

细菌 sRNA 调控靶标的双质粒筛选系统构建

王洪洋 胡利华

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室/蛋白质组学平台(中心), 武汉 430070

摘要 以 pMycVec1/pMycVec2 载体为基础, 构建了筛选和鉴定细菌 sRNA 调控靶标的双质粒系统。对 pMycVec2 载体的多克隆位点进行改造, 并加入强启动子 *rrnBp* 和有效转录终止子, 获得可定向克隆和转录 sRNA 的质粒 pMycVec2-D; 对 pMycVec1 载体的多克隆位点进行改造, 并加入弱启动子 P_{wk} 和有效转录终止子, 获得了分别用报告基因 *lacZ* 和 *GFP* 来检测 sRNA 靶标序列翻译水平的质粒 pMycVec1-*lacZ* 和 pMycVec1-*GFP*。最后, 利用 2 对已知的 sRNA 与其调控靶标 *MicC/ompC* mRNA 和 *MicF/ompF* mRNA, 通过 β -半乳糖苷酶活性和菌体荧光值检测, 表明双质粒系统能有效检测 sRNA 与调控靶标的互作。

关键词 细菌; 非编码小 RNA; 双质粒系统; 调控靶标

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)06-0047-07

非编码小 RNA (small non-coding RNAs, sRNAs) 是新近发现的基因表达调控子, 广泛参与细胞的生理代谢活动^[1-3]。在细菌中, 第一个发现证实的 sRNA 是 6SRNA, 由 *ssrS* 基因编码, 能直接与 RNA 聚合酶的 σ^{70} 互作, 负调控依赖于 σ^{70} 的启动子, 参与生长稳定期的细菌对营养缺乏环境的适应^[4-7]。随后, 发现大肠杆菌的 sRNA CsrB 能够通过 GGA 识别模体与调控 mRNA 翻译及稳定性的 RNA 结合蛋白 CsrA 发生相互作用并调控其活性^[8]。随着测序技术和生物信息学的发展, 越来越多的 sRNAs 及其调控靶标被发现^[9-11]。通过 sRNA 与其 mRNA 靶标的序列同源性、相互作用的热力学参数等生物信息学方法预测调节外膜蛋白 (outer membrane protein, OMP) mRNA 表达的 sRNA 有十几种, 如 *MicA*、*MicC*、*MicF*、*InvR*、*RybB*、*SdsR*、*MicM*、*VrrA*、*RnaG* 等^[12]。利用缺陷型 μ 噬菌体 (Mud), 使其末端携带 5' 端缺失的 *lacZ* 基因, 通过构建 Mud-*lac* 融合体发现在氧化压力条件下 *OxyS* 表达量明显增加, 且与靶标 *fhIa* 发生相互作用^[13]。利用微阵列技术比较分析大肠杆菌 sRNA *RyhB* 异常表达与野生型细胞的表达谱, 显示来自 18 个操纵子的 56 个基因可能是 *RyhB* 的靶

标^[14]。sRNA 抑制靶 mRNA 的翻译却不影响 mRNA 的丰度, 可用转录组学结合蛋白质组学方法分析 sRNA 识别的靶标, 如 sRNA *MicA* 调控的靶标 *ompA* mRNA 以及毒力调控因子的靶标 *rot* mRNA 就是用该方法发现的^[15]。

对各种途径筛选预测的 sRNA 及其靶标, 需要通过实验进一步验证其相互作用。但绝大部分 sRNAs 功能尚不清楚, 其调控靶标的鉴定进展缓慢, 目前主要采用体外鉴定方法。通过凝胶迁移率阻滞实验 (electrophoretic mobility shift assays, EMSA) 和趾纹分析 (toeprinting analysis) 证明 sRNA 可阻断核糖体与翻译起始位点的结合。而体内有效的筛选和鉴定 sRNA 及其调控靶标的方法亟待发掘^[16]。耻垢分枝杆菌中对 sRNA 的研究才开始, 目前仅发现 sRNA *MS1* 的调控靶标为 RNA 聚合酶核心复合体^[17]。本研究基于细菌中大部分 sRNA 通过在靶标 mRNA 的 RBS 附近与 mRNA 发生不完全碱基配对而影响翻译的特点^[18], 以大肠杆菌和分枝杆菌穿梭载体 pMycVec1/pMycVec2 为基础, 构建了一个分枝杆菌 sRNA 调控靶标双质粒筛选系统, 以期用于鉴定分枝杆菌中 sRNA 的调控靶标。

收稿日期: 2017-03-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31470170)

