换基因缺失突变株, 得到的*sig5*缺失突变株经PCR验证后命名为 $\Delta sig5$ (图1), 其中*sig5*被潮霉素抗性基因*hyg*所取代。

以阿维链霉菌野生型菌株总DNA为模板, PCR扩增1005 bp的*sig5*结构基因及其启动子区片段, 该片段用*Bam*H I酶切并纯化后连接于整合型质粒pSET152获得重组质粒pSET152-*sig5*, 将该质粒去甲基化后转入 $\Delta sig5$ 中得到回补菌株 $\Delta sig5/pSET152-sig5$ 。PCR扩增800 bp的含有*sig5*结构基因的DNA片段, 获得的片段用*Hind* III和*Bgl* II酶切纯化后, 连接到pJL117质粒上的红霉素抗性基

因强启动子*ermE*\**p*下游。用*Bgl* II将*ermE*\**p*和*sig5*结构基因片段切下, 纯化回收后得到约1 kb的片段, 连接于质粒pSET152上获得重组质粒pSET152-*erm*p-*sig5*, 将该质粒去甲基化后转入野生型菌株中得到*sig5*过表达菌株WT/pSET152-*erm*p-*sig5*。

### 1.3 实时荧光定量RT-PCR(RT-qPCR)

将发酵培养2天(对数期)和6天(稳定期)的菌丝体在液氮中研磨至粉末, 用Trizol试剂提取总RNA, RNA样品用RNase-free DNase I处理去除DNA污染, NanoVue™ Plus(GE Healthcare)分光光度计测定RNA浓度和纯度。反转录反应在RNase-free的PCR管中加入2  $\mu$ g RNA, 2  $\mu$ L Random

表2. 引物  
Table 2. Primers

Primers	DNA sequenc (5'→3')	Use
LS57	<u>AAGCTT</u> TGTTTTGGTCAGCTGCGACT, <i>Hind</i> III	Deletion of <i>sig5</i>
LS58	<u>CTGCAG</u> ACCCTCGTCG CACTTCTTGT, <i>Pst</i> I	
LS59	<u>GGATCC</u> GTACGACGTGAACGACCCGT, <i>Bam</i> H I	
LS60	<u>GAATTC</u> GCTGTGAAGACCCTGGCTGT, <i>Eco</i> R I	
LS61	TCAGCGGGTGGTGAGCTG	Confirmation of <i>sig5</i> deletion
LS62	TTCCGGATCACCAACAGC	
LS63	GTGATCACTCCTGTCCTCCC	
LS64	TGTAGCGCACGTTGTCGA	
hqf	CGGGATCGCCAATCTAC	Amplification of <i>sig5</i> ORF
hhz	CCATCCCAGCTCGGCAAG	
LS77	CCC <u>AAGCTT</u> CTTCTGTGGTTCCGTCAGA, <i>Hind</i> III	
LS78	GA <u>AAGATCT</u> GCCTGAGACAGCTGGTTT, <i>Bgl</i> II	
LS79	CGGGATCCGTGATCACTCCTGTCCTCCCCGT, <i>Bam</i> H I	Amplification of <i>sig5</i> ORF and its own promoter
LS80	GA <u>AAGATCT</u> GCCTGAGACAGCTGGTTT, <i>Bgl</i> II	
LS87	GGAATTCC <u>CATATG</u> GTGATCACTCCTGTCCTCCCC, <i>Nde</i> I	Amplification of <i>sig5</i> ORF for expression of His <sub>6</sub> -σ <sup>5</sup> in <i>E. coli</i>
LS88	CGGGATCCCTACGCGGCGACGGCGG, <i>Bam</i> H I	
LS52	ATGGTCGGGAACCTCCGCAA	Probe <i>aveA1p</i>
LS53	CTGTGTCCTCACCGCTAGGC	Probe <i>aveRp</i>
GJ105	GGTATTCCATTCGGTGTTC	
GJ106	TGTTATGAATTTGCCCTGGTG	Probe <i>hrdB</i>
GJ91	CCAAGGGCTACAAGTTCTCC	
GJ92	TTGATGACCTCGACCATGTG	Probe <i>SAV618p</i>
LS197	ACCAGTTCAGTAGTCGGACC	
LS198	ATAGGGCTCGGCAGTACGAC	Probe <i>SAV612p</i>
LS199	GGTGACAGTGCGGATGCGTA	
LS200	AGGCACGTCGGAGTATGAC	Probe <i>SAV614p</i>
LS201	CTGATGTCCTTCTCGGGTTG	
LS202	CGCCTGAGACAGCTGGTTTC	Probe <i>SAV615p</i>
LS203	ACATCAGTACGTGACCGAGG	
LS204	TGTGAAGACCCTGGCTGTGG	Probe <i>SAV610p</i>
LS213	GGGAGGACTGACGCGGAG	
LS214	TTTCGGAGCGGAGCCTTC	Probe <i>SAV609p</i>
LS215	TGGGCAGAACGCCTCCGGGC	
LS216	AGGTGCTCGTTGGTCACCAC	

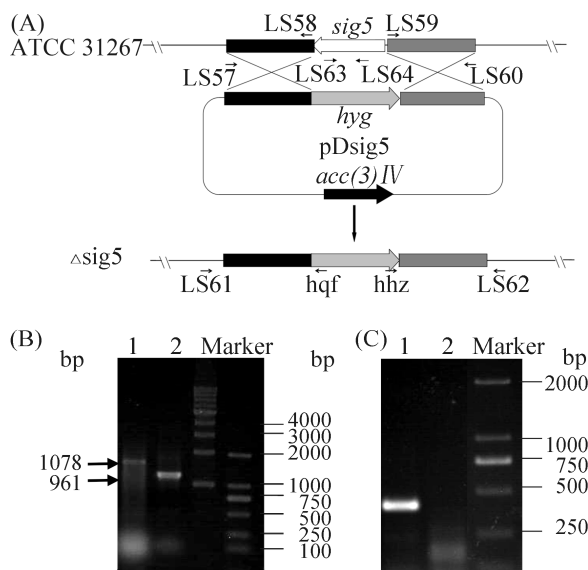


图 1. *sig5*基因缺失的同源双交换示意图(A)及缺失突变株的PCR验证(B, C)

Figure 1. Schematic method used for *sig5* deletion (A) and confirmation of *sig5* deletion by PCR analysis (B and C). A: Thick arrows: genes and their directions. Short arrows: the positions of primers used for cloning exchange regions and confirming gene deletion. Blocks: the homologous exchange regions used for *sig5* deletion. B: Lane 1: the 1.5 kb band was detected with primers LS61/hgf when genomic DNA of  $\Delta sig5$  was used as the template. Lane 2: the 1.2 kb band was detected with primers LS62/hhz when genomic DNA of  $\Delta sig5$  was used as the template. C: Lane 1: the 358 bp band was detected with primers LS63/LS64 when genomic DNA of wild-type ATCC31267 was used as the template. Lane 2: no band was detected with primers LS63/LS64 when genomic DNA of  $\Delta sig5$  was used as the template.

