

# 基因工程的基本流程

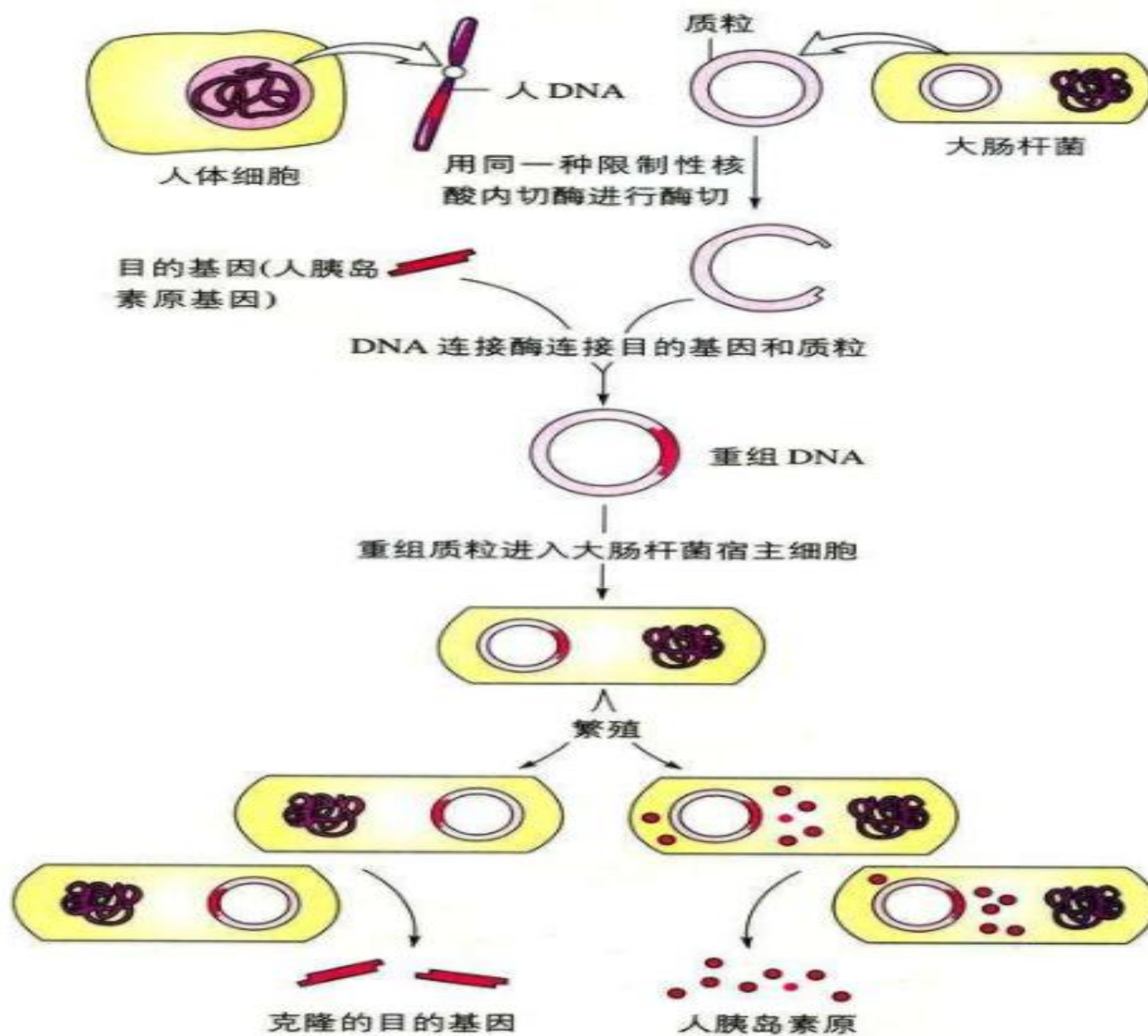
郑玉玺

15915751625







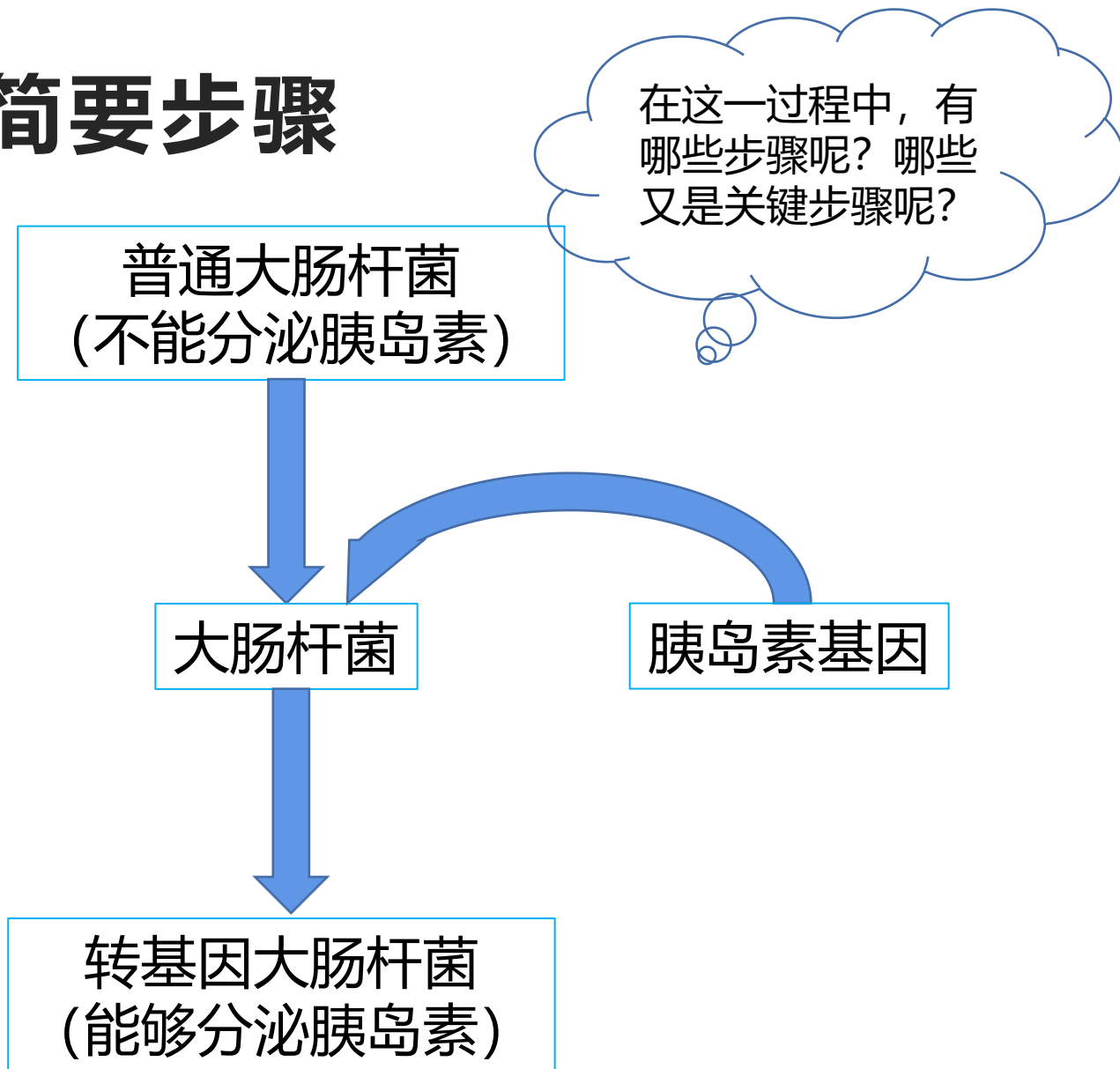


基因工程的基本操作步骤示意图

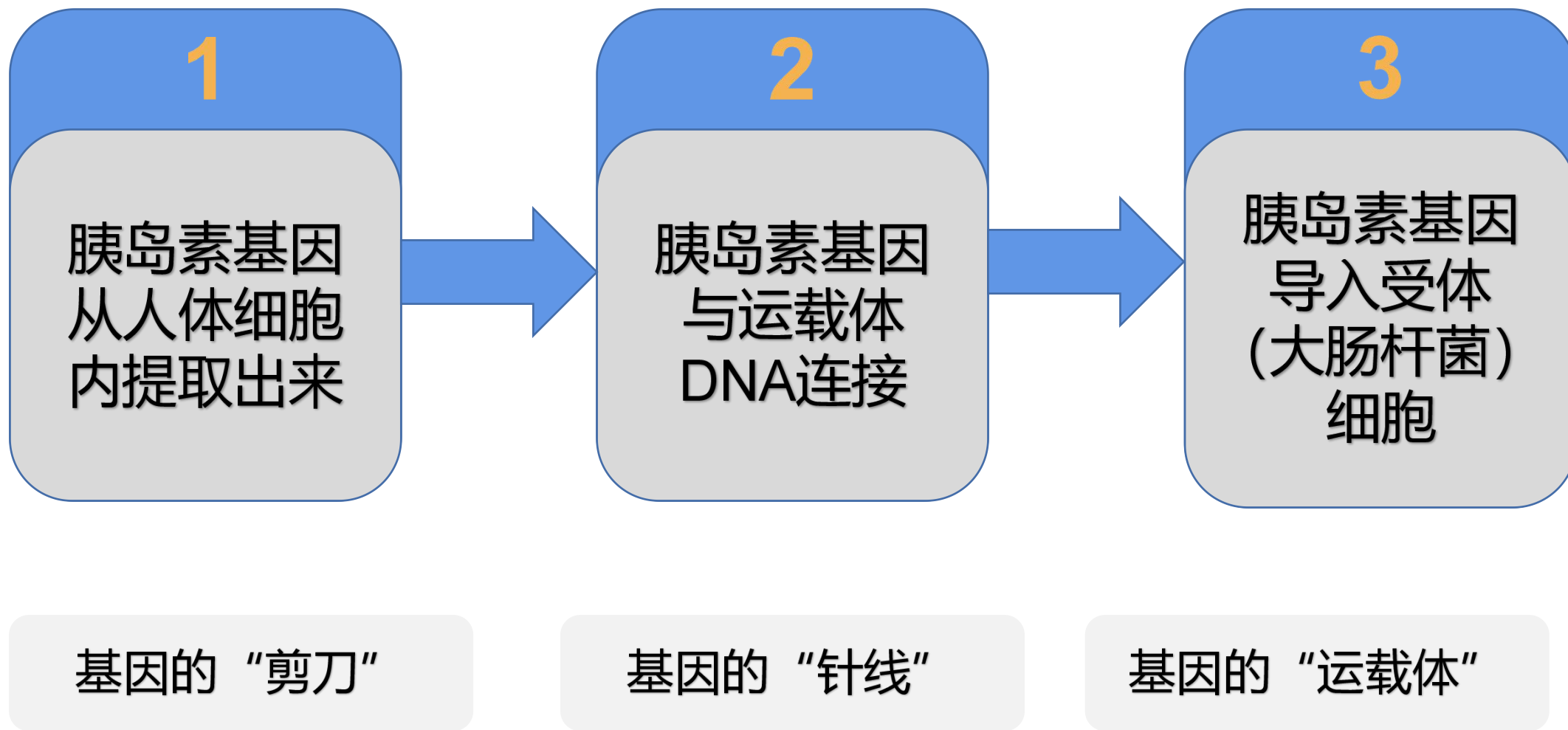
# 培育转基因大肠杆菌的简要步骤

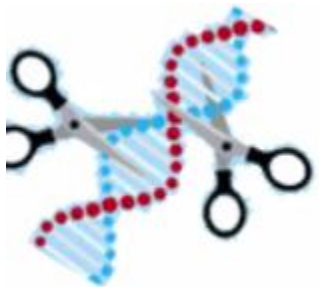


能合成人胰岛素的大肠杆菌



# 培育转基因大肠杆菌的关键步骤





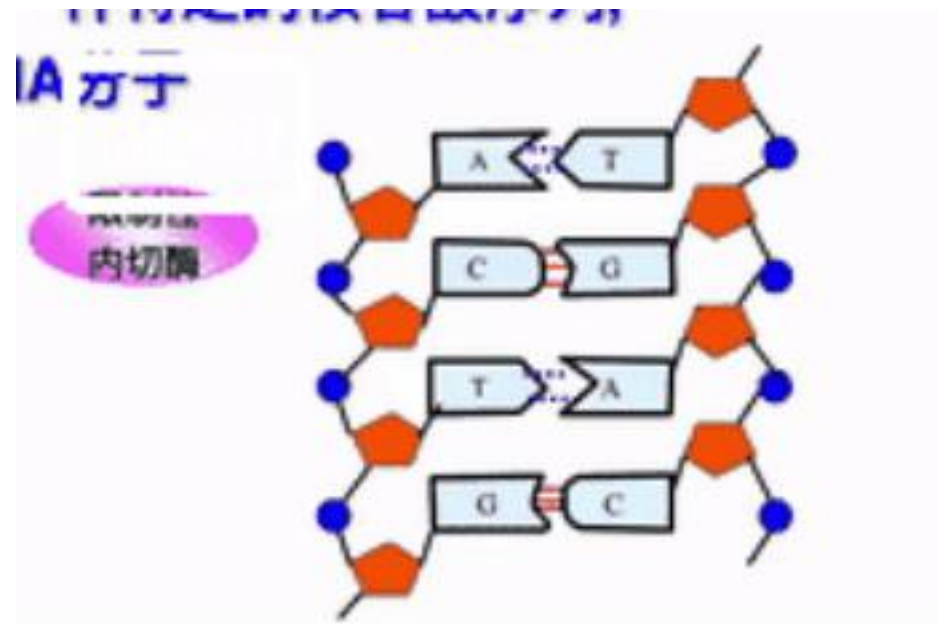
