

小葱植物内生链霉菌线型质粒 pYY8L 的端粒与复制区的克隆和鉴定

杨勇, 钟莉, 田新莉, 成秋香, 陈振华, 覃重军*

(中国科学院上海生命科学研究院, 植物生理生态研究所合成生物学重点实验室, 上海 200032)

摘要:从小葱植物中分离到一株编号为 36R-2-1B 的链霉菌菌株, 该菌株含有一个约为 280 kb 的线型质粒 pYY8L。【目的】克隆、测序和分析 pYY8L 新的端粒和复制区。【方法】采用改良的“在凝胶中进行 DNA 碱处理与酶切”的方法来克隆大的线型质粒 pYY8L 的端粒, 通过构建基因组柯斯文库和次级克隆的方法来缩小和鉴定 pYY8L 的复制区。【结果】在小葱植物内生链霉菌 36R-2-1B 中检测到约为 280 kb 的线型质粒 pYY8L, 克隆了 pYY8L 的端粒。其末端的 152 bp 包含 6 个小的回文序列, 可以形成复杂的二级结构。利用柯斯文库构建、次级克隆和测序获得了 4891 bp 的 pYY8L 的复制区。该复制区含有 6 个基因, 其中 2 个与天蓝色链霉菌线型质粒 SCP1 的复制基因非常相似, 但是邻近的重复序列不同。【结论】采用新的改良的方法克隆和鉴定了 pYY8L 新的端粒和复制区。本文首次报道了植物内生链霉菌线型质粒的端粒和复制基因。

关键词: 链霉菌; 线型质粒; 端粒; 复制

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0452-07

大多数细菌的染色体和质粒 DNA 为共价闭环型结构, 而属于革兰氏阳性细菌的链霉菌 (*Streptomyces*) 的染色体为线型结构^[1], 一些链霉菌菌株还含有线型质粒^[2-3]。链霉菌线型染色体和线型质粒 DNA 的两个端粒含有长度不等的倒转重复序列, 其 5' 末端被端粒末端蛋白 (Telomere terminal protein, Tpg) 共价结合, 保护 DNA 免受核酸酶的降解。与具有线型 DNA 结构的腺病毒不同, 链霉菌线型质粒的复制是从一个位于中部的起始位点开始往两端进行双向复制^[4], 最后形成的 3' 末端的单链 DNA 被一个由端粒末端蛋白、端粒相关蛋白 (Telomere associated protein, Tap) 以及其它蛋白组成的端粒复合体所延伸补齐而成为双链 DNA^[5-6]。研究表明链霉菌线型质粒的端粒均富含小的回文序列, 且大多数端粒的序列是保守的^[7]。位于链霉菌

线型质粒中部的复制起始位点通常由重复序列 (iteron) 及其附近编码 DNA 解旋酶或未知蛋白的复制基因组成^[4,8-9]。

我们实验室从约 100 种不同的植物 (大多数为中草药植物) 中分离到大量的内生放线菌, 利用脉冲电泳技术检测到许多环型和线型质粒。本文报道了从小葱植物中分离到一株编号为 36R-2-1B 的链霉菌菌株, 该菌株含有一个约为 280 kb 的线型质粒 pYY8L。克隆和测序分析表明, pYY8L 具有新的端粒和位于链霉菌线型质粒中部的复制区序列。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本实验所用的菌株与质粒见表 1。

基金项目: 国家自然科学基金 (30870067, 30770045, 30325003); 国家“863 计划” (2007AA021503); 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-YW-G-014)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-21-54924171; E-mail: qin@sibs.ac.cn

作者简介: 杨勇 (1978 -), 男, 湖北红安人, 博士研究生, 主要从事链霉菌分子遗传学研究。E-mail: yyang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2009-10-11; **修回日期:** 2009-12-03

