

第2节

基因工程的基本操作程序



✓ 学习目标

1. 阐明基因工程的原理和基本操作程序。
2. 针对人类生产或生活中的某一需求，选取适当的基因工程的技术和方法，尝试设计获得某一转基因产品的方案。
3. 尝试进行PCR的基本操作并用电泳鉴定PCR的产物



一、目的基因的获取

1、目的基因主要是指编码蛋白质的基因

例如，与生物抗逆性、优良品质、生产药物、毒物降解和工业用酶等相关的基因等。

2、获取目的基因的常用方法有哪些？

(一) 人工合成 (DNA合成仪)

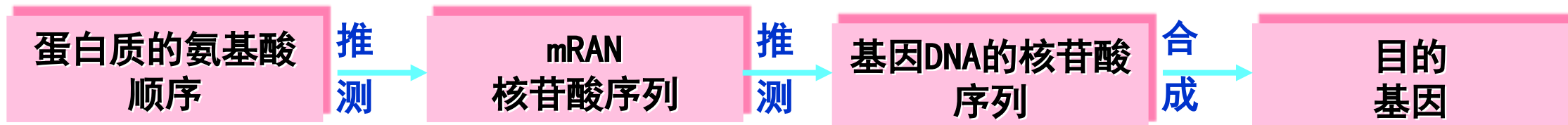
(二) 利用PCR技术扩增

(三) 从基因文库中获取



(一) 通过DNA合成仪用化学方法人工合成

当**基因比较小**、蛋白质的**氨基酸序列可以测得**或**核苷酸序列已知**时，可采用此种方法。



DNA合成仪



(二) 利用PCR获取和扩增目的基因 (常用)

1、概念：PCR全称为聚合酶链式反应，是一项在生物体外复制特定DNA片段的核酸合成技术

通过这项技术可在短时间内大量扩增目的基因。
整个过程是在体外进行，故又叫做体外DNA扩增技术。

2、PCR利用的原理是什么？

DNA复制

3、方式：以指数方式扩增，即 2^n (n为扩增循环的次数)



4、前提：有一段已知目的基因的核苷酸序列，以便根据这一序列合成引物。

5、条件：

(1) DNA模板(需含有目的基因)

(2) 4 种脱氧核苷酸(dNTP)

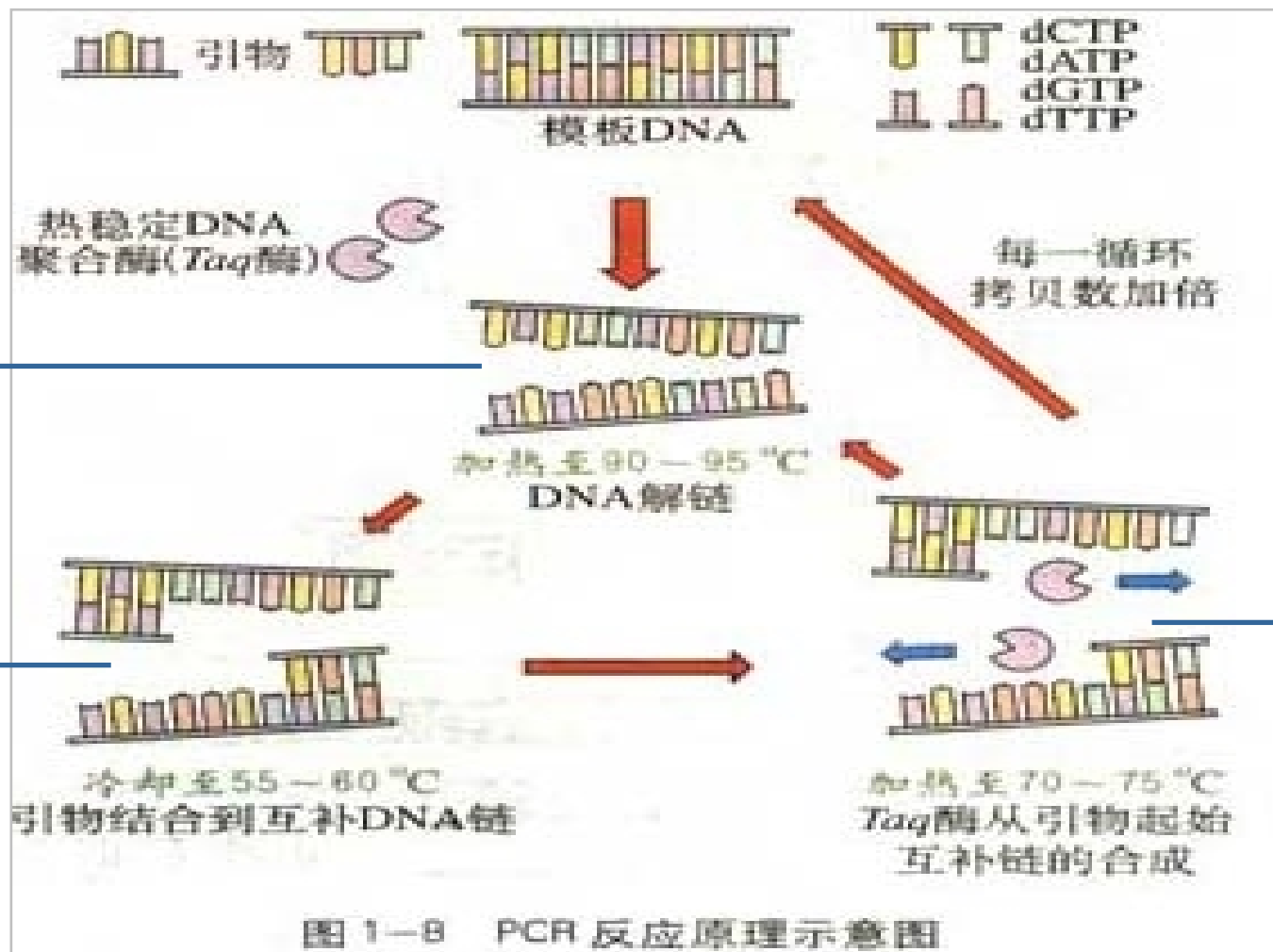
(3) 热稳定DNA聚合酶(Taq酶)

