

Streptomyces rimosus M4018 中氧化应激转录抑制因子 Rex 的克隆表达及与 *rex* 操纵子的体外结合活性

沈晶, 唐振宇, 肖慈英, 郭美锦*

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

摘要: 【目的】为了研究龟裂链霉菌 *Streptomyces rimosus* M4018 中的 *rex* 基因对自身 *rex* operator (ROP) 的调控机制。【方法】根据天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 中 *rex* 基因的同源序列设计引物进行 PCR, 从 *S. rimosus* M4018 中获得其 *rex* 基因 (*Sr-rex*)。同时, 通过染色体步移的方法, 获得其上游的 ROP 序列。采用体外凝胶迁移的方法, 分析了 *Sr-Rex* 对 ROP 的调控作用。【结果】获取的 *Sr-rex* 基因核苷酸序列长度为 846 bp, 预测的编码氨基酸序列与 *S. coelicolor* A3 (2) 中 Rex 的同源性为 84%, 获得 GenBank 登录号: GQ849479。圆二色光谱显示 *Sr-Rex* 的结构以 α 螺旋和 β 折叠为主, 与软件预测相符。凝胶迁移实验表明, *Sr-Rex* 能与 *S. rimosus* M4108 中扩增到的 ROP 片段特异性结合。同时, 以 Rex:ROP 的最小结合序列为基础, 设计了一条 22 bp 的单链 DNA 片段, 和 *Sr-Rex* 的最大结合摩尔浓度比约为 5:1。高浓度的 NADH 抑制两者的结合活性, 而 NAD^+ 对结合没有影响。【结论】在 *S. rimosus* M4108 中, Rex 是通过响应胞内 NAD(H) 水平的方式来调控 ROP 的表达的。

关键词: 龟裂链霉菌, 氧化应激, 转录抑制因子 Rex, 基因克隆和表达, 凝胶迁移分析

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0038-06

对于微生物而言, 细胞内氧化还原状态的维持是正常生长和消除氧化胁迫必需的重要生理功能, 而细胞内的还原生理状态主要依靠细胞内 NADH/NAD⁺、NADPH/NADP⁺、谷胱甘肽浓度等维持。为了能够及时准确感应和调控自身机能以适应环境条件变化, 微生物已进化形成了相应的感应(监测)细胞内外氧浓度变化的细胞调控机制, 这些传感机制种类多样。目前研究比较透彻的氧化还原传感器有一般的氧化还原传感器^[1]、氧压力传感器^[2]、硫基的氧化还原传感器^[3]、Fe-S 簇传感器^[4]和一些氧匮乏传感器^[5]等。细菌监测氧浓度有直接监测方

式和间接监测方式二种机制。直接监测包括能直接结合氧或感应氧化状态的调控因子。间接监测则是通过监测细胞内某些中间代谢物浓度变化(如 H₂O₂)或细胞内氧化还原状态(如 NADH/NAD⁺)的变化来实现的。

Rex 作为一个响应细胞内 NADH/NAD⁺ 的氧化还原传感器, 最先在 *S. coelicolor* A3 (2) 中被发现^[6]。Rex 是调控细胞色素 *bd* 末端氧化酶操纵子 (*cydABCD*) 表达的阻遏子, 其中细胞色素 *bd* 末端氧化酶对氧有很高的亲和力。当 *S. coelicolor* A3 (2) 生长在氧限制或呼吸由于氧化物受阻条件下时,

基金项目: 国家重点实验室开放课题经费 (2060204); 国家“863 计划” (2007 BAI26B02)

