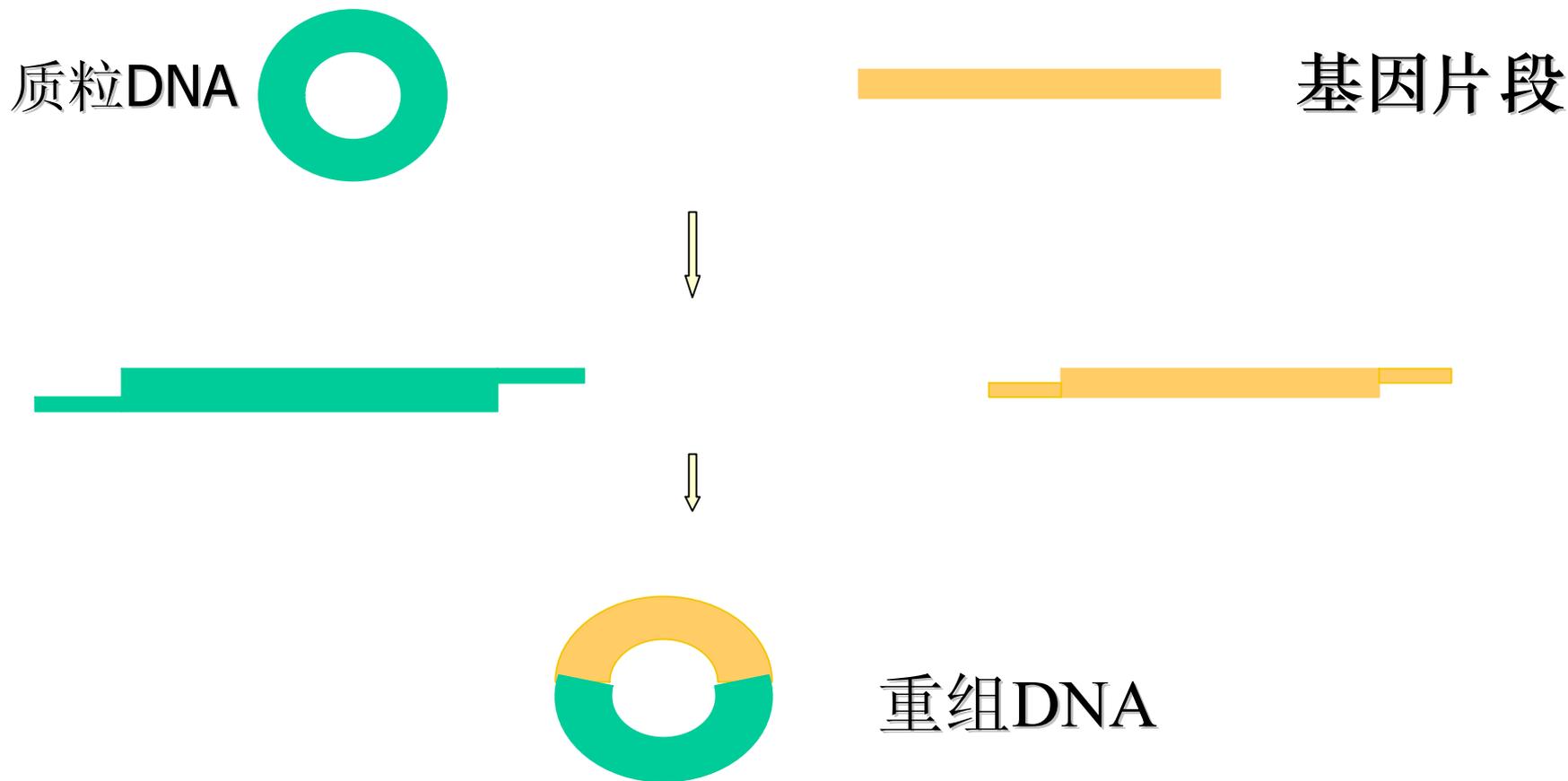


基因重组技术与目的基因

周俊宜

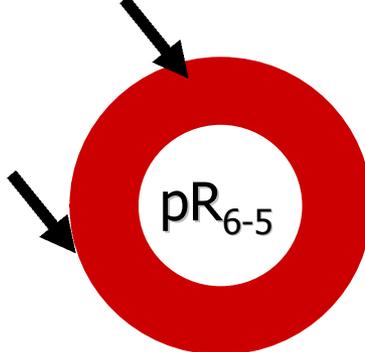
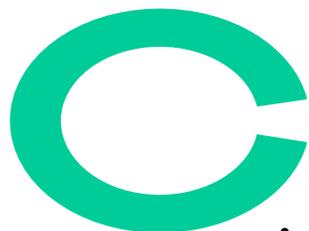
基因重组技术

基因重组：不同的DNA分子间发生共价连接形成重组DNA分子。





抗四环素



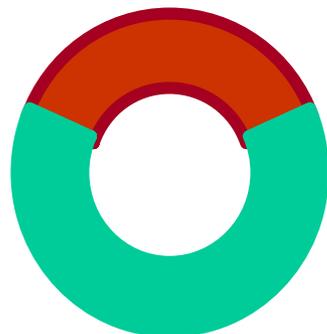
抗卡那霉素



抗卡那霉素
素基因

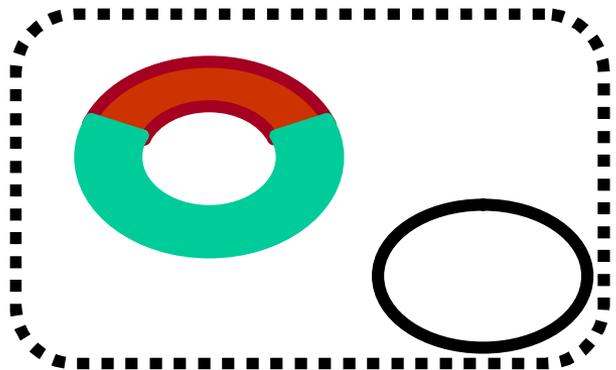
EcoRI

DNA连接酶

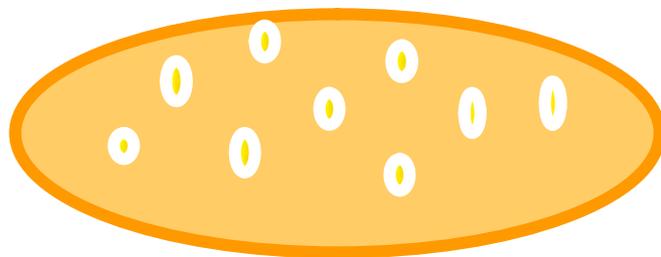


重组DNA分子

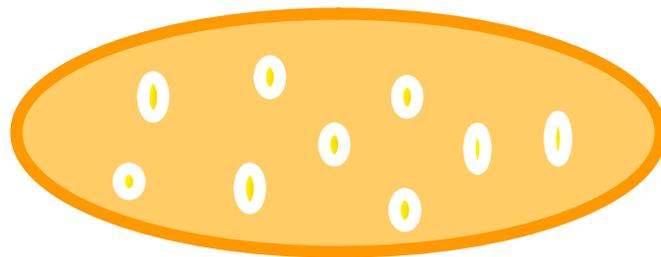
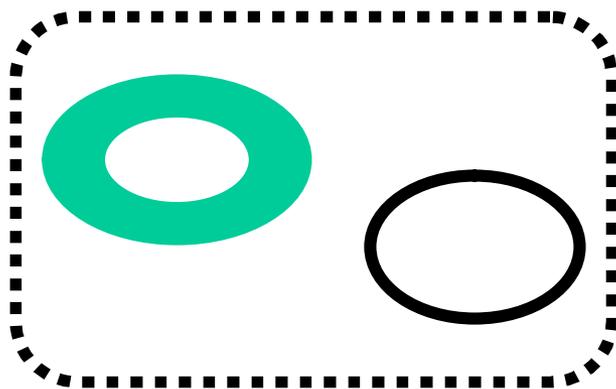
大肠杆菌



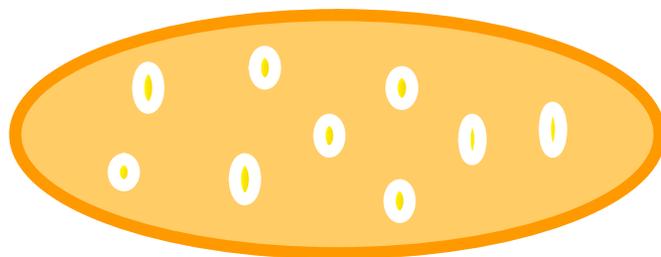
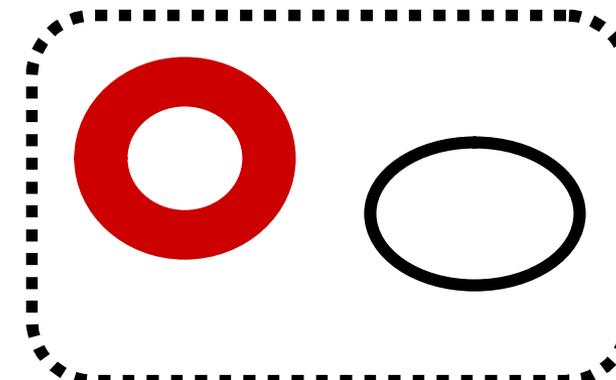
培养皿



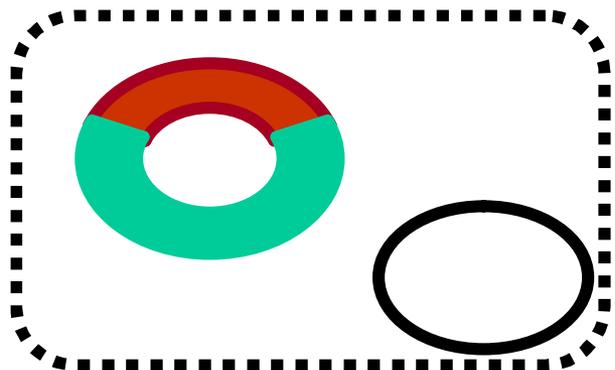
四环素\卡那霉素基因



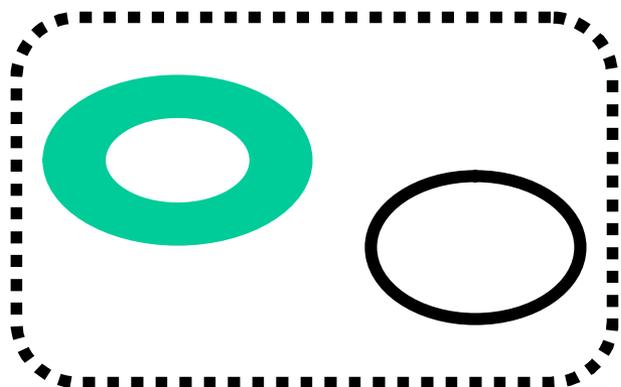
四环素平板



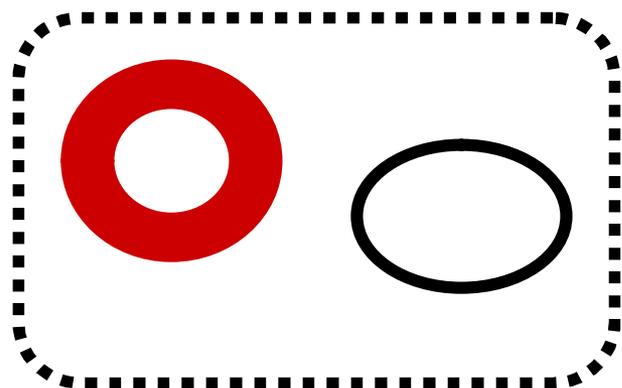
卡那霉素基因



抗四环素\抗卡那霉素



抗四环素



抗卡那霉素



总体技术路线

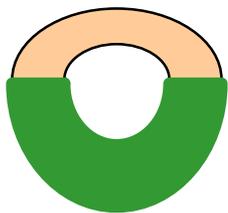
分

目的基因



基因载体

切



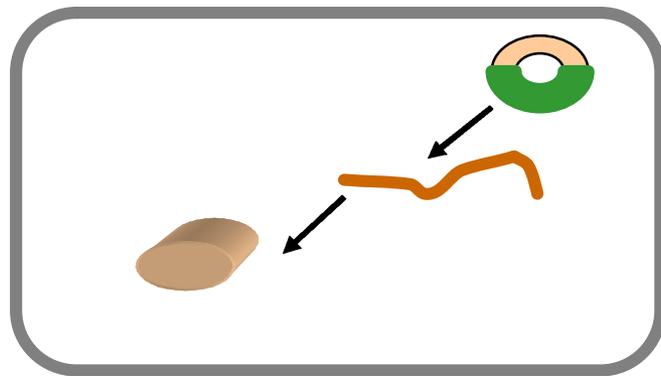
重组体

接



转

筛



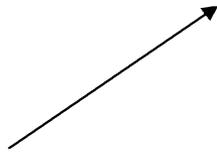
表

分

目的基因及载体的分离

1 目的基因的获取

需要克隆的DNA片段：



化学合成法

cDNA文库

聚合酶链式反应

基因组DNA文库

1) 化学合成法:

PCR引物

测序引物

定点突变

核酸杂交探针

2) 基因文库

基因组DNA



↓ 限制性
内切酶

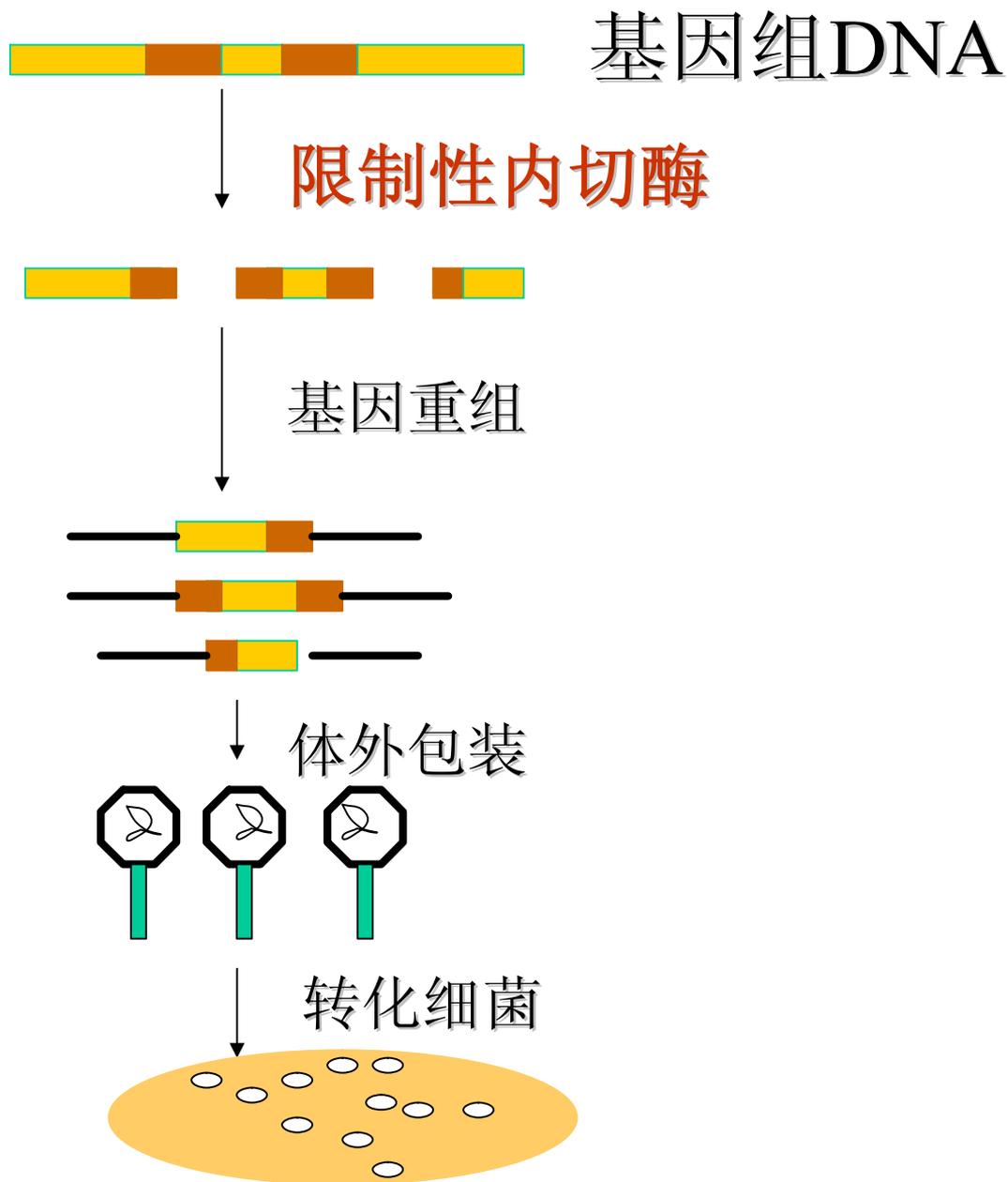


克隆、转化、培养、鉴定

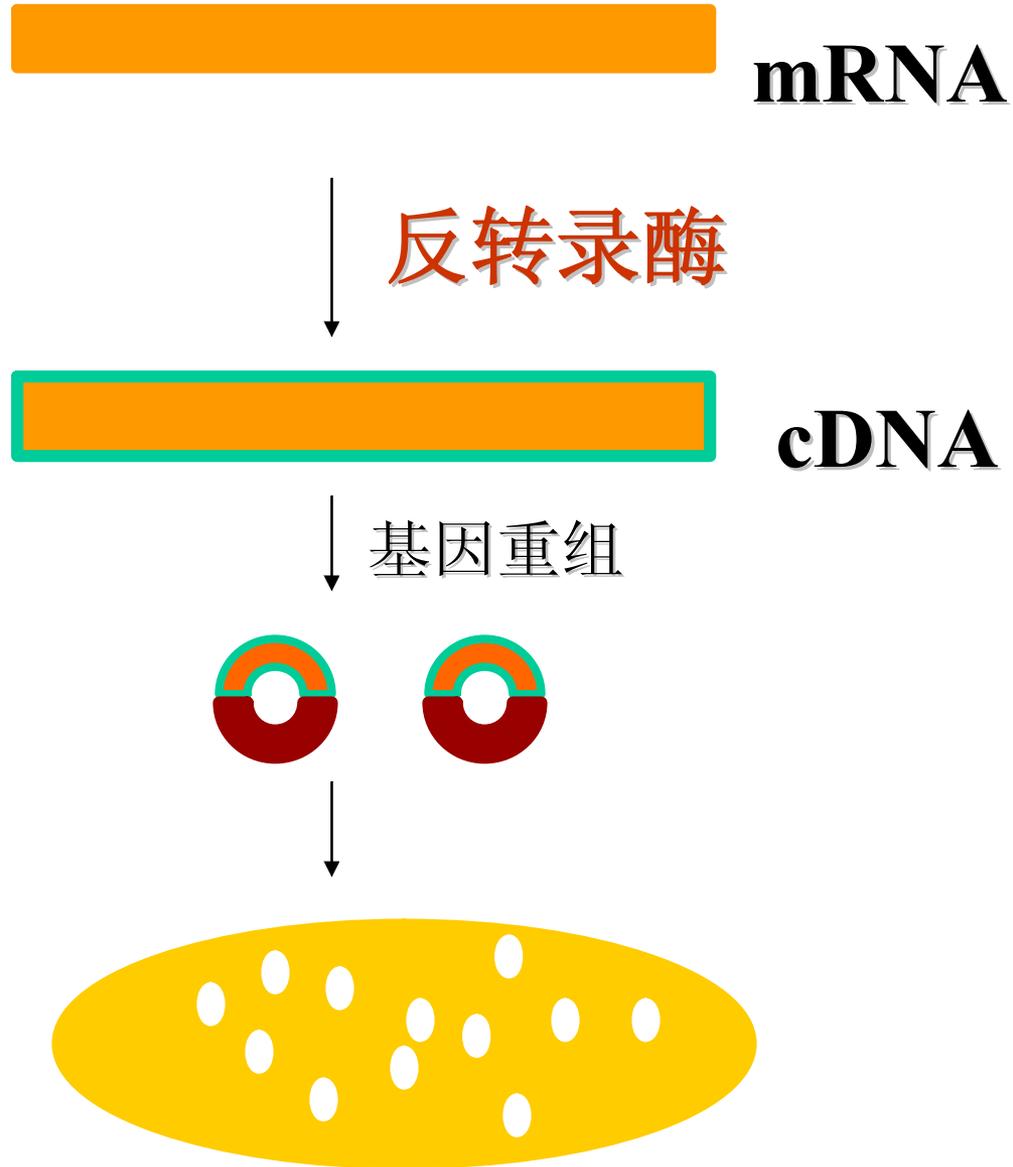


基因文库

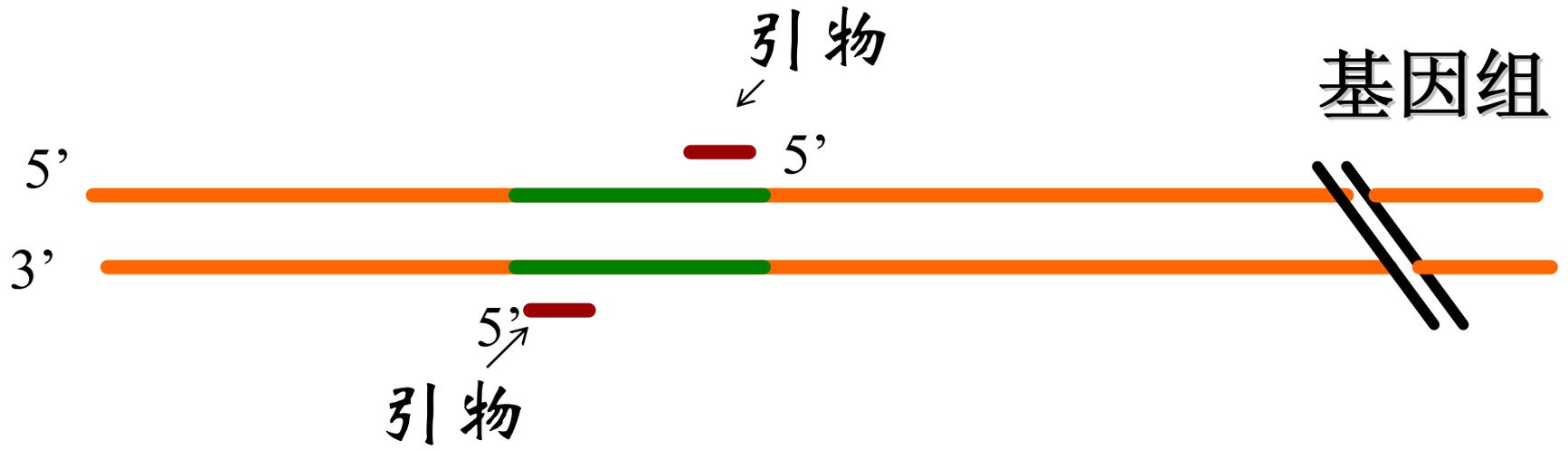
基因组DNA文库



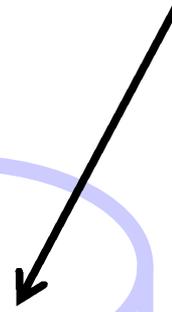
cDNA文库的组建:



3) PCR技术



TaqDNA聚合酶



预变性
94°C 5'



循环仪
94°C
55°C
72°C

PCR技术的基本过程

2 载体DNA的选择

功能：

为目的基因提供进入受体细胞的转移能力。

为目的基因提供在受体细胞中的复制能力或整合能力。

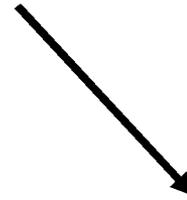
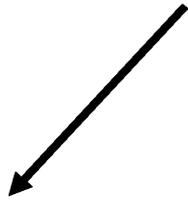
为目的基因提供在受体细胞中的扩增和表达能力。



目的基因



基因载体



整合在宿主细胞
染色体DNA中

独立于宿主细胞
染色体DNA外
(独立的复制子功能)

理想载体的基本条件：

可转移性

合适的复制位点

多克隆位点：广泛、特异

选择标志，便于筛选和鉴定

分子较小，可容纳较大的外源DNA

种类：

质粒

噬菌体

腺病毒载体

逆转录病毒载体

.....

