

## 链霉菌负调控因子突变筛选系统的构建

朱宇<sup>1,2</sup>, 冯迟<sup>1,2</sup>, 谭华荣<sup>1</sup>, 田宇清<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

<sup>2</sup> 中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:**【目的】构建用于阻遏链霉菌隐性次级代谢基因簇表达的负调控因子筛选的报告系统。【方法】通过“REDIRECT (Rapid Efficient Directed Recombination Time Saving)”技术结合链霉菌温和噬菌体  $\phi$ BT1 整合酶的体内位点特异性重组技术, 对链霉菌中多基因进行无痕敲除。以链霉菌隐性次级代谢基因簇中受阻遏的启动子驱动链霉菌中保守的 *inoA* 构建报告质粒, 针对阻遏次级代谢基因簇表达的负调控基因的突变进行检测, 以验证报告系统的可行性。【结果】本研究首先通过对天蓝色链霉菌的肌醇从头合成途径关键酶基因 *inoA*, 及合成黄色聚酮类隐性抗生素 (yellow cryptic polyketide, yCPK) 的途径特异性负调控基因 *scbR2* 依次进行了无痕敲除, 以构建进一步筛选所用的受体菌, 再以 *scbR2* 阻遏的 *cpkO* 启动子控制 *inoA* 的表达构建了报告质粒 pIJ8660::P<sub>*cpkO*</sub>::*inoA*。结果显示沉默的 *cpkO* 启动子在突变的受体菌中被激活并使 *inoA* 得到了表达, 可以使 *inoA* 的光秃型突变表型在不添加肌醇的培养基上恢复到产孢的野生型表型。【结论】*inoA* 可以作为新的链霉菌普遍适用的报告基因, 可方便地通过表型变化的观察进行筛选, 同时可针对性对负调控基因的突变进行检测, 可应用于链霉菌隐性抗生素激活的研究。

**关键词:** 链霉菌, *inoA*, 报告基因, 无痕敲除, 隐性基因簇

**中图分类号:** Q933      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 10-1031-12

链霉菌 (*Streptomyces*) 具有强大的合成次级代谢产物的能力, 多年来一直是人们筛选天然抗生素的主要对象。近年来, 随着微生物基因组测序的快速发展, 尤其是一些模式链霉菌基因组序列被测定<sup>[1]</sup>, 发现其中存在大量的未知其产物的沉默隐性基因簇, 如果能激活这些隐性基因簇的表达将是获得新型抗生素的一个很有希望的途径。

与传统的抗生素筛选策略相比, 通过基因组挖掘获得新抗的优势主要在于能推测次级代谢产物基因簇可能的生物合成途径, 避免与已知的抗生素重

复。如天蓝色链霉菌中黄色聚酮类隐性抗生素 (yellow cryptic polyketide, yCPK) 就是在基因组数据挖掘基础上发现的<sup>[2]</sup>。通过对调控基因进行遗传操作, 启动子改造, 基因簇异源表达等方法<sup>[3–4]</sup>使隐性基因簇激活, 获得具有生物活性的新型代谢产物, 这是摆脱目前抗生素筛选瓶颈的有力手段。但在实际操作中需要有一种较通用的检测手段来研究基因簇的表达, 因此报告系统的建立是必要的基础和条件。

由于链霉菌具有菌丝分化并形成孢子的特点, 其复杂的生理变化局限了很多报告基因的使用, 目

**基金项目:** 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划 (2013CB734001, 2009CB118905); 国家自然科学基金重点项目 (31030003)

\* 通信作者。Tel: +86-10-64807467; Fax: +86-10-64807461; E-mail: tianyq@im.ac.cn

**作者简介:** 朱宇 (1987–), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 主要从事微生物次级代谢合成调控研究。E-mail: zhuyu\_126@126.com

**收稿日期:** 2013-04-01; **修回日期:** 2013-05-10

前可使用的报告基因不多,如 20 世纪 80 年代和 90 年代发展的儿茶酚双加氧酶基因(*xylE*)<sup>[5]</sup>,荧光素酶编码基因(*luxAB*)<sup>[6]</sup>,卡那霉素抗性基因(*neo*)<sup>[7]</sup>,及绿色荧光蛋白基因(*EGFP*)<sup>[8]</sup>等,但这些报告基因在使用上都存在各自的局限性。近年来,发展了具有较高的可信度及产物关联性的 *neo-xylE* 双报告系统,用以通过诱变使抗生素激活因子高表达的筛选<sup>[9]</sup>。但在链霉菌隐性基因簇的激活中,相关基因表达量并不一定都很高,呈现微弱表达的现象是普遍存在的,这种情况下以抗生素抗性基因为报告基因进行初筛,抗性阈值的设定可能会较难以把握,而会产生漏筛现象。鉴于上述问题,根据我们前期的研究结果<sup>[10]</sup>,我们发现链霉菌中肌醇从头合成途径的第一步关键酶基因 *inoA* 是一个理论上较理想的可用于负调控基因突变筛选的报告基因,同时在隐性基因簇激活的研究中将有重要作用。

肌醇从头合成途径在原核生物中仅存在于放线菌中,在链霉菌中该途径的关键酶基因 *inoA* 具有很高的保守性,其蛋白的氨基酸序列一致性普遍在 93% 以上,核酸序列一致性也在 90% 以上,且在基因组上均没有冗余,说明以其作为报告基因在链霉菌中具有普适性;链霉菌 *inoA* 阻断突变株在基本培养基上呈基质菌丝的光秃型表型,而在培养基中添加肌醇可使突变株恢复气生菌丝生长及产孢,以该基因为报告基因,既可通过表型变化方便地观察 *inoA* 的表达情况,在遗传操作中也可通过体外添加肌醇像野生型菌株一样产孢,便于操作,说明其具有可性行和易操作性;又由于链霉菌在气生菌丝生长

及孢子形成阶段对肌醇的需求差异很大,即很低浓度的肌醇合成即可满足气生菌丝生长的需要,而孢子形成需要较高浓度的肌醇合成,气生菌丝与孢子形成都很容易在表型(白色和灰色)观察上与基质菌丝生长的光秃型表型(黄色或培养基的颜色)区分,说明以 *inoA* 作为链霉菌报告基因对低水平的表达也具有高的灵敏度<sup>[10]</sup>。本文以天蓝色链霉菌合成 yCPK 的隐性次级代谢物的基因簇为实例,以 *inoA* 为报告基因,通过基因阻断 yCPK 基因簇途径特异性负调控基因 *scbR2*,检测其阻遏的途径激活因子编码基因 *cpkO*(*kasO*)启动子的表达情况,来完成 *inoA* 作为链霉菌报告基因的实验验证。同时,由于需要对 *scbR2* 及 *inoA* 两个基因进行基因阻断以构建报告系统的受体菌,而链霉菌易用的抗性筛选标记有限,因此我们在链霉菌基因阻断常用的“REDIRECT (Rapid Efficient Directed Recombination Time Saving)”方法(PCR targeting 法)的基础上<sup>[11]</sup>,结合温和噬菌体  $\phi$ BT1 整合酶的体内位点特异性重组的特点<sup>[12]</sup>,方便快速地构建了双基因的无痕敲除株。本文报道这一完整报告系统的构建及检测结果,证实了 *inoA* 可作为链霉菌中一个新的报告基因使用,同时可用于检测隐性基因簇的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:表 1 为本文所用的大肠杆菌及链霉菌菌株。

