

一、緒論與研究目的

在大腸桿菌外膜蛋白質家族中，OmpA 為主要蛋白質，功能是維持大腸桿菌外膜的穩定性(Wang, 2002)。先前研究指出 *ompA* 基因的表現受大腸桿菌轉錄因子 cAMP-CRP 所活化(Gibert and Barbe, 1990)，而 cAMP-CRP 已知在大腸桿菌基因轉錄層次上扮演重要角色，可調控超過百餘基因，藉由結合到基因啟動子鄰近的區域，來增強或抑制該基因的表現(Busby *et al.*, 1999)。

Small noncoding RNA(sRNA)分子發現在微生物中，由一段很短的 RNA 序列所組成，它不會轉譯任何蛋白質，主要功能為調控 mRNA 的轉譯與穩定性(Gottesman, 2004)。目前在大腸桿菌中已經有超過 50 個以上的 sRNA 被發現與鑑定，大多數的 small RNA 藉由序列互補的方式與標定的 mRNA 作結合，影響該 mRNA 的轉譯或穩定性。先前已有文獻報導 small RNA 可調控基因，例如在細胞內 Fe 缺乏時，sRNA RyhB 會降低 Fe 儲存蛋白質基因的表現(Massé and Gottesman, 2002)。當細胞內葡萄糖增加時，Spot 42 sRNA 序列與 *galK* mRNA 互補，阻擋核糖體結合位置，間接增加 Gale 與 GalK 蛋白質的比例(Moller *et al.*, 2002)。而 sRNA 基因表現本身也受到調控，在不同環境條件下，sRNA 在細胞中的量也會有所不同，例如當大腸桿菌生長到穩定後期(stationary phase)時，sRNA MicA 會大量的被表現，影響 OmpA 蛋白質的表現(Rasmussen *et al.*, 2005)。

以往研究結果認為 cAMP 為細胞內轉錄因子 CRP 蛋白的輔因子(cofactor)，與 CRP 形成 cAMP-CRP 複合物，在轉錄的層次上，

可活化或抑制基因的表現，此外 cAMP-CRP 複合物藉由結合到 sRNA 啟動子區域活化一些 sRNA 基因表現，例如：Spot42、RyeE(Johansen *et al.*, 2008)。而 sRNA 在細胞內又與 Hfq 共同作用，扮演著調控 post-transcription 層次上 mRNA 的穩定性或是轉譯。所以我們認為 cAMP 在 mRNA post-transcription 層次上也具有間接調控的功能，作用機制可能是藉由影響 sRNA 或是 Hfq 所造成。此研究中我們將焦點擺在探討 post-transcription 層次上 *ompA* mRNA 的穩定性，我們發現 cAMP 存在下，提升 *ompA* mRNA 的穩定性，但此現象可能不是 cAMP 直接調控 *ompA* mRNA 的穩定性，而是 cAMP 間接影響 sRNA 或是 Hfq 而造成。因此希望能建立模式以了解 cAMP 影響 *ompA* mRNA 穩定性相關的機制，進一步了解大腸桿菌生理與基因調控的關係。



二、文獻回顧

2.1 外膜蛋白質 A(OmpA)結構

在大腸桿菌(*Escherichia coli*)外膜蛋白質家族(outer membrane proteins family)中，外膜蛋白質 A(outer membrane protein A, OmpA)為主要外膜蛋白，大量出現在細胞外膜結構上。OmpA 蛋白質共由 347 個胺基酸所構成(Sugawara and Nikaido, 1994)，主要區分成三部分：曝露細胞外的蛋白質圈環(loops)之親水性區域、8 個反向平行 β 摺板(β -barrel)嵌入外膜、聯繫內外膜之間肽聚糖(peptidoglycan)的蛋白質區域(Wang, 2002)。OmpA 蛋白也大量存在於許多革蘭氏陰性菌(gram-negative)細胞外膜中，以靠近 N 端反向平行 β 摺板蛋白質序列保留性最大(highly conserved)，曝露細胞外的蛋白質圈環親水性區域蛋白質序列保留性最低(Wang, 2002)。

2006 年 Hong 等人證實 OmpA 蛋白允許離子通過，結構上屬於通道蛋白，非專一性也允許一些小物質通過，利用 NMR 證實其分子機制是利用胺基酸鹽橋的改變，開啟或關閉此通道蛋白(Arg138-Glu52 關；Lys82-Glu52 開)，藉此使細胞在受滲透壓環境影響下得以生存。而此通道蛋白孔徑的大小可因溫度影響而改變，由原本較小孔徑的 8 個反向平行 β 摺板，藉由溫度提高，形成大孔徑的 16 個反向平行 β 摺板(Zakharian and Reusch, 2005)。另外，OmpA 蛋白質曝露在細胞外親水性的區域也是噬菌體(phage)的接受體(receptor)，會對噬菌體感染有敏感性

(Datta *et al*, 1977)。

2.2 外膜蛋白質 A (*ompA*)之基因的表現

ompA 基因早在 1977 年就已經被 Chai 和 Foulds 等人發現(Chai and Foulds, 1977)。*ompA* 基因序列長度 1041bp，基因上游包含兩個啟動子(promoters)，分別為 *ompA*₁ 和 *ompA*₂，*ompA*₁ 的活化需要轉錄活化因子(transcription activator)cAMP-CRP 複合物的協助(Gibert and Barbe, 1990)。而轉錄(transcript) *ompA* 之 mRNA 在細胞中的穩定性隨生長速率上升而上升，直到細胞生長到穩定的狀態(stationary phase)時，才迅速從細胞中消失。OmpA 蛋白大量存在細胞中，平均每個細胞含超過 100000 以上的副本數(Koebnik *et al*, 2000)，而 *ompA* 基因表現受到環境因子強烈影響，例如在酸性厭氧情況下生長，OmpA 蛋白質表現量會上升(Yohannes *et al*, 2004)；或是在氮源缺乏的情況下生長，OmpA 蛋白質表現量也會上升(Baev *et al*, 2006)，若受到噬菌體 T2, T4 或 T7 感染，*ompA* mRNA 穩定性會下降(Ueno and Yonesaki, 2004)。

2.3 *ompA* mRNA 在細胞中的穩定性

ompA mRNA 穩定性受到細胞生長速率影響(Nilsson *et al*, 1984)，當細胞生長於對數生長期(exponential growth phase)或生長速度快速的情況下，*ompA* mRNA 的穩定性也隨之而上升，直到細胞生長到穩定的狀態(stationary phase)時，才迅速從細

胞中消失。在 stationary phase 下 *ompA* mRNA 的降解主要是藉由大腸桿菌中 *micA* sRNA 所調控(Aamann Rasmussen *et al*, 2005), *micA* sRNA 與細胞中 RNA 伴隨蛋白(RNA chaperone)-Hfq 做結合, 形成一複合物後, 利用序列互補的方式再與 *ompA* mRNA 轉譯(translation)之領導區域序列互補結合, 藉此防止核糖體(ribosome)蛋白的結合, 降低了 OmpA 蛋白質的表現, 也增加了內核酶 E(RNase E)的切割, 使穩定性下降(Rasmussen *et al*, 2005)(Vytvytska *et al*, 2000 & 1998)。*ompA* mRNA 5' 端領導序列在一般環境下會形成兩個髮夾結構(stem-loop), 分別為 hp1 與 hp2(Stephen *et al*, 2007), 在 hp1 到 hp2 之間與 hp2 到核糖體結合位置(ribosome binding site, RBS)之間, 都具有內核酶 E(RNase E)的切割位, 分別為 ss1 與 ss2(Stephen *et al*, 2007)。在細胞生長於對數生長期(exponential growth phase)或生長速度快速的情況下, 由於細胞中核糖體(ribosome)次單位 30S 的量大於 *micA* 與 Hfq, ss2 切割位受到核糖體(ribosome)次單位 30S 的結合保護, 使 *ompA* mRNA 穩定性提高, 增加轉譯作用; 但當細胞生長到穩定期(stationary phase)或生長緩慢時, *micA* 與 Hfq 量大於 30S 次單位的量, 核糖體次單位 30S 的結合位置(RBS)附近受到 *micA* 與 Hfq 占據, 阻止核糖體次單位 30S 的結合, 反而增加了 RNase E 的切割, *ompA* mRNA 穩定性下降(Udekwu *et al*, 2005)(Vytvytska *et al*, 2000)(Stephen *et al*, 2007)。*micA* small RNA 與 *hfq* 基因大量表現情況也是在大腸桿菌生長到穩定期時(Rasmussen *et al*, 2005), *micA* 基因的表現又正向受到 σ 因子 E(Sigma E, σ^E)所活化, 以至於 *ompA* 基因的表現負向受到 Sigma E 與 *micA* sRNA 所影響(Stephen *et al*, 2007),

而此降解機制的調控集中在 *ompA* mRNA 5' 端非轉譯區域。

2.4 OmpA 主要的功能

OmpA 蛋白質大量出現在革蘭氏陰性菌(gram-negative)外膜(outer membrane)結構上。其主要功能再維持細胞外膜的穩定性，以適應各種環境或外在因素的影響(Wang, 2002)。例如 *ompA* 基因突變的菌株對環境中含有 SDS(清潔劑中一成分，可破壞細菌細胞膜結構)、膽鹽(cholate)與酸性物質特別敏感，或是受到滲透壓衝擊(Osmotic Shock)，*ompA* 基因突變菌株幾乎無法生存(Wang, 2002)。一般認為 OmpA 蛋白質功能主要集中在中間部分較保守的 β 摺板(β -barrel)區域(Wang, 2002)。

2.5 cAMP 的特性

在大腸桿菌，生長條件不同會影響 cAMP 的量，若生長在以葡萄糖(glucose)當作碳原(carbon source)下，間接影響 cAMP 的量降低，已知此影響是藉由抑制產生 cAMP 的酵素 Adenylyl Cyclase。原因在於 adenylate cyclase 的活性大部分是由轉譯後調控(post-translation regulation)所影響。經由 PTS (phosphoenolpyruvate phosphotransferase system)所傳遞的醣類與 adenylate cyclase 都是 PEP(phosphoenolpyruvate)磷酸根的受質。當葡萄糖存在時，葡萄糖較 adenylate cyclase 易接受 PEP 所釋放出的磷酸根，未被磷酸化的 adenylate cyclase 沒有活性無法發揮作用；反之，缺乏葡萄糖時 adenylate cyclase

可充分被磷酸化並提昇活性增加 cAMP 合成速率 (Botsford *et al*, 1992)。

而產生 adenylylase 的 *cya* 基因位於 *E. coli* 基因圖譜中 85.7 分鐘的位置，adenylylase 活性主要可經由轉錄及轉譯後兩階段來調控 (transcriptional、posttranslational regulation) (Botsford *et al*, 1992)。其中轉錄調控是限制 (limited) *cya* 表現的主要層次。另外 *cya* mRNA 轉錄後的穩定性也是影響 cAMP 表現量的因素之一，2008 年 Akira 等人指出 RNase LS 會降低 *cya* mRNA 在細胞中的穩定性，間接降低 cAMP 的量與 CRP 蛋白的產量 (Iwamoto *et al.*, 2008)。當 *E. coli* 細胞中 *cya* 增加六倍表現時便會導致菌體的死亡 (Reddy *et al*, 1985)，因此菌體必須嚴格地控制 *cya* 的表現量以確保生存。

cya 基因本身含有 3 個起動子 (promoter)，其中控制能力最強的為 *cyaP2*，它所包含的操縱子 (operon) 區域同時也是 cAMP-CRP 複合物結合的位置。cAMP-CRP 複合物對 *cya* 基因扮演著抑制者的角色，cAMP-CRP 複合物可藉由結合在 *cya* 基因調控子 -20 至 +11 的位置，此部份與 RNA 聚合酶結合的區域重疊，結合後造成 *cya* 基因被抑制，降低其表現量可達 4~5 倍之多 (Aiba *et al.*, 1985)。但當 cAMP 量下降時，cAMP-CRP 複合物也可增加 *cya* 基因的表現量，形成一個自我調控循環系統 (Iwamoto *et al.*, 2008)。

2.6 cAMP receptor protein (CRP)

大腸桿菌 cAMP receptor protein (CRP) 又可稱為 catabolite activator protein (CAP)。由兩個相同次單位所組成(Dimer)，分子量大約 45KDa。CRP 的每一個次單元體中，氮(N)端區域(amino-proximal domain) 擁有豐富的 β -sheet 結構，形成與 cAMP 結合的袋口(procket)。而碳(C)端區域(carboxy-proximal domain)則為負責與 DNA 結合的 helix-turn-helix 結構(Busby and Richard H, 1999)。cAMP-CRP 是大腸桿菌為轉錄因子(transcriptional factor)的一員，藉由結合在基因啟動子附近區域調控基因的表現。CRP 必須要與 cAMP 分子結合才具有功能，而 CRP 與 cAMP 結合又存在兩種型態，分別是 $CRP \cdot (cAMP)_1$ 及 $CRP \cdot (cAMP)_2$ 。研究顯示在細胞 cAMP 濃度介於 $0 \sim 200 \mu M$ 時，CRP 多以 $CRP \cdot (cAMP)_1$ 的構形存在；若 cAMP 濃度達到 $200 \mu M \sim 15 mM$ 時則以 $CRP \cdot (cAMP)_2$ 的構形為主(Reddy *et al*, 1985)。雖然實驗證實 $CRP \cdot (cAMP)_1$ 對 DNA 的親和力較高，但擁有控制轉錄能力與特定序列結合的仍是 $CRP \cdot (cAMP)_2$ 。目前就 CRP 晶體研究的證據來解釋，這可能是因為二分子 cAMP 結合後對 CRP 造成的構形改變遠大於一分子 cAMP 所造成。

CRP 在 DNA 上所結合的保留序列 (consensus sequences) 有 22 個鹼基對：AAATGTGATCT*AGATCACATTT (* 為任六個鹼基對)，這段序列具反轉重覆 (palindrome) 的特性(Berg *et al.*, 1988)。除了序列的一致性之外，CRP 需求啟動子 (CRP-dependent promoter) 的活性與 CRP 結合位置至轉錄起始點距離成反比。因此，CRP 與 DNA 結合處的位置及序列都對基因表現有重要影響(Reddy *et al*, 1985)。

細胞中 CRP 的表現量亦有 catabolic repression 的現

象，當培養液中加入葡萄糖之後會使細胞內 CRP 含量快速下降，並導致 cAMP-CRP 複合物也隨之減少 (Ishizuka *et al*, 1994)。而葡萄糖對 CRP 表現的抑制現象，目前認為可在轉錄及轉譯步驟調控，研究結果顯示，葡萄糖除可刺激 CRP 蛋白質的分解速率使穩定率下降，也會減低 *crp* 基因之的 mRNA 的表現。除此之外，實驗發現 *crp*⁻ 突變株中 cAMP 的含量遠高於 (大於 100 倍) *crp*⁺ 的野生株 (Reddy *et al*, 1985)，而大量表現 CRP 蛋白質亦使細胞內 cAMP 含量大幅降低，基於這些現象可得知 CRP 對 cAMP 存在明顯地負調節 (negative regulation) 作用。另外 cAMP-CRP 複合物也可調控自己 *crp* 基因的表現，存在自我調控的功能 (Zheng *et al.*, 2004)。

2.7 cAMP-CRP 活化基因表現的調控機制

在大腸桿菌中，cAMP-CRP 複合物主要扮演轉錄活化子 (transcription activator) 角色，藉由結合在基因上游 (upstream) 啟動子 (promoter) 附近區域，吸引 RNA 聚合全酶 (RNA polymerase holoenzyme, RNAP) 結合到啟動子 (-10 & -35 range)，啟動轉錄作用的進行。此啟動子需由 cAMP-CRP 結合 (CAP-dependent promoter) 促進轉錄作用進行又可分兩種類型 (Busby and Richard H, 1999)：

(1) Class I CAP-dependent promoter：

啟動子位置大約位於基因上游 -61.5 的位置或更上游區域。cAMP-CRP、DNA 與 RNAP 三者形成複合物包含蛋白質之間的交互作用。RNAP 全酶由 α 、 β 、 β' 與 σ 次單位所組成，其中 α 次

單位蛋白質 C 末端區域(RNAP α subunit C-terminal domain, α CTD)一部分結合在 DNA 上，另一部分直接與 CAP 蛋白次單位活化區域 1(activating region 1, AR1)接觸，啟動 RNAP 開始轉錄，例如 *lac* 基因(Lawson *et al*, 2004)。

(2) Class II CAP-dependent promoter :

此啟動子位置大約位於基因上游-41.5 的位置左右，幾乎與 -35 啟動子附近重疊。cAMP-CRP、DNA 與 RNAP 三者形成複合物包含蛋白質之間的交互作用又更為複雜。CAP 與 RNAP 蛋白質的直接接觸除了 CAP AR1 區域與 RNAP α CTD 區域直接接觸外，CAP AR2(activating region 2)區域與 AR3(activating region 3)區域又分別與 RNAP 之 α NTD(RNAP α subunit N-terminal domain)區域與 σ R4(σ^{70} region 4)區域直接接觸，啟動 RNAP 開始轉錄，例如 *gal* 基因(Lawson *et al*, 2004)。

2.8 大腸桿菌 small RNA(sRNA)

Non-coding RNA(ncRNA)廣泛的被發現在所有有機生物體，類似 tRNA、rRNA 不會轉譯成蛋白質，在真核生物中又稱 microRNA(miRNA)，主要扮演基因沉默(gene silence)機制(Williams, 2008)的角色，類似的 RNA 又有 siRNA、snoRNA 等。而在原核生物則稱為 small RNA(sRNA)。

第一個被發現的 sRNA，6s 與 spot 42 早在 30 年前就已經被發現。2000 年，多元系統化計算與微陣列(microarray)分析，陸續有 13 個 sRNA 被鑑定(Mass'e *et al*, 2003)，直到現在已經有 70~100 個 sRNA 被發現。sRNA 又稱 small noncoding RNA，由

一段很短的序列所組成，通常只有 50~400bp，而所發現的 sRNA 不會轉譯成蛋白質為其共同特徵。

在基因層次上，陸續發現的 sRNA 也通常都具有自己的啟動子(promoter)，類似其他基因受到轉錄因子所調控，例如 *spot42* small RNA 基因啟動子附近受到轉錄因子 cAMP-CRP 所影響 (Møller *et al*, 2002)。在不同的環境下會受到不同因子刺激下影響，sRNA 基因的表現量也會有所改變，而執行不同的功能 (Gottesman, 2004)，例如在細胞生長到穩定期(stationary phase)時，*micA* small RNA 在細胞中會大量表現，進而降低 *ompA* mRNA 的穩定性(Rasmussen *et al*, 2005)，或是當細胞受過氧化氫(H₂O₂)刺激下，*oxyS* small RNA 表現量會上升，進而降低 *fh1A* mRNA 轉譯作用(Altuvia *et al*, 1997)。

2.9 大腸桿菌 sRNA 功能

大腸桿菌 sRNA 廣泛而言，功能又可分幾種不同類型：

- (1)具有酵素活性(enzymatic)的 sRNA(ribozyme)，例如 RNase P(Gottesman, 2004)。
- (2)轉譯量控制(translation quality control)的 sRNA，例如 TmRNA(Gottesman, 2004)。
- (3)可直接與蛋白質結合並抑制或改變蛋白質活性的 sRNA (protein inhibitor)，例如 6S RNA 結合 RNA 聚合酶(RNA polymerase)，抑制其活性。CsrB 或 CsrC 之 sRNA 結合到 CsrA 蛋白質(CsrA, the carbon storage regulatory protein)，幫助 CsrA 蛋白質與所標定的 mRNA 結合，抑制其 mRNA 轉譯