质粒

存在于细菌染色体外的小型环状DNA分子。

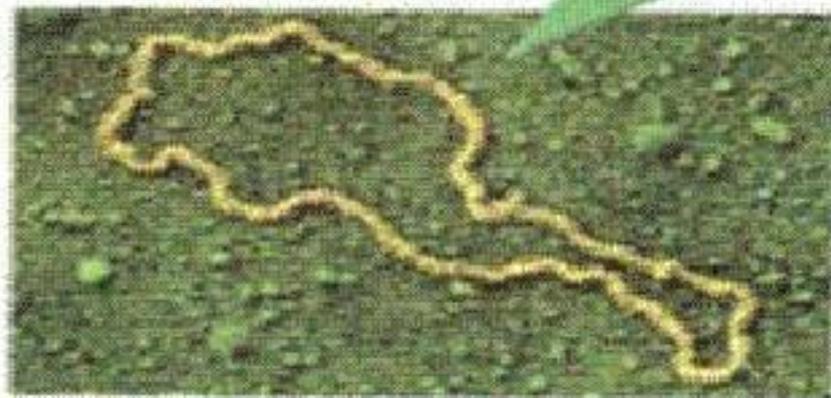
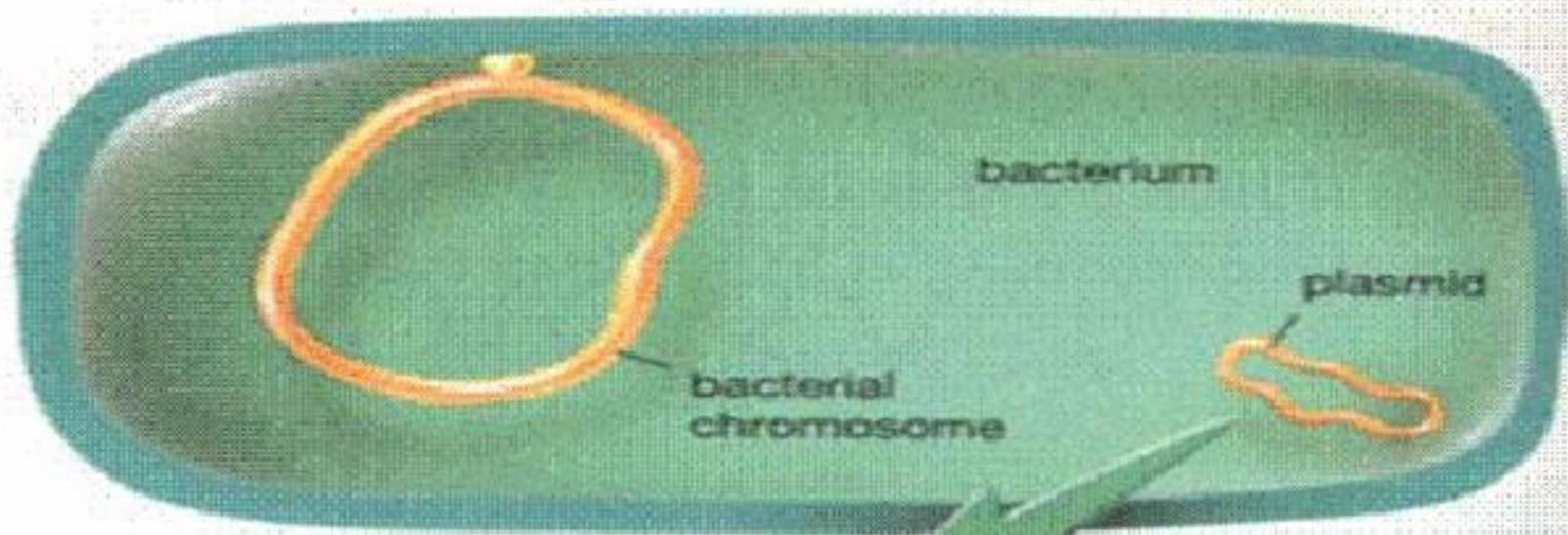
具有自我复制功能。

带有抗性基因及表型识别等遗传性标记物。

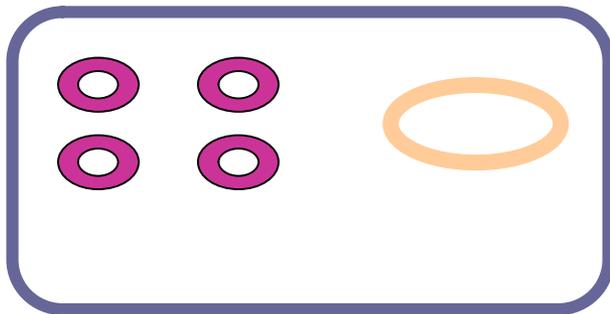
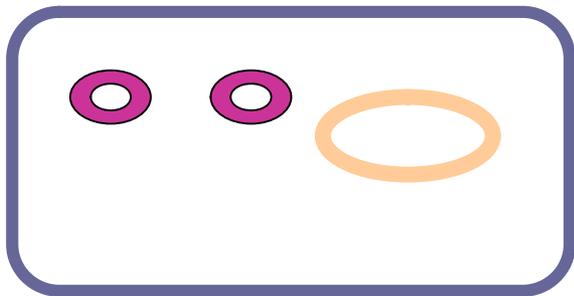
经改造后具有多克隆位点。

举例： pBR322质粒

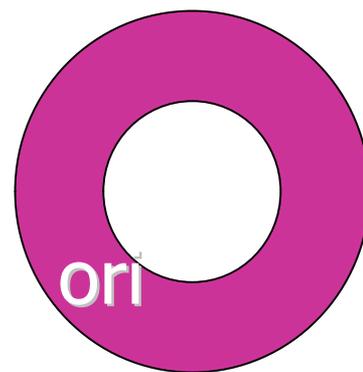


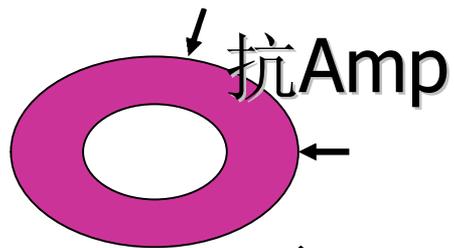


1 micrometer

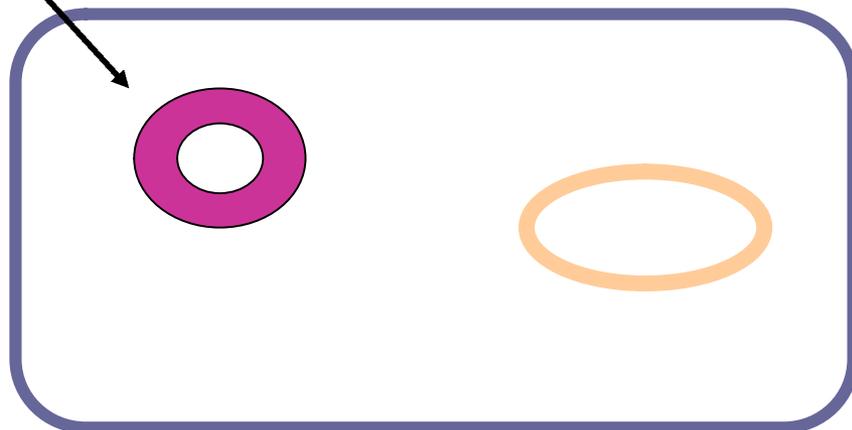


宿主细胞

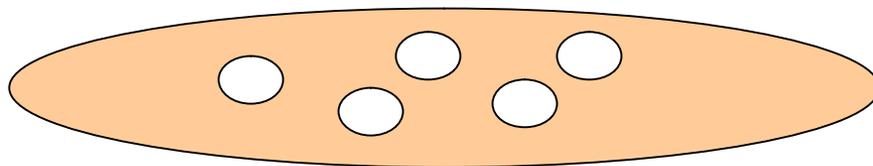




抗Amp



宿主细菌



含**Amp**培养基

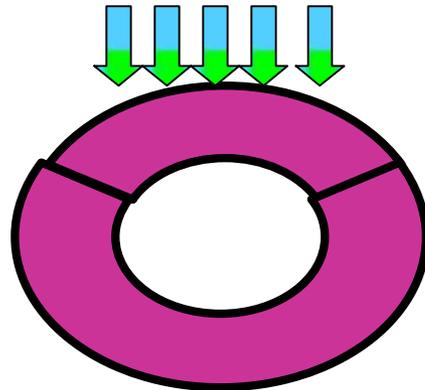
限制性内切酶



多种酶切口

单一酶切口

多克隆位点



多克隆位点



polylinker

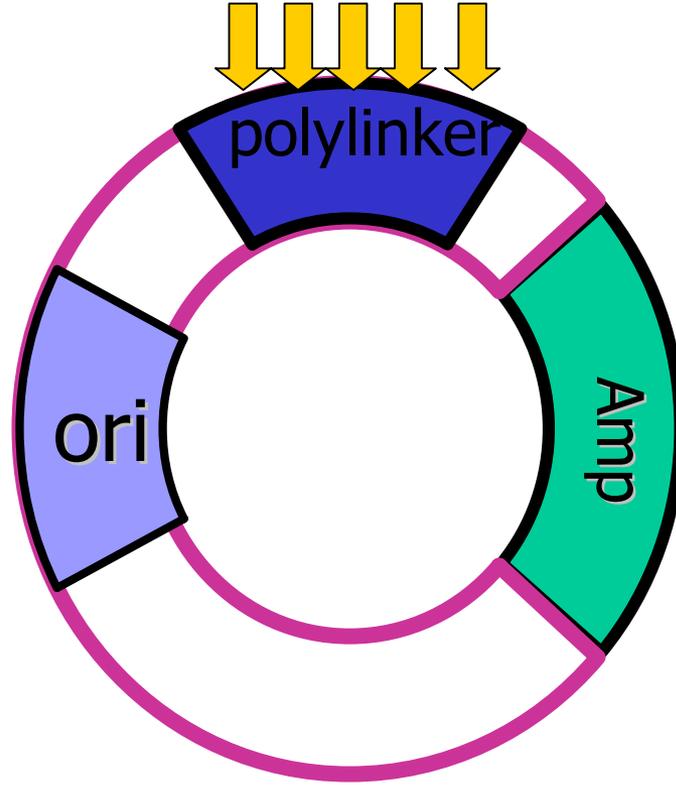
复制起始点

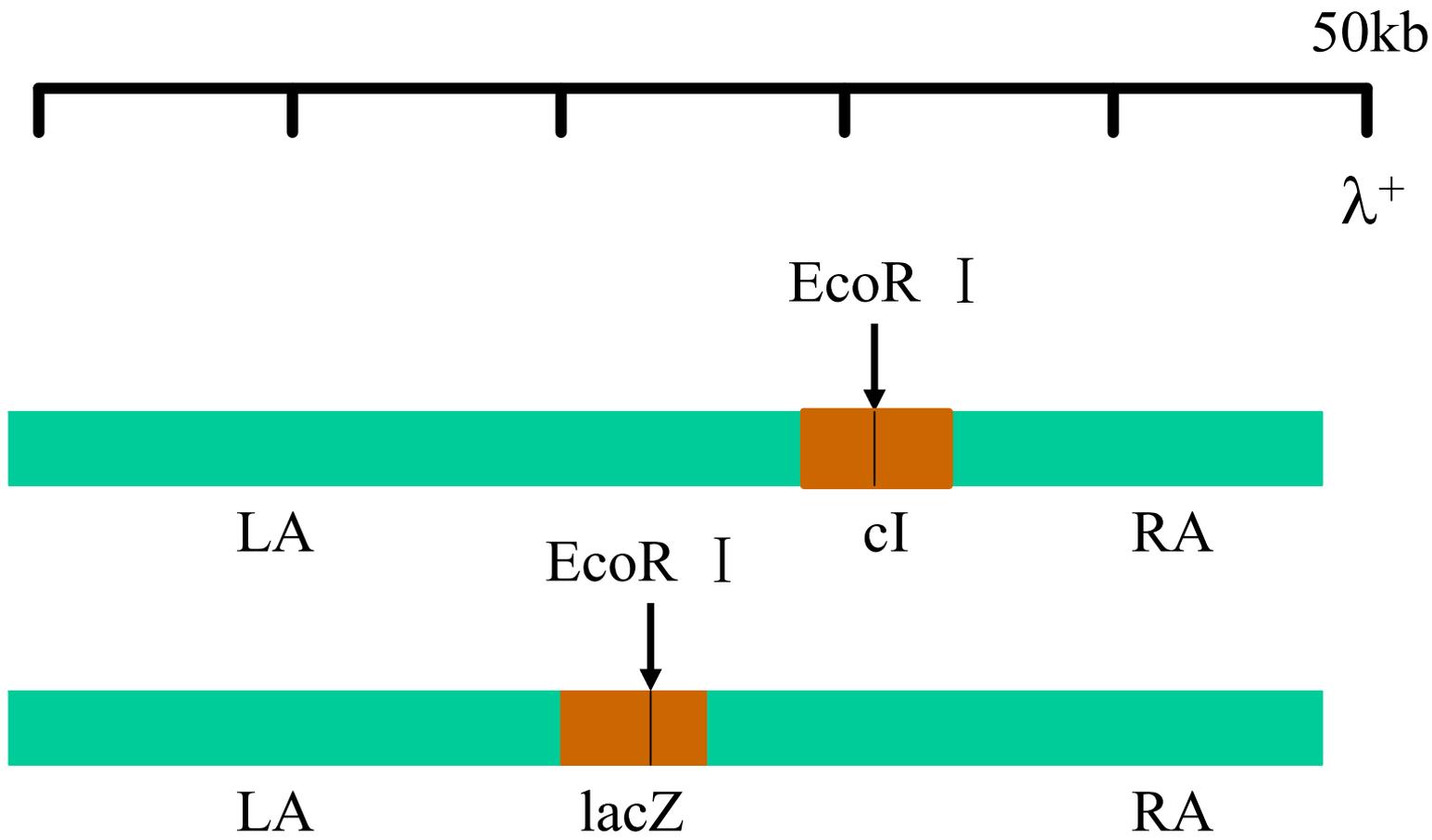
ori

Amp

遗传标记

基因载体

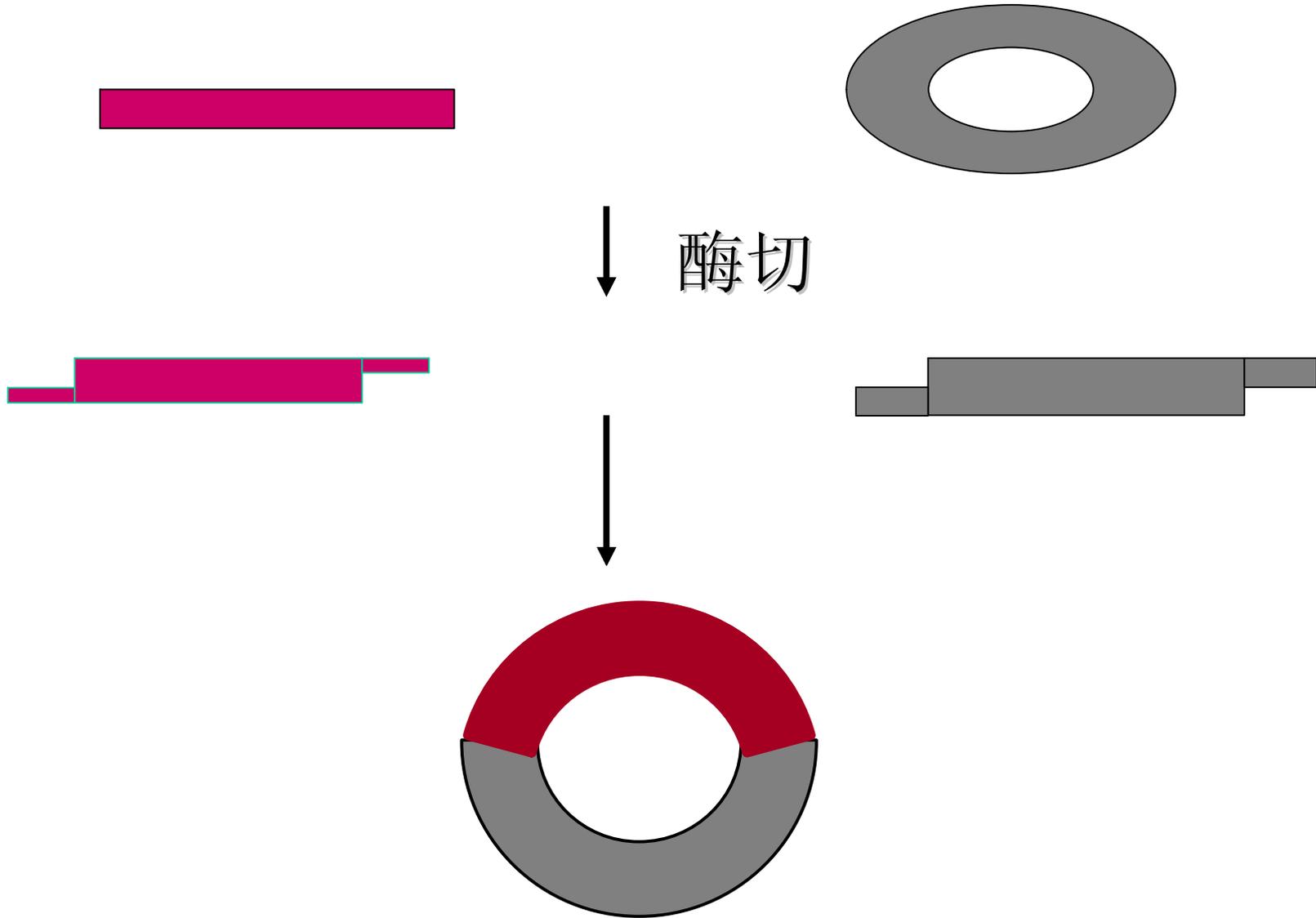




λ 噬菌体载体

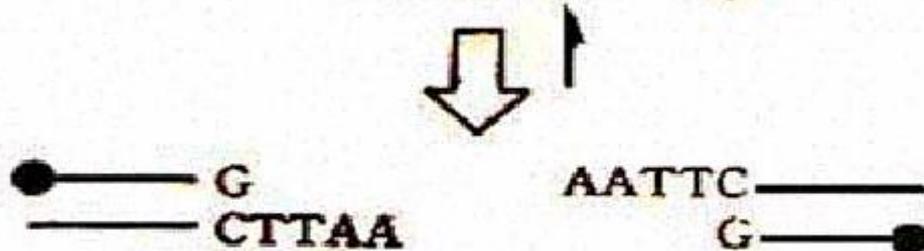
切

限制性内切酶酶切

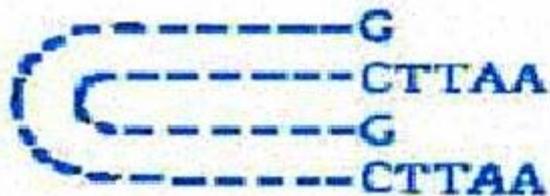




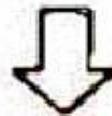
EcoRI 切割反应



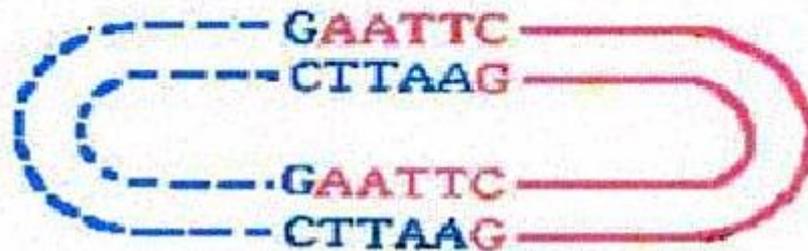
λSC101 质粒 I DNA



果蝇DNA



T4DNA 连接酶
15°C



限制性内切核酸酶

在特异位点上切割DNA分子
分三类，常用为II类酶

识别序列呈回文对称

命名：酶来源的生物名称缩写

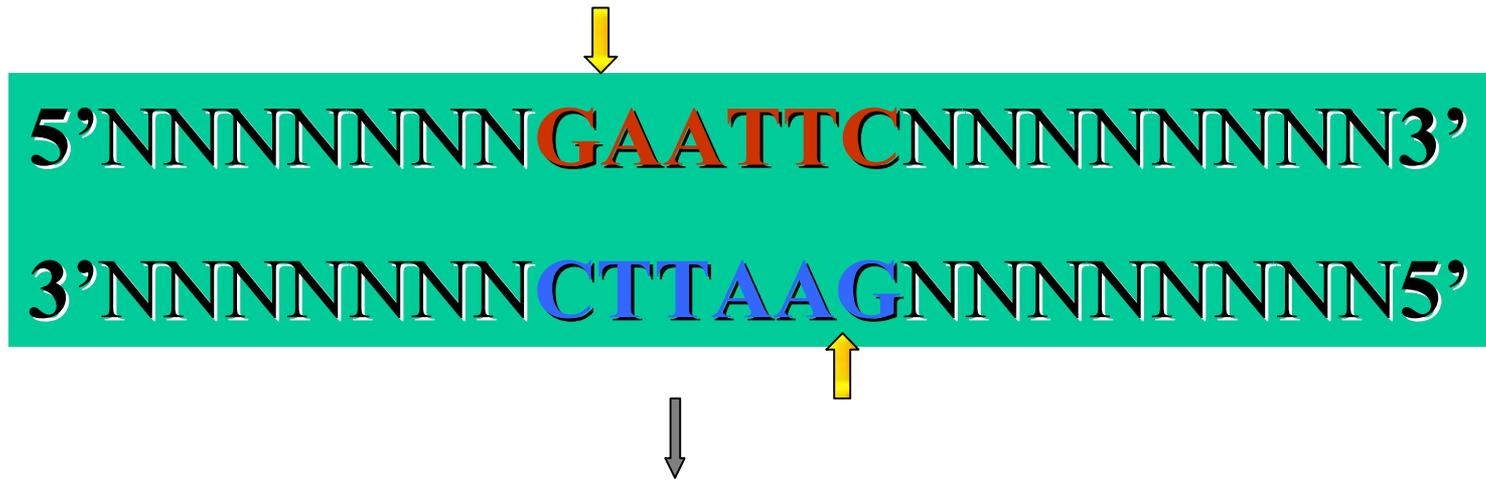
属名-种名-株名-发现次序

EcoR I 的识别序列

5'- GAATTC-3'
3'- CTTAAG -5'

