
第二章 基因工程与食品产业

第四节 基因工程的基本操作技术

第四节 基因工程的基本操作技术

一、目的基因的获得与序列分析

(一) 目的基因的获得

基因工程主要是通过人工的方法，分离、改造、扩增并表达生物的特定基因，以获得有价值的基因产物。目的基因的分离是基因工程操作的第一步。

通常，我们把插入到载体内的非自身的DNA片段称为“**外源基因**”(foreign gene)。

目的基因 (objective gene): 又叫靶基因 (target gene), 是指根据基因工程的目的, 设计的所需要的某些DNA分子片段, 它含有一种或几种遗传信息的全套密码 (code)

■ 目前采用的分离、合成目的基因的常用方法有：

1. 鸟枪法（霰弹枪法）

➤ 具体做法是：首先利用物理方法（如剪切力、超声波等）或酶化学方法（如限制性内切核酸酶）将生物细胞染色体DNA切割成为基因水平的许多片段，而后将这些片段与适当的载体结合，将重组DNA转入受体菌中扩增，获得无性繁殖的基因文库，再结合筛选方法，从众多的转化子菌株中选出含有某种基因的菌株，从中将重组的DNA分离、回收。

这种方法也就是应用基因工程技术分离目的基因。其特点是绕过直接分离基因的难关，在基因组DNA文库中筛选出目的基因。

2. 物理化学法

➤利用核酸DNA双螺旋之间存在着碱基G和C配对、A和T配对的这一特性，从生物基因组分离目的基因的方法。

常用的分离基因的物理化学法主要方法有：密度梯度离心法；单链酶法；分子杂交法。

(1) 密度梯度离心法:

根据液体在离心时其密度随转轴距离而增加，碱基GC配对的双链DNA片段密度较大，利用精密的密度梯度超离心技术可使切割适当片段的不同DNA按密度大小分布开来，进而通过与某种放射性标记的mRNA杂交来检验，分离相应的基因。

(2) 单链酶法:

碱基GC配对之间有三个氢键，比AT配对的稳定性高。当用加热或其他变性试剂处理DNA时，双链上AT配对较多的部位先变成单链，应用单链特异的S1核酸酶切除单链，再经氯化铯超速离心，获得无单链切口的DNA

(3) 分子杂交法:

单链DNA与其互补的序列总有“配对成双”的倾向，如DNA: DNA配对或者DNA: RNA配对，这就是分子杂交的原理。

利用分子杂交的基本原理既可以分离又可以鉴别某一基因。

3. 化学合成法

是以单核苷酸为原料，在体外用化学方法按照已知基因的碱基顺序合成DNA短片段，再依次连接成完整的目的基因链。此法必须预先知道目的基因或其mRNA或蛋白质的一级结构，即核苷酸或氨基酸的顺序。

为了保证定向合成，需要将一个分子的5'端与另一个分子的3'端封闭保护。这种封闭可用磷酸化等方法，必要时可以酸或碱解除封闭。

化学合成法的最大优点是能按照人们的意愿合成突变基因。但有局限性，要合成较长链的 DNA 分子尚有困难。

随着现代科学技术的发展，基因工程操作仪器设备也不断更新。如日本 Zeon 公司已成功制成并出售“全自动 DNA 合成仪”，精工电子工业公司的“DNA 序列仪”。

目前单链 DNA 短片段的合成已经成为分子生物学和生物技术实验室的常规技术了。

4.酶促逆转录合成法

酶促逆转录合成法即利用逆转录酶以mRNA为模板合成相应的DNA方法。

主要用于合成分子量较大而又不知其序列的基因。这种方法是以目的基因的mRNA为模板，借助逆转录酶合成互补的DNA (cDNA)，再在DNA聚合酶的催化下合成双链cDNA片段，与适当的载体结合后转入受体菌，扩增为cDNA文库。然后，采用适当的方法从cDNA文库中筛选出目的基因。

