



# 第四章 基因工程在基因 功能研究中的应用

湖南师范大学生命科学学院

袁雯洲



# 本章目录

4. 1 基因表达谱研究技术

4. 2 基因突变研究技术

4. 3 基因敲除与基因敲减技术

4. 4 基因过表达与异位表达技术

4. 5 基因相互作用研究技术

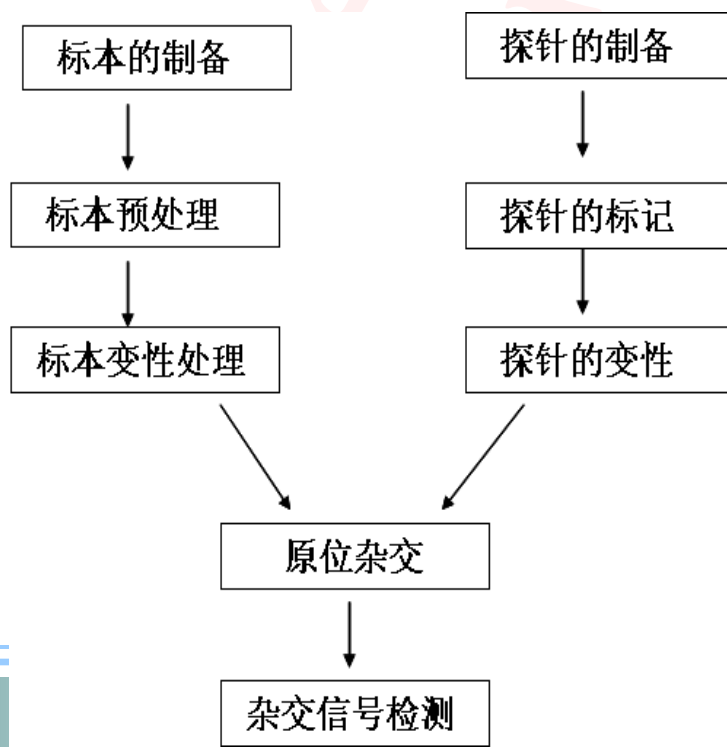


## 第一节、基因表达谱研究技术

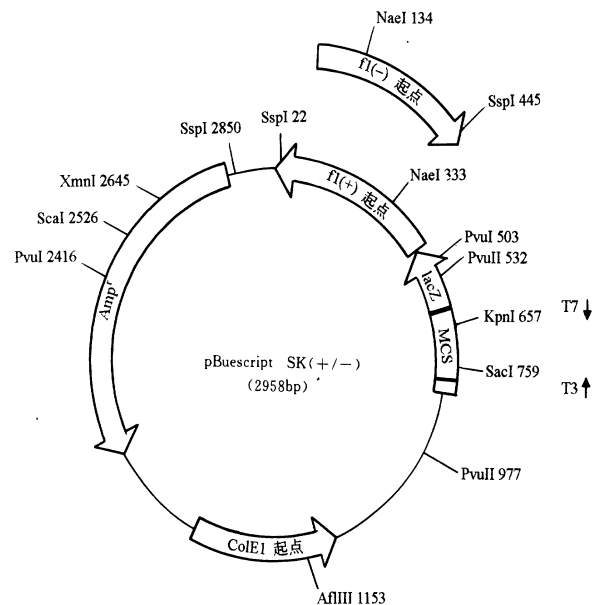
- 胚胎原位杂交技术
- 胚胎抗体染色技术
- 基因芯片技术
- 蛋白质组学技术

# 一、胚胎原位杂交技术

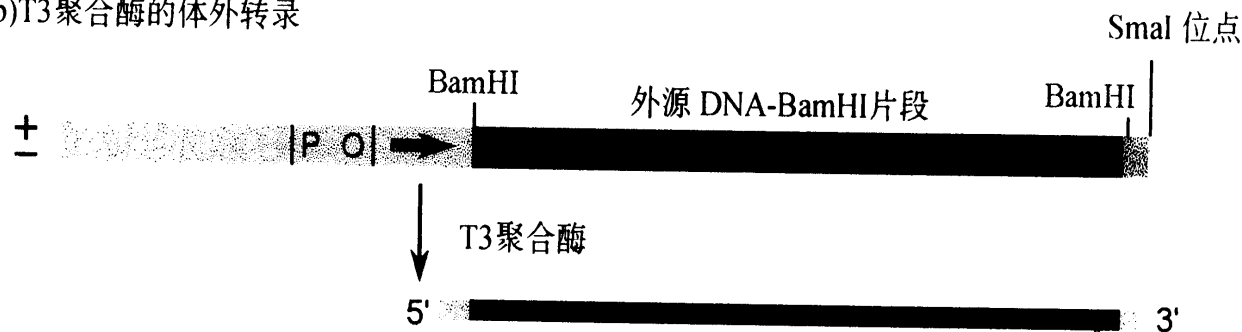
- 胚胎原位杂交技术简称原位杂交 (*in situ* hybridization, ISH)，是利用碱基互补配对的原理，用带有标记的目的DNA或 RNA片段作为核酸探针，与胚胎或组织内的mRNA进行杂交，然后通过放射自显影、荧光显微镜观察或酶促底物显色的方法予以显示，确定目的基因的mRNA的存在与定位情况。



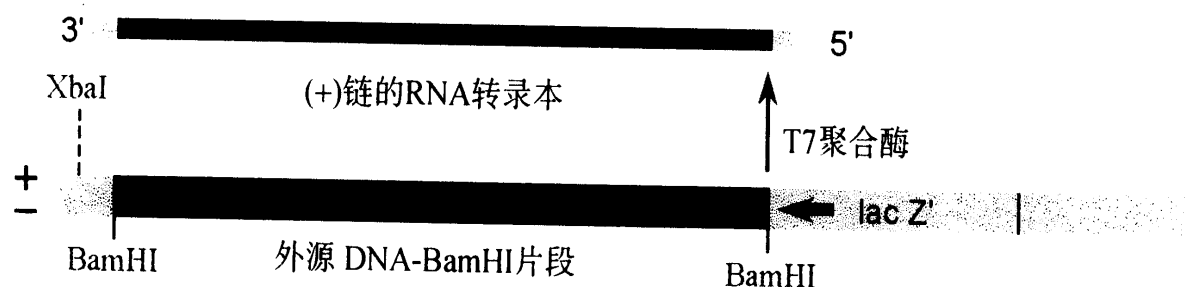
# 1、原位杂交探针



(b) T3聚合酶的体外转录



(c) T7聚合酶的体外转录

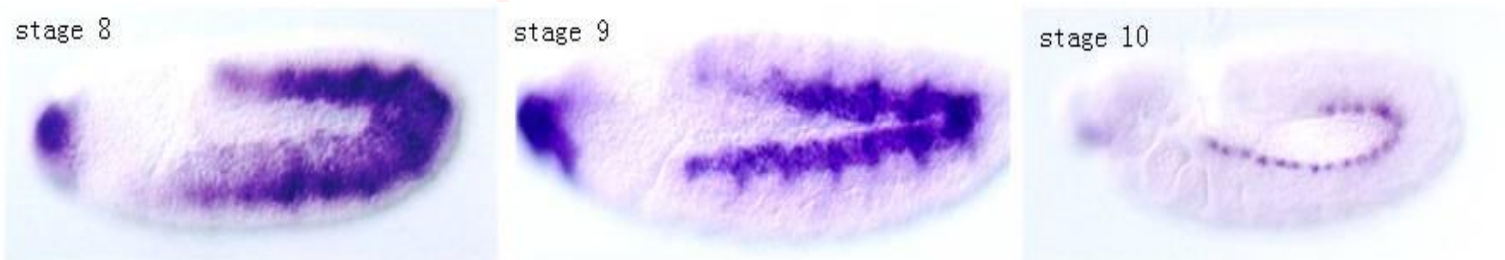


**+链探针与-链探针两种**

**探针较长500-1000bp**

**荧光或酶间接标记**

## 2、胚胎原位杂交结果



果蝇心脏发育基因 *tinman* 在胚胎发育不同时期的原位杂交结果。果蝇胚胎时期见标注。胚胎呈侧面观，头部在左，尾部在右。背部在上，腹部在下。8期胚胎显示 *tinman* 基因在整个中胚层表达，9期胚胎显示 *tinman* 只在背部中胚层表达，10期胚胎显示 *tinman* 局限于心脏前体细胞中表达。



## 二、胚胎抗体染色技术

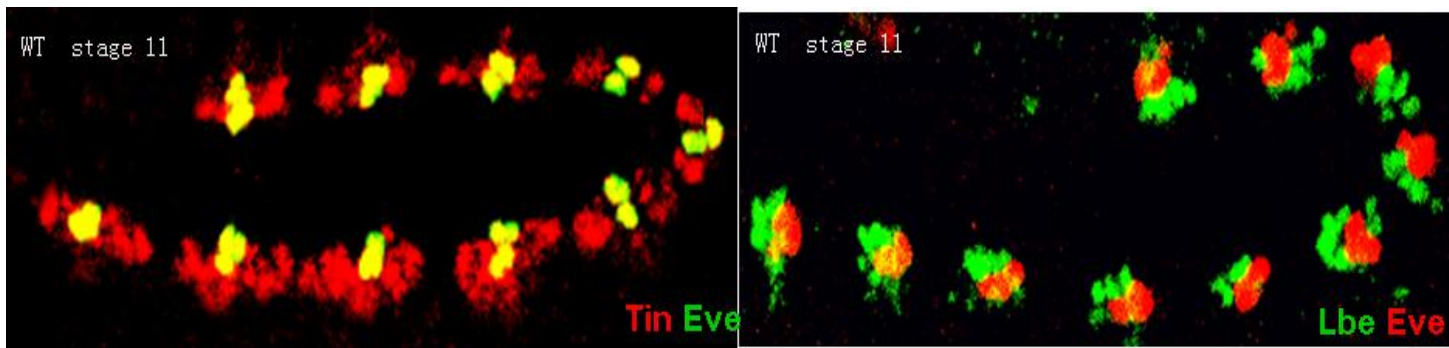
- 胚胎抗体染色技术（antibody staining）是利用固定剂将胚胎、组织或细胞固定，用特异性抗体进行抗原抗体免疫反应，一抗与目的蛋白结合后，再与二抗特异性结合，利用二抗连接不同的酶或荧光基团，就可以通过显色反应或荧光检测确定目的基因的蛋白在胚胎或组织内的定位与表达情况。

一抗与二抗

多克隆抗体

单克隆抗体

# 胚胎抗体染色的结果

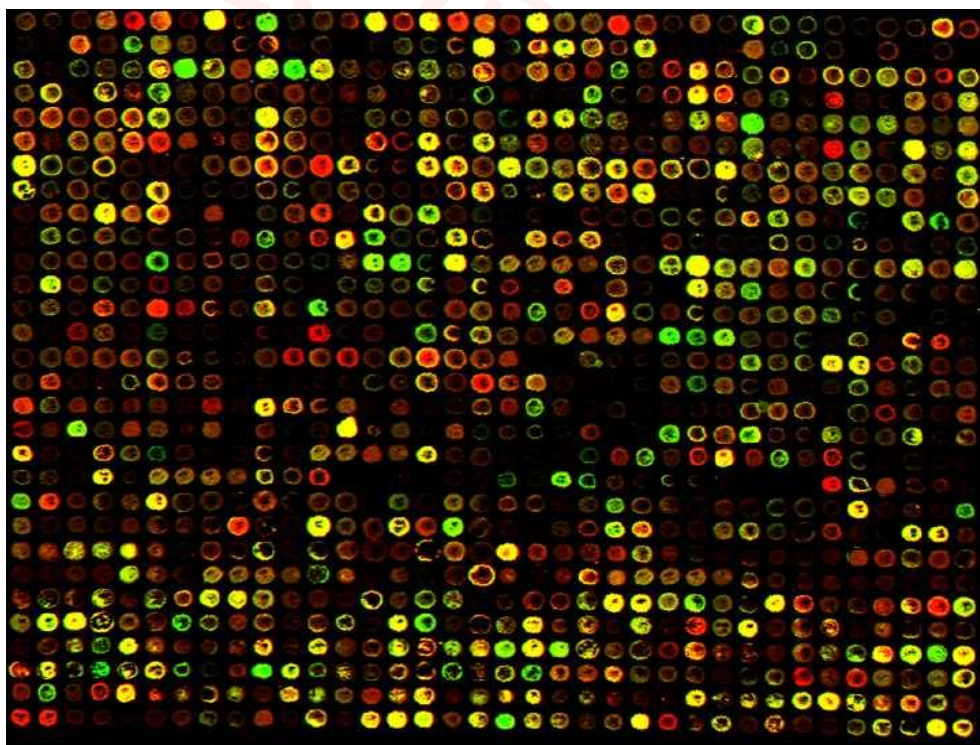


果蝇心脏基因 *tin*、*eve*、*lbe* 在 11 期心脏前体细胞中的蛋白共表达。11 期野生型果蝇胚胎侧面观，头部在左，尾部在右。背部在上，腹部在下。左图中，Tin 抗体用红色荧光标记，Eve 抗体用绿色荧光标记，共聚焦荧光显微镜观察显示，Tin 和 Eve 在副心肌细胞中存在共表达，显示黄色荧光。而右图中，Eve 抗体用红色荧光标记，Lbe 抗体用绿色荧光标记，结果显示两者在不同的副心肌细胞中表达，没有重叠图像。

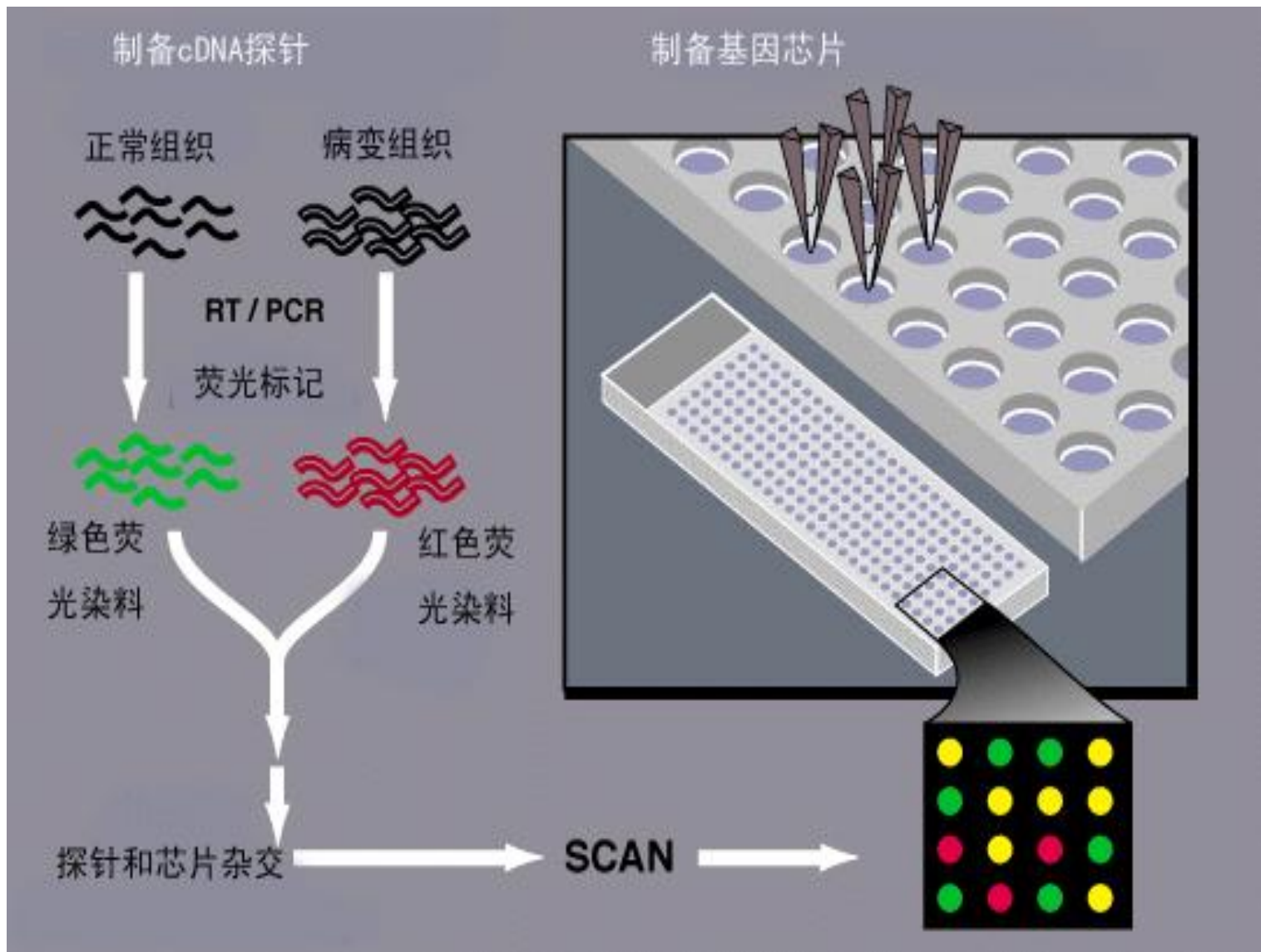


### 三、基因芯片技术

- 将cDNA或RNA以点的形式结合在尼龙膜, 玻片或塑料片上, 形成矩阵排列, 与同位素或荧光标记的探针杂交, 通过放射自显影或荧光扫描仪检测杂交信号.

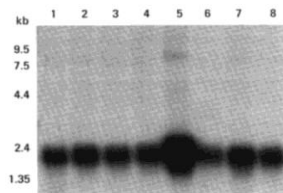


# 1、基因芯片技术原理

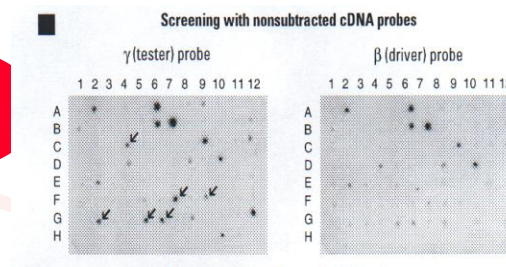


## 2、基因芯片发展历程

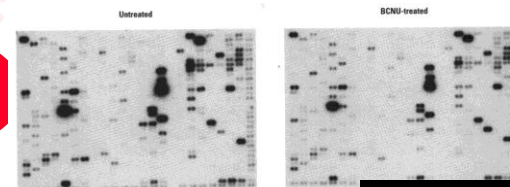
Southern & Northern Blot



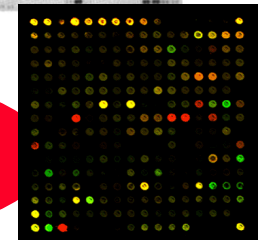
Dot Blot



Macroarray



Microarray



### 3、基因芯片操作平台一览



预制的基因芯片



全自动芯片洗涤工作站



高分辨率的芯片扫描仪



芯片滚动杂交仪

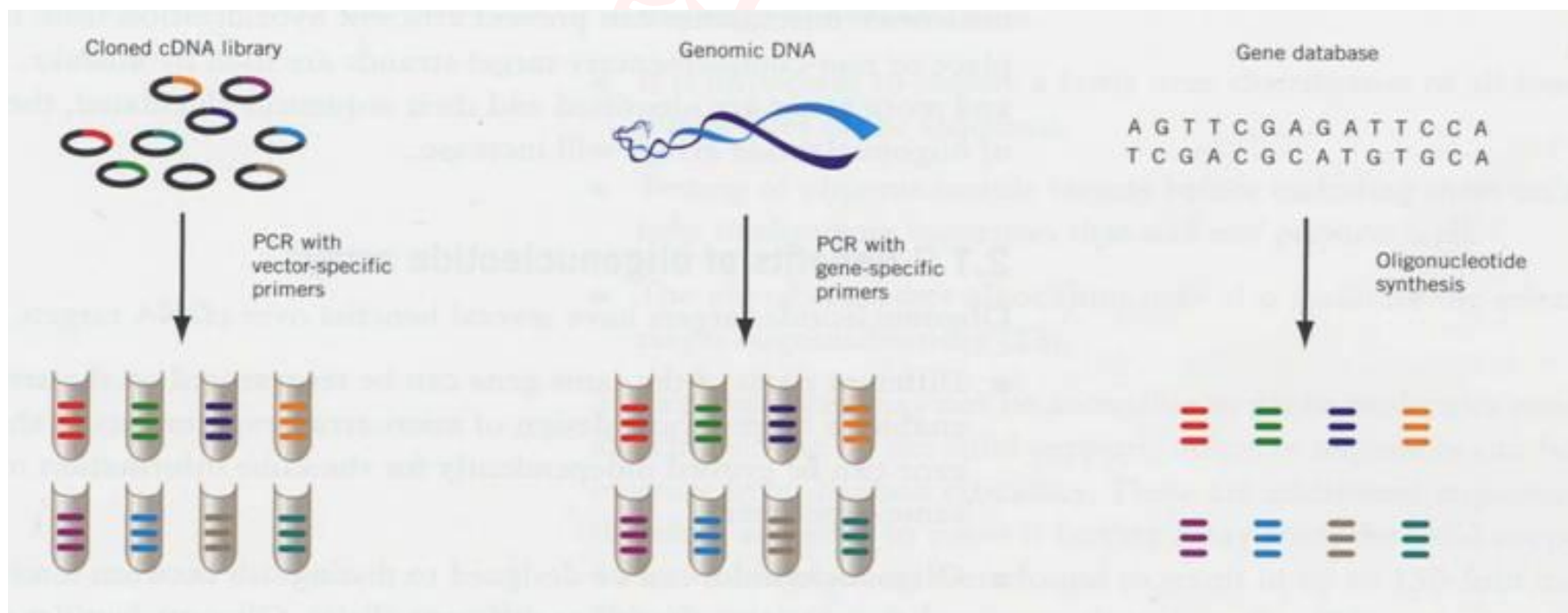


智能化的分析软件



## 4、基因芯片类型

- **cDNA (CDA)** : 用微量点样技术制作的cDNA芯片. 中等密度, 约10000个点阵; 片段长度500–5000bp; 用于比较分析.
- **Oligo (ODA)** : 片上就位合成寡核苷酸点阵芯片. 高密度, 约40万个点阵. 片段大小小于25个核苷酸. 用于测序, 检验点突变.