* 通信作者。Tel: +86-21-64251131; Fax: +86-21-64253702; E-mail: guo_mj@ecust.edu.cn

作者简介: 沈晶 (1985 -), 女, 浙江湖州人, 硕士研究生, 主要从事分子微生物学研究。E-mail: shenjing8510@163.com

收稿日期: 2011-10-10; **接受日期:** 2011-11-22

cydABCD 操纵子的转录迅速被诱导。除了 *cydABCD* 操纵子, Rex 作为 *rex-hemACD* 操纵子的一部分还调控它自身的转录^[6]。

至今对 Rex 蛋白研究比较详细的只有 *Bacillus subtilis* Rex (B-Rex)^[7]、*Thermus aquaticus* Rex (T-Rex)^[8] 和 *Streptomyces coelicolor* Rex (S-Rex)^[6], 前二者主要研究 Rex:NADH 结合的晶体结构数据, 还未有 Rex:ROP 结合的相互作用数据。在 *S. coelicolor* A3 (2) 中, 研究着重于 Rex 调控 *cydABCD* 操纵子, 对于 *rex* 操纵子的自身调控还没有进行过研究。本文对来源于好氧土霉素生产菌 *S. rimosus* M4018 中的 Rex 及其对于 *rex* 操纵子的作用进行了研究, 获得了更多关于其 Rex 氧化还原传感器的信息。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 用于质粒扩增与构建, 由本实验室保存。 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株用于蛋白表达, 由本实验室保存。 *S. rimosus* M4018 由英国 Strathclyde 大学 Iain S. Hunter 教授赠送。 T 载体 (pMD19-T) 用于 PCR 产物 T-A 克隆, 购于 TaKaRa。 表达载体 pET28a 由本实验室保存。

1.1.2 培养基: LB 和 M9^[9] 培养基用于 *E. coli* 培养。 TSB (Tryptone soy broth) 培养基用于 *S. rimosus* 的培养, 购于 Merck。

1.1.3 主要试剂: 限制性内切酶 (*EcoR* I, *Hind* III 等) 及 Taq 酶均购于 TaKaRa。 DNA 回收试剂盒为 Axygen 产品。 Ligation Kit, Genome Walking Kit 为 TaKaRa 产品。 Bradford 蛋白定量试剂盒购于天根。 NAD⁺ 和 NADH 购于 Sigma 公司。

1.2 *S. rimosus* M4018 中 *rex* 基因的扩增

根据已报道的 *S. coelicolor* A3 (2) 的 *rex* 基因序列设计正反引物 RexF (5'-GGGGAATTCGTGCAACTGGCCGAGCACAC-3', 下划线为 *EcoR* I 酶切位点) 和 RexR (5'-GGGAAGCTTTCATGCCGCA TCACGGCGGTA-3', 下划线为 *Hind* III 酶切位点), 以 *S. rimosus* M4018 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。 链霉

菌基因组提取的方法参考文献 [10]。

1.3 *S. rimosus* M4018 中 Rex 的生物信息学分析

氨基酸序列通过 Clone Manager 软件进行预测。 使用 NCBI 的 blastp 工具对其多肽氨基酸序列进行同源性比较。 通过 SOPMA^[11] 软件对 Rex 的二级结构进行预测。

1.4 Rex 蛋白在 *E. coli* 中的表达纯化

1.4.1 表达载体的构建: PCR 扩增的 *rex* 基因与 pMD19-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 筛选阳性克隆并测序验证。 挑取鉴定的阳性克隆于 10 mL 含氨苄抗性的 LB 中 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。 提取质粒后用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 回收后与经过相同酶消化的 pET28a 载体连接, 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 涂布含有卡那抗性的 LB 平板, 培养并筛选阳性克隆。

1.4.2 重组蛋白的表达和纯化: 在含有卡那抗性的 LB 中培养 1.4.1 中获得的含有 pET28a-*rex* 质粒的 *E. coli* BL21 (DE3), 重组蛋白使用 IPTG 诱导, SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白表达情况。 诱导表达后的菌体采用超声破碎, 使用镍柱亲和层析纯化带有 His 标签的重组蛋白。 具体表达和纯化方法参照“分子克隆”一书^[9]。 在使用镍柱亲和层析纯化之后, 再使用 1 次 DEAE 阴离子交换层析, 利用 AKTA 全自动操作, 其中 A 相为 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4), B 相为 1 mol/L NaCl, 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4)。 程序: 50 mL 磷酸缓冲液平衡后, 上样, 用 2 个柱体积 5% B 相和 95% A 相冲柱子, 用 6 个柱体积 5% B 相到 100% B 相梯度洗脱, 收集洗脱液。

