

Change Log

20260302 新建文档，整理DNA二级结构与超螺旋结构的内容

20260309 新加DNA与RNA综合比较内容，整理真核染色质组装内容

20260316 整理DNA复制内容（草稿）

20260323 整理DNA转录内容（草稿）

20260330 整理 DNA转录与翻译内容（草稿）

20260412 补充RNA参阅功能简述

20260504 整理DNA转录与翻译内容

20260505 整理基因工程内容，更新了前言与知识框架

20260521 整理细胞工程内容，更新了知识框架与参阅注释

20260529 整理胚胎工程内容，依据作业题与复习课调整了部分内容与注释

Change Log

20260530 进行第一次纠错，调整与新增部分注释

20260612 进行第二次纠错，未发现错误，并用此颜色新增部分注释

有时间就去看PPT

《生物工》这门课程的大主题为"生物技术与工程"

整理的笔记中有很多文字，正常写的是课上知识点，为了让材料更连贯易懂，使用这个颜色的铅笔在旁解释前因后果。

但结合作业题与复习课，可能部分此颜色内容也需要掌握，故而作了换色调整，但不保证全部调整准确

前半部分主要是核酸这类大分子的基础知识，比较简单，所以笔记比较少；后半部分基因工程、细胞工程与胚胎工程中涉较多前沿知识，所以笔记写的可能有些混乱

原PPT仅约610页，虽比生物I体量小，但后半部分在理解难度上较高，所以浏览完大概仅需一小时，所以考前突击至少留好两小时的时间

加上理解与记忆和求教AI的时间大概需要十小时

另外根据复习课，请留意重要词汇的名词解释，本笔记因后期无空插入，故而没有单独列出所有重点名词的解义

文内所标"☆"仅供参考

根据使用反馈，建议对照PPT看这份笔记

笔记注释PPT，PPT中图片形象化笔记

生物II知识框架

课程信息：2学分，20%+20%+60%
（5%日常考勤，15%两课堂作业）

基因工程

一、核酸基础知识：结构、复制、转录、翻译

二、转基因技术（重组DNA）

三、基因编辑技术：以CRISR-Cas9系统为例

细胞工程

一、植物细胞的培养与融合

二、动物细胞的培养与融合，胚胎干细胞（iPS技术）培养与单克隆抗体培养

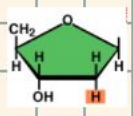
胚胎工程

一、受精与胚胎早期发育

二、试管动物技术

整理·核酸基础

一、关于核酸、核苷酸、多聚核苷酸的知识已经在预科一阶段学习，此处不赘述

核糖核酸 RNA	脱氧核糖核酸 DNA	DNA序列(DNA一级结构)
单链结构 	双链结构 	把DNA单链，以5'→3'碱基序列对其标记
戊糖2'碳连有-OH	戊糖2'碳没有羟-H 	维持一级结构的作用力是 石磷酸二酯键
碱基为AUTG	碱基为ACTG	
多聚体结构不稳定 2'碳-OH会攻击磷酸二酯键	多聚体结构稳定	

A:腺嘌呤　T:胸腺嘧啶　U:尿嘧啶
G:鸟嘌呤　C:胞嘧啶

二、脱氧核糖核酸的双螺旋结构 (DNA的二级结构)　维持作用力有 氢键、碱基堆积力→两碱基平面间疏水作用使其堆积重整。

1. DNA单链间相互吸引依靠碱基通过氢键的互补配对

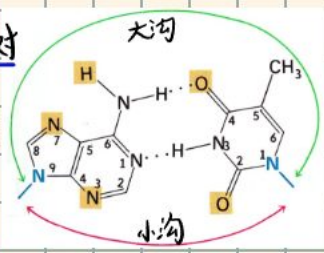
A=T　C≡G

2. 双螺旋结构中，①两条②DNA链反向平行，③右手螺旋，

④螺旋一圈平均包含10个碱基，外侧为亲水糖骨架，内则为疏水碱基

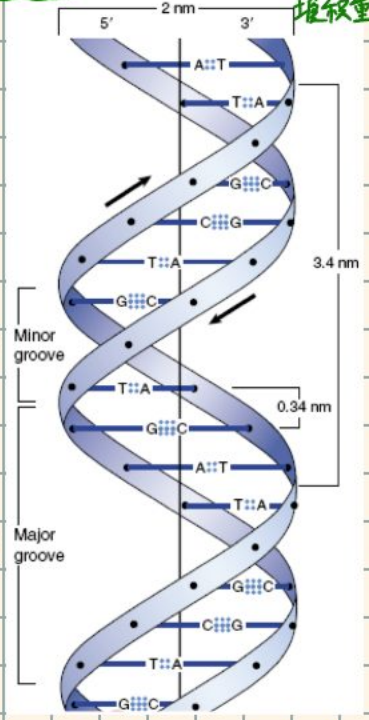
直径2nm，螺距3.4nm

⑥表面有大沟和小沟，⑦碱基互补配对



(不同沟内包含不同的化学基团

此处特异性对酶等的识别很重要)



3. DNA的二级结构异常会引起疾病

包括 串联重复，反向重复，三股螺旋等

↳复制转录时会成发夹结构，后文会大量提及

4. DNA的超螺旋结构

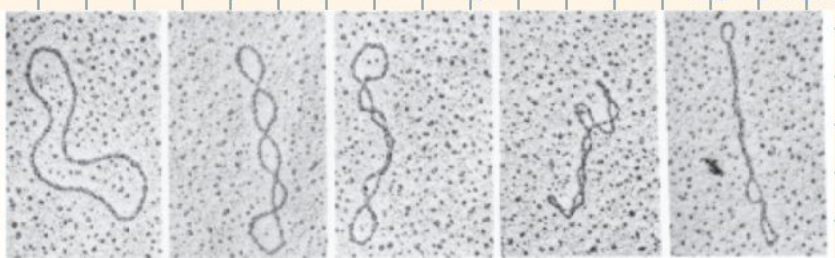
DNA双链的再盘绕

(1) 正超螺旋：外力紧缠，双链会盘绕出左旋的超螺旋

(2) 负超螺旋：外力往松绕方向搓转，双链会盘绕出右旋的超螺旋

原核生物细胞内DNA多以负超螺旋存在，以方便解旋复制。

同一个体内任一体细胞中的DNA的碱基组成都相同，每细胞包含此生物全部遗传物质的倒



(这个图片好像不太直观易懂)

三. 真核生物染色质的组装

1. (1) 组蛋白(H1, H2A, H2B, H3, H4) 参与较低级结构纤维的形成

(2) 非组蛋白参与高级结构的加工与修饰

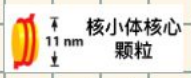
核小体核心颗粒	146bp
染色质小体	166bp
核小体	200bp

2. (1) 组蛋白(H2A, H2B, H3, H4各2个) 形成组蛋白八聚体 → DNA以左旋式盘绕该蛋白 → (2) 核小体核心颗粒 → 组蛋白H1接到其出口

OS: 这部分全是关键词, 不标蓝了







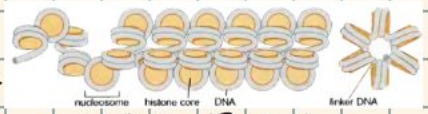


→ DNA自两侧延伸20bp → (3) 染色质小体 → 连接的Linker DNA连接染色质小体 → (4) 核小体串珠结构 (200bp)



→ 六个核小体为一组超螺旋 { ① 螺线管 / ② zigzag } → (5) 30nm纤丝

H1组蛋白衍接加工



经典6个一圈(60°)



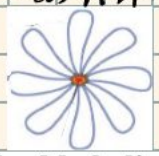
两两相对, 3对一圈(60°)

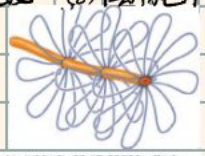
(正常生理状态下染色质的形态)

120°? 怎么记得老师说素描清改正过

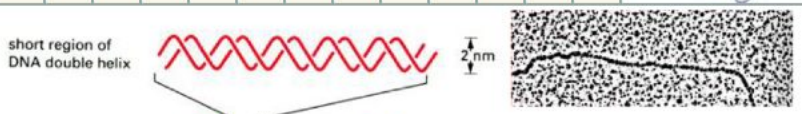
→ 拉动变形 → (6) 袢环 → 粘附聚集 → (7) 玫瑰花结 → 压缩后由非组蛋白体连接 → (8) 中期染色体

