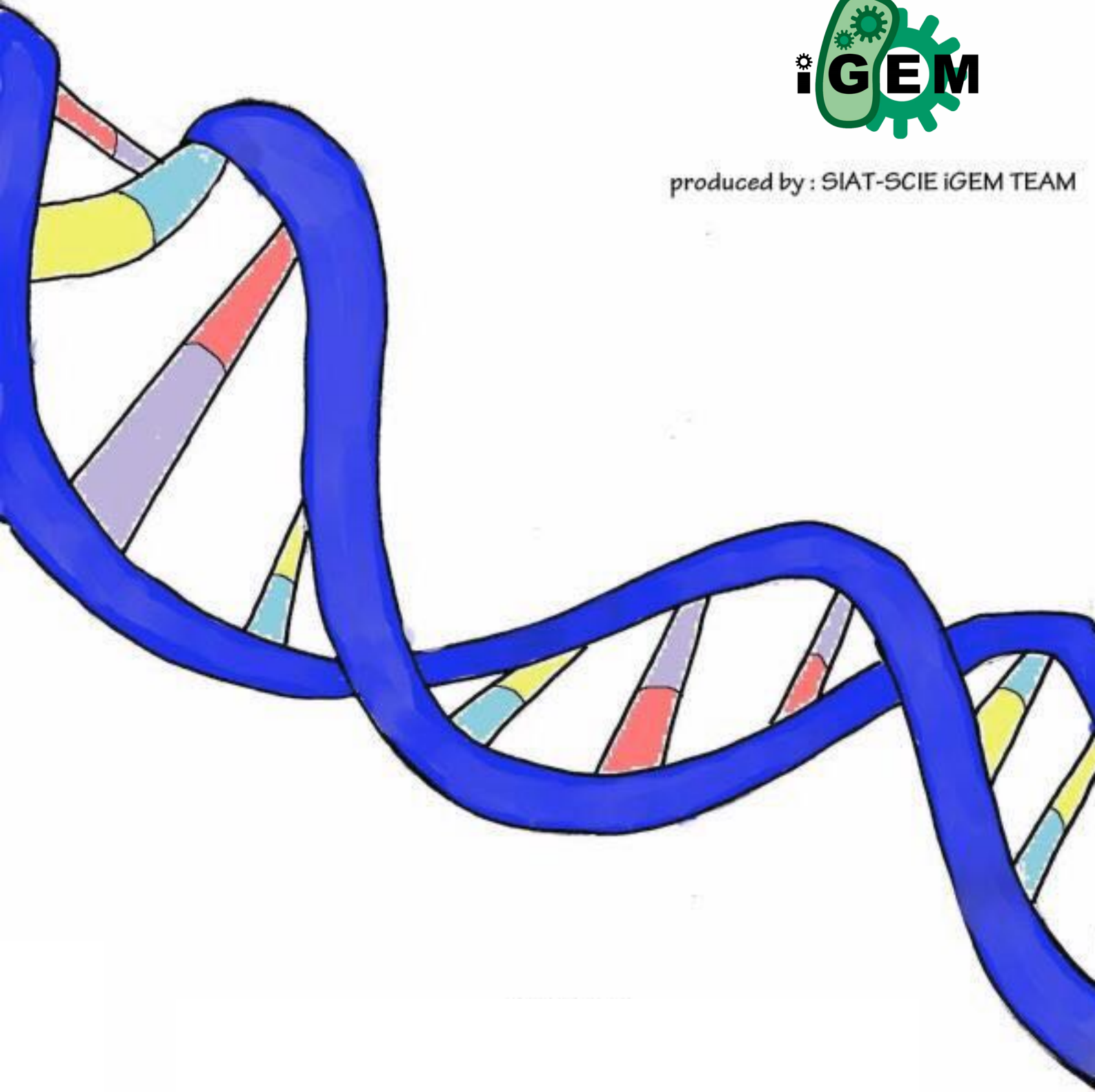




produced by : SIAT-SCIE iGEM TEAM



A Brief Introduction to iGEM

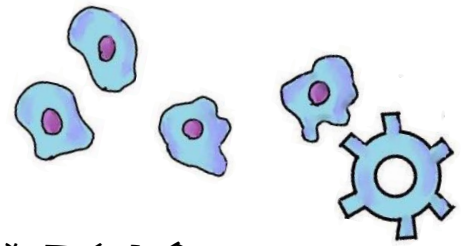
iGEM 入门手册

# 目录

一、简介.....	3
1. 合成生物学	
2. iGEM比赛	
3. SIAT-SCIE队伍	
二、DNA与RNA.....	5
1. DNA是什么	
2. DNA的基本结构	
3. 基因	
4. RNA	
三、中心法则.....	7
1. 中心法则是什么	
2. DNA的复制	
3. RNA的转录	
4. 蛋白质的翻译	
四、分子实验入门.....	13
1. 转化与质粒提取	
2. 酶切与酶连	
3. 聚合酶链式反应 (PCR)	
五、References.....	18

# 一、简介

## 1. 合成生物学简介



### Q: 什么是合成生物学?

A: 合成生物学 (synthetic biology) 的定义可以分为两个概念:

- (1) 对自然界中不存在的生物原件或者生物系统的设计和组装
- (2) 对于现有生物系统的重新设计或者建造

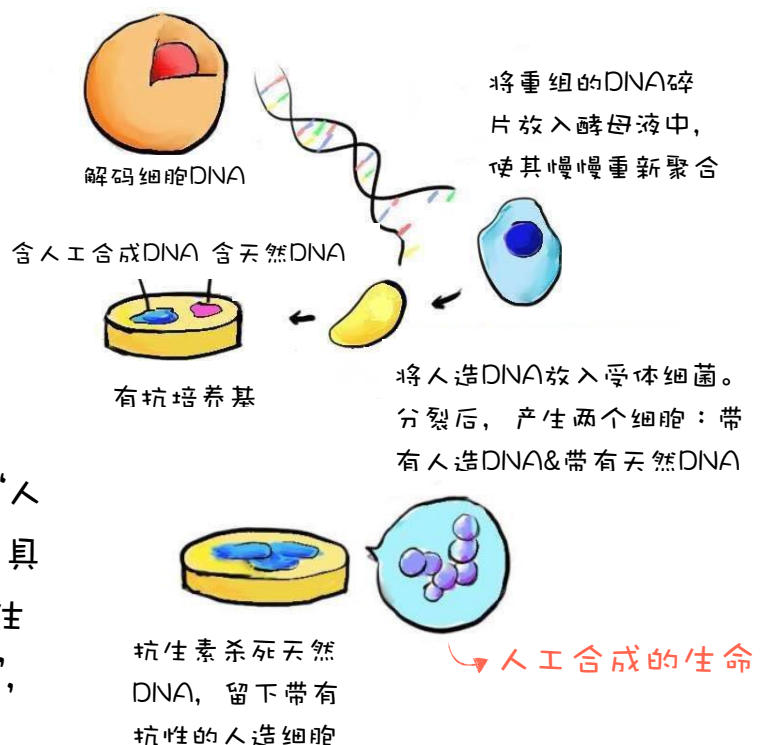
从下到上 (bottom-up) 组装是合成生物学特有的思想——从创造或者改造最基本的细胞组件开始, 再对其进行组装或者组合, 最终目的是使其成为一种对人类有使用价值的一个生物整体。简单来说, 这些工作和搭积木有些相似。