1.5 圆二色谱测定 Rex 二级结构

取 3 mL 透析浓缩的纯化 Sr-Rex 蛋白溶液 (0.2 g/L), 静置 1 min。 在 JASCO J-815 型圆二色谱仪上记录相应波段的圆二色谱。 测定远紫外圆二色谱的扫描范围为 200 - 260 nm, 测定近紫外圆二色谱的扫描范围为 260 - 340 nm。 激发光和发射光狭缝均设为 1 nm, 扫描速度设为中速, 光谱校正设为开启以消除光栅和检测器响应的波长依赖性。 蛋白样品在 25 $^{\circ}$ C 检测, 扫描两次取平均值。

1.6 *rex* 基因上游的 ROP 片段的扩增

根据在 *S. rimosus* M4018 中获得的 *rex* 基因序列的信息, 设计特异性引物组 SP1 (5'-ACGATC ACGACCGCCAGTCCT-3'), SP2 (5'-GAGCCGAGG TAGGAGAAGTCCT-3') 和 SP3 (5'-GCGGTCAACGC

GCGCAGATACA-3'), 通过染色体步移技术获得 ROP 目的片段。具体实验方法参照 TaKaRa Genome Walking Kit 的使用手册。

1.7 凝胶迁移实验

1.7.1 5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶配方 (总体积 50 mL): 30% 丙烯酰胺, 8.3 mL; 10 × TG 缓冲液 (Tris base, 30.1 g; Glycine, 144.0 g; 去离子水定容至 1 L), 5 mL; H₂O, 36.5 mL; 10% 过硫酸铵, 500 μL; TEMED, 25 μL。

1.7.2 缓冲液: 10 × Loading buffer: 50% 甘油, 0.25% (w/v) 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF; 10 × Binding buffer: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 5% (v/v) 甘油, 40 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L DTT, 1 μg/mL BSA。

1.7.3 反应条件: 分别取 1 μL 蛋白和 1 μL DNA 与 1 μL 10 × binding buffer 和 7 μL H₂O 混合, 20°C 水浴 20 min。电泳前, 先将凝胶预跑 30 min。上样后, 使用 150 V 电压 45 min。电泳结束后将胶在 EB 染液中染色 30 min 后, 在紫外下观察结果。

1.7.4 探针序列: ROP1: 5'-CTTTGTGCACGCGTTCACAAAG-3'。

2 结果

2.1 *S. rimosus* M4018 中 *rex* 基因的克隆和生物信息学分析

通过使用引物 REXF 和 REXR, 以 *S. rimosus* M4018 的基因组为模板进行 PCR 扩增, 获得了一条长度约为 800 bp 的 DNA 片段。通过测序获得了目的片段的具体序列信息且片段长度为 846 bp。使用 Conserved Domains Database^[12] 搜索翻译过的氨基酸序列, 发现此片段编码的多肽含有 Rex 蛋白的保守区域, 长度为 213 个氨基酸, E 值为 9.27×10^{-83} 。通过 blastx 比对后, 发现此片段编码的蛋白氨基酸序列与 *Streptomyces coelicolor* A3 (2), *Streptomyces avermitilis* MA-4680, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces lividans* TK24 的 Rex 有较高同源性, 分别为 84%, 84%, 80%, 71%, 初步断定为 *S. rimosus* M4108 的 *rex* 基因。该核苷酸序列已经提交 GenBank 数据库, 登录号: GQ849479。

同时使用 SOPMA 对 *Sr-Rex* 的二维结构进行预测表明, *Sr-Rex* 蛋白由 42.7% 的 α -螺旋、12.81% 的

延伸链、7.83% 的 β -转角和 36.65% 的无规卷曲组成。无规卷曲和 α -螺旋是 *Sr-Rex* 蛋白最大量的结构元件, 而 β -转角和延伸链则分布于整个蛋白质中。

2.2 圆二色谱测定 *Sr-Rex* 二级结构

通过 *E. coli* 异源表达 *Sr-Rex*, 获得了纯化后的蛋白, 圆二色谱仪分析 *Sr-Rex* 的结果见图 1。从图看远紫外圆二色谱表现为 204 nm 处的正峰和 221 nm 处的强负峰, 分别是 β 折叠特征峰和典型的 α 螺旋特征峰。而近紫外圆二色谱没有特征峰出现, 这说明分子中几乎不含二硫键。用 Jasco Secondary Structure Estimation^[13] 分析, 结果显示以 α 螺旋为主, 与峰型显示结果吻合, 这与 SOPMA 对 *Sr-Rex* 蛋白二级结构预测的结果一致。

