

## 中文摘要

mRNA 降解對於原核生物而言，是調節基因表現的重要機制。在大腸桿菌中，RNase E 對 mRNA 的降解以及 rRNA 熟成扮演了關鍵性的角色。RNase E 為細胞生長時必須的蛋白質，當其無活性時會造成大量 mRNA 半衰期延長與阻礙部分 mRNA 之降解，因此大腸桿菌利用回饋作用嚴格控制 RNase E 的生合成。此機制藉由 RNase E 作用於自身 mRNA 的 5'-untranslated region (UTR) 361個核苷酸來進行。

過去文獻指出，大腸桿菌 RNase E 的濃度及活性會隨生長環境不同而進行調整，為了得知環境因子如何在轉錄層面調控 *rne* 基因表現，我們利用插在染色體上的 *rne-lacZ* 活性以及北方墨點法來進行分析。至於 RNase E 的活性，則是藉由其受質 *rpsO* mRNA 的半衰期來測試。結果發現，*rne* mRNA 的表現量與 RNase E 的酵素活性，的確會受到不同碳源、生長速率與氧氣所影響。此外，亦發現 *rne* 基因表現受控於葡萄糖效應，當 LB 培養液外加 40mM 葡萄糖時，*rne-lacZ* 表現會下降。結果發現飢餓環境下，*rne* 基因表現降低會受 (p)ppGpp 調控。當大腸桿菌生長於有氧及無氧的環境下，轉錄因子 Integration host factor (IHF) 亦會對 *rne* 基因進行不同的調控方式。

## Abstract

mRNA degradation is an important mechanism of regulation gene expression in prokaryotes. In *Escherichia coli*, RNase E plays as a key role for mRNA degradation and rRNA maturation. This endonuclease is essential for cell growth. The inactivation of RNase E has been shown to prolong the lifetime of bulk mRNA and to impede the processing and decay of a variety of individual transcripts. *E. coli* cells tightly control RNase E synthesis through a feedback mechanism, which is mediated in cis by the 361-nucleotide *rne* mRNA 5'-untranslated region (UTR).

Earlier reports have indicated that the intracellular RNase E concentration and its activity may change in response to modification of environmental conditions. To examine how the environmental factors regulated *rne* expression at transcription level, *rne-lacZ* operon fusions and Northern blotting were analyzed. In addition, *rpsO* mRNA, which is one of RNase E substrates was used to test RNase E activity. The results showed that the amount of *rne* mRNA and the activity of RNase E indeed changed in different carbon sources, growth rate and oxygen. Besides, *rne* expression was glucose repressed. After starvation, the expression of *rne* gene decreased because of (p)ppGpp effect. Finally, this study showed that integration host factor (IHF) regulated *rne* gene under aerobic and anaerobic growth conditions by different ways.

## 誌謝

感謝指導教授曾慶平老師於生活與實驗上的指導，支持與鼓勵，也謝謝林志生老師和黃效民博士在論文上的細心指教以及在口試的時候給予許多寶貴的意見，在此致上最誠摯的感謝。

過去的兩年來家中正好遭逢許多事情，也是我心情最低落的時後，感謝好友們的支持。我要特別感謝我剛進實驗室時就在的老人家們！愛製造魔音的校賢學長與超老實的宗益學長在生活上與實驗上的各種幫助及任我們使喚；可愛的慧珊在我無聊心煩時陪我聊八卦，還當了我近一年的司機；八卦來源鐘達學長、美麗的傅老師與喜歡史奴比的育甄學姊對我各種幫忙；電腦之神鈞毅對電腦白痴的我耐心教學；蟲在我們剛進實驗室時帶我們做實驗；還有國領學長幫我一張張改口試投影片，該減肥的煜沛學長幫我“隨機”挑論文錯誤。

再來謝謝我可愛的同學們，與我出雙入對的好室友婉君、老鄰居靜雪、活潑的惠文、常常陪我逛街的郁婷、酷妹巧璇、人好好的岳賢以及我的“老老”同學愛雁（從高中到現在的孽緣!?!），因為有你們讓我黑暗的研究生生活出現一線曙光。

還有新進成員，感謝我的新鄰居阿姐慧貞，跟我討論實驗還不辭辛勞的幫我安排各種 schedule ^o^，以及由衷謝謝我的搞笑學妹兼我的新司機，名翊維，字美智的任我差遣，還有“人緣廣”的冀冬、智彬、繼元與秉鑫謝謝你們的各種幫助。

最後特別感謝我的貴婦阿媽與家人對我的包容與支持，謝謝所有關心我的人！

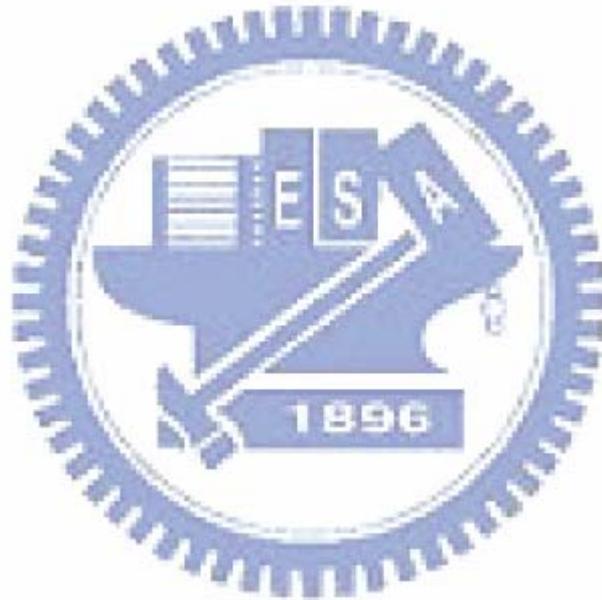
# 目錄

壹、 文獻回顧.....	1
1.1 mRNA 穩定性及對基因表現的影響.....	1
1.2 mRNA 降解機制與 RNA 分解體 (RNA degradosome).....	2
1.3 RNase E 的重要性.....	4
1.4 <i>rne</i> 基因與 RNase E 自我調控 (autoregulation) 機制.....	5
1.5 RNase E 蛋白質.....	7
1.6 環境因子對 RNase E 的影響.....	8
1.7 <i>rpsO</i> mRNA.....	9
貳、 原理.....	10
2.1 批次培養 (batch culture) 時細胞生長模式.....	10
2.1.1 批次培養下細胞之生長曲線.....	10
2.1.2 菌體倍增時間.....	11
2.2 化學恆定連續式培養之原理.....	13
2.2.1 化學恆定連續式培養之動力學模式.....	13
2.3 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 之原理.....	15
2.4 $\beta$ -galactosidase 酵素活性 (specific activity) 之測定.....	15
2.5 mRNA 半衰期計算原理.....	16
參、 材料、設備與方法.....	18
3.1 實驗材料.....	18
3.1.1 菌株.....	18
3.1.2 培養基與培養液.....	19
3.1.3 厭氧培養液的處理.....	20
3.1.4 DNA 電泳分析.....	21
3.1.5 RNA 萃取及電泳分析.....	21
3.1.6 電泳膠體.....	23
3.2 實驗方法.....	23
3.2.1 大腸桿菌生長條件與培養方法.....	23
3.2.2 $\beta$ -galactosidase 酵素活性分析.....	28
3.2.3 大腸桿菌總 RNA 之萃取.....	31
3.2.4 mRNA 穩定性測定方法.....	32
3.2.5 北方墨點分析法 (Northern blotting analysis).....	32

肆、 結果.....	39
4.1 不同生長期對 <i>rne-lacZ</i> 表現之影響 .....	39
4.2 碳源對 <i>rne</i> 基因表現之影響 .....	39
4.2.1 不同碳源對 <i>rne</i> mRNA 表現量影響 .....	39
4.2.2 不同碳源對 <i>rne</i> 基因後轉錄層次(post-transcription)的影響 .....	40
4.2.3 不同碳源對 RNase E 活性影響 .....	40
4.2.4 葡萄糖對 <i>rne-lacZ</i> 的影響 .....	40
4.3 批次培養下氧氣對 <i>rne</i> 基因的影響 .....	42
4.4 生長速率對 <i>rne</i> 基因表現的影響 .....	42
4.5 HimA 蛋白對 <i>rne</i> 表現之影響 .....	43
4.6 饑餓對 <i>rne</i> 表現之影響 .....	44
伍、 討論.....	45
5.1 批次培養下，不同生長時期對 <i>rne-lacZ</i> 表現之影響 .....	45
5.2 碳源對 <i>rne</i> 基因表現的影響 .....	46
5.2.1 不同碳源對 <i>rne</i> 各層面之影響 .....	46
5.2.2 葡萄糖效應、cAMP 與 CRP 對 <i>rne</i> 的調控 .....	46
5.3 氧氣與生長速率對 <i>rne</i> 基因的影響 .....	47
5.4 IHF 對 <i>rne</i> 基因於轉錄層次的影響 .....	48
5.5 飢餓對 <i>rne</i> 基因於轉錄層次的影響 .....	49
陸、 論文圖表.....	51
柒、 參考文獻.....	68
捌、 附圖.....	76

## 表目錄

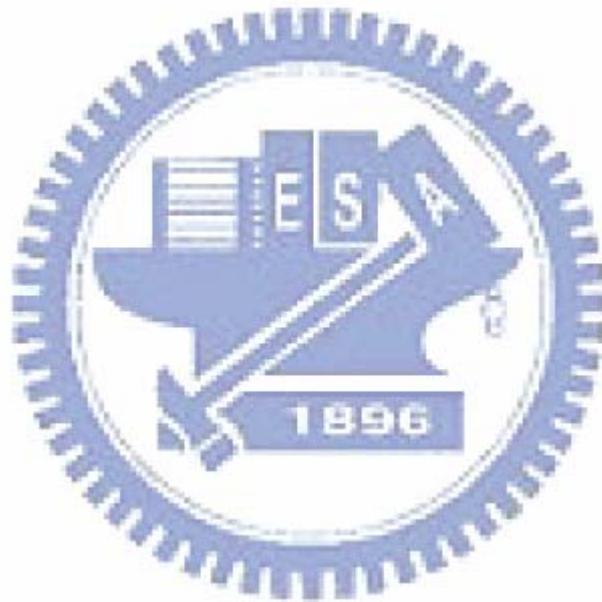
表一、本實驗所使用菌株.....	51
表二、碳源對 RNase E 受質 <i>rpsO</i> mRNA 半衰期之影響.....	52
表三、氧氣與生長速率對 RNase E 受質 <i>rpsO</i> mRNA 半衰期之影響.....	53



## 圖目錄

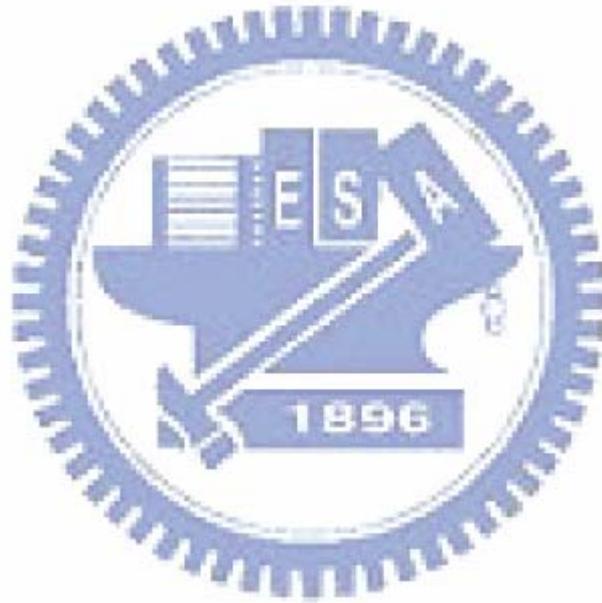
圖一、細菌生長與 <i>rne-lacZ</i> 表現.....	54
圖二、葡萄糖與醋酸為碳源時 <i>rne</i> 基因之表現量 (A) 北方墨點分析及總 RNA 定量分析之電泳圖 (B) 程式定量分析基因相對表現量.....	55
圖三、不同碳源下 <i>rne</i> 基因之穩定度 (A) 40mM 葡萄糖 (B) 40mM 醋酸.....	56
圖四、不同碳源下 RNase E 對 <i>rpsO</i> mRNA 之活性測試 (A) 40mM 葡萄糖下, <i>rpsO</i> mRNA 之穩定性 (B) 40mM 醋酸下, <i>rpsO</i> mRNA 之穩定性.....	57
圖五、有氧環境下葡萄糖對大腸桿菌 <i>rne-lacZ</i> 表現之影響.....	58
圖六、無氧環境下葡萄糖對大腸桿菌 <i>rne-lacZ</i> 表現之影響.....	59
圖七、氧氣對 <i>rne</i> 基因表現之影響 (A) 北方墨點分析及總 RNA 定量分析之電泳圖 (B) 程式定量分析基因相對表現量.....	60
圖八、氧氣與生長速率對 <i>rne</i> 基因表現之影響 (A) 北方墨點分析及總 RNA 定量分析之電泳圖 (B) 程式定量分析基因相對表現量.....	61
圖九、有氧時生長速率對 RNase E 之活性測試 (A) 生長速率 $\mu$ 為 $0.24 \text{ h}^{-1}$ 時, <i>rpsO</i> mRNA 之穩定性及總 RNA 電泳圖 (B) 生長速率 $\mu$ 為 $1.20 \text{ h}^{-1}$ 時, <i>rpsO</i> mRNA 之穩定性及總 RNA 電泳圖.....	62
圖十、無氧時生長速率對 RNase E 之活性測試 (A) 生長速率 $\mu$ 為 $0.24 \text{ h}^{-1}$ 時, <i>rpsO</i> mRNA 之穩定性及總 RNA 電泳圖 (B) 生長速率 $\mu$ 為 $1.20 \text{ h}^{-1}$ 時, <i>rpsO</i> mRNA 之穩定性及總 RNA 電泳圖.....	63
圖十一、IHF 對 <i>rne</i> 基因表現之影響 (A) 北方墨點分析及總 RNA 定量分	

析之電泳圖 (B) 程式定量分析基因相對表現量.....	64
圖十二、飢餓反應對 <i>rne</i> 基因表現的影響 (A) 北方墨點分析及總 RNA 定量分析之電泳圖 (B) 程式定量分析基因相對表現量.....	65
圖十三、野生株與 (p)ppGpp 基因突變株對 <i>rne</i> 基因表現之影響 (A) 正常培養 (B) 饑餓培養.....	66
圖十四、野生株與 (p)ppGpp 基因突變株之 <i>rne</i> 基因相對表現量 (A) 正常培養 (B) 饑餓培養.....	67



## 附圖目錄

附圖一、大腸桿菌內 mRNA 的降解模式.....	76
附圖二、RNase E 蛋白質結構.....	77
附圖三、 <i>rne-lacZ</i> operon fusion 菌株之構築.....	78



## 壹、 文獻回顧

### 1.1 mRNA 穩定性及對基因表現的影響

mRNA 降解 (degradation) 對於基因表現扮演了兩個重要角色：首先，mRNA 分子結構的穩定性決定了其可以當核糖體轉譯模板的時間；再者藉由環境因子調控 mRNA 降解，能使細胞快速適應改變中之菌體所需 (Rauhut and Klug, 1999)。

相較於真核生物 mRNA 半衰期可長達一小時而言，原核生物 mRNA 半衰期只有幾分鐘，是明顯短了許多。正因原核生物可在短時間將 mRNA 降解，所以能對環境改變做出快速的反應及適應 (Regnier and Arraiano, 2000)。且 mRNA 降解過程大都遵循著全有全無定律 (all-or-none)，所以一旦降解作用開始進行後，整個 mRNA 便很快地降解掉，很少會累積其中間產物，以避免製造無功能的蛋白質，進而確保核酸有效分解及再利用 (Py *et al.*, 1994)。

mRNA 的穩定性對蛋白質的表現量及細胞的代謝途徑影響甚大，因此 mRNA 的降解速率對細胞的生理調控極為重要。細胞內調控基因表現之高低通常透過調節個別轉錄產物 (transcripts) 的穩定性，會造成不同 mRNA 之間的降解速率有著極大的差異 (Georgellis *et al.*, 1995)。大腸桿菌體內不同基因之 mRNA 半衰期就有很大的差異，有些 mRNA 的半衰期很短，僅有二十至三十秒，有些則可長達數十分鐘，一般而言，大部分 mRNA 的半衰期約為一到四分鐘 (Rauhut and Klug, 1999)。

## 1.2 mRNA 降解機制與 RNA 分解體 (RNA degradosome)

在大腸桿菌 mRNA 降解機制中，核糖核酸分解酶 (ribonuclease) 為主要分解 mRNA 的酵素，其中又可分為核糖核酸切內酶 (endoribonuclease) 和核糖核酸外切酶 (exoribonuclease) 兩大類。而於 *in vivo* 的情況下，調控 mRNA 降解機制的因子還包括了核糖體 (ribosome)、負責解開 mRNA 二級結構的解旋酶 (helicase) 以及 mRNA 本身特殊的二級結構序列 (Regnier and Arraiano, 2000)，且外在環境改變及細菌生長速率也會影響 mRNA 穩定性 (Wellington *et al.*, 1993)。

絕大部分 mRNA 降解起始於一個主要的內切作用，通常由 RNase E (ribonuclease E) 或少數由 RNase III (ribonuclease III) 來進行。爾後所產生新的 3'端再被外切酶 PNPase (polynucleotide phosphorylase) 或 RNase II (ribonuclease II) 辨識而自 3'端往 5'端降解 (Barlow *et al.*, 1998; Grunberg-Manago, 1999; Regnier and Arraiano, 2000)，最後 mRNA 會被降解成單核苷酸(mononucleotides)及寡核苷酸(oligonucleotides)，或再進一步被 oligoribonuclease 代謝成更小的分子 (附圖一) (Walsh *et al.*, 2001; Kushner, 2002)。

近來研究發現，在大腸桿菌中 RNA 之代謝或降解會由一個酵素複合體的形式來進行，此酵素聚合體稱為 RNA 分解體，RNase E 為 RNA 分解體的主要骨架，其 C 端 (胺基酸 734-1061) 具有其他 RNA 分解體主要組成的酵素 PNPase、RhIB (RNA helicase) 與 enolase 的結合位置 (Miczak *et al.*, 1996; Ow *et al.*, 2002; Py *et al.*, 1996) (附圖二)。另外 RNA 分解體有時還包括少量的 GroEL、DnaK 及 PPK (polyphosphate kinase) (Blum *et al.*, 1997; Coburn *et al.*, 1999; Liou *et al.*, 2001)。目前 *in vivo* 實驗已證實 RNA 分解體

確實存在於大腸桿菌內，以附著於細胞膜來進行分解作用 (Liou *et al.*, 2001)。而其各個組成之相關研究內容如下：

PNPase 由兩個分子量各為 85 KDa 與 48 KDa 的單元體組成，屬於外切酶，為 *pnp* 基因產物 (Deutscher, 1993)。PNPase 自 3'端降解 mRNA，一次移去一個核酸，產生雙磷酸核酸 (Deutscher, 1993; Hajnsdorf *et al.*, 1994)。過去研究發現，在 PNPase 缺失的突變株中，poly (A) tail 會大幅延長，由此證實 PNPase 在分解 mRNA 3'端的 poly (A) tail 上為很重要的核糖核酸酶 (Huang *et al.*, 1998)。

RhlB 是 DEAD box proteins 之中的一員，DEAD 為 Asp-Glu-Ala-Asp 四個氨基酸的縮寫，這類蛋白質在序列中皆有一段 DEAD 之高度保留區，所以稱為 DEAD box proteins。RhlB 作用時需要消耗能量 ATP，其功能為將 RNA 上的雙股結構解開形成單股 RNA 結構，使外切酶可自 3'端往 5'端而將 RNA 降解 (Miczak *et al.*, 1996; Py *et al.*, 1996; Rauhut and Klug, 1999)。當缺乏 ATP 時，RhlB 無法作用，則 RNA 分解體不能完全將 mRNA 降解為核苷酸 (nucleotide) 而產生中間產物，由此可知 RhlB 在降解 RNA 上亦扮演重要的角色 (Py *et al.*, 1996; Rauhut and Klug, 1999)。

PPK 之功能為可逆性合成及分解 polyphosphate (poly (P))，使 AMP 及 ADP 形成 ATP (Ishige and Noguchi, 2000)。在 *in vitro* 實驗中，poly (P) 會強烈抑制 RNA 的降解，但在加入 ADP 後，抑制效果即消失，因此時 PPK 會將 poly (P) 分解，進而與 ADP 結合成 ATP。因此 PPK 在 degradosome 內的功用，可能是分解 poly (P)，再與 RhlB 水解 ATP 後所產生的 ADP 結合，製造 ATP 以提供給 RhlB 重複使用 (Blum *et al.*, 1997)。

