

基因工程重点整理

第二章 工具酶

1.核酸酶(nuclease)：通过切割相邻两个核苷酸残基之间的磷酸二酯键，导致核酸分子多核苷酸链水解断裂的蛋白酶。

2.限制性核酸内切酶(Restriction endonuclease)：是一类能识别双链 DNA 中特殊核苷酸序列，并在合适反应条件下，使每条链一定位点上的磷酸二酯键断开，产生具 3'-OH 和 5'-P 基团的 DNA 片段的内切脱氧核糖核酸酶，简称限制性内切酶、限制酶。

3.R/M 体系(系统)：几乎所有的限制性内切酶都要和能识别而且甲基化相同的 DNA 位点的甲基化酶共同作用。这两个酶——限制性内切酶和甲基化酶一起称为限制—修饰系统(R-M 系统)。在甲基化后，DNA 位点被保护起来，所以宿主细胞中甲基化的 DNA 能够不被限制性内切核酸酶消化。

4.同裂酶：有些限制酶虽来源不同，但有相同的识别序列，酶切位点不同或相同。

5.同尾酶：有些限制酶虽识别序列不同，但酶切产生的 DNA 片段具有相同的末端。

6.甲基化酶：甲基化酶的识别序列与限制酶相同，在序列内使某个碱基甲基化，从而封闭该酶切口。这类甲基化酶的命名常在对应的限制酶名字前面冠以 M。

7.影响限制性内切酶活性的因素 (问答)：

①底物 DNA 分子：

A、DNA 的分子结构

1) 空间构象：限制酶对线性 DNA 分子的切割效率明显高于超螺旋质粒 DNA 和环状病毒 DNA。

2) 侧面序列：当识别序列两侧的碱基序列达到一定长度时，限制酶才能正常切割 DNA 分子。

3) 位点偏爱：DNA 分子中某些识别序列能迅速被限制酶切割，而另一些位点相对不易被切割。

B、DNA 的甲基化程度

Dam 在 5'-GATC-3' 序列中腺嘌呤 N6 位引入甲基，受其影响的有 Bcl I、Mbo I 等。

Dcm 在 5'-CCAGG-3' 或 5'-CCTGG-3' 序列中胞嘧啶 C5 位上引入甲基，受其影响的有 EcoR II 等。

C、DNA 的纯度

DNA 样品中混杂蛋白质、酚、氯仿、乙醇、EDTA、SDS 等，会影响限制酶的切割效率。

加大酶量，1mg DNA 用 10U 酶；加大反应体积；延长反应时间；重新抽提高纯度 DNA。

②限制酶用量

活性单位：在最佳反应条件下反应 1hr，完全水解 1 μg 标准 DNA 所需酶量。

容积活性：每 1 μl 酶液中所含的酶活性单位。

③酶切反应缓冲液

缓冲液是影响限制酶活性的重要因素。

④酶切反应的温度和时间

不同限制酶的最适反应温度不同，大多数是 37℃，少数高于或低于 37℃。

7.星号活性(star activity)：限制酶在非标准反应条件下，对识别序列的特异性下降，能切割一些与特异识别顺序类似的序列，一般在酶的右上角加*表示。

8.什么是完全酶切和部分酶切？作用？

完全酶切：识别序列为 n 碱基对的限制酶，对 DNA 的切割能达到每隔 4n 切割一次的水平。

部分酶切：限制酶对其在 DNA 分子上的全部识别序列进行不完全的切割。

当待克隆的 DNA 片断内部存在酶切位点时特别有用。

部分酶切可获得平均分子量大小有所增加的酶切片断。

9.导致部分酶切的原因：DNA 样品纯度低；识别序列甲基化；酶用量不足；反应缓冲液不适宜；反应温度不适宜；反应时间不够

10.DNA 连接酶 (DNA ligase)：能催化双链 DNA 片段紧靠在一起的 5'-P 末端和 3'-OH 末端之间形成磷酸二酯键，使两末端连接。

11.缺刻平移(nick translation)：在 DNA 分子的单链缺刻上，DNA pol I 的 5'→3'外切酶和 5'→3'DNA 聚合酶活性协同作用，使缺刻沿着 DNA 分子合成的方向移动。（英译汉）

12.E.coli DNA 连接酶和 T4 DNA 连接酶的共同点和区别？

E.coli DNA 连接酶：由 E.coli 基因 lig 编码，需烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)作为辅助因子，分子量 75KD。修复双链 DNA 上的单链缺刻，用于连接匹配粘端。

T4 DNA 连接酶：从 T4 噬菌体感染的 E.coli 中分离得到，由 T4 基因 DNA30 编码，需 ATP 作为辅助因子，分子量 60KD。修复双链 DNA 上的单链缺刻，用于连接匹配粘端；连接 RNA-DNA 杂交双链上 DNA 链缺刻；连接平端双链 DNA 分子。

13.提高平端连接效率的方法

①16℃连接过夜（粘端连接 16℃ 4hr 或 4℃过夜）。

②加大连接酶用量（10 倍于粘端连接, 1-2U）。

③加大平端 DNA 片段的浓度。

④加入 10% PEG 8000。

⑤加入单价阳离子(NaCl)，终浓度 150-200 mM。

14.粘性末端和平末端 DNA 片段的连接方法：

粘性末端 DNA 片段的连接：DNA 连接酶可以催化外源 DNA 分子和载体分子之间发生连接作用。但是由限制酶切产生的具有粘性末端的载体 DNA 分子，在连接反应中会发生自我环化作用。为了克服这一缺点，现在的载体一般能提供多克隆位点，可采用双酶切进行酶切。

平末端 DNA 片段的连接：不具有粘性末端的 DNA 分子也可以被连接起来。连接这种平末端 DNA 分子的方法有 4 种，（1）直接用 T4 DNA 连接酶连接；（2）先用末端核苷酸转移酶，给平末端 DNA 分子加上同聚物尾巴之后再用 DNA 连接酶进行连接；（3）用衔接物连

接平末端 DNA 分子；（4）DNA 接头连接法。

15.DNA 聚合酶（DNA polymerase）有哪些，主要的区别？

E.coli DNA 聚合酶 I ；Klenow 酶 ；T4 DNA 聚合酶 ；T7 DNA 聚合酶 ；Taq DNA 聚合酶 ；逆转录酶

主要区别：持续合成能力和外切酶活性不同。

T7 DNA 聚合酶的聚合能力很强，可连续添加数千个 dNTPs，而不从模板上掉下来。

其它几种 DNA 聚合酶只能连续添加 10 多个 dNTPs，就会从模板上解离下来。

16.制备标记的 DNA 探针的几种方法？

E.coli DNA 聚合酶 I 的缺刻平移法；T4 DNA 聚合酶的取代合成法；T7 DNA pol 的取代合成法；T4-PNP；逆转录酶 oligo(dT)引物标记法和随机引物标记法