## 寡核苷酸 (Oligo) 芯片 VS cDNA芯片

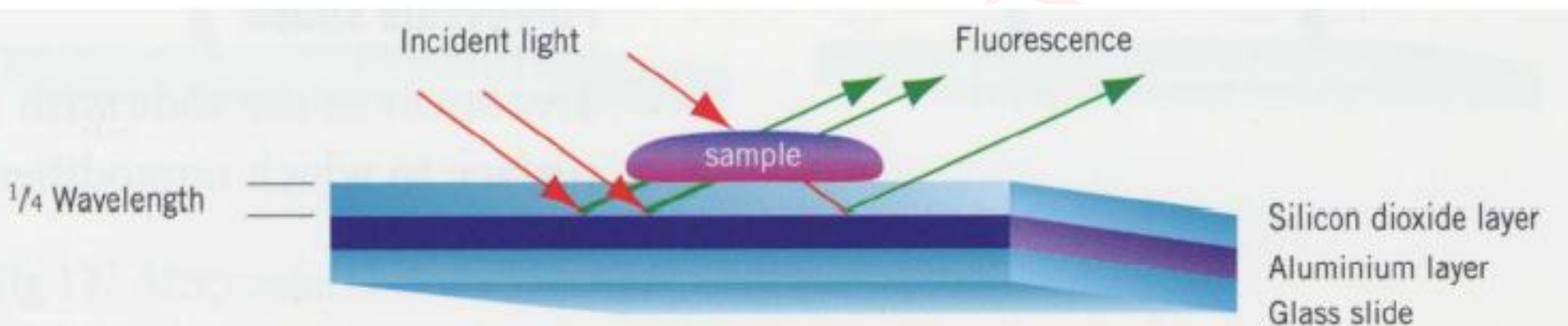
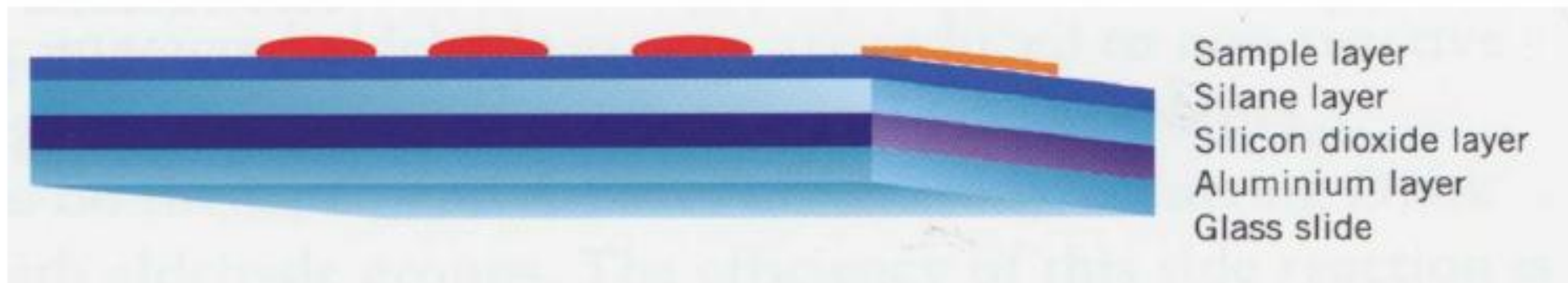
### 优势

### Oligo芯片

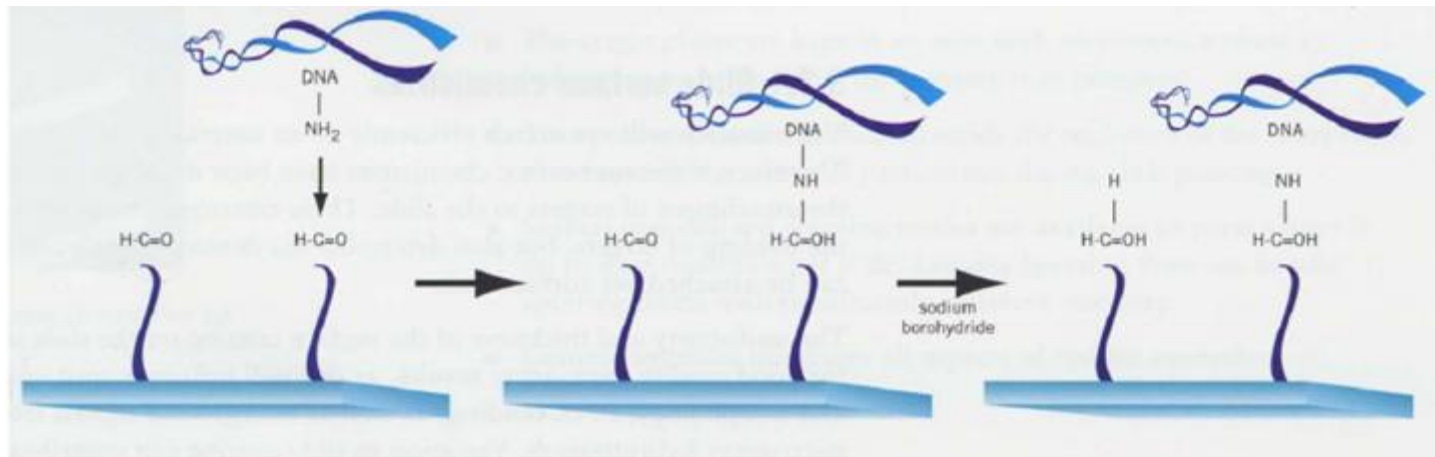
### cDNA 芯片

• 序列准确性高	原位合成	PCR扩增、点样
• 灵敏度更高	5—10ug	≥50ug
• 均一的退火温度	25mer	300bp—1Kb
• 特异性更高	多段探针	单个探针
• 假阳性率低	≤2%	30%

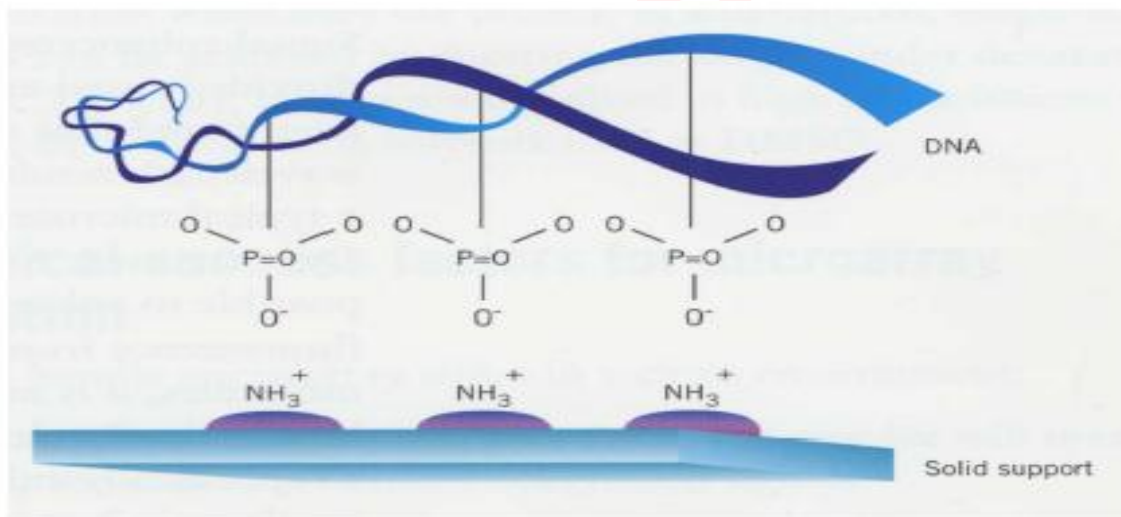
## 5、芯片的组成成分



# DNA与玻片的结合



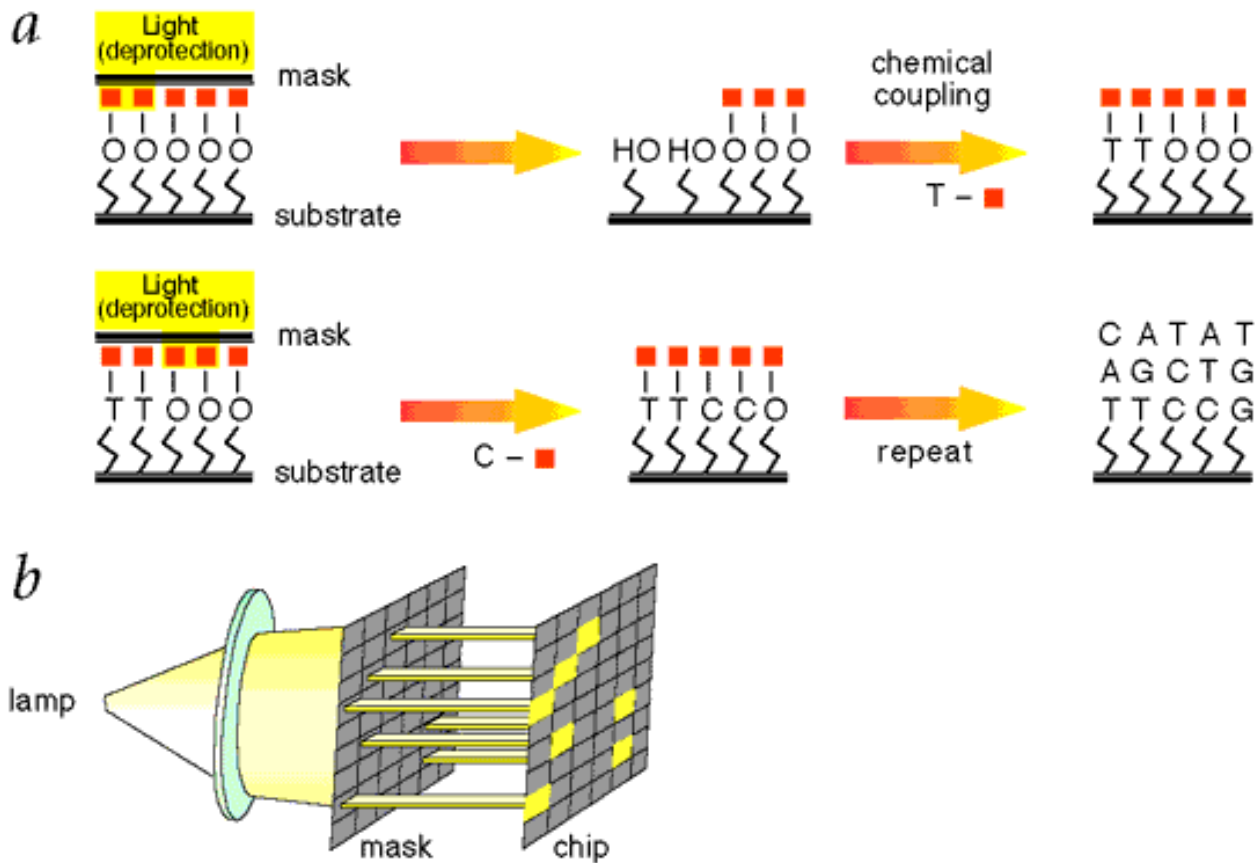
Attachment of amine-modified DNA to aldehyde slide



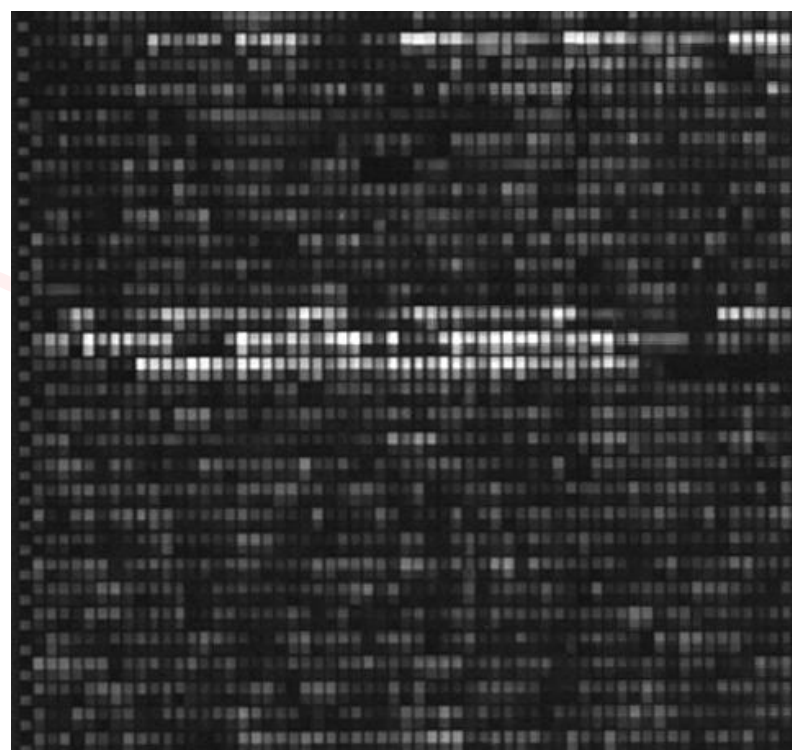
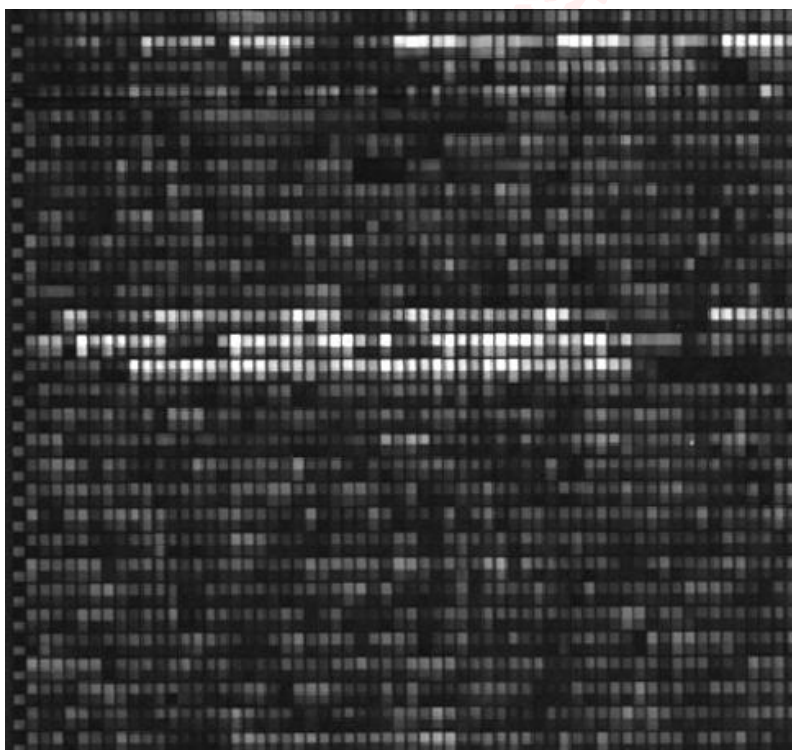
Attachment of unmodified DNA to an amine-modified slide surface. The DNA binds to the surface of the slide via an electrostatic interaction. The positive amines in the silane coating will attract the negative phosphate backbone of the DNA.



