

第11章 基因工程

第1节 基因工程概述

第2节 基因的分离

第3节 外源基因导入受体

第4节 转基因生物的检测与鉴定

第5节 基因工程的应用

第1节 基因工程概述

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

➤遗传工程（genetic engineering），也称生物工程，利用工程技术的方法改造和修饰生物体，使其产生新的性状或产品，从而改良生物体的一种遗传学手段。

➤核心是利用重组DNA技术，在分子水平上操作修饰改变生物体。

细胞工程（cell engineering）

基因工程（gene engineering）

酶工程（enzyme engineering）

发酵工程（fermentation engineering）

第1节 基因工程概述

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

➤ 基因工程 (gene engineering)

● 利用人工的方法把生物的遗传物质在体外进行切割、拼接和重组，获得重组DNA分子，然后导入宿主细胞或个体，使受体的遗传特性得到修饰或改变的过程。

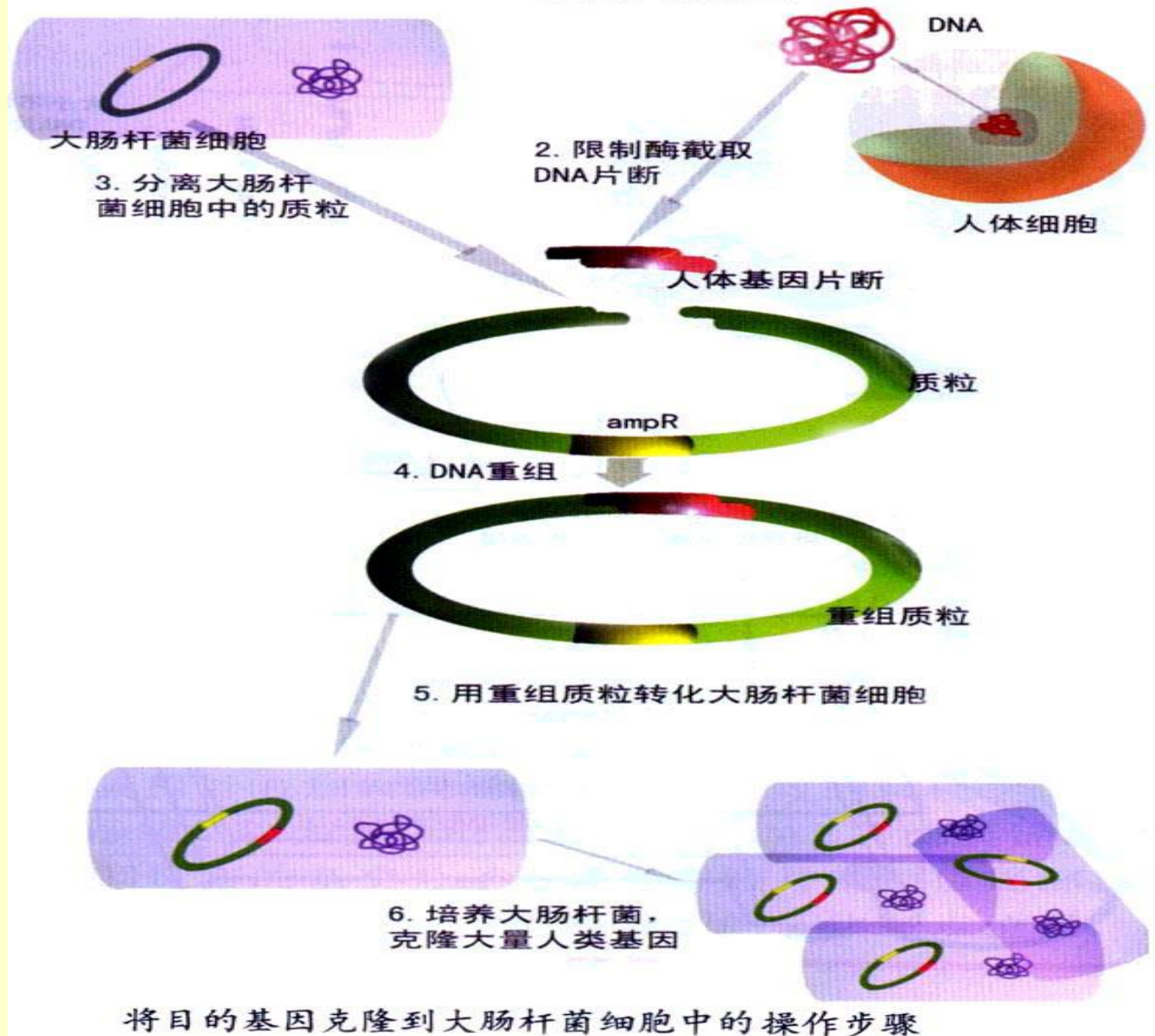
● 基因工程操作的对象是DNA分子，首先把目标基因克隆出来插入到一定的载体中，然后将重组DNA分子导入到受体细胞，并使其保持和遗传下去。

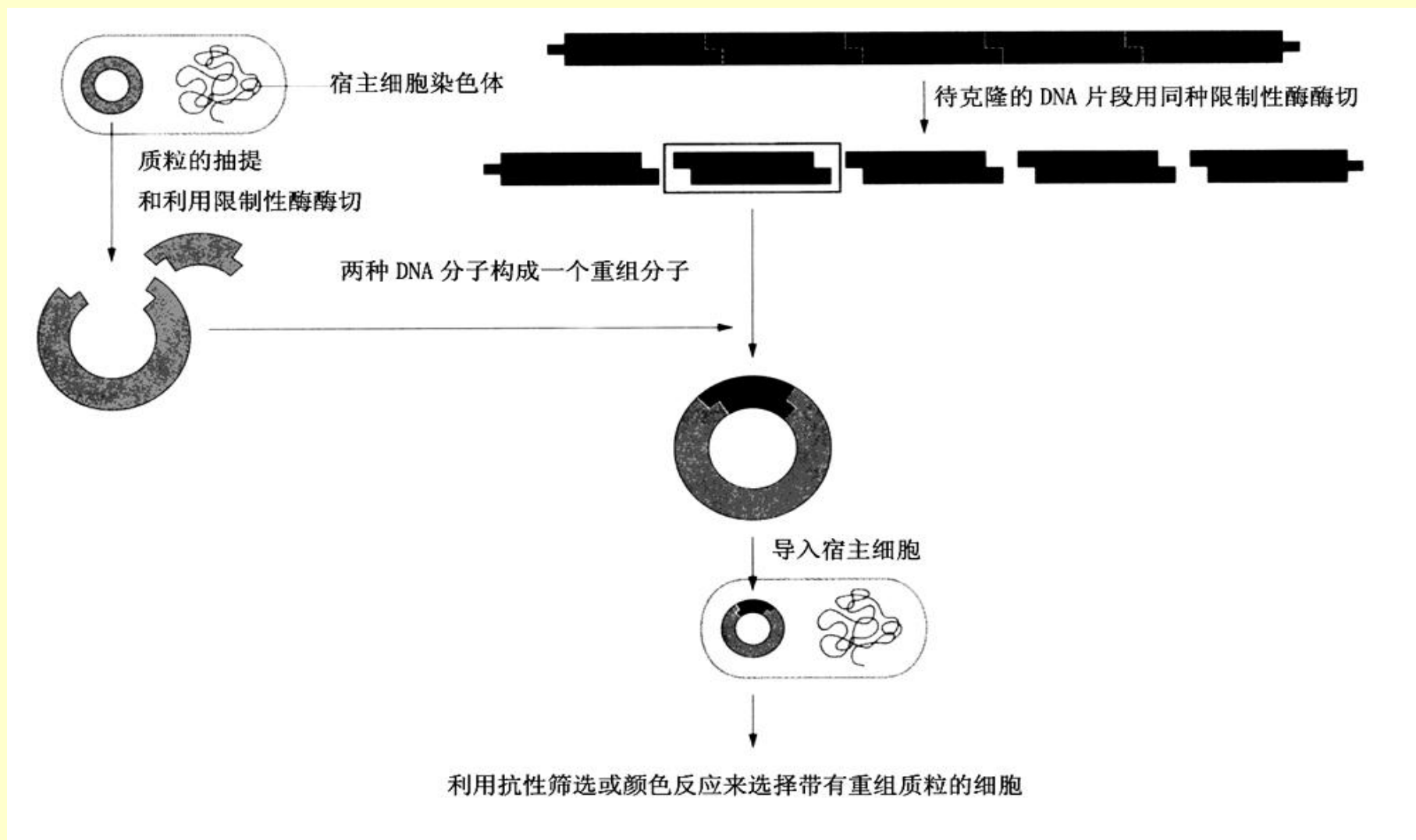
第1节 基因工程概述

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

基因工程的内容

- ◆ 目的基因的获
- ◆ 目的基因与载体的连接成重组DNA分子
- ◆ 重组DNA分子导入受体细胞
- ◆ 筛选重组克隆
- ◆ 基因表达与产物分离





一 工具酶

二 载体

三 基因分离方法

一、工具酶

(一) 限制性内切核酸酶 (*restriction enzymes*)

限制性内切核酸酶（限制酶）是细菌中降解外来DNA分子的一类酶。

细菌中限制—修饰现象：作用于同一DNA的两种酶——分解DNA的限制酶和改变DNA碱基结构使其免遭限制酶分解的修饰酶。通过某些碱基进行甲基化修饰，使得限制酶不能进行切割。而外来的DNA在没有被甲基化，限制酶将其降解。

(一) 限制性内切核酸酶

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

★共同的特性：

- 只切割双链**DNA**分子，不切单链**DNA**；
- 每种酶有其特定的核苷酸序列识别特异性；
- 需要镁离子激活等。

(一) 限制性内切核酸酶

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

★限制酶可分为3类。

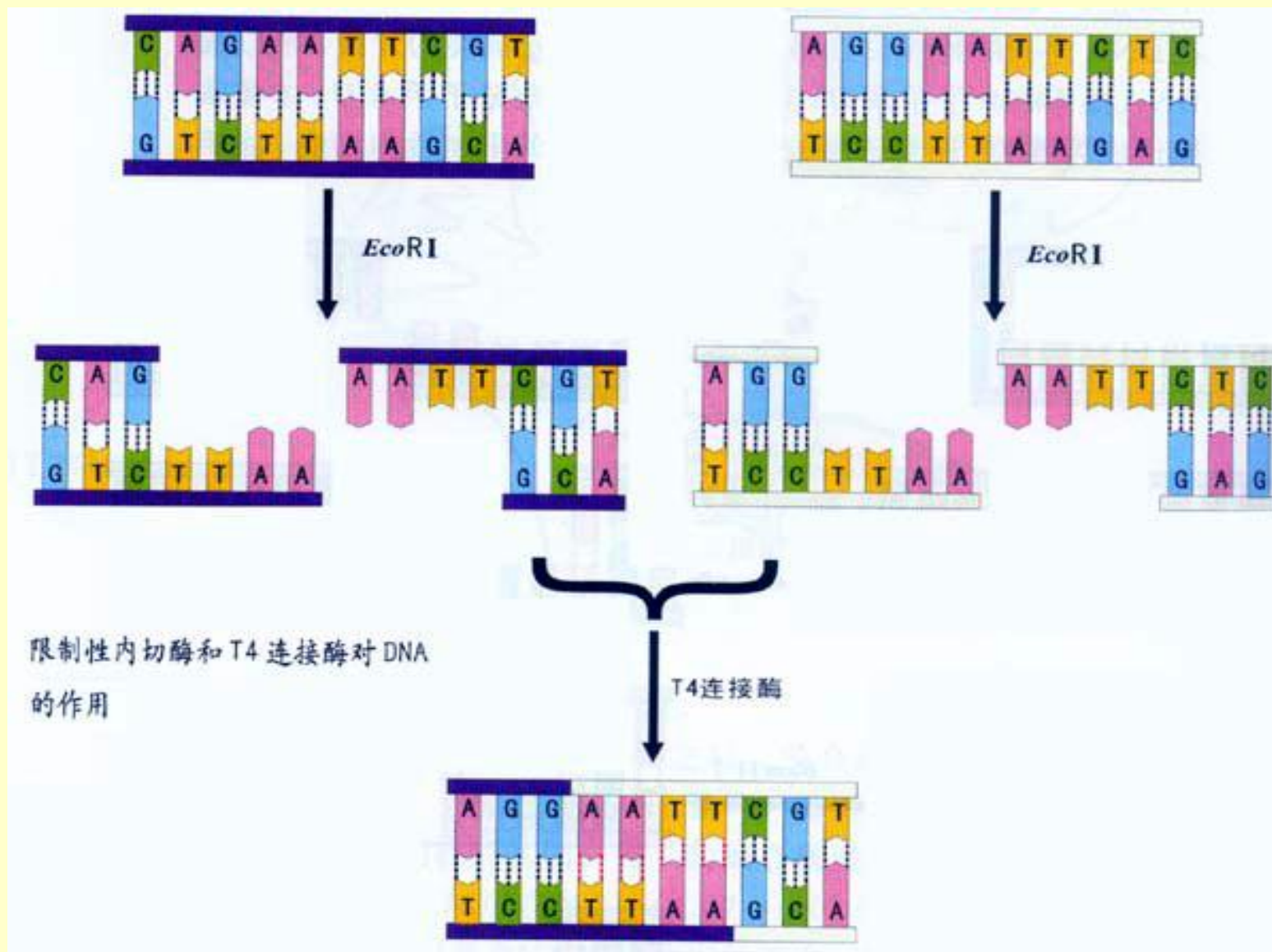
➤ I 型酶：只有 **EcoB** 和 **EcoK** 两种，具有催化限制性切割和修饰核苷酸 2 种功能。

➤ II 型酶：在遗传工程中应用最广泛。① 有特异识别和切割的序列部位，被切割的 **DNA** 分子形成单链的断裂；② 断裂的部位通常不是直接相对的，结果所形成的 **DNA** 片段常具有碱基互补的单链尾巴（粘性末端），使其能够重新连接；③ 内切酶的切割和修饰功能由两个不同的酶催化所完成。

