

Biofizyka

(1100-114BFIZ11)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

Wykład 14

27 maja, 2025

**Transkrypcja i translacja z perspektywy eksperymentów z
pojedynczymi cząsteczkami**

<http://www.fuw.edu.pl/~jantosi/>

jantosi@fuw.edu.pl

Stochastyczna synteza mRNA w komórkach ssaków

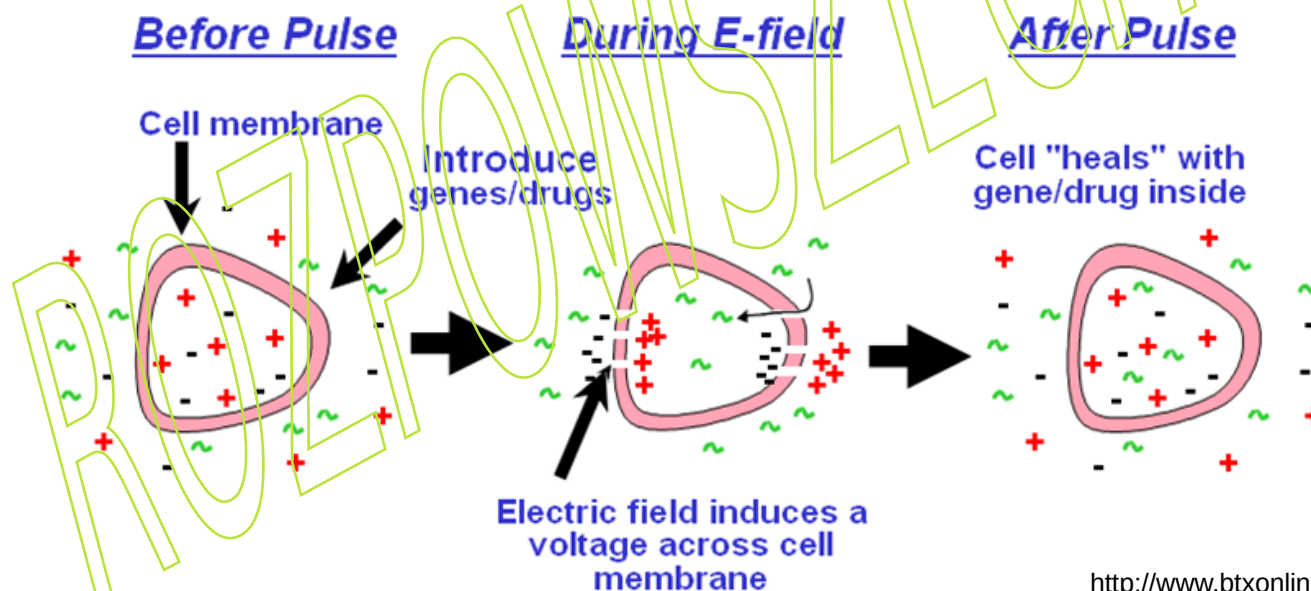
Zwykle w ekspresji genów bierze udział niewielka liczba cząsteczek, przy czym liczba białek często jest rzędu setek cząsteczek, mRNA rzędu dziesiątek cząsteczek, a same geny często występują w zaledwie jednej lub dwóch kopiach na komórkę.

Najbardziej bezpośrednią metodą wykrywania aktywacji i inaktywacji genów jest bezpośrednie monitorowanie mRNA wytwarzanego z genu przy rozdzielczości pojedynczych cząsteczek. Ponieważ okres półtrwania mRNA jest zazwyczaj znacznie krótszy niż białek fluorescencyjnych, ich poziomy dokładniej odzwierciedlają stan genu. Co więcej, wykrywając pojedyncze cząsteczki, można pominąć kwestię czułości. Co więcej, obecność całkowitej liczby cząsteczek byłaby szczególnie cenna w precyzyjnej ocenie modeli stochastycznej ekspresji genów.

Stochastyczna synteza mRNA w komórkach jajnika chomika chińskiego: w tym badaniu autorzy zbadali zmienność ekspresji genów między komórkami, dokładnie zliczając pojedyncze cząsteczki mRNA za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (fluorescence in situ hybridization, FISH).

Aby bezpośrednio obserwować losowe zdarzenia aktywacji i inaktywacji genów, autorzy zmierzili różnice między komórkami w liczbie cząsteczek określonego mRNA. Osiągnęli to poprzez integrację **genu reporterowego** posiadającego tandemowy układ miejsc wiązania sondy z komórkami ssaków i wykorzystali sondy znakowane fluorescencyjnie do wizualizacji mRNA transkrybowanego z genu przez FISH. Aby uzyskać czułość na pojedynczą cząsteczkę, wprowadzili 32 kopie tandemowe sekwencji wiążącej sondę o 43 parach zasad na końcu 3' sekwencji kodującej białko fluorescencyjne (sekwencja M1). Konstrukcję wprowadzono do komórek jajnika chomika chińskiego (CHO) metodą **elektroporacji** i w ten sposób otrzymano stabilną linię komórkową, w której pojedyncza kopia genu została zintegrowana z genomem komórki.

PLoS Biology, 4:e309, 2006



<http://www.btxonline.com/pages/FAQ.html>

Elektroporacja to przykładanie prądu elektrycznego przez błonę komórkową, powodujące tymczasowe utworzenie „porów”, umożliwiających wychwyt egzogennych cząsteczek znajdujących się w pożywce do cytoplazmy (transfekcja przejściowa) lub do jądra (transfekcja stabilna), powodując w ten sposób transfekcję lub transformację komórki. Elektroporację przeprowadza się za pomocą elektroporatorów, urządzeń wytwarzających pole elektromagnetyczne w roztworze komórkowym. Osiąga się to poprzez zewnętrzne przyłożone pole elektryczne. Technikę tę zastosowano do wprowadzenia plazmidów, takich jak DNA i RNA (w tym siRNA), białek, węglowodanów, barwników i cząstek wirusów do komórek bakterii, drożdży, roślin, owadów i ssaków.

Gen reporterowy (wizualizujący)

W biologii molekularnej gen reporterowy to gen, który badacze przyłączają do sekwencji regulatorowej innego genu bakterii lub komórki, będącego przedmiotem zainteresowania. Niektóre geny wybiera się na reportery, ponieważ cechy, jakie nadają organizmom, w których zachodzi ich ekspresja, są łatwe do zidentyfikowania i zmierzenia, lub dlatego, że są markerami selekcyjnymi. Geny reporterowe są często wykorzystywane jako wskaźnik tego, czy dany gen został wchłonięty przez populację komórek lub organizmu lub uległ w nim ekspresji.

Regulatory sequence to
be studied
(e.g. a gene's promoter)

Reporter gene
(e.g. encoding GFP or
luciferase)

..... DNA



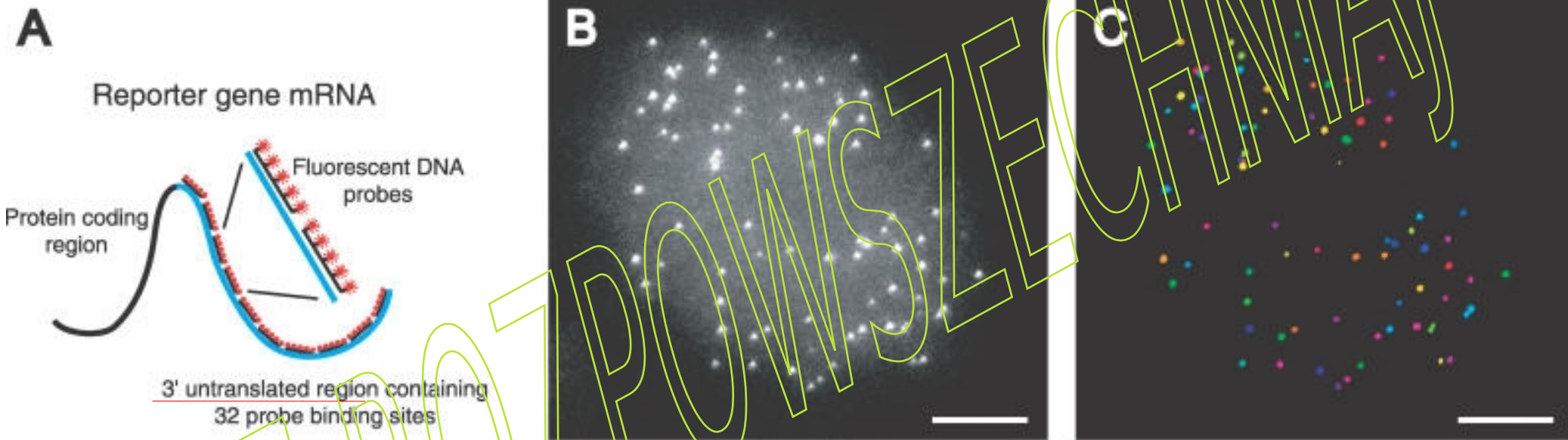
mRNA



A reporter protein
Amount is easily measured
(e.g. GFP by fluorescence)

Diagram wyjaśniający wykorzystanie genu reporterowego do badania sekwencji regulatorowej.

Komórki CHO utrwalono i poddano hybrydyzacji z jednoniciową sondą oligodeoksyrybonukleotydową, która była zarówno komplementarna do tandemowo powtarzanych sekwencji, obecnych w każdym mRNA, jak i wyznakowana pięcioma dobrze rozproszonymi ugrupowaniami fluoroforowymi.



Wykrywanie i oznaczanie ilościowe pojedynczych cząsteczek mRNA w poszczególnych komórkach

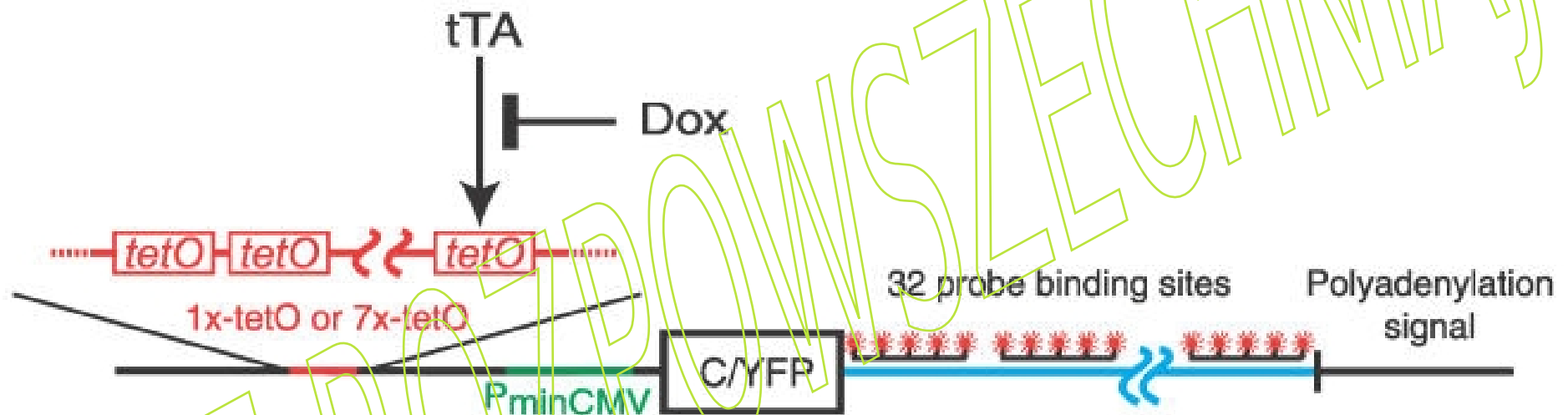
(A) Schematyczny diagram przedstawiający metodę wykrywania mRNA. Wiele sond fluorescencyjnych wiąże się z każdą cząsteczką mRNA, dając jasny, zlokalizowany sygnał.

