

一、名词解释

1. The PCR cycle

PCR 循环, 聚合酶链式反应(PCR)是体外酶促合成特异 DNA 片段的一种方法,由高温变性、低温退火(复性)及适温延伸等几步反应组成一个周期,循环进行,使目的 DNA 得以迅速扩增,完成一次 PCR 中 变性(94°, 变成单链)-退火(60°, 和引物结合)-延伸(72°, 聚合酶作用, 延伸引物复制 DNA)的过程为一次循环。需要聚合酶、buffer、Mg、dNTPs.在 25-30 个循环内, 扩增 DNA 增加明显, 以指数方式增加, 后进入相对稳定状态, 原因: ① 引物和 dNTP 下降; ② Taq 酶活性下降; ③ 扩增产物(焦磷酸盐和 DNA)的阻碍作用; ④ 高浓度的产物可能降低 Taq 酶的延伸和加工能力。所以一味增加循环次数只会增加非特异扩增。

2. Chromosome walking

染色体走读法(步移), 从基因文库中任取一个克隆作为染色体走读的起点, 将之两端序列分别亚克隆, 亚克隆片段在 0.5 - 2.0 kb 范围内。分别以上述亚克隆 DNA 片段为探针, 杂交同一基因文库, 杂交阳性克隆中的插入 DNA 片段必定与起点克隆所含的 DNA 片段连锁在一起。然后再以阳性克隆片段的两端序列为探针, 进行第二步走读, 直至线型染色体 DNA 的端点

3. RNA interference

RNAi, RNA 干扰, 又称转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS), 是指将特异性同源双链 RNA(dsRNA)导入到细胞内, 使目的基因的不表达或表达水平下降。基因能够在细胞核里被稳定地转录, 但在细胞质里却无相应的 mRNA 存在这一现象。siRNA, 小干扰 RNA, 与 mRNA 互补结合, 介导 mRNA 降解。

4. Plaque hybridization

噬菌斑杂交, 把噬菌斑转移到硝酸纤维素膜上, 然后溶菌变性并固定 DNA, 最后用标记的 DNA 或 RNA 探针进行杂交来检测这些被转移的噬菌斑, 根据其在硝酸纤维素滤纸上的位置从原来的琼脂培养基对应位置处中选出与其对应的噬菌斑, 可以直接找出阳性菌落。需要目的基因的探针

5. Tandem affinity purification

串联亲和纯化技术, TAP, 研究蛋白质相互作用的一种方法。具体操作为: 构建含有目的基因的载体, 使目的基因与 2 个不同的表位标签融合表达 (ProtA、CBP)。将细胞抽提物加入 IgG 亲和柱, 复合物中的靶蛋白通过 Prot A 标签与亲和柱上的 IgG 紧密结合。洗去杂蛋白质, 再用 TEV 蛋白酶切割标签。将洗脱下来的带 CBP 标签的蛋白质复合体与偶联有钙调蛋白的亲和柱混合。在钙离子存在下, CBP 就会与钙调蛋白紧密结合。用含有 EGTA 的比较温和的洗脱条件洗脱, 即可得到高纯度的天然构象的靶蛋白复合物。将最后一步洗脱得到的复合物在 SDS-PAGE 或二维电泳上分离。用质谱或者蛋白质测序来鉴定与靶蛋白相互作用的蛋白质。可对纯化的蛋白质复合体进行体外活性测定。通过电镜观察复合体结构等。

6. Restriction mapping

限制性酶切图谱, 又称 DNA 的物理图谱。一种利用限制酶切位点标定 DNA 分子相对位置的方法。某些限制酶的特异性序列在 DNA 链上出现的频率和它们之间的相对位置, 可反映出 DNA 分子结构特性。最简单的构建限制图的方法是比较不同限制酶产生的 DNA 片段的大小。也可以将限制性酶切位点标定在 DNA 分子的相对位置, 用不同限制性酶切后, 根据重叠序列确定酶切片段间连接顺序, 以及遗传标志之间的物理距离。