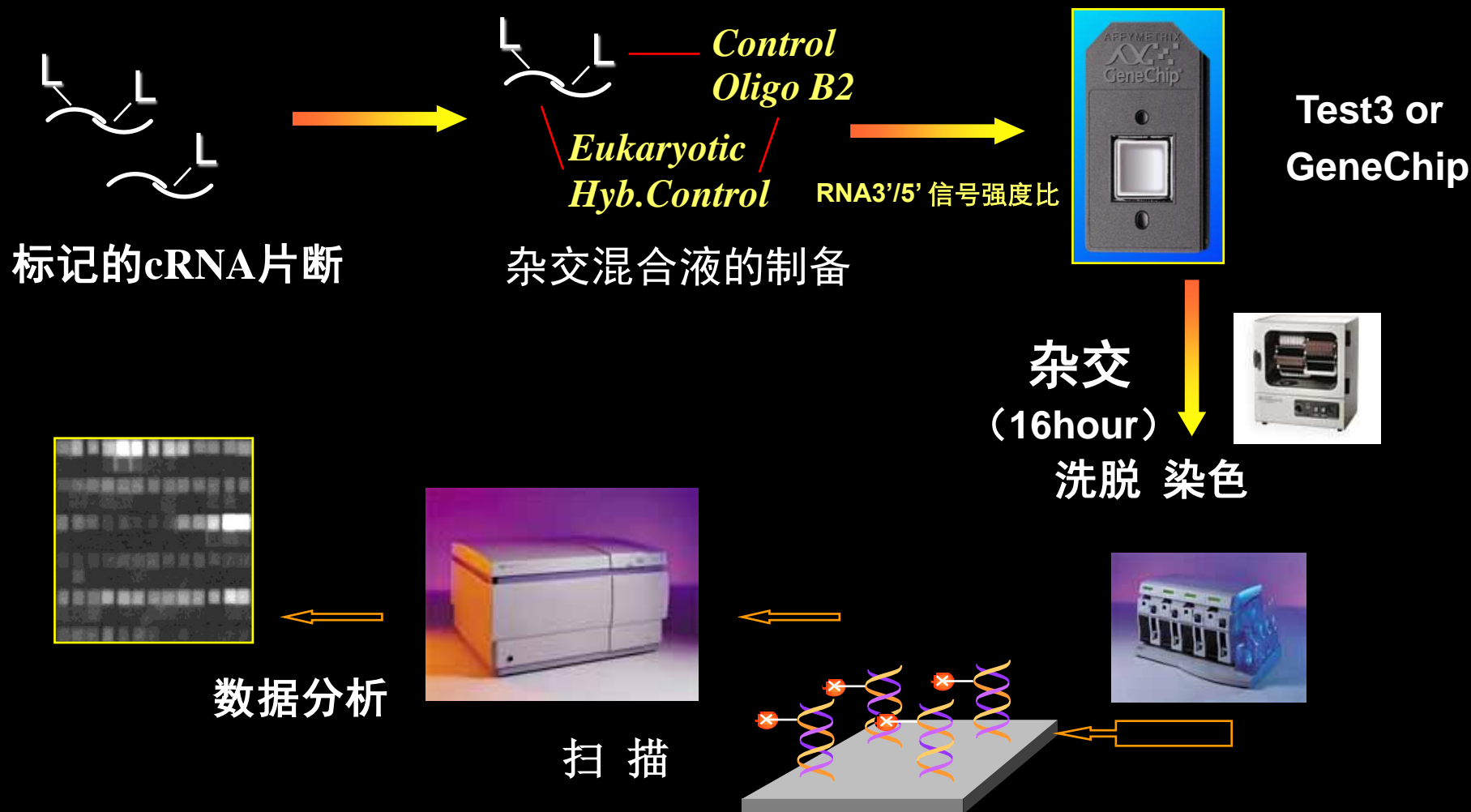
# 光蚀刻原位合成的寡核苷酸芯片



# 高密度的点阵技术

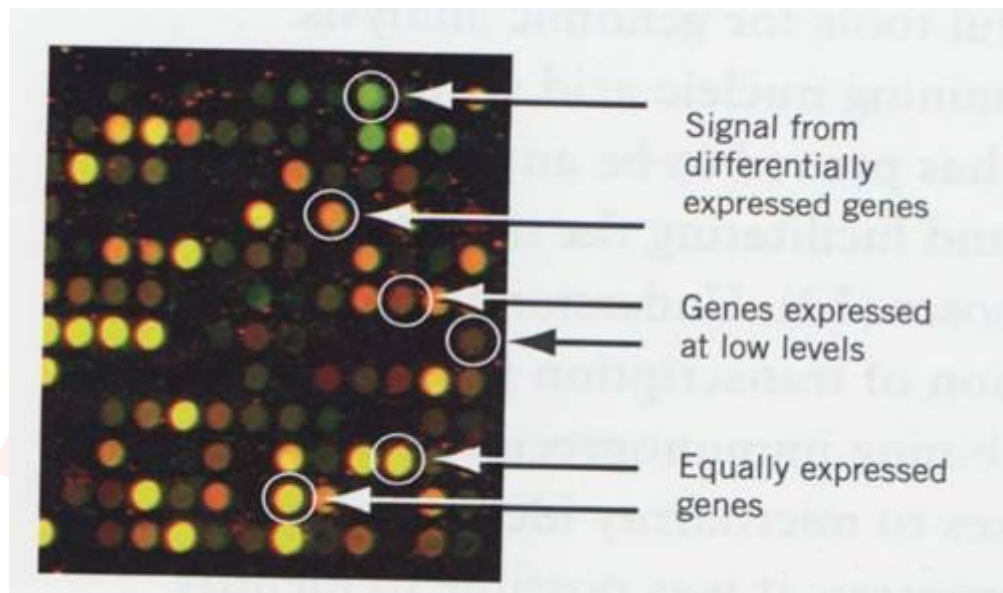


## 6、GeneChip®的操作流程



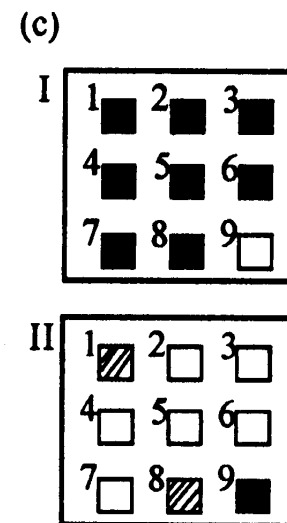
## 7、基因芯片的应用

- 基因表达谱的检测;
- 新药筛选;
- 基因突变与 SNPs 检测;
- 高通量测序.



(b)

	II	TGACCGG	T	AGCAAAATG	杂交作用
	I	TGACCGG	C	AGCAAAATG	I
1			GTCGTTTT	+	±
2			CGTCGTTT	+	-
3			CCGTCGTT	+	-
4			GCCGTCGT	+	-
5			GGCCGTCG	+	-
6			TGGCCGTC	+	-
7			CTGGCCGT	+	-
8			ACTGGCCG	+	±
9			CATCGTTT	-	+



# Human Genome U133 Set

## 世界上第一套人类全基因组芯片

U133由两张芯片组成（A 和 B）  
100多万种寡核苷酸探针，共涵盖  
39000个转录本，代表了33000个  
明晰的人类基因。

序列来自于GenBank®， dbEST，  
and RefSeq

U133A涵盖18000多个转录本，代  
表了18000多个明晰的基因，其中  
13000多个为全长基因。

U133B涵盖21000多个转录本，  
9000多个为EST簇



HG-U133A



HG-U133B



## 四、蛋白质组学研究技术

- 蛋白质组 (proteome) 一词是由Wilkins等于1994年提出的，用来描述一个细胞、组织或有机体表达的所有蛋白质类别。蛋白质组学 (proteomics) 则是研究特定时间或特定条件下这些蛋白质表达情况的科学。

双向凝胶电泳技术

质谱技术



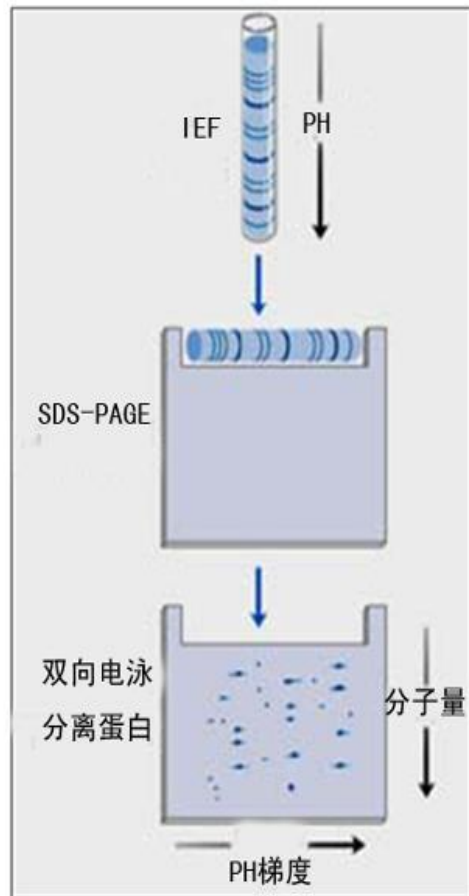
# 1、双向凝胶电泳技术

- 是一项广泛应用于高分辨率地分离细胞、组织或其他生物样品中蛋白质混合物的技术。其基本原理是首先根据蛋白质的等电点在pH梯度胶中等电聚焦，然后按照它们的分子质量大小进行SDS-PAGE第二次电泳分离，从而最大限度地分离蛋白质的方法。

第一  
向

IEF

等电  
聚焦  
区分  
带不  
同电  
荷的  
分子



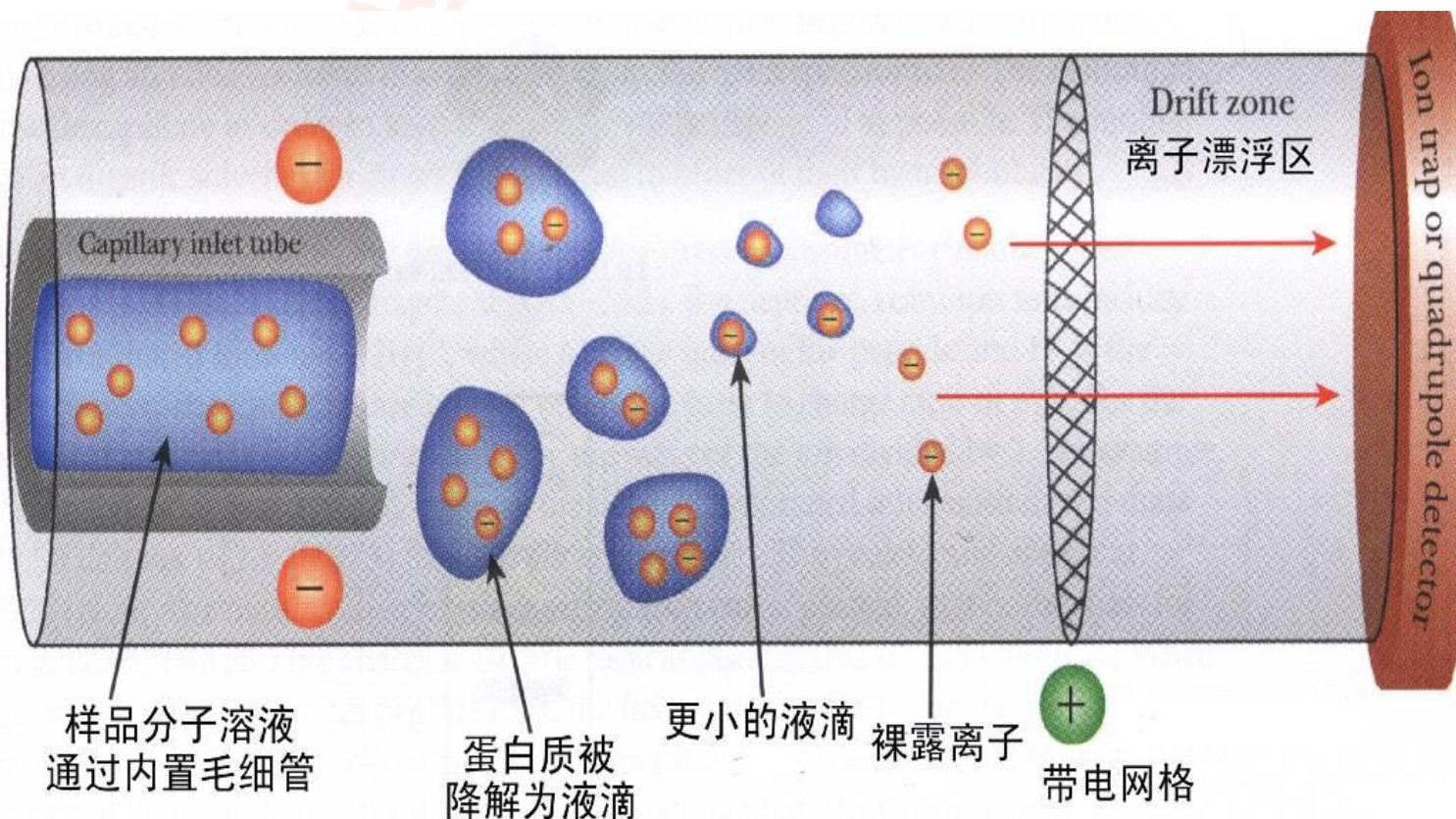
第二向: SDS-PAGE

分离不同分子量蛋白质



## 2、质谱技术

- 质谱技术的基本原理是样品分子离子化后，根据不同离子间的质荷比 ( $m/z$ ) 的差异来分离并确定分子质量。主要包括基质辅助激光解吸收离子化质谱 (MALDI) 和电子喷射离子化质谱 (ESI)。







