

國立交通大學

生物科技研究所

碩士論文

碳源與核酸內切酶對大腸桿菌延胡索酸酶
fumA、*fumC* 基因表現之研究

Effect of carbon source and endoribonuclease
on *fumA* and *fumC* genes expression
in *Escherichia coli*

研究生：林靜雪

指導教授：曾慶平 博士

中華民國九十三年七月

中文摘要

本實驗室先前研究結果發現，*fumA* 與 *fumC* 的 mRNA 穩定性會隨著細菌生長速率上升而增加。本研究中，我們將大腸桿菌培養在不同碳源下，分別觀察在轉錄、轉錄後與轉譯三個層次 *fumA* 基因表現情形。為探究影響 mRNA 穩定性的因子為何，我們使用連續式培養來觀察核糖核酸內切酶 RNase E 與 poly(A) 聚合酶在不同生長速率下，對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的影響。

結果顯示在轉錄層次，以醋酸為碳源時，*fumA* mRNA 表現量比以葡萄糖為碳源時較多。在轉錄後層次，以葡萄糖為碳源時，*fumA* mRNA 較以醋酸為碳源時穩定。在轉譯層次，以葡萄糖為碳源時，FumA 蛋白質比以醋酸為碳源時表現量較多。在連續式培養下，*fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性會隨著細菌生長速率上升而增加。當細胞內 RNase E 突變後，*fumA* 與 *fumC* mRNA 皆比野生株明顯穩定，但仍受生長速率的調控。當 poly(A) 聚合酶缺失後，*fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性與野生株比較後並沒有顯著改變。當 RNase E 與 poly(A) 聚合酶同時缺失，*fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性則大幅提昇，比 RNase E 單獨缺失時更穩定。此研究結果顯示 *fumA* 與 *fumC* 基因在轉錄、轉錄後與轉譯均受碳源及生長速率所調控。

Abstract

The previous studies showed that *fumA* and *fumC* mRNA stability increased with cell growth rate. In this study, we examined the effect of different carbon sources on *fumA* gene expression in transcription, post-transcription, and translation level, and used continuous culture to examine the effect of RNase E (*rne*) and poly (A) polymerase I (*pcnB*) on *fumA* and *fumC* mRNA degradation under different growth rates in *E. coli*.

The results of this study demonstrated that *fumA* mRNA amount was higher in acetate medium than in glucose medium at transcription level. In post-transcription level, *fumA* mRNA was more stable in glucose medium than in acetate medium. In translation level, FumA protein was higher in glucose medium than in acetate medium. In continuous culture, both *fumA* and *fumC* mRNA stability increased with cell growth rate. The stability of *fumA* and *fumC* mRNA in *rne*⁻ strain were higher than in wild type strain. There were no significant change of *fumA* and *fumC* mRNA stability in *pcnB*⁻ strain. In *rne*⁻*pcnB*⁻ double mutant, *fumA* and *fumC* mRNA stability were higher than in *rne*⁻ strain. These results indicated that *fumA* and *fumC* gene expression were regulated by carbon sources and growth rates at transcription, post-transcription, and translation levels.

誌謝

感謝指導教授曾慶平老師在實驗及生活上的指導、支持及鼓勵，並感謝彭慧玲老師及楊昀良老師在論文上的悉心指導及口試時給予許多的寶貴意見，在此致上最誠摯的謝意。

過去這兩年有歡笑、有淚水，我要特別感謝校賢小弟和宗益爸爸對我實驗上的指導及生活上的照顧，還要感謝實驗室的伙伴們支持我一起度過這難忘的時光，育甄學姐、國領學長、煜沛學長、慧貞阿姐、岳賢、慧君、惠文、郁婷、巧璇、繼元、愛雁、冀冬、智彬、翊維。此外還要感謝阿金總是聽我吐苦水，雖然不常見面，但仍讓我感覺你就在我身邊關心我。

最後感謝所有指導過我的老師與朋友，謝謝大家陪伴我一同成長！



目錄

| | 頁次 |
|-------------------------------|------|
| 中文摘要..... | i |
| 英文摘要..... | ii |
| 誌謝..... | iii |
| 目錄..... | iv |
| 表目錄..... | vi |
| 圖目錄..... | vii |
| 附圖目錄..... | viii |
| | |
| 一、緒論與研究目的..... | 1 |
| 二、文獻回顧..... | 3 |
| 2.1 延胡索酸酶..... | 3 |
| 2.1.1 延胡索酸酶之特性..... | 3 |
| 2.1.2 延胡索酸酶在細胞內之調控..... | 4 |
| 2.2 碳源對大腸桿菌生長之影響..... | 5 |
| 2.3 生長速率對大腸桿菌基因表現之調控..... | 5 |
| 2.4 大腸桿菌 mRNA 之降解機制..... | 6 |
| 2.5 核糖核酸酶對 mRNA 穩定性之影響..... | 6 |
| 2.5.1 核糖核酸內切酶..... | 6 |
| 2.5.2 核糖核酸外切酶..... | 8 |
| 2.6 mRNA 結構對其穩定性之影響..... | 10 |
| 2.6.1 5' 端結構對 mRNA 降解之影響..... | 10 |
| 2.6.2 3' 端結構對 mRNA 降解之影響..... | 10 |
| 2.7 核糖體對 mRNA 穩定性之影響..... | 11 |
| 2.8 其他修飾或輔助之蛋白質..... | 11 |
| 2.9 Degradosome..... | 13 |
| 三、材料與原理方法..... | 15 |
| 3.1 材料..... | 15 |
| 3.1.1 菌種..... | 15 |
| 3.1.2 藥品與試劑..... | 15 |

| | |
|---|----|
| 3.2 原理..... | 18 |
| 3.2.1 批次式培養 (batch culture) 之細胞生長模式..... | 19 |
| 3.2.2 連續式培養之動力學模式..... | 20 |
| 3.2.3 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 之原理..... | 21 |
| 3.2.4 mRNA 半衰期計算原理..... | 22 |
| 3.3 方法..... | 22 |
| 3.3.1 大腸桿菌生長條件控制與培養方法..... | 23 |
| 3.3.2 大腸桿菌總 RNA 製備方法..... | 25 |
| 3.3.3 mRNA 穩定性測定方法..... | 26 |
| 3.3.4 北方墨點法 (Northern blotting analysis)..... | 26 |
| 3.3.5 蛋白質上清液之製備..... | 30 |
| 3.3.6 蛋白質濃度測定..... | 30 |
| 3.3.7 蛋白質凝膠電泳法..... | 31 |
| 3.3.8 西方墨點法 (Western blotting analysis)..... | 31 |
| 四、結果..... | 33 |
| 4.1 不同碳源對大腸桿菌 <i>fumA</i> 基因表現之影響..... | 33 |
| 4.1.1 不同碳源對大腸桿菌 <i>fumA</i> 基因在轉錄層次之影響..... | 33 |
| 4.1.2 不同碳源對大腸桿菌 <i>fumA</i> 基因在轉錄後層次之影響..... | 34 |
| 4.1.3 不同碳源對大腸桿菌 FumA 蛋白質在轉譯層次之影響..... | 34 |
| 4.2 影響 <i>fumA</i> 與 <i>fumC</i> mRNA 穩定性的因素..... | 35 |
| 4.2.1 生長速率對 <i>fumA</i> 與 <i>fumC</i> mRNA 穩定性之影響..... | 36 |
| 4.2.2 RNase E 對 <i>fumA</i> 與 <i>fumC</i> mRNA 穩定性之影響..... | 36 |
| 4.2.3 poly(A) 聚合酶對 <i>fumA</i> 與 <i>fumC</i> mRNA 穩定性之影響..... | 37 |
| 4.2.4 RNase E 與 poly(A) 聚合酶對 <i>fumA</i> 與 <i>fumC</i> mRNA 穩定性 之影響..... | 37 |
| 五、討論..... | 39 |
| 六、論文圖表..... | 46 |
| 七、參考文獻..... | 62 |
| 八、附錄..... | 72 |

表目錄

| | |
|---|----|
| 表一、本實驗所使用的大腸桿菌野生株與突變株。..... | 46 |
| 表二、大腸桿菌 K12、N3433 與 N3431 以批次式、不同碳源 (10mM 葡萄糖或醋酸) 培養下，對 <i>fumA</i> mRNA 穩定性之影響。..... | 47 |
| 表三、大腸桿菌 N3433、N3431、YHC3393 與 LK01 以 2.5mM 葡萄糖為碳源，在連續式培養下，生長速率對 <i>fumA</i> mRNA 穩定性之影響。..... | 48 |
| 表四、大腸桿菌 N3433、N3431、YHC3393 與 LK01 以 2.5mM 葡萄糖為碳源，在連續式培養下，生長速率對 <i>fumC</i> mRNA 穩定性之影響。..... | 49 |



圖目錄

| | |
|--|----|
| 圖一、大腸桿菌 K12、 N3433 與 N3431，在批次式、不同碳源 (10mM 葡萄糖或醋酸) 培養下，(A) <i>fumA</i> mRNA 表現量之北方墨點圖。(B)電泳圖。..... | 50 |
| 圖二之一、大腸桿菌 K12、 N3433 與 N3431，在批次式、不同碳源 (10mM 葡萄糖或醋酸) 培養下， <i>fumA</i> mRNA 穩定性之北方墨點圖。(A) K12，(B)N3433，(C)N3431。..... | 51 |
| 圖二之二、大腸桿菌 K12、 N3433 與 N3431，在批次式、不同碳源 (10mM 葡萄糖或醋酸) 培養下， <i>fumA</i> mRNA 穩定性之電泳圖。(A) K12，(B) N3433，(C) N3431。..... | 52 |
| 圖三、大腸桿菌 K12、 N3433 與 N3431，在批次式、不同碳源 (10mM 葡萄糖或醋酸) 培養下，(A) FumA 蛋白質表現量之西方墨點圖。(B) 菌體總蛋白質之電泳圖。..... | 53 |
| 圖四、大腸桿菌 N3433 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) <i>fumA</i> mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B) 電泳圖。..... | 54 |
| 圖五、大腸桿菌 N3433 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) <i>fumC</i> mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B) 電泳圖。..... | 55 |
| 圖六、大腸桿菌 N3431 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) <i>fumA</i> mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B)電泳圖。..... | 56 |
| 圖七、大腸桿菌 N3431 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) <i>fumC</i> mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B) 電泳圖。..... | 57 |
| 圖八、大腸桿菌 YHC3393 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) <i>fumA</i> mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B)電泳圖。..... | 58 |
| 圖九、大腸桿菌 YHC3393 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) <i>fumC</i> mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B) 電泳圖。..... | 59 |
| 圖十、大腸桿菌 LK01 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) <i>fumA</i> mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B)電泳圖。..... | 60 |
| 圖十一、大腸桿菌 LK01 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) <i>fumC</i> mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B)電泳圖。..... | 61 |

附錄目錄

| | |
|---|----|
| 附圖一、RNase E 切割位置之核苷酸序列比較。..... | 72 |
| 附圖二、大腸桿菌 K12 在連續式培養下，以葡萄糖為碳源，(A) <i>fumA</i> mRNA， (B) <i>fumC</i> mRNA 穩定性分析圖。..... | 73 |
| 附圖三、在批次式培養下，大腸桿菌野生株與核糖核酸酶突變株 <i>fumA</i> mRNA 穩定性分析。(A) 野生株 N3433，(B) RNase E (<i>rne</i>) 與 PNPase (<i>pnp</i>) 突變株，(C) RNase G (<i>rng</i>)、RNase III (<i>rnc</i>) 與 RNase I (<i>rna</i>) 突變株。..... | 74 |
| 附圖四、大腸桿菌中 RNA 降解的機制之一。..... | 75 |
| 附圖五、大腸桿菌以連續式培養，控制細胞比生長速率為 0.72/h，取定量總 RNA 進行電泳的電泳圖，(A) N3433 (B) LK01。..... | 76 |



一、緒論與研究目的

許多研究報告指出細胞生長環境中的養分、溫度、供氧量、酸鹼度、滲透壓等因子的改變會造成細胞生理與細胞生長的變化。西元 1958 年，Schaechter 等人研究 *Salmonella typhimurium* 時首先發現細胞內巨分子的組成會受到生長速率的增加而改變 (Schaechter *et al.*, 1958)。之後的研究也陸續證實 DNA、RNA、核糖體 (ribosome) 等巨分子會隨生長速率不同而改變。

大腸桿菌內蛋白質表現量多寡取決於轉錄的 mRNA 表現量、轉錄後的 mRNA 穩定性及轉譯效率。mRNA 表現量之調控機制在先前的科學研究中已有明確概念，但在 mRNA 穩定性的調控機制方面，因原核生物 mRNA 半衰期比真核生物短許多 (Rauhut and Klug, 1999)，不易進行相關研究，一直到近十年來才有較多的研究報告 (Xu and Cohen, 1995)。其中以 RNase E 為主體架構的 degradosome 是探討大腸桿菌 mRNA 穩定性中最重要的發現之一 (Miczak *et al.*, 1996)。

大腸桿菌屬於兼性厭氧菌 (facultative anaerobes)，在有氧環境下進行有氧呼吸的代謝路徑；而在無氧環境下，可藉醱酵 (fermentation) 的代謝途徑而獲得能量。延胡索酸酶 (fumarase) 為檸檬酸循環 (TCA cycle) 中重要的一員，在大腸桿菌內有三種延胡索酸酶，分別為 FumA、FumB 及 FumC。在有氧呼吸時，FumA 與 FumC 負責催化檸檬酸循環中延胡索酸 (fumarate) 轉變為蘋果酸 (L-malate) 的步驟，當無氧發酵時，則由 FumB 將蘋果酸催化為延胡索酸。有氧環境下，FumA 蛋白質會被大量表現，FumB 在無氧環境下才表現，FumC 則是當細胞受到高氧應力時才會被誘導。

先前本實驗室研究曾發現，細菌生長會受到培養基碳源的影響，因此本論文即探討不同碳源下 *fumA* 基因的表現情形，我們分別從轉錄、轉錄後及轉譯三個層次進行觀察。此外本實驗室也發現，*fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性會隨

生長速率上升而上升，因此在本論文中也探討了影響 *fumA* 及 *fumC* mRNA 穩定性的因子為何，希望能建立模式以了解檸檬酸循環中其他酵素調控的相關機制，並可進一步了解細菌生理與基因調控的關係。



二、文獻回顧

2.1 延胡索酸酶

延胡索酸酶 (fumarate hydratase; fumarase; EC4.2.1.2) 是大腸桿菌體內負責將延胡索酸與蘋果酸相互轉換的酵素。當細胞進行有氧呼吸時，檸檬酸循環為主要的代謝途徑，可作為醣類、脂質和蛋白質氧化過程中的共同途徑，也能提供細胞內生合成所需之碳源。因此細胞內延胡索酸酶若有任何缺失，檸檬酸循環將會中斷並造成細胞無法利用延胡索酸，此時細胞無法進行有氧呼吸而產生較少能量。

大腸桿菌為兼性厭氧菌，延胡索酸酶在有氧時參與檸檬酸循環，在無氧時進行草醯乙酸 (oxaloacetate) 到琥珀酸 (succinate) 的還原途徑，以延胡索酸做為細胞處於無氧環境下的電子接受者 (Guest, 1992)，因此不論在有氧無氧的環境下，延胡索酸酶都是大腸桿菌代謝上重要的基因。

2.1.1 延胡索酸酶之特性

已知大腸桿菌體內有三種不同的延胡索酸酶基因：*fumA*、*fumB* 及 *fumC*，各有不同的特性 (Guest and Roberts, 1983)。*fumA* 基因位於大腸桿菌基因圖譜 (linkage map) 35.5 分鐘的位置，可轉錄出 1760 bp 的 mRNA。*fumB* 基因位於大腸桿菌基因圖譜 93.5 分鐘的位置，相鄰 *mel* operon，整個構造基因有 1641 bp (Bell *et al.*, 1989)。而 *fumC* 基因也是位於大腸桿菌基因圖譜 35.5 分鐘位置，即位於 *fumA* 基因的下游，其轉錄方向與相鄰的 *fumA* 基因相同 (Guest *et al.*, 1985)，整個 *fumC* 構造基因有 1398 bp。

比較 *fumA*、*fumB* 與 *fumC* 三種基因及其產物，可將它們分為兩類：*fumA* 和 *fumB* 的基因序列很相似，其基因產物都是由兩個 60 kDa 的單體組合而成的雙體蛋白 (homodimer)，且為熱不安定性，屬於 class I enzyme。雖然

FumA 和 FumB 的結構相似，但彼此的酵素動力學性質則不同。FumA 對延胡索酸的親和性比對蘋果酸高，FumB 則相反 (Woods *et al.*, 1988)。每一個 FumA 蛋白質單體含有一個 4Fe-4S cluster，被氧化後會變成 3Fe-4S cluster 而失去活性。但可藉由加入鐵 (ferrous ammonium sulfate) 及 thiol (2-mercaptoethanol) 後，將 FumA 重新活化 (Flint *et al.*, 1992)。至於 FumC 則被劃分為 class II enzyme，同一類酵素包括 aspartase (*Escherichia coli*)、fumarase (*Bacillus subtilis*、*Saccharomyces cerevisiae*、mammalian)，這些酵素在序列上有很高的相似性，不同於 class I enzyme 的 FumA 及 FumB (Wu and Tzagoloff, 1987)。FumC 是由四個 50 kDa 的單體所組成的四分體蛋白 (tetramer) (Cassio *et al.*, 1975)，為熱安定性且其活性中心不需要鐵離子，FumC 對延胡索酸的親和性比對蘋果酸高，此點則與 FumA 相似 (Ueda *et al.*, 1991)。

2.1.2 延胡索酸酶在細胞內之調控

FumA 蛋白質在有氧條件下會大量合成，其產量比 FumB 或 FumC 高很多，但在厭氧下 *fumA* 基因表現則會受到抑制。研究指出在無氧條件下培養 *arcA* 和 *fnr* 缺失的突變株時，*fumA* 基因表現則不受抑制 (Iuchi and Lin, 1988)，此結果表示 *fumA* 基因在無氧條件下的表現可能是受 ArcA 及 Fnr 所調控。另外，最近研究發現 FumA 會受葡萄糖抑制 (Park and Gunsalus, 1995)，其原因可能是 *fumA* 啟動子上的一個 CRP (cAMP receptor protein) 結合位置所造成。

FumB 被認為是在無氧環境中表現的延胡索酸酶，在無氧環境下酵素活性較有氧環境下表現量高，但 FumB 在無氧時的表現量仍不及 FumA 在無氧下的表現量，研究報告指出 *fumB* 基因表現受厭氧下的轉錄調節子 Fnr 所調控 (Guest and Roberts, 1983; Tseng, 1997)。

FumC 在細胞內會持續被少量製造出來，且 FumC 的表現可藉著加入氧化劑而增加，這是因為 *fumC* 基因受控於 *soxRS* 調節組 (regulon) (Liochev and

Fridovich, 1992; Weaver *et al.*, 1993), 大腸桿菌在遭受高氧應力 (oxygen stress) 或受到可產生過氧化物的氧化試劑破壞時, 細胞內會被誘導出將近四十種的蛋白質, 而其中的 SoxR (superoxide response) 會在轉錄上正向調節許多蛋白質的產生, FumC 即為其中的一種蛋白質。這些誘導出的蛋白質可以用來修復 superoxide radical (O_2^-)、hydrogen peroxide (H_2O_2) 及 hydroxyl free radical ($\cdot OH$) 對細胞所造成的傷害。另外, 研究也發現鐵離子缺乏時會增加 *fumC* 基因的表現, *fumA* 基因仍持續表現但無法產生具有功能的 FumA 蛋白質, 至於 FumB 是否受鐵離子的調控, 目前仍不清楚 (Park *et al.*, 1995a)。

綜合以上結果, 可知 FumA 在微氧環境下會被大量表現, 為檸檬酸循環中主要的延胡索酸酶。FumB 則在無氧環境下才表現, 但其表現仍不如 FumA 在無氧環境的表現。而 FumC 是當細胞受到高氧應力或鐵離子濃度很低時取代 FumA 的功能 (Tseng *et al.*, 1994)。

2.2 碳源對大腸桿菌生長之影響

大腸桿菌可以利用不同碳源來進行細胞的合成與代謝, 不同碳源經過不同代謝途徑以產生不同能量及不同的生長速率。當以葡萄糖為碳源時, 細胞利用 phosphotransferase system 將細胞外的葡萄糖磷酸化後帶入細胞內進行糖解作用 (glycolysis), 代謝產物以 acetyl-CoA 為主, 並進入檸檬酸循環, 氧化後成為二氧化碳與水並產生能量。若是以醋酸為碳源, 醋酸會藉由主動運輸進入細胞, 經由 acetate kinase 與 phosphotransacetylase, 或 acetyl-CoA synthetase 將醋酸轉換成 acetyl-CoA, 之後進入檸檬酸循環。同時大腸桿菌亦可經由 glyoxylate bypass 來代謝 acetyl-CoA, 當環境中有葡萄糖時, 醋酸代謝基因通常會被抑制。

2.3 生長速率對大腸桿菌基因表現之調控

1958 年, Schaechter 等人研究 *Salmonella typhimurium* 時首先發現細胞內巨分子的組成, 如 DNA、RNA、蛋白質, 會隨生長速率的增加而增加

