**实验生物学期中总结**

**重组DNA技术**

**1. 概念**

**重组DNA技术：**供体基因与载体体外重组，导入受体体内表达出新产物或新性状。

**基因工程：**上游技术：重组DNA技术；下游技术：大规模细胞培养、产物分离……

**2. 基本条件**

**工具酶：**

**限制性核酸内切酶：**

4-8bp回文序列

盐浓度、DNA纯度、酶切体系缓冲液性质、DNA样本甲基化程度→酶活

不适宜的条件下：增大酶量、加大体系、延长时间

**DNA连接酶：**

平头连接：增加酶量、增大底物浓度、加入PEG8000、加入NaCl（单价阳离子）

**DNA聚合酶：**

**大肠杆菌DNA聚合酶I（DNA pol I）：**

5’→3’聚合酶活性：缺口平移标记；5’→3’外切酶活性；3’→5’外切酶活性

**Klenow：**

DNA pol I的大片段，无5’→3’外切酶活性：补平5’粘性末端、末端同位素标记、cDNA第二链合成、双脱氧测序

**T4 DNA聚合酶：**

5’→3’聚合酶（存在四种dNTP时占主导地位）；3’→5’内切酶（无dNTP时）：切平3’突出末端

末端放射性标记：无dNTP先切→加入放射性标记dNTP

**反转录酶：**

合成cDNA；双向外切DNA-RNA杂合链中的RNA

**核酸酶：**

**S1核酸酶：**

内切DNA或RNA（单链>双链）；nick→gap

**核酸修饰酶：**

**末端脱氧核苷转移酶（TdT）：**

随机在末端掺入dNTPs

**碱性磷酸单酯酶；T4-多核苷酸磷酸激酶**

**载体：**基因高效转入、复制能力、整合能力、扩增或表达

**质粒：**

**特性：**

自主复制性（严紧、松弛）；不相容性；可转移性（接合）；遗传标记

**分离纯化：**

氯化铯梯度离心：cccDNA位于ocDNA和RNA之间，纯度高，周期长；碱溶法：碱沉淀染色体DNA、蛋白质，裂解RNA；沸水浴法

**噬菌体或病毒DNA：**

**λ噬菌体：**

48502bp，包装上限51kb→插入型载体（0-14kb）、取代型载体（10-25kb）

遗传标记：琥珀型突变

体外包装，高效转染，大片段克隆

**Cosmid：**

Cos位点+质粒；体外包装；装载量大（45kb）

**人造染色体：**

**细菌人造染色体（BAC）**

**酵母人造染色体（YAC）：**端粒、酵母复制子、酵母着丝粒、细菌复制子、细菌复制原点

**基因工程受体：**

**特性：**限制性缺陷型、重组整合缺陷型、较高的转化率、与载体的选择标记表型互补、感染寄生缺陷型

**大肠杆菌：**遗传背景清楚，生长迅速，载体系统完备；产内毒素

**芽孢杆菌：**遗传背景清楚，分泌机制健全，不产内毒素；遗传欠稳定，载体不完备

**链霉菌：**产抗生素；遗传不稳定，生长缓慢

酵母、昆虫细胞、哺乳动物细胞、植物

3. 操作过程（切→接→转→增→筛）

**DNA体外重组（切+接）：**

连接酶直接连接；TdT酶加尾连接（人工黏性末端）；同源重组（至少15bp同源）；CRISPR-Cas9

载体分子连接前去除磷酸基团（磷酸单酯酶）、提高外源片段与载体的分子比（10:1）→提高重组率

重组DNA分子的转化和扩增（转+增）：

**转化技术：**

**Ca2+转化：**

Ca2+与外膜磷脂低温下发生作用形成液晶，并经过热脉冲收缩，出现空隙（G-常用）

原生质体转化：

用溶菌酶去除细胞壁（G+常用）

电击转化；纳米投送、微流体（破膜或融合）；λ噬菌体转染

**转化率——每μg载体转化的分子数：**

载体本身的性质、载体的空间构象、插入片段的大小、受体细胞→转化率

**重组子的筛选和鉴定（筛）：**

**遗传标记：**

抗药性；营养缺陷；显色

**序列：**

PCR；酶切图谱；菌落/噬菌斑原位杂交→探针：反转录，缺口平移、A（生物素结合蛋白）B（生物素）C（荧光胺、显色酶）标记、地高辛标记（dUTP+连接臂+甾醇半抗原+抗体+显色酶）；测序