## 第二节、基因突变研究技术

- 化学诱变

EMS（甲基磺酸乙酯）

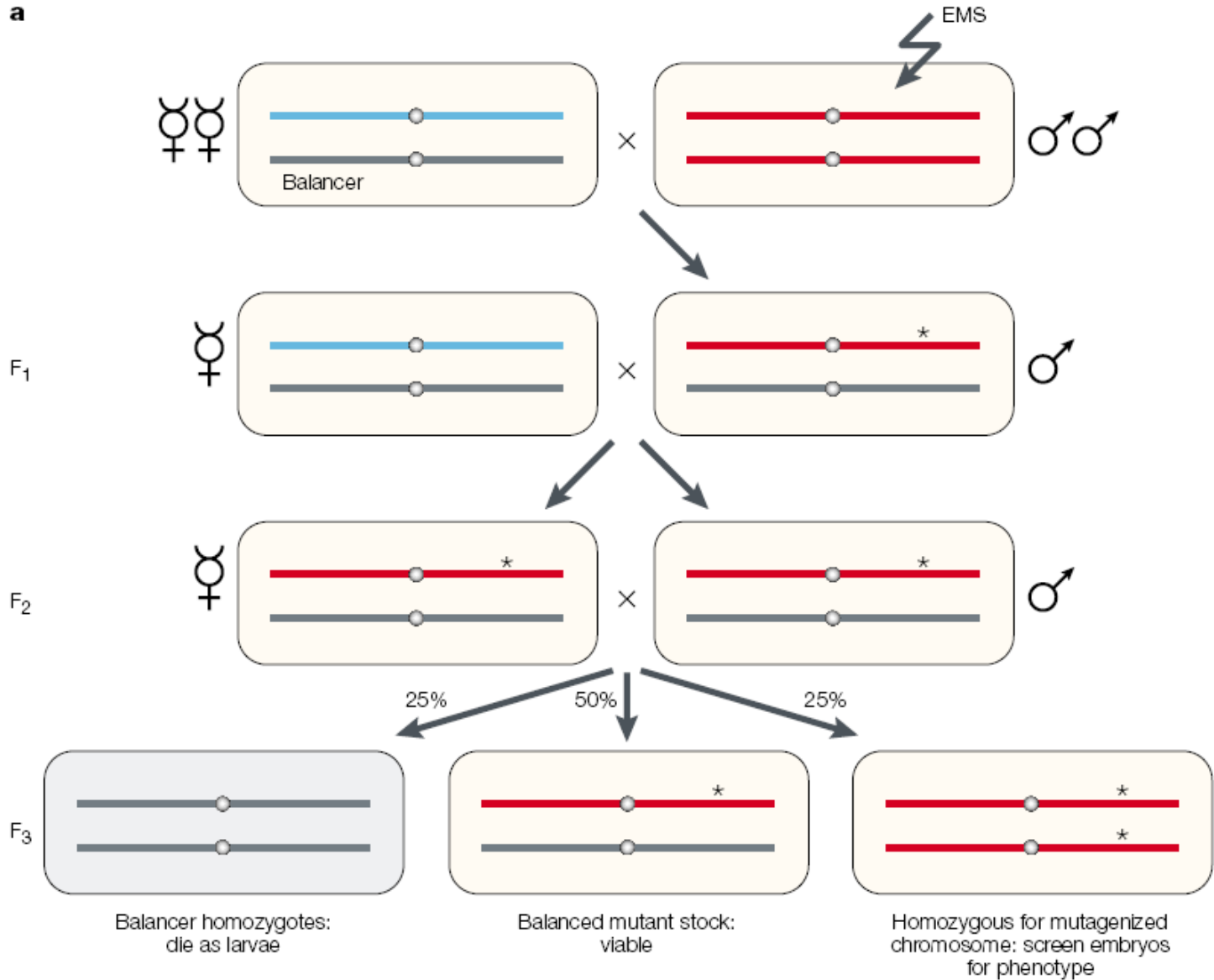
ENU（N-乙基-N-亚硝基脲）

- 转座子诱变

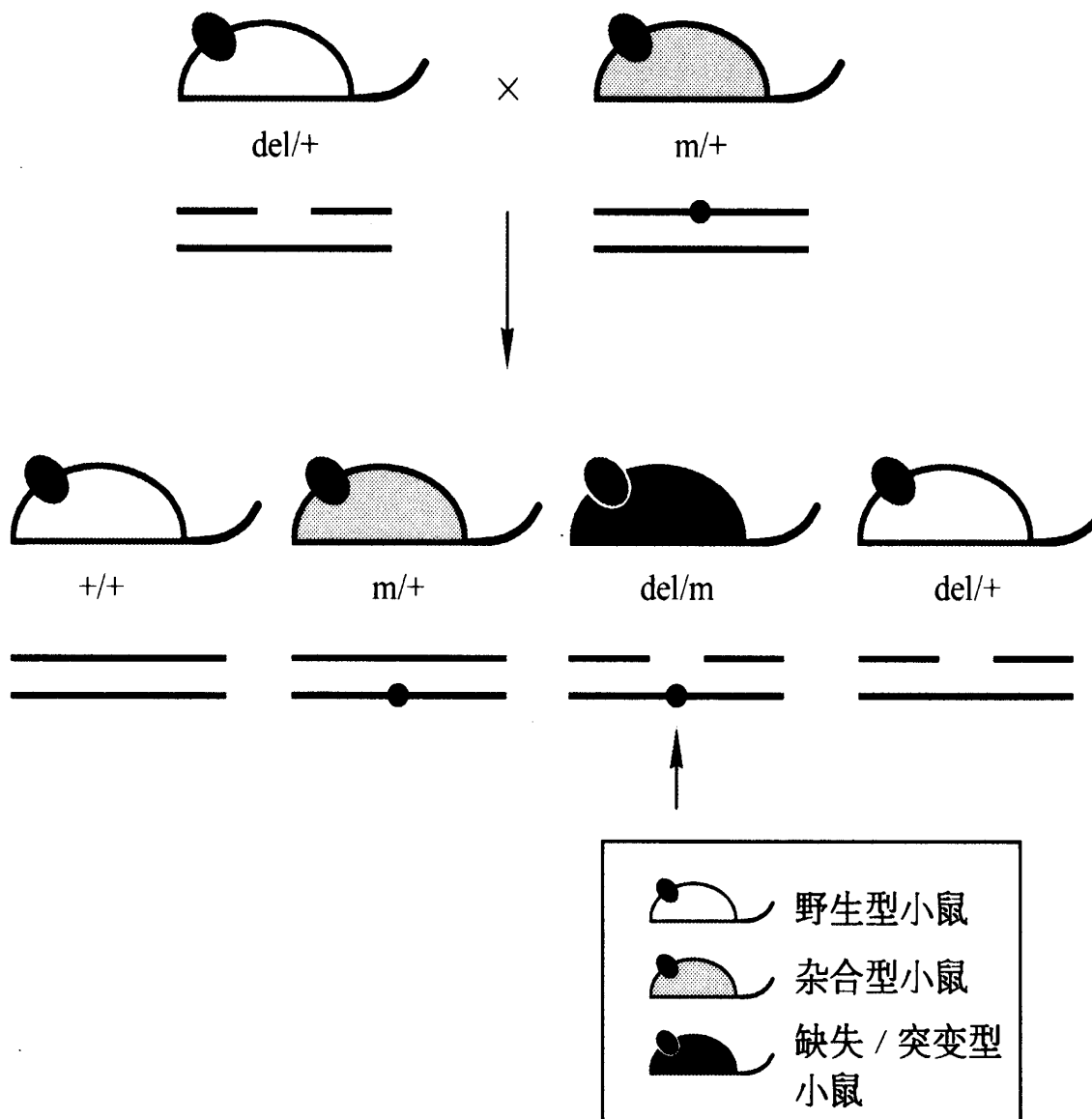
# 一、化学诱变

平衡致死系筛选隐性致死基因

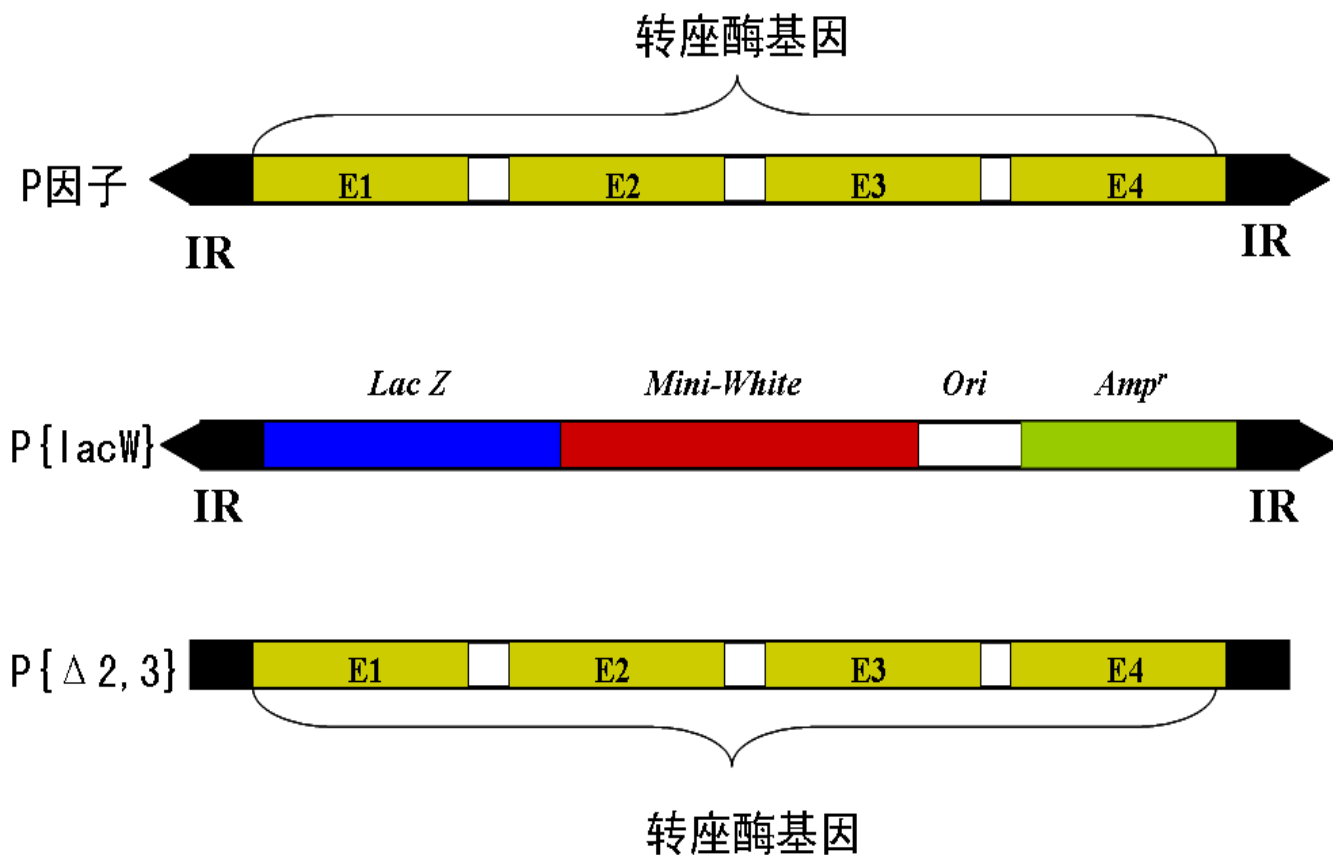
a



# 化学诱变基因的定位



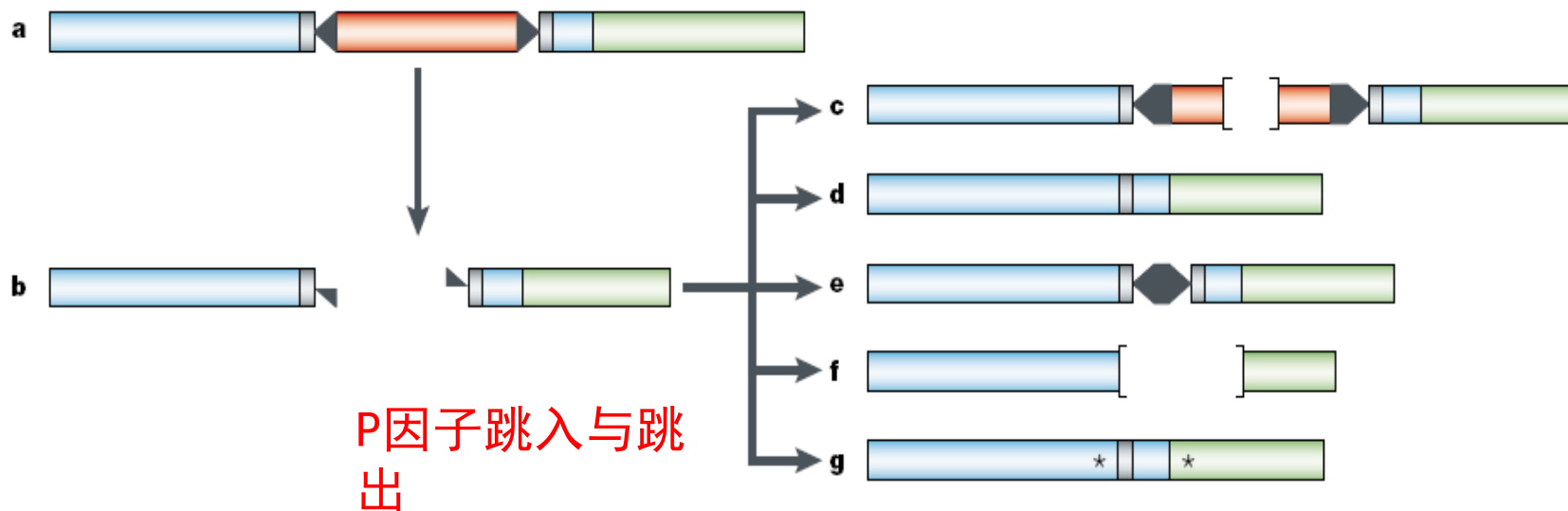
## 二、P转座子诱变



上图为天然的P因子，含有两个正常的转座序列IR和转座酶基因。下图为诱变用基因工程改建的P因子。P{lacW}是转座酶基因缺失系，代之以*lacZ*和*mini-white*及*amp<sup>r</sup>*三个标记基因，转座序列正常。P{Δ 2, 3}是转座序列突变系，转座酶基因正常。

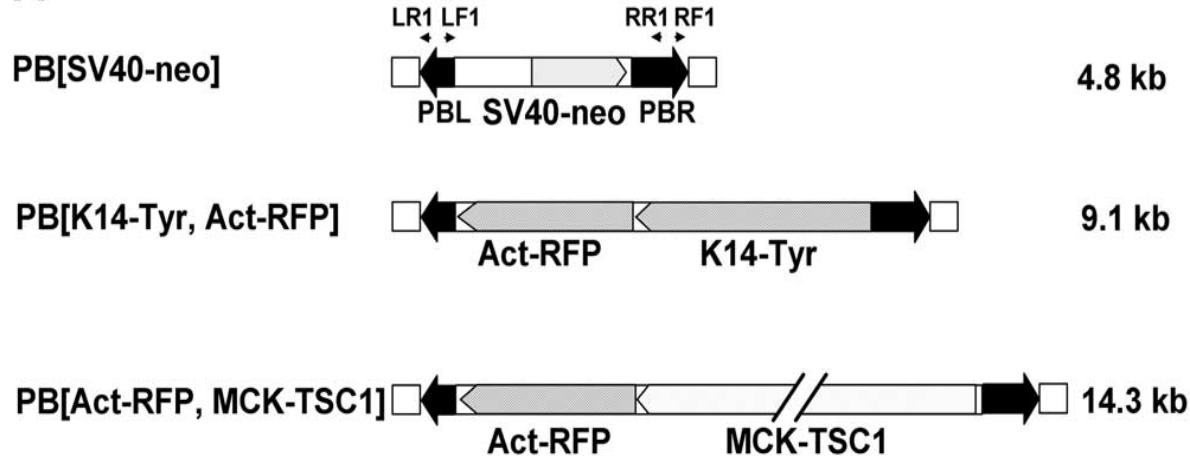
## P转座子诱变的优点

- 1、随机插入基因内或增强子区域
- 2、标记基因检测方便
- 3、插入位点容易通过反向PCR克隆
- 4、诱变是可逆的：跳入与跳出

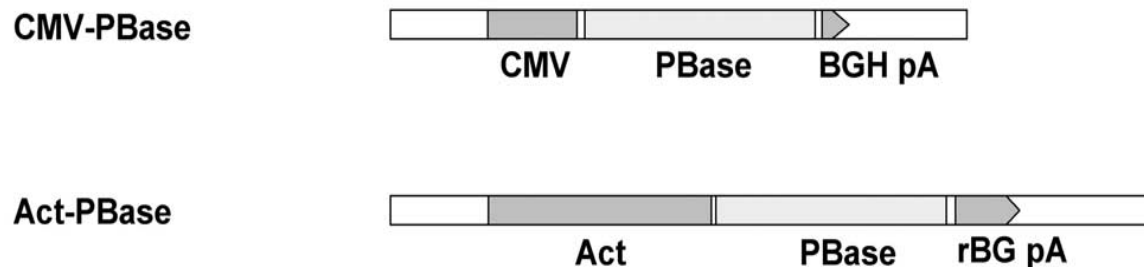


### 三、PB转座子诱变

A

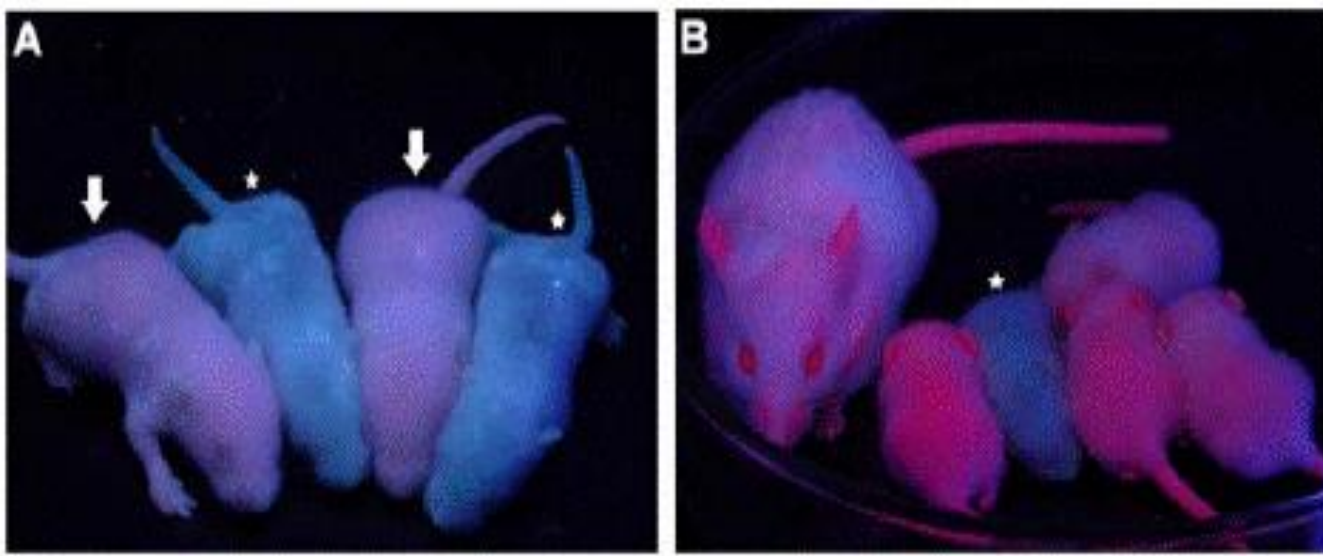


B



PB转座系统载体的构建：A，PB供体载体系列，带有正常转座序列和各种标记基因；B，辅助质粒系列，转座序列缺失，转座酶基因正常。

## PB鼠 (PB mice)



A图箭头所指表现红色荧光的小鼠插入了PB转座子（被称为PBmice），其余为不含PB转座子的小鼠。B图显示带有PB转座子的小鼠（左）产生的后代小鼠依然保持了稳定的红色荧光性状。



## 第三节、基因敲除与基因敲减技术

- 基因敲除技术
- RNA干扰技术
- Morpholino 干扰技术





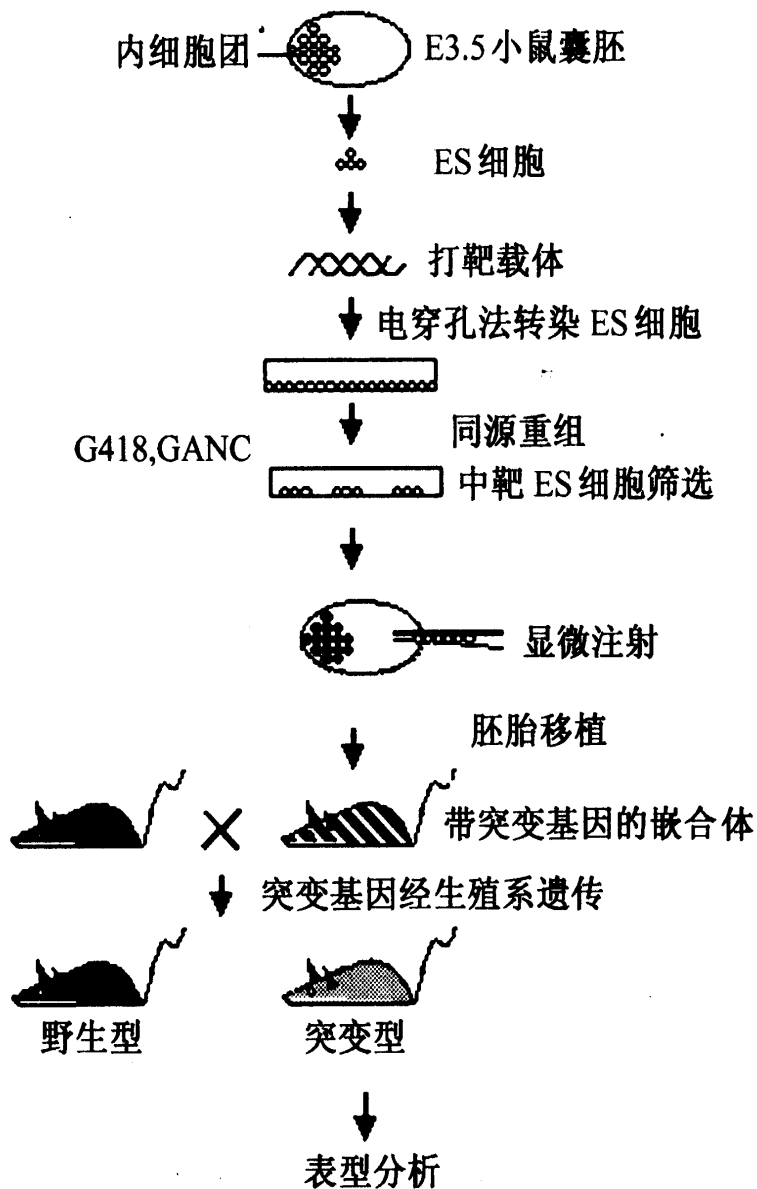
# 一、基因敲除

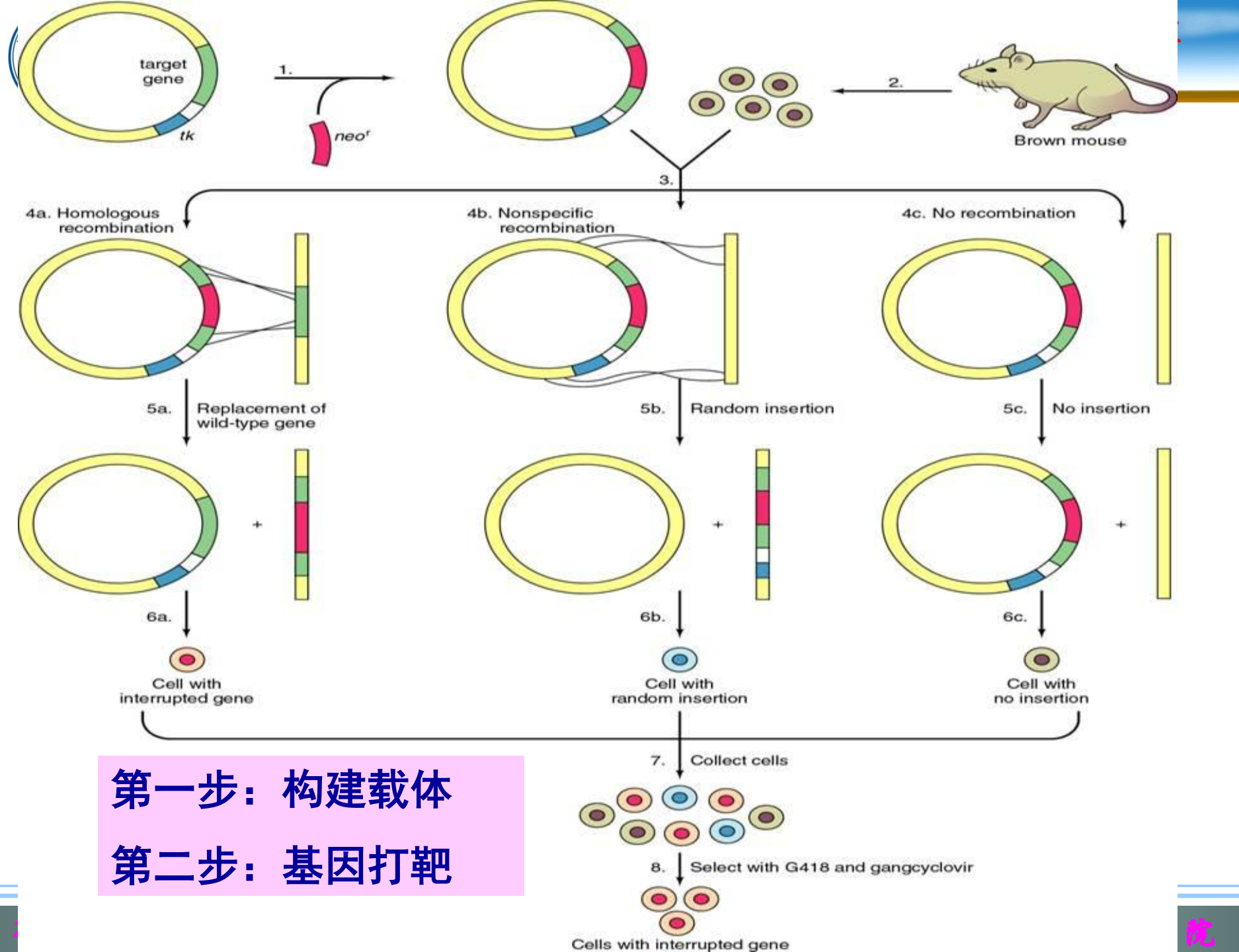
- 基因敲除 (gene knock-out) 是指利用外源的已突变的基因通过同源重组的方法替换掉内源的正常同源基因, 从而使内源基因失活而表现突变体的性状的技术或方法。

