



# 第五讲

## 分子生物学基本研究法

从20世纪中叶开始，分子生物学研究得到高速发展，主要原因之一是研究方法，特别是基因操作和基因工程技术的进步。



基因操作主要包括**DNA**分子的切割与连接、核酸分子杂交、凝胶电泳、细胞转化、核酸序列分析以及基因人工合成、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。



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技术的根本特征。



# DNA操作技术

基因克隆的常用载体系统

基因的分离与鉴定。



## 5.1 重组DNA技术发展史上的重大事件

### 三大成就：

一、在20世纪40年代确定了遗传信息的携带者、即基因的分子载体是DNA而不是蛋白质，解决了遗传的物质基础问题；

二、50年代提出了DNA分子的双螺旋结构模型和半保留复制机制，解决了基因的自我复制和世代交替问题；



三、50年代末至60年代，相继提出了“中心法则”和操纵子学说，成功地破译了遗传密码，阐明了遗传信息的流动与表达机制。



# 表5-1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	Ochoa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	<b>Nirenberg, Ochoa, Khorana, Crick</b> 等人破译了全部遗传密码。
1967	第一次发现 <b>DNA</b> 连接酶
1970	<b>Smith, Wilcox</b> 和 <b>Kelley</b> 分离了第一种限制性核酸内切酶， <b>Temin</b> 和 <b>Baltimore</b> 从 <b>RNA</b> 肿瘤病毒中发现反转录酶。
1972-1973	<b>Boyer, Berg</b> 等人发展了 <b>DNA</b> 重组技术，于72年获得第一个重组 <b>DNA</b> 分子，73年完成第一例细菌基因克隆。
1975-1977	<b>Sanger</b> 与 <b>Maxam</b> 和 <b>Gilbert</b> 等人发明了 <b>DNA</b> 序列测定技术，1977年完成了全长 <b>5387bp</b> 的噬菌体 $\phi$ 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	<b>Palmiter</b> 和 <b>Brinster</b> 获得转基因小鼠， <b>Spradling</b> 和 <b>Rubin</b> 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， <b>Sanger</b> 等人完成了入噬菌体 <b>48,502bp</b> 全序列测定。



<b>1983</b>	获得第一例转基因植物。
<b>1984</b>	斯坦福大学获得关于重组DNA的专利。
<b>1986</b>	GMO首次环境中释放。
<b>1988</b>	Watson出任“人类基因组计划”首席科学家。
<b>1989</b>	DuPont 公司获得转肿瘤基因小鼠——“Oncomouse”。
<b>1992</b>	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)。
<b>1994</b>	第一批基因工程西红柿在美国上市。
<b>1996</b>	完成了酵母基因组( $1.25 \times 10^7$ bp)全序列测定。
<b>1997</b>	英国爱丁堡罗斯林研究所获得克隆羊。
<b>2000</b>	完成第一个高等植物拟南芥的全序列测定( $1.15 \times 10^8$ bp)。
<b>2001</b>	完成第一个人类基因组全序列测定( $2.7 \times 10^9$ bp)。



限制性核酸内切酶能够识别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。

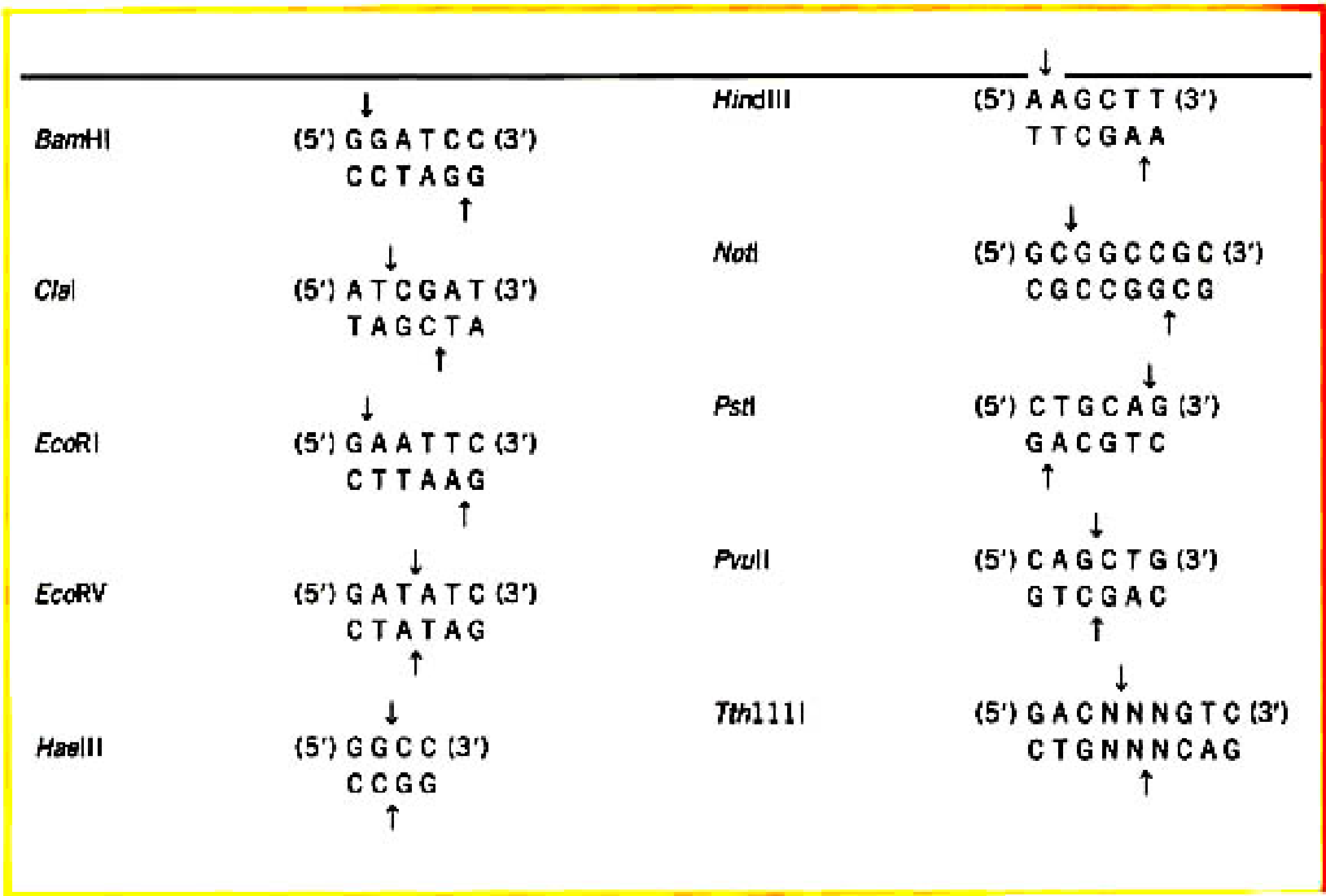


图5-1 几种主要DNA内切酶所识别的序列及其酶切末端。

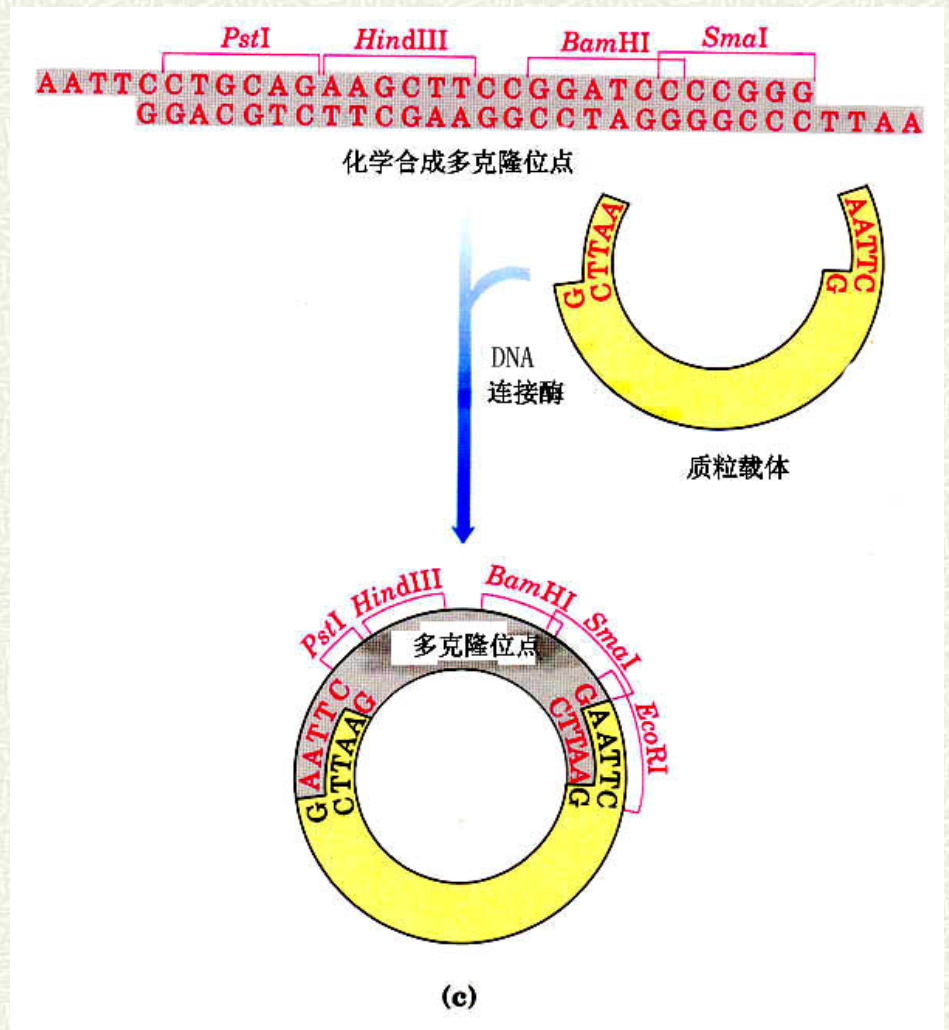
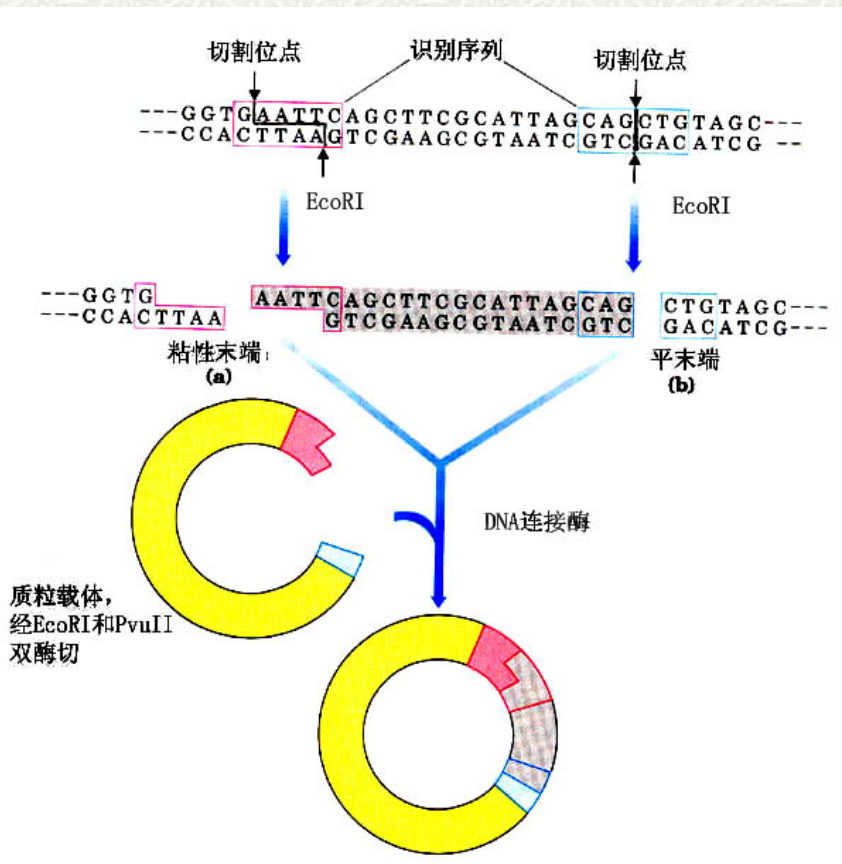


图5-2 DNA连接酶能把不同的DNA片段连接成一个整体。a. DNA的粘性末端; b. DNA的平末端; c. 化学合成的具有EcoRI粘性末端的DNA片段。



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。

具备自主复制能力的DNA分子就是分子克隆的载体（vector）。病毒、噬菌体和质粒等小分子量复制子都可以作为基因导入的载体。



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（图**5-3**）。

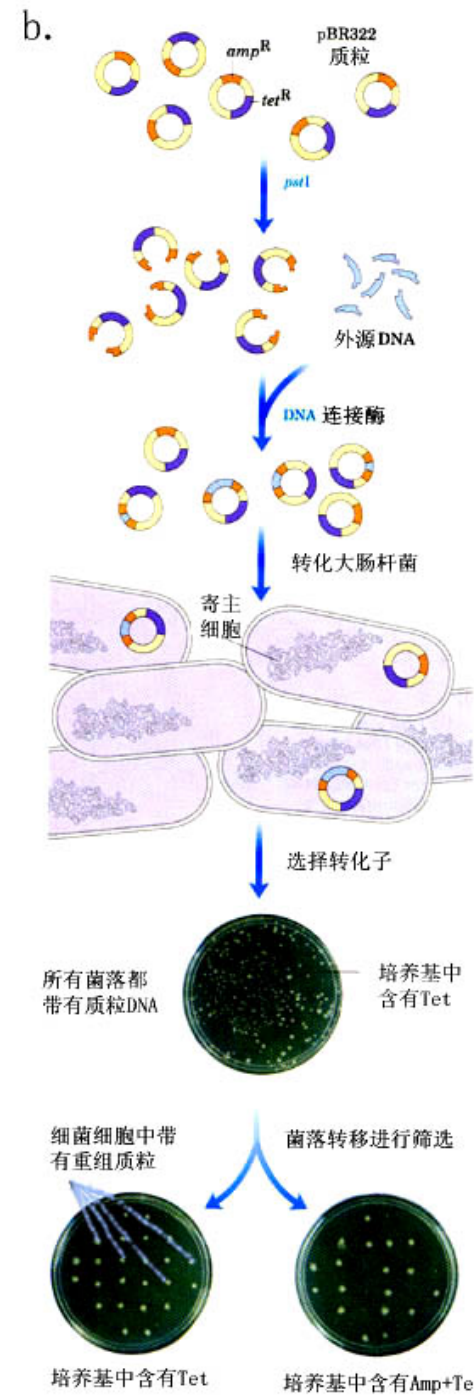
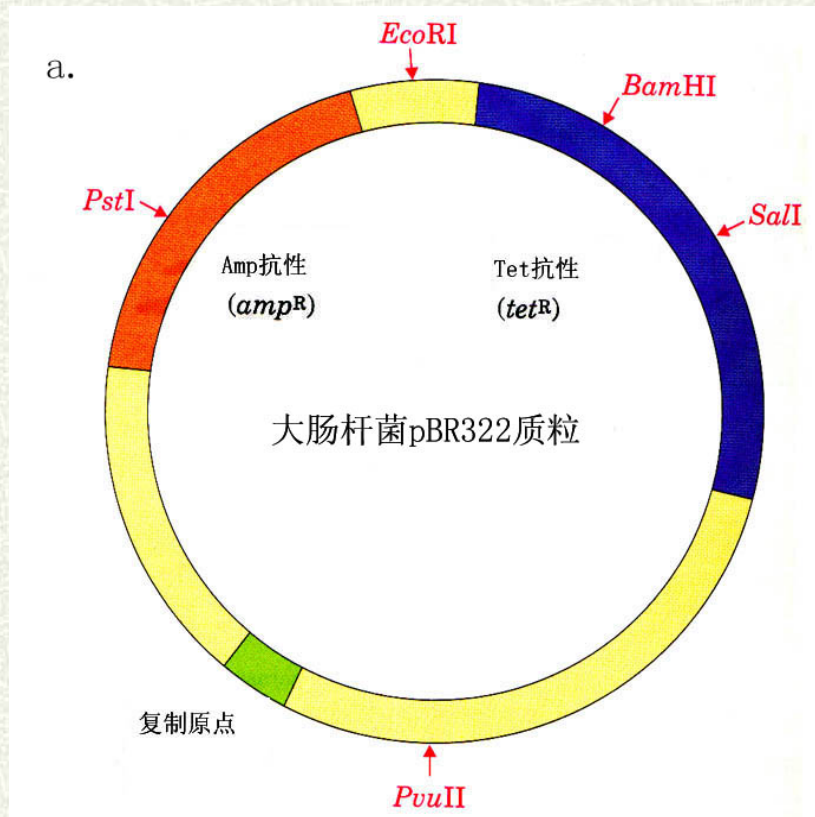


图5-3 重组DNA操作过程示意图。



# 表5-2 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
多核苷酸激酶	把磷酸基团加到多聚核苷酸链的5'-OH末端（进行末端标记实验或用来进行DNA的连接）
末端转移酶	在双链核酸的3'末端加上多聚单核苷酸
DNA外切酶III	从DNA链的3'末端逐个切除单核苷酸
$\lambda$ 噬菌体DNA外切酶	从DNA链的5'末端逐个切除单核苷酸
碱性磷酸酯酶	切除位于DNA链5'或3'末端的磷酸基团



## 5.2 DNA操作技术

### 5.2.1 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实验手段。



# 基本原理

一种分子被放置到电场中，它就会以一定的速度移向适当的电极。我们把这种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。



生理条件下，核酸分子中的磷酸基团呈离子化状态，所以，**DNA**和**RNA** 又被称为多聚阴离子（**polyanions**），在电场中向正电极的方向迁移。

由于糖-磷酸骨架在结构上的重复性质，相同数量的双链**DNA**几乎具有等量的净电荷，因此它们能以同样的速度向正电极方向迁移。



琼脂糖凝胶分辨DNA片段的范围为**0.2~50kb**之间。

聚丙烯酰胺凝胶的分辨范围为**1到1000**个碱基对之间。

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。



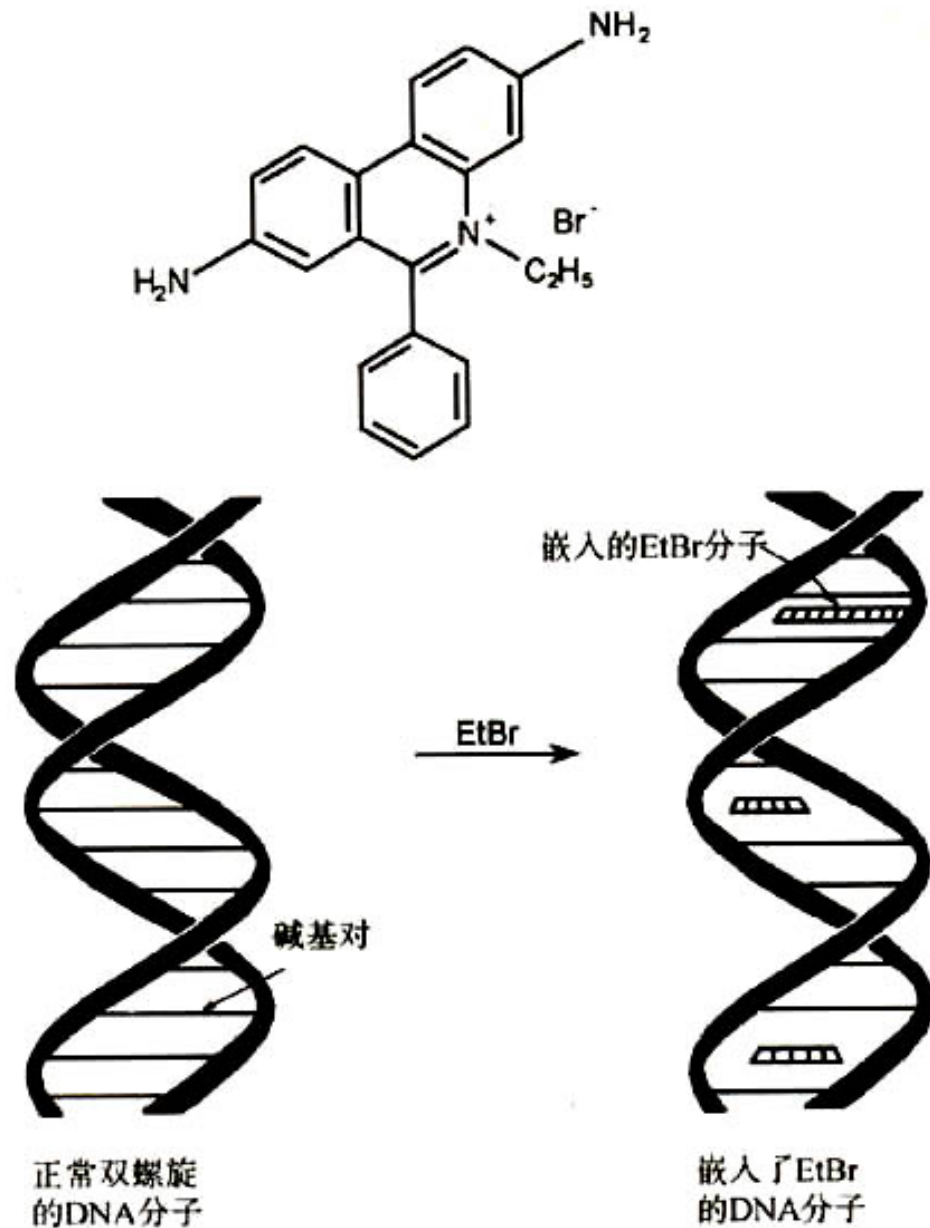
# 表5-3 琼脂糖及聚丙烯酰胺凝胶分辨DNA片段的能力

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

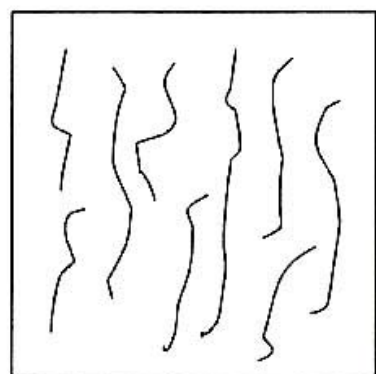


在凝胶电泳中，加入溴化乙锭（**ethidium bromide, EtBr**）染料对核酸分子进行染色，然后放置在紫外光下观察，可灵敏而快捷地检测出凝胶介质中**DNA**的谱带部位，即使每条**DNA**带中仅含有**0.05  $\mu$ g**的微量**DNA**，也可以被清晰地检测出来。