(Gottesman, 2004)。

(4)在轉錄後的修飾作用層次上(post-transcription level)，扮演調控者(regulator)的角色。利用序列互補(complementary sequences)的方式與標定(target)的 mRNA 專一性結合(RNA:RNA base pairing)，進而改變標定 mRNA 轉譯(translation)的活性或是影響 mRNA 在細胞中的穩定性(stability)(Storz *et al*, 2004)。目前已發現一些 sRNA 藉由此作用調控大腸桿菌細胞內生理現象，但是大多數目前所被鑑定出的 sRNA 功能卻是未知。另外所發現具有此功能的 sRNA，大多在與所標定的 mRNA 結合時，同時會與 Hfq 蛋白質結合，而且 Hfq 的存在必要的影響此 sRNA 與所標定的 mRNA 結合能力，這些 sRNA 又可稱為 Trans-encoded sRNA，例如 DsrA、RprA、OxyS、Spot42、micA、ryhB 等 small RNA，而目前大腸桿菌 sRNA 的研究也大多都集中在此類受 Hfq 結合的 sRNA。

2.10 sRNA 藉由序列互補(basepairing)的調控機制

RNA-RNA 序列互補(basepairing)的調控機制，是目前大腸桿菌研究 sRNA 功能最熱門的方向。sRNA 與所標定(target)的 mRNA 序列互補結合而影響 mRNA 轉譯或穩定性，調控基因的表現，以反映環境的改變。目前已發現三種較明確的調控機制：

(1)扮演轉譯抑制(translation repression)作用。

sRNA 與所標定的 mRNA 上核糖體結合位(ribosome binding site, RBS)序列互補結合，造成核糖體次單元 30S 無法結合到核糖體結合位，使轉譯作用無法進行。例如當受到氧化壓力

(oxidative stress)影響下，oxyS sRNA 結合到 *fhIA* mRNA 核糖體結合位(ribosome binding site, RBS)附近區域，造成轉譯被阻礙(Altuvia *et al*, 1997)；或是當環境中葡萄糖(Glucose)量上升時，Spot42(spf) sRNA 表現量上升，並結合到 *galETKM* mRNA 上 *galk* 的核糖體結合位(ribosome binding site, RBS)位置，阻礙 *galk* 轉譯進行，使 Gale/Galk 蛋白質的比例提升(Møller *et al*, 2002)。

(2) 扮演轉譯活化(translation activation)作用。

mRNA 自身序列互補形成的二級結構，遮蔽核糖體次單位 30S 結合到核糖體結合位(ribosome binding site, RBS)附近的序列，sRNA 藉由序列互補，解開 mRNA 核糖體結合位附近序列所形成的二級結構，曝露出核糖體結合位(RBS)，增加 mRNA 的轉譯作用。例如當細胞生長在低溫下，*dsrA* sRNA 基因表現上升，並結合到轉錄因子 *rpoS* mRNA 上核糖體結合位(RBS)附近序列所形成的環狀結構(stem loop)區域，解開此環狀結構(stem loop)，曝露出核糖體結合位(RBS)，增加 *rpoS* mRNA 基因表現(Majdalani *et al*, 1998)。

(3) 改變 mRNA 穩定性作用。

在轉錄後 mRNA 穩定性的層次上(post-transcription level)，sRNA 與所標定的 mRNA 序列互補結合，增加核酸酶(RNase)切割頻率，加速 mRNA 的降解。例如大腸桿菌鐵利用酵素，鐵超氧分解酶(iron superoxide dismutase, FeSOD)，其 mRNA 為 *sodB*。當細胞中鐵(iron)離子濃度較低時，*ryhB* sRNA 基因的表現上升，並結合到 *sodB* mRNA，降低其穩定性(stability)，加速 mRNA 的降解(degradation)，但當細胞中鐵(iron)離子濃度較

高時，轉錄因子 Fur 反而抑制 *ryhB* sRNA 基因的表現，使鐵超氧分解酶(iron superoxide dismutase)產量提高(Mass'e and Gottesman, 2002)。sRNA 調控 mRNA 在轉錄後穩定性層次上，雖然目前只有發現降低 mRNA 的穩定性，但是推測可能也存在著增加 mRNA 穩定性的 sRNA 於細胞中(Storz *et al.*, 2004)。

2.11 大腸桿菌 RNA 伴隨蛋白(RNA chaperone)：Hfq

Hfq 蛋白質存在許多革蘭氏陰性菌或陽性菌，蛋白質結構都相當類似。Hfq 大量的存在大腸桿菌中，蛋白質由 102 個胺基酸所構成，分子量 11.2kDa，以六個相當保守(well-conserved)的次單位(hexamer)所構成的六圓環結構，每一個次單位包括五個 β sheets 與一個 α helix 結構(Brennan and Link, 2007)。Hfq 早在 1968 被描述為幫助 RNA 噬菌體 Q β 在菌體中 RNA 複製的一個蛋白(Fernandez *et al.*, 1968)，因此稱為大腸桿菌 Hfq 蛋白(*E. coli* host factor Q)。又可稱 Sm-like Hfq protein，相似於真核 Sm 與 Sm-like 蛋白質(功能為 RNA splicing 與 RNA 降解)(Sauter *et al.*, 2003)。

Hfq 屬於熱穩定性(thermostable)蛋白質。基因層次上，包括在 *amiB-mutL-miaA-hfq-hflX-hflK-hflC* 操作子中，其 mRNA 相當複雜，具有多個轉錄單位，並藉由許多啟動子調控。而 *hfq* 基因含有三個啟動子，分別為 P1_{hfq}HS、P2_{hfq} 與 P3_{hfq}，其中 P1_{hfq}HS 屬於熱休克啟動子(heat shock promoter)，由 rpoH(σ^{32})調控，在高溫 50°C 時會大量表現 *hfq* mRNA(Tsui *et al.*, 1996)。而 Hfq 也會自我調控基因的表現，藉由 Hfq 結合到 *hfq* mRNA 核糖

體結合位而降低 *hfq* 基因表現(Erek *et al.*, 2005)。另外，Hfq 的量受生長速率影響，在生長快速時，Hfq 在細胞中的量較低，當生長緩慢時，Hfq 大量提高(Vytyvtska *et al.*, 2000)。

2.12 Hfq 的功能

在大腸桿菌，Hfq 可活化或抑制超過 50 個以上蛋白質的合成，藉由直接調控 mRNA 在 post-transcription 層次上的穩定性或 mRNA 的轉譯。由 Hfq 結合的位置(distal site 與 proximal site)分為兩類功能：

(1) 在 Polyadenylation dependent mRNA decay 機制中，mRNA poly(A)尾端與 Hfq distal site 結合，一方面刺激 poly(A)聚合酶醇素(polymerase I, PAP I)繼續合成 poly(A)，另一方面避免 RNase II 或 PNPase 分解(Brennan and Link, 2007)。Hfq distal site 與 mRNA poly(A)尾端結合的親和性又由 poly(A)數量決定(pA_N)，當 N 大於或等於 18 具有較強的親和力，但若 N 小於或等於 15 親和力較弱(Brennan and Link, 2007)(Hajnsdorf and Re'gnier, 2000)(Mohanty *et al.*, 2004)。

(2) 加速 sRNA 與標定的 mRNA 結合藉由 Hfq proximal site。在大腸桿菌基因調控網路中，sRNA 調控 mRNA 在轉錄後的修飾上(post-transcription regulation)，Hfq 的介入成為不可或缺的角色，一方面增加 sRNA 的穩定性(Zhang *et al.*, 2003)，另一方面促進 sRNA 與標定的 mRNA 結合，而改變 mRNA 轉譯或穩定性(Storz *et al.*, 2004)。已發現大多數的 sRNA 都會與 Hfq 蛋白協同調控所標定的 mRNA，而且 Hfq 必要的參與此調控機制。另外

Hfq 與 mRNA 結合的位置主要在 mRNA 轉譯起始上游 AU-rich 區域與周邊具有環狀結構(stem-loop)附近(Brennan and Link, 2007)。

在 sRNA 抑制 mRNA 轉譯與降低穩定性機制中，Hfq、sRNA 與 RNase E 結合形成 ribonucleoprotein 複合物，此複合物結合到 mRNA 5' 端非轉譯區域，阻礙 30S 核糖體的結合，造成轉譯無法進行並增加 RNase E 的分解，使 mRNA 穩定性下降，例如 ryhB sRNA。但是並非所以轉譯抑制，mRNA 穩定性也隨之下降，例如 spf sRNA 與 Hfq 共同結合到 *glaK* mRNA，抑制 mRNA 轉譯，但是穩定性並未影響(Aiba, 2007)。dsrA 與 Hfq 結合到 *rpoS* mRNA 並增加轉譯。

sRNA 與所標定的 mRNA 一般而言通常都各以二級結構的型式單獨存在於細胞中，藉由 Hfq 的幫助解開 sRNA 與 mRNA 的二級結構進而達到促進之間序列互補結合(basepairing)，例如 *sodB* mRNA 轉譯起始密碼子 AUG 附近所形成二級結構的區域，受到 Hfq 解開使得序列與 ryhB sRNA 結合，造成轉譯起始密碼子 AUG 被 ryhB sRNA 所遮蔽，進而受到 RNase E 降解(Geissmann *et al*, 2004)。所以 Hfq 又稱為大腸桿菌 RNA 伴隨蛋白(RNA chaperone)，藉由改變 RNA 結構而達到 sRNA 與 mRNA 的結合(Aiba, 2007)(Brennan and Link, 2007)(Geissmann *et al*, 2004)。

三、材料方法與原理

3.1 材料

3.1.1 菌種

Escherichia coli BW25113 wild-type($\Delta dsrA$ · $\Delta rseX$ · $\Delta gcvB$)
and *Escherichia coli* JW3778

(1) BW25113：為大腸桿菌野生菌株

(2) JW3778：為 *cya* 基因缺失的突變菌，篩選菌株的抗生素為
kanamycin。

(3) KOS08：為 *dsrA* sRNA 基因缺失的突變菌，篩選菌株的抗生素
為 kanamycin。

(4) KOS01：為 *rseX* sRNA 基因缺失的突變菌，篩選菌株的抗生素
為 kanamycin。

(5) KOS10：為 *gcvB* sRNA 基因缺失的突變菌，篩選菌株的抗生素
為 kanamycin。

BW25113 與 JW3778 由日本 Keio collection 菌種中心所取得，其他 sRNA 突變菌株由本實驗室製備(Baba *et al.*, 2006)。

3.1.2 藥品

培養液：

LB(Luria-Bertani)培養液：1% tryptone, 0.5% yeast extract,
1% NaCl

LB 培養基：1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar

PCR(Polymerase chain reaction)：

- 酵素

TOYOBO：KOD-Plus- polymerase

- 藥品

TOYOBO：dNTPs(2mM)

- 緩衝液

TOYOBO：KOD-Plus- 10X buffer

DNA 電泳分析：

- 藥品

MDBio：Agarose

- 緩衝液

TAE electrophoresis buffer：40mM Tris-HCl, 40mM acetate, 1mM EDTA

6X DNA gel loading dye

- 電泳膠體

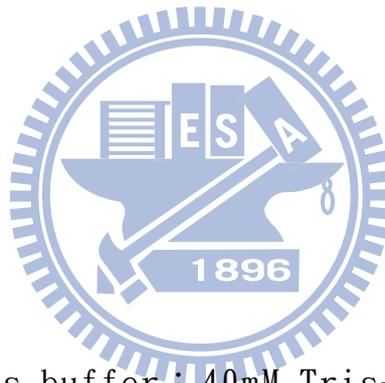
1.0% agarose 溶於 1X TAE buffer 中

RNA 萃取與北方墨點法：

- 藥品

MDBio：Rifampcin

Invitrogen：TRIzol-reagent



MRC : BCP(Bromo-Chloropropane)

MERCK : isopropanol

Promega : Agarose

MERCK : Formaldehyde

MERCK : Formamide

Ambion : Formaldehyde loading Dye

Amresco : 40% Acrylamide (Acryl/Bis 19 : 1 solution)

Amresco : APS(Ammonium Persulfate)

SIGMA : Urea 98%

Amresco : TEMED

Roche : Anti-DIG-AP

Positively charged nylon membrane

Roche : CSPD[®]

SIGMA : Diethyl pyrocarbonate(DEPC)

• 緩衝液

Roche : PCR DIG probe synthesis kit

Roche : DIG wash and Block buffer set

10X Running Buffer : MOPS(pH 7.0) 、 Sodium acetate · 3H₂O 、
0.5M EDTA

Amresco : 5X TBE Buffer

Amresco : 20X SSC, pH 7.0

Biochain : FastHyb-hybridization Buffer(Lot# B205055)

0.1g/ml rifampicin solution : 1g rifampicin in 10ml DMSO

DEPC treated water : 1ml DEPC in 1L ddH₂O , reaction 8 hrs
then autoclaved



基因敲除(Gene Knockout)：

- 藥品

CONDA : Tryptone

CONDA : Yeast extract

Mallinckrodt : NaCl

SHOWA : MgSO₄ · 7H₂O

Alfa Aesar : PEG(polyethylene glycol)

MERCK : MgCl₂

BioLabs : *DpnI* enzyme

SIGMA : Glycerol

SIGMA : L-Arabinose

- 緩衝液

BioLabs : NEBuffer 4

1x TSS buffer solution : 1 g tryptone, 0.5 g yeast extract, 0.5 g NaCl, 10 g PEG (MW= 4000), 5 ml MgCl₂ (1M), pH6.5 in 100ml ddH₂O

SOB culture solution : 2g tryptone, 0.5g yeast extract, 0.05g NaCl in 100ml ddH₂O

SOC culture solution : SOB 培養液額外再加入 20mM Glucose

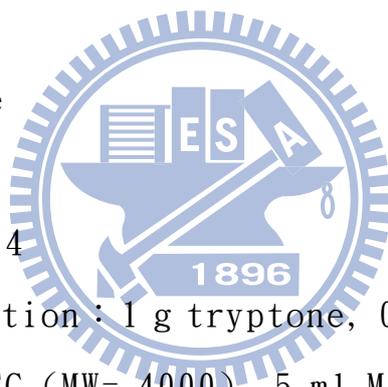
- 質體(plasmid)

pKD46(λ Red helper plasmid)、pKD13

- 抗生素

MDbio : ampicillin (50mg/ml)

Sigma : kanamycin (50mg/ml)



套組(Kit)：

GeneMark：Plasmid Miniprep Purification Kit

Geneaid：Genomic DNA Mini Kit

Geneaid：PCR/Gel fragment Purification Kit

DNase 處理 RNA sample：

- 酵素

Promega：RQ1 RNase-Free DNase I (2u/ μ l)

- 緩衝液

Promega：RQ1 10X buffer

反轉錄第一股合成 cDNA：

- 藥品

Invitrogen：0.1M DTT

Invitrogen：10mM dNTP Mix

Invitrogen：RNase OUT™ recombinant RNase Inhibitor

Invitrogen：SuperScript™ III Reverse-Transcriptase

- 緩衝液

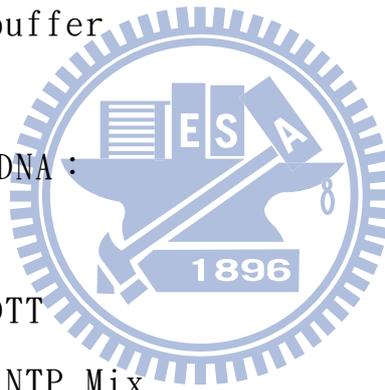
Invitrogen：5X First-strand Buffer

Real-time PCR：

- PCR 混合液

TAKARA：SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time)

TAKARA：ROX™ Reference Dye(50X)



- 儀器

ABI PRISM 7000 Real-Time PCR system

3.2 原理

3.2.1 批次式培養(batch culture)*E. coli* 生長模式

批次式培養是指細胞在培養過程中不再添加任何新的培養液，只有在一開始時提供一定量的培養液供細胞生長。細胞的生長會受到細胞本身的生理狀況、培養液的成分以及細胞所產生的代謝物等因素影響，因此可以依照細胞生長的濃度與所需的時間作出一條生長曲線(Growth curve)。

批次式培養中，細胞生長可分為六個時期：

(1) 遲滯期 (lag phase)

細菌開始適應新環境，菌體重量增加，但還不會分裂繁殖。

(2) 加速生長期 (accelerated growth phase)

又可稱早期對數生長期(early log phase)。菌體開始進行分裂，細胞數量開始增加，且細菌的生長速率逐漸增加而達到最高生長速率。

(3) 對數生長期 (exponential growth phase)

又可稱 log phase。細胞以最高生長速率進行分裂，在一定時間內分裂一次，此時期菌體的數目會隨時間呈對數比例增加。

(4) 減速生長期 (decelerated growth phase)

又可稱晚期對數生長期(late log phase)。菌體生長及分裂速率均降低。

(5) 平原期 (stationary phase)

菌體的增值速率與死亡速率相等，細菌數目維持一定

(6) 死亡期 (death phase)

因養份已被細菌耗盡，而過量代謝物的累積導致菌體的毒害作用。若細菌的死亡速率較期增值速率快，則細胞數目會開始降低。

本實驗中對菌體外膜蛋白 A(OmpA)穩定性之研究取在加速生長期與對數生長期加以分析探討。

3.2.2 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)之原理

PCR 反應是在活體外，以基因體 DNA 當模板(template)，將某段特定序列之套數擴增至數百萬倍，利於實驗進行分析。PCR 原理係利用高溫將雙股基因組 DNA 分成單股(denature)，並以兩段單股的引子(primer)與單股基因組 DNA 互補接合(primer annealing)，經由耐高溫性的 *Taq* DNA polymerase 產生聚合反應，進行引子下游的序列合成(extention)，至此稱一個週期。之後重新進行 DNA 分股的步驟，依序進行多個週期。當進行 n 個週期時，便產生 2^n 條特定序列雙股 DNA，藉此達到擴增大量特定序列之目的。

3.2.3 mRNA 半衰期計算原理

mRNA 自 N_0 開始降解，最後殘餘數值為 N 時，依下列公式表示：

$$N=N_0/2^n \text{-----}(3-4)$$

N_0 : mRNA 最初表現量

N : 一段時間 (t) 後, mRNA 殘餘表現量

n : 降解半衰期次數

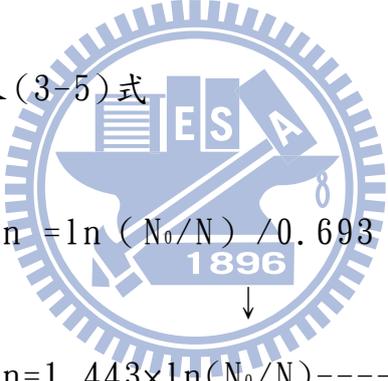
(3-4) 式兩邊取自然對數

$$\ln N_0 = \ln N + n \ln 2$$

↓

$$n = \ln(N_0/N) / \ln 2 \text{----- (3-5)}$$

$\ln 2 = 0.693$ 代入 (3-5) 式


$$n = \ln(N_0/N) / 0.693$$

$$n = 1.443 \times \ln(N_0/N) \text{----- (3-6)}$$

經由測量 N_0 與 N 的量, 得到 $\ln(N_0/N)$ 代入 (3-6) 式, 可求得 n 。半衰期 ($T_{1/2}$) 即 $T_{1/2} = t/n$, 此時 $N = 1/2 N_0$ 。

3.2.4 反轉錄 RNA 成 cDNA 原理

反轉錄 (Reverse-Transcription, RT) 反應是在活體外 (in vitro), 係將 RNA 轉成 cDNA 之原理。以 RNA 當模板 (template), 並以隨機引子 (random primer) DNA 或特定引子 (special primer) DNA 與 RNA 作序列互補, 經由反轉錄酵素

(Reverse-Transcriptase)將 RNA 轉成 cDNA (Complementary DNA)。以方便後續 PCR 實驗利用。

3.2.5 同步定量聚合酶連鎖反應(Real-time quantitative PCR, RT PCR)原理

RT PCR反應即是在進行PCR時同步偵測PCR產物隨著反應物增加的狀況(Real-time)，最後在利用所偵測到的產物回推樣品中原始基因之表現量。依所用螢光物質(fluorescent substance)類別，區分成非特異性(non-specific)與特異性(specific)二種，前者如使用SYBR Green I，後者則可配合不同型式探針，如TaqMan、Molecular beacons 及 Hybridization probe 等，本實驗室是利用TaKaRa公司所產生的螢光物質SYBR Green I為主，在合成出雙股DNA時，SYBR Green I螢光物質可立即結合到雙股DNA上，並發出螢光訊號，即可由ABI PRISM 7000 Real-Time PCR系統所偵測。再隨著PCR產物擴增時，螢光強度也隨之增加，系統最後以螢光強度回推原始樣品中基因的表現量，可獲得一標準曲線(Standard curve)，由標準曲線產生 C_T 值， C_T 值越高，原始樣品中基因的表現量越低。

