

报告基因的显微观察及其在生物学研究中的应用

报告基因—reporter gene

- 编码可被检测的蛋白质或酶的基因,其表达产物容易被鉴定;
- 将它的编码序列和目的基因的表达调控序列或目的基因相融合,转化到生物体中;
- 通过检测其表达可以研究在生物体内,调控序列的作用方式或目的基因的表达调控。

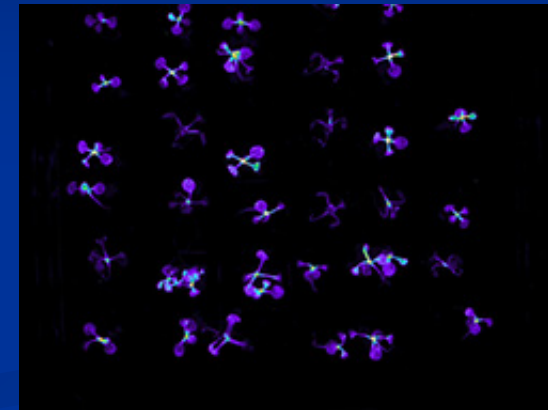
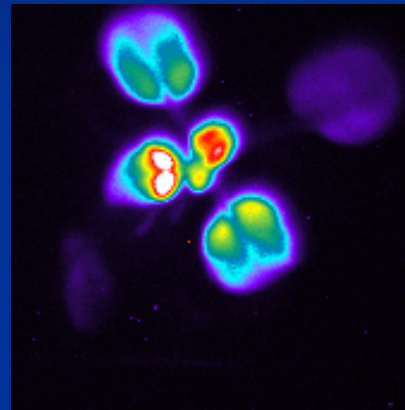
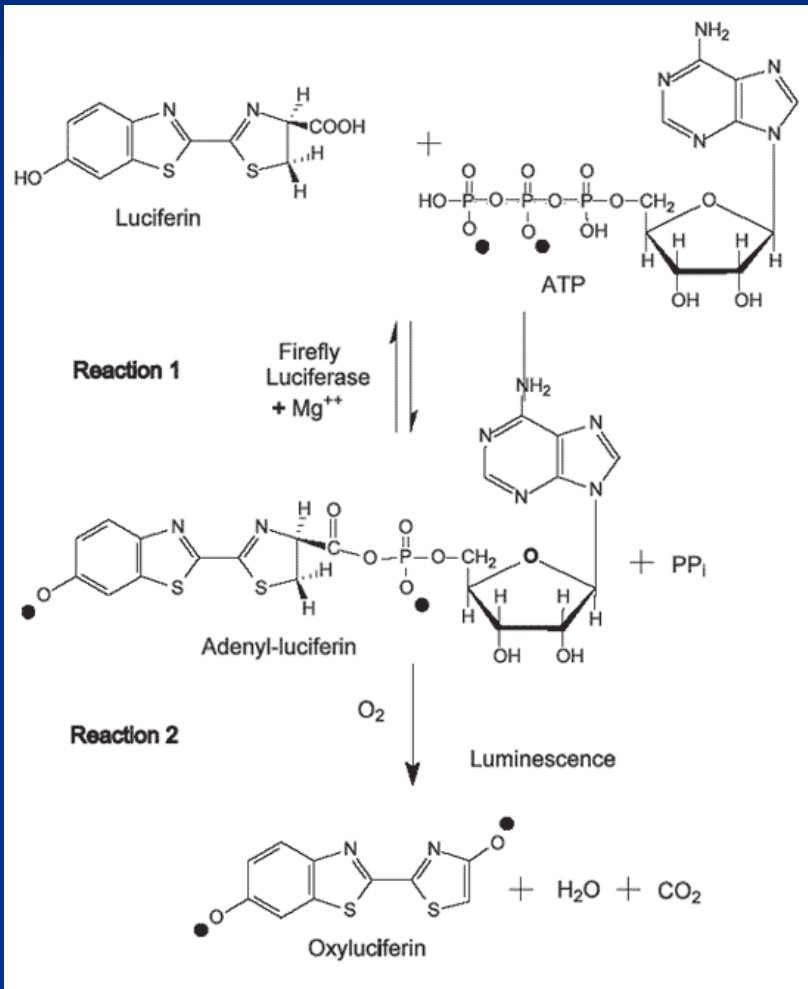
哪些基因可用作报告基因？

- 已被克隆和全序列已测定；
- 表达产物在受体细胞中不存在，即无背景，在被转染的细胞中无相似的内源性表达产物；
- 其表达产物容易观察或能进行定量测定

植物中常用的报告基因

| 基因名称 | 基因编码蛋白 | 检测方法 |
|------------|--|---|
| GUS | β -D-glucuronidase (β -D-葡萄糖苷酶) | 催化底物形成 β -D-葡萄糖苷酸，它在植物体中几乎无背景，组织化学检测很稳定 |
| Luciferase | 荧光素酶 | 在有ATP、 Mg^{2+} 、 O_2 和荧光素(luciferin)存在下发出荧光(化学发光, chemiluminescent) |
| GFP | 绿色荧光蛋白 | 蓝色激发光下发出绿色荧光 |

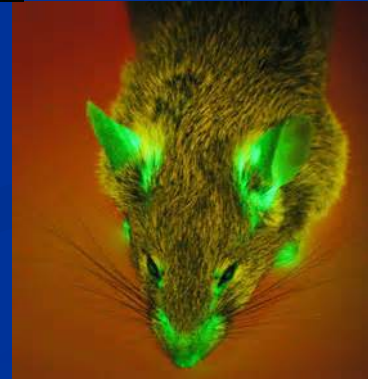
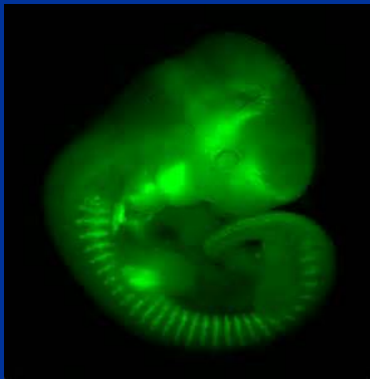
Luciferase



