



四川轻化工大学课程实施大纲

课程名称：基因工程

授课班级：2021 级生物制药 1、2、3 班

任课教师：刘 义，胡 楠，胡丛武

工作部门：生物制药

联系方式：67177

四川轻化工大学 制

2023 年 09 月

《基因工程》课程实施大纲

基本信息

课程代码：16551001

课程名称：基因工程

学 分：2

总 学 时：32

学 期：2023-2024 第一学期

上课时间：1-8 周

上课地点：N1-315

答疑时间和方式：当面答疑、电子邮件、电话

答疑地点：网上答疑（第一实验楼 517）

授课班级：2021 级生物制药 1、2、3 班

任课教师：刘义，胡楠，胡丛武

学 院：化学工程学院

邮 箱：19465765@qq.com

联系电话：67177

目 录

1. 教学理念.....	6
2. 课程介绍.....	9
2.1 课程的性质	
2.2 课程在学科专业结构中的地位、作用	
2.3 课程的前沿及发展趋势	
2.4 学习本课程必要性	
3. 教师简介.....	10
3.1 教师的简介	
3.2 教育背景	
3.3 研究兴趣（方向）	
4. 先修课程.....	11
5. 课程目标.....	11
6. 课程内容.....	12
6.1 课程的内容概要	
6.2 教学重点、难点	
6.3 学时安排	
7.课程实施.....	13
7.1 教学单元一	
7.1.1 教学日期	
7.1.2 教学目标	

7.1.3 教学内容（含重点、难点）	
7.1.4 教学过程	
7.1.5 教学方法	
7.1.6 作业安排及课后反思	
7.1.7 课前准备情况及其他相关特殊要求	
7.1.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）	
7.2 教学单元二	
7.2.1 教学日期	
7.2.2 教学目标	
7.2.3 教学内容（含重点、难点）	
7.2.4 教学过程	
7.2.5 教学方法	
7.2.6 作业安排及课后反思	
7.2.7 课前准备情况及其他相关特殊要求	
7.2.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）	
.....	
8. 课程要求.....	92
8.1 学生自学要求	
8.2 课外阅读要求	
8.3 课堂讨论要求	
8.4 课程实践要求	
9. 课程考核.....	93

9.1 出勤（迟到、早退等）、作业、报告等的要求	
9.2 成绩的构成与评分规则说明	
9.3 考试形式及说明	
10. 学术诚信.....	93
10.1 考试违规与作弊处理	
10.2 杜撰数据、信息处理等	
10.3 学术剽窃处理等	
11. 课堂规范.....	94
11.1 课堂纪律	
11.2 课堂礼仪	
12. 课程资源.....	94
12.1 教材与参考书	
12.2 专业学术著作	
12.3 专业刊物	
12.4 网络课程资源	
13. 教学合约.....	95
13.1 阅读课程实施大纲，理解其内容	
13.2 同意遵守课程实施大纲中阐述的标准和期望	
14. 其他说明.....	95

1. 教学理念

1.1 关注学生的发展

学生是教学过程中的主体，是我们教师直接面对的对象。在课堂的教学过程中，要始终关注学生的个人发展问题，把学生的个人职业发展作为教学中重点关注的内容。制药工程专业的本科毕业学生在四年的本科学习（或进一步研究生学习）之后，大部分将进入制药行业，成为我国医药事业建设者中的一员。

学生的个人职业发展和整个医药行业的发展是密不可分的，是相辅相成的。作为大学教师，给予学生的，不仅仅是传承专业知识和文化，更重要的是让他们有能力在社会上“体面的生存”。没有个人的生存和发展，高谈对于国家社会的贡献只不过是一句空话。通过大学的制药专业教育，让同学们具有制药的专业知识，为未来专业道路的发展打下坚实的基础。不可否认，我们学校毕业的应届本科毕业生不能像国内的名校如北大和清华的毕业生一样，在刚大学毕业就获得进入条件很好、待遇丰厚的大型制药企业（如 GSK, pfizer 等）的机会，但经过大学教育打下的基础和他们在专业道路上的努力，在经过几年的工作和深入学习后，他们同样可以进入到一流的制药企业，成为技术上的骨干或中层管理者。“穷则独善其身，达则兼善天下”，当我们培养的学生能在这样一个物欲横流的社会体面生活的时候，他们实际上已经成为了我们国家医药行业中的中流砥柱，他们的个人发展实际上也在推动着整个社会医药事业的发展，而他们对于医药事业和全人类健康的贡献，也就是他们对于整个社会的回报。

1.2 关注教学的有效性

“既要仰望星空，又要脚踏实地”。学生要有好的发展，必须在学生阶段打好专业基础知识。基因工程相关的学科是应用性很强的学科，它是将多种现代的科学技术综合应用到生物制药行业，做出疗效好、安全放心的药物。因此，在课堂的教学过程中，要让学生掌握基因工程相关的基本原理，特别是应用在制药范围内的一些操作技术和原理。

在掌握原理的基础上，能将各种现代的技术灵活应用到药物的研发、生产的方方面面。

在课堂上，教师除了传授专业知识外，还有更重要的一环，那就是要培养学生的学习能力。作为专业课教师，对学生的学习情况应该更熟悉，学生在智商或情商方面不比名校的学生差，但他们在自律、学习方法方面和名校的学生却一定有差距。因此，对于学生学习方法的教导，对于二本院校的学生来说，尤为重要。现代生物制药技术日新月异，更新速度非常快，这就要求学生在毕业后进入工作岗位，还要不断学习新的科技知识，因此，从专业的角度来讲，学习能力的培养也非常重要。大学教育与中等教育最本质的不同在于：大学教育要给予学生一种能力，这种能力让他们在毕业后的职业生涯中有更深层次的发展潜力。如果把大学教育比作拜师练武学艺的话，大学教育讲求的是“先练内功，后练外功”，而中等教育往往重在“练外功”。在这两种教育体系下培养出来的学生很明显是有差别的：大学教育培养出来的学生在刚毕业时在生物制药技术的操作熟练程度上也许比不过中等技校毕业的学生，甚至有的用人单位在抱怨大学生不如中专生好用，但随着时间的增加，经过5年或10年之后，大学毕业的学生在专业道路上明显要比中等学校的学生走得更远。

然而，现今的大学制药相关专业教育在一定程度上确实存在与社会脱节的现象。大学教学过程中往往过多的纠结于纷繁复杂的公式推导和原理推算，而忽视了基本原理的灵活实际应用，导致学生在进入工作岗位后，发现学到的许多知识似乎是“屠龙术”，实际上没有用武之地，而一些需要学习的知识却没有学到。因此，在制药工程专业学生的教学过程中，特别是高年级学生的教学过程中，在强调基本原理的同时，也要重视知识的灵活应用，启发学生的思维，把原理和实践（安排实验）结合起来，提高学生的实际动手能力和思考能力。

1.3 关注教学的策略

采用合理的教学策略对于教学的有效性起着至关重要的作用。在《基因工程》这门

课程的讲授中，课堂教学以教师的讲授为主，在课堂上讲课不求贪多，而是把一些重点知识讲透，讲懂。对于这门课程中涉及现代技术的应用讲解过程中，要多列举一些制药研发和生产中的实际案例，采用启发式的教学，激发学生的思维和兴趣。另外，除了课程教学外，本门课程还配套进行了实验教学环节，让学生通过实验的过程，对课堂讲解的内容有更直观、深刻的认识，提高学生的实践动手能力。

1.4 关注教学价值观

通过大学教育，使我们培养毕业的学生掌握生物制药的专业知识，当然更重要的是学习知识的能力（也包括做人、做事的态度等其它方面），让他们有能力胜任将来的工作岗位，学能致用；让他们具有这样一种潜质，能在制药行业的舞台上找到属于自己的位置，能在激烈的竞争中脱颖而出。

2. 课程介绍

2.1 课程的性质

二十一世纪是生物学的世纪，分子生物学作为生物学最前沿的基础学科是生物学类专业通向生物高新技术的必修课程。随着人们在分子生物学水平上的研究和学习的深入和广泛展开，除了在分子水平上了解生物学的本质特征外，在分子水平如何进行生物学操作是生物学界共同关心并十分重视的问题。“基因工程”就是利用分子生物学的一般原理阐述在分子生物学实验中所涉及的技术方法，原理和策略，是从事分子生物学研究必修的课程。随着生物科学和生物技术的日益发展，人们越来越重视对生物学研究手段的了解和掌握。特别是二十世纪八十年代以来，以分子生物学为代表的学科领域取得了翻天覆地的变化。《基因工程》是四川轻化工大学适应学科发展应运而生的特色课程，一门指导分子生物学实验操作的理论与实践相结合的课程。

2.2 课程在学科专业结构中的地位、作用

四川轻化工大学开设的生物制药专业是与基因工程、分子生物学等相关课程联系紧密，专业特色很强且生物工程味、药味浓重的同制药相关的专业。《基因工程》课程（包含其对应的实验课程）是分子生物学课程体系中的重要环节，承接上游《生物化学》、《分子生物学》课程，主要目的是为加强对分子生物学实践环节的认识并为分子生物学研究服务。《生物化学》、《分子生物学》、《基因工程》、《基因工程实验》等生物工程相关的课程生物制药专业完整的专业课程体系。

2.3 课程的前沿及发展趋势

《基因工程》是二十一世纪生物工程相关领域技术性很强的一门学科。从 DNA 双螺旋结构的揭示到人类基因组计划的完成，整个学科领域的理论和技术都在突飞猛进的发展，与之相关的产业也有了蓬勃的发展。从农业现代化技术到现代化生物制药领域都涉及到基因工程的方方面面。如今后基因组时代的来临，需要一大批具有丰富理论知识

和经验丰富的技术人员，进一步揭示疾病的发病机制，采取更有效的技术手段在药物研发当中发挥重要作用。作为四川轻化工大学生物制药专业的一门重要专业课，为了满足专业需要，《基因工程》是 2012 级才开设的全新课程，在整个课程体系中占有重要地位。

2.4 学习本课程的必要性

由于人口增长、人口老龄化、经济增长等原因，制药工业始终保持稳定增长的势头，特别是科技含量高的生物制药，面向纳米药物、靶向药物、抗体类药物的需求更是逐年增长。在世界范围内市场经济的激烈竞争和高科技飞速发展的激烈挑战中，需要培养和造就大量生物制药专门人才。《基因工程》是生物制药专业的专业主干课程之一，通过本门课程的学习，学生掌握生物制药过程中的理论知识，为将来进入工作岗位或进一步深入的学习打下坚实的基础。

3. 教师简介

3.1 教师的学历

刘义 博士

胡楠 博士

胡丛武 博士

3.2 教育背景

时 间	学习或工作单位	职位
2011.07-2014.06	中国医科大学	博士
2019.01-2020.01	美国普渡大学药学院	公派访问学者
2014-----至今	四川轻化工大学化学工程学院	专任教师、副教授

3.3 研究兴趣（方向）

分子药理学、基因工程制药、纳米靶向药物的研究

4. 先修课程

《有机化学》、《生物化学》、《微生物学》、《药学分子生物学》等课程是该门课程的基础。学生在学好本门课程时，需要回头复习这些课程，以运用到本门课程的学习中。

《抗生素工艺学》、《制药工程学》等课程与本门课程相辅相成，互为补充。

5. 课程目标

5.1 知识与技能方面

在知识方面，通过本门课程的学习，让学生掌握或熟悉常用的分子克隆相关技术的原理、方法。重点系统地掌握基因工程相关的工具酶的应用，质粒载体、病毒载体构建的操作步骤，以及有目的的设计能够在工厂应用的经济型产物。在技能方面，通过与教学课程配套的实验过程，掌握常用的基因克隆的操作过程，达到熟练操作应用的目的。

5.2 过程与方法方面

通过课堂的教学过程，让学生学会从基因工程的基本原理出发，根据原理的自身特点，来合理的设计具有较好市场应用的产品，并且利用基因工程的思维将其扩展应用至制药领域当中。采用启发性的教学方式，调动学生的思考能力，启发学习兴趣，从而培养学生学习制药专业知识的能力和对于生物制药专业的兴趣，为将来进入工作岗位后进一步自学，打下基础。

5.3 情感、态度与价值观方面

通过本门课程的学习，培养学生实事求是的科学作风。实践是检验真理的唯一标准，基因工程这门课程乃至整个制药学科，是一个动手性很强的实验性学科，许多的结论只有通过不断的实验尝试，才能得出正确的结论。在学习的过程中，让他们懂得尊重客观事实，遵守科研道德，不剽窃，不弄虚作假，养成良好的科学态度，懂得正确的做人 and 做事的方式。

6. 课程内容

6.1 课程的内容概要

《基因工程》是生命科学的重要学科，课程的主要内容包括基因工程的基本原理和方法：目的基因的获得，基因克隆的工具酶、载体，重组分子、重组子的鉴定与表达。课程的主要目的在于使学生掌握基因工程的意义、基因工程操作的基本理论，技术和应用，为今后开展基因工程研究打下理论基础。

6.2 教学重点、难点

教学重点：基因克隆的酶学基础；常用载体；克隆策略；体外重组与筛选鉴定；基因操作有关的基本技术（凝胶电泳技术、PCR 技术、分子杂交技术、探针标记技术等）。

教学难点：基因克隆的基本过程、策略；基因操作有关的基本技术。

6.3 学时安排

次数	讲 课（ 教 学 大 纲 分 章 和 题 目 的 名 称 ）	讲课学时
第 1 次	基因操作与基因工程	2
第 2 次	基因工程是生物科学发展的必然产物	2
	基因的结构	
第 3 次	分子克隆工具酶	2
第 4 次	质粒载体	2
第 5 次	λ 噬菌体载体	2
	单链丝状噬菌体载体	
第 6 次	人工染色体载体	2
第 7 次	表达载体	2

第 8 次	基因操作中大分子的分离和检测	2
第 9 次	分子杂交	2
	期中考试	
第 10 次	基因操作中的核酸分析技术	2
第 11 次	PCR 技术及其应用	2
第 12 次	DNA 序列分析	2
第 13 次	DNA 诱变	2
第 14 次	DNA 文库的构建和目的基因的筛选	2
第 15 次	基因组研究技术	2
第 16 次	基因组工程	2
	总复习	

7.课程实施

7.1 教学单元一

7.1.1 教学日期

第一、二次课（9.4、9.7）

7.1.2 教学目标

介绍基因操作和基因工程之间的关系，提高学生对基因工程的认识，了解该门课程对生物制药的重要意义。

7.1.3 教学内容（含重点、难点）

重 点：基因工程的诞生与发展前景。

难 点：基因操作技术的发展历程和方向，基因的结构。

主要知识点：基因工程的诞生，遗传因子，DNA 的结构和功能，基因工程的工具，

基因操作的原理，基因工程应用，基因克隆的通用策略。

7.1.4 教学过程

基因工程概述

第一节 基因操作与基因工程

一、基因操作与基因工程的关系

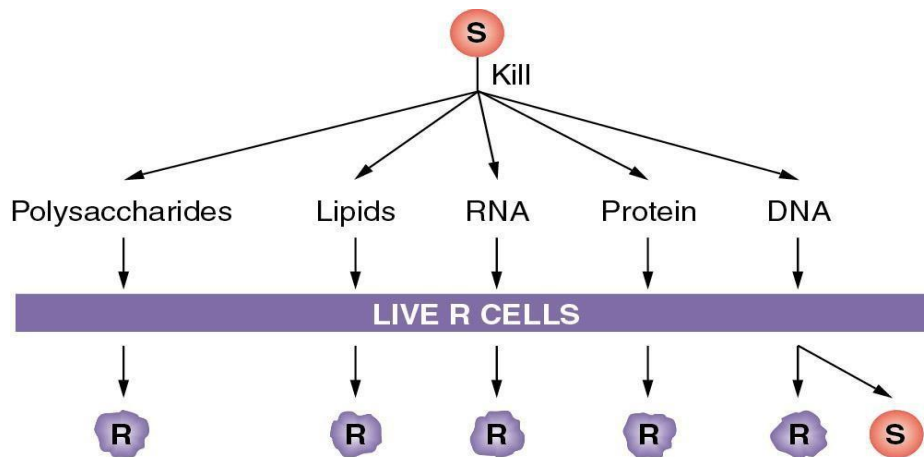
- **基因操作**: 对基因进行分离、分析、改造、检测、表达、重组和转移等操作的总称。
- **基因工程**: 专指为实践应用而进行的基因重组事件，产生的基因工程体可以用作生物反应器或改变了生物性状的工程体等。

基因工程（基因操作）主要是利用 DNA 重组技术，将生物的某个基因或一个 DNA 片段通过基因载体（DNA 载体）运送到另一生物的活性细胞中，然后经过克隆（clone）和行使正常功能（表达）从而创造生物新品种或新物种的遗传学分子技术（从细菌到高等生物）。

理论上的三大发现：

1、DNA 是遗传物质

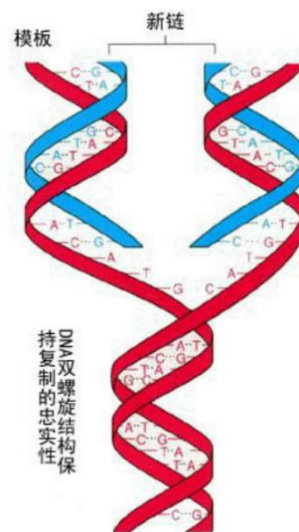
1944 Avery 细菌转化实验，证明：DNA 是遗传物质；意义：DNA 可以从一个细菌转移到另一个细菌，从而把遗传性状传递过去。现代生物学科学性的革命性开端和基因工程的先导（Lederberg 语）。



图示，肺炎双球菌的转化实验

2、DNA 双螺旋模型

1953 Watson/Crick 提出，这对于生命科学的发展作用可与达尔文学说媲美，与孟德尔定律齐名。



图示，DNA 的双螺旋结构和半保留复制

3、确定了遗传信息传递的方式

60 年代破译遗传密码和确定了密码子三联体遗传信息流的中心法则

技术上的三大发现：

1、工具酶的使用

Smith 和 Wilcox (1970) 从流感嗜血杆菌 *Haemophilus influenzae* 分离纯化了 限

制性内切酶 Hind II。其它工具酶（如连接酶）等的发现和纯化奠定了基因工程诞生的最重要的技术基础

2、基因运载工具—DNA 载体的使用（对质粒的认识）

细菌的致育因子（Fertility factor）—F 因子，1947 年 Lederberg 首先提出。

3、逆转录酶的使用

Baltimore 等和 Temin 等（1970）各自发现了逆转录酶，丰富了“中心法则”、真核基因的制备成为可能、构建 cDNA 文库成为可能。

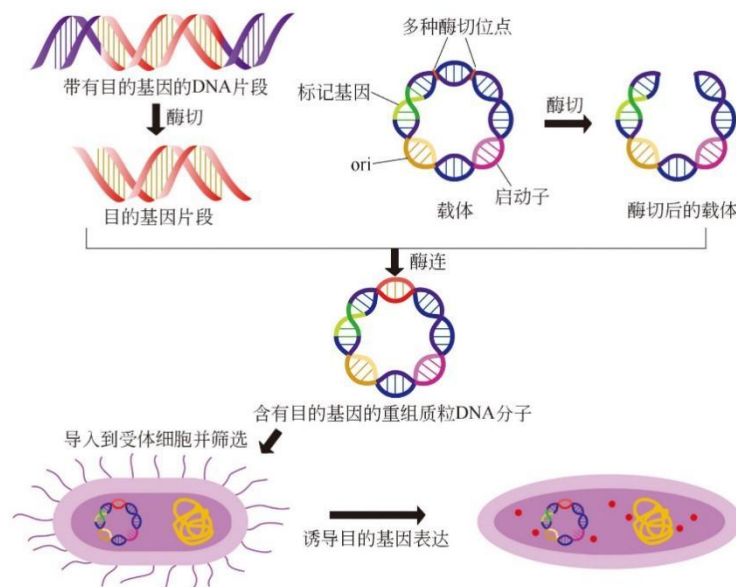


图 1.1

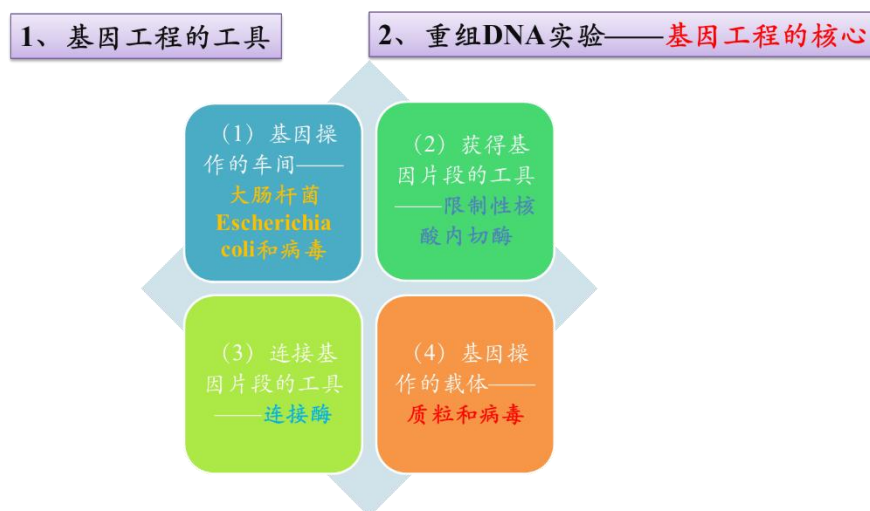
图示，开展基因工程的步骤

基因工程是生物科学发展的必然产物，基因是基因重组的物质基础。由孟德尔提出，认为生物性状的遗传是由遗传因子所控制的。1909 年丹麦学者 W.Johannsen 提出“基因”（gene）一词,代替了孟德尔的遗传因子，认为在杂种中等位基因不融合，各自保持其独立性。1928 年 Griffith 首先发现了肺炎球菌的转化作用，为以后的研究开辟了道路。1944 年 Avery 用转化实验证明了 DNA 是遗传物质。

DNA 的结构：（1）DNA 的组成成分 DNA 是由五碳糖、磷酸基团和 4 种含氮的碱——°16

基——即腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶组成。(2) DNA 的三维结构 Watson 和 Crick 于 1953 年推导出 DNA 的结构是双链缠绕的双螺旋结构。DNA 的复制：1955 年，Watson 和 Crick 提出了 DNA 的复制模型，即每一条链都可以复制出各自的互补链。1957 年，Meselson 和 Stahl 的实验表明，在复制完成后 DNA 链与新合成的互补链重新形成双链结构，也就是说 DNA 的复制是采用半保留复制（semiconservative replication）的方式进行。DNA 可以传递遗传信息：基因可以控制蛋白质的产生，基因和蛋白质的氨基酸序列之间存在对应关系，基因突变会导致蛋白质中一个氨基酸的变化。RNA 是 DNA 遗传信息和蛋白质氨基酸序列之间的桥梁。指导蛋白质合成：DNA 可编码 3 种 RNA，即 mRNA、rRNA 和 tRNA。tRNA 上的反密码子与 mRNA 上的密码子互补，并在蛋白质合成过程中携带氨基酸到正确的位置。转录是以 DNA 为模板，将遗传信息转移到 mRNA 的过程，翻译就是将 mRNA 中的遗传信息转移到蛋白质的氨基酸序列的过程。

基因操作技术的发展促进基因工程的诞生和发展

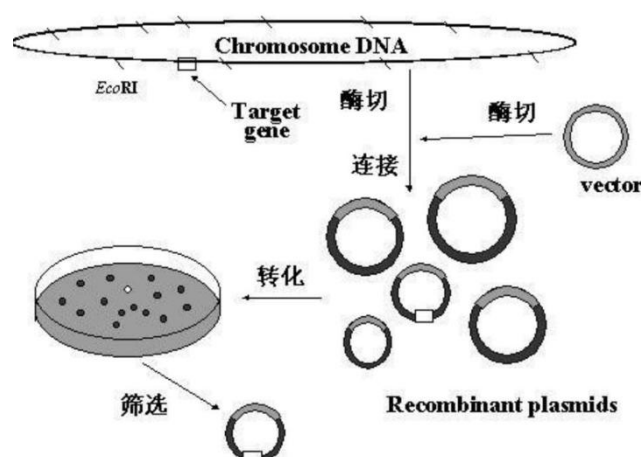


基因操作的理论基础，1、基因及其产物的共线性:基因决定蛋白质的序列组成，是由密码子对应特定氨基酸所决定的。当一个基因的核苷酸序列与其产物的氨基酸序列是一一对应时，则表明它们是共线性的。2、基因及其产物的非共线性：20 世纪 70 年代以来，在真核生物中发现了间断基因（interrupted gene），后来发现这种间断基因在真核生

