

1. 绪论

·基因工程：也叫DNA重组技术或分子克隆等，是在分子水平上进行的遗传操作技术。

将一种或多种生物体(供体)的基因或者基因组提取出来，或者人工合成的基因，按照人们的意愿，进行定向设计，经过体外加工、重组或编辑，转移到另一种生物体(受体)的细胞内，使之能在受体细胞遗传并获得新的遗传性状的技术。

·基因工程诞生的理论基础：理论上的三大发现和技术上的三大发明

理论上的三大发现：

- 1、DNA是主要的遗传物质
- 2、DNA双螺旋结构和半保留复制机理
- 3、中心法则和遗传密码的破译

技术上的三大发明：

- 1、限制性核酸内切酶的发现与DNA的切割
- 2、DNA连接酶的发现与DNA片段的连接

特点：1、内切酶 2、限制性：具有特异的识别位点和切割位点

大肠杆菌DNA连接酶(只连接黏性末端)。T4噬菌体DNA连接酶，

- 3、基因工程载体的研究和应用

基因只有在体细胞内才能发挥作用，所以必须把基因运到宿主细胞内。大多数DNA片段不具备自我复制的能力，所以必须将DNA片段连接到

一种特定的、能够自我复制的DNA分子上。

载体主要是小分子量的复制子，如：质粒、病毒、噬菌体。

·基因工程的基本步骤：

分1. 从供体基因组中，分离获得带有目的基因的DNA片段。

切2. 限制性核酸内切酶处理外源DNA和载体分子。

接3. 将目的基因接到载体上，形成重组DNA分子。

转4. 将重组DNA分子导入受体细胞。

增5. 培养扩增含重组体的细胞，获得大量的细胞繁殖群体。

检6. 筛选和鉴定转化细胞，获得使外源基因高效稳定表达的基因工程菌或细胞。

用7. 对获得的目的基因进行进一步研究和利用，设法使之实现功能蛋白的表达。

·基因工程的应用

自20世纪70年代兴起后，短短几十年间飞速发展，已成为生物科学的核心技术。

在农牧业、工业、环境、能源和医疗等领域展示出惊人的发展潜力和广阔的应用前景。其中农业是基因工程研究与应用中最为广阔、重要的领域之一。传统育种只能通过有性杂交获得动植物新品种，由于物种间存在生殖隔离，有性杂交只能在物种内进行。

基于生物界遗传密码的通用性和碱基配对的一致性，基因工程打破了物种界限，使原核生物与真核生物间、动物与植物间及人与其他生物间的遗传信息进行重组和转移。

(1) 基因工程在农业领域的应用

1、转基因农作物

1) 提高作物抗逆性 将各种抗病、抗虫、抗旱等基因转移到一些重要农作物中，达到提高抗性的目的。

2) 改良作物品质

(2) 基因工程在医学领域的应用

1、生产基因工程药品

胰岛素——治疗糖尿病

从猪、牛等动物的胰腺中提取，100 kg胰腺只能提取4-5 g；将合成的胰岛素基因导入大肠杆菌，每20 L培养液就能产生4 g胰岛素。

干扰素——抗病毒和抗肿瘤药物 对防治病毒性肝炎和恶性肿瘤有重要的作用。现已有了3个品种的基因工程干扰素

得国家新药证书，开始大批量生产。白细胞介素——调节免疫

乙肝疫苗——治疗乙型肝炎 1970至1990年代，乙肝是危害我国人民健康的严重疾病，夺走了几百万人的生命。

以往乙肝疫苗是从人血清中提取，基因工程乙肝疫苗的研制成功，具有巨大的经济效益和社会效益。

基因工程乙肝疫苗是我国正式批准投放市场的第一种高技术疫苗。

继乙肝疫苗之后，我国又研制成功了痢疾、霍乱等数种基因工程疫苗，均获得国家批准进入临床试验。

凝血因子 VII:病人一年需约为120 g，需从120 万升血浆中提取，以每人献血200 mL计，需600 万人献血提供血浆。改用转基因牛来生产，只需1.2 头牛产的牛乳即可满足。

激素抑制素:9 L培养液生产出50 mg的生物活性物质，相当于50万头羊 脑的提取量。

生长激素释放因子“SRIF”的动物激素:羊脑下垂体中提取，50万头羊 只能提取5 mg的产品，而现在只要用10 L培养液就可获得同样的产量。

2、基因诊断与基因治疗

基因诊断是利用重组 DNA 技术，以患者的 DNA 或 RNA 为材料，通过检验基因的序列、缺陷与异常表达，从而对人体健康状况和疾病做出诊断的方法。

基因诊断的临床意义在于对疾病做出早期确切的诊断，来确定患者对疾病的易感性以及疾病的分期分型、疗效监测和预后判断等。

目前基因诊断主要用于遗传性疾病、感染性疾病和肿瘤的基因诊断等三个方面。

3、动物或人体器官的复制

目前人造皮肤和人造耳朵已经成功，都是利用皮肤细胞进行培养得到的。人类角膜、心脏肺瓣、血管、耳、膀胱、肌肉、乳房组织替代物等工程化组织均已在实验室里生长。

(3) 基因工程在工业领域的应用

1、食品工业 利用基因工程技术进行微生物菌种改造，生产食品酶制剂和食品添加剂，已经广泛应用于酿酒业、发酵乳制品、酱油和食醋的生产中。

2、能源工业

以能源植物为主，包括燃料酒精、生物柴油、生物制氢和生物燃料等。

(1)提高植物光合效率

(2)生产燃料酒精

科学家们还在研究利用基因工程创造出能分解纤维素和木质素的多功能的超级工程菌，从而使得稻草、木屑、植物秸秆、食物的下脚料等都可用来生产乙醇。

(3)生产氢能源

把单细胞绿藻的氢化酶基因导入大肠杆菌，通过表达氢化酶的工程菌来生产 H₂能源。

3、环保工业

(1)转基因细菌提高农药降解效率 (2)转基因细菌吸收环境中重金属等有害物质 (3)转基因细菌分解泄露的石油

2. 基因工程工具酶

·名词解释:

同位酶 (isoschizomer) : 能识别相同的序列的限制酶

同裂酶: 识别位点与切割位点相同的酶

同尾酶 (isocaudamer) : 有些酶的识别序列不同，但切割后产生相同的黏性末端，为同尾酶。

由两种同尾酶切割产生的黏性末端可以彼此连接。

杂合位点 (hybrid site) : 由一对同尾酶分别产生的黏性末端共价结合形成的位点，叫杂合位点。杂合位点一般不能再被原来的任何一种同尾酶所识别。

星号活性: 限制性酶的酶切位点是在特定条件下测定的，条件改变时，有些酶的识别位点也改变，切割一些与特异识别序列相似的序列。

·酶是怎么发现的?

