

# 核酸

2024年6月8日 16:38

## 一、概念

**核酸：**以核苷酸为基本组成单位的生物大分子，携带和传递遗传信息。

脱氧核糖核酸DNA [细胞核、线粒体、叶绿体] 【携带遗传信息，并通过复制传递给下一代】

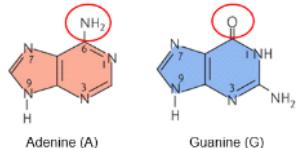
核糖核酸RNA [细胞核、细胞质、线粒体] 【是DNA转录的产物，参与遗传信息的复制与表达。某些病毒RNA也可作为遗传信息的载体】

**核苷酸：**核酸的基本结构单位，由一分子磷酸、一份子戊糖、一份子碱基组合成/核苷或脱氧核苷与磷酸通过酯键结合构成。

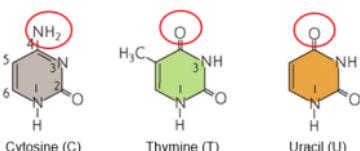
核苷：戊糖+碱基

碱基：含氮的杂环化合物

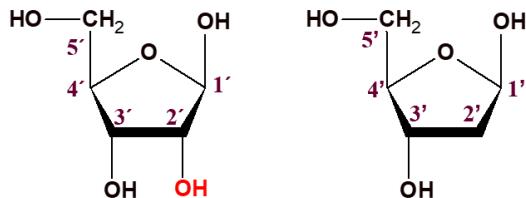
腺嘌呤A、鸟嘌呤G



胞嘧啶C、胸腺嘧啶T、尿嘧啶U



**戊糖：**核糖、脱氧核糖

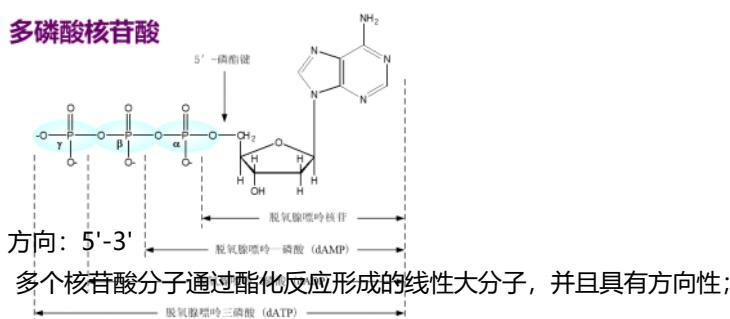


磷酸：  
 $\begin{matrix} \text{HO}-\text{P}-\text{OH} \\ | \\ \text{OH} \end{matrix}$

**DNA：**多个脱氧核苷酸通过 $3',5'$ -磷酸二酯键连接形成具有方向性的的大分子

磷酸二酯键：一个脱氧核苷酸 $3'$ 的羟基与另一个核苷酸 $5'$ 的 $\alpha$ -磷酸基团缩合形成

## 多磷酸核苷酸



**RNA：**多个核苷酸分子通过酯化反应形成的线性大分子，并且具有方向性；

**核酸的一级结构：**核酸中核苷酸的排列顺序，也成为碱基序列

书写方法：



碱基数目：可以表示核酸分子的大小

DNA：ATCG

RNA：AUCG

**DNA的空间结构：**

二级结构：双螺旋（发现者：1953 Watson&Crick/富兰克林X射线衍射/chargaff法则）

碱基互补配对原则：G-C/A-T

维持二级结构的作用力：氢键（双链横向稳定性）/碱基堆积力

特点：两条呈反向平行的多聚核苷酸链通过链间的碱基配对在空间围绕着同一个轴形成右手螺旋的结构

脱氧核糖+磷酸：亲水性骨架外侧 碱基：疏水内侧 大沟和小沟

高级结构：超螺旋结构（正/负）

真核生物DNA的高度有序致密的结构：染色体（细胞分裂期）

核小体：真核染色体结构的基本单位

平时：染色质（松散）由DNA和蛋白质组成

蛋白质：组蛋白（主要成分）

核小体核心颗粒：H2A H2B H3 H4 序列高度保守，位于组蛋白八聚体核心

单个核小体核心颗粒包括：组蛋白八聚体一段DNA片段左旋盘绕

组蛋白H1 序列不保守 位于核小体表面 与DNA松散结合成为染色质小体

相邻染色质小体之间以连接DNA相连 形成核小体

[总结：DNA+组蛋白八聚体核心——核小体核心——+H1——染色质小体——+linkerDNA——核小体——

串珠结构——纤丝结构（螺线管模型/zigzag模型）——袢环模型——玫瑰花结——染色体]