表 1. 菌株  
Table 1. Strains

Strains	Relevant characteristics	Source or reference
<i>Escherichia coli</i>		
Top10	F- mcrA $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
ET12567	<i>dam</i> <i>dcm</i> <i>hsdS</i> <i>cat</i> <i>tet</i>	[13]
BW25113	K-12 derivative; $\Delta$ <i>araBAD</i> $\Delta$ <i>rhaBAD</i>	[14]
<i>Streptomyces</i>		
<i>S. coelicolor</i> M145	Wild type, SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup>	[15]
$\Delta$ <i>inoA</i>	<i>inoA</i> :: <i>aadA</i>	This work
$\Delta$ <i>inoA</i> <sup>*</sup>	$\Delta$ <i>inoA</i> : nt 1 – 984 replaced with <i>attL</i> sequence	This work
$\Delta$ <i>inoA</i> <sup>*</sup> / $\Delta$ <i>scbR2</i>	$\Delta$ <i>inoA</i> <sup>*</sup> , <i>scbR2</i> :: <i>aadA</i>	This work
$\Delta$ <i>inoA</i> <sup>*</sup> / $\Delta$ <i>scbR2</i> <sup>*</sup>	$\Delta$ <i>inoA</i> , $\Delta$ <i>scbR2</i> : nt 1 – 984 of <i>inoA</i> and 60 – 608 of <i>scbR2</i> replaced with <i>attL</i> sequence	This work
$\Delta$ <i>inoA</i> <sup>*</sup> / $\Delta$ <i>scbR2</i> <sup>*</sup> /pIJ8660::P <sub><i>cpkO</i></sub> :: <i>inoA</i>	$\Delta$ <i>inoA</i> <sup>*</sup> / $\Delta$ <i>scbR2</i> <sup>*</sup> with reporter plasmid pIJ8660::P <sub><i>cpkO</i></sub> :: <i>inoA</i>	This work

\* marker-free disruption mutant.

**1.1.2 培养基和培养条件:**链霉菌培养过程中所用的培养基详见操作手册<sup>[15]</sup>,天蓝色链霉菌 M145 及其衍生菌株均在 30℃ 进行培养。所用培养基为 MS 固体培养基、以甘露醇(终浓度 0.5%)为碳源的 MM 固体培养基以及 R2 固体培养基,如需提取链霉

菌基因组 DNA 则使用 YEME(含 34% 蔗糖)液体培养基培养。对 *inoA* 阻断突变株进行传代培养并收集孢子时,培养基需添加有终浓度为 1mmol/L 的肌醇,进行表型筛选时,培养基中不添加肌醇。

**1.1.3 质粒:**表 2 为本研究中所涉及的质粒。

表 2. 质粒  
Table 2. Plasmids

Plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
pUZ8002	<i>tra</i> , <i>neo</i> , RP4	[13]
pIJ8660	<i>aac</i> (3) <i>IV</i> , <i>int</i> - $\phi$ C31, <i>oriT</i> , <i>attP</i> - $\phi$ C31	[15]
pKC1139	<i>ori</i> -pSG5, <i>aac</i> (3) <i>IV</i> , <i>oriT</i>	[15]
pIJ790	$\lambda$ -RED ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ), <i>cat</i> , <i>araC</i> , <i>rep101</i> <sup>ts</sup>	[14]
pIJ778	<i>aadA</i> , <i>oriT</i> , <i>amp</i>	[14]
pIJ10500	<i>hyg</i> , <i>int</i> - $\phi$ BT1, <i>oriT</i> , <i>attP</i> - $\phi$ BT1	[12]
StH24 <sup>*</sup>	<i>S. coelicolor</i> cosmid containing <i>inoA</i> , <i>bla</i> , <i>neo</i>	[16]
StH24- <i>inoADM</i>	<i>inoA</i> replaced with <i>aadA</i> cassette by PCR targeting, <i>bla</i> , <i>neo</i> , <i>aadA</i> , <i>oriT</i> , <i>attB</i> <sub>13</sub> - $\phi$ BT1, <i>attP</i> <sub>13</sub> - $\phi$ BT1	This work
Sco13A3 <sup>#</sup>	<i>S. coelicolor</i> cosmid inserted with DNA fragment from nt 6933655 to 6967529 of genome sequence, containing <i>scbR2</i> , <i>bla</i> , <i>neo</i>	This work
Sco13A3- <i>scbR2DM</i>	<i>scbR2</i> replaced with <i>aadA</i> cassette by PCR targeting, <i>bla</i> , <i>neo</i> , <i>aadA</i> , <i>oriT</i> , <i>attB</i> <sub>6</sub> - $\phi$ BT1, <i>attP</i> <sub>6</sub> - $\phi$ BT1	This work
pKC1139:: <i>P</i> <sub><i>tcp830</i></sub> :: $\phi$ BT1- <i>int</i>	pKC1139 containing $\phi$ BT1 integrase gene controlled by the <i>tcp830</i> promoter, <i>aac</i> (3) <i>IV</i> , <i>oriT</i> , <i>ori</i> -pSG5	This work
pKC1139:: $\phi$ BT1- <i>int</i>	pKC1139 containing $\phi$ BT1 integrase gene with its own promoter, <i>aac</i> (3) <i>IV</i> , <i>oriT</i> , <i>ori</i> -pSG5	This work
pIJ8660:: <i>P</i> <sub><i>cpkO</i></sub> :: <i>inoA</i>	pIJ8660 containing the ORF of <i>inoA</i> controlled by the promoter of <i>cpkO</i> , <i>aac</i> (3) <i>IV</i> , <i>int</i> - $\phi$ C31, <i>attP</i> - $\phi$ C31, <i>oriT</i>	This work

<sup>\*</sup> StH24 was provided by Professor Keith Chater. <sup>#</sup> Sco13A3 was screened from a cosmid library, which was provided by Professor Gang Liu.

