

研究报告



大肠杆菌 Small RNA EsrE 的转录调控

宋洁 侯兵兵 叶江 吴海珍* 张惠展

华东理工大学生物工程学院 生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237

摘要:【背景】大肠杆菌中 Small RNA EsrE 调控琥珀酸脱氢酶的表达并影响细胞生长,对其调控机制的探究有利于加深 EsrE 对细胞生长影响的认识。【目的】探究大肠杆菌 Small RNA EsrE 的转录调控机制。【方法】通过双质粒报告系统筛选转录调控因子,并通过凝胶迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)和 qRT-PCR 研究方法验证转录调控因子。【结果】双质粒报告系统证明 RNA 聚合酶亚基 σ^{32} (RpoH)上调 P_{esrE} , β -羟酰-ACP 脱水酶(FabZ)下调 P_{esrE} 。EMSA 结果和体内实验显示 RpoH 结合 P_{esrE} 片段, FabZ 不结合 P_{esrE} 片段。【结论】RpoH 直接结合启动子序列参与调控, FabZ 以其他方式间接参与 Small RNA EsrE 的转录调控。

关键词: 大肠杆菌, sRNA EsrE, 转录调控因子, RpoH, RNA 聚合酶

Transcriptional regulation of small RNA EsrE in *Escherichia coli*

SONG Jie HOU Bing-Bing YE Jiang WU Hai-Zhen* ZHANG Hui-Zhan

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: [Background] Small RNA EsrE affects cell growth by regulating the expression of succinic acid dehydrogenase in *Escherichia coli*, the exploration of its regulatory mechanism is conducive to deepening the understanding of EsrE on cell growth. [Objective] To explore the transcriptional regulation mechanism of small RNA EsrE in *E. coli*. [Methods] Transcriptional regulators were screened by using a dual plasmid reporting system; the interaction between RpoH and P_{esrE} was verified by electrophoretic mobility shift assay (EMSA); qRT-PCR shows effects of the transcriptional regulators on EsrE. [Results] The results of reporting system demonstrated that RpoH up-regulated P_{esrE} , and FabZ down-regulated P_{esrE} . The results of EMSAs showed that RpoH bound the P_{esrE} fragment directly, however FabZ did not. [Conclusion] RpoH is involved in the regulation of *esrE* transcription by binding the P_{esrE} promoter directly, while FabZ is involved in the transcriptional regulation of EsrE indirectly by other ways.

Keywords: *Escherichia coli*, sRNA EsrE, Transcriptional regulator, RpoH, RNA polymerase

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31070073, 31372550)

*Corresponding author: Tel: 86-21-64252507; E-mail: wuhzh@ecust.edu.cn

Received: 20-08-2019; Accepted: 20-11-2019; Published online: 03-01-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31070073, 31372550)

*通信作者: Tel: 021-64252507; E-mail: wuhzh@ecust.edu.cn

收稿日期: 2019-08-20; 接受日期: 2019-11-20; 网络首发日期: 2020-01-03

原核生物中基因的转录受到严格的调控, 由顺式作用元件(*cis-regulatory elements*)和反式作用因子共同参与完成。基因转录初期, 启动子周围特定的 DNA 序列招募反式作用因子, 继而招募 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)介导转录起始。大肠杆菌中大约有 300 种基因参与编码反式作用因子, 其中 270 种具有序列特异性, 其余 30 种则属于非特异性结合, 通过结合 RNAP 直接发挥功能^[1-2]。作为一类特殊的反式作用因子, σ 因子与核心酶结合形成 RNA 聚合酶全酶共同发挥基因转录起始的功能^[3]。通过数据分析, Cho 等预测在转录调控网络中大约有 4 724 种 σ 因子特异性的启动子^[4], 其中接近一半的启动子受单一 σ 因子的调控, 而其他则受到二至多个 σ 因子的调控^[2,5-7]。

细菌可以通过复杂的调控网络有效响应外界环境变化和压力条件, 其中 Small RNAs (sRNA)作为转录后调控因子, 在调控生物膜形成、耐药应激、营养利用等过程中发挥重要作用^[8-10]。通常, sRNA 的表达受多种反式作用因子的调控, 其可直接感知生物信号或环境变化^[11]。例如, RyhB 是一种广泛存在于许多细菌中的 sRNA, 当铁含量丰富时, Fe^{2+} 依赖的反式作用因子 Fur 会抑制 RyhB 的表达^[12-13], 而 RyhB 可以通过反馈回路调控 Fur 的翻译^[14]; FnrS 是多种肠道细菌中高度保守的 sRNA, 在厌氧条件下, 两个反式作用因子 FNR (fumarate and nitrate reduction)和 ArcA (aerobic respiratory control)会激活 FnrS 的表达^[15-16]。

本实验室前期研究发现大肠杆菌中存在一种新型 sRNA EsrE, 调控琥珀酸脱氢酶的表达并且影响细胞生长^[17-18], 并且证明 EsrE 的转录受控于独立的启动子^[19]。然而, EsrE 转录相关的反式作用因子和调控机制尚不清晰。本研究通过双质粒报告系统和凝胶迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)证明了 σ 因子 RpoH 可反式调控 EsrE 的转录。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

E. coli JM83 用于基因克隆和生物学研究, *E. coli* BL21(DE3)用于蛋白表达。pSP-Z^[19]、pXG-10、pTrec99a 和 pET-28a(+)质粒分别用于双质粒报告系统和蛋白表达。上述菌株和质粒均为本实验室保藏(表 1)。

1.1.2 培养基

大肠杆菌培养采用 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0。培养时根据需求加入相应抗生素, 氨苄青霉素、氯霉素和卡那霉素的工作浓度分别为 100、50 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 。诱导剂异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)的工作浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.1.3 主要试剂和仪器

RNA 抽提试剂盒, Roche 公司; *Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* 高保真聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶和反转录试剂盒, TaKaRa 公司; 质粒抽提试剂盒、DNA 纯化试剂盒和 DNA Marker, 上海捷瑞生物工程有限公司; SYBR Green PCR Master Mix, TOYOBO 公司; RNA 聚合酶核心酶, New England Biolabs 公司。化学发光成像检测仪, 上海天能科技有限公司。

1.1.4 引物

研究所涉及引物均使用 Primerprimer 5 软件设计, 并由金唯智生物科技有限公司合成, 具体系列信息见表 2。

1.2 方法

1.2.1 双质粒报告系统的构建

Bmt I 和 *Xba* I 双酶切质粒 pSP-Z 获得 *lacZ* 基因片段, 连接至同样双酶切处理的载体 pXG-10 中 *PLtetO-1* 启动子下游; 以大肠杆菌 JM83 基因组为模板, PCR 扩增得到 P_{esrE} 片段, 以酶切、连接的方法取代上述所构建质粒的 *PLtetO-1* 启动子, 从而获得报告质粒 pESRE-Z。