限制性核酸内切酶是如何被发现的? 其发现的核心背景机制是什么?

“如何发现的?”是指限制性核酸内切酶的发现过程，其核心背景是基于对“细菌防御外来DNA入侵”机制的研究:

1. 科学家观察到“任何物种都有排除异物保护自身的防御机制”(如人的免疫系统)，进而关注到细菌的“限制与修饰系统”;

2. 该系统是细菌的防御机制，包含两种关键酶:

◦ 限制酶 (即限制性核酸内切酶): 负责识别并切割外来DNA的特异序列;

- 修饰酶：负责对细菌自身DNA进行修饰（如甲基化），避免自身DNA被限制酶切割；
- 3. 科学家通过研究这一系统，逐步分离并确定了限制性核酸内切酶的功能与特性。

● 限制-修饰现象

研究发现，原来是由两种酶配合完成的：

限制酶：可以识别并降解外源DNA

甲基化酶：通过甲基化作用保护自身DNA不被相应的限制酶降解

（限制-修饰现象是细菌特有的防御机制，通过“限制酶切割外来DNA”与“修饰酶保护自身DNA”的协同作用，阻止噬菌体等外源遗传物质入侵，维持自身基因组稳定，也是限制性核酸内切酶发现的核心背景。）

● 限制性核酸内切酶的命名原则

宿主属名的第一个字母(大写)和种名的前两个字母(小写)，要斜体。
菌株或型号的第一个字母。序号，用罗马数字顺序编号I、II、III等。

名称	属	种	株	序号	菌株来源
<i>EcoRI</i>	<i>E</i>	<i>co</i>	R	I	<i>Escherichia coli</i> R
<i>HindIII</i>	<i>H</i>	<i>in</i>	d	III	<i>Haemophilus influenzae</i> d
<i>HindII</i>	<i>H</i>	<i>in</i>	d	II	<i>Haemophilus influenzae</i> d
<i>HpaI</i>	<i>H</i>	<i>pa</i>	/	I	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>

EcoRI 代表从大肠杆菌 R 菌株中分离到的第1个限制酶

HindII 代表从流感嗜血杆菌 d 菌株中分离到的第2个限制酶

● 限制性核酸内切酶的分类

I、II、III型

Type II最常用，特征：

问答题1：简述限制性核酸内切酶的主要分类及II型酶的核心特征（基因工程应用相关）。

答案：

限制性核酸内切酶主要分为I型、II型、III型，其中II型酶是基因工程核心工具，核心特征如下：

1. 亚基组成：同源二聚体，仅含限制亚基；
2. 识别序列：高度特异的回文序列；
3. 切割位点：位于识别序列内部或近旁，切割后产生黏性末端或平末端；
4. 辅因子：仅需Mg²⁺；
5. 应用价值：可精准切割目的基因和载体，是重组DNA构建的关键工具酶。

表 2-1 限制性内切核酸酶类型及主要特性

特性	I 型	II 型	III 型
限制和修饰活性	双功能的酶	核酸内切酶和甲基化酶分开	双功能的酶
酶蛋白分子组成	3 种不同的亚基	单一亚基	两种不同的亚基
限制作用所需的辅助因子	ATP、Mg ²⁺	Mg ²⁺	ATP、Mg ²⁺
特异性识别位点	非对称序列	回文对称结构	非对称序列
切割位点	在距识别位点至少 1000bp 的地方随机的切割	位于识别位点上	距识别位点下游 24~26bp 处
序列特异的切割	不是	是	是
在基因工程中的应用	无用	广泛使用	用处不大

·不同限制性内切酶切割的结果（切割方式）

- 1、黏性末端：上下交错切割产生
- 2、平末端：上下对称切割产生

·影响酶切反应的因素

1、酶的纯度：

不存在其他核酸内切酶或外切酶的污染

2、DNA样品的纯度

DNA样品中所含的RNA、蛋白质、苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、SDS等杂质会影响酶切反应的速度和完全程度

3、DNA的甲基化程度

内切酶不能切割甲基化的核苷酸序列

4、DNA分子的结构

超螺旋质粒DNA酶解所需要的酶量要比线性DNA高很多

5、反应的温度与时间：

大部分限制酶的最适温度37℃；时间一般为1~2 h，进行大量DNA酶解反应时，可酶解过夜。

6、反应的缓冲体系：

具有稳定pH（7.0 ~ 7.6）环境的Tris-HCl 缓冲体系；

Na⁺

，Mg²⁺（辅助因子）；

β-巯基乙醇 二硫苏糖醇（DTT）防止酶氧化，保持酶活性

7、星号活性：

限制性酶的酶切位点是在特定条件下测定的，条件改变时，有些酶的 识别位点也改变，切割一些与特异识别序列相似的序列。

如:EcoRI在高pH(>8)，低盐(<25 mmol/L)，高浓度的甘油(>5%)条件下，识别序列由GAATTC变为NAATTN，以EcoRI*表示。

必须采用规范的实验步骤，应用推荐的反应条件。

8、DNA 末端长度对限制酶切割的影响

限制性核酸内切酶切割DNA 时，由于酶蛋白要占据识别位点两边的若干个碱基，这些碱基对限制酶稳定地结合到 DNA 双链，并发挥切割 DNA 作用是有很大大影响的，称为保护碱基。不同的酶对末端长度的要求是不同的。

·DNA连接酶

DNA连接酶的反应条件

- 1、DNA必须是双链 3'端有游离的-OH, 5'端有一个磷酸基团(PO4)
- 2、需要有能量
噬菌体 — ATP;大肠杆菌 — NAD+
- 3、适宜的温度 连接酶反应的最适温度是37℃, 但是在这个温度下, 黏性末端之间的氢键结合是不稳定的。因此连接温度应介于连接速率和末端结合速率之间, 一般采用16℃。
- 4、需要Mg2+, pH为7.5左右

