The background of the slide is a dark purple color with several microscopic images of bacteria. In the top left, there is a chain of green, spherical bacteria. In the top right, there is a large, yellow, rod-shaped bacterium. In the bottom left, there is a cluster of small, yellow, spherical bacteria. In the bottom right, there is a cluster of yellow, rod-shaped bacteria.

第9章 微生物与基因工程

武汉大学生命科学学院

陈向东

(参见p249)

基因工程 (genetic engineering) 或 **重组DNA技术** (recombinant DNA technology)

对遗传信息的分子操作和施工：

对分离到的或合成的基因经过改造，插入载体中，导入宿主细胞内，使其扩增和表达，从而获得大量基因产物，或者令生物表现出新的性状。

二十世纪生物学具有划时代意义的巨大事件，推动了生物科学的迅猛发展，并带动了生物技术产业的兴起。

微生物在基因工程的兴起和发展过程中起着不可替代的作用！

（参见p251）

“微生物与基因工程”

第9章

微生物与基因工程

第一节 微生物与克隆载体

克隆载体的特点与应用

第二节 基因工程的常用技术和方法

PCR技术的原理与方法

其他需要自己看书掌握的内容见本章供思考的题目

第9章供思考的题目

- 1) 基因工程的基本步骤是怎样的？其中哪些需涉及到微生物的参与？
- 2) 为什么说微生物学不仅为基因工程提供了理论基础，同时也提供了操作技术？
- 3) 结合绘图简述PCR技术的原理。
- 4) 有哪些微生物常用作基因工程的宿主，各有何特点？
- 5) 一个质粒载体需要哪些基本的遗传学元件？请通过查阅文献举例（除了书上列的pBR322外）怎样的质粒载体才有利于基因的克隆和重组子的筛选？

第一节 微生物与克隆载体

(参见p256)

克隆载体的特点与应用

以扩增外源DNA为目的的载体---克隆载体 (cloning vector)

作为克隆载体的基本要求 (p256 倒数第2大段) :

- ✓ (1) 独立的复制子—能够进行独立自主的复制
- ✓ (2) 具有若干限制酶的单一切割位点, 便于外源DNA的插入
- ✓ (3) 具有可供选择的遗传标记—便于对阳性克隆的筛选和鉴定
- (4) 具有一定的安全性—胞内不重组和转移; 胞外不扩散
- (5) 载体DNA须易于分离和实验操作

基因工程的常用载体都来自微生物：

质粒载体

λ 噬菌体载体

黏粒（柯斯质粒载体）

M13噬菌体载体

噬菌粒载体

真核细胞的克隆载体

人工染色体

一、质粒克隆载体



(参见p257)

特点:

a) 低分子量有利于DNA的分离和操作;

b) 具有较高拷贝数;

c) 易于导入细胞;

d) 具有安全性;

质粒载体克隆外源DNA片段的大小一般不超过15Kb

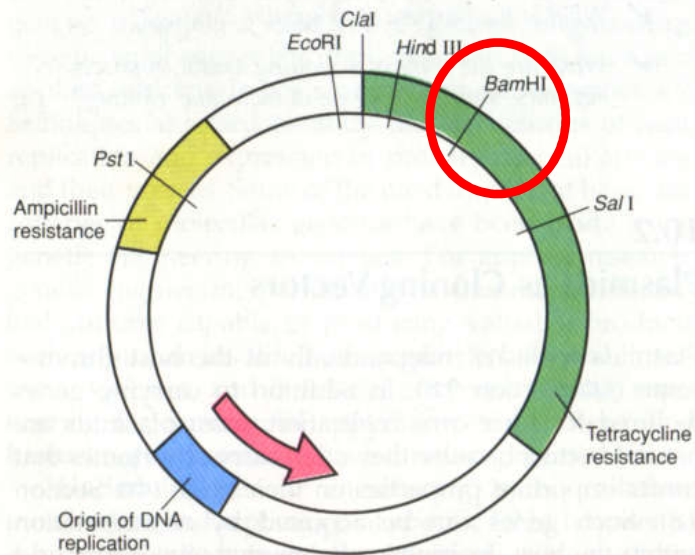
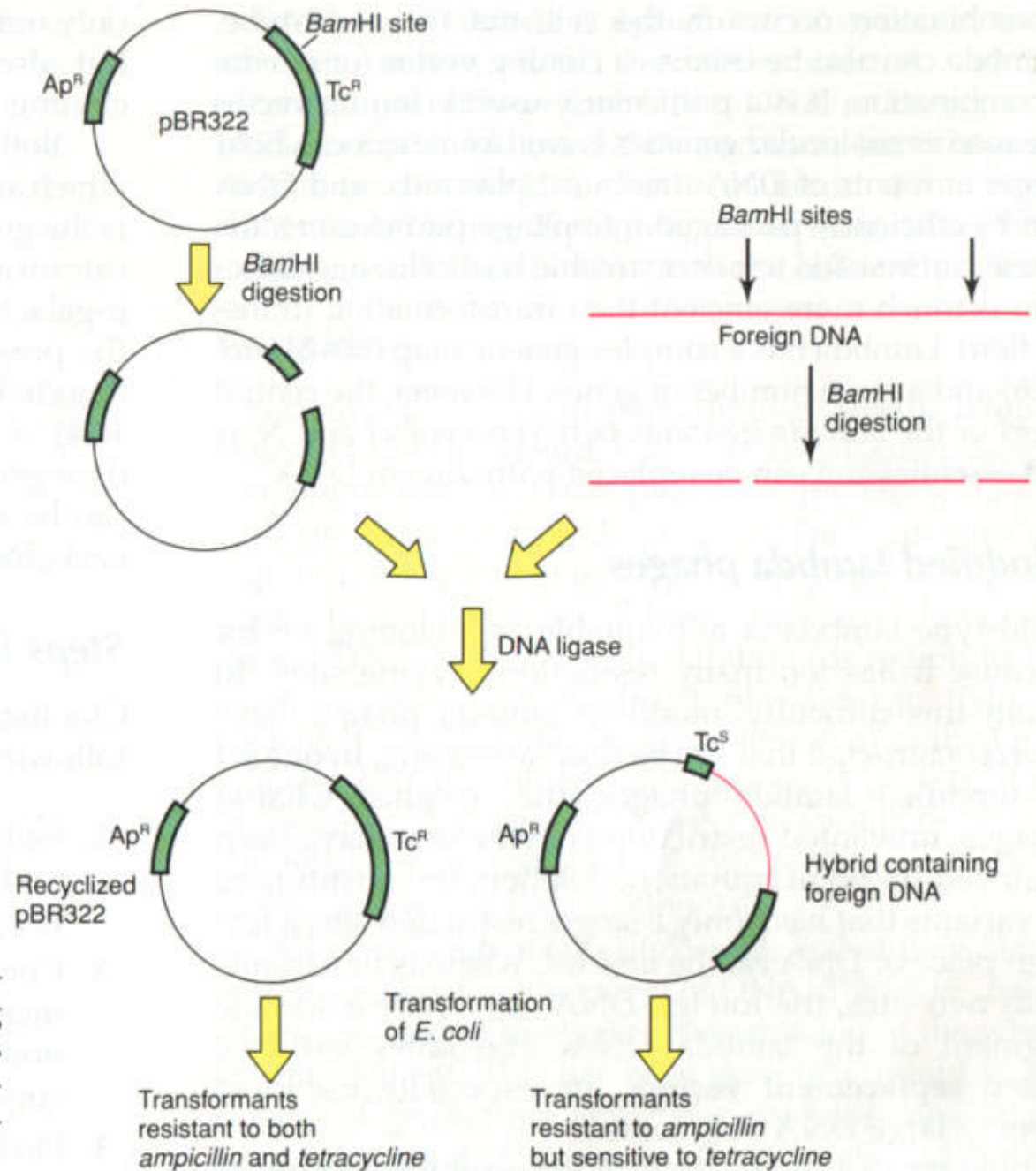


Figure 10.1 The structure of plasmid pBR322, a typical cloning vector, showing the essential features. The arrow indicates the direction of DNA replication from the origin.

参见p257 图10-6



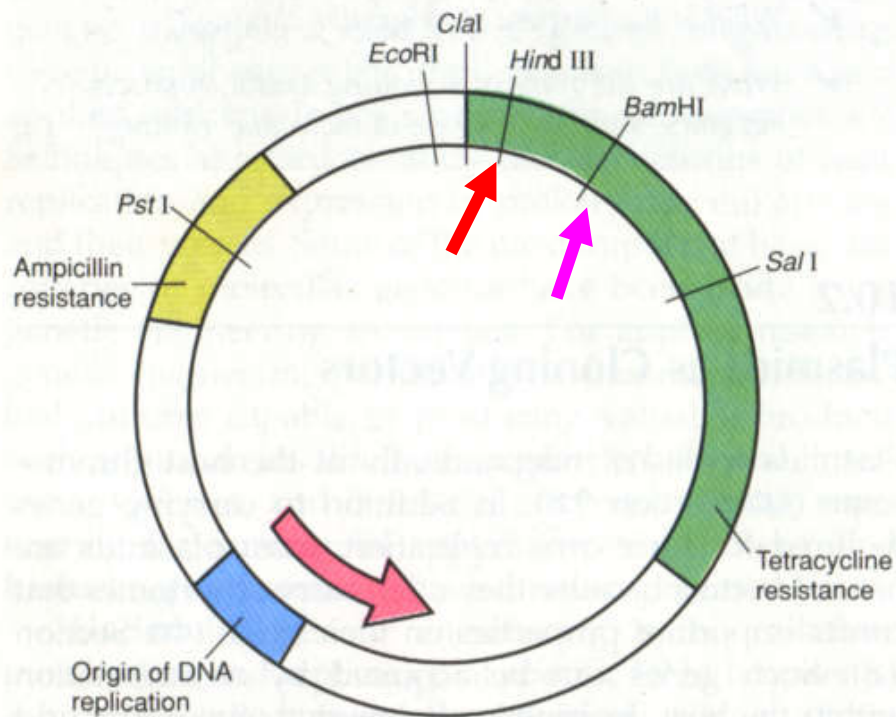


Figure 10.1 The structure of plasmid pBR322, a typical cloning vector, showing the essential features. The arrow indicates the direction of DNA replication from the origin.