王洪洋: 硕士研究生, 研究方向: 分子微生物学, E-mail: 317020759@qq.com

通信作者: 胡利华, 博士, 工程师, 研究方向: 分子微生物学, E-mail: hulihua@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* mc²155 菌株为华中农业大学蛋白质组学平台保存和提供,大肠杆菌

DH5 α 、BL21(DE3)和 DH10B 菌株购买于 Stratagene。本研究所使用的酶类以及相关试剂购自 New England Biolabs 或 TaKaRa 公司。实验所涉及的载体和引物分别见表 1 和表 2。引物合成与测序由 Invitrogen 公司完成。

表 1 实验涉及的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

质粒 Plasmid	抗性 Resistance	表型或特征 Phenotype or feature	来源 Source
pMycVec1	Kan	Cloning vector, pAL5000 origin, ColE1 origin	[19]
pMycVec2	Hyg	Cloning vector, pJAZ38 origin, ColE1 origin	[19]
pGOAL17	Amp	<i>lacZ</i> template	[20]
pMV261-MsTAG-GFP	Kan	<i>GFP</i> template, pAL5000 replicon	[21]
pRomoter	Chlo	p15A origin, <i>P_{uvk}</i> promoter	[22]
pMycVec2-D	Hyg	Expression vector for sRNA	本研究构建 This study
pMycVec1- <i>lacZ</i>	Kan	Expression vector for the targets of sRNA	本研究构建 This study
pMycVec1- <i>GFP</i>	Kan	Expression vector for the targets of sRNA	本研究构建 This study

表 2 本研究所用 PCR 引物

Table 2 Primers used for PCR amplification

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
LacZ-f	GAAT <u>TCTAGAGG</u> TAGTGGCAGCGGAAGTATGCGCCAAACATGCAT
LacZ-r	GGCG <u>CTCGAG</u> TTATTTTGTACACCAGACCAA
T4g32T-f	CAAAATAAAAAAGGGGACCTCTAGGGTCCCAATTAATTAGCTATTAAT
T4g32T-r	TAATAGCTAATTAATTGGGGACCCTAGAGGTCCCCTTTTTTATTTTGGTAC
MCM-f	GGGCGTTTAAACAAGCTTAAGAATTCACAGCTGCAGG
MCM-r	GGGCTTAGAGATATCCTAGACTTTTTTGTAAACAT
rrnBp-f	AGCGGTTTAAACTTTATGTGAACAACGCGCGC
rrnBp-r	GCGGAAGCTTAAAGTTACGTCCTTGAAACT
GFP-f	TTTAT <u>TCTAGAGG</u> TAGTGGCAGCGGAAGTATGGTGAGCAAGGGCGAG
GFP-r	GCGGTTAATTAATTACTTGTACAGCTCGTCCA
Plac-f	GCACGTTTAAACTTCTCACTCATTAGGCAC
Plac-r	GATCAAGCTTACGCTGTTTCTGTGTGA
Pwk-f	GGCGGTTTAAACTTGTCTGAAGATCTTCGACAACA
Pwk-r	CGCGAAGCTTAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGT
MicC-f	GGCGAAGCTTGTTATATATGCCTTTATTGTC
MicC-r	GGGCTCTAGAAAAAAAAGCCCGGACGAC
MicF-f	GCCGAAGCTTGCTATCATCATTAACTTT
MicF-r	GGGCTCTAGAAAAAAAACCGAATGCGAGGC
ompC-f	GCGCAAGCTTTGCCGACTGATTAATGAGG
ompC-r	TGATTCTAGATGGGACCAGGAGG
ompF-f	GCGCAAGCTTAGACACATAAAGACACCAAACACT

注:引物的酶切位点用下划线标明。f 表示正向引物, r 表示反向引物。Note: Restriction enzyme sites are underlined. f: Forward primer; r: Reverse primer.

1.2 PCR 反应

本研究中所用的 PCR 反应体系如下: 0.02 ng Template DNA, 2.5 mmol/L dNTPs, 10 μ mol/L 正向引物, 10 μ mol/L 反向引物, 0.3 μ L *Taq* DNA polymerase 和 10 \times PCR Buffer。PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 随后 30 个循环反应: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 最后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。退火和延伸时间可根据所用引物序列 T_m 值及扩增 DNA 片段的长度做适当调整。

