

Antisense transcription as a tool to tune gene expression

Jennifer AN Brophy & Christopher A Voigt^{*}

阳旭
2018/1/14

contents

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Introduction

转录组研究的增加已经发现反义转录在大多数生物中是很常见的，包括古细菌，原核生物和真核生物。尽管反义转录广泛存在，但是大多数的反义转录的调控作用尚不清楚。

目前有两种机制，通过反义启动子可能会调节基因的表达。

- 第一种涉及产生的反义RNA可以通过结合到mRNA上来改变它的稳定性或翻译，或者起转录调控子的作用来调节基因的表达。
- 第二种是转录干扰，其中正义和反义启动子直接相互作用或是通过RNA聚合酶来引起基因的下降调控。

- 本文中，在大肠杆菌中建立了一个合成系统来研究反义转录如何改变基因的表达和调节调控回路的反应特征。
- 应用基于芯片的寡核苷酸合成系统来构建包括5668个终止子-启动子复合物来控制三个阻遏物（PhlF, SrpR, and TarA）在简单遗传回路中的表达。
- 最后，确定了反义RNA和转录干扰对抑制基因表达的相对贡献，并且引入生物物理模型来捕获RNA聚合酶的碰撞对抑制基因表达的影响。

Materials and Methods

材料

菌株和培养基

菌株：大肠杆菌菌株NEB10 β 和DH10B

培养基：Miller 肉汤培养基；M9基本培养基（添加多种化合物）

方法

数据测量和分析；启动子强度计算；终止子分类；文库设计、构建和测序；细胞分选；富集计算以及生长曲线测量

Results

反义启动子的强度和抑制的相关性

设计了一个简单的系统来量化反义启动子对基因表达的影响（图1A）。

IPTG诱导的正向启动子 P_{tac} 驱动红色荧光蛋白（*rfp*）的表达；在*rfp*的下游存在组成型反义启动子 P_R 朝相反的方向进行转录。使用单独的质粒系统来确定 P_R 和 P_{tac} 的强度。

