

## 一、基因工程的基本操作程序

### (一) 目的基因的筛选与获取

1. 目的基因：P76 用于改变受体细胞形状或获得预期表达产物等的基因就是目的基因。它主要是指编码蛋白质的基因。（有时是为了表达出 RNA，如表达反义 RNA 导致某基因沉默）

2. **筛选**合适的目的基因：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。

（Bt 抗虫蛋白只有在某类昆虫肠道的碱性环境中才能表现出毒性，而人和牲畜的胃液呈酸性，肠道细胞也没有特异性受体）

**获取**目的基因的方法：人工合成、PCR 扩增目的基因、构建基因文库

3. 提取 DNA P74 DNA 的粗提取与鉴定

(1) 提取原理：DNA 不溶于酒精、但某些蛋白质溶于酒精。

(2) 鉴定原理：在一定温度下，DNA 遇二苯胺试剂会呈现蓝色。

(3) 方法步骤：研磨（研磨液配方见附录）→4℃静置/离心取上清液→加入等体积预冷的 95%的酒精→取沉淀物→溶于 2mol/L 的 NaCl→加入二苯胺沸水浴加热（注意设置空白对照）

4. 利用 PCR 获取和扩增目的基因：

(1) PCR：聚合酶链式反应。它是一项根据 DNA 半保留复制的原理，在体外提供参与 DNA 复制的各种组分与反应条件，对目的基因的核苷酸序列进行大量复制的技术。

①**体内** DNA 复制需要的各种组分：模板、原料、引物（RNA 引物）、酶（解旋酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶等）

②体内 DNA 复制所处的温度：生物体温，一般不经历高温。

(2) PCR 需要提供的成分：模板（提取的 DNA 或逆转录出的 cDNA，不能扩增 RNA）、原料（dNTP）、两种引物、酶（耐高温的 DNA 聚合酶）、缓冲液（内含  $Mg^{2+}$ ）

(3) 引物：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，能与单链相应互补序列结合，使 DNA 聚合酶能够从引物的 3'端开始连接脱氧核苷酸。

引物的设计原则：一般是 20-30 个核苷酸的长度，不能太长也不能太短，太短会导致特性差出现非目标条带；引物之间不要出现互补现象，否则会形成引物二聚体；引物自身也不能有互补序列，否则折叠形成发夹结构；

引物各个元件的顺序：

5'-【保护碱基】【限制酶切位点】【功能元件（蛋白标签、调整融合蛋白间隔碱基数等等）】【与目的基因互补的序列】-3'

(4) P78、P84 PCR 反应过程：变性（ $\geq 90^{\circ}C$ ）、复性（ $50^{\circ}C$ 左右、取决于引物的长度和引物的 GC 含量）、延伸（ $72^{\circ}C$ 左右，延伸时间取决于目的基因长度）

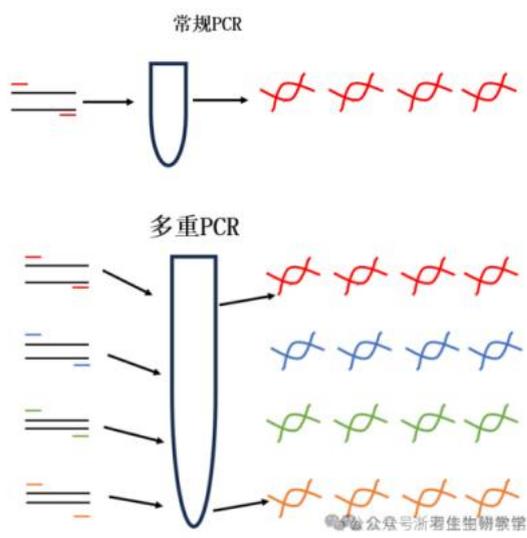
(5) PCR 结果：目的基因的量呈指数形式增长。

注意：第几个循环获得只含目的基因的片段，取决于引物的位置和引物添加序列的情况。

【易考点：特殊的 PCR】

a. **多重 PCR**：在同一 PCR 反应体系里加上二对以上引物，同时扩增出多

个核酸片段的 PCR 反应。用于病原体检测时，可用于同时检测多种病原体或鉴定出是哪一型病原体感染。检测病原体时选择其保守序列（如 16S rRNA）、毒力基因；分型研究选择有差异的保守序列；优势是可以同时检测多种基因。



b. **降落 PCR**：调整退火温度来提高扩增特异性的 PCR 优化策略。其原理是在最初的循环中设置一个比预计最佳退火温度高出几度的起始温度，然后在后续每个循环或每几个循环中，将退火温度逐步降低（如每循环降低  $1^{\circ}\text{C}$ ），直至达到一个较低的“着陆”温度。这种策略确保在最初高温阶段只有结合最紧密、最特异的引物才能与模板结合并扩增，从而优先富集特异性高的目标片段；即使后续温度降低，非特异性产物也因为起始浓度极低而无法被有效扩增。因此，该方法能显著减少非特异性条带和引物二聚体，尤其适用于复杂模板或引物设计不理想的情况。

