

2018 年《基因工程》期末复习指南（整理版）

授课老师：李立家

写在前面

学完一个学期的《基因工程》，仅关于**考试与平时作业**分享两点真实的感受：

1. 期末考试范围是真的很固定，老师考前最后课上会给重点，其实每年重点都差不多，可能也就变个两三道题吧，所以对期末考试不用太担心，老师给的重点考前一定要背熟。

2. **最重要的一点，敲黑板吼！**一个学期的课一般总共有 3 次随堂作业，就是在 PPT 上给题目然后开卷现场写答案交上去。请务必认真对待这个随堂作业，如果老师布置了作业就一定要交！对，即使缺席了那堂课，也请一定课后补上！不要问我为什么这么强调这一点，都是拿最后成绩换来的血吡的教训……

正文是根据 18 年上学期李老师考前给的重点整理的**自用复习资料**，需者自取就好，如遇纰漏还请自行更正。老师考前只给了考试重点的关键词，但是方向其实也很明确了。18 年的期末真题在另一份文档里。

Anyway，大家加油复习吧，祝大家期末都考出好的成绩呀。《基因工程》这门课应该一般是每年春季学期开课吧，那就顺颂暑假快乐咯！

诚扬于 2019 年 1 月

目 录

1. 载体的比较（质粒载体和噬菌体载体）	1
2. 基因组编辑三大系统（TALEN、ZFN 和 CRISPR/CAS）	2
(1) TALEN 技术	2
(2) ZFN 技术	2
(3) CRISPR/Cas 技术	2
3. 探针标记	3
(1) 切口平移标记	3
(2) 随机引物标记	3
(3) 探针标记方法总结	3
4. 杂交	4
(1) SOUTHERN BLOT	4
(2) NORTHERN BLOT	4
(3) WESTERN BLOT	4
5. 基因文库	5
(1) 概念	5
(2) 应用	5
6. 包装细胞	6
(1) 包装细胞	6
(2) 逆转录病毒表达系统	6
7. 转基因植物的转化方法	7
(1) DNA 直接转移法	7
(2) 载体介导法	7
8. 酵母菌表达系统与大肠杆菌表达系统的比较	9
(1) 酵母表达系统	9
(2) 大肠杆菌表达系统	9

1. 载体的比较（质粒载体和噬菌体载体）

质粒---进入原核生物；噬菌体---侵染、进入细菌。

质粒载体：野生的质粒往往不符合作为载体的要求，因此必须对它们进行改造：

（1）删除不必要的 DNA 区域。尽量缩小质粒的分子量，以提高外源 DNA 片段的装载量。

（2）减少限制性酶切位点。可采取缺失突变，限制性酶、核酸外切酶和连接酶的共同作用，机械破碎和质粒之间的重组等方法。

（3）加入易于识别的选择性标记，便于检测含有重组质粒的受体细胞。通过质粒之间的重组，可以使质粒带有合适的选择性标记。

（4）关于质粒安全性能的改造。灭活质粒在细菌之间转移的 *mob* 基因。

质粒载体的分类：根据用途可分为 5 类，即克隆载体、测序载体、穿梭载体、探针载体、表达载体。

噬菌体是一类非细胞微生物，能高效率高特异性地侵染宿主细胞，然后或自主复制繁殖，或整合入宿主基因组中潜伏起来，而且在一定的条件下上述两种状态还会相互转化。有的噬菌体基因组较大，如 λ 噬菌体和 T 噬菌体等；有的则较小，如 M13、f1、fd 噬菌体等。其中用感染大肠杆菌的 λ 噬菌体改造成的载体应用最为广泛。