## 基因的“剪刀” 限制性核酸内切酶（限制酶）

特点：一种限制性内切酶只能识别一种特定的核苷酸序列，并在特定定位点切割DNA分子

来源：主要存在于原核生物中

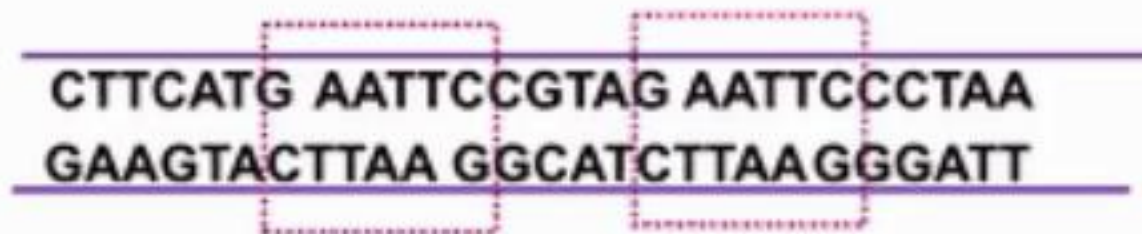
种类：已发现200余种

作用位点：磷酸二酯键



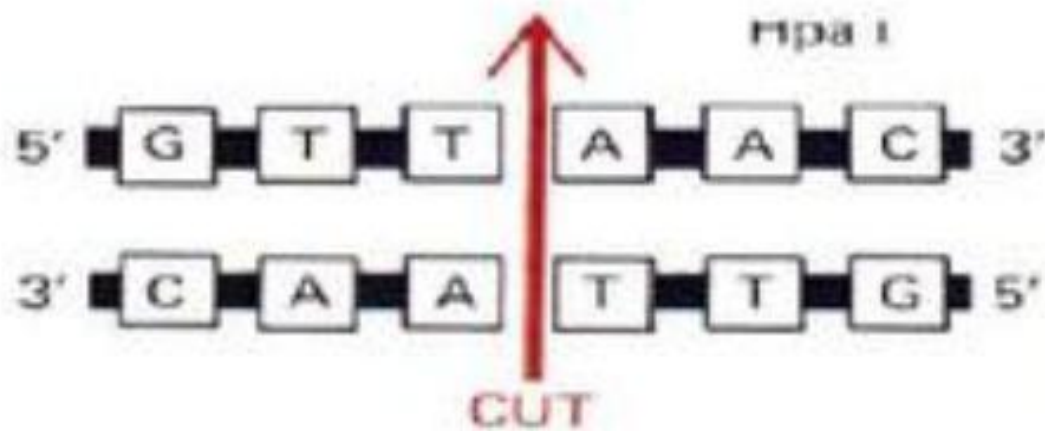
# 使用*EcoRI*剪切下列基因，将得到如何的序列？

*EcoRI*识别位点：GAATTC，切割位置是G和A之间

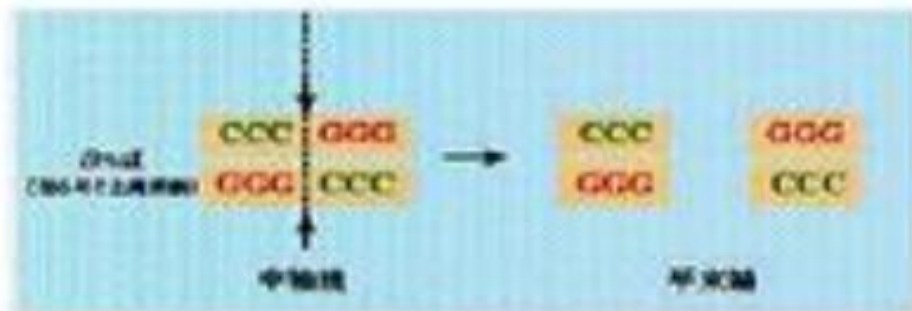


## 同时还有能产生平末端的限制酶

Hpa I



Sma I





基因的“针线”

