

华中农业大学研究生课程考试试卷（I）

考试科目名称： 分子生物学

考试时间：

姓名：_____ 学号：_____ 班级：_____

备注：所有答案均要写在答题纸上，否则，一律无效。

一、 解释名词 （30 分）：

1. **hnRNA**：称为前体 mRNA，它是真核生物基因转录的产物，由于真核生物的 DNA 是间隔基因，所以由他转录出的前体 mRNA 也就具有内含子和外显子，须将内含子切除并进行其它的转录处理才能形成成熟的 mRNA。
2. **Alu 家族 (Alu Family)**：。哺乳动物包括人基因组中含量最丰富的一种中度重复顺序家族，在单倍体人基因组中重复达 30 万~50 万次，约占人基因组的 3~6%， Alu 家族每个成员的长度约 300bp，每个单位长度中有一个限制性内切酶 Alu 的切点（AG↓CT）， Alu 可将其切成长 130 和 170bp 的两段，因而定名为 Alu 序列。
3. **转录因子**：作用于基因表达调控的蛋白质，尤其是调控转录的激活或抑制。
4. **S.D. 序列**：原核生物 mRNA 上起始密码子 AUG 上游方向 4~13 个核苷酸之前有一段富含嘌呤的序列，其一致序列为 5' -AGGAGGU-3'，称为 SD 序列。
5. **复制型转座**：作为自身移动的一个部分，转座子被复制，一个拷贝仍然保留在原来的位置上，而另一个则插入到一个新的部位，这样转座过程伴随着转座子拷贝数的增加。
6. **核酶**：核酶（ribozyme）具有类似酶的催化活性的核酸，是一类具有自我剪切功能的 RNA 分子。
7. **信号肽(Signal Peptide)**：位于新合成肽链的 N 端，一般 16~30 个氨基酸残基，含有 6-15 个连续排列的带正电荷的非极性氨基酸，由于信号肽又是引导肽链进入内质网腔的一段序列，又称开始转移序列（start transfer sequence）。
8. **诱导 (Induce)**：细菌或者酵母只有当底物存在时才会合成某种酶的能力，当用在基因表达中时指的是给诱导物与调控蛋白结合造成的转录转换。
9. **操纵元(Operon)**：在原核生物中功能上相关的基因连成串，由一个共同的控制区进行转录的控制，包括结构基因和控制区以及调节基因的整个核苷酸序列。
10. **增强子 (Enhancer)**：指增加同它连锁的基因转录频率的 DNA 序列。增强子是通过启动子来增加转录的。有效的增强子可以位于基因的 5'端，也可位于基因的 3'端，有的还可位于基因的内含子中。

二、 简答题 （40 分）

1. 简要回顾人类对基因的研究与认识过程并根据你的见解给基因下一个定义。

孟德尔的颗粒因子决定理论：一个因子决定一个性状。

约翰森首先提出“基因”一词。

摩尔根的基因论：一个基因控制一个形状，明确了基因存在于染色体上。

Beadle 和 Tatum: 一个基因一个酶学说。

Avery 肺炎双球菌转化实验: 证实了遗传物质的本质是 DNA。

Benzer: 一个顺反子, 一个多肽链。

基因是指携带有遗传信息的DNA或RNA序列 (即基因是具有遗传效应的DNA或RNA片段), 也称为遗传因子, 是控制性状的基本遗传单位。基因通过指导蛋白质的合成来表达自己所携带的遗传信息, 从而控制生物个体的性状表现。

2. 根据 DNA 复性动力学研究, DNA 序列可以分成哪几种类型? 并加以举例说明。

- ①不重复序列/单一序列: 在基因组中有一个或几个拷贝。真核生物的大多数基因在单倍体
- ②中度单拷贝的。如: 蛋清蛋白、血红蛋白等。功能: 主要是编码蛋白质。
- ③中度重复序列: 在基因组中的拷贝数为 $10^1 \sim 10^4$ 。如: rRNA、tRNA。一般是不编码蛋白质的序列, 在调控基因表达中起重要作用。
- ④高度重复序列: 拷贝数达到几百个到几百万个。
- ⑤卫星 DNA: A·T 含量很高的简单高度重复序列。

3. 何谓 RNA 剪接, 何谓 RNA 编辑?