primer (6 mers, TaKaRa), 补RNase-free 超纯水至 12  $\mu$ L, 70  $^{\circ}$ C 变性10 min, 立即冰浴2 min, 加入4  $\mu$ L 5  $\times$  MLV-Buffer (Promega), 1.25  $\mu$ L dNTPs (10 mmol/L each), 1.25  $\mu$ L水, 0.5  $\mu$ L RNase Inhibitor, 1  $\mu$ L M-MLV RT (Promega)混匀。按程序30  $^{\circ}$ C 10 min, 42  $^{\circ}$ C 60 min, 70  $^{\circ}$ C 15 min进行反转录反应, 所得cDNA经PCR检测后用于qPCR。

实时荧光定量PCR反应体系中采用Roche公司的FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)荧

光染料, 在20  $\mu$ L体系中将cDNA模板、上下游引物及荧光染料混匀, 并用超纯水补足体系。qPCR实验使用Roche 480实时荧光定量PCR仪, 按设定程序(95  $^{\circ}$ C 10 min, 进入40个循环的 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s)进行。根据持家基因*hrdB*及目的基因 $C_t$ 值计算目的基因转录水平。

#### 1.4 重组蛋白His<sub>6</sub>- $\sigma^5$ 在*E. coli*中的表达及纯化

PCR扩增*sig5*基因从起始密码子至终止密码子下游146 bp处长800 bp的DNA片段连接于质粒pET28a(+)上, 得到 $\sigma^5$ 的表达载体并命名为pET28-*sig5*, 用于表达N-端带有His<sub>6</sub>标签的His<sub>6</sub>- $\sigma^5$ 重组蛋白。将pET28-*sig5*转化*E. coli* BL21 (DE3)中, 37  $^{\circ}$ C LB液体培养至 $OD_{600}$ 达到0.4–0.6, 加入0.4 mmol/L IPTG诱导, 16  $^{\circ}$ C继续培养过夜, 超声波破碎细胞, 上清液和沉淀经SDS-PAGE检测后发现大部分His<sub>6</sub>- $\sigma^5$ 存在于沉淀中。用含有8 mol/L尿素的Lysis buffer [20 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)]在室温下溶解包涵体并转移至8–14 kDa的透析袋中; 依次置于含6、4、2、1和0 mol/L尿素的Lysis buffer中4  $^{\circ}$ C下透析4 h; 最后置于Binding buffer [20 mmol/L HEPES (pH 7.6), 10 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mmol/L DTT, 0.2% Tween-20, 30 mmol/L KCl]中5 h, 离心收集上清。将可溶的His<sub>6</sub>- $\sigma^5$ 蛋白定量分装后置于–80  $^{\circ}$ C保存。

#### 1.5 $\sigma^5$ 蛋白多克隆抗体的制备

$\sigma^5$ 抗体由华大基因公司制备, ELISA检测效价为1:10000。

#### 1.6 染色质免疫共沉淀(ChIP assay)

将FM-II中发酵培养2天的阿维链霉菌菌体用1 mmol/L PMSF和1%甲醛室温交联20 min, 加入终浓度为125 mmol/L的甘氨酸终止交联, 抽滤后菌体在液氮中研磨成粉状, 每1 g菌体加入4 mL Lysis buffer, 轻轻混匀后冰上静置30 min, 对细胞裂解液进行超声破碎, 打断染色体DNA片段使之分布于500–1000 bp间。

阳性对照(+CK)的制备: 每1 mL上清中加入40  $\mu$ L 5 mol/L NaCl, 65 °C解交联5 h; 经酚/仿抽提乙醇沉淀后, 加入100  $\mu$ L TE溶解。

ChIP assay: 每500  $\mu$ L上清中加入30  $\mu$ L G蛋白Sepharose (GE Healthcare), 4 °C混匀1 h后, 4 °C 3000 r/min离心1 min, 取上清, 加入一定量的目的蛋白抗体作为样品(Sample), 阴性对照(-CK)中不加抗体或加免疫前血清, 4 °C混匀过夜; 在样品和阴性对照中各加80  $\mu$ L G蛋白, 4 °C混合4 h后, 4 °C、3000 r/min离心1 min, 弃上清; 然后按照下述顺序于4 °C洗涤G蛋白, 每次洗涤3 min, 4 °C、3000 r/min离心1 min后弃上清: High salt [50 mmol/L HEPES (pH 7.5), 500 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate, 1 mmol/L EDTA]洗涤1次, Low salt [50 mmol/L HEPES (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate, 1 mmol/L EDTA]洗涤1次, LNDET buffer [10 mmol/L Tris·Cl (pH 8.0), 250 mmol/L LiCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 1 mmol/L EDTA]洗涤1次, TE在4 °C和室温各洗涤1次; 最后用新鲜配制的Elution buffer (1% SDS, 0.1 mol/L  $\text{NaHCO}_3$ )室温洗脱2次, 每次加入Elution buffer 250  $\mu$ L, 洗脱20 min, 3000 r/min室温离心1 min后取上清, 获得500  $\mu$ L样品和阴性对照; 在上述得到的样品和阴性对照中加入30  $\mu$ L 5 mol/L NaCl, 65 °C解交联4 h; 经酚/仿抽提乙醇沉淀后, 加入50  $\mu$ L TE溶解; 在目的基因启动子区设计引物分别对阳性对照、样品和阴性对照进行PCR检测。

### 1.7 凝胶阻滞实验(EMSA)

EMSA所用探针采用地高辛标记, 探针的制备及实验过程均按照试剂盒(DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation, Roche)说明进行操作。

### 1.8 阿维菌素的摇瓶发酵及产量测定

发酵前先用稀释平板法分离出产孢丰富的阿维链霉菌单菌落转接于YMS培养基上, 28 °C培养7–10 d, 待长出丰富的灰色孢子后接种于50 mL/250 mL的种子培养基中, 28 °C摇床培养24 h, 按5%的接种量接种于50 mL/250 mL发酵培养基中, 摇床培养10 d, 放瓶测定。阿维菌素发酵单位的测定采用高压液相色谱(HPLC)法。