3.2.6 基因敲除(Gene knockout)原理

將可產生認知同源序列重組酵素(recombinase)的質體(Plasmid) pKD46 送入細胞，此 pKD4 帶有對抗抗生素 Ampicillin 的基因與 Arabinose 誘導的啟動子(promoter)，可利用加入 Arabinose 誘導產生重組酶(λ Red recombinase)，此 λ Red recombinase 可認知相同 DNA 序列的不同片段，將其兩不同片段重組交換。所

以利用此酵素功能，將體外送入的 DNA 片段與細胞 DNA 上特定基因序列互換。原本預敲除的特定基因上下游兩端特定序列，將也帶有此相同上下游兩端特定序列並夾帶有抗生素(kanamycin)對抗的基因片段利用電穿孔技術由體外送入細胞，再藉由 λ Red recombinase 可將相同序列同源互換，將此預敲除的特定基因置換掉，使得原本該基因位置上帶有抗生素(kanamycin)對抗基因。之後在篩選出可對抗此 kanamycin 的菌株，並做 PCR 與定序確認，以達到特定基因敲除效果。

3.3 方法

3.3.1 *E. coli* 生長條件控制與培養方法

(1) 菌種活化

挑單一菌落接種於 LB 培養液以活化菌株，於 37°C 恆溫震盪箱已轉速 200rpm 進行批次式培養。菌株活化後則以 LB 培養基作為繼代保存培養基，利用劃線法接種於平板培養基上，於 37°C 恆溫箱培養到適當大小菌落，置於 4°C 冰箱保存。

(2) 批次式培養法

將活化後的菌株 *E. coli* BW25113 w.t 與 *E. coli* BW25113 Δ *cya* 1ml，分別培養於 100ml 的 LB 和 LB+40mM glucose (Takahashi *et al.*, 1975)，在 37°C 恆溫水浴槽中，轉速 200rpm 進行批次培養，培養至 OD₆₀₀=0.3 與 0.5 時，分別抽取 RNA 進行實驗。

3.3.2 mRNA 穩定性測定方法

收集 100ml OD₆₀₀=0.3 與 0.5 的菌液，將菌液置於 37°C 返復式循環水浴槽內持續震盪培養，一開始先取 10ml 菌液作為第 0 點的

樣品，之後立刻將濃度為 0.1g/ml 的 rifampicin 溶液取 500 μ l 加入剩餘菌液中混合均勻後，依據不同時間點分別抽取 10ml 菌液樣品，在每次取完 10ml 菌液後，立刻置於 -80°C 95%酒精桶水浴中 30~40 秒，再迅速插入冰上。收集完所有時間點的樣品後，抽取總 RNA 步驟請參照 *E. coli* 總 RNA 製備方法(3.3.3)。

3.3.3 *E. coli* 總 RNA 製備方法

收集完所有時間點各 10ml 菌液後，以 4°C，6000rpm 離心 10 分鐘，將上清液去除，加入 800 μ l TRIZOL-reagent 並沖散沉澱的細胞，使之均勻分散，65°C 10 分鐘將細胞打破(平均每 2.5 分鐘手搖震盪一次)，室溫下加入 80 μ l BCP(Bromo-Chloropropane)，以溫和手搖方式充分均勻混合，之後擺在室溫 15 分鐘後，4°C，12000rpm 離心 15 分鐘，丟棄下層液，抽取約 370 μ l 清澈的上清液分裝到新的微量離心管，加入 37 μ l 3M sodium acetate(PH 5.2) 及 410 μ l isopropanol，置於 -20°C 冰箱內 overnight。然後於 4°C，12000rpm 離心 15 分鐘，使 RNA 沉澱，將上清液去除，加入 1ml 75%酒精清洗一次，在於 4°C，12000rpm 離心 10 分鐘，完全吸乾上清液後將沉澱之 RNA，進行真空乾燥 10 分鐘，待沉澱物成半溶解狀態時加入適當 DEPC 處理過的二次逆滲透水將其溶解，測定 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀ 吸光比值，確定 RNA 的濃度及純度。剩餘之 RNA 樣本則須立刻置於 -80 °C 冰箱內保存。

3.3.4 北方墨點法(Northern blot)分析

(1) RNA 電泳分析

A. (a)1.2% 洋菜膠(Agarose gel)製備

將 0.55g 洋菜膠(agarose)溶於 29.4ml DEPC 處理過的二次水，加熱使之融解，待稍微冷卻後立刻加入 9.0ml 5 倍濃度 Formaldehyde running gel buffer 和 7.4ml 甲醛 (Formaldehyde)，混合均勻後，倒入製膠容器內，待之膠體凝結。

(b)8% Acrylamide/8M urea gel 製備

先將 5.76 克 urea 加熱溶解於 8.4ml DEPC 處理過的二次水，依序加入 40% Acrylamide(Acryl/Bis 19:1 solution)2.4ml、5X TBE buffer 1.2ml、10% APS 120 μ l、TEMED 6 μ l，共 12ml。混合均勻後，倒入製膠容器內，待之膠體凝結。

B. 樣品緩衝液(Sample buffer)配製

取微量離心管加入 8 μ g RNA、2 μ l 5 倍濃度 Formaldehyde running gel buffer(若是配置 Acrylamide gel，改加入 2 μ l 5 倍濃度 TBE buffer)、3.5 μ l 甲醛(37%)與 10 μ l formamid，混合均勻。

C. 樣品變性(denature)

將樣品至於 65 °C 水域中，待 10 鐘後，取出立即插在冰上。

D. 電泳

將上步驟插在冰上的樣品加入 5 μ l 染劑(Formaldehyde RNA loading Dye)，充分緩和均勻後於室溫下，60 伏特電壓進行 RNA 電泳 2.5 小時(Acrylamide gel 以 100 伏特電泳進行 80 分鐘)。

E. 膠體染色

將完成電泳的膠體浸泡在約 150ml 含 EtBr 染液(0.5 μ g/ml EtBr 溶於 0.1M ammonium acetate)染色約 8 分鐘後，在以 DEPC 處理過的二次水進行退染至少 3 小時，之後在進行照相(Acrylamide gel 使用 0.5 倍 TBE 含 EtBr 染色約 5 分鐘，0.5 倍 TBE 退染約 15 分鐘)。

(2) RNA 轉漬

此轉漬原理利用厚濾紙產生的毛細現象，導引 20X SSC 溶液向上流動，帶動膠體內的 RNA 脫離膠體並吸附在 nylon membrane。退染後照膠並確認 rRNA 存在後，在進行 RNA 轉漬。先準備剪裁與膠體面積相同之 8X7cm 的 nylon membrane、8X7cm 的 Whatman 3MM 濾紙、8X7cm 的厚濾紙板。取一方形容器，內在放入一個 2~4cm 高的方形塑膠盒，此塑膠盒表面必須平整，且大於膠體。倒入適當量的 20X SSC 於方形塑膠盒內，在塑膠盒表面上鋪一張 7X22cm 長方形的 Whatman 3MM 濾紙，放入前必須先將此長方形濾紙用 20X SSC 潤濕，放入後濾紙兩端必須浸到 20X SSC 溶液中，然後在濾紙上在鋪上一張 8X7cm 的 Whatman 3MM 濾紙，並至中，此濾紙長寬與膠體相同。將膠體反轉(原本電泳時朝下的一面朝上)，置於已經潤濕的濾紙上，接下來把 nylon membrane 先用 DEPC 處理過的二次水沾濕，再用 20X SSC 潤濕一次後，至於膠體上，在放上 3 張 8X7cm 的 Whatman 3MM 濾紙於 nylon membrane 上。在濾紙、膠體、nylon membrane 與濾紙之間必須把所有氣泡完全趕出，以防止 RNA 轉漬不完全。最後再疊放約 4 張厚濾紙板在 Whatman 3MM 濾紙上，然後再疊上 7~8 公分高的擦手紙，擦手紙最上層置一塑膠板並用 500 公克重的血清瓶壓住。

轉漬過程進行約 12~16 小時候，取出 nylon membrane，置於核酸快速固定儀器中，利用 UV 光(254nm)照射約 3 分鐘使 RNA 固定於 nylon membrane 上以進行雜交反應。

但若以 Acrylamide gel 轉漬，利用 BIO-RAD 公司生產的 Trans-Blot® Semi-Dry Quick Reference Guide 儀器進行轉漬，電流以 350mA 轉漬約 2 小時 30 分鐘。之後再利用 UV 光使 RNA 固

定於 nylon membrane。

(3) 核酸探針製備

本實驗我們利用聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)來擴增一段序列上含有 DIG-11-dUTP(Roche: PCR DIG probe synthesis kit)的 DNA, 利用此段 DNA 來做為核酸探針, 其做法敘述如下: 將 66 μ l 滅菌二次逆滲透水、10 μ l 10X PCR reaction buffer、5 μ l dNTP mix、5 μ l DIG-labeling mixture、4 μ l DNA 模板、4 μ l(20 μ M) Forward primer 與 4 μ l(20 μ M)Reverse primer、1 μ l(2u/ μ l) Taq DNA polymerase, 依序放入 0.5ml 的微量離心管(ependorf tube), 最終總體積為 100 μ l。混合均勻後放入聚合酶連鎖反應循環機作用。

PCR 溫度設定如下:

先將上述微量離心管內混合液於 94 $^{\circ}$ C 下反應 5 分鐘, 分開所有 DNA 模板, 再進行以下之溫度循環步驟:

- A. 94 $^{\circ}$ C, 30 秒: 使雙股 DNA 模板分開。
- B. 60 $^{\circ}$ C, 30 秒: primer 與 DNA 模板結合。
- C. 72 $^{\circ}$ C, 30 秒: DNA polymerase 合成新股 DNA。

重複上述溫度步驟 30 次循環, 在進行 72 $^{\circ}$ C, 反應 7 分鐘, 使最後一次未完全的 PCR 產物合成完全, 最終保存溫度設定為 4 $^{\circ}$ C。

ompA 核酸探針的 Forward primer 與 Reverse primer 序列:

Forward primer: 5' - TTGGATTTAGTGTCTGCACG -3'

Reverse primer: 5' - ATGAAAAAGACAGCTATCGC -3'

ompA 核酸探針長度大約為 389 bp, PCR 完後產物切膠純化, 利

用 GeneMark 公司 Micro-Elute DNA clean/Extraction kit(Lot# H00401)，但由於 dUTP 上接有 DIG 的關係，在電泳膠上的位置會略高於 389 bp，約在 400 bp~500 bp 之間。

(4) 雜交反應 (hybridization)

將 RNA 固定在上面的 nylon membrane 放入玻璃雜交管內，加入 15ml 的 FastHyb-hybridization Buffer，於 65°C 核酸雜交烘箱旋轉反應 30 分鐘，轉速設為 30 rpm，此過程稱為 Pro-hybridization。之後再加入 4 μ l 核酸探針，加入前核酸探針需先以 100°C 煮沸 10 分鐘後再迅速插在冰上約 5 分鐘，探針加入後再繼續進行 65°C 的核酸雜交烘箱旋轉，反應時間為 14~18 小時。反應結束後將 nylon membrane 自雜交管取出，平放於乾淨的塑膠盒內，加入 2X SSC、0.1% SDS 的洗滌液 50ml，在室溫下平面震盪方式清洗 5 分鐘，震盪速度大約 25~30 rpm，共洗兩次，倒掉；再用含 0.1X SSC、0.1% SDS 的洗滌液 50ml 清洗 15 分鐘，共洗三次。

(6) 免疫偵測 (immunological detection)

此免疫偵測實驗採用 Roche 公司所產生的 DIG wash and Block buffer set，內含有 10 倍濃度的 buffer 1、2、3 和 4。nylon membrane 用上述 0.1X SSC、0.1% SDS 的洗滌液清洗完三次後，接下來用 30ml 的 1X buffer 1 清洗 5 分鐘，一樣在室溫下平面震盪方式清洗，震盪速度大約 25~30 rpm，倒掉，再用 30ml 的 1X buffer 2 與 1X buffer 3 混和液清洗 40 分鐘。其這一步在使 buffer 3 中的 Bovine Serum Albumin (BSA) 均勻佈滿整張 nylon membrane 表面，避免 anti-DIG-AP 直接與 nylon membrane 結合，此舉可以減少大量非專一性的鍵結(non-specific

binding)，這步驟稱之為 blocking。反應結束後將 3 μ l 的 anti-DIG-AP 加入 30ml 的 1X buffer 2 與 1X buffer 3 混和液，再一次於室溫下搖動 40 分鐘，使 Anti-DIG-AP 與核酸探針上的 DIG 形成專一性之鍵結。之後於室溫下，用 30ml 的 1X buffer 1 清洗兩次，每次 15 分鐘。倒掉 1X buffer 1 後，加入 15ml 的 1X buffer 4 清洗 5 分鐘，之後把 nylon membrane 平放於投影片夾層內，將 15.5 μ l 的 CSPD[®] 溶於 1.4ml 的 1X buffer 4 內，均勻灑佈於 membrane 上，蓋上投影片，置於底片夾層內，於室溫下避光進行反應 10 分鐘。反應後於暗房內以 X 光底片(Kodak) 進行壓片，感光適當時間後沖洗底片。

(7) 訊號分析

利用掃描器(Microteck ScanMaker)將底片掃成 .tif 圖檔，儲存於電腦中，再利用 Zero-Dscan Quantitative Gel and Blot Analysis (Scannalytics)軟體偵測每一個雜交訊號 (hybridization signal)的強度，並將所測得的數值與不同的採樣時間點做一關係圖，利用線性回歸分析在不同時間點所得的雜交訊號強度，可算得 mRNA 的半衰期。

3.3.5 Genomic DNA 抽取製備方法

培養於 37 $^{\circ}$ C 之 5ml 菌液以轉速 150 rpm 培養，過夜後隔天以轉速 13000 rpm 離心 1 分鐘去除上清液，菌體以 Geneaid genomic DNA extraction kit 抽取 genomic DNA。首先加入 200 μ l GT buffer 將菌體懸浮，靜置室溫 5 分鐘，再加入 200 μ l GB buffer 於 70 $^{\circ}$ C 作用 30~60 分鐘，每 3 分鐘 invert tube，直到溶液從混濁變澄清。8,000 rpm 離心 3 分鐘，去掉沉澱物，取上清液

加入 200 μ l 95% ethanol，混合均勻後全部加至 GD column，13,200rpm 離心 5 分鐘，將過濾液倒去加入 500 μ l Wash beffer，在 8,000 rpm 下 離心 30 秒，倒去過濾液，再以 13,200 rpm 離心 3 分鐘將殘餘的 ethanol 除去，最後以 50~100 μ l ddH₂O elution。

3.3.6 質體 DNA 微量抽取製備方法(Plasmid DNA miniprep purification)

將接菌於 5 ml 含有 50 ug/ml 抗生素 ampicillin or kanamycin 的 LB 培養液，以 37°C 轉速為 150 rpm 振盪培養過夜，取 1.5 ml 的菌液以 13,000 rpm 的轉速離心 1 分鐘，並倒除掉上清液以 Plasmid Miniprep Purification Kit 抽取質體 DNA，首先加入 200 μ l Solution I 以震盪器(Vortex)震盪，直至細胞均勻懸浮於溶液中，再加入 200 μ l Solution II，上下翻轉 5 次使細胞被打破出現透明狀，再加入 200 μ l Solution III，上下翻轉 5 次。以 13,000 rpm 的轉速離心 5 分鐘(另先將 spin column 裝入 collection tube 中備用)，這時會產生白色混著物黏附在微量離心管管壁上，取乾淨上清液到 spin column 中以 13,000 rpm 的轉速離心 60 秒，然後將 collection tube 中管內的液體倒掉。加入 600 μ l Washing Solution 清洗 spin column，以 13,000 rpm 的轉速離心 60 秒將管內的液體倒掉，再以最高轉速離心 3 分鐘將殘餘的 ethanol 去除，將 spin column 蓋子打開靜至於室溫約 3~5 分鐘使所有 ethanol 揮發乾淨。取一新 1.5 ml 的微量離心管將 spin column 套入，加入約 50 μ l 已滅菌的二次水至 spin column，再以 13,000 rpm 的轉速離心 1 分鐘將

DNA 溶解出來，並儲存於 -20°C 中備用。

3.3.7 DNA 洋菜膠體電泳法(Agarose gel electrophoresis)

秤取 1 克洋菜膠(agarose)溶於 100 ml 的 1X TAE buffer，以微波爐加熱使其完全融解，倒入鑄膠器中配製成 1.0 % 的 agarose gel，待冷卻凝固後將其置於電泳槽中，在電泳槽中加入 1X TAE buffer(40 mM Tris-HCl, 40 mM acetate, 1 mM EDTA) 蓋過 gel，將欲分析的樣本 DNA 與 6X loading dye 混合置於膠體的 well 中，並以 DNA marker 作為對照，通入 100 Volt 的電壓時間 30 分鐘，使 DNA 由負極向正極移動，電泳完畢後取出膠體置於含 $0.5 \mu\text{l/ml}$ EtBr 溶液中染色 10 分鐘，取出 gel 置於 UV Box 上觀察並照相記錄其結果。

3.3.8 電泳膠體中回收 DNA 片段(Elution)

利用 PCR/Gel fragment Purification Kit(Geneaid)回收 DNA 片段。將欲回收的 DNA 先進行洋菜膠體電泳以 $0.5 \mu\text{l/ml}$ EtBr 溶液染色，染色後的 gel 置於 UV Box。將欲回收的 DNA 片段用一乾淨的刀片或解剖刀切下含有 DNA 的 agarose band，放入 1.5 ml 離心管中。加入 $600 \mu\text{l}$ 的 DF Buffer，將離心管放置於 60°C 直到 agarose 完全融化(約 5 ~ 15 分鐘)，取出於室溫下靜置 1 分鐘。另將 DF column 放入 collection tube。將含有 DNA 的溶液取出加至 DF column 內，用離心機以 6,000 rpm 離心 60 秒，將 collection tube 內的液體移除。加入 $600 \mu\text{l}$ 的 Wash Buffer 到 DF column 中，以 6,000 rpm 離心 60 秒，將 collection tube 內的液體移除。再以

13,000 rpm 離心 3 分鐘將殘餘的 ethanol 去除丟棄 collection tube，並將 DF column tube 放入一新的 1.5 ml 離心管上。加入 60°C 預熱之 10 ~ 50 μ l 的無菌水或 elution buffer (TE 緩衝液)，於室溫下靜置 3-4 分鐘以 13,000 rpm 離心 3 分鐘得到純化後的 DNA，儲存於 -20°C 中備用。

3.3.9 基因敲除(Gene Knockout)方法

(1) *E. coli* 熱休克(Heat shock)勝任細胞(Competent cell)製備

由 LB 固體培養基上挑選大腸桿菌(*E. coli*)編號 BW25113 wild type(w.t)菌株的單一菌落，養在 5ml 的 LB 液體培養試管內，在 37°C 的振盪培養箱中培養過夜。吸取 1ml 的菌液到含有 100ml LB 培養液的錐形瓶，在 37°C 振盪培養箱中培養 2~3 小時，直到 O.D 值達到約 0.4 時，將全部菌液插在冰上 20 分鐘後，在將菌液分裝到 50ml 離心管，再以 5000rpm，4°C 離心 10 分鐘，將上清液倒掉，加入 1ml 的 1x TSS buffer，緩慢地以 1 ml tip 將菌體懸浮後置於冰上 20~30 分鐘，最後將勝任細胞溶液分裝以 50 μ l 為一管並存放在 -80°C 中備用。

(2) *E. coli* 熱休克轉形作用(Transformation)

將質體(plasmid) pKD46 取 2 μ l 加入含有 50 μ l 熱休克(Heat shock)勝任細胞(Competent cell)的微量離心管中，輕搖使混合均勻，放至冰上約 10~20 分鐘，在將含有 competent cell 與 pKD46 的微量離心管至於 42°C 水域中 1 分鐘後，迅速在插回冰上約 3 分鐘，加入 600 μ l 的 LB 培養液，放至 30°C 培養 1 小時後，再取 100 μ l 菌液塗在含有 50 μ g/ml Ampicillin 的 LB 培養基，放