Enolase 為參與糖解作用中的一個酵素，可將 2-phosphoglycerate 移走一個水分子形成 phosphoenopyruvate (Woo and Lin-Chao, 1997)，在細胞內僅有 5~10%的 enolase 會與 RNA 分解體結合，但其在 RNA 分解體中之功

用目前仍不清楚 (Rauhut and Klug, 1999)。GroEL 為一種 chaperonin 蛋白，除了幫助蛋白質摺疊 (protein folding) 外，亦可調節 mRNA 穩定性，其會與 RNase E 一起被純化，在功能上也與 RNase E 活性具有交互作用 (Sohlberg *et al.*, 1993)。

### 1.3 RNase E 的重要性

RNase E 最早被提及於過去文獻中，是因為其參與大腸桿菌中作用 9S rRNA 成熟為 5S rRNA 之必須蛋白質 (Gegenheimer *et al.*, 1977; Ghora and Apirion, 1978)。現今已有超過二十種大腸桿菌之核糖核酸分解酶 (Deutscher, 1993) 被鑑定出，其中具核糖核酸內切酶活性的主要有 RNase E、RNase III 及 RNase P (Deutscher, 1985, 1993; Apirion and Miczak, 1993)，而大部分 mRNA 的降解均起始於 RNase E 的內切作用，此步驟亦為速率決定步驟，因此 RNase E 被認為是大腸桿菌中降解 mRNA 最重要的酵素 (Apirion, 1978; Ono and Kuwano, 1979; Mudd *et al.*, 1990; Babitzke and Kushner, 1991; Melefors and von Gabain, 1991; Taraseviciene *et al.*, 1991)。

雖然 RNase E 已被定義為內切酶，但於最近研究發現 *in vitro* RNase E 具有外切活性，可切短位於 3' 端的 poly (A) 與 poly (U) tails 產生單核苷酸產物 (Huang *et al.*, 1998; Nicholson, 1999)。目前已知 RNase E 在大腸桿菌中扮演多重角色，除了先前所提到與 9S rRNA 的成熟有關 (Ghora and Apirion, 1978)，也會作用 16S rRNA 的 5' 端 (Li *et al.*, 1999) 以及成熟 RNase P 的 RNA subunit，亦參與 tRNA 之成熟 (Li and Deutscher, 2002)。且其可切割負調控子 RNA I 及 *copA* 和 *sok* (控制或維持 ColE1 和 R1 質體

copy number 的基因)，因而被認為可控制細菌體內 DNA 複製 (Cohen and McDowall, 1997; Le Derout *et al.*, 2002)。RNase E 對很多 RNA 都有切割的活性，包括降解自身的 mRNA (*rne* transcripts)、OmpA、TrxA 和核糖體蛋白 S20、S15 的 mRNA (*rpsT* 及 *rpsO*) 等 (Rauhut and Klug, 1999; Le Derout *et al.*, 2002)。

由過去文獻得知，當細胞內缺乏 *rne* 基因，會造成大部分的 mRNA 降解不完全，進而造成菌體死亡，且利用質體大量表現 *rne* 基因則使細胞生長減慢、失去含 *rne* 之質體或產生 *rne* 突變株 (Jain and Belasco, 1995; Woo and Lin-Chao, 1997; Grunberg-Manago, 1999)，故細胞內 RNase E 至少須為正常值之 10~20% 才可維持菌體生長 (Jain *et al.*, 2002)，由此可知 RNase E 在維持菌體生存上扮演著重要的角色。

#### 1.4 *rne* 基因與 RNase E 自我調控 (autoregulation) 機制

*rne* 基因具有三個啟動子，其中 p2 及 p3 分別位於 p1 上游 34 及 145 核苷酸處，形成的 5'-untranslated region (5'-UTR) 分別為 395 核苷酸及 506 核苷酸。啟動子轉錄能力 (transcription activity) 由高至低分別為：野生株 (wildtype，即具有三個啟動子)、p1 啟動子、p3 啟動子、p2 啟動子。當細胞內分別只具有 p1、p2 及 p3 其中一種啟動子時，便已足夠維持細胞存活，但會明顯減少細胞內的 RNase E 濃度，並使 RNase E 失去自我調節的能力。另外細胞內 RNase E 濃度下降時，雖然會使 *rne* mRNA 穩定性增加，但其轉譯的效率亦下降 (Ow *et al.*, 2002)。

由於 RNase E 調節許多 mRNA 的降解及幫助 rRNA 與 tRNA 的成熟，

其存在與否皆會影響菌體的存活能力，因此大腸桿菌非常嚴密地調控 RNase E 在菌體內的量 (Jain and Belasco, 1995; Grunberg-Manago, 1999; Diwa *et al.*, 2002)。而 RNase E 藉由改變對自己 mRNA 降解速率來控制自身的合成，此種回饋抑制 (feedback control) 的機制是經由啟動子 p1 所轉錄 *rne* mRNA 的 5'-UTR 所調控 (Jain and Belasco, 1995)。*rne* mRNA 長 3.6-Kb，啟動子 p1 產生的 5'-UTR 具有 361 個核苷酸 (Jain and Belasco, 1995; Ow *et al.*, 2002)。為了使細胞內 RNase E 能維持適當的濃度，RNase E 可自我調控於菌體內的含量，當細胞內 RNase E 活性或濃度變高時，便會加快對 *rne* mRNA 的降解速率 (Jain and Belasco, 1995; (Diwa *et al.*, 2002)，所以將菌體內 *rne* 基因增加 21 倍時，RNase E 蛋白只增加 2.8 倍 (Jain and Belasco, 1995)。若將 *rne* mRNA 的 5'-UTR 刪除，RNase E 便失去自我調節的功能。5'-UTR 可折疊出三個髮夾結構 (stem-loop structure)，其中第二個 stem-loop (hp 2) 是影響 RNase E 自我調節最主要的區域，其調控機制可能是直接或間接提供 RNase E 結合位置，並幫助 RNase E 找到其切點，進而快速地分解 *rne* 之 mRNA (Diwa *et al.*, 2000; Diwa and Belasco, 2002)。值得一提的是雖然 5'-UTR 上有 RNase E 的切點，但將此切點突變並不影響 RNase E 自我調節的功能，推測 *rne* mRNA 上可能有許多 RNase E 的切點所致 (Jain and Belasco, 1995)。

此外目前發現當 RNase E 失去活性時，*rne* 之 mRNA 會被其它內切酶作用，切點位於 1558 及 1576 核苷酸處 (靠近 3'端) 並產生 2-kb 片段 (Woo and Lin-Chao, 1997)。而減少細胞內 RNase E 時，其它 RNA 降解速率的下降並不與之呈正比 (Jain *et al.*, 2002)，引此推測 *rne* mRNA 穩定度除了受 RNase E 自我調節之外，亦會受 RNase E-independent 機制所調控 (Woo and Lin-Chao, 1997; Barlow *et al.*, 1998)。

## 1.5 RNase E 蛋白質

RNase E 是 *rne* 基因 (即 *ams* 或 *hmp* 基因) 轉譯而得, 由 1,061 個胺基酸組成, 分子量為 118 kDa, 但在 SDS-polyacrylamide gel 上卻移動至 180 kDa 位置 (Casaregola *et al.*, 1992, 1994), 這種異常的移動是因為在 RNase E 的 C-端含有一段 proline-rich 的序列所造成 (Cohen and McDowall, 1997)。在 1993 年之前所提到的核糖核酸內切酶 RNase K, 已證實為 RNase E 酵素水解後殘存仍具有活性的酵素, 因此 RNase K 正式改名為 RNase E (Mudd and Higgins, 1993)。RNase E 蛋白之 N 端 (胺基酸 1~498) 為剪切 RNA 酵素活性區, 亦為影響細胞存活主要位置 (McDowall and Cohen, 1996); C 端 (胺基酸 734~1061) 為與 RNA 分解體其他三個主要成員 RhlB、enolase 及 PNPase 蛋白結合處 (Vanzo *et al.*, 1998), 若將此區刪除並不會影響細菌的存活, 但會妨礙 mRNA 降解及 RNase E 自我調控的能力 (Lopez *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000)。胺基酸 580~700 處有一段 arginine-rich 的序列, 為 RNase E 與 RNA 結合的區域 (附圖二) (Cohen and McDowall, 1997; Jiang *et al.*, 2000; Diwa *et al.*, 2002)。

RNase E 切割位置通常是單股 RNA 且為 AU-rich 的序列區 (Babitzke and Kushner, 1991; Cohen and McDowall, 1997; Le Derout *et al.*, 2002), 其切割效率受到 RNA 結構與是否接近其切點所影響, 如核糖體或與 RNA 結合的蛋白質 (如 DEAD box helicases) 均可能會遮閉 RNase E 的切點, 使得 RNase E 切割效率降低 (Iost and Dreyfus, 1995; Le Derout *et al.*, 2002)。RNase E 需自 RNA 的 5'端開始作用 (5'-end-dependence), 若將其受質以人為方式使 mRNA 兩端接合形成圓形 (circular form) 時, RNase E 便無法作

用 (Mackie, 1998; Grunberg-Manago, 1999; Carpousis, 2002)，而當受質 5' 端為單一磷酸根 (monophosphate) 時，RNase E 可較有效率地將其降解 (Grunberg-Manago, 1999; Regnier and Arraiano, 2000; Le Derout *et al.*, 2002)。

## 1.6 環境因子對 RNase E 的影響

為適應不斷改變的外在環境，大腸桿菌具有許多不同的代謝途徑，生成各種蛋白，以供環境改變時，能迅速適應。將大腸桿菌培養在營養豐富的培養液中，在 diauxic lag 生長時，*rne* mRNA、RNase E 蛋白及 RNase E 作用於其受質的能力皆會暫時下降；可是在厭氧環境下，此種 diauxic response 並不會發生 (Barlow *et al.*, 1998)。而 RNase E 是降解 mRNA 的主要酵素，因此許多研究，都是利用 RNase E 受質的穩定性，或 9S rRNA 產生 5S rRNA 的能力來推知不同環境下 RNase E 活性的高低。研究發現，將生長快速的大腸桿菌移至營養貧脊的培養液中，RNase E 之受質 *ompA* mRNA 降解速率上升，9S rRNA 形成 5S rRNA 的速率下降；相反地，若將生長緩慢的細胞移至營養培養液中，*ompA* mRNA 降解速率下降，9S rRNA 形成 5S rRNA 的速率上升 (Georgellis *et al.*, 1992)。而在厭氧環境、相同的生長速率下，*ompA* mRNA 降解速率及 9S rRNA 形成 5S rRNA 的速率皆會下降 (Georgellis *et al.*, 1993)。由過去文獻也得知，若將培養溫度上升至 44°C，則會造成 *rpsO* mRNA 累積；若於培養液中加入 casamino acid，*rpsO* mRNA 則可被降解，且此時細胞內 RNase E 量上升 (Woo and Lin-Chao, 1997; Le Derout *et al.*, 2002)，另外以人工誘導 RNase E 的受質 (substrate)

表現時發現造成 *rne* mRNA 會累積，這是因 RNase E 對 *rne* mRNA 切割活性改變所造成的結果 (Sousa *et al.*, 2001)。由上述可知當環境改變時可能會改變細胞內 RNase E 的活性及濃度 (Le Derout *et al.*, 2002)。而實際上環境因子是如何影響 RNase E 的表現，目前仍不甚清楚，因此我們藉由  $\beta$ -galactosidase 酵素活性的表現、北方墨點以及測定 RNase E 之受質 *rpsO* mRNA 的穩定性來推知各種環境因子對 *rne* 基因在轉錄層面上和酵素活性的影響與調控。

## 1.7 *rpsO* mRNA

*rpsO* mRNA 的蛋白質產物為核糖體蛋白(ribosome protein) S15。大腸桿菌中 *rpsO* mRNA 的降解途徑是目前研究最清楚的降解途徑之一。其降解的起始步驟是由 RNase E 切第一刀，使其缺乏 3'端的髮夾結構，之後就會由外切酶 PNPase 及 RNase III 快速的由 3'端往 5'端進行降解 (Regnier and Hajnsdorf, 1991; Hajnsdorf *et al.*, 1994; Braun *et al.*, 1996)。

最近文獻指出，環境因子會控制 RNase E 作用 *rpsO* mRNA 的效率。研究發現，當培養基缺乏 casamino acid 時，大腸桿菌細胞中 *rpsO* mRNA 濃度會上升。而造成其濃度上升的原因為 RNase E 作用 *rpsO* mRNA 之 M2 位置的效率減低，使得 *rpsO* mRNA 趨於穩定化 (Le Derout *et al.*, 2002)。

由此可知，*rpsO* mRNA 可以很靈敏的感應到環境因子調控 RNase E 作用，而反應在它的穩定度上，因此於本實驗中我們選擇 *rpsO* mRNA 作為偵測環境因子調控 RNase E 作用效率的指標。

## 貳、 原理

### 2.1 批次培養 (batch culture) 時細胞生長模式

批次培養法是指在細胞的培養過程中不再添加任何新鮮的培養液，僅於開始時提供定量的培養液供細胞生長所需。由於細胞的生理狀況、培養液組成及細胞代謝產物等因素均會影響細胞的生長，因此進行分批式培養時，細胞的生長具有一定模式，且可依細胞生長濃度與所需時間作出一條生長曲線。

#### 2.1.1 批次培養下細胞之生長曲線

在批次培養系統下，細菌的生長過程可分為以下六個時期 (Lee, 1992)：

1. 遲滯期 (lag phase)：

細菌開始適應新的環境，菌體的重量會增加，但細胞不會分裂繁殖。

2. 加速生長期 (accelerated growth phase)：

細菌體開始進行分裂，細胞數增加，且細菌的生長速率逐漸增加至最高生長速率。

3. 對數生長期 (exponential growth phase)：

細菌以最高生長速率在固定時間內分裂一次，菌數亦隨著時間呈對數比例增加。

4. 減速生長期 (decelerated growth phase) :

菌體生長及分裂速率均開始降低。

5. 靜止期 (stationary phase) :

細菌的增殖速率與死亡速率相等，菌數維持一定。

6. 死亡期 (death phase) :

環境中的養分耗盡，過量代謝產物累積對菌體產生毒害作用。細菌的死亡速率快於增殖速率，菌數開始降低。

欲研究細菌生理及生長速率，一般皆取對數生長期之菌體加以測定分析。



### 2.1.2 菌體倍增時間

菌體自開始培養到最後總菌群為  $N$  時，可依下列公式表示：

$$N = N_0 \times 2^n \text{ ----- (2-1)}$$

其中  $N$ ：最後菌數

$N_0$ ：起始時間菌數

$n$ ：菌體培養時的世代數

(2-1) 式兩邊取自然對數

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

↓

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

↓

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

$\ln 2 = 0.693$  代入 (2-2) 式

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

↓

$$n = 1.443 \times \ln (N / N_0) \text{ ----- (2-3)}$$

菌群加倍所需時間為倍增時間，以下列公式表示：

$$g = t / n \text{ ----- (2-4)}$$

其中  $g$ ：菌體倍增時間

$t$ ：發生  $n$  次世代所需時間

$N_0$  和  $N$  為已知，則可由 (2-3) 式得到  $n$  值，將其代入 (2-4) 得到  $g$  值即菌體的倍增時間。

## 2.2 化學恆定連續式培養之原理

連續式培養可依對流量控制之方式不同而分兩種形式，一種是利用可調式幫浦直接控制流進基質的量，同時從反應槽中移除相同體積的菌液，以維持反應槽中的培養體積固定。流進的基質成分中，除了一種為限量基質 (limited nutrient) 外，其餘的養分均夠細胞生長所需。而此限制生長的營養因子 (growth-limiting nutrient) 在連續式培養的過程中濃度受新鮮培養液之稀釋速率 (dilution rate) 控制，並控制了穩定狀態 (steady state) 下細胞族群的大小。此種方式之培養稱為化學恆定 (chemostat) 的連續式培養 (chemostat 是指在穩定狀態時培養基內的化學組成維持一定)。另一種方式稱為濁度恆定 (turbidostat) 連續式培養，其培養液之流量是以光電管來控制，這種光電管可以很敏銳的察覺反應槽中細胞濃度變化，當培養液中菌體的吸光度超過設定值時，可依據光電發出的訊號來添加基質以維持細胞濃度的一定。本論文中採用化學恆定的連續式培養法來控制細胞生長速率。

### 2.2.1 化學恆定連續式培養之動力學模式

當連續式培養達穩定狀態時，反應槽中細胞質量的平衡狀態可以下列反應式表示：

$$\text{cell in} - \text{cell out} + \text{cell growth} - \text{cell death} = \text{cell accumulation}$$

$$FX_0/V - FX/V + \mu X - \alpha X = dX/dt \text{ ----- (2-5)}$$

$X_0$  : 進料時的細胞質量

$X$  : 細胞質量

$\mu$  : 比生長速率 ( $\text{hr}^{-1}$ )

$\alpha$  : 死亡速率 ( $\text{hr}^{-1}$ )

$F$  : 培養液流量 (L/hr)

$V$  : 培養體積 (L)

$t$  : 時間 (hr)

由於進料的培養液為滅菌培養液，所以為無菌狀態 (即  $X_0 = 0$ )，且在連續式培養中，比生長速率遠大於死亡速率 ( $\mu \gg \alpha$ )，所以上式可以簡化如下：

$$(\mu - F/V)X = dX/dt \text{ ----- (2-6)}$$

當反應槽達穩定狀態時，單位時間內菌體質量的變化為零，即

$$dX/dt = 0$$

所以由 (2-6) 可得

$$\mu = F/V \text{ ----- (2-7)}$$

又將  $F/V$  定義為稀釋率 ( $D$ )，因此可得  $\mu = D$ ，也就是在化學恆定連續式培養過程中固定反應體積 ( $V$ ) 下只需控制培養液流動速率 ( $F$ ) 即

可控制細胞生長速率。所以在低的稀釋速率時，相對槽體內所含的限制營養成分濃度降低，細胞生長速率減慢；當稀釋速率高時，相對槽體內所含的限制營養成分濃度提高，細胞生長速率則會增快。

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

聚合酶連鎖反應是在活體外，以基因組 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)，經由耐熱性高的 *Taq* DNA polymerase 產生聚合反應，進行 primer 下游的序列合成 (extension)，至此稱為一個週期。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。

### 2.4 $\beta$ -galactosidase 酵素活性 (specific activity) 之測定

不同環境因子對 *rne* 基因於轉錄層面 (transcriptional level) 的影響，可由 *rne-lacZ* 中 reporter fusion 所表現的  $\beta$ -galactosidase 酵素活性得知。

大腸桿菌可利用乳糖 (lactose) 作為唯一碳源，在雙糖的代謝中需  $\beta$ -galactosidase 酵素將乳糖水解為半乳糖 (galactose) 和葡萄糖 (glucose)。

生長於乳糖培養基中的每個大腸桿菌含有數千個  $\beta$ -galactosidase 分子，若生長於其它碳源中，如葡萄糖或甘油 (glycerol)，則每個細胞只含有少於十個  $\beta$ -galactosidase 分子，所以其專一性很高。又因為培養基中乳糖的存在會誘導  $\beta$ -galactosidase 大量增加，其是藉由引導新的酵素分子合成而非活化 proenzyme，因此  $\beta$ -galactosidase 是一個可誘導的酵素。在乳糖操縱組及結構基因中，*lacZ* 的基因產物即為  $\beta$ -galactosidase，是乳糖操縱組裡最主要的一種酵素，且極為穩定易被偵測，故 *lacZ* 是常被用來接在欲研究啟動子 (promoter) 後面的結構基因 (structure gene)。若啟動子表現能力強，則可測得較高的  $\beta$ -galactosidase 酵素活性。

$\beta$ -galactosidase 的酵素活性 (specific enzyme activity) 可利用色素原基質 o-nitrophenyl- $\beta$ -d-galactopyraniside (ONPG) 來檢測。在  $\beta$ -galactosidase 存在下，此無色的複合物會分解成半乳糖和硝基酚 (o-nitrophenol)，因硝基酚是黃色的，所以可在波長 420 nm 下偵測其吸光度。在過量的 ONPG 下 o-nitrophenol 的產量與酵素的含量呈正比，故可對  $\beta$ -galactosidase 作定量的測定。當加入濃碳酸鈉溶液使 pH 值變成 11 時， $\beta$ -galactosidase 失去活性，則反應終止。