如：1972年采用逆转录酶合成了家兔和人球蛋白的cDNA。

5.PCR扩增法

当已知目的基因的序列时，通常利用多聚酶链式反应(PCR)技术来分离目的基因。

它能快速、简便地在体外扩增特定的DNA片段，具有高度的专一性和灵敏度。

- **PCR反应体系应具备的条件:**

(1) 要有与被分离的目的基因的DNA双链两端序列相互补的DNA引物(约20个碱基左右);

(2) 具有热稳定性的酶如TaqDNA聚合酶;

(3) dNTP;

(4) 作为模板的目的DNA序列。一般PCR反应可扩增出100~5000bp的目的基因。

● PCR反应过程包括：

1. DNA变性（ 90°C – 96°C ）：双链DNA模板在热作用下，氢键断裂，形成单链DNA
2. 退火（ 25°C – 65°C ）：系统温度降低，引物与DNA模板结合，形成局部双链。
3. 延伸（ 70°C – 75°C ）：在Taq DNA聚合酶（在 72°C 左右最佳的活性）的作用下，以dNTP为原料，从引物的5'端→3'端延伸，合成与模板互补的DNA链。

每一循环经过变性、退火和延伸，DNA含量既增加一倍。如此反复进行约30个循环左右，即可扩增得到目的DNA序列

(二) DNA序列测定

DNA序列分析 (DNA sequencing): 指对某一段DNA分子或片段的核苷酸排列顺序测定, 也就是测定组成DNA分子的A、T、G、C的排列顺序。

测序也常常用于对重组DNA的序列分析, 其结果是最直接、最客观反映重组DNA中是否有目的基因的方法。

● 核苷酸序列测定的方法有：

➤ 化学降解法

➤ 酶促法（双脱氧终止法）

➤ 自动测序法

➤ **PCR**测序法

1.化学降解法

也叫Maxam-Gilbert法。

原理：用一些特殊的化学试剂，分别作用于DNA序列中四种不同的碱基。这些碱基经过处理后，在核苷酸序列中形成的糖苷键连接变弱，因此很容易从DNA链上脱落下来。丢失了碱基的核苷酸链再经适当处理，就可在缺失碱基处断裂。在进行这些反应时，将反应条件控制在每条DNA链断开一处，因此经过处理，产生一系列长短不等的DNA片段。根据所用的试剂不同，其末端分别为G、A、C、T，再对一系列这样的片段进行综合分析，就可测得DNA分子中的核苷酸排列顺序。

2. 酶促法

又叫Sanger法和链终止法。

原理：先将DNA分子用限制性内切酶切割成片段，然后用电泳依其长短不同分离，钝化单股片段，以 ^{32}P 标记其5'末端，并用以作为复制其互补片段的模板，在复制过程中，利用从大肠杆菌提取的DNA聚合酶 I 经过枯草杆菌蛋白酶处理而得的大片段，以复制互补单股DNA，从而求得其序列。

3. 自动化测序法

➤ Prober等1987年将链终止法加以改进，并与电子计算机程序的自动化技术相结合，加快了序列测定，并且不用放射性同位素标记脱氧核苷酸，避免了放射线对操作者的危害。

➤ 实际做法：在每种脱氧核苷酸上分别都以共价键接上不同荧光染料，然后与四种三磷酸核苷在同一器皿中，依照上述链终止法条件进行，即会复制出一系列不断增加较长一点的多聚脱氧核苷酸链，其3'末端都各自带有特色荧光染料的双脱氧核苷酸，为了测定序列，将反应混合物在一条道上进行凝胶电泳，结果这条道上出现一系列有荧光的带。

这些有荧光的带中每一条都代表一个碱基在复制链中所在的位置。凝胶荧光测定体系由电子计算机控制。这个体系是用激光激发不同颜色的染料所发生的荧光，用短波长的蓝光及长波长的红光分别测量荧光强度之比值，测定在复制链中各碱基的位置，从而得到DNA的序列。

熟练的操作者用这种方法一天可测1000个以上的碱基，而现在其他测序方法一般一人一年只能测50000个碱基。这种方法因用电子计算机控制，自动化操作，大大缩短测定时间，而且结果准确可靠，是目前最优越的测序方法。

