



第七章 基因表达的实时检测技术

第一节 基因表达与调控的概念与原理

第二节 转录水平的基因表达检测

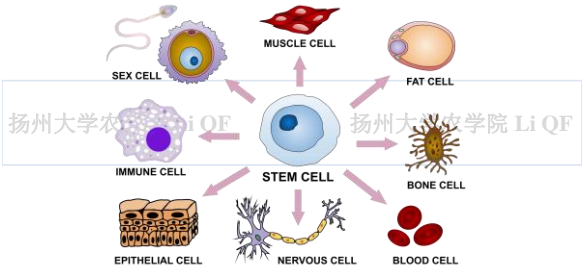
第三节 蛋白水平的基因表达检测

第一节 基因表达与调控的概念与原理

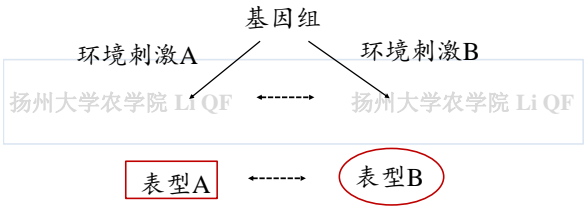
表型可塑性是所有生物体的共同特征



分化：来自同一基因组的不同类型细胞



归因于基因的表达及其调控



基因表达的概念

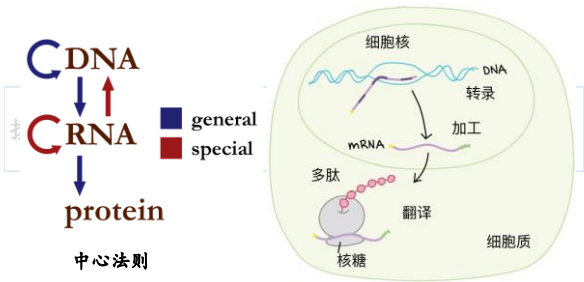
- 基因组(genome)
一个细胞或病毒所携带的全部遗传信息或整套基因。

扬州大学农学院 Li QF

•基因表达(gene expression)
基因经过转录、翻译，产生具有特异生物学功能的蛋白质分子或RNA分子的过程。

- 基因表达调控(regulation of gene expression)
基因表达是受内源及外源信号调控的。

基因表达调控



基因表达的特点

- 基因表达具有时间特异性和空间特异性
 - 基因表达按一定的时间顺序发生
 - 特定生长发育阶段，同一基因在不同的组织器官表达不同

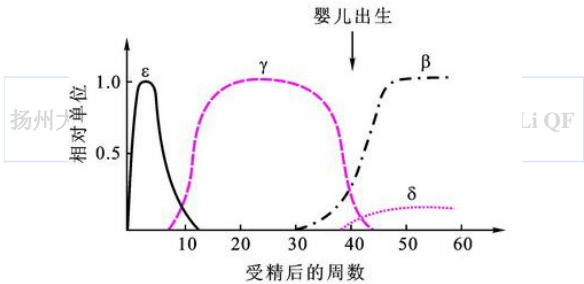
扬州大学农学院 Li QF

➢ 基因表达的方式存在多样性

- 有些基因几乎在所有细胞中持续表达
- 有些基因的表达受到环境变化的诱导和阻遏
- 生物体内不同基因的表达受到协调调节

- 基因表达受调控序列和调节分子共同调节
- 基因表达调控呈现多层次和复杂性

人体发育过程中不同类型珠蛋白的含量变化



如何研究不同基因的表达特性？

第二节 转录水平的基因表达检测

扬州大学农学院 Li QF

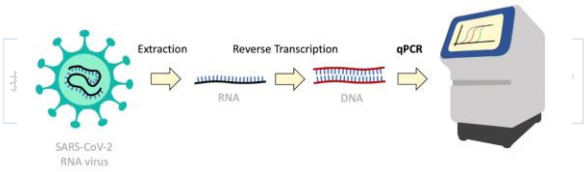
- ◆实时荧光定量PCR
- ◆荧光原位杂交