**1.1.4 引物:**表 3 为本实验中所使用的引物。

**1.1.5 主要试剂:**本实验中所使用的限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司,PCR 使用的高保真 KOD-plus DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司,*Taq* DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司,T4 多聚核苷酸激酶购自 New England Biolabs 公司,T4 DNA 连接酶购自 Thermo 公司,引物合成及测序均由上海 Invitrogen 生物公司完成。

**1.2 PCR 及 DNA 操作**

PCR 过程同标准流程相似,由于链霉菌基因组 GC 含量较高,需要在 PCR 体系中添加终浓度为 5% 的 DMSO(可根据扩增片段的 GC 含量做适当调整),PCR 所得到的 DNA 片段克隆后均经测序验证。DNA 相关操作如纯化、连接、限制性内切酶分析、琼脂糖电泳以及大肠杆菌(*Escherichia coli*)的转化过程参见分子克隆实验指南<sup>[17]</sup>。链霉菌基因组的提取过程详见操作手册<sup>[15]</sup>。

**1.3 辅助载体的构建**

以质粒 pIJ10500 为模板(Chris den-Hengst 教授馈赠),使用引物组 BT1-s-in/ BT1-s-out/BT1-as 来扩增片段 *P*<sub>*tcp830*</sub>:: $\phi$ BT1-*int*(*tcp830* 启动子控制  $\phi$ BT1 整合酶转录,重叠的引物 BT1-s-in/ BT1-s-out 包含了 *tcp830* 启动子的全序列);使用引物对 BT-1-all-s/ BT-1-all-as 来扩增片段  $\phi$ BT1-*int*(带  $\phi$ BT1 整合酶自身启动子,组成型表达),两片段均经过 *Hind* III 酶切,所得到的两片段分别同 *EcoR* V/*Hind* III 双酶切的 pKC1139 进行连接,然后转化 *E. coli* Top10,经转化子验证,即得到辅助载体 pKC1139::*P*<sub>*tcp830*</sub>:: $\phi$ BT1-*int* 和 pKC1139:: $\phi$ BT1-*int*。

**1.4 *inoA* 报告质粒的构建**

以天蓝色链霉菌 M145 基因组为模板,使用引物对 P6280-s/P6280-as 来扩增 *cpkO* 启动子片段 *P*<sub>*cpkO*</sub>,引物对 3899ORF-s/3899ORF-as 用来扩增 *inoA* 基因编码区片段(*inoA* ORF),其中引物 P6280-as 及

表 3. 引物  
Table 3. Primers

Primers	Sequences (5'→3')
FRT-5	ATTCCGGGGATCCGTCGACC
FRT-6	TGTAGGCTGGAGCTGCTTC
LCR-2	GCCCAGTCAGGGCCTCACTCGTACACACAGGGAGCAACCGGACCAGGTTTTTGACGAAA
LCR-3	CAGATCCAGATGATCCAGCATTCCGGGGATCCGTCGACC
LCR-4	GCTCGACGGATCCCCGGAAT
LCR-5	GCTGGATCATCTGGATCTGTTTCGTCAAAAACCTGGTC
LCR-6	CGGTTGCTCCCTGTGTGTACGAGTGAGGCCCTGACTGGGC
LCR-8	GATGCCGCGGTCCTTGCGCATCTTTGCTGAGTAGTTTCCCATGGAT
LCR-9	CTGTGTCCAGAGACAACAACCCAGCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
LCR-10	GAAGCAGCTCCAGCCTACATG
LCR-11	CTGGGTTGTGTCTCTGGACACAGATCCATGGGAACTACTCAGCAAAGATC
LCR-12	GCCAAGGACCGCGGCATCGCGGGCCCGATCCTGTCC
inoAF	GCCCAGTCAGGGCCTCACTC
inoAR/LCR-7	GGACAGGATCGGGCCGCC
FF1	GCACGTACGCGTCGAGCT
FF2	CTGATTCTCTCCGCCGCCGAGCCAGGTTTTTGACGAA
FF3	ACTGATCCAGATGATCCAGCATTCCGGGGATCCGTCGACC
FR1	GCTCGACGGATCCCCGGA
FR2	ATGCTGGATCATCTGGATCAGTTTCGTCAAAAACCTGGCTC
FR3	GGCGCGGAGAGAATCAGAGCTCGACGCGTACGTGC
RF1	CACCAGCGCGGACCCGCC
RF2	ACAACGCCGCCCGGGGCACTGGTTGCTGAGTAGTTTCCCATGGA
RF3	TCAGTGTCAGAGACAACAACCCAGCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
RR1	GAAGCAGCTCCAGCCTACATGC
RR2	TGGGTTGTGTCTCTGGACACTGATCCATGGGAACTACTCAGCAACCAG
RR3	TGCCCCGGCGCGCTTGTGCCGGGTCCGCGCTGGTG
BT1 -s-in	CCCTATCACTGATAGAGATATCTGATCAGGAGGACCCCAATGTCGCCCTTCATCGCTCC
BT1 -s-out	TGCTGTTGGCTACTCTATCATTTGATAGTGGTAGGATCCCTATCACTGATAGAGATATCT
BT1 -as	CCCAAGCTTTACAGCGCCGCAAGCTCCC (Hind III)
BT-1 -all-s	CCCAAGCTTTGCGGAAAAAGGATGGATAT (Hind III)
BT-1 -all-as	GAAGGAACTACTAGTTAGCCTAACT
sco3900ORF-s	ATGAGCCGGAGATCCGGCAT
3899ORF-s	ATGGGTTCGGTTCGCGTAGC
3899ORF-as	TCAGCGCTCGACCTCACCCG
6286IFproof-s	CCGCGACCTCGTGCGCGT
6286IFproof-as	GCGAGGAACGCTCCCGCG
P6280-s	AAGGAAAAAAGCGCCGCGTGAACACGCTGCGGTTTCGAG (Not I)
P6280-as	AACTCCCCCAGTCTGCACG

3899ORF-s 均在扩增前使用 T4 多核苷酸激酶进行磷酸化修饰。*inoA* ORF、*Not* I 酶切后的 P<sub>*cpkO*</sub> 以及 *Eco*R V/*Not* I 双酶切后的 pIJ8660 经 T4 DNA 连接酶连接后转化 *E. coli* Top10,经转化子验证,得到正确的报告质粒 pIJ8660::*P<sub>cpkO</sub>*::*inoA*。

1.5 天蓝色链霉菌的接合转移

天蓝色链霉菌接合转移见操作手册<sup>[15]</sup>, 由于 *inoA* 基因负责肌醇从头合成,是链霉菌正常生长与分化的必需基因,其阻断导致突变株不能在无肌醇添加的培养基中正常生长及分化产孢,所以在进行 *inoA* 基因阻断的接合转移过程中需向培养基中添加

终浓度为 10mmol/L 的肌醇。经验证获得了正确的 *inoA* 阻断突变株后,对该菌株进行后续传代等操作时,肌醇浓度可降低至 1mmol/L<sup>[10]</sup>。