二、目的基因与载体的连接

通过不同的途径获取了目的基因，选择或构建适当的基因载体之后，基因工程的下一步工作是如何将目的基因与载体连接在一起，即DNA的体外重组。**基因重组是基因工程的核心。**

基因重组 (gene recombination)，就是将目的基因与载体DNA两者连接起来。这种连接主要靠**T₄DNA连接酶**。

通常连接的形式有：

- 黏性末端连接
- 平端连接
- 人工接头连接
- 同聚物加尾连接

（一）黏性末端连接

黏性末端连接有两种情况。

◆ 同一限制性内切酶酶切位点连接

由同一限制性内切酶切割的不同DNA片段，会产生具有完全相同的黏性末端，在适合条件下。单链黏性末端间进行碱基配对形成双链，然后在 T_4 DNA连接酶催化作用下使之共价连接，形成的重组DNA分子。

◆不同限制酶切位点连接

由两种不同的限制性内切酶切割的DNA片段，产生具有相同类型的黏性末端，彼此称为互补末端，也可以产生末端连接。

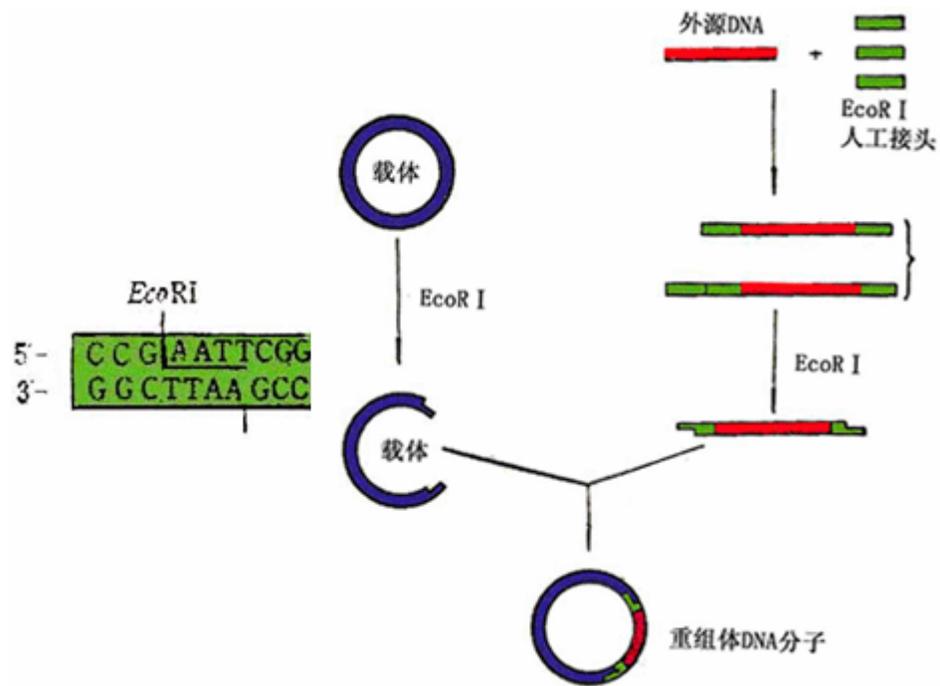
(二) 平端连接

一些内切酶如 *Hae*III 和 *Hpa*I 切割产生的DNA片段是平齐末端。具有平齐末端的酶切载体只能与平齐末端的目的基因连接。

T_4 DNA连接酶可催化相同和不同限制性内切酶切割的平端之间连接。

(三) 人工接头连接

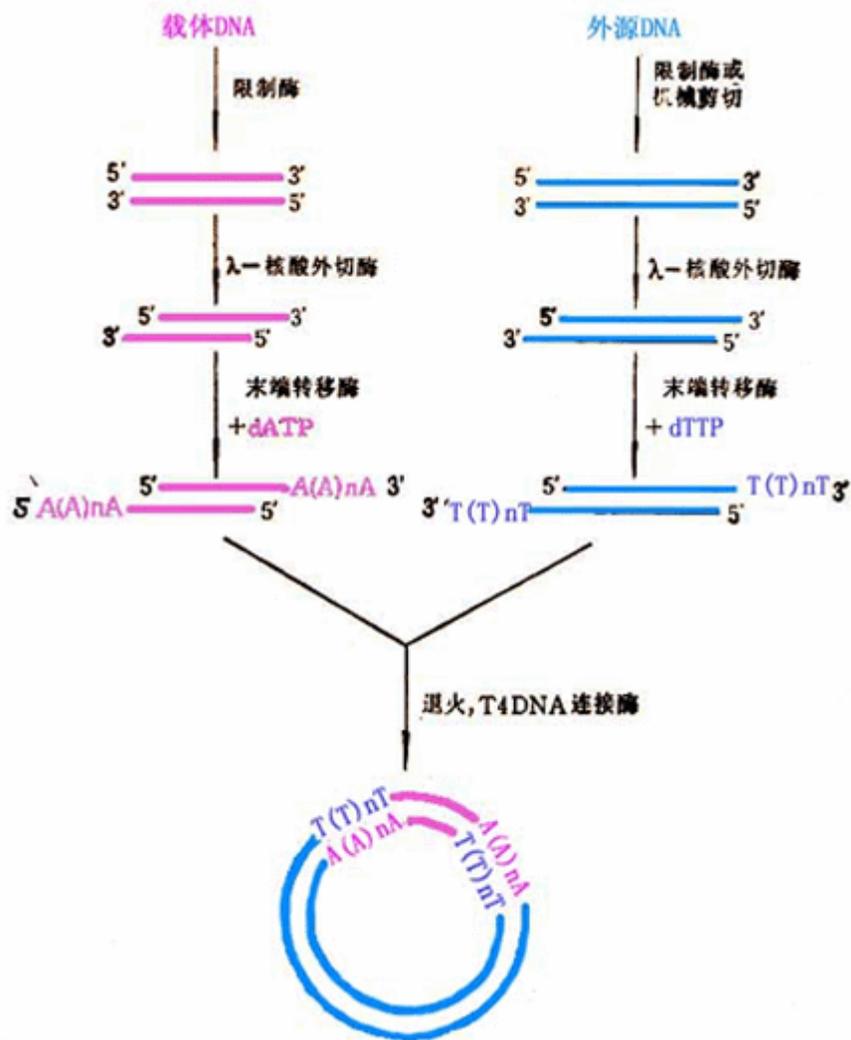