物中普遍存在，也就是后来所说的基因间存在着内含子（intron）。内含子指真核生物基因中不能翻译成蛋白质的 DNA 片段但可被转录，当两侧序列（外显子）的转录 RNA 被剪接在一起时就将内含子转录的 RNA 从整个转录物中除去。外显子是指能够翻译成蛋白质的任一间断的基因片段，一个基因可有多个外显子。

3、基因的重叠与基因的可变性：DNA 序列与蛋白质序列的对应关系不是单一的，单个 DNA 序列可编码一个以上的蛋白质，这些蛋白质在结构上有的是相同的序列重复，也可以是全新的蛋白质。由单个基因通过在不同部位的起始（或终止）表达而形成两种蛋白质，两个基因也可通过在不同读码中译读 DNA 而共用同一序列。基因的重叠与可变性也可从重组中得以体现。例如芽胞杆菌的 *spoIV* 基因片段分布在两个不同区域，当需要发挥作用时便通过重组而连接在一起。

4、启动子和终止子：启动子是基因转录过程中控制起始的部位。RNA 聚合酶的结合位点(binding site)，不同生物中这个结合(识别)位点是有差异的,同一生物的不同基因之间也有差异。上游(upstream)指转录起始点左侧的序列,而下游(downstream)指起始点右侧的序列。或上游指其 5'方向,下游指其 3'方向。转录终止子主要有两种一种依赖 ρ 因子,另一种不依赖 ρ 因子。后者主要是能够形成特定二级结构的 DNA 序列,如茎环结构。



基因克隆的一般策略

7.1.5 教学方法

一单元的教学方法采用课堂讲授的形式进行，为了提高同学们对基因工程课程的兴趣，因此，本单元主要是讲授科学历程和基因工程领域的重大事件以提高对本课程的兴趣。

7.1.6 作业安排及课后反思

- 1.简述基因操作、基因重组和基因工程的关系。
- 2.为什么说基因工程是生物学和遗传学发展的必然产物？
- 3.简述基因的结构组成对基因操作的影响。
- 4.基因工程研究的意义和前景如何？

7.1.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。对分子生物学和生物化学的基础有一定要求。

7.1.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《基因工程》袁葵洲版，第一章（p1-p13）

7.2 教学单元二

7.2.1 教学日期

第三次课（9.11）

7.2.2 教学目标

了解分子生物学和基因工程所需工具酶的种类，特别是对于 II 型限制性内切酶的作用方式和特点需要深入讲解。掌握作为基因工程的“剪刀”和“胶水”，及核酸内切酶和连接酶是基因工程操作的基础。

7.2.3 教学内容（含重点、难点）

重 点：分子克隆工具酶的种类和特点。

难 点：限制性内切酶使用的条件和识别序列的特点。

主要知识点：限制与修饰系统的种类，II 型限制性内切酶，同裂酶，同尾酶，DNA 末端长度对限制性内切酶切割的影响，甲基化酶，DNA 聚合酶，反转录酶，末端转移酶。

7.2.4 教学过程

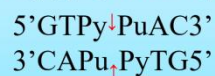
限制与修饰系统：限制(restriction)指一定类型的细菌可以通过限制酶的作用,破坏入侵的噬菌体 DNA，导致噬菌体的寄主幅度受到限制。

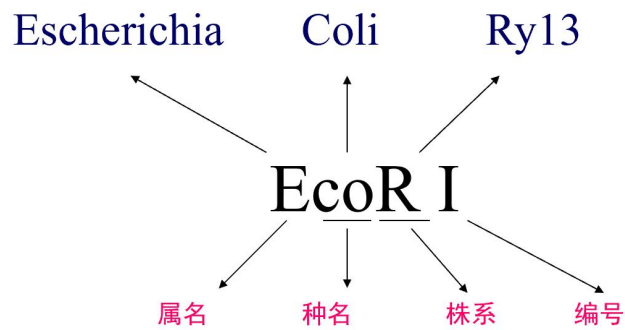
限制作用:实际就是限制性内切酶将侵入细菌体内的外源 DNA 切成小片断,维护宿主遗传稳定的保护机制。修饰(modification)指寄主本身的 DNA 由于在合成后通过甲基化酶的作用得以甲基化,使 DNA 得以修饰,从而免遭自身限制性酶的破坏。

修饰作用:宿主细胞通过甲基化作用达到识别自身遗传物质和外来遗传物质的目的。

限制酶的发现

20世纪60年代,首次从E.coli K中分离得到限制酶,70年,由于偶然发现,H.Smith找到了来源于流感嗜血杆菌的Hind II限制性内切酶。





若种名头2个字母相同
则其中一个可用种名的第一和第三个字母。

II 型限制酶是基因工程中应用最广泛的酶之一。在限制修饰系统中占比例最大, 93%。

I 型限制酶占有比例只有 1%, III 型限制酶则不足 1%。

限制酶识别的序列：一般识别长度为 4-8bp，最常见的为 6bp 的位点，除了 ATCG 几种碱基表示方法外，对于简并的碱基：

R=A 或 G，Y=C 或 T，M=A 或 C，K=G 或 T，

S=C 或 G，W=A 或 T，H=A 或 C 或 T，B=C 或 G 或 T，V=A 或 C 或 G，D=A 或 G 或 T，N=?，I=?

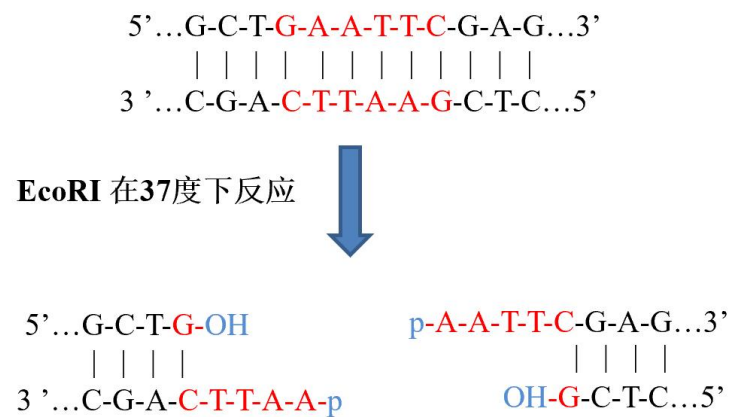
限制酶产生的末端：

1、黏性末端：指 DNA 分子在限制性内切核酸酶的作用下形成的具有互补碱基的单链延伸形成的末端结构，它们能够通过互补碱基间的配对而重新连接起来

2、平末端：限制性内切核酸酶在识别序列的对称轴上切割，形成的片段末端

3、非对称末端：当识别序列非对称（无回文结构）时，切割末端不同

EcoRI等产生的5'粘性末端



3 个重要概念

1、同裂酶

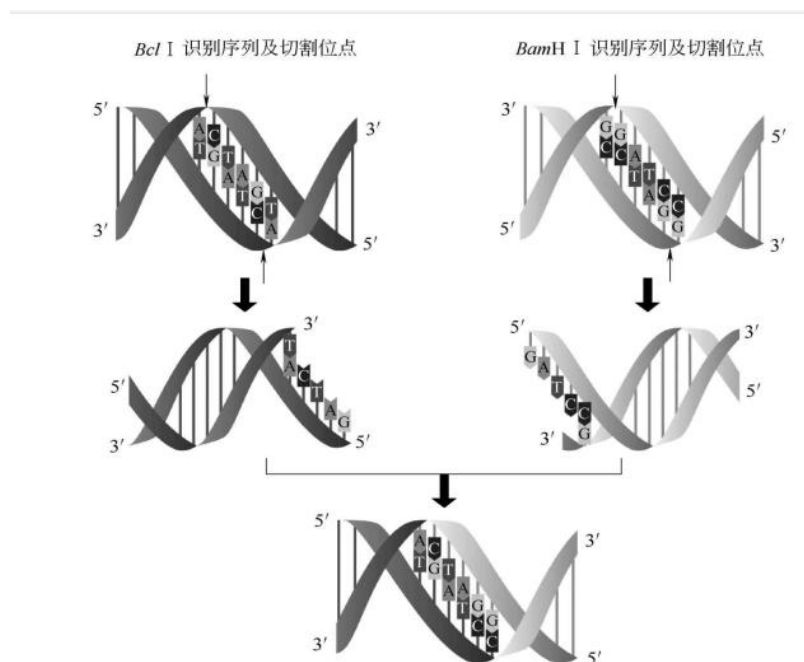
识别相同序列的限制酶称同裂酶，但是他们的切割位点可能不同

2、同尾酶

不同的限制酶切割位点切割出相同的末端

3、归位内切酶

有些线粒体、叶绿体和 T 偶数噬菌体中编码内切酶的内含子，某些内含肽。



位点偏爱：某些限制酶对同一底物中的有些位点表现出偏爱性切割，即对不同位置的同一个识别序列表现出不同的切割效率，这种现象叫做位点偏爱。

原因：切割前需要同时识别几个位点，被切割序列上的顺式原件引起等。

单位定义：1U 限制性内切酶指在其最适温度（37 度）下，20 μ l 反应体系中反应一小时能够彻底切割 1 μ gDNA 的量

STAR 活性：在非理想的条件下，内切酶切割与识别位点相似但不完全相同的序列，这一现象称 STAR（星号）活性

影响酶活性的因素：

1、DNA 样品的纯度：DNA 样中混有蛋白质、苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、SDS、NaCl 等,都有可能抑制酶活性。

可采用以下方法：提高酶活性、加大酶的用量（1 μ g DNA 用 10U 酶）、

加大反应总体积、延长反应时间。

2、DNA 样品的甲基化程度

大肠杆菌中的 **dam** 甲基化酶在 5'GATC3'序列中的腺嘌呤 N6 位引入甲基，受其影响的酶有 Bcl I Mbo I 等，但 BamH I、Bgl II、Sau3A I 不受影响。大肠杆菌中的 **dcm** 甲基化酶在 5'CCAGG3'或 5'CCTGG3'序列中的胞嘧啶 C5 位上引入甲基，受其影响的酶有 EcoR II 等，但 Bgl I、Kpn I 不受影响。

采用去甲基化酶的大肠杆菌菌株来制备质粒 DNA，可防止 DNA 的甲基化。

3、酶切反应的温度

多数标准反应温度是 37℃，如 Sma I 为 25℃或 30℃，Sfi I 为 50℃。反应温度过度或过低都会影响酶活性，甚至导致酶失活。

4、DNA 分子结构

某些酶切割超螺旋质粒 DNA 时，酶量比切割线性 DNA 时高出多倍，可高达 20 倍。

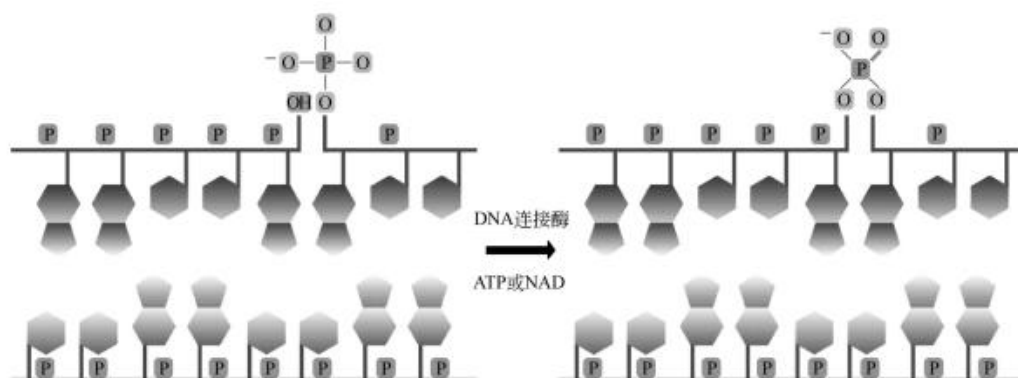
5、核酸内切酶的缓冲液

高浓度的酶、高浓度的甘油、低离子强度、极端 pH 值等，会使一些核酸内切酶的识别和切割序列发生低特异性，即所谓的“星活性”现象。

常见的酶

1、DNA 连接酶

DNA 连接酶是生物体内重要的酶，其所催化的反应在 DNA 的复制和修复过程中起着重要的作用。具有依赖于 ATP 或依赖于 NAD⁺进行催化的两种类型。DNA 连接酶的作用：催化 3'羟基和'磷酸基团，形成磷酸二酯键。



2、DNA 聚合酶

DNA 聚合酶主要活性是催化 DNA 的合成。真核细胞有四种 DNA 聚合酶，原核生物三种 DNA 聚合酶中聚合酶 III 是延伸新链的主要酶。

大肠杆菌中存在三种 DNA 聚合酶聚合酶 I、II 和 III；真核细胞中也分离出四种 DNA 聚合酶，聚合酶 α 、 β 、 γ 和线粒体聚合酶。目前常用于基因工程的为大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 和 T4 DNA 聚合酶。后者由 T4 噬菌体感染大肠杆菌所得。而用于 PCR 扩增技术的多为耐热的 Taq DNA 聚合酶，它是来自一种水生嗜热杆菌。

3、Cas 核酸内切酶

CRISPR/Cas(成簇规律的间隔短回文重复序列)(clustered regularly interspaced palindromic repeats, CRISPR) 系统是存在于古细菌及许多细菌中的一套防御系统； Cas 则是一系列具有多种活性的核酸内切酶，其主要功能是定位外来入侵的 DNA 并将其切断，从而阻止外来入侵的噬菌体和质粒繁衍子代。

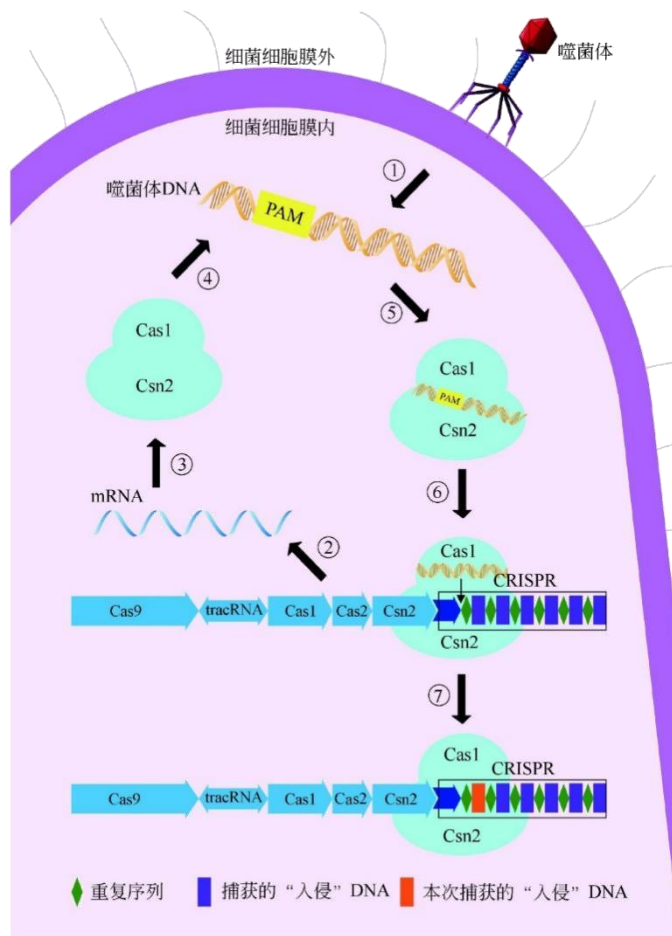
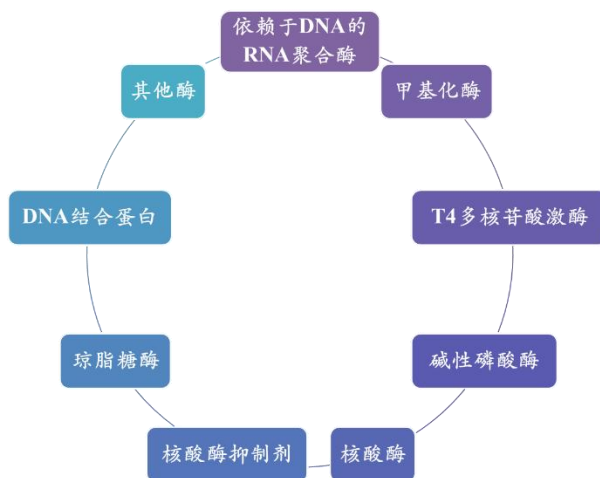


图 2.32

4、其他分子克隆工具酶



7.2.5 教学方法

二单元的教学方法采用课堂讲授和举例分析的形式进行。

7.2.6 作业安排及课后反思

- 1、限制性内切酶可以划分为哪几个类型，各种特点？
- 2、什么是同裂酶和同尾酶，它们在基因操作中有和用途
- 3、为保证限制性内切酶正确发挥作用，有哪些需要注意的事项？

7.2.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

7.2.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《基因工程》袁蓂洲版，第二章（p14-p43）

7.3 教学单元三

7.3.1 教学日期

第四次课、第五次课（9.14、9.18）

7.3.2 教学目标

通过对本单元的学习，认识到分子克隆、基因工程等操作过程当中载体的重要性，会熟练的选取合适的克隆载体去解决实际工作中的需要。

7.3.3 教学内容（含重点、难点）

重 点：质粒载体的基本特性。

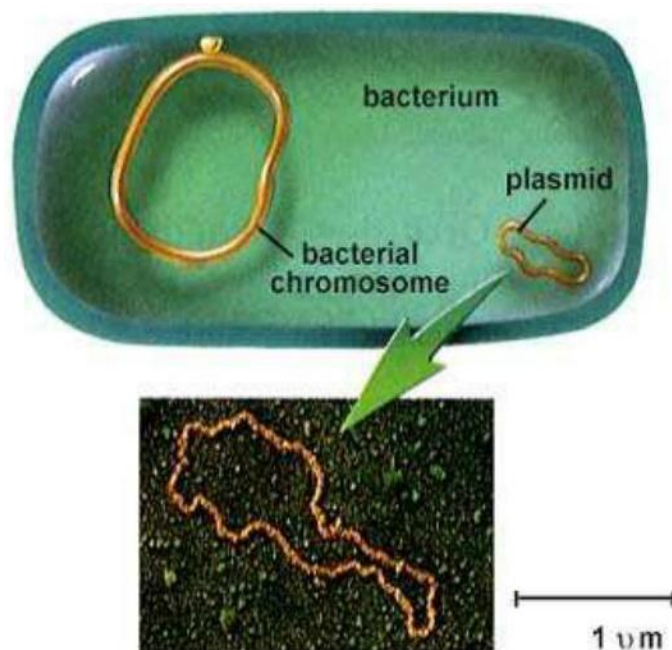
难 点：遗传标记基因，具有代表性的克隆载体。

主要知识点：质粒的复制规则，质粒的不相容性，标记基因，克隆的原理及步骤，载体与外源 DNA 的酶切，外源 DNA 与载体的连接，阳性转化子的筛选过程，噬菌粒。

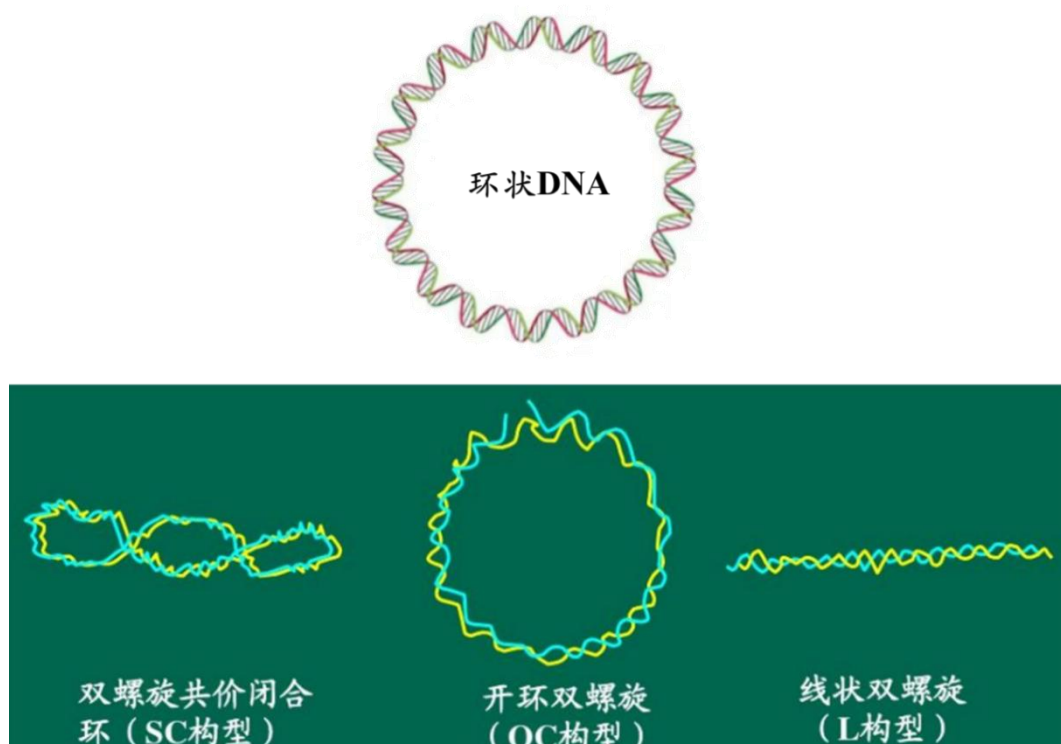
7.3.4 教学过程

载体应具备的特征：在宿主细胞内必须能够自主复制（具备复制原点）；必须具备合适的酶切位点，供外源 DNA 片段插入，同时不影响其复制；有选择标记，用于筛选；最好有较高的拷贝数，便于载体的制备。

质粒 (plasmid)：是独立于许多细菌及某些真核细胞染色体外共价闭合环状的 DNA 分子，能独立复制的最小遗传单位，大小在 1-200kb 之间。和病毒不同，他们没有衣壳蛋白（裸 DNA）。



绝大多数质粒 DNA 是双链环形，它具有 3 种不同的构型：当其两条多核苷酸链均保持着完整的环形结构时，称之为共价闭合环形 DNA (cccDNA) 这样的 DNA 通常呈现超螺旋的 SC 构型 (c)；如果两条多核苷酸链中只有一条保持着完整的环形结构，另一条链出现有一至数个缺口时，称之为开环 DNA (ocDNA)，此即 OC 构型 (b)；若质粒 DNA 经过适当的限制性核酸内切酶切割之后，发生双链断裂而形成线性 DNA (lDNA)，通称 L 构型 (a)。



质粒与宿主细胞的关系：(1) 质粒对宿主的生存不是必需的，只是友好的，“借居”。在宿主细胞中，既不杀伤细胞，对宿主的代谢活动也无“影响”，宿主失去质粒可以照常生存下去。(2) 质粒离开宿主就无法生存，只有依赖宿主细胞的（酶和蛋白质）帮助，才能完成自身的复制、转录。(3) 质粒经常为宿主执行一些适当的遗传功能，作为对宿主细胞的“补偿”。(4) 质粒赋予宿主各种有利的表现，使宿主获得生存优势，与基因工程实验紧密相关的如抗生素基因。

质粒发现和研究意义：(1) 理论意义：质粒能够复制、传递和表达遗传信息，从分子遗传学观点来看是一种有机体，是比病毒更原始的生命形式，是生命起源研究的一块重要基石。(2) 实践意义：是基因工程的重要载体，能把外源基因输送到宿主细胞中去克隆扩增或克隆表达。质粒是可以改造的，可以剪切，剪接的，基因工程的重要任务之一就是严格改造质粒的同时，控制质粒不传递，如携带致病因子的质粒。

质粒的复制：通常一个质粒含有一个复制起始区以及与此相关的顺式作用原件（以整个遗传单位定义为复制子）。复制起始区的组成方式可决定复制方式，如滚环复制或 θ

复制。

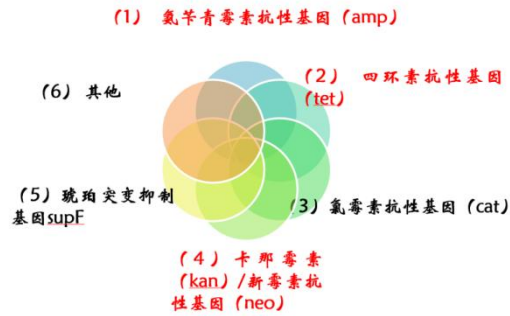
质粒的拷贝数：按照质粒控制拷贝数的程度，可将质粒的复制方式分为严谨型与松弛型。严谨型质粒在每个细胞中的拷贝数有限，大约 1~几个；松弛型质粒拷贝数较多，可达几百。