**1.8.1 样品处理:** 取1.0 mL发酵液, 加入4.0 mL甲醇, 浸泡30 min以上, 每隔10 min振荡1次, 离心, 取上清液进样分析。

**1.8.2 HPLC分析条件:** C18反相柱, 柱长150 mm, 柱内径4.6 mm; 柱温40 °C; 流动相为甲醇:水(90:10); 流速1.0 mL/min; 进样体积20  $\mu$ L; 检测波长为246 nm。

**1.8.3 标准品:** 阿维菌素B1标准品为齐鲁制药厂的产品, 含有97%的阿维菌素B1a和3%的阿维菌素B1b, 将其用甲醇配成200  $\mu$ g/mL的溶液。

## 2 结果和分析

### 2.1 *sig5*及其附近基因功能预测

*sig5*(*SAV614*)基因全长654 bp, 编码一个由217个氨基酸残基组成的ECF- $\sigma$ 因子(图2-A)。*sig5*的上游基因*SAV615*, *SAV616*和*SAV618*均编码分泌蛋白(secreted protein), *SAV617*编码阳离子转运P-型ATP酶。*sig5*的下游基因*SAV613*和*SAV612*编码未知功能的蛋白, *SAV611*基因编码 $\beta$ -羟化酶, *SAV610*基因编码MFS家族的转运蛋白, *SAV609*基因编码3-氧酰基ACP合成酶(3-oxoacyl-ACP synthase III), *SAV608*基因编码酰基载体蛋白, *SAV607*基因编码牛磺酸代谢酶(图2-B)。从各基因间隔区的距离和RT-PCR结果(未显示)可知, *sig5*-*SAV615*共转录形成一个操纵子, *SAV616*-*SAV617*-*SAV618*共转录组成另一个操纵子, *SAV607*-*SAV608*-*SAV609*-*SAV611*-*SAV612*共转录组成一个大的操纵子。

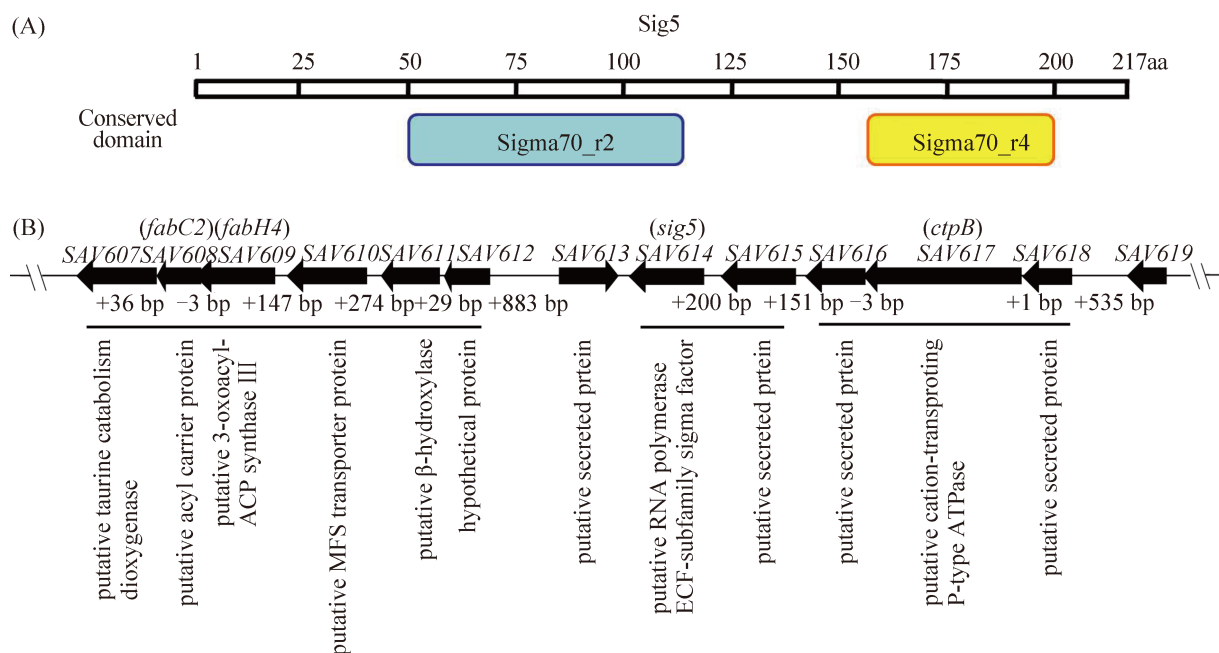


图 2.  $\sigma^5$  的保守结构域(A)及其基因在阿维链霉菌基因组中的位置(B)

Figure 2. Conserved domain of  $\sigma^5$  (A) and its gene locus in *S. avermitilis* genome (B). The three transcriptional units are indicated by black bars.

## 2.2 $\sigma^5$ 负调控阿维菌素的生物合成

为研究  $\sigma^5$  在阿维链霉菌中的功能, 首先构建了 *sig5* 基因的缺失突变株  $\Delta sig5$ 、回补菌株  $\Delta sig5/pSET152-sig5$  和过表达菌株 WT/pSET152-*ermp-sig5*。将这些菌株在发酵培养基 FM-I 中进行摇瓶发酵, 以野生型菌株 (WT) 作为对照, 发酵产物的 HPLC 分析结果显示:  $\Delta sig5$  中阿维菌素产量比野生型菌株提高了约 68%; 回补菌株阿维菌素产量基本恢复到野生型水平; 过表达菌株的阿维菌素产量降低至野生型菌株的 30% (图 3), 初步表明  $\sigma^5$  对阿维菌素的合成具有负调控作用。

在 YMS 和 MM 平板培养基上对野生型菌株、*sig5* 缺失突变株和回补菌株进行划线培养, 28 °C 培养 7 d 观察菌体的生长状态, 发现在菌体生长的各个阶段, 菌株间的生长分化无明显差异 (结果未显示), 表明在上述培养条件下 *sig5* 缺失不影响菌体的形态分化。

将野生型菌株、*sig5* 缺失突变株和回补菌株在可溶性发酵培养基 FM-II 中进行摇瓶发酵, 绘制

阿维菌素产量曲线 (图 4-A) 和生长曲线 (图 4-B)。结果显示, 在液体发酵培养期间, 菌株间的菌体干重无明显差异, 但缺失突变株  $\Delta sig5$  中的阿维菌素产量明显提高, 说明 *sig5* 缺失不影响菌体生长, 但可以促进阿维菌素的合成, 而且 *sig5* 缺失引起的阿维菌素产量上升不是通过促进菌体生长来实现的。

