



第 六 章

分子生物学基本研究法

(下) 基因功能研究技术



6.1 基因表达研究技术

6.1.1 基因表达系列分析技术（**Serial Analysis of Gene Expression, SAGE**）

是以**DNA**序列测定为基础分析全基因组表达模式的技术。任何长度超过**9-10**个碱基的核苷酸片段都可能代表一种特异性的转录产物，因此，根据某个序列占总标签数的比例可分析所对应基因的表达频率。

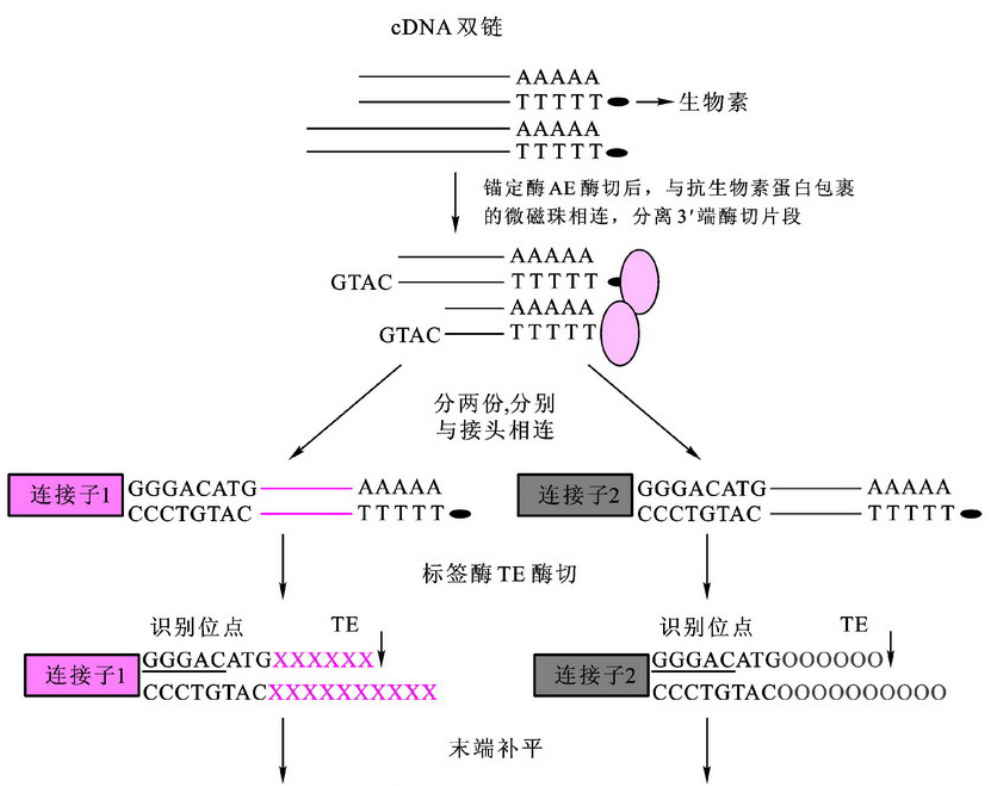
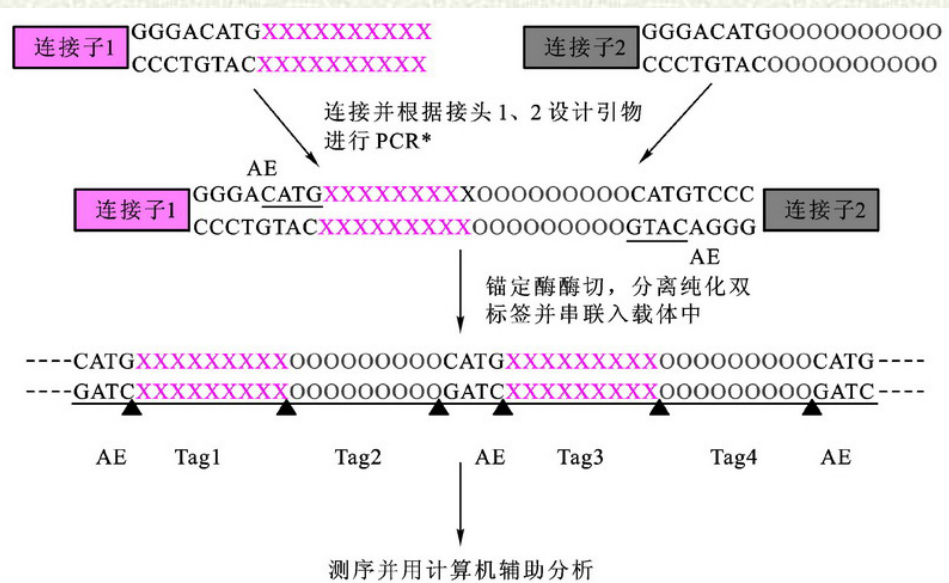


图6-1 常规SAGE方法 (short SAGE) 基本流程





LongSAGE技术

标签来自转录物3'端一段**21bp**的序列，可以进行快速分析并与基因组序列数据相匹配。其原理与**ShortSAGE**方法类似，只是用了不同的**IIS**类标签酶（**MmeI**），并将程序做了相应修改。



6. 1. 2 RNA的选择性剪接技术

RNA的选择性剪接是指用不同的剪接方式从一个**mRNA**前体产生不同的**mRNA**剪接异构体的过程。可分为：平衡剪切、**5'**选择性剪切、**3'**选择性剪切、外显子遗漏型剪切及相互排斥性剪切。常用**RT-PCR**法研究某个基因是否存在选择性剪切。

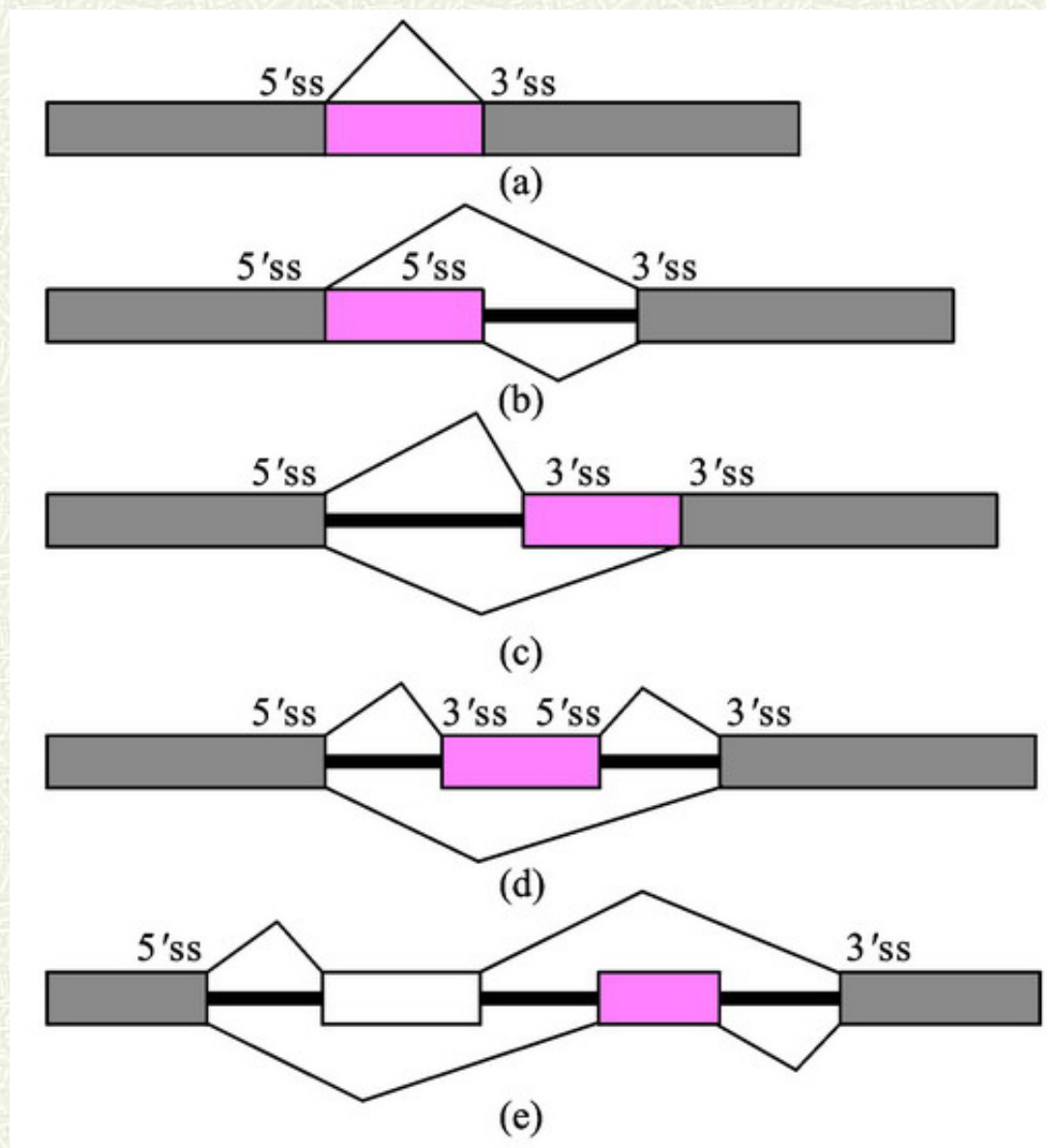


图6-2 选择性剪切的不同类型

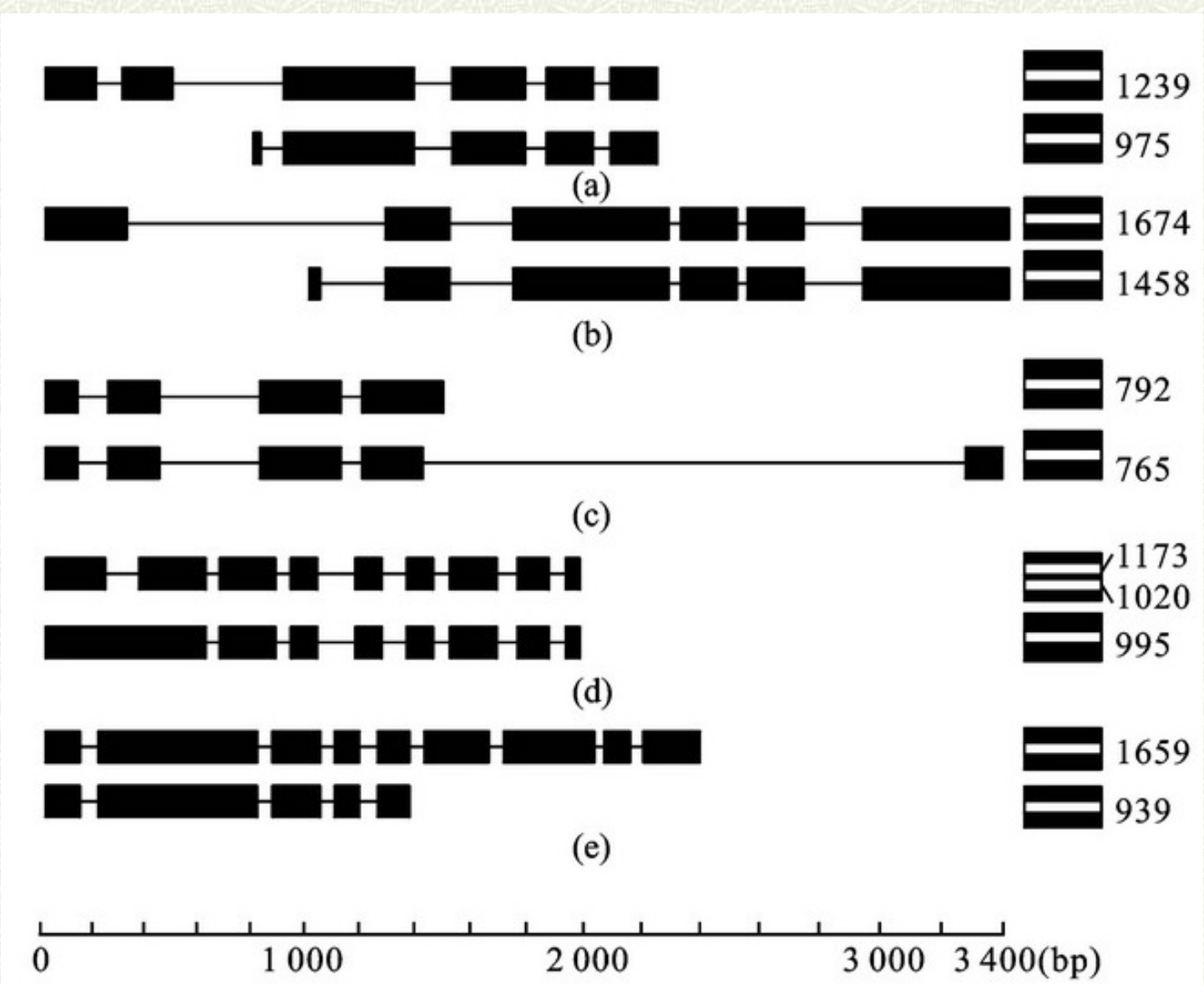


图6-3 RT-PCR检测5个拟南芥转录调控因子基因的选择性剪切

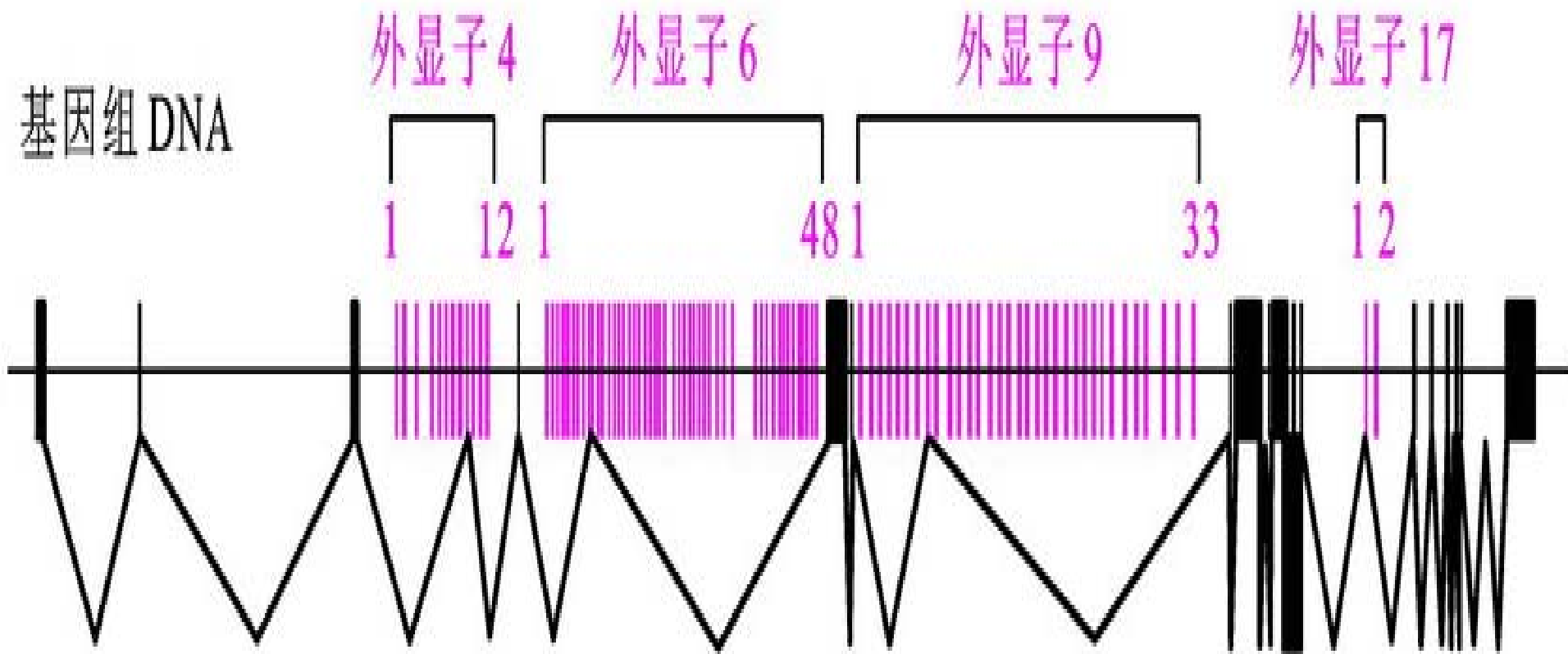


图6-4 果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的 *Dscam* 基因可以通过可变剪接产生38000多种可能的mRNA异构体