严谨型	松弛型
拷贝数少，一般少于 10 个，分子量大，复制受限，受细菌宿主 DNA 复制系统的控制	拷贝数多，10-200 个，分子量小；复制不受细菌 DNA 复制系统限制，当宿主蛋白质合成受抑制时，其拷贝数可猛增至 1000-3000 之多
机理：普遍认为是该质粒可以产生阻遏蛋白，反馈抑制自身 DNA 合成	基因工程操作过程中使用松弛型质粒可以获得更多的基因产物

质粒的不相容性：两个质粒在同一宿主中不能共存的现象称为质粒的不相容性（incompatibility），它是指在第二个质粒导入后，在不涉及 DNA 限制系统时出现的现象。

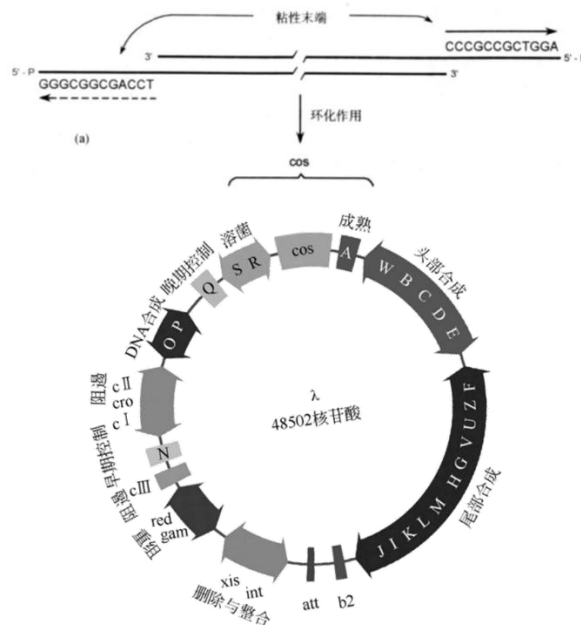
质粒的转移性：指质粒具有转移的特性。自然条件下，很多质粒可以通过细菌结合（conjugation）的作用转移到新宿主细胞内。它需要移动基因 *mob*、转移基因 *tra*、顺式作用原件 *bom* 及内部的转移缺口位点 *nic*（接合型质粒）。但是基因工程质粒无 *nic/bom* 位点，但是可以通过人工方法将其转化到细菌细胞中（非接合型质粒）。

抗生素是目前使用最广泛的选择标记



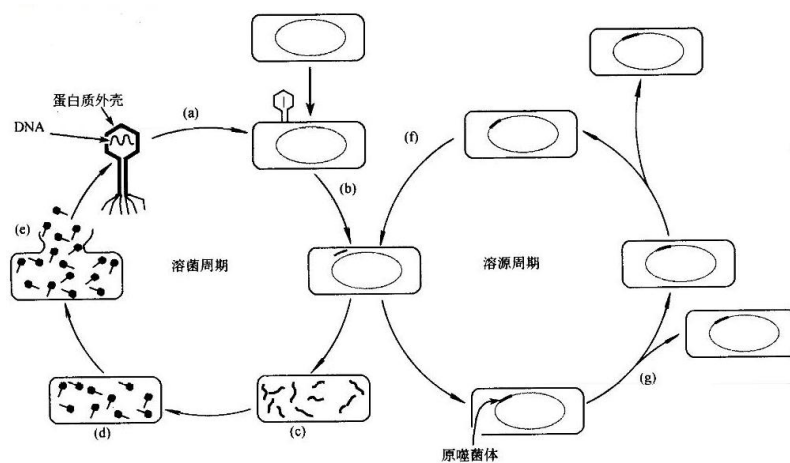
质粒载体的种类：1、克隆载体 主要用于扩增或保存 DNA 片段，是最简单的载体，pBR322、pUC18、pUC19、pGEM-3Z/4Z 等；2、表达载体 在克隆载体基础上衍生而来，添加了强启动子，以及有利于表达产物的分泌、分离或纯化的元件。

λ噬菌体的分子生物学：λ噬菌体是感染大肠杆菌的溶原性噬菌体，在感染宿主后可进入溶原状态，也可进入裂解循环。λ噬菌体基因组是长度约为 50kb 的双链 DNA 分子，实际大小为 48,502bp，两端各有一段长度为 12 个核苷酸的互补单链（粘端），称为 cos 位点。当λ噬菌体 DNA 进入宿主细胞后，其两端互补单链通过碱基配对形成环状 DNA 分子，而后在宿主细胞的 DNA 连接酶和解链酶作用下，形成封闭的环状 DNA 分子。



λ 噬菌体的生命周期分为溶菌周期和溶原周期

λ 噬菌体感染大肠杆菌后，出能裂解细胞外，也可能将其 DNA 直接整合到宿主细胞的染色体 DNA 上，并不产生子代噬菌体颗粒，这种现象称为溶原周期。整合主要由 λ 噬菌体 DNA 上的 *cI* 和 *int* 两个基因的产物所激活，而这两个基因的开放与关闭又取决于宿主细胞本身的性质。可以根据需要改变 λ 噬菌体或宿主细胞的性质，使噬菌体处于溶原状态或者溶菌状态。DNA 重组技术一般需要 λ 噬菌体进入溶菌状态。



既能进入溶菌生命周期又能进入溶原生命周期的噬菌体克隆交温和噬菌体，只具有溶菌生长周期的噬菌体克隆叫烈性噬菌体。

烈性噬菌体溶菌生长的基本过程：

- 1、吸附 吸附到位于感染细胞表面的特异受体上
- 2、注入 噬菌体 DNA 穿过细胞壁注入宿主细胞
- 3、转变 被感染的细胞称为制造噬菌体颗粒的场所
- 4、合成 大量合成噬菌体特有的核酸和蛋白质
- 5、组装 包装了 DNA 头部和尾部组装成噬菌体的颗粒
- 6、释放 合成的子代噬菌体颗粒从宿主细胞内释放出来

λ 噬菌体载体的选择标记：

- 1、基因组大小：野生型 λ 噬菌体基因组为 48kb，若用 9~23kb 的外源 DNA 替换可

取代区后，可以正常存活

2、**lacZ 基因**：通过插入或替换载体中的 β -半乳糖苷酶基因片段，在 IPTG/X-gal 平板上筛选重组噬菌体

3、**cI 基因失活**：外源基因插入到 cI 基因中，使噬菌体高效进入裂解生长状态。

7.3.5 教学方法

三单元的教学方法采用课堂讲授的形式进行。

7.3.6 作业安排及课后反思

- 1、何为 α -互补？在载体构建中有何作用？
- 2、作为一个最基本的载体，它必须具备哪些功能原件
- 3、除了抗生素外，载体的标记还有哪些类型？

7.3.7 课前准备情况及其他相关特殊要求（教师、学生）

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

7.3.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《基因工程》袁蓂洲版，第三章（p44-p53）

7.4 教学单元四

7.4.1 教学日期

第六次课（9.21）

7.4.2 教学目标

人工染色体载体的构建过程是本节的难点，通过讲授使同学了解黏粒载体的特性，已经应用范围。常见的人工染色体载体的特性及构建的基本思路。

7.4.3 教学内容（含重点、难点）

重点：黏粒载体的特征。

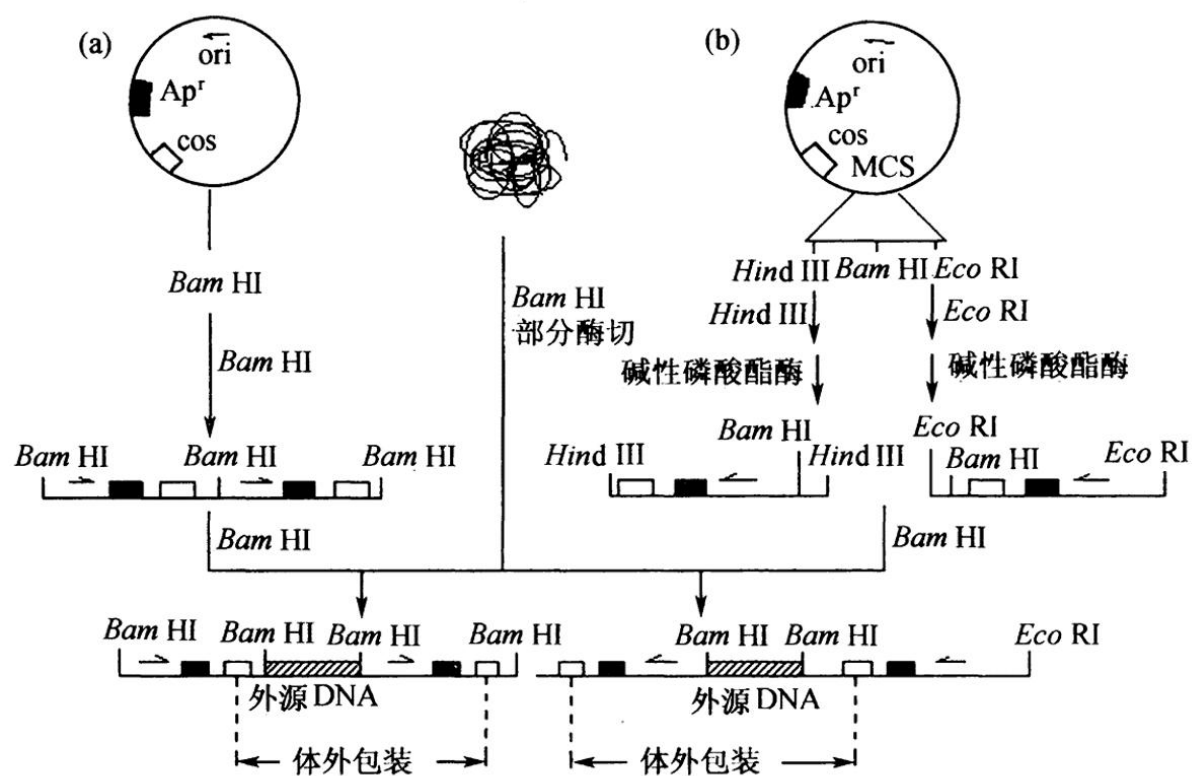
难点：人工染色体载体的构建过程。

主要知识点：黏粒的结构特征和用途，黏粒载体的工作原理，黏粒克隆载体，黏粒文库的扩增和贮存，BAC 载体及其结构组成，BAC 载体工作原理，P1 噬菌体的分子遗传特征。

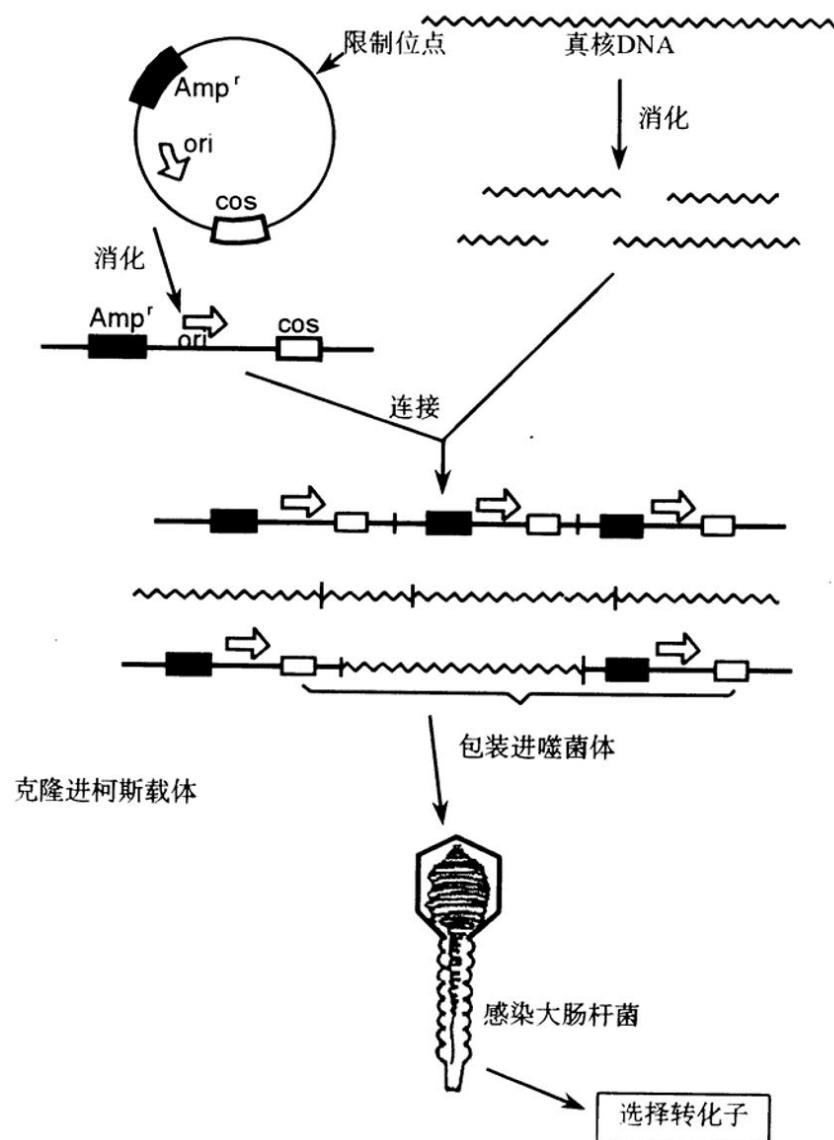
7.4.4 教学过程

黏粒的结构特征和用途：黏粒（cosmid）：黏粒实际是质粒的衍生物，是带有 cos 序列的质粒。cos 序列是λ噬菌体 DNA 中将 DNA 包装到噬菌体颗粒中所需的 DNA 序列。黏粒的组成包括复制质粒的起点、抗性标记、cos 位点，因而能像质粒一样转化和增值。他的大小一般 5-7kb 左右，用来克隆大片段 DNA，克隆的最大 DNA 片段可达 45kb。有的黏粒载体含有两个 cos 位点，在某种程度上可提高使用效率。黏粒载体的主要工作原理类似λ噬菌体载体。在外源片段与载体连接时，黏粒载体相当于λ噬菌体载体的左右臂，cos 位点通过粘末端退火后，再于外源片段相间连接成多联体。当多联体与λ噬菌体包装的蛋白质混合时λ噬菌体 A 基因蛋白的末端酶功能将切割成两个 cos 位点，并将两个同方 cos 位点之间的片段包装到λ噬菌体颗粒中去。允许插入片段为 30-45kb。

典型的黏粒载体：1. 黏粒 pJB8：典型的黏粒载体，组成简单，大小 5.4kb，由抗性基因 ampr、ColE1 复制起点（ori）、cos 位点和多克隆位点组成，可容纳 33-46.5kb 外源 DNA 片段，主要用于在细菌中克隆真核 DNA。2. 含双 cos 位点的黏粒载体：c2RB 大小为 6.8kb，含两个 cos 位点，在 cos 位点间有一个卡那霉素抗性基因，载体容量为 33-46.5kb。SuperCos-1 大小为 7.94kb，含有 SV40 复制起点和 neor 抗性基因，容量为 35-45kb。



使用 cosmid 克隆载体程序示意图
(引自王永宝、龙敏南、张凤章等 1997)



应用柯斯质粒作载体进行基因克隆的一般程序

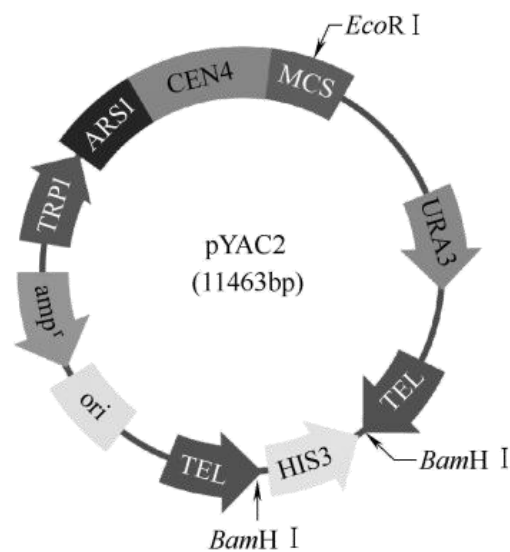
黏粒载体应用的一般程序

构建黏粒文库应注意的问题：①载体分子的自身连接，从而导致效率降低或者失败。载体自身只相当于可以插入片段的 1/10 左右，因此往往会出现载体同载体自身连接，结果在一个重组分子内可有几个柯斯质粒载体连在一起。但用碱性磷酸酶处理，可阻止载体分子自身连接；大小不等的外源片段相互连接后插入同一个载体分子。结果使在基因组内本来不是相邻的片段错乱地连接成一个片段，会影响实验结果的分析，通过收集 30~45kb 的外源 DNA 插入载体 DNA，此时，每个载体只可能插入一个外源片段，因

—°36

为如果二个片段，则将超过包装成噬菌体颗粒的限度。细菌的菌落体积远大于噬菌斑，因此如用柯斯质粒制备基因文库，则筛选所需的含某一 DNA 片段的菌落很费时间。现虽建立了高密度菌落筛选法，但由于柯斯质粒制成的基因文库常常不太稳定，插入的大片段外源 DNA 有可能通过同宿主基因组交换而致丢失等，所以最常使用的还是噬菌体载体。

酵母人工染色体（YAC）是利用酿酒酵母染色体的复制原件构建的载体，YAC 是结构上能够模拟真正酿酒酵母染色体的现状 DNA 分子。将大片段的基因组 DNA 连接到 YAC 载体的两个“臂”上，然后将连接物通过转化的方法导入酵母菌的到重组的 YAC。



YAC 载体应含有下列元件：酵母染色体的端粒序列，酵母染色体的复制子，酵母染色体的着丝粒序列，酵母系统的选择标记，大肠杆菌的复制子标记，YAC 载体的装载量为 250 - 400 kb。

将酵母染色体 DNA 的端粒(TEL)、DNA 复制起点 (ARS)和着丝粒(CEN)以及必要的选择标记(HISA4 和 TRP1)基因序列克隆到大肠杆菌质粒 pBR322 中，构建成 YAC 克隆载体。YAC 载体主要是用来构建大片段 DNA 文库，特别是用来构建高等真核生物的

基因组文库，并不用作常规的基因克隆。

当用 BamH I 切割 pYAC4 载体成现状后，就形成了一个微型酵母染色体，包含染色体复制的必要顺式元件。这些元件在酵母菌中可以驱动染色体的复制和分配，从而决定着个微型染色体可以携带酵母染色体大小的 DNA 片段。

插入失活选择：SUP4 酶失活的酵母菌落呈红色；不失活的菌落是白色。

显性标记基因的编码产物只要是毒性物质的抗性蛋白		
■ 标记基因	■ 编码产物	■ 遗传表型
■ <i>aph</i>	氨基糖苷转移酶	抗G418
■ <i>cat</i>	氯霉素乙酰转移酶	抗氯霉素
■ <i>dhfr</i>	二氢叶酸还原酶	抗氨甲喋呤和磺胺
■ <i>cup1</i>	铜离子螯合物	耐受铜离子
■ <i>suc2</i>	蔗糖转化酶	耐受高浓度蔗糖
■ <i>ilv2</i>	乙酰乳糖合成酶	抗硫酰脲除草剂

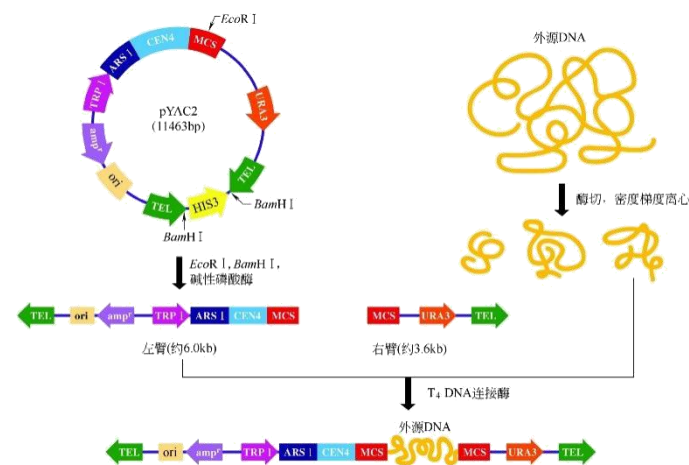


图 3.22

YAC 应用的流程图

一般酵母表达载体都以大肠杆菌质粒为基本骨架再加上酵母的自主复制序列，选择标记，外源基因插入位点，启动子和终止子。既能在酵母菌中复制也能在大肠杆菌中复制，所谓酵母菌—大肠杆菌穿梭载体。正常酵母人工染色体含有：四膜虫端粒（tel），酵母自主复制序列（ARS），酵母着丝点（CEN），酵母的选择标记（TRP1、URA1）。

酿酒酵母作表达系统的优缺点

缺点：在 YAC 载体中的插入片段会出现缺失和重排的现象；容易形成嵌合体。即在单个 YAC 中的插入片段由 2 个或多个独立的基因片段连接组成的现象；YAC 染色体与宿主细胞的染色体大小相近，YAC 染色体转入酵母细胞后很难从中分离出来。

优点：酵母细胞比大肠杆菌对不稳定的、重复的和极端的 DNA 片段有更强的容忍性，文库的代表性强，适合作真核染色体片段功能研究。

细菌人造染色体通常是在大肠杆菌性因子 F 质粒的基础上构建的，其装载量范围在 50-300 kb 之间。

BAC 载体及其结构组成：BAC 载体的大小约 7.5kb，其本质实际上是一个质粒克隆载体。与常规克隆载体的核心区别在于其复制单元的特殊性。BAC 复制单元来自 F 质粒，包括严谨型控制的复制区 oriS、启动 DNA 复制的由 ATP 驱动的解旋酶（RepE），以及 3 个确保低拷贝并使质粒精确分配到子代细胞的基因座（parA、parB、parC）。BAC 载体的低拷贝可以避免嵌合体的产生，并且还可以减少外源基因的表达产物对宿主细胞的毒副作用。正常细菌人工染色体含：严谨型控制的复制区（oriS），启动 DNA 复制的由 ATP 驱动的解旋酶（RepE），确保 3 个低拷贝并使质粒精确分配到子代细胞的基因座（parA、parB、parC），标记基因是氯霉素抗性基因（Cmr），可以通过 α -互补原理筛选重组子，设计了用于回收克隆 DNA 的 Not I 酶切位点，用于克隆 DNA 片段体外转录的 SP6 和 T7 启动子。

BAC 载体的工作原理与常规的质粒克隆载体相似。不同的是 BAC 载体装载的是大片段，100Kb~300Kb。对如此大的 DNA 片段一般要通过脉冲凝胶电泳分离。BAC 载体的拷贝数小，制备难度大。可以将 BAC 载体装载作为外源片段克隆到常规高拷贝质粒克隆载体上，如（pGEM-4Z），从大肠杆菌中以多拷贝的形式复制，便于载体的制备，使用时将高拷贝质粒去掉。

	质粒	λ噬菌体	柯斯质粒	单链噬菌体
克隆DNA大片段	±*	+	+	-
构建基因组文库	-	+	+	-
构建DNA文库	+	-	-	-
常规的亚克隆化	+	-	-	-
构建新型的DNA结构	+	-	-	-
序列分析	+	-	-	+
单链探针	±**	-	-	+
外源基因在大肠杆菌中的表达	+	-	-	-

7.4.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授、案例分析和课堂讨论的形式进行

7.4.6 作业安排及课后反思

- 1、大容量载体有哪些种类，各有何特点？
- 2、YAC 克隆载体和 BAC 克隆载体的标记基因有何特点？
- 3、简述利用 YAC 克隆载体构建基因文库的原理？
- 4、BAC 克隆载体与常规质粒载体有何区别和优势？

7.4.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

7.4.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《基因工程》袁蓂洲版第三章（p54-p58）《基因工程》孙明版，第四章（p74-p89）
—°40