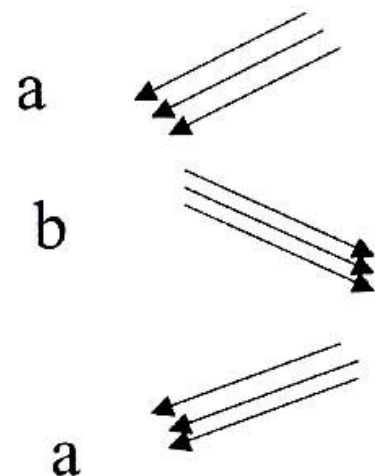
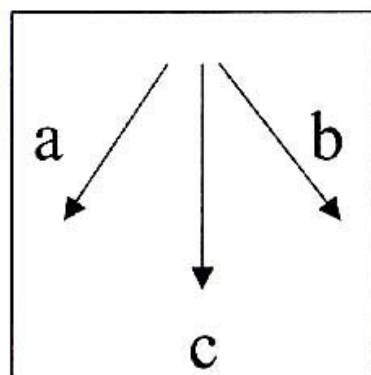
图5-4 溴化乙锭染料的结构及其对DNA分子的插入作用。由于插入了溴化乙锭分子，在紫外光照射下，琼脂糖凝胶电泳中DNA的条带便呈现出橘黄色荧光，易于鉴定。



# DNA的脉冲电泳技术 (PFGE — pulse-field gel electrophoresis)



无规则



超大分子，不能有效地被一般电泳所分离。

a、b表示每次电泳的不同方向，c为DNA分子的最终移动方向。

应用脉冲电场技术，可分离高达 $10^7$ bp的DNA分子。



## 5.2.2 核酸的分子杂交

将带有互补的特定核苷酸序列的单链DNA或RNA混合在一起，其相应的同源区段就会退火形成双链结构。如果退火的核酸来自不同的生物有机体，所形成的双链分子就被称为杂种核酸分子。



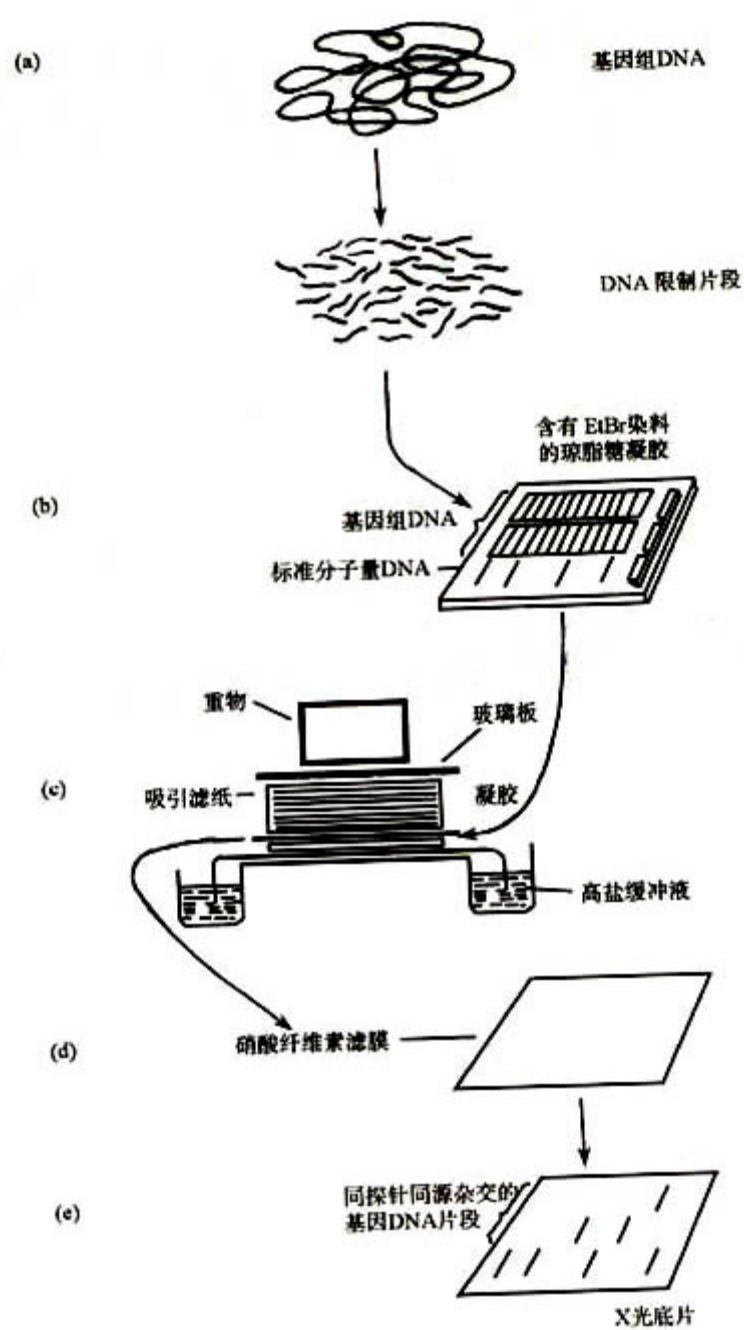
经过凝胶电泳分离的**DNA**或**RNA**分子，都必须通过毛细管或电导作用按其在凝胶中的位置原封不动地“吸印”转移到滤膜上，因此，核酸杂交也被称为“**DNA印迹杂交**”。由于该方法是**E. M. Southern**首先设计出来的，所以又叫做**Southern blotting**。



在理想的条件下，应用放射性同位素标记的特异性探针和放射自显影技术，即便每带电泳条带仅含有**2ng的DNA**也能被清晰地检测出来。



# 图5-6 Southern 凝胶转移杂交 技术





生色或荧光诱发物质



呈色或发出荧光



碱性磷酸酯酶



链球菌抗生物素蛋白



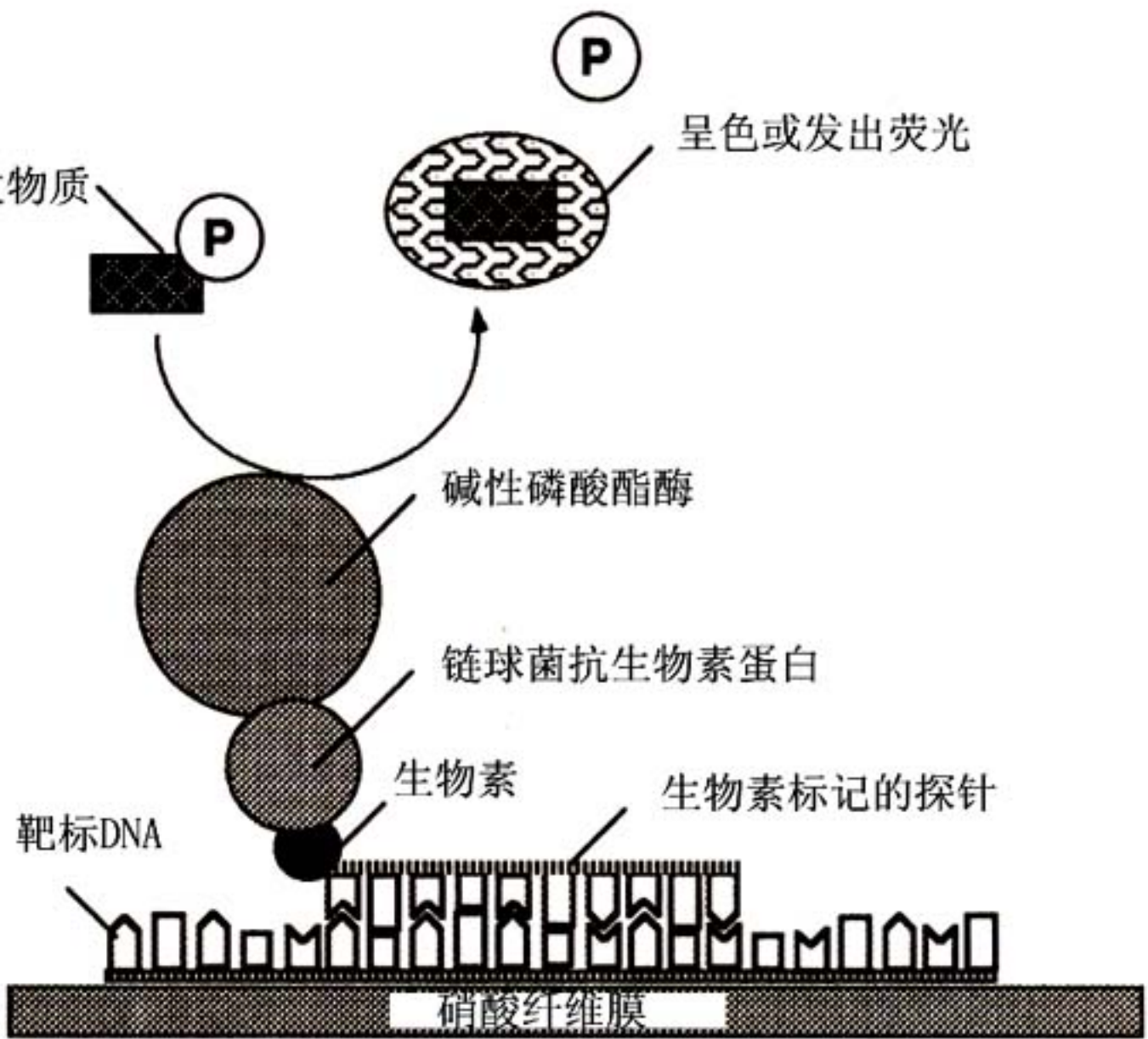
生物素

靶标DNA

生物素标记的探针



硝酸纤维膜





## 5.2.3 细菌转化

所谓细菌转化，是指一种细菌菌株由于捕获了来自另一种细菌菌株的**DNA**而导致性状特征发生遗传改变的生命过程。提供转化**DNA**的菌株叫作供体菌株，接受转化**DNA**的细菌菌株则被称为受体菌株。



将快速生长中的大肠杆菌置于经 $0^{\circ}\text{C}$ ) 预处理的低渗氯化钙溶液中，使细胞膨胀形成原生质球，与外源DNA形成粘附在细胞表面的复合物。

$42^{\circ}\text{C}$ 下做短暂热刺激，复合物便会被细胞所吸收。在全培养基中生长一段时间使转化基因实现表达，就可涂布于选择性培养基中分离转化子。

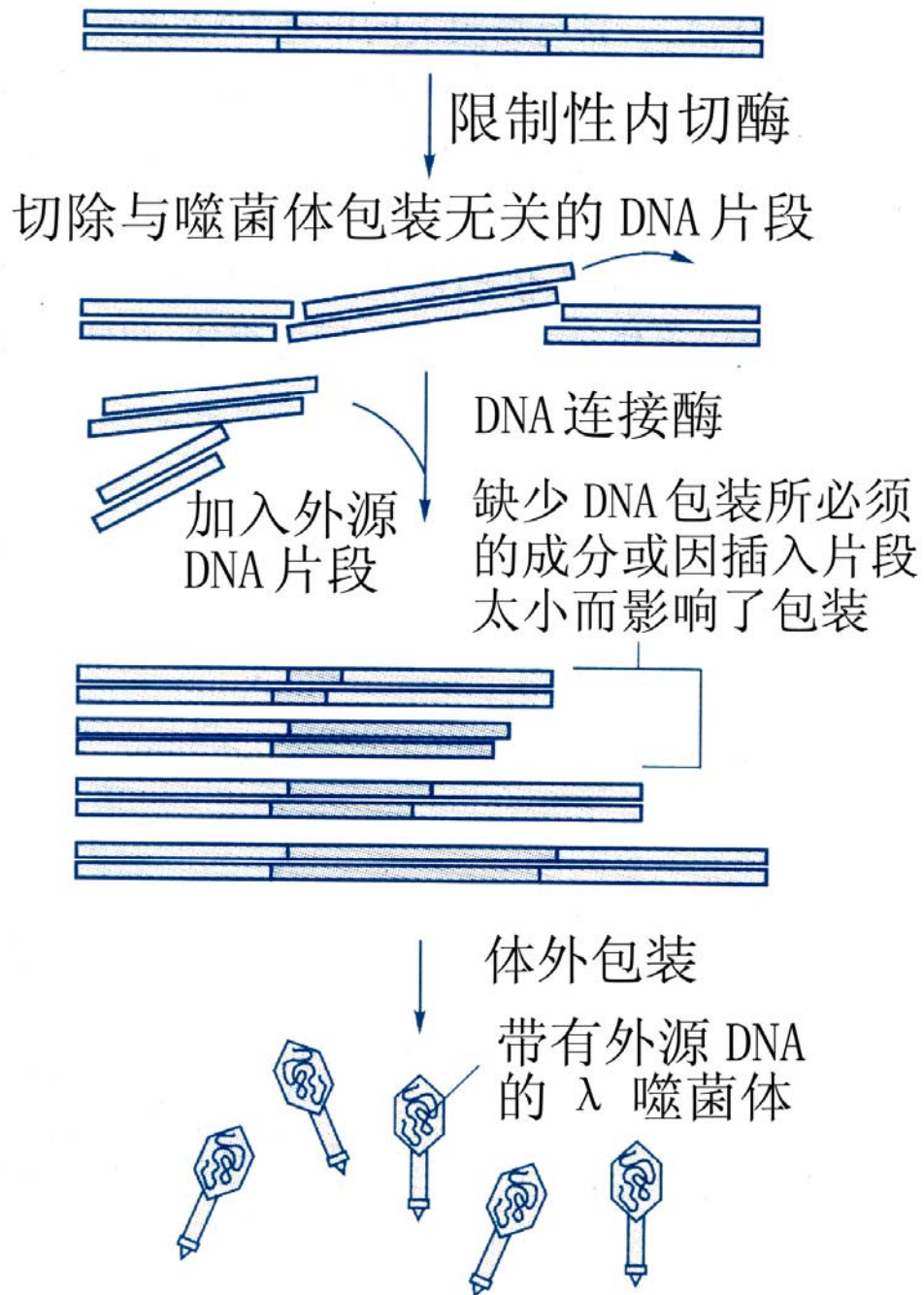


图5-8  $\lambda$  噬菌体作为克隆载体



## 5.2.4 核苷酸序列分析

### 1、Sanger双脱氧链终止法

**Sanger**等人于**1977**年发明了利用**DNA**聚合酶的双脱氧链终止原理测定核苷酸序列的方法，该法有时也称为引物合成法或酶催引物合成法。



它利用了**DNA**聚合酶的两种酶催反应特性：

能够利用单链的**DNA**作模板，合成出准确的**DNA**互补链；

能够利用2', 3'-双脱氧核苷三磷酸作底物，将其掺入到寡核苷酸链的3'-末端，从而终止**DNA**链的生长。

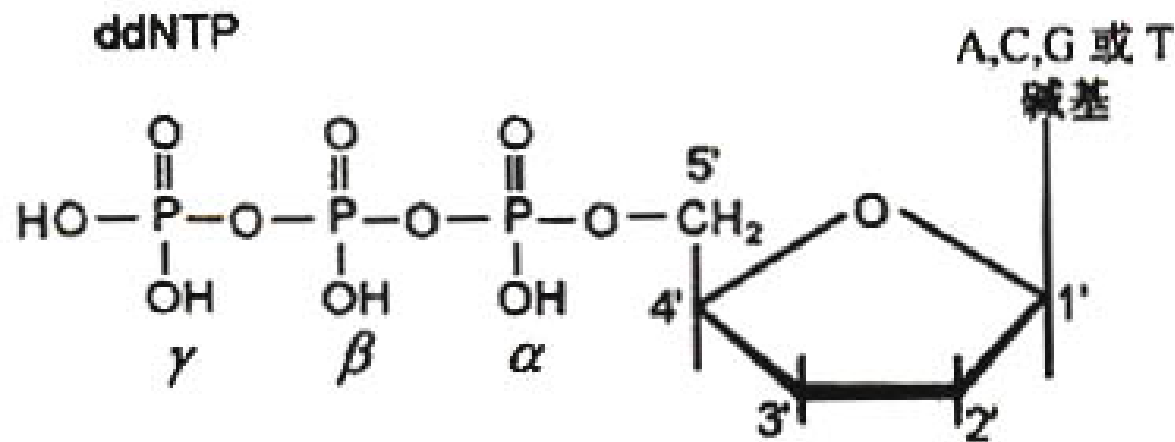
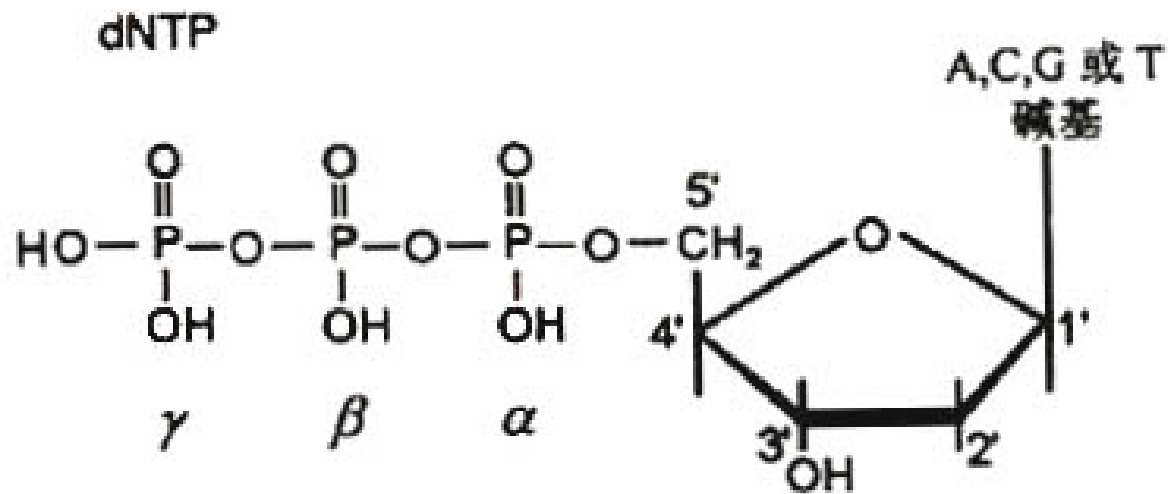
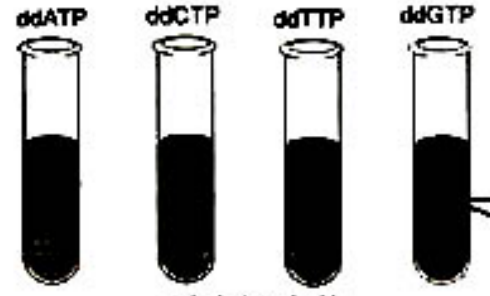
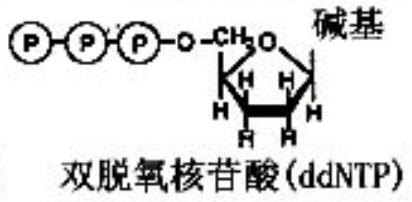


图5-9 脱氧核苷三磷酸（dNTP）和双脱氧核苷三磷酸（ddNTP）的分子结构式。DNA合成中，5'→3'磷酸二酯键的形成需要3'-OH参与，因此ddNTP的掺入会导致DNA链合成的终止。

5' CTGACTTCGACAA 3' 待测序的单链DNA

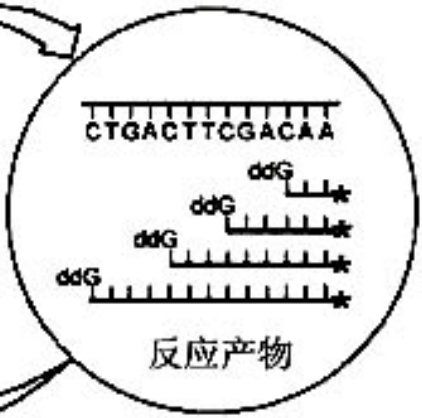
放射性标记的引物

DNA 聚合酶I  
dATP  
dGTP  
dCTP  
dTTP

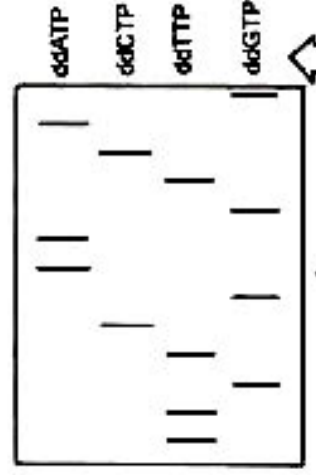


反应混合物

酰胺电泳放射  
自显影检测



凝胶电泳方向



5' CTGACTTCGACAA 3'

测序胶的判读

图5-10 Sanger双脱氧链终止DNA序列分析法原理。每个反应中都加入一种不同的ddNTP和全部4种dNTP，其中一种带有<sup>35</sup>P同位素标记。反应混合物样品加到聚丙烯酰胺胶中，进行电泳分离。电泳凝胶用X光底片作放射自显影曝光，产生出可见的谱带。从胶的底部开始判读谱带，逐渐读向顶部。所得的核苷酸序列是同模板链碱基序列互补的。图中\*号表示带有放射性同位素标记的核苷酸。



## 2、Maxam-Gilbert化学修饰法：

用化学试剂处理末端放射性标记的**DNA**片段，特异性切割碱基，产生一组各种不同长度的**DNA**片段的混合物，经电泳分离和放射自显影之后，根据**X**光片上所显现的相应谱带，判定**DNA**序列。



