

第2节 基因工程的基本操作程序

知识点 1 目的基因的筛选与获取

- 1.目的基因:用于改变受体细胞性状或获得预期表达产物等的基因,主要是指编码蛋白质的基因。
- 2.筛选目的基因的方法:从相关的已知结构和功能清晰的基因中进行筛选是较为有效的方法之一。
- 3.获取目的基因的方法
 - (1)人工合成目的基因。
 - (2)利用PCR获取和扩增目的基因。
 - (3)通过构建基因文库来获取目的基因。

4.利用PCR(聚合酶链式反应)获取和扩增目的基因

(1)原理:DNA半保留复制。

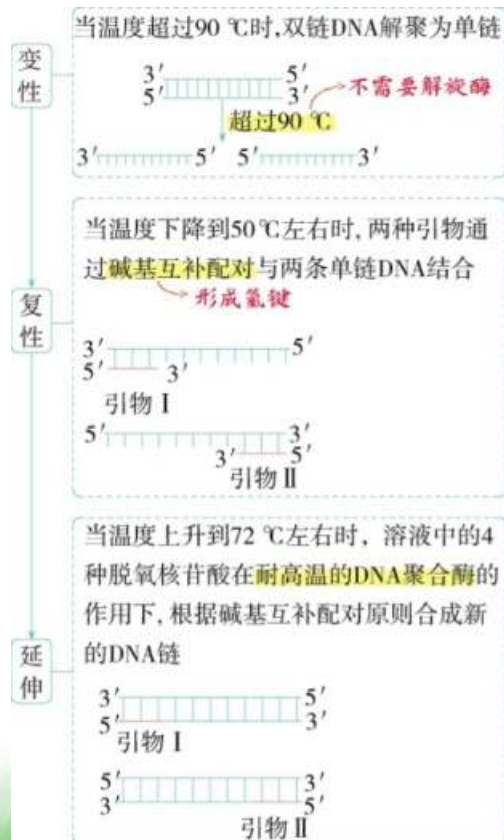
(2)前提:要已知目的基因的一段核苷酸序列,以便根据这段序列合成引物。

(3)基本条件

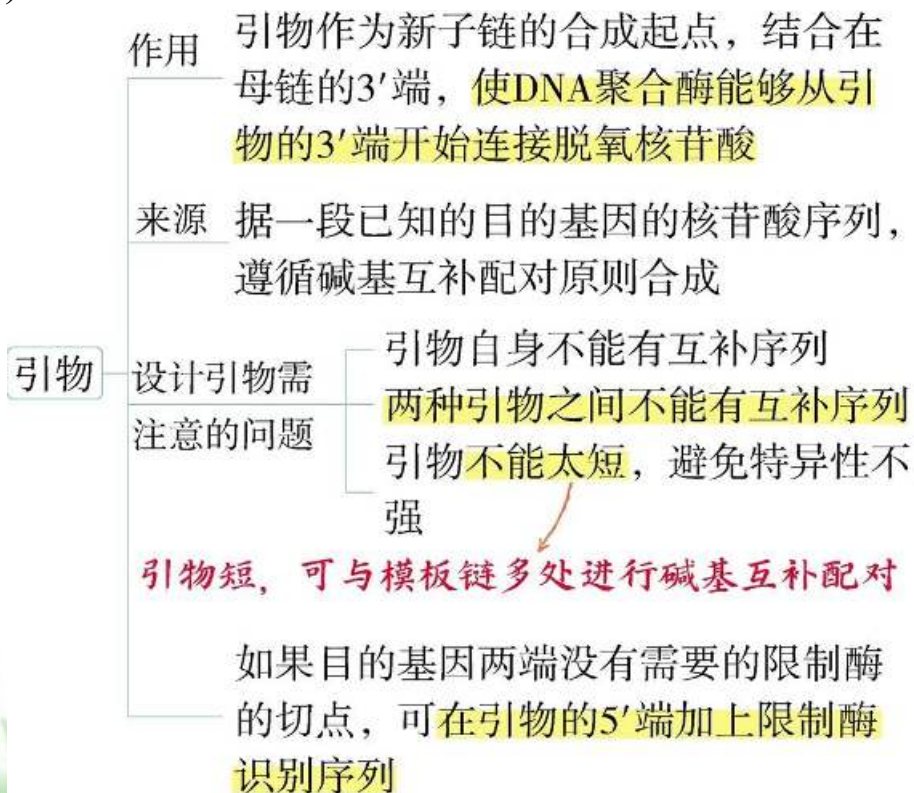
模板	DNA母链
原料	4种脱氧核苷酸
酶	耐高温的DNA聚合酶
引物	一小段能与DNA母链的一段碱基序列互补配对的短单链核酸