构成中心骨架

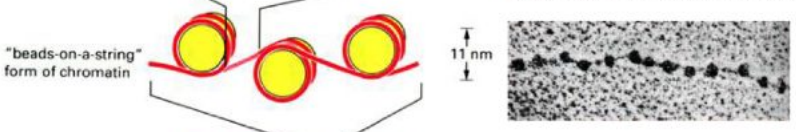




DNA double helix (2nm)
DNA双螺旋



"Beads on a string" structure(11nm)
串珠结构



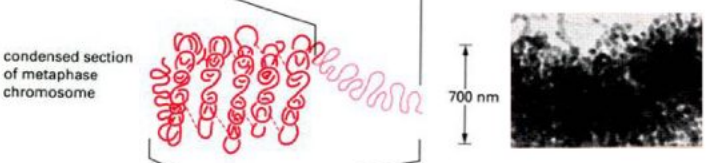
30nm fiber (30nm)
30nm纤丝



looped domain structure(300nm)
袢环



rosettes
玫瑰花结/微带



Chromosome
染色体



- 染色质：细胞分裂间期； 松散的细丝，30nm纤丝；松散状态
  方便 DNA 复制和转录

- 染色体：细胞分裂期；高度螺旋卷曲的致密的结构；紧密状态
  方便 遗传物质平均分配

四. 各种RNA

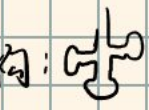
	细胞核和胞液	线粒体	功能
核糖体RNA	rRNA	mt rRNA	核糖体组分
信使RNA	mRNA	mt mRNA	蛋白质合成模板
转运RNA	tRNA	mt tRNA	转运氨基酸
核内不均一RNA	hnRNA		成熟mRNA的前体
核内小RNA	SnRNA		参与hnRNA的剪接、转运
核仁小RNA	SnoRNA		rRNA的加工、修饰
胞浆小RNA	scRNA/7SL-RNA		蛋白质内质网定位合成的信号识别体的组分

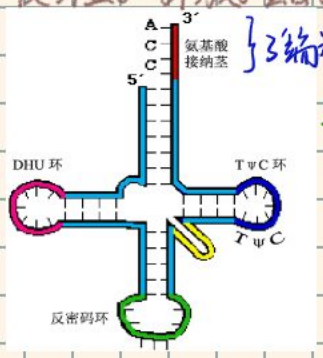
1. mRNA由DNA为模板，先转录得到hnRNA，将其中内含子切除后形成mRNA

mRNA是蛋白质合成的模板

↳ DNA上并非所有的核苷酸都编码蛋白合成
仅外显子部分对蛋白合成有影响

2. tRNA是蛋白质合成中的氨基酸载体

二级结构：　三级结构：倒"L"形



3'端为C-C-A-OH
与氨基酸羧基酯化"氨酰基"

3. 以rRNA为组分的核蛋白体是蛋白质合成的场所

↳ 细胞内含量最多的RNA，30S小亚基，50S大亚基

五. DNA复制（形成引发体——链延长——链终止）

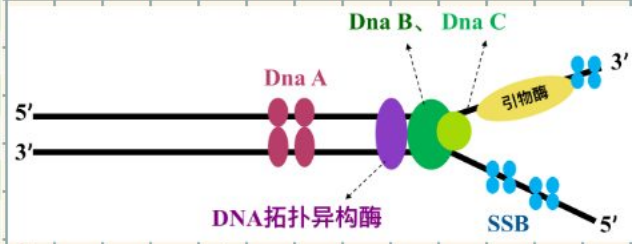
半保留复制
亲代双链分离后，每条单链均作为新链合成的模板的DNA复制方式

1. 复制起始（DNA解链，形成引发体）

(1) 酶

蛋白质	通用名	功能
Dna A		辨认起始点
Dna B	解旋酶	解开DNA双链
Dna C		运送和协同Dna B
SSB	单链DNA结合蛋白	稳定已解开的单链
Dna G	引物酶	催化RNA引物合成
拓扑异构酶		理顺DNA链

↳ 实为以DNA为模板的RNA聚合酶



引发体（链和酶的结合体）

(2) 机理

起始蛋白DnaA识别结合位点，使部分氢键断开，形成小复制泡

→ DnaC携DnaB与复制泡上已解链部分结合 → SSB与已解链部分结合以使其稳定

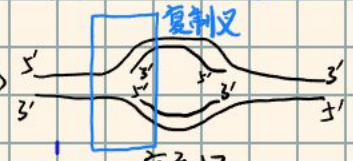
↳ Helicase，环六聚体蛋白　　同时使单链DNA伸直便于复制

→ 引物酶催化生成RNA引物（提供3'-OH），拓扑异构酶理顺DNA
（DnaG）　↳ 约10bp

解决进程中未解链部分形成正超螺旋

↳ I 切一条链，理顺后恢复（不需ATP）
↳ II 切两条链，理顺后恢复（需ATP）

2. 复制延长（前导链连续复制，后随链不连续复制）



易错：聚合活性方向指的新链延长方向

DNA-pol 依赖DNA的DNA聚合酶

- 辅复制蛋白，其与DNA-pol结合使其可迅速与引物结合
- 滑动夹装配器 携带DNA-pol Ⅲ 辅助滑动夹与解旋叉结合
  - 称为全酶体或复制体C
  - 3T
  - 可沿其方向切下dNTP

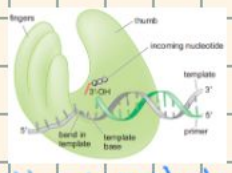
① DNA-pol Ⅰ 具有5'→3'和3'→5'外切酶活性（切RNA引物，填补空缺）→ 均具有5'→3'聚合活性

② DNA-pol Ⅱ 不具有外切酶活性（用于紧急状态修复）

- Ⅱ的聚合活性对模板的特异性不高

③ DNA-pol Ⅲ 具有3'→5'外切酶活性（复制延长阶段起主要作用）

(2) 聚合机理（主要依靠DNA-pol Ⅲ）（这个机理感觉看不到这么细，而且我没有放图，会不好理解）



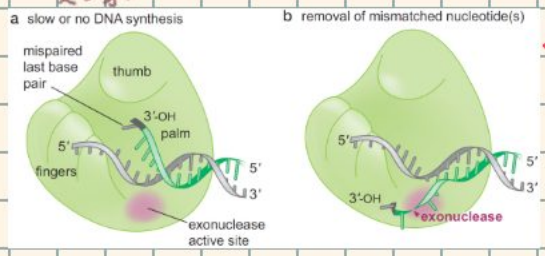
DNA-pol 核心酶的基本结构

① 游离的dNTP进入DNA-pol的聚合活性中心 → ② 碱基配对，辅助核苷酸进入活性中心 → ③ 活性中心的分辨器氨基酸与2'-H识别，促进前者核苷酸3'-OH攻击dNTP的α磷酸键 → ④ 3'-OH在金属离子A的作用下与α磷酸结合

- A+T与C+G拥几乎相同的几何大小
- 若2'-OH，则其与分辨器氨基酸大位阻使其α磷酸结位
- 此过程中DNA pol构象改变由张状变为紧状
- 焦磷酸
- 主要是A使O-H极性增大，使O⁻亲核性增强

金属离子B吸引β与γ磷酸辅助其脱离

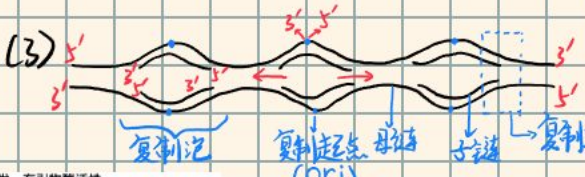
DNA复制复合体包括：滑动夹及其装配器，引物酶，解旋酶，DNA聚合酶核心酶(×3)



聚合时对错配dNTP，在③中发现后，会将其转移至外切核酸酶活性位点，错配dNTP被切除。

- 由于空间位阻，使此结合体与聚合酶活性位点亲和性降低

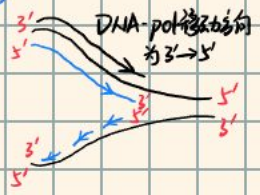
(3)



① 对5'→3'的母链，子链沿5'→3'方向连续延长，子链称为前导链

② 对3'→5'的母链，DNA-pol仍沿3'→5'移动，在复制叉后合成较短小的冈崎片段，而后其由DNA连接酶连接，形成完整的子链，称为后随链

- 不连续合成
- DNA ligase
- 解旋酶简称为 helicase



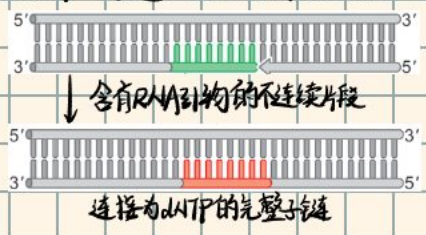
DNA-pol α	起始引发，有引物酶活性
DNA-pol β	参与低保真度的复制
DNA-pol γ	在线粒体DNA复制中起催化作用
DNA-pol δ	延长子链的主要酶，有解螺旋酶活性
DNA-pol ε	在复制过程中起校读、修复和填补缺口的作用