(B) Połączony obraz trójwymiarowego stosu obrazów z komórki CHO wyrażającej gen 7x-tetO przedstawiony w (A), gdzie każdy mRNA jest hybrydyzowany z sondami FISH, które wiążą się z multimeryczną sekwencją wiążącą sondę w jej 3'-UTR (3'-untranslated region; 3'-wiązanie sondy P1-TMR z sekwencją M1). Każda plamka odpowiada pojedynczej cząsteczce mRNA.

(C) Identyfikacja plam w trójwymiarowym stosie obrazów w (B). Każda cząstka znaleziona przez algorytm analizy obrazu ma inny kolor, co pokazuje, że algorytm jest dokładny i że poszczególne cząsteczki są jednoznacznie identyfikowane. Paski skali mają długość 5 μm .

Pomiar różnic między komórkami w liczbie mRNA w komórkach klonalnych*

Autorzy wygenerowali stabilne linie komórkowe CHO ekspresjonujące wprowadzony do nich konstrukt. Gen umieszczono pod kontrolą **promotora**, którego ekspresję można było kontrolować w komórkach ssaków, i stabilnie zintegrowano go z genomem poprzez elektroporację, w wyniku której każda komórka zawiera pojedynczą kopię genu.



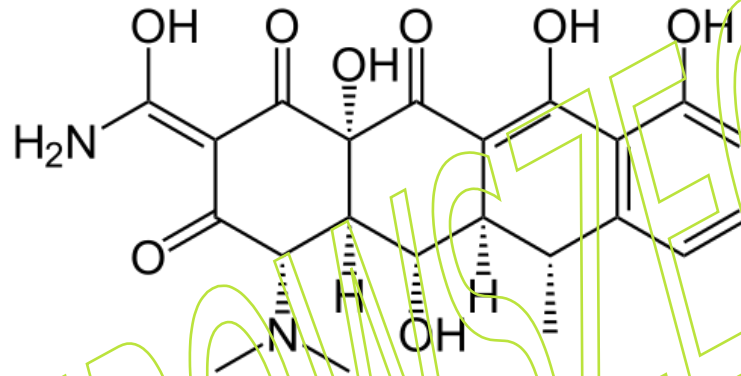
Schematyczne przedstawienie promotora kontrolowanego przez doksycyklinę z jednym (1xtetO) i siedmioma (7xtetO) miejscami wiązania, i kontrolowanymi przez niego genami reporterowymi. Doksycyklina wiąże się z białkiem tTA (transaktywatorem tetracykliny), zapobiegając w ten sposób wiązaniu się go z operatorem tet. Zsyntetyzowane mRNA zawiera sekwencję wiążącą 32 sondy jednoniciowego DNA, z których każda jest wyznakowana pięcioma fluoroforami.

W genetyce **promotor** to region DNA, w którym wiąże się polimeraza RNA, co inicjuje transkrypcję określonego genu. Promotory znajdują się w pobliżu genów, które transkrybują. Promotory mogą mieć długość od kilkudziesięciu do setek par zasad.

*Kiedy komórki dzielą się przez mitozę, powstają dwie genetycznie identyczne, a więc klonalne, komórki potomne. Komórki w ciele człowieka są zazwyczaj klonalne (ponieważ powstały z pojedynczej komórki). Populacje bakterii i wirusów są często klonalne.

Aktywacja transkrypcji kontrolowana tetracykliną...

... to metoda indukowalnej ekspresji genów, w której transkrypcja jest odwracalnie włączana lub wyłączana w obecności antybiotyku tetracykliny lub jednej z jej pochodnych (np. doksycykliny).



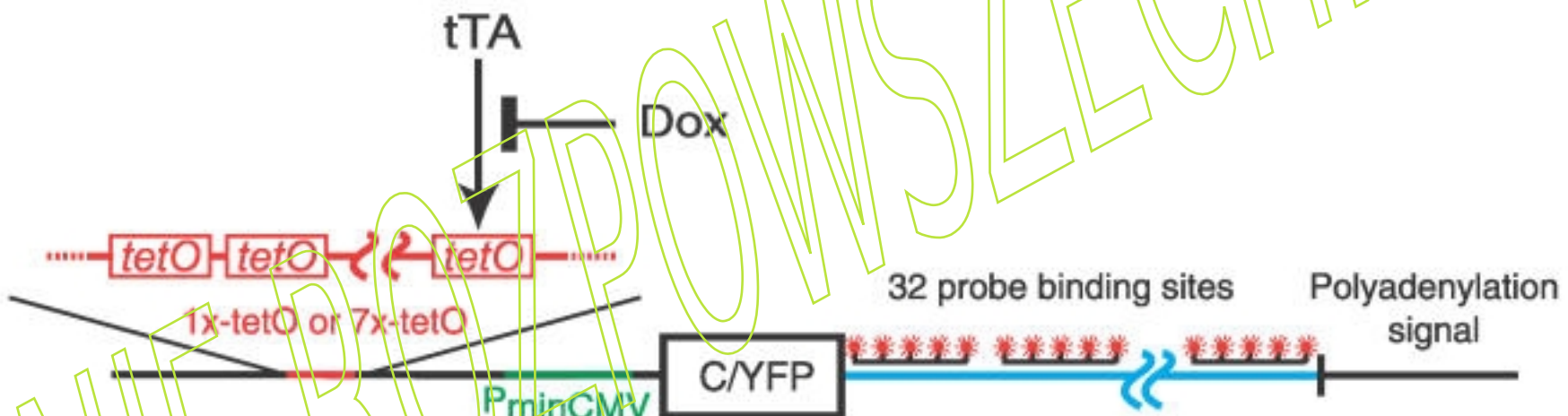
System Tet-Off do kontrolowania ekspresji badanych genów w komórkach ssaków został opracowany przez H. Bujarda i M. Gossena na Uniwersytecie w Heidelbergu w 1992 roku.

System Tet-Off wykorzystuje białko transaktywatora tetracykliny (**tTA**), które powstaje w wyniku fuzji jednego białka, TetR (represora tetracykliny), występującego w bakterii *Escherichia coli*, z domeną aktywacyjną innego białka, VP16, występującego w opryszczce wirusa Simplex. Powstałe białko tTA jest zdolne do wiązania DNA w określonych **sekwencjach operatora TetO**. W większości systemów Tet-Off kilka powtórzeń takich sekwencji TetO umieszcza się przed minimalnym promotorem, takim jak promotor CMV. Promotor CMV (ang. CMV promoter, od cytomegalovirus) to region DNA odpowiedzialny za inicjowanie i regulację transkrypcji genów w komórkach ssaków. Jest to jeden z najczęściej stosowanych promotorów w biologii molekularnej, używany do uzyskiwania wysokiego poziomu ekspresji genów w różnych eksperymentach, zarówno in vitro, jak i in vivo.

W systemie Tet-Off ekspresja genów kontrolowanych przez TRE może być tłumiona przez tetracyklinę i jej pochodne. Wiążą tTA i uniemożliwiają mu wiązanie się z sekwencjami TRE, zapobiegając w ten sposób transaktywacji genów kontrolowanych przez TRE.

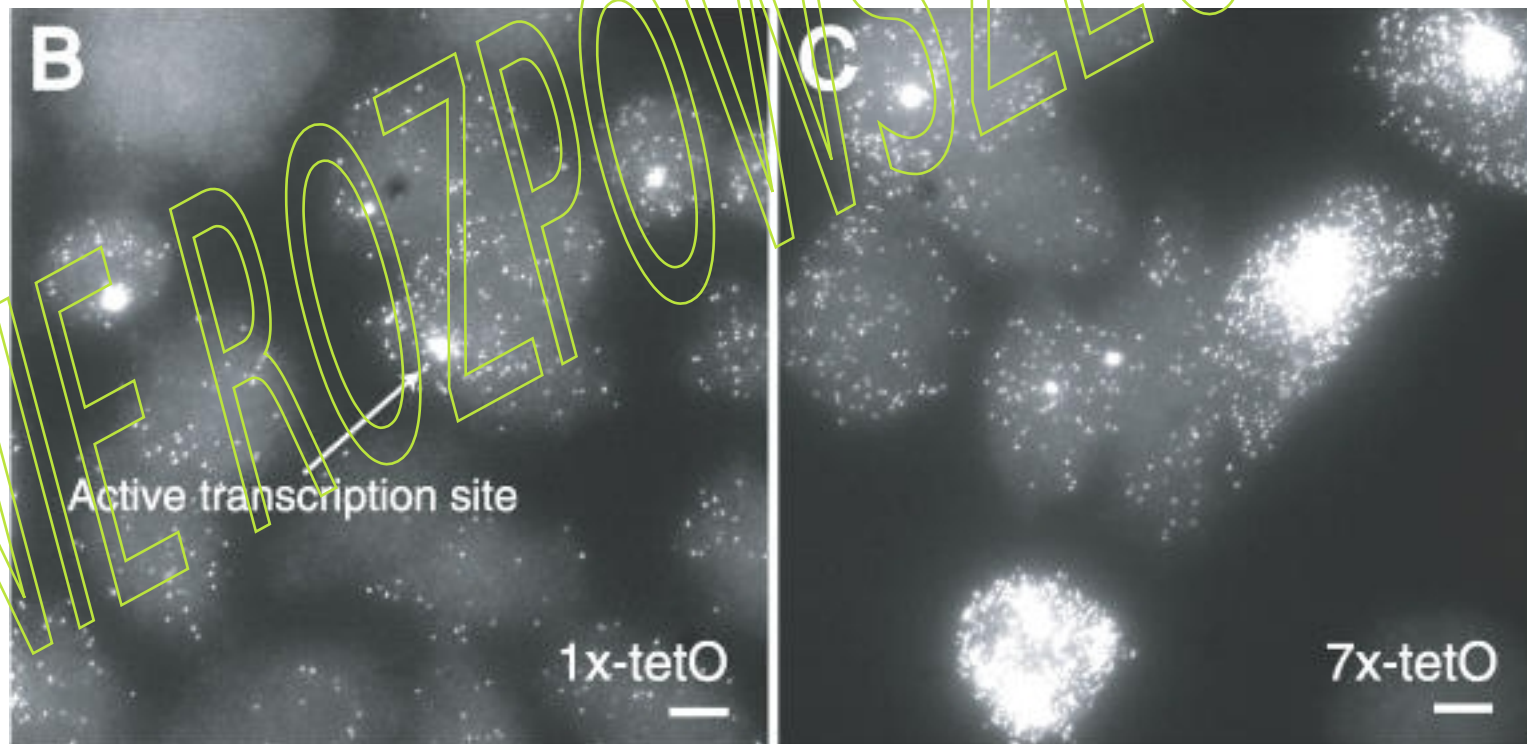
wracamy do Stochastycznej syntezy mRNA w komórkach ssaków

Aby zbadać mechanizmy kontrolujące wybuchy transkrypcji, autorzy zmienili ogólny poziom transkrypcji zarówno poprzez zmianę ilości aktywatora transkrypcji obecnego w komórkach, jak i poprzez zmianę liczby miejsc wiązania tego aktywatora w promotorze, jedno (1xtetO) lub siedem (7xtetO) kopie sekwencji operatora tet wrażliwej na tetracyklinę były obecne powyżej promotora.