- ◆报告基因

2.1 实时荧光定量PCR

扬州大学农学院 Li QF

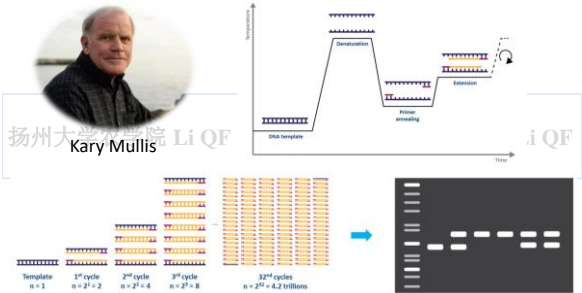
Real-time PCR; quantitative PCR, qPCR

qPCR检测新冠病毒



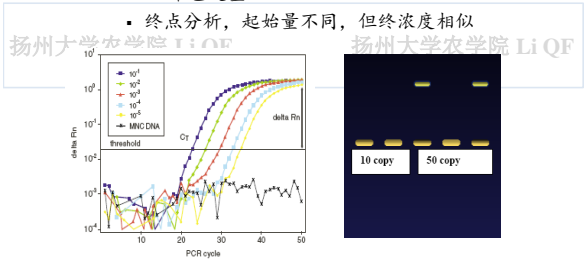
核酸检测结果一般被视为“黄金标准”

PCR (polymerase chain reaction)



普通PCR的问题

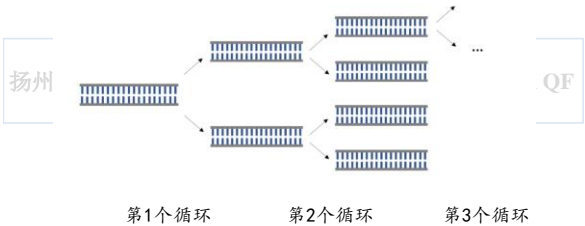
- 灵敏度低，分辨率低
- 非自动化，结果不以数字显示
- EB染色定量
- 终点分析，起始量不同，但终浓度相似



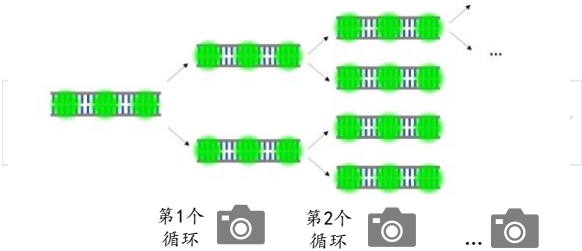
1996年ABI公司推出世界上第一台定量PCR仪7700型



常规PCR反应



Real-time PCR quantitative PCR (qPCR)



qPCR是一种可以在反应进行时“实时”显示PCR反应的技术。qPCR可以定量起始DNA的含量。

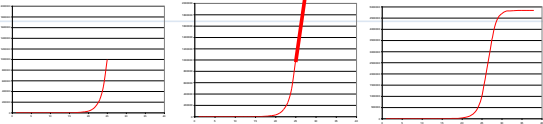
试管中DNA的量



?

扬州大学农学院 Li QF

扬州大学农学院 Li QF



如何定量?

B基因起始量是A基因的4倍



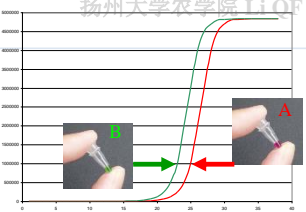
A: 1,000,000拷贝, 25循环

B: 4,000,000拷贝, 25循环

2,000,000拷贝, 24循环

1,000,000拷贝, 23循环

B会比A提前2个循环
到达1,000,000拷贝。



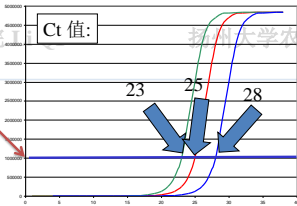
阈值循环数 (Cycle threshold, Ct值)