真核细胞DNA聚合酶（我认为了解即可）

滞后链上的DNA复制要以不连续复制的方式首先合成一些片段，称为冈崎片段

3. 复制终止（切除引物、填补空缺、连接切口）

(1) 后随链不连续片段连接



- RNase H

① 依赖RNA的核酸外切酶将RNA引物切除，再由DNA-pol Ⅰ切去残余NTP → ② DNA-pol Ⅰ依碱基互补配对将dNTP沿5'→3'聚合上去 → ③ DNA连接酶使3'-O-H与5'-P-OH生成磷酸二酯键

- 仅聚合，则其3'末端与后段间存在Nick空隙
- 此过程消耗ATP

或 直接由DNA-pol Ⅰ切引物与补空缺，再由DNA ligase连接

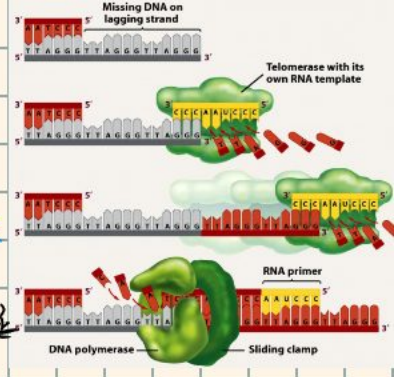
- DNA连接酶（后面基因工程基本工具）

(2) 5'端缩短

补足机理中，DNA-pol Ⅰ需上游dNTP 3'-OH发动，导致线状DNA中5'端无法补足

- 环状DNA不受影响

为避免此问题，在补足机制引入端粒与端粒酶



端粒酶中包含 端粒酶RNA(CCCCUAA)，逆转录酶与协同蛋白

↳ 故而端粒为TTAGGG循环序列

机制：①端粒酶与DNA单链3'末端结合，在其单链上逆转录出新片段

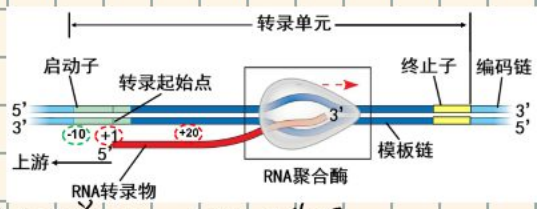
→②沿5'→3'持续滑动与逆转录 →③复制时RNA引物结合至新延伸出的DNA与相关蛋白结合体，称为端粒

伸出(TTAGGG)片段上，则此段3'丢失 →④使原链信息保持完整

↳ 端粒的缩短表示细胞的衰老

六、DNA转录（起始——延长——终止）

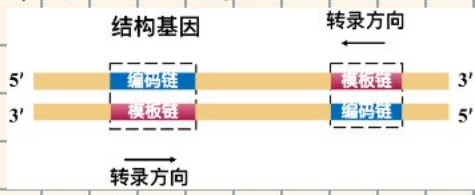
1.转录的起始阶段



(1)①一个转录单元包括从启动子开始至终止子结束的DNA序列

启动子后段一处为转录起始点，此处核苷酸被标记为"+1"

②原核细胞的一个转录单元含有多个编码基因，真核细胞中一个转录单元仅一个编码基因



③DNA上编码基因与不编码基因交替出现

④编码基因片段中，某一股DNA单链为模板链，另一股为编码链

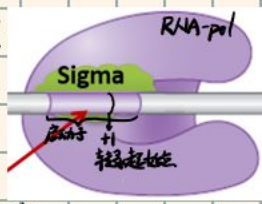
常以其序列来描述DNA序列

且DNA分子中模板链不总只出现在一条单链上

✡转录的不对称性

✡(2)限速阶段(起始) 会发生起始失败的情况

①RNA-pol核心酶与σ因子结合，形成与启动子结合能力更强的RNA-pol全酶

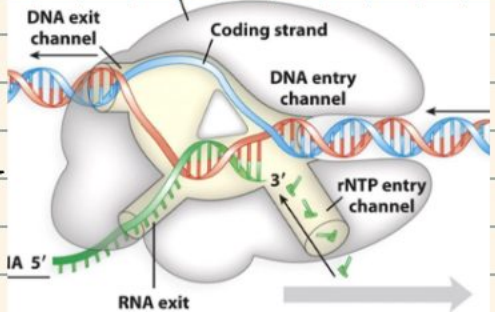


→②RNA-pol全酶与启动子结合，形成闭合复合体 →③结合后引发转录起始点附近的DNA分解旋，形成开放复合体，解旋部分称为转录泡

→④RNA-pol向下游移动，当合成超10bp的mRNA后，形成稳定的三元复合体(RNA-pol、DNA模板与增长中RNA链) →⑤σ因子因不在复合体内，则在RNA-pol逃离启动子过程中逐渐与其解离

↳参与下一个转录起始，"σ循环"

2.转录的延伸阶段



(1)RNA-pol具有5'→3'聚合活性与校对活性

RNA-pol沿DNA模板运动的为3'→5'

故转录仅可沿一个方向进行

大致过程：①转录泡内形成DNA-RNA杂交链 → ②随着RNA-pol的移动，RNA单链从RNA-pol上脱落 → ③RNA单链从RNA出口通道释放 → ④模板链与原对应编码链重新双螺旋

(2) 当出现NTP错配时

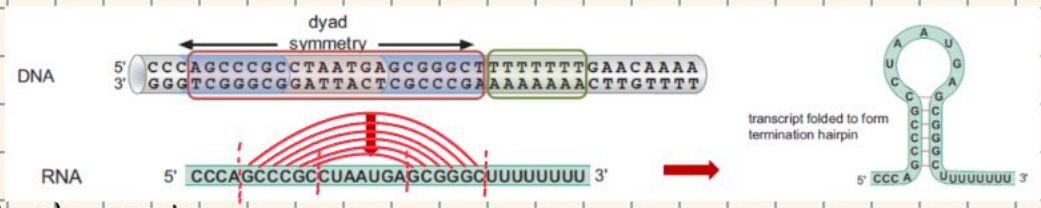
① RNA-pol后退，水解末端NTP（焦磷酸化编辑）

② RNA-pol后退，切除含有错误的一段RNA序列（水解编辑）

3. 转录的终止阶段

内源性终止子

(1) ρ因子非依赖性终止子



①特点：富含G≡C的非完全回文序列，而后出现连续4~8个dATP

反向重复序列

②机理：回文部分G≡C对应RNA片段，由于G≡C稳定且氢键能高，形成发夹结构（茎环结构）

阻止RNA-pol全酶移动

而dA-rU间成键不强，易辅助脱落

(2) ρ因子依赖性终止子

无前述特殊结构，ρ因子实为一种解旋酶 使末端DNA-RNA杂交链解旋

七. 翻译（起始 → 进位 → 成肽 → 转位 → 终止）

1. 遗传三联体密码

(1) 起始密码子：AUG ；终止密码子：UAA, UGA, UAG

使用频率 UAA > UGA > UAG

(2) 密码子在mRNA的开放阅读框(ORF)内连续分布（连续性）

故而出现基因缺陷时，丢失一个基因对密码的影响（框移突变）

(3) 密码子仅可从5'→3'方向阅读，且同一氨基酸可由多个密码编码，具有简并性

（方向性）

(4) 密码子与反密码子互补配对时，有时U可与G配对

摆动配对 通用性：自病毒乙类共用一张密码表

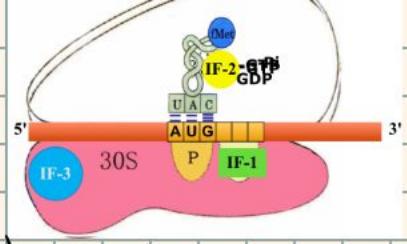
2. 核糖体

小亚基上有 A位（氨酰位）结合氨酰-tRNA（30S）

P位（肽酰位）结合肽酰-tRNA（30S）

大亚基上有 E位（排出位）释放已卸氨基酸的tRNA

3. 翻译过程



(1) 起始

①核糖体大小亚基分离 → ②mRNA与小亚基结合，且起始位点AUG → ③IF3因子结合到小亚基头部，以使大亚基不会与小亚基结合 → ④IF1因子结合到A位点 → ⑤起始氨基酰tRNA（甲酰甲硫氨酸fMet-tRNA）结合至P位点（由IF2辅助） → ⑥大亚基与上述结合，三个IF因子脱去，形成起始复合物。