DNA连接酶

作用位点：磷酸二酯键

CTTCATG AATTCCTAA

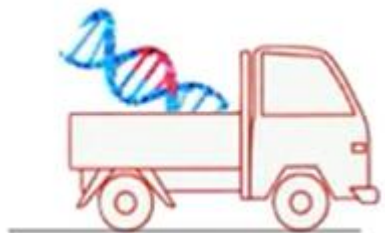
GAAGTACTTAAGGGATT

甲DNA片段

GAATTCGTAAGAATTCGGATT

CTTAAGGCATCTTAAGCCTAA

乙DNA片段

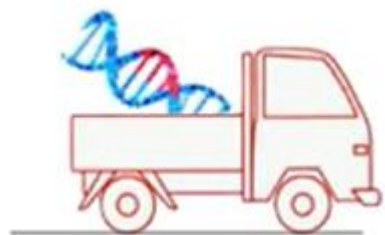


## 基因的“运载体”

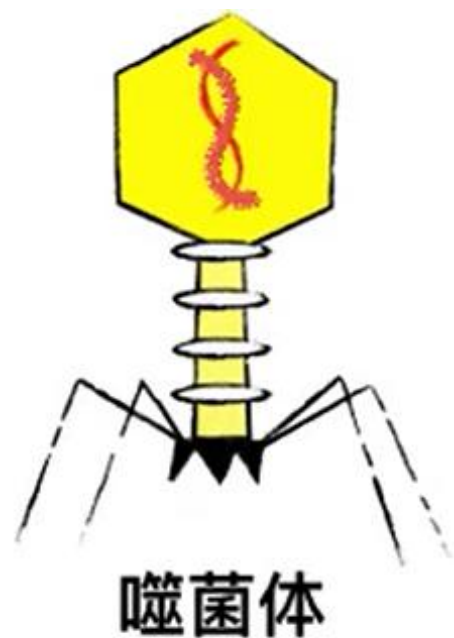
质粒、噬菌体、动植物病毒等



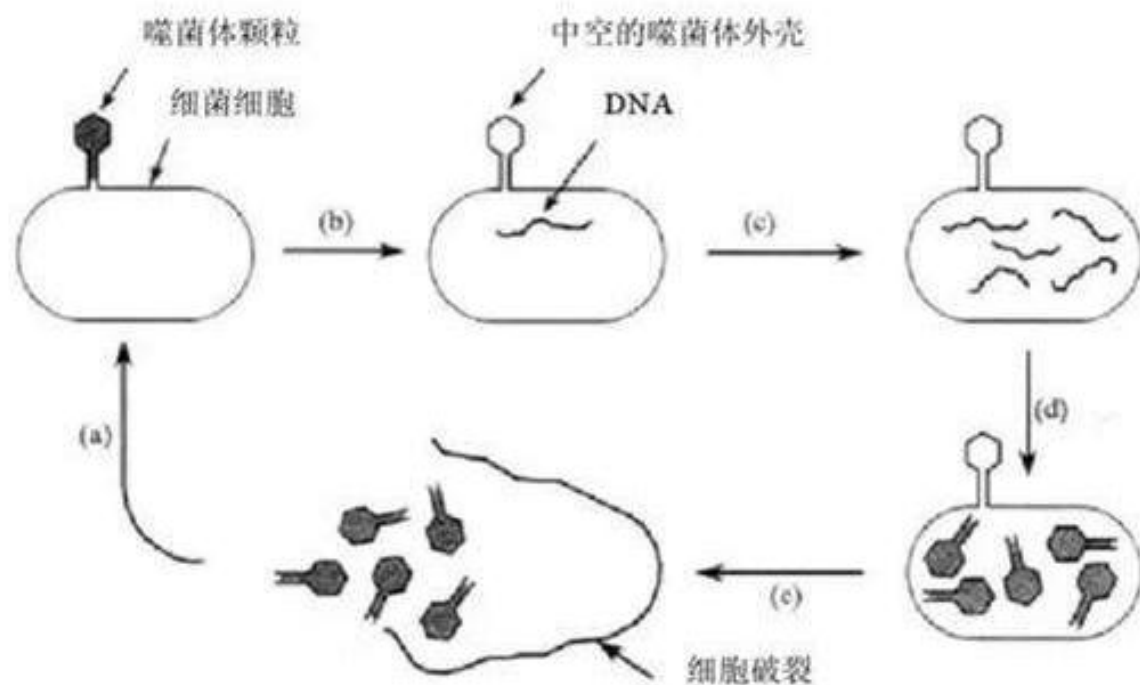
存在于细菌拟核外、独立进行自主复制的共价、闭合、环状双链DNA。



## 基因的“运载体”

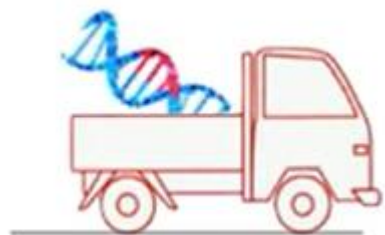


能够侵染吸进，赋予寄主细菌生物学性状。

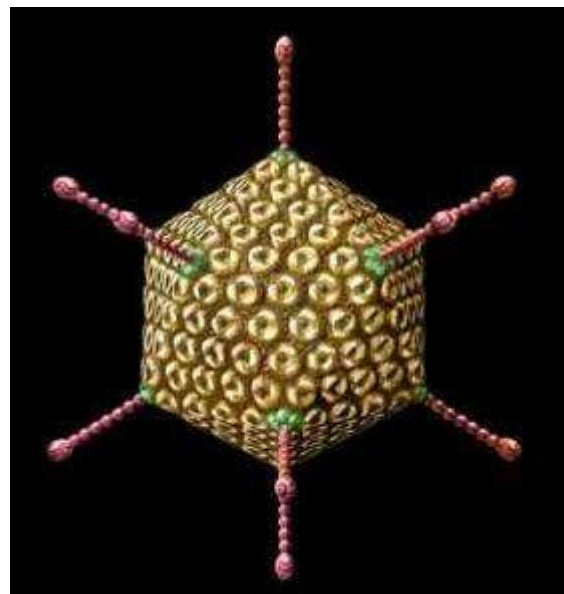


a: 噬菌体颗粒吸附到寄主细胞表面; b: 噬菌体DNA注入寄主细胞; c: 噬菌体DNA复制及蛋白质合成; d: 子代噬菌体颗粒的组装; e: 寄主细胞溶菌释放出子代噬菌体颗粒。

微信号: bllsc



## 基因的“运载体”



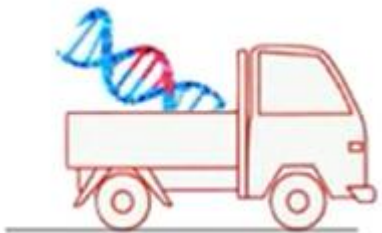
各类动植物病毒  
----腺病毒

项目编号 JSVCT088

### 重组新型冠状病毒疫苗（腺病毒载体） 入组筛查记录

| 基本信息登记 |          |
|--------|----------|
| 姓 名:   | 姓名:      |
| 性 别:   | 性别:      |
| 出生日期:  | 出生日期: 日  |
| 年 龄:   | 年龄:      |
| 家庭住址:  | 家庭住址: 17 |
| 联系电话:  | 联系电话: 17 |
| 筛选编号:  | 筛选编号:    |

江苏省疾病预防控制中心 制  
湖北省疾病预防控制中心  
2020 年 03 月 14 日 1.2 版

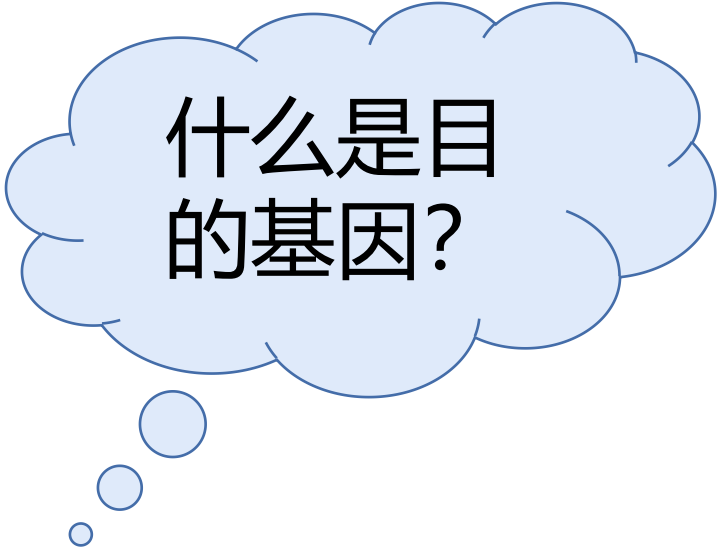


## 基因的“运载体”

### 特点

- 1、能够在宿主细胞中复制并稳定保存
- 2、具有多个限制酶切位点，以便与外源基因连接
- 3、具有标记基因（绿色荧光基因、抗性基因等），以便进行筛选

# 基因工程的基本步骤



什么是目的基因?