7. DNA Microarray

DNA 微阵列, 又称 DNA 阵列或 DNA 芯片、基因芯片 (gene chip), 是集成化的核酸分子杂交技术。将大量寡核苷酸或 DNA 探针 (与核酸分子杂交相反, 亦称靶基因) 按特定的排列方式固化在固相支持物表面, 按碱基互补配对的原则, 与标记的特异的单链 DNA 或 RNA (待测样品) 分子杂交形成双链, 通过对杂交信号的检测分析, 即可得出样品分子的数量和序列信息。(一块带有 DNA 微阵列 (micorarray) 涂层的特殊玻璃片, 在数平方厘米之面积上安装数千或数万个核酸探针, 经由一次测验, 即可提供大量基因序列相关资讯。)

8. Post-transcriptional gene silencing

转录后基因沉默 (PTGS), 又称 RNA 干扰, 是指将特异性同源双链 RNA(dsRNA)导入到细胞内, 使目的基因的不表达或表达水平下降。且转基因能够在细胞核里被稳定地转录, 但在细胞质里却无相应的 mRNA 存在这一现象。一般是通过特异性的双链 RNA 与目的基因转录的 mRNA 结合后诱导其降解, 使目的基因不表达或表达水平下降。

二、问答题

1. 基因治疗的策略及其治疗的途径

(第七章 PPT 策略: 基因置换、基因修复、基因修饰、基因失活、免疫调节。2 种途径: 间接、直接)

答: 基因治疗是向有功能缺陷的细胞补充相应功能基因, 以纠正或补偿其基因缺陷, 从而达到治疗的目的。

前提条件: 发病机制在 DNA 水平上已经清楚、要转移的基因已经克隆分离, 其表达产物有详尽的了解、该基因正常表达的组织可在体外进行遗传操作

策略: 1)基因置换: 是用正常的基因原位替换病变细胞内的致病基因, 使细胞内的 DNA 完全恢复正常状态。

2)基因修复: 指将致病基因的突变碱基序列纠正, 而正常部分予以保留。

3)基因修饰: 又称基因增补。是将目的基因导入病变细胞或其他细胞, 目的基因的表达产物能够修饰缺陷细胞的功能或使原有的某些功能得到加强。

4)基因失活: 利用反义 RNA、核酶或肽核酸等反义技术及 RNA 干涉等技术能特异地封闭基因表达的特性, 抑制一些有害基因的表达, 以达到治疗疾病的目的。

5)免疫调节: 这是将抗体、抗原或细胞因子的基因导入病人体内, 改变病人 的免疫状态, 从而达到预防和治疗疾病的目的。

途径: 1) 间接体内法(ex vivo 法): 是将受体细胞在体外培养, 转入外源基因,

经过适当的选择系统, 把重组的受体细胞回输到患者体内, 让外源基因表达以改善患者症状。

2) 直接体内法(in vivo 法): 直接将外源 DNA 注射到机 体内, 使其在体内表达发挥治疗作用

2. 同聚物加尾连接法

(是什么、加尾的方法、优缺点,

两种辅助因子 Mg Co, Mg 做辅助因子在突出 3'羟基末端添加单核苷酸, Co 做辅助因子, 隐蔽的 3'端或平末端添加单核苷酸。

末端转移酶在外源 DNA 或者载体的 3'端加上寡核苷酸, 制备人工粘性末端, 分别加上 dC/dG,dA/dT, 加尾后再用 DNA 连接酶进行构成重组 DNA 分子。

优点: 不易自身环化、效率高, 任何一种方式获得的 DNA 都可以用这种方法连接

缺点: 自身操作繁琐、DNA 难回收, 加入同聚物后影响外源基因的表达、在平末端等加上后可能产生限制性内切酶位点)

