

Fine-tuning gene networks using simple sequence repeats

组员：丁梦思 张桂荣

2012年10月30日



Outline

Introduction

Methods and Results

Conclusion

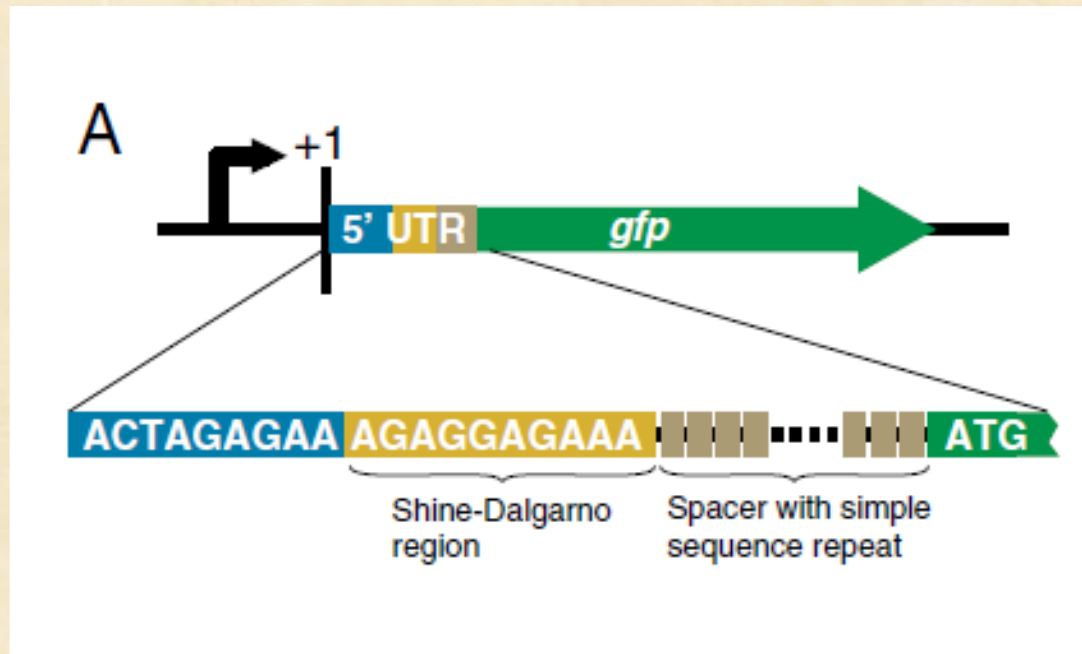
Introduction

运转基因网络之前，必须调控参数。

这篇文章介绍了一种调控的方法：将高突变的简单重复序列插入到核糖体结合位点的间隔区来达到微调的目的。

