

# 目的基因的获取

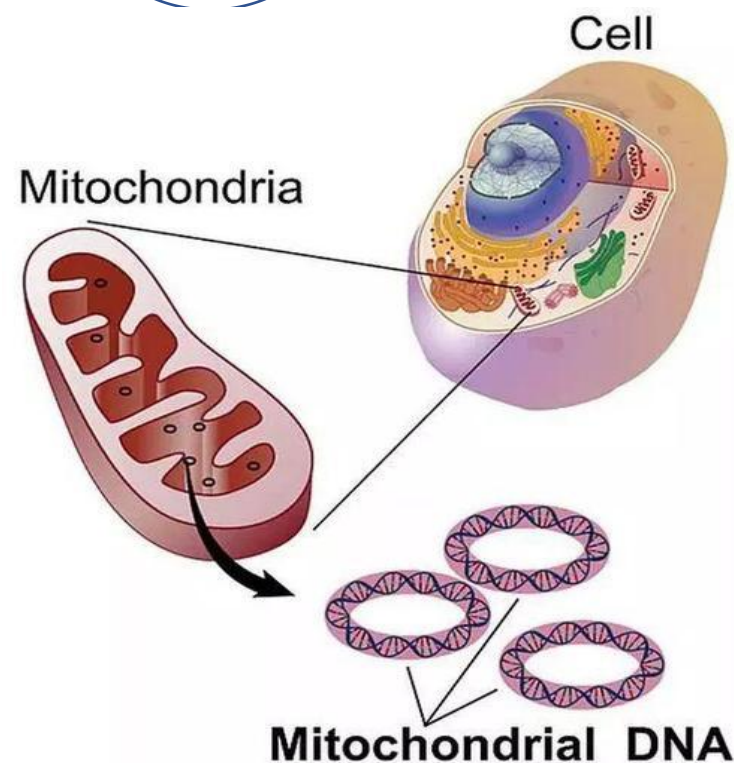
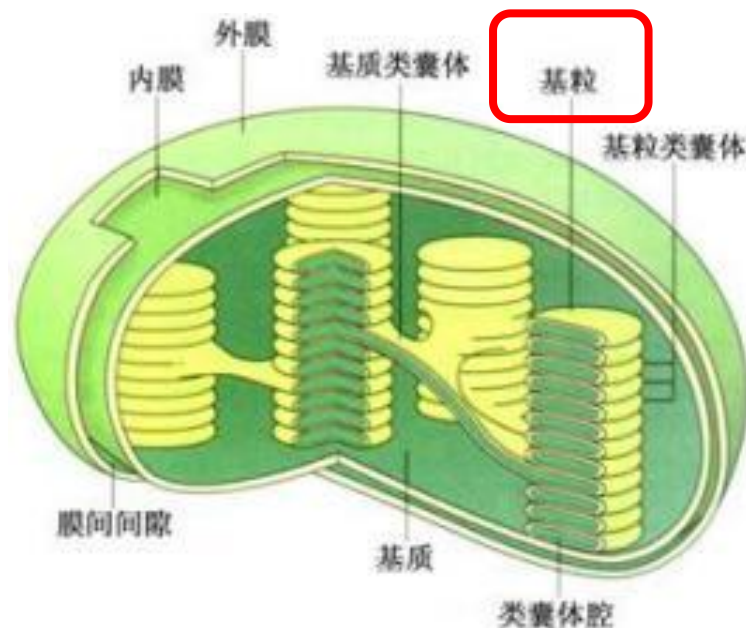
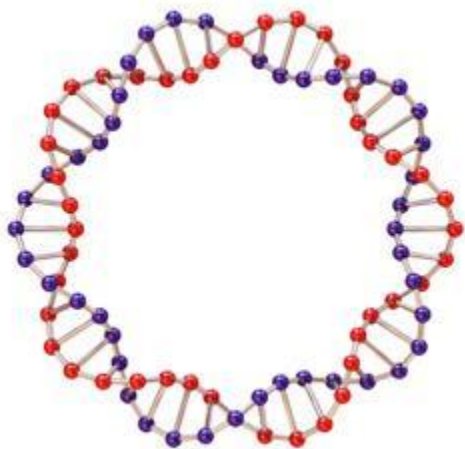
郑玉玺