## 2.5 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：

$$N = N_0 / 2^n \text{ -----(2-8)}$$

$N_0$  : 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

(2-8) 式兩邊取自然對數

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

↓

$$n = \ln (N_0 / N) / \ln 2 \text{-----}(2-9)$$

$\ln 2 = 0.693$  代入 (2-9) 式

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

↓

$$n = 1.443 \times \ln (N_0 / N) \text{-----}(2-10)$$

經由測量  $N_0$  與  $N$  的量, 得到  $\ln (N_0 / N)$  代入 2-10 式, 可求得  $n$  。

半衰期 ( $T_{1/2}$ ) 即  $T_{1/2} = t / n$  , 此時  $N = 1/2 N_0$  。

## 參、 材料、設備與方法

### 3.1 實驗材料

#### 3.1.1 菌株

##### 1. 菌株

*Escherichia coli* K12

*Escherichia coli* K12  $\Delta relA$

*Escherichia coli* K12  $\Delta spoT$

*Escherichia coli* K12  $\Delta relA \Delta spoT$

*Escherichia coli* MC4100 : (*F* *araD139*  $\Delta$ (*argF-lac*)U169 *rpsL150 relA1 flb-5301 deoC1 ptsF25 rbsR*)

HHS2 : 利用  $\lambda$  phage 將 *rne-lacZ* operon fusion 插入 MC4100 染色體中 (附圖三)。

HHS5 : 利用 P1 lysate 將  $\Delta cya$  送至 HHS2，篩選菌株之抗生素為 Kanamycin。

HHS9 : 利用 P1 lysate 將  $\Delta crp$  送至 HHS2，篩選菌株之抗生素為 Tetracyclin。

HHS10 : 利用 P1 lysate 將  $\Delta himA$  送至 HHS2，篩選菌株之抗生素為 Tetracyclin。

### 3.1.2 培養基與培養液

#### 1. 基礎培養液 (minimal medium)

每公升 solution I 須加入 1 毫升 solution II

Solution I :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.44 g ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10.49 g ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g , casamino acids 0.5 g

Solution II (以 0.2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  為溶劑) :

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50 g ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5 g ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.125 g ,  
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.735 g

#### 2. LB (Luria-Bertani) 培養液

1% Tryptone , 0.5% Yeast extract , 1% NaCl pH 7.0

#### 3. LB 培養基

1% Tryptone , 0.5% Yeast extract , 1% NaCl pH 7.0 , 1.5% Agar

#### 4. LB-Kanamycin 培養基

1% Tryptone , 0.5% Yeast extract , 1% NaCl pH 7.0 , 1.5% Agar , 30  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin

#### 5. LB-Chloroamphenicol 培養基

1% Tryptone , 0.5% Yeast extract , 1% NaCl pH 7.0 , 1.5% Agar , 30  $\mu\text{g/ml}$  Chloroamphenicol

#### 6. LB-Kanamycin, Chloroamphenicol 培養基

1% Tryptone , 0.5% Yeast extract , 1% NaCl pH 7.0 , 1.5% Agar , 30  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin , 30  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol

#### 7. LB-X gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) 培養基

1% Tryptone , 0.5% Yeast extract , 1% NaCl pH 7.0 , 1.5% Agar , X-gal  
40 mg/L

8. LB-X gal-Tetracyclin 培養基

1% Tryptone , 0.5% Yeast extract , 1% NaCl pH 7.0 , 1.5% Agar , X-gal 40  
mg/L , 30 µg/ml Tetracyclin

9. LB-X gal-Kanamycin 培養基

1% Tryptone , 0.5% Yeast extract , 1% NaCl pH 7.0 , 1.5% Agar , X-gal 40  
mg/L , 30 µg/ml Kanamycin

10. LB-X gal-Kanamycin-Tetracyclin 培養基

1% Tryptone , 0.5% Yeast extract , 1% NaCl pH 7.0 , 1.5% Agar , X-gal 40  
mg/L , 30 µg/ml Kanamycin , 30 µg/ml Tetracyclin

以上培養基 (液) 若須添加碳源、抗生素或指示劑時皆待 121 °C 高濕  
高壓滅菌後冷卻至 55 °C 後再加入。

### 3.1.3 厭氧培養液的處理

本實驗所需用到的厭氧培養液其組成與好氧培養液相同，唯配製時處理方式不同。為確保細菌於厭氧環境下生長，所有厭氧環境下實驗所需用到的培養液，在配製好後裝於錐形瓶中必須事先加熱煮沸，再以氮氣趕走培養液中的氧氣。煮沸 10 分鐘後將錐形瓶迅速放於冰中冷卻，此時即開始通氮氣。分裝前的試管亦必需先通氮氣，每根試管分裝 10 ml 的培養液後，立刻以鋁蓋封口，並以 121 °C 高溫高壓滅菌。

### 3.1.4 DNA 電泳分析

#### 藥品

Promega : agarose

J. T. baker : Tris-HCl , EDTA

Viogene : DNA gel extraction kit

#### 緩衝液

1. TAE electrophoresis buffer

40 mM Tris-HCl, 40mM acetate, 1 mM EDTA

2. DNA gel loading dye (PROtech Lot#AL24)

### 3.1.5 RNA 萃取及電泳分析

#### 藥品

BDH : chloroform

MRC : TRI reagent

Merck : formamide, formaldehyde, ammonium acetate, ethanol,

3-(N-Morpholino propanesulfonic acid) (MOPS),

sodium acetate, sodium citrate, Denhardt's solution

Roche : Anti-DIG-AP, positively charged nylon membrane, CSPD<sup>®</sup>

Sigma : diethyl pyrocarbonate (DEPC), rifampin, Dextran sulfate

J. T. Baker : HCl, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O,  
2-propanol, Tris-HCl, sodium dodecyl sulfate (SDS), dimethyl sulfoxide  
(DMSO)

緩衝液

1. PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche 1 636 090)

2. DIG Wash and Block Buffer set (Roche 1 585 762)

3. 10X formaldehyde gel running buffer

0.2 M MOPS, 80 mM sodium acetate, 10 mM EDTA (pH 7.0)

4. RNA gel loading dye (Ambion cat#8552)

5. 20X SSC, pH 7.0

3 M NaCl, 300 mM sodium citrate

6. 20X SSPE, pH 7.0

3 M NaCl, 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.02 mM EDTA (pH 7.4)

7. Hybridization buffer

5X Denhardt's solution, 33% formamide, 6.6X SSPE, 1% SDS,

50% Dextran sulfate

8. Tris-glycine electrophoresis buffer

25 mM Tris-base, 250 mM glycine(pH 8.3), 0.1% SDS

9. Rifampicin solution

1 g rifampicin 於 10 ml DMSO, 過濾滅菌

10. DEPC treated water

1 ml DEPC 於 1 L ddH<sub>2</sub>O, 震盪 2 分鐘, 靜置 10 小時後高溫高

壓滅菌

### 3.1.6 電泳膠體

#### 1. DNA gel

1.0% agarose 溶於 1 X TAE buffer 中

#### 2. RNA gel

1.2 % agarose (Peomega), 1 X formaldehyde gel running buffer, 2.2 M formaldehyde

## 3.2 實驗方法

### 3.2.1 大腸桿菌生長條件與培養方法

#### 1. 繼代培養



菌株之第一代培養皆以 LB 為培養液，挑單一菌落於培養液，在 37 °C 恆溫震盪箱，以震盪速率 200 rpm 培養 12~16 小時。利用四區劃法將菌株畫於含 1.5% 洋菜膠的平板培養基上 (LB plate) (不同菌株可依其所需培養在含不同抗生素的平板培養基上)，在 37 °C 恆溫箱培養。同時本實驗所使用的菌株多為 *lacZ* fusion，所以平板培養基需含有 X-gal，而 X-gal 需避光以避免其分解。因 *lacZ* 之關係，所生成的菌落應為藍色。待菌落生成後將其置於 4 °C 保存。4 °C 下平板培養基上之菌株大概可保存一個月，因此每個月均需重覆以上繼代培養之工作，保持菌株新鮮度以防止其失去活性。另外，將菌株做長期保存的方法為在 37 °C 培養菌液至平穩期後，取菌液加 15% Glycerol (已滅菌)，再分裝至菌種保存管中後編號，存放於 -80 °C

冰櫃。

## 2. 批次培養 (batch culture)

為使菌體適應生長環境，所以需先作二次繼代培養，然後再於第三代時培養在所需條件。

第一代培養：挑取單一菌落接種至 5 ml 的 LB 培養液 (依其需要可在培養液中加入所需的抗生素)，培養 6~8 小時使菌體活化。

第二代培養：取適量菌液接種到有氧及厭氧的基礎培養液，並以終濃度 40 mM 葡萄糖作為碳源，於 37 °C 隔夜培養，此培養目的在使細菌適應新的生長環境。

第三代培養：取適量菌液至有氧及厭氧，並以 40 mM 葡萄糖為碳源的基礎培養液中進行培養。所加入的菌量多寡完全視菌液的濃度而定，唯加入之菌量在 OD<sub>600</sub> 上升範圍控制於 0.02~0.025 之間，並於 37 °C 200 rpm 培養。在有氧環境下，5 ml 培養液之透氣塑膠蓋的玻璃管中培養至 mid-exponential phase 大約是 OD<sub>600</sub> 吸光值為 0.40~0.45 時收取；而厭氧環境之培養則是用 10 ml 的培養液，以鋁蓋封口之玻璃管，菌液利用針筒注入，並注意避免打入空氣，培養至 OD<sub>600</sub> 在 0.20~0.25 之間收菌。收菌後置於冰上 20 分鐘後以 6000 rpm，離心 10 分鐘並除去上清液，離心下來的菌體以 PM2 buffer 懸浮，準備作  $\beta$ -galactosidase 活性測定之分析，或置於 -80 °C 酒精冰桶 10 秒鐘，之後進行總 RNA 萃取。

以下除最後一次繼代培養時依其所需加入不同碳源或不同培養環境外，其餘培養及收菌條件皆相同。

### 3. 飢餓處理 (starvation)

將菌體培養在 LB 培養液中，當其生長達對數生長期前期，以 6000 rpm，離心 10 分鐘，倒去上清液，利用不含 casamino acid 之基礎培養液清洗菌體後再以 6000 rpm，10 分鐘離心，倒去上清液之後加入不含 casamino acid 之基礎培養液繼續培養 30 分鐘。

### 4. 連續式培養 (continuous culture)

本實驗用化學恆定連續式培養 (chemostat continuous culture) 控制細胞的生長速率。在連續式培養過程中細胞生長速率可用比生長速率 (specific growth rate,  $\mu$ ) 表示。細胞數目增倍所需的時間為 Td (doubling time) 與比生長速率 ( $\mu$ ) 的關係為  $Td = \ln 2/\mu$ 。在連續式培養中當進料的液體為無菌之培養液且醱酵槽內細胞生長已達穩定狀態 (steady state) 時， $\mu$  可用稀釋度 (D) 來表示，即  $\mu = D$ ，

其中  $D = F/V$

F：培養液之流動速率 (medium flow rate)

V：培養液在醱酵槽內體積 (working volume)

而稀釋率由可調式幫浦決定，因此可控制細菌的比生長速率 (詳見 2.2)。

#### (1) 培養基的製備

化學恆定連續式培養使用之培養基與批式培養的基本培養基成分相同，唯碳源的添加為 2.25 mM/L，在此以 carbon limitation 來限制菌體生長。

由於連續式培養須消耗大量培養液，所以以 20 L 的儲水桶 (Nalgene cat No. 2250-0050) 為單位，每桶裝 17 L 的 minimal medium，配製數桶後於高溫高壓下滅菌 100 分鐘，於滅菌後待培養液溫度下降到室溫時再添加碳源。

## (2) 連續式培養系統之裝置

連續式培養系統主要可分為四個部分：槽體、流速測定管、培養液供應桶、廢液收集桶。

### a. 槽體之組裝：

槽體為連續式發酵之主體。將槽身洗淨後加入 1 L 的去離子水，把上蓋裝配鎖緊，將冷凝管出口及進氣口接上 0.22  $\mu\text{m}$  濾菌膜，各出口及接頭均用鐵夾封閉並在管口處包上錫箔紙。以打氣幫浦測試槽體是否有漏氣情況，直到調整到完全封閉後才可加以滅菌。滅菌時須打開冷凝管出口以防止滅菌時壓力的變化。

### b. 流速測定管：

將滴定管頂部以棉花塞住，包上錫箔紙。滴定管之下方接上三插管，再接上矽膠管而分成兩個接頭，其中一個與槽體相接，另一個則與進料管相接，並在管口處包上錫箔紙，二接頭均用鐵夾封閉。

### c. 培養液供應桶：

內裝有 17 L 的培養液，桶上的蓋子有兩個接頭，一個是負責進料的接頭，另一個接頭則與過濾器相接，目的在平衡桶子內外的壓力並過濾空氣，

所有出口及接頭均用鐵夾封閉並在管口處包上錫箔紙，以防止滅菌後的污染。

d. 廢液收集桶：

以 20 L 的空桶收集廢液用。桶上的蓋子也有兩個接頭，一個與醱酵槽出料管相接以收集廢液，另一個接頭與裝有棉花之注射筒的筒身相接，目的也是在平衡桶子內外的壓力並過濾空氣，出口及接頭均用鐵夾封閉並在管口處包上錫箔紙，以防止滅菌後的污染。

槽體、流速測定管、廢液收集桶三者可同時置於 121 °C，1 大氣壓下滅菌 50 分鐘或各別滅菌，而培養液供應桶則需 121 °C，1 大氣壓下滅菌 100 分鐘。滅菌後便可以將此四部分所有接頭相連接，所有操作過程皆需快速完成並過火滅菌以避免污染。

(3) 接菌前的準備及接菌

由於安裝於蠕動幫浦之矽膠管長度可能會有些許的不同，所以每次接菌前須先利用流速測定管測定本次蠕動幫浦的流速，以作為往後調控培養液之流動速率的依據。且在接菌之前需先啟動連續式培養系統，將槽體內的一次水置換成培養液，本實驗的通氣量是利用氣體流量計來控制，而氣體流量計在使用之前需用排水集氣法校正。另外欲進行連續式培養的菌株需先培養在 5 ml 的 LB 培養液，於 37 °C 恆溫振盪培養至對數期後以作為接菌用。接菌時利用 10 ml 注射針筒在無菌操作台取出活化之菌液並注入醱酵槽內，接菌完成後，先以批式培養使菌體生長達對數期後，再調整蠕動幫浦的流速以控制生長速率進行連續式培養。

#### (4) 連續式培養的生長條件

本實驗是利用 BIOFLO III (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO.) 醱酵槽控制器進行生長條件的控制。實驗用槽體體積為 1.5 L，培養液在醱酵槽內體積 (working volume) 為 1 L，培養溫度為 37 °C，攪拌速率為 500 rpm，通氣量控制在 2 L/min。調整蠕動幫浦控制培養液之流動速率以進行不同生速率之連續式培養。每次變換培養液流動速率時，至少須相隔 6 個反應槽的滯留時間 (reactor residence time,  $\tau$ )，以確定菌體的生長到達新的穩定期 (steady state)，當菌體生長達穩定狀態後才可以收集樣本。

### 3.2.2 $\beta$ -galactosidase 酵素活性分析

#### 1. 藥品製備

##### (1) 1 M NaPO<sub>4</sub> (pH 7.0) buffer

分別配製 1 M 的 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O (pH 4.2) 及 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (pH 9.0) 再將二者混合調至 pH 7.0 (此緩衝液不需以高溫高壓滅菌)。

##### (2) PM2 緩衝液之製備

取無菌水 500 ml (去離子水以高溫高壓滅菌過)，加入 100 ml 的 1 M NaPO<sub>4</sub> (pH 7.0) 緩衝液，1 ml 1 M 的 MgSO<sub>4</sub> 和 1 ml 0.2 M MnSO<sub>4</sub>，再以無菌水加到總體積為 1 L 即可。

### (3) ONPG (o-nitrophenyl-β-d-galactopyraniside) 之配製

取 ONPG 0.4 g 溶於 100 ml 0.25 M 的 NaPO<sub>4</sub>(pH 7.0) 緩衝液中。因其溶解性差，故可以於 60 °C 水浴槽內加熱（不可高於此溫度否則 ONPG 會被破壞）。一旦溶解後，立刻取出並以每 10 ml 分裝之。分裝後的 ONPG 放入 -20 °C 冰中保存。配置及使用時皆須避光。

### (4) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的製備

利用無菌水配製 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>。

## 2. 細胞內蛋白質濃度之測定

離心收集來的菌體加入 PM2 緩衝液，將細胞震盪混合均勻。PM2 緩衝液的量可依其活性的高低而自行調整，一般約為收集菌液的 0.1 倍體積即可。本實驗依其活性不同加入 0.6~1.5 ml 不等的 PM2 緩衝液使細胞懸浮。測定細胞內蛋白質含量步驟如下：取 100 μl 的細胞懸浮液加入 900 μl PM2 懸浮液（即 10 倍稀釋）。利用光電比色計 (UV/VIS 911A 機型) 測定其 OD<sub>600</sub> 吸光值，細胞內蛋白質總濃度可由公式計算得知：

$$\text{蛋白質濃度 (mg/ml)} = \text{OD}_{600} \times \text{稀釋倍數} \times 0.107$$

## 3. β-galactosidase 酵素反應

本實驗中酵素反應的測定取 100 μl 細胞懸浮液至 900 μl PM2 緩衝液做十倍稀釋後，再取 100 μl 稀釋液加入 900 μl PM2 緩衝液（稀釋倍數可依酵素活性大小調整，但最後反應體積為 1 ml）。緩衝液中可先加入 3.5 μl/ml

$\beta$ -mercaptoethanol, 50  $\mu$ l chloroform 及 25  $\mu$ l 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate), 震盪混和後置於 28 °C 水浴槽 10 分鐘。此過程是為了破壞細胞膜而容易偵測到  $\beta$ -galactosidase 的酵素活性。酵素活性反應從起始至終止皆於 28 °C 水浴槽中進行, 加入 0.25 ml ONPG 後即開始反應。注意加入 ONPG 後需震盪混合, 並記錄反應時間。當反應至呈現淡黃色時, 利用 2 ml 1 M 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  終止反應。反應時間和酵素含量及其活性有關, 最理想的反應時間在 15 分鐘至 2 小時之間 ( $\text{OD}_{420}$  在 0.3~0.8 之間), 超過此範圍必須考慮調整細胞懸浮液的稀釋倍數。終止反應後取 1.5 ml 酵素呈色反應液以 11000 rpm 離心 17 分鐘。儘量吸取上層之液體測定  $\text{OD}_{420}$  及  $\text{OD}_{550}$  吸光值。經由公式計算即可得  $\beta$ -galactosidase 的酵素活性。

#### 4. 酵性活性之計算

$\beta$ -galactosidase 酵素比活性定義是: 1 mg 的蛋白質在 28 °C, 1 分鐘內水解 1 nmole ONPG 為 1 unit (即 Miller unit)。其比活性計算公式為:  
specific activity

$$= \frac{(\text{OD}_{420} - \text{OD}_{550} \times 1.75) \times \text{total assay volume}}{\text{time} \times \text{volume cells} \times (\text{mg/ml}) \text{ protein} \times \text{extinction coefficient}}$$

total assay volume : 1 ml

time : 反應時間 (in min)

volume cells : 酵素反應時所加細胞懸浮液的體積 (0.1 ml)

protein (mg/ml)：細胞懸浮液蛋白質濃度

extinction coefficient：0.0045

除了 ONPG 被分解產生的 o-nitrophenol 可在 OD<sub>420</sub> 下吸光外，菌體本身亦會吸光。大腸桿菌於 OD<sub>420</sub> 及 OD<sub>550</sub> 的關係式為： $OD_{420} = 1.75 \times OD_{550}$ 。而 o-nitrophenol 在 OD<sub>550</sub> 下不吸光，故可利用此關係式來校正細胞在 OD<sub>420</sub> 吸光值所造成的效應。另外 extinction coefficient 是在 28 °C，1 分鐘，1 unit  $\beta$ -galactosidase 酵素水解 ONPG 所測得 OD<sub>420</sub> 吸光值為 0.0045，亦即每 1 nm 的 ONPG 水解相對的 OD<sub>420</sub> 吸光值為 0.0045。

### 3.2.3 大腸桿菌總 RNA 之萃取

收集 10 ml 菌液( $OD_{600} = 0.4 \sim 0.45$ )於離心管內，迅速置於 -80 °C 的酒精桶內，進行冰浴 10 秒鐘後迅速插於冰上，立刻以 6,000 rpm 在 4 °C 下，離心 10 分鐘。之後去除上清液，以 0.75 ml TRI reagent 將菌塊震盪溶解，將溶液轉置於微量離心管內，於 65 °C 水浴槽內水浴 10 分鐘 (每隔 2.5 分鐘取出，以手搖方式溫和混合均勻，重複 4 次)，然後在室溫下加入 150  $\mu$ l chloroform，以溫和手搖方式充份混合均勻，於室溫下靜置 15 分鐘後，在 4 °C 下以 12,000 rpm，離心 12 分鐘後，去除下層液，將上清液吸取到另一乾淨離心管內，加入 400  $\mu$ l 2-propanol 及 40  $\mu$ l 3 M sodium acetate (pH 5.2)，置於 -20 °C 冰箱內 30 分鐘，此目的在於沉澱 RNA。然後於 4 °C，12,000 rpm，離心 12 分鐘，丟棄上清液後留下 RNA 沉澱物，加入 75% 乙醇 1.0 ml 清洗一次，再於 4 °C，12,000 rpm 離心 10 分鐘，完全吸乾上清液後，將沉澱之 RNA，進行真空乾燥。待 RNA