DNA连接酶的种类

- 1、大肠杆菌DNA连接酶 需烟酰胺-腺嘌呤二核苷酸(NAD+)做能源, 只能连接黏性末端
- 2、T4噬菌体DNA连接酶 需腺苷三磷酸(ATP)做能源, 可以连接黏性末端和平末端
- 3、T4噬菌体RNA连接酶 需ATP做辅助因子, 催化单链DNA或RNA的连接

影响连接反应的因素

- 1、反应温度: 16℃
- 2、ATP浓度:最适浓度为0.5 mmol/L, 过高会抑制。
- 3、DNA浓度:
外源片段浓度比载体DNA浓度高5 ~ 10倍。增加插入片段与载体的接触机会, 减少载体自连现象, 可提高连接效率。
在平末端连接反应中, 连接酶、外源DNA及载体DNA浓度均偏高。

两种常用DNA连接酶比较

	T4 DNA ligase	E.coli DNA ligase
来源	T4 噬菌体	大肠杆菌
分子量	68000	75000
辅助因子	ATP	NAD ⁺
底物	两个带有互补黏性末端的双链DNA分子; 两个有平末端的双链DNA分子; 一条链带有切口的双链DNA分子; RNA-DNA杂合体中RNA链的切口	两个带有互补黏性末端的双链DNA分子; 一条链带有切口的双链DNA分子
应用范围	广泛、效率高	窄

T4 噬菌体DNA连接酶

底物:DNA or RNA(效率低) 黏性末端、平末端的DNA;RNA-DNA杂合体中RNA链上的切口
连接速率: 切口 > 黏性末端 > 平末端

·DNA聚合酶

大肠杆菌DNA聚合酶 I

Klenow片段

T4 噬菌体DNA 聚合酶

Taq DNA聚合酶

高保真 DNA聚合酶

- 1. 大肠杆菌DNA聚合酶

1、5'→3' DNA聚合酶活性:

以一条DNA为模板，在4种dNTPs（脱氧核糖核苷三磷酸）和 Mg^{2+} 存在下，催化单核苷酸结合到引物链的3'-OH末端，沿5'→3'的方向合成新的DNA。

底物: 模板 (ssDNA或5'突出dsDNA)，引物 (带3'-OH基)

2、5'→3'外切酶活性:

能从5'端降解双链DNA，使之成为单核苷酸；
也能降解RNA-DNA中的RNA（RNase H 活性）。

底物: 双链DNA 或 DNA-RNA杂交体

(2)

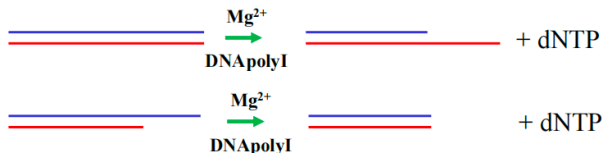
可以在DNA合成过程中，起到校正作用

(3)

3、3'→5'外切酶活性:

一定条件下，也能从3'-OH末端降解单链 / 双链DNA分子，使之成为单核苷酸。

底物: 3'-OH dsDNA or ssDNA



基本用途:切口平移

原理: 外切活性和聚合活性共同作用使切口沿5'→3'方向平移

2. Klenow片段

Klenow酶拥有5'→3'的DNA聚合酶活性和3'→5'的核酸外切酶活性;另一个较小的片段具有5'→3'的核酸外切酶活性。

切口平移与末端标记的区别

切口平移是将DNA片段的全长进行标记;而末端标记只将DNA片段的一端进行部分标记。一般活性不高，极少作为分子探针。

另外，Klenow酶不能直接用于3'黏性末端DNA的标记。

3. T4 噬菌体DNA聚合酶

与Klenow酶一样，具有5'→3'的DNA聚合酶活性和3'→5'的核酸外切酶活性。

置换合成

无dNTP时，主要表现为3'→5'外切酶活性，从3'-OH端降解DNA，形成3'凹陷的DNA;

有dNTP时，外切酶活性被抑制，表现为聚合酶活性，于是又将DNA末端填平。结果就是加入的核苷酸取代了原有的核苷酸，这种现象叫置换合成。如果在反应体系中加入放射性标记的核苷酸，则可制备DNA杂交探针。

请简述切口平移、末端标记、置换合成三种DNA标记方法的核心区别（从标记位置、反应原理、适用场景三个维度作答）。

标准答案：

1. 标记位置

- 切口平移：标记遍布整条DNA链（全链标记）；
- 末端标记：仅标记DNA的5'端或3'端（仅末端标记）；
- 置换合成：仅替换并标记DNA 3'末端的核苷酸（3'末端替换标记）。

2. 反应原理

- 切口平移：依赖DNA聚合酶I的5'→3'外切酶+5'→3'聚合酶活性，通过切口沿5'→3'方向边拆边补，将标记dNTP掺入整条DNA链；
- 末端标记：无需拆补整条链，仅针对DNA末端修饰（3'端补标记dNTP/5'端接标记磷酸基团）；
- 置换合成：无dNTP时靠3'→5'外切酶活性降解3'端形成凹陷，有dNTP时聚合酶活性补标记dNTP填平，仅替换3'末端核苷酸。

3. 适用场景

- 切口平移：适合长双链DNA的高灵敏度标记（如核酸杂交探针）；
- 末端标记：适合短片段DNA（寡核苷酸、酶切短片段）的标记；
- 置换合成：适合精准替换并标记DNA 3'末端核苷酸（如末端修复后标记）。

·Taq DNA聚合酶和高保真DNA聚合酶的特点与二者的区别。

1. Taq DNA聚合酶

- 核心特点：可以耐受90℃以上的高温而不失活，最适温度为75～80℃。由于其耐热性强，是PCR等分子克隆实验中，应用最多的酶。
- 具有5'→3'聚合酶和5'→3'外切酶活性，需Mg²⁺作辅助因子。无3'→5'外切酶活性，即无校正功能，易错配。
- 与大肠杆菌DNA聚合酶相比，其最大特性是耐高温。
- 优势：扩增效率高、适合PCR快速扩增，能耐受多次高温变性循环；
- 不足：扩增错误率高（约10⁻⁶ 错误/碱基），易引入碱基错配。