(Schaechter *et al.*, 1958)。不同營養源會影響細菌生長速率及大腸桿菌內基因表現改變 (Pedersen *et al.*, 1978)。在營養成分較高的環境中，細胞的生長速率較快，並擁有較穩定的 rRNA 與 tRNA (Keener and Nomura, 1996; Grunberg-Manago, 1996)。此外，研究指出生長速率對於細胞的轉錄作用、轉譯作用、染色體複製均有重要的影響，其中 RNA 聚合酶 (RNA polymerase) 活性、DNA 合成速率、RNA 合成速率及蛋白質合成速率等均受到生長速率所調控，因此細胞生長速率與基因調控的關係相當密切 (Dennis and Bremer, 1974; Bremer and Dennis, 1987)。

2.4 大腸桿菌 mRNA 之降解機制

大腸桿菌中許多蛋白質表現量，取決於 mRNA 的表現量與穩定性。轉錄作用是決定 mRNA 表現量的主要因素，mRNA 的穩定性則是和環境改變時細胞快速做出反應或與細胞週期間的轉換有關。不同基因 mRNA 的半衰期有很大差異，80% 左右的 mRNA 半衰期介於 3 到 8 分鐘，生物功能相近的基因有相似的半衰期 (Bernstein *et al.*, 2002)。

目前已知影響 mRNA 降解的因素有以下幾類：(1)核糖核酸酶 (rinonuclease)；(2) mRNA 的結構；(3)核糖體與 mRNA 結合的數目；(4)其他修飾或輔助的蛋白質。

2.5 核糖核酸酶對 mRNA 穩定性之影響

大腸桿菌中的核糖核酸酶可分為兩類：核糖核酸內切酶 (endoribonuclease) 及核糖核酸外切酶 (exoribonuclease)。

2.5.1 核糖核酸內切酶

大腸桿菌分解 mRNA 的核糖核酸內切酶，有 RNase I、RNase G、RNase III 和 RNase E 等。RNase E 與 RNase III 是目前研究最多，作用機制最清楚的

mRNA 內切酶，其功能與作用分述如下。

(1) RNase E (*rne*)

含有 1061 個氨基酸，分子量為 118 kDa，但在蛋白質膠體電泳上卻移動至 180 kDa 位置，可能是因為在 RNase E 的 C' 端含有一段 proline-rich 的序列 (Casaregola *et al.*, 1992)。RNase E 是一種多功能性的酵素，對很多 RNA 都有切割活性 (Ono and Kuwano, 1979)，包括可以啟始許多 mRNA 的降解，移去 mRNA 3' 端的 poly(A) tail (Huang *et al.*, 1998)，也參與了 rRNA 與 tRNA 成熟過程 (Ghora and Apirion, 1978; Li and Deutscher, 2002)。

RNase E 作用位置為單股 RNA 且 AU-rich 的序列區，RNase E 會從 mRNA 的 5' 端往 3' 端搜尋適合的切割位置 (Cohen and McDowall, 1997)。此外，RNase E 會切割自己的 mRNA，具有自我調節 (autoregulation) 能力 (Jain and Belasco, 1995)。其調節機制為：*rne* 之 5'-UTR (untranslated region) 有髮夾結構 (hairpin) (hp2)，當 RNase E 濃度升高，過多的 RNase E 蛋白質會結合上 hp2，且由 5' 端往 3' 端搜尋適合的切割位置並進行切割，導致 *rne* mRNA 快速被降解，以防止 RNase E 過度表現 (Diwa *et al.*, 2000)。

當細胞缺乏 *rne* 基因會造成大部分的 mRNA 降解不完全進而導致菌體死亡 (Belasco and Brawerman, 1993)，RNase E 在 mRNA 上的切割作用為 mRNA 降解過程的速率決定步驟 (Bouvet and Belasco, 1992)，研究顯示細胞要生存至少需要正常 RNase E 濃度的 10-20% (Jain *et al.*, 2002)，由此證明 RNase E 在維持 mRNA 的穩定性以及菌體生存上，有著極重要的角色。但因為 RNase E 也參與了 rRNA 與 tRNA 的成熟過程，所以也有科學家推測 *rne* 缺失後導致 rRNA 成熟不完全才會造成菌體死亡。此外有研究指出 tRNA 成熟不完全才是主因 (Ow and Kushner, 2002)。

(2) RNase III (*rnc*)

為一 52 kDa 的雙體蛋白 (Dunn, 1976)，位於基因圖譜 55 分鐘的位置。作

用受質為雙股 RNA (Robertson *et al.*, 1968)，切割 phosphodiester bond 產生 5'-phosphate 與 3'-hydroxyl termini，其切割位置的保留序列 (consensus sequences) 為 A/U N A G A/U G N N C A/U U N N，需鎂離子等正電荷活化。目前已知 RNase III 的功能為參與 rRNA 的成熟和起始某些 mRNA 的降解。

RNase III 可以切割 rRNA 的 primary transcript，產生 16S rRNA 與 23S rRNA 的前驅物，再和其他核糖核酸酶繼續進行 processing。RNase III 對細胞而言並非必須的，當 RNase III 缺失細胞仍可存活，可是生長速率會下降，推測是因為 rRNA 成熟過程不完全，使蛋白質合成過程有缺失導致的結果 (Talkad *et al.*, 1978)。在細菌、噬菌體與質體中，RNase III 可藉由對 mRNA 專一性的結合與切割，改變 mRNA 的穩定性或構形，使得轉譯效率改變，導致基因表現改變 (Court, 1993)。如 RNase III 可以切割 phage lambda integrase mRNA 3'-UTR 的 stem-loop 結構，使由 3' 端往 5' 端進行切割作用的核糖核酸外切酶得以進行降解作用 (Gottesman *et al.*, 1982)。

此外 RNase III 可以幫助 PNPase (polynucleotide phosphorylase) 進行自我調控，也可進行本身調控，RNase III 會切割自身 5'-UTR 處的 stem-loop 結構，如此 RNase III mRNA 就會變得不穩定，容易於被降解 (Matsunaga *et al.*, 1996)。

2.5.2 核糖核酸外切酶

實驗證實，在大腸桿菌中至少有八種核糖核酸外切酶，都是由 RNA 的 3' 端往 5' 端進行降解 (Deutscher and Li, 2001)，其中只有 PNPase、RNase II 與 oligoribonuclease 直接和 mRNA 的降解有關 (Donovan and Kushner, 1986; Ghosh and Deutscher, 1999)。

PNPase 由 *pnp* 基因產生，位於基因圖譜 69 分鐘的位置，由三個分子量為 78 kDa 的單體組成 (Regnier *et al.*, 1987)。RNase II 由 *rnb* 基因產生，位於基因圖譜 29 分鐘的位置 (Zilhao *et al.*, 1995)，分子量為 72 kDa (Donovan and Kushner, 1983)，RNase II 需要鎂離子與鉀離子來活化它 (Gupta *et al.*, 1977)。

PNPase 與 RNase II 皆作用於單股 RNA，從 3' 端往 5' 端進行降解。PNPase 利用 phosphorolytic mechanism 一次移去 1 個核苷酸，釋放出雙磷酸核苷酸，RNase II 則是利用 hydrolytic mechanism 一次移去 1 個核苷酸，釋放出單磷酸核苷酸 (Deutscher, 1993)。兩者皆對 RNA 的二級結構敏感，且無法有效率與短鏈單股核苷酸結合 (Spickler and Mackie, 2000)，所以短鏈單股核苷酸 (3-5 nucleotide) 由 oligoribonuclease 進行降解 (Ghosh and Deutscher, 1999)。

分析 *E. coli* 細胞萃取物發現，由 RNase II 進行的 hydrolytic nuclease activity 佔了 90%，由 PNPase 進行的 phosphorolytic nuclease activity 只佔了 10% (Deutscher and Reuven, 1991)，在兩者同時缺失的情況下，菌體會死亡 (Donovan and Kushner, 1986)。利用 microarray 的實驗發現，雖然 PNPase 只有 10% 的活性，但 PNPase 與其他參與 mRNA 降解的蛋白質會形成一複合體，稱為 degradosom，其中一個成員 RNA 解旋酶 (RNA helicase) 可以解開 RNA 的二級結構，使 PNPase 容易發揮作用 (Py *et al.*, 1996; Liou *et al.*, 2002)，而 RNase II 並無其他輔助蛋白質，二級結構的阻礙會使 RNase II 的能力大幅下降 (Mohanty and Kushner, 2003)。

在 *in vivo* 與 *in vitro* 實驗證實，RNase II 可以穩定某些 mRNA，如：ribosomal protein mRNAs (Pepe *et al.*, 1994; Coburn and Mackie, 1998)，其可能機制是透過抑制 PNPase 的降解作用。當 RNase II 結合上 mRNA 3' 端，若此 3' 端具有二級結構，則 RNase II 無法進行降解，而 PNPase 或 poly(A) 聚合酶 (poly(A) polymerase) 又無法結合上 mRNA，故此 mRNA 獲得保護，不被降解 (Mohanty and Kushner, 2000)。

pnp mRNA 具有自我調控機制且需 RNase III 的參與。首先 RNase III 會在 *pnp* mRNA 5'-UTR 的 stem-loop 處進行切割，結果仍剩下雙股，接著 PNPase 再進行 3' 端往 5' 端的單股切割作用，最後剩下 5'-單股 mRNA，此單股 mRNA 變得不穩定，很快的被其他酵素降解掉 (Jarrige *et al.*, 2001)。

此外，大腸桿菌中還有 RNase R、RNase BN、RNase PH、RNase D 及 RNase T 等核糖核酸外切酶，與 tRNA 的 3' 端成熟有關 (Li and Deutscher, 1996)。

2.6 mRNA 結構對其穩定性之影響

結構對 mRNA 穩定性的影響可由 mRNA 的 5' 端和 3' 端序列分別來討論。

2.6.1 5' 端結構對 mRNA 降解之影響

以 out membrane protein A (*omp A*) 的 mRNA 為例，在菌體內 *omp A* 的 5'-UTR 會形成兩個髮夾結構，阻止核糖核酸內切酶（如：RNase E）和 mRNA 結合，藉此增加 mRNA 的穩定性 (Emory and Belasco, 1990; Arnold *et al.*, 1998)。5'-UTR 抑制 mRNA 降解的現象在 RNA I 也得到證實 (Bouvet and Belasco, 1992)。此外 RNase E 比較容易切割具單磷酸 5' 端的 mRNA (Mackie, 1998)，故細胞內的 5' 端三磷酸結構可減慢 RNase E 對 mRNA 最初的降解能力，使 mRNA 穩定性增加。

2.6.2 3' 端結構對 mRNA 降解之影響

細胞內的 PNPase 和 RNase II 為核糖核酸外切酶，會從 mRNA 3' 端往 5' 端進行降解，其作用受到 mRNA 本身 3' 端有無二級結構的影響。當 mRNA 3' 端形成 stem-loop 結構，PNPase 和 RNase II 將無法與 mRNA 結合，且 stem-loop 結構也會阻礙 PNPase 和 RNase II 在 mRNA 上的移動，所以 3' 端二級結構可保護上游 mRNA 的穩定性 (Belasco *et al.*, 1993)。

近年來發現大腸桿菌中某些 mRNA 轉錄出來後，在 3' 尾端會再連接一段 poly(A)，稱為 poly(A) tail，合成 poly(A) tail 的酵素為 poly(A) 聚合酶。在真核生物 3' 端的 poly(A) tail 會增加 mRNA 的穩定性，但在原核生物中，mRNA

的 3'端有 poly(A) tail 反而會加速降解作用。poly(A) tail 對 mRNA 降解的影響詳見 2.8。

2.7 核糖體對 mRNA 穩定性之影響

早期的研究指出，利用抗生素抑制轉譯作用會影響 mRNA 的穩定性 (Pato *et al.*, 1973)。在大腸桿菌中當核糖體與 *ompA* mRNA 結合後，其 mRNA 降解速率就會下降 (Lundberg *et al.*, 1988)，RNase E 也會因為 mRNA 特殊切割位置被核糖體佔住而無法作用，因此增加 mRNA 的穩定性 (Iost and Dreyfus, 1995)。如此看來，當核糖體附著於 mRNA 上，能延緩 mRNA 被核糖核酸酶降解的速率，但也有可能在進行轉譯的過程中，mRNA 的二級結構被核糖體解開，導致 PNPase、RNase II 能夠更順利的從 3' 端開始分解 mRNA，此時核糖體所扮演的角色則轉為加速 mRNA 的降解 (Belasco *et al.*, 1993)。

2.8 其他修飾或輔助之蛋白質

除了核糖核酸酶，另有一些修飾或輔助蛋白質和 mRNA 的降解有關，如 poly(A) 聚合酶、RNA 解旋酶等。

大腸桿菌 poly(A) 聚合酶有兩種，poly(A) 聚合酶 I (*pcnB*) 及 poly(A) 聚合酶 II (Cao *et al.*, 1996)，細胞中 90% 的 polyadenylation 是由 poly(A) 聚合酶 I 完成的 (O'Hara *et al.*, 1995)。大腸桿菌與真核生物的 polyadenylation 有很大的不同，大腸桿菌中被加上 poly(A) tail 的 RNA 不到 2% (Cao *et al.*, 1996)，而且 poly(A) tail 的長度通常只有 10-40 個核苷酸 (O'Hara *et al.*, 1995)，在脊椎動物可超過 200 個核苷酸 (Brawerman, 1973)。更重要的是，在大腸桿菌中，加上 poly(A) tail 通常是標示此 RNA 將被降解 (Xu *et al.*, 1993; Kushner, 2002)。

Poly (A) tail 加速 mRNA 降解的原因目前認為是 poly (A) 提供一段單股核糖核酸序列，它會提高核糖核酸外切酶 (RNase II 或 PNPase) 與 mRNA 3' 端的結合力，加速 mRNA 降解作用 (Cohen, 1995)。已知細胞中會進行

polyadenylation 的 mRNA 有 *rpsO*、*trxA*、*lpp*、*ompA* 等。誘導增加細胞中的 polyadenylation，會使這些 mRNA 的半衰期顯著減短，但卻會穩定 RNase E 及 PNPase 的 mRNA，也增加了蛋白質產量，對 RNase II 及 RNase III 的 mRNA 則沒有影響 (Mohanty and Kushner, 1999, 2000)。

增加 polyadenylation 會穩定 RNase E 及 PNPase 的 mRNA，解釋這個現象的說法有二：

(1) 一般而言，在大腸桿菌中，polyadenylation 可以增加 mRNA 被降解的速率，但也有可能 polyadenylation 會穩定某些特定的 RNA (Sarkar, 1997)。

(2) 已知 RNase E 及 PNPase 皆具有自我調控機制。當細胞中的 polyadenylation 增加，表示被標示將要降解的 RNA 增加了，需要更多核糖核酸酶來進行降解作用，故 RNase E 與 PNPase 進行自我調控，使其 mRNA 穩定且使得蛋白質產量增多 (Mohanty and Kushner, 2002)。

poly(A) 聚合酶會受到細胞生長速率的調控，當細胞生長速率較慢，*pcnB* 表現效率較高，使得細胞內被 adenylated 的 RNA 較多 (Jasiecki and Wegrzyn, 2003)，當 polyadenylation 增加時，mRNA 的降解速率也增加 (Mohanty and Kushner, 1999)。理論上所有 RNA 的 3' 端皆是 poly(A) 聚合酶的受質，但實際上效率各有不同。23S rRNA 是很好的受質，而 16S rRNA、tRNA、5S rRNA 與無二級結構的 mRNA 接上 poly(A) tail 的效率並不高 (Mohanty and Kushner, 2000)。

RNA 解旋酶 (*rhlB*) 是 DEAD box proteins 中的一員，DEAD 為 Asp-Glu-Ala-Asp 四個氨基酸的縮寫，因為這類的蛋白質在序列中皆有一段 DEAD 高度保留區，所以稱為 DEAD box proteins。此酵素活性是將 mRNA 上的雙股結構打開，形成單股 RNA 結構，以促進 RNA 的降解。此過程需要 ATP 參與 (Py *et al.*, 1996)。不論是在 *in vivo* 或 *in vitro* 的情況下，RNA 解旋酶可以單獨和 PNPase 結合，並進行降解作用。這提供了一個可能性，也許不需要

組成複雜的 degradosome，也可以進行 mRNA 的降解 (Liou *et al.*, 2002)。但當 RNA 解旋酶和 RNase E 的 C' 端結合時，解旋酶的活性會大幅提昇 (Vanzo *et al.*, 1998)。

2.9 Degradosome

在純化 RNase E 的過程中，科學家發現與 RNA 降解有關的蛋白質會形成一複合體，稱為 degradosome。其主要組成包括 RNase E、PNPase、RNA 解旋酶、enolase，此外還有少量的 polyphosphate kinase (PPK)、GroEL 及 DnaK (Miczak *et al.*, 1996; Py *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 1997)。

RNase E 是 degradosome 中最主要的酵素，其 N' 端為酵素催化的區域，並且附著於細胞膜上進行降解作用 (Liou *et al.*, 2001)。C' 端為與其他成員結合的區域，將 C' 端突變後，並不影響細胞的生存，剩下的 RNase E 蛋白質仍有活性 (Taraseviciene *et al.*, 1995; McDowall and Cohen, 1996)。RNase E 與 PNPase 分別為 degradosome 中的內切酶與外切酶，具有分解 RNA 的功能，RNA 解旋酶可以解開 RNA 的二級結構，幫助 PNPase 進行降解。

PPK 能可逆性地催化 ATP 上 γ -phosphate 形成 polyphosphate (poly (P))。在 *in vitro* 實驗中，poly(P) 會強烈抑制 RNA 降解。但是在加入 ADP 後，抑制效果就消失了，因為此時的 PPK 又會將 poly(P) 分解，與 ADP 合成 ATP。因此 PPK 在 degradosome 內的功用可能是分解 poly(P)，再與 RNA 解旋酶水解 ATP 後所產生的 ADP 結合，製造 ATP 提供給 RNA 解旋酶重複使用 (Binnie *et al.*, 1999)。

enolase 為參與醱解反應中的一個酵素，從 2-phosphoglycerate 移走一個水分子而產生 phosphoenolpyruvate，enolase 在 degradosome 中的角色仍不清楚。DnaK 是一種熱休克蛋白 (heat shock protein)，GroEL 則是一種 chaperonin 蛋白，可以幫助蛋白質摺疊 (protein folding)，具有與 RNA 結合的能力。

目前認為 degradosome 是進行 RNA 降解的機器 (Rauhut and Klug, 1999)

，但在細胞中 mRNA 的降解是否必須依靠 degradosome 的形成，仍不清楚。2004 年，Bernstein 等人利用 microarray 做整體性的觀察，將組成 degradosome 的四個主要蛋白質：RNase E、PNPase、RNA 解旋酶與 enolase 分別做突變，結果顯示此四個蛋白質對於正常的 RNA 降解都是必須的。並且進一步推測，degradosome 會參與某些 RNA 的降解，而有些 RNA 的降解則是 degradosome-independent (Bernstein *et al*, 2004)。



三、材料與原理方法

3.1 材料

3.1.1 菌種

Escherichia coli K12 (W3110)、N3433、N3431、YHC3393、LK01

- (1) K12-W3110：為大腸桿菌野生菌株。
- (2) N3433：為 N3431 與 YHC3393 的 isogenic strain (野生菌株)。
- (3) N3431：為 *rne* 基因缺失的突變株，以溫度敏感 (temperature sensitive) 形式來調控 *rne* 基因表現與否，培養於 33°C 時為野生株，44°C 處理 30 分鐘則轉換為 *rne* 基因缺失的突變株。
- (4) YHC3393：為 *pcnB* 基因缺失的突變株，篩選菌株之抗生素為 tetracycline
- (5) LK01：為 *pcnB* 基因與 *rne* 基因雙重缺失的突變株。

K12 -W3110 由 Yale. *E. coli* 遺傳中心取得，其他菌種皆由中研院分子生物所林淑端老師所提供。N3433 是 N3431 與 YHC3393 的 isogenic strain，LK01 則是利用 P1 transduction 將 *pcnB* allele 送入 N3431 中。

3.1.2 藥品與試劑

藥品

Difco : yeast extract, tryptone, agar, casamino acid

J. T. Baker : citric acid (monohydrate), glycerol, dextrose (glucose), sodium acetate

Merck : K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl, $Na(NH_4)HPO_4 \cdot 4H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Sigma : ampicillin, tetracycline, antiform C

培養液(基)

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

Vogel-Bonner 培養液 : 10g/l K_2HPO_4 , 3.5g/l $Na(NH_4)HPO_4 \cdot 4H_2O$, 0.2g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25g/l casamino acid, 2g/l citric acid(monohydrate)

DNA 電泳分析 :

藥品

Promega : agarose

J. T. Baker : Tris-HCl, EDTA

Viogene : DNA gel extraction kit

緩衝液

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

6X DNA gel loading dye (PROtech Lot#AL24)

電泳膠體

1.0 % agarose 溶於 1 X TAE buffer 中

RNA 萃取、電泳及北方墨點分析 :

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[®],

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

J. T. Baker : HCl, NaCl, NH₄Cl,(NH₄)₂SO₄, CaCl₂, MgCl₂·6H₂O, 2-propanol,
Tris-HCl, sodium dodecyl sulfate (SDS), dimethyl sulfoxide
(DMSO)

緩衝液

PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche 1 636 090)

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

10X formaldehyde gel running buffer : 0.2 M MOPS, 80 mM sodium acetate, 10
mM EDTA (pH 7.0)

RNA gel loading dye (Ambion cat#8552)

20X SSC, pH 7.0 : 3 M NaCl, 300 mM sodium citrate

20X SSPE, pH 7.0 : 3 M NaCl, 0.2 M NaH₂PO₄·H₂O, 0.02 mM EDTA (pH 7.4)