1.3 定点突变

利用重叠延伸 PCR 技术进行定点突变。首先设计包含突变位点的引物(正、反向)和基因两端特异引物, 然后分别配对, 以目标片段为模板、用 *Pfu* 聚合酶进行 PCR, 准确回收 2 条目的条带, 随后将纯化后的 2 份 PCR 产物进行适量混合使其互为模板和引物, 加入 dNTP、*Pfu* 或 *Taq* DNA 聚合酶及引物进行 PCR, 扩增出具有特异位点突变的基因产物。

1.4 β -半乳糖苷酶活性分析

以 *E. coli* DH5 α 为宿主菌株, 按照文献[23]方

法对本研究构建的 *lacZ* 质粒进行 β -半乳糖苷酶活性分析：将实验菌株培养至对数早期 ($D_{600} \approx 0.8$)，离心收获细胞，用 PBS 缓冲液清洗 1 次并用 Z buffer (60 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgSO_4 , 50 mmol/L 巯基乙醇, pH 7.0) 重悬。测定细胞 D_{600} 值后，取 300 μL 重悬液加 100 μL 氯仿, 50 μL 0.1% SDS, 28 $^\circ\text{C}$ 孵育 5 min, 随后加入 200 μL 4 mg/mL 的 ONPG (邻-硝基苯- β -D-半乳糖苷, 显色底物), 混匀, 记录溶液颜色变黄的反应时间 t 。加入 200 μL 1 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应, 分别测 D_{420} 和 D_{550} 值。 β -半乳糖苷酶活性单位 (U) = $1000 \times \{(D_{420} - 1.75 \times D_{550}) / (D_{600} \times V \times t)\}$, 式中, V 为反应中菌体的体积, mL; t 为反应时间, min。

1.5 菌体荧光值检测

以 *E. coli* DH5 α 为宿主菌株, 将含有 GFP 相

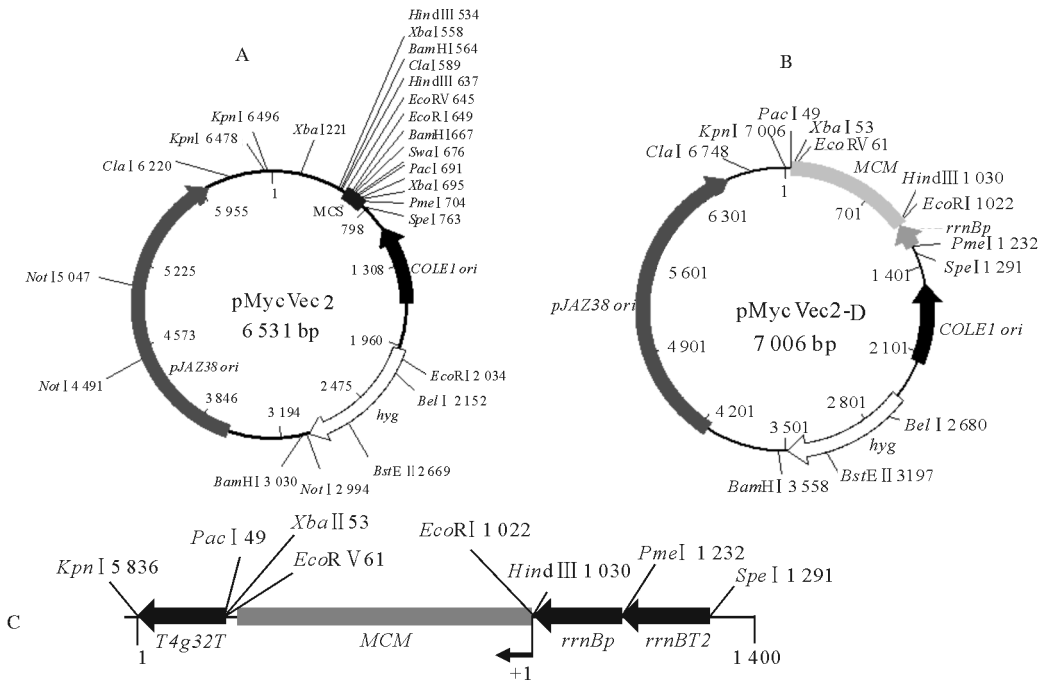
关质粒的菌株培养至对数期, 离心收获细胞, 用双蒸水洗涤 2 次。样品重悬、铺于玻片上并加盖盖玻片后, 在正置荧光显微镜下观察 GFP 蛋白表达情况。细胞的 GFP 荧光值通过多功能酶标仪测定：将细胞离心并用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 样品重悬后吸取 200 μL 置于 96 孔板中进行测定。