答: 同聚物加尾连接法指利用末端脱氧核苷酰转移酶 (TdT) 在一定条件下, 催化 5'脱氧核苷三磷酸进行 5'→3' 方向的聚合作用, 逐个地将脱氧核苷酸分子加到 DNA 链的 3'-OH 末端的特性。给外源 DNA 片段和载体分子分别加上互补的同聚物尾巴, 制备人工粘性末端, 在外源 DNA 和载体 DNA 末端分别加上不同的寡聚核苷酸 dA(dG)/dT(dC), 再使用 DNA 连接酶以使它们有效地连接, 构成重组 DNA 分子。

方法: 加尾时需要 3'-OH、二甲肼酸缓冲液, Mg 离子 (Co 离子)、一种 dNTP (形成同聚物), 底物可以是单链 DNA、3'- OH 突出的双链 DNA、平末端在 Co²⁺代替 Mg²⁺下也可以。不需要模板。且 Mg 做辅助因子在突出 3'羟基末端添加单核苷酸, Co 做辅助因子, 隐蔽的 3'端或平末端添加单核苷酸。

优点: 不易自身环化、连接效率高, 任何一种方式获得的 DNA 都可以用这种方法连接 (适用范围广)

缺点: 方法自身操作繁琐、外源片段难回收, 加入同聚物后影响外源基因的表达、在平末端等加上后可能产生限制性内切酶位点

3. 在大肠杆菌中表达干扰素融合蛋白，载体，表达策略，影响表达的因素

(融合蛋白表达设计，举出一个例子，载体的主要组成结构。

典型载体：PGEX 载体、PET 载体 GST/HIS 融合蛋白。

PGEX 6 个组成结构特点：启动子、操纵基因、调节基因、SD 序列、复制起点 Ori、GST 谷胱甘肽 s 转移酶融合蛋白表达

策略：三种表达载体区别在于插入外源基因后阅读框的正确性，外源基因插入后与靶基因的阅读框的顺序

影响因素：强启动子、终止子、密码子、重组子的稳定性、SD 序列、质粒的拷贝数、不同蛋白的表达方式)

答：融合性异源蛋白表达是将外源基因与受体菌自身的蛋白质编码基因拼接在一起，并作为一个开放型阅读框架进行表达。由这种杂合基因表达出的蛋白质称为融合蛋白。在这种融合蛋白结构中，通常受体细菌的蛋白部分位于 N 端，异源蛋白位于 C 端。通过在 DNA 水平上人工设计引入的蛋白酶切割位点或化学试剂特异性断裂位点，可以在体外从纯化的融合蛋白分子中释放回收异源蛋白。

用于融合蛋白构建的**受体蛋白**有谷胱甘肽转移酶 (GST)、麦芽糖结合蛋白 (MBP)、泛素蛋白 (Ubi) 等。

策略：用融合载体表达融合蛋白质：在设计时注意外源基因与靶基因连接后仍保持正确的读码框。

载体：pGEX 载体 (Pgex-1λT、2X、3X)、PET 载体

PEGX 载体组成结构：启动子：tac、操纵基因：lacO、调节基因：lacI、S-D 序列、ori：pBR322 ori、GST(谷胱甘肽巯基转移酶)【用凝血酶、Xa 因子切】

目的蛋白的回收：融合蛋白中受体蛋白部分的存在可能会影响目的蛋白的空间构象和生物活性。融合蛋白的位点专一性断裂方法有两种：化学断裂法 (CNBr)、酶促裂解法

GST 融合蛋白的纯化：亲和层析柱分离纯化，再用凝血酶或 Xa 因子把外援蛋白切下来，收集

影响因素：强启动子 (最佳启动子必须具备条件)、终止子 (强化转录终止的必要性)、密码子 (偏爱性)、重组子的稳定性、核糖体结合位点 (SD 序列)、质粒的拷贝数、不同蛋白的表达方式