2 结果

2.1 基因阻断考斯质粒的构建

用于 *inoA* 基因阻断的考斯质粒 (cosmid) 的构建按照 PCR targeting 系统操作 (Bertolt Gust 博士馈赠) 说明进行<sup>[18]</sup>。*inoA* 阻断基因盒的获得与操作说明中的标准步骤不同,具体操作如下: 首先以

pIJ778 为模板,用 FRT-5/FRT-6 引物对扩增 *aadA-oriT* 作为突变筛选标记;以彼此相互重叠的 LCR-2/LCR-3/LCR-4/LCR-5/LCR-6 和 LCR-7/LCR-8/LCR-9/LCR-10/LCR-11/LCR-12 两组引物通过连接酶链式反应 (Ligase Chain Reaction, LCR) <sup>[19-20]</sup> 分别合成 *aadA-oriT* 的两个侧翼序列,其中左臂为 98 bp,包括 5'-端 42 bp 的 *inoA* 上游同源臂,中间 36 bp 的 *attB*<sub>13</sub> 位点序列<sup>[21]</sup> 及 3'-端 20 bp 与 *aadA-oriT* 片段 5'-末端配对序列;右臂为 109 bp,包括 5'-端 42 bp 的 *inoA* 下游同源臂,中间 48 bp 的

*attP*<sub>13</sub> 位点序列<sup>[21]</sup> 及 3'-端 19 bp 与 *aadA* 片段 3'-末端配对序列;接下来将相互重叠的左臂、*aadA-oriT* 及右臂 DNA 片段混合作为模板,通过彼此搭桥,并用两侧引物 *inoAF/inoAR* 扩增出全长的用于 PCR targeting 阻断 *inoA* 的基因盒 (gene disruption cassette) (图 1-A, 1-B);最后以该基因盒通过电转化转入含有 pIJ790 及 StH24 并经过诱导产 IRED 重组酶系的 BW25113 菌株,对 *inoA* 目的基因进行打靶,获得了用于基因阻断用的 StH24-*inoADM* 质粒 (图 1-C)。

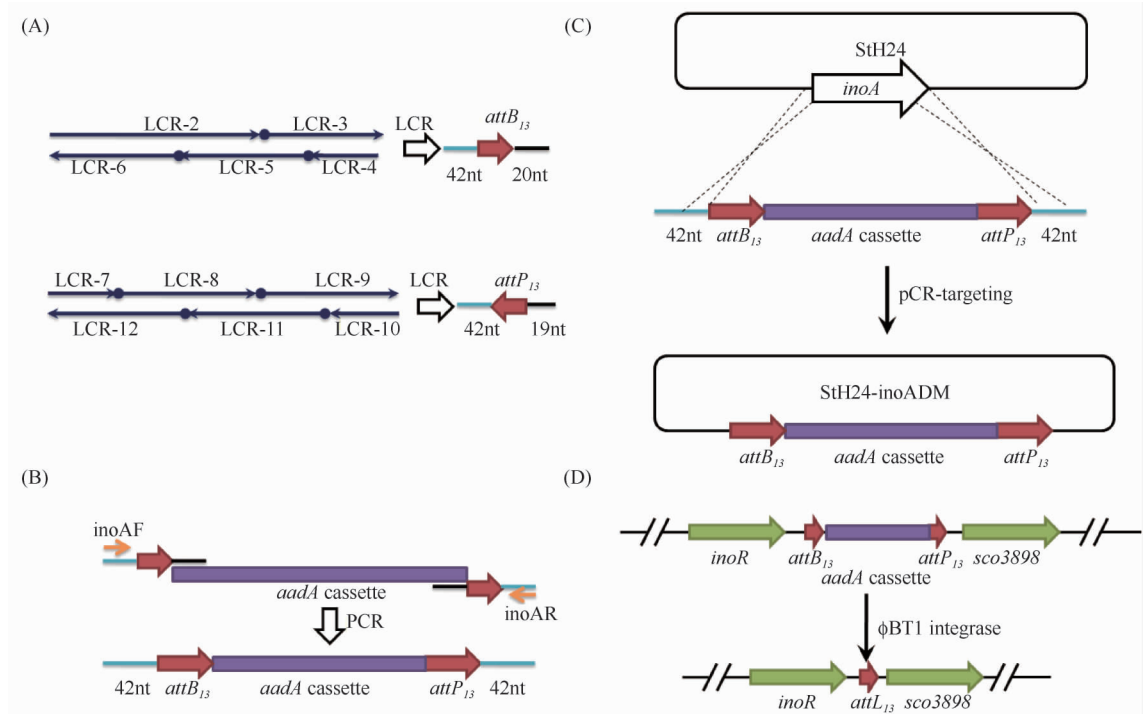


图 1. *inoA* 阻断基因盒的获得及 *inoA* 无痕敲除策略

Figure 1. Generation of *inoA* disruption cassette and the strategy of marker-free mutagenesis for *inoA*. A: Synthesis of long primer pair for amplification of disruption cassette by LCR, the dot at the end of each primer means 5' phosphorylation. B: PCR amplification of *inoA* disruption cassette. C: Construction of StH24-*inoADM*. D: Remove of the marker *in vivo*.

用于 *scbR2* 基因阻断考斯质粒的构建原理同上:其中左臂 95 bp,带有 *attB*<sub>6</sub> 位点序列<sup>[21]</sup>,以 FF1/FF2/FF3/FR1/FR2/FR3 引物组经 LCR 合成,右臂 106 bp,带有 *attP*<sub>6</sub> 位点序列<sup>[21]</sup>,由 RF1/RF2/RF3/RR1/RR2/RR3 引物组经 LCR 合成。最后带有 *aadA* 的基因盒由 FF1/RF1 引物对进行 PCR 搭桥扩增获得。由于 *scbR2* 位于原天蓝色链霉菌考斯质粒 St1G7 的边缘,不便进行双交换基因敲除,因此我们重新筛选了天蓝色链霉菌的考斯文库并获得了 Sco13A3 考斯质粒,用以进行 PCR targeting,得到了

可用于 *scbR2* 基因阻断的 Sco13A3-*scbR2DM* 质粒。

## 2.2 *inoA* 的无痕敲除

将 StH24-*inoADM* 考斯质粒转入大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 菌株中,再通过接合转移转入天蓝色链霉菌 M145 中,通过考斯质粒上 *inoA* 两侧序列与染色体上同源序列发生高频率双交换。通过抗性筛选,得到链霉素/壮观霉素抗性、卡那霉素敏感的双交换 (double crossover) 破坏菌株,即 *inoA* 基因的有抗敲除株  $\Delta$ *inoA*,并经 PCR 进行了验证。