15915751625

# 核酸的制备

- 核酸包括：  
基因组DNA、RNA、质粒DNA和叶绿体DNA、线粒体DNA等。

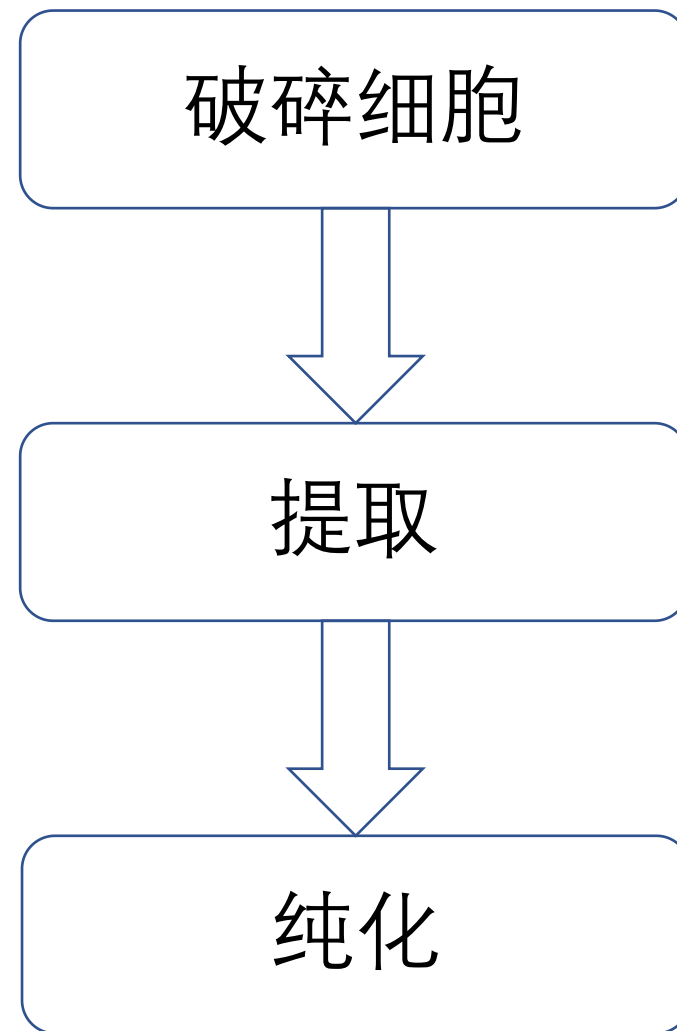
制备核酸的意义是什么？核酸又包括了哪些种类？



# 基因组DNA提取

步骤：

- 温和裂解细胞
- 溶解DNA
- 采用化学或酶法，去除蛋白质、RNA及其他大分子

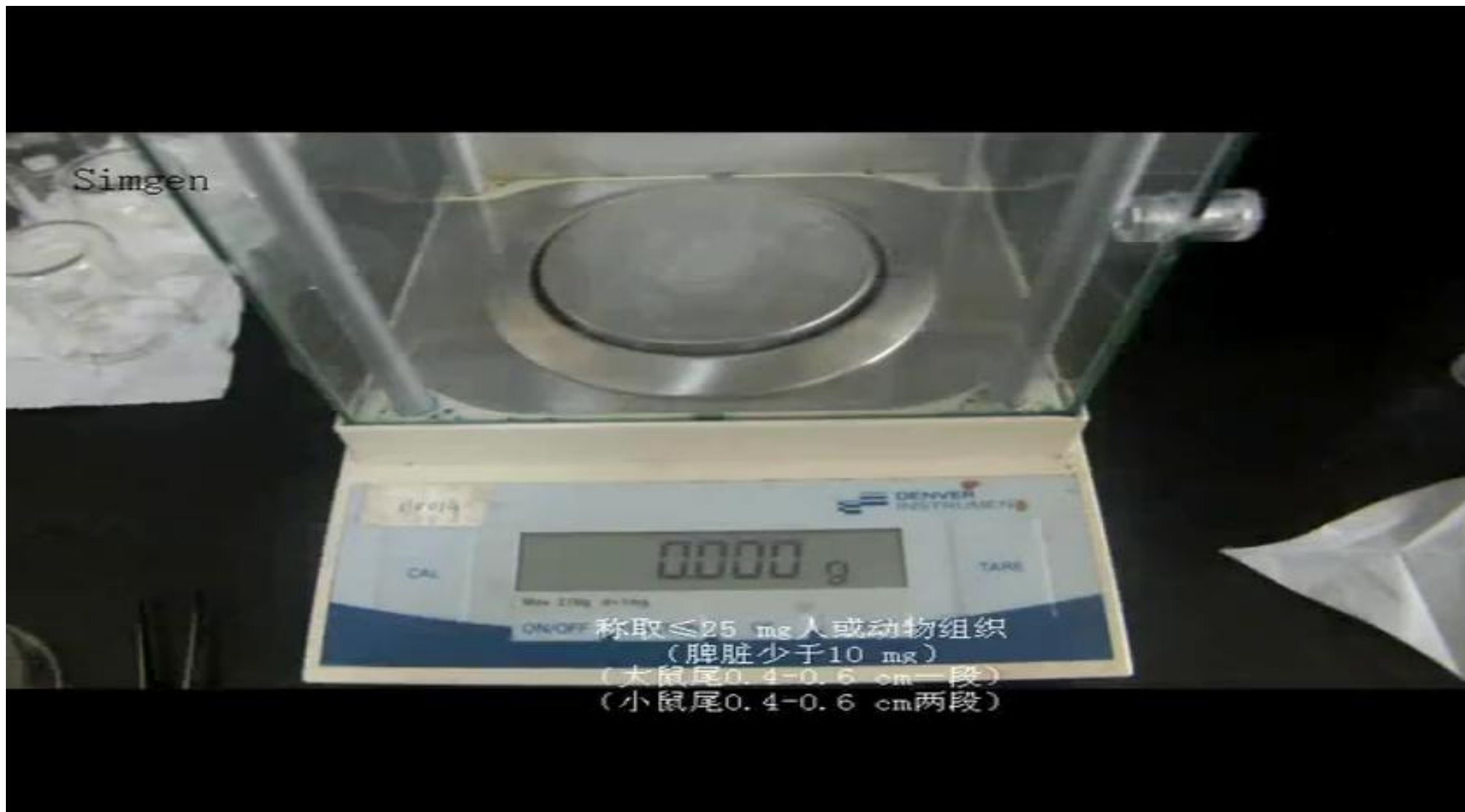


# 植物DNA的提取



称取300~500 mg新鲜植物  
(100~200 mg干燥的植物)

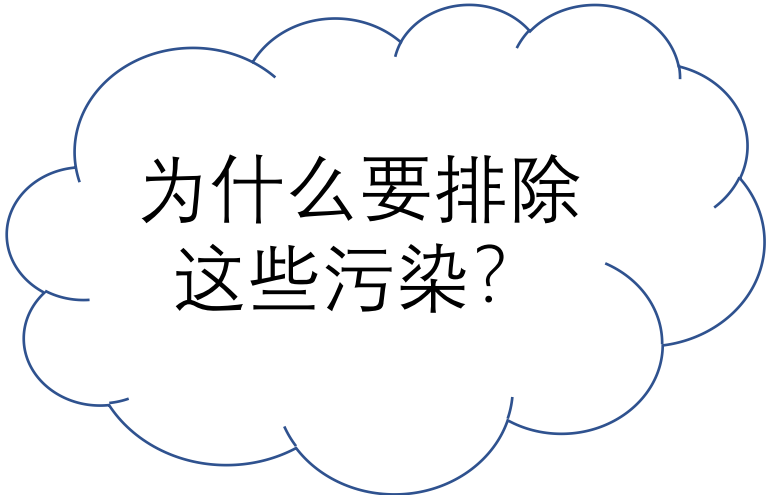
# 动物DNA的提取



# 基因组DNA提取

原则：

- ✓ 保证核酸一级结构的完整性；
- ✓ 排除其他分子的污染；
- ✓ 不应存在对酶有抑制作用的有机溶剂或高浓度的金属离子；
- ✓ 排除其他生物大分子污染；
- ✓ 排除其他核酸分子污染。



为什么要排除  
这些污染？

# 温和裂解细胞。

为什么要温和的裂解细胞？

化学裂解



SDS、CTAB、  
碱裂解等

酶裂解



溶菌酶

机械裂解



均一、高效、选  
择性低



存在DNA断裂风险

较温和

# 化学裂解

- SDS: 十二烷基硫酸钠, 阴离子表面活性剂, 溶解细胞膜和核膜蛋白, 使细胞膜和核膜破裂
- CTAB: 溴化十六烷基三甲铵, 阴离子表面活性剂, 溶解细胞膜和核膜, 并能与核酸形成复合物, 使其溶于高盐溶液 ( $>0.7\text{mmol/L NaCl}$ ), 在低盐溶液 ( $<0.3\text{mmol/L NaCl}$ ) 中沉淀。相比SDS, CTAB对含糖量较高的材料提取DNA效果更理想。