## 2.3 *sig5* 缺失影响 *ave* 基因及附近基因的转录水平

为分析 *sig5* 与阿维菌素合成相关基因间的调控关系, 利用 RT-qPCR 检测了  $\Delta sig5$  和野生型菌株中阿维菌素生物合成结构基因 *aveA1* 和途径特异性正调控基因 *aveR* 的转录水平。结果显示: 与野生型菌株相比,  $\Delta sig5$  中 *aveA1* 的表达量在发酵第 2 天和第 6 天都明显上调; *aveR* 在发酵第 2 天的表达量变化不明显, 在第 6 天表达量明显提高 (图 5)。  $\Delta sig5$  中 *aveA1*、*aveR* 的转录水平与阿维菌素产量水平是一致的, 表明  $\sigma^5$  在转录水平负调控阿维菌素的生物合成。

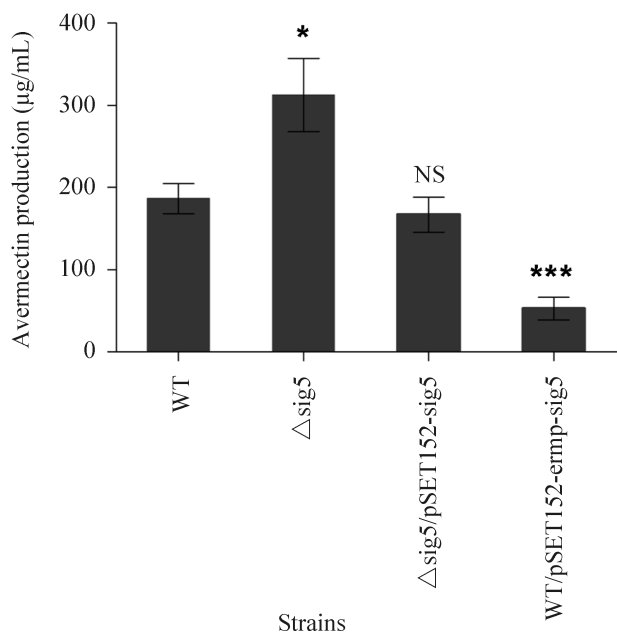


图 3. *sig5* 相关菌株阿维菌素产量比较

Figure 3. Comparison of avermectin production in various *S. avermitilis* strains. WT: wild-type strain ATCC31267. Δsig5: *sig5* deletion mutant. Δsig5/pSET152-sig5: *sig5*-complemented strain. WT/pSET152-erm-p-sig5: *sig5*-overexpressing strain. Error bars: standard deviations from three independent experiments. Statistical significance was analyzed by Student's *t* test. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ . NS: not significant.

接下来检测了 *sig5* 基因上游的 2 个操纵子 *sig5-SAV615* 和 *SAV616-SAV617-SAV618* 中第一个基因 *SAV615* 和 *SAV618* 在 Δsig5 中的转录水平变化。结果如图 5 所示, Δsig5 中 *SAV615* 在发酵第 2 天的表达量与野生型菌株相比无明显差异, 在第 6 天的表达量降低至野生型菌株的 30%; *SAV618* 在发酵第 2 天的表达量降低至野生型菌株的 70%, 在第 6 天的表达量与野生型菌株相比无明显差异, 暗示  $\sigma^5$  对 *SAV615*、*SAV618* 基因及其所在操纵子具有正调控作用。

*sig5* 下游基因组成的操纵子 *SAV607-SAV608-SAV609-SAV611-SAV612* 中含有 *nrps6* 基因簇, 可能参与未知次级代谢产物的合成。Δsig5 中这些基因在发酵第 2 天的转录水平比野生型菌株明显降

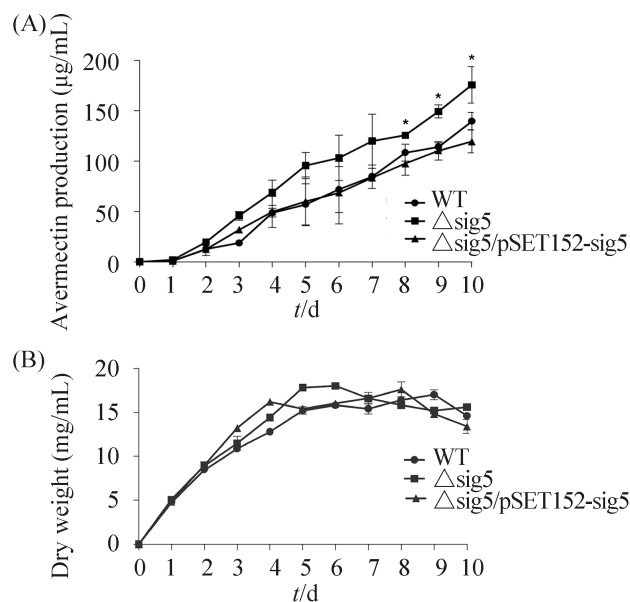


图 4. *sig5* 缺失对阿维菌素合成(A)和菌体生长(B)的影响

Figure 4. Effect of *sig5* deletion on avermectin production (A) and growth (B) of *S. avermitilis* grown in FM-II

低, 在第 6 天除了 *SAV612* 无明显差异外其它基因都比野生型菌株明显降低(图 5), 暗示  $\sigma^5$  正调控这些下游基因的表达。在野生型菌株和 Δsig5 中都没有检测到 *SAV613* 的转录, 可能该基因在发酵培养条件下不表达。

## 2.4 $\sigma^5$ 与 *sig5*、*SAV612*、*SAV615* 和 *SAV618* 启动子区结合

为寻找  $\sigma^5$  的靶基因, 在大肠杆菌中外源表达了 N-端带有 His<sub>6</sub> 标签的 His<sub>6</sub>- $\sigma^5$  重组蛋白, 并进行了体外 EMSA 实验。由于 His<sub>6</sub>- $\sigma^5$  主要以包涵体形式存在, 故将沉淀中的包涵体用 8 mol/L 尿素溶解, 通过梯度透析复性的方法得到部分可溶的 His<sub>6</sub>- $\sigma^5$  用于后续 EMSA 实验。

$\sigma^5$  负调控阿维菌素的合成, 它是否能够直接结合在 *ave* 基因的启动子区呢? 为此, 利用 EMSA 实验检测了复性后的可溶 His<sub>6</sub>- $\sigma^5$  蛋白与 *aveR* 和 *aveA1* 启动子区的结合情况, 结果如图 6 所示,