即在大肠杆菌中构建干扰素融合蛋白，应先获得干扰素目的基因，将其与 GST 基因连接并与 pGEX 载体构成重组子，导入大肠杆菌中表达，获得产物后进行纯化分离。

4. 在毕赤酵母中表达 HBsAg，载体

(HBsAg：乙型肝炎病毒表达抗原

常用毕赤酵母载体：ppic9k、ppic3.5k、pao815

限制性内切酶消化、然后 T4DNA 酶连接，将外源基因插入到表达载体当中，构建重组质粒/表达载体

大肠杆菌是直接转化、诱导表达 (IPTG)，筛选 (Amp⁺/酶)

酵母中多了一道：转化到大肠杆菌中，用卡那霉素进行筛选得到重组质粒，提纯。在转入酵母之前用 BGL2 酶消化使其线性化，再转入毕赤酵母 GS115 (载体有 kan/HIS，GS115 是缺陷型菌株，载体是 HIS⁺，重组整合到酵母染色体上后可以弥补 HIS 缺陷型，可以直接筛选出重组菌株(同时有 kan/HIS))，

表达：先用甘油培养基培养，甘油耗尽后，再用甲醛诱导表达。

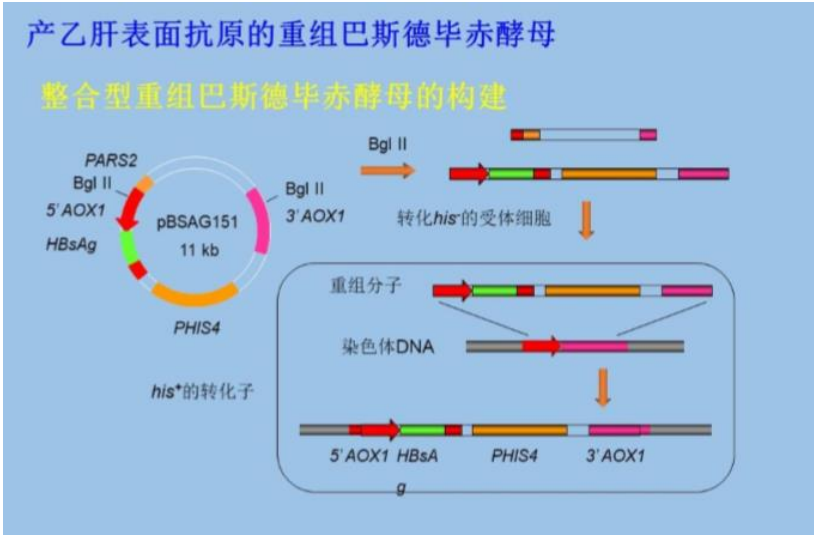
载体的结构特点：AOX1 启动子，MCS 多克隆位点、转录终止子、多聚腺苷酸化序列、3'AOX1 下游区域，不同抗性氨苄/卡那等大肠杆菌筛选标记，大肠杆菌复制起始位点，穿梭载体，酵母选择标记 (营养缺陷型) 课件里构建表达 HBsAg 路线图)

答：HBsAg：乙型肝炎病毒表达抗原

表达载体：pPIC3.5K、pPIC9K、pAO815。三个载体结构共同点：5'AOX1(含有 AOX1 启动子，可调控异源蛋白表达，同时也是载体和受体菌染色体发生重组的位点)、MCS (允许目的基因插入)、TT (转录终止和多聚腺苷酸化序列，允许 mRNA 有效转录终止和多聚腺苷酸化)、3'AOX1 (TT 序列下游区域，同源重组位点之一)、His4 (编码组氨酸，提供转化子的筛选标记，重组位点之一，允许酵母中筛选)、amp^r/kan^r (氨苄/卡那抗性基因，允许在大肠杆菌中筛选)、含有 E.coli 质粒复制起点 (便于克隆操作)、穿梭载体 (大肠杆菌和酵母中)

宿主菌：GS115，his4⁻

整合转化子的筛选及目的基因的诱导表达：利用整合到受体菌染色体上的 Kan^r 标记基因并结合目的基因的 PCR 扩增对整合转化子进行筛选。将整合转化子先培养在以甘油或葡萄糖作为碳源的培养基上，待甘油或葡萄糖耗尽，菌体进入稳定期后，再加入甲醇诱导目的基因的高效表达。