参见p257 图10-6

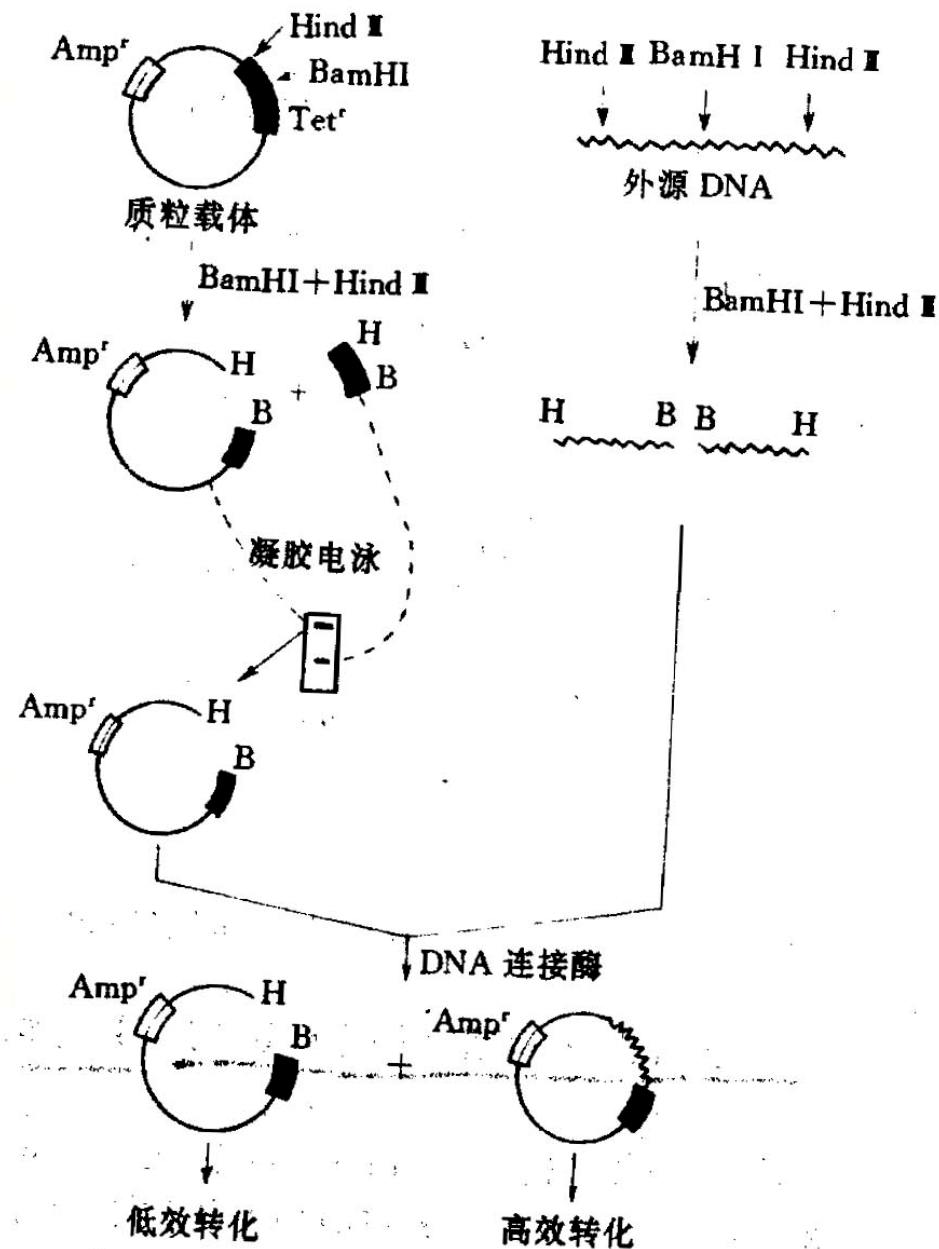
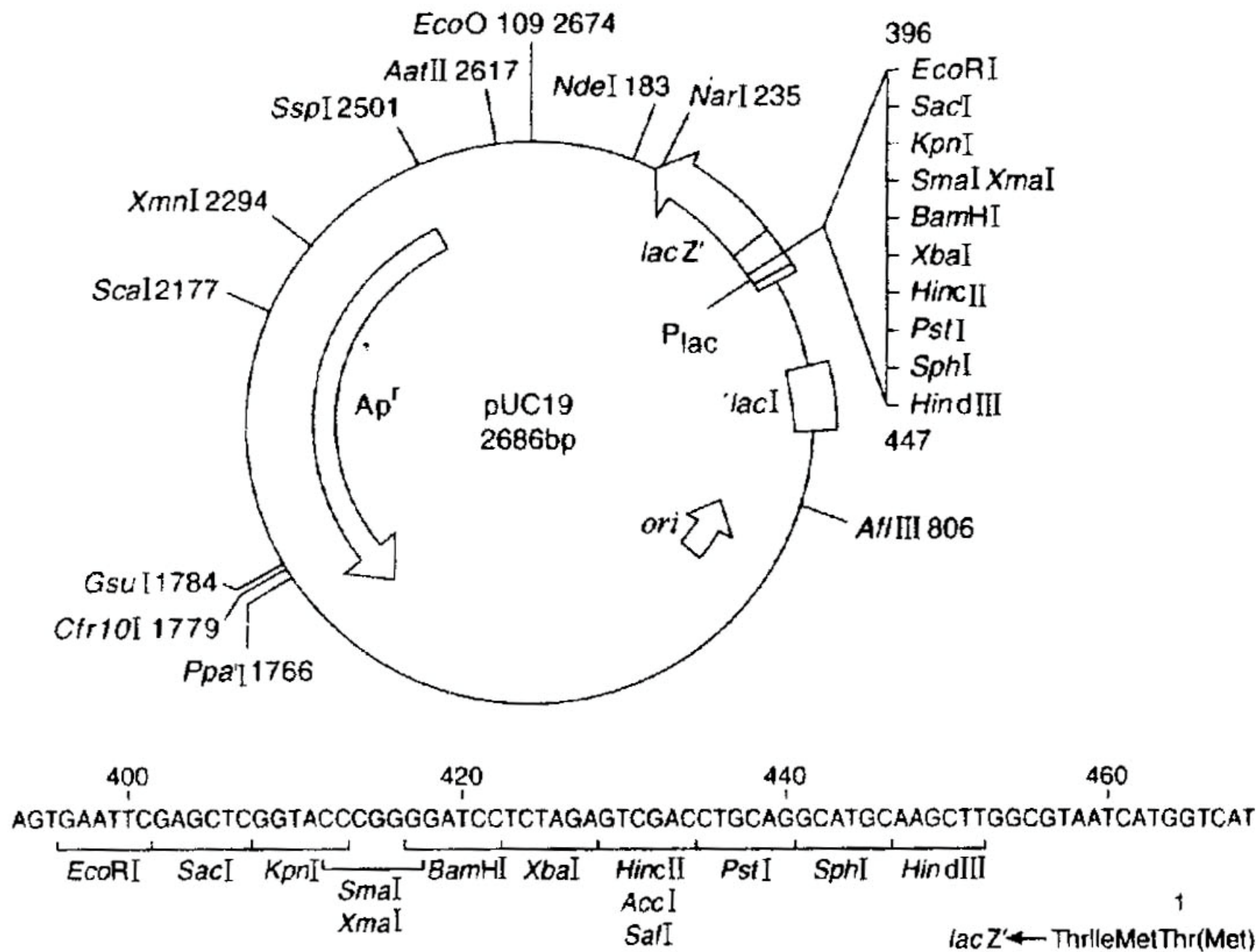
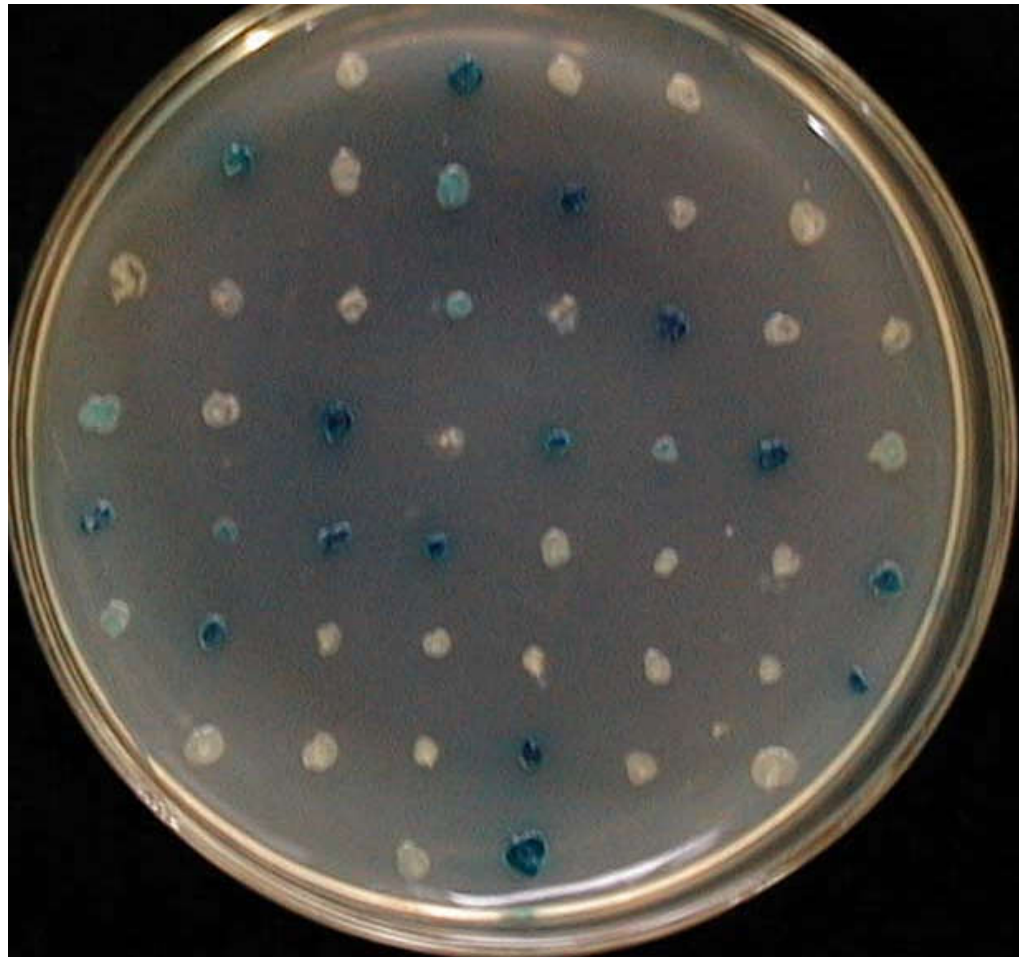


