

σ^{38} 和 RMF 对有关基因表达调控的研究

丁 清 泉

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

石 浜 明

(日本国立遗传学研究所, 静冈县三岛市 411 日本)

摘 要 将大肠杆菌的 *rpoS* 和 *rmf* 基因突变型和野生型菌株分别培养在营养丰富的 LB 培养基和成分有限的 EP 培养基上。在相同条件下, 进入稳定期后的突变型菌株的活细胞数低于野生菌株。采用 Western blot 方法测定了不同基因产物在稳定期的变化。 σ^{38} 对 RNA 聚合酶核心酶亚单位结构基因 *rpoA*、*rpoB*、*rpoC* 以及 *groEs* 和 *tufA* 基因的表达影响不大, 能抑制 *crp* 和促进 *rmf* 的表达。RMF 在营养丰富的条件下对 *rpoA*、*rpoD*、*groEl*、*rho*、*tufA* 和 *ompA* 基因的表达有促进作用, 而在 EP 条件下的影响并不明显, 对 *crp* 和 *rpoS* 的表达分别有抑制和促进作用。

关键词 转录调控, RNA 聚合酶, σ^{38} 因子, 核糖体调节因子(RMF)

rpoS 基因产物 σ^{38} 是大肠杆菌 RNA 聚合酶的亚单位 σ 家族中的成员之一, 在大肠杆菌进入生长稳定期对基因转录起重要的调控作用^[1]。*rmf* 基因表达产物核糖体调节因子(Ribosome Modulation Factor, RMF)是近年来发现的一种伴随 100S 核糖体(70S 核糖体的二聚体)而出现的由 55 个氨基酸残基组成的蛋白质。大肠杆菌从对数生长期进入稳定期后, 细胞的所有翻译活性随着 100S 核糖体的出现相对有所减少, 而 RMF 的产生则伴随细胞繁殖速率的降低而大量积累^[2]。

为了探讨大肠杆菌生长稳定期特有的这两种因子在基因表达过程中所起的作用, 将 *rpoS* 和 *rmf* 突变株及其相应的野生株分别培养在营养丰富和成分有限的培养基上。测定其生长曲线, 用 Western blot 方法定量分析基因产物产量的变化, 以期对 σ^{38} 和 RMF 的调控功能有所了解。

1 材料和方法

1.1 菌株和抗体

W3110(*rmf*⁺)和 HMY102(*rmf*⁻)^[3]、MC4100(*rpoS*⁺)和 RH90(*rpoS*⁻)^[4]菌株和文中用于 Western blot 分析的抗体由日本国立遗传学研究所分子遗传室提供。

1.2 培养基

LB 培养基按常规方法配制。EP 培养基成分为(%): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 柠檬酸 0.2, K_2HPO_4 1.0, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.35, 蛋白胨 2.0。

1.3 生长曲线测定

将野生型菌株和突变型菌株分别培养在 LB 和 EP 液体培养基中, 37℃ 连续通气培养, 在对数生长期测定 600nm 时 OD 值, 对细胞悬液浓度进行监测, 待 OD 值达到 0.5 时, 取 0.1ml 菌液作系列稀释后, 在 LB 琼脂平板上检测活细胞数, 同时取 10ml 菌液置 -80℃ 保存备用。以后分别在不同时间测定细胞浓度, 活细胞数及有关蛋白含量的变化。

1.4 细胞菌体的处理

取保存于 -80℃ 的各菌液, 解冻, 离心收集菌体并重悬浮于 0.5ml 的 TG 缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 25% 甘油) 中, 加 10 μ l 0.5 mol/L EDTA, 5 μ l 5mg/ml 溶菌酶后, 放 0℃ 10min, 加 50 μ l 10% Triton X-100, 50 μ l 酶混合液 (10mmol/L PMSF, 100mmol/L MgCl₂, 2mol/L KCl, 1mg/ml DNase, 1mg/ml RNase), 37℃ 保温 5min, 再加入 100 μ l 10% SDS, 50 μ l 2-巯基乙醇, 95℃ 保温 5min, 如需要可再用超声波处理 5min, 此菌体降解物可用于电泳。

1.5 SDS 凝胶电泳

SDS 凝胶电泳采用 laemmli 系统^[5], 分离胶浓度 13.5%, 浓缩胶浓度 5.0%, 加入菌体降解物样品时以提纯的相应蛋白作为对照, 确定该蛋白迁移的准确位置。