- ①目的基因的获取
- ②目的基因与运载体结合
- ③目的基因导入受体细胞
- ④目的基因的检测和表达

# 1、目的基因的获取

➤ 目的基因：靶标基因，实验中研究或操纵的特定基因。能够编码蛋白质。

抗虫基因

优良品质基因

生物药物基因

。 。 。 。 。 。

➤ 如何获取目的基因？

① 基因文库构建

② PCR方法

③ 人工合成方法：化学合成

# 1、目的基因的获取

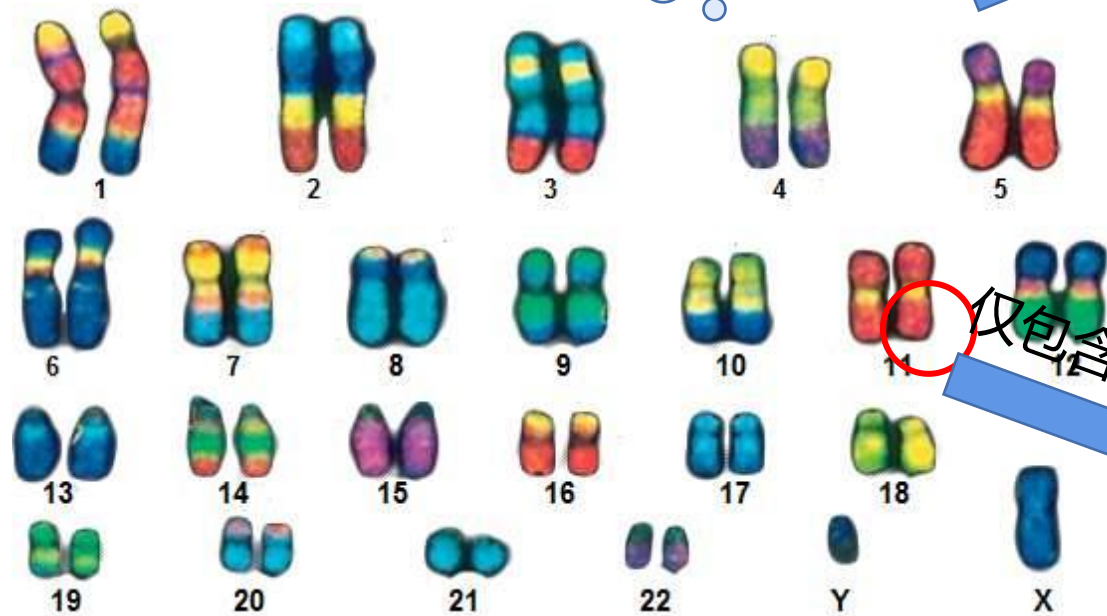
## ①基因文库构建

三个概念：

- ✓ 基因文库：含有某种生物不同基因的许多DNA片段，导入受体菌的群体中储存，各个受体菌分别含有这个生物的不同基因。
- ✓ 基因组文库：包含一种生物所有基因。
- ✓ 部分基因文库：只包含一种生物的一部分基因。如cDNA文库。

为什么要构建基因文库？直接从含有目的基因的生物体内提取不行吗？

包含一种生物的全部基因



人类基因组  
(23条染色体)

