

國立交通大學

生物科技研究所

碩士論文

cAMP 對大腸桿菌 *ompA* mRNA 穩定性之研究

Study the effect of cAMP on the stability of
ompA expression in *Escherichia coli*



研究生：徐其正

指導教授：曾慶平 博士

中華民國九十八年七月

cAMP 對大腸桿菌 *ompA* mRNA 穩定性之研究

Study the effect of cAMP on the stability of *ompA* expression
in *Escherichia coli*

研究生：徐其正

Student: Hsu Chi-Cheng

指導教授：曾慶平 博士

Advisor: Dr. Ching-Ping Tseng

國立交通大學

生物科技研究所



Submitted to Institute of Biological Science and Technology
National Chiao Tung University

In partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science

in

Biological Science and Technology

Jul. 2009

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十八年七月

目錄

	頁次
中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
表目錄.....	iii
圖目錄.....	iv
一、緒論與研究目的.....	1
二、文獻回顧.....	3
2.1 外膜蛋白 A 的結構.....	3
2.2 外膜蛋白質 A (<i>ompA</i>)之基因的表現.....	4
2.3 <i>ompA</i> mRNA 在細胞中的穩定性.....	4
2.4 OmpA 主要的功能.....	6
2.5 cAMP 的特性.....	6
2.6 cAMP receptor protein (CRP).....	7
2.7 cAMP-CRP 活化基因表現的調控機制.....	9
2.8 大腸桿菌 small RNA(sRNA).....	10
2.9 大腸桿菌 small RNA 功能.....	11
2.10 Small RNA 藉由序列互補(basepairing)的調控機制.....	12
2.11 大腸桿菌 RNA 伴隨蛋白(RNA chaperone) : Hfq.....	14
2.12 Hfq 的功能.....	15
三、材料方法與原理.....	17
3.1 材料.....	17
3.1.1 菌種.....	17
3.1.2 藥品.....	17

3.2 原理.....	22
3.2.1 批次式培養(batch culture)大腸桿菌生長模式.....	22
3.2.2 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)之原理.....	23
3.2.3 mRNA 半衰期計算原理.....	23
3.2.4 反轉錄 RNA 成 cDNA 原理.....	24
3.2.5 同步定量聚合酶連鎖反應(Real-time quantitative PCR)原理....	25
3.2.6 基因敲除(Gene knockout)原理.....	25
3.3 方法.....	26
3.3.1 大腸桿菌生長條件控制與培養方法.....	26
3.3.2 mRNA 穩定性測定方法.....	26
3.3.3 大腸桿菌總 RNA 製備方法.....	27
3.3.4 北方墨點法(Northern blot)分析.....	27
3.3.5 Genomic DNA 抽取製備方法.....	32
3.3.6 質體 DNA 微量抽取製備方法(Plasmid DNA miniprep purification).....	33
3.3.7 DNA 洋菜膠體電泳法(Agarose gel electrophoresis).....	34
3.3.8 電泳膠體中回收 DNA 片段(Elution).....	34
3.3.9 基因敲除(Gene Knockout)方法.....	35
3.3.10 總 RNA 樣品去除殘留 DNA 方法.....	41
3.3.11 反轉錄(reverse transcription)第一股合成 cDNA 方法.....	42
3.3.12 Real-time quantitative PCR(Q-PCR)方法.....	42
四、結果.....	44
4.1 轉錄層次(transcription level)上 cAMP 影響 <i>ompA</i> 基因表現.....	44
4.2 轉錄後層次(post-transcription level)上 cAMP 影響 <i>ompA</i> mRNA 穩定性.	45
4.3 Small RNA 影響 <i>ompA</i> mRNA 穩定性篩選.....	46