在碱性的条件下，肼（**hydrazine**，又叫联氨， $\text{NH}_2\cdot\text{NH}_2$ ）能够从**C4**和/或**C6**原子位置作用于胸腺嘧啶和胞嘧啶碱基，环化形成新的**5**原子环。有六氢吡啶（**piperidine**）存在时，通过 $\beta$ -消除反应，释放**2**个磷酸分子并在这个核苷酸位置上发生**DNA**链的断裂。

如果加入**1mol/L**浓度的盐，那么联氨同胸腺嘧啶的反应速率便会明显下降，发生胞嘧啶特异的化学切割反应。



硫酸二甲酯是一种碱性的化学试剂，能使**DNA**碱基环中的氮原子发生甲基化反应。

在中性pH条件下，鸟嘌呤和腺嘌呤残基上的甲基化足以导致配糖键发生水解，**DNA**链断裂。

加入六氢吡啶后，就只在**G**而不是**A**残基上发生**DNA**链的断裂。



在酸性环境中，因嘌呤碱基的质子化作用（**protonation**）导致脱嘌呤效应，会使配糖键发生水解，再经过六氢吡啶催化的 $\beta$ -消除作用移去磷酸分子，于是就会在这个位点上发生**DNA**链的断裂。这一反应是嘌呤碱基特有的。

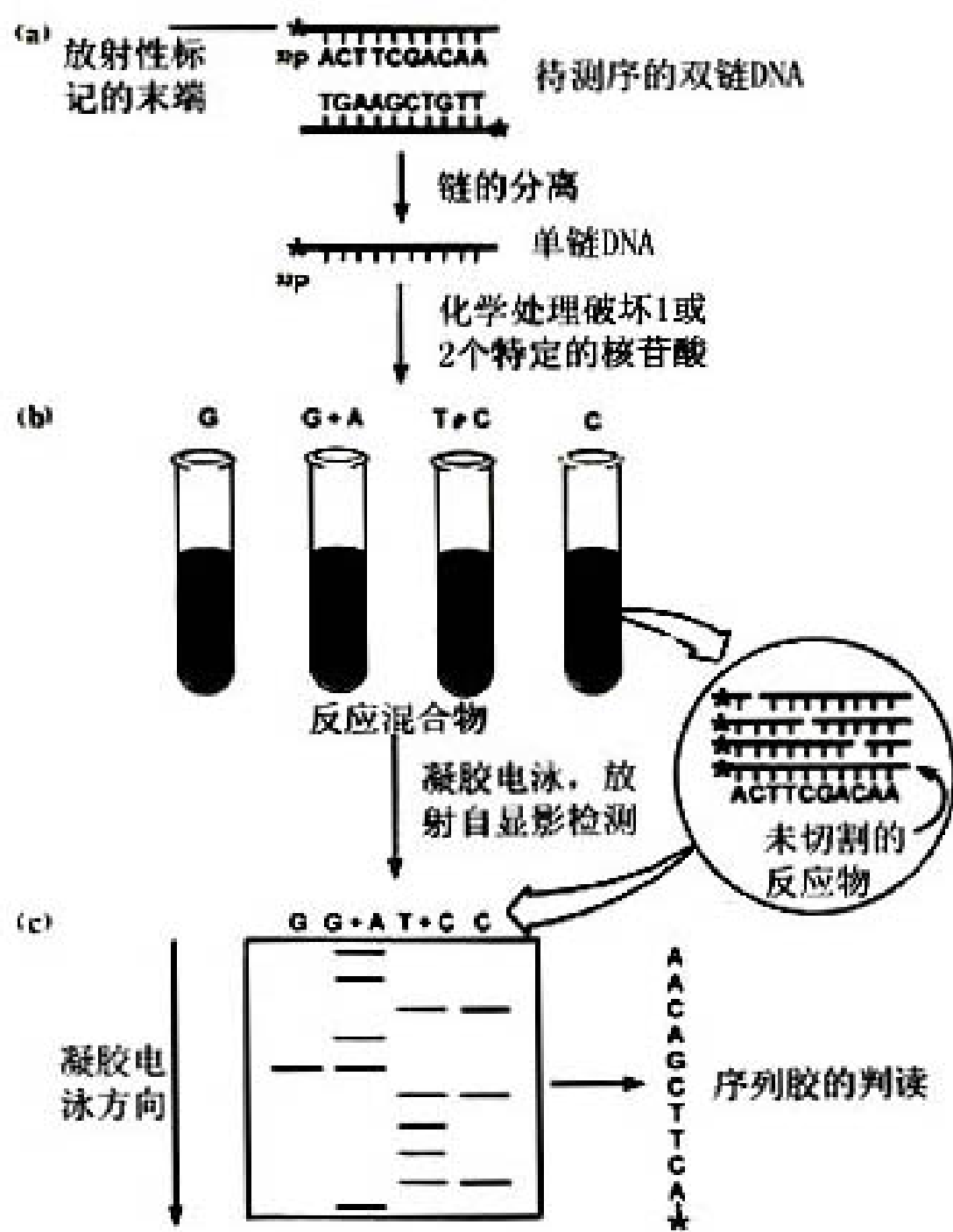


图 5-11 Maxam-Gilbert化学修饰法原理。(a) 用T4多核苷酸激酶标记DNA限制片段的5'-末端, 或用T4 DNA聚合酶标记其3'-末端; (b) 将 $^{32}\text{P}$ -末端标记的DNA片段分成4个反应试管, 进行化学切割反应; (c) 将反应物加到聚丙烯酰胺序列胶上, 进行电泳分离, 经放射自显影后在X光底片上显现出可判读的谱带。



### 3、DNA序列分析的自动化

包括两个方面：即“分析反应”的自动化和“读片过程”的自动化，后者是问题的关键。

现在大多采用四甲基若丹明

（**tetramethylrhodamine**）作为荧光剂，预先标记引物**DNA**。带有这种引物的**DNA**片段能在激光诱导下发出荧光，从而取代同位素标记。



在电泳凝胶的侧面，固定一个激光通道小孔，在凝胶板的上面装荧光信号接收器。当DNA条带在电场的作用下经过激光通道小孔时，带有荧光剂标记的DNA受激发产生荧光。荧光感受器收到荧光信号后，转换数据，判定核酸序列。

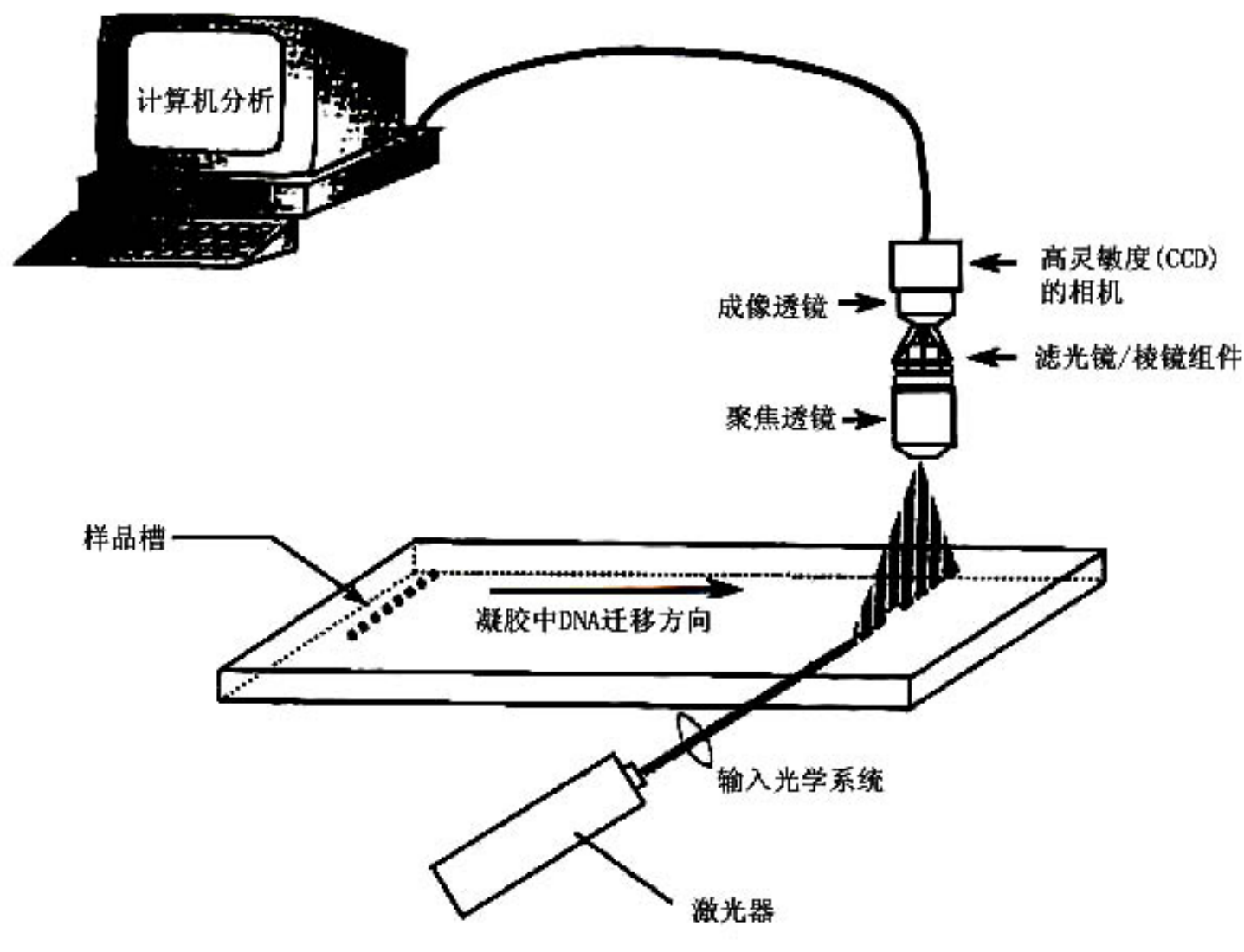


图5-12 自动DNA序列分析仪的工作原理。激光束通过精密的光学系统后被垂直导向凝胶表面的检测区，遇到经过检测孔的DNA片段后激发荧光发色基团发射出具特异性波长的荧光。这些荧光通过聚焦透镜集中后传给滤光镜/棱镜组件，区分四种碱基产生的不同波长。经成像透镜后由高灵敏度的（CCD）相机分段收集信号，传送到计算机上进行分析处理。



**4、DNA杂交测序法（SBH, sequencing by hybridization）。**它利用一组已知序列的寡核苷酸短序列作探针，同某一特定的较长的靶DNA分子进行杂交，从而测定其核苷酸的序列。

**DNA杂交测序法，没有繁琐的凝胶电泳，不需要核酸酶，不需要进行复杂的化学反应，十分适合于大规模DNA序列分析。**



**DNA杂交测序**包括两个步骤，

将待测定的靶**DNA**分子同一组已知其核苷酸顺序的寡核苷酸探针进行杂交。

与能够同靶**DNA**形成完全的双链杂合分子的寡核苷酸探针做比较分析，并据此推算出靶**DNA**的核苷酸序列。



如果将5'-AGCCTAGCTGAA-3'的12-mer靶DNA，与完全随机的8-mer寡核苷酸探针杂交，在总数为 $4^8=65\ 536$ 种的8-mer探针群体中，仅有5种会与靶DNA形成完全互补的双链体。根据这5种完全杂交的8-mer探针之间的重叠关系，便可推算出靶DNA分子的核苷酸序列。



3'-T-C-G-G-A-T-C-G-5'  
C-G-G-A-T-C-G-A  
G-G-A-T-C-G-A-C  
G-A-T-C-G-A-C-T  
A-T-C-G-A-C-T-T

---

3'-T-C-G-G-A-T-C-G-A-C-T-T-5'  
5'-A-G-C-C-T-A-G-C-T-G-A-A-3'

图5-13 最简单的杂交测序原理。在65536种随机8碱基探针中，只有5种与12碱基靶序列完全相同。



图5-14是两条长度均为17-mer的靶DNA片段I和II的杂交测序结果，两者仅在第8位碱基有不同，分别为C和T。靶DNA片段I可与1~8共8段彼此相互重叠的8-mer寡核苷酸形成完全的双链分子，但不能与第9段8-mer寡核苷酸形成完全的双链分子。



(a)

II TGACCGG**T**AGCAAAATG  
 I TGACCGG**C**AGCAAAATG

1                   GTCGTTTT  
 2                   CGTCGTTT  
 3                   CCGTCGTT  
 4                   GCCGTCGT  
 5                   GGCCGTCG  
 6                   TGGCCGTC  
 7                   CTGGCCGT  
 8                   ACTGGCCG  
 9                   CATCGTTT

(b)

杂交作用

	I	II
1	+	±
2	+	-
3	+	-
4	+	-
5	+	-
6	+	-
7	+	-
8	+	±
9	-	+

(c)

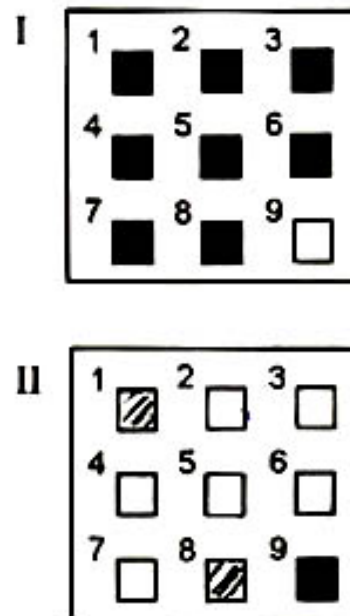


图5-14 DNA杂交测序图。(a) 两条在第8碱基位置发生了以T取代C的单碱基变换的17-mer的靶DNA (I和II)，可以与9个8-mer的寡核苷酸杂交形成完全的双链体或具有一个碱基错配的双链体，(b) 标记的8-mer寡核苷酸同固定的17-mer的靶DNA片段在溶液中杂交；(c) 8-mer寡核苷酸被固定成二维阵列后同标记的17-mer的靶DNA片段杂交，形成完全双链体分别以“+”和“■”表示；具有中间及某些末端碱基错配的双链体分别以“-”和“□”表示；具有G-C末端碱基错配的中间型双链体分别以“±”和“▨”表示。



靶DNA片段II的杂交结果表明，横跨其第8位碱基T的6段8-mer寡核苷酸的双链体，由于含有内部的碱基错配，因此其杂交效率明显下降。

与第1和第8两段8-mer寡聚体形成的具有末端G-T错配的双链分子，其稳定性下降并不显著。

与第9段8-mer寡核苷酸能形成完全的双链体，证实该片段在第8位发生了由C碱基到T碱基的变化。



## 5.2.5 基因扩增

首先将双链DNA分子加热分离成两条单链，DNA聚合酶以单链DNA为模板并利用反应混合物中的四种dNTP合成新生的DNA互补链。

因为DNA聚合酶需要有一小段双链DNA来启动（“引导”）新链的合成，所以，新生DNA链的起点由寡核苷酸引物在模板DNA链两端的退火位点所决定。



整个**PCR**反应的全过程，即**DNA**解链（变性）、引物与模板**DNA**相结合（退火）、**DNA**合成（链的延伸）三步，可以被不断重复。经多次循环之后，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 $2^n$ 。



1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1024
11	2048
12	4096
13	8192
14	16 384
15	32 768
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

图5-15 PCR指数  
扩增时循环次数  
与DNA产物数量  
的比较。



## 主要步骤:

将含有待扩增**DNA**样品的反应混合物放置在高温 ( $>94^{\circ}\text{C}$ ) 环境下加热1分钟, 使双链**DNA**变性, 形成单链模板**DNA**。



然后降低反应温度（约 $50^{\circ}\text{C}$ ），致冷1分钟，使寡核苷酸引物与两条单链模板DNA发生退火作用并结合在靶DNA区段两端的互补序列位置上。



最后，将反应混合物的温度上升到72左右保温1-数分钟，在DNA聚合酶的作用下，从引物的3'-端加入脱氧核苷三磷酸，并沿着模板分子按5'→3'方向延伸，合成新生DNA互补链。

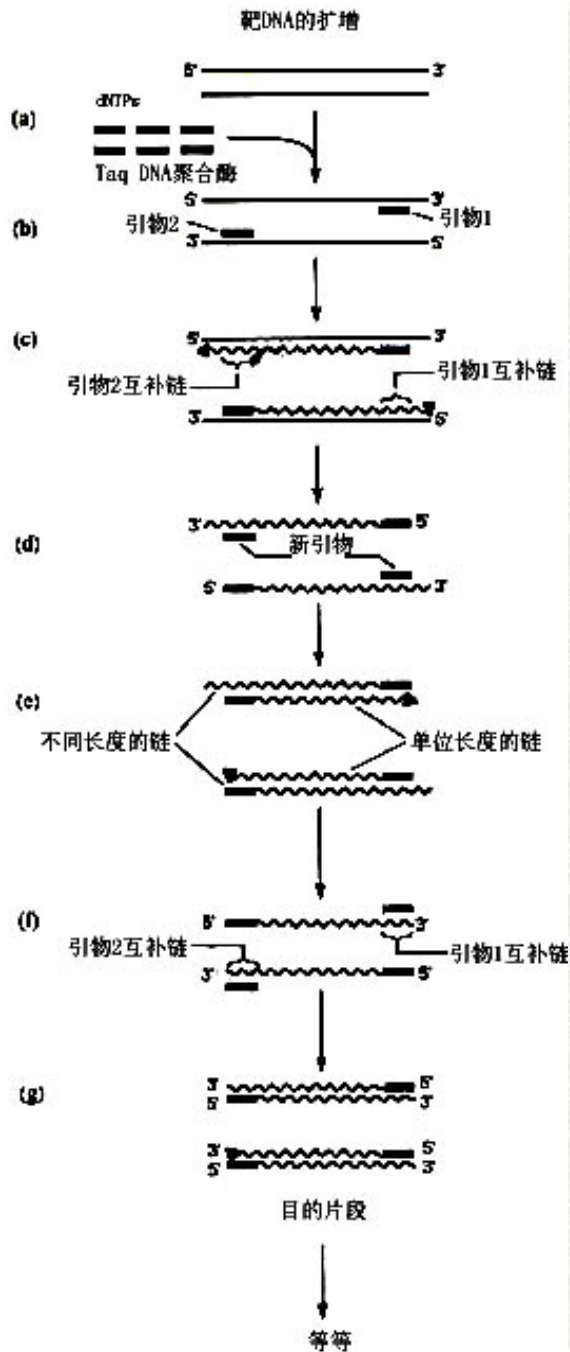


图5-16 聚合酶链式反应示意图。（a）起始材料，双链DNA；（b）反应混合物加热后发生链分离，降温使引物结合到待扩增靶DNA区段两端的退火位点上；（c）Taq聚合酶以单链DNA为模板在引物的引导下利用反应混合物中的dNTPs合成互补的新链DNA；（d）将反应混合物再次加热，使旧链和新链分开；（e）合成新的互补链DNA；（f）重复b；（g）重复c、



常规**PCR**技术能扩增两引物之间的**DNA**区段，然而，有时我们也希望扩增位于靶**DNA**区段之外的未知**DNA**序列，这就需要应用反向**PCR** (**reverse PCR**) 技术。



先用一种在靶**DNA**区段上没有识别位点的核酸内切限制酶，从距靶**DNA**区段有一定距离的两侧位置切割**DNA**分子，然后将这些片段作分子内连接成环形。根据已知的靶**DNA**序列按向外延伸的要求设计一对向外引物，保证被扩增的是位于靶**DNA**区段两侧的未知**DNA**序列。

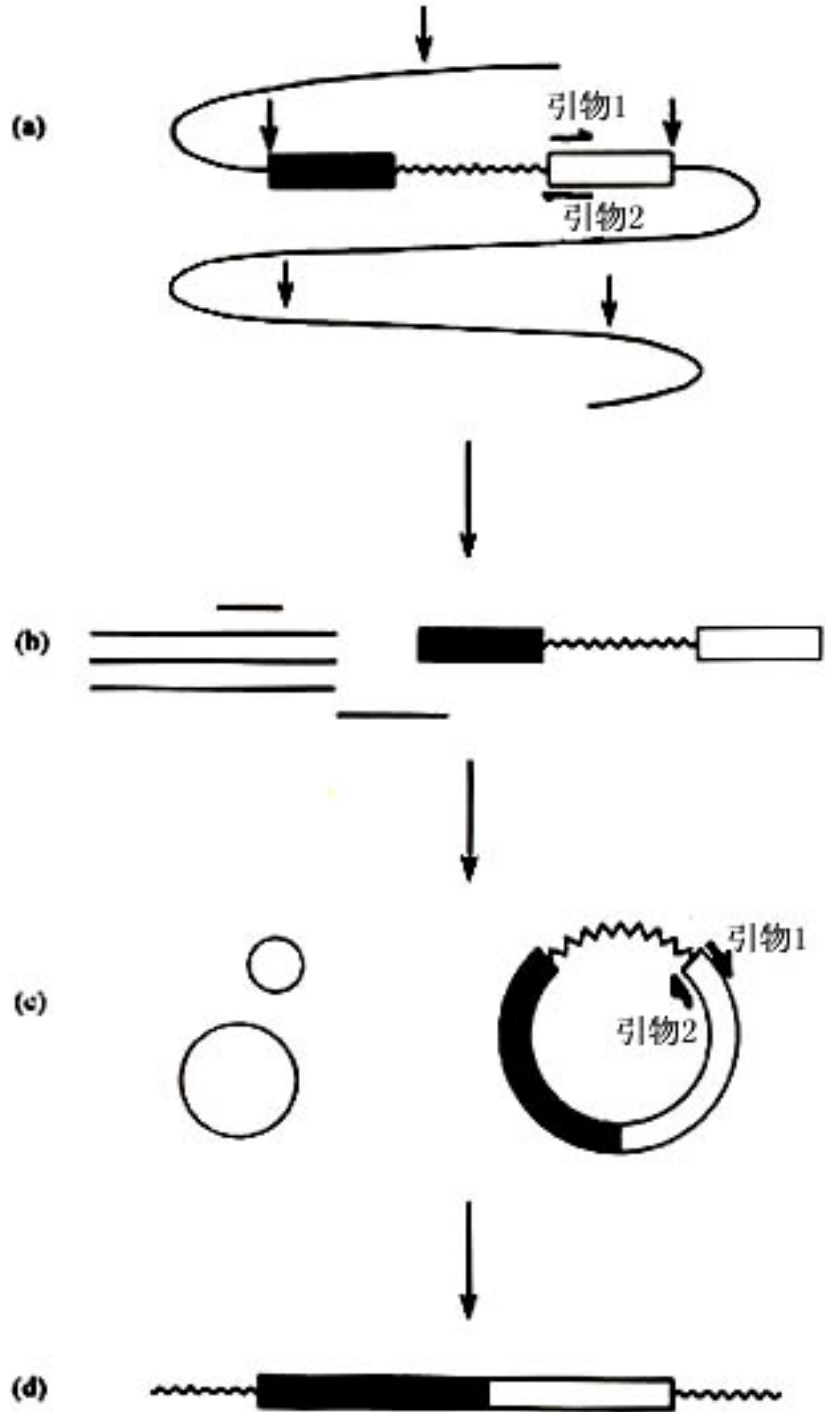


图5-17 反向PCR的基本操作程序。波纹线表示靶DNA区段，箭头表示限制性内切酶位点，分别用方框表示包围靶DNA区段的左侧序列和右侧序列。(a)用一种在靶序列上没有切点的核酸限制性内切酶消化大分子量DNA；