Hae I 的识别序列

5'- GTTAAC-3'
3'- CAATTG -5'



EcoR I 的识别序列和酶切切口（粘端）



Hae I 的识别序列和酶切切口（平端）

接

目的基因与载体的连接

磷酸二酯键的形成



T₄-DNA连接酶： T₄-噬菌体

连接温度： 不高于粘性末端熔点温度 (T_m)
≤15°C： 15°C/6h； 12°C/8h； 8°C/12h；

连接方式:

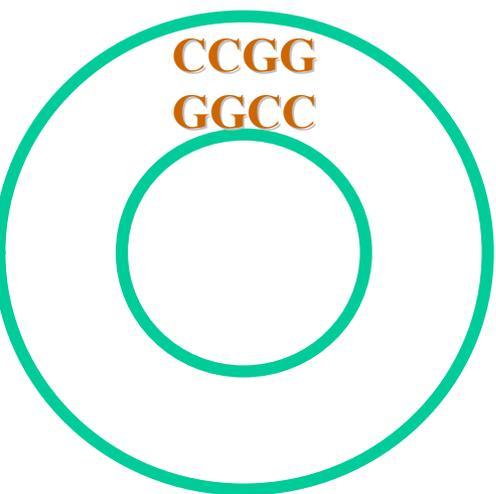
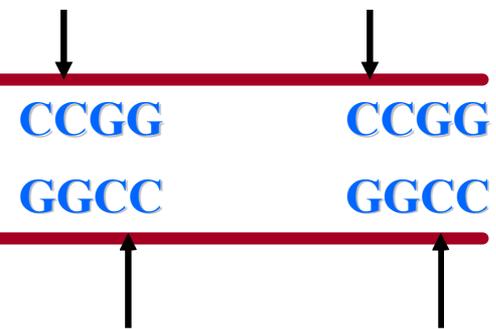
相同粘性末端的连接

平头末端的连接

不同粘性末端的连接

人工粘性末端的连接

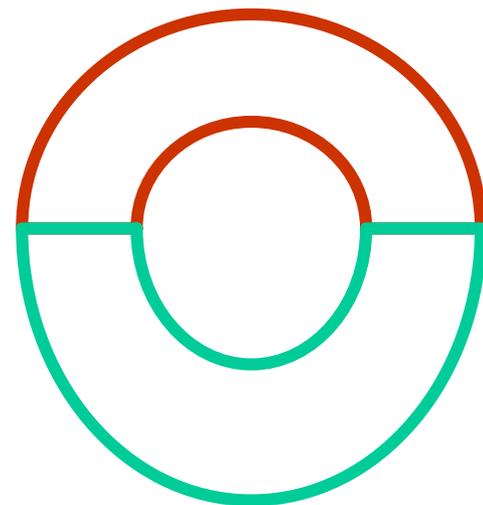




→
Hap II



→
T4-DNA
连接酶



粘端连接

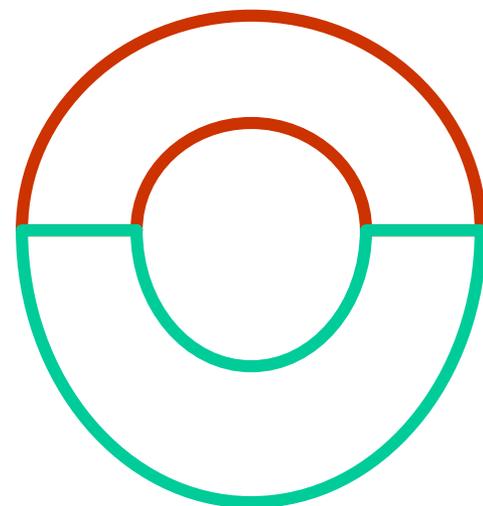
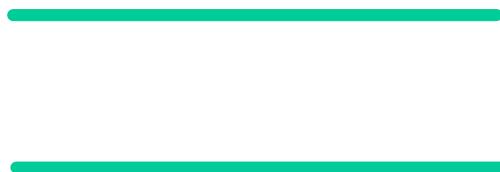
AGCT AGCT
TCGA TCGA



→
Alu I



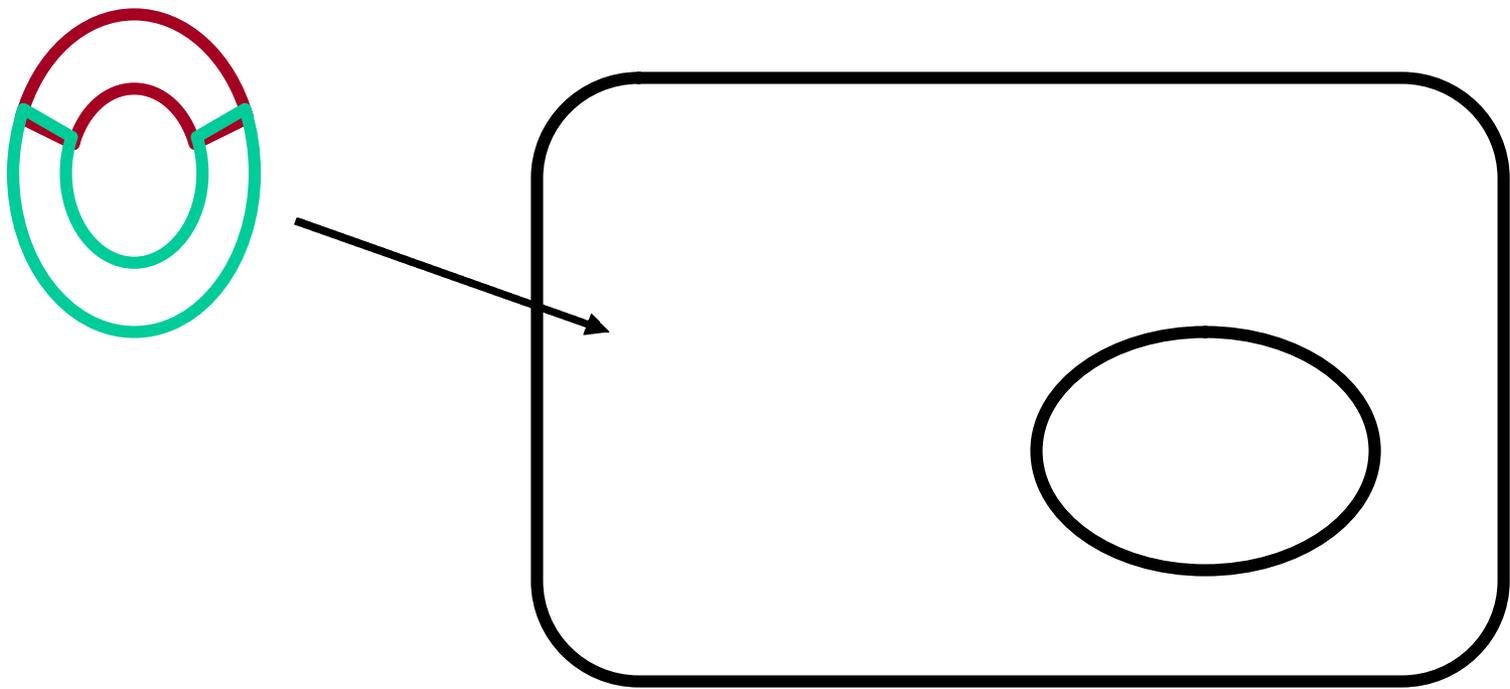
→
DNA连接酶



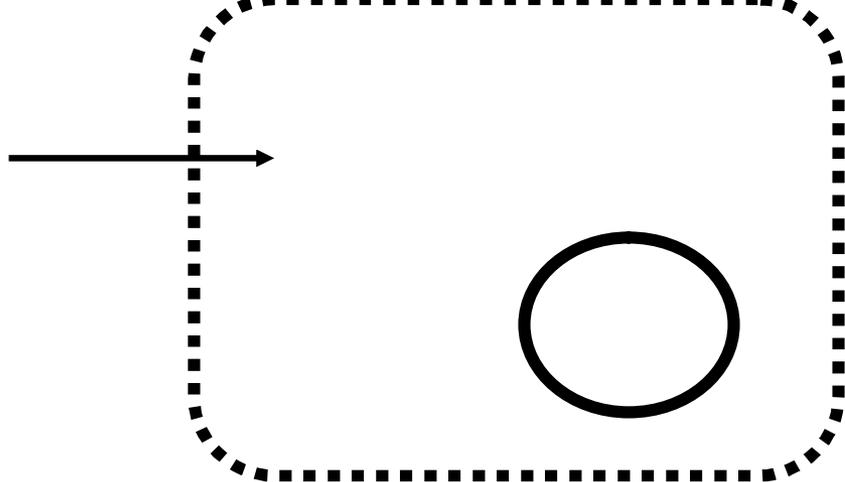
平端连接

转

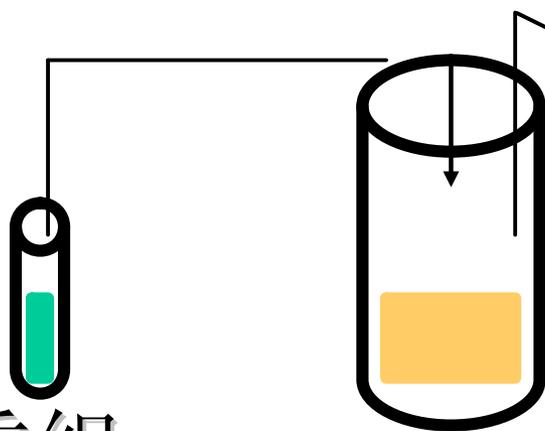
重组体的转化



受体细胞

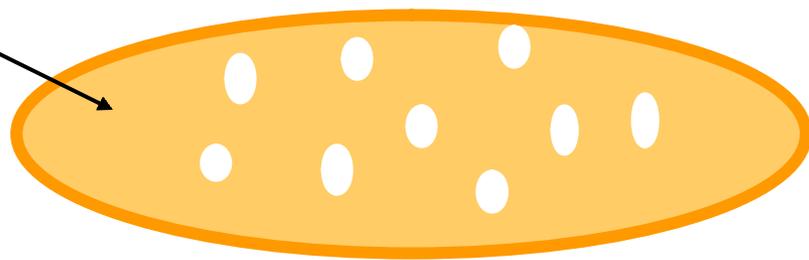


JM109感受态



重组
质粒

感受态



含氨苄平板

原核细胞的转化（细菌转化）

1) 受体细胞的选择

限制缺陷型： 避免修饰和降解

重组缺陷型： 避免重组整合

转化亲和型： 较高的可转化性

遗传互补型： 利于筛选

感染缺陷型： 防止感染

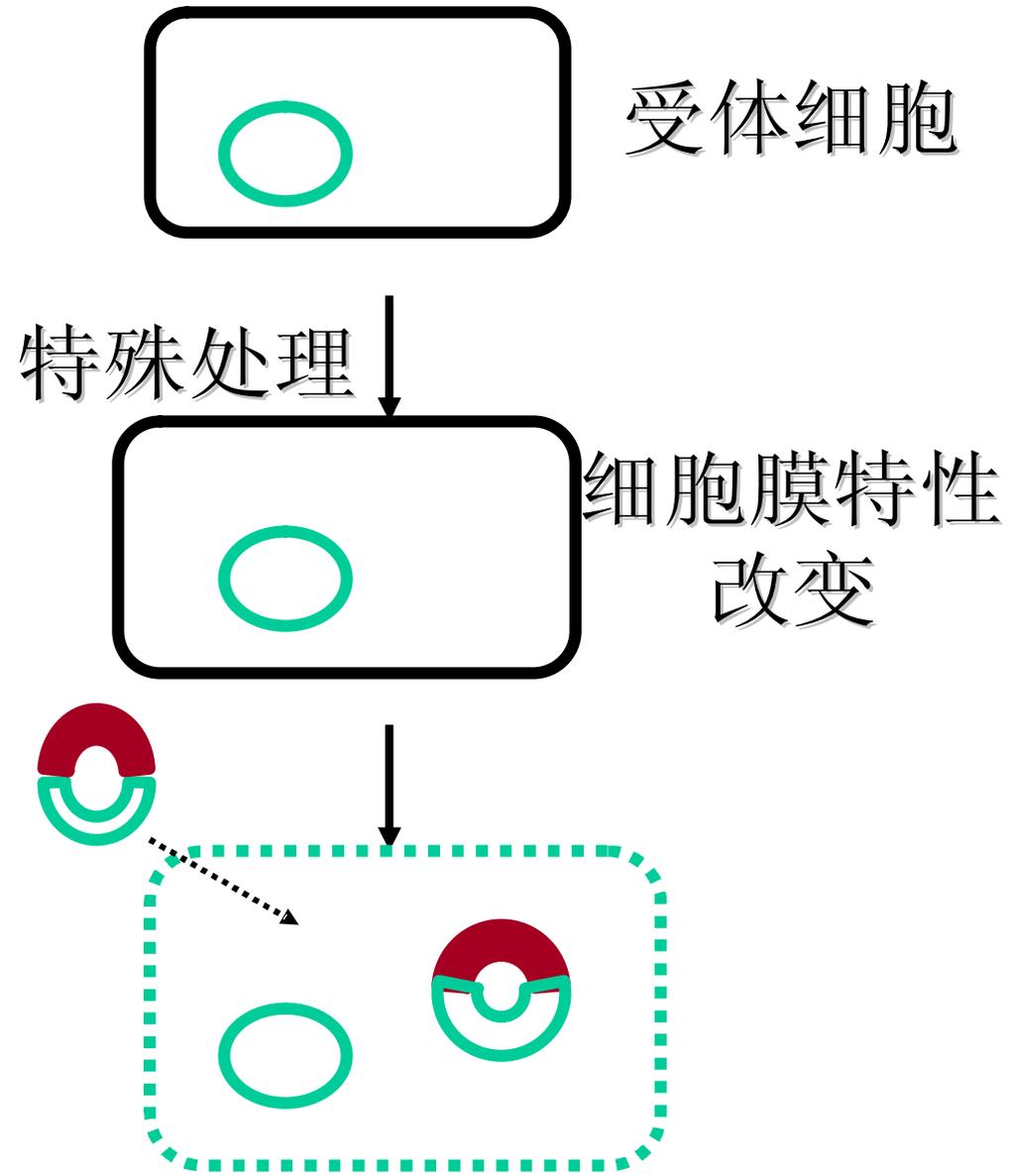
2) 转化方法

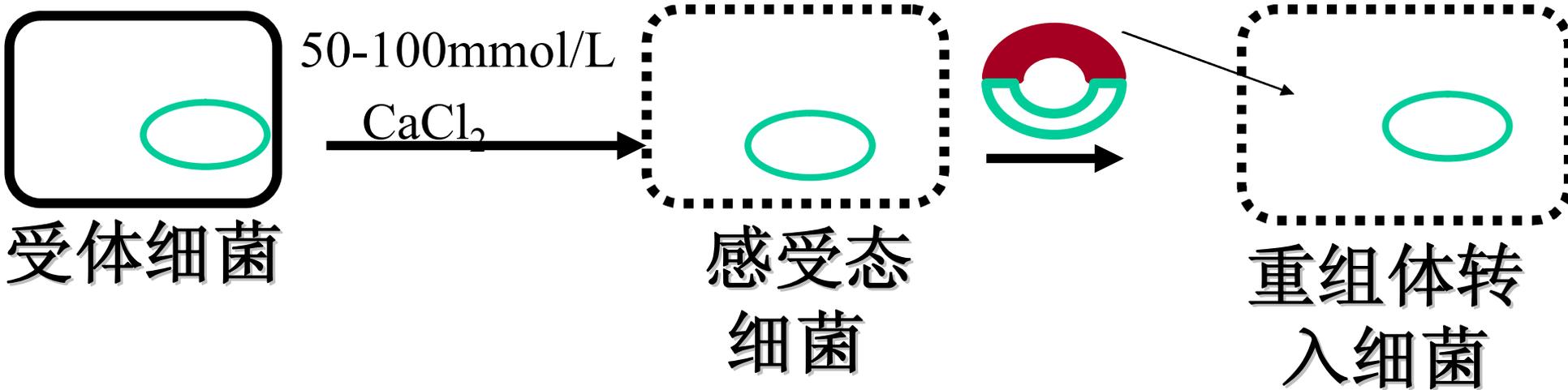
CaCl₂诱导转化

电穿孔

PEG介导转化

人工体外包装

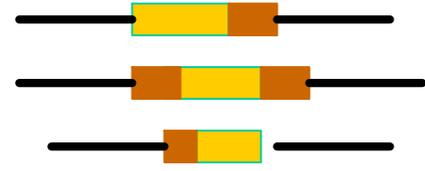




CaCl₂处理

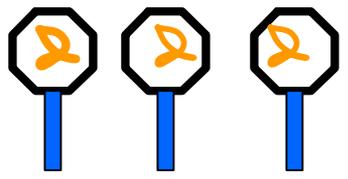


基因重组

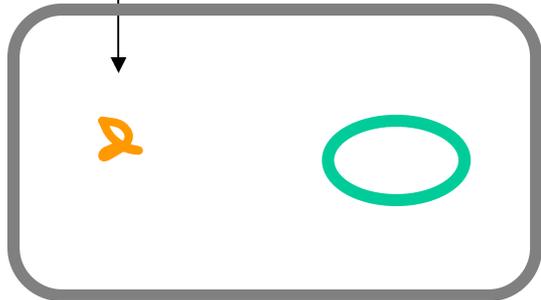


噬菌体

体外包装



转染



噬菌体体外包装

3) 转化率：转化细胞/细胞总数

影响因素：

载体：载体性质、空间结构、分子大小等

受体细胞

转化过程

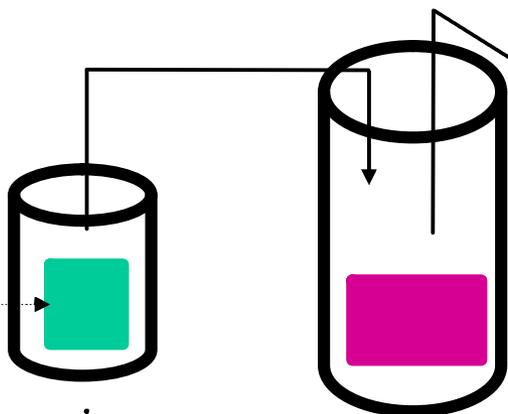
筛

重组体克隆的筛选与鉴定

连接

转化

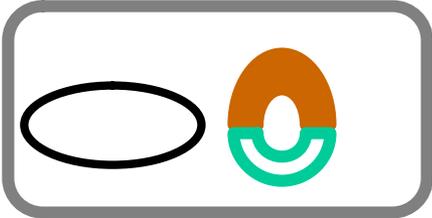
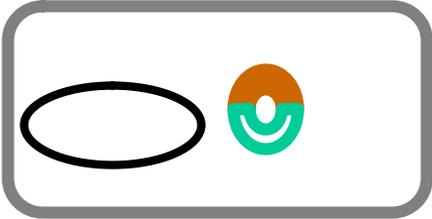
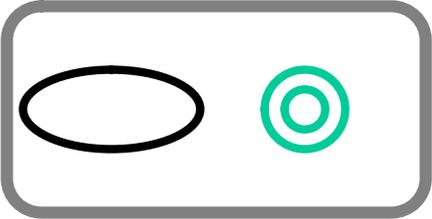
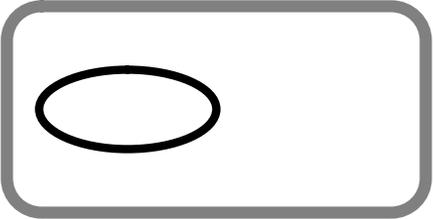
目的基因
基因载体
连接酶