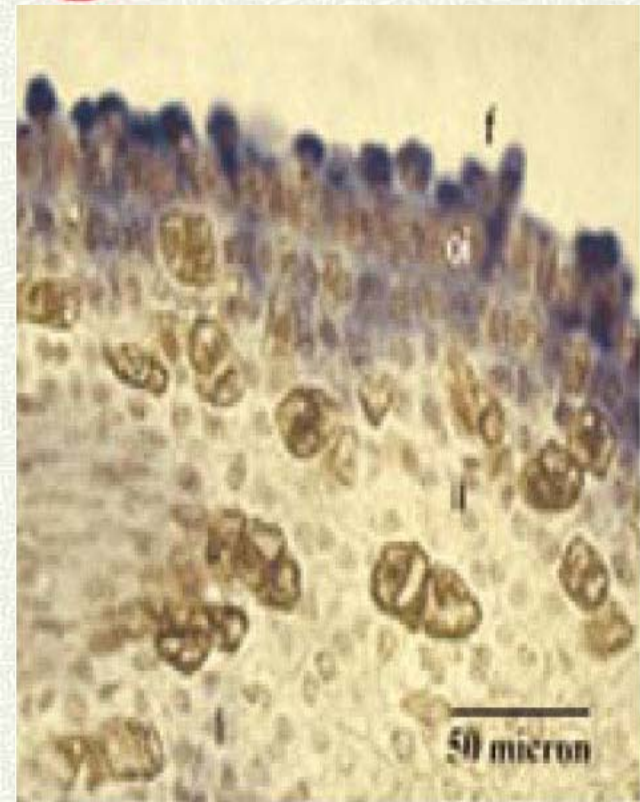


6.1.3 原位杂交技术

原位杂交(**In Situ Hybridization, ISH**)是用标记的核酸探针,经放射自显影或非放射检测体系,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的一种手段,分为**RNA**和染色体原位杂交两大类。



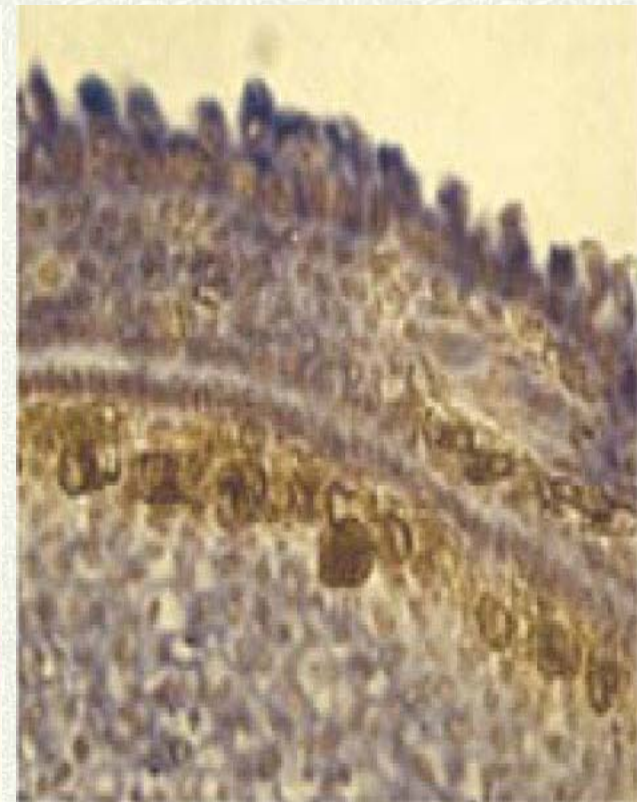
RNA原位杂交用放射性或非放射性（如地高辛、生物素等）标记的特异性探针与被固定的组织切片反应，若细胞中存在与探针互补的**mRNA**分子，两者杂交产生双链**RNA**，可通过放射性标记或经酶促免疫显色，对该基因的表达产物做出定性定量分析。



mRNA的互补链，杂交信号集中于纤维细胞中。



负对照，mRNA的同义链，无杂交信号。



正对照，UBQ10杂交信号遍布于整个胚珠。



荧光原位杂交(**fluorescence in situ hybridization, FISH**).

首先对寡核苷酸探针做特殊的修饰和标记，然后用原位杂交法与靶染色体或**DNA**上特定的序列结合，再通过与荧光素分子相耦联的单克隆抗体来确定该**DNA**序列在染色体上的位置。



6. 1. 4 基因定点突变(site-directed mutagenesis).

通过改变基因特定位点核苷酸序列来改变所编码的氨基酸序列，用于研究某个（些）氨基酸残基对蛋白质的结构、催化活性以及结合配体能力的影响，也可用于改造**DNA**调控元件特征序列、修饰表达载体、引入新的酶切位点等。