➤ III 型酶具有特异的识别位点，这种识别位点是非对称的。

(一) 限制性内切核酸酶

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

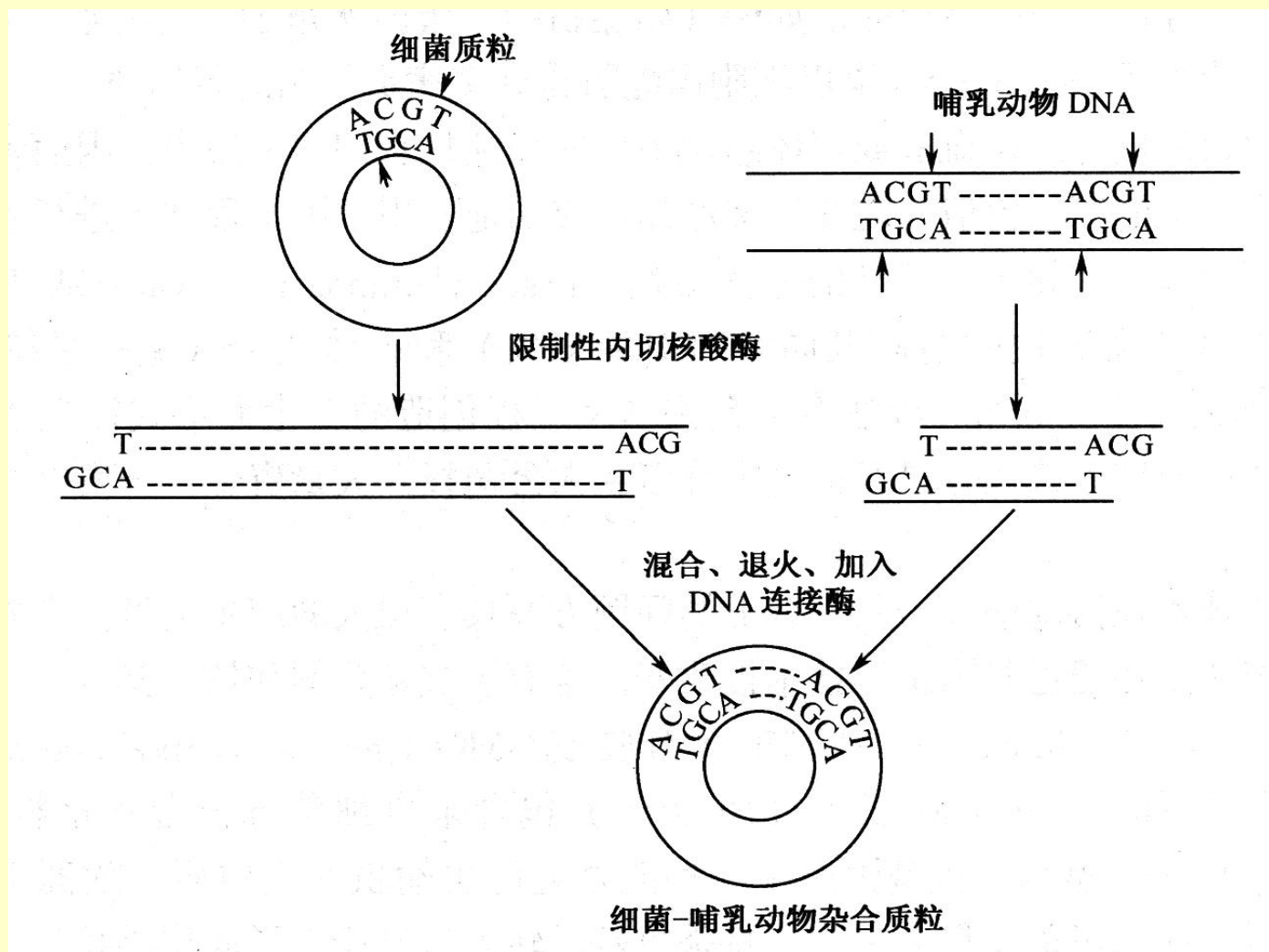


完整版，请访问www.kaoyancas.net 科大科院考研网，专注于中科大、中科院考研

(一) 限制性内切核酸酶

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

通过用相同的
限制性内切核酸酶切
割形成一个
重组DNA分子



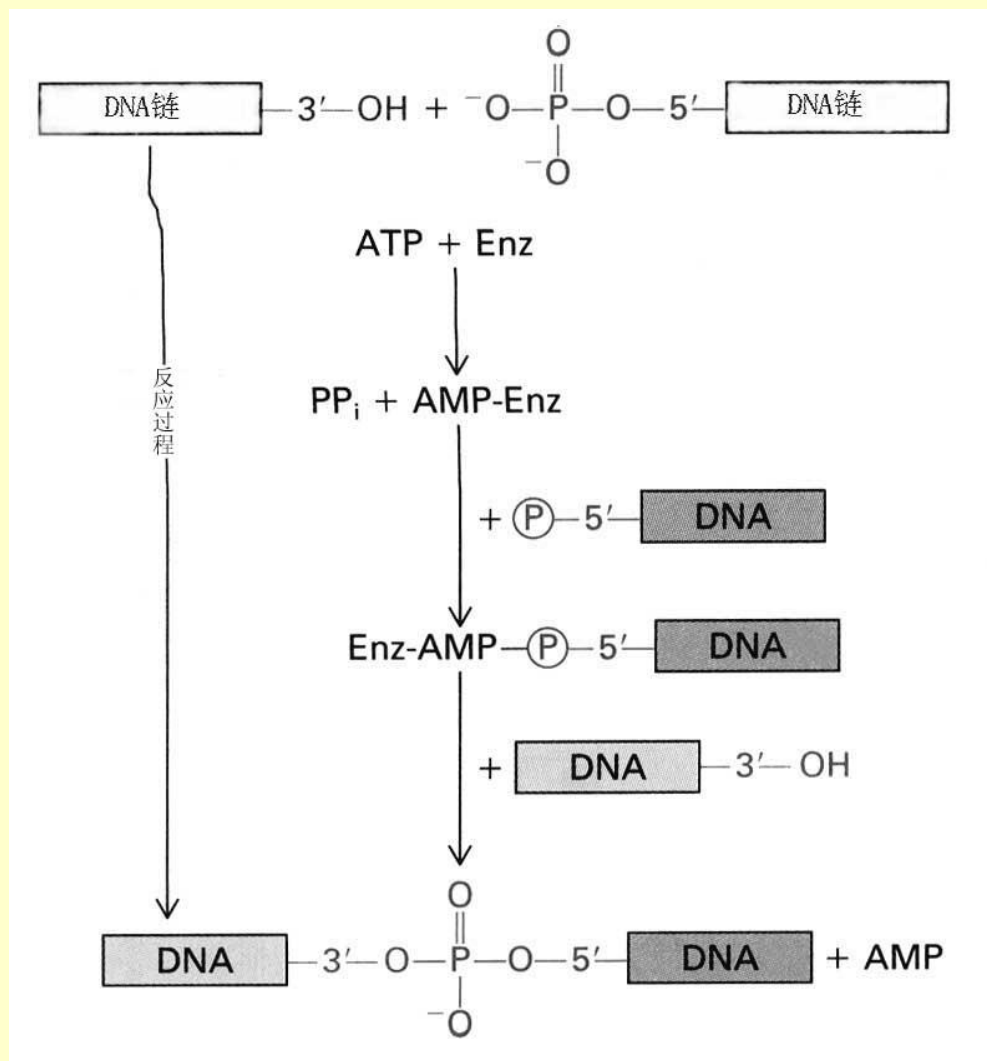
种类	来源	识别位点
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	5' -G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G- 5' m ↑
EcoRII	<i>E. coli</i>	5' -G-C-C-T-G-G-C- -C-G-G-A-C-C-G- 5' m ↑
HindII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5' -G-T-Py-Pu-A-C- -C-A-Pu-Py-T-G- 5' m ↑
HindIII	<i>H. influenzae</i>	5' -A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A- 5' m ↓ ↑ m
HaeIII	<i>H. aegyptius</i>	5' -G-G-C-C- -C-C-G-G- 5' ↑
HpaII	<i>H. parainfluenzae</i>	5' -C-C-G-G- -G-G-C-C- 5' ↑
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	5' -C-T-G-C-A-G- -G-A-C-G-T-C- 5' ↑ ↓
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	5' -C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C- 5' ↑ ↓
BamI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5' -G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G- 5' ↓ ↑
BglII	<i>B. globiggi</i>	5' -A-G-A-T-C-T- -T-C-T-A-G-A- 5' ↓ ↑

(二) DNA连接酶 (ligase)

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导课程，访问：www.kaoyancas.net

➤在分子克隆中使用的**DNA连接酶**有两种：**大肠杆菌DNA连接酶**和**T4 DNA连接酶**。

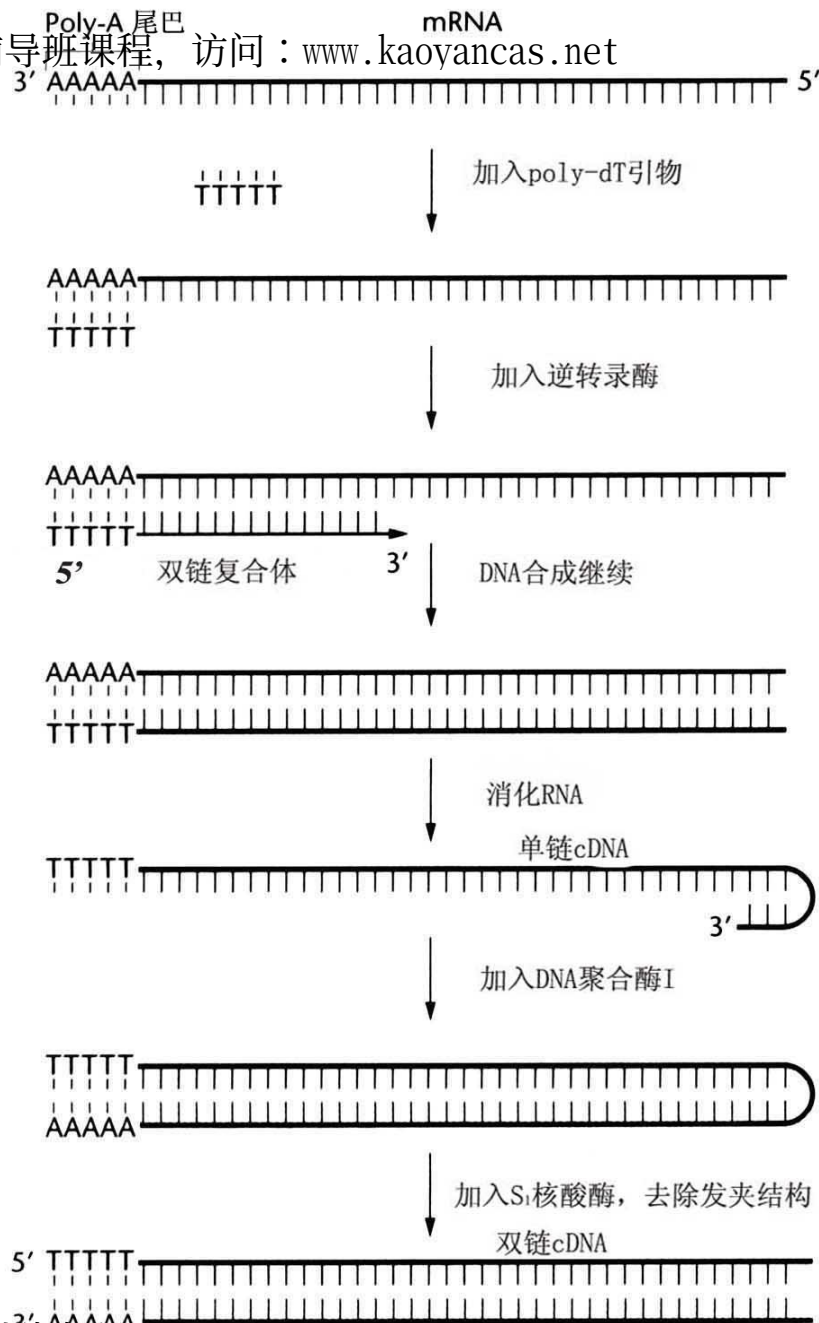
➤催化**DNA**中相邻的**3'-OH**和**5'-磷酸基**末端之间形成**磷酸二酯键**并把两段**DNA**连接起来。



(三) 反转录酶 (reverse transcriptase)

★反转录酶是一类以RNA为模板来指导DNA合成的DNA聚合酶，所以又称为依赖于RNA的DNA聚合酶。

★反转录酶在遗传工程中的主要用途是以mRNA为模板合成cDNA。



(四)

PCR

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

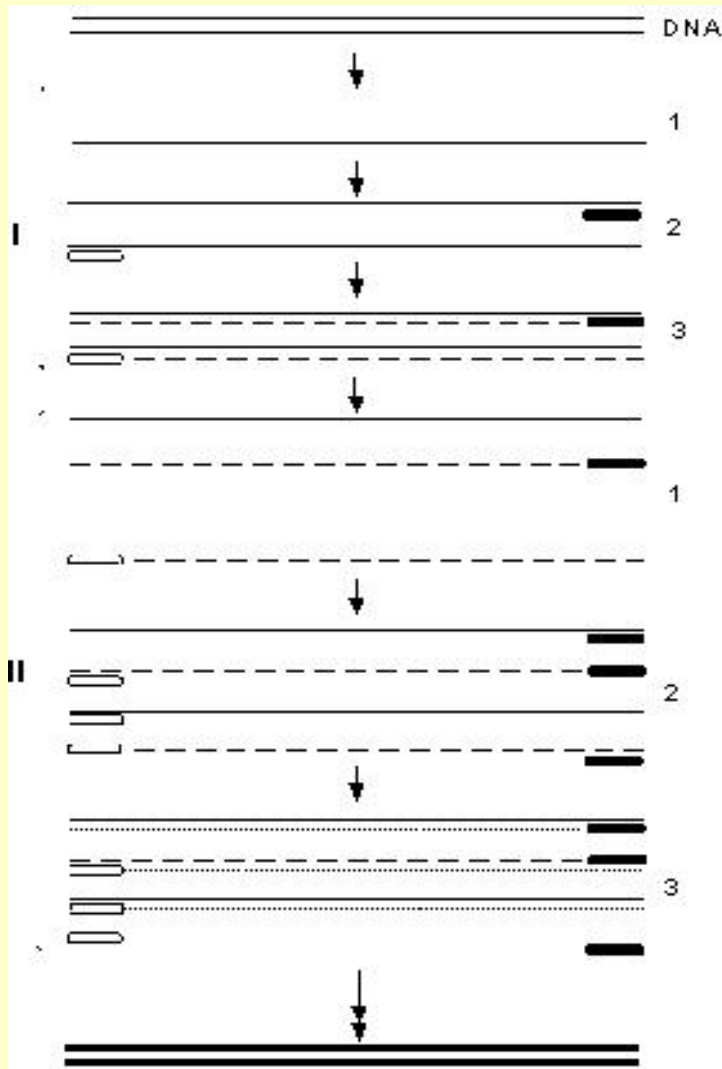


图 9-15 PCR 扩增 DNA。

◆ 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) 是体外快速扩增DNA的方法。

◆ PCR反应包括三个步骤：

● 变性：在94-95℃使模板DNA的双链变性成单链。

● 复性：两个引物分别与单链DNA互补复性，复性的温度在50-60℃

● 延伸：在引物的引导及Taq酶的作用下，于72℃合成模板DNA的互补链

◆ 这三个步骤称为一个循环，PCR反应常有25-35个循环。

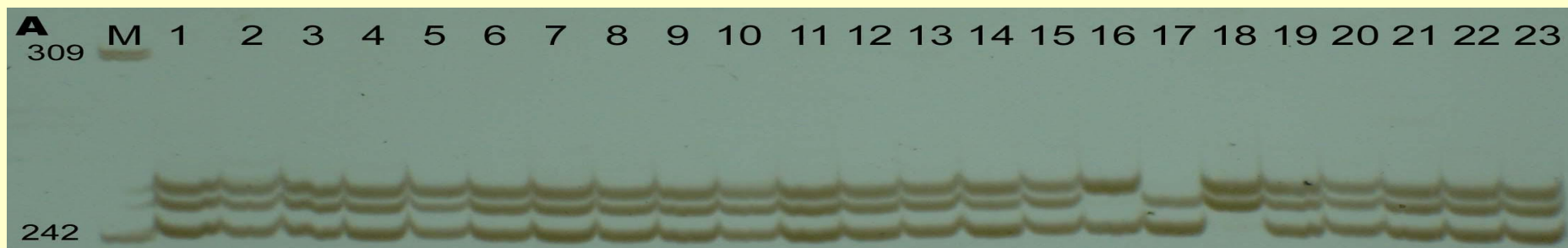
◆ PCR.EXE

(四) *PCR*

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

PCR产物可以通过电泳检测

琼脂糖电泳



聚丙烯酰胺凝胶电泳

完整版，请访问www.kaoyancas.net 科大科院考研网，专注于中科大、中科院考研

载体（vector）是将外源基因送入受体细胞的工具。作为载体DNA分子，需要具备：

- 在宿主细胞中能独立复制，有独立的复制起始位点；
- 载体DNA分子中有一段不影响其复制的非必需区域，即有限制酶切位点，允许外源基因插入且插入后随载体DNA分子一同进行复制或扩增；
- 有选择标记，便于选择含重组DNA分子的寄主细胞；
- 分子量小，多拷贝，易于操作。

除了上述特点外，一般还要求载体载荷外源DNA的幅度要宽，具有安全性等。

(一) 质粒

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

◆ 质粒(plasmid)是细菌染色体外存在的一种能够自我复制的双链闭合环状DNA分子，大小1kb~200kb。

➤ 质粒常常带有一些特殊的基因，如致死基因，抗抗生素的基因等等。

➤ 一般质粒都含有一个复制起始区，可独立复制。

➤ 质粒DNA复制与宿主之间的关系，可分为“严谨型”和“松弛型”。“严谨型”质粒在每个细胞中的拷贝数通常1~3个，而“松弛型”通常在10个以上，可高达200个拷贝。