- Luciferase在底物存在的条件下高度不稳定，因此适合于动态调控的研究；
- 用生物钟调控的启动子驱动Luciferase 的表达；
- 通过该转基因植物研究植物的生物周期节律的调控，分离突变体；
- 这一系统的优势在于高通量、非破坏性、自动监测

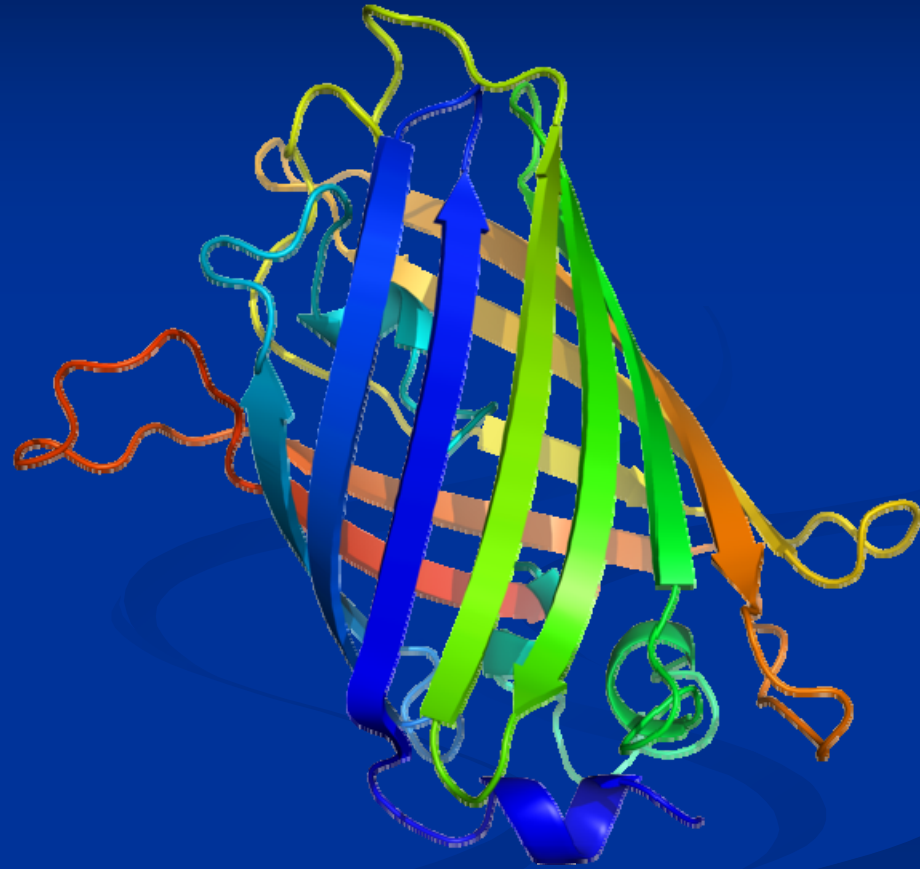
绿色荧光蛋白--GFP

- GFP最初从水母, *jellyfish Aequorea victoria* 中分离出
- 在分子生物学和细胞学领域, GFP是广泛使用的报告基因



绿色荧光蛋白--GFP

- GFP蛋白含238 氨基酸残基，分子量29.6KDa
- Fluorescent protein (荧光蛋白):
在蓝-紫外光的激发下产生强的绿色荧光

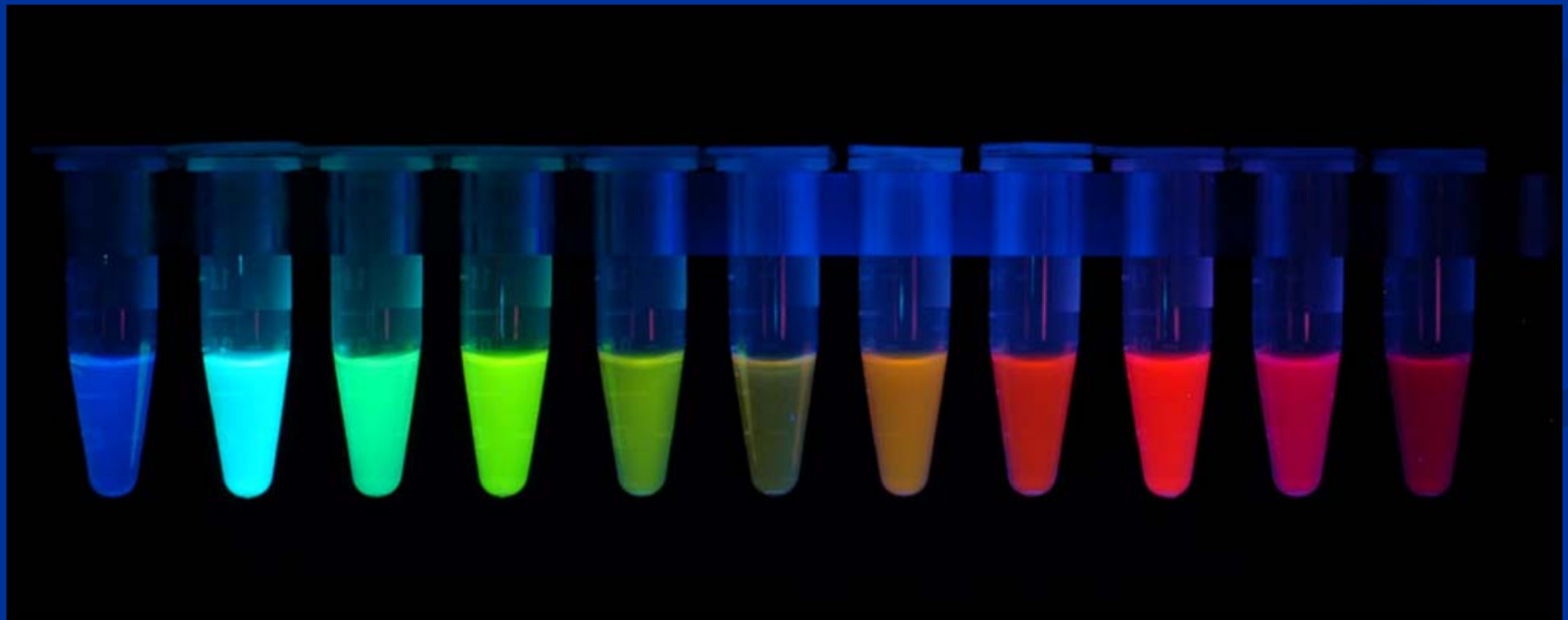
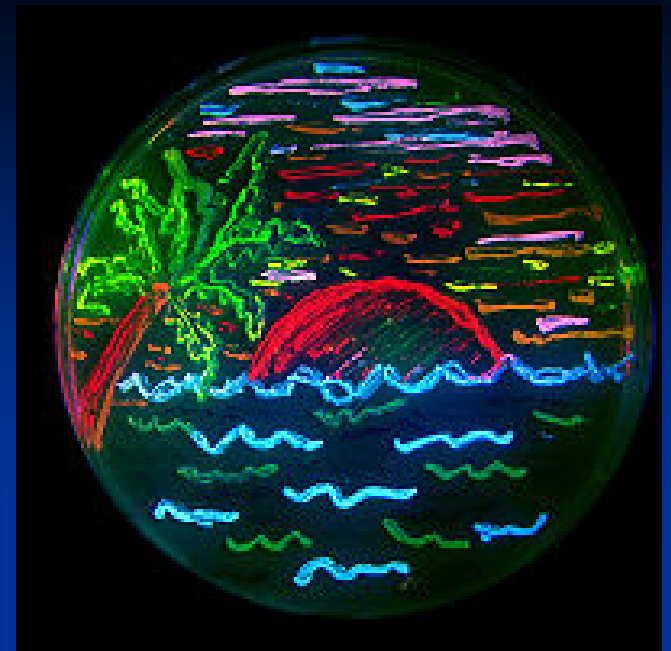


