

一、 名词解释

- 1、 **基因**：能够表达和产生蛋白质和 RNA 的 DNA 序列，是决定遗传性状的功能单位。
- 2、 **基因组**：细胞或生物体的一套完整单倍体的遗传物质的总和。
- 3、 **端粒**：以线性染色体形式存在的真核基因组 DNA 末端都有一种特殊的结构叫端粒。该结构是一段 DNA 序列和蛋白质形成的一种复合体，仅在真核细胞染色体末端存在。
- 4、 **操纵子**：是指数个功能上相关的结构基因串联在一起，构成信息区，连同其上游的调控区（包括启动子和操纵基因）以及下游的转录终止信号所构成的基因表达单位，所转录的 RNA 为多顺反子。
- 5、 **顺式作用元件**：是指那些与结构基因表达调控相关、能够被基因调控蛋白特异性识别和结合的特异 DNA 序列。包括启动子、上游启动子元件、增强子、加尾信号和一些反应元件等。
- 6、 **反式作用因子**：是指真核细胞内含有的大量可以通过直接或间接结合顺式作用元件而调节基因转录活性的蛋白质因子。
- 7、 **启动子**：是 RNA 聚合酶特异性识别和结合的 DNA 序列。
- 8、 **增强子**：位于真核基因中远离转录起始点，能明显增强启动子转录效率的特殊 DNA 序列。它可位于被增强的转录基因的上游或下游，也可相距靶基因较远。
- 9、 **基因表达**：是指生物基因组中结构基因所携带的遗传信息经过转录、翻译等一系列过程，合成特定的蛋白质，进而发挥其特定的生物学功能和生物学效应的全过程。
- 10、 **信息分子**：调节细胞生命活动的化学物质。其中由细胞分泌的调节靶细胞生命活动的化学物质称为细胞间信息分子；而在细胞内传递信息调控信号的化学物质称为细胞内信息分子。
- 11、 **受体**：是存在于靶细胞膜上或细胞内能特异识别生物活性分子并与之结合，进而发生生物学效应的特殊蛋白质。
- 12、 **分子克隆**：在体外对 DNA 分子按照即定目的和方案进行人工重组，将重组分子导入合适宿主，使其在宿主中扩增和繁殖，以获得该 DNA 分子的大量拷贝。
- 13、 **蛋白激酶**：是指能够将磷酸集团从磷酸供体分子转移到底物蛋白的氨基酸受体上的一大类酶。
- 14、 **蛋白磷酸酶**：是具有催化已经磷酸化的蛋白质分子发生去磷酸化反应的一类酶分子，与蛋白激酶相对应存在，共同构成了磷酸化和去磷酸化这一重要的蛋白质活性的开关系统。
- 15、 **基因工程**：有目的的通过分子克隆技术，人为的操作改造基因，改变生物遗传性状的系列过程。
- 16、 **载体**：能在连接酶的作用下和外源 DNA 片段连接并运送 DNA 分子进入受体细胞的 DNA 分子。
- 17、 **转化**：指质粒 DNA 或以它为载体构建的重组 DNA 导入细菌的过程。
- 18、 **感染**：以噬菌体、粘性质粒和真核细胞病毒为载体的重组 DNA 分子，在体外经过包装成具有感染能力的病毒或噬菌体颗粒，才能感染适当的细胞，并在细胞内扩增。
- 19、 **转导**：指以噬菌体为载体，在细菌之间转移 DNA 的过程，有时也指在真核细胞之间通过逆转录病毒转移和获得细胞 DNA 的过程。
- 20、 **转染**：指病毒或以它为载体构建的重组子导入真核细胞的过程。
- 21、 **DNA 变性**：在物理或化学因素的作用下，导致两条 DNA 链之间的氢键断裂，而核酸分子中的所有共价键则不受影响。
- 22、 **DNA 复性**：当促使变性的因素解除后，两条 DNA 链又可以通过碱基互补配对结合形