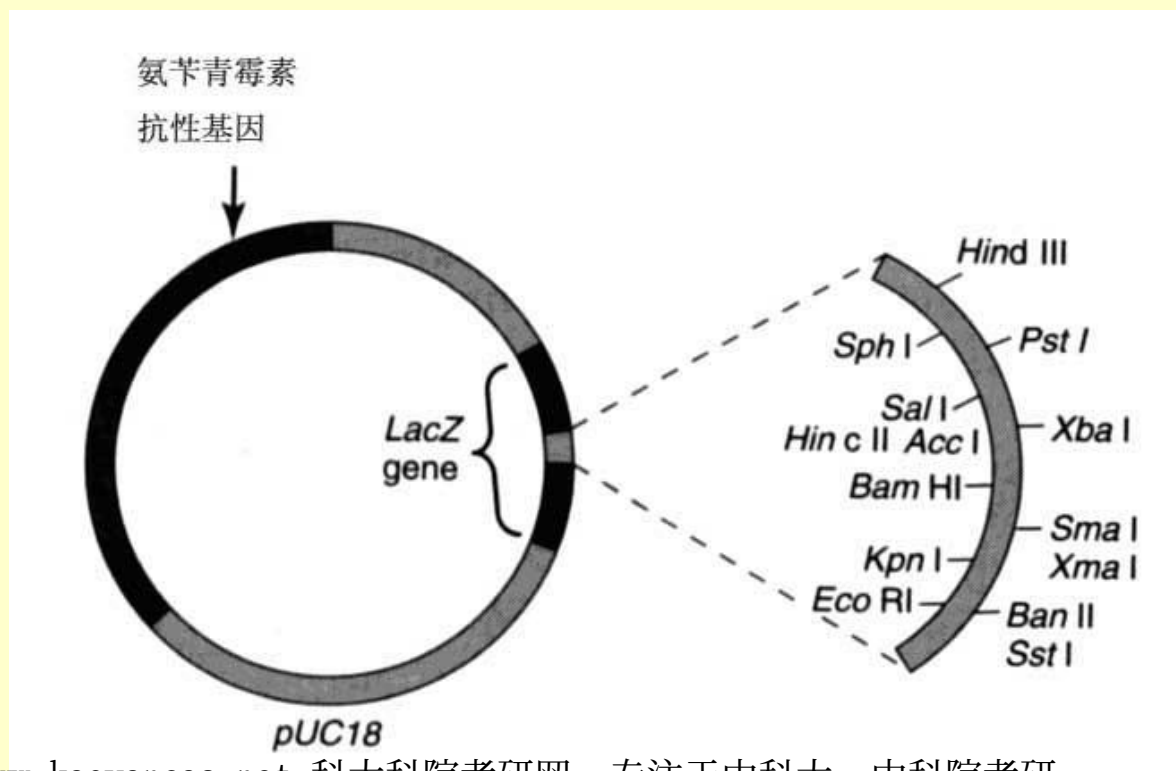
◆ 一般质粒通过改造后才能用于遗传工程。

(一) 质粒

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

➤ pUC18可以克隆比较大的DNA片段，在细胞中产生500个拷贝左右。

➤ 有一个多克隆位点，位于大肠杆菌的*lacZ*基因之内，有利于筛选和分离转化细胞。



(一) 质粒

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

➤筛选的原理是：细菌细胞含有野生质粒，在含有***X-gal***（5-溴-氯吲哚-半乳糖苷酶）的培养基上培养时产生**兰色菌斑**；插入克隆片段后，***lacZ***基因失去功能，不能代谢***X-gal***，从而产生**白色菌斑**。

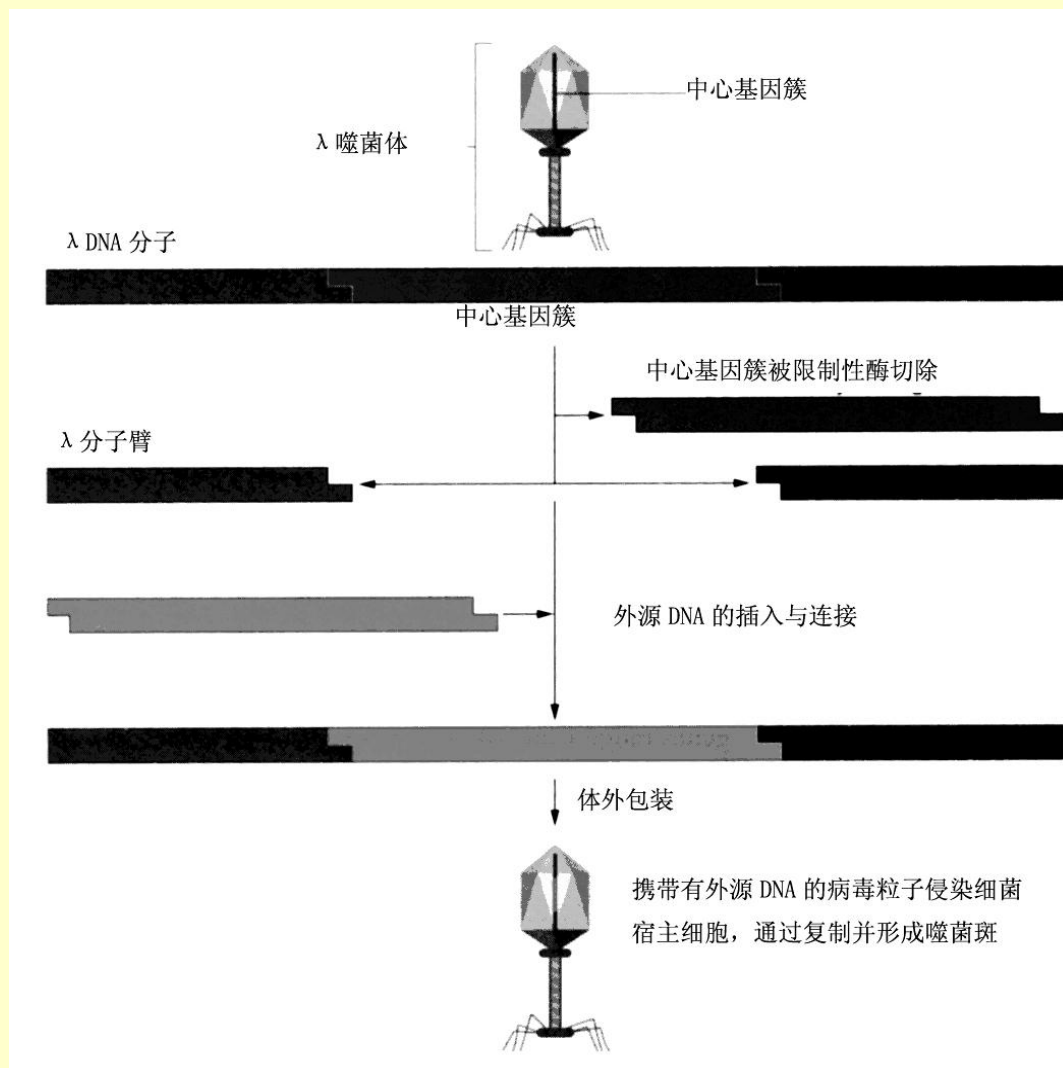


(二) 病毒载体

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

λ 噬菌体

◆ λ 噬菌体基因组全长48kb。中间约1/3的序列为中间基因簇 (central gene cluster)，两端为DNA左、右臂。 λ 基因组的中间基因簇序列可被外源DNA片段取代，而不影响噬菌体感染细菌及形成噬菌斑的能力。



(二) 病毒载体

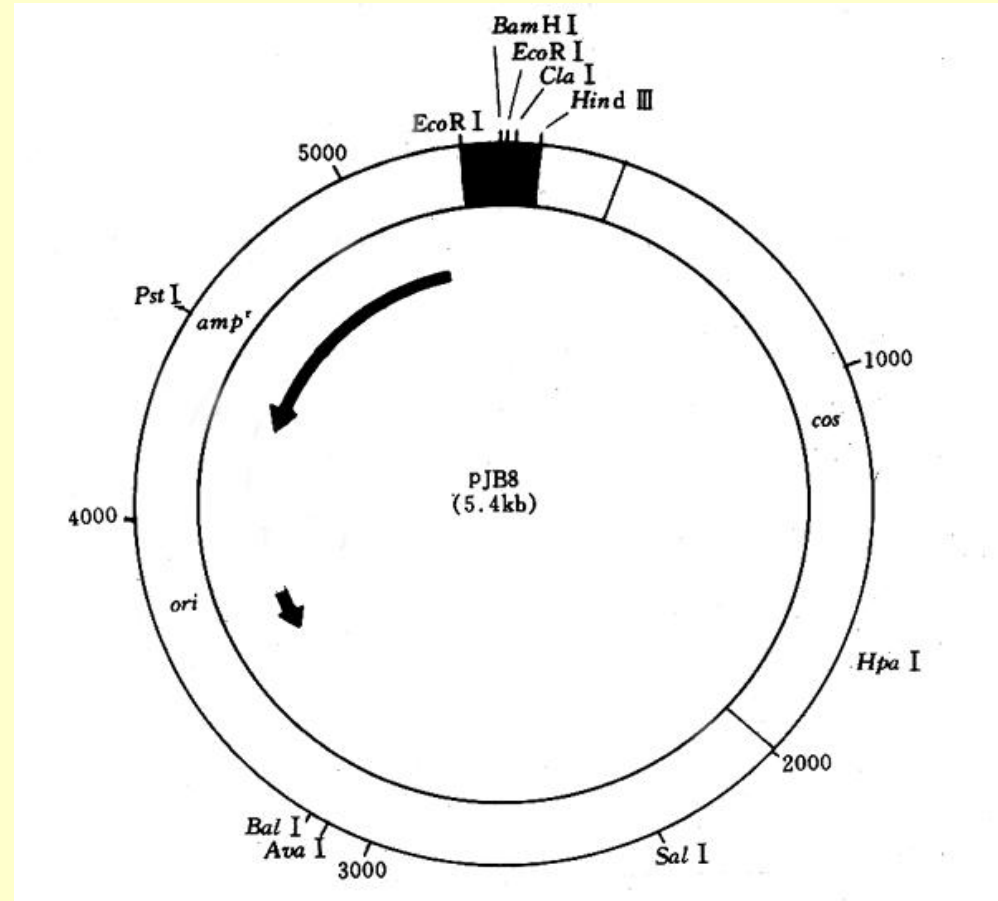
高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

◆ λ 噬菌体载体可接受**15 kb-23 kb**的外源**DNA**片段，它既可作为克隆载体，也可作为表达载体，广泛用于各类基因库的构建。

粘粒载体、细菌人工染色体和酵母人工染色体载体等。

◆粘粒载体 (**cosmid**)
是一类含有**cos**位点的
质粒载体。

◆兼有 λ 噬菌体的高效
感染能力和质粒的易于
克隆和选择的优点，既
能像质粒一样在寄主细
胞内复制，又能象
 λ DNA一样被包装到噬
菌体颗粒中去。



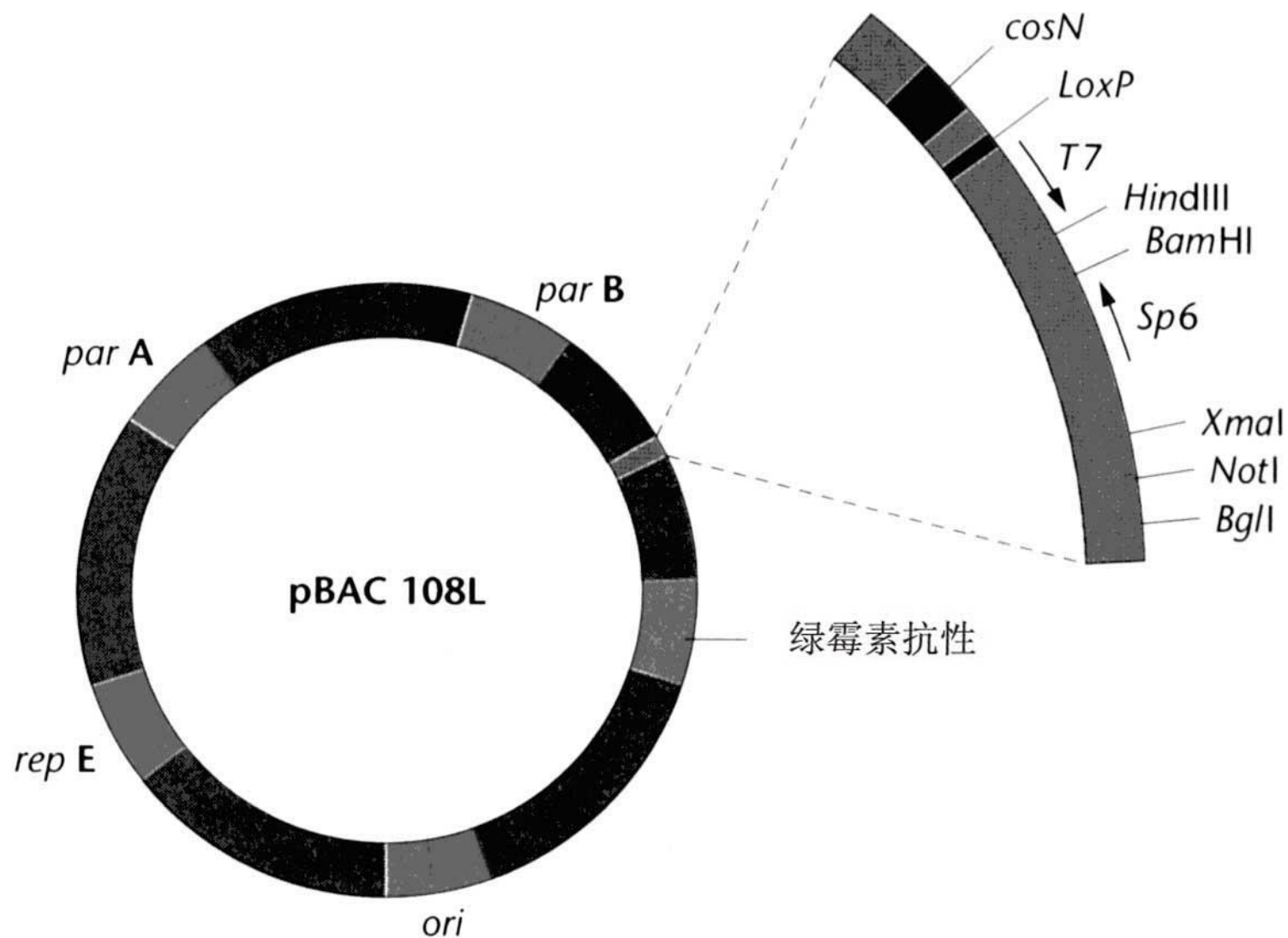
与噬菌体载体和质粒载体相比具有多个优点：

- 具有**cos**位点，能高效地转化大肠杆菌，能在大肠杆菌中实现自身环化，并能在大肠杆菌中复制；
- 有像质粒一样的选择标记；
- cosmid**载体比较小，但能插入较大的外源片段，可克隆外源片段的长度在**15~45 kb**之间。