7.5 教学单元五

7.5.1 教学日期

第七次课（9.25）

7.5.2 教学目标

熟练掌握基因克隆中表达载体的应用方法，会利用常见的表达载体设计构建生物制药相关的产品。

7.5.3 教学内容（含重点、难点）

重 点：利用大肠杆菌表达系统表达蛋白质。

难 点：表达载体的表达原件及其特征。

主要知识点：表达原件的意义，不同载体的表达形式区别，表达融合蛋白的表达载体，融合蛋白标签，穿梭载体的意义。

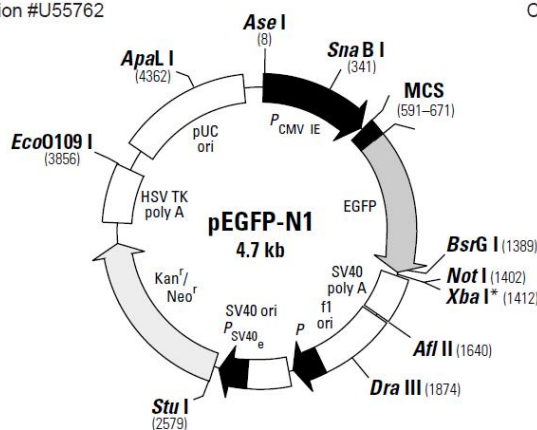
7.5.4 教学过程

大肠杆菌表达载体的结构

原核表达载体：适用于在原核细胞中表达外源基因的载体。均是质粒载体，首先必然满足克隆载体的基本要求，然后增加表达元件。

pEGFP-N1 Vector Information
GenBank Accession #U55762

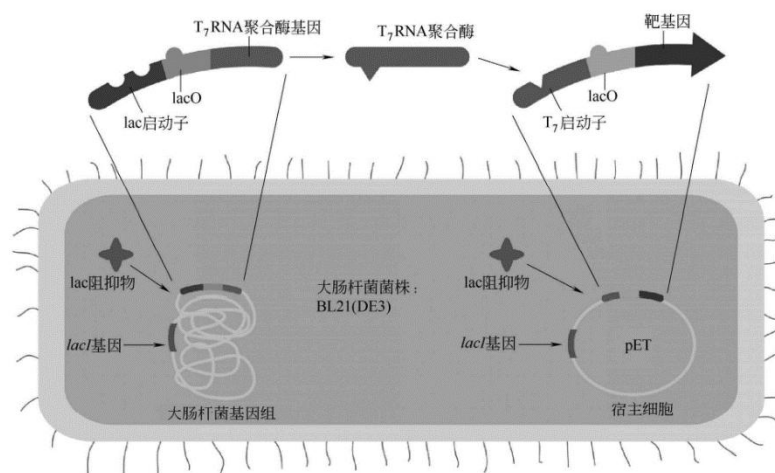
PT3027-5
Catalog #6085-1



1、表达元件 (expression elements):	<p>a) 启动子(promoter): 三类, 即: <i>lac</i>启动子、<i>trp</i>启动子和它们的杂合启动子<i>tac</i>或<i>trc</i>, 都受IPTG诱导; <i>T₇</i>噬菌体启动子; λ噬菌体的<i>P_L</i>启动子。</p> <p>b) 终止子: 依赖于ρ因子或不依赖于ρ因子(遇茎环结构而终止)。</p> <p>c) 核糖体结合位点(ribosome binding side, RBS): Shine-Dalgarno (SD)序列, ATG与RBS之间的距离很重要, 一般3-11bp。</p>
2、表达形式	<p>a) 完整单一蛋白: 单一基因的编码区表达。</p> <p>b) 融合蛋白(fusion protein): 多个基因的编码区的串联体, 但构成一个整体的单一ORF, 如果融合标签蛋白有利于蛋白的定向、纯化, 如果融合多个目标蛋白, 则类似于直接表达了一个多酶复合体一样, 可减少载体构建难度, 而且可以偶连两个或多个相关基因的表达。</p>
3、表达的控制	<p>a) 诱导表达系统: IPTG</p> <p>b) 防渗漏表达系统: <i>lacI^q</i></p> <p>c) <i>P_L</i>启动子受<i>c I</i>的调控, 低温(30℃)下阻抑转录, 高温(40-45℃)下解除抑制。</p>

表达载体的特点

利用 *T7* 噬菌体启动子的表达载体: pET 系列, 表达能力强, 可控性好, 只受 *T7* 噬菌体 RNA 聚合酶识别, 不受大肠杆菌 RNA 聚合酶识别, 可用 IPTG 诱导表达。使用大肠杆菌 BL21 (DE3) 作为宿主菌。其菌种基因组上整合上一个 λ 噬菌体 DNA, 在 λ 噬菌体的 DE3 区有一个 *T7* RNA 聚合酶基因, 该基因受到 IPTG 调控。



非融合型表达载体

主要元件：强启动子、SD、起始密码子 ATG、万能终止密码子。

由于 pET 系列载体对宿主的限制较为严格，不便对各种宿主广泛使用，且诱导剂提高使用成本等因素存在。近年来利用大肠杆菌固有启动子的载体开始广泛应用。

表达融合蛋白的表达载体：表达的蛋白需要有效的分离纯化，通过以融合蛋白的形式表达的产物可对目的蛋白进行分离和纯化，用做分离的载体蛋白称为标签蛋白或标签多肽（tag）。

1、GST (glutathione S-transferase, 谷胱甘肽S-转移酶)表达载体：

- 如Amersham（GE）公司的pGEX系列，其GST来自于血吸虫，融合蛋白下保持酶学活性，对谷胱甘肽有很强的结合能力，融合蛋白纯化出来后用凝血蛋白酶切割可得到纯的目的蛋白。

2、组氨酸标签表达载体：

- 如Novagen（Merck）公司的pET系列，可在目标蛋白的N-端或C-端加上6个组氨酸的标签和Xa因子酶工位点，能与镍等二价金属离子结合，纯化目的蛋白，用Xa因子处理可得到纯的目的蛋白。

3、内含肽表达载体：

- 如NEB公司的Impact-Twin系统，将目的蛋白放在两个可自裂解的内含肽(intein)中间，在得到融合蛋白以后不通过蛋白酶消解、只需要调节pH值等条件就将标签蛋白切除。

4、Profinity eXact融合标签载体

- 可以一步进行层析和酶切反应，是表达蛋白不带融合标签，如：pPAL17载体

5、分泌表达载体：

- 产物可跨膜分泌至胞周间隙，可避免受细胞内蛋白酶的降解，或使其正确折叠，或去除N-端甲硫氨酸，以维护活性。信号肽(signal peptide)有碱性磷酸酶信号肽、蛋白质A信号肽（如Amersham公司的pEZZ18系统）。

无细胞体系蛋白质表达系统：有些重要功能的蛋白可能会有细胞毒性，在大肠杆菌细胞内表达会造成宿主细胞的死亡，因此很难大量表达，用无细胞系统可以解决这一问题（Niernberg 和 Matthaei 于 1961 年建立无细胞蛋白表达系统）。

利用细胞提取物的无细胞表达系统

以外源 mRNA 或 DNA 为模板，利用大肠杆菌细胞抽提物的酶系，通过添加氨基酸，

T7 RNA 聚合酶和能量物质等来表达蛋白质的体外翻译系统。S30 体外翻译系统是一种典型的大肠杆菌体外翻译系统。

体外重构表达系统

PURExpress 表达系统将转录和翻译所需的必需因子重新组合在一起，重构大肠杆菌的翻译机器，包括从大肠杆菌中高度纯化的核糖体和 tRNA，已经重组表达的各种翻译必需因子，如起始因子、延长因子等。

穿梭载体(shuttle vector)：能够在两类不同的宿主中复制、增殖和选择的载体，主要是质粒，它们至少有两套复制单元和两套选择标记，相当于两个载体的联合。只要涉及大肠杆菌以外的细胞，绝大多数载体都装有大肠杆菌质粒载体的基本元件，都可看作穿梭载体。一、大肠杆菌/革兰氏阳性菌穿梭载体：如向枯草芽孢杆菌的穿梭。二、大肠杆菌/酵母菌穿梭载体：主要用于遗传学和真核表达研究，尤其是当蛋白需要进行真核修饰时，如磷酸化、糖基化等。三、其它穿梭载体：如动物病毒载体、植物转化的 Ti 质粒、昆虫杆状病毒等，更为复杂一些。

整合载体(integration vector)：用于将某个基因或某些基因插入到宿主的染色体中去工作，按整合方式可分为定点整合和随机整合两类，按作用可分为目的基因的插入/敲除或随机突变体库的构建。一、基因插入/基因敲除：同源重组整合载体最为常用，不仅含有大肠杆菌克隆载体的骨架，还有一段便于同源重组的重组 DNA 片段。二、随机插入突变载体：用于功能基因组研究中基因突变材料的创造。随机突变体库是指标记基因在载体的携带下通过 DNA 重组事件随机插入到基因组中而形成的众多基因突变体的集合。1、微生物插入突变体库：如 pEG922，需要借助转座子。2、构建植物突变体库所用的载体：根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的 T-DNA 插入或植物转座子(transposon)标签是植物基因功能研究中常用的产生突变体的方法。

7.5.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授、案例分析和课堂讨论的形式进行。

7.5.6 作业安排及课后反思

- 1、什么是表达标签？有何作用？
- 2、何为穿梭载体？其结构上有哪些特点？
- 3、整合载体与穿梭载体有哪些区别？

7.5.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

7.5.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《基因工程》袁蓂洲版，第3章（p60-p76）

7.6 教学单元六

7.6.1 教学日期

第八次课（9.28）

7.6.2 教学目标

生物体内大分子的分离和检测时最基本的基因工程操作手段之一，熟练掌握分离生物大分子的方法和原理，会将所学的检测方法应用到相关领域当中。

7.6.3 教学内容（含重点、难点）

重 点：核酸分离的方法原理。

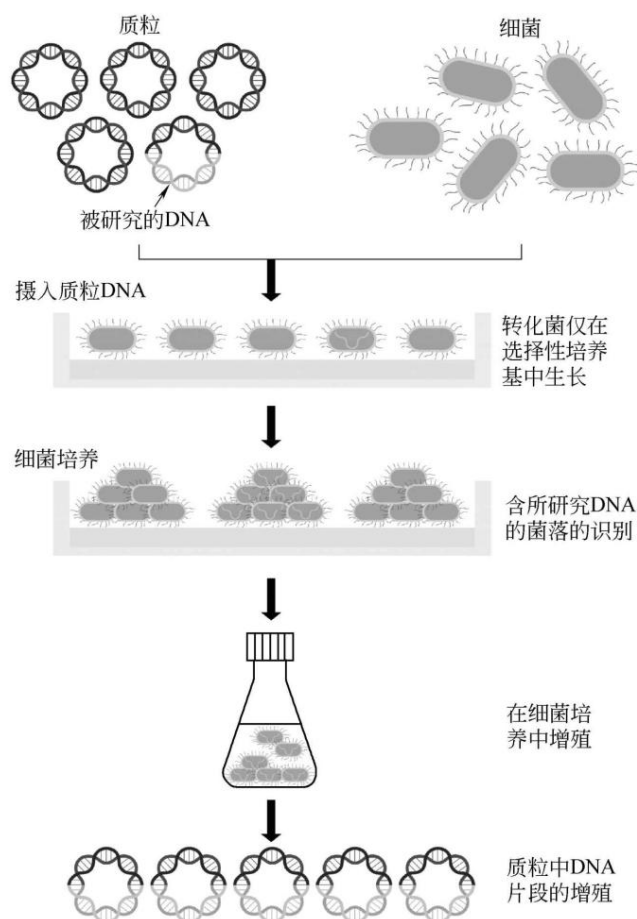
难 点：DNA 片段纯化的方法，分子杂交的原理步骤。

主要知识点：碱裂解法提取 *E.coli* 质粒 DNA 的原理，基因组 DNA 的分离，核酸的琼脂糖凝胶电泳分离和检测核酸质量和纯度，聚丙烯酰胺凝胶电泳分离生物大分子的原理，紫外吸收法检测 DNA 的浓度和纯度，Southern 杂交，Northern 杂交，Western 杂交，重组 DNA 分子导入到大肠杆菌的方法。

7.6.4 教学过程

一、重组 DNA 分子导入大肠杆菌

外源目的基因与载体在体外连接构建重组体 DNA 分子以后，需要将重组 DNA 分子导入受体细胞进行扩增（amplification）和筛选，得到大量、单一的重组体分子，即阳性克隆。最后，重组 DNA 分子还要导入到受体细胞内实现高效表达，产生基因产物或改变受体生物的遗传性状。将重组 DNA 分子导入受体细胞的方法，根据载体和受体细胞的不同，也会有很大的差异。



受体细胞也叫宿主细胞，包含原核受体细胞和真核受体细胞。所有的受体细胞必须具备以下一些特征：

- 1、遗传稳定性高，易于扩大培养或发酵生长；

- 常用的转化方式，CaCl₂ 转化法，电转化法，噬菌体转导



主要试剂及作用:

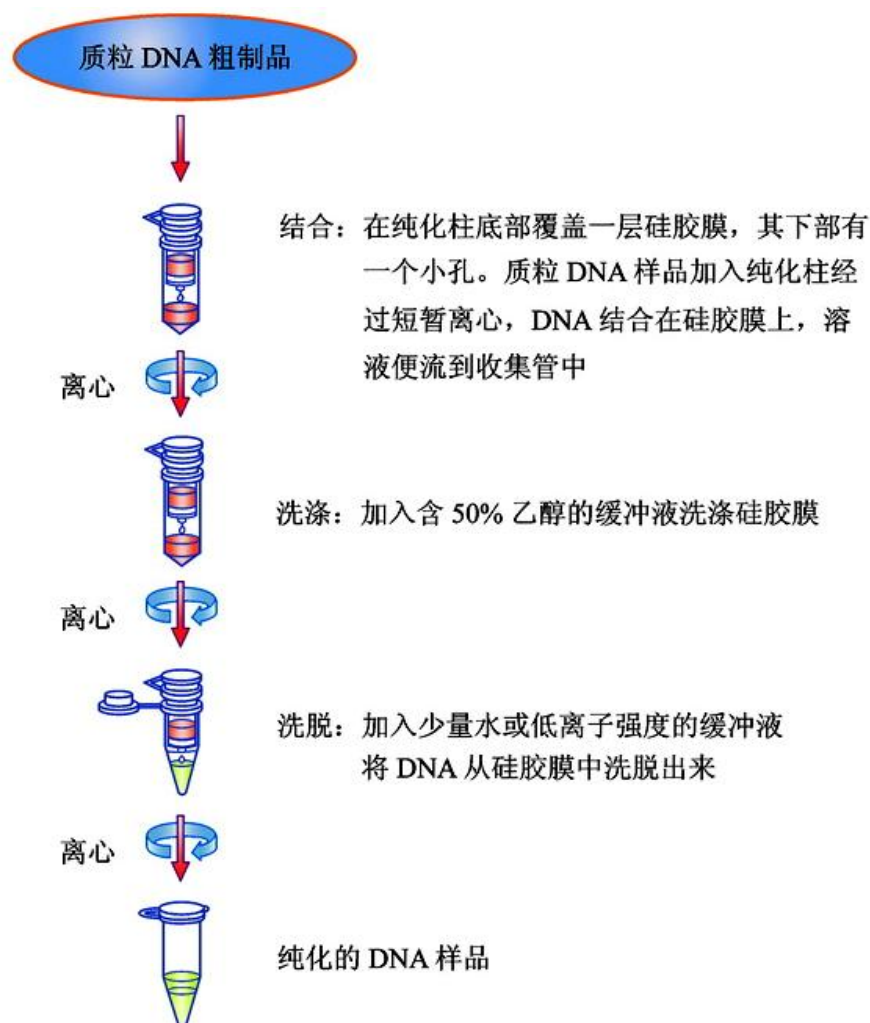
- 1、苯酚：主要作用是裂解细胞，使细胞中的蛋白，核酸物质解聚进一步得到释放。

2、氯仿：对酚类物质进行抽提，为有机溶剂与水互不相溶。DNA 溶于水相。

3、异丙醇：能与任意比例的水混合，因此加入异丙醇，能够夺取 RNA/DNA 周围的水分，RNA/DNA 能够聚集而发生沉淀。

碱裂解法提取质粒 DNA 的时候,溶液三中用的是 KAc,一方面利用 HAc/Ac-缓冲体系平衡溶液二中 NaOH 的强碱性,使 DNA 复性；另一方面, K^+ 与溶液二中的 SDS（结合到蛋白质上）结合生成微溶性物质,促使体系中的蛋白质以及蛋白质所连接的基因组 DNA 的沉降。

TE 溶液含有 Tris-HCl, EDTA, 为 DNA 提供稳定的液相，抑制核酸酶。



DNA purification Kit (QiaGen)

基因组 DNA 的分离

1. CTAB 法提取植物细胞染色体 DNA

CTAB（十六烷基三甲基溴化铵），阳离子去污剂，溶解细胞膜，与核酸形成复合物

提取流程：液氮研磨——裂解细胞——抽提——沉淀——干燥溶解

2. SDS 抽提法

1976 年由 Stafford 及其同事提出

裂解缓冲液（EDTA、SDS、无 DNA 酶的 RNA 酶）——蛋白酶 K 处理——Tris 饱和酚二次抽提（pH8.0）——透析或沉淀——DNA 样品

DNA 琼脂糖凝胶电泳

主要检测：分子量，DNA 浓度

琼脂糖凝胶电泳(agarose gel electrophoresis)

琼脂糖(agarose)：从海藻(algae)中提取的一种线状高聚物

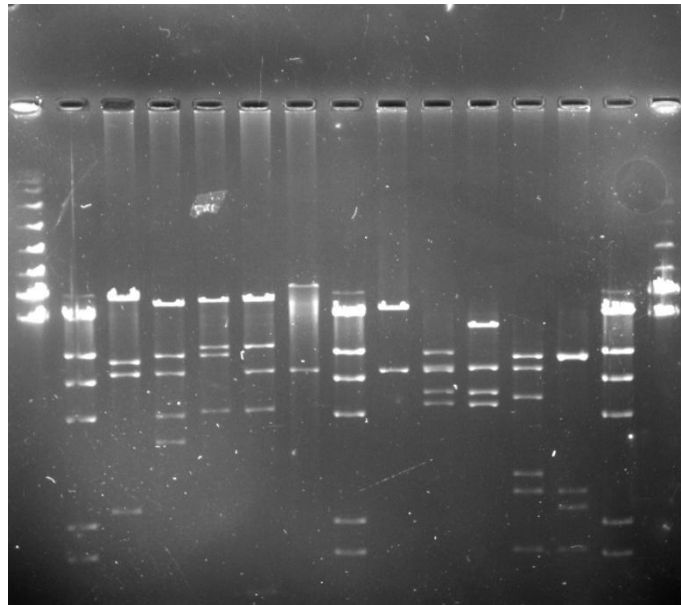
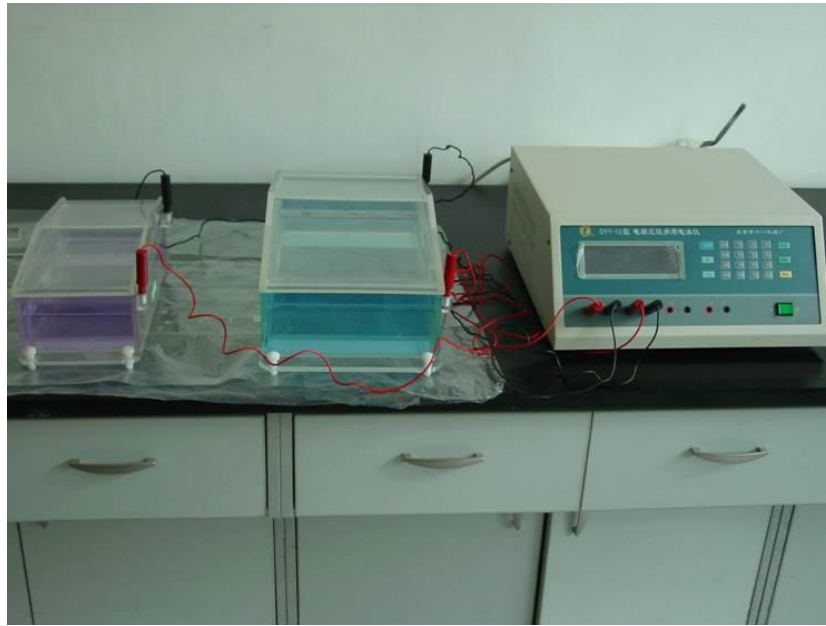
琼脂糖凝胶电泳实验原理

DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时，有电荷效应与分子筛效应。

电荷效应：DNA 分子在高于其等电点的溶液中带负电荷，在电场中向正极移动。

分子筛效应：DNA 分子在凝胶中迁移速度主要由分子受凝胶阻滞程度的差异所决定，与 DNA 的分子大小及其构型有关。

增加凝胶的浓度可以在一定程度上降低电荷效应，使分子的迁移速度主要由分子受凝胶阻滞程度的差异所决定，提高分辨率。同时适当减低电泳时的电压，也可使分子筛效应相对增加而提高分辨率。



电泳设备及电泳结果

紫外吸收法检测 DNA 的浓度和纯度

纯净的 DNA $A_{260}/A_{280}=1.8$ ，制备的 DNA 样品应该为 1.7~1.8

纯净的 RNA $A_{260}/A_{280}=2.0$ ，制备的 RNA 样品应该大于 2.0

如果制备的 DNA 样品 $A_{260}/A_{280}<1.7$ ，说明样品中含酶和蛋白质过高，应将样品用酚、氯仿、异戊醇抽提，再用乙醇沉淀 DNA；

$A_{260}/A_{280}>2.0$ ，说明样品中 RNA 过高，可用 RNase 消化后，用酚、氯仿、异戊醇抽提，再用乙醇沉淀 DNA；

醇抽提，再用乙醇沉淀 DNA；

如果样品 A260/A280 为 1.8~2.0，说明样品中盐的含量过高，样品沉淀后应用 70% 乙醇多洗一遍。



切胶示意图

三、RNA 的分离、检测和纯化

一个典型哺乳动物细胞约含 10^{-5} g RNA，其中 80-85% 为 rRNA (28S, 18S 和 5S/23S, 16S 和 5S) 三种类型)，其余 15~20% 主要由各种类型的低分子量 RNA 组成（如 tRNA，核内小分子 RNA 等）。mRNA 为总 RNA 的 1~5%，3' 端有一个 poly(A) 尾，可与 oligo(dT)-纤维素吸附，亲和层析分离寡脱氧胸苷酸。

实验的主要操作步骤



四、分子杂交

通常利用已标记的某一 DNA 或 RNA 片段作为探针, 探测重组 DNA 分子中是否有 DNA 片段与探针发生同源性杂交, 再利用放射自显影等方法鉴定。

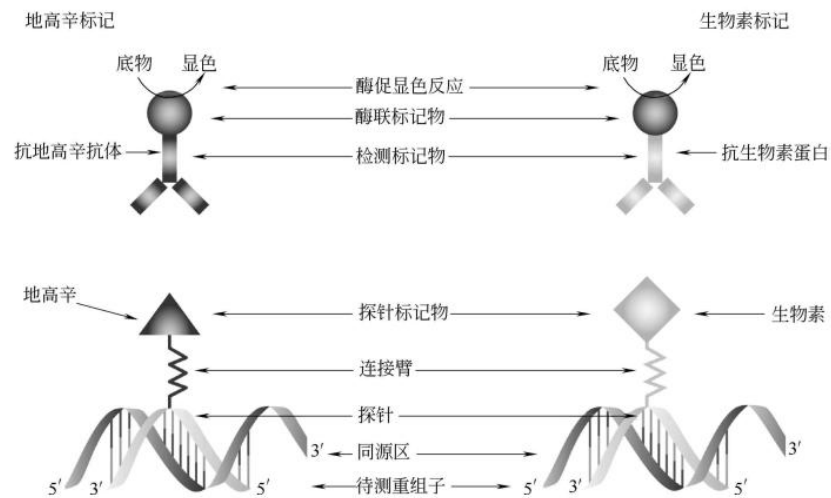
在重组子的筛选和鉴定中, 其杂交的双方是待测的转化子目的基因序列和经过标记的目的基因特定序列片段 (称为探针)。只要选择特定序列的 DNA 探针或 RNA 探针, 就可以检测转化子中是否含有目的基因

根据被杂交的对象分为

Southern (DNA), Northern (RNA), Western(蛋白),

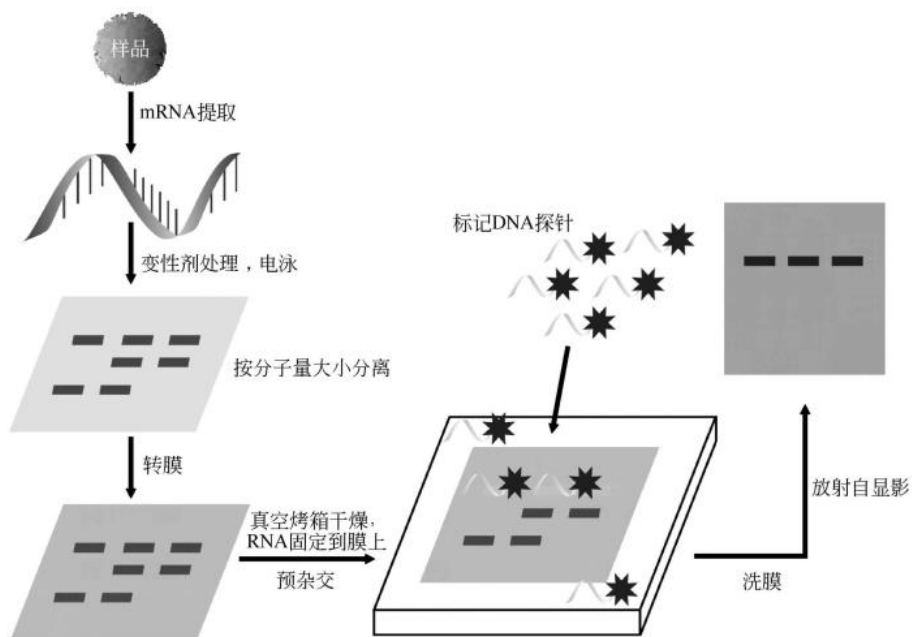
1、Southern 杂交

该法利用硝酸纤维素膜或经特殊处理的滤纸或尼龙膜具有吸附 DNA 的能力, 先做 DNA 片段的凝胶电泳, 并将凝胶电泳中的 DNA 区带吸附到膜上, 然后直接在膜上进行同位素标记的核酸探针与被测样品之间的杂交, 再通过放射自显影对杂交结果进行检测。



