1. 基因治疗：是利用基因工程技术向有功能缺陷的人体细胞补充相应功能基因，以纠正或补偿基因缺陷，从而达到治疗疾病的目的。

常规治疗（蛋白质）、基因治疗（RNA、DNA）

如何进去、如何表达

病毒（腺病毒）可以将基因带进细胞

病毒可以将基因带进预期的细胞并且入核表达

腺病毒：快表达、不整合

逆转录病毒：快表达、危险整合（可能整合到特定位点）

慢病毒（艾滋、狂犬）：慢表达（潜伏期）、随机整合

腺相关病毒（不单独产生）：快表达、稳定表达、安全整合（可通过血脑屏障）

前提条件：确切性（明确的致病机理与基因信息）、安全（载体：非整合：免疫原性、细胞毒性；整合：遗传毒性）、不可替代性（治疗方式，目前治疗中难以阻止疾病发展的严重疾病）

格尔辛格之死：操作不规范

单基因疾病（精氨酸酶缺乏症；鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏症；脂蛋白脂肪酶缺乏症；重症联合免疫缺陷；A型和B型血友病；β地中海贫血；镰刀型细胞贫血；亨廷顿的舞蹈病；脊髓型肌萎缩症MSA）

SMN：神经细胞：可变剪接；神经轴突的装运、发育；肌肉细胞：肌细胞的组装。

基因治疗途径:体外法(exvivo)

优点: 风险较小

缺点:

步骤较多

费用较高

基因治疗的策略

1.基因增补或称基因添加( gene augmentation) :导入靶细胞中不表达的外源

基因，补偿缺陷基因的功能:缺陷基因仍在细胞内。

2.基因置换(gene replacement) :用正常功能的基因完全替换缺陷基因，达

到永久更正、治疗的目的。

3.基因修正(gene correction) :将致病基因的突变序列进行修正，使其变成正

常序列。

4.基因激活(gene activation) :通过去甲基化、组蛋白乙酰化、改变启动子序

列等方式来激活基因的表达.

5.基因失活(gene inactivation) :利用反义核酸、核酶或RNA千扰等技术封闭

靶基因的表达。

6.免疫调节(immune adjustment) : 将抗原、抗体或细胞因子的基因导入病人

体内，调节病人的免疫状态。

7.药物敏感疗法:关闭耐药基因的表达，提高肿瘤对药物的敏感性:或将自杀基

因转入肿瘤细胞，自杀基因能将无毒的药物前体变成杀伤肿瘤的有效药物。

1. 测序

一代测序技术的不足

●手工操作

●同位素标记

●4个反应系统

●4个泳道

●一个胶板

●测序长度短(300- 700bp)

●耗时长

怎么得到有特殊规律可循的一个个DNA片段?

1. 通过酶合成的方法

（一代、酶合成法一Sanger末端终止法，Sanger 1977年发明）

根据要测序的DNA模板合成一个一个互补的DNA片段;

利用了一个DNA链合成的终止剂（ddNTP），使DNA新链合成时会有规律地终止于某一个特定的碱基处，从而得到许多有规律的DNA片段。

未端终止法测序的局限性

1、依赖凝胶电泳分离DNA片段，分辨率不高;

2、测序片段不能太长;

3、经历反应、电泳、扫描分析等多步骤，过程繁琐;

4、不能大规模多通道测序。

二代、一边合成、一边测序，技术成熟、应用最广

焦磷酸测序

焦磷酸发光检测合成碱基，每生成一个碱基发一次荧光，三磷酸腺苷双磷酸酶降解ATP及未掺入的dNTP

优点:

1.不需要制胶，不需要毛细管，也不需要荧光染料和同位素。

2.10分钟内可分析96个样品的SNP.可满足高通量分析的要求。

3.每个样品孔都可进行独立的测序或SNP分析，实验设计灵活。

4.序列分析简单，结果准确可靠。

唯一缺陷就是当遇到模板链同一个碱基连串存在时，无法区分碱基的个数。

Solexa测序（加了阻断基因）

是通过荧光信号直接读取序列信息，简便高效，垄断90%的测序市场。

二代测序技术的优点.

●高通量(芯片)

●耗时短

●荧光标记或发光

●无需电泳

●即时检测

●测序长度中等70-750bp

●同时测\_上万到几十万个DNA片段

●HiSeq2000- 个run可产生200Gb的数据，升级版达到600Gb的数据

三代 开始应用

Hel iscope测序技术的优点

●单分子模板

●超高通量

●单色荧光标记

●测序长度短35bp

SMRT测序技术的优点

●单分子模板

●高通量

●4色荧光标记

●即时检测

●测序长度超长1. 5-20kb

纳米孔测序技术的优点

●单分子模板

●高通量

●外切酶单切

●即时检测

●测序长度无限长

2.化学降解的方法

把DNA分子降解成一个一个可以拼接的片段。

Southern测序：DNA组测序

Northern测序：RNA组测序

Western测序：与靶蛋白结合的全部DNA序列

Eastern测序：表观基因组测序

3.基因编辑

同源重组

1. 构建载体
2. ES细胞同源重组
3. 获得基因敲除鼠

优缺点

●

同源重组靶向基因

体内基因定点替换.

●

不适合无ES细胞的品系

同源重组打靶效率低

费时费力费钱

ZFN锌指核酶

3个串联的C2H2锌指组成DNA结合结构域，每一锌指含约30个的氨基酸残基，能够结合特定序列的3bp的靶DNA片段。

ZFN技术的优缺点

●适应于所有细胞类型

DNA断裂频率高

InDel或基因片段替换

●脱靶频率高

锌指组合难度大，亲和力弱

三、TALE锌指

TALE单体:二联体氨基酸识别不同碱基

TALE模块组合成识别15-30个碱基的识别模块

精确度、灵活性、特异性更高

TALEN技术的优缺点

●

适应于所有细胞类型，

DNA断裂频率高

InDe |或基因替换

脱靶频率低

锌指可任意长度组合，特异性更好

组装模块繁琐

CRISPR技术的优缺点

●

适应于所有细胞类型

设计和获取gRNA非常简便

InDe |或基因替换

单碱基编辑

●

脱靶频率介于ZFN和TALEN之间

RNA弓|导稳定性受限

4.IPS细胞

三.

iPS细胞有哪些特性?

(1) .细胞来源广泛。

(2).iPS技术不使用胚胎细胞或卵细胞，因此没有伦理争议。

(3).可以用病人自己的体细胞制备专有的干细胞，所以不会有免疫排斥问题。

(4)iPS细胞功能上类似于胚胎干细胞

不足

1. 无限繁殖、导致肿瘤
2. 添加四个“干基因”、病毒转染可能插入破坏基因组，有致癌风险
3. 体外突变无法识别清除
4. 细胞不纯等原因可能导致肿瘤

改进

1. 不用病毒、纳米技术，更安全的方法，如用蛋白质制备IPSC
2. 不转入基因、使原基因高表达
3. 高度纯化细胞

IPS细胞会受到免疫排斥

IPS治疗疾病类型（所以与细胞死亡、衰老、细胞功能缺陷有关的疾病）

帕金森（分化、迁移、成熟、连接、改善功能）

多重PCR：同时使用多对引物扩增一个模板DNA。（开展遗传病的基因诊断、亲子鉴定）

DNA指纹：多态性位点进行多重PCR得到的个体DNA基因型。

反向PCR：扩增已知序列两侧的未知序列（转基因插入位点检测）

定点突变：PCR过程中在引物处引入突变位点

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

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。

条件基因敲除：Cre-loxp，cre蛋白（编码区人工转进特定启动子后）切除两段loxp间的序列