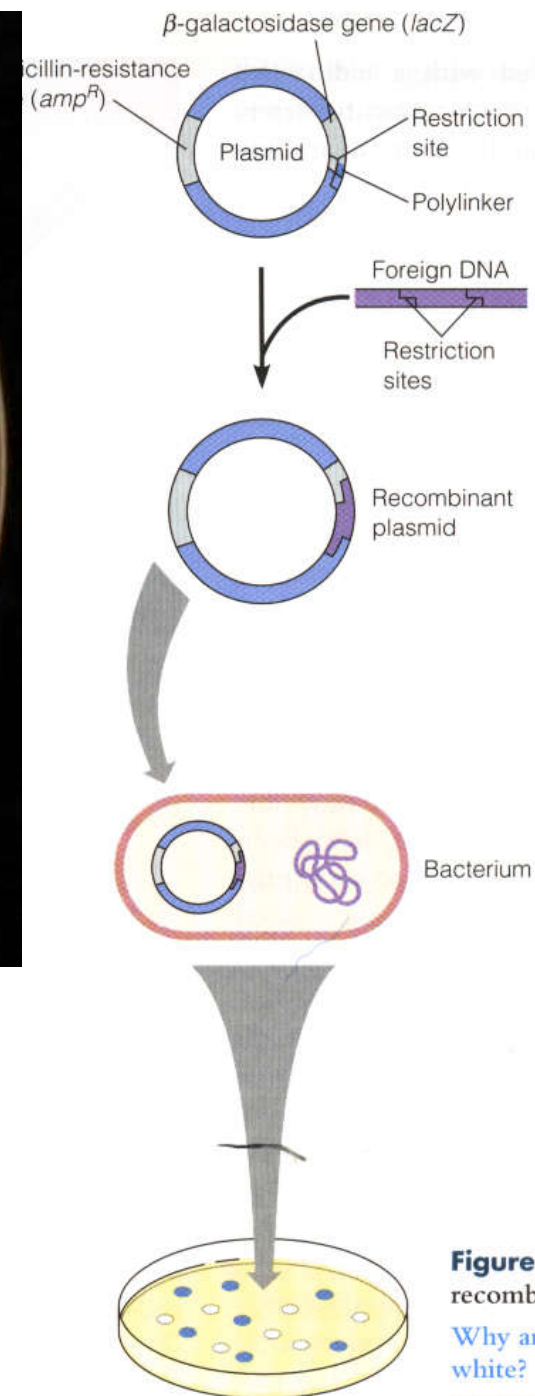
图 5-16 定向克隆法





4 All treated bacteria are spread on a nutrient agar plate containing ampicillin and β -galactosidase substrate, and incubated.

5 White colonies that appear must contain foreign DNA. Blue colonies must not contain foreign DNA.



具有细菌启动子功能的嗜盐古菌DNA片段的克隆

策略：

嗜盐古菌总DNA
随机酶降解片段

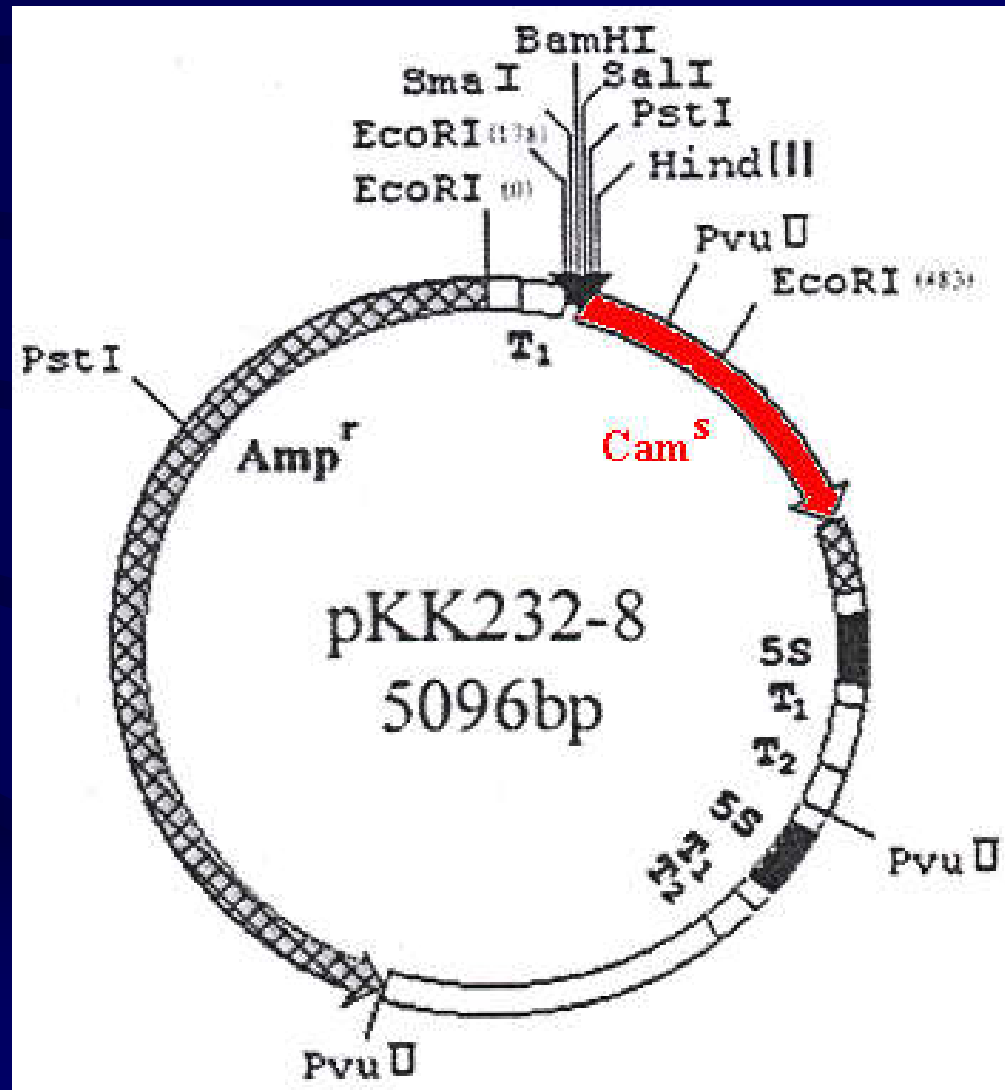


质粒载体
(pKK232-8)



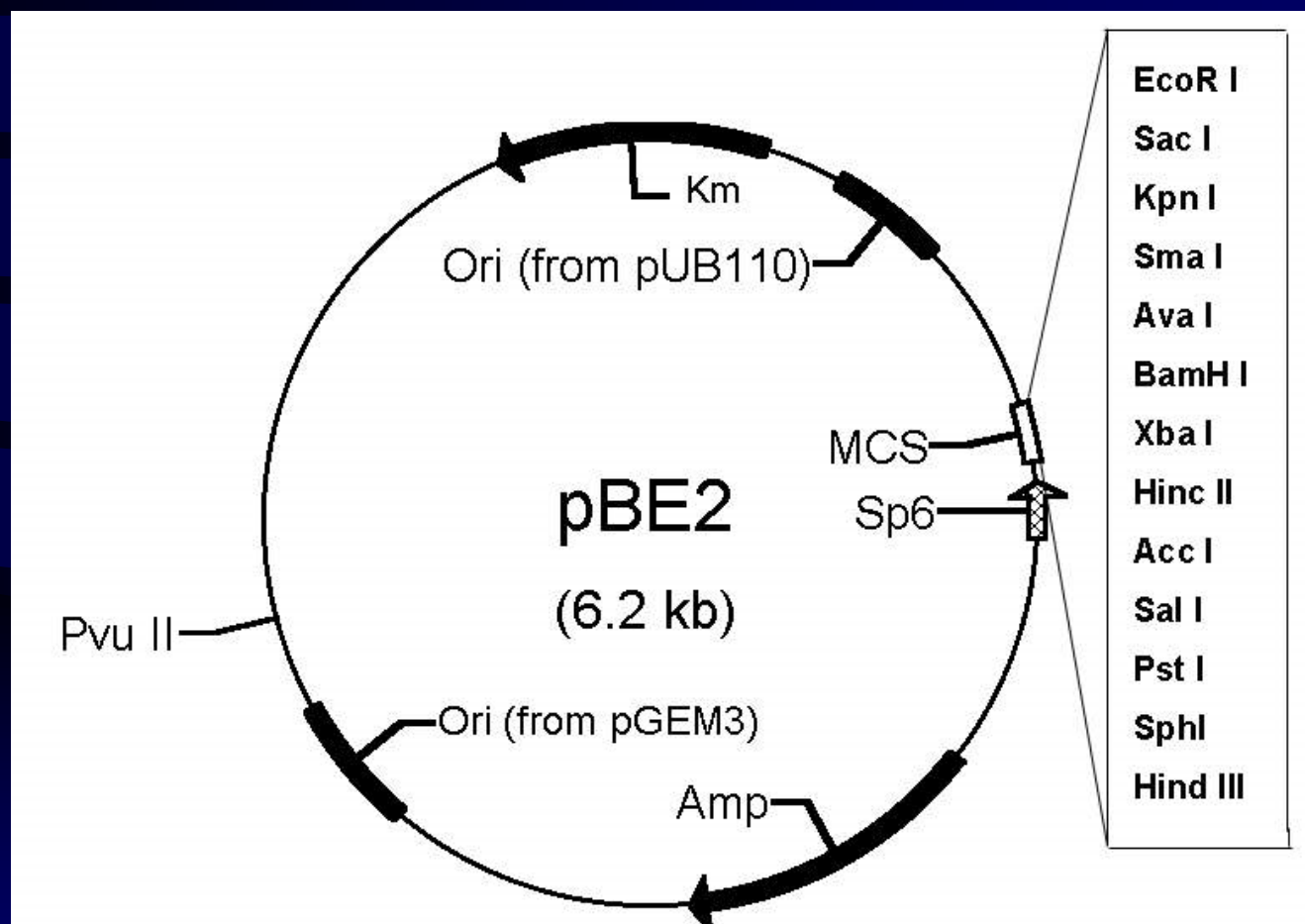
筛选氯霉素抗性转化子

pKK232-8质粒图谱



穿梭载体 (Shuttle vector)

