



# 第三章 目的基因的制备与鉴定

湖南师范大学生命科学学院

袁婴洲



# 本章目录

- 3.1 从基因文库获取目的基因
- 3.2 从GENEBANK基因组数据库获取目的基因
- 3.3 PCR技术获取与扩增目的基因
- 3.4 通过蛋白质工程改建目的基因
- 3.5 目的基因的鉴定



## 第四节 通过蛋白质工程改建目的基因

蛋白质工程是指基于对蛋白质结构和功能的认识，进行分子设计，通过基因工程途径定向地改造蛋白质或创造合乎人类需要的新的突变蛋白质的理论或实践活动。

- 定点突变技术
- 定向进化技术



## 一 定点突变

- 寡核苷酸引物介导的定点突变
- PCR介导的定点突变
- 盒式突变



# 中心法则

基因组学

转录组学

蛋白组学

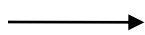
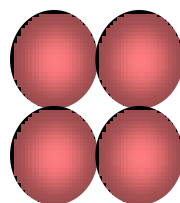
代谢组学

复制

转录

翻译

代谢



DNA (基因)

逆转录

mRNA

蛋白质

生物代谢物质



# 1. 寡核苷酸引物介导的定点突变

- 用含有突变碱基的寡核苷酸片段作引物，在聚合酶的作用下启动DNA分子进行复制的过程。

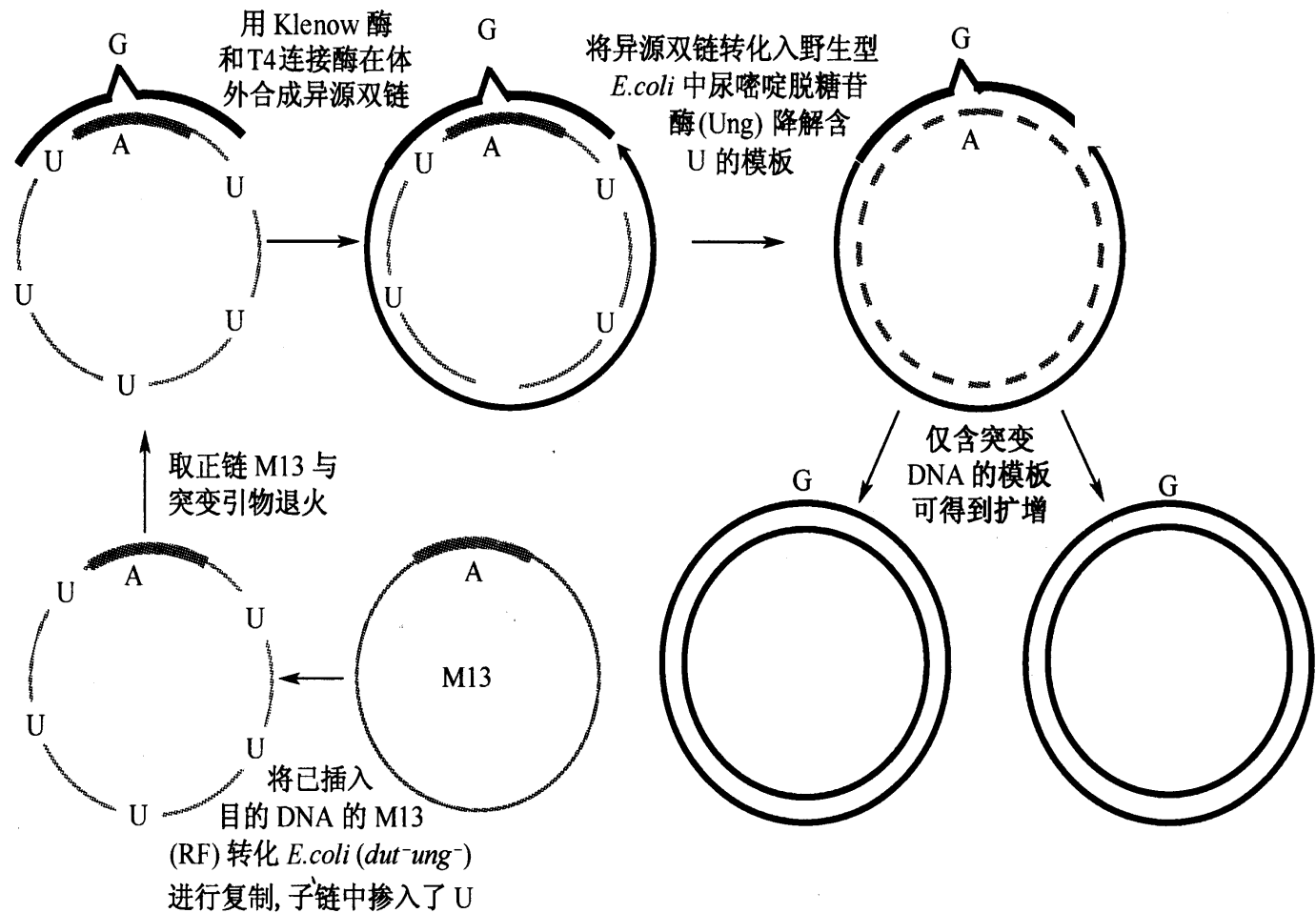
- 寡核苷酸引物介导的定点突变的Kunkel I 改进：

载体：RF—M13DNA载体

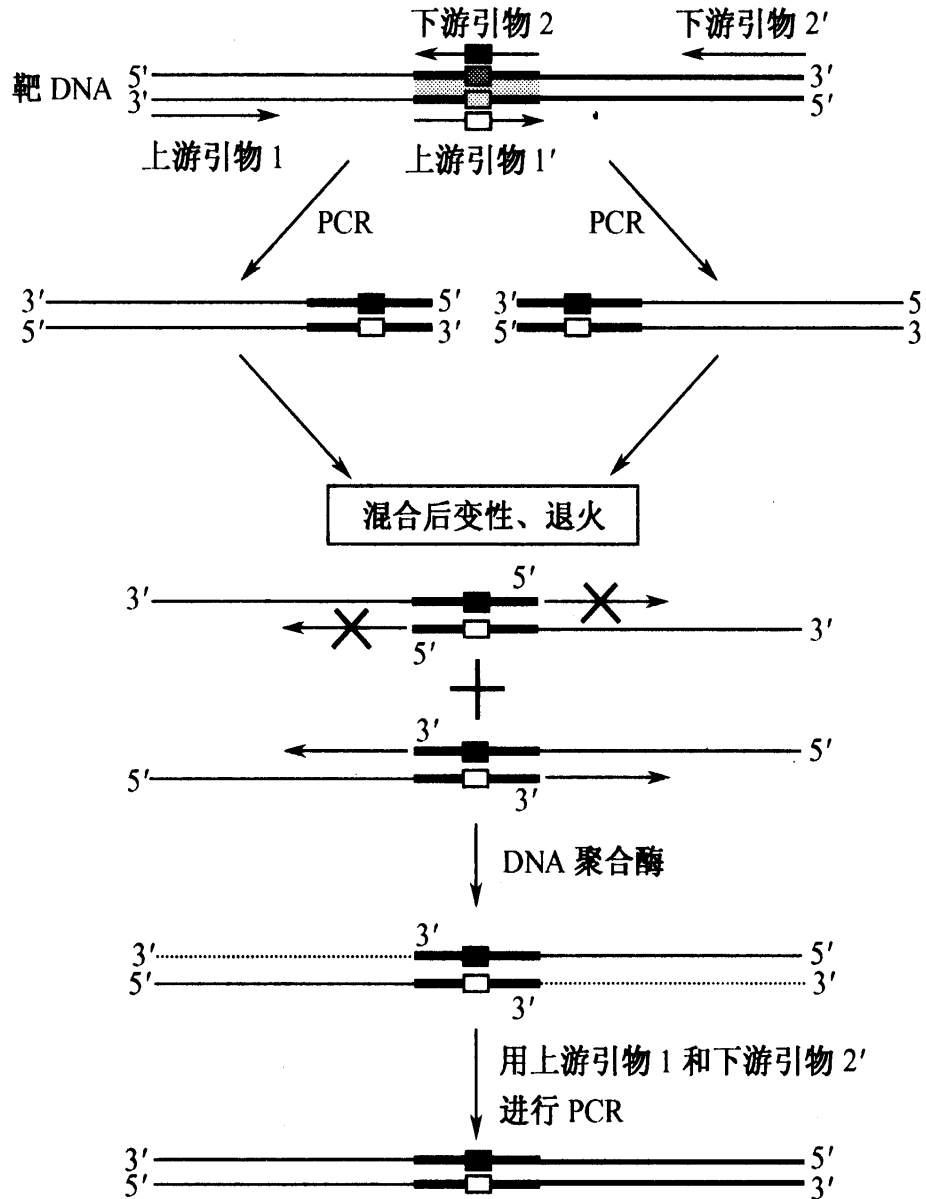
菌株：dUTP酶和N—尿嘧啶脱核苷酶双缺陷的菌株。

原理：dUTP酶缺陷导致胞内dUTP上升，部分取代dTTP进入新生DNA链中，使得M13单链DNA大约1%的T被U取代。另一链合成后，将双链DNA导入正常大肠杆菌，N—尿嘧啶糖基化酶除去DNA链上的尿嘧啶碱基，原M13模板链被降解，突变链因不含U被保留下来。