(4) 温度控制

(5) 一对引物：引物是一段核苷酸序列，与目的基因的起始段互补。



PCR扩增过程是怎样的？



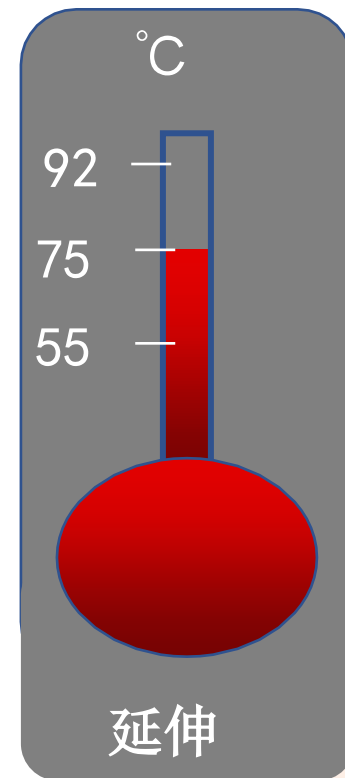
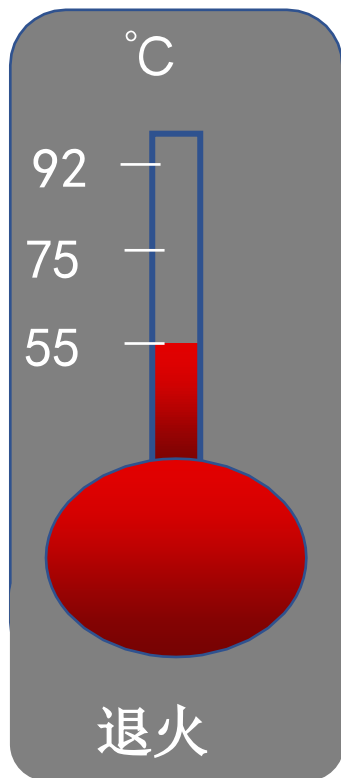
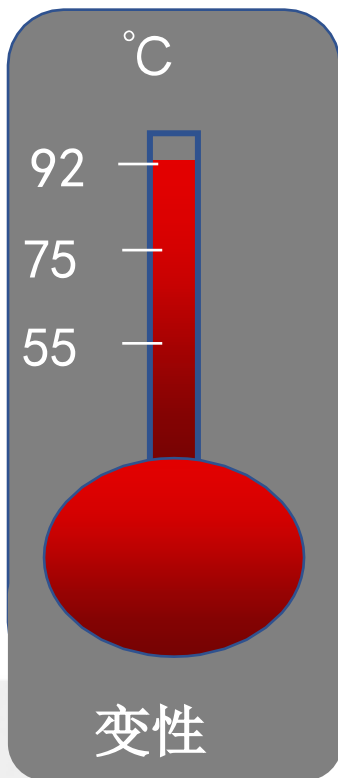
变性

复性

延伸



PCR过程 (三次)





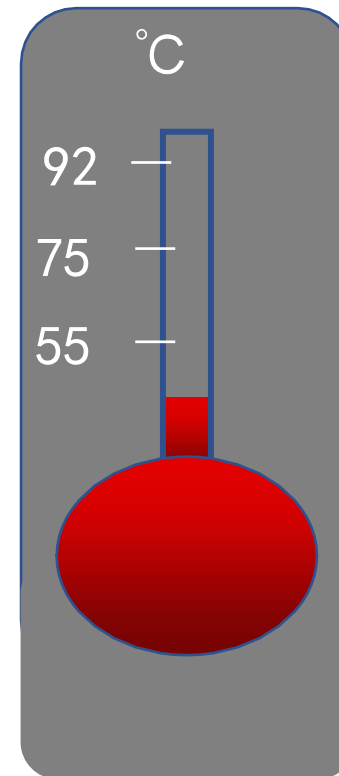
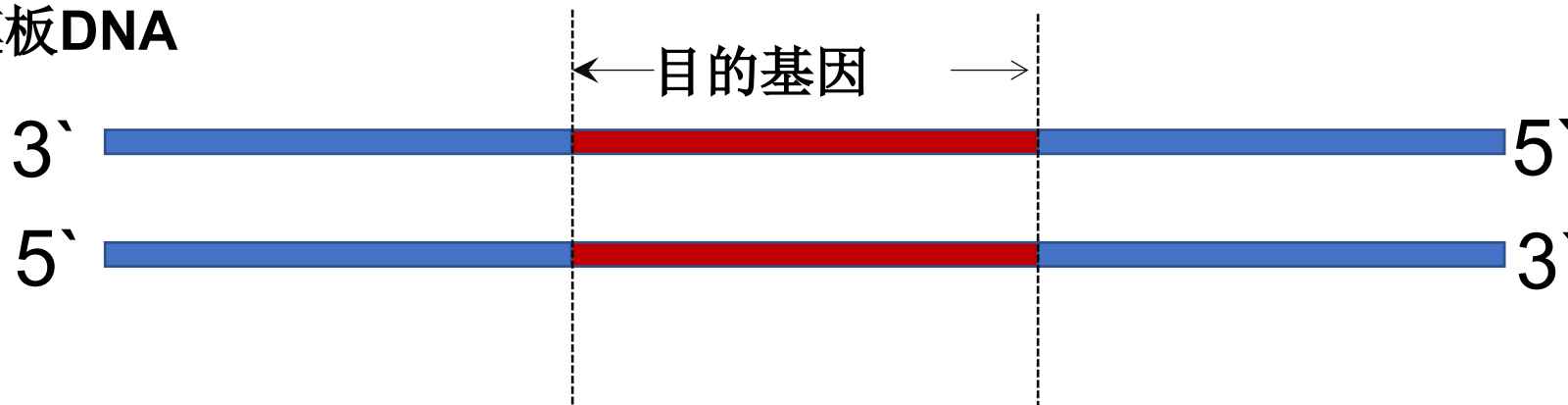
Taq聚合酶

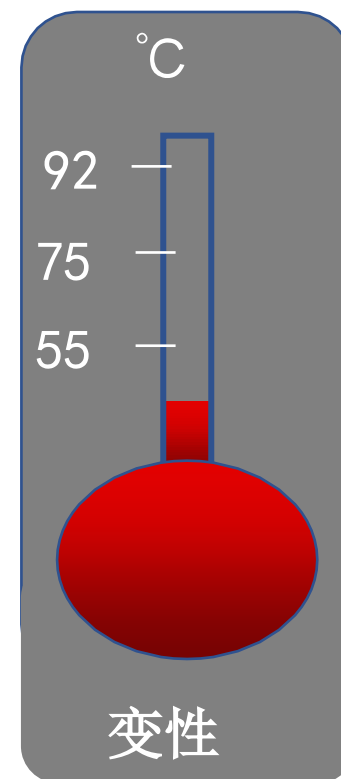
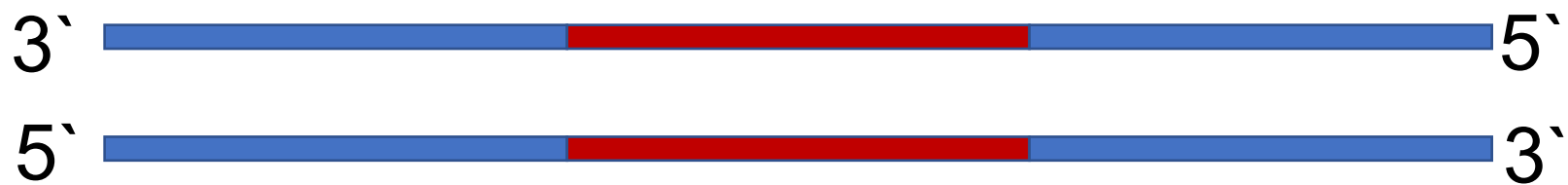
引物1