真核生物的染色体：姐妹染色单体1&2 着丝粒 端粒

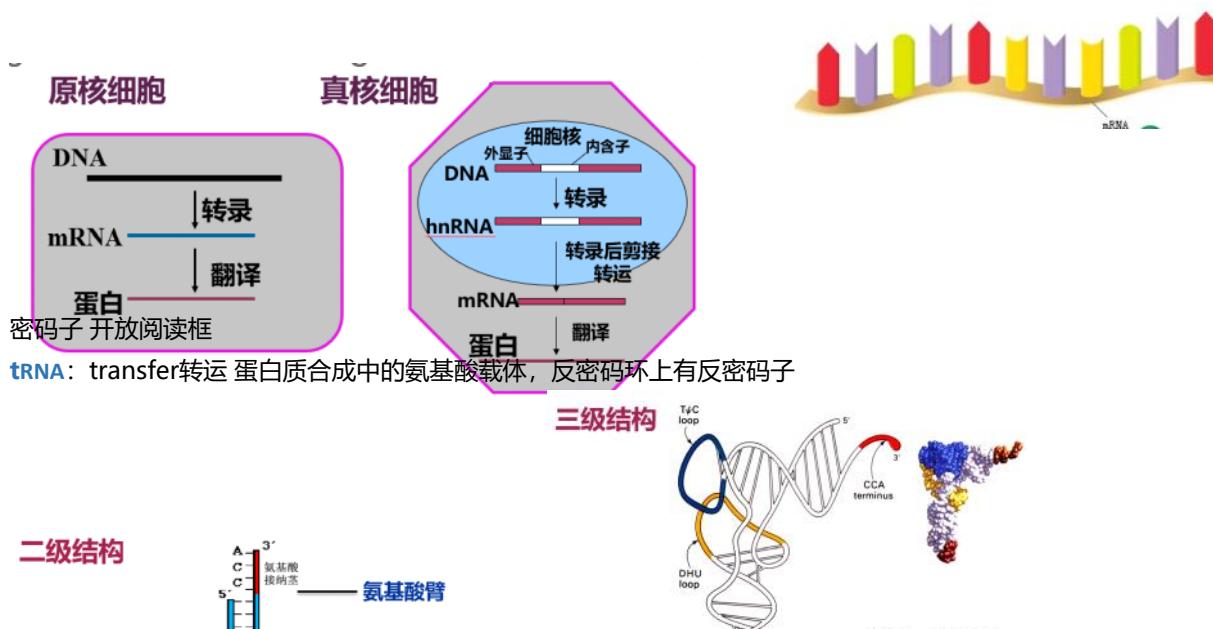
RNA：

种类、分布、功能

|          | 细胞核和胞液        | 线粒体     | 功 能                 |
|----------|---------------|---------|---------------------|
| 核蛋白体RNA  | rRNA          | mt rRNA | 核蛋白体组分              |
| 信使RNA    | mRNA          | mt mRNA | 蛋白质合成模板             |
| 转运RNA    | tRNA          | mt tRNA | 转运氨基酸               |
| 核内不均一RNA | HnRNA         |         | 成熟mRNA的前体           |
| 核内小RNA   | SnRNA         |         | 参与hnRNA的剪接、转运       |
| 核仁小RNA   | SnRNA         |         | rRNA的加工、修饰          |
| 胞浆小RNA   | scRNA/7SL-RNA |         | 蛋白质内质网定位合成的信号识别体的组分 |

**mRNA**：messenger信使 蛋白质合成模板 hnRNA经剪切内含子外显子后为成熟mRNA前体

功能：把DNA所携带的遗传信息，按碱基互补配对原则，抄录并传送至核糖体，用以决定其合成蛋白质的氨基酸排列顺序。





## 二、过程

**DNA的合成/复制：**DNA双螺旋的两条链分别作为模板，在DNA聚合酶的作用下按照碱基互补（Base pairing）的原则合成两条与模板链互补的新链

1. 复制的三种可能模型：

**半保留复制（Semiconservative replication）：亲代DNA分子双链**

分离后，两条单链均可作为新链合成的模板，复制完成后，子代

DNA分子的双链一条来自亲代，另一条为新合成的链 实验：同位素示踪+氯化铯密度梯度离心

**全保留复制（Conservative replication）：以亲代DNA分子为模**

板，复制后两条新生成的子链全部从亲代脱落，形成全新的子代  
双链分子，而亲代DNA分子又恢复原样

**弥散复制（Dispersive replication）：复制完成后，子代DNA的  
每一条链都是由亲本链的片断与新合成的片断随机拼接而成**

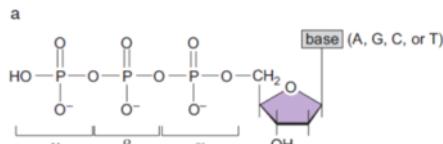
半保留复制的意义：子代与亲代DNA碱基序列一致·遗传的保守性

2. 参与复制的物质

模板：解开成单链的DNA母链

dNTP是什么？三磷酸脱氧核糖核苷

引物：RNA，提供3'-OH末端使dNTP可以依次聚合



底物：dNTP (dATP dGTP dCTP dTTP)