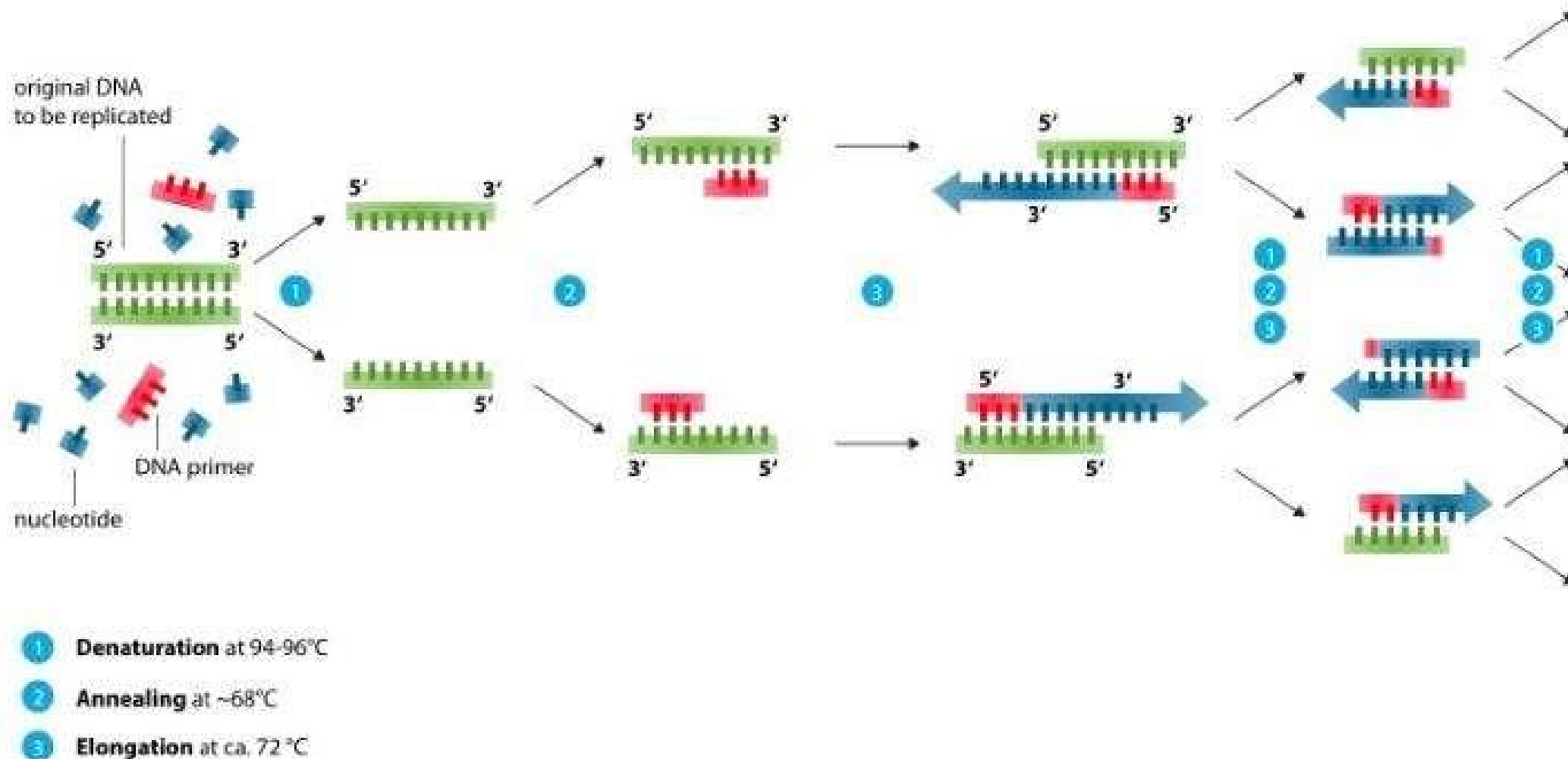
仅包含一部分基因



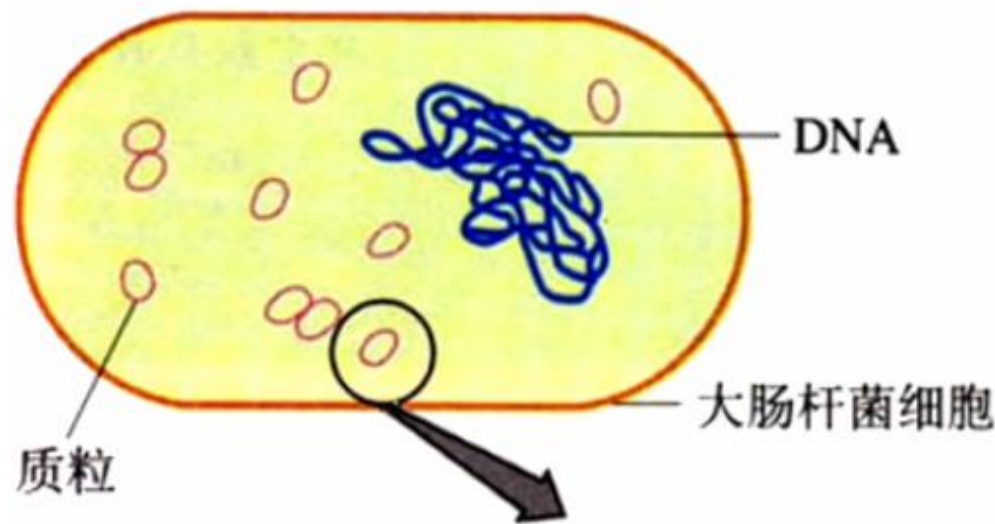
国家图书馆（基因组文库）



广州市图书馆（部分基因文库）



## 2、目的基因与运载体结合（核心步骤）

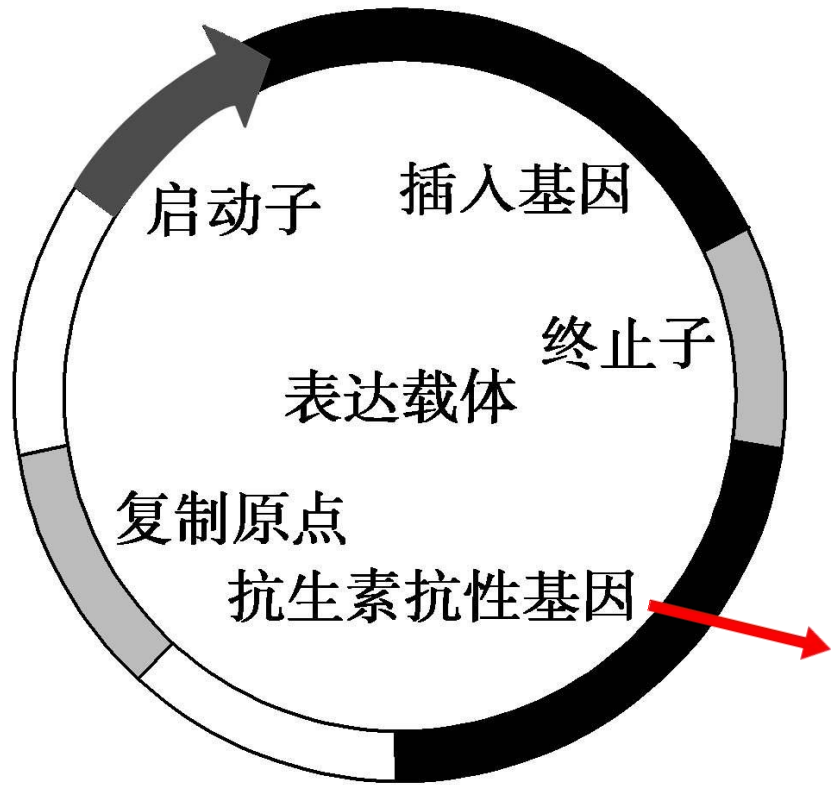


直接将所有DNA  
导入受体可以吗？

表达载体作用

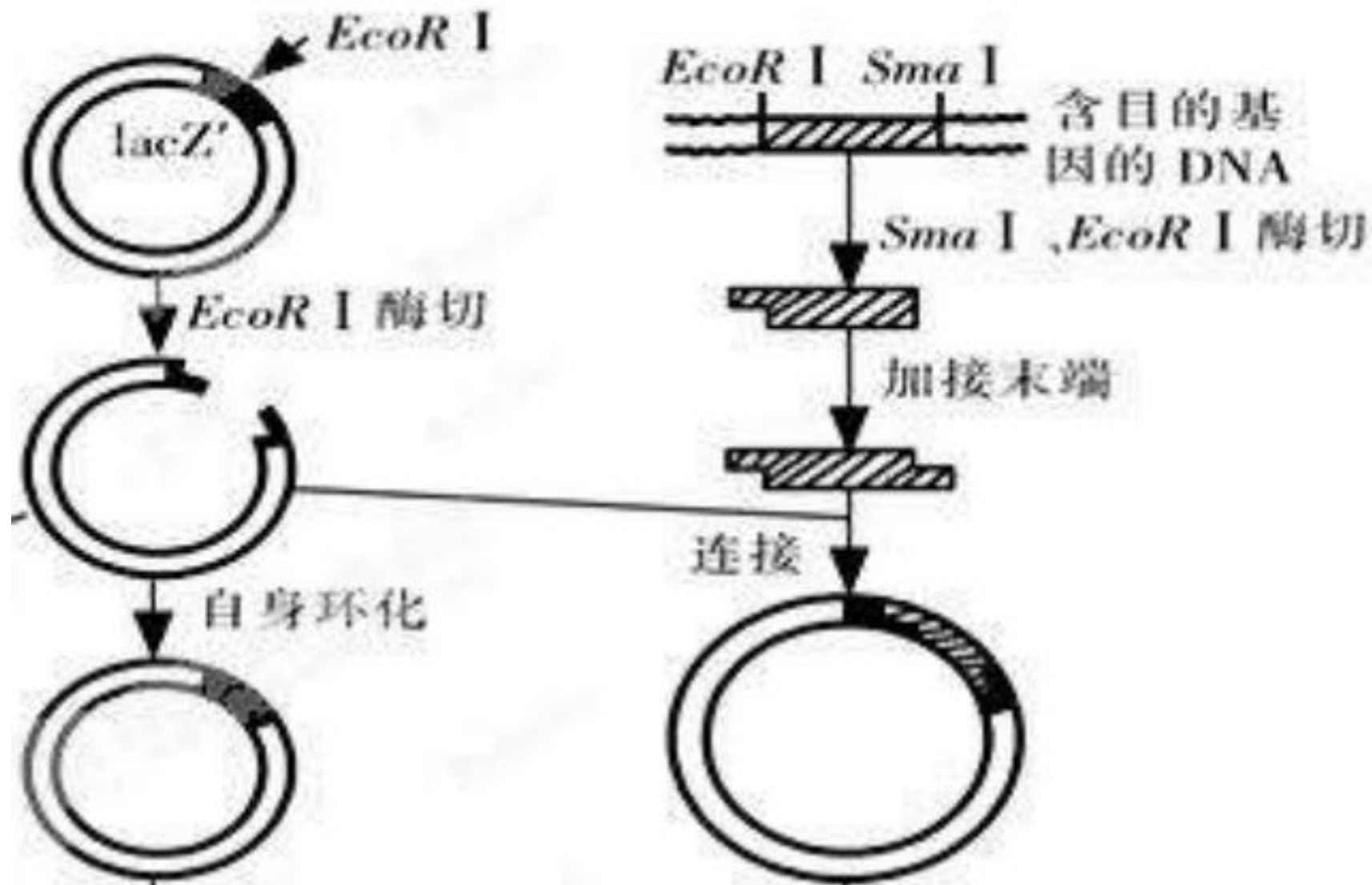
能够使目的基因在受体细胞中稳定存在，且可以遗传给下一代；同时能够使目的基因表达和发挥作用。

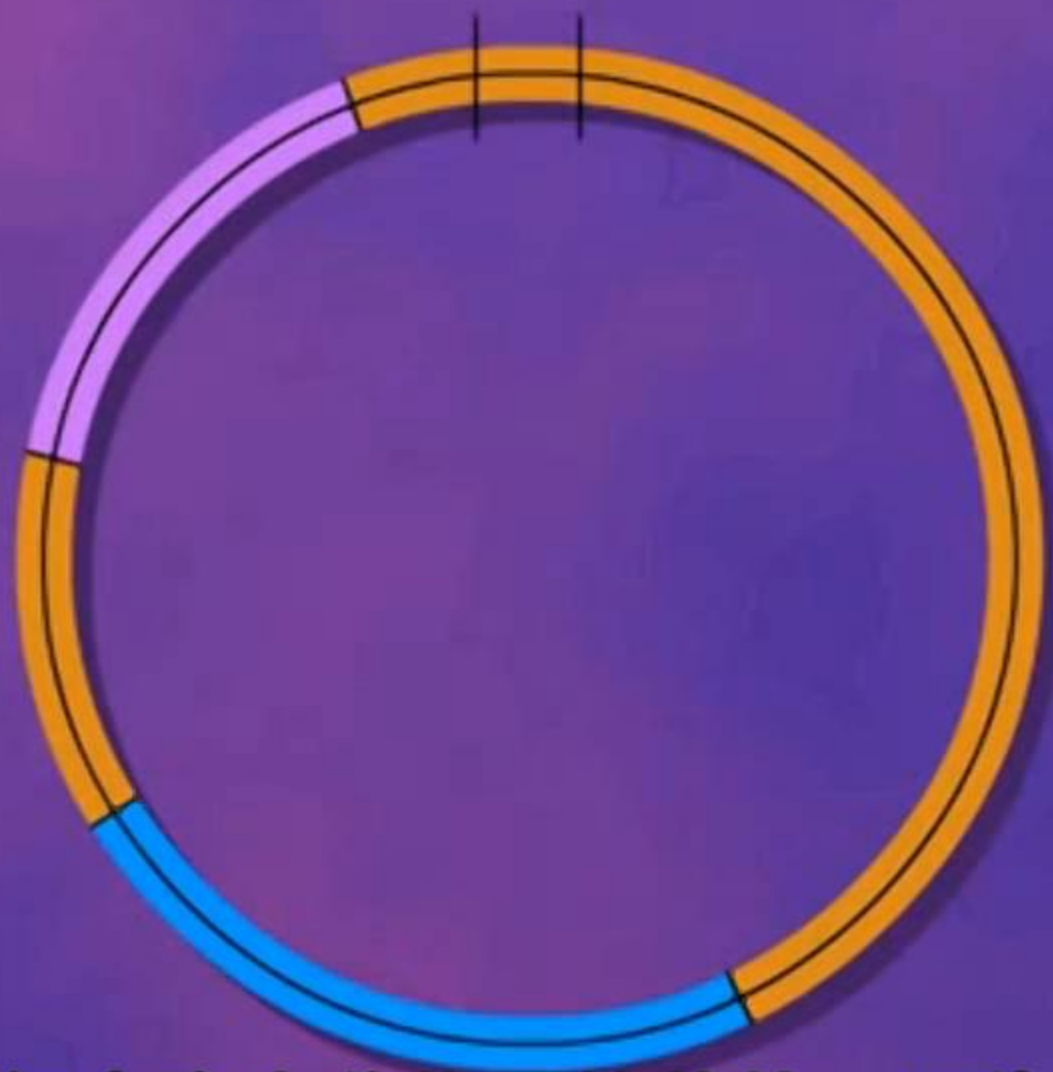
## 2、目的基因与运载体结合（核心步骤）



- 1、基因表达载体的组成：启动子、目的基因、终止子、标记基因等。
- 2、启动子：一段有特殊结构的DNA片段，位于基因的首端，是RNA聚合酶识别和结合的部位，驱动基因转录出mRNA。
- 3、终止子：位于基因的尾端，也是一段特殊结构的DNA短片段，终止转录的进程。
- 4、标记基因：为了鉴别受体细胞中是否含有目的基因，从而将含有目的基因的细胞筛选出来，如抗生素抗性基因就可以作为这种基因。