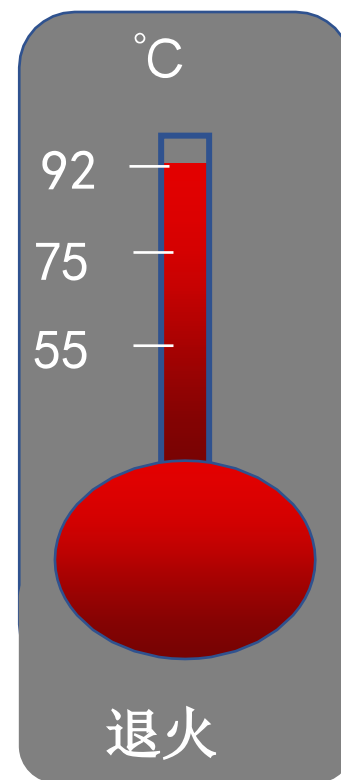
引物2

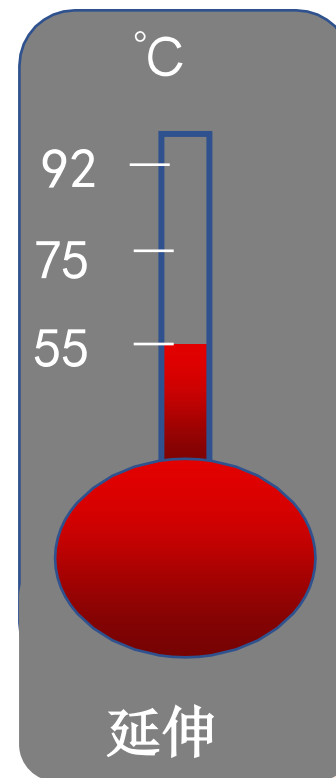
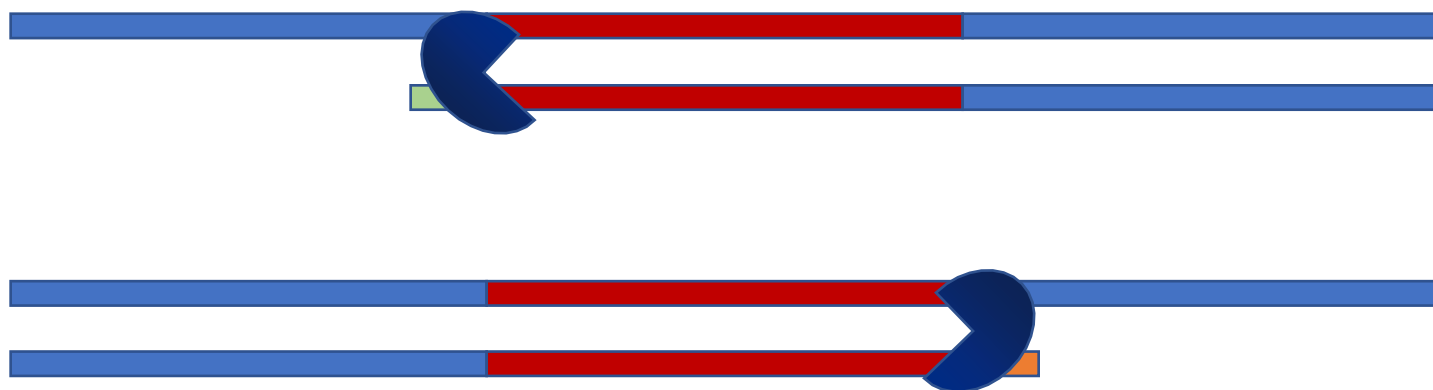
原料

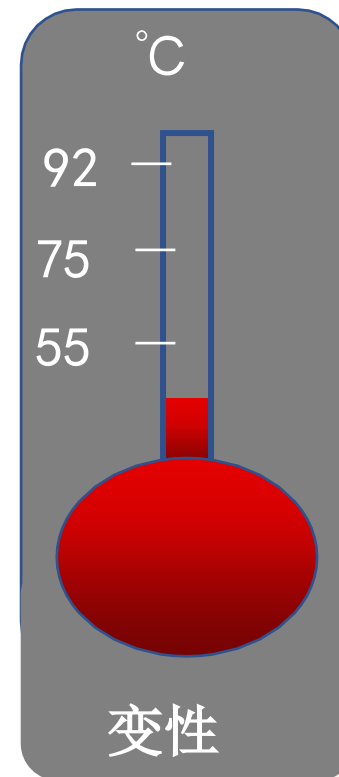
模板DNA

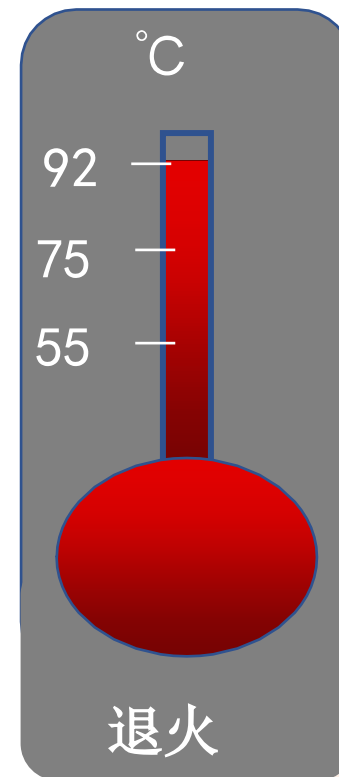
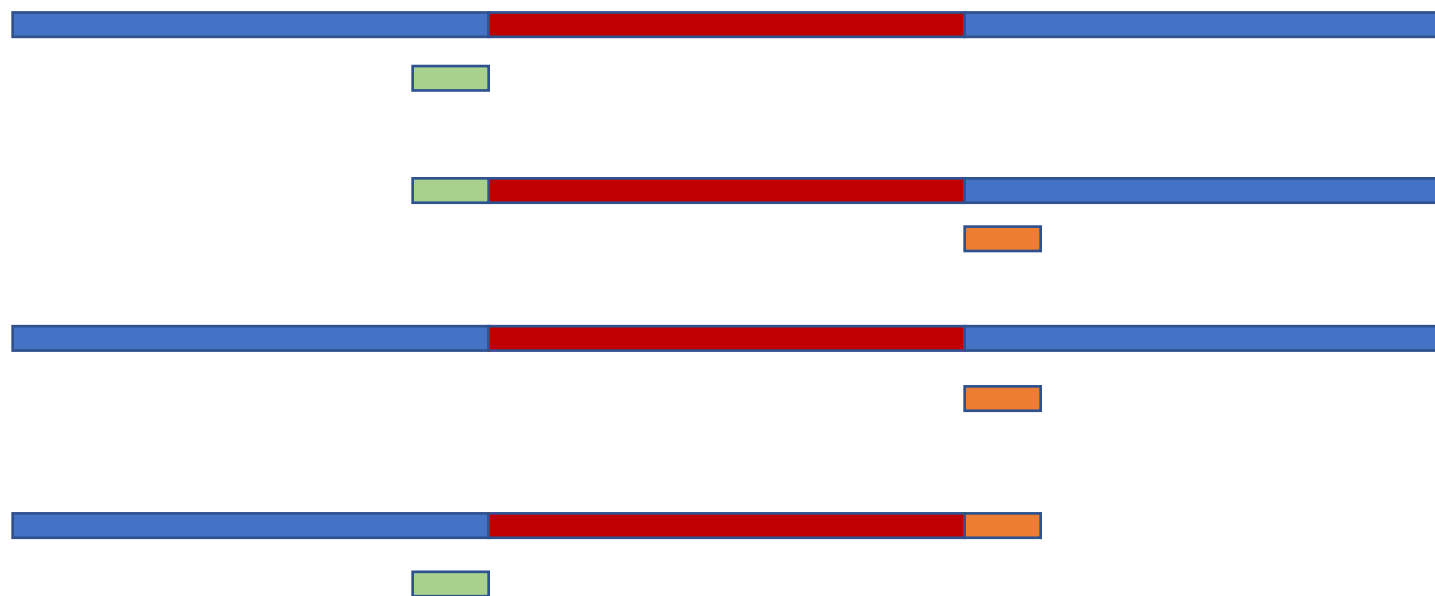