### Q: 为什么合成生物学对我们来说很重要?

A: 合成生物学在医学、制药、化工、能源、材料、农业等领域都有广阔的应用前景。通过利用合成生物学方法和理论, 有目标的对生命过程或生物体进行改造乃至重新合成, 创造解决生物医药、环境能源、生物材料等问题的微生物、细胞和蛋白 (酶) 等新“生命”。合成生物学的迅速发展可能会掀起一场技术革命的热潮, 对于解决与国计民生相关的重大生物技术问题有着长远的战略意义和现实的策略意义。

### \*人造生命“Synthia”

2010年5月20日, 美国私立科研机构克雷格·文特尔研究所宣布世界首例人造生命——他们通过在实验室中利用化学物质制造了一整个基因组, 然后将这个合成基因组植入到一个空细胞中。接下来, 这个细胞根据植入的基因指令开始自我复制和修正, 这个“人造生命”被起名为“Synthia”。这项具有里程碑意义的实验表明, 新的生命体也许可以在实验室里“被创造”, 而不是一定要通过“进化”来完成。



## 2. iGEM比赛简介

iGEM的全称是International Genetically Engineered Machine Competition (国际遗传工程机器大赛)。由麻省理工学院于2003年创办，2005年发展成国际性学术竞赛，并在2011年进一步设立了高中组的比赛。比赛是以一个队伍的形式报名，大多都以学校为单位，或者以实验室为单位。iGEM的比赛题目较为开放，每个队伍自主选题，做一个由标准生物组件 (BioBrick) 搭建起来的、具有特定功能的基因回路或者系统，建立有效的数学模型，实现对精致复杂人工生物系统的预测、操纵和测量。可以做的题目大致有几种：

👉 实践类：如能检测变质食物的细菌、用微生物来吸附重金属防止污染等

👉 技术类：改进现有的方法或者研发新技术，方便合成生物学的研究。

除了常见的湿实验项目 (wet lab project) 以外还可以是开发一个合成生物研究可以用到的软件，如做一个支持上传所有实验室草案 (protocol) 的软件，这样各种实验室的“黑科技”就可以被分享给全世界了。

## 3. 我们的简介

我们是SIAT-SCIE，是由中国科学院深圳先进技术研究院与深圳国际交流学院12个高中生合作建立的iGEM团队。今年我们将使用世界上最强悍的生物 [水熊虫] 的保护机制中的一些蛋白，来给更多的生物提供保护。比如，这个机制可以保护运输过程中的酶不因脱水而解构，或者让益生菌在辐射环境下工作。更多信息请扫描最后一页的二维码，关注我们的微信公众号。

我们希望带领更多的同学初步认识和了解iGEM，因此我们编写了这本科普手册，真诚的希望大家享受阅读这本书~



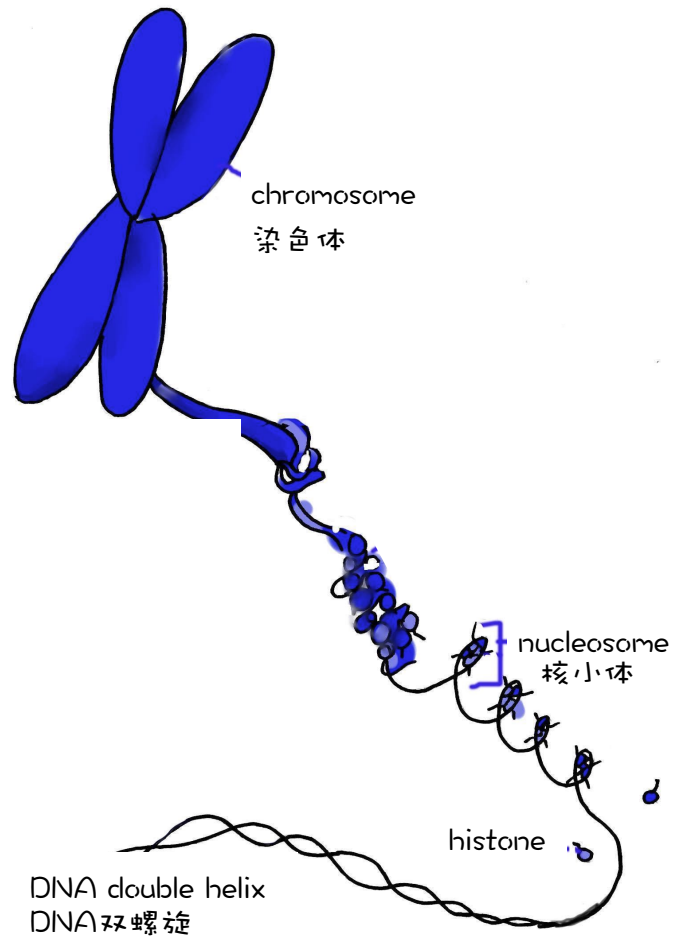
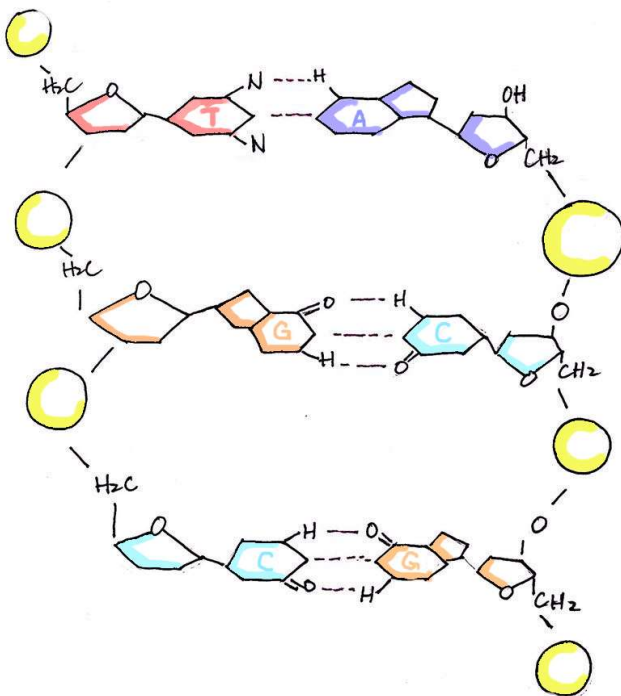
## 二、DNA与RNA

### 1. DNA是什么

DNA是一种含氮碱基、脱氧核糖和磷酸分子组成的生物大分子。在20世纪30年代，格里菲恩肺炎双球菌实验证明了DNA是主要遗传物质。DNA作为遗传物质，它具有以下特点：具有相对稳定的分子结构；能贮存大量遗传信息。

