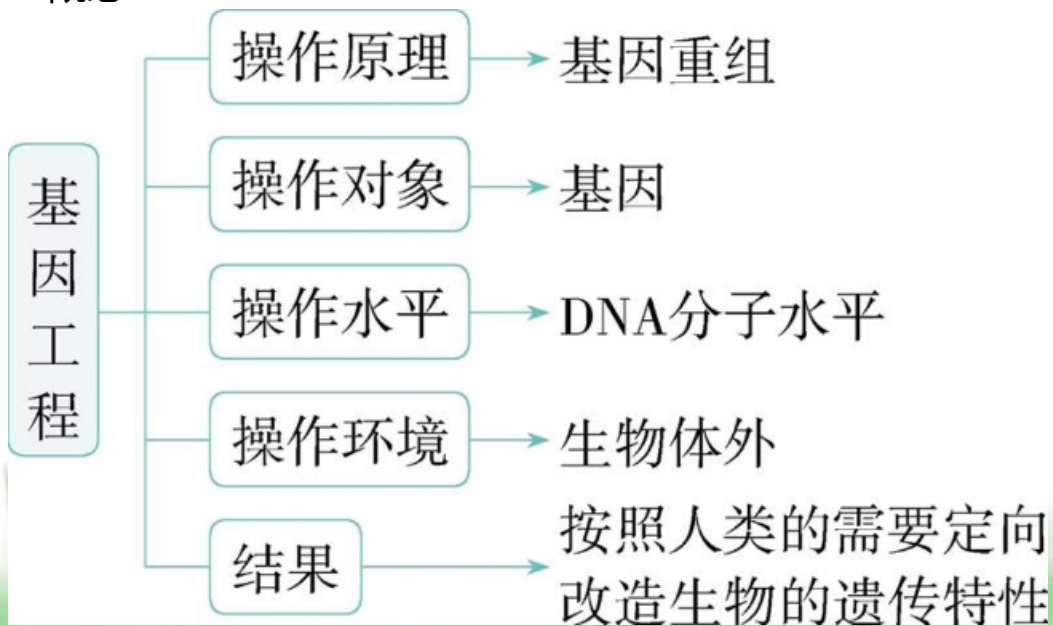


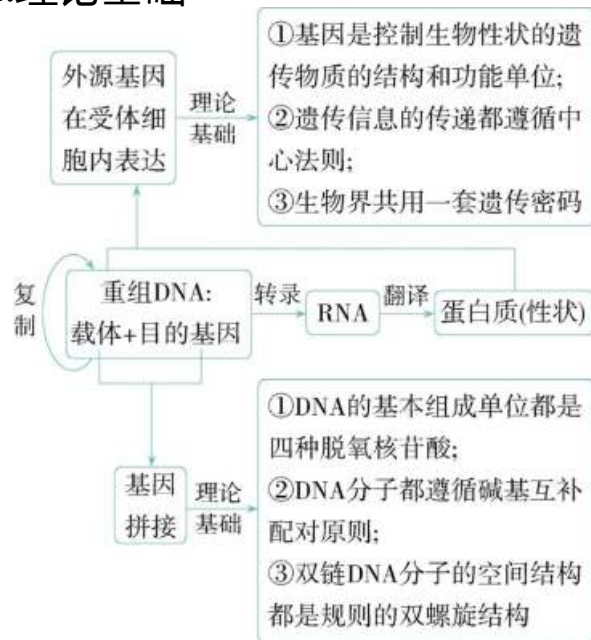
第1节 重组DNA技术的基本工具

知识点 1 基因工程(重组DNA技术)

1.概念



2.理论基础



知识点 2 限制性内切核酸酶(限制酶)

1.来源:主要是原核生物。

特别提醒

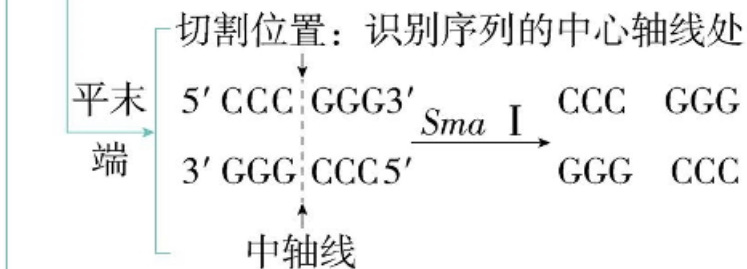
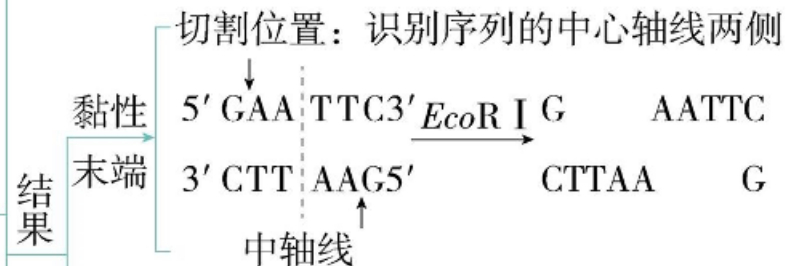
(1) 限制酶在原核生物中的主要作用:限制酶是原核生物的一种防御工具,用来切割侵入细胞的外源DNA,以保证自身安全。