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strain and plasmid	Genotype	Sources
<i>Streptomyces</i> sp. 36R-2-1B	Host <i>Streptomyces</i> strain harboring linear plasmid pYY8L	This work
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$) <i>phoA supE44</i> $\lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$	Stratagen
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 Δ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139(Δ<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK</i> $\lambda^- rpsL nupG$</i>	Stratagen
<i>S. lividans</i> ZX7	<i>pro-2 str-6 rec-46</i> Δ <i>dnd</i> HAU3 ^S SLP2 ⁻ SLP3	[10]
pBluescript II SK	<i>Amp, lacZ</i>	Stratagen
pHAQ31	<i>Kan cos oriT tsr</i>	[11]
pYY39	pBluescript II SK contains the <i>tsr</i> gene from pIJ702	This work
pYY141	A cosmid contains an autonomous replication sequence (ARS) of pYY8L	This work
pYY173	pYY39 contains a 5 kb <i>XhoI</i> fragment of pYY141	This work
pYY179	pBluescript II SK contains the 5 kb <i>XhoI</i> fragment of pYY173	This work
pYY183	pYY39 contains a 12.5 kb <i>XhoI</i> fragment of pYY141	This work
pYY225	pBluescript II SK contains 1.9 kb telomere DNA of pYY8L	This work

1.1.2 主要试剂和仪器:生化试剂、常规抗生素和高保真 pfu DNA 聚合酶购于上海生工生物工程技术服务有限公司。硫链丝菌素购于 Sigma 公司。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购于 MBI 公司。脉冲电泳的分子标样 (Lambda Ladder PFG Marker) 购于 New England BioLabs 公司。噬菌体包装试剂盒 (Gigapack III Gold) 购于 Stratagen 公司。DNA 标记试剂盒 (High Prime DNA Labelling Kit) 购于 Roche 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司。

1.2 培养和基本的遗传操作

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的培养、转化和质粒提取等基本操作见文献 [12]。链霉菌的培养、DNA 的抽提、原生质体的制备及转化等操作见文献 [13]。变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) ZX7 的原生质体制备的培养基为 YEME, 转化和再生培养基为 R5。链霉菌菌丝液体培养用 TSB。16S rRNA 基因的引物为 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 R (5'-TCAGGCTACCTTGTACGACTT-3')。PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.3 线型质粒 pYY8L 端粒 DNA 的克隆

链霉菌菌丝的液体培养、含菌体的胶块的制备和处理、以及进行脉冲场电泳参照文献 [13]。将包埋好 36R-2-1B 菌体的胶块进行脉冲电泳,电泳条件是:1% 琼脂糖凝胶,电压 6 V/cm,14 $^{\circ}$ C 电泳 24 h,切换时间为 1 s 到 25 s。电泳完成后,进行溴化乙锭染色,切割目标 DNA 条带移至离心管中。加入终浓度为 0.2 mol/L NaOH,于 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h。加入 0.2 mol/L HCl,0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 和 2 \times SSC^[12],于 37 $^{\circ}$ C 水浴 3 h。倾倒在吸掉全部液体,加

1 \times 的 *Bam*HI 酶切缓冲液浸泡胶条 3 次,每次 30 min。加入 *Bam*HI 酶切缓冲液和稍过量的 *Bam*HI 进行长时间酶切 (5 μ g 的 DNA,使用 100 U 的 *Bam*HI 消化 24 h)。酶切完成后,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收胶条中的 DNA。将 DNA 连接到大肠杆菌质粒 pBluescript II SK 的 *Eco*RV 和 *Bam*HI 位点,转化大肠杆菌 DH5 α ,最终得到克隆含有端粒的质粒 pYY225。

1.4 线型质粒 pYY8L 探针的制备

用手术刀割下脉冲电泳凝胶上 pYY8 L 的 DNA 于离心管中,加入 3 倍体积胶回收试剂盒中的融胶液 S1,于 50 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,使胶条彻底融化。用超声波破碎仪以高功率破碎 3 次,每次 3 s,然后按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书的后续步骤对超声波处理后的 DNA 进行回收。按照 DNA 标记试剂盒对回收的 DNA 进行同位素标记。

1.5 链霉菌 36R-2-1B 柯斯 (cosmid) 文库的构建

采用的 cosmid 载体是含有双柯斯 (*cos*) 位点和硫链丝菌素抗性基因 (*tsr*) 的质粒 pHAQ31^[11]。提取链霉菌 36R-2-1B 的总 DNA,用限制性内切酶 *Sau*3AI 进行部分酶切,然后用碱性磷酸酶去磷。载体 pHAQ31 用 *Nhe*I 酶切、去磷后再用 *Bam*HI 酶切和回收。将处理好的总 DNA 与载体 pHAQ31 进行连接,然后用噬菌体包装试剂盒进行体外包装并感染大肠杆菌 DH10B。