题目：降落 PCR 能有效扩增一段特异性较高的 DNA 片段。常规 PCR 的退火温度固定在  $55^{\circ}\text{C}$ ，而降落 PCR 的前 10 个循环中退火温度从  $65^{\circ}\text{C}$

逐步降至 55℃，后续 25 个循环保持在 55℃。降落 PCR 的产物电泳结果显示单一明亮条带，而常规 PCR 出现多条非特异性条带。下列说法正确的是（ ）

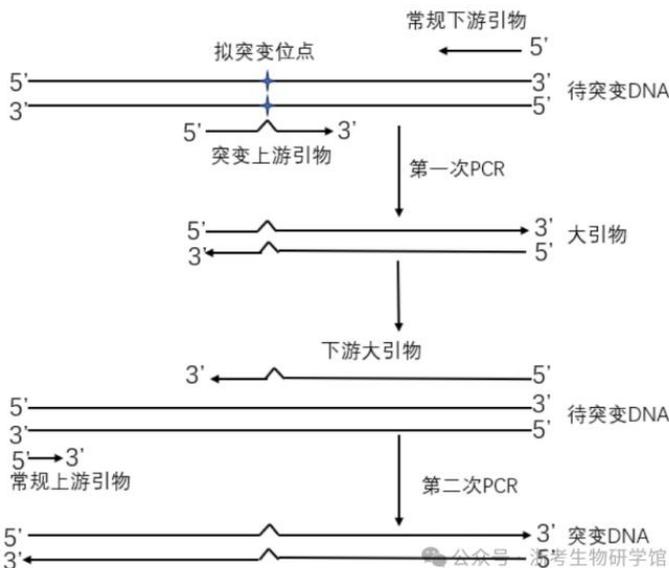
**A. 降落 PCR 初始退火提高了引物与模板的特异性结合，减少非配对产物的积累**

B. 常规 PCR 的退火温度过低，导致 DNA 变性不彻底，非特异性产物被优先扩增

C. 降落 PCR 的循环次数更多，DNA 聚合酶活性更高，因此产物量更大

D. 降落 PCR 的 35 个循环过程一共消耗引物的个数为  $2^{35}-2$

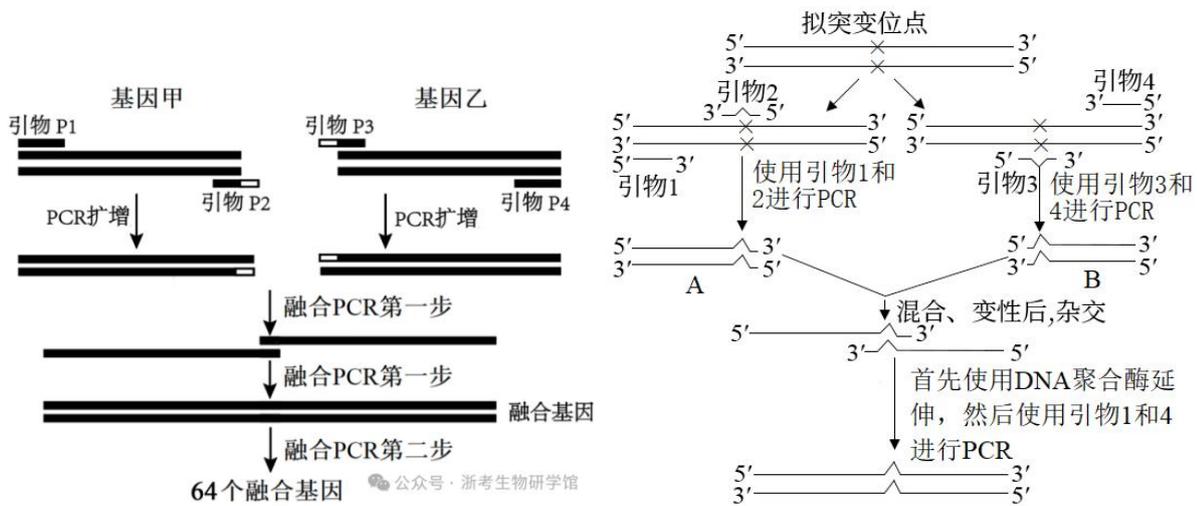
c. **大引物 PCR 技术**: 是一种在 PCR 反应中使用长引物来扩增目标序列的 PCR 技术，其实质就是第一轮的产品作为第二轮的引物。