2 结果与分析

2.1 sRNA 表达载体 pMycVec2-D 的构建

sRNA 表达载体 pMycVec2-D (图 1B) 是在 pMycVec2 质粒 (图 1A) 基础上改造而成的。pMycVec2 质粒具有大肠杆菌复制子 *COLE1 ori* 和分枝杆菌复制子 *pJAZ38 ori*, 可在大肠杆菌和分枝杆菌中复制。

为了在 pMycVec2 中定向插入表达 sRNA, 对其多克隆位点 (MCS) 进行改造。先将 *hyg* 基因内的 *EcoR I* 位点 GAATTC 同义突变为 GAGTTC



A: pMycVec2 质粒图谱; B: pMycVec2-D 质粒图谱; C: pMycVec2-D 多克隆位点示意图。A: The map of pMycVec2; B: The map of pMycVec2-D; C: The scheme of pMycVec2-D multiple cloning site.

图 1 克隆 sRNA 的载体图谱

Fig.1 The map of vector for cloning sRNA

(2034 位点), 消除 *EcoR I* 酶切位点, 避免影响 MCS 的改造。随后对 MCS 进行改造：首先, 将 *Kpn I* (6478 位点) 和 *Pac I* (691 位点) 之间的 DNA 序列用转录终止子 *T4g32T* 替换, 在引入转录终止子的同时消除 *Xba I*、*Hind III*、*EcoR I* 等酶

切位点; 其次, 通过 PCR 加入已构建好的多克隆媒介 (multiple cloning mediator, MCM) [24], 引入分枝杆菌中基因克隆常用酶切位点 *Pme I*、*Hind III*、*EcoR I*、*EcoR V*、*Xba I* 和 *Pac I*; 然后, 在 MCS 前插入强启动子 *rrnBp* 以达到超表达 sRNA 的目

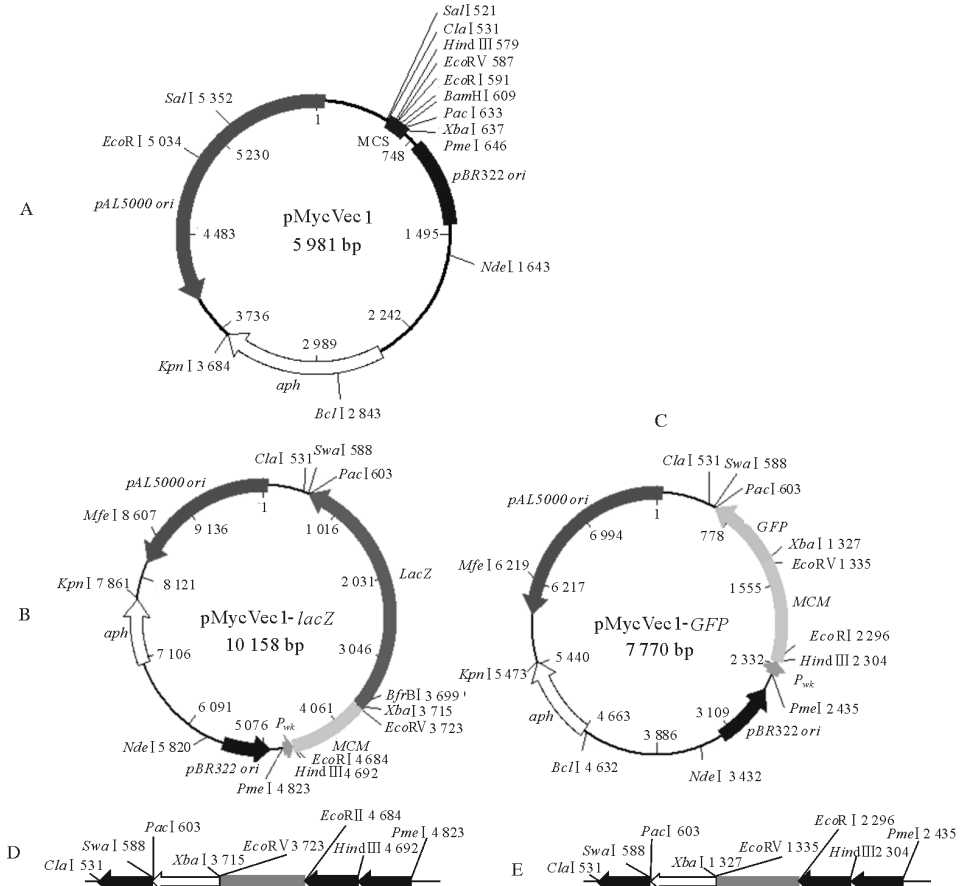
的(图 1C)。

2.2 sRNA 靶标表达载体 pMycVec1-lacZ 和 pMycVec1-GFP 的构建

sRNA 靶标表达载体 pMycVec1-lacZ(图 2B)和 pMycVec1-GFP(图 2C)是在 pMycVec1 质粒(图 2A)基础上改造获得的。pMycVec1 含有与 pMycVec2 相容的双复制子,即大肠杆菌的 *pBR322 ori* 和分枝杆菌的 *pAL5000 ori*,可与