# 化学裂解

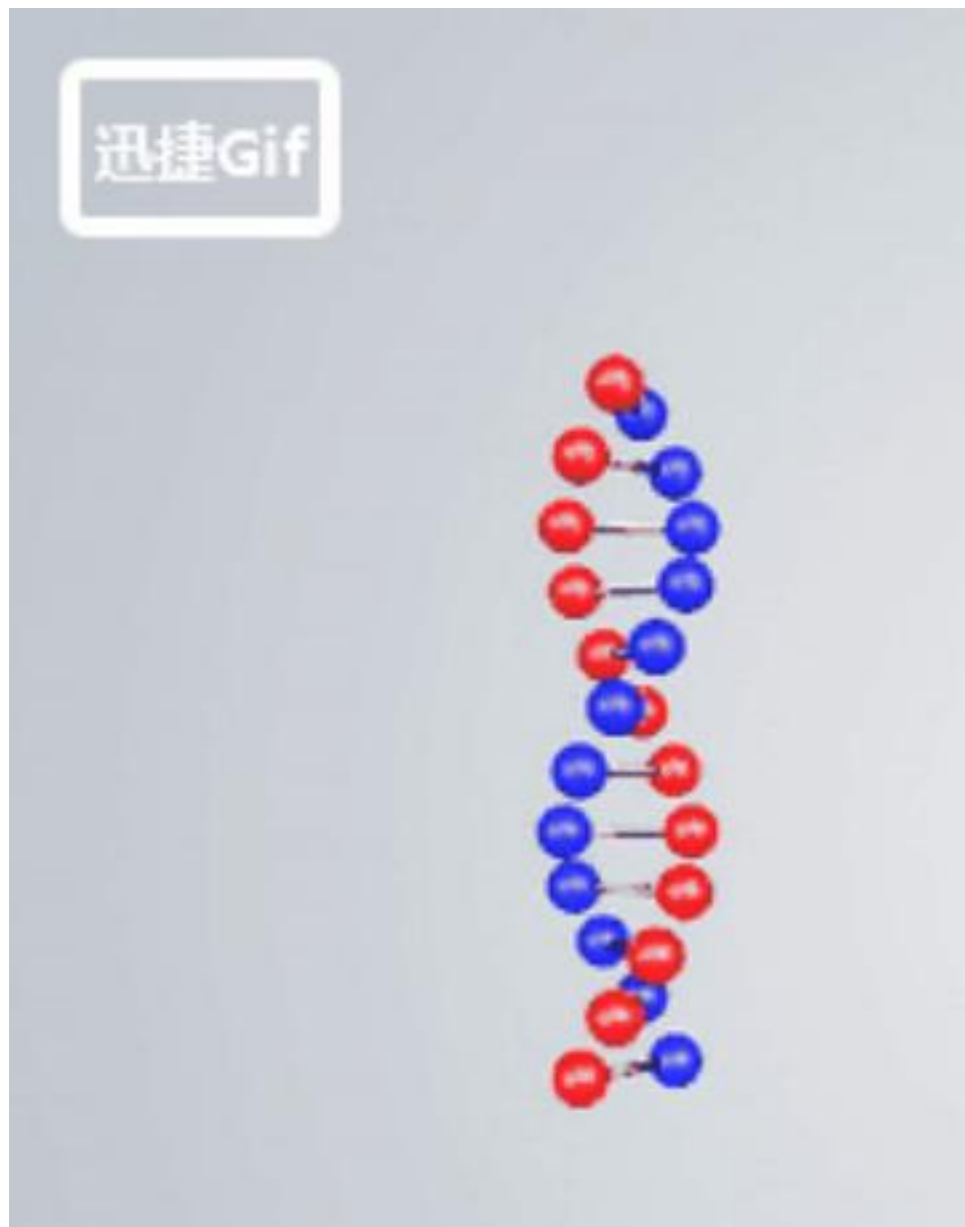
- 一般在化学裂解方法中，我们还会添加EDTA。
- EDTA：乙二胺四乙酸，能与 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 等二价金属离子结合。