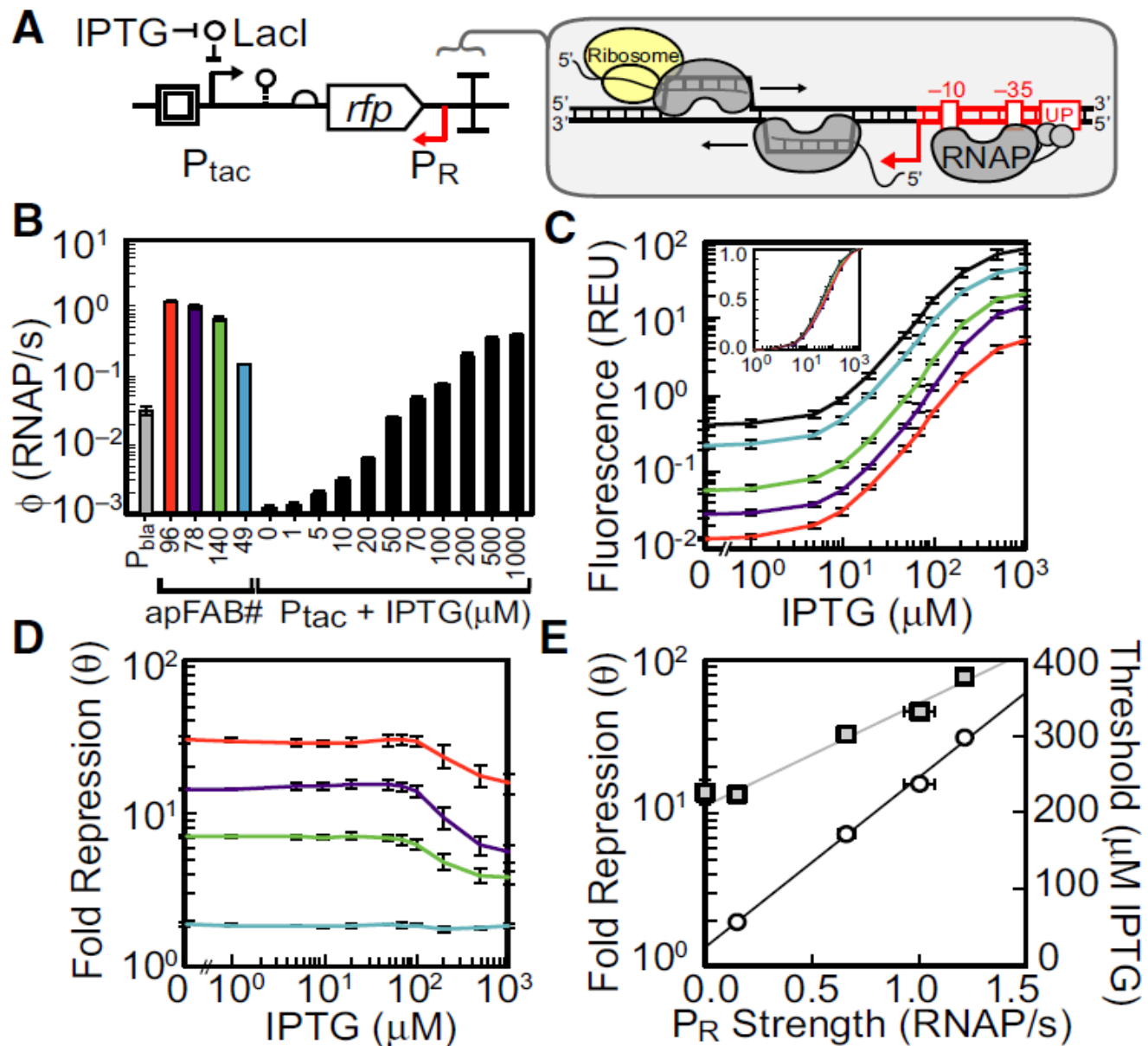


图1 反义转录及其对基因表达的影响

选择非门，输入启动子驱动阻遏物的表达而关闭输出启动子。构建基于52个终止子和109个组成型启动子的文库，成对组合来产生5668独特的复合部分，并克隆到目标位置。然后转化到大肠杆菌中。