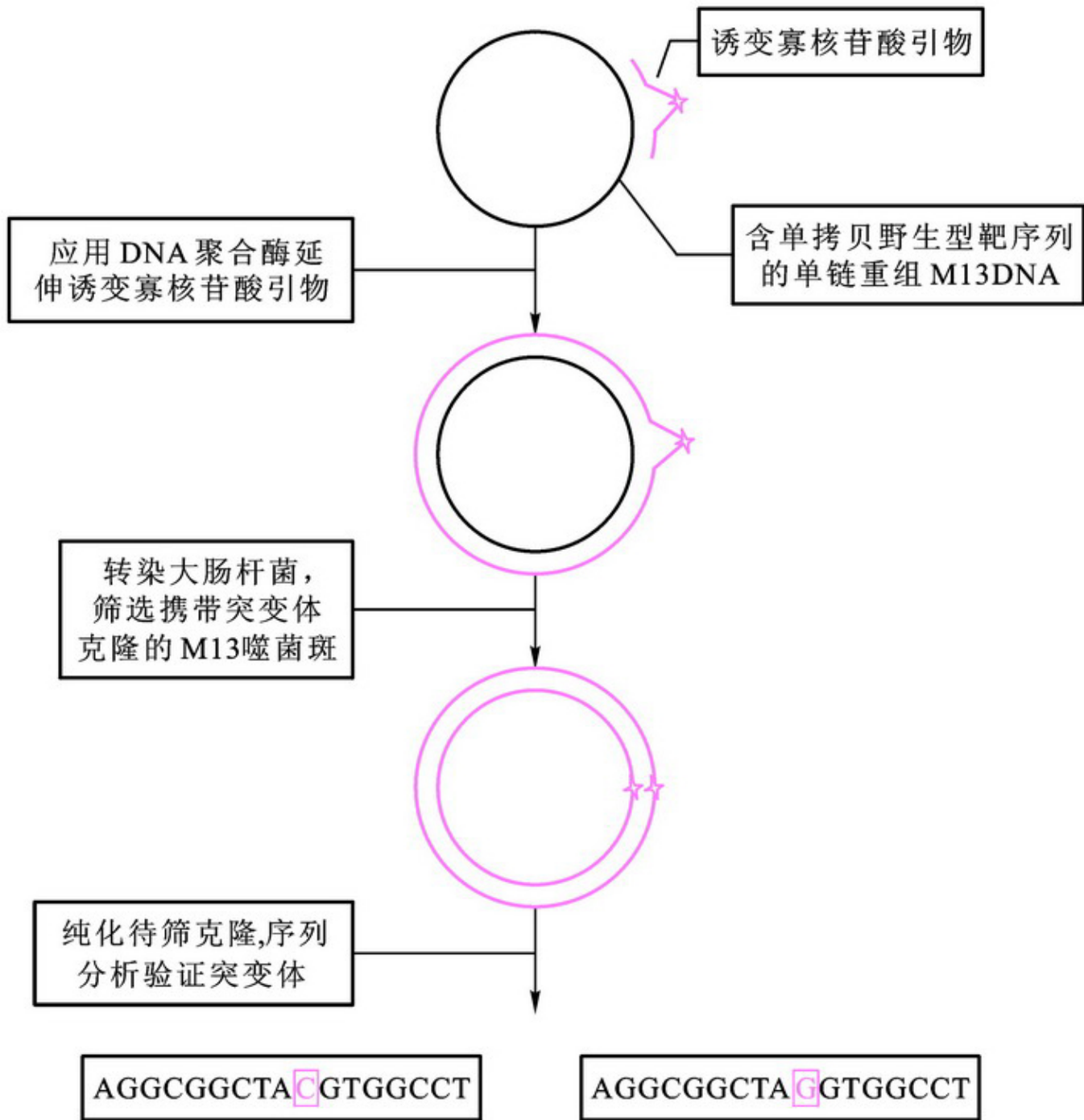


图6-6 寡核苷酸介导的 DNA 突变技术



目前，主要采用两种**PCR**方法，重叠延伸技术和大引物诱变法，在基因序列中进行定点突变。

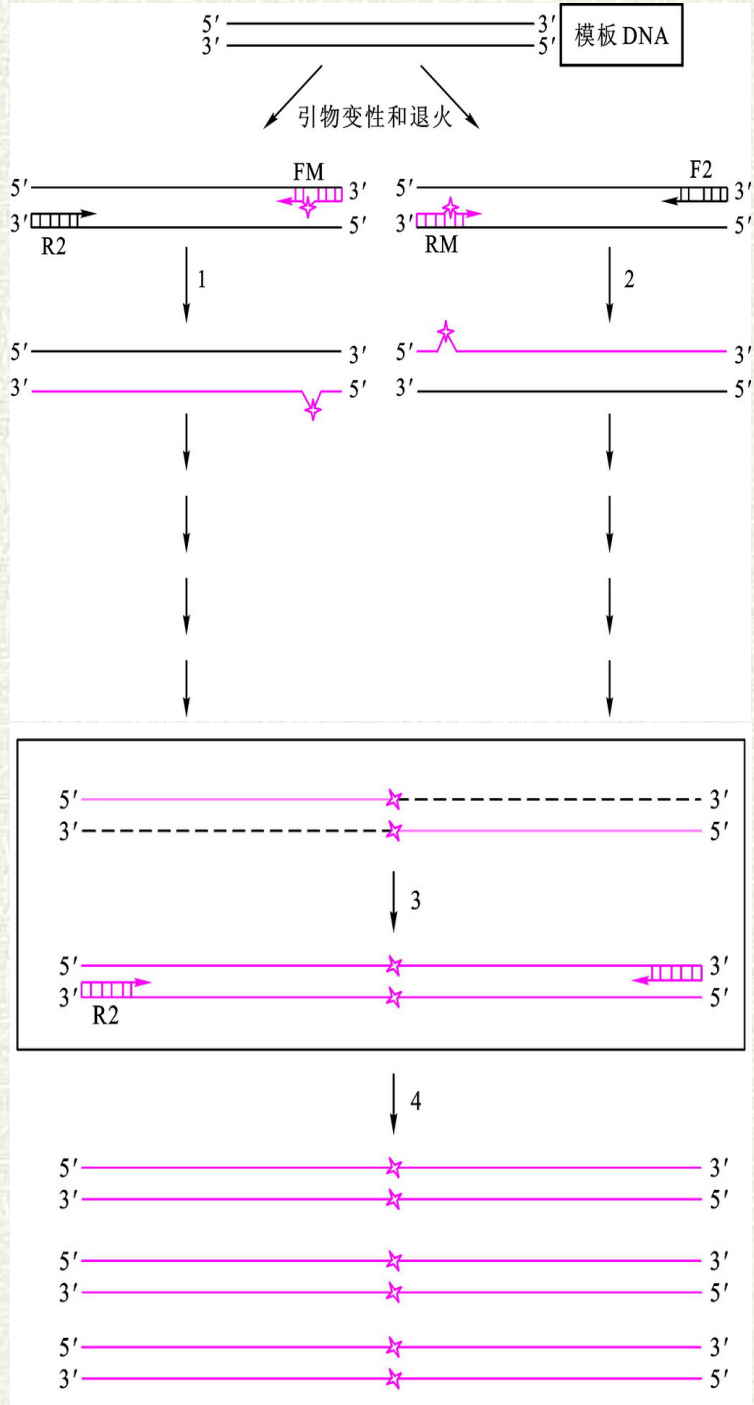


图6-7 重叠延伸介
导的定点诱变

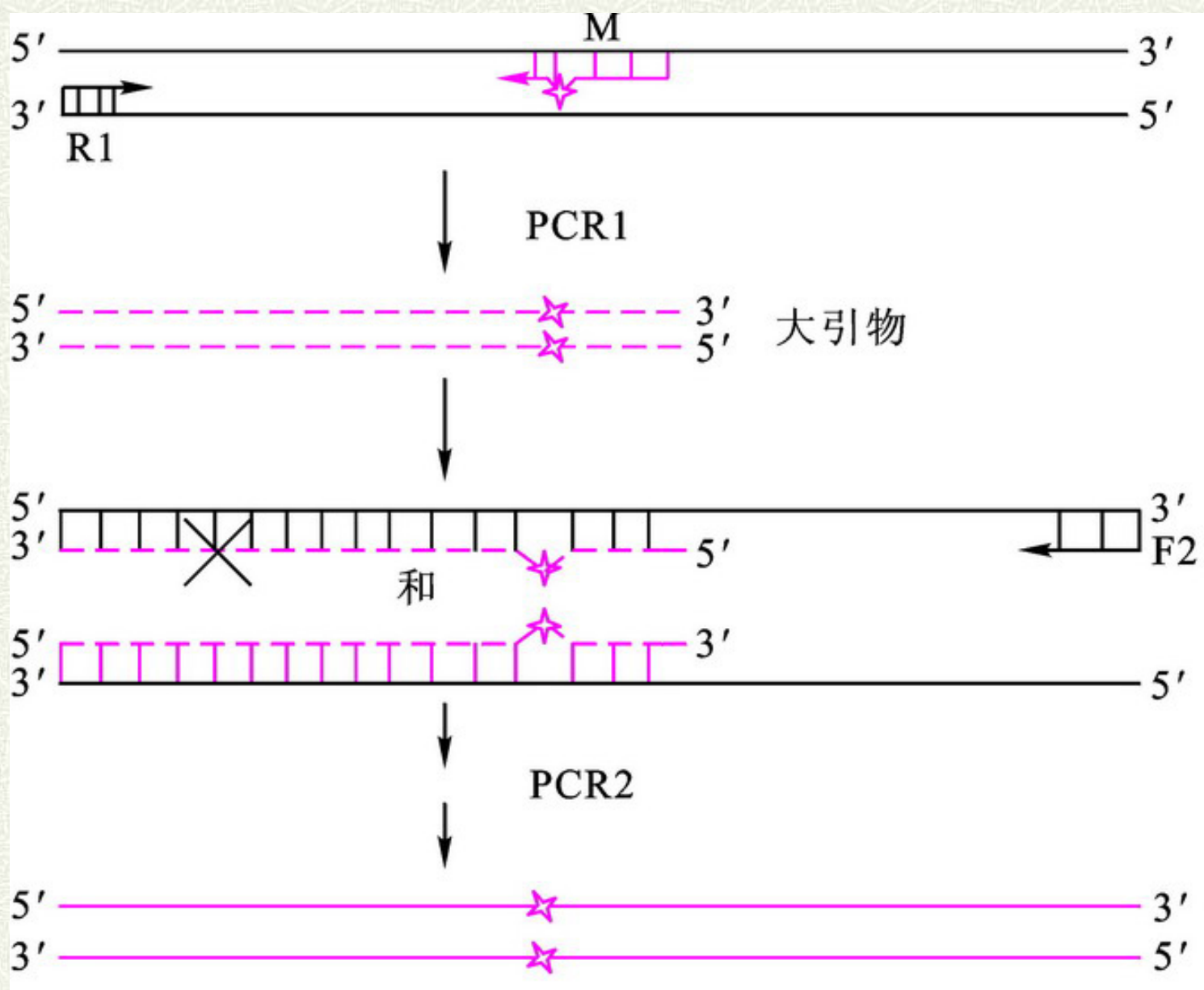


图6-8 大引物诱变法示意图



6. 2 基因敲除技术

6. 2. 1 基本原理

经典遗传学（**Forward genetics**）是从一个突变体的表型出发，研究其基因型，进而找出该基因的编码序列。

现代遗传学（**Reverse genetics**，反向遗传学）首先从基因序列出发，推测其表现型，进而推导出该基因的功能。



基因敲除（**gene knock-out**）又称基因打靶，通过外源DNA与染色体DNA之间的同源重组，进行精确的定点修饰和基因改造，具有专一性强、染色体**DNA**可与目的片段共同稳定遗传等特点。



基因敲除分为完全基因敲除和条件型基因敲除（又称不完全基因敲除）两种。

完全基因敲除是指通过同源重组法完全消除细胞或者动物个体中的靶基因活性，条件型基因敲除是指通过定位重组系统实现特定时间和空间的基因敲除。



噬菌体的**Cre/Loxp**系统、**Gin/Gix**系统、酵母细胞的**FLP/FRT**系统和**R/RS**系统是现阶段常用的四种定位重组系统，尤以**Cre/Loxp**系统应用最为广泛。

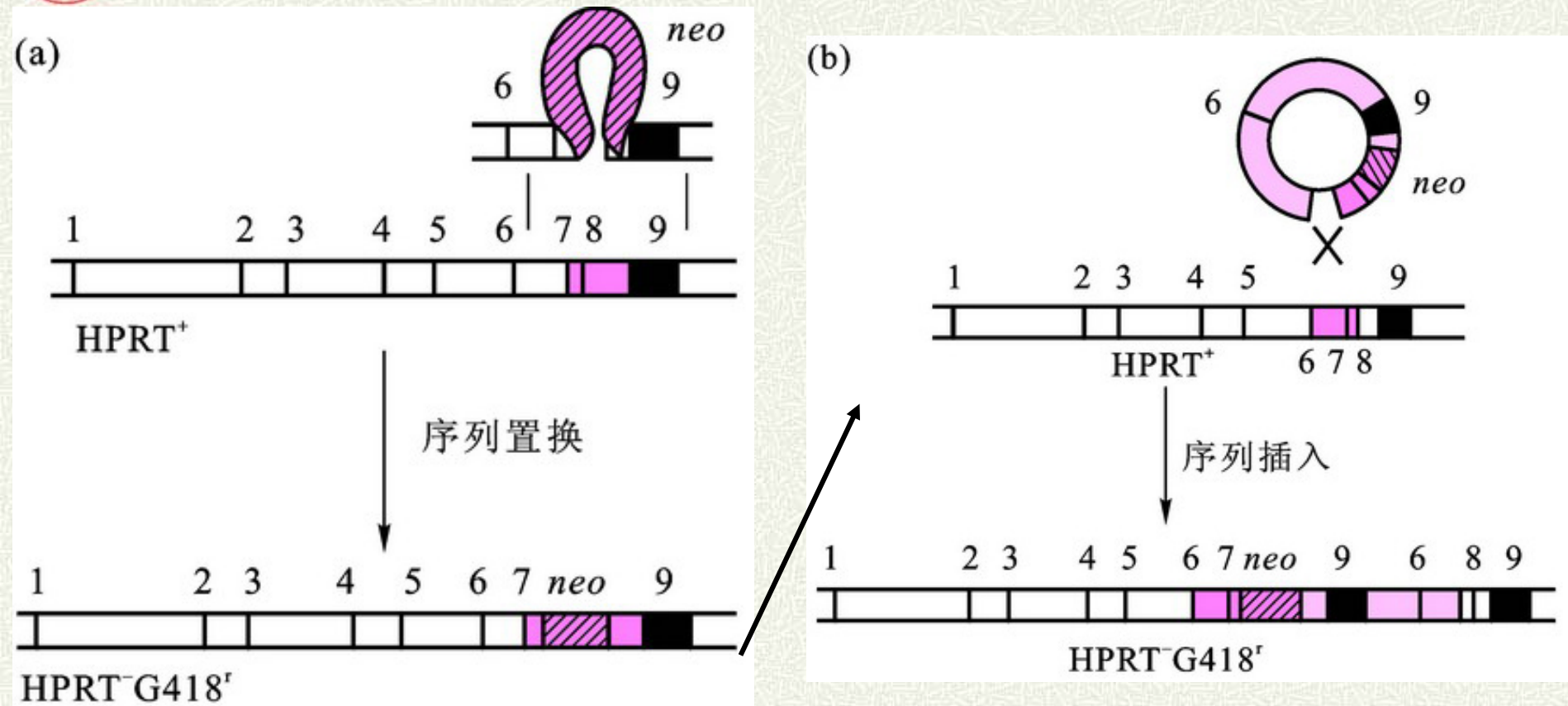


图6-9 用取代型 (a) 或插入型 (b) 载体进行完全基因敲除实验

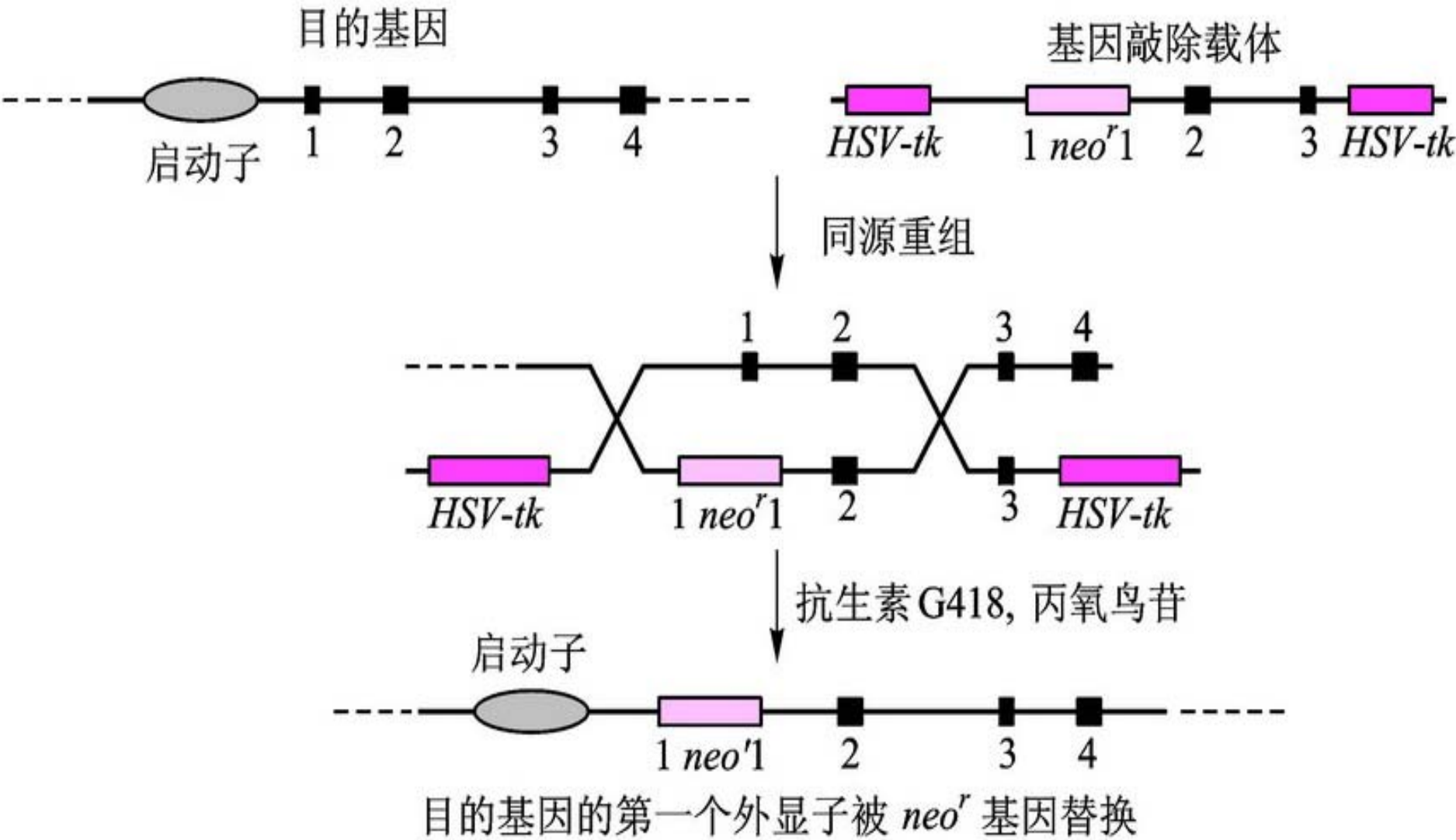


图6-10 正负筛选法（PNS法）筛选已发生同源重组的细胞



由于基因转移的同源重组自然发生率极低，动物的重组概率约为 **$10^{-2} \sim 10^{-5}$** ，植物的概率为 **$10^{-4} \sim 10^{-5}$** ，即使采用双向选择法也很难保证一次就从众多细胞中筛选出真正发生了同源重组的胚胎干细胞，得用多种分子筛选技术验证所获得的确实是目的基因被敲除的细胞系。



6.2.2 高等动物基因敲除技术

真核生物基因敲除的技术路线主要包括构建重组基因载体，用电穿孔、显微注射等方法把重组**DNA**导入胚胎干细胞纯系中，使外源**DNA**与胚胎干细胞基因组中相应部分发生同源重组，将重组载体中的**DNA**序列整合到内源基因组中并得以表达。

