

大肠杆菌严谨型 RNA 聚合酶的筛选及体内转录活性测定

刘常宏 沈悦斐 薛雅蓉 彭士明

(南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室 南京 210093)

摘 要 利用选择性培养基筛选大肠杆菌自然突变菌株,经噬菌体 P1 转导和蛋白质互补试验,发现一株突变体(LCH001)的突变基因发生在编码 RNA 聚合酶  $\beta'$  亚基的 *rpoC* 基因上,经 DNA 序列分析,发现突变位点发生在第 3406 个碱基上,由 G 变成了 T,导致编码的氨基酸由甘氨酸(GGT)变成半胱氨酸(TGT)。体内转录试验表明该突变 RNA 聚合酶转录严谨型启动子控制基因的活性显著降低,其  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性是野生型菌株的 18%,而转录非严谨型启动子控制基因的活性显著提高,其  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性约是野生型菌株的 5 倍。研究结果对探讨 RNA 聚合酶结构与功能的关系以及 RNA 聚合酶在细菌严谨反应过程中的作用具有重要意义。

关键词:大肠杆菌;严谨反应;RNA 聚合酶

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)02-0270-04

严谨反应(stringent response)是细菌适应环境的一种应激代谢方式,涉及广泛的生物转录调控程序。应激环境包括许多种,如营养缺乏、高温、酸、氧化、辐射、渗透压等,其中研究最多的是细菌对氨基酸缺乏所进行的一系列基因调控。当氨基酸缺乏时导致细菌细胞内出现空载 tRNA,空载 tRNA 刺激细胞瞬间大量合成一种信号物质——鸟苷四磷酸(ppGpp)或鸟苷五磷酸(pppGpp)以下通称为 ppGpp<sup>[1]</sup>,ppGpp 通过作用于 RNA 聚合酶,在转录水平上正调控由非严谨型启动子(*lacUV5*,*pTac* 等)控制的编码氨基酸生物合成、糖原合成和碳水化合物代谢等酶的基因,负调控由严谨型启动子(*rrnB* P1,*pyrBI* 等)控制的编码核糖体 rRNA 和 tRNA、RNA 聚合酶各亚基、核酸合成、磷脂合成和 DNA 复制相关蛋白质合成等的基因。已证明大肠杆菌(*Escherichia coli*)至少有 80 个基因的转录和表达受到严谨反应的调控<sup>[2]</sup>。

可见,由氨基酸缺少诱导、ppGpp 介导、RNA 聚合酶实施的严谨反应在细菌的生命活动过程中扮演重要的角色,明确细菌严谨反应的调控机制已成为微生物学家和分子生物学家共同关注的一个新热点。本文将利用基因突变技术,通过对突变 RNA 聚合酶的筛选及其转录活性的研究,探讨细菌严谨反应的机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:供试菌株均来自大肠杆菌 MG1655 的改造菌株,由美国国立卫生院 Jin 教授提供。分别含有不同类型启动子控制基因 *lacZ*,其中 *pyrBI* 和 *rrnB* P1 属于严谨型启动子,*lacUV5* 为非严谨型启动子,除 DJ1000 菌株抗四环素(Tetracycline,简称为 Tet)外,其它菌株均对四环素敏感(表 1)。

表 1 测试菌株的遗传特性及生长表型

Table 1 Genotypes and phenotypes of the test strains

Strains	Genetic background	Report gene	Antibiotics	Growth phenotype	
				LB	MacConkey
CLT5034	MG1655	<i>pyrBI-lacZ</i>	Tet <sup>s</sup>	+++	red
RLG1350	MG1655	<i>rrnB</i> P1- <i>lacZ</i>	Tet <sup>s</sup>	++	red
RLG1319	MG1655	<i>lacUV5-lacZ</i>	Tet <sup>s</sup>	++	red
DJ1000	MG1655	<i>btuB::Tn10-Tet<sup>r</sup></i>	Tet <sup>r</sup>	+++	red

