

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (4) :449 - 454; 4 April 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.04.012

反义 RNA 介导的大肠杆菌非必需基因 *rpsF* 的基因沉默

唐欣茹^{1,3}, 殷瑜^{2,3}, 戈梅³, 陈代杰^{1*}

¹华东理工大学生物工程学院, 上海 200237

²上海交通大学药学院, 上海 200240

³上海来益生物药物研究开发中心, 上海 201203

摘要: 【目的】探讨反义 RNA 技术介导的大肠杆菌非必需基因 *rpsF* 基因沉默导致菌体生长受抑制的原因。【方法】将 *rpsF* 基因 5' 端 41 - 230 bp 的片段反向插入带有末端配对结构的反义表达载体 pHN678, 获得重组质粒, 导入大肠杆菌宿主获得反义 RNA 菌株 *Escherichia. coli*/pHNF, 并用诱导剂 IPTG 诱导反义 RNA 表达, 通过与对照菌 *E. coli*/pHN678 的液体生长状态差异判断菌体生长表型; 采用 Real time RT-PCR 方法跟踪分析转录水平。【结果】构建了针对 *rpsF* 的反义 RNA 菌株, 且其生长受抑制程度与 IPTG 浓度呈正相关。IPTG 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 菌体生长未受抑制, 但靶基因 *rpsF* 的 mRNA 量降低了 36%, 而 *rpsR* 是位于同一操纵子下游的必需基因, 其转录水平却未受影响; IPTG 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 菌体生长明显受抑制, 经分析发现 *rpsR* 转录水平降低了 12%。【结论】反义 RNA 菌株 *E. coli*/pHNF 生长受抑制的原因是由于此反义 RNA 引起了同一操纵子下另一必需基因 *rpsR* 的转录水平降低。

关键词: 反义 RNA, 非必需基因 *rpsF*, 基因沉默, 操纵子, Real time RT-PCR

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 04-0449-06

基因沉默技术是研究基因功能、进行代谢调控的重要工具, 反义 RNA 技术 (Antisense RNA, asRNA) 属其中重要的一种, 即利用基因重组, 构建人工表达载体, 使其离体或体内表达反义 RNA, 通过碱基互补与靶 RNA 配对结合, 抑制靶基因的表达, 从而影响细胞的功能^[1]。与基因敲除等功能缺失性研究方法相比, 反义 RNA 技术具有投入少、周期短、操作简单等优点^[2]。并已经成功用于研究不同细菌系统的基因功能, 如变形链球菌 (*Streptococcus mutans*)^[2]、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)^[3] 以及大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[4] 等。理论上, 反义 RNA 技术作用

位点为必需基因时才能达到基因沉默引起的菌体生长受抑制效果, 而非必需基因的沉默不会影响细菌生长即菌体生长表型的变化, 但近来 Meng 等^[5] 应用反义 RNA 技术进行基因沉默时发现, 靶向一些非必需基因的反义菌株生长也会受抑制, 此现象的原因未做进一步分析。

核糖体蛋白 (ribosomal protein) 是组成细菌核糖体的主要成分, 在细胞内蛋白质生物合成过程中发挥重要作用。大肠杆菌核糖体由两个亚基即 30S 亚基与 50S 亚基组成, 其中 30S 亚基由 16S rRNA 与 21 种核糖体蛋白 S1-S21 构成^[6]。非必需基因 *rpsF*

基金项目: 国家自然科学基金 (81102355)

* 通信作者。E-mail: hceb001@163.com

作者简介: 唐欣茹 (1988 -), 女, 内蒙古人, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程 (微生物方向)。E-mail: xrutang@163.com

收稿日期: 2013-08-20; 修回日期: 2013-12-03

与必需基因 *rpsR* 分别表达核糖体蛋白 S6 以及 S18, 据文献报道, 它们位于大肠杆菌同一操纵子即一个转录单位上^[7-8]。

本实验室在应用反义 RNA 技术构建针对核糖体蛋白的反义 RNA 菌株 (Antisense RNA strain)^[9] 时也发现: 针对 30S 亚基非必需基因 *rpsF* 的反义 RNA 菌株生长表型会受影响, 本文拟从操纵子水平上针对此现象进行研究以找到原因。