Methods and Results

rbSSR的探索性和可预见性



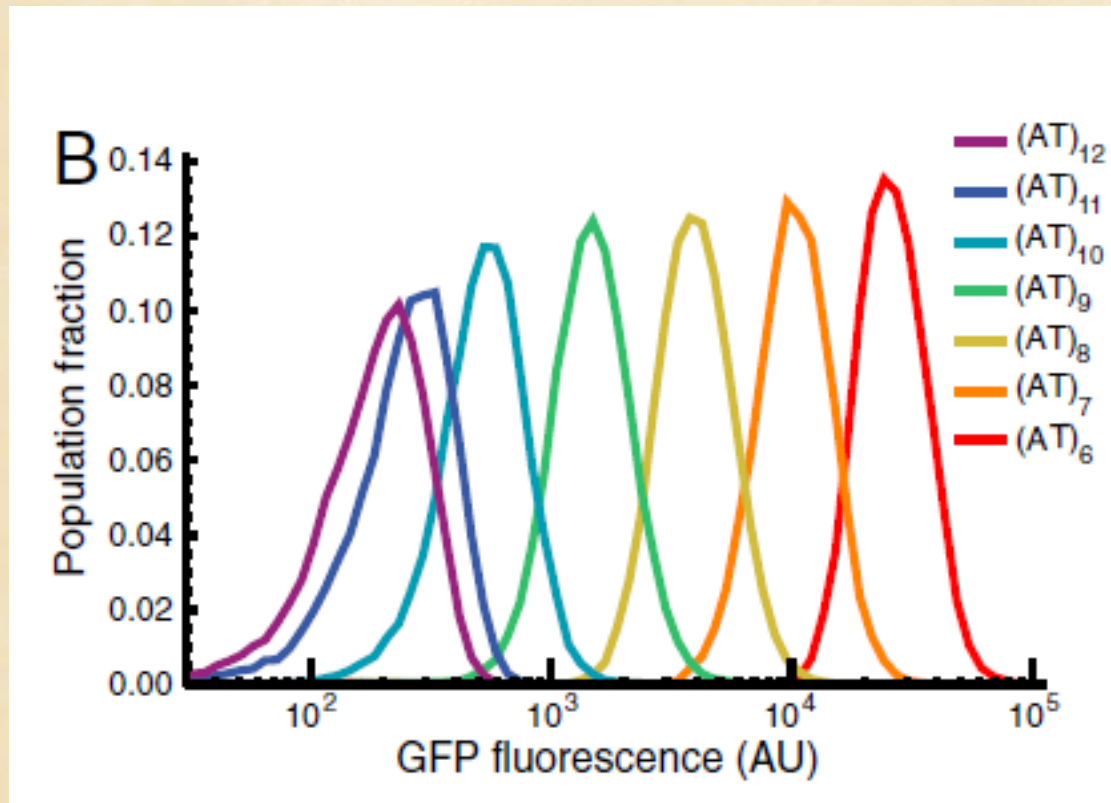
构建质粒：启动子，SD序列，simple sequence repeat(SSR)

本文所用SSR：(A)_n，(T)_n，(AT)_n，(AC)_n

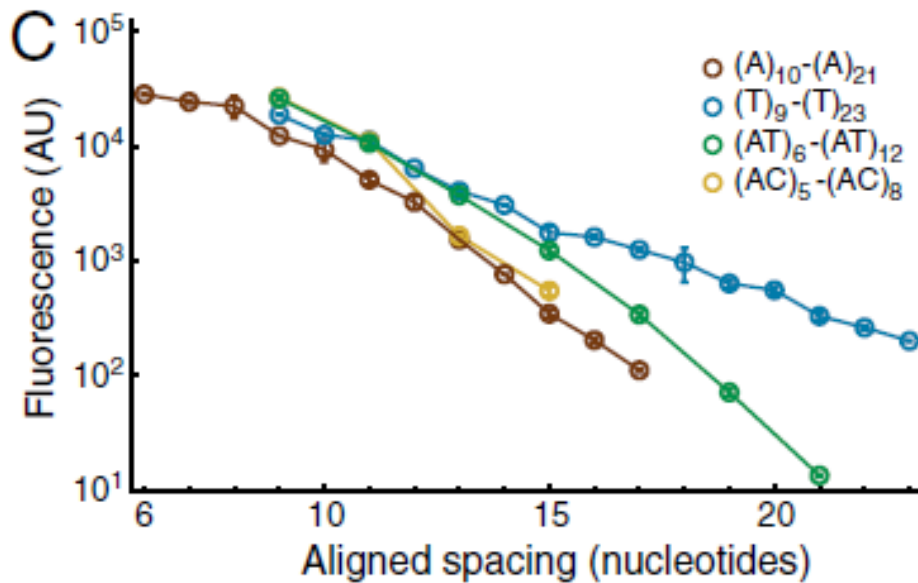
The sequence motif called rbSSR.