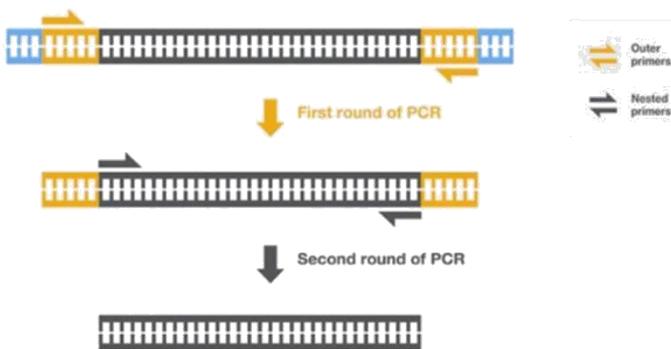
d. **重叠延伸 PCR/融合 PCR**

采用具有互补末端的引物，形成具有重叠链的 PCR 产物，通过 PCR 产物重叠链的延伸，从而将不同来源的任意 DNA 片段连接起来，这项技

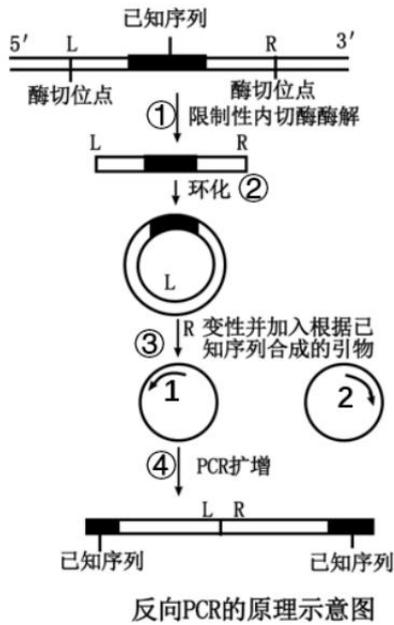
术称为融合 PCR。



e. **巢式 PCR**: 一种变异的聚合酶链式反应，使用两对（而非一对）PCR 引物扩增完整的片段。第一对 PCR 引物扩增片段和普通 PCR 相似。第二对引物称为巢式引物（因为它们第一次 PCR 扩增片段的内部）结合在第一次 PCR 产物内部，使得第二次 PCR 扩增片段短于第一次扩增。巢式 PCR 的好处在于，如果第一次扩增产生了错误片段，则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低。因此，巢式 PCR 的扩增非常特异。



f. **反向 PCR**: 以环状 DNA 为模板，通过已知序列设计引物，扩增已知序列两侧的未知序列的 PCR，被称为反向 PCR。



## g. 荧光定量 PCR

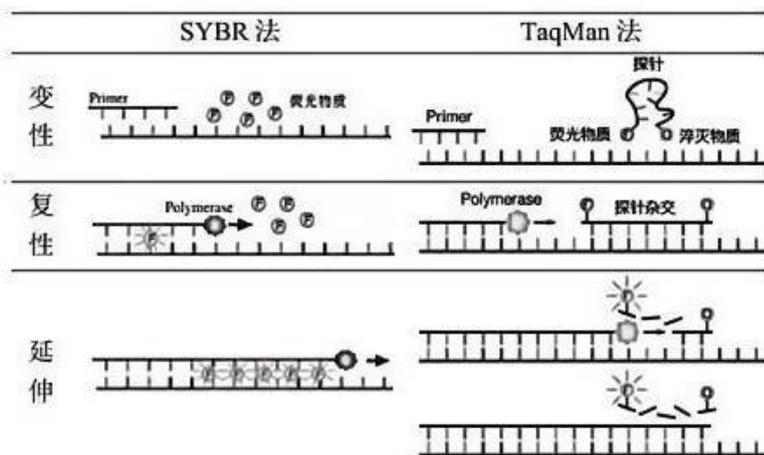
·用途：可用于监测 DNA 复制的数量，qPCR 可以与 RT-PCR 结合，对基因表达水平、RNA 病毒核酸进行检测

·原理：在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号变化实时监测整个进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。常用的有 TaqMan 法及 SYBR 法。

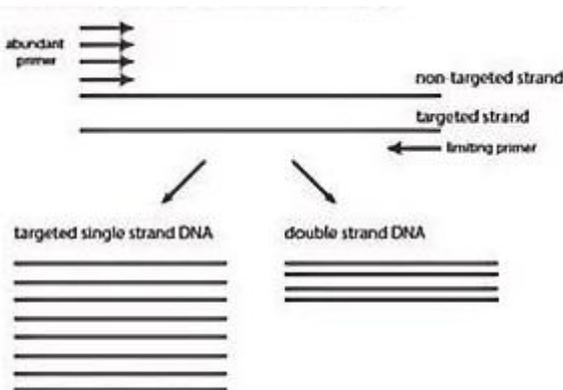
SYBR 法 (染料法)：在 PCR 反应体系中，加入过量 SYBR 荧光染料，SYBR 荧光染料非特异性地接入 DNA 双链后，发射荧光信号；而不掺入链中的 SYBR 染料分子不会发射任何荧光信号，从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。