拥有2个复制起始区的质粒，在不同属种的宿主细胞中具有自我复制能力，方便对基因的克隆与操作。



pBE2: 大肠杆菌—枯草杆菌穿梭载体

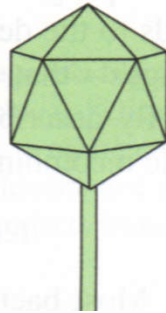
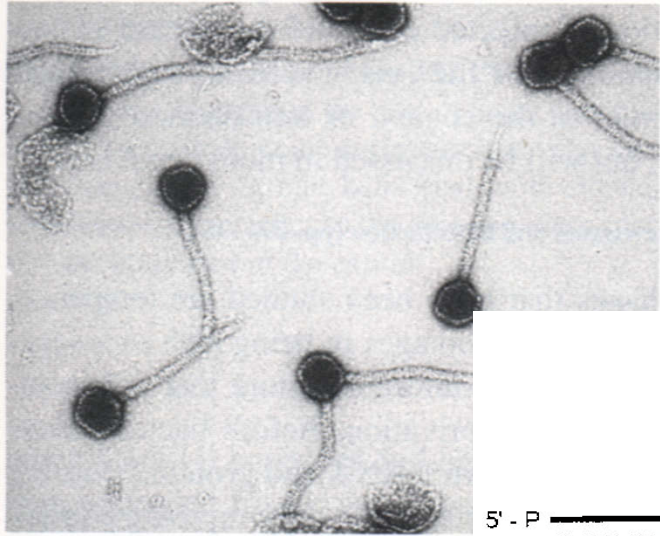
二、 λ 噬菌体克隆载体

(参见p257-258)

将野生型 λ 噬菌体DNA进行改造后建成，主要是去掉噬菌体DNA上过多的常用限制酶的酶切位点，及对非必要基因区域进行改造。

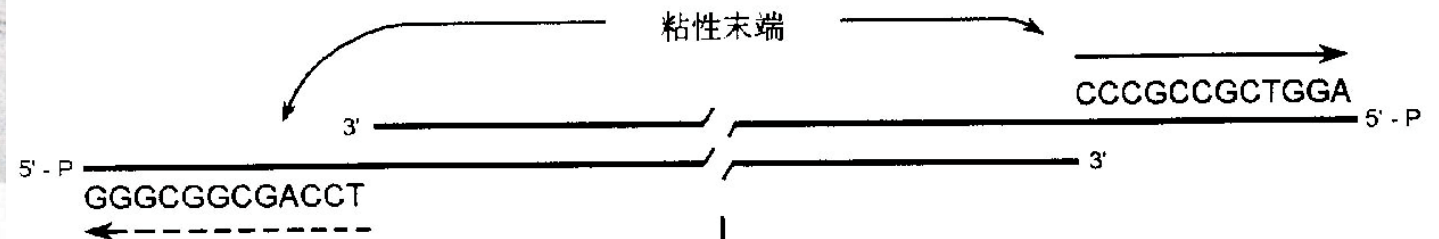
特点：

- 1) 分子遗传学背景清楚；
- 2) 容量较大（能容纳大约23kb的外源DNA片段）；
- 3) 感染效率高。其感染宿主细胞的效率几乎可达100%，而质粒DNA的转化率却只有0.1%。
- 4) 具有更为狭窄的寄主范围，更加安全。



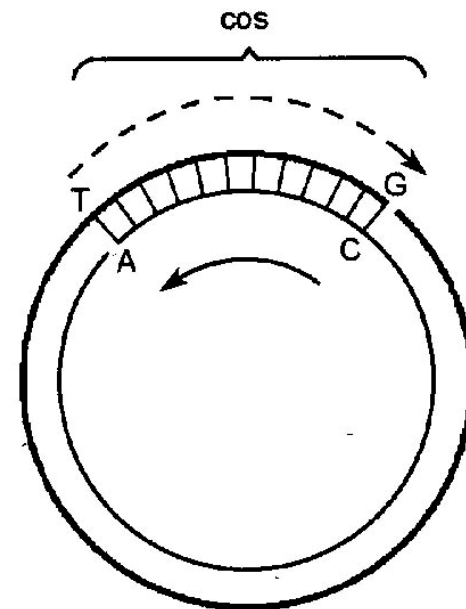
λ噬菌体的基因组特点:

Figure 17.14 Bacteriophage Lan



(a)

环化作用



(b)

开环结构

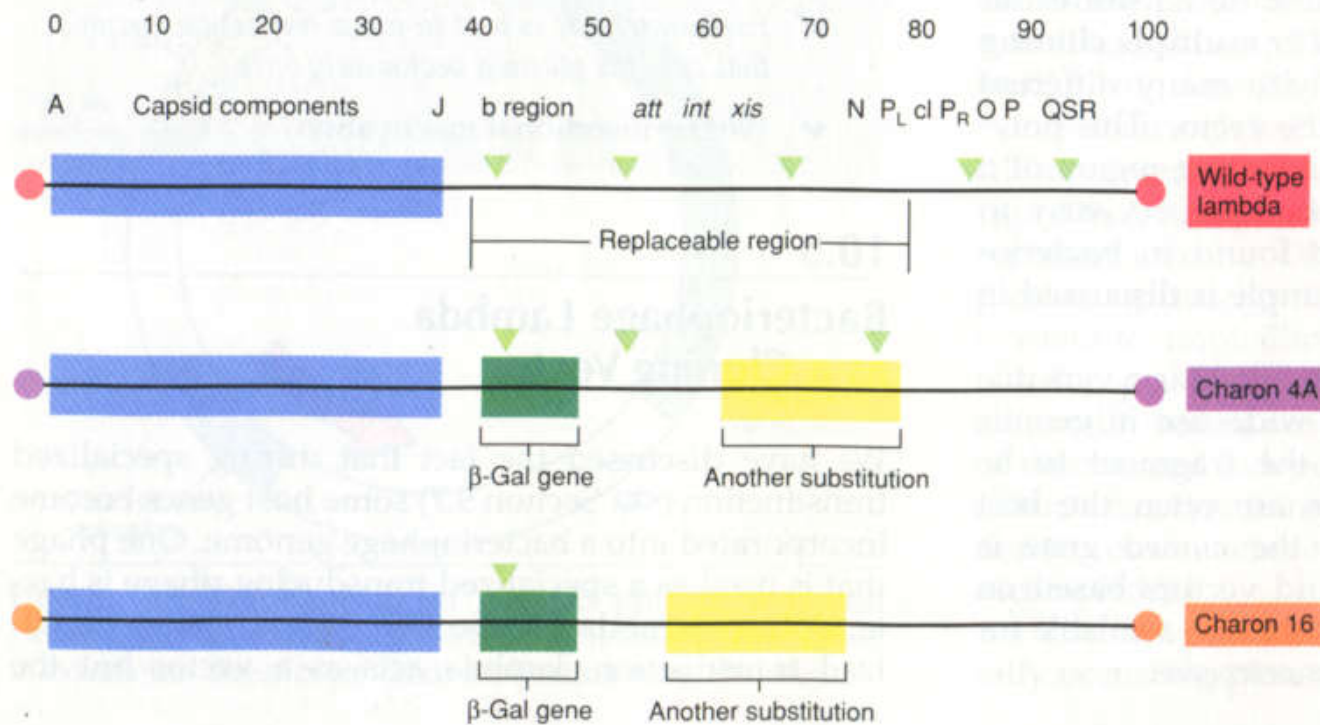


Figure 10.3 Molecular cloning with lambda. Abbreviated genetic map of bacteriophage lambda showing the cohesive ends as circles (∞ Figure 8.26). Charon 4A and 16 are both derivatives of lambda, which have various substitutions and deletions in the non-essential region. One of the substitutions in each case is a gene (β-Gal) that codes for the enzyme β-galactosidase, which permits detection of clones containing this phage. Whereas the wild-type lambda genome is 48.5 kilobase pairs, that for Charon 4A is 45.4 and that for Charon 16 is 41.7 kilobase pairs. The arrows (▼) shown above the maps of each phage indicate the sites recognized by the restriction enzyme *EcoRI*.

与溶原性相关的基因可以被外源DNA取代而不影响λ噬菌体的感染、复制和裂解宿主细胞的能力。

插入型载体 (insert vector)

取代型载体 (replacement vector)

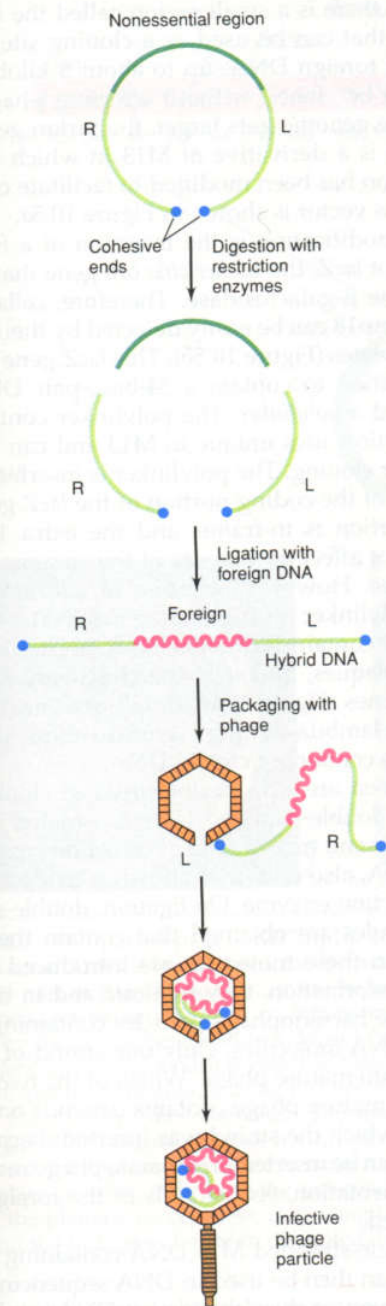


Figure 10.4 The use of bacteriophage lambda as a cloning vector. (See text for details.)