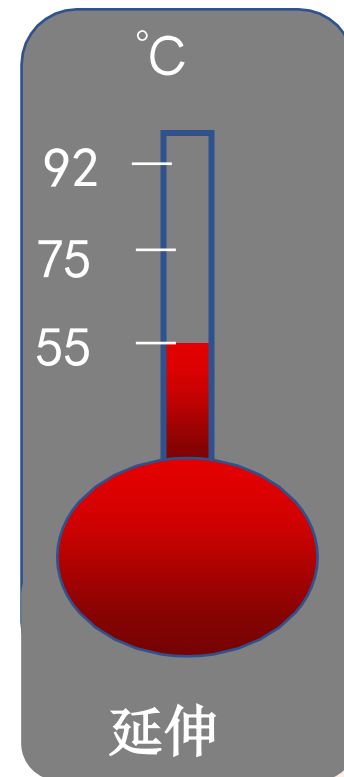
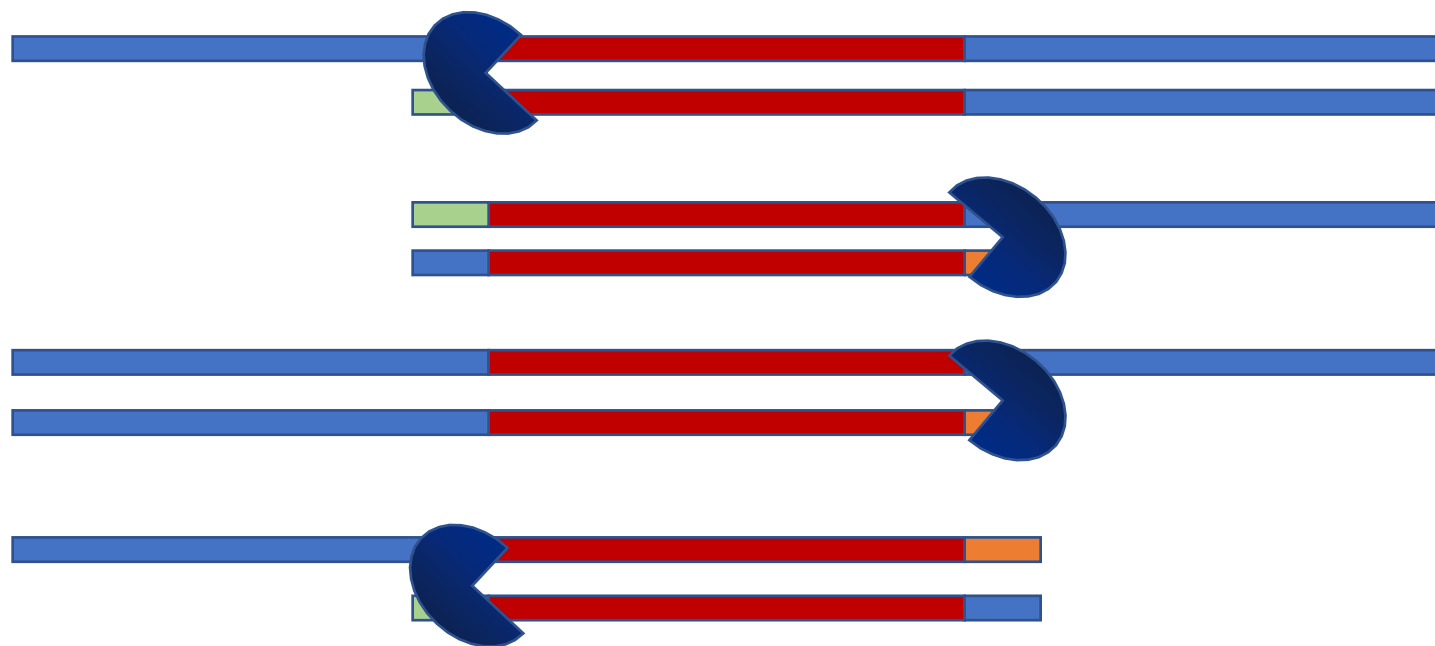






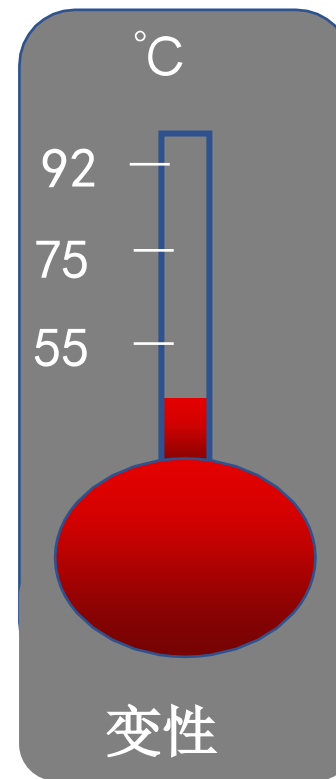
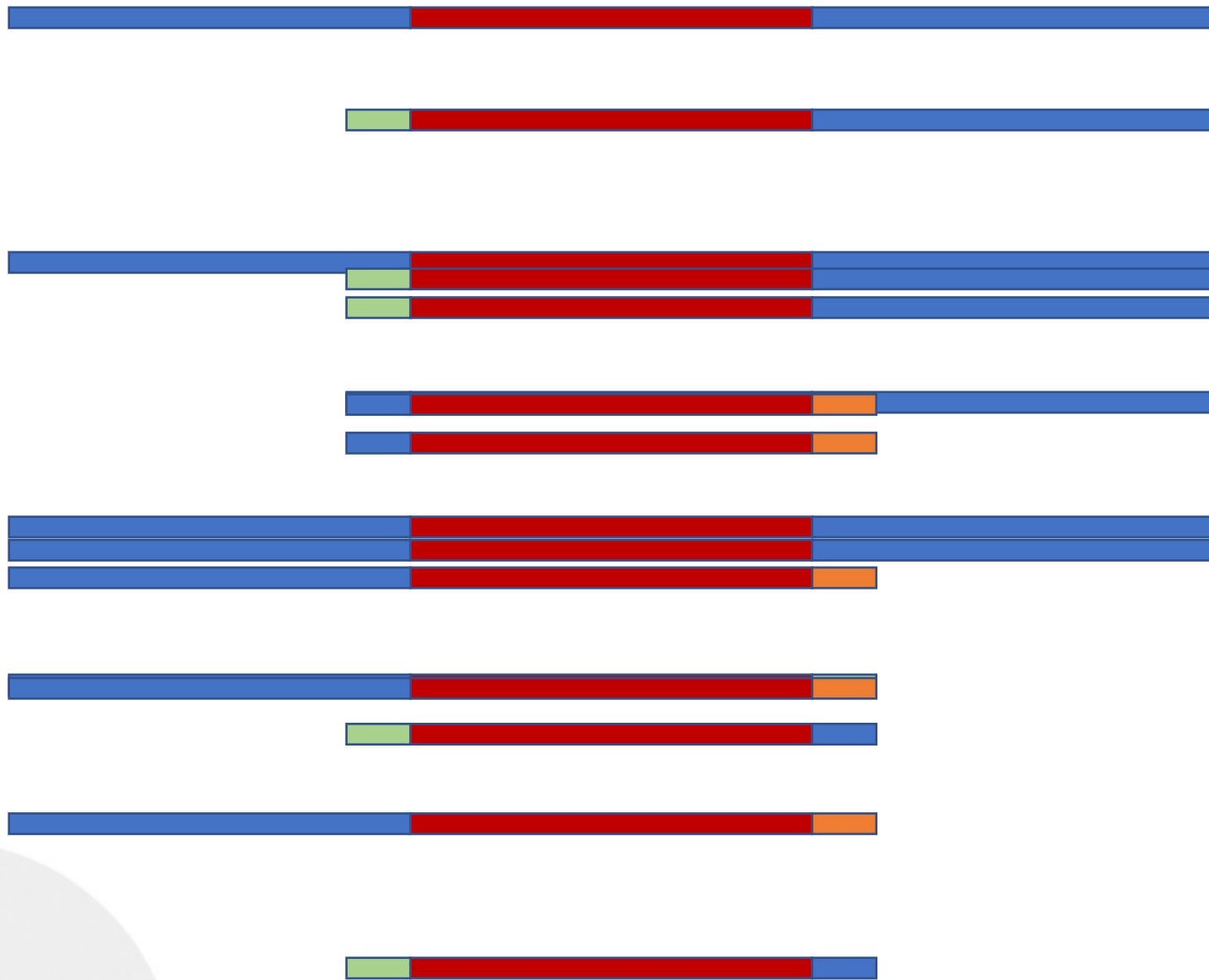