寡核苷酸引物介导的定点突变的 Kunkel 改进

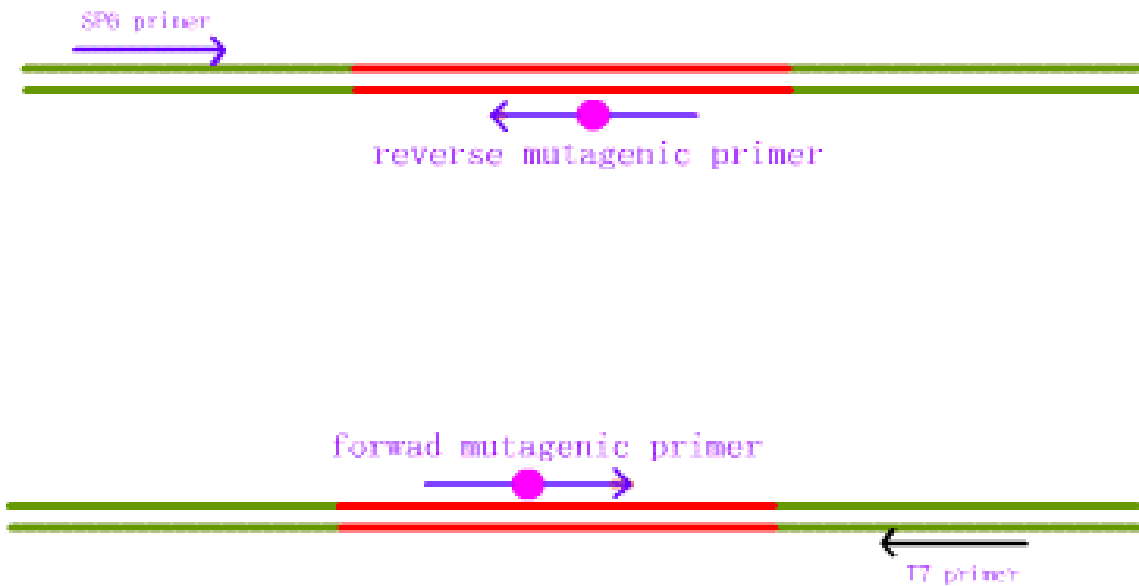


## 2. PCR介导的定点突变



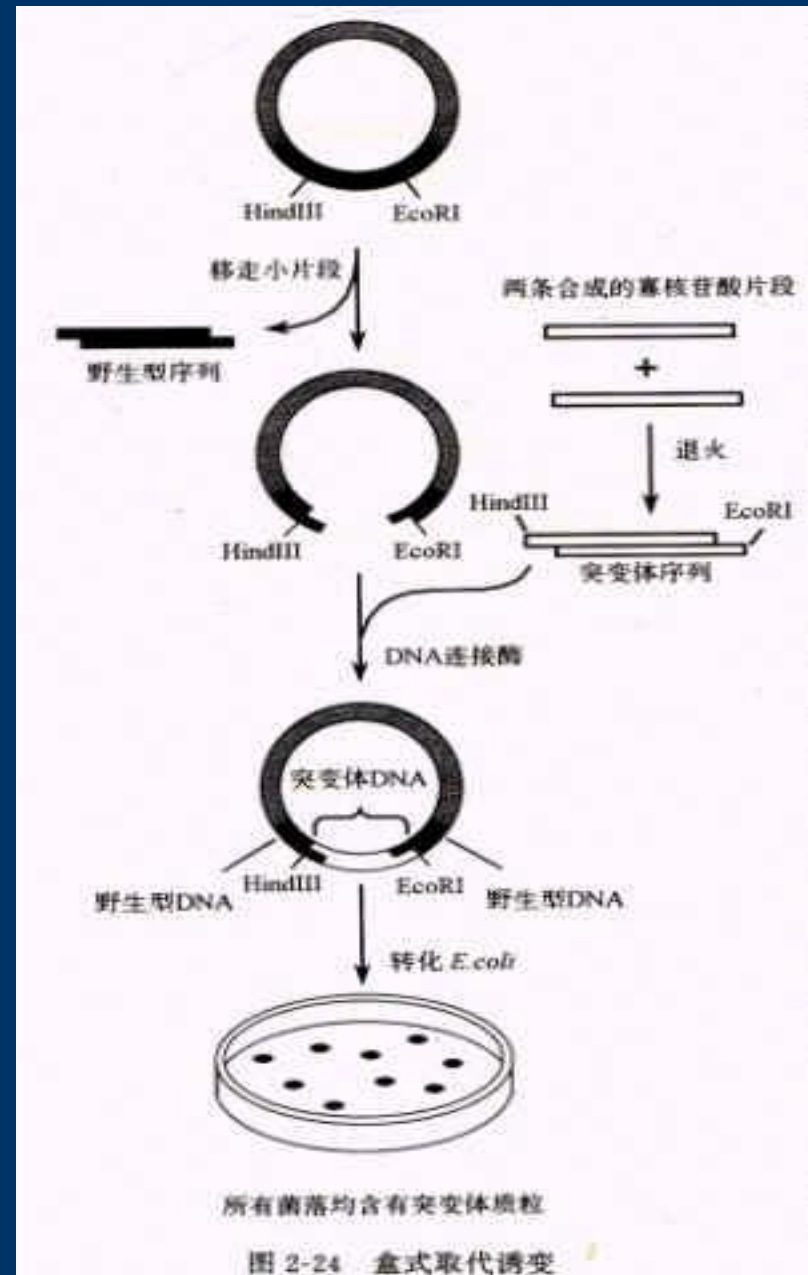


## 2. PCR介导的定点突变



### 3. 盒式突变

- 利用一段人工合成的含基因突变序列的寡核苷酸片段，取代野生型基因中的相应序列。突变的寡核苷酸链成对存在，不会出现异源双链的情况。全部转化质粒都是突变体。



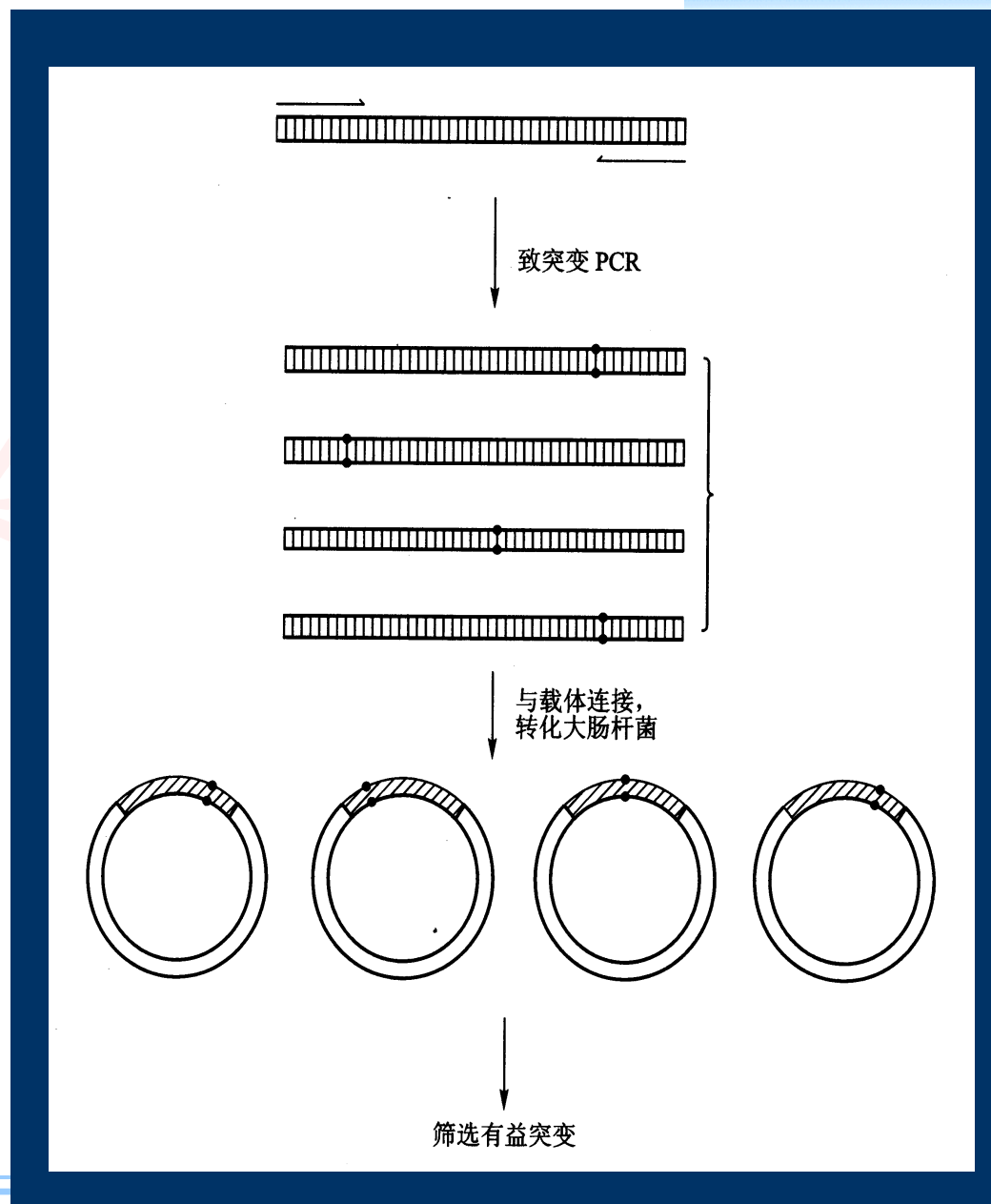


## 二、定向进化

- **先随机突变，再定向选择。**如在待进化酶基因的PCR扩增反应中，利用Taq酶不具有3—5端纠错的功能，配合适当条件，以很低的比率向目的基因引入突变，构建突变序列库，再凭借定向的选择方法，定向选出所需性质的突变酶。

# 1. 易错PCR

- 在PCR反应中，降低一种dNTP的含量，使PCR容易出错，达到随机突变的目的。

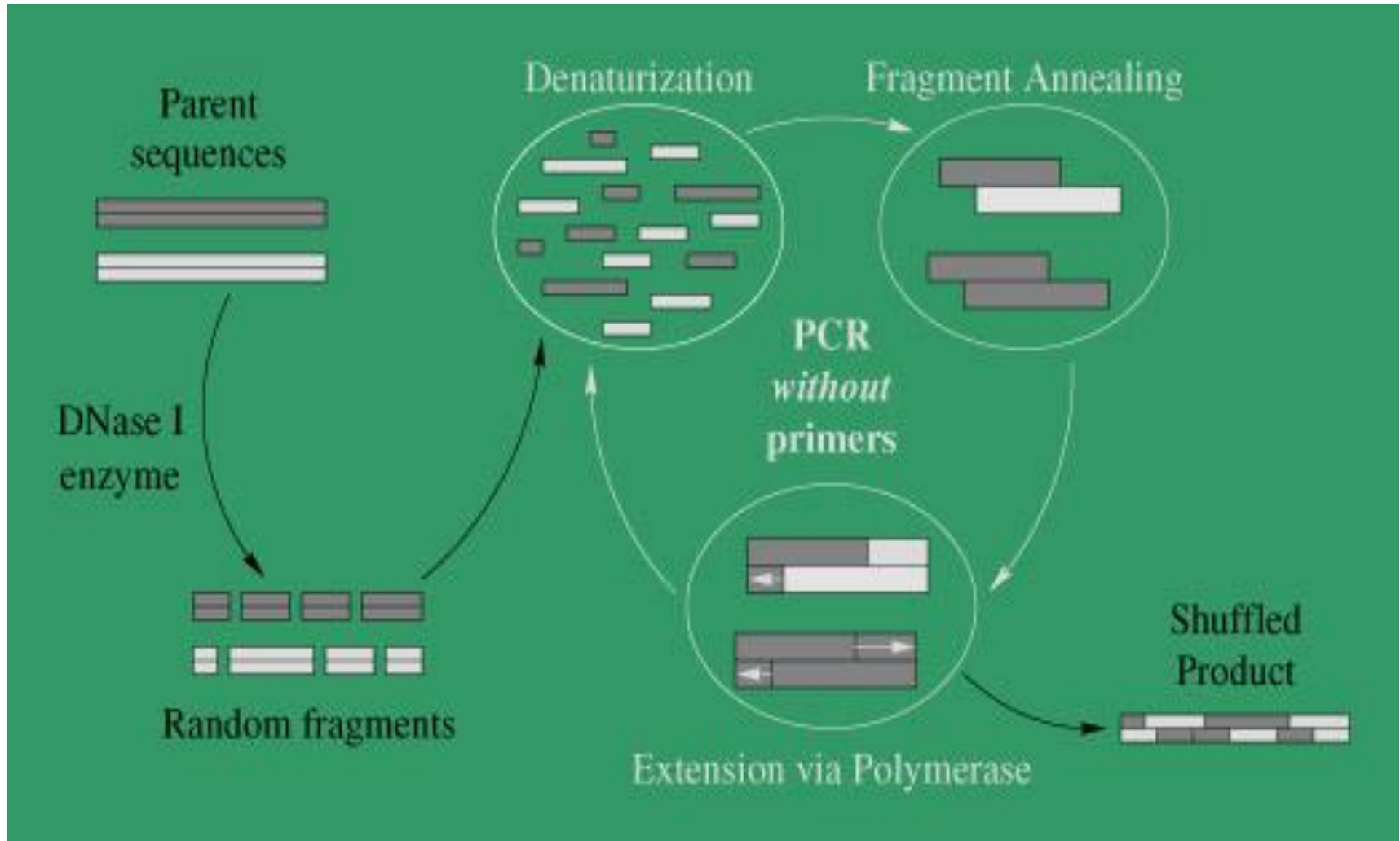




## 2. DNA改组

- 用**DNAase I** 先将一个DNA片段消化成许多小片段，然后**不加引物进行PCR**，使得消化后DNA小段之间重新按多种组合方式连接重组，然后利用原来整片段DNA两端的引物进行**加引物的PCR扩增**，以便得到一系列改组后的突变DNA序列。