▲ 经过**体外基因操作和包装**后形成**重组噬菌体**，可以通过正常的**感染**途径进入宿主细胞；

▲ **重组噬菌体DNA**也可不经过体外包装而直接通过**转染（转化）**方式进入宿主细胞；

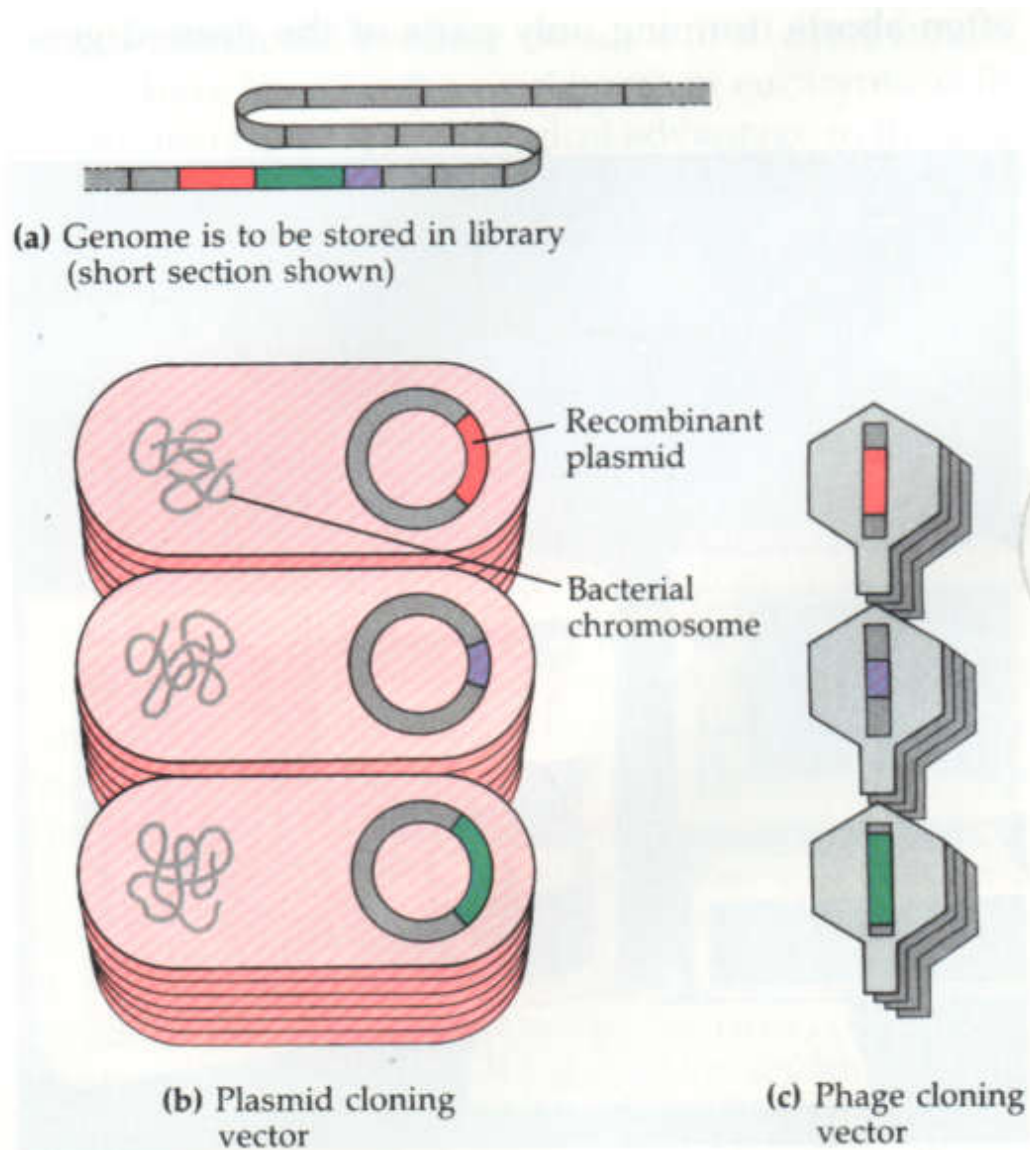


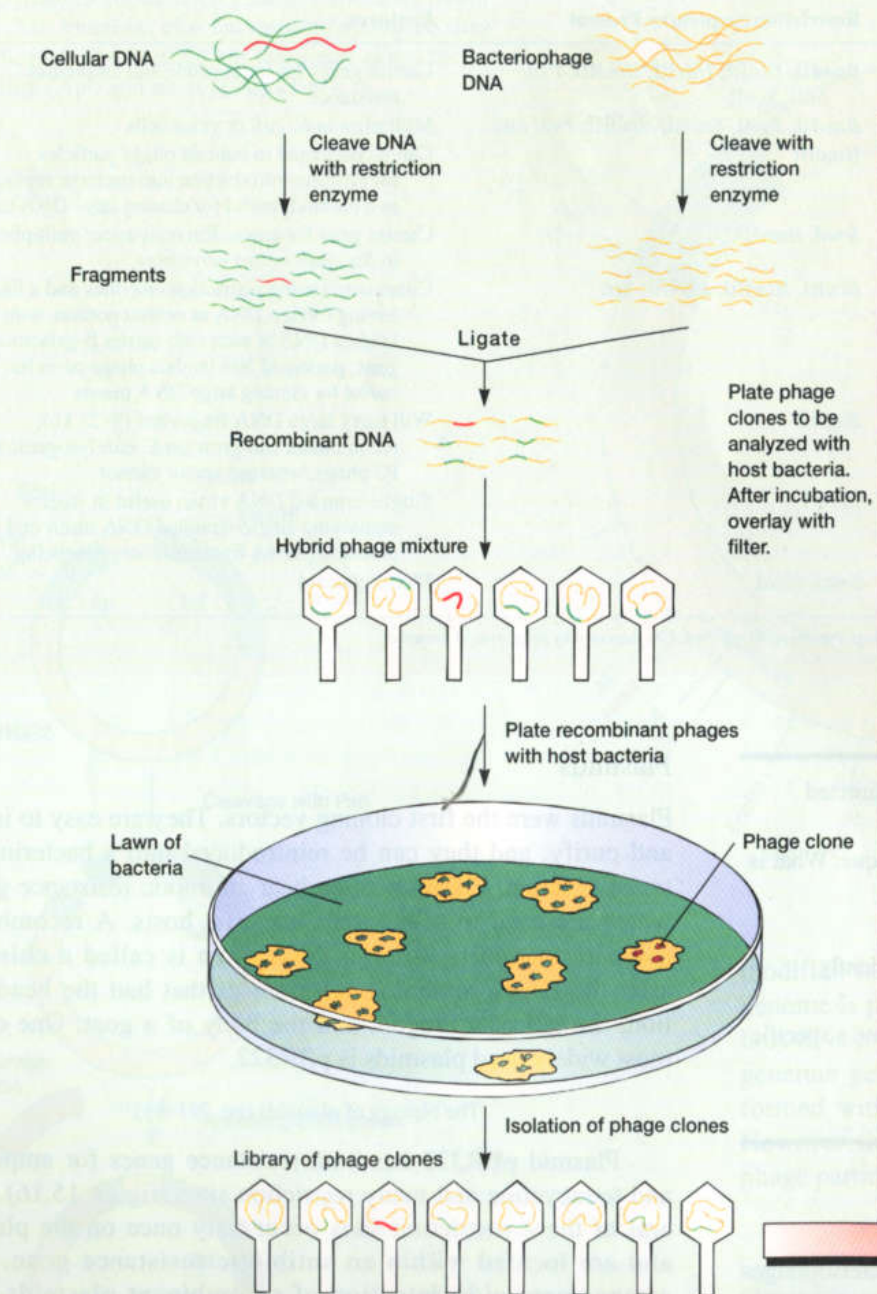
FIGURE 9.7 Gene libraries. A gene library is a collection of a large number of DNA fragments from a genome (a). Each fragment, containing about one gene, is carried by a vector, either a plasmid carried within a bacterial cell (b) or a phage (c).