2008 诺贝尔奖得主：

Osamu Shimomura：发现 GFP；

Roger Chalfie：将GFP用作报告基因；

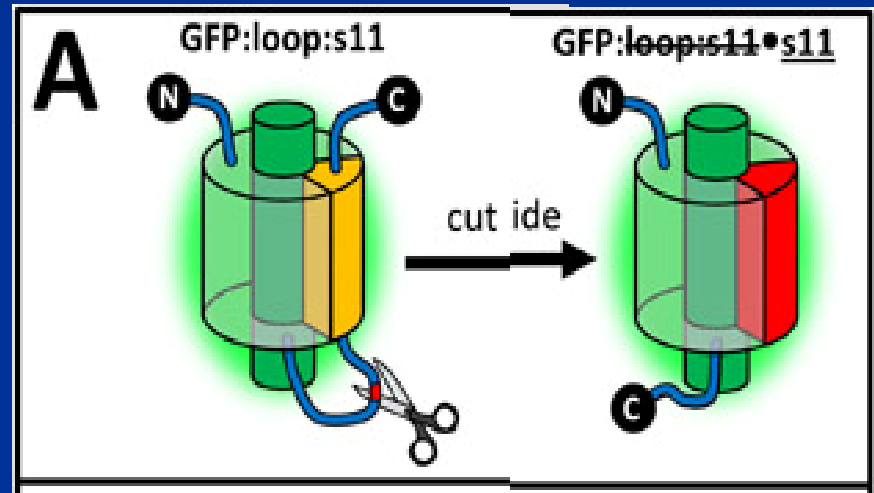
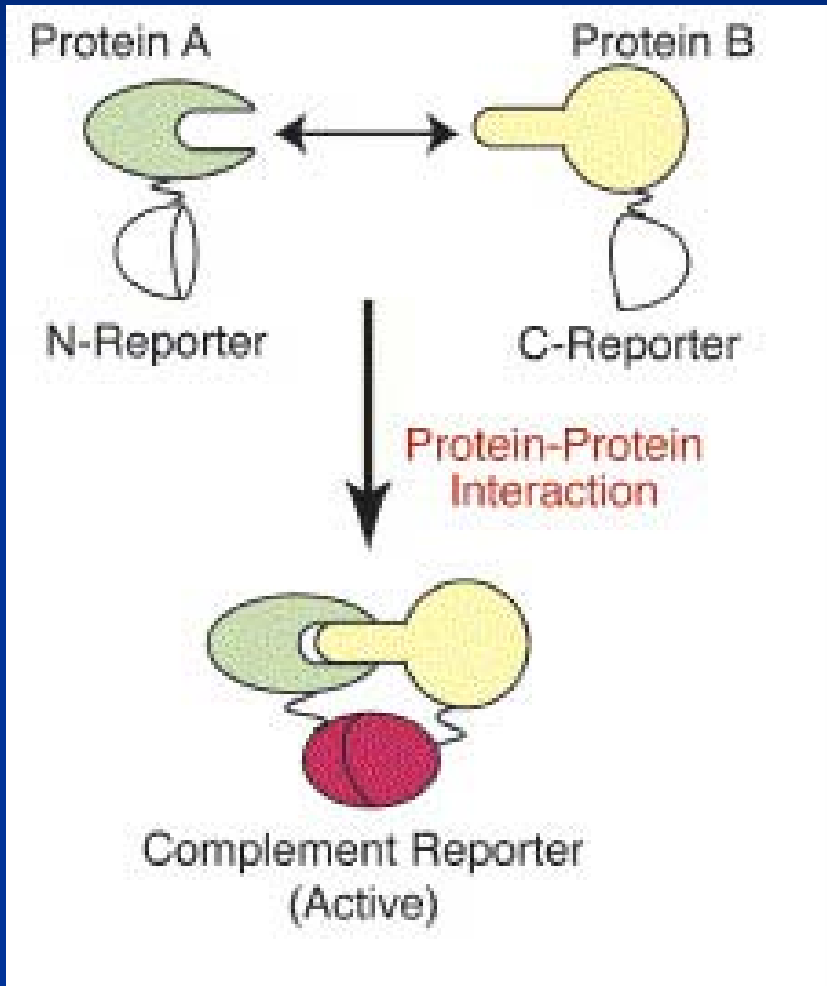
Roger Tsien：揭示GFP产生荧光的机制，研发出一系列GFP的衍生物。