完全基因敲除

条件基因敲除

# 1、完全基因敲除





第一步：构建载体

第二步：基因打靶

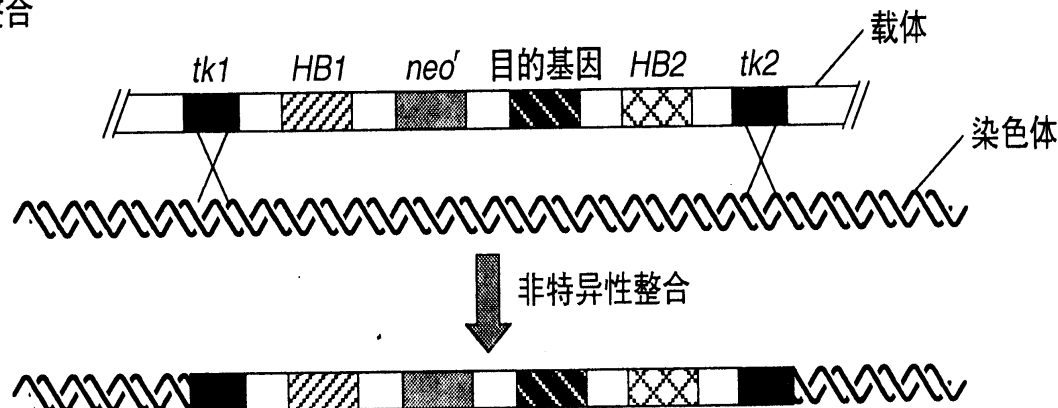
## 第三步：正负筛选法

### 正选择标记的基因：

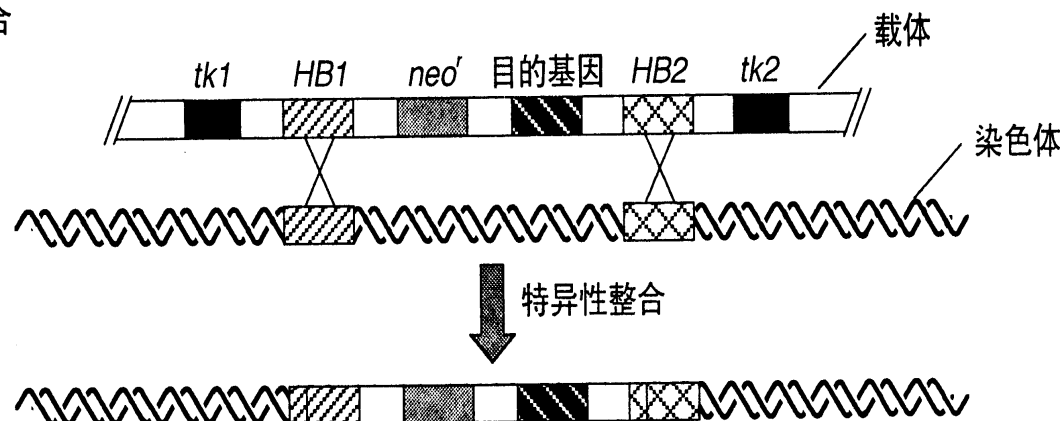
**neo<sup>r</sup>**，新霉素抗性基因，能在G418培养基上生长。

**负标记基因：tk**，简单疱疹病毒胸腺嘧啶核苷酸激酶基因。使核苷酸类似物GANG或FIAU磷酸化，在DNA复制时整合到DNA链上，导致DNA合成终止，造成细胞死亡。

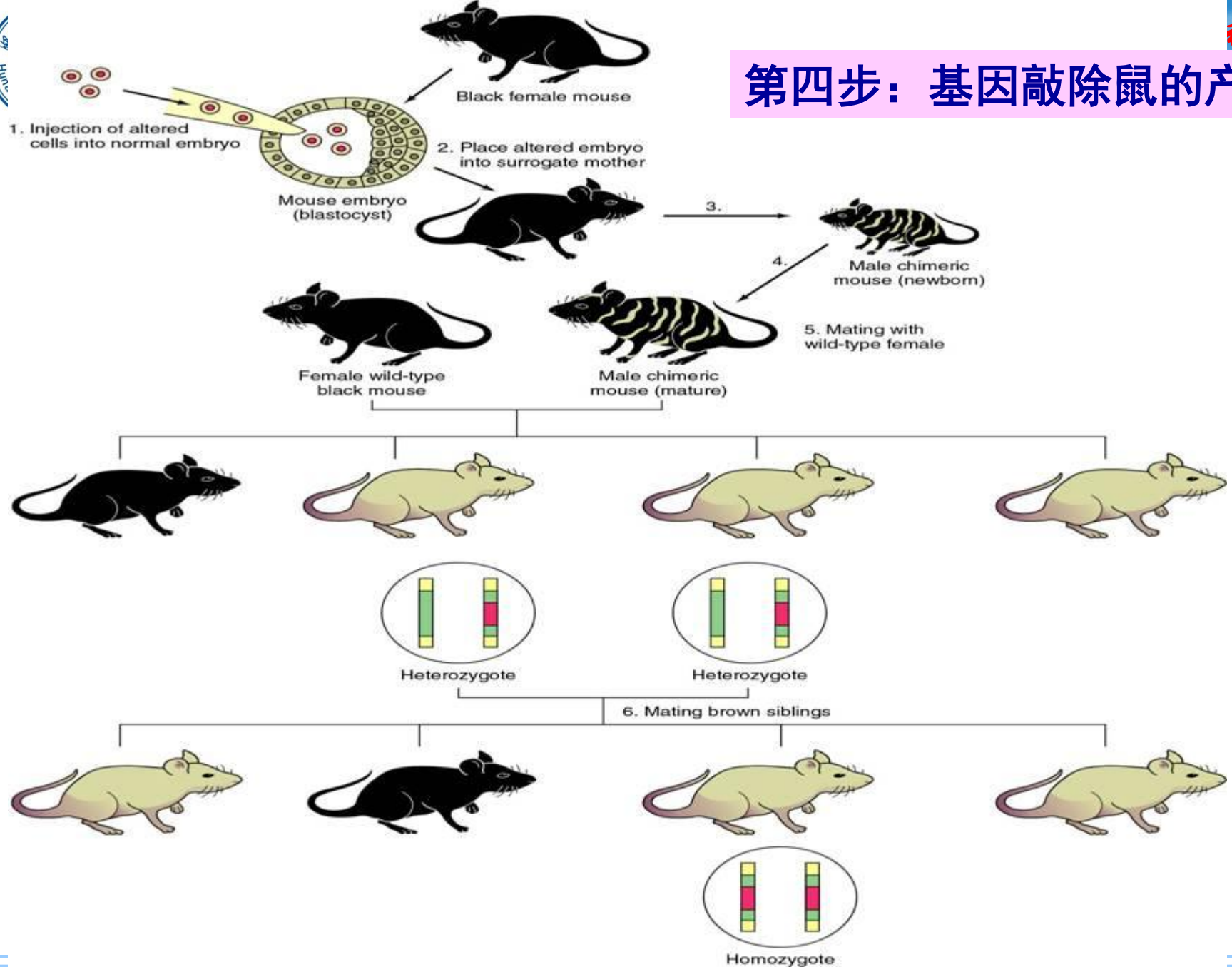
A 非特异性整合



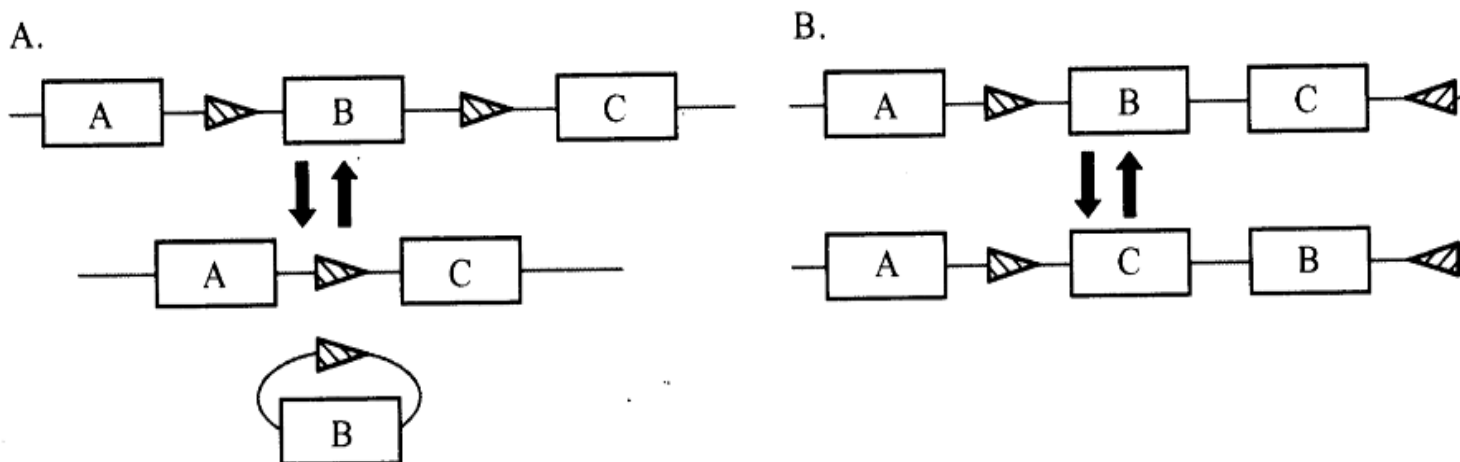
B 特异性整合



# 第四步：基因敲除鼠的产生

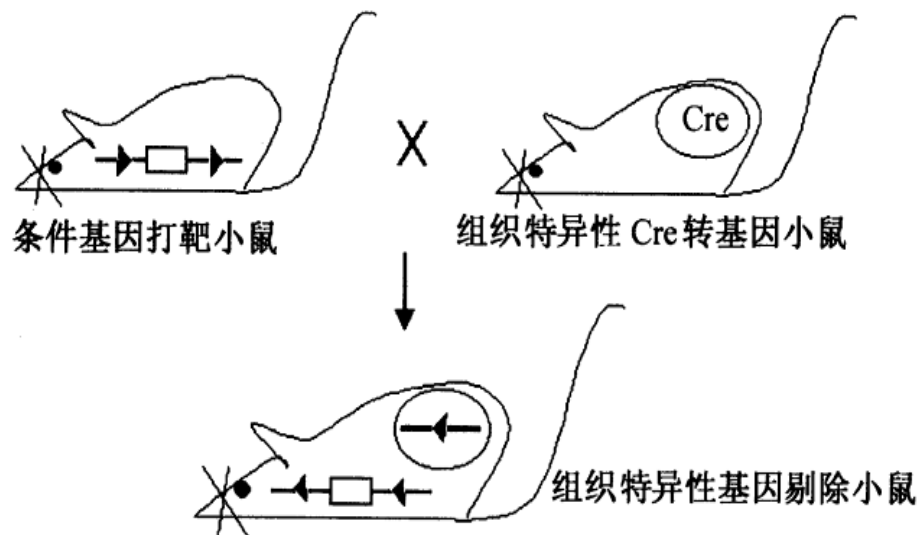


## 2、条件基因敲除



Cre-LoxP重组酶系统介导的DNA重组。长方框代表外显子，三角形代表LoxP位点。A为Cre酶介导的删除，B为Cre酶介导的倒位。

# 条件基因敲除的原理

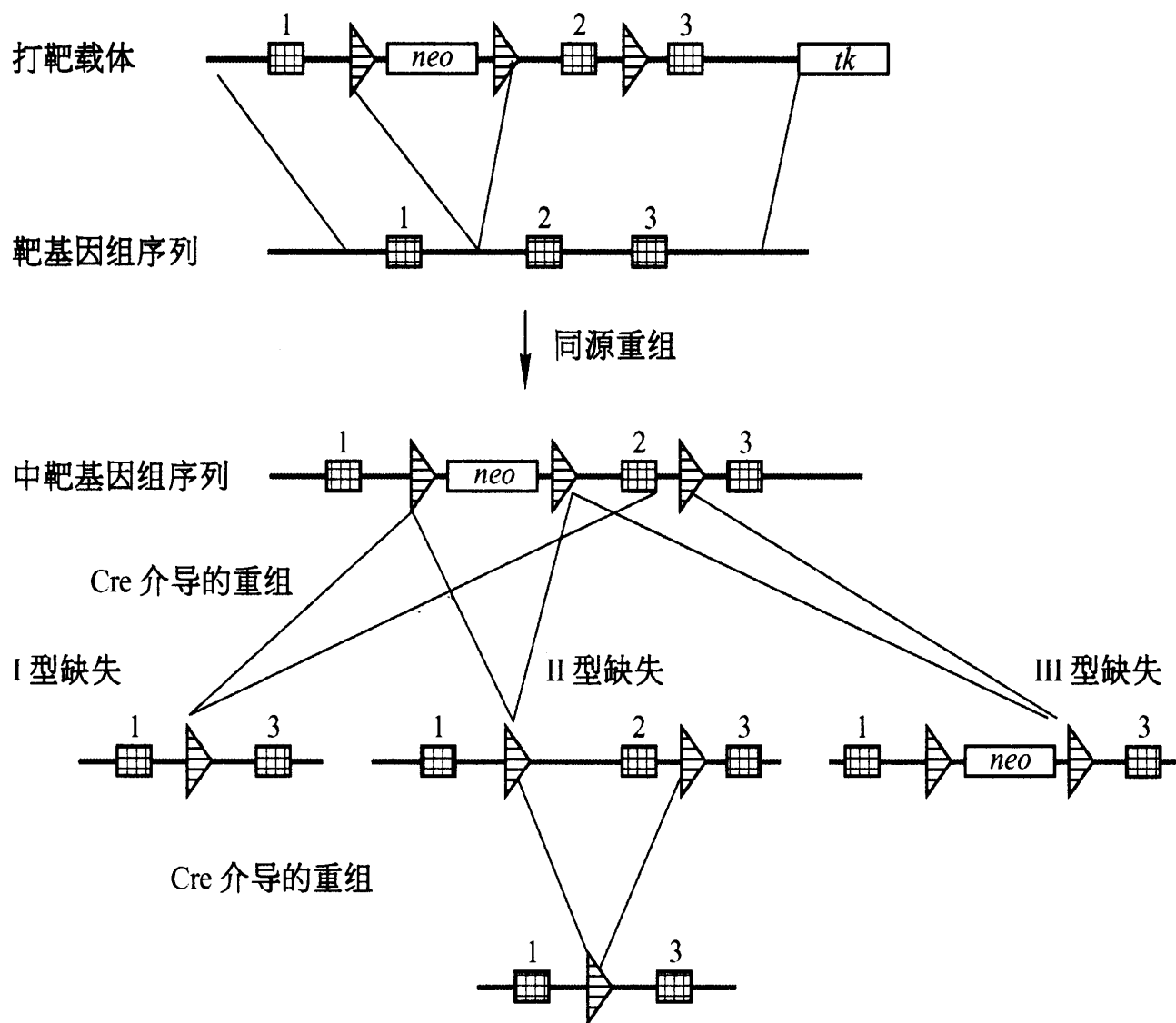


Cre介导的组织或细胞特异性基因敲除。长方框表示被LoxP序列锚定的靶基因，三角形表示LoxP序列。被Cre标记的阴影部分表示表达Cre重组酶的特定组织。



# 条件基因敲除载体的构建

三角形表示  
LoxP序列，带  
网格的长方形  
表示靶基因的  
外显子1，2，3，  
筛选标记基因  
用带标记的长  
方框表示。*Neo*  
表示新霉素抗  
性正选择标记  
基因，*tk*表示  
胸苷激酶基因  
负选择标记基  
因







### 3、锌指核酶技术

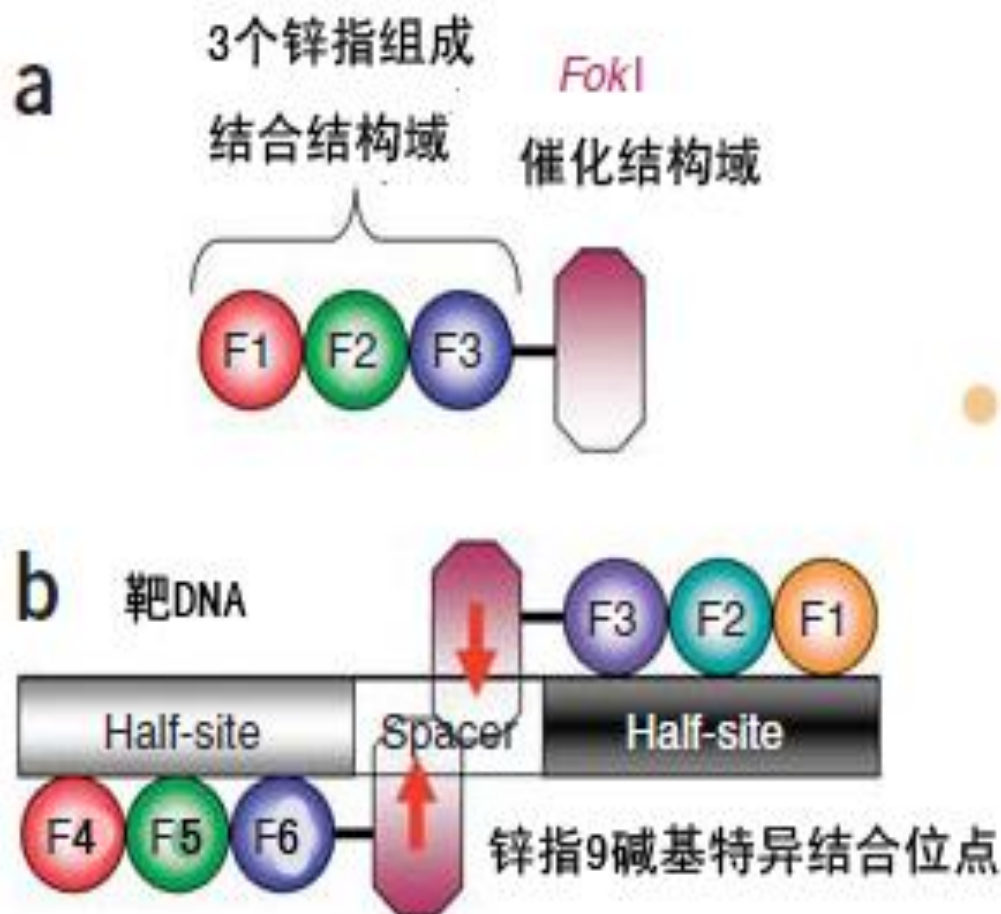
锌指核酶ZFNs是一类能特异剪切基因组某段DNA的人工合成的核酸内切酶，主要包括两个结构域，即DNA结合结构域和核酶催化结构域。

催化结构域由FokI (DD / RR) 组成，具有核酸内切酶活性，能够非特异切断DNA。FokI以适当的碱基距离形成异二聚体，从而发挥其剪切活性。

DNA结合结构域一般含有3到4个串联的Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>锌指蛋白，其中每一个锌指基序含30个左右的氨基酸残基，具有 $\beta\beta\alpha$ 二级结构，能够结合特定序列的3bp的靶DNA片段。

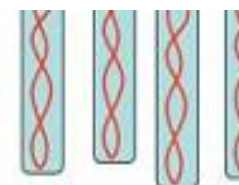
# 锌指核酶特异性切割靶DNA的原理

锌指核酶由3个人工设计的锌指DNA结合结构域和1个FokI核酶催化结构域组成。3个锌指识别特异的9bp靶DNA序列。FokI核酶催化结构域必须形成二聚体才能发挥作用，因此两个锌指核酶各结合靶DNA 9bp结合位点（半个位点，half site），二聚体之间必须有一段长度各异的双链DNA的间隔序列（spacer），核酶催化结构域将间隔序列从5' → 3' 方向切断，造成5' 突出的粘性末端，从而使靶DNA特定定位点的碱基缺失或突变。