聚合酶：DNA-pol 依赖DNA的聚合酶

其他的酶和蛋白质因子

复制是一种聚合反应，新链生成需要引物和模板，延长只可沿5'-3'方向进行，

原核生物单起点双向复制，真核生物多起点双向复制，且两相邻起始点间的距离为一个复制子

DNA聚合酶：DNA-dependent DNA polymerase 依赖DNA的DNA聚合酶

拥有1) 5'→3' 的聚合活性

2) 核酸外切酶活性

核酸外切酶是什么？是能从核酸链的末端

**原核生物有三种DNA聚合酶**

把核苷酸依次水解出来的有方向性的酶

3-5 能辨认错配的碱基对并水解

5-3 能与上一起切除突变的DNA片段

I 校对错误，填补空隙

III 复制延长中真正起催化作用的

| Pol        | Function  |
|------------|---|
| DNA 聚合酶I   | 5'→3' 聚合酶活性<br><b>3'→5' 核酸外切酶活性</b><br><b>5'→3' 核酸外切酶活性</b> |
| DNA 聚合酶II  | 5'→3' 聚合酶活性   |
| DNA 聚合酶III | 5'→3' 聚合酶活性<br><b>3'→5' 核酸外切酶活性</b>                         |

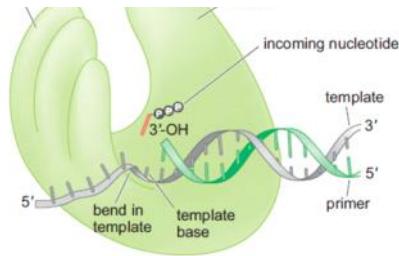
**真核生物常见的有五种**

DNA-pol α 起始引发，有引物酶活性

DNA-pol β 参与低保真度的复制



- DNA-pol  $\alpha$  起始引发，有引物酶活性
- DNA-pol  $\beta$  参与低保真度的复制
- DNA-pol  $\gamma$  在线粒体DNA复制中起催化作用
- DNA-pol  $\delta$  延长子链的主要酶，有解螺旋酶活性
- DNA-pol  $\epsilon$  在复制过程中起校读、修复和填补缺口的作用



聚合酶的结构（右上图）聚合酶活性位点于掌心 外切酶活性位点于小鱼际

### 3. 复制过程

#### 起始：解链并形成引发体

起始蛋白(DNA A)识别并结合在复制起点(通常富含A-T)上，破坏碱基氢键  
解旋酶(DNA B)在复制叉上催化双键的分离 利用ATP水解的能量结合 C协同  
单链DNA结合蛋白(SSB) 稳定已结合的单链  
拓扑异构酶 理顺超螺旋  
引物酶(DNA G) 形成10bp的RNA引物 提供3'OH末端作为DNA聚合酶起点  
引发体：含有解旋酶、DNA C蛋白、引物酶和DNA复制起始区域的复合结构

**延长：**在DNA-pol催化下，dNTP以dNMP的方式逐个加入引物或延长中的子链上，其化学本质是磷酸二酯键的不断生成。

前导链继续复制 后随链(滞后链)不连续复制：冈崎片段 通过DNA连接酶  
冈崎片段：在DNA的后随链的不连续合成期间生成的片段  
滑动夹：增强聚合酶的延伸能力  
**终止：**切除引物 填补空缺 连接切口 (连接酶)

## RNA的合成/转录

两种方式：DNA指导RNA合成（转录）/RNA指导RNA合成（常见于病毒）

转录：生物体以DNA为模板合成RNA的过程。

### 1. 参与物质：

原料：NTP(ATP, UTP, GTP, CTP)

模板：DNA（转录出的区段称为结构基因，这种选择性称为不对称转录）

模板链：DNA双链中，转录时作为RNA合成模板的一股单链。也称作反义链或Watson链

编码链：相对的另一股单链。也称为有义链或Crick链

启动子：RNA聚合酶识别、结合并启动转录的一段DNA序列。特异性且保守，多数位于转录

起始点的上游且不被转录，有些(tRNA)位于下游可被转录

转录单元：DNA上从启动子至终止子结束一段序列

原核：一个转录单元中可由多个编码基因 真核：只能一个

酶：RNA聚合酶 (RNA-pol)

活性1) 5-3的聚合活性

2) 校对活性

原核生物：多亚基蛋白质，不需要引物，具有解旋能力，作用机制与DNA-pol相似，底物NTP

其他蛋白质因子：s因子（原核），转录因子（真核）

### 2. 过程

限速（起始）阶段：RNA聚合酶与启动子识别  $\sigma$ 因子与聚合酶的核心酶结合形成全酶

转录泡形成 启动子逃离  $\sigma$ 因子离开复合体结合新的核心酶

延伸阶段：5-3

聚合酶校对功能：焦磷酸化编辑+水解编辑

转录终止：a.rho因子非依赖性终止子（内源性，发夹/茎环结构，富含GC）

b. Rho因子依赖性终止子 (需要ρ因子参与)