以 JM83 基因组为模板, PCR 扩增获得候选蛋

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> JM83	Recipient for cloning experiment, F ⁺ , <i>ara</i> , <i>lac-proA_B</i> , <i>rpsL</i> , (Str ^r), Φ80Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>	Our Laboratory
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Recipient for cloning experiment, F ⁺ , <i>omp</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal dcm</i> (DE3)	Our Laboratory
Plasmids		
pSP-Z	Cloning vector for deletion or mutation experiment, Ap ^r , <i>lacZ</i>	Our Laboratory
pXG-10	Cloning vector of report plasmid used in dual-plasmid system, P _{LietO} promoter, Cm ^r , <i>lacZ</i>	Our Laboratory
pESRE-Z	Report plasmid carried DNA fragment P _{esrE} as target, Cm ^r , <i>lacZ</i>	This work
pTrc99a	Cloning vector of expression plasmid used in dual-plasmid system, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	Our Laboratory
pTrc99a-RdgC	<i>rdgC</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-SeqA	<i>seqA</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-RpoH	<i>rpoH</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-RpoS	<i>rpoS</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-RpoD	<i>rpoD</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-FabZ	<i>fabZ</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-PhnF	<i>phnF</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-UidR	<i>uidR</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-Fur	<i>fur</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-Dps	<i>dps</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-NikR	<i>nikR</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-DicA	<i>dicA</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-SucD	<i>sucD</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-YjiM	<i>yjiM</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-PyrI	<i>pyrI</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-Crr	<i>crr</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-PspA	<i>pspA</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-OmpR	<i>ompR</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-AccD	<i>accD</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-GntR	<i>gntR</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-MdH	<i>mdH</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-HybD	<i>hybD</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pTrc99a-AmiA	<i>amiA</i> expression vector, carrying <i>trc</i> promoter, Ap ^r	This work
pET28a	Cloning vector of expression plasmid used in purifying proteins, carrying T7 promoter, Km ^r	Our Laboratory
pET28a-RpoH	<i>rpoH</i> expression vector, carrying T7 promoter, Km ^r	This work
pET28a-FabZ	<i>fabZ</i> expression vector, carrying T7 promoter, Km ^r	This work

白的编码基因片段；*EcoR* I 和 *BamH* I 分别双酶切基因片段和载体 pTrc99a，利用 T4 连接酶重组外源基因片段和载体，从而获得候选基因的表达质粒 pTrc99a-X。PCR 反应体系：上、下游引物各 0.5 μmol/L，模板 1 μg，*Taq* 酶 2%，dNTPs 0.2 mmol/L，Buffer 10%。PCR 反应条件：97 °C 5 min；95 °C 30 s，56 °C 1 min，72 °C 40 s，30 个循环。