定义: 每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数。

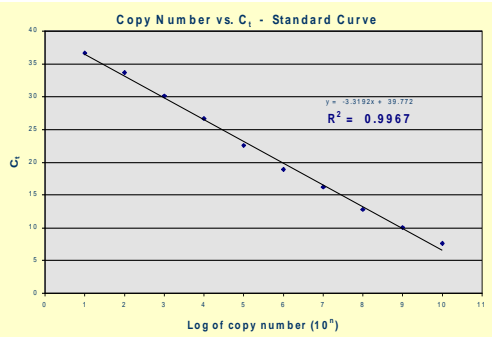
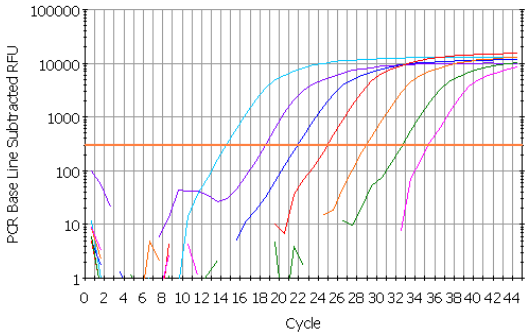
扬州大学农学院 Li QF

扬州大学农学院 Li QF

阈值



扬州大学农学院 Li QF



DNA 的起始量与达到任意数量的 DNA 拷贝 (Ct 值) 的循环次数之间存在直接关系。

qPCR的两种化学方法

SYBR Green



扬州大学农学院 Li QF

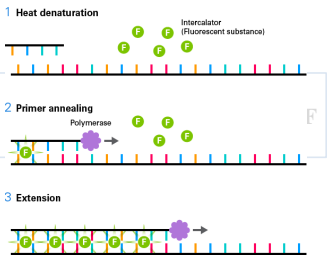
扬州大学农学院 Li QF

TaqMan probe



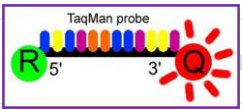
SYBR Green方法过程

- 1.当 SYBR 染料加入到样品中后，它可立即与样品中的所有双链DNA 进行结合。
- 2.在 PCR 过程中，DNA 聚合酶对产生 PCR 产物的目标序列进行扩增。
- 3.随后，SYBR 染料会与每一个新产生的双链DNA 分子进行结合。
- 4.随着PCR进行，生成更多PCR产物，SYBR会结合所有双链DNA，荧光强度也增强。



TaqMan探针法

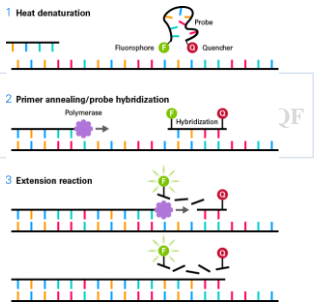
- 5' 端标记一个报告荧光基团 (Reporter, R)，一般为FAM、VIC、HEX、TET等荧光基团。
- 3' 端标记一个淬灭荧光基团 (Quencher, Q)，一般为TAMRA、MGB等。



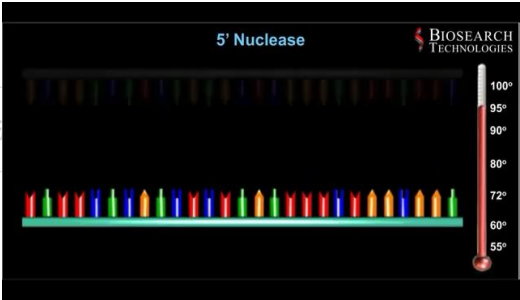
荧光探针

TaqMan 方法过程

- 1. 构建一段寡核苷酸探针。
- 2. 探针会在其中一个引物结合位点的下游发生退火，并随着引物的延伸通过 Taq DNA 聚合酶的 5' 核酸酶活性，完成切除。
- 3. 探针从目的链去除，荧光报告增强。引物沿模板链继续延伸。