TaqMan 法 (探针法)：TaqMan 探针是一种用于特异性识别靶序列的荧光探针，其结构包括一段与引物相似的核苷酸序列，并在其两端标记了报告荧光基团和淬灭荧光基团。当探针未被切割时，由于这两个基团的距离非常接近，报告荧光基团发出的荧光会被淬灭基团吸收，

因此检测不到荧光信号。随着 PCR 过程中扩增产物的积累，TaqMan 探针通过碱基互补配对原则特异性地结合到这些产物上。在 Taq 聚合酶的 5'-3'外切酶活性作用下，探针被切割，使得报告荧光基团与淬灭基团分离，释放出可检测的荧光信号。切割的荧光分子数目与 PCR 产物的数量成正比，因此可以通过荧光信号强度来定量 PCR 产物的数量。

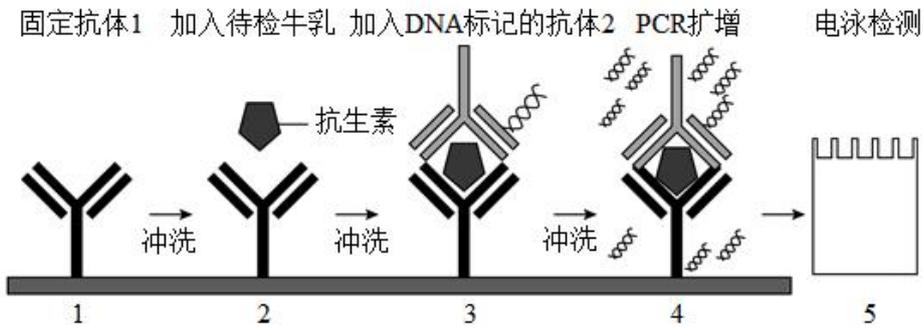


h. **不对称 PCR**: 采用不等量的一对引物，经若干次循环后，低浓度的引物被消耗尽，以后的循环只产生高浓度引物对应的延伸产物，结果产生大量的单链 DNA。可用于生产 DNA 探针。



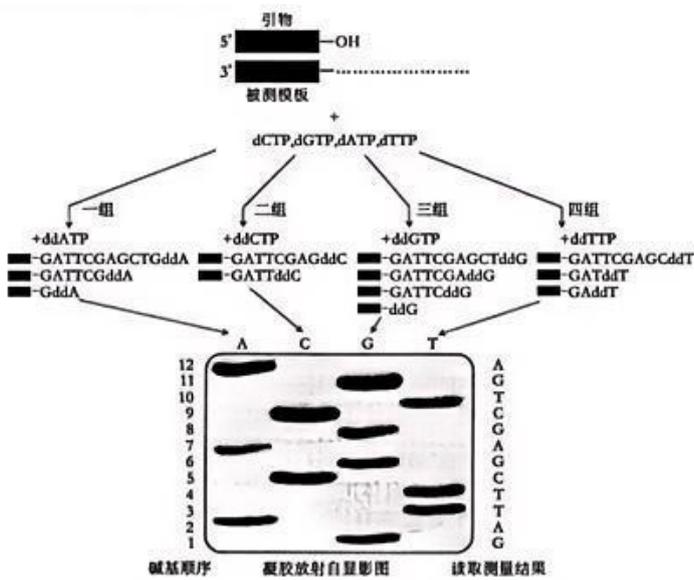
i. **免疫 PCR**: 是利用抗原抗体反应的特异性和 PCR 扩增反应的极高灵敏性而建立的一种微量抗原检测技术。

例：下图是利用该技术检测牛乳中微量抗生素的流程图。



### j. 桑格测序法 (利用 PCR 和电泳)

原理是利用 dNTP 和 ddNTP (在 3 号碳位置脱氧, 无法用于延伸 DNA 分子, 会使 DNA 复制终止) 做原料, 随机终止 DNA 的复制, 通过电泳技术分离长度不同的 DNA 分子读取序列信息, 优点是准确度高, 缺点是一次只能测量一个 DNA 序列, 流程复杂。



## 5. 电泳 P84

(1) 原理: DNA 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, 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。

(2) PCR 产物一般通过琼脂糖凝胶电泳来鉴定。DNA 分子迁移速率和凝胶浓度、DNA 分子的大小和构象有关。

(3) 观察：染色后可用紫外灯观察。

(4) 步骤：配制琼脂糖溶液→融化、加核酸染料→倒入模具插梳子→凝固后拔梳子放进电泳槽→加电泳缓冲液没过胶→混合 PCR 产物和凝胶载样缓冲液→加样、留一个孔加标准参照物→电泳→指示剂前沿接近凝胶边缘停止电泳→紫外灯观察照相。