1.6 DNA 序列的测定和分析

测序由上海桑尼生物科技有限公司和上海博尚生物技术有限公司完成。DNA 序列比对及分析的软件为 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)、Vector NTI Suite 9、BioEdit 和 Clone Manager Suite v7.1。DNA 二级结构的预测采用软件“DNA

mfold”^[14] (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form1.cgi>)。链霉菌开放阅读框 (open reading frame, ORF) 的预测采用软件 “FramePlot 3.0beta”^[15] (<http://watson.nih.gov/~jun/cgi-bin/frameplot-3.0b.pl>)。

2 结果和分析

2.1 脉冲电泳检测线型质粒 pYY8L

本实验室从洋葱、蒜苗、大葱和小葱等植物中分离到 9 株内生放线菌,经 16S rDNA 序列的扩增、克隆和测序,发现它们与链霉菌有 >99% 的相似性,因此,初步归属于链霉菌属。将这 9 株链霉菌的菌丝体用琼脂糖凝胶包埋、原位溶菌后进行脉冲电泳。结果显示,9 个菌株可能均含有线型结构的染色体,其中一株编号为 36R-2-1B 的菌株还含有一个约为 280 kb 的质粒 DNA,命名为 pYY8L(图 1)。利用碱性溶菌法提取菌株 36R-2-1B 的环型质粒 DNA,凝胶电泳后未能检测到质粒 DNA 条带,暗示该菌株可能不存在游离态的环型 DNA。

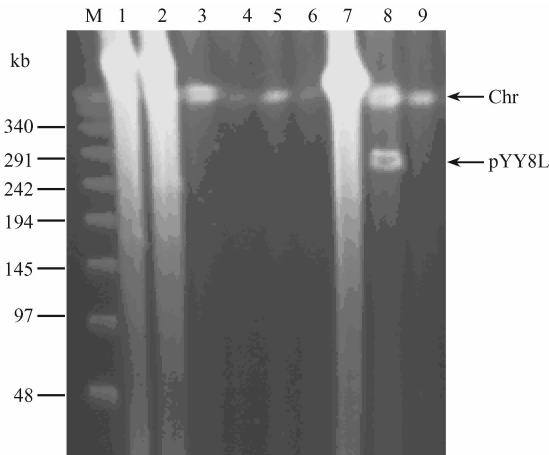


图 1 脉冲电泳检测 9 株内生链霉菌的基因组

Fig. 1 Pulse field gel electrophoresis (PFGE) detection of genomes of 9 endophytic *Streptomyces* strains. Lanes 1/2, 3/4, 5/6/7 and 8/9 correspond to strains from *Allium cepa* L., *Allium sativum* L., *Allium fistulosum* L. and *Allium fistulosum* L., respectively. M: Lambda ladder PFG marker, Chr: Chromosome. The PFGE conditions are 1% agarose gel, 6V/cm, 14°C for 24 h, switch time ramped from 1 to 25 s.

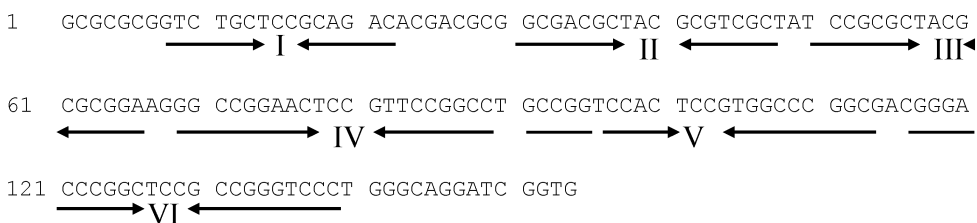


图 2 线型质粒 pYY8L 的 152 个核苷酸的端粒序列及其一级结构

Fig. 2 The 152 nt telomere sequence of linear plasmid pYY8L and its first structure. Small palindromes (I-VI) are indicated by paired arrowheads.

