

第五章

分子生物学研究法（上）

DNA、RNA及蛋白质操作技术

主要内容

- 模式生物
- 核酸的操作和分析技术
- 蛋白质的分离和分析

什么是模式生物？

分子生物学有一个著名的说法：
基础问题可以在最简单和最容易获得的系统中得以回答。

能够代表生物界的某一大类群；

对人体和环境无害，容易获得并易于在实验室内饲养和繁殖；

世代短、子代多、遗传背景清楚；

容易进行实验操作，特别具有遗传的操作手段和表型分析的方法。



通过对选定的生物物种进行科学研究，用于揭示某种具有普遍规律的生命现象，这种被选定的生物物种即为模式生物。

模式动物与动物模型的区别

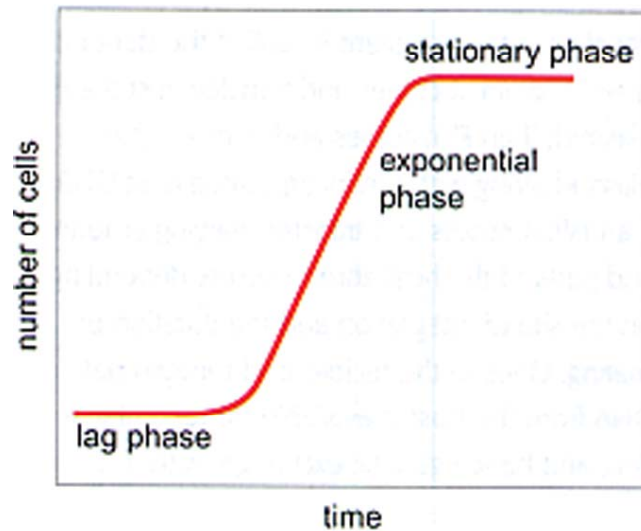
- 基本生命现象；特殊
- 固有的；创造的
- 基础研究；应用研究
- 结构简单；复杂

常见模式生物

- 点燃基因工程的先行者——大肠杆菌和它的噬菌体
- 食品与酒香催生了现代分子生物学——酿酒酵母
- 植物遗传研究的代表——拟南芥
- 遗传学史上地位显赫国王——果蝇
- 奠定现代发育生物学里程碑的海洋中刺客——海胆
- 丑陋的爪蟾变成发育生物学的王子——非洲爪蟾
- 讲述细胞凋亡故事的美丽公主——线虫
- 现代生物医学中的新贵族——斑马鱼
- 诺贝尔奖的最大赢家——小鼠

分子生物学家聚焦于大肠杆菌

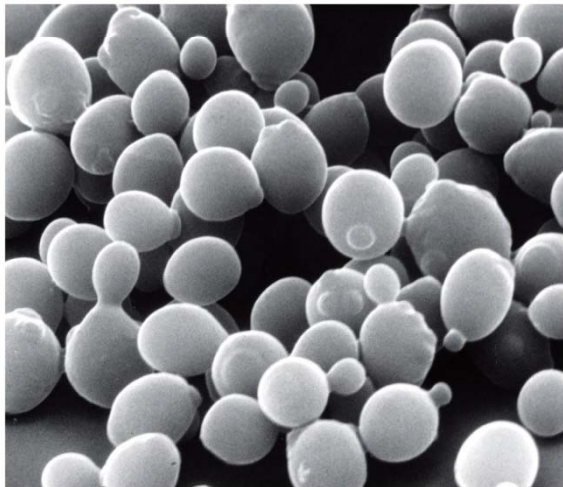
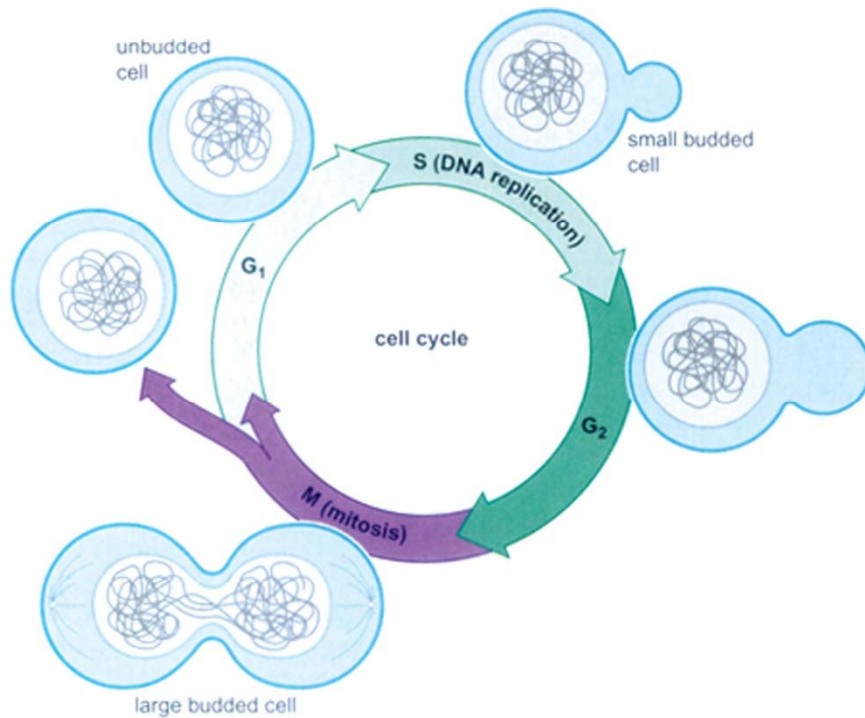
分子生物学起源于细菌和噬菌体模式系统的实验。细菌处于DNA复制、信息传递、基因调节机制等研究的中心位置。



21-5

- 大肠杆菌容易培养，能适应环境中多变的化学条件，并且繁殖很快。
- 为单细胞生物，所有DNA、RNA和蛋白质合成的机器都包含在同一空间。
- 只有一条染色体大约有460万核苷酸，并能制造4300多种不同的蛋白质。
- 主要优势是具备易于进行遗传交换的系统，便于进行定点突变、构建含多种突变的菌株等。
- 细菌可以自主复制，细菌质粒可用作克隆载体。

酿酒酵母 (Saccharomycetaceae)



10 μm

Figure 1-32 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

- 单细胞真核生物，基因组较小，基因数目也较少；
- 可快速繁殖，从单个细胞可以繁殖成克隆群体；
- 具备真核细胞的主要特征；
- 单倍体和双倍体细胞的存在促进了酿酒酵母的遗传分析；
- 在酵母中容易产生精确的突变；
- 酿酒酵母细胞在生长时改变形态。
- 在转录和基因调控、DNA复制、重组、翻译等研究中非常重要。

2001年诺贝尔生理学或医学奖



Leland H. Hartwell



Tim Hunt



Paul M. Nurse

2001年诺贝尔生理学或医学奖授予美国科学家利兰·哈特韦尔、英国科学家蒂莫西·亨特和保罗·纳斯，以表彰他们发现了细胞周期的关键分子调节机制：细胞周期蛋白依赖激酶分子和细胞周期蛋白驱动细胞从一个阶段到下一个阶段

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)

--从30万种植物中选出的模式植物



- 能在室内大量生长，8-10个星期内能产生大量后代。
- 基因组是目前已知植物基因组中最小的，已完成全部序列的测序。
- 容易获得各种代谢功能的缺陷型。通过研究拟南芥所携带的遗传信息，可以认识更多的有花植物的遗传学、分子生物学和进化。
- 对于农作物或其他植物种类的发育和生理学也非常有用。

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)

--理解动物发育的一把钥匙

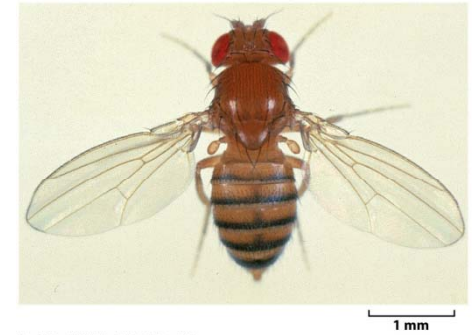
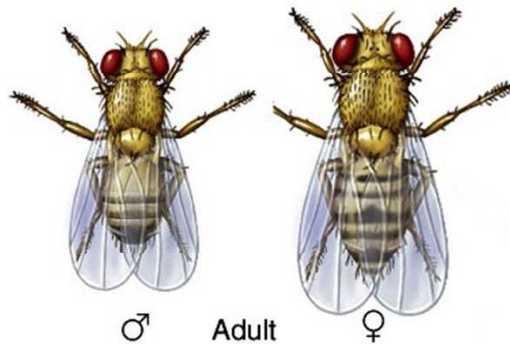


Figure 1-34 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)



作为模式生物用于遗传与发育研究已经近100年;

- 生活周期很短;
- 第一个基因图谱在果蝇中产生;
- 制备携带外源DNA的转基因果蝇简便易行。
- 果蝇的基因与在人类中相对应的基因有惊人的相似, 可作为一种研究人类发育和疾病的模式动物。

果蝇 (*Drosophila melanogaster*)



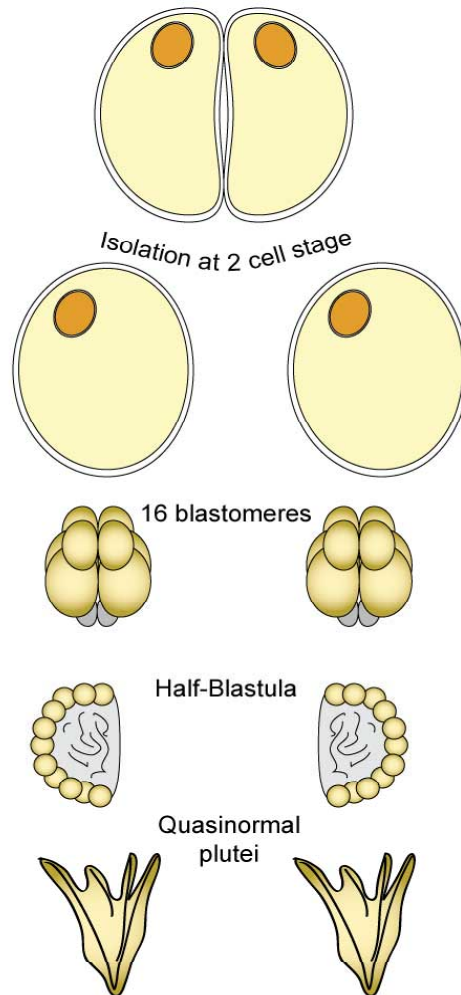
Richard Axel



Linda B. Buck

- 研究揭开了胚胎如何由一个细胞发育成完美的特化器官。
- 有助于解释人类先天性畸型。
- 美国科学家Richard Axel和Linda B.Buck因为在气味受体和嗅觉系统的研究贡献而一同分享了2004年的诺贝尔医学生理学医学奖: 发现了果蝇在嗅觉功能上有个特定的大脑区域, 以此清楚地阐明了人类嗅觉系统的工作方式。

海胆 (Echinoidea)

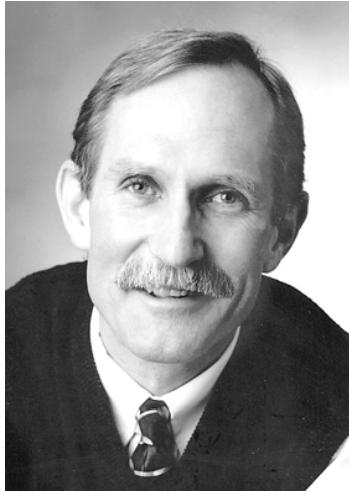


● 最早被使用的模式生物，卵子和胚胎对早期发育生物学的发展有举足轻重的作用。

● 易于得到大量受精卵，同步发育，胚体透明，孵化速度快的特点成为了生物学研究的模式生物。

● 1891年，Hans Driesch实验，为现代发育生物学奠定了第一块观念里程碑。

非洲爪蟾 (Xenopus)



Peter Agre

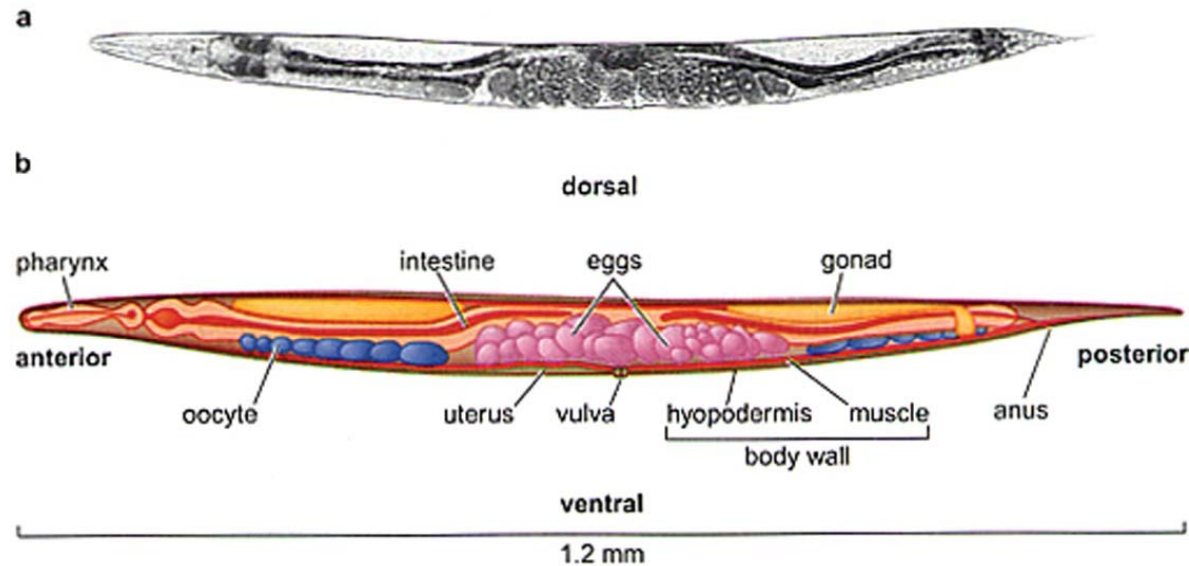


- 卵母细胞体积大、数量多，易于显微操作，易于生化分析。
- 用于卵母细胞减数分裂机理研究中具有不可替代的作用。
- 参与卵母细胞减数分裂的重要蛋白激酶的功能研究开启了细胞周期调控的分子机理之门。
- 1991年，美国科学家Agre发现第一个水通道蛋白CHIP28。

Roderick MacKinnon



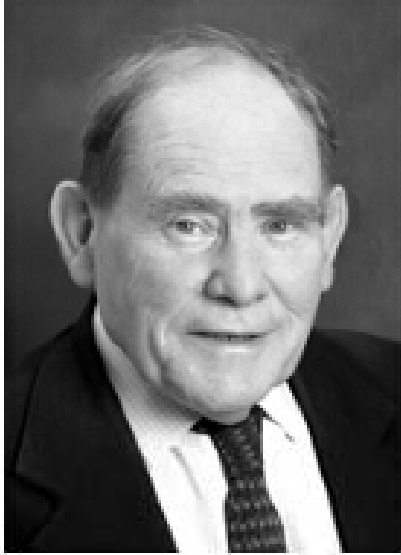
秀丽新小杆（隐杆）线虫 (*Caenorhabditis elegans*)



比果蝇小且更简单的多细胞动物(1mm)，具有很多合适的特性：

- 生活周期很短，易于培养，只吃细菌。12 h内胚胎完成发育，40 h内成为一个性成熟的成虫（959个体细胞）。雌雄同体的成虫4 d可产生300个自身后代。
- 基因组含9700万对核苷酸，编码了约19000个基因，由相对较少、研究得很深入的细胞谱系组成。
- 细胞死亡途径和干扰RNA都是在线虫中发现的（Nobel奖）。

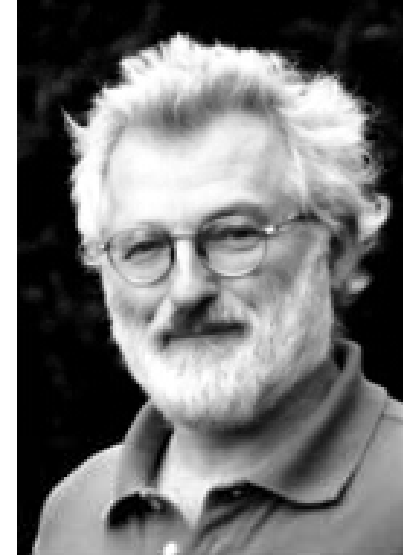
线 虫



Sydney Brenner



H. Robert Horvitz



John E. Sulston

2002年诺贝尔生理学或医学奖，获奖的原因是在20世纪60年代初期正确选择线虫作为模式生物，发现器官发育和“程序性细胞死亡”过程中的基因规则。

线虫



Photo: L. Cicero
Andrew Z. Fire



Photo: J. Mottern
Craig C. Mello

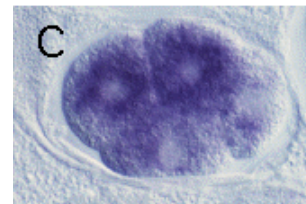
Double stranded RNA



Inject

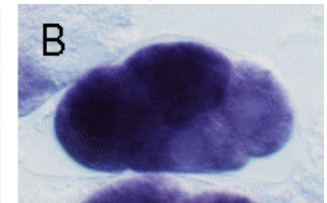


Neg. control



Antisense RNA

Uninjected



dsRNA

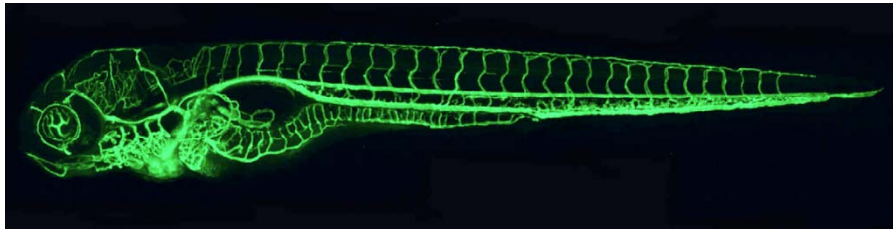
2006年诺贝尔生理学或医学奖 “RNA干扰”

将双链RNA导入线虫基因中，发现双链RNA较单链RNA更能高效地特异性阻断相应基因的表达，称这种现象为RNA干扰。

Nature 1998 391:806-811

斑马鱼 (Brachydanio rerio)

用于研究脊椎动物发育的模式生物



- 基因与人类基因的相似度达到87%。

- 其胚胎是透明的，能在活体中观察细胞的运动以及它们随发育进行而发生改变的征。

- 斑马鱼的细胞标记技术、突变技术、转基因技术、基因活性抑制技术等已经成熟。

- 胚胎突变体是研究胚胎发育分子机制的优良资源，易于药物对其体内器官影响的观察与研究。

小鼠 (*Mus musculus*)