↳ fMet-tRNA与起始密码子特异性结合

甲酰化可用于识别与翻译连接。

(2) 延长

①密码子与反密码子间结合，使目标tRNA进入A位（进位/注册）

→②在转肽酶催化下，P位上与tRNA相连肽链的 $-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O-R$ 与A位氨基酸上 $-NH_2$ 形成肽键（成肽） → ③在转位酶催化下，核糖体沿5'→3'方向移动，使原A位上肽酰tRNA进入P位，空载tRNA进入E位并离开（转位） → ④下一轮

转肽酶，在大亚基23SrRNA上

↳ 与延长因子EF-G合作

(3) 终止

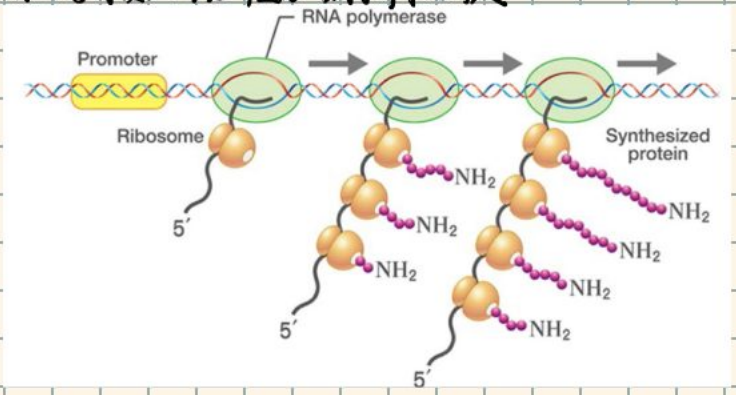
①释放因子RF与终止密码子在A位结合 → ②RF向P位多肽提供水分子使其脱离 → ③大小亚基与mRNA分离

与相应的酶

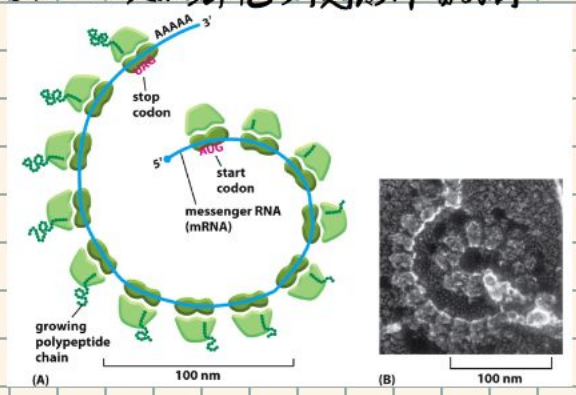
↳ -COOH末端形成

故而肽链应沿N→C方向阅读

4. (1) 原核细胞转录翻译耦联



(2) 原核真核细胞多核糖体翻译



整理·基因工程 { 转基因(引入外源基因) / 基因编辑(删去自身基因)

一. 基本工具

1. 限制性核酸内切酶(限制酶) { 内切:在基因片段中间切 / 外切:从DNA端点切,具方向性 } { 识别特定序列 / 切除特定位点 }

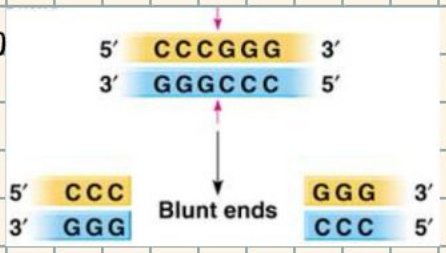
(1)用处:识别双链DNA分子中的特定序列,通过水解磷酸二酯键来切断双链DNA分子 (产生ATP)

(2)对象:其靶序列一般为回文序列(反向重复序列)

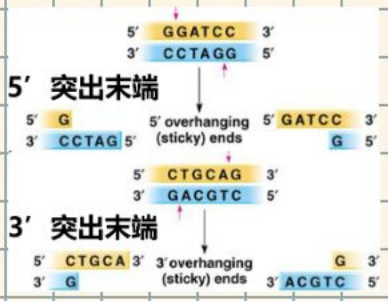
GCACGTGC / CGTGCACG — GCTGCAGC TGCAGC / CGACGTCG ACGTCG

(3)产物:由于限制酶仅切割特定dNTP与dNTP间键,故会有不同的末端

①平末端



②黏性末端



2. DNA连接酶

对没有完全配对的两个末端,需要DNA-pol与dNTP将其补足

(1)对象:有缺口的双链DNA,形成磷酸二酯键 消耗ATP

不能连接单链DNA 已通过氢键建立互补配对

(2)种类:①E.coli DNA连接酶 → 黏性末端 (来自大肠杆菌)

②T_4DNA连接酶 → 黏性末端与平末端 (来自T_4噬菌体)

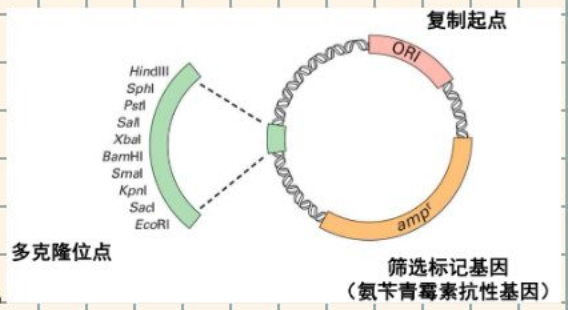
3. 质粒 裸露、结构简单,独立于细菌拟核之外的双链环状DNA

(1)用处:作为目的基因载体进入细胞

(2)特征:①具有复制起点 ori 序列,即可自发复制

②携带筛选标记 通常为抗生素抗性基因

③具有多克隆位点,即多种限制酶酶切位点



(3)其他可作为基因载体:噬菌体载体、酵母人工染色体、病毒载体

二. 重组DNA(转基因技术)

1. 获取目的基因("分")

编码蛋白质的结构基因

(1)从基因文库获取

它含质粒文库、噬菌体文库、红酵母人工染色体

①基因组文库(某生物DNA的全部片段的集合)

获取：鸟枪法（直接分离法）：培养→筛选→分离→克隆

提取DNA→切割→导入载体→外源扩增

核酸杂交：使用目的基因互补序列的核酸探针

原位杂交：使用的荧光标记探针上的荧光染料

②互补DNA文库（属于部分DNA文库）

→生物某时期全部mRNA的反转录结果，cDNA

核酸杂交

产生特定性状

获取：反转录法：培养→筛选→分离→克隆

提取mRNA→反转录DNA→导入载体→外源扩增

(2)化学合成法：最古一，但仅限合成小片段基因

(3) PCR技术扩增目的基因

多聚酶链式反应

机制：①94℃高温变性，使DNA片段变性解旋为单链

②60℃低温退火，引物DNA结合，形成局部双链

③72℃中温延伸，Taq酶作用下，从引物5'→3'延伸，合成基于模板的DNA双链

→一种耐高温的DNA-pol

→一次扩增可使目的基因增多一倍

2. 构建表达载体（"七切""接"）（基因工程的核心）

质粒 → 单酶切得一个切口（用一种酶，获得相同末端）

DNA分子 → 双酶切得到目的基因

→ DNA连接酶得到重组DNA分子



3. 导入受体细胞（"转"）

复习课上详细讲这些内容（此图来自Codex）

受体细胞	常用方法	关键原理/特点
植物细胞	农杆菌转化法、基因枪法、花粉管通道法	农杆菌 Ti 质粒 T-DNA 可转移并整合到植物染色体，常用于双子叶植物。
动物细胞	显微注射法	常将目的基因注入受精卵雄原核；雄原核较大、位置较清楚、便于操作。
微生物细胞	$CaCl_2$ 感受态细胞法、电转法	Ca^{2+} 和热激提高细胞摄取外源 DNA 能力；电击短暂改变膜通透性。

农杆菌转化法流程

目的基因插入 Ti 质粒 T-DNA 区 ⟶ 重组 Ti 质粒导入农杆菌 ⟶ 农杆菌感染植物受伤组织 ⟶ T-DNA 带目的基因整合到植物染色体 ⟶ 组织培养再生转基因植株。

方法：
- 将目的基因导入植物细胞：农杆菌转化法（T-DNA）、基因枪法、花粉管通道法
- 将目的基因导入动物细胞：显微注射法（核原核）
- 将目的基因导入微生物细胞：感受态细胞法（化学转化法，利用$CaCl_2$热激）、电转法