RNA剪接: 从DNA模板链转录出的最初转录产物中除去内含子, 并将外显子连接起来形成一个连续的RNA分子的过程。

RNA编辑(RNA editing): RNA编辑是指在mRNA水平上改变遗传信息的过程。RNA编辑是通过比较成熟的mRNA与相应基因的编码信息时发现的, 成熟的mRNA序列中有几种意想不到的变化, 包括U→C, C→U; U的插入或缺失、多个G或C的插入等。

4. 什么是正调控与负调控, 试举例说明。

正调控系统和负调控系统是按照没有蛋白质存在的情况下操纵元对新加入的调节蛋白的响应情况来定义的。在没有调节蛋白质存在时基因是表达的, 加入这种调节蛋白后基因表达活性便关闭。这样的控制系统就叫做负调控系统。如大肠杆菌色氨酸操纵子的调控。相反, 如果在没有调节蛋白质存在时基因是关闭的, 加入这种调节蛋白后基因活性就被开启, 这样的控制系统叫做正调控系统。如 cAMP-CAP 对于乳糖操纵元的正调控。

5. 什么是 DNA 甲基化? 简要说明甲基化的检测方法及其生物学效应。

胞嘧啶和甲基在甲基化酶的作用下形成 5'-甲基胞嘧啶的过程叫做 DNA 的甲基化。DNA 甲基化抑制或降低转录水平, 在基因转录起始点附近, 有高度密集的 CpG 重复序列, 被称为 CpG 岛, 或 HTF 岛。推测该序列与基因转录活性有关。

检测方法:

- ①酶切鉴定: Hpa II 只能切割未甲基化的-CCGG-, Hpa II 如果第二个 C 被甲基化了就不能切割。Msp I 能够识别和切割甲基化或未甲基化-CCGG-。比较这两种酶切割 DNA 产生的 DNA 片段的差异, 可知 DNA 片段甲基化的程度与有无。
- ②限制性内切酶+Southern blotting
- ③甲基化特异性 PCR (MSP)
- ④亚硫酸盐变性后测序
- ⑤甲基化敏感性单核苷酸引物扩增 (Ms-SnuPE)
- ⑥甲基化荧光检测

- ⑦亚硫酸氢钠变性后限制酶分析 (COBRA)
- ⑧差异甲基化杂交 (DMN)
- ⑨酶的区域性甲基化分析 (ERMA)

6. 简述空转反应的形成及其结果。

当无负载的 tRNA 进入核糖体 A 位以后, 无法形成新的肽键, 而 ATP 却在不断的消耗, 这就是所谓的空转反应。细胞内出现空转反应时, 就会发出一种报警信号, 这就是鸟苷 5' 二磷酸 3' 二磷酸 (pppGpp)。ppGpp 和 pppGpp 能通过某种方式控制细胞的许多生理过程, 以使细胞能够适应有限的营养条件, 特别是氨基酸的供应。这些非同寻常的代谢产物能够影响某些蛋白质和酶的活性或性质, 从而设法解决细胞所碰到的问题。

7. 简述突变热点的定义及其可能的机制。

从理论上讲, DNA 分子上每一个碱基都能发生突变, 但实际上突变位点并非完全随机分布, 而是某些位点的突变频率大大高于平均数, 这些位点就称为突变热点。

形成突变热点的最主要的原因是 5-甲基胞嘧啶的存在。5-甲基胞嘧啶和 C 一样, 在突变剂的作用之下, 会产生脱氨基氧化。5-甲基胞嘧啶脱氨基化以后生成 T, 而 T 是 DNA 的正常组分, 形成 G-T 的不配对状态。

形成突变热点还有其他原因。在短连续重复序列处容易发生插入或缺失突变。

突变热点还与突变剂有关。使用不同的突变剂时出现的突变热点处不同。

8. 简述同源重组的机理。

同源重组发生在 DNA 同源序列之间, 大肠杆菌的同源重组需 RecA 蛋白, 以 Holliday 为例说明同源重组的机理:

- ①切断: 同源联会的两个 DNA 分子中任意一个出现单链切口, 切口由某些 DNA 内切酶产生。
- ②链置换: 切口处形成的 5' 端局部解链, 由细胞内类似于大肠菌聚合酶 I 的酶系统利用切口处的 3' OH 合成新链, 而把原有的链逐步置换出来, 使之成为游离的以 5' P 为末端的单链区段, 单链反应可以一直进行下去, 由此产生的单链区段越来越长。
- ③单链侵入: 由置换产生的单链区段侵入到参与联会的另一条 DNA 分子因局部解链而产生的单链中。
- ④loop 切除: 侵入的单链 DNA 与参与联会的另一条 DNA 分子中的互补链形成碱基配对, 同时把侵入单链的同源链置换出来, 由此产生 D-loop。
- ⑤链同化: loop 切除中产生的 3' OH 断头和侵入单链的 5' P 由 DNA 连接酶共价连接。
- ⑥异构化: 链同化进行过程中, DNA 经过一定的扭曲形成异构体。
- ⑦分支迁移: 两条 DNA 分子之间形成的交叉可以沿 DNA 移动, 这一过程叫分支迁移。

三、应用题 (30 分, 前 5 题中任选 2 题)

1. 请设计一个实验证明某基因存在一个内含子 ?

内含子的鉴定是通过所谓的 “berk-sharp” 制图法又称 S1 核酸制图法来实现的, 其原理是: 利用 S1 核酸酶的单链特异性, 核酸酶 VII 的单链外切特异性, 以及稀碱溶液能分解 RNA 的特性, 来对杂交分子做不同的处理以得到外显子的长度。内含子的长度以及基因的总长度。

具体操作：首先将 DNA 进行转录，制备 mRNA，然后将 DNA 与 mRNA 分子进行杂交，对杂交分子做不同的处理。一份杂交分子用 S1 酶处理，核酶能降解所有的单链区，留下一个有缺口的 DNA 与 mRNA 杂交双链分子，如果直接走电泳，可以得到一个带，相当于外显子连接起来的长度；如果经碱溶液处理在走电泳，则得到多条带，为外显子带。另外一份杂交分子用外切核酸酶 VII 处理，去除两端没杂交的 DNA，在用碱溶液处理，去除 RNA，走电泳得到一条带为外显子及其之间的内含子的总长度。从而鉴定内含子。

2. 假设从一种生物抽提了核酸，你将用什么简便的方法，区别它是 DNA 或 RNA？

①溶解性：都溶于水而不溶于乙醇，因此，常用乙醇来沉淀溶液中的 DNA 和 RNA。DNA 溶于苯酚而 RNA 不溶，故可用苯酚来沉淀 RNA。

②利用 Southern blotting 及 Northern blotting 杂交法区分 DNA 和 RNA。DNA 分子可以与硝酸纤维素滤膜结合，通过特异性探针检测 DNA 片段的存在。而 RNA 分子不能与硝酸纤维素滤膜结合，而是将 RNA 转移到叠氮化的或其他化学修饰的活性滤纸上，通过共价交联作用而使他们结合在一起。所以通过不同的杂交方法可以鉴别 DNA 和 RNA。

③沉降速度：对于拓扑异构体（核苷酸数目相同的核酸），其沉降速度从大到小依次为：RNA；超螺旋 DNA > 解链环状 DNA；松弛环状 DNA；线形 DNA 也就是在离心管中最上层是线形 DNA，最下面是 RNA。

④利用 RNase 与 DNase 水解鉴定 DNA 和 RNA。RNase 能水解 RNA 片段，而不水解 DNA 片段；而 DNase 只能水解 DNA 而不能水解 RNA，这样通过水解的程度与与可鉴别 DNA 和 RNA。

⑤显色反应：

鉴别 DNA 和 RNA，加入浓盐酸，

RNA → 绿色化合物，DNA → 蓝紫色化合物苔黑酚

3. 请设计一个实验来证明 DNA 复制是以半保留方式进行的？

首先让大肠杆菌在以 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 为唯一氮源的培养基中连续培养 12 代，使所有的 DNA 都被标记上 ^{15}N ， $^{15}\text{NDNA}$ 的密度比普通 $^{14}\text{NDNA}$ 的密度大，在氯化铯 (CsCl) 密度梯度离心时，这两种 DNA 形式位于不同的区带，如果将所有 ^{15}N 标记的大肠杆菌转移到普通培养基中（含有 ^{14}N 的培养基）经过一代之后，所有 DNA 的密度都介于 $^{15}\text{NDNA}$ 和 $^{14}\text{NDNA}$ 之间，即所有 ^{15}N - ^{14}N 杂合分子，两代后 ^{14}N 和 ^{15}N - ^{14}N 杂交分子等量出现，若再继续培养，可以看到 $^{14}\text{NDNA}$ 增多，而当把 ^{15}N - ^{14}N 杂合分子加热变性时，它们分开成 ^{15}N 链和 ^{14}N 链，这就充分证明了，在 DNA 复制时原来的 DNA 分子可被分成两个亚单位，分别构成子代分子的一半，这些亚单位经过许多代复制，仍然保持着完整性。