质粒和噬菌体载体都可用于构建基因文库；

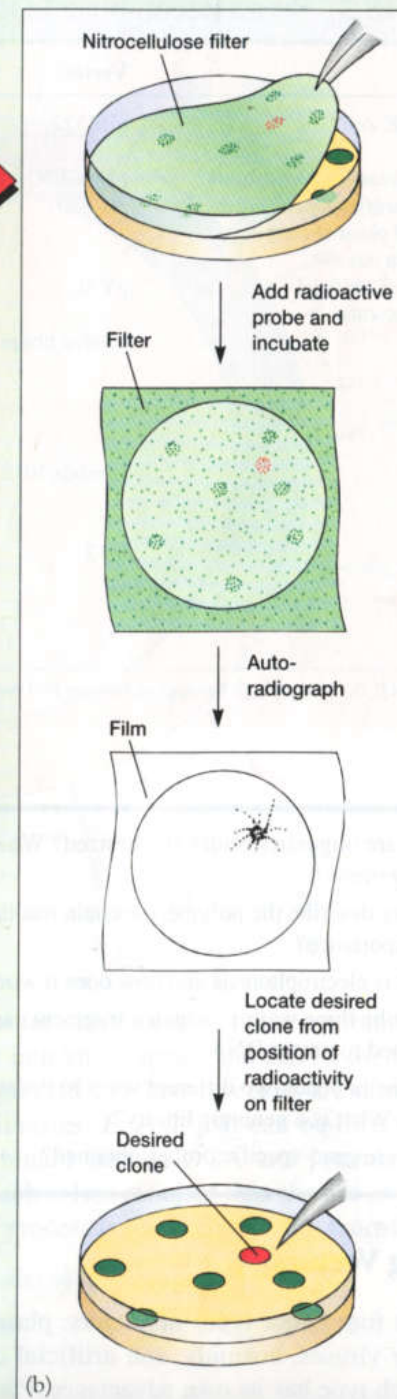
但后者更有优势：

容纳的外源DNA片段较大；

以感染途径进入宿主细胞的效率比转化高；



(a)



(b)

以探针杂交技术对重组噬菌体进行筛选

——有关技术在第10章介绍

第二节 基因工程的常用技术和方法

PCR技术的原理与方法

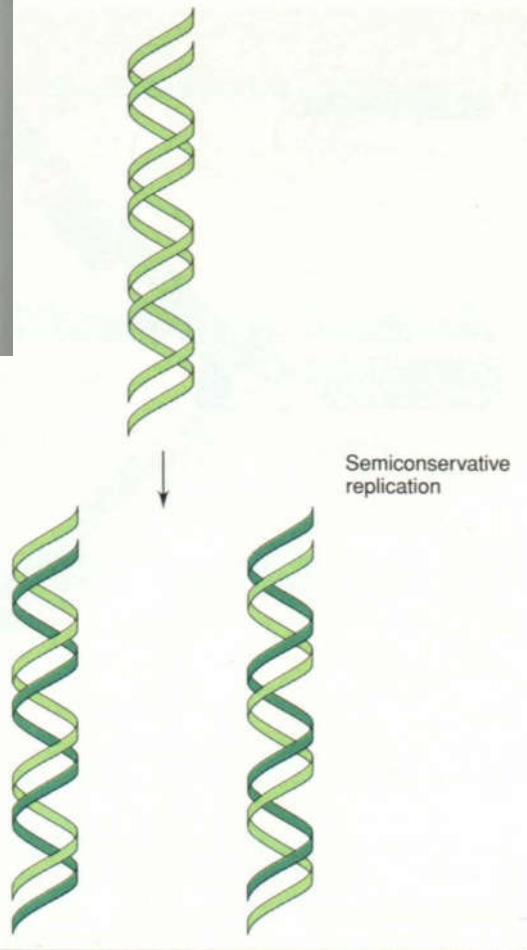
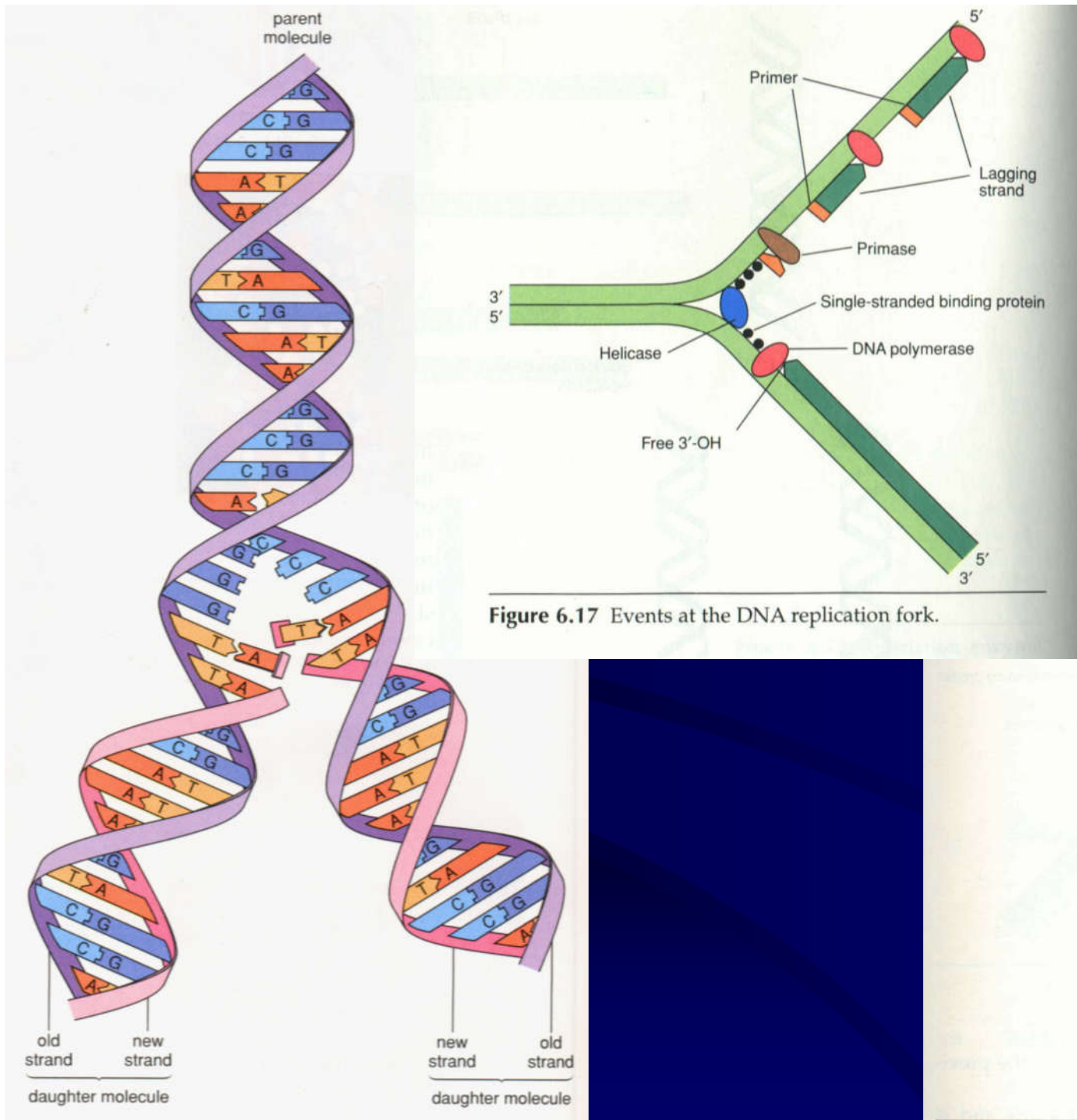
一、PCR的原理和应用

(参见p254-255)

1. 原理

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)

特点：在体外模拟细胞内进行的DNA复制过程



- 基本原理:

- 以待扩增的DNA为模板，由分别与待扩增DNA两侧互补的两段寡核苷酸作引物，在DNA聚合酶和4种dNTP存在情况下，经变性、退火和延伸，多次循环反复使微量的特异模板DNA片段得到大量扩增。

- (参见p254~255)