为了获得 *inoA* 的无痕敲除株 (marker-free

disruption mutant),为下一步进行双基因敲除及后续的遗传操作奠定基础,我们尝试了利用  $\phi$ BT1 整合酶基因( $\phi$ BT1-*int*)在体内进行位点特异性重组以切除 *aadA* 抗性筛选标记。为防止与链霉菌染色体上含有的天然  $\phi$ BT1 整合酶识别位点 *attB* 发生错误重组,我们根据 Gregory 等报道的 *attB* 及 *attP* 位点以中心两核苷酸(野生型为 GT)为对称发生重组交换<sup>[12]</sup>,及 Zhang 等报道的中心两核苷酸为可变区,其序列一致的位点重组频率高,而不一致的位点重组频率低的特点<sup>[21]</sup>,选用 *attB*<sub>13</sub>/*attP*<sub>13</sub> 一对识别位点(中心两核苷酸改变为 CA<sup>[21]</sup>)置于 *aadA* 筛选标记两侧以保证重组发生在彼此之间,而不会与野生型菌株染色体上的位点重组。

将构建好的辅助载体 pKC1139::P<sub>tcp830</sub>:: $\phi$ BT1-*int*(图 2-A)转化大肠杆菌 ET12567/pUZ8002,再经过接合转移转入  $\Delta$ inoA 中,获得的菌株在含有终浓

度为2 mg/mL脱水四环素(anhydrotetracycline, aTc)的培养基上生长并诱导<sup>[22]</sup>使其中的  $\phi$ BT1 整合酶得以表达,介导 *attB*<sub>13</sub>和 *attP*<sub>13</sub>间的体内位点特异性重组<sup>[12,21]</sup>得到 *inoA* 基因的无痕敲除株  $\Delta$ inoA\* (图 1-D)。我们通过设计,使重组后残留的位点均为 *attL*,从而避免了多基因突变时发生 *attL* 与 *attR* 之间再重组的现象,这样  $\phi$ BT1 整合酶与 PCR targeting 结合理论上可以方便地进行无限制的多基因无痕敲除。 $\Delta$ inoA\* 在培养 12 h 后,将其置于 39℃ 继续培养使辅助载体丢失,从而可以在该菌株中进行 *scbR2* 的无痕敲除。该辅助载体引导的重组率有赖于脱水四环素的诱导强度,本实验经随机挑选克隆进行验证,获得的正确重组切除 *aadA* 效率约为 50%。所得到的 *inoA* 基因突变株在无肌醇添加的基本培养基上表现为光秃型表型,而培养基中添加肌醇后能够恢复产气生菌丝并产成熟孢子的能力(图 3)。

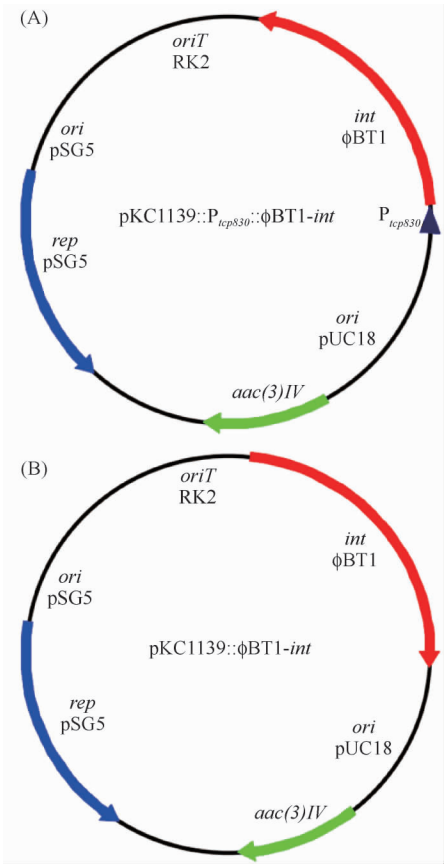


图 2. 辅助载体的构建

Figure 2. Construction of helper plasmids. A: pKC1139::P<sub>tcp830</sub>:: $\phi$ BT1-*int*, the expression of  $\phi$ BT1 integrase is induced by anhydrotetracycline (aTc); B: pKC1139:: $\phi$ BT1-*int* in which  $\phi$ BT1 integrase is constitutively expressed.



图 3. 菌株  $\Delta$ inoA、 $\Delta$ inoA\* 的表型分析

Figure 3. The phenotypic observation of  $\Delta$ inoA and  $\Delta$ inoA\* on MM medium with (Down) or without (Up) inositol. a/c: *S. coelicolor* M145; b:  $\Delta$ inoA; d:  $\Delta$ inoA\*.



2.3 *inoA* 和 *scbR2* 双基因的无痕敲除

以构建的  $\Delta inoA^*$  突变株为出发菌株, 进一步进行 *scbR2* 的无痕敲除实验, 其策略与 *inoA* 的敲除策略相似, 我们选用 *attB<sub>6</sub>*/*attP<sub>6</sub>* 一对识别位点 (中心两核苷酸改变为 CT<sup>[21]</sup>) 置于 *aadA-oriT* 选择标记两侧。在无痕敲除过程中重新构建了带有  $\phi BT1-int$  自身启动子的辅助载体 pKC1139:: $\phi BT1-int$  (图 2-B), 由于整合酶为组成型表达, 其正确重组切除 *aadA* 效率在本实验随机挑选克隆验证中为 100%。所得到的突变株表型如图 4 所示, 该突变株中 ScbR2 蛋白对 *kasO* (*sco6280*) 基因的抑制被解除, 使得 *cpk* 基因簇得以表达, 在没有添加肌醇的培养基上呈光秃型表型的同时, 可以观察到黄色次级代谢产物的合成, 与以往文献报道的结果一致<sup>[23-24]</sup>。

2.4 突变株的验证

本文中所涉及的突变株均进行了总 DNA 提取及 PCR 验证, 如图 5 所示。*inoA* 基因的敲除株用引物对 (*sco3900ORF-s*/*3899ORF-as*) 来验证, 扩增片段长度如下: 天蓝色链霉菌 M145 为 1805 bp,  $\Delta inoA$  为 2359 bp,  $\Delta inoA^*$  为 905 bp (图 5-A), 均与理论计算

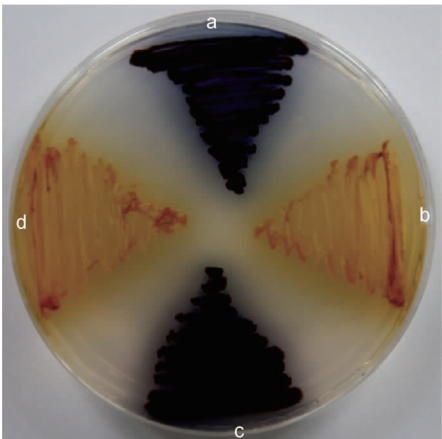


图 4. 菌株  $\Delta inoA^*/\Delta scbR2^*$  在 R2 培养基上的表型分析  
Figure 4. The phenotypic observation of  $\Delta inoA^*/\Delta scbR2^*$  strain grown on R2 medium. a/c: *S. coelicolor* M145; b/d:  $\Delta inoA^*/\Delta scbR2^*$ .