Hybridization buffer : 5X Denhardt's solution, 33% formamide, 6.6X SSPE, 1%
SDS, 50% Dextran sulfate, filtrated

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

rifampicin solution : 1g rifampicin in 10 ml DMSO, filtrated

DEPC treated water : 1 ml DEPC in 1 L ddH₂O, shook 2 min, reacted 10 hrs,
then autoclaved

5X protein loading dye : 100mM Tris-HCl (pH6.8), 200mM Dithiothreitol, 4%
SDS, 0.2% Bromophenol blue, 20% glycerol

電泳膠體

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

formaldehyde

蛋白質萃取、電泳及西方墨點分析

緩衝液

Lysis buffer : KH_2PO_4 , 100mM , pH7

Bio-Rad Protein Assay kit II (Bio-Rad, Cat: No. 500-0002)

1X SDS running buffer : Tris base 1.51g, glycine 9.4g, 10%SDS 5ml in 500ml
 dH_2O

Transfer buffer : glycine 2.93g, Tris base 5.82g, SDS 0.37g in 800 ml dH_2O +
200ml methanol

Blocking solution : skim milk 5g, 1X PBS 100ml, Tween20 200 μl

1X PBS : NaCl 8g, Na_2HPO_4 1.44g, KH_2PO_4 0.24g, PH7.4 in 1L dH_2O

PBST : 0.05% Tween20 + 1X PBS

ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham pharmacia, Cat:
RPN2106)

電泳膠體

SDS-PAGE gel (10% polyacrylamide gel)

10% resolving polyacrylamide gel

5.9ml ddH₂O, 5.0ml 30% acrylamide mix, 3.8ml 1.5M Tris(pH8.8), 1.5 ml

10% SDS, 0.15 ml 10% ammonium persulfate, 6ul TEMED

5% stacking gel

2.7ml ddH₂O, 0.67 ml 30% acrylamide mix, 0.5ml 1.0M Tris(pH6.8), 40ul

10% SDS, 40ul 10% ammonium persulfate, 4ul TEMED

3.2 原理

3.2.1 批次式培養 (batch culture) 之細胞生長模式

批次式培養是指在細胞的培養過程中不再添加任何新鮮的培養液，僅於開始時提供一定量的培養液供細胞生長所需。由於細胞的生理狀況、培養液的組成及細胞代謝產物等因素均會影響細胞生長，因此批次式培養時，依細胞生長濃度與所需時間可作出一條生長曲線 (growth curve)。

在批次式培養過程中，細菌的生長可分為以下六個時期：

(1) 遲滯期 (lag phase)

細菌開始適應新的環境，菌體的重量增加，但不會分裂繁殖。

(2) 加速生長期 (accelerated growth phase)

菌體開始進行分裂，細胞數目增加，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)

細胞以最高生長速率進行分裂，在一定的時間內分裂一次，此時期菌體的數目會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降低。

(5) 平原期 (stationary phase)

細菌的增殖速率與死亡速率相等，細胞數目維持一定。

(6) 死亡期 (death phase)

因養分已被細菌耗盡，而過量代謝產物的累積導致菌體的毒害作用。若細菌的死亡速率較其增殖速率快，則細胞數目會開始降低。

本實驗中對細菌生理及生長速率的研究均取對數生長時期的菌體加以分析。

3.2.2 連續式培養之動力學模式

基於研究或工業所需，可利用連續式培養法將菌體維持在對數生長期。連續式培養法是藉由控制無菌培養液流入醱酵槽之流速，並以相同的速率將醱酵槽內的含菌培養液排出，藉此將醱酵槽內菌體維持在對數生長期。

連續式培養法依流量控制方式之不同可分成兩種形式。

(1) 化學恆定 (chemostat) 之連續式培養

利用可調式幫浦直接控制流速，同時由醱酵槽內移除等體積的菌液，維持槽中菌體處於恆定狀態。流進的無菌培養液中，除了限制生長所需之單一營養因子 (growth-limiting nutrient) 外，其餘養份皆足以供應細菌生長所需。此法可控制菌數處於穩定狀態 (steady state)，這種在菌數穩定狀態下，培養液養分維持一定的方法稱為化學恆定連續式培養。本實驗即採用此法。

(2) 濁度恆定 (turbidostat) 之連續式培養

以光電管來控制無菌培養液之流量，此法可以很敏銳地偵測醱酵槽中細胞濃度的變化。一旦槽體中菌體的吸光度異於設定值，光電管將發出訊號來調控無菌培養液之流量，藉以維持菌數恆定。

連續式培養之動力學模式如下：

當連續式培養達到穩定狀態時，對反應槽中細胞質量作質量平衡

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

$$FX_0/V - FX/V + \mu X - \alpha X = dX/dt \text{ ----- (3-1)}$$

| | | |
|----|----------------------|-------------------------|
| 其中 | X_0 : 進料時的細胞質量 | X : 細胞質量 |
| | μ : 比生長速率 (1/hr) | α : 比死亡速率 (1/hr) |
| | F : 流量 (1/hr) | V : 培養液體積 (l) |

T : 時間 (hr)

由於進料是滅菌後之培養液，為無菌狀態（即 $X_0=0$ ），再者於連續式培養中，比生長速率遠大於死亡速率（ $\mu \gg \alpha$ ），因此（3-1）式可以簡化如下：

$$(\mu - F/V) X = dX / dt \text{ ----- (3-2)}$$

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

$$dX / dt = 0$$

因此由（3-2）式可得

$$\mu = F / V \text{ ----- (3-3)}$$

又（3-3）式中 F/V 可定義為

$$D = F / V, \text{ 且 } D = 1 / \tau$$

其中 D：稀釋速率

τ ：培養液流經醱酵槽體的平均滯留時間（residence time, hr）

因此在化學恆定之連續式培養中，僅需決定進料流量（F）或稀釋率（D）便可以控制細菌的比生長速率（ μ ）。

3.2.3 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，進行引子下游的序列合成（extention），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。

3.2.4 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：

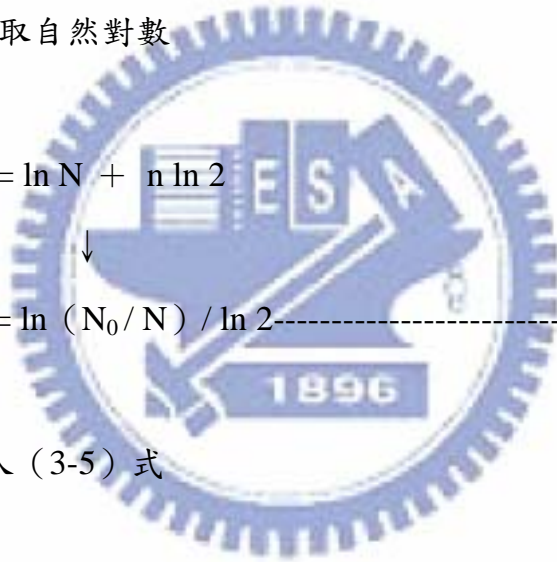
$$N = N_0 / 2^n \text{ ----- (3-4)}$$

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


$$\begin{aligned} \ln N_0 &= \ln N + n \ln 2 \\ \downarrow \\ n &= \ln (N_0 / N) / \ln 2 \text{ ----- (3-5)} \end{aligned}$$

$\ln 2 = 0.693$ 代入 (3-5) 式

$$\begin{aligned} n &= \ln (N_0 / N) / 0.693 \\ \downarrow \\ n &= 1.443 \times \ln (N_0 / N) \text{ ----- (3-6)} \end{aligned}$$

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 $N = 1/2 N_0$ 。

3.3 方法

3.3.1 大腸桿菌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 恆溫震盪箱以轉速 200 rpm 進行批次培養。菌株活化後則以 LB 培養基做為繼代保存培養基，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的菌落，置於 4°C 冰箱保存。

(2) 批次式培養法

將活化後的菌株於三角錐形瓶內，以 100 ml VB 為基礎培養液，葡萄糖或醋酸為碳源 (10 mM)，在 37°C 恆溫水浴槽中，轉速 150 rpm 進行批次培養，培養至 $OD_{600} = 0.3 \sim 0.4$ ，抽取 mRNA 進行實驗。

(3) 連續式培養法

本實驗所採用的是化學恆定之連續式培養，以稀釋速率 (D) 控制比生長速率 (μ)，藉此來控制細菌的不同比生長速率。

(i) 培養液之製備方法

連續式培養是利用 Vogel-Bonner 培養液作為基礎培養液，加入葡萄糖作為碳源，使培養液僅有 2.25 mM 的限量碳源 (carbon limited)。利用 20 公升的儲水桶 (Nalgene cat No. 2250-0050)，每桶裝 17 公升的 Vogel-Bonner 培養液，同時加入 2 ml 消泡劑 (antifoam C)，配製後於 121°C，1 大氣壓下滅菌 100 分鐘，滅菌後於 4°C 保存備用，欲使用前再添加已滅菌之所需碳源。

(ii) 連續式培養系統之裝置

連續式培養系統可分為四個部份：醱酵槽體、流速測定管、培養液供應桶、廢液收集桶，分述如下。

(a) 醱酵槽體之組裝

醱酵槽體為連續式培養系統之主體。將槽身及其上的進料管與出料管洗淨後，加入 1 公升的一次逆滲透水於槽內，將頭蓋板 (headplate) 安置於槽身。滅菌前，先用空氣幫浦測試槽體是否密閉，再將冷凝管上的矽膠管開口接上過

濾器 (0.22 μm)，除冷凝管之開口不得封閉外，其餘各開口及接頭均用鐵夾封閉並在接頭處包上錫箔紙，以防止滅菌後的污染。

(b) 流速測定管

將測定管上方開口用棉花塞住，然後在接頭處包上錫箔紙，測定管尾端接上三叉管，三叉管兩端分別接上矽膠管而分成兩條通路，兩端開口各接上一個接頭。一個接頭與醱酵槽體進料管相接，另一個接頭則與培養液供應桶進料管相接。

(c) 培養液供應桶

利用每桶裝 17 公升之 Vogel-Bonner 培養液的儲水桶作為培養液供應桶，桶蓋上的兩個接頭，各連接著矽膠管，各矽膠管開口均接上一個接頭，其中一個接頭與流速測定管相接；另一個接頭則與過濾器 (0.22 μm) 相接，目的在於平衡儲水桶內外壓差並過濾空氣，所有開口及接頭均用鐵夾封閉並在接頭處包上錫箔紙，以防止滅菌後的污染。

(d) 廢液收集桶

廢液收集桶為一個空的 20 公升儲水桶。桶蓋上亦有兩個接頭，各連接著矽膠管，各矽膠管開口均接上一個接頭，一個接頭與醱酵槽體出料管相接以收集廢液，另一個接頭與裝有棉花之注射針筒的筒身相接，筒身開口以錫箔紙封閉，目的也在於平衡桶子內外壓差並過濾空氣，所有開口及接頭均用鐵夾封閉並在接頭處包上錫箔紙，以防止滅菌後的污染。

醱酵槽體、流速測定管、廢液收集桶三者可同時置於 121 $^{\circ}\text{C}$ ，1 大氣壓下滅菌 30 分鐘。滅菌後將此三部份及培養液供應桶的接頭相連接，於連接過程皆需過火且快速完成，各連接處包上錫箔紙以避免整個連續式培養系統污染。

(iii) 接菌

連續式培養系統於裝置完成後，安裝於蠕動幫浦之進料管管徑大小不一，須於實驗前利用流速測定管測定蠕動幫浦所控制之實際流速，以視為設定培養液流速的依據。接菌前需將槽體內裝的一次逆滲透水全部置換成培養液，所需

培養液約為 1 公升，而槽體通氣量則是以氣體流量計來控制。菌株欲進行連續式培養前，需先於 37 °C 之恆溫振盪培養箱內，以 20ml LB 培養液培養至對數生長期，作為接菌用母菌。接菌前須在無菌操作台內，將母菌菌液吸入於 20 ml 無菌注射針筒內，接著以 70 % 酒精消毒醱酵槽體的接菌口後，迅速將菌液注入槽體內。接菌完成後，先進行批次培養，菌體到達對數生長期後，再啟動已設定好之蠕動幫浦以控制培養液流速，進而控制細菌的生長速率。

(iv) 連續式培養法的條件設定

BIOFLO III (New Brunswick Scientific Co.) 醱酵槽體的體積為 1.5 公升，實驗條件為培養液體積 1 公升，培養溫度為 37°C，槽體內葉片攪拌速率為 500 rpm，低溫冷卻槽的溫度控制在 10 °C。槽體內通氣量則控制於每分鐘 2 公升，屬於高通氣量。

(v) 細菌生長速率之控制

欲控制槽體內的細菌生長速率，可藉由控制菌體之稀釋速率而達到此目的。而調整蠕動幫浦的設定值可以調控培養液流入槽體之流速，間接調控菌體之稀釋速率，進而控制槽體內細菌生長速率。欲培養細菌處於某一特定生長速率之狀態，至少須在改變培養液流速後，相隔 6 倍體積的反應槽內培養液滯留時間 (reactor residence time, τ) 才收取菌液，此舉可確保菌體完全處於穩定狀態。本實驗皆在菌體達到穩定狀態後才收集樣本。

3.3.2 大腸桿菌總 RNA 製備方法

收集 10 ml 菌液 ($OD_{600} = 0.3 \sim 0.4$) 置於離心管內，迅速插於 -80°C 的酒精桶內冰浴 10 秒鐘後迅速插於冰上，並立刻以 6,000 rpm 在 4°C 下離心 10 分鐘。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 μ 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，丟棄下層液，將上清液吸取到另一乾淨離心管內，加入 400 μ l 2-propanol 及 40 μ l 3 M sodium acetate (pH 5.2)，置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱內 30 分鐘，沉澱 RNA。然後於 4 $^{\circ}$ 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 ml 清洗一次，再於 4 $^{\circ}$ 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 10 分鐘，待沉澱物成半溶解狀態時加入適量 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 $^{\circ}$ C 冰箱內保存。

3.3.3 mRNA 穩定性測定方法

收集 100 ml (OD₆₀₀ = 0.3 ~ 0.4) 菌液，將菌液置於 37 $^{\circ}$ 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 500 μ 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 $^{\circ}$ C 酒精桶內冰浴 10 秒鐘，迅速插於冰上。其他 RNA 萃取步驟請參照大腸桿菌總 RNA 製備方法 (4.2.2)。

3.3.4 北方墨點法 (Northern blotting analysis)

(1) RNA 電泳分析

(i) 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。

(ii) 樣品製備

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

(iii) 樣品變性 (denature) 及電泳處理

將樣本置於 65 °C 水浴 10 分鐘後，取出插至冰上，加入 5 μ l 染劑 (6X RNA loading 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。

(iv) 膠體染色

電泳完成後，將膠體浸泡於 150 ml EtBr (Ethidium bromide) 染液 (0.5 μ g/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。

退染後若看到的 rRNA 非常明顯 (sharp)，則進行 RNA 轉漬。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，且略大於膠體。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 20X 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 20X 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，接著把溼潤的 nylon membrane 置於膠體上，再放一張 8 \times 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 \times 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，用此段 DNA 來做為核酸探針，其做法敘述如下：將 63 μ l 滅菌二次逆滲透水，10 μ l 10X PCR reaction buffer，10 μ l DIG-labeling mixture，8 μ l(25 ng/ μ l) DNA 模版，4 μ l(20 μ M) primer 1 與 primer 2，5 units *Taq* DNA polymerase，依序放入 0.5 ml 的微量離心管內 (ependorff tube)，最終體積為 100 μ l。混合均勻後放入聚合酶溫度循環機進行反應。

PCR 設定溫度如下：

將上述微量離心管內混合液先於 95°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：

- (i) 95°C，1 分鐘：使兩股 DNA 模板分開。
- (ii) 60°C，1 分鐘： primer 與 DNA 模板結合。
- (iii) 72°C，1 分鐘： DNA polymerase 合成新股 DNA。

重覆上列溫度循環 30 次，之後進行 72°C，反應 10 分鐘，使最後一次合成未完全的 PCR 產物合成完全，最終保存溫度設定為 4°C。

本實驗 *fumA* 核酸探針的 primer A1 及 primer A2 的序列如下：

primer A1：5'-GTTACTGACGCCGGGAAACTG-3' (22 mer)

primer A2：5'-CCAAGATTTTGCCTTCGATCA-3' (22 mer)

fumA 核酸探針的預期長度為 250 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 250 bp，約在 300 bp ~ 400 bp 之間。

fumC 核酸探針的 primer C1 及 primer C2 的序列如下：

primer C1：5'-GATTATGCTCGAGCATCGCTACCCA-3' (25 mer)

primer C2 : 5'– CGACGAATTCCCGCTGGCTATCTGGCA –3' (27 mer)

(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 hybridization buffer，於 42°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。之後加入 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 42°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 2 X 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 0.1 X 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 倍濃度的 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 Brovine Serium 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 μ l 的 anti-DIG-AP (Roche Cat. No. 1 093 274) 加入 30 ml 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 μ l 的 CSPD[®] 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，於室溫下避光進行反應 15 分鐘。反應後於暗房內以 X 光底片 (Kodak XAR-5) 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。

3.3.5 蛋白質上清液之製備

以批次式培養法進行不同碳源的培養，待細胞生長達對數期便可收集樣本，樣本一收集後需立刻置於冰上 10 分鐘，目的在停止菌體的生長。然後於 4 °C，6,000 rpm 離心 10 分鐘。將沉澱菌塊溶於 1ml 100mM phosphate buffer (pH 7.6)，再利用超音波震盪器於冰塊中打破細胞。調整超音波以 2 分鐘為一個週期，其中 10 秒超音波震盪，10 秒停止，可以得到打破細胞的溶胞產物 (lysate)。溶胞產物於 4 °C，12,000 rpm 離心 30 分鐘，離心後取出上清液即為蛋白質上清液，樣本可置於 -20 °C 保存。

3.3.6 蛋白質濃度測定

上清液中蛋白質的定量係採用 Bradford 於 1976 年所發表的原理。利用 Coomassie Blue G-250 在酸性溶液下為紅棕色，當它與帶正電的蛋白質相鍵結後會變成藍色，而因蛋白質濃度的不同而反應後所生的顏色也有程度上的變化，再利用分光光度計於 OD₅₉₅ 測定吸光值，經由標準溶液內蛋白質的量與吸光值作關係圖，即可換算出上清液蛋白質的含量。

利用已知濃度的 Bovine serum albumin (BSA) 溶液為標準，取 45μl BSA 溶

液稀釋 10 倍，再依序取不同體積的 BSA 溶液 (10、20、40、60、80、100、120 μ l) 加入 200 μ l 的染劑 (Coomassie Brilliant Blue G-250 dye)，並加無菌水至總體積為 1 ml，以分光光度計 (spectrophotometer) 測量 OD₅₉₅ 的吸光值，作出吸光值與濃度關係的標準曲線。之後取適當體積的蛋白質上清液 (約 5 μ l)，加入 200 μ l 的染劑，並加無菌水至總體積為 1ml，以分光光度計測量 OD₅₉₅ 的吸光值，將吸光值與標準曲線比較並換算出蛋白質濃度，以得知細胞萃取液內總蛋白質濃度。

3.3.7 蛋白質凝膠電泳法

首先以酒精擦拭組成鑄膠器的各部分，將鑄膠器架設好，依照配方配製 12% 下層的 resolving gel 溶液，注入鑄膠器內至距離上方約 2.5 cm，再小心加上一層水層使凝膠水平，在室溫下靜置約 30 分鐘後將水層倒掉，配製 5% stacking gel 溶液，注入鑄膠器內並插入齒梳 (comb)，在室溫下靜置約 30 分鐘待膠完全凝固，將作好的膠體移至電泳槽中，拿掉齒梳並加入電泳緩衝液 (Tris-glycine running buffer) (5mM Tris-base, 50mM glycine, 0.1% SDS)。將細胞萃取液依照定量結果取出適量蛋白質樣品 (10 μ g)，依照樣本體積加入 5X loading dye (300mM Tris-Cl, pH6.8, 10% SDS, 0.125% bromophenol blue, 50% glycerol, 25% 2-mercaptoethanol)，於沸水中加熱 5 分鐘後置於冰上，之後於電泳膠體的 well 中依序置入 marker 及樣本，以電壓 80 伏特 進行電泳，直到樣本由 stacking gel 移至 resolving gel 中，改變電壓為 100 伏特，持續進行電泳直到所有染劑皆由膠體底部跑出為止。

3.3.8 西方墨點法 (Western blotting analysis)

預先浸泡數張 3MM paper 在 transfer buffer (39mM glycine, 48mM Tris-base, 0.037% SDS, 20% methanol) 中約 10 分鐘，此外將 PVDF membrane 以甲醇 (methanol) 浸泡約 5 分鐘後，也浸泡在 transfer buffer 中備用。在蛋白

質凝膠電泳完成之後，將膠體由電泳裝置中取出，在膠體右上方作記號，浸泡在 transfer buffer 約 5 分鐘，之後依序將 3MM paper、膠體、PVDF 膜、3MM paper 由負極至正極在 gel holder cassette 裝置上排列好，並確認無氣泡產生，放入裝有 transfer buffer 的直立電泳槽中，確認擺放及電流方向，並放入一個低溫的冰寶以維持電泳時的低溫。以 200 毫安培定電流電泳 2 小時，轉移完成後將 membrane 取出，把含有蛋白質樣本的那一面朝上，放在保鮮盒內並加入 blocking reagent (5% skim milk, 0.2% Tween-20) 進行 blocking，放置在 shaker 上輕搖，室溫下 1 小時或 4°C 下過夜。之後將溶液倒出，加入含有一級抗體的溶液，放置在 shaker 上輕搖，室溫下 1 小時，倒出含有一級抗體的溶液後以 PBST (1X PBS, 0.05% Tween 20) 溶液清洗 3 次，每次 5 分鐘，再加入含有二級抗體的溶液，放置在 shaker 上輕搖，室溫下 1 小時，再以 PBST 溶液清洗 3 次，每次 5 分鐘。清洗完畢後將溶液完全取出，在 membrane 上加入混合好的 ECL 溶液，使溶液完全覆蓋在 membrane 上作用約 2 分鐘，將多餘的溶液去除，把 membrane 移至壓片裝置中，於暗房進行壓片及沖洗底片以觀察結果，之後將 PVDF 膜以 amido black (0.1% amido black, 40% methanol, 10% acetic acid) 染色以確認 loading 蛋白質總量。