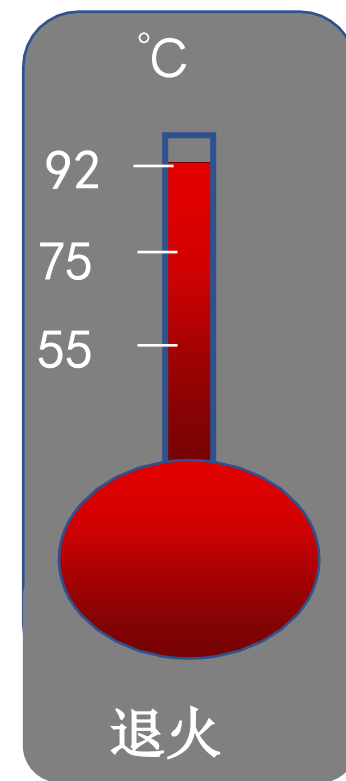
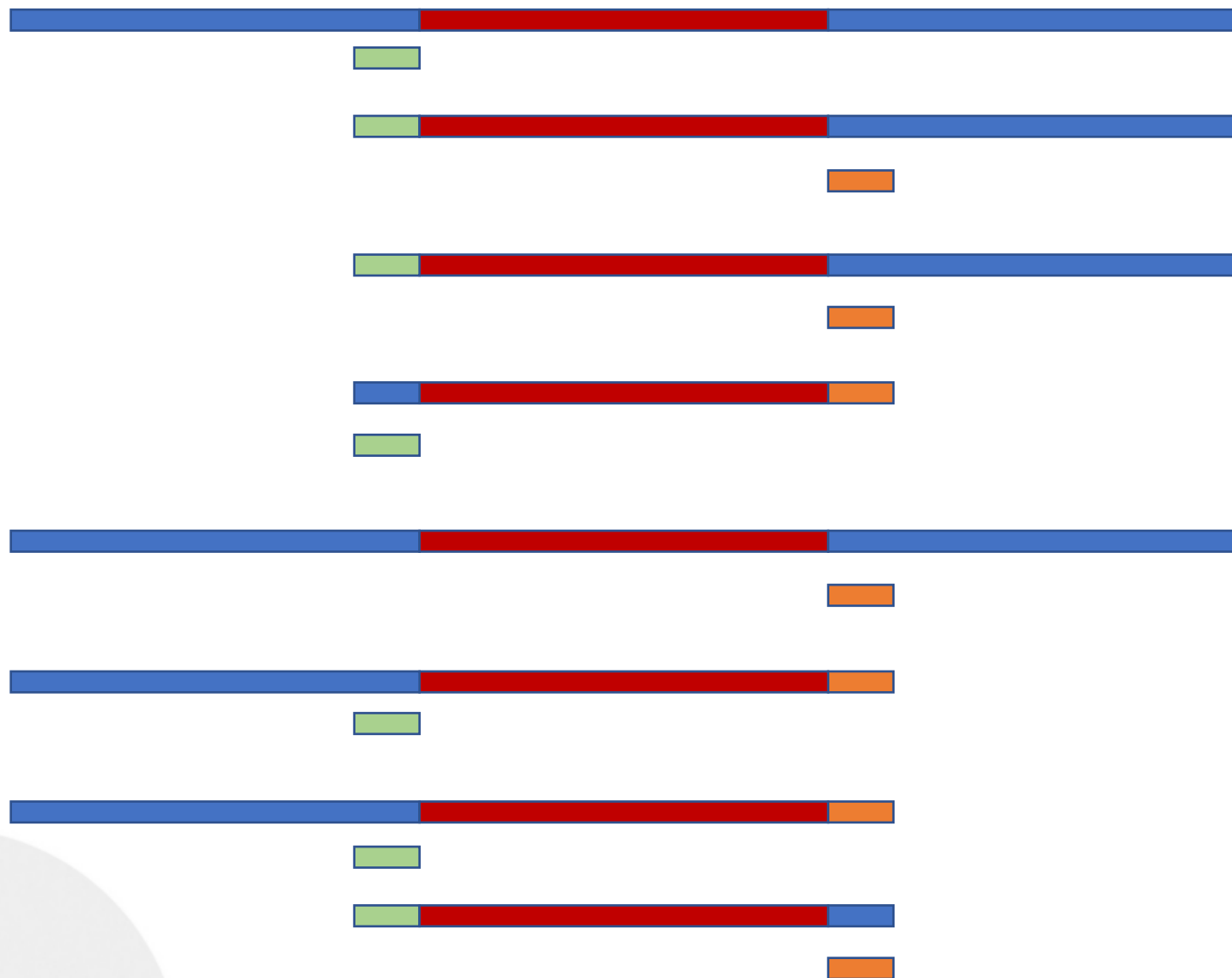