2.2 线型质粒 YY8L 端粒 DNA 的克隆、测序和分析

利用链霉菌中保守的端粒复制蛋白 (Tpg 和 Tap) 的 DNA 序列对线型质粒 pYY8L 的 DNA 进行 PCR 扩增,未检测到扩增的 DNA 条带。暗示该质粒可能含有新的端粒复制基因,对应可能含有新的端粒序列。

利用 *Bam*HI 可以有效的消化凝胶中的 DNA,以及 NaOH 在凝胶中仍可以有效除去 DNA 末端共价结合的蛋白的特点,我们采取了“在凝胶中进行 DNA 碱处理与酶切”的策略来克隆大型线型质粒 pYY8L 的端粒 DNA,最终克隆到了约为 1.9 kb 的 pYY8L 的端粒 DNA 片段(见“材料与方法”)。

预计在得到的克隆 pYY225 的 *Eco*RV 端的 DNA 片段为 pYY8L 的端粒 DNA 序列。测序结果表明,与 *Eco*RV 位点连接的 152 bp 确实与链霉菌保守的端粒序列不同,但是与链霉菌线型质粒 pSHK1 的端粒(未发表)非常相似(前 30 个碱基中仅有 2 个碱基的差别)。虽然 pYY8L 端粒 DNA 的序列与前人已发表的不同,但是仍可以形成许多小的回文序列(图 2),并且可以形成复杂的二级结构(图 3)。

2.3 线型质粒 pYY8L 复制区的鉴定、测序和分析

2.3.1 线型质粒 pYY8L 的复制区的鉴定:我们以 pHAQ31 为 cosmid 载体,构建了链霉菌 36R-2-1B 的全基因组 cosmid 文库(见“材料和方法”)。随机挑取 10 个大肠杆菌 DH10B 转染子,抽提 cosmid 质粒 DNA,用 *Bam*HI 酶切,凝胶电泳显示这些转染子具有多样性(酶切电泳图未列出)。挑单克隆于铺在 LB 固体培养基的尼龙膜上,进行过夜培养,用制备好的 pYY8L 的 DNA 探针(见“材料和方法”)对其进行菌落原位杂交。从大约 4000 个克隆中检出 53 个与 pYY8L 探针有杂交信号的阳性克隆。

将筛选出的 53 个阳性克隆混合、提取质粒,通过原生质体转化的方法导入到无内源质粒的变铅青链霉菌菌株 ZX7,共获得了 5 个硫链丝菌素抗性转化子。从链霉菌抗性转化子中提取环型质粒及电泳