➤ 人工接头是人工合成的具有特定限制性内切酶识别和切割序列的双股平端DNA短序列。将其接在目的基因片段和载体DNA上，使它们具有新的内切酶位点，应用相应的内切酶切割，就可以分别得到互补的黏性末端。



（四）同聚物加尾连接

利用末端转移酶(也称DNA转移酶)在DNA片段上制造一个粘性末端的方法。

如在目的基因片段的3'末端添加一小段同聚物(如dA碱基),在载体3'末端添加一小段同聚物dT,形成碱基配对,然后在T₄DNA连接酶催化作用下使之共价连接,形成的重组DNA分子。



三、重组DNA向受体的转化

在目的基因与载体连接成重组DNA分子以后，下面的重要工作主要是将其导入受体细胞进行扩增和筛选，获得大量的重组DNA分子，这就是外源基因的无性繁殖，即克隆(cloning)。

由于外源基因与载体构成的重组DNA分子性质不同、宿主细胞不同，将重组DNA导入宿主细胞的具体方法也不相同。

常用的受体细胞以细菌为主，其中主要有大肠杆菌、枯草杆菌

● 重组DNA导入受体细胞的方法有：

(1) **转化**：是将重组质粒DNA导入受体细胞，使受体遗传性状发生改变的方法；

- 转化是使重组体DNA分子在热休克的短暂时间内被导入受体。热休克后将受体菌在不含抗生素的培养液中生长至少30分钟以上，使其蛋白得到足够表达，以便能在含抗生素的琼脂培养平板上生长。由于*E. coli* X1776菌株用CaCl₂处理后制备的感受态细胞长期冷藏仍能保持其摄取外源DNA的能力，故常用作受体菌。

