

- 1 概念及主要基因工程产品
- 2 基因工程中常用的工具酶和载体
- ➔ ● 3 基因工程无性繁殖系的构建
 - 3.1 概念
 - 3.2 基因工程无性繁殖系构建过程
- 4 基因工程药物的发酵、纯化与保存
- 5 基因工程制药技术的研究热点

填空题 2分

生长激素抑制素以前是从羊的脑部提取，十万只羊才能提取纯化1mg的生长激素抑制素，但采用基因工程技术表达生产，只需10L发酵液即可获得，这说明利用基因工程技术生产这个产品，可以大大降低 [填空1] (4个字)；人的生长激素以前是从新鲜死尸脑部提取，但有可能因为材料来源污染的问题，导致提取的激素携带病毒或者其他致病原，而通过基因工程技术表达生产人的生长激素则完全不存在这个问题，这说明利用基因工程技术生产人的生长激素，相比较而言 [填空2] 更高 (3个字)。

单选题 1分

以下具有刺激造血细胞增殖、免疫细胞成熟的生物药物是：

- ☐ A EPO
- ☒ B CSF
- ☐ C IFN
- ☐ D TNF

单选题 1分

目前为止应用得最为成熟的基因工程疫苗是：

- ☐ A 肺结核疫苗
- ☐ B HIV疫苗
- ☒ C HBV疫苗
- ☐ D HPV疫苗