用TetR的同源物：PhIF, SrpR, TarA来构建起始非门的反应函数。

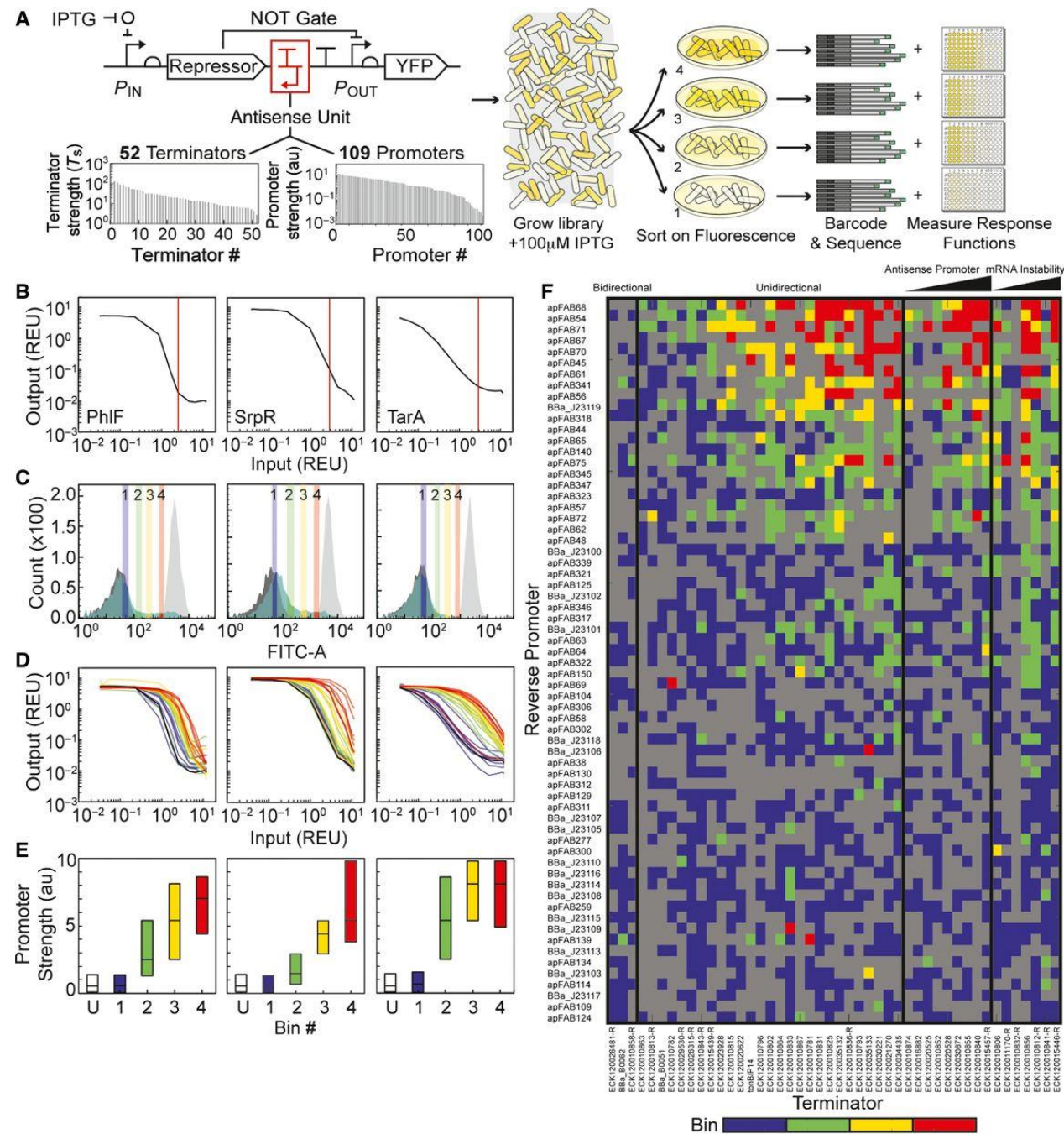


图2 终止子/反义启动子对的文库构建及其对调控回路性能影响的特征

鉴定一组强终止子能够被用来连接一组反义启动子从而可靠的调控基因表达。可预测性需要启动子与其配对的终止子之间的作用是相互独立的。因此提供了九个能够融合到不同的基因或操纵子上的强终止子和20个能够成功添加从而控制表达的反义启动子。