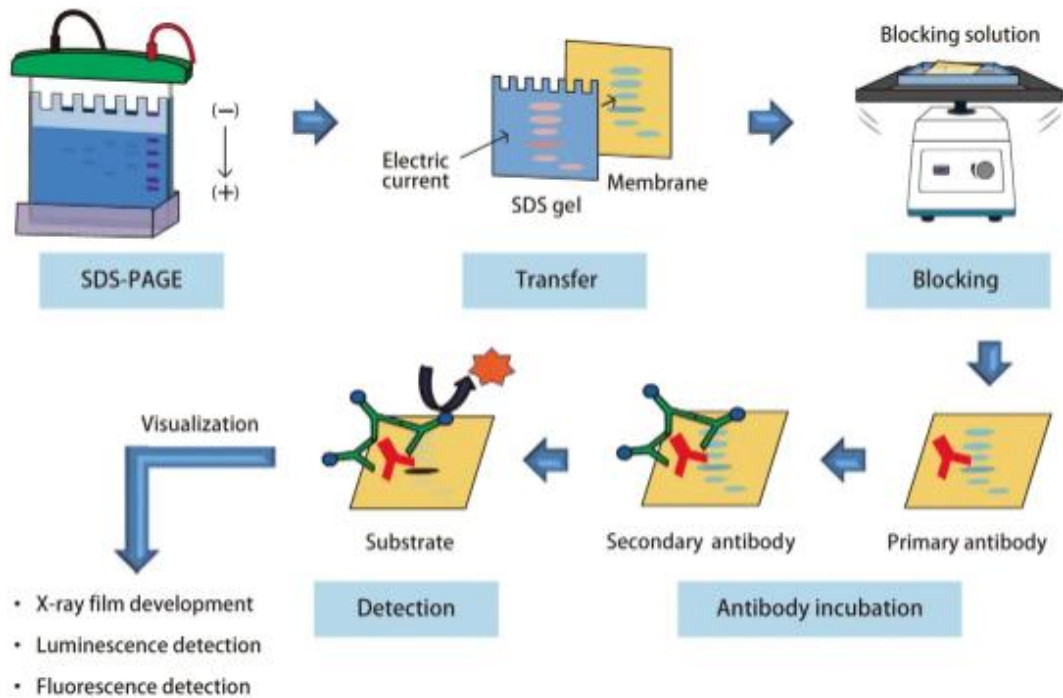
2、Northern 杂交

类似于 Southern blot,但用于检测 RNA 的分子杂交技术,用于分析总 RNA 或 mRNA



3、Western 杂交：基本原理同其它 blot 方式，检测蛋白质与 Southern blot 的关键区别在于探针性质：抗体(antibody)。抗体的要求：1.单克隆抗体(monoclonal antibody)并非都适合，由于靶蛋白已变性。2.多克隆抗体抗体为混合物，对其特异性，亲和力及浓度都一无所知，对由 SDS/还原剂变性处理的目标蛋白是否还能识别应做预备实验。

第一抗体:就是平常所说的抗体,即能和抗原特异性结合。第二抗体:是能 and 抗体结合的,即抗体的抗体。主要用于检测抗体的存在。一抗和底物结合与否用肉眼无法识别。二抗可以和一抗结合,并带有可以被检测的标记(如荧光、放射性、化学发光或显色基团)。当一抗结合到底物上,就可以通过二抗检测。简要步骤:



1.样品制备 SDS-PAGE 样品

2.SDS-PAGE

3.蛋白质转移

硝酸纤维素滤膜, 电转移: 三夹板/隔离电极板

干燥

4.染色

丽春红 S or 印度墨水(射启性检测适用)但现少采用, 由于有 prestain MW marker

5.封闭背景 脱脂奶粉 5%

6.第一抗体与靶蛋白结合

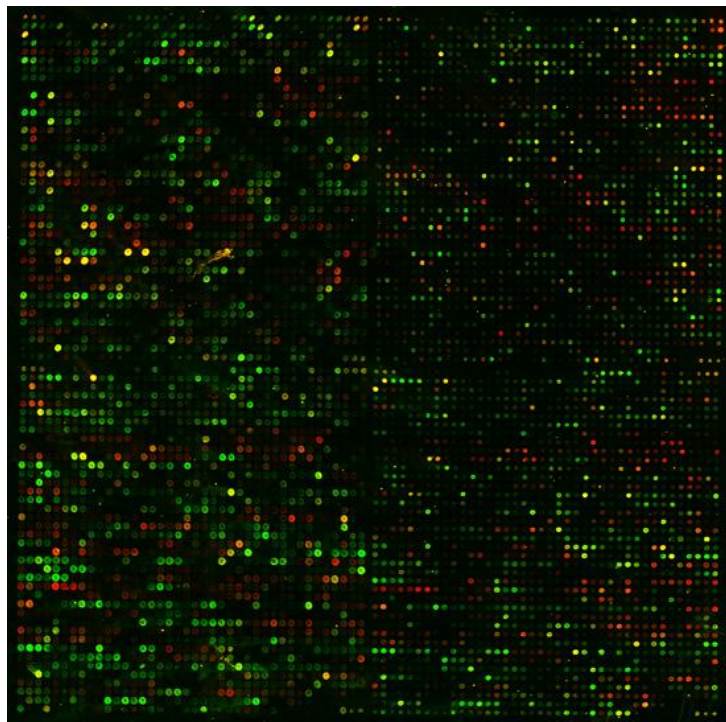
7.二级免疫反应 抗免疫球蛋白抗体 或 A 蛋白

8.检测

辣根（HRP, horseradish peroxidase）与 3,3-二氨基联苯胺作用形成棕色沉淀，钴或镍可加深颜色，提高灵敏度，但不可完全排除背景，应小心使用

其他分子杂交：原位杂交、斑点杂交

DNA 微阵列分析，DNA Microarray。



7.6.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授、案例分析和课堂讨论的形式进行。

7.6.6 作业安排及课后反思

- 1.在基因操作实践中有哪些检测核酸和蛋白质分子量的常规方法？
- 2.质粒 DNA 分离纯化的原理有哪些？
- 3.分离 RNA 的过程中应注意哪些事项？

7.6.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

7.6.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《基因工程》袁葵洲版，第六章（p109-p126）第六章（p109-p126）

7.7 教学单元七

7.7.1 教学日期

第十次课

7.7.2 教学目标

熟悉基因操作中常见的核酸分析技术，会运用相应的核酸分析方法对待测样品进行分析。了解相关的分析软件。

7.7.3 教学内容（含重点、难点）

重 点：生物大分子间的相互作用分析方法。

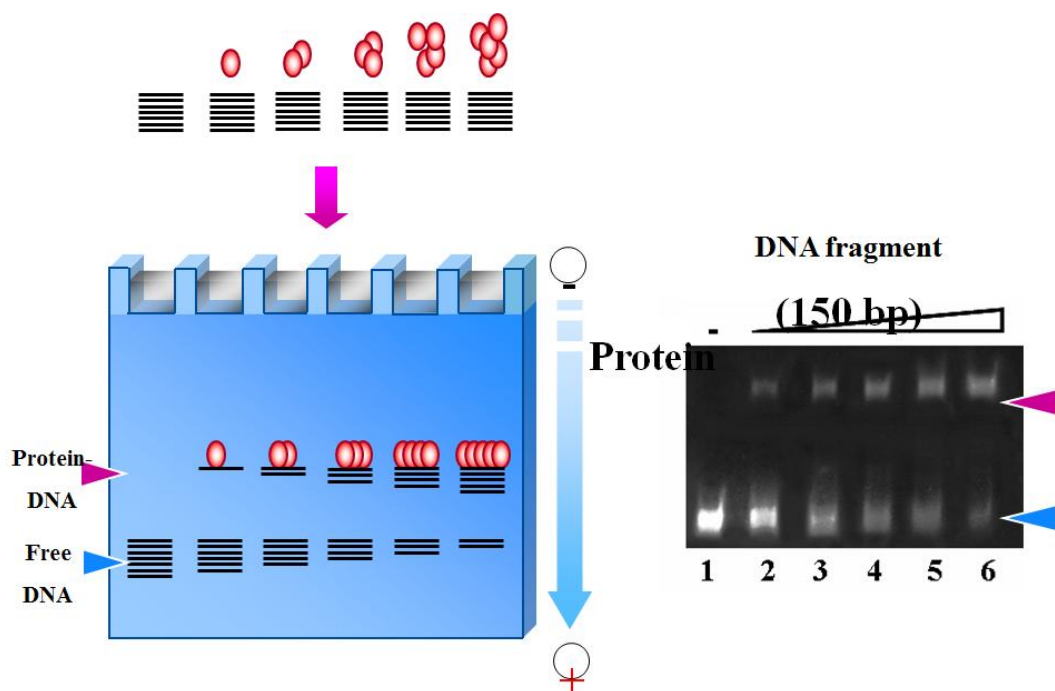
难 点：RNAi 技术的原理。

主要知识点：凝胶阻滞实验，DNase I 足迹实验，酵母杂交技术，染色质免疫沉淀方法分析蛋白质和 DNA 的相互作用，RNAi 的作用机制。

7.7.4 教学过程

一、DNA 和蛋白质相互作用分析

1、凝胶阻滞实验 Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)：研究 DNA 与特异性蛋白的相互作用。将放射性标记的 DNA 片段与纯化蛋白（或提取物中的蛋白混合物）相结合，然后在非变性凝胶中分析该产物。与游离 DNA 相比，蛋白-DNA 复合物的迁移率将降低。与游离 DNA 相对应，结合的 DNA 泳动受到“阻滞”。

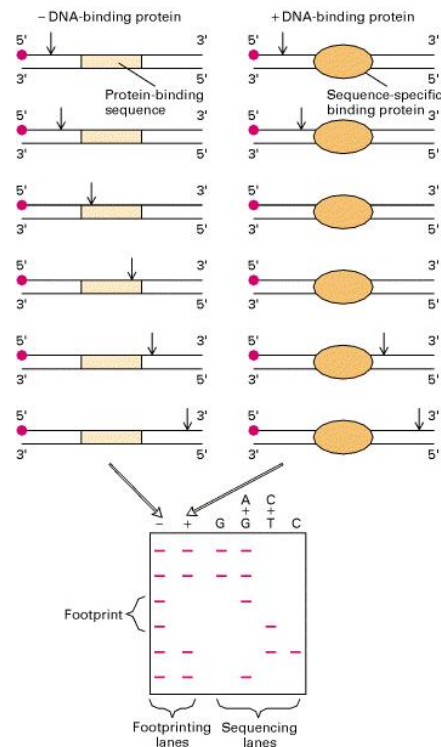


2、染色质免疫沉淀技术（chromatin immunoprecipitation assay，CHIP）

是另一种研究 DNA 序列与蛋白质相互作用的方法。但是与 EMSA 不同的是，它是目前唯一一种（描述错误）研究体内 DNA 与蛋白质相互作用的方法。CHIP 的基本原理是在活细胞状态下固定体内蛋白质-DNA 相互作用的复合物，然后将染色质 DNA 提取出来并将其用超声波随机切断为一定长度范围内的染色质小片段，再通过免疫学方法用某种蛋白质特异的抗体沉淀此复合体，特异性地富集目的蛋白结合的 DNA 片段，通过对目的 DNA 片段的分离、纯化与 PCR 检测，获得 DNA 序列信息，从而确定与特定蛋白质相互作用的 DNA 序列。

3、DNase I 足迹实验：一种确定 DNA 结合蛋白在 DNA 分子上的结合位点的方法。

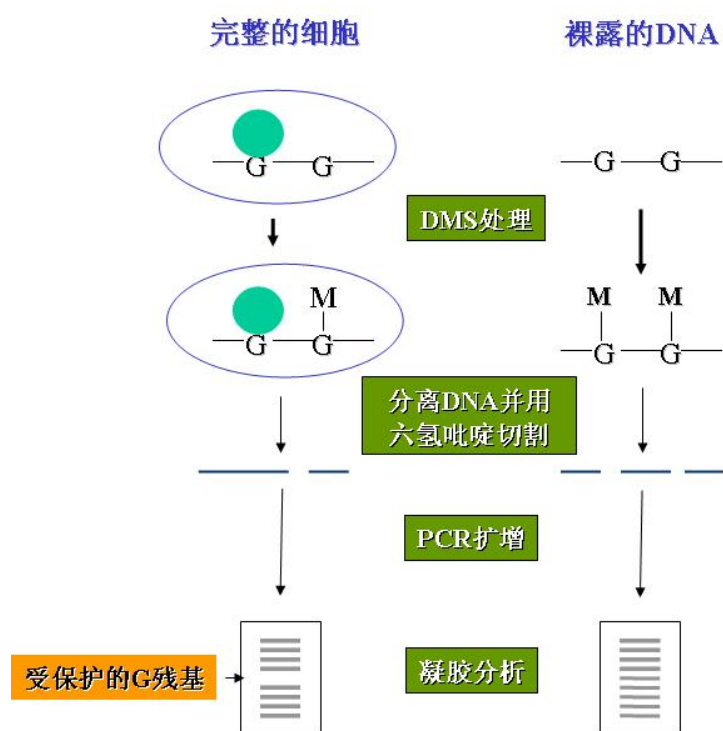
将 DNA 片段进行单链单末端标记，与初步纯化的 DNA 结合蛋白在体外行结合作用，然后加入 DNase I 对 DNA 一蛋白质复合物进行随机切割，产生一系列不同长度的 DNA 片段。DNA 结合蛋白与其特异序列结合后，由于空间位阻等多种效应，DNase I 不能对其进行切割。



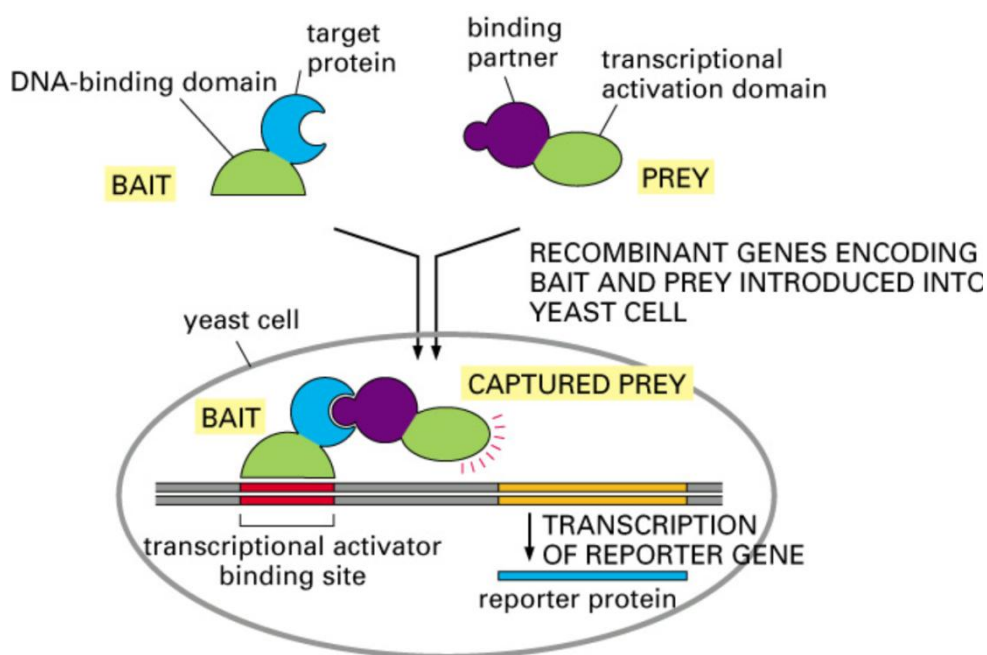
4、体内足迹实验 *in vivo* foot-printing assay: EMSA 法和 DNase I 足迹法都是经典而有效的研究转录因子与 DNA 相互作用的方法，但是它们有一个共同的不足之处：体外进行的实验。因此人们就会怀疑这些实验结果是否能够反映细胞内发生的真实生命过程，即细胞内发生的真实的 DNA 与蛋白质的相互作用情况。

体内足迹试验的原理：

- 1、化学试剂硫酸二甲酯 DMS 能够使 G 残基甲基化；
- 2、六氢吡啶能特异的切割甲基化的 G 残基；
- 3、同蛋白质结合的 DNA 中 G 残基由于受到蛋白质保护而不会被 DMS 甲基化，就不会被六氢吡啶切割；二缺少蛋白保护的 G 残基则会被切割。



5、酵母单杂交技术 (yeast one hybrid system): 真核转录因子如 GAL4 等含有二个不同的结构域: DNA-binding domain 和转录激活结构域(transcription-activating domain)。前者可识别 DNA 上的特异序列, 并使转录激活结构域定位于所调节的基因的上游, 转录激活结构域可同转录复合体的其他成分作用, 启动它所调节的基因的转录。



使两种蛋白 X 和 Y 分别以和 BD/AD 形成杂合蛋白形式在酵母中表达, X 与 Y 之间的相互作用可以将 BD 和 AD 在空间结构上重新联结为一个整体而与报告基因的上游激活序列结合, 进而激活转录, 使受调控的报告基因得到表达。

6、DNA-蛋白质相互作用研究技术的新进展

1. SELEX 与核酸适体技术

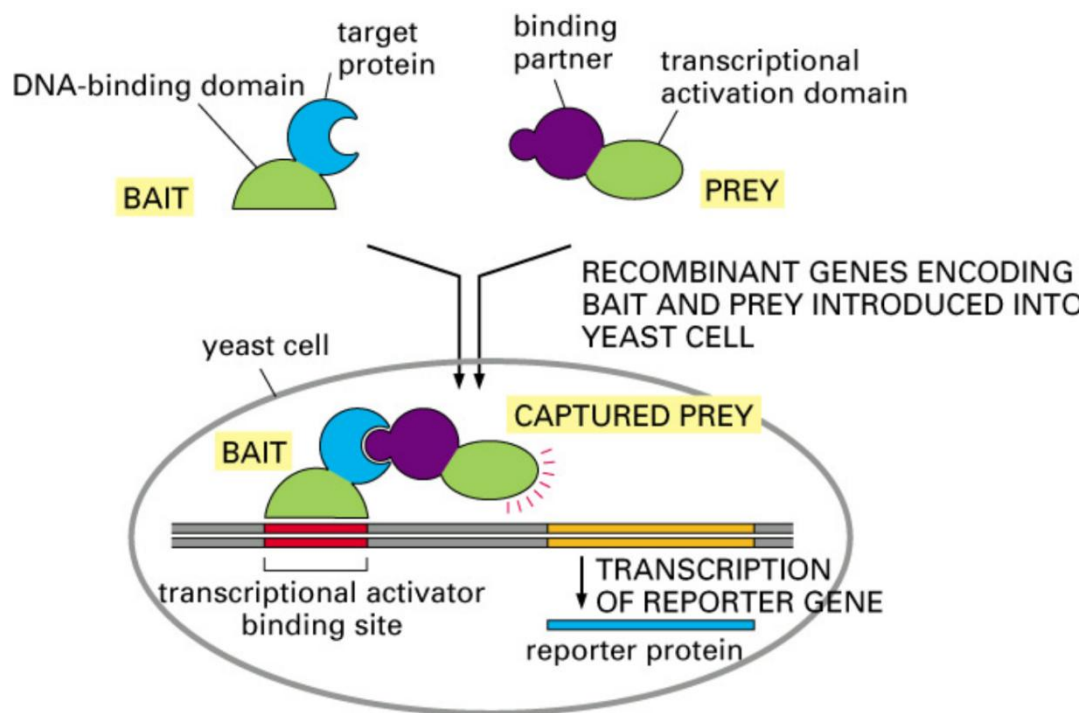
2. 荧光标记技术

3. 扫描探针显微镜技术(scanning probe microscope ,SPM)

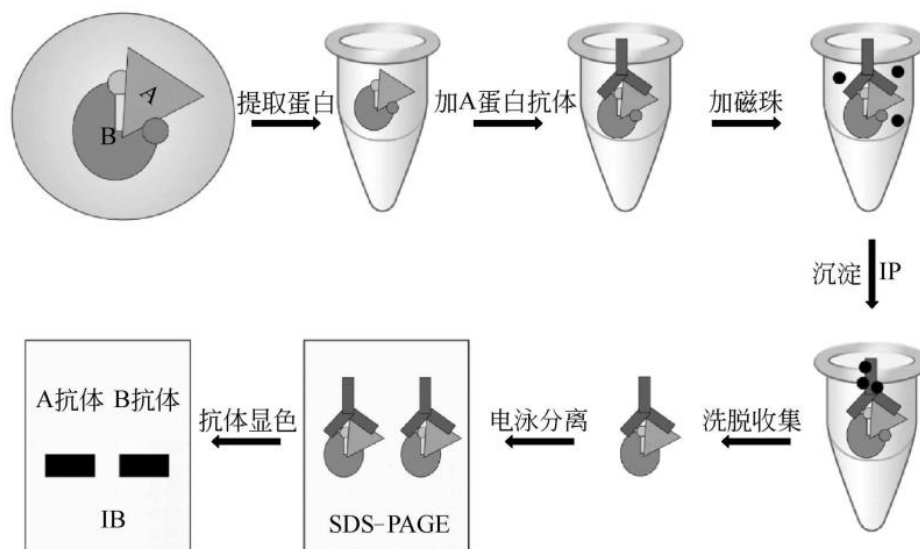
4. 表面等离子共振技术(surface plasma resonance, SPR)

二、蛋白质的相互作用

1、酵母双杂交



2、免疫共沉淀



三、RNA 干扰技术：称转录后基因沉默，指在进化中高度保守的、由双链 RNA 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解现象。早在 1990 年，将全长或部分基因导入植物细胞导致植物某些内源基因能转录但不能表达；1995 年康奈尔大学 Guo 和 Kemphues 发现，给秀丽隐杆线虫注射反义 RNA 可以阻断 par-1 基因的表达，正义链亦可。3 年后，发现双链 RNA 能引起较单链更强的基因沉默现象。他们将这种现象称为 RNA 干扰。

RNAi 的作用机制

RNAi 发生的重要中间效应因子：干扰性小 RNA（small interfering RNA 或 short interfering RNA，SiRNA）

SiRNA 特征：

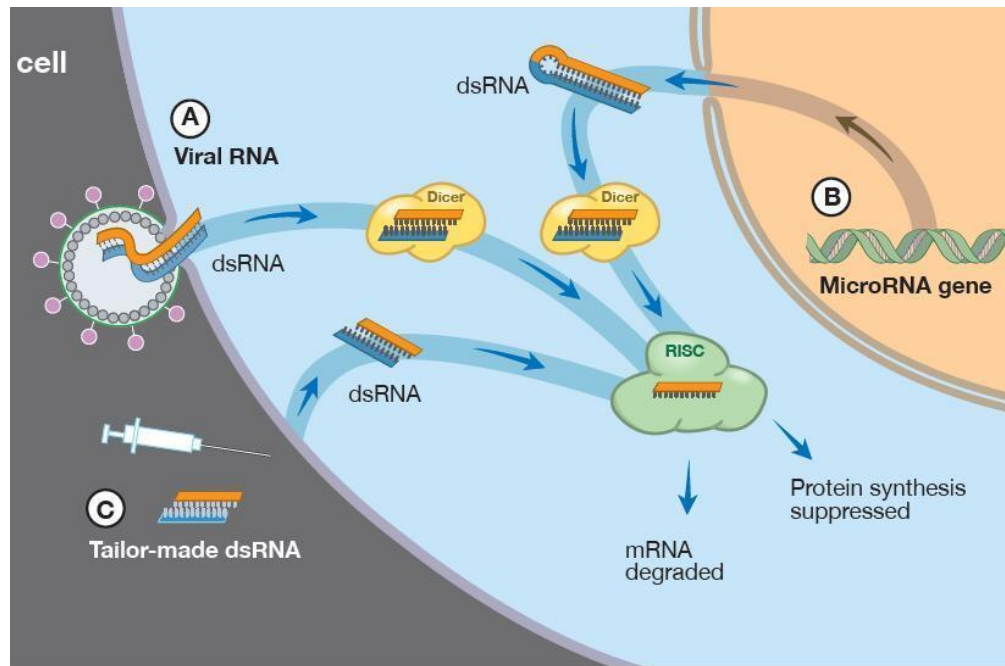
21~25nt 的 dsRNA、与靶 mRNA 序列具有同源性、两条单链末端为 5'磷酸和 3'羟基、每个 3'端均有 2~3 个突出非配对碱基

