1.2 基因工程的基本操作程序

基因工程基本操作的四个环节

1、目的基因的获取

有了目的基因，我们才干赋予一种生物以另一种生物的遗传特性。

2、基因体现载体的构建

使目的基因在受体细胞中稳定存在，并可进行遗传、体现和发挥作用

3、目的基因导入受体细胞

载体进入受体细胞稳定体现，才干实现一种生物的基因在另一种生物中的转化。

4、目的基因的检测与鉴定

才干拟定目的基因与否真正在受体细胞中稳定遗传和对的体现。

一、目的基因的获取

1

目的基因主要是编码蛋白质的基因：

如：与生物抗性相关的基因、与优良品质相关的基因、与生物药物和保健品相关的基因、与毒物降解相关的基因、与工业用酶相关的基因、具调控作用的因子等。

2

获取目的基因的常用方法：

1、从基因文库中获取

2、利用PCR技术扩增

3、人工合成

1. 从基因文库中获取目的基因

1. 基因文库的概念:

将含有某种生物不同基因的许多DNA片断，导入到受体菌的群体中，各个受体菌分别含有这种生物的不同基因。

2. 基因文库的种类:

- 基因组文库：含有一种生物的全部基因
- 部分基因文库：只包含了一种生物的部分基因，如：cDNA文库

基因组DNA文库与cDNA文库

某生物体内全部DNA

↓ 限制酶

许多DNA片段

↓ 与运载体连接导入

受体菌群体

基因组文库

某种生物某个时期的mRNA

↓ 反转录

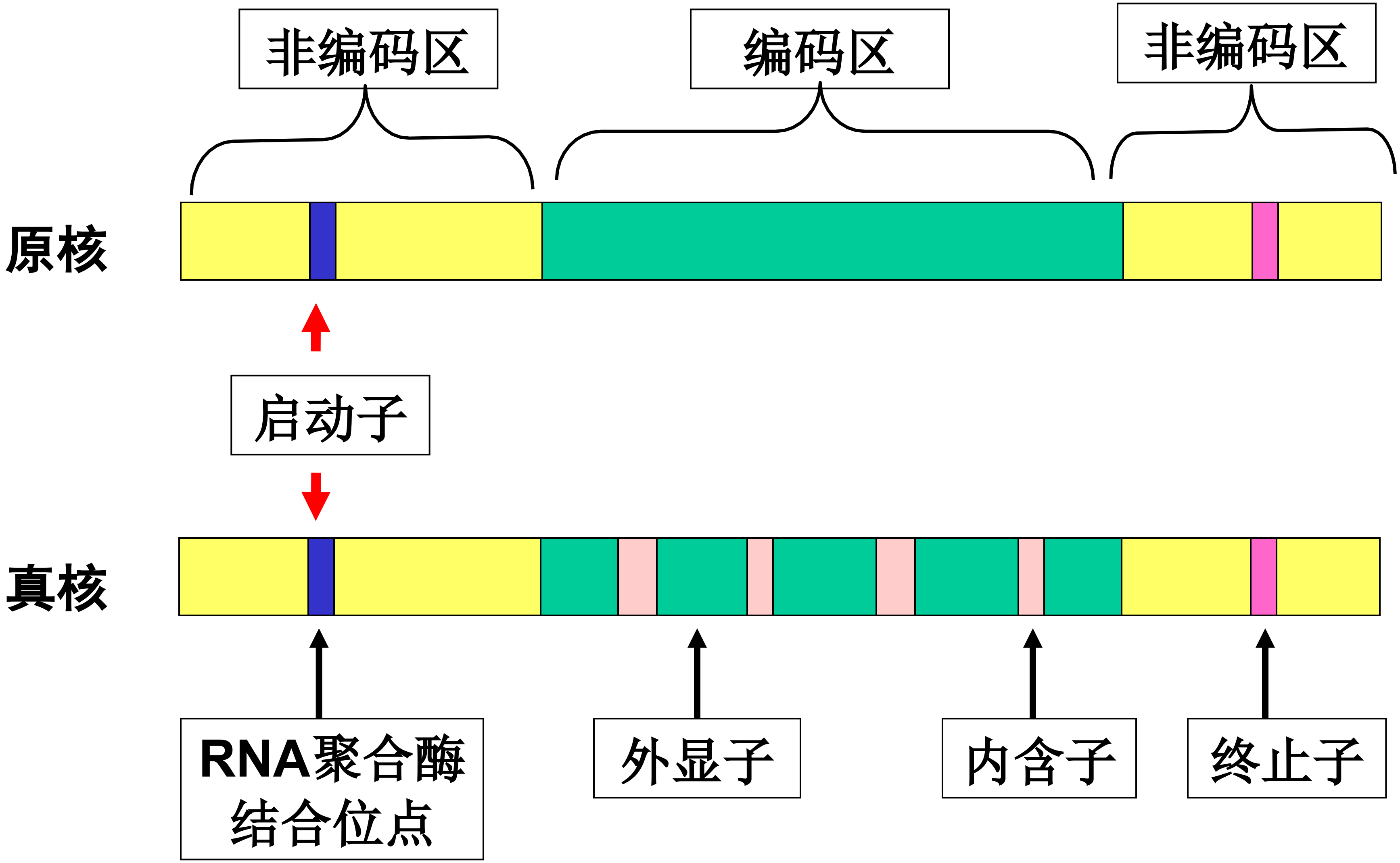
cDNA

↓ 与运载体连接导入

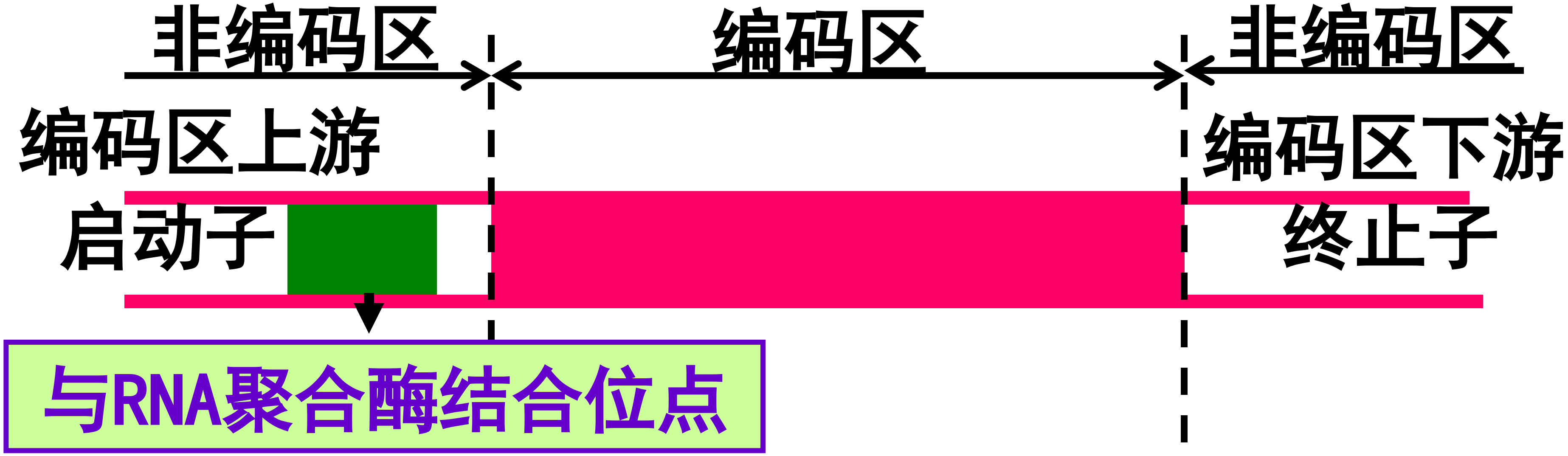