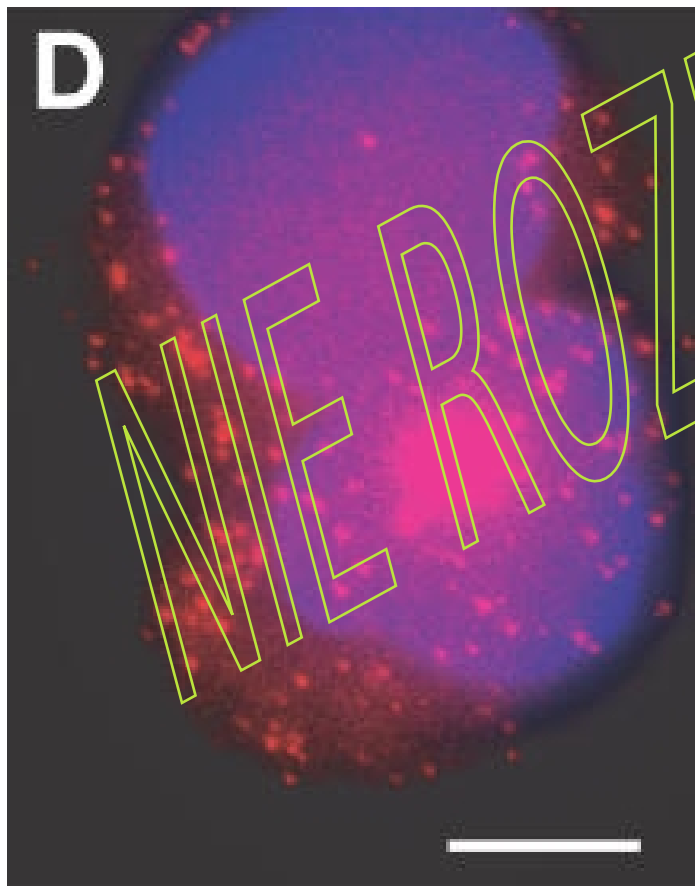


Transkrypcja z promotora jest możliwa tylko wtedy, gdy białko znane jako tet-trans-aktywator (tTA) wiąże się z sekwencją operatora. tTA jest białkiem składającym się z dwóch domen: jednej, która wiąże się z operatorem tet, i drugiej, która promuje transkrypcję pobliskich genów (domena aktywacji kwasowej VP16, domena wiążąca DNA). Doksylicykina, antybiotyk podobny do tetracykliny, wiąże się z domeną wiążącą DNA tTA, uniemożliwiając jej wiązanie się z DNA. Zmieniając poziom doksylicykliny w pożywce wzrostowej, autorzy byli w stanie kontrolować poziom wolnego tTA w komórkach.

Obserwacja mRNA syntetyzowanego w komórkach CHO wykazała, że istniały wyraźne różnice w liczbie cząsteczek mRNA w poszczególnych komórkach (Rysunek B, C). Sporadycznie obserwowane większe jasne obszary to niedawno aktywowane miejsca transkrypcji spowodowane nagromadzeniem powstającego mRNA, które jeszcze nie rozproszyło się. Obserwacja, że te miejsca występują rzadko, wskazuje, że mRNA nie jest syntetyzowany w sposób ciągły, lecz raczej w krótkich okresach czasu, gdy gen jest aktywny transkrypcyjnie. Autorzy nazywają te okresy wybuchami transkrypcji. Przez resztę czasu gen znajduje się w stanie nieaktywnym transkrypcyjnie, podczas którego nie są syntetyzowane żadne cząsteczki mRNA, a te zsyntetyzowane wcześniej ulegają degradacji. Paski skali mają długość 5 μm .



Ponieważ metoda FISH podaje również lokalizację przestrzenną mRNA, autorzy byli także w stanie porównać względną liczbę mRNA w jądrze i cytoplazmie, aby dokładniej zbadać zachowanie impulsów transkrypcyjnych. Jeśli transkrypcja zachodzi w seriach, wówczas można spodziewać się znalezienia większej liczby mRNA w jądrze niż w cytoplazmie, gdy gen jest aktywny, ponieważ jądrowy mRNA nie został wyeksportowany. Jednakże, gdy gen jest w stanie nieaktywnym, jądrowe mRNA zostaną wyeksportowane do cytoplazmy bez uzupełniania, w rezultacie zmniejsza się część całkowitego mRNA komórkowego, która znajduje się w jądrze. Aby zbadać takie zachowanie, autorzy po hybrydyzacji zabarwili komórki barwnikiem **DAPI** i określili, czy każdy mRNA znajdował się w cytoplazmie czy w jądrze. Często stwierdzali, że komórki bez ogniska transkrypcyjnego miały tylko cytoplazmatyczny mRNA, podczas gdy komórki z miejscem transkrypcji miały zwykle dużą liczbę jądrowego mRNA (Rysunek D).

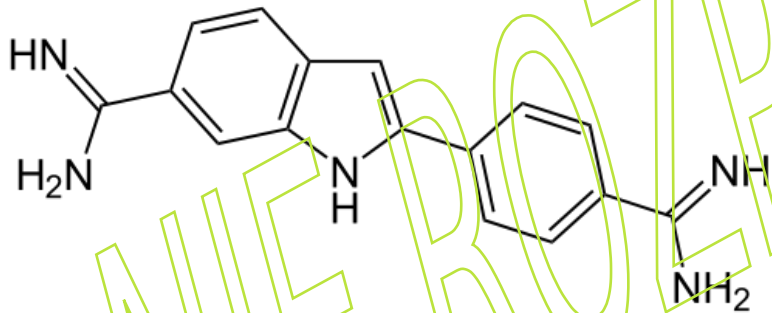


Dwie siostrzane komórki z linii komórkowej E-YFP-M1-7x przedstawiające mRNA wykryte przez sondę FISH (czerwone) i jednocześnie wybarwione przez DAPI (niebieskie). Obraz reprezentuje jedną płaszczyznę ogniskową. Paski skali mają długość 5 μm .

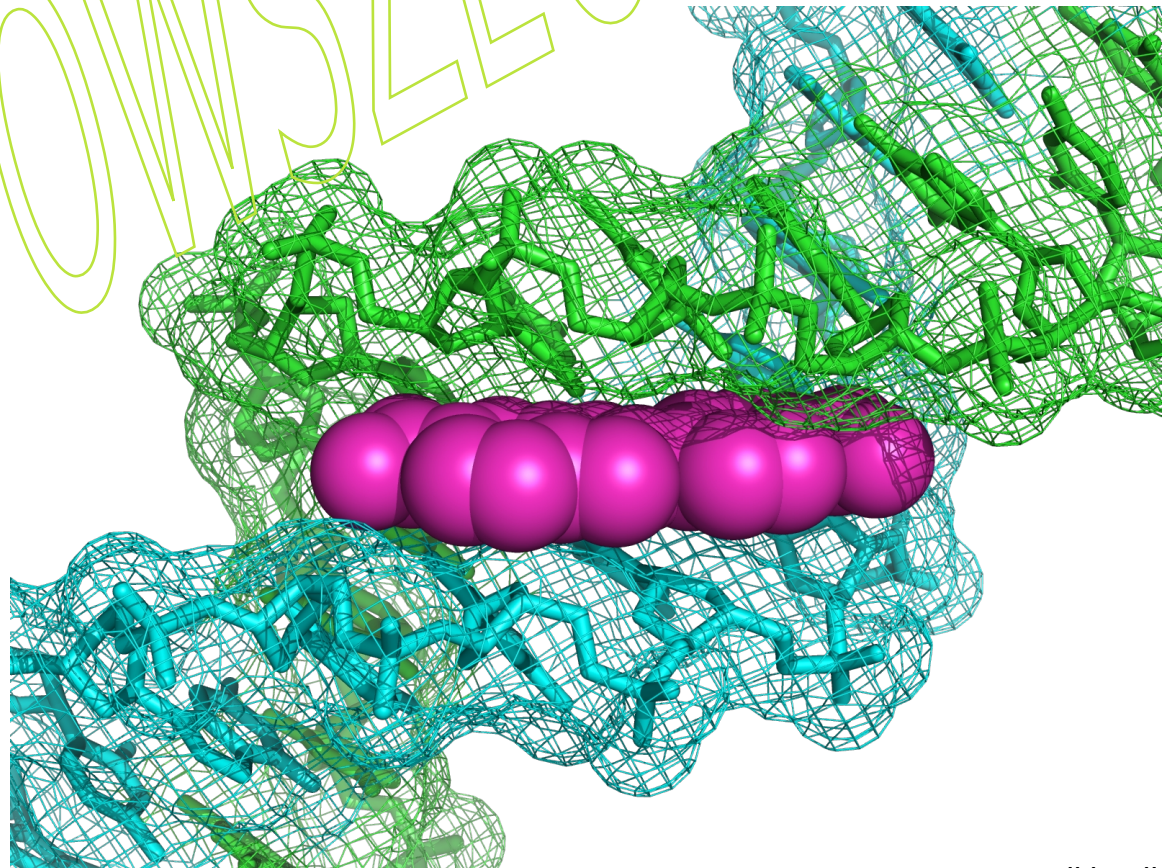
Co ciekawe, choć dwie komórki pokazane na rysunku D niewątpliwie pochodzą od tej samej komórki macierzystej, wydają się wykazywać różne zachowania transkrypcyjne. Jest to obserwacja typowa, wskazująca, że globalne zmiany czynników zewnętrznych, takie jak pozycja w cyklu komórkowym, nie są głównym źródłem zmienności aktywności transgenu;

DAPI

4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI) jest barwnikiem fluorescencyjnym, który silnie wiąże się z regionami DNA bogatymi w A-T. Jest szeroko stosowany w mikroskopii fluorescencyjnej. DAPI może przenikać przez nienaruszoną błonę komórkową, dlatego można go stosować do barwienia zarówno żywych, jak i utrwalonych komórek, chociaż w żywych komórkach przechodzi przez błonę mniej efektywnie, przez co skuteczność barwienia jest niższa. Po związaniu z dwuniciowym DNA DAPI ma maksimum absorpcji przy długości fali 358 nm (ultrafiolet), a maksimum emisji przy 461 nm (niebieski). DAPI będzie również wiązać się z RNA, chociaż nie jest tak silnie fluorescencyjny. Po związaniu z RNA jego emisja przesuwa się do około 500 nm. Przy odpowiednich protokołach DAPI barwi jądra specyficznie, z niewielkim lub żadnym znakowaniem cytoplazmy.