完全乾燥後 (約需 10 分鐘), 加入適量的 DEPC 處理過的二此逆滲透水將其溶解, 測定  $OD_{260}$  及  $OD_{280}$  吸光值, 確定 RNA 的濃度及純度。剩餘之 RNA 樣本則須立刻置於  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱內保存。

### 3.2.4 mRNA 穩定性測定方法

收集 100 ml ( $OD_{600} = 0.4 \sim 0.45$ ) 菌液, 將菌液置於  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  返復式循環水浴槽內持續震盪培養, 先取 10 ml 菌液做為第 0 點的樣品, 之後立即將濃度為 0.1g/ml 的 rifampicin 溶液取 250  $\mu\text{l}$  加入剩餘菌液中混合均勻後, 依據不同時間點分別收取樣品。每次取完後立刻置於  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  酒精桶內冰浴 10 秒鐘, 迅速插於冰上。其他 RNA 萃取步驟請參照 3.2.3 大腸桿菌總 RNA 之萃取。

### 3.2.5 北方墨點分析法 (Northern blotting analysis)

#### 1. RNA 電泳分析

##### (1) 1.2% 洋菜膠 (agarose gel) 配製

取洋菜膠 0.55 g 加入 29.4 ml DEPC 處理過後的水, 加熱溶解並混合均勻, 待稍冷卻後即加入 5 倍濃度的 formaldehyde gel running buffer 9 ml 及甲醛 (formaldehyde) 7.4 ml, 再次混和均勻並製成膠體。

## (2) 樣品前處理

取出下列試劑分別加入微量離心管內並充份混合均勻：8  $\mu\text{g}$  RNA，2  $\mu\text{l}$  之 5 倍濃度的 formaldehyde gel running buffer，3.5  $\mu\text{l}$  的 formaldehyde (37%)，10  $\mu\text{l}$  的 formamid。

## (3) 樣品變性反應處理(denature) 及電泳

將樣本置於 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 分鐘後，取出插至冰上，加入 5  $\mu\text{l}$  染劑 (6X RNA dye)，充份混合均勻後於室溫下，60 伏特電壓進行 RNA 電泳 2.5 小時。

## (4) 膠體染色

電泳完成後，將膠體浸泡於 150 ml EtBr 染液 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EtBr 溶於 0.1 M ammonium acetate) 染色 8 分鐘，接著以 DEPC 處理過的水進行退染 3 小時後，利用 UV 燈箱即可觀察到 rRNA，之後進行照相。

## 2. RNA 轉漬

此轉漬原理係利用厚濾紙產生的毛細現象，引導 20X SSC 溶液向上流動，進而帶動膠體中的 RNA 脫離膠體，吸附於 nylon membrane。

剪裁與膠體面積相同之 8  $\times$  7 cm 的 nylon membrane，轉漬前先將與膠體面積相同的 nylon membrane，以 20 X SSC 溶液浸溼。取一方形容器，其內放置一個 2~4 cm 高的方形塑膠盒，此塑膠盒表面需平整，且比膠體長些和寬些。倒入適量的 20X SSC 溶液於方形容器內，於塑膠盒表面鋪上一張 7  $\times$  22 cm 長方形的 whatman 3MM 濾紙，濾紙二端需浸到 20 X SSC 溶液。然後濾紙上層再鋪一張 8  $\times$  7

cm 的 whatman 3MM 濾紙，此濾紙長寬與膠體相同，並用 20 X SSC 溶液使其潤濕。將膠體反轉（原來電泳時朝下的一面朝上），置於已經溼潤的濾紙上，接著把濕潤的 nylon membrane 置於膠體上，再放一張 8 × 7 cm 的 Whatman 3MM 濾紙於 nylon membrane 上方，在濾紙、膠體、 nylon membrane 與濾紙相互之間必須把氣泡完全趕出，避免 RNA 轉漬不完全。最後放一疊 6~7 cm 高的厚濾紙（長寬約為 8 × 7 cm）在 Whatman 3MM 濾紙上，厚濾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 12~16 小時後，取出 nylon membrane，置於核酸快速固定儀中，利用 UV 光（254 nm）照射 2 分鐘使 RNA 固定於 nylon membrane 上以進行雜交反應。

### 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 Cat. No. 1 636 090）的 DNA，以此段 DNA 來做為核酸探針，其做法敘述如下：將 63  $\mu$ l 滅菌二次逆滲透水，10  $\mu$ l 10X PCR reaction buffer，10  $\mu$ l DIG-labeling mixture，8  $\mu$ l (25 ng/ $\mu$ l) DNA template，4  $\mu$ l (20  $\mu$ M) primer 1 與 primer 2，1  $\mu$ l 5 units *Taq* DNA polymerase，依序放入 200  $\mu$ l 的微量離心管內（ependorff tube），最終體積為 100  $\mu$ l。混合均勻後放入聚合酶溫度循環機進行反應。

本實驗 *rne* 核酸探針的 *rne-1* 及 *rne-2* 的序列如下：

*rne-1* : 5'-CCTCTGGCAAAGTCTGGAT - 3' (19 mer)

*rne-2* : 5'-CTGCGGCACCTTTACCTT- 3' (18 mer)

PCR 設定溫度如下

將上述微量離心管內混合液先於 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：

1. 94 °C，35 秒鐘：使兩股 DNA 模板分開。
2. 58 °C，35 秒鐘： primer 與 DNA 模板結合。
3. 72 °C，35 秒鐘： DNA polymerase 合成新股 DNA。

重覆上列溫度循環 20 次，之後進行 72 °C，反應 10 分鐘，使最後一次未合成完全的 PCR 產物合成完全，最終保存溫度設定為 4 °C。

*rne* 核酸探針的預期長度為 612 bp，但由於在 dUTP 上接有 DIG 的關係，在電泳膠上的位置會略高於 612 bp，約在 600 bp ~ 700 bp 之間。

本實驗 *rpsO* 核酸探針的 *rpsO*-1 及 *rpsO*-2 的序列如下：

*rpsO*-1： 5'-CGGCGTCCTTTCATTC- 3'(16 mer)

*rpsO*-2： 5'-GCTGCCGTCAGCTTG- 3'(16 mer)

PCR 設定溫度如下

將上述微量離心管內混合液先於 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：

1. 94 °C，30 秒鐘：使兩股 DNA 模板分開。
2. 53.5 °C，20 秒鐘： primer 與 DNA 模板結合。

3. 72 °C，30 秒鐘：DNA polymerase 合成新股 DNA。

重覆上列溫度循環 20 次，之後進行 72 °C，反應 10 分鐘，使最後一次未合成完全的 PCR 產物合成完全，最終保存溫度設定為 4 °C。

*rpsO* 核酸探針的預期長度為 366 bp，但由於在 dUTP 上接有 DIG 的關係，在電泳膠上的位置會略高於 366 bp，約在 400 bp ~ 500 bp 之間。

本實驗所採用的是 viogen 公司生產之 Gel Extraction Kit 來純化 PCR 產物。其做法敘述如下：將 PCR 產物自電泳膠上切下，放入微量離心管內，並加入 0.5 ml 的 GEX buffer 在 65 °C 下加熱溶解，吸取已溶解之 PCR 產物混和液至 spin column 內，用 13,000 rpm 之速度離心 30 秒，再將 0.5 ml wash I buffer 加至 spin column 內沖洗，在 13,000 rpm 下，離心 30 秒，再以 0.7 ml wash II buffer 沖洗之，然後也是在 13,000 rpm 下，離心 30 秒，最後將 spin column 放到另一個 1.5 ml 微量離心管內，加入 30 µl 滅菌二次逆滲透水，於室溫下靜置 1 分鐘，最終以 13,000 rpm，離心 2 分鐘的方式沖洗出所需的核酸探針 (PCR 產物)，定量後儲存於 -20 °C 冰箱備用。

#### 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 15 ml 的 hybridization buffer，於 48 °C 核酸雜交烘箱旋轉反應 30 分鐘，轉速設定為 30 rpm，此過程稱為 Pre-hybridization。再加入 150

ng 的核酸探針 (核酸探針需先以 100 °C，煮沸 10 分鐘後，置於冰上 10 分鐘)，繼續進行 48 °C 的核酸雜交烘箱旋轉反應，反應時間為 14 ~ 18 小時。反應結束後將 nylon membrane 自玻璃雜交管取出，平放於微免疫偵測反應盒內，加入含 2X SSC，0.1% SDS 的洗滌液 50 ml，在室溫下以平面震盪的方式清洗 5 分鐘，震盪速度為 25 rpm，共洗二次；再用含 0.1X SSC，0.1% SDS 的洗滌液 50 ml 清洗 15 分鐘，共洗三次。

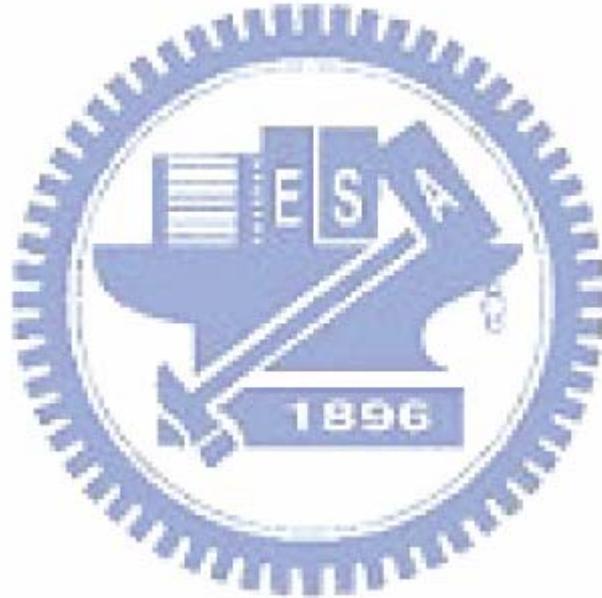
#### 5. 免疫偵測 (immunological detection)

本實驗所採用的是 Roche 公司所生產的 DIG Wash and Block Buffer Set (Cat. No. 1 585 762)，內含有 10 倍濃度之 buffer 1、2、3 和 4。將 nylon membrane 用洗滌液清洗完畢後，用 30 ml 的 1X buffer 1 清洗 5 分鐘，倒掉 1X buffer 1 後，加入 30 ml 的 1X buffer 2 與 1X buffer 3 混和液，於室溫下，以平面震盪的方式搖動 40 分鐘，震盪速率為 25 rpm。目的在於使 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 membran 結合，此舉可以減少大量非專一性之鍵結 (non-specific binding)，這個步驟稱為 blocking。反應結束後將 3 µl 的 anti-DIG-AP (Roche Cat. No. 1 093 274) 加入 30ml 的 1X buffer 2 與 1X buffer 3 混和液，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 30 ml 的 1X buffer 1 清洗兩次，每次 15 分鐘。倒掉 1X buffer 1 後，加入 15 ml 的 1X buffer 4 清洗 5 分鐘，之後把 nylon membrane 平放於投影片夾層內，將 10 µl 的 CSPD<sup>®</sup> 溶於 1 ml 的 1X buffer 4 內，均勻灑佈於 membrane 上，蓋上投影片，立刻置於底

片夾內，於室溫下進行避光反應 15 分鐘。反應後於暗房內以 Kodak XAR-5 X 光底片進行壓片，感光適當時間後沖洗底片。

## 6. 訊號分析

利用掃描器 (Microteck) 將底片掃成 .tif 圖檔，存進電腦中，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。



## 肆、 結果

### 4.1 不同生長期對 *rne-lacZ* 表現之影響

首先我們將含有 *rne-lacZ* operon fusion 的大腸桿菌培養於含有 40 mM 葡萄糖的基礎培養液下進行批次培養，於不同時間點收取菌液測 OD<sub>600</sub> 吸光值，並離心菌液測其  $\beta$ -galactosidase 活性，分別繪製成生長曲線與  $\beta$ -galactosidase 活性雙曲線圖 (圖一)。由圖一我們發現，*rne-lacZ* 表現在不同生長時間點皆出現趨近於 3500 miller unit 左右，代表 *rne* 基因於不同生長時期，分別為遲滯期 (lag phase)、對數生長期 (exponential growth phase) 與靜止期 (stationary phase) 表現都相差不大。

### 4.2 碳源對 *rne* 基因表現之影響

#### 4.2.1 不同碳源對 *rne* mRNA 表現量影響

將大腸桿菌分別培養於含有 40 mM 葡萄糖或醋酸 (acetate) 的基礎培養液中，當菌體生長至對數生長期前期，分別抽取總 RNA 後，以 *rne* 探針進行北方墨點分析。由圖二 A 得知，將大腸桿菌培養於以葡萄糖為碳源的培養基中，其 *rne* 基因之表現量明顯比培養於醋酸時高，經由程式定量分析後發現在葡萄糖之表現量比醋酸高了約六倍 (圖二 B)。

#### 4.2.2 不同碳源對 *rne* 基因後轉錄層次(post-transcription)的影響

接著我們進行 *rne* mRNA 的穩定性測試，當菌生長達對數生長期前期時，加入 rifampicin，於不同時間點抽取總 RNA 之後，以 *rne* 探針進行北方墨點分析。結果發現當大腸桿菌培養於葡萄糖時，*rne* mRNA 在加入 rifampicin 後的第 3 分鐘仍可看見訊號，而培養於醋酸時，*rne* mRNA 在加入 rifampicin 後的第 1 分鐘後訊號即消失（圖三）。

#### 4.2.3 不同碳源對 RNase E 活性影響

在 RNase E 的活性測試上，我們以 RNase E 的受質 *rpsO* mRNA 之穩定性作為測試 (Le Derout *et al.*, 2002)。同樣當菌生長達對數生長期前期，加入 rifampicin，於不同時間點抽取總 RNA 後，改以 *rpsO* 探針進行北方墨點分析，接著利用程式定量分析與計算半衰期。發現以葡萄糖為碳源時，*rpsO* mRNA 的半衰期為 2.3 分鐘，而以醋酸為碳源時，*rpsO* mRNA 的半衰期則為 1.8 分鐘（表二、圖四）。

#### 4.2.4 葡萄糖對 *rne-lacZ* 的影響

為瞭解有氧情況下葡萄糖對 *rne* 基因表現之影響，將具有 *rne-lacZ* operon fusion 的大腸桿菌分別培養於 LB 培養液及含有 40 mM 葡萄糖的 LB

培養液中，當菌生長到對數生長期前期，將菌液離心，測其  $\beta$ -galactosidase 活性，結果發現培養於 LB 培養液之 *rne-lacZ* 的表現量約為 4500 miller unit 左右，但在加入葡萄糖後 *rne-lacZ* 的表現量則下降 40% 左右，代表 *rne* 基因有受葡萄糖抑制的現象(catabolic repression) (圖五)，此現象指微生物處於兩種不同的碳源環境下會先分解較易利用的受質當作能源，直到此受質耗盡後再利用另一受質的情形。若是大腸桿菌優先利用葡萄糖作為能量來源，此時乳糖酵素等相關基因被抑制不表現，這種 catabolic repression 又被稱為葡萄糖效應(glucose effect)。

研究發現 catabolic repression 反應與細胞內 cAMP 濃度以及 CRP 蛋白質有密切相關，cAMP 是經由 adenylate cyclase (*cya*) 催化 ATP 所形成，大腸桿菌中可被 cAMP 調控的基因多達數十個，其調控的方式是 cAMP 與其調節蛋白質 CRP (cAMP receptor protein) 形成複合物，再藉由此複合物來調控不同基因的表現 (Busby and Ebright, 1999)。因此我們使用  $\Delta cya$  突變株及  $\Delta crp$  突變株來探討 *rne* 基因出現之葡萄糖效應是否是受到 cAMP 和 CRP 所調控。將具有 *rne-lacZ* operon fusion 的  $\Delta cya$  突變株及  $\Delta crp$  突變株大腸桿菌分別培養於 LB 培養液及含有 40 mM 葡萄糖的 LB 培養液中。結果顯示， $\Delta cya$  突變株葡萄糖效應消失，*rne* 基因在 LB 培養液中不論有無加入葡萄糖其表現量相去不遠，而  $\Delta crp$  突變株亦具有相同的情形 (圖五)。此外也發現  $\Delta cya$  突變株與  $\Delta crp$  突變株 *rne-lacZ* 表現量皆會減少 20% 左右。

接著進行無氧情況下葡萄糖對 *rne* 基因表現的影響，將具有 *rne-lacZ* operon fusion 的大腸桿菌分別培養於 LB 培養液厭氧管與含有 40 mM 葡萄糖的 LB 培養液厭氧管中，分別偵測其  $\beta$ -galactosidase 活性，結果發現 *rne* 基因在無氧狀態下也具有葡萄糖效應，培養含有 40 mM 葡萄糖於厭氧 LB 培養液之 *rne-lacZ* 的表現量下降了約 30% (圖六)。我們也使用  $\Delta cya$  突變株

及  $\Delta crp$  突變株，來探討在無氧生長環境下，*rne* 基因出現之葡萄糖效應是否也是受控於 cAMP 和 CRP。將具有 *rne-lacZ* operon fusion 的大腸桿菌分別培養於 LB 培養液，及含有 40 mM 葡萄糖的 LB 培養液厭氧管中。結果在  $\Delta cya$  突變株和  $\Delta crp$  突變株中發現葡萄糖效應消失，結果與有氧狀態下的現象相近。但在無氧中  $\Delta crp$  突變株並不會造成 *rne-lacZ* 表現下降 (圖六)。

#### 4.3 批次培養下氧氣對 *rne* 基因的影響

大腸桿菌為一兼性厭氧細菌 (facultative anaerobe)，可因環境中氧氣含量不同而行使不同的代謝途徑。在有氧環境下，大腸桿菌會以氧作為電子傳遞鏈中最終的電子接受者。在無氧環境下，細菌會進行醱酵作用 (fermentation) 或利用環境中不同受質 (substrate) 當作電子接受者以進行厭氧呼吸作用。

大腸桿菌分別培養於含有 40 mM 葡萄糖的基礎培養液與厭氧管下進行批次培養，當細菌生長達對數生長期之前期，抽取總 RNA 後，以 *rne* 探針進行北方墨點分析。結果發現，在無氧狀態下 *rne* mRNA 的表現量比在有氧狀態下提高許多，(圖七、(A))。經掃描程式定量分析後，得知無氧情形下 *rne* mRNA 的表現量為有氧的 2.7 倍(圖七、(B))。

#### 4.4 生長速率對 *rne* 基因表現的影響

將大腸桿菌以 2.25 mM 葡萄糖進行連續式培養，在有氧狀態下，於菌體生長速率達  $\mu$  為  $0.24 \text{ h}^{-1}$  及  $1.20 \text{ h}^{-1}$  時收取菌液，之後分別抽取不同生長速率的菌液之總 RNA 以 *rne* 探針進行北分墨點分析。結果發現，有氧狀態下 *rne* RNA 表現量在高生長速率時略高於低生長速率，高了 50% 左右。在無氧狀態下，亦於菌體生長速率  $\mu$  為  $0.24 \text{ h}^{-1}$  及  $1.2 \text{ h}^{-1}$  時收取菌液，結果顯示 *rne* RNA 表現量在高生長速率時為低生長速率的 2.5 倍 (圖八、(A)(B))。

接著進行 RNase E 之活性測試，我們以 RNase E 的受質 *rpsO* mRNA 的穩定性作為測試，發現有氧情況下，生長速率  $\mu$  為  $0.24 \text{ h}^{-1}$  時，*rpsO* mRNA 的半衰期為 2.3 分鐘，而生長速率  $\mu$  為  $1.2 \text{ h}^{-1}$  時，*rpsO* mRNA 的半衰期為 3.8 分鐘 (表三、圖九)。

無氧情況下時，生長速率  $\mu$  為  $0.24 \text{ h}^{-1}$  時，*rpsO* mRNA 的半衰期為 1.2 分鐘，而生長速率  $\mu$  為  $1.2 \text{ h}^{-1}$  時，*rpsO* mRNA 的半衰期為 1.8 分鐘 (表三、圖十)。

