

rnf 基因启动子识别因子选择性研究

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)

摘 要 分别用 σ^{70} 或 σ^{38} 因子和核心酶(Core enzyme)重建 RNA 聚合酶全酶(Holoenzyme)对含有 rnf 基因启动子的 DNA 模板进行体外转录。不同的限制性内切酶酶切片模板证实了 rnf 基因转录起始位点, 尽管 rnf 基因在大肠杆菌进入稳定期大量表达, 但是其启动子对稳定期起重要作用的 σ^{38} 因子的识别能力很低, 而只能被 σ^{70} 所识别。rnf 基因启动子体外转录的最适温度为 37℃, 最适 NaCl 浓度为 50mmol/L。

关键词 体外转录, 核糖体调节因子, RNA 聚合酶, 启动子选择性

核糖体调节因子(Ribosome Modulation Factor, 简称 RMF)是大肠杆菌从对数生长期进入稳定期伴随 100S 核糖体(70S 核糖体的二聚体)而出现的一种蛋白因子, 其结构基因 rnf 基因位于大肠杆菌基因图 21.8min 处, 编码 55 个氨基酸。在细胞迅速生长的对数期 rnf 保持沉默, 一旦细胞生长从对数期进入稳定期, rnf 即开始大量表达^[1]。rnf 基因已被克隆和序列分析, 采用引物延伸法确定了 rnf 基因转录的起始位点, 改变 rnf 基因的结构, 细菌的 100S 核糖体不能产生, 细胞的存活率明显降低^[2]。

σ 因子是大肠杆菌 RNA 聚合酶的重要亚单位, 被认为具有识别启动子功能。 σ^{70} (rpoD 基因产物)是大肠杆菌迅速生长期的必需因子, 而 σ^{38} (rpoS 基因产物)则在细胞进入稳定期后对基因转录起重要调控作用^[3]。采用 rnf 和 rpoS 基因突变株的研究表明, RMF 和 σ^{38} 对保存稳定期的细胞繁殖活力是不可缺少的调节因子^[4]。

不同类型的 σ 因子组成的 RNA 聚合酶全酶能识别不同类型的启动子。Tanaka 根据启动子对 σ^{70} 或 σ^{38} 的选择性将启动子分为三组, 第一组被称为“当家启动子 (Housekeeper promoter)”, 能被 σ^{70} 和 σ^{38} 同时识别; 第二组“严紧启动子 (Stringent promoter)”, 主要被 σ^{70} 识别; 第三组“变速启动子 (Gearbox promoter)”, 只能被 σ^{38} 所识别^[5]。

RMF 和 σ^{38} 均为大肠杆菌稳定期的产物, 根据野生型菌株 σ^{38} 和 RMF 产生的时间来看, RMF 早于 σ^{38} ^[4], 但 rnf 基因能否被 σ^{38} 所识别尚无确切证据。本研究采用 σ^{70} 或 σ^{38} 和核心酶($\alpha_2\beta\beta'$, 简称 E)体外重组 RNA 聚合酶全酶($E\sigma^{70}$ 或 $E\sigma^{38}$), 以主要被 σ^{70} 识别的 LacUV5, 被 σ^{38} 识别的 osmY 基因启动子作为对照, 对含 rnf 启动子的 DNA 模板进行体外转录, 探讨 rnf 基因启动子的识别因子选择性及最佳体外转录条件。

1 材料和方法

1.1 RNA 聚合酶

σ^{70} 按 Igarashi 方法提纯^[6]。 σ^{38} 和核心酶(α, β, β')按 Tanaka 方法提纯^[5]。核心酶与 σ^{70} 或 σ^{38} 体外重建全酶的分子比为 1:4。上述材料由日本国立遗传学研究所分子遗传室提供。

1.2 含有基因启动子的 DNA 模板

含有 lacUV5、rmf、osmY 基因启动子的质粒 DNA 分别从 pKB252^[7] pT109^[2] 和 pDY 1.4^[8] 菌株中按常规方法提纯^[9]，经限制性内切酶消化提取本研究所需片段作为体外转录的模板。

