

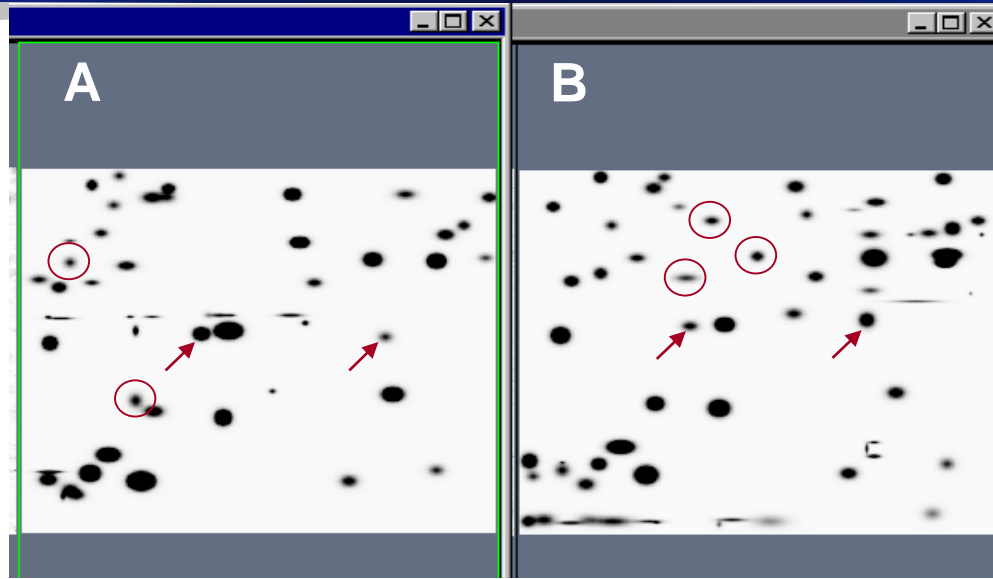


# 基因结构与功能 分析的基本策略

喻红

武汉大学基础医学院生化系

# 问题？



利用比较蛋白质组学从某一病理组织中检测到一种新的蛋白质，下一步？

探讨相关基因结构与功能，请设计研究方案及相关方法

# Main Contents

基因结构与功能分析概述

基因结构与功能的生物信息学分析

基因启动子及调控序列的结构分析

基因编码区结构分析方法

基因功能分析方法

# 基因结构与功能的研究策略

新基因

新蛋白



生物信息学的分析与预测  
序列同源性比对、查找、定位、功能预测

新基因结构研究

新基因功能研究

基因编码区结构分析

基因启动子等调控序列分析



编码区

- cDNA文库分析
- qPCR—基因拷贝数
- FISH-定位及拷贝数
- DNA芯片及SNP芯片
- RNA剪接分析

启动子

- 启动子克隆
- 足迹法
- EMSA
- ChIP
- 报告基因
- 启动子捕获

转录起始点

- cDNA克隆测序
- cDNA末端快速扩增(RACE)
- Deep-RACE
- 5'端连续分析基因表达(5'SAGE)
- 帽分析基因表达(CAGE)

## 第四节

# 基因功能分析策略

## Strategies for Analyzing Gene Function

# 基因功能研究技术策略的演绎

**基因功能分析** 即从细胞的生物学行为或生物个体的表型遗传性状的变化鉴定基因的功能。

**基因表达分析** { **mRNA检测**  
**蛋白水平检测**

Northern blot, 1977  
Western blot, 1979  
基因表达序列标签(EST), 1980s'  
PCR, 1986  
DNA/EST/mRNA数据库, 1990s'  
生物芯片: 基因表达谱检测, 本世纪初  
.....

**基因生物学功能鉴定技术**

转基因、基因打靶技术  
1980~90s'

**功能获得策略**  
**功能失活策略**  
**随机突变筛选策略**

# 基因功能研究技术策略

1. 生物信息学在预测基因功能中的应用

2. 基因表达谱的分析

- mRNA 转录谱检测
- 蛋白质水平的表达谱分析

3. 基因的生物学功能分析技术

- 功能获得策略
- 功能失活策略
- 随机突变筛选策略

# 一. 基因表达谱的分析

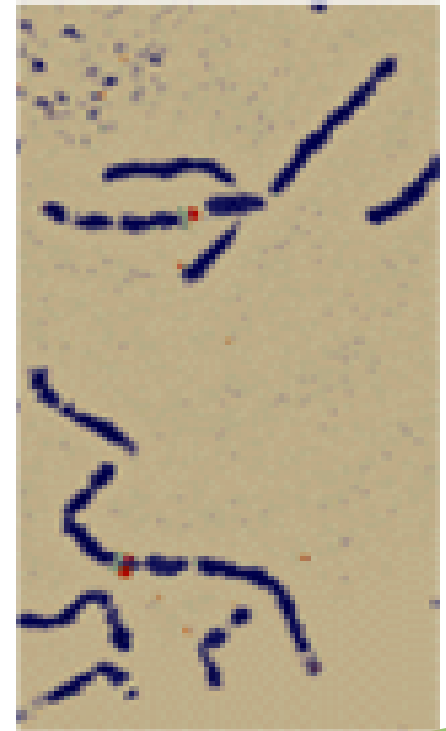
## (一) 基于杂交的方法可检测mRNA表达水平

### 1. Northern印迹 (Northern blot)

- 既可分析mRNA表达又可验证cDNA新序列

### 2. 原位杂交实验 (ISH)

- 可对细胞/组织中mRNA进行区域定位及定量分析





# 一. 基因表达谱的分析

## (二) RT-PCR是常用的mRNA检测方法

### 1. 反转录PCR

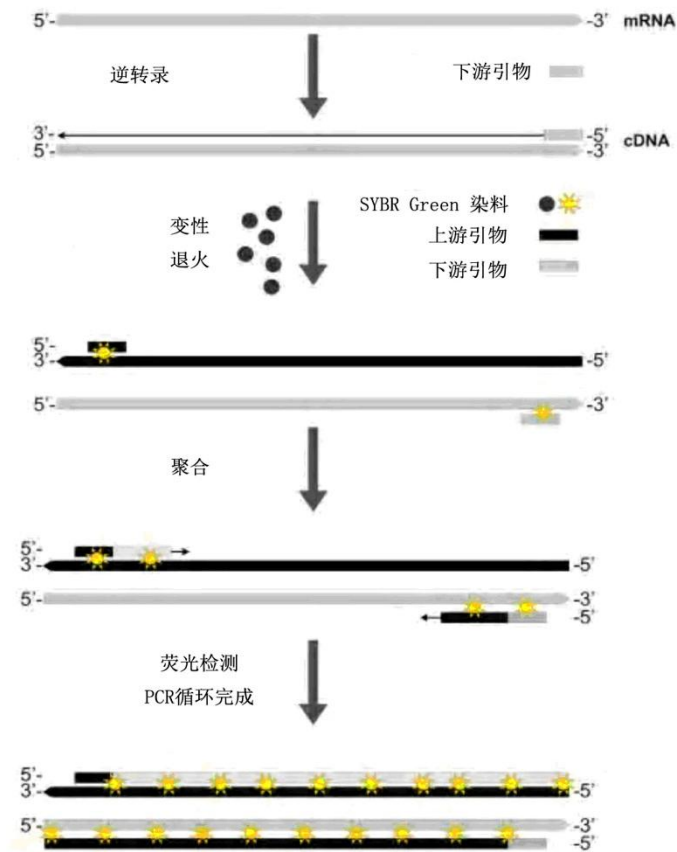
( reverse transcription-PCR, RT-PCR )