报告基因在植物中的主要应用

- 研究基因表达调控序列（组织特异性表达，调控序列的确定）
- 蛋白质的细胞内定位、运动
- 蛋白质相互作用（split Luciferase/GFP）、降解等
- 信号转导途径的研究

Protein interaction_Split GFP



Promoter activity

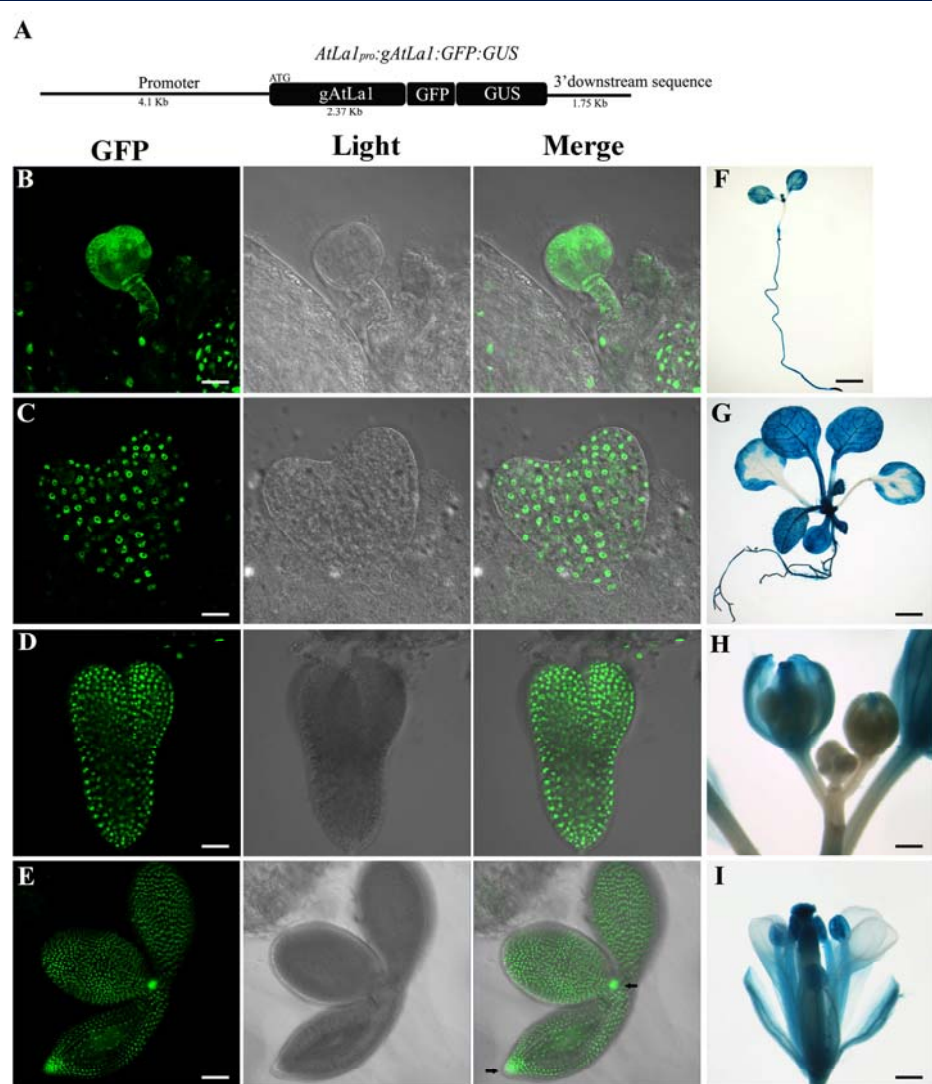


Figure 1. The expression pattern of the *AtLal* gene in *Arabidopsis*

(A) Diagram of the *AtLal_{pro}:gAtLal:GFP:GUS* construct.

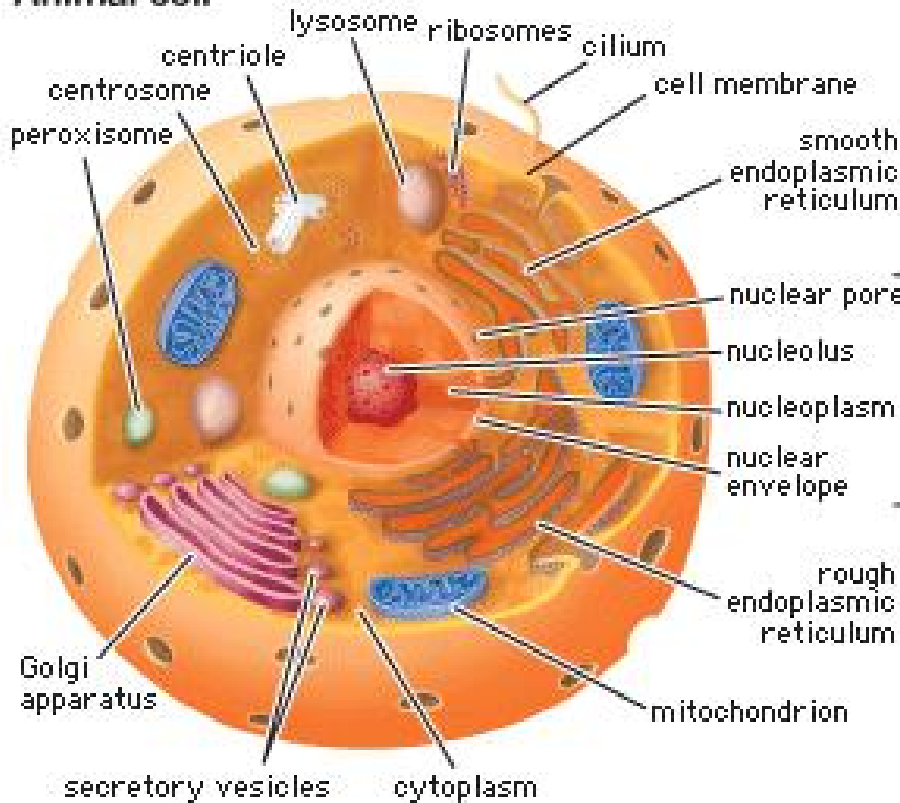
(B) - (E) Expression of the *AtLal* gene at the global stage (B), heart stage (C), torpedo stage (D), and mature stage (E) during the embryogenesis of the *AtLal_{pro}:gAtLal:GFP:GUS* plant. The arrows in E indicate the SAM and RAM.