成 DNA 双螺旋结构。

- 23、退火：指将温度降至引物的 T_m 值左右或以下，引物与 DNA 模板互补区域结合形成杂交链。
- 24、筑巢 PCR：先用一对外侧引物扩增含目的基因的大片段，再用内侧引物以大片段为模板扩增获取目的基因。可以提高 PCR 的效率和特异性。
- 25、原位 PCR：以组织固定处理细胞内的 DNA 或 RNA 作为靶序列，进行 PCR 反应的过程。
- 26、定量 PCR：基因表达涉及的转录水平的研究常需要对 mRNA 进行定量测定，对此采用的 PCR 技术就叫定量 PCR。
- 27、基因打靶：是指通过 DNA 定点同源重组，改变基因组中的某一特定基因，从而在生物活体内研究此基因的功能。
- 28、DNA 芯片：DNA 芯片技术是指在固相支持物上原位合成寡核苷酸或者直接将大量的 DNA 探针以显微打印的方式有序地固化于支持物表面，然后与标记的样品杂交，通过对杂交信号的检测分析，即可获得样品的遗传信息。由于常用计算机硅芯片作为固相支持物，所以称为 DNA 芯片。
- 29、错义突变：DNA 分子中碱基对的取代，使得 mRNA 的某一密码子发生变化，由它所编码的氨基酸就变成另一种的氨基酸，使得多肽链中的氨基酸顺序也相应的发生改变的突变。
- 30、无义突变：由于碱基对的取代，使原来可以翻译某种氨基酸的密码子变成了终止密码子的突变。
- 31、同义突变：碱基对的取代并不都是引起错义突变和翻译终止，有时虽然有碱基被取代，但在蛋白质水平上没有引起变化，氨基酸没有被取代，这是因为突变后的密码子和原来的密码子代表同一个氨基酸的突变。
- 32、移码突变：在编码序列中，单个碱基、数个碱基的缺失或插入以及片段的缺失或插入等均可以使突变位点之后的三联体密码阅读框发生改变，不能编码原来的蛋白质的突变。
- 33、癌基因：是细胞内控制细胞生长的基因，具有潜在的诱导细胞恶性转化的特性。当癌基因结构或表达发生异常时，其产物可使细胞无限制增殖，导致肿瘤的发生。包括病毒癌基因和细胞癌基因。
- 34、细胞癌基因：存在于正常的细胞基因组中，与病毒癌基因有同源序列，具有促进正常细胞生长、增殖、分化和发育等生理功能。在正常细胞内未激活的细胞癌基因叫原癌基因，当其受到某些条件激活时，结构和表达发生异常，能使细胞发生恶性转化。
- 35、病毒癌基因：存在于病毒（大多是逆转录病毒）基因组中能使靶细胞发生恶性转化的基因。它不编码病毒结构成分，对病毒无复制作用，但是当受到外界的条件激活时可产生诱导肿瘤发生的作用。
- 36、基因诊断：以 DNA 或 RNA 为诊断材料，通过检查基因的存在、结构缺陷或表达异常，对人体的状态和疾病作出诊断的方法和过程。
- 37、RFLP：即限制性片段长度多态性，个体之间 DNA 的核苷酸序列存在差异，称为 DNA 多态性。若因此而改变了限制性内切酶的酶切位点则可导致相应的限制性片段的长度和数量发生变化，称为 RFLP。
- 38、基因治疗：一般是指将限定的遗传物质转入患者特定的靶细胞，以最终达到预防或改变特殊疾病状态为目的治疗方法。
- 39、反义 RNA：碱基序列正好与有意义的 mRNA 互补的 RNA 称为反义 RNA。可以作为一种调控特定基因表达的手段。
- 40、核酶：是一种可以催化 RNA 切割和 RNA 剪接反应的由 RNA 组成的酶，可以作为基因