# DNA改组



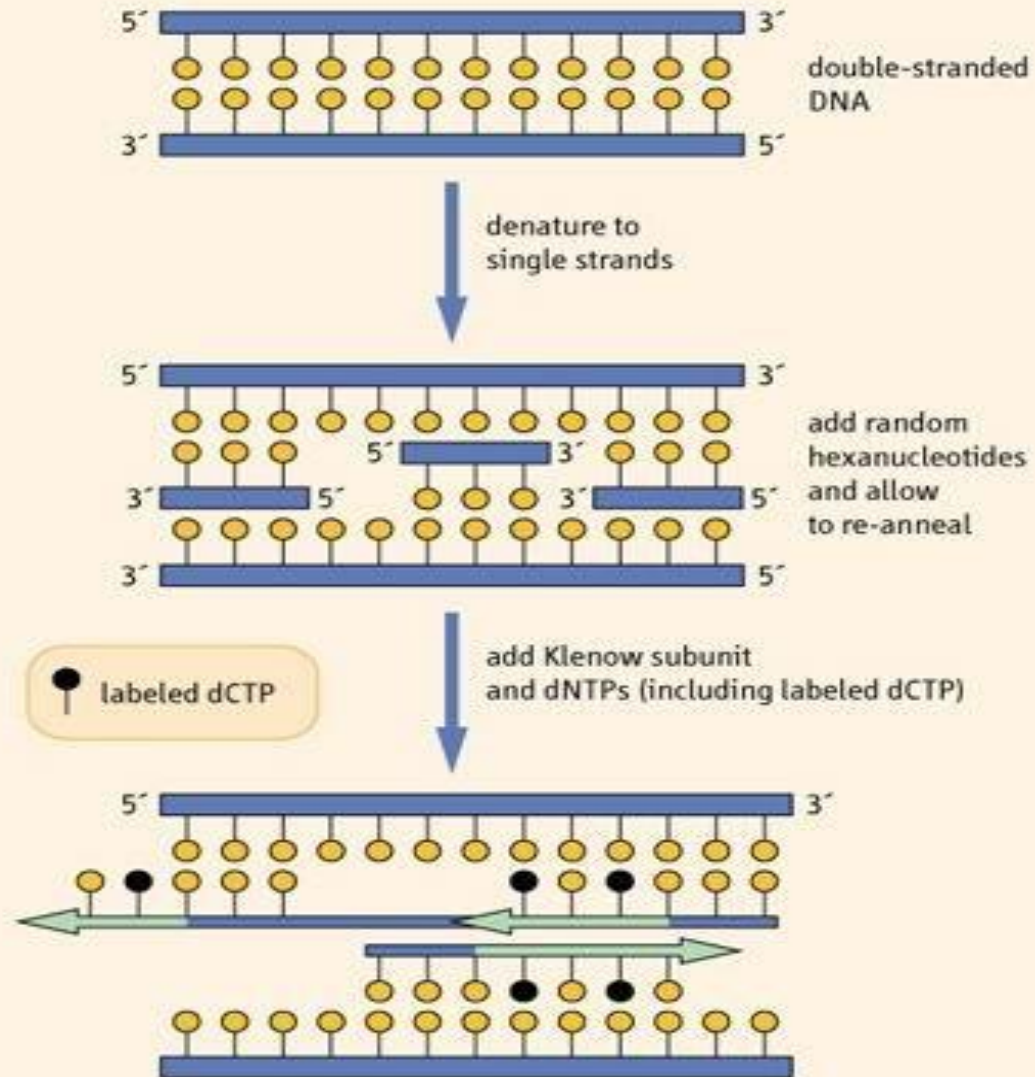


### 3. 体外随机引发重组

- 以单链DNA为模板，随机引物扩增，将产生大量与模板不同位点互补的短的DNA片段，由于碱基的错配和错误引发，这些短DNA片段中会存在一些点突变。

# 随机引物引发重组

## Random primer probe labeling







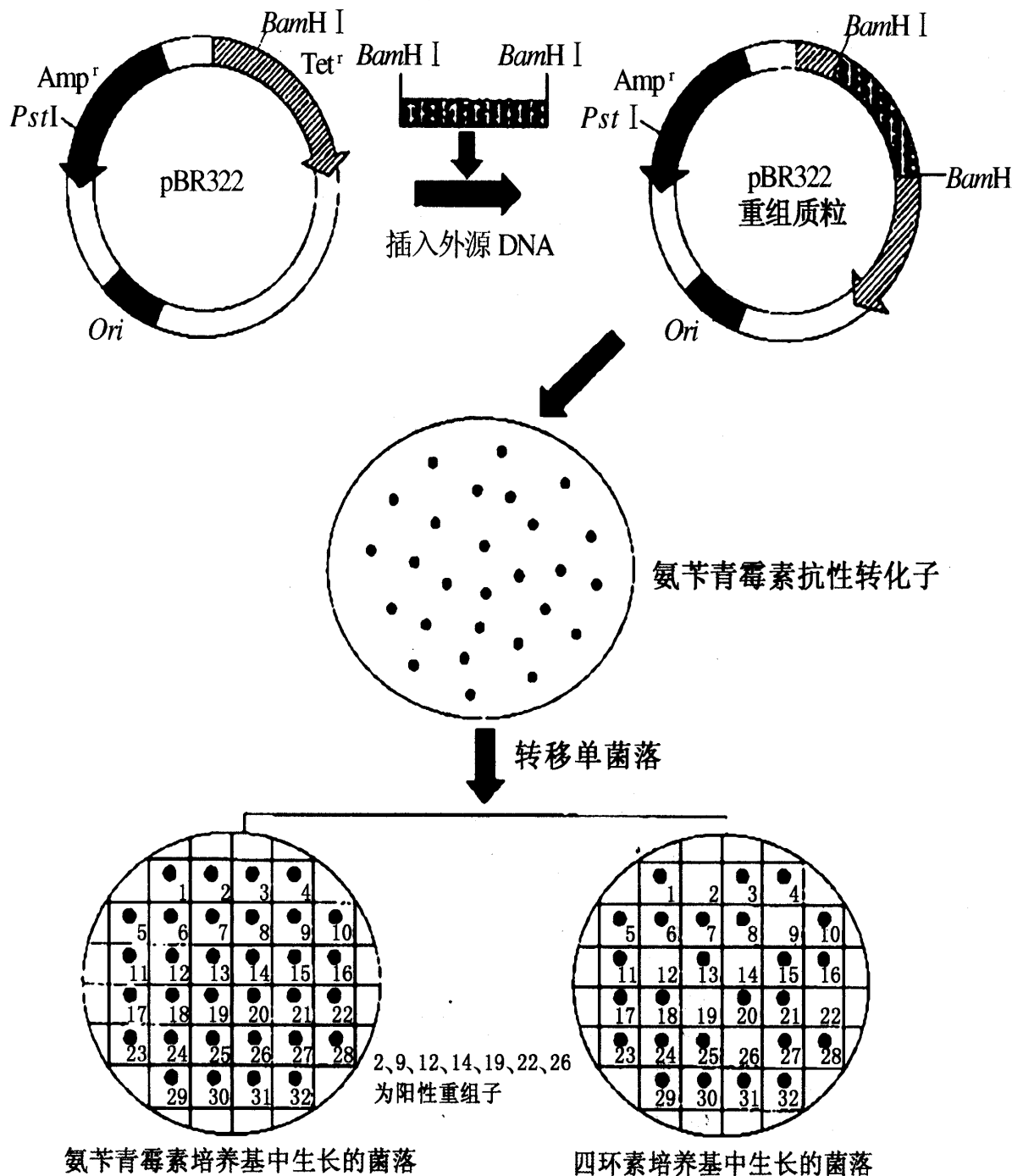
## 第五节 目的基因的鉴定

- 遗传表型检测法
- 酶切电泳检测
- 核酸分子杂交
- PCR扩增鉴定筛选
- DNA序列测定

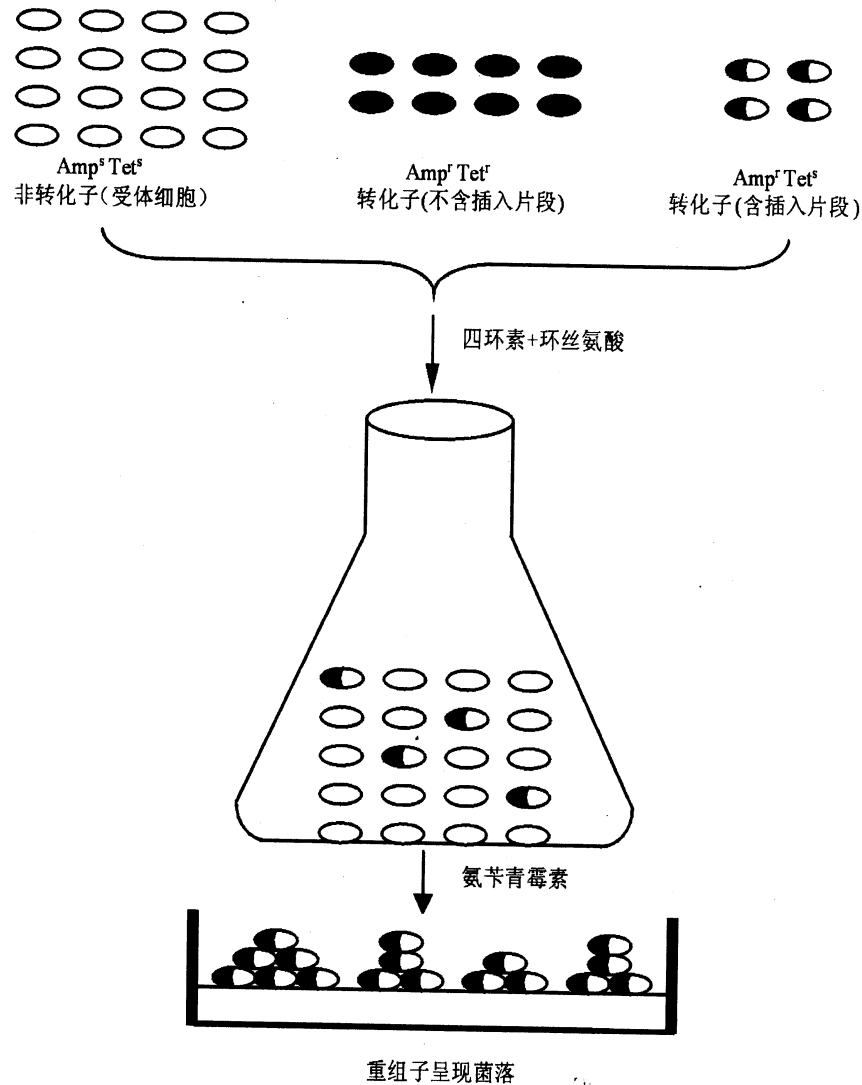


# 一、遗传表型检测

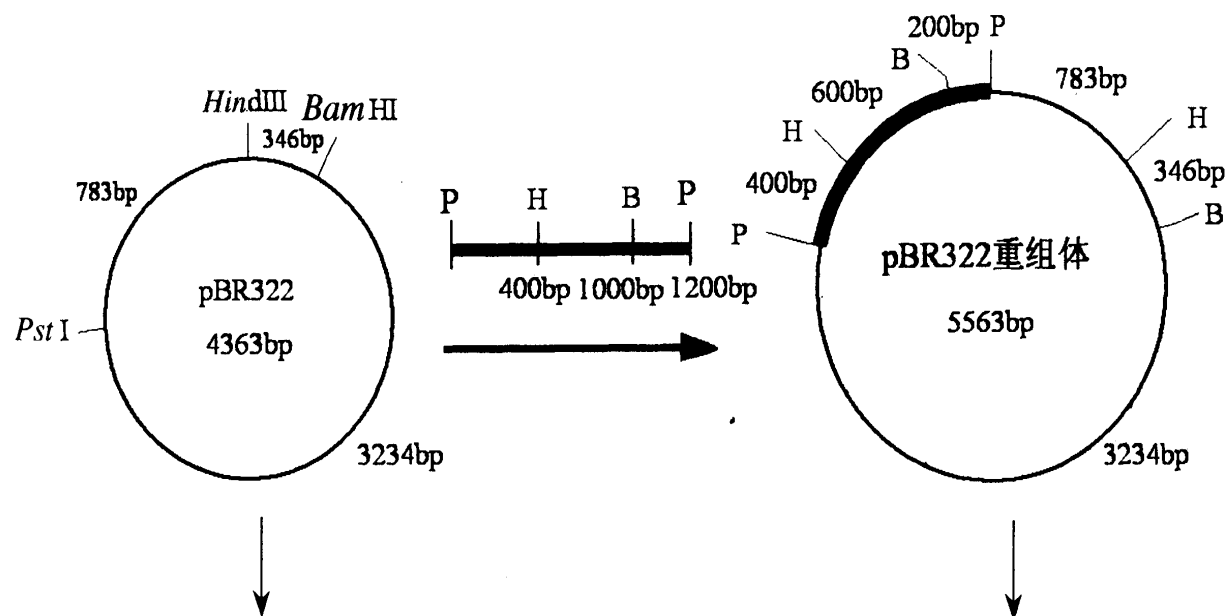
- 抗药性标记基因
- lacZ基因蓝白斑筛选
- GFP等



# 环丝氨酸筛选法



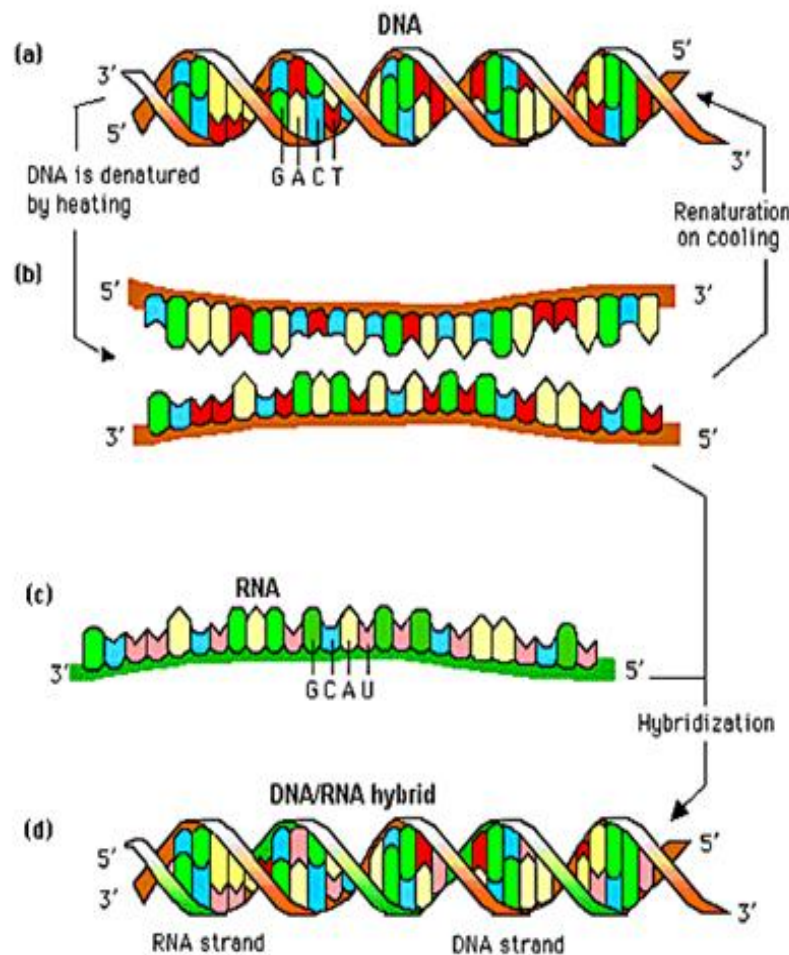
## 二、酶切电泳检测



<i>Pst</i> I	4.36 kb	4.36 kb+1.2 kb
<i>Hind</i> III	4.36 kb	3.98 kb+1.58 kb
<i>Bam</i> HI	4.36 kb	4.23 kb+1.33 kb
<i>Pst</i> I + <i>Hind</i> III	3.58 kb+0.78 kb	3.58 kb+0.8 kb+0.78 kb+0.4 kb
<i>Pst</i> I + <i>Bam</i> HI	3.23 kb+1.13 kb	3.23 kb+1.13 kb+1.00 kb+0.2 kb
<i>Hind</i> III + <i>Bam</i> HI	4.01 kb+0.35 kb	3.63 kb+0.98 kb+0.6 kb+0.35 kb

