



载体指南

专业引领
载体知识一本通

泓迅生物精心编制的《载体指南》，旨在成为广大科研工作者提供一个便捷的参考工具。在载体指南中，我们全面而深入地介绍了多种类型的载体，包括但不限于质粒载体、病毒载体、克隆载体以及表达载体等。针对每一种载体都进行详尽的阐述，从特点剖析到优势展示，从限制说明到应用领域，关键信息一应俱全。

《载体指南》不仅是一份实用的科研工具，更是一份宝贵的学习资料。它将在您的科研道路上提供坚实的支持与帮助，使您在探索未知的旅途中更加游刃有余。



4000-973-630



基因合成：support@synbio-tech.com

泓迅官网：www.synbio-tech.com.cn

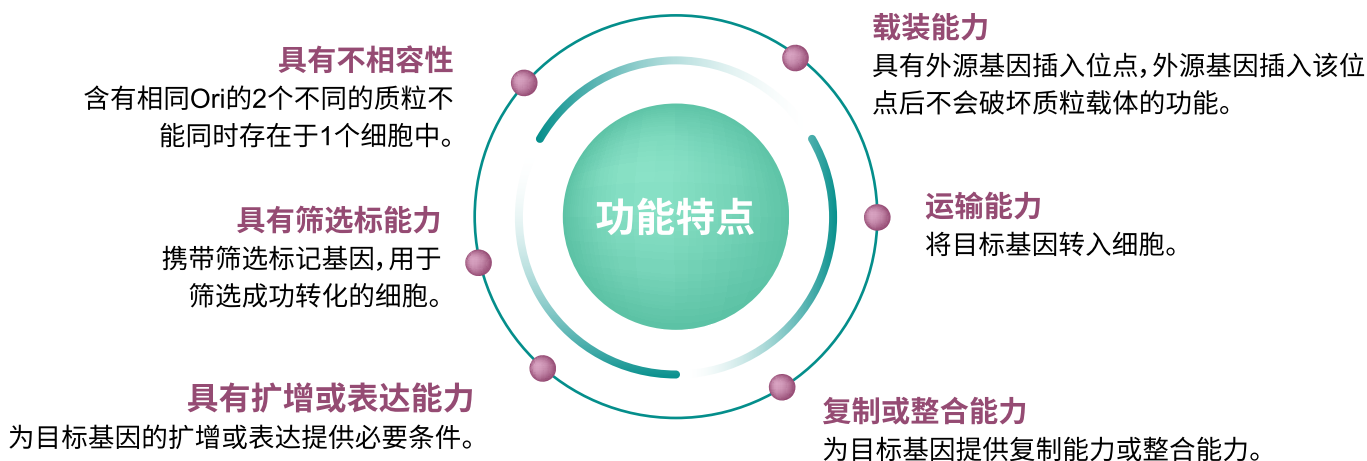
载体概述

1. 载体

将目的基因 (DNA片段) 转入目标细胞、组织或生物体中以实现基因克隆、表达、编辑等一系列功能研究, 该方法是生物领域最常用的一种研究方法。在基因工程领域, 为避免目的基因DNA片段序列的降解同时保证功能有效性, 在转入细胞、组织或生物体之前, 需要先通过基因工程技术将目的基因构建在一类具有在宿主细胞内进行自主复制能力的DNA分子上, 该类运输工具被称为载体 (Vector)。其中, 工程化的质粒是基因工程中最常用的载体。

2. 质粒载体

质粒是生物细胞内固有的、能独立于寄主染色体而自主复制、并被稳定遗传的一类核酸分子, 常见于原核细菌及真菌中。绝大多数的质粒是DNA型的, 少部分为RNA型。天然DNA质粒大都具有共价、封闭、环状的分子结构, 具有分子量大、拷贝数低、单一酶切位点少等特点。通过对天然质粒进行元件添加、优化等工程化改造, 将其转换成基因工程中最常用的载体, 也称为质粒载体。



基本组成元件



(1) 复制起始点 (Ori):一段富含AT和重复序列的特定序列,通过招募复制相关蛋白启动质粒复制。Ori决定了质粒在宿主中的拷贝数,高拷贝质粒(10-60个拷贝)被称为松弛型复制质粒;低拷贝质粒(1-3个拷贝)被称为严紧型复制质粒,通常适用于毒性基因及大片段基因的克隆。只有1个Ori,表示是原核的克隆或表达质粒;有2个Ori,则表示该质粒是穿梭质粒,即可在原核也可在真核中复制。注意:具有相同的ori的质粒具有不相容性,不可共转染。