将构建成功的报告质粒钙转化入 *E. coli* JM83 构建单质粒报告菌株，同时将报告质粒和表达质粒钙转化转入 *E. coli* JM83，构建双质粒报

告菌株系统。

1.2.2 β-半乳糖苷酶酶活测定

E. coli JM83 双质粒报告菌株于 LB 培养基中 37 °C、190 r/min 摇床培养至对数期(*OD*₆₀₀ 为 0.6)，加入诱导剂 IPTG 后置于 16 °C 继续培养 12 h。收集菌体，PBS 溶液洗涤、重悬后进行超声破碎(功率 150 W，工作 2 s，间歇 2 s，5 min)，4 °C、13 000 r/min 离心 30 min 收集上清溶液。β-半乳糖苷酶酶活测定方法参考文献[19]。β-半乳糖苷酶酶活测定公式如下：LacZ 酶活力=(*A*₄₂₀ 测定值×1 000)/(反应时间×菌量)。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Application or reference
P _{esrE} [*] -1	Biotin-TGCACCGTTATCGCCTACGC	Amplification of probe P _{esrE} [*] used in EMSA
P _{esrE} -1	TGCACCGTTATCGCCTACGC	Amplification of probe P _{esrE} used in EMSA
P _{esrE} -2	GCGATATCACCGGTATAAGG	Amplification of probe P _{esrE} & P _{esrE} [*] used in EMSA
ORF _{esrE} [*] -1	Biotin-GCAAAGCCATGCGCGGAGGC	Amplification of probe ORF _{esrE} [*] used in EMSA
ORF _{esrE} -1	GCAAAGCCATGCGCGGAGGC	Amplification of probe ORF _{esrE} used in EMSA
ORF _{esrE} -2	CAGTTTTCAGCCGTTTGG	Amplification of probe ORF _{esrE} & ORF _{esrE} [*] used in EMSA
S1-F	AAAACCTGCAGTGCACCGTTATCGCCTACGCCAGTG	Construction of report plasmid pESRE-Z
V3-R	CTAGCTAGCGCGATATCACCG	Construction of report plasmid pESRE-Z
LacZ-B	CGGCTAGCATGACCATGATTACGGATTCACT	Construction of report plasmid pESRE-Z
LacZ-X	GCTCTAGAACTCGAGGGATCCCCTTACGCG	Construction of report plasmid pESRE-Z
rdgC-1	CATGCCATGGATGCTGTGGTTCA	Construction of expression plasmid pTrc99a-RdgC
rdgC-2	AAAACCTGCAGTTAACGTTGTGCTTC	Construction of expression plasmid pTrc99a-RdgC
seqA-1	CATGCCATGGATGAAAACGATTGAAGTTGATGATG	Construction of expression plasmid pTrc99a-SeqA
seqA-2	AAAACCTGCAGTTAGATAGTTCCGCAAACCTTCTCA	Construction of expression plasmid pTrc99a-SeqA
fabZ-1	CGCGGATCCCTTGACTACTAACACTCATACTCTGC	Construction of expression plasmid pTrc99a-FabZ
fabZ-2	CCCAAGCTTTCAGGCCTCCCGGCTACGAGCACAC	Construction of expression plasmid pTrc99a-FabZ
rpoS-1	CCGGAATTCATGAGTCAGAATACGCTGA	Construction of expression plasmid pTrc99a-RpoS
rpoS-2	GCTCTAGATTACTCGCGGAACAGCG	Construction of expression plasmid pTrc99a-RpoS
rpoH-1	CCGGAATTCATGACTGACAAAATGCAA	Construction of expression plasmid pTrc99a-RpoH
rpoH-2	CGCGGATCCCTTACGCTTCAATGGCAGCAC	Construction of expression plasmid pTrc99a-RpoH
rpoD-1	CCGGAATTCATGGAGCAAAACCCGCAG	Construction of expression plasmid pTrc99a-RpoD
rpoD-2	GCTCTAGATTAAATCGTCCAGGAAGCTACGCAGCA	Construction of expression plasmid pTrc99a-RpoD
phnF-B	CGGGATCCATGCACTTGTCTACACA	Construction of expression plasmid pTrc99a-PhnF
phnF-H	CCCAAGCTTTCAGTGCTCCATAGTG	Construction of expression plasmid pTrc99a-PhnF
MdH-1E	CGGAATTCATGAAAGTCGCAGTCTCTCGGC	Construction of expression plasmid pTrc99a-MdH
MdH-2H	CCCAAGCTTTTACTTATTAACGAACTCT	Construction of expression plasmid pTrc99a-MdH
UidR-1E	CGGAATTCATGATGGATAACATGCAGA	Construction of expression plasmid pTrc99a-UidR
UidR-2H	CCCAAGCTTTCAGGATGCGGTAAAGA	Construction of expression plasmid pTrc99a-UidR
NikR-P	CCGGAATTCATGCAACGAGTCACCATCACG	Construction of expression plasmid pTrc99a-NikR
NikR-2	CGCGGATCCCTCAATCTTCTTCGGCAACACTGC	Construction of expression plasmid pTrc99a-NikR
DicA-P	CCGGAATTCATGAAACAAAAAATTTAACTATCGGC	Construction of expression plasmid pTrc99a-DicA
DicA-2	CGCGGATCCCTATCTTTTATTGTCCGCTGACGG	Construction of expression plasmid pTrc99a-DicA
gntR-1	GGCAATTCCATATGAAAAAGAAAAGACCCGTACTTC	Construction of expression plasmid pTrc99a-GntR
gntR-2	CGCGGATCCCTTAAATAGATCCGCCCGGTGACAAG	Construction of expression plasmid pTrc99a-GntR
AccD-1	CGCGGATCCATGAGCTGGATTGAACGAATTAATA	Construction of expression plasmid pTrc99a-AccD
AccD-2	CCCAAGCTTTCAGGCCTCAGGTTCTCTGATC	Construction of expression plasmid pTrc99a-AccD
FabZ-1	CGCGGATCCCTTGACTACTAACACTCATACTCTGC	Construction of expression plasmid pTrc99a-FabZ
FabZ-2	CCCAAGCTTTCAGGCCTCCCGGCTACGAGCACAC	Construction of expression plasmid pTrc99a-FabZ
PyrI-1	CGCGGATCCATGACACACGATAATAAATTGCAGG	Construction of expression plasmid pTrc99a-PyrI
PyrI-2	CCCAAGCTTTTAATTGGCCAGCACCACATTATGG	Construction of expression plasmid pTrc99a-PyrI
YjiM-1	CGCGGATCCATGTCACTTGTACCCGATCTACCCG	Construction of expression plasmid pTrc99a-YjiM
YjiM-2	CCCAAGCTTTTACAGCATCTCAATAAAGGC	Construction of expression plasmid pTrc99a-YjiM
Crr-1	CGCGGATCCATGGGTTTGTTCGATAAACT	Construction of expression plasmid pTrc99a-Crr
Crr-2	CCCAAGCTTTTACTTCTTGATGCGG	Construction of expression plasmid pTrc99a-Crr
SucD-1	CGCGGATCCATGTCCATTTTAATCGAT	Construction of expression plasmid pTrc99a-SucD
SucD-2	CCCAAGCTTTTATTTTCAAGACAGTTTTCAGTGCT	Construction of expression plasmid pTrc99a-SucD
AmiA-1	CGCGGATCCATGAGCACTTTTAAACCACTA	Construction of expression plasmid pTrc99a-SeqA
AmiA-2	CCCAAGCTTTTATCGCTTTTTCGAATGTGCTTT	Construction of expression plasmid pTrc99a-SeqA
HybD-1	CGCGGTACCAAGGTTTGTGAATCGGAT	Construction of expression plasmid pTrc99a-HybD
HybD-2	CCCAAGCTTTTCAGACATGCGCCGTCTCCTTAGGA	Construction of expression plasmid pTrc99a-HybD
PspA-1	GAGCGCCATATGGGTATTTTCTCTCGC	Construction of expression plasmid pTrc99a-PspA

(待续)

(续表 2)

PspA-2	GCCGAATTCATTATTATTGATTGTCT	Construction of expression plasmid pTrc99a-PspA
Fur-1	CCGGAATTCATGACTGATAACAATACC	Construction of expression plasmid pTrc99a-Fur
Fur-2	CGCGGATCCTTATTTGCCTTCGTGCG	Construction of expression plasmid pTrc99a-Fur
Dps-1	CGGGAATTCATGAGTACCGCTAAATTAGTT	Construction of expression plasmid pTrc99a-Dps
Dps-2	CCCAAGCTTTTATTTCGATGTTAGACTCGATA	Construction of expression plasmid pTrc99a-Dps
OmpR-1	CGGGAATTCATGCAAGAGAACTACAAGATTCTGG	Construction of expression plasmid pTrc99a-OmpR
OmpR-2	CCCAAGCTTTCATGCTTTAGAGCCGTCGGGTACA	Construction of expression plasmid pTrc99a-OmpR
rpoD-X1	CAACCAGGTTCAATGCTCCGTT	qRT-PCR
rpoD-X2	TTCCTGGGAAAGCTCAGAACCGA	qRT-PCR
lacZ-RT1	TTCGTCTGGGACTGGGTG	qRT-PCR
lacZ-RT2	AAACTGCTGCTGGTGTGTTTG	qRT-PCR
esrE-X1	AATCAGCAAAGCCATGCG	qRT-PCR
esrE-X2	TCAGGGCATCAACAGCAC	qRT-PCR
rpoH-RT1	TCGTCAAAGTTGCGACCACCAAAG	qRT-PCR
rpoH-RT2	ATCGTCGTCGGAAGACAGGTCAAA	qRT-PCR
rpoH-F	GGAATTCATATGACTGACAAAATGCAA	Construction of expression plasmid pET28a-RpoH
rpoH-R	CCGGAATTCCTTACGCTTCAATGGCAGCAC	Construction of expression plasmid pET28a-RpoH
fabZ-1N	GGAATTCATATGCATATGTTGACTACTAACACTCATACT	Construction of expression plasmid pET28a-FabZ
fabZ-2B	CGGGATCCTCAGGCCTCCCGGTACGAGCAC	Construction of expression plasmid pET28a-FabZ

注：限制性内切酶酶切位点用下划线标注。

Note: Restriction enzyme sites are underlined.