高中生物



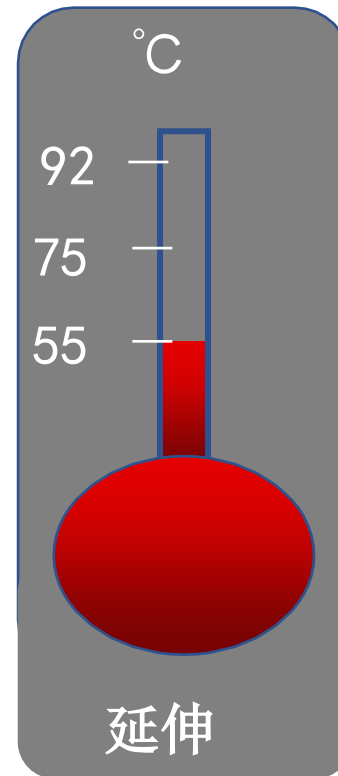
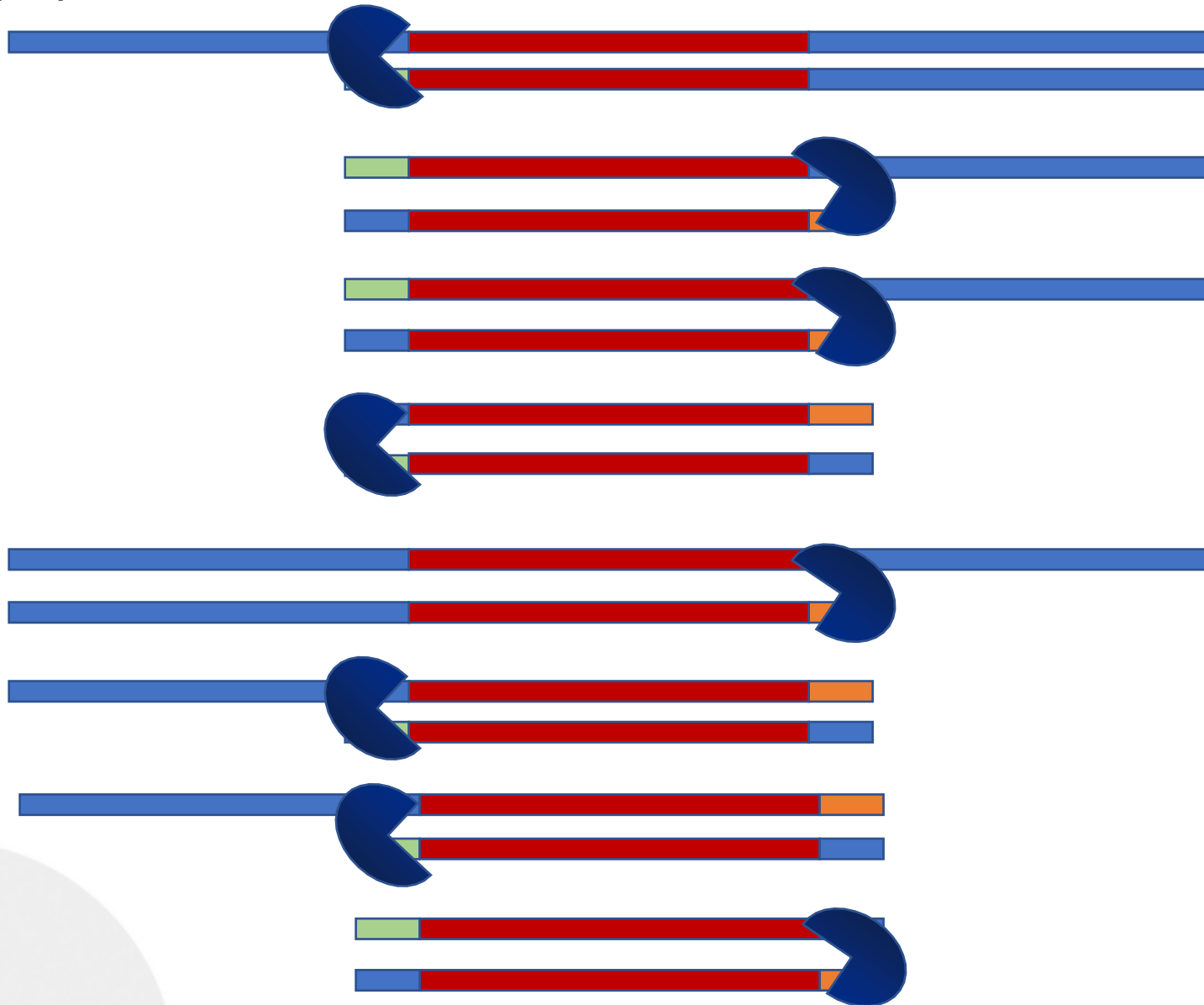


高中生物





高中生物





PCR技术扩增过程

- a、DNA变性（ 90°C – 95°C ）：双链DNA模板在热作用下，氢键断裂，形成单链DNA_____
- b、复性（ 55°C – 60°C ）：系统温度降低，引物与DNA模板结合，形成局部双链。
- c、延伸（ 70°C – 75°C ）：在TaqDNA聚合酶的作用下，从引物的DNA链延伸，合成与模板互补的5'端→3'端。



(三) 从基因文库中直接获取 (拓展)

1. 什么是基因文库?

2. 按外源DNA片的来源分类基因文库分为哪几类?

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

3. 建构基因文库的目的是什么?

为了在不知目的基因序列的情况下, 便于获得所需的目基因。

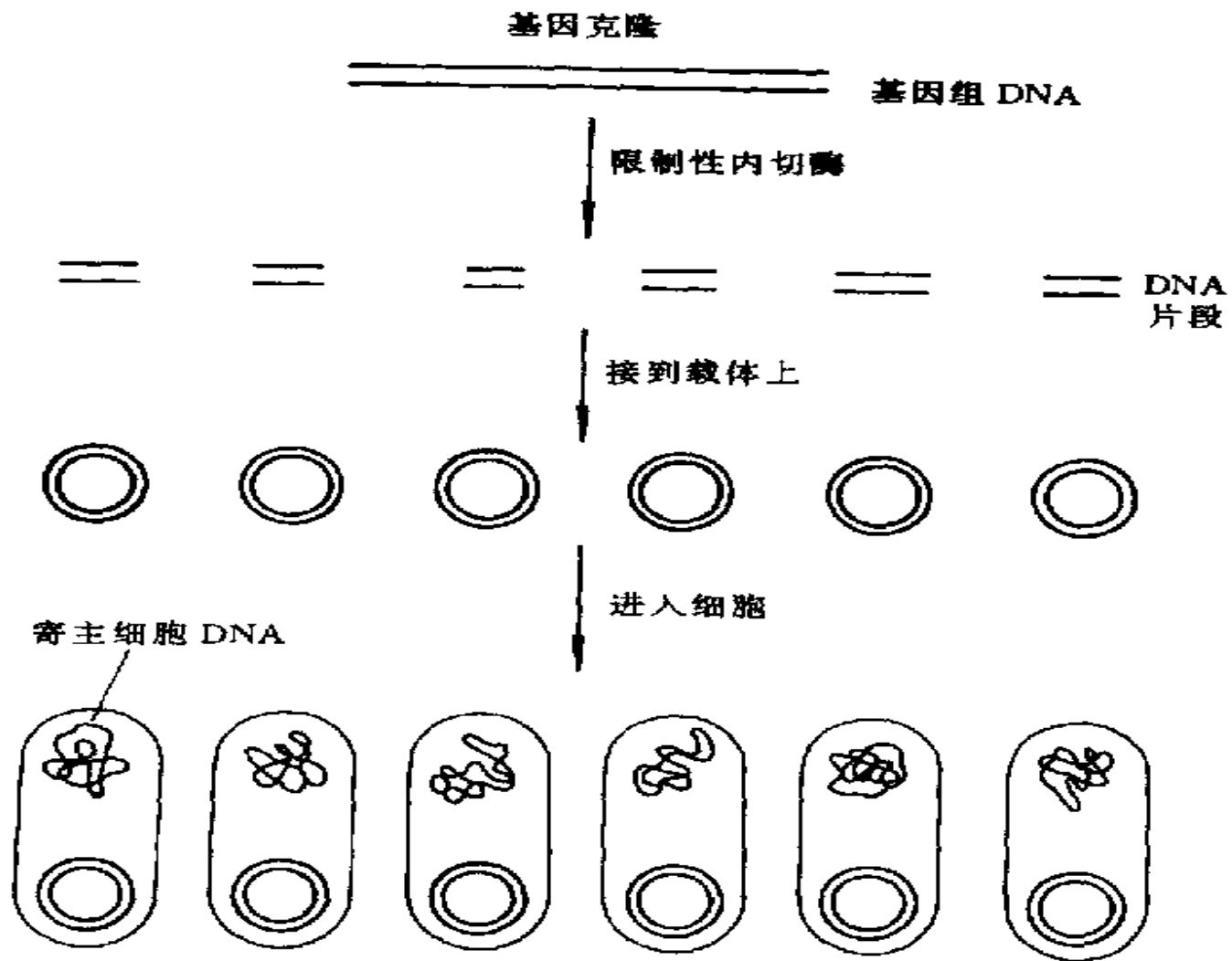
4. 怎样从基因文库中得到我们所需要的目的基因?