RNAi 作用阶段：

1.起始阶段 内切核酸酶加工裂解 dsRNA 至 21~25nt 的 SiRNA。

如果蝇、拟南芥、秀丽隐杆线虫、粟酒裂殖酵母菌及哺乳动物中的 Dicer 核酸酶。

2.效应阶段 SiRNA 中反义链指导形成 RNA 诱导的沉默复合体（RNA induced silencing complex, RISC）；激活的 RISC 与 mRNA 结合，在距离 SiRNA 3'端 12 个碱基的位置切割 mRNA。



SiRNA 亦可作为引物，以 mRNA 为模版合成新的 dsRNA，继续上述循环。

RNAi 技术中的关键问题

1. dsRNA 序列的选择

主要选自己知 cDNA 的 ORF 中的基因区域，避免选择①起始密码子下游或终止密码的 50~100 核苷酸位置以内的序列②5'或 3'非翻译区③内含子区域

2.dsRNA 的导入方法

电穿孔、微注射、浸泡法、工程菌喂养法、磷酸钙共沉淀法等

3.发夹样结构的 SiRNA 的使用

能延长在细胞内的作用时间

RNAi 技术的应用

基因治疗方面：特异性高、作用迅速、副反应小、不影响作用细胞的调控系统。2004

年，Acuity Pharmaceuticals 公司向美国食品药品监督管理局（FDA）提交有史来第一个基于 RNAi 的药物 Cand5 的临床研究申请，用来治疗湿性老年黄斑和糖尿病患者的视网膜病变引发的失明

7.7.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授、案例分析和课堂讨论的形式进行。

7.7.6 作业安排及课后反思

- 1.分析 DNA-蛋白质的相互作用方法有哪些，各有何特点？
- 2.酵母单杂交与酵母双杂交有何异同？
- 3.RNA 干扰的技术原理是什么，并说明该技术可以利用在哪些领域？

7.7.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

7.7.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《基因工程》袁蓼洲版，第七章（p241-244,p249-256）

7.8 教学单元八

7.8.1 教学日期

第十一次课（10.18）

7.8.2 教学目标

掌握 PCR 的原理和方法。会合理设计 PCR 引物，利用相关的生物信息学软件。

7.8.3 教学内容（含重点、难点）

重 点：PCR 技术的应用领域。

难 点：PCR 技术原理和工作方式，PCR 体系当中各个组分的作用。

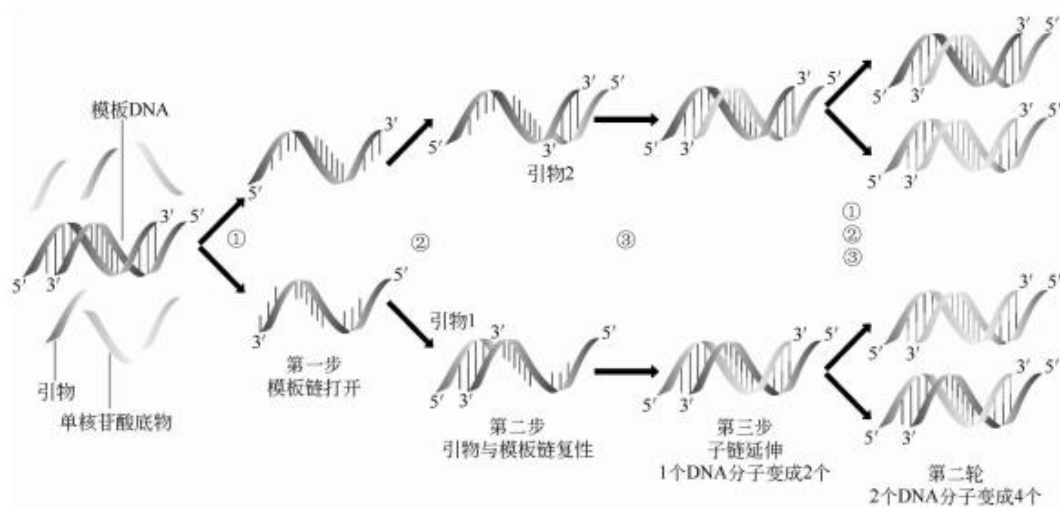
主要知识点：PCR 反应体系的基本要素，PCR 的扩增步骤，PCR 反应程序的设置，

T/A 克隆法克隆 PCR 产物的过程，反向 PCR，利用接头的 PCR，与反转录相关的 PCR，荧光实时定量 PCR。

7.8.4 教学过程

PCR, polymerase chain reaction 是 80 年代发展起来的新技术，广泛应用于分子生物学(molecular biology)和基因工程(gene engineering)及其它与 DNA 鉴定相关的其它领域，如疾病检测、临床应用、商品检疫、法医鉴定和新药品的开发等。PCR 是指那些模拟体内 DNA 复制的方式在体外选择性地扩增 DNA 某个特殊区域的技术，PCR 过程在自然界是不存在的，它是人们对 DNA 复制的深刻理解而带来的产物。现代 PCR 概念是 Kary Mullis 于 20 世纪 80 年代早期发明的。经过与 Cetus 公司的同事合作，最终导致现在广泛使用的 PCR 技术的诞生。PCR 概念的出现与其它许多好的想法出现的一样，是许多现成技术累积的结果，是科学技术发展的必然产物。比如寡核苷酸的合成技术、通过 DNA 聚合酶用寡核苷酸指导 DNA 的合成。Mullis 的创新点在于使用两个与 DNA 的两条不同链互补的寡核苷酸作为引物特异性地扩增两个引物之间的 DNA 区域，并且重复进行。在此同时，得到的扩增产物又可作为下一轮扩增的模板，从而使得扩增产物按几何级数递增。特别重要的是，从嗜热细菌中分离的耐热 DNA 聚合酶的发现使 PCR 从概念成为真正适用的技术。

扩增原理：PCR 技术的基本原理类似于 DNA 的天然复制过程，其特异性依赖于与靶序列(target sequence)两端互补的寡核苷酸引物(primer)。



PCR 扩增的步骤

由变性(denature)--退火(annealing)--延伸(extension)三个基本反应步骤构成：模板 DNA 的变性(denature)：模板 DNA 经加热至 93℃左右一定时间后，使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应作准备；模板 DNA 与引物的退火(annealing)(复性)：模板 DNA 经加热变性成单链后，温度降至 55℃左右，引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合；引物的延伸(extension)：DNA 模板--引物结合物在 Taq DNA 聚合酶的作用下，以 dNTP 为反应原料，靶序列为模板，按碱基配对与半保留复制原理，合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链。重复循环变性--退火--延伸三过程，就可获得更多的“半保留复制链”，而且这种新链又可成为下次循环的模板。能将待扩目的基因放大几百万倍。

PCR 反应体系

1.缓冲液 buffer (1×)

50mM KCl 引物退火 annealing

10mM Tris·HCl pH 8.3-9.0

1.5mM MgCl₂ (0.5-2.5)

特异性和产率(-20℃保效，Mg²⁺不含沉淀析出)

0.01%明胶(0.1% Triton-100)

2.三磷酸脱氧核苷 (dNTP)

终浓度 0.2mM (即饱和浓度) (pH7.0), 4 种 dNTP 应平衡, 提高忠实性, 使用时应考虑 Mg^{2+} 、引物和产量之间的关系, 如序列分析和制备探针时, 用 20-40 μ M。

3.引物 primers

各 1 μ m, 即 1pmol/ μ l

引物设计原理

① 长度至少 16bp, 通常 20-30bp

② $T_m = 81.5 + 16.61 \log[J^+] + 0.41(G+C)\% - (675/N)$

N:链长, J: 单价离子浓度

若 N=20 G+C%=55% $[J^+] = 60\text{mmol/L}$

则 $T_m = 81.5 - 20.3 + 22.6 - 33.75 = 50.05$

4.模板 template

1 μ g 人类单拷贝基因组 DNA	3×10^5 targets
10ng yeast DNA	3×10^5
1ng <i>E.coli</i> DNA	3×10^5
1ng 1kb DNA	9×10^6
1% M13 plaque	10^6

5.DNA 聚合酶 (DNA polymerase)

PCR 反应程序

1.常用程序

94-96 $^{\circ}\text{C}$ 预加热 10-几分钟/加酶

94 $^{\circ}\text{C}$ 30''

55°C 30''

72°C 1'

72°C 3-7min

4°C



不同种类的 PCR

反向 PCR (inverse PCR)

接头 PCR

热不对称交错 PCR

重叠延伸 PCR

原位 PCR

巢式 PCR

多重 PCR

随机扩增多态性 DNA (RAPD)

逆转录 PCR

RACE-PCR

实时荧光定量 PCR

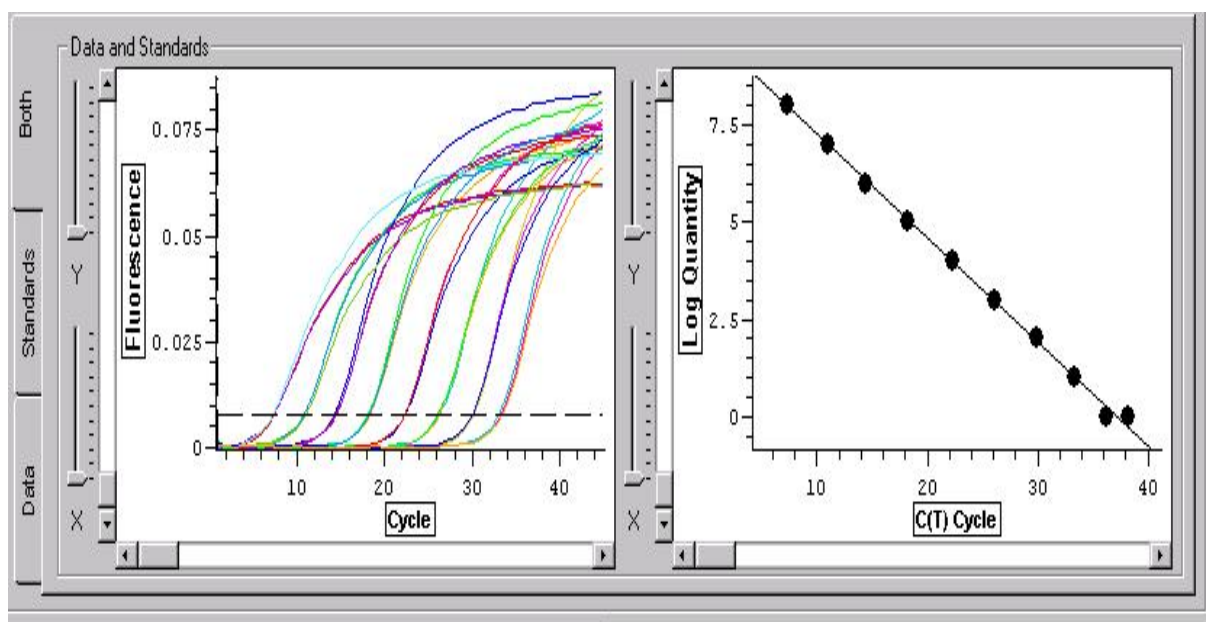
环介导等温扩增技术 (LAMP)

与反转录相关的 PCR: mRNA----cDNA---- 随机引物。如 10 碱基成对引物, 单个 18 碱基引物(cDNA 合成, 单一引物) 一、cDNA 末端 5'端的快速扩增。1. cDNA5'端的快速扩增。设计靠近 5'端区域序列对应的特异性引物, 扩增出新的 cDNA 第一链; RNase 降解模版 mRNA, 纯化 cDNA 第一链; 用末端转移酶在 cDNA 第一链 3'端加同聚物尾 C; 最后用特异性引物和复合引物对加尾的 cDNA 第一链扩增。2. cDNA3'端的快速扩增方法类似 cDNA5'端的快速扩增。二、差异显示 PCR (differential display PCR, DD-PCR) 用于检测相似生物材料的基因表达谱差异。1. 用一套锚定引物反转录待检测的 2 个材料合成 cDNA 第一链。2. 用一套随机引物和锚定引物对每一个 cDNA 组分进行 PCR 扩增。3. 电泳分离产生的 PCR 产物。4. 从凝胶中回收特异显示的 DNA 条带并克隆。5. 以克隆到的特异显示 DNA 为探针, 用 RNA 分析技术 (Northern 杂交等) 验证差异表达真实性。

实时定量 PCR

常规 PCR 技术: 对 PCR 扩增反应的终产物进行定量及定性分析。

定量 PCR 技术: 对 PCR 扩增反应中每一个循环的产物进行定量及定性分析。



7.8.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授、案例分析和课堂讨论的形式进行。

7.8.6 作业安排及课后反思

1. 如何理解 PCR 扩增的原理和过程？
2. PCR 扩增的温度有哪些要求？
3. PCR 产物的克隆与一般的 DNA 片段的克隆有何异同点？

7.8.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

7.8.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《基因工程》袁蓂洲版，第四章（p95-p114）

7.9 教学单元九

7.9.1 教学日期

第十二次课（10.18）

7.9.2 教学目标

通过课堂讲授，了解常见的 DNA 序列分析方法，掌握 Sanger 双脱氧链终止法的原理，步骤，以及对基因工程研究领域的意义。了解二代测序方法的种类和原理。

7.9.3 教学内容（含重点、难点）

重 点：Sanger 双脱氧链终止法的原理。

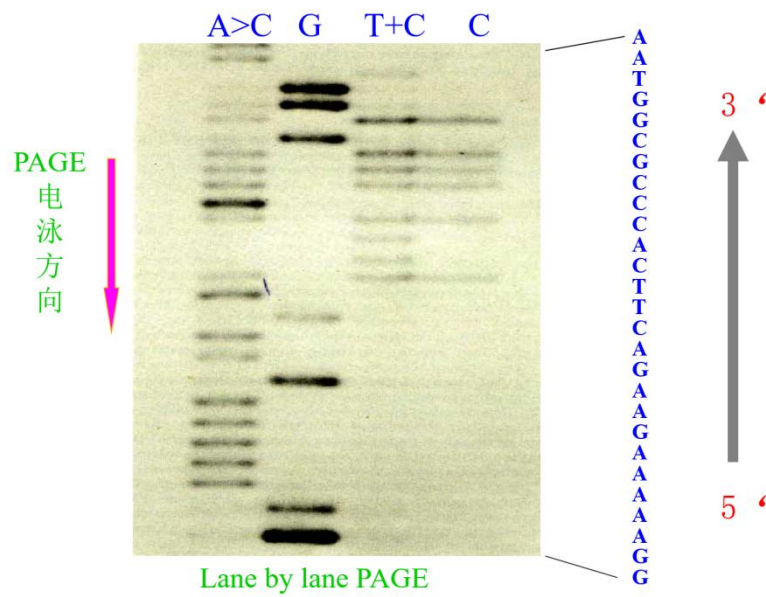
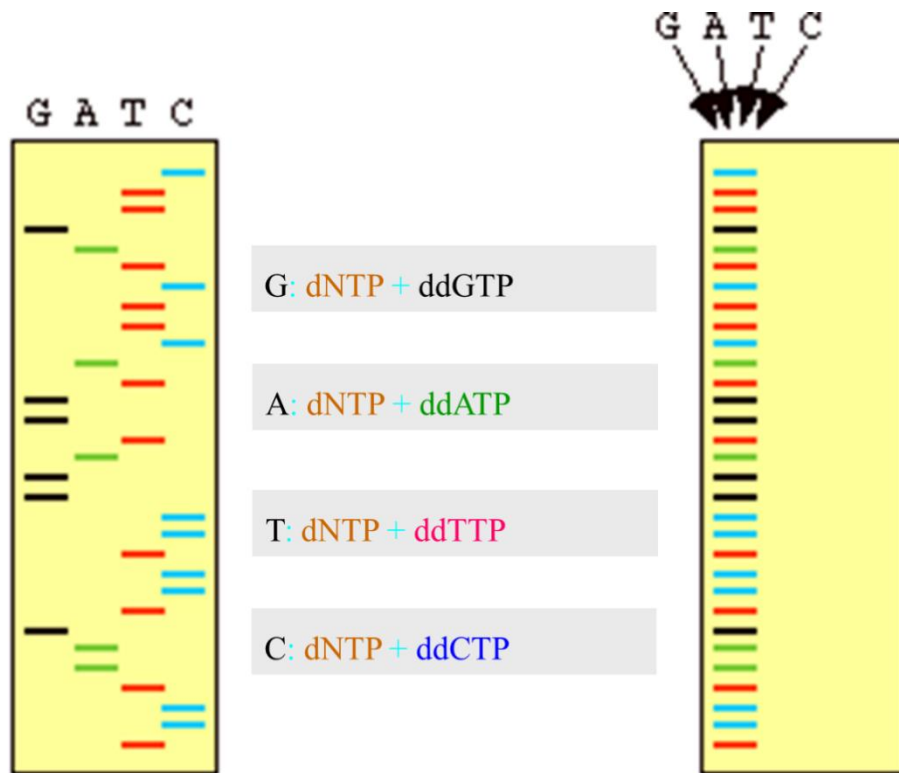
难 点：测序引物的设计，测序峰图的阅读。

主要知识点：Maxam-Gilbert 化学降解法测序技术，Sanger 双脱氧链终止法，序列分析的基本步骤，454 测序技术，solexa 测序技术基本步骤，SOLID 测序技术，DNA 片段序列测定的策略，转录组测序。

7.9.4 教学过程

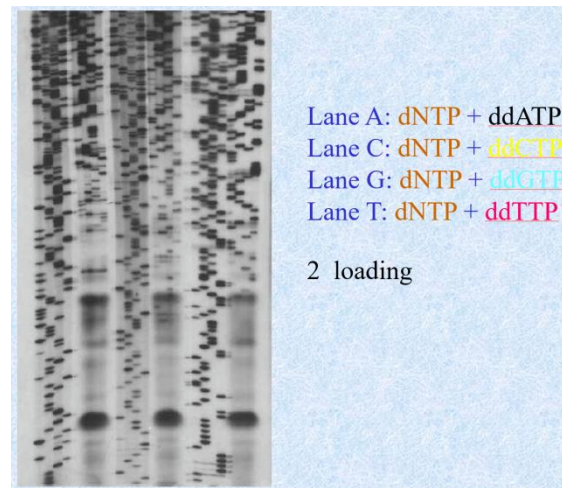
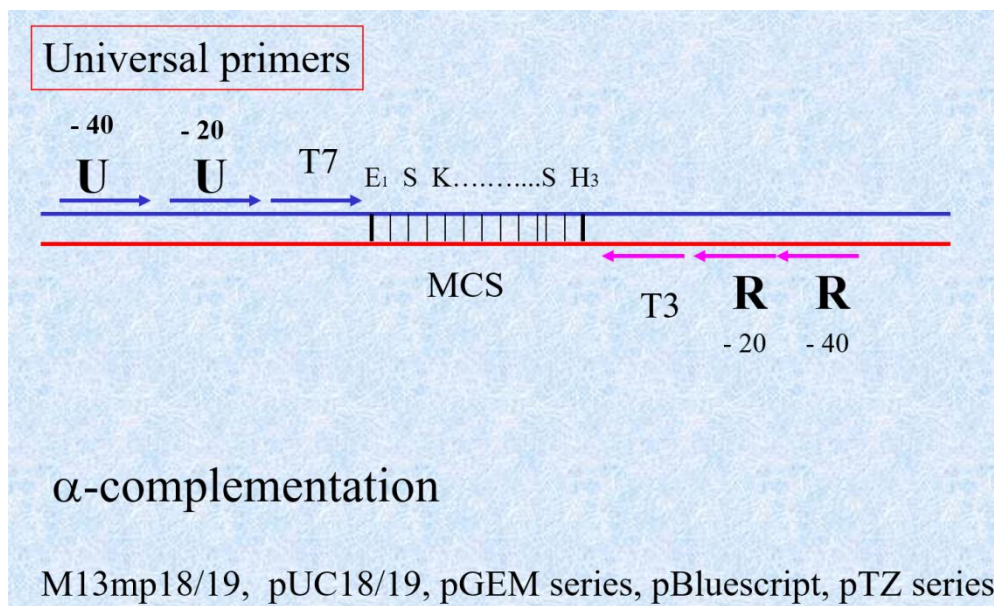
Maxam-Gilbert 化学降解法测序技术（DNA sequencing by chemical degradation）

直接或间接特异性识别 4 种碱基，生成起始于固定起点和终止于特定碱基的一组核苷酸片段。特定化学试剂可对碱基进行特异性修饰，在修饰碱基处(5'或 3')打断磷酸二酯键。G 反应：硫酸二甲酯 DMS 使 G 鸟嘌呤的 7 位氮原子甲基化，其后断开第 8 位碳原子和第 9 位氮原子间的化学键，哌啶置换了被修饰鸟嘌呤与核糖的结合。G+A 反应：甲酸使嘌呤环上的氮原子质子化，削弱了腺嘌呤脱氧核糖核苷酸和鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸中的糖苷键，然后哌啶置换了嘌呤。T+C 反应：胍断开了嘧啶环，产生的碱基片段能被哌啶所置换。C 反应：在 NaCl 存在时，只有 C 才能与胍发生反应，随后被修饰的胞嘧啶被哌啶置换。



Lane by lane PAGE

Sanger 双脱氧链终止法



第二代测序技术

454	Solexa	SOLiD
100MB	1GB	4G
250bp	35bp	35bp

2005 年底，罗氏诊断公司和 454 公司推出了——Genome Sequencer 20 System (GS 20)，2007 年推出了通量更大，读长更长，准确性更高的第二代基因组测序系统——Genome Sequencer FLX System (GS FLX)。

1) 样品种类：GS FLX 系统支持各种不同来——°72

源的样品序列测定：包括基因组 DNA，PCR 产物，BAC，cDNA，小分子 RNA 等等。

2) 样品 DNA 打断：样品例如基因组 DNA 或者 BAC 等被打断成 300—800 bp 的片段；对于小分子的非编码 RNA，这一步骤则不需要。短的 PCR 产物则可以利用 GS 融合引物进行扩增后直接进行步骤 4) 的工作。3) 衔接子连接：借助一系列标准的分子生物学技术，将 A 和 B 接头（3' 和 5' 端具有特异性）连接到 DNA 片段上。接头也将在后继的纯化，扩增和测序步骤中用到。图中仅仅显示了后续步骤中要用到的单链的 DNA 片段。4) 一条 DNA 片段 = 一个磁珠：接头使成百上千条 DNA 片段结合到它们自己唯一的磁珠上，此磁珠被单个油水混合小滴包被后，在这个小滴里进行独立的扩增，而没有其他的竞争性或者污染性序列的影响；整个 DNA 片段进行平行扩增。5) 一个磁珠 = 一条读长：经过 PCR 扩增后，每个磁珠上的 DNA 片段拥有了成千上万个相同的拷贝。经过富集以后，这些片段仍然和磁珠结合在一起，随后就可以放入到 PicoTiterPlate 板中供后继测序使用了。6) 数据读取和分析工具：GS FLX 系统在 7.5 小时的运行当中可获得 40 多万个读长，读取超过 1 亿个碱基信息。GS FLX 系统提供三种不同的生物信息学工具对测序数据进行分析，适用于不同的应用：例如多达 3GB 序列的重测序，对比已知参考序列进行的扩增产物差异分析，及 120 MB 的从头测序工作等。

步骤：1) 样品种类：GS FLX 系统支持各种不同来源的样品序列测定：包括基因组 DNA，PCR 产物，BAC，cDNA，小分子 RNA 等等。2) 样品 DNA 打断：样品被打断成 300—800 bp 的片段；3) 衔接子连接：将 A 和 B 接头（3' 和 5' 端具有特异性）连接到 DNA 片段上。接头也将在后继的纯化，扩增和测序步骤中用到。4) 一条 DNA 片段 = 一个磁珠：接头使成百上千条 DNA 片段结合到它们自己唯一的磁珠上，此磁珠被单个油水混合小滴包被后，在这个小滴里进行独立的扩增，而没有其他的竞争性或者污染性序列的影响；整个 DNA 片段进行平行扩增。5) 一个磁珠 = 一条读长：经过 PCR 扩增后，每个磁珠上的 DNA 片段拥有了成千上万个相同的拷贝。经过富集以后，这些片段仍然和磁珠结