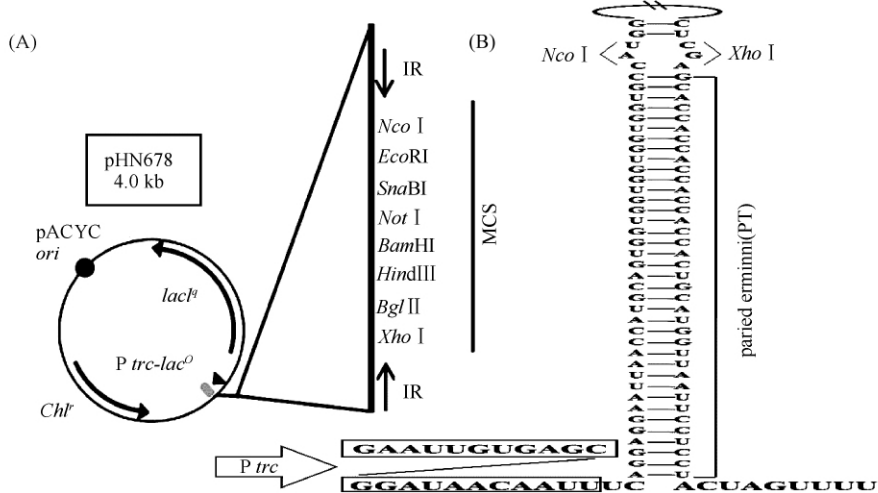


图 1. 反义 RNA 表达载体 pHN678 (A) 与 PT 结构 (B)

Figure 1. pHN678-asRNA expression vector (A) and its PT structure (B). A: Arrows indicate open reading frame or promoter, and circle indicates ori. MCS, multiple cloning site; IR, inverted repeat; Po, trc promoter (IPTG induced) and lactose operator sequence; Chl^r, chloramphenicol-resistance gene. B: Structure of a typical paired terminus from 5' end of pHN678. The curved line indicates the asRNA sequence (or a MCS control sequence in the case of an empty vector). The residues that have been underlined are transcribed from the lac^o sequence.

1.1.2 工具酶及试剂盒: PCR 产物纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购于爱思进生物技术, DEPC 水购于上海生物工程公司, T4 DNA 连接酶、PrimeStar HS DNA 聚合酶、*Xho* I、*Nco* I 内切酶均购自宝生物, 细菌总 RNA 提取试剂盒、FastQuant RT Kit (With gDNase) 及 SYBR Green Real-Time qPCR 试剂盒均购于天根生化科技公司、RiboPure Bacteria Kit 购于 Fermentas 公司。

1.1.3 培养基及试剂: 酵母提取物和蛋白胨为 Oxiod 公司产品; 氯霉素及 IPTG 均购自上海生物工程公司; 其他均为国产分析纯试剂, 购于国药上海试剂公司。

1.1.4 仪器: BIO-RAD680 Model Microplate Reader (美国), 棱光 UV762 紫外/可见分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司), Centifuge 5415 R (德国 Eppendorf), Mastercycler ep PCR 仪 (德国 Eppendorf) 及 Mastercycler ep realplex 实时荧光定量

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒: *E. coli* DH5 α 菌株由本实验室保藏; 携带末端配对 (PT) 结构的质粒 pHN678^[4-10], 如图 1 所示, 由英国皇家兽医学院 Liam Good 实验室惠赠。