4.4 RseX sRNA 影響 <i>ompA</i> mRNA 穩定性.....	47
4.5 DsrA sRNA 影響 <i>ompA</i> mRNA 穩定性.....	47
4.6 轉錄層次(transcription level)上 <i>dsrA</i> small RNA 影響 <i>ompA</i> 基因表現.	48
4.7 cAMP 影響 <i>dsrA</i> small RNA 基因的表現.....	48
4.8 Real-time PCR cAMP 影響 <i>dsrA</i> small RNA 基因的表現.....	49
4.9 Real-time PCR cAMP 影響 <i>gcvB</i> , <i>ryhA</i> small RNA 基因與 <i>hfq</i> 基因的表現.	50
4.10 cAMP 影響 <i>hfq</i> 基因的表現.....	51
4.11 GcvB sRNA 影響 <i>ompA</i> mRNA 穩定性.....	52
五、討論.....	53
5.1 轉錄層次上 cAMP 影響 <i>ompA</i> 基因的表現.....	53
5.2 轉錄後層次上 cAMP 影響 <i>ompA</i> mRNA 穩定性.....	53
5.3 早期對數生長期(OD 0.3)small RNA 影響 <i>ompA</i> mRNA 穩定性.....	55
5.4 早期對數生長期(OD 0.3), cAMP 影響 <i>hfq</i> 基因表現.....	59
六、結論.....	62
6.1 結論表歸納本實驗總結果.....	62
6.2 結論圖.....	64
七、論文圖表.....	65
八、參考文獻.....	86
九、附錄.....	91

中文摘要

大腸桿菌之 small RNA (sRNA) 藉由序列互補的方式，與 Hfq 協同結合到 messenger RNA 上，可調控 messenger RNAs 穩定性與轉譯。先前研究指出 cAMP-CRP 活化一些 sRNA 基因表現，例如 Spot42 與 RyeE，並藉由結合到 sRNA promoter 區域來調控。cAMP-CRP 在大腸桿菌又扮演 transcriptional activator 角色，藉由結合到 promoter，增加與 RNA polymerase 之間的交互作用，活化基因的表現。

本研究將大腸桿菌野生菌株與 *cya* 基因突變菌株，分別培養在 LB 與 LB 加 glucose 培養液，結果發現當 glucose 存在或 *cya* 基因突變下，*ompA* mRNA 的表現量明顯下降，結果顯示 cAMP 可調控 *ompA* 基因的表現，我們更進一步分析 *ompA* mRNA 在 early log-phase 與 log-phase 的穩定性，發現當 cAMP 不存在時，*ompA* mRNA 穩定性下降快速，結果說明了 cAMP 可增加 *ompA* mRNA 的穩定性。

迄今 cAMP 影響 mRNA 穩定性的機制並不清楚，我們推測 *ompA* mRNA 在 post transcription 層次上的穩定性並非藉由 cAMP 直接的影響。根據 northern 實驗分析野生菌株與 *cya* 突變菌株，結果顯示 *hfq* 基因表現受 cAMP 所影響。但並未找到會影響 *ompA* mRNA 穩定性並且是藉由 cAMP 調控的 sRNA，因此我們認為 Hfq 可能是參與調控 *ompA* mRNA 穩定性機制中的主要者。

先前研究已證實 *ompA* mRNA 穩定性會受 Hfq 所降解，由於我們發現 cAMP 的存在確實降低了 *hfq* mRNA 的量。因此推測增加 *ompA* mRNA 穩定性是藉由降低 *hfq* 基因的表現所造成。

ABSTRACT

In *E. coli*, small RNAs primarily serve as regulators with Hfq to modulate messenger RNA stability and translation efficiency by base-pairing with target messenger RNAs. Previous studies have reported that cAMP-CRP regulates small RNA expression by modifying promoter activity, such as *spot42* and *ryeE* gene. As far as we know, the cAMP-CRP acts as a transcriptional activator in *E. coli*, by binding to promoters and enhancing the interaction with RNA polymerase.

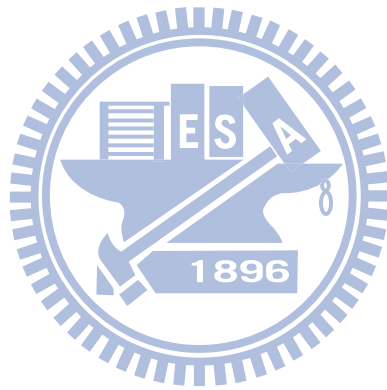
In this research, *E. coli* wild-type and *cya* mutant strains were grown in LB and LB+Glc, respectively. We found that the amount of *ompA* mRNA was down-regulated when glucose was added or *cya* was mutated. These results suggested that cAMP played a regulatory role on *ompA* expression. Furthermore, we analyzed *ompA* mRNA stability in early log-phase and log-phase. When cAMP was absent, the *ompA* mRNA was degraded rapidly. This result indicated that the stability of *ompA* mRNA was elevated by cAMP.