1.6 Western blot 分析

按常规 Western blot 方法进行^[5]。取下电泳后的凝胶置于转移液 (25mmol/L Tris-HCl, 192mmol/L 甘氨酸和 20% 甲醇) 中浸泡 30min, 采用石墨电极转移装置将凝胶上的蛋白样品转移至硝酸纤维素膜上。膜经封闭处理后, 先后加入第一抗体 (兔抗待测标准蛋白的抗体, 由日本国立遗传学研究所分子遗传研究室提供) 和第二抗体 (偶联辣根过氧化物酶的抗兔 IgG), 用二氨基联苯胺显色, 在激光密度扫描仪上 (Ultrosan laser Densitomer, LKB 产品) 对染色样品进行扫描。

2 结果

2.1 生长曲线的测定

rpoS 和 rmf 野生型和突变型菌株分别培养在 LB 和 EP 培养基中, 通过测定 600nm 时细胞密度和平板计数法分别计算细胞相对浓度和活细胞数, 野生型和突变型菌株在整个生长期中细胞相对浓度无明显差异 (结果未显示), 但后者的活细胞数进入稳定期后明显少于前者, 在成分有限的 EP 培养基中更为显著 (图 1)。这表明, rpoS 基因产物 σ^{38} 及 rmf 基因产物 RMF 是保存稳定期细胞活力的重要因子。

2.2 σ^{38} 、RMF 对某些基因表达的影响

表 1 简单介绍文中涉及到的基因产物的功能。

不同时间取样的大肠杆菌降解产物经 SDS 凝胶电泳, Western blot 转移, 特异性抗体染色, 用激光密度扫描仪对染色斑点进行扫描, 然后换算成相应值绘制图 2 和图 3。结果表明: (1) rmf 突变株的 σ^{38} 产量比野生型低 (LB 8 倍, EP 35 倍), 但 rpoS 突变株的 RMF 产量降低没有这样明显 (LB 2 倍, EP 7 倍)。从 RMF 和 σ^{38} 大量产生的时间看, W3110 (rmf⁺) LB 培养时 σ^{38} 为 96h, EP 培养时 120h; MC4100 (rpoS⁺) LB 培养时 RMF 24h,

σ^{38} 120h, EP 培养时 RMF48h, σ^{38} 144h。这表明野生型菌株的 RMF 大量产生于细菌从对数生长期进入稳定期后不久,而 σ^{38} 大量产生则是在稳定期进入衰亡期期间, RMF 早于 σ^{38} 发挥作用。RMF 对于 rpoS 基因的表达是非常重要的,而 σ^{38} 对于 rpoS 基因的

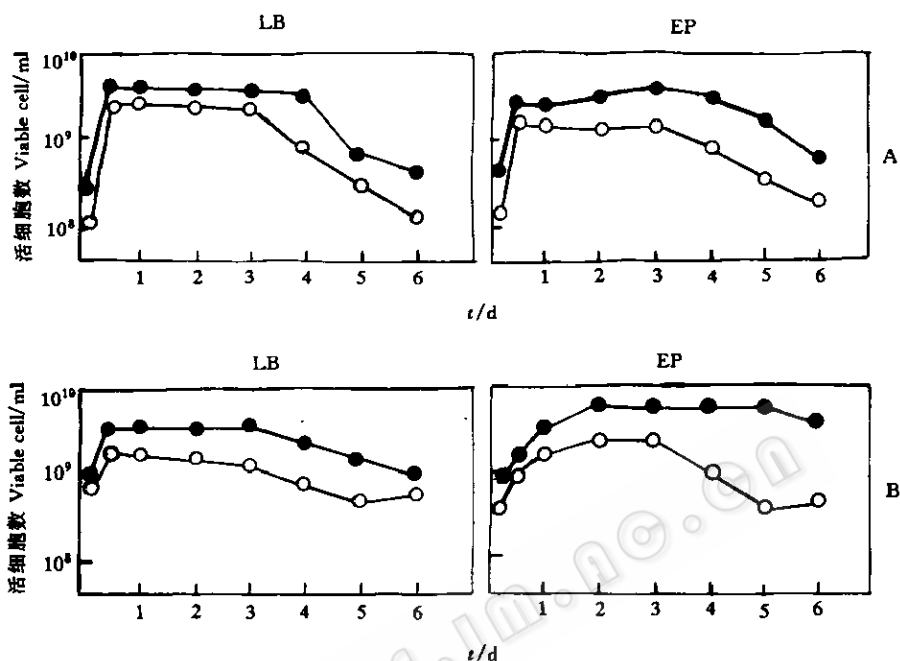


图1 野生型和突变型菌株生长曲线

Fig.1 The culture curve of wild type and mutant strains

A, rpoS strain: MC4100(rpoS⁺●), RH90(rpoS⁻○); B, rmf strain: W3110(rmf⁺●), HMY102(rmf⁻○).