(F) - (I) Expression of the *AtLal* gene in 5-day-old seedlings (F), 3-week-old seedlings

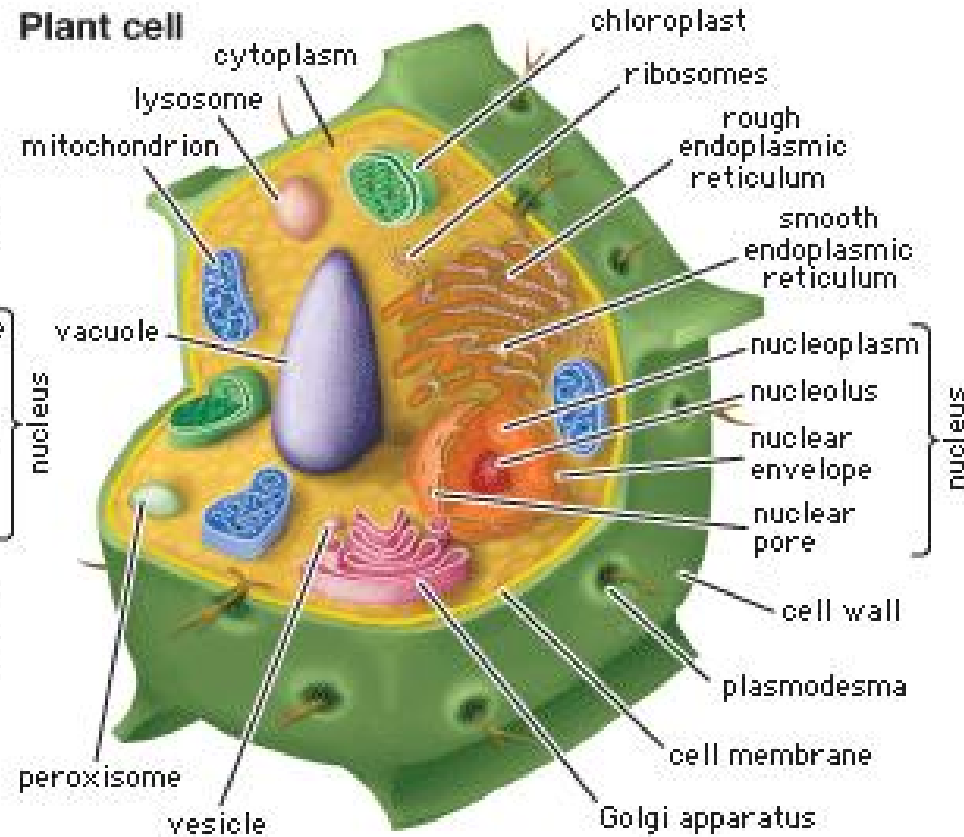
蛋白质的细胞内定位

Typical animal cell and plant cell

Animal cell

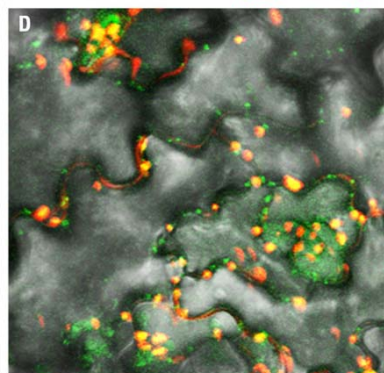
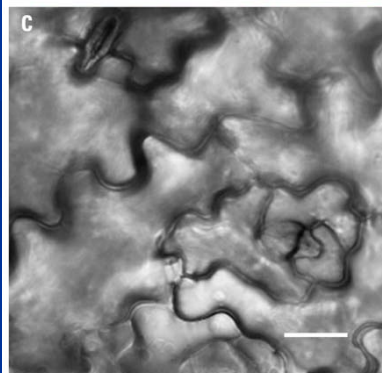
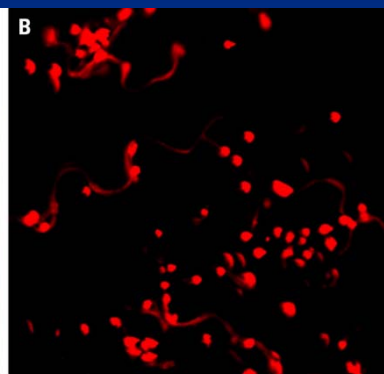
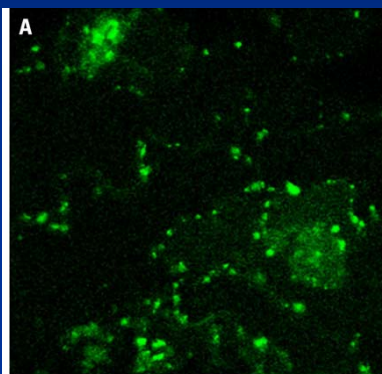
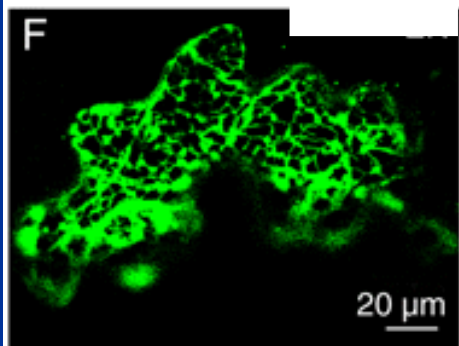
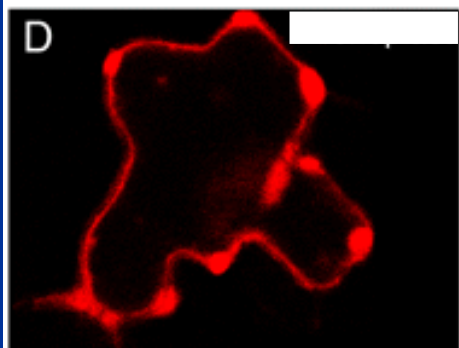
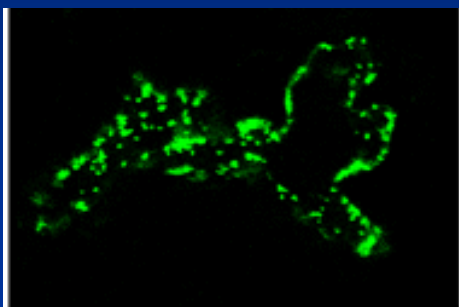
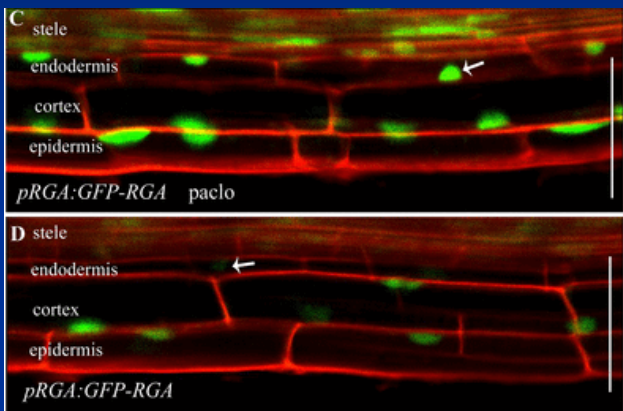