### 三、核酸分子杂交检测

- 根据两条单链DNA或DNA与RNA中互补碱基序列能专一配对的原理，在一定条件下，利用已标记的目的基因的DNA或RNA片段作为探针，探测转化子受体细胞中是否有DNA或RNA片段与目的基因探针发生同源性杂交，经过适当的检测，从而确定目的基因是否进入受体细胞基因组的方法。

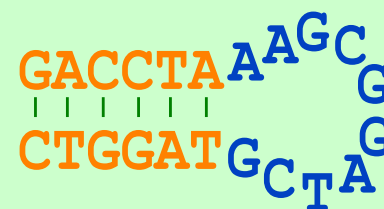


Nucleic Acid Hybridization

# 1、杂交探针的制备

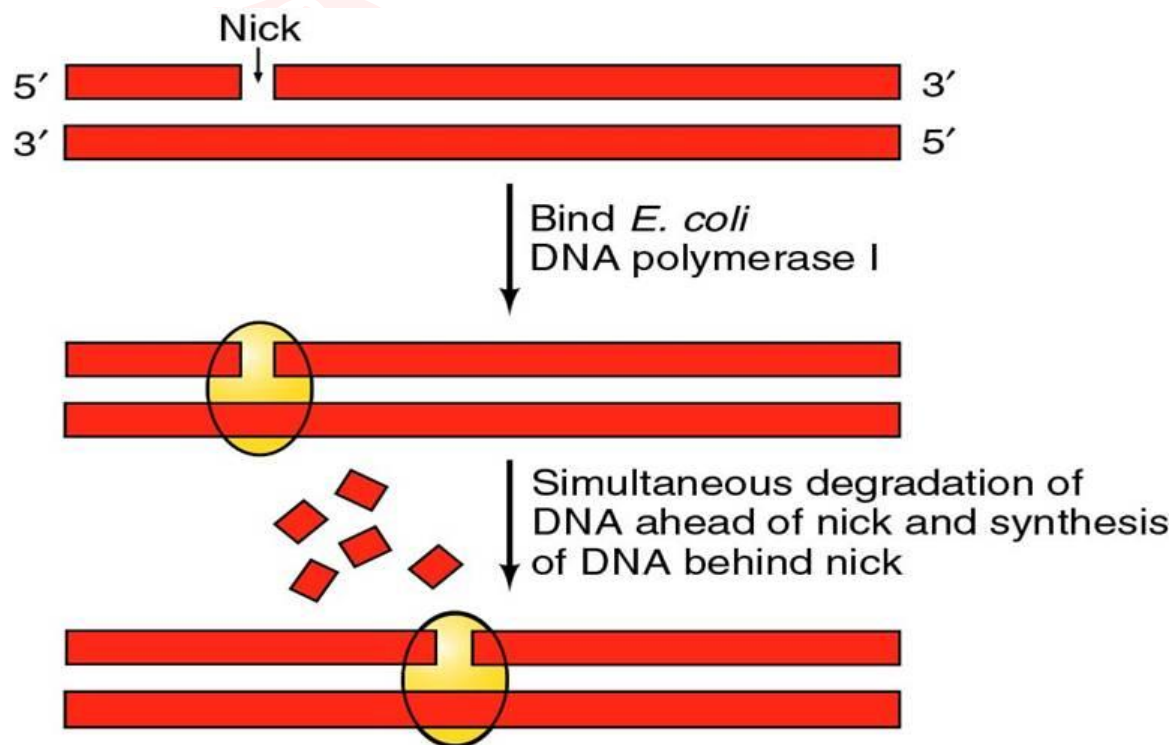
- 用于核酸分子杂交的探针必须满足下列条件：
- 单链结构（双链DNA可用碱变性）
- 足够长度（至少12个碱基，一般300–500bp）
- 内部不含互补区

GACCTAAAGCGGATCGTAGGTC



# 缺口转译法标记探针

- Dnase I 使DNA双链产生缺口
- DNA聚合酶将生物素标记的dNTP插入到缺口的3`端



## 杂交探针的标记：T4-PNP介导的末端标记



T4-PNP



Mg<sup>2+</sup>

pppATP ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP)





## 杂交探针的标记：逆转录 酶介导的反转录标记

3' AAAAAAAAAAACCAGCTTCC ··· GAACTGATTAGGCT 5' mRNA

5' TTTTTTTTTTTT

反转录酶



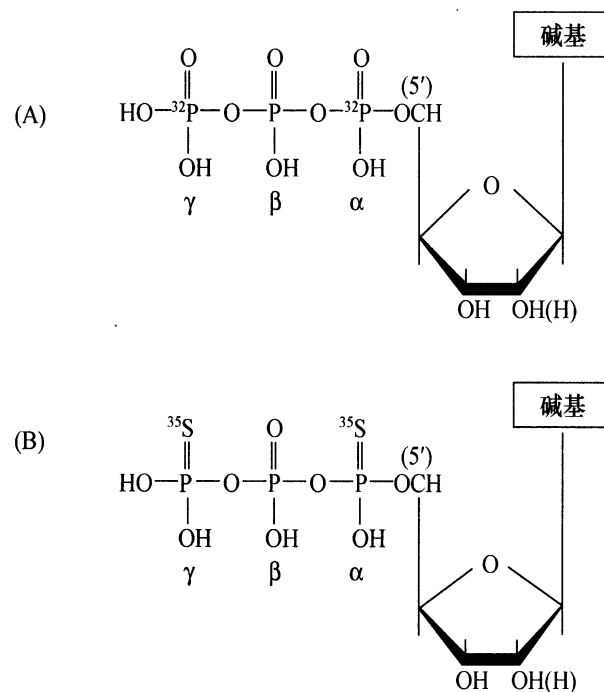
Mg<sup>2+</sup> dNTP + pppdATP ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP)

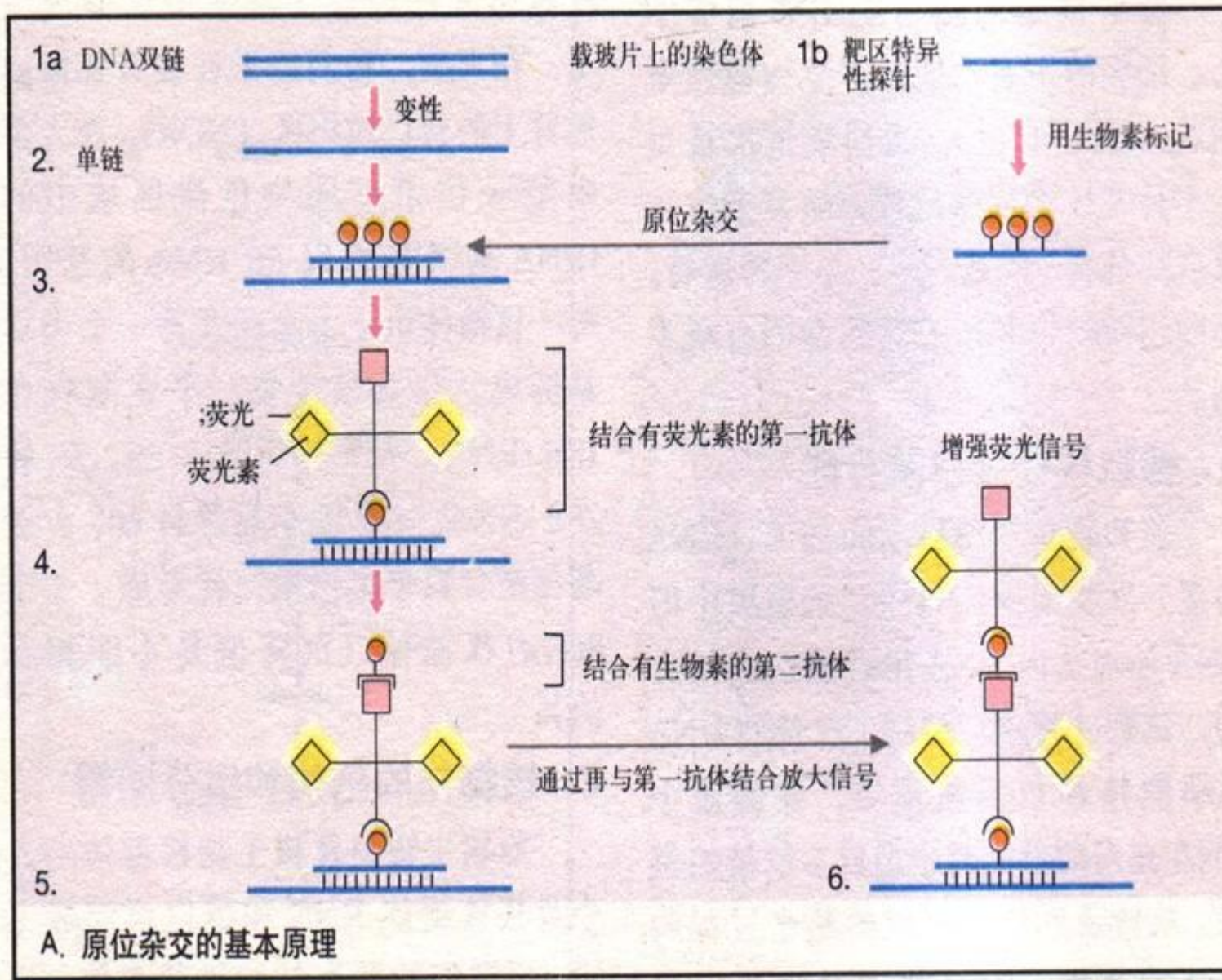
3' AAAAAAAAAAACCAGCTTCC ··· GAACTGATTAGGCT 5' mRNA

5' TTTTTTTTTTTTGGTCGAAAGG ··· CTTGAACTAAATCCGA 3' cDNA

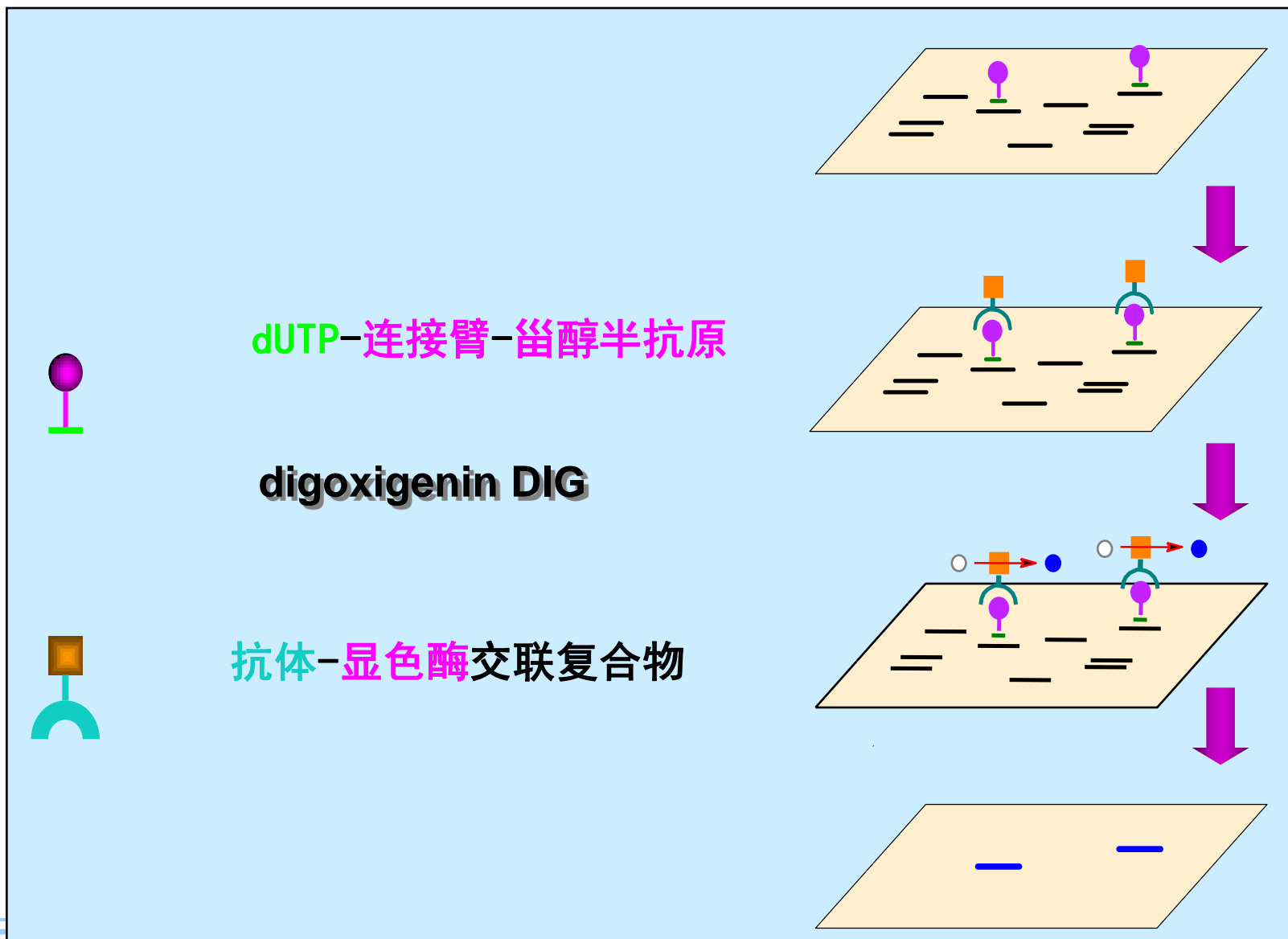
# 探针的标记

- 同位素标记： $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$
- 非放射性标记：
  - 直接标记：酶、荧光素直接与探针相连
  - 间接标记：探针接抗原，检测物接抗体