表1 有关基因产物及功能

Table 1 Product and function of some genes

基 因	产物及名称		功 能	文 献
Gene	Product and name		Function	Reference
rpoA	α	RNAp 酶亚单位	和 $\beta\beta'$ 组成核心酶	[6]
rpoB	β	RNAp 酶亚单位	催化 RNA 合成,识别终止信号	[6]
rpoC	β'	RNAp 酶亚单位	结合模板 DNA	[6]
rpoD	σ^{70}	RNAp 酶亚单位	与核心酶结合,识别启动子	[6]
rpoS	σ^{38}	RNAp 酶亚单位	与核心酶结合,识别启动子	[1]
rmf	RMF	核糖体调节因子	伴随 100S 核糖体出现,功能不明	[3]
crp	CRP	cAMP 受体蛋白	促进转录	[7,8]
rho	Rho	转录终止因子	促进转录终止	[9]
tufA	Tu	翻译延长因子	促进翻译	[9]
ompA	OmpA	细胞外膜蛋白	改变膜的通透性	[8]
groE	GroE	热诱导因子	与噬菌体组装有关	[8]

表达的重要性稍次。(2)在 *rpoS* 突变株(RH90)中,蛋白产量增加的有 CRP、GroEs(EP 稳定期)、 α (LB)、 β (LB 衰亡期),产量降低的有 β' (LB 稳定期后期,EP 衰亡期)、 σ^{70} (LB)和 GroEl。(3)在 *rmf* 突变型菌株(HMY102)中,蛋白产量增加的有 CRP、 β (EP)、GroEs (LB 衰亡期)和 σ^{70} (EP 稳定期后期),降低的有 α (LB 稳定期,EP 稳定期后期)、 σ^{70} (LB 稳定期后期)、 β (LB 稳定期早期)、GroEl(LB)、Rho(LB)Tu(LB)和 OmpA(LB 稳定期后期)。