回 30°C 培養箱中培養過夜。30°C 培養是因為質體 pKD46 是對溫度敏感的質體(Temperature sensitive replication)，高溫 37°C~42°C 培養下，質體 pKD46 的複製量減少，易在細胞中消失，而在 30°C 培養下質體 pKD46 較易複製與保留在細胞中。隔天在從含有 50 μ g/ml Ampicillin 的 LB 培養基中挑選存活下來的菌落，代表此菌落熱休克轉形作用可能成功，並已含有送入的質體 pKD46。之後再將挑起的菌落培養至也含有 50 μ g/ml Ampicillin 的 LB 培養液試管中做第二次篩選，並至於 30°C 培養箱中培養，隔天再抽取質體確認是否含有 pKD46(抽取質體方法見 3.3.5)。

(3) *E. coli* BW25113(含有質體 pKD46)電穿孔(Electroporation)勝任細胞(Competent cell)製備(Preparation of Electrocompetent Cells)

將以確定含有 pKD46 質體的 *E. coli* BW25113 經由菌種活化步驟(見 3.3.1 之 1)後，從含有 50 μ g/ml Ampicillin 的 LB 培養液試管中取 1ml，加入含有 100ml SOB 培養液的錐形瓶中，另外在加入 20mM 的 L-arabinose，以 150rpm，30°C 培養，培養至 0.D 值到達 0.4~0.45 後，在無菌操作台中分裝菌液至 50ml 離心管並迅速插在冰上 20 分鐘。之後所有實驗步驟必須在無菌與冰上進行，主要目的改變細胞膜結構，增加通透性。將 50ml 離心管以 4000rpm，4°C 下離心 15 分鐘(離心機必須在實驗前先預冷至 4°C)，在無菌操作台中小心的到掉上清液，並用 Pipettes 將剩餘殘留 SOB 液體吸取乾淨留下細胞沉澱物，加入 50ml 10% Glycerol 清洗，10% Glycerol 必須先放在冰上預冷，清洗方式用 Pipettes 緩慢地衝散細胞沉澱物，此步驟必須在冰上並緩慢的沿著管壁沖散細胞，盡量避免 tip 直接接觸細胞沉澱物。細胞

均勻散佈於 Glycerol 後，同樣以 4000rpm，4°C 下離心 15 分鐘，在無菌操作台中小心的到掉上清液，加入 25ml 10% Glycerol 清洗，重複上述步驟用 Pipettes 緩慢地衝散細胞沉澱物，然後再以 4000rpm，4°C 下離心 15 分鐘，加入 10ml 10% Glycerol 清洗，離心後，最後在以 5ml 10% Glycerol 清洗，離心，除去上清液。此四步清洗步驟主要目的在將原本 SOB 培養液清洗至乾淨，避免培養液中的離子、鹽類還存在，影響後續電穿孔效率。清洗完畢除去上清液後，加入 300 μ l 10% Glycerol (Glycerol 加入的量，依細胞最後剩下的量而定，盡量使勝任細胞濃度越高)，並使細胞均勻分散於 Glycerol 中，再分裝於微量離心管，每管 50 μ l 的勝任細胞，並存放在 -80°C 中備用。

(4) PCR 純化製備帶有抗生素 kanamycin 對抗基因的同源序列片段

先利用質體 pKD13 上帶有 kanamycin 對抗基因上下游 (up & down-stream) FRT (FLP recognition target) 序列外各設計一對引子序列，分別是：

Forward primer : 5' -ATTCCGGGGATCCGTCGACC -3' (P1)

Reverse primer : 5' -TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG -3' (P2)

另外分別在 Forward 與 Reverse 引子 5' 端再額外加入一段 50mer 的序列，此段額外的序列必須與目標要敲除的基因上下游 50b. p 序列相同 (可利用 Ecocyc 網站查詢該基因上下游序列，網址 <http://ecocyc.org/>)，分別稱 H1 與 H2 序列，形成：

Forward primer : H1+P1 序列

Reverse primer : H2+P2 序列

以目標預敲除 dsrA sRNA 基因所設計的一對引子(primer)為例：

Forward primer：

5' -TATTCATGACTTCAGCGTCTCTGAAGTGAATCGTTGAATGCACAATAAAAA
TTCCGGGGATCCGTCGACC-3' (H1+P1)

Reverse primer：

5' -ATATGGCGAATATTTTCTTGTCAGCGAAAAAATTGCGGATAAGGTGATGT
GTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3' (H2+P2)

以 pKD13 為模板(template)，將上述 Forward (H1+P1)與 Reverse (H2+P2)為引子(primer)，PCR 產生特定一段線狀序列，夾帶有抗生素 kanamycin 對抗基因：

H1-P1-(FRT- *Anti-kanamycin gene* -FRT)-P2-H2

PCR 溫度設定如下：

先將上述微量離心管內混合液於 94°C 下反應 5 分鐘，分開所有 DNA 模板，再進行以下之溫度循環步驟：

- A. 94°C，30 秒：使雙股 DNA 模板分開。
- B. 59°C，30 秒：特別設計帶有 H1 和 H2 primer 與 DNA 模板結合。
- C. 72°C，2 分鐘：用 KOD-Plus- polymerase(TOYOBO)合成新股 DNA。

重複上述溫度步驟 30 次循環，在進行 72°C，反應 7 分鐘，使最後一次未完全的 PCR 產物合成完全，最終保存溫度設定為 4°C。

另外此次 PCR 酵素必須選擇同時也具有 3' 往 5' 端外切的活性 (3' to 5' exonuclease)，可在 DNA 複製時修補錯誤的核苷酸 (proofreading)。

反應完最後 PCR 產物必須純化。

1. DpnI restriction enzyme 去除模板 pKD13

由於大腸桿菌利用將 DNA 上氮鹼基甲基化來區分外來與內部本身 DNA。PCR 所利用的模板 pKD13 來源從菌體中抽取出(利用 GeneMark: Plasmid Miniprep Purification Kit)，所以 pKD13 上 5' -GATC- 3' 序列，嘌呤(A)氮鹼基上通常會帶有甲基(CH₃ group)。

DpnI enzyme 可認知 5' -GATC- 3' 序列，嘌呤(A)氮鹼基上帶有甲基化(-CH₃)的位置，並將嘌呤(A)與尿嘧啶(T)之間磷酸根切除，而使雙股 DNA 截斷。

可利用 DpnI restriction enzyme 去除模板質體 pKD13。最終 PCR 產物總體積共 50μl，加入 8μl 10X NEBuffer 4，19μl 滅菌二次滲透水，3μl DpnI enzyme，總共 80μl 總體積，再以 37°C 反應約 4 小時，反應完放入 4°C 冰箱保存。

2. 切膠純化經 DpnI 處理過後的 PCR 產物

利用 Geneaid 公司所生產的 PCR/Gel fragment Purification Kit 來純化 PCR 產物。並以滅菌二次滲透水回溶最後 PCR 產物，放於 -20°C 保存。

(5) 電穿孔操作(Electroporation)

將含有預電穿孔勝任細胞(Electrocompetent Cells)的微量離心管與純化後的 PCR 產物帶有抗生素 kanamycin 對抗基因的同源序列 DNA 片段至於冰上退冰。加入 7~8μl 純化後的 PCR 產物 DNA 片段於含有 50μl 電穿孔勝任細胞的微量離心管中，並小心緩慢的混合均勻，再置於冰上停留約 3~5 分鐘。將所有微量離心管內

混和物移至電穿孔專用的微量容器(Electroporation cuvette)內(電穿孔用微量容器需先置於冰上預冷)。利用 BIO-RAD 公司 MicroPulser 儀器進行電擊，根據電穿孔專用微量容器兩金屬板間距大小 0.2cm，選擇 Eco2 或 Eco3 進行電擊(0.1cm，選擇 Eco1)，電擊結束後，並在 1 分鐘以內加入 500 μ l 或 1ml SOC 培養液(SOC 培養液額外再添加約 20mM arabinose)，此時勿在冰上進行(SOC 培養液加入前必須先回溫至室溫)，之後在無菌操作台內將電穿孔專用微量容器內的混合液移至新的微量離心管，以 150rpm，30 $^{\circ}$ C 培養 2.5~3 小時。

(6)篩選基因敲除成功的菌株

將培養 SOC 培養液 2.5~3 小時的菌液，進行 LB+50 μ g/ml kanamycin 的培養基塗盤篩選，以 37 $^{\circ}$ C 培養過夜後，在培養基上初步挑起存活下來的菌落，在培養至 5ml 含有 50 μ g/ml kanamycin 的 LB 培養液進行第二次篩選，培養過夜。若在 LB+50 μ g/ml kanamycin 的培養液中的菌株有存活下來，已經極有可能基因製換成功。將菌液一部分先製成凍管後儲存於-80 $^{\circ}$ C，剩下菌液進行 DNA 抽取，利用 Geneaid 公司 Genomic DNA Purification Kit，將抽取出的 DNA 進行 PCR 確認：

A. 確認 DNA 上是否含有 Anti-kanamycin 基因

將所設計的引子(primer)KT & K2，PCR 從菌體抽出的 DNA 是否含有 Anti-kanamycin 基因。

引子：

Forward primer：5' -cggccacagtcgatgaatcc- 3' (KT)

Reverse primer：5' -cggtgccctgaatgaactgc- 3' (K2)

B. 確認基因敲除的位置是否正確

同樣利用 PCR 的方式。先從原始基因上游或下游約 100b.p 的位置設計一條約 20~25b.p 的引子(primer)。將所設計的引子與 *Anti-kanamycin* 基因的引子(KT 或 K2)形成一對 Forward 和 Reverse 引子。以從菌體抽出的 DNA 當模板，預先計算 PCR 完後產物序列長度，在進行 PCR，最後將 PCR 完後產物跑洋菜膠電泳確認序列長度是否正確。

以設計 *dsrA* small RNA 基因外引子為例：

Forward primer : 5' - CCTTCGAACTGGATATTCATGAC- 3'

C. 定序確認

將第 2 點 PCR 確認後產物經切膠純化(Geneaid 公司 PCR/Gel fragment Purification Kit)，送往生技公司定序確認(明欣生物科技有限公司，網址：www.missionbio.com.tw)。

3.3.10 總 RNA 樣品去除殘留 DNA 方法

將樣品所抽取出的總 RNA(方法見 3.3.3)從 -80 °C 冰箱取出並置於冰上退冰。退冰後取 200µg 總 RNA 量至新的微量離心管，補 DEPC 處理過的二次水至總體積為 88µl，加入 10µl RQ1 10X buffer(Promega)，再加入 2µl RQ1 RNase-Free DNase I(Promega)，總體積為 100µl。將樣品至於 37 °C 下反應 30 分鐘，之後再加入 400µl DEPC 處理過的二次水，總體積為 500µl，再加入 100µl BCP 並手搖混合均勻後；靜置 15 分鐘，以 4 °C, 12000rpm 離心 15 分鐘，丟棄下層液，抽取約 400µl 清澈的上清液分裝到新的微量離心管，加入 40µl 3M sodium acetate(PH 5.2)及 440µl isopropanol，置於 -20 °C 冰箱內 overnight。然後於 4 °C，12000rpm 離心 15 分鐘，使 RNA 沉澱，將上清液去除，加入 1ml 75%

酒精清洗一次，在於 4 °C，12000rpm 離心 10 分鐘，完全吸乾上清液後將沉澱之 RNA，進行真空乾燥 10 分鐘，待沉澱物成半溶解狀態時加入適當 DEPC 處理過的二次逆滲透水將其溶解，測定 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀ 吸光比值，確定 RNA 的濃度及純度。剩餘之 RNA 樣本則須立刻置於 -80 °C 冰箱內保存(方法與 3.3.3 後續 RNA 回收方法相同)。

3.3.11 反轉錄(reverse transcription)第一股合成 cDNA 方法
將 DNase I 處理過的總 RNA 樣品(方法見 3.3.10)取出並置於冰上退冰。取 5µg 總 RNA 量於新的 PCR 專用微量離心管，加入 300ng 的隨機引子(random primer, 6mer)，再加入 1µl dNTP mix(10mM)，補 DEPC 處理過的二次水至總體積為 13µl。置於 65 °C 水域 5 分鐘後再迅速插在冰上約一分鐘。之後再加入 4µl 5X First-strand Buffer、1µl 0.1M DTT、1µl RNase OUT™ recombinant RNase Inhibitor 酵素與 1µl SuperScript™ III Reverse-Transcriptase，共 20µl。靜置於室溫約 5 分鐘後，以 50 °C 反應兩個鐘頭，在以 70 °C 停止反應約 15 分鐘。再將反應後總 cDNA 產物共 20µl 取出並至於新的微量離心管，加入 80µl DEPC 處理過的二次水稀釋五倍，最後總體積為 100µl。產物總 cDNA 樣本則置於 -20 °C 冰箱內保存。

3.3.12 Real-time quantitative PCR(Q-PCR)方法

將 96-well 盤放入新的 Q-PCR 專用微量離心管後，依序加入適用於 ABI PRISM 7000 Real-Time PCR 系統 PCR 反應混合物，分別為 2µl 的模板 cDNA、各 0.4µl PCR Forward 與 Reverse 引子

(10 μ M)、6.8 μ l DEPC 處理過的二次水、0.4 μ l ROXTM Reference Dye(50X)與 10 μ l SYBR[®] *Premix Ex Taq*TM(2X)，總共 20 μ l。本質對照組(Internal control)組以 PCR 16s cDNA 為主。負對照組(negative control)模板 cDNA 以 DEPC 處理過的二次水取代，確定 DEPC 處理過的二次水沒有雜質存在。另外每個樣品加入的 PCR 反應混合物做二次重複，以方便後續計算平均值與標準差。加入完所有 PCR 反應混合物後，蓋上 Q-PCR 專用塑膠玻璃蓋(蓋上前必須換上乾淨新手套，防止玻璃蓋上有任何灰塵存在，影響儀器偵測螢光物質)後，放入 ABI PRISM 7000 Real-Time PCR 儀器(使用前必須先開機約 30 分鐘)，電腦開啟 ABI PRISM 7000 Real-Time PCR system 程式，輸入所要使用的 well 名稱後，將全部 well 設定選取使用 SYBR Green Dye 偵測，以 95 $^{\circ}$ C，5 秒分離雙股 DNA；60 $^{\circ}$ C，34 秒引子黏合與聚合酶合成新股 DNA，反應前必須先存檔。反應完後結果選擇 Auto-C_T，自動由系統計算 C_T 值，將產生的 C_T 值以 Microsoft office Excel 型式儲存。將各種不同條件所產生的 C_T 值減去對應於各種不同條件下本質對照組(Internal control)組 16s 的 C_T 值，產生 ΔC_T 值。樣品之間基因表現比較，可以一個樣品 ΔC_T 值為標準值，將其他要比較的樣品 ΔC_T 值減去此標準值即可產生 $\Delta\Delta C_T$ 值，帶入公式 $2^{-\Delta\Delta C}$ 即可換算出相對比較值(Relative Fold)，比較不同樣品間基因表現差異。

四、結果

4.1 轉錄層次(transcription level)上 cAMP 影響 *ompA* 基因表現

本實驗為觀察在菌體生長到對數生長期(0.D 0.4)時，cAMP 的存在是否影響 *ompA* 基因的表現。

將 *E. coli* BW25113 野生株(w.t)與 *cya* 基因突變的菌株(Δ *cya*)，經過隔夜菌種活化後，分別培養於 LB 培養液與 LB 加入 40mM 葡萄糖培養液中，以 200rpm，37°C 衡溫水浴槽培養，直到生長至對數生長期(log phase)0.D 0.4~0.45 時停止培養(*E. coli* 生長曲線附於圖一)，將菌液插在冰上數分鐘。之後離心菌液並抽取總 RNA，取定量總 RNA 進行北方墨點法(Northern blot)，所得的結果利用 Zero-Dscan 軟體測定個訊號強度，即可測定四種不同的條件下(分別為：w.t in LB、w.t in LB+Glc、 Δ *cya* in LB、 Δ *cya* in LB+Glc)，cAMP 影響 *ompA* 基因表現量。

實驗結果發現，當 *E. coli* 生長至 0.D 0.4~0.45 時，環境中若有葡萄糖或 cAMP 不存在的情況下(Δ *cya*)，*ompA* 基因表現量會下降。以 Zero-Dscan 軟體分析結果，我們將野生株培養在 LB 下 *ompA* mRNA 所產生的量換算成一倍，在有加葡萄糖之野生株(LB+Glc)，*cya* 基因突變菌株培養在 LB(Δ *cya* in LB)與 *cya* 基因突變菌株培養在 LB+葡萄糖(Δ *cya* in LB+Glc)，*ompA* mRNA 量都分別下降至 0.57、0.43 與 0.43(見圖二)。

由於已知環境中葡萄糖存在下，*E. coli* 會以葡萄糖當作碳源，而造成 cAMP 量下降(見 2.5)。所以以上結果可知當 *E. coli* 生長在對數生長期(0.D 0.4~0.45)時，cAMP 存在下，造成 *ompA*

基因的表現量上升。

4.2 轉錄後層次(post-transcription level)上 cAMP 影響 *ompA* mRNA 穩定性(stability)

以往認為 cAMP 只有在轉錄層次上影響基因的表現，本實驗也觀察菌體生長至早期對數生長期與進入對數生長期(0. D 0.3 & 0.5)時，cAMP 在轉錄後層次上是否影響 *ompA* mRNA 穩定性。

將 *E. coli* BW25113 野生株(w. t)與 *cya* 基因突變的菌株(Δ *cya*)，經過隔夜菌種活化後，分別培養於 LB 培養液與 LB 加入 40mM 葡萄糖培養液中，以 200rpm，37°C 衡溫水浴槽培養，在菌液生長至早期對數生長期(0. D 0.3)時，一開始先取 10ml 菌液作為第 0 分鐘的樣品，之後立刻加入 rifampicin 溶液於菌液中混合均勻 (rifampicin 抗生素可抑制 RNA 聚合酶活性，造成轉錄作用停止)後，依據 8 個時間點(0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 26min)分別抽取 10ml 菌液樣品，在每次取完菌液後，立刻置於-80°C 95% 酒精桶水浴中 30~40 秒，再迅速插入冰上。收集完所有時間點的樣品後，抽取總 RNA 並進行北方墨點法，所得的結果利用 Zero-Dscan 軟體測定每個時間點訊號強度。另外在分別測定對數生長期(0. D 0.5)條件下，*ompA* mRNA 穩定性，相同以上作法敘述。

實驗結果發現，在 0. D 0.3 與 0.5 條件下，野生菌株培養在 LB 培養液與 *cya* 突變菌株培養在 LB 培養液比較下，*cya* 突變菌株之 *ompA* mRNA 穩定性明顯下降(見圖三之一與圖四之一)。尤其是在 0. D 0.3 更為明顯，半衰期由 13.6 分鐘下降至 3.8 分鐘(見圖三之一)。而在 0. D 0.5，半衰期由 12.3 分鐘下降至 5.5 分鐘

(見圖四之一)。但是比較野生菌株培養在 LB 培養液與野生菌株培養在 LB 外加葡萄糖培養液下，*ompA* mRNA 穩定性卻沒有明顯的變化(見圖三之一與圖四之一)。在 0.D 0.3，半衰期也大約分別為 13 分鐘與 11 分鐘左右。而另外 *cya* 突變菌株培養在 LB 外加葡萄糖培養液，相較於 *cya* 突變菌株培養在 LB 培養液，由 *ompA* mRNA 穩定性變化可看出葡萄糖對 cAMP 影響的現象消失了(見圖三之一與圖四之一)。

所以由以上結果可知在大腸桿菌生長至早期對數生長期(OD 0.3)與對數生長期(0.D 0.5)時，cAMP 明顯會影響 *ompA* mRNA 轉錄後的穩定性，而 cAMP 的存在下明顯增加 *ompA* mRNA 穩定性。