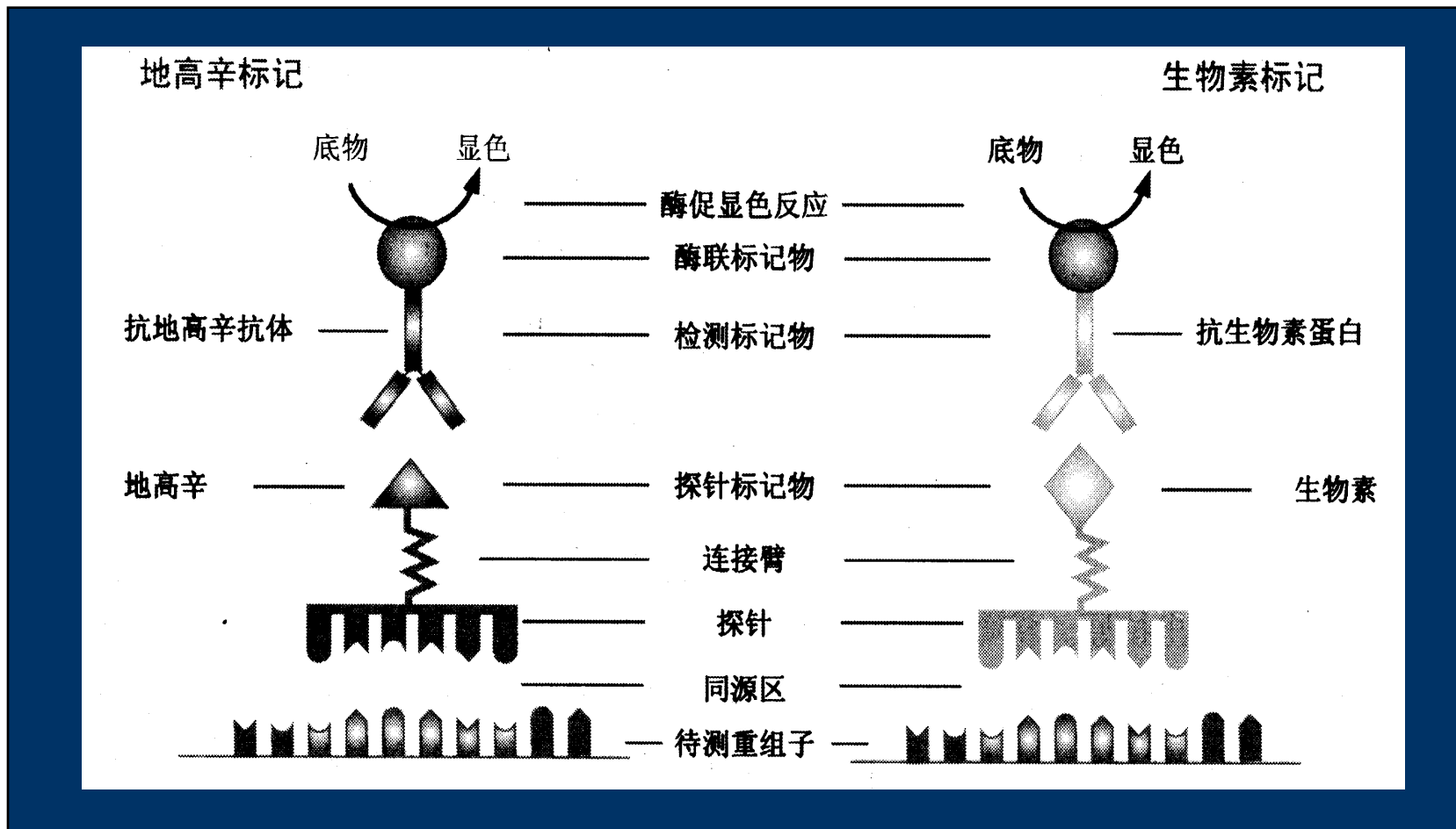




# 杂交探针的标记：地高辛系统标记



# 生物素与地高辛间接标记



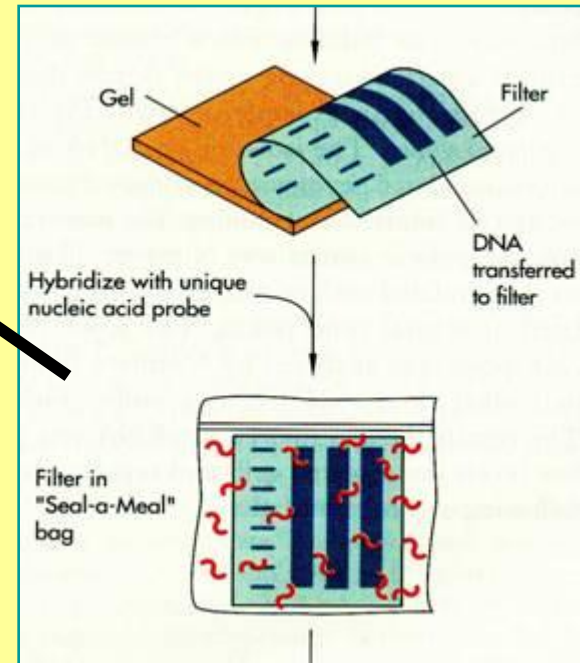
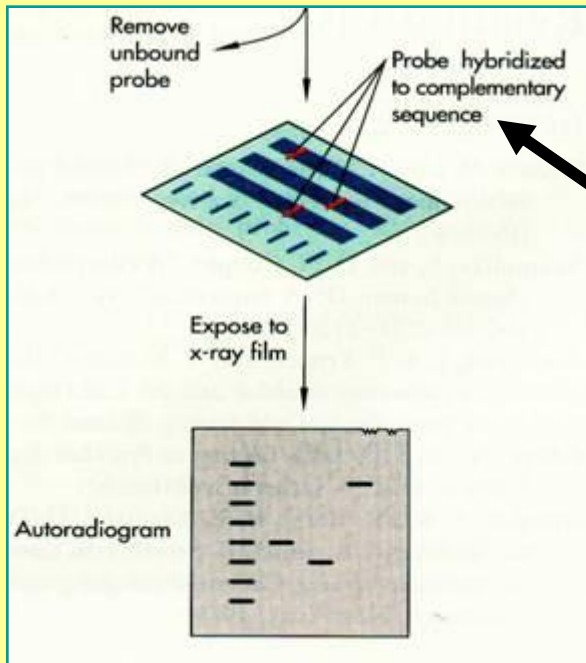
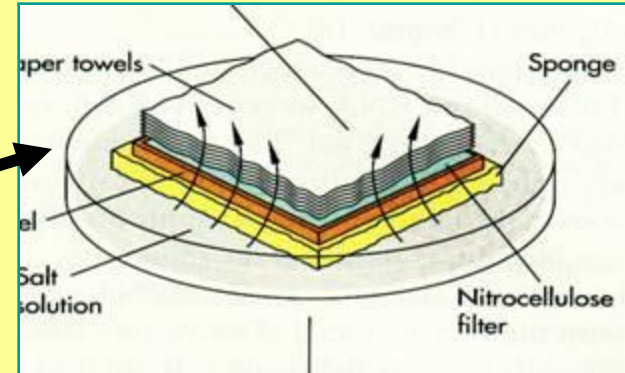
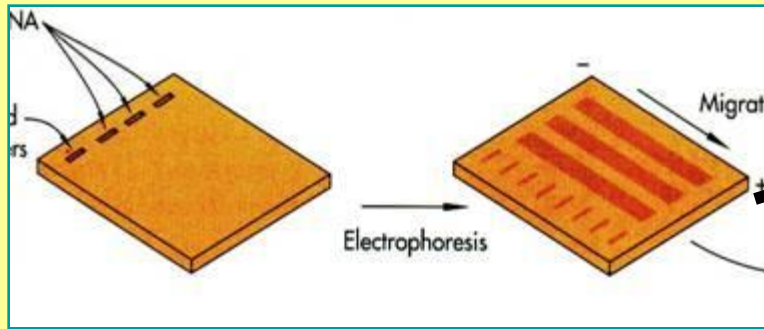


## 2、Southern Blot

- 又称DNA印迹技术，Southern于1975年建立。
- 利用硝酸纤维素膜或尼龙膜具有吸附DNA的功能，先作DNA片段的凝胶电泳，并将凝胶电泳中的DNA区带吸附到膜上，然后直接在膜上进行同位素标记核酸探针与被测样品之间的杂交，再通过放射自显影对杂交结果进行检测。
- 可以确定DNA中的特异序列，以及特异DNA片段分子量的大小及其含量。