17.探针（probe）：用来探知被测物存在的小 DNA 或 RNA 叫做探针。

18.Klenow 酶：*E.coli* DNA pol I 经枯草杆菌蛋白酶处理，获得 N 端 2/3 的大肽段，即为 Klenow 酶。

19.Klenow 酶的主要用途：

补平由限制酶酶切产生的 5'突出粘端；DNA 片段的同位素末端标记；合成 cDNA 第二链；双脱氧末端终止法测定 DNA 序列。

20.T7 DNA pol 的主要用途：

- ①以大分子量 DNA 为模板的合成，如 M13。
- ②将双链 DNA 的 5'或 3'突出粘端转变成平端；补平 5'突出粘端；切平 3'突出粘端。
- ③取代合成法标记 DNA 3'末端，制备探针。

21.Taq DNA 聚合酶的特点和用途：

良好的热稳定性；5'→3'聚合酶活性，对 dATP 有优先聚合活性；5'→3'外切酶活性；无 3'→5'外切酶活性。

用途：聚合酶链反应

22.T-A 克隆（T 载体克隆）：Taq 酶扩增的 PCR 产物，3'末端总是带有 1 个非模板依赖型的突出碱基，而这个碱基几乎总是 A，刚好与线性 T 载体 3'突出端的 T 配对，直接进行高效的连接和克隆，而无需限制性内切酶的酶切过程。

23.逆转录酶的特性和用途：

特性：5'→3'DNA 聚合酶活性；RNase H 活性：特异性水解 RNA-DNA 杂交链中的 RNA。

用途：以 RNA 为模板聚合 cDNA 第一链；双向外切 DNA-RNA 杂交链中的 RNA 链；制备同位素标记的 cDNA 探针。

24.S1 核酸酶的用途：

内切单链 DNA 或 RNA；内切带缺刻或缺口的双链 DNA 或 RNA。

S1 核酸酶可用于切掉 DNA 片段的单链突出末端产生平头末端、在双链 cDNA 合成时切除发夹环结构等。而且，S1 核酸酶作图法在测定杂交核酸分子(DNA:DNA 或 DNA:RNA)的杂

交程度、RNA 分子定位、确定真核基因中内含子的位置、内含子与外显子剪切位点的定位、转录起始位点与终止位点的确定中，都是十分有效的工具。

25.RNase A 的作用：

在分子克隆中，核糖核酸酶 A 的主要用途为：

① **DNA:RNA 杂交体中去除未杂交的 RNA 区。**

② **确定 RNA 或 DNA 中的单碱基突变的位置。**在 RNA:DNA 或 RNA:RNA 杂交体中，若存在单碱基错配，可用 RNAase 识别并切割。通过凝胶电泳分析切割产物的大小，即可确定错配的位置。

③ **RNA 检测：**即核糖核酸酶保护分析法(RNase protection assay)是近年来发展起来的一种检测 RNA 的杂交技术。其基本原理是利用单链 RNA 探针，与待测的 RNA 样品进行杂交形成 RNA:RNA 双链分子。由于核糖核酸酶可专一性地降解未杂交的单链 RNA，而双链受到保护不被降解，经凝胶电泳可以确定目的 RNA 的长度。

④ **降解 DNA 制备物中的 RNA 分子。**

26.RNase H 的主要用途：

与大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 和 DNA 连接酶一起参与 cDNA 克隆中第二条 DNA 互补链的合成。

27.TdT、碱性磷酸酶、T4-PNP 的作用：

TdT：

① **同聚物加尾：**给外源 DNA 片段、载体分子分别加上互补的同聚物尾，以使二者有效连接。

② **标记 DNA 片断的 3'端：**催化放射性、非放射性标记物掺入 DNA 片断的 3'端，如 ^{32}P 、Bio-11-dUTP。

碱性磷酸酶：防止 DNA 在重组中自身环化。

T4-PNP：使缺失 5'-P 末端的 DNA 发生磷酸化作用；DNA 片段的 5'末端同位素标记。

第三章 载体

1.载体(vector)：在基因工程操作中，能携带外源 DNA 进入受体细胞的 DNA 分子。

2.理想载体应具备的条件：

① 具有针对受体细胞的亲缘性或亲和性(可转移性)。

② 具有与受体细胞相适应的复制位点或整合位点。

③ 自身分子量较小，在寄主细胞中的拷贝数高(松弛型复制子)，具有较高的外源 DNA 载装能力；(低分子量的质粒通常拷贝数较多,容易转化，大于 15kb 时，成为转化效率制约因素)。

④ 具有多种单一的限制酶酶切位点，便于外源基因插入。

⑤ 具有合适的筛选标记。

⑥ 具有较好的安全性，不能任意转移。

3.克隆载体和表达载体的共同点和区别：

克隆载体：克隆一个基因或 DNA 片断，允许外源的 DNA 插入、储存、扩增。

表达载体：用于一个基因的蛋白表达，允许外源 DNA 的插入、储存、扩增和表达。

主要区别：1.目的 2.所含元件

4.质粒 (plasmid)：存在于许多细菌以及酵母菌等生物中，是细胞染色体外能够自主复制的很小的环状 DNA 分子。

5.质粒的基本特征：自主复制性；不相容性；可转移性；携带特殊的遗传标记

6.严紧型质粒 (Stringent)：这类质粒的复制由细胞内 DNA 聚合酶III介导，并被质粒上编码的蛋白因子正调控，由于这些蛋白因子极不稳定使得每个细胞只能复制少数几个质粒拷贝，一般把一个细胞内拷贝数少于 5 个的质粒称为严紧型质粒。

7.松弛型质粒 (Relaxed)：这类质粒的复制需要半衰期较长的 DNA 聚合酶 I、RNA 聚合酶及其他复制辅助蛋白因子，这类质粒在宿主细胞中一般可达到 30~50 个拷贝，所以称为松弛型质粒。

8.质粒的氯霉素扩增：当宿主细胞进入生长后期，加入氯霉素可以抑制宿主细胞蛋白质的生物合成，阻断宿主菌的大部分代谢途径，松弛型质粒就能利用丰富的原料及能量进行复制，最终每个细胞就能累积上千个 DNA 分子，把这种操作称为质粒的氯霉素扩增。

9.如何改造与构建基因工程质粒？

大于 20kb 的质粒很难导入受体细胞，且极不稳定。

①删除不必要的 DNA 区域，尽量缩小质粒的相对分子量，提高外源 DNA 的装载量

②灭活某些编码基因。灭活促进质粒在细菌种间转移的 *mob* 基因，杜绝重组质粒扩散污染环境，保证 DNA 重组实验的安全性。灭活对质粒复制产生负调控效应的基因，提高质粒的拷贝数。

③加入选择标记基因。最好有两种选择标记基因，并且在选择标记基因区内有合适的克隆位点。当外源 DNA 片段插入克隆位点后，标记基因失活，成为选择克隆子的依据。

④在选择标记基因内，引入人工合成的多种限制酶连续酶切位点的 DNA 短序列，即多克隆位点(multiple cloning sites, MCS)，也称多酶接头(polylinker)。同时删除重复的酶切位点，使其单一化。