PCR 仪 (德国 Eppendorf)。

1.2 反义 RNA 菌株的构建

本文中大肠杆菌基因组 DNA 提取、质粒 DNA 小量提取、酶切、回收、连接、转化等常见分子生物学操作见黄培堂等译著的《分子克隆实验指南》。

1.2.1 asrpsF 片段 PCR 扩增: 根据 *E. coli* BL21 (DE3) (GenBank 号: NC_012971) 的 *rpsF* 基因序列, 利用 Vector NTI 软件设计引物。在 *rpsF* 基因 5' 端 41-230 bp 片段处设计反义引物, 用于扩增大小约为 210 bp 的 asrpsF 片段, 如图 2 所示^[7-8], 上游引物 P1 为 5'-ATATACTCGAG (*Xho*I) AGAGCGAACA GGTCCGGGC-3', 下游引物 P2 为 5'-GGCAACCA TGG (*Nco*I) GTAGTTTCCAGCTCAT CGAT-3', 由上海生工生物工程公司合成。以大肠杆菌 DH5 α 基因组 DNA 为模板, P1 和 P2 为引物, PCR 扩增 asrpsF 片段, PCR 扩增条件为: 预变性 94 $^{\circ}$ C 2 min; 30 次循环变性 94 $^{\circ}$ C 2 min, 60.9 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min。

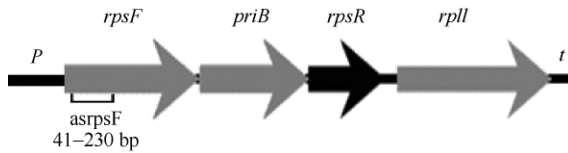


图 2. 大肠杆菌 *rpsF* 操纵子与反义片段

Figure 2. *Escherichia coli* operon *rpsF* targeted and silenced by asRNA. Fragment of *asrpsF* starts from 41 bp to 230 bp around 5' end of gene *rpsF*. Dark arrows is essential gene, while gray arrows are nonessential genes, promoter (P), transcription terminator (t), and operon structure was based on PEC database and references.

1.2.2 反义 RNA 菌株的构建: PCR 产物经电泳鉴定、纯化、酶切后重组至 *NcoI* 与 *XhoI* 双酶切后的质粒 pHN678 中获得重组质粒 pHNF。热激法将重组质粒 pHNF 和 pHN678 分别转化至 *E. coli*/DH5 α 感受态细胞中,涂布于含有 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素抗性的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,获得反义 RNA 菌株 *E. coli*/pHNF 与对照菌株 *E. coli*/pHN678。

1.3 反义 RNA 菌株阳性克隆的验证

采用载体上酶切位点 (*NcoI* 与 *XhoI*) 外的片段设计上游引物 P3: 5'-CGACATCATAACGGTCTGGCAAAT-3'、下游引物 P4: 5'-GGCAACCATGGTAGTTTCCAGCTCATCGAT-3' 进行菌落 PCR 验证^[11]。分别挑取四株实验菌 *E. coli*/pHNF 与一株阴性对照菌 *E. coli*/pHN678 单菌落于 3 mL LB (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素) 中,37 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min 培养 4 h。配制如下 50 μL 菌落 PCR 体系:10 \times buffer 5 μL , Mg^{2+} 2 μL , dNTP 2 μL , 上下游引物 P3、P4 (20 mmol/L) 各 1 μL , ddH₂O 37.5 μL , *Taq* 酶 0.5 μL , 1 μL 上述菌株的单菌落培养后的菌液。菌落 PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 60.9 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环 30 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 4 min。

1.4 反义 RNA 菌株生长表型的测定

反义 RNA 菌株 *E. coli*/pHNF 及对照菌 *E. coli*/pHN678 在含有 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min, 过夜培养。将过夜培养的菌液接种至新鲜的 LB 液体培养基中 (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素), 培养至对数期中期, 对菌体培养液菌浓做适当的稀释后, 按如下条件操作。向无菌微生物生长分析百孔板各孔中分别加入初始菌浓为 5×10^3 cfu/mL、氯霉素浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、IPTG (终浓度为 0、100、200、300、500 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 的反义 RNA 菌株 *E. coli*/pHNF 及对照菌 *E. coli*/pHN678 菌悬液 200 μL , 每个条件设 5 个

重复。以 Bioscreen C MBR 自动微生物生长分析仪实时监测菌体生长情况, 培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$, 中等强度持续震动, 每 15 min 自动测定 OD_{600} 值, 绘制生长曲线, 根据生长曲线判断生长表型。