TaqMan 方法过程



两种方法的优缺点比较

SYBR Green	vs	Taqman
SYBR Green 基于双链DNA结合染料		Taqman基于杂交探针和Taq酶5' 至 3' 核酸外切酶活性。
荧光标记探针		
不需要荧光标记的探针		需要双标记探针
多重基因分析		
不能用于多个基因靶标		可用于多个基因靶标
成本		
便宜		贵
特异性		
特异性相对低		高度特异

qPCR应用

RNA	<ul style="list-style-type: none">• 基因表达分析• miRNA表达分析
DNA	<ul style="list-style-type: none">• SNP基因分型• 体细胞突变分析• 拷贝数检测• 染色质免疫定量检测• DNA甲基化检测• 病原体检测• 病毒定量

2.2 原位杂交
(In situ hybridization, ISH)

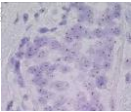
扬州大学农学院 Li QF

一、原位杂交的概念

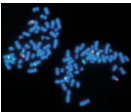
原位杂交技术 (In situ hybridization, ISH) 是指将特定标记的已知序列核酸为探针与细胞或组织切片中核酸 (DNA、RNA) 进行杂交, 从而对特定核酸顺序进行精确定量、定位的过程。

两种可视化显示原位RNA和DNA靶标方法: 大

显色原位杂交
(Chromogenic In Situ Hybridization, CISH)



荧光原位杂交
(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)



基本原理

根据碱基互补配对原则, 同源的DNA-DNA、DNA-RNA和RNA-RNA两条单链在一定条件下能结合成双链。用放射性或非放射性物质标记的DNA、RNA或与mRNA互补的cDNA作探针, 与组织切片或细胞内待测核酸 (RNA或DNA) 片段进行杂交, 经放射自显影或非放射检测体系予以显示, 在组织、细胞、间期核及染色体上对核酸进行定位和相对定量研究。

扬州大学农学院 Li QF

原位杂交常用的标记物质

1放射性同位素

^3H 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{32}P 等

70年代

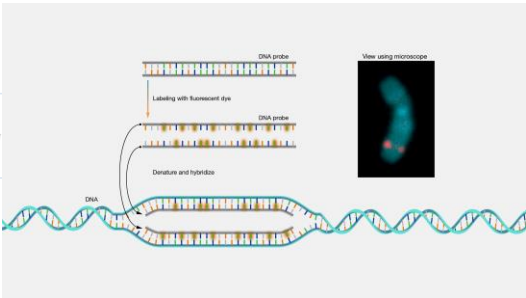
2非放射性物质

荧光素、生物素、地高辛等

80年代中后期

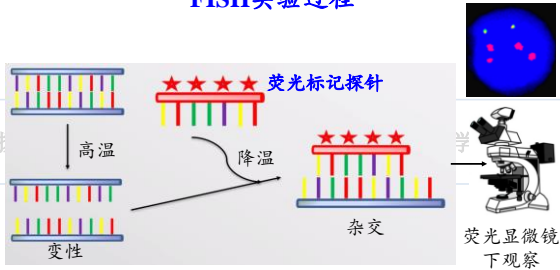
扬州大学农学院 Li QF

FISH工作原理



扬州大学农学院 Li QF

FISH实验过程



扬州大学农学院 Li QF

FISH特点

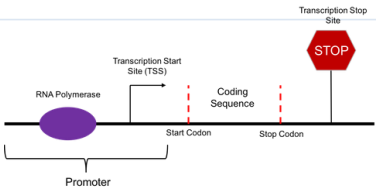
- 1.安全性高；
- 2.FISH探针稳定；
- 3.实验周期短；
- 4.其灵敏度与放射性探针相当；
- 5.多色FISH通过在一个核中显示不同的颜色可同时检测多种序列；
- 6.既可以在玻片上显示中期染色体数量或结构的变化，也可以在悬液中显示间期染色体DNA的结构。



2.3 报告基因 (reporter gene)

启动子 (promoter)