# DNA分子杂交技术流程



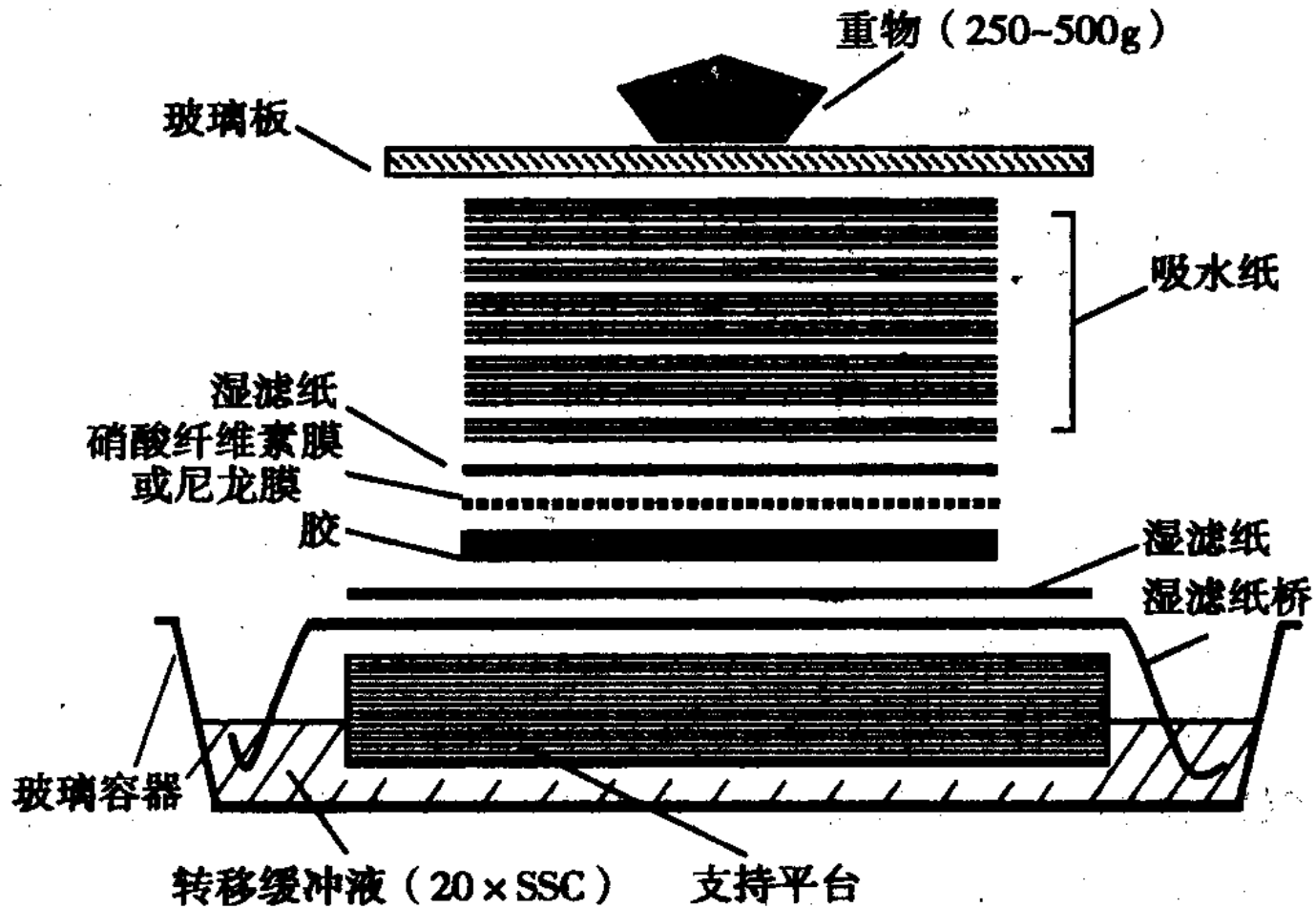


图 10-2 毛细管虹吸法 Southern 转膜示意图





# Southern blot流程总结

- DNA电泳
- 转膜, 转膜时要凝胶底面朝上, 上盖硝酸纤维素膜
- 探针与膜变性
- 预杂交
- 杂交
- 洗膜
- 放射自显影检测

## Southern blot的结果

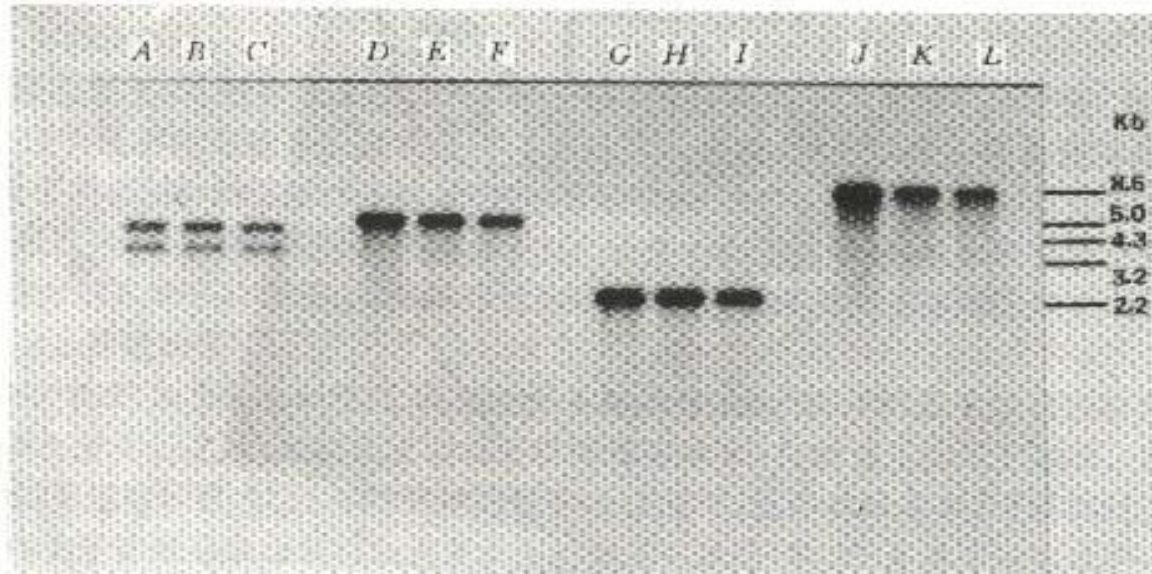


图 2-4 Southern DNA 印迹杂交之 X 光显像图片

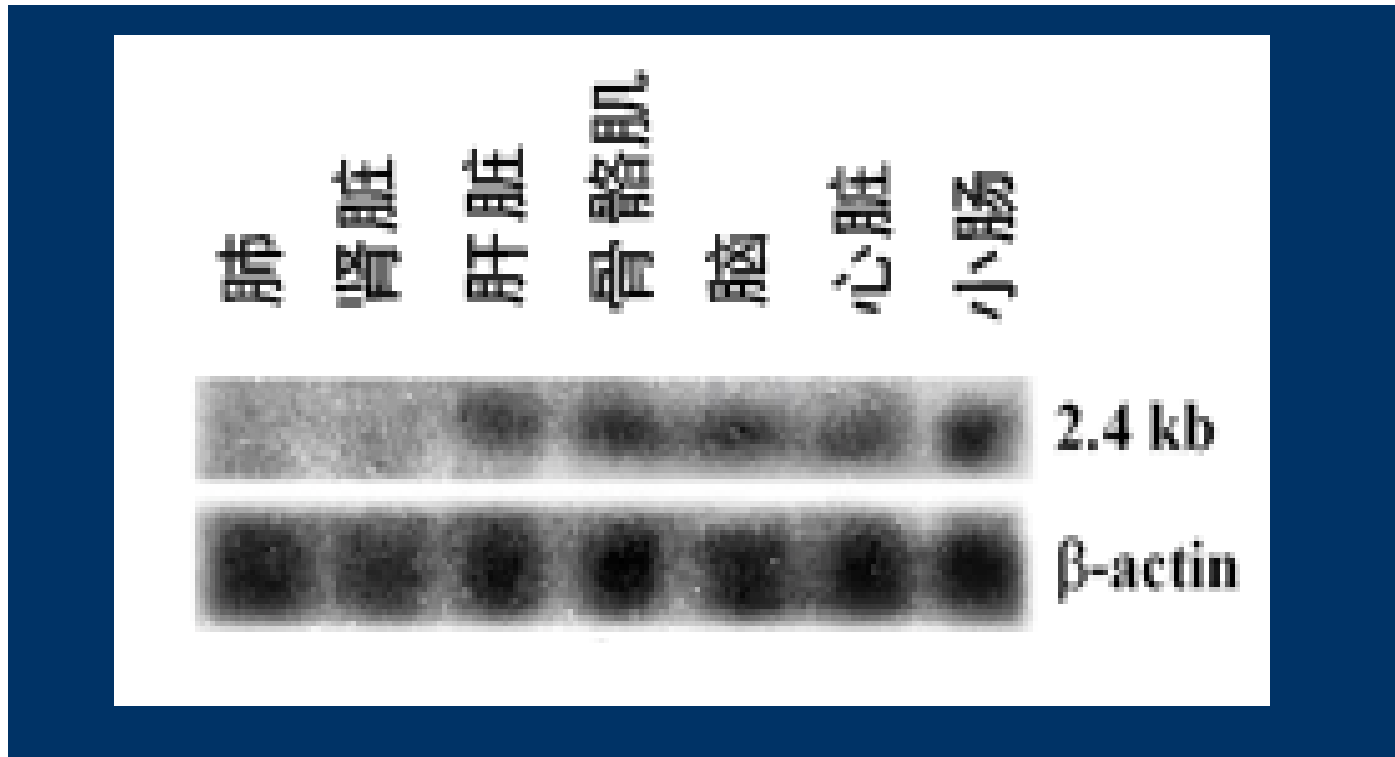
水稻 (*Oryza sativa* L.) 的叶绿体 DNA 分别用核酸内切限制酶 BglIII (A-C)、BamHI (D~F)、EcoRI (G~I) 和 HindIII (J~L) 消化, 加样在含有 EtBr 染料的 1% 的琼脂糖凝胶中作电泳分离, 然后同  $^{32}\text{P}$  标记的玉米 psbA 探针作 Southern 杂交。X 光底片中显现的阳性条带, 表明含有水稻的 psbA 基因序列, 相应的分子大小以 kb 为单位示于图的右侧 (照片由本书作者提供)



### 3、 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 特异探针针对固定于膜上的mRNA 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，**以确定目的基因的表达组织。**

# Northern 杂交结果





## Northern blot 的注意事项

- 用含甲醛的凝胶电泳缓冲液分离RNA样品
- 转膜， Northern膜
- 防止RNA酶的污染： DEPC 或 RNA酶抑制剂
- 杂交带若呈弥散状，表示RNA样品已降解；若一条带下方有弥散状的杂交信号，表示部分降解
- 杂交信号弱，曝光时间应长一点

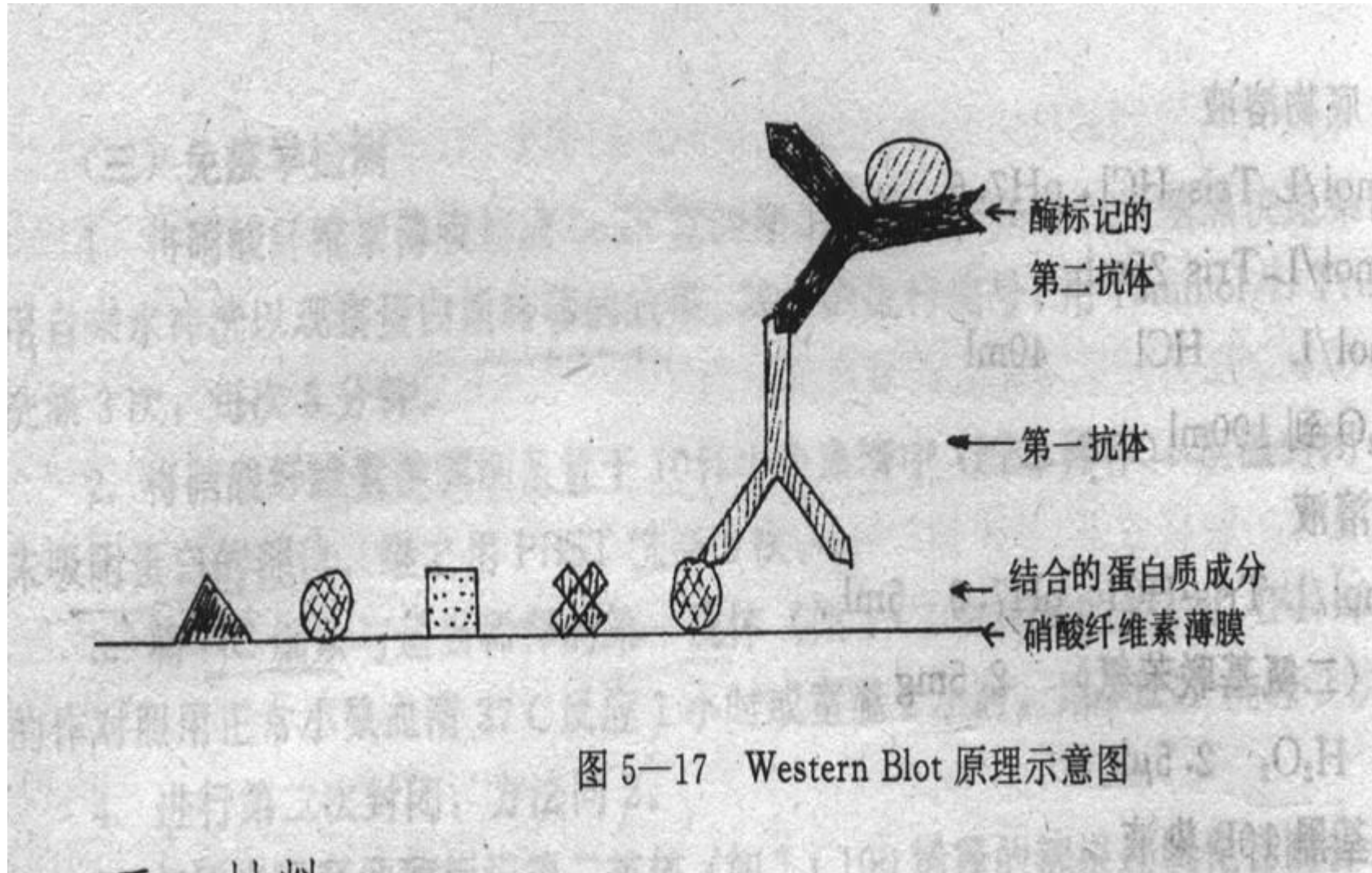


## 4、 Western blot

- Western blot 是指经过 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的蛋白质样品，转移到固相载体（硝酸纤维素薄膜）上，固相载体以非共价键形式吸附蛋白质，且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。
- 以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原与对应的抗体起免疫反应，再与酶或同位素标记的第二抗体起反应，经过底物显色或放射自显影以检查电泳分离的特异性的目的基因的表达的蛋白成分。