单选题 1分

以下能刺激造血干细胞分化为红细胞，治疗慢性肾衰和放化疗引起的各种贫血的是：

- A EPO
- B CSF
- C IFN
- D TNF

克隆目的基因

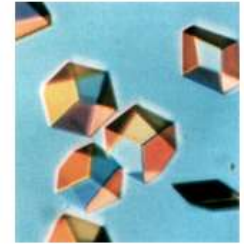
基因和载体重组

转入宿主细菌

挑出所要群落

得到纯的工程菌

人类胰岛素
Human Insulin



大量发酵生产

概念及构建过程

无性繁殖

即克隆，指制备由一个亲本而来的彼此相同的子代（无性繁殖系）的操作技术

构建过程

基因工程目的基因的制取

目的基因与分子载体的体外重组

重组载体引入宿主细胞的转化和转导

含目的基因重组子的筛选、鉴定和分析

目的基因在宿主细胞中的高效表达

基因工程药物无性繁殖系的组建 目的基因的制取

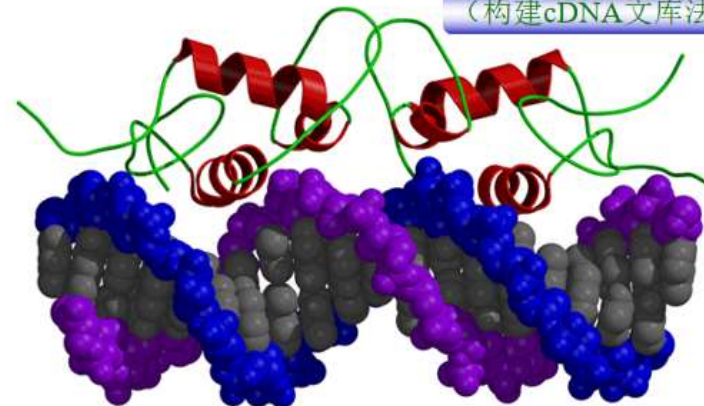
化学合成法

构建基因文库法 ✓

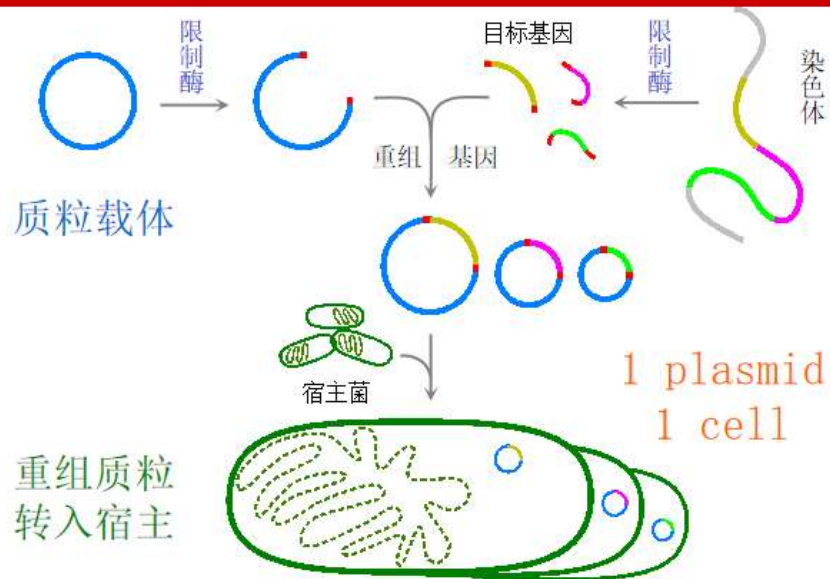
酶促合成法 ✓ ✓

（反转录法）

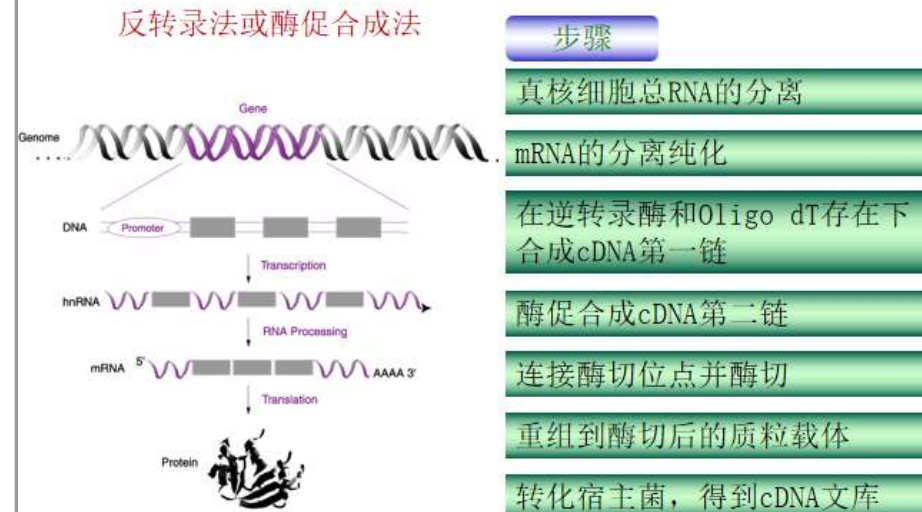