- 启动子是位于基因5‘端近旁的一段调控序列，能作为RNA聚合酶的结合位点，同时也是转录因子结合的位点。
- 启动子控制基因表达的时间和地点。
- 启动子的功能可通过报告基因简便检测。



报告基因 (reporter gene)

报告基因的特点:

- 是一种编码容易被检测的蛋白质或酶的基因。
- 将某个基因表达调控序列与报告基因编码序列相融合，利用报告基因表达研究该基因表达调控。
- 利用报告基因与其它目的基因融合蛋白的表达，进行蛋白定位。

- 报告基因产物必须区别于转染前真核细胞内任何相似的产物；
- 受体细胞内其它的基因产物不会干扰报告基因产物的检测；
- 报告基因编码产物的检测应该快速、简便、灵敏度高而且重现性好。

GUS报告系统

β-葡萄糖苷酸酶（GUS）

- 由uidA编码，该酶是一种水解酶，能催化许多β-葡萄糖苷酯类物质的水解。
- 广泛用于转基因植物、细菌和真菌的报告基因，尤其在研究外源基因瞬时表达的转化实验中。



水稻胚表现GUS活性

GUS检测方法

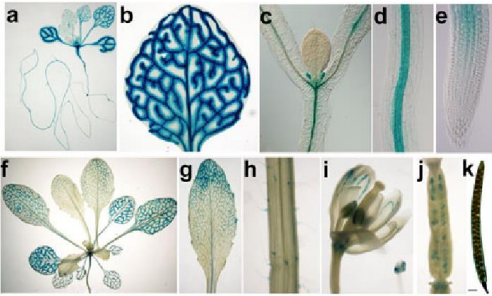
组织化学染色定位法(定性)

能够将无色的底物x-gluc催化生成蓝色的产物。

荧光法（定量）

以4-甲基伞形酮酰-β-D葡萄糖醛酸苷为底物，GUS催化其水解为4-甲基伞形酮及β-D葡萄糖醛酸。4-甲基伞形酮分子中的羟基解离后被365nm的光激发，产生455nm的荧光，可用荧光分光光度计定量。

GUS染色分析结果



GUS其他用途：

用于确定基因传递系统的效率、基因产物的细胞内定位、蛋白-蛋白或蛋白-DNA互作检测、翻译起始信号效率等。

GUS优点：

- 大多数植物组织中GUS活性的本底低
- 反应物基本不扩散，在植物细胞内积累
- 通过简单的扩散或者真空渗入，底物易被植物细胞吸收。

GUS缺点：

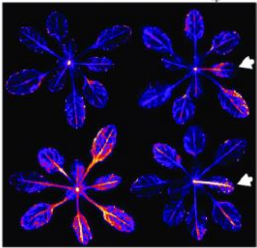
- 不适用于活体组织的观察
- 反应产物可与脂质结合扩散到远离酶活位点，导致定位不准

常用的报告基因

- β-葡萄糖苷酸酶（β-glucuronidase, GUS）基因
- 荧光素酶（Luciferase, LUC）基因
- 绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）基因