➤ 用于mRNA定性及半定量分析

### 2. 实时定量PCR

( Real Quantitative PCR, RT-qPCR )

➤ 常用于mRNA的定量分析



SYBR Green-Real time PCR示意图

# 一. 基因表达谱的分析

## (三) Western blot 可直接测定基因编码多肽

### Western blotting (蛋白质印迹)

根据抗原抗体的特异性结合对细胞或组织样品中某种特异蛋白进行定性和半定量分析。

基本原理与核酸分子杂交相似，只是以偶联标记物的抗体分子作为探针，检测转移到固相支持物上的蛋白质/多肽分子。

1. 蛋白质样品的制备
2. SDS-PAGE分离
3. 蛋白质转膜及膜封闭
4. 标记探针与膜上蛋白结合 (特异的第二抗体及标记的抗抗体孵育)
5. 酶的底物反应而显影、成像、扫描信息。

## Western blot 基本流程

# 一. 基因表达谱的分析

## (四) 酶联免疫吸附分析检测蛋白质水平

酶联免疫吸附分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

也是建立在抗原-抗体反应基础上的蛋白质定性与定量分析方法。

不需电泳分离样品，而将样品包被在支持体上，再经吸附结合特异一抗及酶标二抗（也可预先包被抗体，“吸附”抗原），酶-底物反应后通过酶标仪测定。

**特点：**

高灵敏度及特异性；稳定、操作简便，标本用量少，适于大规模筛查。

# 一. 基因表达谱的分析

## (五) 原位免疫组化可检测组织/细胞表达的蛋白质

免疫组织化学 immunohistochemistry } 免疫组化  
免疫细胞化学 immunocytochemistry }

又被统称为免疫荧光法 immunofluorescence

- 可应用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜(confocal microscopy)对靶分子进行定性、定量和定位分析，是在蛋白质水平分析基因表达的直观方法。
- 运用双重或多重着色可同时对多个感兴趣的靶分子进行检测，可揭示更多有关细胞群的功能和它们之间相互作用信息。

# 一. 基因表达谱的分析

## (六) 流式细胞术分析表达特异蛋白质的阳性细胞

**flow cytometry**利用荧光标记抗体与抗原的特异性结合，通过流式细胞仪分析荧光信号，检测特异蛋白质表达阳性的细胞。

- 可检测活细胞，也可检测甲醛固定的细胞。
- 广泛应用于细胞表面和胞内分子表达水平的定量分析，并能区分细胞亚群。
- 也可使用多个荧光标记抗体同时对多个基因产物进行监测，是对细胞进行快速分析、分选及特征鉴定的一种有效方法。

# 一. 基因表达谱的分析

## (七) 基因表达研究的高通量检测技术

“芯片”等快捷、灵敏、信息量大，适合“组学” (omics) 研究，更适合生命活动过程相关的基因表达谱分析。

A. 基因芯片、高通量测序技术、SAGE和CAGE  
在基因水平高通量分析基因表达

B. 蛋白质芯片和双向电泳  
在蛋白质水平高通量分析基因表达

高通量筛选技术(High throughput screening, HTS)

# 一. 基因表达谱的分析

## (七) 基因表达研究的高通量检测技术

### 1. 基因芯片 gene chip 是基因表达谱分析的常用方法

又称DNA微阵列 (DNA microarray)、DNA芯片 (DNA chip)，将大量已知序列的核酸片段（包括寡核苷酸、cDNA、基因组DNA、microRNA等）集成点阵排列在一基片上，通过与标记样品进行杂交，检测、获取细胞或组织的基因信息。

基因表达谱 (expression profile) 分析是目前基因芯片应用最多的一个方面，主要采用cDNA芯片，比较不同状态(如生理、病理)下的基因表达谱，揭示转录组 (transcriptome) 差异表达的规律，对探索发病机制、评价治疗、筛选药物靶标具有重要意义。

# 一. 基因表达谱的分析

## (七) 基因表达研究的高通量检测技术

### 2. 高通量测序技术是新一代基因表达谱分析方法

可一次对几十万到几百万个DNA分子片段进行测序，从而快速获得转录组或基因组的全貌，又称为深度测序。

#### 主要应用：

- 🌻 DNA测序；
- 🌻 基因组分析：DNA水平——大规模分析基因组多态性、甲基化、筛选突变基因；RNA水平——对RNA片段进行扫描、定量与鉴定，对全基因组进行广谱表达研究。
- 🌻 对小分子RNA或非编码RNA(ncRNA)的研究。轻易检测短序列，高度同源的小分子RNA；还能发现新的小分子RNA。（“开放系统”）