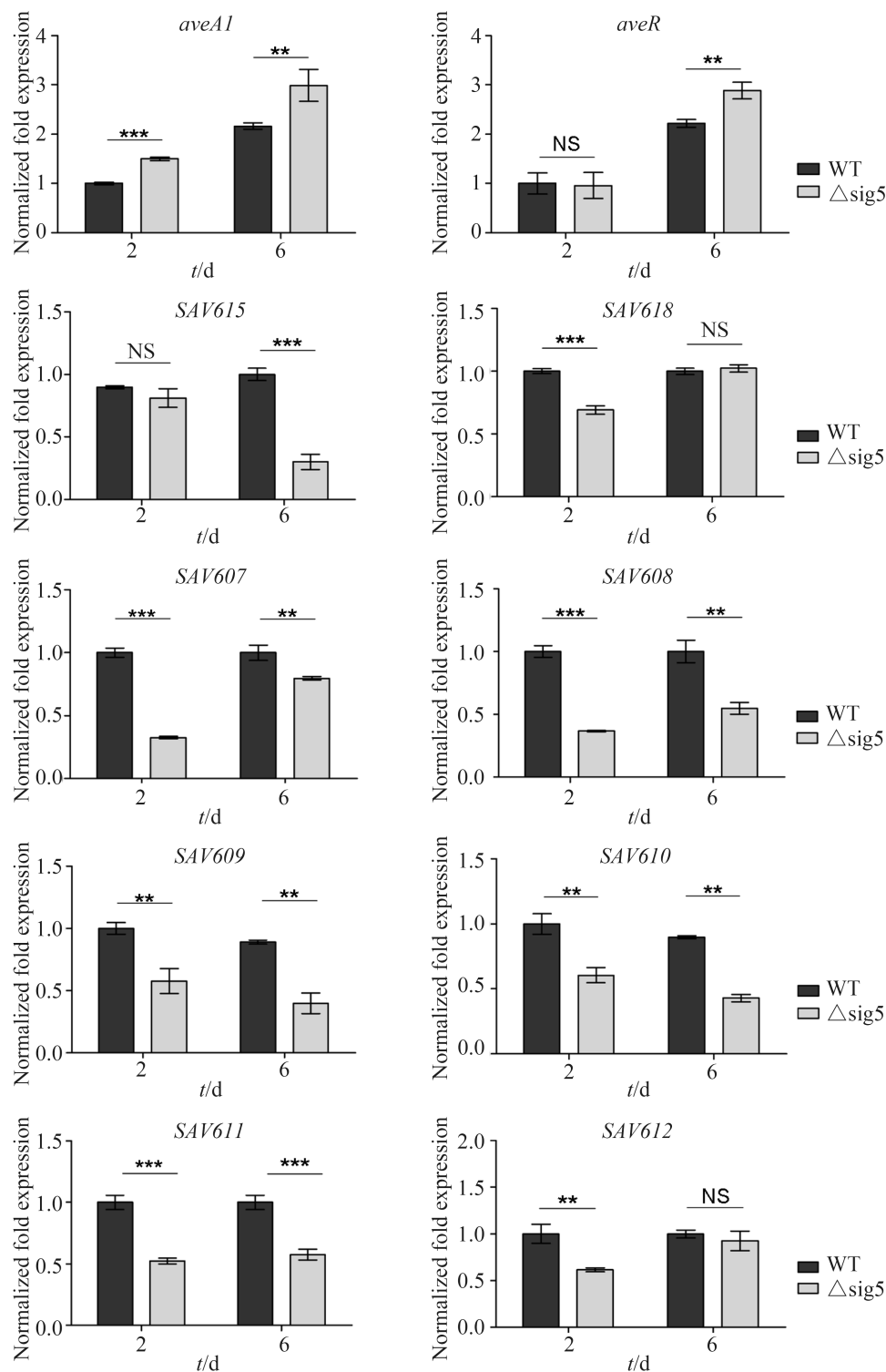


图 5. RT-qPCR分析 $\Delta sig5$ 和野生型菌株中 $sig5$ 相关基因的转录水平

Figure 5. Transcriptional analysis of  $sig5$  related genes by RT-qPCR. RNA samples were isolated from 2- and 6-day fermentation cultures in FM-I. Relative transcription levels were obtained after normalization against the level of transcription of the internal reference gene *hrdB* at specific time points.  $P$  values were determined by Student's  $t$  test. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ . Student's  $t$  test. NS: not significant.

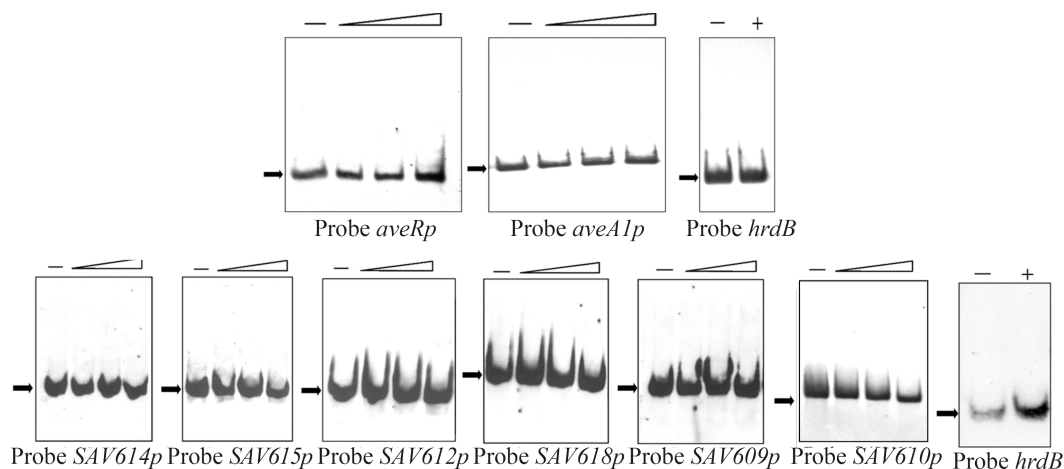


图 6. His<sub>6</sub>-σ<sup>5</sup>与*sig5*相关基因启动子区的体外EMSA实验

Figure 6. *In vitro* EMSAs of the interaction of His<sub>6</sub>-σ<sup>5</sup> with promoter regions of *sig5* related genes. Each lane contained 0.15 nmol/L labeled probe. Lane 1: free probe without protein (-). Lanes 2 to 4 contained 0.1, 0.5 and 1 μmol/L of His<sub>6</sub>-σ<sup>5</sup>, respectively. Labeled probe *hrdB* was used as a negative control. The concentration of His<sub>6</sub>-σ<sup>5</sup> used for control probe *hrdB* (+) was 1 μmol/L. Arrows: free probes.