Figure 1-40 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

- 基因组和人类99%同源，且生理生化和发育过程和人类相似。
- 在小鼠和人类之间有着大量的同线性；85%以上的基因是一一对应的；
- 运用基因组序列和生物信息学分析，发展新型的基因组改造方法，并在随机或定向突变的基础上，在整体动物表型水平进行分析。
- 同源重组为单个基因的选择性去除提供了机会，易于建立人类疾病的小鼠模型，是研究人类发育和疾病的优良模型。

小鼠 (*Mus musculus*)



Photo: U. Montan
Mario R. Capecchi



Photo: U. Montan
Sir Martin J. Evans



Photo: U. Montan
Oliver Smithies

2007年诺贝尔生理学或医学奖，获奖的原因 “*for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells*” 。

现代分子生物学技术

基因操作主要包括DNA分子的切割与连接、细胞转化、核酸序列分析以及基因人工合成、表达、定点突变和PCR扩增等，是分子生物学研究的核心技术。

基因工程是指在体外将核酸分子插入病毒、质粒或其它载体分子，构成遗传物质的新组合，使之进入原先没有这类分子的寄主细胞内并进行持续稳定的繁殖和表达。

重组DNA技术史话

基因工程技术是核酸操作技术的一部分，只不过它强调了外源核酸分子在另一种不同的寄主细胞中的繁衍与性状表达。

事实上，这种跨越物种屏障、把来自其它生物的基因置于新的寄主生物细胞之中的能力，是基因工程技术区别于其它生命科学技术的根本特征。

重组DNA技术史上的主要事件

年 份	事 件
1869	F. Miescher 首次从莱茵河鲑鱼精子中分离 DNA 。
1957	A. Kornberg 从大肠杆菌中发现了 DNA 聚合酶 I。
1959-1960	Uchoa 发现 RNA 聚合酶和信使 RNA ，并证明 mRNA 决定了蛋白质分子中的氨基酸序列。
1961	Nirenberg 破译了第一个遗传密码； Jacob 和 Monod 提出了调节基因表达的操纵子模型。
1964	Yanofsky 和 Brenner 等人证明，多肽链上的氨基酸序列与该基因中的核苷酸序列存在着共线性关系。
1965	Holley 完成了酵母丙氨酸 tRNA 的全序列测定；科学家证明细菌的抗药性通常由“质粒” DNA 所决定。
1966	Nirenberg ， Uchoa ， Khorana ， Crick 等人破译了全部遗传密码。

1967	第一次发现 DNA 连接酶
1970	Smith ， Wilcox 和 Kelley 分离了第一种限制性核酸内切酶， Temin 和 Baltimore 从 RNA 肿瘤病毒中发现反转录酶。
1972-1973	Boyer ， Berg 等人发展了 DNA 重组技术，于 72 年获得第一个重组 DNA 分子， 73 年完成第一例细菌基因克隆。
1975-1977	Sanger 与 Maxam 和 Gilbert 等人发明了 DNA 序列测定技术， 1977 年完成了全长 5387bp 的噬菌体 ϕ 174 基因组测定。
1978	首次在大肠杆菌中生产由人工合成基因表达的人脑激素和人 胰岛素 。
1980	美国联邦最高法院裁定微生物基因工程可以被专利化。
1981	Palmiter 和 Brinster 获得转基因小鼠， Spradling 和 Rubin 得到转基因果蝇。

1982	美、英批准使用第一例基因工程药物——胰岛素， Sanger 等人完成了入噬菌体 48,502bp 全序列测定。
1983	获得第一例 转基因植物 。
1984	斯坦福大学获得关于重组 DNA 的专利。
1986	GMO 首次在环境中释放。
1988	Watson 出任“人类基因组计划”首席科学家。
1989	DuPont公司 获得转肿瘤基因小鼠——“ Oncomouse ”。
1992	欧共体 35 个实验室联合完成酵母第三染色体全序列测定（ 315kb ）。
1994	第一批基因工程西红柿在美国上市。
1996	完成了 酵母基因组 （ $1.25 \times 10^7 \text{bp}$ ）全序列测定。
1997	英国爱丁堡罗斯林研究所获得 克隆羊 。
2000	完成 拟南芥 的全序列测定（ $1.2 \times 10^8 \text{bp}$ ）。
2001	完成第一个 人类基因组 全序列测定（ $2.7 \times 10^9 \text{bp}$ ）。

上个世纪中下叶以来，现代分子生物学的迅猛
发展源自工具酶的发现。

工欲善其事，
必先利其器。

重组DNA实验中常见的主要工具酶

酶 类	功 能
限制性核酸内切酶	识别并在特定位点切开DNA
DNA连接酶	通过磷酸二酯键把两个或多个DNA片段连接成一个DNA分子
DNA聚合酶I（大肠杆菌）	按5' 到3' 方向加入新的核苷酸，补平DNA双链中的缺口
反转录酶	按照RNA分子中的碱基序列，根据碱基互补原则合成DNA链
碱性磷酸酯酶	切除位于DNA链末端的磷酸基团
末端转移酶	在双链核酸的3'末端加上多聚或单核苷酸
DNA外切酶III	从DNA链的3' 末端逐个切除单核苷酸
λ 噬菌体DNA外切酶	从DNA链的5' 末端逐个切除单核苷酸

DNA重组技术的基本工具

- 准确切割DNA的工具（“分子手术刀”）
——限制性核酸内切酶
- DNA片段的连接工具（“分子缝合针”）
——DNA连接酶
- 基因转移工具（“分子运输车”）
——基因进入受体细胞的载体

(一) 限制性核酸内切酶——“分子手术刀”

(1) 来源:主要是从原核生物中分离纯化出来的。

(2) 化学本质: 蛋白质。

(3) 作用 { 催化作用,可重复利用
可用于DNA的切割获取目的基因和载体的切割

(4) 作用特点: 特异性, 即限制酶可识别特定的脱氧核苷酸序列, 切割特定位点。

(5) 切割方式 { 错位切: 产生两个相同的黏性末端
平切: 形成平末端

限制性核酸内切酶

(Restriction endonuclease, RE)

能够识别**DNA**上的特定碱基序列并从这个位点切开**DNA**分子。

第一个核酸内切酶EcoRI是Boyer实验室在1972年发现的，它能特异性识别GAATTC序列，将双链DNA分子在这个位点切开并产生具有粘性末端的小片段。

限制性内切酶的种类和命名

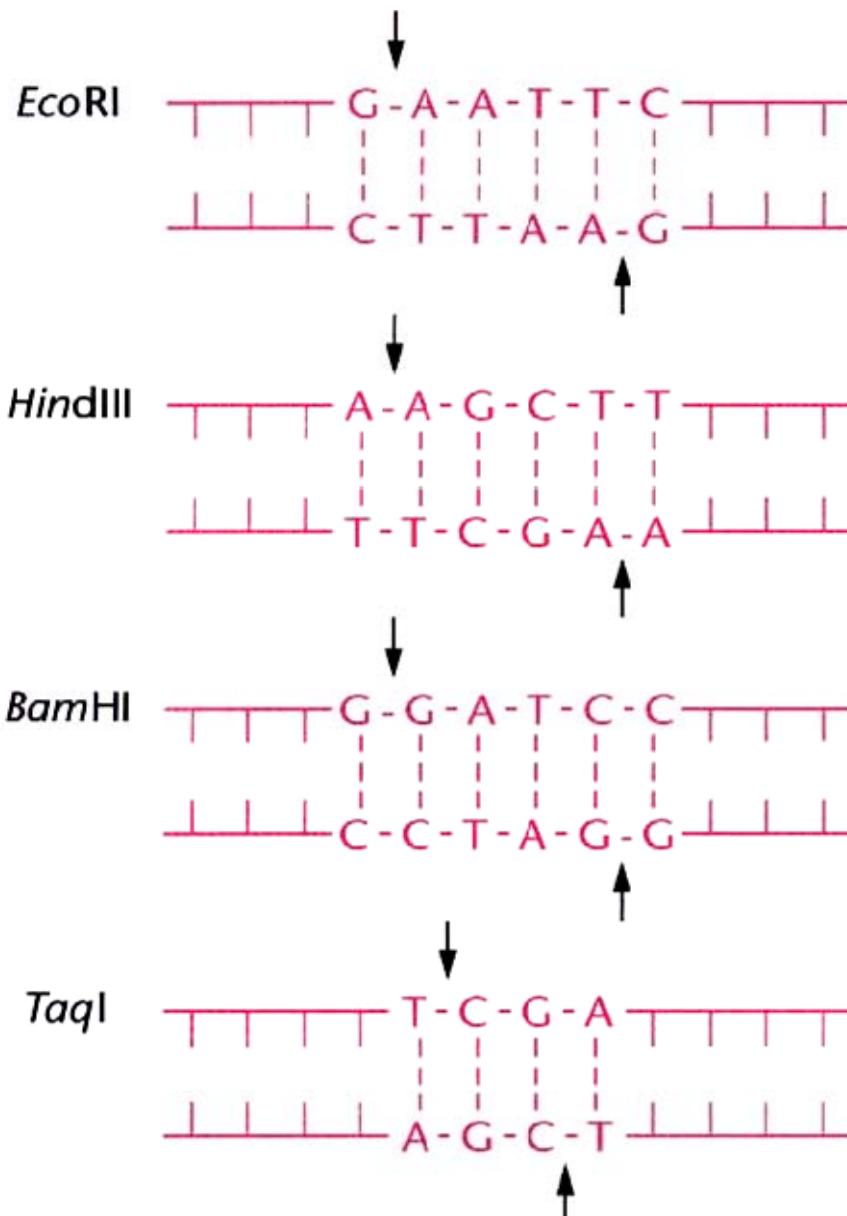
已经从约300种微生物中分离出了约4000种限制性内切酶。

命名方法：

粘质沙雷氏杆菌（*Serratia marcesens*） $\longrightarrow$ Sma I

大肠杆菌（*Escherichia coli* R） $\longrightarrow$ EcoR I

限制酶的识别序列



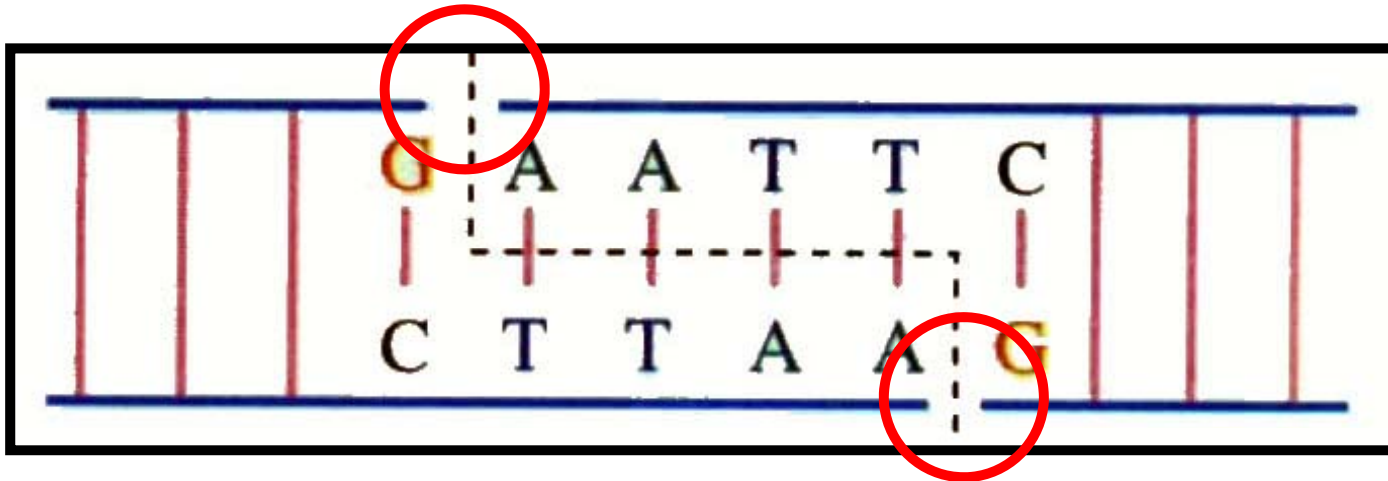
能被限制性内切酶特异性识别的切割部位都具有**回文序列**：

在切割部位，一条链正向读的碱基顺序与另一条链反向读的顺序完全一致。

(二) DNA连接酶——分子缝合针

1、种类： $\left\{ \begin{array}{l} \text{E·coli DNA连接酶} \\ \text{T}_4 \text{ DNA连接酶} \end{array} \right.$

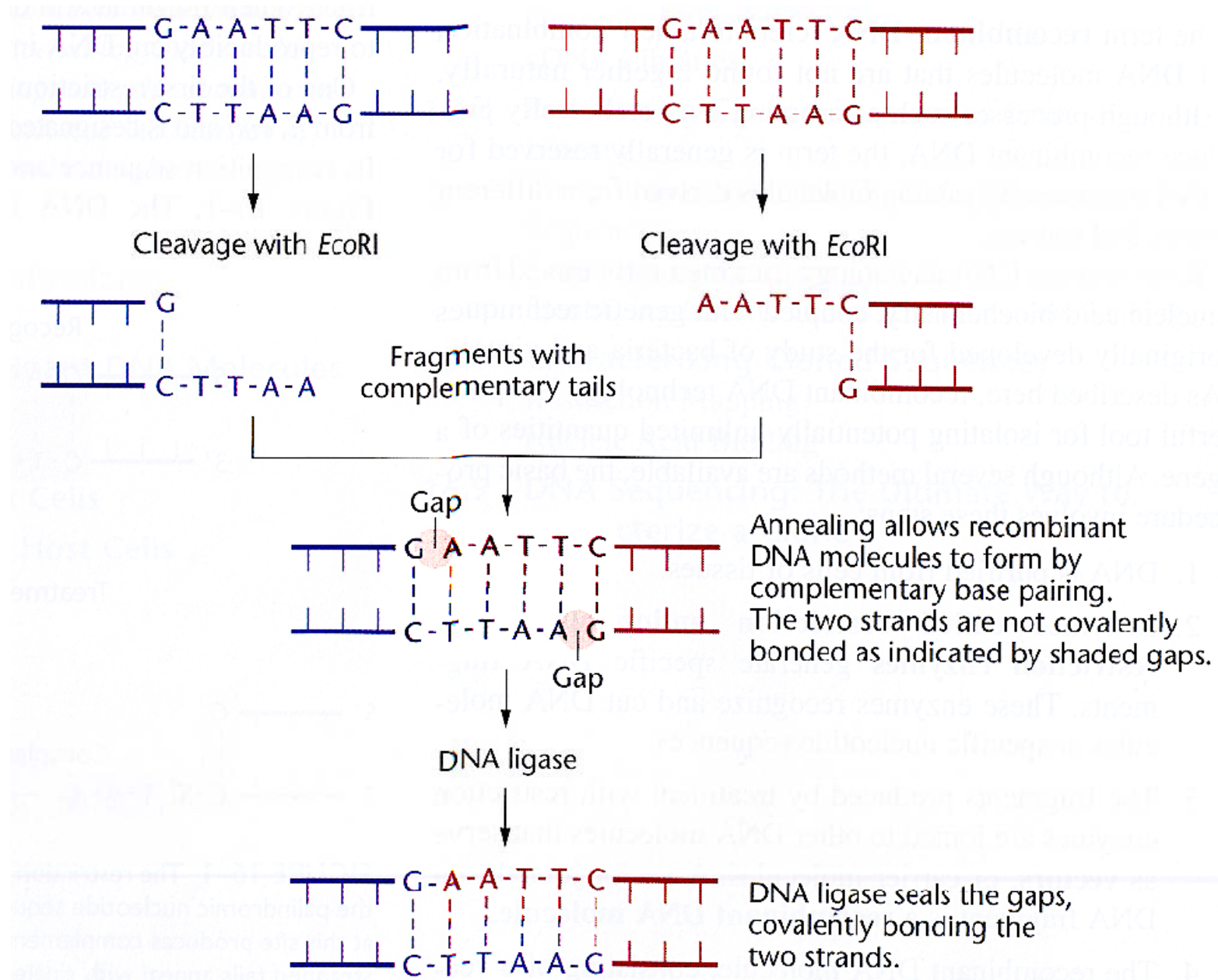
2、作用：



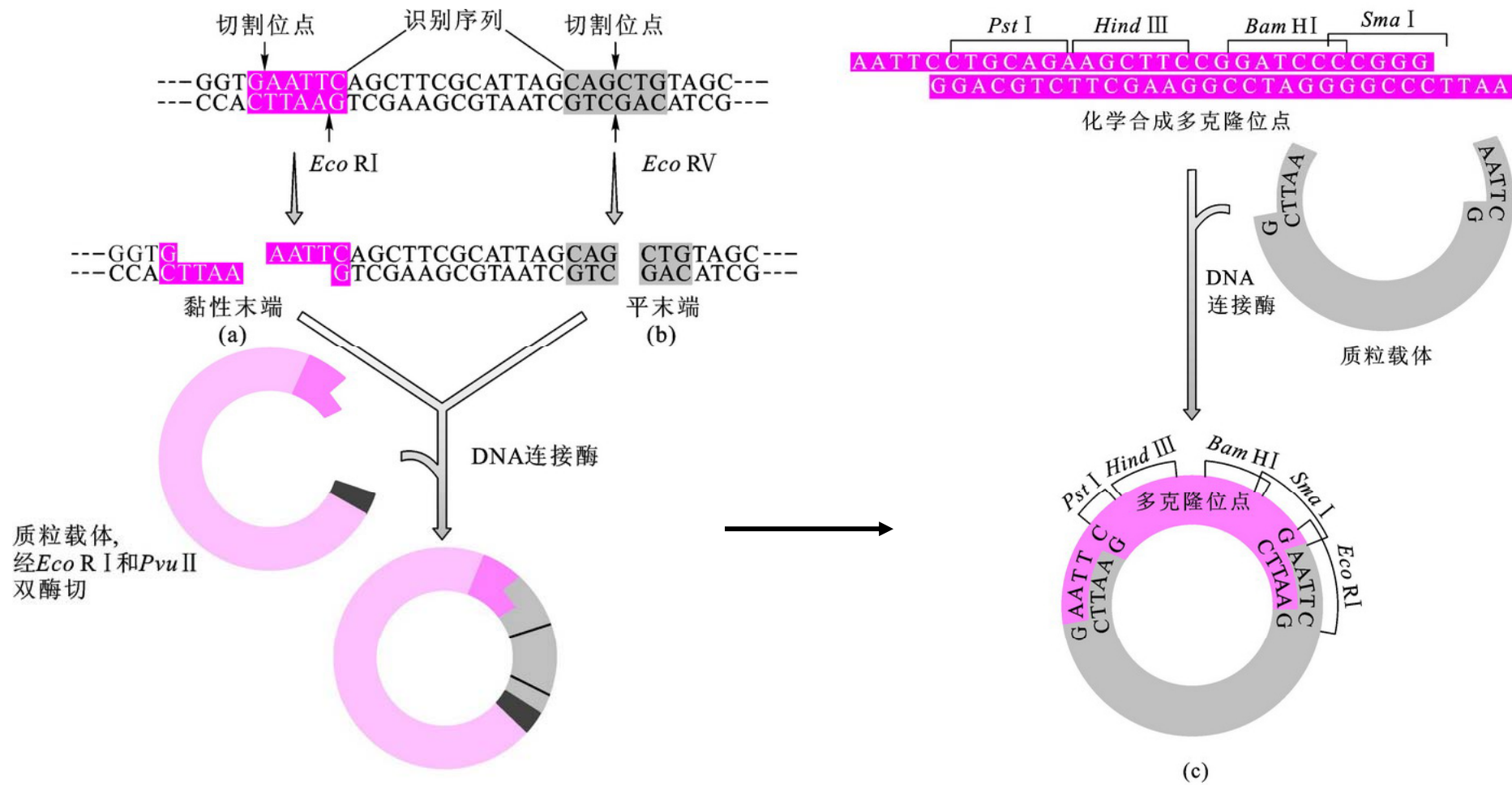
将双链 DNA片段“缝合”起来，恢复被限制酶切开的两个核苷酸之间的磷酸二酯键，形成一个重组的DNA分子。