受体菌群体

cDNA文库

基因的构造



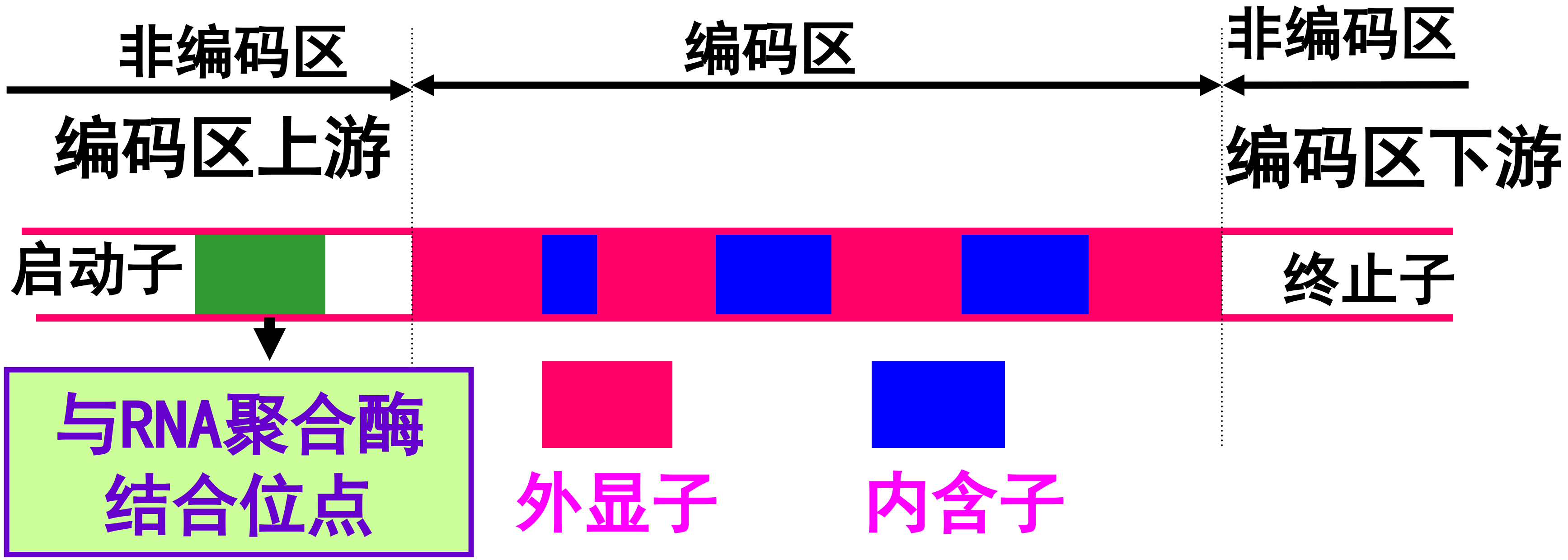
原核细胞的基因构造



基因构造

- 编码区：编码蛋白质，持续不间断
- 非编码区
  - ①不编码蛋白质。
  - ②调控遗传信息体现，上游的RNA聚合酶结合位点：

真核细胞的基因构造



基因构造

- 编码区
  - 外显子：能编码蛋白质的序列
  - 内含子：不能编码蛋白质的序列
- 非编码区：有调控作用，上游有RNA聚合酶结合位点（启动子）。

原核细胞与真核细胞的基因构造比较

	原核细胞	真核细胞
不同点	编码区是持续的，边转录边翻译	编码区是间隔的、不持续的，先转录后翻译
相同点	都由能够编码蛋白质的编码区和具有调控作用的非编码区组成的	