#### 4.5 HimA 蛋白對 *rne* 表現之影響

已知 integration host factor (IHF) 會於有氧無氧環境下調控某些基因 (Darie and Gunsalus, 1994)，因此對為瞭解 IHF，是否會在有氧或無氧下進行調控 *rne* 基因的表現，我們以大腸桿菌 IHF  $\alpha$  次單元體 Him A 蛋白的基因突變株來進行實驗。IHF 除了可調控 DNA 複製外，還會影響許多基因表現 (Mengeritsky *et al.*, 1993)。將含大腸桿菌中 *himA* 基因突變株，以 40 mM 葡萄糖為碳源，分別在有氧及無氧的環境下，以 *rne* 探針進行北方墨點分析。由圖十四發現，*himA* 基因突變後，*rne* 基因表現仍以在無氧環境

下較高。而在有氧環境下，*himA* 突變株 *rne* mRNA 的表現量比野生株低，下降約 30%。在無氧環境時，*himA* 基因突變之大腸桿菌 *rne* 基因之表現量則反而上升 60% 左右（圖十四），因此顯示 HimA 蛋白（即 IHF）於有氧狀態實為一轉錄活化子（activator）可幫助 *rne* 基因的表現，但在無氧環境下則為抑制子（repressor）。

#### 4.6 饑餓對 *rne* 表現之影響

當細菌體內胺基酸、碳源及能量不足時，皆會使 (p)ppGpp 濃度上升，而使菌體內大分子物質合成量下降並進而影響基因表現，此反應稱為迫切反應（stringent responses）(Pao and Dyess, 1981)。首先我們將菌液培養達對數生長期，接著進行饑餓反應。結果發現，於進行饑餓反應後 *rne* 基因表現量比起正常生長顯著降低下降了 90% 左右（圖十二、(A)(B)）。*relA* 與 *spoT* 可產生 (p)ppGpp，為大腸桿菌於貧脊環境中調控生理表現的重要機制。過去文獻中對於 (p)ppGpp 是否影響 ribonuclease 的活性或表現量並無太多的研究，為了瞭解 *rne* 於饑餓反應後明顯下降的情形是否為受 (p)ppGpp 的影響，我們分別以 *relA* 及 *spoT* 突變株以及其雙突變株，進行正常生長和饑餓反應後 *rne* 表現量之偵測。結果指出，於正常培養下，*relA* 突變後 *rne* 表現量與野生株比較，並沒有明顯改變，而 *spoT* 突變株及雙突變株亦為相同情形（圖十三，圖十四）。而在進行饑餓反應後，*relA* 突變株之 *rne* 表現量比野生株進行饑餓反應相差不大，但值得注意的是 *spoT* 突變株與雙突變株的 *rne* 表現量則會出現回復情形。

## 伍、討論

為適應瞬息萬變的外在環境以求生存，大腸桿菌可快速地調控基因表現，目前已知大部分基因表現是藉由改變轉錄層次 (transcription level) 來達成 (Barlow *et al.*, 1998)。由過去文獻發現，當環境改變時，大腸桿菌體內 RNase E 濃度及活性可能會隨之改變，為了瞭解不同環境因子如何影響 RNase E，藉由偵測  $\beta$ -galactosidase 的活性、北方墨點分析以及 RNase E 受質 *rpsO* mRNA 半衰期，來推測不同生長環境下 *rne* 基因於轉錄層次的表現情形與酵素活性。

### 5.1 批次培養下，不同生長時期對 *rne-lacZ* 表現之影響

在批次培養下，*rne-lacZ* 的表現量於不同生長時期皆具有高度且穩定的表現，由此我們可得知，*rne* 基因表現對菌體生長的每個時期而言均為重要且必須，因為每個時期都需要不同的蛋白質表現。無須再被轉譯 mRNA 則需要被降解，以免製造出這個生長時期無需的蛋白質，浪費細胞能量。RNase E 是目前認為降解 mRNA 最主要關鍵的酵素之一 (Apirion, 1978; Ono and Kuwano, 1979; Mudd *et al.*, 1990; Babitzke and Kushner, 1991; Melefors and von Gabain, 1991; Taraseviciene *et al.*, 1991)，因此由此推測每個生長時期皆要有 *rne* 基因的高度表現，更證明若無 *rne* 的基因表現，對大腸桿菌而言為致死性突變 (Apirion, 1978; Ono and Kuwano, 1979)。

## 5.2 碳源對 *rne* 基因表現的影響

### 5.2.1 不同碳源對 *rne* 各層面之影響

大腸桿菌可利用不同碳源來生長，當碳源改變時大腸桿菌可經由細胞內不同途徑加以代謝利用。以一分子的葡萄糖為例，在氧充足的環境下，葡萄糖經糖解作用 (glycolysis) 後進入 TCA cycle，然後利用氧作為電子傳遞鏈中最終的電子接受者，可產生 36 或 38 個 ATP，若以其他物質當碳源時，大腸桿菌以其他途徑代謝，產生的能量便會減少。

本實驗發現葡萄糖為碳源時，*rne* mRNA 表現量較醋酸為碳源時高(圖二)，且經由 *rne* mRNA 穩定性測定後發現，*rne* mRNA 的穩定度以葡萄糖為碳源時較穩定(圖三)。由此推測，先前所看到的結果，為轉錄及後轉錄綜合的調控的現象。而 RNase E 之活性測試發現，RNase E 以醋酸為碳源下活性較佳 (*rpsO* mRNA 半衰期較短)，由過去文獻我們知道 RNase E 會藉由降解自身的 mRNA 來自我調控，而當 RNase E 活性較低時，*rne* 之 mRNA 穩定性會上升 (Jain and Belasco, 1995)，因此推測醋酸為碳源時，*rne* 之 mRNA 表現較少是因為 RNase E 活性較高並進行自我調控之緣故。

### 5.2.2 葡萄糖效應、cAMP 與 CRP 對 *rne* 的調控

*rne-lacZ* 表現於有氧無氧下皆具有 catabolic repression 的現象(圖

四)，已知 catabolic repression 反應與細胞內 cAMP 的濃度有密切相關，因此我們由 *cya* 及 *crp* 突變株觀察 *rne-lacZ* 表現情形。由結果發現當 *cya* 及 *crp* 突變後，無論在有氧或厭氧環境下，葡萄糖效應就會消失，因此 cAMP 與 CRP 的確為 *rne* 基因葡萄糖效應的影響因子。而不論在有氧無氧，當 *cya* 突變時 *rne-lacZ* 的表現就會下降，代表 cAMP 對 *rne* 基因而言為活化子。但 CRP 在有氧無氧下對 *rne* 基因的影響則較不同；有氧情況下因 *crp* 突變造成對 *rne-lacZ* 下降，推測其在有氧時為 *rne* 的活化子，但在無氧時 *crp* 突變，並不會造成 *rne-lacZ* 上升或下降。

經過比對後發現 *rne* 的 promoter 及 5'-UTR 處並沒有目前已知 CRP 於 DNA 上結合的保留序列 (consensus sequences) (約有 22 個鹼基對，其序列為 AAATGTGATCT [N<sub>6</sub>] AGATCACATTT (N<sub>6</sub> 為任何六個鹼基對)，這段序列具反轉重覆 (palindrome) 的特性，並位於轉錄起始點之後 (Berg and von Hippel, 1988))，因此推測 cAMP 與 CRP 可能是間接影響 *rne-lacZ* 的表現，但詳細機制仍有待進一步研究。

### 5.3 氧氣與生長速率對 *rne* 基因的影響

由以葡萄糖為碳源之批次培養與連續式培養中發現，大腸桿菌在無氧狀態下之 *rne* mRNA 表現量皆比有氧情況時高。而大腸桿菌為兼性厭氧細菌 (facultative anaerobe)，所以可能在無氧的代謝途徑上對 *rne* 基因具有較大的調控。

在以 2.25 mM 葡萄糖連續式培養方面，不論有氧無氧，*rne* mRNA 的表現量隨生長速率上升而上升，但 RNase E 的活性卻是隨生長速率上升而

下降 (*rpsO* mRNA 半衰期延長)，似乎也是受到 RNase E 自我調控的影響 (Jain and Belasco, 1995)。這與碳源的結果不謀而合，因以葡萄糖為碳源時，其生長速率會比以醋酸為碳源來的快。先前研究也發現，將生長緩慢的細胞移至營養培養液中，RNase E 之受質 *ompA* mRNA 降解速率會下降，且把大腸桿菌由高生長速率轉移到低生長速率時，RNase E 會被 down-regulated (Georgellis *et al.*, 1992; Georgellis *et al.*, 1993)。推測當大腸桿菌快速生長時，需要大量蛋白質表現，以供分裂與生長之所需，因此降解 mRNA 的主要酵素 RNase E 活性減低，以維持轉譯蛋白質時所需之大量 mRNA。

#### 5.4 IHF 對 *rne* 基因於轉錄層次的影響

Integration host factor (IHF) 為一種 DNA 結合蛋白，會參與細菌體內許多生理機制，包括基因重組 ( $\lambda$  site-specific recombination)、基因的 transposition 及 inversion、噬菌體包裹 DNA (DNA packaging)、質體與噬菌體的 DNA 複製與調控許多基因表現 (Mengeritsky *et al.*, 1993)。研究發現 IHF 除了將 DNA 彎曲 (bending) 以活化或抑制基因表現之外，它還可扮演轉錄因子 (transcription factor) 的角色 (Steffen *et al.*, 2002)。*himA* 基因是 IHF 的  $\alpha$  次單元體的基因，位於基因圖譜 38.6 分鐘處 (Goldenberg *et al.*, 1994)。由圖十一發現，當 *himA* 突變後於有氧及無氧環境下 *rne-lacZ* 的表現量皆下降。已知 HimA 在 DNA 上所結合的序列為：WATCAA [N<sub>4</sub>] TTR (W 為 A 或 T；R 為 A 或 G；N<sub>4</sub> 為任四個鹼基對) (Dhavan *et al.*, 2002; Resnik *et al.*, 1996)，經比對發現在 *rne* promoter 處可能具 HimA 的結合位(為第 223 至 233 核苷酸處)，因此推測 *himA* 於有氧的時候為 *rne* 基因的轉錄活化因

子，故 *himA* 突變後會影響轉錄的作用，使 *rne* 基因無法有效進行轉錄的動作，進而影響 *rne* 基因的表現，但於無氧狀態下，其可能對 *rne* 進行另一種方式之調控。在過去文獻中結果顯示，當 *himA* 基因突變時，生成 glutamyl-tRNA dehydrogenase 之 *hemA* 基因表現量也是於有氧時低於野生株，但於無氧時卻高於野生株 (Darie and Gunsalus, 1994)，由此推測 IHF 可能藉由相同的調控模式於有氧無氧狀況調控 *rne* 與 *hemA* 基因。

## 5.5 飢餓對 *rne* 基因於轉錄層次的影響

過去研究發現，當大腸桿菌於豐富培養液在 diauxic lag 生長時（反映出菌體耗盡一種未確認的培養液組成，而轉移到一個新的代謝途徑的情形），會出現 *rne* mRNA 表現量下降、RNase E 蛋白減少以及其作用於受質之能力下降的情形 (Barlow *et al.*, 1998)，而這與本實驗中發現當大腸桿菌在飢餓環境下，其 *rne* 表現量會顯著下降的結果相符(圖十二)，因為當菌體耗盡某種培養液組成的情形，類似於短暫的飢餓環境。在必須養分缺乏的飢餓環境時，菌體必須具有立即調整蛋白質生合成的能力 (Barlow *et al.*, 1998)。推測在養分缺乏的壓力之下，菌體為了維持生存所需蛋白質，必須降低 RNase E 的表現，使轉譯所需的 mRNA 穩定。而先前也已經觀察到於養分缺乏的壓力下，大量 mRNA 的降解都會出現減緩的現象 (Georgellis *et al.*, 1993)。而於飢餓環境下大量 mRNA 降解減緩的情形則可被降低的轉錄速率所抵銷 (Georgellis *et al.*, 1993)，因此 *rne* mRNA 減少的原因可能是於飢餓環境下菌體的轉錄速率減緩所導致。

生長環境惡劣時，大腸桿菌生長速率會減慢且菌體內 RNA、核糖體、蛋白質等巨分子量降低，以避免產生浪費，此種迫切反應是由菌體內

(p)ppGpp 含量所調控 (Gallant, 1979)。一般環境下細菌體內(p)ppGpp 量非常低，若細胞內缺乏胺基酸時，RelA 會將 ATP 上  $\beta$  及  $\gamma$  上的 phosphates 移轉至 GTP 上，形成 pppGpp 或 ppGpp (Gallant, 1979)；而細胞內碳源及能量缺乏時，則由 SpoT 製造 (p)ppGpp。當細菌產生迫切反應時，菌體內 (p)ppGpp 的濃度上升，其會抑制 rRNA 合成、降低轉錄頻率、減少核糖體合成並影響轉譯速率 (Pao and Dyess, 1981)。由本實驗結果發現，正常培養下 *relA* 突變株、*spoT* 突變株及雙突變株，*rne* 表現量與野生株比較，並沒有改變 (圖十三 (A)，圖十四、(A))。在進行饑餓反應後，*relA* 突變株之 *rne* 表現量與野生株相比差距不大，而 *spoT* 突變株及雙突變株的 *rne* 表現量與野生株相較則會出現回復情形。顯現出於飢餓環境下 *rne* 之表現確實受到 (p)ppGpp 之調控，且由 *spoT* 調控較顯著 (圖十三 (B)，圖十四、(B))，即 *rne* 對碳源與能量缺乏時較敏感，但詳細的機制仍需進一步研究。

綜合上述研究結果可知，*rne* 的基因表現確實會受到環境因子調控，在其轉錄以及後轉錄的層次。且 RNase E 的酵素活性也會因環境因子改變而改變，進行自我調控。

## 陸、論文圖表

表一、本實驗所使用菌株

菌株名稱	來源	基因型或表現型
MC4100		<i>F<sup>-</sup> araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flb-5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>
HHS2	MC4100	<i>rne-lacZ</i>
HHS5	HHS2	<i>Δcya Kan<sup>r</sup></i>
HHS9	HHS2	<i>Δcrp Tet<sup>r</sup></i>
HHS10	HHS2	<i>ΔhimA Tet<sup>r</sup></i>
K12		
K12 <i>ΔrelA</i>	K12	<i>ΔrelA Kan<sup>r</sup></i>
K12 <i>ΔspoT</i>	K12	<i>ΔspoT Cm<sup>r</sup></i>
K12 <i>ΔrelA spoT</i>	K12	<i>ΔrelA spoT Kan<sup>r</sup> Cm<sup>r</sup></i>

表二、碳源對 RNase E 受質 *rpsO* mRNA 半衰期之影響

碳源 (40mM)	<i>rpsO</i> mRNA 半衰期 (分鐘)
葡萄糖	2.3
醋酸	1.8

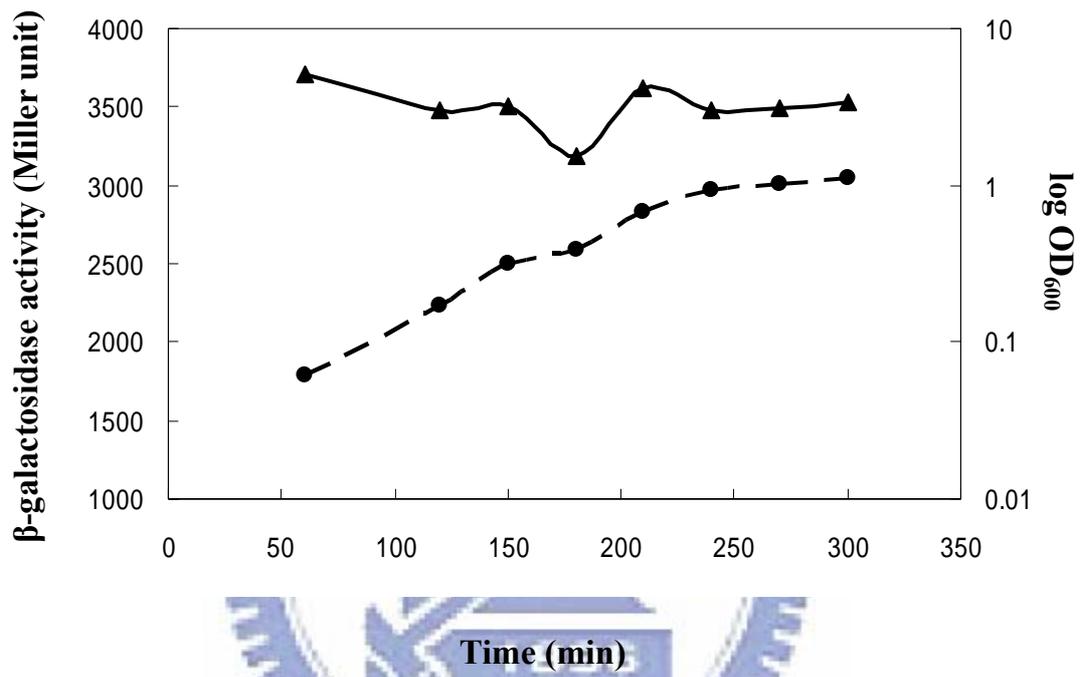


※將菌體分別培養於含 40mM 葡萄糖或醋酸的基礎培養液中進行批次培養，當菌體生長達對數生長期前期，加入 rifampicin 後，於不同時間點抽取其總 RNA，之後以 *rpsO* 探針，進行北方墨點分析再利用程式將底片的訊號進行定量分析偵測每一個雜交訊號的強度，並將所測得的數值與不同的採樣時間點做一關係圖，利用線性回歸分析在不同時間點所得的雜交訊號強度，計算出 mRNA 的半衰期。

表三、氧氣與生長速率對 RNase E 受質 *rpsO* mRNA 半衰期之影響

<i>rpsO</i> mRNA 半衰期 (分鐘)		
生長速率 $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	+O <sub>2</sub>	-O <sub>2</sub>
0.24	2.3	1.2
1.20	3.7	1.8

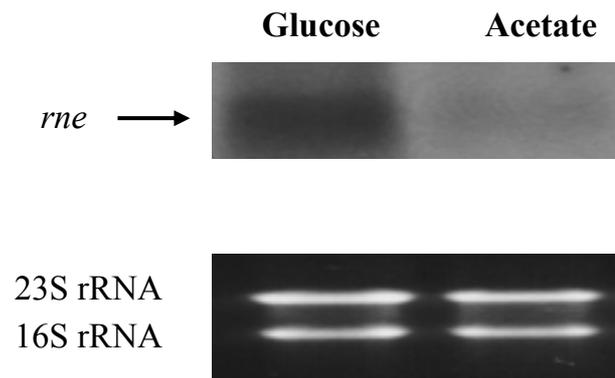
※以含 2.25mM 葡萄糖的基礎培養液分別於有氧及無氧下進行連續式培養，當菌體生長速率  $\mu$  達  $0.24 \text{ h}^{-1}$  與  $1.20 \text{ h}^{-1}$  時取出菌液，加入 rifampicin 後，於不同時間點抽取其總 RNA，之後以 *rpsO* 探針，進行北方墨點分析再利用程式將底片的訊號進行定量分析偵測每一個雜交訊號的強度，並將所測得的數值與不同的採樣時間點做一關係圖，利用線性回歸分析在不同時間點所得的雜交訊號強度，計算出 mRNA 的半衰期。



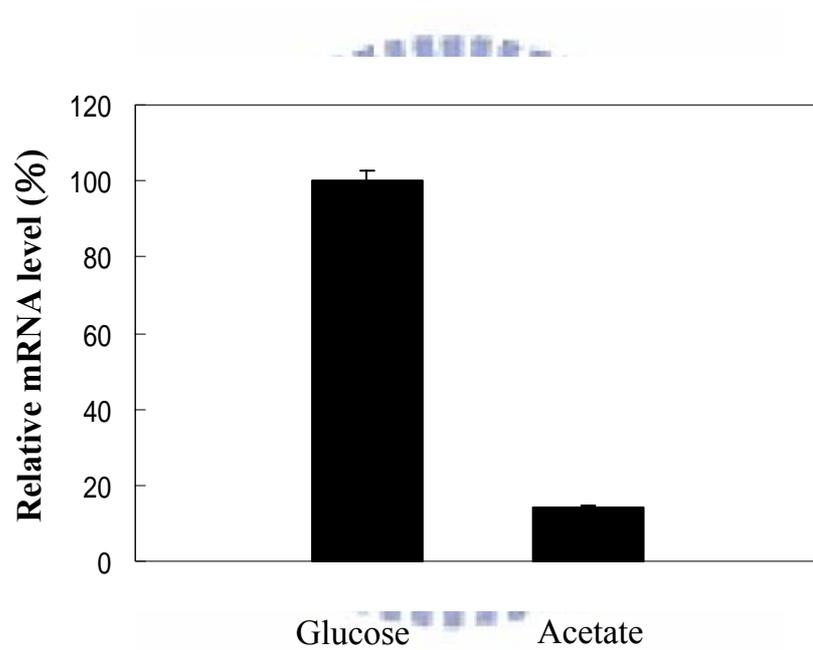
圖一、細菌生長與 *rne-lacZ* 表現

●生長曲線；▲ β - galactosidase activity。將 *rne-lacZ* 菌株培養於 40mM 葡萄糖的基礎培養基，於不同時間點將菌液取出利用 OD<sub>600</sub> 測其混濁度繪製成生長曲線與測不同時間點其 *rne-lacZ* 的 β - galactosidase 活性。