### 2. DNA的基本结构

DNA是由2条链组成的。它们之间由氢键连接，似“麻花状”绕同一轴心向互平行而反向盘绕形成DNA双螺旋构型。两条主链由脱氧核糖



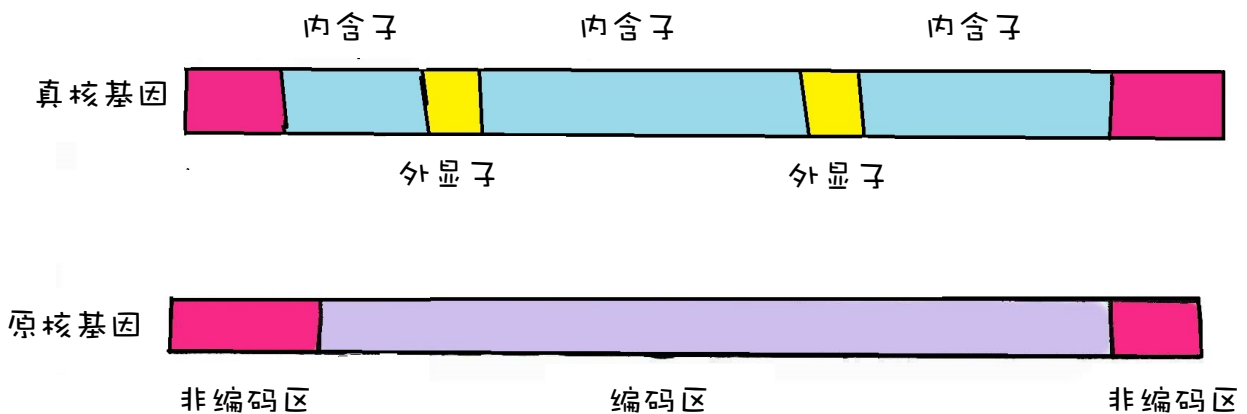
和磷酸交替连接，排列在外侧，构成基本骨架；碱基对排列在内侧。

碱基配对必须遵循一定的规律：

Adenine (A, 腺嘌呤) 一定与  
Thymine (T, 胸腺嘧啶) 配对,  
Guanine (G, 鸟嘌呤) 一定与  
Cytosine (C, 胞嘧啶) 配对。

### 3. 基因

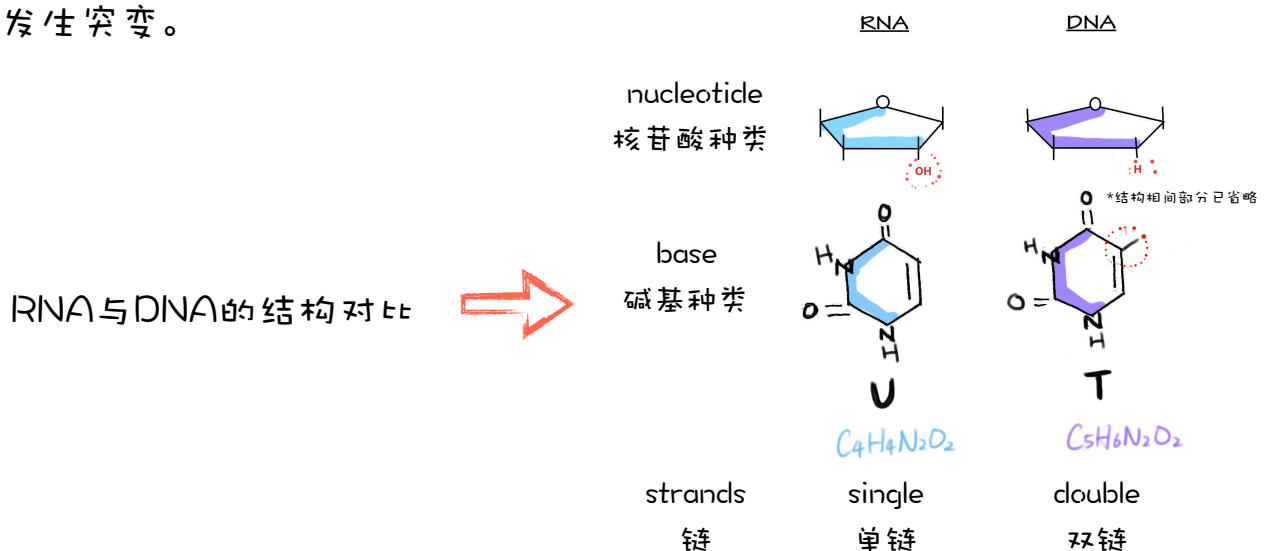
基因是带有遗传信息的DNA片段，基因能控制生物的性状，特定的基因决定特定的性状。特定基因的遗传效应反映出来的效果是控制蛋白质的合成，从而表现相应的生物性状。绝大多数真核基因和某些原核基因是断裂基因，即基因由若干个编码区和非编码区互相间隔开但是又连续镶嵌而成。



编码区序列称为外显子，非编码区序列称为内含子。基因表达时，外显子和内含子被一起转录成前体RNA分子，再通过RNA剪切删除内含子序列而把外显子序列连接起来，产生成熟的有功能的mRNA, rRNA或tRNA。

### 4. RNA

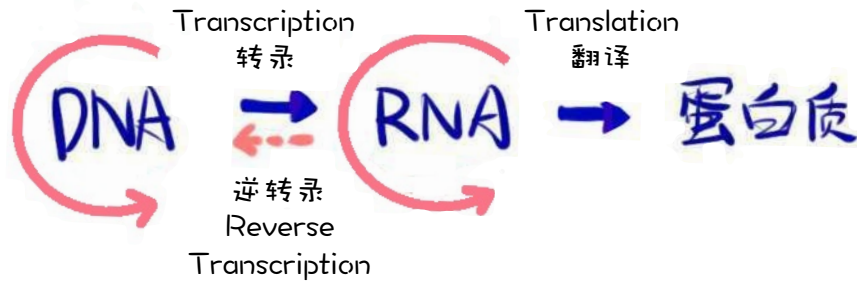
RNA的全称是核糖核酸，大多数以单链的形式存在。RNA的碱基种类为4种：A（腺嘌呤）、U（尿嘧啶）、C（胞嘧啶）、G（鸟嘌呤）。RNA里不存在T（胸腺嘧啶）。当RNA作为遗传物质时，由于RNA单链结构不稳定，易发生突变。



### 三、中心法则 (central dogma)

#### 1.中心法则是什么

在遗传学上，把遗传信息的流动方向叫做信息流。信息流的方向可以用科学家克里克提出的“中心法则”来表示。从“中心法则”可以看出，遗传信息的一遍流动方向为如下图：



- ① 复制：在DNA的自我复制过程中，遗传信息从DNA流向DNA
- ② 转录+翻译：遗传信息从DNA流向mRNA，进而流向蛋白质，即完成遗传信息的转录和翻译过程