DAPI (magenta) związany z mniejszym rowkiem DNA (zielony i niebieski). Z PDB 1D30.



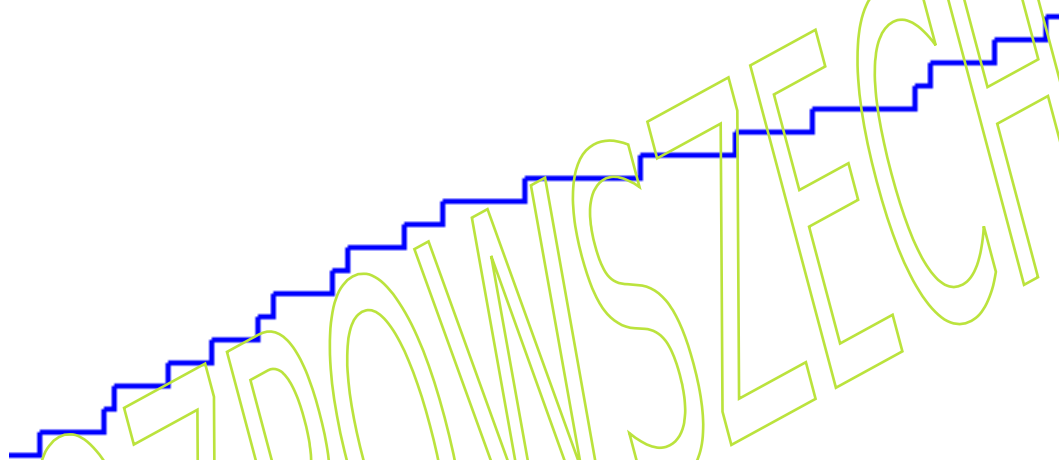
wracamy do
Stochastycznej syntezy mRNA w komórkach ssaków

Dalsze dowody na wybuchy transkrypcji pochodzą z analizy statystyk rozkładu cząsteczek mRNA na komórkę w całej populacji komórek. Jeżeli mRNA był wytwarzany ze stałą szybkością, można by oczekiwać rozkładu Poissona mRNA na komórkę, w którym to przypadku średnia liczba cząsteczek mRNA na komórkę i wariancja (tzw. kwadrat odchylenia standardowego) byłyby równe. Jednakże autorzy odkryli, że średnia wynosiła około 40 cząsteczek mRNA na komórkę, podczas gdy wariancja wynosiła około 1600 cząsteczek do kwadratu*, co wskazuje, że mRNA nie jest syntetyzowany ze stałą szybkością. Natomiast taka obserwacja jest zgodna z występowaniem wybuchów transkrypcji.

*oczekiwaliśmy wariancji 40 cząsteczek do kwadratu, zatem odchylenie standardowe wynosi 6,32, patrz następny slajd.

Proces Poissona i rozkład Poissona

W teorii prawdopodobieństwa proces Poissona jest procesem stochastycznym, który zlicza liczbę zdarzeń i czas ich wystąpienia w danym przedziale czasu (patrz rysunek, gdzie oś x to czas, a y to liczba zdarzeń).

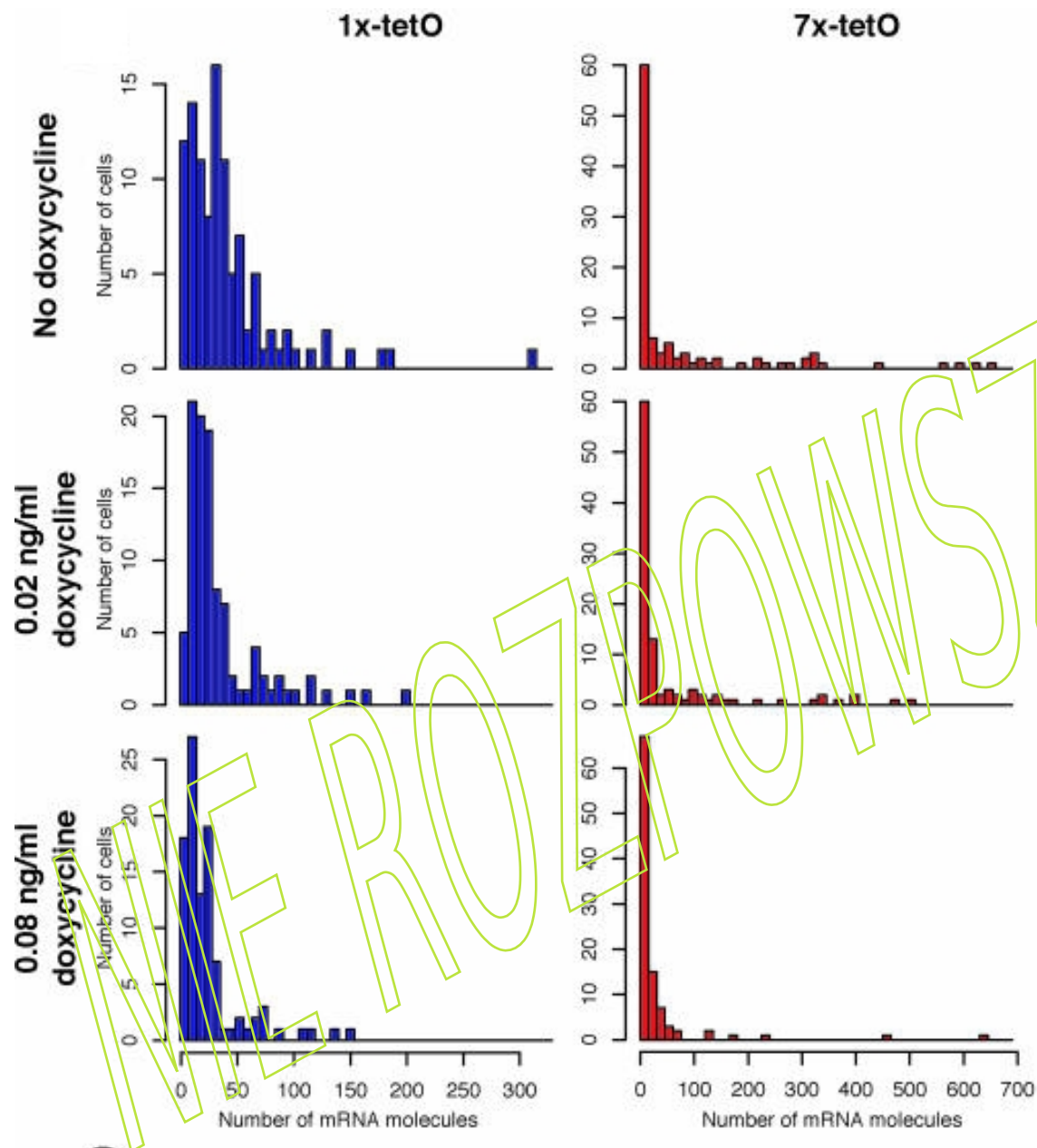


Jednorodny proces Poissona zlicza zdarzenia, które zachodzą ze stałą szybkością. Proces ten charakteryzuje się parametrem szybkości λ , znanym również jako intensywność, tak że liczba zdarzeń w przedziale czasu $(t, t + \tau]$ jest zgodna z rozkładem Poissona z powiązaniem z nim parametrem $\lambda \tau$. Zależność ta jest wyrażona jako

$$P\{[N(t + \tau) - N(t)] = k\} = \frac{(\lambda \tau)^k}{k!} e^{-\lambda \tau} \quad (k = 0, 1, 2, \dots)$$

gdzie $N(t + \tau) - N(t) = k$ to liczba zdarzeń w przedziale czasu $(t, t + \tau]$.

W procesie Poissona liczba zaobserwowanych zdarzeń oscyluje wokół średniej λ z odchyleniem standardowym równym pierwiastkowi kwadratowemu z λ . Dodatnia liczba rzeczywista λ jest równa oczekiwanej wartości X , a także jej wariancji. Wariancja zmiennej losowej X jest oczekiwaną wartością kwadratu odchylenia od średniej X .



Histogramy pokazujące rozkład cząsteczek mRNA na komórkę dla trzech stężeń doksycykliny dla obu linii komórkowych E-YFP-M1-1x (po lewej) i E-YFP-M1-7x (po prawej).

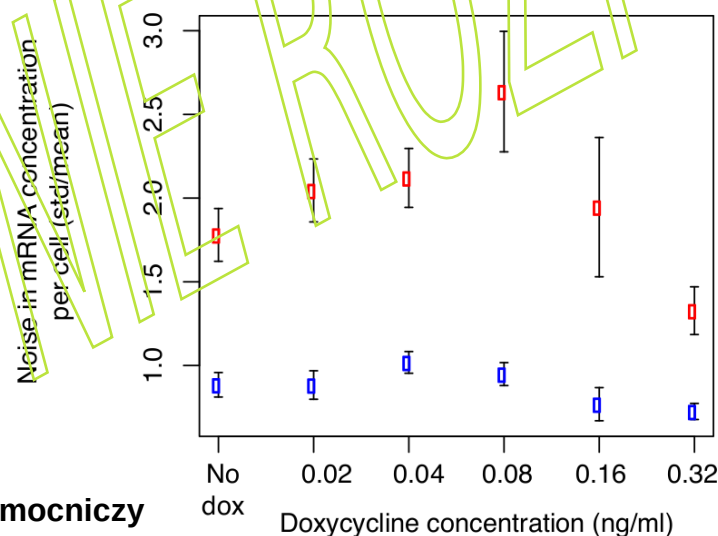
Zaobserwowano, że wielkość wybuchów była większa w linii komórkowej E-YFP-M1-7x niż w linii komórkowej E-YFP-M1-1x.

Następnie autorzy zróżnicowali ilość doksycykliny w pożywce wzrostowej i zmierzili rozkład liczby cząsteczek mRNA na komórkę na kilku polach komórek hodowanych przy każdym stężeniu doksycykliny.