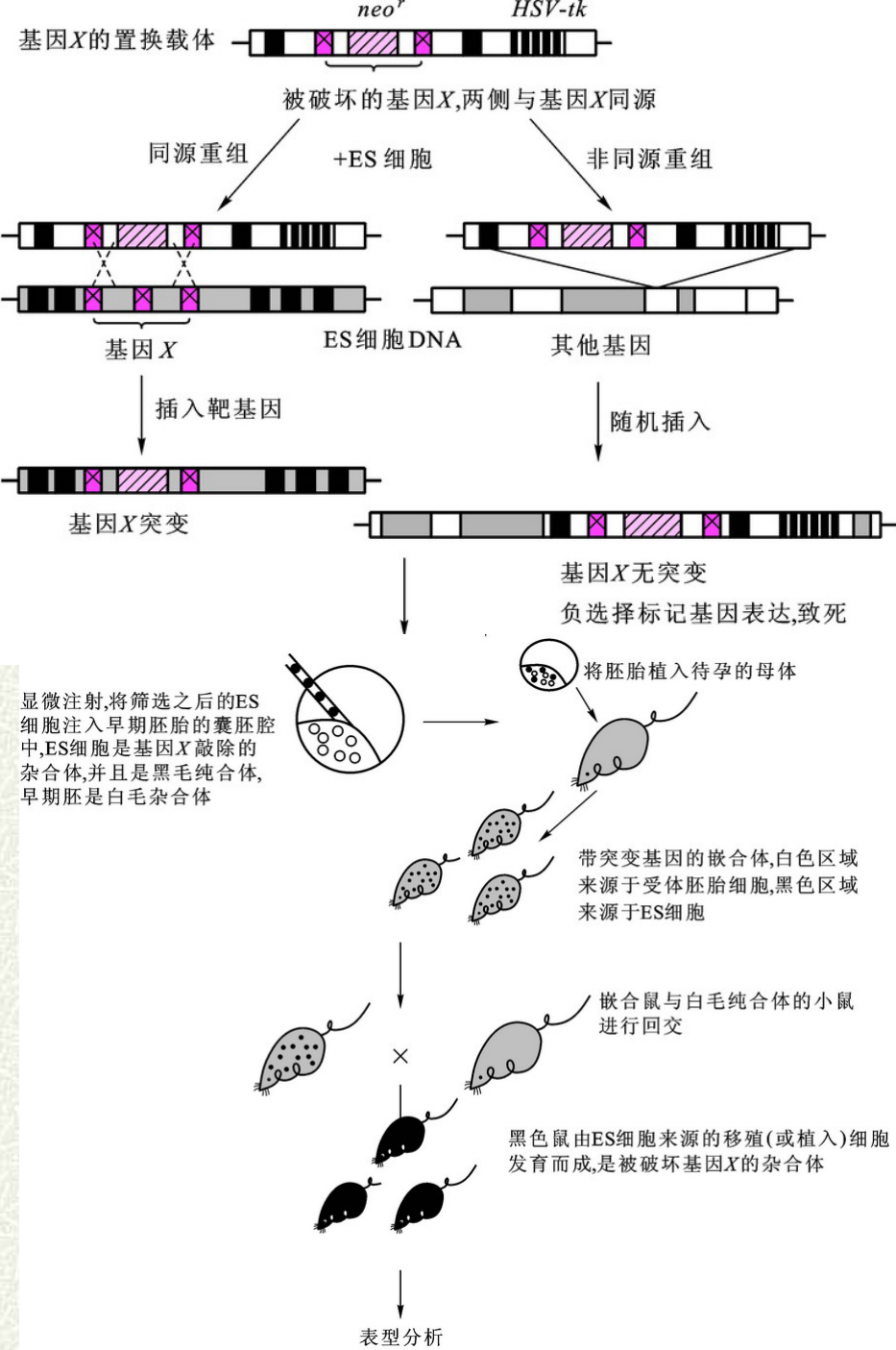


图6-12 模式动物小鼠中完全基因敲除的主要技术策略与应用。



显微注射命中率较高，技术难度相对大些。
电穿孔法命中率比显微注射低，操作使用方便。

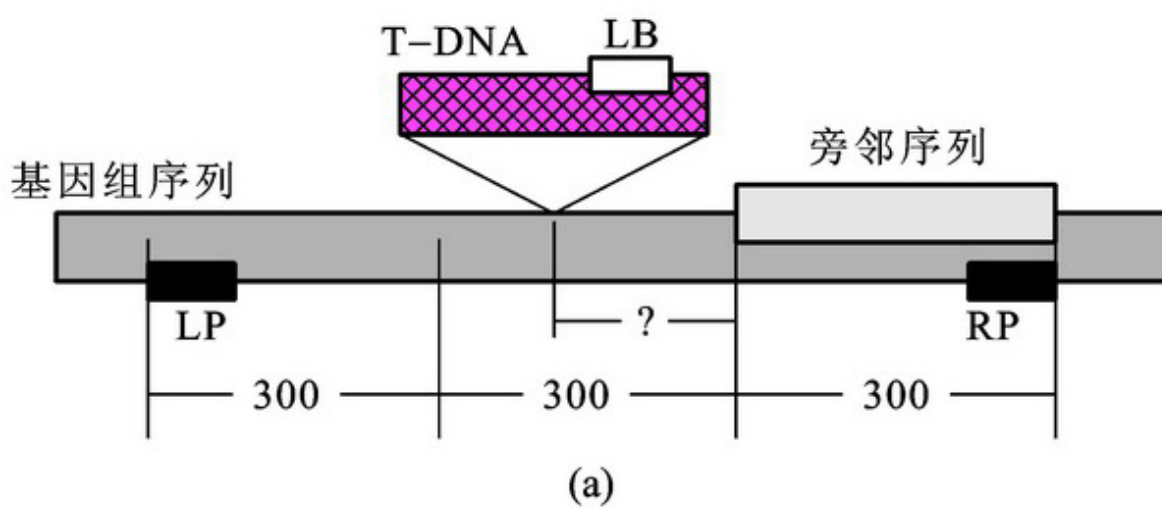
胚胎干细胞（**ES**细胞）分离和体外培养的成功奠定了哺乳动物基因敲除的技术基础。



6. 2. 3 植物基因敲除技术

T-DNA插入失活技术是目前在植物中使用最为广泛的基因敲除手段。

利用根癌农杆菌**T-DNA**介导转化，将带有报告基因的**DNA**序列整合到基因组**DNA**上，如果这段**DNA**插入到目的基因内部或附近，就会影响该基因的表达，从而使该基因“失活”。



a. 引物设计。LP和RP分别代表插入基因两端的引物，LB是指载体上的一段引物，目的基因片段(设为900bp)。旁邻序列是经测序后获得的DNA序列。

b, PCR产物电泳结果。分别代表野生型、杂合子和纯合子PCR条带。

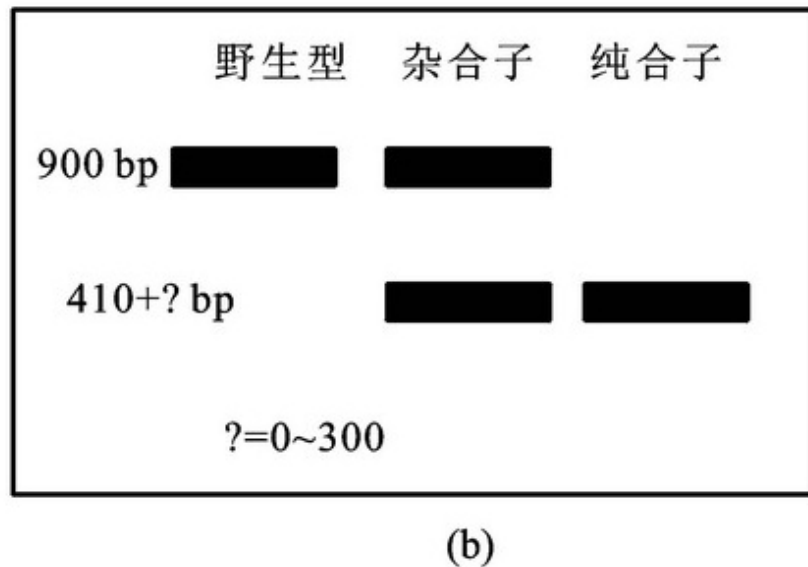


图6-14 植物基因敲除及突变体筛选



6.3 蛋白质及**RNA**相互作用技术

6.3.1 酵母单杂交系统（Yeast one-hybrid system）

是上世纪**90**年代中发展起来的研究**DNA**-蛋白质之间相互作用的新技术，可识别稳定结合于**DNA**上的蛋白质，在酵母细胞内研究真核生物中**DNA**-蛋白质之间的相互作用，并通过筛选**DNA**文库直接获得靶序列相互作用蛋白的编码基因。



将已知顺式作用元件构建到最基本启动子（**minimal promoter, Pmin**）的上游，把报告基因连接到**Pmin**下游。将编码待测转录因子 **cDNA** 与已知酵母转录激活结构域（**transcription-activating domain, AD**）融合表达载体导入酵母细胞，该基因产物如果能够与顺式作用元件相结合，就能激活**Pmin**启动子，使报告基因得到表达。

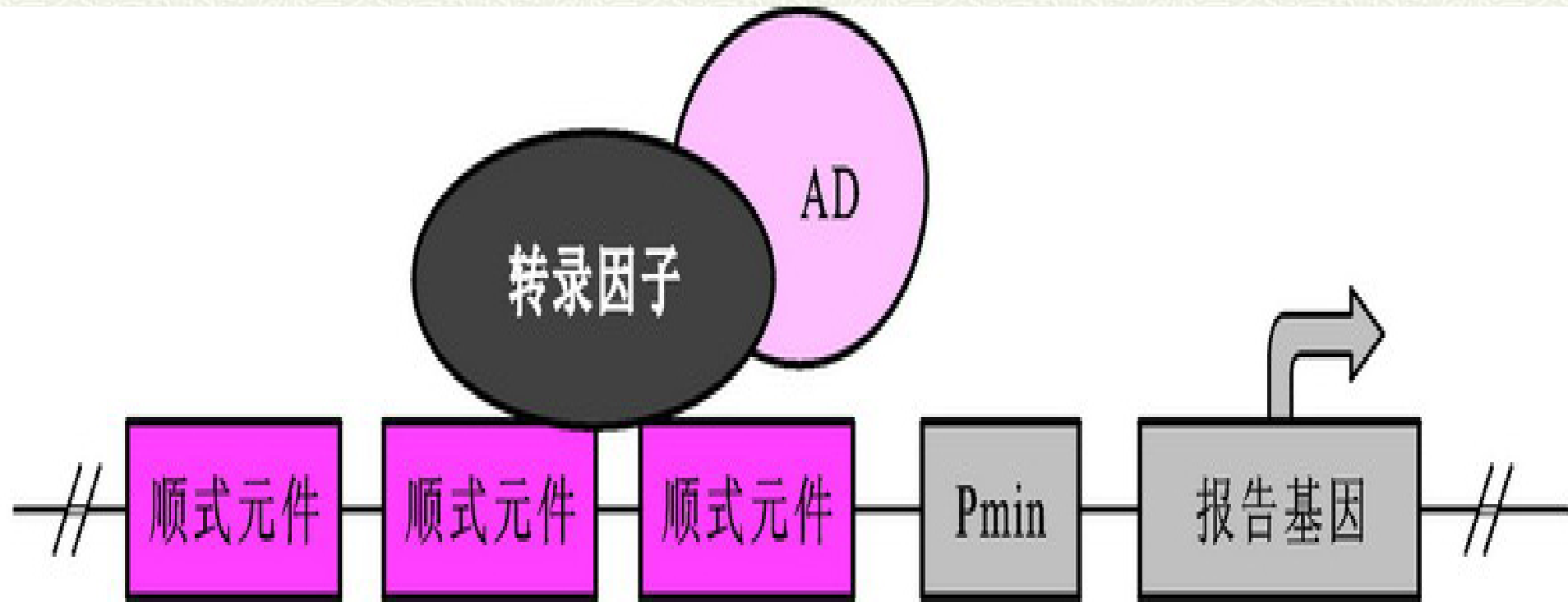


图6-15 酵母单杂交的基本原理示意图

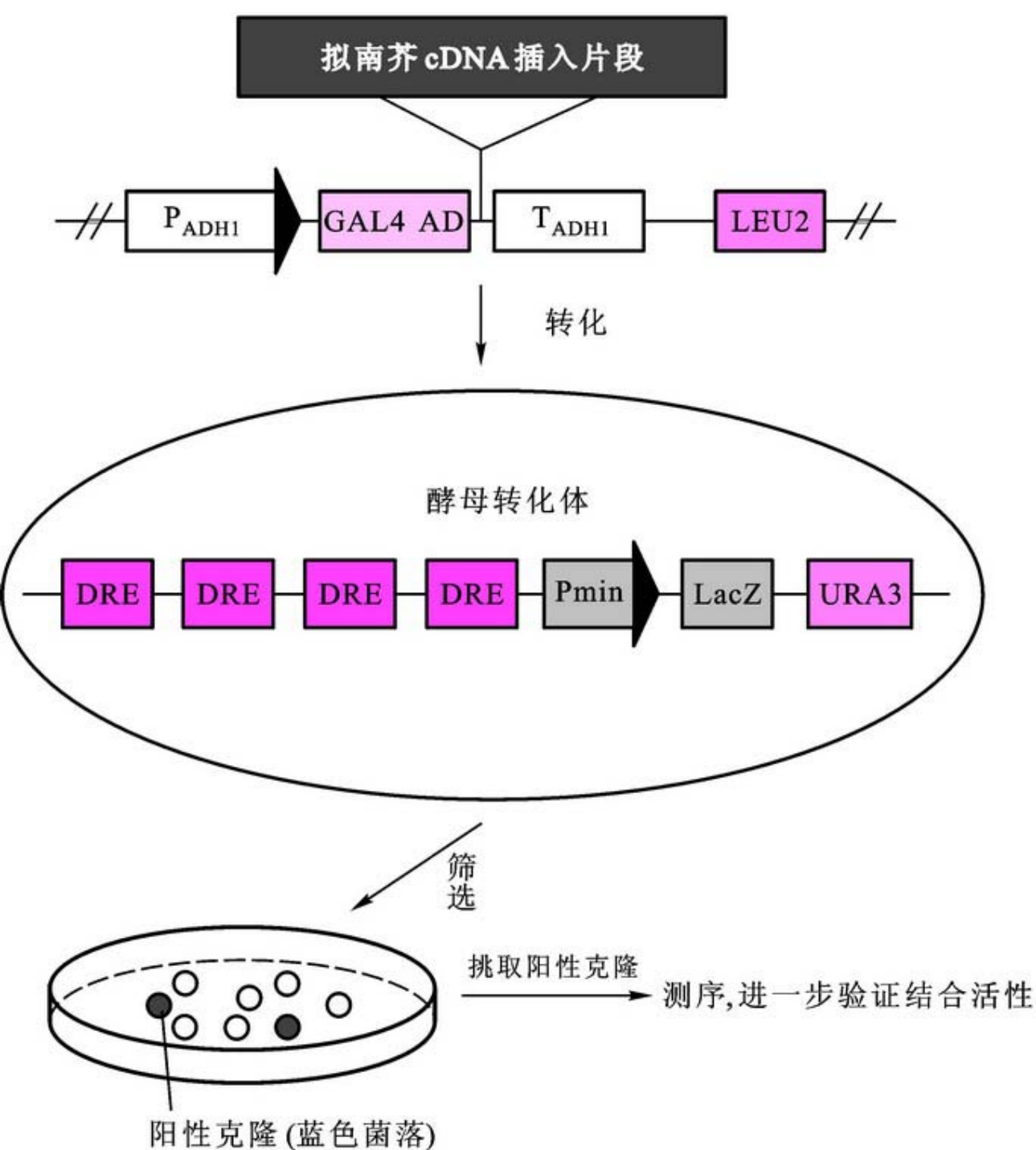


图6-16 从拟南芥cDNA文库中筛选与顺式元件DRE结合的转录因子示意图。



6. 3. 2 酵母双杂交系统 (Yeast two-hybrid system)

真核生物转录调控因子具有组件式结构 (**modular**) 特征, 这些蛋白往往由两个或两个以上相互独立的结构域, 其中 **DNA** 结合结构域 (**binding domain, BD**) 和转录激活结构域 (**activation domain, AD**) 是转录激活因子发挥功能所必须的。