后来的科学研究又发现，在某些病毒中：

- ③ RNA复制：只有在RNA病毒中存在时，RNA也可以自我复制
- ④ 逆转录：RNA被逆转录为DNA，这个过程最初在RNA致癌病毒中发现，后来在人的白细胞和胎盘滋养层中也测出了与反向转录有关的反向转录酶的活性

所以，遗传信息的标准流程大致可以这样描述：“DNA转录mRNA，mRNA翻译蛋白质，蛋白质反过来协助前两项流程，并协助DNA自我复制”。

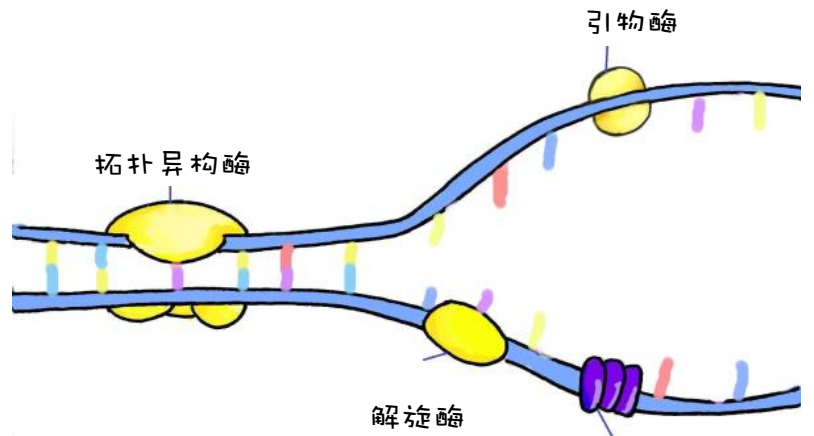
也就是说，基因指导蛋白质合成；基因控制生物体；生物体性状由蛋白质直接体现。



但是随着科学的进步，中心法则的正确性正在被不断挑战，现在并没有人能确定中心法则到底是不是完全正确无误的。

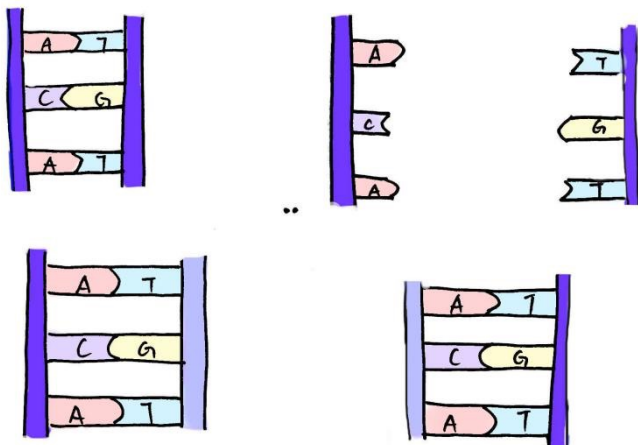
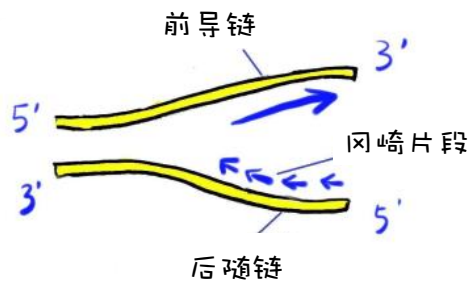
## 2. DNA的复制

DNA双链在细胞分裂以前进行的复制过程，DNA复制起点双链被DNA解旋酶解开，以解开的每一条母链为模板，大多数的DNA聚合酶需要引物才能开始催化DNA的合成。DNA聚合酶会添加游离的四种脱氧核苷酸到模板链上，遵循碱基互补配对原则，在有关酶的作用下，各自合成与母链互补的子链。



一些蛋白结合在DNA上，阻止被解旋酶解开的DNA双链再次合在一起

在复制启动时，尚未解开螺旋的亲代双链DNA同新合成的两条子代双链DNA的交界处，就称为复制叉 (replication fork)。



← DNA的半保留复制

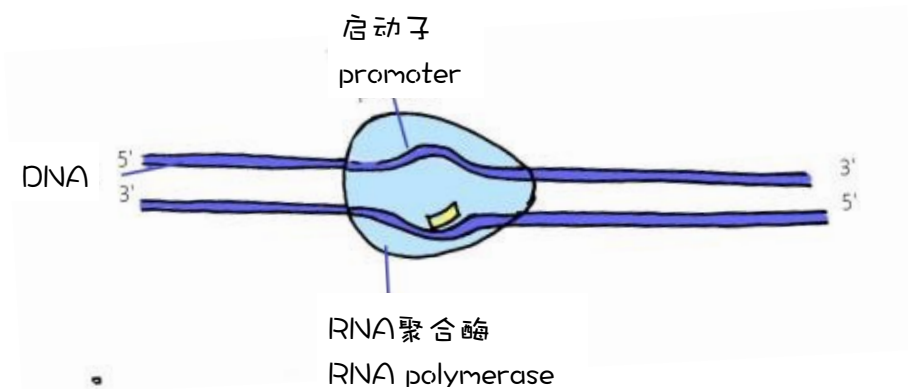
形成子代DNA: 每条子链与其对应的母链盘绕成双螺旋结构，从而形成2个与亲代DNA完全相同的子代DNA分子。



### 3.转录 transcription

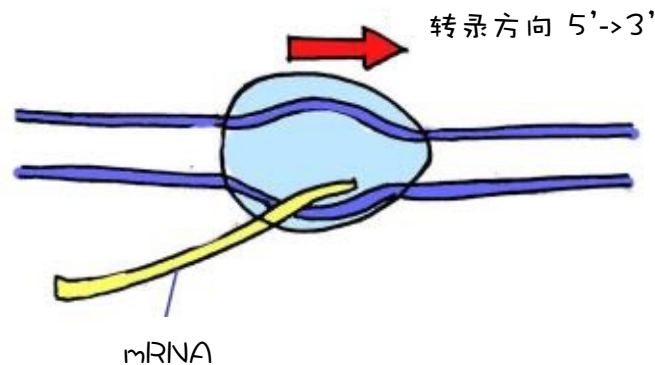
#### 1) 转录的开始

DNA双链解旋，当RNA聚合酶和启动子结合后，由此RNA聚合酶在模板链上开始了RNA链的合成。



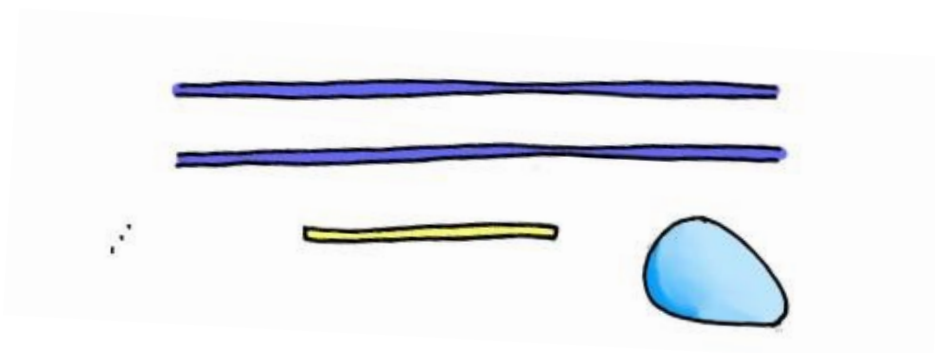
#### 2) 转录的延伸

RNA聚合酶继续往前移动，延长5'-3'的RNA转录物。被转录过的DNA链会重新互补配对，并缠绕回原来双螺旋的样子。



#### 3) 转录的终止

当RNA链延伸到转录终止位点时，RNA聚合酶不再形成新的磷酸二酯键，RNA-DNA杂合物分离，转录泡瓦解，DNA恢复成双链状态，而RNA聚合酶和RNA链都被从模板上释放出来，这就是转录的终止。



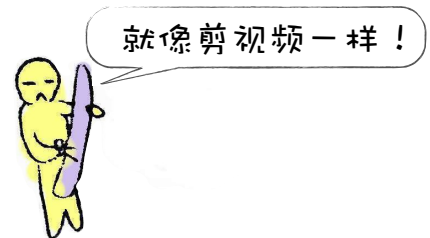
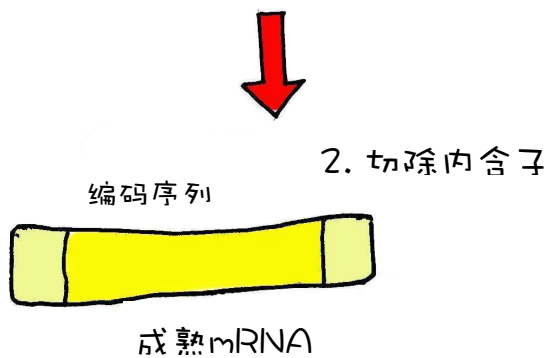
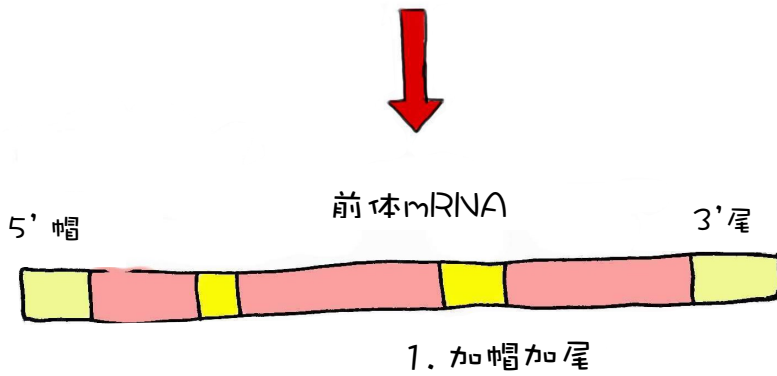
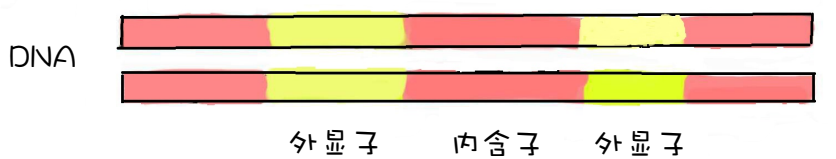
## 真核生物mRNA的成熟加工

真核生物的mRNA的加工一般要经过四步：

- (1) 5'加帽
- (2) 3'加尾
- (3) 切除内含子
- (4) 修饰：对某些碱基进行甲基化

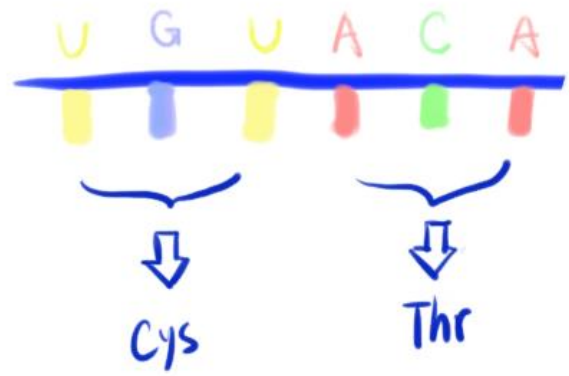
而原核生物不需要mRNA的成熟加工。

\* 加帽的作用：在翻译过程中起信号识别作用，协助核糖体与mRNA结合，使翻译从AUG开始。而且还能mRNA,避免5'端降解。



## 三联体密码子

mRNA分子上每3个核苷酸为一组，决定肽链上某一个氨基酸，称为三联体密码。这种体系可以最多编码 $4^3=64$ 种氨基酸。不同的生物密码子基本相同。起始密码子主要有两种，一种是甲硫氨酸 (AUG)，一种是缬氨酸 (GUG)，而终止密码子有3个，分别是UAA、UAG、UGA。

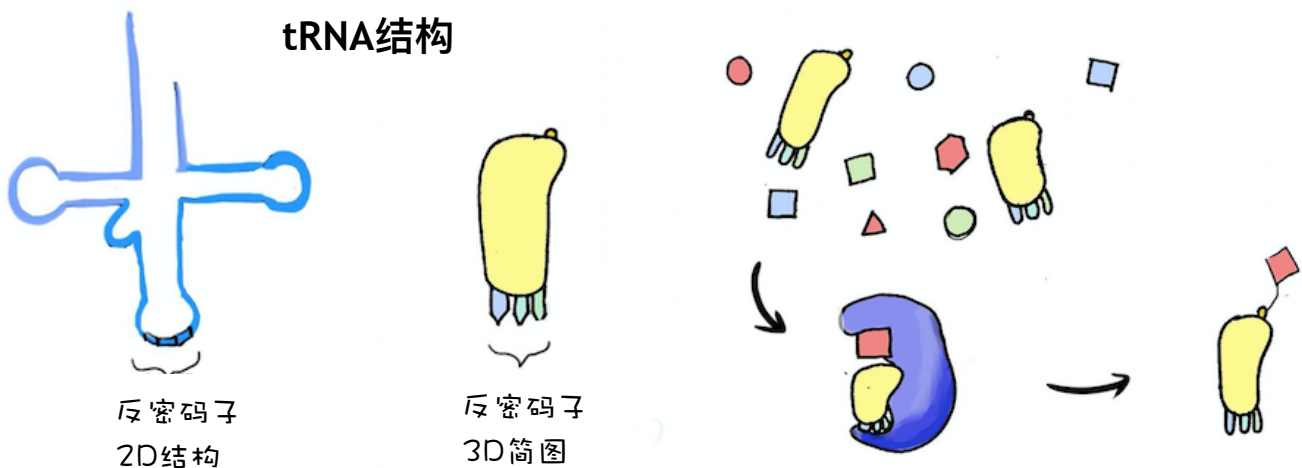


## 4.翻译

翻译是蛋白质生物合成过程中的第二步（转录为第一步），翻译是根据遗传密码的中心法则，将成熟的信使RNA分子中“碱基的排列顺序”解码，并生成对应的特定氨基酸序列的过程。

### tRNA - 氨酰基

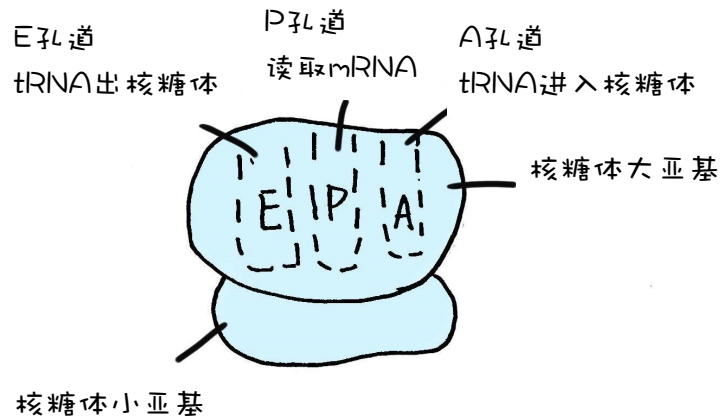
tRNA是氨基酸的搬运工具，是一条长70-90个核苷酸并折叠成三叶草状的短链。蛋白质合成开始时，氨基酸在酶的作用下，由ATP供能，而特定的tRNA的3'端（有CCA的一端）的腺嘌呤 (A)共价相连而成氨酰基-tRNA。一个tRNA分子上有一个由3个核苷酸组成的反密码子，可以识别mRNA上的密码子并与其互补配对。



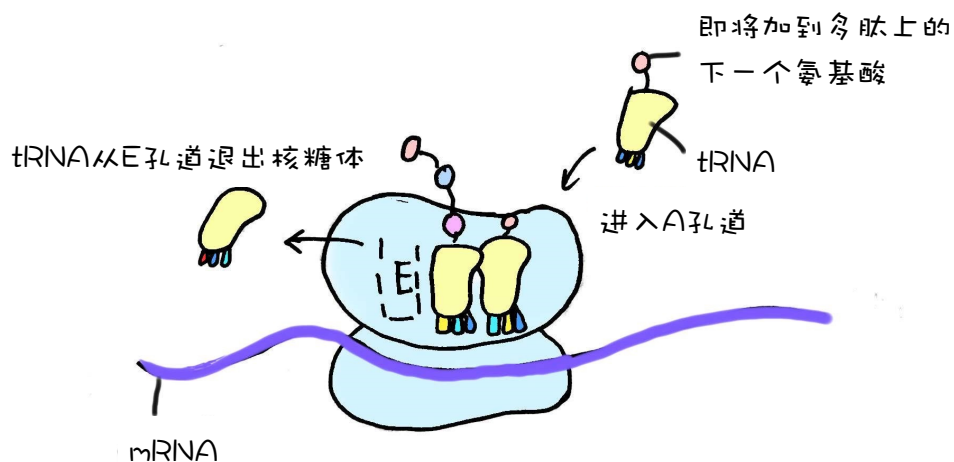
## 核糖体“阅读”密码子，氨基酸连成多肽

各tRNA分子分别运载上氨基酸之后，核糖体的“阅读”功能使氨基酸按tRNA上反密码子规定的次序形成肽链。

一个核糖体包含两个亚基，每个亚基都是由蛋白质和相当数量的rRNA组成。这两个亚基只有在行使肽链合成功能时才聚合成整体，为蛋白质的合成提供场所。



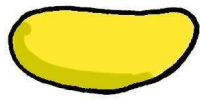
每个核糖体在它的小亚基上有一个mRNA结合部位，在大亚基上有两个tRNA结合部位P位和A位，其中P位提供携带待延长的多肽链的tRNA的停留，A位供给携带新的氨基酸的tRNA进入并停留。



最后翻译完的tRNA会在E位释放。

# 四、分子实验入门

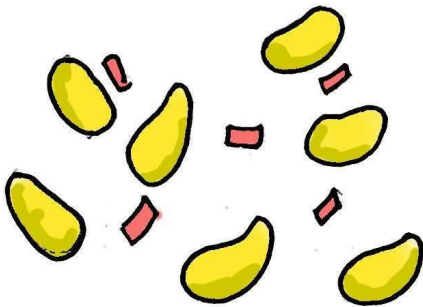
## 1. (1) 感受态转化



制备好的感受态细胞



-80°C



将质粒溶液加入感受态细胞  
0°C冰浴30min 试使DNA附在细胞壁上



菌液

90s 42°C 热激  
热胀冷缩使细胞膨胀，  
细胞膜接触DNA → 0°C冷却，  
细胞遇冷收缩，  
吸收DNA

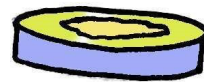


摇床

12h

液体培养基 e.g. LB肉汤

放入摇床复苏



12h 37°C

涂菌液于带抗性的培养皿，  
放入恒温培养箱过夜培养

## 1. (2) 质粒提取-原理介绍

质粒 (plasmid) 是许多细菌与真菌细胞染色质外的、较小的、能够自我复制的环状超螺旋DNA分子。质粒的拷贝数 (copy number) 是同一种质粒在细胞内的数量, 从单一到数千都有可能。有些携带抗性基因的质粒可以给宿主提供抗药性, 但是通常来讲, 质粒的存在对宿主的生存不构成决定性的影响。

### 大肠杆菌



- 无性繁殖, 基因变异几率小。蛋白产物纯度高
- 分裂繁殖速度快 (大肠杆菌20分钟左右繁殖一代)

### 温度控制



42°C 通过温度短时间内急剧变化, 细胞膜的通透性变大便于外源基因或载体进入感受态细胞。由于细胞膜的流动性, 这种孔洞在合适的温度下会被细胞自身所修复。

### 缓冲液的运用



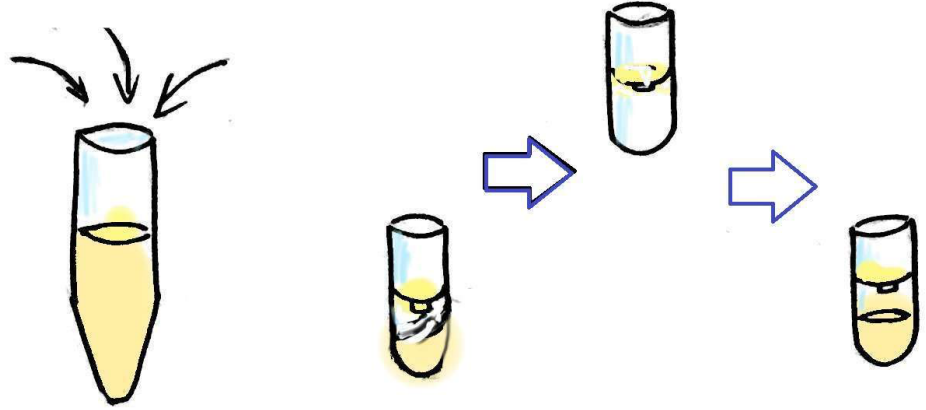
- 在整个质粒提取过程中需要用到多种缓冲液, 如:
- 溶液P1: 含RNA酶, 裂解除目标DNA外的核酸
  - 溶液P2: 裂解细胞以释放DNA
  - 溶液P3: 中和溶液

### 琼脂糖凝胶电泳原理简述



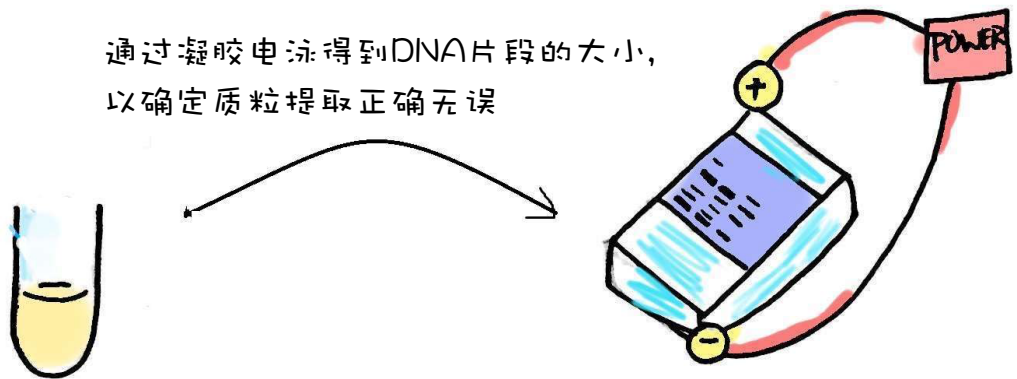
核酸分子或蛋白质在电场中时, 它们会以一定的速度从负电极往正电极迁移。根据分子大小的不同、形状的差异以及所带的净电荷的多少, 便可以通过凝胶电泳将蛋白质或核酸分子混合物中的各种成分彼此分离开来。分子量较大的分子容易被琼脂糖凝胶的分子筛阻挡, 所以迁移的相对慢, 反之亦然。琼脂糖凝胶中的最亮条带是含有最多我们需要的DNA的地方。

## 质粒提取-简略实验步骤

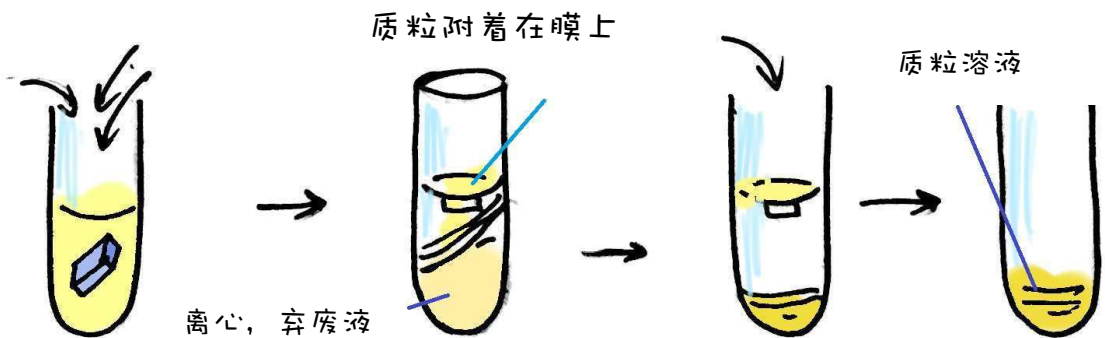


按照一定的顺序加入缓冲液并离心，洗脱后将附着在膜上的DNA收集到离心管中

通过凝胶电泳得到DNA片段的大小，  
以确定质粒提取正确无误



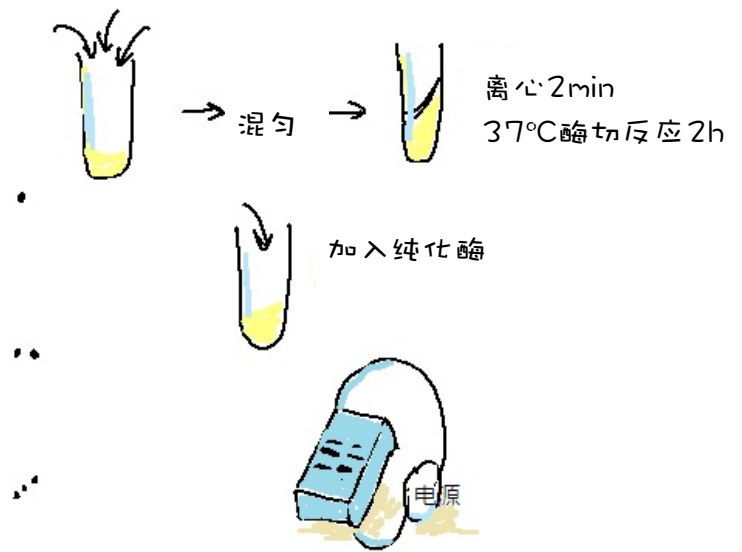
...



胶回收：取胶的最亮条带，切下来后放入另外一些缓冲液中，以便得到一个特定长度的DNA片段

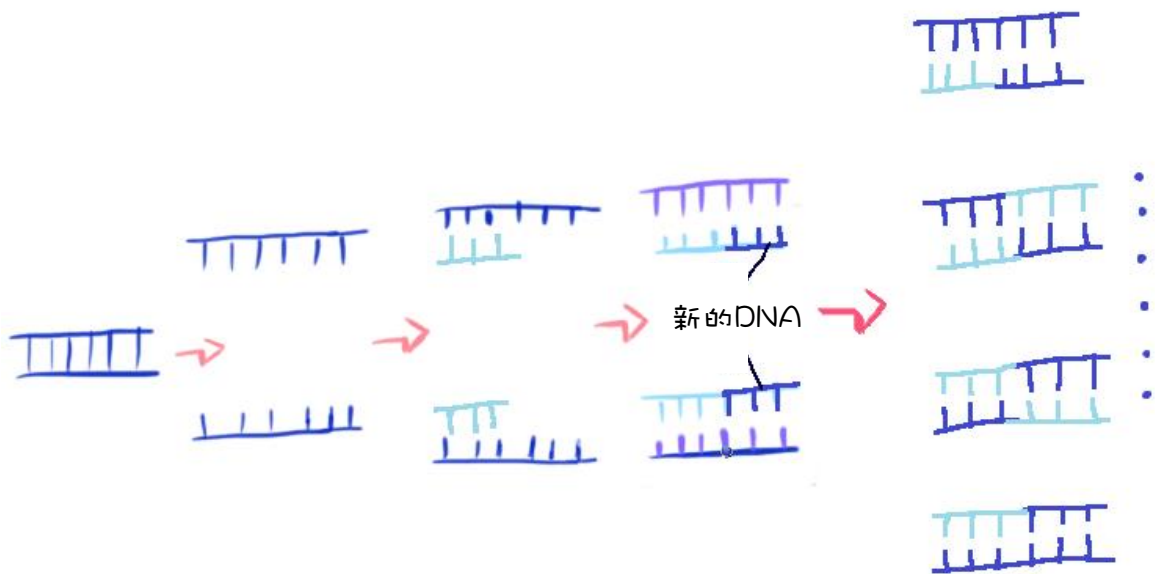
## 2. 酶切酶连

利用限制性核酸内切酶切割DNA和利用DNA连接酶连接DNA是DNA重组过程中的关键步骤之一。由于酶具有特异性，一种酶只能识别一段特定的DNA序列，所以使用特定的酶可以进行定向切割。用限制性内切酶切割下来我们需要的DNA片段，纯化后可通过连接酶连接到目标生物的质粒上进行表达。



## 3. PCR-原理介绍

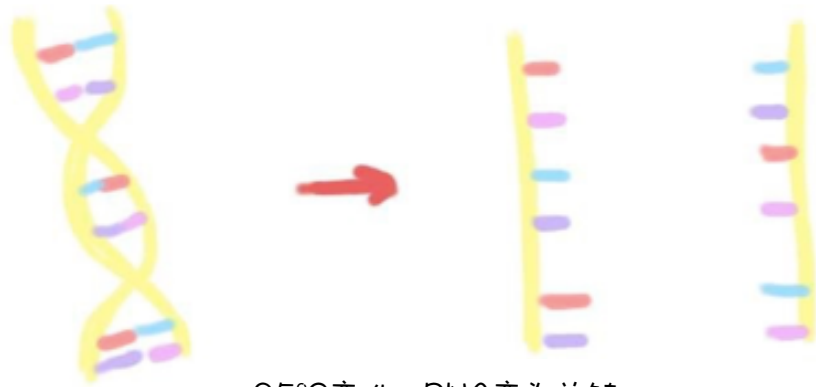
聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, 简称PCR) 是一种用于放大扩增特定的DNA片段的分子生物学技术，它可看作是生物体外的特殊DNA复制。PCR技术具有特异性强、灵敏度高、操作简便、省时等特点。





## PCR-简略实验步骤

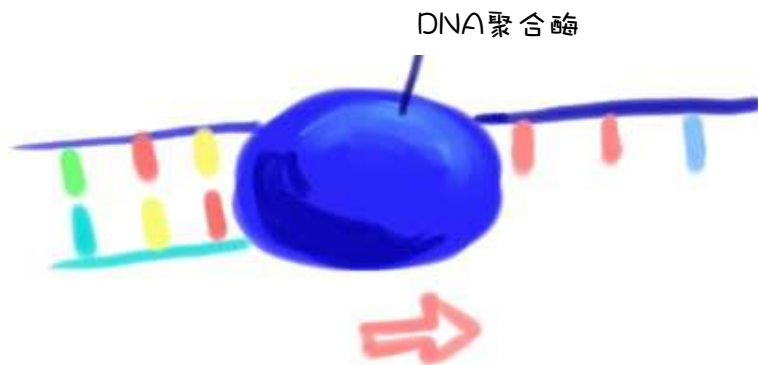
PCR操作步骤由高温变性、低温退火及适温延伸等几步反应组成一个周期，多次循环进行，使目的DNA得以 $2^{(n-2)}$ 倍迅速扩增。PCR的原料包括：反应缓冲液、模板DNA、DNA聚合酶、引物以及用于减少错配误差的dNTP溶液等。



95°C变性，DNA变为单链



60°C复性，引物和单链DNA结合



DNA聚合方向：5'端→3'端

72°C是最适合PCR的温度，DNA聚合酶催化形成互补链

现在大部分实验室都采用PCR仪作为控温设备，与不会高温变性失活的TaqDNA聚合酶

## 五、References (in an alphabetic sequence)

- 陈阅增, 吴相钰, 陈守良, 葛明德 《普通生物学第四版(第四版)》第21章 第22章 第23章 ISBN 9787040250589
- Jane BR; Lisa AU; Michael LC; Steven AW; Peter VM; Robert BJ and Neil AC. Chapter 15 and 18 and 20 Campbell biology (10th ed.) edition ISBN 9780321775658
- 《揭开遗传密码子的起源之谜》 . 科学网. 2015-10-9[引用日期2015-11-13]
- Zimm BH, Levene SD (1992). "Problems and prospects in the theory of gel electrophoresis of DNA" (PDF). Quarterly Reviews of Biophysics. 25 (2): 171–204. PMID 1518924. doi:10.1017/S0033583500004662
- Robert WO; Sandy BP. Principle of Gene Manipulation - An Introduction to Genetic Engineering (5th ed.). Blackwell Scientific. p. 9. ISBN 9780632037124

## 联系我们

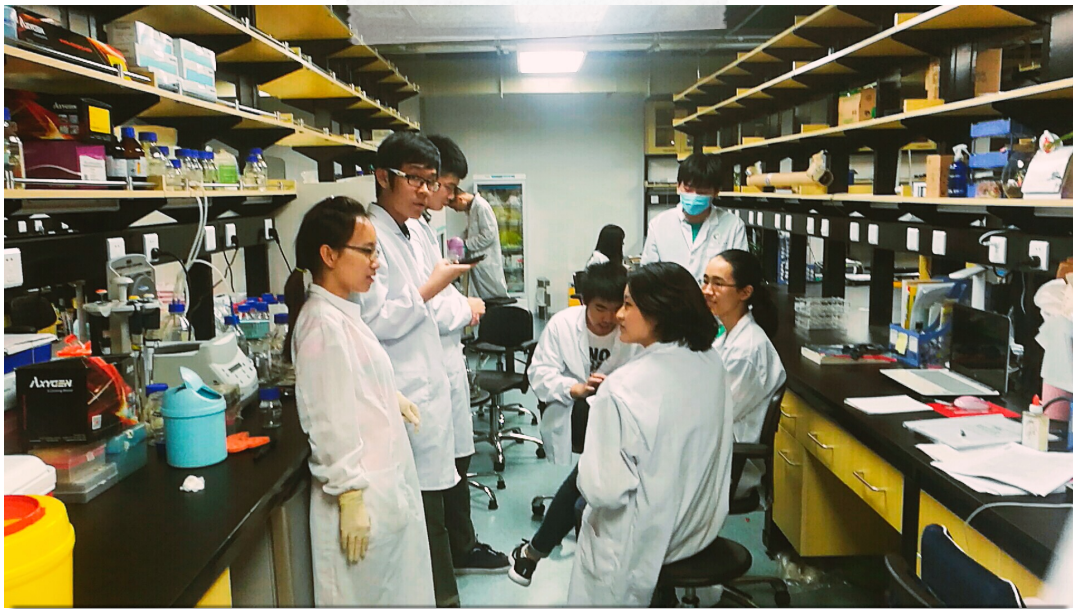
官方邮箱：siatxscie@gmail.com

微信公众号



## 特别感谢Bluepha对本书提供的赞助

微信公众号



(部分队员合照)

十分感谢您对我们的支持～  
祝各位iGEM之旅一路顺风！