4. 目的基因检测与鉴定

(1)基于载体遗传标记

①抗药性筛选：利用质粒上标记基因的抗性，将空细菌筛去，保留含有质粒的菌

②显色筛选：以蓝白斑筛选为例，

lac Z基因中包含多克隆位点，目的基因插入后，lac Z基因失活，不再表达特定

的显色蛋白，以此判断长养菌落中目的基因是否插入

→ 显色底物为X-gal，非β-半乳糖苷酶

→ Lac Z基因表达产物可使X-gal显蓝

(2) 基于克隆片段序列

① 菌落原位杂交：使用带放射性同位素标记的DNA探针，显影拍摄并寻找

② 限制性酶切图法：由于目的基因插入前后酶切位点的变动，

对其酶切产物电泳检测

★ ③ 核酸杂交：将待测基因酶切并电泳分离后再用探针标记显影

DNA探针：Southern印迹法 DNA-DNA分子杂交

RNA探针：Northern印迹法 DNA-RNA分子杂交（RNA：mRNA）

④ DNA测序：利用ddNTP逐个测定待测基因序列

(3) 基于外源基因表达产物

① 外源基因蛋白质功能检测：故名思义

② 蛋白质凝胶电泳检测：将不同体量的蛋白利用电泳分离，而后使用抗体标记显影

(Western印迹法)

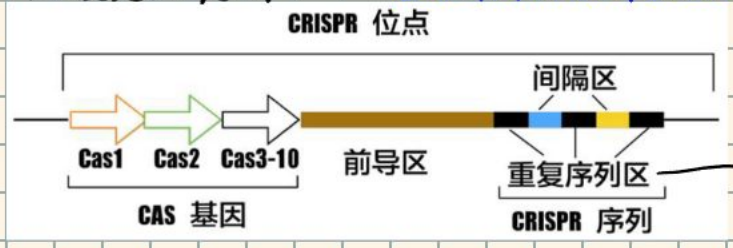
凝胶易碎，故将蛋白印至特定膜上

三、基因编辑

主要介绍 CRISR-Cas技术

1. CRISR位点

短回文重复序列　CRISPR序列原本为生物用于自身免疫



→ 此区内为旋转回文序列，可形成发夹结构

5'-CGATATCTAGC-3'
3'-GCTATAGATCG-5'

前导区起启动子作用，负责启动转录

Cas基因可编码一系列CRISR关联蛋白

★ 2. 以II类CRISR-Cas系统为例，其只需一种Cas9蛋白

改造基因编辑工具并入侵、识别和剪切目标DNA过程：

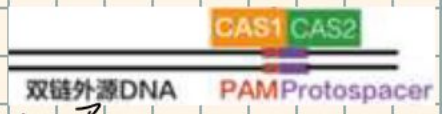
(外源)

(1) 目标DNA的俘获

原间隔序列临近基序，常记为NGG（A,T,C,G）

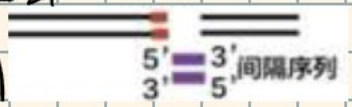
CRISR-Cas系统通过对目标DNA的PAM序列的识别区分其身份，

则在CRISR-Cas系统第一次接触此目标DNA时，需：



①通过Cas1与Cas2蛋白复合物识别其PAM序列 → ②Cas1&2蛋白复合物将PAM序列的临近序列剪切下来作为候选间隔序列

↳具有核酸内切酶活性



→ ③在其他酶的帮助下将候选间隔序列整合并增至原前导区序列与CRISR序列之间

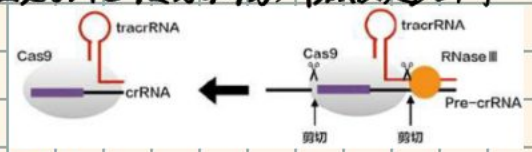
→完成对目标DNA的记忆存储



(2) crRNA的产生

①由现有CRISR序列中DNA转录 {(i) pre-crRNA：整个CRISR序列的转录产物

(ii) tracrRNA：重复序列区转录产物，形成发夹结构



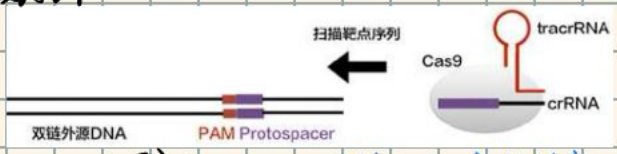
②pre-crRNA、tracrRNA与Cas9蛋白组装为复合物

③复合物与RNase Ⅲ酶协助将 pre-crRNA 剪切为 crRNA →

每crRNA包含一个间隔序列与部分重复序列

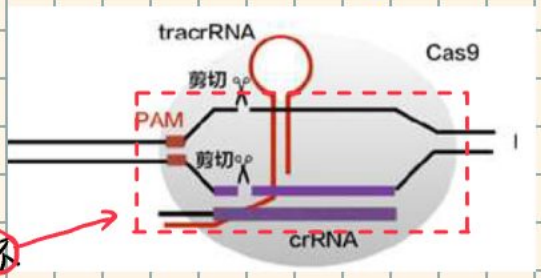
(来自目标DNA)

(3) 靶向干扰目标DNA



①crRNA，tracrRNA与Cas9蛋白复合物，识别目标DNA上可互补配对的片段

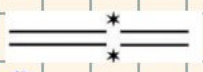
→②Cas9识别PAM，将复合物定位到PAM与间隔序列源序列区域



→③定位后将目标DNA此区域解旋，形成R环

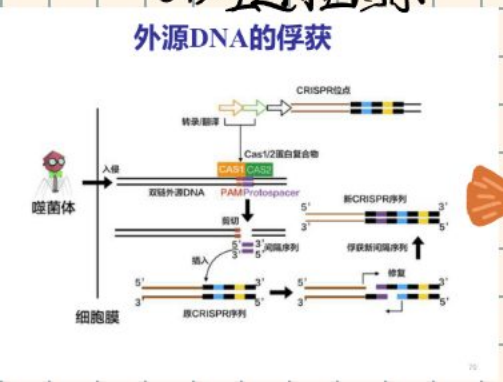
→④R环中目标DNA的两条链被Cas9剪切，即目标DNA双链断裂

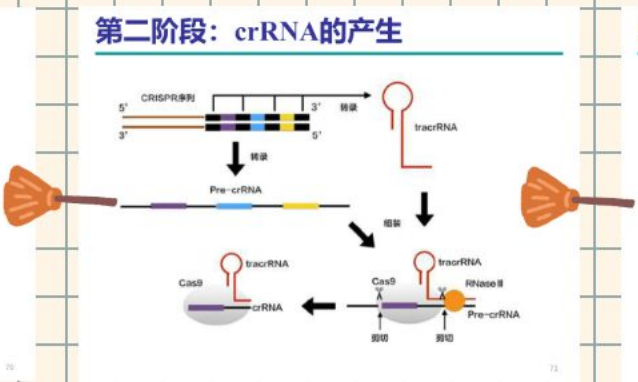
↳此蛋白内包含两核酸内切酶结构域

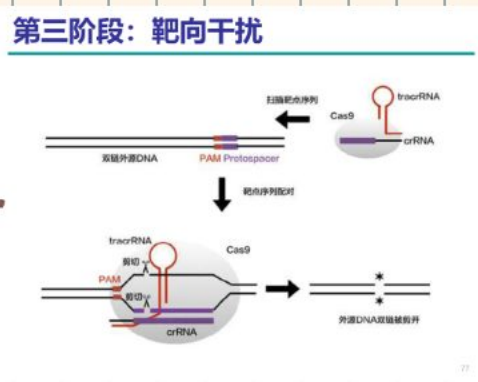


→⑤目标DNA无法正常表达，实现靶向切除

(4) 全过程图示







(4) 技术应用

① Cas9与特异性gRNA(向导RNA)协同敲除目标基因片段

② 目标DNA两处双链断裂后，其自身修复功能激活

(1) 周围没有供体DNA，会把开的DNA两端强行连接，易产生框移突变 → 非同源末端连接(NHEJ)

(2) 周围有供体DNA提供与断点两端匹配，则可精准修复 → 同源定向修复(HDR)