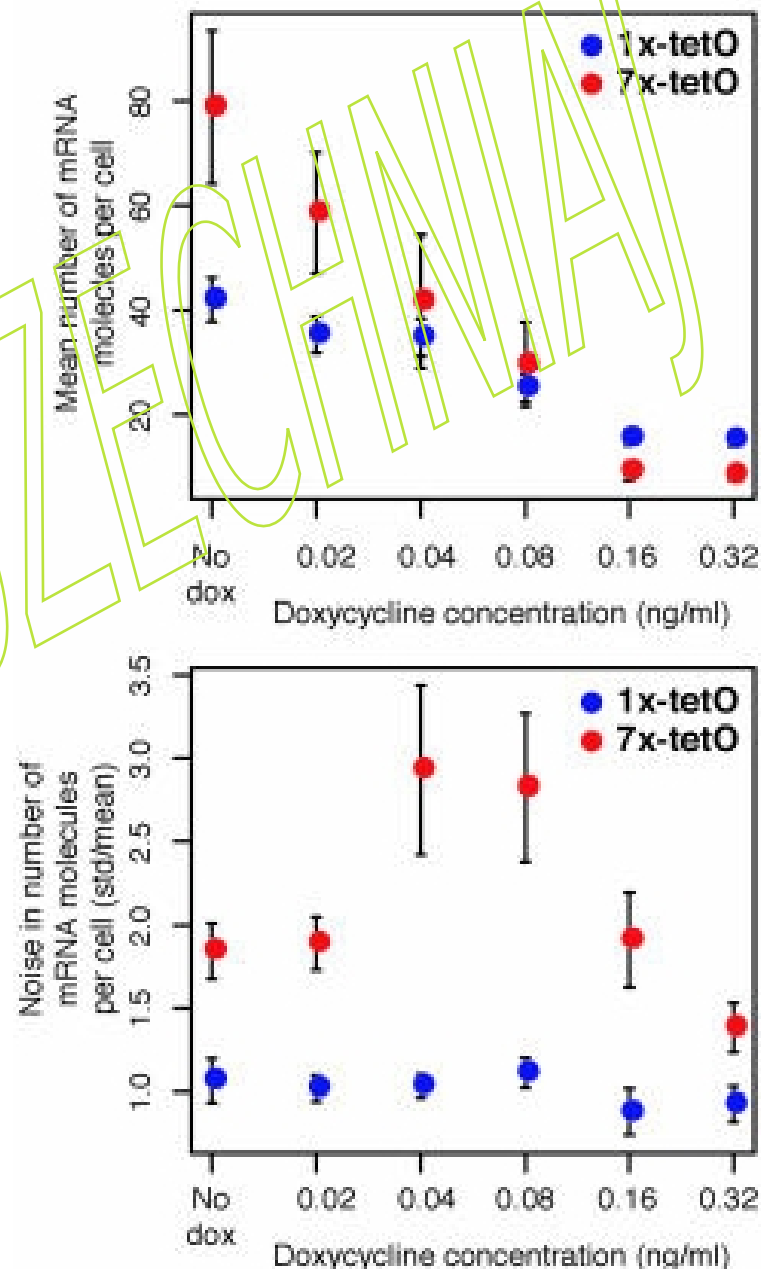
Wykresy przedstawiające średnią populacji [na górze] i szum (zdefiniowany jako odchylenie standardowe podzielone przez średnią [na dole]) jako funkcję stężenia doksycykliny. Statystyki zostały pobrane ze zliczeń mRNA pokazanych na poprzednim slajdzie.

Zgodnie z oczekiwaniami, zwiększenie poziomu doksycykliny spowodowało zmniejszenie średniej liczby cząsteczek mRNA na komórkę (na górze). Jednakże autorzy odkryli również, że zmienność w całej populacji (mierzona ilościowo za pomocą „szumu”, który definiują jako odchylenie standardowe podzielone przez średnią) pozostała stała dla wszystkich stężeń doksycykliny dla konstruktu 1x-tetO, ale różniła się niemonotonicznie dla konstruktu 7x-tetO (na dole).

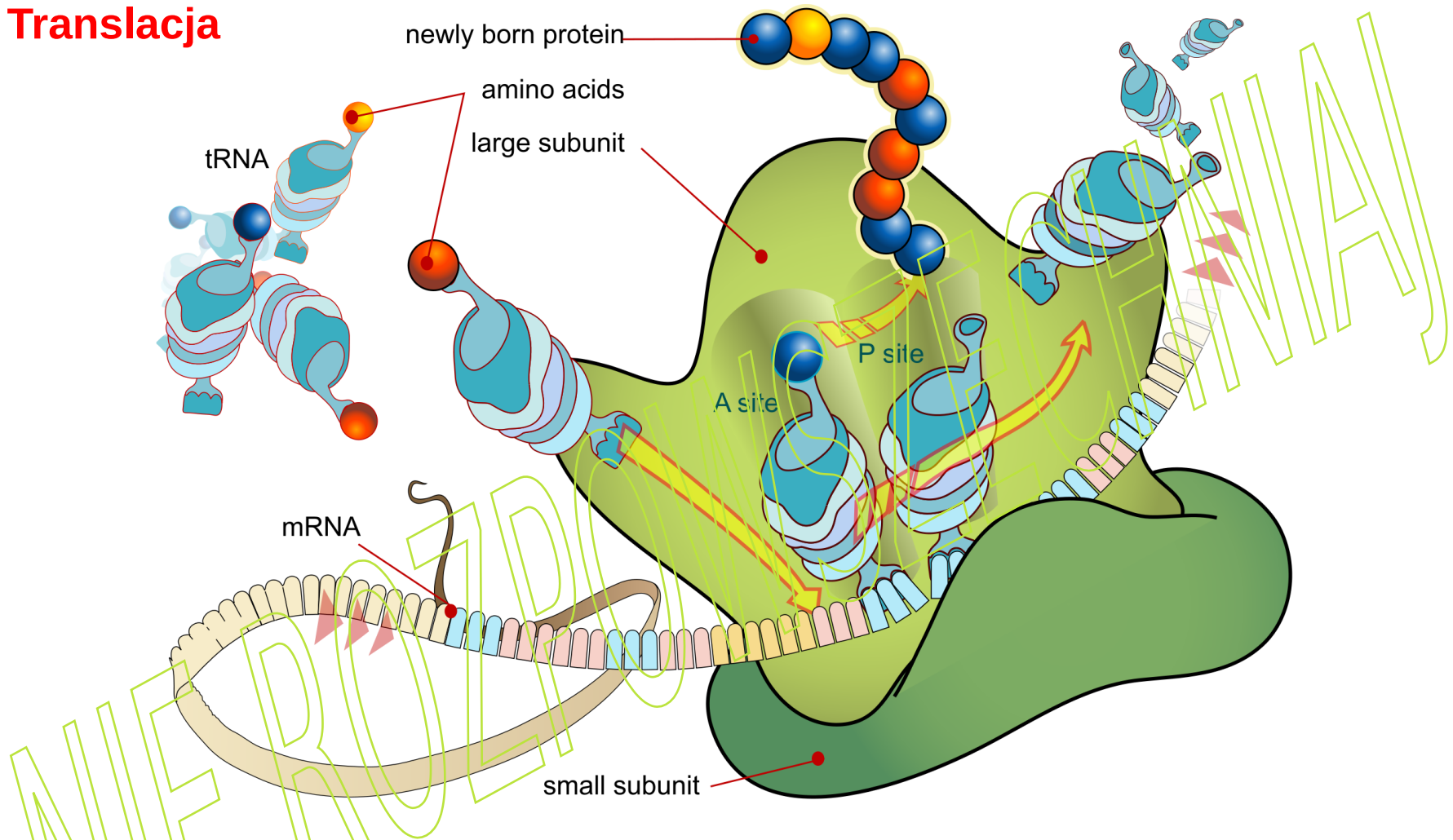
Obydwa wyniki są niespójne z konwencjonalnymi stochastycznymi modelami ekspresji genów, które przewidują, że szum powinien stale rosnąć w miarę zmniejszania się średniego poziomu transkrypcji.



Wykres pomocniczy

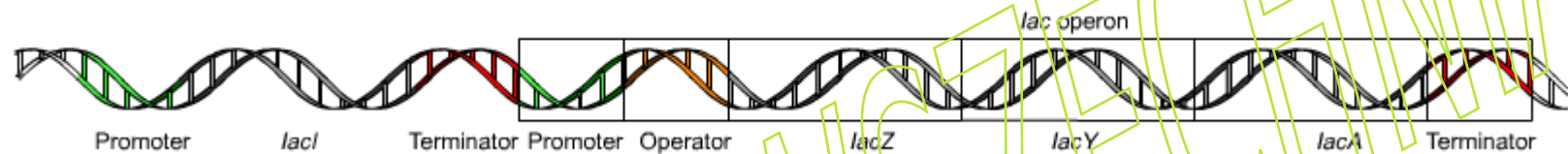


Translacja



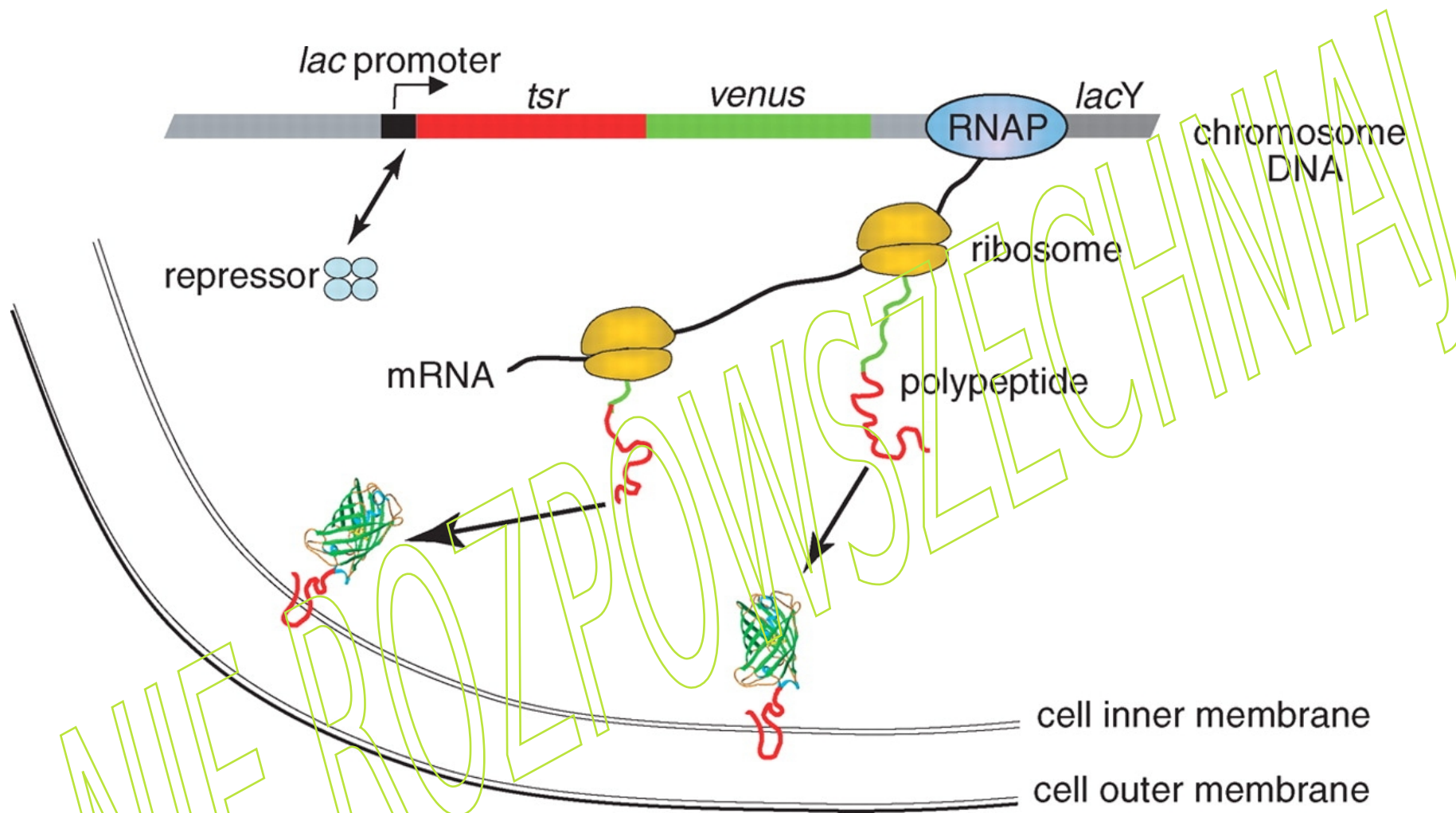
W biologii molekularnej i genetyce translacja to proces, w którym rybosomy komórkowe tworzą białka. Translacja przebiega w czterech fazach: inicjacja, elongacja, translokacja i terminacja. Podczas aktywacji właściwy aminokwas jest kowalencyjnie związany z właściwym transferowym RNA (tRNA). Inicjacja polega na wiązaniu się małej podjednostki rybosomu z końcem 5' mRNA za pomocą czynników inicjujących. Podczas wydłużania i translokacji aminokwasy są dostarczane do rybosomów i łączone w białka. Zakończenie polipeptydu ma miejsce, gdy miejsce A rybosomu jest skierowane w stronę kodonu stop (UAA, UAG lub UGA).