即获得 HBsAg 目的基因和载体经限制酶切后，T4DNA 连接酶连接形成重组 DNA，先转入大肠杆菌，通过卡那霉素等抗性筛选出正确的重组子，提纯后用 Bgl II 酶切为线性，再转入毕赤酵母中使其与酵母染色体发生同源重组，最后通过营养缺陷型筛选（选 GS115）。

5. cDNA 文库，基因组文库

答：基因文库 (gene library or gene bank)：从特定生物个体中分离的全部基因，这些基因以克隆的形式存在（人工构建）。根据构建方法的不同，基因文库分为：**基因组文库**（含有全部基因）、**cDNA 文库**（含有全部蛋白质编码的结构基因，用细胞总 mRNA 为模板反转录合成双链 cDNA 建立的文库）。

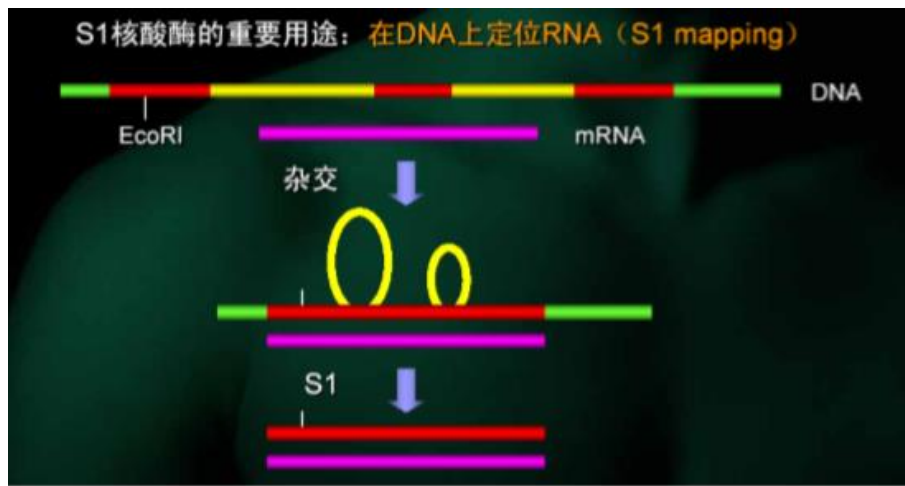
cDNA	基因组
具有蛋白质产物的一些结构基因，包括调节基因	克隆任何基因，包括未知功能的 DNA 序列（全部基因）
克隆的是不完全编码的 DNA 序列，因此受到发育时期和调控序列的影响	克隆全部遗传信息、不受时空的影响
不含内含子、分编码区，只有外显子编码基因	编码的基因是真实的基因、包含了外显子和内含子、非编码区

6. S1-mapping, foot printing

(S1 核酸酶作图、足迹法在原理、方法、应用上的差别
SI 用于研究内含子、转录起点、终点，原理：DNA-RNA 杂交，DNA-RNA 同源配对，再用 S1 核酸酶进行切割，如果有杂交体不会被切割 (DNA 形成环被切掉)
FP 用于研究表达的调控原件，原理：DNA 与蛋白质结合，核酸与蛋白质互作，结合后用 DNA 酶 1 切割，电泳时候有结合会失去一条带)