例:

利用EcoRI构建基因表达重组载体



DNA连接酶能把不同的DNA片段连接成一个整体



E. coli DNA连接酶与T4 DNA连接酶比较

类型	来源	功能	
		相同点	差别
<i>E. coli</i> DNA连接酶	大肠杆菌	恢复 磷酸 二酯键	只能连接黏性末端
T ₄ DNA连接酶	T ₄ 噬菌体		能连接黏性末端和平末端(效率较低)

DNA连接酶与DNA聚合酶的比较

	DNA聚合酶	DNA连接酶
区别1	1)只能将单个核苷酸连接到已有的核酸片段上,形成磷酸二酯键	1)在两个DNA片段之间形成磷酸二酯键
区别2	2)以一条DNA链为模板,将单个核苷酸通过磷酸二酯键连接成一条互补的DNA链	2)将DNA双链上的两个缺口同时连接起来,不需要模板
相同点	形成磷酸二酯键	

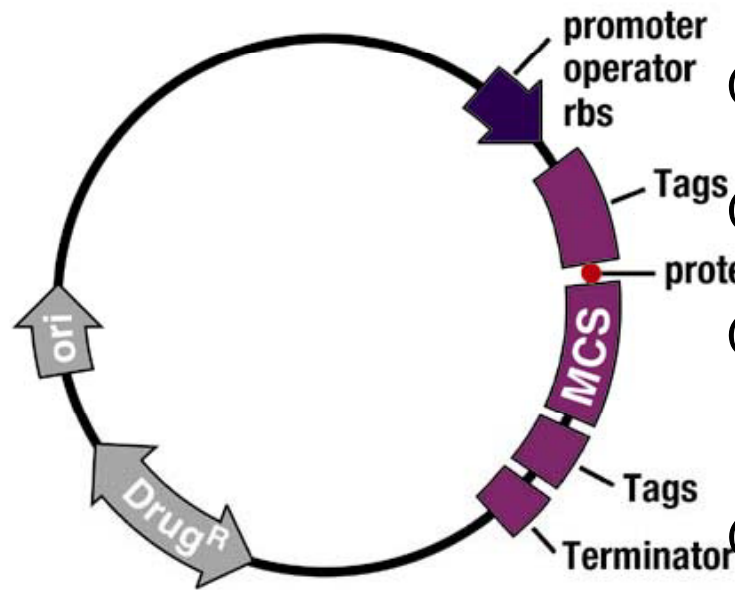
仅仅能在体外利用限制性核酸内切酶和**DNA**连接酶进行**DNA**的切割和重组，还不能满足基因工程的要求，只有将它们连接到具备自主复制能力的**DNA**分子上，才能在寄主细胞中进行繁殖。

（三）基因进入受体细胞的载体---“分子运输车”

具备自主复制能力的DNA分子就是分子克隆的载体（vector）。

载体的作用	1) 作为运载工具，将目的基因导入受体细胞中 2) 在受体细胞内对目的基因进行大量复制
载体的种类	① 细菌的质粒 ② 病毒：λ噬菌体衍生物、动植物病毒等。

表达载体需具备的几个条件



(1) 有一至多个不同的限制酶切点 (MCS) ；

(2) 对受体细胞无害；

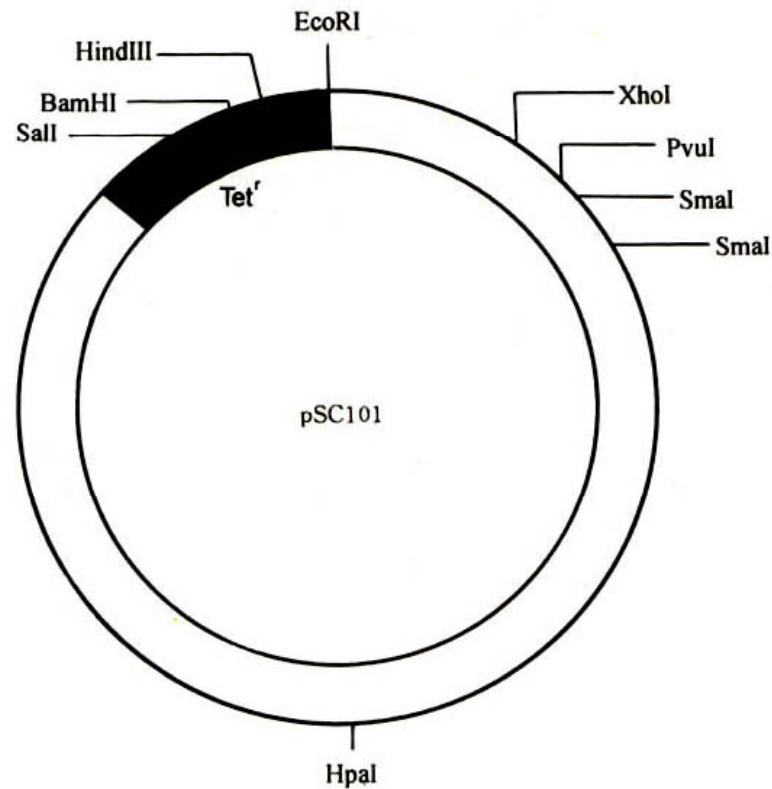
(3) 能在宿主细胞内复制并稳定地保存；

(4) 具有某个筛选标记，便于利用含抗生素的培养基进行鉴别和筛选；

(5) 含有一个复制起始点；

(6) 载体DNA 分子应大小适中，以便于提取和操作。

1、pSC101质粒载体（第一代载体）

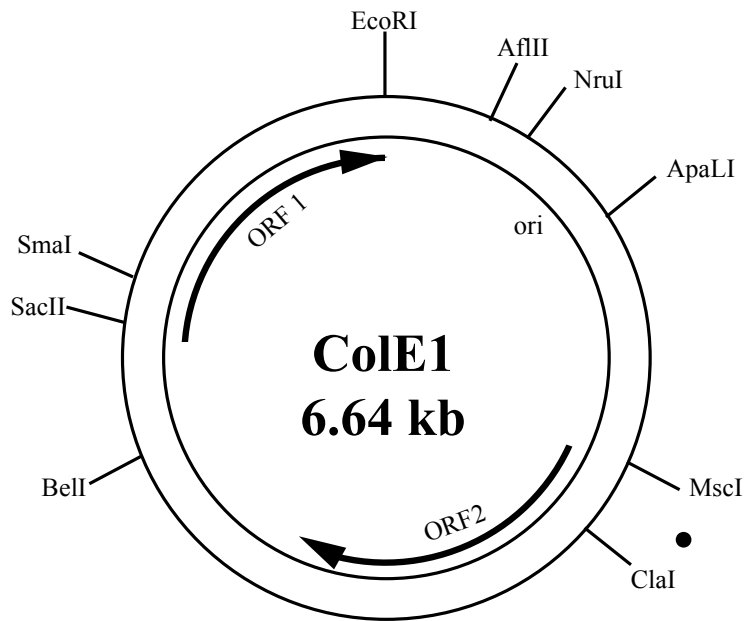


长9.09kb，带有四环素抗性基因（**tet^r**）及**EcoRI**、**HindIII**、**BamHI**、**SalI**、**XhoI**、**PvuII**以及**SmaI**等7种限制性核酸内切酶的单酶切位点，在**HindIII**、**BamHI**和**SalI**等3个位点插入外源基因，会导致**tet^r**失活。

缺点：它是一种严紧型复制控制的低拷贝质粒，平均每个寄主细胞仅有1~2个拷贝，从带有该质粒的寄主细胞中提取**pSC101 DNA**，产量很低。

2、ColE1质粒载体

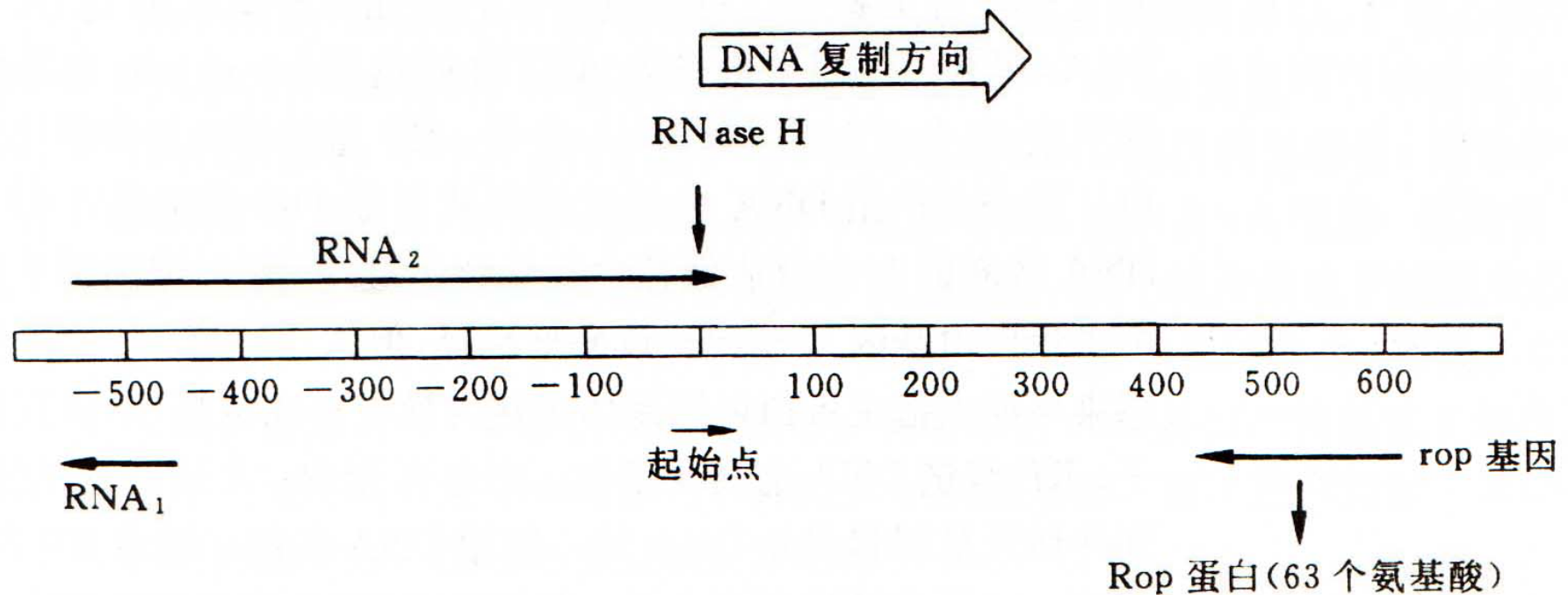
- 松弛型复制控制的多拷贝质粒。



一般情况下，当培养基中氨基酸被耗尽，或是在细胞培养物中加入氯霉素以抑制蛋白质的合成，寄主染色体DNA的复制便被抑制，细胞的生长也随之停止。

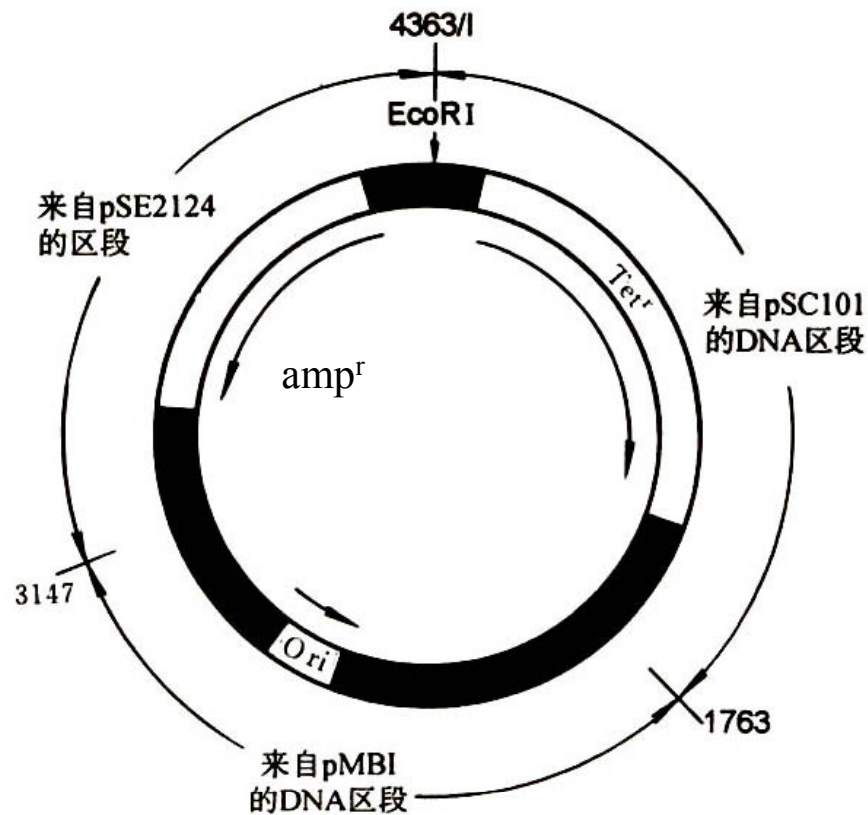
- 松弛型质粒DNA却继续复制数小时，使每个寄主细胞中ColE1质粒的拷贝数达到1000~3000个，占细胞总DNA的50%左右。

ColE1质粒DNA复制起始部位调控因子之间关系



- 前体RNA(RNA_{II})的转录起始于复制起点上游，需经RNaseH加工后产生有555个核苷酸的引物，起始DNA合成。
- RNA₁在RNA₂的5'末端，转录方向相反，因此能通过氢键配对与后者相互作用，阻止RNaseH加工RNA₂，使其不能转化为有活性的引物，阻碍复制起始。
- 没有Rop蛋白，RNA₁基因就不能起始转录。

3、pBR322质粒载体



由三个不同来源的部分组成的：

第一部分氨苄青霉素抗性基因（**Amp^R**）；

第二部分四环素抗性基因（**tet^r**）；

第三部分**DNA复制起点（ori）**。

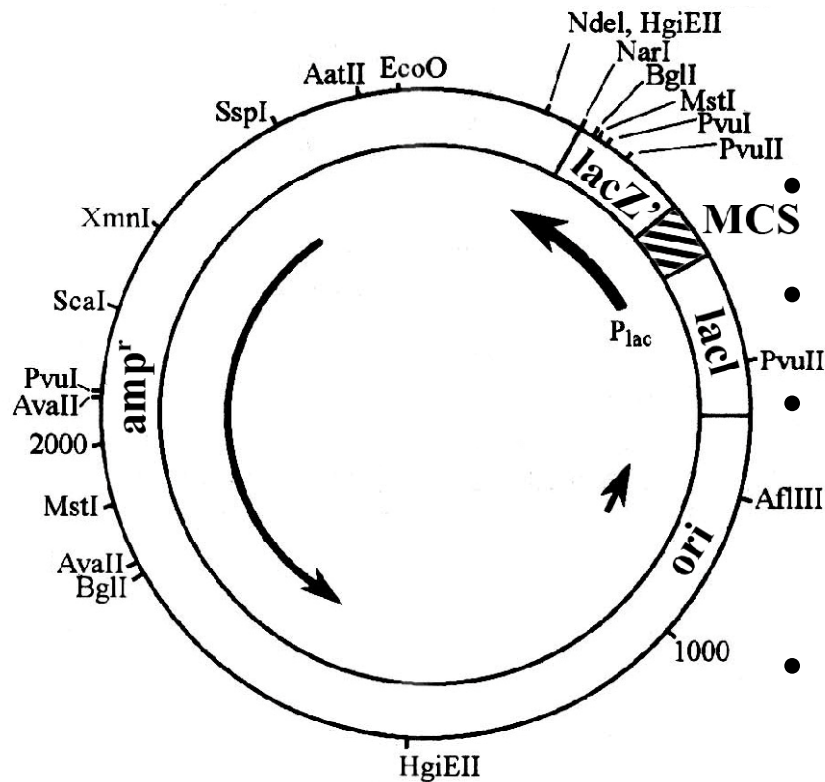
优点：

具有较小的分子量（**4363 bp**）。能携带**6-8 kb**的外源DNA片段，操作较为便利。

有两种抗生素抗性基因作为转化子的选择标记。

有较高的拷贝数，经过氯霉素扩增，每个细胞可累积1000~3000个拷贝，便于制备重组体DNA。

4、pUC质粒载体



包括四个部分：

- 来自pBR322质粒的复制起点（ori）

- 氨苄青霉素抗性基因（amp^r）

- 大肠杆菌 β -半乳糖酶基因（lacZ）启动子及编码 α -肽链的DNA序列。特称为lacZ'基因

- 位于lacZ'基因5'-端的一段多克隆位点（MCS），外源基因插入破坏lacZ'基因功能

- **LacZ**编码 β -半乳糖苷酶氨基端**146**个氨基酸的 α -肽，
- **IPTG**（异丙基- β -D-硫代半乳糖苷）诱导该基因表达，
- 所合成的 β -半乳糖苷酶 α -肽与宿主细胞编码的缺陷型 β -半乳糖苷酶互补，产生有活性的 β -半乳糖苷酶，水解培养基中的**X-gal**（5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷），生成**蓝色的溴氯吲哚**。

结果：

含**X-gal**培养基中**非转化菌落呈蓝色**，含有重组**DNA**分子的**菌落为白色**。

优点:

- 更小的分子量和更高的拷贝数。

在pBR322基础上构建pUC质粒载体时，仅保留了其中的氨苄青霉素抗性基因及复制起点，其分子小了许多。由于缺失rop基因，pUC质粒不经氯霉素扩增时，平均每个细胞即可达500~700个拷贝。

- 可用X-gal显色法实现对重组体转化子的鉴定。

pUC质粒结构中具有来自大肠杆菌lac操纵子的lacZ'基因，所编码的 α -肽链可参与 α -互补作用。

- 具有多克隆位点MCS区段，可以把具两种不同粘性末端（如EcoRI和BamHI）的外源DNA片段直接克隆到质粒载体上。

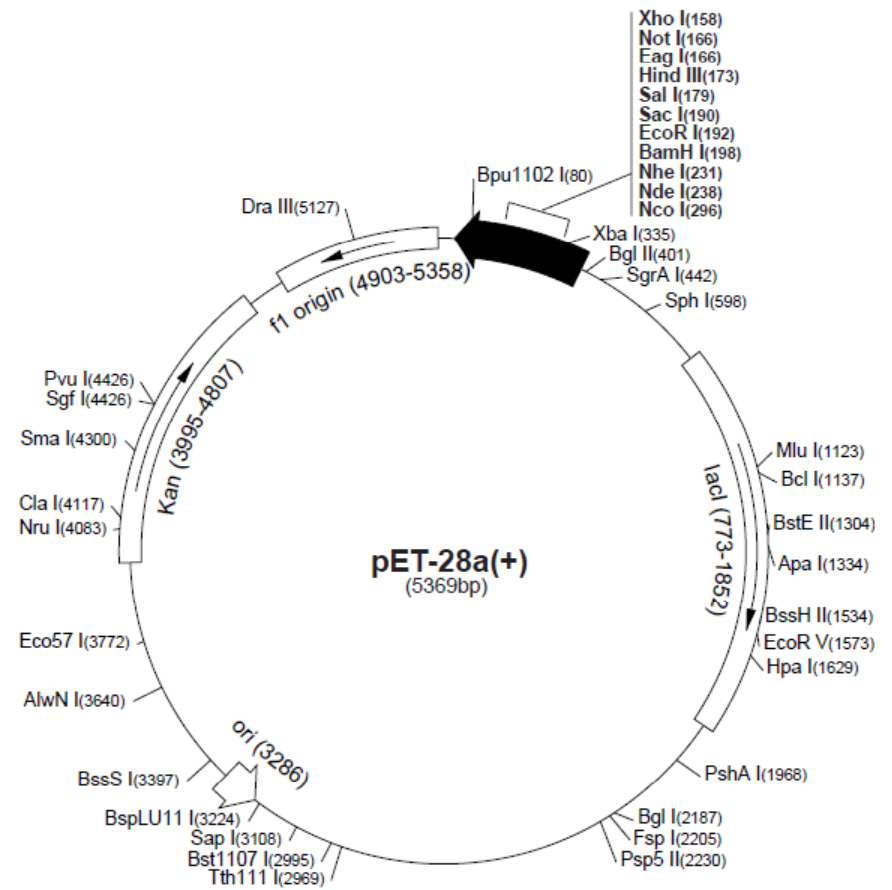
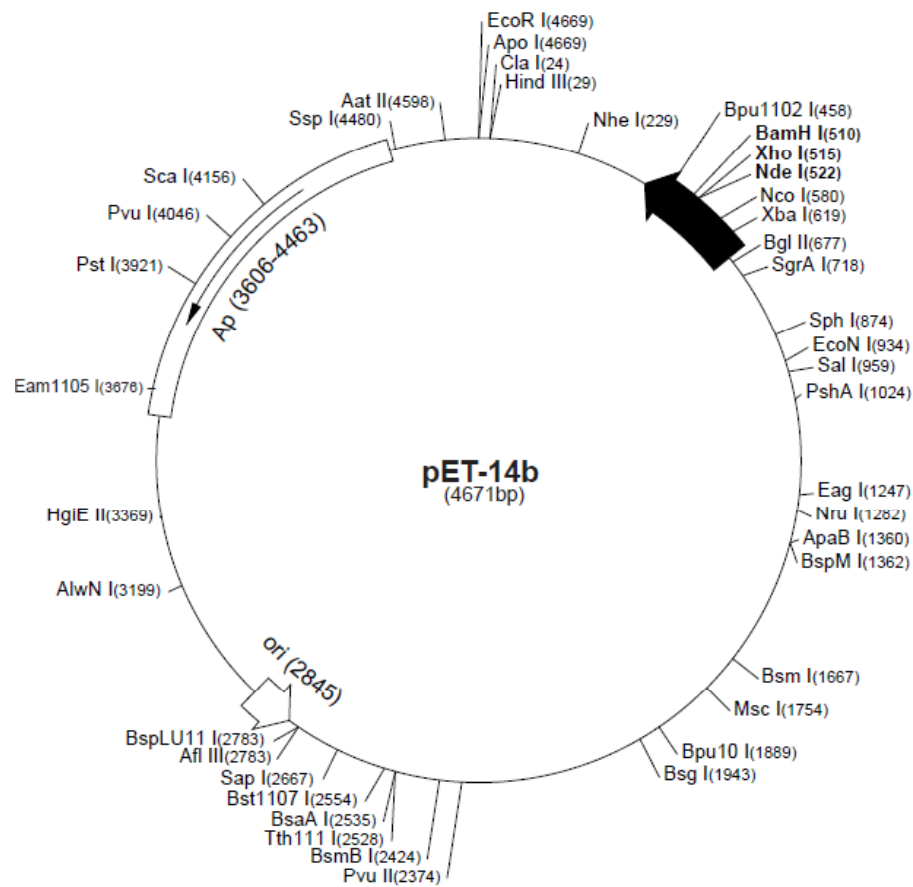
5、pET系列质粒

pET系统是有史以来在E.coli中克隆表达重组蛋白的功能最强大的系统。

- 目的基因被克隆到pET质粒载体上，受噬菌体T7强转录及翻译信号控制，表达由宿主细胞提供的T7RNA聚合酶诱导。
- T7 RNA聚合酶机制十分有效并具选择性：充分诱导时，几乎所有的细胞资源都用于表达目的蛋白。

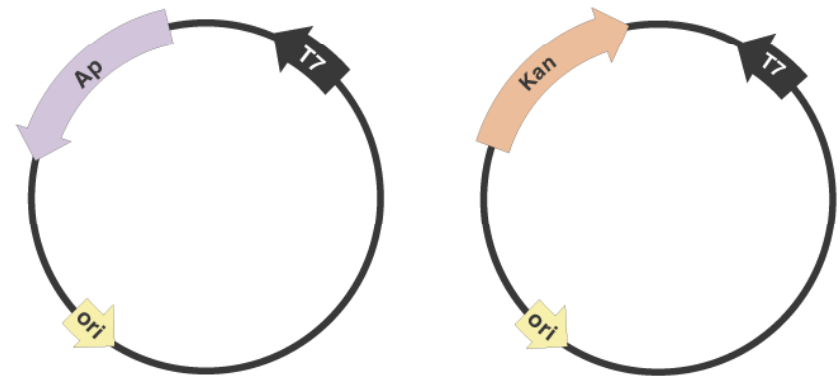


pET系列表达载体



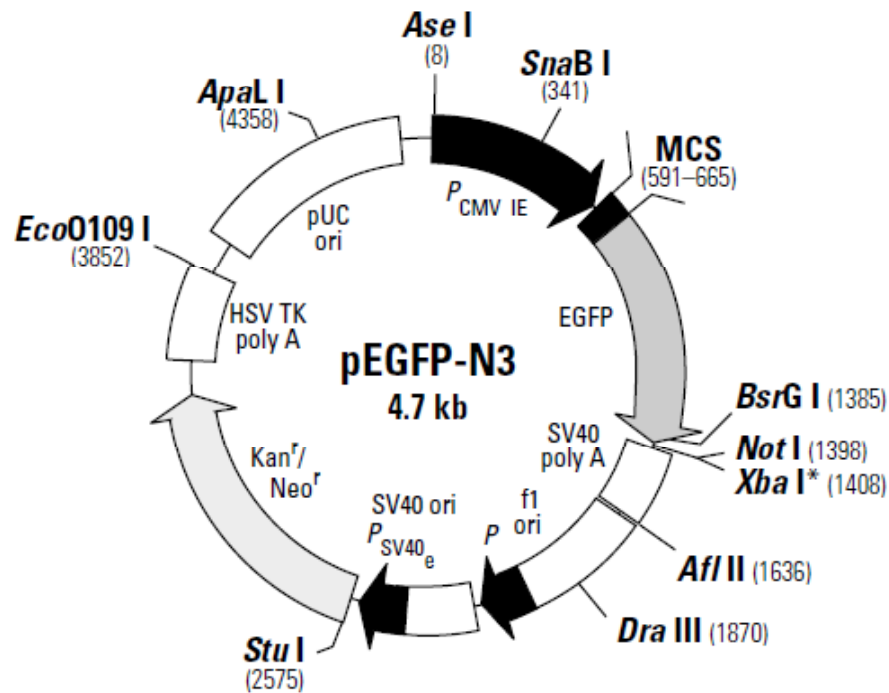
pET载体的抗生素抗性

- pET载体常用的两种筛选标记是 $\text{Amp}^{\text{r+}}$ 和 $\text{Kna}^{\text{r+}}$
- 因为内酰胺酶的消化和PH的降低， $\text{Amp}^{\text{r+}}$ 的选择性易于丢失。某种情况下使用 $\text{Kna}^{\text{r+}}$ 更为有利。
- $\text{Amp}^{\text{r+}}$ 和 $\text{Kna}^{\text{r+}}$ 的另一个不同是两种基因的转录方向不同。
 $\text{Amp}^{\text{r+}}$ 位于T7启动子下游，与其方向相同。除了pET5系列，T7转录终止序列位于内酰胺酶基因前面，但是这个终止序列只有70%的有效性。因此，T7聚合酶能够通读，导致内酰胺酶的积累。相反 $\text{Kna}^{\text{r+}}$ 的转录方向与T7启动子方向相反，诱导时并没有 $\text{Kna}^{\text{r+}}$ 基因的增加。

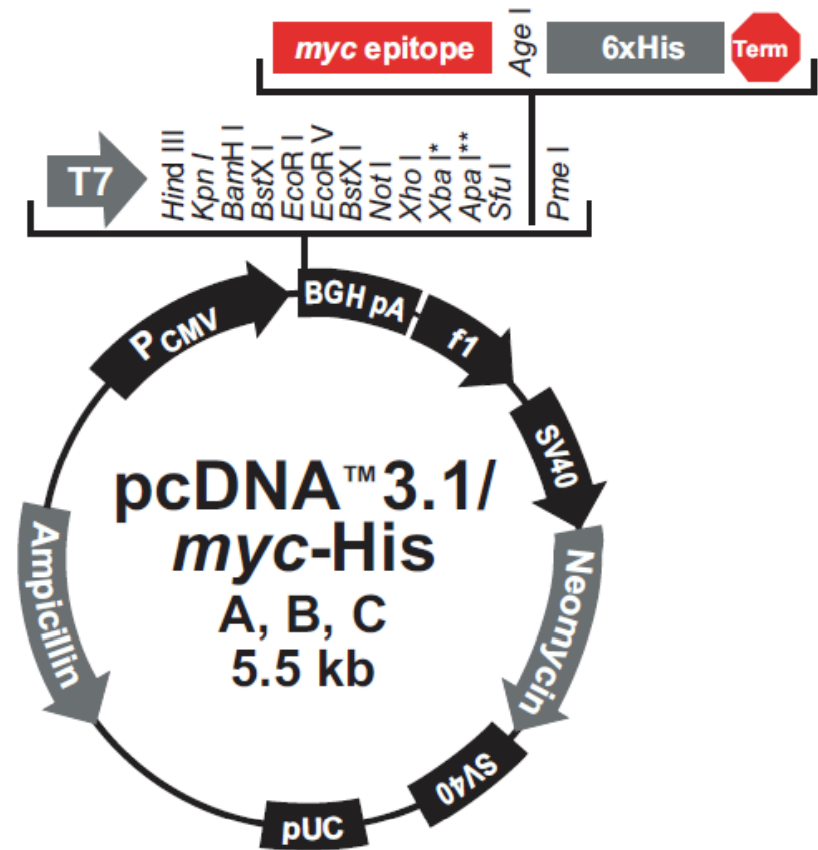


6、常用真核表达载体

增强型绿色荧光蛋白表达载体



可确定外源基因在细胞内的表达和/或组织中的定位。



主要由CMVp启动子、氨苄抗性基因和抗neo基因以及pUC骨架构成，在大多数真核细胞内都能高水平稳定地表达外源目的基因。

7、穿梭质粒载体 (shuttle plasmid vector)

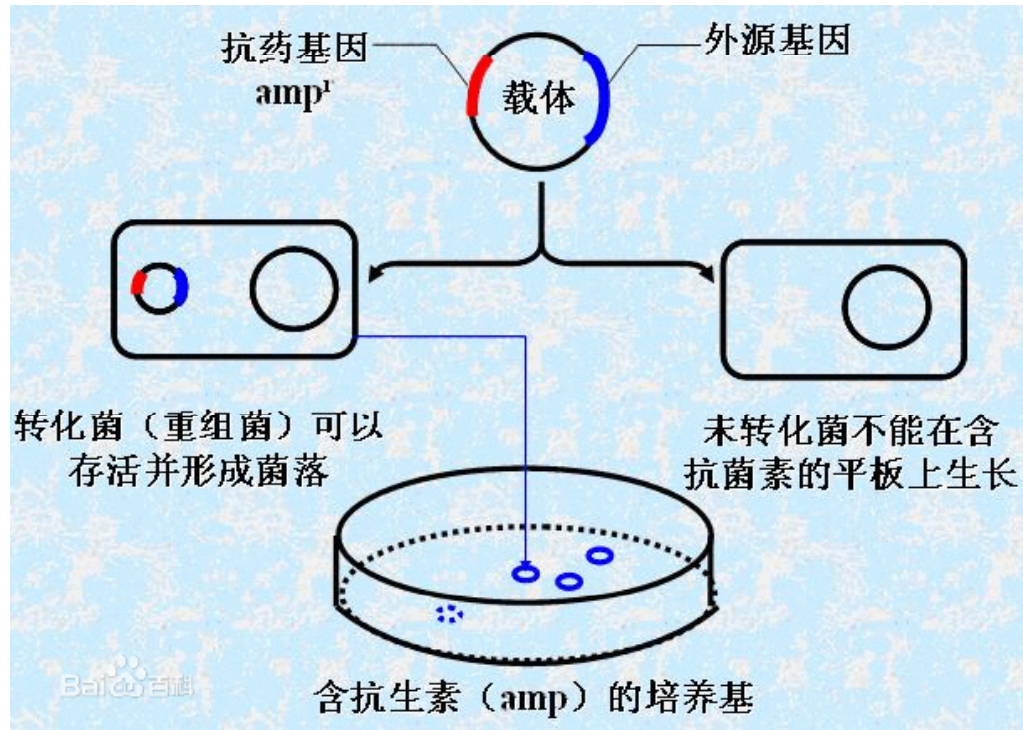
由人工构建的具有原核和真核两种不同复制起点和选择标记，可在不同的寄主细胞内存活和复制的质粒载体。

这类质粒载体可保证外源DNA序列在不同物种(原核和真核)的细胞内得到扩增，用途广泛。

如用于枯草的pBE2、酵母的pPIC9K、哺乳动物表达载体pMT2 和用于植物细胞的Ti 质粒。

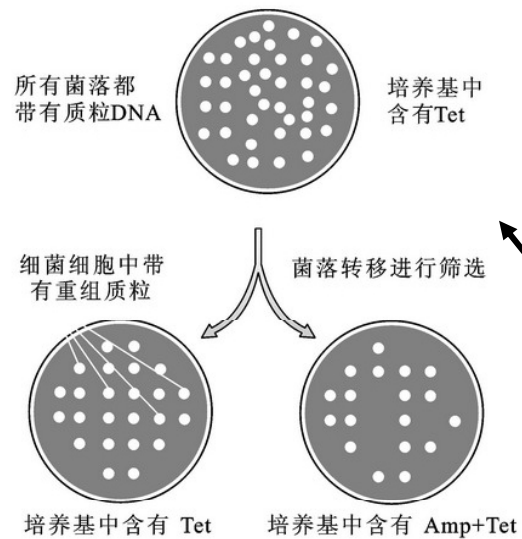
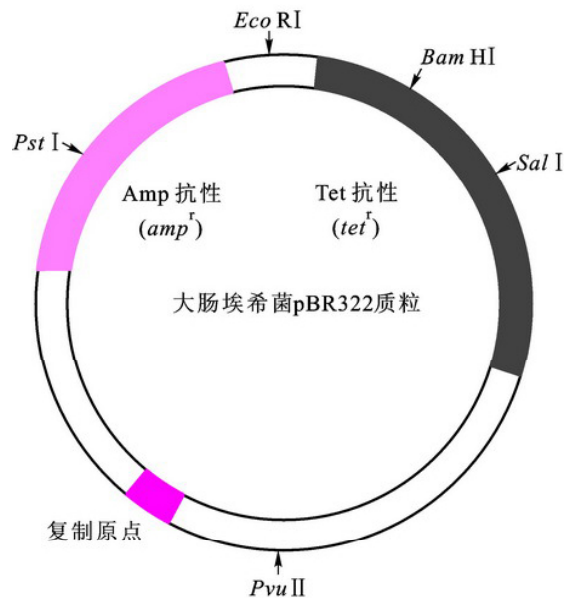
细菌转化与目标DNA分子的增殖

获得了用外源**DNA**片段和载体分子重组而成的杂种**DNA**分子后，还必须通过一个被称为**细菌转化**的过程将其重新导入到寄主细胞中，才能**保证重组DNA分子的增殖**。