宿主细胞

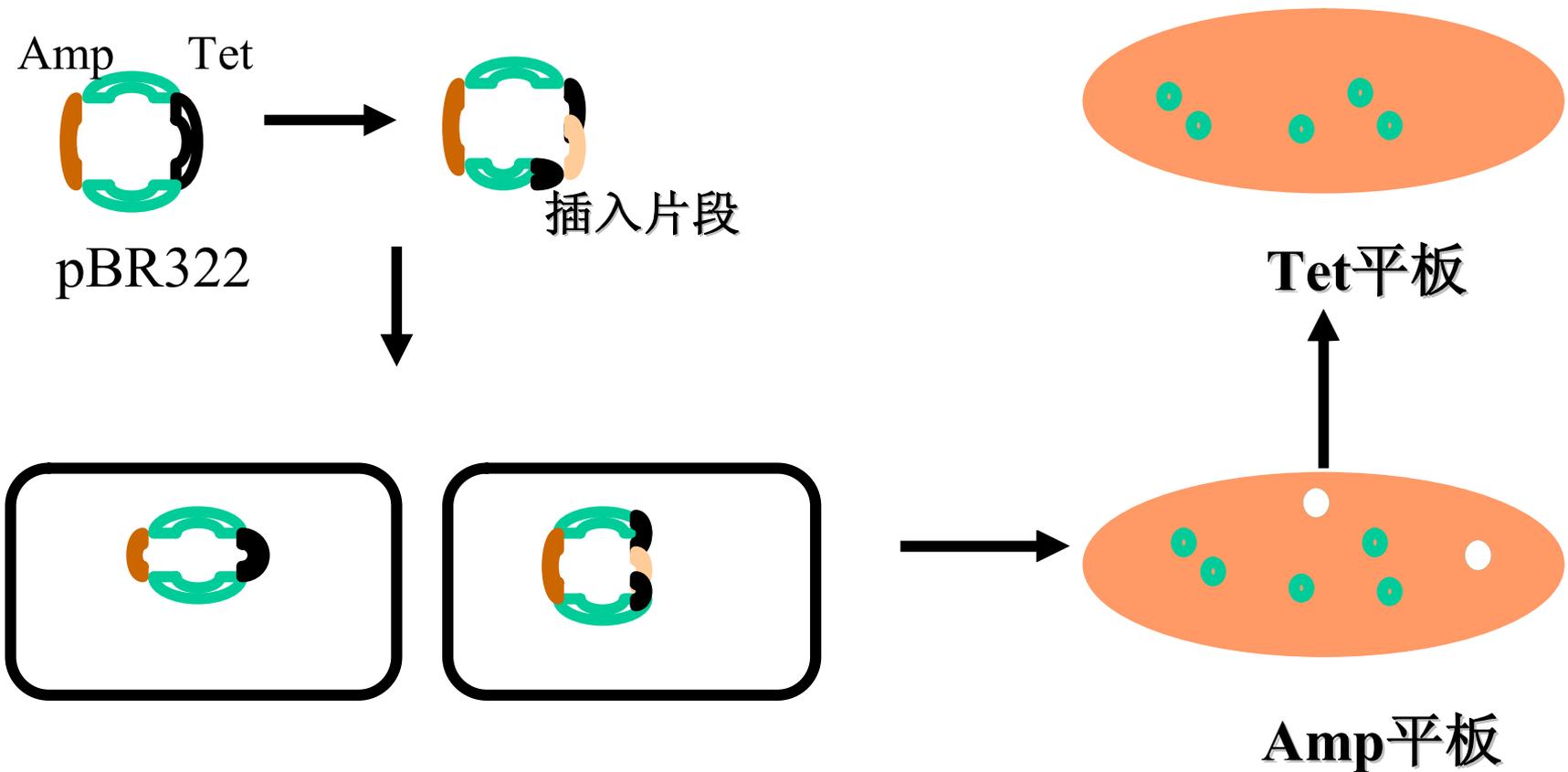
含氨苄平板

转化后的克隆群体：

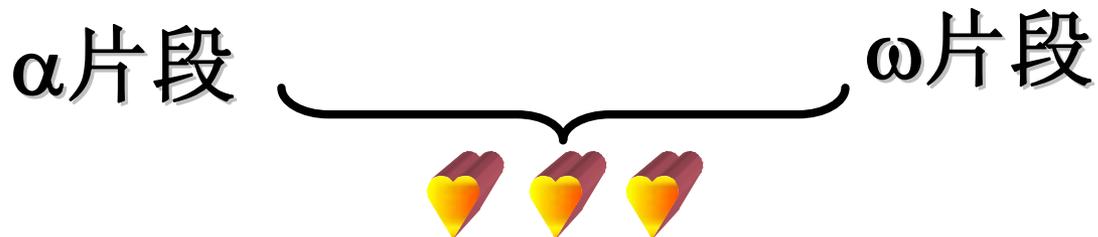
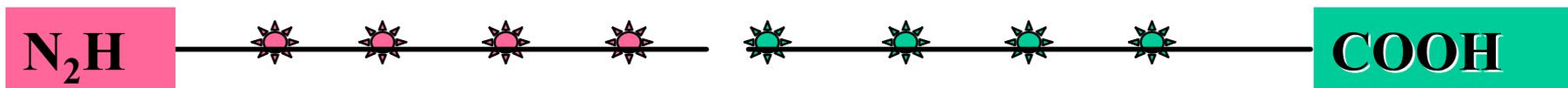


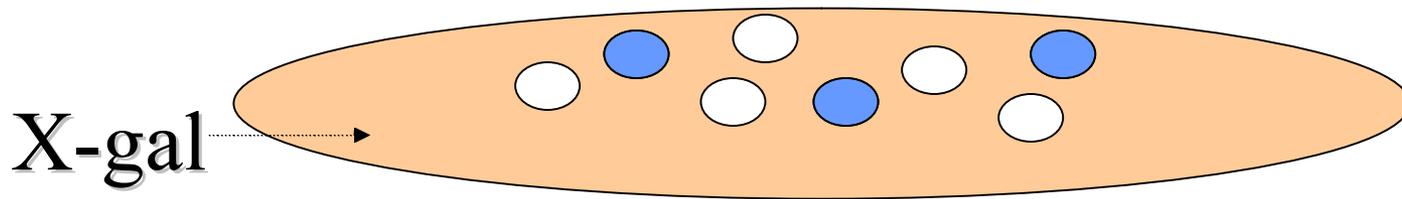
1 遗传检测法

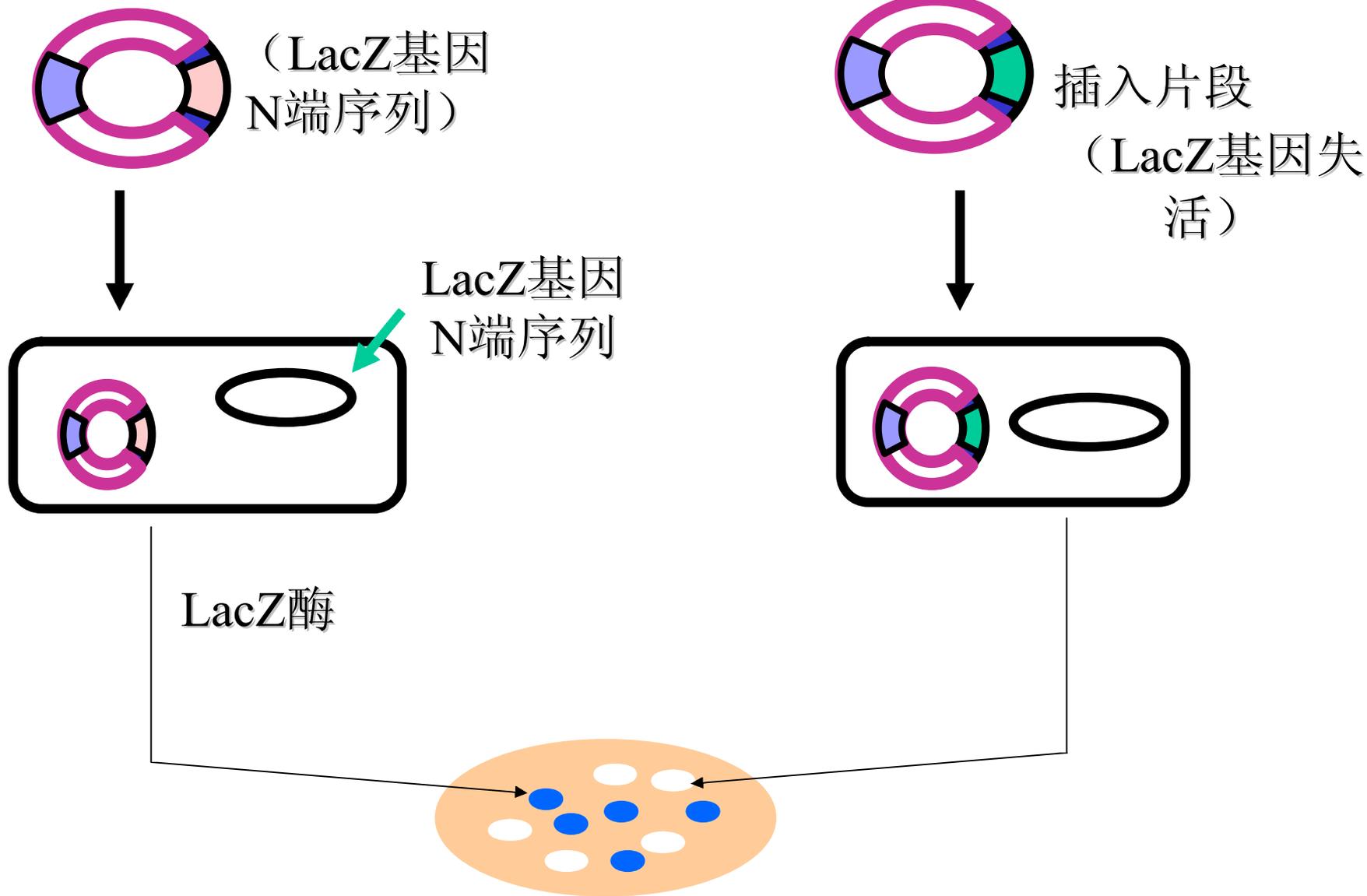
1) 抗药性标志的选择



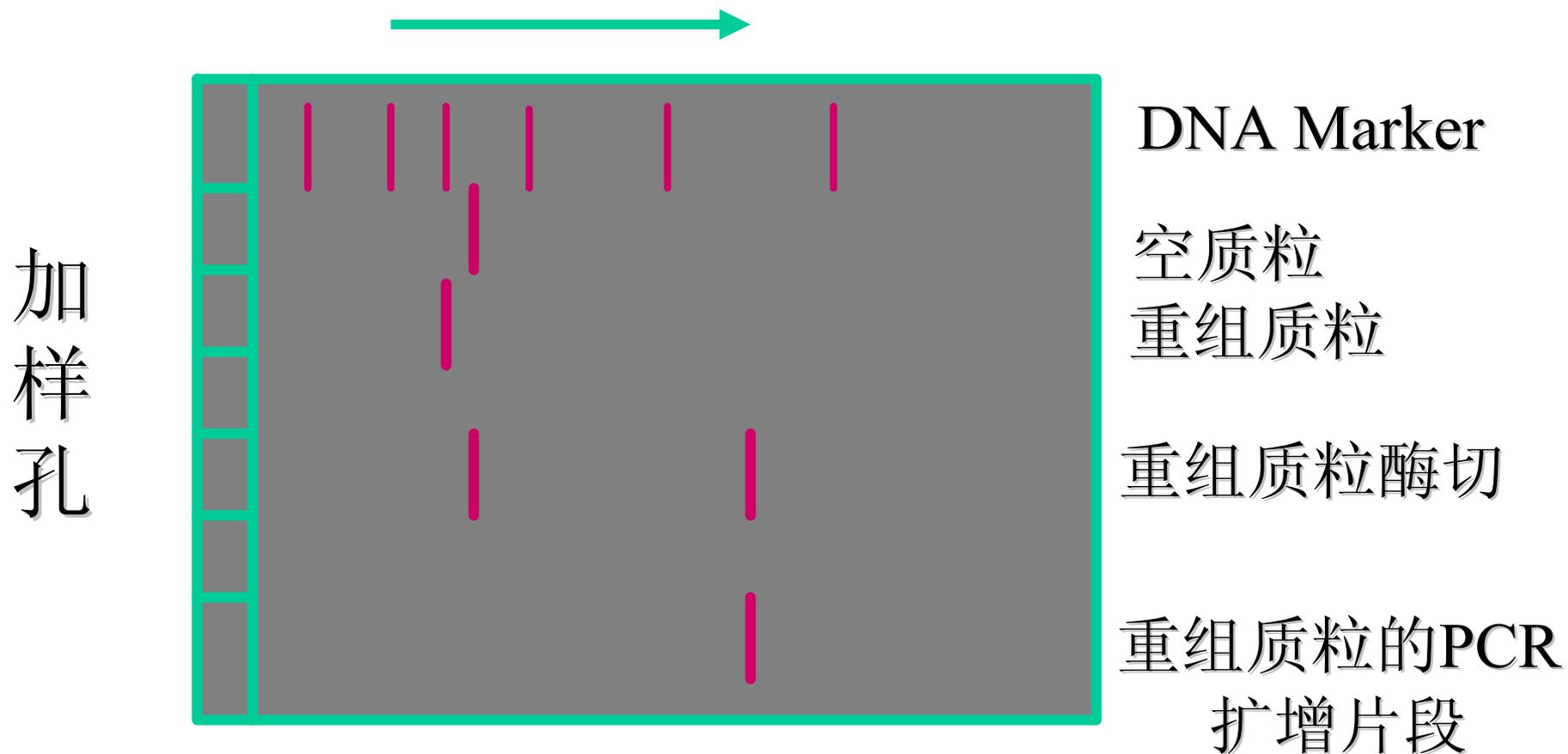
2) 标志补救 (β -半乳糖苷酶法)