# 一. 基因表达谱的分析

## (七) 基因表达研究的高通量检测技术

### 3. 蛋白质芯片 protein chip 用于蛋白质表达谱的分析

根据制作方法和用途不同，

可分为

1. 蛋白质检测芯片
2. 蛋白质功能芯片

抗体芯片

抗原芯片

配体芯片

碳水化合物芯片等

用来研究蛋白质修饰、蛋白-蛋白/DNA-蛋白/RNA-蛋白，以及蛋白与脂质、蛋白与药物、酶与底物、小分子-蛋白等的相互作用

# 一. 基因表达谱的分析

## (七) 基因表达研究的高通量检测技术

### 4. 双向电泳结合质谱常用于蛋白表达谱分析和鉴定 双向PAGE (即二维电泳two-dimensional electrophoresis, 2-D电泳)

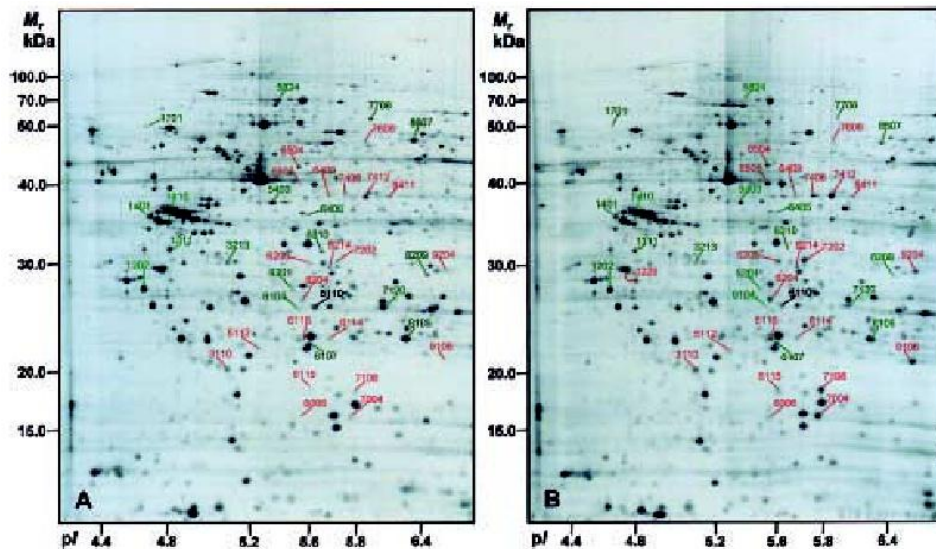
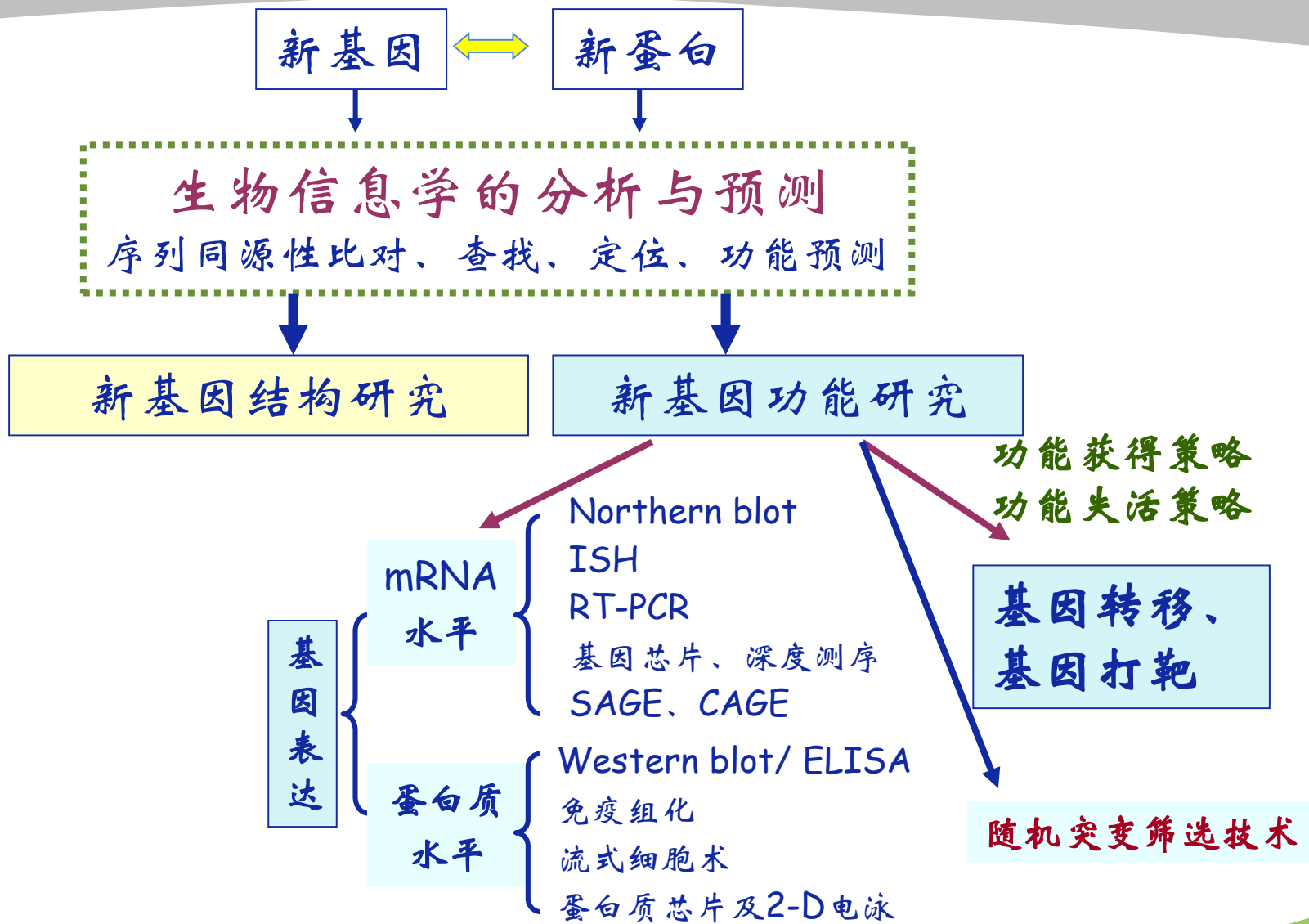


Figure 1. 2-DE patterns of the whole-cell proteins from (A) JX-0 cells and (B) JX-1 cells. Red arrows indicate the proteins that were upregulated in JX-1 cells, and green arrows indicate those that were downregulated,  $P < 0.01$ ; the spot 6110 with black arrow was not significantly altered in expression level but identified as HSP 27, and spot 1229 detected only in JX-1 cells is red circled.

分离后比较差异蛋白，还可切取凝胶中的蛋白点，经胰蛋白酶消化后得到短肽片段，利用质谱 (mass spectrum)对差异表达的蛋白质进行定性分析。

# 基因结构与功能的研究策略



**基因功能获得策略**即将目的基因直接导入某一细胞或个体中，使其获得新的或更高水平的表达，通过细胞或个体生物性状的变化来研究基因的功能。常用方法有：

## 转基因技术

### 基因敲入 (基因打靶技术, gene targeting)

**基因功能失活策略**是通过观察细胞或个体的某一基因功能被部分或全部失活后，细胞生物学行为或个体遗传性状表型的变化，来鉴定基因的功能。

### 基因敲除 Gene knock-out (基因打靶)

### 基因敲减 Gene knock-down

## 二、基因转移技术分析基因功能

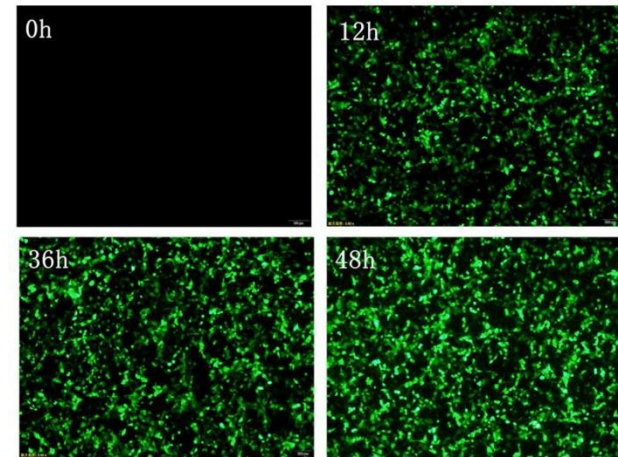
### (一) 基因转染细胞模型用于功能研究

将目的基因插入真核表达载体如腺病毒、Lentivirus等载体，转入某一细胞使基因高表达，通过观察细胞生物学性状变化而认识基因的功能。

是目前最常用的基因功能研究方法。

二种方式：

1. 转染不表达该基因的细胞；
2. 在低表达该基因的细胞导入，使目的基因过表达



人类人工染色体 (human artificial chromosome, HAC) ，可携带包含完整基因或多个基因，以及基因外显子、附近的染色体调控区，为目的基因提供了一个类似正常染色体的环境，保证了转基因在正常细胞中的时空表达。