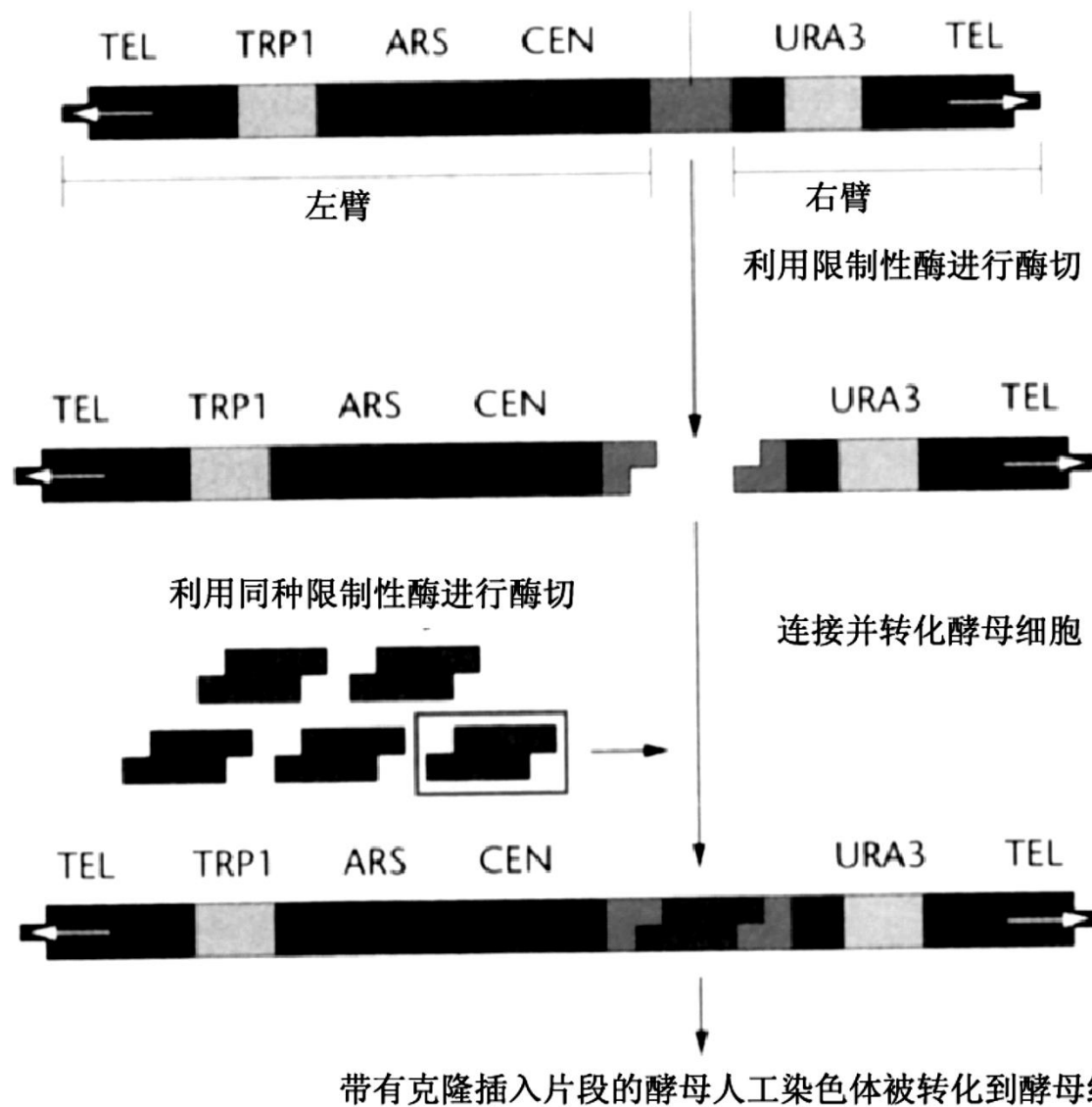
由于**cosmid**载体的大片段克隆能力，多用于基因组文库的构建，而 λ 噬菌体载体多用于**cDNA**文库的构建。已有多种粘粒载体可用于基因克隆，**pJB8**是最常用的粘粒载体之一

◆ BAC载体是基于细菌的性因子(F因子)质粒的一些特点构建的。F因子在细菌接合时转移1Mb的细菌染色体片段。将F因子经基因工程改良构成的BAC载体，可用于克隆100 kb以上的DNA片段。

◆ 带有外源片段的BAC载体在细菌细胞中通常仅单个拷贝，这一特点有利于保持DNA大分子，在细胞内稳定复制而不发生重组。BAC载体本身分子量小，具有氯霉素抗性选择基因及多克隆位点。



- ◆ 酵母人工染色体是另一类酵母穿梭载体。具有自主复制序列、克隆位点以及可在细菌和酵母菌中选择的标记基因。
- ◆ YAC可以接受100-1000 kb的外源DNA片段，这一特点使YAC成为人类基因组计划及图位克隆分离基因的重要工具，并促进了发展人类人工染色体(human artificial chromosome, HAC)的研究。



- 基于基因库的分离基因方法
- **T-DNA**标签克隆基因
- 基于**PCR**的基因克隆
- 人工合成基因

(一) 基于基因库的分离基因方法

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

1 构建基因库

基因库(library)是一组DNA和cDNA序列克隆的集合体。从基因库中分离基因，首先要构建基因库。只有利用合乎要求的基因库才有可能筛选出所需要的基因，很多分子遗传学工作才能继续深入下去。

核基因库

◆核基因库(genomic library或genomic bank)是将某一生物的全部基因组DNA酶切后与载体连接构建而成的。

◆通常的方法是，尽量提取大分子量的核DNA，用限制性酶酶切后，分离选择具有一定长度(大于15kb)的DNA片段，与适宜的载体连接构成重组DNA分子，选择相应的宿主细胞用于克隆。载体可以是质粒，噬菌体，BAC或YAC等

- ◆理想的核基因组应当能包括全部的基因组序列。如果每一个克隆包括的DNA片段大，则总克隆数目少，常选择能接受较大片段的载体。
- ◆检测是否包括一个完整的基因组序列的公式：

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-a/f)}$$

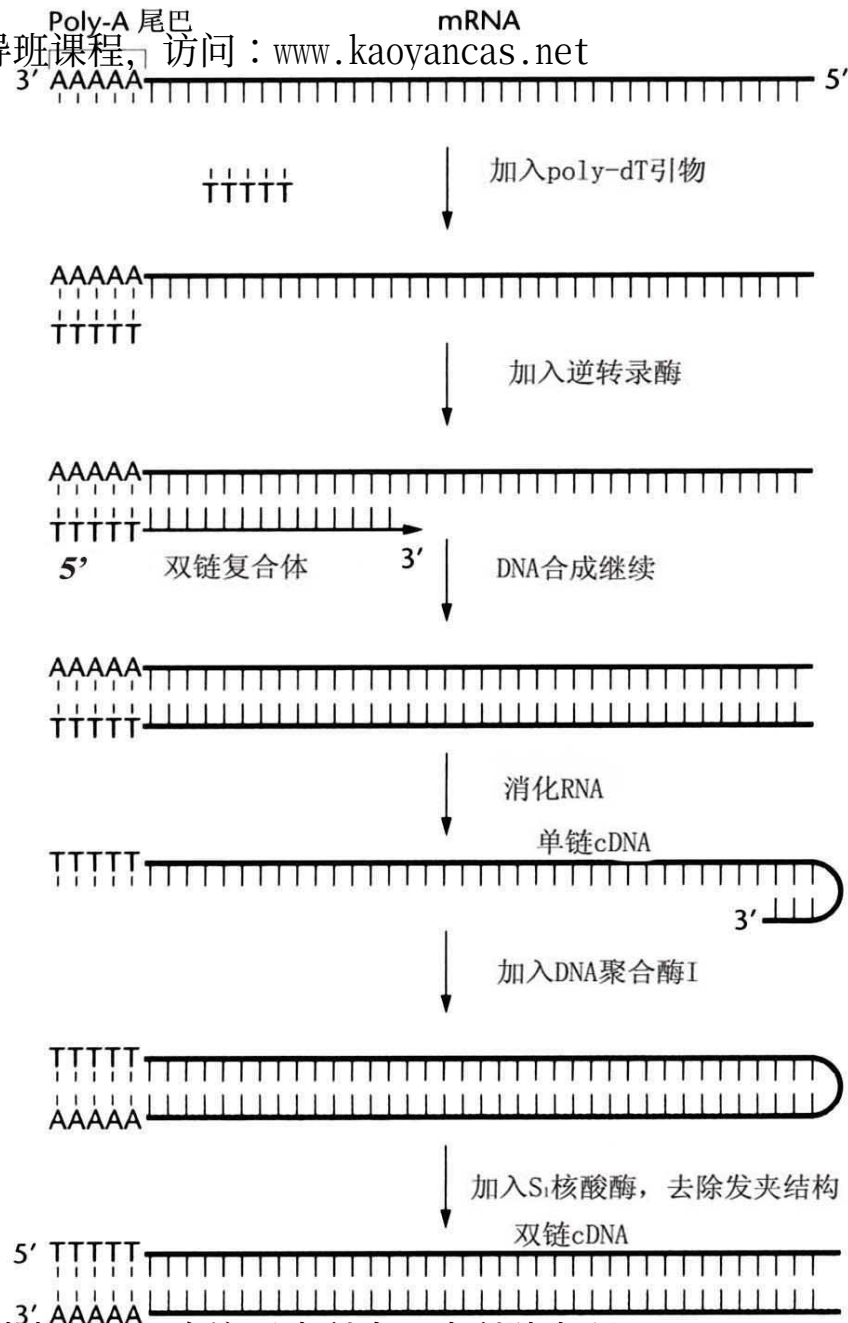
- ◆例：人类基因组 3.0×10^6 kb，以 λ EMBL作载体，插入片的平均长度为17 kb，p为99%时，基因组应有 8.1×10^5 个重组噬菌体。

◆将基因组的一部分（如一条染色体）用来构建基因库，对于选择特异基因及分析染色体结构和组织十分有价值。

- 果蝇X染色体上的一个片段，具有50多个多线染色体带，利用微切割技术切割，抽提DNA，构建染色体片段基因库。
- 在人类基因组项目研究中，利用流动细胞分选技术将人类染色体分开，构建单个染色体基因库，大大加速了人类基因组作图和分析。
- 在酵母菌中，利用一种改良的脉冲电泳方法，将酵母菌的16条染色体据分开，用于构建染色体库。

◆ 以mRNA为模板，经反转录酶合成互补DNA (cDNA)，构建的基因库。

◆ 绝大多数真核生物 mRNA的3'端具有一段多聚A(poly-A)尾端序列。在反转录酶作用下，用poly-T引物(primer)，引导合成一条互补DNA，即第一条DNA链，形成RNA-DNA杂合双链。然后合成第2条链。



◆ **cDNA库**仅具有用于分离**mRNA**的细胞或组织内表达的基因的**mRNA**序列，仅包括基因组的部分基因序列。

◆ 构建什么样的基因库取决于研究目的。

cDNA 库对于研究基因的表达模式、分离某一特定基因是十分有用的。如分离在某一细胞或组织高效表达的某种基因。

◆ 通常是将**cDNA**库与核基因库配合使用，以便既能得到基因的编码序列，又可得到基因的调控序列。

◆从基因库中筛选、分离基因，可据对待选基因相关信息的了解程度，确定筛选方法和条件。

◆常用方法是利用一段核苷酸序列(DNA, cDNA或寡核苷酸)作探针(probe)，用放射性同位素或非放射性同位素标记探针，也可用抗体作探针，筛选基因库。

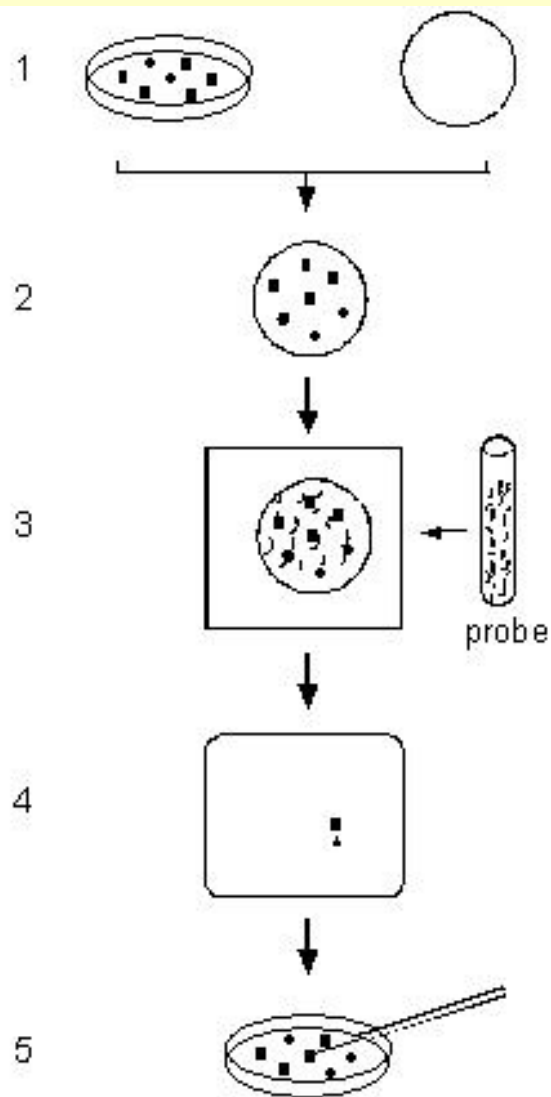


图 9-11 筛选基因库

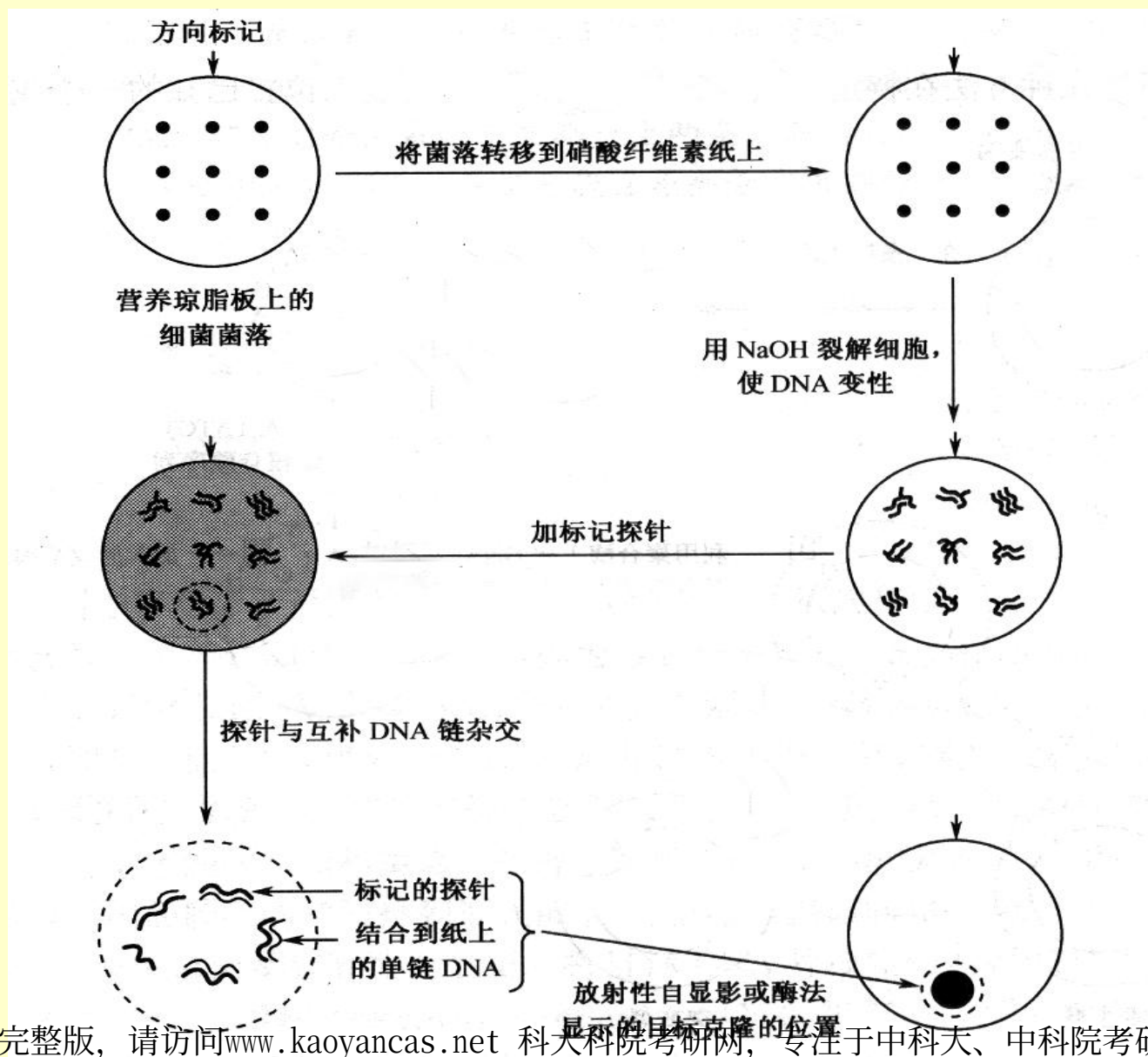
◆将重组噬菌体(来自基因库)感染的宿主细菌细胞与少量培养基混合培养，噬菌体在宿主细胞内复制扩增后形成噬菌斑。

◆将培养皿中的噬菌斑转到硝酸纤维素膜或尼龙膜上，变性，用标记的探针与膜上的噬菌体DNA杂交，杂交膜用X-光片放射自显影，检测杂交信号。

◆与探针杂交的噬菌斑即为阳性克隆。根据杂交信号的位置，找出培养皿中所对应的噬菌斑，培养，制备DNA。

菌落杂交技术寻找目标DNA克隆

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net



完整版，请访问www.kaoyancas.net 科大科院考研网，专注于中科大、中科院考研

(三) 序列测定和分析

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

从文库中筛选获得目标克隆后，只有进行测序才能进行生物信息分析和功能预测。

限制性酶图谱

◆ 一个15kb DNA片段的限制性酶图谱构建

★ 实验过程：

首先将阳性克隆DNA分装在3个管中，分别用不同的酶及酶的组合酶切DNA。酶切的产物用于琼脂糖凝胶电泳，染色，在紫外灯下可见到DNA带。各条带的分子量大小可根据分子量标记估测。