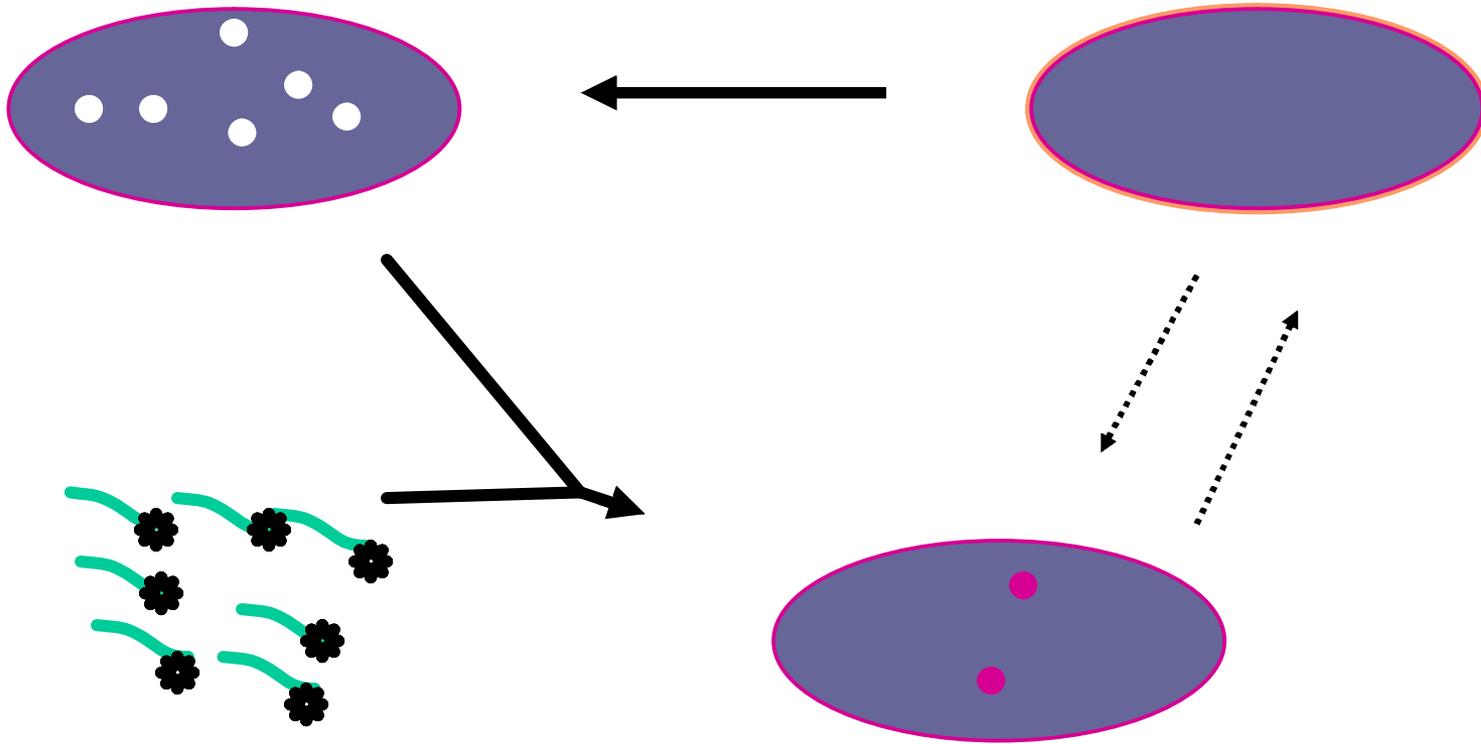


2 电泳检测法



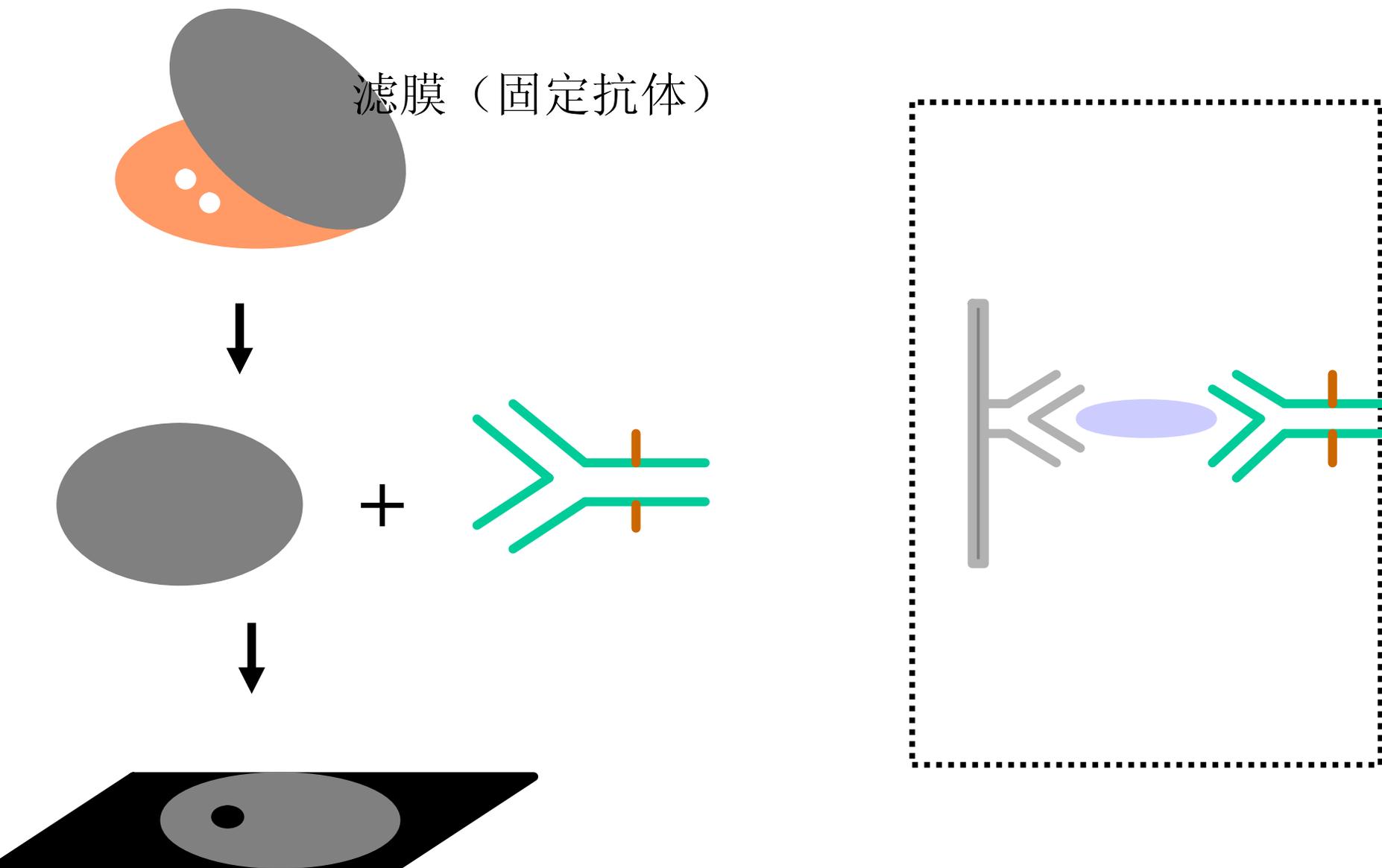
凝胶电泳检测

3 菌落杂交筛选法



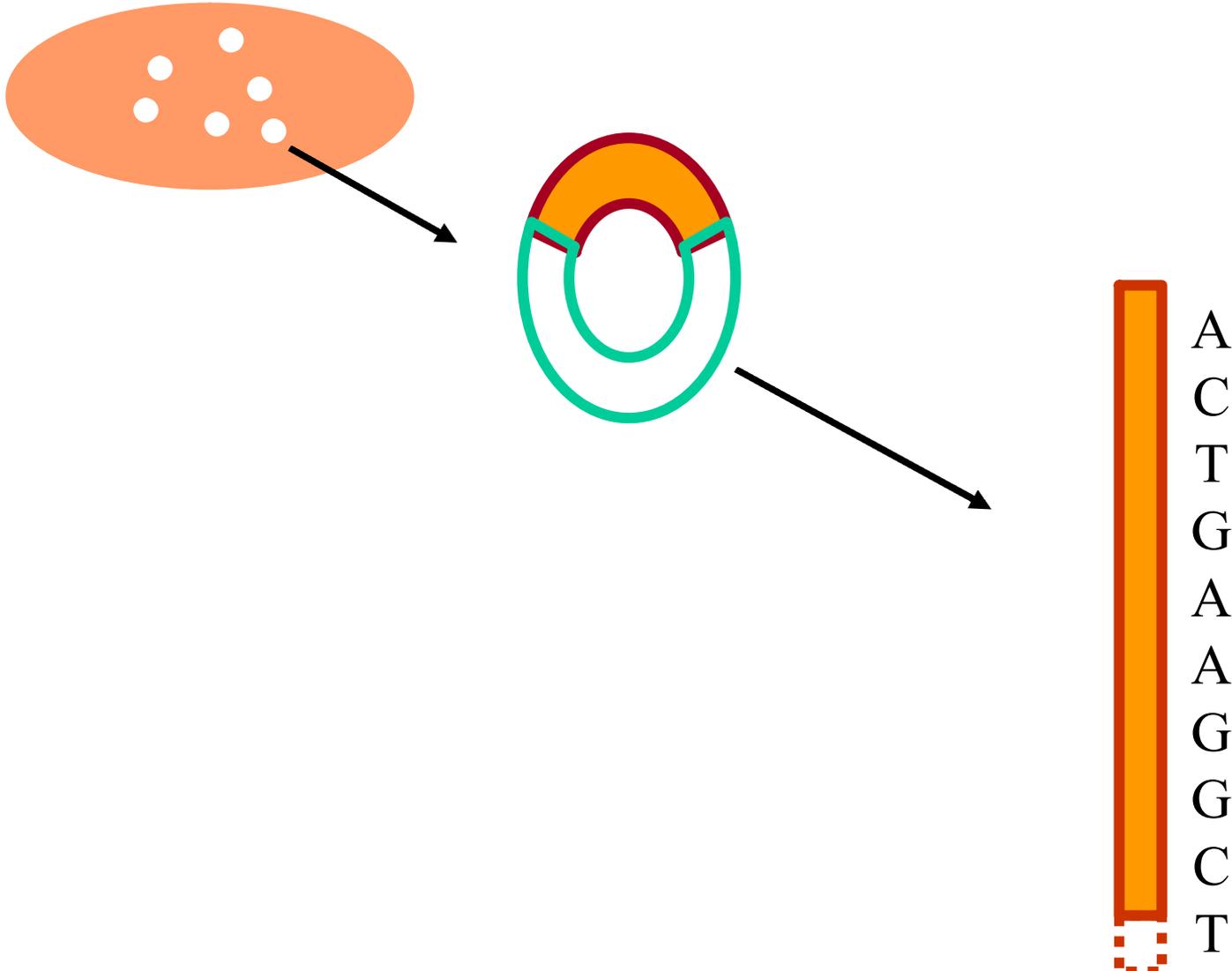
原位杂交

4 免疫化学检测法



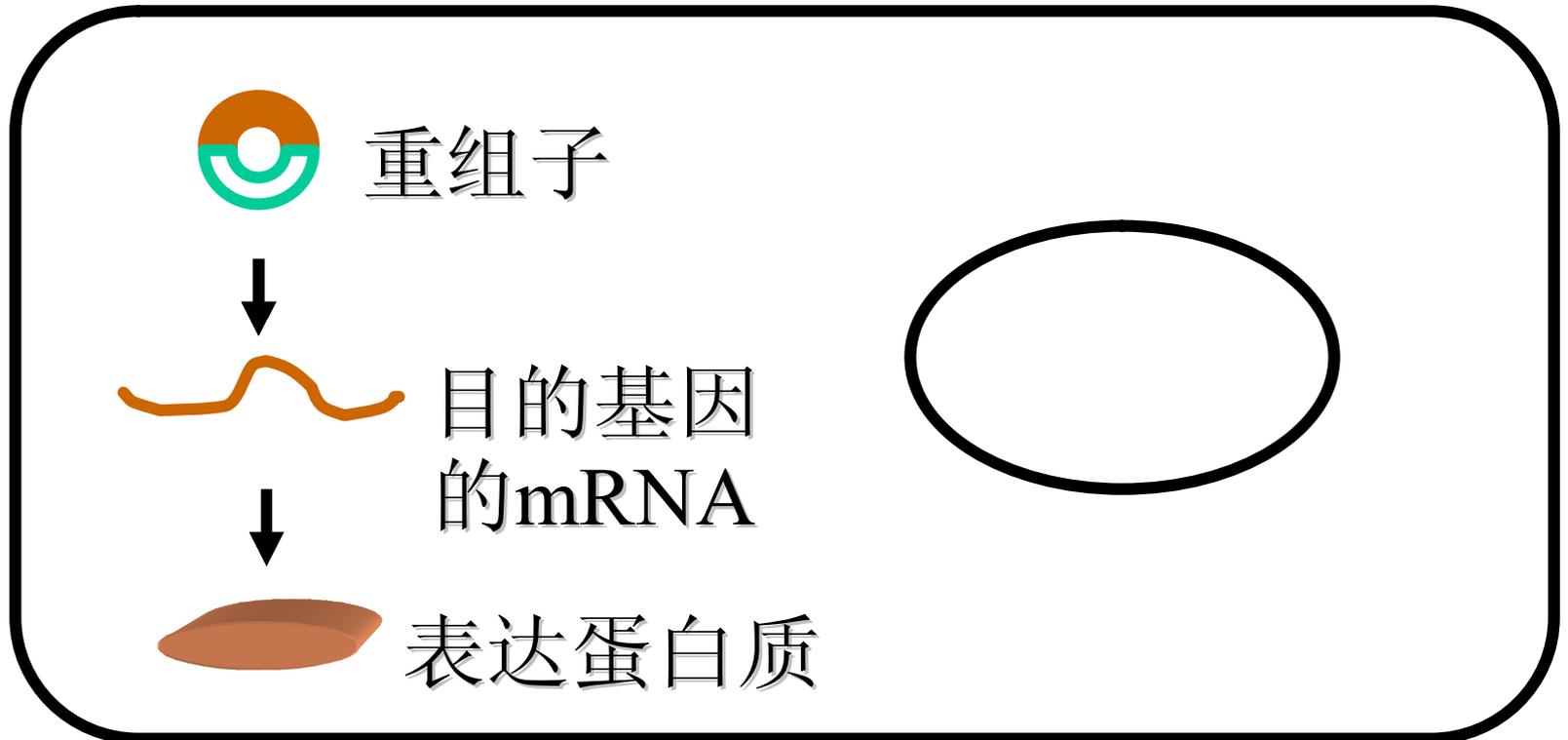
放射性抗体检测法

5 DNA序列检测



表

外源基因在宿主细胞中的表达



大肠杆菌 (E.coli) 受体细胞

1 E.coli表达体系

优势:

一种成熟的基因克隆表达的受体细胞
繁殖迅速，培养代谢易于控制
易于进行遗传操作和高效表达

不足之处:

- 1) 缺乏适当的转录后和翻译后加工机制。
- 2) 缺乏表达蛋白质复性系统，表达蛋白无特异性空间结构。
- 3) 表达产物不稳定，易被细菌蛋白酶降解。

2 目的基因在E.coli中的高效表达

三个因素：

强化蛋白质的生物合成

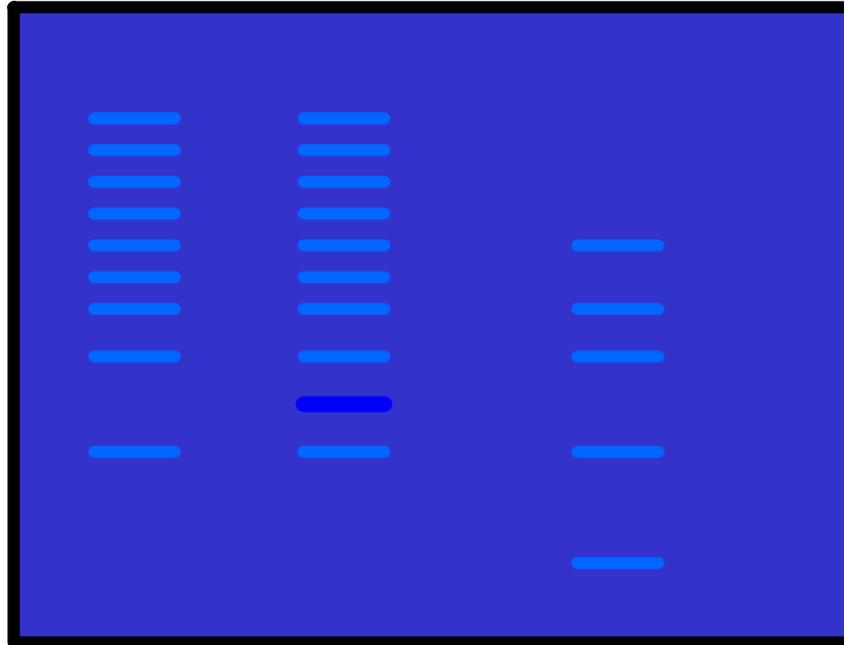
抑制蛋白质的降解

恢复蛋白质的空间构象

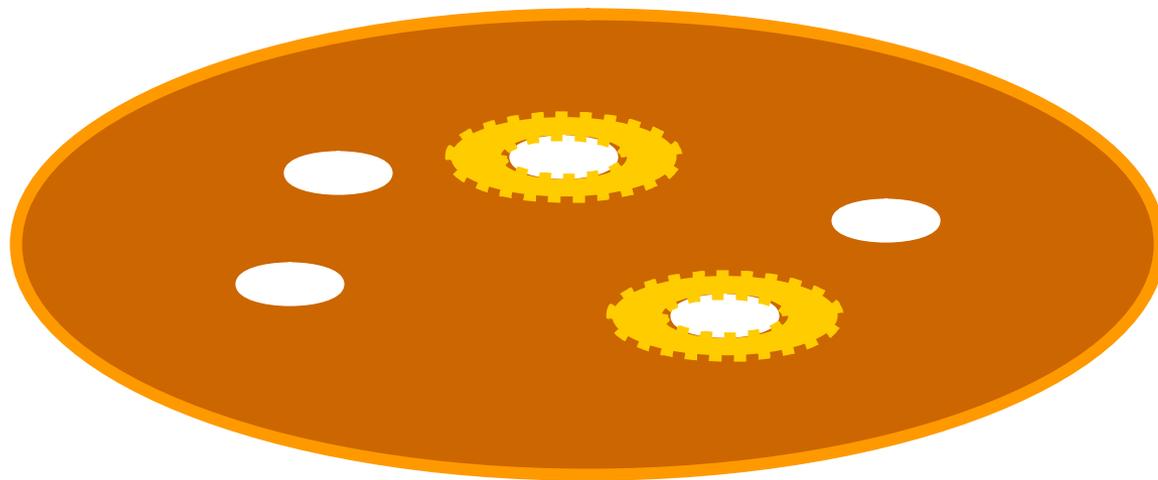
3 目的基因表达产物的检测

1) 蛋白质的PAGE

对照 样品 Marker

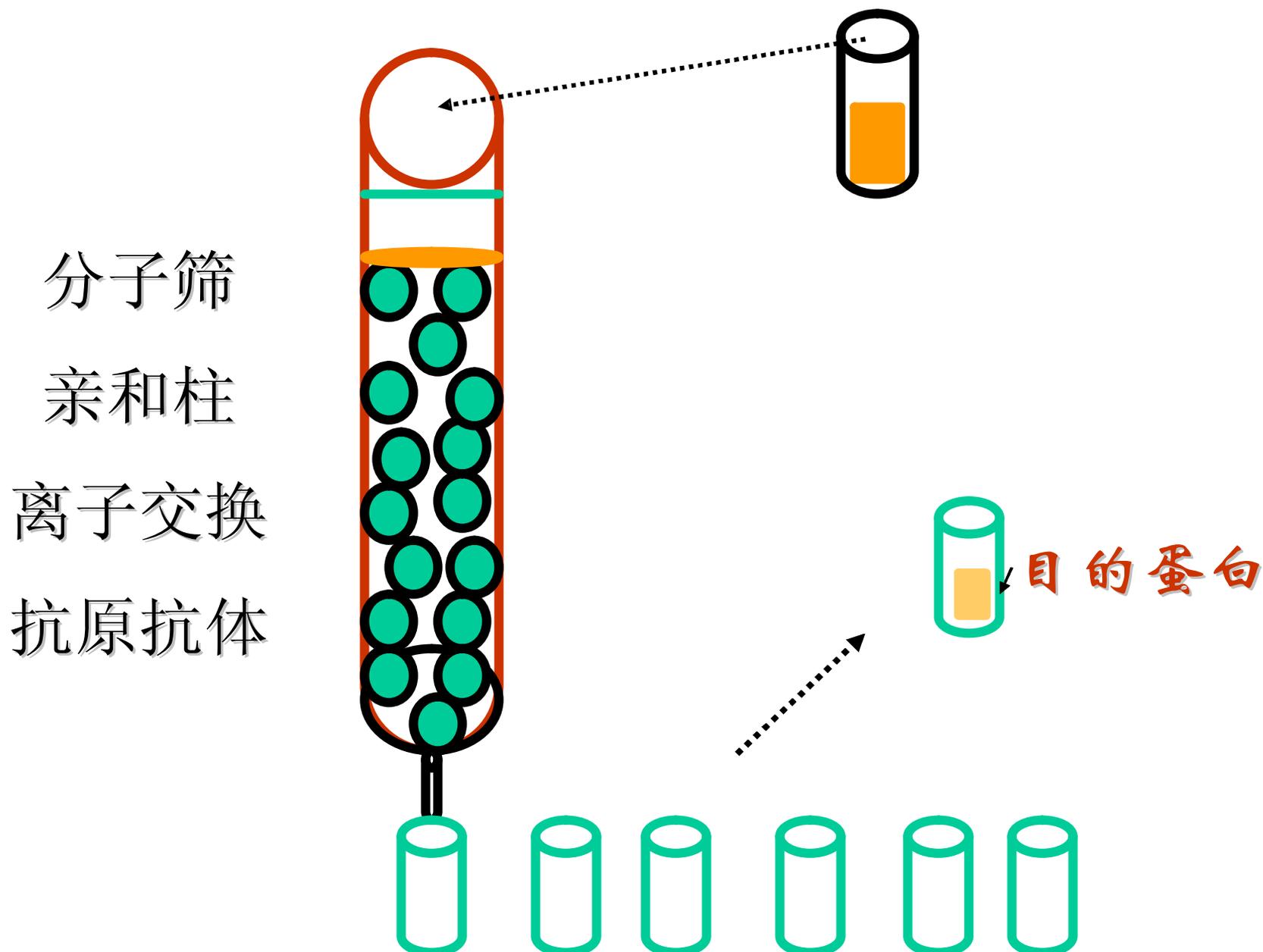


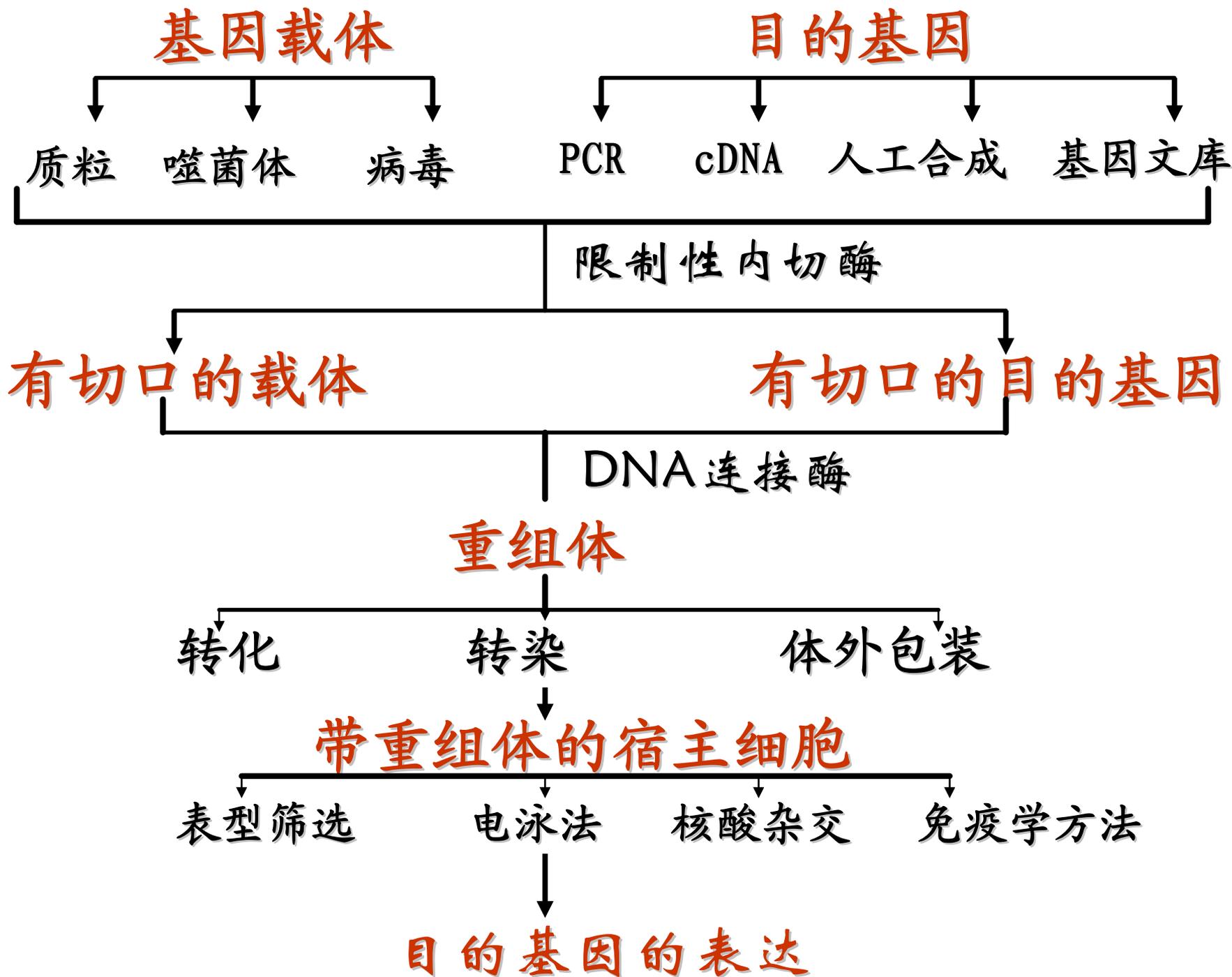
2) 表达蛋白生物学功能检测



淀粉酶基因表达

4 目的蛋白的分离纯化



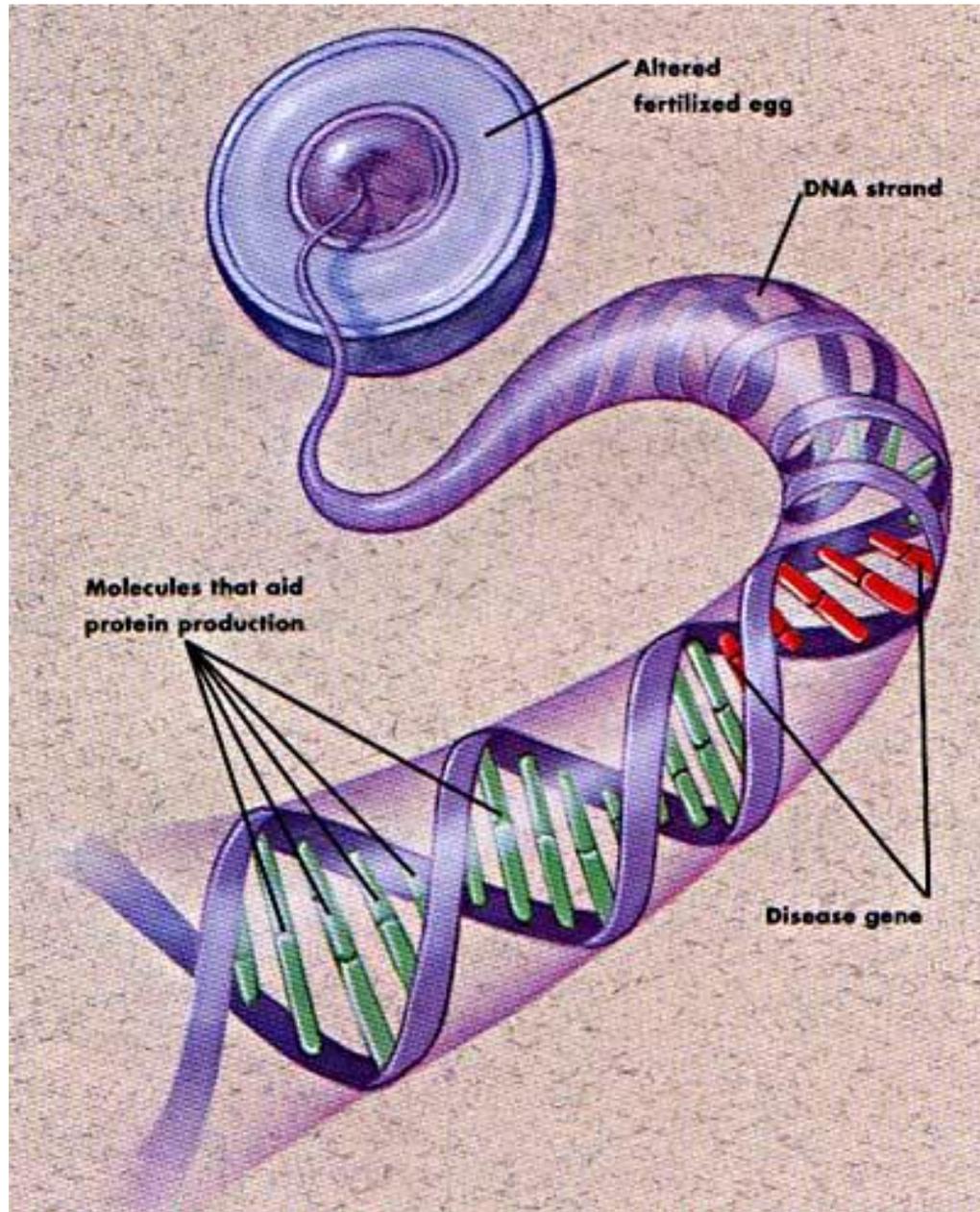


目的基因

目的基因

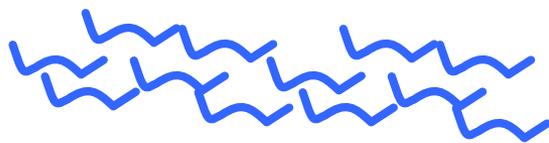
研究某个基因，或者要克隆某个基因用于生产大量DNA和蛋白质分子，首先都要把它从庞大的基因组中分离出来。