1.3 体外转录

体外转录采用标准单循环(single-round)方式完成^[6,10]，简述如下：将纯化的核心酶(E)与 σ^{70} 或 σ^{38} 按分子比 1:4 重建全酶 $E\sigma^{70}$ 或 $E\sigma^{38}$ 。标准的体外转录程序为：10 μ l 转录反应液(50mmol/L Tris-HCl pH7.6, 3mmol/L MgCl₂, 50mmol/L NaCl, 0.1mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT, 0.1pmol 模板 DNA, 1pmol 的全酶 $E\sigma^{70}$ 或 $E\sigma^{38}$)于 37℃ 保温 30min，加入 10 μ l 含有底物的缓冲液(0.2mmol/L ATP, GTP 和 CTP, 0.05mmol/L UTP, 1 μ Ci[α -³²P] UTP, 200 μ g/ml Heparin)继续保温 5min，终止反应后采用乙醇沉淀回收转录产物 RNA，样品在含 8mol/L 尿素的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳，凝胶置于显像板(BAS-III, Fuji Imagine Plate)内放射自显影，然后在显像分析仪(Fuji X Bio-Imaging Analyzer, BAS2000)上拍照及分析转录产物的放射强度。

2 结果和讨论

2.1 rmf 基因启动子对识别因子的选择性

为了证明 $E\sigma^{70}$ 和 $E\sigma^{38}$ 的可靠性，以对 $E\sigma^{70}$ 亲和性大的 lacUV5 和对 $E\sigma^{38}$ 亲和性大的 osmY 启动子作为对照实验，分别用 $E\sigma^{70}$ 、 $E\sigma^{38}$ 转录 lacUV5、osmY 和 rmf 启动子。放射自显影的结果见图 1，它表明 rmf 只能被 σ^{70} 识别。比较三种启动子的核酸序列(图 2)，rmf 启动子的 -35 区与 lacUV5 相似，而与 osmY 相差甚远；三种启动子的 -10 区均富含 TA，差别不大，可以推测 σ 因子的识别位置是在 -35 区。尽管 rmf 和 osmY 都是在大肠杆菌稳定期表达，但 rmf 表达在稳定期前期^[2]，而 osmY 则是在稳定期后期^[8]。同是稳定期表达的基因启动子识别的 σ 因子就可能不同，按照 Tanaka 的分类法^[5]，rmf 应归于第二组“严紧启动子”。

从野生型菌株 RMF 和 σ^{38} 大量产生的时间来看，RMF 早于 σ^{38} ^[4]。rmf 基因依赖于 σ^{38} 转录的可能性不大。 σ^{70} 是大肠杆菌生长时基因转录所必需的 RNA 聚合酶的亚单位，其产量大于 σ^{38} ，因此，rmf 能被 σ^{70} 识别的理论根据更充分。本实验结果直接证实了 Yamagishi 关于 rmf 基因表达不需要 katF(即 rpoS)基因产物的推测^[2]。

2.2 rmf 基因转录起始位点的分析

Yamagishi 根据引物延伸法确定 rmf 基因转录的起始点位于结构基因上游 -65 处。在结构基因 +56、+140 处分别含有 Hap II 和 EcoT14I 酶切位点^[2]，依此计算 EcoT14I

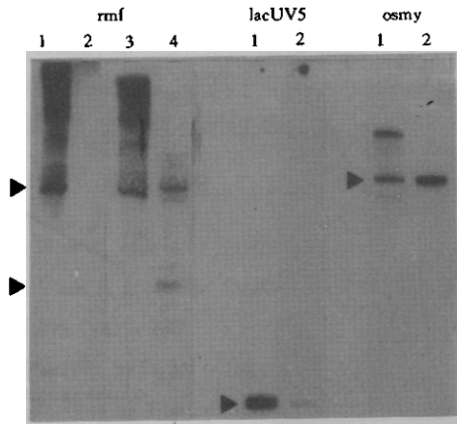


图1 标准条件下体外转录产物的放射自显影

- ▲表示转录产物 RNA 的位置, 下面三角形表示经 HpaII 消化的 rmf 启动子模板转录的产物位置;
1,2 分别是 $E\sigma^{70}$ 和 $E\sigma^{38}$ 的转录产物; 3 和 4 是采用相同的条件(3 无 HpaII, 4 加 HpaII)
消化后用 $E\sigma^{70}$ 转录的产物。

Fig.1 Transcripts by truncated DNA template in standard condition

- ▲ Indicated the site of transcripts. 1 and 2 was transcript by $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^{38}$ separately.
4 was transcript of rmf DNA fragment digested with HpaII by $E\sigma^{70}$. 3 was
digested with same condition but no HpaII.