合在一起，随后就可以放入到 PicoTiterPlate 板中供后继测序使用了。6) 数据读取和分析工具：GS FLX 系统 在 7.5 小时的运行当中可获得 40 多万个读长(200bp)，读取超过 1 亿个碱基信息(100MB)。

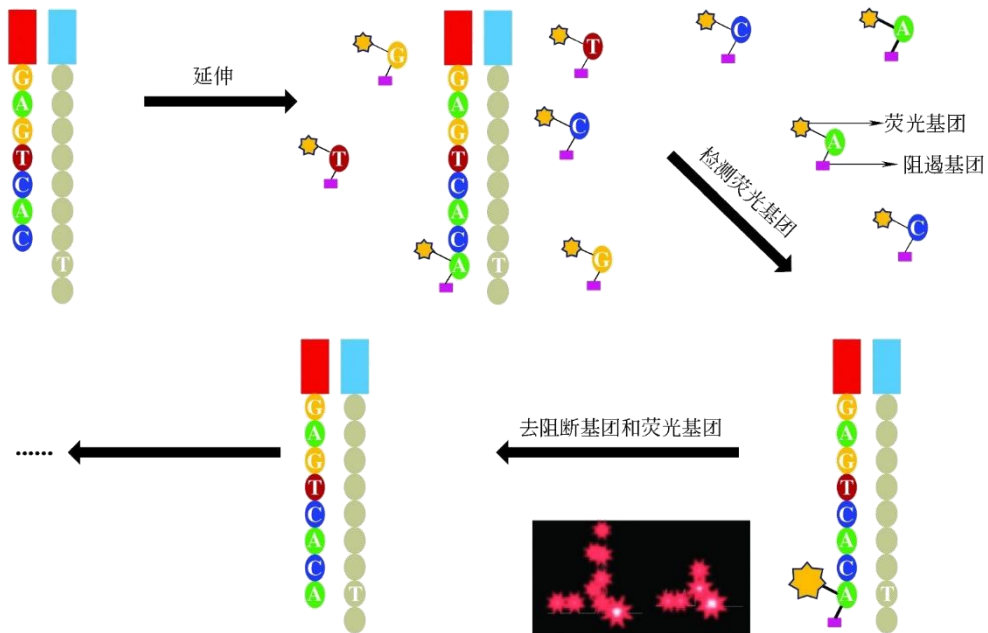
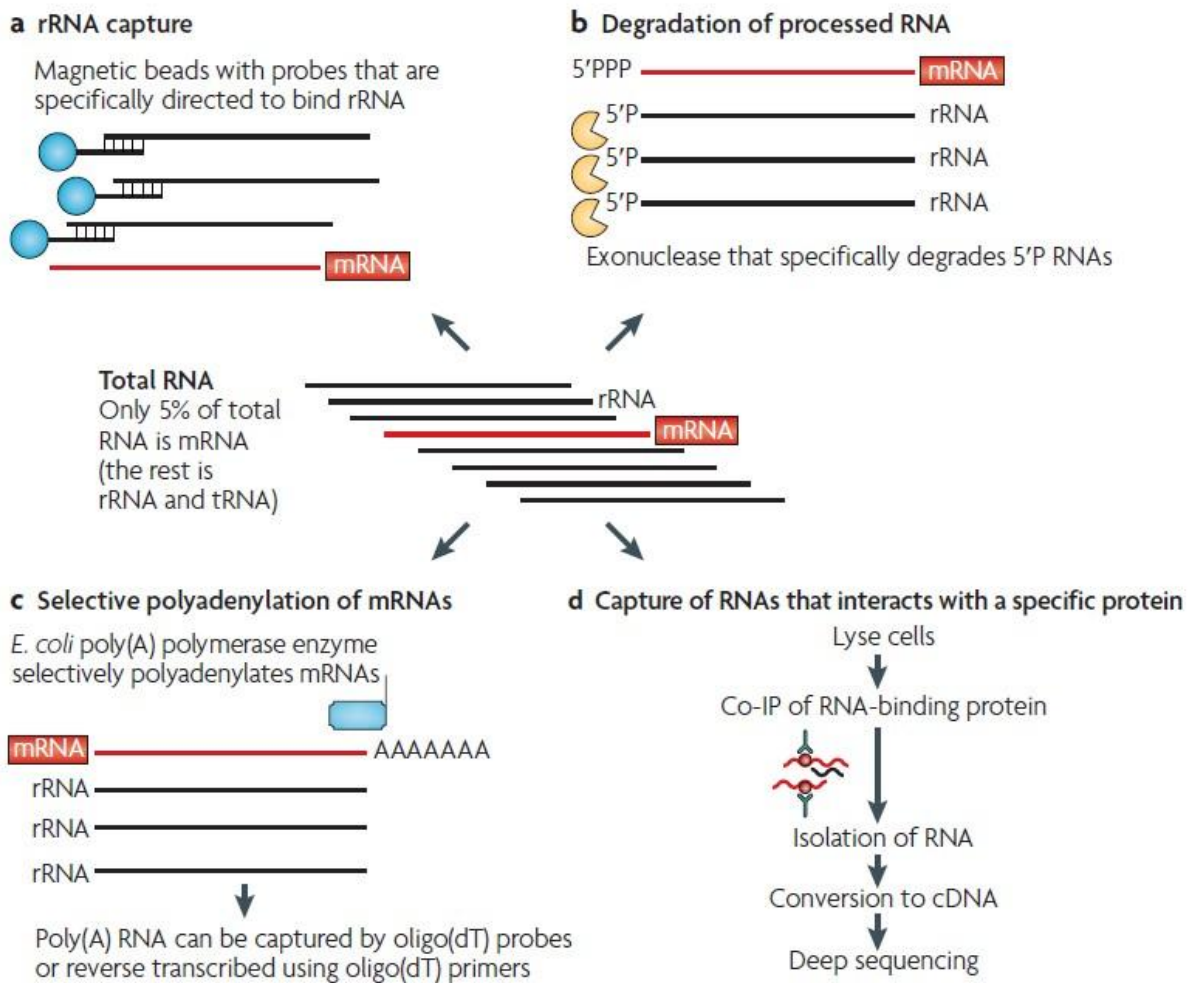


图 6.27

转录组测序

细胞中所有转录产物的群体构成了该物种和特定组织或细胞的转录组 (transcriptome)，包括 mRNA、rRNA、tRNA 及非编码 RNA。2008 年，高通量的第二代测序技术出现后，可用于深度测定转录组序列，从而演变成一种 RNA 测序技术，即 RNA sequencing (RNA-seq) 技术。





基因数据库和分析工具

1. 基因数据库

世界上的三大数据库，美国的 GenBank、欧洲的 EMBL、日本的 DDBJ

2. 基因分析工具

在 NCBI 网站上提供了许多基因分析工具和其他分析网站的连接点。

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

EMBL: <http://www.ebi.ac.uk>

Sanger 中心: <http://www.sanger.ac.uk>

ExPASy: <http://www.expasy.ch>

7.9.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授、案例分析和课堂讨论的形式进行。

7.9.6 作业安排及课后反思

- 1.简述双脱氧链终止法即 Sanger 测序方法的基本原理，并简述其应用范围和发展？
- 2.对未知的 100kb DNA 片段，如何设计测序方案？
- 3.在获得了一段未知 DNA 片段的序列后，可做哪些基本的分析工作？

7.9.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

7.9.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《基因工程》袁蓂洲版，第六章（p169-p180）

7.10 教学单元十

7.10.1 教学日期

第十三次课（10.21）

7.10.2 教学目标

了解通过 DNA 诱变可能产生的新物种。对比 DNA 诱变的好处与坏处。掌握利用 DNA 诱变产生新的具有优良性状物种的方法、思路。

7.10.3 教学内容（含重点、难点）

重 点：突变是研究基因结构与功能的最基本手段。

难 点：利用体外诱变方法对克隆化的 DNA 进行诱变处理的步骤。

主要知识点：错误掺入诱变，盒式诱变，化学诱变的方法，DNA 洗牌法，交错延伸重组，随机引发重组，寡核苷酸介导的定点诱变，PCR 介导的定点诱变，嵌套缺失。

7.10.4 教学过程

一、定点突变技术：化学合成能与野生型 DNA 靶序列退火并携带所需突变的寡核苷酸；
—°76

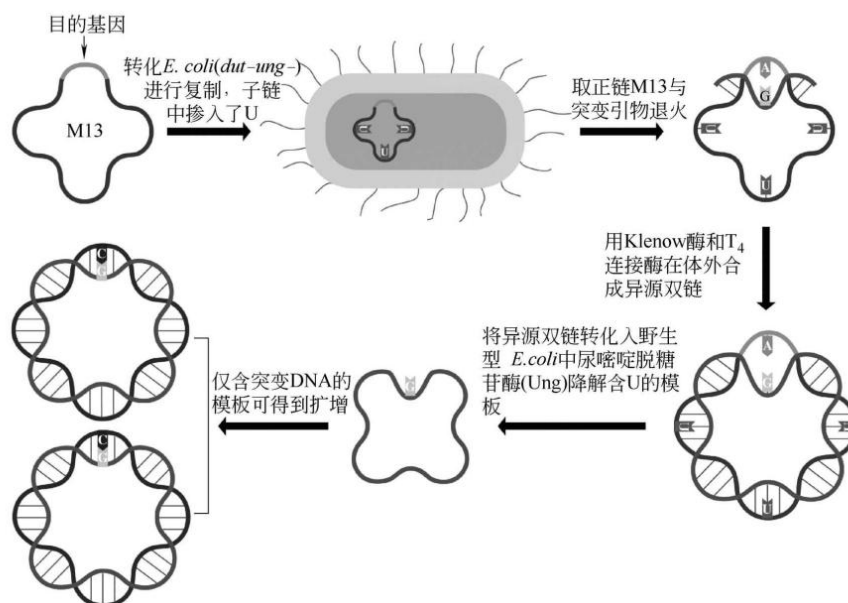
DNA 聚合酶产生含有预定突变的双链 DNA；模板 DNA 的排除；突变体 DNA 测序，验证靶点突变。

Kunkel 法 或称 “U”法

dut⁻ dUTP 酶(dUTPase)缺陷：细胞不能把 dUTP 转化为 dUMP, 因此细胞内 dUTP 的含量大为增加，其中一些 dUTP 可掺入 DNA 中正常情况下由胸苷嘧啶占据的位置。

ung⁻ UDG 酶缺陷,：UDG 酶[尿嘧啶(uracil) -N-糖基化酶(glycosylase)]可除去掺入 DNA 中的尿嘧啶残基。

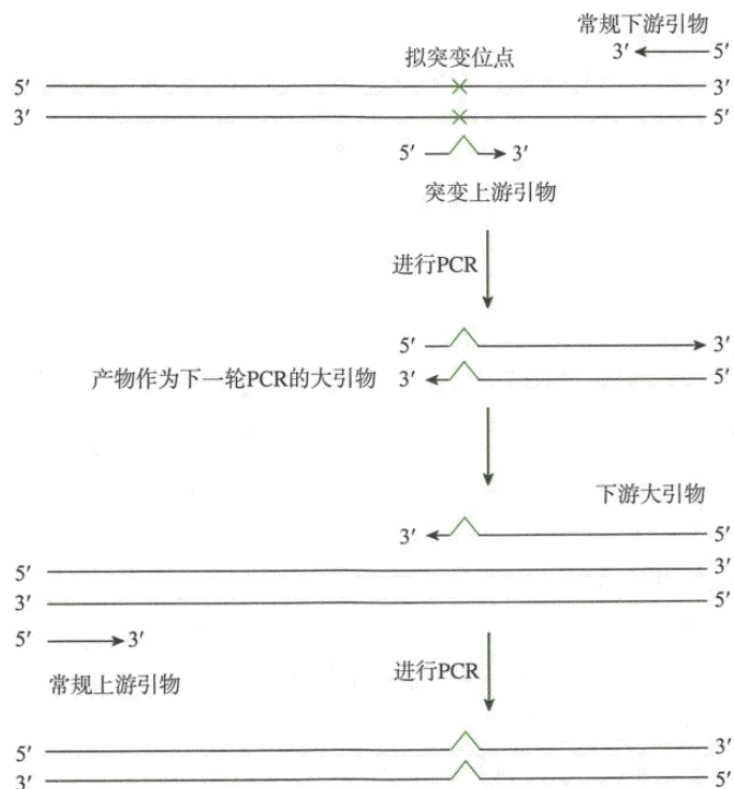
E.coli (dut⁻ / ung⁻)：合成的 DNA 含有尿嘧啶，M13 噬菌体 DNA 中将含有 20-30 个尿嘧啶碱基。



PCR 介导的定点诱变

第一轮 PCR：致突变引物与邻近的侧翼引物扩增出带诱变位点的小片段。

第二轮 PCR：获得的小片段也就是大引物，与另一侧翼引物配对，扩增出全长且带有突变位点的片段。



二、随机重组技术

1、易错 PCR 法

2、DNA 改组 DNA shuffling

3、随机引发重组 Random-priming recombination

7.10.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授、案例分析和课堂讨论的形式进行

7.10.6 作业安排及课后反思

1. DNA 诱变有哪些种类，各有何特点？
2. PCR 应用在 DNA 诱变过程中有何优势？
3. 通过 PCR 如何将两段 DNA 片段在任意指定的位点进行连接？

7.10.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

7.10.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《基因工程》袁葵洲版，第四章（p116-121）

7.11 教学单元十一

7.11.1 教学日期

第十四次课（10.25）

7.5.2 教学目标

了解构建 DNA 文库的目的及意义；掌握利用 DNA 文库进行目的基因筛选的原理、方法和操作步骤。

7.11.3 教学内容（含重点、难点）

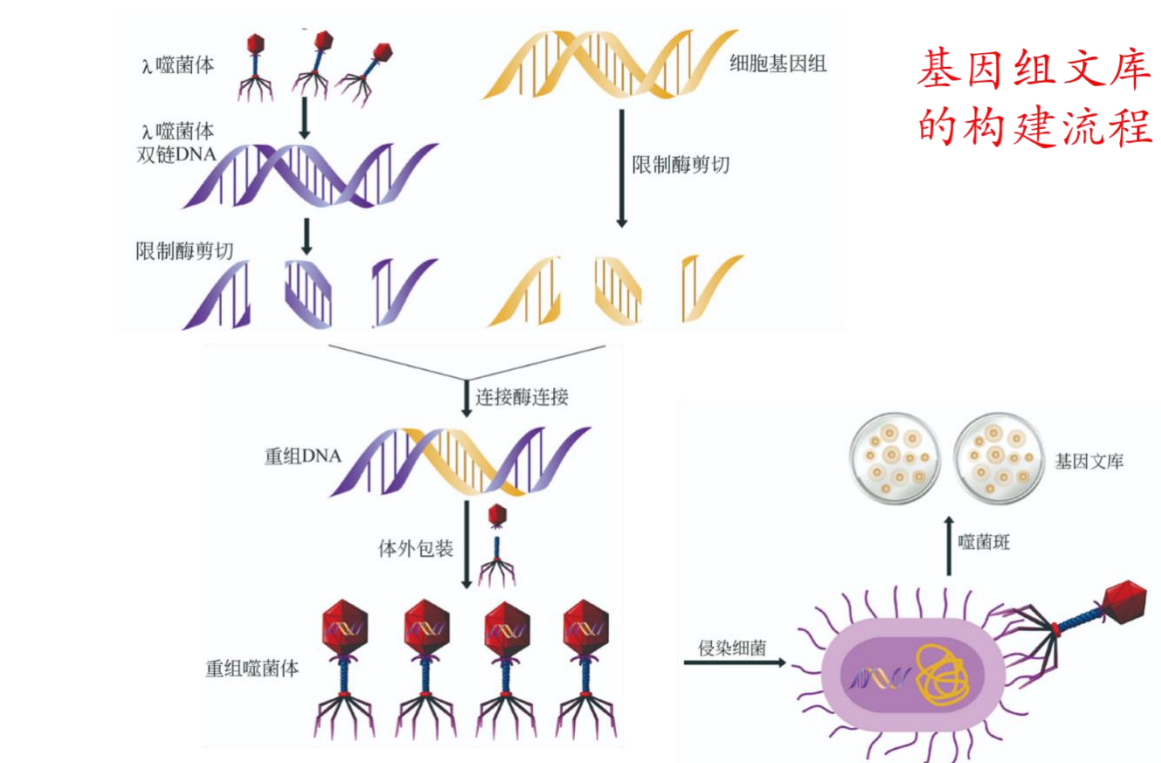
重 点：DNA 文库的构建和目的基因的筛选的目的意义。

难 点：基因组 DNA 文库构建的步骤。

主要知识点：质粒文库，噬菌体文库，黏粒文库，人工染色体文库，cDNA 文库的构建，SMART 全长 cDNA 文库的构建方法。

7.11.4 教学过程

基因文库（Gene library）：由大量的含有基因组 DNA（即某一生物的全部 DNA 序列）的不同 DNA 片段的克隆所构成的群体，称之为基因文库。一个完全的基因文库，应该能够保证从中筛选到目的基因。即—Genomic library。cDNA 文库：若这些大量的重组 DNA 分子所含的外源 DNA 不是基因组 DNA，而是由某一生物的特定器官或特定发育时期细胞内的 mRNA 经反转录形成的 cDNA，它们所构成的重组 DNA 克隆群体，则称之为 cDNA 基因文库。



基因组 DNA 文库的类型和发展

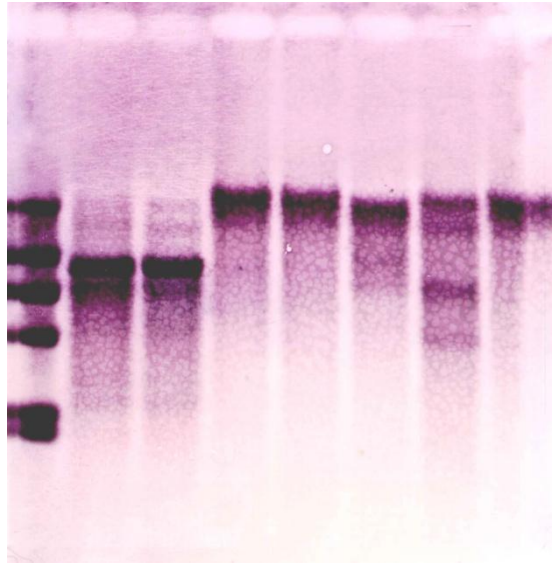
1. 质粒文库（容纳外源 DNA 在 10kb 以内）
2. 噬菌体文库（噬菌体载体、M13 单链噬菌体载体等）
3. 黏粒文库（用于构建小基因组物质 DNA 文库）
4. 人工染色体文库（容纳外源 DNA 在 100kb~1Mb）
5. 亚基因组文库：用基因组 DNA 的特定部分所构建的基因文库（质粒 DNA，线粒体 DNA，特定限制性片段）

如无特殊需要(如单个λ phage 不能包容靶基因片段或要分离一系列跨过染色体 DNA 特大区段的重叠克隆时)一般不采用 cosmid, 因其在构建文库和贮存文库比λ phage 困难得多。YAC 可用于克隆 500kb 以上，甚至几 Mb 的 DNA 片段；BAC 可减少 DNA 分子间的重组。

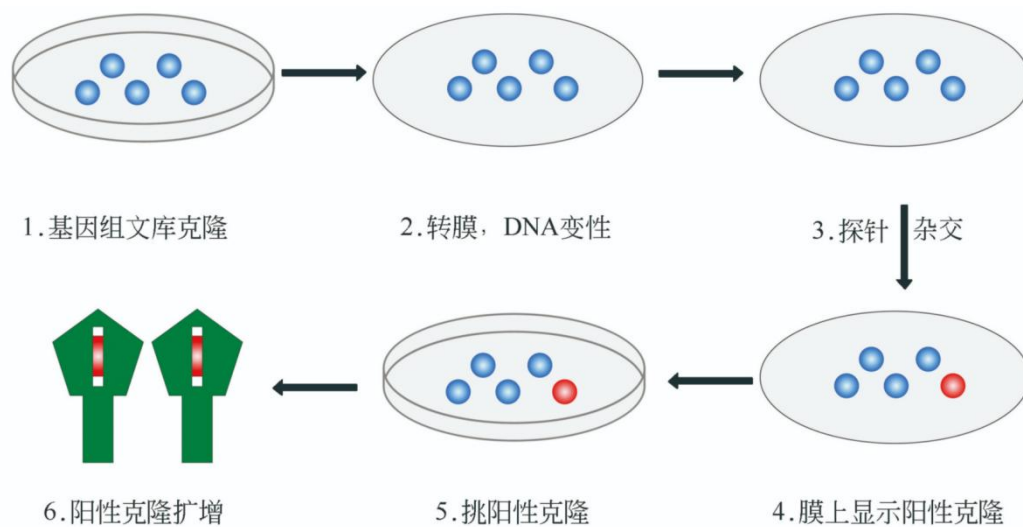
选择载体要考虑的因素：易于从重组噬菌体中回收插入的外源 DNA；易于制备两臂；载体的可知性，如序列，图谱；载体臂上的琥珀突变；利用特殊筛选系统；重组体

中有活性的 *gam* 基因；载体臂上的 *chi* 序列。

噬斑原位杂交：将噬菌体以一定密度铺于平板，并影印到固相膜上。要从哺乳动物 DNA 文库里筛选出目标基因，哺乳动物基因组复杂度为 3×10^9 bp，必须筛选几十万个噬斑。



例如 将基因组 DNA 用多种限制性内切酶切割，通过 Southern 杂交，发现目标基因在 8.3kb *Spe*I 片段上，则将 *Spe*I 切割的基因组 DNA 中的~8.3kb 片段回收，用于构建 DNA 文库。

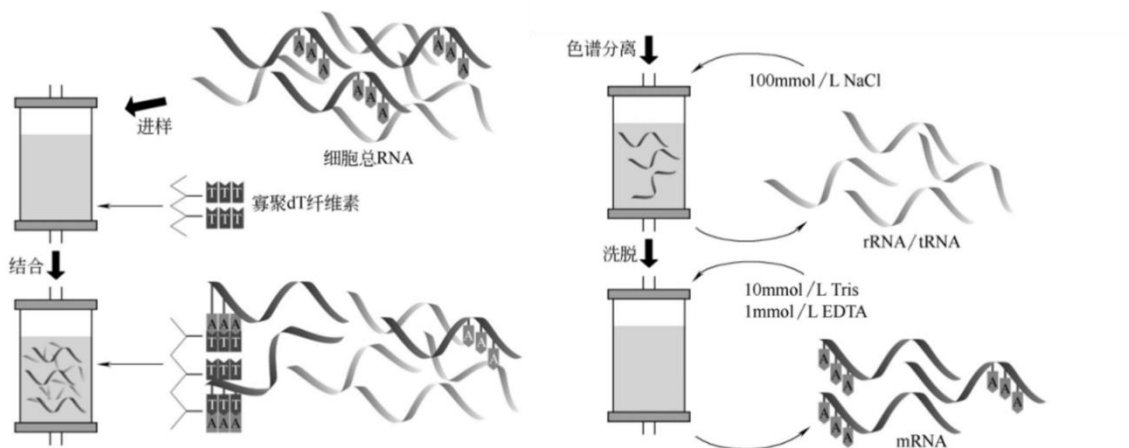


基因组文库中筛选目的基因

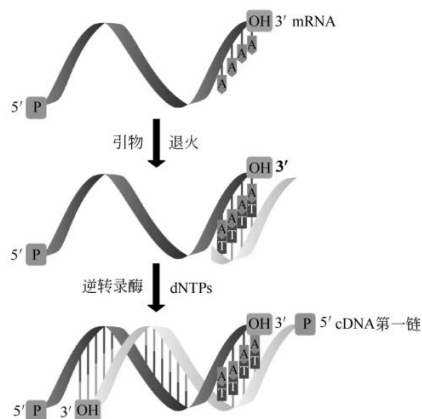
cDNA 文库的特征和发展:自 20 世纪 70 年代中期首次合成 cDNA 以来,运用 cDNA 文库进行基于克隆和基因功能研究发展很快, cDNA 文库已成为分子生物学研究的基本工具; cDNA 文库的取材最好选取目的基因表达最高的发育时期; 基因表达量差异决定构建 cDNA 文库的容量。