★ 基因文库的构建

(1) 基因组文库的构建

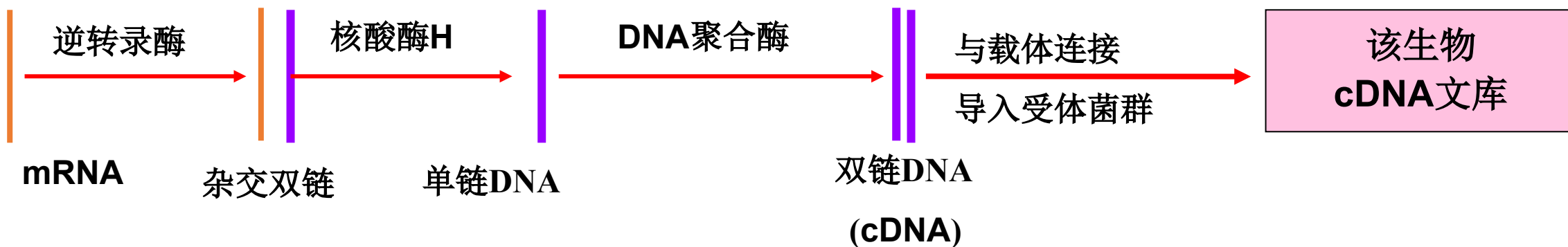




基因组文库



(2) cDNA文库的构建——mRNA反转录形成



• **第一步**，反转录酶以RNA为模板合成一条与RNA互补的DNA单链，形成**RNA-DNA杂交分子**。

• **第二步**，核酸酶H使RNA-DNA杂交分子中的RNA链降解，使之变成**单链的DNA**。

• **第三步**，以单链DNA为模板，在DNA聚合酶的作用下合成另一条互补的DNA链，形成**双链DNA分子**。



基因组文库和部分基因文库

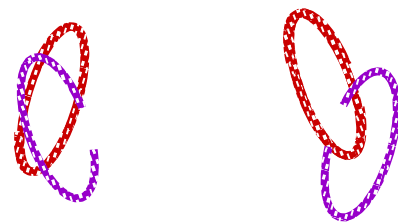
文库类型	cDNA 文库	基因组文库
文库大小	小	大
基因中启动子(具有启动作用的 DNA 片段)	无	有
基因中内含子(位于编码蛋白质序列内的非编码 DNA 片段)	无	有
基因多少	某种生物的部分基因	某种生物的全部基因
物种间的基因交流	可以	部分基因可以