(b)产生大小不同的线性DNA片段群体，其中靶DNA区段的DNA分子长度不超过2~3kb，经连接后重新环化；(c)按靶序列设计的一对引物与互补序列退火结合，其延伸方向如箭头所指；

(d)经PCR扩增产生的主要是线性双链DNA分子，它是由左侧序列和右侧序列首尾连接而成，其接点是(a)中所用的限制性内切酶的识别位点。



## 5.2.6 DNA与蛋白质相互作用研究

### 1、凝胶阻滞试验

凝胶阻滞试验（gel retardation assay），又叫作DNA迁移率变动试验（DNA mobility shift assay），是用于体外研究DNA与蛋白质相互作用的一种特殊的凝胶电泳技术。



在凝胶电泳中，由于电场的作用，裸露的DNA朝正电极移动的距离与其分子量的对数成反比。如果此时DNA分子与某种蛋白质相结合，那么，由于分子量增大，它在凝胶中的迁移作用便会受到阻滞，在特定电压和时间内朝正电极移动的距离也就相应缩短了。

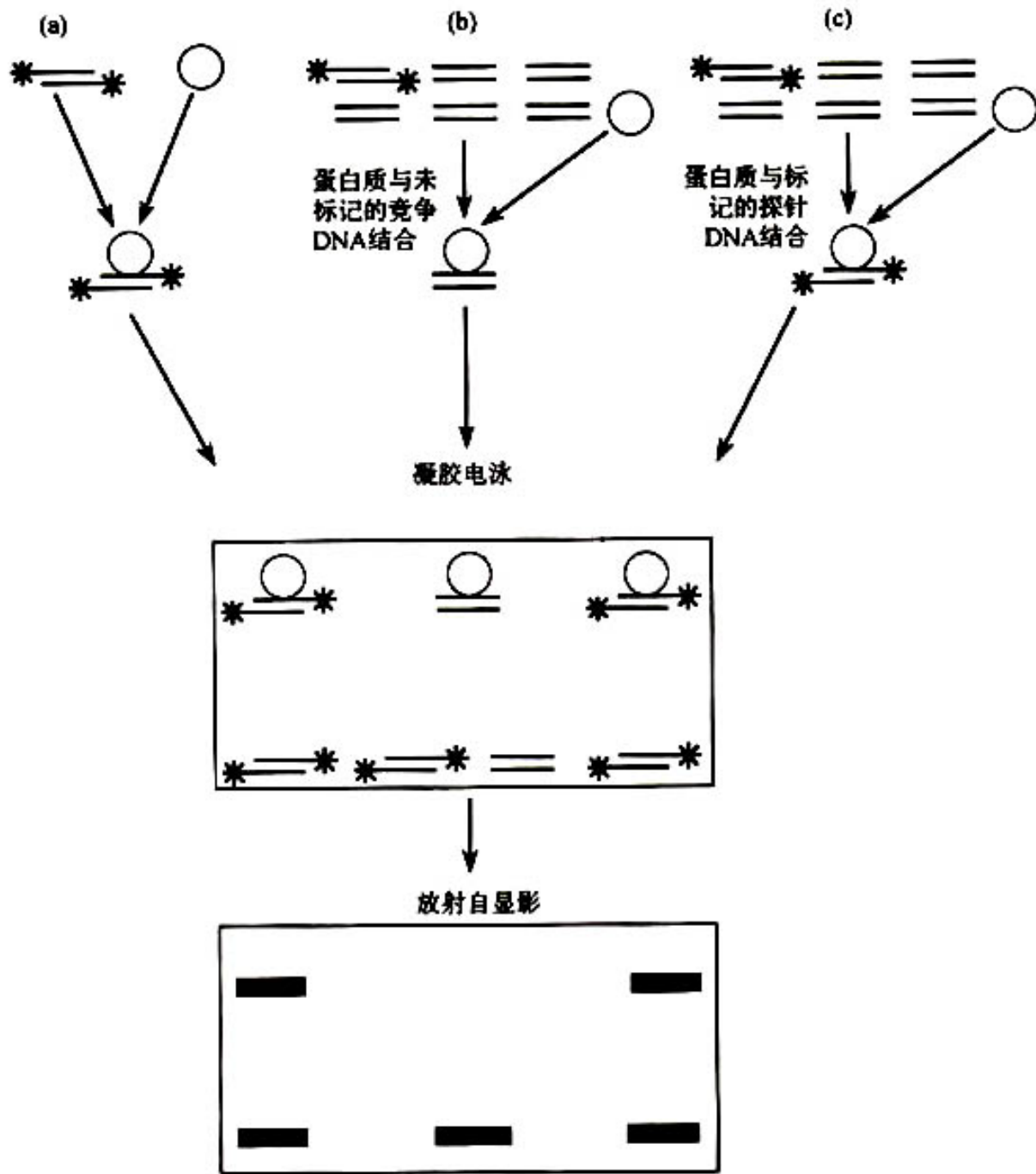


图5-18 在凝胶阻滞实验中竞争DNA与探针DNA之间的竞争作用。(a) 没有加入竞争DNA的凝胶阻滞实验，探针DNA与特异蛋白质结合，出现阻滞条带；(b) 加入超量竞争DNA与探针DNA竞争结合同一种蛋白质，阻滞条带消失；(c) 竞争DNA与探针DNA分别结合不同的蛋白质，仍然出现阻滞条带。



## 2. DNaseI 足迹试验 (DNA footprinting assay)

首先将待检测的双链DNA分子用 $^{32}\text{P}$ 作末端标记，并用限制性内切酶去掉其中的一个末端，得到只有一条链的单个末端标记的双链DNA分子，与细胞蛋白质提取物混合。



加入少量 **DNaseI**（随机切割 **DNA**）消化 **DNA** 分子，保证平均每条 **DNA** 链只发生一次磷酸二酯键断裂。如果蛋白质提取物中不存在与 **DNA** 结合的特异蛋白质，经 **DNaseI** 消化之后便会产生出距放射性标记末端 1 个、2 个、3 个核苷酸等等一系列前后长度均仅相差一个核苷酸的连续的 **DNA** 片段梯度群体。



如果有蛋白质结合到**DNA**分子的某一区段上，它就将保护该**DNA**区段免受**DNaseI**的消化作用，不能产生出相应长度的切割条带。

在电泳凝胶放射自显影图片上，相应于蛋白质结合的部位不出现放射性标记的条带，出现了被称为“足迹”的空白区。

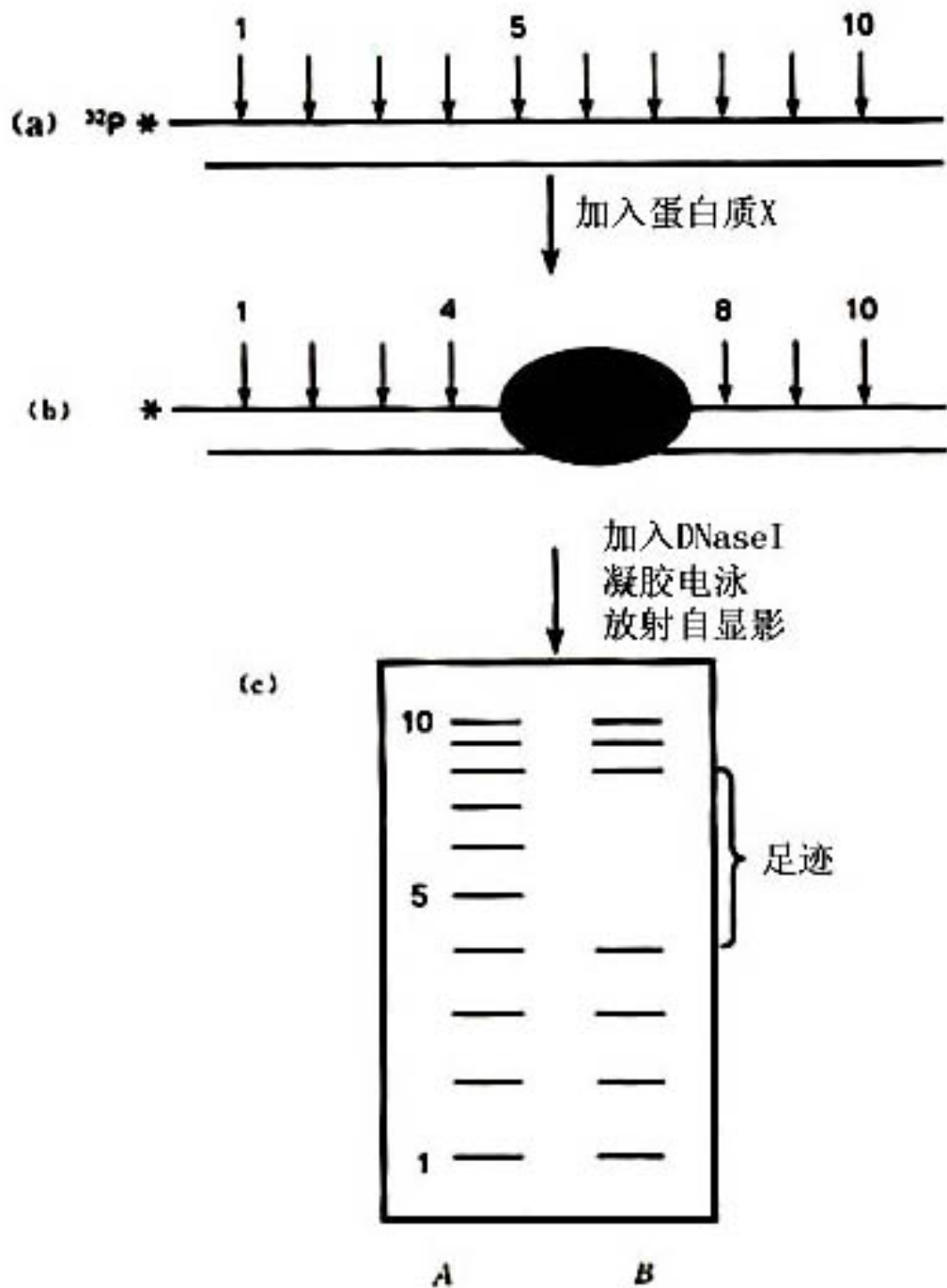


图5-19 DNase I足迹试验。  
 (a) 双链DNA片段中只有一条链的5'-端被 $^{32}\text{P}$ 标记，上面带有若干个DNase I潜在的切割位点；  
 (b) 位点5、6、7因受特异结合蛋白质X的保护而免受DNase I的切割作用；  
 (c) 在上述两个样品中加入少量的DNase I，除去蛋白质后加样在变性的DNA测序凝胶中作电泳分离和放射自显影。结果B样品DNA片段的5~7部位呈现空白的“足迹”，与A样品对照后解出该区段的核苷酸序列。



## 5.3 基因克隆的主要载体系统

### 5.3.1 质粒DNA及其分离纯化

细菌质粒是存在于细胞质中的一类独立于染色体并能自主复制的遗传成份，绝大多数质粒都是由环形双链DNA组成的复制子。



# 1、氯化铯密度梯度离心法

质粒 DNA 仅占细胞总 DNA 的 1%~2%，其化学结构与寄主染色体 DNA 之间并没有什么差别。

实验表明，在 DNA 分离过程中，染色体 DNA 容易断裂成较小的线性片段，而质粒 DNA 由于其分子量较小、结构紧密，仍能保持完整状态。



在大肠杆菌裂解液中加入**EtBr-氯化铯溶液**，使**EtBr**分子嵌入到**DNA**链上，导致双螺旋结构发生解旋反应。线性的染色体**DNA**大片段及开环的质粒**DNA**分子具有游离的末端而易于解旋，可结合大量的**EtBr**分子。共价闭合环状的**DNA**分子，只能发生有限的解旋反应，结合少量的**EtBr**分子。



在**DNA-EtBr**复合物中，结合的**EtBr**分子数量越多，其密度也就越低。因此，在**EtBr**达到饱和浓度的条件下，质粒**DNA**就要比线性的染色体**DNA**片段具有更高的密度。通过氯化铯密度梯度离心之后，它们就会被平衡在不同的位置，从而达到纯化质粒**DNA**的目的。

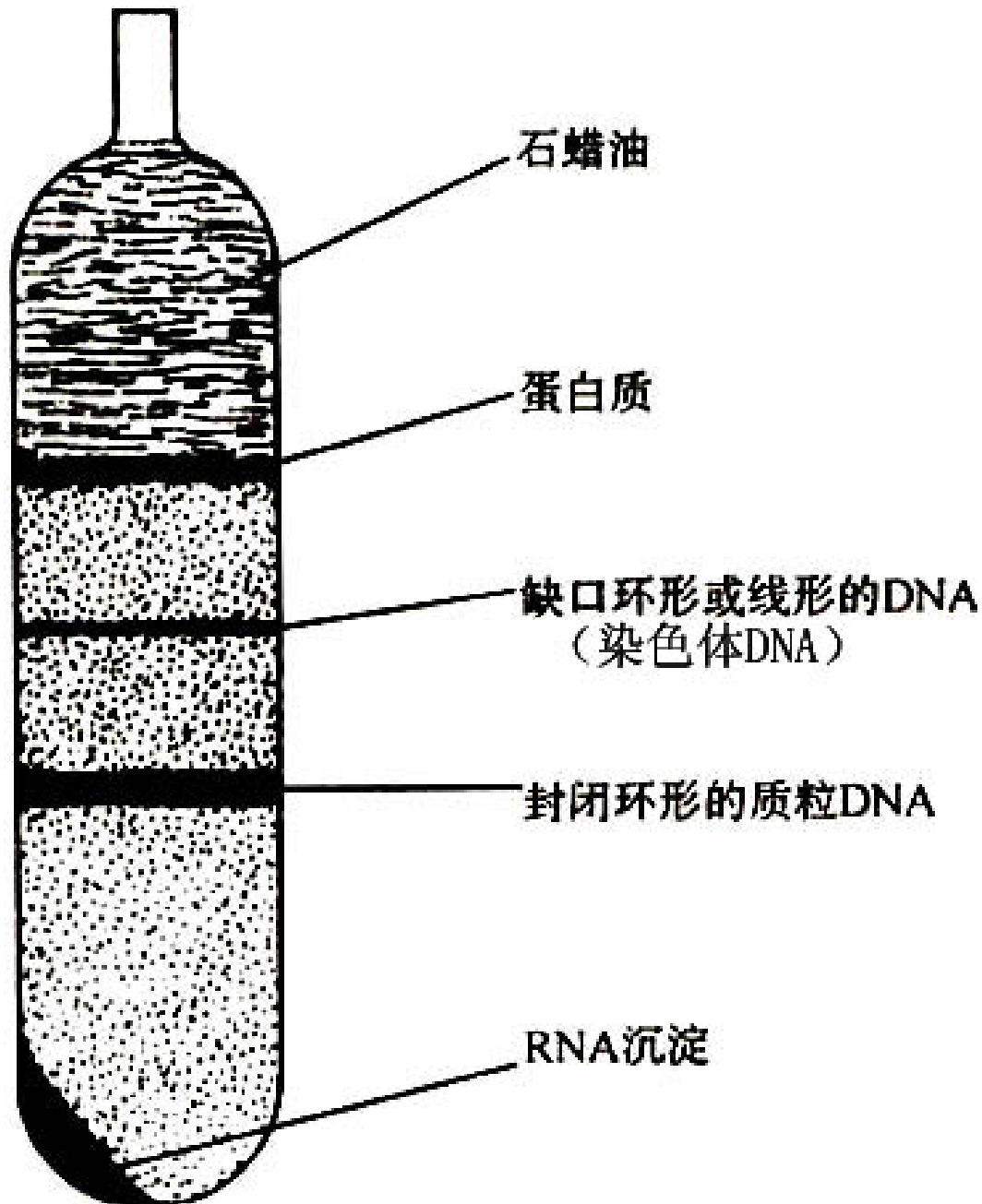


图 5-20 应用 CsCl-EtBr 密度梯度离心技术可直接在紫外光下观察到被分离的不同 DNA 分子。染色体 DNA 带中，可能也含有一定数量的线性质粒 DNA 分子。



## 2、碱变性法

在pH值12.0~12.5时加热DNA溶液，线性DNA会被变性，两条链完全分开。闭合环状质粒DNA不会被变性，尽管连接DNA互补链之间的氢键也会断开，但由于闭合环状质粒DNA的双螺旋主链彼此盘绕，两条链仍然结合在一起。

致冷或恢复中性pH后，共价闭合环状的质粒DNA能迅速而准确地复性。



## 5.3.2 重要的大肠杆菌质粒载体

### 1、pSC101质粒载体

是一种严紧型复制控制的低拷贝数的大肠杆菌质粒载体，平均每个寄主细胞仅有1~2个拷贝。长**9.09kb**，编码有四环素抗性基因（**tet<sup>r</sup>**），具有**EcoRI**、**HindIII**、**BamHI**、**SalI**、**XhoI**、**PvuII**以及**SmaI**等7种限制性核酸内切酶的单切割位点，在**HindIII**、**BamHI**和**SalI**等3个位点克隆外源DNA，都会导致**tet<sup>r</sup>**基因失活。



**pSC101质粒有可插入外源DNA的多个内切酶单克隆位点和四环素抗性**  
**强选择记号，是第一个真核基因克**  
**隆载体。**

**缺点：它是一种严紧型复制控制的**  
**低拷贝质粒，从带有该质粒的寄主**  
**细胞中提取pSC101 DNA，产量很**  
**低。**

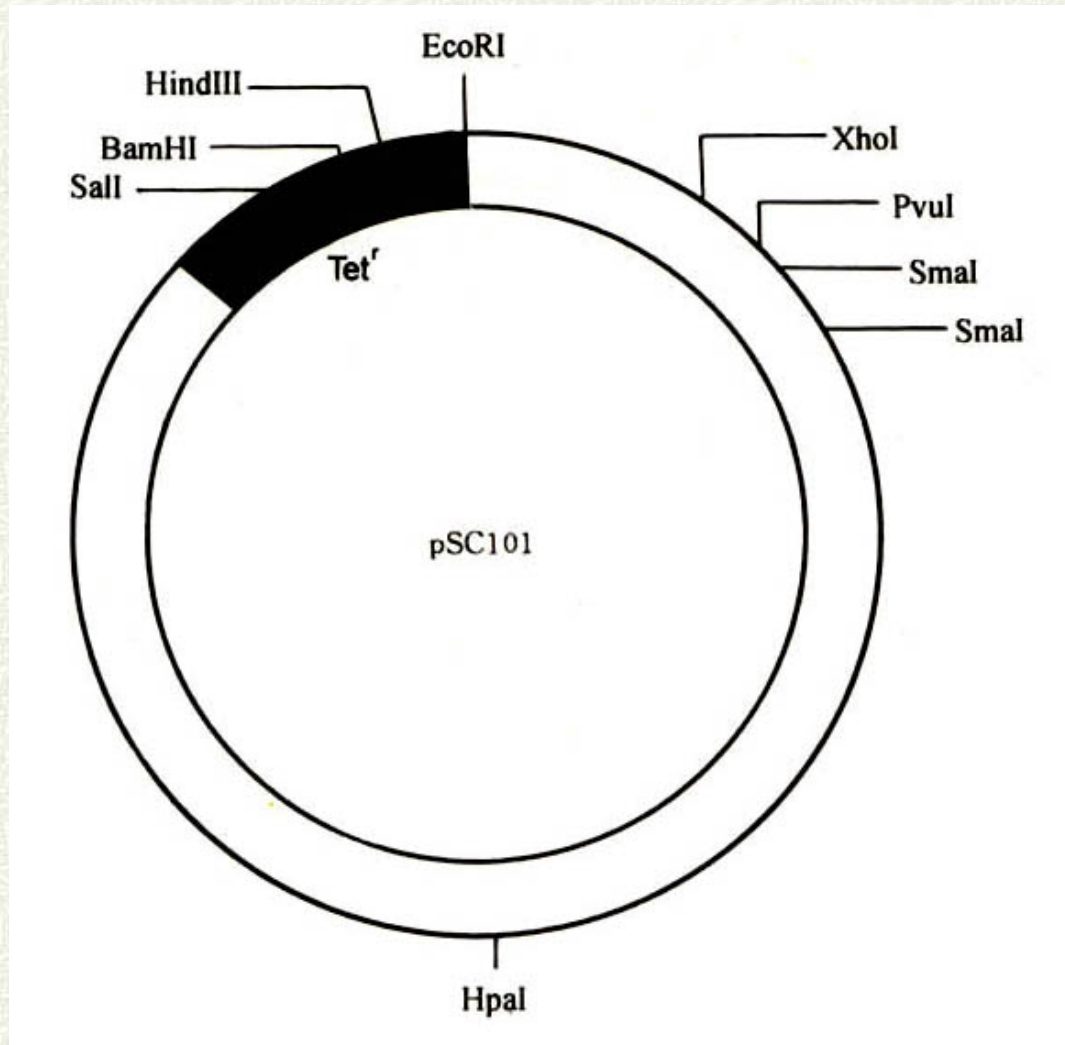


图5-21 大肠杆菌pSC101质粒载体示意图。



## 2、ColE1质粒载体

**ColE1质粒**属于松弛型复制控制的多拷贝质粒。正常生长条件下，当培养基中氨基酸被耗尽，或是在对数生长末期的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。



松弛型复制控制的质粒DNA仍然可以继续复制达数小时之久，使每个寄主细胞中所累积的ColE1质粒拷贝数增加到1000~3000个之多，质粒DNA大约可占细胞总DNA的50%左右。