	-35	-10
rmf	GCGCATTGAOCCGAGTTATGATTCCGGTATTGCTTAACCTGTG	
lacUV5	AGGCCTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGAAT	
osmY	TATCCCGACGGTTTCAAATTTGTGATCTATATTTAACAAAGT	

图2 三种启动子序列的比较

Fig.2 Comparison of three promoters

片段 DNA 模板转录产物 RNA 为 205 个碱基, 用 HpaII 再消化的模板转录产物应为 121 个碱基, 图 1 中 4 号样品处的结果证实了这一点, 图中 205 个碱基迁移位置仍有转录物出现, 可能是由于 HpaII 消化不完全所致。

2.3 温度对 rmf 转录的影响

采用标准的反应系统但在不同反应温度(包括酶和模板的预热温度和加入底物后的 RNA 合成温度)下进行体外转录, 以放射性强度最大的转录物的转录水平为 100%, 其它的依据放射强度换算成相应值。图 3 的结果表明在 37℃ 时 $E\sigma^{70}$ 对 rmf 的转录水平最高, 温度愈低下降愈快, 而 $E\sigma^{38}$ 无论处于什么温度, 其转录活性均未超过 5%。

2.4 盐浓度对 rmf 转录的影响

大肠杆菌在生长过程中, 由于细胞和环境不断进行物质交换, 细胞内外的盐浓度将会不断变化, 盐浓度的变化将直接影响基因的表达。按本实验要求, 采用不同浓度 NaCl

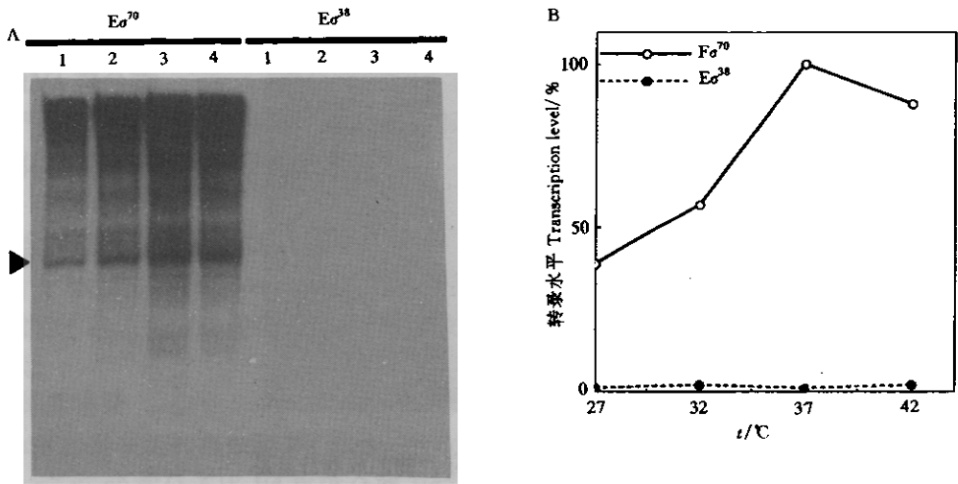


图3 温度对 *rnf* 转录的影响

A: 1, 2, 3 和 4 分别是在 27、32、37 和 42°C 条件下转录; B: 转录水平的比较。

Fig.3 Effect of temperature *in vitro* transcription for *rnf* promoter

A: 1, 2, 3 and 4 was transcript in 27, 32, 37 and 42°C, respectively;