相符。*scbR2* 基因的敲除株用引物对 (6286IFproof-s/*6286IFproof-as*) 来验证, 扩增片段长度如下: 天蓝色链霉菌 M145 为 1227 bp,  $\Delta inoA^*/\Delta scbR2$  为 2177 bp,  $\Delta inoA^*/\Delta scbR2^*$  为 723 bp (图 5-B), 也与理论值相符。

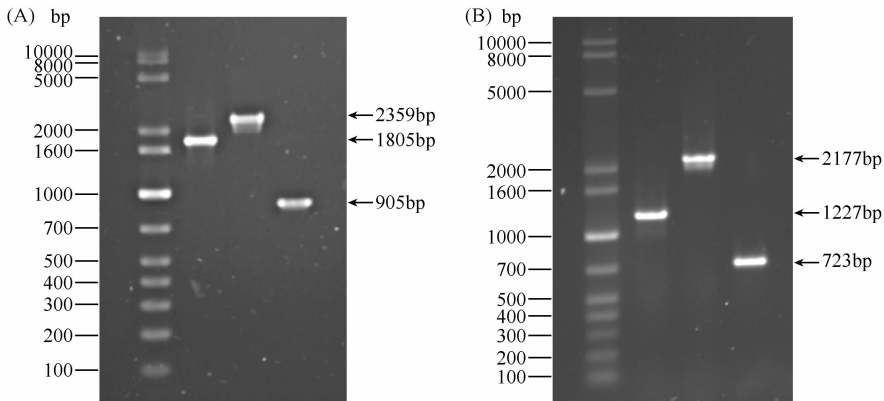


图 5. 突变株的 PCR 验证

Figure 5. Confirmation of  $\Delta inoA$ ,  $\Delta inoA^*$ ,  $\Delta inoA^*/\Delta scbR2$  and  $\Delta inoA^*/\Delta scbR2^*$  strains by PCR amplification. A: Verification of  $\Delta inoA$  and  $\Delta inoA^*$ . M, 1 kb Plus DNA ladder; lane 1, *S. coelicolor* M145; lane 2,  $\Delta inoA$ ; lane 3,  $\Delta inoA^*$ . B: Verification of  $\Delta inoA^*/\Delta scbR2$  and  $\Delta inoA^*/\Delta scbR2^*$ . M, 1 kb Plus DNA ladder; lane 1, *S. coelicolor* M145; lane 2,  $\Delta inoA^*/\Delta scbR2$ ; lane 3,  $\Delta inoA^*/\Delta scbR2^*$ .

所得到的双基因无痕敲除株中的杂合序列 *attL<sub>13</sub>* 和 *attL<sub>6</sub>* 经测序进行了验证 (图 6)。上述构建的无痕敲除阻断突变株具有突出的新颖性, 可以通

过设计使保留的杂合序列均为 *attL* 或 *attR* 以避免干扰, 同时在理论上可使用同一个抗性基因为筛选标记进行无限制的多基因突变。

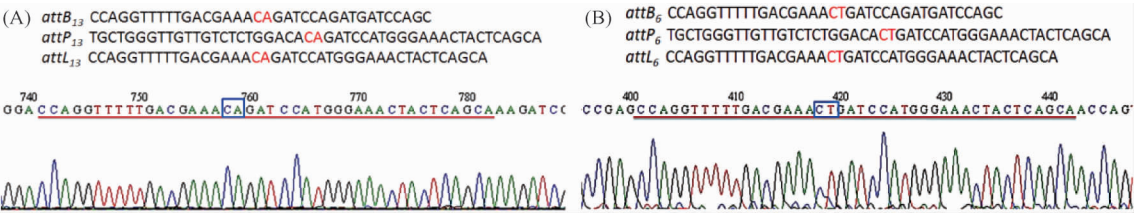


图 6. 两株无痕敲除株中的杂合序列 *attL*<sub>13</sub> 和 *attL*<sub>6</sub> 的序列测定

Figure 6. DNA sequencing of both *attL*<sub>13</sub> and *attL*<sub>6</sub>.

2.5 *inoA* 报告系统的可行性验证

由于 *ScbR2* 在天蓝色链霉菌营养生长阶段直接阻遏 *CPK* 基因簇途径特异性正调控基因 *cpkO* 的转录,使其启动子不能表达,我们设想以 *inoA* 为报告基因,以 *cpkO* 启动子控制其表达,在 *inoA* 及 *scbR2* 双突变株中应该不受到阻遏,从而在营养生长阶段就能得到表达,使肌醇得以合成,来互补 *inoA* 的突变并恢复气生菌丝生长及产孢。按照这一思路,我们构建得到了报告质粒 pIJ8660::P<sub>*cpkO*</sub>::*inoA* (图 7),并将其转入大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 中,经接合转移导入  $\Delta$ *inoA*\*/ $\Delta$ *scbR2*\* 突变株中,并整合到染色体 fC31 的 *attB* 位点上,得到 *inoA* 互补株  $\Delta$ *inoA*\*/ $\Delta$ *scbR2*\* /pIJ8660::P<sub>*cpkO*</sub>::*inoA*,表型观察结果显示,该互补株在无肌醇添加的 MM 培养基上能恢复野生型产灰色孢子的表型(图 8);说明 *inoA* 可作为报告基因使用,其突变株与互补株的表型变化可以作为筛选标记,本实验也通过模

拟验证了将来用 *inoA* 作为报告基因,来检测阻遏抗生素生物合成负调控基因突变的报告系统是可行的。

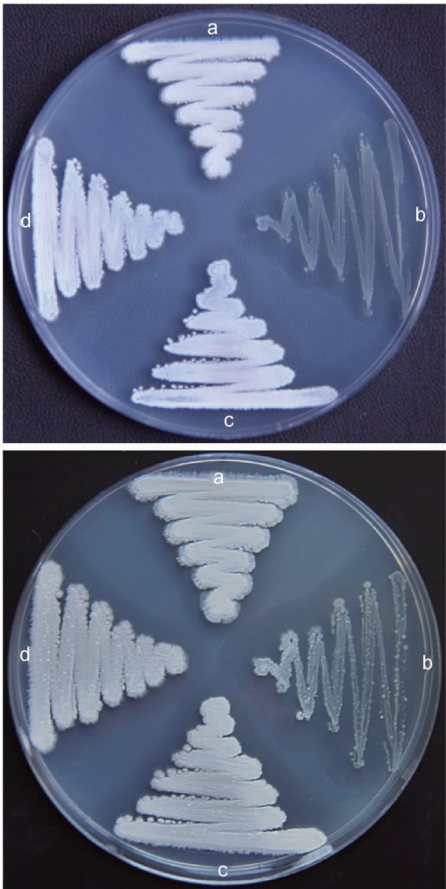


图 8. 菌株  $\Delta$ *inoA*\*/ $\Delta$ *scbR2*\* /pIJ8660::P<sub>*cpkO*</sub>::*inoA* 的表型分析

Figure 8. The phenotypic observation of  $\Delta$ *inoA*\*/ $\Delta$ *scbR2*\* /pIJ8660::P<sub>*cpkO*</sub>::*inoA* strains grown on MM medium with mannitol as carbon source for 4 d (Up) and 7 d (Down). a: *S. coelicolor* M145; b:  $\Delta$ *inoA*\*/ $\Delta$ *scbR2*\*, c/d:  $\Delta$ *inoA*\*/ $\Delta$ *scbR2*\* /pIJ8660::P<sub>*cpkO*</sub>::*inoA*.