荧光素酶（Luciferase）

荧光素酶（Luciferase）是自然界中能够产生生物荧光的酶的总称。荧光素酶可以催化荧光素氧化成氧化荧光素，在荧光素氧化的过程中，会发出生物荧光。



荧光素酶成像

第三节 蛋白水平的基因表达检测

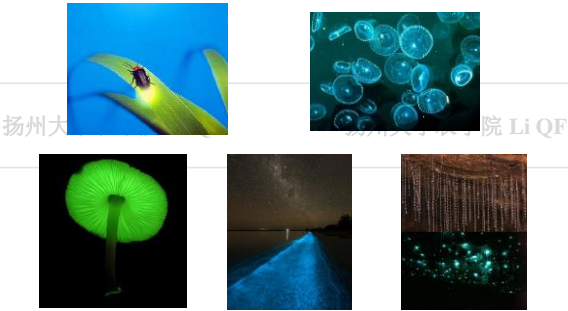
扬州大学农学院 Li QF 荧光蛋白 扬州大学农学院 Li QF

激光共聚焦显微镜

3.1 荧光蛋白

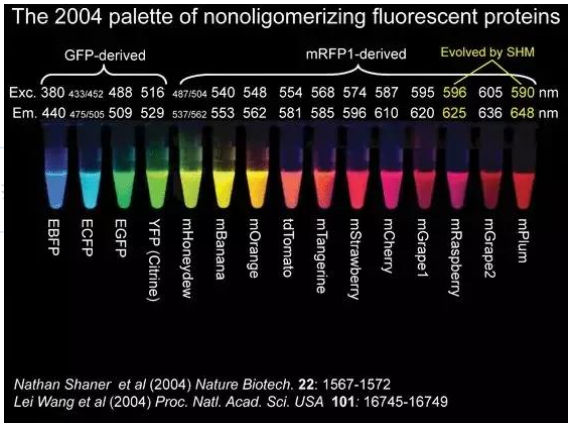
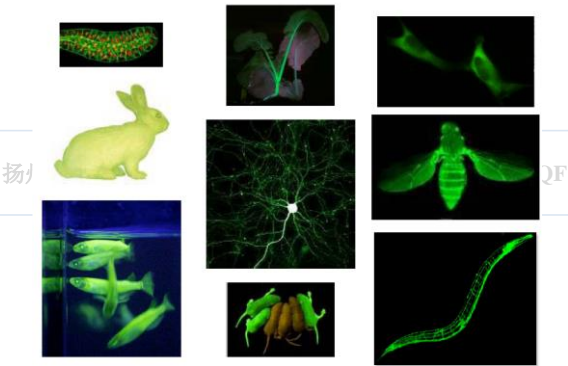
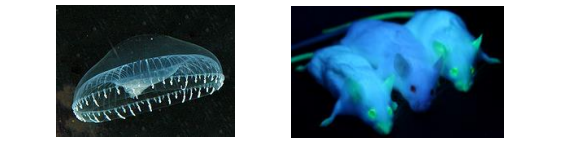
扬州大学农学院 Li QF 扬州大学农学院 Li QF

生物发光

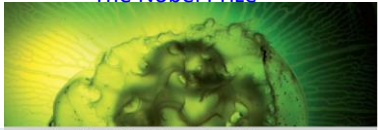


绿色荧光蛋白基因
(green fluorescent protein, GFP)