将质粒转移到*E.coli*（大肠杆菌）中

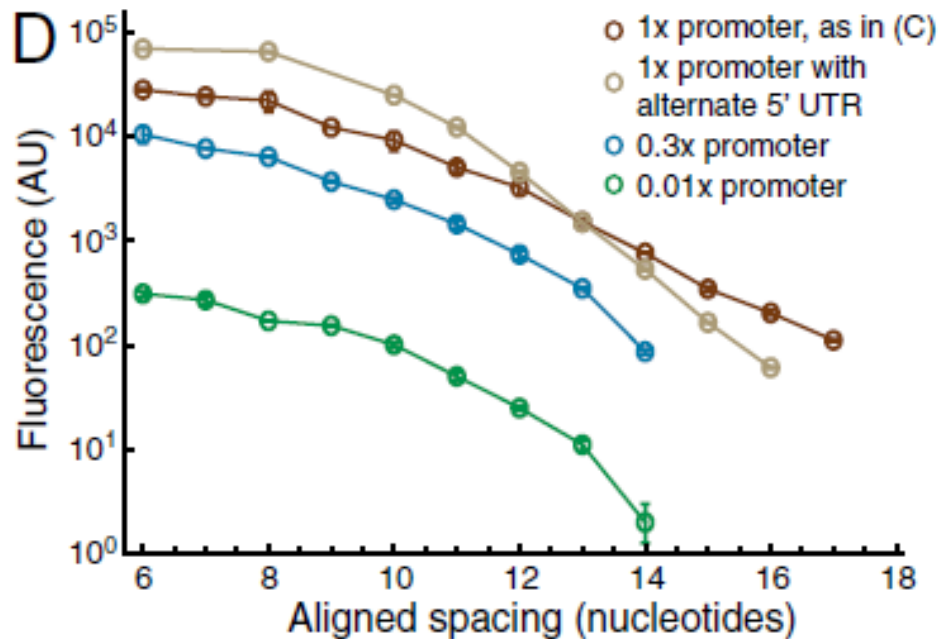
用流体细胞仪来衡量rbSSR的绿色荧光蛋白（rbSSR-GFP）的输出水平



随着n的增加，荧光标记的平均强度直线下降了100-1000倍。

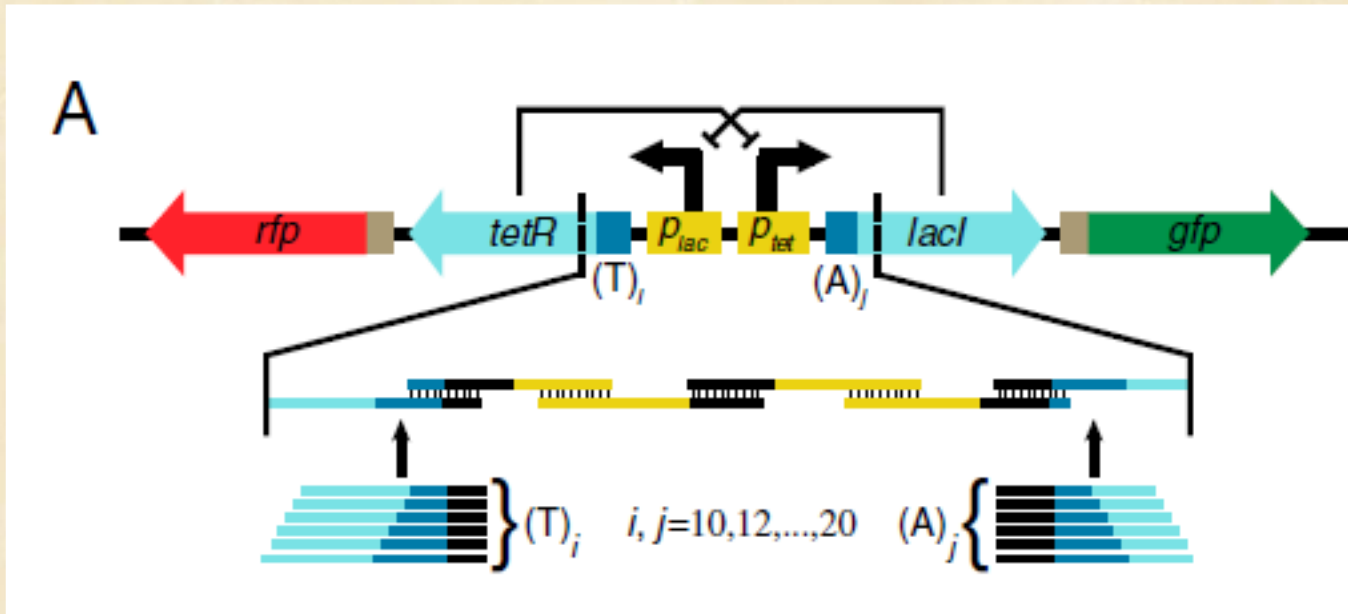


荧光强度下降的速率与序列结构有关：