**外源基因产物：**

诱导抗性；蛋白质生物功能；蛋白质抗原性；SDS-PAGE

**4. 目的基因的克隆与文库构建**

**鸟枪法：**

**随机克隆全基因组DNA**（超声波、全酶切、部分酶切（片段长度可控））→**与载体连接**→**转化受体细胞**→**筛选有效片段**

局限性：工作量大，需要背景知识；不能获得最小长度；不能去除内含子

**cDNA法：**

**第一链合成：**polyT作为引物，逆转录酶

**第二链合成：**自身引导法（第一链3’端环化→Klenow补平→S1酶切，5’端会缺失）；置换合成法（RNaseH消化RNA，RNA片段作为引物→pol I合成→S1酶消化单链部分，T4连接酶补齐空隙）；引导合成法（TdT酶在第一链的3’端加C，不丢失片段）

**RT-PCR**

**差异分离：**根据不同类群细胞中表达量的差异设计分离程序

**PCR法：**

**T载体克隆：**Taq酶倾向在产物的3’端加一个A，载体上配有3’突出的T

**盒式PCR：**基因外侧序列位置，设计盒式接头引物

**反向PCR：**基因组片段自连成环

**化学合成法**

**基因文库的构建：**

**基因库：**天然存在；**基因文库：**人工构建

**文库的完备性：**N = ln(1-P)/ln(1-f)，P-基因存在于克隆中的概率，f-克隆片段的长度/基因组长度，N-所需克隆数

载体的选择：质粒-15 kb、λ-DNA-25 kb、cosmid-45 kb、BAC-300 kb、YAC-1000 kb

酶切片段排序：指纹图谱（酶切→部分相同图谱→重叠片段）；染色体走读（亚克隆的两端片段杂交，往外推）

**5. 外源基因在大肠杆菌中的表达**

**优势：**背景清楚，操作方便，系统完善，安全；**劣势：**缺乏对真核生物蛋白复性，缺乏修饰加工系统，内源蛋白酶，内毒素

**高效表达：**

**启动子：**高效；可控（*Plac*-IPTG诱导→抗葡萄糖代谢阻遏*Plac*-UV5，*Ptrp*-IAA诱导，T7启动子-T7RNA聚合酶→菌体自身诱导表达）

**终止子：**强终止子

**核糖体结合位点：**SD序列

**密码子偏好性；质粒拷贝数**

**构建策略：**

**包涵体表达：**

**包涵体：**大分子聚集体，丧失生物活性

**优点：**方便分离，产物结构稳定；**缺点：**复性困难（尤其Cys残基较多时）

**溶解与变性：**拆开错配的二硫键和次级键（清洗剂：SDS等、促溶剂：尿素等、混合溶剂、极端pH）

复性：稀释，修饰，分子伴侣等

重折叠：二硫键形成-分子氧化法（较随机），二硫键交换（谷胱甘肽，较特异）

**分泌型异源蛋白：**

**优点：**稳定性高，易于分离，末端完整（Met随信号肽被切除），有分子伴侣帮助形成正确构象；**缺点：**大肠杆菌分泌机制不健全

**融合型异源蛋白表达：**

稳定性好，易于分离，表达率高，溶解性好，需要回收

**系统构建：**保证读码框一致

**蛋白回收：**化学裂解（CNBr断裂甲硫氨酸），酶促断裂（Xa、EK）

**寡聚型异源蛋白表达：**

**外源基因→多拷贝串联：**表达效率高，稳定，分离困难

**整合型异源蛋白表达：**

转位因子；同源序列

**蛋白酶缺陷或抗性表达系统：**

C端的Asp有助于提高稳定性；构建蛋白酶缺陷的大肠杆菌菌株

**胰岛素的表达：**

分别表达A、B链，随机形成二硫键→效率很低

人胰岛素cDNA（ABC链）→形成良好的构象

**模式生物技术**

**1. 模式生物：**采用活体模型，阐释生命规律或生理、病理过程

**2. 常用模式生物：**

**小鼠：**

生物进化上与人类接近，胎盘形成和早期胚胎发育与人类接近；器官组织和细胞结构和人类接近；测序已经完成；基因与人类高度同源；基因操作手段成熟

解读功能位置的人类基因、疾病模型

**斑马鱼：**

个体小，饲养方便；胚胎发育时间短，胚胎透明；遗传操作方法成熟；具有大量突变体，可以模拟人类疾病