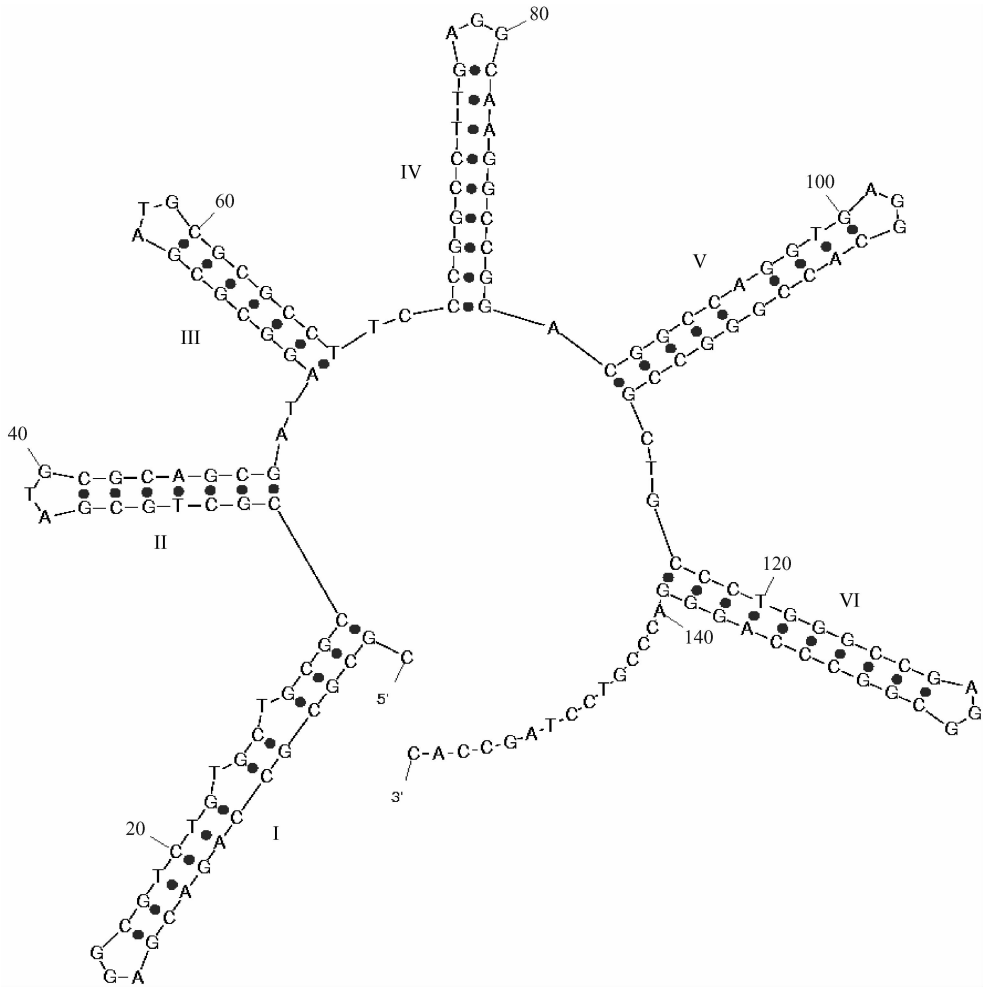


图3 预测的线型质粒 pYY8L 端粒的二级结构

Fig. 3 Secondary structure of telomere of linear plasmid pYY8L. The predicted secondary structure formed by 3' single strand of the terminal 152 nt with the lowest energy ($dG = -63.27$ kcal/mol) is shown. The palindromes are numbered as I-VI. The base pairings within the palindromes are indicated by black dots.

检测,显示这 5 个 cosmid 在 ZX7 中都以游离态的形式存在。该结果暗示了这些 cosmid 含有来源于 pYY8L 的自主复制序列 (autonomous replication sequence, ARS)。

将含有 pYY8L 的 ARS 的 5 个 cosmid 分别用 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切,酶切电泳图显示它们含有相似的酶切条带(酶切电泳图未列出),我们推测它们含有同一 ARS。选择转化效率最高、产生的转化子具典型的黑色色素的 cosmid(pYY141)为研究对象,利用次级克隆方法缩小 pYY141 上含有的 ARS 片段。将 pYY141 用 *Xho*I 进行部分酶切,与载体 pYY39 连接后,转化大肠杆菌。从混合的大肠杆菌转化子中抽提混合质粒再转化 ZX7 的原生质体,获得了硫链丝菌素抗性转化子。提取链霉菌抗性转化子质粒 DNA,得到了含有插入片段长度分别约为 5 kb 和

12.5 kb 的质粒 pYY173 和 pYY183。酶切分析显示 pYY183 所含的 12.5 kb 的 *Xho*I 片段是部分酶切的结果,其中包含了 pYY173 中的 5 kb 的 *Xho*I 片段。因此 pYY173 中的 5 kb 的 *Xho*I 片段是目前克隆到的最小的 ARS。

2.3.2 线型质粒 pYY8L 复制区的测序和分析:将 pYY173 上 5 kb 的外源片段克隆到 pBluescript II SK 的 *Xho*I 位点得到质粒 pYY179。测序表明该外源片段大小为 4891 bp, ORF 分析预测其有 6 个基因 (*pYY8L. 1c-pYY8L. 6c*), 分别编码 2 种未知功能蛋白、磷脂酸胞苷转移酶、转录因子、DNA 引物酶/解旋酶和 DNA 引物酶/聚合酶(表 2)。 *pYY8L. 4c* 和 *pYY8L. 5c* 分别与天蓝色链霉菌线型质粒 SCP1 上复制基因 *SCP1. 197* 和 *SCP1. 196* 有很高的同源性 ($71/119 = 59\%$ 和 $307/509 = 60\%$)。此外, *pYY8L.*

6c 附近还有一段 DNA 序列含有正向和反向重复序列,即为可能的 iteron 区(图 4)。

表 2 预测的 pYY8L 复制区的开放阅读框

Table 2 Predicted open reading frames (ORFs) of the replication origin of pYY8L

ORFs ^a	Position (bp) ^b	Size (aa)	E value ^c	Function/Homology
<i>pYY8L. 1c</i>	387(4)	127		Unknown
<i>pYY8L. 2c</i>	666(388)	92		Unknown
<i>pYY8L. 3c</i>	1056(670)	128	4×10^{-13}	Phosphatidate cytidyltransferase (<i>Weissella</i>)
<i>pYY8L. 4c</i>	1478(1101)	125	4×10^{-35}	Hypothetical protein SCP1.197 (<i>Streptomyces</i>)
<i>pYY8L. 5c</i>	3210(1675)	511	2×10^{-173}	DNA primase/helicase SCP1.196 (<i>Streptomyces</i>)
<i>pYY8L. 6c</i>	4292(3207)	361	2×10^{-102}	DNA primase/polymerase (<i>Streptomyces</i>)