利用掃描器將底片掃成 .tif 圖檔存進電腦中，再利用 Zero-Dscan 軟體偵測每一個訊號帶的強度，即可得到不同碳源生長條件下蛋白質量的變化情形。

四、結果

4.1 不同碳源對大腸桿菌 *fumA* 基因表現之影響

本實驗為批次式培養條件下，碳源為 10mM 葡萄糖或 10mM 醋酸，探討不同碳源對大腸桿菌 *fumA* 基因在轉錄、轉錄後及轉譯三個層次的影響。所利用的菌株為野生株 (K12-W3110)、N3431 的 isogenic strain (N3433) 及 RNase E 單基因突變株 (N3431) (見表一)。RNase E (*rne*) 是近年來研究大腸桿菌 mRNA 降解的重要酵素，RNase E 對許多 RNA 都有切割的活性，一旦 RNase E 缺失會導致菌體死亡。因此利用溫度敏感的方式來構築 *rne*⁻ 突變株 (N3431)。當 N3431 培養於 33°C 時，RNase E 正常表現，一旦轉置於 44°C 恆溫水浴槽 30 分鐘後，*rne* 完全不轉錄，成為 *rne*⁻ 突變株。

4.1.1 不同碳源對大腸桿菌 *fumA* 基因在轉錄層次之影響

將大腸桿菌 K12-W3110、N3433 及 N3431 分別培養於 10mM 葡萄糖或 10mM 醋酸的生長基質中，當細胞處於對數生長期且 N3431 經 44°C、30 分鐘誘導 *rne* 基因突變後，萃取大腸桿菌的總 RNA，取定量的總 RNA 進行膠體電泳。經由 EtBr 染色後可以得到(圖一 B)的電泳圖，其中兩條亮帶分別為 23S rRNA 與 16S rRNA。23S rRNA 為 2904 個核苷酸，16S rRNA 為 1541 個核苷酸。可經由兩亮帶的訊號強度作為 internal control，重複確認定量之正確與否，之後再以我們所製備的 *fumA* 基因單股 DNA 作為探針，進行北方墨點分析，得到(圖一 A)的結果。將所得的結果利用 Zero-Dscan 軟體測定各訊號的強度，可知不同條件下 *fumA* mRNA 表現量的變化。

實驗結果發現，無論是 K12-W3110、N3433 或 N3431，菌株以醋酸為碳源時，*fumA* mRNA 表現量皆大於以葡萄糖為碳源時(見圖一)。在 K12-W3110 中，以醋酸為碳源時，*fumA* mRNA 表現量較以葡萄糖為碳源時上升了 4 倍，在

N3433 中則上升 23 倍，在 N3431 中上升 21 倍。

4.1.2 不同碳源對大腸桿菌 *fumA* 基因在轉錄後層次之影響

將大腸桿菌 K12-W3110、N3433 及 N3431 培養於 10mM 葡萄糖或 10mM 醋酸的生長基質中，當細胞處於對數生長期且 N3431 經 44°C、30 分鐘誘導 *rne* 基因突變後，加入 rifampicin 停止 mRNA 的新合成。rifampicin 會與大腸桿菌 RNA polymerase 的 α subunit 形成鍵結而抑制轉錄的啟動，如此可使 mRNA 停止生成，細胞中僅會進行降解反應。在加入 rifampicin 後的不同時間點抽取菌體總 RNA，取定量總 RNA 進行北方墨點法，所得結果利用 Zero-Dscan 軟體測定各訊號的強度，並以 mRNA 半衰期計算公式加以計算（請參考 3.2.4 mRNA 半衰期計算原理），即可測定大腸桿菌 *fumA* mRNA 的半衰期。

實驗結果發現，無論是 K12-W3110、N3433 或 N3431，在細胞以葡萄糖為碳源時，*fumA* mRNA 的半衰期皆大於以醋酸為碳源時（見圖二）。K12-W3110 以葡萄糖為碳源時，*fumA* mRNA 半衰期為 2.5 分鐘，以醋酸為碳源時則為 1.5 分鐘。N3433 以葡萄糖為碳源時，*fumA* mRNA 半衰期為 3.2 分鐘，以醋酸為碳源時則為 2.1 分鐘。N3431 以葡萄糖為碳源時，*fumA* mRNA 半衰期為 9.8 分鐘，以醋酸為碳源時則為 3.8 分鐘（見表二）。

4.1.3 不同碳源對大腸桿菌 FumA 蛋白質在轉譯層次之影響

利用批次式培養，將大腸桿菌 K12-W3110、N3433、N3431 培養於 10mM 葡萄糖或 10mM 醋酸的生長基質中，當細胞處於對數生長期且 N3431 經 44°C、30 分鐘誘導 *rne* 基因突變後，將菌體立刻放在冰上 10 分鐘，終止細胞所有反應。之後低溫離心蒐集菌體，並以超音波震盪的方式打破細胞，抽取菌體總蛋白質，取定量總蛋白質進行膠體電泳，再以 FumA 的抗體進行西方墨點法，所得結果利用 Zero-Dscan 軟體測定各訊號的強度，即可知在不同碳源下 FumA 蛋白質的變化量。

實驗發現細胞以葡萄糖為碳源時，無論是 K12-W3110、N3433 或 N3431，FumA 蛋白質表現量皆大於以醋酸為碳源時。K12-W3110 以葡萄糖為碳源時，FumA 蛋白質表現量較醋酸為碳源時上升 0.1 倍，在 N3433 中則上升 0.2 倍，在 N3431 中上升 1.1 倍（見圖三）。

4.2 影響 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的因素

由前述結果可發現，大腸桿菌培養在不同碳源下，*fumA* mRNA 的穩定性也有所不同。目前認為影響 mRNA 穩定性的因素有四大類：(1)核糖核酸酶，(2) mRNA 的結構，(3)核糖體與 mRNA 結合的數目，(4)其他修飾或結合上 mRNA 的蛋白質。

近年來發現一些參與大腸桿菌 mRNA 降解的酵素會以 degradosome 的複合體存在，其組成有 RNase E、PNPase、RNA 解旋酶與 enolase，而 RNase E 是 degradosome 中最主要的酵素 (Miczak *et al.*, 1996; Py *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 1997)。此外，大腸桿菌中某些 mRNA 轉錄出來後，在 3' 尾端會再連接一段 poly(A) tail，合成 poly(A) tail 的酵素為 poly(A) 聚合酶 (*pcnB*)。目前認為 poly(A) tail 提供了一段單股核糖核酸序列，可以提高核糖核酸外切酶 (RNase II 或 PNPase) 與 mRNA 3' 端的結合力，進而加速 mRNA 降解作用 (Xu *et al.*, 1993; Kushner, 2002)。

本實驗是利用醱酵槽進行連續式培養，藉由控制培養液的稀釋倍數來控制細胞生長速率。條件設定為葉片轉速 500 rpm，通氣量為 2L/min，以 Vogel-Bonner (VB) 培養液作為基礎培養液，加入葡萄糖作為碳源，使培養液僅含 2.25 mM 的限量碳源，培養液流速分別控制在 4 ml/min、8 ml/min、12 ml/min 及 16 ml/min（比生長速率各為 0.24/h、0.48/h、0.72/h、0.96/h），藉此控制細胞的生長速率。利用 N3431 的 isogenic strain (N3433)、*rne*⁻ 突變株 (N3431)、*pcnB*⁻ 突變株 (YHC3393) 及 *rne*⁻、*pcnB*⁻ 雙突變株 (LK01) 來探討 RNase E 與 poly(A) 聚合酶對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的影響。

4.2.1 生長速率對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性之影響

利用醱酵槽進行連續式培養，經由控制醱酵槽培養液的流速，可控制細胞的生長速率，因此在批次式培養時，不同碳源所造成生長速率改變的因素也就被排除。本實驗為觀察生長速率對大腸桿菌 N3433 中 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的影響。

在連續式培養下，當細胞到達穩定狀態，加入 rifampicin 停止 mRNA 的新合成，並在加入 rifampicin 後的不同時間點抽取菌體總 RNA，取定量總 RNA 進行北方墨點法，所得結果利用 Zero-Dscan 軟體測定各訊號的強度，並以 mRNA 半衰期計算公式加以計算，即可測定大腸桿菌 *fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性。

實驗發現，當生長速率由 0.24/h 上升到 0.96/h，*fumA* mRNA 的半衰期由 2.2 分鐘上升到 5.4 分鐘（見表三），當生長速率由 0.24/h 上升到 0.72/h，*fumC* mRNA 半衰期由 2.5 分鐘上升到 4.4 分鐘（見表四）。可知隨著生長速率上升，*fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性也隨之上升（見圖四、圖五）。

4.2.2 RNase E 對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性之影響

RNase E 為 degradosome 的組成骨架，也在 RNA 降解上扮演了重要角色。本實驗以連續式培養 RNase E 單基因突變株 N3431，觀察不同生長速率下，RNase E 對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的影響。

將 N3431 培養於 33°C，調整細胞的生長速率，當細胞達穩定狀態，再將溫度提升至 44°C、30 分鐘使 *rne* 基因突變後，加入 rifampicin 停止 mRNA 的新合成，並在加入 rifampicin 後的不同時間點抽取菌體總 RNA，取定量總 RNA 進行北方墨點法，利用 Zero-Dscan 軟體測定實驗結果各訊號的強度，並計算 mRNA 的半衰期，即可測定大腸桿菌 *fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性。

結果顯示，當 RNase E 缺失後，不論是 *fumA* 或 *fumC* mRNA 穩定性皆隨著生長速率上升而上升（見圖六、圖七）。當生長速率由 0.24/h 上升到

0.72/h，*fumA* mRNA 的半衰期由 7.4 分鐘上升到 21 分鐘（表三）。生長速率由 0.24/h 上升到 0.96/h，*fumC* mRNA 半衰期由 17 分鐘上升到 28 分鐘（表四）。

4.2.3 poly(A) 聚合酶對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性之影響

poly(A) 聚合酶可以在 mRNA 3' 端加上一段 poly(A) tail，增加核糖核酸外切酶的活性，是目前研究 mRNA 降解中頗受重視的基因。本實驗為利用醱酵槽進行連續式培養 poly(A) 聚合酶單基因突變株 YHC3393，觀察不同生長速率下，poly(A) 聚合酶對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的影響。

以連續式培養 YHC3393，控制細胞的生長速率，當細胞達穩定狀態，加入 rifampicin 停止 mRNA 的新合成，並在加入 rifampicin 後的不同時間點抽取菌體總 RNA，取定量總 RNA 進行北方墨點法，所得結果利用 Zero-Dscan 軟體測定各訊號的強度，並計算 mRNA 半衰期，即可測定大腸桿菌 *fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性。

poly(A) 聚合酶突變後，隨著生長速率由 0.24/h 上升到 0.72/h，*fumA* mRNA 半衰期由 1.5 分鐘上升到 3.7 分鐘（表三）。當生長速率由 0.24/h 上升到 0.96/h，*fumC* mRNA 半衰期由 2.2 分鐘上升到 4.8 分鐘（表四）。可知當 poly(A) 聚合酶突變後，不論是 *fumA* 或 *fumC* mRNA 的穩定性皆隨著生長速率上升而上升（見圖八、圖九）。

4.2.4 RNase E 與 poly(A) 聚合酶對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性之影響

本實驗為以連續式培養，觀察 RNase E 與 poly(A) 聚合酶同時缺失（LK01）時，不同生長速率下，*fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的變化。

將 LK01 培養於 33°C，並且控制細胞的生長速率，當細菌生長至穩定狀態，再將溫度升至 44°C、30 分鐘使 *rne* 基因突變，而且原本 poly(A) 聚合酶也突變的情況下，加入 rifampicin 停止 mRNA 的新合成，並在加入 rifampicin

後的不同時間點抽取菌體總 RNA，取定量總 RNA 進行北方墨點法，利用 Zero-Dscan 軟體測定實驗結果各訊號的強度，並以 mRNA 半衰期計算公式加以計算，即可測定大腸桿菌 *fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性。

結果發現，當 RNase E 與 poly(A) 聚合酶都缺失的情況下，隨著生長速率由 0.24/h 上升到 0.48/h，*fumA* mRNA 的半衰期由 22 分鐘上升到 55 分鐘（表三），*fumC* mRNA 半衰期由 50 分鐘上升到 58 分鐘（表四）。可知當 RNase E 與 poly(A) 聚合酶雙重突變後，不論是 *fumA* 或 *fumC* mRNA 的穩定性皆隨著生長速率上升而上升（見圖十、圖十一）。



五、討論

5.1 不同碳源對大腸桿菌 *fumA* 基因表現之影響

本實驗以批次式培養，碳源為 10 mM 葡萄糖或 10 mM 醋酸，利用大腸桿菌野生株 (K12-W3110)、N3431 的 isogenic strain (N3433) 及 RNase E 單基因突變株 (N3431) 探討 *fumA* 基因在轉錄、轉錄後與轉譯層次的表現。

5.1.1 不同碳源對大腸桿菌 *fumA* 基因在轉錄層次之影響

在大腸桿菌內葡萄糖主要以主動運輸進入細胞，再經由醱解作用產生能量。醋酸則以 acety-CoA 的形式進入細胞，進行檸檬酸循環。相同濃度的葡萄糖與醋酸作為碳源時，葡萄糖可以提供較多的能量與碳原子，因此在批次式培養時，大腸桿菌在上述兩種不同碳源會有不同的生長速率。

在轉錄層次方面，無論是 K12-W3110、N3433 或 N3431，細胞以醋酸為碳源時，*fumA* mRNA 表現量皆大於以葡萄糖為碳源時 (見圖一)。K12-W3110 以醋酸為碳源時，*fumA* mRNA 表現量較葡萄糖為碳源時上升 4 倍，在 N3433 中則上升 23 倍，在 N3431 中上升 21 倍。此現象與利用 microarray 的結果相同 (Oh *et al.*, 2002)。

上述變化可能與 glucose catabolite repression 有關，已知 *fumA* 基因前端有 CRP binding site，基因的表現會受到 cAMP 所調控。當碳源為葡萄糖時，細胞內 cAMP 濃度下降，使 *fumA* 基因轉錄作用下降，故 *fumA* mRNA 表現量下降。因此在 cAMP 突變株中，兩種碳源的差異會大幅降低 (Tseng *et al.*, 2001)。

5.1.2 不同碳源對大腸桿菌 *fumA* 基因在轉錄後層次之影響

在轉錄後層次方面，無論是 K12-W3110、N3433 或 N3431，細胞以葡萄糖為碳源時，*fumA* mRNA 的半衰期皆大於以醋酸為碳源時 (見圖二)。當 K12-W3110 以葡萄糖為碳源，*fumA* mRNA 半衰期較以醋酸為碳源時上升 0.7 倍，在 N3433 中則上升 0.5 倍，在 N3431 中上升 1.6 倍 (見表二)。

目前已知影響 mRNA 穩定性的因素有四類：(1) 核糖核酸酶，(2) mRNA 的結構，(3) 核糖體與 mRNA 結合的數目，(4) 其他修飾或結合上 mRNA 的蛋白質。

本實驗室之前利用 *rne-lacZ* fusion 測試 *rne* 的表現，結果顯示細胞以葡萄糖為生長碳源，*rne* 的表現量較低，以醋酸為生長碳源，*rne* 的表現量較高（許慧珊, 2004）。同時我們在 *fumA* 基因序列中也發現 RNase E 的可能切點（見附圖一），由此推測細胞以葡萄糖為碳源時，*rne* 的表現量較低，所以 *fumA* mRNA 較穩定

以不同碳源培養細胞時，除了碳源會影響基因表現外，碳源所造成的生長速率不同也應列入考慮。利用葡萄糖為生長碳源會造成較高的生長速率，以 N3433 為例，細胞分裂一次的時間為 48 分鐘，利用醋酸為生長碳源則生長速率較低，以 N3433 為例，細胞分裂一次的時間為 125 分鐘。根據文獻指出生長速率較快，細胞內核糖體的數目也會增加 (Miura *et al.*, 1981; Nomura *et al.*, 1984)，而 mRNA 上結合的核糖體數目越多，mRNA 會越穩定 (Iost and Dreyfus, 1995)，因此生長速率較快時 *fumA* mRNA 也可能較穩定。

5.1.3 不同碳源對大腸桿菌 FumA 蛋白質在轉譯層次之影響

在轉譯層次方面，細胞以葡萄糖為碳源時，無論是 K12-W3110、N3433 或 N3431，FumA 蛋白質表現量皆大於以醋酸為碳源時。K12-W3110 以葡萄糖為碳源時，FumA 蛋白質表現量較以醋酸為碳源時上升 0.1 倍，在 N3433 中則上升 0.2 倍，在 N3431 中上升 1.1 倍（見圖三）。

綜合上述實驗結果，無論是 K12-W3110、N3433 或 N3431，在轉錄層次，以醋酸為碳源 *fumA* mRNA 表現量皆大於以葡萄糖為碳源。在轉錄後層次，以葡萄糖為碳源 *fumA* mRNA 皆較醋酸為碳源時穩定。而在轉譯層次，以葡萄糖為碳源 FumA 蛋白質表現量皆大於以醋酸為碳源時。因此推斷影響 FumA 蛋白質表現量主要是轉錄後層次的調控。

本實驗室之前觀察碳源與生長速率對 *fumA* 與 *fumC* 基因表現影響的實驗是利用大腸桿菌野生株 K12-W3110，而觀察核糖核酸酶對 *fumA* 與 *fumC* 基因

表現影響則需以 N3431 的 isogenic strain N3433 作為實驗菌株，故在本實驗中將兩者做個比較。結果可發現，K12-W3110 不論是以葡萄糖或醋酸為碳源，mRNA 表現量、mRNA 穩定性與 FumA 蛋白質表現量皆小於 N3433，即用來構築 RNase E 突變株的 N3433 在分子調控上與 K12 有相同趨勢，只是 N3433 表現較高。

5.2 生長速率對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性之影響

本實驗是利用醱酵槽進行連續式培養，經由控制培養液的稀釋速率可以控制細胞的生長速率。以 Vogel-Bonner (VB) 培養液作為基礎培養液，加入 2.25 mM 葡萄糖作為碳源，控制細胞比生長速率為 0.24/h、0.48/h、0.72/h 與 0.96/h。利用 N3433 觀察生長速率對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的影響。

由表三、表四可知，當生長速率由 0.24/h 上升到 0.96/h，N3433 *fumA* mRNA 的半衰期由 2.2 分鐘上升到 5.4 分鐘，生長速率由 0.24/h 上升到 0.72/h，*fumC* mRNA 半衰期由 2.5 分鐘上升到 4.4 分鐘。可知隨著生長速率上升，*fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性也隨之上升，顯示 *fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性受到生長速率的調控 (growth-rate dependent)。

本實驗室先前利用大腸桿菌 K12-W3110 觀察生長速率對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的影響，結果發現隨著生長速率上升，*fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性也隨著上升，其結果與本實驗相同 (見附圖二)。此外，FumA 與 FumC 蛋白質的活性也受到生長速率的調控 (Tseng *et al.*, 2001)。目前已知會受到生長速率調控的基因有 ribosomal proteins (Dennis and Bremer, 1974)、glucose 6 phosphate、6-phosphogluconate dehydrogenase (Wolf *et al.*, 1979)、chloramphenicol acetyltransferase、OmpA (Nilsson *et al.*, 1984)、succinate dehydrogenase (Park *et al.*, 1995b)、malate dehydrogenase (Park *et al.*, 1995a; Park *et al.*, 1995b) 等。

由 5.1.3 結果可知影響 FumA 蛋白質表現量主要是轉錄後層次的調控，即 mRNA 的穩定性對於蛋白質表現量具有重大的影響。從 5.1.2 中可知影響 mRNA 穩定性有四大因素，所以接下來的實驗將探討影響 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性因素中的 RNase E 與 poly(A) 聚合酶。

5.3 RNase E 對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性之影響

本實驗室先前利用批次式培養，觀察大腸桿菌在不同核糖核酸酶缺失下，*fumA* mRNA 的穩定性變化。結果發現當 RNase E 突變後，*fumA* mRNA 的穩定性會大幅提昇（見附圖三）。而 5.2 的實驗結果顯示，*fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性會受到生長速率的調控，故本實驗利用連續式培養 RNase E 單基因突變株 N3431，控制細胞的生長速率，觀察不同生長速率下，RNase E 對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的影響。

當 RNase E 突變後，隨著生長速率由 0.24/h 上升到 0.72/h，*fumA* mRNA 的半衰期由 7.4 分鐘上升到 21 分鐘，生長速率由 0.24/h 上升到 0.96/h，*fumC* mRNA 半衰期由 17 分鐘上升到 28 分鐘（見表三、表四）。