⑤根据外源基因克隆的不同要求，分别加装特殊的基因表达调控元件，如启动子。

10.插入失活：在一个基因位点中插入外源 DNA 片段，从而使该基因活性丧失的现象叫插入失活。

11.多克隆位点(multiple cloning sites, MCS)：在选择标记基因内，引入人工合成的多种限制酶连续酶切位点的 DNA 短序列，也称多酶接头(polylinker)。

12.质粒的分类（根据功能和用途）：高拷贝质粒、低拷贝质粒、温敏质粒、测序质粒、整合质粒、穿梭质粒、表达质粒、探针质粒

13.α-互补 (alpha-complementation)：β-半乳糖苷酶基因产物不具酶活性，装配为四聚体后才有酶活。该蛋白质可分为两部分：α链和β链。前者负责四聚体装配，后者具β-半乳糖苷

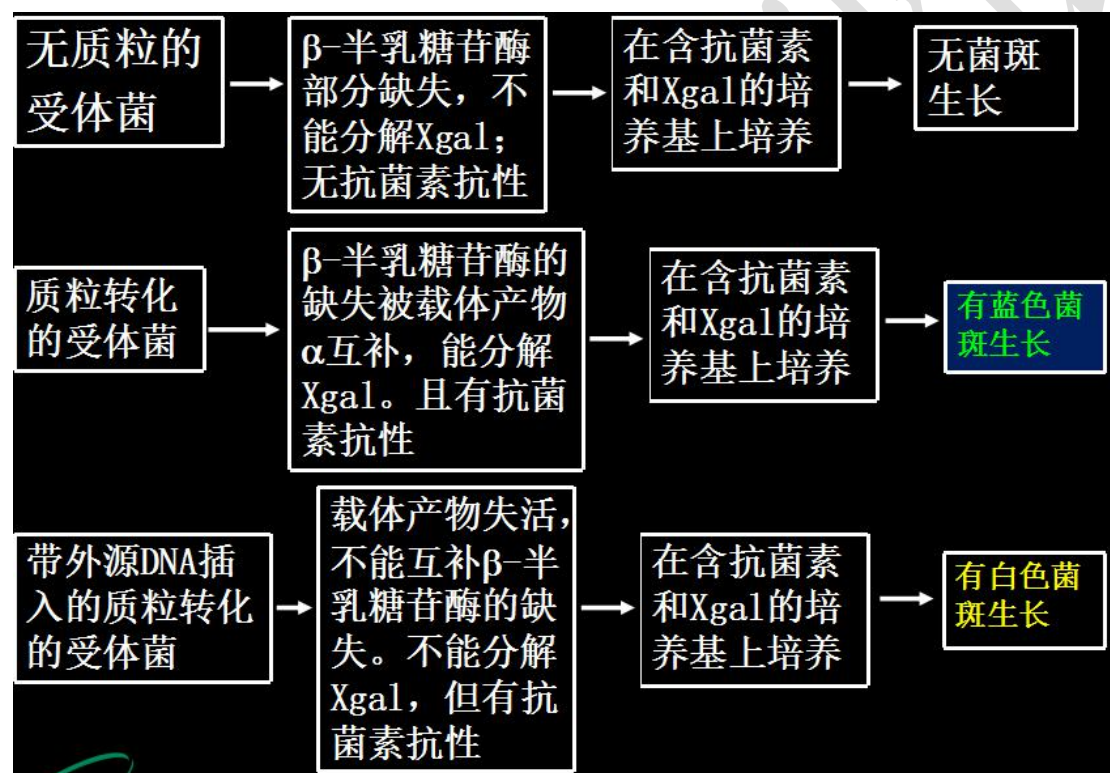
酶活性；只有当两者都存在时，才会表现出酶活性，该作用称之为 α -互补作用。

14.蓝白斑筛选的原理：

大肠杆菌 β -半乳糖苷酶可以和其底物 X-Gal 相互作用并且释放出一种蓝色物质，当该酶的 α -片段（ α -链）和 w-片段（ β 链）分开时就失去了这种显色的功能。

通常将缺失了部分 α -链的，仅编码 w 片段（ β 链）的 LacZ Δ M15 构建在 F 质粒上先转入大肠杆菌中，而将编码该酶 N 端 140 个氨基酸的 α -片段（ α -链）的 LacZ'基因插入到载体的多克隆位点的侧翼序列中。

当含有 LacZ'基因的载体导入到这类寄主细胞中时，载体编码的 α -片段就能和寄主编码的 w 片段发生互补并具有了对底物 X-gal 的作用功能（发生显色反应），这种现象被称为是 α -互补（alpha-complementation）.将这种筛选方式称为蓝白斑筛选）



15.穿梭质粒(shuttle plasmid)：含有两个亲缘关系不同的复制子结构、相应的选择标记基因，能在两种不同种属的受体细胞中复制并被检测。克隆的外源基因可不用更换载体、直接从一种受体菌转入另一种受体菌中复制并遗传。

16.探针质粒：用于筛选表达调控元件，如启动子、终止子。通常装有一个可定量检测表达程度的报告基因（如抗生素抗性基因），但缺少相应的启动子或终止子，因此本身不能表达报告基因。只有含启动子或终止子的外源 DNA 插入载体的合适位点，报告基因才能表达，表达量的高低直接反映表达调控元件的强弱。

17.cos 位点(cohesive-end site)： λ -DNA 两端各有 12 个核苷酸组成的 5'突出粘性末端，二者的核苷酸序列互补，进入宿主细胞后，粘性末端连接成环状 DNA 分子，此末端称为 cos 位

点。

18. λ -DNA 载体的构建:

野生型 λ 噬菌体能包装原 λ -DNA 长度的 75-105% (37-51kb)，本身长度为 48.5kb，只有当插入的外源 DNA 片段 ≤ 2.5 kb 时，才能被包装成有感染力的噬菌体颗粒。

①切去非必须区段，在不影响其功能的前提下，尽量缩短野生型 λ -DNA 的长度，提高外源 DNA 的装载量；

②删除重复的酶切位点，引入单一的酶切位点

③引入合适的选择标记基因，便于重组噬菌体的检测。

④引入突变，灭活一些与裂解周期有关的基因，使 λ -DNA 载体只能在特殊的条件下感染裂解宿主菌，以避免可能出现的生物污染。基因工程实验中使用的受体是具有琥珀型突变体校正功能的菌株。

⑤建立体外包装系统。重组 λ -DNA 需在体外人工包装成有感染力的噬菌体重组颗粒，方可高效导入受体细胞。

19. λ -DNA 作为载体的特点:

①可在体外包装成噬菌体颗粒，高效感染 E.coli。

②装载容量大，最大 25 kb。

③筛选方便。

④提取比质粒简便。

⑤适合外源基因的克隆和扩增，但不适合其表达。

20. 常用的动植物病毒载体有哪些?