(A)



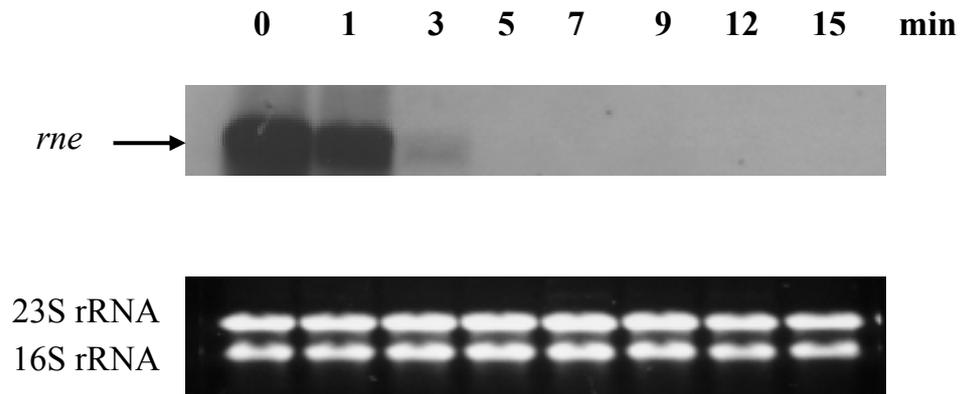
(B)



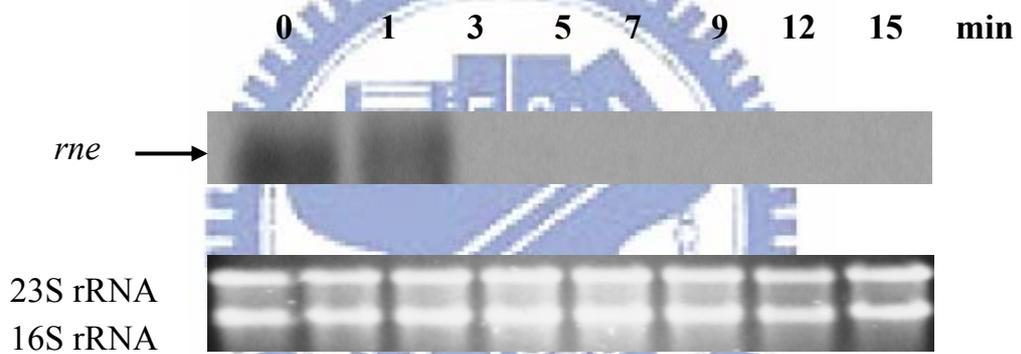
圖二、葡萄糖與醋酸為碳源時 *rne* 基因之表現量

(A) 北方墨點分析及總 RNA 定量分析之電泳圖 (B) 程式定量分析基因相對表現量。將菌體分別培養於含 40mM 葡萄糖或醋酸的基礎培養液中，進行批次培養。當菌體生長達對數生長期前期，抽取其總 RNA，電泳圖為 RNA 定量之 internal control。以 *rne* 探針進行北方墨點分析，結果以壓片訊號強弱來判讀，再利用程式將訊號進行定量分析與相對表現量計算。

(A)

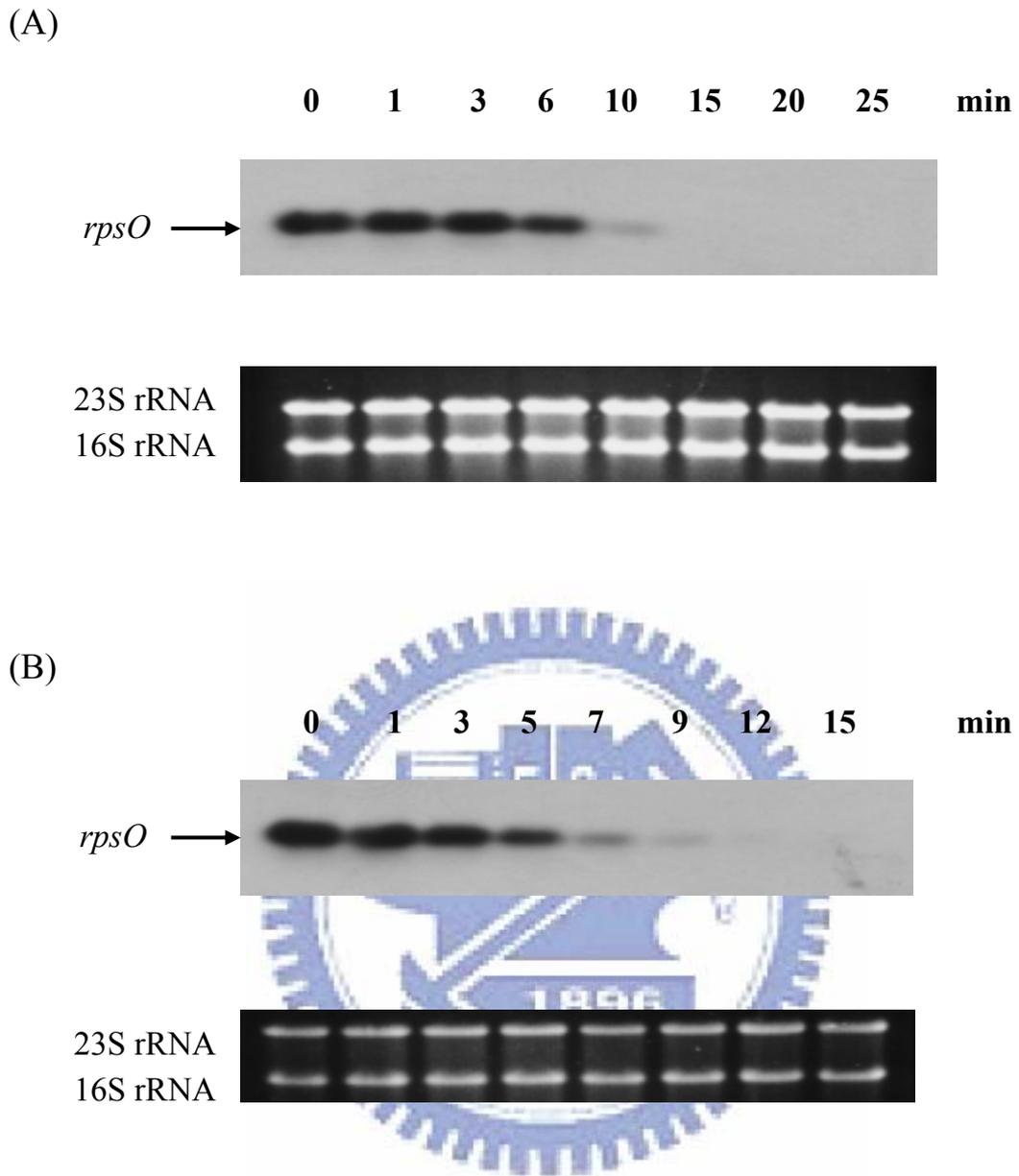


(B)



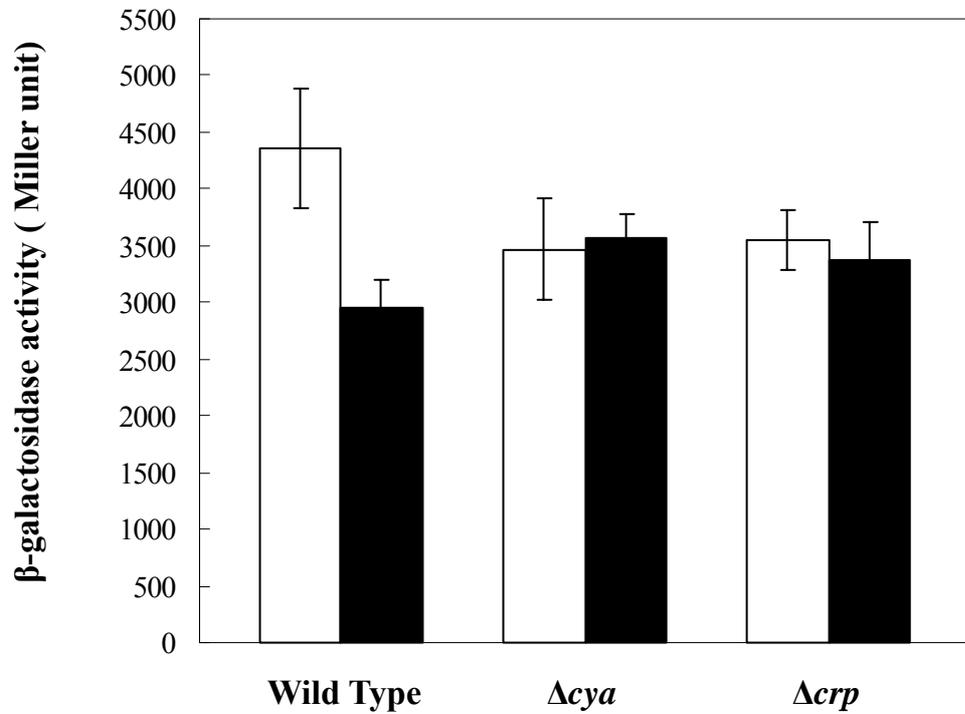
圖三、不同碳源下 *rne* 基因之穩定度

(A) 40mM 葡萄糖 (B) 40mM 醋酸。將菌體分別培養於含 40mM 葡萄糖或醋酸的基礎培養液中進行批次培養，當菌體生長達對數生長期前期，加入 rifampicin 後，於不同時間點抽取其總 RNA 進行電泳，電泳圖為 RNA 定量之 internal control，之後以 *rne* 探針進行壓片與北方墨點分析。



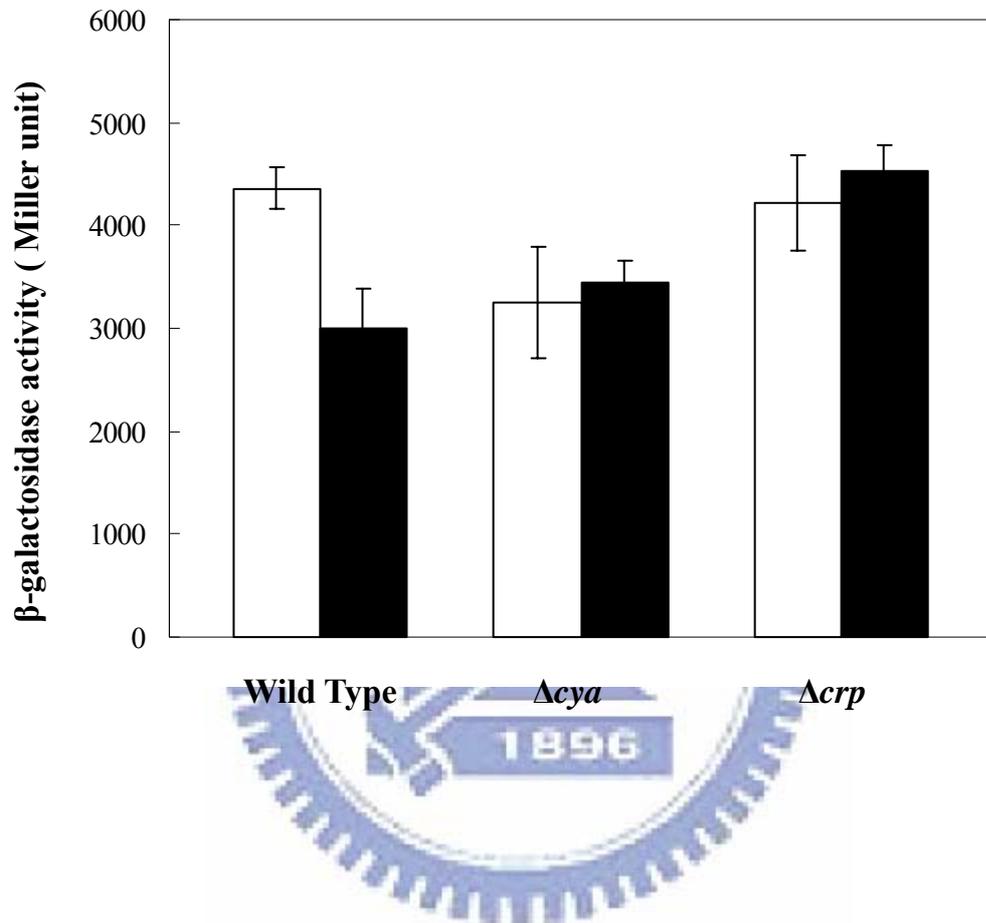
圖四、不同碳源下 RNase E 對 *rpsO* mRNA 之活性測試。

(A) 40mM 葡萄糖下, *rpsO* mRNA 之穩定性 (B) 40mM 醋酸下, *rpsO* mRNA 之穩定性。將菌體分別培養於含 40mM 葡萄糖或醋酸的基礎培養液中進行批次培養, 當菌體生長達對數生長期前期, 加入 rifampicin 後, 於不同時間點抽取其總 RNA 進行電泳, 電泳圖為 RNA 定量之 internal control, 之後以 *rpsO* 探針進行壓片與北方墨點分析。



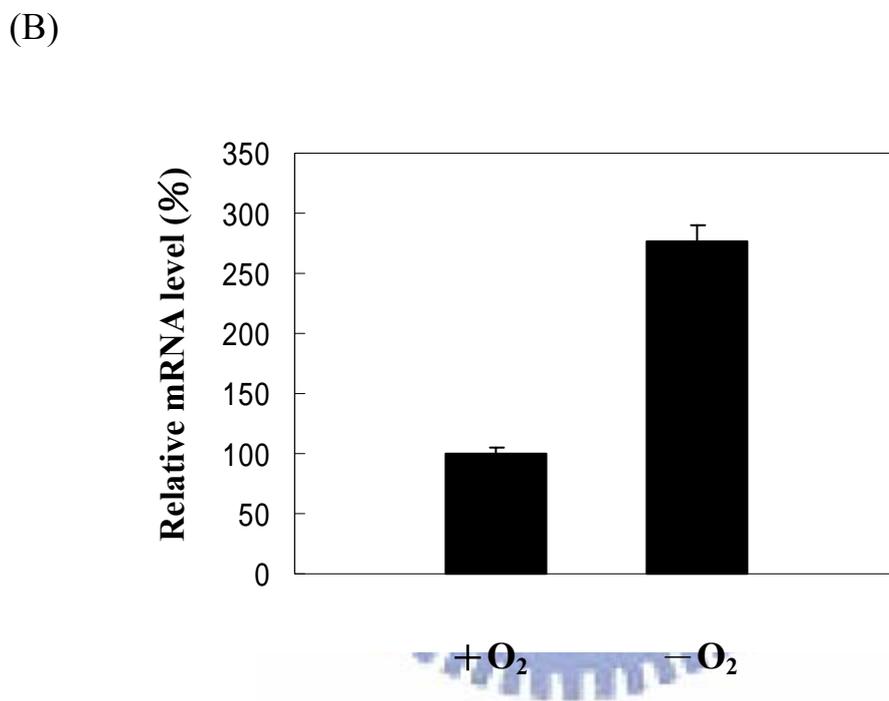
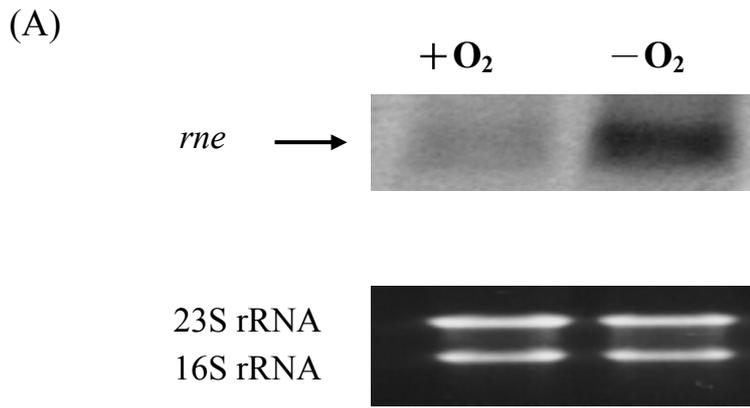
圖五、有氧環境下葡萄糖對大腸桿菌*rne-lacZ*表現之影響

□ LB；■ LB+40mM 葡萄糖。將具有*rne-lacZ*的野生株與突變株分別培養於LB或含40mM葡萄糖的LB培養液中，進行批次培養，當菌體生長達對數生長期前期測其 *rne-lacZ* 的 $\beta$ -galactosidase 活性。



圖六、無氧環境下葡萄糖對大腸桿菌 *rne-lacZ* 表現之影響

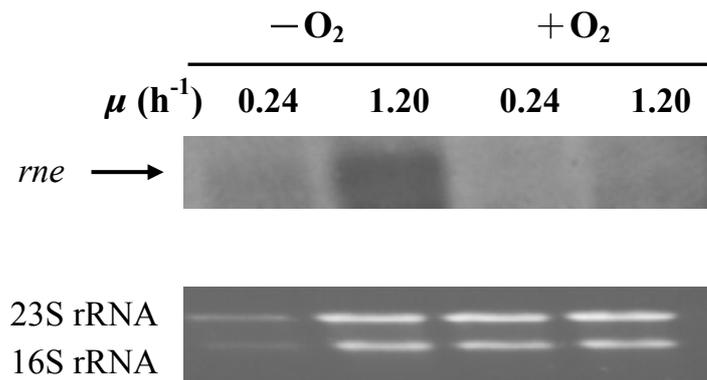
□ LB；■ LB+40mM 葡萄糖。將具有 *rne-lacZ* 的野生株與突變株分別培養於LB厭氧管或含40mM葡萄糖的LB培厭氧管中，進行批次培養，當菌體生長達對數生長期前期測其 *rne-lacZ* 的  $\beta$ -galactosidase 活性。



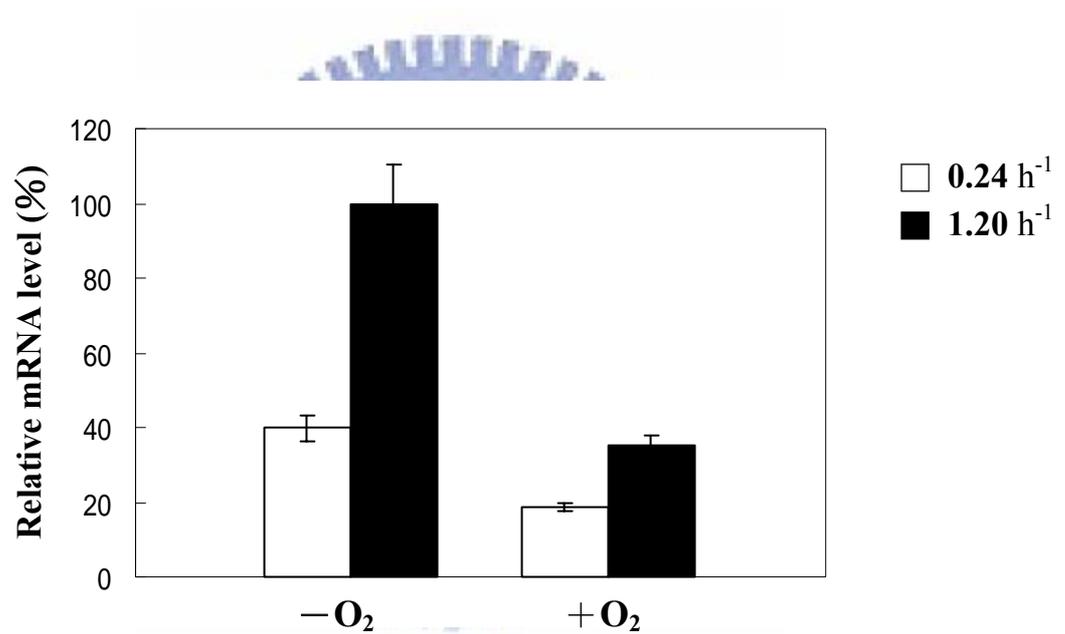
圖七、氧氣對 *rne* 基因表現之影響

(A) 北方墨點分析及總 RNA 定量分析之電泳圖 (B) 程式定量分析基因相對表現量。將菌體分別培養於含 40mM 葡萄糖的基礎培養液或基礎培養液厭氧管中進行批次培養，當菌體生長達對數生長期前期，抽取其總 RNA，當菌生長達對數生長期前期，抽取其總 RNA，電泳圖為 RNA 定量之 internal control。以 *rne* 探針進行北方墨點分析，結果以壓片訊號強弱來判讀，再利用程式將訊號進行定量分析與相對表現量計算。