由於 RNase E 在 mRNA 上的切割位置主要為單股且 A+U rich 的區域，經由比較不同 mRNA 上 RNase E 的切割位置，我們發現在 *fumA* 與 *fumC* mRNA 上均有相似的 G-A/U-cut-AUU 序列（見附圖一）。與野生株 N3433 的結果比較，可知當 RNase E 突變後，*fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性大幅提昇。綜合以上結果，故可推斷 *fumA* 與 *fumC* mRNA 的降解是經由 RNase E-dependent pathway。

實驗證實在野生株 N3433 中，*fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性受到生長速率的調控，而 RNase E 為 *fumA* 與 *fumC* mRNA 降解的主要酵素，那麼，*fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性隨生長速率上升而上升的現象是否為 RNase E 所調控？以連續式培養 N3431 發現，RNase E 突變後，*fumA* 與 *fumC* mRNA 半衰期依舊隨著生長速率上升而上升，但 *fumC* mRNA 穩定性上升的倍率略微減少（見表三、表四），可知 RNase E 可以略微影響生長速率對 *fumC* mRNA 穩定性的調控，但生長速率並非完全藉由 RNase E 來調控 *fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性。

5.4 poly(A) 聚合酶對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性之影響

poly(A) 聚合酶是近年來大腸桿菌在 mRNA 降解上的重要發現，有些

mRNA 的 3' 端會接上一段 poly(A) tail，使核糖核酸外切酶易於作用。本實驗利用連續式培養 poly(A) 聚合酶單基因突變株 YHC3393，控制細胞的生長速率，觀察 poly(A) 聚合酶在不同生長速率下對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的影響。

當 poly(A) 聚合酶突變後，隨著生長速率由 0.24/h 上升到 0.72/h，*fumA* mRNA 半衰期由 1.5 分鐘上升到 3.7 分鐘，生長速率由 0.24/h 上升到 0.96/h，*fumC* mRNA 半衰期由 2.2 分鐘上升到 4.8 分鐘（見表三、表四）。

與野生株 N3433 比較，當 poly(A) 聚合酶突變後，*fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性並沒有顯著差異，其可能性有兩種：

(1) 之前研究顯示大腸桿菌中接上 poly(A) tail 的 mRNA 只有不到 2% (Cao *et al.*, 1996)，*fumA* 與 *fumC* mRNA 的尾端可能沒有接上 poly(A) tail，所以當 poly(A) 聚合酶突變後，並沒有直接影響 *fumA* 與 *fumC* mRNA 的穩定性。

(2) *fumA* 與 *fumC* mRNA 的尾端有接上 poly(A) tail，但在 poly(A) 聚合酶單基因突變菌株中，RNase E 仍有作用，而目前所瞭解的機制是 RNase E 先進行 mRNA 內部的切割降解作用，剩下的小片段再接上 poly(A) tail，使核糖核酸外切酶易於進行更進一步的降解（見附圖四）。*fumA* 與 *fumC* mRNA 被 RNase E 降解後，剩下的小片段無法用北方墨點法偵測到，所以實驗結果呈現出當 poly(A) 聚合酶突變後與野生株比較並無顯著差異。

5.5 RNase E 與 poly(A) 聚合酶雙突變株對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性之影響

本實驗為以連續式培養 RNase E 與 poly(A) 聚合酶雙突變株 LK01，觀察當 RNase E 與 poly(A) 聚合酶都缺失的情況下，不同生長速率對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的影響。

實驗結果顯示，隨著生長速率由 0.24/h 上升到 0.48/h，*fumA* mRNA 的半衰期由 22 分鐘上升到 55 分鐘，*fumC* mRNA 半衰期由 50 分鐘上升到 58 分鐘（見表三、表四）。

由結果可知當 RNase E 與 poly(A) 聚合酶同時突變，導致 *fumA* 與 *fumC*

mRNA 穩定性大幅提昇，比 RNase E 單基因突變後更穩定，但 poly(A) 聚合酶單獨缺失時卻無顯著影響。可能是除了 RNase E 外，另有一酵素參與 *fumA* 與 *fumC* mRNA 的降解，而且受到 poly(A) 聚合酶的調控。當 poly(A) 聚合酶單獨缺失時，RNase E 仍有活性且 RNase E 是一個強力降解酵素，所以實驗的結果與野生株比較並無差異，但當 RNase E 也缺失後，*fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性就會大幅提昇。

此外，當 RNase E 與 poly(A) 聚合酶同時突變，生長速率上升到 0.72/h，取定量 RNA 進行電泳時發現 16S rRNA 與 23S rRNA 皆呈現模糊 (smear) 的現象 (見附圖五)，但在 RNase E 或 poly(A) 聚合酶單基因突變株中並無此現象。已知 RNase E 也參與了 rRNA 的 processing，而 RNase E 單基因突變株中 RNA 電泳圖無模糊現象，可能此受 poly(A) 聚合酶調控的酵素也參與了 rRNA 的 processing 過程，當 RNase E 與 poly(A) 聚合酶同時缺失時，rRNA processing 的過程嚴重受挫，故無法形成正常的 rRNA。

大腸桿菌有 7 個 rRNA gene clusters，其組成方式皆為：promoter - 16S rRNA - tRNA - 23S rRNA - 5S rRNA - terminator。它們進行 processing 的方式也都相似，先由 RNase III 進行雙股 RNA 的切割，產生 16S rRNA 與 23S rRNA 的前驅物，由 RNase E 切割產生 5S rRNA 的前驅物。16S rRNA 成熟的可能機制是，從 *rrn* operon 轉錄的 primary transcript 先由 RNase III 進行切割，產生 17S rRNA，再由一未知酵素進行 3' 端的成熟切割，產生 16.5S rRNA，接著由 RNase E 進行切割，產生 16.3S rRNA，最後成熟的 16S rRNA 由 RNase G 作用產生 (Wachi *et al.*, 1999)。目前已知 23S rRNA 成熟的機制是，RNase III 切割產生 23S rRNA 的前驅物，此前驅物的 5' 端由某未知酵素 (可能是核糖核酸內切酶) 進行切割，3' 端則由核糖核酸外切酶 (已知有 RNase T) 進行切割，最終形成成熟的 23S rRNA (Li *et al.*, 1999)。我們所推測參與 rRNA processing 且受 poly(A) 聚合酶調控的酵素為何，須經更進一步的探討。

綜合以上實驗結果可知，將細胞培養在不同碳源下，*fumA* 基因在轉錄、轉錄後和轉譯層次方面的表現會有所不同，顯示此三個層次基因表現均受到碳源

的調控，而決定 FumA 蛋白質表現量是轉錄後層次的調控為主。

已知影響 mRNA 穩定性的因素有：(1) 核糖核酸酶，(2) mRNA 二級結構，(3) 核糖體與 mRNA 結合的數量，(4) 一些修飾或輔助的酵素。由先前實驗結果我們推測核糖核酸酶在 *fumA* mRNA 降解上較重要，且 poly(A) 聚合酶是近年來 mRNA 降解上很重要的酵素，所以本實驗探討 RNase E 與 poly(A) 聚合酶對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的影響。

由結果可知，RNase E 是降解 *fumA* 與 *fumC* mRNA 重要的核糖核酸內切酶，在 poly(A) 聚合酶單基因突變的實驗中，poly(A) 聚合酶對 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的影響還不能下定論，需經更進一步實驗探討。而由 RNase E 與 poly(A) 聚合酶雙突變株的實驗推測受 poly(A) 聚合酶所調控的酵素，我們認為是一種核糖核酸酶，在 poly(A) 聚合酶缺失時，細胞內被標示需降解的 mRNA 減少了，導致此核糖核酸酶活性較低，故 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性增加 (Mohanty and Kushner, 1999, 2000)。

除了核糖核酸酶外，核糖體及 mRNA 二級結構對 mRNA 降解也有影響性。核糖體對 mRNA 降解可能是正向也可能是負向的影響，核糖體結合上 mRNA 可能遮蔽住核糖核酸酶的切割位置而使 mRNA 較穩定，也可能因解開 mRNA 的二級結構而使 mRNA 易於被降解。在本實驗中控制細胞的生長速率，觀察 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性的變化，結果得知隨著生長速率上升，*fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性也隨之上升，推測可能是因為細胞生長速率高時，核糖體合成快 (Miura *et al.*, 1981; Nomura *et al.*, 1984)，結合上 mRNA 的數量也多，導致 mRNA 穩定性增加 (Iost and Dreyfus, 1995)。而在同一生長速率且實驗條件皆一致，核糖體結合上 mRNA 的數量應該也類似，*fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性變化即突變的 RNase E 及 poly(A) 聚合酶所造成。

目前預測 mRNA 二級結構的軟體準確度仍不高，但 mRNA 二級結構為穩定的結構，在同一生長速率且相同的實驗條件下，二級結構並不會有所差異。在不同的生長速率下，二級結構可能會改變，但核糖體結合上 mRNA 且遮蔽 mRNA 上核糖核酸酶的切割位置，使得 *fumA* 與 *fumC* mRNA 穩定性增加。

表一、本實驗所使用的大腸桿菌野生株與突變株

| <i>E. coli</i> strain | Genotype and relevant markers | Source or reference |
|-----------------------|---|---|
| K12-W3110 | derived from K-12, F ⁻ IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1 | <i>E. coli</i> genetic stock center of Yale. university |
| N3433 | <i>lacZ43, relA, spoT1, thi1</i> | Dr. Sue Lin-Chao (Kaberdin <i>et al.</i> , 1996) |
| N3431 | <i>lacZ43, relA, spoT1, thi1, rne-3071^{ts}</i> | Dr. Sue Lin-Chao (Kaberdin <i>et al.</i> , 1996) |
| YHC3393 | Tc ^r , <i>lacZ43, relA, spoT1, thi1, pcnB</i> | Dr. Sue Lin-Chao (Kaberdin <i>et al.</i> , 1996) |
| LK01 | Tc ^r , <i>lacZ43, relA, spoT1, thi1, rne-3071^{ts}, pcnB</i> | Dr. Sue Lin-Chao (Kaberdin <i>et al.</i> , 1996) |

ts : Temperature sensitive mutant

Tc^r : Tetracyclin resistance

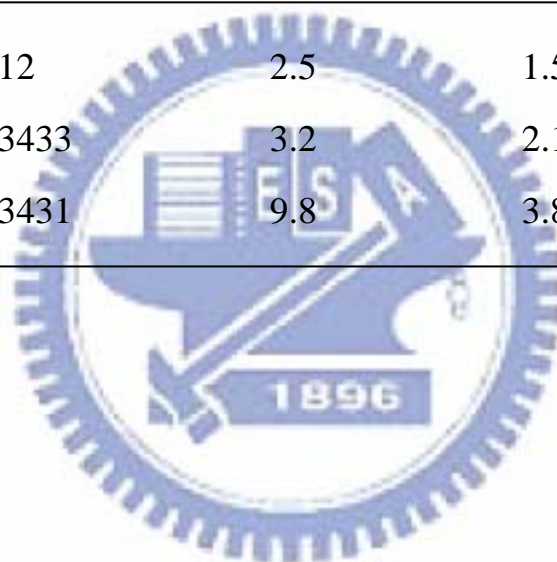
六、論文圖表

表二、大腸桿菌 K12 、 N3433 與 N3431 以批次式、不同碳源
(10mM 葡萄糖或醋酸) 培養下，對 *fumA* mRNA 穩定性之
影響。

Chemical half-lives of *fumA* mRNA

| <i>E. coli</i> strain | Glc | Ace |
|-----------------------|-----|-----|
| K12 | 2.5 | 1.5 |
| N3433 | 3.2 | 2.1 |
| N3431 | 9.8 | 3.8 |

Unit : min



表三 大腸桿菌 N3433 N3431 YHC3393 與 LK01 以 2.5mM 葡萄糖為碳源，在連續式培養下，生長速率對 *fumA* mRNA 穩定性之影響。

Chemical half-lives of *fumA* mRNA

| Cell growth rate k (1/h) | N3433 (wild type) | N3431 (<i>rne</i> ⁻) | YHC3393 (<i>pcnB</i> ⁻) | LK01 (<i>rne</i> ⁻ <i>pcnB</i> ⁻) |
|----------------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---|
| 0.24 | 2.2 | 7.4 | 1.5 | 22 |
| 0.48 | 2.8 | 16 | 2.9 | 55 |
| 0.72 | 3.5 | 21 | 3.7 | -- |
| 0.96 | 5.4 | -- | -- | -- |

Unit : min

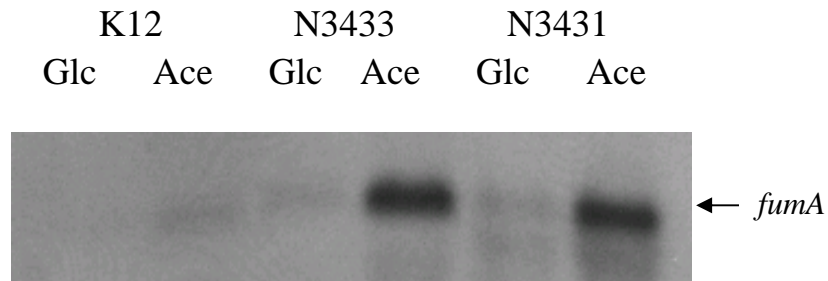
-- : Not determined

表四、大腸桿菌 N3433、 N3431、 YHC3393 與 LK01 以 2.5mM 葡萄糖為碳源，在連續式培養下，生長速率對 *fumC* mRNA 穩定性之影響。

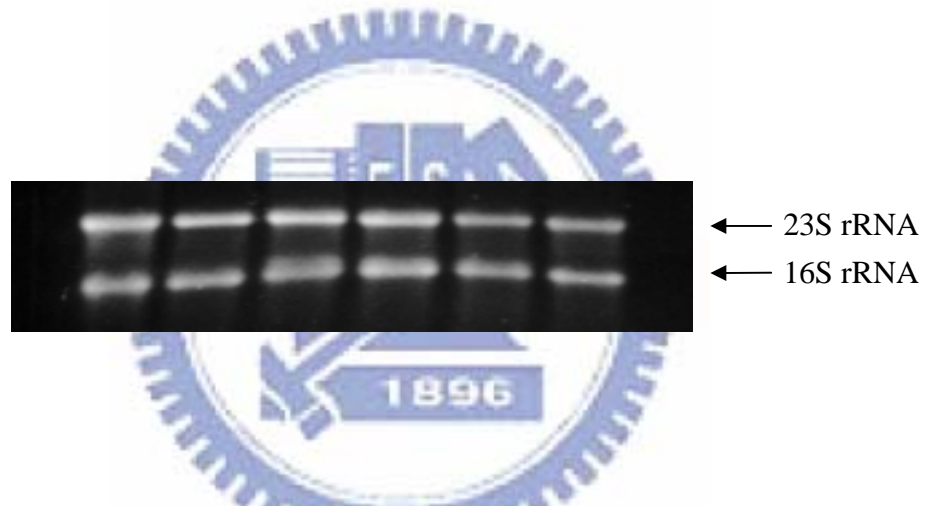
| Chemical half-lives of <i>fumC</i> mRNA | | | | |
|---|-------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---|
| Cell growth rate k (1/h) | N3433 (wild type) | N3431 (<i>rne</i> ⁻) | YHC3393 (<i>pcnB</i> ⁻) | LK01 (<i>rne</i> ⁻ <i>pcnB</i> ⁻) |
| 0.24 | 2.5 | 17 | 2.2 | 50 |
| 0.48 | 3.8 | 21 | 3.8 | 58 |
| 0.72 | 4.4 | -- | 4.5 | -- |
| 0.96 | -- | 28 | 4.8 | -- |

Unit : min
 -- : Not determined

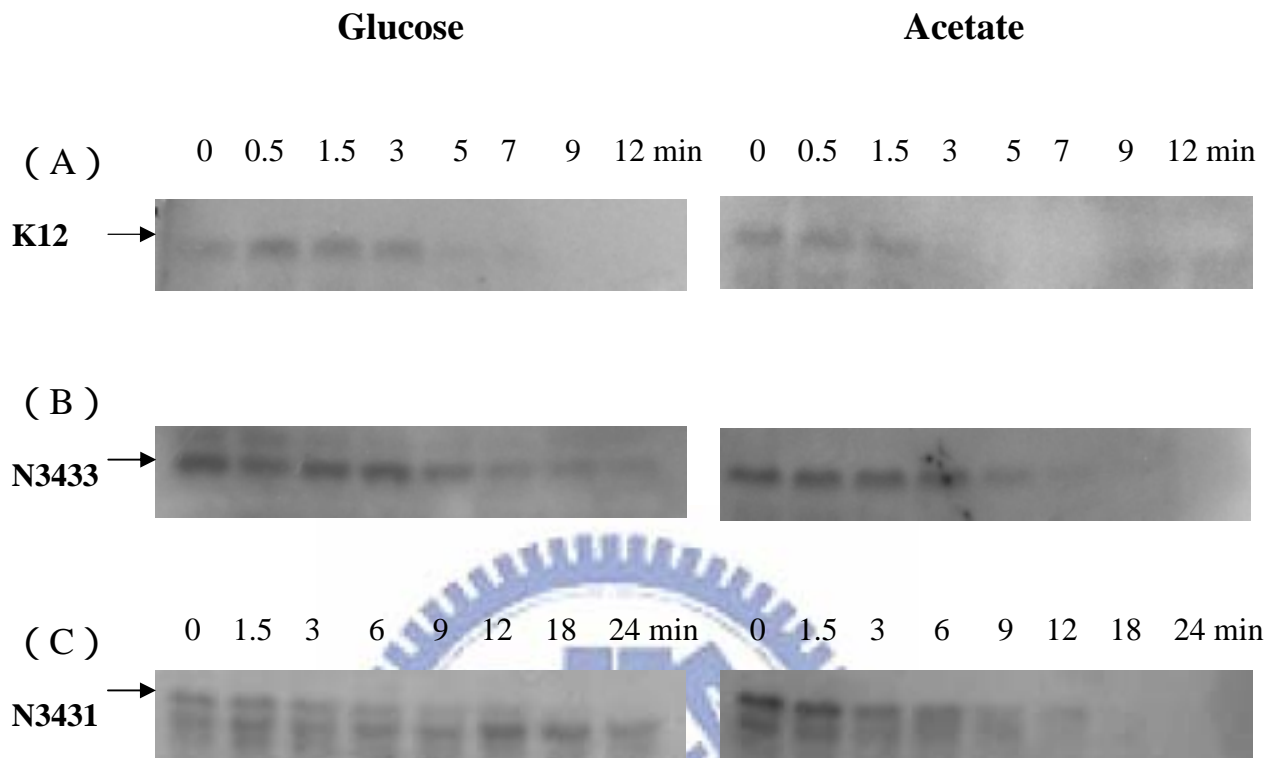
(A)



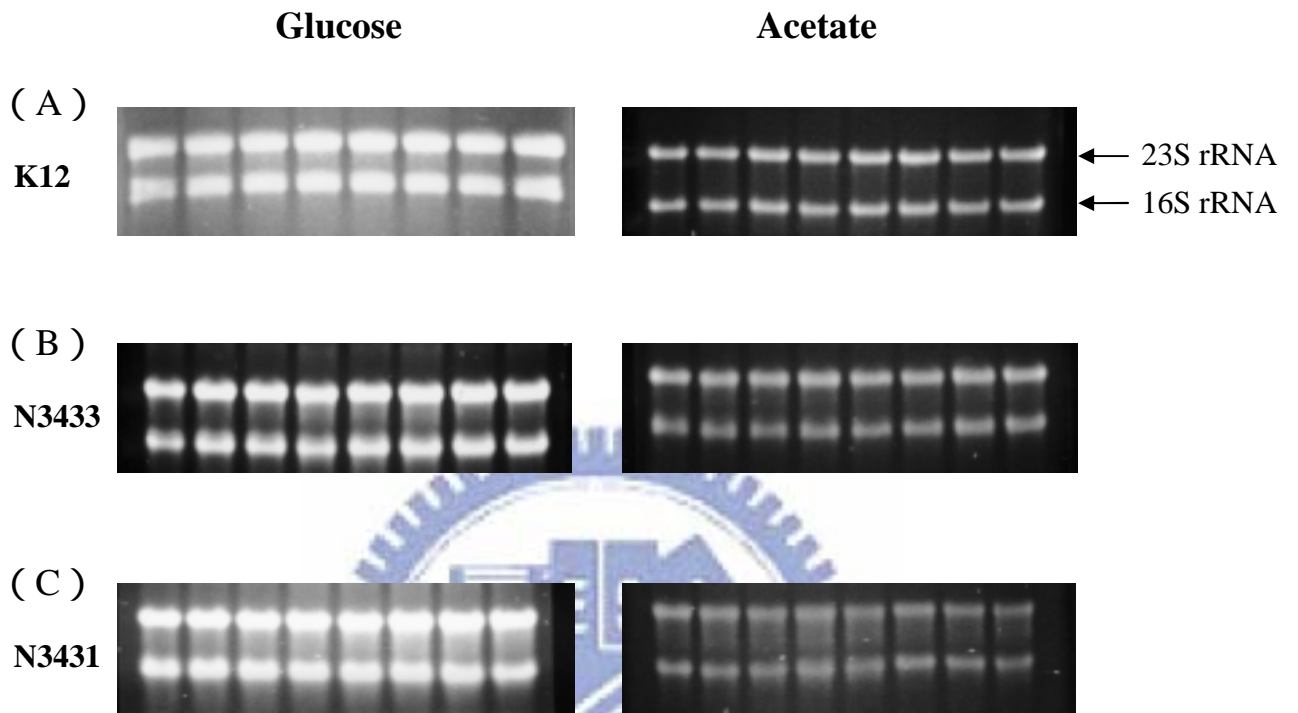
(B)