# Western blot的原理



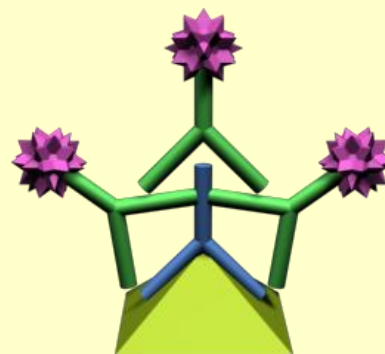
# 直接荧光检测



膜上抗原



一抗结合抗原

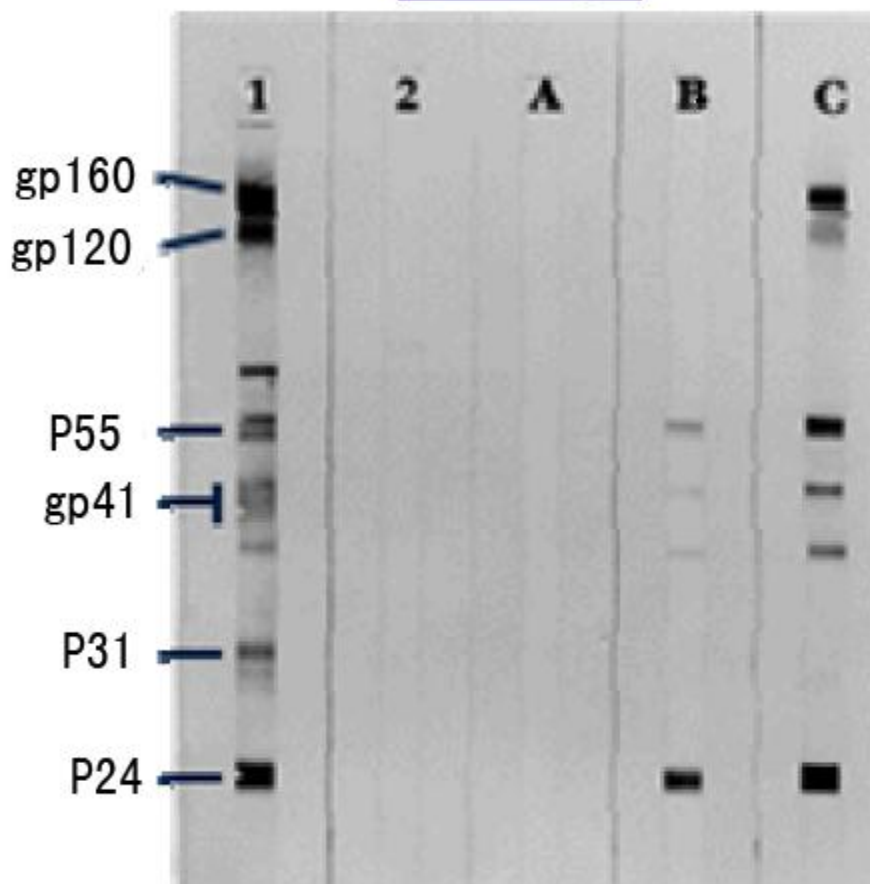


红外荧光标记的二抗



# Western blot的应用

## 艾滋病检测



泳道1是艾滋病毒的多种特异蛋白对照，泳道2是正常人对照，泳道A、B、C分别是不同艾滋病毒感染者。检测结果表明，A体内的艾滋病毒尚未表达病毒蛋白，而B和C已经表达艾滋病毒蛋白产物，尤其是感染者C。



# Western blot 操作流程

- 聚丙烯酰胺凝胶电泳，用考马斯亮蓝染色，检查蛋白质分离的效果
- 电转膜：90伏，2小时 4度
- 纤维素膜用10%小牛血清BSA封闭30分钟，以封闭未吸附蛋白质的部位
- 纤维素膜与第一抗体温育，冲洗后再封闭
- 与酶标第二抗体温育
- 加入酶促底物显色

# Western blot转膜过程

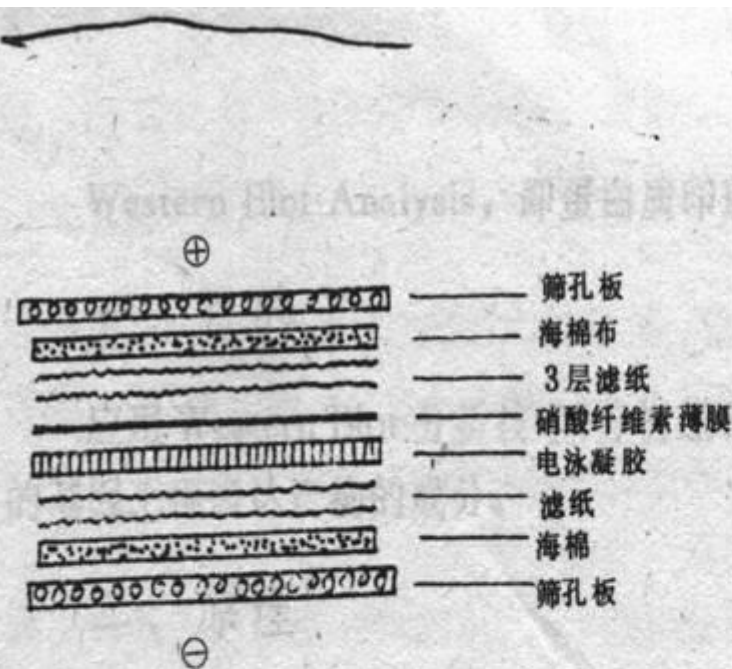


图 5—18 电转移时硝酸纤维素薄膜、  
凝胶、滤纸等夹心放置顺序  
操作时注意不要有气泡出现在里面。

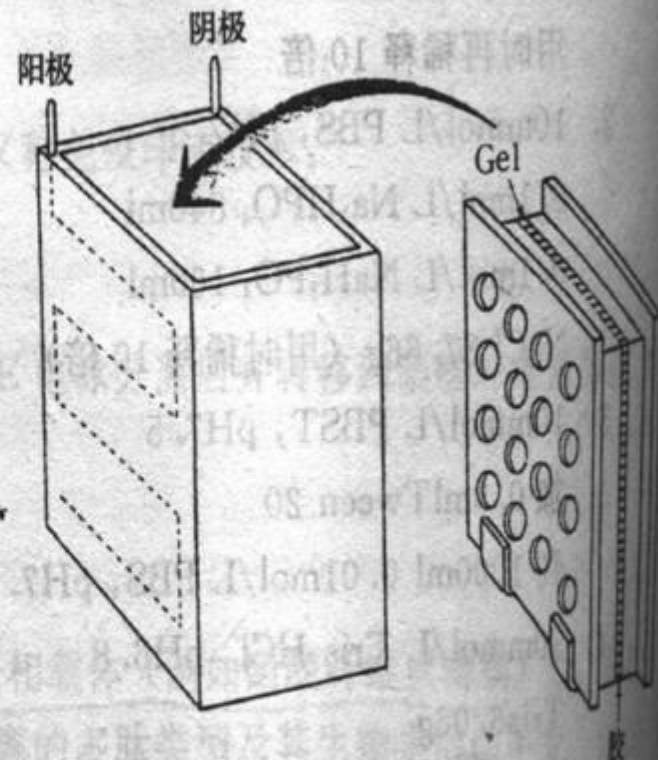


图 5—19 Western Blot 操作过程简图



## 四、DNA序列测定： DNA sequencing

- 末端终止法或酶合成法： 由Sanger 等人1977年建立
- 化学降解法： 由Maxam and Gilbert 等人1977年建立
- 自动测序系统： 在末端终止法基础上发展而来

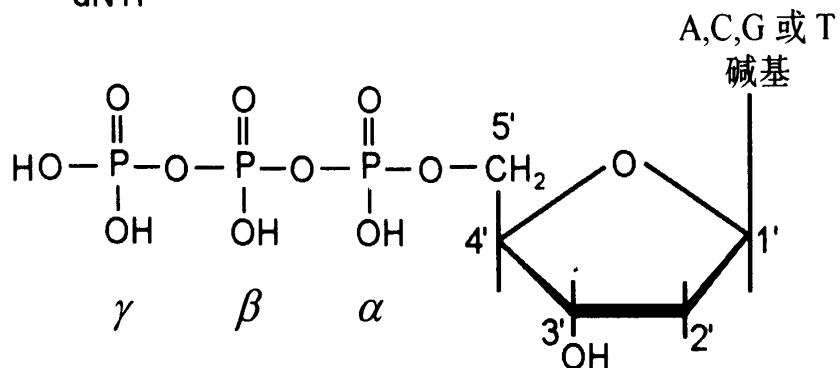


# 1、 双脱氧末端终止法

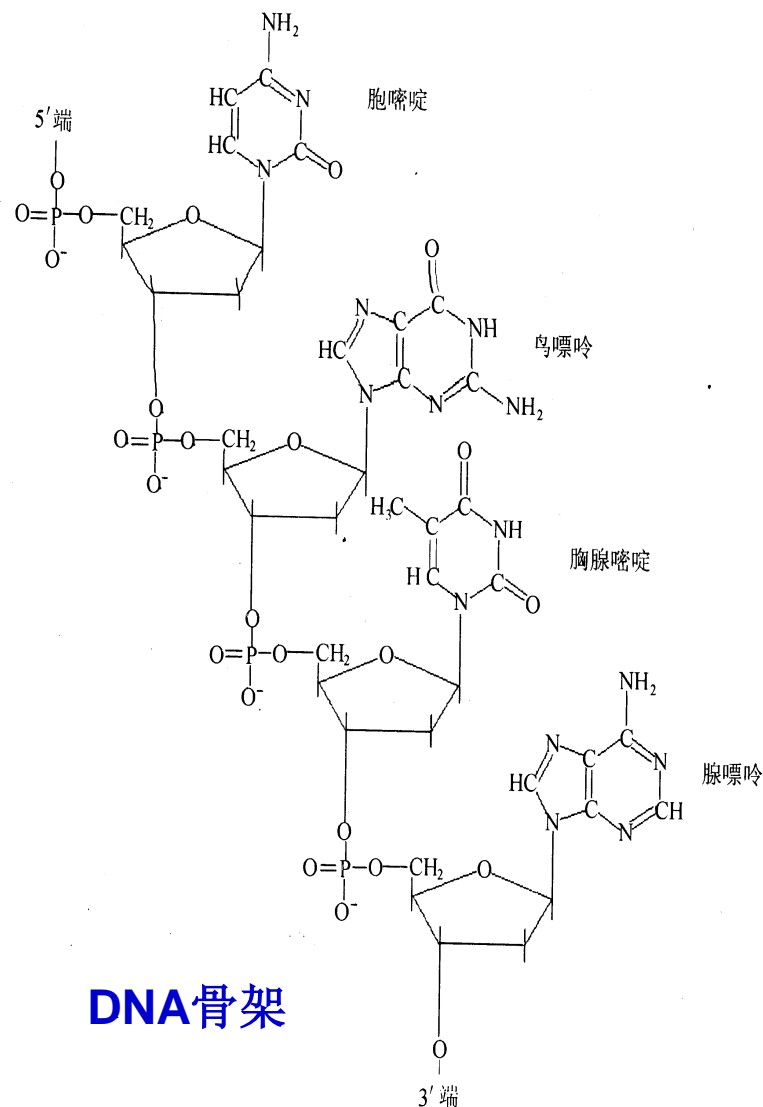
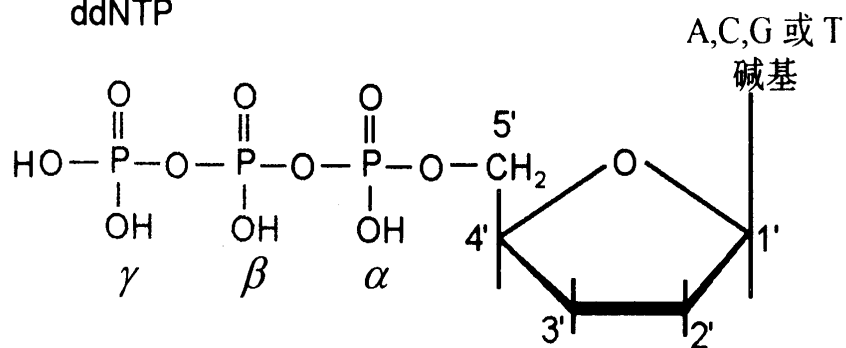
- 特性：利用DNA聚合酶进行引物延伸反应；其引物是带有放射性标记的，可通过放射自显影检出；**双脱氧核糖核苷三磷酸（ddNTP）作为链终止剂**；采用聚丙烯酰胺区分长度仅差一个碱基的单链DNA。
- 原理：双脱氧核糖核苷三磷酸（ddNTP）不会与正常的脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）形成磷酸二酯键，从而链的随机终止；**建立4个系统，就可得到4个套组（nested sets）**；在一个胶板上同时电泳，就可读出模板链的互补链的顺序。