### 3、pBR322质粒载体

由三个不同来源的部分组成的：第一部分来源于pSF2124质粒易位子Tn3的氨苄青霉素抗性基因（**amp<sup>r</sup>**）；

第二部分来源于pSC101质粒的四环素抗性基因（**tet<sup>r</sup>**）；

第三部分则来源于ColE1的衍生质粒pMB1的DNA复制起点（**ori**）。



优点是具有较小的分子量，其长度为**4 363bp**。不仅易于纯化，而且即使携带上一段**6-8kb**的外源**DNA**片段，操作起来仍较为便利。

具有两种抗生素抗性基因以用作转化子的选择记号。有较高的拷贝数，若经过氯霉素扩增，每个细胞中可累积**1000~3000**个拷贝，为重组体DNA的制备提供了极大的方便。



将外源DNA片段克隆在pBR322质粒的BamHI或SalI位点上，由于阻断了tet<sup>r</sup>基因编码序列的连续性，使其失去活性，产生了具有Amp<sup>r</sup>Tet<sup>s</sup>表型的重组的pBR322质粒。

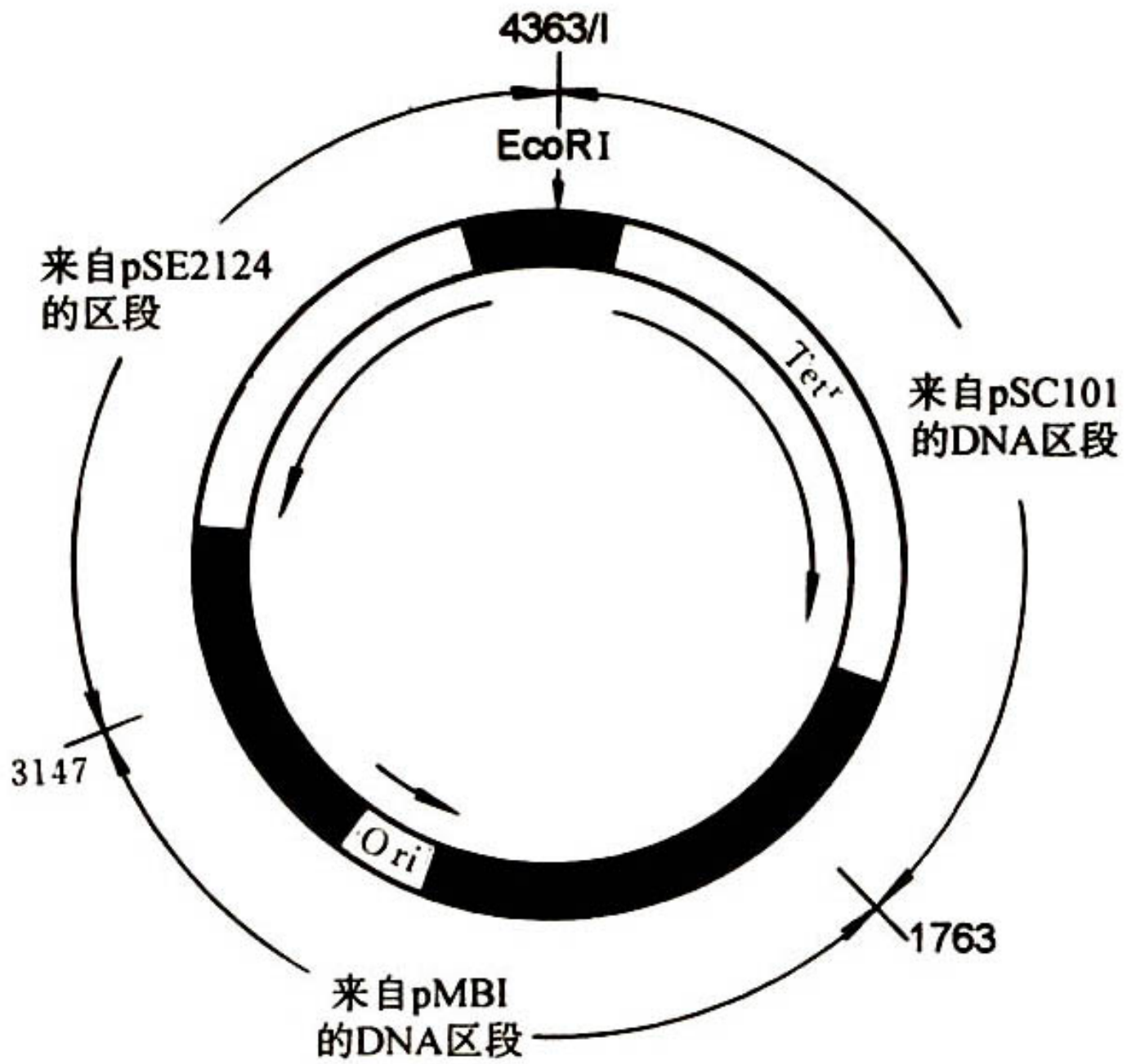


图 5-22 pBR322 质粒载体的结构图及其来源分析。



#### 4、pUC质粒载体（包括四个部分）：

(i)来自pBR322质粒的复制起点（ori）；

(ii)氨苄青霉素抗性基因（amp<sup>r</sup>）；

(iii)大肠杆菌 $\beta$ -半乳糖酶基因（lacZ）的启动子及其编码 $\alpha$ -肽链的DNA序列，此结构特称为lacZ'基因；

(iv)位于lacZ'基因中的靠近5'-端的一段多克隆位点（MCS）区段，外源基因插入后破坏了lacZ'基因的功能。



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，仅保留下其中的氨苄青霉素抗性基因及复制起点，其分子小了许多，**pUC8** 为 **2750bp**，**pUC18** 为 **2686bp**。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。



可用组织化学方法检测重组体。  
pUC8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 $\alpha$ -肽链可参与 $\alpha$ -互补作用。因此，可用X-gal显色法实现对重组体转化子的鉴定。

第三，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pUC8质粒载体上。



## 5、 pGEM-3Z质粒

长度为**2743bp**，编码有一个氨苄青霉素抗性基因和一个**lacZ'**基因。

含有两个噬菌体启动子（**T7**和**SP6**），为**RNA**聚合酶的附着作用提供了特异性的识别位点。加入**T7**或**SP6 RNA**聚合酶，所克隆的外源基因便会转录出相应的**mRNA**。



## 6、穿梭质粒载体 (shuttle plasmid vector)

指由人工构建的具有两种不同复制起点和选择记号，可在两种不同的寄主细胞中存活和复制的质粒载体。由于这类质粒载体可以保证外源DNA序列在不同物种的细胞之间得到扩增，能在原核和真核细胞之间往返穿梭，具有广泛的用途。



### 5.3.3 $\lambda$ 噬菌体载体

噬菌体可在脱离寄主细胞的状态下保持自己的生命，但一旦脱离了寄主细胞，就既不能生长也不能复制，因为大多数的噬菌体只能利用寄主核糖体、合成蛋白质的因子、各种氨基酸及能量代谢体系进行生长和增殖。



分为溶菌周期和溶源周期两种不同的类型。

在溶菌周期，噬菌体将其感染的寄主细胞转变成为噬菌体的“制造厂”，产生出大量的子代噬菌体颗粒。将只具有溶菌生长周期的噬菌体叫作烈性噬菌体。



溶源生长周期是指在感染过程中没有产生出子代噬菌体颗粒，噬菌体DNA被整合到寄主细胞染色体DNA上，成为它的一个组成部分。具有这种溶源周期的噬菌体，叫作温和噬菌体。



$\lambda$  噬菌体的分子量为**48.5kb**，是温和噬菌体。

$\lambda$  噬菌体有**61**个基因，其中约一半参与了生命周期的调控，是 $\lambda$ 噬菌体的必需基因；另一部分基因则被称为非必需基因，被外源基因取代后不影响生命周期。



在  $\lambda$  噬菌体线性DNA分子的两端，各有一条由12个核苷酸组成的完全互补的5'突出序列（即粘性末端），注入到寄主细胞内的  $\lambda$  噬菌体的线性DNA分子，会迅速地通过粘性末端之间的互补作用，形成环形双链DNA分子，并进一步超盘绕。

这种粘性末端结合形成的双链区段称为cos位点（cohesive-end site）。

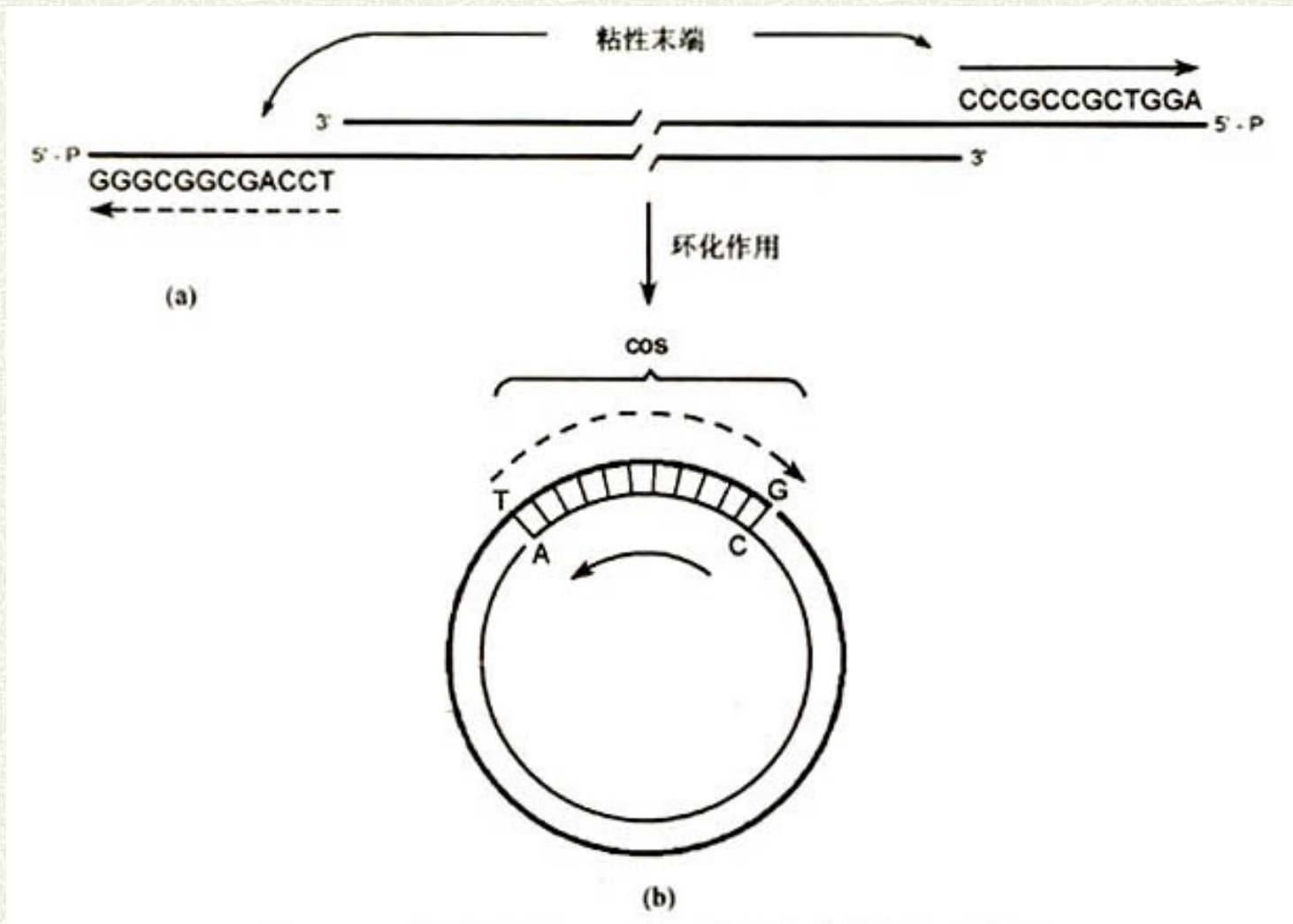


图5-23  $\lambda$  噬菌体线性DNA分子的粘性末端及其环化作用。(a) 具有互补单链末端（粘性末端）的  $\lambda$  DNA分子，(b) 通过粘性末端之间的碱基配对作用实现的线性分子的环化作用，由此形成的双链区叫作cos位点。



## 5.3.5 pBluescript噬菌粒载体

**pBluescript**是指由**Stratagene**公司发展的一类从**pUC**载体派生而来的噬菌粒载体，简称为**pBS (+/-)**，如今则更多地叫作**pBluescript KS (+/-)**或**pBluescript SK (+/-)**。



**(i) 在多克隆位点区（MCS）的两侧，存在一对T3和T7噬菌体的启动子，用以定向指导插入在多克隆位点上的外源基因的转录活动；**



**(ii) 具有单链噬菌体M13或f1的复制起点和一个来自ColE1质粒的复制起点，保证pBluescript噬菌粒载体在有或无辅助噬菌体共感染的不同情况下，按照不同的复制形式分别合成出单链或双链DNA；**



(iii) 编码有一个氨苄青霉素抗性基因，作为转化子克隆的选择标记；

(iv) 含有一个lacZ基因，可以按照X-gal-IPTG组织化学显色法筛选噬菌粒载体的重组子。

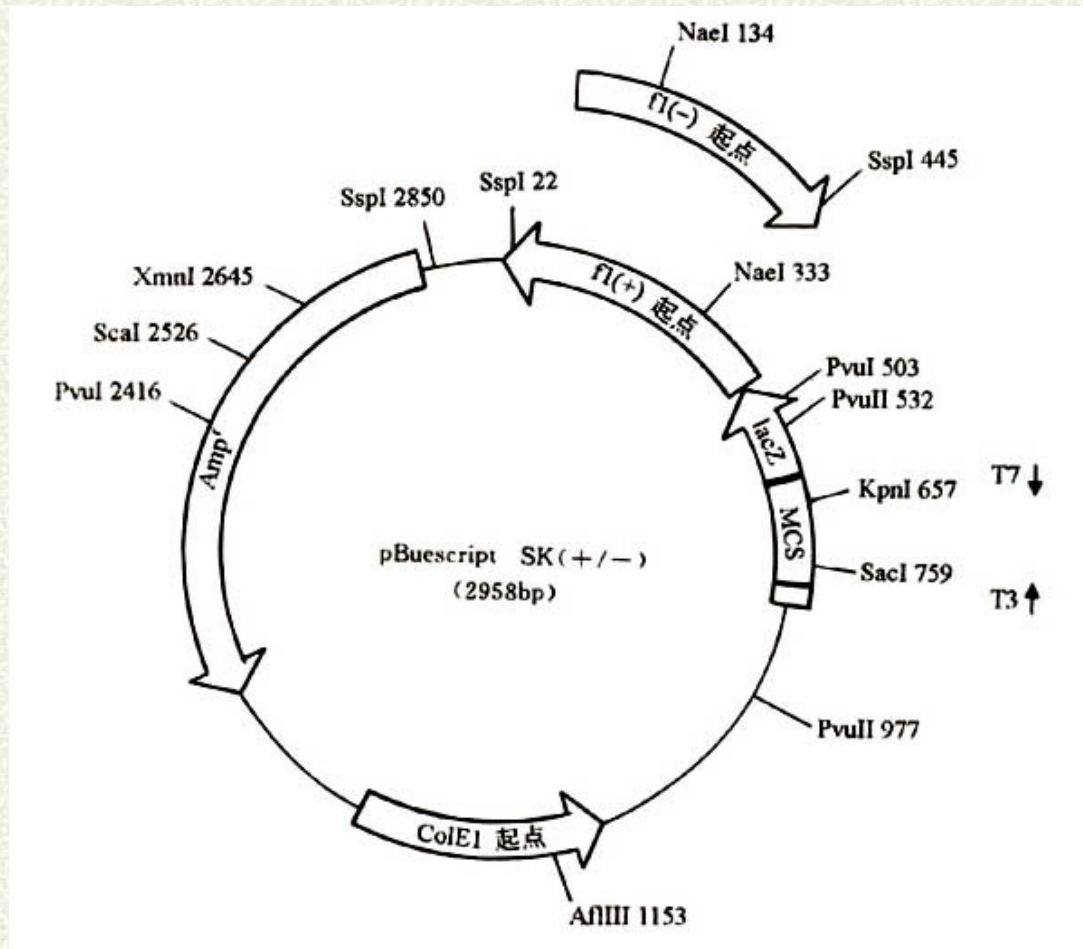


图5-24 pBuescript SK (+/-) 噬菌粒载体的分子结构示意图。SK表示多克隆位点区的一种取向，即lacZ基因是按照SacI→KpnI的方向转录；(+/-)表示单链噬菌体f1复制起点的两种相反的取向。f1(+)起点表示当pBuescript噬菌粒载体和辅助噬菌体共感染寄主细胞时，能够回收到lacZ基因的有意义链DNA；而f1(-)起点则表示当pBuescript噬菌粒载体与辅助噬菌体共感染寄主细胞时，可回收到lacZ基因的无意义链DNA。



## 5.4 基因的分离与鉴定

在多细胞的高等生物个体水平上，人们用克隆（**clone**）表示由具有相同基因型的同一物种的两个或数个个体组成的群体。从同一受精卵分裂而来的单卵双生子（**monozygotic twins**）便是属于同一克隆。



在细胞水平上，克隆一词是指由同一个祖细胞（**progenitor cell**）分裂而来的一群遗传上同一的子细胞群体。

在分子生物学上，人们把将外源**DNA**插入具有复制能力的载体**DNA**中，使之得以永久保存和复制这种过程称为克隆。



基因克隆，包括目的基因的分离和鉴定两个内容，分四个基本步骤：

**(1) DNA材料的选择与片段化；**

**(2) 外源DNA片段与载体分子的体外连接反应；**

**(3) 将人工重组的DNA分子导入它们能够进行正常复制的寄主细胞；**

**(4) 重组转化子克隆的选择或筛选。**



## 5. 4. 1 DNA片段的产生与分离

由于高等真核生物的基因组庞大，按一般载体承受外源DNA插入能力（大约为 $1000\sim 3000\text{bp}$ ）计算，能产生几十万个大小不同的DNA片段，形成由几十万个大小不同的重组体分子组成的克隆群体。



## 5.4.2 重组体DNA分子的构建

### 1. 外源DNA片段定向插入载体分子

用两种不同的限制性核酸内切酶同时消化特定的DNA分子，将产生不同粘性末端的DNA片段。如果载体分子和待克隆的DNA分子都用同一对限制性核酸内切酶切割，载体和外源DNA片段将按一种取向连成重组DNA分子，保证外源DNA片段定向插入载体分子。



载体分子和外源**DNA**插入片段（或称供体**DNA**），并不一定总能产生出互补的粘性末端，所以，有时采用平末端连接法或采用附加衔接物的办法来提高平末端之间的连接效率。

BamHI接头分子

外源DNA片段

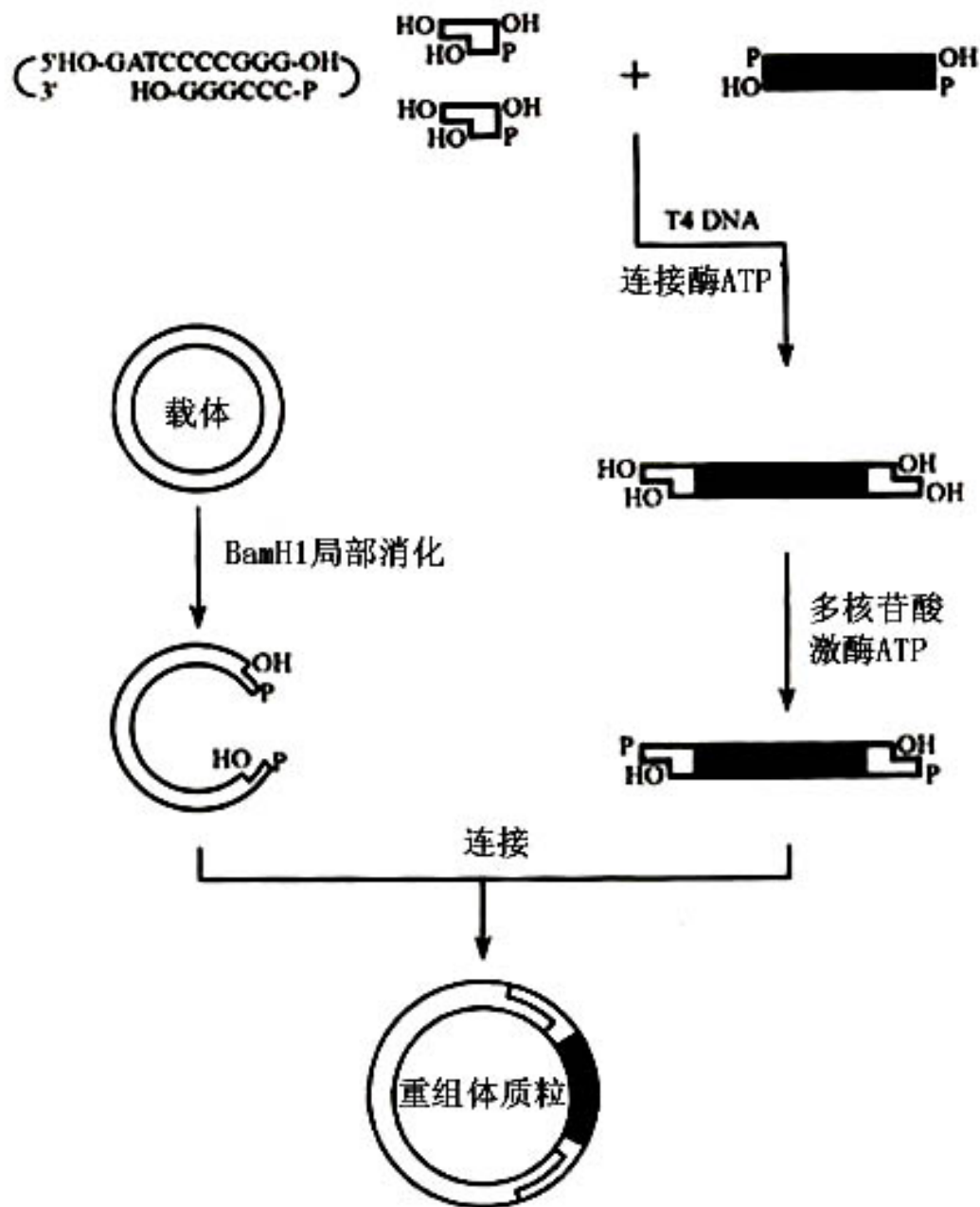


图5-25 应用BamHI接头构建重组体分子的基本程序。由于接头分子具有5'-OH，不会发生自身聚合作用。加到外源DNA片段上的接头分子，通过多核苷酸激酶的催化作用被重新磷酸化，然后同经酶切的载体分子连接，形成重组分子。