^a c; complementary strand; ^b Stop codons are not included; ^c E value; expectation value, $<1 \times 10^{-3}$ as the cut-off values.

```

4441 CGCCCAATTA GCTTCCTGAG TCCCTTCGGT CCCTTCGATC CCTGACTTTT GTGGCAGTTG
                                     DR-I      DR-I
4501 TTGCACTGCT TGGTAAGTTT TTAGGGCGAT TTGCGAGTGC CTGAAGGGGC TGACTCTGCG
      AT-rich
4561 CAACAGTAGC CACGCCGGGG TACGCCCCCT CCGTCAGTCC CTGCGGGGGG ACAGGAGGAC
4621 TGTCAGGGGC TCAGGCACCG GTGGCGGGCA GTGCGCGTGA GGGAGGTCTG GCTATGCCAG
                                     IR-I
4681 GGACCCCGCA ACGGGGGCGC AGGGGCGGAC TTCCCTTTGA GTCCCTATGG TGTTTGTGCA
      IR-II      IR-III
4741 GGTCAAAGGG CCTTTGGGTT GCCAGAGAGG GACTGAAGGG ACTCGGATCC CTATTTATAT
      IR-IV      AT-rich
4801 AGCGCACTCT GCTCTGTCTT CTACGCGCCC GCGCGTACCT CATCAACAGT TGACGTCATA
      AT-rich      IR-V      AT-rich
4861 ATTGCGAAAT TCGGTCCCTA CAGTCCCTTC C
      AT-rich

```

图 4 预测的 pYY8L 复制基因附近的 iteron 区

Fig. 4 Predicted iteron near the pYY8L replication genes. Directed repeat (DR) and inverted repeat (IR) sequences are indicated by arrowheads and At-rich sequences by underlines.

3 讨论

前人报道的克隆链霉菌线型质粒端粒的方法包括从凝胶中回收 DNA,通用蛋白酶 K 或 NaOH 处理以去除与 DNA 共价结合的蛋白,酶切后连接到一端为粘端、一端为平端的载体上^[7,16]。该方法对于较小线型质粒的端粒克隆是很有效的。为了高效地克隆大的线型质粒的端粒,本文对前人的方法进行了改进,包括直接在凝胶中进行 NaOH 处理以及限制性内切酶消化,然后进行胶回收。利用改良的方法,我们克隆到大的线型质粒 pYY8L 的端粒。此外本室的研究人员利用改良的方法还克隆到多个线型质粒的端粒(未发表),暗示该方法可能具有普遍的意义。

前人在利用同位素标记大的 DNA 片段的实验中,需要将含有 DNA 的凝胶转入透析袋中洗脱回收或者利用低熔点琼脂糖回收 DNA^[12],但是该方法比较繁琐。本实验将琼脂糖凝胶中的 DNA 进行融

胶,然后用超声波打断、过柱回收 DNA。所得到的 DNA 可以很好地进行同位素标记,相对简化了程序。

天蓝色链霉菌中 356 kb 的线型质粒 SCP1 的复制区长约 5.4 kb,包括复制基因 *SCP1.197*, *SCP1.196*, *SCP1.195* 和重复序列 iteron^[17],本实验鉴定的 pYY8L 的两个复制基因 *pYY8L.4c/pYY8L.5* 与 *SCP1.197/SCP1.196* 非常相似,但是邻近的基因 (*pYY8L.6c*) 和 iteron 序列与 SCP1 的没有同源性,暗示其具体的复制机理可能有所不同。

天蓝色链霉菌的 SCP1 具有新的端粒序列,与之对应发现了新的端粒复制基因^[18]。我们克隆到的线型质粒 pYY8L 的端粒也是一个新的序列,暗示该质粒存在新型的端粒复制基因。pYY8L 的端粒与 SCP1 的不同,暗示 pYY8L 的端粒复制基因不同于 SCP1 新的端粒复制基因。pYY8L 与 SCP1 的中心复制区域相似,而端粒序列不相似,暗示线型质粒端粒与中心复制区的进化不是同步进行的。