应用动物病毒弱毒或无毒株: 腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒、改造的猴肾病毒 SV40、痘苗病毒、疱疹病毒、昆虫杆状病毒

用于构建克隆载体的植物病毒:

双链 DNA 病毒: 如花椰菜花叶病毒(CaMV)

单链 DNA 病毒: 如番茄金黄花叶病毒(TGMV)

RNA 病毒: 如雀麦草花叶病毒(TMV)

21. 考斯质粒(Cosmid): 是一类人工构建的含有 λ -DNA 的 cos 序列、包装相关序列 + pBR322 质粒的复制子、克隆位点、标记基因的特殊类型载体; 也叫粘粒。

24. 噬菌粒(phagemid): 是一类人工构建的含单链噬菌体包装序列、复制子和质粒复制子、克隆位点、标记基因的特殊类型载体。

27. 人工染色体载体(artificial chromosome): 将细菌接合因子或酵母染色体的复制区、分配区、稳定区与质粒组装在一起, 即构成人工染色体载体。

第四章 目的基因的克隆

1. 基因文库构建的两种方法: 鸟枪法和 cDNA 法

2. 目的基因克隆的策略:

①构建感兴趣的生物个体的基因文库

②利用 PCR 扩增技术或化学合成法体外直接合成目的基因，然后将之克隆表达。

3.基因文库 (gene library or gene bank)：包含特定生物个体或特定环境样品全部基因的克隆集合。

4.基因组文库和 cDNA 文库的区别：

	构建方法	材料来源	所含基因
基因组文库	鸟枪法构建	材料来自染色体 DNA	含全部基因
cDNA 文库	cDNA 法构建	材料来自 mRNA	含全部蛋白质编码的 结构基因

5.基因文库的构建过程：

①基因组 DNA 的制备

②基因组 DNA 的切割

③载体和受体的选择

④基因组 DNA 与载体的连接

⑤转化受体细胞

⑥筛选含有目的基因的重组子

6.鸟枪法及其特点：

构建好的基因组文库，再用分子杂交等技术去钓取目的基因克隆的方法，称为**鸟枪法**或散弹射击法。

优点：操作简便

缺点：工作量大；具有一定的盲目性

7.cDNA 文库的优点、局限性和构建过程（问答题）

优点：

①**cDNA 文库以 mRNA 为材料，特别适用于某些 RNA 病毒，例如流感病毒；**因其不通过 DNA 中间体，所以研究其唯一的方法就是 cDNA 克隆。

②**cDNA 基因文库的筛选比较简单易行。**cDNA 文库所含的克隆数是基因文库的十分之一，或更少。

③由于每一个 cDNA 克隆都含有一种 mRNA 序列，这样在目的基因的选择中出现假阳性的概率比较低，而相比之下基因组文库克隆的选择较复杂，假阳性的概率就高。

④**cDNA 克隆可用于在细菌中能进行表达的基因克隆，直接应用于基因工程操作。**

原因是：高等真核生物与原核生物在结构组成上的最大区别是前者含有内含子间隔序列，而后者没有。通过基因文库中筛选的目的基因难以在原核生物中表达。而 cDNA 是经过转录

后得来的其内含子部分已被删除。

⑤**cDNA 克隆还可以用于真核细胞 mRNA 的结构和功能的研究。**一种特异的 mRNA 在细胞中往往占很小的比例，难以直接研究其序列、结构和功能。一般是通过比较基因组进行确定。

缺点：

①受材料来源的影响

②遗传信息量有限

③构建的 cDNA 文库中高丰度的（含量） mRNA 含量比低丰度的易得和分离，现在构建的 cDNA 基本上是高丰度的而低丰度的很少

构建过程：

①**总 RNA 提取：**商业化试剂盒。

②**mRNA 的分离纯化：**商业化 oligo(dT)纤维素柱。

利用 mRNA 含 polyA 尾，将其从总 RNA 中分离纯化，mRNA 只占总 RNA 的 1-2%。

哺乳动物 mRNA 长度为 0.5-8.0kb，大部分为 1.5-2.0kb。

③**cDNA 第一链的合成**

④**cDNA 第二链的合成：**自身引导法、置换合成法、引物合成法

8.PCR 引物设计的原则/注意事项：

①序列应位于高度保守区,与非扩增区无同源序列。

②引物长度以 15-40 bp 为宜。

③碱基尽可能随机分布,G+C 占 50-60%。

④引物内部避免形成二级结构。

⑤两引物间避免有互补序列。

⑥引物 3'端为关键碱基；5'端无严格限制。

⑦**RT-PCR 引物设计特别注意：**跨越两个外显子

⑧两个引物的 Tm（解链温度）相近。

9.不对称 PCR：是采用不等量的一对引物产生大量的单链 DNA 的体外扩增技术。

10.反向 PCR：是用反向的互补引物来扩增两引物以外的 DNA 片段，对某个已知 DNA 片段两侧的未知序列进行扩增。

11.多重 PCR：在同一 PCR 反应体系里加上二对以上引物，同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应。

12.锚定 PCR：用于扩增已知一端序列的目的 DNA。在未知序列一端添加一同聚物尾（polydG),与同聚物尾配对的 3'锚定引物（带有限制性内切位点 polydC)一起作 PCR 扩增。

13.实时荧光定量 PCR（real-time PCR):用荧光染料标记的特异性探针,对 PCR 产物进行标记跟踪,实时在线监控反应过程,结合相应软件可以对结果进行分析,计算待测样品的初始模板量。

第五章 基因工程的受体、操作过程

1.基因工程中，主要的宿主系统（受体系统）：大肠杆菌系统、枯草芽孢杆菌系统、酿酒酵母系统、丝状真菌系统、杆状病毒系统、动物细胞

2.DNA 的体外重组，不同的粘性末端如何连接？

可将其转化为平末端后再进行连接。

3.DNA 的体外重组，人工粘性末端的连接策略？



4.什么是 DNA 体外重组的重组率？提高重组率的方法？

重组率=含外源 DNA 的重组分子数/载体分子总数

提高重组率的方法：

- ①提高外源 DNA 片段与载体的分子比：5:1-10:1；
- ②载体 DNA 分子在连接前去除 5'-P；
- ③加装同聚尾。

5.转化(transformation)：外源 DNA 导入特定受体（宿主）细胞，并使之繁殖和表达的操作。

6.感受态(competent)：受体(宿主)细胞经过一些理化或生物学方法处理后，细胞膜的通透性发生暂时性的改变，成为能允许外源 DNA 进入的一种生理状态。

7.转染(transfection)：噬菌体或病毒通过感染方式将外来 DNA 引入宿主细胞，并导致宿主细胞遗传性状改变的过程称为转染。

8.重组 DNA 分子转化原核细胞的方法(问答)：

①**Ca²⁺诱导转化法**：Ca²⁺与细菌外膜磷脂在低温下形成液晶结构，后者经热脉冲发生收缩作用，使细胞膜出现空隙，细菌细胞此时的状态称为感受态。

适用于革兰氏阴性菌（如 E.coli）

②**原生质体转化法**：革兰氏阳性菌（如枯草杆菌、链霉菌等）接纳外源 DNA 的主要屏障是细胞壁，常采用原生质体（细胞去壁后形态）转化法。

也适用于酵母、真菌、植物细胞。

③**λ噬菌体 DNA 的转染**：必须先在体外将重组λ-DNA 包装成有感染力的重组噬菌体颗粒。用于体外包装的蛋白已商品化，通常为互补两部分：一部分缺少 E 组份，另一部分缺少 D 组份。当这两部分同时与重组λ-DNA 混合时，包装才能有效进行。