(2) 抗性筛选基因 (R):即抗生素抗性基因,方便后续通过抗生素筛选阳性克隆。一般克隆发载体只有1种抗性筛选标记,部分穿梭质粒具有2种抗性筛选标记。注意:原核生物和真核生物中的筛选基因不完全一致,原核生物中常见的有Ampr、Camr、Kanr、Tetr等;真核生物中常见的有Puro、G418、Hygr;原核和真核都可以的筛选基因有Zeocin、Blasticidin。

(3) 多克隆位点 (MCS):即多个限制性内切酶酶切位点汇集序列区,其中的每个酶切位点在整个质粒载体中只有一个。MCS区是外源基因的插入位点,一般位于启动子与转录终止信号元件之间。不同载体,MCS所包含的限制性内切酶种类、数目不同。注意:插入基因序列过长会导致质粒载体转化效率变低。

(4) 启动子 (P):通过与RNAPol特异型结合,启动下游DNA转录的一段DNA序列,本身不被转录。启动子决定基因表达的细胞类型及表达量。根据在细胞中启动表达的形式不同,分为3类:组成型/广谱型启动子,组织/细胞基因特异性启动子,诱导表达启动子。

基本组成元件



(5) 增强子(Enhancer):一种增强邻近基因转录过程的顺式作用元件,无方向性。

(6) 核糖体识别位点(RBS):位于mRNA的起始密码子(AUG)上游,核糖体可以识别、结合这段序列并向下寻找ATG以起始蛋白翻译。在原核生物中表达载体上的RBS为SD序列(位于AUG前面);在真核生物中,主要依赖于mRNA的5'端帽子结构,除此之外,IRES元件和2A多肽元件也可作为RBS以启动蛋白表达。

(7) 转录终止子(Terminator):位于待转录基因下游的3'端调控元件之后,主要为多聚腺苷酸化或聚(A)信号,具有终止转录功能。原核生物主要为polyA;真核生物如哺乳动物常见的终止子(SV40 polyA、hGH polyA、BGH polyA和rbGlob)包括促进聚腺苷酸化和终止的序列基序AAUAAA。

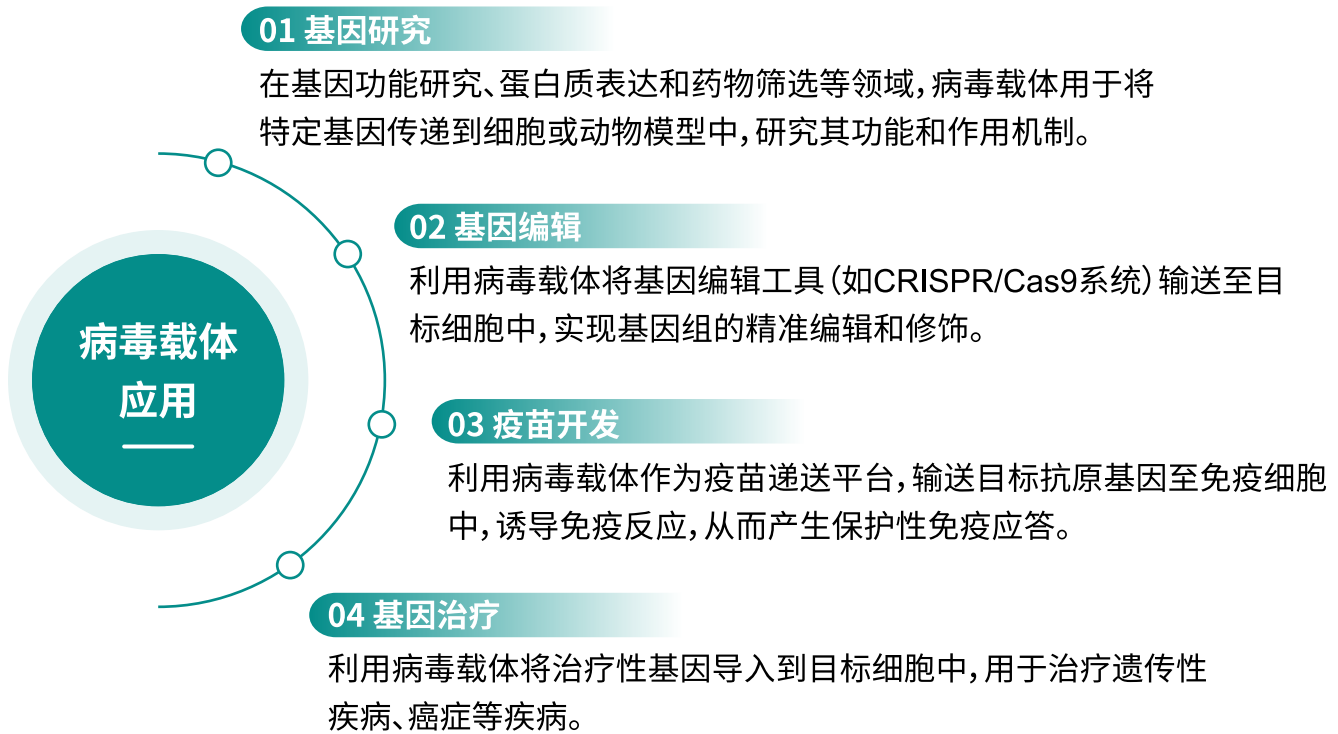
(8) 引物结合位点(PBS):一段短的单链DNA序列,可以与PCR扩增或测序的引物结合,主要用于质粒序列的人工检测。注意:该类位点可以根据应用进行灵活设计。