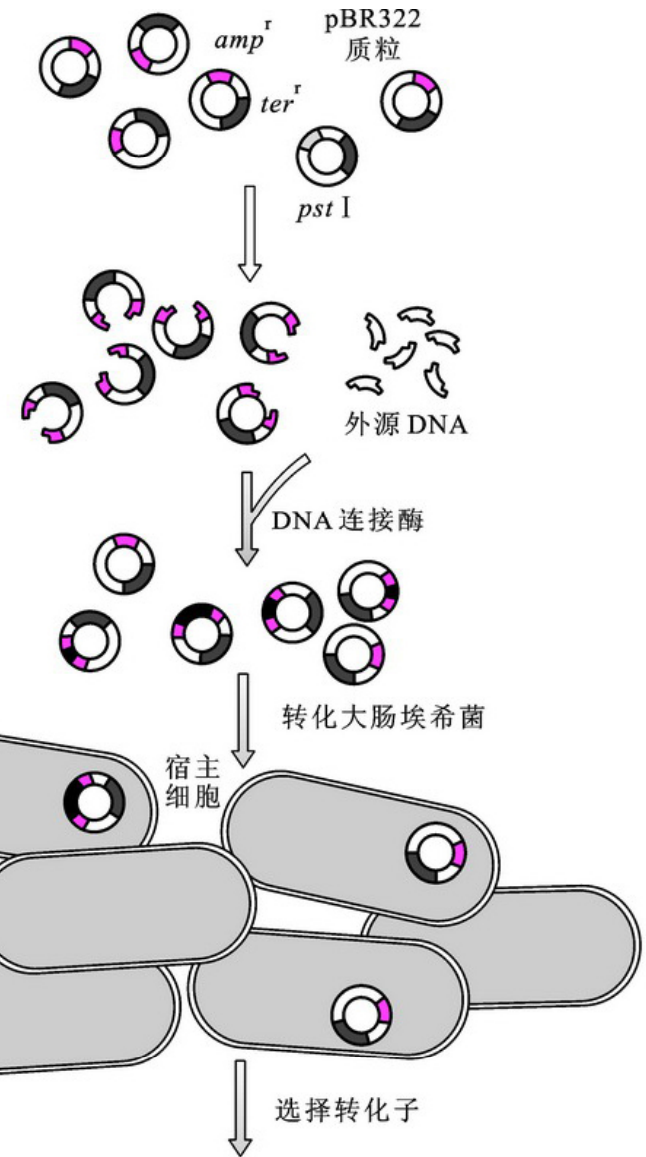


外源**DNA**能在宿主细胞中通过自身载体上的复制起始位点进行复制增殖，从而在宿主细胞中长期保存，并以完整的形式从细胞中被分离纯化出来。

重组DNA操作过程



(b)



细菌转化（**transformation**），是指一种细菌菌株由于捕获了来自供体菌株的**DNA**而导致性状特征发生遗传改变的过程。

细菌转化原理

- 细菌处于容易吸收外源DNA的状态叫感受态。
- 为提高效率，可对受体菌进行物理或化学处理，增加其获取DNA的能力。经过这种处理的细胞被称作感受态细胞（**competent cells**）。
- 目前应用较广的转化方法有两种：
 - (1) CaCl_2 转化法（化学转化法）
 - (2) 电转化法（电击法）

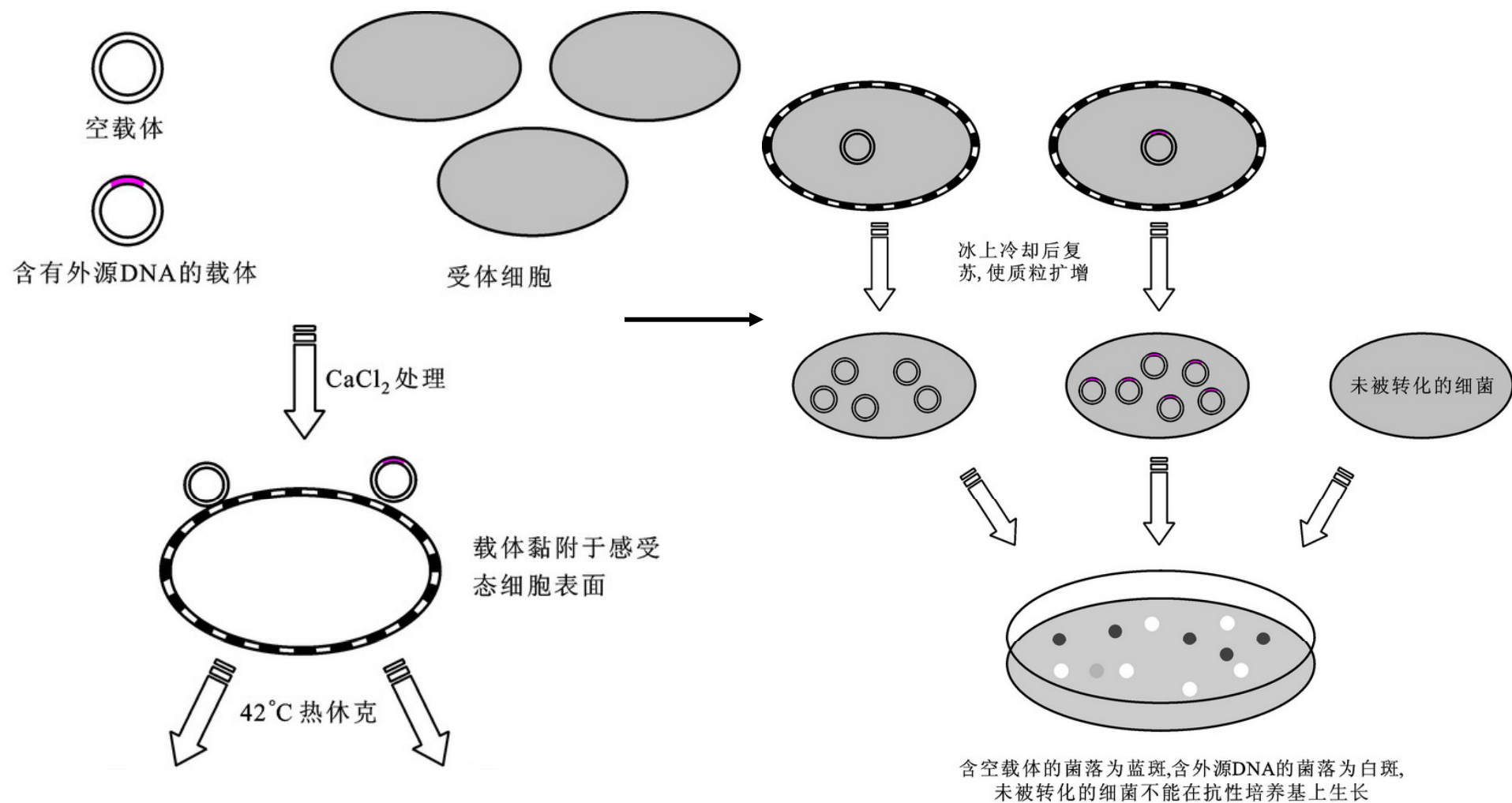
CaCl₂法

将快速生长期大肠杆菌置于经**0℃**预处理的低渗**CaCl₂**溶液中，细胞膨胀，膜通透性改变，易与外源**DNA**相粘附。

将该体系转移到**42℃**下做短暂的热刺激，外源**DNA**就可能被细胞吸收。将经过转化后的细胞置于选择性培养基上，筛选阳性克隆。

转化效率可达到 **$5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$** 个转化子/**μg**超螺旋质粒**DNA**。

细菌转化及蓝白斑筛选



电击法

电脉冲可以在细胞膜上造成小凹陷，形成疏水孔洞。随着跨膜电压增加，大疏水性孔洞会转变为亲水性孔洞，介质中的**DNA**进入细胞质。

将生长至对数中期的**E. coli**菌液冷却至4℃后离心，洗菌后用**10%**的甘油悬浮，将高密度菌液（ **$\sim 2 \times 10^{10}/\text{ml}$** ）置于特制的电极杯中进行电击。

获得最大转化效率时场强一般为**12.5~15kV/cm**，时间跨度一般为**4.5~5.5**毫秒。

电击转化**与温度有关**，一般在**0~4℃**进行。由于转化载体上常带有**LacZ**基因，多用带有不同抗生素的选择性培养基结合**α-互补**蓝白斑筛选法鉴定转化细胞。

缺点：

过程太长，因而不是大规模研究的最好方法，而且如果目的基因沉默引起胚胎和发育早期过程中死亡，这种方法将不会凑效。

哺乳动物细胞表达系统

由哺乳动物细胞翻译后再加工修饰产生的外源蛋白质，在活性方面远胜于原核表达系统及酵母、昆虫细胞等真核表达系统，更接近于天然蛋白质。

哺乳动物细胞表达载体包含原核序列、启动子、增强子、选择标记基因、终止子和多聚核苷酸信号等。

转染(transfection)

指真核细胞由于外源DNA掺入而获得新的遗传标志的过程。

转染技术方法

瞬时转染:

外源DNA/RNA不整合到宿主染色体中，因此一个宿主细胞中可存在多个拷贝数，产生高水平的表达，但通常只持续几天，多用于启动子和其它调控元件的分析。超螺旋质粒DNA转染效率较高，在转染后24-72小时内分析结果。

稳定转染（永久转染）:

外源DNA既可以整合到宿主染色体中，也可能作为一种游离体(episome)存在。尽管线性DNA比超螺旋DNA转入量低但整合率高。外源DNA整合到染色体中概率很小，大约 $1/10^4$ 转染细胞能整合，需要通过一些选择性标记，如来氨丙基转移酶 (APH; 新霉素抗性基因)，潮霉素B磷酸转移酶 (HPH)，胸苷激酶(TK)等反复筛选，得到稳定转染的同源细胞系。

转染技术的选择对转染结果影响也很大，许多转染方法需要优化DNA与转染试剂比例，细胞数量，培养及检测时间等。

将外源基因导入哺乳动物细胞主要方法

1. 感染性病毒颗粒感染宿主细胞；
2. 通过脂质体法、显微注射法、磷酸钙共沉淀法及DEAE-葡聚糖法等非病毒载体的方式将基因导入到细胞中。

*其中，病毒载体已成为动物体内表达外源基因的有力工具，在临床基因治疗的探索中也发挥了重要作用。

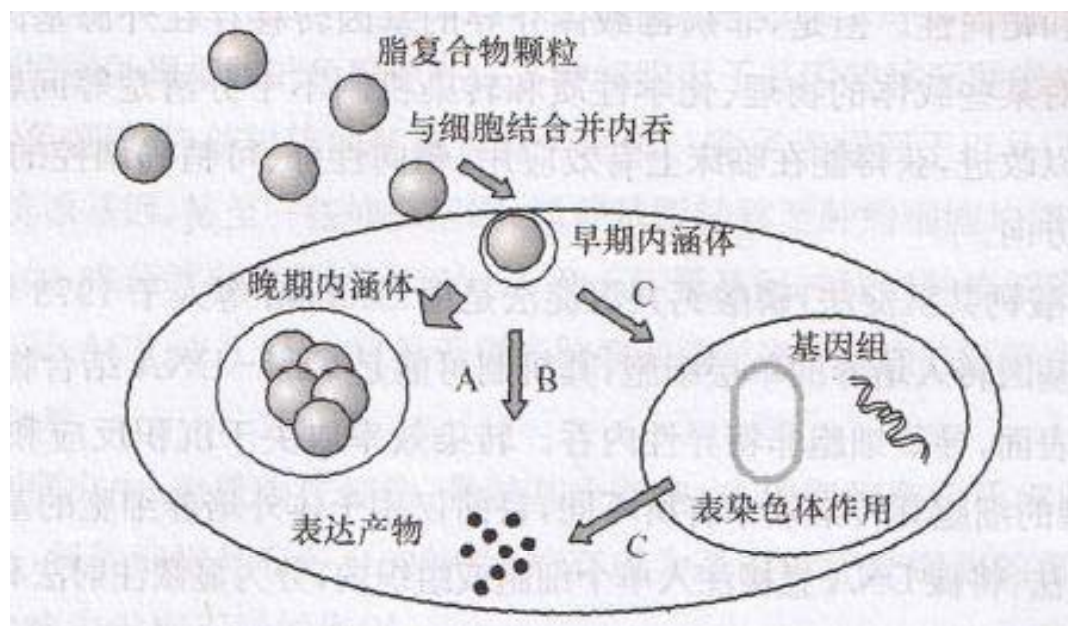
*逆转录病毒感染效率高，某些难转染的细胞系也可通过其导入外源基因，但要注意的是逆转录病毒可整合入宿主细胞染色体，具有潜在的危险性。

DEAE-葡聚糖法

- **DEAE-葡聚糖**是最早应用哺乳动物细胞转染试剂之一；
- **DEAE-葡聚糖**是阳离子多聚物，它与带负电的核酸结合后接近细胞膜而被摄取；
- 用**DEAE-葡聚糖**转染成功地应用于瞬时表达的研究，但用于稳定转染却不是十分可靠。

磷酸钙法

- 磷酸钙共沉淀法是由**Graham**等人于**1973**年首先建立的，因为试剂易取得，价格便宜而被广泛用于瞬时转染和稳定转染的研究；
- 先将**DNA**和氯化钙混合，然后加入到**PBS**中慢慢形成**DNA**磷酸钙沉淀，最后把含有沉淀的混悬液加到培养的细胞上，通过细胞胞膜的内吞作用摄入**DNA**。
- 转染效率取决于沉积反应和形成颗粒的大小，对于不同类型的细胞其转染效率有所不同，目前仅用于体外培养细胞的基因转移。
- 磷酸钙似乎还通过抑制血清中和细胞内的核酸酶活性而保护外源**DNA**免受降解。



人工脂质体法

- 人工脂质体法采用**阳离子脂质体**，具有较高的转染效率，不但可以转染其他化学方法不易转染的细胞系，而且还能转染从寡核苷酸到人工酵母染色体不同长度的**DNA**，以及**RNA**和蛋白质。
- LipoFiter™**脂质体转染试剂是一种适合于把质粒或其它形式的核酸,以及核酸蛋白复合物转染到真核细胞中的高效阳离子脂质体转染试剂。它可以**和带负电荷的核酸结合后形成复合物**，当复合物接近细胞膜时**被内吞**成为内体进入细胞质，随后**DNA**复合物被释放进入细胞核内。
- 同时适用于瞬时表达和稳定表达，可以介导**DNA**和**RNA**转入动物和人的体内用于基因治疗。

物理转染方法

①显微注射:

显微注射虽然费力，但是非常有效的将核酸导入细胞或细胞核的方法。这种方法常用来制备转基因动物，但却不适用于需要大量转染细胞的研究。

②电穿孔:

电穿孔法常用来转染如植物原生质体这样的常规方法不容易转染的细胞。电穿孔靠脉冲电流在细胞膜上打孔而将核酸导入细胞内。导入的效率与脉冲的强度和持续时间有关系。已经应用于活体基因转移。

③基因枪(微粒子轰击法):

基因枪依靠携带了核酸的高速粒子而将核酸导入细胞内，这种方法具有操作简捷、安全、有效、不损伤靶细胞原有的结构等优点。适用于培养的细胞核在体的细胞。

应用例举

1978年，胰岛素基因在*E.coli*中表达

组成：51肽

功能：抑制高血糖，治疗糖尿病

效益：全世界糖尿病患者6000万，美国200万

8000吨胰脏→1 Kg胰岛素→1000名患者使用一年，每名患者每年需用8吨胰脏提取的胰岛素

用基因工程法：2吨发酵液→650吨动物胰脏：每名患者每年需用25升发酵液

1979年，人生长素基因在*E.coli*中表达

- 组成：191肽（脑垂体分泌）
- 功能：治疗侏儒症
- 效益：50个人脑垂体→1名患者用一年
- 基因工程法：1升发酵液即可达到这样的目的

1980年，人干扰素基因在*E.coli*中表达

- 组成：
 α 、 β 干扰素由166个氨基酸组成， γ 干扰素由146个氨基酸组成
- 功能：调节免疫功能，抗病毒，抗肿瘤
- 效益：1升发酵液 $\rightarrow$ 600 μg 干扰素=1000升血细胞提取物
- 基因工程以前：1 mg干扰素价值超过1万美元；
- 基因工程以后：1 mg干扰素价值只有几美分

基因治疗

•遗传性疾病的基因治疗

1990 年，美国国立卫生院的科学家用反转录病毒作为载体，把腺苷脱氨酶（adenosine deaminase, ADA）基因转染至一名患 ADA 缺陷症女孩的淋巴细胞，使这个患者先天缺损的免疫系统趋于正常。

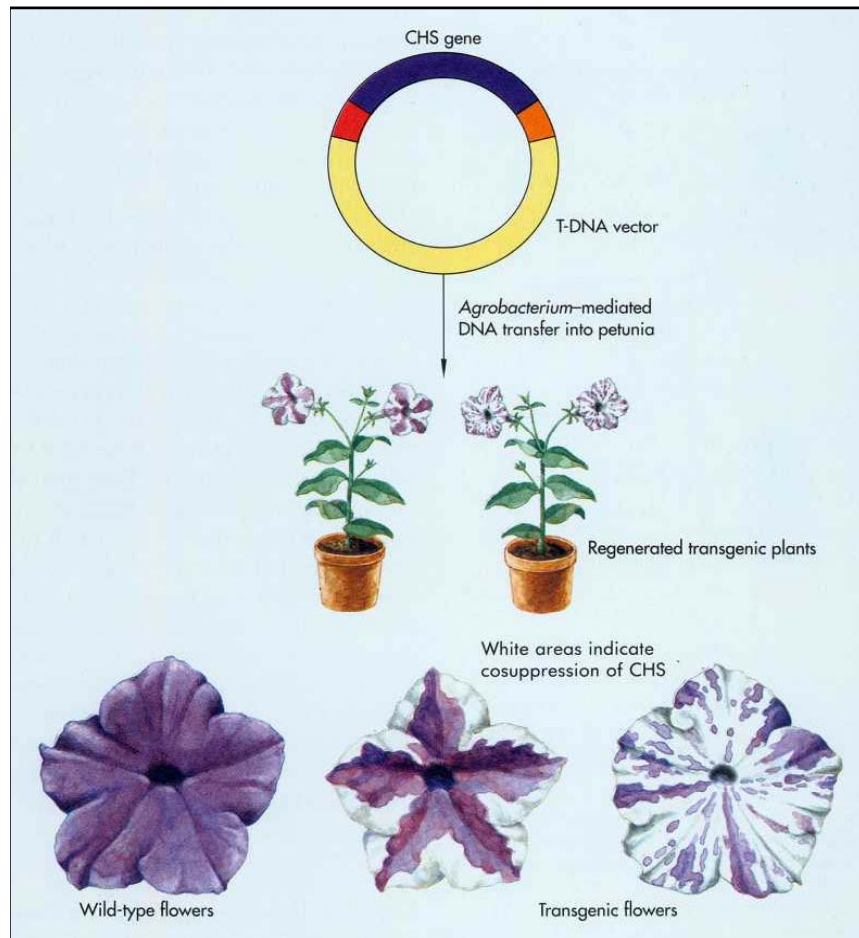
•恶性肿瘤的治疗

用反转录病毒将毒素基因导入癌细胞中，在靶细胞中表达毒素并发挥杀伤作用，但对其他细胞的毒性较低。

•传染病的基因治疗

美国科学家用反转录病毒将编码CD4 分子的基因导入上皮细胞及小鼠的成纤维细胞并使之表达，目的是抑制艾滋病病毒HIV 的繁殖。还有将编码艾滋病病毒RNA 降解的核酸酶基因转染淋巴细胞，可以抑制HIV 病毒的传播。利用类似的方法还可以治疗人乳头瘤病毒、巨细胞病毒及肝炎病毒的感染。