Plant cell



细胞核 液泡膜
 ER 线粒体
 高尔基体 叶绿体
 细胞膜 核仁

蛋白质的细胞内定位

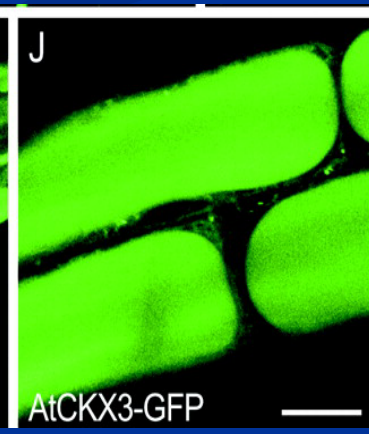
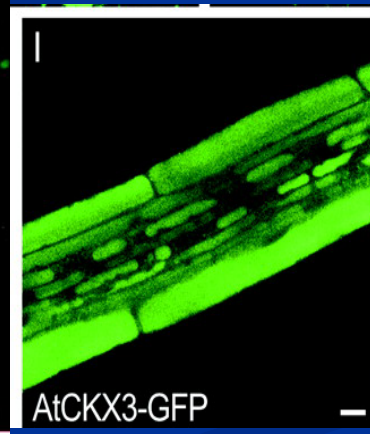
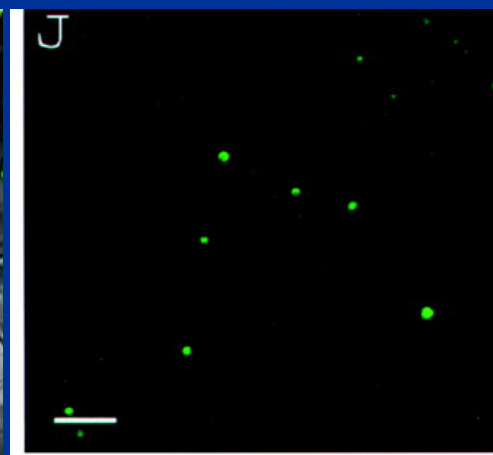
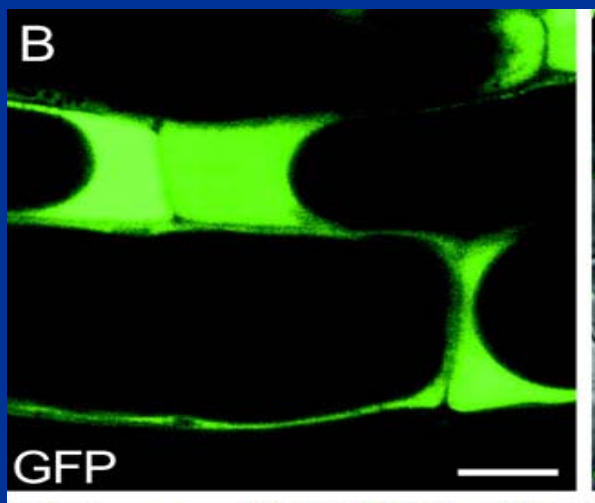
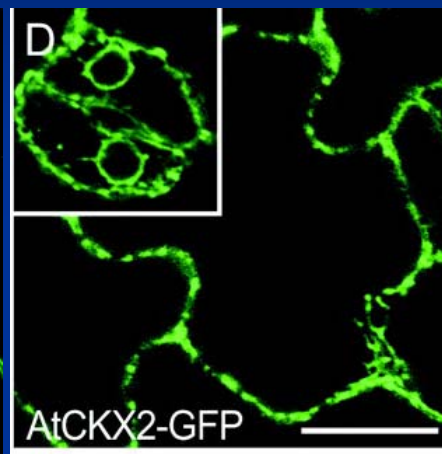
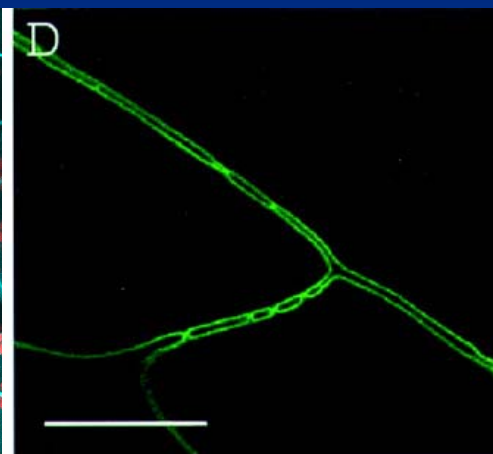
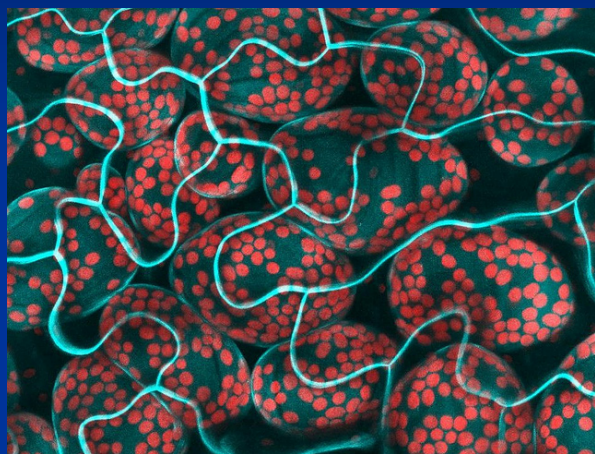