噬菌体或病毒的 DNA 能被开发成为基因工程的有用载体，因为：

（1）感染宿主的效率高；

（2）在宿主内自主复制繁殖性能强。

λ 噬菌体的改造：基因组太大（49kb），酶切点太多，如有 5 个 *Bam*H1 位点（G↓GATCC，只能接纳一定长度的 DNA，即相当于 λ 噬菌体的 75-105%，那么只能接纳 $49\text{kb} \times 5\% = 2.45\text{kb}$ 的 DNA，重组的 λ DNA 分子难于直接导入宿主细胞。因此改造方法如下：(1)缩短长度；(2)删除重复的酶切位点增加一些单一的酶切位点；(3)加装选择标记；(4)构建琥珀密码子的突变体。

λ -DNA 作为载体的优点：

（1）高效： λ -DNA 可在体外包装成噬菌体颗粒，能高效转染大肠杆菌。

（2）高装载量： λ -DNA 载体的装载能力为 25 kb，远远大于质粒的装载量。

（3）易筛选：重组 λ -DNA 分子的筛选较为方便。

2. 基因组编辑三大系统（TALEN、ZFN 和 CRISPR/Cas）

转录激活样效应因子核酸酶（transcription activator-like effector nuclease, TALEN）技术与锌指核酸酶（Zinc-finger nuclease, ZFN）技术组成了一大类强有力的基因组编辑工具。这些嵌合核酸酶由两部分组成——一个序列特异性 DNA 结合模块与一个非特异性的 DNA 切割结构域。通过诱导 DNA 双链断裂来刺激容易出错的非同源末端连接或在特定基因所在的位置进行的同源定向修复，TALEN 和 ZFN 能够完成一系列遗传学编辑修饰操作。

成簇规律间隔短回文重复（clustered regulatory interspaced short palindromic repeat, CRISPR）技术是最新出现的一种基因组编辑工具，它能够完成 RNA 导向的 DNA 识别及编辑。与其它基因组编辑工具相比，CRISPR 技术更易于操作，具有更强的可扩展性。

（1）TALEN 技术

TAL 效应因子（TAL effector, TALE）最初是在一种植物病原体中作为一种细菌感染植物的侵袭策略而被发现的。这些 TALE 通过细菌 III 类分泌系统被注入植物细胞中，通过靶定效应因子特异性的基因启动子来调节转录，促进细菌的集落形成。由于 TALE 具有序列特异性结合能力，通过将 Fok I 核酸酶与一段人造 TALE 连接起来，便形成了一类具有特异性基因组编辑功能的强大工具，即 TALEN。TALEN 技术的原理即通过 DNA 识别模块将 TALEN 元件靶向特异性的 DNA 位点并结合，然后在 Fok I 核酸酶的作用下完成特定位点的剪切，并借助于细胞内固有的同源定向修复或非同源末端连接完成特定序列的插入（或倒置）、删失及基因融合。

（2）ZFN 技术

锌指核酸酶（Zinc-finger nuclease, ZFN）是一类人工合成的限制性内切酶，由锌指 DNA 结合域与限制性内切酶的 DNA 切割域融合而成。研究者可以通过加工改造 ZFN 的锌指 DNA 结合域，靶向定位于不同的 DNA 序列，从而使得 ZFN 可以结合复杂基因组中的目的序列，并由 DNA 切割域进行特异性切割。此外，通过将 ZFN 技术和胞内 DNA 修复机制结合起来，研究者还可以自如地在生物体内对基因组进行编辑。

（3）CRISPR/Cas 技术

不论是 TALEN 技术还是 ZFN 技术，其定向打靶都依赖于 DNA 序列特异性结合蛋白模块的合成，这一步骤非常繁琐费时。而 CRISPR/Cas 技术，即 CRISPR 序列和 CRISPR 相关基因（CRISPR-associated genes, Cas gene），作为一种最新涌现的基因组编辑工具，能够完成 RNA 导向的 DNA 识别及编辑。CRISPR/Cas 技术使用一段序列特异性向导 RNA 分子引导核酸内切酶到靶点处，从而完成基因组的编辑。CRISPR/Cas 系统的开发为构建更高效的基因定点修饰技术提供了全新的平台。此系统的工作原理是 crRNA（CRISPR-derived RNA）通过碱基配对与 tracrRNA（trans-activating RNA）结合形成 tracrRNA/crRNA 复合物，此复合物引导核酸酶 Cas9 蛋白在与 crRNA 配对的序列靶位点剪切双链 DNA。