转基因植物



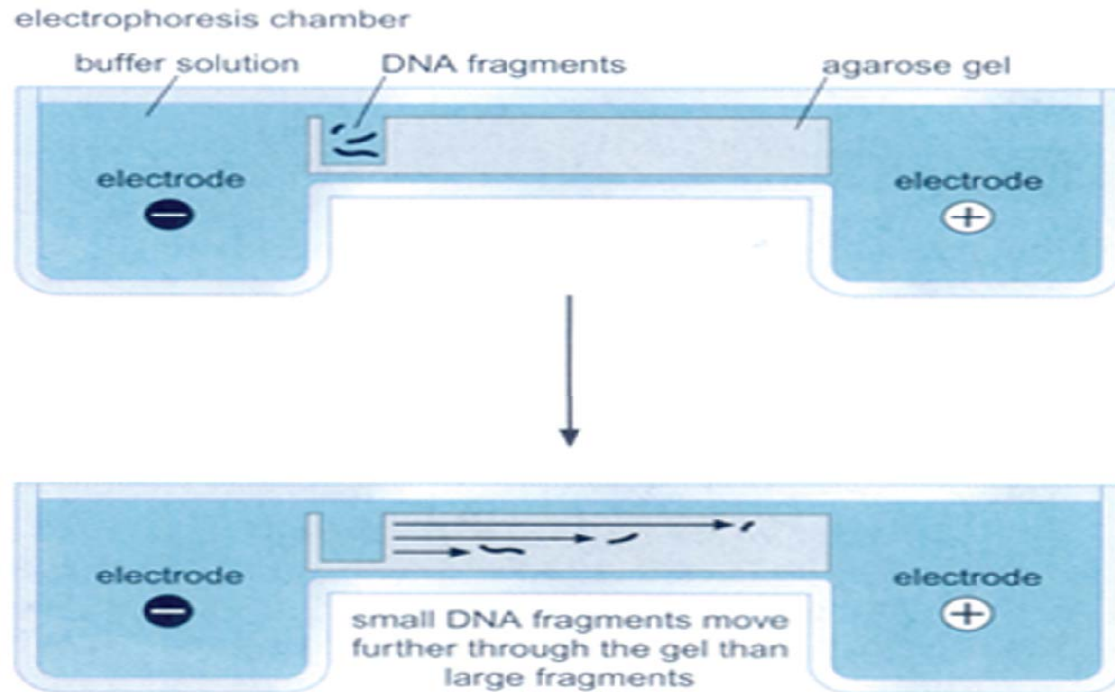
- 品质、抗虫害、抗逆性遗传改良
- 用马铃薯生产人糖尿病疫苗
- 用烟草生产人的红血球蛋白
- 用烟草生产人的溶酶素
- 用烟草生产人的抗癌疫苗
- 用苜蓿生产人的免疫球蛋白
- 用玉米生产人的牙齿保健抗体蛋白等

DNA操作技术

（一）核酸的凝胶电泳

自从琼脂糖（**agarose**）和聚丙烯酰胺（**polyacrylamide**）凝胶被引入核酸研究以来，按分子量大小分离**DNA**的凝胶电泳技术，已经发展成为一种分析鉴定重组**DNA**分子及蛋白质与核酸相互作用的重要手段。

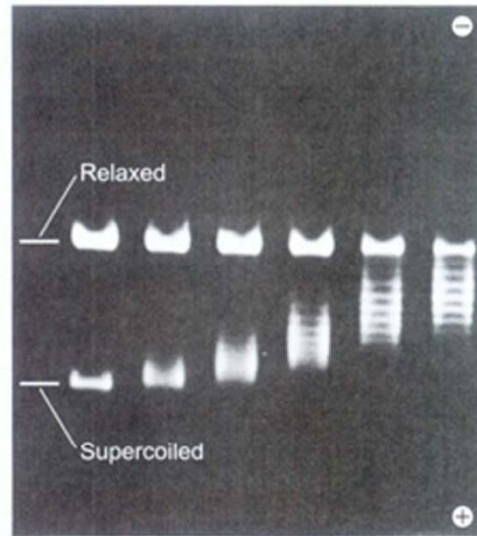
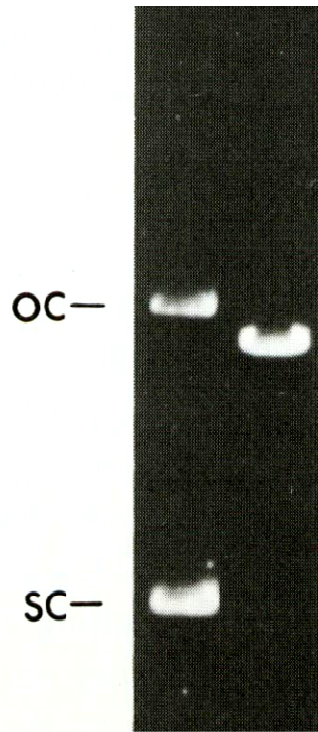
凝胶电泳的原理



20-1

- 带有负电荷的核苷酸链（DNA或RNA），依靠无反应活性的稳定的介质和缓冲液，在电场中以一定的**迁移率**从负极移向正极。
- 电泳分子在电场作用下的迁移速度，叫做**电泳的迁移率**，它与电场强度和电泳分子本身所携带的净电荷数成正比，与片段大小成反比。

电泳的迁移率取决于核酸分子本身的大小和构型



6-27

- 分子量较小的DNA分子，比分子量较大的DNA分子迁移率要快；
- 同等分子量的不同构型的核酸分子，构型紧密的比松散型的开环DNA分子或线性DNA分子迁移率要快。

两种主要凝胶基质

1.聚丙烯酰胺凝胶的分辨力高，但能够区分**DNA**的大小范围窄。其分辨范围为**1**到**1000**个碱基对之间。

2.琼脂糖凝胶分辨力不如聚丙烯酰胺凝胶，但能够区分几十至几百**Kb**大小的**DNA**片段。

凝胶浓度的高低影响凝胶介质孔隙的大小，浓度越高，孔隙越小，其分辨能力就越强。

琼脂糖及聚丙烯酰胺凝胶分辨DNA片段的能力

凝胶类型及浓度	分离DNA的大小范围 (bp)
0.3%琼脂糖	50 000~1 000
0.7%琼脂糖	20 000~1 000
1.4%琼脂糖	6 000~300
4.0%聚丙烯酰胺	1 000~100
10.0%聚丙烯酰胺	500~25
20.0%聚丙烯酰胺	50~1

琼脂糖凝胶电泳的参数

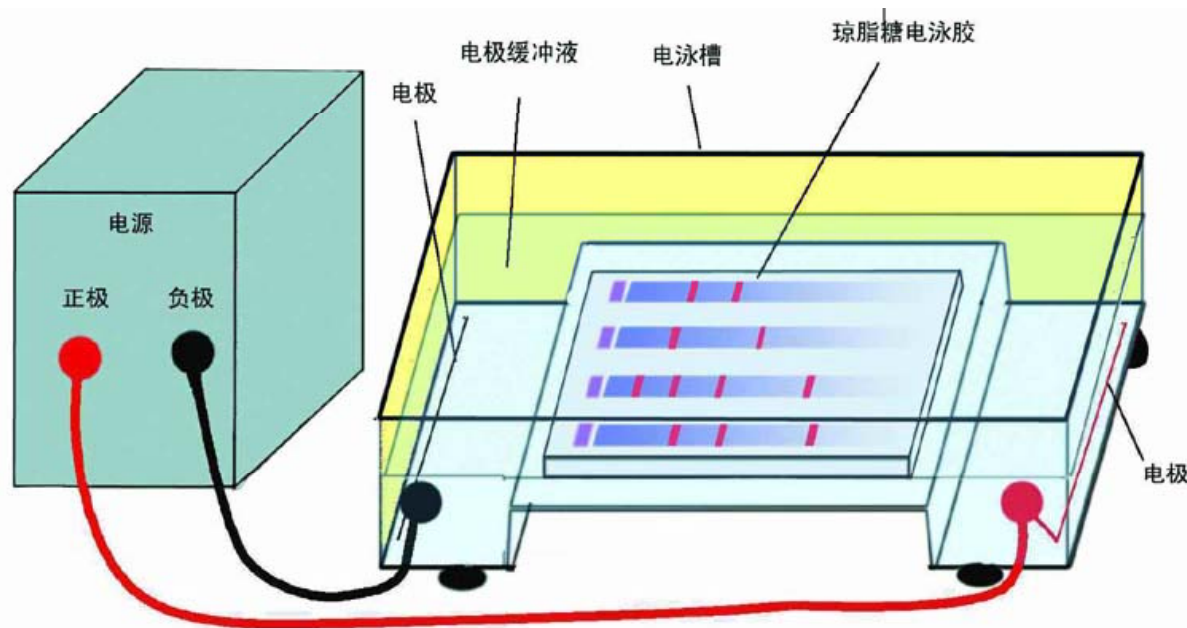
缓冲液: $1\times$ TAE (TBE TPE)

凝胶的含量: 根据检测的DNA大小

加DNA样品: $<1\ \mu\text{g}$, loading buffer (指示剂)

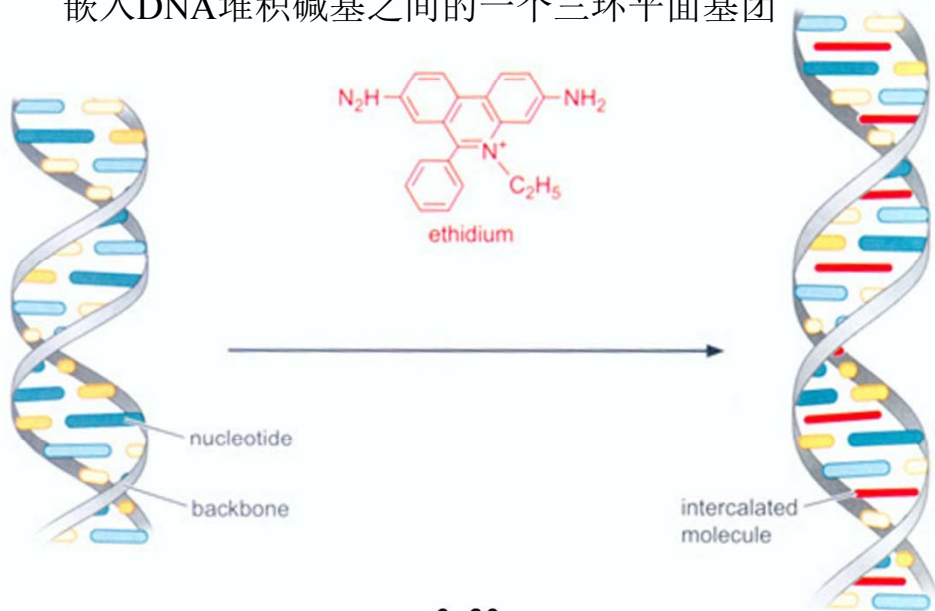
电泳条件: 大片断低电压长时间; 小片段高电压短时间

染色和观察: 溴化乙锭 (EB) 染色, 在300nm波长的紫外下观察 (凝胶成像仪)。可看到 $0.05\ \mu\text{g}$ 的微量DNA; DNA的片断大小与荧光强度成正比

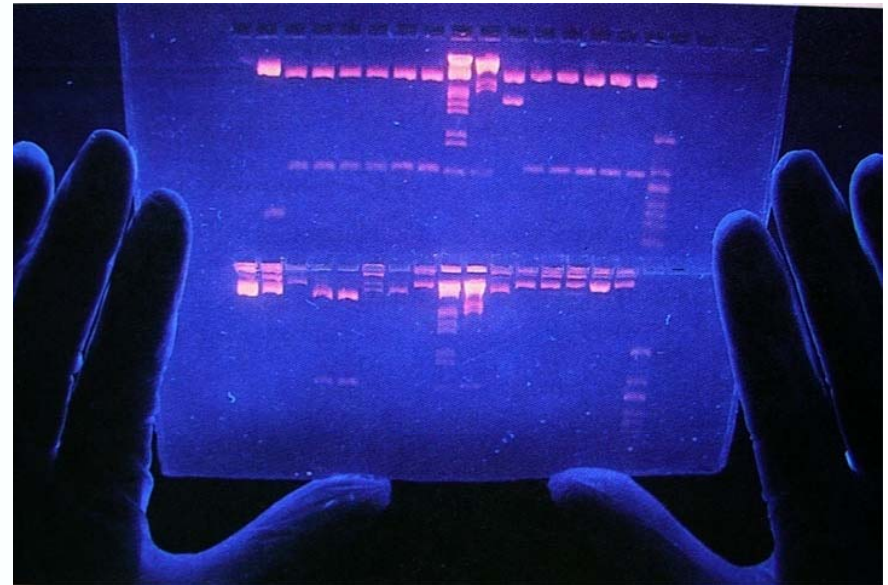


溴化乙锭染料的化学结构及其对DNA分子的插入作用。由于插入了溴化乙锭分子，在紫外光照射下，琼脂糖凝胶电泳中DNA的条带便呈现出橘黄色荧光，易于鉴定。

嵌入DNA堆积碱基之间的一个三环平面基团



6-28



溴化乙锭（ethidium bromide, EB）

SYBR Green I是高灵敏的**DNA**荧光染料，诱变能力大大降低，适用于各种电泳分析操作简单：无须脱色或冲洗。

溴化乙锭的净化处理

由于溴化乙锭具有一定的毒性，实验结束后，应对含**EB**的溶液进行净化处理再行弃置，以避免污染环境和危害人体健康。

(1) 对于EB含量大于0.5 mg/ml的溶液，可如下处理：

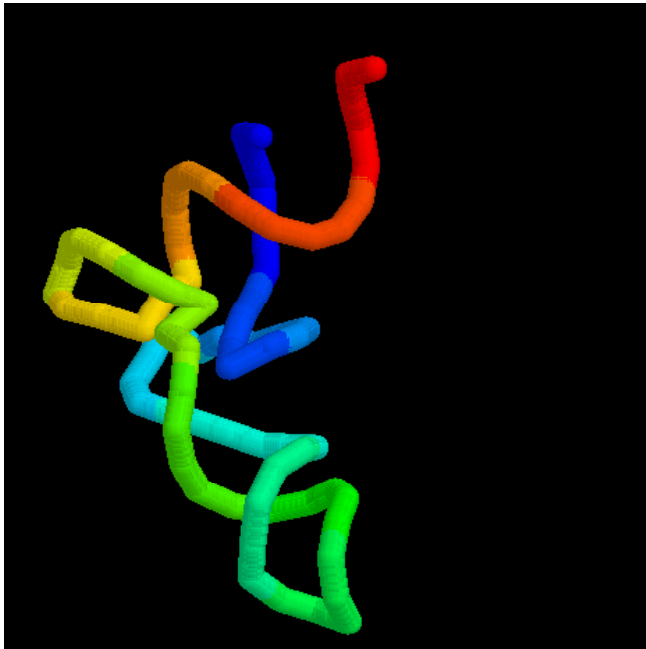
- ①将EB溶液用水稀释至浓度低于0.5 mg/ml；
- ②加入一倍体积的0.5 mol/L KMnO_4 ，混匀，再加入等量的25 mol/L HCl ，混匀，置室温数小时；
- ③加入一倍体积的2.5 mol/L NaOH ，混匀并废弃。

(2) EB含量小于0.5 mg/ml的溶液可如下处理：

- ①按1 mg/ml的量加入活性炭，不时轻摇混匀，室温放置1小时；
- ②用滤纸过滤并将活性碳与滤纸密封后丢弃。

RNA的分离

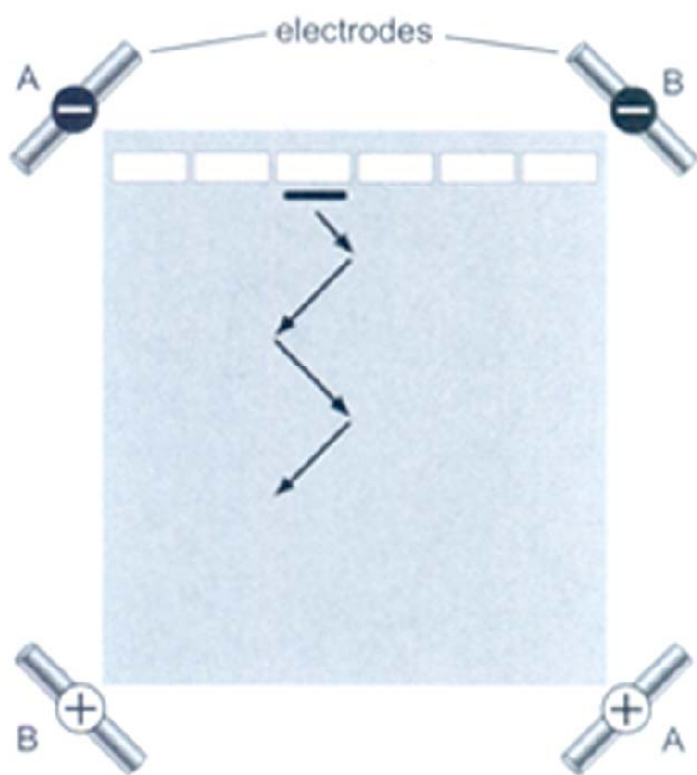
琼脂糖凝胶电泳 (RNA变性凝胶电泳)



- RNA由单链核苷酸组成，其局部可形成双链的二级结构或三级结构。因此欲测定RNA较准确的分子大小，必须在变性条件下进行电泳。其他同DNA电泳。
- 上样前使用的变性剂处理，如**甲醛**、**乙二醛**、**羟甲基汞**，它们能和RNA分子反应而防止碱基对的形成。
- 染色最好能够用30 $\mu\text{g/ml}$ 吖啶橙浸胶。

脉冲电场凝胶电泳

(PFGE—pulse-field gel electrophoresis)