原核细胞：转录翻译耦联

复制与转录的异同

同：都需要模板 且都是聚合酶合成的多聚核苷酸

**复制：**

- ✓ 模板：两股链均复制
- ✓ 合成整个基因组
- ✓ 原料：dNTP
- ✓ DNA聚合酶
- ✓ 产物：双链DNA
- ✓ 配对：A-T,C-G
- ✓ 一个细胞周期或细胞分裂一次仅复制一次
- ✓ 出错概率控制在千万分之一以内

**转录：**

- ✓ 模板：模板链
- ✓ 选择性的对部分基因进行转录
- ✓ 原料：NTP
- ✓ RNA聚合酶
- ✓ 产物：单链RNA
- ✓ 配对：A-U,C-G,T-A
- ✓ 一个转录单元可在在一个细胞周期内有多个转录产物
- ✓ 出错概率为万分之一

33

**蛋白质的合成/翻译：**

mRNA是蛋白质合成的直接模板 从其5'起始密码子AUG到3'终止密码子之间：开放阅读框（ORF）

密码子：在mRNA的开放阅读框区，以每3个相邻的核苷酸为一组，代表一种氨基酸(或其他信息)，这种三联体形式的核苷酸序列称为密码子

起始：AUG

终止：UAA UAG UGA

特点：方向性 连续性

简并性：一种氨基酸编码的各密码子称为简并性密码子 也称同义密码子

通用性：基本上适用于生物界的所有物种

摆动性：反密码子与密码子之间的配对有时并不严格遵守常见的碱基配对规律（摆动配对）

工具：核糖体 三个重要功能位点

P位：肽酰位 (peptidyl site)，结合肽酰-tRNA。

E位：排出位 (exit site)，释放已经卸载了氨基酸的tRNA。

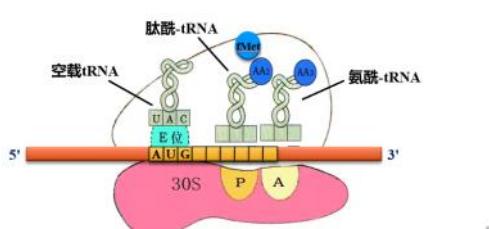
A位：氨基酰位 (aminoacyl site)，结合氨基酰-tRNA。

蛋白质因子

起始因子IF1, IF2, IF3

延伸因子EF-Tu, EF-Ts, EF-G

释放因子RF1, RF2, RF3



47

**过程：**

起始：指mRNA和起始氨基酰-tRNA分别与核糖体结合，形成翻译起始复合物的过程。

核糖体大小亚基分离—mRNA在小亚基定位结合—起始氨基酰-tRNA的结合（P位点）—核糖体大亚基结合

延长：指在mRNA模板的指导下，氨基酸依次进入核糖体并聚合成多肽链的过程。

进位/注册到A位—成肽（转肽酶催化）—转位（转位酶催化横糖体向3'端移动一个密码子）

终止：A位出现mRNA的终止密码子后 多肽链合成停止 肽链从肽酰-tRNA中释出，mRNA、核糖体大、小亚基等分离的过程。

# 基因工程

2024年6月9日 10:46

## 一、理论突破

1928 格里菲斯 肺炎双球菌转化 &1944艾弗里DNA介导转化 &T2噬菌体实验 --DNA是遗传物质

1950 查哥夫法则 1953沃森&克里克 1958DNA半保留复制--DNA双螺旋结构和中心法则

1963-1966 遗传密码破译

1967-1970 基因转移载体发现（质粒） 工具酶发现（限制性核酸内切酶）

1965-1977 DNA合成和测序-Sanger法

1972-1983 重组DNA表达实验、转基因

1983-1988 PCR技术

**二、重组DNA技术：**利用载体系统人工修饰有机体遗传组成的技术,即在体外通过酶的作用将异源DNA与载体DNA重组,并将该重组DNA分子导入受体细胞内,以扩增异源DNA,并实现其功能表达

三种工具：“手术刀”——限制性核酸内切酶

“缝合针”——DNA连接酶

“运输工具”——基因载体

-----插播-----酶-----

酶：活细胞产生、具有催化活性和高度专一性的生物催化剂

活性中心 -催化位点 负责催化底物，产生新的化合物，决定酶的催化能力

-结合位点 负责与底物结合，决定酶的专一性

1.限制性核酸内切酶：是一类能从DNA分子中间水解磷酸二酯键,从而切断双链DNA的核酸水解酶,可识别双链DNA分子某种特定的核苷酸序列（存在特异性）（多为回文结构,反向重复序列）

主要分布于原核生物：可切断外源DNA保护自身

平末端、黏末端

如何判断切没切好？凝胶电泳分离不同大小DNA片段

2.DNA连接酶：连接不同的DNA片段形成重组DNA分子

重组之后呢？通过“转化”机制引入细菌，并在细菌中复制

3.基因载体

常见载体：质粒、噬菌体载体、酵母人工染色体、病毒载体

组成：复制原点+目的基因+启动子+终止子+标记基因

质粒：独立于细菌染色体外能够进行自主复制的遗传单位，大多数是环状DNA分子，少部分为RNA

特点：裸露 结构简单 独立于细菌拟核DNA之外 自我复制 可插入外源DNA片段并作为标记基因

## **质粒成为载体的必备条件：**

具有复制起点ori序列（Origin sequence）  
携带筛选标记，通常为抗生素抗性基因  
有多克隆位点，即能够被多种限制性核酸内切酶酶切的位点  
不必备条件：具有较小的相对分子量和多拷贝数、安全性