1.2.3 重组蛋白表达与纯化

重组质粒测序成功后利用钙转化导入 *E. coli* BL21(DE3), 接种于 LB 培养基中 37 °C、190 r/min 摇床培养, 待 OD_{600} 约为 0.6–0.8 时加诱导剂 IPTG, 16 °C 培养 16–20 h。4 °C、13 000 r/min 离心 30 min 收集菌体, PBS 溶液洗涤、重悬后进行超声破碎, 离心收集上清溶液。镍柱亲和层析纯化, 并进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 凝胶迁移实验(EMSA)

配制 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶, PCR 扩增生物素探针 P_{esrE}^* 和 ORF_{esrE}^* 以及不含生物素的相应冷探针 P_{esrE} 和 ORF_{esrE} (图 1), 配制结合缓冲液 [20 mmol/L Tris (pH 8.0), 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaCl, 4 mmol/L $MgCl_2$, 5% 甘油(体积比), 500 ng Poly dI-dC]。PCR 反应体系: 上、下游引物各 0.5 μ mol/L, 模板 JM83 基因组 1 μ g, *Taq* 酶 2%, dNTPs 0.2 mmol/L, Buffer 10%。PCR 反应条件: 97 °C 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 40 s, 30 个循环。当结合体系中存在 RNA 聚合酶核心酶时, 先将核心酶与 RpoH 先混合, 放于冰水浴孵育 25 min, 然后

按照顺序加入结合缓冲液和相应的冷探针, 室温放置 2–5 min, 再加入生物素探针, 充分混匀后 28 °C 放置 25 min, 进行电泳及化学发光成像检测。

1.2.5 热休克实验

E. coli JM83 单质粒报告菌株于 LB 中生长至对数生长期(OD_{600} 为 0.6), 将 3 组摇瓶分别放于 25、37 和 45 °C 3 个不同的温度培养, 每组设置 3 个平行实验, 培养 1 h 后收集菌体用于检测 β -乳糖苷酶活性或者 qRT-PCR 分析。

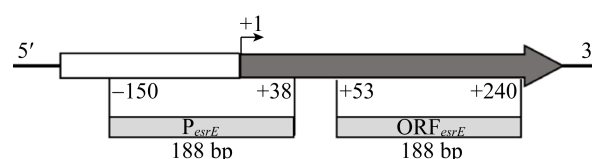


图 1 EMSA 所用探针 P_{esrE} 和 ORF_{esrE}

Figure 1 Probes P_{esrE} and ORF_{esrE} used in EMSA

注: P_{esrE} 探针位于 *esrE* 转录起始位点上游-150 至下游+38 处, 总长度为 188 bp; ORF_{esrE} 探针位于转录起始位点下游+53 至 +240 处, 总长度为 188 bp.

Note: The P_{esrE} probe contains 188 bp, covering the regions of -150 to +38 relative to the transcription start site (TSS) of *esrE*. The ORF_{esrE} probe contains 188 bp, covering the regions of +53 to +240 relative to the TSS of *esrE*.

1.2.6 RNA 抽提及 qRT-PCR

RNA 抽提、反转录及 qRT-PCR 实验参考文献[18]。RNA 抽提采用总 RNA 抽提试剂盒；RNA 反转录为 cDNA 采用反转录酶试剂盒；qRT-PCR 分析采用 SYBR Green PCR Master Mix。PCR 反应体系：上、下游引物各 0.5 μmol/L，cDNA 100 ng，SYBR Green 50%，Plus solution 10%。PCR 反应条件：95 °C 3 min；95 °C 10 s，60 °C 10 s，72 °C 10 s，40 个循环。

2 结果与分析

2.1 EsrE 转录调控因子的验证

本实验室前期工作通过 DNA pull-down 实验筛选到 *E. coli* JM83 中存在与 *esrE* 启动子(P_{esrE})相

互结合的蛋白，优先选择 DNA 结合蛋白、功能未知蛋白，另选择一些蛋白酶。为验证这些候选蛋白是否调控 P_{esrE} 的活性，设计了双质粒报告系统，其一为报告质粒，装配有 P_{esrE} 片段和报告基因 *lacZ*，其二为表达质粒，装配有候选蛋白的表达盒(图 2A)。将双质粒同时转化 *E. coli* JM83，并进行 β-半乳糖苷酶活性检测，结果显示 RpoH 过表达酶活显著提高，FabZ 过表达酶活显著下降，而其他候选蛋白过表达不影响酶活(图 2B)，其中，RpoH 为 RNA 聚合酶亚基 Sigma 32，FabZ 为 β-羟烷基-ACP 脱水酶。实验结果表明 RpoH 正调控 P_{esrE} 启动子的活性，FabZ 负调控 P_{esrE} 启动子的活性。