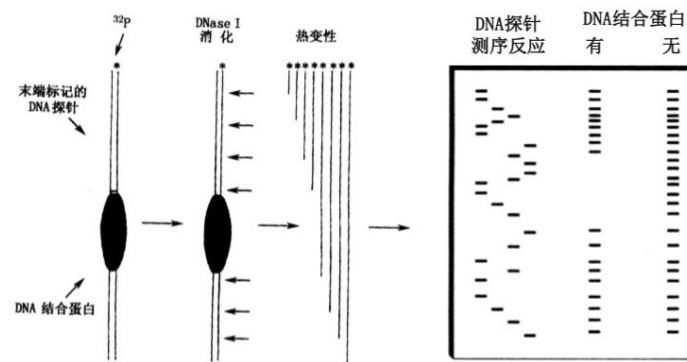
答：**S1 核酸酶作图原理**：DNA 外显子区域与 RNA 同源配对杂交形成双链，内含子形成环状，用 S1 核酸酶切割后去除环状，从而找到 **DNA 外显子序列及内含子部位、mRNA 转录起点和终点**。

S1 核酸酶来源于米曲霉菌，催化反应通常由 Zn²⁺激活，并在酸性 pH (4.0-4.5) 条件下进行，其特征是：
(1) 降解单链 DNA 或 RNA，包括不能形成双链的区域（如发夹结构中的环状部分），但降解 DNA 的速度大于降解 RNA 的速度；(2) 降解反应的方式为内切和外切；(3)酶量过大时会伴有双链核酸的降解。因为该酶的双链降解活性比单链低 7.5 万倍，因此在 DNA 重组及分子生物学研究中，S1 核酸酶常用来切平突出的单链末端以及制作 S1 图谱。S1 图谱分析 DNA：RNA 杂交体结构，确定内含子部位。



足迹法原理：用的 **DNase I**，也叫做 **DNase I 足迹分析**，是体外鉴定 **DNA 结合蛋白** 在 **DNA 上的结合位点** 的实验方法。(也可以研究**调控元件**)。DNA 和蛋白质结合以后便不会被 **DNase** 分解，在测序时便出现空白区(即蛋白质结合区)，从而了解与蛋白质结合部位的核苷酸对数目。在用酶移出与蛋白质结合的 DNA 后，又可测出被结合处 DNA 的序列。

DNA-蛋白质结合位点的检测



7. 采用 Ti 载体，设计一个转基因植物，检测

(植物基因工程的基本路线：目的基因分离，将目的基因克隆至 Ti 质粒，构建重组 DNA，重组 DNA 要连接控制目的基因转录的启动子、终止子，特殊的标记 (如荧光蛋白，Neor,)，可利用细菌扩增重组 DNA，利用农杆菌将连接了启动子和终止子的目的基因导入目标植物细胞中。导入后进行筛选转化细胞，然后诱导成为转基因植物)

举例：花椰菜病毒 CAMV 包膜蛋白转基因黄瓜、转基因烟草表达小鼠抗体 (重链亲链分别表达 然后杂交获得抗体)、二元载体 (多聚半乳糖苷酶基因导入到番茄当中))

答：Ti 质粒：土壤农杆菌的质粒，介导双子叶植物尤其是豆科类植物根瘤形成。Ti 质粒分为 T-DNA 区 (转化 DNA 区)、Vir 区 (致病区，毒性区)、Ori 区 (质粒复制起始区)、Con 区 (接合转移区)，其中 T-DNA 可以整合到植物细胞染色体上。由于 T-DNA 上的基因带有植物细胞可识别的表达调控信号，因此它能够依赖植物细胞中的 RNA 聚合酶 II 进行转录。

植物基因工程的基本路线：目的基因分离，将目的基因克隆至 Ti 质粒，构建重组 DNA，重组 DNA 要连接控制目的基因转录的启动子、终止子，特殊的标记 (如荧光蛋白，neo^r 新霉素磷酸转移酶)，可利用细菌扩增重组 DNA，利用农杆菌将连接了启动子和终止子的目的基因导入目标植物细胞中。导入后进行筛选转化细胞，然后诱导成为转基因植物。

Ti 质粒改造的原则：1、保留 T-DNA 的转移功能；2、取消 T-DNA 的致瘤性，使之进入植物细胞后不至于干扰细胞的正常生长和分化，转化体可再生植株；3、通过简便的手段可使外源 DNA 插入 T-DNA 之中，并随着 T-DNA 整合到植物染色体上