如何插入？酶切质粒DNA+加入待克隆的片段+连接酶

然后？让细菌复制

### **三、重组DNA技术（也称基因工程）基本操作步骤**

#### **1. 获取目的基因：编码蛋白质的结构基因**

常用方法：

· 从基因文库中获取

基因文库：将含有某种生物不同基因的许多DNA片断，导入到受体菌的群体中，各个受体菌分别含有这种生物的不同基因。

基因组文库：将某生物的全部基因组DNA切割成一定长度的DNA片段克隆到某种载体上而形成的集合。

部分DNA文库（如cDNA文库：是指某生物某一发育时期的全部mRNA经反转录形成的cDNA片段，与载体连接而形成的克隆的集合。）

质粒文库、噬菌体文库、细菌人工染色体（BAC）

**如何从基因文库中获取目的基因？**

· 鸟枪法（直接分离法）

将文库中DNA用限制酶切割，与载体连接重组再导入受体细胞，进行外源DNA扩增后检测目的基因并分离。

· 反转录法

· 化学合成法 蛋白质氨基酸序列--mRNA核苷酸序列--结构基因核苷酸序列--化学合成目的基因

#### **• PCR技术扩增目的基因**

Polymerase chain reaction 多聚酶链式反应

步骤：一次循环 共20次

Heating 高温变性 94C 使混合物的DNA片段因变性而成单链。

Cooling 低温退火 60C 引物 DNA结合在适于配对的DNA片段上。

Replication 中温延伸 72C 由DNA聚合酶(Taq酶)催化，从引物由5-3合成与模板互补的DNA链

PCR体系组成：模板DNA 特异性引物 TaqDNA聚合酶 dNTPs

#### **2. 构建表达载体**

大致过程：将质粒与DNA分子用同一种限制酶处理，分别获得两个黏性末端/一个目的基因，再通过DNA连接酶得到重组质粒

目的：使目的基因在受体细胞中稳定存在，并且可以遗传给下一代，同时使目的基因能够表达和发挥作用

#### **3. 导入受体细胞**

**转化：**目的基因进入受体细胞内，并且在受体细胞内维持稳定和表达的过程

方法-导入对象-植物细胞-农杆菌转化法、基因枪法、花粉管通道法

-动物细胞-显微注射法：取生殖细胞（受精卵） 将载体/基因注射入雄原核（原因）

#### 4. 目的基因的检测与鉴定

##### · 基于载体遗传标记的筛选与鉴定

-抗药性筛选法

-显色筛选法：蓝白斑筛选 白色为β-半乳糖苷酶被破坏的含重组质粒的细菌，阳性结果

原理：**插入失活** 当外源基因或DNA片段插入到某一基因内的位点后，使这个基因丧失了原有的功能。外源DNA插入到位于筛选标记基因（抗生素基因或β-半乳糖苷酶基因）的多克隆位点后，会造成标记基因失活，表现出转化子相应的抗生素抗性消失或转化子颜色改变。

**插入失活** 是从不同的转化菌落中鉴定出含有目的基因的转化子的主要方法

##### · 基于克隆片段序列的筛选与鉴定

-菌落原位杂交 在含有重组质粒的细菌培养皿上覆盖硝酸纤维素薄膜，使DNA结合在膜上，裂解使其变性，再用放射性同位素标记的DNA探针与之杂交，通过放射自显影找到携带目标分子的菌落

-限制性酶切图谱法 凝胶电泳 Marker

-DNA测序

-核酸杂交 Southern印迹法

##### · 基于外源基因表达产物的筛选与鉴定

-蛋白质凝胶电泳检测

-外源基因蛋白质功能检测

## 四、基因工程的应用

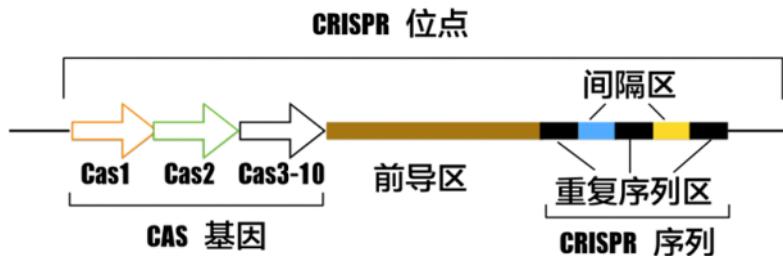
基因治疗：患病个体基因的改变，治疗单基因缺陷的疾病方面具有巨大潜力，用载体将基因递送到特定类型的细胞（例如骨髓）中