## 2、目的基因与运载体结合（核心步骤）





质粒是进行克隆十分优质的载体，因为他们携带

Plasmids can be good cloning vectors because they carry an origin of

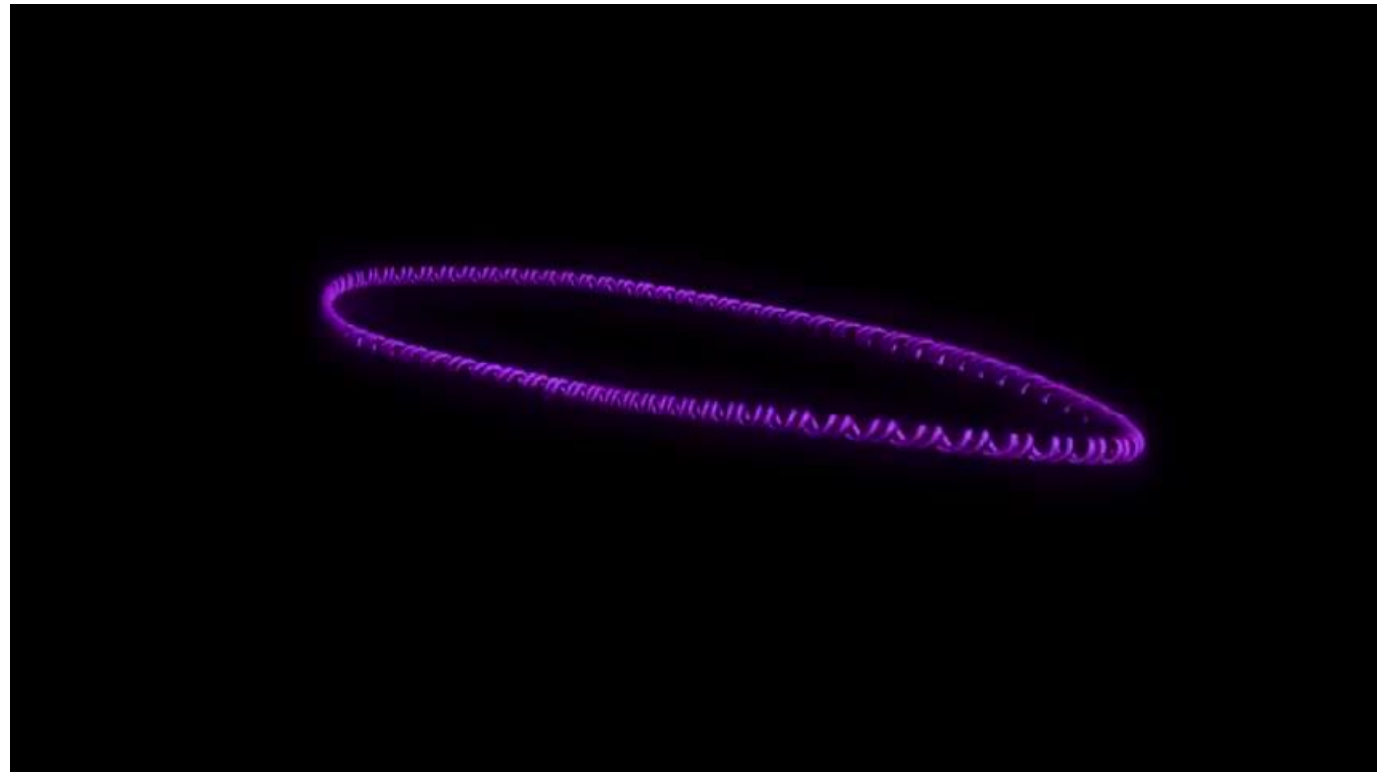
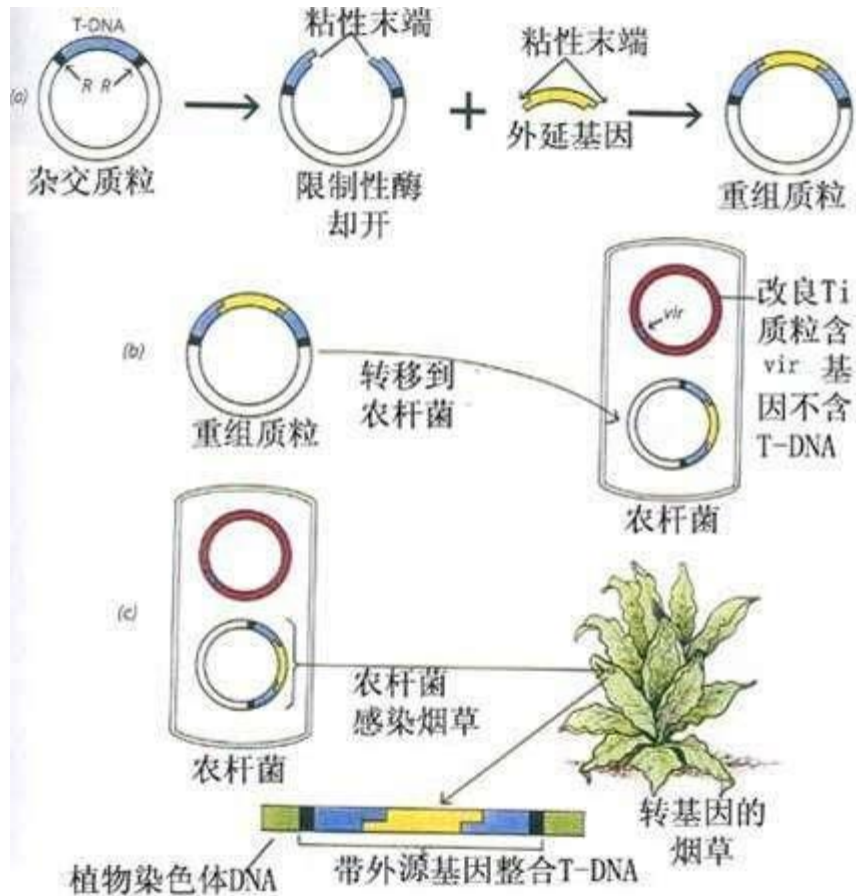
### 3、目的基因导入受体细胞

✓ 转化：目的基因进入受体细胞，能够在受体细胞中维持稳定和表达的过程。

| 受体细胞  | 方法                                                                                                      |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 植物细胞  | 1、农杆菌转化法：目的基因插入Ti质粒的T-DNA→农杆菌→导入植物细胞→稳定维持和表达<br>2、基因枪法：单子叶植物中常用的一种基因转化方法，成本较高<br>3、花粉管通道：我国独创的方法，十分简便经济 |
| 动物细胞  | 显微注射法：含有目的基因的表达载体提纯→取受精卵→显微注射→受精卵发育→获得具有新性状的动物                                                          |
| 微生物细胞 | Ca <sup>2+</sup> 处理细胞→感受态细胞→表达载体与感受态细胞混合→感受态细胞吸收DNA分子→目的基因随受体细胞的繁殖而复制                                   |