## (二) 基因表达载体的构建——核心工作

### 1. 载体

(1) 种类：按来源来分——质粒载体、噬菌体载体、动植物病毒载体等

按用途来分——克隆载体（基因可稳定存在遗传）、基因表达载体（基因稳定存在、能够遗传、能够表达和发挥作用）等

(2) 元件：克隆载体需要含有复制原点、标记基因、限制酶切割位点；基因表达载体需要有复制原点、标记基因、限制酶切割位点、启动子、终止子。农杆菌表达载体还需要有 T-DNA 片段（整合到受体 DNA 上）。

①复制原点：保证载体能够在细胞中自我复制

②标记基因：便于重组 DNA 分子的筛选。常用标记基因有抗生素抗性基因、荧光蛋白基因等。

③启动子：RNA 聚合酶识别和结合的部位，驱动基因转录

启动子的类型：诱导型启动子、组成型启动子、组织特异性启动子

④终止子：使转录在所需要的地方停下来

⑤限制酶切割位点：供外源 DNA 片段插入其中

## 2. 限制酶切割载体和目的基因

(1) 限制酶：从原核生物中分离纯化出来的，能够识别双链 DNA 分子的特定核苷酸序列，使每一条链中特定部位的磷酸二酯键断开。大多数识别序列是 6 个核苷酸，也有 4 个、8 个或其他数量的核苷酸组成。大多识别序列是回文序列，即两条链 5'-3' 碱基排列顺序一致，但也有些限制酶的识别序列不是回文序列。

(2) DNA 切割出的末端形式：黏性末端、平末端

为了防止载体、目的基因自连和目的基因反向连接，保证目的基因正确插入载体中，可以采用切割出不同黏性末端的限制酶进行双酶切。

(3) 切割出相同黏性末端的限制酶称为同尾酶。

(4) 限制酶的切割效率不是 100%，处理后的载体溶液中可能含有未切开的空载体。

## 3. 连接目的基因和载体

(1) DNA 连接酶：能够将两个 DNA 片段连接起来的酶。

(2) 类型：*E.coli* DNA 连接酶、T4 DNA 连接酶。都能连接平末端和黏性末端，但 *E.coli* DNA 连接酶连接平末端 DNA 效率远远低于 T4 DNA 连接酶。

(3) 比较几种酶的作用对象和作用位点

	作用对象	作用位点	作用结果
--	------	------	------

限制酶	DNA 分子	磷酸二酯键	形成黏性末端或平末端
DNA 聚合酶	dNTP/脱氧核苷酸	磷酸二酯键	复制出新的 DNA 分子
DNA 连接酶	DNA 片段	磷酸二酯键	连接成完整的 DNA 分子
DNA 酶	DNA 分子	磷酸二酯键	形成脱氧核苷酸
解旋酶	DNA 分子	氢键	形成单链 DNA 分子

### (三) 将目的基因导入受体细胞

1. 目的基因导入大肠杆菌： $\text{Ca}^{2+}$ 处理大肠杆菌细胞，使细胞处于一种能吸收周围环境中 DNA 分子的生理状态（感受态），然后再将重组的基因表达载体导入其中。

2. 目的基因导入植物细胞：

(1) 花粉管通道法：操作方法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在植物授粉后一定时间内，剪去柱头，将 DNA 溶液滴在花柱切面，使目的基因通过花粉管通道进入胚囊。

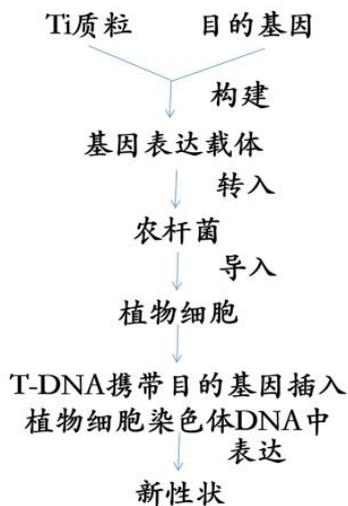
(2) 农杆菌转化法

①农杆菌：普遍存在于土壤中的一种微生物，它能在自然条件下侵染大多数双子叶植物和裸子植物，对大多数单子叶植物没有侵染能力。

②特点：侵染植物后，Ti 质粒上的 T-DNA 能整合到该细胞的染色

体 DNA 上。

③过程：根据受体植物不同，具体转化方法有所差别。可以侵染叶片，受体细胞为体细胞，筛选转化细胞再生成植株，可以花序直接浸没在菌液中，受体细胞为受精卵培养植株获得种子再进行筛选鉴定。筛选时必须选择 T-DNA 上具有的标记基因。