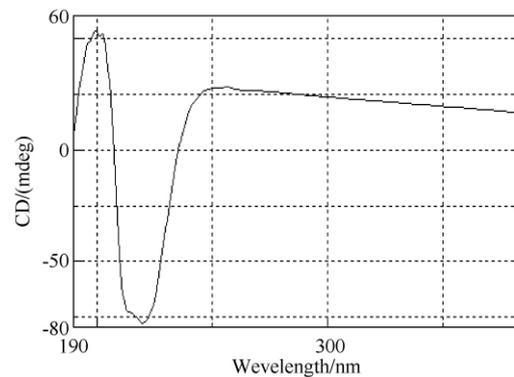


图 1 *Sr-Rex* 的圆二色谱

Fig. 1 The CD spectra of *Sr-Rex*.

2.3 ROP 片段的克隆与测序

根据获得的 *Sr-rex* 基因的序列, 设计 3 对反向引物进行 5' 端步移扩增, 采用 TaRaKa Genome Walking Kit 所提供的 4 个引物 AP1, AP2, AP3, AP4 分别与 3 个反向引物 (序列信息见材料和方法) 进行 4 组 3 轮 PCR 反应, 产物连 T 载体后送测序, 发现是 *Sr-rex* 基因上游的序列。预测 Rex:ROP 结合位点是一段 16 bp 长短的反向重复序列 (5'-TGTGCACGCGTTCACA-3'), 位于 *rex* 结构基因上游, 在 *S. rimosus* M4018 中克隆到的 Rex:ROP 结合位点与 *S. coelicolor* A3 (2) 中的一致^[6]。

2.4 凝胶迁移分析 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) *Sr-Rex*:ROP 生物学活性

2.4.1 *Sr-Rex* 蛋白与 ROP 片段的特异性结合: 通过体外 EMSA 实验, 图 2 显示 *Sr-Rex* 蛋白能与 2.3 中获得的 *Sr-rex* 上游序列特异性的结合, 而非特异

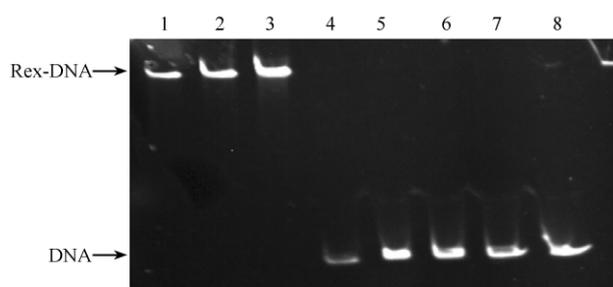


图 2 体外 *Sr-Rex* 蛋白与特异性 DNA 的结合

Fig. 2 *In vitro* binding of *Sr-Rex* with the specific DNA. Lane1: 5 $\mu\text{mol/L}$ specific DNA, 10 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*; Lane2: 10 $\mu\text{mol/L}$ specific DNA, 10 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*; Lane3: 15 $\mu\text{mol/L}$ specific DNA, 10 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*; Lane4, 5, 6, 7: four pieces of unspecific DNA, 10 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*; Lane8: 15 $\mu\text{mol/L}$ specific DNA.