④**电穿孔转化法**：将重组 DNA 加入电穿孔转化仪的样品池，两极施加瞬时高压电场。在强大电场作用下，细菌细胞壁和细胞膜产生缝隙，重组 DNA 分子进入细胞。

几乎对所有含细胞壁结构的细胞有效。

⑤**三亲本杂交法**：被转化的受体菌、含重组 DNA 分子的供体菌、含广泛宿主辅助质粒的辅助菌共培养，在辅助质粒的作用下，重组 DNA 分子被转移到受体菌细胞内。

当重组 DNA 分子不能直接转化受体菌时，可采用三亲本杂交转化法。

9. 重组 DNA 分子导入植物细胞的方法（问答）：

①**根癌农杆菌介导的 Ti 质粒转化法**：根癌农杆菌通过侵染植物伤口进入细胞后，将 T-DNA 插入植物基因组中，随其复制而复制。用携带外源基因的 Ti 质粒转化植物原生质体，外源 DNA 与植物染色体 DNA 整合，通过原生质体的培养分化成愈伤组织，最后发育成具有新性状的完整植株---转基因植物。

②**植物病毒介导的转染**：病毒载体能将外源基因导入植物所有组织和细胞中，且不受单子叶或双子叶的限制。

③**电穿孔转化法**：将重组 DNA 加入植物细胞原生质体中，在 200-600V/cm 电场中处理若干秒，然后将原生质体在组织培养基中生长 1-2w，再生出完整植株。

④**基因枪转化法**：又称微弹轰击法，将外源 DNA 包裹在微小的钨粉或金粉颗粒的表面，借助高压动力射入受体细胞或组织，整合到植物基因组中并得以表达。

⑤**激光微束穿孔法**：利用直径小、能量高的激光微束可引起细胞膜可逆性穿孔的原理，在荧光显微镜下用激光处理细胞，处于细胞周围的重组 DNA 随之进入细胞。

最适于活细胞中线粒体和叶绿体等细胞器的基因转移。

⑥**多聚物介导法**：聚乙二醇(PEG)、多聚赖氨酸、多聚鸟氨酸等是协助 DNA 转移的常用多聚物，以 PEG 应用最广。这些多聚物同二价阳离子和 DNA 混合，可在原生质体表面形成颗粒沉淀，促使 DNA 进入细胞内。

⑦**花粉管通道法**：授粉后注射外源 DNA，利用植物在开花、受精过程中形成的花粉管通道，将外源 DNA 导入受精卵细胞，整合到基因组中，随受精卵发育而成为转基因植物。

10. 重组 DNA 分子导入哺乳动物细胞的方法：

①**DEAE-葡聚糖转染法**：DEAE-dextran（二乙胺乙基葡聚糖）是一种高分子多聚阳离子试剂，能促进哺乳动物细胞捕获外源 DNA。

②**磷酸钙转染法**：哺乳动物细胞能捕获粘附在细胞表面的 DNA-磷酸钙沉淀，使 DNA 进入细胞。将 DNA 和 CaCl_2 溶液混合，然后缓慢滴入磷酸盐缓冲液 PBS 中，形成 DNA-磷酸钙沉淀，粘附到细胞膜并通过胞饮进入细胞。

③**脂质体介导法**：脂质体是人工构建的、由磷脂双分子层组成的膜状结构，将外源 DNA 包裹其中，通过脂质体与细胞膜接触，可将外源 DNA 导入受体细胞。

④**显微注射法(microinjection)**：鉴于哺乳动物细胞便于注射的特性，常利用显微注射法，直接把外源 DNA 注射到宿主细胞核里，使其整合到染色体上。

⑤**病毒颗粒转染法**：

病毒直接感染受体细胞，目的基因随病毒 DNA 整合到其染色体 DNA 上；病毒基因组为缺陷型，需辅助病毒一起感染受体细胞；病毒基因组为缺陷型，但受体细胞基因组中整合了病毒缺失的基因，无需辅助病毒。

⑥**电穿孔法**

11.什么是转化率，影响转化率的因素有哪些？

转化率是衡量转化效率的重要指标。

转化率=1mg 载体 DNA 进入受体细胞的分子数。

在一般的转化实验规模下，每个受体细胞最多只能接受 1 个载体分子，因此转化率的定义也可表征为：1mg 载体 DNA 转化后，受体细胞接纳 DNA 的个数，即克隆数。

影响因素：

①载体及 DNA 重组子方面：载体本身的性质；载体的空间构象；插入片段的大小

②受体细胞方面：受体细胞必须与载体匹配

③转化方法方面：受体细胞的预处理；供受体的比例；转化方法

12.根据载体标记筛选转化子的几种方法

①**抗药性筛选法**：可区分转化子与非转化子、重组子与非重组子。

②**营养缺陷型筛选法**：可区分转化子与非转化子，一般不能区分重组子与非重组子。

③**显色筛选法**：可区分转化子与非转化子、重组子与非重组子。

13.标志补救：当宿主细胞存在某种基因及其表达产物的缺陷时，可采用此方法筛选重组体。即在载体 DNA 分子中插入相应的缺陷基因，如宿主细胞重新获得缺陷基因的表达产物，则说明该细胞中带有重组体。

14.依据目的基因的序列检测筛选转化子的几种方法（问答）：

①**DNA 电泳直接检测**

直接电泳检测法：从转化后的菌体克隆中分离质粒，电泳比较其分子量。

利用有插入片段的重组载体的分子量比野生型载体分子量大。

②**限制性酶切图谱法**：区分重组子与非重组子、鉴定目的重组子。

提取转化子 DNA→用合适的限制酶酶切→琼脂糖凝胶电泳→获得酶切图谱→如酶切片段数量和大小同预期一致，则可能是目的重组子。

③**分子杂交法**：根据目的基因序列设计并合成探针，以此筛选目的重组子。

④**PCR 法**：根据目的基因的序列，设计合成上、下游引物，以待鉴定克隆的 DNA 为模板，进行扩增，若获得特异性 DNA 片段，表明其含有目的基因。

⑤**DNA 序列测定**：是精确鉴定目的基因的重要手段。采用 Sanger 发明的双脱氧末端终止法。

15.根据外源基因产物的检测来筛选转化子的方法：

蛋白质生物功能测定法：DNA 结合蛋白编码基因的鉴定

蛋白质生物结构鉴定法：放射免疫原位杂交鉴定、免疫沉淀鉴定

第六章 大肠杆菌基因工程

1.*E.coli* 表达外源基因的优势和劣势（大肠杆菌作为基因工程受体菌的优缺点是什么？）

优势：

- ①全基因组已测序，共有 4405 个开放阅读框架，大部分基因生物学功能已鉴定。
- ②基因克隆表达系统成熟完善。
- ③繁殖迅速、培养简单、操作方便、遗传稳定。
- ④被美国 FDA 批准为安全的基因工程受体生物。