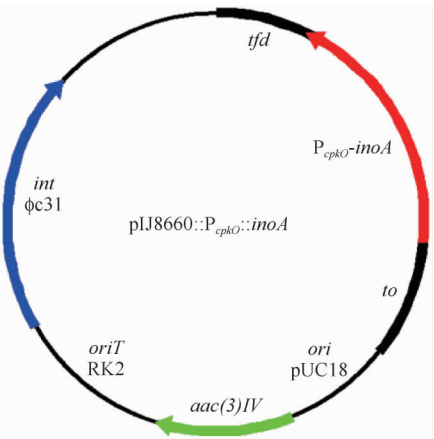


图 7. 报告载体 pIJ8660::P<sub>*cpkO*</sub>::*inoA* 的构建

Figure 7. The construction of reporter plasmid pIJ8660::P<sub>*cpkO*</sub>::*inoA*.



### 3 讨论

报告基因是用来置于顺式作用元件,尤其是启动子元件的控制之下,指示顺式作用元件活性的一类基因,通过报告基因的表达变化来指示并寻找一个顺式元件在调控网络或调控级联中更上位的反式调控因子是一个遗传研究中反向寻找的过程,相对由上及下的调控关系的寻找(如利用转录组或蛋白组学研究)来说可用的高效研究手段相对较少,获取信息更加困难,有时需要结合有针对性的特殊设计的实验来实现,如寻找更上位的正调控基因需要报告系统结合表达文库进行筛选,而寻找上位的负调控基因需要报告系统结合突变文库进行筛选。在链霉菌次级代谢生物合成与调控研究中,负责产物合成的功能基因往往受到多层次多水平的调控,如受途径特异性调控,多效调控及全局性调控等,也可以分为转录水平,翻译水平及信号分子水平的调控等<sup>[25]</sup>。针对那些沉默的隐性次级代谢基因簇的调控,因为其合成基因不表达,可以解释为受到直接或间接的阻遏造成的,负责这些基因转录的启动子如果受到来自簇内或簇外的负调控因子阻遏,则可视作直接阻遏,如果启动子因为缺乏正调控因子或信号分子的激活而没有转录,则可以视为正调控因子或信号分子的合成受到抑制的间接阻遏。如果通过遗传操作去除上述阻遏因素,则多数情况下隐性基因簇理论上应该可以表达。这方面可以从以往对链霉菌中一些关键的负调控基因的研究中获得理论指导,如在天蓝色链霉菌全局性负调控基因 *dasR* 的研究中,发现 *dasR* 的阻断可以激活或增强多种次级代谢产物的合成,包括其黄色隐性次级代谢产物 yCPK 的合成<sup>[26]</sup>;而对 yCPK 生物合成基因簇中的途径特异性负调控基因 *scbR2* 进行阻断,可以激活 yCPK 及其具有抑菌活性的前体 abCPK (antibacterial CPK) 的生物合成<sup>[27]</sup>。在链霉菌中,类似作用的负调控基因可能还有很多,对这些未知基因的发现具有很高的理论和应用价值。按照这一思路,我们认为对链霉菌进行随机诱变,应该可以有机会使一些类似作用的负调控基因阻断,从而使相应的隐性基因簇获得表达,如果能够结合合适的报告系统,就可以有针对性地对选定的基因簇进行激活表达的检测及突变株的筛选。

在本研究中,我们成功地尝试了 *inoA* 作为新报告基因的使用,我们针对性的选择了沉默的隐性基因簇作为检测对象,对阻遏隐性基因簇表达的负调控基因突变后的检测结果表明了 *inoA* 作为报告基因的可操作性及灵敏度,也预示其可以用于类似负调控基因的突变筛选,并可用于隐性基因簇调控机制及激活的研究。在链霉菌已经成功应用的报告基因中,按检测方法可以分为两类:一类是通过显色或发荧光来进行检测,如儿茶酚双加氧酶、荧光素酶、及绿色荧光蛋白基因,这类检测方法往往需要最后添加特殊的作用底物,或依赖特殊的仪器进行检测,对于高通量的文库筛选往往不易胜任;另一类是利用选择性压力(如抗性基因)进行检测,这一类虽然可以胜任文库的高通量筛选,但由于需要在培养基中添加一定浓度的抗生素,因此抗性阈值的设定是决定筛选成功的前提,如果阈值设低了容易出现假阳性,而设高了容易出现漏筛现象,因此抗生素抗性基因作为报告基因比较适合对高表达的启动子进行检测及筛选高产株,而在实际工作中,次级代谢基因簇即便被激活,其表达强度也并不一定很高,因此该类报告基因在使用中也存在缺陷。链霉菌不仅具有产生多种次级代谢产物的特点,而且还有复杂的发育分化过程,长期以来是人们研究原核生物发育分化的理想模式生物,其不同发育分化阶段的表型特征(光秃,白色,灰色)为基因的克隆表达提供了便利的筛选,本研究即是以易观察的表型变化作为筛选标志开展的研究。

由于 *inoA* 编码的肌醇-1-磷酸合成酶以初级代谢过程的重要中间产物葡萄糖-6-磷酸为底物,因此为了协调基础碳代谢与肌醇合成的平衡,*inoA* 在链霉菌发育分化的不同阶段表达量受到严格的发育分化调控;其阻断突变株在基本培养基上不能进行正常的发育分化,仅能保持光秃型的表型,我们还发现培养基中残存的痕量肌醇就可以使 *inoA* 突变株表型发生变化,表明链霉菌的形态分化对肌醇浓度的感应很敏感,且 *inoA* 在链霉菌中高度保守,因此其可以成为较理想的报告基因。在实际应用中,可以将 *inoA* 置于要研究的沉默基因的启动子下游,构建报告质粒,再转入一个预先构建好的 *inoA* 突变株中,形成报告系统,进而可以对这一报告系统进行随机诱变,就可以检测沉默的启动子上位的调控基因的突变,比如利用转座子随机插入突变,就可以检测