2. 高保真DNA聚合酶

- 核心特点：多为融合酶/修饰酶，同样耐高温，除5'→3'聚合酶活性外，具备3'→5'外切酶纠错活性；
- 优势：扩增错误率极低（约10⁻⁷~10⁻⁹ 错误/碱基），能识别并切除错配碱基，保证扩增序列准确性；
- 不足：扩增效率略低于Taq酶，部分类型对扩增片段长度有一定限制。

区别

维度	Taq DNA聚合酶	高保真DNA聚合酶
纠错能力	无3'→5'外切酶活性，无纠错	有3'→5'外切酶活性，可纠错
扩增错误率	高（10 ⁻⁶ 错误/碱基）	极低（10 ⁻⁷ ~10 ⁻⁹ 错误/碱基）
扩增效率	高，适合快速扩增	略低，扩增速度稍慢
适用场景	普通PCR扩增、粗筛、基因分型	克隆、测序、突变检测、精准扩增

·末端脱氧核苷酸转移酶(末端转移酶)的用途
1、同聚物加尾:给外源DNA片段和载体分子分别加上互补的同聚物尾巴, 以使它们有效地连接。
同聚物尾巴(homopolymeric tail):当反应混合物中只有一种dNTP时, 就可以形成仅由一种核苷酸组成的3'尾巴, 称这种尾巴为同聚物尾巴。
2、对DNA片段的3'端进行标记 标记物可以是放射性的, 如 α -³²P-dNTP;也可以是非放射性的, 如生物素-11-dUTP。它们可用于DNA序列分析和分子杂交等实验中。

·T4噬菌体多核苷酸激酶
活性:催化ATP的 α -磷酸基团转移至DNA或RNA的5'末端(即核酸的磷酸化)。
正向反应:ATP的 α -磷酸基团被转移 到去磷酸化的 DNA 5'端, 对缺乏 5'-磷酸的 DNA进行磷酸化。
交换反应:
过量的ADP, 可将DNA的5'磷酸转移给ADP, 然后DNA从[α -³²P]ATP中获得放射性标记的 α -磷酸而重新磷酸化。

用途:
1、连接前, 使缺乏5'磷酸的DNA磷酸化 2、进行DNA或RNA 5'磷酸末端标记
效率:单链末端 \geq 双链5' 黏性末端 $>$ 双链平末端 $>$ 双链3' 黏性末端

·碱性磷酸酶
活性:去除DNA或RNA 5'磷酸变为5'-OH 末端(去磷酸)
用途
1、5'末端标记前的处理, 去除DNA的5'-P(作用同交换反应)
2. 去除载体DNA的5'-P, 防止载体自连, 提高连接效率
常用CIP

基因重组操作中常用的工具酶

酶	主要用途
限制性核酸内切酶	识别DNA特定序列, 切断DNA分子
DNA连接酶	连接两个DNA分子或片段
DNA聚合酶I 或Klenow片段	①缺口平移制作标记DNA探针 ②合成cDNA的第二链 ③填补双链DNA3'凹端 ④DNA序列分析
耐热DNA聚合酶	聚合酶链反应 (PCR)
RNA酶A	降解除RNA
DNA酶I	降解DNA, 在双链DNA上产生随机切口
SI核酸酶	降解单链DNA或RNA, 使双链DNA突出端变为平端
末端转移酶	在3'末端加入同质多聚物尾
多核苷酸激酶	催化多核苷酸5'羟基末端磷酸化, 制备末端标记探针
碱性磷酸酶	切除核酸末端磷酸基

第2章 基因工程载体
·载体: 在基因工程中, 把能携带外源基因进入受体细胞的“运输工具”叫载体(Vectors), 它的本质是DNA复制子。
·质粒是染色体外能自我复制的小型环状DNA分子
·多克隆位点: 是一段用于插入外 源DNA片段的特定区域, 由一系列紧密相连的限制 性内切酶位点组成, 而且 每个限制性内切酶位点在整个载体中是唯一的。

- 克隆质粒载体(最简单的载体): 专用于基因或DNA片段无性繁殖的质粒载体。
- 表达质粒载体(pET系列) 专用于在宿主细胞中高水平表达外源蛋白的质粒载体。
- 阿法互补: 肽(lacZ' 基因编码)能与lacZΔM15基因的 产物互补, 形成具有酶活性的β-半乳糖苷酶, 产生 lacZ+表型, 实现基因内互补, 这种现象称为α互补。
- 插入失活(insertional inactivation): 因插入外源DNA而导致基因失活的现象。用于鉴定目的DNA是否存在 如:对对抗性基因的某一抗性基因插入失活(Ap+Tet)。
- 黏粒载体: 是一类人工构建的含有噬菌体的cos序列和 质粒复制子的质粒载体, 又称柯斯质粒载体。
- cos位点: 当其注入到寄主细胞中后, 迅速通过这两个黏性末端配对形成双链的环形 DNA分子。这种由黏性末端结合形成的双链区段称为cos位点

·载体必须具备的3个基本条件:

- 1、能够在宿主细胞中稳定存在, 并独立地进行自我复制(复制原点—— DNA聚合酶识别)。
 - 2、具有合适的限制性内切酶位点。至少有一个, 酶切位点越多, 越易选择出合适的酶。最好是单一切点(保证外源基因准确插入)。
 - 3、具有合适的选择标记基因(相当于车上装了一个GPS)。有些载体上携带某些特殊基因, 能够带给载体或其受体细胞某些特殊性的基因, 如抗药性基因。
- 当这种载体进入受体细胞后, 因为这个抗药性基因的作用, 使得 其受体抗了某种药。

·质粒的存在形式 (构型)

- 1 闭环环状DNA, 即SC构型
- 2 开环DNA, 即OC构型
- 3 线形DNA, 即L构型

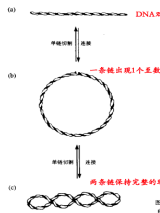


图 4-2 质粒 DNA 的分子构型
(a) 闭环环状的 L 构型 (b) 开环环状的 OC 构型
(c) 线形 DNA 构型

电泳时迁移速率: SC构型 (闭环环状) > L构型 (线形) > OC构型 (开环)