★结果分析

●从凝胶电泳结果可见，模式II就是这个15kb DNA片段用上述两种酶酶切后的限制性酶图谱。

●将不同DNA用限制性酶消化，产生的多态性，即限制性酶片段长度的多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)，用来分析DNA水平的变异程度，进行基因组图谱分析。

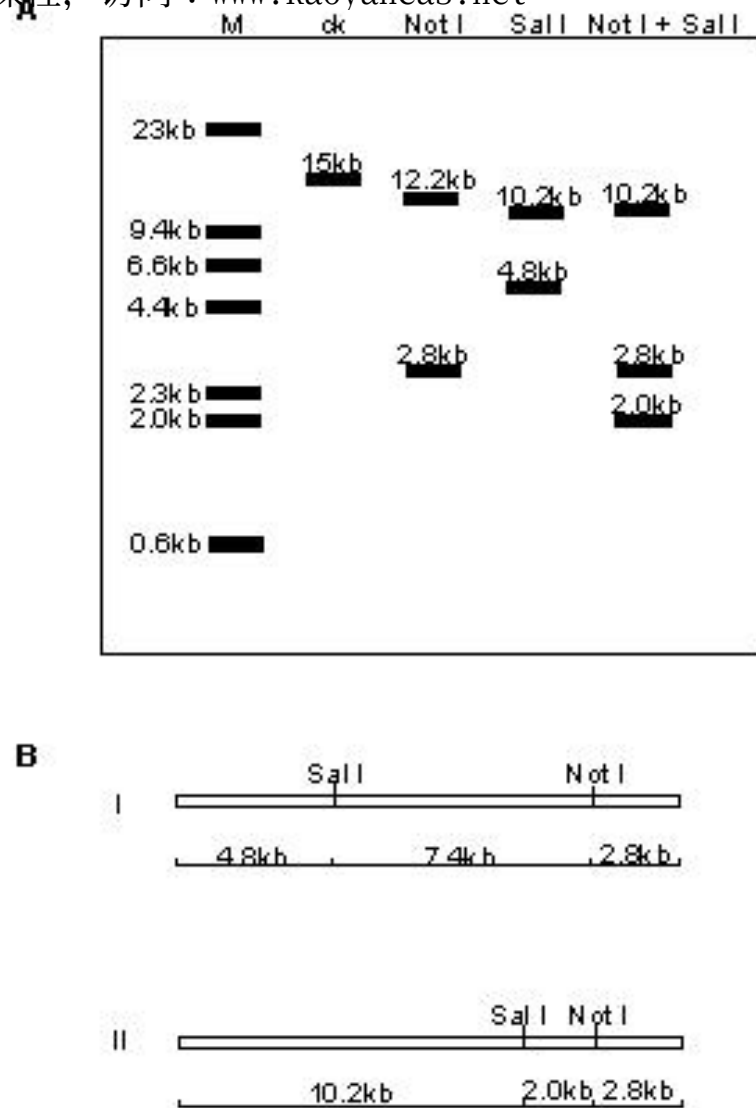


图 9-12 限制性酶图谱的构建

(二) **T-DNA**标签克隆基因

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

基本原理：

- 利用**T-DNA**插入突变创造突变体，获得各突变体的纯合材料；
- 然后分析突变性状与**T-DNA**的共分离关系，存在共分离的材料用适当的**PCR**克隆技术获得**T-DNA**的侧翼基因组序列；
- 用其作探针筛选基因文库，获取目标基因或克隆，再进行下一步的分析。

T-DNA 载体构建



转化植物 (T1, T-DNA杂合子)收获T2种子



筛选T2，获突变子，应为3:1分离



确定T-DNA与突变型共分离的个体



产生纯合后代



克隆T-DNA两侧的植物DNA



利用侧翼DNA序列作探针从该植物的cDNA文库中钓取基因



基因功能的验证

(三) 基于PCR的基因克隆

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

基于**PCR**的**DNA**克隆与基于载体的克隆技术相比具有一定优越性。

➤ **PCR**反应速度很快，可以在几个小时内完成，而载体克隆需要几周时间。

➤ **PCR**反应非常灵敏，可以用来扩增痕量样品的**DNA**。

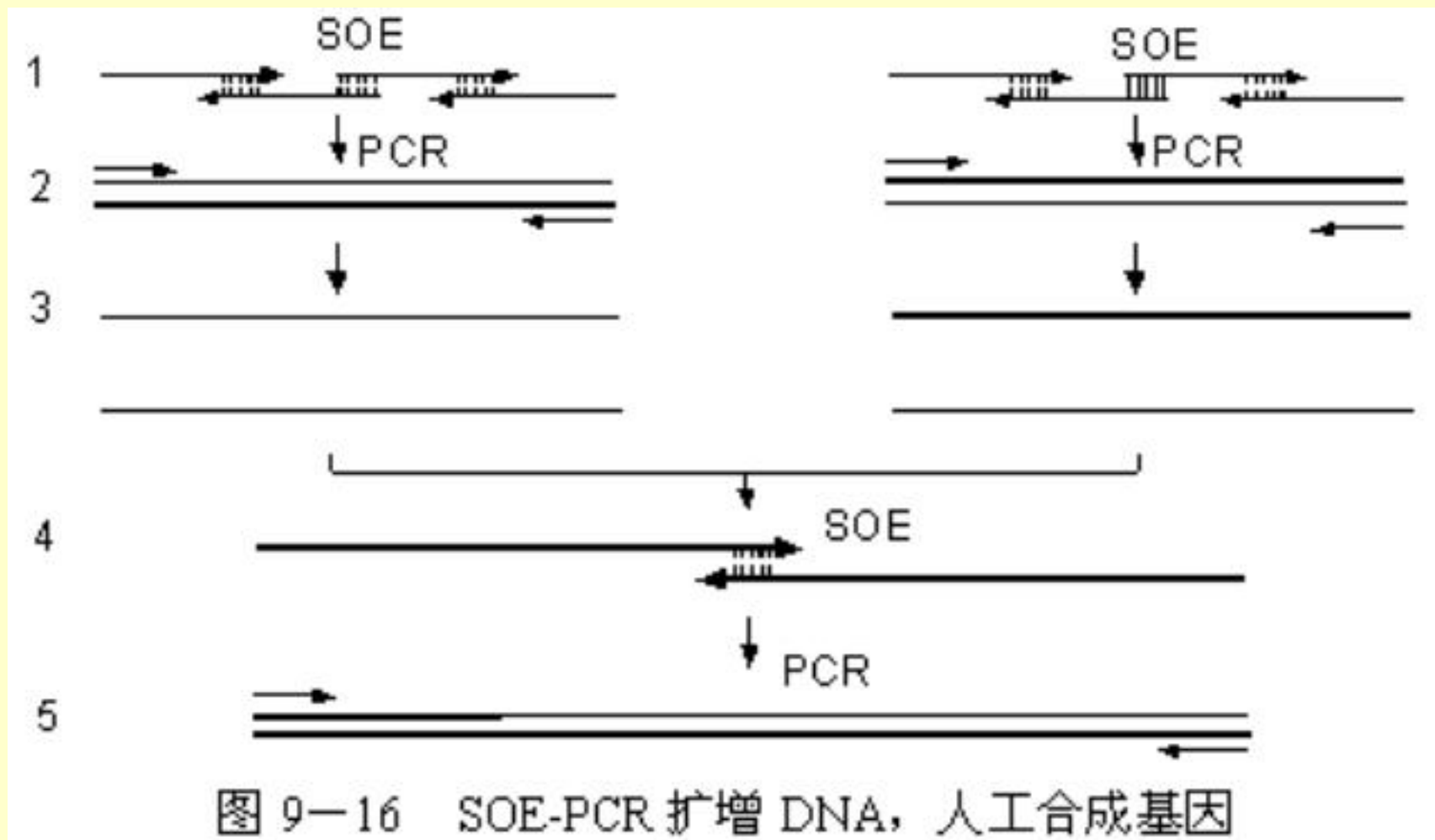
➤ 对于部分降解、甚至污染，用载体克隆无法进行的**DNA**样品，**PCR**扩增仍可获得目的基因克隆

(四) 人工合成基因

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

◆根据已知的基因或氨基酸序列，将化学合成寡核苷酸的方法与酶促合成DNA的方法结合起来，可以很快地人工合成基因。

◆例如，首先化学合成多个含有80-100个核苷酸的寡核苷酸，每个寡核苷酸之间具有19-24个核苷酸的重叠序列，再将各个寡核苷酸等量混合，在DNA聚合酶(或Taq酶)作用下，各寡核苷酸又作为引物合成新链，使单链部分补齐成为双链，再用两个PCR引物，经PCR扩增出DNA片段。若将两个DNA片段放在一起，经SOE-PCR(sequence overlapped extension, SOE)扩增出完整的基因片段。



第 3 节 外源基因导入受体

- 一、重组**DNA**导入原核生物（细菌）
- 二、植物表达载体
- 三、外源基因导入植物

一、重组DNA导入原核生物（细菌）

➤ **CaCl₂处理转化**。CaCl₂处理转化的机制尚不清楚，可能是CaCl₂处理破坏了细菌的细胞壁，使游离的DNA分子被摄入受体细胞。这种方法的转化频率大概是千分之一。

➤ **电激转化（electroporation）**。是目前常用的一种转化方式。在电转化仪施加的强电场的作用下，使受体细胞细胞壁具有可逆的电穿孔，DNA分子进入细胞。

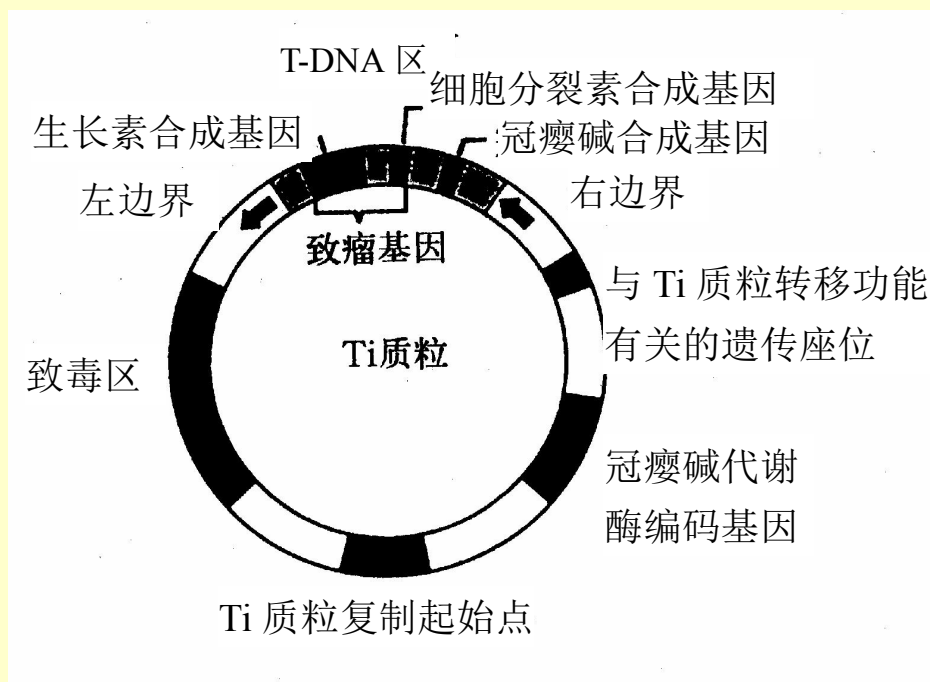
➤ **结合（conjugation）**。结合是原核生物细胞与细胞接触而进行遗传物质转移的一种自然过程。

二、植物表达载体

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

◆ **Ti质粒**是一种细菌质粒，它自然存在于土壤农杆菌细胞中。土壤农杆菌可感染大多数双子叶植物的受伤部位，使之产生冠瘿瘤(grown gall tumors)。

◆ **Ti 质粒**。Ti质粒的一部分**DNA**叫做**转移DNA (T-DNA)**，当**T-DNA**整合到宿主植物细胞的染色体后，就诱导出根瘤，并使根瘤细胞合成**冠瘿碱(opine)**，作为土壤农杆菌的碳源和氮源。



(1) T-DNA区 (transferred-DNA regions)

T-DNA是农杆菌侵染植物细胞时，从Ti质粒上导入植物细胞的一段DNA。

➤ **T-DNA两端各有一段25bp的重复序列(LB, RB)。**
T-DNA携带的致瘤基因是一些与激素合成有关的基因，由于激素合成基因使细胞处于不停的分裂状态，形成冠瘿瘤，不能进行细胞分化。

➤ **Ti质粒改造后才能应用于植物的基因工程。保留T-DNA两端的末端序列，然后用外源DNA插入或直接取代野生型T-DNA的部分基因，使转化的植物细胞不具有成瘤能力。**

(2) Vir区 (virolence region)

Vir区段上的基因与T-DNA从细菌转移到植物细胞的遗传过程有关，区段上的基因能够使农杆菌表现出毒性，故称之为**毒性区**。Vir区段总长度大约35kb，由7个互补群组成，分别命名为*VirA*、*VirB*、*VirC*、*VirD*、*VirE*、*VirG*和*VirH*。

(3) Con区(regions encoding conjugations)

该区段上存在着与细菌间接合转移的有关基因 (*tra*)，调控Ti质粒在农杆菌之间的转移。

(4) Ori区(origin of replication)

该区段基因调控Ti质粒的自我复制，故称之为**复制起始区**。

- **Ti**质粒分子受到信号分子的激活作用之后，**virD**基因编码的一种核酸内切酶，先在**T-DNA**的**RB**序列中的第**3**和第**4**碱基之间切开一个**单链**缺口，随后在**T-DNA**同一条链的**LB**序列中切出第二个单链缺口。
- **T-DNA**便以单链形式释放出来，并在**RB**序列的引导下定向地转移到寄主植物细胞。
- 在有关的植物细胞酶体系的催化作用下，合成互补链形成双链形式的**T-DNA**分子。在一系列酶的参与下整合进植物基因组。这种整合是一种非正常重组。

Ti质粒的衍生载体

(1) 双元载体系统 (**binary vector**)
具有两个质粒——穿梭质粒和Ti质粒。

(2) 共整合载体 (**integrated vector**)
共整合载体系统包括在T-DNA上的激素合成区经过突变后的Ti质粒和中间载体两部分。

有一种农杆菌中存在另一种质粒，**Ri质粒**，这种农杆菌即发根农杆菌。**Ri质粒**也可完成外源基因向植物的转移工作。发根农杆菌侵染后植物细胞产生许多不定根，这种不定根生长迅速，不断分枝成毛状，故称之为毛状根，也称为发状根，分别简称为毛根或发根，**Ri质粒**为根诱导质粒。**Ri质粒**的结构与**Ti质粒**的结构很相似，可以分为**T区**、**vir区**、**ori区**和其它区域等几个部分。

T区与Ti质粒的T-DNA十分相似，包括以下几个部分：

①**T区的左右边界序列。**在**Ri质粒**的左右边界上含有**25bp**的重复序列，与**T-DNA**的左右边界序列具有很高的同源性。

②**TL-DNA区。**该区中含有与毛状根形成有关的***rolA*、*B*、*C*、*D***基因群。***RoIA***与肿瘤和毛状根的形成有关，该基因不活化时通常形成较多的不定根，而在活化的情况下与毛状根形成有关；***rolB***基因是**Ri质粒**转化过程中最关键的基因，没有该基因的参与转化细胞不可能形成毛状根组织。***rolC*、*D***不活化时不会产生性状。

③**TR-DNA区。**该区中含有与农杆菌合成有关的基因（***ags***）和生长素合成有关的基因（***tms1*、*tms2***）。***ags***基因在转化的初期起着重要的作用，是不定根产生的关键

高等植物基因遗传转化的方法为两类：

◆非生物载体介导的遗传转化

包括种质转化系统和直接转化系统。**种质转化系统**是以植物自身的生殖系统种质细胞为受体进行的转化，如花粉浸泡外源DNA、DNA注射受粉后的子房等；**直接转化**是采用物理或化学方法直接将外源基因导入受体细胞，如基因枪法等。