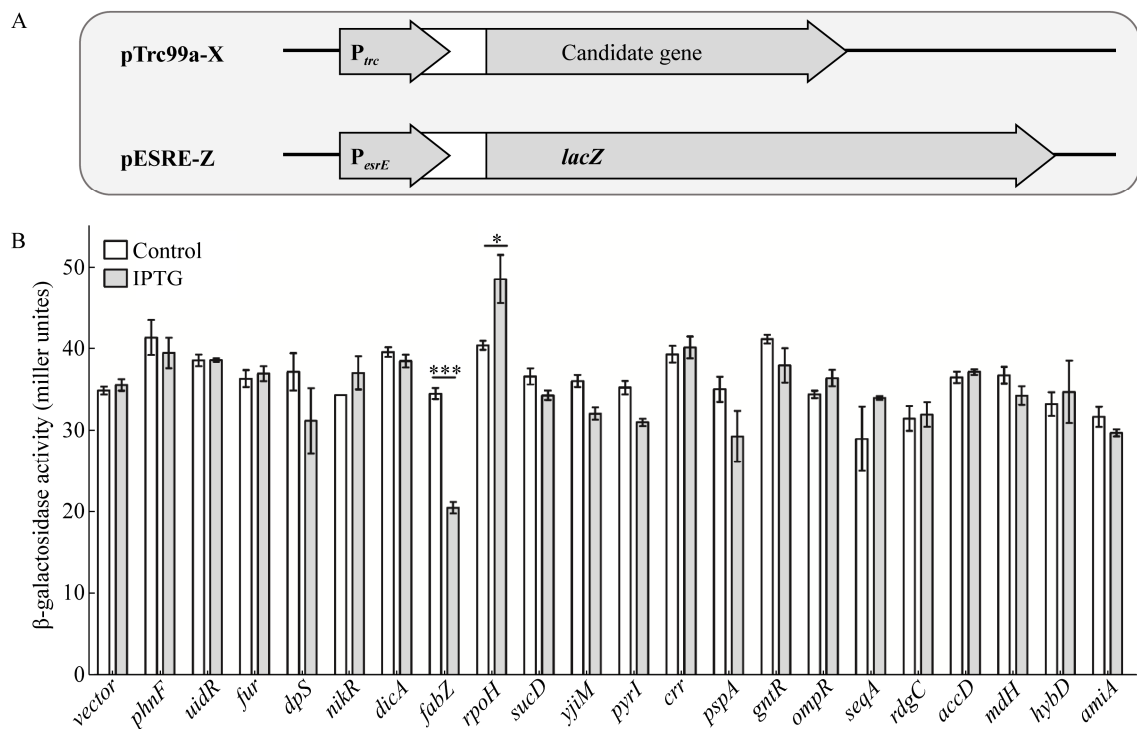


图 2 *esrE* 转录调控因子的验证

Figure 2 Identification of the transcriptional regulators of *esrE*

注：A：双质粒报告系统示意图；B：β-半乳糖苷酶活性检测分析。误差线取自 3 次生物重复的平均值。Control：未添加 IPTG 诱导；IPTG：添加 IPTG 诱导；Vector：阴性对照，即 pTrc99a+pESRE-Z。*：P<0.05；***：P<0.001。

Note: A: Reporter system with dual plasmids; B: Analysis of β-galactosidase activity. Bars correspond to the mean±SD of three biological replicates. Control: Without IPTG; IPTG: With IPTG; Vector: Negative control, pTrc99a+pESRE-Z. *: P<0.05; ***: P<0.001.

2.2 FabZ 和 RpoH 的过表达及纯化

为进一步分析 RpoH 和 FabZ 与 P_{esrE} 的相关性,以 pET-28a (+)为表达载体, *E. coli* BL21(DE3)为表达菌株对两种蛋白进行了过表达。SDS-PAGE 分析表明目标蛋白 His₆-RpoH (33.6 kD) 和 His₆-FabZ (19 kD)在超声上清和超声沉淀中皆存在(图 3A 和 3B)。对超声上清中的目标蛋白进行了纯化并经不同浓度的咪唑溶液洗脱后, His₆-FabZ 可得到与预期大小相符的单一蛋白,而 His₆-RpoH 则伴随着多种未知杂蛋白(图 3A),推测可能是 RNA 聚合酶其他亚基的影响。已有研究表明^[20]利福平可以结合 RNA 聚合酶 β 亚基,降低 RpoH 与 RNA 聚合酶核心酶的结合,增加游离状态的 RpoH,因此对 RpoH 的重组表达进行了优化,尝试在培养基中添加利福平(150 μ g/mL)。SDS-PAGE 分析结果显示,经优化后获得了纯度和浓度均较高的 His₆-RpoH 目标蛋白(图 3C)。

2.3 FabZ 和 RpoH 与 P_{esrE} 结合力的鉴定

将纯化后的重组蛋白 His₆-RpoH 和 His₆-FabZ 与 DNA 探针 P_{esrE}^* 分别进行了体外 EMSA,蛋白与探针的结合程度将影响 DNA 的迁移率,从而通过显影条带显示。验证 RpoH 与 P_{esrE}^* 的结合时,考虑到 RpoH 为 RNA 聚合酶的 Sigma 因子(σ^{32}),通过结合核心酶(core enzyme)共同发挥调控基因转录的功能,因此在 EMSA 体系中加入核心酶作为对照。结果如图 4A 所示,单独添加 RpoH 或单独添加核心酶时均未有明显的结合条带,只有二者共同存在下方可形成阻滞条带,表明 RpoH 与靶探针的结合需要核心酶的辅助作用。非生物素标记的冷探针(competitor, 图 4A)和对照探针(ORF_{esrE}^* , 图 4B)结果显示 RpoH 与 P_{esrE} 之间的结合具有特异性,但 EMSA 结果显示 FabZ 并不结合 P_{esrE}^* 探针(图 4C)。由此证明, RpoH 可直接结合至 *esrE* 基因的启动子区,发挥转录调控功能。

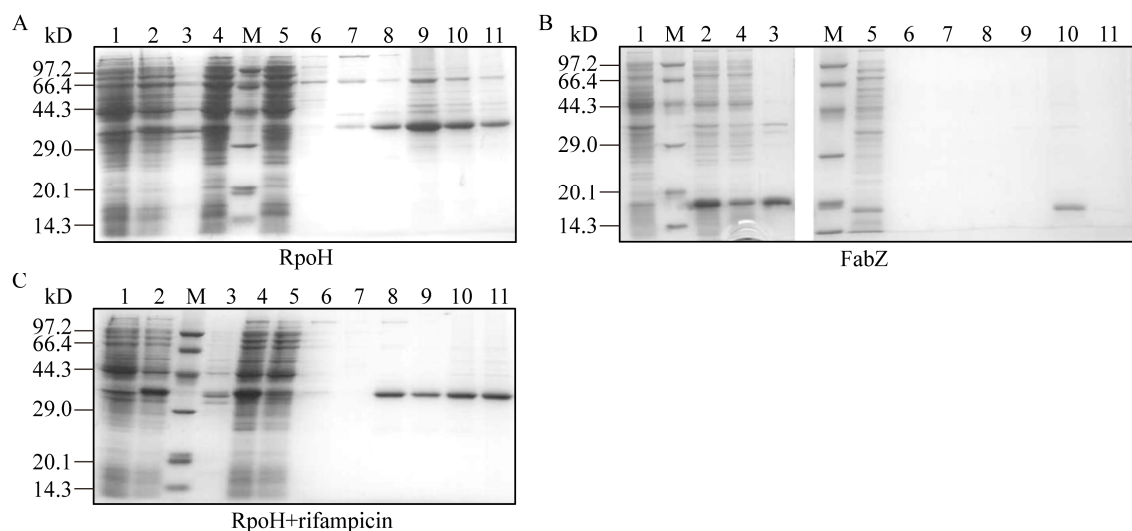


图 3 FabZ 和 RpoH 蛋白重组表达与纯化

Figure 3 Overexpression and purification of His₆-FabZ and His₆-RpoH

注: A: His₆-RpoH 重组表达与纯化; B: His₆-FabZ 重组表达与纯化; C: His₆-RpoH 添加利福平后重组表达与纯化。M: 蛋白标准分子量; 1-4: 诱导前、诱导后、超声沉淀、超声上清; 5: 流穿液; 6-11: 不同浓度咪唑溶液洗脱液(20、50、100、200、300 和 500 mmol/L)。

Note: A: Overexpression and purification of His₆-FabZ; B: Overexpression and purification of His₆-RpoH; C: Overexpression and purification of His₆-RpoH with the presence of rifampicin. M: Protein Marker; 1-4: Whole-cell protein of recombinant proteins before induced, after induced, precipitation and supernatant after ultrasonication; 5: Flowthrough from the Ni-NTA column; 6-11: Proteins purified by Ni²⁺ affinity chromatography (20, 50, 100, 200, 300 and 500 mmol/L).