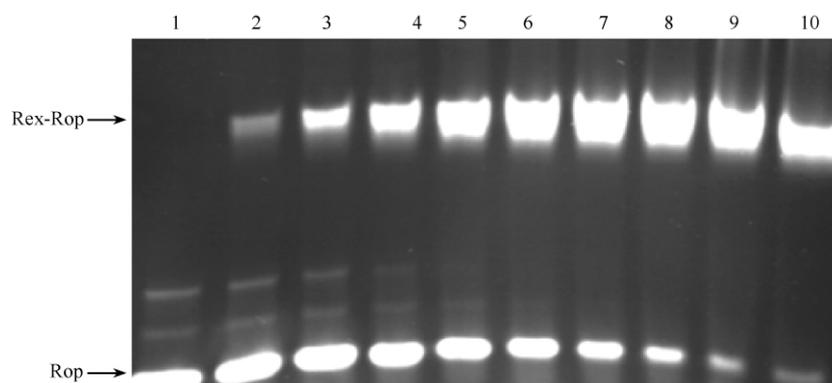


图 3 不同浓度比的 *Sr-Rex* 蛋白与 ROP 序列的体外结合

Fig. 3 *In vitro* binding activity of *Sr-Rex* and ROP using different molar ratios. Lane1: 100 $\mu\text{mol/L}$ ROP1; Lane2: 100 $\mu\text{mol/L}$ ROP1, 2 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*; Lane3: 100 $\mu\text{mol/L}$ ROP1, 4 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*; Lane4: 100 $\mu\text{mol/L}$ ROP1, 6 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*; Lane5: 100 $\mu\text{mol/L}$ ROP1, 8 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*; Lane6: 100 $\mu\text{mol/L}$ ROP1, 10 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*; Lane7: 100 $\mu\text{mol/L}$ ROP1, 12 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*; Lane8: 100 $\mu\text{mol/L}$ ROP1, 15 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*; Lane9: 100 $\mu\text{mol/L}$ ROP1, 18 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*; Lane10: 100 $\mu\text{mol/L}$ ROP1, 20 $\mu\text{mol/L}$ *Sr-Rex*.

2.4.3 NADH 和 NAD^+ 对 *Sr-Rex* 蛋白与 ROP 序列的结合活性的影响: 为了研究 NADH 和 NAD^+ 对 *Sr-Rex* 蛋白与 ROP 的结合活性的影响, 在 2.4.2 中的结合反应进行 20 min 后, 在结合反应液中分别添加不同浓度的 NADH 和 NAD^+ 继续反应 15 min, EMSA 结果如图 4。结果表明高浓度的 NADH 抑制 *Sr-Rex* 蛋白与 ROP1 序列的结合, 且随着 NADH 浓度的增加, 抑制越强, 当 NADH 浓度超过 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 几乎没有 Rex-ROP 条带出现。然而不同浓度的 NAD^+ 则不影响两者的结合。

3 讨论

Dimitris 等^[6] 在 2002 年最早发现了 *S. coelicolor*

性 DNA 与 *Sr-Rex* 不发生作用。初步说明 *Sr-Rex* 蛋白能调控 *Sr-rex* 基因, 与已知的 Rex 蛋白具有相同的生物学功能。

2.4.2 *Sr-Rex* 蛋白与 ROP 序列的结合活性: 以 2.3 中的 16 bp 核心序列为基础, 合成了一段长 22 bp 的单链 ROP1 序列 (序列信息见材料和方法), 比较不同浓度的 *Sr-Rex* 蛋白分别与相同浓度的 ROP 序列的结合情况。从图 3 可知一定浓度的 ROP1 条件下 (100 $\mu\text{mol/L}$), 随着 *Sr-Rex* 蛋白浓度的增加 (从 0 $\mu\text{mol/L}$ 逐渐增加到 20 $\mu\text{mol/L}$), 结合越多, 游离的 ROP1 越来越少, 当蛋白浓度达到 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, ROP1 基本都与之结合, 几乎没有游离, 即达到饱和状态。

A3 (2) 的 Rex 及其响应胞内 NADH/ NAD^+ 氧化还原状态并改变 *cydABCD* 和 *rex-hemACD* 操纵子转录的生物学功能。本实验由于无法获得 *S. rimosus* M4018 的全基因组信息, 所以 *Sr-rex* 的调取只能基于已知同属的 *S. coelicolor* A3 (2) 的相关序列信息。初步的 PCR 扩增获得的目的条带 (约 800 bp) 与 *Sr-rex* 的 777 bp 的长度相近^[14], 片段编码的氨基酸序列与同属的链霉菌的 Rex 至少都有 71% 的同源性, 而且在此序列中也识别到了 Rex 蛋白的保守区域。由此可以判断, 我们获得的基因就是 *S. rimosus* M4018 中的 *rex*。同时, 通过染色体步移, 在 *Sr-rex* 编码区上游找到 Rex: ROP 结合位点也与 *S. coelicolor* A3 (2) 中发现的一致^[6]。