(A)

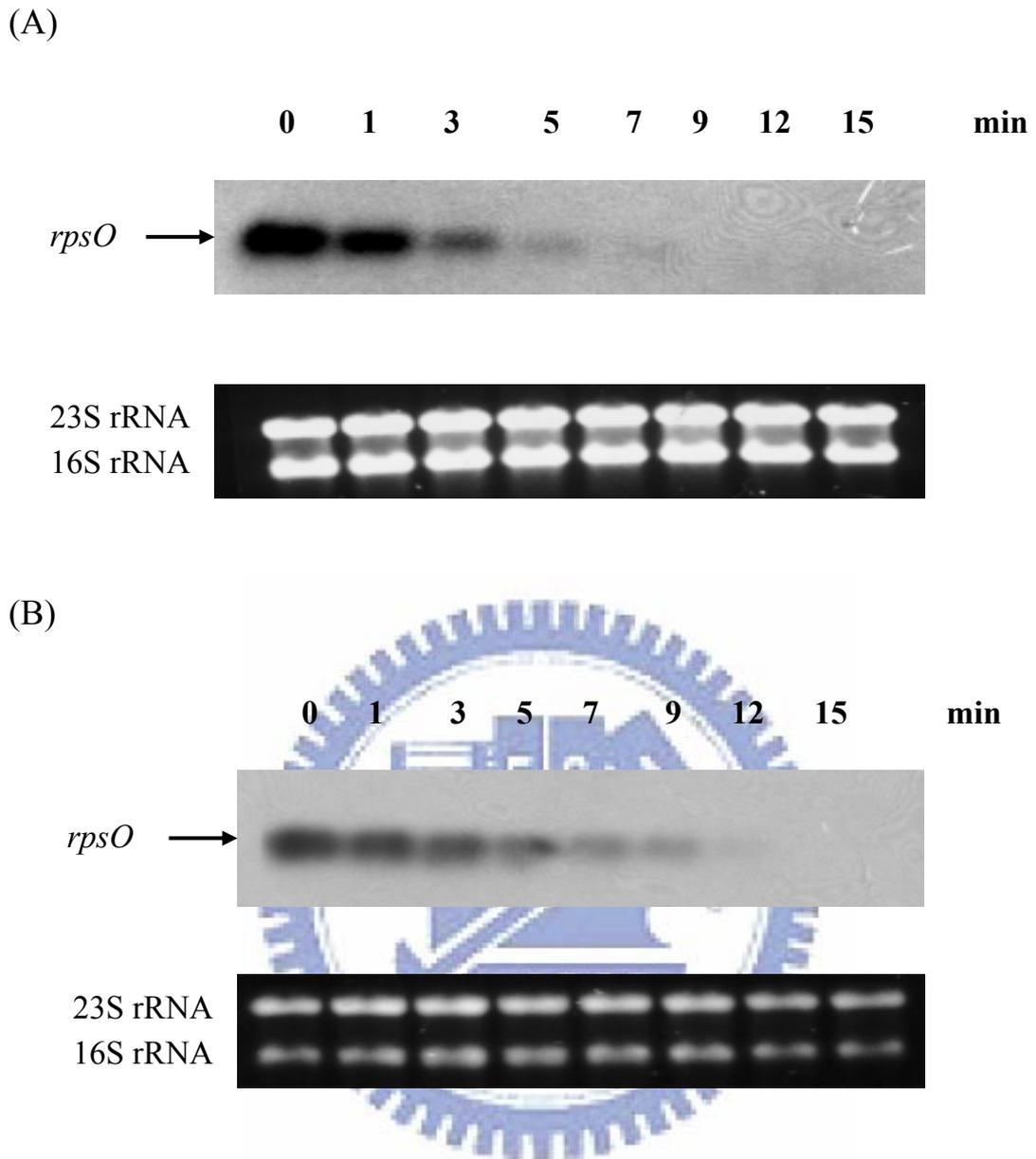


(B)



圖八、 氧氣與生長速率對 *rne* 基因表現之影響

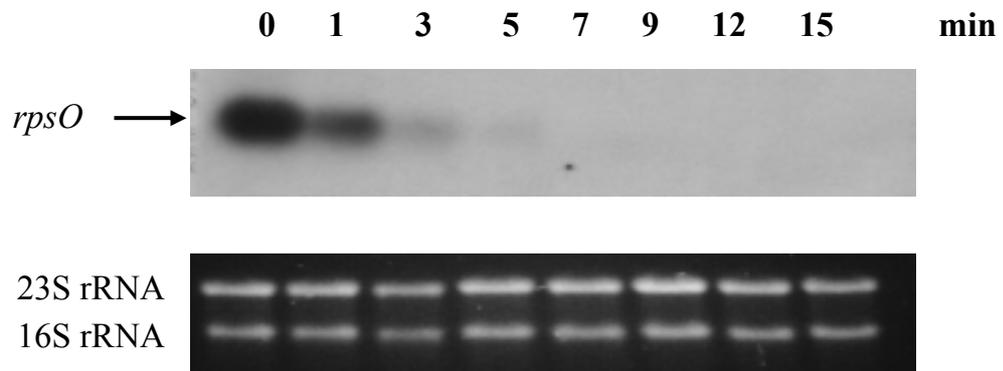
(A) 北方墨點分析及總 RNA 定量分析之電泳圖 (B) 程式定量分析基因相對表現量。以含 2.25mM 葡萄糖的基礎培養液分別於有氧與無氧下進行連續式培養，當菌體生長速率  $\mu$  達  $0.24 \text{ h}^{-1}$  與  $1.20 \text{ h}^{-1}$  時，取出菌液，抽取其總 RNA 進行電泳，電泳圖為 RNA 定量之 internal control。以 *rne* 探針進行北方墨點分析，結果以壓片訊號強弱來判讀，再利用程式將訊號進行定量分析與相對表現量計算。



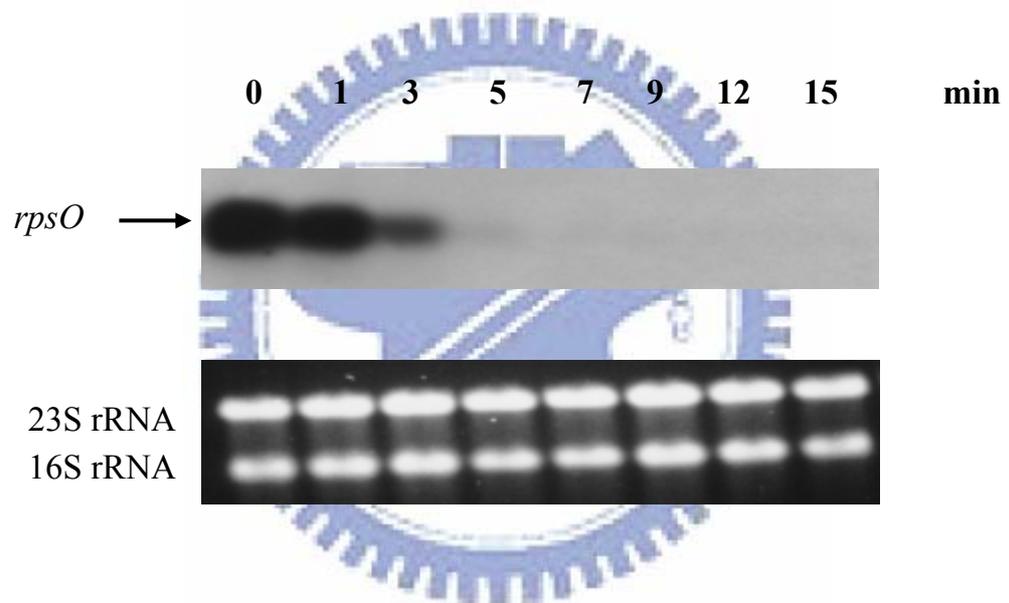
圖九、有氧時生長速率對 RNase E 之活性測試

(A) 生長速率  $\mu$  為  $0.24 \text{ h}^{-1}$  時，*rpsO* mRNA 之穩定性及總 RNA 電泳圖 (B) 生長速率  $\mu$  為  $1.20 \text{ h}^{-1}$  時，*rpsO* mRNA 之穩定性及總 RNA 電泳圖。以含  $2.25 \text{ mM}$  葡萄糖的基礎培養液分別於有氧下進行連續式培養，當菌體生長速率  $\mu$  達  $0.24 \text{ h}^{-1}$  與  $1.20 \text{ h}^{-1}$  時取出菌液，加入 rifampicin 後，於不同時間點抽取其總 RNA 進行電泳，電泳圖為 RNA 定量之 internal control，之後以 *rpsO* 探針進行壓片與北方墨點分析。

(A)



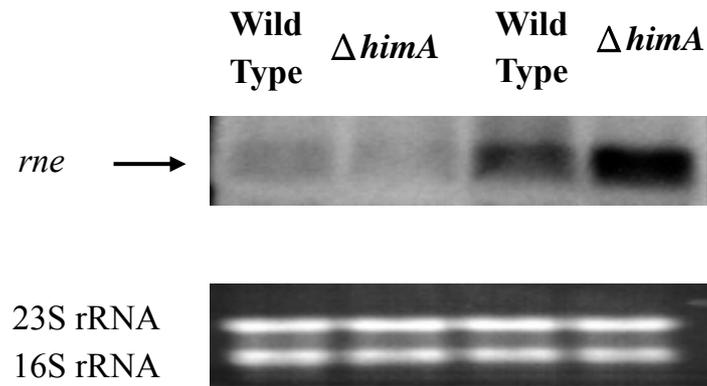
(B)



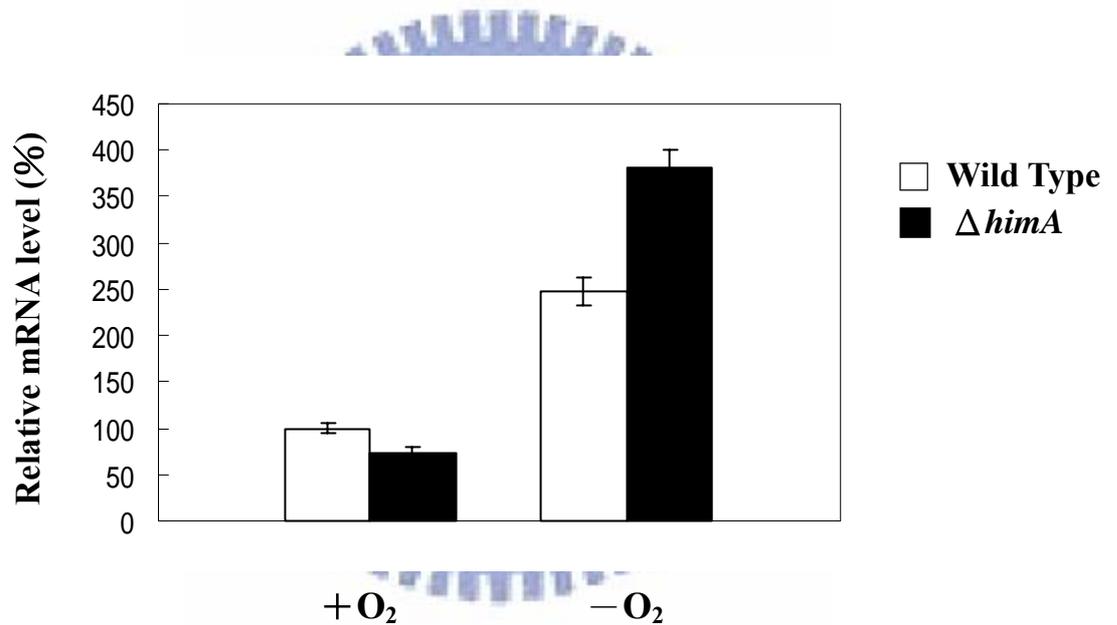
圖十、無氧時生長速率對 RNase E 之活性測試

(A) 生長速率  $\mu$  為  $0.24 \text{ h}^{-1}$  時, *rpsO* mRNA 之穩定性及總 RNA 電泳圖 (B) 生長速率  $\mu$  為  $1.20 \text{ h}^{-1}$  時, *rpsO* mRNA 之穩定性及總 RNA 電泳圖。以含 2.25mM 葡萄糖的基礎培養液分別於無氧下進行連續式培養, 當菌體生長速率  $\mu$  達  $0.24 \text{ h}^{-1}$  與  $1.20 \text{ h}^{-1}$  時取出菌液, 加入 rifampicin 後, 於不同時間點抽取其總 RNA 進行電泳, 電泳圖為 RNA 定量之 internal control, 之後以 *rpsO* 探針進行壓片與北方墨點分析。

(A)



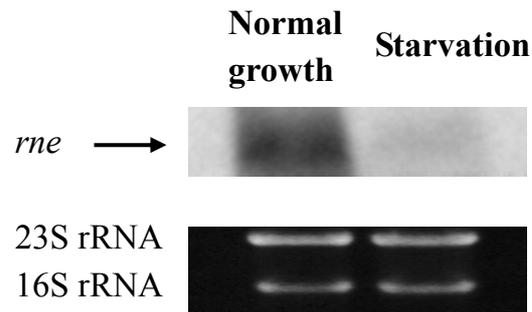
(B)



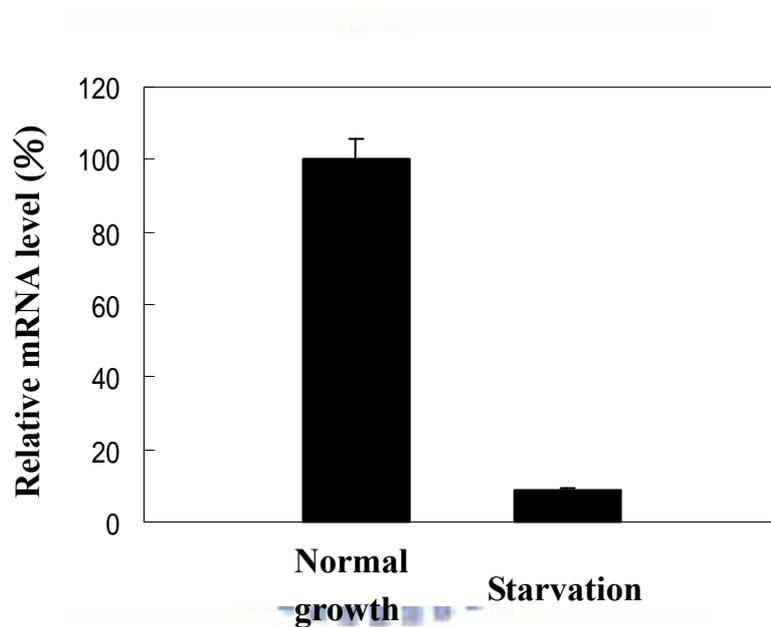
圖十一、 IHF 對 *rne* 基因表現之影響

(A) 北方墨點分析及總 RNA 定量分析之電泳圖 (B) 程式定量分析基因相對表現量。將野生株與  $\Delta himA$  突變株培養於含 40mM 葡萄糖的基礎培養液進行批次培養，當菌生長達對數生長期前期，抽取其總 RNA，電泳圖為 RNA 定量之 internal control。以 *rne* 探針進行北方墨點分析，結果以壓片訊號強弱來判讀，再利用程式將訊號進行定量分析與相對表現量計算。

(A)



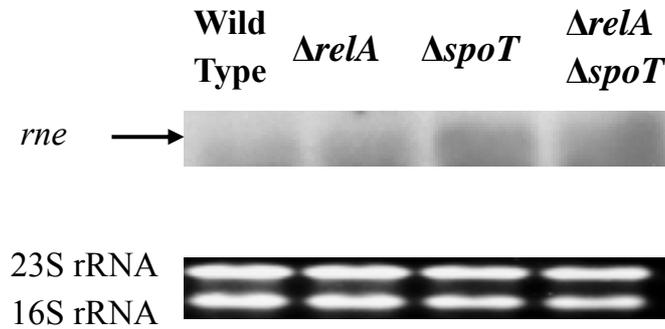
(B)



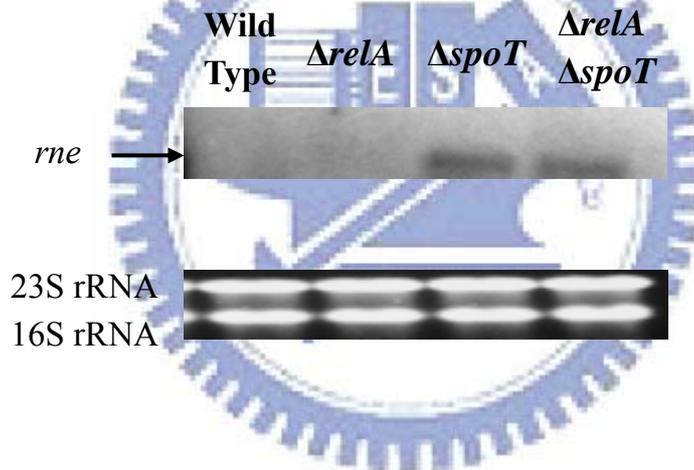
圖十二、 飢餓反應對 *rne* 基因表現之影響

(A) 北方墨點分析及總 RNA 定量分析之電泳圖 (B) 程式定量分析基因相對表現量。將菌體培養於 LB 培養液進行批次培養，當菌生長達對數生長期前期，置換不含 casamino acid 之基礎培養液進行飢餓培養 30 分鐘，之後抽取其總 RNA，電泳圖 RNA 定量之為 internal control。以 *rne* 探針進行北方墨點分析，結果以壓片訊號強弱來判讀，再利用程式將訊號進行定量分析與相對表現量計算。

(A)



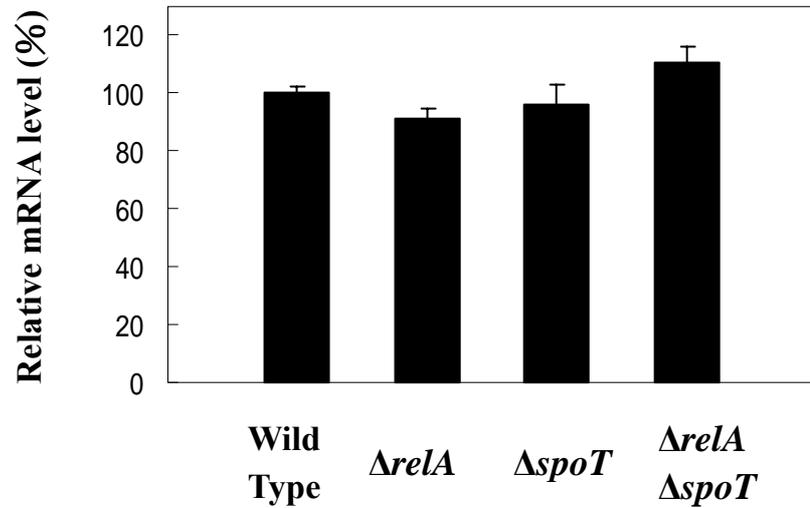
(B)



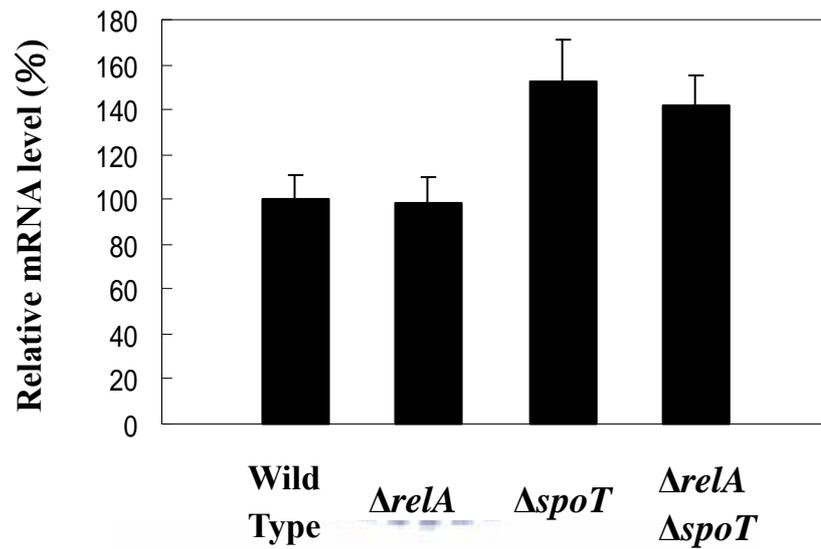
圖十三、野生株與 (p)ppGpp 基因突變株對 *rne* 基因表現之影響

(A) 正常培養 (B) 饑餓培養。將 *E. coli* K12 及 (p)ppGpp 相關基因突變株培養於 LB 培養液進行批次培養，當菌體生長達對數生長期前期，分別至換新的 LB 培養液或不含 casamino acid 之基礎培養液進行飢餓培養 30 分鐘，之後抽取其總 RNA，電泳圖為 RNA 定量之 internal control。以 *rne* 探針進行北方墨點分析，結果以壓片訊號強弱來判讀。

(A)



(B)



圖十四、野生株與 (p)ppGpp 基因突變株之 *rne* 基因相對表現量

(A) 正常培養 (B) 飢餓培養。將 *E. coli* K12 及 (p)ppGpp 相關基因突變株培養於 LB 培養液進行批次培養，當菌體生長達對數生長期前期，分別至換新的 LB 培養液或不含 casamino acid 之基礎培養液進行飢餓培養 30 分鐘，之後以 *rne* 探針，進行壓片與北方墨點分析，再利用程式將底片的訊號進行定量分析與相對表現量計算。

## 柒、参考文献

- Apirion, D. (1978) Isolation, genetic mapping and some characterization of a mutation in *Escherichia coli* that affects the processing of ribonucleic acid. *Genetics* **90**: 659-671.
- Babitzke, P., and Kushner, S.R. (1991) The Ams (altered mRNA stability) protein and ribonuclease E are encoded by the same structural gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1-5.
- Barlow, T., Berkmen, M., Georgellis, D., Bayr, L., Arvidson, S., and von Gabain, A. (1998) RNase E, the major player in mRNA degradation, is down-regulated in *Escherichia coli* during a transient growth retardation (diauxic lag). *Biol Chem* **379**: 33-38.
- Berg, O.G., and von Hippel, P.H. (1988) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. II. The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *J Mol Biol* **200**: 709-723.
- Blum, E., Py, B., Carpousis, A.J., and Higgins, C.F. (1997) Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol Microbiol* **26**: 387-398.
- Braun, F., Hajnsdorf, E., and Regnier, P. (1996) Polynucleotide phosphorylase is required for the rapid degradation of the RNase E-processed *rpsO* mRNA of *Escherichia coli* devoid of its 3' hairpin. *Mol Microbiol* **19**: 997-1005.
- Busby, S., and Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199-213.
- Carpousis, A.J. (2002) The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function

and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem Soc Trans* **30**: 150-155.

