

## 第二章 基因工程制药

### 2.3 目的基因的获得

#### 一、课程目标

##### 1) 知识学习目标

掌握目的基因制备方法：反转录法、反转录-聚合酶链反应法、化学合成法、直接提取法、改造已知基因、基因筛选新方法。

##### 2) 思政育人

通过“核酸保健品”的案例，引导学生利用所学的知识分析社会事件，知道核酸作为遗传物质，对人体的生理活动至关重要，但是人体中的核酸都是人体用其他化学物质自我合成的，并不从膳食中直接吸收。膳食中的核酸都将在消化道中被彻底分解掉。因此生物医学界公认核酸不是营养物质，口服核酸不仅不能起到营养、保健作用，而且核酸吃多了，还会对身体造成危害，会导致痛风和结石等疾病，培养学生科学的批判精神。

#### 二、思政案例



核酸保健品一度甚嚣尘上，甚至上了春节晚会，而它完全是一个伪科学商业骗局。这个商业骗局是上个世纪 60 年代在美国出现的，1981 年，它被美国法庭认定为商业骗局后，在美国就基本消失了，然而 20 年后却在中国重新出现，而且有多名中国科研人员为之捧场。

对此，我们已在 2001 年上半年做过充分的揭露。对“珍奥核酸”盗用多名诺贝尔奖获得者的名义做宣传的行为，我们也曾经联系到诺贝尔奖获得者发表声明澄清。那次揭露持续了几个月的时间，在国内媒体引起了很大的反响，甚至连美国《科学》杂志都做了报道。国

家工商行政管理总局为此发出通知要求集中检查核酸类保健食品广告违法问题，卫生部也通报“珍奥核酸”夸大宣传，要求对保健食品夸大宣传的违法行为加大监督力度，依法严厉打击。

### 三、课程组织

**导入：**上节课学习了基因工程制药的一般过程，这节课一起学习目的基因的获得。

首先我们先考虑一个问题，

**问题思考：**原核生物和真核生物的基因的转录翻译方式和真核有何不同？来源于真核细胞的产生基因工程药物的目的基因，为什么不能进行直接分离？

我们知道，真核生物的基因转录和翻译有 RNA 的剪切和拼接的功能。真核细胞中基因总量较大，从染色体中直接分离纯化目的基因极为困难，另外，真核基因一般都有内含子，如果以原核细胞作为表达系统，即使分离出真核基因，由于原核细胞缺乏 mRNA 转录后的加工系统，真核基因转录的 mRNA 也不能被加工、拼接成为成熟的 mRNA，因此不能直接克隆真核基因。

**目的基因获得常用方法讲解：**克隆真核基因常用的方法有**反转录法**。

**反转录法**就是先分离纯化目的基因的 mRNA，再反转录成 cDNA，然后进行 cDNA 的克隆表达。为了克隆编码某种特异蛋白质多肽的 DNA 序列，可从产生该蛋白质的真核细胞中提取 mRNA，以其为模板，在逆转录酶的作用下，反转录合成该蛋白质 mRNA 的互补 DNA，再以此第一链为模板，在逆转录酶或 DNA 聚合酶 I 作用下，最终合成编码该多肽的双链 DNA 序列，cDNA 与模板 mRNA 序列严格互补，而不含内含子一般来讲，反转录法包括以下几个步骤

#### 1. mRNA 的纯化

细胞内含有三种 RNA，mRNA 占 RNA 总量的 2%-5%，相对分子量大小不一致，分离也有很大的困难但是 mRNA 的 3' 末端常含有一多聚腺苷酸组成的末端，长达 20-250 个腺苷酸，足以吸附于寡聚胸苷酸-纤维素上，从而可以用亲和层析法将 mRNA 从细胞总 RNA 上分离出来，可得到纯度较高的 mRNA。

**引入思政案例：**市面上出售的**核酸保健品**，是否具有它所宣传的作用？

核酸分为 DNA 和 RNA，RNA 又分为 mRNA、tRNA、rRNA 等，人体核酸都是人体用其他化学物质自我合成的，并不从膳食中直接吸收。膳食中的核酸都将在消化道中

被彻底分解掉。因此生物医学界公认核酸不是营养物质，口服核酸不仅不能起到营养、保健作用，而且核酸吃多了，还会对身体造成危害，会导致痛风和结石等疾病。

## 2. 互补 DNA 第一链的合成

mRNA 的 3' 末端常含有一多聚腺苷酸序列，可用寡聚脱氧胸苷酸为引物，在反转录酶的催化下，开始互补 DNA 的合成。

## 3. 互补 DNA 第二条链的合成

先用碱解或酶解的方法除去 cDNA-mRNA 杂交链中的 mRNA 链，然后以 cDNA 第一链为模板合成第二链。由于第一链 cDNA 链 3' 末端往往形成一个发夹结构，所以，可以从这一点开始合成 cDNA 第二链。此反应是在 DNA 聚合酶 I 催化下完成的。