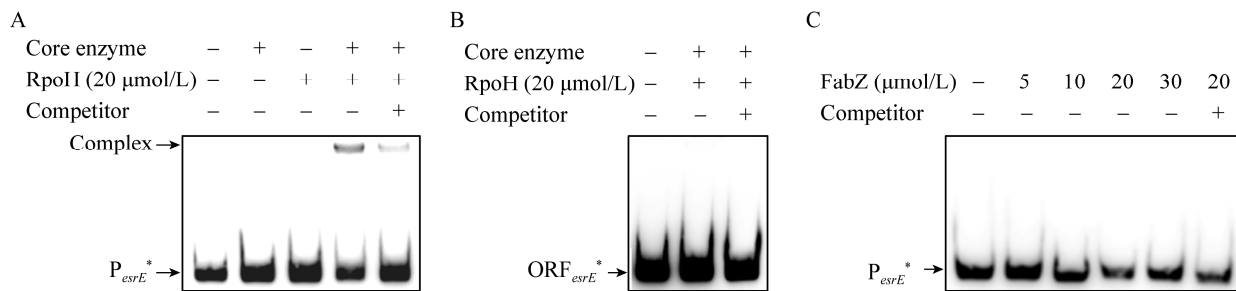


图 4 EMSA 验证 FabZ 和 RpoH 与 P_{esrE} 的结合力

Figure 4 EMSAs assays of FabZ or RpoH with the P_{esrE} probe

注: 生物素标记的探针 P_{esrE}^{*} (188 bp, 5 ng) 与 RpoH 或 FabZ 蛋白共同孵育, 通过阴性探针 (ORF_{esrE}^{*}) 和过量的非标记的竞争物 (competitor) 确定结合条带的特异性, 探针和 DNA-蛋白复合物以箭头指示。Core enzyme: RNA 聚合酶核心酶; +: 添加; -: 不添加。

Note: Biotin-P_{esrE} (188 bp, 5 ng) were incubated with purified RpoH or FabZ, Negative probe (ORF_{esrE}^{*}) and 100-fold excess of unlabeled specific competitor were added as control to confirm the specificity of the band shifts. The free probes and DNA-protein complexes are indicated by arrows. Core enzyme: Core enzyme of RNAP; +: Add; -: Not add.

2.4 RpoH 调控 EsrE 的转录

为了进一步探究 RpoH 对 *esrE* 的转录调控功能, 选择大肠杆菌持家 σ 因子 RpoD 和压力相关的 σ 因子 RpoS 作为对照, 另外空载质粒作为系统阴性对照进行双质粒报告实验, β -半乳糖苷酶酶活检测结果显示, 只有在 IPTG 诱导过表达 RpoH 的情况下, 酶活才有显著性升高 (图 5A), 这表明 RpoH 参与调控 *esrE* 基因的表达, 而 RpoD 和 RpoS 则不参与。

据报道^[21], RpoH 为热休克调节因子, 因此通过定量 PCR 实验考察了不同温度下 *rpoH* 与 *esrE* 转录的相关性。实验结果显示当细胞处于 45 °C 热刺激下, *rpoH* 基因的转录水平增加, *esrE* 基因的转录水平也相应增加 (图 5B), 证明了 RpoH 与 *esrE* 呈正相关。同时, 双质粒报告实验显示在 45 °C 热激下, P_{esrE} 介导的 β -半乳糖苷酶酶活较 25 °C 与 37 °C 均有所提高 (图 5C), 定量 PCR 实验显示 P_{esrE} 介导的 *lacZ* 基因的转录水平也有所提高 (图 5D), 表明 45 °C 热激下 RpoH 表达量的提高增强了 P_{esrE} 启动子的活性, 从而促进了 *lacZ* 基因的转录, 并最终反映出酶活活力的上升。综上, 进一步证明了 RpoH 调控 *esrE* 的转录。

3 讨论与结论

前期研究发现, 定位于 *ubiJ* 基因 3' 端的 sRNA

EsrE 具有独立的启动子 (P_{esrE}), 且该启动子存在顺式调控元件。基于 DNA pull-down 和质谱分析的结果, 筛查到与 P_{esrE} 潜在结合的候选蛋白。双质粒报告系统和 EMSA 实验结果表明 RpoH (σ^{32}) 可直接结合至 P_{esrE}, 正调控 P_{esrE} 的转录活性。 σ 因子与核心酶所组成的 RNA 聚合酶可结合至启动子的保守序列, 进而调控靶基因的转录。大肠杆菌的 RNA 聚合酶亚基 σ^{32} 由 *rpoH* (*htpR*) 基因编码合成, 可特异性识别热休克基因启动子^[21-22]。热激条件下 EsrE 的表达量也有所提高, 同样表明 RpoH 调控 EsrE 转录。为了排除实验系统带来的假阳性, 我们验证了 σ^{70} 和 σ^{38} 参与 EsrE 转录调控的可能性, 过表达 RpoD (σ^{70}) 或 RpoS (σ^{38}) 并不影响 P_{esrE} 的转录活性。这些结果都证明 RpoH 在 sRNA EsrE 的转录调控中发挥重要作用。此外, 根据报道, RpoH 所识别的保守序列为 TTGAAA-N₁₃₋₁₄-CCCCATNT^[23-24], 我们通过 MEME Suite 5.0.5 (<http://meme-suite.org/index.html>) 在线软件分析了 P_{esrE} 的序列, 并未搜索到该保守序列。在该区域中检索到一段并不保守的序列 TTCGAC-N₁₆-CCCCTTAT (图 6)。由此推测 RpoH 对 *esrE* sRNA 的调控可能更具复杂性。