3. 质粒载体分类

质粒载体将目的基因导入宿主细胞,进而实现基因功能表达,这些载体在分子生物学研究中发挥着至关重要的作用,是推动合成生物学、生物医药、基因治疗、靶点药物筛选及农业生物技术等领域发展的基础。根据质粒载体的多样化应用,其分类也是多样化的,主要有以下几种:

3.1 按照属性质粒载体可分为:病毒载体和非病毒载体。

病毒载体是一种利用病毒作为基因传递的载体,通常通过将外源基因插入或替换病毒基因组的方式,将所需的基因输送至目标细胞中。病毒载体具有高度传染性和特异性,能够在宿主细胞中高效地传递和表达外源基因。



病毒载体分类及比较如下：

慢病毒 (LV) 载体

定义	一种基于慢病毒(如人类免疫缺陷病毒HIV-1)的基因传递系统, 去除了病毒的复制和致病基因, 慢病毒载体保留了病毒将遗传物质整合到宿主细胞的基因组中特性。
特点	<ol style="list-style-type: none">1. 整合能力: 可将外源基因整合进宿主细胞的染色体DNA中。2. 宿主范围广: 对分裂细胞和非分裂细胞都有感染能力。3. 可稳定性表达。
优势	载荷容量较大: 适用于携带较大基因片段或多个基因的转导。
限制	潜在致癌风险: 基因整合可能导致插入突变, 增加致癌风险。

腺病毒载体

定义	一种基于腺病毒 (Adenovirus) 的基因转移工具, 腺病毒是一种无包膜的双链DNA病毒, 能够在非分裂的细胞中高效地表达外源基因, 不整合到宿主细胞基因组中, 适合短期表达。
特点	<ol style="list-style-type: none">1. 非整合能力。2. 感染范围广: 能够感染包括分裂细胞和非分裂细胞在内的广泛宿主细胞。3. 瞬时表达。
优势	<ol style="list-style-type: none">1. 高效感染: 能够在短时间内感染大量细胞。2. 安全性高: 腺病毒载体不整合到宿主细胞染色体中, 无插入致突变性。3. 高滴度: 腺病毒载体可产生高滴度的病毒液, 有利于大规模制备和应用。
限制	<ol style="list-style-type: none">1. 瞬时表达: 外源基因表达持续时间较短, 需要多次接种以达到治疗效果。2. 免疫反应风险: 腺病毒具有较强的免疫原性, 可能引发宿主细胞的免疫反应和炎症反应, 影响治疗效果。