pMycVec2 在大肠杆菌和分枝杆菌中共存。

pMycVec1 的改造策略与 pMycVec2 类似。首先,为去除影响 MCS 重新构建的酶切位点,将 *EcoR I* (5 034 位点)GAATTC 同义突变为 GAGTTC。然后,针对该质粒重新构建一个适合克隆表达 sRNA 靶标基因的 MCS(图 2D、E):先利用转录终止子片段 *T4g32T* 替换 *Cla I* (531 位点)和 *Pac I* (633 位点)之间的 DNA 序列。然后,通过 PCR 和



A: pMycVec1 质粒图谱; B: pMycVec1-lacZ 质粒图谱; C: pMycVec1-GFP 质粒图谱; D: pMycVec1-lacZ 多克隆位点示意图; E: pMycVec1-GFP 多克隆位点示意图。A: The map of pMycVec1; B: The map of pMycVec1-lacZ; C: The map of pMycVec1-GFP; D: The scheme of pMycVec1-lacZ multiple cloning site; E: The scheme of pMycVec1-GFP multiple cloning site.

图 2 克隆 sRNA 靶标的载体图谱

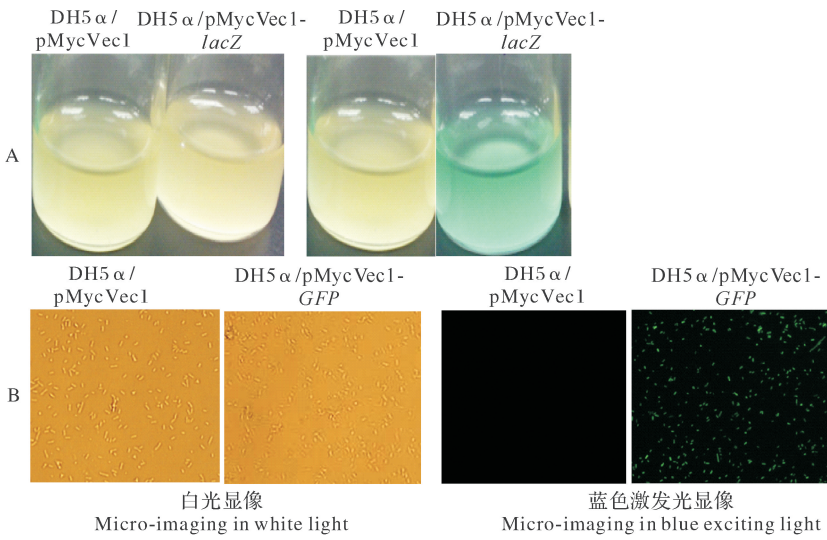
Fig.2 The map of vector for cloning sRNA target

酶连方法加入报告基因 *lacZ* 或 *GFP* 以及 *MCM*。最后引入一个相对较弱的启动子 P_{wk} ,得到 2 个用于克隆表达 sRNA 靶标基因的质粒。

2.3 报告基因的表达分析

将 pMycVec1-lacZ 和 pMycVec1-GFP 分别转入大肠杆菌 DH5 α ,进行报告基因的表达验证。在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-gal 的 LB 培养液中, DH5 α /pMycVec1-lacZ 相比 DH5 α /pMycVec1 有非常明显的