## 2、重组子导入受体细胞的途径

将外源重组体分子导入受体细胞的主要途径包括转化（或转染）、转导、显微注射和电穿孔等。转化和转导主要适用于细菌一类原核细胞和酵母等低等真核细胞，而显微注射和电穿孔则主要应用于高等动物的真核细胞。



### 5.4.3 cDNA基因克隆

真核生物基因组庞大，含有大量重复序列。无论是电泳分离技术还是通过杂交的方法，都难以直接分离到目的基因片段。

尽管高等生物一般具有3-5万种左右不同的基因，在单个细胞或组织的特定时间段中，仅有15-20%左右的基因得以表达。



**cDNA**克隆的基本过程是通过一系列酶催作用，使总**poly (A) mRNA**转变成双链**cDNA**群体并插入到适当的载体分子上，转化大肠杆菌寄主菌株细胞，构成包含所有基因编码序列的**cDNA**基因文库。



可应用 Promega PolyAT tract mRNA 分离系统分离多聚(A)mRNA。将用生物素标记的寡聚(dT)引物与细胞总RNA共温育，加入与微磁球相连的抗生物素蛋白，用磁场吸附通过寡聚(dT)引物与抗生物素蛋白及强力微磁球相连的mRNA。

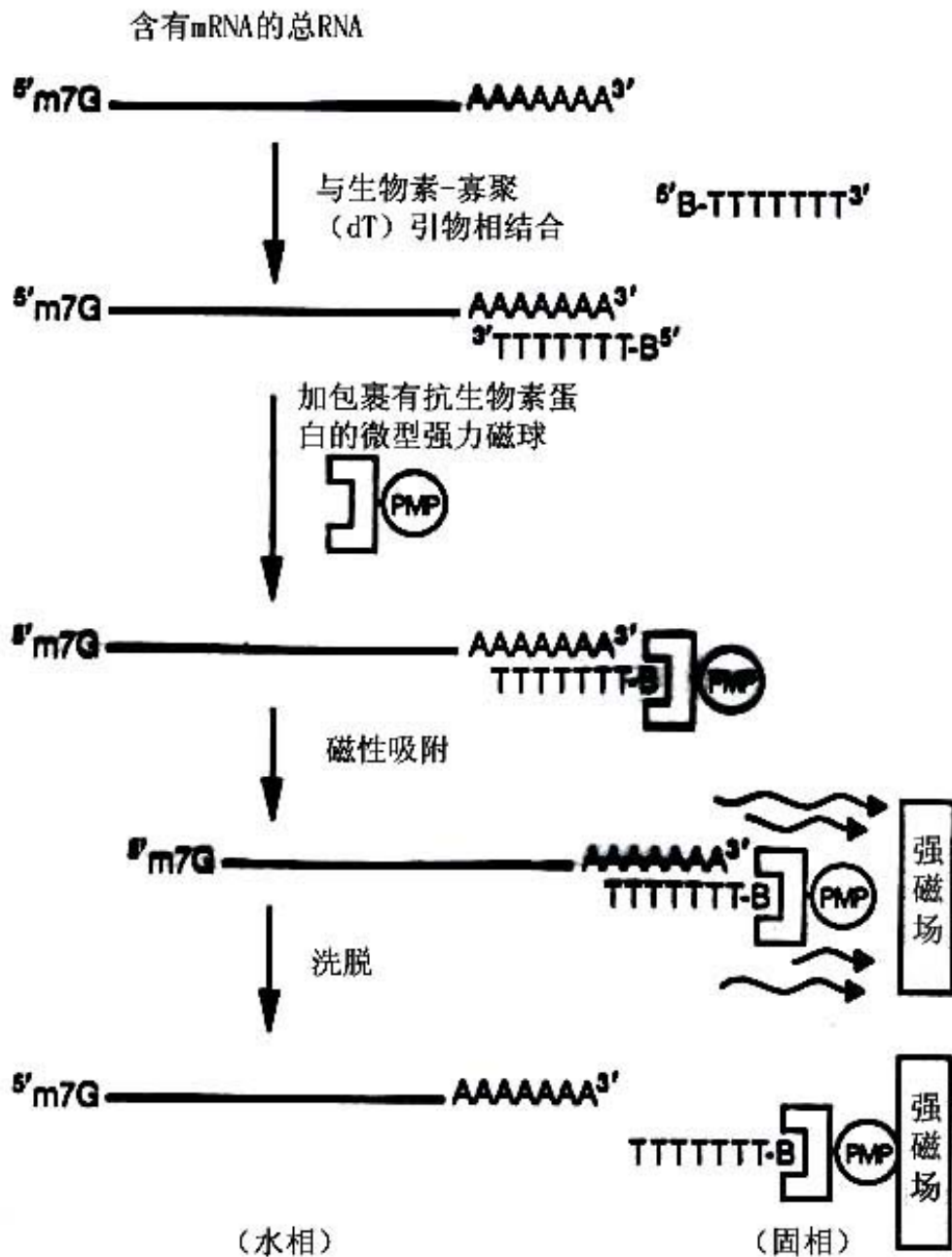


图5-26  
PolyA Tract  
mRNA的分离纯  
化过程简图。

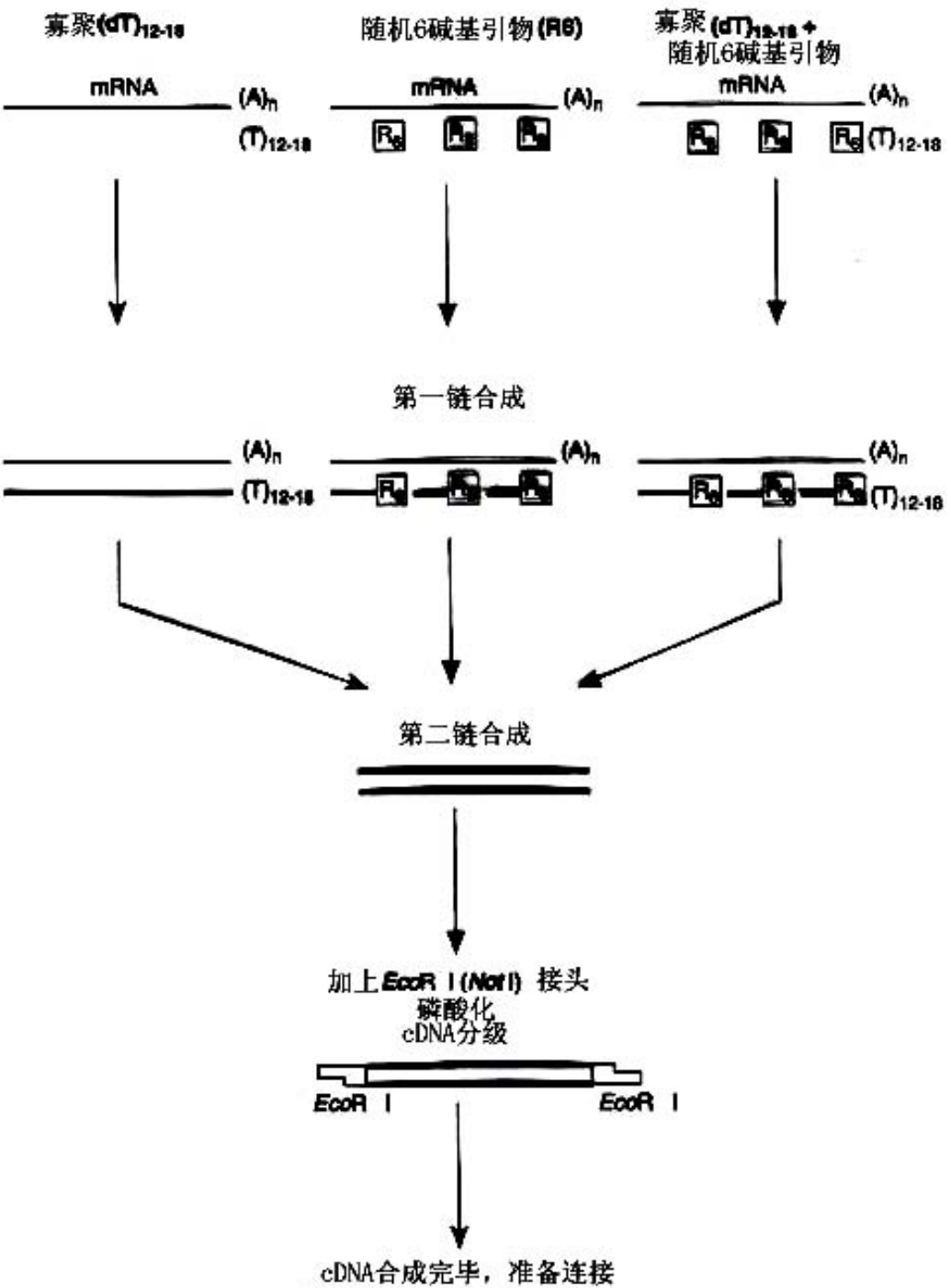


图5-27 cDNA合成过程示意图。

接头及引物序列

5' CTCGAGTTTTTTTTTTTTT

3' AAAAAAAAAAAAAA

无RNaseH活性物反转录酶5'-甲基dCTP、  
dATP、dGTP、dTTP

Xho I  
5' CTCGAGTTTTTTTTTTTTT  
3' AAAAAAAAAAAAAA

CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub>

RNase H  
DNA聚合酶I

Xho I  
5' CTCGAGTTTTTTTTTTTTT  
3' GAGCTCAAAAAAAAAAAAAA

CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub>

ECORI接头  
T4DNA连接酶

EcoR I Xho I  
5' AATTC...CTCGAGTTTTTTTTTTTTT  
3' G...GAGCTCAAAAAAAAAAAAAA...CTTAA 5'

CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub>

XhoI限制性核酸内切酶

Xho I  
5' TCGAGTTTTTTTTTTTTT  
3' CAAAAAAAAAAAAA...CTTAA 5'

CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>3</sub>

完整的有方向性的cDNA

图5-28 cDNA合成中的分子修饰。



# 表5-3 真核细胞mRNA群体的丰度等级及其复杂性分析

丰度等级	相应丰度等级的mRNA群体占总mRNA的百分数(%)	在相应丰度等级中所含的不同种类mRNA序列的数量(个)	每个细胞所含的相应丰度mRNA序列的拷贝数(个)
高丰度	22	30	3 500
中丰度	49	1 090	230
低丰度	29	10 670	14



低丰度mRNA，每个细胞仅有14个拷贝左右，其总量约占总mRNA的30%，其中约有11000个左右的不同种类的mRNA。为了获得能够代表全部低丰度mRNA序列的cDNA基因文库，理论最低克隆数是 $11000/0.30 \approx 37\ 000$ 。实验中为使低丰度mRNA的cDNA克隆达到99%的期望率，需要筛选170 000个克隆子。



## 5.4.4 克隆基因的分离

### 1、应用核酸探针克隆目的基因。

把基因文库转移到尼龙膜或硝酸纤维素滤膜上，就可以与特异性的核酸探针进行菌落或噬菌斑杂交，以便筛选出具有目的基因的阳性克隆，这个过程叫作克隆基因的分离或筛选。



## 2、应用**mRNA**差别显示技术克隆目的基因。

不同基因在生物个体发育的不同阶段或不同的组织、细胞中发生的按时间、空间进行有序表达的方式称为基因的差别表达（**differential expression**）。



**基因数量： 人类共有5-6万个**

**水稻有5-6万个**

**小鼠有4-5万个**

**拟南芥有29000个**

**线 虫有18000个**

**酵母有6500个**

**大肠杆菌有4200个**



1992年，美国波士顿Dana-Farber癌症研究所的科学家P. Liang和A. D. Pardee发明了mRNA的差别显示（mRNA differential display）技术，简称DDRT-PCR，可以从一对不同基因型的细胞群体所产生的约15 000种mRNA中有效地鉴定并分离出差别表达的基因。



**5'-AGAAAAA...AA-3'**

**5'-CGAAAAA...AA-3'**

**5'-GGAAAAA...AA-3'**

**5'-TGAAAAA...AA-3'**

**5'-ATAAAAA...AA-3'**

**5'-CTAAAAA...AA-3'**

**5'-GTAAAAA...AA-3'**

**5'-TTAAAAA...AA-3'**

**5'-ACAAAAA...AA-3'**

**5'-CCAAAAA...AA-3'**

**5'-GCAAAAA...AA-3'**

**5'-TCAAAAA...AA-3'**



设计合成了12种由11个或12个连续的脱氧胸苷酸加上两个3'-端锚定脱氧核苷酸组成的3'引物，用以反转录mRNA，合成第一链cDNA。每一种人工合成的寡核苷酸引物，都能够把总mRNA群体的1/12分子反转录成mRNA-cDNA杂合分子。



在**DDRT-PCR**反应中，常用**3'**-端锚定引物和**8-10-mer**的**5'**-端随机引物组成的引物对，以第一链**cDNA**为模板进行**PCR**扩增（图**5-29**）。



(a) 从一对不同的组织或器官中分离总mRNA，分别称为A组和B组。

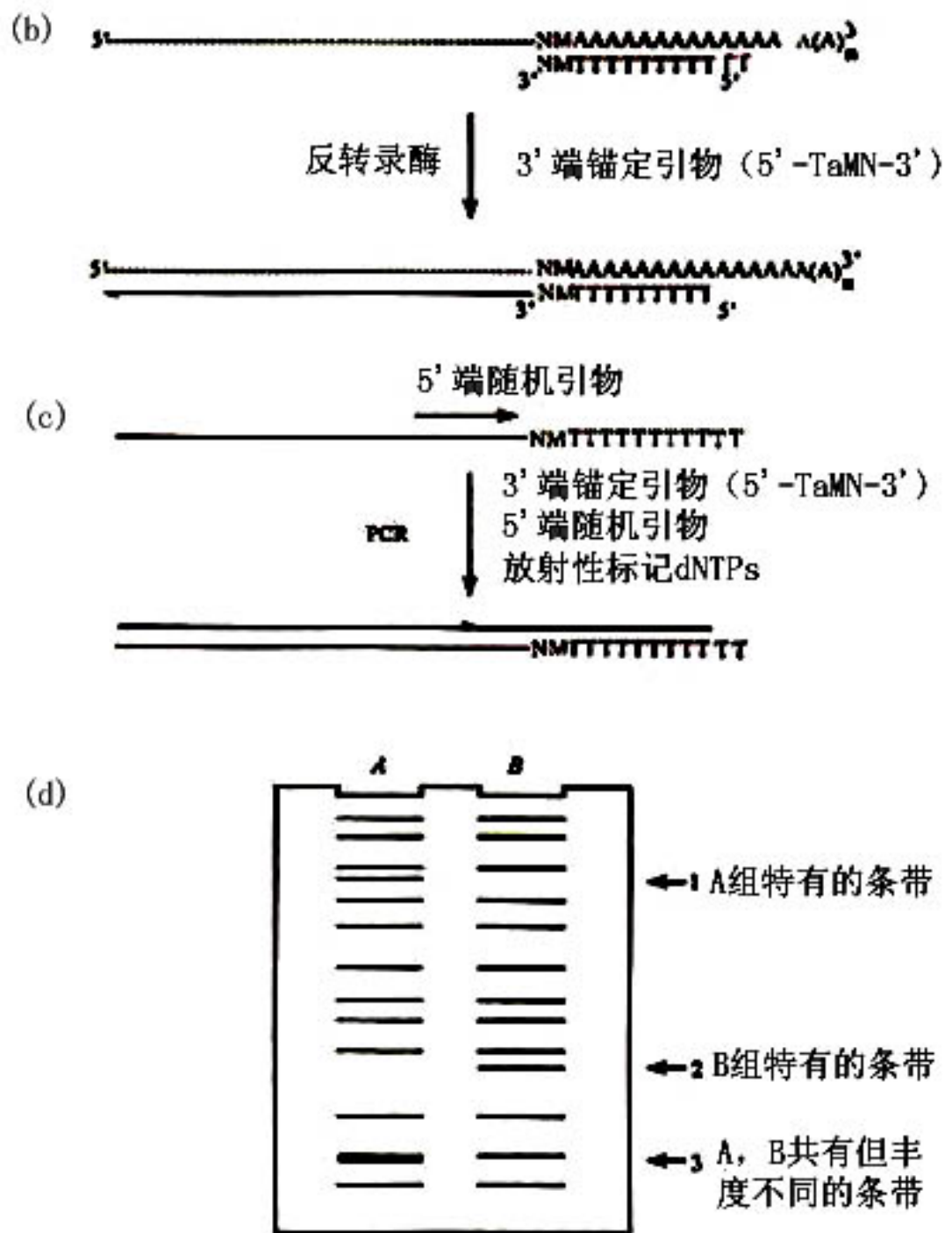


图5-29 DDRT-PCR反应的基本程序。



### 3、应用RDA法进行分子克隆

该法通过降低cDNA群体复杂性和更换cDNA两端接头等方法，特异性扩增目的基因片段。因为 **Tester** 和 **Driver**在接受差示分析前均经一个4碱基切割酶处理，形成平均长度**256bp**的代表群，保证绝大部分遗传信息能被扩增。



每次**T减D**反应后仅设置72℃复性与延伸，94℃变性这两个参数共**20个PCR**循环，**PCR**产物的特异性和所得探针的纯度非常高（图**5-30**）。

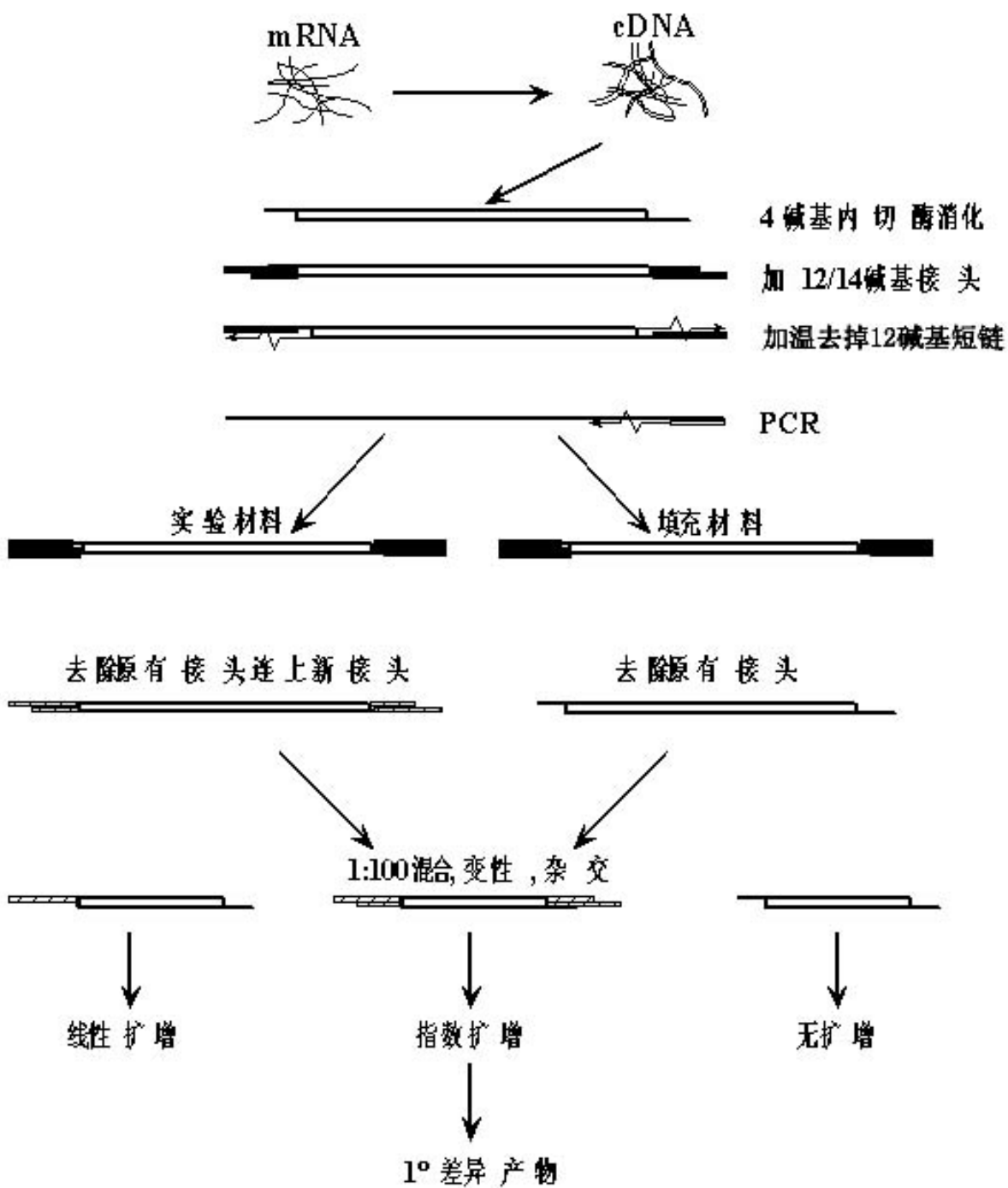


图5-30 RDA  
流程图。



## 4. 应用酵母双杂交体系（**Two-hybrid system**）克隆基因

真核生物的转录因子大多是由两个结构上分开、功能上独立的结构域组成的。如**GAL4**的N端**1-147aa**是**DNA**结合域（**BD**），其C端**768-881aa**是转录激活域（**AD**）。一般情况下，**BD**能与**GAL4**效应基因启动子上游的特定**DNA**区段（**UAS**）相结合，**AD**则推动了转录起始。