腺相关病毒 (AAV) 载体

定义	一种基于腺相关病毒 (Adeno-Associated Virus, AAV) 的基因转移工具, AAV是一种小的、非包膜的单链DNA病毒, 它与多种腺病毒有关, 但与腺病毒不同, AAV本身不会引起疾病, 因此在作为基因载体时具有很高的安全性。
特点	<ol style="list-style-type: none">1. 小型单链DNA病毒: 基因组DNA < 5 kb, 无包膜。2. 非致病性: AAV自然存在于人类中, 但并不会导致任何已知的疾病。
优势	<ol style="list-style-type: none">1. 安全性高: AAV不会破坏宿主细胞的基因组, 不会引起明显的免疫反应或病理反应。2. 可长期表达: AAV可以在宿主细胞中长期表达外源基因。3. 靶向性: AAV有多种血清型, 不同的AAV血清型可以靶向不同的细胞和组织。
限制	<ol style="list-style-type: none">1. 载体容量有限: AAV的基因组较小, 能够携带的外源基因序列长度有限, 通常不超过4.5 kb。2. 免疫原性: 虽然AAV的免疫原性较低, 但在部分人群中仍可能引起免疫反应。3. 制备成本高: AAV的制备过程较为复杂, 成本较高。

逆转录病毒载体

定义	一种利用逆转录病毒作为递送系统的基因转移工具, 逆转录病毒载体通常来源于能够将RNA逆转录成DNA的病毒, 如人类免疫缺陷病毒 (HIV) 经过改造后的形式。
特点	<ol style="list-style-type: none">1. RNA病毒: 逆转录病毒是一种单链RNA病毒, 其基因组以RNA形式存在。2. 逆转录机制: 逆转录病毒利用逆转录酶将其RNA基因组逆转录为DNA, 并整合到宿主细胞基因组中。
优势	<ol style="list-style-type: none">1. 稳定表达: 由于整合到宿主基因组, 逆转录病毒载体可以实现长期的基因表达。2. 较大基因载量: 逆转录病毒能够携带较大的外源基因序列, 通常可达8-10 kb。3. 感染效率高: 逆转录病毒载体可以感染多种类型的细胞, 包括一些难以转染的细胞类型。4. 技术成熟: 逆转录病毒载体技术相对成熟, 有多种载体和包装系统可供选择。
限制	<ol style="list-style-type: none">1. 整合位点不确定性: 逆转录病毒随机整合到宿主基因组中, 可能引起插入突变, 导致基因组不稳定性及潜在的致癌风险。2. 主要感染分裂细胞。3. 潜在的免疫反应: 尽管逆转录病毒通常不会引起强烈的免疫反应, 但在某些情况下仍可能引发宿主免疫系统的反应。

3.2 按照进入受体细胞的类型不同可分为原核载体、真核载体和穿梭载体 (即可以存在于原核细胞, 又可存在于真核细胞)。

3.3 按照Ori元件不同可分为高拷贝质粒和低拷贝质粒。

3.4 按照载体性质不同可分为融合型载体和非融合型载体。

融合型载体能够将外源基因整合进宿主细胞的基因组实现外源基因在宿主细胞中的稳定表达, 又称为稳定型表达载体; **非融合型载体**装载着目标基因以游离的形式存在于细胞中, 使得目标基因在宿主细胞中的短暂表达, 又称为瞬时表达载体。

瞬时表达载体与稳定性表达载体比较如下:

质粒类型	瞬时表达载体	稳定表达载体
工作原理	游离于细胞中, 带动目标基因在短时间内快速表达并达到高峰, 随后逐渐降低。	将目标基因整合在宿主细胞基因组后使得目标基因持续且稳定性表达。
导入细胞方法	病毒包装、化学试剂、电穿孔等。	病毒包装、化学试剂、电穿孔等。
特点	筛选标记基因是非必须元件; 表达快速、操作简单。	筛选标记基因是必须元件; 持续稳定表达。
优势	表达快速、操作简单、灵活、成本低。	长期稳定表达、表达水平可控、遗传稳定性、安全性高、可重复性好。
限制	1. 可能触发细胞防御机制, 导致基因沉默; 2. 高效表达可能会对细胞产生毒性; 3. 表达非永久且不稳定。	1. 转化效率低; 2. 细胞筛选周期长、成本高; 3. 转染/转化条件苛刻。
应用	快速分析基因的功能或蛋白活性。	在基因工程、细胞生物学及医学等领域应用广泛, 如重组蛋白生产、基因功能研究、基因治疗药物开发等。