BD能与特定基因启动区结合，但不能激活基因转录，由不同转录调控因子的**BD**和**AD**所形成的杂合蛋白却能行使激活转录的功能。

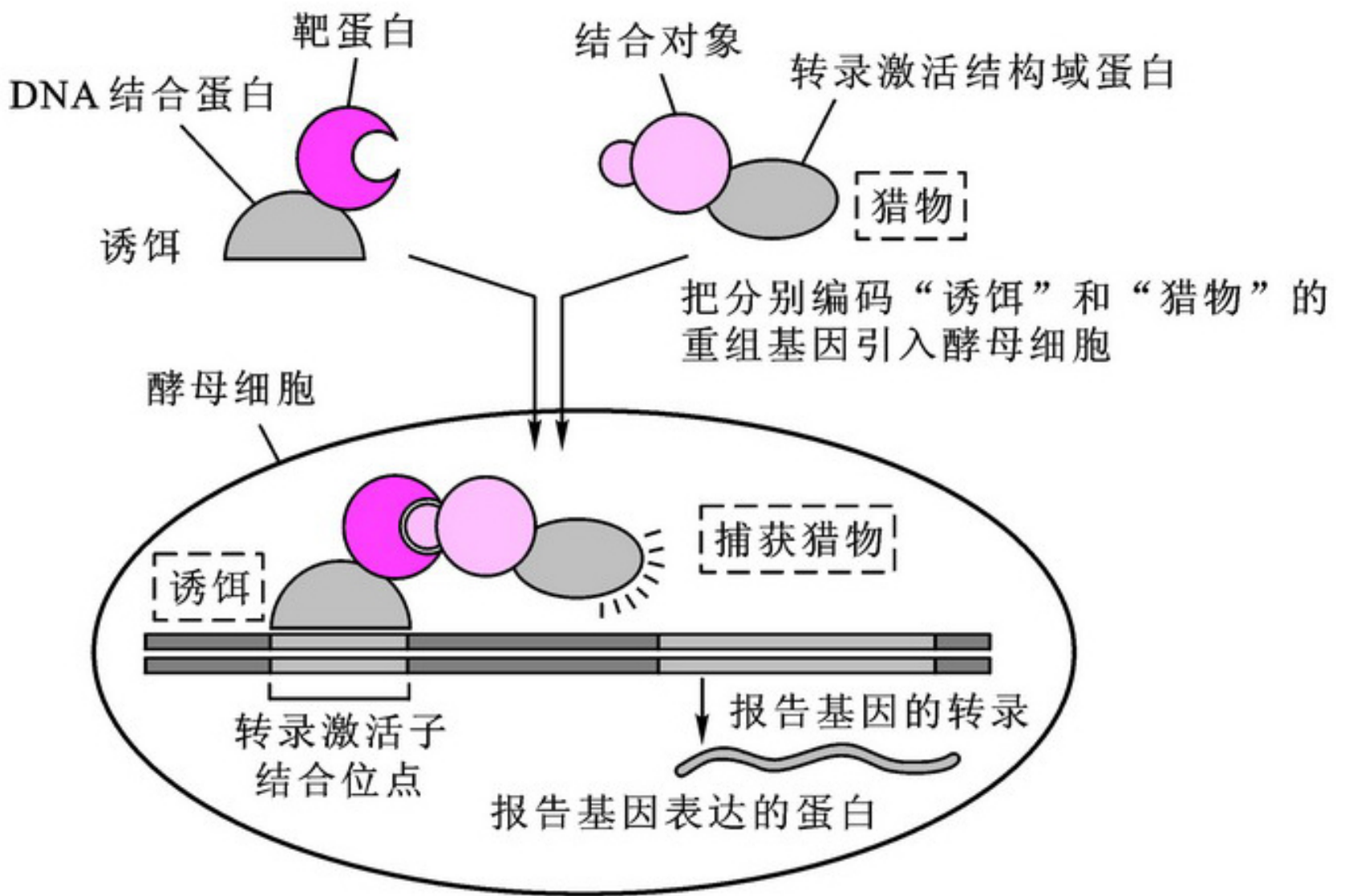


图6-17 酵母双杂交技术原理示意图



6.3.3 体外蛋白质相互作用技术

1、Far Western印迹技术

用 ^{32}P 标记的体外表达蛋白作探针,直接检测与该蛋白发生相互作用的蛋白或表达该蛋白的**cDNA**。

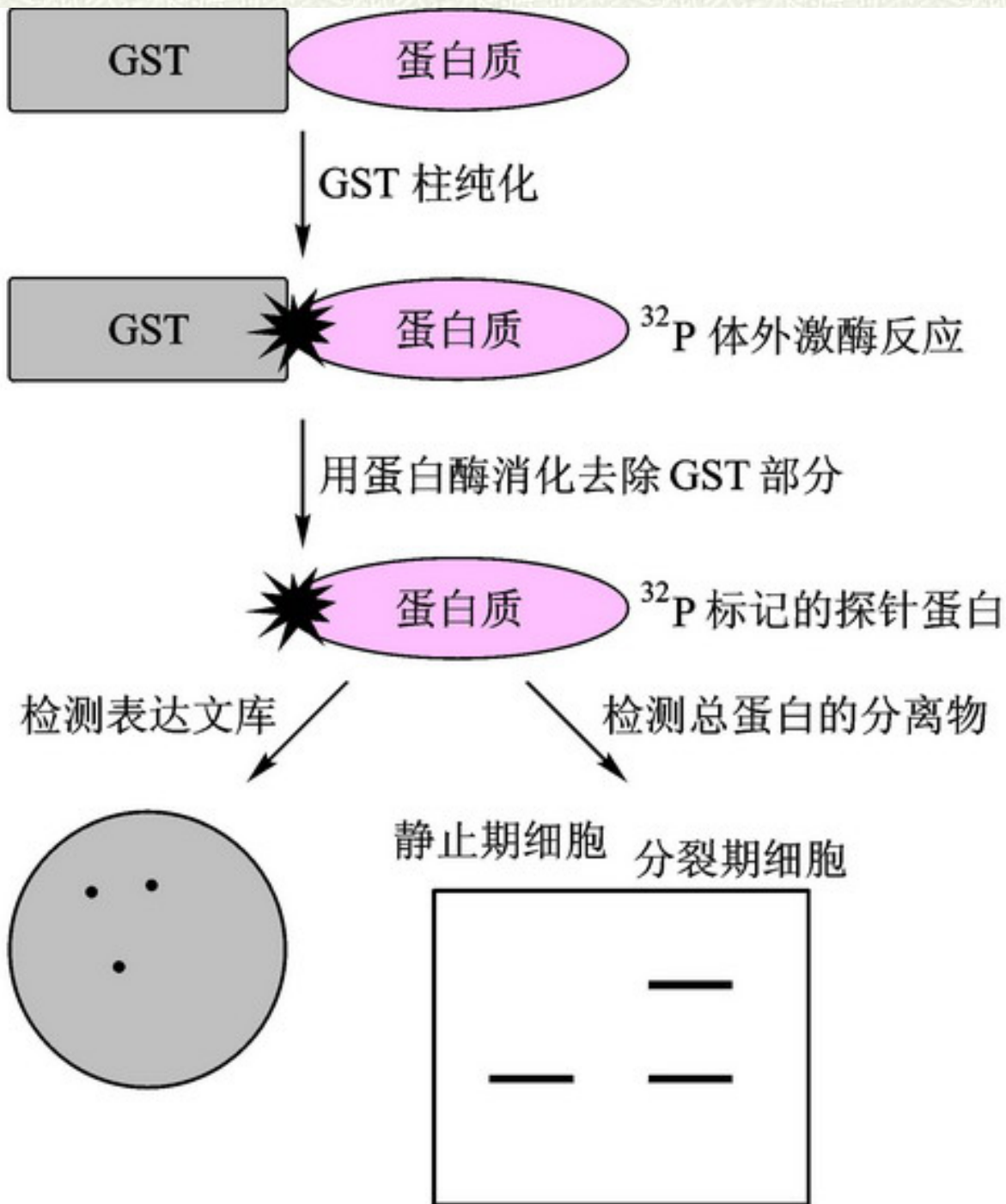


图6-18 Far Western印迹试验



2、**GST**融合蛋白沉降技术

利用**GST**对谷胱甘肽偶联的琼脂糖球珠的亲
和性，从混合蛋白质样品中纯化得到相互作
用蛋白。

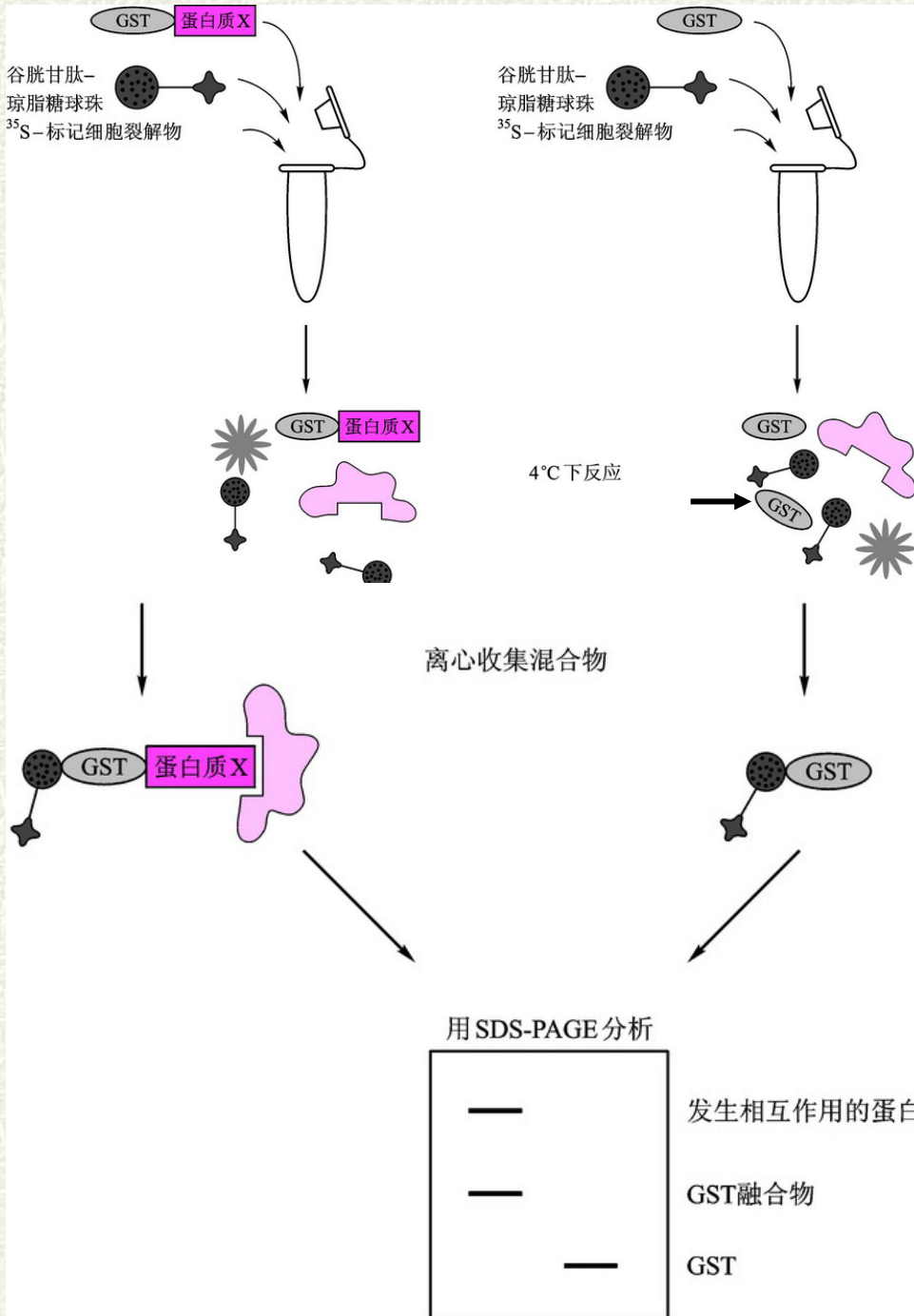


图6-19 GST融合蛋白沉降技术流程。



3、蛋白质芯片技术

蛋白质芯片可以用来大规模筛选蛋白之间的相互作用。将荧光标记的探针蛋白与蛋白质芯片孵育，洗脱非特异性结合的蛋白后，可以通过扫描芯片上的荧光点检测到稳定的相互作用蛋白点。



NLPE&PGE



4、等离子表面共振技术

将诱饵蛋白结合于葡聚糖表面并固定于纳米级厚度的金属膜上。当蛋白质混合物经过时，如果有蛋白质同“诱饵”蛋白发生相互作用，那么两者的结合将使金属膜表面的折射率上升，导致共振角度的改变。