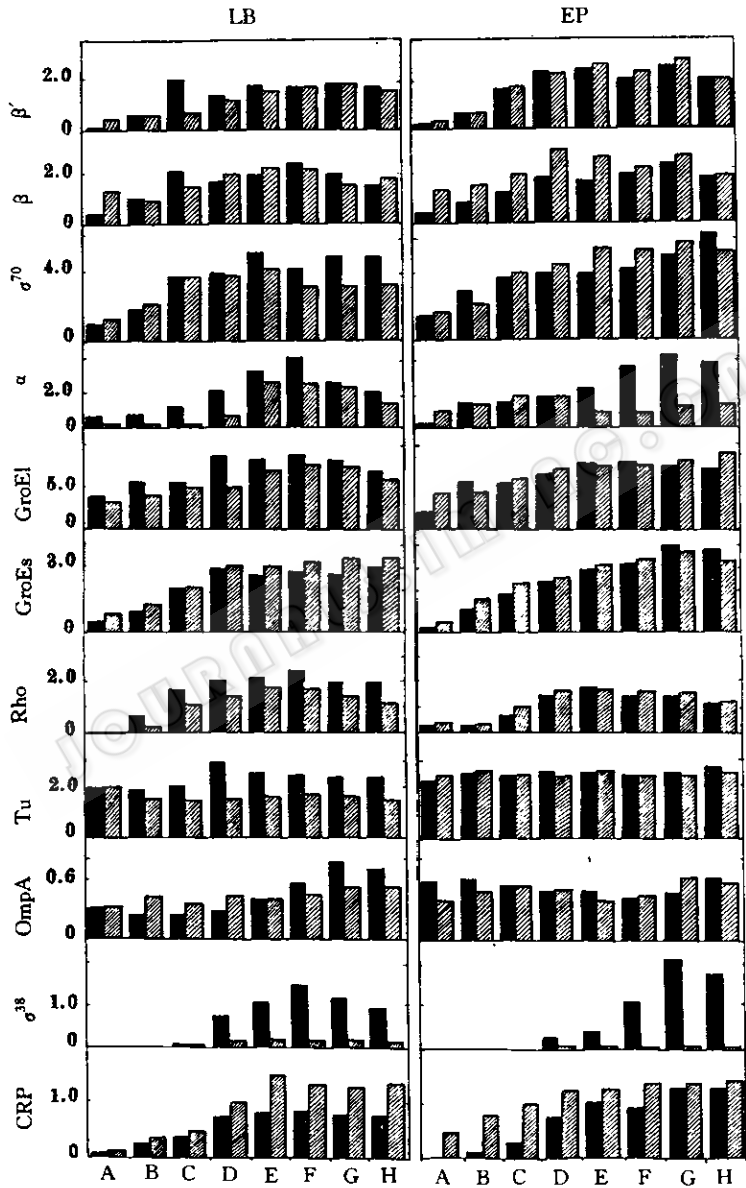


图 2 *rmf* 菌株中不同基因产物产量的变化

Fig.2 The change of the products of some genes in *rmf* strains W3110(*rmf*⁻, filled column) and HMY102 (*rmf*⁻, oblique column). A was a sample in OD 0.5 (600nm). B~H was the sample in 12, 24, 48, 72, 96, 120 and 144h respectively.

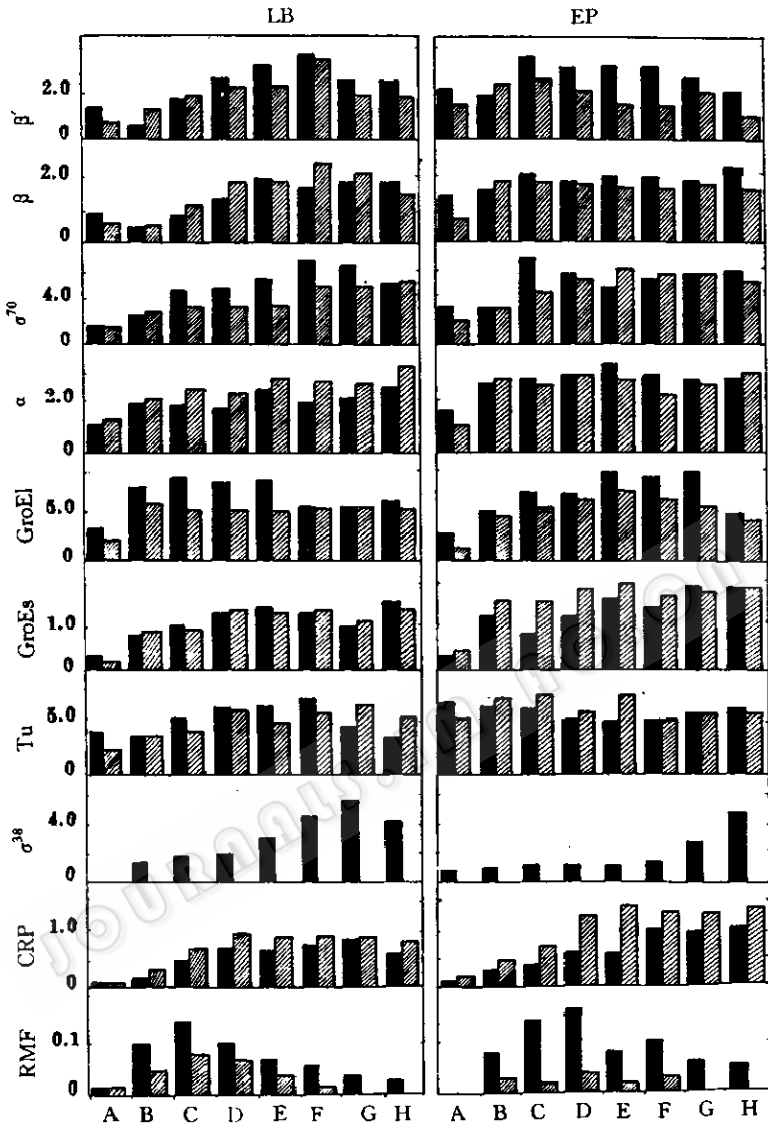


图3 rpoS 菌株中不同基因产物产量的变化

Fig.3 The change of the products of some genes in rpoS strains MC4100 (rpoS⁺, filled column) and RH90 (rpoS⁻, oblique column), A was a sample in OD0.5 (600nm), B~H was the sample in 12, 24, 48, 72, 96, 120 and 144h respectively.