·理想质粒载体的必备条件

- 1、具有较小的分子量和较高的拷贝数
- 2、具有若干限制性核酸内切酶的单一酶切位点(多克隆位点, MCS)
- 3、具有两种以上的选择标记基因
- 4、缺失mob基因
- 5、插入外源基因的重组质粒较易导入宿主细胞并复制和表达

·β-α肽(lacZ' 基因编码)能与lacZΔM15基因的 产物互补, 形成具有酶活性的β-半乳糖苷酶, 产生 lacZ+表型, 实现基因内互补, 这种现象称为α互补。

3. 底层原理

IPTG: 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(诱导物)

β-半乳糖苷酶的功能需要完整的蛋白结构, lacZΔM15突变的宿主菌只能合成缺失N端α肽区域的无活性酶片段, 而载体的lacZ' 基因恰好编码这一缺失的α肽; 两者单独存在时无酶活性, 结合后能填补彼此的结构缺陷 (基因内互补), 恢复β-半乳糖苷酶的催化功能, 可分解X-gal等底物产生显色信号。

当外源DNA插入lacZ' 基因的多克隆位点时, lacZ' 基因被破坏, α肽合成中断, 无法与宿主菌的酶片段互补, β-半乳糖苷酶失活, 无显色反应。

·插入失活(insertional inactivation): 因插入外源DNA而导致基因失活的现象。用于鉴定目的DNA是否存在 如:对双抗性基因的某一抗性基因插入失活(Ap^r+Tet^r)。

2. 底层原理

标记基因的功能依赖连续完整的编码区和调控序列, 外源DNA插入会破坏基因的阅读框架或关键编码区域, 使基因转录/翻译中断, 无法产生有活性的蛋白(如抗性蛋白、酶蛋白);

以Ap^r+Tet^r双抗性载体为例: 若外源DNA插入Tet^r(四环素抗性)基因, 该基因失活, 含重组质粒的宿主菌在氨苄青霉素培养基中能存活, 但在四环素培养基中死亡; 而含空载质粒的宿主菌在两种抗生素培养基中均能存活, 以此区分重组质粒和空载质粒。

·表达质粒载体(pET系列) 专用于在宿主细胞中高水平表达外源蛋白的质粒载体。与克隆载体的区别:

- 1、含有强启动子 一个可诱导的强启动子可使外源基因有效表达, 如Lac、Trp等。
- 2、在外源基因插入序列的下游区有强转录终止子 保证外源基因的有效转录和mRNA的稳定性。
- 3、在启动子下游区和ATG上游区有一个核糖体结合位点序列(SD序列) 促进蛋白质翻译。

如何判断?

克隆载体: 专用于基因或DNA片段无性繁殖的载体。都有一个松弛的复制子, 能带动外源基因在宿主细胞中大量复制, 形成大量的基因克隆。克隆载体只为保存基因片段。多是高拷贝的。
表达载体: 专用于在宿主细胞中高水平表达外源蛋白质的载体。它不仅可复制, 还能转录、翻译。除具有克隆载体的基本元件(ori、Ampr、MCS等)外, 还要有转录/翻译所必需的DNA顺序的载体。有的是高拷贝的, 有的是低拷贝的。

是否含有表达系统元件, 即启动子—核糖体结合位点—克隆位点—转录终止信号, 这是用来区别克隆载体和表达载体的标志。

利用表达载体表达目的基因的核心步骤:

1. 选择适配宿主的表达载体 (含启动子、终止子、筛选标记);
 2. 酶切连接目的基因与载体, 构建重组表达载体;
 3. 将重组载体导入宿主细胞 (转化/转染);
 4. 筛选阳性克隆, 诱导目的基因表达;
 5. 检测并纯化目的蛋白。
-
1. 选载体: 按宿主选 (大肠杆菌→原核表达载体 pET-28a; 动物细胞→真核表达载体 pcDNA3.1), 确保载体带宿主能识别的启动子。
 2. 插基因: 用酶切把目的基因精准插到载体“启动子-终止子”之间的MCS里, 方向要对 (别反插)。
 3. 导宿主: 用热激 (原核)、脂质体转染 (真核) 把重组表达载体导入宿主细胞。
 4. 诱导表达: 加诱导剂 (如IPTG) 触发启动子, 让宿主转录、翻译目的基因, 控制温度/时间避免蛋白失活。
 5. 检纯化: 用Western blot确认蛋白表达, 再用载体上的标签 (如His-tag) 把目的蛋白提纯。

·噬菌体载体的生活周期
具有溶原周期和溶菌周期

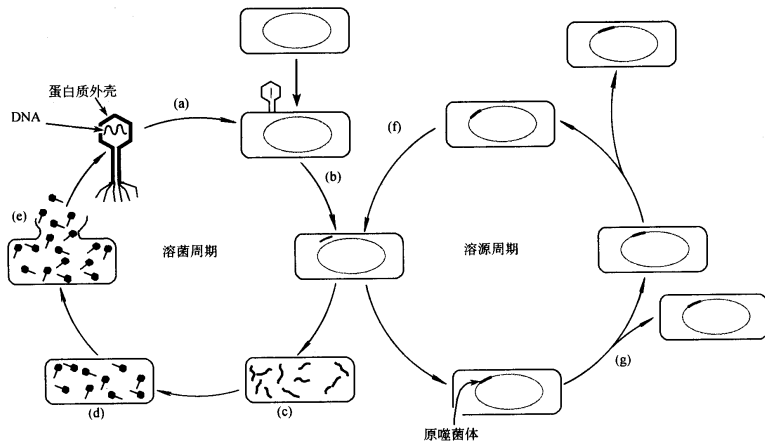


图 5-3 溶源性噬菌体的生命周期

·黏粒载体的特性

- 1、具有 λ 噬菌体的特性 黏粒只有连接上适宜长度的外源DNA后，才能被包装蛋白包装，并转导寄主细胞。不带外源DNA片段的载体，因为包装下限而不能被包装，具有正选择作用。黏粒载体重组DNA分子进入寄主细胞后，DNA环化和复制，但是不在体内包装，不裂解宿主细胞，即不发生溶菌现象。
- 2、具有质粒载体的特性 在寄主细胞内以质粒的方式复制，且带有抗性选择标记基因，有些还带有插入失活型的多克隆位点，为重组体的筛选提供了方便。
- 3、高容量的克隆能力 分子质量较小，一般为5~10 kb。只有复制起点、选择标记和cos位点等构成。按 λ 噬菌体的包装限制(38~51 kb)，其克隆上限可达45 kb左右，下限为11 kb。
- 4、具有与同源序列的质粒进行重组的能力 与一种带有同源序列的质粒共存于同一个宿主细胞中，它们便会通过同源重组形成共合体。