④变异类型：根据 T-DNA 插入的位置不同，结果不一样。如果插入基因间序列，引起基因重组。如果插入某个基因内部，则引起基因突变和基因重组。

(3) 目的基因导入动物细胞：显微注射法

(四) 目的基因的检测与鉴定

类型	检测内容	方法
分子水平的检测	受体细胞的染色体DNA上是否插入了目的基因	PCR等技术
	目的基因是否转录出了mRNA	
	目的基因是否翻译成蛋白质	抗原-抗体杂交技术
个体生物学水平的鉴定	个体是否具有相应性状	病原体接种实验等

【易考点】常见鉴定方法

A. DNA 分子杂交(Southern blot):利用放射性标记的 DNA 探针检测样品中的特定 DNA 分子

1.提取受体细胞 DNA，进行酶切

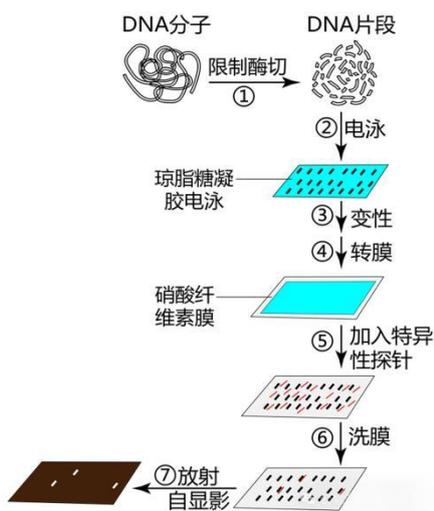
2.进行琼脂糖凝胶电泳

3.将电泳凝胶转移到硝酸纤维素膜上

4.将硝酸纤维素膜浸泡在含有用目的基因制成的荧光探针的溶液中，使探针与样品进行特异性碱基互补配对结合

5.将未结合的荧光探针洗去，检测荧光信号

结果：有杂交带的出现，就有目的基因



B. DNA-RNA 分子杂交(Northern blot):利用放射性标记的 DNA 探针，检测 RNA 样品中的特定 RNA 分子，具体操作过程和 Southern blot 类似。

C. 抗原-抗体杂交(蛋白印迹技术 Western blot)

从转基因个体中提取蛋白质，用相应的抗体进行抗原-抗体杂交，若出现杂交带，则目的基因成功翻译出蛋白质。

注意：转基因个体所提取的蛋白质作为抗原（被检测物）；人工制备

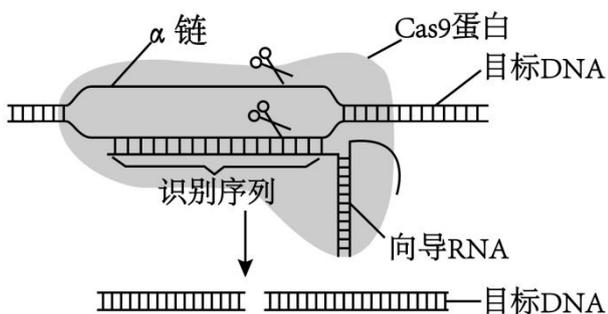
的特异性标记抗体作为抗体（检测工具）

#### D. 蓝白斑筛选法（P98）

### 【常见基因工程技术补充】

#### 1. CRISPR-Cas9 基因编辑技术

向导 RNA 能与基因组 DNA 中特定碱基序列通过碱基互补配对结合在一起，引导 Cas9 到特定的基因位点进行切割；通过设计向导 RNA 中的识别序列，可人为选择 DNA 上的目标位点进行切割。根据 CRISPR/Cas9 精准攻击外源 DNA 的工作原理，就可以实现基因敲除。如果在此基础上为细胞引入一个修复的模板质粒（供体 DNA 分子），就可以实现基因的定点突变或者基因敲入。



#### 2. 基因沉默技术

原理是小 RNA 分子与目的基因的 mRNA 结合形成双链结构，抑制 mRNA 翻译。可通过将目的基因反向连接入基因表达载体实现。

#### 3. 融合蛋白

##### (1) 蛋白定位研究

蛋白质在组织、细胞内的定位是细胞生物学和分子生物学研究的核心问题，因为了解其定位才有可能了解其生物学功能。

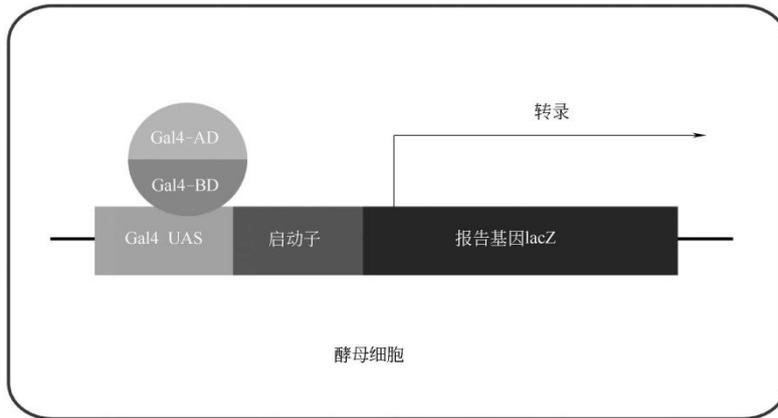
使用目标基因的启动子，将目标蛋白的编码序列与 GFP 等荧光蛋白序列共表达形成融合蛋白，在激发光照射后发出荧光，通过荧光显微镜就可以观察 GFP 在组织或亚细胞结构中的分布，从而确定目标蛋白的定位，还可以通过不同条件下荧光的亮度变化来初步判断基因的表达量变化。