3. 探针标记

(1) 切口平移标记

利用微量的 DNase I, 使待标记的双链 DNA 分子产生若干切口, 形成 3'-OH 末端。DNA 聚合酶 I 把一个带有标记物的 dNTP 就加在这引物的 3'-OH 末端, 而它的 5'-3' 的核酸外切酶活性将切除 5'-单核苷酸, 同时依次添加新的核苷酸到 3 一侧, 其结果使切口沿着 DNA 平移。

(2) 随机引物标记

能与任何 DNA 配对互补的一小段 DNA 序列叫随机引物。DNA 聚合酶 klenow 能在随机引物的引导下以带有标记的 dNTP 为原料合成新的与模板 DNA 互补的探针。

(3) 探针标记方法总结

随机引物法	双链 DNA	放射性及非放射性探针	以变性的靶 DNA 为模板, 利用随机的八碱基引物体外合成 DNA 探针	快速简便 灵敏度较低
PCR 掺入法	双链 DNA	放射性及非放射性探针	通过 PCR 反应合成 DNA 探针	模板不受限制 灵敏度高 需合成引物
末端转移法	双链或单链 DNA	放射性及非放射性探针	通过 DNA 末端转移酶将标记的核苷酸连到双链或单链 DNA 探针的 3' -OH 上	快速简便 需 TDT 酶
切口平移法	双链 DNA	放射性及非放射性探针	利用 Klenow 酶的 DNA 聚合酶和 5' -3' 外切酶活性从双链切口开始合成 DNA 探针	快速简便 灵敏度较低
末端标记法	DNA 和 RNA 探针	放射性探针	利用 T4 核苷酸激酶将 [γ - ³² P]ATP 标记到探针的 5' 端	比内标探针稳定, 灵敏度高
体外转录法	单链 DNA 或 RNA 探针	放射性及非放射性探针	以单链或变性靶核酸为模板, 用 RNA 聚合酶或逆转录酶体外合成双链探针, 再通过酶解等处理得到单链探针	灵敏度高

4. 杂交

(1) Southern blot

Southern 杂交是将待分析的基因组 DNA 或其它 DNA 首先用一种或几种限制性核酸内切酶消化，消化后的 DNA 片段通过琼脂糖凝胶电泳按照分子量的大小进行分离。之后对凝胶进行碱变性处理，将 dsDNA 分子变性成 ssDNA，经毛细管作用或物理方法将凝胶中的 ssDNA 分子从胶上转移到固相支持物上(一般使用的是尼龙膜和纤维素膜)。然后用标记的 DNA 或 RNA 探针对附着于膜上 ssDNA 进行杂交来检测这些被转移的 DNA 片段，与探针有同源性的 DNA 片段在膜上的位置可以通过特定的检测方法如放射自显影或显色而显示。

(2) Northern blot

Northern 杂交是将 RNA 样品通过琼脂糖凝胶电泳进行分离，再转移到硝酸纤维素滤膜上，用同位素或生物素标记的 DNA 或 RNA 特异探针对固定于膜上的 RNA 进行杂交，洗脱除去非特异性杂交信号，对杂交信号进行分析，以确定目的基因的是否转录，是检测 RNA（主要是 mRNA）的方法。

(3) Western blot

将通过 SDS-PAGE 电泳分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上，然后与能特异性识别待检蛋白的抗体进行反应，洗涤去除没有结合的特异性抗体后，加入标记的、能识别特异性抗体的种属特异性抗体，孵育一段时间后再次洗涤去除非特异性结合的标记抗体，加入适合标记物的检测试剂进行显色或发光等，观察有无特异性蛋白条带的出现，也可通过条带的密度大小来进行特异性蛋白的半定量。