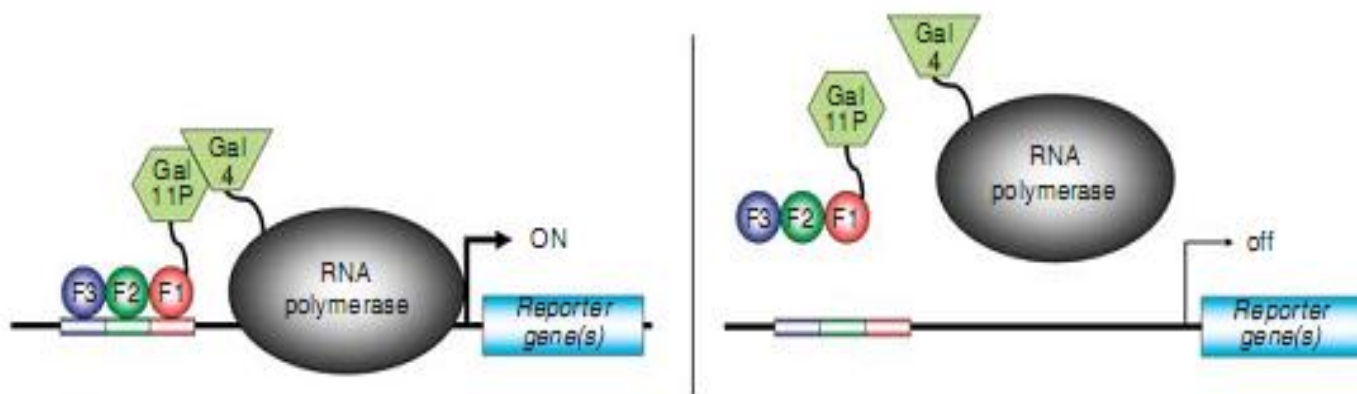


# 锌指库的筛选

Randomly recombined  
library of Gal11P-  
zinc-finger arrays



C



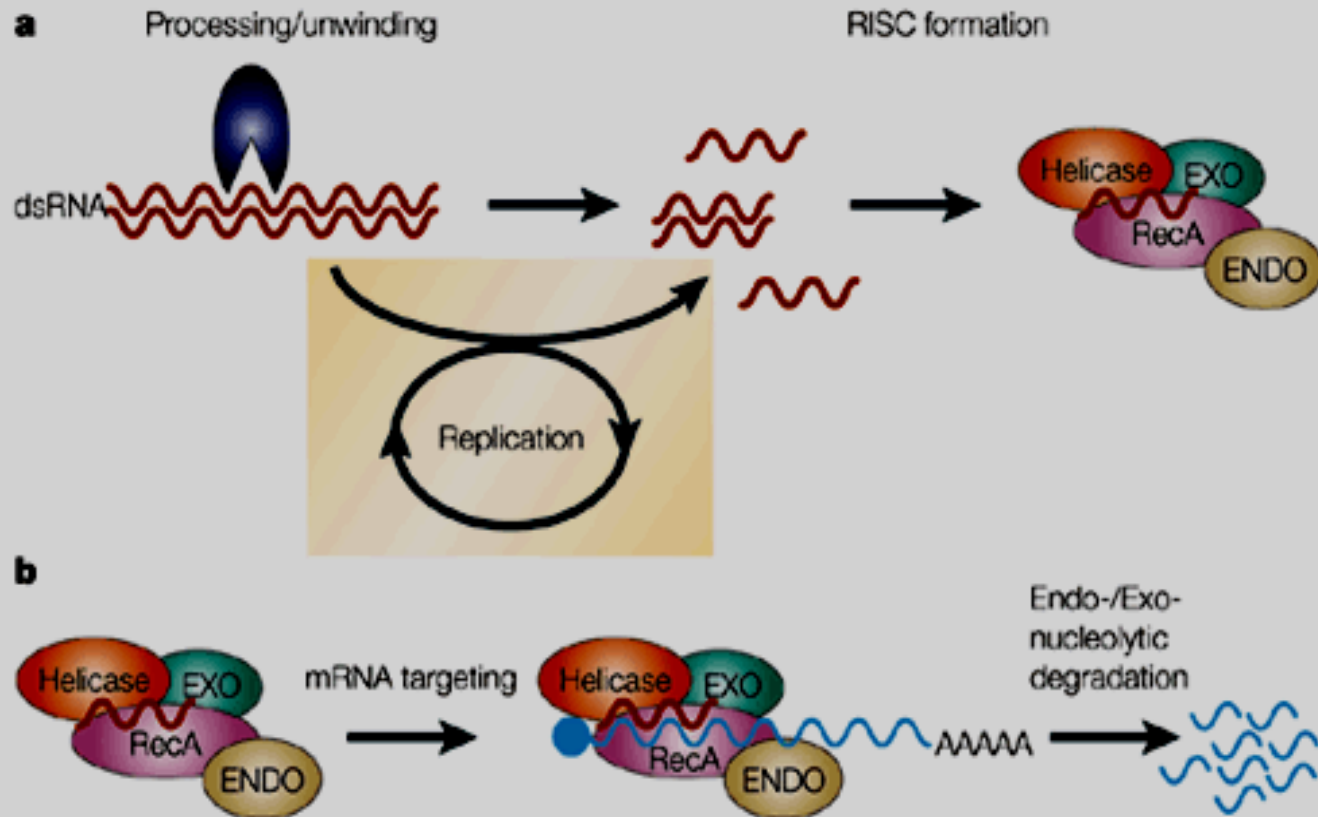
运用细菌双杂交技术筛选特异序列对应的锌指库



## 二、RNA干扰技术

- RNA干扰（RNA interference, RNAi）是指通过反义RNA与正义RNA形成的双链RNA特异性地抑制靶基因的转录后表达的现象，它通过人为地引入与内源靶基因具有同源序列的双链RNA（dsRNA），从而诱导内源靶基因的mRNA降解，达到阻止基因表达的目的。

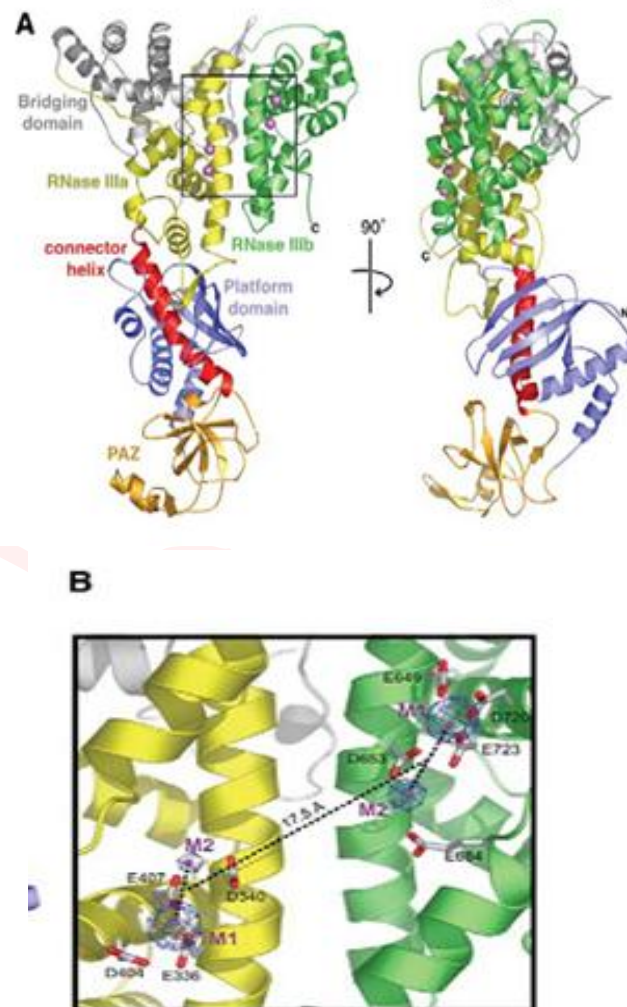
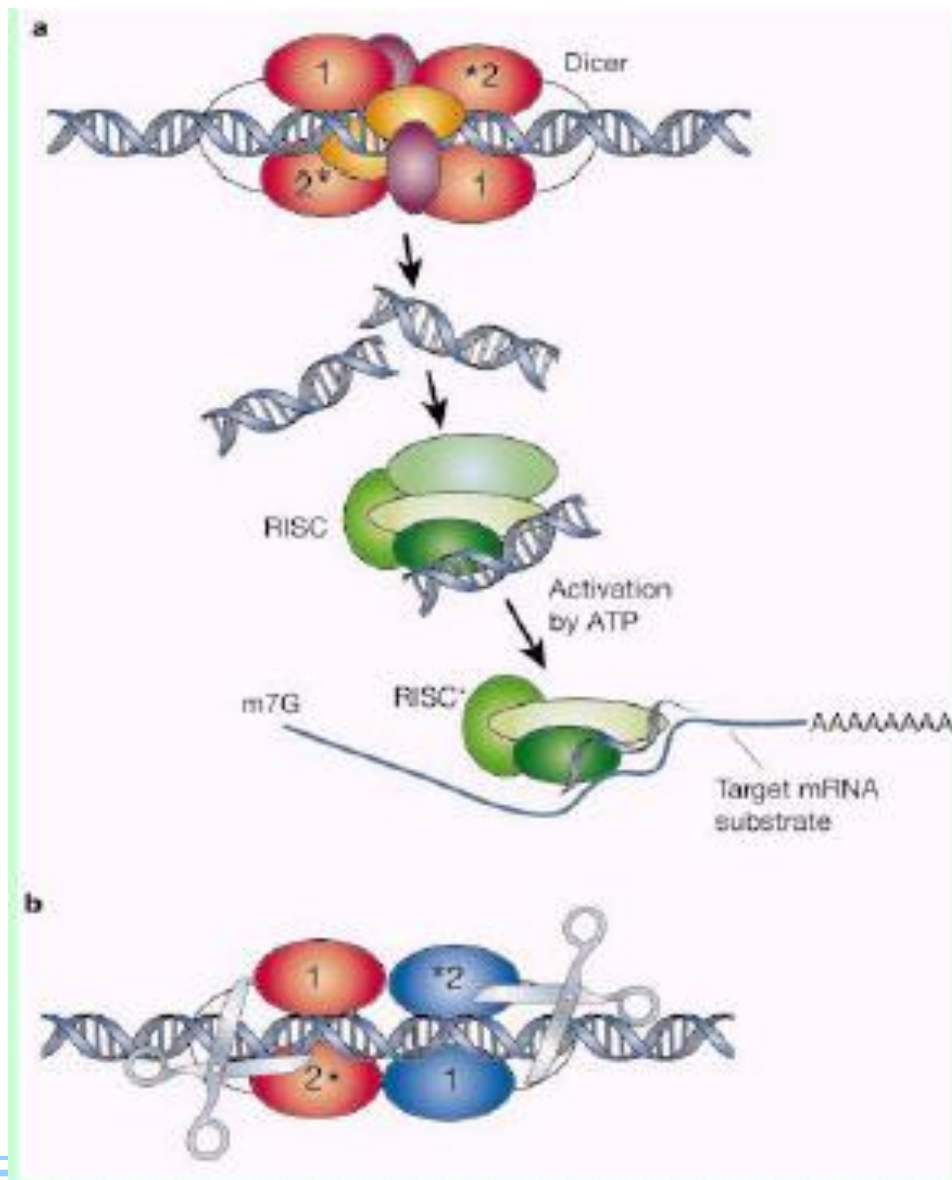
# 1、RNAi 机制



Nature Reviews | Genetics



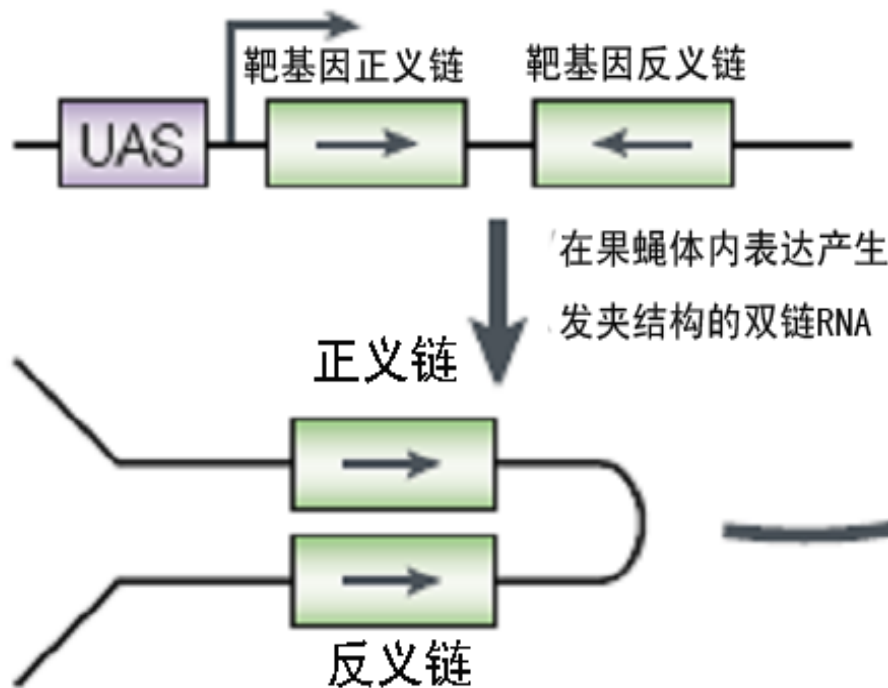
# Dicer酶的晶体结构



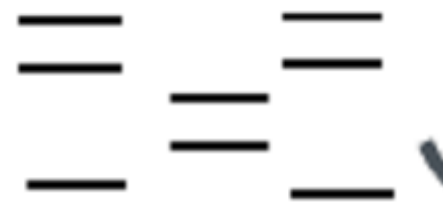


## 2、果蝇可遗传的RNA干扰系统

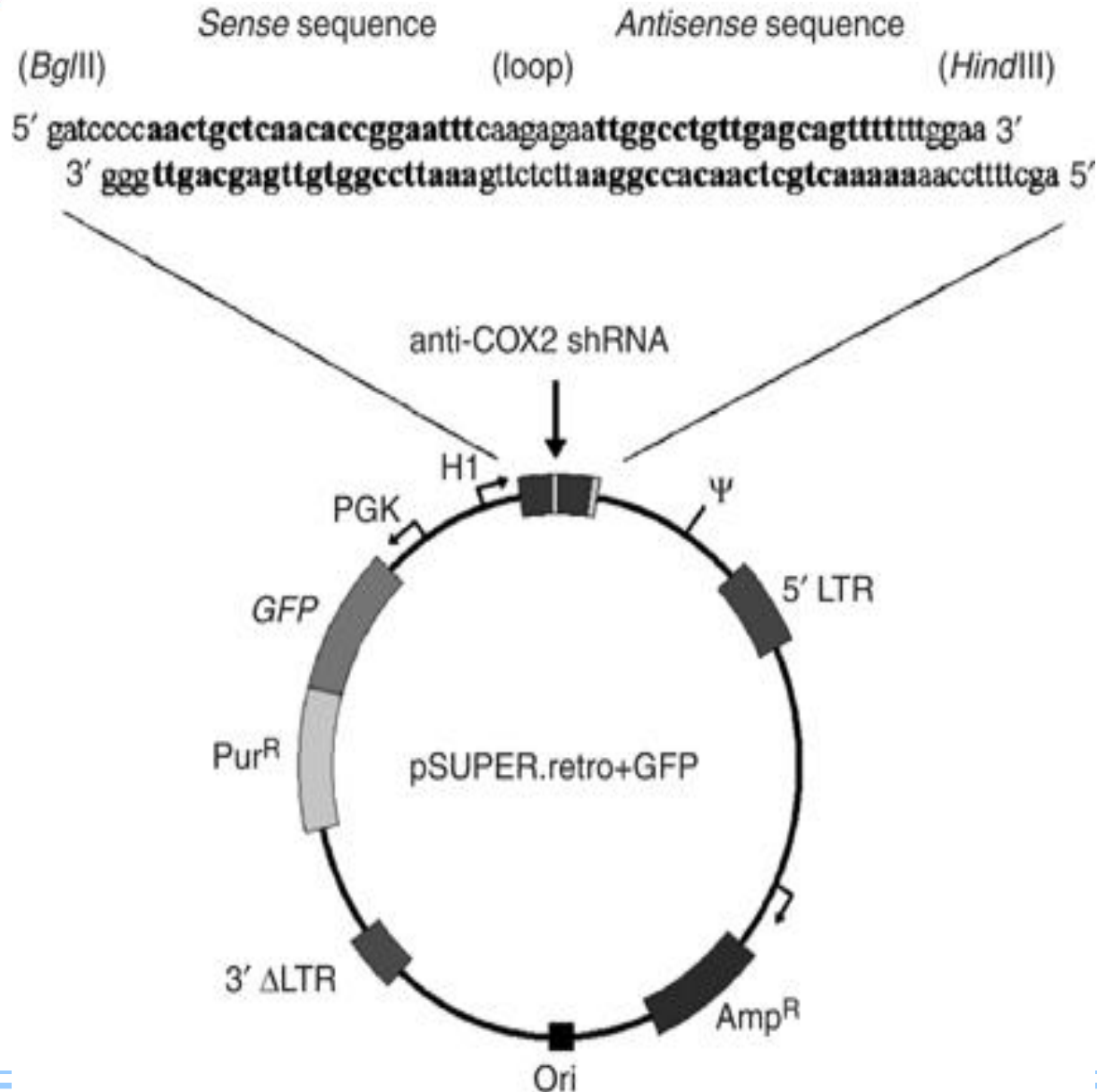
pUAST载体



双链RNA在体内被加工成21-25nt的siRNA



### 3、哺乳动物siRNA载体

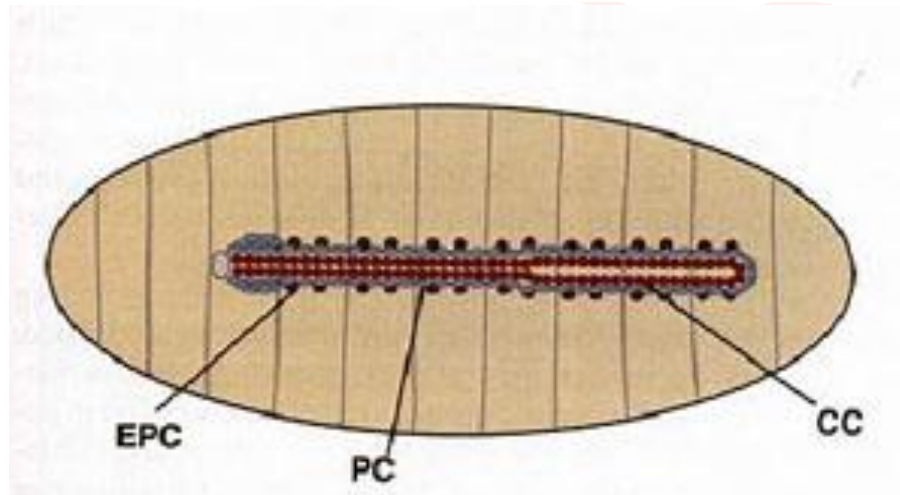
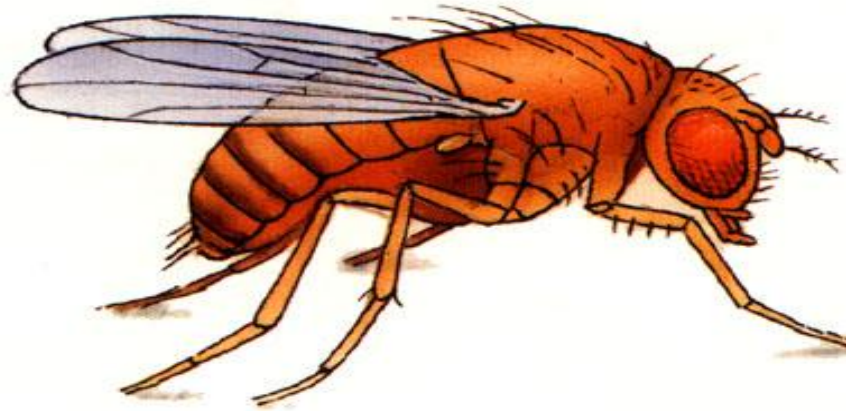