表达和病毒复制的抑制剂。

- 41、三链 DNA: 当某一 DNA 或 RNA 寡核苷酸与 DNA 高嘌呤区可结合形成三链, 能特异地结合在 DNA 的大沟中, 并与富含嘌呤链上的碱基形成氢键。
- 42、SSCP: 单链构象多态性检测是一种基于 DNA 构象差别来检测点突变的方法。相同长度的单链 DNA, 如果碱基序列不同, 形成的构象就不同, 这样就形成了单链构象多态性。
- 43、管家基因: 在生物体生命的全过程都是必须的, 且在一个生物个体的几乎所有细胞中持续表达的基因。
- 44、细胞全能性: 指同一种生物的所有细胞都含有相同的 DNA, 即基因的数目和种类是一样的, 但在不同阶段, 同一个体的不同组织和器官中基因表达的种类和数目是不同的。
- 45、SD 序列: 转录出的 mRNA 要进入核糖体上进行翻译, 需要一段富含嘌呤的核苷酸序列与大肠杆菌 16S rRNA 3' 末端富含嘧啶的序列互补, 是核糖体的识别位点。
- 46、反义核酸技术: 是通过合成一种短链且与 DNA 或 RNA 互补的, 以 DNA 或 RNA 为目标抑制翻译的反义分子, 干扰目的基因的转录、剪接、转运、翻译等过程的技术。
- 47、核酸探针: 探针是指能与某种大分子发生特异性相互作用, 并在相互作用之后可以检测出来的生物大分子。核酸探针是指能识别特异碱基顺序的带有标记的一段 DNA 或 RNA 分子。
- 48、周期蛋白: 是一类呈细胞周期特异性或时相性表达、累积与分解的蛋白质, 它与周期素依赖性激酶共同影响细胞周期的运行。
- 49、CAP: 是大肠杆菌分解代谢物基因活化蛋白, 这种蛋白可将葡萄糖饥饿信号传递个许多操纵子, 使细菌在缺乏葡萄糖时可以利用其他碳源。
- 50、顺反子
- 51、结构域
- 52、

二、问答题

(一)、病毒、原核、真核基因组的特点?

答: 1、病毒基因组的特点:

- ① 种类单一; ②单倍体基因组: 每个基因组在病毒中只出现一次; ③形式多样; ④大小不一; ⑤基因重叠; ⑥动物/细菌病毒与真核/原核基因相似: 内含子; ⑦具有不规则的结构基因; ⑧基因编码区无间隔: 通过宿主及病毒本身酶切; ⑨无帽状结构; ⑩结构基因没有翻译起始序列。

2、原核基因组的特点:

- ①为一条环状双链 DNA; ②只有一个复制起点; ③具有操纵子结构; ④绝大部分为单拷贝; ⑤可表达基因约 50%, 大于真核生物小于病毒; ⑥基因一般是连续的, 无内含子; ⑦重复序列很少。

3、真核基因组的特点:

- ①真核生物基因组远大于原核生物基因组, 结构复杂, 基因数庞大, 具有多个复制起点;
- ②基因组 DNA 与蛋白质结合成染色体, 储存于细胞核内;
- ③真核基因为单顺反子, 而细菌和病毒的结构基因多为多顺反子;
- ④基因组中非编码区多于编码区;
- ⑤真核基因多为不连续的断裂基因, 由外显子和内含子镶嵌而成;
- ⑥存在大量的重复序列;
- ⑦功能相关的基因构成各种基因家族;
- ⑧存在可移动的遗传因素;
- ⑨体细胞为双倍体, 而精子和卵子为单倍体。

(二)、乳糖操纵子的作用机制?

答: 1、乳糖操纵子的组成: 大肠杆菌乳糖操纵子含 Z、Y、A 三个结构基因, 分别编码半

乳糖苷酶、透酶和半乳糖苷乙酰转移酶，此外还有一个操纵序列 O，一个启动子 P 和一个调节基因 I。

2、阻遏蛋白的负性调节：没有乳糖存在时，I 基因编码的阻遏蛋白结合于操纵序列 O 处，乳糖操纵子处于阻遏状态，不能合成分解乳糖的三种酶；有乳糖存在时，乳糖作为诱导物诱导阻遏蛋白变构，不能结合于操纵序列，乳糖操纵子被诱导开放合成分解乳糖的三种酶。所以，乳糖操纵子的这种调控机制为可诱导的负调控。

3、CAP 的正性调节：在启动子上游有 CAP 结合位点，当大肠杆菌从以葡萄糖为碳源的环境转变为以乳糖为碳源的环境时，cAMP 浓度升高，与 CAP 结合，使 CAP 发生变构，CAP 结合于乳糖操纵子启动序列附近的 CAP 结合位点，激活 RNA 聚合酶活性，促进结构基因转录，调节蛋白结合于操纵子后促进结构基因的转录，对乳糖操纵子实行正调控，加速合成分解乳糖的三种酶。

4、协调调节：乳糖操纵子中的 I 基因编码的阻遏蛋白的负调控与 CAP 的正调控两种机制，互相协调、互相制约。

（三）、真核生物转录水平的调控机制？

答：真核生物在转录水平的调控主要是通过反式作用因子、顺式作用元件和 RNA 聚合酶的相互作用来完成的，主要是反式作用因子结合顺式作用元件后影响转录起始复合物的形成过程。