## 二、基因转移技术分析基因功能

### (二) 转基因动物可在整体水平研究基因的功能

#### 转基因动物 (transgenic animal) :

将外源目的基因整合入受精卵细胞或ESC，然后导入模拟的胚胎发育生长环境，发育成带有目的基因、并能稳定遗传的新个体。

近真实地再现外源基因在整体水平的调控规律及其表达所致的表型变化，从系统性和独立性角度研究基因的功能。

整体动物水平是目前层次最高的实验体系。



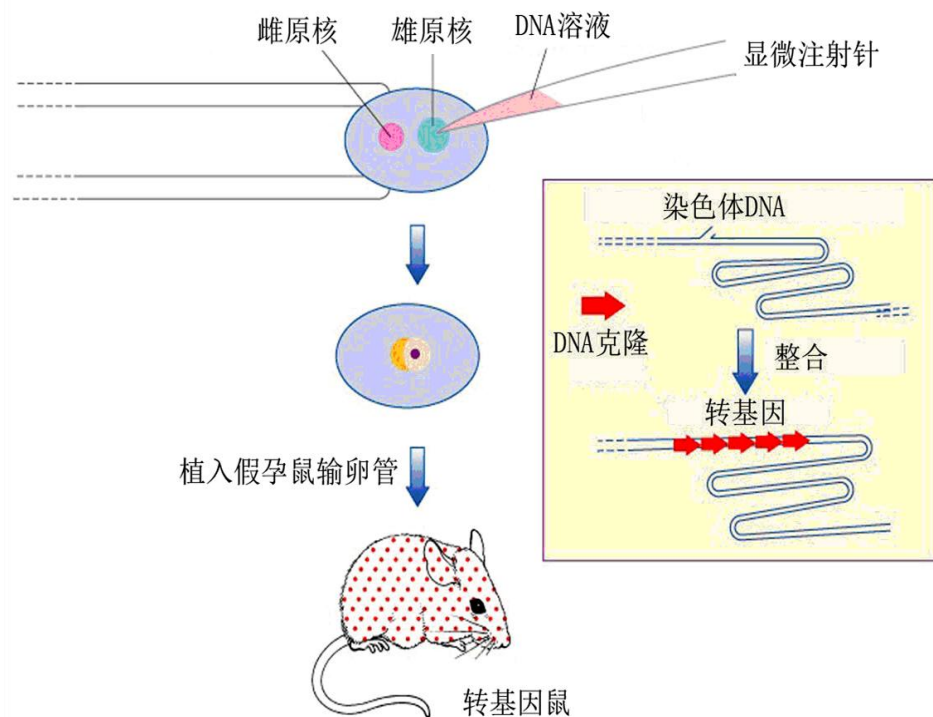
1982，世界首例转基因超级鼠——转大鼠生长激素基因的小鼠

## 二、基因转移技术分析基因功能

### (二) 转基因动物可在整体水平研究基因的功能

#### 基本制作过程包括：

- 转基因表达载体的构建
- 外源基因的导入
- 转基因动物的获得和鉴定
- 转基因动物品系的建立以及外源基因表达的鉴定



转基因动物制作原理示意图

## 二、基因转移技术分析基因功能

### (二) 转基因动物可在整体水平研究基因的功能

#### 优点:

转基因疾病动物模型具有遗传背景清楚、遗传物质改变简单、更自然更接近疾病的真实症状等优点。

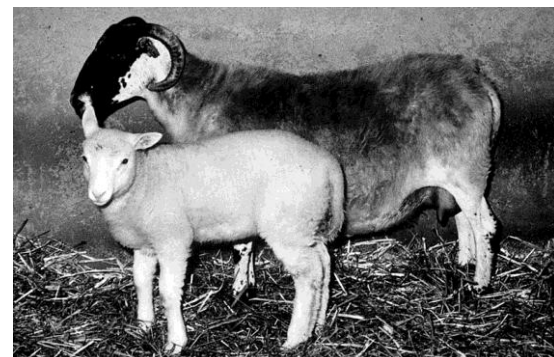


FIGURE 7.12  
Dolly the sheep with her surrogate mother. Dolly was cloned by nuclear fusion of an adult cell with an enucleated egg.

© 2005 Brooks/Cole, a division of Thomson Learning, Inc.

#### 仍存在的问题:

1. 外源基因随机插入宿主基因组，可能产生突变；
2. 外源基因在染色体上整合的拷贝数不等；
3. 外源基因可遗传丢失而导致不稳定遗传等。





## 二、基因转移技术分析基因功能

### (二) 转基因动物可在整体水平研究基因的功能

#### 转基因技术在不断完善

- 表达转基因获得**时空特异性的调控**，在构建转基因表达载体时，选择只在特定的细胞类型或特定的生命时期才启动基因表达的启动子，即可使外源基因获得时空特异性的表达。

可调控的基因表达系统也是一种常用的方法：

如**四环素调控系统**，该表达系统可使转基因动物体内外源基因的表达受诱导剂（四环素）的调控，通过加入或去除诱导剂，就可以实现对外源基因表达时间及水平的控制。

# 三、基因打靶技术分析基因的功能

## 基因打靶：gene targeting

- 是一种定向修饰生物活体特定基因从而改变相关性状的实验手段，技术的产生和发展建立在胚胎干(ES)细胞技术和同源重组的基础之上。
- 主要包括基因敲除、基因敲入和基因敲减技术
- 通过基因灭活、点突变引入、缺失突变、外源基因定位引入、等使特定基因敲除失活、新基因敲入或基因敲减，使生物体内遗传信息修饰并表达突变的性状，从而进行基因功能研究

# 三、基因打靶技术分析基因的功能

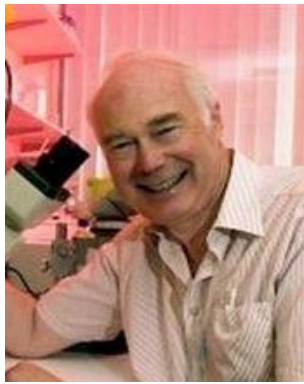
2007年诺贝尔生理学或医学奖

“涉及胚胎干细胞和哺乳动物DNA重组方面有着一系列突破性发现”



马里奥·卡佩基

将外源无功能的DNA整合入细胞染色体中，重组置换正常基因，正常基因被敲除 (Knockout)



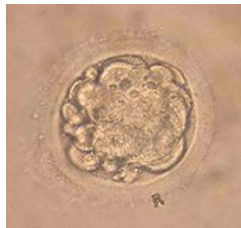
马丁·埃文斯

第一位成功地繁殖胚胎干细胞  
英国



奥利弗·史密斯

利用“同源重组”把正确基因导入骨髓造血细胞，治疗遗传性血液病



由于老鼠有着和人类非常类似的基因，从生理学角度看，通过对小鼠体内不同基因的功能进行了解，可以进而指导对人类的基因研究。从医学角度看，通过了解基因与疾病的关系，人类可以开发出更为有效的治疗手段及药物。”