◆生物载体介导的遗传转化。

在生物载体介导的转基因中，农杆菌介导的转基因是常用的方法。

(一) 农杆菌法

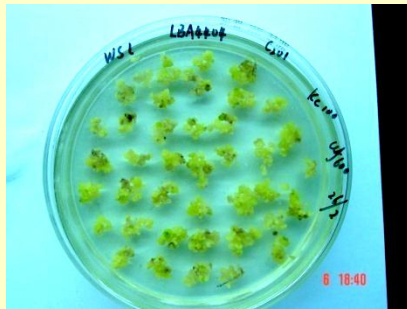
需要具备如下条件：

- 高效的植株再生体系。选择容易从体细胞再生植株的受体基因型是获得转化成功的关键。
- 受体植物细胞对农杆菌要有很高的亲和力。一般认为受体细胞应处于高度的分裂状态，**T-DNA**才能插入植物基因组；
- 具有有效的选择系统。必须有一个理想的选择方法将转化细胞从非转化细胞中选择出来；
- 稳定的转化技术和基因表达。外源基因转入植物后应能传代并稳定表达。

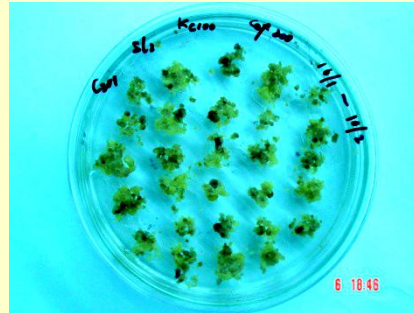
(一) 农杆菌法

一般技术程序

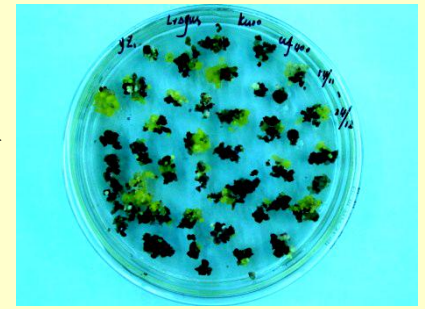
- 农杆菌侵染植物细胞、细菌与植物细胞共培养、在筛选培养基上筛选、获得转化细胞克隆、转化细胞分化并再生植株。
- 叶圆盘转化法。带有伤口的植物叶片的圆盘。使用的外植体可以是叶圆盘、下胚轴、胚性愈伤组织等。



1. 共培养



2. 在选择培养基上筛选



3. 筛选获得的抗性愈伤



6. 转基因植株移栽大田



5. 胚萌发成苗



4. 抗性愈伤分化成胚状体

(一) 农杆菌法

选择系统

选择是为了将转化细胞与非转化细胞区分开，使转化细胞具有生长优势。在构建载体时，往往在目的基因上连上一个选择标记基因。

通常使用的是抗生素抗性基因，如*NPTII*基因——新霉素磷酸转移酶基因，能分解卡那霉素等抗生素。

其它选择标记基因，如抗除草剂基因，报告基因（如：*GUS*基因、*GFP*基因等）等。

(二) 基因枪介法

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

◆基因枪法（gene gun）是依赖高速的金属微粒将外源基因导入活细胞的一种转化技术。

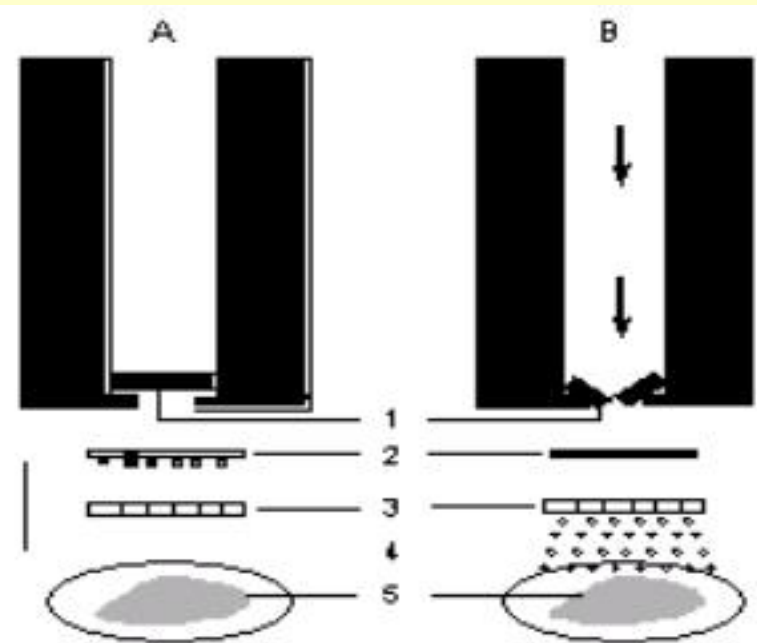


图 9—19 基因枪转化原理
基因枪转化前(A)及转化后(B)的主要部分示意图

- 1、位于高压气体桶底部的爆破片
- 2、载有 DNA 及金属颗粒的大载体
- 3、阻挡板
- 4、包裹有 DNA 的金属颗粒
- 5、样品

(二) 基因枪法

高参考价值的真题、答案、学长笔记、辅导班课程，访问：www.kaoyancas.net

➤优点：（1）无宿主限制。可以对任何基因型材料进行转化研究；靶受体几乎包括所有具有潜在分化能力的组织或细胞。（2）易于操作。

➤缺点：如转化频率低、嵌合体较多、结果的重复性差，转化的外源基因以多拷贝居多，易导致基因沉默，实验成本较高等。

还有很多将外源基因引入植物基因组的方法，如电激法、花粉管通道法、超声波法等，它们都在不同程度上得到应用。

第4节 转基因生物的检测与鉴定

一、分子检测

二、生物学性状鉴定

一、分子检测

常用的转基因生物分子检测手段有

- PCR
- Southern杂交
- Northern杂交
- Western杂交

PCR检测

PCR检测外源基因的原理是根据被转移的外源基因（目的基因或选择标记基因）设计引物，扩增外源基因的片段。如果扩增出的片段与设计的一对引物之间的实际片段在长度上相吻合，说明基因已转入受体细胞。

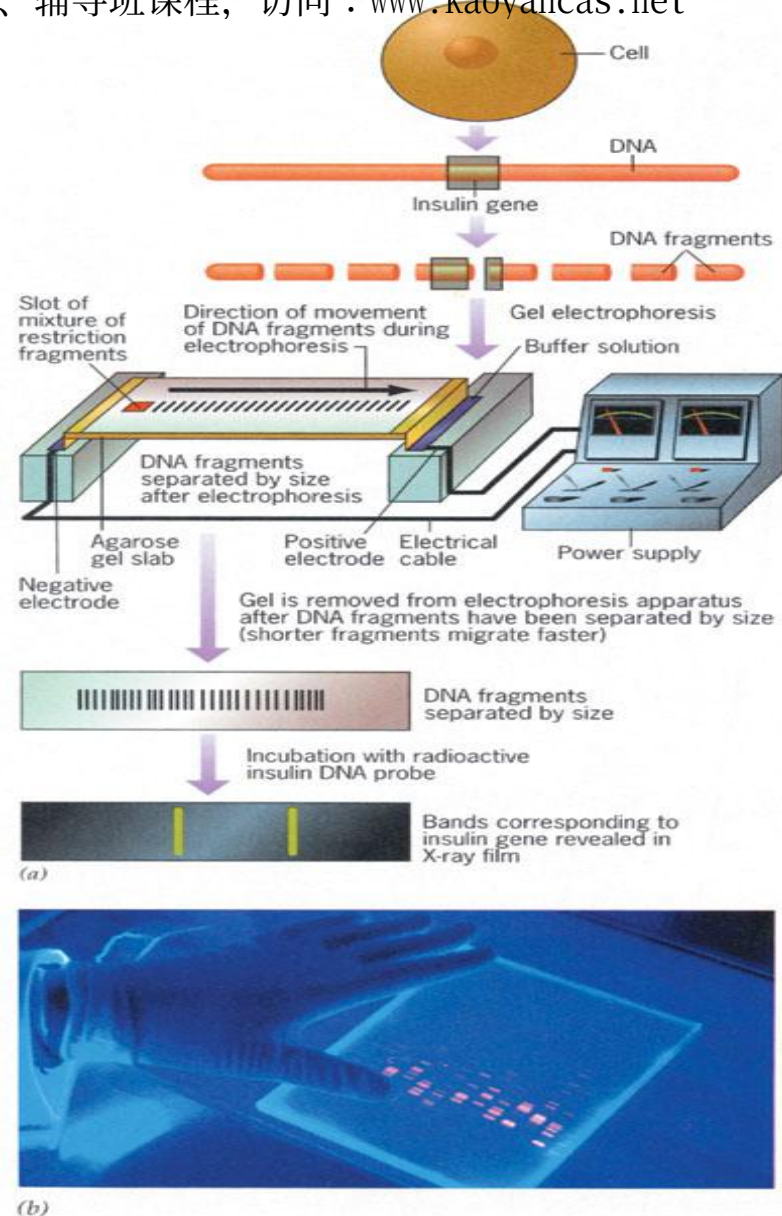
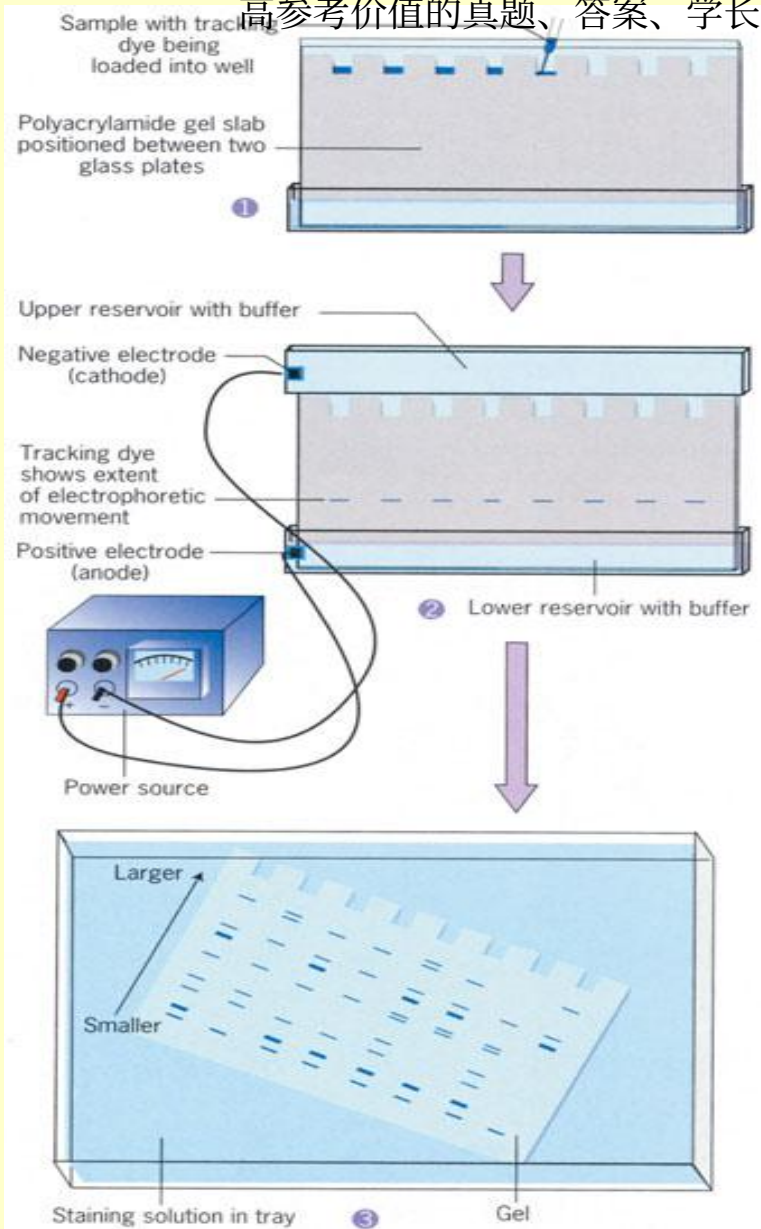
- 在进行PCR检测时应设两个对照：阳性对照即质粒DNA和阴性对照即非转基因材料的DNA。
- PCR扩增结果只能初步确定转基因材料的真实性，并不能完全确信。容易出现假阳性，通常需要进一步用Southern杂交才能证实。

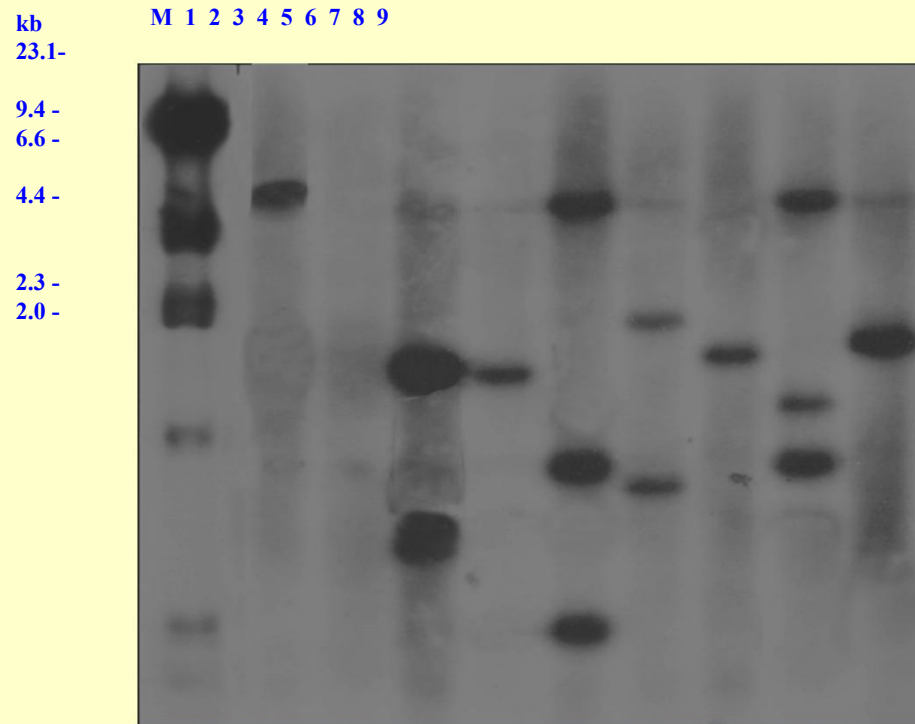


转基因棉花选择标记基因***NPTII***编码区段的
PCR扩增结果（**M**为分子量标准，**C**为非转基因植株，**P**为质粒对照，**1-20**为转基因植株）

Southern杂交(Southern blotting)

- ◆将DNA用限制性酶酶切→酶切DNA电泳→变性→转移到膜上→经过标记的DNA探针与膜上的DNA片段杂交→洗去膜上非特异性结合的探针→检测杂交信号。
- ◆如果转移的膜上具有与杂交探针相同或部分同源的序列，就会检测到杂交带信号。
- ◆SOUTHERN.EXE





转基因棉花的**Southern**杂交检测（**M**为分子量标准，**1**为阳性对照，**2**为阴性对照，**3-8**为转基因植株）

Northern杂交是一种RNA-DNA杂交。

- 将提取的植物总**RNA**或**mRNA**用变性凝胶电泳分离，则不同的**RNA**分子将按分子量大小依次排布在凝胶上；
- 将它们原位转移到固相膜上；在适宜的离子强度及温度条件下，用探针与膜杂交；
- 然后通过探针的标记性质检出杂交体。。