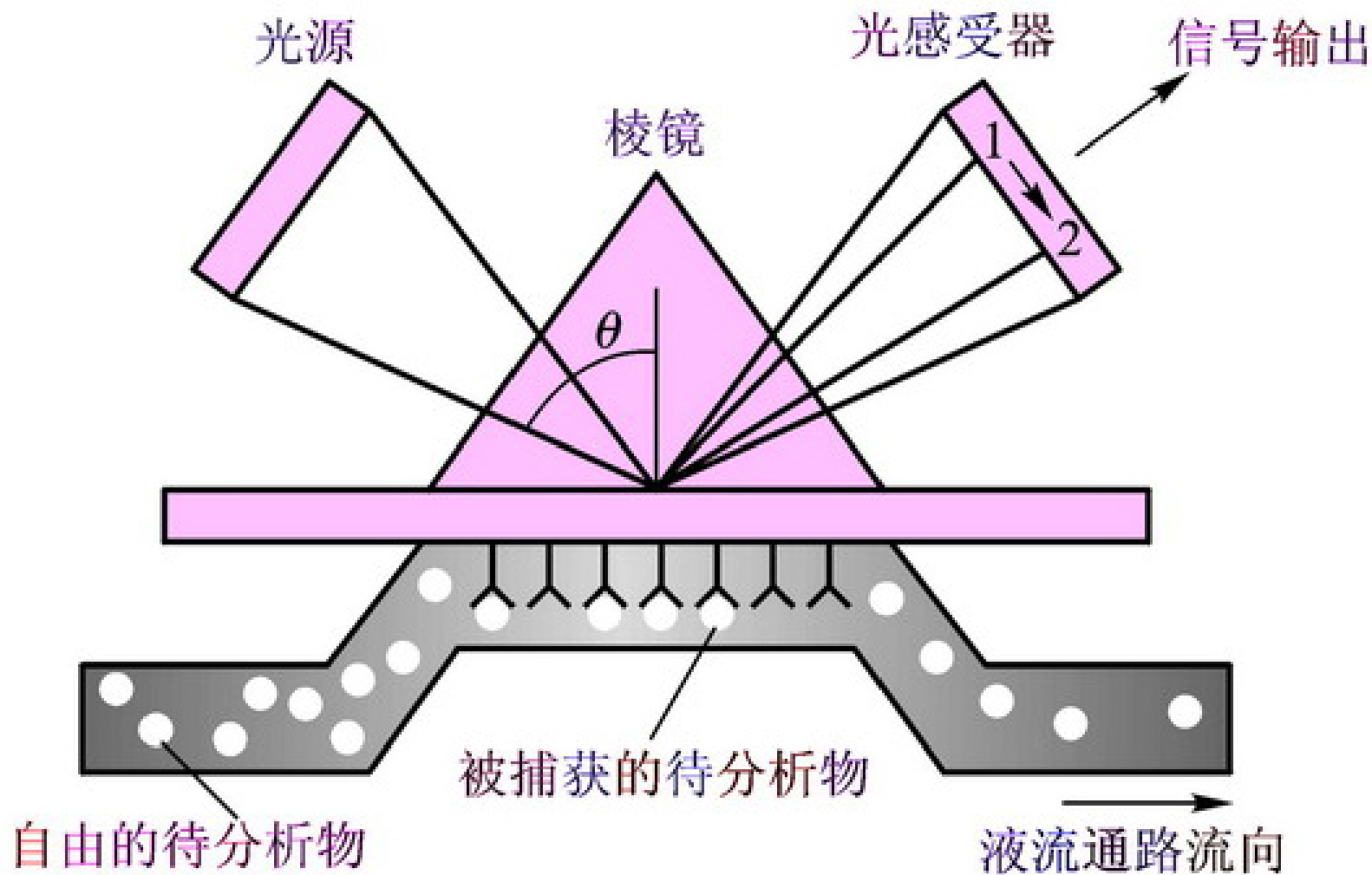


图6-21 等离子表面共振技术示意图



5、免疫共沉淀技术

将靶蛋白的抗体连接到固体基质上，再将可能与靶蛋白发生相互作用的待筛选蛋白加入反应体系中，用低离心力沉淀或微膜过滤法在固体基质和抗体的共同作用下将蛋白复合物沉淀到试管的底部或微膜上。



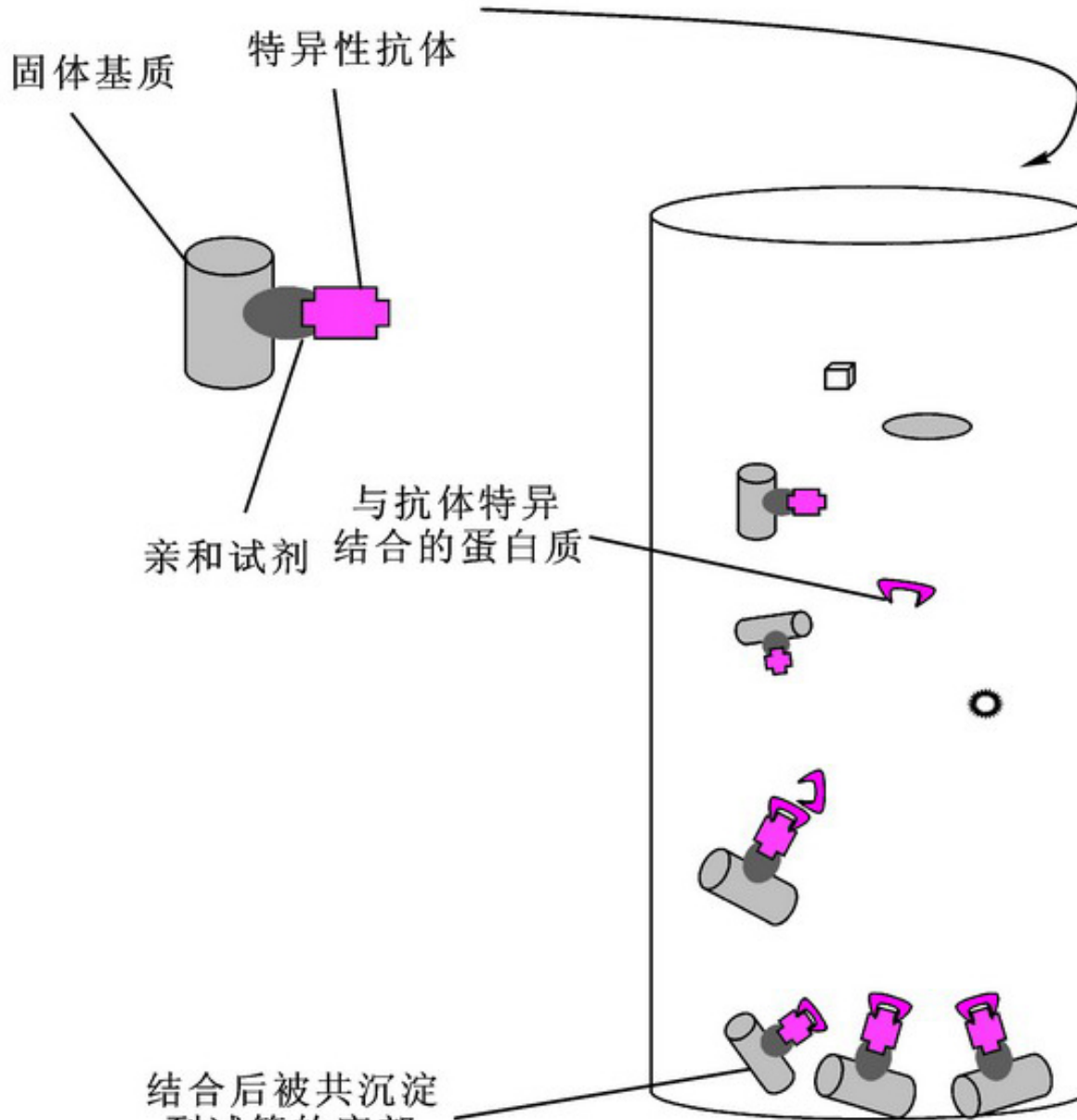
将蛋白抗体基质复合体加入含有不同组分的蛋白质溶液中

固体基质 特异性抗体

亲和试剂 与抗体特异性结合的蛋白质

结合后被共沉淀到试管的底部

免疫共沉淀示意图





6.3.4 细胞内蛋白质相互作用研究—荧光共振能量转移法 (FRET)

FRET荧光能量转移有三个基本条件:

- (1) 给体与受体在合适的距离 ($1 \sim 10$ nm) ;
- (2) 给体的发射光谱与受体的吸收光谱有一定的重叠 (这是能量匹配的条件) ;
- (3) 给体与受体的偶极具有一定的空间取向 (这是偶极-偶极耦合作用的条件) 。

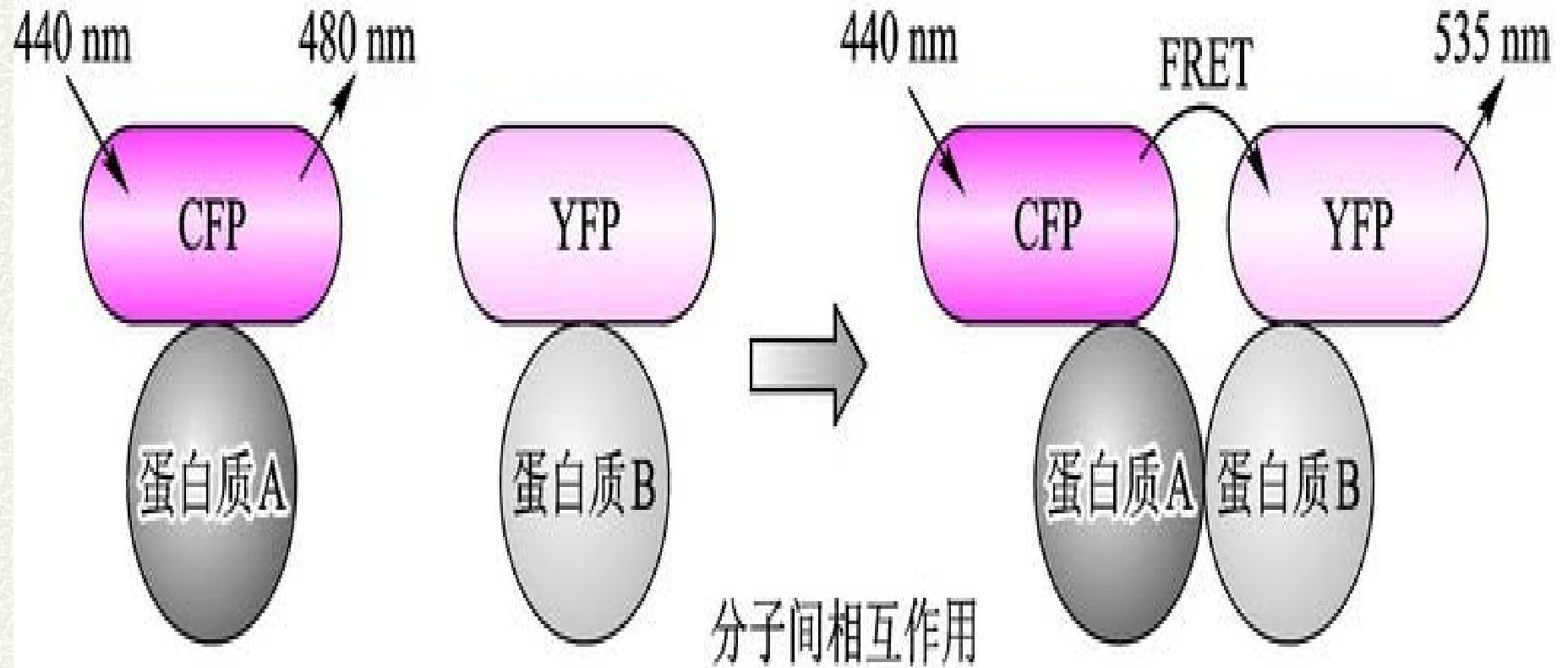


图6-23 荧光共振能量转移法



FRET需要有两个探针，即荧光给体和荧光受体，要求给体的发射光谱与受体的吸收光谱有一定的重叠，而与受体的发射光谱尽量没有重叠。不同蛋白的吸收和发射波长不同，可根据需要组成不同的探针对。常用的探针有：

荧光蛋白

传统有机染料

镧系染料



荧光蛋白，一类能发射荧光的天然蛋白及其突变体。

传统有机染料，具有特征吸收和发射光谱的有机化合物组成的染料对。包括荧光素、罗丹明类化合物和青色染料**Cy3**、**Cy5**等。

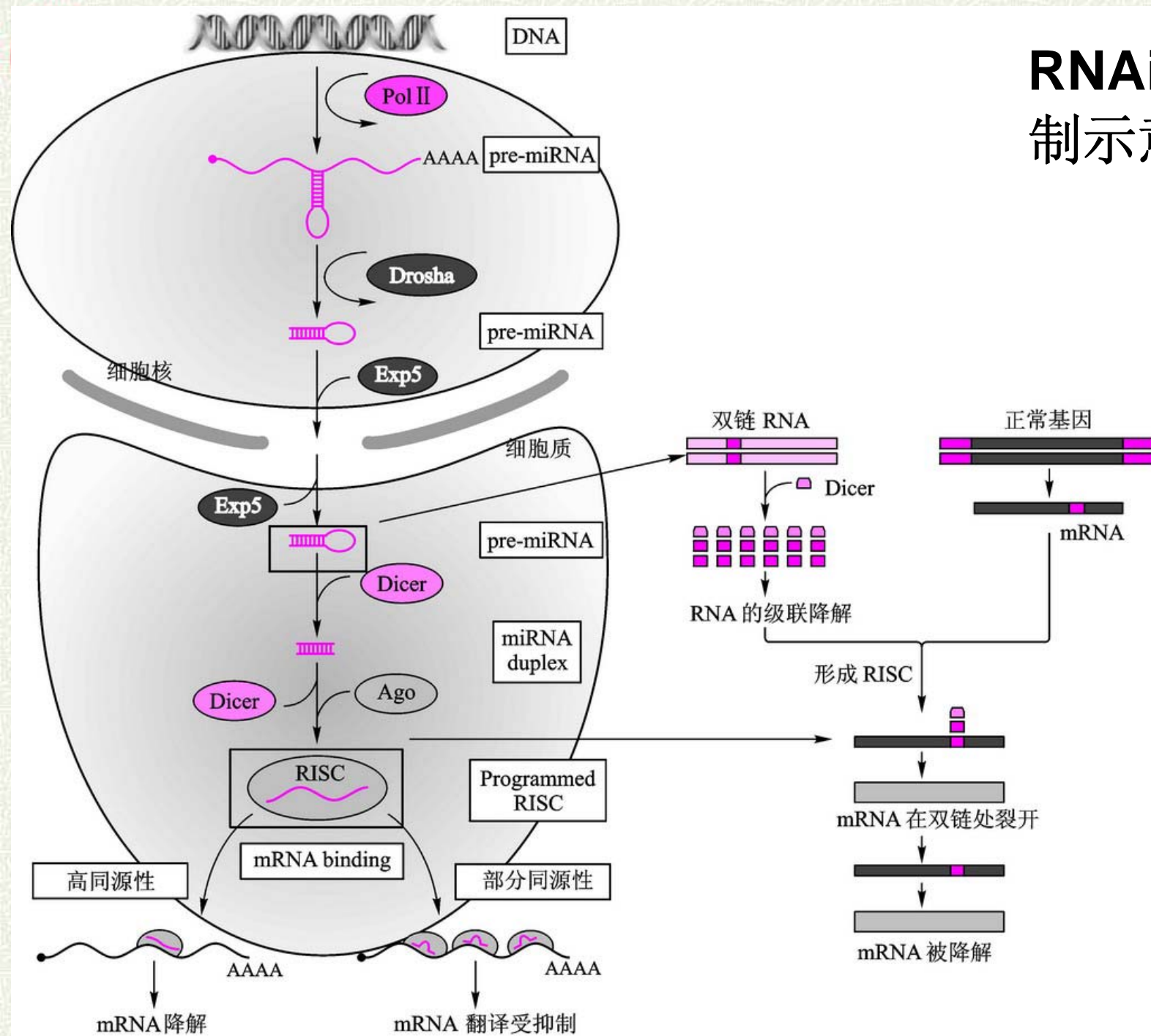
镧系染料，金属染料。一般与有机染料联用，分别作为**FRET**的给体或受体，以提高检测的准确性和信噪比。



6. 3. 5 RNAi (RNA interference, RNA干涉) 技术及其应用

RNAi技术利用双链小**RNA**高效、特异性降解细胞内同源**mRNA**从而阻断靶基因表达，使细胞出现靶基因缺失的表型。**RNAi**的命名来源于安德鲁·法尔**1998**年在《自然》杂志上的论文。