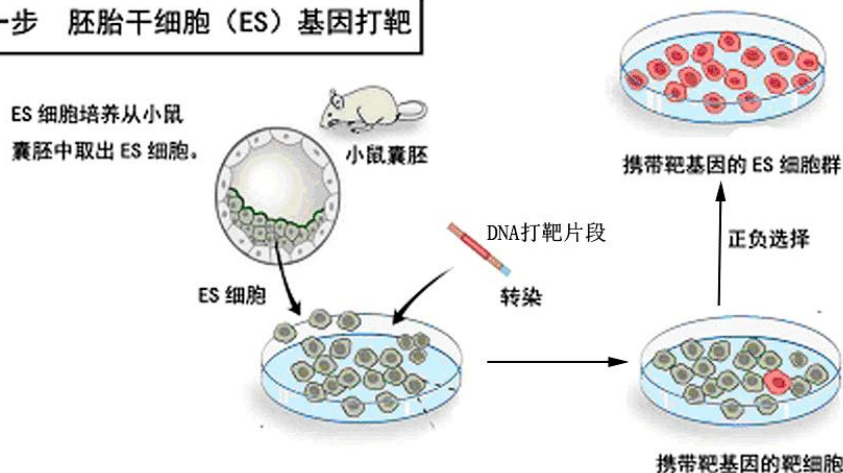
# 三、基因打靶技术分析基因的功能

## 基因打靶：

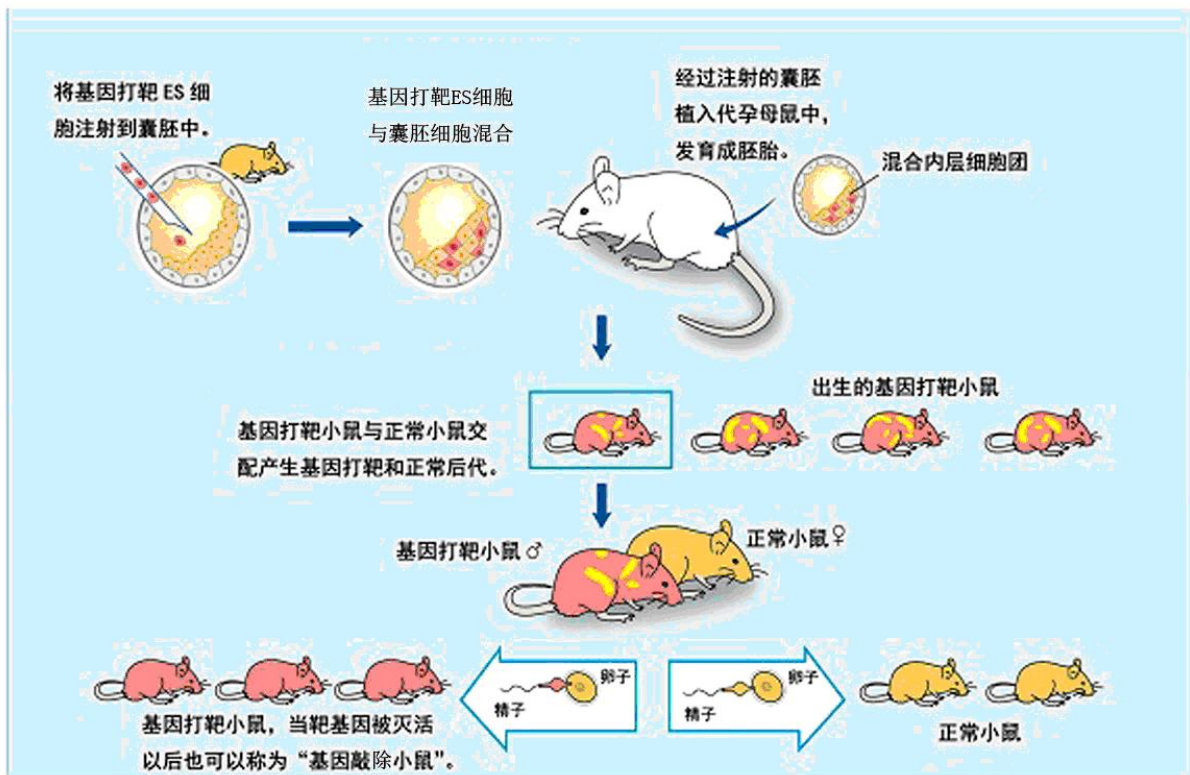
- ① 构建重组载体；
- ② 从小鼠囊胚分离出未分化的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)
- ③ 利用同源重组原理“正负筛选法”筛选获得中靶的ESC
- ④ 将修饰的ESC移植回小鼠囊胚，分化、发育为“嵌合鼠”；
- ⑤ 杂交交配，传代出生纯合体。

# 基因打靶的原理示意图

## 第一步 胚胎干细胞 (ES) 基因打靶



## 第二步 将基因打靶胚胎干细胞 (ES) 细胞培育成基因打靶小鼠



# 三、基因打靶技术分析基因的功能

## (一) 基因敲除

Gene knock-out 属于基因打靶技术的一种，可使基因的功能完全缺失

是利用染色体DNA可与导入的外源DNA在相同序列的区域发生同源重组的现象，在ES细胞中定点破坏内源基因，然后利用ES细胞发育的全能性，获得带有预定基因缺陷的杂合子，通过遗传育种最终获得目的基因缺陷的纯合个体。