劣势：

- ①缺乏对真核生物蛋白质的复性功能，表达产物多以无活性的包涵体形式存在。
- ②缺乏对真核生物蛋白质的翻译后加工修饰系统，如糖基化、磷酸化。
- ③内源性蛋白酶易降解空间构象不正确的异源蛋白，造成表达产物不稳定。
- ④细胞周质内含有种类繁多的内毒素，痕量内毒素即可导致人体热原反应。

2.外源基因在 *E.coli* 中高效表达的原理（问答）：

①**强化蛋白质生物合成**：启动子（*E.coli* 启动子）、终止子、核糖体结合位点、密码子、质粒拷贝数

②**抑制蛋白质产物降解**

③**恢复蛋白质特异性空间构象**

3.强化外源蛋白质在 *E.coli* 中的生物合成，从哪几个方面入手？

启动子、终止子、核糖体结合位点、密码子、质粒拷贝数

4.**启动子(promoter)**：位于结构基因上游，能被 RNA 聚合酶识别、结合并启动基因转录的一段 DNA 序列，长 40-60bp。

5.启动子如何筛选？

用同位素 ^{32}P 标记 ATP，测定从 ATP 转移到半乳糖的 ^{32}P 的放射性强度，可推算 galK 表达的半乳糖激酶的量，由此比较启动子的强弱。

采用鸟枪法策略，将合适大小的 DNA 片段克隆到启动子探针质粒 pKO1 上，受体细胞染色

体 DNA 上的 galE、galT 与质粒上报告基因 galk 的表达产物联合作用, 可将培养基中的半乳糖酵解成红色素物质。

6.为什么要用可控性的启动子?

- ①外源基因的全程高效表达, 会对 E.coli 的生理生化过程造成不利影响。
- ②外源基因持续高效表达的重组质粒, 在细胞若干次分裂后, 会部分甚至全部丢失, 导致重组菌不稳定。

7.最佳启动子的具备条件:

- ①必须是强启动子, 能使外源基因表达量达到细胞总蛋白的 10-30%以上。
- ②应呈现低水平的基础转录。
- ③应是诱导型的, 可通过简单方式、使用廉价诱导物诱导, 如温度诱导、IPTG 诱导。

8.为什么要强化转录终止, 防止转录过头的策略是什么?

强化转录终止的必要性: 外源基因在强启动子控制下表达, 易发生转录过头现象, RNA 聚合酶滑过终止子, 继续转录邻近序列, 形成长短不一的 mRNA 混合物。过长转录物的产生会影响外源基因的表达。

防止转录过头策略: 采用强终止子、二聚体终止子串联的特殊结构

9.核糖体结合位点(ribosomal binding site, RBS): mRNA 的起始 AUG 上游约 8~13 核苷酸处. 存在一段由 4~9 个核苷酸组成的共有序列-AGGAGG-, 可被 16SrRNA 通过碱基互补精确识别。

10.Shine-Dalgarno (SD) 序列: 位于翻译起始密码子上游的 6-8 个核苷酸序列: 5'-UAAGGAGG-3'。

11.RBS 对外源基因表达的影响包括哪几个方面?

SD 序列、翻译起始密码子、SD 序列与起始密码子之间距离、SD 序列与起始密码子之间序列、起始密码子后续若干密码子

12.PlacUV5 启动子与 Plac 启动子的区别是什么?

Plac UV5 含有一对突变碱基, 活性比野生型 Plac 更强, 而且对葡萄糖及分解代谢产物的阻遏作用不敏感, 但仍会被受体细胞中的 Lac 阻遏蛋白阻遏, 因此可以用乳糖或 IPTG 诱导。

13.怎样纠正大肠杆菌对外源基因密码子的偏爱性?

外源基因全合成、同步表达相关 tRNA 编码基因

14.大肠杆菌基因工程中, 异源蛋白的表达有哪些类型?

包涵体型异源蛋白、分泌型异源蛋白、融合型异源蛋白、寡聚型异源蛋白、整合型异源蛋白

15.包涵体(Inclusion Bodies, IB): E.coli 表达的蛋白质在细胞内凝集, 形成无活性、不溶于水的固体颗粒, 称为包涵体(Inclusion Bodies, IB)。

16.包涵体表达形式的优缺点:

优点:

- ①简化表达产物的分离操作
- ②保持表达产物的结构稳定

缺点:

表达的目的蛋白无生物学活性, 必须通过有效的体外复性活化, 才能获得正确空间构象。

17.蛋白质以分泌形式表达的优缺点:

优点:

- ①目的蛋白稳定性高
- ②目的蛋白易于分离
- ③目的蛋白末端完整

缺点:

①E.coli 的蛋白分泌机制不健全，真核基因很难在 E.coli 中分泌型表达。

②少数外源基因即使能分泌表达，表达率也比包涵体方式低得多。

18.蛋白质融合型表达的优缺点：

优点：

- ①目的蛋白稳定性高
- ②目的蛋白易于分离
- ③目的蛋白表达率高
- ④目的蛋白溶解性好

缺点：

目的蛋白需要回收

19.融合型蛋白表达系统的构建原则：

- ①受体基因能高效表达，表达产物可通过亲和层析纯化。
- ②外源基因应装在受体基因下游，为融合蛋白提供终止密码子。
- ③两基因拼接位点处的序列设计十分重要，直接决定融合蛋白的裂解工艺。
- ④两基因应保持一致的翻译阅读框架，否则后面的多肽链移码。