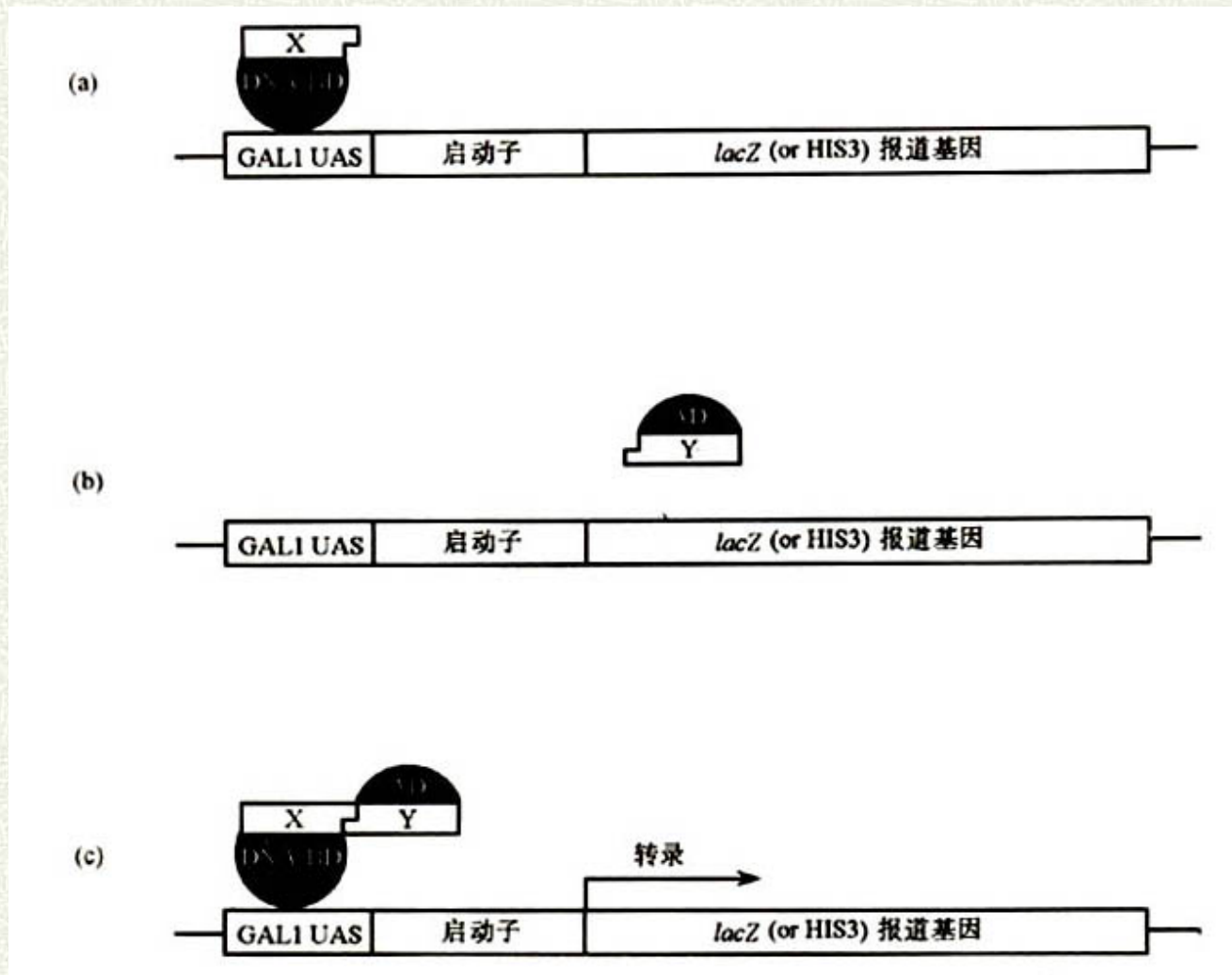


图5-31 酵母双杂交体系原理示意图。(a) GAL4的DNA-BD和蛋白质X结合形成的杂种蛋白，同GAL1的UAS序列结合，但由于没有同AD结合，故不能启动报道基因转录；(b) GAL的AD同蛋白质Y结合形成的杂种蛋白，没有同UAS序列结合，故不能启动报道基因转录；(c) 通过这两个杂种蛋白中的X蛋白和Y蛋白之间的相互作用，在细胞内重建了GAL4的功能，结果启动报道基因进行表达。

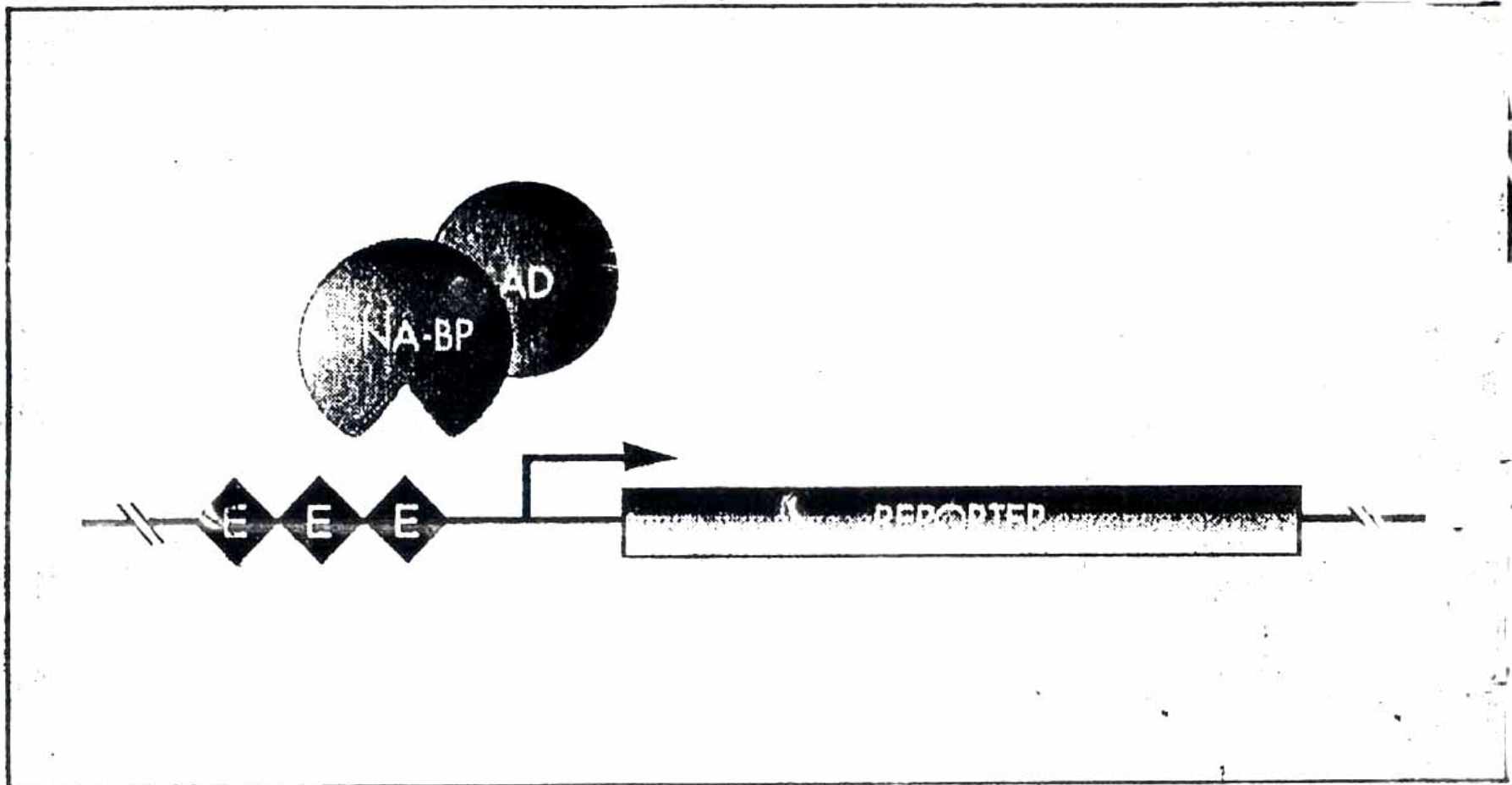
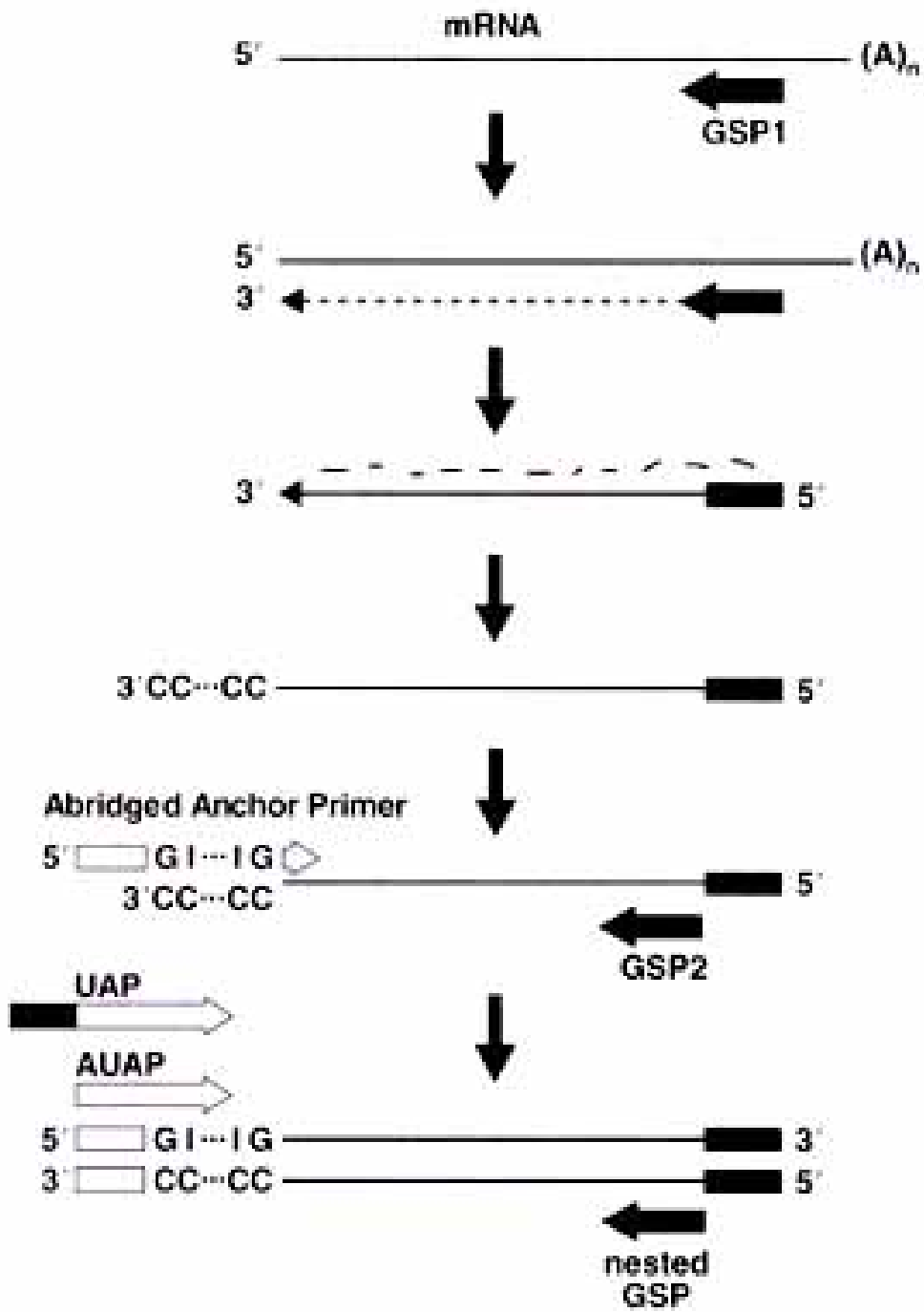


Figure 1. Detection of DNA-binding proteins using the MATCHMAKER One-Hybrid System.



## 5、cDNA RACE (cDNA末端快速扩增)

是用于从已知cDNA片段扩增全长基因的方法，它根据已知序列设计基因片段内部特异引物，由该片段向外侧进行PCR扩增得到目的序列。用于扩增5'端的方法称为5'RACE，用于扩增3'端的称为3'RACE。



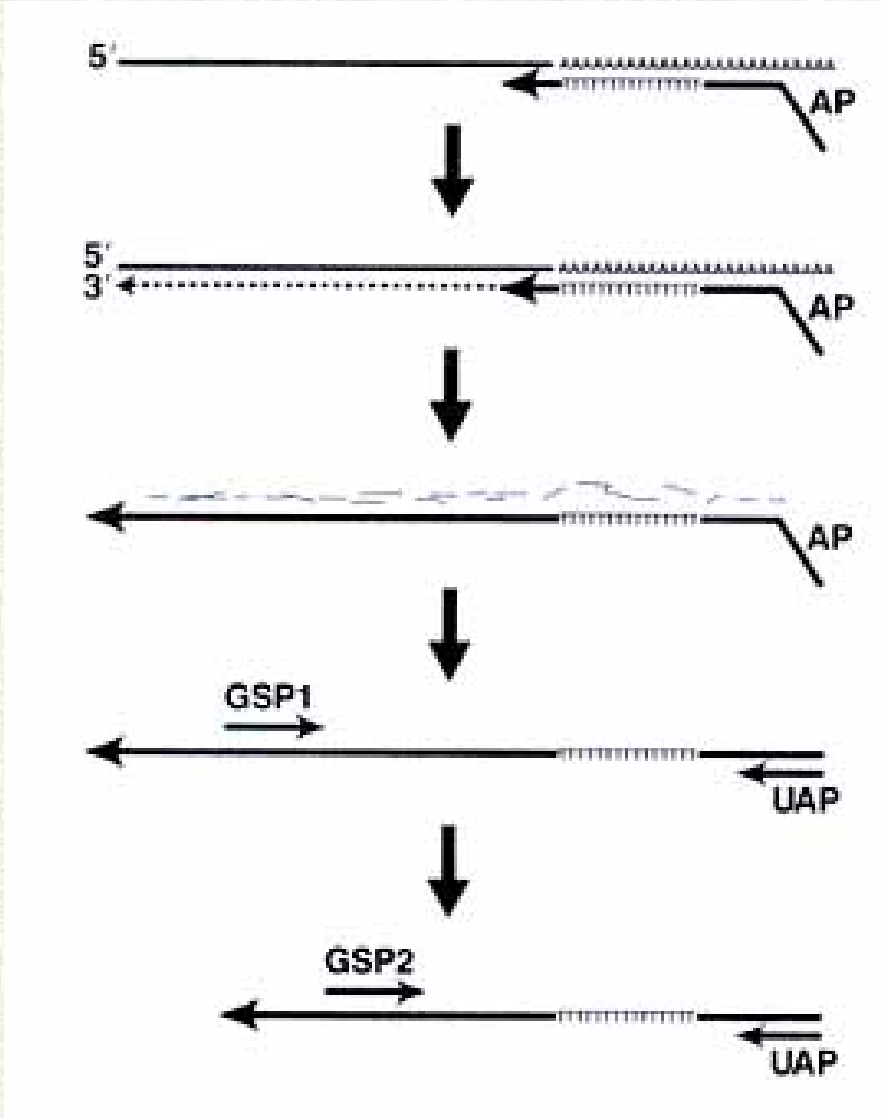
## 5' RACE

1. 在反转录酶的作用下，以已知基因片段内部。特异性引物起始cDNA第一条链的合成

2. RNase混合物降解模板mRNA，纯化cDNA第一条链。

3. 用末端转移酶在cDNA链3'端加入连续的dCTP

4. 以连有oligo(dG)的锚定引物和基因片段内部特异的nested引物进行PCR扩增，以期得到目的片段，并可用nest PCR进行检测。



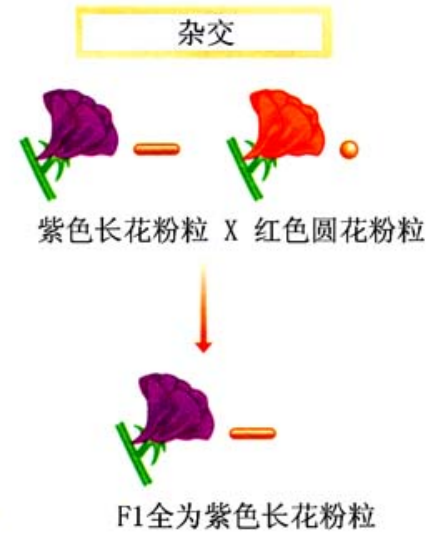
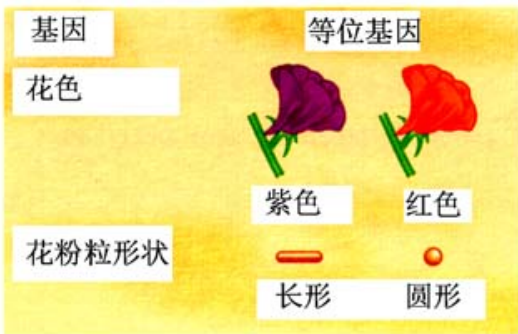
## 3'RACE

1. 在反转录酶的作用下，以连有可以和polyA配对的oligo(dT)的锚定引物起始cDNA第一条链的合成。
2. 用RNaseH 降解模板mRNA。
3. 用通用锚定引物和基因片段内部特异引物进行PCR扩增得到目的3'片段，并可用nest PCR的方法继续进行检测和扩增。



## 6. 基因的图位克隆法（Map-based cloning）

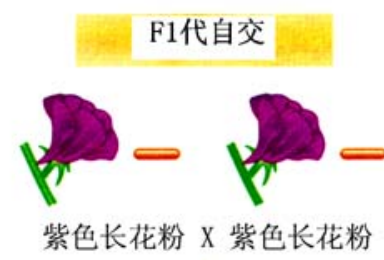
所有具有某种表现型的基因都可以通过该方法克隆得到。首先，通过构建遗传连锁图，将目的基因定位到某个染色体的特定位点，并在其两侧确定紧密连锁的**RFLP**或**RAPD**分子标记（图5-32）。



**结论**  
 相对于红色，紫色是显性性状  
 相对于圆花粉粒，长花粉是显性性状

如果基因不连锁  
 F1自交后代应分离为  
 9紫色长花粉：3紫色圆花粉：  
 3红色长花粉：1红色圆花粉

如果基因相连锁  
 F1自交后代中永远是：  
 3紫色长花粉：1红色圆花粉植株



**结论**  
 基因之间存在部分连锁现象

**事实上**  
 4831 紫色，长花粉  
 390 紫色，圆花粉  
 391 红色，长花粉  
 1338 红色，圆花粉



通过对许多不同的生态型及大量限制性内切酶和杂交探针的分析，找出与目的基因距离最近的**RFLP**标记，通过染色体步移技术将位于这两个标记之间的基因片段克隆并分离出来（图5-33）。

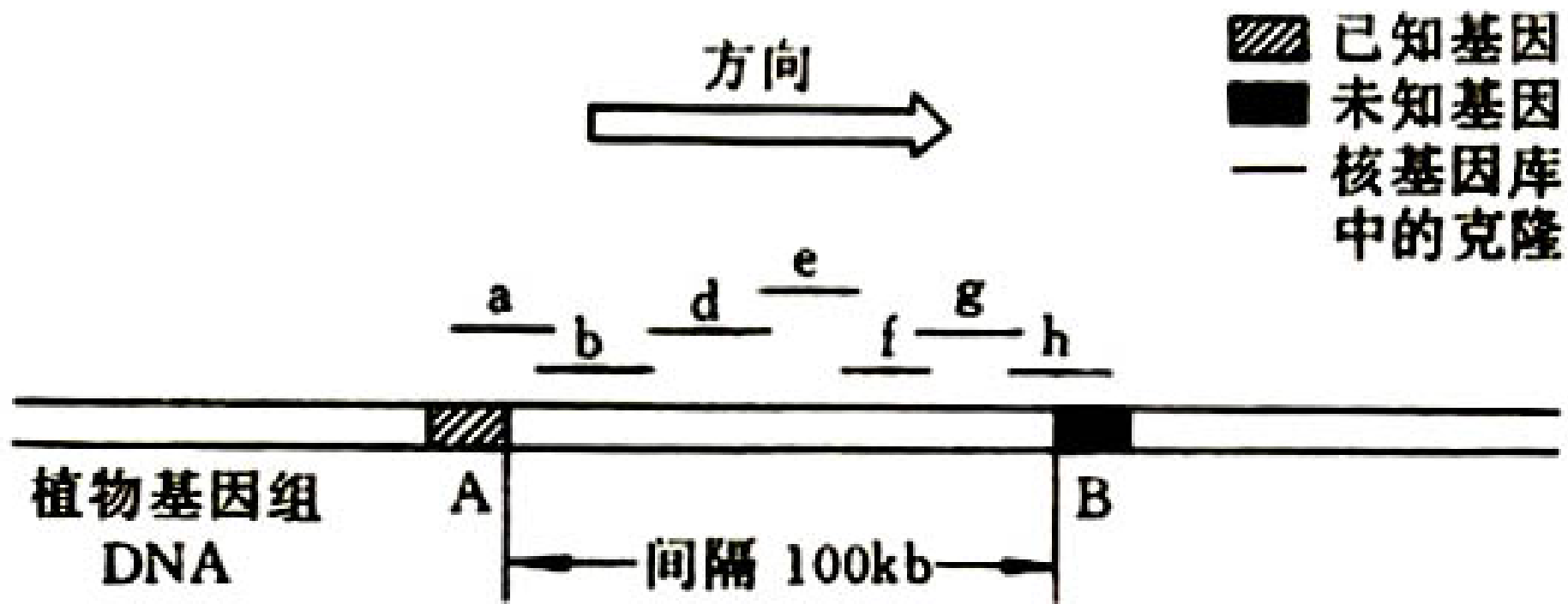


图5-33 染色体步移法克隆基因示意图。



根据基因功能互作原理鉴定目的基因。在**RFLP**作图中，连锁距离是根据重组率来计算的，**1cm**（厘摩）相当于**1%**的重组率。人类基因组中，**1cm**  $\approx$  **1000kb**；拟南芥菜中，**1cm**  $\approx$  **290kb**；小麦中，**1cm**  $\approx$  **3500kb**。