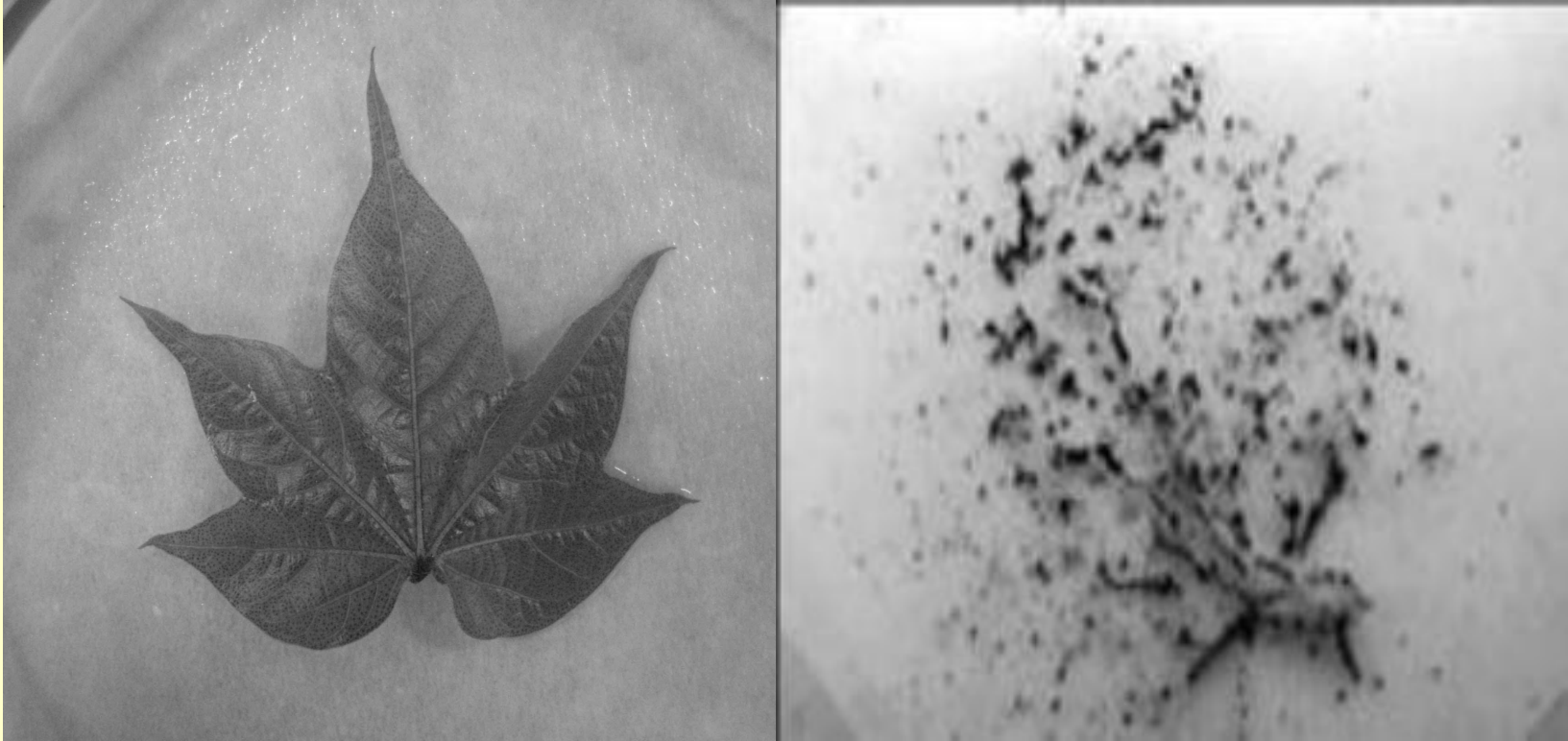
Western 杂交

从转基因植物中提取总蛋白质，经纯化处理后，进行**SDS**(十二烷基磺酸钠)聚丙烯酰胺凝胶电泳使蛋白质按分子量大小分离，将凝胶上的蛋白质转移到膜上，按特定的程序与抗体杂交，对杂交结果进行检测便可得知被检植物组织内目的蛋白表达与否及其表达量。

➤鉴定转移的目的基因、选择标记基因是否表达。

➤观察是否发生外源基因以外的变异。转基因生物还可能因为细胞培养或T-DNA的插入而造成其它性状的突变。最好选出其它性状均未改变而仅产生目的基因性状的转基因材料。

但是，不应忽视转基因过程中产生的其它变异的应用价值，如转基因抗虫棉的研究中就可筛选到既抗虫纤维品质的某方面也改善的品系。



转基因棉花饲喂棉铃虫时被食用情况（左图为转基因抗虫棉，右图为非转基因棉）

第5节 基因工程的应用

1. 基因工程是生物科学基础研究的重要手段

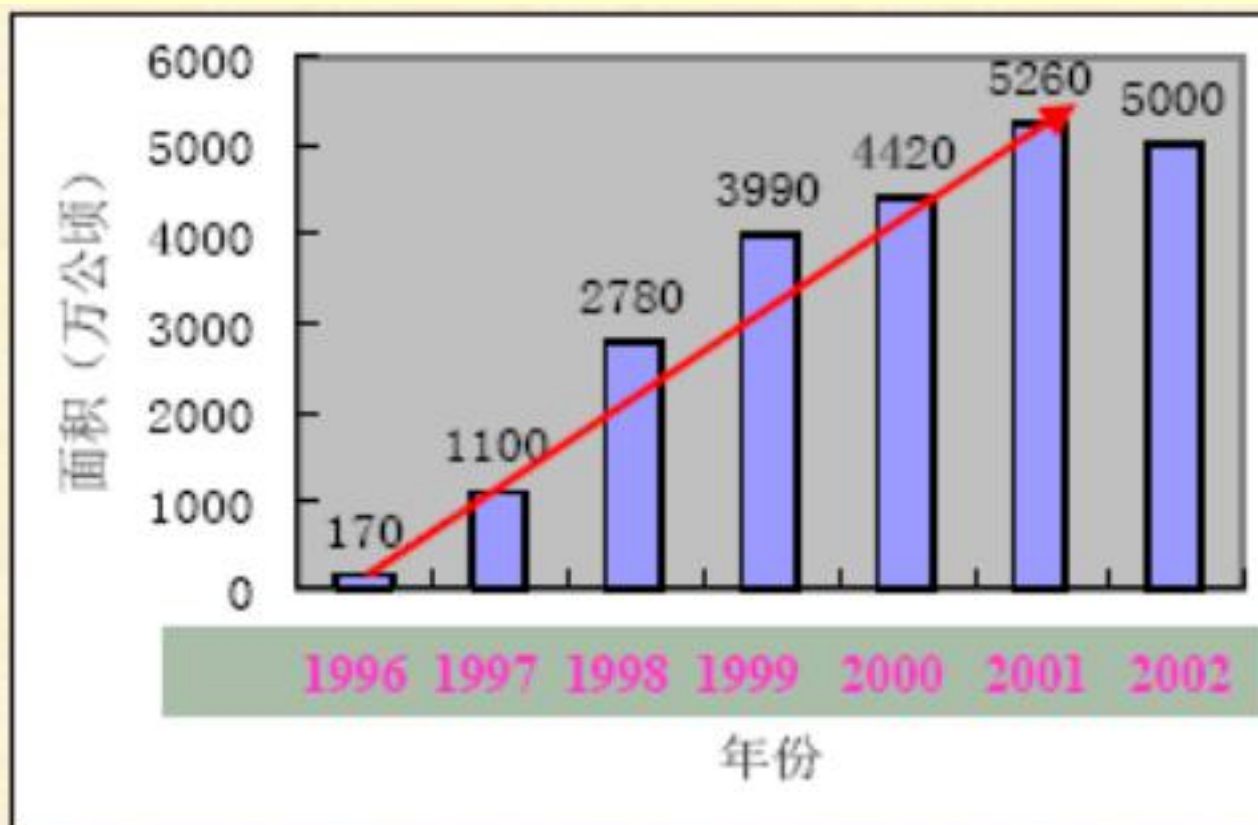
- 一些重要的发现是借助基因工程技术完成的，如基因结构的重叠现象和不连续性，**mRNA**的剪接现象和转座因子等。
- 功能基因研究是生物科学研究的一大热点领域，分离和克隆基因并验证其功能，对于阐明基因的调控、作用方式等十分重要。
- 基因工程在细胞分化、胚胎发育、细胞识别、癌变产生、免疫机制、生物进化、形态建成、产量和品质的形成规律、生物与环境的信号识别等方面的研究中具有重要用途。

2. 利用基因工程改良植物

◆利用转基因技术改良植物已取得很大进展并在生产上应用。

➤1996年转基因作物在生产上使用。2003年转基因抗虫和抗除草剂的作物分别达到1000万和5000万公顷左右。美国的转基因棉花达到总播种面积的80%左右，全球的转基因棉花已达到50%的面积。

➤目前的转基因作物主要是转基因的大豆、玉米、油菜和棉花。种植区域主要分布在美洲。作物的抗逆、抗病、品质改良、风味的改变都将成为作物基因工程研究的重要方向。



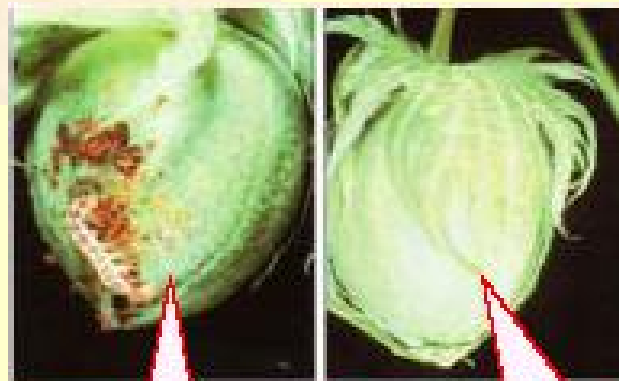
1996年全世界转基因植物种植面积为170万公顷，1997年为1100万公顷，1998年2780万公顷，1999年3990万公顷，2000年4420万公顷，2001年5260万公顷，2002年5000万公顷。

2001年种植面积>100万公顷的转基因作物：

大豆（3330万 hm^2 ，占全世界转基因作物的63%，均为抗除草剂大豆）、**玉米**（980万 hm^2 ，占19%）、**棉花**（680万 hm^2 ，占13%）、**油菜**（270万 hm^2 ，占5%）；

其它还有水稻、小麦、花生、向日葵、亚麻、甘蓝、马铃薯等，番茄、烟草、南瓜和木瓜等50多种转基因作物已培育成功。

主要分布在美国（3570万 hm^2 ）、阿根廷（1180万 hm^2 ）、加拿大（320万 hm^2 ）和中国（150万 hm^2 ）等国。



对照

转基因抗棉铃虫品种

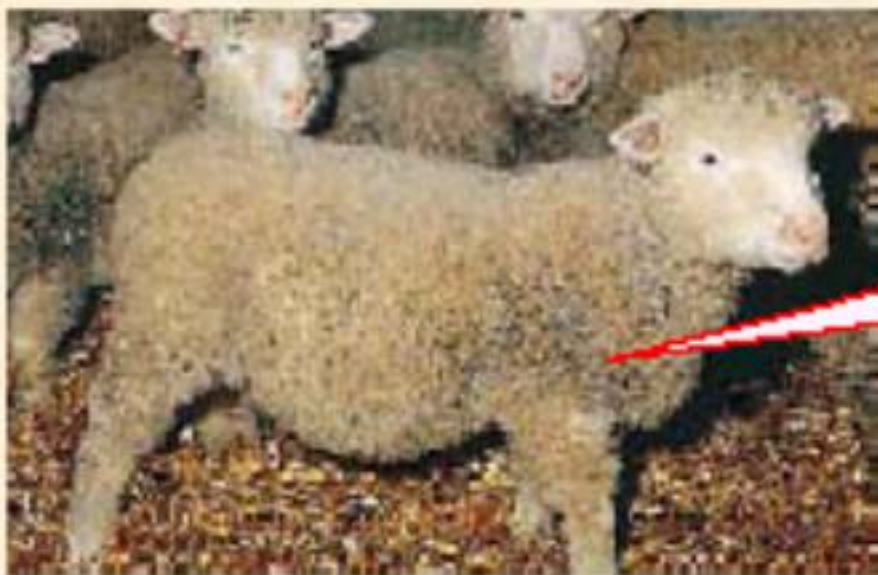
3. 利用基因工程改良动物

- 转基因动物比转基因植物的发展要缓慢些，这不仅涉及到技术问题，也涉及到伦理和宗教问题。
- 转基因动物通常是将目的基因构建到载体上，然后用微量注射法将重组**DNA**导入受体合子细胞核中，借助母体环境实现转基因动物生产。
- 转基因动物遇到的技术难题是动物体细胞再生并不像植物那么容易，而且动物的繁殖数量十分有限。克隆动物的成功（**1997**年克隆羊多利）和转基因鱼在生产上的应用是动物基因工程的典范示例。

◆将人的抗胰蛋白酶 α -1基因克隆在羊奶产生相关基因启动子的下游，这种启动子仅在乳腺细胞中表达。将这个嵌合基因注射到已授精的羊的合子中，再放植到母羊体内，产下的转基因羊发育正常。交配后产生的羊奶中含有大量有功能的人类抗胰蛋白酶(每升35克)，这一结果说明可利用家禽作为生物反应器，生产人类大量需要的重要蛋白质。

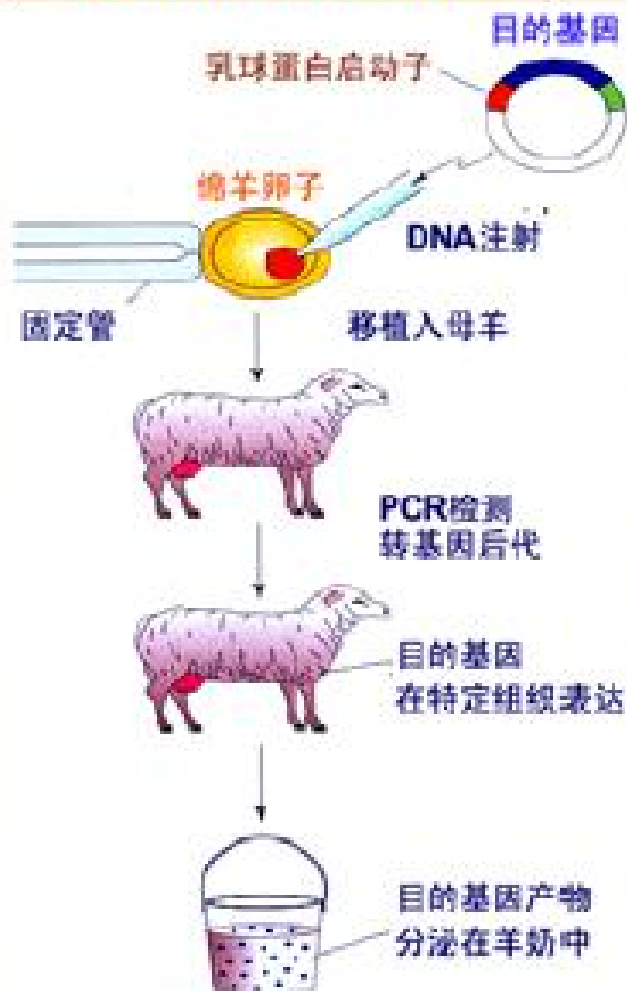
利用转基因羊→大量表达人类的**抗胰蛋白酶**。

可分泌人类生长**因子IX**的转基因羊“Polly”。



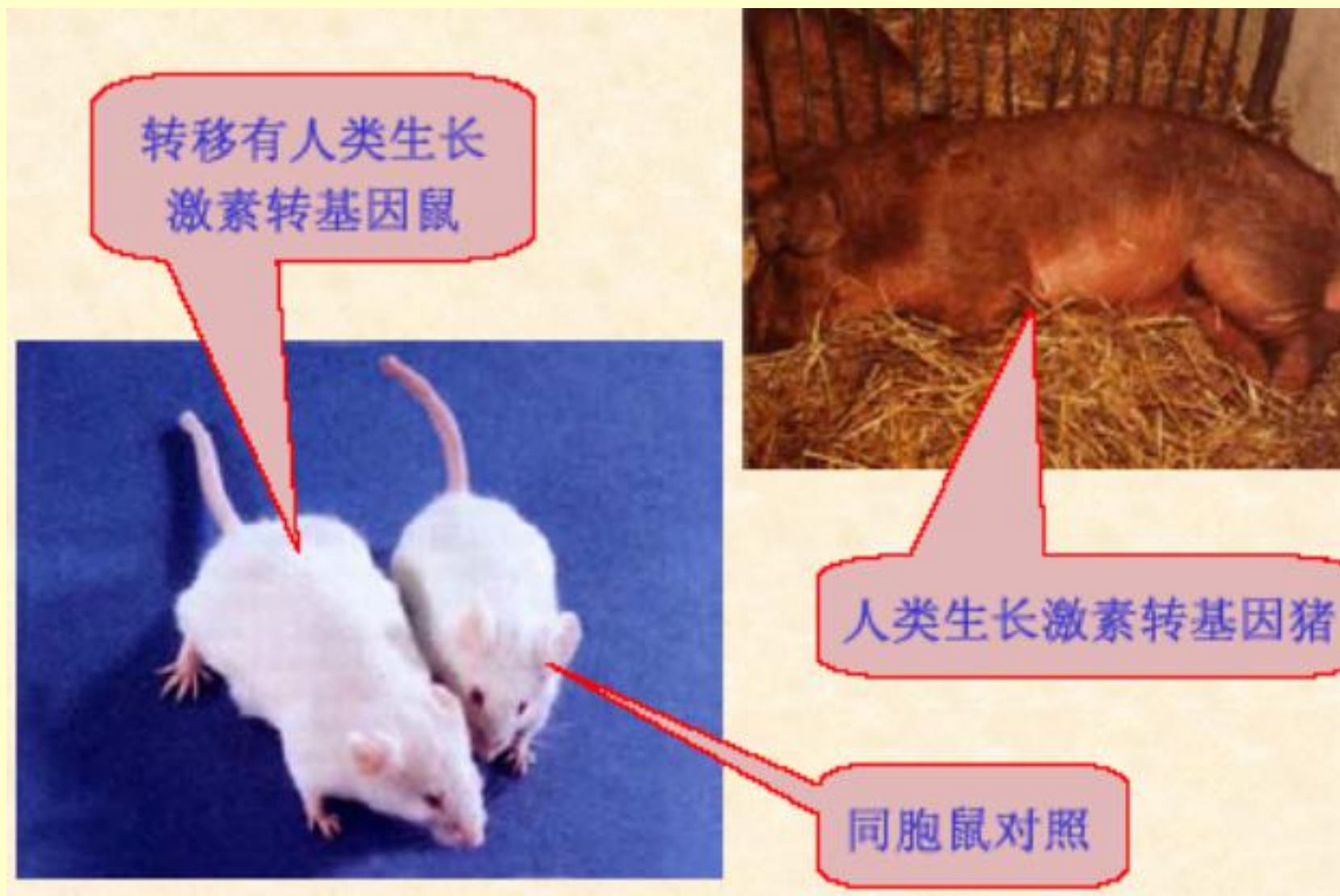
(Wilmot等,
Nature 385, 1997)