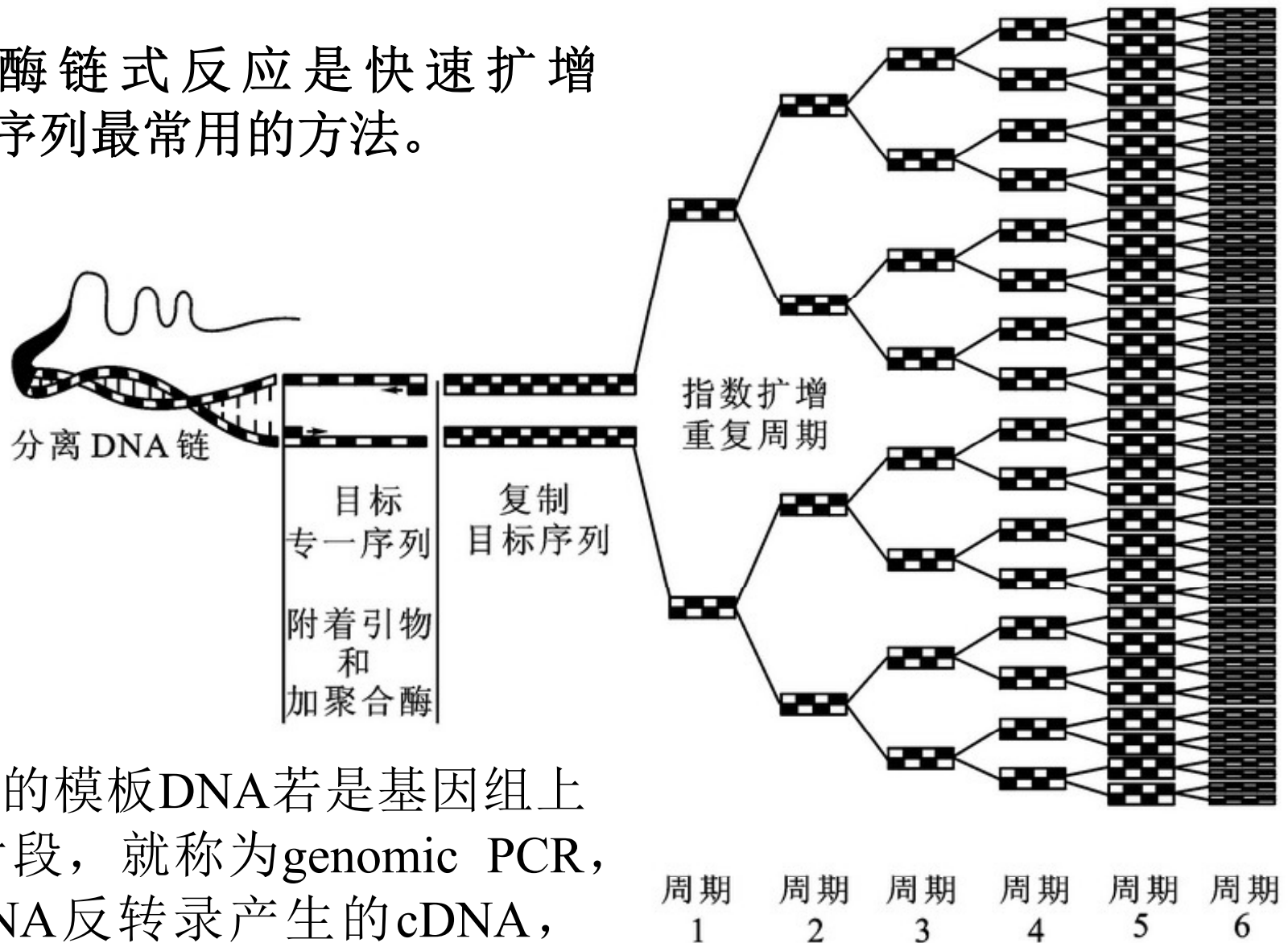
20-2

- 1984年，D. Schwartz & C. Centor发明，DNA分子的螺旋半径超过凝胶分子孔径。能够分离超大分子量的DNA分子（ 10^7bp ）。

在脉冲电泳中，电场方向是周期变化的，头一个脉冲电场方向与核酸的移动方向成 45° 角，下一个脉冲的电场方向与核酸移动方向在另一侧成 45° 角，由于加在琼脂糖凝胶电泳上的电场方向、电流大小、以及作用时间都在交替地变换着，这就使得DNA分子必须随时调整其泳动的方向，来适应凝胶孔隙的无规则变化。

(二) 聚合酶链式反应 (PCR)

聚合酶链式反应是快速扩增
DNA序列最常用的方法。



PCR反应的模板DNA若是基因组上的某个片段，就称为genomic PCR，若是mRNA反转录产生的cDNA，就称为RT-PCR。

1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1 024
11	2 048
12	4 096
13	8 192
14	16 384
15	32 788
16	65 536
17	131 072
18	262 144
19	524 288
20	1 048 576
21	2 097 152
22	4 194 304
23	8 388 608
24	16 777 216
25	33 554 432
26	67 108 864
27	134 217 728
28	268 435 456
29	536 870 912
30	1 073 741 824
周期	拷贝

PCR指数扩增时循环次数 与DNA产物数量的比较



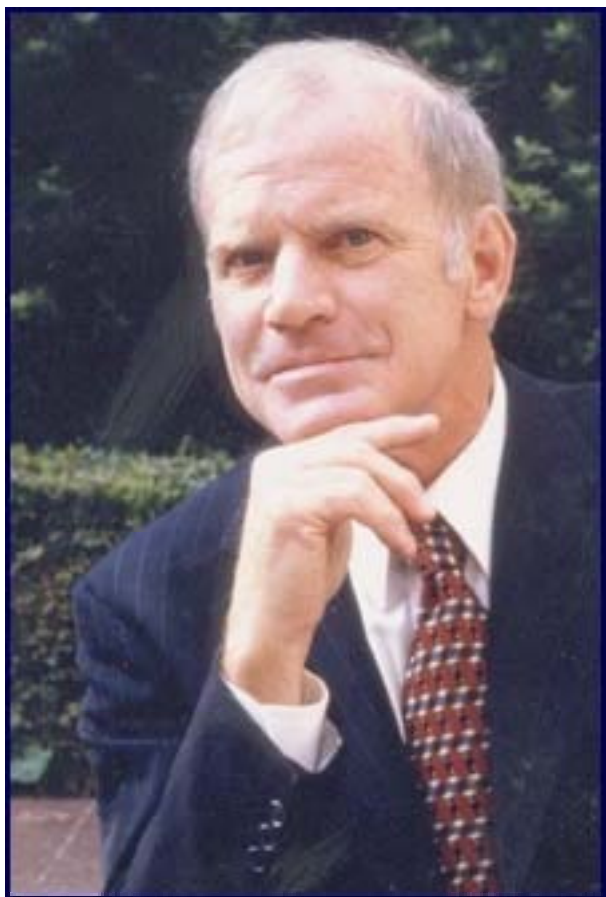
- **Khorana(1971)**等提出在体外经DNA变性,与适当引物杂交,再用DNA聚合酶延伸,克隆DNA的设想。
- **1983年,Mullis**发明了PCR技术,使Khorana的设想得到实现。
- **1988年Saiki**等将耐热DNA聚合酶(Taq)引入了PCR技术
- **1989年**美国《Science》杂志列PCR为十余项重大科学发明之首,比喻1989年为PCR爆炸年,**Mullis荣获1993年度诺贝尔化学奖。**

1989年12月，著名的自然科学杂志“SCIENCE”将PCR和它所使用的聚合酶命名为第一个“年度分子”。

主编Daniel Koshland Jr. 写道：第一篇有关PCR的论文发表于1985年。自那以后，PCR已经发展成为日益强大的和有广泛用途的技术。..... 有了PCR，极少量遗传物质也能扩增产生大量一般实验室都能得到的、可用于生化分析和鉴定的材料。

“SCIENCE”确实在1985年发表了第一篇关于PCR的论文。但是，却拒绝了由穆利斯撰写的描述PCR技术的论文。编辑部给他回了一封标准的拒稿信：

“这篇文章虽然通过了评审委员会的初选，但不幸的是，专家们对本文的评审结论并没有像对同时期拟录用的稿件那样积极。所以，尊稿无力竞争本刊有限的版面。”



Kary B. Mullis

凯利·穆利斯（Kary Mullis），1944年出生，1962年在佐治亚理工学院化学工程专业毕业。

受同学们的蛊惑，1966年报考加州伯克利大学生生化专业研究生被录取。

1968年一个人在NATURE发表“时间反演的宇宙学意义”论文并侥幸通过了博士生资格考试。

1972年，以“微生物铁转运因子的结构与有机合成”获得博士学位。

毕业后，尝试写小说，但因“不能使一部分人物具有不幸的遭遇”而失败，又因厌恶天天宰杀实验小鼠而两次丢掉工作。

他有一条知名的可能引起不少同学共鸣的学习曲线：

刚开始时，对拓宽自身知识面表现出极大的兴趣——

知识迅速上升，然后徘徊不前，最终进入失望和不安阶段——辞职

以后去一家小咖啡馆当了两年经理。1979年加入西特斯公司，负责**DNA**合成。

正是费时费力的**DNA**合成（单引物，以算术级数增长），激发了他的思维。

1983年8月，穆利斯第一次在公司正式作了一个有关**PCR原理**的学术报告。人们对这个报告的反应冷淡，只有少数几个实验技术人员有些兴趣。穆利斯回忆说，“绝大多数人要么在我结束报告之前就离开了会场，要么故意留下来给我出难题。他们认为这些肯定是胡说八道。”

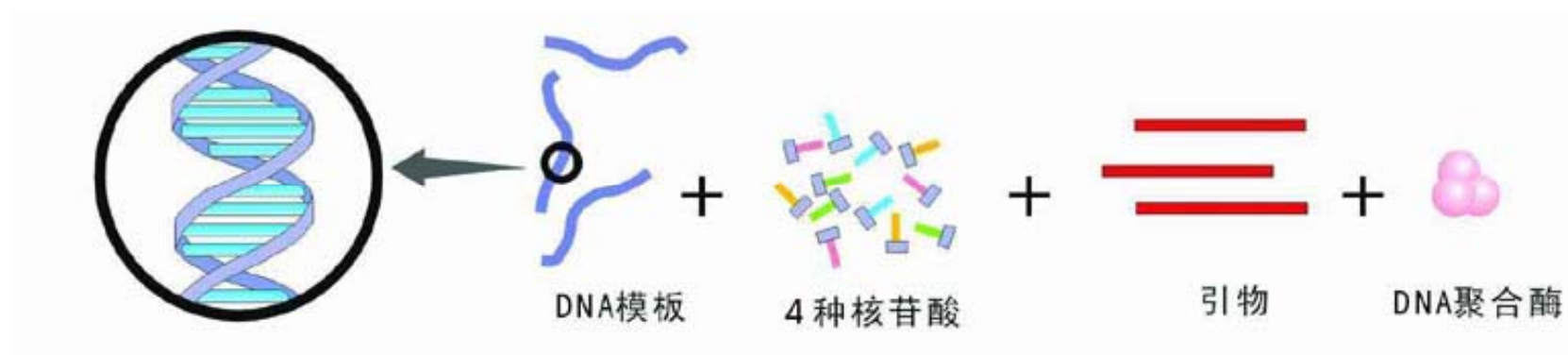
普遍的观点是，虽然我不够聪明，没看出问题的要害，但肯定有理由证明这个方法不行，要不为什么从前没人想到呢？

PCR技术的原理

首先将双链DNA分子在临近沸点的温度下加热分离成两条单链DNA分子，DNA聚合酶以单链DNA为模板并利用反应混合物中的四种脱氧核苷三磷酸、合适的 Mg^{2+} 浓度和实验中提供的引物序列合成新生的DNA分子。

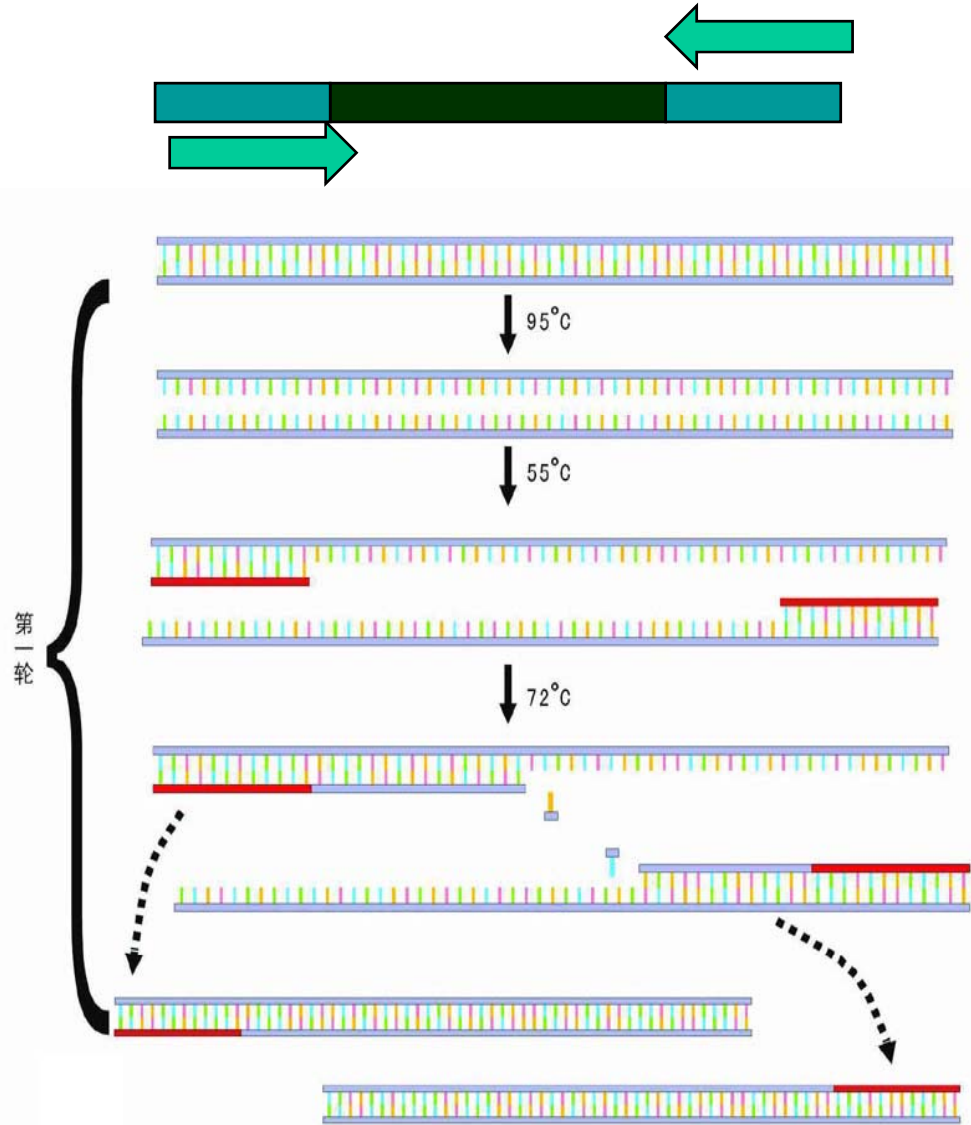
PCR技术需要加入4种物质：

- (1) 作为**模板**的DNA序列；
- (2) **引物**（20个左右碱基的短DNA单链），与被分离的目的基因两条链各自5'端序列相互补；
- (3) **TaqDNA聚合酶**；
- (4) **dNTP**（dATP, dTTP, dGTP和dCTP）。



变性、退火、延伸三步曲

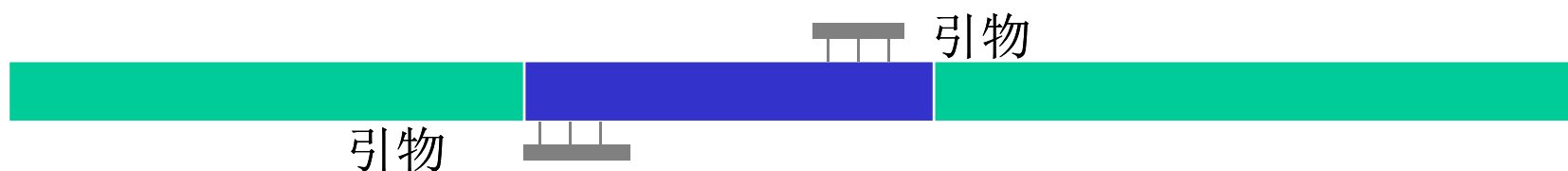
- 变性：双链DNA解链成为单链DNA
- 退火：部分引物与模板的单链DNA的特定互补部位相配对和结合
- 延伸：以目的基因为模板，合成互补的新DNA链



经不断重复循环之后，反应混合物中所含有的双链DNA分子数，即两条引物结合位点之间的DNA区段的拷贝数，理论上的最高值应是 2^n ，实得 1.8^n 。

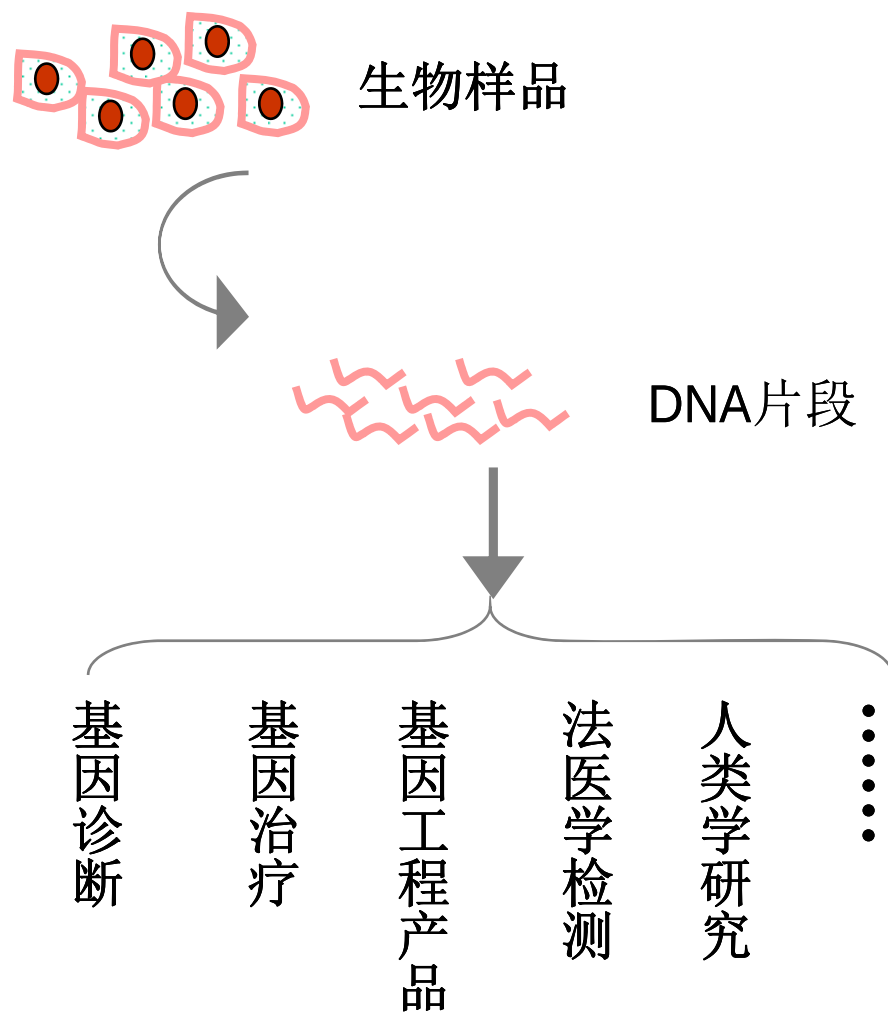
PCR技术的特点

1. 特异性强（引物的序列及其与模板结合的特异性是决定PCR反应结果的关键）
2. 敏感性高
3. 快速、简便
4. 可扩增RNA和cDNA
5. 对起始材料要求低
6. 有一定程度单核苷酸碱基错误掺入