转基因动物：将一种物种的基因引入另一种动物的基因组中，这种动物就是转基因动物

基因编辑作物：指的是利用CRISPR-Cas9等基因编辑技术精确修改过基因的作物；与传统转基因作物相比，基因编辑的产物更加精确可控，对基因的改变也更加自由，同时在大多数情况下并不会加入来自其他物种的基因

### CRISPR-Cas系统

CRISPR 成簇cluster规律性regularly间隔interspaced短short回文palindromic重复repeats序列：是一个广泛存在于细菌和古细菌基因组中的特殊DNA重复序列家族，由众多短而保守的DNA重复序列区（Repeat）和DNA间隔区（Spacer）组成，是原核生物的免疫系统。



Cas基因：CRISPR关联基因，其编码的蛋白均可与CRISPR序列区域共同作用

前导区：启动子

CRISPR序列：外源基因入侵时，表达与入侵基因序列相识别的RNA，相关酶在识别处切割外源基因DNA沉默其表达

特点：精准靶向功能

存在三类系统，其中II类只需要Cas9

原理详解：1.外源DNA的俘获：病毒入侵，系统从其双链DNA中截取一段序列作为病毒的“身份证”并将身份证（原间隔序列）整合到基因组的CRISPR序列中。

身份证：向两端延伸的碱基需要保守（原间隔序列临近基序，PAM）（NGG）

截取操作：cas1 Cas2 编码蛋白扫描外源DNA并识别PAM区域，12蛋白复合物（同时也是双链DNA核酸酶）酶切原间隔序列-----> 插入临近CRISPR序列前导区的下游，通过复制修复双链缺口

2.crRNA产生：在前导区调控下转录pre-crRNA 整个CRISPR序列转录而成的分子量较大的RNA分子  
tracrRNA 由重复序列区转录而成的具有发卡结构的RNA

两种RNA及Cas9编码的蛋白将复合，选取身份证，并在RNaseIII协助下剪切形成crRNA

3.靶向干扰：crRNA Cas9 tracrRNA 复合物找到与crRNA互补的原间隔序列并使其断裂

应用：基因敲除

BT抗虫玉米：转基因作物 加入来自细菌基因

低镉水稻：基因编辑 敲除自身基因 降低吸收镉的能力

# 细胞工程

2024年6月9日 13:44

概念：应用细胞生物学和分子生物学的原理和方法，通过细胞水平或细胞器水平上的操作，按照人们的意愿来改变细胞内的遗传物质或获得细胞产品的一门综合科学技术。

克隆多利羊-细胞/细胞器水平上生物技术-细胞工程

培育抗虫棉-分子水平技术-基因工程

## 一、理论发展

植物：

1902 哈泊兰特 细胞全能性

1937-1970 实验证明全能型

1970 植物细胞克隆

动物：

1907 哈里森 淋巴液培养蝌蚪神经元细胞

1960s 童第周 鱼的细胞核移植

1996 世界克隆羊多莉 2001 我国首例克隆牛康康

## 二、植物细胞工程

理论基础：植物细胞的全能性：是指生物体的细胞具有使后代细胞形成完整个体的潜能。每个体细胞都由同一个受精卵有丝分裂、分化得到，因此每个细胞包含该物种的全部基因

全能性受到抑制：基因在时间上和空间上的选择性表达。环境--分化

表现条件：使生物体的细胞处于离体状态+提供植物生长所需的营养物质、激素及适宜的温度、酸碱度等。

全能性大小：分化程度越低，全能性越大 如受精卵 > 生殖细胞 > 体细胞 植物>动物

常用技术：**1.植物组织培养**

在无菌和人工控制条件下，将离体的植物器官、组织、细胞，培养在人工配制的培养基上，给予适宜的培养条件，诱导其产生愈伤组织、丛芽，最终形成完整的植株。

流程：离体植物器官/组织/细胞 脱分化 形成愈伤组织（避光） 再分化 长出根或芽 植物体

避光：有光时，往往容易形成维管组织，而不易形成愈伤组织。

脱分化：已经高度分化的植物细胞经诱导后逐渐失去原来的结构和功能，转变成未分化细胞的过程，即形成愈伤组织

再分化：愈伤组织重新分化成根或芽等器官的过程

例：胡萝卜组织培养 用韧皮部/形成层：分生能力强。有大量的纺锤状原始细胞和射线原始细胞

**培养基**: 含有一定营养成分，供组织培养植物生长的固体基质

无机营养成分: C, H, O及部分微量元素

有机营养成分

① 含N物质: 包括维生素和氨基酸

② 碳源: 2%—5%的蔗糖

③ 琼脂: 起支持作用

④ 激素: 生长素, 细胞分裂素和赤霉素

pH值: 5.0 - 6.0

## 2. 植物体细胞杂交技术

将不同种植物的体细胞，在一定条件下融合成杂种细胞，并把杂种细胞培育成新的植物体的技术

流程: 植物细胞去壁 (酶解法: 纤维素酶/果胶酶) 变成原生质体 - 融合 (细胞膜的流动性) (人工诱导方法: 物理-离心/振动/电刺激 化学-聚乙二醇) - 融合后再生细胞壁 (融合完成的标志) - 杂种细胞进行植物组织培养