RNAi作用机制示意图。





研究发现，双链**RNA**是**RNAi**的触发物，引发与之互补的单链**RNA**（**ssRNA, single-stranded RNA**）的降解。

经过**Dicer**（一种具有**RNAase III**活性的核酸酶）的加工，细胞中较长的双链**RNA**（**30**个核苷酸以上）首先被降解形成**21~25**个核苷酸的小分子干扰核糖核酸（**siRNA, short interfering RNA**），并有效地定位目标**mRNA**。



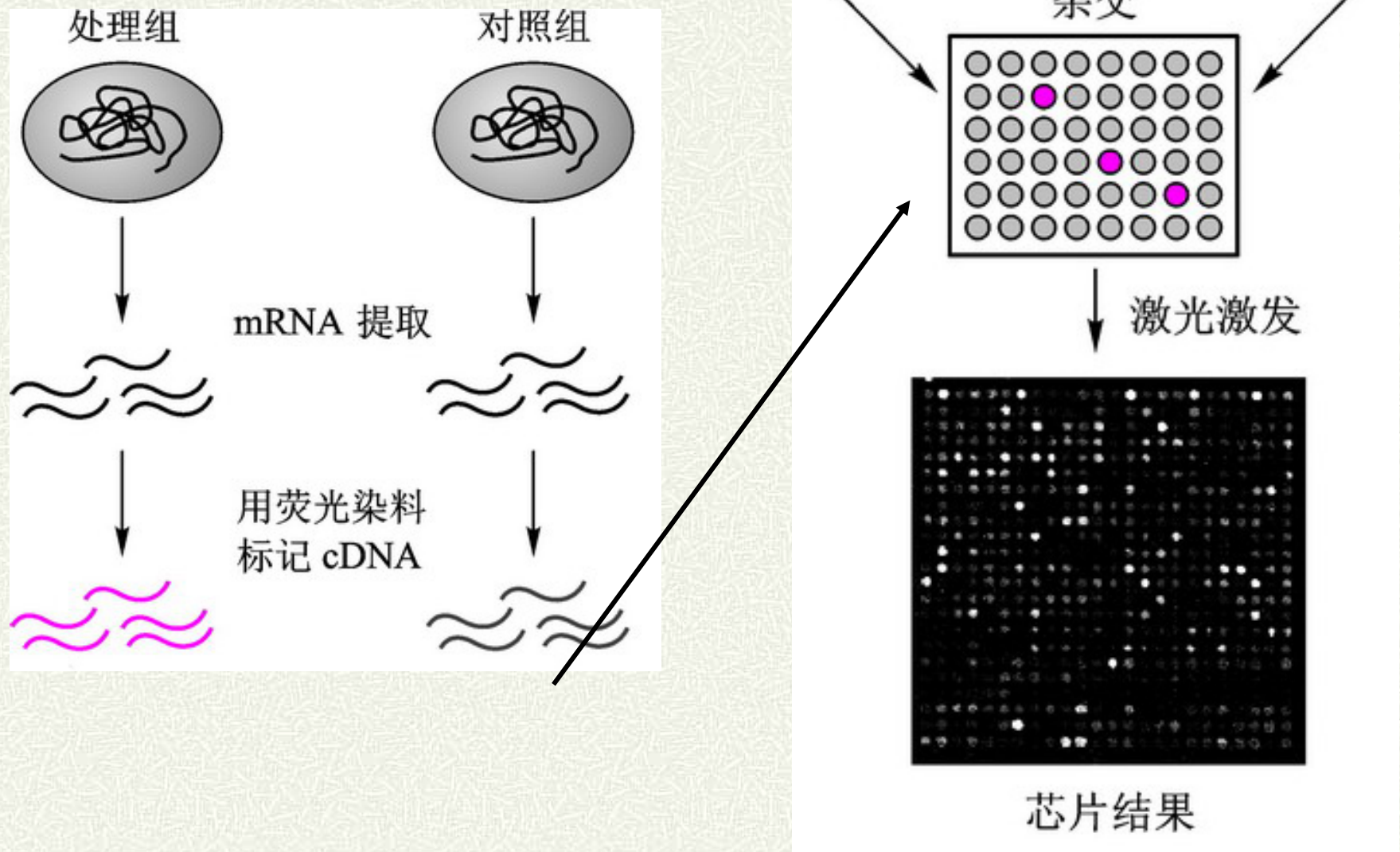
siRNA是引发转录后基因沉默中序列特异性**RNA**降解的重要中间媒介，它具有特殊的结构特征，即**5'**端磷酸基团和**3'**端的羟基，其两条链的**3'**端各有两个碱基突出于末端。

由**siRNA**中的反义链参与指导合成被称为**RNA**诱导的沉默复合体（**RISC**）的核蛋白体，再由**RISC**介导切割目的**mRNA**分子中与**siRNA**反义链互补的区域，从而实现干扰靶基因表达的功能。



6.4 基因芯片及数据分析

基因芯片（**DNA chip**），又称**DNA**微阵列（**DNA microarray**）技术是能同时监测大量靶基因表达的实验手段，从而迅速准确地在基因组水平上阐述不同生物组织或细胞中各种转录本的变化规律。



6-25 基因芯片技术流程图

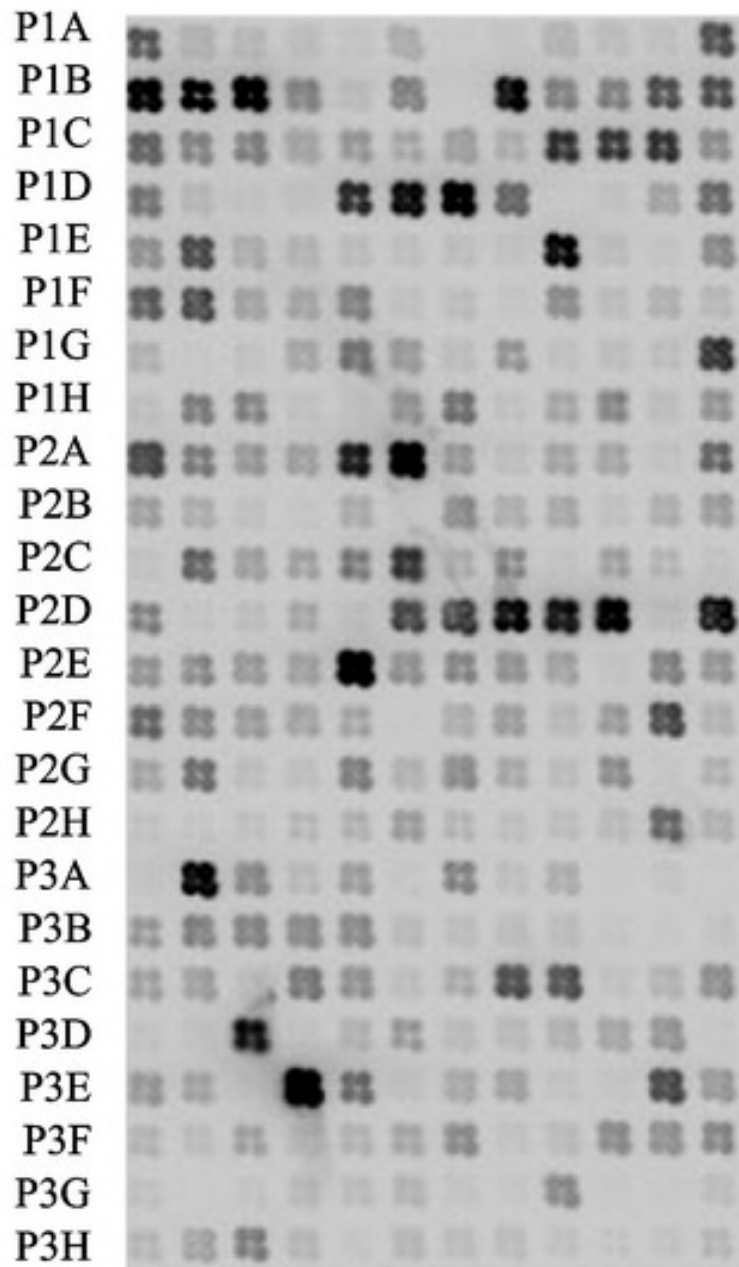


简易基因芯片

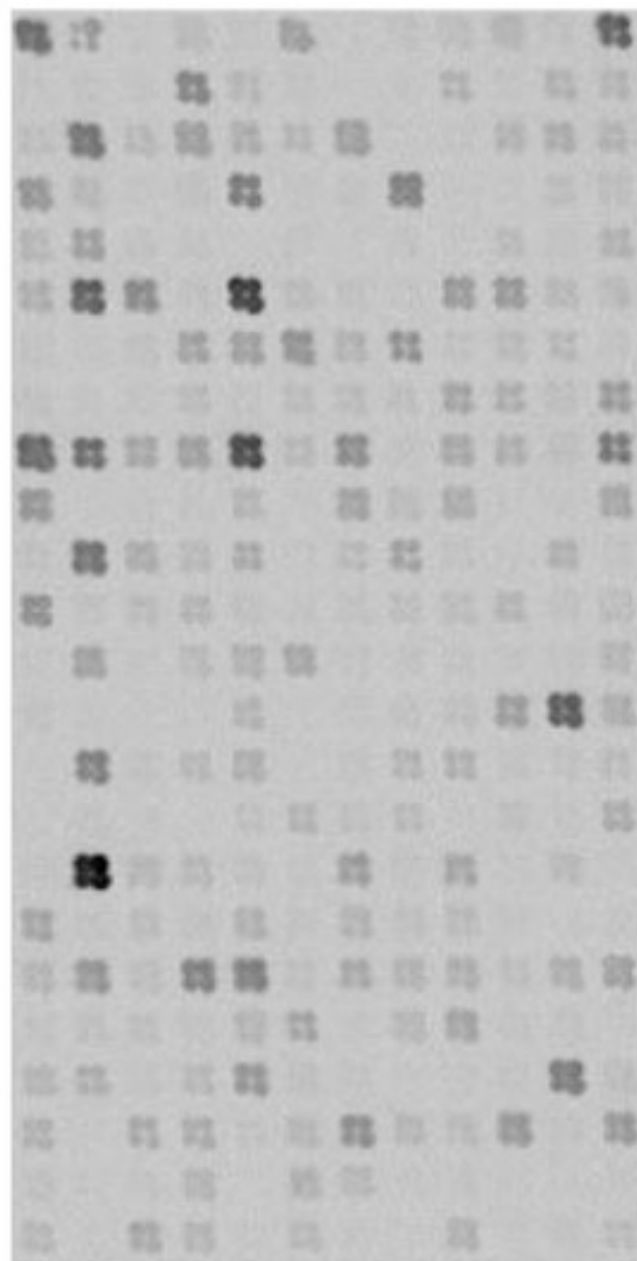
使用机械臂把**DNA**片段点在玻璃片或尼龙膜上，经过物理吸附作用达到固定化。也可以直接在玻璃板表面进行化学合成，从而得到寡聚核苷酸芯片。将芯片与待研究的**cDNA**或其它样品杂交，经过计算机扫描和数据处理，便可以观察到大规模的基因群在不同组织或同一组织不同发育时期或不同生理条件下的表达模式。

01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12

01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12



(a)

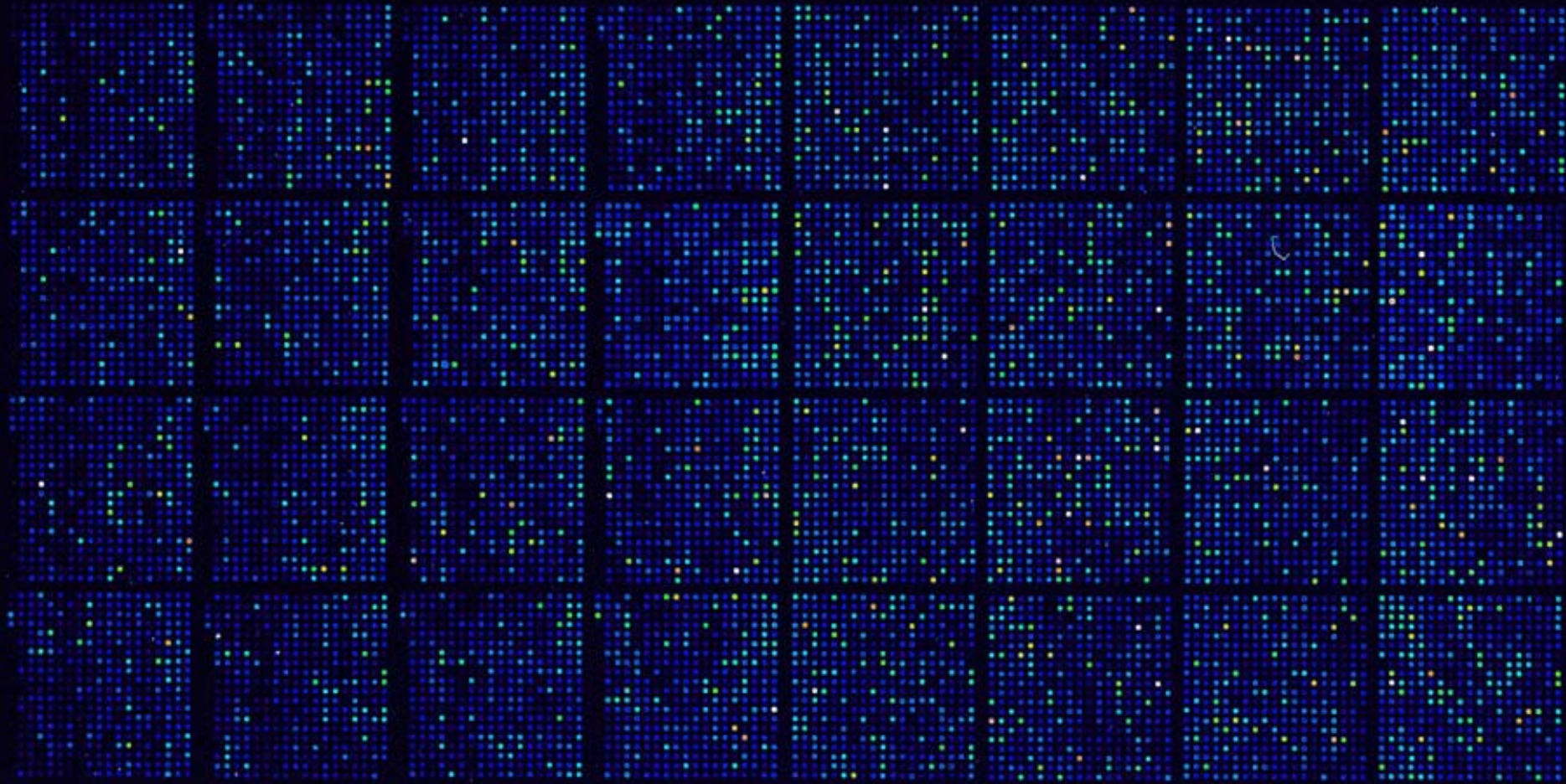


(b)