圖一、大腸桿菌 K12、N3433 與 N3431，在批次式、不同碳源 (10mM 葡萄糖或醋酸) 培養下，(A) *fumA* mRNA 表現量之北方墨點圖。(B)電泳圖。

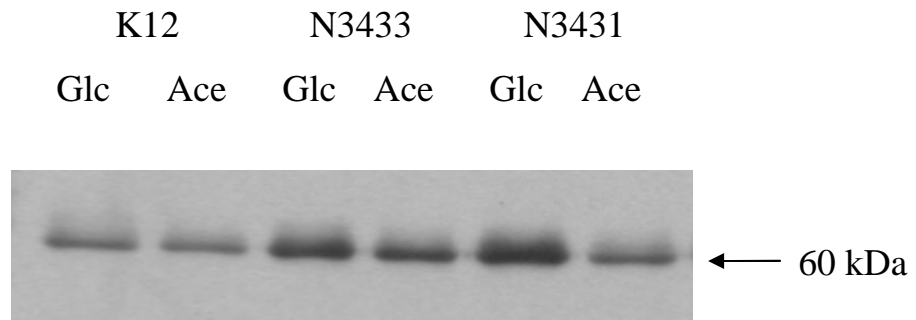


圖二之一、大腸桿菌 K12、N3433 與 N3431，在批次式、不同碳源 (10mM 葡萄糖或醋酸) 培養下，*fumA* mRNA 穩定性之北方墨點圖。(A) K12，(B) N3433，(C) N3431。

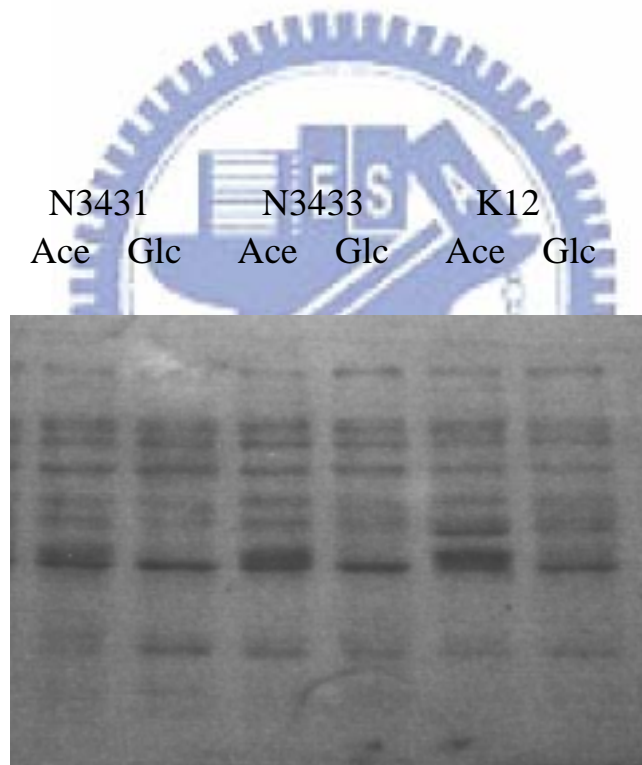


圖二之二、大腸桿菌 K12、N3433 與 N3431，在批次式、不同碳源 (10mM 葡萄糖或醋酸) 培養下，*fumA* mRNA 穩定性之電泳圖。(A) K12，(B) N3433，(C) N3431。

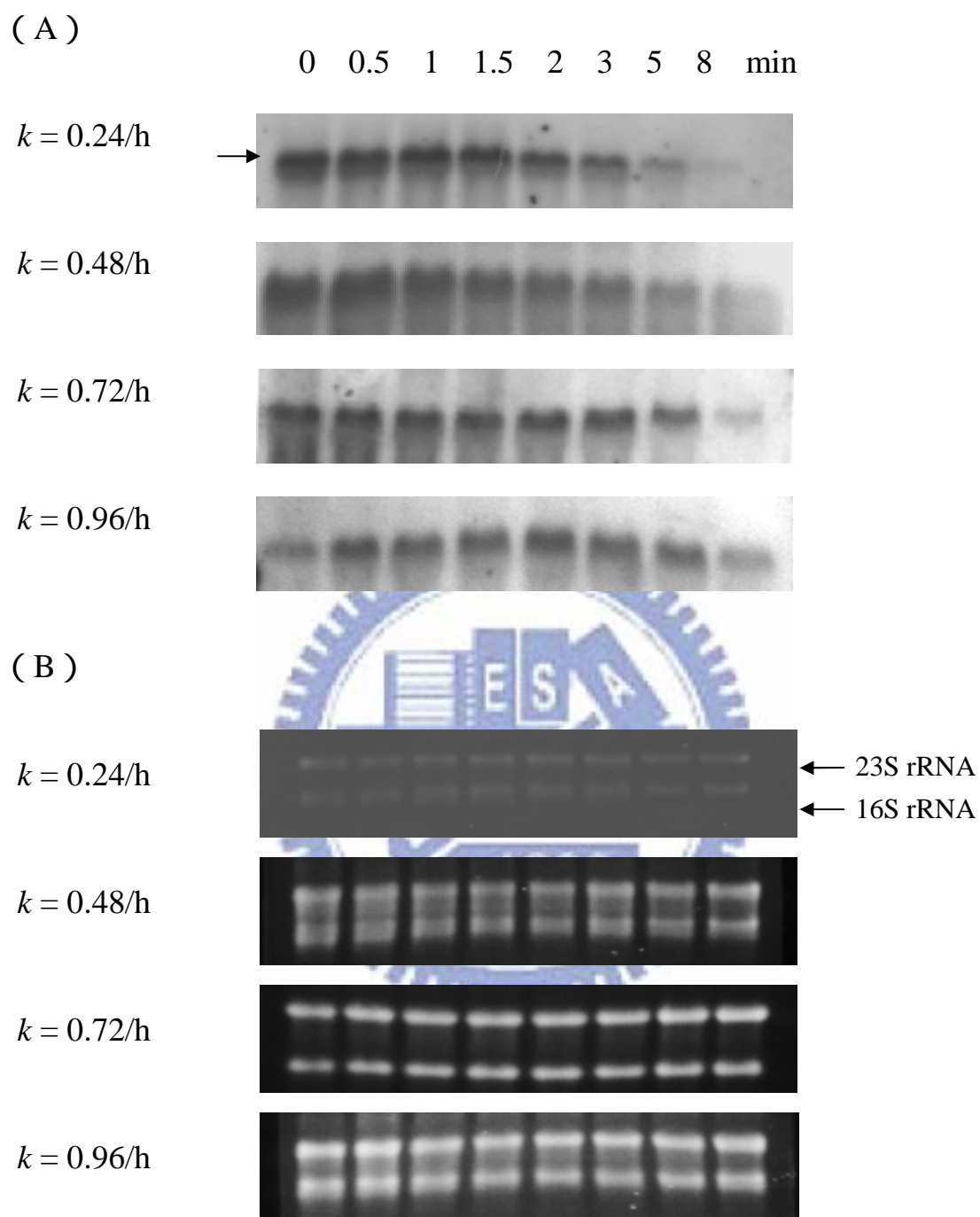
(A)



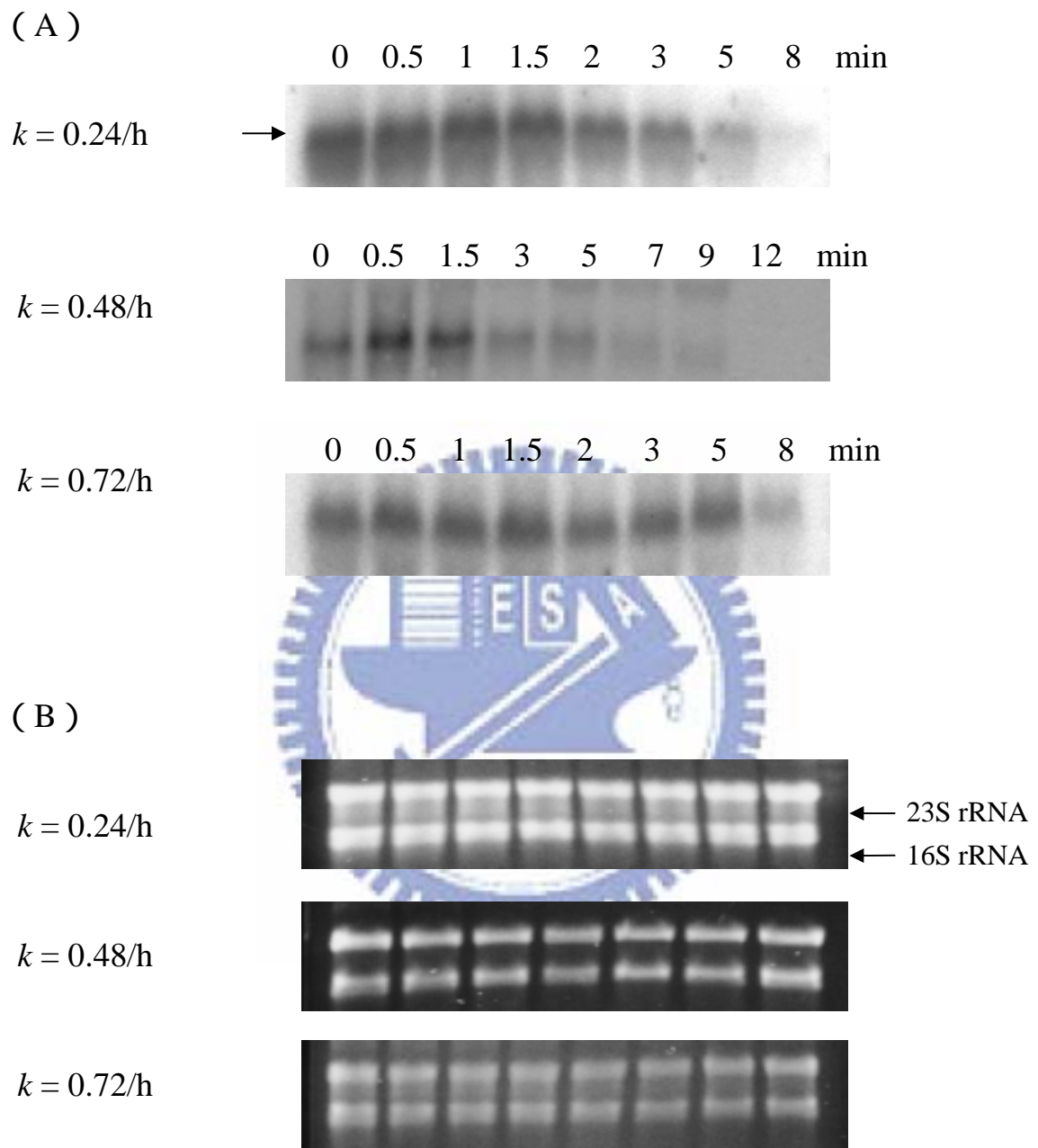
(B)



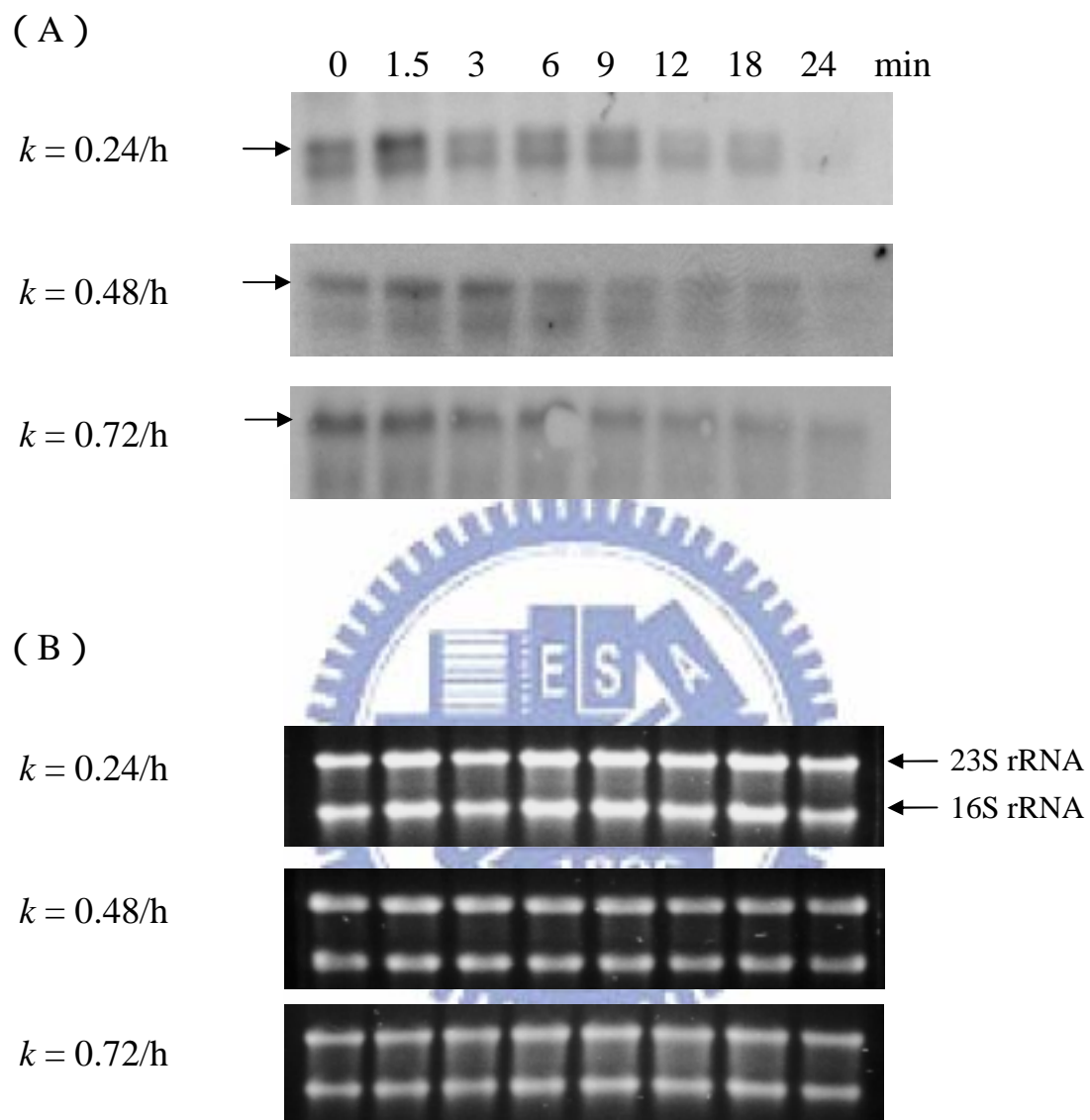
圖三、大腸桿菌 K12、 N3433 與 N3431，在批次式、不同碳源 (10mM 葡萄糖或醋酸) 培養下，(A) FumA 蛋白質表現量之西方墨點圖。(B) 菌體總蛋白質之電泳圖。



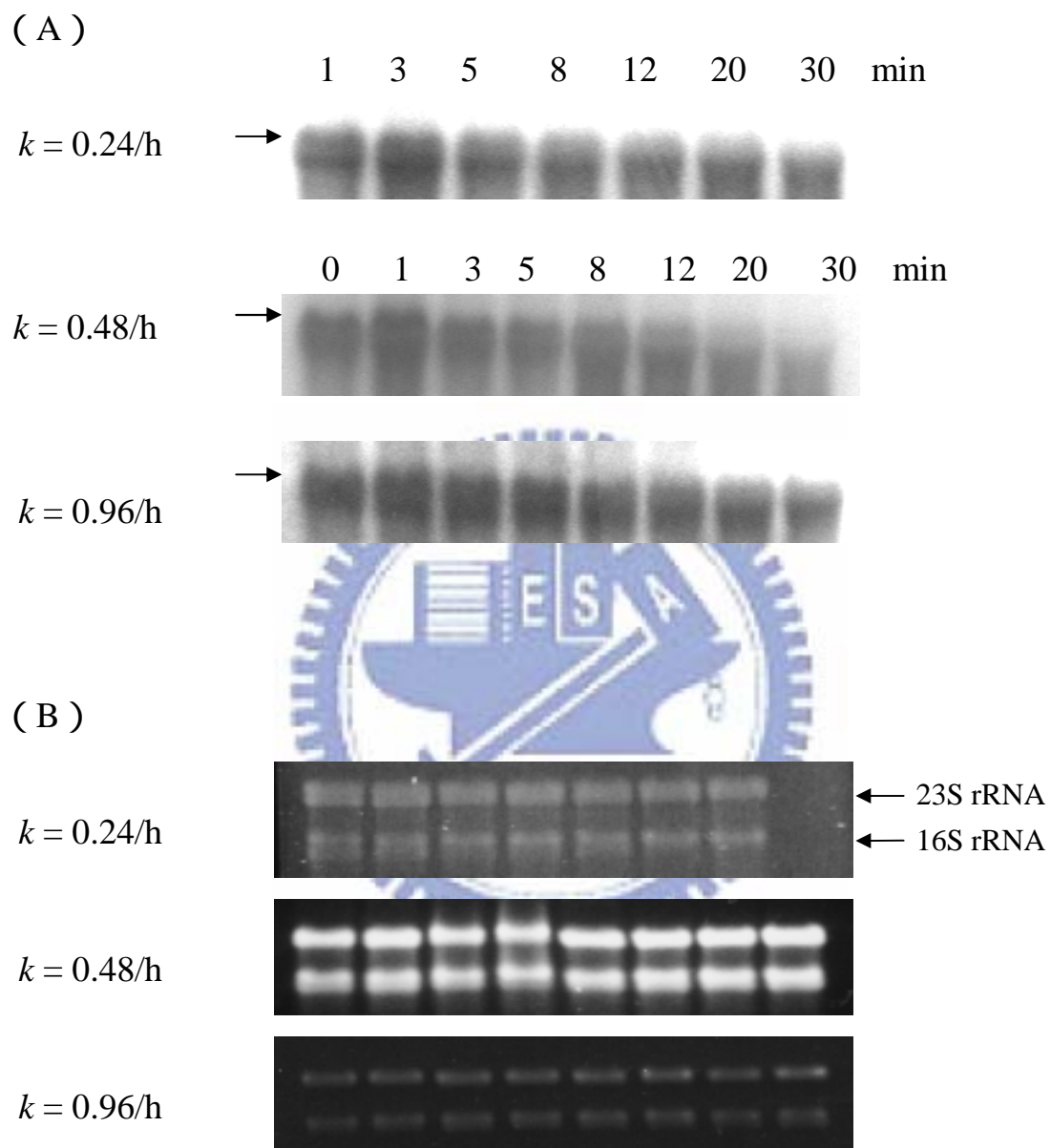
圖四、大腸桿菌 N3433 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) *fumA* mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B) 電泳圖。



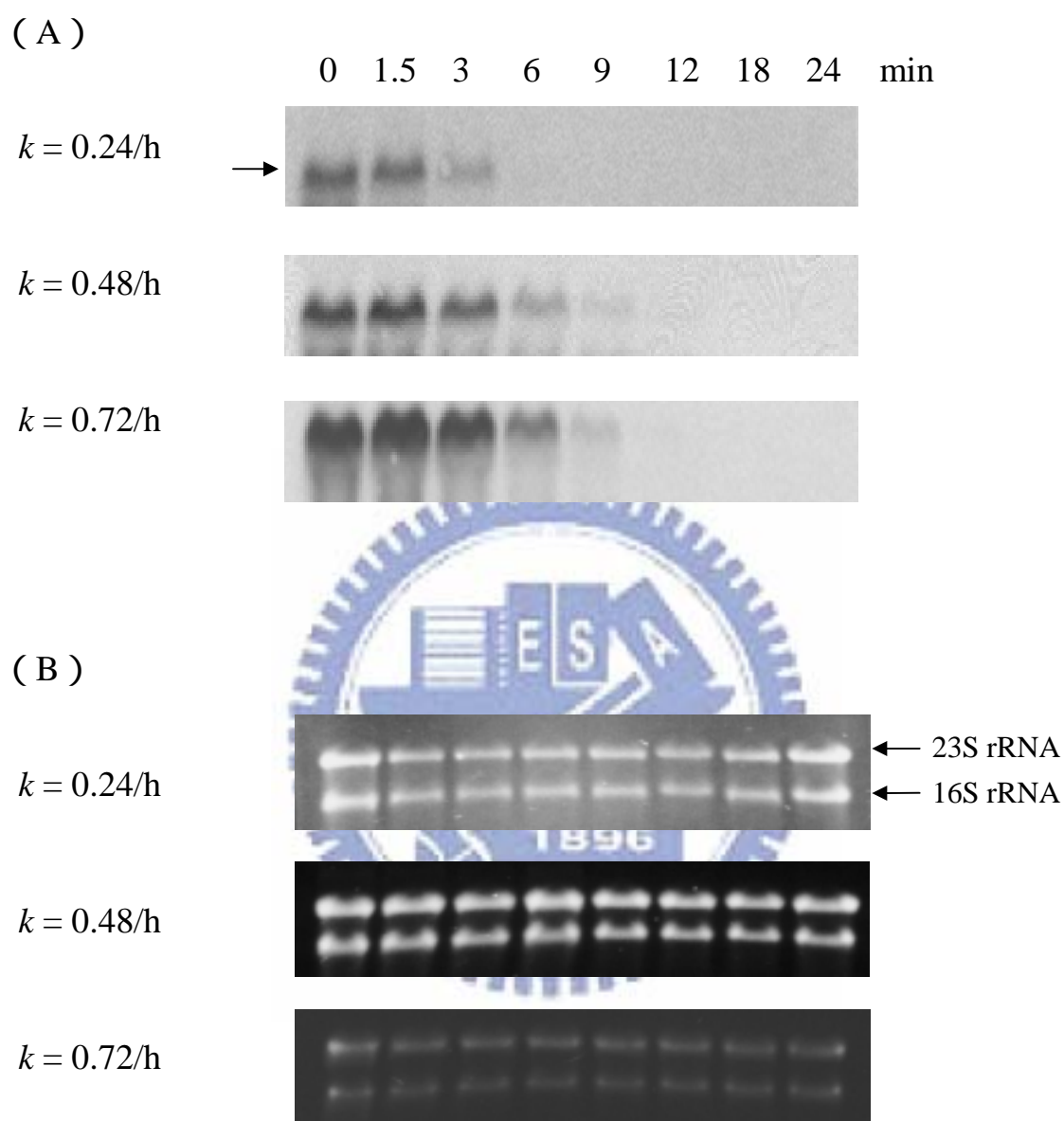
圖五、大腸桿菌 N3433 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) *fumC* mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B) 電泳圖。