Bright field

Merged

细胞核 液泡膜
ER 线粒体
高尔基体 叶绿体
细胞膜 核仁

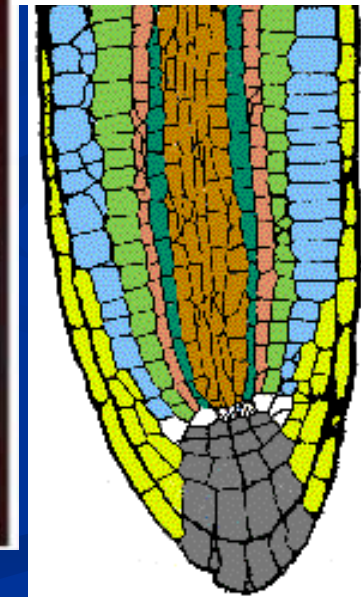
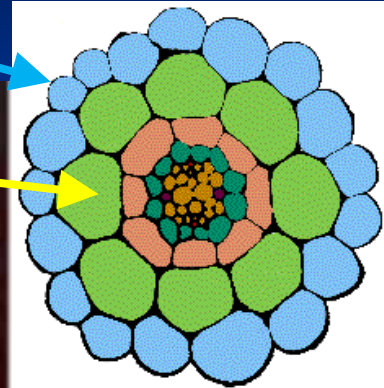
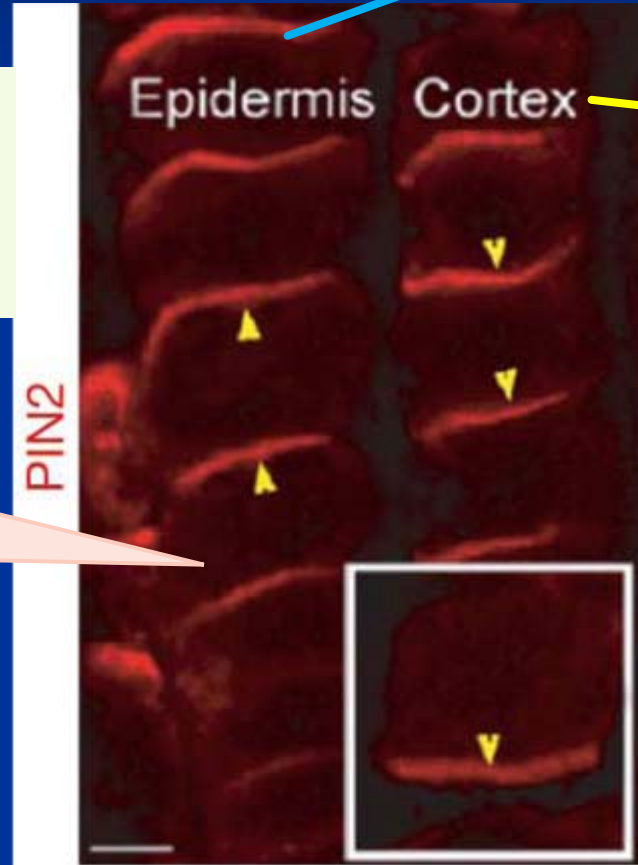
蛋白质的细胞内定位



Different PIN proteins orient differently

PIN2 localizes to the lower surface of root cortex cells and the upper surface of epidermal cells.

PIN2 is functions primarily in the redistribution of auxin during root gravitropism