## 为什么要加EDTA呢？

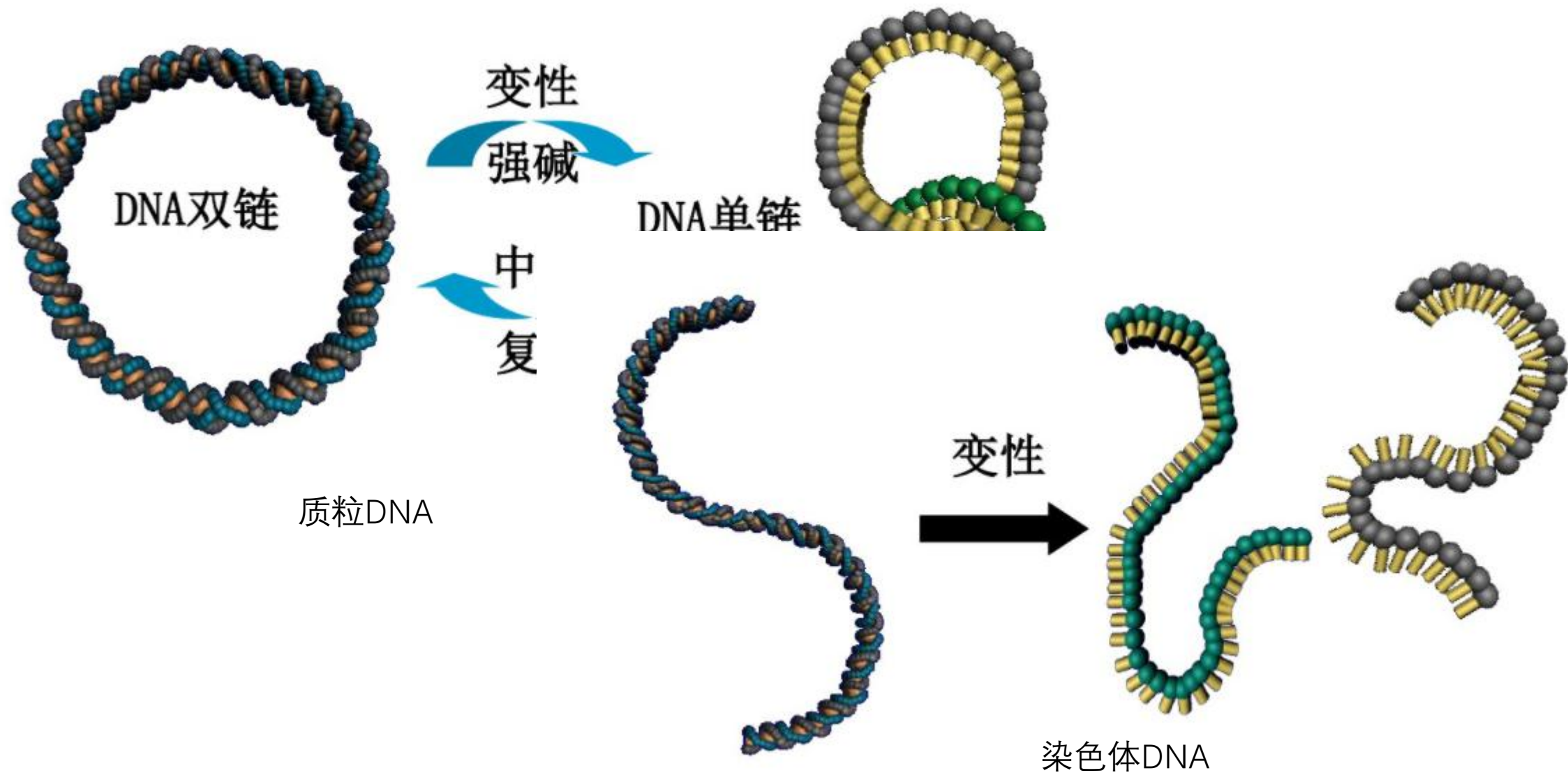
在细胞内有大量的DNA酶，会降解DNA，影响DNA提取效率。而DNA酶的活性依赖 $\text{Ca}^{2+}$ ，激活依赖 $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Mn}^{2+}$ 。因此去除这些离子可以有效保护DNA不被降解。

# 化学裂解

- 碱裂解：主要用于细菌质粒的提取。由于DNA在碱性环境下（pH 12.6）会发生变性（染色体DNA氢键断裂，双螺旋结构解开；而质粒DNA大部分氢键虽然也断裂，但超螺旋共价闭合的两条互补链不会完全分离），而pH环境恢复中性后（pH4.8调节至中性），质粒DNA可复性，染色体DNA不会复性，缠结成网状物质，可通过离心去除。