·载体克隆容量排序

黏粒载体 > λ 噬菌体载体 > 表达质粒载体 ≈ 克隆质粒载体

人工染色体载体 (BAC/YAC) > 黏粒载体 > λ 噬菌体载体 > 普通质粒载体 > M13噬菌体载体

第3章 核酸分子基本操作技术

·植物基因组DNA提取思路：CTAB法(人工/试剂盒)

·判断DNA抽提好坏的标准：1、电泳检测：

1 标准质粒DNA电泳检测图应该有3条带 跑最快的是超螺旋；中间的是线性DNA；最后是开环DNA。

2 基因组DNA电泳检测图应只有1条分子量较大的清晰条带。

·吸光值检测：

采用紫外分光光度计检测波长260 nm、280 nm和230 nm处吸光

值。核酸在波长260 nm处有最大的吸收峰；蛋白在波长280 nm处有最大的吸收峰；盐和小分子在波长230 nm处有最大的吸收峰。

吸光值260 nm / 280 nm的比值介于1.7 ~ 2.0之间时，DNA质量较好，纯DNA的比值为1.8；<1.7可能有蛋白质污染；>2.0可能有RNA污染，或DNA降解。

吸光值260 nm / 230 nm的比值介于2.0 ~ 2.5，若<2.0表明溶液中有残存的盐和小分子杂质，如氨

· 氨基酸或酚等

· 质粒DNA的提取

原理：染色体线性DNA，用碱处理后，发生变性，双链分离，难以复性而形成缠绕的结构，与变性的蛋白质和细胞碎片结合形成复合物，离心时沉淀下去。

闭合环状的质粒DNA，在变性后不会分离，复性快。

原理：

在pH 12.0~12.6碱性环境中，细菌中的线性大分子染色体DNA易变性，而共价闭环的质粒DNA虽然变性，但当恢复到中性时，即恢复到天然构象(拓扑缠绕状态)，呈可溶状态，而变性的染色体DNA与变性蛋白质、RNA和细胞碎片在去污剂SDS作用下形成沉淀。通过离心去沉淀，获得含有质粒DNA的上清液，最后用乙醇沉淀，获得质粒DNA。

人工/试剂盒提取均可。

· 凝胶电泳技术

方向？由负极到正极

电泳分离的原理

利用在电场的作用下，由于各种分子带电气质以及分子本身大小、形状等性质的差异，使带电分子产生不同的迁移速度，从而对样品进行分离、鉴定或提纯的技术。

电荷效应：利用带电粒子在电场中移动速度不同而达到分离的目的。分子筛效应：凝胶是支持电

泳的介质，具有分子筛效应。不同的分离

介质形成的孔径不同，在孔径大的介质中泳动速度快，相反则慢。

生物大分子的性质：一般来说，分子带的电荷量越大、直径越小，则其电泳迁移速度越快。迁移速度与分子量的对数值成反比。

· RNA的纯度和含量

吸光值260 nm / 280 nm的比值介于1.9 ~ 2.1之间，吸光值260 nm / 230 nm介于2.0 ~ 2.5之间较好。

纯RNA:OD260/OD280应为2.0

RNA电泳3条带

· 来源不同的两条单链核酸分子，通过碱基互补形成异源双螺旋分子，称为核酸分子杂交。

· 探针

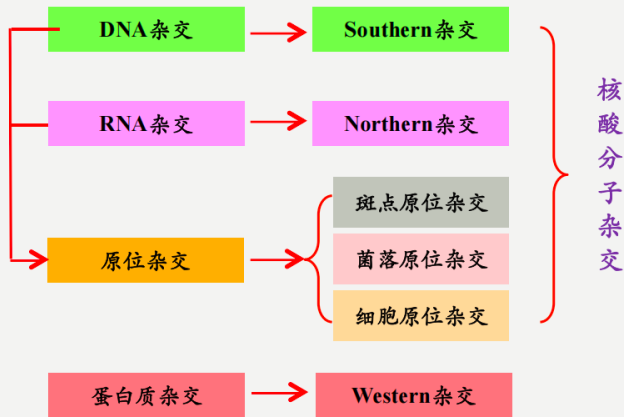
概念：指经放射性或非放射性等物质标记的，序列已知且与目的基因互补的单链DNA或RNA序列。

常用的标记物

放射性同位素：³H、³²P、³⁵S、¹²⁵I等。非放射性同位素：荧光素、生物素类、地高辛等。

· 区分分子杂交类型和核酸分子杂交类型，以及核酸分子杂交有哪些类型

分子杂交类型：



第4章 聚合酶链式反应 (PCR)

·PCR又称体外DNA扩增技术，是模拟体内DNA复制方式，在体外特异地将DNA某一区域大量扩增出来的技术。在模板DNA、引物和4种脱氧核糖核苷酸(dNTP)存在的条件下，由耐热DNA聚合酶在体外反复酶促合成双链DNA的反应。

·逆转录 PCR：先在逆转录酶的作用下，以mRNA为模板合成互补的cDNA再以cDNA为模板进行的PCR反应。

·实时荧光定量PCR(Quantitative real-time PCR)，简称定量PCR (qPCR)。是指在PCR反应体系中加入荧光化学物质，随着PCR反应的进行，PCR反应产物不断累计，荧光信号强度也等比例增加，利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

·PCR的基本原理

将目的基因DNA在高温(95°C)下，解链成为单链模板，人工合成的一对与目的基因两侧序列相互互补的寡聚核苷酸引物在低温(50 ~ 60°C)下，分别与变性的目的基因片段两侧的两条链的部分序列互补结合，在中等温度(72°C)下，由耐热DNA聚合酶(Taq酶)将dNTP中的脱氧单核苷酸加至引物 3'-OH末端，并以此为起点，沿着模板以5'→3'方向延伸，合成一条新的互补链。