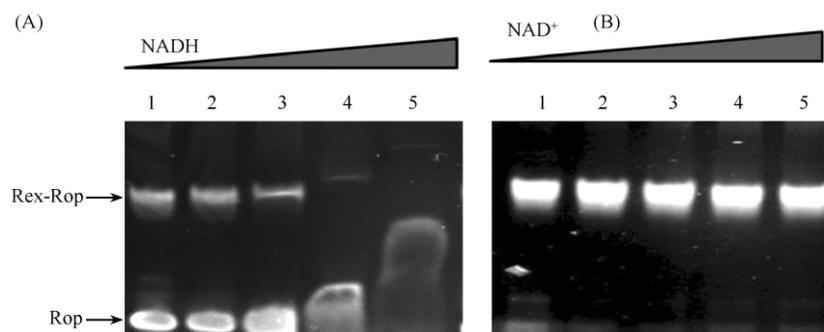


图4 NADH 和 NAD^+ 对 *Sr-Rex* 蛋白与 *ROPI* 序列的结合活性的影响

Fig. 4 The effect of NADH and NAD^+ on ROP-binding activity of *Sr-Rex*. Figure a: Lane1 - 5 (the concentration of NADH): 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 100.0 $\mu\text{mol/L}$. Figure b: Lane1 - 5 (the concentration of NAD^+): 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 100.0 $\mu\text{mol/L}$.

由于 *Sr-Rex* 蛋白中几乎不含二硫键,所以它不是以通过感应 H_2O_2 , O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 等中间代谢物方式进行调控的,在 *S. coelicolor* A3(2) 中, *Rex* 是通过一个 Rossmann 折叠来结合 NADH 和 NAD^+ 来调控相关基因表达^[6]。在 *S-Rex* 中 Gly-X-Gly-X-X-Gly 这个特征序列对这些辅因子的结合至关重要,同样在 *Sr-Rex* 中也存在这个保守序列,即 Gly₁₀₀-Ile₁₀₁-Gly₁₀₂-Asn₁₀₃-Leu₁₀₄-Gly₁₀₅,但是 NADH 和 NAD^+ 对 *Rex* 和 *ROP* 的相互作用影响却有所不同。在本实验中,当 NADH > 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,在 EMSA 中能抑制 *Sr-Rex* 和 *ROP* 的结合,并使 *Rex* 从 *ROP* 上解离下来,而高浓度的 NAD^+ 对结合则没有明显的抑制效应。由于细胞内是 NADH 和 NAD^+ 共存的环境,所以 NAD^+ 和 NADH 能竞争性地与 *Rex* 的结合,从而调控下游基因的转录强度。虽然链霉菌中 NAD(H) 的水平 and NADH/NAD^+ 还没有被详细研究过,但是在别的细菌中已经发现在快速生长的有氧培养中, NADH/NAD^+ 维持在很低的水平。例如, *E. coli* 在恒化器 10% 溶氧的稳定状态中,总的 NAD(H) 库中 NADH 占大约 3%,而在氧限制的条件下 NADH/NAD^+ 显著增加^[15]。另外 Woodmansee 等人^[16] 研究发现,在 *E. coli* 中呼吸抑制剂氰化物能引起 NADH 浓度增加 16 倍。在 *S. coelicolor* A3(2) 中氰化物能诱导启动子 *cyd* 的表达,但在有氧生长条件下 *cyd* 和 *rex* 的转录被 *Rex* 抑制。有氧条件下,胞内总的 NAD(H) 库中 NADH 不到 2%^[6]。由此我们推测,在 *S. rimosus* M4018 中, *Rex* 蛋白应该也是通过响应胞内 NADH/NAD^+ 的方式来调控 *cydABCD* 操纵子和自身的表达,从而响应环境的变化。本文通过对于 *S. rimosus* M4018 中 *Rex* 的研究,为今后在 *S. rimosus* 中开发应用于原位监测细胞内