用于基因敲除

用于基因替换与基因插入

(5) CRISR-Cas系统的另类应用

使Cas9切割域突变失活，其仍具有与DNA结合能力，称为dead Cas9

则gRNA可引导dCas9与特定DNA片段结合，

可控制RNA-pol延伸，即可介导转录的激活与抑制

整理·细胞工程

一. 植物细胞工程

1. 植物组织培养

(1) 原理：植物细胞的全能性

能力：植物细胞 > 动物细胞；受精卵 > 生殖细胞 > 体细胞

→ 原因：体细胞都是由受精卵分裂分化而来

指生物体的细胞具有使后代细胞形成完整个体的潜能

但基因在时间上和空间上选择性表达

(2) 条件：①使细胞离体

②提供植物生长所需的营养物质、激素及适宜的环境条件

培养基碳源为蔗糖，另特有植物激素

(3) 步骤：①使离体的植物器官、组织或细胞脱分化 → ②转变为未分化细胞，形成愈伤组织

→ 多对植物形成层细胞无菌接种

避光培养，以免形成维管组织

→ ③愈伤组织再分化为根、芽等器官 → ④长成新植物体

愈伤组织：排列疏松而无规则，高度液泡化且无定形

培养基内有琼脂作支撑

先发芽再生根

①便于开始光合作用

②细胞分裂素多于生长素，优先生芽

③先生根可能限制芽的发育空间

2. 植物体细胞杂交

(1) 原理：细胞膜的流动性

人工诱导：物理：离心、振动、电刺激；化学：聚乙二醇

(2) 步骤：①植物细胞A、B，加入纤维素酶、果胶酶去除细胞壁 → ②原生质体A、B进行融合

→ ③融合的原生质体再生出细胞壁 → ④植物组织培养 → ⑤全新个体

↳ 杂交完成的标志

(3) 当下成果：杂交亲本间基因相互干扰，使子一代个体性状难以预测

3. 植物细胞工程的应用

(1) 快速繁殖、培育无菌植物

(2) 作物脱毒

(3) 人工种子

人工薄膜+人造胚状体

(4) 单倍体育种

纯合子后代，性状遗传稳定



(5) 细胞产物的工厂化生产

4. 优点：

①可大批量生产

②取材少

③培养周期短

④可以保持作物的优良性状

二. 动物细胞工程 此章附名词解释很重要

细胞贴壁，接触抑制，细胞株，细胞系，原代培养，传代培养

1. 动物细胞培养（纯培养，无分化）

(1) 原理：细胞增殖

(2)目的：细胞扩增，获取目的蛋白或细胞

(3)条件：① 营养丰富的培养基（不能添加葡萄糖，另特有动物血清）

② 严格无菌环境

③ 95%空气与5% CO_2，调整pH

(4)过程：①动物组织或器官，剪碎，加酶 → ②单细胞悬液，发生细胞贴壁（悬液中分散的细胞很快就会附着在瓶壁上）

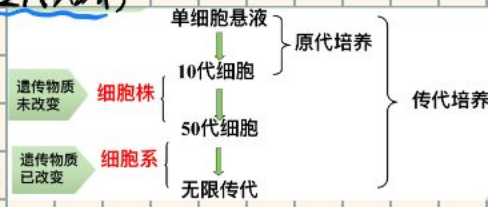
至此为原代细胞培养

→ ③加入培养液，培养至10代细胞时出现生长停滞，此时发生接触抑制

- (i) 从初代取出还未进行培养的细胞 → 原代细胞
- (ii) 培养的第代至含10代以内的细胞 → 原代细胞培养

当贴壁细胞分裂生长到表面相互接触时，细胞会停止分裂增殖（癌细胞无接触抑制）

→ ④使用胰蛋白酶将细胞从瓶壁上解离，加入新培养液，将细胞分离稀释，并从原培养瓶转接至新培养瓶，开展传代培养，



→ ⑤传代培养至第10代再出现生长停滞，细胞株培养完成（至此可认为遗传物质未改变）

→ ⑥若无限传代，则认为扩展出不同细胞系（必然出现遗物改变，使细胞癌化）

2. 动物细胞核移植技术（克隆技术的一部分）

第一部分是胚胎移植

(1)原理：动物细胞的全能性

(2)目的：获得胚胎干细胞，以此发挥其全能性

(3)过程：

① 个体A → 体细胞 → 培养供体细胞

② 个体B → MII中期时卵母细胞 → 显微操作去除核

①细胞最②含有支持胚胎生长发育的物质/细胞质

③ 供体细胞A注入去核卵母细胞B → 通过物理或化学方法使其融合，得到胚胎干细胞 → 刺激其开始分裂

(4)问题

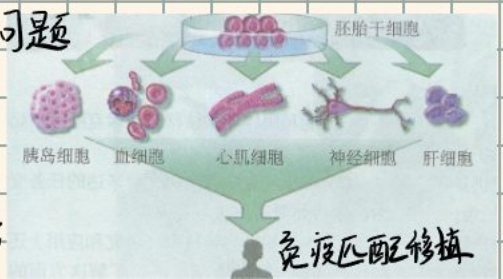
① 成功概率低 → 带来伦理问题

② 克隆动物存在 异常肥胖、发育困难、免疫失调 等问题

(5)作用

发挥其全能性

所获胚胎干细胞可用于特定需求细胞的培养



(6)* 诱导性多潜能干细胞的培养(iPS细胞培养)(前沿,详细内容应该不会考)

因其不使用卵母细胞,不存在胚胎干细胞,故而解决了干细胞培养中的伦理问题

①培养供体体细胞 → ②转染c-myc基因驱动细胞无限增殖,再引入Oct3/4与Sox2基因协同激活并调控多能性基因网络 → ③筛选转染成功的细胞,加以培养得iPS细胞 → ④iPS细胞分化为不同组织细胞与胚胎干细胞

3. 动物细胞融合技术(与植物细胞融合类似,这里只放区别)

比较项目	植物体细胞杂交	动物细胞融合
融合的原理	细胞膜的流动性	细胞膜的流动性
步骤	去除细胞壁后诱导原生质体融合	使细胞分散后诱导细胞融合
诱导方法	物理(离心、振动、电激) 化学(聚乙二醇)	物理、化学方法(同左) 灭活的病毒
用途	获得杂种植株	主要用于制备单克隆抗体

→ 此步操作多是将多个原生质体/细胞一起混合

4. 单克隆抗体的获取

(1)过程

灭活的病毒表面有融合蛋白 → 细胞膜被病毒颗粒表面 → 细胞融合



①特定B细胞(能从免疫的细胞中分离得到) 与骨髓瘤细胞(利用灭活病毒)融合 → ②选择培养(利用HAT等特定培养基) → ③利用抗原进行阳性克隆筛选 → ④克隆扩增目的杂交瘤细胞 → ⑤体内/体外培养目的杂交细胞 → ⑥获得单克隆抗体

(2)概念(单克隆抗体)

由单个B淋巴细胞经过无性繁殖(克隆),形成基因型相同的细胞群,这一细胞群所产生的化学性质单一、特异性强的抗体

(3)特点:特异性强,灵敏度高,产量高

普通B细胞在体外无法无限增殖,且寿命较短

整理·胚胎工程

一、体内受精与早期胚胎发育(胚胎工程预备知识)

1.生殖细胞的产生(大部分为初一学过的,对于简单内容不再叙述)

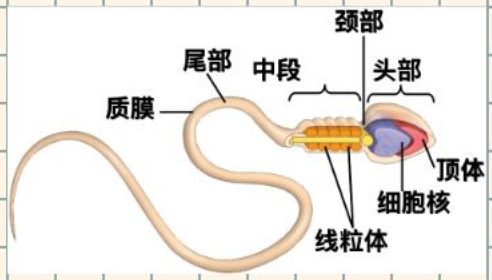
↳ 请留意减数分裂过程中,细胞内DNA数量的变化

(1)精原细胞在生物体出生后会重启有丝分裂,进一步减Ⅰ与减Ⅱ得到精子细胞

(2)精子细胞变形为精子(青春期)

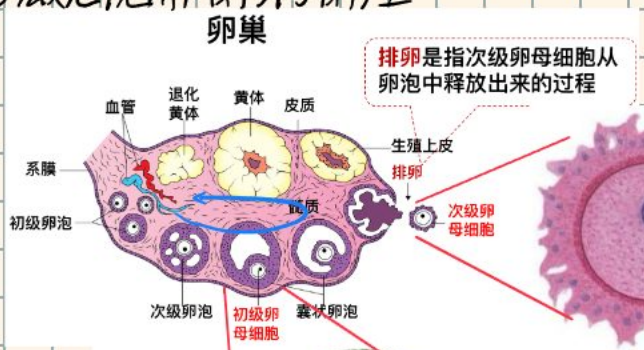
高尔基体 → 顶体 } 头部
细胞核 }
线粒体 → 聚为线粒鞘 } 颈部
中心体 → 微管 → 鞭毛 } 尾部