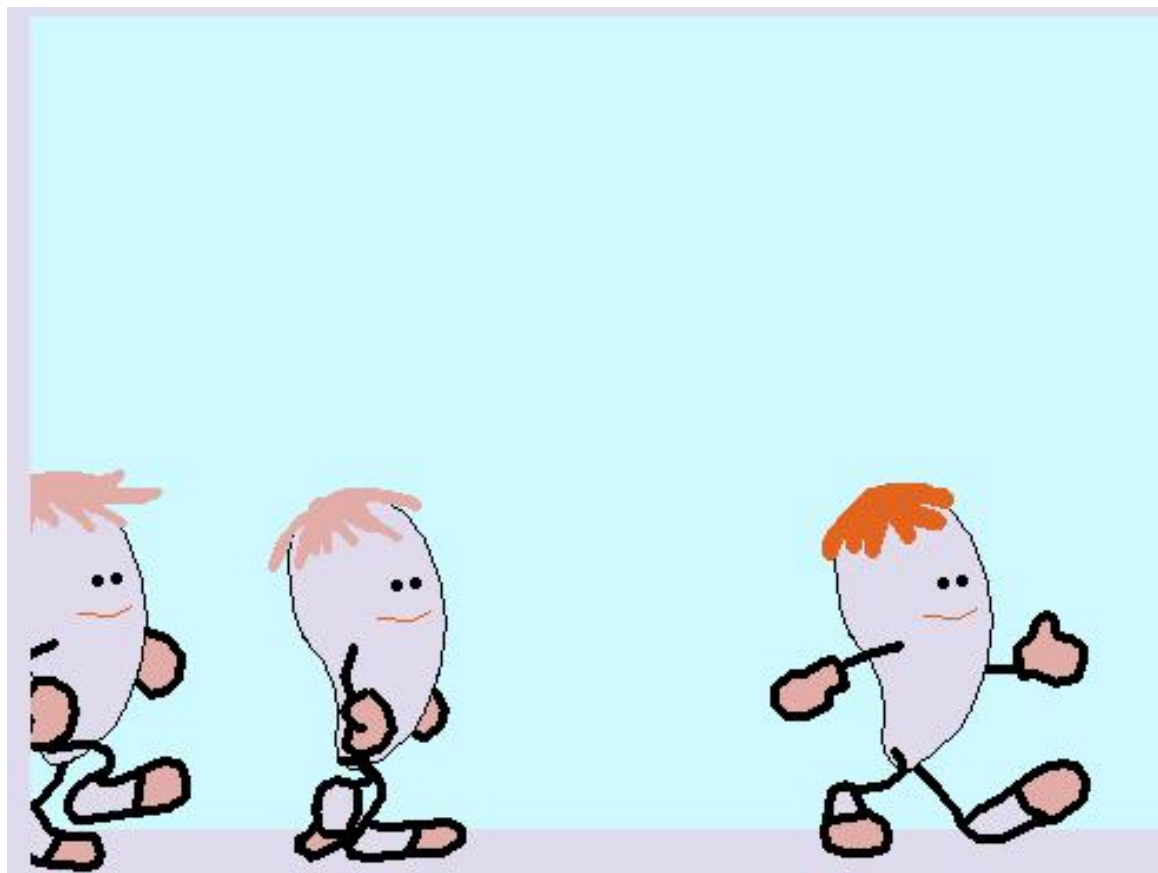


# 化学裂解



# 酶裂解

- 溶菌酶：胞壁质酶，能够分解细胞壁的多糖，形成可溶性糖肽，导致细胞壁破裂，细胞内容物逸出，便于DNA提取。



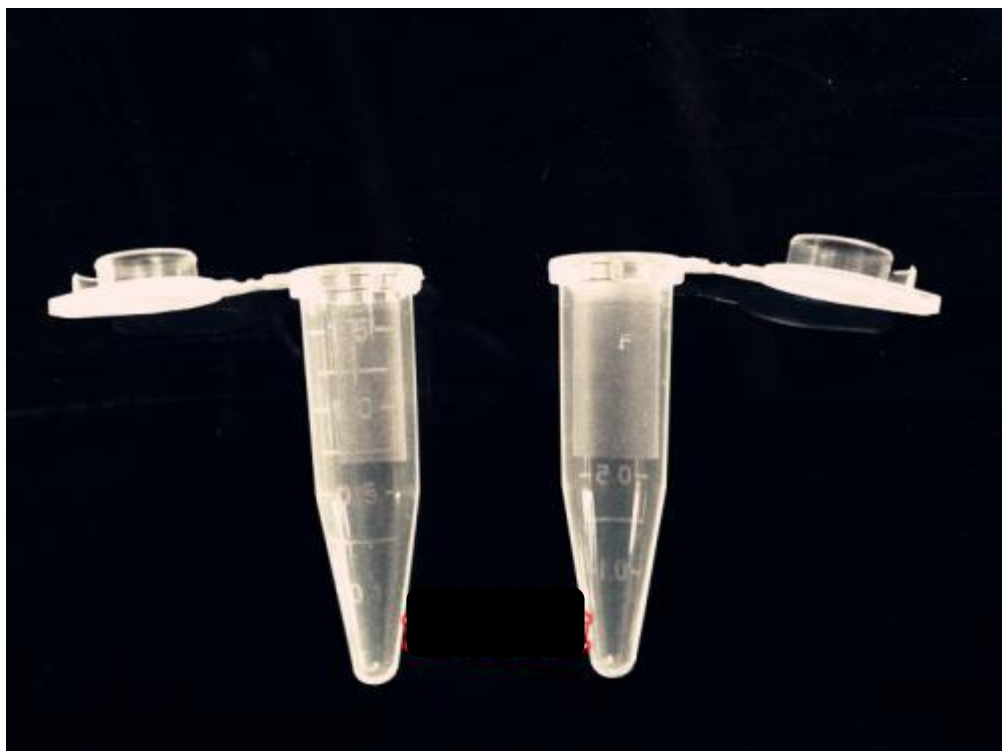
# 去除蛋白质、RNA及其他大分子

- DNA在细胞内往往与蛋白质结合，需要去除蛋白质，提纯DNA。
- 采用苯酚/氯仿抽提
- 苯酚/氯仿混合物对蛋白质有很强的变性作用