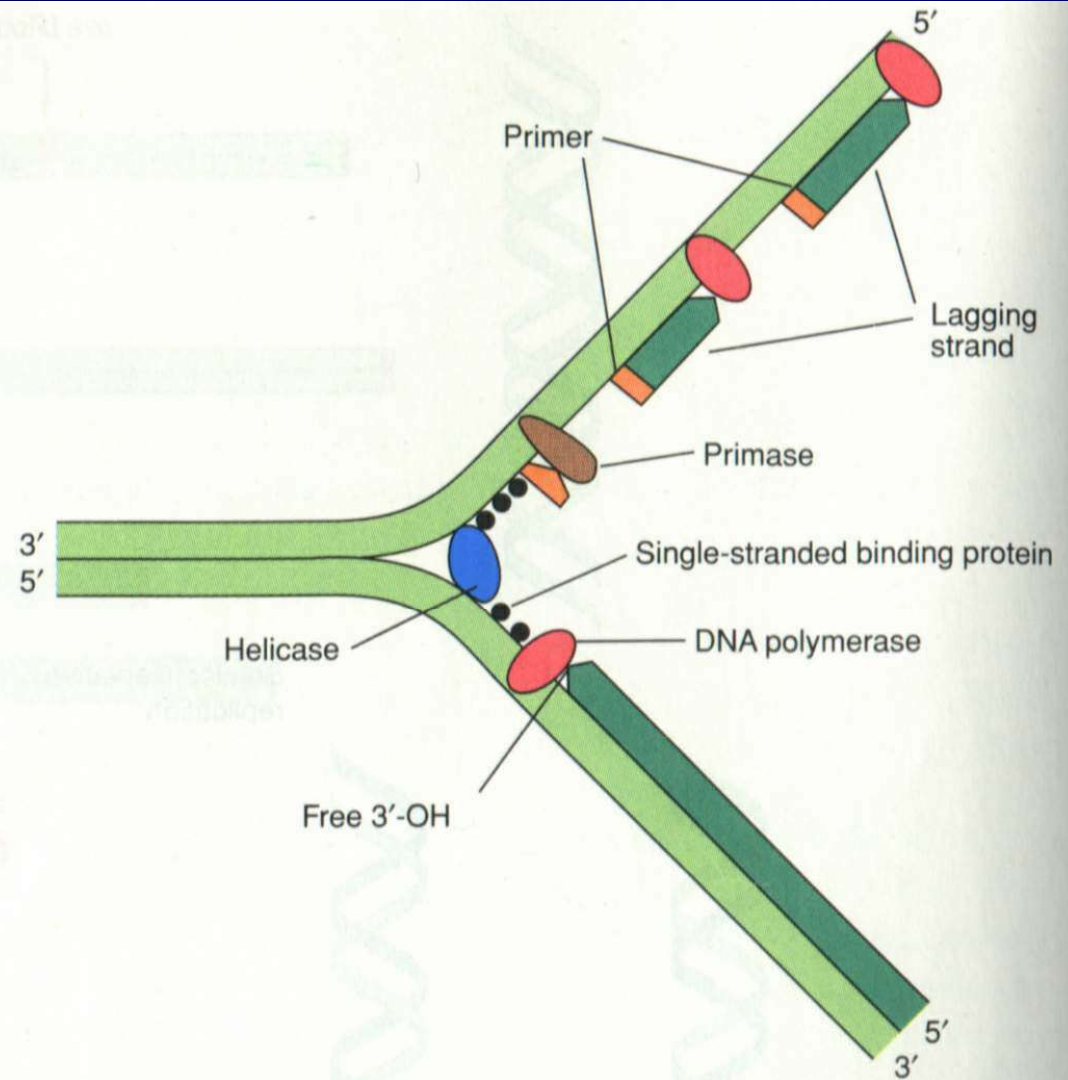
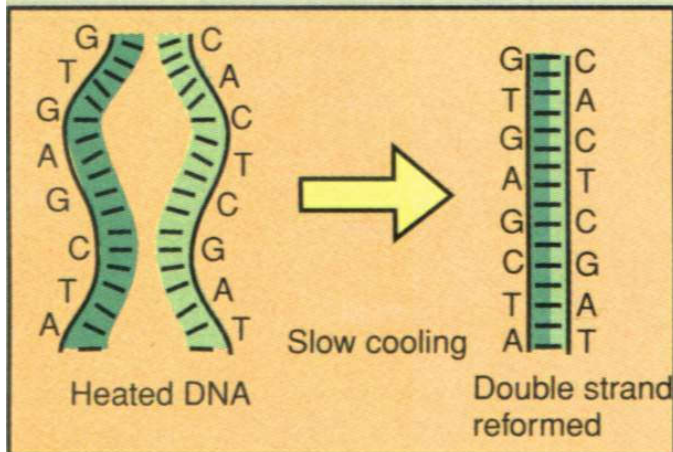
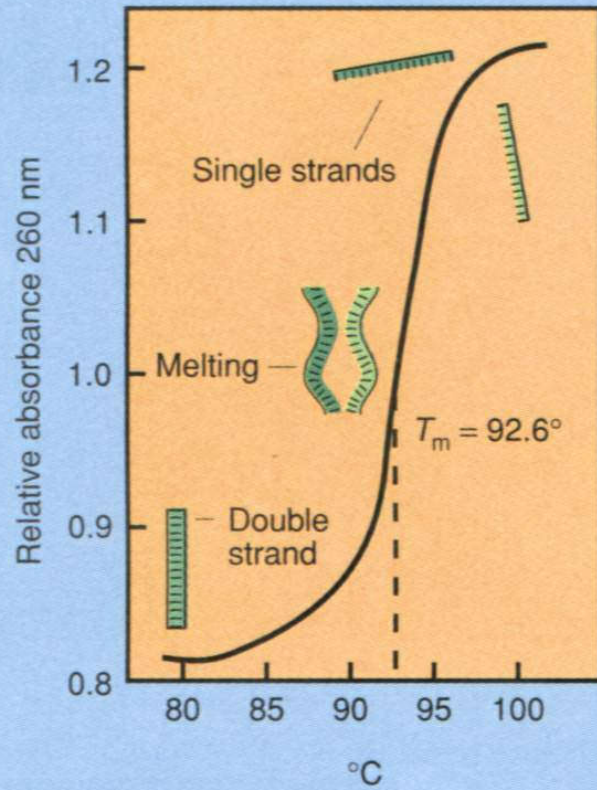
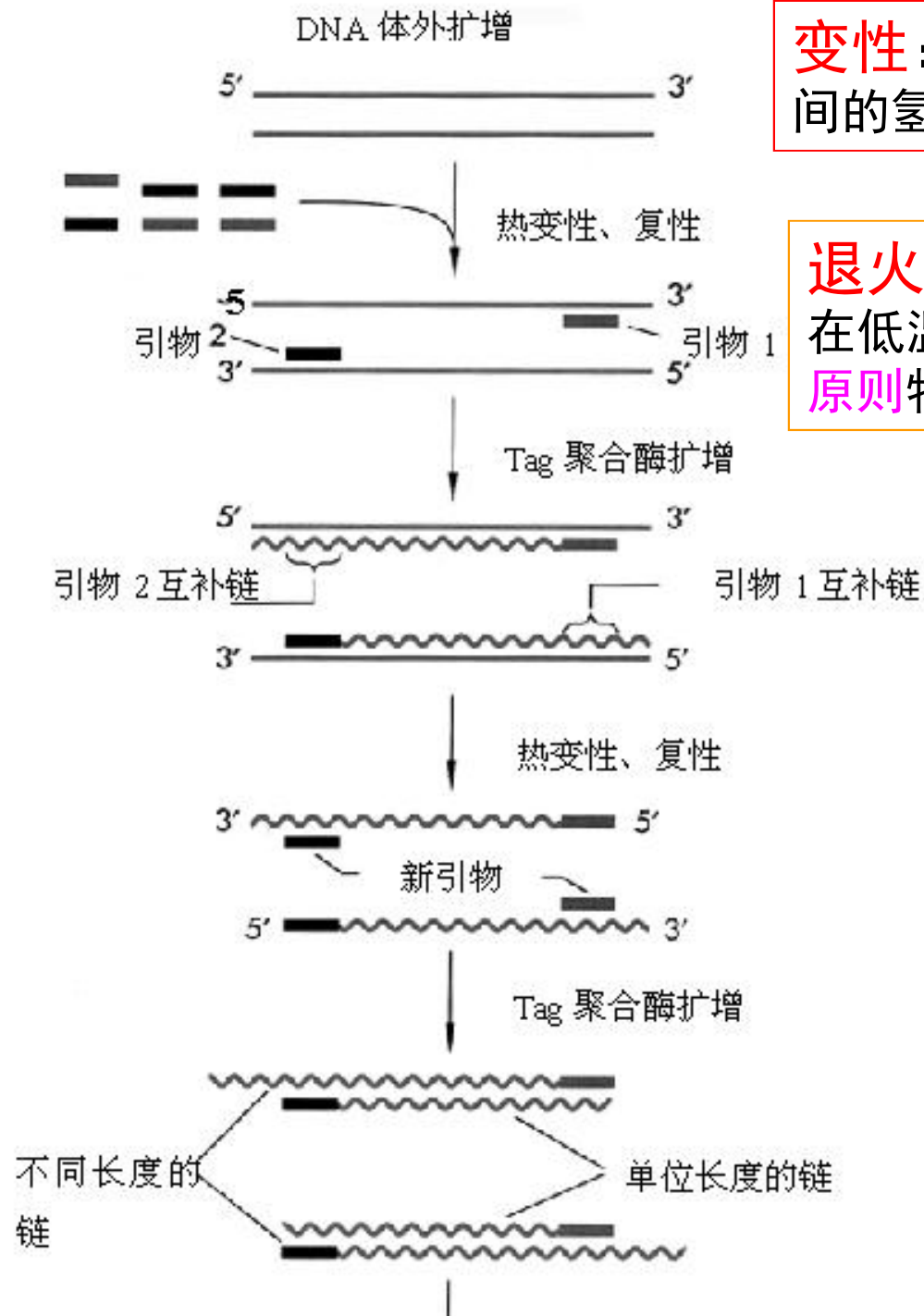


Figure 6.17 Events at the DNA replication fork.

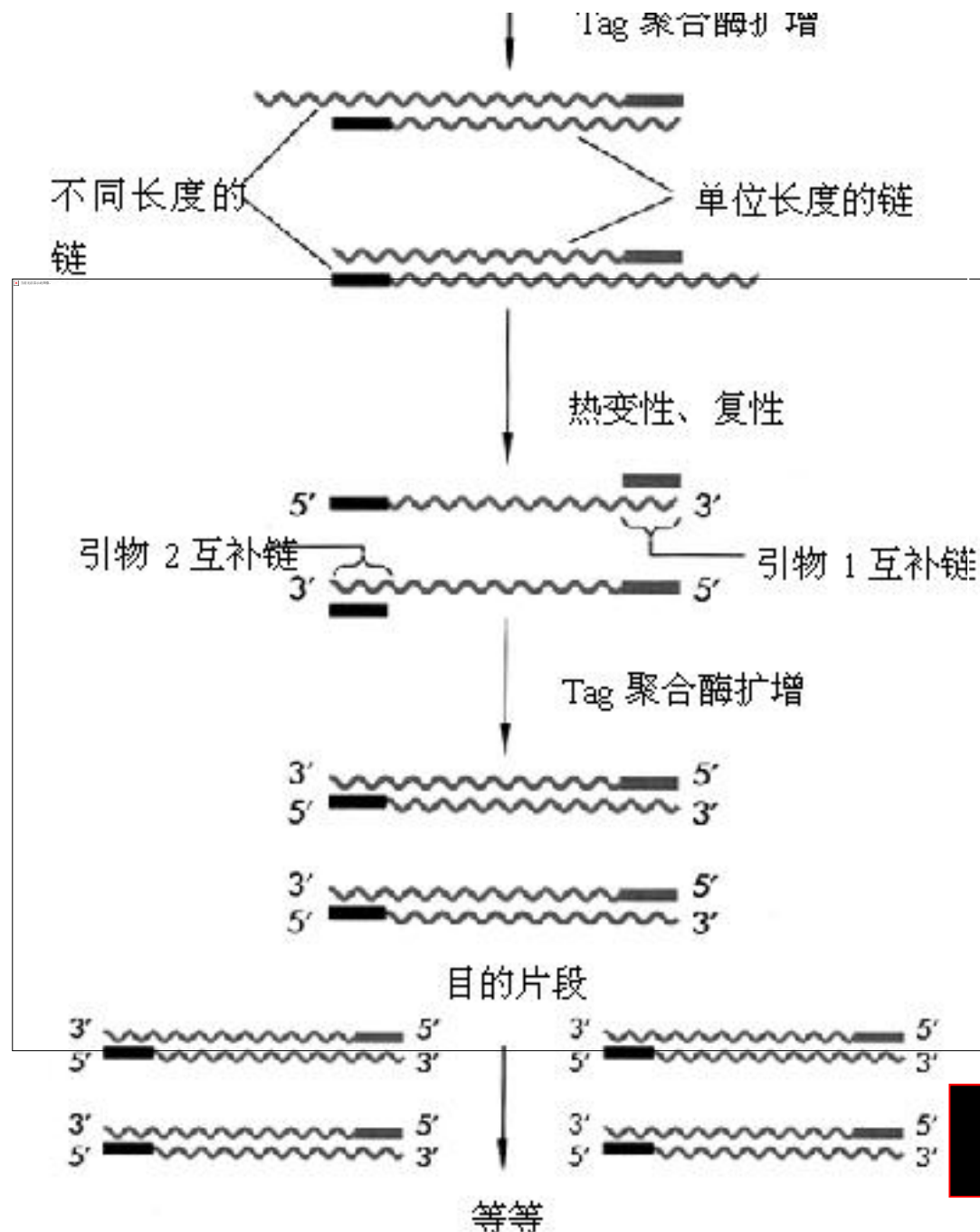


变性： 94 °C使待扩增模板DNA双链间的氢链断裂形成两条单链

退火： 降低温度（55 °C），使引物在低温下与模板DNA片段按**碱基配对原则**特异性结合，形成部分双链

延伸： 温度升高至(72 °C)，耐热Taq DNA聚合酶以单链DNA为模板，以4种三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)为原料，在引物的引导下催化合成互补的DNA，即引物的延伸阶段。

