**基因工程名词解释**

**1.基因工程**：指在体外将外源目的基因通过载体导入到受体细胞使之能够在受体细胞内复制、增殖并表达基因产物的生物技术。

**2.限制型核酸内切酶**:指能够识别双链DNA分子中特异的序列并在识别序列内部或两侧特异切割双链DNA分子的核酸内切酶。

**3.DNA连接酶**:能催化双链DNA分子中具有邻近位置的3’-羟基和5'-磷酸基团形成磷酸二酯键，因此该酶可促使具有互补粘性末端或平末端的载体和供体DNA片段结合或连接，以形成重组DNA。

**4.柯斯质粒(cos质粒)**:是人工构建的由λ噬菌体的COS序列、质粒的复制子序列及抗生素抗性基因序列组合而成的一类特殊的质粒载体。

**5.人工染色体载体**:是利用真核生物染色体或原核生物基因组的功能元件构建的能克隆大于50kbDNA片段的人工载体。

**6.表达载体**: 带有基因表达所需的各种调控元件，能使克隆的目的基因在宿主细胞中表达的载体。

**7.终止子**:在一个基因的3’末端或是一个操纵子的3’末端往往有一段特定的核苷酸序列，具有终止转录功能，这一序列称为转录终止子。

**8.蛋白质的融合表达**:指外源基因与载体已有的担体蛋白的编码基因拼接在一起，并作为一个新的开放阅读框进行表达。

**9.IRES序列**:指内部核糖体进入位点，来源于脑心肌炎病毒，可翻译一条mRNA上的两个开放阅读框，由其连接的两个基因的表达率相同。

**10.基因文库(DNA文库)**:指在细菌中增殖来自某一生物的染色体DNA或cDNA所形成的全部DNA片段克隆的集合体。

**11.PCR(多聚酶链式反应)**:是利用碱基互补配对的原则，经过高温变性、低温复性、子链延伸的不断循环，在体外快速、选择性地特异扩增目的DNA的一种方法。

**12.反向PCR**:指通过已知序列设计引物，扩增已知序列两侧未知序列的方法。

**13.巢式PCR(嵌套PCR)**:指PCR完成以后，以PCR产物为模板，根据引物内侧的序列设计新引物所做的PCR。

**14.反转录PCR(逆转录PCR)**:以mRNA为模板进行的特殊PCR。

**15.实时荧光定量PCR**:通过荧光染料或荧光标记的特异性探针，对PCR产物进行标记跟踪，实时在线监控反应过程的技术。

**16.多重PCR**:在一个反应体系中使用多对引物对同一模板进行扩增的PCR。

**17.Ct值**:指产生在基线上方的统计学上显著的荧光强度时所对应的PCR循环次数。

**18.蛋白质工程**:基于对蛋白质结构和功能关系的认识，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及实践。

**19.转座子**:是一类可以改变自身基因位置的遗传因子，其DNA序列含有两种转座必需的成分，即位于DNA序列两个末端的转座序列和位于序列中间转座酶基因。

**20.基因敲除**:指利用外源的已突变的基因通过同源重组的方法替换掉内源的正常同源基因，从而使内源基因失活而表现突变体的性状的技术或方法。

**21.RNA干扰(RNAi)**:指通过反义RNA与正义RNA形成的双链RNA特异性地抑制靶基因的转录后表达的现象。

**22.Morpholino(吗啉基)**:是一种用来修饰基因表现的分子。

**23.凝胶迁移率阻滞实验(EMSA)**:是一种研究DNA结合蛋白和其相关的DNA结合序列相互作用的技术。

**24.免疫共沉淀(CO-IP)**:是以抗体和抗原之间的专一性反应为基础研究两种蛋白质在完整细胞内生理活性状态下相互作用的方法。

**25.报告基因**:用来筛选和指示转化细胞、组织和转基因植株的有效标记。

**26.生物安全**:指在一定的时间与空间范围内，由于自然或人类活动引起外来物种迁移，外来物种在定居、建群、繁衍、扩展的连串过程中对本土物种和生态系统的威胁、危害，使之衰退，甚至退化和灭绝；或由于人为造成环境的剧烈变化，导致生态环境的破坏或掠夺生物资源，砍伐和捕捞过度，严重时导致物种濒危或灭绝；或由于科学技术研究、开发、生产和应用中造成对人类健康、生存环境和社会生活的有害影响。

**27.转基因动物**:指借助基因工程技术把外源目的基因导入动物的生殖细胞、胚胎干细胞或早期胚胎，使之在受体染色体上稳定整合，并能把外源目的基因传给子代的个体。

**28.胚胎干细胞(ES细胞)**:是从哺乳动物早期胚胎的内细胞团(ICM)或原始生殖细胞(PGC)中分离出来的尚未分化的胚胎细胞，经过体外培养、具有发育全能型的细胞。

**29.体细胞核移植(NT)**:指将动物体细胞的细胞核移植到去核的受精卵或成熟的卵母细胞胞质中，从而获得重构卵，并使其恢复细胞分裂，继续发育成与供体细胞基因型完全相同的后代的技术。

**30.Southern印迹法**:通过探针和已结合于硝酸纤维素膜(或尼龙膜)上的经酶切、电泳分离的变性DNA链杂交，检测样品中是否存在目的DNA序列的方法。

**31.Northern印迹法**:通过探针和已结合于硝酸纤维素膜(或尼龙膜)上的RNA分子杂交，检测样品中是否存在目的RNA序列。

**32.动物生物反应器**:指利用转基因活体动物的某种能够高效表达外源蛋白的器官或组织来进行工业化生产活性功能蛋白的技术。

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，以纠正或补偿器基因缺陷，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

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

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