1987年，首次建立了完整的ES细胞基因敲除的小鼠模型，此后基因敲除技术得到进一步的发展和完善，目前该技术已经成为研究基因功能最直接、最有效的方法之一。



# 三、基因打靶技术分析基因的功能

## (一) 基因敲除

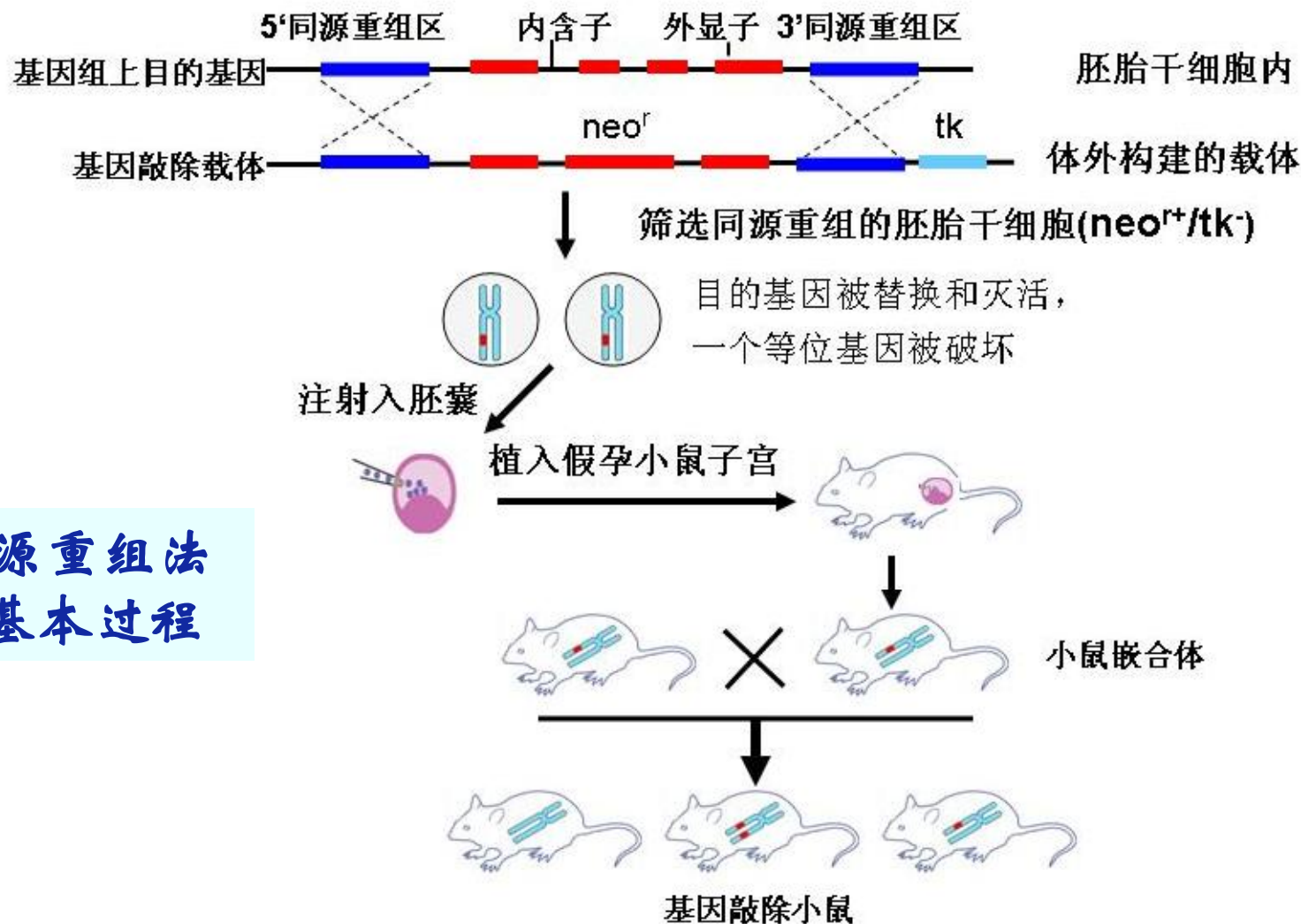


图12-8 同源重组法  
基因敲除的基本过程

# 三、基因打靶技术分析基因的功能

## (一) 基因敲除

条件性基因敲除 (conditional gene knock-out) 是对目的基因在不同发育阶段和不同器官、组织的选择性敲除。

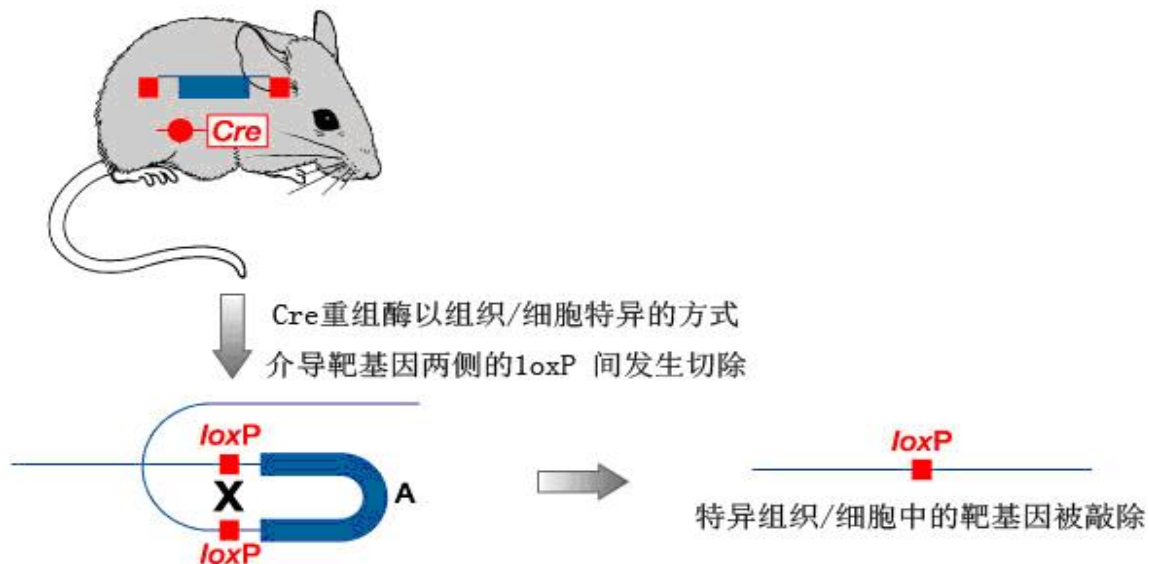
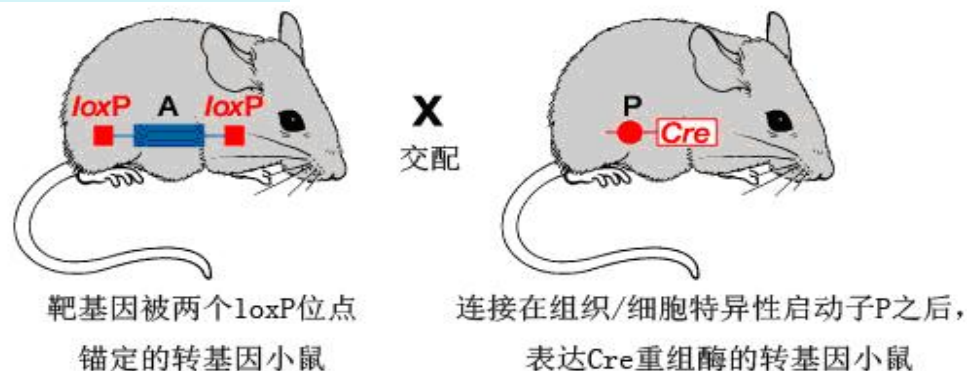
基因被完全敲除之后使得表型分析受到很多限制：

- 有些重要的靶基因被敲除后会引起胚胎早期死亡，无法分析成年期该基因功能；
- 某些基因在不同的细胞类型中执行不同的功能，完全敲除会导致突变小鼠出现复杂表型，很难判断异常表型是由一种细胞引起的，还是由几种细胞共同引起的。