5. 基因文库

(1) 概念

将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种生物的不同基因，称为**基因文库**。有基因组 DNA 文库和 cDNA 文库两种。

(2) 应用

1) 便于分离生物的基因，特别是分离高等真核生物的基因。对于高等真核生物来说，由于基因组序列长且染色体结构复杂，直接从细胞中提取并分离出某一特定基因的 DNA 片段在技术上是很难的。但在基因文库中，不同的 DNA 片段分别在不同的克隆中扩增，只要有该基因的探针存在，则从许多克隆中筛选一个所需的克隆是一项比较简单的工作。

2) 应用于个体发育的研究中。如从芽孢杆菌的正在形成芽孢的菌体中分离 mRNA，并用同位素标记做成探针，用这些探针可以从芽孢杆菌的基因文库中分离出只在芽孢形成过程中活动的基因，有助于对发育过程中基因调控进行研究。

3) 应用于高等生物的基因定位。

6. 包装细胞

(1) 包装细胞

包装细胞是导入了病毒中编码蛋白外壳序列的细胞,因此该细胞能产生病毒粒子包装所需的结构蛋白。

(2) 逆转录病毒表达系统

逆转录病毒表达系统是一种新的重组蛋白高效表达系统,由逆转录病毒载体、辅助载体(表达病毒包装需要的蛋白质)和包装细胞系组成。在逆转录病毒载体中,去除了正常的蛋白编码序列而保留了复制和包装信号,通过分子克隆技术将目的基因插入此载体上,而包装细胞系能提供病毒载体包装成病毒粒子所需的结构蛋白。当重组病毒载体导入包装细胞后,缺陷病毒载体和包装细胞的互补作用共同完成病毒装配,该病毒颗粒可感染其他宿主细胞,此时目的基因进入该细胞并整合到细胞基因组中,导致插入序列在宿主细胞中表达,产生目的蛋白。宿主细胞不能像包装细胞那样为缺失结构基因的逆转录病毒提供结构蛋白,因而在宿主细胞内不会产生新的感染性病毒颗粒,保证了该载体在生物制品领域的生物安全性问题。

逆转录病毒介导的基因转移技术的优缺点:

优点: 操作简便、可大量感染细胞、形成单拷贝和高转化率(可达 100%)。

缺点: 病毒载体可能从整合位点上脱落,恢复病毒特性,对宿主细胞的功能造成影响。逆转录病毒载体容纳外源基因的 DNA 片段较小($\leq 10\text{kb}$),而且获得的子代动物嵌合体的比例大。

7. 转基因植物的转化方法

外源基因导入植物细胞的方法可分为 DNA 直接转化和以载体为媒介的基因转化两种。

(1) DNA 直接转移法

通过物理化学法将外源基因转入受体植物细胞的技术。

1) **化学刺激法**：植物细胞的原生质体经过某些化学药品（PEG、PNA、磷酸钙、氯化钙）处理后，能够捕获外源 DNA。

2) **电刺激法**：是一种直接转移外源基因进入受体植物细胞的方法，这种方法可适用于单子叶植物及双子叶植物细胞原生质体的转化。

3) **显微注射法**：微针注射是一种经典的物理转基因技术，它是借助显微注射仪，将外源 DNA 或 mRNA 通过机械方法直接注射到受体细胞。

4) **脂质体介导法**：当脂质体与植物原生质共温育时，脂质体与原生质体膜结构之间发生相互作用，脂质体内的外源 DNA 通过融合或吞噬作用高效率地转运到原生质体细胞质和细胞核内。

5) **基因枪法**：也称微粒轰击法，是一种快速有效的植物 DNA 转移系统之一。其基本原理是利用带有外源 DNA 的金粉或钨粉微粒经过放电或机械加速后对细胞射击。