- 从维多利亚多管发光水母中分离获得
- 能够在不使用底物的情况下使用这种报告子来监测活细胞的变化



The Nobel Prize

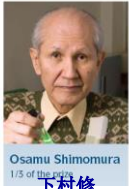


The Nobel Prize in Chemistry 2008

扬州大学

for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP

院 Li QF



Osamu Shimomura

下村修



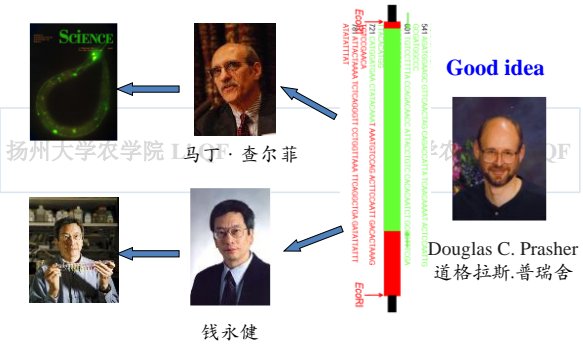
Martin Chalfie

马丁·查尔菲

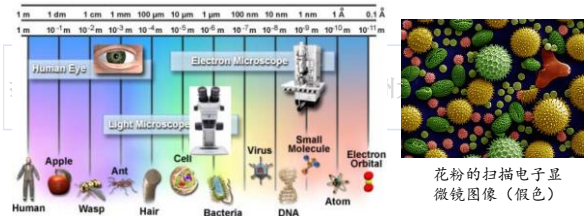


Roger Y. Tsien

钱永健



显微镜的尺度



花粉的扫描电子显微镜图像（假色）

显微镜的功能

- 放大——倍率

大 大 大

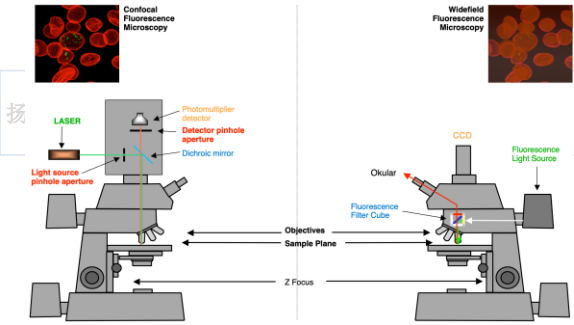
- 在放大的基础上要能分清物体——分辨率

分辨率 分辨率

- 通过好的对比更有效地分清物体——反差

反差 反差

共聚焦显微镜 VS 宽场显微镜

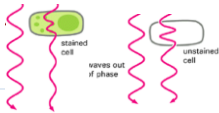


3.2 激光共聚焦显微镜

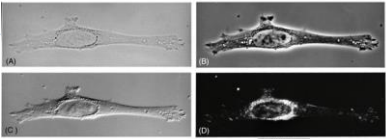
(Laser scanning confocal microscope, LSCM)

基本原理

相差、DIC

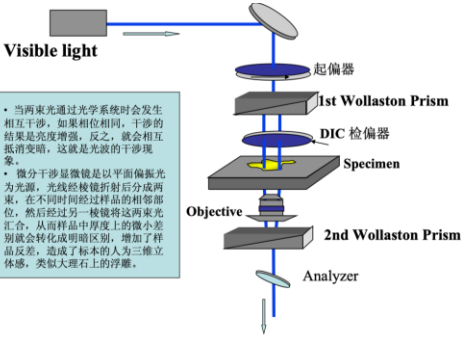


扬州大学 院 Li QF



A、明场；B、相差显微镜；C、Nomarski 微分干涉显微镜（DIC）D、暗视野显微镜。

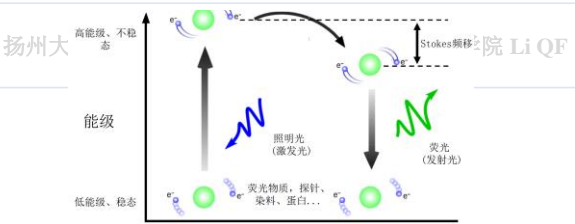
Differential Interference Contrast (DIC)



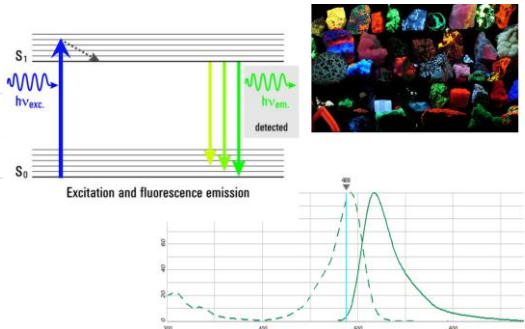
• 当两束光通过光学系统时会发生相互干涉，如果相位相同，干涉的结果是亮度增强，反之，就会相互抵消变暗，这就是光波的干涉现象。
• 微分干涉显微镜是以平面偏振光为光源，光线经棱镜折射后分成两束，在不同时间经过样品的相邻部位，然后经过另一棱镜将这两束光汇合，从而样品中厚度上的微小差别就会转化成明暗区别，增加了样品反差，造成了标本的人为三维立体感，类似大理石上的浮雕。