4.3 sRNA 影響 *ompA* mRNA 穩定性篩選

在確定 cAMP 的存在會增加 *ompA* mRNA 的穩定性後，接下來探討此作用是否是藉由 cAMP 調控 sRNA 而造成。我們從先前文獻蒐集與實驗室現有的實驗結果取得交集，挑出 7 個可能影響的 sRNA，分別是：*micA*、*rseX*、*ryhB*、*dsrA*、*spf*、*ryhA*、*gcvB*(見表二)。其中 *micA* 調控 *ompA* mRNA 穩定性在穩定期(stationary phase)時已經被先前文獻報導(見討論 5.3 之(1))，所以我們從 *rseX*、*dsrA* 與 *gcvB* sRNA 開始探討。

實驗前必須先建構 *rseX*、*dsrA* 與 *gcvB* sRNA 基因突變菌株，我們利用同源互換序列原理將標定的基因敲除，將兩端帶有同源序列內含抗生素 *kanamycin* 對抗基因的線狀序列，純化後，利用電穿孔送入已經帶有 pKD46 *help* 質體的野生種勝任細胞，之後再挑選可對抗 *Kanamycin* 抗生素的菌株，並利用 PCR 確認基因敲除(方法見 3.3.9)(確認 *rseX* 基因突變菌 PCR 電泳圖見圖五)(確

認 *dsrA* 基因突變菌 PCR 電泳圖見圖七)(確認 *gcvB* 基因突變菌 PCR 電泳圖見圖十四)。

4.4 RseX sRNA 影響 *ompA* mRNA 穩定性

本實驗再菌體生長至早期對數生長期(0.D 0.3)時，利用北方墨點法探討 *rseX* sRNA 是否影響 *ompA* mRNA 穩定性。

將 *E. coli* BW25113 野生株(w.t)與 *rseX* 基因突變的菌株 ($\Delta rseX$)，經過隔夜菌種活化後，以 37°C 分別培養於 LB 培養液與 LB 加葡萄糖培養液至 0.D 0.3 後停止，依據 8 個時間點(0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 26min)分別抽取總 RNA 樣品並利用北方墨點法探測 *ompA* mRNA 穩定性(作法與 4.2 相同)。

實驗結果在 0.D 0.3，比較野生菌株培養於 LB 培養液、野生菌株培養於 LB 外加葡萄糖培養液、*rseX* 突變菌株培養於 LB 培養液與 *rseX* 突變菌株培養於 LB 外加葡萄糖培養液下，*ompA* mRNA 穩定性並沒有明顯的變化(見圖六之一)。

所以在早期對數生長期(0.D 0.3)時，*rseX* sRNA 的存在對 *ompA* mRNA 的穩定性並沒有明顯的影響。

4.5 DsrA sRNA 影響 *ompA* mRNA 穩定性

本實驗再菌體生長至早期對數生長期(0.D 0.3)時，利用北方墨點法探討 *dsrA* 是否影響 *ompA* mRNA 穩定性。

將 *dsrA* 基因突變菌株與 BW25113 野生菌株分別培養於 LB 培養液，在 0.D 0.3 時停止培養，與上述(4.2)方法相同，8 個時間點分別抽取總 RNA，利用北方墨點法測其 *ompA* mRNA 穩定性。

兩次實驗結果發現，在早期對數生長期(0.D 0.3)時，比較

野生菌株培養於 LB 培養液與 $\Delta dsrA$ 基因突變菌株培養於 LB 培養液 *ompA* mRNA 穩定性，發現 $\Delta dsrA$ 基因突變菌株培養於 LB 培養液 *ompA* mRNA 穩定性明顯下降，半衰期大約為 3.52 分鐘與 4.13 分鐘(見圖八之一(A)(B))。

所以找出的 *dsrA* sRNA 確實影響 *ompA* mRNA 穩定性，在早期對數生長期(OD 0.3)時，*dsrA* sRNA 存在下增加了 *ompA* mRNA 穩定性。

4.6 轉錄層次(transcription level)上 *dsrA* sRNA 影響 *ompA* 基因表現

本實驗為觀察在菌體生長到早期對數生長期(0.D 0.3)時，*dsrA* sRNA 的存在是否影響 *ompA* 基因的表現。

將 *E. coli* BW25113 野生株(w.t)與 *dsrA* 基因突變的菌株($\Delta dsrA$)，分別以 37°C，200 rpm 培養於 LB 培養液，培養至 0.D 0.3 時停止培養，並將菌液分裝後立即插在冰上數分鐘。之後離心菌液並抽取總 RNA，取定量總 RNA 進行北方墨點法。

實驗結果發現在早期對數生長期(0.D 0.3)時，比較野生菌株與 *dsrA* 基因突變的菌株，*ompA* mRNA 量並沒有明顯的改變(見圖九)。

所以在早期對數生長期(0.D 0.3)時，*dsrA* sRNA 在轉錄層次(transcription level)上並沒有明顯的影響 *ompA* 基因表現。

4.7 cAMP 影響 *dsrA* sRNA 基因的表現

本實驗利用 Northern 觀察在菌體生長到早期對數生長期(0.D 0.3)時，cAMP 的存在是否影響 *dsrA* sRNA 基因的表現。

由於 *dsrA* sRNA 基因大量表現的條件是在低溫下約 20°C~30°C，菌體生長到對數生長期(D. Sledjeskil *et al*, 1996)。所以將 BW25113 野生株(w. t)與 *dsrA* 基因突變的菌株($\Delta dsrA$)，分別以 20 °C，200 rpm 培養於 LB 培養液，培養至 OD 0.4 時抽取總 RNA 當作這次實驗的正負對照組(positive & negative control)。另外實驗組將 *E. coli* BW25113 野生株(w. t)與 *cya* 基因突變的菌株(Δcya)，分別培養於 LB 培養液與 LB 外加 40mM 葡萄糖培養液，以 37°C，200rpm 培養至 OD 0.3 時停止培養並抽取總 RNA。對照組與實驗組取定量 20 μ g 總 RNA 進行北方墨點法偵測 *dsrA* 基因表現量。

實驗結果發現正負對照組中，正對照組 *dsrA* 的量明顯大於其他組別，負對照組完全沒有表現 *dsrA*。而實驗組方面，只比較 *cya* 突變的菌株與野生菌株，*cya* 突變的菌株 *dsrA* 的量大於野生菌株(見圖十)。

所以實驗結果在菌體生長到早期對數生長期(0. D 0.3)時，cAMP 的存在反而降低 *dsrA* 基因的表現，也就是 cAMP 會阻礙 *dsrA* 基因的表現。

4.8 以 Real-time PCR 測定 cAMP 影響 *dsrA* sRNA 基因的表現

由 Northern blot 結果看出 cAMP 的存在反而降低 *dsrA* 基因的表現。本實驗利用 Real-time PCR 再次觀察 cAMP 的存在影響 *dsrA* sRNA 基因的表現。

將 *E. coli* BW25113 野生株(w. t)與 *cya* 基因突變的菌株(Δcya)分別培養於 LB 培養液，在 0. D 0.3 時所抽取的總 RNA 樣品置於冰上退冰，將兩種菌株總 RNA 樣品以 DNase I 處理後，剩餘

的總 RNA 取 5 μ g 的量在分別加入特定 *dsrA* 與 16S reverse primer(special primer)進行反轉錄成 *dsrA* 與 16S 的 cDNA，再將兩種菌株 *dsrA* 與 16S 的 cDNA 進行 Real-time PCR 反應並分析實驗結果。

實驗結果在早期對數生長期(0.D 0.3)時，*cya* 基因突變的菌株，*dsrA* sRNA 的量也大於野生菌株 *dsrA* sRNA 的量(見圖十一)，與 Northern 的實驗結果類似。

所以在菌株生長至早期對數生長期(0.D 0.3)時，cAMP 的存在會降低 *dsrA* 基因的表現，也就是 cAMP 阻礙 *dsrA* 基因的表現。

4.9 以 Real-time PCR 偵測 cAMP 影響 *gcvB* 與 *ryhA* sRNA 基因及 *hfq* 基因的表現

本實驗在菌體生長到早期對數生長期(0.D 0.3)時，利用 real time PCR 實驗觀察 cAMP 影響 *gcvB*, *ryhA* sRNA 基因與 *hfq* 基因表現。

將培養於 LB 培養液的野生株(w.t)與 *cya* 基因突變的菌株 (Δ *cya*)DNase I 處理過後的總 RNA 樣品取出並置於冰上退冰後，總 RNA 量取 5 μ g 分別加入 6mer 的隨機引子(random primer)進行總 RNA 反轉錄反應，將所有 RNA 轉成總 cDNA，之後再將兩種菌株總 cDNA 分別加入 *gcvB*, *ryhA* 與 *hfq* 所特別設計的引子進行 Real-time PCR 反應並分析實驗結果。

實驗結果在早期對數生長期(0.D 0.3)時，*cya* 基因突變的菌株之 *gcvB* sRNA 的量小於野生株 *gcvB* sRNA 的量而 *ryhA* 之 sRNA 的量反而是大於野生株 *ryhA* sRNA 的量；另外 *hfq* mRNA 的量也是大於野生株 *hfq* mRNA 的量(見圖十二)。

所以在菌株生長至早期對數生長期(0. D 0. 3)時，cAMP 的存在增加了 *gcvB* sRNA 基因的表現，及降低 *ryhA* sRNA 基因與 *hfq* 基因的表現。因此 cAMP 會促進 *gcvB* sRNA 基因的表現，而阻礙 *ryhA* sRNA 基因與 *hfq* 基因的表現。

4.10 cAMP 影響 *hfq* 基因的表現

本實驗在菌體生長至早期對數生長期(0. D 0. 3)時，利用 Northern blot 觀察 cAMP 影響 *hfq* 基因的表現。

將 *E. coli* BW25113 野生株(w. t)與 *cya* 基因突變的菌株(Δ *cya*)分別培養於 LB 培養液與 LB 外加葡萄糖培養液，以 37 °C，200 rpm 培養至 0. D 0. 3 時停止培養並抽取總 RNA 進行北方墨點法。所得的結果利用 Zero-Dscan 軟體測定個訊號強度，即可測定四種不同的條件下(分別為：w. t in LB、w. t in LB+Glc、 Δ *cya* in LB、 Δ *cya* in LB+Glc)，cAMP 影響 *hfq* 基因表現量。

實驗結果在早期對數生長期(0. D 0. 3)時，野生株培養於 LB 培養液 *hfq* 基因表現量明顯較低於野生株培養於 LB 外加葡萄糖培養液、*cya* 基因突變的菌株培養於 LB 培養液與 *cya* 基因突變的菌株培養於 LB 外加葡萄糖培養液。由於 *hfq* mRNA 轉錄單元(transcription units)次數較多，所以 Northern 結果顯示產生 3 個 band(見圖十三)。利用 Zero-Dscan 軟體定量的結果，把野生株培養於 LB 培養液 *hfq* 基因表現量換算成一倍，野生株培養於 LB 外加葡萄糖培養液明顯上升約 3 倍，*cya* 基因突變的菌株培養於 LB 培養液上升約 2 倍，而 *cya* 基因突變的菌株培養於 LB 外加葡萄糖培養液上升約 2 倍(見圖十三)。

所以在菌株生長至早期對數生長期(0. D 0. 3)時，cAMP 的存

在明顯降低 *hfq* 基因的表現量，所以 cAMP 會阻礙 *hfq* 基因的表現。

4.11 GcvB 之 sRNA 影響 *ompA* mRNA 穩定性

本實驗再菌體生長至早期對數生長期(0. D 0.3)時，利用北方墨點法探討 *gcvB* 是否影響 *ompA* mRNA 穩定性。

將 *gcvB* 基因突變菌株與野生菌株分別培養於 LB 培養液，在 OD 0.3 時停止培養，與上述(4.2)方法相同，8 個時間點分別抽取總 RNA，利用北方墨點法測其 *ompA* mRNA 穩定性。

實驗結果，在早期對數生長期(0. D 0.3)時，比較野生菌株培養於 LB 培養液與 Δ *gcvB* 基因突變菌株培養於 LB 培養液，*ompA* mRNA 穩定性並沒有明顯的改變(見圖十五(A))

所以在早期對數生長期(0. D 0.3)時，*gcvB* 的存在對 *ompA* mRNA 的穩定性並沒有明顯的影響。

五、討論

5.1 轉錄層次上 cAMP 影響 *ompA* 基因的表現

本實驗利用批次式培養法，在對數生長期(0. D 0.4)時，觀察 cAMP 影響 *ompA* 基因的表現量。

已知 *ompA* 基因前 *ompAp2* 啟動子需要由 cAMP-CRP 複合物所活化(Gibert and Barbe, 1990)。由於 cAMP 在細胞中的量受到 glucose catabolite repression 所影響，當葡萄糖存在時，cAMP 的量降低。所以實驗再一次確認將野生株培養於 LB 培養液外加葡萄糖、*cya* 基因突變菌株培養於 LB 培養液與 *cya* 基因突變菌株培養於 LB 培養液外加葡萄糖 *ompA* 基因表現量與野生株菌株培養於 LB 培養液作比較，可看出在 LB 外加葡萄糖糖培養液下，野生株 *ompA* 基因表現量下降 0.57 倍，而 *cya* 基因突變菌株培養於 LB 培養液更明顯下降至 0.43 倍，另外 *cya* 基因突變菌株培養於 LB 培養液外加葡萄糖下，由於葡萄糖對 cAMP 影響現象已經不存在，所以也明顯下降 0.43 倍。cAMP 在對數生長期(0. D 0.4)時確實是有調控 *ompA* 基因的表現(見圖二)。

5.2 轉錄後層次上 cAMP 影響 *ompA* mRNA 穩定性

以往認為 cAMP 在大腸桿菌中扮演轉錄輔因子的角色，藉由與轉錄因子 CPR 結合，活化 CRP 活性後，再共同與基因啟動子附近結合，形成 cAMP-CRP-DNA 複合物，增強或降低下游基因的表現。所以再轉錄層次上，轉錄因子 cAMP-CRP 扮演相當重要的角色(Kallipolitis *et al.*, 1997)(Busby and Ebright, 1999)。以知 cAMP-CRP 在轉錄層次上正向調控 *ompA* mRNA 基因表現。本

實驗探討 cAMP 在轉錄後層次上是否影響 *ompA* mRNA 在細胞中的穩定性。

在轉錄後層次上，無論是在早期對數生長期(0.D 0.3)或是對數生長期(0.D 0.5)(大腸桿菌生長曲線可見圖一)，*ompA* mRNA 穩定性明顯受到 cAMP 所影響(見圖三之一與圖四之一)，當 cAMP 不存在時，*ompA* mRNA 穩定性明顯下滑，尤其是在早期對數生長期(0.D 0.3)時最為明顯。在 0.D 0.3 時，野生株培養於 LB 培養液與 *cya* 基因突變菌株培養於 LB 培養液比較下，半衰期由 13.6 分鐘下降至 3.8 分鐘(見圖三之一)；而在對數生長期(0.D 0.5)時，半衰期由 12.3 分鐘下降至 5.5 分鐘(見圖四之一)。由此可見當菌體生長至早期對數生長期(0.D 0.3)或至對數生長期(0.D 0.5)時，cAMP 明顯增加了 *ompA* mRNA 在細胞中的穩定性。

一般而言 *ompA* mRNA 在細胞中的穩定性隨生長速率而上升，受生長速率而影響(Nilsson *et al.*, 1984)，在對數生長期或生長快速下，*ompA* mRNA 在細胞中的半衰期可到 14 幾分鐘左右(VYTVYTSKA *et al.*, 1998)，但是生長到穩定期(stationary phase)時，*ompA* mRNA 在細胞中的半衰期大約只有 4 分鐘左右，主要是受到 *micA* sRNA 與 Hfq 蛋白共同作用下而增加 *ompA* mRNA 的降解，此時 *micA* sRNA 與 Hfq 在細胞中的量也大為增加(Rasmussen *et al.*, 2005)。我們實驗發現在早期對數生長期(0.D 0.3)或對數生長期(0.D 0.5)時，cAMP 的存在增加了 *ompA* mRNA 在細胞中的穩定性。我們認為 cAMP 分子並無直接結合到 *ompA* mRNA 而增加它的穩定性之證據，而也許存在著間接調控功能而影響 *ompA* mRNA 的穩定性。

目前直接調控菌體 mRNA 在轉錄後的層次上，除了蛋白質

外，sRNA 形成主要的調控者，藉由自身序列與所標定的 mRNA 序列互補結合，改變 mRNA 轉譯與穩定性。另外大多數 sRNA 藉由序列互補方式調控 mRNA 都需要 RNA 伴隨蛋白 Hfq 的共同參與，而 Hfq 成為必要的參與者，增加 sRNA 與 mRNA 之間的交互作用 (Møller *et al.*, 2002)。所以我們認為 cAMP 或許是間接影響 *ompA* mRNA 穩定性，可能主要是藉由 cAMP 調控 sRNA 或 Hfq 而造成。

5.3 早期對數生長期 (O.D 0.3) 各種 sRNA 影響 *ompA* mRNA 穩定性

是否 cAMP 藉由調控 sRNA 而造成 *ompA* mRNA 穩定性的改變。我們從先前文獻找出已知與 *OmpA* 相關的 sRNA 與實驗室實驗 DATA 中受葡萄糖影響或受 CRP 調控的 sRNA，交叉比對下挑出 7 個 sRNA (見表二)：

(1) *MicA* (*SraD*)： *micA* sRNA 在菌體生長至穩定期時才會大量表現，在 Hfq 的協助下直接與 *ompA* mRNA 5' 端靠近核糖體結合位 (RBS) 處結合，因此阻擋了 30S 核糖體的結合也增加了 RNase E 對 5' 端處的切割，使 *ompA* mRNA 穩定性下降 (Rasmussen *et al.*, 2005)。本實驗室先前 *in vitro* 實驗並沒有搜尋到 *micA* 基因前具有 cAMP-CRP 結合的位置。

(2) *RseX*： *rseX* 基因位於大腸桿菌基因圖譜大約 43.7 分中的位置，目前對 *rseX* 基因大量表現的環境並不清楚，2006 年 Douchin 等人在菌體中利用質體大量表現 *rseX* sRNA，而造成外膜蛋白 (*Omp*) 家族成員中 *ompA* 與 *ompC* mRNA 量降低，但若在 *hfq* 基因突變下大量表現 *rseX* sRNA，*ompA* 與 *ompC* mRNA 在細胞中的量則無任何改變，可見 *rseX* sRNA 會降低 *ompA* 與 *ompC* mRNA 量是需要 Hfq 參與 (Douchin *et al.*, 2006)。本實

驗室先前 *in vitro* 實驗預測到 *rseX* 基因前具有 cAMP-CRP 結合位，並誘導 *rseX* 基因表現。

(3) RyhB(SraI)：當細胞內鐵離子濃度降低時，*ryhB* sRNA 基因表現提升，並結合到與鐵利用或儲存相關的 mRNA，降低其穩定性，加速分解(Mass'e and Gottesman, 2002)(Mass'e *et al.*, 2005)。2006 年，Urban 與 Vogel 利用標定的基因序列後端攜帶可表現 GFP 螢光蛋白所建構的質體，探討許多 sRNA 在轉譯層次上影響 mRNA 轉譯作用。我們在文獻中挑出影響 *OmpA* 轉譯的兩個 sRNA，分別為 *ryhB* 與 *dsrA*。此兩個 sRNA 大量表現下會增加 *ompA* mRNA 的轉譯，但是卻較微弱(Urban and Vogel, 2007)。另外已知 *ryhB* 基因的表現間接受到 cAMP-CRP 負向的調控，cAMP-CRP 正向調控 Fur 轉錄因子，而 Fur 又負向調控 *ryhB* 基因的表現。

(4) DsrA：*dsrA* 基因大量表現的環境是在低溫下 20 到 30°C，當菌體生長至對數生長期時(Sledjeskil *et al.*, 1996)，主要功能藉由解開 *rpoS* mRNA 的二級結構而增加 *rpoS* mRNA 轉譯與降低 *hns* mRNA 基因的表現(LEASE *et al.*, 1998)。此兩個 mRNA 分別為穩定期 σ 因子(stationary phase σ factor, σ^s)與 histone-like protein(SLEDJESKI and GOTTESMAN, 1995)。*dsrA* 影響的基因也不止只有 *rpoS* 與 *hns*，2004 年 Lease 等人再 *dsrA* 大量表現的環境下利用 array 大量篩選出其他有受到 *dsrA* 影響的基因，並建立 *dsrA* 間接影響這些基因表現的圖譜，其中 *ompA* 基因從中被篩選出，但只有稍微受到 *dsrA* 正向影響而 mRNA 量增加(Lease *et al.*, 2004)。另外 *dsrA* sRNA 作用時也同時需要 Hfq 蛋白質的幫助，但若 Hfq 量過多反而