### 3、目的基因导入受体细胞

植物细胞----农杆菌转化法（最常用）

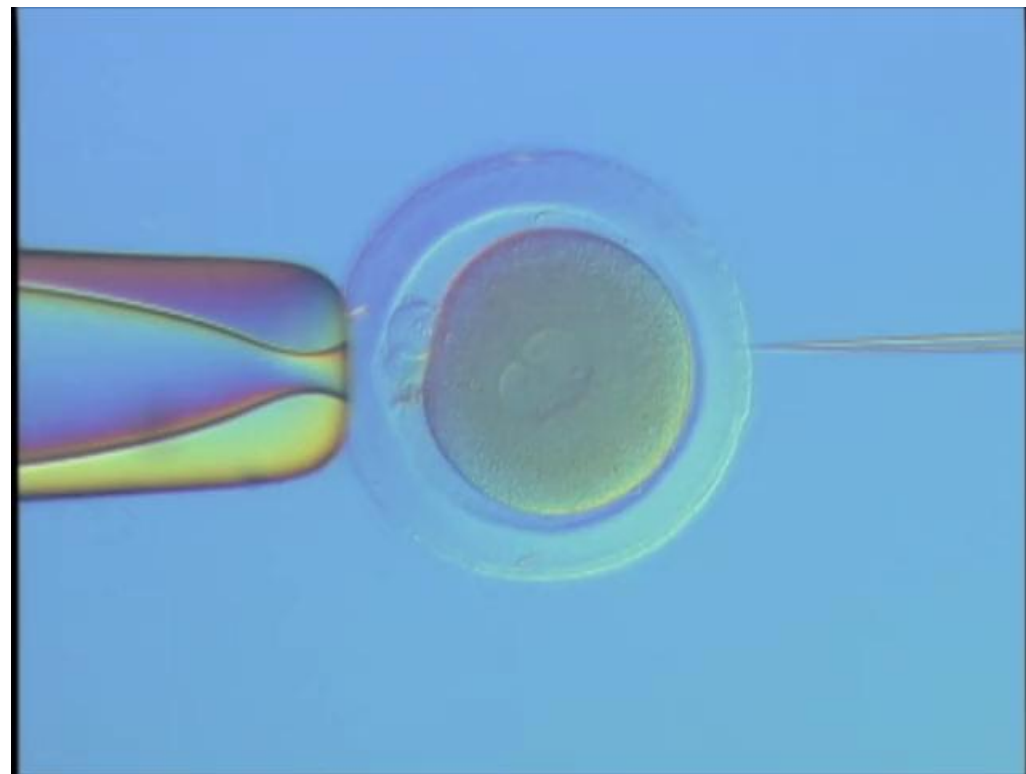
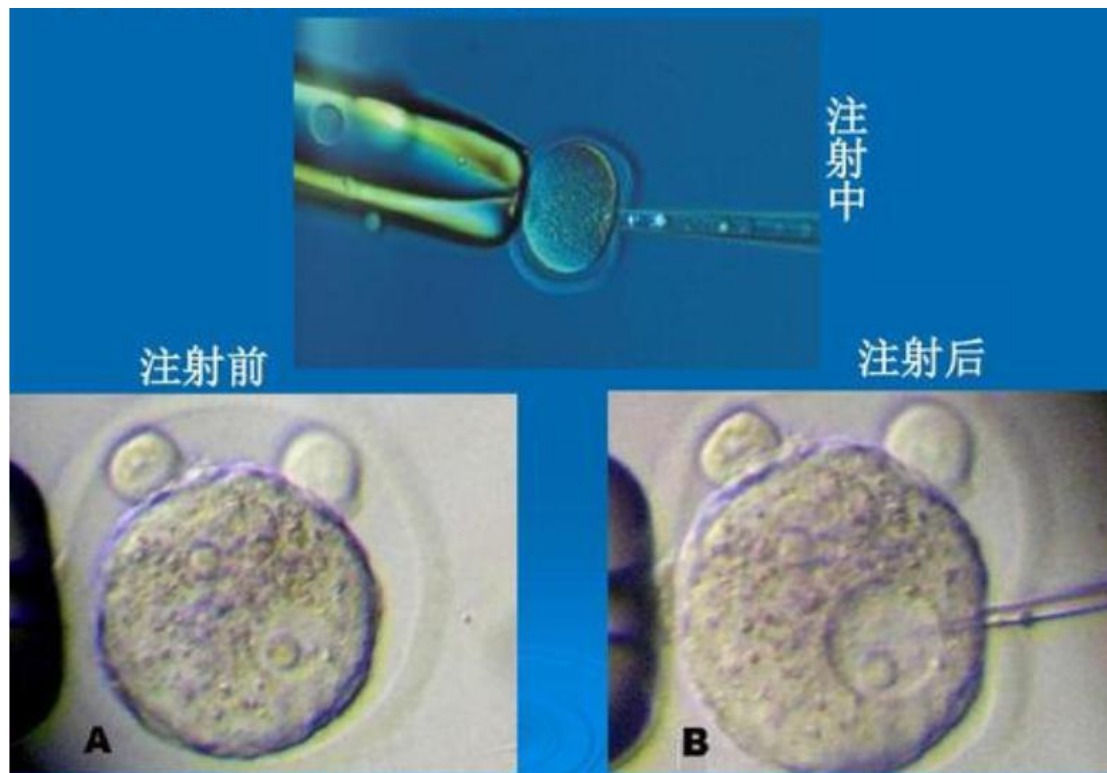


### 3、目的基因导入受体细胞

动物细胞----受体细胞多使用受精卵；使用显微注射技术

- ①将含有目的基因的表达载体提纯，使DNA浓度保持在1-3 $\mu$ g/mL
- ②从雌性动物体内取出卵（可在体内受精，或体外受精）
- ③利用显微注射技术进行显微注射
- ④将注射目的基因的受精卵，经胚胎早期培养一段时间后一直到雌性动物的输卵管或子宫
- ①发育成为具有新性状的动物

### 3、目的基因导入受体细胞

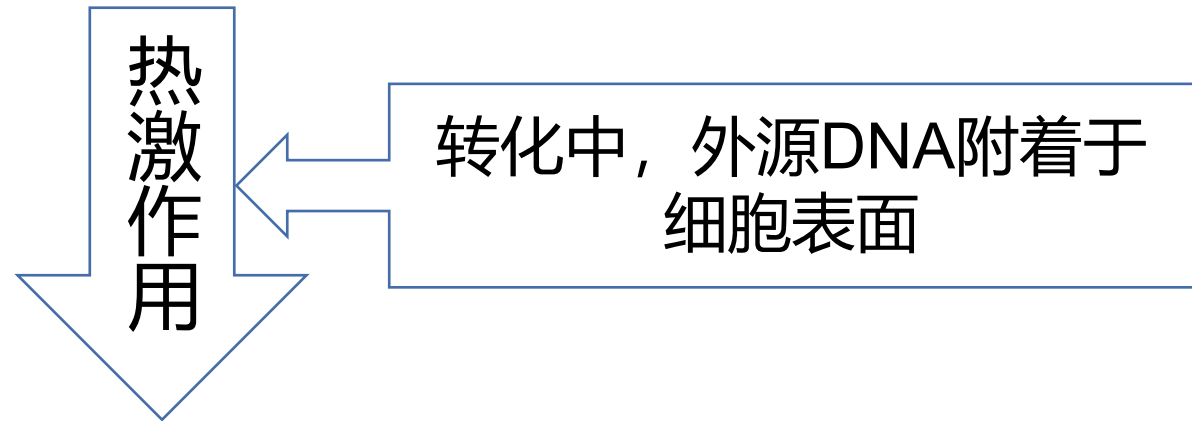


### 3、目的基因导入受体细胞

微生物细胞----优势：繁殖快、单细胞、遗传物质相对较少

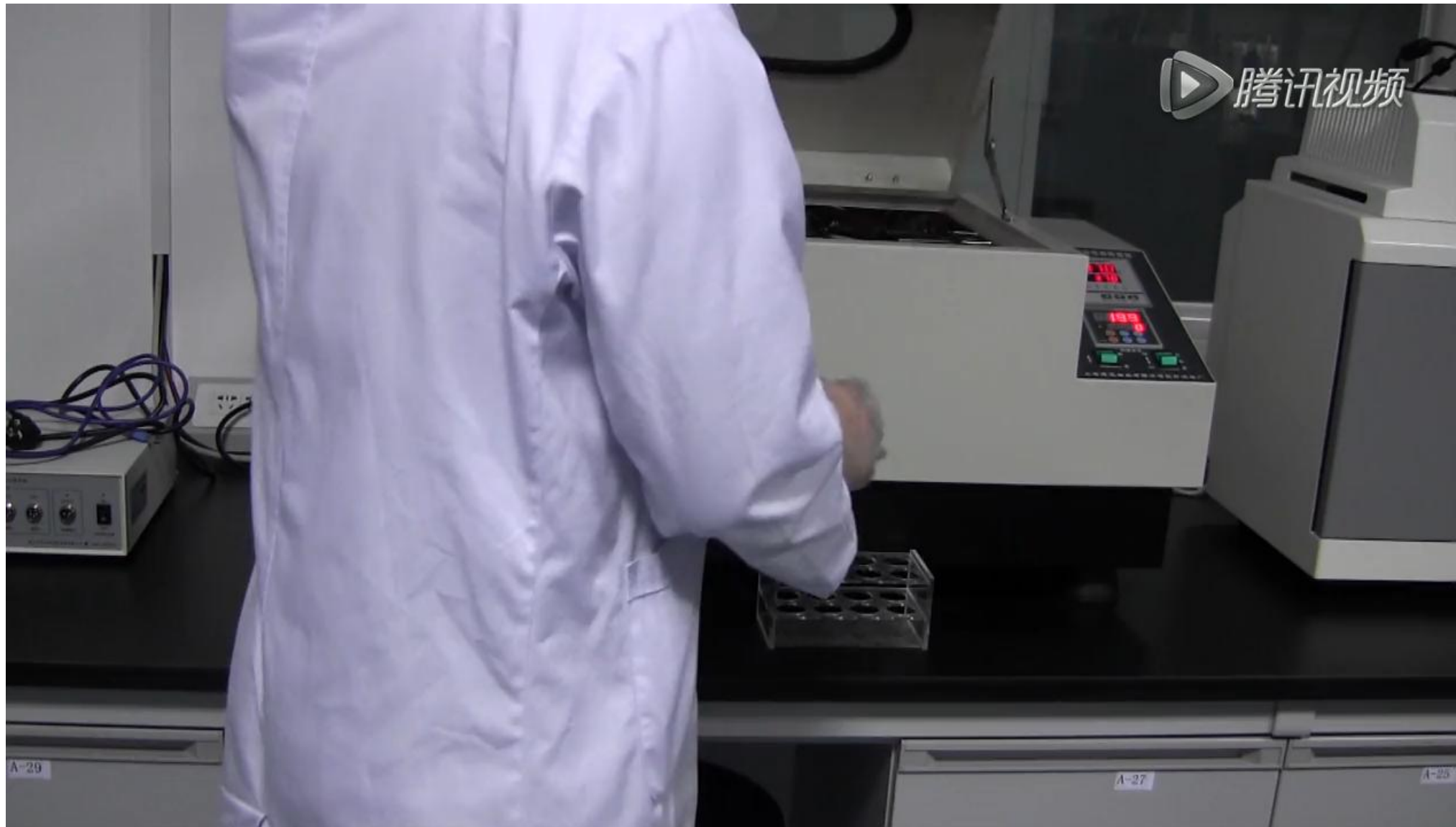
✓ 感受态细胞：细胞处于一种能够吸收周围环境中DNA分子的生理状态

CaCl<sub>2</sub>法原理：细胞在低温、低渗CaCl<sub>2</sub> (0.1M) 作用下会发生膨胀，Ca<sup>2+</sup>使细胞膜磷脂双分子层形成液晶结构，促使细胞外膜与内膜间隙中的部分核酸酶解离出来，诱导细胞成为感受态细胞。