3.5 按照功能不同可分为克隆载体、表达载体、基因编辑载体、表达调控载体、体外转录载体及功能检测载体等。

3.5.1 克隆载体



3.5.2 表达载体

主要元件组成:除了克隆载体的基本元件,还须具备转录/翻译所必须的DNA元件,如启动子、核糖体结合位点、转录终止信号。启动子驱动目标基因转录生成RNA,合成的RNA在转录终止信号下停止转录。

1. 根据启动子类型可分为组成型表达载体、组织特异性表达载体和诱导表达载体,比较如下:

组成型表达载体

特点	能在多种细胞类型或生物体中实现基因的持续表达。
优势	表达量高; 构建及使用较为简单; 通用性:不受细胞类型限制。
限制	缺乏调控性:基因过表达可能对细胞产生毒性; 持续表达,消耗过量细胞资源,影响细胞的正常生理功能。
应用	通过基因亚细胞定位及过表达研究基因功能; 提高基因表达量以获得大量目标蛋白。

组织特异性表达载体

特点	在特定的细胞类型、发育阶段或环境条件下,对目标基因进行选择性地表达。
优势	特异性表达:能够在特定的细胞类型、组织类型下实现外源基因的特异性表达,而不影响其他细胞或组织。 特定调控元件:如组织特异性启动子、调节子或响应元件等,用于调控外源基因的表达。
限制	复杂性:需要设计和构建特异性调控元件,相对比较复杂,需要一定的技术和资源支持。 表达水平波动:外源基因的表达水平可能不够稳定,需要进一步优化调控元件以提高表达的稳定性。
应用	适用于多种研究或应用领域,如基因治疗、基因调控、生物传感等。

诱导表达载体

特点	含有特定的诱导或响应元件,在特定的外部信号或诱导剂的作用下,对目标基因进行调控性表达。
优势	精确调控:可精确控制基因表达的时间和强度,有助于避免非特异性效应。 节省成本:只在必要时诱导表达,避免了持续表达可能造成的资源浪费。 灵活性高:能够根据需要选择不同的诱导条件,实现外源基因的诱导表达或抑制。
限制	操作复杂:需要精确控制诱导剂的添加时间和浓度,以及可能需要考虑诱导剂对细胞的影响。 诱导条件限制:诱导型表达载体的诱导表达通常受到特定条件的限制,可能不适用于所有研究或应用场景。 表达水平波动:不同实验条件下,表达水平可能存在波动,需要精细调控。
应用	适用于特定条件下基因功能研究及蛋白的表达。

2. 根据启动子来源可分为哺乳动物表达载体、酵母表达载体、大肠杆菌表达载体等。

3. 根据目标基因类型可分为常规基因表达载体、重组蛋白表达载体、非编码RNA表达载体、抗体蛋白表达载体等。

常规基因表达载体、重组蛋白表达载体、非编码RNA表达载体及抗体蛋白表达载体比较如下：

常规基因表达载体

目标基因	未知功能的基因或特定序列
特点	具有筛选marker或报告基因元件：通过筛选marker或报告基因实现基因的亚细胞定位或实现基因过表达或恢复表达。
限制	免疫原性：部分表达载体会使宿主细胞产生免疫反应，导致载体被清除或细胞死亡。
应用	基因的功能研究

重组蛋白表达载体

目标基因	编码目标蛋白的基因序列
特点	根据目标蛋白设计出的基因序列,不一定是天然存在的; 含有目标蛋白筛选、纯化的特定标签元件; 具有多样化的蛋白表达系统如大肠杆菌、酵母、哺乳动物、昆虫细胞等。 启动子多为诱导型表达启动子; 具有良好的扩展性:从实验级别到工业级别。
限制	1. 成本高:从载体构建到蛋白纯化。 2. 放大困难:主要受困于细胞生长条件、产物稳定性维持等。 3. 部分蛋白因结构复杂、难以正确折叠或易被宿主细胞降解等原因而无法高效表达。
应用	1. 蛋白质生产 2. 基因治疗 3. 疫苗开发

非编码RNA表达载体

目标基因	miRNA、siRNA、lncRNA或circRNA等多种类型
特点	特异性:针对特定的基因或RNA分子进行RNA序列选择及设计。
限制	1. 引发免疫反应; 2. 出现非特异性调控; 3. 稳定性差:非编码RNA在体内的稳定性较低。
应用	1. 调控基因表达; 2. 可作为研究非编码RNA生物学功能的有利工具; 3. 具有治疗某些由异常基因表达引起的疾病。