會降低 *dsrA* sRNA 執行的功能 (Lease and Woodson, 2004)。本實驗室先前也預測到 *dsrA* 基因前具有 cAMP-CRP 結合位，並阻止 *dsrA* 基因表現。

(5) Spot42(*spf*)：以知 *spf* 基因前具有 cAMP-CRP 結合的位置，而且 *spf* 基因的表現受到 cAMP-CRP 所抑制。目前已知 *spf* 只有在當環境中葡萄糖量增多時才會大量表現，可推測當葡萄糖存在時，cAMP 的量下降而造成 *spf* 的量上升，而 *spf* 主要藉由結合在半乳糖操作子 *ETKM*(*galactose operon ETKM*) 中 *glaK* 核糖體結合位而降低基因的表現。*glaK* 產生的酵素為 kinase，功能為將進入細胞中的 galactose 磷酸化，而能進入糖類代謝途徑充分產生能量 (Møller *et al.*, 2002)。另外 *spf* 作用同時也需要 Hfq 蛋白的協助，當 *hfq* 突變後，*spf* 在細胞中穩定性也會因此而降低 (Møller *et al.*, 2002)。

(6) RyhA(SraH)：*sraH* sRNA 初期全長 108b.p，經過修飾後形成只有 45b.p 的 *ryhA* sRNA (Argaman *et al.*, 2001) (Wassarman *et al.*, 2001)。目前 *ryhA* 在細胞中的功能還是未知，但已知也會與 Hfq 蛋白結合 (Wassarman *et al.*, 2001)。另外 *ryhA* 基因大量表現的環境再 LB 培養液下生長至穩定期時 (Vogel *et al.*, 2003) (Wassarman *et al.*, 2001)。本實驗室先前預測到 *ryhA* 基因前具有 cAMP-CRP 結合位，並會阻止 *ryhA* 基因表現。

(7) GcvB：*gcvB* 大約 205b.p，大量表現的環境是在 early log phase。目前主要功能為結合到膜上蛋白 OppA 與 DppA 運輸系統 (oligopeptide and dipeptide transport systems) 或是胺基酸 Sst 運輸系統 (amino acids transport systems) 的

mRNA，並降低其 mRNA 轉譯作用 (Sharma *et al.*, 2007)(Pulvermacher *et al.*, 2009)。 *gcvB* 基因的表現受到 GcvA 與 GcvR 蛋白的調控，GcvA 與 GcvR 本身主要為甘胺酸分解系統 (glycine cleavage system) 的轉錄因子，2009 年 Pulvermacher 等人證實 *gcvB* sRNA 也會結合到甘胺酸等胺基酸通透酶 (permease) 的 mRNA (*cycA* mRNA)，並也降低其轉譯作用 (Pulvermacher *et al.*, 2009)。 Hfq 必須參與 *gcvB* sRNA 的調控 (Sharma *et al.*, 2007)。 但是有文獻內容指出 *gcvB* 並不會干擾核糖體 30S 與 *ompA* mRNA 結合 (Sharma *et al.*, 2007)。 本實驗室先前預測到 *gcvA* 基因前具有 cAMP-CRP 結合位，並會促進 *gcvB* 基因表現。

由於 *micA* sRNA 先前文獻已經被證實在生長後期時會降低 *ompA* mRNA 穩定性，我們從另一個與 *ompA* mRNA 直接相關的 *rseX* sRNA 開始探討在早期對數生長期 (O.D 0.3)，*rseX* sRNA 是否有影響 *ompA* mRNA 穩定性。 Northern 實驗結果在早期對數生長期 (O.D 0.3)，*rseX* 並沒有明顯的改變 *ompA* mRNA 穩定性 (見圖六之一)。 所以推測一般情況下 *rseX* 在早期對數生長期 (OD 0.3) 時並沒有明顯的表現而影響 *ompA* mRNA 穩定性，因為大量表現 *rseX* 情況下，*ompA* mRNA 穩定性才會因此受影響而降低 (Douchin *et al.*, 2006)。

另外比較野生菌株與 *dsrA* 基因突變的菌株 *ompA* mRNA 穩定性。 在早期對數生長期 (O.D 0.3) 時，轉錄後層次上，Northern 結果顯示 *dsrA* 突變菌，*ompA* mRNA 穩定性呈現下降 (見圖八之一)，可見 *dsrA* 會增加 *ompA* mRNA 穩定性，但是 real time PCR 與 Northern 結果 cAMP 是對 *dseA* 基因的表現在早期對數生長期

(0. D 0.3)卻是抑制作用(見圖十與圖十一)，所以證實 cAMP 不是藉由調控 *dsrA* 而增加 *ompA* mRNA 的穩定性。轉錄層次上，*dsrA* 也沒有明顯改變 *ompA* 基因的表現(見圖九)，推測是 *dsrA* 表現量太低，而沒有影響 *ompA* 基因的表現。在 37°C，早期對數生長期(0. D 0.3)cAMP 明顯增加 *ompA* mRNA 的穩定性，但由於在這環境下 *dsrA* 在細胞中的量明顯較低，所以推測 cAMP 增加 *ompA* mRNA 的穩定性不是藉由增加 *dsrA* sRNA 而造成，而 *dsrA* 的突變造成 *ompA* mRNA 的穩定性下降，推測是 *dsrA* 突變下間接的影響。

由於 *rseX* sRNA 表現的條件未知，*dsrA* sRNA 表現的條件又是在低溫下，其他 5 個 sRNA 中只有 *gcvB* 是在 early log phase 下大量表現，而 real time PCR 結果，cAMP 又正向調控 *gcvB* 基因的表現(見圖十二)，*gcvB* 已知的功能為調控膜上運輸蛋白 *OppA* 與 *DppA* 的 mRNA。但是 Northern 實驗結果 *gcvB* 並沒有明顯影響 *ompA* mRNA 的穩定性(見圖十五)，另外 2007 年有文獻中內容指出 *gcvB* 並不會影響核糖體 30S 與 *ompA* mRNA 的結合(Sharma *et al.*, 2007)。所以雖然 *gcvB* 是在 early log phase 下大量表現，但是任務並非去調控 *ompA* mRNA 的穩定性。

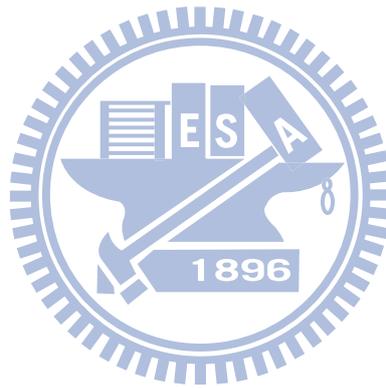
5.4 早期對數生長期(0. D 0.3)下，cAMP 會影響 *hfq* 基因表現

1998 年 Vytvytska 等人比較野生菌株培養於 LB 培養液與 *hfq* 突變菌株培養於 LB 培養液 *ompA* mRNA 穩定性，發現在對數生長期時，*ompA* mRNA 半衰期從原本 14 分鐘(野生株)上升到 25 分鐘(*hfq* 突變菌株)。先前已有許多文獻證實 *ompA* mRNA 在細胞中的穩定性受 Hfq 蛋白的負向調控，藉由 Hfq 結合到 *ompA* mRNA 5' 端非轉譯區域，靠近 SD 序列處 A/U 豐富的區域，干擾核糖體

的結合，並改變 *ompA* mRNA 5' 端區域的結構，增加 RNase 的分解速率，使 *ompA* mRNA 穩定性下降 (Vytvytska *et al.*, 1998)(Vytvytska *et al.*, 2000)(Moll *et al.*, 2003)。在對數生長期或是生長快速時，由於 Hfq 的含量較低於核糖體次單位 30S 的量，以至於 30S 有較多機會結合到 *ompA* mRNA 5' 端區域，阻擋 RNase 的切割，使穩定性增加。但是到穩定期或是生長緩慢時，Hfq 的量上升，使得較多機會與 30S 競爭 *ompA* mRNA 5' 端區域，而造成 Hfq 結合到 *ompA* mRNA 並改變 5' 端區域結構，穩定性下降 (Vytvytska *et al.*, 2000)。2005 年，Rasmussen 等人證實在穩定期時 *ompA* mRNA 的穩定性受 MicA small RNA 所調控而降低，而 MicA 也是在穩定期時大量表現，與 Hfq 共同結合到 *ompA* mRNA 5' 端區域，降低其穩定性。此外也發現若 *hfq* 基因突變菌時或當 Hfq 不存在，即使 *micA* 大量表現下，*ompA* mRNA 穩定性並未受到影響，可見 Hfq 是必需參與 *ompA* mRNA 穩定性的調控 (Rasmussen *et al.*, 2005)。

本實驗也發現在早期對數生長期 (O.D 0.3)，cAMP 的存在反而降低 *hfq* 基因的表現 (見圖十二與圖十三)，野生株培養於 LB 培養液 *hfq* mRNA 的量明顯低於野生株培養於 LB 外加葡萄糖與 *cya* 突變菌培養於 LB 培養液 (見圖十三)，可見 cAMP 對於 *hfq* 基因的表現呈現負向調控，雖然目前還未找到 *hfq* 基因上游是否具有 cAMP-CRP 結合位，但可推測存在 cAMP 直接或間接降低 *hfq* 基因的表現。另外 Hfq 也降低 *ompA* mRNA 的穩定性。所以在早期對數生長期時 (O.D 0.3)，cAMP 直接或間接降低 *hfq* 基因的表現，也可造成 Hfq 蛋白量降低，使得不足與 30S 競爭結合 *ompA* mRNA，而增加 *ompA* mRNA 的穩定性。而在 LB 外加葡萄糖下，葡萄糖的

存在降低 cAMP 含量，而 *hfq* 基因表現上升(見圖十三)，但是 *ompA* mRNA 穩定性並沒有明顯被影響(見圖三之一與圖四之一)，認為原因在於葡萄糖存在下，*spf* sRNA 大量表現，並需要 Hfq 蛋白的協助結合到 *galK* mRNA，降低 Kinase 的表現(Møller *et al.*, 2002)(Görke and Vogel, 2008)，所以雖然 *hfq* 基因大量表現使得 Hfq 量上升，但此時 Hfq 協助 *spf* 的調控機制，對 *ompA* mRNA 的穩定性並沒有明顯的影響。



六、結論

6.1 結論表、歸納本實驗總結果

	Effect of cAMP ^a	The effect on <i>ompA</i> mRNA stability ^b	<i>ompA</i> mRNA expression level ^c	CRP-binding Position and Site sequence ^e
<i>cya</i> ⁻	↓	↓	↓	
<i>micA</i>	No detected	Reference [36] ↓	Unknow	ND(No detected)
<i>rseX</i>	No detected	This study (X) ^d	Unknow	No detected in gene expression; -192; TTATG TG ATAAAAG TCAC ATTT
<i>ryhB</i>	Reference [52] ↓	Unknow	Unknow	ND
<i>dsrA</i>	This study ↓	This study ↑	This study (X) ^d	Repressor; -98; AGG GGT GACGTGCG TCAC ATTT
<i>spf</i>	Reference [31] ↓	Unknow	Unknow	Repressor; -95; TTT TGT GATGGCTA TTAG AAAT

<i>ryhA</i>	This study ↓	Unknow	Unknow	Repressor; -48; TTA ACTGA TTTCATG TAACA AAT
<i>gcvB</i>	This study ↑	This study (X) ^d	Unknow	Activator; -239; TACT GCGG CCTTGGG TACA AAA
Hfq	This study ↓	Reference [49] ↓	Unknow	Predicted indirectly activator

^a cAMP 調控 7 個 *sRNA* 與 *hfq* 基因表現

^b Post-transcription 層次上，7 個 *sRNA* 與 Hfq 影響 *ompA* mRNA 穩定性

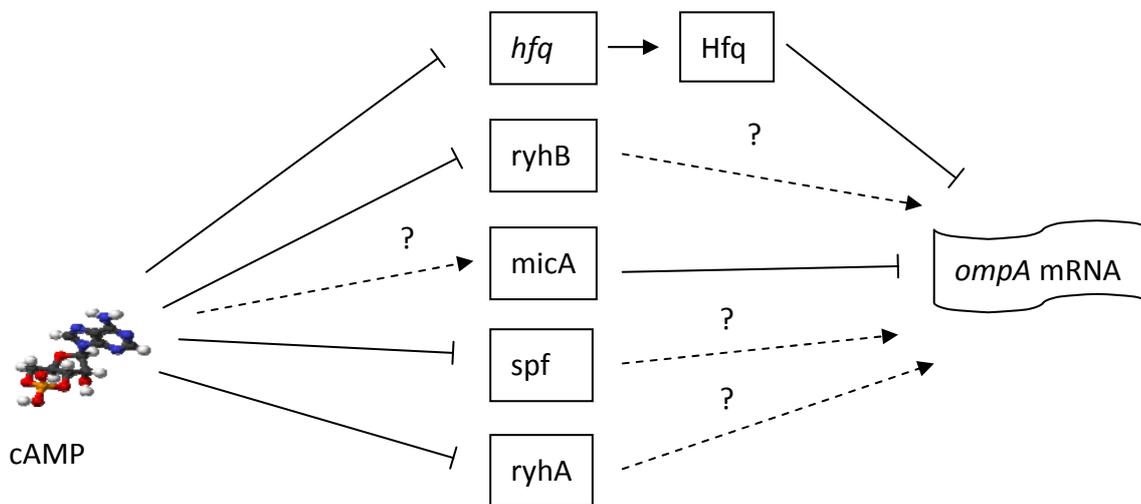
^c Transcription 層次上，7 個 *sRNA* 與 Hfq 影響 *ompA* 基因表現

^d (X) 表示無影響

^e 由本實驗室先前研究結果取得



6.2 結論圖



篩選本實驗所得到的結果，結論推測在早期對數生長期(OD 0.3)，cAMP 可能藉由調控 *hfq*、*ryhB*、*micA*、*spf* 與 *ryhA* 基因表現而達到增加 *ompA* mRNA 穩定性。



七、論文圖表

表一、本實驗所使用的菌株與質體。

<i>E. coli</i> strain	Genotype and relevant markers	Source or Reference
BW25113	<i>lacF^r rrnB₇₁₄ ΔlacZ_{Δ116} hsdR514 ΔaraBA-D_{ΔH33} ΔrhaBAD_{ΔD78}</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
JW3778	Kan ^r , <i>Δcya</i>	Kei collection
KOS01	Kan ^r , <i>ΔrseX</i>	This study
KOS08	Kan ^r , <i>ΔdsrA</i>	This study
KOS10	Kan ^r , <i>ΔgcvB</i>	This study
Plasmid	Genotype and relevant markers	Source or Reference
pKD46	Amp ^r , λ Red recombinase expression	Baba <i>et al.</i> , 2006
pKD13	Kan ^r	Baba <i>et al.</i> , 2006

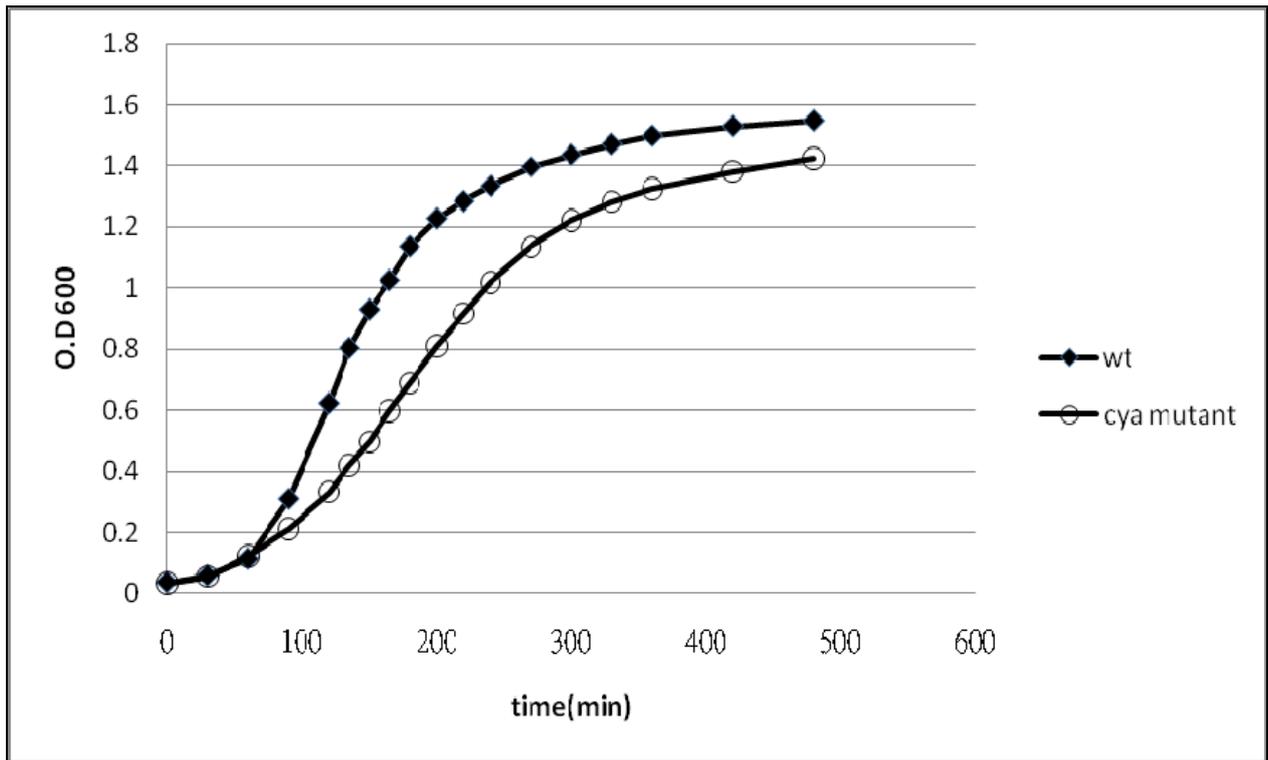
表二、可能影響本實驗 *ompA* mRNA 穩定性的 sRNA。

Small RNA	Length(b. p)	Expression condition	OmpA ^a	cAMP-CRP ^b	Hfq ^c	Reference
MicA(SraD)	72	Stationary phase in LB	Down-regulate <i>ompA</i> mRNA	Unknown	yes	Rasmussen <i>et al.</i> , 2005
RseX	91	Unknown	Down-regulate <i>ompA</i> mRNA	Unknown	yes	Douchin <i>et al.</i> , 2006
RyhB(SraI)	90	Iron starvation	Activative OmpA translati	yes	yes	Urban and Vogel., 2007
DsrA	87	Low temperature	Activative OmpA translation	Unknown	yes	Urban and Vogel., 2007
Spot42(spj)	109	Glucose presence	Unknown	yes	yes	Møller <i>et al.</i> , 2002
RyhA(SraH)	45	Stationary phase in LB	Unknown	Unknown	yes	Wassarman <i>et al.</i> , 2001
GcvB	205	Early log phase in LB	Unknown	Unknown	yes	Pulvermacher <i>et al.</i> , 2009