（构建cDNA文库法）



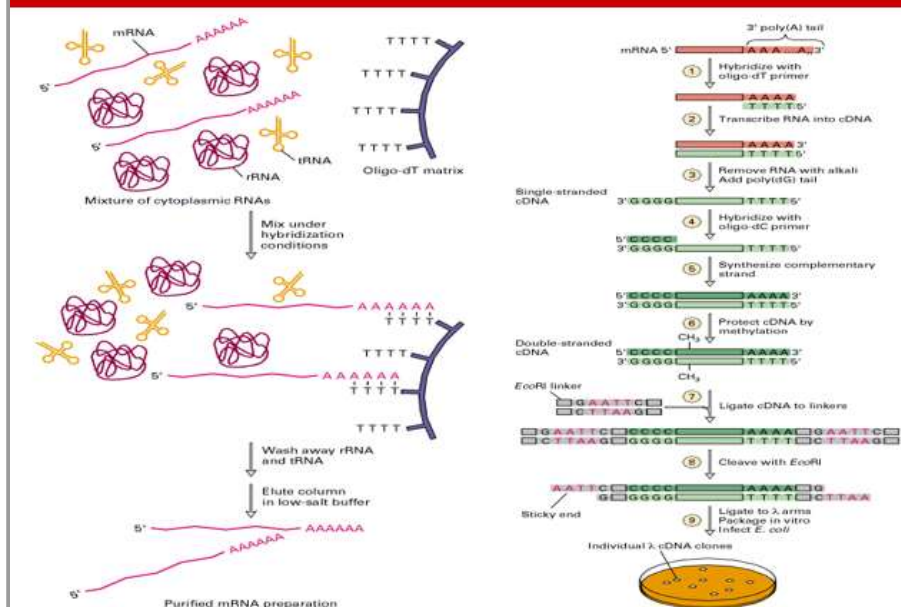
目的基因的制取 构建基因（染色体）文库



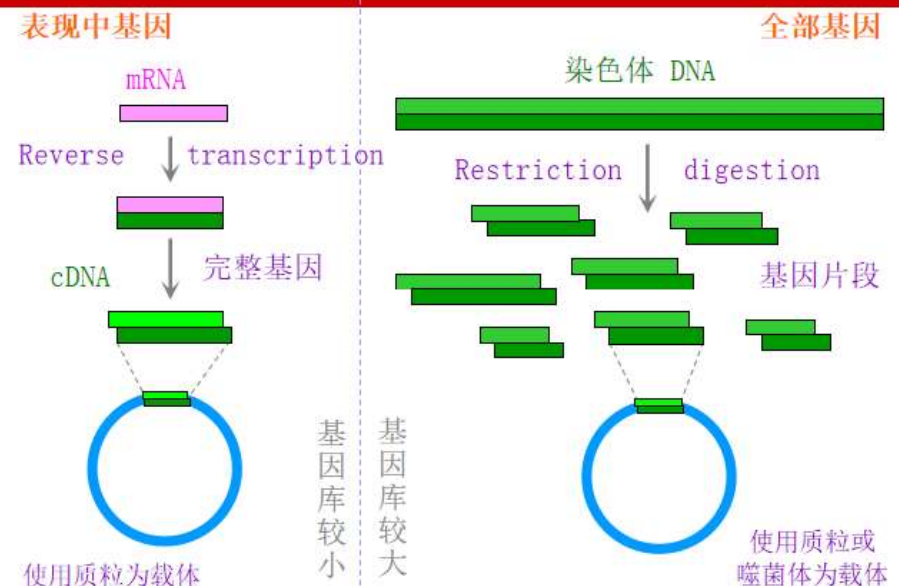
目的基因的制取 构建cDNA文库



构建cDNA文库



两种基因文库：cDNA 基因库 vs 染色体基因库



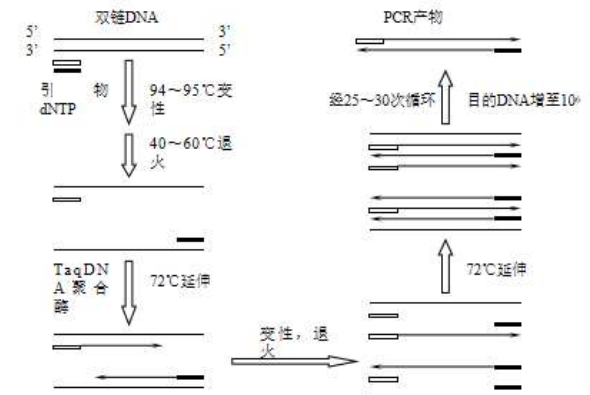
目的基因的制取 从文库中筛选目的基因

-  核酸杂交法
-  抗体检测法
-  其它

RT-PCR法直接获得目的cDNA PCR



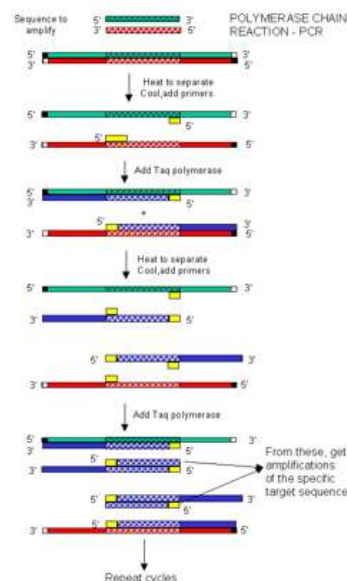
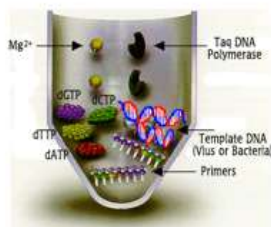
Polymerase Chain Reaction



RT-PCR法直接获得目的cDNA RT-PCR

步骤

- 真核细胞总RNA的分离
- mRNA的分离纯化
- 在逆转录酶和Oligo dT存在下合成cDNA第一链
- 以两个引物所结合的cDNA第一链为模板进行PCR, 直接合成目的cDNA