荧光

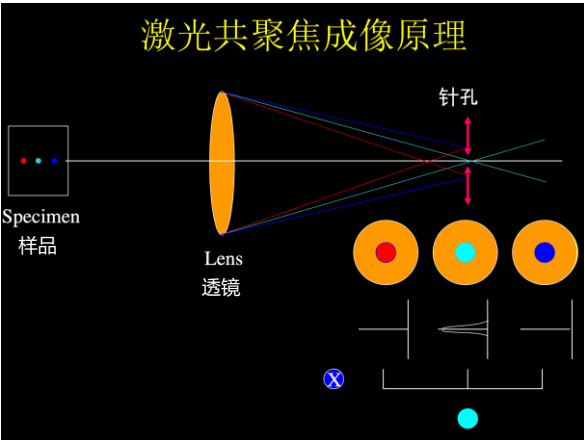
物质中的电子吸收光的能量由低能状态转变为高能状态，再回到低能状态时释放出的光，是非温度辐射光——冷光。即：物质吸收短波光，发射出的长波光。



荧光现象



激光共聚焦成像原理



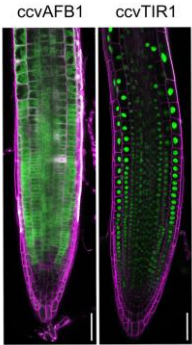
应用

1、形态结构观察：在不损伤细胞的前提下对活的组织、细胞或者细胞器的形态结构进行观察，这种功能对于细胞培养、转基因研究尤为重要，可以说是LSCM最大的优势。

扬州大学农学院 Li QF 扬州大学农学院 Li QF

2、细胞物理化学测定：对细胞形状、周长、面积、平均荧光强度等参数进行测定；对细胞的溶酶体、线粒体、内质网、DNA、RNA、酶和受体分子等细胞内特异结构的含量、组分及分布进行定量、定性、定位测定。

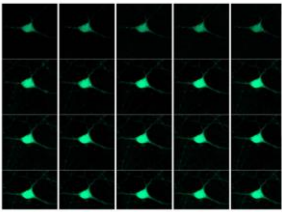
扬州大学农学院 Li QF 扬州大学农学院 Li QF



AFB1和TIR1两个基因的亚细胞定位

3、动态观察和测量：观察和测量细胞内 pH 和多种离子 (Ca²⁺、K⁺、Na⁺、Mg²⁺) 在活细胞内的浓度及变化。

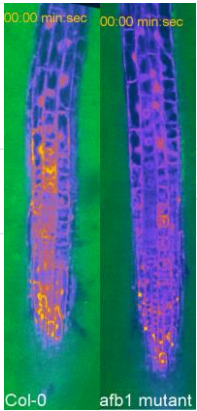
扬州大学农学院 Li QF 扬州大学农学院 Li QF



在 *afb1* 突变体中，施加生长素后，细胞质中 Ca²⁺ 浓度并未增加。

扬州大学农学院 Li QF 扬州大学农学院 Li QF

表明受体 AFB1 对于生长素诱导的 Ca²⁺ 转运是必需的。

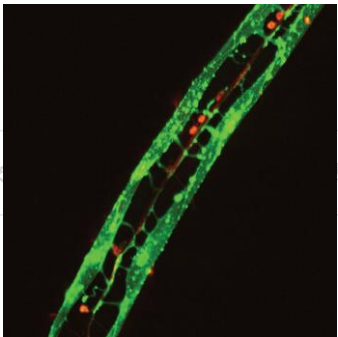


4、三维图像的重建：可以对样品的立体结构分析，直观地进行形态学观察，并揭示其结构的空间关系。

扬州大学农学院 Li QF 扬州大学农学院 Li QF

5、长时程观察细胞迁移和生长

扬州大学农学院 Li QF 扬州大学农学院 Li QF



线虫运动神经元和肌臂



这张苍蝇头部图像是通过使用软件将六张图像拼接在一起而创建的。



GFP 标记的小鼠海马神经元

激光扫描共聚焦显微镜的局限性

- 1、标记染料的光漂白：为了获得足够的信噪比必须提高激光强度；而高强度的激光会使染料在连续扫描过程中迅速褪色。
- 2、光毒作用：在激光照射下，许多荧光染料分子会产生单态氧或自由基等细胞毒素。