B: The comparison of transcription level in different reaction temperature

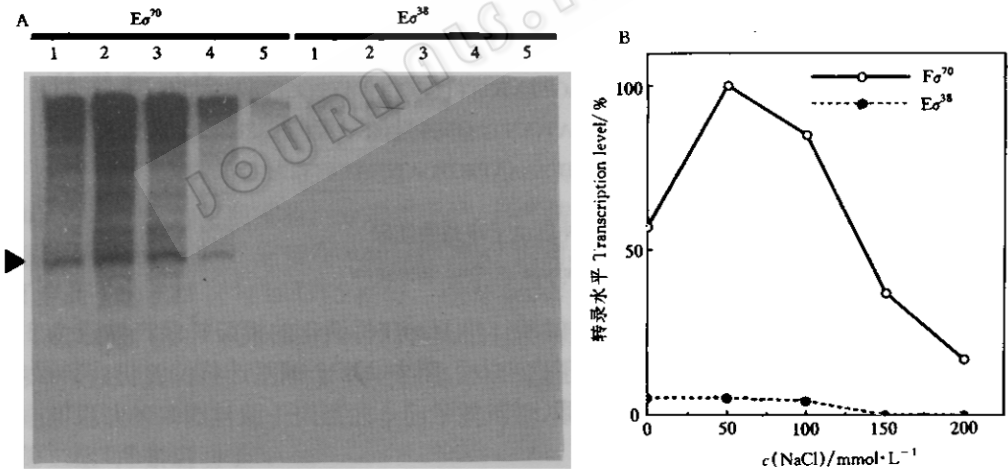


图4 NaCl 浓度对 *rnf* 转录的影响

A: 1, 2, 3, 4 和 5 分别表示反应缓冲液中含 0、50、100、150 和 200mmol/L NaCl;

B: 转录水平的比较。

Fig.4 Effect of NaCl concentration *in vitro* transcription for *rnf* promoter

A: 1, 2, 3, 4 and 5 was transcript in 0, 50, 100, 150 and 200mmol/L NaCl concentration buffer, respectively;

B: The comparison of transcription level.

取代标准反应系统中 50mmol/L 的 NaCl, 图 4 结果表明, $E\sigma^{70}$ 对 rmf 基因启动子体外转录的最适 NaCl 浓度为 50mmol/L, 当 NaCl 浓度超过 100mmol/L 则转录水平大为下降。可见低盐浓度有利于 rmf 的转录, 在高于 150mmol/L NaCl 时, $E\sigma^{38}$ 不能转录 rmf, 而在低于 100mmol/L 时其转录水平也不超过 $E\sigma^{70}$ 的 5%。

参 考 文 献

- [1] Wada A, Yamazaki Y, Fujita N *et al. Proc Acad Sci USA*, 1990, **87**: 2657 ~ 2661.
- [2] Yamagishi M, Matsushima H, Wada A *et al. The EMBO Journal*, 1993, **12**(2): 625 ~ 630.
- [3] Ishihama A. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 2483 ~ 2489.
- [4] 丁清泉, 石浜明. *微生物学报*, 1996, **36**(5): 344 ~ 350.
- [5] Tanaka K, Takayanagi Y, Fujita N *et al. Proc Acad Sci USA*, 1993, **90**: 3511 ~ 3515.
- [6] Igarashi K, Ishihama A. *Cell*, 1991, **65**: 1015 ~ 1022.
- [7] Kajitania M, Ishihama A. *Nucl Acids Res*, 1983, **11**: 671 ~ 686.
- [8] Yim H H, Villarejo M. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 3637 ~ 3644.
- [9] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982, 365 ~ 373.
- [10] Zou C, Fujita N, Igarashi K *et al. Mol Microbiol*, 1992, **6**: 2599 ~ 2605.

STUDIES ON SELECTIVITY OF RECOGNIZING FACTOR FOR rmf PROMOTER

Ding Qingquan

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

Akira Ishihama

(National Institute of Genetics, Mishima, shizuoka 411 Japan)

Abstract The truncated DNA template carrying rmf gene promoter was transcribed by *E. coli* RNA polymerase holoenzyme ($E\sigma$) reconstituted with core enzyme ($\alpha\beta\beta'$) and σ^{70} or σ^{38} *in vitro*. The initial site of the transcription of rmf was confirmed with different restriction endonuclease. rmf promoter can be recognized by $E\sigma^{70}$ but not $E\sigma^{38}$. The suitable temperature for *in vitro* transcription was 37 °C, NaCl concentration was 50mmol/L.

Key words *In vitro* transcription, Ribosome Modulation Factor (RMF), RNA polymerase, Promoter selectivity