Badanie ekspresji białek w poszczególnych żywych komórkach *Escherichia coli* pod kontrolą stłumionego promotora lac, jedna cząsteczka na raz.



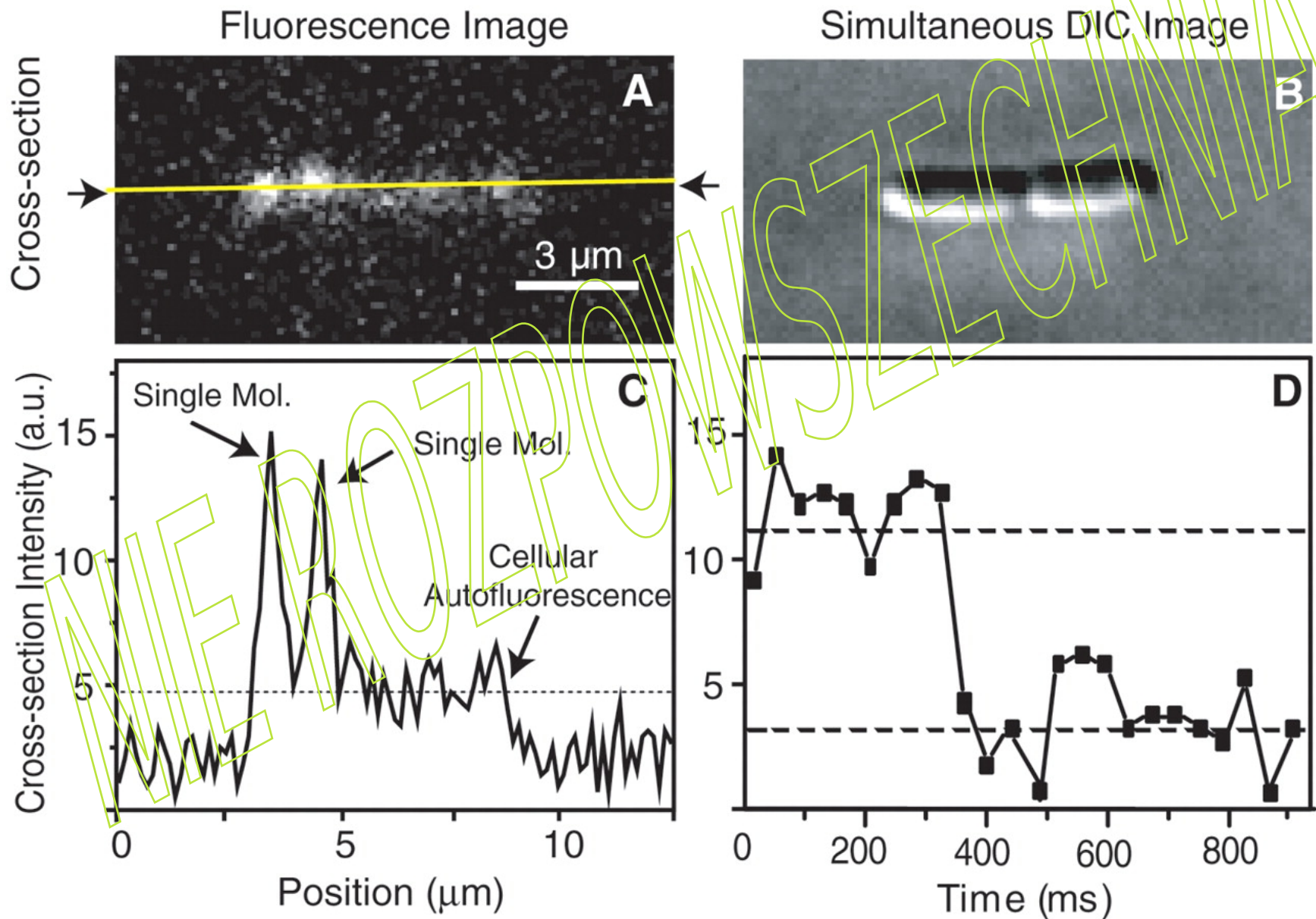
Autorzy skonstruowali szczep *E. coli* SX4, w którym produktem ekspresji genu jest białko fuzyjne Tsr-Venus. Białko Tsr jest jednym z czterech produktów genu *tsr* w *E. coli*. Po ekspresji w cytoplazmie łączy się z błoną cytoplazmatyczną. Białko Venus jest odmianą GFP z żółtą fluorescencją, czyli odmianą YFP, która ma krótki czas dojrzewania. Pojedynczą kopię chimerycznego genu *tsr-venus* włączono do chromosomu *E. coli*, zastępując natywny gen *lacZ*. Endogenny gen *tsr* *E. coli* pozostał nienaruszony. Fakt pojawienia się w komórce zsyntetyzowanego białka fuzyjnego Tsr-Venus w wyniku ekspresji rejestruje się poprzez zaobserwowanie fluorescencji Venus, gdy białko fuzyjne zostanie zakotwiczone w błonie komórki swoją częścią Tsr. Fluorescencja Tsr-Venus gdy dyfunduje ono w cytoplazmie jest niewidoczna, gdyż przemieszczanie się białka jest zbyt szybkie.



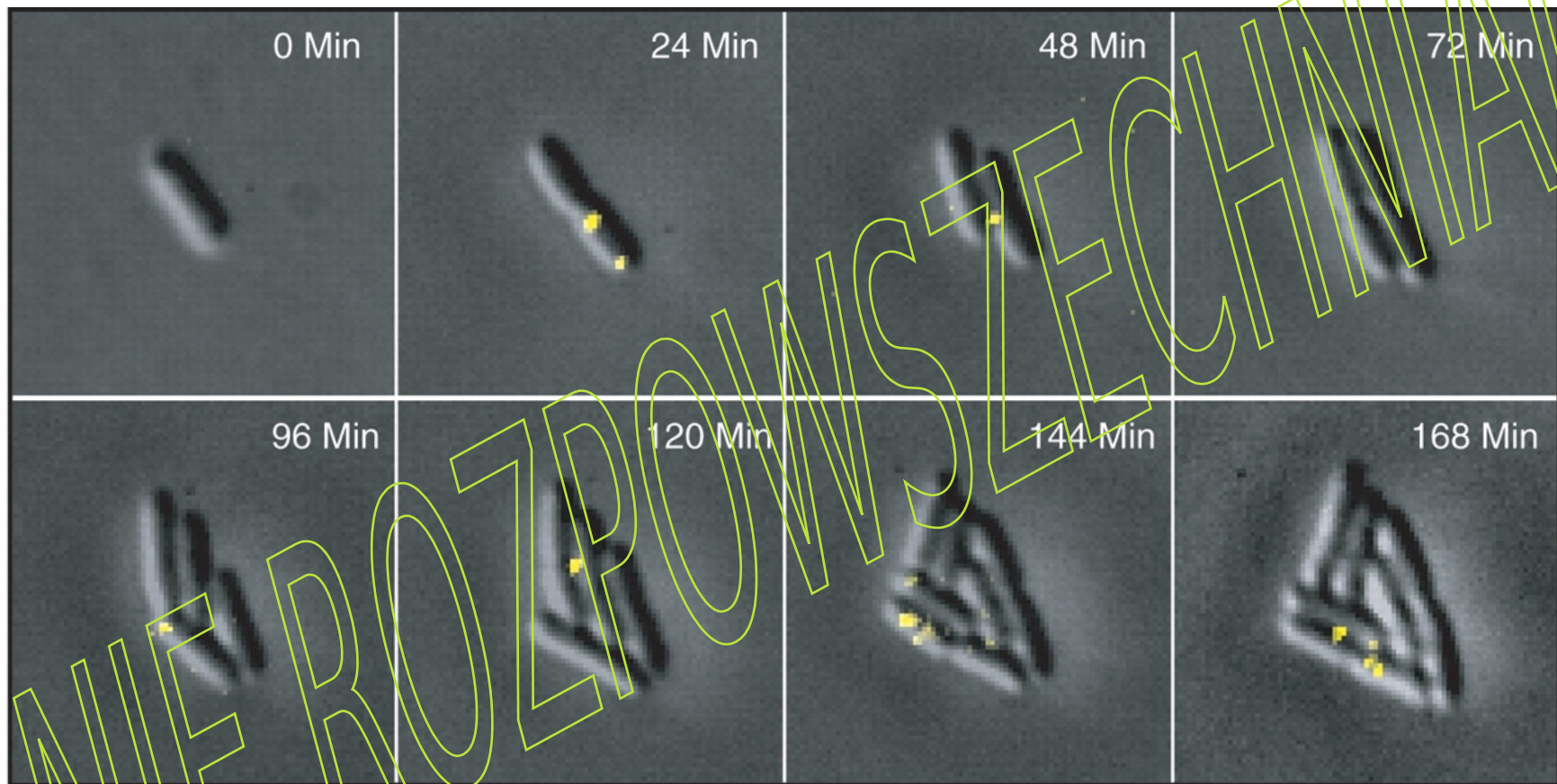


Projekt eksperymentu: Tsr-Venus ulega ekspresji pod kontrolą represora lac, który ściśle wiąże się z operatorem lac w DNA. Transkrypcja jednego mRNA przez polimerazę RNA wynika z rzadkiego i przejściowego zdarzenia dysocjacji represora z DNA. Wiele kopii cząsteczek białka ulega translacji z mRNA przez rybosomy. Po złożeniu w wewnętrznej błonie E. coli cząsteczki białka Tsr-Venus można wykryć indywidualnie za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego.