引物设计的最大原则是最大限度地提高扩增效率和特异性；同时尽可能减少非特异性扩增。

PCR技术的应用

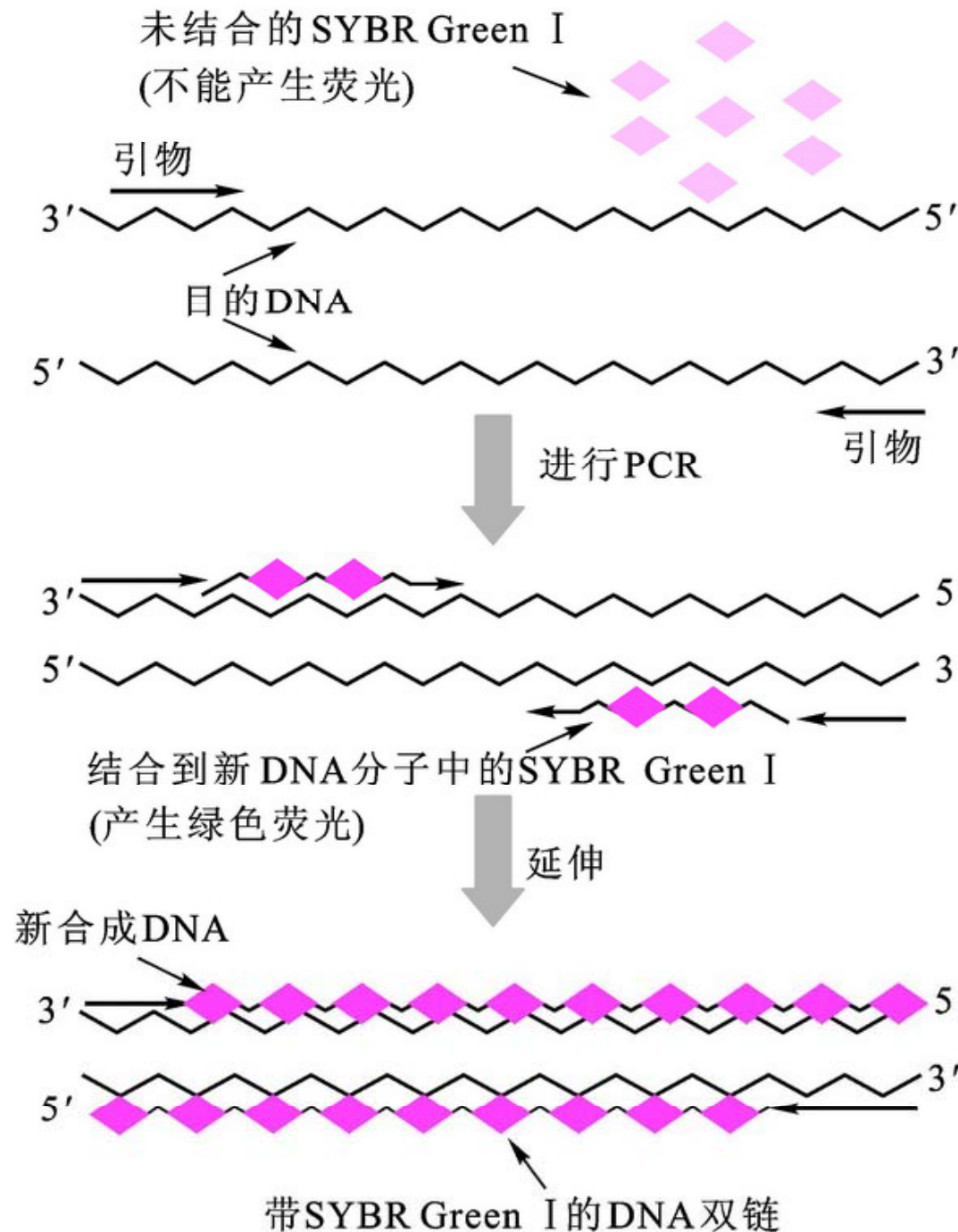


实时定量PCR

(real time quantitative PCR, Q-PCR)

- 由于PCR敏感性高，扩增产物总量变异系数大，定量不准确。
- 90年代末期出现了Q-PCR，利用荧光检测PCR仪绘制DNA扩增过程中的累积速率动态变化图，基本消除在测定终端产物丰度时变异系数较大的问题。

SYBR Green I作 探针的实时定量 PCR



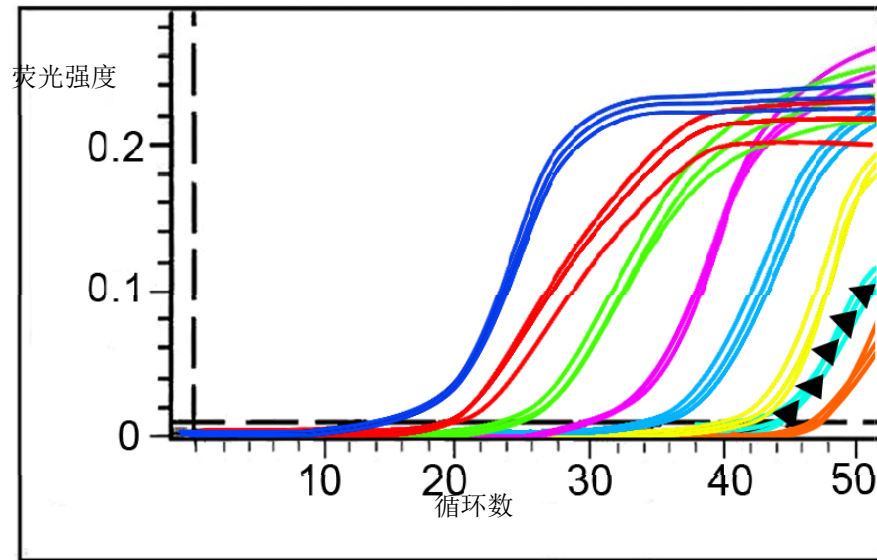
•混合在PCR反应液中的荧光探针只有与大片段DNA结合后，才能够被激发出荧光。

•随着新合成DNA片段的增加，由于结合到DNA上的荧光探针增加，被激发产生的荧光相应增加。

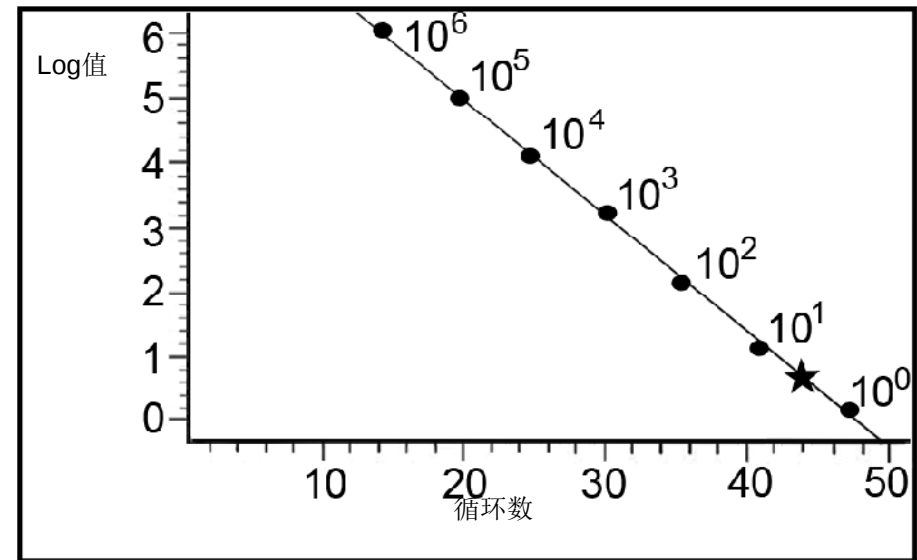
•非序列特异性荧光染料SYBR Green I，激发光波长520 nm，只与双链DNA结合。

用实时定量PCR法分析未知样品靶基因的绝对量

A 扩增曲线

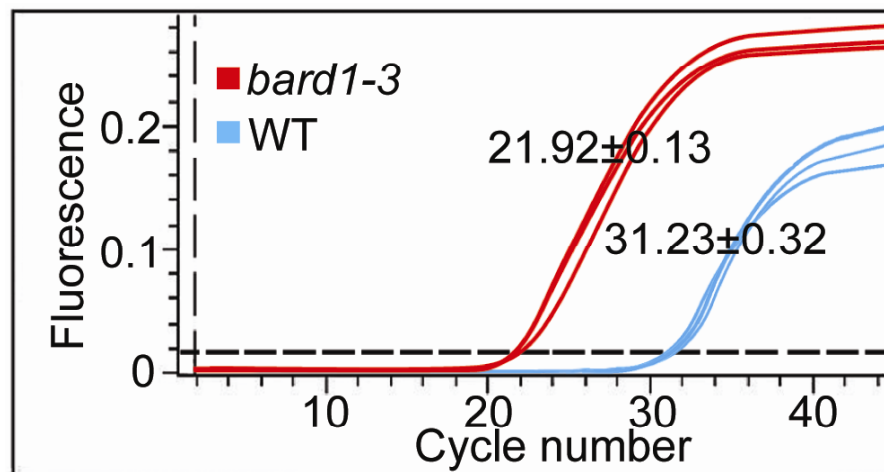


B 标准曲线



- 以10-15个循环的荧光值作为阈值或基线，也可以阴性对照荧光值的最高点作为基线。
- Ct值是产物荧光强度首次超过设定阈值时，PCR反应所需的循环数。
- 利用标准曲线，可以确定样品中待检测靶DNA的绝对含量。

实时定量PCR对不同样品中目的cDNA含量的相对定量

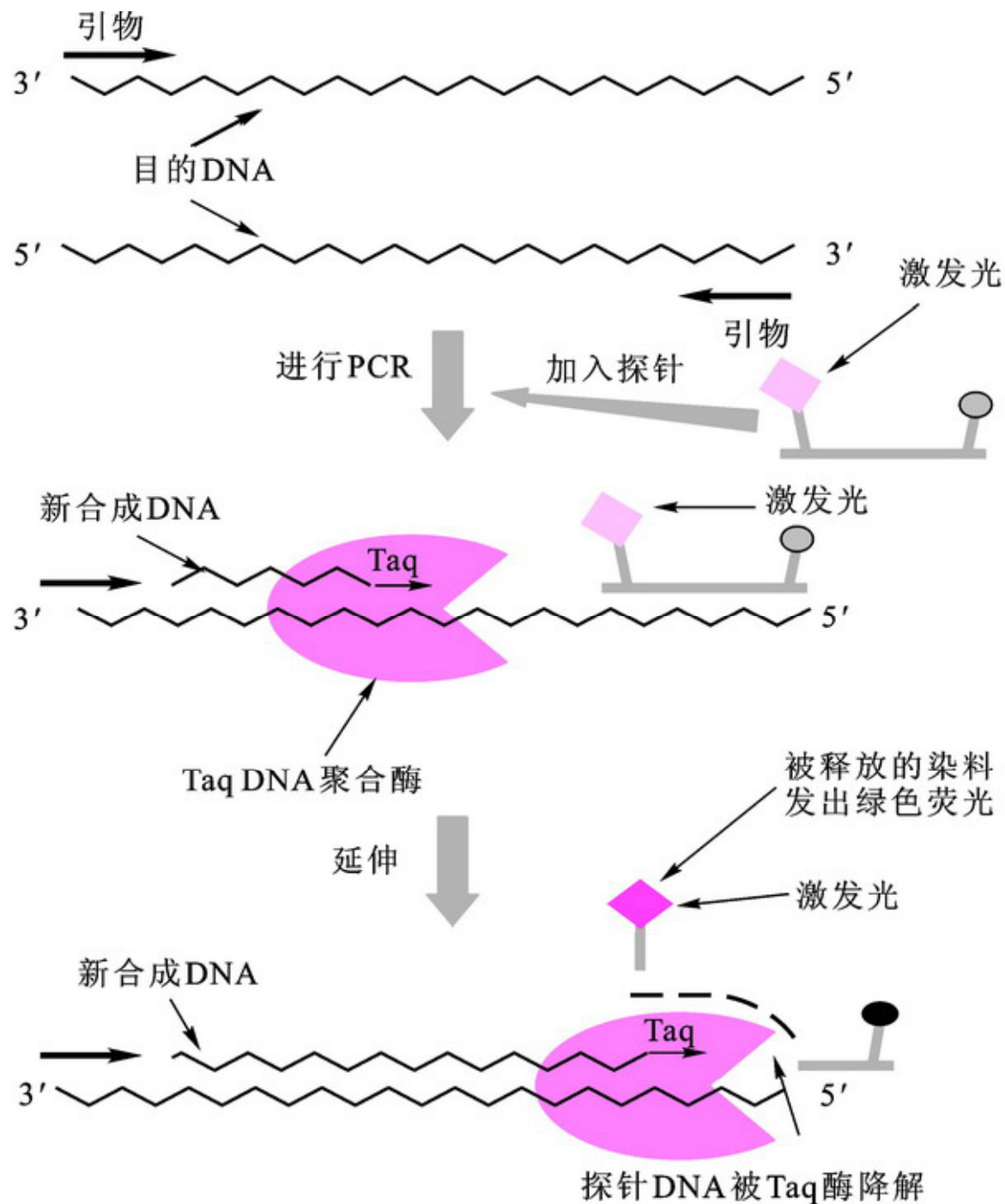


	野生型拟南芥 (WT)	突变体拟南芥 (Mu)	$\Delta Ct(AvgCt_{WT}-AvgCt_{Mu})$	相对比值 ($1.8^{\Delta Ct}$)
Wus Ct值	31.49	21.78		
	30.87	21.95		
	31.34	22.04		
平均值 (Avg)	31.23±0.32	21.92±0.13	9.31±0.19	239±26.25

拟南芥野生型和突变体样品经由拟南芥持家基因 (*UBQ10*) 进行均一化处理。

- 为确保荧光检测的确实是靶DNA，又设计了仅能与目的DNA特异结合的荧光探针。
- **TaqMan**探针是一段与靶DNA序列中间部位结合的单链DNA，长50bp-150bp，该DNA的5'和3'端带有短波长和长波长两个不同荧光基团，由于彼此距离靠近，在荧光共振能量转移（FRET）作用下发生荧光淬灭，因而检测不到荧光。
- 随着PCR反应的进行，TaqMan 探针结合到目的DNA序列上，并且会被具有外切酶活性的Taq DNA聚合酶逐个切除而降解。切下来的荧光基团解除了荧光淬灭的束缚，会在激发光下发出荧光，因此，产生的荧光强度直接反映了所扩增靶DNA的总量。

TaqMan 探针 实时定量PCR 技术



重亚硫酸盐测序技术 (Bisulfite Sequencing)

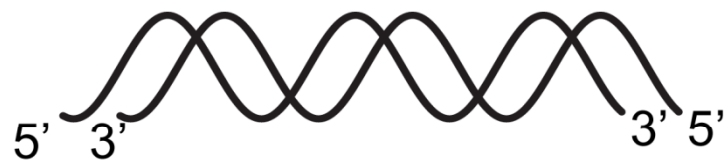
DNA分子上可能发生多种化学修饰，如甲基化、乙酰化等。在不改变**DNA**序列的情况下，通过对**DNA**分子的化学修饰，可以改变基因表达水平。

相对于传统的遗传学——即只有**DNA**序列变化才能导致基因表达的改变而言，这种现象被称为**表观遗传学**（**Epigenetics**）。

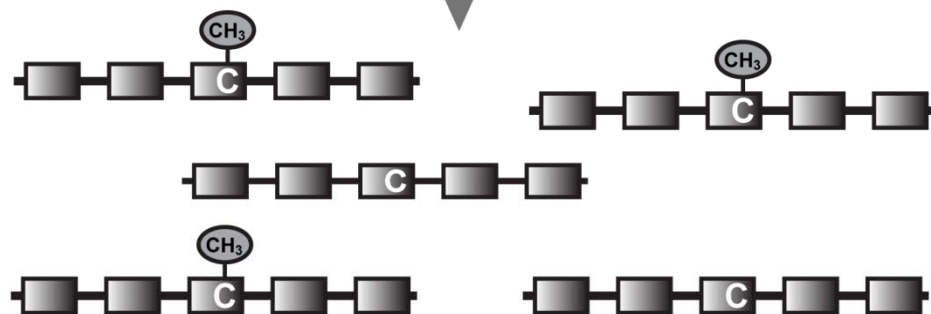
重亚硫酸盐测序技术等方法被用来确定某个碱基位点的甲基化情况。

重亚硫酸盐测序技术主要实验过程

- 将待测**DNA**样品用限制性内切酶处理或超声波破碎等物理方法打断成**500~1000 bp**的碎片，
- 重亚硫酸盐处理使**DNA**中未甲基化的胞嘧啶脱氨基变成尿嘧啶，**PCR**扩增后被测序仪读为胸腺嘧啶。
- 已甲基化的胞嘧啶由于甲基的保护而不受影响。
- 参考原始序列判定原**C**位点是否甲基化——未甲基化的**C**位点变为**T**，甲基化的**C**位点仍保持为**C**。



超声破碎或酶切

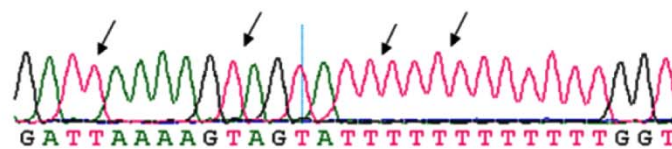
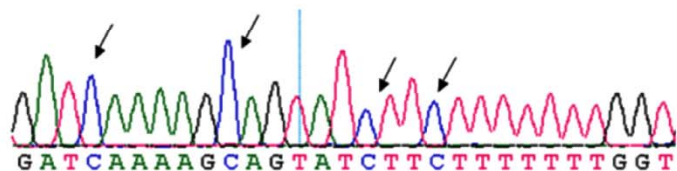


重亚硫酸盐处理

脱氨基



PCR扩增, 克隆, 测序



重亚硫酸盐
测序
(bisulfite
sequencing)

- 因为没有甲基保护的C在重亚硫酸盐处理后转变为U，引物设计时要将该位点相应改为T。
- 由于DNA上的C位点通常不是百分之百甲基化或非甲基化，所以合成引物时要用简并位点，正向引物中为Y (Y=C或T)，反向引物中记做R (R=G或A)。
- 重亚硫酸盐测序分析时，必须对同一目标片段进行多次测序，通常要求至少测序11次，以避免产生同源测序（sibling sequencing）。
- 缺点：耗费时间和金钱。

谢谢！