1、转录起始复合物的形成：真核生物 RNA 聚合酶识别的是由通用转录因子与 DNA 形成的蛋白质-DNA 复合物，只有当一个或多个转录因子结合到 DNA 上，形成有功能的启动子，才能被 RNA 聚合酶所识别并结合。

转录起始复合物的形成过程为：TF II D 结合 TATA 盒；RNA 聚合酶识别并结合 TF II D-DNA 复合物形成一个闭合的复合物；其他转录因子与 RNA 聚合酶结合形成一个开放复合物。

在这个过程中，反式作用因子的作用是：促进或抑制 TF II D 与 TATA 盒结合；促进或抑制 RNA 聚合酶与 TF II D-DNA 复合物的结合；促进或抑制转录起始复合物的形成。

2、反式作用因子：一般具有三个功能域（DNA 识别结合域、转录活性域和结合其他蛋白结合域）；能识别并结合上游调控区中的顺式作用元件；对基因的表达有正性或负性调控作用。

3、转录起始的调控：

(1)反式作用因子的活性调节：①表达式调节——反式作用因子合成出来就具有活性；②共价修饰——磷酸化和去磷酸化，糖基化；③配体结合——许多激素受体是反式作用因子；④蛋白质与蛋白质相互作用——蛋白质与蛋白质复合物的解离与形成。

(2)反式作用因子与顺式作用元件的结合：反式作用因子被激活后，即可识别并结合上游启动子元件和增强子中的保守性序列，对基因转录起调节作用。

(3)反式作用因子的作用方式——成环、扭曲、滑动、Oozing。

(4)反式作用因子的组合式调控作用：每一种反式作用因子结合顺式作用元件后虽然可以发挥促进或抑制作用，但反式作用因子对基因调控不是由单一因子完成的而是几种因子组合发挥特定的作用。

（四）、真核生物转录后水平的调控机制？

答：（1）、5' 端加帽和 3' 端多聚腺苷酸化的调控意义：5' 端加帽和 3' 端多聚腺苷酸化是保持 mRNA 稳定的一个重要因素，它至少保证 mRNA 在转录过程中不被降解。

（2）、mRNA 选择性剪接对基因表达调控的作用

（3）、mRNA 运输的控制

(五)、受体的特点？

答：1、高度专一性；2、高度亲和性；3、可逆性；4、可饱和性；5、特定的作用模式

(六)、表皮生长因子介导的信号传导途径？

答：表皮生长因子受体是一个典型的蛋白酪氨酸激酶受体，这个信号转导途径的主要步骤是：

- 1、受体二聚化的形成及其磷酸化：表皮生长因子与受体的结合使受体发生二聚化，从而改变受体构象，使蛋白酪氨酸激酶活性增强，受体自身的几个蛋白酪氨酸残基在激酶的作用下发生磷酸化。
- 2、募集接头蛋白 Grb2：表皮生长因子受体自身被磷酸化后，不仅其激酶活性增强，而且其构象发生变化，从而适合与含 SH2 结构域的蛋白分子相结合。Grb2 是作为接头蛋白结合到受体上。
- 3、调控分子 SOS 的活化：SOS 含有可与 SH3 结构域相结合的富含脯氨酸基序，当 Grb2 结合到磷酸化的表皮生长因子受体后，它的两个 SH3 结构域即可结合 SOS，使之活化。
- 4、低分子量 G 蛋白 Ras 的活化：SOS 可促进 Ras 释放 GDP，结合 GTP 的反应，使 Ras 激活。活化的 Ras 作用其下游分子 Raf，使之活化。Raf 是 MAPK 级联反应的第一个分子，由此启动了 MAPK 的三级激活过程。
- 5、MAPK 的级联激活：Raf 是一种 MAPKKK，它作用于 MEK，使之磷酸化而激活，活化的 MEK 在作用于 MAPK 家族的 ERK1，使之磷酸化激活由此完成了三级激活。
- 6、转录因子的磷酸化及转录调控作用：活化的 ERK 可以转至细胞核内，使某些转录调控因子发生磷酸化，从而影响基因的转录。