FabZ 是大肠杆菌中的 β -羟烷基-ACP 脱水酶, 同样由 DNA pull-down 以及随后的质谱分析

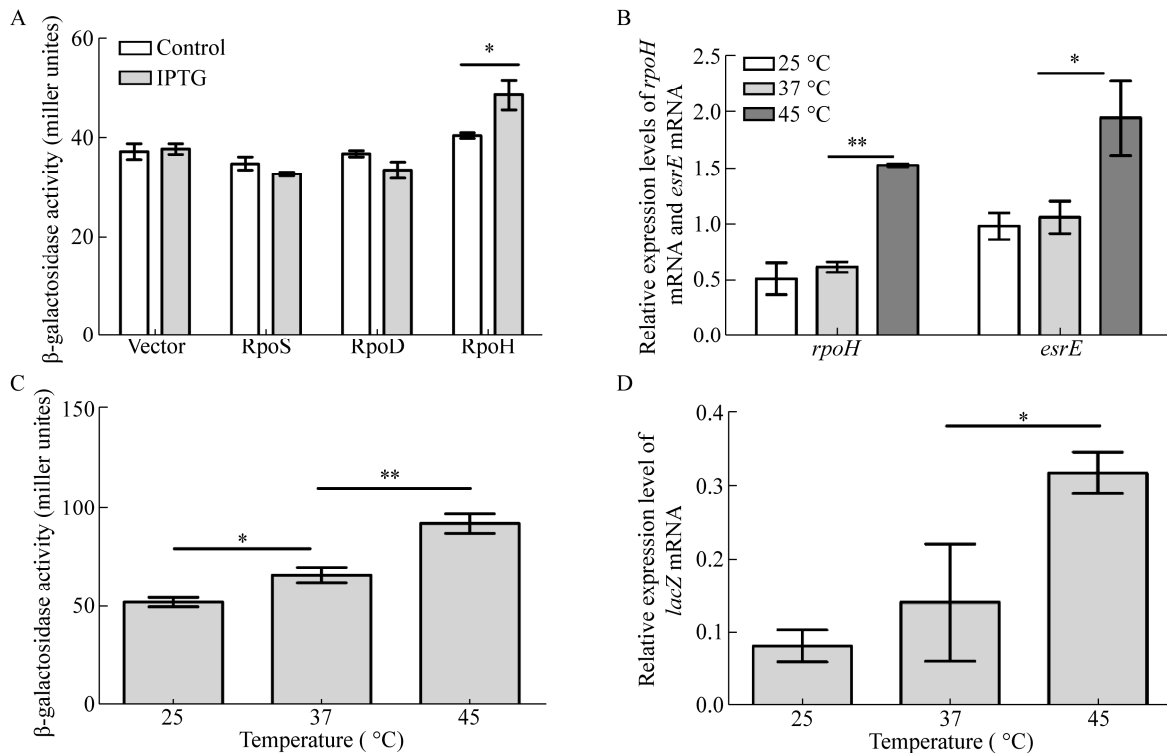


图 5 体内实验验证 RpoH 调控 P_{espE}

Figure 5 RpoH regulates P_{espE} in vivo

注: A: 报告系统分析 RpoS、RpoD 和 RpoH 过表达时 P_{espE} 的转录活性, 未添加 IPTG 诱导表达以及空载质粒同时作为阴性对照; B: qRT-PCR 分析热休克反应下 *rpoH* 和 *espE* 的 mRNA 水平; C: 报告系统分析热休克反应下 P_{espE} 的转录活性; D: qRT-PCR 分析热休克反应下 P_{espE} 所启动的报告基因 *lacZ* 的 mRNA 水平。误差线取自 3 次生物重复的平均值。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

Note: A: Transcriptional activity of P_{espE} with overexpression of RpoS, RpoD and RpoH. Culture with no addition of IPTG and strain harboring empty vector were used as negative controls. B: qRT-PCR analysis of the mRNA levels of *rpoH* and *espE* upon heat shock in JM83. C: Transcriptional activity of P_{espE} upon heat shock in JM83/pESRE-Z. D: qRT-PCR analysis of the mRNA levels of the reporter gene *lacZ* upon heat shock. Bars correspond to the mean \pm SD of three biological replicates. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

TGCACCGTTATCGCCTACGCCAGTGTGTTGCCGAAACTTCGCGATCGCCAGCAGCTTACCGCA
CTGATTTCGAGTGGTGAGCTGGAAGTGCAGGGCGATATTCAGGTGGTGCAAAACTTCGTTGCG
CTGGCAGATCTGGCAGAGTTCGACCTGCGGAACTGCTGGCCCCCTATACCGGTGATATCGC

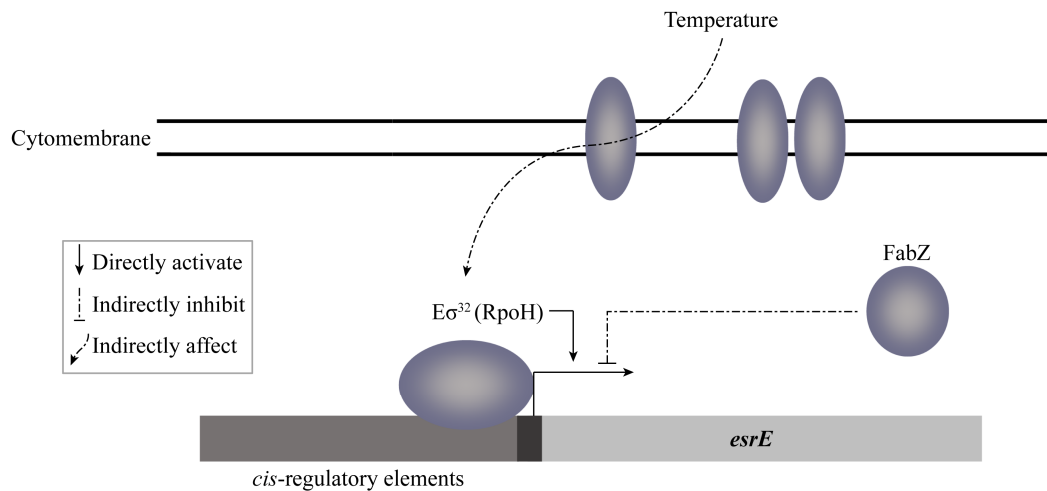
图 6 P_{espE} 序列中 RpoH 结合位点的分析

Figure 6 Analysis of the binding site of RpoH in P_{espE}

识别得到。FabZ 属于“热狗”超家族, 两个单体的亚基以一种经典的 $\alpha + \beta$ “热狗”结构折叠在一起, 即一个层面有 6 个反向平行的 β -转角, 中心围绕着 6 个翻转的 α -螺旋, 两个单体通过 $\beta 3$ 相互作用形成稳定的二聚体^[25], 体内报告系统证明 FabZ 的过表达引起 P_{espE} 转录活性的降低, 这暗示 FabZ 参与 *EsrE* 的转录调控。但是, Kimber 等发现 FabZ 通常以六聚体的形式发挥功能^[26]。从结构