His<sub>6</sub>-σ<sup>5</sup>不能与探针Probe *aveRp*和Probe *aveAlp*结合, 暗示σ<sup>5</sup>对阿维菌素合成的调控作用是间接的。

据文献报道, 一般ECF-σ因子可以结合自身基因的启动子从而起始自身的转录<sup>[28]</sup>, 那么σ<sup>5</sup>能否结合自身启动子呢? 虽然*sig5*和*SAV615*是共转录的, 但二者间隔200 bp, *sig5*可能有自己的启动子。因此, PCR扩增*sig5*和*SAV615*上游的DNA片段并分别标记为Probe *SAV614p*和Probe *SAV615p*进行EMSA实验, 结果表明, His<sub>6</sub>-σ<sup>5</sup>并不与这两个探针结合形成滞留条带(图6)。

RT-qPCR检测结果表明σ<sup>5</sup>与其上下游基因间存在调控关系, 那么σ<sup>5</sup>是否可以直接调控这些基因呢? 为此, PCR扩增这些基因可能的启动子区片段并标记为探针*SAV609p*、*SAV610p*、*SAV612p*、*SAV618p*。EMSA实验结果表明, His<sub>6</sub>-σ<sup>5</sup>不与上述任何探针结合形成滞后条带(图6)。

上述EMSA结果可能是由于σ<sup>5</sup>并不直接调控所检测基因的转录, 还可能是由于复性后的His<sub>6</sub>-σ<sup>5</sup>蛋白活性低导致的。为了排除蛋白活性低对EMSA实验结果的影响, 利用体内ChIP实验检测

了σ<sup>5</sup>与上述基因启动子区的结合情况。以细胞破碎后获得的总DNA为正对照(+)模板, 以经过抗原-抗体反应免疫沉淀下来的DNA为样品(S)模板, 以不加入抗体反应得到的DNA为负对照(-)模板, 利用EMSA实验中扩增探针所用的引物进行PCR扩增。结果如图7所示, 正对照模板扩增出大小正确的条带; 负对照模板几乎没有扩增出条带; 样品模板中*aveR*、*aveAl*、*SAV609*、*SAV610*的启动子区和作为对照的*hrdB*结构基因都不能扩增出条带, 而*SAV612*、*sig5*(*SAV614*)、*SAV615*和*SAV618*的启动子区都能扩增出条带, 表明σ<sup>5</sup>对阿维菌素合成的负调控作用是间接的, 同时暗示*sig5*的上游还有一个自身启动子, σ<sup>5</sup>可以结合在*SAV612*、*sig5*、*SAV615*和*SAV618*的启动子区, 起始这些基因及其所在操纵子中基因的转录。

## 2.5 σ<sup>5</sup>可能参与渗透胁迫反应

ECF-σ因子一般都参与响应环境胁迫反应, 那么σ<sup>5</sup>能参与哪些胁迫反应呢? 为此, 在YMS培养基中加入HCl(强酸)、NaOH(强碱)、NaCl(渗透压)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Diamide(巯基氧化剂)、和EDTA(金属离子螯合剂)等几种胁迫因子, 通过孢子悬液点接

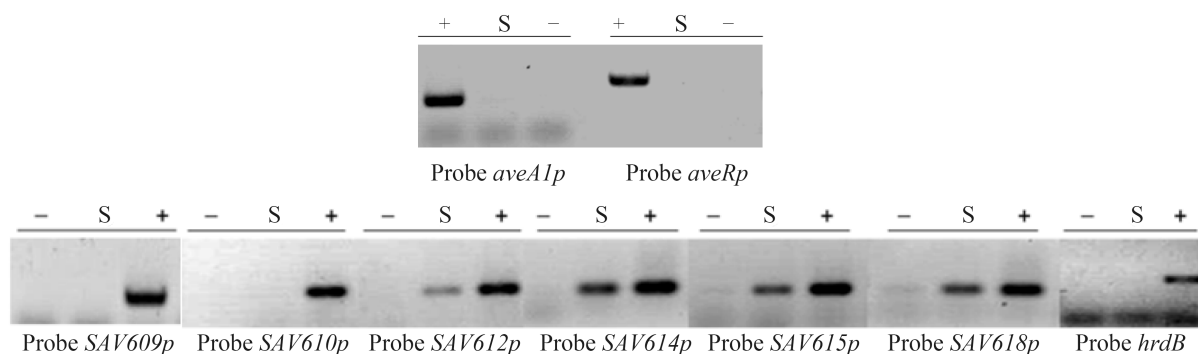
图 7.  $\sigma^5$ 与*sig5*相关基因启动子区的体内ChIP实验

Figure 7. *In vivo* ChIP assays of the interaction of  $\sigma^5$  with promoter regions of *sig5* related genes.

法检测野生型菌株、*sig5*缺失突变株和过表达菌株的表型差异。从图8上可以看到，*sig5*缺失突变株和野生型菌株在各种压力胁迫下的生长没有明显差异，但是在含有3.5% NaCl的YMS培养基上，*sig5*过表达菌株的生长受到明显抑制，暗示 $\sigma^5$ 可能参与响应渗透胁迫反应。推测 $\sigma^5$ 的靶基因中有负调控渗透胁迫相关基因的调控基因，或是 $\sigma^5$ 可与其它 $\sigma$ 因子竞争起始渗透胁迫基因的转录，但起始转录的效率没有其它 $\sigma$ 因子高。

### 3 讨论

通过对*sig5*基因缺失、回补和过表达菌株的

摇瓶发酵和RT-qPCR实验证实， $\sigma^5$ 在转录水平负调控阿维菌素的合成，但不影响菌体的生长和形态分化。 $\sigma$ 因子的作用是识别靶基因的启动子区从而起始相关基因的转录，由于它抑制*aveA1*和*aveR*基因的转录水平，暗示它对阿维菌素生物合成的调控作用是间接的，EMSA和ChIP实验也证实了这一点。推测 $\sigma^5$ 可能是通过起始未知调控基因的转录，再由未知基因直接或间接负调控阿维菌素生物合成途径特异性正调控基因*aveR*的表达。目前的研究报道除了持家 $\sigma^{hrdB}$ 能够识别并结合*aveR*启动子外<sup>[20]</sup>，还没有发现其它能够起始*aveR*转录的选择性 $\sigma$ 因子。本实验室新近报道PhoP通过与*aveR*启动子区附近的PHO box 结合，