负调控基因的突变,接下来再可以方便地克隆突变基因来研究调控机制。该系统的构建相对其他报告系统需要多进行一步 *inoA* 的基因阻断,且随着在链霉菌中进行的遗传操作次数的增加,抗性筛选的使用会受到限制,而我们在本文中构建这个系统的无痕敲除方法可方便地解决这一问题。我们这一新的报告系统有望在隐性基因簇的研究中发挥其重要的作用。

## 参考文献

- [ 1 ] Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 2002, 417(6885): 141-147.
- [ 2 ] Pawlik K, Kotowska M, Chater KF, Kuczek K, Takano E. A cryptic type I polyketide synthase (cpk) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Archives of Microbiology*, 2007, 187(2): 87-99.
- [ 3 ] Laureti L, Song L, Huang S, Corre C, Leblond P, Challis GL, Aigle B. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(15): 6258-6263.
- [ 4 ] Martin R, Sterner O, Alvarez MA, de Clercq E, Bailey JE, Minas W. Collinone, a new recombinant angular polyketide antibiotic made by an engineered *Streptomyces* strain. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 2001, 54(3): 239-249.
- [ 5 ] Ingram C, Brawner M, Youngman P, Westpheling J. *xylE* functions as an efficient reporter gene in *Streptomyces* spp.: use for the study of *galPI*, a catabolite-controlled promoter. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(12): 6617-6624.
- [ 6 ] Sohaskey CD, Im H, Nelson AD, Schauer AT. Tn4556 and luciferase: synergistic tools for visualizing transcription in *Streptomyces*. *Gene*, 1992, 115(1-2): 67-71.
- [ 7 ] Cadenas RF, Martin JF, Gil JA. Construction and characterization of promoter-probe vectors for *Corynebacteria* using the kanamycin-resistance reporter gene. *Gene*, 1991, 98(1): 117-121.
- [ 8 ] Sun J, Kelemen GH, Fernandez-Abalos JM, Bibb MJ. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology*, 1999, 145 ( Pt 9): 2221-2227.
- [ 9 ] Xiang SH, Li J, Yin H, Zheng JT, Yang X, Wang HB, Luo JL, Bai H, Yang KQ. Application of a double-reporter-guided mutant selection method to improve clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(4-5): 310-318.
- [ 10 ] Zhang G, Tian Y, Hu K, Zhu Y, Chater KF, Feng C, Liu G, Tan H. Importance and regulation of inositol biosynthesis during growth and differentiation of *Streptomyces*. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(6): 1178-1194.
- [ 11 ] Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4): 1541-1546.
- [ 12 ] Gregory MA, Till R, Smith MC. Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(17): 5320-5323.
- [ 13 ] Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 204-211.
- [ 14 ] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [ 15 ] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical *Streptomyces* Genetics: a Laboratory

- Manual. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [16] Redenbach M, Kieser HM, Denapaite D, Eichner A, Cullum J, Kinashi H, Hopwood DA. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(1): 77-96.
- [17] Sambrook P, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [18] Gust B KT, Chater KF. REDIRECT technology: PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): a Laboratory Manual. Norwich: John Innes Foundation, 2002.
- [19] Au LC, Yang FY, Yang WJ, Lo SH, Kao CF. Gene synthesis by a LCR-based approach: high-level production of leptin-L54 using synthetic gene in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 248(1): 200-203.
- [20] Wiedmann M, Wilson WJ, Czajka J, Luo J, Barany F, Batt CA. Ligase chain reaction (LCR)—overview and applications. *PCR Methods and Applications*, 1994, 3(4): S51-64.
- [21] Zhang L, Wang L, Wang J, Ou XJ, Zhao GP, Ding XM. DNA Cleavage is independent of synapsis during *Streptomyces* phage phiBT1 integrase-mediated site-specific recombination. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2010, 2(5): 264-275.
- [22] Dangel V, Westrich L, Smith MCM, Heide L, Gust B. Use of an inducible promoter for antibiotic production in a heterologous host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(1): 261-269.
- [23] Takano E, Kinoshita H, Mersinias V, Bucca G, Hotchkiss G, Nihira T, Smith CP, Bibb M, Wohlleben W, Chater K. A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(2): 465-479.
- [24] Xu G, Wang J, Wang L, Tian X, Yang H, Fan K, Yang K, Tan H. “Pseudo” gamma-butyrolactone receptors respond to antibiotic signals to coordinate antibiotic biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(35): 27440-27448.
- [25] Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu G, Tan H. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(1): 112-143.
- [26] Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, Mulder S, Thomae AW, Hopwood DA, van Wezel GP. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Reports*, 2008, 9(7): 670-675.
- [27] Gottelt M, Kol S, Gomez-Escribano JP, Bibb M, Takano E. Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology*, 2010, 156 ( Pt 8 ): 2343-2353.

# Construction of screening system for mutation of negative regulatory genes in *Streptomyces*

Yu Zhu<sup>1,2</sup>, Chi Feng<sup>1,2</sup>, Huarong Tan<sup>1</sup>, Yuqing Tian<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [ **Objective** ] We aimed to create a novel report system for screening the mutation of the negative regulatory genes, especially for those repressing the expression of cryptic antibiotics clusters. [ **Methods** ] We used marker-free gene disruption strategy, which combines with the “REDIRECT (Rapid Efficient Directed Recombination Time Saving)” technology and *in vivo* site-specific recombination by *Streptomyces* phage  $\phi$ BT1 integrase, to construct a *scbR2/inoA* double mutant strain of *S. coelicolor* M145. This strain was used as the host of the report system. For the construction of the reporter plasmid, the ScbR2 repressed promoter of *cpkO* from CPK (cryptic polyketide) cluster was used to drive the expression of a promoterless conserved gene *inoA* of *S. coelicolor*. Then the reporter plasmid was introduced into the host strain described above to test the availability of *inoA* as a reporter gene in this system. [ **Results** ] The *scbR2/inoA* double mutant strain gave rise to a bald pheno type on MM medium in the absence of inositol, and produced yellow pigmented secondary metabolite by the disruption of *scbR2* to release the repression of *cpkO*, a pathway specific activator gene situated in CPK cluster. After introducing the reporter plasmid into this test stain, the resulting strain recovered the phenotype as wild-type strain, indicating that the promoter of *cpkO* can drive the expression of *inoA* in *scbR2* mutant and consequently restore the biosynthesis of inositol. [ **Conclusion** ] Our results indicated that *inoA* can be used as a novel reporter gene for *Streptomyces*, especially for detecting the activation of the “silent” promoter. This report system might be available for screening the mutation of the negative regulatory genes for the cryptic secondary metabolic gene clusters.

**Keywords:** *Streptomyces*, *inoA*, reporter gene, marker-free gene disruption, cryptic gene cluster

( 本文责编:王晋芳 )