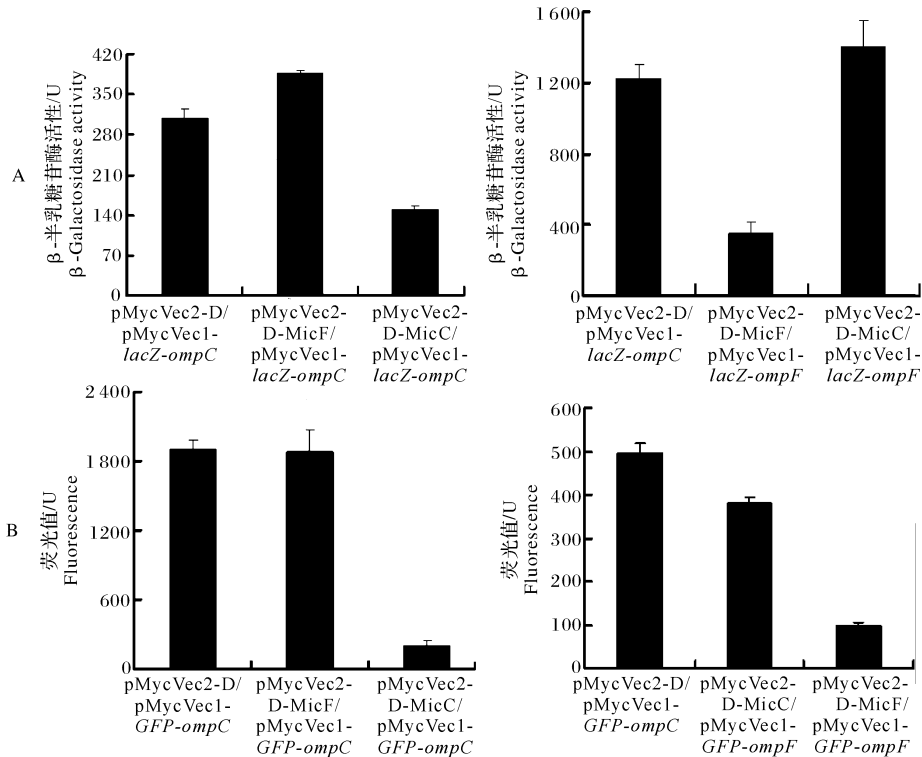
显色(蓝色)反应(图 3A),表明报告基因 *lacZ* 编码的 β -半乳糖苷酶使含有 X-gal 的培养基变成蓝色,即 *lacZ* 基因能正确表达。类似的,在荧光显微镜下观察菌株发光情况,发现 DH5 α /pMycVec1-GFP 有绿色荧光,而对照菌株 DH5 α /pMycVec1 没有荧光产生(图 3B),说明报告基因 *GFP* 编码的绿色荧光蛋白使菌体产生荧光,即 *GFP* 基因也能够正确表达。



A: DH5α/pMycVec1 和 DH5α/pMycVec1-*lacZ* 分别在 0 μg/mL X-gal 和 50 μg/mL X-gal 的 LB 培养液中的显色反应; B: DH5α/pMycVec1 和 DH5α/pMycVec1-*GFP* 分别在白光和蓝光激发下的显像。A: Color reaction of DH5α/pMycVec1 and DH5α/pMycVec1-*lacZ* in LB medium containing 0 μg/mL X-gal and 50 μg/mL X-gal, respectively; B: Micro-imaging of DH5α/pMycVec1 and DH5α/pMycVec1-*GFP* in white light and in blue exciting light, respectively.

图 3 报告基因的表达分析

Fig.3 The expression of reporter genes



A: 以 *lacZ* 为报告基因双质粒系统的 β-半乳糖苷酶活性分析; B: 以 *GFP* 为报告基因双质粒系统的荧光值分析。A: The β-galactosidase activity analysis for two-plasmid system based on the reporter gene *lacZ*. B: The fluorescence values analysis for two-plasmid system based on the reporter gene *GFP*.

图 4 双质粒系统功能验证

Fig.4 Verificating the function of two-plasmid system

以上结果表明,用于克隆 sRNA 调控靶标的质粒 pMycVec1-*lacZ* 和 pMycVec1-*GFP* 已经构建成功

功,报告基因 *lacZ* 和 *GFP* 都能够正确表达。

2.4 双质粒系统的功能验证

为了验证本研究构建的双质粒筛选系统,将 *E. coli* 中已经证实的 2 对 sRNAs 与其调控靶标 *MicC/ompC* mRNA 和 *MicF/ompF* mRNA 分别克隆到双质粒上,转化宿主菌株 (*E. coli* DH5 α),检测报告基因的表达情况,分析 sRNA 与其调控靶标的相互作用。结果显示,以 *lacZ* 为报告基因的双质粒系统,菌株 pMycVec2-D-MicC/pMycVec1-*lacZ-ompC* 和 pMycVec2-D-MicF/pMycVec1-*lacZ-ompF* 的 β -半乳糖苷酶活性明显低于其他 2 组。pMycVec2-D-MicC/pMycVec1-*lacZ-ompC* 降低了 1/2 左右, pMycVec2-D-MicF/pMycVec1-*lacZ-ompF* 降低了 3/4 左右(图 4A),说明 *MicC* 和 *MicF* 分别与其调控靶标 *ompC* 和 *ompF* 发生了相互作用,从而抑制了 *lacZ* 的表达。