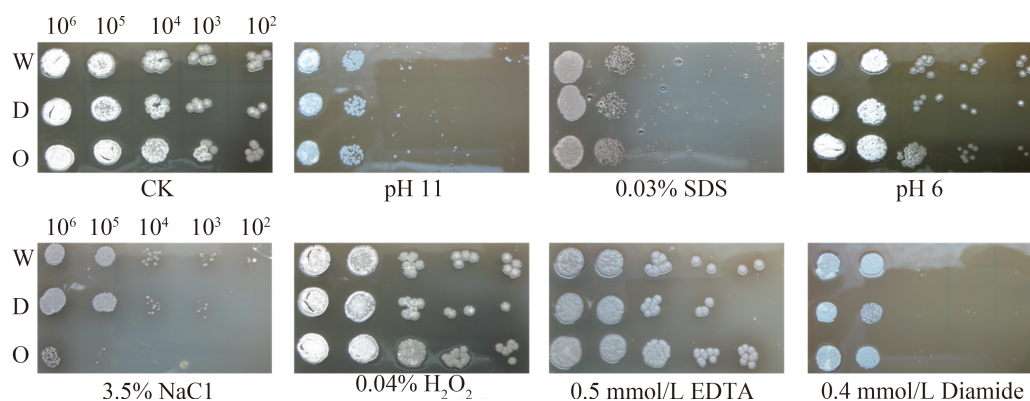
图 8. *sig5* 缺失突变株、过表达菌株和野生型菌株对不同压力胁迫的敏感性检测

Figure 8. Sensitivity of *sig5* deletion mutant (D), *sig5*-overexpressing (O) and wild-type (W) strains to various stress conditions. Serial dilutions of spores were dot-inoculated onto YMS plates containing HCl (pH 6), NaOH (pH 11), SDS (0.03%),  $H_2O_2$  (0.04%), EDTA (0.5 mmol/L), NaCl (3.5%) or Diamide (0.4 mmol/L) and incubated at 28 °C for 3 days.

直接负调控阿维菌素合成<sup>[19]</sup>。那么 $\sigma^5$ 是否可起始 *phop* 基因的转录呢? 还需进一步实验证实。

转录分析和ChIP实验证实 $\sigma^5$ 不仅能结合在自身基因的启动子区, 还能结合在附近的*SAV612*、*SAV615*和*SAV618*基因的启动子区, 直接正调控这些基因及所在操纵子的表达。*SAV612*、*SAV615*和*SAV618*均编码未知功能的蛋白, 它们与阿维菌素生物合成是否有关还有待进一步研究。*SAV612*所在操纵子*SAV607-SAV608-SAV609-SAV611-SAV612*含有*nrps6*基因簇, 该基因簇预测参与非核糖体肽类化合物的合成(<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>), 因此 $\sigma^5$ 可能还参与了其它次级代谢产物合成的调控。目前还没有对阿维链霉菌*nrps6*基因簇的研究报道, 对其合成的产物仍未知。

一般认为,  $\sigma$ 因子只有在与RNA聚合酶核心酶组装成RNA聚合酶全酶后, 才能识别基因的启动子, 而对于 $\sigma$ 因子是否可以独立地识别基因启动子, 目前的研究报道较少。Yeh等2011年发现在枯草芽孢杆菌中, 持家 $\sigma$ 因子 $\sigma^A$ 在没有RNA聚合酶核心酶时能够结合在靶基因的启动子上, 这表明 $\sigma$ 因子可以独立地识别基因启动子<sup>[29]</sup>。这一结果暗示细菌的转录过程可能存在两种方式: 一种是细胞中游离的 $\sigma$ 因子和RNA聚合酶核心酶先组装成全酶, 再通过 $\sigma$ 因子结合到基因启动子上起始基因转录; 另一种方式为 $\sigma$ 因子单独识别并结合在基因启动子上, 再招募RNA聚合酶核心酶组装成全酶起始基因转录。本实验室前期通过EMSA和体外转录实验证实可溶性的His<sub>6</sub>- $\sigma^{25}$ (也是通过尿素变性和梯度透析复性得到的)可以特异性地结合在自身基因启动子上, 起始自身基因的转录<sup>[17]</sup>, 支持了Yeh等的研究结果, 遗憾的是本研究中没能通过EMSA实验检测到His<sub>6</sub>- $\sigma^5$ 与靶基因启动子的结合。在大肠杆菌中异源表达His<sub>6</sub>- $\sigma^5$ 蛋白时发现, His<sub>6</sub>- $\sigma^5$ 主要以包涵体形式存在, 上清液中的可溶性蛋白含量很少, 不足以通过Ni柱纯化出足够量的蛋白用于后续EMSA实验, 因此, 通过对包涵

体进行尿素变性和梯度透析复性得到了部分可溶的His<sub>6</sub>- $\sigma^5$ 蛋白。但是透析复性后得到的可溶性His<sub>6</sub>- $\sigma^5$ 蛋白浓度非常低, 重复几次后依然无法得到浓度较高的His<sub>6</sub>- $\sigma^5$ 蛋白, 加上复性后的蛋白活性可能不高及单独的 $\sigma$ 因子与DNA的亲和力不强等原因, 始终没能在EMSA实验中检测到与DNA结合的滞后条带, 因此也没能进行后续的足迹实验和体外转录实验。蛋白质复性是一个比较复杂的过程, 复性效率除了与透析条件有关外, 还与蛋白质本身的性质有关, 例如蛋白质在复性时可能需要辅助因子(金属离子或者分子伴侣等)帮助, 或者蛋白本身的结构使其在复性过程中极易形成错误折叠的中间体, 因此可以在透析复性中尝试添加分子伴侣蛋白、氨基酸或者其它助溶剂等物质促进蛋白的复性, 减少蛋白的析出, 提高复性后蛋白的浓度和活性。

环境胁迫实验暗示 $\sigma^5$ 可能参与了渗透胁迫反应, 目前阿维链霉菌中还没有参与渗透胁迫反应基因的相关报道。 $\sigma^5$ 的靶基因*SAV612*、*SAV615*在天蓝色链霉菌、灰色链霉菌等中没有同源基因, *SAV618*在天蓝色链霉菌中的同源基因*SCO0861*也没有参与环境胁迫的报道, 因此,  $\sigma^5$ 是如何响应渗透胁迫反应的还有待于研究。此外, 在今后实验中还可以尝试通过ChIP-seq寻找确定 $\sigma^5$ 的靶基因, 揭示 $\sigma^5$ 的调控网络。

## 参考文献

- [1] Burg RW, Willer EE, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong YL, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Omura S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents, producing organisms and fermentation. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1979, 15(3): 361-367.
- [2] Egerton JR, Ostlind DA, Blair LS, Eary CH, Suhayda D, Cifelli S, Riek RF, Campbell WC. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the Bla component. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1979, 15(3): 372-378.