多聚核糖体的免疫学纯化法:用抗体来纯化合成的目的多肽的多聚核糖体; 免疫亲和柱/A 蛋白-Sepharose 柱, 单克隆抗体把正在合成新生链的多聚核糖体结合到 A 蛋白-Sepharose 柱上, 随后用 EDTA 解离下来, 通过 oligo(dT)层析分离 mRNA。此法分离的 mRNA 只占总 mRNA 的 0.01-0.05%。并非都可用, 根据材料\来源\特异性来选择。

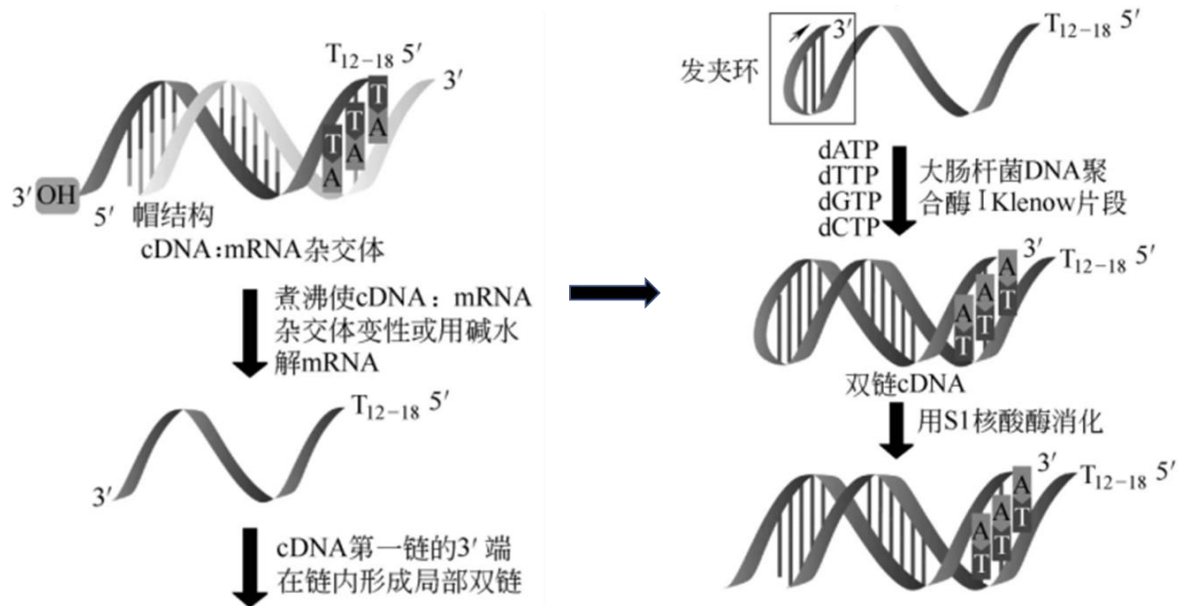
步骤 1 总 RNA 的提取和 mRNA 的分离



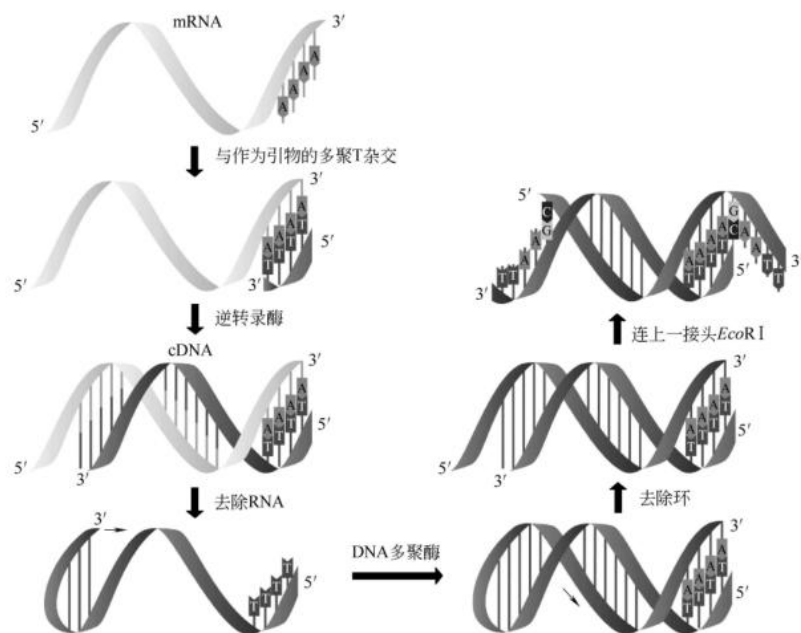
步骤 2 cDNA 第一链的合成



步骤 3 cDNA 第二链的合成



步骤 4 cDNA 双链与载体连接



cDNA 文库均一化处理：去除表达丰度高或较高组，使文库中各克隆出现的随机性相对一致。在一个经过均一化处理的 cDNA 文库中，丰度高或较高的 cDNA 克隆的比例之和仅为 4.6%，低丰度的比例高达 95.4%。基因组 DNA 饱和杂交法&基于复性动力学原理法。

扣除杂交 cDNA 文库

目的：提升文库中低丰度基因的比例，使筛选差异表达基因的可能性大大提高

原理：将含目的基因的组织或器官的 mRNA 群体作为待测样本（tester），将基因表达谱相似或相近但不含目的基因的组织或器官的 mRNA 群体作为对照样本（driver），使 tester 和 driver 的 cDNA 进行多次杂交，去掉在二者之间都表达的基因，而保留二者之间差异表达的基因。

7.11.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授、案例分析和课堂讨论的形式进行。

7.11.6 作业安排及课后反思

- 1.基因组 DNA 文库有哪些类型？其相关的特点是什么？
- 2.构建大片段基因组文库过程中需要注意哪些问题？
- 3.扣除 cDNA 文库的基本原理是什么？主要用途是什么？
- 4.基因克隆筛选的几种方法和相关的技术特征有哪些？

7.11.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

7.11.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《基因工程》袁蓂洲版，第四章（p78-83）

7.12 教学单元十二

7.12.1 教学日期

第十五次、十六次课（10.28）

7.12.2 教学目标

了解常用的基因组研究技术分离，掌握基因作图的原理、方法、步骤和意义。

7.12.3 教学内容（含重点、难点）

重 点：基因组研究技术的发展历程，基因组研究的基本方法。

难 点：基因组物理图谱和基因组遗传图谱的区别。

主要知识点：基因组遗传图谱的构建，基因组物理图谱的构建，基因组测序，鸟枪法拼接序列，现代基因组研究技术的应用，功能基因组研究技术。

7.12.4 教学过程

传统基因组研究技术

在基因组学新兴之初，获得生物体基因组 DNA 序列是研究关注的焦点，基因组测序基本策略：整个基因组 DNA 随机打断——各小片段逐一测序——按位置关系排列组装各测序小片段；基因组图谱精确指导测序拼接：遗传图谱、物理图谱、序列图谱和功能图谱。

遗传作图（genetic mapping）是对某个未知真核生物基因组中的遗传信息（或者是控制某个性状的基因）在染色体上的位置和分布状况进行初步确定。

遗传作图的方法

（1）遗传作图的遗传学原理

孟德尔遗传学的连锁和交换定律

基因交换频率与在染色体上的间隔距离成正比

利用重组率判断基因在染色体上相对位置

（2）不同模式生物的连锁分析

有性杂交实验连锁分析

系谱分析作图

细菌（无减数分裂）——转化、转导和结合转移频率

限制性作图：在基因组上标定限制性酶切位点的相对位置；主要适合对小基因组的原核生物和大片段进行限制性位点分析。

DNA 大片段重叠克隆的基因组作图：先构建基因组的大片段基因文库；然后根据克隆片段之间的重叠顺序构建重叠群(contig)，从而绘制物理连锁图。

荧光标记原位杂交作图 (fluorescent in situ hybridization, FISH)：通过荧光标记的探针与染色体杂交，从而确定分子标记在染色体上的实际物理位置。

序列标签位点作图 (sequence tagged site, STS)：通过 PCR 或分子杂交将序列标签小段 DNA 序列在基因组 DNA 中进行定位；可用于构建最为详细的大基因组物理图。

基因组光学图谱——OpGen 公司开发

光学图谱：来源于细菌、酵母或者真菌的单个基因组 DNA 分子有序、高信息含量的限制性酶切位点的图谱。

做法：

- (1) 温和裂解细胞，抽提长的基因组 DNA 分子
- (2) 微流体装置将单个 DNA 分子在光学芯片上锚成平行阵列
- (3) 原位限制性消化锚定 DNA 分子并染色
- (4) 分析软件测量酶切产生片段大小和顺序
- (5) 光信号转换成数字信号，获得单分子光学图谱

基因组测序

1. 大规模基因组测序方法学改进

454 测序技术、Solexa 测序技术、SOLiD 测序技术和单分子测序技术（具体测序原理见第九章）

2. 基因组 DNA 序列的确定

- (1) 通过鸟枪法拼接序列

染色体 DNA 随机打断成小片段——测序小片段——检测短序列间可能的重叠区——逐级拼接、推导出完整序列

（2）克隆重叠群法测序技术

在鸟枪法基础上发展起来：人类基因组测序：人类基因组计划 1999 年正式实施，2003 年全部完成；国际人类基因组测序协调组：图谱测序方法（物理图谱、鸟枪法）。

现代基因组研究技术：随着生命科学领域技术的飞速发展，只停留在传统基因组学时代里获得生物全基因组序列、重点关注单个或少数基因表达调控，已满足不了科学发展的需要。后基因组时代使命：把一个基因组或一类基因组作为一个独立单位，来研究众多基因是如何精妙地组织构成基因组、基因组之间的进化关系和演化方向以及基因组仅靠静态的核酸序列是如何在瞬息万变中有条不紊地指挥生命的。

基因组序列的解读：

1. 通过序列分析查找基因

（1）寻找基因的开放阅读框

Getorf: FASTA 输入格式 <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/getorf.html>

（2）借助序列的同源性寻找基因

常用软件：TWINSKAN(Korf I 等, 2001)和 SGP2(syntenic gene prediction tool)(Parra G 等, 2003)

2. 确定基因的实验技术

（1）分子杂交检验某一片段是否含有表达序列

DNA-mRNA 的杂交分析（Northern 杂交）

（2）EST 和 cDNA 测序有助于鉴定基因

（3）确定转录物末端

cDNA 末端快速扩增（rapid amplification of cDNA end, RACE）

(4) 异源双链分析

(5) 外显子捕获

基因功能的预测和验证：

1. 利用生物信息学分析基因功能

同源性检索：利用氨基酸序列进行同源性检索得到的假阳性可能会较少

BLAST (Basic local alignment sequence tool)

2. 用实验手段确定基因功能 反向遗传学

(1) 基因失活

基因敲除、T-DNA 插入突变体库、RNA 干扰、反义 RNA 等

(2) 基因超量表达探索基因功能 (overexpression)

(3) 目的基因异源表达

3. 基因编码的蛋白质功能的深入研究

定点诱变、报告基因和免疫细胞化学、噬菌体表面展示、酵母双杂交等

转录组学相关研究技术：基因的表达谱能显示基因在细胞中的作用，也能帮助鉴定它与其他基因在功能上的联系。

用于全局分析基因表达情况的技术：

(1) cDNA-AFLP (cDNA-amplified fragment length polymorphism)

(2) 差异显示 PCR (differential display reverse transcription PCR, DDRT-PCR)

(3) 抑制性扣除杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH)

(4) 基因表达系统分析 (serial analysis of gene expression, SAGE)

(5) 微阵列技术 (microarray)

(6) 转录组测序技术

蛋白质组学相关研究技术：蛋白质才是生物系统中最终端、最关键的成分，必须对

蛋白质展开直接研究

(1) 双向凝胶电泳 (two dimensional gel electrophoresis, 2DGE)

(2) 定量蛋白质组学技术 (quantitative proteomics)

基于质谱技术的方法:

同位素定量标记方法 (iTRAQ) & 非标记定量方法 (label free)

(3) 蛋白质相互作用和相互作用组

酵母双杂交技术、细菌双杂交技术、噬菌体表面展示技术、蛋白质芯片技术

代谢组学相关研究技术: 对某一生物或细胞所有低相对分子量代谢产物进行定性和定量分析。

代谢组的分析技术包括:

化合物的分离

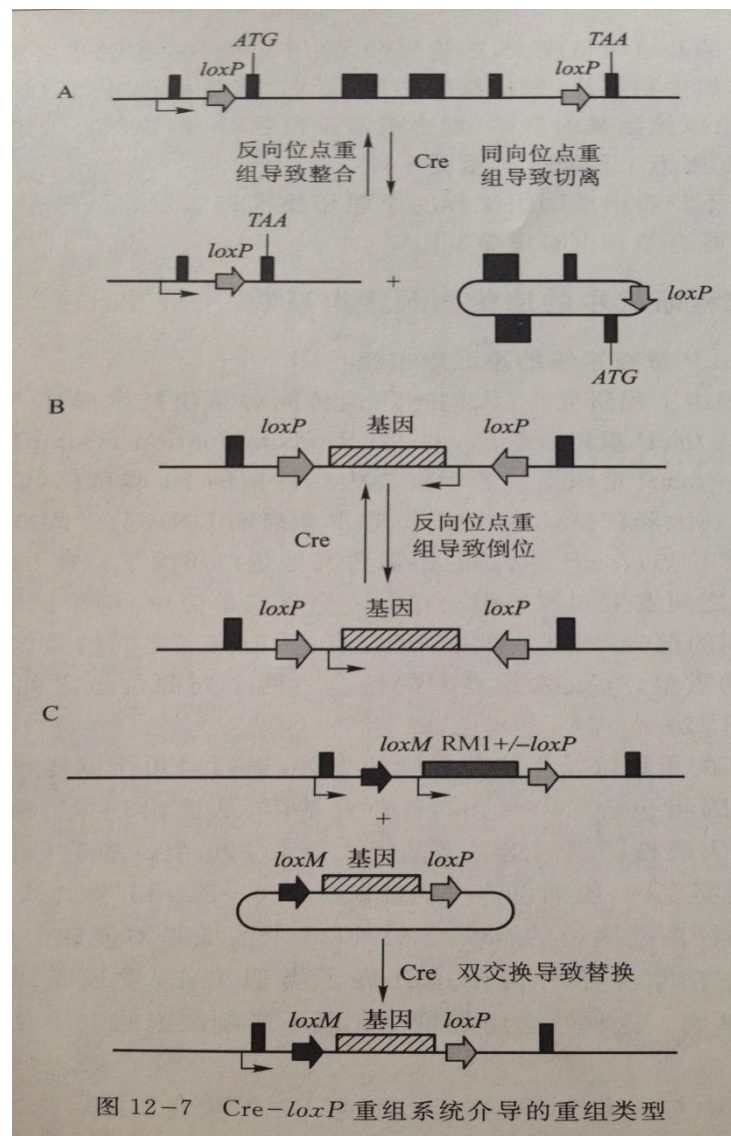
气相色谱 (gas chromatography, GC)

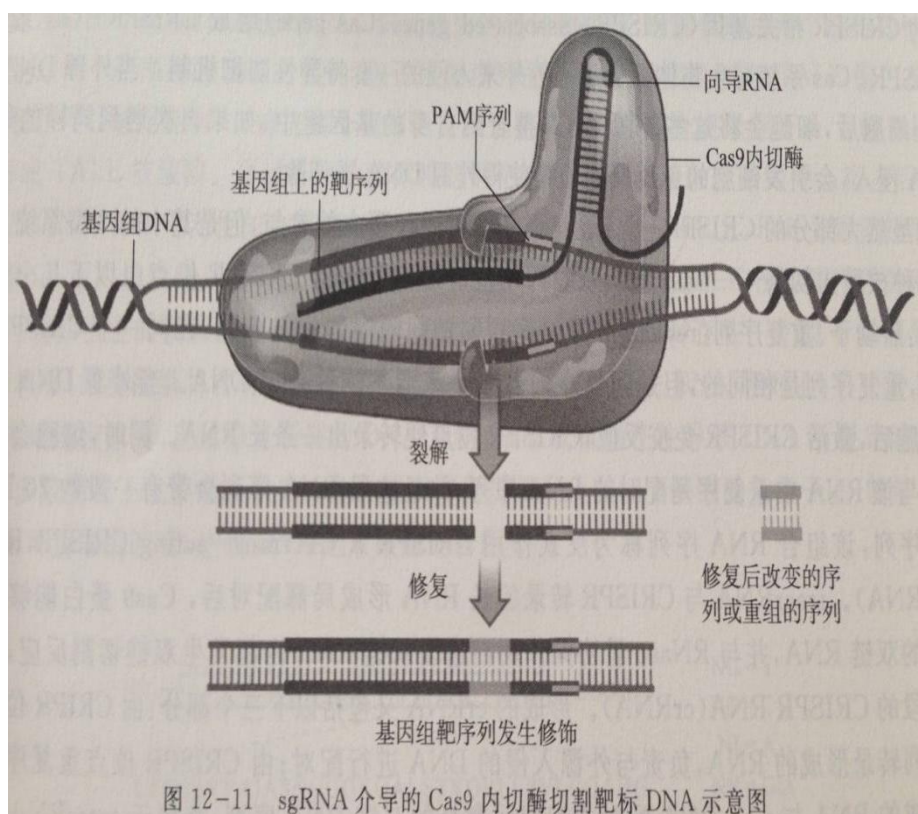
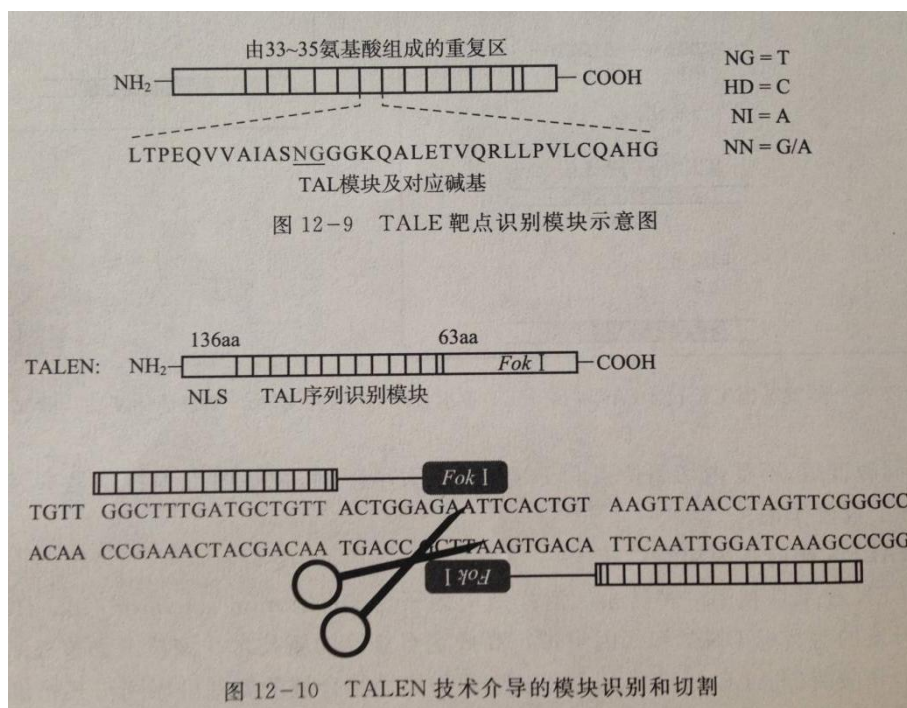
液相色谱 (liquid chromatography, LC)

毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 等

检测及鉴定技术

质谱、光谱、核磁共振、电化学等





常用的几种基因编辑技术

7.12.5 教学方法

教学方法采用课堂讲授、案例分析和课堂讨论的形式进行。

7.12.6 作业安排及课后反思

- 1.简要叙述基因组物理图谱的构建方法和原理？
- 2.功能基因组研究有哪几个层次，并试论其分别采用的技术手段和原理？
- 3.有哪些技术手段可以进行基因组编辑，并介绍其原理？

7.12.7 课前准备情况及其他相关特殊要求

教师认真备课；学生上课前对参考教材进行预习。

7.12.8 参考资料（具体到哪一章节或页码）

《基因工程》袁蓂洲版，第七章（p204-201）

8. 学生课程学习要求

8.1 学生自学的要求

学生上课前，需对课本进行预习。预习时参考本大纲的内容快速阅读。课后，对参考教材中的内容，特别是课堂上重点强调的内容进行学习，达到掌握知识的目的。

8.2 课外阅读的要求

课外，对参考教材中的内容，特别是课堂上重点强调的内容进行学习，达到掌握知识的目的。对课堂上安排的习题认真的完成，达到巩固知识的目的。另外，还可以通过中国知网和网络对所讲授的相关知识进行延伸阅读，以达到较广知识面的目的。

8.3 课堂讨论的要求

对老师提出的讨论题目积极参与，认真思考，踊跃发言。通过讨论的过程，启发大家的思考能力，解决制药生产中的实际分离问题，激发大家对本门课程的学习兴趣。

8.4 课程实践的要求

按照课程的安排要求，准时参加，不迟到，不早退，认真完成课程相关的实验工作。实验前认真做实验，实验过程中认真动手，积极思考，不去懂就问。实验后认真写实验

报告，讨论实验过程中遇到的科学问题。

9. 课程考核方式及评分规程

9.1 出勤（迟到、早退等）、作业、报告等的要求

严格考勤，随机抽查点名（对于缺过课的同学，随机点名时要重点抽查）。三次随机点名未到，无故缺课者，取消考试资格，该门课成绩为不合格。

作业要求认真完成，教师认真批改作业，对于作业中出现的问题，要在课堂上集中进行讲解。

实验报告的书写方式按照四川轻化工大学实验报告的要求认真书写，要求认真、客观、科学。

9.2 成绩的构成与评分规则说明

课程考核采用平时考核和期末考试考核。平时考核成绩由课堂表现、课后作业和期中考试成绩组成，其中，课堂表现占 10%，课后作业占 15%，期中考试占 15%，总计平时考核成绩占课程成绩的 40%。期末考试成绩占总课程成绩的 60%。即，课程成绩 = 课堂表现成绩 × 10% + 课后作业成绩 × 15% + 期中考试成绩 × 15% + 期末考试成绩 × 60%。无故缺席三次以上者取消期末考试资格。

9.3 考试形式及说明（含补考）

考试形式为闭卷形式，相关要求按照四川轻化工大学考试相关要求执行。

10. 学术诚信规定

10.1 考试违规与作弊

考试违规和作弊者，按照四川轻化工大学有关规定进行处理。

10.2 杜撰数据、信息等

杜撰数据和信息者，按照四川轻化工大学有关规定，交学校学术委员会讨论处理。

10.3 学术剽窃等

学术剽窃者，按照四川轻化工大学有关规定，交学校学术委员会讨论处理。

11. 课堂规范

11.1 课堂纪律

按照四川轻化工大学关于课堂纪律的要求执行。学生认真听讲，积极踊跃发言，在教室讲课时，对于不懂的问题，可以随时打断老师，进行讨论式的学习和讲解。不得在上课时打闹，吃零食，做与课程无关的事。

教师认真授课，上课时不得拨打电话，或讲授与课程无关的内容，维持课堂良好的纪律，保证教学质量。

11.2 课堂礼仪

教师和同学的课堂礼仪按照四川轻化工大学关于课堂礼仪的规定执行。总的要求是学生应当衣着整齐，有着大学生的青春风貌；教师同样应衣着规范，干净整洁，给人为人师表的形象。师生互敬互爱，相互尊重。

12. 课程资源

12.1 教材与参考书

《基因工程》（袁葵洲主编，化学工业出版社，第二版）

《基因工程》（孙明 主编，高等教育出版社;第2版）

12.2 专业学术专著

《现代分子生物学》（朱玉贤主编，高等教育出版社;第4版）

《基因工程原理》上下册（吴乃虎主编，科学出版社;第2版）

《分子克隆实验指南》（J.萨姆布鲁克主编，科学出版社;第3版）

12.3 专业刊物

Journal of Biological Chemistry

SCIENCE

NATURE

12.4 网络课程资源

百度文库（地址：<http://wenku.baidu.com>）

小木虫论坛（地址：<http://emuch.net/bbs>）

丁香园（地址：<http://www.dxy.cn>）

12.5 课外阅读资源

图书馆的相关资源

电子图书馆中的中国知网的相关资源。

13.教学合约

13.1 阅读课程实施大纲，理解其内容

学生应认真阅读课程实施大纲，如有异议，可以向授课教师提出，教师根据实际情况作出修改和调整，如无异议，则视为同意遵守课程实施大纲当中所确定的责任与义务。

13.2 同意遵守课程实施大纲中阐述的标准和期望

课程实施大纲编写完成后旨在提高教学规范和效率，学生应该按照该达到课程实施大纲要求的标准进行学习。

14.其他说明

无