4. 请设计一个实验确定某基因的启动子区？

足迹法：RNA 聚合酶结合于 DNA，然后加入 DNA 内切酶、核酸酶将大部分 DNA 都降解成单核苷酸或者二核苷酸，而被 RNA 聚合酶覆盖的部分则保留下来，然后终止 DNAase 的作用，出去 RNA 聚合酶，即可分离到被保护的 DNA 片段，这种片段一般为 40bp 左右。

脚印法：将结合有 RNA 聚合酶的 DNA 用限制酶切割，得到一个共同的端点，再将端点的一条链用放射性标记，用微量的 DNAase I 部分水解酶——DNA 复合物，在不受 RNA 聚合酶覆盖的区域，每个磷酸二酯键都可能遭到 DNAase I 的进攻，但同一个分子上只有少量（1~2 个）切点，将所得片段经过碱变性电泳和放射自显影，就可以知道 RNA 聚合酶在标记上覆盖的大小，并可以确定 DNA 序列。

5. 设计一个实验证明某基因存在选择性剪切？

对内含子和外显子进行选择剪切的方式称为选择性剪切。我们可以用 northern blot 的方式检测选择性剪切是否存在：用含有变性剂的琼脂糖凝胶电泳分离 RNA，然后将分离的 RNA 转膜到纤维素膜上，在液相中与标记的核酸探针杂交，经过放射自显影以后，如果检测到一条带，那么没有选择性剪切，如果有两条或者多条，那么存在选择性剪切。

6. 举出 2-3 种基因组测序或功能基因组研究的策略，并加以说明？

①Sanger 双脱氧核苷酸终止法

原理：利用 DNA 聚合酶所具有的两种催化反应特性：

第一，DNA 聚合酶能以单链 DNA 为模板，准确合成出 DNA 的互补链。

第二，DNA 聚合酶能以 2', 3'-双脱氧核苷三磷酸为底物，使之参与到寡核苷酸链的 3'末端，从而终止 DNA 链的延长。当 2', 3'-双脱氧胸腺嘧啶 dTTP，参与到延长的寡核苷酸链末端，取代 3'脱氧胸腺嘧啶 dTTP 之后，由 ddTTP 没有 3'-OH，所以寡核苷酸链不能继续延长（终止 3 链的合成），于是在本该由 dTTP 参入的位置上发生特异的链终止效应。如果在同一反应试管中，同时加入一种 DNA 合成的引物和模板，DNA 聚合酶，ddTTP，dTTP 以及其他三种脱氧核苷二磷酸（dAP，dGTP，dCTP），而其中有一种是带 ^{32}P 放射性标记的，那么经过适当的温育之后，使会产生不同长度的 DNA 片段混合物，他们都具有同样的 5'-末端，并在 3'末端 ddTTP 处终止。将这种混合物加到变性凝胶上进行电泳分离，就可以获得一系列全部以 3'末端 ddTTP 为终止残基的 DNA 片段的电泳谱带模式。使用相应于其他核苷酸的抑制物，如 ddATP，ddGTP，和 ddCTP，并分别在不同反应试管温育，然后连同第一个 ddTTP 反应，平行加到同一变性凝胶上进行电泳分离----放射自显影。

②焦磷酸测序法原理它是 4 种酶催化的同一反应体系中的酶吸联化学发光反应。

原理：引物与模板 DNA 退火以后，在 DNA 磷酸酶 4 种酶的协同作用下，将引物上每一个 dNTP 的聚合与一次荧光信号的释放耦联起来，通过检测荧光的释放和强度，达到实时测定 DNA 序列目的，反应体系由反应底物、待测单链、测序引物和 4 种酶构成，反应底物为 5'-磷酸硫酸和荧光素。

Designed By Lorjean