1.1.2 试剂和仪器 培养基成分购自南京大学化学试剂供应中心,抗生素、polymyxin B 和二硫苏糖醇购

自 Sigma 公司,PCR 产物纯化试剂盒(DP204-01)购自天为时代公司,酶联免疫检测仪(型号:DG5031)由

基金项目:教育部留学回国人员启动经费(0208133051)  
作者简介:刘常宏(1964-),男,陕西人,副教授,博士,主要从事微生物学基础研究以及代谢产物的开发研究。Tel:86-25-83685469;  
Fax:86-25-83592705;E-mail:chliu@nju.edu.cn  
收稿日期:2006-08-21;接受日期:2006-12-14;修回日期:2006-12-27  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

国营华东电子管厂制造;PCR 仪为 PE-9600 型;DNA 测序仪为 ABI 3100-Avant Genetic Analyzer。

**1.1.3 培养基:**麦考凯琼脂培养基(每升含胰蛋白胨 18g,乳糖 10g,NaCl 5g,中性红 0.05g,琼脂 16g, pH7.4±0.2);LB 液体培养基(每升含胰蛋白胨 10g,酵母膏 5g,NaCl 10g,琼脂 15g, pH7.0±0.2)。

## 1.2 突变 RNA 聚合酶菌株的筛选

大肠杆菌 CLT5034 菌株(野生型)带有严谨型启动子 *pyrBI* 控制的报告基因 *lacZ*,在正常培养条件下(LB 琼脂培养基 37℃)细胞生长快,菌落大;在麦考凯琼脂培养基上菌落呈红色。但在氨基酸缺乏条件下,由于 RNA 聚合酶转录严谨型启动子控制基因的活性显著降低,使得细胞生长缓慢,菌落较小,在麦考凯琼脂培养基上菌落呈粉红色或白色。因此,本试验将筛选在正常培养条件下的表型类似于在氨基酸缺乏条件下的表型,即菌落小,在麦考凯琼脂培养基上菌落呈粉红色或白色的突变体。具体筛选方法为:取 10μL 在 37℃ 条件下培养 12h 的 CLT5034 菌液,置于含 10mL LB 液体培养基的试管中作系列稀释,共 10 管。然后每管取 200μL 稀释液涂布麦考凯琼脂培养基 37℃ 培养,不定期观察菌落颜色。野生型菌落为红色,突变型菌落为粉红色或白色,突变型菌落经进一步纯化验证后于 -80℃ 冰箱保存备用。

## 1.3 突变基因的确定

**1.3.1 转导试验:**采用噬菌体 P1 转导试验<sup>[3]</sup>,供体菌为带有 *btuB::Tn10-Tet<sup>r</sup>* 基因的突变菌株,受体菌为野生型 MG1655,筛选培养基为含有四环素(50μg/mL)的麦考凯琼脂培养基和 LB 琼脂培养基,根据菌落颜色和大小差异,计算突变基因与 *btuB::Tn10-Tet<sup>r</sup>* 基因的共转导率。

**1.3.2 转化试验:**按照常规细菌转化试验,将带有编码 β 亚基基因 *rpoB* 的质粒 pDJJ11 和编码 β' 亚基基因 *rpoC* 的质粒 pDH3 分别转入突变转导子中,观察转导子在含有氨苄青霉素(100μg/mL)的 LB 琼脂培养基和麦考凯琼脂培养基上的菌落特征,空载质粒 pBR332 为对照。质粒 pDH3 的构建方法与 pDJJ11 相同,含有相同的启动子,只是用 *rpoC* 基因代替了 *rpoB* 基因<sup>[4]</sup>。

**1.3.3 DNA 测序:**根据互补效应结果及大肠杆菌全基因组序列,设计 10 对引物,进行突变菌株 *rpoC* 基因(4224bp)的 PCR 扩增,扩增产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后进行 DNA 序列分析。

## 1.4 β-半乳糖苷酶活性的测定

待测菌株在 LB 液体培养基中培养至稳定期(37℃ 培养 7h),按 1% 的比例接种至 25mL LB 液体

培养基(装于 250mL 的三角瓶),30℃、210r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.4 时取样,用于 β-半乳糖苷酶活性的测定<sup>[5]</sup>。首先取 100μL 细胞培养液加入 96 孔培养板中,每样品重复 3 次,立即加入含 polymyxin B (200μg/mL)的渗透缓冲液 50μL [100mmol/L Tris·HCl pH7.8, 32mmol/L  $NaH_2PO_4$ , 8mmol/L 二硫苏糖醇, 8mmol/L 环己二胺四乙酸(CDTA) 4% Triton X-100],室温放置 30min,然后每孔加邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)溶液 50μL,测定 420nm 处的光密度值  $OD_{420}$ ,相对酶活性单位为  $OD_{420}/OD_{600}$ 。