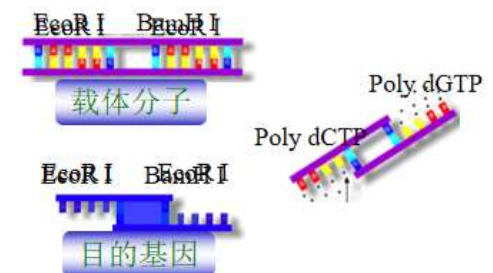
基因工程药物无性繁殖系的组建 DNA重组

DNA重组

将目的基因用DNA连接酶在体外连接到合适的载体DNA上, 称为DNA重组

方法

- 定向克隆法
- 粘性末端连接法
- 平端连接法
- 快速克隆法
- 同聚物加尾法
- 加合成接头法



基因工程药物无性繁殖系的组建 重组体的转化

受体（宿主）细胞 在转化和转导中接受外源基因的细胞

微生物（大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酵母）
哺乳动物细胞（中华仓鼠卵巢）

转化 把带有目的基因的重组质粒DNA引入受体细胞的过程

转染 重组噬菌体DNA或病毒DNA直接引入受体细胞过程

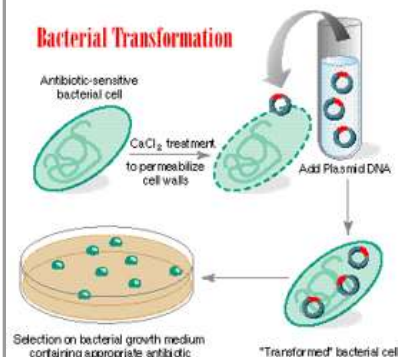
转导 重组噬菌体DNA被包装到噬菌体头部成为有感染力的噬菌体颗粒，并以此噬菌体为载体将重组DNA导入受体细胞的过程

感受态 细菌吸收转化因子（DNA）的状态

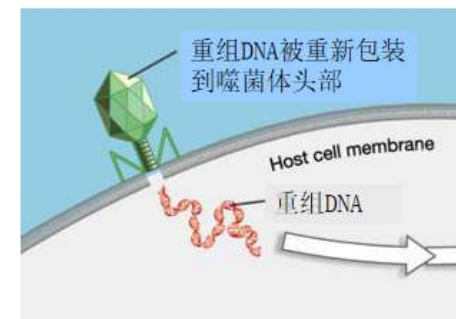
冷的氯化钙处理制备感受态细胞

重组体的转化、转染与转导

Bacterial Transformation



转化

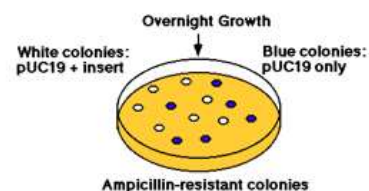
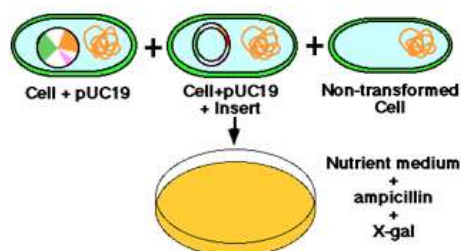
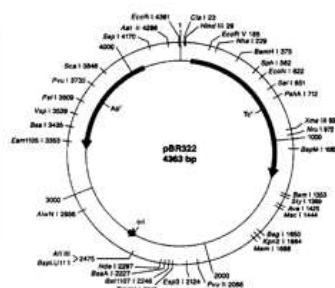