你所感兴趣和想研究的基因，称为目的基因。

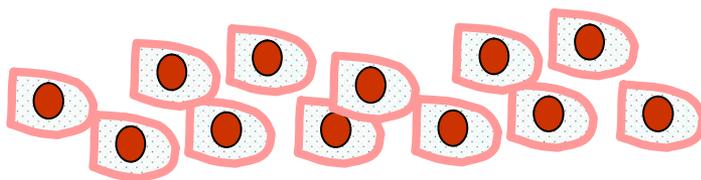


克隆 来自同一始祖的相同拷贝的集合。

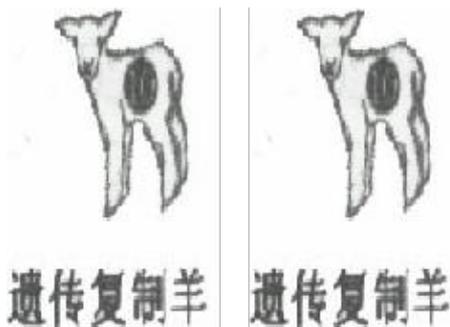
分子克隆



细胞克隆

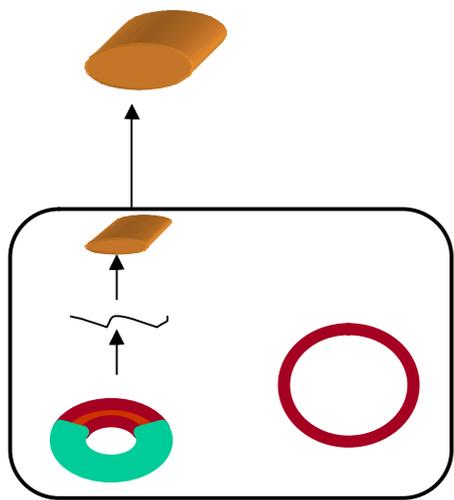
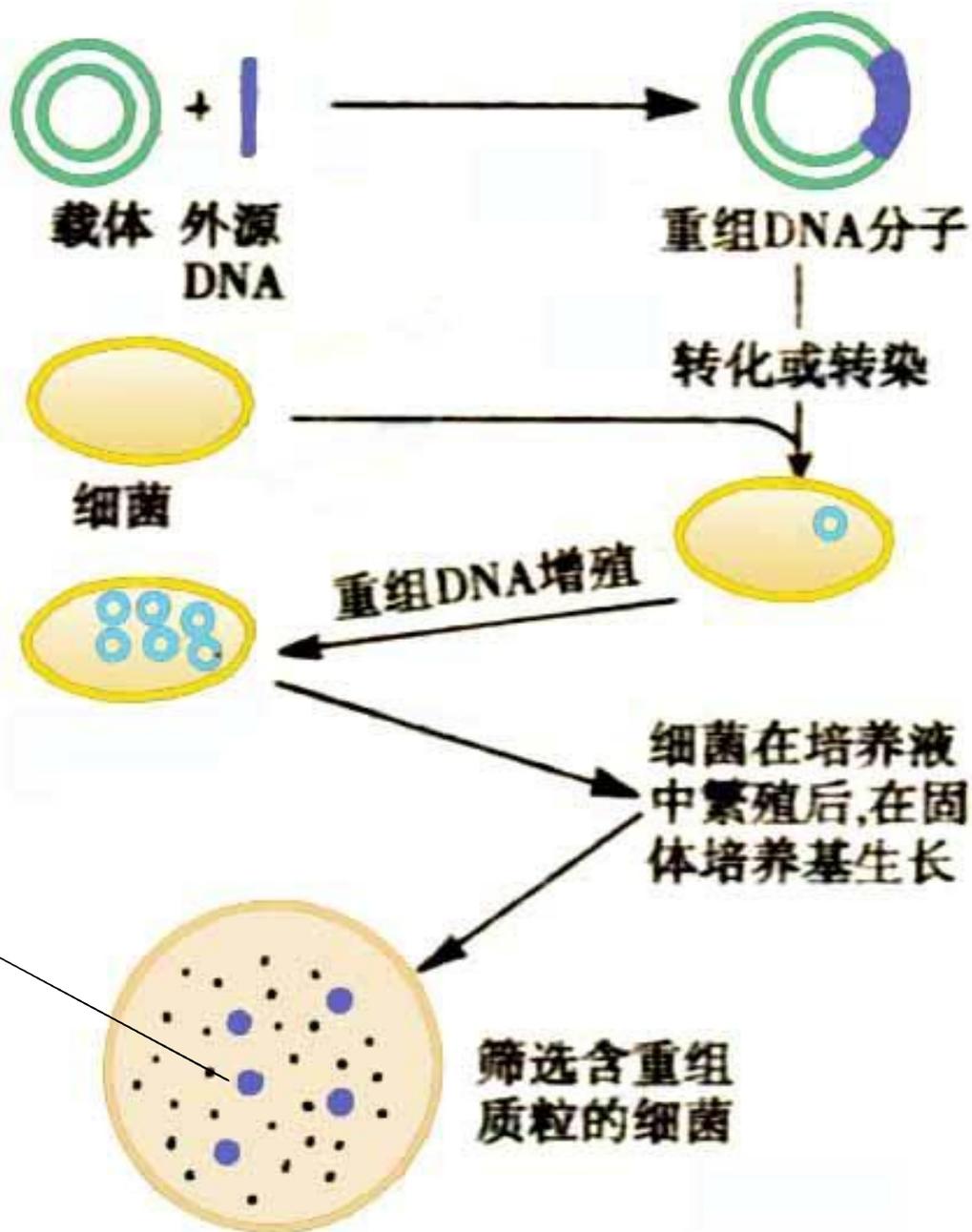


动物克隆



基因工程和生物大分子 的定量概念

一、基因工程



表达体系的建立

表达载体的构建

受体细胞的建立

表达产物的分离纯化

二、生物大分子的定量概念

基因的大小

碱基对数目 (bp)

分子量 (ku)

质量单位 (μg 、ng、pg)

基因大小可用**分子量或碱基对** (basepairs, bp) 表示。

化学物质的分子量单位是**道尔顿** (Dartton, D) 即原子质量单位u ($1u=1.6605402 \times 10^{-27}$ kg) 。

生物大分子则以D或U单位的千 (kilo-) 或百万 (mega-) 倍来表示, 写成kD (Ku) 或MD (Mu) 。

构成DNA的脱氧单核苷酸 (**dNMP**) 有dAMP、dGMP、dCMP和dTMP4种, 其平均分子量为**0.34kD** (340D) 。

生物体DNA是双链结构, 故常用bp, 千碱基对 (kb) 或百万碱基对 (Mbp) 表示其大小。 **1bp=0.68kD.**

$$1\text{kb}=680\text{kD}=0.68\text{MD}$$

$$1\text{MD}=1.47\text{kb} \quad \text{或} \quad 1\text{kD}=1.47\text{bp}$$

$$\text{DNA } 1\text{kb} \approx 120 \times 330 \approx \text{蛋白质 } 40\text{kD}$$

$$\text{蛋白质 } 1\text{kD} \approx \text{DNA } 250\text{bp}$$

分子量1MD的双链DNA: $1\mu\text{g}=1\text{ pmol}$

分子大小1kb的双链DNA: $1\mu\text{g}=0.68\text{ pmol}$
或: $1\text{pmo}=1.47\mu\text{g}$

一个 O.D_{260} 单位的核酸溶液,浓度随核酸种类而定:

DNA= $50\mu\text{g}/\text{ml}$

单链DNA= $33\mu\text{g}/\text{ml}$

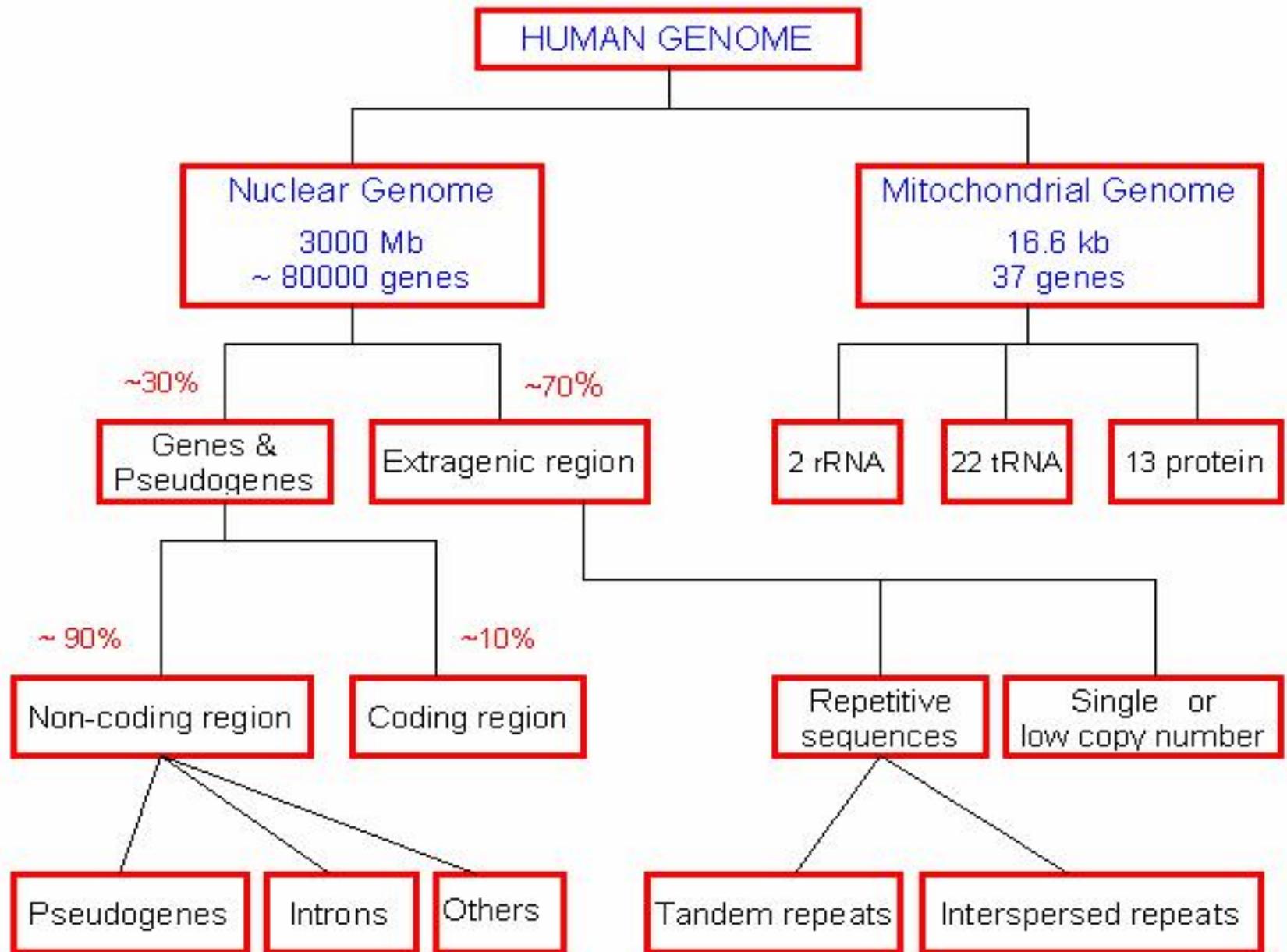
RNA= $40\mu\text{g}/\text{ml}$

基因组的大小

细胞或生物体中一套完整单体的遗传物质的总和。

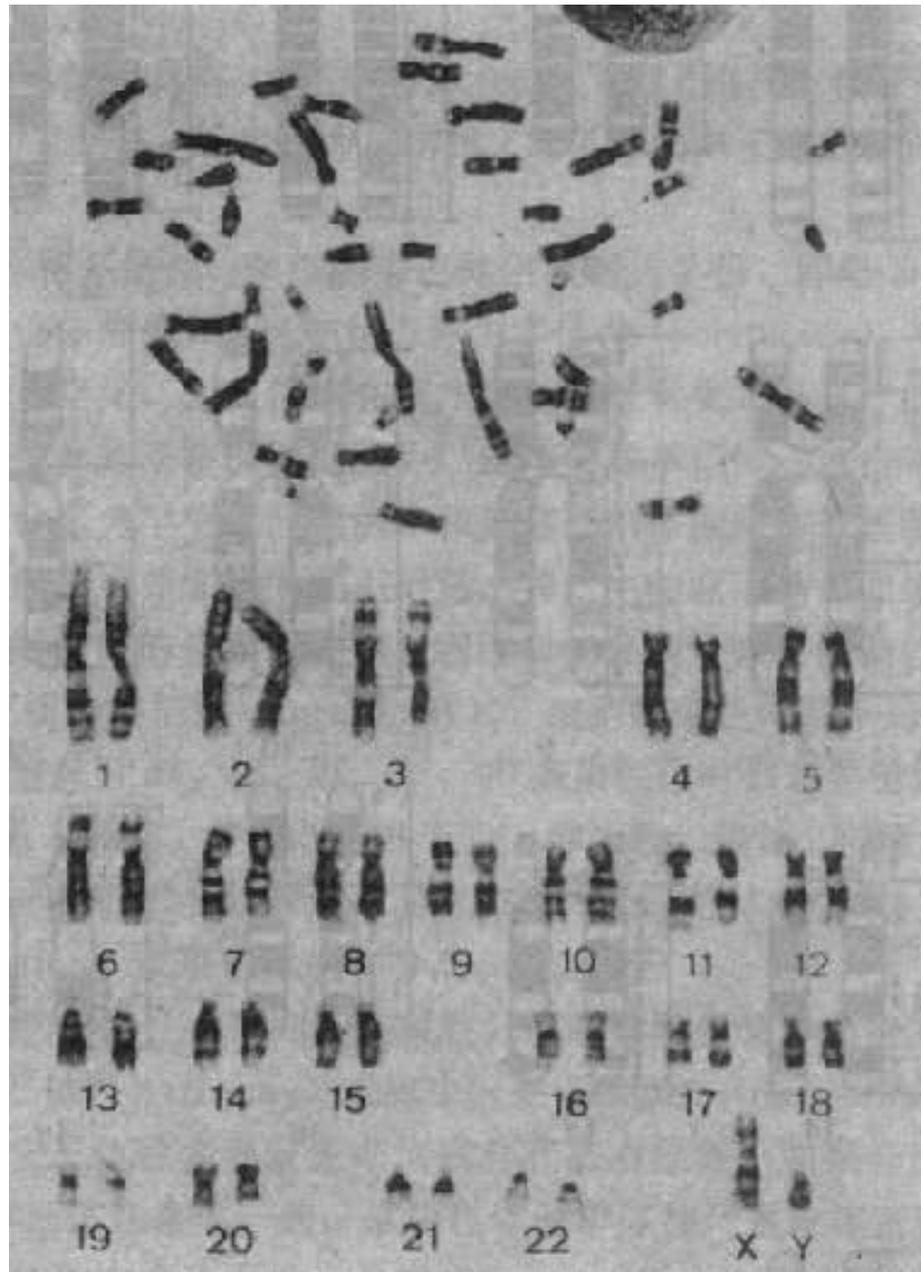
人类基因组包含22条常染色体和X、Y 两条性染色体和线粒体上的全部遗传物质。

不同生物的基因组大小复杂程度不同，其大小一般与进化程度相关。



染色体

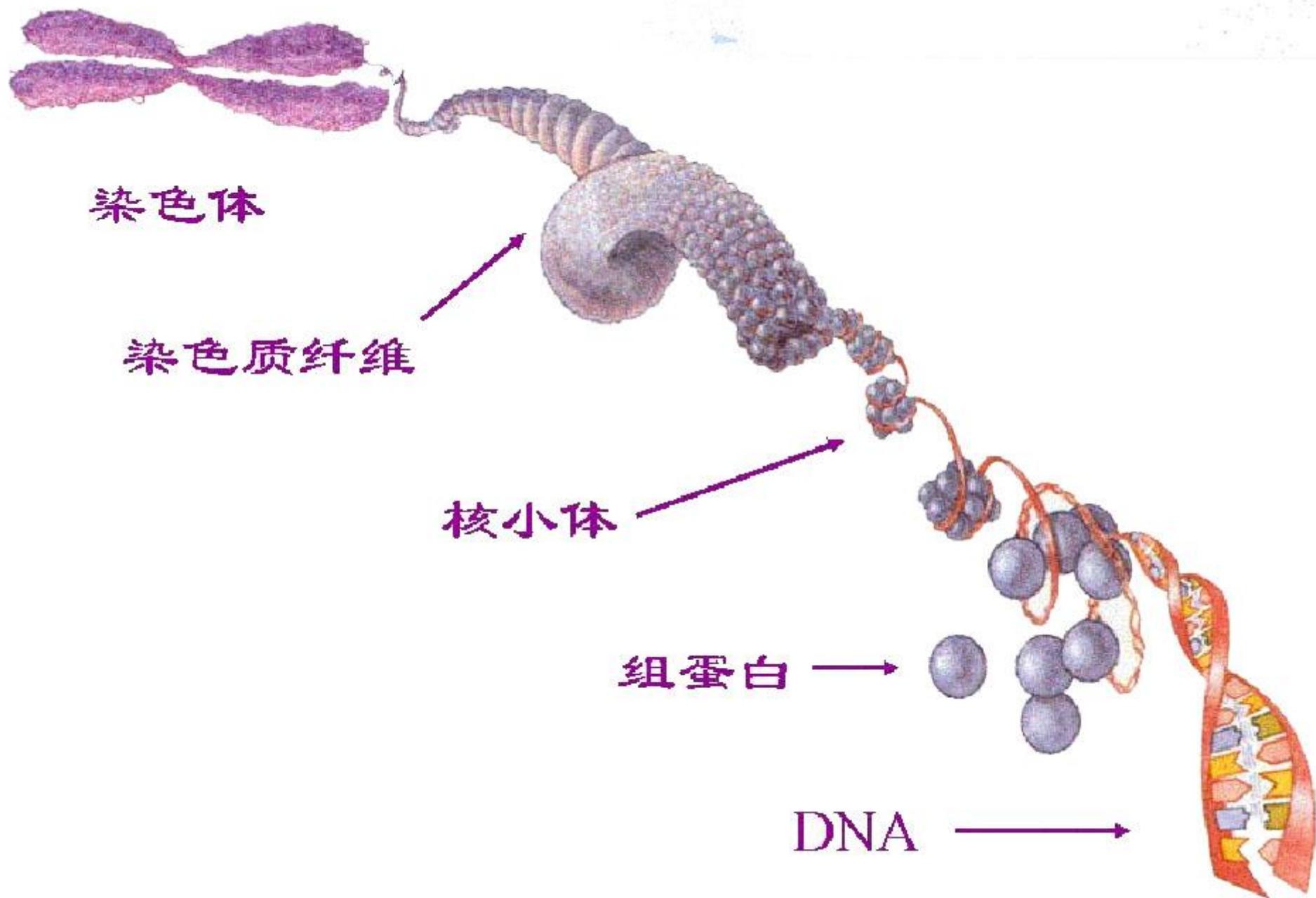
chromosome



几种生物的基因组比较

种类	大小 (Kb)	染色体数	形状
■ 病毒SV40	5.2	1	环状
■ 大肠杆菌	4000	1	环状
■ 酵母	17000	17	线状
■ 人	$5-7 \times 10^6$	23	线状