# 三、基因打靶技术分析基因的功能

## (一) 基因敲除



Cre/loxP系统的条件性基因敲除原理

# 三、基因打靶技术分析基因的功能

## (一) 基因敲除

### 条件性基因打靶的优势：

1. 克服了重要基因被敲除所导致的早期致死
2. 能客观、系统地研究基因在组织器官发生、发育以及疾病发生、治疗过程中的作用和机制

### 技术的缺点：

1. 费用太高
2. 周期较长
3. 许多基因在剔除后并未产生明显的表型改变，可能是这些基因的功能为其他基因代偿所致

# 三、基因打靶技术分析基因的功能

## (二) 基因敲入可实现基因的定向插入

Gene knock-in 也属于基因打靶技术的一种，可实现基因的定向插入。

通过同源重组，用某一基因替换另一基因，或将一个设计好的基因片段插入到基因组的特定位点，使之表达并发挥作用。

基因敲入可以研究特定基因在体内的功能；也可与之前基因的功能进行比较；或将正常基因引入基因组中置换突变基因以达到靶向基因治疗的目的。

# 三、基因打靶技术分析基因的功能

## (三) 基因敲减(基因沉默、基因失活)

采用功能失活策略鉴定基因的功能

### Gene knock-down (Gene silencing)

是指由外源基因导入引起的生物体内的特定基因不表达或表达受抑制的现象。

最常用的基因沉默技术包括：

1. RNA干扰 (RNA interference, RNAi) 转录后基因沉默

2. 反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASON)

采用功能失活的策略之一，可利用siRNA——在细胞水平、整体水平上研究基因的功能。

# 三、基因打靶技术分析基因的功能

## (三) 基因敲减(基因沉默、基因失活)

### 1. RNA干扰 (SiRNA) 可引发基因沉默

利用dsRNA介导同源序列的mRNA特异性降解，导致的**转录后基因沉默**。

RNAi是机体的一种天然防御机制，具有防御病毒感染、入侵等功能。

利用RNAi能够在短时间内高效特异地抑制靶基因表达的特点研究基因的功能已成为功能基因组学的热点之一。

若将RNAi技术与Cre/loxP重组系统以及基因表达调控系统相结合，建立条件转基因动物模型，则不仅具有稳定、可遗传、可诱导等特点，而且无需使用胚胎干细胞技术和基因打靶技术，与基因敲除相比具有简单、易操作、周期短等优势。

已被作为一种简便和有效的工具广泛用于基因功能的研究。

### 缺点：

1. 该技术可能对靶基因的相似序列发生作用，导致脱靶（off-targeting）效应。
2. 还可能诱导干扰素和其他细胞因子的表达。

# 三、基因打靶技术分析基因的功能

## (三) 基因敲减(基因沉默、基因失活)

### 2. 反义寡核苷酸可引发基因沉默

**ASON**是指能与mRNA互补配对的RNA分子，长度约为20nt左右。

**ASON引发基因沉默的机制：**

- 可能是通过与靶mRNA互补结合后以位阻效应抑制靶基因的翻译；
- 也可能通过与双链DNA结合形成三股螺旋而抑制转录；
- 也不能排除激活细胞内的Dicer酶进入RNA干涉途径而降解靶mRNA。

ASON技术简便易行，已成为研究基因功能的方法之一。

## 四、随机突变筛选策略

利用转基因、基因敲除等技术从特定基因的改造到整体动物表型分析的“反向遗传学”研究也存在明显的局限性：

1. 生物体的代偿机制，使得基因敲除动物常常观察不到异常表型；
2. “反向遗传学”只能对已知的基因进行研究，而人类基因组中尚有90%以上的非编码序列处于未知状态；
3. 由于“功能缺失”和“功能获得”小鼠常出现胚胎期死亡，而目前条件性基因改造的启动子还很少，从而阻碍了成体动物中特定基因的功能分析；
4. 由于一个蛋白有多个不同的功能域，特定基因在不同位点上的突变可能产生不同的表型，应用单一的“功能缺失”方法，显然不可能发现这些

故基于“正向遗传学”（从异常表型到特定基因突变）

的随机突变筛选策略逐渐受到青睐。



## 四、随机突变筛选策略

随机突变筛选策略的第一步是通过物理诱变、化学诱变或生物技术产生大量的基因组DNA突变。

**ENU诱变**是近年来发展起来的研究基因功能的新手段。ENU是一种化学诱变剂，它通过对基因组DNA碱基的烷基化修饰，诱导DNA在复制时发生错配而产生突变。


- ✦ ENU诱变主要诱发**单碱基突变**，双突变的情况非常少，更接近于人类遗传性疾病的基因突变情况。
- ✦ ENU**突变效率**非常高，可达0.2%，是其他突变手段的10倍左右。
- ✦ ENU处理后雄鼠精子基因组发生点突变，使得后代小鼠有可能出现突变表型，经筛选及遗传试验即可得到**突变系小鼠**。对其深入研究、对突变基因定位及位置候选法克隆突变碱基就会得到突变基因的功能信息。

## 四、随机突变筛选策略

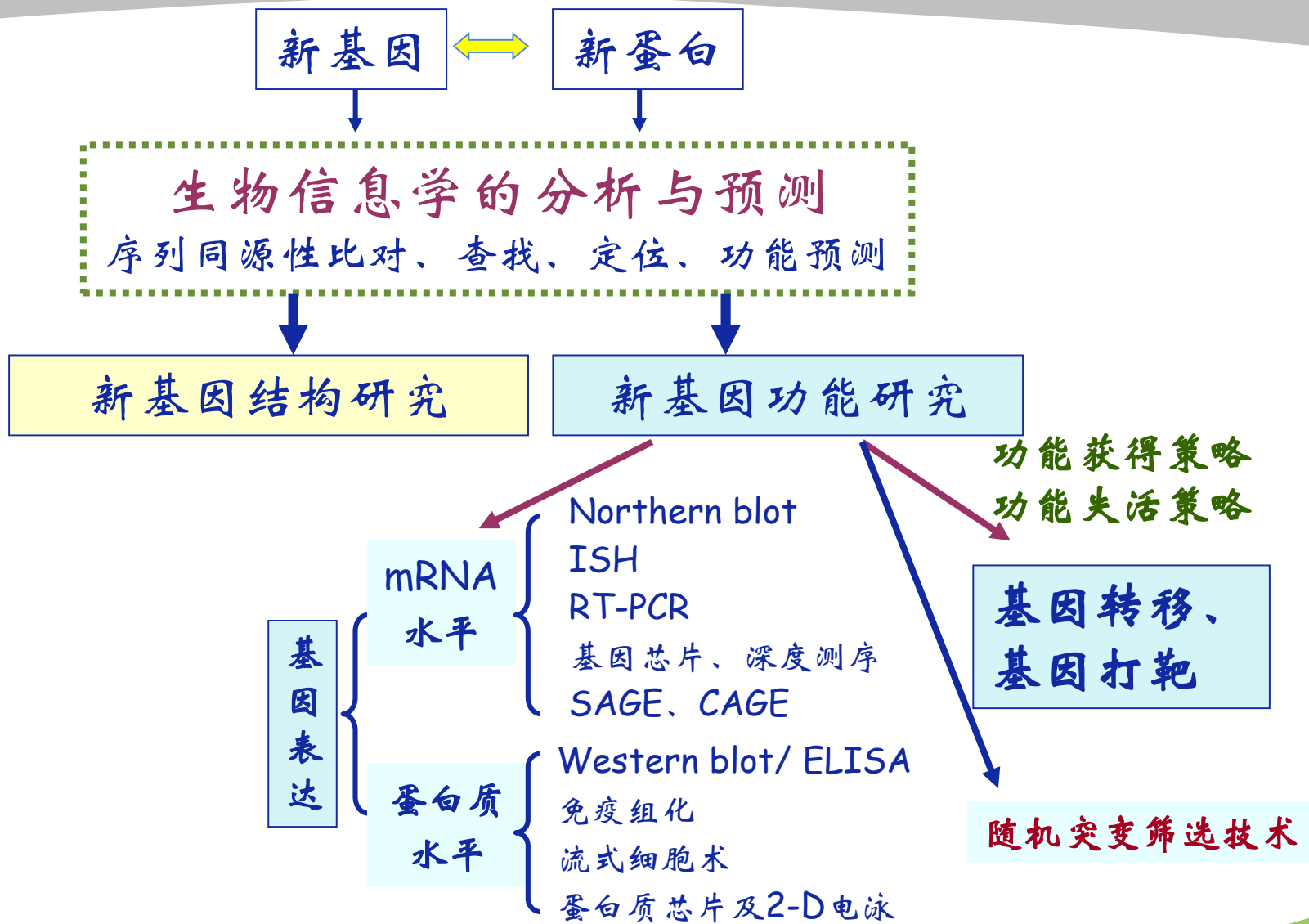
**基因捕获技术Gene trapping**是一种产生大规模随机插入突变的便利手段，对于揭示基因序列所对应的基因功能具有重要的应用价值。