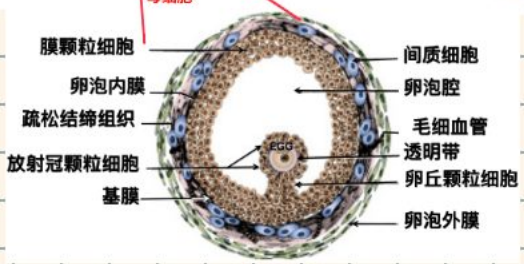
其余细胞质 → 原生质滴 → 脱落



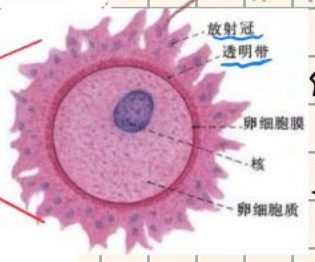
(3)卵原细胞在生物体出生时便已全部完成第一次减数分裂,成为初级卵母细胞

(4)云观视角下的卵子的产生





→ 第一极体在卵细胞膜与透明带之间



卵子排出时与第一极体一同进入输卵管

其停留在第二次减数分裂中期

对人而言

其他某些生物可能停留在MⅠ中后、MⅡ前等

2.受精

(1)精子获能:精子必须在此雌性动物的生殖道发生相应的生理变化,才激活顶体酶,获得受精能力

卵子准备:在输卵管发育至减Ⅱ中期

(2)受精过程:(发生在输卵管内)

① 精子穿越放射冠和透明带(顶体内的酶释放出来并溶解放射冠内卵丘细胞间质)(顶体反应)

→ ② 精子细胞膜与卵细胞膜融合(透明带阻止后来的精子进入卵细胞)

→③精子细胞核入卵(卵细胞膜发生变化使透明带更结实)→④精子细胞核重组为雄原核

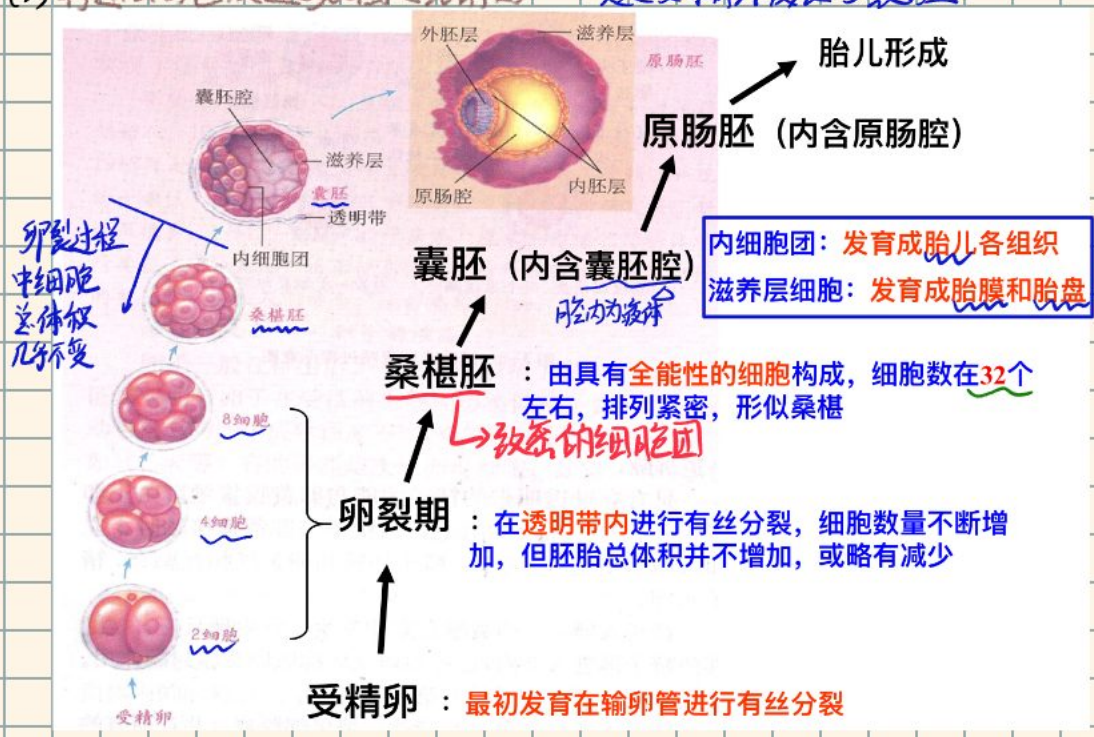
→⑤与上一步同时,卵子完成减Ⅱ,释放第二极体,形成雌原核

→⑥此雄原核靠近,核膜消失,染色体组合,合成受精卵→⑦受精结束

3. 胚胎早期发育

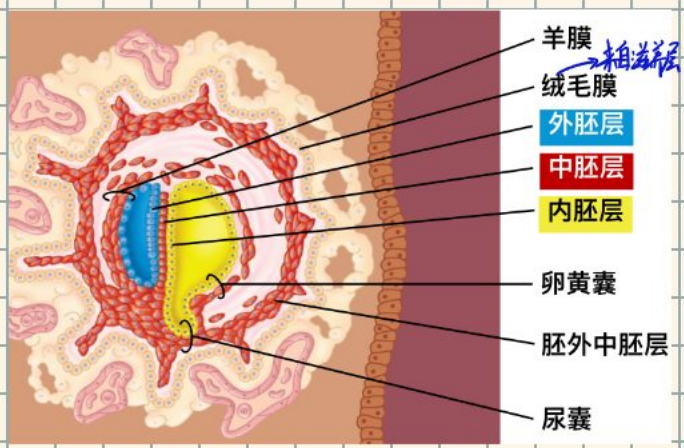
(1) 受精卵向子宫转移与卵裂同时进行

(2) 再怎么写也没这张图总结的好 从受精卵发展为囊胚



卵裂过程中细胞总体积几乎不变

(3) 囊胚附着到子宫壁上后向胚胎发育



外胚层	中胚层	内胚层
神经系统	骨骼	肝、胰等腺体
感觉器官	肌肉	呼吸道上皮
表皮及其附属结构(如汗腺)	循环系统	消化道上皮
	泌尿系统	
	生殖系统	

二、试管动物技术:通过人工操作使卵子和精子在体外条件下成熟和受精

并通过培养发育成早期胚胎后,再经胚胎移植产生后代。

- 体外受精
- 早期胚胎培养
- 胚胎移植

1. 与正常生育不同之处：受精与胚胎早期发育均在体外完成

2. 生殖细胞的采集与准备

(1) 卵细胞

①小型动物(包括猪、羊等)常用超数排卵技术：

利用促性腺激素，使卵巢中有更多卵被排出，而后从输卵管中冲取卵子

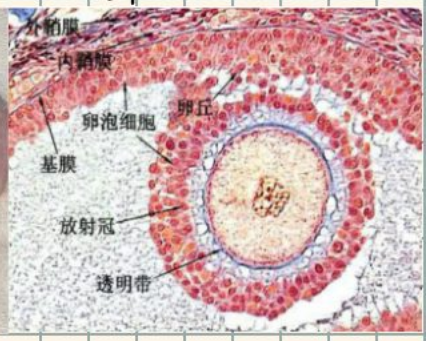
↳第二次减数分裂中期

大型动物(牛等)常直接从卵巢中采集卵母细胞 → 初级卵母细胞

(i) 活体采卵：借助B超、内窥镜、腹腹镜等在活体卵巢内定位卵泡并吸出

(ii) 屠宰后从卵巢上采集





②选择：常选择具有卵丘细胞且卵母细胞细胞质均匀的卵母细胞

(A、B级卵母细胞)