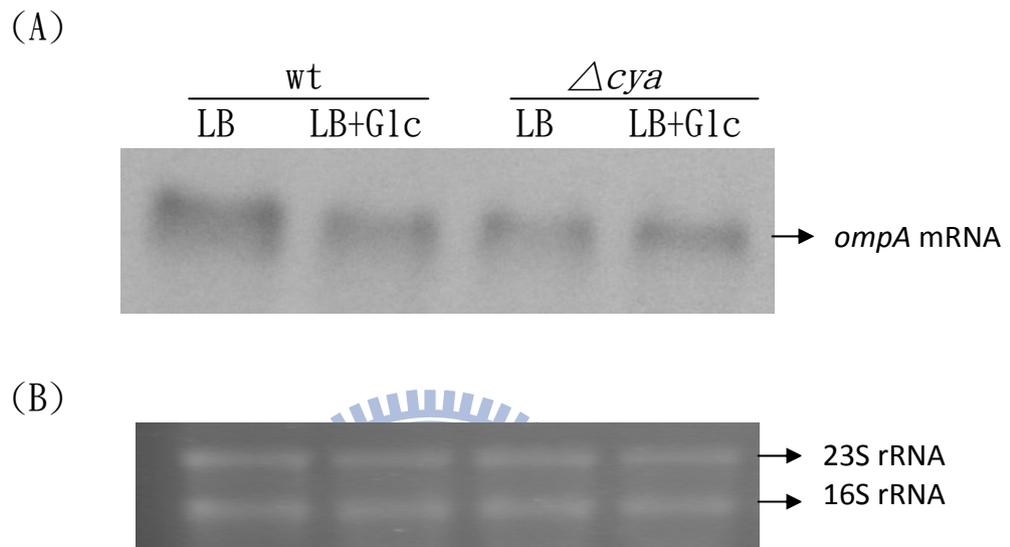
^a 已知與 *ompA* 相關調控

^b 已知受 cAMP-CRP 所調控

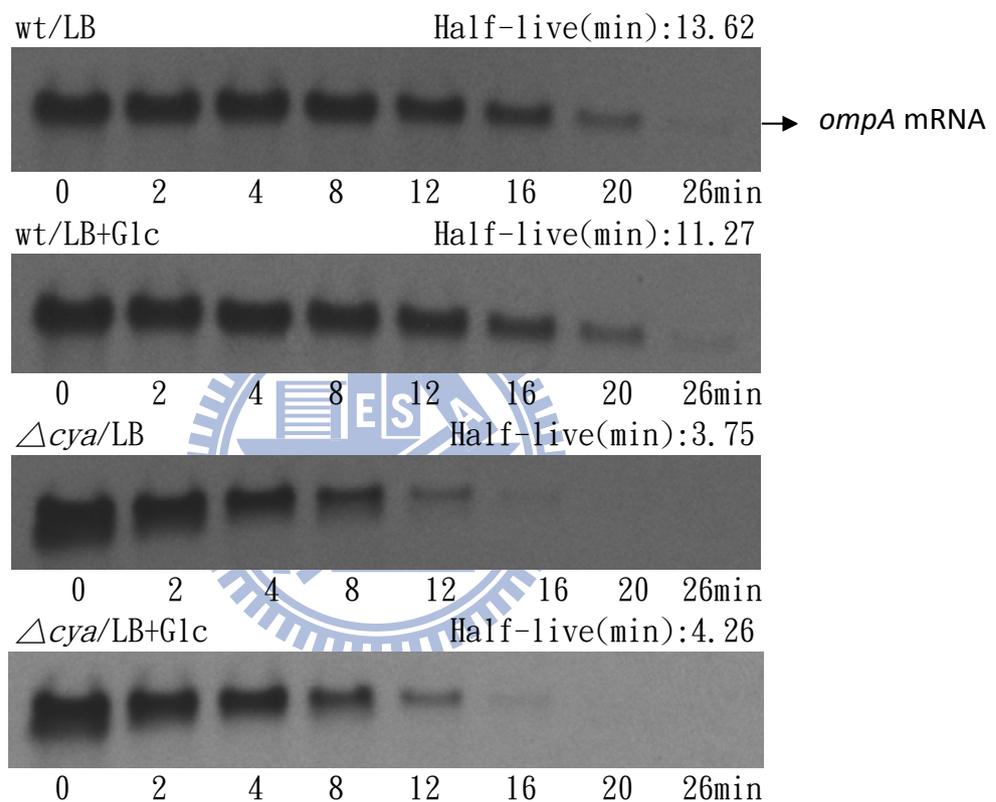
^c Hfq 結合與否



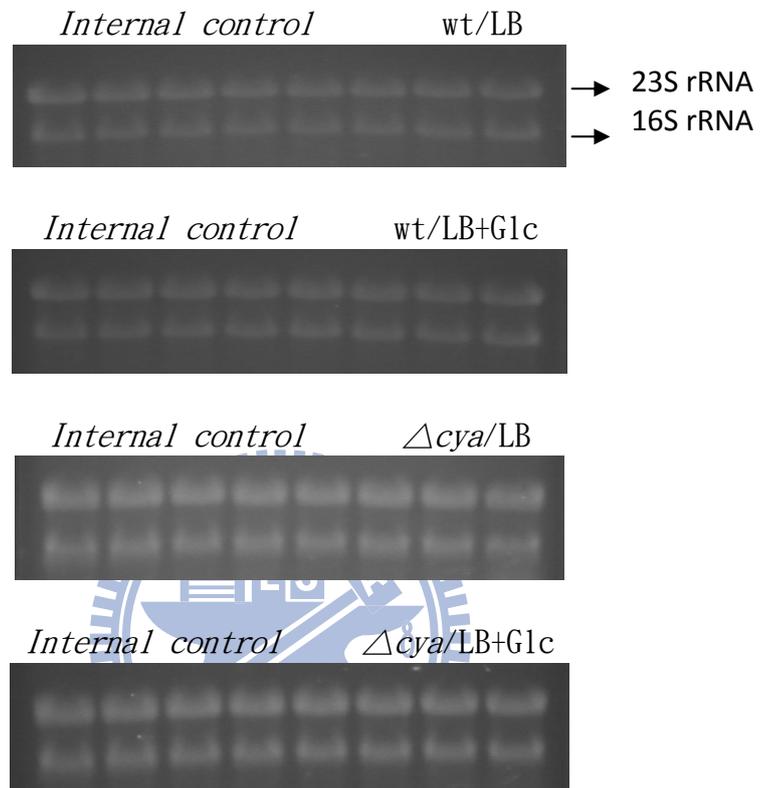
圖一、大腸桿菌編號 BW25113 野生菌株(wt)與 cAMP 基因突變菌株(Δcya)生長曲線



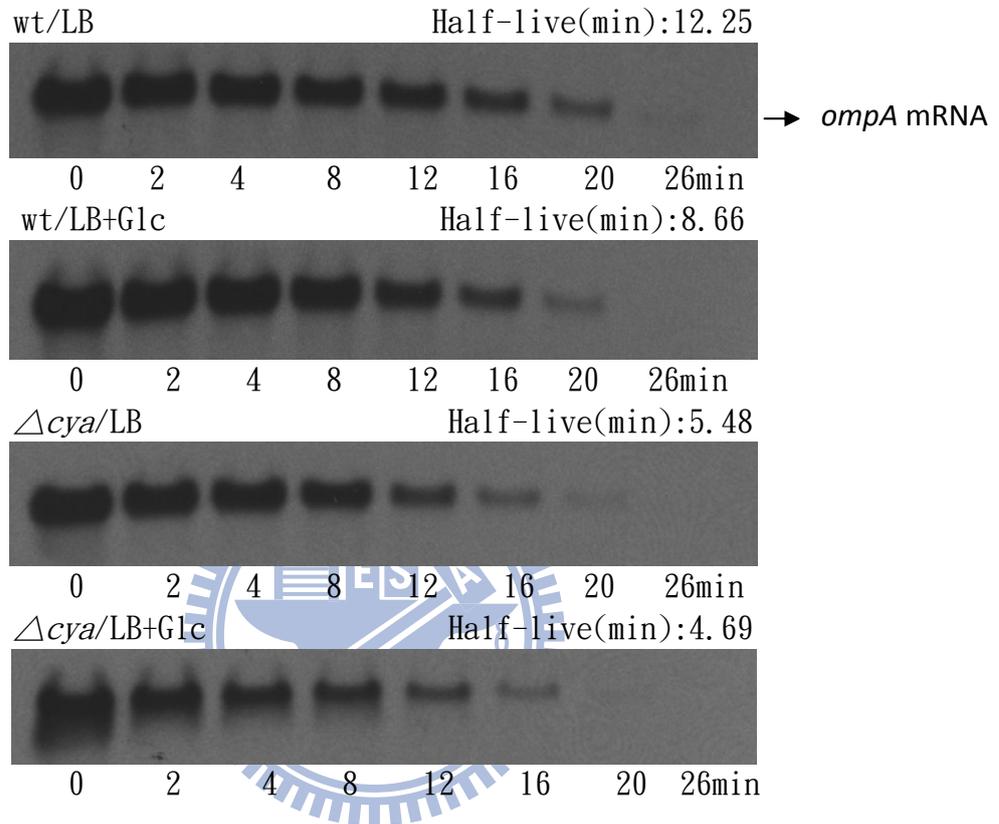
圖二、(A)大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌(Δcya)分別培養在 LB 與 LB 外加 40mM 葡萄糖下，生長至對數生長期時(O.D 0.4)，停止培養並抽取總 RNA 進行 Northern，觀察 *ompA* mRNA 基因表現量的變化。(B)internal control 16S 與 23S rRNA 電泳圖



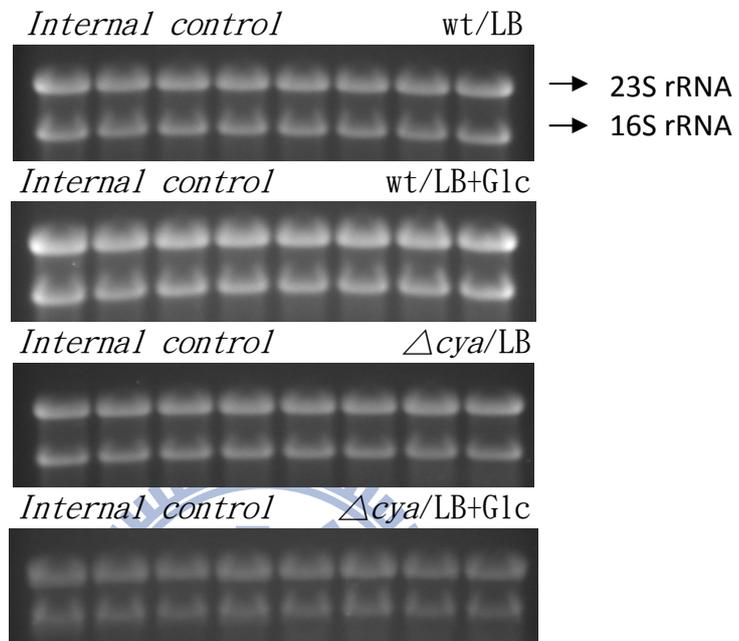
圖三之一、大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌(Δcya)分別培養在 LB 與 LB 外加 40mM 葡萄糖下，生長至早期對數生長期時(0. D 0. 3)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern blot 分析 *ompA* mRNA 穩定性變化。



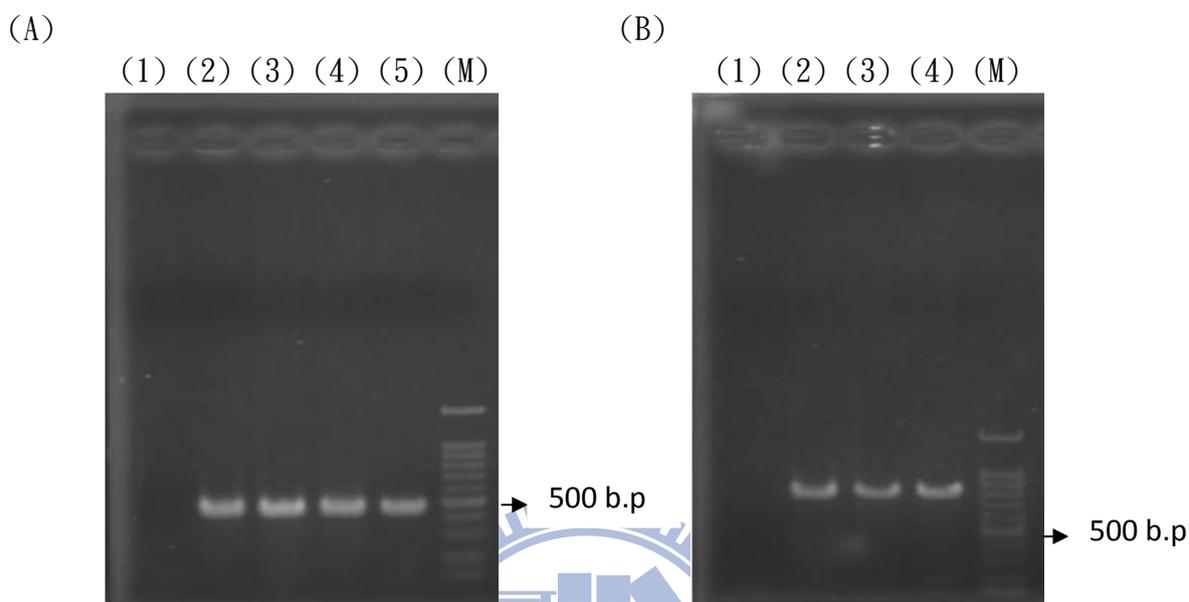
圖三之二、Internal control RNA 電泳圖。



圖四之一、大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌(Δcya)分別培養在 LB 與 LB 外加 40mM 葡萄糖下，生長至對數生長期時(O.D 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 *ompA* mRNA 穩定性變化。

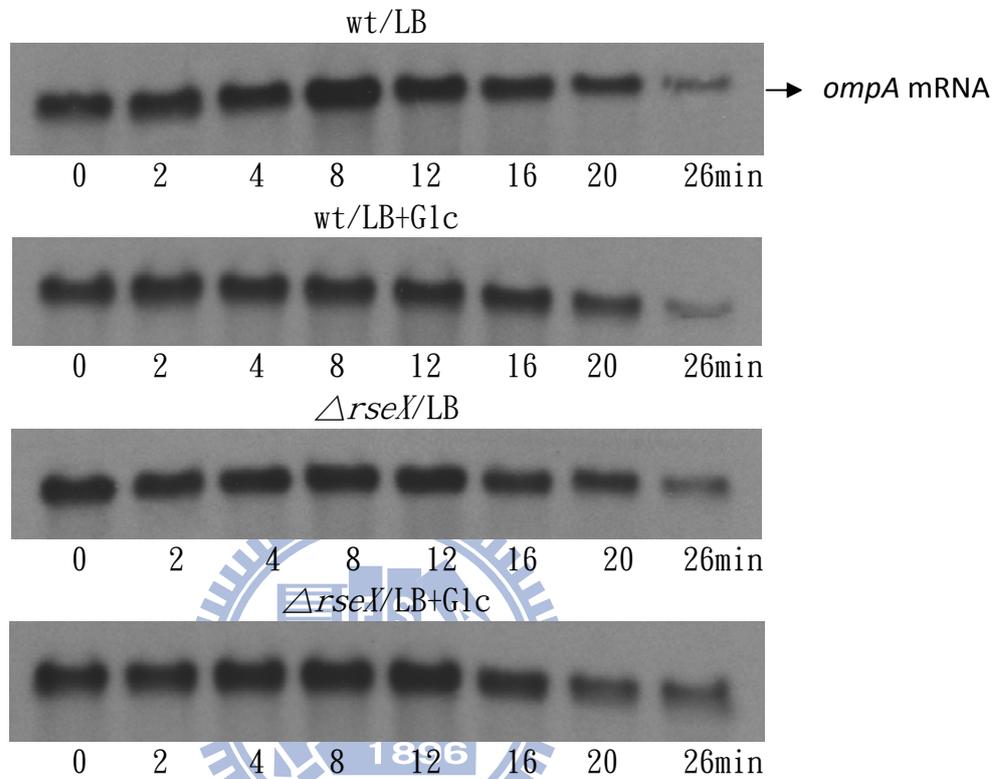


圖四之二、Internal control RNA 電泳圖。1896

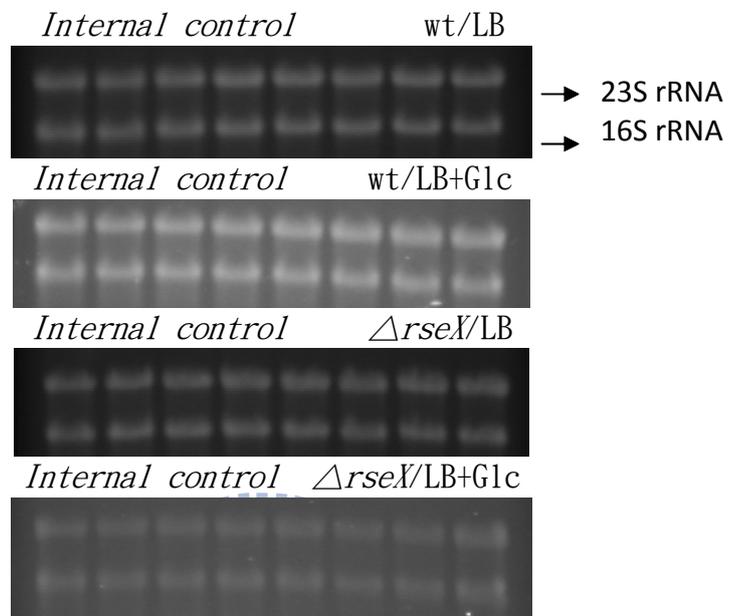


圖五、(A)確認 *rseY* sRNA 基因敲除，利用 KT forward 和 K2 reverse 引子，PCR Anti-Kanamycin(*kan*) gene marker 的電泳圖，共 486b.p。(1)為負 control 組 PCR 野生菌株 DNA，(2)為正 control 組 PCR 質體 pKD13，(3)~(5)為 PCR *rseY* sRNA 基因敲除菌株。(M)為 100b.p Marker。

(B) 確認 *rseY* 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 *rseY* sRNA 基因敲除菌株。(M)為 100b.p Marker。

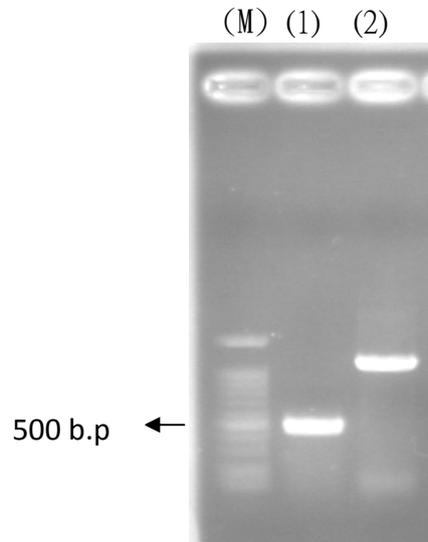


圖六之一、大腸桿菌野生株(wt)與 *rseX* 突變菌($\Delta rseX$)分別培養在 LB 與 LB 外加 40mM 葡萄糖下，生長至早期對數生長期時(OD 0.3)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern blot 分析 *ompA* mRNA 穩定性變化。