### 基因捕获技术的基本过程：

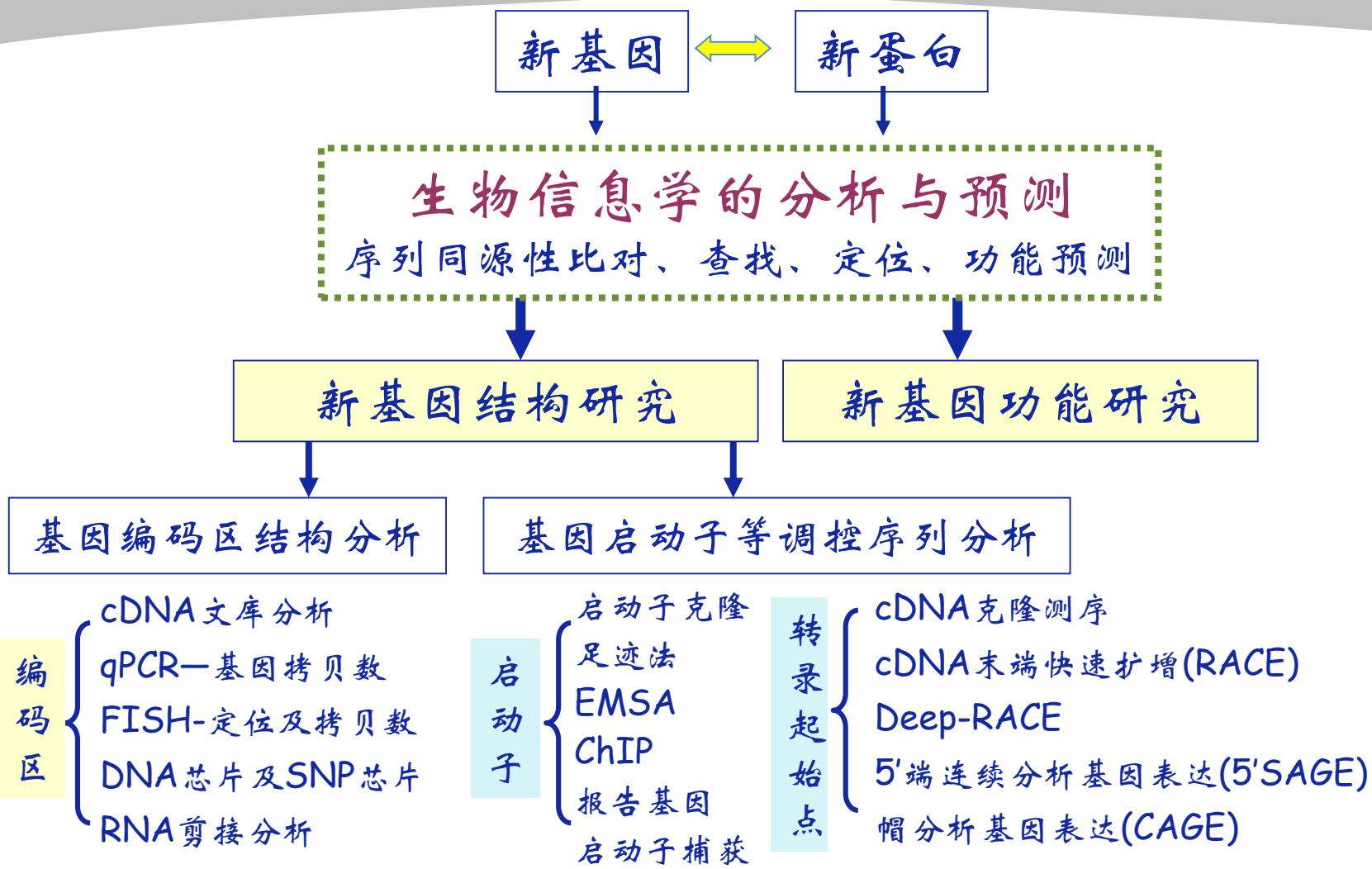
将一含报告基因的DNA载体随机插入基因组，产生内源基因失活突变，通过报告基因的表达，提示插入突变的存在，以及内源基因的表达特点。利用基因捕获可以建立一个携带随机插入突变的ES细胞库，每一种ES细胞克隆中含有不同的突变基因，ES细胞克隆经囊胚注射发育为**基因突变动物模型**，通过对动物模型的表型分析鉴定突变基因的功能。

 基因捕获技术可节省大量构建特异打靶载体，以及筛选染色体组文库的工作及费用，成为可同时对基因的序列、基因的表达以及基因的功能进行研究的高效技术。

# 基因结构与功能的研究策略



# 基因结构与功能的研究策略



# 小结

# 问题？

- 利用比较蛋白质组学从某一病理组织中检测到一种新的蛋白质，拟进一步探讨相关基因结构与功能，请设计研究方案及相关方法。

充分应用生物信息学已知数据进行预测和分析；

基因功能的鉴定最终仍需要通过实验来验证，尤其是在整体水平（模式生物）的研究。

结合基因功能获得和失活技术，从正反两方面解析。

- *PATH to success*

*Persistence*

*Accuracy*

*Think and Try*

*Honest and Hardworking*



See You !