单A下降得最快，单T下降得最缓慢。



连接不同强度的启动子或者是改变5'UTR的结构可以使不同区域的表达水平横跨5个数量级。

扩大复杂性：微调双稳态转换子



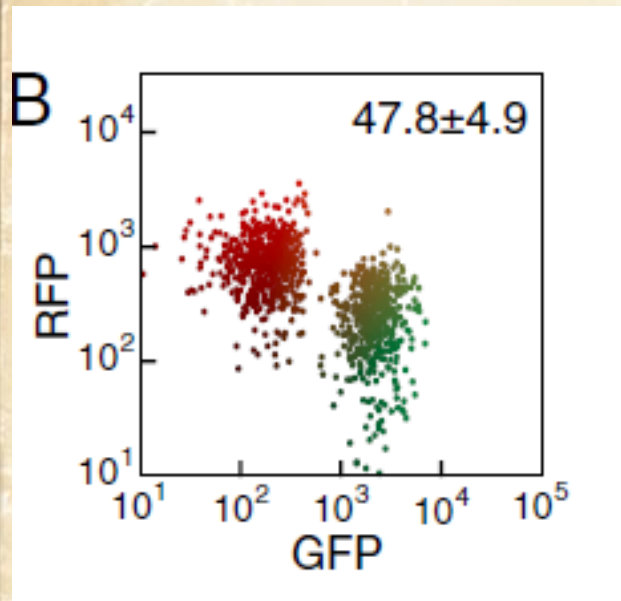
文章中构建的双向稳定的转换子，rbSSR各自独立的驱动表达阻遏蛋白LacI和TetR，分别表达出GFP和RFP。