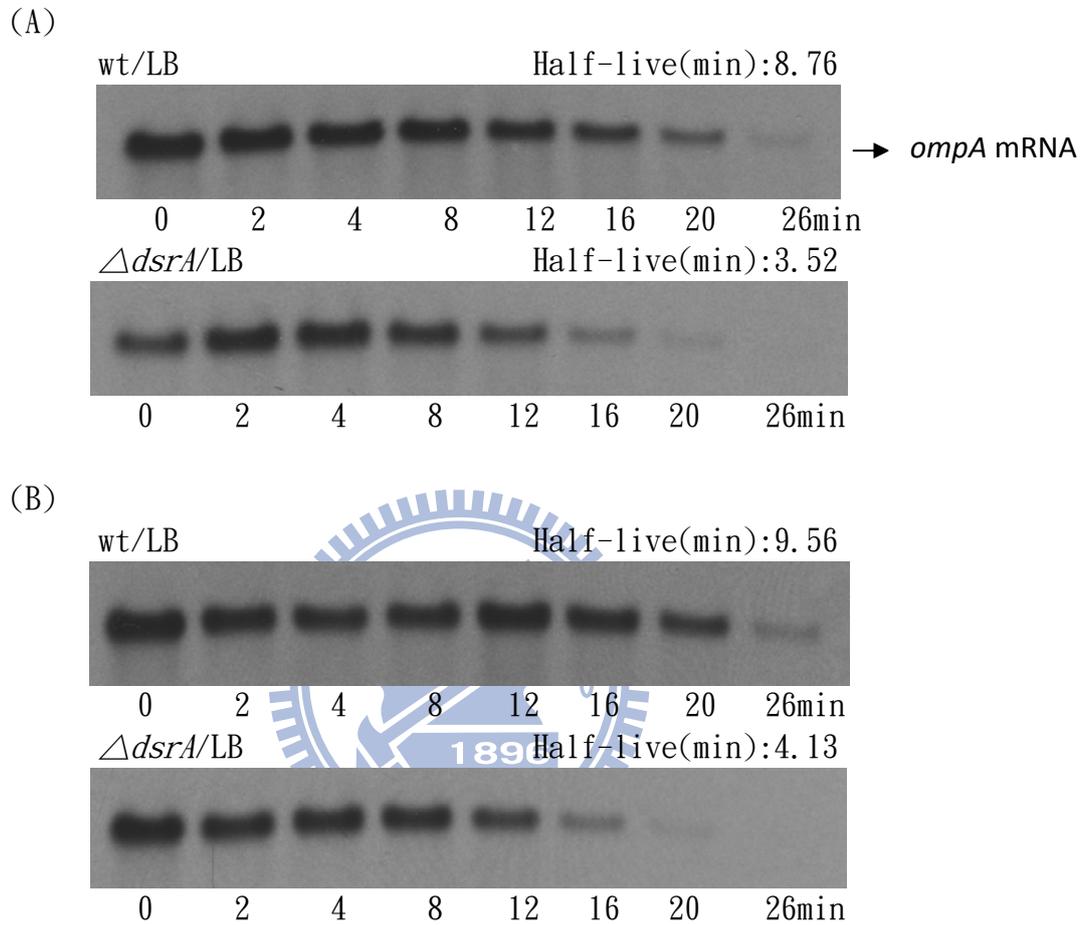


圖六之二、Internal control RNA 電泳圖。



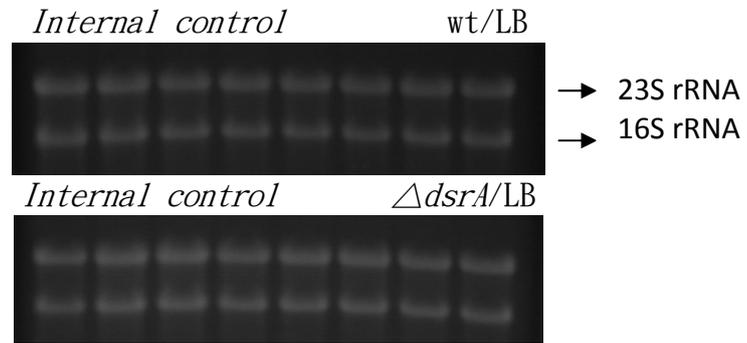


圖七、確認 *dsrA* sRAN 基因敲除與敲除位置。(1)利用 KT forwark 和 K2 reverse 引子，PCR Anti-Kanamycin(*kan*) gene marker 的電泳圖，共 486b. p。(2)利用基因外所設計的引子與 KT 引子形成一對 Reverse 和 Forward 引子，PCR 的電泳圖，約 1.2Kb。(M)為 100b. p marker。

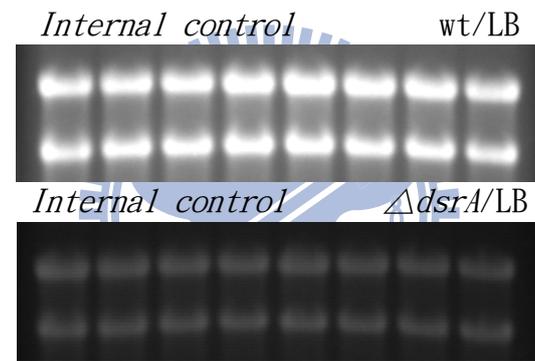


圖八之一、(A)(B)分別表示第一次實驗與第二次實驗結果。將大腸桿菌野生株(wt)與 *dsrA* 突變菌($\Delta dsrA$)培養在 LB 培養液，生長至早期對數生長期時(O.D 0.3)，加入 Rifampin 停止培養，並在往後 8 個時間點(0、2、4、8、12、16、20、26 分鐘)分別抽取總 RNA 進行 Northern blot 分析 *ompA* mRNA 穩定性變化。

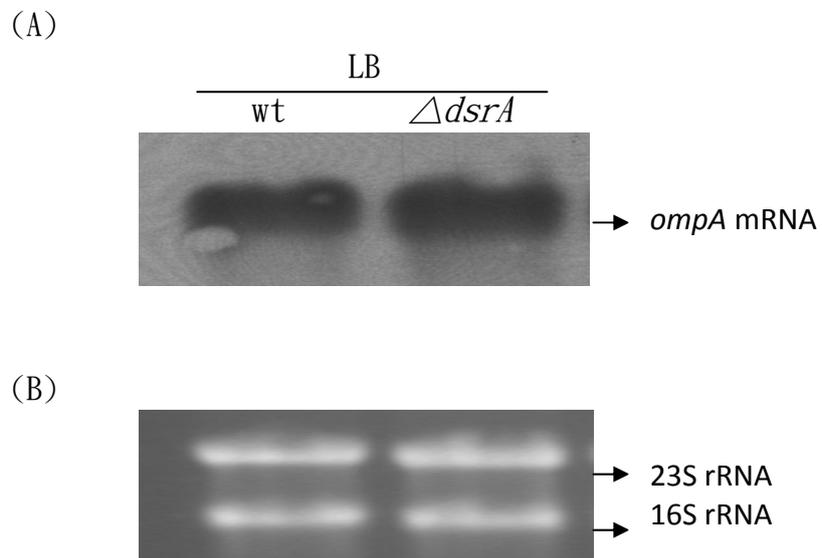
(A)



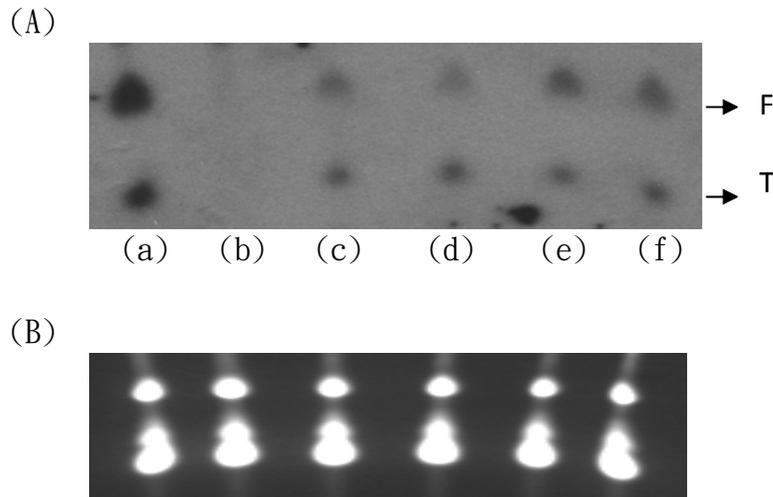
(B)



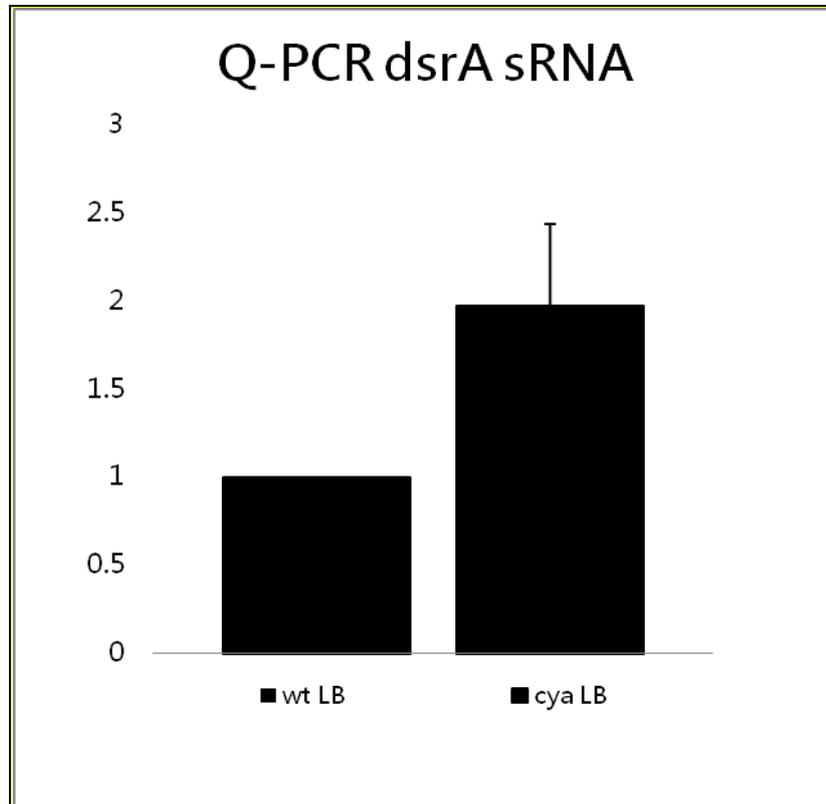
圖八之二、(A)(B)Internal control RNA 電泳圖。



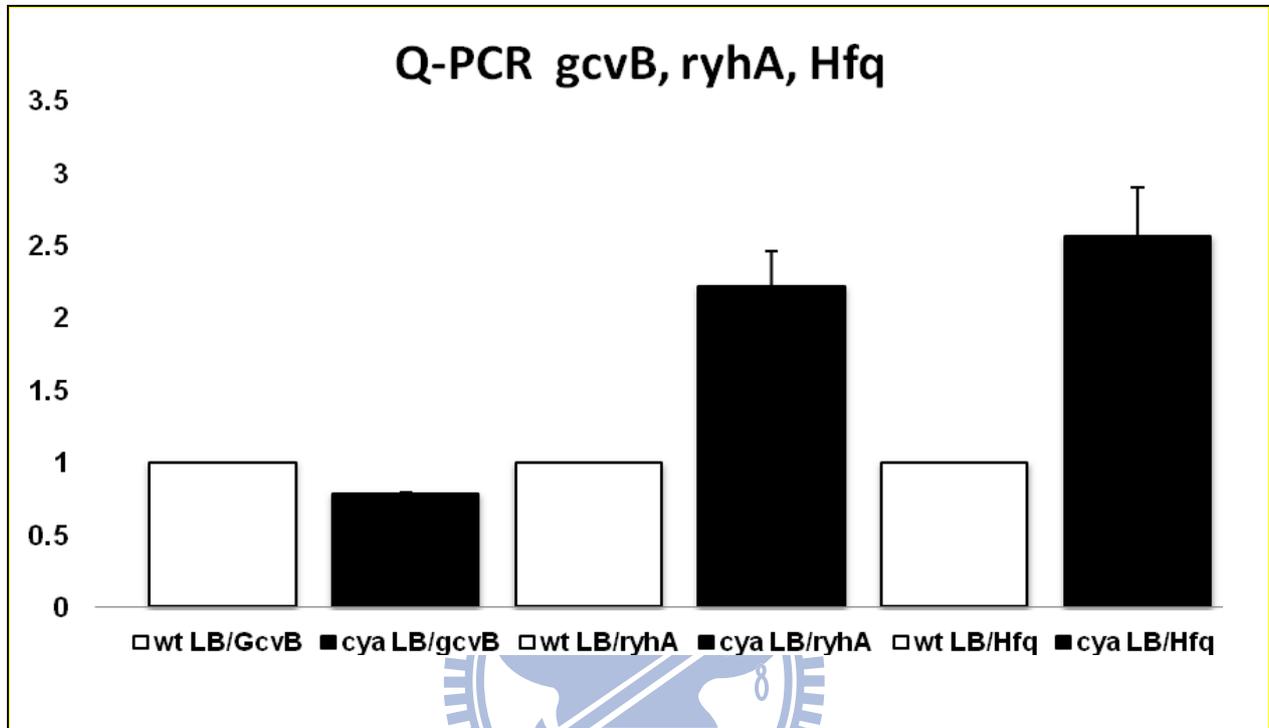
圖九、(A)大腸桿菌野生株(wt)與 *dsrA* 突變菌($\Delta dsrA$)分別培養在 LB 下，生長至早期對數生長期時(O.D 0.3)，停止培養並抽取總 RNA 進行 Northern，觀察 *ompA* mRNA 基因表現量的變化。(B)internal control 16S 與 23S rRNA 電泳圖。



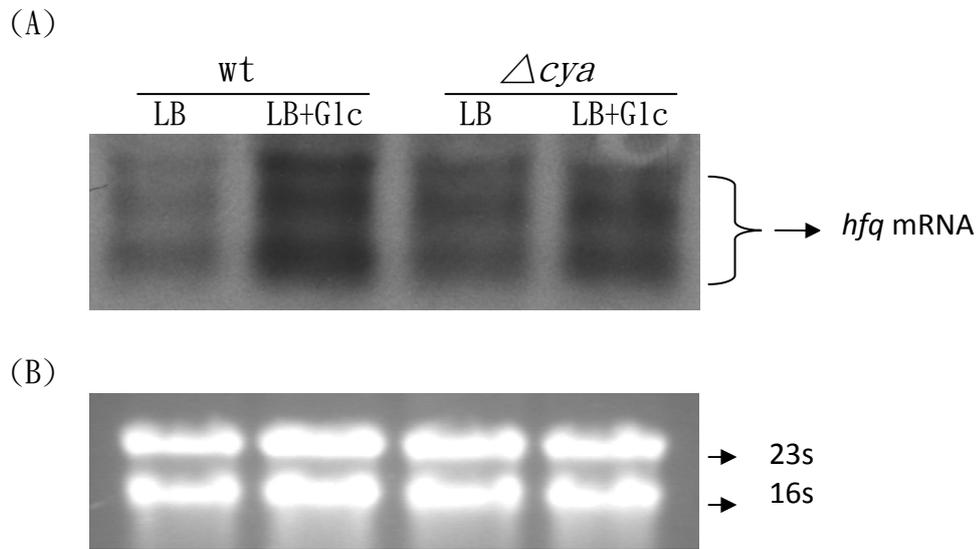
圖十、(A)Northern 分析 cAMP 影響 *dsrA* 基因的表現，(a)正對照組：野生株培養 LB 於 20°C，0. D 0.3 時停止培養並抽取總 RNA，北方墨點法分析 *dsrA* sRNA。(b)負對照組：*dsrA* 突變菌培養 LB 於 20°C，0. D 0.3 時停止培養並抽取總 RNA，北方墨點法分析 *dsrA* sRNA。(c) 野生株培養 LB 於 37°C，0. D 0.3 時停止培養並抽取總 RNA，北方墨點法分析 *dsrA* sRNA。(d) 野生株培養 LB 外加 40mM 葡萄糖培養液於 37°C，0. D 0.3 時停止培養並抽取總 RNA，北方墨點法分析 *dsrA* sRNA。(e)*cya* 突變菌株培養 LB 於 37°C，0. D 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 40mM 葡萄糖培養液於 37°C，0. D 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。



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(O.D 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。縱軸為相對比較數值(relative fold)。

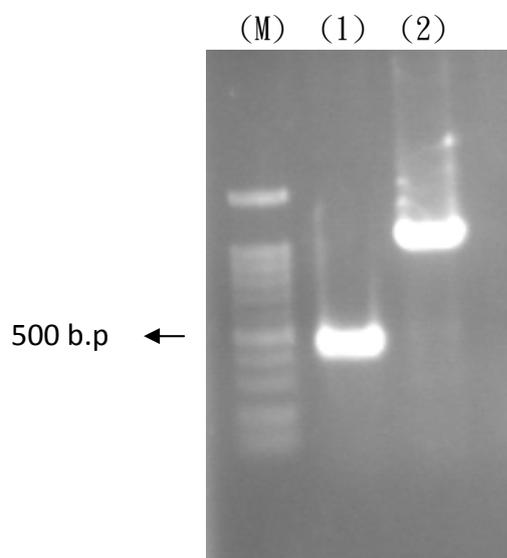


圖十二、Real-time PCR(Q-PCR) *gcvB*、*ryhA* sRNA 與 *hfq* 基因表現。大腸桿菌野生株(wt) 與 *cya* 突變菌(Δcya)培養在 LB 培養液，生長至早期對數生長期時(O.D 0.3)停止培養，抽取總 RNA 並進行反轉錄成總 cDNA，Q-PCR *gcvB*、*ryhA* sRNA 與 *hfq* 基因表現量。野生株(wt) 培養再 LB 培養液 *gcvB*、*ryhA* sRNA 與 *hfq* mRNA 量換算成一倍。縱軸為相對比較數值(relative fold)。

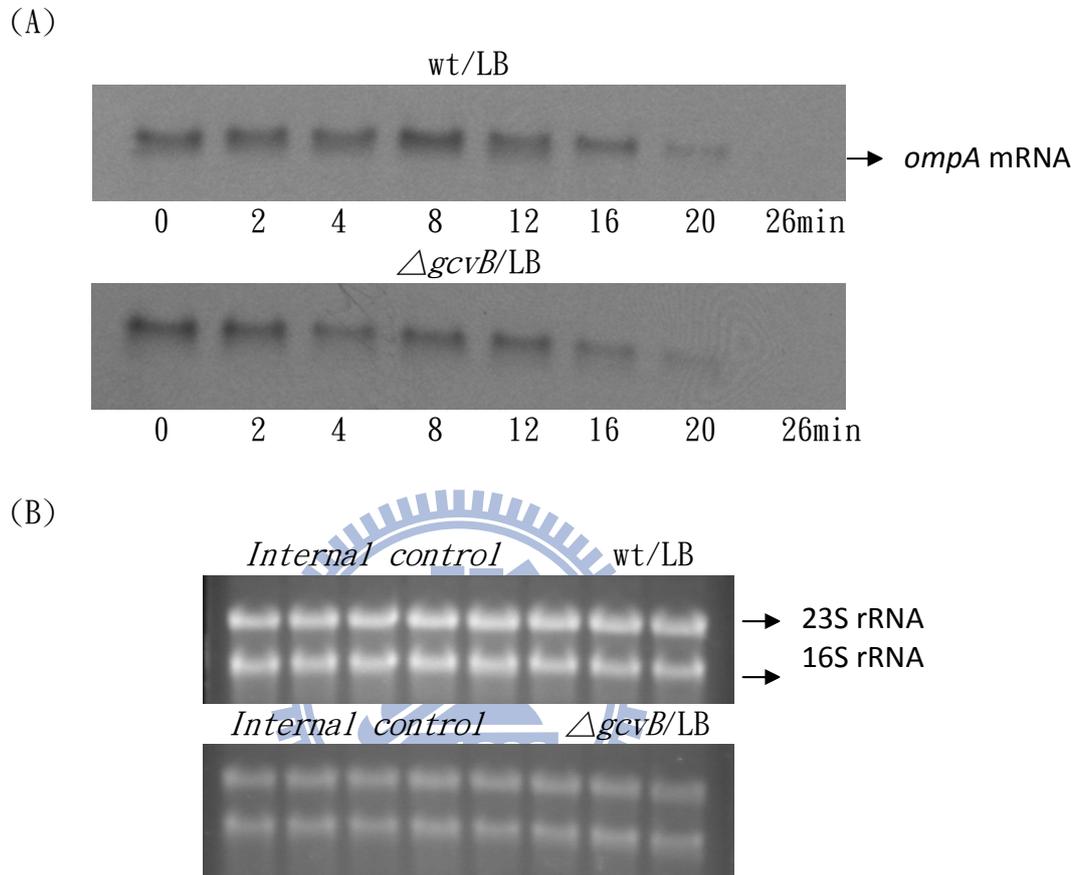


圖十三、(A)大腸桿菌野生株(wt)與 *cya* 突變菌(Δcya)分別培養在 LB 與 LB 外加 40mM 葡萄糖下，生長至早期對數生長期時(O. D 0.3)，停止培養並抽取總 RNA 進行 Northern blot，觀察 *hfq* mRNA 基因表現的變化。(B)internal control 23S 與 16S 電泳圖。





圖十四、確認 *gcvB* sRAN 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。



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(O.D 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。