20.从纯化的融合蛋白分子中回收外源蛋白的方法？（融合蛋白断裂的方法有哪几种？）

化学断裂法、酶促裂解法

21.什么是蛋白质的寡聚型表达？优缺点？

寡聚型表达：构建寡聚串联型异源蛋白表达载体，将多拷贝外源基因克隆在一个低拷贝质粒上，以取代单拷贝外源基因在高拷贝载体上表达。

优点：

- ①目的蛋白高效表达
- ①稳定表达小分子短肽

缺点：

目的产物回收困难

22.整合型异源蛋白表达的优缺点和策略：

优点：目的基因稳定表达

缺点：目的基因表达率低

策略：将外源基因直接整合在受体细胞染色体 DNA 的特定位置上，使之成为染色体 DNA 的组成部分，增加其稳定性。

23.工程菌质粒不稳定性的表现形式和机制是什么？有哪些改进策略？

表现形式：

- ①结构不稳定性：重组 DNA 分子上某一区域缺失、重排，导致其生物学功能丧失。
- ②分配不稳定性：整个重组 DNA 分子从受体细胞中逃逸。

机制：

- ①受体细胞中的限制修饰系统对外源 DNA 的降解。
- ②外源基因的高效表达严重干扰受体细胞正常的生长代谢。
- ③受体细胞的内源性转座元件促进重组 DNA 的缺失、重排。
- ③重组质粒在受体细胞分裂时的不均匀分配。

改进策略：

- ①改进载体-受体系统
- ③施加选择压力

③控制目的基因的过量表达

③优化基因工程菌的培养工艺

24.质粒的宏观逃逸率：当含有重组质粒的工程菌在非选择性条件下生长时，培养系统中一部分细胞不再携带重组质粒，这些空载细胞数与总细胞数之比称为重组质粒的宏观逃逸率。

25.生产人胰岛素大肠杆菌工程菌的构建策略有哪些？

①A 链和 B 链分别表达法

②人胰岛素原表达法

③A 链和 B 链同时表达法

④分泌型表达法

第七章 酵母基因工程

1.酵母菌表达外源基因的优缺点：

优点：

①全基因组测序，基因表达调控机理清楚，遗传操作简便。是最简单的真核模式生物。

②具有原核生物无法比拟的真核生物蛋白翻译后加工修饰系统。

③能将外源基因表达产物分泌至培养基中。

④大规模发酵工艺简单、成本低廉。

⑤不含特异性病毒、不产毒素，被美国 FDA 认定为安全的基因工程受体系统。

缺点：表达产物的糖基化位点和结构特点与高等真核生物有差距。

2.用于外源基因表达的酵母宿主菌有哪几种？

①酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)

②甲醇酵母

③其它酵母：已有 60 多种酵母菌建立了转化系统。

目前已广泛用于外源基因表达和研究的酵母菌包括：

酵母属 如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

克鲁维酵母属 如乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)

毕赤酵母属 如巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)

裂殖酵母属 如非洲酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)

汉逊酵母属 如多态汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)

3.外源基因转化酵母菌的方法有哪些？

①原生质体转化法：在 Ca^{2+} 和 PEG 存在下，转化子可达原生质体总数的 1-2%。

②碱金属离子介导转化法：酵母菌完整细胞经碱金属离子(如 Li^+)处理、在 PEG 存在下和热休克后，可高效吸收质粒 DNA。

③电击转化法：酵母菌完整细胞或原生质体可在电击下吸收质粒 DNA。

4.比较酿酒酵母和甲醇酵母表达系统的优缺点。（问答）

酿酒酵母表达系统的缺陷：

①表达水平普遍不高：

表达载体传代不稳定 (YEp、YRp)

所采用的强启动子调控不严谨

不能利用简单的无机培养基进行高密度发酵

② 表达产物过糖基化。

甲醇酵母表达系统的优点：

优点：

- ①AOX1 启动子是目前最强、调控机理最严格的启动子之一，甲醇可严格调控外源基因表达。
- ②表达水平高。
- ③产物可翻译后修饰：糖基化、磷酸化、脂酰化。

缺点：

- ①不能满足结构要求严格的糖基化。
- ③载体在受体细胞有丝分裂时显示出不稳定性。

5.为什么说多型汉逊酵母表达系统有可能比巴斯德毕赤酵母表达系统更优越？

因为多型汉逊酵母表达系统除具有巴斯德毕赤酵母表达系统的所有优点外，还允许重组分子以多拷贝的形式整合在染色体上，从而使外源基因的表达水平更高。

6.对作为表达目标蛋白宿主的酵母细胞有什么基本要求？

- ①安全无毒，没有致病性。
- ②遗传背景清楚，容易进行遗传操作。
- ③外源 DNA 容易导入宿主细胞，转化效率高。
- ④培养条件简单，容易进行高密度发酵。
- ⑤有较强的蛋白质分泌能力。
- ⑥有类似高等真核生物的蛋白质翻译后的修饰加工能力。

第九章 高等植物基因工程

1.植物基因工程的受体系统有哪些？

- ①植物组织受体系统：病毒或质粒的 DNA 转移到受伤的组织---愈伤组织---完整植株
- ②植物细胞原生质体系统
- ③生殖细胞受体系统：以植物生殖细胞如：花粉细胞、卵细胞为受体细胞进行基因转化的系统。
- ④叶绿体转化系统：外源基因可以在叶绿体中稳定表达。

2.Ti 质粒介导的植物基因转移，野生型 Ti 质粒如何改造？

- ①除去 T-DNA 上的生长素（tms）和分裂素（tmr）生物合成基因，因为大量的生长素和分裂素会抑止细胞再生长为整株植物；
- ②除去 T-DNA 上的有机碱生物合成基因（tmt）；因为有机碱的合成大量消耗精氨酸和谷氨酸，影响植物细胞的生长；
- ③除去 Ti 质粒上的其它非必需序列，最大限度地缩短载体的长度；
- ④安装大肠杆菌复制子，使其能在大肠杆菌中复制，以利于克隆操作；
- ⑤安装植物细胞的筛选标记，如 neor（新霉素磷酸转移酶）基因，使用植物基因的启动子和 polyA 化信号序列；
- ⑥安装多聚人工接头以利于外源基因的克隆。

3.农杆菌介导的 Ti 质粒转化法的优缺点

优点：

- ①成本低，转化率高；
- ②构建的转基因植株再生效率高；
- ③外源基因在整合入植物基因组中后，不发生修饰改变（如基因重排）。

缺点：

①转入的外源基因拷贝数低，大多数为单拷贝。

②宿主局限性，主要用于双子叶植物的遗传转化。

农杆菌极少能感染单子叶植物，一些重要的农作物（如水稻、小麦、玉米等）对其不敏感。

4.两种常用的植物病毒载体

花椰菜花叶病毒(CaMV): 双链 DNA 病毒

①即使切除基因组中的非必需序列，其承载外源基因的能力还是有限，只能插入很小的片段。

②宿主范围非常窄，主要是芸苔属植物，如芜菁、甘蓝、花椰菜等。

双生病毒(Geminivirus): 单链 DNA 病毒

①宿主范围广，是一种很有潜力的植物病毒载体，可侵染重要的作物（如玉米、小麦）。

②可引起破坏性侵染，需严格防护，防止载体从宿主中逃逸，侵染自然中的植物。

5.外源基因转化植物细胞的方法（结合第五章内容）

①基因枪法（微粒轰击法）

②电击法

③脂质体介导法

④花粉管导入法

⑤化学刺激法

⑥显微注射法

⑦微激光束法

6.什么是报告基因(reporter gene)，包括哪些种？

报告基因：指编码产物能够被快速测定，常用来判断外源基因是否已经成功导入寄主细胞并能检测其表达活性的一类特殊用途的基因。

包括：

①抗性基因：抗生素抗性基因、抗除草剂基因、

②显色或发光报告基因

7.基因沉默（gene silencing）：由于转基因的拷贝数和构型、环境条件和发育因子，以及DNA的甲基化等作用导致基因失活的现象。

8.导致基因沉默的原因和提高外源基因表达水平的策略（问答）

重复序列诱发基因沉默：

转基因植物中，外源基因往往以多拷贝的串联方式整合在寄主的基因组内，但外源基因拷贝数的增加并不意味着表达水平的提高，反而经常导致外源基因的失活，这与重复序列间的异位配对和DNA的甲基化有关。