# 核酸的检测。

- DNA无色无味、易溶于水。



提取出的核酸长什么样？我们怎么才知道是否提取到了DNA呢？

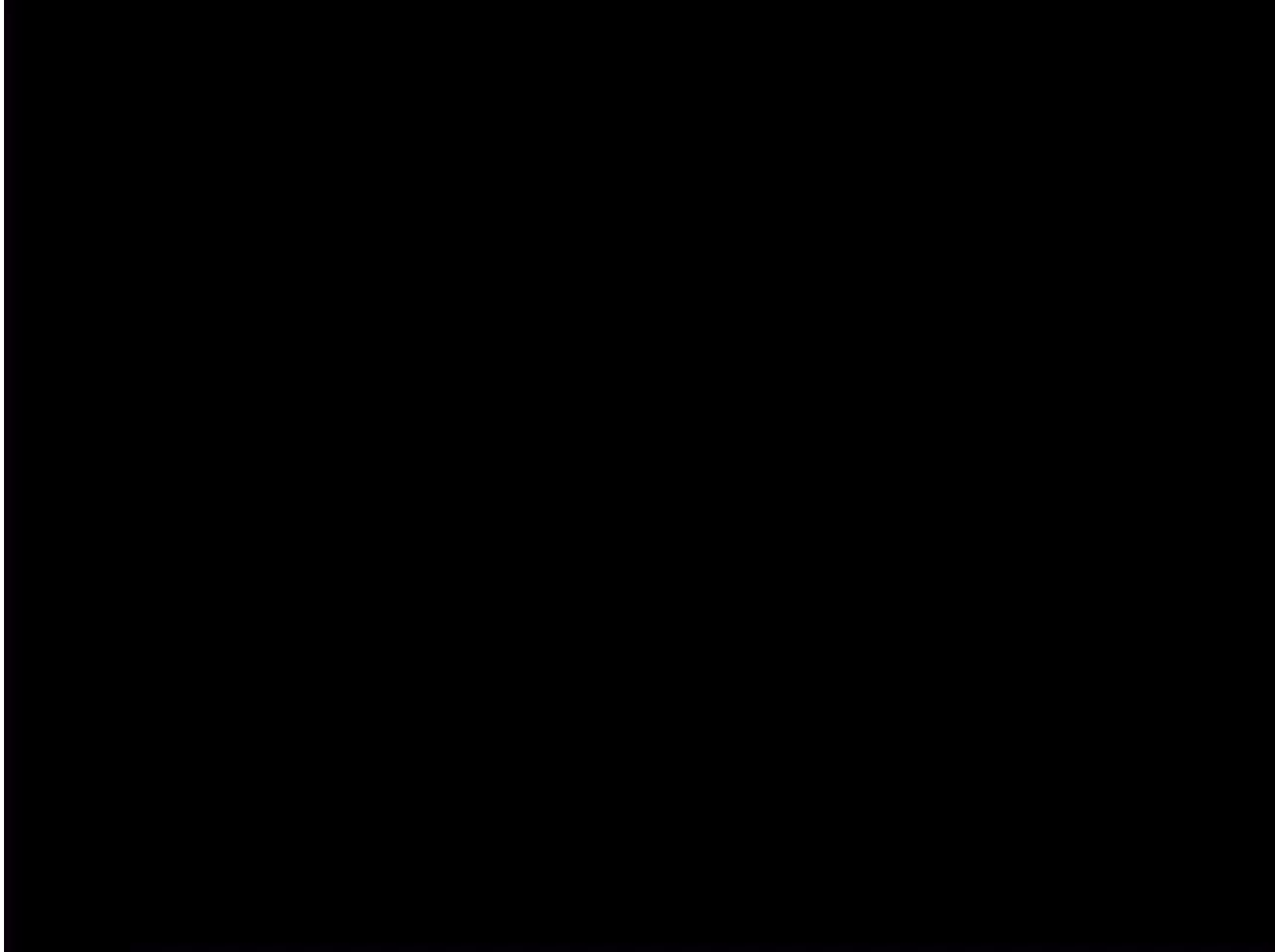
所以我们肉眼是无法看出我们是否提取出了DNA的



# 核酸的检测

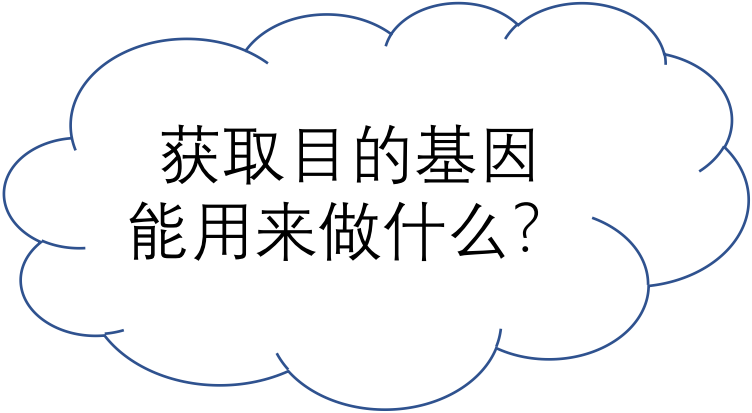
- ✓ 凝胶电泳法
- ✓ 紫外分光光度法