# 双脱氧核糖核苷三磷酸 (ddNTP)

dNTP



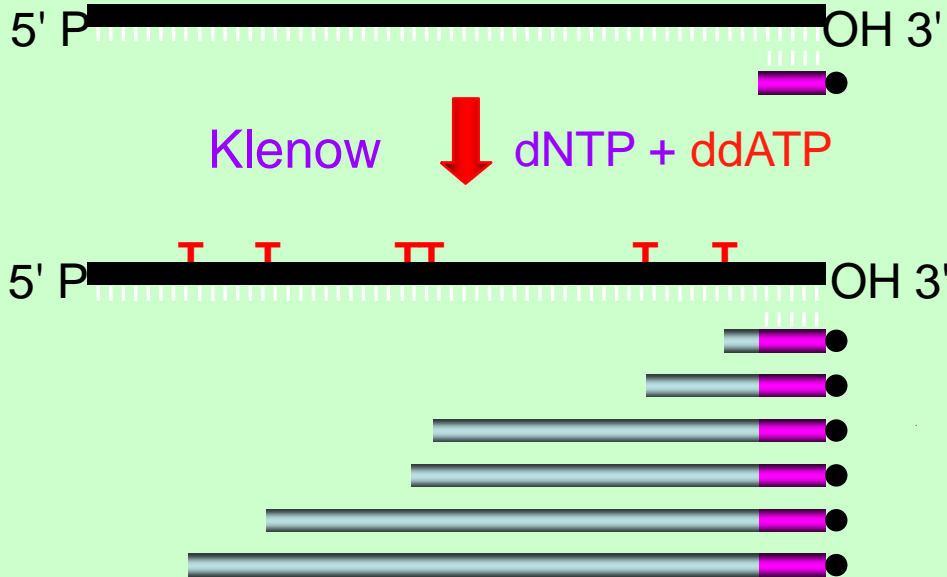
ddNTP



DNA骨架



# 双脱氧末端终止 测序法的基本操作

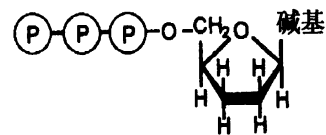


凝胶电泳方向

5' CTGACTTCGACAA 3' 待测序的单链DNA

TGT \* 放射性标记的引物

DNA聚合酶I  
dATP  
dGTP  
dCTP  
dTTP



双脱氧核苷酸 (ddNTP)

ddATP

ddCTP

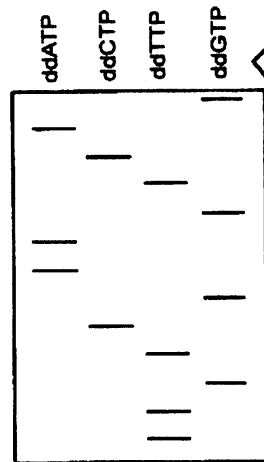
ddTTP

ddGTP

反应混合物

凝胶电泳放射  
自显影检测

反应产物



5' CTGACTTCGACAA 3'

序列胶的判读



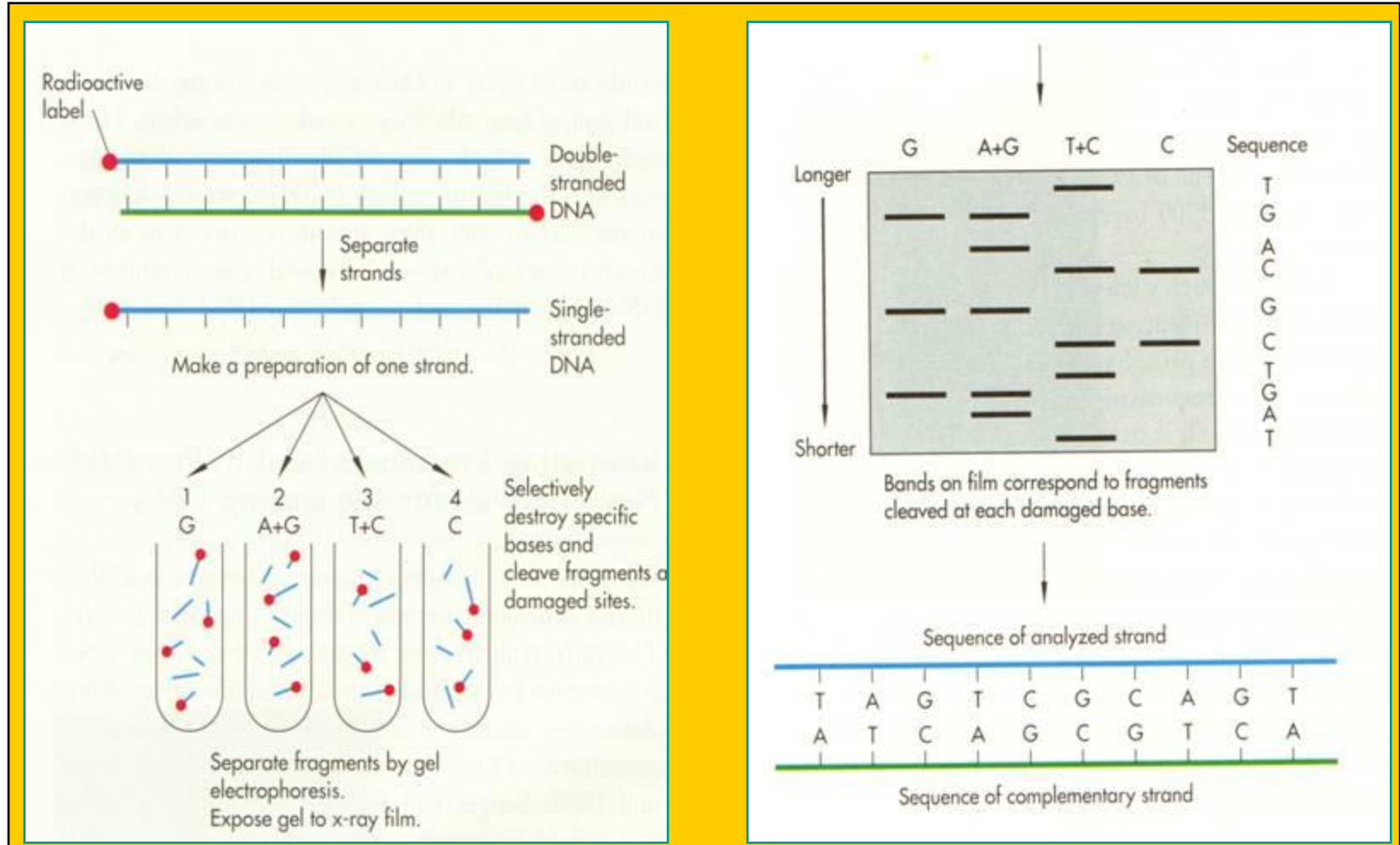


## 2、化学降解法测序

- 将双链或单链DNA经过不同的化学方法降解，得到随机的短的DNA片段，再通过电泳分离读取顺序。
- 每次只能在一个特定的核苷酸处降解：
  - ① **G反应**：硫酸二甲脂（DMS）使鸟嘌呤N7甲基化；
  - ② **A+G反应**：甲酸使嘌呤环上的氮质子化导致糖苷键被削弱，进而嘌呤环被嘧啶取代；
  - ③ **C+T反应**：肼能够裂解嘧啶环，进而导致其脱落；
  - ④ **C反应**：在一定浓度的条件下，肼只对胞嘧啶起作用



# 化学法测序的基本原理





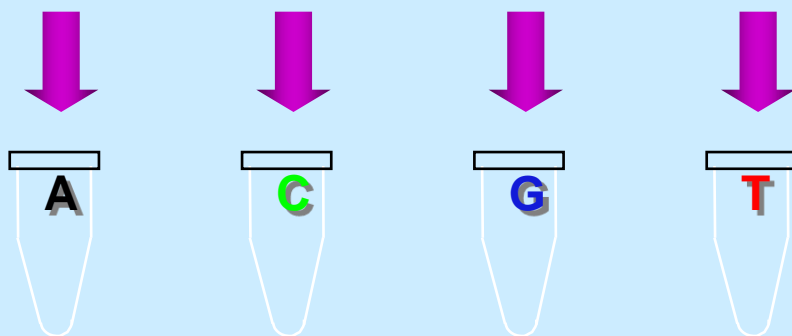
### 3、DNA序列的自动测定

- 基本原理：末端终止法
- 4种双脱氧核糖核苷酸分别用4种荧光素标记
- 测序系统由1个反应系统、1个电泳系统及驱控系统组成



# 双脱氧末端终止测序法的基本操作

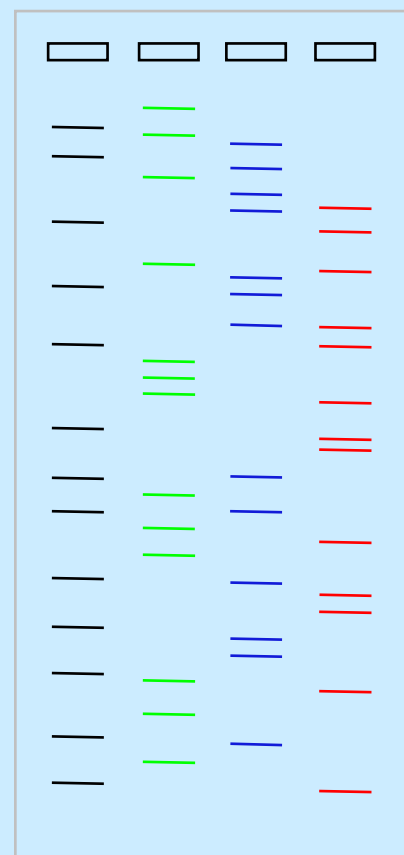
<b>ssDNA</b>	<b>ssDNA</b>	<b>ssDNA</b>	<b>ssDNA</b>
<b>Primer</b>	<b>Primer</b>	<b>Primer</b>	<b>Primer</b>
<b>Klenow</b>	<b>Klenow</b>	<b>Klenow</b>	<b>Klenow</b>
<b>dNTPs</b>	<b>dNTPs</b>	<b>dNTPs</b>	<b>dNTPs</b>
<b>ddATP</b>	<b>ddCTP</b>	<b>ddGTP</b>	<b>ddTTP</b>



DNA聚合反应

聚丙烯酰胺凝胶电泳

**A** **C** **G** **T**



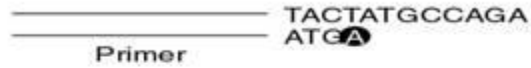


# DNA自动测序原理

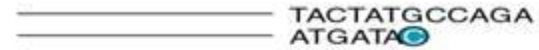
基因工程

Primer extension reactions:

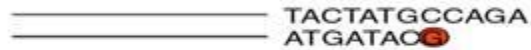
ddA reaction:



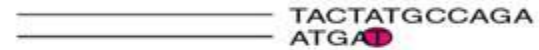
ddC reaction:



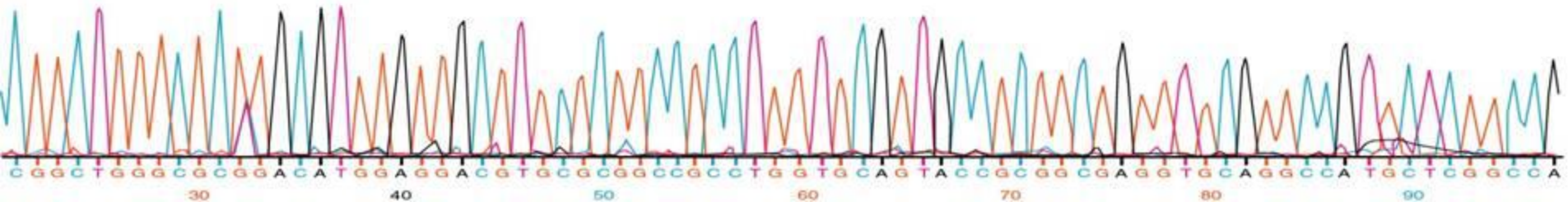
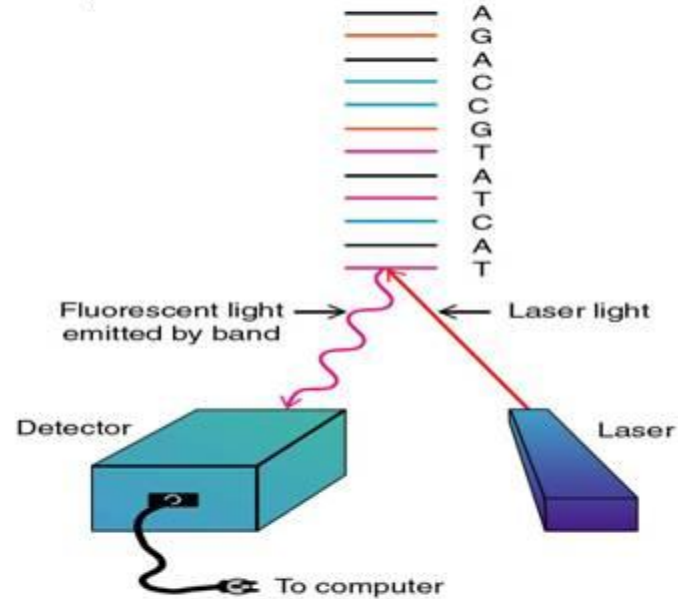
ddG reaction:



ddT reaction:



Electrophoresis:





# DNA测序结果