6) **微激光束法**：利用激光微束脉冲引起细胞膜可逆性穿孔，从而将外源 DNA 导入受体细胞。

7) **花粉管通道法**：将外源 DNA 片段在自花授粉后的特定时期注入柱头或花柱，外源 DNA 沿花粉管通道或传递组织通过珠心进入胚囊，转化不具备正常细胞壁的受精卵、合子及早期的胚体细胞。

(2) 载体介导法

通过农杆菌或植物病毒介导感染受体植物将外源基因转入植物细胞的技术。目前，载体法主要包括土壤农杆菌 Ti 质粒、Ri 质粒及植物 DNA 病毒等介导的遗传转化法。

农杆菌介导法：土壤农杆菌介导的基因转移是目前最常用的获得转基因植物的方法，它主要用于双子叶植物系统。利用土壤农杆菌介导的基因转移的再生效率很高，且外源基因在转入并整合到植物基因组中后未发生任何重大的修饰改变。一般来说，使用土壤农杆菌介导的基因转移方法所转入的外源基因一般拷贝数较低，大多是单拷贝转移。

表 9-9 若干种主要的植物细胞转化法的比较

方 法	优 点	缺 点
农杆菌介导法	转化效率高 能够插入非重排的外源 DNA 长片段 外源转化 DNA 片段主要以单拷贝或低拷贝形式插入 不需要特殊的专用设备	转化的寄主范围有限,特别是对许多单子叶植物不适用 外源的转基因只能以 T-DNA 插入的方式被导入寄主细胞。
化学法及电穿孔法	实验操作比较简单 转化效率高 在同一实验中可处理许多样品 化学法不需要特殊的专用设备	外源转化 DNA 重排频率高,并经常以多拷贝形式插入 化学法需要通过原生质体培养及其再生体系,才能产生出转基因植株 有增加导入体细胞克隆变异(somaclonal variation)的风险
生物弹击法	基因转移不受物种界限的约束 可适用于不同的转化样品,诸如根、茎、叶、培养细胞愈伤组织,甚至种子等 很有可能用于培育转基因的禾谷类作物	需要复杂的专用设备 外源转化 DNA 重排频率高,并经常以多拷贝形式插入
显微注射法	基因转移不受物种界限的约束 可适用于不同的转化样品,例如根、茎、叶、愈伤组织等 可在目测控制下进行操作	需要复杂昂贵的专用设备 需要接受专门训练的技术人员进行操作

8. 酵母菌表达系统与大肠杆菌表达系统的比较

(1) 酵母表达系统

酵母是一类最简单的真核生物,其生长代谢与原核生物相似;但在基因表达与调控方面类似于高等生物。

目前作为酵母表达系统宿主菌的酵母主要有酿酒酵母、巴斯德毕赤酵母、乳酸克努维酵母和多型汉森酵母。

酵母是一种单细胞低等真核生物,培养条件普通,生长繁殖速度迅速,能够耐受较高的流体静压,用于表达基因工程产品时,可以大规模生产,有效降低了生产成本。

(2) 大肠杆菌表达系统

优越性:

- 1) 结构简单, 生理生化和遗传背景知识, 尤其是其基因表达调控机制有了清楚的了解;
- 2) 易于大规模培养, 成本低廉;
- 3) 经过了遗传改造, 已发展为一种安全的基因工程实验系统, 拥有各种不同的菌株和载体系列。

不足之处(表达真核基因的障碍):

- 1) 真核基因具有内含子, 所以只能用其 cDNA;
- 2) 许多真核生物基因仅在大肠杆菌中合成无特异性空间结构的多肽链;
- 3) 许多真核基因的蛋白质产物, 都要经受翻译后的加工修饰, 而大肠杆菌缺乏蛋白质加工系统;
- 4) 大肠杆菌内源性蛋白酶易降解外来的真核生物基因所表达的蛋白质分子;
- 5) 大肠杆菌细胞膜间隙中含有大量的内毒素, 痕量的内毒素即可导致人体热原反应。