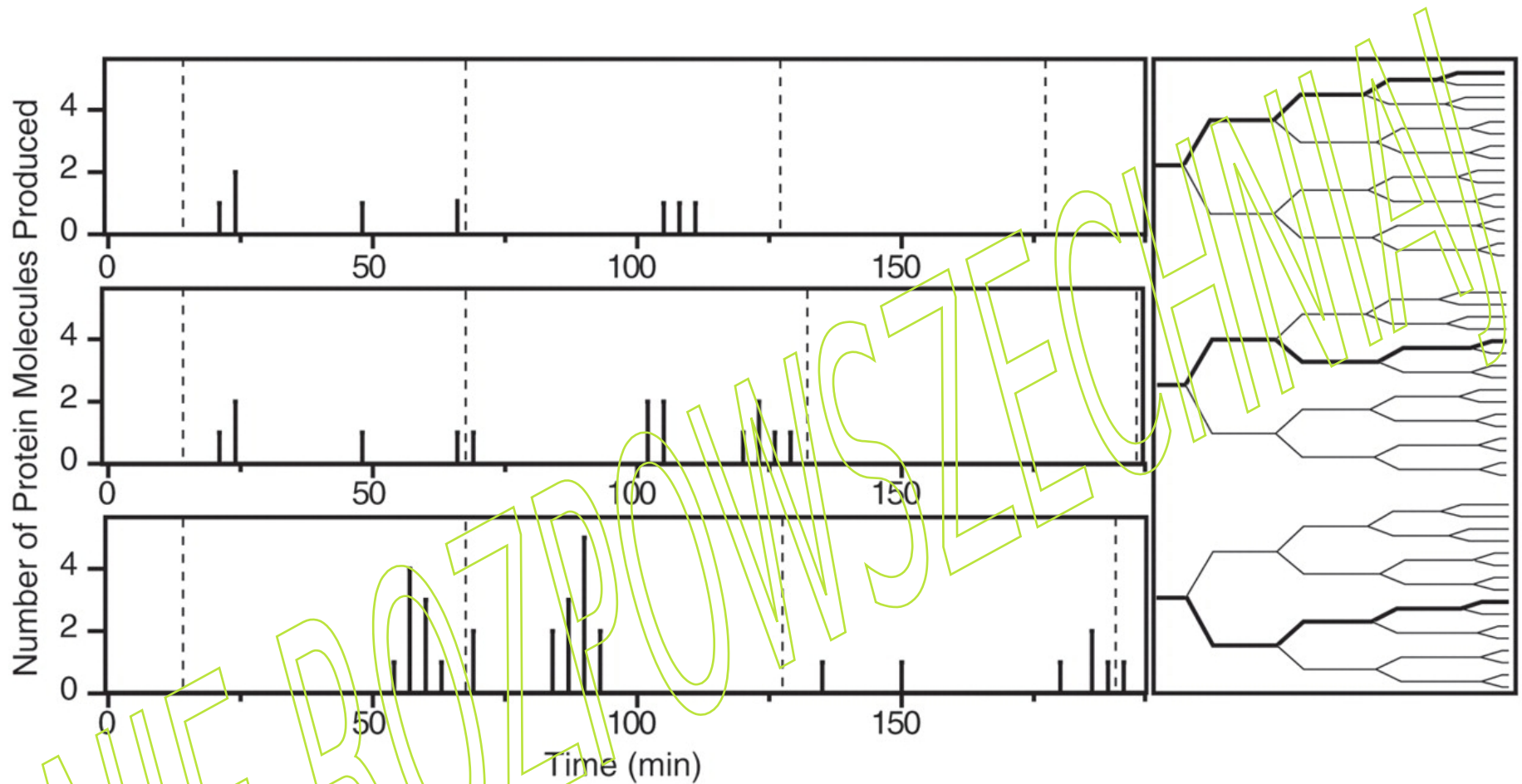
Wykazanie możliwości wykrywania pojedynczych cząsteczek białka fluorescencyjnego Tsr-Venus ulegających ekspresji w komórkach SX4



Aktywność promotora lac w bakteriach szczepu SX4 immobilizowanych w żelu agarozowym w temperaturze 37°C, w warunkach silnie represyjnych.

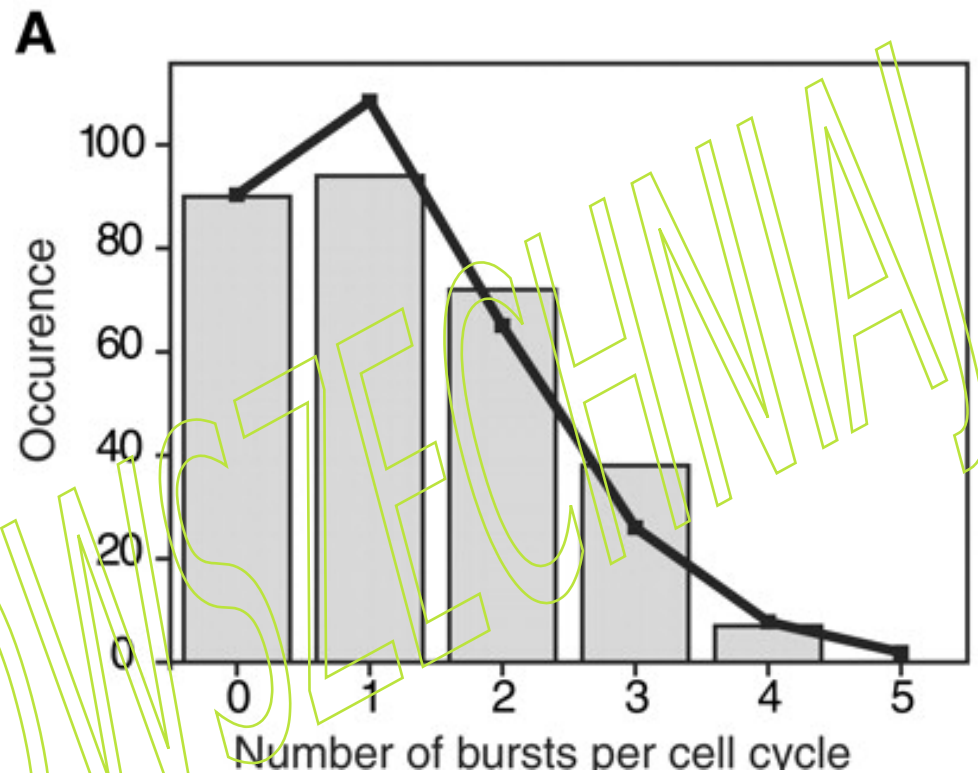


Monitorowanie w czasie rzeczywistym ekspresji tsr-venus pod kontrolą stłumionego promotora lac. Sekwencja obrazów fluorescencyjnych (żółty) nałożonych na jednocześnie obrazy DIC (szary) komórek *E. coli* wyrażających Tsr-Venus na podkładce żelowej agarozowej w pożywce M9. Cykl komórkowy trwa 55 ± 10 minut w komorze o kontrolowanej temperaturze na stoliku mikroskopowym. Osiem klatek pochodzi z filmu fluorescencyjnego poklatkowego, nagranych przez ponad 195 minut z ekspozycją lasera o długości 100 ms ($0,3 \text{ kW/cm}^2$) co 3 minuty. Po każdym zebraniu obrazów stosuje się ekspozycję 1100 ms w celu fotowysłabienia fluoroforów Venus.



Ślady czasowe ekspresji cząsteczek białka Tsr-Venus (po lewej) w trzech konkretnych liniach komórkowych (po prawej) wyekstrahowane z filmu poklatkowego fluorescencji-DIC. Rozdzielczość czasowa wynosi 3 minuty. Oś pionowa to liczba cząsteczek białka nowo zsyntetyzowanych w ciągu ostatnich trzech minut. Linie przerywane oznaczają czasy podziału komórek. Wykresy czasowe pokazują, że produkcja białka zachodzi w przypadkowych impulsach (wybuchach ekspresji), w ramach których generowana jest zmienna liczba cząsteczek białka. Każdy wybuch ekspresji genu trwa od ~3 do 15 minut.

Czy te wybuchy ekspresji genów zachodzą losowo w czasie?



Analizy statystyczne śladów czasu produkcji białka: histogram (szare słupki) liczby zdarzeń ekspresji na cykl komórkowy (w całej populacji komórek). Histogram dobrze pasuje do rozkładu Poissona, co sugeruje, że wybuchy ekspresji genów zachodzą losowo i nie są skorelowane w czasie. Średnia liczba impulsów wynosi $n_{burst} = 1,2$ na cykl komórkowy, co daje średni czas 46 minut pomiędzy dwoma sąsiednimi impulsami.

W naszym przypadku zdarzeniem jest obserwacja k ekspresji genu podczas jednego cyklu komórkowego, a zmienna losowa podlegająca rozkładowi Poissona to $[N(t+\tau_{cell})-N(t)]$, gdzie $N(t)$ jest liczbą obserwowanej ekspresji genów od czasu t do czasu $t+\tau_{cell}$, gdzie t oznacza moment rozpoczęcia nowego cyklu komórkowego, a τ_{cell} oznacza czas trwania cyklu komórkowego.

Ile cząsteczek mRNA jest odpowiedzialnych za każdy wybuch ekspresji genu w warunkach represji?

Średnia liczba cząsteczek mRNA na wybuch ekspresji (m) wynosi:

$$m = \frac{n_{mRNA} \tau_{cell}}{n_{burst} \tau_{mRNA}}$$

gdzie n_{mRNA} to liczebność “steady-state” cząsteczek mRNA *tsr-venus* uśredniona dla populacji komórek, τ_{cell} to średni czas podziału komórki, n_{burst} to średnia liczba impulsów ekspresji na cykl podziału komórki, a τ_{mRNA} to czas życia w komórce mRNA kodującego *tsr-Venus*. Parametry n_{mRNA} i τ_{mRNA} należy wyznaczyć na podstawie niezależnych eksperymentów (patrz kolejne dwa slajdy). Autorzy uzyskali: $n_{mRNA} = 0,037 \pm 0,013$ i $\tau_{mRNA} = 1,5 \pm 0,2$ min. Daje to $m = 1,14$, stąd wnioskuje się, że w warunkach tłumienia każdy wybuch ekspresji genu wynika z jednej cząsteczki mRNA, co sugeruje, że represor Lac szybko ponownie wiąże odsłonięty region operatora DNA, co umożliwia inicjację transkrypcji zasadniczo tylko jednej cząsteczki mRNA.