1.5 细菌总 RNA 提取及反转录

采用细菌总 RNA 提取试剂盒分别提取不同 IPTG 浓度诱导前后反义 RNA 菌株 *E. coli* /pHNF 的总 RNA, 参考 RiboPure Bacteria Kit 产品说明书去除总 RNA 中的基因组 DNA, 依据如下公式: RNA 浓度 = $(A_{260} - A_{280}) \times \text{稀释倍数} \times 0.04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 测定总 RNA 的浓度。使用 FastQuant RT Kit (With gDNase) 反转录试剂盒中的 gDNase 进一步去除总 RNA 中的基因组 DNA, 消除基因组 DNA 对本实验的影响, 使用试剂盒中的随机引物将 1 μg 的总 RNA 进行反转录反应, 得到 cDNA 并置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.6 Real time RT-PCR

选择位于同一操纵子的 *rpsF*、*rpsR* 基因进行 mRNA 转录水平分析, 以大肠杆菌内源稳定表达的 RNA 聚合酶 α 亚基 *rpoA* 基因^[12] 作为内参基因。根据 *E. coli* BL21 (DE3) 基因组 (GenBank 号: NC_012971) 设计用于荧光定量 PCR 扩增目标片段的引物序列, 由上海生工生物工程公司合成。引物特征见表 1。

反应体系 20 μL 及反应程序均按照天根公司 SYBR Green Real-Time qPCR 试剂盒说明书操作, 每个反应设 3 个重复。采用相对定量的 Comparative Delta-delta Ct 方法, 分析目的基因相对表达量。

表 1. Real time RT-PCR 引物序列

Table 1. Primers of real time RT-PCR

name	primer (5'→3')
rpoA-F	AAGCTGGTCATCGAAATGGAA
rpoA-R	GCCGCACGACGAATCG
rtrpsF-F	CGTACCAAGCAGCGTGTAC
rtrpsF-R	GAAATCATCGCGACGCTC
rtrpsR-F	ATGGCACGTTATTTCCGTCGTCG
rtrpsR-R	ACAGGTAGCGAGCGCTTTGATAG

2 结果

2.1 asrpsF 片段扩增与反义 RNA 菌株阳性克隆的验证

用材料与方法中所设计合成的一对引物 (P1 与 P2) PCR 扩增 *E. coli* DH5 α 的 *rpsF* 基因, 扩增产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在约 210 bp 处有一特

异性扩增条带,分子量大小与理论扩增值相符,如图3-A所示,说明 *asrpsF* 片段扩增成功。利用材料与方法中的上、下游引物(P3与P4)进行对照组 *E. coli/pHN678* 与实验组 *E. coli/pHNF* 的菌落PCR验证,扩增产物经3%琼脂糖凝胶电泳分析,如图3-B所示,阴性对照 *E. coli/pHN678* 扩增条带大小约为290 bp左右,所挑选的4株实验菌 *E. coli/pHNF* 扩增条带大小约为400 bp左右,分子量大小与理论值相符,验证结果说明所挑选的4株反义RNA菌株均为阳性克隆株。

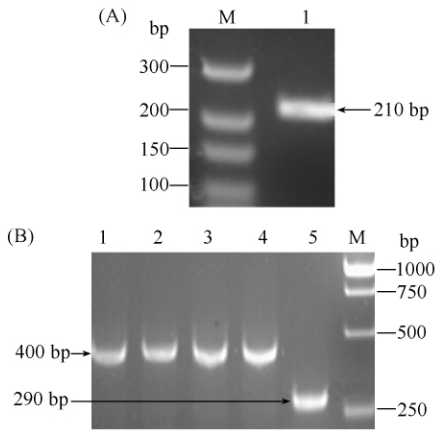


图3. *asrpsF* 片段 PCR 扩增结果 (A) 与菌落 PCR 验证结果 (B)

Figure 3. PCR amplification of *asrpsF* (A) and Clone verification (B). A: M, DNA marker; lane 1, *asrpsF*; B: lane 1-4, *E. coli/pHNF*; lane 5, *E. coli/pHN678* control; M, DNA marker.

2.2 反义RNA菌株生长表型的测定

不同IPTG诱导浓度下实时监测对照菌 *E. coli/pHN678* 与反义RNA菌株 *E. coli/pHNF* 液体生长情况,实验结果如图4所示,在实验范围内对照菌 *E. coli/pHN678* 的生长不受IPTG诱导浓度的影响,而反义RNA菌株 *E. coli/pHNF* 随着IPTG高于200 $\mu\text{mol/L}$ 时,生长明显受影响,且随着诱导浓度的升高抑制现象越明显。实验结果验证了反义RNA菌株 *E. coli/pHNF* 液体生长表型的出现,进一步说明反义RNA菌株 *E. coli/pHNF* 构建成功,并且为转录水平分析mRNA相对含量奠定了基础。

2.3 同一操纵子下两种基因的Real time RT-PCR结果

不同IPTG浓度诱导 *E. coli/pHNF* 至对数生长期,提取细菌总RNA后消化去除基因组DNA,将1 μg 的细菌总RNA反转录成cDNA,采用

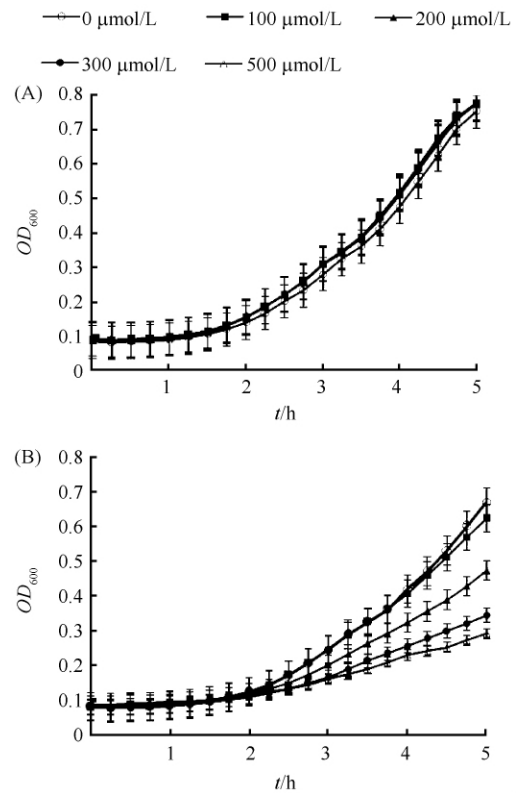


图4. IPTG浓度对 *E. coli/pHNF* 生长的影响

Figure 4. Dose dependent growth inhibition of *E. coli/pHNF*. The control strain was *E. coli/pHN678*. Overnight *E. coli/pHN678* (A) and *E. coli/pHNF* (B) cultures were sub-cultured in fresh media containing different IPTG doses for each strain; Concentrations of IPTG used for induction of pHNF (*rpsF*-antisense expression) were 0, 100, 200, 300 and 500 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Each concentration of IPTG repeat five times, and strains growth monitored by turbidity, so as to obtain a titration in growth inhibition.

Mastercycler ep realplex 实时荧光定量PCR仪进行Real time RT-PCR反应,每个反应设3个重复,对 *rpsF* 靶基因及同一操纵子下的必需基因 *rpsR* 的转录水平进行跟踪分析。由图4和图5可见,诱导剂IPTG浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时,反义RNA菌株生长未受抑制,但靶基因 *rpsF* 的mRNA量较对照降低了36%,同一操纵子下的必需基因 *rpsR* 的转录水平未降低;IPTG浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 时,反义RNA菌株生长受明显抑制,靶基因 *rpsF* 的转录水平与100 $\mu\text{mol/L}$ 时相差并不大,但 *rpsR* 的转录水平降低了12%。由此推测反义RNA菌株 *E. coli/pHNF* 表型受抑制的原因是由于此反义RNA引起了同一操纵子下另一必需基因 *rpsR* 的转录水平降低。

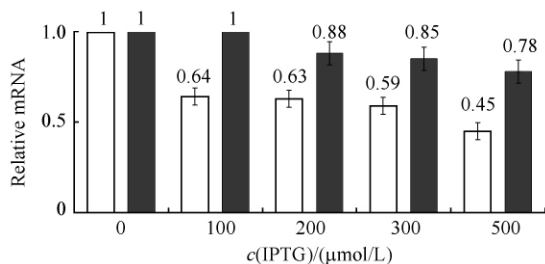


图 5. *E. coli*/pHNF *rpsF* 与 *rpsR* mRNA 相对表达量

Figure 5. Relative mRNA of *rpsF* and *rpsR* in *E. coli*/pHNF. *E. coli*/pHNF cultures were harvested during the logarithmic phase of growth in different concentration of IPTG. Relative mRNA of *rpsF* and *rpsR* were analysed by Real time RT-PCR. Open bars indicate relative mRNA of *rpsF* and grey bars indicate relative mRNA of *rpsR*.

3 讨论

近年来,反义 RNA 技术已经成为一种重要的基因表达调控手段^[13],本文构建了针对大肠杆菌非必需基因 *rpsF* 的反义 RNA 菌株。实验结果显示,反义片段在大肠杆菌中可明显引起 mRNA 上靶基因转录水平下调,诱导剂 IPTG 浓度增加时,反义片段的浓度不断提高,细胞中的内源靶基因转录的 mRNA 浓度不断下降,其同一操纵子下其它必需基因的转录水平也被下调,但 2 个基因转录水平的下调幅度并不一致,靶基因的转录下调行为先于其它基因发生而且下降幅度也大于其它基因。对以上现象的解释,已有报道 RNA 杂交互补链可被 RNA 双链核酸酶酶切而导致 mRNA 上的靶基因被率先降解^[14-15],而剩余的 mRNA 的稳定性也不如完整的 mRNA 也有不同程度的降解,导致同一 mRNA 上的其它基因水平也出现下降。实验结果也说明了,反义技术虽然可以通过 asRNA 而特异性的结合在 mRNA 上的靶基因位置上,但在大肠杆菌中也会引起同一 mRNA 上的其它基因的降解。这解释了靶向一些非必需基因的反义 RNA 菌株生长表型也会受抑制的现象。而细菌 mRNA 转录时存在多顺反子 polycistronic 特性^[16],在细菌操纵子水平上特异性调控某单基因表达仍将是一个巨大的挑战。因此,正如 Liam Good 等^[17]所述,应用反义技术构建靶向性抗菌筛选模型所选靶基因应遵循以下原则:首先必须是菌体生长所必需基因;其次沉默该靶基因时不影响下游基因正常表达。本实验构建的非必需基因 *rpsF* 反义 RNA 菌株的生长表型受抑制,一方面原因正如本文实验结果所示的影响了下游必需

基因的正常转录,从而影响蛋白表达;另一方面可能还存在着在翻译阶段对于核糖体蛋白表达的阻遏。

致谢:感谢英国皇家兽医学院 Liam Good 实验室惠赠的质粒 pHN678;同时感谢本实验室林刚博士后对本文思路及写作过程中所给予的指导。

参考文献

- [1] Good L, Stach JE. Synthetic RNA silencing in bacteria-antimicrobial discovery and resistance breaking. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2.
- [2] Wang B, Kuramitsu HK. Inducible antisense RNA expression in the characterization of gene functions in *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 2005, 73 (6): 3568-3576.
- [3] Ji Y, Zhang B, Van SF, Warren P, Woodnutt G, Burnham MK, Rosenberg M. Identification of critical *staphylococcal* genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science*, 2001, 293 (5538): 2266-2269.
- [4] Nakashima N, Tamura T. Conditional gene silencing of multiple genes with antisense RNAs and generation of a mutator strain of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37 (15): e103-e103.
- [5] Meng J, Kanzaki G, Meas D, Lam CK, Crummer H, Tain J, Xu HH. A genome-wide inducible phenotypic screen identifies antisense RNA constructs silencing *Escherichia coli* essential genes. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 329 (1): 45-53.
- [6] Stelzl U, Connell S, Nierhaus KH, Wittmann LB. Ribosomal proteins: role in ribosomal functions. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001, DOI: 10.1038/npg.els.0000687.
- [7] Allen G, Kornberg A. The priB gene encoding the primosomal replication n protein of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266 (18): 11610-11613.
- [8] Schnier J, Kitakawa M, Isono K. The nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal region containing the genes for ribosomal proteins S6, S18, L9 and an open reading frame. *Molecular and General Genetics MGG*, 1986, 204 (1): 126-132.
- [9] Donald RG, Skwish S, Forsyth R, Anderson JW, Zhong T, Burns C, Lee S, Meng X, LoCastro L, Jarantow LW. A *Staphylococcus aureus* fitness test platform for mechanism-based profiling of antibacterial c01ompounds. *Chemistry & Biology*, 2009, 16 (8): 826-836.

- [10] Nakashima N, Tamura T, Good L. Paired termini stabilize antisense RNAs and enhance conditional gene silencing in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34 (20) : e138-e138.
- [11] Yin Y, Ge M, Qian X, Chen D. Establishment of screening model for *FabI* inhibitors based on antisense RNA technology. *Chinese Medical Biotechnology*, 2012, 7 (3) : 197-201. (in Chinese)
殷瑜, 戈梅, 钱秀萍, 陈代杰. 基于反义 RNA 技术的 *FabI* 抑制剂筛选模型的构建. *中国医药生物技术*, 2012, 7 (3) :197-201.
- [12] Nakashima N, Goh S, Good L, Tamura T. Multiple-gene silencing using antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Functional Genomics*, 2012, 307-319.
- [13] Sesto N, Wurtzel O, Archambaud C, Sorek R, Cossart P. The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 11 (2) : 75-82.
- [14] Mass é E, Escorcía FE, Gottesman S. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, 2003, 17 (19) : 2374-2383.
- [15] Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Molecular Cell*, 2011, 43 (6) : 880-891.
- [16] Dryselius R, Nikravesh A, Kulyté A, Goh S, Good L. Variable coordination of cotranscribed genes in *Escherichia coli* following antisense repression. *BMC Microbiology*, 2006, 6 (1) : 97.
- [17] Goh S, Boberek JM, Nakashima N, Stach J, Good L. Concurrent growth rate and transcript analyses reveal essential gene stringency in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2009, 4 (6) : e6061.

Antisense RNA mediated gene silencing of nonessential gene *rpsF* in *Escherichia coli*

Xinru Tang^{1,3}, Yu Yin^{2,3}, Mei Ge³, Daijie Chen^{1*}

¹ School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

² School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

³ Shanghai Laiyi Center for Biopharmaceutical R&D, Shanghai 201203, China

Abstract: [Objective] We explored the cause of cell growth inhibition by antisense RNA mediated nonessential gene silencing of *rpsF* gene in *Escherichia coli*. [Methods] The 41 – 230 bp fragment around 5' end of gene *rpsF* was reversely cloned into antisense expression vector pHN678, which is flanked with a paired-termini. The recombinant plasmid was named pHNF. Then it was transformed into *E. coli* to produce antisense RNA strain *E. coli*/pHNF. Antisense RNA expression was induced by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), the difference of liquid growth phenotype was identified between *E. coli*/pHNF and the control strain *E. coli*/pHN678; and gene transcriptional level was measured by Real time RT-PCR. [Results] We obtained one antisense RNA strain targeted *rpsF*. We found that the reduced growth rate of this strain was positively related to the IPTG concentration. When IPTG was 100 μmol/L, the cell growth was not inhibited whereas the mRNA amount of *rpsF* had decreased by 36%, and mRNA of essential gene *rpsR* in the same operon did not decayed. However, when IPTG reached 200 μmol/L, the cell growth was obviously inhibited and *rpsR* mRNA was reduced by 12%. [Conclusion] The essential gene transcription level of *rpsR* decreases with the nonessential gene silencing of *rpsF* in the same operon, and leads to the growth inhibition of *E. coli*/pHNF.

Keywords: antisense RNA, nonessential gene *rpsF*, gene silencing, operon, real time RT-PCR

(本文责编:张晓丽)