Casaregola, S., Jacq, A., Laoudj, D., McGurk, G., Margaron, S., Tempete, M., Norris, V., and Holland, I.B. (1992) Cloning and analysis of the entire *Escherichia coli ams* gene. *ams* is identical to *hmp1* and encodes a 114 kDa protein that migrates as a 180 kDa protein. *J Mol Biol* **228**: 30-40.

Casaregola, S., Jacq, A., Laoudj, D., McGurk, G., Margaron, S., Tempete, M., Norris, V., and Holland, I.B. (1994) Cloning and analysis of the entire *Escherichia coli ams* gene. *ams* is identical to *hmp1* and encodes a 114 kDa protein that migrates as a 180 kDa protein. *J Mol Biol* **238**: 867.

Coburn, G.A., Miao, X., Briant, D.J., and Mackie, G.A. (1999) Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev* **13**: 2594-2603.

Cohen, S.N., and McDowall, K.J. (1997) RNase E: still a wonderfully mysterious enzyme. *Mol Microbiol* **23**: 1099-1106.

Darie, S., and Gunsalus, R.P. (1994) Effect of heme and oxygen availability on *hemA* gene expression in *Escherichia coli*: role of the *fnr*, *arcA*, and *himA* gene products. *J Bacteriol* **176**: 5270-5276.

Deutscher, M.P. (1985) *E. coli* RNases: making sense of alphabet soup. *Cell* **40**: 731-732.

Deutscher, M.P. (1993) Ribonuclease multiplicity, diversity, and complexity. *J Biol Chem* **268**: 13011-13014.

Dhavan, G.M., Crothers, D.M., Chance, M.R., and Brenowitz, M. (2002) Concerted binding and bending of DNA by *Escherichia coli* integration host factor. *J Mol Biol* **315**: 1027-1037.

- Diwa, A., Bricker, A.L., Jain, C., and Belasco, J.G. (2000) An evolutionarily conserved RNA stem-loop functions as a sensor that directs feedback regulation of RNase E gene expression. *Genes Dev* **14**: 1249-1260.
- Diwa, A.A., and Belasco, J.G. (2002) Critical features of a conserved RNA stem-loop important for feedback regulation of RNase E synthesis. *J Biol Chem* **277**: 20415-20422.
- Diwa, A.A., Jiang, X., Schapira, M., and Belasco, J.G. (2002) Two distinct regions on the surface of an RNA-binding domain are crucial for RNase E function. *Mol Microbiol* **46**: 959-969.
- Gallant, J.A. (1979) Stringent control in *E. coli*. *Annu Rev Genet* **13**: 393-415.
- Gegenheimer, P., Watson, N., and Apirion, D. (1977) Multiple pathways for primary processing of ribosomal RNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **252**: 3064-3073.
- Georgellis, D., Arvidson, S., and von Gabain, A. (1992) Decay of *ompA* mRNA and processing of 9S RNA are immediately affected by shifts in growth rate, but in opposite manners. *J Bacteriol* **174**: 5382-5390.
- Georgellis, D., Barlow, T., Arvidson, S., and von Gabain, A. (1993) Retarded RNA turnover in *Escherichia coli*: a means of maintaining gene expression during anaerobiosis. *Mol Microbiol* **9**: 375-381.
- Georgellis, D., Sohlberg, B., Hartl, F.U., and von Gabain, A. (1995) Identification of GroEL as a constituent of an mRNA-protection complex in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **16**: 1259-1268.
- Ghora, B.K., and Apirion, D. (1978) Structural analysis and *in vitro* processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an *rne* mutant of *E. coli*. *Cell* **15**: 1055-1066.

- Goldenberg, D., Giladi, H., and Oppenheim, A.B. (1994) Genetic and biochemical analysis of IHF/HU hybrid proteins. *Biochimie* **76**: 941-950.
- Grunberg-Manago, M. (1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu Rev Genet* **33**: 193-227.
- Hajnsdorf, E., Steier, O., Coscoy, L., Teyssset, L., and Regnier, P. (1994) Roles of RNase E, RNase II and PNPase in the degradation of the *rpsO* transcripts of *Escherichia coli*: stabilizing function of RNase II and evidence for efficient degradation in an *ams pnp rnb* mutant. *Embo J* **13**: 3368-3377.
- Huang, H., Liao, J., and Cohen, S.N. (1998) Poly(A)- and poly(U)-specific RNA 3' tail shortening by *E. coli* ribonuclease E. *Nature* **391**: 99-102.
- Iost, I., and Dreyfus, M. (1995) The stability of *Escherichia coli lacZ* mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *Embo J* **14**: 3252-3261.
- Ishige, K., and Noguchi, T. (2000) Inorganic polyphosphate kinase and adenylate kinase participate in the polyphosphate:AMP phosphotransferase activity of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14168-14171.
- Jain, C., and Belasco, J.G. (1995) RNase E autoregulates its synthesis by controlling the degradation rate of its own mRNA in *Escherichia coli*: unusual sensitivity of the *rne* transcript to RNase E activity. *Genes Dev* **9**: 84-96.
- Jain, C., Deana, A., and Belasco, J.G. (2002) Consequences of RNase E scarcity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **43**: 1053-1064.
- Jiang, X., Diwa, A., and Belasco, J.G. (2000) Regions of RNase E important for 5'-end-dependent RNA cleavage and autoregulated synthesis. *J Bacteriol* **182**: 2468-2475.
- Kushner, S.R. (2002) mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *J Bacteriol* **184**: 4658-4665; discussion 4657.

- Le Derout, J., Regnier, P., and Hajnsdorf, E. (2002) Both temperature and medium composition regulate RNase E processing efficiency of the *rpsO* mRNA coding for ribosomal protein S15 of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **319**: 341-349.
- Li, Z., Pandit, S., and Deutscher, M.P. (1999) RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *Embo J* **18**: 2878-2885.
- Li, Z., and Deutscher, M.P. (2002) RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *Rna* **8**: 97-109.
- Liou, G.G., Jane, W.N., Cohen, S.N., Lin, N.S., and Lin-Chao, S. (2001) RNA degradosomes exist *in vivo* in *Escherichia coli* as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 63-68.
- Lopez, P.J., Marchand, I., Joyce, S.A., and Dreyfus, M. (1999) The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing *in vivo*. *Mol Microbiol* **33**: 188-199.
- Mackie, G.A. (1998) Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**: 720-723.
- McDowall, K.J., and Cohen, S.N. (1996) The N-terminal domain of the *rne* gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *J Mol Biol* **255**: 349-355.
- Melefors, O., and von Gabain, A. (1991) Genetic studies of cleavage-initiated mRNA decay and processing of ribosomal 9S RNA show that the *Escherichia coli* *ams* and *rne* loci are the same. *Mol Microbiol* **5**: 857-864.

- Mengeritsky, G., Goldenberg, D., Mendelson, I., Giladi, H., and Oppenheim, A.B. (1993) Genetic and biochemical analysis of the integration host factor of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **231**: 646-657.
- Miczak, A., Kaberdin, V.R., Wei, C.L., and Lin-Chao, S. (1996) Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3865-3869.
- Mudd, E.A., Krisch, H.M., and Higgins, C.F. (1990) RNase E, an endoribonuclease, has a general role in the chemical decay of *Escherichia coli* mRNA: evidence that *rne* and *ams* are the same genetic locus. *Mol Microbiol* **4**: 2127-2135.
- Mudd, E.A., and Higgins, C.F. (1993) *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: autoregulation of expression and site-specific cleavage of mRNA. *Mol Microbiol* **9**: 557-568.
- Nicholson, A.W. (1999) Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 371-390.
- Ono, M., and Kuwano, M. (1979) A conditional lethal mutation in an *Escherichia coli* strain with a longer chemical lifetime of messenger RNA. *J Mol Biol* **129**: 343-357.
- Ow, M.C., Liu, Q., Mohanty, B.K., Andrew, M.E., Maples, V.F., and Kushner, S.R. (2002) RNase E levels in *Escherichia coli* are controlled by a complex regulatory system that involves transcription of the *rne* gene from three promoters. *Mol Microbiol* **43**: 159-171.
- Pao, C.C., and Dyess, B.T. (1981) Stringent control of RNA synthesis in the absence of guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate. *J Biol Chem* **256**: 2252-2257.
- Py, B., Causton, H., Mudd, E.A., and Higgins, C.F. (1994) A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **14**: 717-729.

- Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* **381**: 169-172.
- Rauhut, R., and Klug, G. (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 353-370.
- Regnier, P., and Hajsnsdorf, E. (1991) Decay of mRNA encoding ribosomal protein S15 of *Escherichia coli* is initiated by an RNase E-dependent endonucleolytic cleavage that removes the 3' stabilizing stem and loop structure. *J Mol Biol* **217**: 283-292.
- Regnier, P., and Arraiano, C.M. (2000) Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays* **22**: 235-244.
- Resnik, E., Pan, B., Ramani, N., Freundlich, M., and LaPorte, D.C. (1996) Integration host factor amplifies the induction of the aceBAK operon of *Escherichia coli* by relieving IclR repression. *J Bacteriol* **178**: 2715-2717.
- Sohlberg, B., Lundberg, U., Hartl, F.U., and von Gabain, A. (1993) Functional interaction of heat shock protein GroEL with an RNase E-like activity in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 277-281.
- Sousa, S., Marchand, I., and Dreyfus, M. (2001) Autoregulation allows *Escherichia coli* RNase E to adjust continuously its synthesis to that of its substrates. *Mol Microbiol* **42**: 867-878.
- Steffen, N.R., Murphy, S.D., Toller, L., Hatfield, G.W., and Lathrop, R.H. (2002) DNA sequence and structure: direct and indirect recognition in protein-DNA binding. *Bioinformatics* **18 Suppl 1**: S22-S30.
- Taraseviciene, L., Miczak, A., and Apirion, D. (1991) The gene specifying RNase E (*rne*) and a gene affecting mRNA stability (*ams*) are the same gene. *Mol Microbiol* **5**: 851-855.

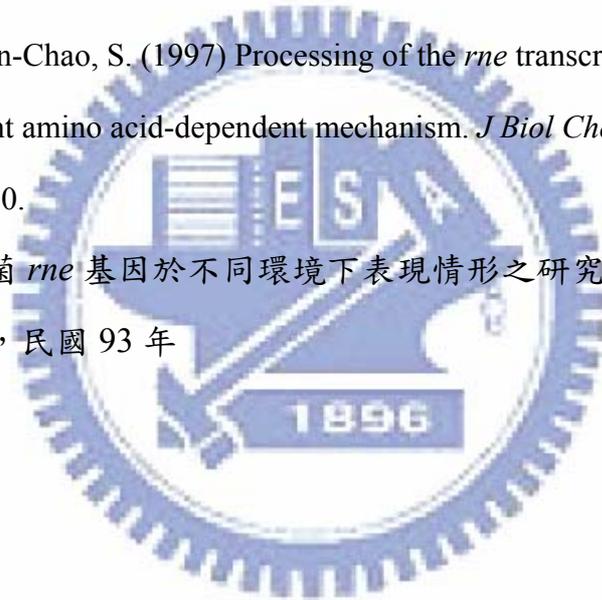
Vanzo, N.F., Li, Y.S., Py, B., Blum, E., Higgins, C.F., Raynal, L.C., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1998) Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev* **12**: 2770-2781.

Walsh, A.P., Tock, M.R., Mallen, M.H., Kaberdin, V.R., von Gabain, A., and McDowall, K.J. (2001) Cleavage of poly(A) tails on the 3'-end of RNA by ribonuclease E of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **29**: 1864-1871.

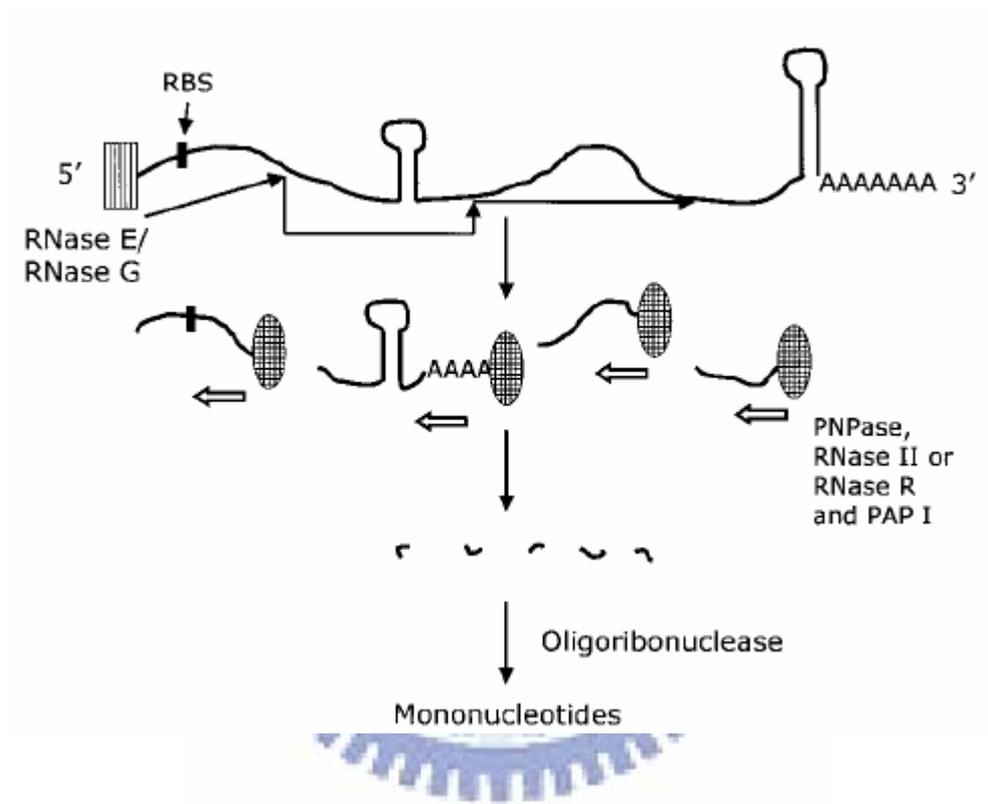
Wellington, C.L., Greenberg, M.E., and Belasco, J.G. (1993) The destabilizing elements in the coding region of c-fos mRNA are recognized as RNA. *Mol Cell Biol* **13**: 5034-5042.

Woo, W.M., and Lin-Chao, S. (1997) Processing of the *rne* transcript by an RNase E-independent amino acid-dependent mechanism. *J Biol Chem* **272**: 15516-15520.

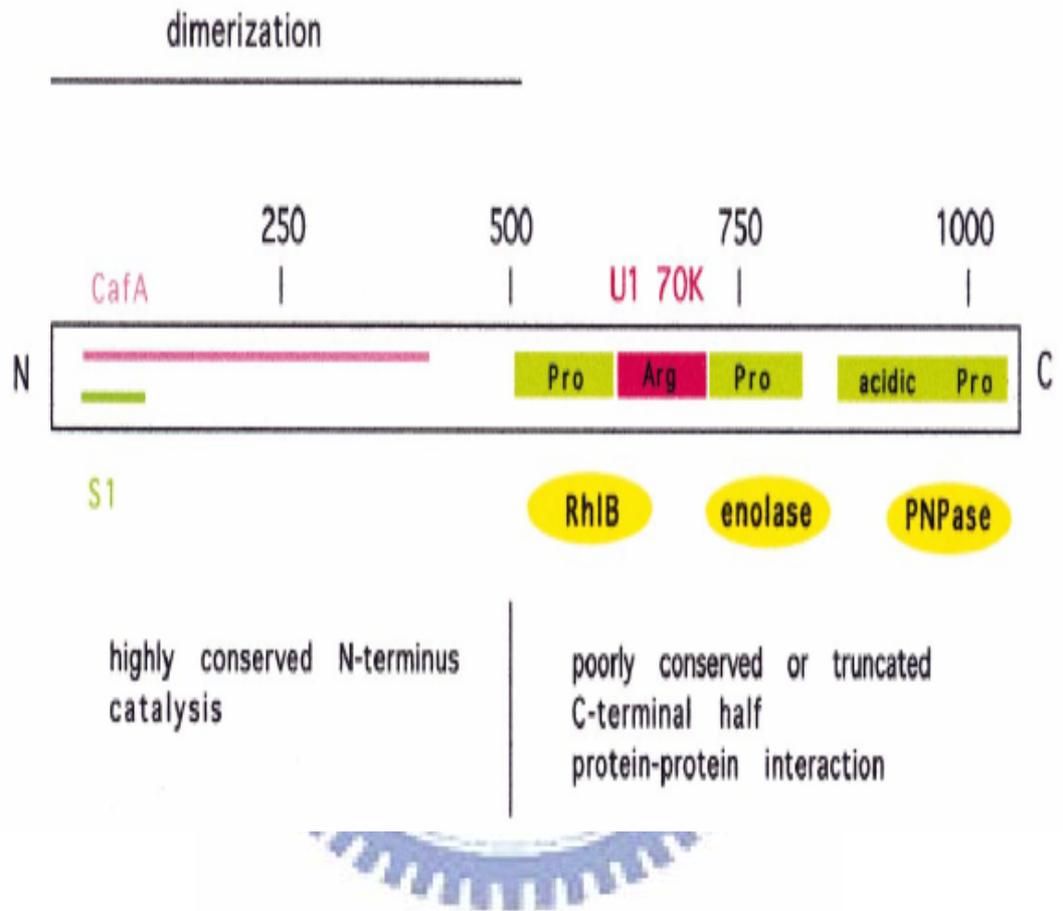
許慧珊，大腸桿菌 *rne* 基因於不同環境下表現情形之研究，國立交通大學，碩士論文，民國 93 年



捌、附圖



附圖一、大腸桿菌內 mRNA 的降解模式 (Kushner,2002)

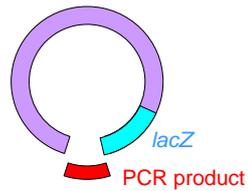


附圖二、RNase E 蛋白質結構。其 N 端為酵素活性區，C 端可提供骨架給 degradosome 中其他成員結合 (Rauhut and Klug, 1999)。

### *rne* gene



### pRS415 (operon fusion)



Phage

*rne-lacZ* fusion inserts into chromosome

select single copy fusion strain

Examine of different environmental conditions on *rne-lacZ* fusion.

附圖三、*rne-lacZ* operon fusion 菌株之構築 (許慧珊，大腸桿菌 *rne* 基因於不同環境下表現情形之研究，國立交通大學，碩士論文，民國 93 年)