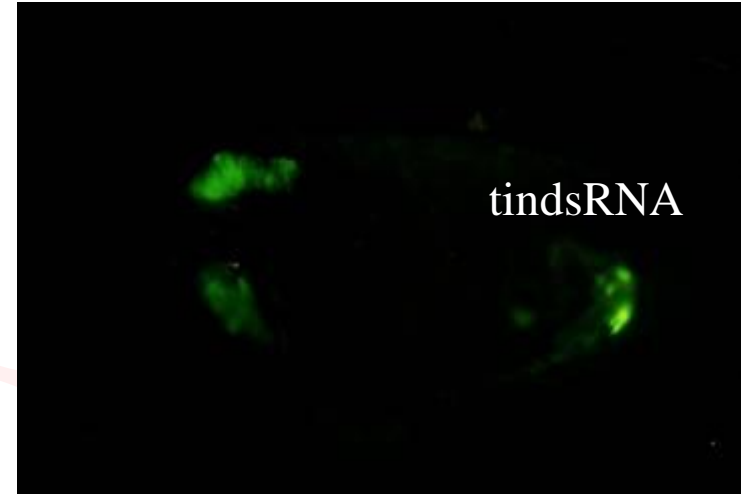
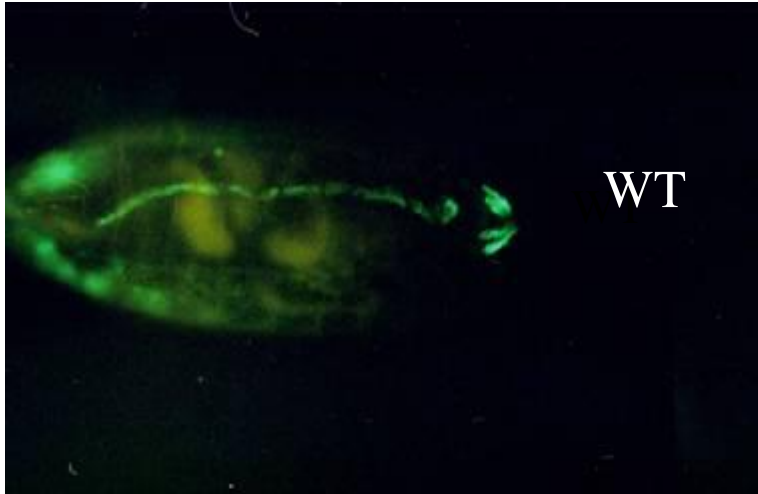
## 4、RNAi 的应用

- 基因功能鉴定与功能基因组学
- 基因调控机制的研究
- 药物开发与基因治疗

# *Drosophila* heart



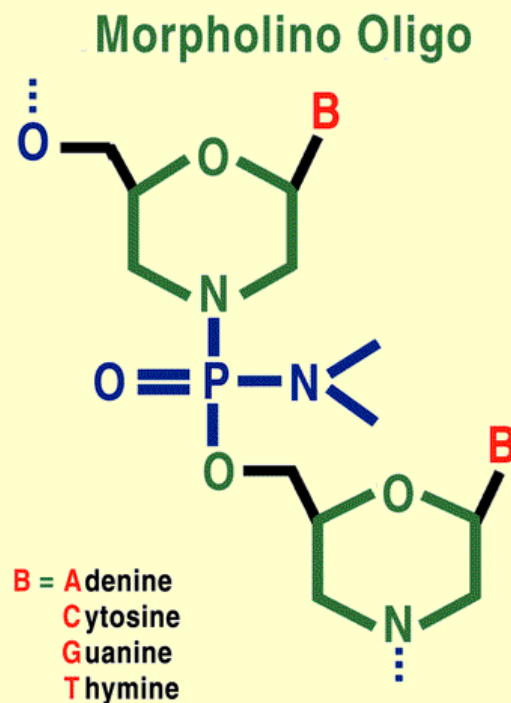
# *tin* dsRNA GFP heart



**Drosophila normal GFP heart is tubular structure, lies beneath the central dorsal epidermis, but in *tin* dsRNA injected embryos, no GFP heart tube is seen. Embryos are at stage 16, dorsal is up, anterior is left.**

## 三、Morpholino干扰技术

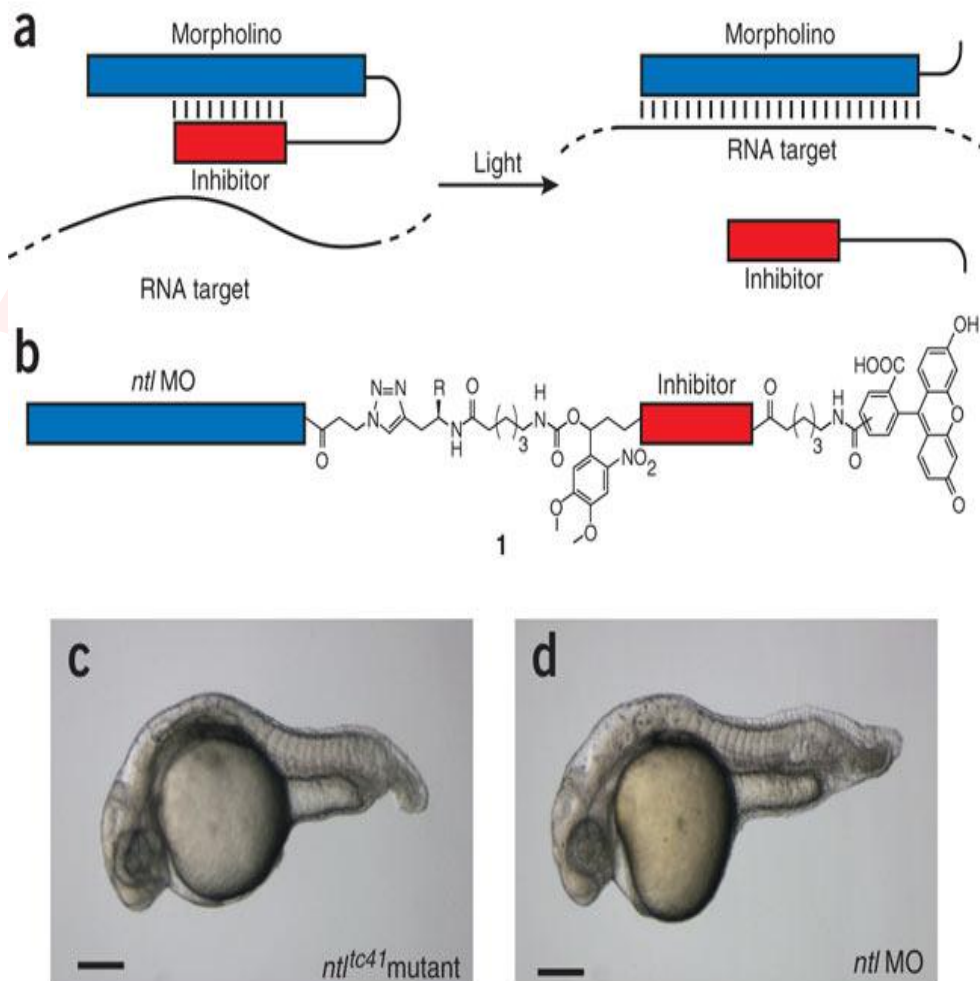
- Morpholino oligos是指**吗啉代寡核苷酸**，是用吗啉基对天然核苷酸结构重新设计获得的合成分子。其中，吗啉代替寡聚核苷酸分子中的核糖，用磷酸二胺连接取代寡聚核苷酸磷酸二酯键的连接，侧链碱基则是与寡核苷酸序列相同，由A、T、C、G组成的特异序列。





# 1、Morpholino干扰原理

- Morpholino干扰原理与反义核酸技术相同，通过与靶基因mRNA的同源序列互补而结合在mRNA分子上，从而阻碍其他分子和蛋白质与特定mRNA核酸序列的结合，最终使靶基因mRNA不能翻译成蛋白质。



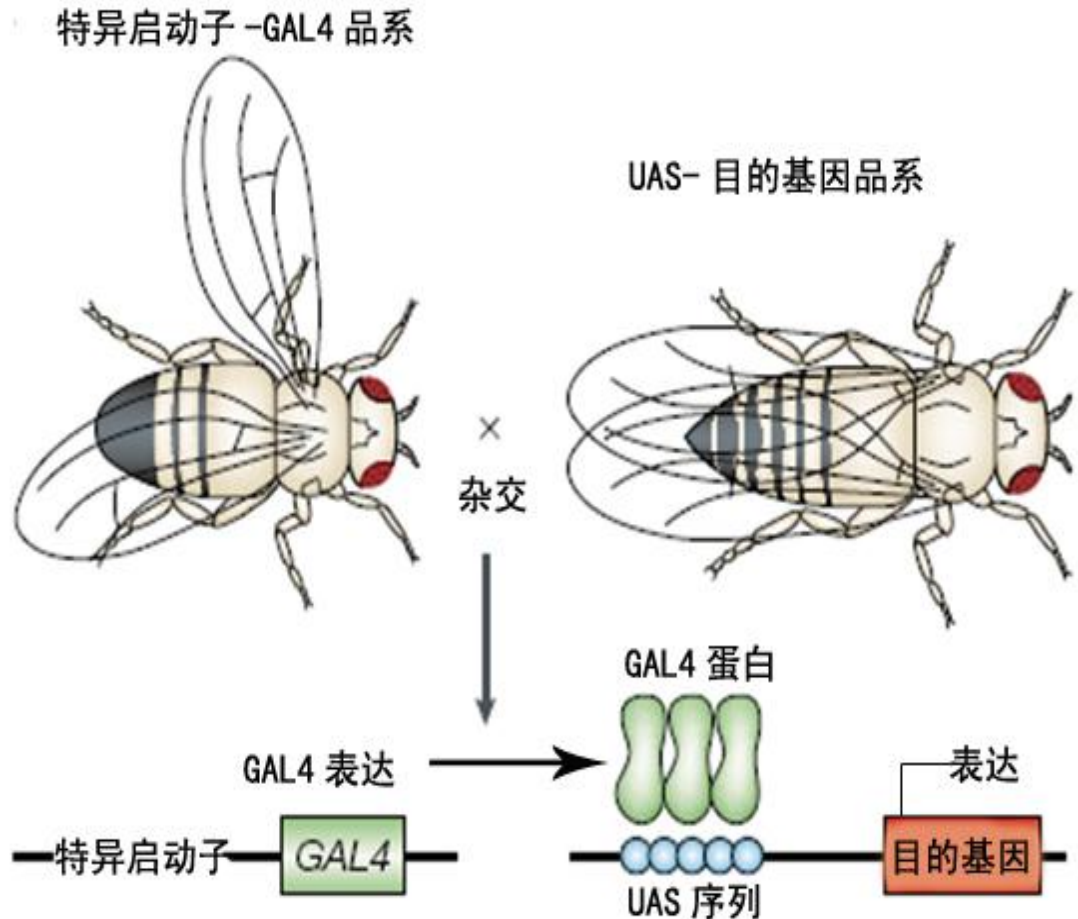


## 第四节、基因过表达与异位表达技术

- GAL4-UAS系统的构建
- GAL4/UAS定时开启系统

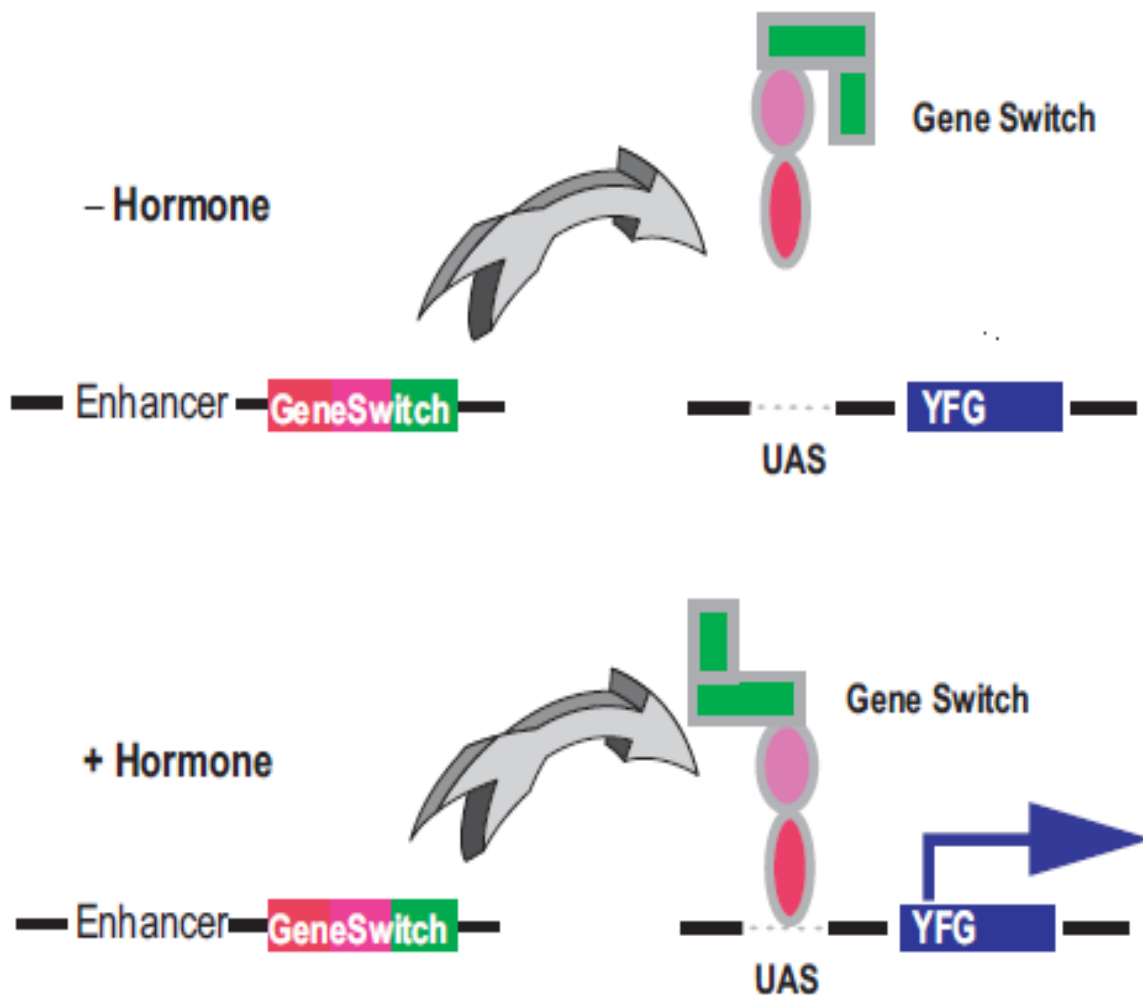
# 一、GAL4-UAS过表达系统

- GAL4/UAS系统由GAL4和UAS两组转基因品系构成。GAL4品系是将GAL4基因与组织特异性的启动子相连。两个单独的品系中，靶基因不会表达。只有将两个品系杂交后，杂交后代既含组织特异性表达的GAL4因子，又含与UAS序列相连接的靶基因，这时，GAL4蛋白与UAS序列结合，驱动靶基因转录表达。



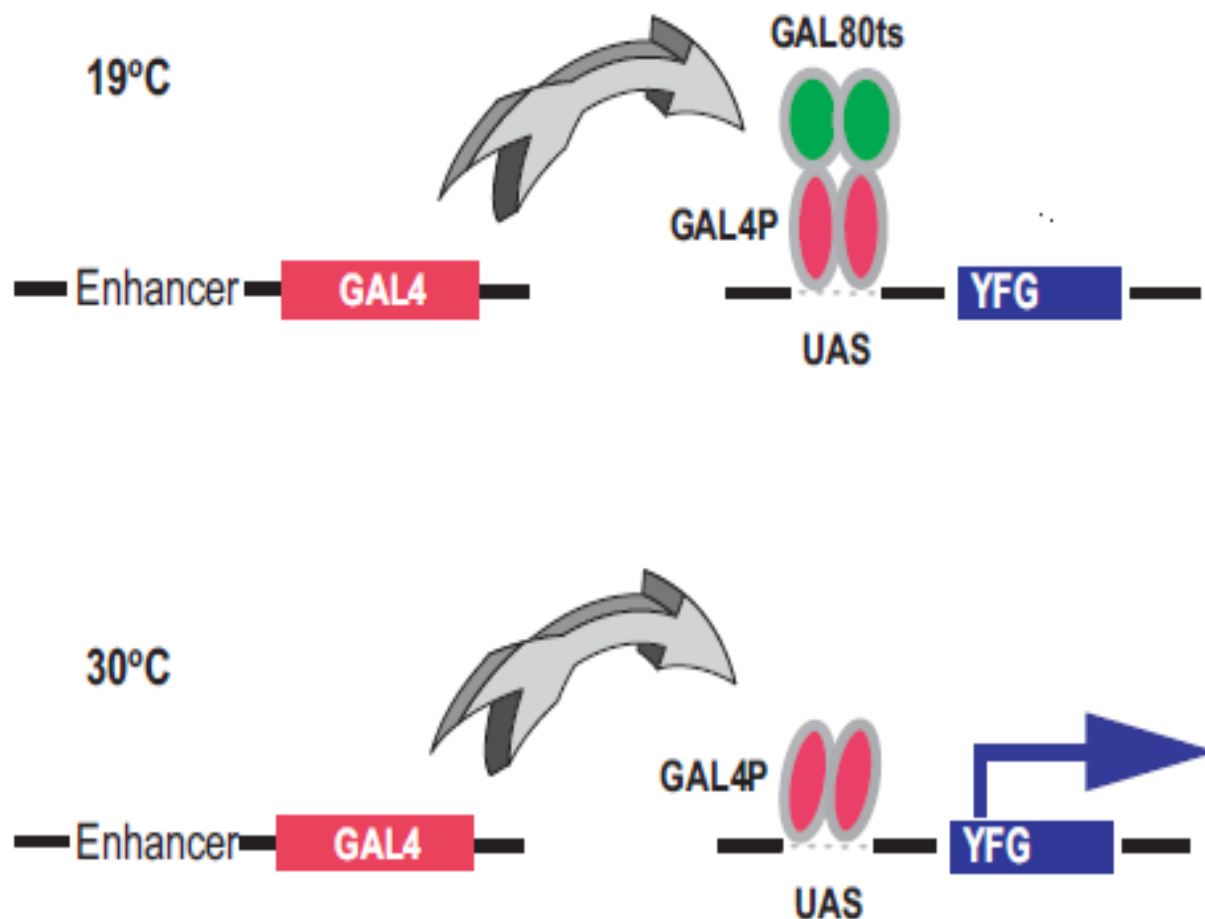
## 二、 GAL4-UAS定时开启系统

### 1、激素诱导的GAL4/UAS定时开启系统



本系统中，GAL4蛋白经过了修饰，其UAS结合结构域与一个突变的激素受体的配体结合结构域相融合。当没有激素时，激素受体与GAL4融合蛋白的构象阻碍了GAL4与UAS序列结合，靶基因YFG不能表达。当加激素诱导时，激素受体与激素结合，使GAL4蛋白的构象发生改变，暴露了DNA结合结构域，从而可以与UAS序列结合，诱导靶基因表达。

## 2、Gal80温敏蛋白诱导的 GAL4/UAS定时开启系统



Gal80温敏蛋白诱导的GAL4/UAS定时开启系统。GAL80是GAL基因家族的成员，能够与GAL4蛋白结合，抑制其激活结构域的活性。GAL80有一个温敏突变体，在19°C时抑制GAL4的活性最强，但温度超过30°C就解体，失去抑制活性。



### 3、GAL4/UAS定时开启系统的优点

- 实现靶基因的定时定点表达。不仅可以研究靶基因在某一个特定的组织中的功能，还可以研究该基因在特定的组织中某一个特定的时期或者不同时期的功能。
- 与其他功能研究技术结合，例如与RNA干扰技术及基因敲除技术结合，就可以在特定的组织和特定的时期让一个基因失活，从而也能确定基因在特殊时期的功能。如建立Cre酶转基因鼠的诱导系统，RNA干扰的可诱导系统等等。