## (2) 蛋白互作研究

将某个结构、功能已知且能体现某种特殊表型的蛋白质的结构域拆分开，分别作为标签蛋白连接在两个目标蛋白上形成融合蛋白，可以观察两个目标蛋白之间是否存在互作。因为目标蛋白互作时必然伴随着空间上的互相靠近，那么被拆分开的标签蛋白结构域会互相接近而形成完整的蛋白质或者一起发挥作用，从而表现出某种特殊的现象。基于这个原理衍生出了很多相关的技术：

### ① 酵母双杂交

酵母双杂交利用的是酵母的转录因子 Gal4, Gal4 有两个功能结构域：DNA 结合结构域 (BD) 和转录激活结构域 (AD)。BD 结构域负责 Gal4 蛋白与基因上游激活序列 UAS 的结合，AD 结构域负责 Gal4 蛋白激活 UAS 下游靶基因转录。两个结构域缺一不可，否则 Gal4 都会失去作用。Gal4 控制下的基因有很多，在这里我们选择的是 *LacZ*，它是人教版课本介绍过的一种标记基因，其表达的产物  $\beta$ -半乳糖苷酶能够将无色化合物 X-gal (也缩写为 BCIG, 5-溴-4-氯-3-吲哚基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷) 分解成半乳糖和深蓝色的物质 5-溴-4-靛蓝，使菌落呈现蓝色。



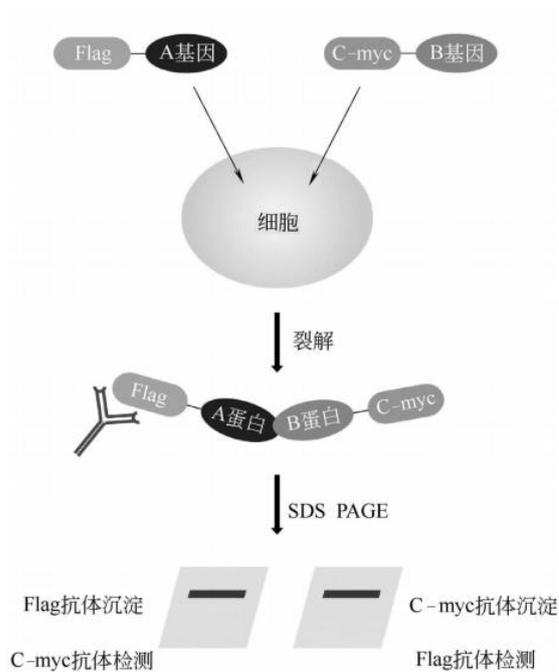
构建酵母双杂交系统时，将 BD 结构域序列与一个功能已知的蛋白 X 序列连接并共表达形成融合蛋白 Gal4BD-蛋白 X。再将 AD 结构域序列和待检测的蛋白 Y 序列共表达形成融合蛋白 Gal4AD-蛋白 Y。若在酵母细胞内蛋白 X 和蛋白 Y 存在互作，则会形成 Gal4BD 结构域-蛋白 X-蛋白 Y-Gal4AD 结构域的复合体，BD 和 AD 分别发挥作用，启动报告基因的表达。也就是说菌落若呈现蓝色，说明两种蛋白质存在相互作用，若菌落呈现白色，则两种蛋白质不存在相互作用。这和教材上蓝白斑筛选实验中 *LacZ* 作为标记基因的例子恰好是相反的。

**酵母双杂交系统除了可以确定待测蛋白与已知蛋白的相互作用以外，还可以筛选和发现新的相互作用蛋白。** 如果对于目的蛋白的互作蛋白毫无头绪，可以通过筛文库的方式来找到它的互作蛋白。将目的蛋白和 BD 序列构建成融合蛋白称作诱饵蛋白，将 cDNA 文库和 AD 构建融合蛋白称作文库蛋白。因为 cDNA 文库中有上万种以上的 cDNA，所以转化出的酵母细胞也有上万种，将诱饵蛋白表达载体分别转入这些酵母，将蓝色菌落里的质粒 DNA 提出来进行测序鉴定，就能知道是哪些 cDNA 的产物与诱饵蛋白相互作用，筛选出互作蛋白质。