目的基因的获取



染色体

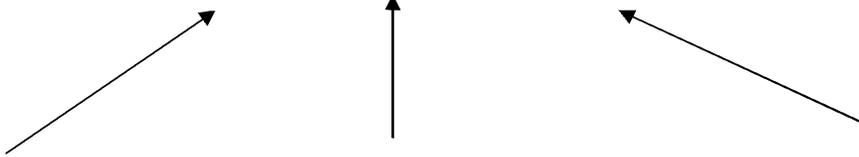
染色质纤维

核小体

组蛋白

DNA

目的基因的获取



化学合成法

cDNA文库

聚合酶链式反应

基因组DNA文库

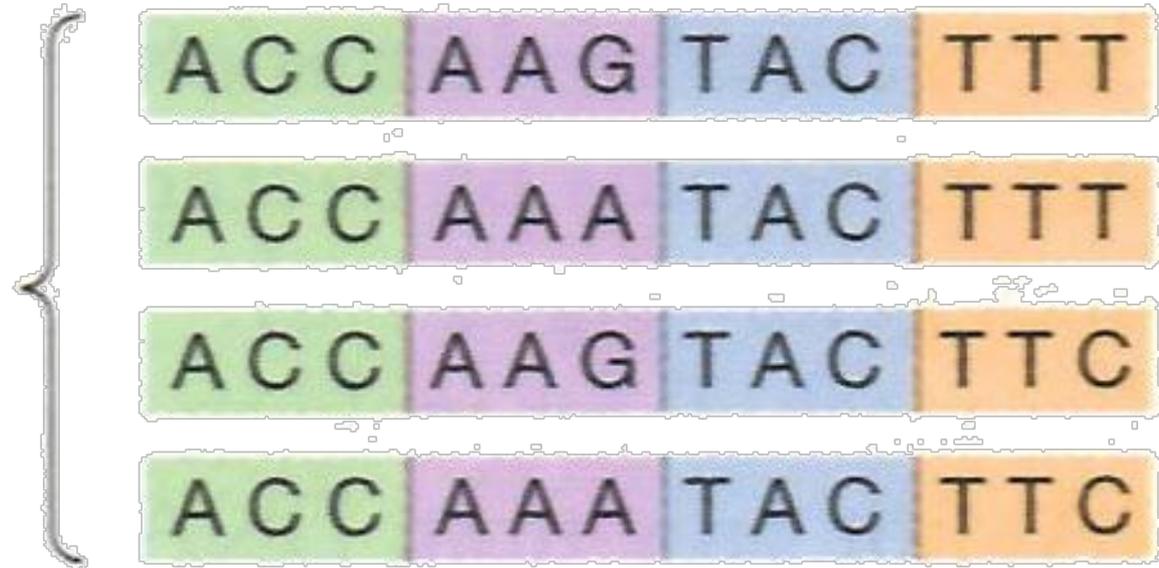
一、化学合成法获取目的基因

DNA合成仪

氨基酸



可能的DNA序列



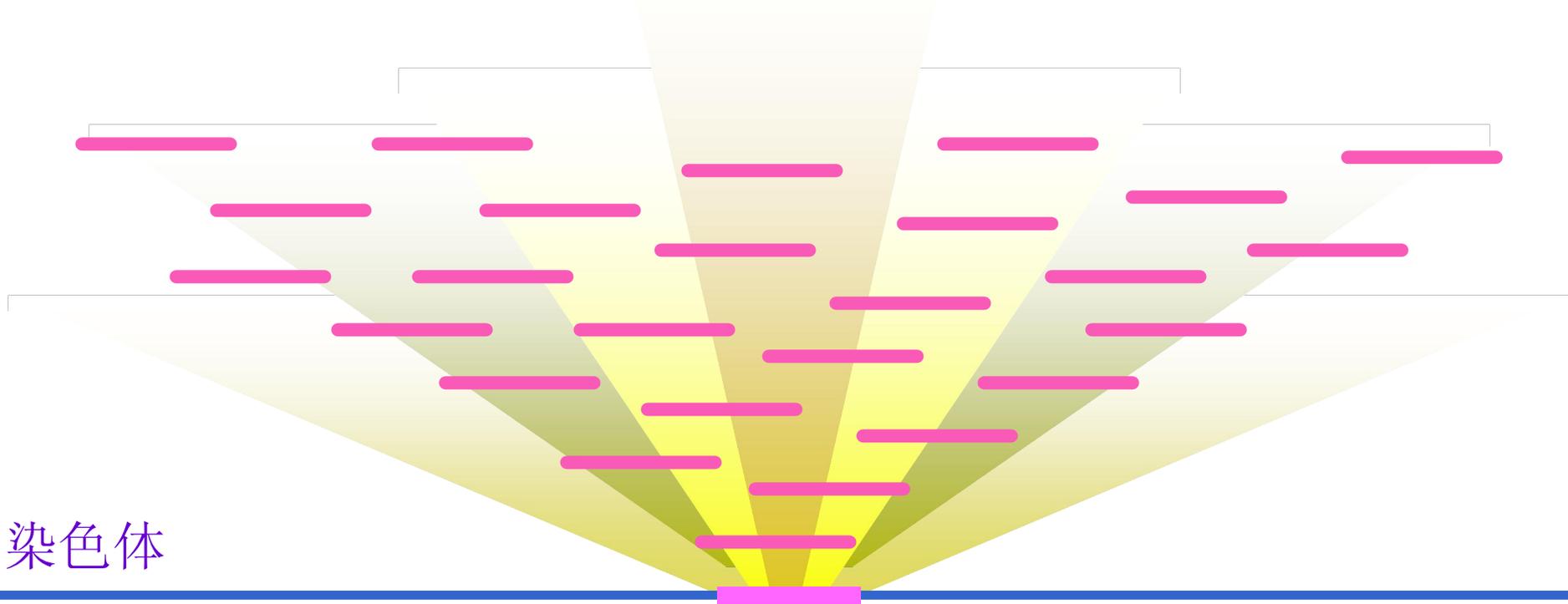
由已知氨基酸序列推测可能的DNA序列

较短的核酸片段（60-80bp）

用途：PCR引物
测序引物
定点突变
核酸杂交探针

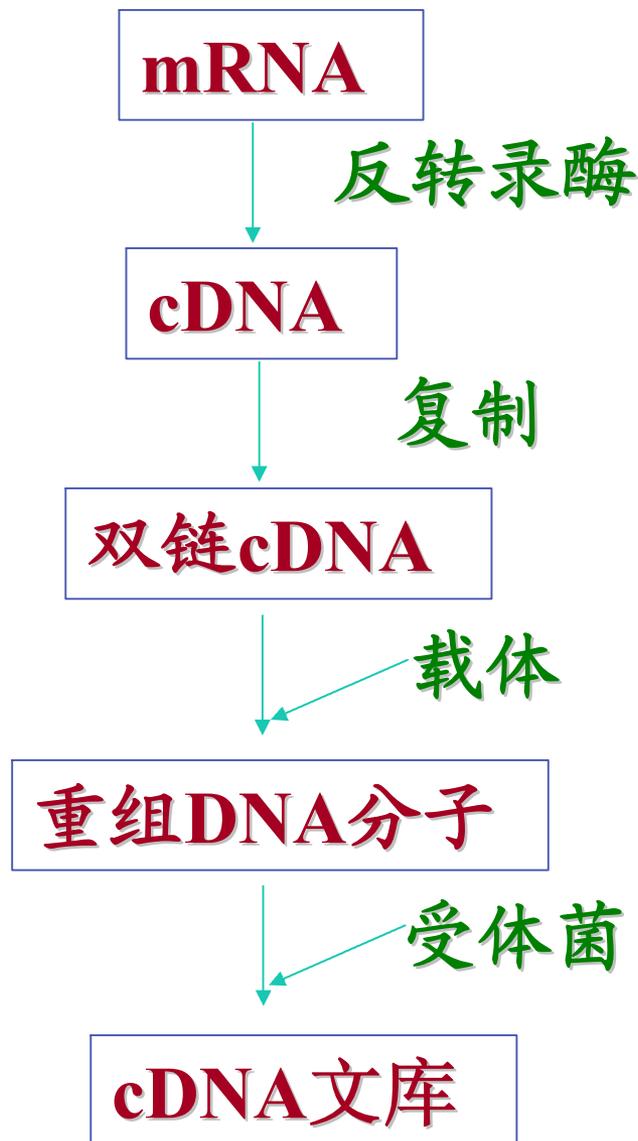
二、聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)

PCR 基因放大连锁反应



PCR 可以把 指定的基因片段 数量放大

三、从cDNA文库获取目的基因

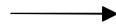


(一) mRNA的提取与纯化

破碎细胞



解聚核蛋白体



化学方法提取



柱层析、电泳法纯化

1 总RNA的提取

强变性剂

有机溶剂

RNA酶抑制剂

尿素-氯化锂法

异硫氰酸胍法

热酚法

.....

尿素-氯化锂法、硫氰酸胍法

胍类化合物

尿素

氯化锂

Rnasin---RNA酶

DEPC

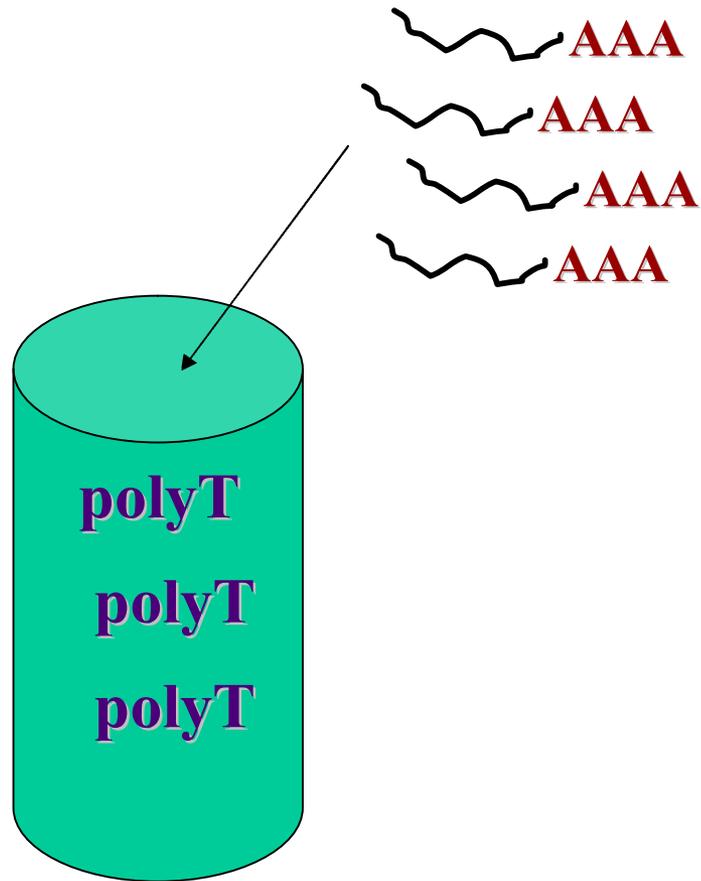
2 mRNA的分离纯化

polyT亲和层析法

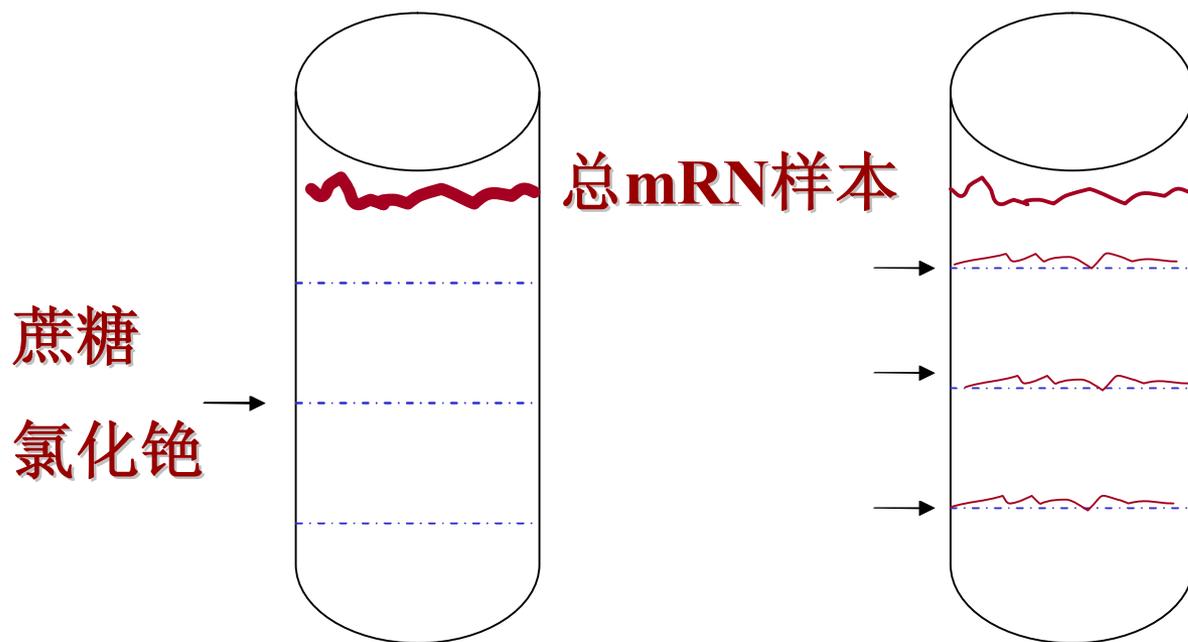
密度梯度离心分级法

探针筛选法

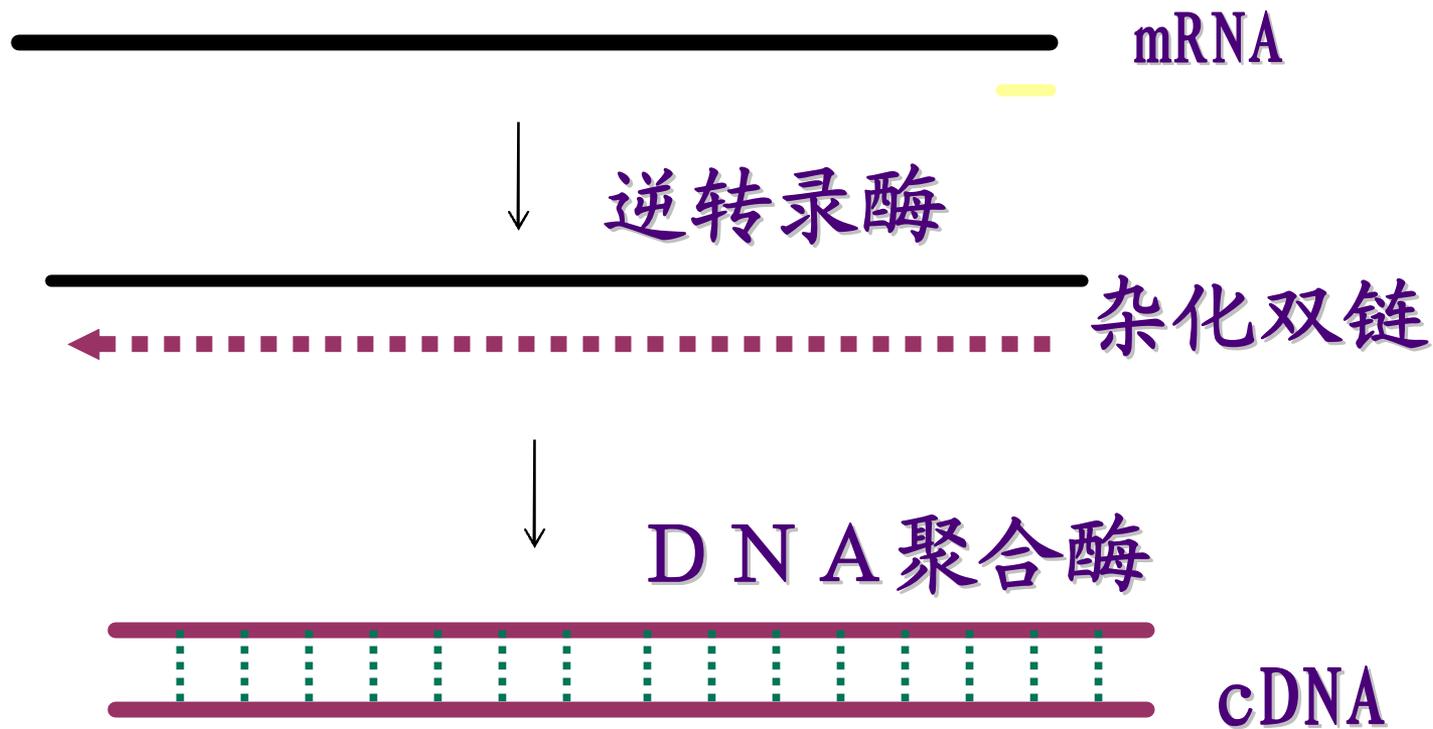
polyT亲和层析法



密度梯度离心分级法



(二) 从mRNA制备cDNA



-----AAAA

↓ 逆转录酶

-----AAAA
—————TTTT

↓ 碱水解

└—————TTTT

↓ DNA聚合酶 I

└—————
└—————

↓ SI核酸酶

—————
—————

RNase H
.....→

— — —
—————

DNA聚合酶 I
↓

— — —
—————

DNA连接酶
↓

—————
—————

四、基因文库法

基因文库

```
graph TD; A[基因文库] --> B[基因组文库 (G-文库)]; A --> C[cDNA文库 (C-文库)];
```

基因组文库 (G-文库)

cDNA文库 (C-文库)