基因文库的构建办法

① 基因组文库的构建

提取某种生物的**全部DNA**

用适宜的限制酶酶切

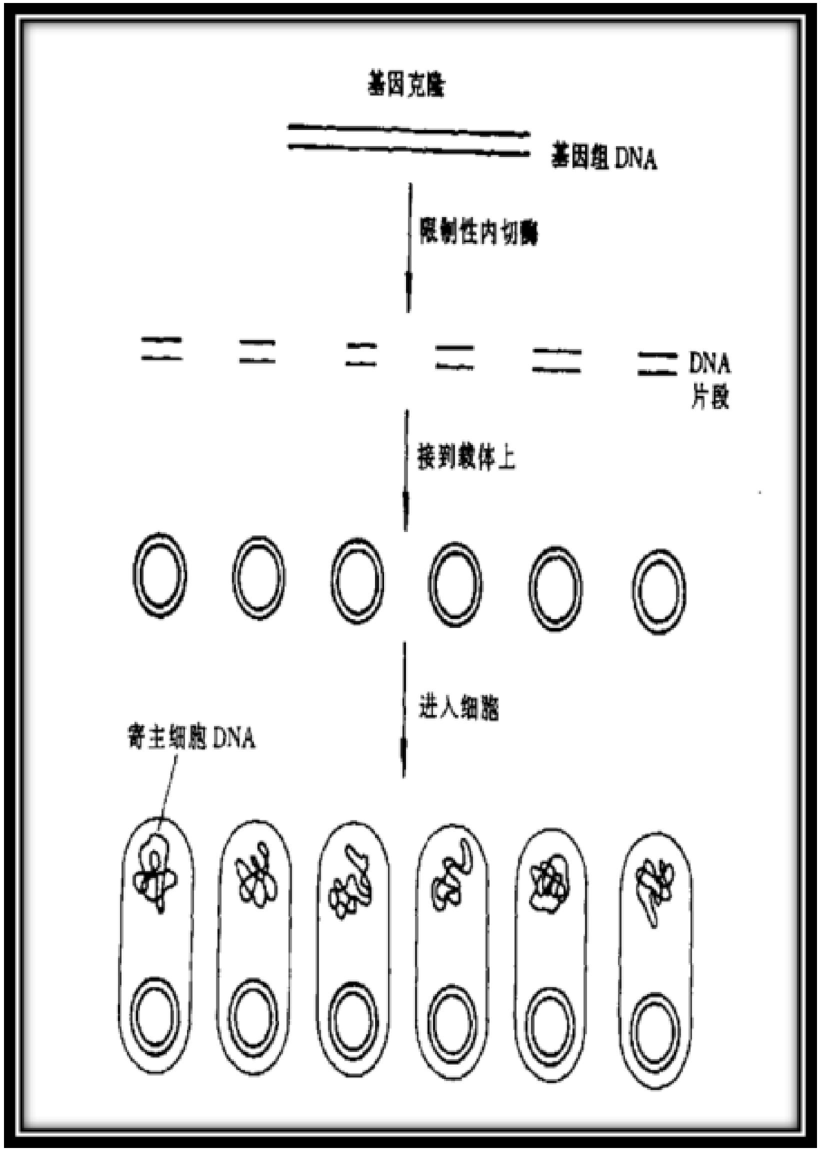
一定大小的DNA片段

将DNA片段与载体连接

重组载体

导入受体菌中储存

基因组文库



② cDNA文库的构建------逆转录法：