(2) 转染：是指噬菌体、病毒、或以其为载体构建的重组DNA导入细胞的过程。（其中又分磷酸钙沉淀法与体外包装法）

◆ 磷酸钙沉淀法

利用磷酸钙-DNA共沉淀，把外源基因与λ噬菌体DNA的重组分子导入大肠杆菌和哺乳动物细胞，简称磷酸钙沉淀法。细胞具有摄取磷酸钙沉淀的双链DNA的能力，几乎所有的双链DNA都可以通过这种方法导入细胞，而且可在电子显微镜下清楚地看到细胞吞噬DNA-磷酸钙复合颗粒。此法的转染效率远远不如体外包装法。

(2) 转染：是指噬菌体、病毒、或以其为载体构建的重组DNA导入细胞的过程。（其中又分磷酸钙沉淀法与体外包装法）

◆体外包装转染法

体外包装：指在体外将重组DNA放置到噬菌体的蛋白质外壳里，然后通过正常的噬菌体感染过程，将它们导入宿主细胞。将重组DNA噬菌体包装成噬菌体颗粒，使其能够感染细菌，并在宿主菌体内扩增和表达外源基因。

(3) 微注射技术：是将外源基因直接注射到真核细胞内的方法；

又称之为直接显微注射。一般是用微吸管吸取供体DNA溶液，在显微镜下准确地插入受体细胞核中，并将DNA注射进去。此法常用于转基因动物的基因转移。

(4) 电转化法

- 也有人称做高压电穿孔法（简称电穿孔法），即在受体细胞上施加短暂、高压的电流脉冲，使质膜形成纳米大小的微孔，DNA能直接通过这些微孔，或者作为微孔闭合时所伴随发生的膜组分重新分布而进入细胞质中。
- 该法可用于真核细胞（如动物细胞和植物细胞）和原核细胞（转化大肠杆菌和其他细菌等）的外源DNA的直接导入。
- 电穿孔法具有简便、快速、效率高等优点

(5) 基因枪技术

又称高速微型子弹射击法、微弹射击法、高速粒子轰击法

基本原理：将DNA吸附在微型子弹(1 μm)的表面通过放电或机械加速，使子弹射入完整的细胞或组织内。

基本做法：先将外源DNA溶液与钨、金等金属微粒(直径0.5-5 μm)共同保温，使DNA吸附于金属颗粒表面，然后放电加速金属颗粒，使之以400m/s的速度直接喷射受体细胞，外源遗传物质随金属颗粒进入细胞内部。

(6) 脂质体介导法

脂质体(又叫做人工膜泡)作为体内或体外输送载体的方法,一般都需要将DNA或RNA包囊于脂质体内,然后进行脂质体与细胞膜的融合,通过融合导入细胞。

(7) 其他方法:

很多高效的新颖的导入方法,如加速冷冻法、碳化硅纤维介导法等正在研究并逐渐达到实用水平。

受体细胞：也叫宿主细胞，是指在转化、转导、杂交中接受外源基因的细胞。

分为原核受体细胞(最主要的是大肠杆菌)、真核受体细胞(最主要的是酵母菌)、动物细胞和昆虫细胞(其实也是真核受体细胞)。

具有接受外源DNA的能力；为限制性内切酶缺陷型菌珠或为DNA重组型菌珠；在标记上和载体对应；有利于表达；不适宜在人体或非培养条件下生存，有利于安全。

大肠杆菌是目前基因工程中最常用的受体细胞。通常采用的是大肠杆菌的感受态细胞，即在冰浴中用一定浓度的CaCl₂处理对数生长期的大肠杆菌，以获得高效转化的感受态细胞。也有采用Rb⁺、Mn²⁺、K⁺、二甲亚砜、二硫苏糖醇 (DTT) 或用氯化己胺钴处理制备感受态细胞。