二、PCR反应成分及反应条件

PCR反应成分

模板
引物
Taq DNA聚合酶
dNTP
 Mg^{2+}
缓冲液

PCR反应条件

变性温度
变性时间
退火温度
退火时间
延长时间
循环次数

(一)PCR反应成分

1、模板 — 核酸

> DNA是直接模板，RNA是间接模板，RNA样品必须先经过逆转录生成cDNA，cDNA作为PCR扩增的模板。这个技术称为逆转录PCR(RT-PCR)。

> 避免有影响扩增反应的物质存在，如核酸酶，能降解DNA、RNA;蛋白酶 能降解Taq DNA聚合酶。

> 模板量要合适:50 μ L PCR反应体系中模板DNA推荐使用量: 人基因组DNA:0.1~1 μ g;大肠杆菌基因组DNA:10~100 ng;

λ DNA:0.5 ~ 5 ng。

2、引物

> 引物是人工合成的、能与模板DNA互补结合的脱氧寡核苷酸。分为正向引物(F, Forward)和反向引物(R, Reverse)。

> 引物的序列根据欲扩增的DNA片段两端序列而设计的;长度一般为18~30 bp，20~24 bp最佳。

> 引物决定PCR扩增产物的特异性和长度。

特异性:引物只针对DNA的一段特定序列互补结合，因此，2条引物与DNA模板特异性结合决定了要扩增的DNA区域。长度:2条引物分别互补于所要扩增DNA片段的两端，使DNA片段的扩增只限于引物之间的部位。

> 引物浓度要远高于模板浓度，一般每条引物的浓度0.1~0.5 μ mol。浓度过高会引起错配和非特异性扩增，且可增加引物之间形成二聚体的机会。

> 两个引物之间不应存在互补，特别是在引物3'端，否则易发生“引物二聚体”。“引物二聚体”实质上是DNA聚合酶作用下，一条引物在另一条引物序列上进行延伸所形成的，与两条引物长度相近的双链DNA片段，是PCR常见的副产品，有时甚至成为主要产物。

>

合适的退火温度

T_m (解链温度) = $(G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$ 合适的退火温度 T_a 比引物本身的 T_m 低5 $^{\circ}$ C左右，一般为45~60 $^{\circ}$ C。

T_a 越高，引物特异性越高，非特异条带逐渐变弱、减少甚至消失;但如果温度过高，则会导致目的条带的产量减少

引物设计是否合理可用一些引物设计软件检查。目前可用于引物设计的软件很多，如:PCRDEN、PRIMER、OLIGO、DNAMAN等。各有特点，掌握其中1~2个的使用就可以了。

3、DNA聚合酶 > Taq DNA聚合酶

有良好的热稳定性:一般Taq DNA聚合酶活性半衰期为92.5 $^{\circ}$ C 130 min、95 $^{\circ}$ C 40 min。特点:PCR反应时，会在产物的3'端添加一个'A'。

缺点:易产生错配——1 kb长的DNA靶序列，经30个循环后出错率可达2.5个碱基对。

➢Pfu DNA 聚合酶(高保真耐高温DNA聚合酶) 耐热性极好:97.5°C时半衰期大于3h, 具有3'→5'外切酶活性, 可校正PCR扩增过程中产生的错误, 使产物的碱基错配率极低。特点:PCR产物为平端, 3'端无突出的单'A'核苷酸。
4、dNTPs — 原料 dNTPs的质量与浓度和PCR扩增效率有密切关系, 合适浓度为20~200 μmol/L。

另外, 反复冻融会使dNTP的高能磷酸键打开, 影响PCR扩增。

5、Mg²⁺

Taq 酶的必需激活剂。常用范围0.5~2.5 mmol/L之间, 多用1.5~2.0 mmol/L。

太少:酶活性明显降低;太多:导致非特异性扩增。6、缓冲液

常用10 mmol/L Tris-HCl缓冲液, pH 8.3~8.8为Taq 酶最适pH值;50 mmol/L KCl 促进引物退火。

(二)PCR反应条件及循环次数

5' A 3' A 5'

1、预变性: 95°C, 3~5 min, 使模板DNA完全解链。2、变性: 95°C, 30~60 s, 双链DNA变成单链。

3、退火: 50~60°C, 30~60 s, 引物与模板互补结合。退火温度对特异性影响很大, 根据Tm值进行筛选。

4、延伸: 72°C, 0.5~2 min, Taq 酶催化dNTP, 从引物3'-OH端开始, 与模板互补, 合成一条新的DNA链, 速度为60 nt/s, 2 kb长的片段多采用1 min。

5、后延伸: 72°C, 5~10 min, 确保产物3'端加A。

6、循环次数: 主要取决于模板DNA的起始浓度, 合适循环数为25~35次。循环数太少: 产物量不多;太多: 非特异性扩增会增加, 出现平台效应。

·荧光定量PCR的应用

1、核酸定量定性分析 对传染性疾病进行定量定性分析, 病原微生物或病毒含量的检测。比如新冠病毒的核酸检测。

2、基因表达差异分析 比较经过不同处理样本之间特定基因的表达差异(如药物处理、物理处理、化学处理等), 特定基因在不同时期、不同部位的表达差异等。

第5章 基因文库的构建

·基因文库(gene library)是利用分子克隆方法, 将某种生物或其组织细胞的所有DNA片段插入适当载体, 转化适当宿主菌后进行保存的克隆集合。

·基因组文库(genomic library): 由一种生物所有的基因组DNA构建而成

指将某种生物的全部基因组DNA切割成一定长度范围的DNA片段, 再与合适的载体在体外重组并转化到宿主细胞获得的所有阳性菌落, 这个群体就称为该生物基因组文库。

·cDNA文库(cDNA library): 利用从RNA序列反转录而成的cDNA构建而成

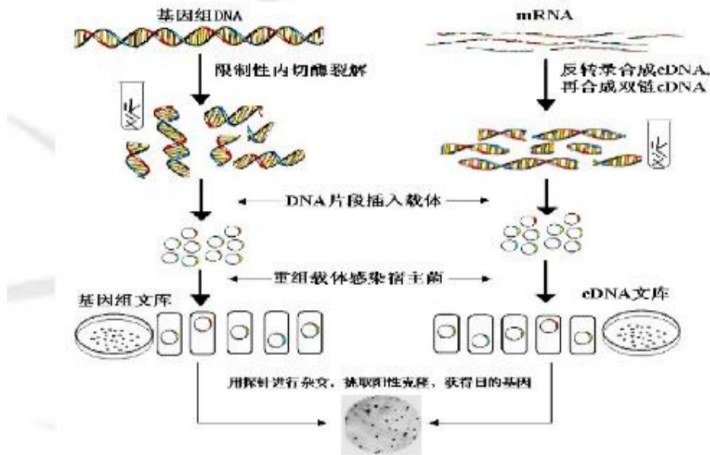
将mRNA反转录产生的DNA片段与载体连接, 把得到的重组DNA分子转入到宿主细胞内得到的克隆群体集合。