Określenie n_{mRNA} metodą reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (real-time reverse transcription polymerase chain reaction, real-time RT-PCR)

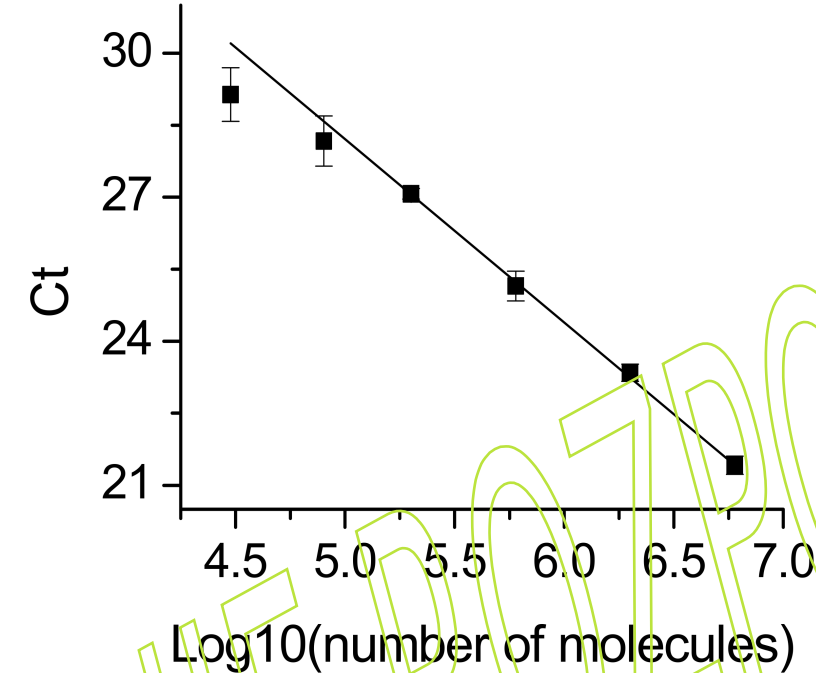


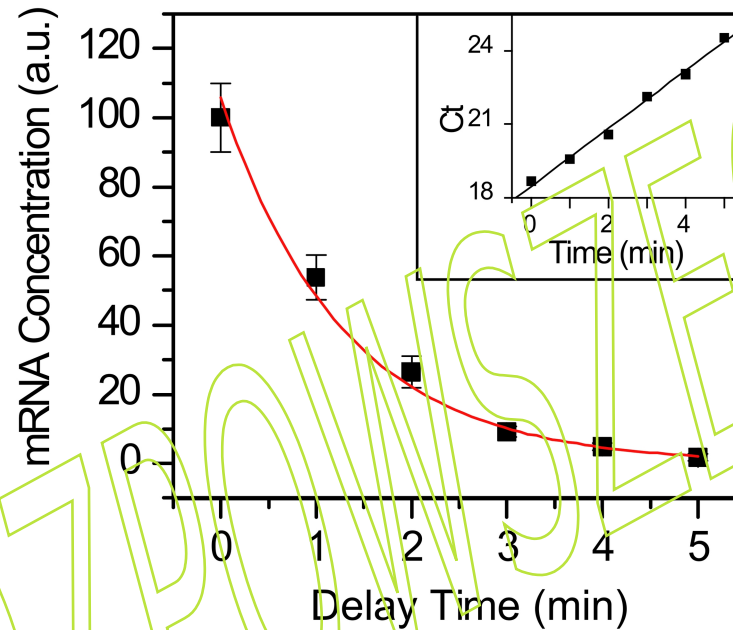
Table S1. Quantification of *tsr-venus* mRNA in SX4 with real-time RT-PCR

	Ct	Number of mRNA molecules	Number of cells	mRNA molecules per 1000 cells
1	24.15 ± 0.12	1154770	1.88 × 10 ⁷	61.42
2	25.75 ± 0.16	439314	1.88 × 10 ⁷	23.37
3	26.82 ± 0.16	230963	1.20 × 10 ⁷	19.25
4	25.69 ± 0.09	454579	1.20 × 10 ⁷	37.88
5	25.95 ± 0.01	390204	1.20 × 10 ⁷	32.52
6	25.16 ± 0.07	626939	1.53 × 10 ⁷	41.11
7	25.10 ± 0.05	648723	1.53 × 10 ⁷	42.54
Average				36.9
95% confidence interval				36.9 ± 12.9

Ct = liczba cykli, w których fluorescencja przekracza próg.

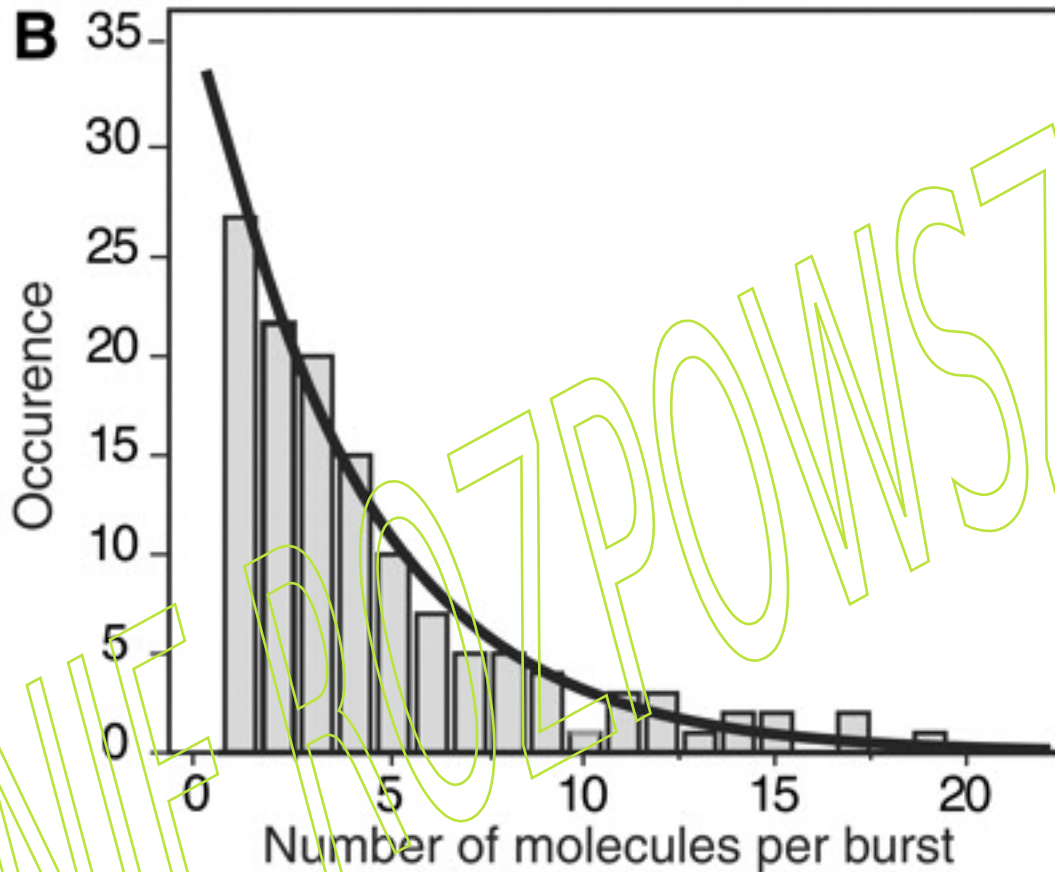
Kalibracja do ilościowego oznaczania mRNA *tsr-venus* w czasie rzeczywistym metodą RT-PCR (PCR z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym). Kalibrację przeprowadza się przy użyciu mRNA wygenerowanego w wyniku transkrypcji *in vitro*. W szczególności mieszałyśmy komórki BW25993 (~10⁷) ze znaną ilością mRNA *tsr-venus*, który otrzymano z transkrypcji *in vitro*, w ilości odpowiednio 3,0x10⁴, 8,0x10⁴, 2,0x10⁵, 6,0x10⁵, 2,0x10⁶ i 6,0x10⁶ cząsteczek. Średnią liczbę cykli progowych (Ct) z czterech niezależnych ekstraktów wykreślono w funkcji ilości dodanego mRNA *tsr-venus*. RNA wyekstrahowany z komórek BW25993 bez dodatku mRNA *tsr-venus* daje Ct 30. Pasek błędu przedstawia odchylenie standardowe Ct. Odwrotna transkrypcja (reverse transcription) to synteza DNA z matrycy RNA

Wyznaczenie τ_{mRNA} metodą reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (real-time RT-PCR)



Czas życia komórkowego mRNA *tsr-venus*. Po krótkim okresie indukcji wytwarzanie mRNA zostaje zahamowane i ilość mRNA *tsr-venus* mierzy się za pomocą testu RT-PCR po impulsowej indukcji wytwarzania mRNA. Pomiar powtarza się sześciokrotnie. Pasek błędu przedstawia odchylenie standardowe pomiarów. Rozpad mRNA *tsr-venus* (kwadraty) jest wyposażony w pojedynczą funkcję wykładniczą (krzywa ciągła), która daje stałą czasową degradacji mRNA wynoszącą $1,5 \pm 0,2$ min. Wstawka pokazuje progową liczbę cykli (Ct) zmierzona w reakcji PCR w czasie rzeczywistym w funkcji opóźnienia czasowego. Linia prosta to liniowe dopasowanie danych.

Jaki jest rozkład liczby cząsteczek białka w każdym wybuchu? (Albo ile cząsteczek białka Tsr-Venus (n) powstaje na jedną cząsteczkę mRNA?)



$$P(n) = \rho^n (1 - \rho)$$

$$\langle n \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} n P(n)$$

ρ – prawdopodobieństwo związania rybosomu z mRNA;
 $(1-\rho)$ – prawdopodobieństwo związania się rybonukleazy z mRNA;
 $\rho(1-\rho)$ – prawdopodobieństwo, że po jednorazowym związaniu mRNA z rybosomem nastąpi związanie z rybonukleazą;
 $\rho^2(1-\rho)$ – prawdopodobieństwo, że mRNA po dwukrotnym związaniu się z rybosomem zwiąże się z rybonukleazą;
 itp.

Rozkład liczby cząsteczek białka fluorescencyjnego wykrytych w każdym wybuchu ekspresji genu, zgodny z rozkładem geometrycznym (linia ciągła), dający prawdopodobieństwo związania rybosomu wynoszące $0,81 \pm 0,05$ i średnią liczbę cząsteczek na wybuch wynoszącą $n=4,2$. Ostatnia liczba pomnożona przez liczbę impulsów na cykl komórkowy (1,2) daje w wyniku ustaloną liczebność białka wynoszącą $5,0 \pm 0,8$ cząsteczek Tsr-Venus na komórkę w populacji komórek.