## 4. cDNA 克隆

用于 cDNA 克隆的载体有两类：质粒 DNA (如 pUC、pBR 322 等) 和噬菌体 DNA (如 lgt 10、lgt 11 等)。cDNA 插入片段小于 10kb，可选质粒载体，如大于 10kb 则应选用噬菌体 DNA 为载体 cDNA 片段与载体的连接通常采用以下方法

方法一：**加同聚尾连接**，用 3' 末端脱氧核苷酸转移酶催化，使载体与 cDNA 的 3' 末端带上互补的同型多聚体序列，如载体加上 poly CA 的尾巴，则 cDNA 加上 poly T 的尾巴，借助同型多聚体的退火作用形成重组分子，最后用 T4DNA 连接酶封口。

方法二：**加人工接头连接**，用 T4DNA 连接酶在平末端接上人工接头可以使 DNA 发生连接。所谓人工接头是指人工合成的、连接在目的基因两端的含有某些限制酶切位点的寡核苷酸片段。cDNA 连上人工接头后，用该种限制酶酶切就可得到粘性末端，从而能够与载体连接。体外包装的 1 噬菌体，感染感受态大肠杆菌形成噬菌斑；或转化感受态大肠杆菌使质粒进入细胞内将重组 DNA 或其他外源 DNA 导入宿主细胞，常用的方法有转化、感染和转染。

## 6. cDNA 文库的鉴定

根据重组体的表型进行筛选，主要有抗性基因失活法和菌落或噬菌斑颜色改变法。然后采用凝胶电泳、分子杂交、DNA 序列分析测定等方法进行进一步筛选和鉴定。

## 7 目的 cDNA 克隆的分离和鉴定

从 cDNA 文库中分离特异的 cDNA 克隆，主要采用：



**核酸，创造生命，保护生命，延长生命；  
人类，生于核酸，养于核酸，逝于核酸；  
核酸是组成遗传基因的唯一物质，核酸充足，为基因的自我修复提供了充分的底料；  
在某种意义上保健品只分两大类：核酸类保健品和非核酸类保健品。  
珍奥核酸—中国保健品信誉保证第 001 号**

(1) 核酸探针杂交法：用层析和高分辨电泳等技术纯化微克量的目的蛋白质，根据目的蛋白质纯品的氨基酸序列分析结果，人工合成相应的单链寡核苷酸作为探针，从 cDNA 文库中分离特异 cDNA 克隆。

(2) 免疫反应鉴定法：用表达型载体构建的 cDNA 文库，可用免疫学方法分组逐一鉴定各 cDNA 的表达产物，即以某种蛋白质的抗体寻找相应的特异 cDNA 克隆。

分离得到含有目的基因的阳性克隆后，必须对其作进一步的验证和鉴定，主要是进行限制酶图谱的绘制、杂交分析、基因定位、基因测序以及确定基因的转录方向、转录起始点等。

#### **目的基因获得常用方法讲解：反转录-聚合酶链反应法**

目的基因的克隆的第二种方法是反转录-聚合酶链反应法。1985，PCR 发明以后，RT-PCR 得到了广泛的应用。mRNA 经过反转录合成 cDNA 的第一链，不需再合成 cDNA 第二链，而是在特异引物协助下，用 PCR 法进行扩增，特异的合成目的 cDNA，用于重组、克隆。

#### **目的基因获得常用方法讲解：化学合成法**

目的基因的克隆，除了前两种方法之外，较小的蛋白质或多肽的编码基因可以采用人工化学合成法合成，其先决条件是已知目的基因的核苷酸序列。已知蛋白质的氨基酸序列，按相应的密码子推导出 DNA 的碱基序列。用化学方法合成目的基因不同部位的两条链的寡核苷酸短片段，再退火成为两端形成粘末端的 DNA 双链片段，然后将这些双链片段按正确的次序进行退火使连接成较长的 DNA 片段，再用连接酶连接成完整的基因。

#### **3.3.4 表型克隆筛选基因的方法**

表现克隆直接依据表型与基因组序列或 mRNA 表达序列的联系来克隆基因，而不必事先分化功能或连锁、定位，开辟了一条分离复杂性状相关基因的快捷可行的途径，是近年来发展十分的一类方法。包括功能克隆法、构建 cDNA 文库、差异显示技术的应用

#### **3.3.5 对已发现基因的改造**

通过对基因功能相关区域的研究，并采用基因修饰和点突变技术进行基因新功能的研究和再确证，从而达到提高目的基因表达产物的稳定性和体内半衰期，提高表达产物的生物学活性，降低有效使用剂量或提高表达产量，降低毒性或免疫原性。

基因工程改造在蛋白质工程药物的分子设计上的应用有以下几个方面：

- ①点突变技术更换活性蛋白的某些关键氨基酸残基
- ②通过增加、删除或调整分子上的某些肽段或结构域或寡聚链，使之活性改变，生成合适的糖型，产生新的生物学功能
- ③将功能互补的两种基因工程药物在基因水平上融合，即“择优而取”的嵌合型药物，其功

能不仅仅是原有药物功能的加和，还会出现新的药理作用

④对表达产物的后修饰可改善蛋白质工程药物的药理作用

总结：主要学习了反转录法、反转录-聚合酶链反应法、化学合成。