抗体蛋白表达载体

目标基因	编码特定抗体的基因序列, 包含编码抗体重链和轻链的DNA片段
特点	灵活性强:可表达多种类型的抗体, 包括单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体等。通过改造和优化载体, 还可以实现多基因共表达、融合蛋白表达等高级应用。
限制	<ol style="list-style-type: none">1. 表达效率的不稳定性:载体表达效率受到宿主细胞类型、培养条件、基因序列等因素导致表达效率的不稳定。2. 活性不易控制:抗体聚集和错误折叠而失去活性。3. 纯化成本高:昂贵的纯化试剂和设备, 增加了抗体生产的成本。4. 宿主细胞的安全性:某些宿主细胞(如哺乳动物细胞)进行抗体表达时, 可能携带病毒、细菌或其他病原体, 需要严格的生物安全措施来确保生产过程中的安全。
应用	抗体药物研发

01 基因表达与功能研究

在特定宿主细胞中表达目标基因, 并研究该基因在宿主细胞中的功能。这种技术对于理解基因在生物体内的作用机制、基因功能发现等具有重要意义。



主要功能与应用

02 蛋白生产

用于生产具有特定功能的蛋白质。通过选择适当的宿主细胞和表达载体, 可以高效地表达并纯化目标蛋白, 用于生物制药、诊断试剂、工业酶等领域。

03 基因疗法

在基因治疗领域, 表达载体可将正常的基因导入到患者的细胞中, 以替换或修复缺陷基因。通过这种表达载体介导的基因转移技术, 可以实现基因在患者细胞中的长期、稳定表达, 从而达到治疗疾病的目的。

04 疫苗开发

表达载体将抗原基因导入特定宿主细胞中表达, 诱发免疫反应可以制备出具有免疫原性的抗原蛋白。这些抗原蛋白可以用于制备疫苗, 预防和控制传染病的发生。

3.5.3 编辑载体

编辑载体 (Editing Vector) 是一种用于基因编辑的分子工具, 它通常基于质粒 (plasmid) 或其他DNA载体系统, 并携带特定的基因编辑元件, 如DNA核酸酶、识别序列以及模板DNA等, 用于在目标生物体的基因组中进行精确的DNA序列修改。编辑载体的设计和构建需要高度的专业知识和技能, 以确保编辑的精确性和效率。随着基因编辑技术的不断发展, 编辑载体在生物医学研究、农业生物技术、基因治疗等领域的应用前景越来越广阔。



主要功能与应用

01 基因敲除

通过DNA核酸酶在特定位置切割DNA, 然后依赖细胞的DNA修复机制 (如非同源末端连接) 来删除或破坏基因。

02 基因敲入

在DNA切割后, 通过提供模板DNA来引导细胞进行同源重组, 从而在特定位置插入新的DNA序列。

03 基因修复

类似于基因敲入, 但用于修复已存在的突变或缺陷。

根据编辑对象不同,主要分为CRISPR Cas9敲除载体和CRISPR Cas13敲除载体,比较如下表:

CRISPR Cas9敲除载体

定义	一种基于CRISPR-Cas9系统的基因敲除 (Knockout, Ko) 工具。载体上的Cas9蛋白来源于化脓链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>) 的II型CRISPR/Cas系统,能够精确地识别和切割目标DNA序列,实现基因的定点敲除。
特点	<ol style="list-style-type: none">1. 灵活性:载体构建技术易于操作,可以通过改变Cas9蛋白的序列实现对不同DNA序列的剪切。2. 广泛适用性:载体构建技术可广泛应用于各种生物体系,包括细菌、酵母、植物、动物等。
编辑对象	DNA
限制	<ol style="list-style-type: none">1. 脱靶效应:存在一定的脱靶效应。2. 基因组不稳定性:引起的DNA断裂和修复可能导致基因组的不稳定性,增加突变的风险。3. 致癌风险:研究表明,CRISPR Cas9-Ko载体可能引发某些类型的癌症。

CRISPR Cas13敲除载体

定义	Cas13是一种能够切割RNA的CRISPR相关蛋白,具有高度的RNA识别和切割能力,能够精确地识别和切割目标RNA序列。
特点	<ol style="list-style-type: none">1. 灵活性:Cas13-Ko载体可以灵活地针对不同的RNA序列进行编辑,只需要更换相应的crRNA即可。2. 安全性:Cas13-Ko载体在RNA水平下进行编辑,不会改变基因组DNA序列,因此避免了可能由DNA编辑引起的脱靶效应和基因突变等风险。此外,Cas13-Ko载体在编辑过程中产生的副产物较少,对细胞毒性较低,进一步提高了其安全性。
编辑对象	RNA
限制	<ol style="list-style-type: none">1. 脱靶效应:尽管CRISPR Cas13在RNA识别方面具有较高的特异性,但仍存在一定的脱靶效应风险。2. 长期效果和安全性:CRISPR Cas13-Ko载体在RNA编辑方面的长期效果和安全性仍需要进一步研究和评估。

3.5.4 表达调控载体

表达调控载体通常包含启动子、增强子、沉默子等必须的顺式调控元件, 以及一个或多个用于插入目标基因的多克隆位点。通过设计这些调控元件, 研究人员可以精确地控制目标基因在特定时间、特定组织或特定条件下的表达水平。

01 基础科学研究

通过构建表达调控载体, 可以精确地控制目标基因在特定时间或特定细胞类型中的表达, 从而深入研究该基因在生物体中的功能。

02 代谢工程

通过精确控制关键酶的表达水平, 提高目标产物的产量或改变其代谢产物的比例。

03 医药研发

通过调控治疗基因的表达来纠正或补偿缺陷基因的功能, 实现疾病的基因治疗。

04 作物改良

通过提高抗旱、抗病或抗虫基因的表达水平, 增强作物的抗逆性。



主要功能
与应用

根据调控表达形式主要分为CRISPRi载体及CRISPRa载体。详情如下表：

CRISPRi载体

特点	用CRISPR/Cas系统从阻止基因转录的起始来抑制或沉默特定基因的表达；CRISPRi介导的敲低是可诱导且可逆的。
关键元件	dCas9、sgRNA、KRAB
工作原理	主要依赖于dCas9 (没有切割活性的Cas9) 和sgRNA (单链引导RNA) 的复合物。当这个复合物被引导到靶基因的转录起始位点 (TSS) 时, dCas9能够物理性地阻碍RNA聚合酶的通过, 导致基因沉默。同时, dCas9可以融合一个基因抑制结构域, 如KRAB结构域, 进一步提高转录抑制的效率。这种结构域可以阻止转录因子与DNA的结合, 从而抑制基因的表达。

CRISPRa载体

特点	利用CRISPR/Cas9系统原理进行基因激活表达；
关键元件	dCas9、sgRNA、转录激活结构域 (如VP64或p65AD)
工作原理	将dCas9与转录激活结构域 (如VP64或p65AD) 融合, 形成一个具有转录激活功能的Cas9-激活域融合蛋白。当这个融合蛋白与sgRNA结合时, 它可以被引导到目标基因的启动子或增强子区段, 并通过转录激活结构域的作用, 促进RNA聚合酶的招募和转录起始复合物的形成, 从而实现目标基因的激活。

3.5.5 体外转录载体

体外转录 (*In Vitro* Transcription, IVT) 载体, 又称为无细胞转录载体, 是一种在实验室条件下, 利用纯化的DNA作为模板, 在试管或其他容器中进行的RNA合成过程。主要用于生产和研究RNA分子。

主要功能与应用:

(1) 基因功能研究: 在分子生物学和生物技术的基础研究和教学领域, 体外转录技术是一种重要的实验工具。通过体外转录实验, 可以帮助学生和研究人员更深入地理解RNA的合成、加工和功能机制。

(2) mRNA疫苗和免疫治疗: 通过体外转录技术, 可以制备出编码特定抗原的mRNA, 这些mRNA可以在体内被细胞摄取并翻译成蛋白质, 从而诱导机体产生免疫反应。这种技术已经成功应用于多种传染病和肿瘤的疫苗研发中。

(3) 生物合成和代谢工程: 用于生产具有特定功能的RNA分子, 如RNA酶、RNA适配体等。这些RNA可以用于生产特定的生物活性物质或调节代谢途径。

(4) 诊断与检测: 还可以用于生产标记有放射性同位素或其他探针的RNA分子, 通过检测特定RNA分子的表达水平或结构变化, 可以判断疾病的发病机制和病情进展。

载体类型	必须元件	IVT产物
RNA体外转录载体	T7启动子	RNA
mRNA体外转录载体	T7启动子、Kozark序列、5'UTR、3'UTR、polyA	mRNA