从基因组DNA文库获取目的基因

组织或细胞染色体DNA

限制性内切酶

基因片段

克隆载体

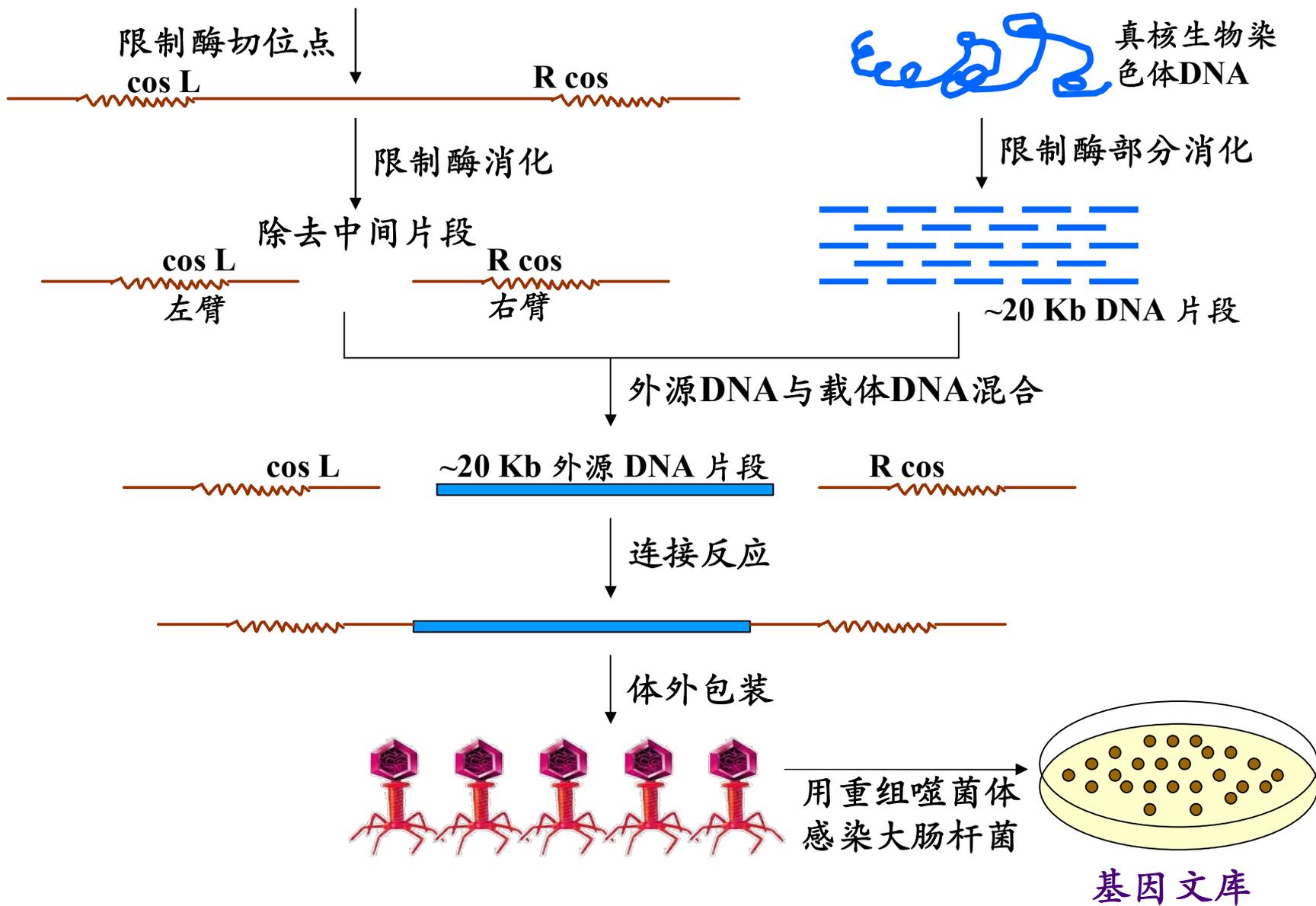
重组DNA分子

受体菌

含重组分子的转化菌

基因组DNA文库

存在于转化细胞内由
克隆载体所携带的所有
基因组DNA的集合

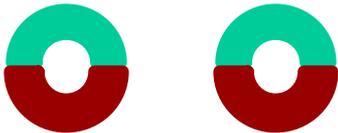


mRNA

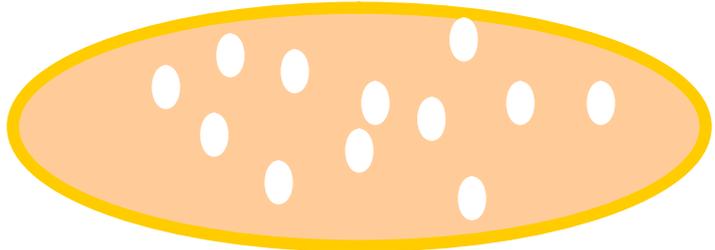
反转录酶

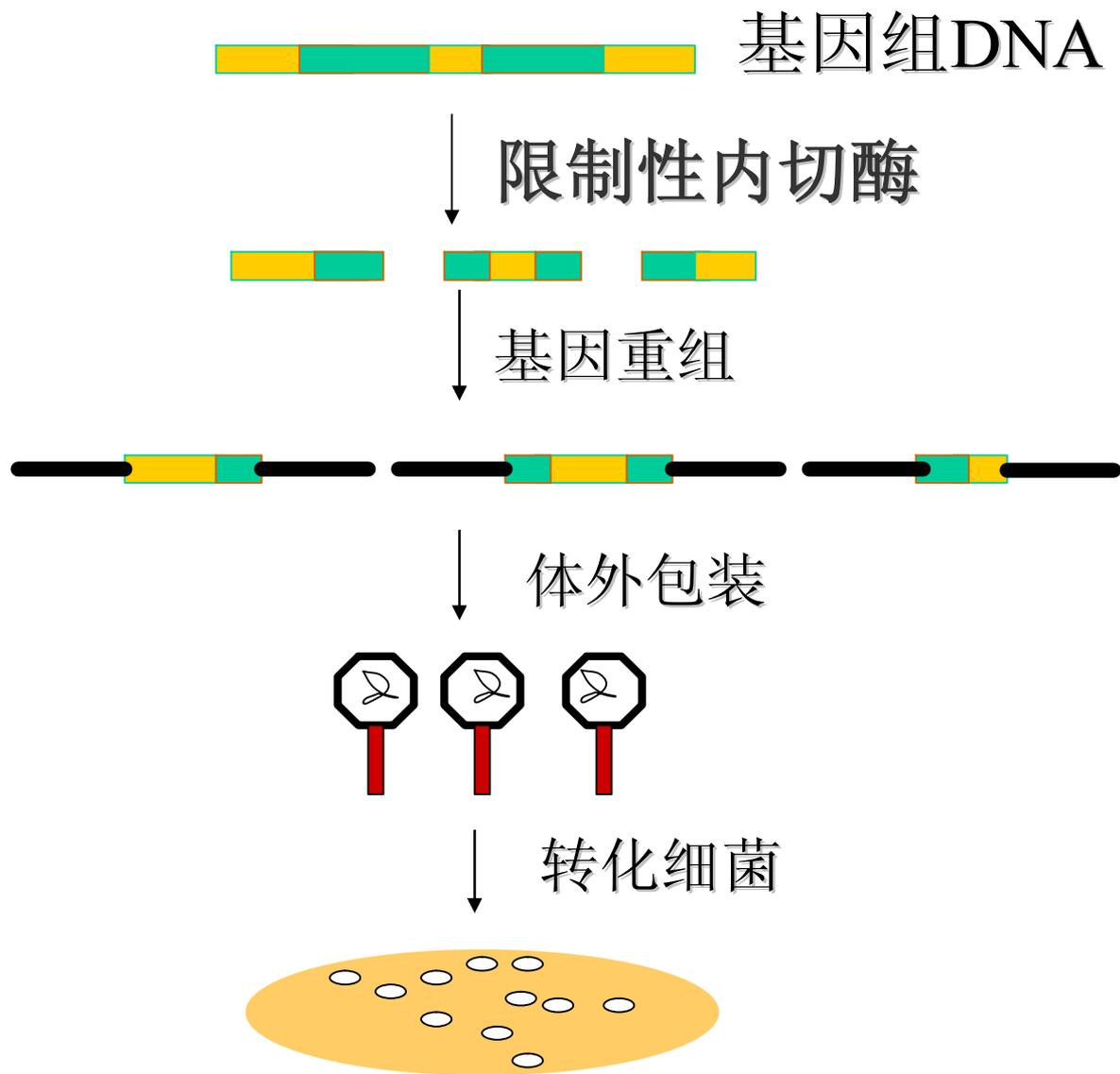
cDNA

基因重组

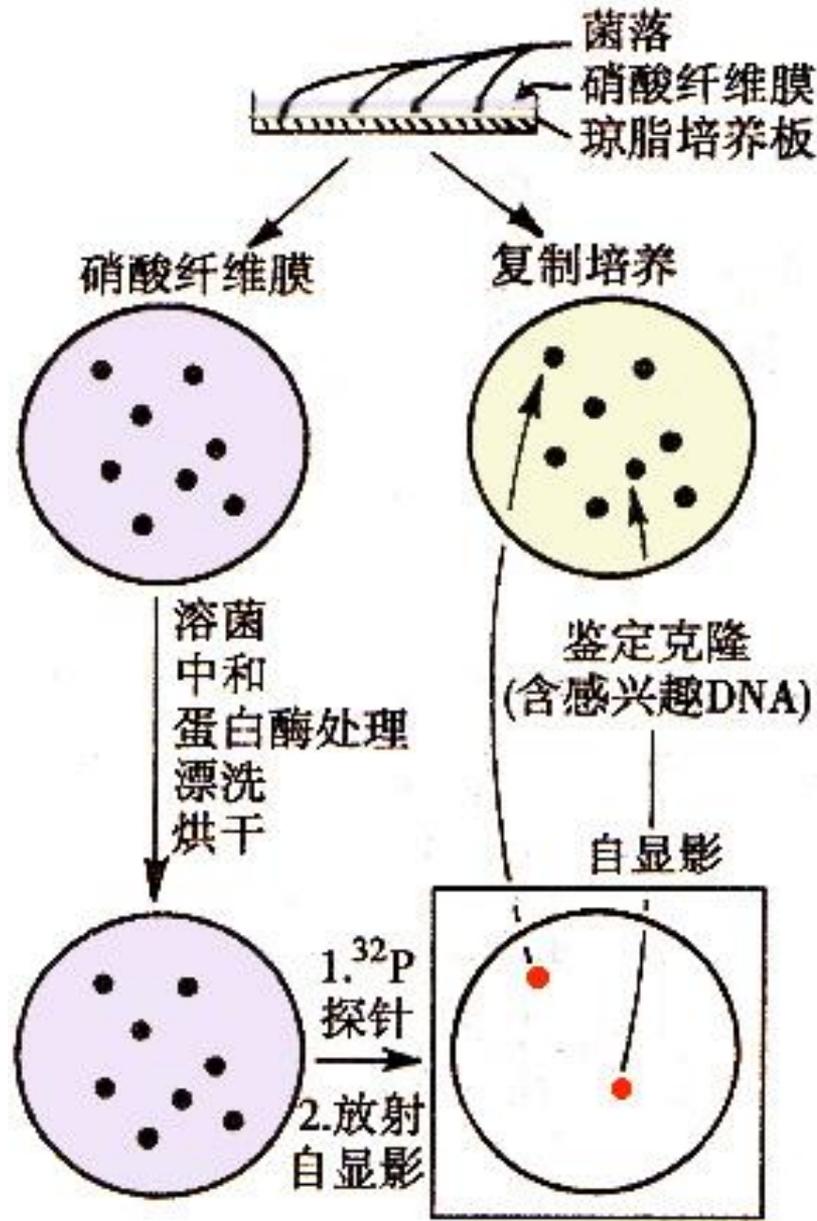


cDNA文库

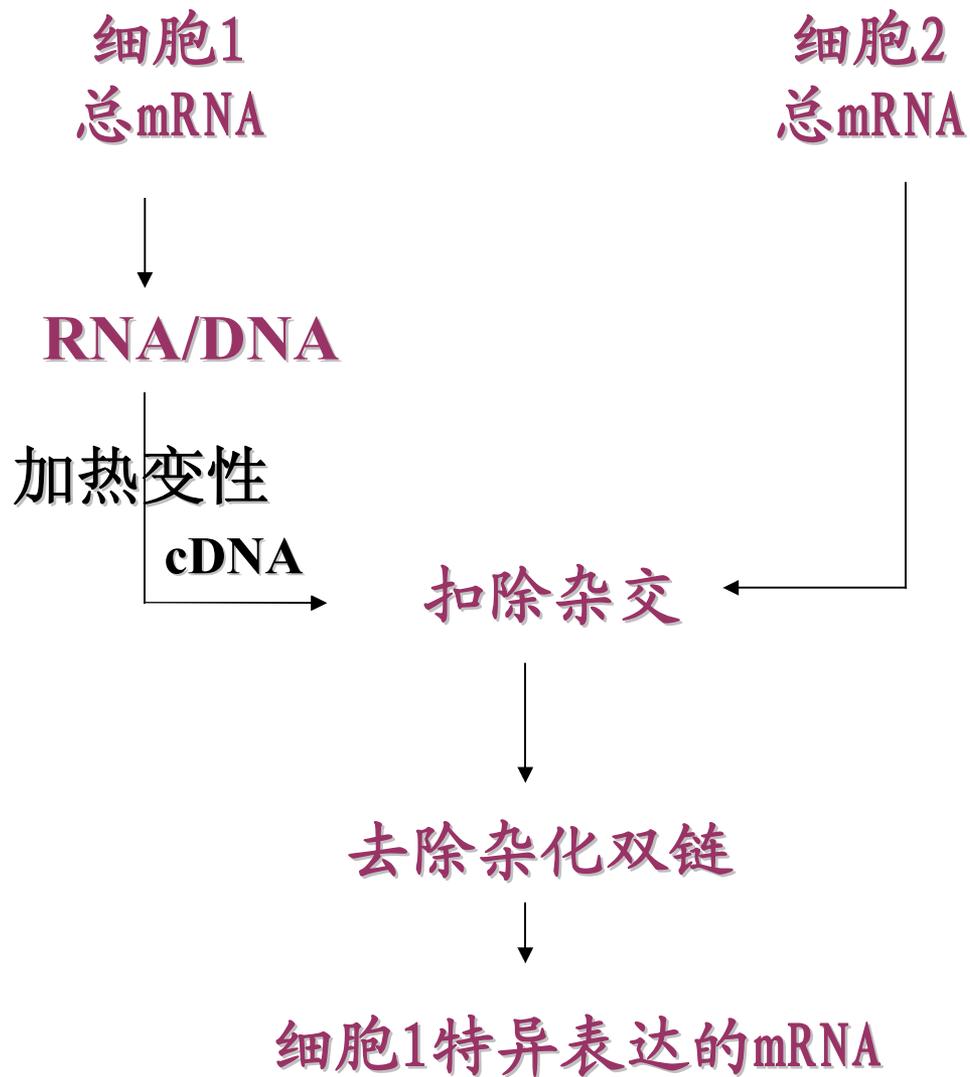




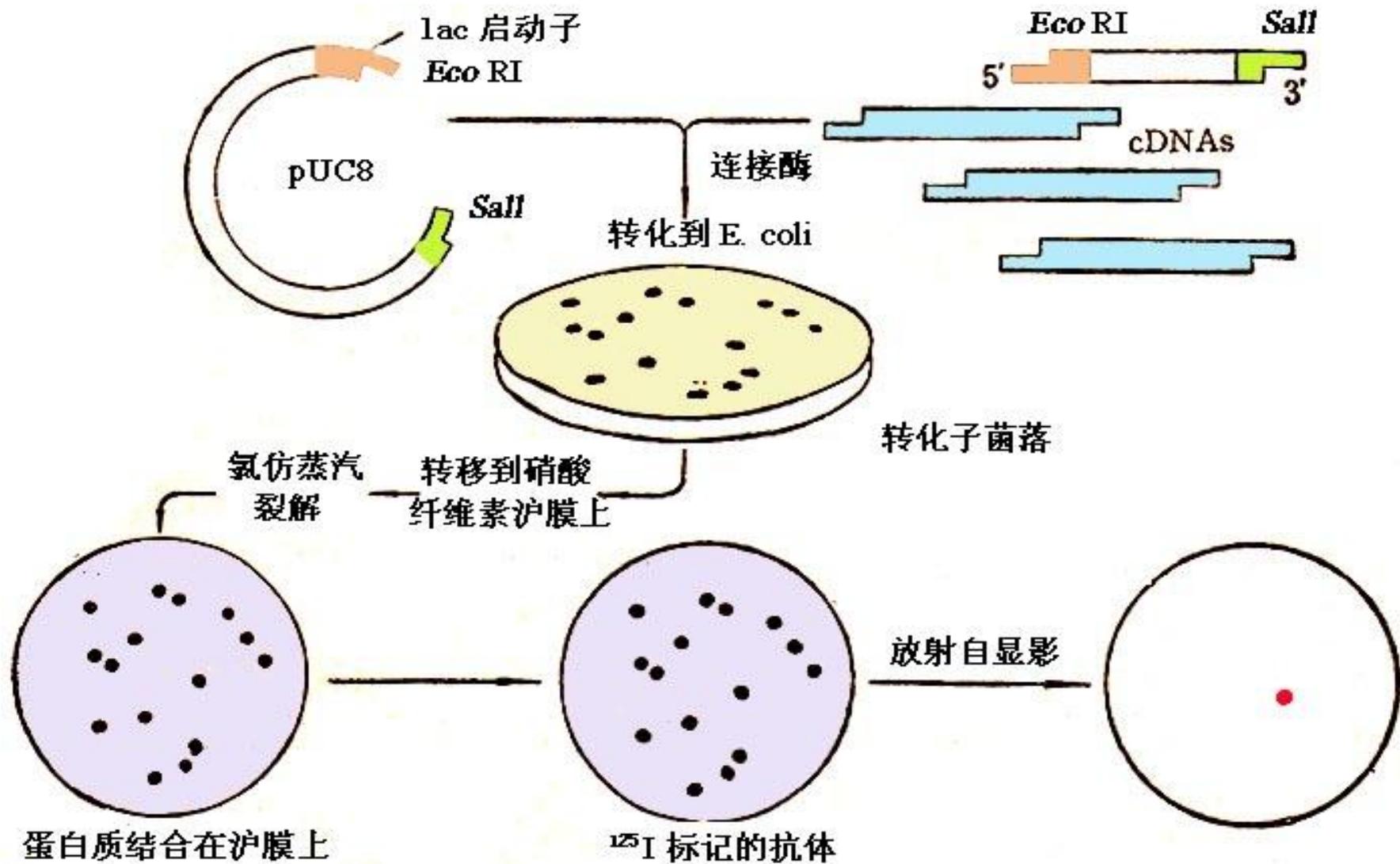
斑点杂交



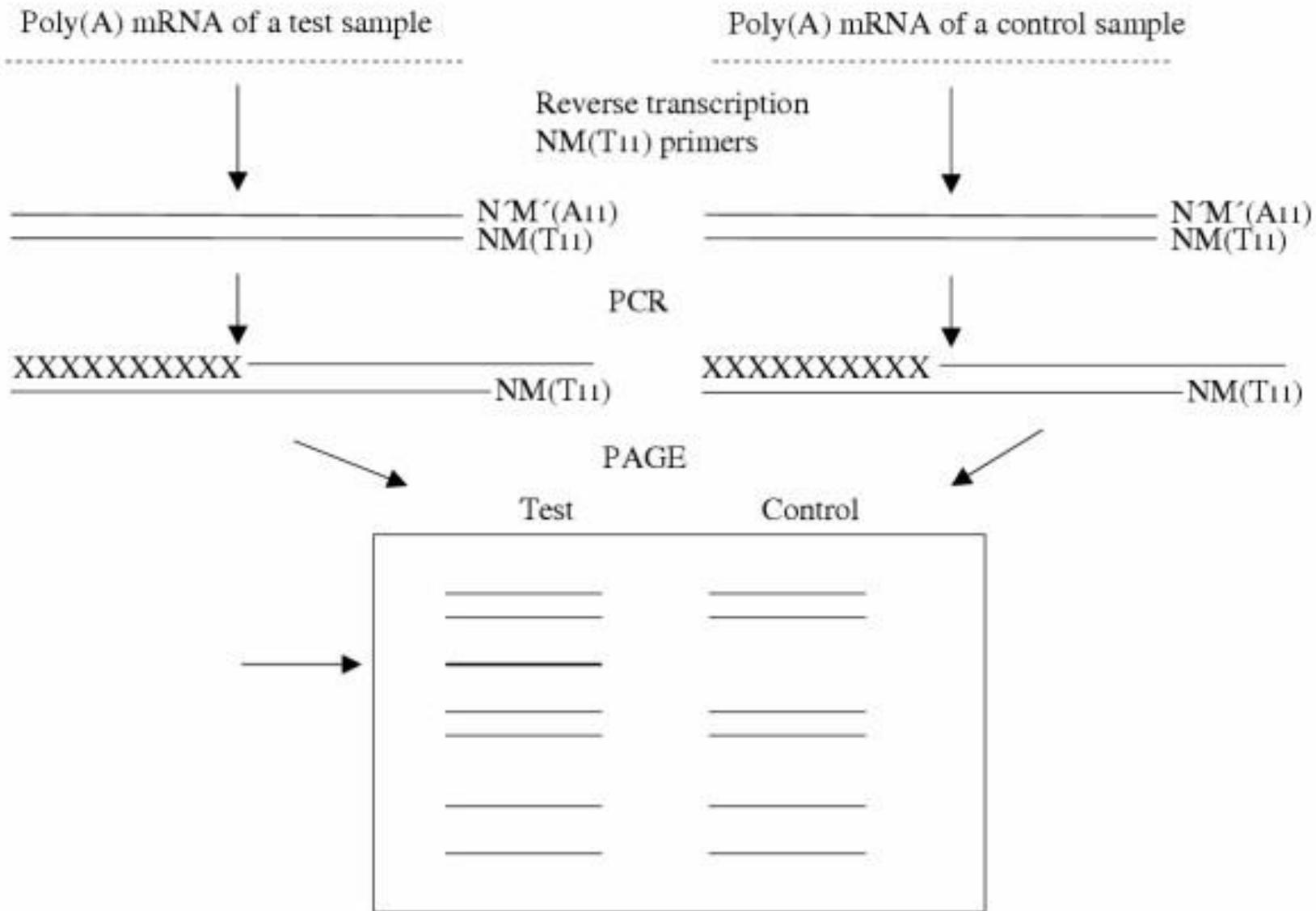
扣除杂交法



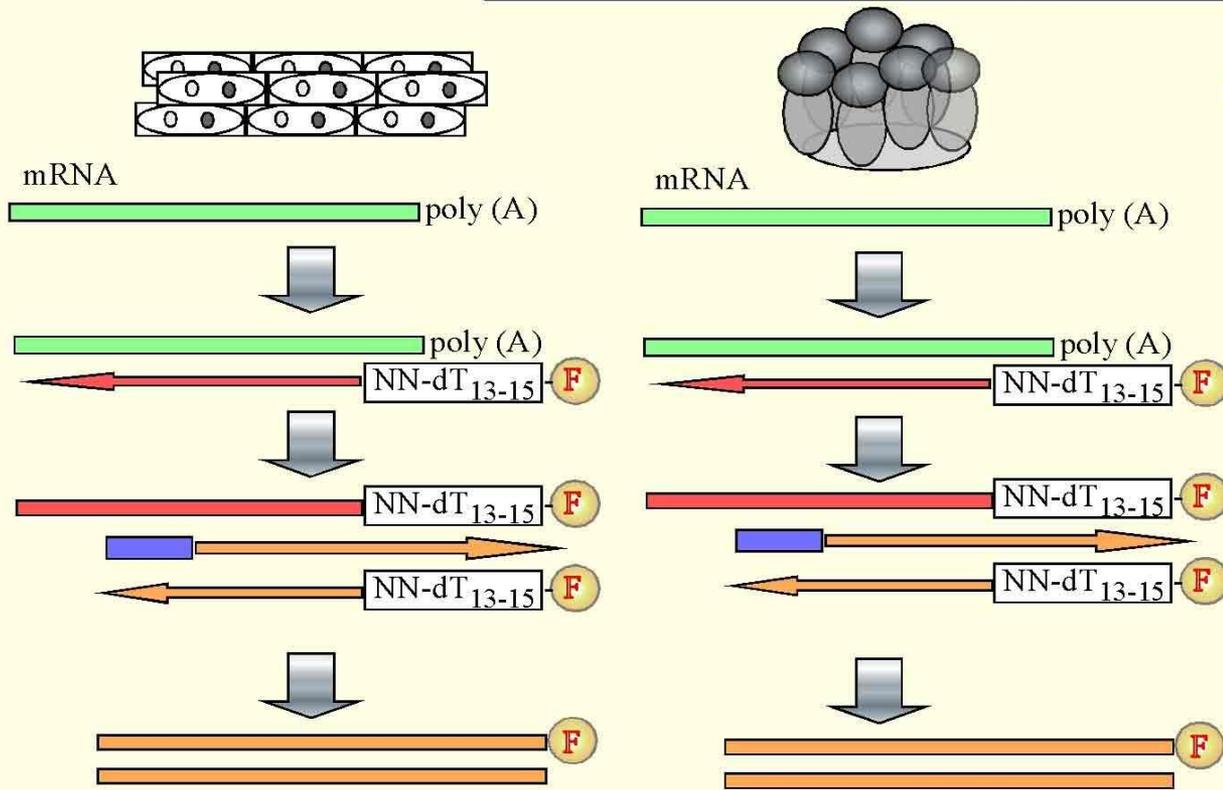
免疫化学筛选法



差异显示技术



Fluorescence Differential Display method



Isolation of total RNAs

with
Fluorescence
Down stream primer
x 9

NN-dT₁₃₋₁₅-F

1st cDNA synthesis

with
Random
Up stream primer
10 mer x12



PCR amplification

Polyacrylamide gel
electrophoresis
Detection of specific
fragments with
Fluorescence