在一个给定的菌株中，并不能明确预言转换子两极哪一极先占优势或是两极处于相似的境地。

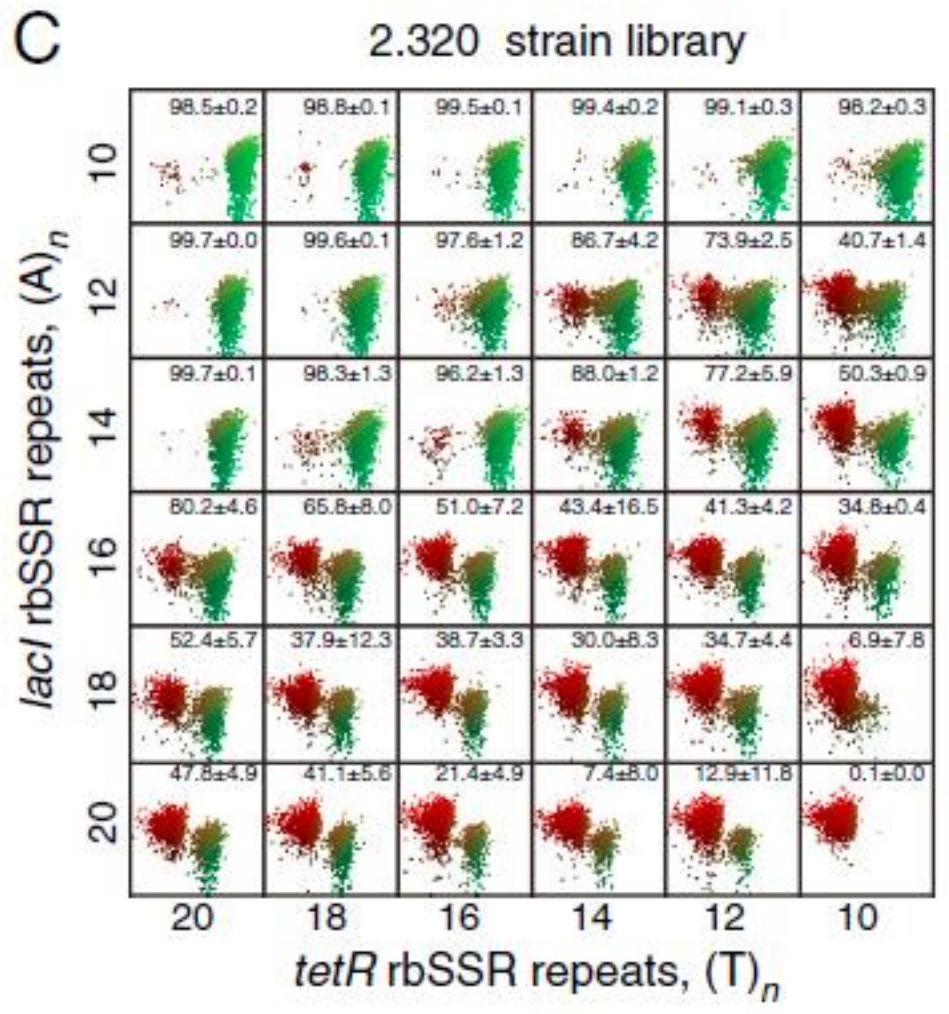
虽然实际上，作者团队第一次将这个没有调控的转换子结构应用在大肠杆菌菌株DH5 α 中时，得出的结果表明转换子只能在一极稳定：虽然刚开始偏向于LacI优势极，但是由于细胞生长率的优势最后自发的转换到TetR优势极。

转换子的三种有效行为

1. 如果两极都是稳定的，转换子可用作感应环境信号的分子探针，并且可以在环境信号消失后连续10代仍保持感应状态。
2. 如果一极比另外一极显著不稳定，细胞可用作一个预置在不稳定那一极的程序化的延时调节器。
3. 如果两极平衡，细胞会出现coin-flipping行为而用作噪音转换子，在完善单细胞到合成的多细胞系统中起到基础循环的作用。