真核细胞和细菌的DNA聚合酶都需要 Mg^{2+} 激活。因此,PCR反应缓冲液中一般要添加 Mg^{2+} 。

(4)PCR反应过程



(5)引物



易混易错 比较PCR扩增技术和体内DNA复制

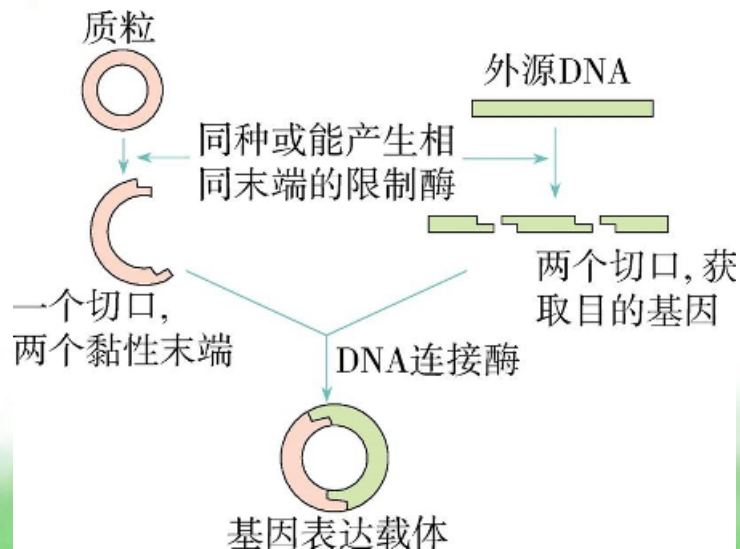
	体内DNA复制	PCR扩增技术
解旋方式	解旋酶催化, DNA双链部分解开	高温解旋, DNA双链全部解开
酶	解旋酶、DNA聚合酶	耐高温的DNA聚合酶
温度条件	细胞内温和条件	需控制温度, 在较高温度下进行
结果	DNA分子	特定DNA片段

(6)PCR产物鉴定:琼脂糖凝胶电泳(见知识点5)。

知识点2 基因表达载体的构建——基因工程的核心

- (1)使目的基因在受体细胞中稳定存在,并且遗传给下一代。
- (2)使目的基因能够表达和发挥作用。

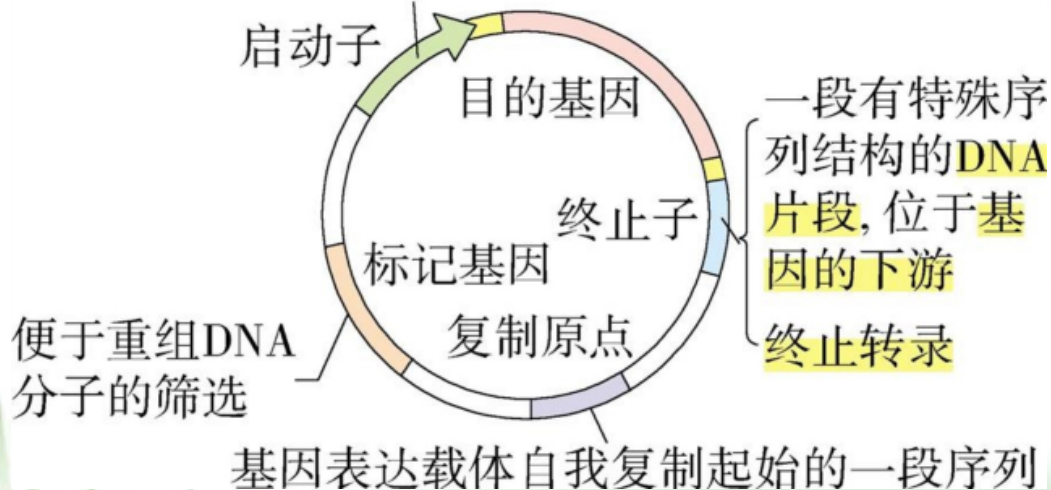
2.过程



3. 基因表达载体的组成

一段有特殊序列结构的DNA片段, 位于基因的上游

RNA聚合酶识别和结合的部位, 驱动基因转录出mRNA



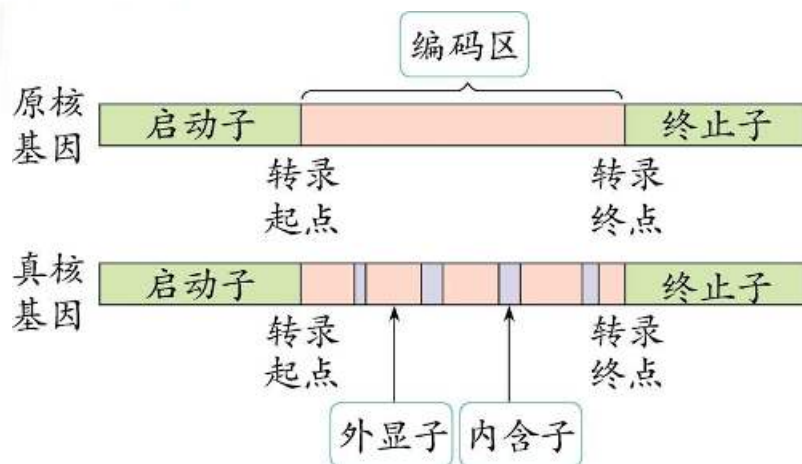
基因表达载体自我复制起始的一段序列

易混易错

项目	启动子	终止子	起始密码子	终止密码子
本质	DNA	DNA	mRNA	mRNA
位置	目的基因上游	目的基因下游	mRNA首端	mRNA尾端
功能	RNA聚合酶识别和结合的部位, 驱动基因转录出 mRNA	终止转录	翻译的起始信号	翻译的结束信号