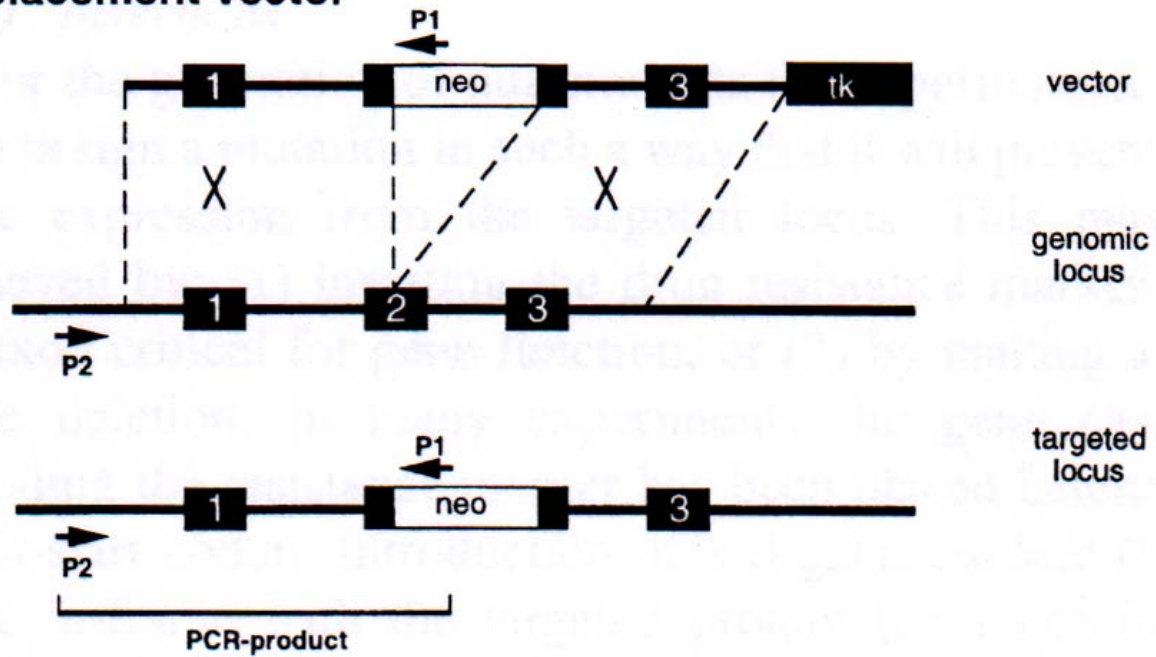


# 5. 4. 5真核基因表达研究方法与应用

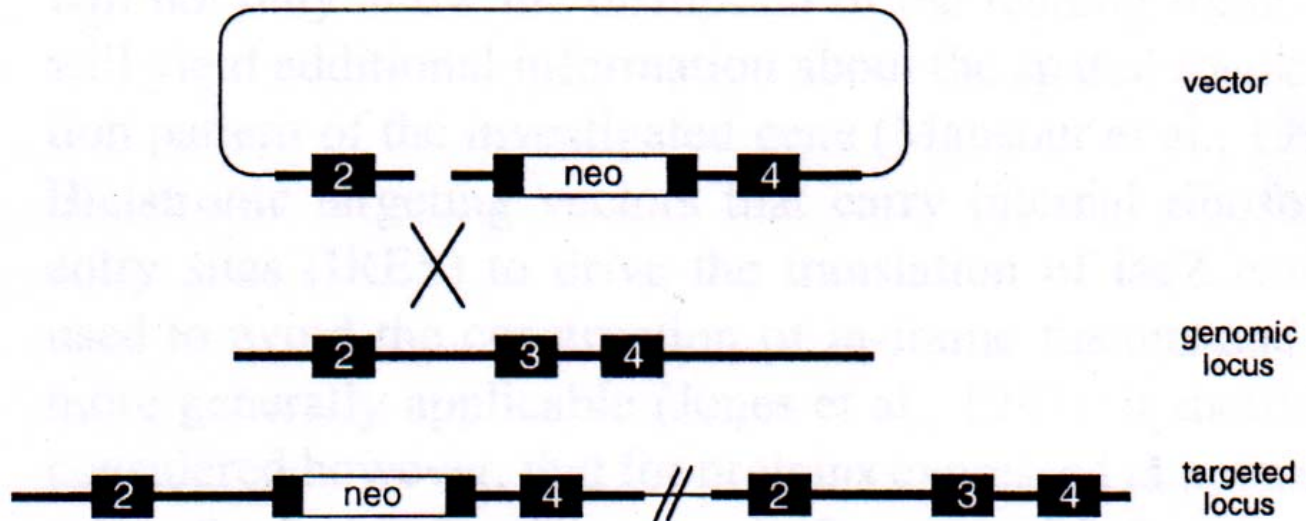
## 1、基因敲除技术 (Gene Knockout)



## A: Replacement vector



## B: Insertion vector





# TARGETED TRANSGENESIS Endogenous Promoters

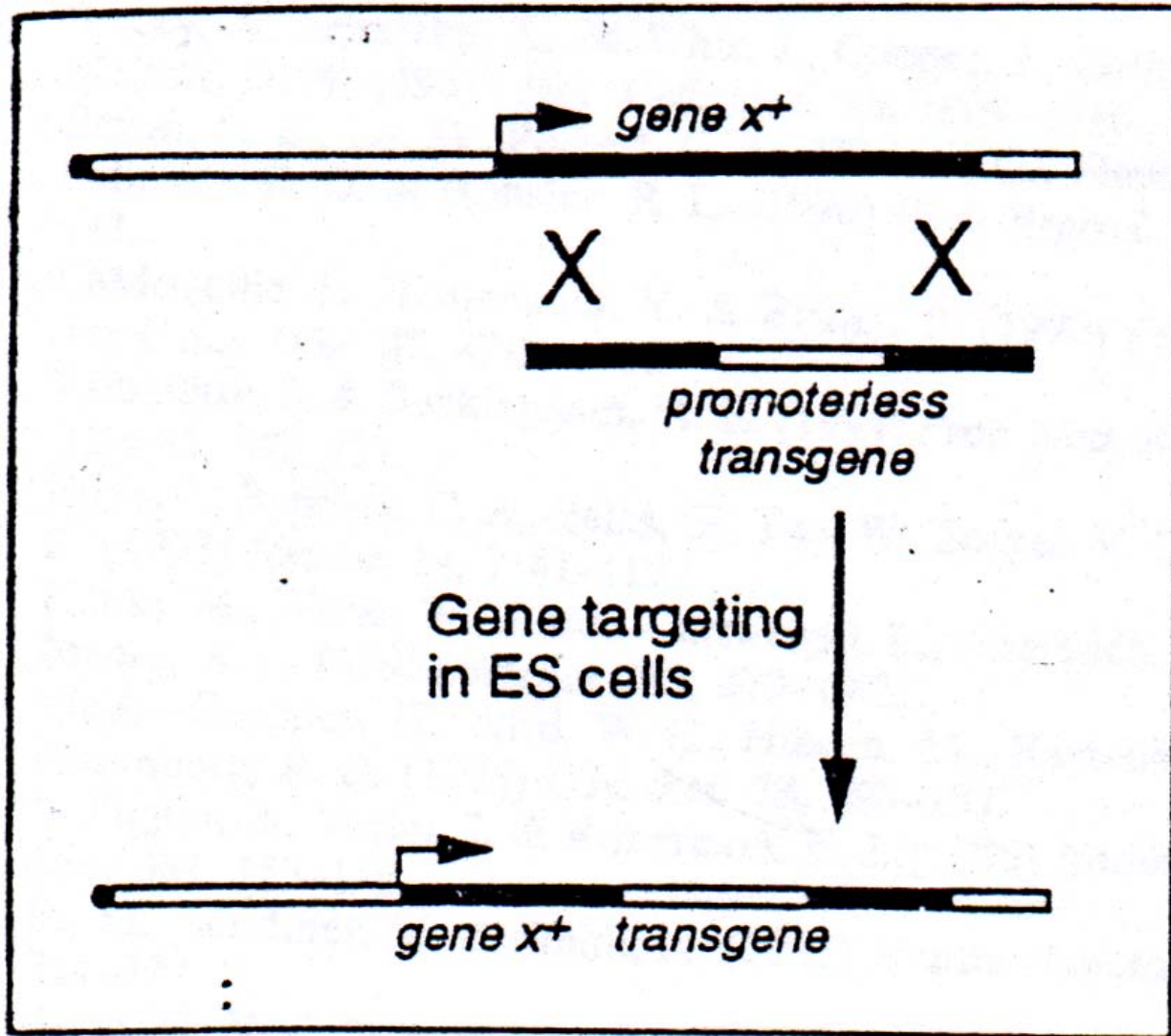


FIG. 3.

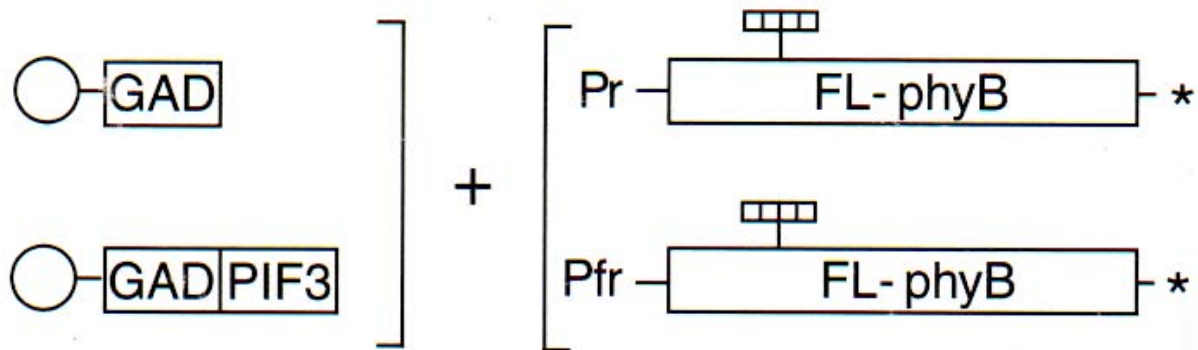
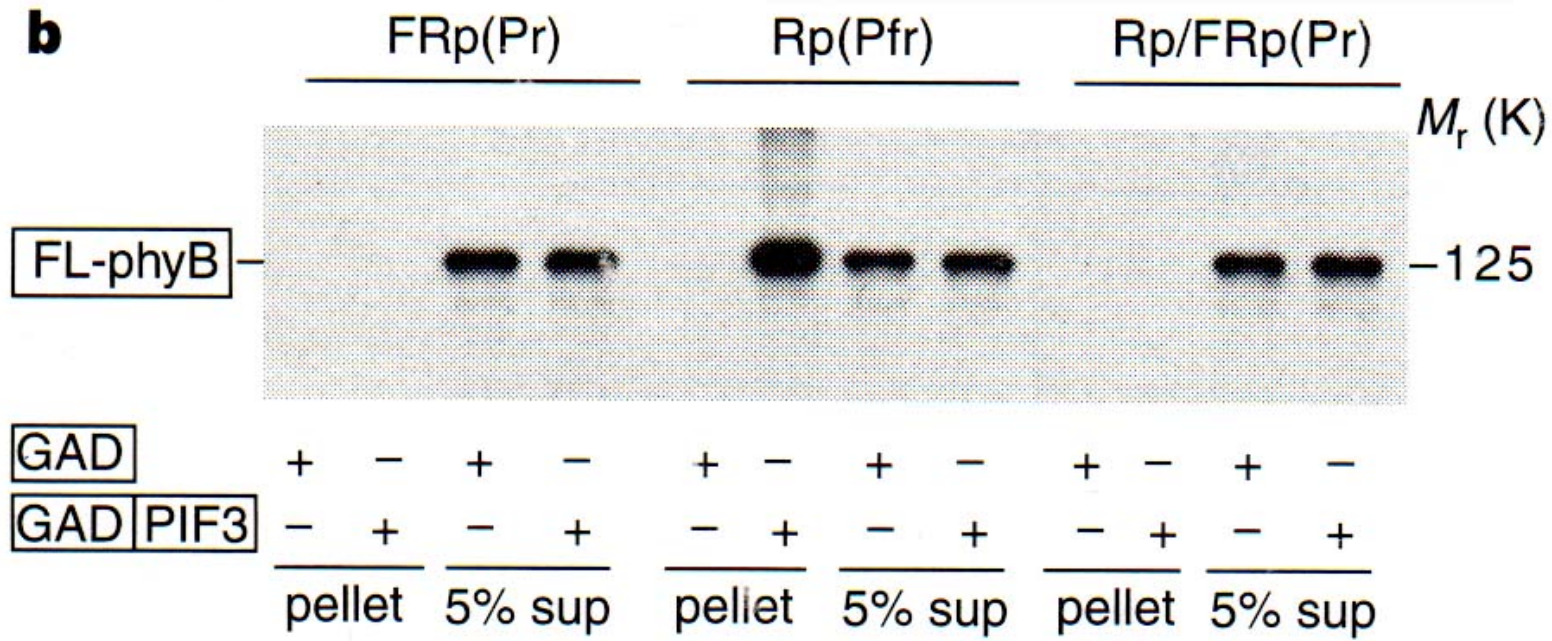


## 注意事项:

- (1)、有合适的胚胎干细胞 (**embryonic stem cells**);
- (2)、有已知的单拷贝基因位点;
- (3)、用线性载体或不能自我复制的载体。



## 2.蛋白质相互作用(Pull-down assay)

**a****b**

**Figure 1** Phytochrome B (phyB) binds to PIF3 specifically as the biologically active conformer Pfr. **a** Experimental design. Recombinant Gal4-activation

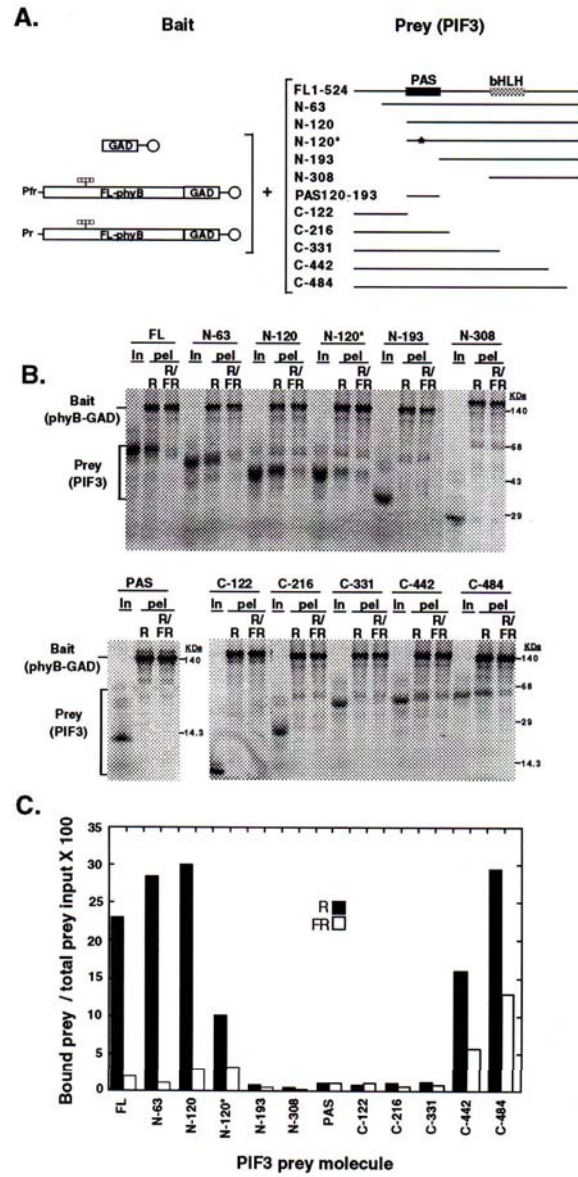


Figure 4



### 3、导弹药物——药物导向治疗

肿瘤或癌细胞表面常过量表达某些特征性蛋白质，可作为肿瘤导向治疗的作用靶。将抗体的某些部分与外毒素相连接，就能把毒素直接送到病变细胞表面，有效地杀死病变细胞，保护健康细胞。



## 4. 用 DNA 微列阵技术 (DNA Microarray) 进行基因克隆

最简单的例子是用机械手把极微量 (nanoliters) 的已经除去中等或高度重复序列的DNA样品点到玻片或其它载体上并使之永久固定, 用不同细胞周期发育阶段的cDNA作探针系统性地研究细胞中任何时期特异表达的基因。



若把某一生物体内全部基因分别点到**DNA**微列阵或者基因芯片上，再用不同发育阶段的**cDNA**与之杂交，就能了解某些基因对特定生长发育阶段的重要性。

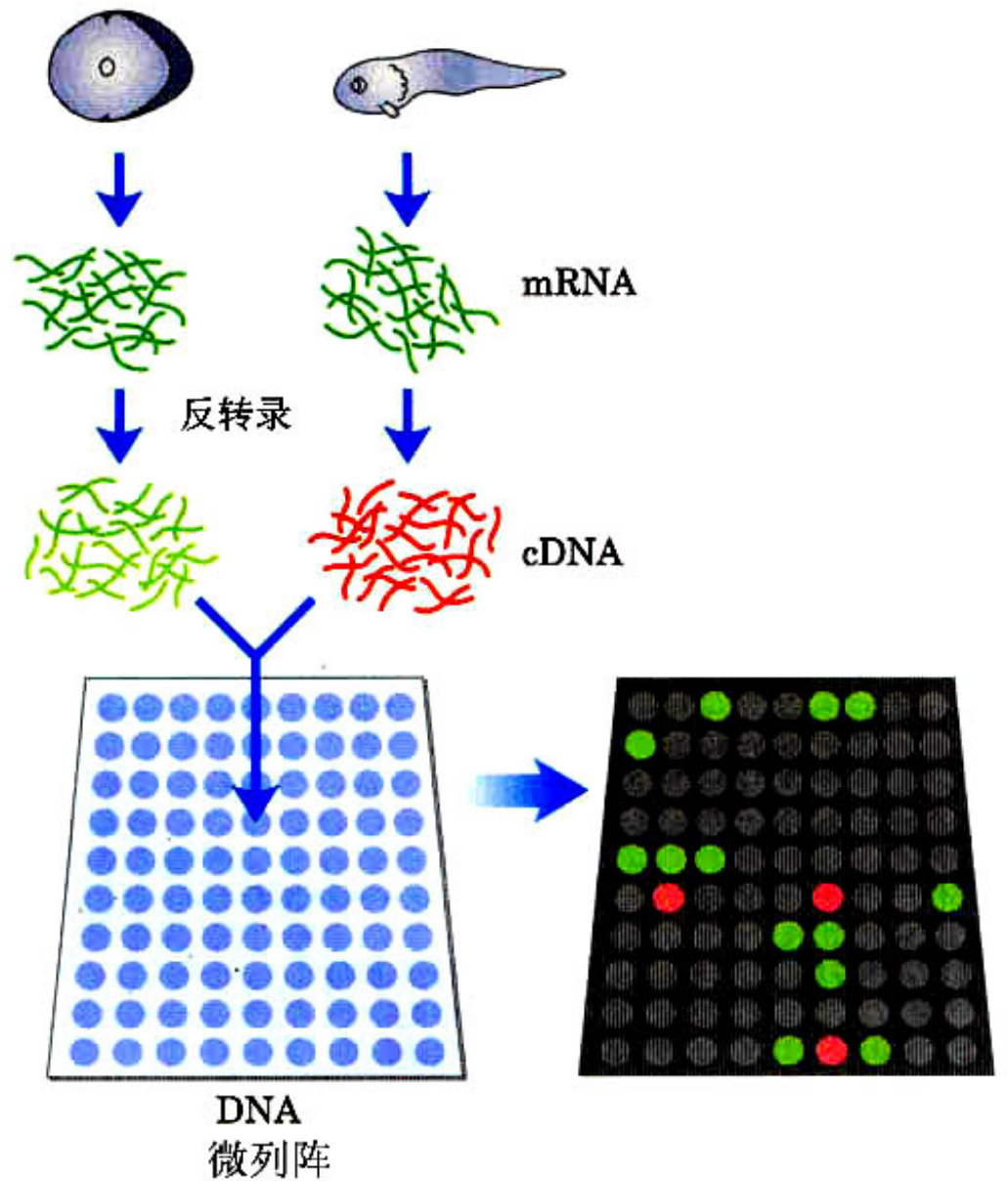


图5-34 用DNA微列阵方法克隆基因示意图。



基因芯片还可用于进行基因诊断。先建立正常人特定组织、器官的基因芯片，给出标准杂交信号图，用可疑病人的**cDNA**做探针与之杂交，确定哪些基因的表达受抑制或激活。