疾病、肿瘤模型；高通量药物筛选；药物安全性评价

**线虫：**

体积小，饲养方便，生命周期短，雌雄同体；细胞谱系清楚；遗传操作手段成熟

重要的发育（细胞命运决定）、神经系统的模式生物

**3. 遗传操作技术原理：**

**转基因小鼠：**显微注射+胚胎移植

**特点：**随机插入（单位点、多位点、多串联）；插入位点及整合方式影响转基因的表达和表型（*de novo*甲基化，基因沉默）；使用前先建系；表型数据需要在不同的系之间相互验证；表型受遗传背景影响很大

**载体构建：**合适的启动子（强度、组织专一性，可控性），5’-UTR，3’-UTR，Kozak序列

**报告基因；可诱导表达**

**基因敲除小鼠：**

**ES细胞分离、培养**→**打靶载体构建**（抗性基因+同源片段+HV-tk，双向选择：载体未整合-致死，未转化-无抗性）→**电转**→**药物筛选**→**囊胚腔注射（**嵌合细胞团）→**繁育基因敲除小鼠**

**CRISPR-Cas9**

**条件基因打靶技术：**

**Cre/loxP；FLP/FRT；Dre/rox：**同源重组导致缺失、倒位、异位

在目标基因两侧插入loxP；同时建立或选择一个表达Cre的小鼠→杂交，得到Cre; abcflox/flox小鼠→诱导特异组织的Cre表达

**流式细胞原理及应用**

**1. 流式细胞术：**稳定、快速、直线流动的颗粒→快速的多参数、定性或定量分析

**2. 光学系统：**

前向散射光（FSC）：由颗粒大小决定，与表面性质有关，死细胞会减小

侧向散射光（SSC）：垂直于前向角，与细胞内部的复杂程度有关（如凋亡小体，凋亡细胞SSC增大，FSC减小）

判断流式细胞仪能否检测某一特定的荧光（带通/长通滤光片）

**3. 流式数据分析**

流式数据分析设门：选择目标细胞，剔除多个细胞，剔除死细胞和碎片

线形门、矩形门、圆形门、多边形门、任意形状门和十字门

**生物光学成像技术**

**1. Infinite correct system**：object lens + tube lens（放大率=*ft/fo*）

**2. PSF：**

从物体出发的点光源在像面无法完全汇聚（例如艾里斑）

**计算物镜的放大率，分辨率**

**3. 传统显微镜（宽场）：**

**明场：**靠透射光照明，背景为亮，目标为暗；**暗场：**靠反射光或发射光照明，目标为亮；**相差：**目标组织的内部结构和厚度不同，折射率不一样，光通过后产生相差，利用光的干涉将相差转化为振幅，使目标组织呈现亮或暗的反差（环形光阑、相位板）

**4. 3D显微镜：**

**共聚焦：**

激发光路与收集光路在两个位置聚焦，激发光聚焦在样品的一个点平面上，而焦面上的发射光会聚焦于pinhole上，可以穿过pinhole，而非焦面的发射不能通过pinhole→减少了非焦面的激发光，降低背景，提升分辨率；但是需要逐点扫描，速度慢

**spinning disc：**

为了解决传统的点扫描共聚焦速度慢的问题，聚焦透镜和pinhole被两张分别带有很多微透镜和很多pinhole的spinning disc所取代，通过圆盘的旋转实现多点同时扫描，提高速度

**双光子：**

通过使荧光分子在极短的时间内同时吸收两个波长较长光子，从而达到与吸收一个波长较短的光子一样的激发效果→由于需要两个光子聚焦，荧光只会在焦点发出，减少了背景荧光；波长较长的光对于厚的组织穿透性较好，光损耗、光漂白较少；但是点扫描速度很慢

**光片：**激发光在仅在物镜的焦平面形成一道“光片”，使只有焦平面被照亮

**5. 超分辨显微镜：**

**STED（受激发射损耗显微镜）：**

激发光由于光的衍射，在焦面处聚焦为一个光斑，STED通过在激发光外围增加一圈损耗激光，使得外围的荧光分子以受激发射的方式回到基态，而中心的荧光分子继续以自发荧光的方式回到基态，从而减小了激发面积，实现更高的分辨率；激光功率大，会损坏样品、光漂白