(七)、cAMP 信号转导途径？

答：1、组成：胞外信息分子（主要是胰高血糖素、肾上腺素和促肾上腺皮质激素），受体，G 蛋白，AC，cAMP，PKA。

2、途径：

- ❖ 信号分子与受体结合，引起受体构象变化
- ❖ 受体活化 G 蛋白
- ❖ 活化后的 G 蛋白激活腺苷酸环化酶（AC）
- ❖ AC 催化 ATP 生成 cAMP
- ❖ cAMP 活化 PKA，PKA 使目标蛋白磷酸化，调节代谢酶的活性或调节基因的表达

(八)、IP₃-Ca²⁺信号途径：

- ❖ 信号分子与受体结合，引起受体构象变化
- ❖ 受体活化 G 蛋白
- ❖ 活化后的 G 蛋白激活 PLC
- ❖ PLC 水解 PIP₂ 生成 IP₃ 和 DG
- ❖ IP₃ 使钙通道打开，细胞内 Ca²⁺升高
- ❖ Ca²⁺与 CaM 结合，激活 Ca²⁺-CaM 依赖的蛋白激酶
- ❖ Ca²⁺-CaM 依赖的蛋白激酶使目标蛋白磷酸化。

(九)、分子克隆中常用的工具酶及良好载体的条件？

答：(1)、常用的工具酶

- 1、限制性核酸内切酶：是细菌产生的一类能识别和切割双链 DNA 分子内特定的碱基顺序的核酸水解酶。
- 2、DNA 连接酶：将两段 DNA 分子拼接起来的酶。
- 3、DNA 聚合酶：催化单核苷酸链延伸。
- 4、逆转录酶：依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶，这是一种有效的转录 RNA 成为 DNA 的酶，产物 DNA 又称互补 DNA。

5、末端脱氧核糖核酸转移酶：将脱氧核糖核酸加到 DNA 的 3' 末端。

6、碱性磷酸酶：催化去除 DNA、RNA 等的 5' 磷酸基团。

7、依赖 DNA 的 RNA 聚合酶：识别特异性启动子，RNA 转录。

(2)、良好载体的条件

1、必须有自身的复制子；2、载体分子上必须有限制性核酸内切酶的酶切位点，即多克隆位点，以供外源 DNA 插入；3、载体应具有可供选择的遗传标志，以区别阳性重组子和阴性重组子；4、载体分子必须有足够的容量；5、可通过特定的方法导入细胞；6、对于表达载体还应具备与宿主细胞相适应的启动子、前导顺序、增强子、加尾信号等 DNA 调控元件。

(十)、蓝-白筛选的原理？

答：某些质粒带有大肠杆菌的半乳糖苷酶基因片段，在半乳糖苷酶基因的基因区外又另外引入了一段含多种单一限制酶位点的 DNA 序列。这些位点上如果没有克隆外源性 DNA 片段，在质粒被导入 lac⁻的大肠杆菌后，质粒携带的半乳糖苷酶基因将正常表达，与大肠杆菌的半乳糖苷酶基因互补，产生有活性的半乳糖苷酶，加入人工底物 X-gal 和诱导剂 IPTG 后，出现蓝色的菌落。如果在多克隆位点上插入外源 DNA 片段，将使 lac Z 基因灭活，不能生成半乳糖苷酶，结果菌落出现白色。由于这种颜色标志，重组克隆和非重组克隆的区分一目了然。

(十一) SANGER 双脱氧链终止法的原理？

答：DNA 链中核苷酸以 3', 5' -磷酸二酯键连接，合成 DNA 所用的底物是 2' -脱氧核苷三磷酸。2', 3' ddNTP 与普通 dNTP 不同，它们在脱氧核糖的 3' 位置缺少一个羟基。在 DNA 聚合酶作用下通过三磷酸基团掺入到延伸的 DNA 链中，但由于没有 3' 羟基，不能同后续的 dNTP 形成磷酸二酯键，因此，正在延伸的 DNA 链不能继续延伸。在 DNA 合成反应混合物的 4 种普通 dNTP 中加入少量的一种 ddNTP，链延伸将与偶然发生但却十分特异的链终止竞争，产物是一系列的核苷酸链，其长度取决于引物末端到出现过早链终止位置间的距离。在 4 组独立酶反应中分别采用 4 种不同的 ddNTP，结果将产生 4 组寡核苷酸，它们将分别终止于模板链的 A、C、G 或 T 位置。