重复序列诱导的DNA甲基化是诱导外源基因启动子区域或者5'端非编码区甲基化的主要因素，一般情况下一个位点插入的外源基因拷贝数越多，失活的程度越高，解决方案：

①对外源基因及启动子进行改造，使其与植物基因组间有很短的同源序列，避免异位配对的发生，

②使用农杆菌法则可以在一定程度上避免多拷贝基因的插入。

③在筛选作为育种材料的转基因植株时，应尽量选择单拷贝插入的个体。

策略：

①转化方法的影响

②使用信号肽

③选择强启动子和诱导型启动子

④强终止子

⑤消除甲基化的影响

⑥使用植物偏爱的密码子

- ⑦使用 MAR 序列
- ⑧使用增强子
- ⑨外源基因的修饰和改造
- ⑩在载体序列上加 增强翻译序列和核糖体结合位点
- ⑪叶绿体作为一个核外遗传的物质的载体，基因转录和翻译机制类似于原核生物，为原核基因在高等植物中直接表达提供了场所。
- ⑫使用一些病毒编码蛋白
- ⑬在有性生殖后代中筛选单拷贝植株

第十章 基因诊断和基因治疗

1.基因诊断 (gene diagnosis) :

狭义:在基因 (DNA 或 RNA)水平, 用 PCR、核酸杂交、基因重组、基因芯片等各种分子生物学技术检测特定基因存在与否、结构变异和表达状态的过程, 对疾病作出诊断。

广义: 应用于 DNA 指纹分析、个体识别、亲子鉴定等司法鉴定, 动植物检疫以及转基因动植物中阳性基因的检测等方面。

2.基因诊断常用的技术方法有哪些?

- ①核酸分子杂交
- ②PCR 及相关技术
- ③核酸序列分析技术
- ④限制性酶谱分析技术
- ⑤基因芯片

3.基因治疗 (gene therapy) :

经典概念(狭义概念): 将具有正常功能的基因置换或增补患者体内缺陷的基因, 从而达到治疗疾病的目的。

广义概念: 将某些遗传物质转移至患者体内, 使其在体内表达, 或者在基因水平改变基因的表达, 最终达到治疗某种疾病的方法, 均称之为基因治疗。

4.基因治疗的基本策略 (问答)

①基因置换

定义: 指将特定的目的基因导入特定细胞, 通过定位重组, 以导入的正常基因置换基因组内原有的缺陷基因。

目的: 将缺陷基因的异常序列进行桥正。对缺陷基因的缺陷部位进行精确的原位修复, 不涉及基因组结构的任何改变。

②基因增补

定义: 通过导入外源基因使靶细胞表达其本身不表达的基因。

类型:

A:在有缺陷基因的细胞中导入相应的正常基因, 补偿缺陷基因的功能而细胞内的缺陷基因并未除去;

B:向靶细胞中导入靶细胞本来不表达的基因, 利用其表达产物达到治疗疾病的目的。

③基因干预

采用特定的方式抑制某个基因的表达, 或者通过破坏某个基因的结构而使之不能表达, 以达到治疗疾病的目的。(区别于抗生素的基因水平调节)

④“自杀基因”

自杀基因又称前体药物酶转化基因，这种基因导入受体细胞后可产生一种酶，它可将原来无细胞毒性或低毒药物前体转化为细胞毒性物质，将细胞本身杀死，这种基因被称为“自杀基因”，可以通过整合位点等选择目标细胞。

⑤免疫基因治疗

通过将抗癌免疫增强细胞因子或 MHC 基因导入肿瘤组织，以增强肿瘤微环境中的抗癌免疫反应。

⑥耐药基因治疗

定义：化疗过程中，把产生抗药物毒性的基因导入患者体内，从而使患者能耐受更大剂量的化疗。

基因治疗的基本方法/过程/步骤（问答）

①治疗性基因的获得

在了解疾病发生的分子机制基础上，选择对疾病有治疗作用的特定基因。

治疗性基因的获得有赖于对疾病病因和病理机制的深入研究。

②基因载体的选择

基因治疗关键步骤之一，是将治疗基因高效转移入患者体内、并能调控其适度表达。

常用的载体有两类：病毒载体和非病毒载体。

病毒载体：逆转录病毒载体，腺病毒载体，

腺相关病毒载体等；

非病毒载体：脂质体，受体介导等理化方法将治疗基因转移入患者体内。

③靶细胞的选择

体细胞

只限于某一体细胞的基因的改变

限于个体当代

生殖细胞

对缺陷的生殖细胞进行矫正

当代及子代

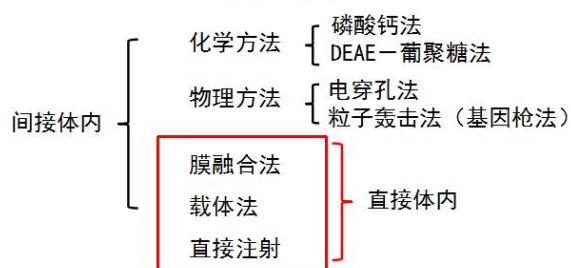
对生殖细胞进行基因治疗，可使该生殖细胞分化发育成长的个体及其后代均具有正常基因，理论上讲是根治遗传病的理想方法。

但由于涉及安全性和伦理学问题，目前基因治疗中禁止使用生殖细胞作为靶细胞。

④基因转移

导入方法：直接体内疗法

间接体内疗法



⑤治疗基因的受控表达、转染细胞的筛选检测

时间：在患者需要实施治疗时才表达，而平时不需要进行治疗时则处于关闭状态

空间：限制治疗基因只在靶细胞中表达，避免治疗基因指导合成的蛋白质干扰非靶细胞的正常生活，产生毒副作用

表达水平：既要考虑治疗效果，又要避免副作用

⑥体外细胞回输体内

基因修饰的淋巴细胞以静脉注射的方式回输到血液中；

将皮肤成纤维细胞以细胞胶原悬液注射至患者皮下组织；

采用自体骨髓移植的方法输入造血细胞；

或以导管技术将血管内皮细胞定位输入血管等

DemonYukiku