## 第五节、基因的相互作用研究技术

- 凝胶迁移率阻滞技术
- 染色质免疫沉淀技术
- 酵母双杂交技术
- 免疫共沉淀技术



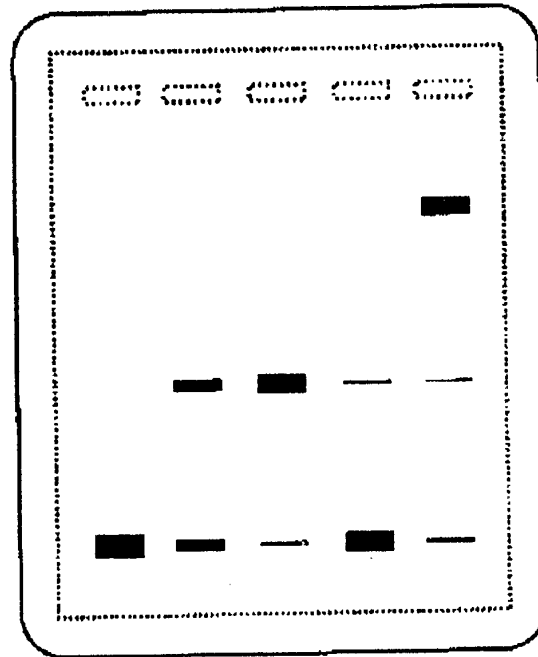
## 一、凝胶迁移率阻滞技术

- 凝胶迁移率阻滞实验（Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA）是将待研究的DNA序列和待研究的蛋白质置于非变性的聚丙烯酰胺凝胶中电泳，其中DNA序列分为两组，一组用 $^{32}\text{P}$ 同位素标记，称为探针或热探针；另一组不加标记，称为冷探针。电泳时，DNA序列产生一条带（自由探针带）。而结合了蛋白质的DNA因为跑的慢，会在DNA探针带的后面产生另一条移动慢的带（**DNA在凝胶中的迁移率受到阻滞**）。由于DNA序列带有同位素标记，可通过放射自显影显示这两条带的位置。

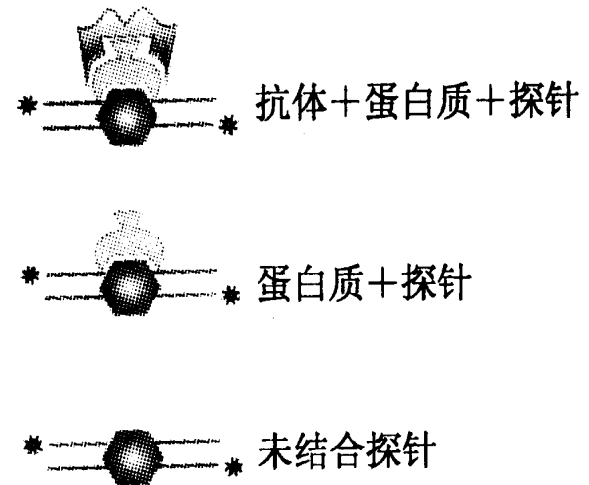
# 1、凝胶迁移率阻滞技术的原理

A

特异抗体	—	—	—	—	1×
未标记的寡核苷酸	—	—	—	10×	—
蛋白质	—	1×	10×	1×	10×
探针	1×	1×	1×	1×	1×



放射自显影



## 2、凝胶迁移率阻滞实验结果

EMSA的应用：

1. 体外研究特定的DNA序列与特定的蛋白质之间的相互作用
2. 确定DNA上的转录因子结合位点
3. 启动子分析
4. RNA与RNA结合蛋白的相互作用

B 1 2 3 4 5



← 抗体+蛋白质+探针

← 蛋白质+探针

1. 探针

2. 探针+蛋白质

3. 探针+蛋白质+冷探针

4. 探针+2倍蛋白质

5. 探针+蛋白质+抗体

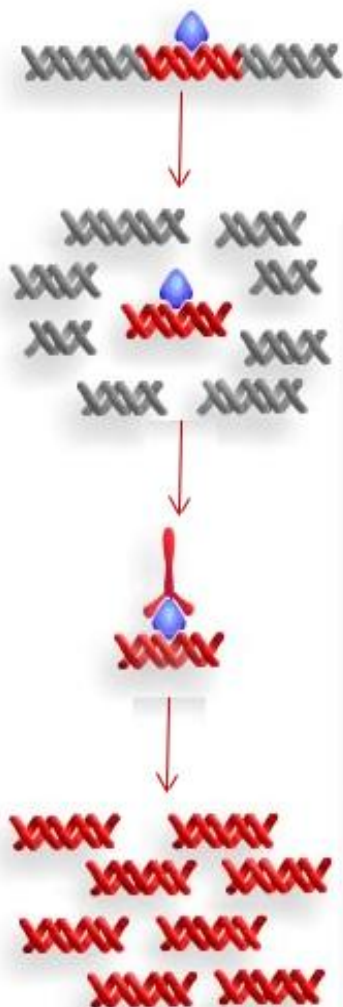
← 未结合蛋白质的自由探针



## 二、染色质免疫沉淀技术

- 染色质免疫沉淀技术（chromatin immunoprecipitation assay, CHIP）是另一种在体内研究DNA序列与蛋白质相互作用的方法。
- CHIP的基本原理是在活细胞状态下固定体内蛋白质—DNA相互作用的复合物，然后将染色质DNA提取出来并将其用超声波随机切断为一定长度的染色质小片段，然后通过免疫学方法用某种蛋白质特异的抗体沉淀此复合体，特异性地富集目的蛋白结合的DNA片段，通过对目的DNA片断的分离、纯化与检测，获得DNA序列信息，从而确定与特定蛋白质相互作用的DNA序列

# 1、染色质免疫沉淀技术的原理



1. 用甲醛使蛋白质与 DNA 交联

2. 用超声波随机打断为一定长度范围内的染色质小片段

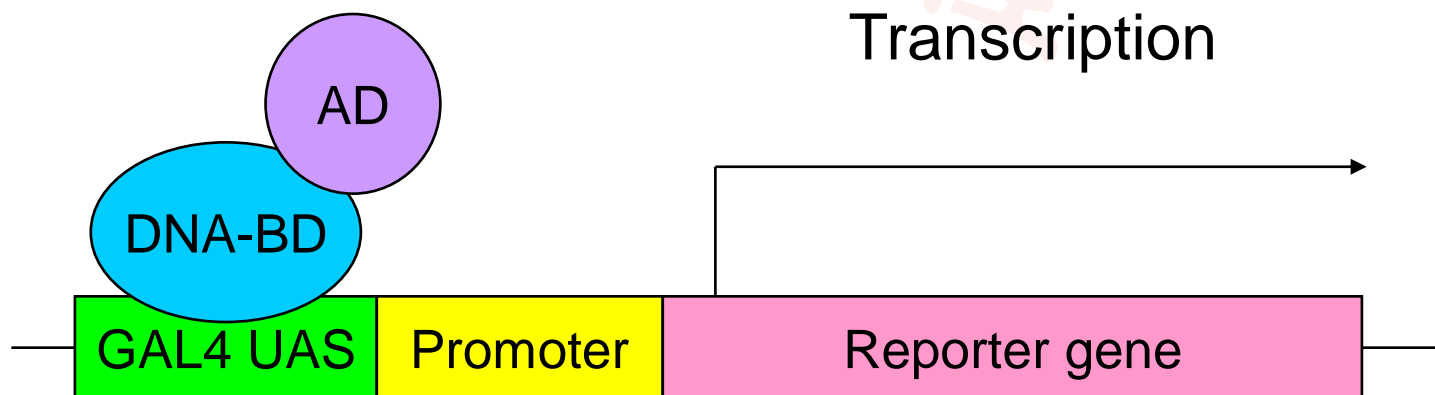
3. 抗体与蛋白质特异性地结合，  
通过免疫学方法沉淀此复合体

4. 特异性地富集目的蛋白结合的 DNA 片段



### 三、酵母双杂交技术

- 酵母半乳糖苷酶基因的转录激活因子GAL4, 其N端1-147位氨基酸区段是**DNA结合结构域 (BD)**, 其C端768-881位氨基酸区域是**DNA激活结构域 (AD)**.
- DNA-BD能够识别位于GAL4效应基因上游的特定区段并与之结合, 称为UAS (上游激活序列), 而DNA-AD则通过与其他转录因子作用, 激活UAS下游基因的转录.

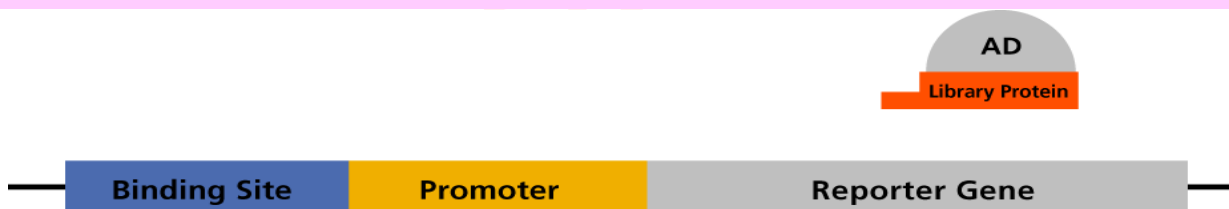


# 1、酵母双杂交技术的原理

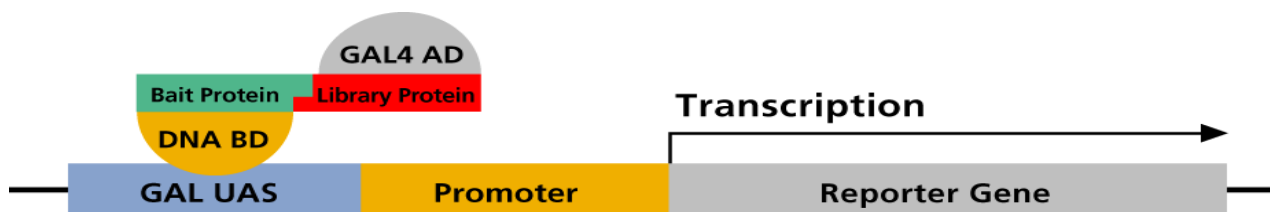
**A** 单独诱饵蛋白及BD与UAS结合, 不能使报告基因表达



**B** 单独使待测蛋白及AD与UAS 结合, 也不能使报告基因表达



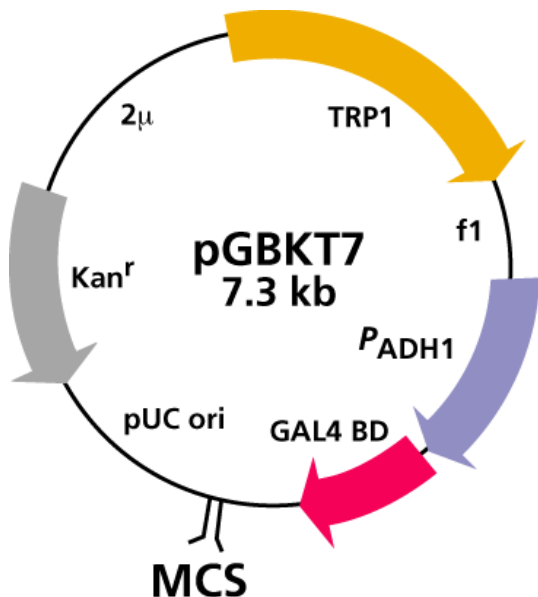
**C** 只有待测蛋白与诱饵蛋白相互作用, 才能使BD与UAS结合, 促使报告基因表达.



## 2、酵母双杂交系统的两个载体

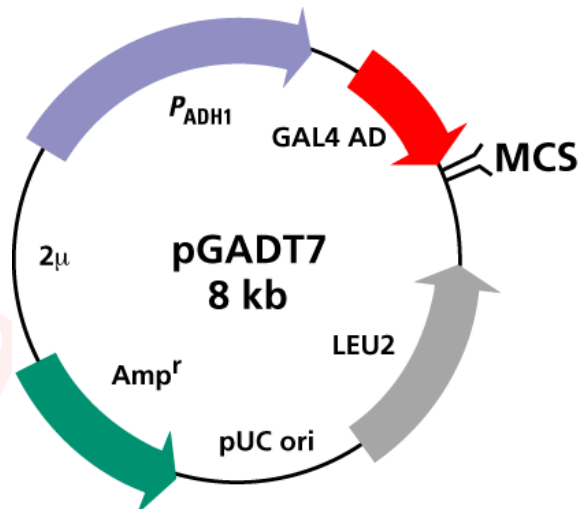
BD载体

饵蛋白载体

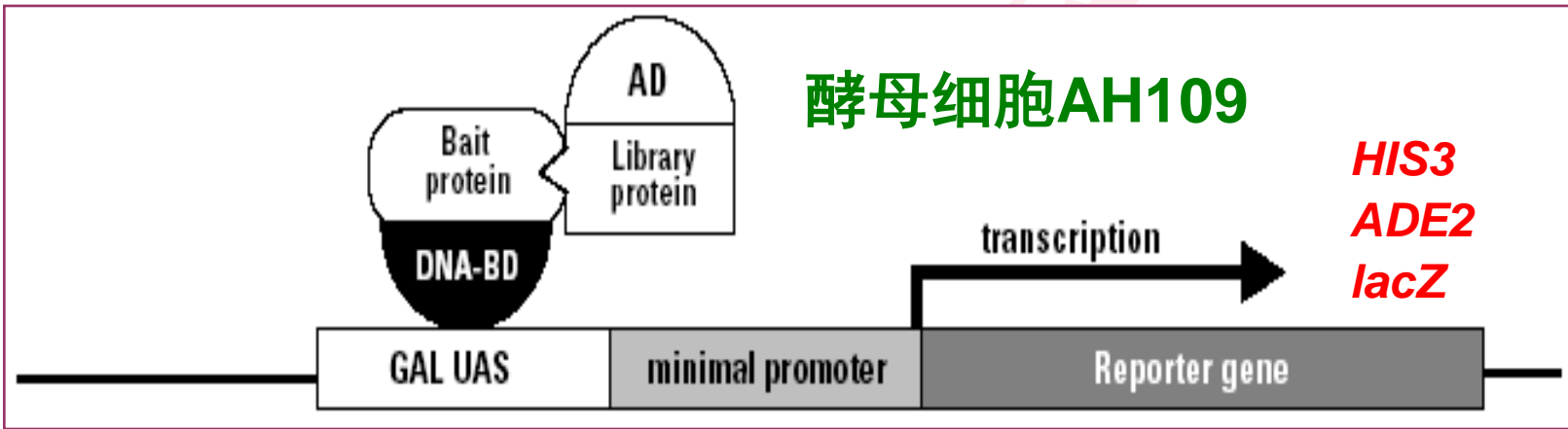


AD载体

靶蛋白载体



酵母细胞AH109





### 3、酵母双杂交技术的应用

- 确定待测靶蛋白与特定的已知饵蛋白的相互作用
- 求证疑似的相互作用蛋白
- 确定蛋白质相互作用结构域
- 筛文库发现新的相互作用蛋白

缺点：1. 只能分析核内蛋白质相互作用  
2. 存在自激活现象，假阳性。

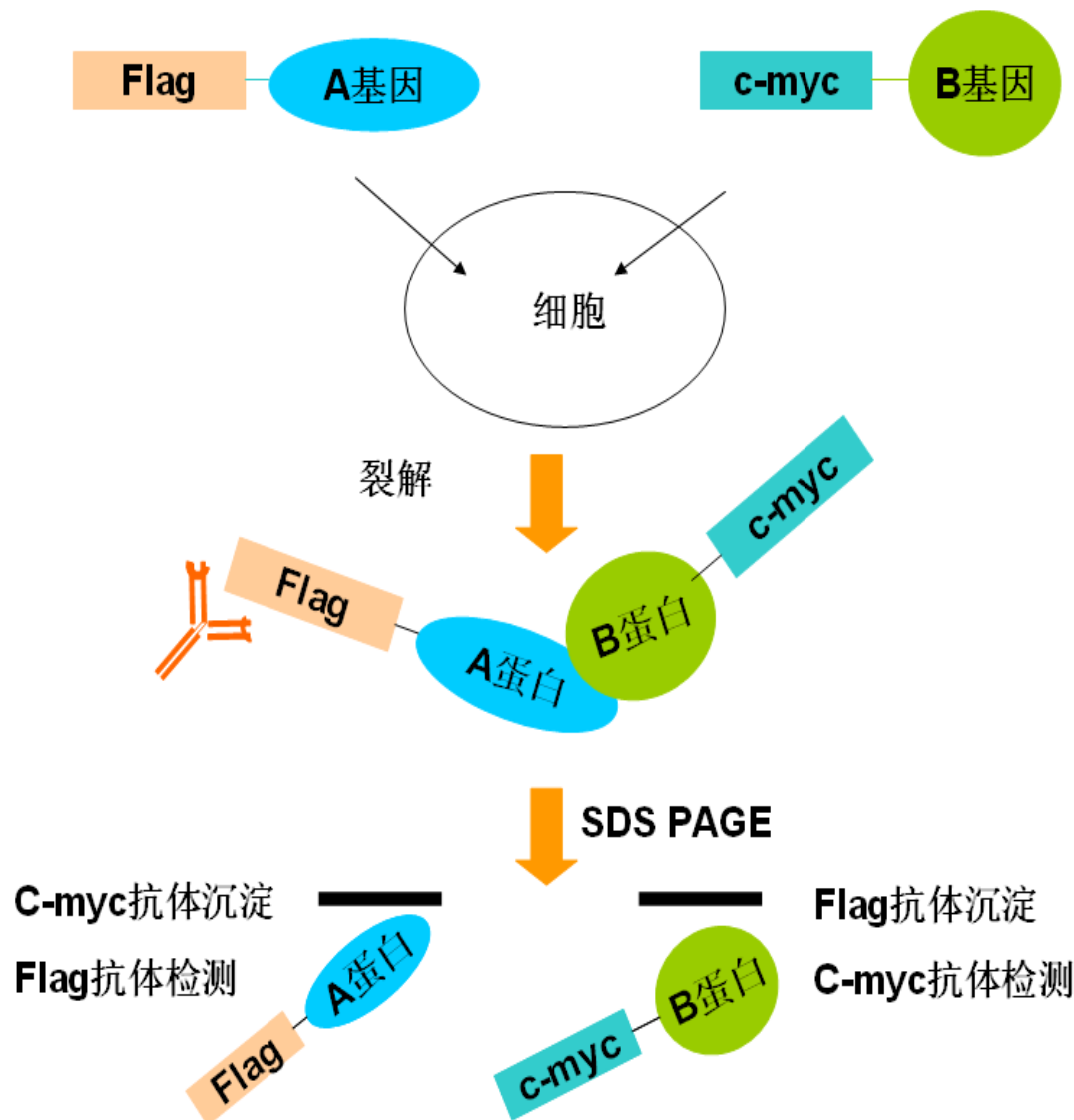


## 四、免疫共沉淀技术

- 免疫共沉淀 (Co-Immunoprecipitation, CO-IP) 是以抗体和抗原之间的专一性反应为基础研究两种蛋白质在完整细胞内生理活性状态下相互作用的有效方法。
- CO-IP的基本原理：完整细胞内存在许多蛋白质-蛋白质间的相互作用，如果用蛋白质A的抗体免疫沉淀A蛋白，那么在体内与A蛋白结合的B蛋白也能被沉淀下来。通过SDS-PAGE胶时，用B蛋白的特异标记抗体检测，应该能够检测到A和B两种蛋白结合的带。同理，如果用B蛋白的抗体去免疫沉淀B蛋白质，那么与B蛋白结合的A蛋白也被沉淀下来，用A蛋白标记的抗体也可以显示这一条蛋白复合物的带。

# 1、免疫共沉淀的原理

分别构建Flag-A融合表达载体和c-myc-B融合表达载体共转染细胞系，用Flag抗体去沉淀A蛋白，如果B蛋白与A蛋白相互作用，结合在一起，那么B蛋白也被沉淀下来，跑SDS-PAGE后，用c-myc的抗体能够检测到这个复合物的带。同理，用c-myc抗体去沉淀B蛋白，跑PAGE胶后，用Flag抗体也能检测到复合物的带。





## 2、免疫共沉淀的结果

IP: 沉淀抗体

IB: 检测抗体

应用:

1. 测定两种目标蛋白是否在体内相互作用
2. 确定一种特定蛋白的新的作用搭档。