提取某种生物的某器官或特定发育时期的mRNA

↓ 反（逆）转录酶

单链DNA

↓ DNA聚合酶

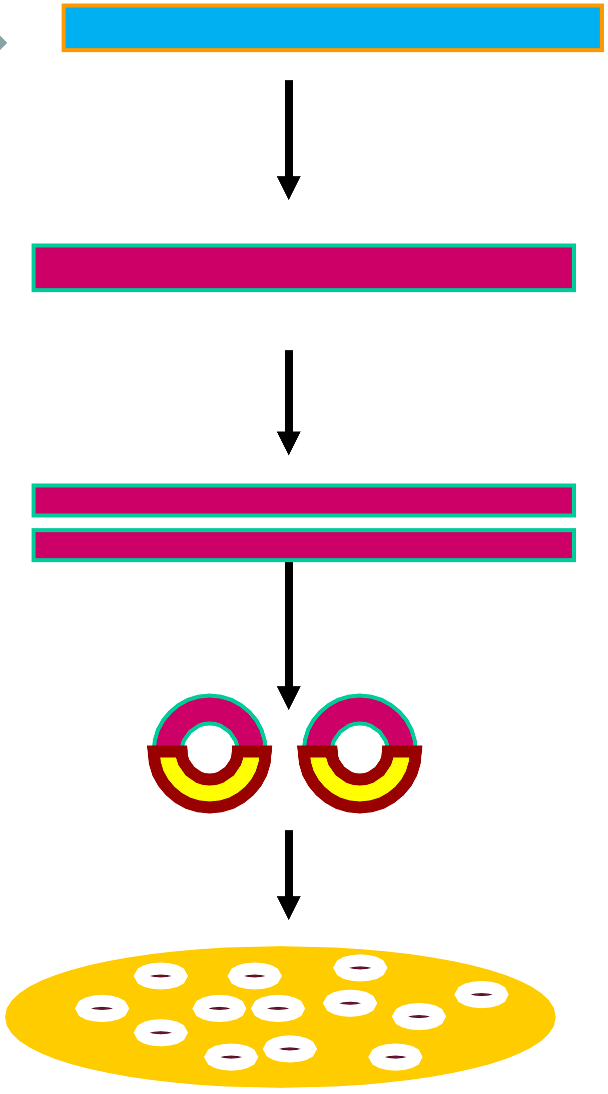
双链cDNA片段

↓ 与载体连接

重组载体

↓ 导入受体菌中储存

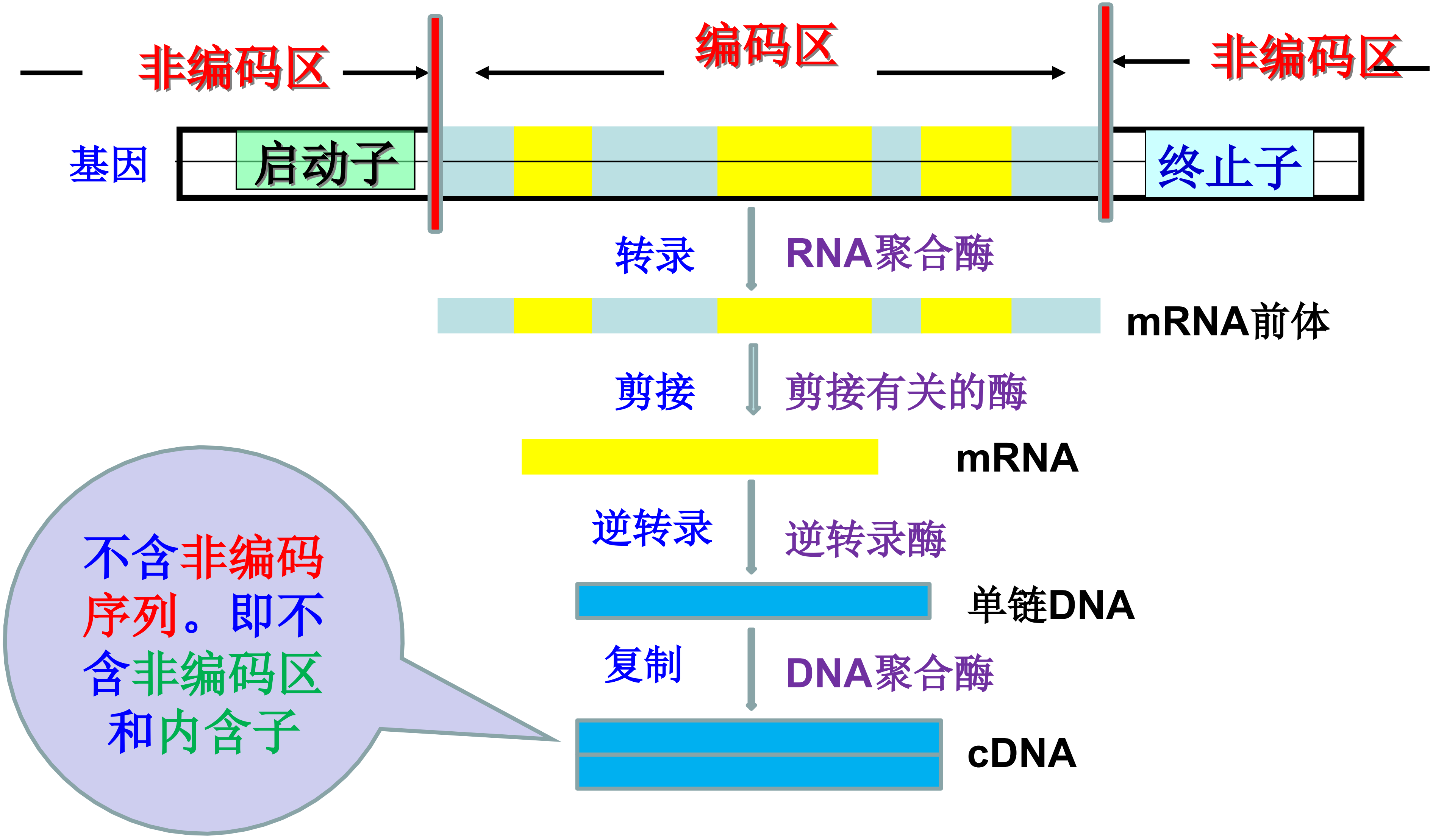
cDNA文库



思考?