3 讨论

RNA 聚合酶是基因转录最重要的催化剂。大肠杆菌 RNA 聚合酶的核心酶(Core enzyme)由 $\alpha_2\beta\beta'$ 组成,核心酶和 σ 因子结合后被称为全酶(Holoenzyme),全酶和启动子结合后启动基因转录,一旦 RNA 链形成, σ 因子就从全酶中释放,而合成的 RNA 链在没有 σ 因子加入的核心酶的催化下继续延长。大肠杆菌含有不同的 σ 因子,每一种能识

别不同类型的启动子^[10]。其中 σ^{70} 是细菌整个生长期最重要的基本因子。而 σ^{38} 则是在细菌进入稳定期后才发挥作用。本研究采用 rpoS 基因突变型菌株来研究其基因产物 σ^{38} 的调控功能。结果表明: σ^{38} 能抑制 rpoA、rpoB 和 crp 基因的表达, 前两者的表达产物是 RNA 聚合酶亚单位 α 和 β , 后者的产物 CRP 具有促进转录的功能, 抑制了这些基因的表达就降低了 RNA 聚合酶和促转录因子的浓度, 使细胞内整体转录水平下降, 有利于延缓细胞衰亡。 σ^{38} 的大量产生也有可能通过竞争性取代 σ^{70} 与核心酶结合, 使 σ^{70} 可以启动的一些基因的转录水平下降, 因此, σ^{38} 对基因的表达主要在转录水平上进行调控。

RMF 是近年来发现的在大肠杆菌从对数生长期进入稳定期特有的一种小蛋白分子, 尽管人们已对 rnf 基因和 RMF 因子的结构有深入的了解, 但对于 RMF 因子在基因表达过程中的调控作用还不清楚^[12,3]。本研究结果表明: 在丰富营养条件下, RMF 促进 rpoA、rpoD、rpoS、rho、groEl、tufA 和 ompA 基因的表达, 相应的表达产物 α 、 σ^{70} 、 σ^{38} 和 Rho 与转录调控有关, GroE 与热诱导相关, Tu 与翻译调控有关, OmpA 与膜的通透性有关。这些产物都将在大肠杆菌的基因表达全局调控过程中发挥作用, 有利于细菌在营养缺乏等恶劣环境中保持活力。70S 核糖体是 mRNA 翻译成蛋白质的重要场所, RMF 能促进 70S 核糖体聚合形成 100S 核糖体, 因此推测 RMF 对基因表达的影响主要在翻译阶段。RMF 是直接通过本身的作用还是间接通过聚合 70S 核糖体对基因表达进行调控还有待于研究。

参 考 文 献

- [1] Tanaka K, Takayanagi Y, Fujita N *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 3511~3515.
- [2] Wada A, Yamazaki Y, Fujita N *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 2657~2661.
- [3] Yamagishi M, Matsushima H, Wada A *et al.* *The EMBD Journal*, 1993, **12**(2): 625~630.
- [4] Hengge-Aronis R, Lange R, Hennenberg R *et al.* *J Bacteriol*, 1993, **175**: 259~265.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning*, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1989. 18.60~18.75.
- [6] Ishihama A. *Adv Biophys*, 1990, **26**: 19~31.
- [7] Ross W, Gosink K K, Salomon J *et al.* *Science*, 1993, **262**: 1407~1413.
- [8] Harley C, Reynolds R P. *Nucl Acids Res*, 1987, **15**(5): 2340~2535.
- [9] Glass R E. *Gene Fuction*. London: Croom Helm Lid, 1982. 57~92.
- [10] Ishihama A, Yoshikawa H. *Control of cell growth and division*. Tokyo: Japan Sci Soc Press, 1991. 121~140.

STUDIES ON MODULATION AND CONTROL OF σ^{38} AND RMF FOR THE EXPRESSION OF SOME GENES

Ding Qingquan

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071*)

Akira Ishihama

(*National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka 411, Japan*)

Abstract The *E.coli* mutants and wild type strains of *rpoS* and *rmf* were cultured in rich medium LB and limited component medium EP respectively. During the stationary phase, the viable cells of mutants were less than wild type strains's. The change of the product of serial proteins was quantified with Western blot. σ^{38} has no effects on the product of *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *groE* and *tu* gene, depress the transcription of *crp* and promote the expression of *rmf*. RMF can promote expression of *rpoA*, *rpoD*, *groEl*, *rho*, *ompA* and *tufA* gene in rich medium, but not in limited medium, and then depress and promote the expression of *crp* and *rpoS* respectively.

Key words Transcription control, RNA polymerase, σ^{38} factor, Ribosome modulation factor (RMF)