- [3] Ikeda H, Ōmura S. Avermectin biosynthesis. *Chemical Reviews*, 1997, 97(7): 2591-2610.
- [4] Ikeda H, Nonomiya T, Ōmura S. Organization of biosynthetic gene cluster for avermectin in *Streptomyces avermitilis*: analysis of enzymatic domains in four polyketide synthases. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2001, 27(3): 170-176.
- [5] Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, Ohta T, and Omura, S. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1999, 96(17): 9509-9514.
- [6] Sun P, Zhao Q, Yu F, Zhang H, Wu Z, Wang Y, Wang Y, Zhang Q, Liu W. Spiroketal formation and modification in avermectin biosynthesis involves a dual activity of AveC. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(4): 1540-1548.
- [7] Ōmura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2001, 98(21): 12215-12220.
- [8] Guo J, Zhao J, Li L, Chen Z, Wen Y, Li J. The pathway-specific regulator AveR from *Streptomyces avermitilis* positively regulates avermectin production while it negatively affects oligomycin biosynthesis. *Molecular Genetics and Genomics*, 2010, 283(2): 123-133.
- [9] Kitani S, Ikeda H, Sakamoto T, Noguchi S, Nihira T. Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(6): 1089-1096.
- [10] Chen L, Lu Y, Chen J, Zhang W, Shu D, Qin Z, Yang S, Jiang W. Characterization of a negative regulator AveI for avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* NRRL8165. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(2): 277-286.
- [11] Miyamoto KT, Kitani S, Komatsu M, Ikeda H, Nihira T. The autoregulator receptor homologue AvaR3 plays a regulatory role in antibiotic production, mycelial aggregation and colony development of *Streptomyces avermitilis*. *Microbiology*, 2011, 157(Pt 8): 2266-2275.
- [12] He F, Liu WS, Sun D, Luo S, Chen Z, Wen Y, Li JL. Engineering of the TetR family transcriptional regulator SAV151 and its target genes increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(1): 399-409.
- [13] Guo J, Zhang X, Luo S, He F, Chen Z, Wen Y, Li J. A novel TetR family transcriptional regulator, SAV576, negatively controls avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71330.
- [14] Guo J, Zhang X, Chen Z, Wen Y, Li J. Two adjacent and similar TetR family transcriptional regulator genes, SAV577 and SAV576, co-regulate avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99224.
- [15] Liu Y, Yan T, Jiang L, Wen Y, Song Y, Chen Z, Li J. Characterization of SAV7471, a TetR-family transcriptional regulator involved in the regulation of coenzyme A metabolism in *Streptomyces avermitilis*. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(19): 4365-4372.
- [16] Liu W, Zhang Q, Guo J, Chen Z, Li J, Wen Y. Increasing avermectin production in *Streptomyces avermitilis* by manipulating the expression of a novel TetR-family regulator and its target gene product. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(15): 5157-5173.
- [17] Luo S, Sun D, Zhu J, Chen Z, Wen Y, Li J. An extracytoplasmic function sigma factor,  $\sigma^{25}$ , differentially regulates avermectin and oligomycin in *Streptomyces avermitilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(16): 7097-7112.
- [18] Jiang L, Liu Y, Wang P, Wen Y, Song Y, Chen Z, Li J. Inactivation of the extracytoplasmic function sigma factor Sig6 stimulates avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(10): 1955-1961.
- [19] Yang R, Liu X, Wen Y, Song Y, Chen Z, Li J. The PhoP transcription factor negatively regulates avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(24): 10547-10557.
- [20] Zhuo Y, Zhang W, Chen D, Gao H, Tao J, Liu M, Gou Z, Zhou X, Ye B, Zhang Q, Zhang S, Zhang L. Reverse biological engineering of *hrdB* to enhance the production of avermectins in an industrial strain of *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2010, 107(25): 11250-11254.
- [21] Helmann JD. The extracytoplasmic function (ECF) sigma

- factors. *Advances in Microbial Physiology*, 2002, 46: 47-110.
- [22] MacNeil DJ, Klapko LM. Transformation of *Streptomyces avermitilis* by plasmid DNA. *Journal of Industrial Microbiology*, 1987, 2(4): 209-218.
- [23] Bierman M, Logan R, Obrien K, Seno ET, Rao RN, Schoner BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.. *Gene*, 1992, 116(1): 43-49.
- [24] Ikeda H, Kotaki H, Tanaka H, Omura S. Involvement of glucose catabolism in avermectin production by *Streptomyces avermitilis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1988, 32(2): 282-284.
- [25] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical *Streptomyces* genetics: a laboratory manual. Norwich, John Innes Foundation, 2000.
- [26] Chen Z, Wen J, Song Y, Wen Y, Li J. Enhancement and selective production of avermectin B by recombinants of *Streptomyces avermitilis* via intraspecific protoplast fusion. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(5): 616-622.
- [27] Zhao J, Wen Y, Chen Z, Song Y, Li J. An *adpA* homologue in *Streptomyces avermitilis* is involved in regulation of morphogenesis and melanogenesis. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(5): 623-630.
- [28] Mascher, T. Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF)  $\sigma$  factors. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(2): 148-155.
- [29] Yeh HY, Chen TC, Liou KM, Hsu HT, Chung KM, Hsu LL, Chang BY. The core-independent promoter-specific interaction of primary sigma factor. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(3): 913-925.

## ECF- $\sigma^5$ in *Streptomyces avermitilis* is involved in regulation of avermectin biosynthesis and stress response

Shuai Luo, Di Sun, Zhi Chen, Ying Wen\*

State Key Laboratory of Agro-Biotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** [Objective] We investigated the role of extracytoplasmic function (ECF)  $\sigma$  factor,  $\sigma^5$ , in avermectin biosynthesis, morphological differentiation and stress response in *S. avermitilis*. [Methods] We constructed *sig5* gene deletion, complementation and overexpression strains and determined the role of  $\sigma^5$  in avermectin production and morphological differentiation by shaking flask fermentation and morphological observation of these strains. We used RT-qPCR, EMSA and ChIP assays to identify the target genes of  $\sigma^5$ . We used stress tests to reveal the stress response that  $\sigma^5$  may be involved in. [Results] Determination of avermectin production and morphological observation in *sig5* related strains implied that  $\sigma^5$  inhibits avermectin production, but has no effect on growth or morphology. Deletion of *sig5* increased transcription levels of pathway-specific activator gene *aveR* and structural gene *aveA1*, but  $\sigma^5$  did not bind to the promoter regions of *aveR* and *aveA1*. RT-qPCR and ChIP assays showed that  $\sigma^5$  positively regulates the transcription of itself and adjacent genes by binding to the promoter regions of *sig5*, *SAV612*, *SAV615* and *SAV618*. Stress tests suggested that  $\sigma^5$  is involved in responding to osmotic stress. [Conclusion] Our findings indicated that  $\sigma^5$  indirectly inhibits avermectin production by affecting transcription of *ave* genes.

**Keywords:** *Streptomyces avermitilis*, avermectin, ECF- $\sigma$  factor,  $\sigma^5$

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31170045)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-62732715; Email: wen@cau.edu.cn

Received: 4 December 2015; Revised: 28 December 2015; Published online: 31 December 2015

actamicro@im.ac.cn