转导

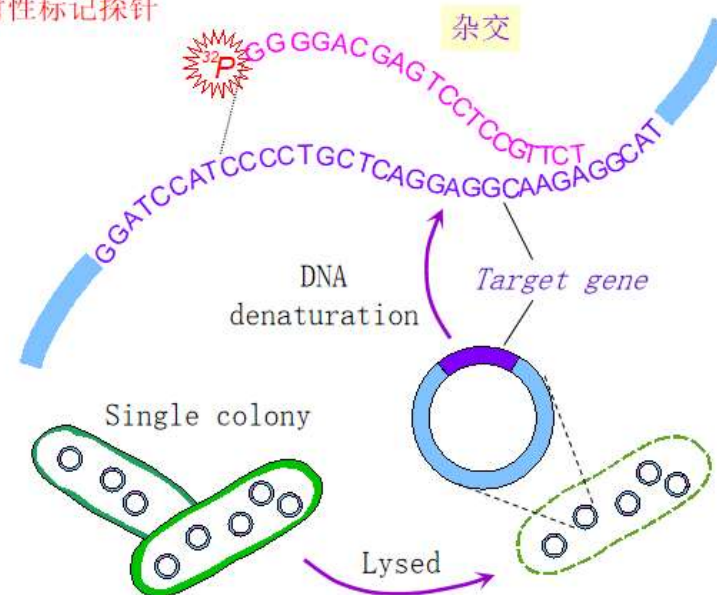
基因工程药物无性繁殖系的组建 重组体的筛选

方法

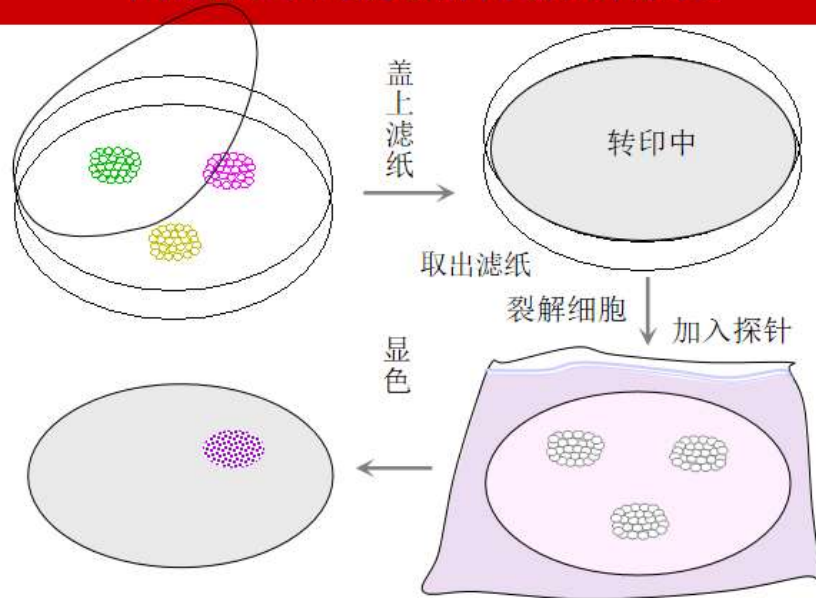
- 抗生素抗性基因插入失活法
- β-半乳糖苷酶基因插入失活法
- 放射性标记核酸探针杂交筛选法
- 免疫化学筛选法