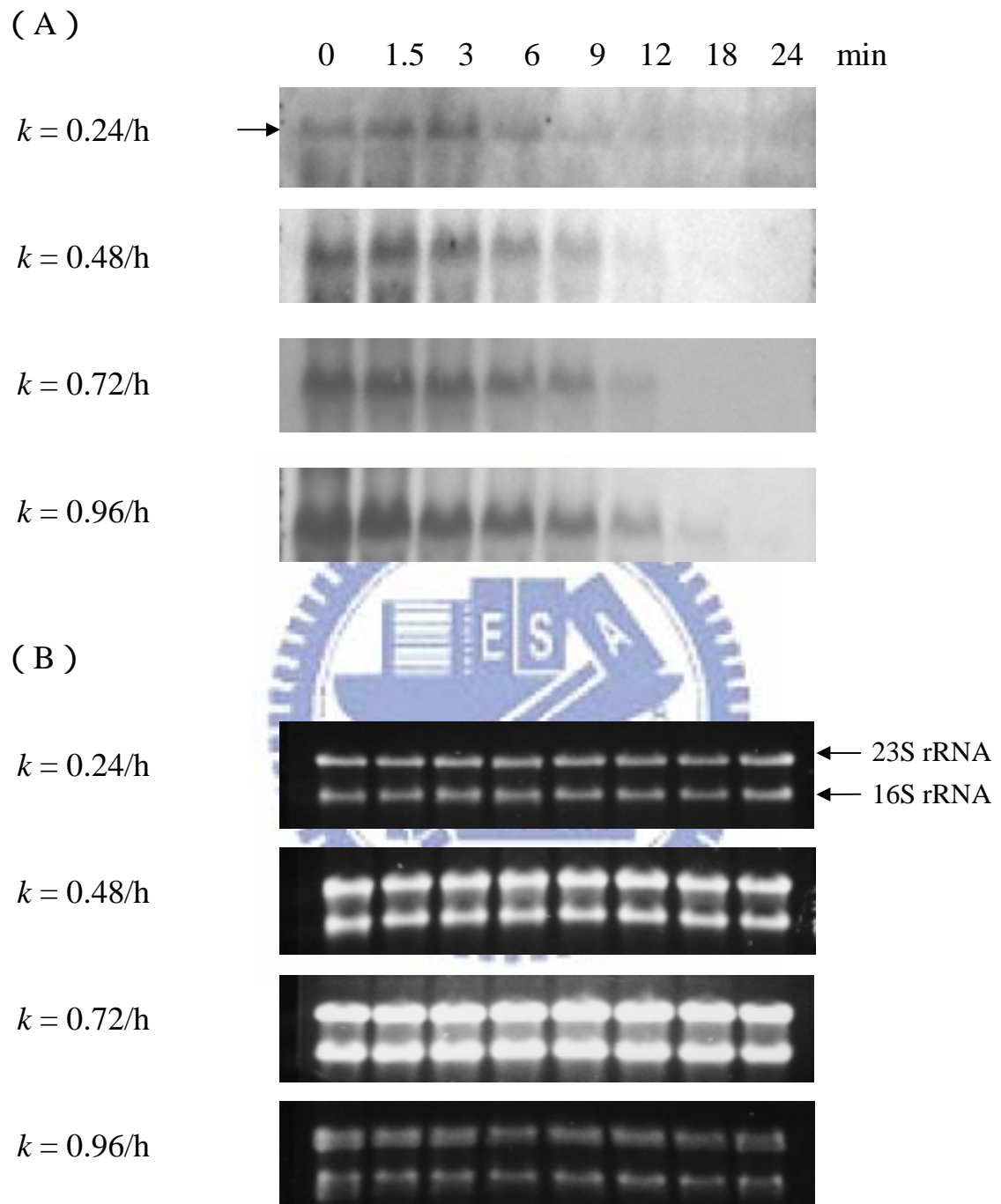
圖六、大腸桿菌 N3431 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) *fumA* mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B)電泳圖。



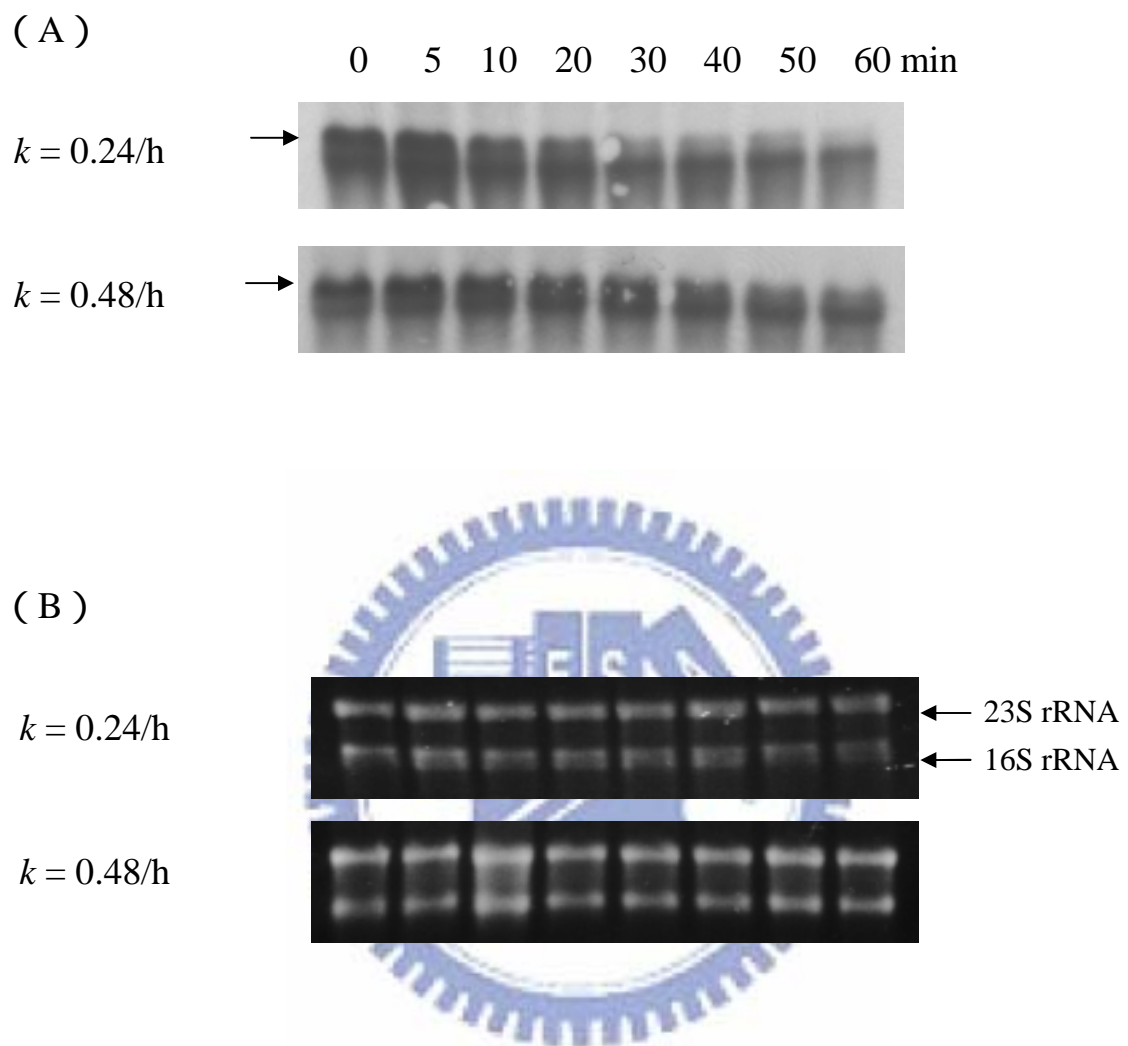
圖七、大腸桿菌 N3431 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) *fumC* mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B) 電泳圖。



圖八、大腸桿菌 YHC3393 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) *fumA* mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B)電泳圖。

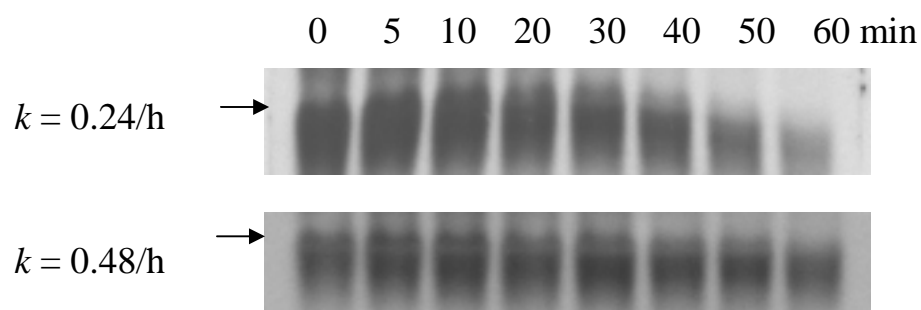


圖九、大腸桿菌 YHC3393 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) *fumC* mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B) 電泳圖。

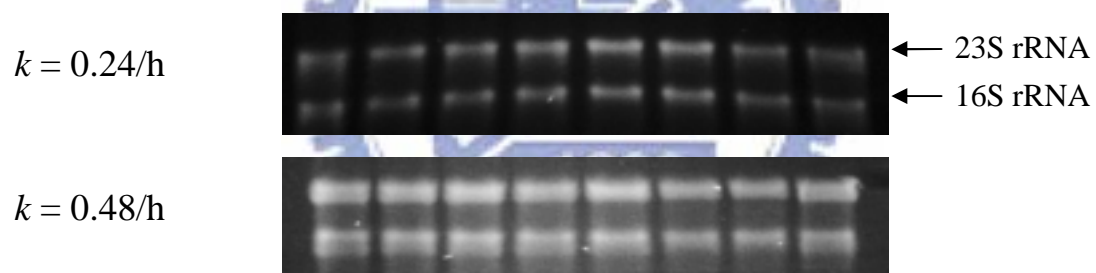


圖十、大腸桿菌 LK01 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) *fumA* mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B)電泳圖。

(A)



(B)



圖十一、大腸桿菌 LK01 以 2.25mM 葡萄糖為碳源，在不同生長速率下，(A) *fumC* mRNA 穩定性之北方墨點圖。(B)電泳圖。

七、参考文献

1. Arnold, T.E., Yu, J., and Belasco, J.G. (1998) mRNA stabilization by the *ompA* 5' untranslated region: two protective elements hinder distinct pathways for mRNA degradation. *RNA* **4**: 319-330.
2. 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.
3. Belasco, J. G., G. Brawerman. 1993. Control of messenger RNA stability. p.53-70. Academic Press, Inc. The United States of America.
4. Bell, P.J., Andrews, S.C., Sivak, M.N., and Guest, J.R. (1989) Nucleotide sequence of the FNR-regulated fumarase gene (*fumB*) of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **171**: 3494-3503.
5. Bernstein, J.A., Khodursky, A.B., Lin, P.H., Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (2002) Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9697-9702.
6. Bernstein, J.A., Lin, P.H., Cohen, S.N., and Lin-Chao, S. (2004) Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2758-2763.
7. Binnie U., Wong K., McAteer S. and Masters M. (1999) Absence of RNase III alters the pathway by which RNAI, the antisense inhibitor of ColE1 replication, decays. *Microbiology*. **145** (Pt11):3089-3100.
8. 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.
9. Bouvet, P., and Belasco, J.G. (1992) Control of RNase E-mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in *E. coli*. *Nature* **360**: 488-491.
10. Brawerman, G. (1973) The isolation of RNA from mammalian cells. *Methods Cell Biol* **7**: 1-22.
11. Bremer, H. and P. Dennis. 1987. Modulation of chemical composition and other

- parameters of the cell by growth rate. p.1527-1542. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger(ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Vol. 2. American Society for Microbiology, Washington D. C.
12. Cao, G.J., Pogliano, J., and Sarkar, N. (1996) Identification of the coding region for a second poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11580-11585.
 13. Casaregola, S., Jacq, A., Laoudj, D., McGurk, G., Margarson, S., Tempete, M., Norris, V., and Holland, I.B. (1992) Cloning and analysis of the entire *Escherichia coli* *ams* gene. *ams* is identical to *hmpI* and encodes a 114 kDa protein that migrates as a 180 kDa protein. *J Mol Biol* **228**: 30-40.
 14. Cassio, D., Mathien, Y., and Waller, J.P. (1975) Enhanced level and metabolic regulation of methionyl-transfer ribonucleic acid synthetase in different strains of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **123**: 580-588.
 15. Coburn, G.A., and Mackie, G.A. (1998) Reconstitution of the degradation of the mRNA for ribosomal protein S20 with purified enzymes. *J Mol Biol* **279**: 1061-1074.
 16. Cohen, S.N. (1995) Surprises at the 3' end of prokaryotic RNA. *Cell* **80**: 829-832.
 17. Cohen, S.N., and McDowall, K.J. (1997) RNase E: still a wonderfully mysterious enzyme. *Mol Microbiol* **23**: 1099-1106.
 18. Court, D. (1993) RNA processing and degradation by RNase III. In Control of mRNA stability. Belasco, J.G., and Brawerman, G. (eds). New York: Academic Press, pp. 71-116.
 19. Dennis, P.P., and Bremer, H. (1974) Differential rate of ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli* B/r. *J Mol Biol* **84**: 407-422.
 20. Deutscher, M.P., and Reuven, N.B. (1991) Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3277-3280.
 21. Deutscher, M.P. (1993) Ribonuclease multiplicity, diversity, and complexity. *J Biol Chem* **268**: 13011-13014.
 22. Deutscher, M.P., and Li, Z. (2001) Exoribonucleases and their multiple roles in

- RNA metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **66**: 67-105.
23. 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.
 24. Donovan, W.P., and Kushner, S.R. (1983) Amplification of ribonuclease II (*rnb*) activity in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* **11**: 265-275.
 25. Donovan, W.P., and Kushner, S.R. (1986) Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 120-124.
 26. Dunn, J.J. (1976) RNase III cleavage of single-stranded RNA. Effect of ionic strength on the fidelity of cleavage. *J Biol Chem* **251**: 3807-3814.
 27. Emory, S.A., and Belasco, J.G. (1990) The *ompA* 5' untranslated RNA segment functions in *Escherichia coli* as a growth-rate-regulated mRNA stabilizer whose activity is unrelated to translational efficiency. *J Bacteriol* **172**: 4472-4481.
 28. Flint, D.H., Emptage, M.H., and Guest, J.R. (1992) Fumarase a from *Escherichia coli*: purification and characterization as an iron-sulfur cluster containing enzyme. *Biochemistry* **31**: 10331-10337.
 29. 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.
 30. Ghosh, S., and Deutscher, M.P. (1999) Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4372-4377.
 31. Gottesman, M., Oppenheim, A., and Court, D. (1982) Retroregulation: control of gene expression from sites distal to the gene. *Cell* **29**: 727-728.
 32. Grunberg-Manago, M. 1996. Regulation of the expression of aminoacyl tRNA synthetases and translation factors, p. 1432–1457. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
 33. Guest, J.R., and Roberts, R.E. (1983) Cloning, mapping, and expression of the

- fumarase gene of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **153**: 588-596.
34. Guest, J.R., Miles, J.S., Roberts, R.E., and Woods, S.A. (1985) The fumarase genes of *Escherichia coli*: location of the *fumB* gene and discovery of a new gene (*fumC*). *J Gen Microbiol* **131** (Pt 11): 2971-2984.
 35. Guest, J.R. (1992) Oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. The 1992 Marjory Stephenson Prize Lecture. *J Gen Microbiol* **138** (Pt 11): 2253-2263.
 36. Gupta, R.S., Kasai, T., and Schlessinger, D. (1977) Purification and some novel properties of *Escherichia coli* RNase II. *J Biol Chem* **252**: 8945-8949.
 37. 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.
 38. 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.
 39. Iuchi, S., and Lin, E.C. (1988) *arcA* (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 1888-1892.
 40. 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.
 41. Jain, C., Deana, A., and Belasco, J.G. (2002) Consequences of RNase E scarcity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **43**: 1053-1064.
 42. Jarrige, A.C., Mathy, N., and Portier, C. (2001) PNPase autocontrols its expression by degrading a double-stranded structure in the *pnp* mRNA leader. *EMBO J* **20**: 6845-6855.
 43. Jasiacki, J., and Wegrzyn, G. (2003) Growth-rate dependent RNA polyadenylation in *Escherichia coli*. *EMBO Rep* **4**: 172-177.
 44. Kaberdin, V.R., Chao, Y.H., and Lin-Chao, S. (1996) RNase E cleaves at multiple sites in bubble regions of RNA I stem loops yielding products that dissociate differentially from the enzyme. *J Biol Chem* **271**: 13103-13109.
 45. Keener, J., and M. Nomura. 1996. Regulation of ribosome synthesis, p.1417–1431.

- In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
46. Kushner, S.R. (2002) mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *J Bacteriol* **184**: 4658-4665; discussion 4657.
 47. Li, Z., and Deutscher, M.P. (1996) Maturation pathways for *E. coli* tRNA precursors: a random multienzyme process *in vivo*. *Cell* **86**: 503-512.
 48. Li, Z., Pandit, S., and Deutscher, M.P. (1999) Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T. *RNA* **5**: 139-146.
 49. 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.
 50. Liochev, S.I., and Fridovich, I. (1992) Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the *soxRS* regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5892-5896.
 51. 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.
 52. Liou, G.G., Chang, H.Y., Lin, C.S., and Lin-Chao, S. (2002) DEAD box RhlB RNA helicase physically associates with exoribonuclease PNPase to degrade double-stranded RNA independent of the degradosome-assembling region of RNase E. *J Biol Chem* **277**: 41157-41162.
 53. Lundberg, U., Nilsson, G., and von Gabain, A. (1988) The differential stability of the *Escherichia coli* *ompA* and *bla* mRNA at various growth rates is not correlated to the efficiency of translation. *Gene* **72**: 141-149.
 54. Mackie, G.A. (1998) Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**: 720-723.
 55. Matsunaga, J., Simons, E.L., and Simons, R.W. (1996) RNase III autoregulation: structure and function of *rncO*, the posttranscriptional "operator". *RNA* **2**: 1228-1240.

56. 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.
57. 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.
58. Miura, A., Krueger, J.H., Itoh, S., de Boer, H.A., and Nomura, M. (1981) Growth-rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *E. coli*: expression of the *lacZ* and *galk* genes fused to ribosomal promoters. *Cell* **25**: 773-782.
59. Mohanty, B.K., and Kushner, S.R. (1999) Analysis of the function of *Escherichia coli* poly(A) polymerase I in RNA metabolism. *Mol Microbiol* **34**: 1094-1108.
60. Mohanty, B.K., and Kushner, S.R. (2000) Polynucleotide phosphorylase, RNase II and RNase E play different roles in the *in vivo* modulation of polyadenylation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **36**: 982-994.
61. Mohanty, B.K., and Kushner, S.R. (2002) Polyadenylation of *Escherichia coli* transcripts plays an integral role in regulating intracellular levels of polynucleotide phosphorylase and RNase E. *Mol Microbiol* **45**: 1315-1324.
62. Mohanty, B.K., and Kushner, S.R. (2003) Genomic analysis in *Escherichia coli* demonstrates differential roles for polynucleotide phosphorylase and RNase II in mRNA abundance and decay. *Mol Microbiol* **50**: 645-658.
63. Nilsson, G., Belasco, J.G., Cohen, S.N., and von Gabain, A. (1984) Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*. *Nature* **312**: 75-77.
64. Nilsson, P., and Uhlin, B.E. (1991) Differential decay of a polycistronic *Escherichia coli* transcript is initiated by RNaseE-dependent endonucleolytic processing. *Mol Microbiol* **5**: 1791-1799.
65. Nomura, M., Gourse, R., and Baughman, G. (1984) Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu Rev Biochem* **53**: 75-117.
66. Oh, M.K., Rohlin, L., Kao, K.C., and Liao, J.C. (2002) Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**: 13175-13183.
67. O'Hara, E.B., Chekanova, J.A., Ingle, C.A., Kushner, Z.R., Peters, E., and Kushner, S.R. (1995) Polyadenylation helps regulate mRNA decay in

- Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1807-1811.
68. 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.
 69. Ow, M.C., and Kushner, S.R. (2002) Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in *E. coli*. *Genes Dev* **16**: 1102-1115.
 70. Park, S.J., Cotter, P.A., and Gunsalus, R.P. (1995a) Regulation of malate dehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon, and heme availability. *J Bacteriol* **177**: 6652-6656.
 71. Park, S.J., and Gunsalus, R.P. (1995) Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products. *J Bacteriol* **177**: 6255-6262.
 72. Park, S.J., Tseng, C.P., and Gunsalus, R.P. (1995b) Regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) operon expression in *Escherichia coli* in response to carbon supply and anaerobiosis: role of ArcA and Fnr. *Mol Microbiol* **15**: 473-482.
 73. Pato, M.L., Bennett, P.M., and von Meyenburg, K. (1973) Messenger ribonucleic acid synthesis and degradation in *Escherichia coli* during inhibition of translation. *J Bacteriol* **116**: 710-718.
 74. Pedersen, S., Bloch, P.L., Reeh, S., and Neidhardt, F.C. (1978) Patterns of protein synthesis in *E. coli*: a catalog of the amount of 140 individual proteins at different growth rates. *Cell* **14**: 179-190.
 75. Pepe, C.M., Maslesa-Galic, S., and Simons, R.W. (1994) Decay of the *IS10* antisense RNA by 3' exoribonucleases: evidence that RNase II stabilizes RNA-OUT against PNPase attack. *Mol Microbiol* **13**: 1133-1142.
 76. 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.
 77. Rauhut, R., and Klug, G. (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 353-370.
 78. Regnier, P., Grunberg-Manago, M., and Portier, C. (1987) Nucleotide sequence of the *pnp* gene of *Escherichia coli* encoding polynucleotide phosphorylase.