类似的,以 *GFP* 为报告基因的双质粒系统, pMycVec2-D-MicC/pMycVec1-*GFP-ompC* 和 pMycVec2-D-MicF/pMycVec1-*GFP-ompF* 的荧光值也明显低于其他 2 组。pMycVec2-D-MicC/pMycVec1-*GFP-ompC* 降低了 8/9 左右, pMycVec2-D-MicF/pMycVec1-*GFP-ompF* 降低了 3/4 左右(图 4B),说明 *MicC* 和 *MicF* 分别与其调控靶标 *ompC* 和 *ompF* 发生了相互作用,并抑制了 *GFP* 的表达。综上所述,无论使用 *lacZ* 还是 *GFP* 作为报告基因,构建完成的双质粒系统都能够通过检测报告基因的表达量来分析 sRNA 与靶标的相互作用,并可指示作用的方向。

3 讨论

本研究构建了用于细菌 sRNA 调控靶标的双质粒筛选系统 (pMycVec1-*lacZ*/pMycVec2-D, pMycVec1-*GFP*/pMycVec2-D),并且在大肠杆菌中进行了有效性验证。报告基因采用了 *lacZ* 和 *GFP*,研究发现 *LacZ* 及 *GFP* 均可监测基因的转录表达,并且结果一致。另外,这 2 个报告基因又各具特点。*lacZ* 作为报告基因时,既可在培养基中添加 X-gal 通过显色(蓝色)反应定性判断基因的表达情况,又可通过 ONPG 显色底物定量检测 β -半乳糖苷酶活性,但是其动态分析能力差、且宿主菌株基因型、细胞裂解反应及显色底物特性也会对结果产生影响^[25]。*GFP* 报告基因来自水母 (*Aequorea victoria*),具有 2 个优点:一是不需要外源底物,可不间断探测荧光以监测基因表达;二是可用流式细胞仪

实时监测活细胞培养物或用荧光显微镜观察单个细胞的基因表达水平。但是低表达量的 *GFP* 很难被检测到,是影响分析结果的因素之一。本研究建立的双质粒筛选系统可以相互验证,具有很好的互补优势。

本研究建立的双质粒系统在插入启动子元件时充分考虑了基因转录优化需要。表达 sRNA 的质粒具有一个强启动子 *rrnBp*,以达到超表达 sRNA 的目的^[26];表达 sRNA 调控靶标的质粒则是一个相对较弱的启动子 P_{weak} ,可以保证不同的靶标序列具有稳定的转录水平。同时,克隆到载体上的靶标 mRNA 的序列长度也是影响结果分析的因素。理想状态下,克隆序列应该包含全部的 5'-UTR 和一小段编码区;减短有可能破坏 sRNA 的作用位点或破坏 mRNA 的固有结构,从而影响检测结果,增长可能会使靶标基因的转录元件克隆到载体上,导致载体转录水平的稳定性受到影响而影响筛选效果;所以基因转录+1 位点或启动子的位置确定非常重要^[27]。本研究构建载体引入启动子时,均保证从第一个碱基(+1 位点)开始转录,这样既可得到与原基因组相同的转录产物,也可避免多余碱基的影响。

参 考 文 献

- [1] GROSSHANS H, FILIPOWICZ W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs[J]. Nature, 2008, 451: 414-416.
- [2] GEORG J, HESS W R. Cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria[J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2011, 75: 286-300.
- [3] HOE C H, RAABE C A, ROZHDESTVENSKY T S, et al. Bacterial sRNAs: regulation in stress[J]. International journal of medical microbiology, 2013, 303: 217-229.
- [4] HINDLEY J. Fractionation of ³²P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting[J]. Journal of molecular biology, 1967, 30: 125-136.
- [5] WASSARMAN K M, STORZ G. 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity[J]. Cell, 2000, 101: 613-623.
- [6] GEISSEN R, STEUTEN B, POLEN T, et al. *E. coli* 6S RNA a universal transcriptional regulator within the centre of growth adaptation[J]. RNA biology, 2010, 7: 564-568.
- [7] STEUTEN B, SETNY P, ZACHARIAS M, et al. Mapping the spatial neighborhood of the regulatory 6S RNA bound to *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme[J]. Journal of molecular biology, 2013, 425: 3649-3661.
- [8] BABITZKE P, ROMEO T. CsrBsRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins[J]. Current opinion in microbiology, 2007, 10: 156-163.
- [9] VOGEL J, SHARMA C M. How to find small non-coding RNAs in