分析可知, FabZ 通过六聚体的形式结合 P_{espE} 序列从而调控 *EsrE* 的转录是不成立的。同时, 体外 EMSA 实验证明 FabZ 蛋白与 P_{espE} DNA 片段不结合。综上, 这些实验表明 FabZ 是以一种间接的方式调控 sRNA *EsrE* 的转录, 过表达 FabZ 可能激发某种未知的信号传导途径, 从而调控 *EsrE* 的转录。

总之, 我们的结果验证了大肠杆菌中 RpoH 和 FabZ 参与 *EsrE* 的转录调控(图 7)。除了 RpoH

图 7 多因素参与 *esrE* 转录调控的模式Figure 7 Model of *esrE* transcriptional regulation by multiple factors

(σ^{32}), 可能还存在其他反式调控因子可以与 P_{esrE} 启动子结合, 从而多层次调控 P_{esrE} 的转录活性。另外, *EsrE* 的表达很可能受到温度的影响, 在高温条件下 σ^{32} 比 σ^{70} 更容易结合 RNA 聚合酶核心酶形成全酶^[27]。截至目前, 这种调控机制仍未完全研究清楚。在进一步的研究中我们将继续筛选验证与 *EsrE* 转录相关的转录调控因子, 以期加深对于 *EsrE* 转录调控网络的认识。

REFERENCES

- [1] Ishihama A. The nucleoid: an overview[J]. *EcoSal Plus*, 2009, 3(2), doi: 10.1128/ecosalplus.2.6
- [2] Ishihama A. Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(5): 628-645
- [3] Ishihama A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 499-518
- [4] Cho BK, Kim D, Knight EM, et al. Genome-scale reconstruction of the sigma factor network in *Escherichia coli*: topology and functional states[J]. *BMC Biology*, 2014, 12: 4
- [5] Gama-Castro S, Jiménez-Jacinto V, Peralta-Gil M, et al. RegulonDB (version 6.0): gene regulation model of *Escherichia coli* K-12 beyond transcription, active (experimental) annotated promoters and Textpresso navigation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(S1): D120-D124
- [6] Shimada T, Yamamoto K, Ishihama A. Novel members of the Cra regulon involved in carbon metabolism in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(3): 649-659
- [7] Myers KS, Yan HH, Ong IM, et al. Genome-scale analysis of *Escherichia coli* FNR reveals complex features of transcription factor binding[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(6): e1003565
- [8] Fröhlich KS, Gottesman S. Small regulatory RNAs in the enterobacterial response to envelope damage and oxidative stress[J]. *Microbiology Spectrum*, 2018, 6(4), doi:10.1128/microbiolspec.RWR-0022-2018
- [9] Melamed S, Peer A, Faigenbaum-Romm R, et al. Global mapping of small RNA-target interactions in bacteria[J]. *Molecular Cell*, 2016, 63(5): 884-897
- [10] Wagner EGH, Romby P. Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it[J]. *Advances in Genetics*, 2015, 90: 133-208
- [11] Beisel CL, Storz G. Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(5): 866-882
- [12] Mandin P, Chareyre S, Barras F. A regulatory circuit composed of a transcription factor, *IscR*, and a regulatory RNA, *RyhB*, controls Fe-S cluster delivery[J]. *mBio*, 2016, 7(5): e00966-16
- [13] Prévost K, Salvail H, Desnoyers G, et al. The small RNA *RyhB* activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 64(5): 1260-1273
- [14] Večerek B, Moll I, Bläsi U. Control of Fur synthesis by the non-coding RNA *RyhB* and iron-responsive decoding[J]. *The EMBO Journal*, 2007, 26(4): 965-975

- [15] Durand S, Storz G. Reprogramming of anaerobic metabolism by the FnrS small RNA[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(5): 1215-1231
- [16] Tanwer P, Bauer S, Heinrichs E, et al. Post-transcriptional regulation of target genes by the sRNA FnrS in *Neisseria gonorrhoeae*[J]. *Microbiology*, 2017, 163(7): 1081-1092
- [17] Chen ZC, Wang Y, Li YR, et al. *Esre*: a novel essential non-coding RNA in *Escherichia coli*[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(8): 1195-1200
- [18] Xia H, Yang XC, Tang QQ, et al. EsrE-a *yigP* locus-encoded transcript-is a 3'UTR sRNA involved in the respiratory chain of *E. coli*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1658
- [19] Wang Y, Ye J, Zhang HZ. Identification of transcriptional regulatory sequences of *yigP* gene in *Escherichia coli*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(5): 566-572 (in Chinese)
汪屹, 叶江, 张惠展. 大肠杆菌 *yigP* 基因转录调控序列的鉴定[J]. *微生物学报*, 2012, 52(5): 566-572
- [20] Wegrzyn A, Szalewska-Pałasz A, Błaszczak A, et al. Differential inhibition of transcription from σ^{70} - and σ^{32} -dependent promoters by rifampicin[J]. *FEBS Letters*, 1998, 440(1/2): 172-174
- [21] Grossman AD, Erickson JW, Gross CA. The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters[J]. *Cell*, 1984, 38(2): 383-390
- [22] Landick R, Vaughn V, Lau ET, et al. Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *E. coli* suggests its protein product may be a transcription factor[J]. *Cell*, 1984, 38(1): 175-182
- [23] Nonaka G, Blankschien M, Herman C, et al. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ^{32} , reveals a multifaceted cellular response to heat stress[J]. *Genes & Development*, 2006, 20(13): 1776-1789
- [24] Koo BM, Rhodius VA, Campbell EA, et al. Dissection of recognition determinants of *Escherichia coli* σ^{32} suggests a composite -10 region with an 'extended -10' motif and a core -10 element[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 72(4): 815-829
- [25] Leesong M, Henderson BS, Gillig JR, et al. Structure of a dehydratase-isomerase from the bacterial pathway for biosynthesis of unsaturated fatty acids: two catalytic activities in one active site[J]. *Structure*, 1996, 4(3): 253-264
- [26] Kimber MS, Martin F, Lu YJ, et al. The structure of (3*R*)-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabZ) from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(50): 52593-52602
- [27] Błaszczak A, Zylicz M, Georgopoulos C, et al. Both ambient temperature and the DnaK chaperone machine modulate the heat shock response in *Escherichia coli* by regulating the switch between σ^{70} and σ^{32} factors assembled with RNA polymerase[J]. *The EMBO Journal*, 1995, 14(20): 5085-5093