## ②免疫共沉淀 CO-IP

免疫共沉淀是以抗体和抗原之间的专一性反应为基础研究两种蛋白质在完整细胞内生理活性状态下相互作用的方法。CO-IP 的基本原理是：当细胞在非变性条件下被裂解时，完整细胞内存在的许多蛋白质-蛋白质间的相互作用被保留了下来。如果用蛋白质 A 的抗体免疫沉淀 A 蛋白，那么与 A 蛋白在体内结合的蛋白质 B 也能被沉淀下来。通过 SDS-PAGE 电泳分离细胞蛋白提取物，再通过 B 蛋白质的特异标记抗体检测，应该能够检测到 A 和 B 两种蛋白结合的带。同理，如果用 B 蛋白的抗体去免疫沉淀 B 蛋白质，那么与 B 蛋白结合的 A 蛋白也被沉淀下来，用 A 蛋白标记的抗体也可以显示这一条蛋白复合物的带。

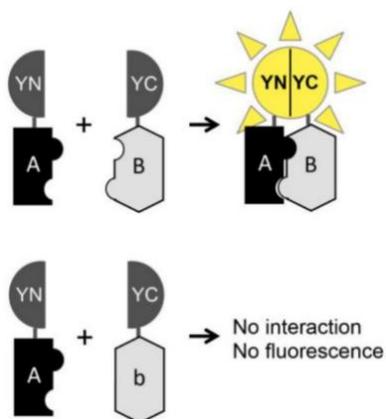
但有时蛋白的特异性抗体不容易获得，时间长成本高，那么可以分别构建蛋白 A、B 的融合蛋白。比如 A 基因与与 Flag 标签相连，B 基因与 C-myc 标签相连，共转染细胞后让两个融合蛋白表达。一定时间后，裂解细胞，用 Flag 抗体去沉淀 A 蛋白，如果 A、B 蛋白有互作，那么 B 蛋白也被沉淀下来，进行 SDS-PAGE 后，用标记的 C-myc 的抗体去检测，应该能检测到复合物的带。但是如果 A 基因或 B 基因载体单独转染细胞，将不会出现阳性结果。



### ③双分子荧光互补

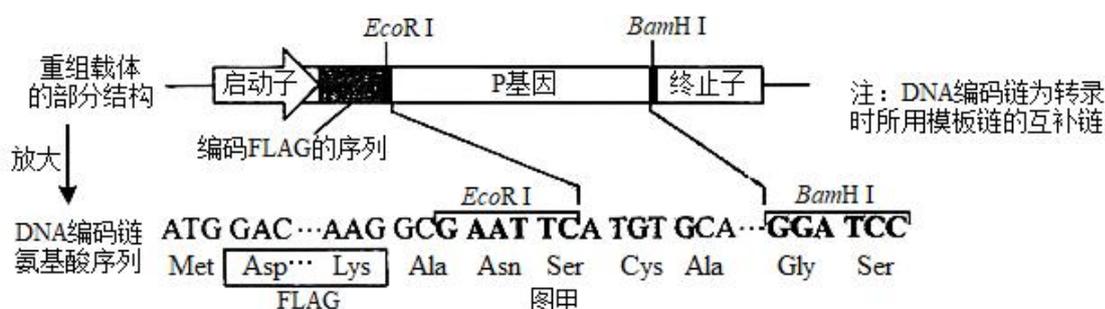
双分子荧光互补 (BiFC) 可以在荧光显微镜下直接观察活细胞中两个蛋白质之间的互作。

双分子荧光互补技术的基本原理是将荧光蛋白在某些特定的位点切开分成两个不具有荧光活性的分子片段，再分别与目标蛋白 A、B 连接，如果蛋白 A 和 B 发生相互作用而靠近，荧光蛋白的两个分子片段在空间上被拉近，重新构建成完整的具有活性的荧光蛋白而发出荧光。



(3) 构建时注意的问题:

① **移码突变问题**。无论是标签蛋白基因在上游还是目的蛋白基因在上游，转录出的 mRNA 上的起始密码子必须是完整的，上游蛋白不存在移码突变的问题，但下游的蛋白可能存在移码突变的问题。2022 年山东生物等级考就考察了相关情境，FLAG 标签基因位于上游，翻译出的融合蛋白中 P 基因对应的氨基酸序列与 P 不同。解决方案也非常简单，如果目的基因在上游，可以对下游引物添加碱基；如果目的基因在下游，则可以目的基因的上游引物中添加碱基。



② **终止密码子问题**。如果表达载体的结构是“启动子-标签蛋白基因-目的基因”类型，载体上的标签蛋白一般是带有起始密码子但不带终止密码子对应序列的。目的基因带有的终止密码子对应序列可以保证表达的正确。如果表达载体的结构是“启动子-目的基因-标签蛋白基因”，则要特别注意，目的基因克隆的时候必须带有起始密码子对应序列，一定不能带有终止密码子对应序列，否则标签蛋白无法表达。