(十二)、核酸分子杂交的原理？

答：具有互补序列的两条单链核酸分子在一定的条件下（适宜的温度及离子强度等）碱基互补配对结合，重新形成双链；在这一过程中，核酸分子经历了变性和复性的变化，以及在复性过程中个分子间键的形成和断裂。杂交的双方是待测核酸和已知序列。

(十三)、影响杂交的因素？

答：1、核酸分子的浓度和长度：核酸浓度越大，复性速度越快。探针长度应控制在 50-300 个碱基对为好。

2、温度：温度过高不利于复性，而温度过低，少数碱基配对形成的局部双链不易解离，适宜的温度是较 T_m 值低 25 度。

3、离子强度：在低离子强度下，核酸杂交非常缓慢，随着离子强度的增加，杂交反应率增加。高浓度的盐使碱基错配的杂交体更稳定，所以进行序列不完全同源的核酸分子杂交时必须维持杂交反应液中的盐浓度和洗膜液中的盐浓度。

4、杂交液中的甲酰胺：甲酰胺能降低核酸杂交的 T_m 值。它有以下优点：在低温下探针更稳定；能更好地保留非共价结合的核酸。

5、核酸分子的复杂性：是指存在于反应体系中的不同顺序的总长度。两个不同基因组 DNA 变性后的相对杂交速率取决于样品浓度绝对一致时的相对复杂性（即 DNA 中的碱基数）。

6、非特异性杂交反应：在杂交前应对非特异性杂交反应位点进行封闭，以减少其对探针的非特异性吸附作用。

(十四)、探针的种类和优缺点？

答：1、cDNA 探针：通过逆转录获得 cDNA 后，将其克隆于适当的克隆载体，通过扩增重组

质粒而使 cDNA 得到大量的扩增。提取质粒后分离纯化作为探针使用。它是目前应用最为广泛的一种探针。

2、基因组探针：从基因组文库里筛选得到一个特定的基因或基因片段的克隆后，大量扩增、纯化，切取插入片段，分离纯化作为探针。

3、寡核苷酸探针：根据已知的核酸顺序，采用 DNA 合成仪合成一定长度的寡核苷酸片段作为探针。

4、RNA 探针：采用基因克隆和体外转录的方法可以得到 RNA 或反义 RNA 作为探针。

（十五）、探针的标记法？

答：1、缺口平移法：此法是利用适当浓度的 DNase I 在 DNA 双链上随机切割单链，造成单链切口。切口处产生一个 5' 末端和 3' 末端，3' 末端就可以作为引物，在大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的催化下，以互补的 DNA 单链为模板，依次将 dNTP 连接到切口的 3' 末端的羟基上，合成新的 DNA 单链；同时 DNA 聚合酶 I 的 5'→3' 的核酸外切酶活性在切口处将旧链从 5' 末端逐步切除，新合成链不断延伸，从而使原 DNA 分子上的部分核苷酸残基被标记的核苷酸所取代。

2、随机引物法：随机引物是人工合成的长度为 6 个寡核苷酸残基的寡聚核苷酸片段的混合物。对于任何一个用作探针的 DNA 片段，随机引物混合物中都会有一些六核苷酸片段可以与之结合，起到 DNA 合成引物的作用。将这些引物与变性的 DNA 单链结合后，以 4 种 dNTP（其中一种是标记物标记的 dNTP）为底物，合成与探针 DNA 互补的切带有标记物的 DNA 探针。

3、PCR 标记法：在 PCR 反应底物中，将一种 dNTP 换成标记物标记的 dNTP，这样标记的 dNTP 就在 PCR 反应的同时掺入到新合成的 DNA 链上。

4、末端标记法：只是将 DNA 片段的一端进行标记。

（十六）、PCR 的基本原理？

答：PCR 是在试管中进行的 DNA 复制反应，基本原理是依据细胞内 DNA 半保留复制的机理，以及体外 DNA 分子于不同温度下双链和单链可以互相转变的性质，人为地控制体外合成系统的温度，以促使双链 DNA 变成单链，单链 DNA 与人工合成的引物退火，然后耐热 DNA 聚合酶以 dNTP 为原料使引物沿着单链模板延伸为双链 DNA。PCR 全过程每一步的转换是通过温度的改变来控制的。需要重复进行 DNA 模板解链、引物与模板 DNA 结合、DNA 聚合酶催化新生 DNA 的合成，即高温变性、低温退火、中温延伸 3 个步骤构成 PCR 反应的一个循环，此循环的反复进行，就可使目的 DNA 得以迅速扩增。DNA 模板变性：模板双链 DNA→单链 DNA，94℃。退火：引物+单链 DNA→杂交链，引物的 T_m 值。引物的延伸：温度至 70℃左右，Taq DNA 聚合酶以 4 种 dNTP 为原料，以目的 DNA 为模板，催化以引物 3' 末端为起点的 5'→3' DNA 链延伸反应，形成新生 DNA 链。新合成的引物延伸链经过变性后又可作为下一轮循环反应的模板 PCR，就是如此反复循环，使目的 DNA 得到高效快速扩增。