·cDNA文库和基因组文库的区别

时效性: cDNA 文库代表某一时期特定细胞或组织中mRNA, 是转录水平, 仅反映某一时期特定组织表达的功能基因, 不是全部基因;而基因组文库包含该生物所有基因。

序列组成不同: cDNA 文库无间隔序列和调控区等非编码区;基因组文库可真实显示基因组的全部结构信息, 由于制备DNA片段的切点是随机的, 所以每一克隆内所含的DNA片段既可能是一个或几个基因, 也可能是一个基因的一部分或除完整基因外还包含着两侧的邻近DNA顺序。

基因组DNA文库与cDNA文库的比较



·cDNA的第二链合成:

自身引导合成法: 加热或碱处理的方法, 将RNA—cDNA杂合分子变性, 剩下的cDNA单链的3'末端会形成一个弯回来的双链发卡结构用核酸酶S1可以切掉发卡结构。但这会导致cDNA中有用的序列被切掉, 获得的双链DNA 5'端会有几对碱基缺失; 而且合成效率低, 只有不到1%的mRNA能合成cDNA。(机理不明), 可成为合成第二条cDNA链的引物。用DNA聚合酶合成第二链DNA。

置换合成法: RNaseH酶能识别mRNA-cDNA杂交分子中的mRNA, 并将其降解成许多小片断, 小片断正好成为DNA聚合酶的引物。

DNA聚合酶 I 进行修补并除去引物。最后使用DNA连接酶连成一整条DNA链。

PCR合成法: 先向mRNA-cDNA杂交分子的3'端添加poly(dC)同聚物, 降解 mRNA 获得单链cDNA; 以cDNA第一条链为模板, 以poly(dG) 和poly(dA)为引物, 经PCR扩增获得多拷贝双链cDNA。

·cDNA末端修饰:

1 同聚物加尾 利用末端转移酶在双链cDNA和载体的3'端都加上一个互补的同聚片段, 退火后两个片段连接成重组子。

2 接头添加法

3 衔接头添加法

·cDNA文库的特点 来自结构基因, 仅代表某种生物的一小部分遗传信息, 且只代表正在表达的基因的遗传信息。

2、各cDNA均可获得表达 3、代谢或发育特异性

处于不同代谢阶段(或发育阶段)的结构基因表达亦不相同。

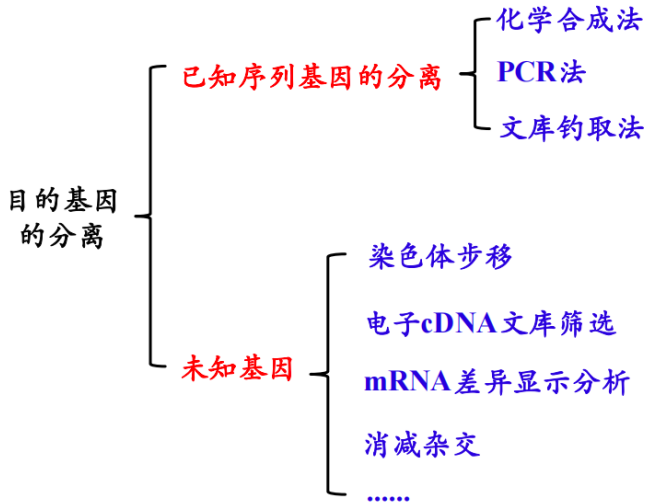
4、器官特异性

不同器官或组织的功能不一样, 因而, 有些基因的表达具有器官特异性, 故从不同器官中提取的mRNA不同, 所组建的 cDNA文库也就不同。

5、不均匀性

在同一个cDNA文库中, 不同类型的cDNA分子的数目是大不相同的, 尽管它们都是由单拷贝基因转录而来的。

第6章 目的基因的获取



·从基因文库中调取目的基因

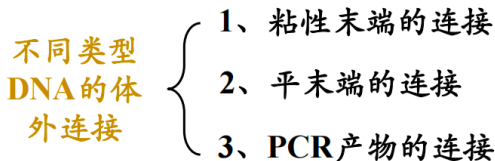
1. 核酸分子杂交法
2. 差示杂交法
3. pcr筛选法

真核。原核生物获取已知序列目的基因的区别？

原核生物找已知目的基因，直接用基因组文库做PCR就行，扩出来的基因能直接用；真核生物得先用cDNA文库，扩出来的基因没内含子能直接表达，若用基因组文库，扩出来的基因带内含子，还得额外处理才能用。

第7章 DNA体外重组与基因转移

一、DNA片段的体外连接



·将目的基因与载体(克隆载体、表达载体等)在体外连接起来 就是DNA分子的体外重组。

·双酶切优点

黏性末端连接可抑制载体和目的DNA分子的自连，因而可大大提高连接的效率。更重要的是不同限制性酶切位点的粘性末端连接 可以控制目的DNA和载体DNA的连接方向。

在相同限制酶切位点连接时，目的DNA片段正向和反向连接的几率是相同的，而在不同限制性酶切位点连接目的DNA和载体连接的方向是唯一的。这在构建可转录和表达载体是非常关键的。

·重组DNA向细菌细胞转入方法：化学转化法、电击转化法

·外源目的基因向真核细胞转入

导入植物细胞

1、载体介导的转化（农杆菌介导）

2、DNA直接导入（基因枪法、电击法等）

3、种质系统法（花粉管通道法等）

第九章 重组子的筛选与鉴定

·转化子是导入外源DNA后获得了新的遗传标志的受体细胞。

·重组子是指通过体外DNA重组技术，将目的基因（外源DNA片段）与载体DNA连接后，形成的带有外源目的基因的重组DNA分子

重组子的筛选与鉴定

