

基因工程的基本操作程序

目的基因的获取→基因表达载体的构建→将目的基因导入受体细胞→目的基因的检测与鉴定

一、目的基因的获取方法

1. 从基因文库中获取

①基因文库

基因组文库：含有一种生物的全部基因

部分基因文库：含有一种生物的一部分基因（如：cDNA 文库）

②构建基因文库

供体 DNA（限制酶处理）→许多 DNA 片段→构建基因表达载体→导入受体菌群

③构建 cDNA 文库（反转录法，得到的基因比原有的目的基因短）

目的基因的 mRNA（反转录酶反转录）→单链 DNA（DNA 聚合酶合成）→双链 DNA（cDNA）

→构建基因表达载体→导入受体菌群

注意：对于真核基因，cDNA 与原有的目的基因相比，少了启动子、终止子和内含子，反转录法得到的 cDNA 比实际的 DNA 分子短

2. 利用 PCR 技术扩增目的基因

①需要的条件：已知基因的核苷酸序列（前提）、一对引物、四种游离的脱氧核苷酸、耐高温的 DNA 聚合酶（Taq 酶）

引物的作用：在 Taq 酶的作用下，以 DNA 做模板，利用 4 种游离的脱氧核苷酸按照碱基互补配对的原则合成单链 DNA

②方式：以指数方式扩增，即 2^n （n 为扩增循环的次数）

③过程：

a、DNA 变性（90℃-95℃）

双链 DNA 模板在热作用下，氢键断裂，形成 DNA 单链

b、退火（复性 55℃-60℃）

系统温度降低，引物与 DNA 模板结合，形成局部双链

c、延伸（70℃-75℃）

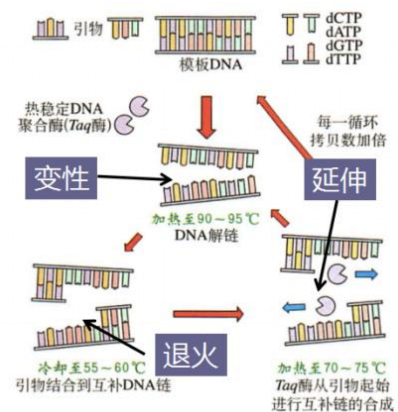
在 Taq 酶的作用下，从引物处延伸，合成与模板互补的 DNA 链

注意：在高温条件下双链 DNA 解链为单链 DNA 的，因此整个过程不需要解旋酶

3. 人工合成：化学合成法（已知氨基酸序列合成 DNA）

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

注意：由于一种氨基酸可对应多种密码子（密码子的简并性），故有多种 mRNA 和多种目的基因



二、基因表达载体的构建（核心）

1. 表达载体的组成

①**启动子**：基因的首端的一段特殊的 DNA 片断，它是 RNA 聚合酶识别和结合的部位，是转录的起点

②**终止子**：位于基因的尾端的一段特殊的 DNA 片断，转录的终点，在转录过程中起调控作用

③**标记基因**：为了鉴别和筛选含有有目的基因的受体细胞

④**目的基因**：能够控制特定的性状的基因

此外，质粒上还具有**复制原点**，它是质粒自我复制的起点，真正被用作载体的质粒，都是在天然质粒的基础上进行过人工改造的

2. 构建基因表达载体的目的

使目的基因在受体细胞中**稳定存在**，表达并发挥作用，同时可以遗传给下一代

3. 构建的过程



三、将目的基因导入受体细胞

1. 将目的基因导入植物细胞

①**基因枪法**（单子叶植物）

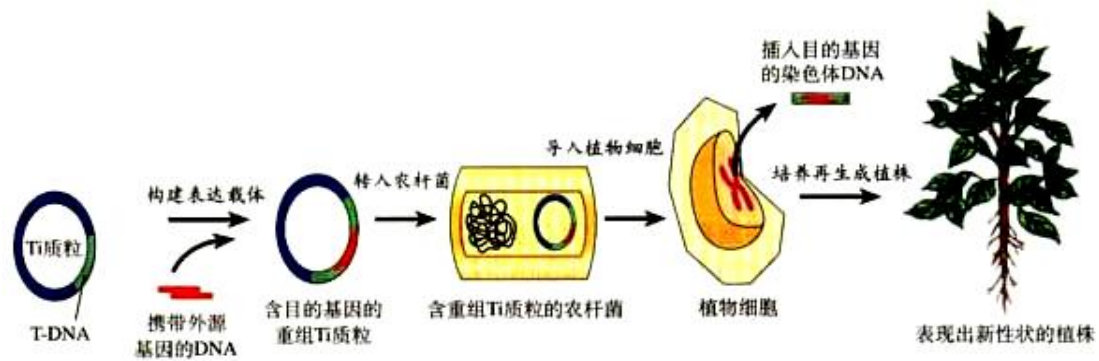
②**花粉管通道法**（被子植物）

③**农杆菌转化法**（双子叶和裸子植物）

<1>原理：**Ti 质粒**的 **T-DNA** 可转移至受体细胞并整合到其染色体上

<2>特点：当植物受到损伤时，伤口处的细胞会分泌大量的酚类化合物，吸引农杆菌移向这些细胞，农杆菌中的 Ti 质粒的 T-DNA 可转移至受体细胞，并且整合到其染色体上

<3>过程



2. 将目的基因导入**动物细胞**（受体细胞：受精卵【细胞的全能性较高】）

方法：**显微注射技术**

3. 将目的基因导入**微生物**（受体细胞：原核细胞）

①方法：**感受态细胞法**（又名 Ca^{2+} 处理法）

②原核生物特点：繁殖快、多为单细胞、遗传物质相对较少。

③常用菌：大肠杆菌

④转化过程：用 **Ca^{2+} (CaCl_2)** 处理细胞用，增加细胞膜的通透性，时细胞成为容易吸收周围环境中 DNA 分子的感受态细胞，再将基因表达载体与感受态细胞混合，使感受态细胞吸收 DNA 分子，实现转化。

（四）目的基因的检测与鉴定

分子水平

1. 转基因生物的 DNA 上是否插入目的基因——**DNA 分子杂交技术**（DNA-DNA）

目的基因（含有放射性标记）→作为基因探针→探针与受体中的 DNA 分子杂交

若出现杂交带，则说明已插入目的基因；

若未出现杂交带，则说明未插入目的基因。

原理：**碱基互补配对原则**

2. 目的基因是否转录出了 mRNA——**分子杂交技术**（DNA-RNA）

目的基因（含有放射性标记）→作为基因探针→探针与受体中的 mRNA 分子杂交

若出现杂交带，则说明已转录目的基因；

若未出现杂交带，则说明未转录目的基因。

原理：**碱基互补配对原则**

3. 目的基因是否翻译成蛋白质——**抗原-抗体杂交技术**

相应的抗体（含有放射性标记）→作为基因探针→探针与受体中的蛋白质分子杂交

若出现杂交带，则说明已翻译目的基因；

若未出现杂交带，则说明未翻译目的基因。

原理：**抗原—抗体的特异性结合**

个体水平

转基因生物是否产生相应性状——抗虫或抗病接种实验、产物活性鉴定

在个体水平上检验植株是否抗虫抗病或检测是否产生相应的产物，若有，则转入的目的基因成功表达。