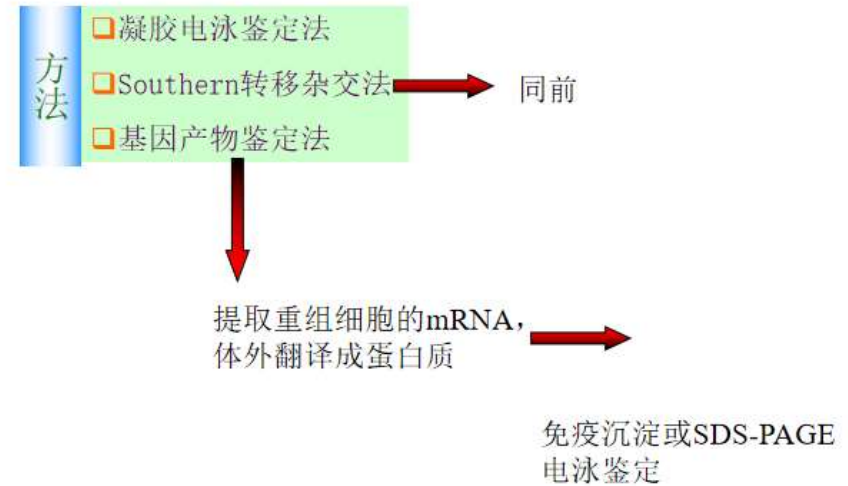
放射性标记探针



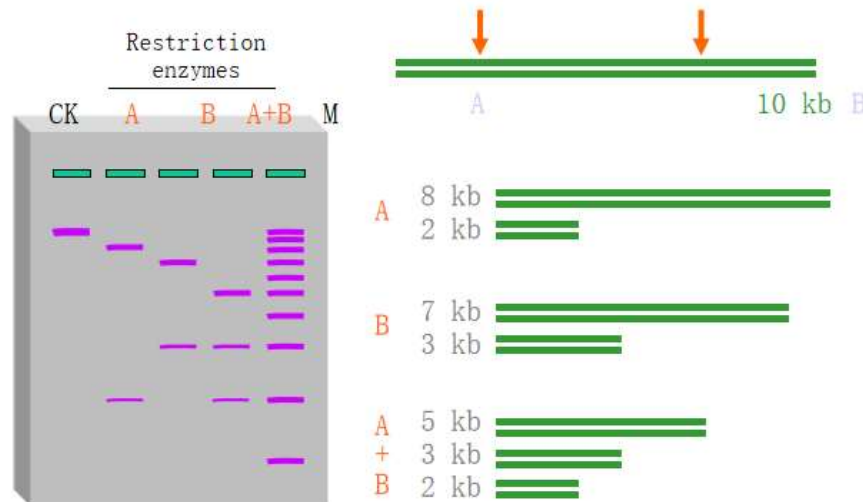
菌落转印到滤纸后以探针杂交



基因工程药物无性繁殖系的组建 重组体的鉴定



DNA 的酶切电泳图谱鉴定



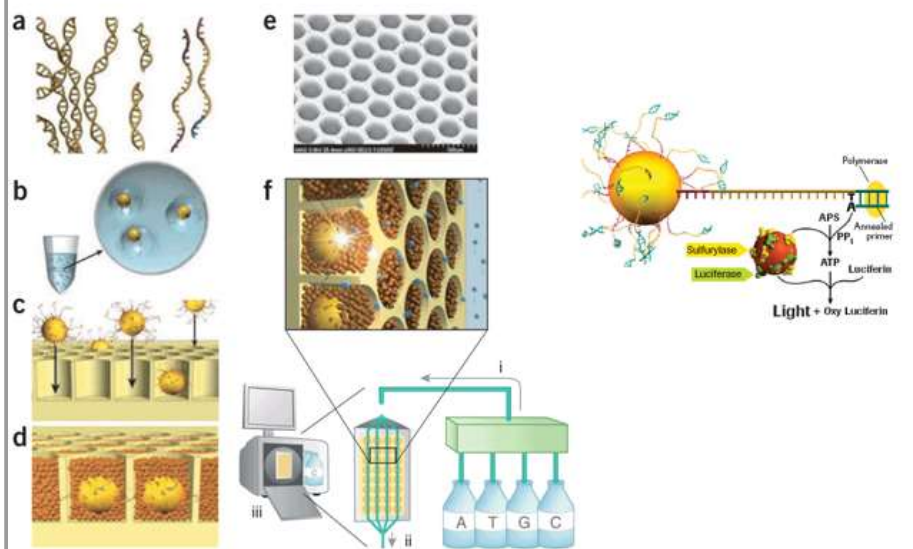
基因工程药物无性繁殖系的组建 重组体序列分析

Sanger双脱氧法

化学降解法

	测序方法/平台	公司/公司网站	方法/酶	测序长度	每个循环的数据产出量	每个循环耗时	主要错误来源
第一代测序技术	Sanger/ABI3730 DNA Analyzer	Applied Biosystems www.appliedbiosystems.com	Sanger法/DNA聚合酶	1000 bp	56 kb		
第二代测序技术	454/GS FLX Titanium Series	Roche www.roche-applied-science.com	焦磷酸测序法/DNA聚合酶	400 bp	400-600 Mb	10 h	插入、缺失
	Solexa/Illumina Genome Analyzer	Illumina www.illumina.com	边合成边测序/DNA聚合酶	2*75 bp	20.5-25 Gb	9.5 d	替换
	SOLID/SOLID 3 system	Applied Biosystems www.appliedbiosystems.com	连接酶测序/DNA连接酶	2*50 bp	10-15 Gb	6-7 d	替换
第三代测序技术	Heliscope/Helicos Genetic Analysis System	Helicos www.helicosbio.com	边合成边测序/DNA聚合酶	30-35 bp	21-28 Gb	8 d	替换
	SMRT	Pacific Biosciences www.pacificbiosciences.com	边合成边测序/DNA聚合酶	100000 bp			
	纳米孔单分子	Oxford Nanopore Technologies www.nanoporetech.com	电信号测序/核酸外切酶	无限长			

