
DNA重组技术

徐纪茹

2011-03-01

概述

1

点击输入简要文字内容，文字内容需概括精炼，不用多余的文字修饰，言简意赅的说明分项内容……

2

点击输入简要文字内容，文字内容需概括精炼，不用多余的文字修饰，言简意赅的说明分项内容……

3

点击输入简要文字内容，文字内容需概括精炼，不用多余的文字修饰，言简意赅的说明分项内容……

内容提要

一、DNA重组与DNA重组技术

二、DNA重组技术发展简史

三、主要方法和技术路线

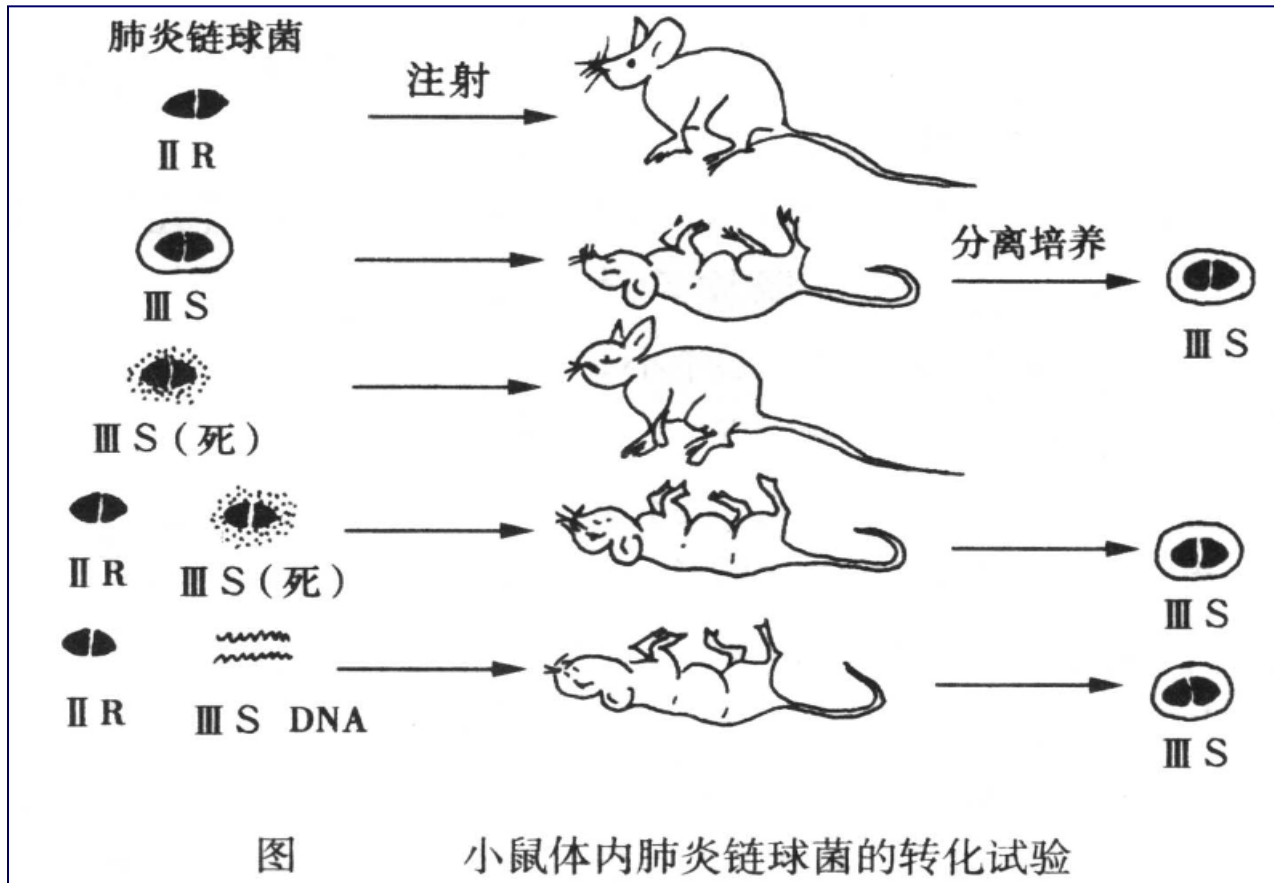
四、意义及应用

DNA重组与DNA重组技术

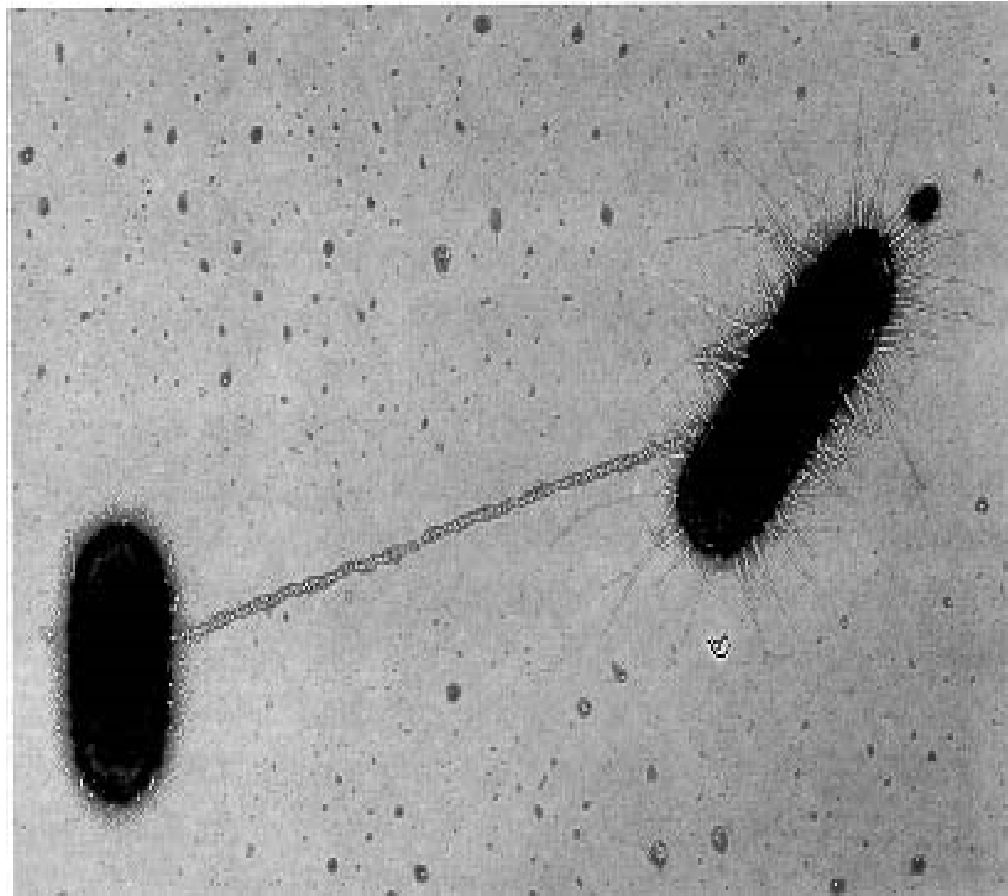
DNA重组 (DNA recombination) :

DNA分子内或分子间发生的遗传信息的重新共价组合过程。包括同源重组、特异位点重组和转座重组等类型，广泛存在于各类生物。

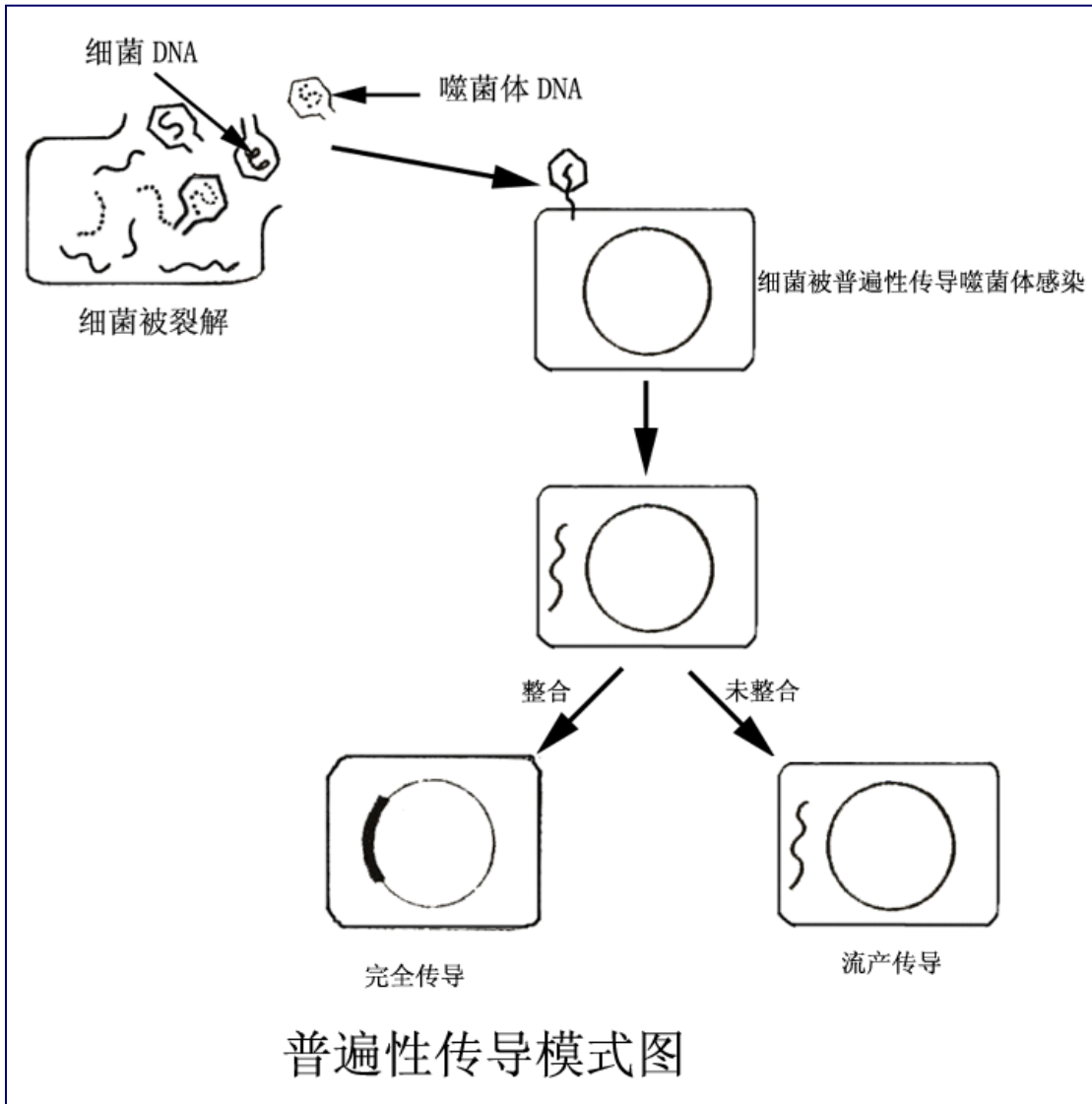
转化

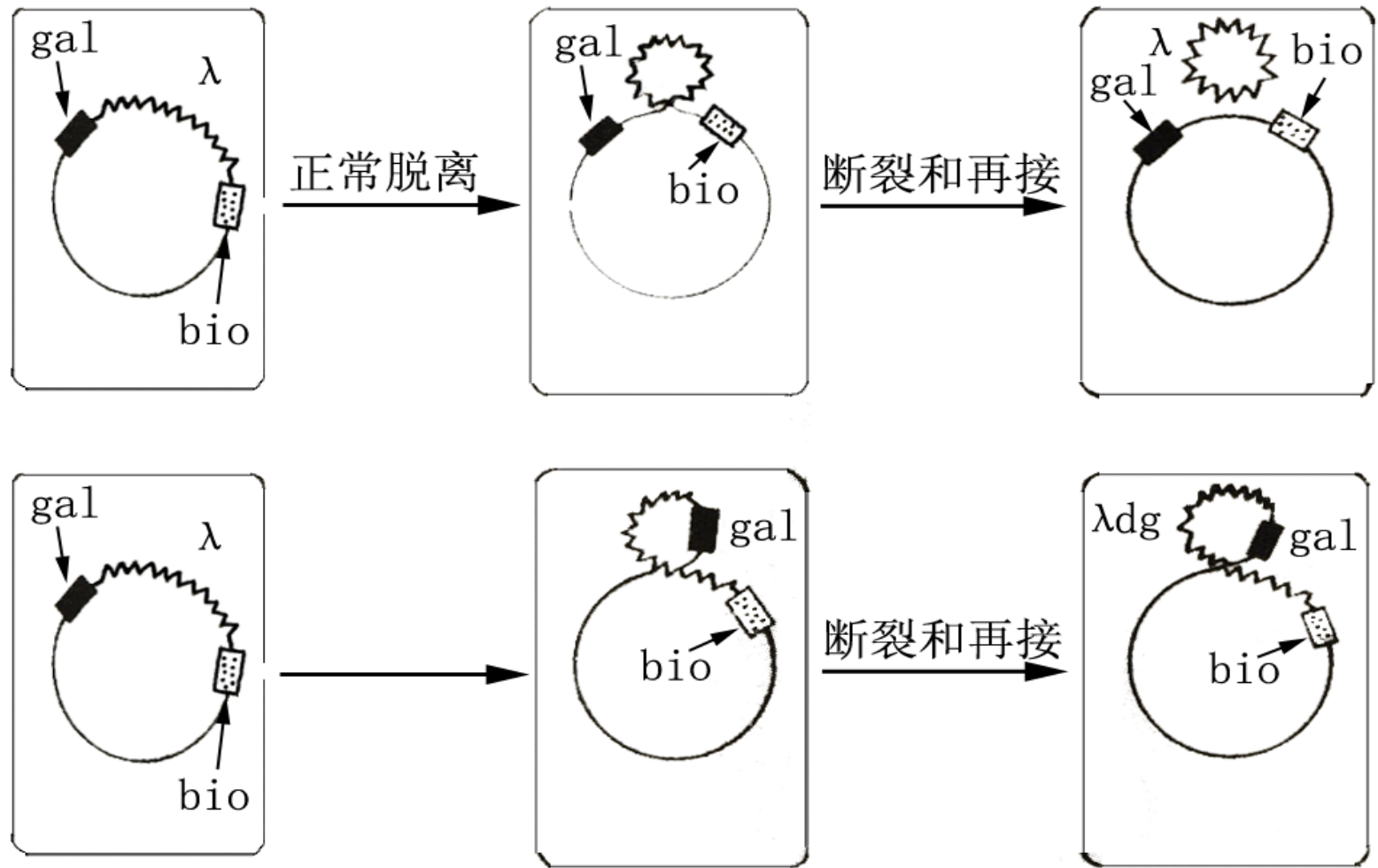


接合



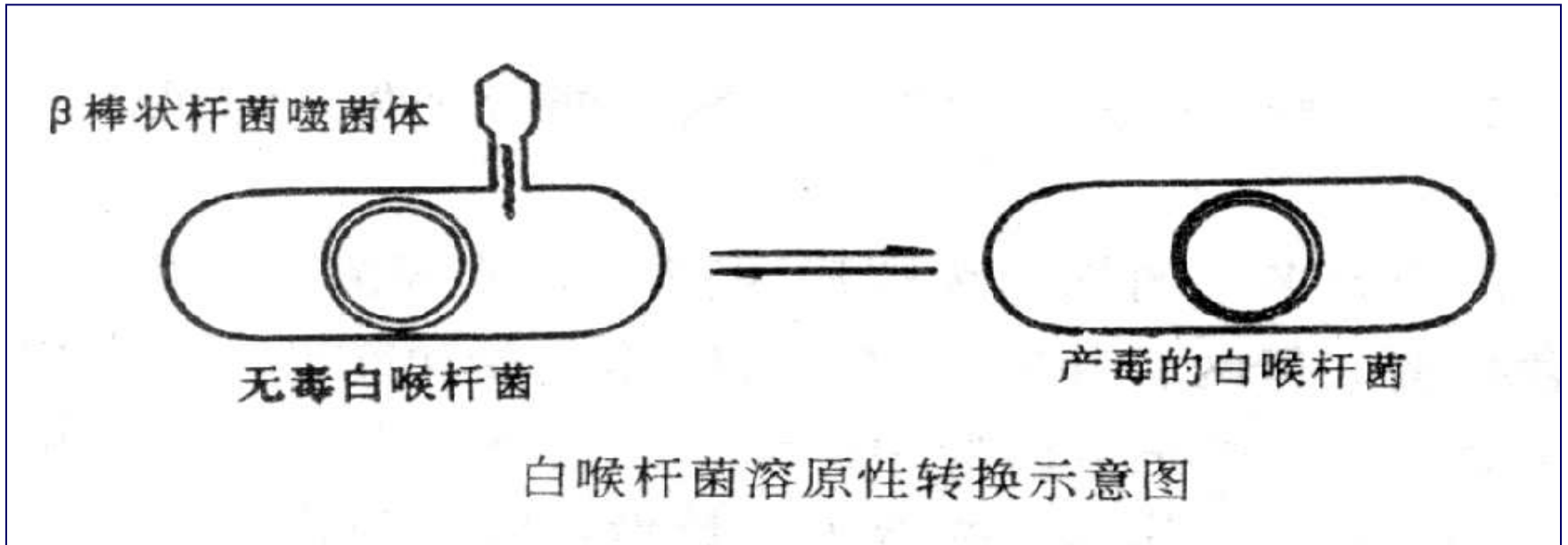
转导





局限性传导模式图

融源性转换



DNA重组技术 (DNA recombinant techniques) :

用人工手段对DNA进行改造和重新组合的技术。包括对DNA分子的精细切割、部分序列的去除、新序列的加入和连接、DNA分子扩增、转入细胞的复制繁殖、筛选、克隆、鉴定和序列测定等等，是基因工程技术的核心。

DNA重组技术的理论基础

- **19世纪中** **孟德尔** **豌豆杂交试验** **遗传因子** **经典遗传学**
- **20世纪初** **摩尔根** **果蝇杂交实验** **基因** **基因学**
- **1944年** **艾弗瑞** **肺炎双球菌转化实验** **遗传物质DNA**
分子遗传学
- **1953年** **沃森-克瑞克** **DNA双螺旋结构** **分子生物学**
- **1973年** **伯格-杰克森-考恩-鲍耶** **DNA分子体外拼接**
基因工程

DNA重组技术发展简史

重组DNA技术来源于两个方面的基础理论研究

- 限制性核酸内切酶（简称**限制酶**）
- 基因载体（简称载体）。

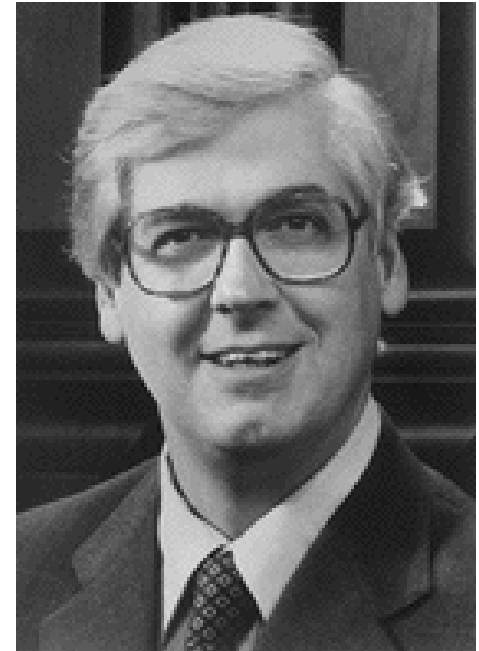
限制性核酸内切酶的发现及其在分子遗传学中的应用



阿尔伯
Werner Arber
瑞士生物学家
巴塞尔Biozentrum大学
1929 ~



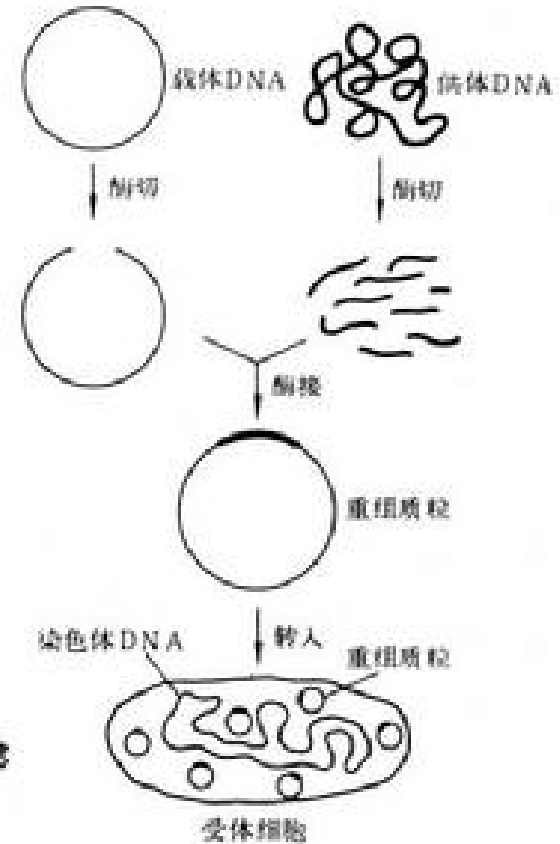
内森斯
Danien Nathans
美国微生物学家
霍普金斯大学医学院
1931 ~



史密斯
Hamilton O . Smith
美国微生物学家
霍普金斯大学医学院
1931 ~

限制性核酸内切酶（简称限制酶）

1952年美国分子遗传学家 S.E. 卢里亚在大肠杆菌中所发现的一种限制现象——从菌株甲的细菌所释放的噬菌体能有效地感染同一菌株的细菌，可是不能有效地感染菌株乙；少数被感染的菌株乙的细菌所释放的同一噬菌体能有效地感染菌株乙可是不能有效地感染菌株甲。



重组 DNA 技术示意

阿尔伯（Arber, Werner）研究表明，细菌细胞能够通过一种“限制酶”的存在来保护自己，抵御噬菌体的攻击。这种限制酶通过分裂噬菌体的DNA使之大部或全部失活，从而遏制噬菌体的生长。到1968年，阿尔伯收集了足够多的关于限制酶的资料，终于能够证明一种特别的限制酶的存在，它只分裂那些含有为噬菌体所特有的某种序列的核苷酸。

内森斯（Nathans, Daniel）与史密斯合作，研究了能在特定部位分裂DNA分子的酶。这使人们有可能对已知的大得足以带有遗传信息的核酸片断进行研究。这项研究于1971年完成，以后又导致了旨在把核酸拆开再按其它结构加以组装的重组DNA的研究工作。

史密斯在研究流感嗜血杆菌从噬菌体P22接受DNA的机制时，于1968年发现了一类新的限制酶，它们分别在特定部位切断DNA分子，因此可用以研究DNA分子中核苷酸的顺序和用于DNA重组技术。

基因载体（简称载体）

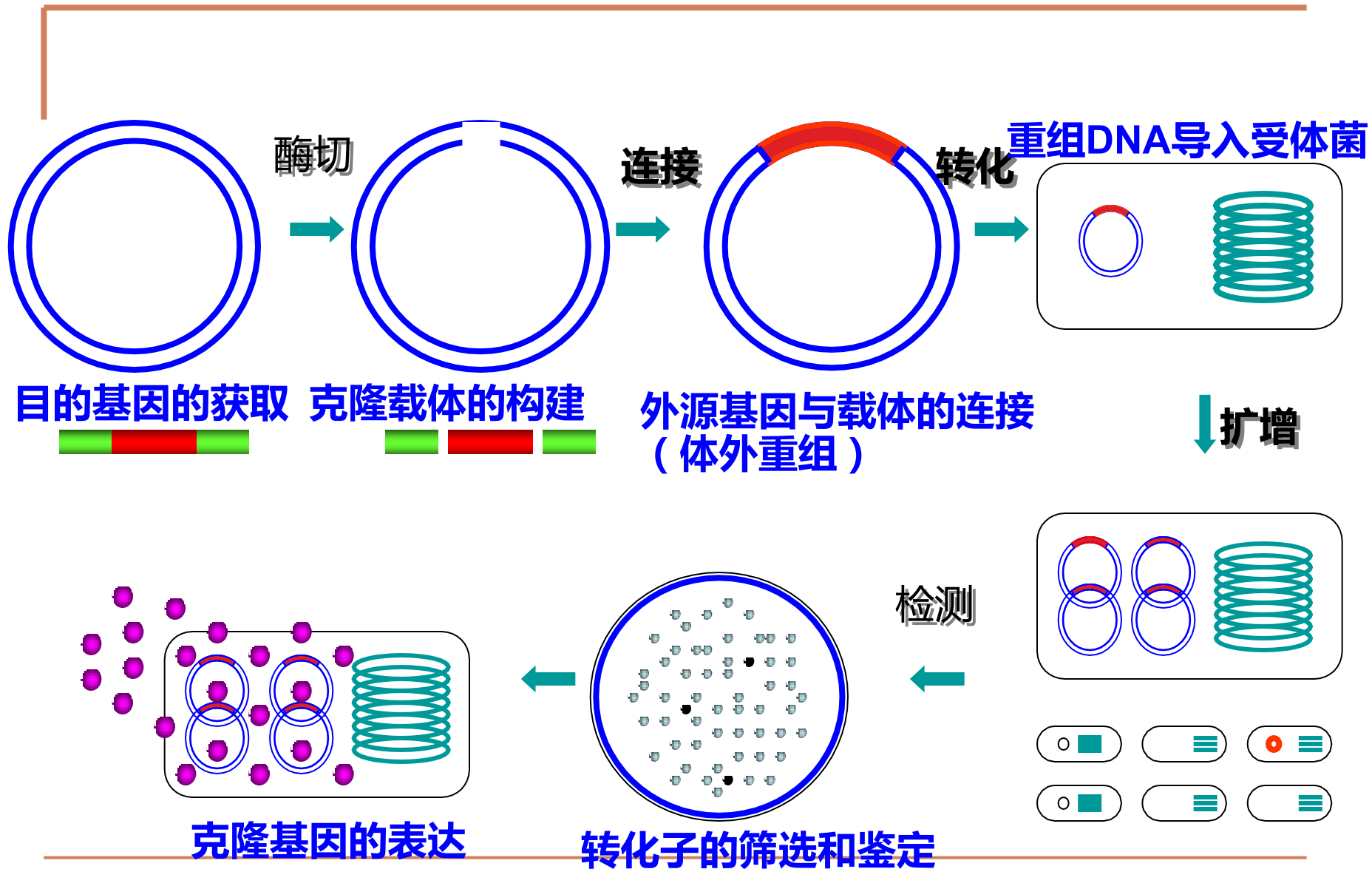
主要是质粒和温和噬菌体（见转导）两类。

- 1952年，英国微生物遗传学家W·海斯和美国微生物遗传学家J·莱德伯格等在首先认识到大肠杆菌的F因子是染色体外的遗传因子。
- 1953年，法国学者P·弗雷德里克等发现大肠杆菌产生大肠杆菌素这一性状为一种染色体外的大肠杆菌素因子所控制。
- 1957年日本学者发现了抗药性质粒。后两类质粒都是在遗传工程中广泛应用的质粒。
- 重组DNA技术中广泛应用的噬菌体是大肠杆菌的温和噬菌体 λ ，它是在1951年由美国学者E·莱德伯格等发现的。

主要方法和技术路线

重组DNA技术包括：

1. 目的基因的获取
2. 克隆载体的选择与构建
3. 外源基因与载体的连接
4. 重组DNA导入受体菌
5. 重组体的筛选
6. 克隆基因的表达



DNA克隆的基本过程

- 分：分离目的基因
- 切：对目的基因和载体适当切割
- 接：目的基因与载体连接
- 转：重组DNA转入受体菌
- 筛：筛选出含有重组体的受菌体

基因工程技术策略

分：

基因载体

目的基因

质粒

噬菌体

病毒

直接分离

cDNA

人工合成

基因文库

切：

限制性内切酶

有缺口的载体

目的基因

接：

连接酶

粘端连接

平端连接

尾接法

重组体

转：

转化

转染

体外包装

带重组体的宿主

筛：

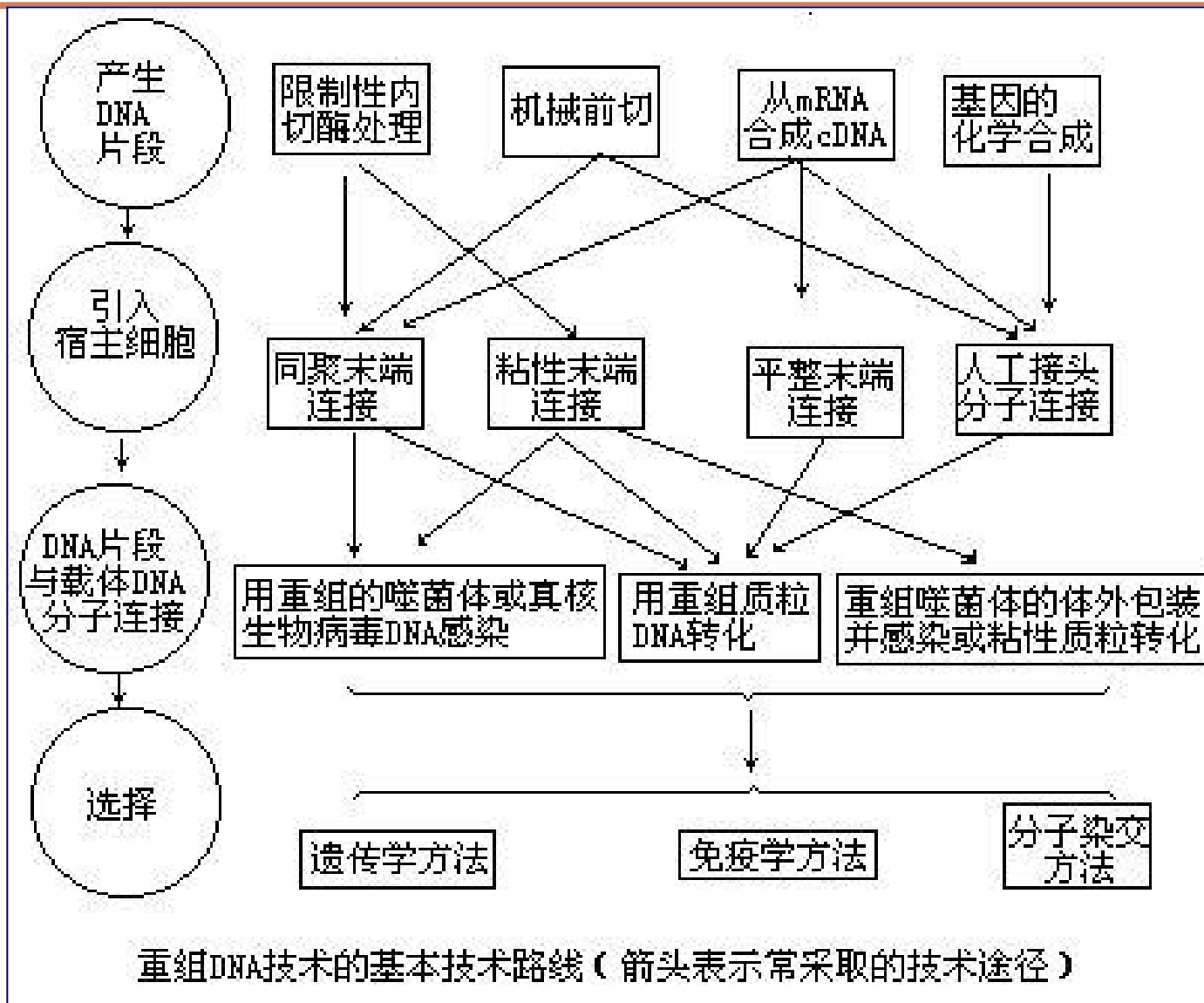
13.01.2025

表型筛选

电泳法

核酸杂交





DNA重组技术的基本工具

- **限制性核酸内切酶——“分子手术刀”**
- **DNA连接酶——“分子缝合针”**
- **基因进入受体细胞的载体——“分子运输车”**

工具酶

限制性核酸内切酶

- DNA聚合酶I
- 逆转录酶
- DNA连接酶
- 碱性磷酸酶
- 末端转移酶
- *Taq* DNA聚合酶

限制性核酸内切酶——“分子手术刀”

限制性核酸内切酶 (restriction endonuclease)

识别DNA的特异序列，并在识别位点或其周围切割双链DNA的一类内切酶。

是细菌内存在的保护性酶。分为I、II、III三类。II类酶识别序列特点为回文结构。

… … GGATCC … …
… … CCTAGG … …

限制性核酸内切酶作用后产生两种末端：

- 钝性末端(blunt end)
- 粘性末端(sticky end)

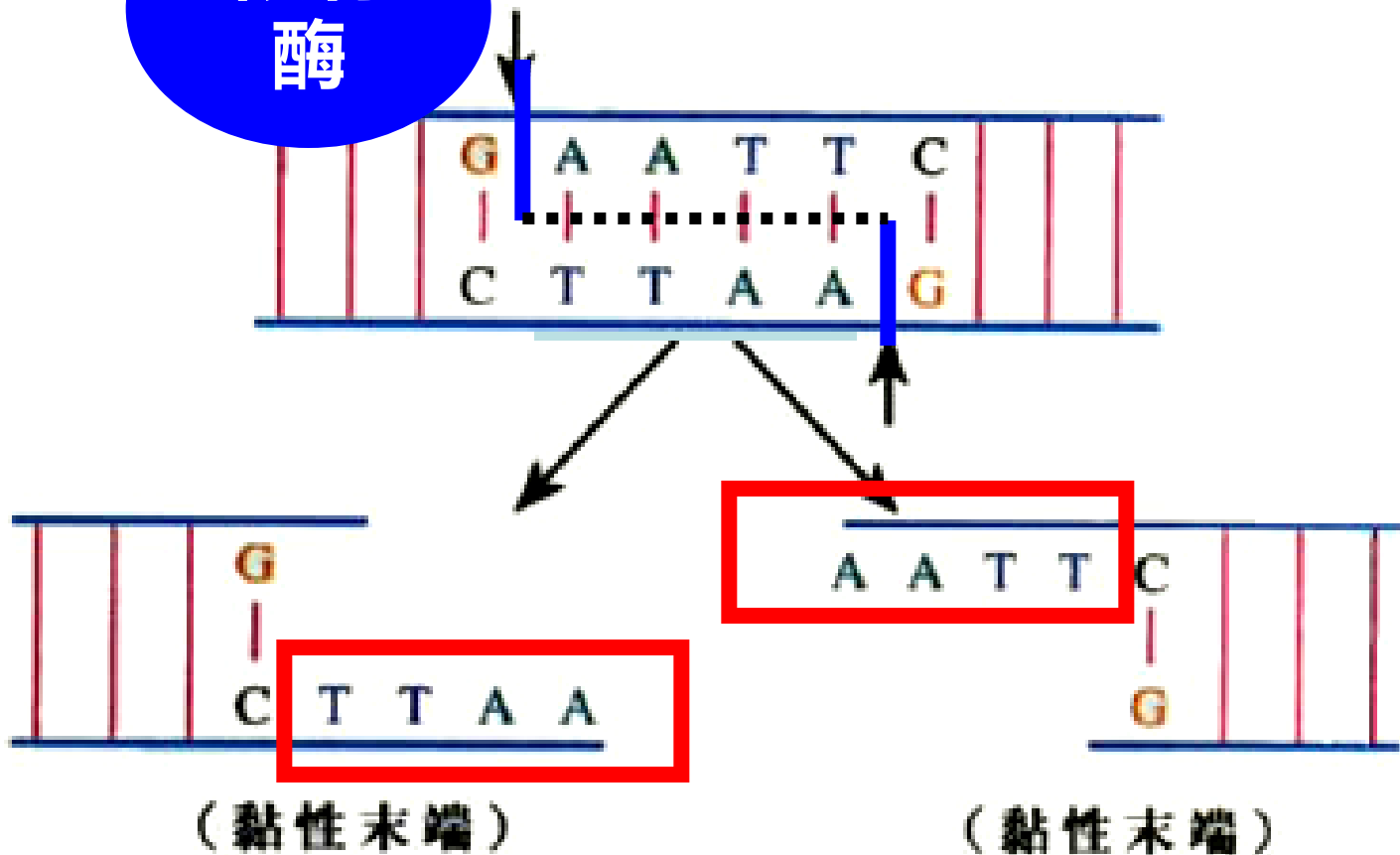
粘性末端

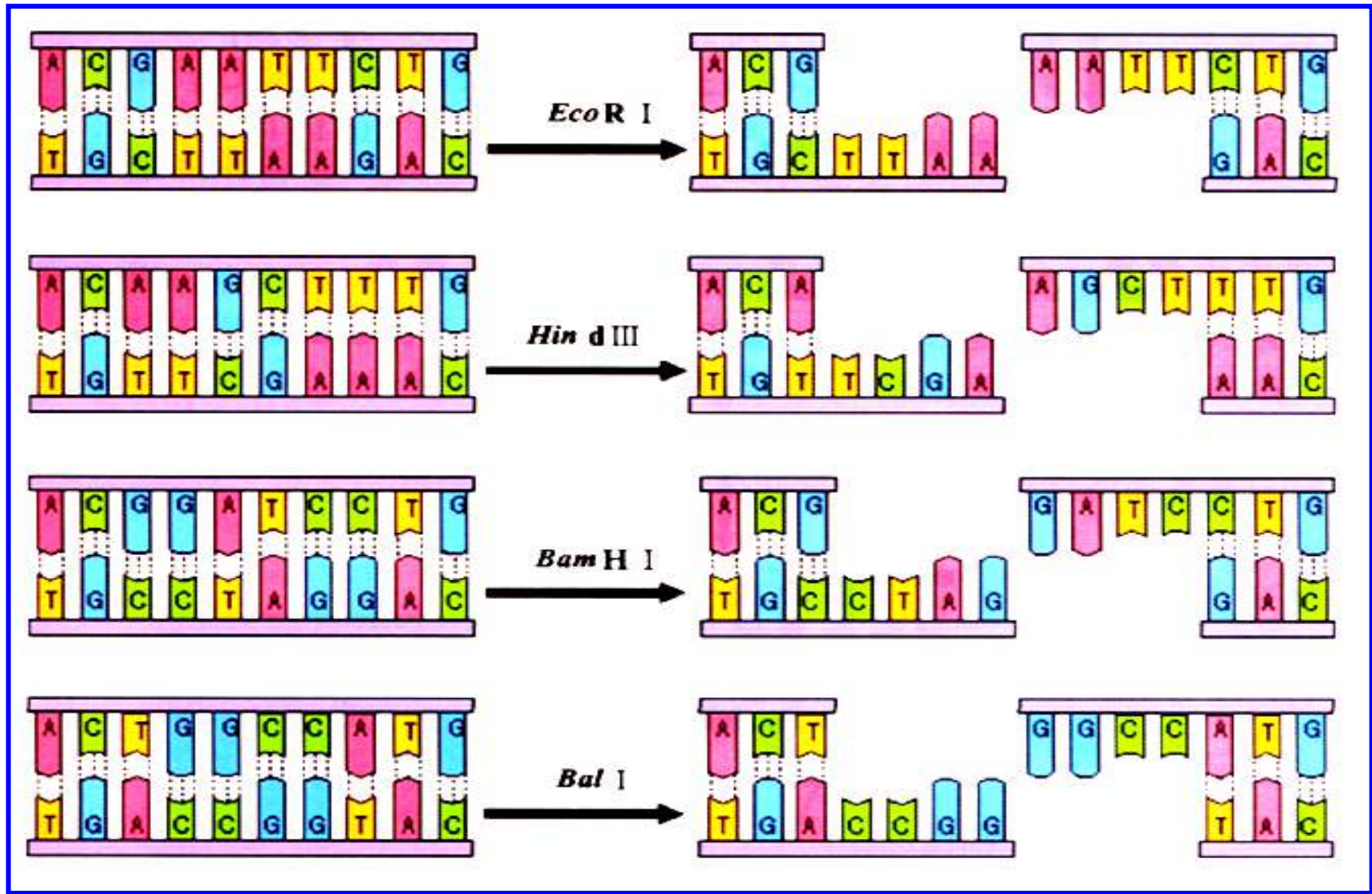
5'-端突出

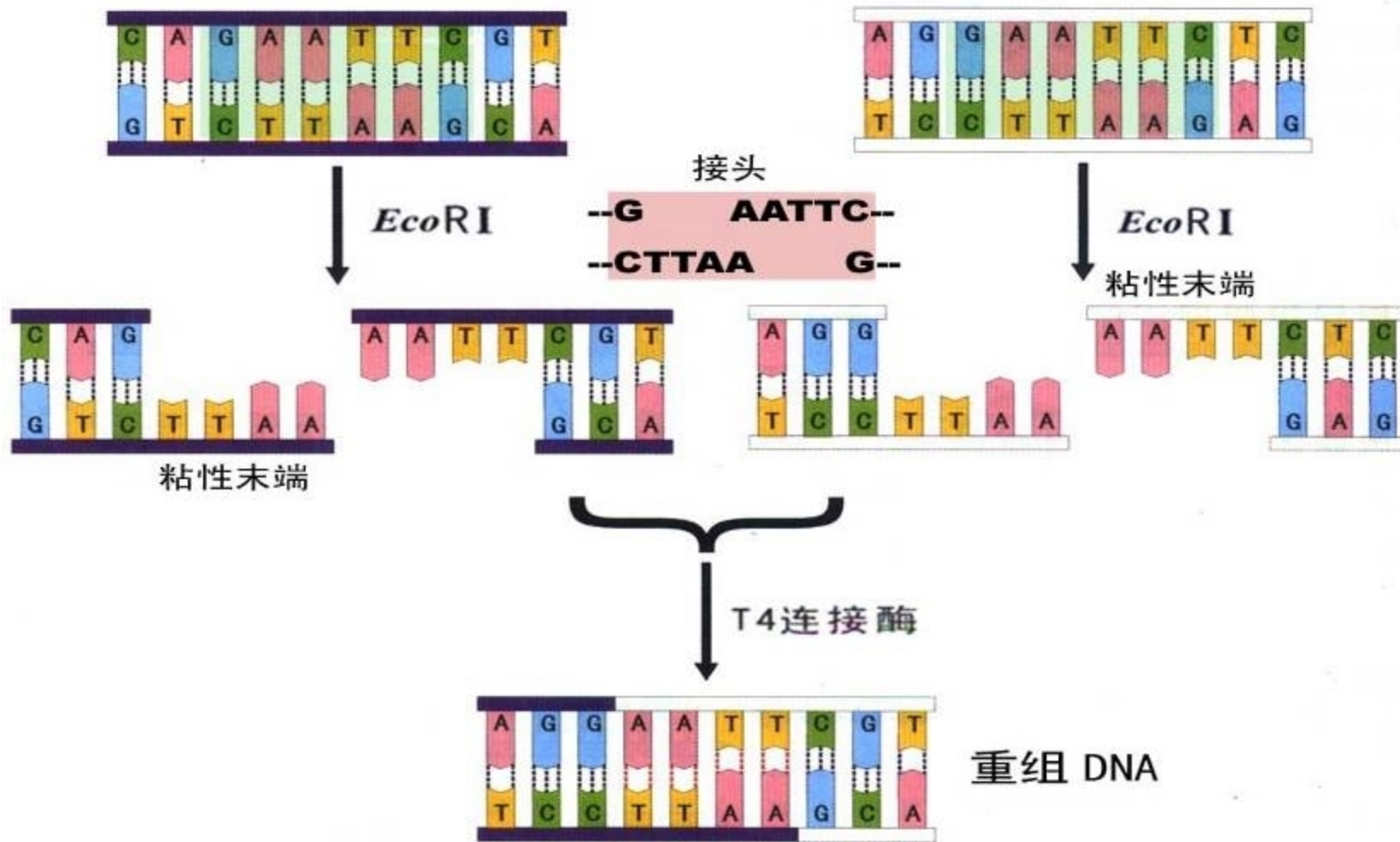
3'-端突出

限制性核酸内切酶识别序列长度为4~8个bp。
不同酶切产生的相同粘性末端称**配伍末端**
(compatible end) , 可用连接酶连接。

限制酶

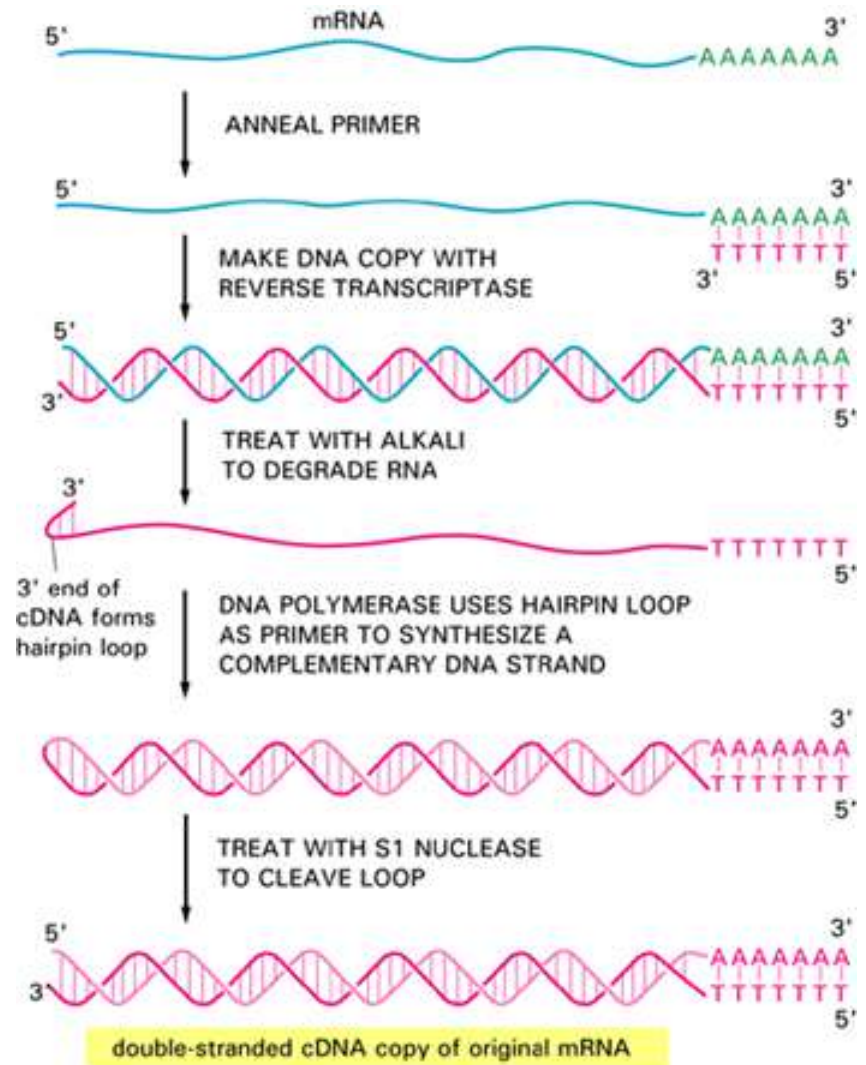






目的基因

- ① 利用限制酶取得具有粘性末端或平整末端的DNA片段；
- ② 用机械方法剪切取得具有平整末端的DNA片段，例如用超声波断裂双链DNA分子；
- ③ 经反向转录酶的作用从mRNA获得与mRNA顺序互补的DNA单链，然后再复制形成双链DNA（cDNA）；
- ④ 用化学方法合成DNA片段。

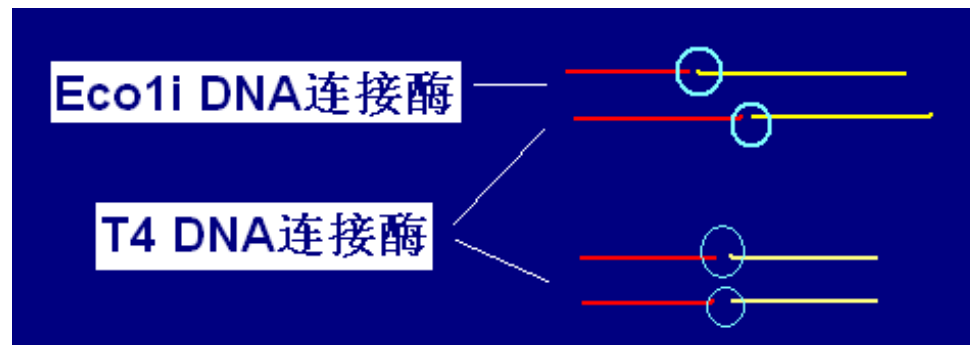


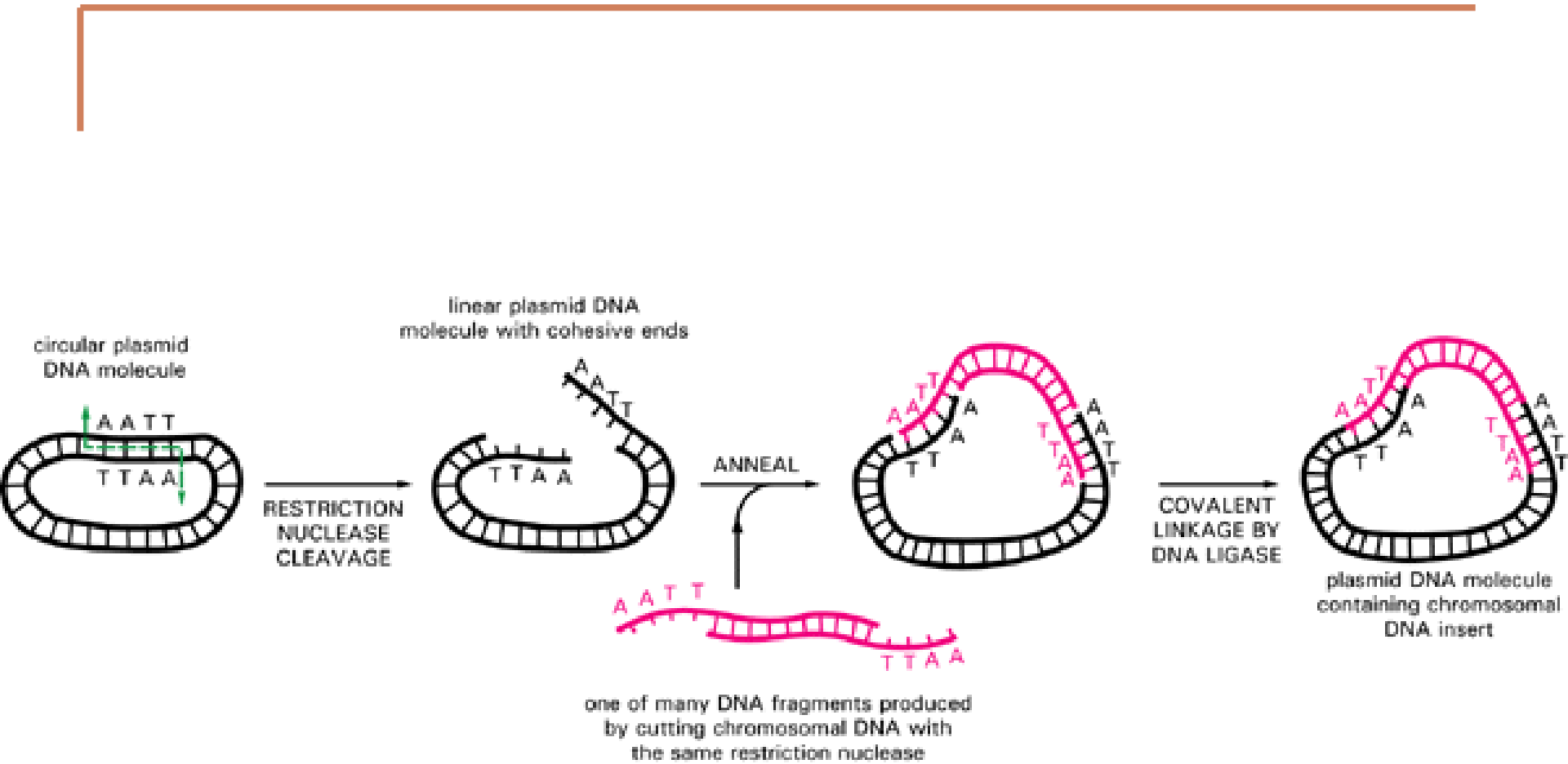
载体连接

- ①粘性末端连接
- ②平整末端连接
- ③同聚末端连接, (也称末端转移酶)
- ④人工接头分子连接

DNA连接酶——“分子缝合针”

- 连接酶有两种：一种是从大肠杆菌中分离得到的，称之为*E·coli*连接酶。另一种是从T4噬菌体中分离得到，称为T₄连接酶。
- 这两种连接酶催化反应基本相同，都是连接双链DNA的缺口，而不能连接单链DNA。
- *E·coli*连接酶只能连接黏性末端；T₄连接酶既可“缝合”黏性末端，又可“缝合”平末端。





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/706043241144011004>