③培养：

培养目标：使靠近卵母细胞的卵丘细胞形成放射冠

培养条件：牛血清、促性腺激素、抗生素等，二氧化碳培养箱中

(2) 精子

①收集：假阴道法、手握法、电刺激法

②体外获能：啮齿动物和猪等，培养法：精子在获能液中获能

牛、羊等　　化学诱导法：一定浓度的肝素或钙离子载体A23187溶液

3. 受精溶液中完成受精

4. 早期胚胎培养

二氧化碳培养箱内，38.5℃，100%湿度，含5%CO_2的空气

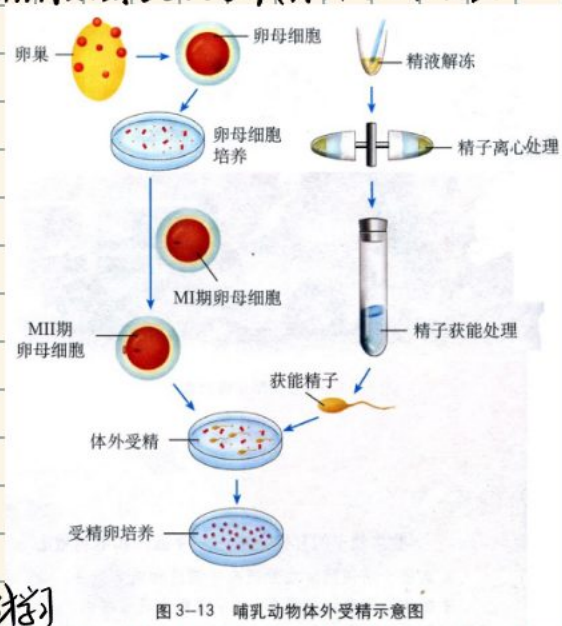


图 3-13　哺乳动物体外受精示意图

5. 发育到适宜程度时，将胚胎移植到母体子宫

↳试管婴儿是在8细胞或16细胞阶段

三. 胚胎分割等其他胚胎工程技术，课上未做重点讲解，可查阅教材扫

Appendix 九次随堂笔记

20260316

DNA复制

一、

1. 原则：碱基互补配对原则

2. RNA引物，提供3'端-OH引导（AUTG rNTP）

3. 复制底物：dNTP（ATCG）→ 复制时3'-OH攻击α-P使β,γ磷酸键断开

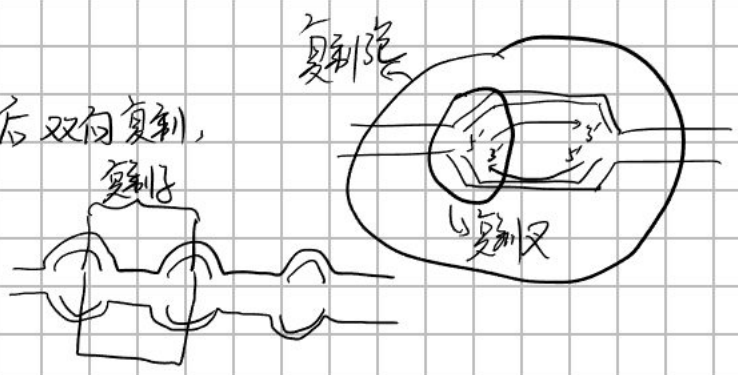
4. 聚合酶（依赖DNA的）

子新链的延长仅沿5'→3'方向进行

二、

1. 原核生物 单起点双向复制，由一个oriC解链后双向复制，

2. 真核生物 多起点双向复制，多复制子复制



三、DNA聚合酶（DNA-pol）

5'→3'聚合活性

核酸外切酶活性

1. 原核：

DNA-pol Ⅰ：5'→3'聚合，3'→5'外切，5'→3'外切 切除RNA引物，填补空缺

DNA-pol Ⅱ：5'→3'— 仅有聚合功能，用于应急状态修复

DNA-pol Ⅲ：5'→3'—，3'→5'外切 复制延长中主要起作用

2. 真核 3. 聚合机制

α 起始	检测进入TP的base pair与2'-OH集激活活性位点，从而实现base配对并使5'-OH为的
β 处理错误	（β,γ磷酸）
γ 线粒体	碱基配对后聚合酶构象改变以对dNTP产生作用，使其到达正确位置聚合
δ = Ⅲ	
ε = Ⅰ	配对失败会将其引入外切酶活性位点并切除（3'→5'外切活性）

4. 复合过程

(1) 起始：解旋链，形成引发体（引入引物，进入延长阶段）

DnaA 起始蛋白，识别复制点
DnaB 解旋酶（识别位点能力较差） 解旋时需破坏氢键（需水解ATP）
DnaC 运送并协同DnaB
SSB 单链DNA结合蛋白，稳定已解开单链，非特异性与单链结合
DnaG 引物酶，催化RNA引物合成
拓扑异构酶 改变超螺旋状态，理顺DNA（解旋后纠正超螺旋） I：切一条 II 切两条

(2) 延长：前导链连续复制，后导链间断复制（延长时不需额外ATP，β-γ 即可提供能量）

半不连续复制，对后 3'→5' 方向，先生成若干短小的冈崎片段，再通过DNA连接酶形成新单链

滑动夹：固定保证 DNA 聚合酶（以水解与合成ATP来次要构象） 脱落后

聚合酶：2个核心酶与1个滑动夹共聚复合

1个沿着 3'→5'
2个后随链冈崎片段（交替合成）

DnaG不断向分叉方向的后随链合成RNA引物，结合好引物后再由滑动夹固定后聚合

(3) 终止：切除引物，填补空缺

由DNA连接酶接合切口（需ATP）

20260323

真核生物DNA复制 (1) 不断拆装核小体

线性链的5'端缩短：末端性结合在较长的3'端，保留此端的基因完整性

（此处3'-OH缺失）

逆转录连接上一段DNA，便于连接酶结合并工作

DNA转录

基因表达

DNA —转录→ RNA —翻译→ 蛋白

一、原料 AUTG NTP，模板DNA，依赖DNA的RNA聚合酶，σ因子（原核）

DNA上可以转录出RNA的片段称为"结构基因"

仅一条链作为模板链，且结构基因不仅在一条单链上。

无转录生物 自转录起始 开始

模板链 → 编码链（用于描述DNA序列，因其序列与翻译时核苷酸序列一致）

转录的双方称

二、转录单元（启动子至终止子） 有转录产物

原核生物中，一个转录单元中有多个结构基因 → 几个表达蛋白质总是协同合作，互缺一不可

转录起始点为+1，上游无法转录，下游至终止子结束有转录产物

20260330

三. RNA-pol 具有 5'→3' 聚合活性与校对活性

转录过程：

①促进阶段：RNA-pol与启动子识别 → 解链，转录泡形成（-11~+3） → 逃离启动子区域（脱开σ因子）

（RNA-pol+σ=RNA-pol全酶）

（与启动子特异性识别）

转录起始复合体

RNA-pol, DNA模板, RNA产物

三元复合体

σ因子的功能：促进复制用，循环

结合新RNA-pol

②延伸阶段，5'→3'方向（RNA生成方向）

③校对阶段 { 焦磷酸化编辑（切掉一个核苷酸）

水解编辑（切掉一段DNA序列）

④终止阶段

(i) Rho因子非依赖性终止子（内源性终止子）

终止取决于终止子序列

特点：

(a) 富含G≡C反向重复序列，易产生发夹结构引起pol停顿

(b) 而后产生4~8个连续的U（dA~rU结合弱，促使RNA产物离开复合体）

(ii) Rho因子依赖性（原核细胞因没有核膜，在mRNA尚未转录完成时便可开始翻译）转录翻译偶联

↳ 本质上是解旋酶（破坏DNA与RNA复合体结构）rRNA尚未转录完成时便可开始组装核糖体

蛋白质翻译

一. mRNA $\xrightarrow[\text{核糖体}]{\text{tRNA}}$ 多肽

二. 5'- 起始密码子 AUG（同时是甲硫氨酸Met的密码子）

终止 UAA、UAG、UGA -3'

中间为开放阅读框（ORF） 三联体密码（方向、连续、简并、通用、摆动）

摆动配对：有时G可与U配对

三. P位：肽酰位

A位：氨酰位

E位：排出位

IF3结合30S使与50S与其脱离

IF1占据A位点，IF2辅助

氨酰

1. 起始：大小亚基分离 → mRNA在小亚基结合 → 起始tRNA结合 → 大亚基结合
（与起始密码子互补配对）

氨基酸 多肽
外→A P→A A→P

2. 延长：进位 → 转位 → 成肽（肽键形成）→ 继续进位（前者tRNA P→E出离）
（转肽酶）

3. 终止 多肽链分离（释放因子与核糖体结合）（大小亚基也分离）

（真核细胞多核糖体翻译）

20260529 复习课

核酸

核酸定义、种类、分布、基本单位 → 核苷酸，核苷键，酯键

DNA结构
- 一级结构：DNA序列，连接方，书写表示 5'→3'
- 二级结构：DNA双螺旋，模型要点
- 高级结构
  - 超螺旋：与不同生物的复杂超螺旋
  - 真核生物：染色质与染色体

DNA复制：特点，DNA-pol，其他酶，过程，名词解释

DNA转录：特点，不对称，酶，过程，名词解释

蛋白翻译
- 肽链需从N→C阅读，三个核苷酸决定一个氨基酸
- mRNA，tRNA，rRNA相关知识（结构，功能）
- 肽酰转移酶位点（23sRNA）

基因工程

工具
- 限制性核酸内切酶（序列与切口的特异性，从原核生物中提取）
- 载体（质粒，特点）
- DNA连接酶

分 基因文库，PCR

切接 克隆载体、表达载体

转 农杆菌转化，动物细胞转入

筛

转基因技术

CRISR-Cas基因编辑

细胞工程

植物 全能性、组织培养、细胞杂交

动物 细胞培养，名词解释，与植对比 xx区别

核移植，ITS，细胞融合，单克隆抗体

胚胎工程