Roche第二代测序技术 454 Sequencing



第三代测序技术 Oxford Nanopore Tech

Oxford Nanopore Technologies



区别于传统DNA重组技术

Red/ET 同源重组技术

Red/ET Recombination

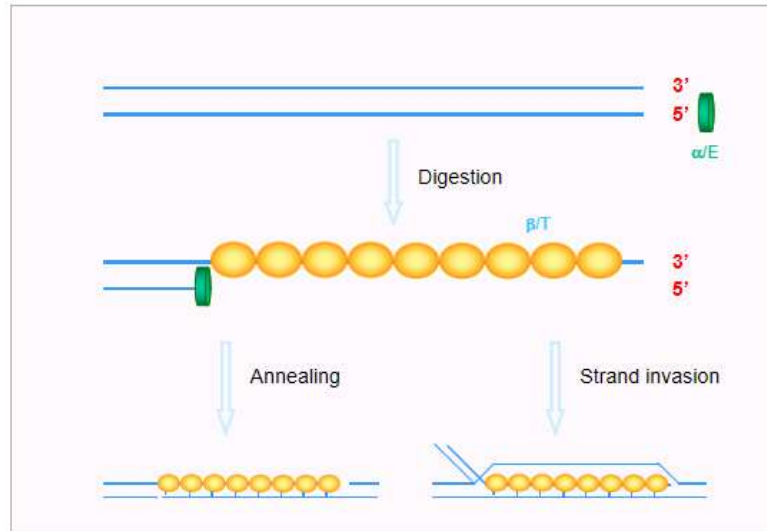
Red/ET Recombination

- Based on two pairs of genes ---
- recE* and *recT* of the *Rac* prophage, integrated in the genome of *E.coli* K12 strains;
- red α* and *red β* of lambda phage.
- The *Rac* *recE/recT* operon = the lambda *red* operon
recE = *red α* — 5' → 3' exonuclease
recT = *red β* — single strand DNA binding protein; recombinase

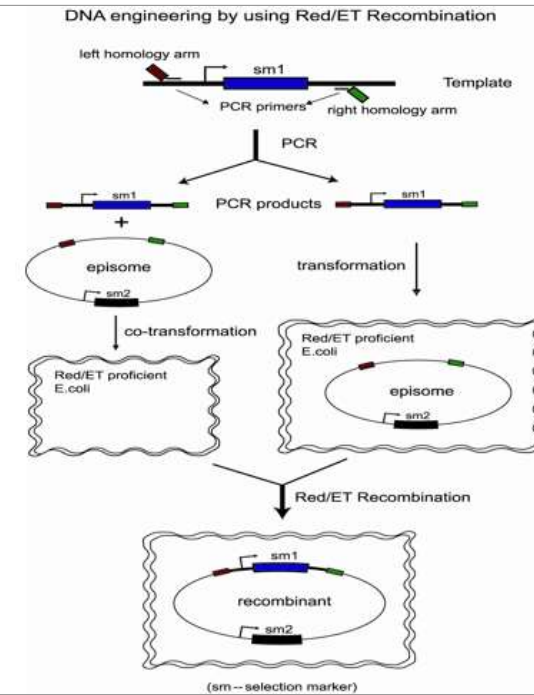
SIMPLE & ELEGANT DNA ENGINEERING

Red/ET RECOMBINATION

Initial steps in Red/ET Recombination



Red/ET用于基因工程重组



Red/ET用途和技术特点

Red/ET Recombination is ideal for DNA engineering

- Insertions
- Deletions
- Substitutions
- Fusions
- Point mutations
- Direct cloning
- Subcloning

Without Restriction Enzymes
Without Ligase
No Site Limit
No Size Limit

SIMPLE & ELEGANT DNA ENGINEERING

区别于传统DNA重组技术

CRISPER CAS9基因编辑技术 (见预习视频)