(2) 限制酶不切割原核细胞本身的DNA分子的原因:原核细胞的DNA分子中不具有限制酶的识别序列,或对限制酶识别序列进行了修饰,从而使限制酶不能将其切开。

2.功能:识别双链DNA分子的特定核苷酸序列,并且使每一条链中特定部位的磷酸二酯键断开。

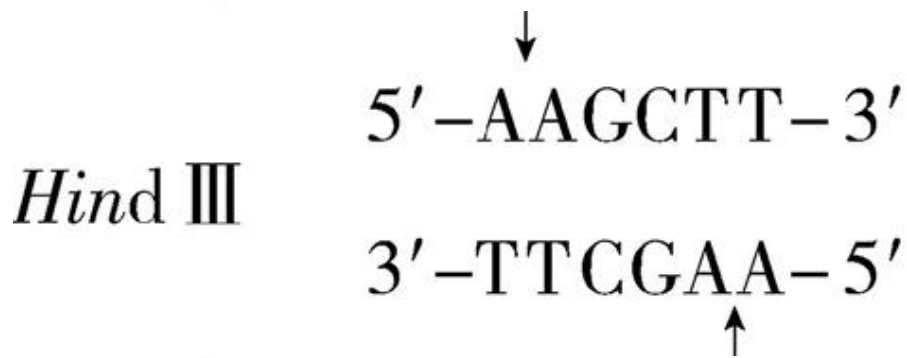
限制酶

识别序列 大多数限制酶的识别序列由6个核苷酸组成，少数限制酶的识别序列由4个、8个或其他数量的核苷酸组成



切割一次，断开2个磷酸二酯键，产生2个游离的磷酸基团，产生2个黏性末端(或平末端)，消耗2分子水

特别提醒 限制酶特异性识别和切割的部位具有回文序列,即在切割部位,一条链正向读的碱基顺序,与另一条链反向读的顺序完全一致。



上边链从5'→3'为AAGCTT,下边链从5'→3'也为AAGCTT。

知识点3 DNA连接酶

1.作用:将双链DNA片段“缝合”起来,恢复被限制酶切开的磷酸二酯键。

2.类型

	<i>E.coli</i> DNA连接酶	T4 DNA连接酶
来源	大肠杆菌	T4噬菌体
功能	连接黏性末端或平末端	
区别	<i>E.coli</i> DNA连接酶连接具有平末端的DNA片的效率要远远低于T4 DNA连接酶	

特别提醒 用不同的限制酶进行切割,只要切割后产生的黏性末端相同,就可用DNA连接酶连接起来。

知识点 4 基因进入受体细胞的载体

1.种类:质粒、噬菌体、动植物病毒等。

2.作用:作为运输工具,将外源基因送入细胞。

3.常用载体——质粒

(1)本质:质粒是一种裸露的、结构简单、独立于真核细胞细胞核或原核细胞拟核DNA之外,并具有自我复制能力的环状双链DNA分子。

(2)质粒作为载体所具备的条件及原因

条件	原因
有一个至多个限制酶切割位点	供外源DNA片段插入其中
在细胞中稳定存在,并能自我复制或整合到受体DNA上,随受体DNA同步复制	使目的基因在受体细胞中稳定存在且可扩增
具有特殊的标记基因	便于重组DNA分子的筛选
对受体细胞无毒害作用	避免受体细胞受到损伤

特别提醒 天然的质粒不能直接作为载体,基因工程中用到的质粒都是在天然质粒的基础上进行过人工改造的。

知识点 5 DNA的粗提取与鉴定

1.实验原理

(1)DNA提取原理

- ①DNA不溶于酒精,但某些蛋白质溶于酒精,可初步分离DNA和蛋白质。
- ②DNA在不同浓度的NaCl溶液中溶解度不同,能溶于2 mol/L的NaCl溶液。

(2)DNA鉴定原理

DNA+二苯胺 $\xrightarrow{\text{沸水浴}}$ 蓝色

2.方法步骤

切碎的洋葱放入研磨液中研磨



过滤并在4 °C冰箱静置或离心，取上清液



DNA的析出(上清液中加入冷酒精，静置后
卷起丝状物或离心取沉淀)



DNA的鉴定(二苯胺试剂, 沸水中加热)

特别提醒 加入冷酒精后用玻璃棒搅拌时,动作要轻缓,以免加剧DNA分子的断裂,导致DNA分子不能形成絮状沉淀。

3.实验结果:溶有丝状物或沉淀物的试管变蓝,作空白对照的试管不变蓝。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/206215223110011005>