**SIM（结构光照明显微镜）：**

OTF相当于低通滤波器，将含有细节的高频信息过滤掉了，而采用结构光照明，则可将部分的高频信息转化移动到OTF的范围内，从而使采集的图像上包含一定的高频信息，可以还原出图像的某些细节，从而实现超分辨成像

**PALM/STORM：**

单分子荧光成像，通过非常弱的激发光，一次只随机激发少量的荧光分子，使得荧光分子之间重叠很少，然后通过激光关闭这些荧光分子，再次随机激发，经过多次成像后，即可拼合出目标物体；成像时间长，样品所受的辐射大

**生物信息学**

**贝叶斯公式：**

*A*-data，即结果；*B*-model，即起因；，先验概率，往往不知道

从一堆球中摸出R个红球，G个绿球，估计红球的比例x

data: R, G model: x

**最大似然估计：**

上式为data关于x的概率分布，求出当概率最大时x的取值即为最大似然估计：

**贝叶斯估计：**

若假设x为均匀分布，则有：

x在[0, 1]之间连续：

上式为x的概率分布，贝叶斯估计即为求x的期望

**基因表达分析**

设计实验——如何找到导致疾病的分子机制

**1. 找到差异表达基因：**

**基因芯片：**便宜、操作方便；不能覆盖整个基因组、杂交假阳性、不能检测非编码RNA

**RNA-seq：**可以覆盖整个基因组、准确、可检测非编码RNA；昂贵、操作复杂

**2. 检测目标基因的表达量：**

**RNA水平：**RT-qPCR，核糖体保护，Northern blot……

**蛋白质水平：**Western blot……

**3. 找出表达量变化的原因：**

**较大的突变（例如拷贝数变异）：**FISH（荧光原位杂交）

**SNP：**Taqman 探针qPCR，芯片，测序……

**染色质结构变异：**Dnase I超敏感位点作图（找开放区，基因表达多的区间），Hi-C（测定染色质三维结构）

**DNA修饰：**限制酶消化+qPCR（甲基化）

**转录因子的亚细胞定位：**免疫荧光

**4. 研究基因表达调控元件的作用：**

**转录因子-启动子：**寻找转录起始位点（S1酶作图，引物延伸……）→寻找启动子（报告基因试验：片段+报告基因）→寻找转录因子（报告基因试验：转录因子和binding site-gene质粒共转染）

**验证转录因子和DNA互作：**凝胶阻滞实验，DNA印迹，DNA亲和层析

**增强子的作用：**enhancer trap，Hi-C，ChiP

**5. 基因的表型验证：**RNAi或CRISPR-Cas9

**单细胞测序**

**1. 扩增技术：**

**非线性扩增（PCR）：**产率高；但是合成长度短，覆盖率差（allelic preference，随机引物），定量误差大（不同链扩增速率不一样）

**线性扩增（MDA，多重取代扩增）：**

利用𝛷-29 DNA聚合酶结合能力强（长距离合成），保真性高的特点，用随机引物扩增DNA，合成至下一随机引物结合的位点时，将下一段链取代

产率低；但是覆盖率好，扩增误差小

**UMI：**PCR的引物前端带有随机的核苷酸标记，最后根据扩增结果中UMI种类的数目可以知道一开始模板的分子数，用于定量分析

**2. 单细胞分选技术：**

**流式细胞术：**可以从多种信号分选；损伤较大

显微操作技术

**微流控芯片：**含有不同barcode的油滴包裹凝胶珠，分选通量高；但对细胞活性和数量要求较高

**3. 单细胞测序技术：**

**SMART-seq：**无UMI，可以测全长。先通过流式或微流控芯片分选出单细胞，裂解细胞后用MMLV逆转录酶以poly(dT)为引物进行逆转录，会在3’端加上几个C，再利用polyG作为上游引物，合成第二链，从而得到全长cDNA。

**Drop-seq：**有UMI，有barcode，不能测全长，通量较高。用微流控芯片得到单细胞，之后将单细胞和凝胶珠包入油滴中构成反应体系，释放mRNA，进行逆转录反应，使DNA带上代表单分子的UMI和代表细胞的barcode，随后打破油滴进行PCR、tagmentation和3’富集过程，进行建库、测序。