4.基因表达载体构建过程中限制酶的选择方法(见定点1)

知识拓展 真、原核基因的结构



(1) 真核基因编码区不连续, 分为内含子和外显子。

(2) 原核基因编码区连续, 没有内含子和外显子的区分。

(3) 真核细胞的mRNA和蛋白质中不含内含子对应的序列, 因此由mRNA逆转录得到的cDNA

不含内含子的序列。

知识点3 将目的基因导入受体细胞

1. 导入植物细胞常用的方法

(1) 花粉管通道法——我国独创的方法

① 用微量注射器将含目的基因的DNA溶液直接注入子房中。

② 在植物受粉后的一定时间内,剪去柱头,将DNA溶液滴加在花柱切面上,使目的基因借助花粉管通道进入胚囊。

(2) 农杆菌转化法

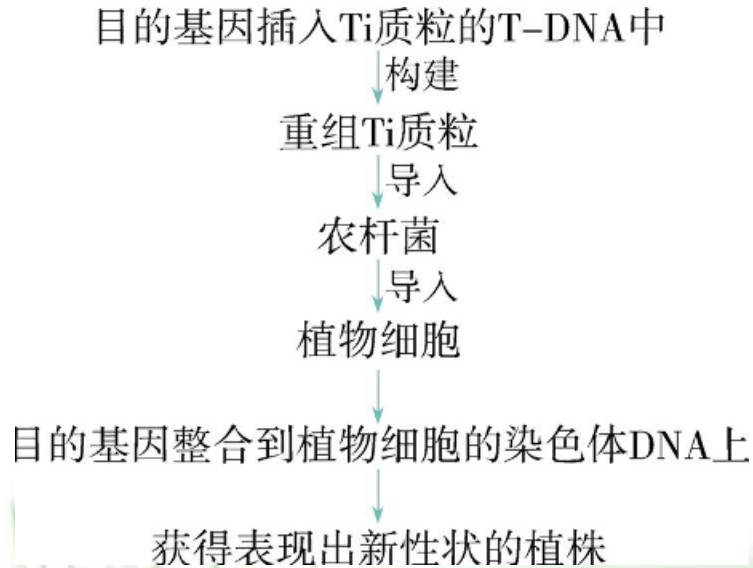
① 转化:目的基因进入受体细胞内,并且在受体细胞内维持稳定和表达的过程。

② 农杆菌的特点

a. 自然条件下侵染双子叶植物和裸子植物,而对大多数单子叶植物没有侵染能力。

b.农杆菌细胞内含有Ti质粒,当它侵染植物细胞后,能将Ti质粒上的T-DNA(可转移的DNA)转移到被侵染的细胞,并将其整合到该细胞的染色体DNA上。

③农杆菌转化过程



	第一次	第二次
两次拼接	将目的基因拼接到Ti质粒的T-DNA上	被插入目的基因的T-DNA拼接到受体细胞染色体的DNA上
两次导入	将含目的基因的重组Ti质粒导入农杆菌	将农杆菌导入植物细胞(含目的基因的T-DNA整合到受体细胞)

2.导入动物细胞(受精卵)常用的方法:显微注射法。

3.导入原核细胞常用的方法: Ca^{2+} 处理细胞,使细胞处于一种能吸收周围环境中DNA分子的生理状态。

知识点 4

目的基因的检测与鉴定

类型	检测内容	方法	结果显示
分子水平的检测	目的基因是否插入转基因生物的DNA上	PCR等	是否出现凝胶电泳条带
	目的基因是否转录出mRNA		
	目的基因是否翻译成蛋白质	抗原—抗体杂交技术(蛋白质+蛋白质)	是否出现杂交带
个体生物学水平的鉴定	是否具有抗性及其程度	对转基因生物进行抗性的接种实验	是否赋予了预期抗性以及抗性的程度

知识点 5 DNA片段的扩增及电泳鉴定

1.实验原理

(1)DNA片段的扩增:PCR利用了DNA的热变性原理,通过调节温度来控制DNA双链的解聚与结合。

(2)DNA片段的电泳鉴定

①DNA分子具有可解离的基团,在一定的pH下,这些基团可以带上正电荷或负电荷。

②在电场的作用下,带电分子会向着与它所带电荷相反的电极移动,这个过程就是电泳。

③在凝胶中DNA分子的迁移速率与凝胶的浓度、DNA分子的大小和构象等有关。

④凝胶中的DNA分子通过染色,可以在波长为300 nm的紫外灯下被检测出来。

2.结果分析

未出现扩增条带的主要原因	<i>Taq</i> DNA聚合酶失活
	引物出现质量问题
	Mg ²⁺ 浓度过低
	变性时的温度低,变性时间短
出现非特异性扩增条带的主要原因	模板DNA出现污染
	引物特异性不强或形成引物二聚体
	Mg ²⁺ 浓度过高
	复性时的温度过低

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/286220041110011005>