应用:

繁殖:

快速繁殖 (微型繁殖) - 组织培养技术

作物脱毒 (长期进行无性繁殖的作物易积累感染的病毒, 故采用分生区附近进行组织培养)

人工种子 (人工薄膜+胚状体)

无菌植物, 培育转基因植物

育种: 传统方法杂交育种, 根据基因的自由组合定律选取优良基因自由组合

单倍体育种 (花药离体培养得到单倍体, 再使用秋水仙素处理幼苗)

诱导突变体

## 三、动物细胞工程

### 1. 基础: 动物细胞培养

从动物机体中取出相关的组织, 将它分散成单个细胞, 然后, 放在适宜的培养基中, 让这些细胞生长和增殖 (原理: 细胞增殖) (目的: 获得细胞或蛋白)

流程: 取动物组织块 (胚胎或幼龄) 加胰蛋白酶剪碎

(作用: 分解弹性纤维胶原纤维)

得到单个细胞放入培养液制得单细胞悬液

发生**细胞贴壁**: 悬液中分散的细胞很快就贴附在瓶壁上, 称为细胞贴壁。

原代培养到第10代 形成细胞株 (遗传物质未改变) (从机体取出后立即培养的细胞为原代细胞。培养的第一代细胞与传10代以内的细胞称为原代细胞培养。)

传代培养到第50代 往后都是细胞系 (改变了) (当原代培养的细胞生长停止, 这时如果要使细胞继续生长, 就要及时用胰蛋白酶等, 使细胞从瓶壁上解离下来, 然后加入新的培养液, 将细胞分离稀释, 并从原培养瓶内转接到新的培养瓶内, 这个过程称传代培养。)

发生接触抑制：当贴壁细胞分裂生长到表面相互接触时，细胞就会停止分裂增殖，这种现象称为细胞的接触抑制。

培养条件：无菌无毒培养液，需含有抗生素、葡萄糖、氨基酸、无机盐、微量元素、动物血清、血浆等；36.5 +0.5度；pH为7.2-7.4；O<sub>2</sub>和CO<sub>2</sub>（95%空气和5% CO<sub>2</sub>）

## 2. 动物细胞核移植技术：表现动物细胞的全能性

核移植：将动物的一个体细胞的细胞核，移入一个已经去掉细胞核的卵母细胞（减数分裂Ⅱ期：最大，细胞质成熟）中，使其重组并发育成一个新的胚胎，这个新的胚胎最终发育为动物个体。

克隆动物：用核移植的方法得到的动物

技术两阶段：核移植+胚胎移植

诱导多能干细胞（iPS）：通过重编程向成体细胞中导入特定的基因可以诱导产生多能干细胞。

## 3. 动物细胞融合

概念：指两个或多个动物细胞结合形成一个细胞的过程

原理：细胞膜的流动性

结果：形成杂交细胞

原理：细胞膜的流动性

方式：物理-离心/振动/电激

化学：聚乙二醇（PEG）

生物：灭活病毒

流程：灭活病毒黏附细胞表面使细胞膜被穿透

原理：病毒表面糖蛋白和酶与细胞膜上糖蛋白和酶作用

灭活：指用物理或化学手段使病毒或细菌失去感染能力，但并不破坏这些病原体的抗原结构，保留融合活性。

意义：突破有性杂交方法局限

## 4. 应用：利用杂交瘤技术制造单克隆抗体

概念：由单个B淋巴细胞经过无性繁殖（克隆），形成基因型相同的细胞群，这一细胞群所产生的化学性质单一、特异性强的抗体称为单克隆抗体。

流程：只分泌一种特异性抗体的B淋巴细胞+骨髓瘤细胞----融合-----杂种细胞----动物细胞培养得到单克隆抗体

特点：特异性强、灵敏度高、产量高

应用：抗原检测，细胞因子测定，激素测定，蛋白质提纯，肿瘤靶向治疗，放射免疫显像技术

# 胚胎工程

2024年6月9日 18:02

理论基础：哺乳动物的受精卵和早期胚胎的发育规律

操作对象：早期动物胚胎和胚子

应用及前景：胚胎移植/分割/干细胞

## 一、体内受精和早期胚胎发育

### 1. 精子产生

场所：睾丸生精小管

时期：从初情期到生殖机能衰退

精原细胞 → 精子( $64 \pm 4.5$ 天)

过程：睾丸生精小管上皮的精原细胞 $2n$

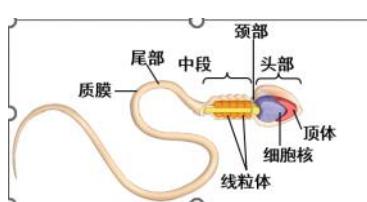
初级精母细胞 $2n$

(减数分裂I)

两个次级精母 $n$

(减数分裂II)