So far, the mechanism of cAMP regulation of RNA stability is not clear. In this study, we propose that post-transcription of *ompA* mRNA was not directly affected by cAMP. According to the northern blot analysis of wild type and *cya* mutant, the results showed that the expression of *hfq* encode RNA chaperone was affected by *cya*. However, sRNAs were not found to involve in *ompA* mRNA stability. Thus we suggested that Hfq may participate in regulation of *ompA* mRNA stability.

The Hfq down-regulates *ompA* mRNA stability which has been demonstrated in previous studies. In this study, we found that the amount of *hfq* mRNA was down-regulated while cAMP was present. Therefore, the stability of *ompA* mRNA may be increased by reducing *hfq* gene expression.

表目錄

結論表、歸納本實驗總結果.....	62
表一、本實驗所使用的菌株與質體.....	65
表二、可能影響本實驗 <i>ompA</i> mRNA 穩定性的 small RNA.....	66



圖目錄

結論圖.....	64
圖一、大腸桿菌編號 BW25113 野生菌株(wt)與 cAMP 基因突變菌株(Δcya)生長曲線.....	67
圖二、(A)大腸桿菌野生株(wt)與 <i>cya</i> 突變菌(Δcya)分別培養在 LB 與 LB 外加葡萄糖下，生長至對數生長期時(OD 0.4)，停止培養並抽取總 RNA 進行 Northern，觀察 <i>ompA</i> mRNA 基因表現量的變化。(B)internal control 16S 與 23S rRNA 電泳圖.....	68
圖三之一、大腸桿菌野生株(wt)與 <i>cya</i> 突變菌(Δcya)分別培養在 LB 與 LB 外加葡萄糖下，生長至早期對數生長期時(OD 0.3)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern blot 分析 <i>ompA</i> mRNA 穩定性變化.....	69
圖三之二、Internal control RNA 電泳圖.....	70
圖四之一、大腸桿菌野生株(wt)與 <i>cya</i> 突變菌(Δcya)分別培養在 LB 與 LB 外加葡萄糖下，生長至對數生長期時(OD 0.5)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern blot 分析 <i>ompA</i> mRNA 穩定性變化.....	71
圖四之二、Internal control RNA 電泳圖.....	72
圖五、(A)確認 <i>rseX</i> sRNA 基因敲除，利用 KT forwark 和 K2 reverse 引子，PCR Anti-Kanamycin(<i>kan</i>) gene marker 的電泳圖，共 486b. p。(1)為負 control 組 PCR 野生菌株 DNA，(2)為正 control 組 PCR 質體 pKD13，(3)~(5)為 PCR <i>rseX</i> sRNA 基因敲除菌株。(M)為 100b. p Marker。 (B) 確認 <i>rseX</i> sRNA 基因敲除位置，利用基因外所設計的引子與 K2 引子形成一對 Forward 和 Reverse 引子，PCR 的電泳圖，共 868b. p。(1)為負 control 組 PCR 野生菌株 DNA，(2)~(4)為 PCR <i>rseX</i> sRNA 基因敲除菌株。(M)為 100b. p Marker.....	73
圖六之一、大腸桿菌野生株(wt)與 <i>rseX</i> 突變菌($\Delta rseX$)分別培養在 LB 與 LB 外加葡萄糖下，生長至早期對數生長期時(OD 0.3)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern	

blot 分析 *ompA* mRNA 穩定性變化..... 74
圖六之二、Internal control RNA 電泳圖..... 75

圖七、確認 *dsrA* sRNA 基因敲除與敲除位置。(1)利用 KT forward 和 K2 reverse 引子，PCR Anti-Kanamycin(*kan*) gene marker 的電泳圖，共 486b. p。(2)利用基因外所設計的引子與 KT 引子形成一對 Reverse 和 Forward 引子，PCR 的電泳圖，約 1.2Kb。(M)為 100b. p marker..... 76