- Homology of the primary structure of the protein with the RNA-binding domain of ribosomal protein S1. *J Biol Chem* **262**: 63-68.
79. Robertson, H.D., Webster, R.E., and Zinder, N.D. (1968) Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **243**: 82-91.
80. Sarkar, N. (1997) Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* **66**: 173-197.
81. Schaechter, M., Maaloe, O., and Kjeldgaard, N.O. (1958) Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol* **19**: 592-606.
82. Spickler, C., and Mackie, G.A. (2000) Action of RNase II and polynucleotide phosphorylase against RNAs containing stem-loops of defined structure. *J Bacteriol* **182**: 2422-2427.
83. Talkad, V., Achord, D., and Kennell, D. (1978) Altered mRNA metabolism in ribonuclease III-deficient strains of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **135**: 528-541.
84. Taraseviciene, L., Bjork, G.R., and Uhlin, B.E. (1995) Evidence for an RNA binding region in the *Escherichia coli* processing endoribonuclease RNase E. *J Biol Chem* **270**: 26391-26398.
85. Tseng, C. P. (1997) Regulation of fumarase (*fumB*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, iron and heme availability: role of the *arcA*, *fur*, and *hemA* gene products. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**:67-72.
86. Tseng, C.P., Hansen, A.K., Cotter, P., and Gunsalus, R.P. (1994) Effect of cell growth rate on expression of the anaerobic respiratory pathway operons *frdABCD*, *dmsABC*, and *narGHJI* of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 6599-6605.
87. Tseng, C.P., Yu, C.C., Lin, H.H., Chang, C.Y., and Kuo, J.T. (2001) Oxygen- and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (FumA, FumB, and FumC) activity. *J Bacteriol* **183**: 461-467.
88. Ueda, Y., Yumoto, N., Tokushige, M., Fukui, K., and Ohya-Nishiguchi, H. (1991) Purification and characterization of two types of fumarase from *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **109**: 728-733.
89. 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

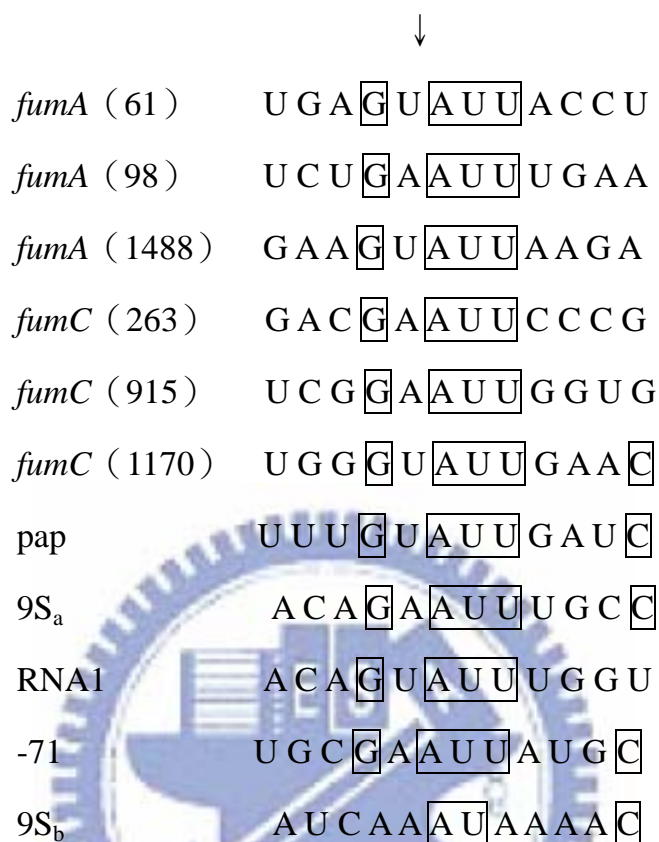
- the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev* **12**: 2770-2781.
90. Wachi, M., Umitsuki, G., Shimizu, M., Takada, A., and Nagai, K. (1999) *Escherichia coli cafA* gene encodes a novel RNase, designated as RNase G, involved in processing of the 5' end of 16S rRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 483-488.
 91. Weaver, T.M., Levitt, D.G., and Banaszak, L.J. (1993) Purification and crystallization of fumarase C from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **231**: 141-144.
 92. Wolf, R.E., Jr., Prather, D.M., and Shea, F.M. (1979) Growth-rate-dependent alteration of 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucose 6-phosphate dehydrogenase levels in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **139**: 1093-1096.
 93. Woods, S.A., Schwartzbach, S.D., and Guest, J.R. (1988) Two biochemically distinct classes of fumarase in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **954**: 14-26.
 94. Wu, M., and Tzagoloff, A. (1987) Mitochondrial and cytoplasmic fumarases in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single nuclear gene *FUM1*. *J Biol Chem* **262**: 12275-12282.
 95. Xu, F., Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (1993) The *Escherichia coli pcnB* gene promotes adenylation of antisense RNAI of ColE1-type plasmids *in vivo* and degradation of RNAI decay intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6756-6760.
 96. Xu, F., and Cohen, S.N. (1995) RNA degradation in *Escherichia coli* regulated by 3' adenylation and 5' phosphorylation. *Nature* **374**: 180-183.
 97. Zilhao, R., Caillet, J., Regnier, P., and Arraiano, C.M. (1995) Precise physical mapping of the *Escherichia coli rnb* gene, encoding ribonuclease II. *Mol Gen Genet* **248**: 242-246.
 98. 林志賢，大腸桿菌內 RNase E 和 poly(A) 聚合酶對延胡索酸酶 mRNA 降解機制之調控，國立交通大學，碩士論文，民國90年。
 99. 林承宏，生長速率對大腸桿菌延胡索酸酶 *fumA*、*fumC* 在轉錄、轉錄（後）及轉譯表現之研究，國立交通大學，碩士論文，民國 92 年。
 100. 林校賢，細胞生長速率與供氧量對大腸桿菌延胡索酸酶及基因表現之研究：酵素活性及 mRNA 穩定性之探討，國立交通大學，碩士論文，民國 87

年。

101. 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。
102. 張琦艷，生長速率對大腸桿菌延胡索酸酵素活性及 *fumA* 與 *fumC* 基因表現之研究，國立交通大學，碩士論文，民國89年。
103. 傅慧鳳，大腸桿菌之核糖核酸內切酶、poly(A) 聚合酶及 Hfq 蛋白對延胡索酸酶 A 基因表現影響之研究，國立交通大學，碩士論文，民國 92 年。
104. 羅國仁，碳源、供氧量級細胞生長速率對大腸桿菌延胡索酸基因表現之研究：mRNA穩定性及酵素活性之探討，國立交通大學，碩士論文，民國88年。

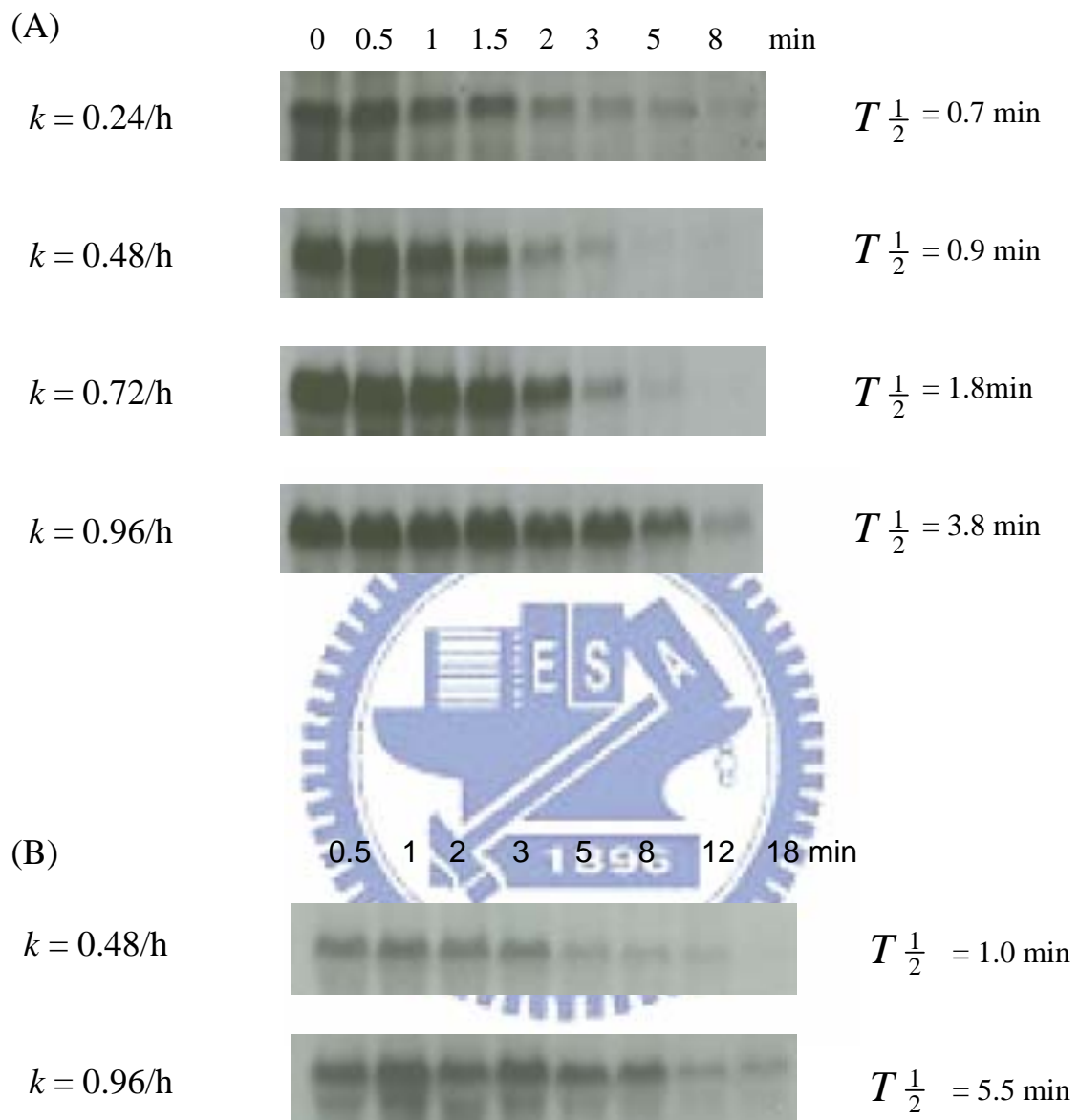


八、附錄

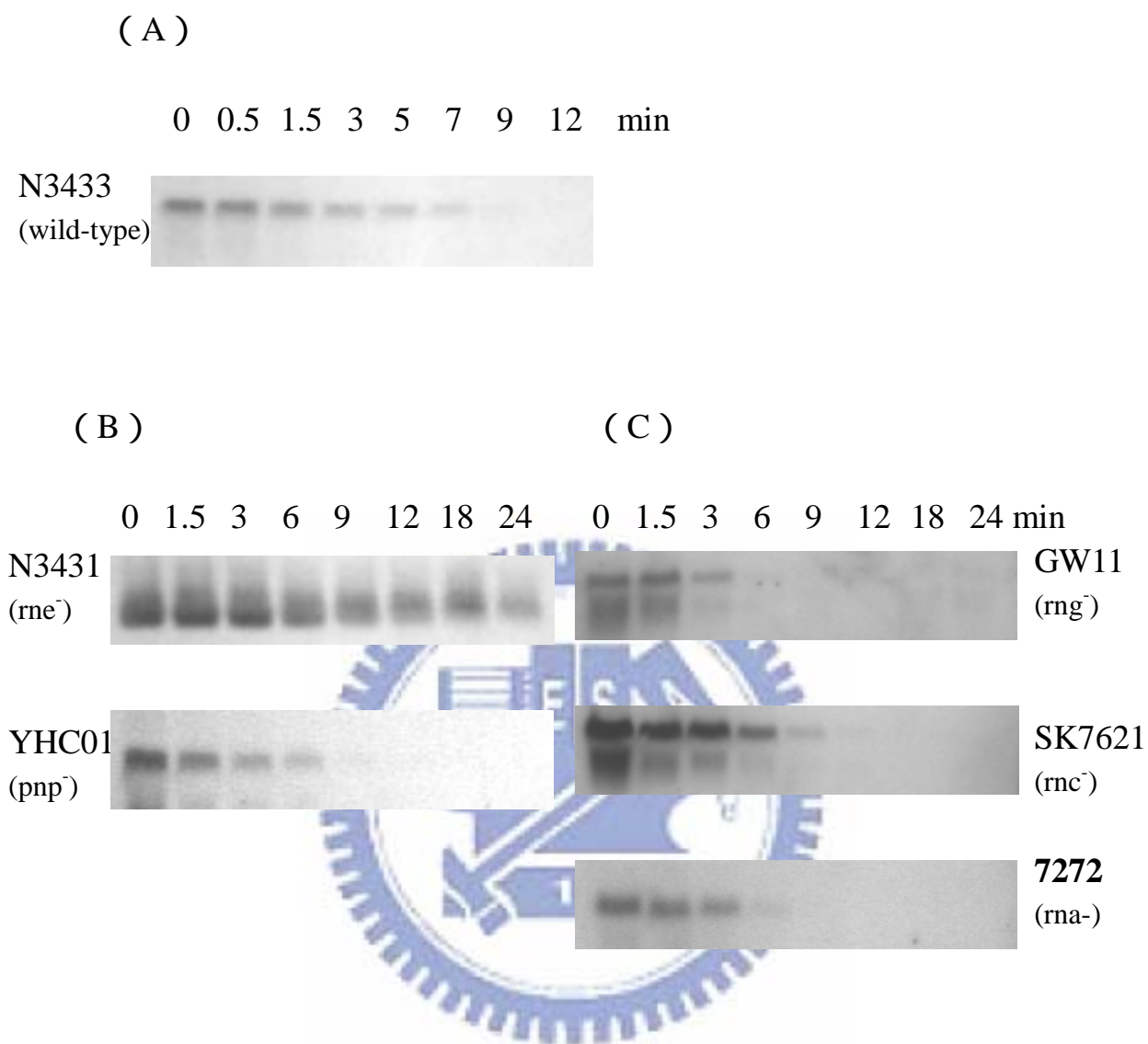


附圖一、RNase E 切割位置之核苷酸序列比較 (Nilsson and Uhlin, 1991)。

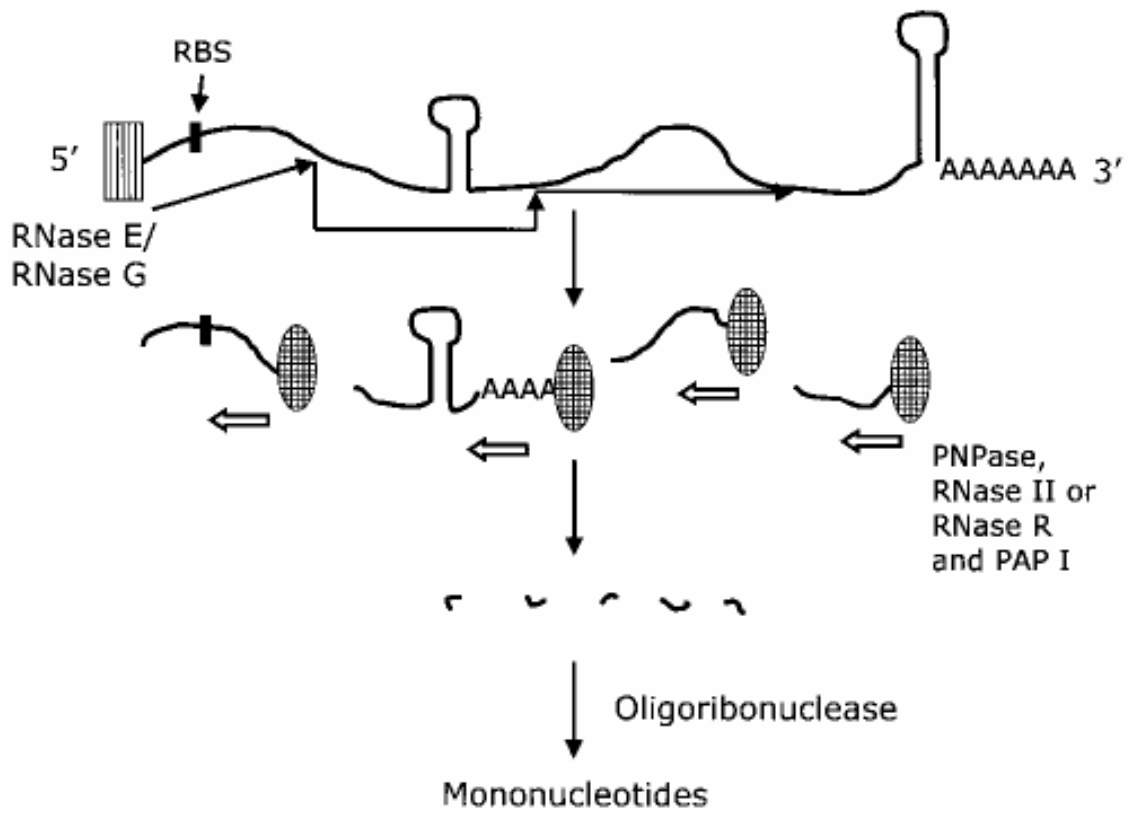
1. *fumA* 或 *fumC* 括弧內數字表示轉譯起始點後之切割位置。
2. *pap* 為 P-fimbrial adhesin 基因的 *papB-papA* intercistronic region 切割位置。
3. 9S_a 為 9S 前驅 RNA (9S precursor RNA) 變成 5S rRNA 的高效能 (high-efficiency) 切割位置。
4. 9S_b 為 9S 前驅 RNA (9S precursor RNA) 變成 5S rRNA 的低效能 (low-efficiency) 切割位置。
5. RNA1 為調節 ColE1 複製子 (replicons) 複製之抑制子 (inhibitor RNA)。
6. -71 為 T4 噬菌體基因 32 (gene 32) 的 RNase E 切割位置。
7. 箭頭表示 RNase E 切割位置。
8. 框線表示序列相似性 (homologies)。



附圖二、大腸桿菌 K12 在連續式培養下，以葡萄糖為碳源，(A) *fumA* mRNA (B) *fumC* mRNA 穩定性分析圖。(林承宏, 2003)

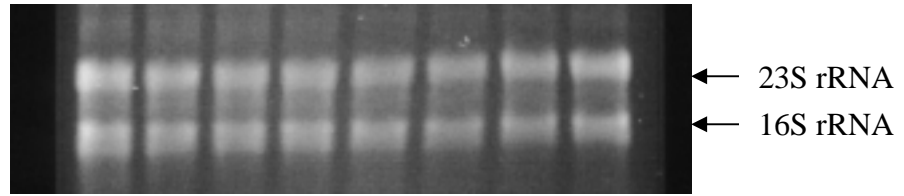


附圖三、在批次式培養下，大腸桿菌野生株與核糖核酸酶突變株，*fumA* 的 mRNA 穩定性分析。(A) 為野生株 N3433，(B) 為 RNase E (*rne*) 與 PNPase (*pnp*) 突變株 (林志賢, 2001)，(C) 為 RNase G (*rng*)、RNaseIII (*rnc*) 與 RNase I (*rna*) 突變株 (傅慧鳳, 2003)。

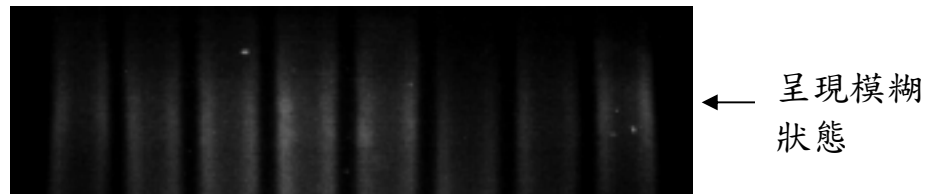


附圖四、大腸桿菌中 RNA 降解的機制之一 (Kushner, 2002)。

(A)



(B)



附圖五、大腸桿菌以連續式培養，控制細胞生長速率為 0.72/h，取定量總 RNA 進行電泳的電泳圖，(A) N3433 (B) LK01。