外源DNA进入感受态细胞

### 3、目的基因导入受体细胞



## 4、目的基因检测与鉴定

转入外源DNA  
是否成功，应  
怎样判定？

➤ 目的基因是否转入成功，基因是否被转录，且是稳定的维持和表达。

✓目的基因导入检测

✓表达检测—转录检测

✓表达检测—翻译检测

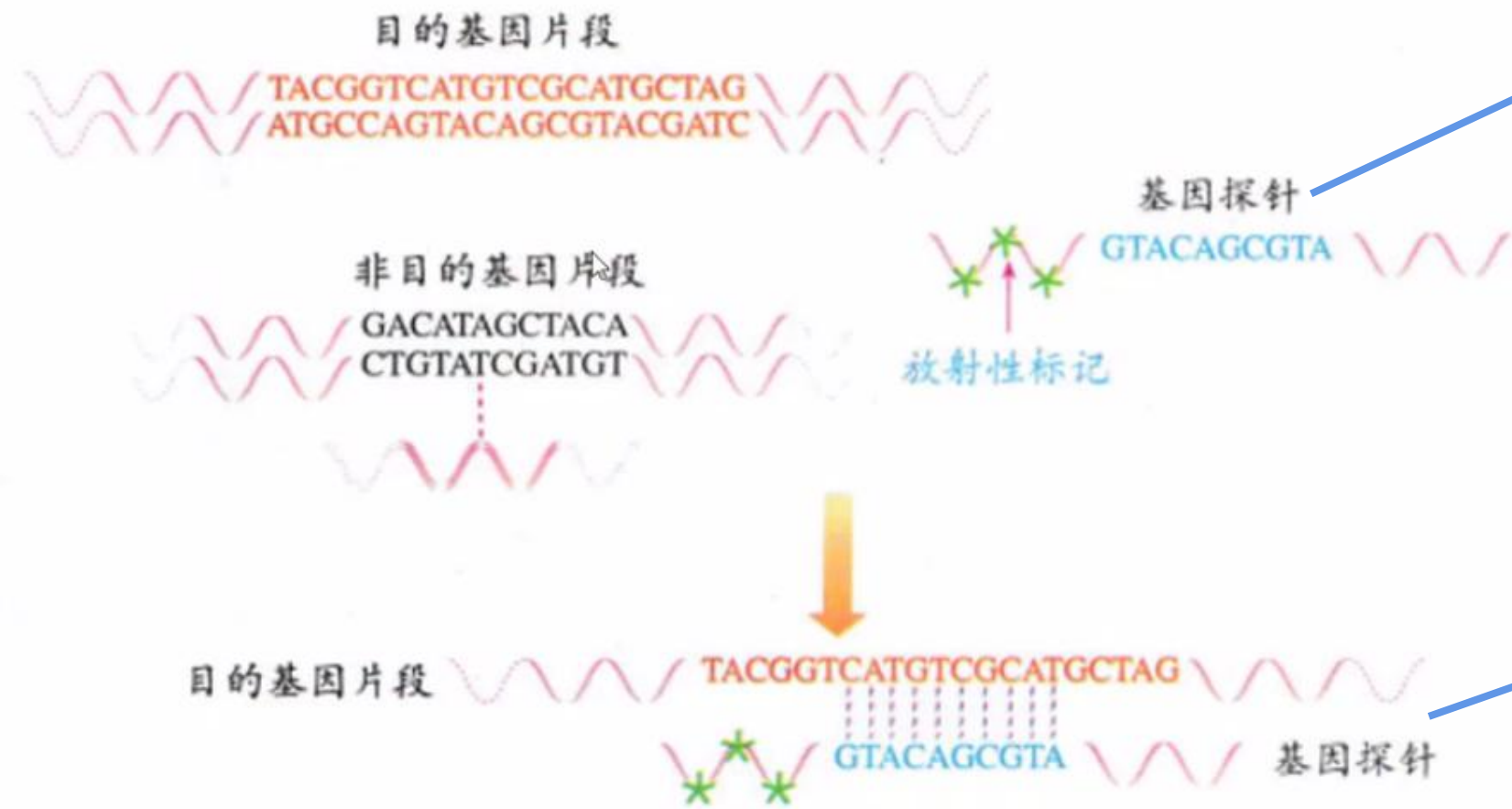
✓个体生物学检测

分子水平检测

个体水平检测

## 4、目的基因检测与鉴定

✓ 导入检测—DNA分子杂交技术

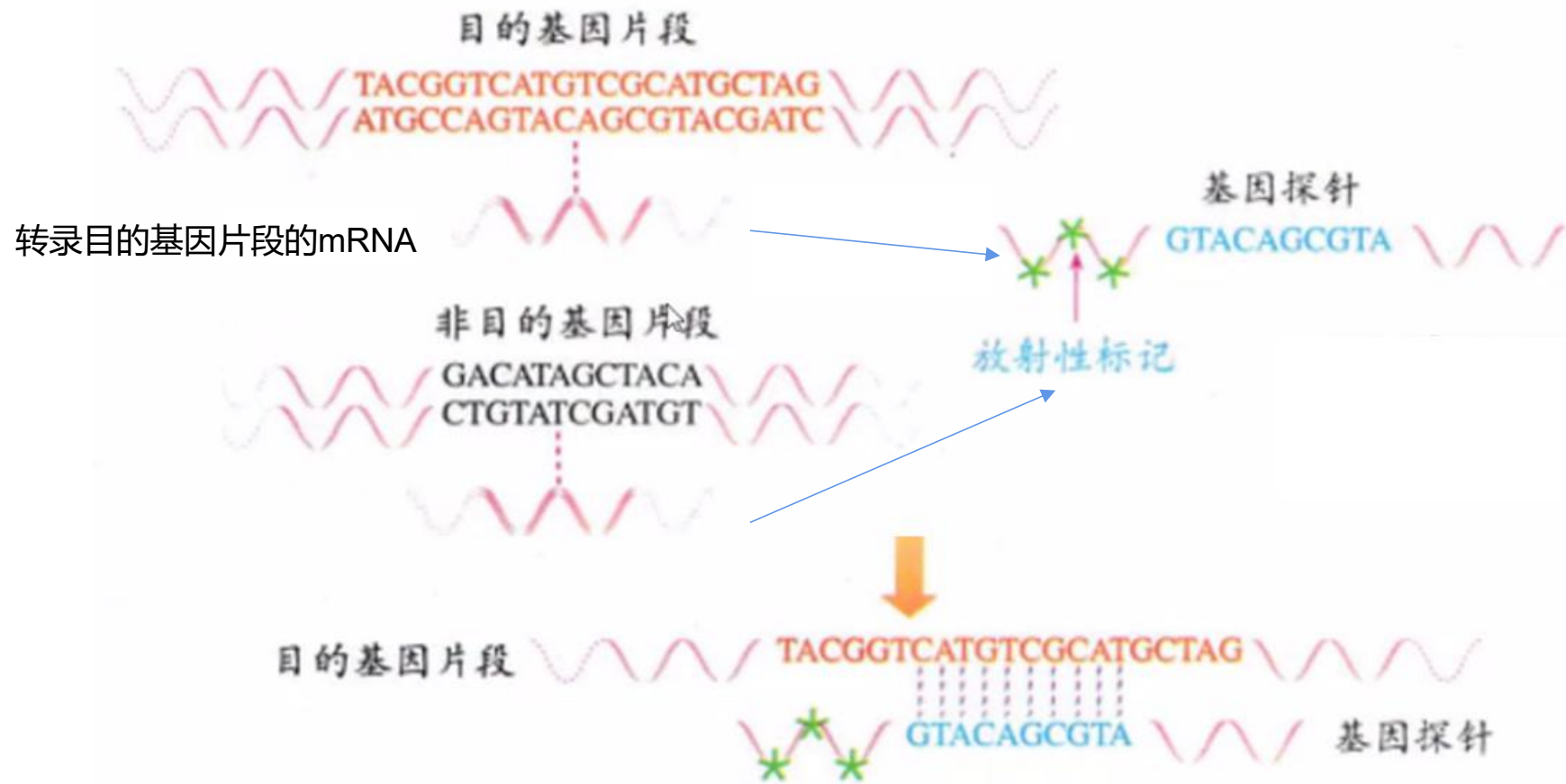


基因探针：一段带有检测标记，序列已知，与目的基因互补的核酸序列，可以是DNA或RNA。

杂交带的出现，意味着什么？

## 4、目的基因检测与鉴定

✓ 表达检测--转录检测（是否能够转录出mRNA）：分子杂交技术



## 4、目的基因检测与鉴定

✓ 表达检测—翻译检测，即是否能翻译成蛋白质：抗原-抗体杂交