## 2 结果

### 2.1 突变体的筛选

通过大量筛选,我们共获得 5 株在 LB 琼脂培养基上生长缓慢、麦考凯琼脂培养基上呈粉红色或白色的自然突变体。

### 2.2 突变基因的定位

转导试验结果表明只有 1 株突变体(LCH001)的突变基因可能发生在编码 RNA 聚合酶亚基的基因上,该突变基因与 *btuB* 基因的共转导率为 73.8% (84 个转导子中有 62 个表现突变型表型),表现为在麦考凯琼脂培养基上菌落呈粉红色,在 LB 琼脂培养基上菌落较小。而其它 4 株突变体的突变基因与 *btuB* 基因的共转导率均低于 20%。根据 Jin 和 Gross<sup>[6]</sup>的报道,*btuB* 基因与 *rpoB* 和 *rpoC* 基因的共转导率约为 75%。因此,突变体 LCH001 的突变基因可能发生在 *rpoB* 或 *rpoC* 基因上。

转化试验结果显示凡转入带有 *rpoC* 基因质粒 pDH3 的细胞在 LB 琼脂培养基上生长较快,在麦考凯琼脂培养基上菌落呈红色,类似于野生型菌落,而转入带有 *rpoB* 基因的质粒 pDJJ11 或空载体质粒 pBR332 均未改变突变体的表型,即在 LB 琼脂培养基上生长缓慢,在麦考凯琼脂培养基上呈粉红色或白色。表明 LCH001 的突变基因可能发生在 *rpoC* 基因上。

为了进一步确证突变基因及突变碱基,我们用 10 对特异性引物扩增 *rpoC* 基因,并进行了序列测定。结果发现 *rpoC* 的第 3406 个碱基发生了突变,由 G 变成了 T,导致编码的氨基酸由原来的甘氨酸(GGT)变成半胱氨酸(TGT)。

### 2.3 生长曲线的测定

为了解 LCH001 与其野生型菌株 CLT5034 的生长差异,我们测定了二者的生长曲线,接种量为培养液的 0.2% (500mL 三角瓶装液量为 200mL),培养条

件为 37℃、210r/min。结果显示 LCH001 的生长速度显著慢于 CLT5034, 倍增时间分别为 54.7min 和 31.5min, 突变菌株是野生型菌株的 1.7 倍(图 1)。

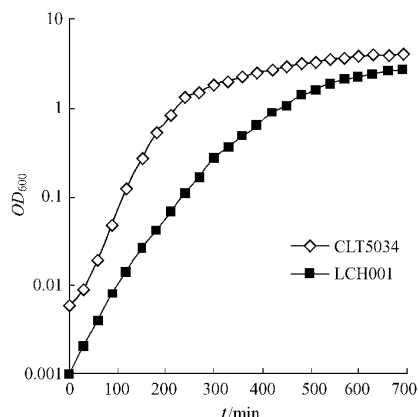


图 1 野生型和突变菌株的生长曲线

Fig.1 Growth curve of wild-type and mutant strains.

## 2.4 体内转录特性

LCH001 在营养丰富的 LB 琼脂培养基上生长缓慢、在麦康凯琼脂培养基上呈粉红色的特点类似于野生型大肠杆菌在严谨反应下的表型。换言之, LCH001 在正常生长条件下转录严谨型启动子控制基因的活性类似于野生型菌株在营养缺乏时(ppGpp 含量升高)的转录活性。为了证明这一假说,我们利用噬菌体 P1 转导技术,将突变基因 *rpoC* 转入 RLG135(*rrnB* P1-*lacZ*)和 RLG131(*lacUV5-lacZ*)菌株中,通过测定转导子  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性,比较突变 RNA 聚合酶转录严谨型(*rrnB* P1)与非严谨型启动子(*lacUV5*)控制基因 *lacZ* 的差异。结果如图 2 所示,突变菌株转录严谨型启动子控制基因的活性显著降低,其  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性(6.4 单位)是野生型菌株(35.8 单位)的 18%,而转录非严谨型启动