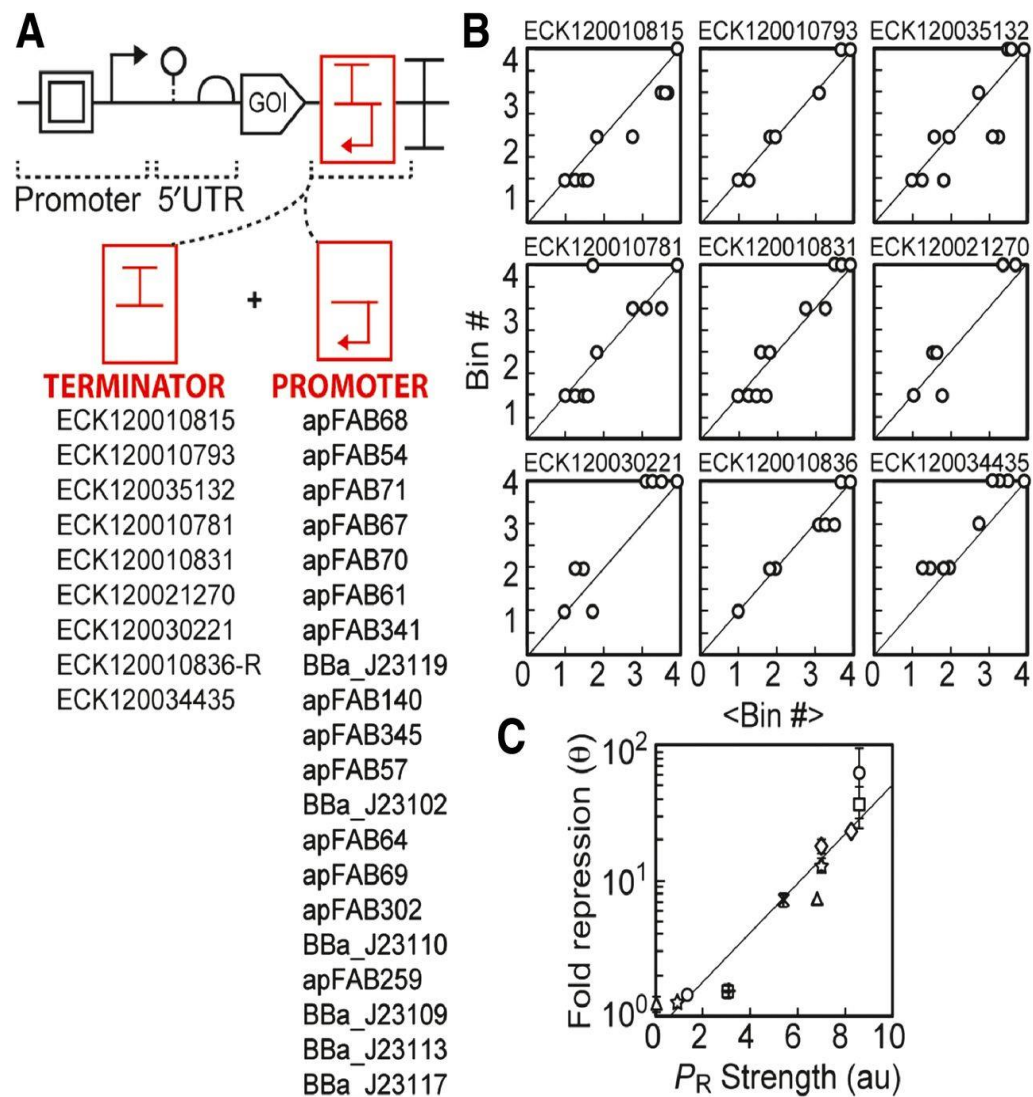


图3 单向终止子和反义启动子组合

反义转录产生的抑制 (θ) 可以分为：
 由反义RNA产生的抑制 (θ_{RNA})
 和由转录干扰产生的抑制 (θ_{TI})。

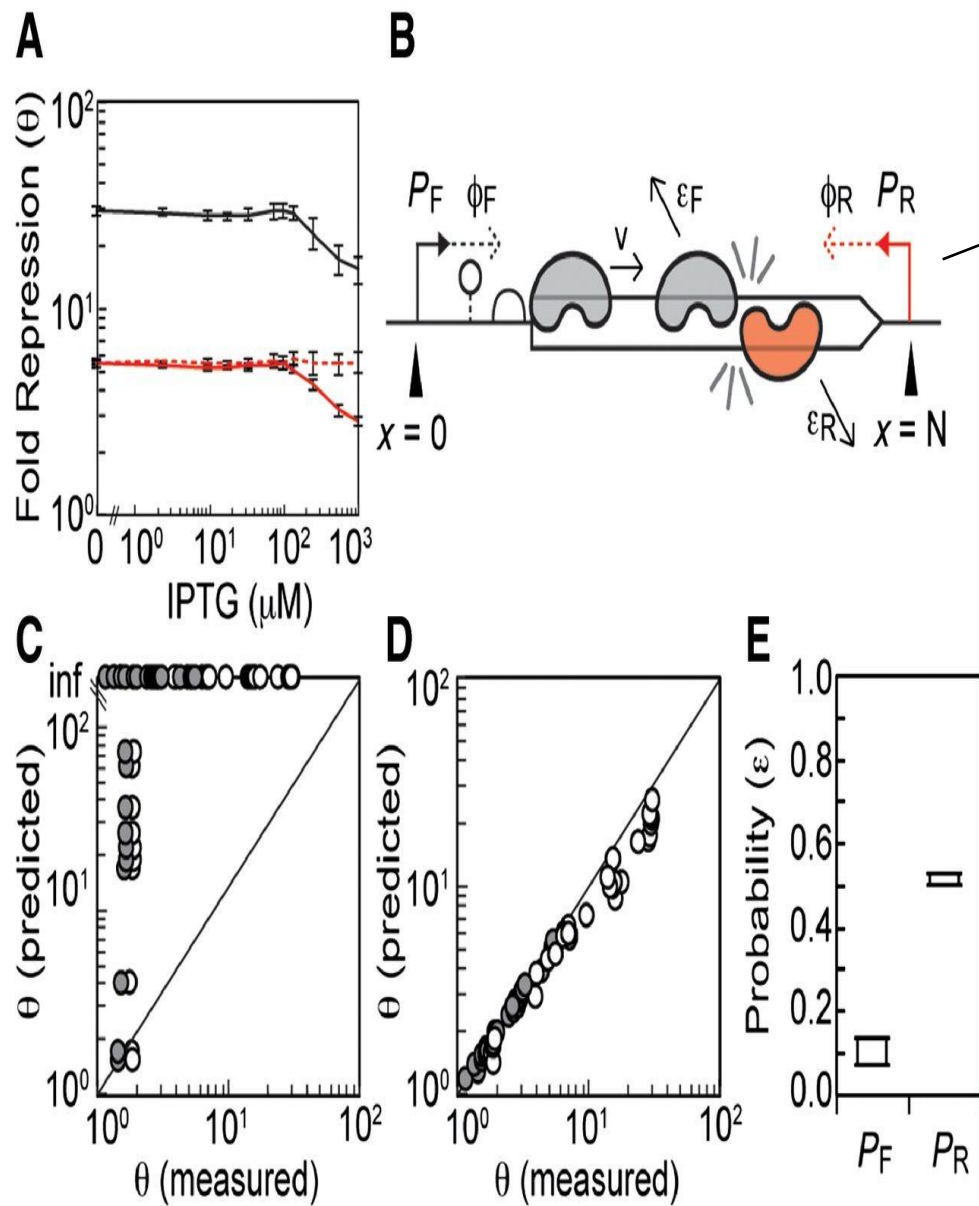


图4 由反义转录产生抑制的机制

Discussion

这项工作表明反义启动子能够可靠的调控基因表达。在这个范式中，还有其他的方法来控制基因的表达水平，如改变正向启动子或者核糖体结合位点，或者添加小RNA或3'发夹结构来改变mRNA的稳定性。尽管这些方法可以实现更大范围的表达控制，但是反义启动子具有对一些应用有利的独特特征。

反义转录的性能源于其对从正向启动子开始的转录的影响和转录后对蛋白质表达影响的独特协同。在文章描述的系统里，我们发现反义RNA、转录活性高的RNA聚合酶之间的碰撞对抑制基因表达有相同的效果。

总结

在大肠菌中建立了一个合成系统来研究反义转录如何改变基因的表达和调节调控回路的反应特征，并确定了反义RNA和转录干扰对抑制基因表达的相对贡献。

创新点：开发了一种由一个单向终止子之后是组成型反义启动子的新的遗传结构，并证明了这一结构依据反义启动子的强度成比例的抑制基因表达。引入生物物理模型来捕获RNA聚合酶的碰撞对抑制基因表达的影响，并量化反义转录在调控网络中的作用。

启发：文章中用到基于芯片的寡核苷酸合成来构建文库的方法是借鉴前人的研究。同时作者综合各种方法和技术来用于研究。所以我们在研究问题时，应该善于学习和借鉴别人的方法，并整合已有的知识和方法来更好的为我们的研究服务。

THANK YOU !