# 琼脂糖凝胶电泳法



# 目的基因的获取。

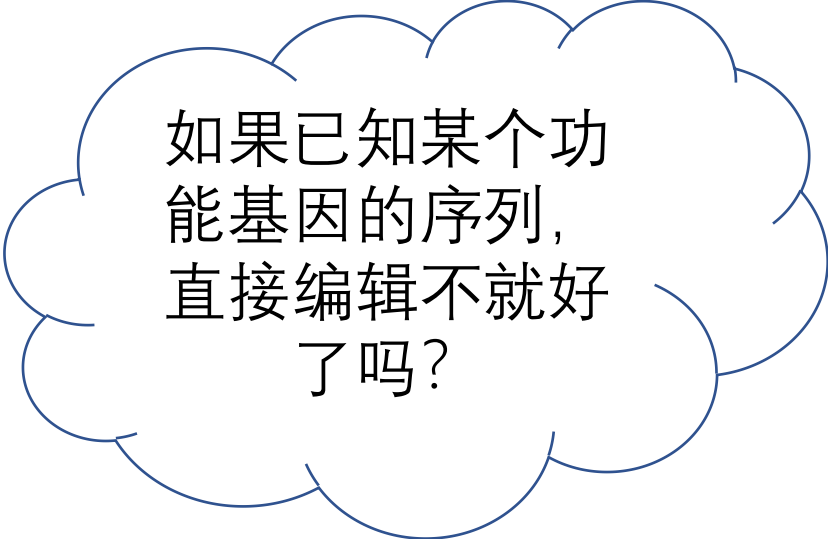
- ✓研究表达调控机制
- ✓建立高效表达系统
- ✓进行目的基因修饰和改良



获取目的基因  
能用来做什么?

# 目的基因的获取

- 化学合成法 ○
- 鸟枪法 ○
- cDNA法
- PCR扩增法
- 基因文库构建



如果已知某个功能基因的序列，  
直接编辑不就好了吗？

## ✓ 化学合成法

- 将已知序列的目的基因利用化学合成的方法直接合成。
- 以四种核苷酸为原料。