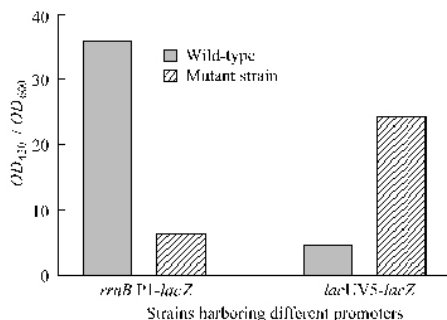


图 2 野生型和突变型 RNA 聚合酶转录严谨型启动子 *rrnB* P1 与非严谨型启动子 *lacUV5* 控制基因的活性比较

Fig.2 Comparison of the transcriptional activity of wild-type and mutant RNA polymerases on stringent controlled promoter *rrnB* P1 and non-stringent controlled promoter *lacUV5*. Growth conditions are: 30℃, 210r/min, 5h.

子控制基因的活性则显著提高,其  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性(24.2 单位)约是野生型菌株(4.6 单位)的 5 倍。表明该突变属于严谨型突变。

## 3 讨论

当环境中氨基酸缺乏时,由于细菌 *relA* 基因的表达而瞬间大量合成信号物质 ppGpp。ppGpp 通过与 RNA 聚合酶的结合有选择性地调控基因的表达,其中由严谨型启动子(stringent promoter)控制的基因转录被抑制,而一些非严谨型启动子控制基因的转录则被激活<sup>[2,7,8]</sup>。

大肠杆菌是研究细菌严谨反应机制的理想模型,但由于研究严谨反应涉及一系列基因的转录表达,调控系统极其复杂。因此,虽然有关严谨反应机制的假说很多,但确切的机制还不是十分清楚。Zhou & Jin<sup>[9]</sup>通过比较 4 种 *rpoB* 基因突变体的 RNA 聚合酶 RpoB114(S531F), RpoB3449(D532A), RpoB3443(L533P)和 RpoB3370(T563P)和野生型 RNA 聚合酶转录不同类型启动子活性的差异,发现这些突变 RNA 聚合酶相对于野生型 RNA 酶与严谨型启动子形成的开放复合体的半衰期很短,转录活性降低;与非严谨型启动子形成的开放复合体(open complex)的半衰期没有显著差异,并将该类突变 RNA 聚合酶称为严谨型 RNA 聚合酶(stringent RNA polymerase)。据此提出了开放复合体稳定性模型,现已被多数学者认可<sup>[10~12]</sup>。其核心思想是在转录起始阶段, RNA 聚合酶与严谨型启动子形成的闭合复合体和开放复合体之间存在一个动态平衡,当细胞出现严谨反应时,由于 ppGpp 的大量积累以及与 RNA 聚合酶的结合,使得 RNA 聚合酶与严谨型启动子形成的开放复合体极不稳定,开放复合体向闭合复合体(closed complex)方向转化,从而降低了 rRNA 等负调控基因的转录。同时,由于 RNA 聚合酶离开了严谨型启动子,使细胞内游离 RNA 聚合酶的浓度提高,进而增加了正调控基因的表达<sup>[13]</sup>。

本试验利用自然突变筛选技术,获得 1 株编码 RNA 聚合酶  $\beta'$  亚基的新的 *rpoC* 基因突变,也能导致类似的严谨反应,表明 ppGpp 至少能够与 RNA 聚合酶的两个亚基  $\beta$  和  $\beta'$  结合,影响转录严谨型启动子控制基因的活性。虽然目前尚缺乏 ppGpp 直接结合大肠杆菌 RNA 聚合酶的晶体结构,但有证据显示 ppGpp 可能通过与 RNA 聚合酶的结合抑制转录的起始,即开放复合体的形成阶段<sup>[14]</sup>。因此,本研究结果对认识 RNA 聚合酶结构与功能之间的相互关系以及在基因调控方面的作用具有重要的意义。目