感受态是指受体细胞能吸收外源DNA分子而有效地作为转化受体的某些生理状态。一般受体细胞在对数生长期转化能力最强。

四、重组体的筛选与外源基因的鉴定

(一) 重组体的筛选

基因克隆的下一道工序是：从转化细菌菌落中筛选含有阳性重组DNA分子的菌落，并鉴定重组DNA分子的正确性。

1、针对遗传表型筛选

- 按载体的性状变化进行筛选
- 根据插入基因的遗传性状进行筛选。

2、根据重组子的结构特征筛选

- 快速裂解菌落，鉴定分子大小
- 内切酶图谱鉴定
- PCR筛选重组子
- 核酸分子杂交

(二) 重组体的鉴定

经过转化的重组体，如转基因微生物、转基因动物和转基因植物细胞，经过培养在其形成了一定的菌株、品系之后，就需要对它们进行鉴定，检验它们在生长发育、传种接代过程中是否保留了已获得的外源基因。

1、 报告基因的检测法

- 是一种快速而简易地区分转基因生物和非转基因生物的方法。
- 报告基因检测法：指在构建目的基因时将一种报告基因(如GUS基因)构建在一起，当目的基因转入受体细胞时，报告基因一同被转入。
- 报告基因：是一种编码可被检测的蛋白质或酶的基因，也就是说，是一个其表达产物非常容易被鉴定的基因。

2、分子杂交技术

- 为了从分子水平鉴定目的基因是否已经整合到受体细胞中，是否转录，是否表达，经常用到基因探针杂交技术。
- 即用已知基因片段(往往是目的基因片段)制作的探针，与待测样品的基因片段进行核酸分子杂交，从而判断二者的同源程度。
- 目前已广泛应用于食品生物技术的研究中。
- 这种技术通常包括原位杂交、点杂交、Southern吸印杂交、Northern吸印杂交、Western吸印杂交等。后三者需要琼脂糖凝胶电泳与分子杂交相结合的分析手段。

(1) 点杂交：将待测DNA或RNA或细胞裂解物变性后直接点在硝酸纤维素膜上，不需限制性酶进行酶切，即可与探针进行杂交反应。该技术对于基因拷贝数多的样品很适合，具有间接快速的特点，一般可作大批量样品的筛选。

(2) Southern吸印杂交：是1975年由Southern首创的，以后又由多人改造，目前被认为是最经典和应用最广泛的杂交方法。根据基因探针与待测DNA限制酶的酶解片段杂交带谱，可以直接确定是否已经转入受体细胞并接合到受体细胞的基因组中。

基本原理和操作过程是：提取重组体DNA，限制性酶切后进行琼脂糖凝胶电泳，在碱溶液中使用DNA变性即双链变为单链，再经毛细管虹吸作用被原位转移到硝酸纤维素膜或尼龙膜上，将膜上的DNA烤干，固定后加入杂交液和标记探针进行杂交，洗去多余探针，在X光底片上放射自显影。

(3) Northern吸印杂交

- 基本原理与Southern大致相同，只是检测的对象不是DNA，而是RNA。
- 具体做法是：提取重组体总RNA或mRNA，在强变性剂如甲基汞或甲醛存在的情况下(防止RNA形成二级结构环)，进行琼脂糖凝胶电泳，电泳后，将电泳分离开的RNA原位吸印到经化学处理过的纸或硝酸纤维素膜上，用同位素标记的探针进行杂交，然后放射自显影，根据X光片上的条带，可以了解与探针互补的RNA的大小及数量。
- 由于RNA比DNA更易受到各种因素的降解，整个操作过程必须十分小心，按规程操作。
- 对转基因生物Northern杂交显示阳性，说明外源基因已经转入受体基因组中，并且顺利地进行转录，形成mRNA。

(4) Western吸印杂交:

- 主要用于检测外源基因在转化细胞中的表达情况，即是否进行了翻译，产生了外源基因所编码的蛋白质。
- 具体做法是：提取重组体蛋白质，用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质，然后将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶上原位转移到硝酸纤维素膜上，最后进行抗体与抗原结合反应。