（十七）、PCR 引物设计的基本要求？

答：1、引物长度一般为 15~30 个核苷酸。过短影响 PCR 的特异性，过长会提高相应退火温度，使延伸温度超过 TaqDNA 聚合酶最适温度 74℃，影响产物的生成。

2、引物的碱基尽可能随机，避免出现嘌呤、嘧啶碱基堆积现象。3' 端不应有连续 3 个 G 和 C。否则会使引物和模板错误配对。G+C 含量一般占 45% -55%。3' 端和 5' 端引物具有相似的 T_m 值，T_m 值计算公式：T_m=4(G+C)+ 2(A+T)

3、引物自身不应存在互补序列以避免折叠成发夹结构。引物的连续互补序列，一般不超过 3bp。

4、两个引物之间不应存在互补序列，尤其应避免 3' 端的互补重叠。

5、引物与非特异扩增区的序列的同源性不超过 70%，引物 3' 末端连续 8 个碱基在待扩增区以外不能有完全互补序列，否则易导致非特异性扩增。

6、引物 3' 端碱基是引发延伸的起点, 因此一定要与模板 DNA 配对。引物 3' 端最佳碱基选择是 G 和 C, 形成的碱基配对比较稳定。

7、引物与模板结合时, 引物的 5' 端最多可以游离十几个碱基而不影响 PCR 反应的进行。

8、引物的 5' 端可以修饰, 如附加限制酶位点, 引入突变位点, 用生物素、荧光物质、地高辛标记, 加入其它短序列包括起始密码子、终止密码子等。

(十八)、PCR 的反应条件?

答: 1、PCR 反应的缓冲液:

- Tris-HCl 缓冲液
- KCl 促进引物的退火, 浓度太高时会抑制 Taq DNA 聚合酶活性。
- 加入 BSA 或明胶有利于保护 TaqDNA 聚合酶活性。
- 必要时加入适量二甲基亚砜(DMSO)或甲酰胺利于破坏模板二级结构, 提高 PCR 反应特异性。

2、镁离子浓度 一般用量 1.5-2.0 mmol/L, Taq DNA 聚合酶活性需要 Mg²⁺。Mg²⁺浓度过低, 会显著降低酶活性。Mg²⁺浓度过高又使酶催化非特异性扩增增强。Mg²⁺浓度还会影响引物的退火、模板与 PCR 产物的解链温度, 从而影响扩增片段的产率。

3、底物浓度 工作浓度 20-200μmol/L, dNTPs 浓度过高可加快反应速度, 也增加碱基的错配率和实验成本。降低浓度会导致反应速度下降, 可提高反应的特异性。在 PCR 反应中, 4 种 dNTP 必须以等摩尔浓度配制, 以减少 PCR 反应的错配误差并提高使用效率。

4、Taq DNA 聚合酶 75-80℃时具有最高的聚合酶活性, 150 个核苷酸/秒; 具有良好的热稳定性, 95℃仍有活性, 应用浓度一般为 1-2.5u/100ul 反应体积。

5、引物 0.1-0.5μmol/L。引物浓度偏高会引起错配或非特异性扩增、生成引物二聚体, 使目的 DNA 片段产率下降。退火温度与引物 T_m 值有关, 引物 T_m 值在 55-80℃ 范围较为理想。

6、反应温度和循环次数

(十九)、影响大肠杆菌系统外源基因表达的因素?

答: 1、启动子的强弱; 2、基因的剂量; 3、影响 RNA 转录和翻译效率的因素: SD 序列、mRNA; 4、外源基因密码子的选择; 5、表达产物的大小; 6、表达产物的稳定性。

(二十)、大肠杆菌系统表达外源基因必须具备的条件?