前我们正在进行该突变菌株 RNA 聚合酶的提取以及体外转录严谨型和非严谨型启动子活性的测定,以进一步揭示其转录机制。

致谢 感谢美国 NIH,NCI Jin 教授友情提供实验菌株,南京大学开放实验室提供实验条件,以及国家教育部留学回国人员启动经费(0208133051)的支持。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 2006, **311**(5764):1113–1116.
- [ 2 ] Primm TP, Andersen SJ, Mizrahi V, *et al.* The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol*, 2000, **182**(17):4889–4898.
- [ 3 ] Miller JL. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- [ 4 ] Jin DJ, Gross CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol*, 1988, **202**(1):45–58.
- [ 5 ] Schupp JM, Travis SE, Price LB, *et al.* Rapid bacterial permeabilization reagent useful for enzyme assay. *Biotechniques*, 1995, **19**(1):18–19.
- [ 6 ] Jin DJ, Gross CA. Three *rpoBC* mutations that suppress the termination defects of *rho* mutants also affect the functions of *nusA* mutants. *Mol Genet Genomics*, 1989, **216**(2–3):269–275.
- [ 7 ] Aizenman E, Engelberg-Kulka H, Glaser G. An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by 3′, 5′-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death. *PNAS*, 1996, **93**(12):6059–6063.
- [ 8 ] Dennis PP, Ehrenberg M, Bremer H. Control of rRNA synthesis in *Escherichia coli*: a systems biology approach. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, **68**(4):639–668.
- [ 9 ] Zhou YN, Jin DJ. The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like ‘stringent’ RNA polymerases in *Escherichia coli*. *PNAS*, 1998, **95**(6):2908–2913.
- [ 10 ] Barker MM, Gaal T, Josaitis CA, *et al.* Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *J Mol Biol*, 2001, **305**(4):673–688.
- [ 11 ] Bartlett MS, Gaal T, Ross W, *et al.* RNA polymerase mutants that destabilize RNA polymerase-promoter complexes alter NTP-sensing by *rrn* P1 promoters. *J Mol Biol*, 1998, **279**(2):331–345.
- [ 12 ] Paul BJ, Ross W, Gaal T, *et al.* rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet*, 2004, **38**:749–770.
- [ 13 ] Cabrera JE, Jin DJ. The distribution of RNA polymerase in *Escherichia coli* is dynamic and sensitive to environmental cues. *Mol Microbiol*, 2003, **50**(5):1493–505.
- [ 14 ] Chatterji D, Ojha AK. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol*, 2001, **4**(2):160–165.

## Stringent RNA polymerase of *E. coli* and its *in vivo* transcriptional activity

LIU Chang-hong\*, SHEN Yue-fei, XUE Ya-rong, PENG Shi-ming

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract:** Several spontaneous *E. coli* mutants with the similar phenotype as that in the condition of amino acid deficiency were obtained on the selective media. One of the mutants (LCH001) showing slow growth phenotype on LB agar plate and pink or white colonies on MacConkey agar plate was mapped at *rpoC* gene encoding the  $\beta'$  subunit of RNA polymerase by phage P1 transduction and transformation assays and found to be a new site mutation from G to T at 3406bp in the *rpoC* gene, which resulted in the amino acid change from Glycine (GGT) to Cysteine (TGT). The effect of the mutation on transcriptional activity of both stringent and non-stringent controlled promoters *in vivo* was measured by determining the  $\beta$ -galactolactase activity of the growing cells. Results showed that the transcriptional activity of the mutant LCH001 reduced greatly on the stringent promoter, but increased significantly on the non-stringent promoter. The  $\beta$ -galactolactase activity of the mutant LCH001 transcribed on stringent promoter was 18% lower, but 5-fold higher on the non-stringent controlled promoter than that of the wild-type strain CLT5034. This finding may give insights into future studies of the structure-function relationship of RNA polymerase as well as its role in the stringent response of bacteria.

**Keywords:** *E. coli*; stringent response; RNA polymerase

Foundation item: Foundation of Educational Ministration (0208133051)

\* Corresponding author. Tel 86-25-83685469, Fax 86-25-83592705, E-mail: chliu@nju.edu.cn

Received: 21 August 2006/Accepted: 14 December 2006/Revised: 27 December 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn