

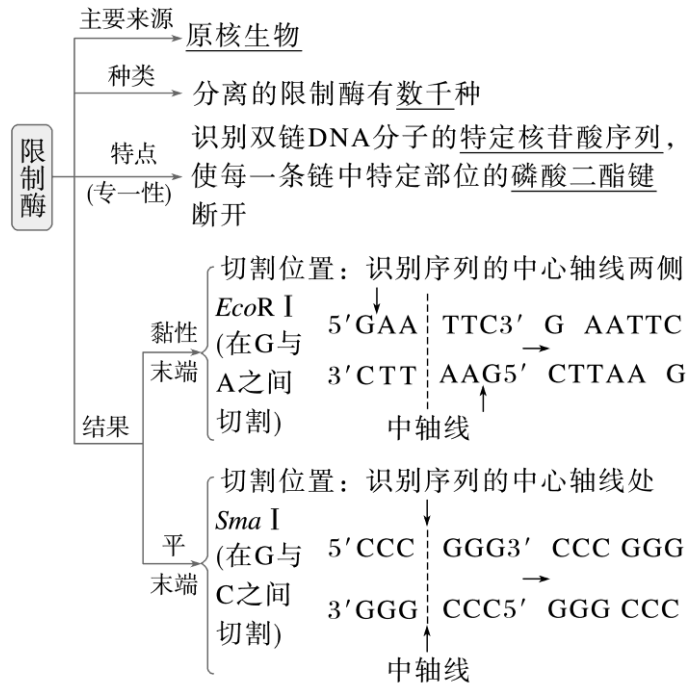
考点一 基因工程的基本工具

1. 基因工程的优点：克服远缘杂交不亲和的障碍，定向改造生物的遗传性状
2. 基因工程的原理：基因重组
3. 重组 DNA 技术的基本工具

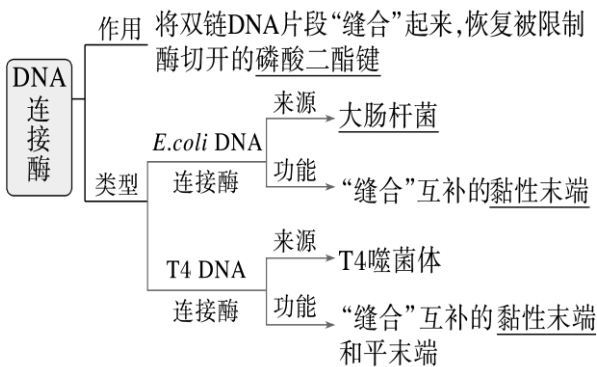
(1)限制性内切核酸酶(简称“限制酶”)

[提醒]

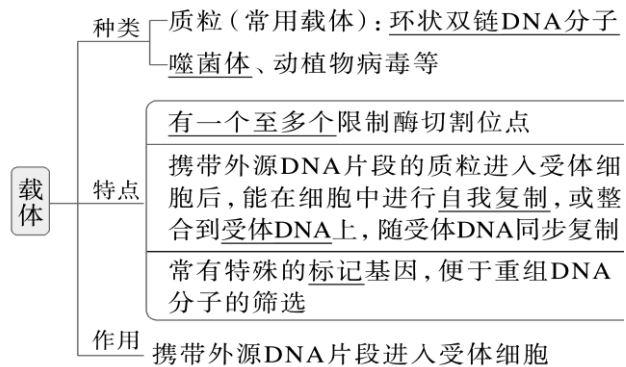
- ①限制酶的识别序列一般由 6 个核苷酸组成，少数由 4 个、8 个或其他数量的核苷酸组成。
- ②限制酶作用的化学键只能是磷酸二酯键。
- ③在切割含目的基因的 DNA 分子时，需用限制酶切割两次此 DNA 分子，产生 4 个末端。只有这样才能使目的基因的两端都有可连接的黏性末端或平末端。



(2)DNA 连接酶



(3)载体



归纳总结 与 DNA 有关的酶

酶	作用	作用相关“键”
限制酶	切割 DNA 片段，产生两个(具有相同黏性末端或平末端)DNA 片段	破坏磷酸二酯键
DNA 连接酶	催化两个 DNA 片段之间形成磷酸二酯键，从而连接起来	形成磷酸二酯键
解旋酶	将双链 DNA 分子局部解旋为单链(ATP 水解供能)	破坏氢键(氢键非化学键)
DNA 聚合酶	把游离的脱氧核苷酸连接到引物或者已有的 DNA 单链的 3' 端上	形成磷酸二酯键
DNA(水解)酶	将 DNA 水解为脱氧核苷酸	破坏磷酸二酯键
逆转录酶	以 RNA 为模板合成 cDNA	形成磷酸二酯键

限制酶选择的常见考查方向

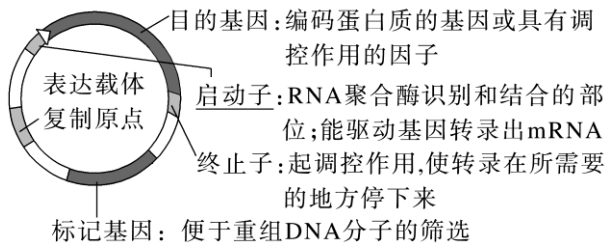
- (1)载体上的标记基因 **至少保留一个** (选择培养基中加对应的抗生素, 且受体细胞不能有该标记基因)。
- (2)只能切割目的基因两侧的序列, **不能切割内部**, 否则导致目的基因插入失活。
- (3)目的基因应插 **在启动子和终止子之间**。
- (4)合理选择单酶切或者双酶切, 即注意区分 **正向插入** 正常表达和反向插入异常表达。
- (5)**不能破坏** 载体上的有用序列, 如 **启动子、终止子和复制原点等**。
- (6)要破坏对受体细胞不利的 DNA 片段, 如 *ccdB* 片段, 其表达产物抑制 DNA 复制, 导入细胞后阻碍受体细胞存活, 难以形成单菌落。
- (7)农杆菌转化法中最关键的是 T-DNA 序列, **目的基因必须插在 T-DNA 上启动子和终止子之间**, 最终转化到植物染色体的标记基因也是 T-DNA 上的。
- (8)**注意长序列里面是否含有短序列的酶切位点**, 比如能被 A 酶(GGATCC)识别的 DNA 序列, 也可被 B 酶(GATC)识别。
- (9)注意 **同尾酶拼接产物不一定还能被原先酶识别** (限制酶的特征是识别特定核苷酸序列, 切割特定位点, 对碱基序列有严格要求)。
- (10)善用“双酶切”, 注意方向性: 目的基因所在序列和载体上存在多种酶切位点时, 一般需要在目的基因所在序列和载体上都存在切割位点的两种不同的限制酶, 对目的基因所在序列和载体进行剪切, 即“双酶切法”。**其优点和作用是: ①防止目的基因环化; ②避免目的基因与载体反向连接**, 即用 DNA 连接酶连接后形成的重组 DNA 分子上, **目的基因和载体启动子的方向(或描述为“RNA 聚合酶的移动方向”)必须是相同的**, 否则目的基因导入后无法正常表达。

考点二 基因工程的基本操作程序

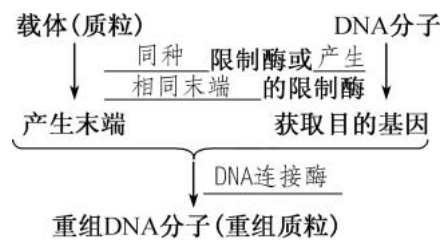
1. 目的基因的筛选与获取



基因表达载体的组成



2. 基因表达载体的构建(核心工作)



[提醒] 启动子、终止子、起始密码子、终止密码子对比

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	使转录在所需要的地方停下来	翻译的起始信号 (编码氨基酸)	翻译的结束信号 (正常情况下, 不编码氨基酸)

复制原点是 DNA 上的一段序列，富含 A—T，是 DNA 复制开始的地方，一个 DNA 有一个或多个复制原点。

3. 将目的基因导入受体细胞

生物种类	植物	动物	微生物
常用方法	农杆菌转化法、 <u>花粉管通道法</u>	显微注射法	Ca^{2+} 处理法
受体细胞	<u>体细胞或受精卵</u>	受精卵	原核细胞
转化过程	将目的基因插入 Ti 质粒的 T—DNA 中→农杆菌→导入植物细胞→整合到受体细胞的染色体 DNA 上→表达	将含有目的基因的表 达载体提纯→取卵 (受精卵)→显微注射 →受精卵发育→获得 具有新性状的动物	Ca^{2+} 处理细胞→细 胞处于一种能吸收 周围环境中 DNA 分子的生理状态→ 基因表达载体导入

目的基因导入受体细胞的结果有 3 种：未导入质粒；导入重组质粒；导入普通质粒。

(1)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，**称为转化。实质是基因重组**

(2)农杆菌转化法原理：农杆菌易感染植物细胞，并将其 Ti 质粒上的 **T—DNA** 转移并整合到受体细胞染色体 DNA 上。

(3)农杆菌转化法中的两次拼接和两次导入



4. 目的基因的检测与鉴定

(1)通过 **PCR 等技术**检测目的基因是否导入或是否转录出 mRNA。

(2)利用 **抗原—抗体杂交**技术检测目的基因是否翻译。

(3)进行 **个体水平**的抗虫、抗病、功能活性等鉴定。

注：若用报告基因，如绿色荧光蛋白基因与目的基因构建 **融合基因**，可根据荧光情况进行定性、定量和定位的研究分析。

考点三 PCR 技术

1. 原理：**DNA 半保留复制**和 DNA 的热变性。

2. 特点：可在短时间内**大量扩增**目的基因。

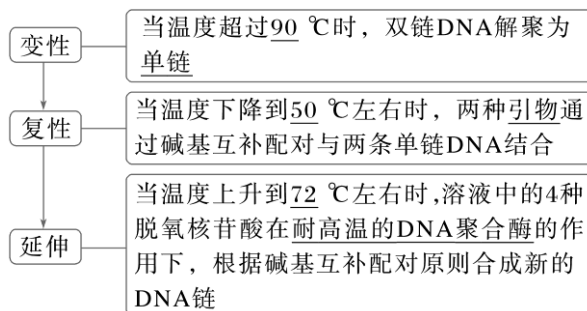
3. PCR 反应所需的条件及作用

条件	作用
有一段已知目的基因的核苷酸序列	便于合成 引物
在一定的 缓冲液 中进行	提供相对稳定的 pH 环境
4 种脱氧核苷酸 (实际上用脱氧核苷三磷酸，即 dNTP)	作为合成 DNA 子链的 原料 ，同时提供 能量
DNA 母链 (DNA 模板)	作为 DNA 复制的模板
耐高温的 DNA 聚合酶 (Taq DNA 聚合酶)	催化合成 DNA 子链
2 种引物 (是一小段 短单链核酸 ，作为 DNA 复制的起始序列，它能与 DNA 母链的一段碱基序列互补配对)	使 DNA 聚合酶能够从引物的 3' 端开始连接脱氧核苷酸

[归纳提升]

- (1)耐高温的 DNA 聚合酶的作用：催化合成 DNA 子链。
- (2)引物(2种)的作用：使 DNA 聚合酶能够从引物的 3' 端开始连接脱氧核苷酸。
- (3)缓冲液的作用：维持反应体系 pH 稳定。
- (4)复性温度过高，则引物难以与模板链结合，温度过低则易使两条母链配对结合，均无法获得 PCR 产物。

4. 过程



n 次循环后，目的基因的量将被扩增 2^n 倍。

复制 n 次，合成等长的 DNA 分子数为 $2^n - 2n$ ，共消耗引物： $2^{n+1} - 2$ 个。

5. 引物的要求：

引物是一小段能与 DNA 母链的一段碱基序列互补配对的短单链核酸。引物设计的原则主要包括：

- (1)引物长度一般为 20~30 bp，可定位目的基因并为子链的延伸提供 3' 端。
- (2)引物中 CG 含量要适宜，CG 含量越高，复性(退火)温度越高，产物特异性越高。
- (3)引物自身、引物之间不能有连续 4 个碱基互补，否则引物会折叠成发夹结构或二聚体，影响引物与模板的复性结合。
- (4)引物的 5' 端可以修饰(添加酶切位点、引入突变序列)，但 3' 端不可修饰(与模板 DNA 配对)。

6. 利用 PCR 技术扩增 DNA 片段并电泳鉴定

- (1)扩增原理：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。PCR 仪实质上就是一台能够自动调控温度的仪器。一次 PCR 一般要经历 30 次循环。
- (2)电泳原理：DNA 分子具有可解离的基团，在一定的 pH 下，这些基团可带正电荷或负电荷。在电场的作用下，这些带电分子会向与它所带电荷相反的电极移动。
- (3)鉴定原理：PCR 的产物一般通过琼脂糖凝胶电泳来鉴定。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。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。

注：①预变性可使 DNA 充分变性，以利于引物更好地和模板结合；

②最后一轮延伸给予更长时间的主要目的是：使子链充分延伸，得到更多的等长 DNA。

(2)电泳鉴定：配制琼脂糖溶液，加入核酸染料混合→制备凝胶→加缓冲液(没过凝胶 1 mm 为宜)→加样(PCR 产物与含指示剂的凝胶载样缓冲液混合，留一个孔加标准参照物)→进行电泳(待指示剂前沿迁移接近凝胶边缘时停止)→紫外灯下鉴定。

注意区分“核酸染料”和“指示剂”！指示剂一般是加样时添加的，主要有 3 个作用：①提示操作者何时停止电泳；②有助于判断加样时样品是否到达加样孔底部；③由于指示剂密度较大，有助于 DNA 样品沉降。

7. DNA 迁移速率的影响因素

- (1)凝胶浓度：凝胶浓度的高低影响凝胶介质孔隙的大小，浓度越高，孔隙越小，DNA 迁移受到的阻力越大，速率

越慢。

(2)DNA 分子的大小: DNA 的分子量越大, 迁移速率越慢。

(3)DNA 分子的构象: 三种构象的质粒在琼脂糖凝胶电泳的前后顺序为环形超螺旋(DNA 两条链都是完整的质粒)>线形>开环(DNA 双链断了一条成为松弛的环)。

乳腺生物反应器与工程菌的比较

比较内容	乳腺生物反应器	工程菌
含义	让外源基因在哺乳动物的乳腺中特异表达, 利用动物的乳腺组织生产药物蛋白	指用基因工程的方法, 使外源基因得到高效表达的微生物
基因表达	合成的药物蛋白与天然蛋白相同	细菌合成的药物蛋白可能没有活性
受体细胞	动物受精卵	微生物细胞
目的基因导入方式	显微注射法	Ca ²⁺ 处理法
生产条件	不需要严格灭菌, 温度等外界条件对其影响不大	需要严格灭菌, 严格控制工程菌所需的温度、pH、营养物质浓度等外界条件
药物提取	从动物乳汁中提取	从微生物细胞或其培养液中提取

考点四 蛋白质工程

蛋白质工程: 通过改造或合成基因, 来改造现有蛋白质, 或制造一种新的蛋白质

判断基因工程和蛋白质工程

操作 { 如果仅将基因用限制酶从DNA片段中切割下来, 没有经过对编码蛋白序列进行修饰、加工, 或仅对其调控序列进行加工, 则属于基因工程。
如果将目的基因经过了一些实质性的改造, 如对编码蛋白序列进行了碱基替换或增添或缺失某几个碱基, 则属于蛋白质工程。

蛋白质 { 如果合成的蛋白质是天然蛋白质, 则是基因工程。
如果合成的蛋白质和天然蛋白质有差异, 甚至是自然界中没有的, 则为蛋白质工程。