受精卵细胞注射法



Transplantation of nucleus of a fertilized egg into an unfertilized egg using a glass pipette

转基因牛：受精卵注射法



4. 基因工程工业

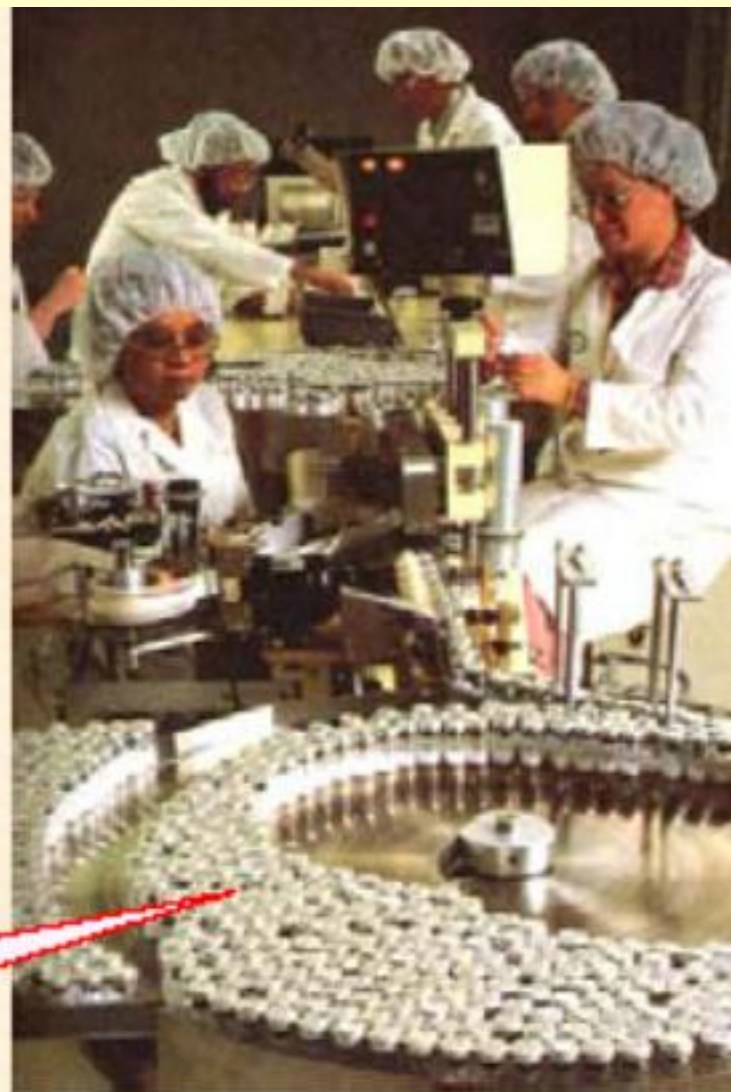
真正将基因工程工业在实际中应用，需要解决很多实际问题，如筛选宿主系统。细菌、真菌、植物、哺乳动物和昆虫细胞培养系统都可以成为合适的宿主系统。另外一个重要的问题就是克隆到所需要的基因和构建高效的表达载体。最后是产品的收集、纯化技术。

- 生产所需要的蛋白质。
- 花卉工业。改变花卉的花色或外观。
- 生物采矿、药物生产、工业原料生产方面。

现已在细菌中生产10多种
药品，例如表皮生长因子、人
生长激素因子、干扰素、乙型
肝炎工程疫苗等。

目前，**酵母菌、植物悬浮
细胞、植株和动物培养细胞**均
成功地应用于**表达**外源蛋白。

基因工程应用大肠杆菌
生产人类生长激素



◆在动物体内胰岛素是胰腺细胞先形成一种前体胰岛素，再加工成两条不同的成熟胰岛素原分子，A链含21个氨基酸残基，B链含30个氨基酸残基，经两对二硫键连接形成成熟的胰岛素。

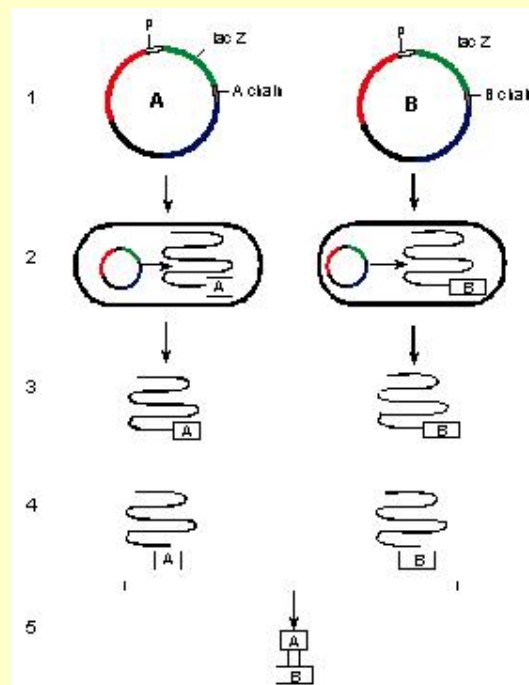


图 9-17 在细菌中产生胰岛素的方法

- 1、细菌表达质粒具有启动子 (P)， β -半乳糖苷酶基因(lacZ)与胰岛素链序列形成融合分子，质粒还带有抗生素抗性基因。A 和 B 质粒分别带有胰岛素的 A 或 B 链。
- 2、在细菌中分别诱导表达 β -半乳糖苷酶-胰岛素 A 链(或 B 链)融合蛋白；
- 3、纯化融合蛋白；
- 4、用溴化氰切割，得到纯化的胰岛素 A 链和 B 链；
- 5、将胰岛素 A、B 链混合，经二硫键连接形成有功能的胰岛素分子。

- 基因治疗（**gene therapy**）是利用功能基因或正常基因，通过生物技术手段，置换缺陷基因，从而达到矫正遗传疾病的目的。
- 遗传矫正途径：（1）是替代治疗，即用功能正常的基因替代缺陷基因；（2）靶标基因修复，即用分子工具修正基因组中的突变基因。
- 用重组**DNA**技术生产疫苗：用酵母生产的人乙型肝炎病毒疫苗是第一个真核细胞基因工程的商业化产品。我国采用哺乳动物表达系统和重组痘苗表达系统也进行了乙肝疫苗的研制，其免疫效果均可超过血源疫苗的效果。

5. 疾病诊断与基因治疗。

- 利用植物生产重组蛋白。包括抗体、疫苗、调节蛋白和酶等。**1988**年第一个利用烟草生产重组抗体获得成功。
- 利用植物生产药物具有如下优点：栽培费用低、产量高；从基因到蛋白所需用的时间相对较短；需要资金少；治疗风险小。

RFLP 法

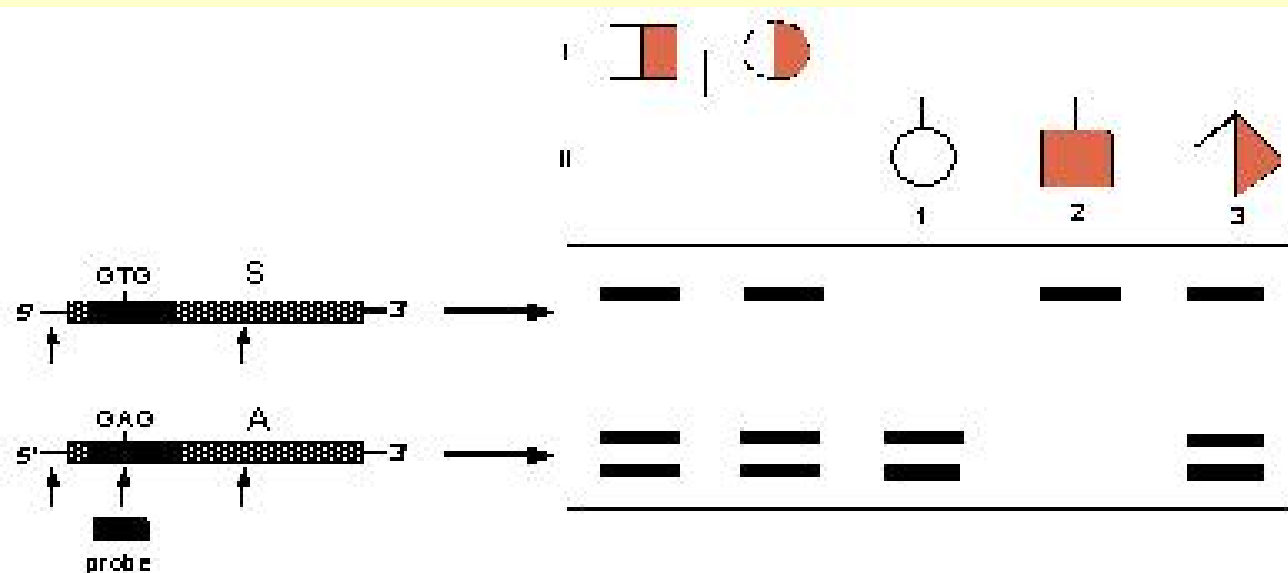


图 9-21 镰刀性贫血病的 RFLP 诊断

一个核苷酸突变(GAG-GTG)使限制性酶酶切点发生改变(A 为正常基因 β^A , S 为突变基因 β^S)。箭头处表示酶切位点。从 Southern 杂交结果即可知道这个家系各成员的遗传组成及表型。双亲(I)均为贫血病携带者(杂合),三个子代(II)中一个正常纯合,一个贫血病携带者(杂合),一个隐性突变基因纯合(患病)。粗线表示与 β -球蛋白基因杂交的探针(probe)

等位基因特异 寡核苷酸法

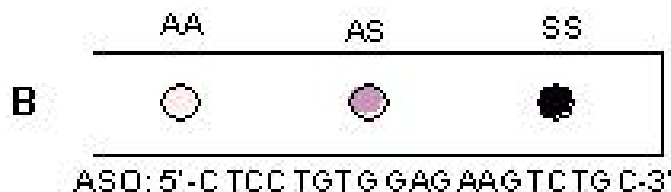
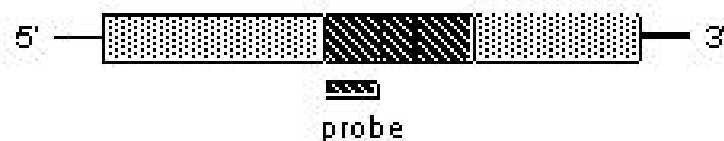
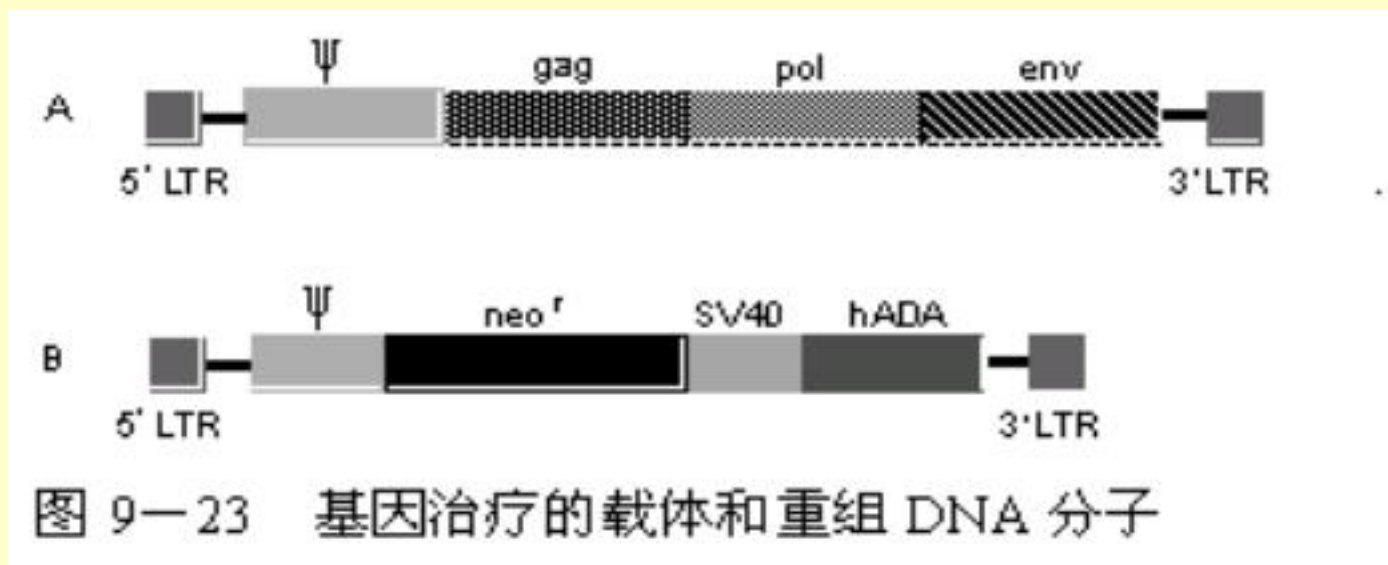


图 9—22 利用等位基因寡核苷酸法鉴定基因型
从血液细胞中提取 DNA 分别用正常及突变的 ASO 进行 PCR，杂交后的两种结果。

A、用正常基因(β^A)的 ASO 进行 PCR 时，三种基因的信号强度。

B、用突变基因(β^S)的 ASO 进行 PCR 时，三种基因的信号强度。

◆最常用的基因转移治疗方法是利用减毒的病毒DNA(retro virus DNA)作载体，构建重组DNA分子，用病毒包装物包装后形成的重组减毒病毒感染患者的细胞，将正常基因整合到染色体上。



6. 生物工程与环境保护。

- 生物治疗：利用微生物降解环境中的毒素和危险化合物。
- 废物处理：也是利用微生物降解废物，使之转化为二氧化碳和甲烷，后者可以用作生物能源燃料。
- 制作诊断工具：研制人类、动植物主要流行性疾病的早期探测试剂盒，做到疾病的早期预防和控制。
- 植物诊断：利用植物消除环境中的污染或使其转化为无害的物质。比如，利用某些植物吸收土壤中的重金属，可以缓解土壤中的重金属污染。利用生物工程技术生产工程菌，用作肥料，提高肥料的利用率，降低化学肥料使用量，从而降低肥料对地下水的污染

7. 安全性评价

- 人类对生物技术应用的安全性关注的方面包括是否会破坏环境，是否对人类健康有害，食品安全，以及宗教和伦理问题。
- 生物工程体的安全性评价是一个复杂的过程，包括生物工程体对生物群落的影响，对土壤动物和生物遗传多样性的影响，转基因通过花粉逃逸的问题，载体的安全性，食品的安全性等。
- 多个国家都对基因的安全性制定了相应的法规和判断标准。只有通过安全性评价的基因工程产品才允许投入生产。

本章重点

- 基因工程的一般步骤
- 限制酶和载体
- 基因分离（PCR）
- 转基因（southern）

作业