二、基因表达载体的构建 —— 核心



重组DNA



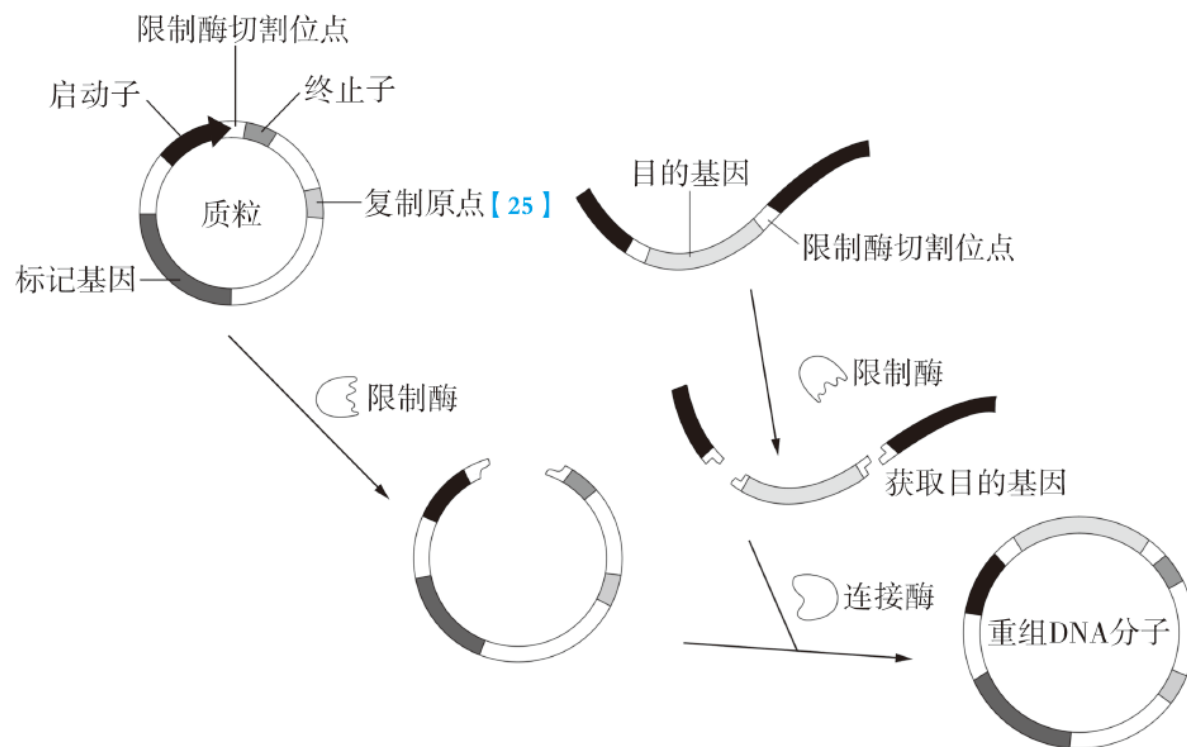
DNA连接酶

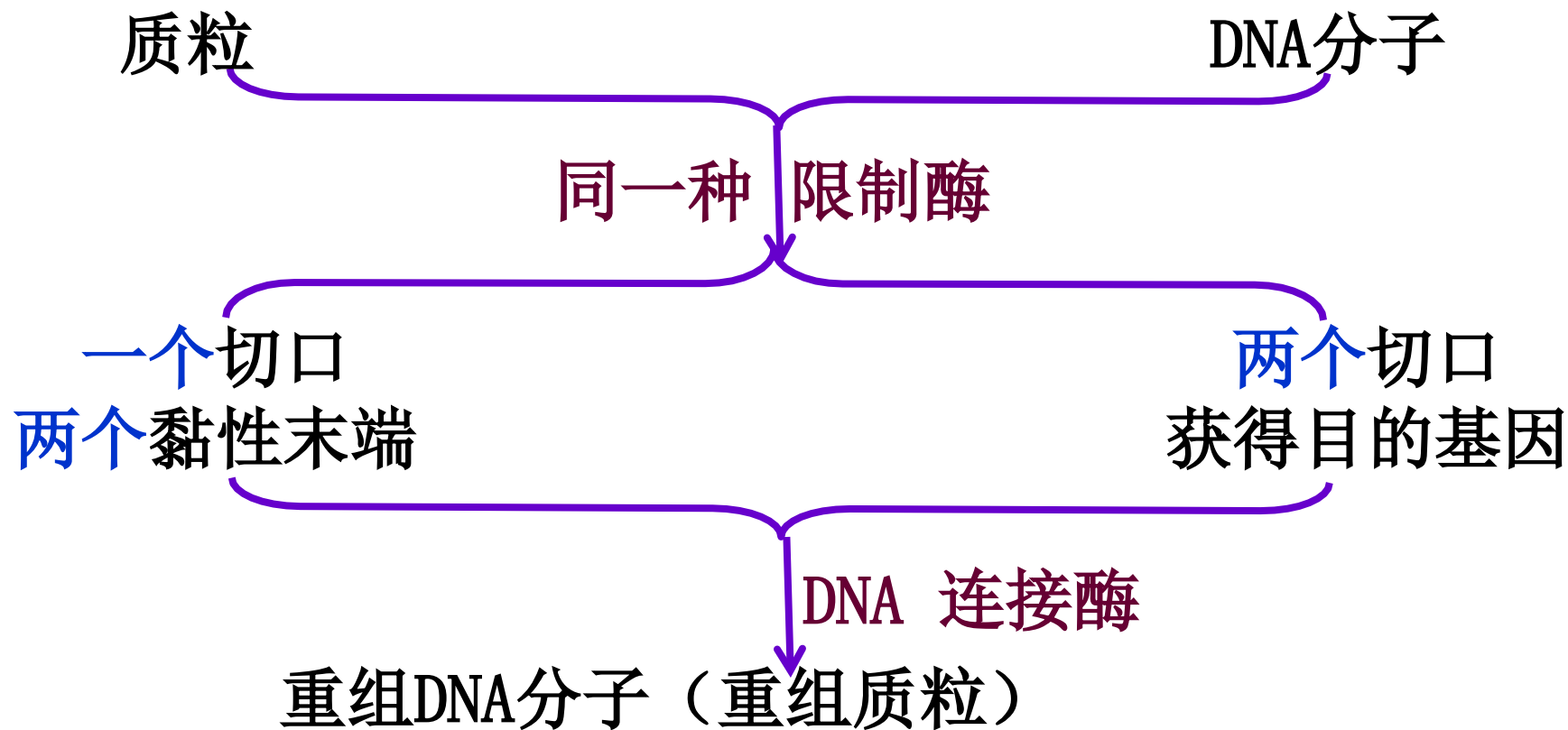


(1) 用一定的 限制酶 切割质粒，使其出现一个切口，露出 黏性末端。

(2) 用 同一种限制酶 切断目的基因，使其产生 相同的黏性末端。

(3) 将切下的目的基因片段插入质粒的 切口 处，再加入适量 DNA连接酶，形成了一个重组 DNA 分子（重组质粒）。





目的基因与运载体的结合过程，实际上是不同来源的基因重组的过程。



资料:

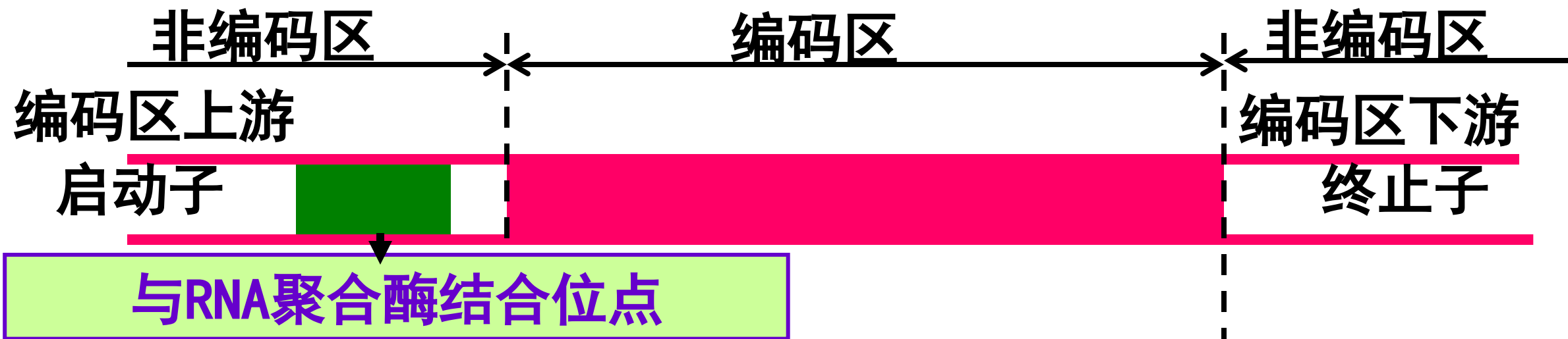
科学家在培育抗虫棉时，经过了许多复杂的过程和不懈的努力，才获得成功。

起初把苏云金芽孢杆菌的抗虫基因插入载体质粒中，然后导入棉花的受精卵中，结果抗虫基因在棉花体内没有表达。

然后在插入抗虫基因的质粒中插入启动子(抗虫基因首端)，导入棉花受精卵，长成的棉花植株还是没有抗虫能力。科学家又在有启动子、抗虫基因的质粒中插入终止子(抗虫基因末端)，导入棉花受精卵，结果成长的植株，有了抗虫能力。



开阔眼界：1. 原核细胞的基因结构



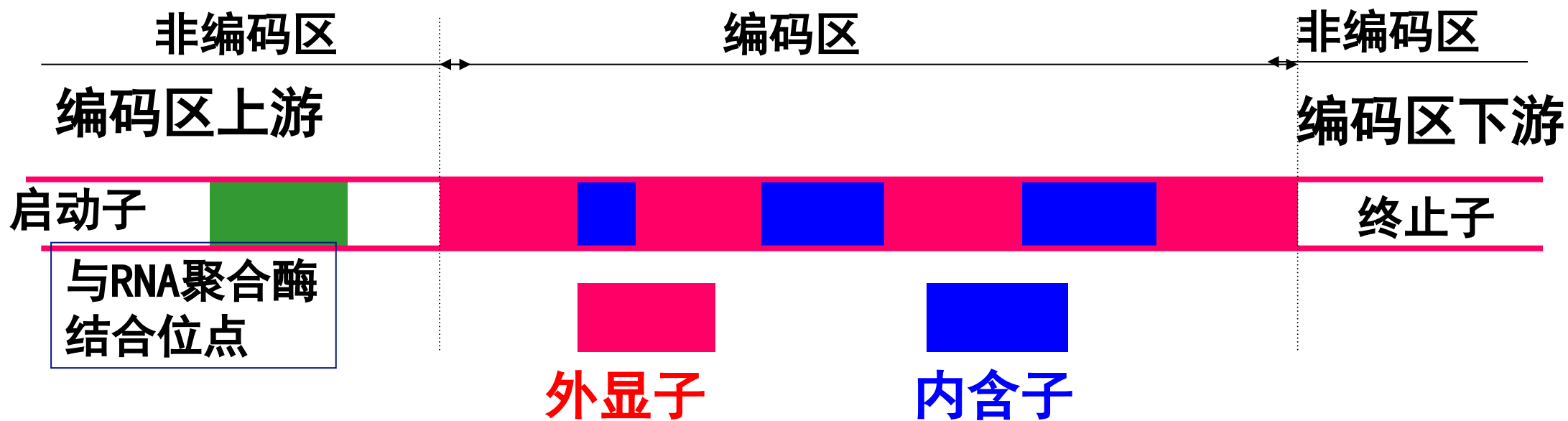
启动子：位于基因首端一段能与RNA聚合酶结合并能起始mRNA合成的序列。没有启动子，基因就不能转录。

终止子：位于基因的尾端的一段特殊的DNA片断，它能阻碍RNA聚合酶的移动，并使其从DNA模板链上脱离下来，使转录终止。

RNA聚合酶：能够识别启动子上的结合位点并与其结合的一种蛋白质。
(以模板转录然后脱落)



开阔眼界：2. 真核细胞的基因结构



外显子： 能够编码蛋白质的序列叫做外显子

内含子： 不能够编码蛋白质的序列叫做内含子

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/308125005125007002>