真核生物的基因用逆转录法得到的cDNA与原基因相似吗？

真核细胞的cDNA的获取



基因组DNA文库与cDNA文库的比较

文库类型	cDNA文库	基因组文库
文库大小	小	大
基因中启动子（具有启动作用的DNA片段）	无	有
基因中内含子(位于编码蛋白质序列的非编码DNA片段）	无	有
基因多少	某种生物的部分基因	某种生物的全部基因
物种间的基因交流	能够	部分基因能够

2.运用PCR技术扩增目的基因

1 概念：

PCR全称为多聚酶链式反映，是一项在生物体外复制特定DNA片段的核酸合成技术。

2 原理：DNA复制

原料：模板DNA；DNA引物；四种脱氧核苷酸；热稳定DNA聚合酶

3 前提：

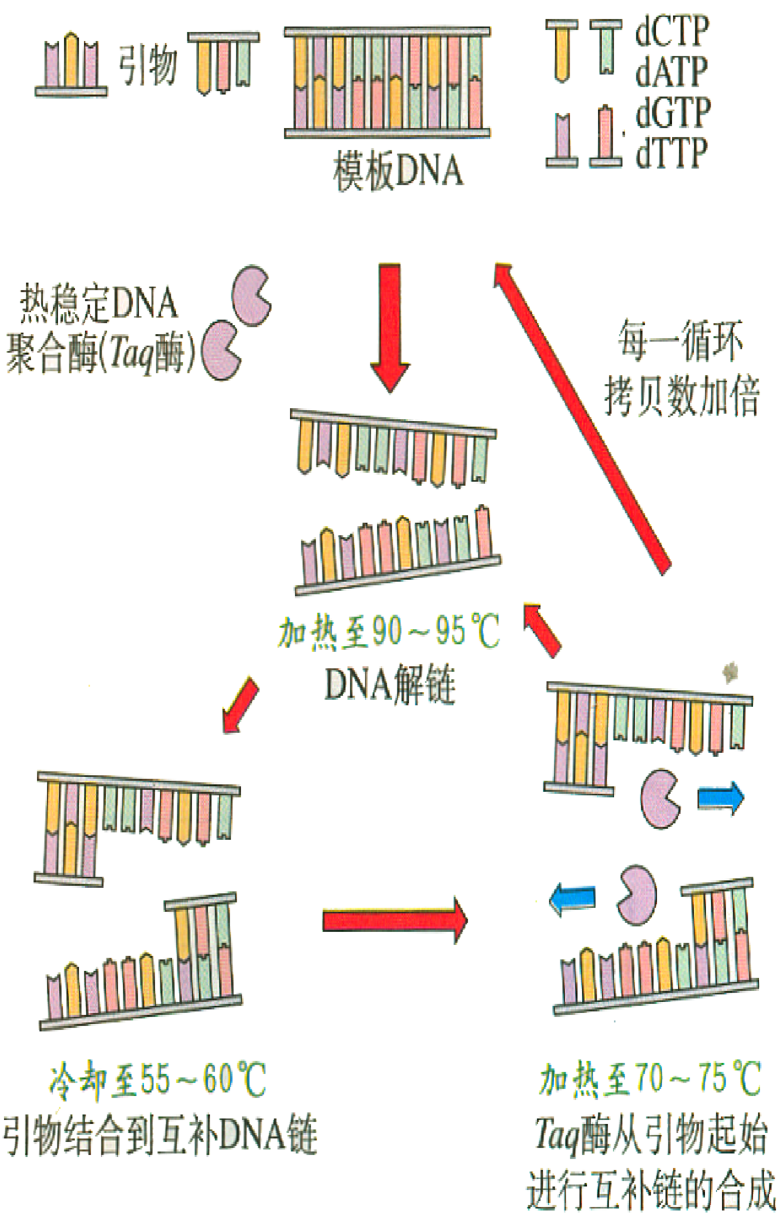
已知目的基因的一段核苷酸序列

a、DNA变性（90℃-95℃）：双链DNA模板在热作用下，氢键断裂，形成单链DNA

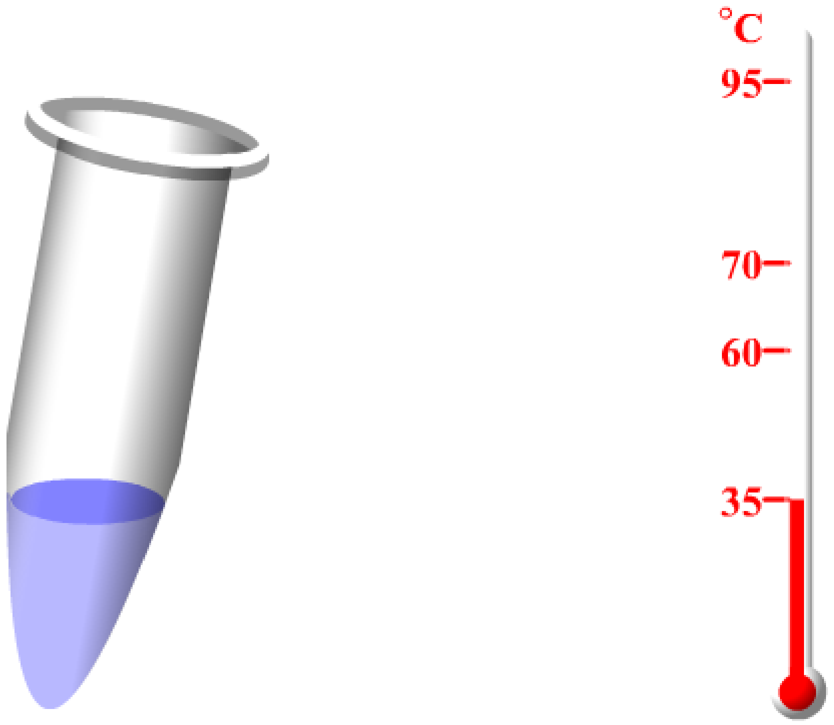
b、退火（复性55℃-65℃）：系统温度减少，引物与DNA模板结合，形成局部双链。