报告基因在生长素信号转导途径的运用

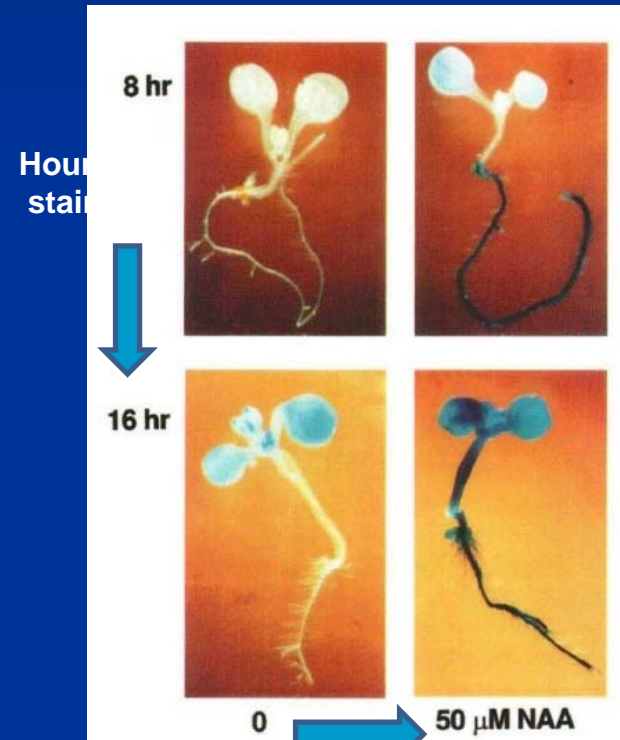
DR5::GFP



AuxRE

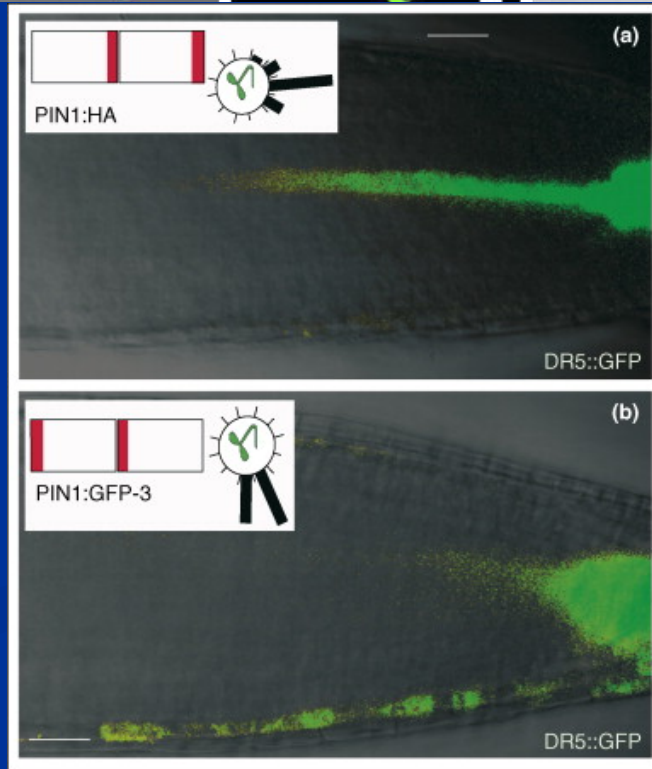
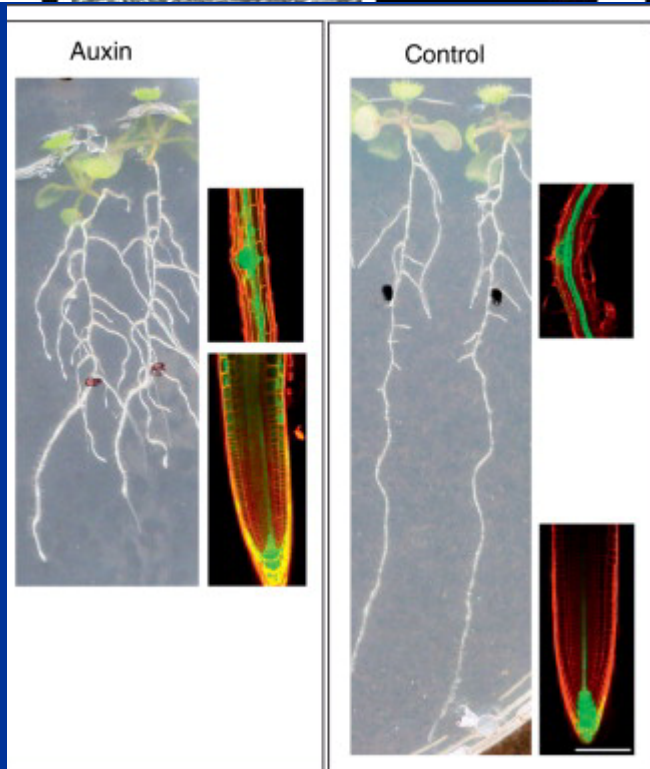
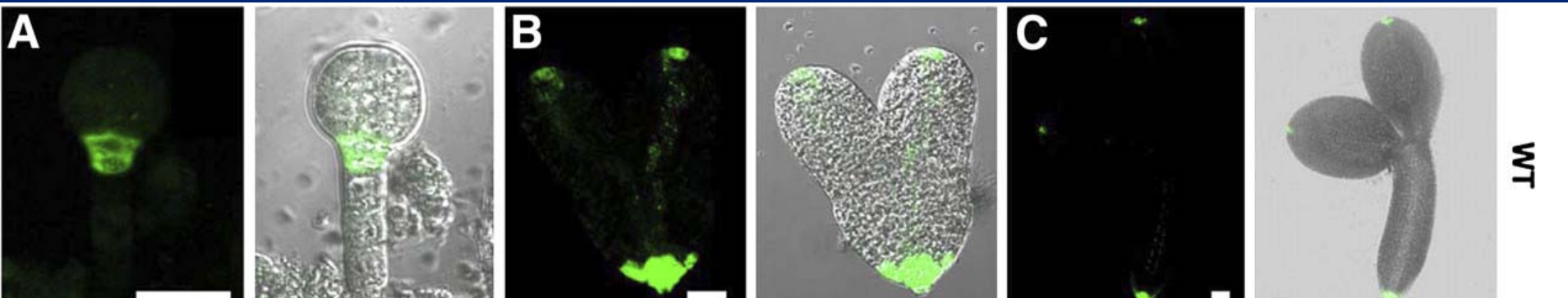
DR5报告基因主要用于检测植物体内生长素反应水平

DR5 由7个生长素应答元件 (auxin-response element , AuxRE) 组成。该元件是生长素应答转录因子 (auxin-responsive transcription factors , ARFs)的结合位点。



Auxin-response level increases with exogenous auxin (NAA)

DR5::GFP



重力方向

实验材料

转基因植物

- DR5-GFP:生长素报告基因 (GFP)

EGFP

488

507

蓝色激发光 (3)

实验试剂、仪器

- 吲哚乙酸 (IAA, 生长素)
 - 1 μ M IAA
 - Propidium iodide, PI, 碘化丙啉
 - 1000x 母液 : 10 mg/ml PI in PBS或水 (避光)
 - 1x 工作液: 10 μ g /ml PI in PBS或水
- 荧光显微镜

Propidium Iodide (PI)

536

617

绿色 (4)、蓝色激发光

实验步骤

DR5-GFP在根部的表达观测

- PI 染色
 - 将植物根部浸泡在1XPI工作液中10秒—1分钟
 - 用水冲洗30秒

| | | |
|------|-----|-----|
| EGFP | 488 | 507 |
|------|-----|-----|

■ 制片

- 用擦镜纸擦载玻片
- 滴一滴水
- 用镊子取一棵幼苗，将根部在水中展开（可以将叶片切除）
- 用镊子夹取盖玻片，从一侧轻轻盖上

■ 显微镜操作

- 放下载物台，将载玻片放上载物台，旋转20X物镜至光路，滤光片在明场位置（1）
- 将载物台上升至离物镜很近处，不要碰到物镜
- 寻找视野中模糊的根，下调载物台，聚焦
- 移动载物台，寻找根尖
- 转换至40X物镜，滤光片调至蓝光（3）或绿光（4），打开shutter，观察

作业：

- 1.观察GFP荧光信号在DR5:GFP植株中的分布特点；
- 2.观察生长素处理后GFP荧光信号在DR5:GFP植株中的分布与信号强弱；