- bacteria[J].Bio Che,2005,386:1219-1238.
- [10] CHEN H T,CATHERINE B,JONATHAN L.Identification of novel RNAs in mycobacterial species [J]. PLoS ONE, 2013, 8: e79411.
- [11] PAOLO M,FRANCESCO F,DANIELA M C.Genome-wide discovery of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. PLoS ONE,2012,7: e51950.
- [12] CHEN S,ZHANG A,BLYN L B, et al.MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli* [J].Journal of bacteriology,2004,186:6689-6697.
- [13] ALTUVIAI S,ZHANG A, ARGAMAN L, et al.The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses fhlA translation by blocking ribosome binding[J].The EMBO journal,1998,17:6069-6075.
- [14] MASSE E,GOTTESMAN S.A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli* [J].Proc Natl Acad Sci USA,2002,99:4620-4625.
- [15] BOISSET S, GEISSMANN T, HUNTZINGER E, et al.Staphylococcus aureus RNAlII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism[J].Genes Dev,2007,21:1353-1366.
- [16] GISELA S,JORG V,KAREN M W.Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers[J].Molecular cell,2011,43: 880-891.
- [17] JARMILA H,JITKA J M,PETR H, et al.Ms1, a novel sRNA interacting with the RNA polymerase core in mycobacteria[J].Nucleic acids research,2014,42:11763-11776.
- [18] DAVID L,MAXIME S R,DANIEL L, et al.Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes[J].Biochimica et biophysica acta,2013,1829(6/7):742-747.
- [19] IRIS K, SABINE E, SILKE S, et al. Energy transfer between fluorescent proteins using a co-expression system in *Mycobacterium smegmatis* [J].Gene,2001,278:115-124.
- [20] TANYA P, NEIL G S. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* tly ApleABC mutant by gene replacement [J]. Microbiology, 2000, 146: 1969-1975.
- [21] HUANG F, HE Z. Characterization of a conserved interaction between DNA glycosylase and ParA in *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis* [J]. PLoS ONE, 2012, 7: e38276.
- [22] ZENG J, ZHANG L, LI Y, et al. Over-producing soluble protein complex and validating protein-protein interaction through a new bacterial co-expression system [J]. Protein expression and purification, 2010, 69: 47-53.
- [23] STOVER C, DE LA CRUZ V, FUERST T, et al. New use of BCG for recombinant vaccines [J]. Nature, 1991, 351: 456-460.
- [24] GUO M M, FENG H, ZHANG J, et al. Dissecting transcription regulatory pathways through a new bacterial one-hybrid reporter system [J]. Genome research, 2009, 19: 1301-1308.
- [25] JIANG T, XING B, RAO J. Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression [J]. Biotechnology and genetic engineering reviews, 2008, 25: 41-76.
- [26] ARNVIG K B, GOPAL B, PAPA VINASASUNDARAM K G, et al. The mechanism of upstream activation in the *rrnB* operon of *Mycobacterium smegmatis* is different from the *Escherichia coli* paradigm [J]. Microbiology, 2005, 151: 467-473.
- [27] URBAN J H, VOGEL J. Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs *in vivo* [J]. Nucleic acids research, 2007, 35: 1018-1037.

Construction of a two-plasmid system for identifying targets of bacterial sRNA

WANG Hongyang HU Lihua

National Key Laboratory of Agricultural Microbiology/Center for Proteomics Research, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Small non-coding RNAs (sRNAs) are a large number of regulators and are significantly important in physiological processes in bacteria. However, few approaches are available for identifying their cellular targets *in vivo*. In this study, a two-plasmid system based on the initial vectors pMycVec2 and pMycVec1 was established to screen the targets of mycobacterial sRNA. The vector (pMycVec2-D) for cloning sRNA was derived from the vector pMycVec2 and contained the strong promoter *rrnBp* and an effective transcription terminator, which has been modified to enable tight regulation of the expression of sRNA. The vectors for cloning target genes, pMycVec1-*lacZ* and pMycVec1-*GFP*, were constructed from the pMycVec1, which stabilized the transcription with a weak promoter P_{wk} , and the translation level of target was detected through the reporter genes. The two-plasmid system was validated by detecting the interaction between sRNA and its regulatory target, MicC/*ompC* mRNA and MicF/*ompF* mRNA respectively.

Keywords bacteria; small non-coding RNAs (sRNAs); two-plasmid system; regulatory target

(责任编辑:张志钰)