NADH/ NAD^+ 平衡的 *Rex* 探针提供分子基础。

参考文献

- [1] Bauer CE, Elsen S, Bird TH. Mechanisms for redox control of gene expression. *Annual Reviews in Microbiology*, 1999, 53(1): 495-523.
- [2] Price CW. Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2000.
- [3] Paget MSB, Buttner MJ. Thiol-based regulatory switches. *Annual review of genetics*, 2003, 37(1): 91-121.
- [4] Kiley PJ, Beinert H. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 2003, 6(2): 181-185.
- [5] Patschkowski T, Bates DM, Kiley PJ. Mechanisms for sensing and responding to oxygen deprivation. //Storz G, Hengge-Aronis R. *Bacterial Stress Responses*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2000, 61-78.
- [6] Brekasis D, Paget MSB. A novel sensor of NADH/NAD^+ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The EMBO Journal*, 2003, 22(18): 4856-4865.
- [7] Wang E, Bauer MC, Rogstam A, Linse S, Logan DT, Von Wachenfeldt C. Structure and functional properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor *Rex*. *Molecular microbiology*, 2008, 69(2): 466-478.
- [8] Sickmier EA, Brekasis D, Paranawithana S, Bonanno JB, Paget MSB, Burley SK, Kielkopf CL. X-ray structure of a *Rex*-family repressor/ NADH complex insights into the mechanism of redox sensing. *Structure*, 2005, 13(1): 43-54.
- [9] Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

- [10] Hopwood, DA. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. Norwich: John Innes Foundation, 1985.
- [11] Geourjon C, Deleage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Computer applications in the biosciences*, 1995, 11 (6) : 681-684.
- [12] Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Gwadz M, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic acids research*, 2005, 33 (suppl 1) : D192-D196.
- [13] Protein Secondary Structure Estimation Instruction Manual. Tokyo: Japan Spectroscopic Co. Ltd., 1988.
- [14] Bentley S, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 2002, 417 (6885) : 141-147.
- [15] Wimpenny JWT, Firth A. Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *Journal of Bacteriology*, 1972, 111 (1) : 24-32.
- [16] Woodmansee AN, Imlay JA. Reduced Flavins Promote Oxidative DNA Damage in Non-respiring *Escherichia coli* by Delivering Electrons to Intracellular Free Iron. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (37) : 34055-34066.

Cloning and expression of the redox-sensing transcriptional repressor Rex and *in vitro* DNA-binding assay of the Rex and *rex* operator in *Streptomyces rimosus* M4018

Jing Shen, Zhenyu Tang, Ciyang Xiao, Meijin Guo*

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: [Objective] The aim is to explore the self-regulation mechanism of the *rex* in *Streptomyces rimosus* M4018. [Methods] We cloned the *rex* of *S. rimosus* M4018 (*Sr-rex*) based on its homologous sequence in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and its upstream *rex* operator (ROP) fragment using PCR and genome walking. An electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was applied to analyze the regulation of *rex* to ROP *in vitro*. [Results] *Sr-rex* is 846 bp in length and has a 84% identity with the one in *S. coelicolor* A3 (2) in amino acid sequence. It was deposited in Genbank under the accession number GQ849479. The expressed *Sr-Rex* by *E. coli* was mainly composed of alpha-helices and beta-sheets, which was in compliance with the prediction. An Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) confirmed the specific binding activity of *Sr-Rex* with ROP. Meanwhile, we synthesized a 22 bp DNA fragment (ROP1) based on the minimal binding site of ROP. The maximal binding ratio of this fragment to *Sr-Rex* was 5:1 (molar). NADH negatively affected the binding activity, however, NAD⁺ had no impact on it. [Conclusion] In *S. rimosus* M4018, the Rex regulated the gene expression of ROP via sensing the intracellular level of NAD (H).

Keywords: *Streptomyces rimosus*, redox-sensing, transcriptional repressor Rex, gene cloning and expression, electrophoretic mobility shift assay

(本文责编: 张晓丽)

Supported by Open Funding Project of the State Key Laboratory of Bioreactor Engineering (2060204) and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007 BAI26B02)

* Corresponding author. Tel: +86-21-64251131; Fax: +86-21-64253702; E-mail: guo_mj@ecust.edu.cn

Received: 10 October 2011 / Revised: 22 November 2011