四个精子细胞 $n$



变化对应：

1. 细胞核——精子头的主要部分（遗传物质储存和复制的场所）
2. 高尔基体——头部的顶体（分泌作用）
3. 中心体——精子的尾
4. 线粒体——线粒体鞘膜（尾的基部，提供能量运动）
5. 细胞内其他物质——原生质滴（球状，最后脱落）

四个精子

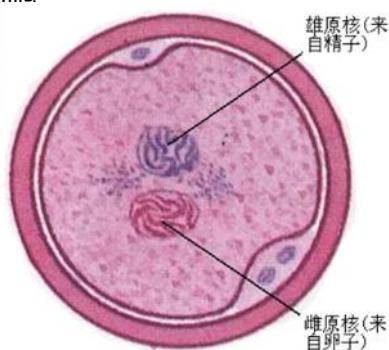
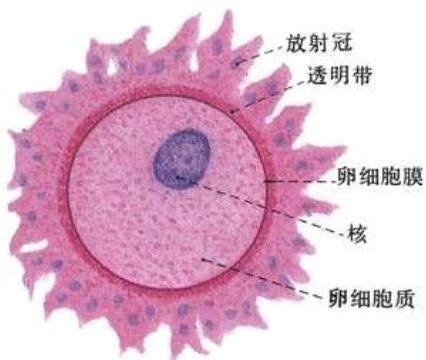
### 2. 卵子产生

场所：卵巢

排卵：卵母细胞从卵泡中释放出来的过程，一个卵泡中能形成一个成熟的卵子

过程：卵巢生发上皮的卵原细胞 - 初级卵母细胞 - 第一极体 + 次级卵母细胞（成熟卵细胞停留在减II中期等待受精） - 第二极体 + 卵细胞

结构：左下



受精的标志：在卵细胞膜和透明带的间隙可以观察到两个极体 右上

### 3.受精

#### 准备阶段

- (1) 精子获能 精子必须在雌性动物的生殖道发生相应的生理变化后，才获得受精能力。
- (2) 卵子准备 在输卵管中发育到减数第二次分裂的中期，才具有与精子受精的能力。

#### 受精阶段

- (1) 精子穿越放射冠和透明带

顶体反应：顶体内的酶释放出来并溶解放射冠内的卵丘细胞间质

透明带反应（防止多精入卵的第一道屏障）：精子触及卵细胞膜的瞬间，会阻止后来的精子进入透明带的生理反应。当第一个精子进入后，透明带的穿透性就立即发生变化，从而阻止其他精子穿越透明带。

- (2) 精子进入卵黄膜（哺乳类为卵细胞膜）

卵细胞膜封闭作用（防止多精入卵受精的第二道屏障）：精子入卵后，卵黄膜会发生生理反应，拒绝其他精子再进入卵内

- (3) 雄原核和雌原核形成

a. 精子进入卵子后，尾部脱离，原有的核膜破裂

b. 精子形成一个新的核膜，随后形成一个比原来精子核还大的核—雄原核

c. 精子入卵后被激活的次级卵母细胞完成减数第二次分裂，排出第二极体，形成雌原核

- (4) 配子结合

雌雄原核融合形成合子（受精卵）

雄原核和雌原核同时向细胞中部靠拢，并相互融合成一个细胞核，这时称受精卵

### 4.胚胎发育

#### 排卵

在输卵管中受精并进行有丝分裂

卵裂期：在透明带内有丝分裂，细胞数量增，总体积减

桑椹胚：由32个左右具有全能性的细胞构成，形似桑椹

囊胚：内细胞团--胎儿各组织

滋养层细胞--胎膜和胎盘

附着在子宫壁（子宫内膜上皮）上并逐渐植入

胎儿形成

双胞胎几个胎盘？几根脐带？

## 二、试管动物技术

通过人工操作使卵子和精子在体外条件下成熟和受精，并通过培养发育成早期胚胎后，再经移植产生后代的技术。

用到的技术有：体外受精、早期胚胎培养和胚胎移植技术

体外受精：采取雌性动物的卵细胞和雄性动物的精子，使其在试管中受精（发育主要场所是母体）

I 卵母细胞的采集：超数排卵（促性腺激素）/死活体卵巢采集（完成减I的初级卵母并且绝大部分需要被卵丘细胞包围形成复合体）

II 精子的采集：假阴道法，手握法，电刺激法

III 精子体外获能：啮齿动物、猪-培养法：精子在获能液（含有类似于雌性动物生殖道中的物质，能解除精浆对精子获得受精能力的抑制作用）中获能 牛羊等家畜-化学诱导法：一定浓度的肝素或钙离子载体A23187溶液处理精子

IV 获能的精子和培养成熟的卵子，一般情况下在获能溶液或专用受精溶液中完成受精过程

早期胚胎培养：是应用人工创造条件，对获取的早期胚胎进行体外培养。困难，需要一系列不同培养液用于不同发育时期的胚胎

培养液成分：水、无机盐、糖类、维生素、氨基酸、激素、核苷酸、血清等

二氧化碳培养箱中培养：培养条件为38.5°C、100%湿度和5%二氧化碳的空气。

胚胎移植