(参见p255)



变性、退火和延伸 三个基本步骤组成一轮循环。

每一轮循环将使样品中的模板DNA扩增一倍，经过25-35轮循环后就可使DNA扩增 $10^7 \sim 10^{10}$ 倍。

(参见p255)

图 20-1 聚合酶链式反应 (PCR) 示意图

PCR技术的关键酶-----耐热DNA聚合酶

- 1) **Klenow聚合酶**（大肠杆菌DNA聚合酶片段）
- 2) **Taq DNA聚合酶**（水生栖热菌（*Thermus aquaticus*）中分离，1988年萨奇（R.K.SaiKi））
- 3) **pfu DNA聚合酶**（火球菌（*Pyrococcus Furiosus*）中分离）
- 4) **Vent DNA聚合酶**（极端嗜热细菌*Thermococcus litoralis*）
- 5) **Tth DNA聚合酶**（嗜热细菌*Thermus thermophilus*）同时具有逆转录酶活性，可使RT-PCR和PCR在同一体系中进行。

（参见p255）



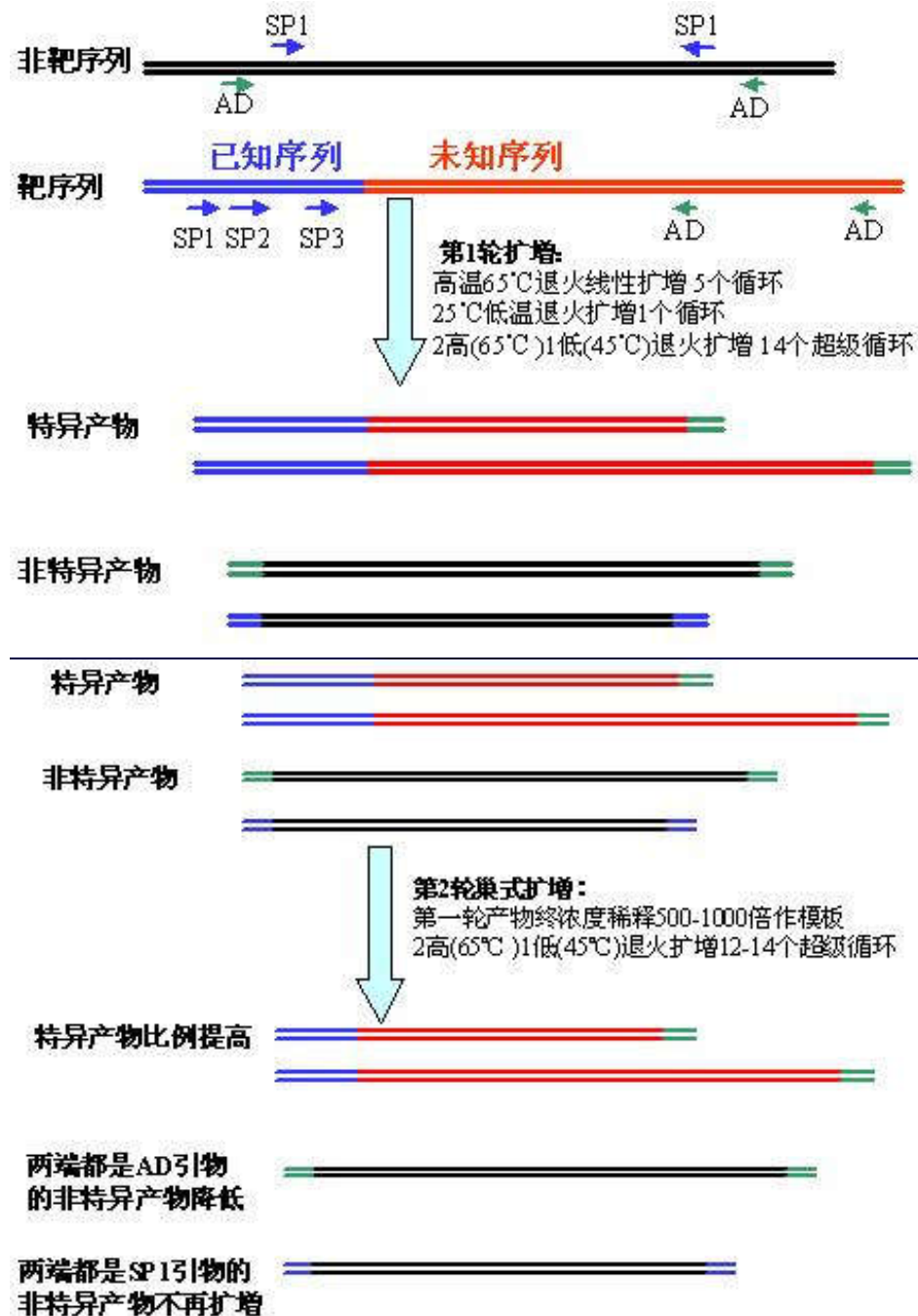


Figure 15.9 A Modern PCR Machine. PCR machines are now fully automated and microprocessor controlled. They can process up to 96 samples at a time.

PCR技术应用举例：

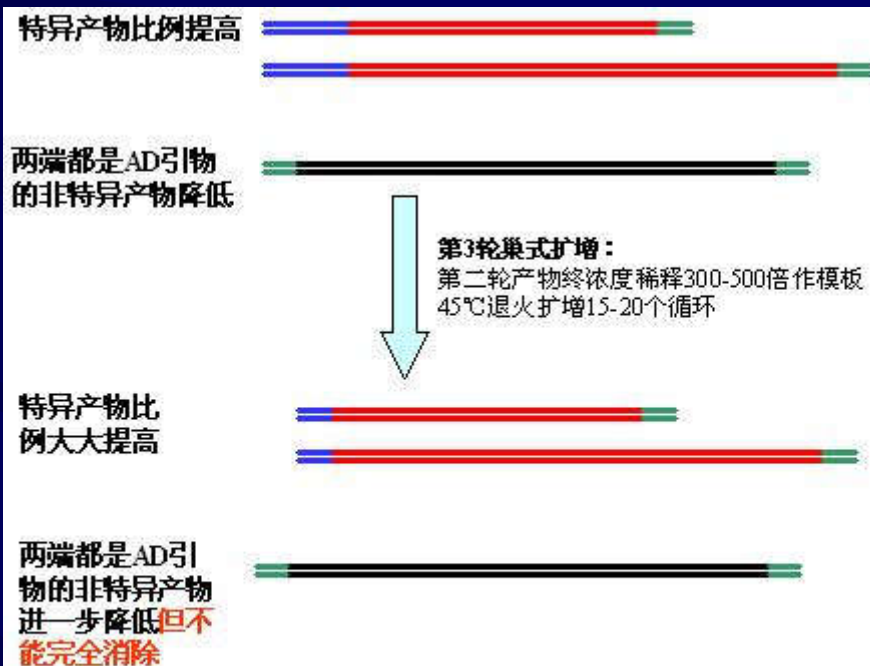
TAIL-PCR

Adaptor PCR



TAIL-PCR

(thermal asymmetric interlaced PCR)
 交错式热不对称PCR, 又叫巢式PCR



Genomic DNA



- Digest separate aliquots with restriction enzymes
- Ligate to GenomeWalker Adaptor



GenomeWalker "Libraries"

Amplify gene of interest
from all four libraries

Adaptor PCR

Genomic DNA
fragment



AP1
GSP1

Primary PCR



AP2
GSP2

Secondary or "nested" PCR



Examine products on
an agarose/EtBr gel

色素形成关键基因的克隆有哪些可能的策略？

- 根据酪氨酸酶的保守结构域设计引物用PCR方法克隆；
- 全基因组测序后根据注释针对目标基因进行PCR扩增；
- 鸟枪法克隆或者构建DNA文库后克隆；
- 根据纯化的酪氨酸酶 N端序列设计引物用PCR方法克隆；
- 采用转座子插入突变的方式来筛选不产黑色素的突变子，再用PCR技术确定目标基因；

○ ○ ○ ○ ○ ○

实验方案

- 1、利用Tn5转座子对WS进行突变
- 2、通过抗性筛选得到转座子整合到WS genome上的突变株，再通过表型筛选得到影响黑色素合成的WS突变株
- 3、通过Tail-PCR或者 Adaptor-PCR的方法克隆转座子所打断的基因
- 4、对所得的基因进行分析，并在WS原始株中进行相应的敲除和回补,找到关键基因进行异源表达。

本章其它有关内容

自学!

第9章供思考的题目

- 1) 基因工程的基本步骤是怎样的？其中哪些需涉及到微生物的参与？
- 2) 为什么说微生物学不仅为基因工程提供了理论基础，同时也提供了操作技术？
- 3) 结合绘图简述PCR技术的原理。
- 4) 有哪些微生物常用作基因工程的宿主，各有何特点？
- 5) 一个质粒载体需要哪些基本的遗传学元件？请通过查阅文献举例（除了书上列的pBR322外）怎样的质粒载体才有利于基因的克隆和重组子的筛选？