B. 用流式细胞仪获得红色和绿色荧光标记的指数生长时期的细胞散点图



C. 就像预期的一样，一个抑制子的强rbSSR通常与另一极相反抑制子的较弱的rbSSR相对应。

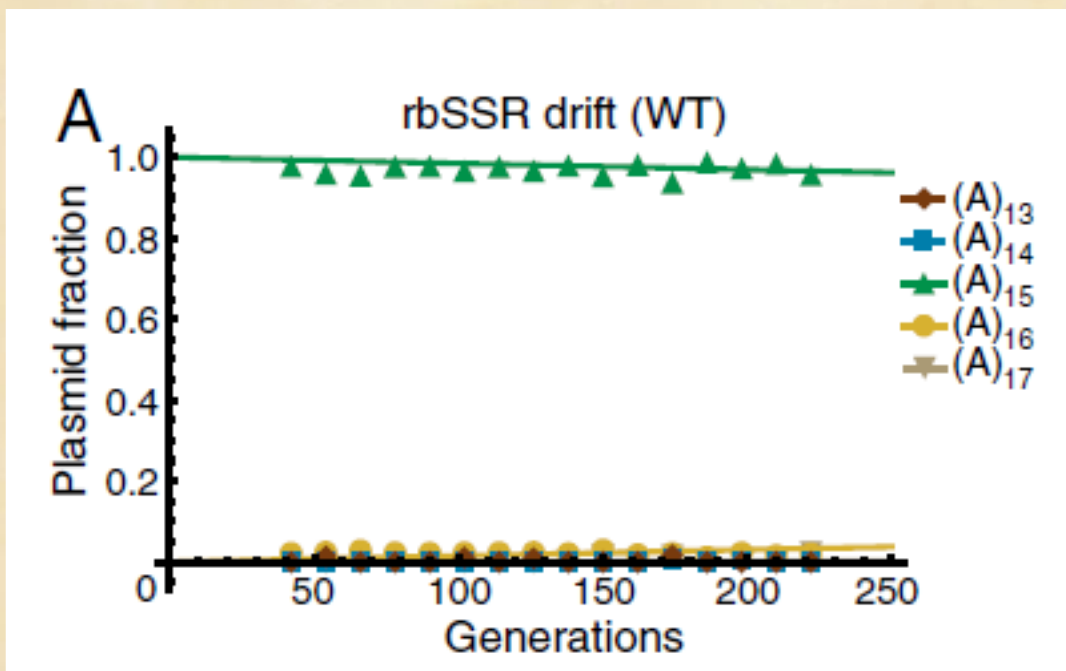
环境问题

将每个rbSSR-BSS库的不同类型导入到第二个大肠杆菌菌株 *lacI*- (BW25113 Δ *lacI*) 中，原来生成双峰的rbSSR对现在生成了单峰。

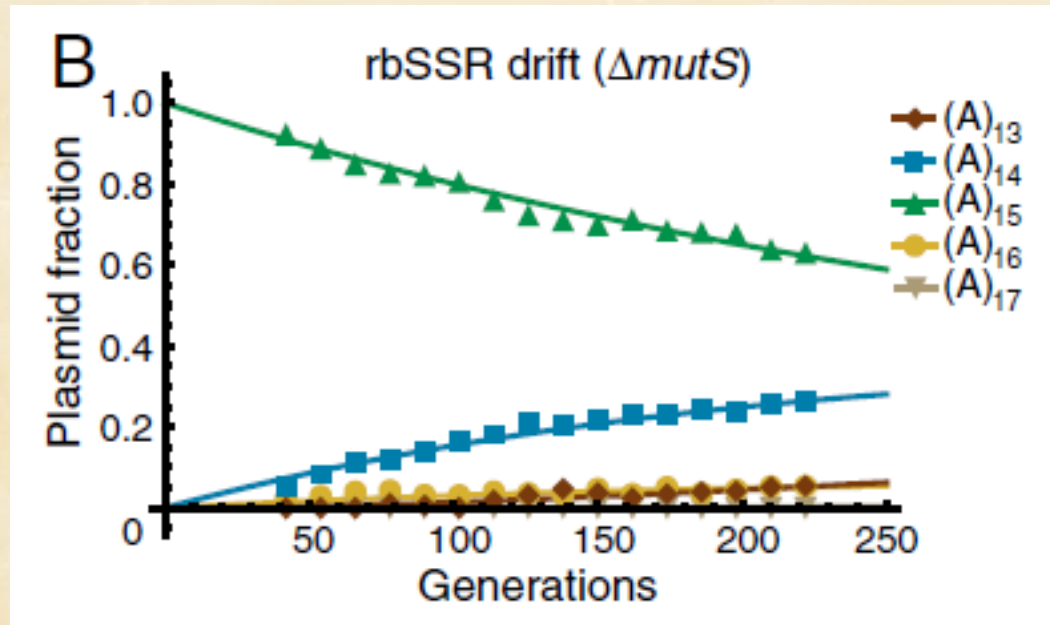
为了观察每个转换子的稳定性，作者团队用引诱剂IPTG和 anTc将菌株分别变成TetR 和LacI极，洗脱引诱剂后培养96小时，(A)₁₂和(T)₁₂结构在两种菌株背景中都表现很强的双稳定性。在菌株2.320中，整个实验过程中都保持着双稳定性。较弱的(A)₁₄和(T)₁₆结构下LacI极比较不强健，导致96小时后TetR 和LacI极的混合。