参考文献

- [1] Lin Y, Kieser H, Hopwood D, et al. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Molecular Microbiology*, 1993, 10: 923-933.
- [2] Hirochika H, Sakaguchi K. Analysis of linear plasmids isolated from *Streptomyces*: association of protein with the ends of the plasmid DNA. *Plasmid*, 1982, 7: 59-65.
- [3] Kinashi H, Mori E, Hatani A, et al. Isolation and characterization of linear plasmids from lankacidin-producing *Streptomyces* species. *Journal of Antibiotics*, 1994, 47: 1447-1455.
- [4] Chang P, Kim E, Cohen S. *Streptomyces* linear plasmids that contain a phage-like, centrally located, replication origin. *Molecular Microbiology*, 1996, 22: 789-800.
- [5] Bao K, Cohen S. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes and Development*, 2001, 15: 1518-1527.
- [6] Bao K, Cohen S. Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication. *Genes and Development*, 2003, 17: 774-785.
- [7] Huang C, Lin Y, Yang Y, et al. The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Molecular Microbiology*, 1998, 28: 905-926.
- [8] Zhang R, Xia H, Guo P, et al. Variation in the replication loci of *Streptomyces* linear plasmids. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 290: 209-216.
- [9] Hiratsu K, Mochizuki S, Kinashi H. Cloning and analysis of the replication origin and the telomeres of the large linear plasmid pSLA2-L in *Streptomyces rochei*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2000, 263: 1015-1021.
- [10] Zhou X, Deng Z, Firmin J, et al. Site-specific degradation of *Streptomyces lividans* DNA during electrophoresis in buffers contaminated with ferrous iron. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 4341-4352.
- [11] 夏海洋, 黄隽, 胡敏杰, 等. 构建有序排列的除虫链霉菌基因组的柯斯文库用于工业生产菌株的遗传改造. 中国抗生素杂志 (*Chinese Journal of Antibiotics*), 2009, 34(7): 340-343
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [13] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [14] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3406-3415.
- [15] Ishikawa J, Hotta K. FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 174(2): 251-253.
- [16] Zhang R, Yang Y, Fang P, et al. Diversity of telomere palindromic sequences and replication genes among *Streptomyces* linear plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 5728-5733.
- [17] Redenbach M, Bibb M, Gust B, et al. The linear plasmid SCP1 of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) possesses a centrally located replication origin and shows significant homology to the transposon Tn4811. *Plasmid*, 1999, 42: 174-185.
- [18] Huang C, Tsai H, Tsay Y, et al. The telomere system of the *Streptomyces* linear plasmid SCP1 represents a novel class. *Molecular Microbiology*, 2007, 63: 1710-1718.

Cloning and identification of telomere and internal origin of the endophytic *Streptomyces* linear plasmid pYY8L from *Allium fistulosum*

Yong Yang, Li Zhong, Xinli Tian, Qiuxiang Cheng, Zhenhua Chen, Zhongjun Qin*

(Key laboratory of Synthetic Biology, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Strain 36R-2-1B was isolated from *Allium fistulosum* and identified as *Streptomyces* spp., harboring a ~280 kb linear plasmid designated pYY8L. [**Objective**] Cloning, sequencing and analysis of telomere and internal replication origin of pYY8L. [**Methods**] pYY8L telomere was cloned by a modified procedure —“alkaline treatment and enzyme digestion in gel”. The internal replication origin of pYY8L was cloned by construction of a cosmid library and then sub-cloning. [**Results**] A ~280 kb DNA band (pYY8L) of strain 36R-2-1B was detected by pulsed-field gel electrophoresis. The 152-bp telomere, containing six small palindromes and potentially forming complicated secondary structure, was cloned and sequenced. The replication origin of pYY8L was initially cloned on a cosmid and then sub-cloned as a 4891-bp autonomous replication sequence. This sequence was predicted to contain six genes, two of them resembling replication genes of *Streptomyces* linear plasmid SCP1, but their adjacent iterons were different. [**Conclusion**] New telomere and internal replication origin of *Streptomyces* linear plasmid pYY8L were cloned and identified. This is the first example of report on telomere and replication genes of linear plasmid from endophytic *Streptomyces*.

Keywords: *Streptomyces*; linear plasmid; telomere; replication origin

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870067, 30770045, 30325003), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA021503) and the Chinese Academy of Sciences project (KSCX2-YW-G-014)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-54924171; E-mail: qin@sibs.ac.cn

Received: 11 October 2009/ Revised: 3 December 2009

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效! 此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。