图 6-26 包含 280 个棉花 cDNA 的简易芯片的杂交图谱。



大规模基因芯片的应用





基因芯片可用于进行基因诊断。先建立正常人特定组织、器官的基因芯片，给出标准杂交信号图，用可疑病人的cDNA做探针与之杂交，确定哪些基因的表达受抑制或激活。



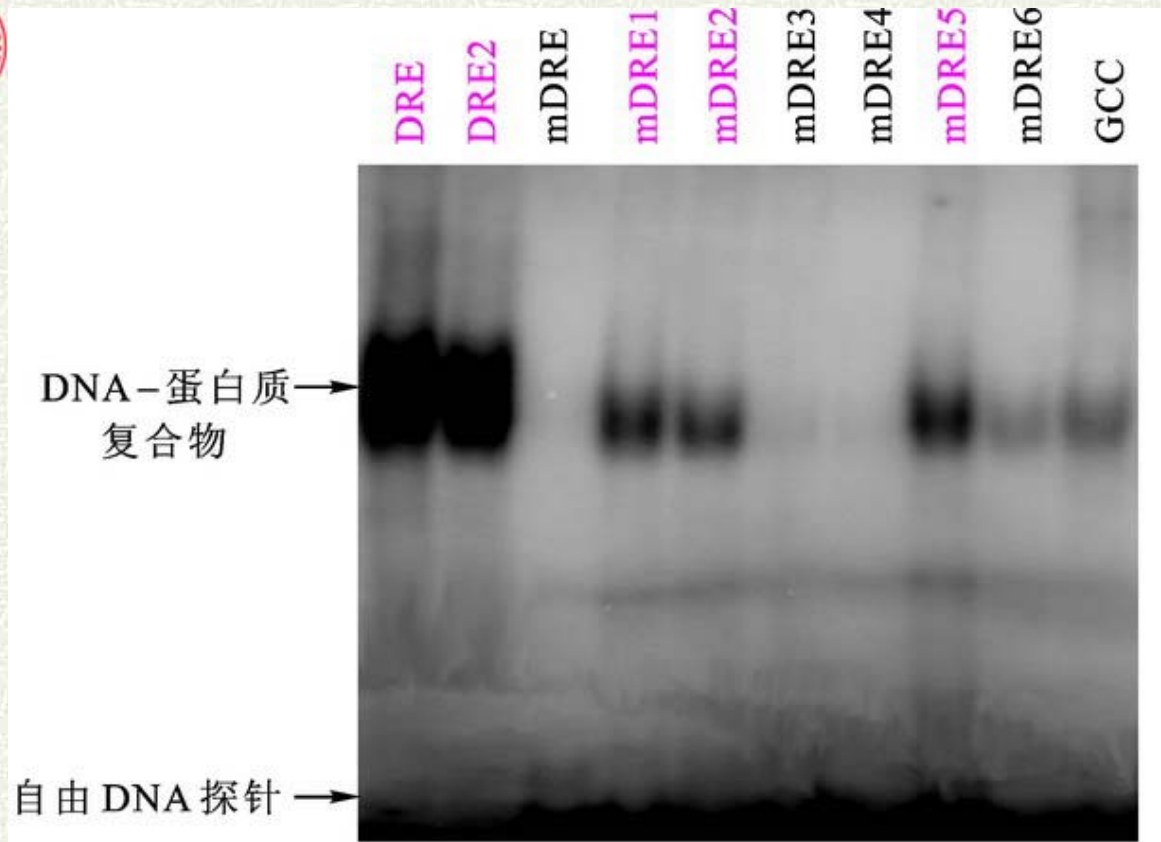
6. 5 其它分子生物学技术

1 凝胶滞缓实验

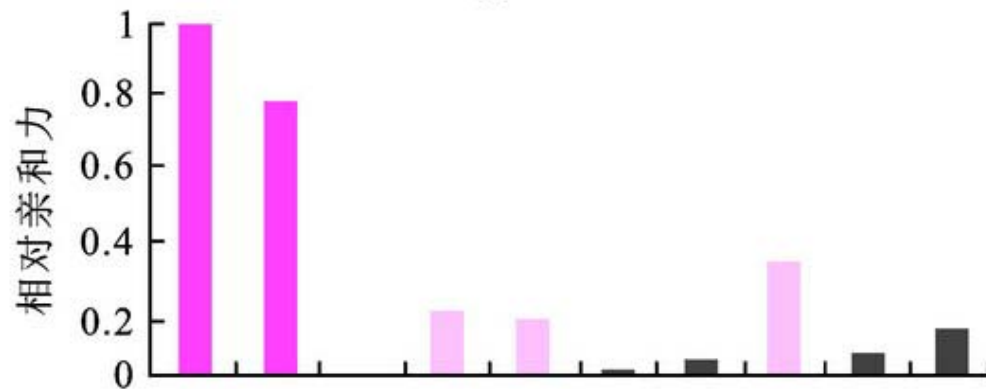
凝胶滞缓试验 (gel retardation assay) , 又叫作DNA迁移率变动试验 (DNA mobility shift assay) , 是用于体外研究DNA与蛋白质相互作用的一种特殊的凝胶电泳技术。



在凝胶电泳中，由于电场的作用，裸露的DNA朝正电极移动的距离与其分子量的对数成反比。如果此时DNA分子与某种蛋白质相结合，那么，由于分子量增大，它在凝胶中的迁移作用便会受到阻滞，在特定电压和时间内朝正电极移动的距离也就相应缩短了。



(a)



(b)

拟南芥转录因子与不同DNA元件有不同的结合能力。



2 噬菌体展示技术

噬菌体是细菌病毒的总称，英文为 **Bacteriophage**，来源于希腊文“**phagos**”，有“吞噬”之意。

噬菌体可被分为溶菌周期和溶源周期两种不同的类型。在溶菌周期，噬菌体将其感染的宿主细胞转变成为噬菌体的“制造厂”，产生出大量的子代噬菌体颗粒。实验室常将只具有溶菌生长周期的噬菌体叫作烈性噬菌体。



溶源生长周期是指噬菌体**DNA**被整合到宿主细胞染色体**DNA**上，成为它的一个组成部分，感染过程中不产生子代噬菌体颗粒。具有这种溶源周期的噬菌体被称为温和噬菌体。



噬菌体展示技术的基本原理是将编码“诱饵”蛋白的**DNA**片段插入噬菌体基因组，并使之与噬菌体外壳蛋白编码基因相融合。重组噬菌体侵染宿主细菌后，复制形成大量带有杂合外壳蛋白的噬菌体颗粒，直接用于捕获靶蛋白库中与“诱饵”相互作用的蛋白质。

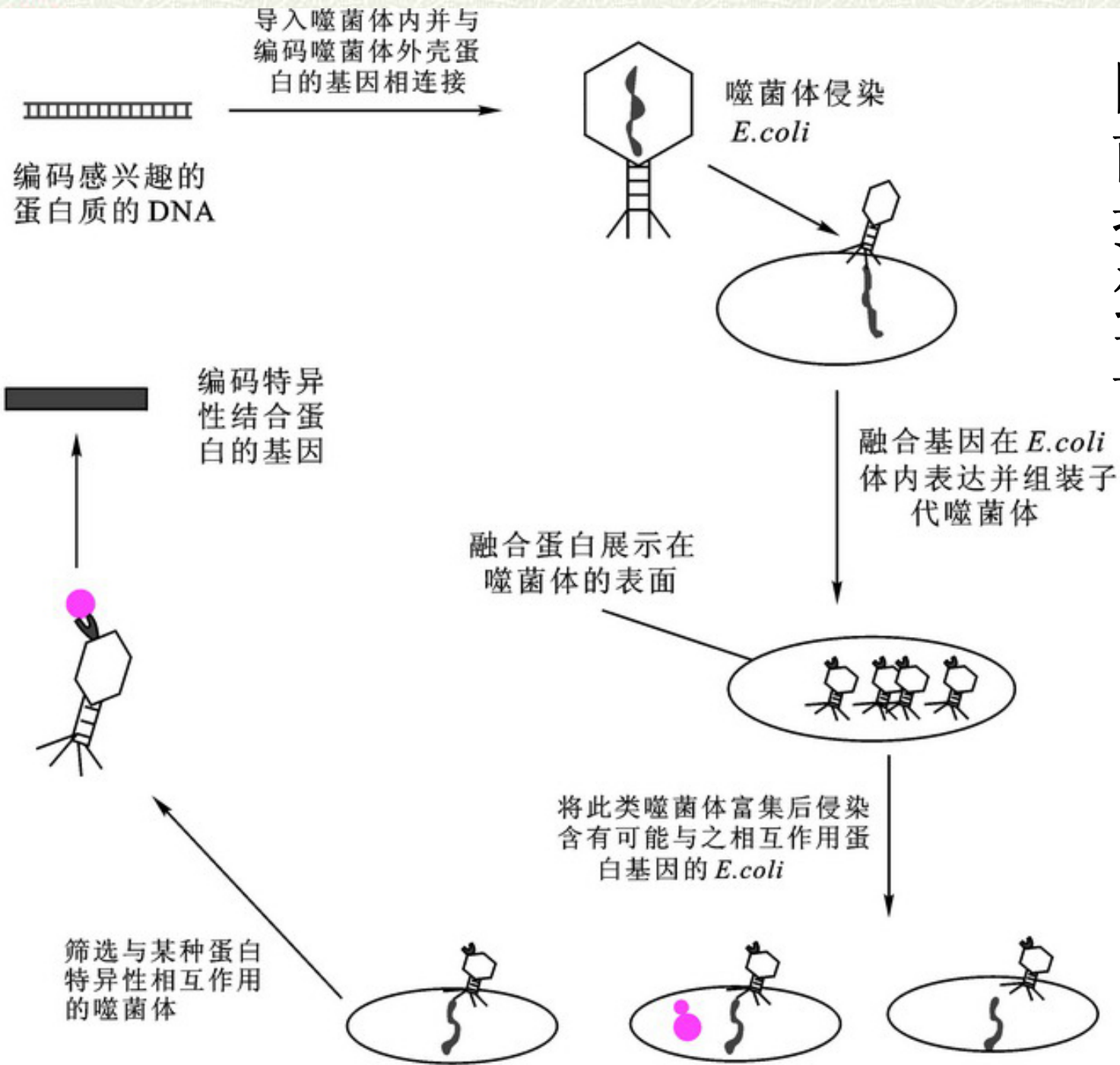


图6-36 噬菌体展示技术研究蛋白质相互作用。



蛋白质磷酸化分析技术

由于细胞内可能有多达上千个蛋白激酶，体内检测某个蛋白激酶活性非常困难，科学家常用体外激酶活性分析法来检测蛋白激酶活性。该方法能十分可靠地鉴定某个蛋白激酶对底物的磷酸化作用，筛查激酶的特异性底物。

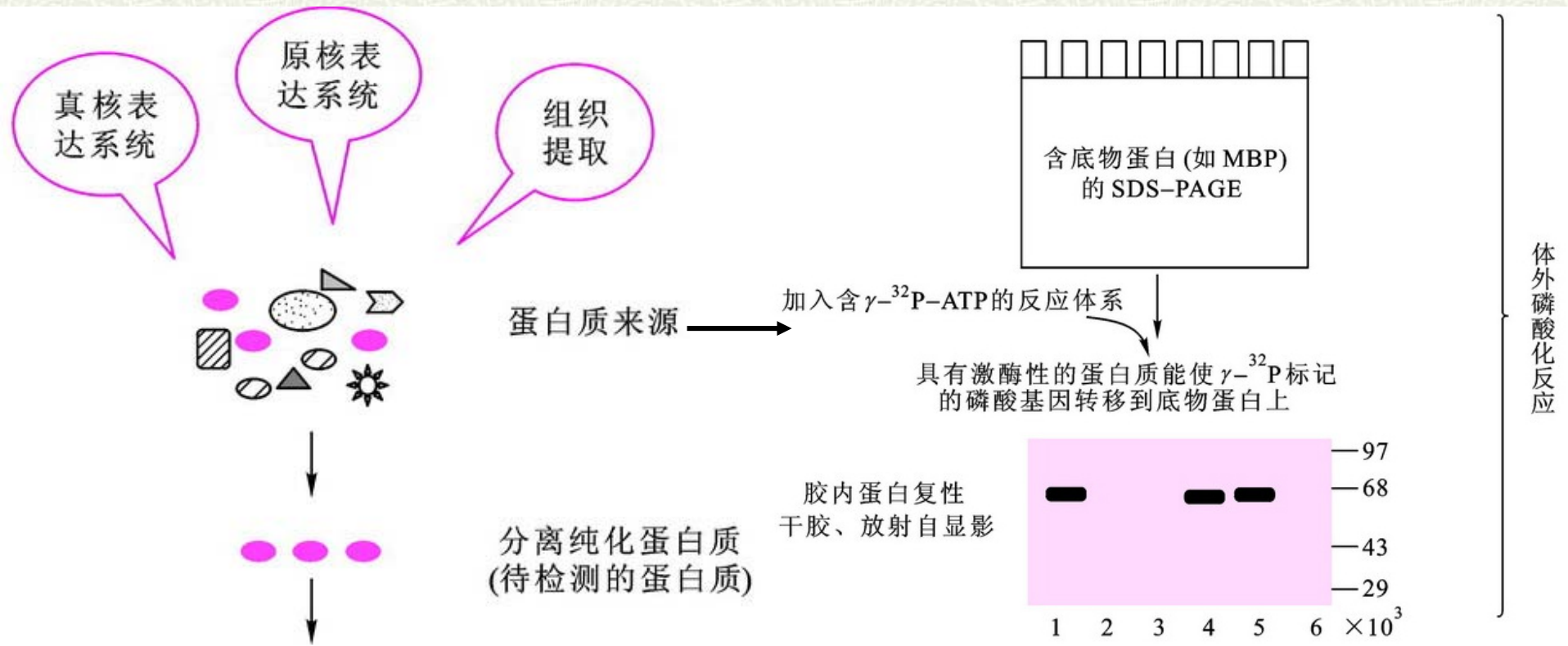


图6-38 蛋白激酶体外磷酸化活性分析