(5) 原位(菌落)杂交技术:

- 是利用核酸杂交原理检测含有待测DNA序列的重组分子。
- 在许多情况下，含有理想重组体的细菌往往混杂在含有其他重组分子的细菌之中，当理想重组体的存在无法用遗传方法检测时，必须考虑其他筛选方法，原位(菌落)杂交法是最常用的方法之一。

➤大致过程：先通过一定方法，让菌落转移到一种支撑膜上，如硝酸纤维素滤膜，然后裂解膜上的细菌，使DNA变性并原位结合在滤膜上，将带有DNA印迹的滤膜与放射性标记的RNA或DNA探针杂交。在杂交后，先洗未杂交的探针，再进行放射性自显影，与探针有同源性的DNA印迹将会显露在X光片上。显然，提供这种DNA的菌落包含着理想的DNA序列，可从主盘中找到那个相应的菌落。

第六节 反义基因技术

一、反义基因技术的基本概念和原理

反义RNA (antisenseRNA)：有义DNA链转录成的、与特异的靶RNA互补结合并能抑制靶RNA表达的一段序列。

反义RNA是一类能与特异mRNA互补的小分子量、可扩散的DNA转录物，它能够从翻译水平、转录水平和核酸复制水平上高度特异地抑制靶基因表达。

转录产生反义RNA的基因称之为反义基因。

反义RNA技术：指把一段DNA序列以反义方向插入到合适的启动子和终止子之间，然后把此基因构建体转化到受体细胞中去(通常用农杆菌转化的方法)，通过选择培养获得转化生物体的技术。

反义基因的表达载体构建方法：

第一步，分离得到的mRNA为模板，合成反义DNA；

第二步，以此反义链为模板合成有义DNA链；

第三步，以细菌质粒(DNA)为载体，用限制性内切酶在靠近启动子处切割一缺口；

第四步，将有义DNA插入表达载体的缺口中，即得到一表达质粒，如果启动子开始转录，表达载体即转录原来的mRNA；如果将插入的表达载体用限制性内切酶切割后，以相反的方向插入载体DNA环中，即表达载体转录形成反义RNA。

二、反义基因技术的特点

- 1、反义RNA可以高度专一地调节某一特定基因的表达，不影响其他基因的表达。
- 2、转化到植物中的反义RNA的作用类似于遗传上的缺陷型，表现为显性。所以被转化的植物材料不必为纯合体就可表现相应的性状，从而避免了二倍体内等位基因的显隐性干扰。

3、反义基因整合到植物的基因组中可独立表达和稳定遗传，后代符合孟德尔遗传规律。

4、反义基因不必了解其目的基因所编码的蛋白质结构，可省去对基因产物的研究工作。

5、反义基因不改变目的基因的结构，在应用上更加安全。

三、反义基因技术的应用

世界上第一个基因工程商业化园艺产品，就是利用反义基因技术将反义PG基因转入番茄得到的耐贮运的番茄。

以反义PG番茄为例，介绍其培育过程：

首先，通过一定的方法如反转录方法、化学合成方法或者筛选基因文库等方法得到目的基因PG。

第二步，构建反义PG基因重组子，即PG基因反向构建到适宜的载体上，如农杆菌Ti质粒。或者需要通过一个中间载体如大肠杆菌质粒再转移到农杆菌Ti质粒上。利用载体本身所带的抗生素基因对构建后的重组子进行筛选，然后进一步鉴定。

第三步，利用携带反义PG基因的农杆菌Ti质粒，通过叶盘法进行转化番茄子叶或者下胚轴。

第四步，被转化的番茄子叶或者下胚轴在含有一定浓度的抗生素培养基上培养，经历愈伤组织形成、发芽、生根等过程，逐渐形成一颗完整植株。

第五步，对再生植株进行鉴定，如点杂交、Southern杂交、Northern杂交和性状观察等，检测外源基因是否已经转录、翻译和表达等。

第六步，对正确表达目的基因的植株进行选择，获得纯合体后代，通过安全评价程序，进行田间释放、中试和商业化生产。