优势

(1) 高效快速

可以在短时间内合成出大量的RNA/mRNA分子, 满足实验需求。

(2) 高纯度

通过体外转录系统合成的RNA/mRNA分子纯度高, 不需要经过复杂的分离和纯化步骤。

(3) 灵活性

可以合成各种长度和序列的RNA/mRNA分子, 适用于不同的实验需求。

(4) 可控性强

体外转录过程可以在实验室内进行控制, 可以根据实验需要调整反应条件和时间。

(5) 适用于大规模生产

由于体外转录系统的高效性和可控性, 它适用于大规模生产RNA分子, 如mRNA疫苗的生产等。

限制

(1) 稳定性受限

体外转录的RNA/mRNA分子在保存和运输过程中可能受到温度、湿度等环境因素的影响, 导致稳定性下降。

(2) 可能产生非特异性产物

在体外转录过程中, 可能会产生一些非特异性的RNA产物, 影响实验结果的准确性。

(3) 不适用于所有类型的RNA合成

虽然体外转录系统可以合成多种类型的RNA分子, 但对于某些特殊的RNA结构或功能可能无法实现有效合成。

3.5.6 启动子功能检测载体

启动子功能检测载体将目标启动子序列与报告基因(荧光蛋白、酶等)相连,并将其导入到目标细胞或组织中。当启动子被激活时,会驱动报告基因的表达,通过观察报告基因的表达情况来评估启动子的活性。

🔑 关键元件

一个启动子插入位点及供启动子驱动表达的报告基因,以及必要的调控序列和标记基因。

★ 特点

报告基因多样:通常包含一个或多个报告基因,如荧光素酶或绿色荧光蛋白(GFP),用于衡量启动子的活性。

📊 应用优势

- (1) 快速筛选:**能够快速识别和评估启动子的活性。
- (2) 定量分析:**报告基因的表达水平可以量化,便于比较不同启动子的效率。
- (3) 多样性评估:**适用于多种研究应用,包括启动子鉴定、功能分析和优化。
- (4) 技术成熟:**利用双荧光素酶报告系统进行转录调控元件活性及结合位点预测等实验设计思路与细节已经非常成熟。

🚫 应用限制

- (1) 背景噪声:**某些载体可能存在非特异性表达,导致背景噪声。
- (2) 宿主限制:**启动子的活性可能受到宿主细胞类型的影响。
- (3) 成本:**购买或构建高特异性的检测载体可能成本较高。

3.5.7 蛋白互作检测载体

蛋白互作检测通常通过构建融合蛋白表达载体来实现,其中目标蛋白序列与报告基因或标签序列融合,并在宿主细胞中共表达这两个融合蛋白。当这两个融合蛋白发生相互作用时,它们能够激活或抑制与它们相连的报告基因,从而引发可测量的信号变化,如荧光强度的增强或颜色的改变。通过检测这些信号变化,研究人员能够评估并量化蛋白质之间的相互作用。

🔑 关键元件

目标基因插入位点、用于报告蛋白互作的报告系统元件。

★ 特点

- (1) **双报告基因系统**:通常包含两个报告基因,用于监测蛋白间的相互作用。
- (2) **融合标签**:载体设计包含融合蛋白标签,如GST、His或Flag,便于蛋白的纯化和检测。
- (3) **信号放大**:一些载体通过信号放大机制提高检测的灵敏度。

■ 优势

- (1) **实时监测**:可以实时监测蛋白互作的动态过程。
- (2) **定量分析**:提供了一种定量分析蛋白互作强度的方法。
- (3) **高通量筛选**:适用于大规模筛选实验,有助于快速识别互作蛋白。
- (4) **应用广泛**:可用于药物筛选、疾病机制研究和信号传导途径分析。

⊘ 限制:

- (1) **假阳性/假阴性**:可能由于非特异性结合或实验条件不当导致错误结果。
- (2) **局限性**:蛋白互作检测载体通常只能检测到已知蛋白质之间的相互作用,对于未知的蛋白质相互作用可能无法检测。此外,一些低亲和力或瞬时的蛋白质相互作用也可能无法被检测到。