答: 1、要求外源基因的编码区不能含有内含子;

2、表达的外源片段要位于大肠杆菌启动子的下游, 并形成正确的阅读框架;

3、转录出的 mRNA 必须有与大肠杆菌 16S rRNA 3' 末端相匹配的 SD 序列, 才能被有效的翻译成蛋白质。

4、蛋白产物必须稳定, 不易被细胞内蛋白酶快速降解, 且对宿主无害。

(二十一)、真核细胞表达外源基因的条件?

答: 1、首先必须具备哺乳动物细胞表达的功能元件。要求哺乳动物细胞表达载体带有能在真核细胞中表达外源基因的真核转录调控元件;

2、注意选择转染的受体细胞, 不同类型的细胞具有不同的特性;

3、注意选择适当的选择标记。

(二十二)、转基因动物的概念、原理及应用?

答: 1、概念: 是指用人工方法将外源基因导入或整合到基因组内, 并能稳定传代的一类动物。它的特点是“分子及细胞水平操作, 组织及动物整体水平表达”。

2、基本原理: 将目的基因或基因组片段用显微注射等方法注入实验动物的受精卵或着床前的胚胎细胞中, 使目的基因整合到基因组中, 然后将此受精卵或着床前的胚胎细胞再植

入受体动物的输卵管或子宫中，使其发育成携带有外源基因的转基因动物，人们可以通过分析转基因和动物表型的关系，揭示外源基因的功能；也可以通过转入外源基因培育优良的动物品种。

3、应用：建立用于研究外源基因表达调控体系；建立医学中常用的疾病模型；培育动物新品种；药理学和药用蛋白的生产研究。

(二十三)、基因敲除的基本程序？

答：通过 DNA 同源重组，使得胚胎干细胞特定的内源基因被破坏而造成功能丧失，然后通过胚胎干细胞介导得到该基因丧失的小鼠模型的过程称为基因敲除。

- 1、打靶载体的构建：同源序列要足够长，要含有筛选用的标志基因。
- 2、胚胎干细胞的体外培养
- 3、打靶载体导入胚胎干细胞
- 4、同源重组胚胎干细胞的筛选
- 5、基因敲除胚胎干细胞注射入胚泡
- 6、胚泡植入假孕小鼠的子宫中
- 7、杂交育种获得纯合的基因敲除动物

(二十四)、DNA 芯片的原理？

答：DNA 芯片技术就是一种大规模的集成的固相核酸分子杂交，以大量已知碱基序列的寡核苷酸片段为探针，检测样品中哪些核酸序列与其互补，然后通过定性定量分析得出待测样品的基因序列及表达的信息。其方法包括芯片的制备、样品的准备、分子杂交和检测分子。

(二十五)、诱变剂的作用机制？

答：1、碱基的类似物诱发突变

- 2、改变 DNA 的化学结构
- 3、结合到 DNA 分子上诱发移码突变
- 4、紫外线及其他射线引起的 DNA 分子的变化

(二十六)、突变类型及其遗传效应？

答：1、突变类型：

- ① 点突变：DNA 大分子上一个碱基的变异。分为转换和颠换。
- ② 缺失：一个碱基或一段核苷酸链从 DNA 大分子上消失。
- ③ 插入：一个原来没有的碱基或一段原来没有的核苷酸链插入到 DNA 大分子中间。
- ④ 倒位：DNA 链内重组，使其中一段方向倒置。

2、突变的遗传效应：

- ① 遗传密码的改变：错义突变、无义突变、同义突变、移码突变
- ② 对 mRNA 剪接的影响：一是使原来的剪接位点消失；二是产生新的剪接位点。
- ③ 蛋白质肽链中的片段缺失：

(二十七)、基因治疗的策略？

答：1、基因置换或称基因矫正：特定的目的基因导入特定的细胞，通过定位重组，让导入的正常基因置换基因组内原有的缺陷基因，不涉及基因组的任何改变。

2、基因添加或称基因增补：通过导入外源基因使靶细胞表达其本身不表达的基因。

3、基因干预：采用特定的方式抑制某个基因的表达，或者通过破坏某个基因而使之不能表达，以达到治疗疾病的目的。

4、基因标记：基因标记实验是基因治疗的前奏，并不在于直接治疗疾病而是期望能够提供有关正常细胞生物学和疾病病理方面的信息。

(二十八)、基因诊断常用的生物学技术。

(二十九)、简述重组 DNA 技术的过程。