c、延伸（70℃-75℃）：在Taq酶的作用下，合成与模板互补的DNA链。

d. 重复a. b. c环节：每重复一次，目的基因增加一倍

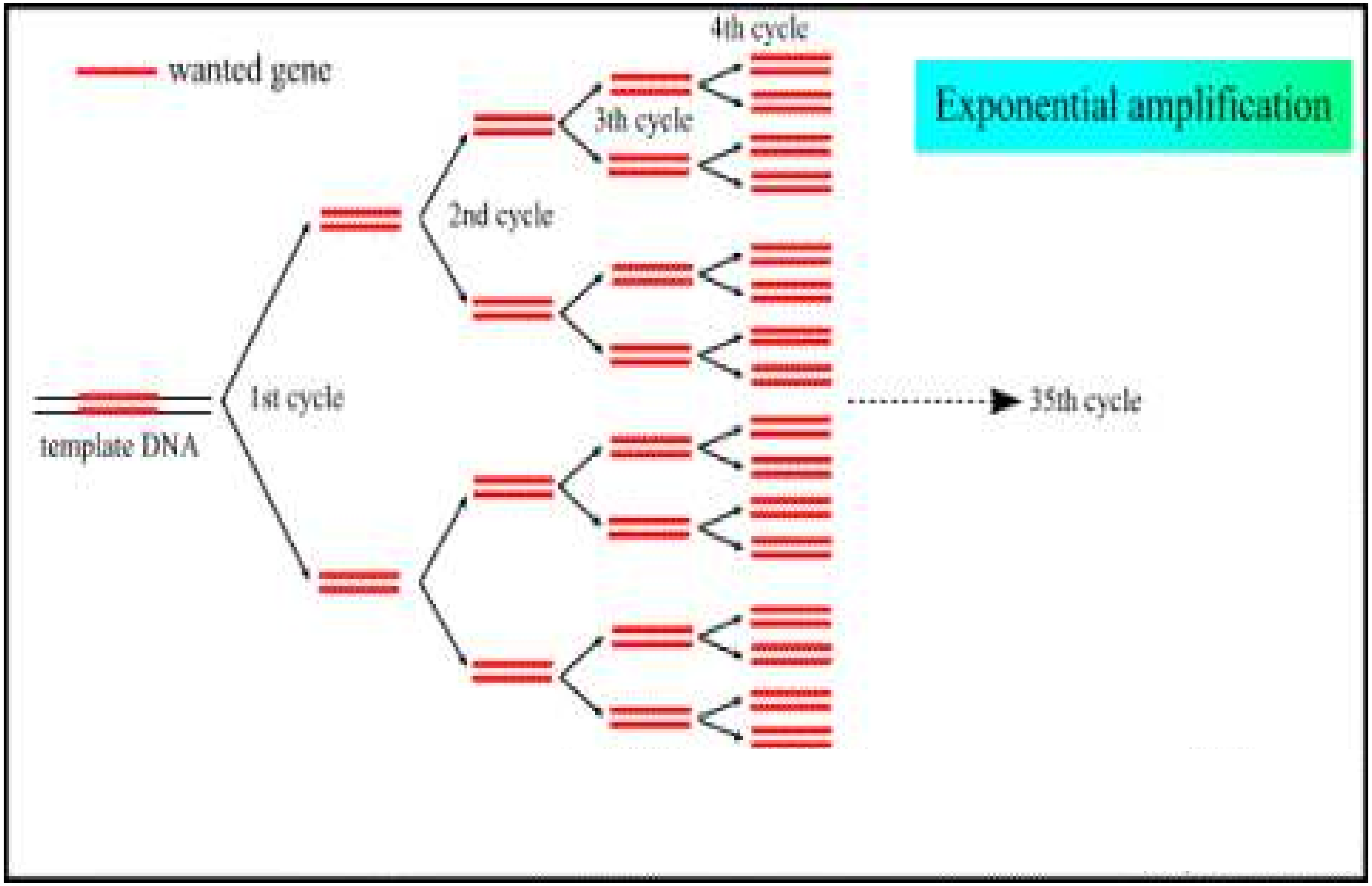


PCR技术的操作过程



聚合酵素連鎖反應(Polymerase chain reaction) ，
是一種快速的DNA複製方法

PCR技术的操作过程



PCR反映体系中目的基因成指数(2n)形式扩增

PCR技术扩增与DNA复制的比较

	DNA复制	PCR技术
场所	重要在细胞核内	体外复制
原理	碱基互补配对原则	碱基互补配对原则
条件	四种脱氧核苷酸、模板、酶、ATP	四种脱氧核苷酸、模板、酶、引物
解旋方式	解旋酶催化解旋	DNA在高温下变性解旋
酶	细胞内的DNA聚合酶、解旋酶等	热稳定的DNA聚合酶
特点	半保存复制、边解旋边复制	半保存复制、全解旋再复制
结果	形成整个DNA分子	大量的DNA片段

3. 人工合成法

在基因较小，核苷酸序列已知的状况下，能够运用

DNA合成仪人工合成

蛋白质的氨基酸序列

↓ 推测

mRNA的核苷酸序列

↓ 推测

基因的核苷酸序列

↓ 化学合成

目的基因

思考： 化学法合成的目的基因含内含子、启动子和终止子吗？

人工合成法（真核生物）

反转录法

目的基因的信使RNA

↓

单链DNA

↓ 合成

目的基因

化学合成法

肽链氨基酸序列

↓ 推测

信使RNA序列

↓ 推测

基因的核苷酸序列

↓ 合成

目的基因

课堂小结

目的基因的获取

1、从基因文库中获取

种类

- 基因组文库：含有一种生物的全部基因
- 部分基因文库：只包含了一种生物的部分基因，如：cDNA文库

2、运用PCR技术扩增

3、人工合成

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/055020300232011334