圖八之一、(A)(B)分別表示第一次實驗與第二次實驗結果。將大腸桿菌野生株(wt)與 *dsrA* 突變菌($\Delta dsrA$)培養在 LB 培養液，生長至早期對數生長期時(OD 0.3)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern blot 分析 *ompA* mRNA 穩定性變化..... 77
圖八之二、(A)(B)Internal control RNA 電泳圖..... 78

圖九、(A)大腸桿菌野生株(wt)與 *dsrA* 突變菌($\Delta dsrA$)分別培養在 LB 下，生長至早期對數生長期時(OD 0.3)，停止培養並抽取總 RNA 進行 Northern，觀察 *ompA* mRNA 基因表現量的變化。(B)internal control 16S 與 23S rRNA 電泳圖..... 79

圖十、(A)Northern 分析 cAMP 影響 *dsrA* 基因的表現，(a)正對照組：野生株培養 LB 於 20°C，OD 0.3 時停止培養並抽取總 RNA，北方墨點法分析 *dsrA* sRNA。(b)負對照組：*dsrA* 突變菌培養 LB 於 20°C，OD 0.3 時停止培養並抽取總 RNA，北方墨點法分析 *dsrA* sRNA。(c)野生株培養 LB 於 37°C，OD 0.3 時停止培養並抽取總 RNA，北方墨點法分析 *dsrA* sRNA。(d)野生株培養 LB 外加葡萄糖培養液於 37°C，OD 0.3 時停止培養並抽取總 RNA，北方墨點法分析 *dsrA* sRNA。(e)*cya* 突變菌株培養 LB 於 37°C，OD 0.3 時停止培養並抽取總 RNA，北方墨點法分析 *dsrA* sRNA。(f) *cya* 突變菌株培養 LB 外加葡萄糖培養液於 37°C，OD 0.3 時停止培養並抽取總 RNA，北方墨點法分析 *dsrA* sRNA。F 表示 full length *dsrA* sRNA，T 表示 truncated forms *dsrA* sRNA(Repoila and Gottesman, 2001)。(B)Internal control 電泳圖..... 80

圖十一、Real-time PCR(Q-PCR) *dsrA* 基因表現。大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌(Δcya)培養於 LB 培養液，生長至早期對數生長期時(OD 0.3)停止培養，抽取總 RNA 並針對 *dsrA* sRNA 進行反轉錄成 *dsrA* cDNA，Q-PCR *dsrA* 基因表現量。野生株(wt)培養再 LB 培養液 *dsrA* sRNA 量換算成一倍。橫軸為相對比較數值(relative fold)..... 81

圖十二、Real-time PCR(Q-PCR) *gcvB*、*ryhA* sRNA 與 *hfq* 基因表現。大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌(Δcya)培養在 LB 培養液，生長至早期對數生長期時(OD

0.3)停止培養，抽取總 RNA 並進行反轉錄成總 cDNA，Q-PCR *gcvB*、*ryhA* sRNA 與 *hfq* 基因表現量。野生株(wt)培養再 LB 培養液 *gcvB*、*ryhA* sRNA 與 *hfq* mRNA 量換算成一倍。橫軸為相對比較數值(relative fold)..... 82

圖十三、(A)大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌(Δcya)分別培養在 LB 與 LB 外加葡萄糖下，生長至早期對數生長期時(OD 0.3)，停止培養並抽取總 RNA 進行 Northern blot，觀察 *hfq* mRNA 基因表現的變化。(B)internal control 23S 與 16S 電泳圖..... 83

圖十四、確認 *gcvB*sRNA 基因敲除與敲除位置。(1)利用 KT forwark 和 K2 reverse 引子，PCR Anti-Kanamycin(*kan*) gene marker 的電泳圖，共 486b. p。(2)利用基因外所設計的引子與 KT 引子形成一對 Reverse 和 Forward 引子，PCR 的電泳圖，約 1.2Kb。(M)為 100b. p marker..... 84

圖十五、(A)將大腸桿菌野生株(wt)與 *gcvB* 基因突變菌($\Delta gcvB$)培養在 LB 培養液，生長至早期對數生長期時(OD 0.3)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern blot 分析 *ompA* mRNA 穩定性變化。(B)Internal control 電泳圖..... 85