rbSSR的稳定性和进化性

用大概220代野生型和突变型菌株的DNA踪迹来分析序列的漂移

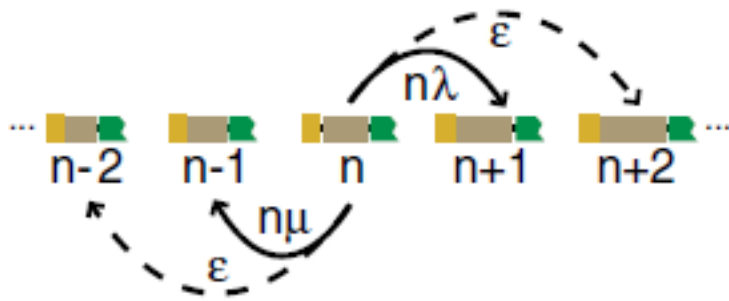


野生型中gfp基因包括调控区域和rbSSR序列没有突变，表明rbSSR序列有很强的稳定性。

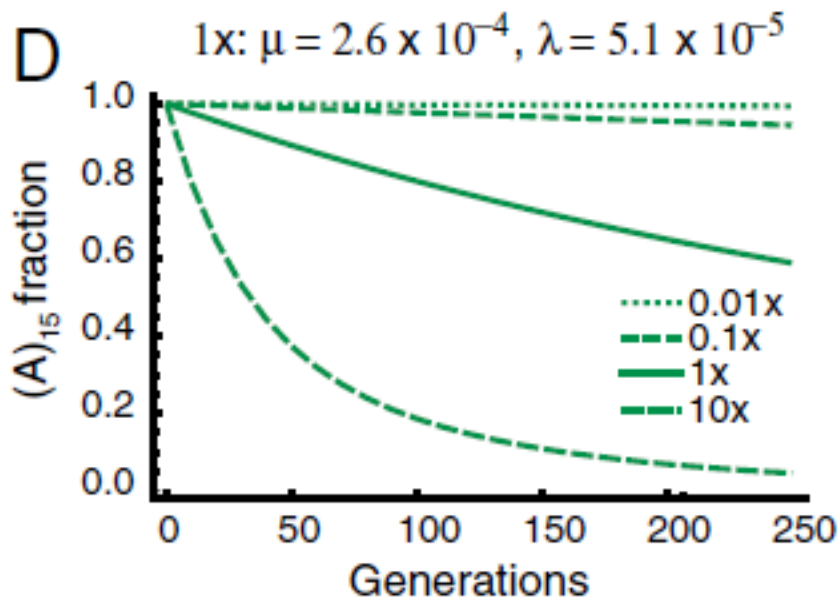


但是在突变菌株中当 $(A)_{14}$ 质粒稳定性增加的时候，存在着很强的SSR缺失的倾向。

C



D



通过C和D的数据，推论出在每一代中每对碱基的缺失突变率是 2.6×10^{-4} ，插入突变率是 5.1×10^{-5} ，突变菌株中SSR突变率是野生型菌株的20倍。

Conclusion

1. 一个复杂的基因网络如果想要按照设计来运转，需要进行实际调控。本文使用了在RBS间隔区插入简单重复序列的方法来进行调控，进一步的实验应该验证这些序列在基因网络调控中的潜力。
2. 该实验也演示了基因网络库的行为范围，文中提到的转换子是实际可行的并且对宿主环境是非常敏感的，表达该转换子的细胞可以在医疗诊断或是生物工业中用作分子探针或是延时调节器，但是有时需要和其他方法结合使用。相同的转换子结构可以在合成的多细胞系统中用作使细胞开始分化的重要元件。

3. 运用简单重复序列来调控基因网络的方法可扩展运用到其他细菌和高等生物中，和其他方法相结合可能能够调控到目前调控不了的网络参数。这个方法可以用作在给定环境下优化整个基因网络调控战略中的一部分。



Thank you !