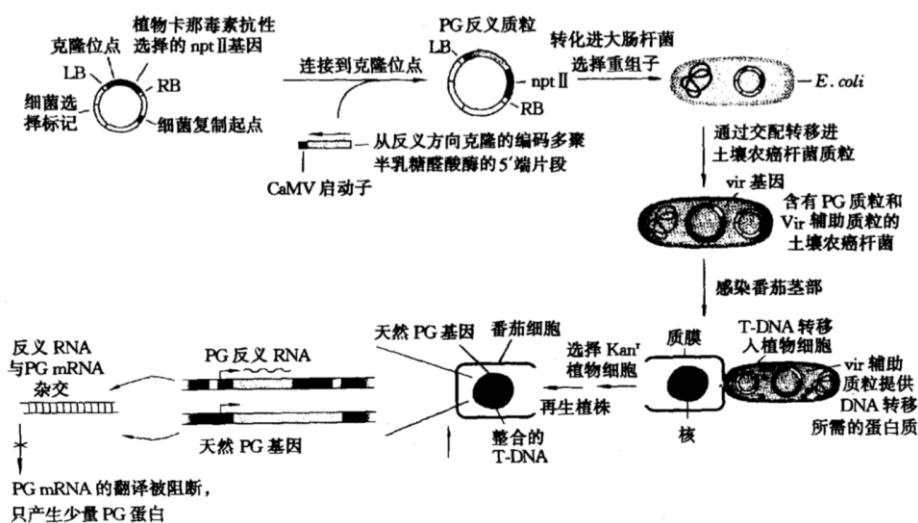
二元载体系统： T-DNA 与 vir 基因分别放置于不同的质粒上，1、**二元载体：** T-DNA 左右界、农杆菌复制起点、大肠杆菌复制起点、细菌选择标志、植物选择标志、MCS 2、**帮助质粒：** 如 pAL4404,从 Ti 质粒 pTiAch5 上删除 T-DNA，保留整套 vir 基因、农杆菌复制起点、在农杆菌 LBA4404 中抗利福平霉素。3、**二元质粒系统转化：** 利福平霉素和卡那霉素双筛选（农杆菌）、感染植物，卡那霉素筛选。4、三亲融合法



如何将以上构建的质粒转入农杆菌？

1. 直接用纯化的小 Ti 质粒转化含有 vir 区质粒的根癌农杆菌感受态细胞；
2. 采用三亲杂交的方法。把三种有关菌株混合培养在一起进行的杂交称为三亲杂交。

用二元载体系统将多聚半乳糖醛酸酶的反义基因导入蕃茄细胞



农杆菌通过和原生质体共培养感染植物细胞。

检测：PCR、分子杂交；植物表型鉴定（如利用除草剂抗性，可喷洒除草剂）

8. 星号活性，可能的原因

（定义：环境条件改变，识别和切割的序列发生改变，称为星号活性）

原因 6 个：甘油、限制性内切酶的用量、低离子强度、高 pH 值、除镁离子外的二价阳离子存在等）

答：限制性核酸内切酶有特异性识别序列和切割位点，但当酶解条件发生变化时，酶切反应的专一性可能会降低，导致同种酶识别多种识别位点，这种现象称为**星号活性**。如 *EcoRI*，正常条件下识别 GAATTC，但在低盐，高 pH 和高甘油存在的情况下，能识别并切割 AAATTC, GAGTTC, GAATTC 等。

高浓度的酶、高浓度的甘油、低离子强度、极端 pH 值等，会使一些核酸内切酶的识别和切割序列发生低特异性，即所谓的星号活性（“星”活性，Star activity）现象。

常见原因：高浓度甘油 (>5%, v/v)、高浓度内切酶（用量过高，>100U/gDNA）、低离子强度 (<25mmol/L) 高 pH 值 (8.0 以上)、含有机溶剂，如 DMSO、乙醇等、有非 Mg^{2+} 的二价阳离子存在（如 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 等）

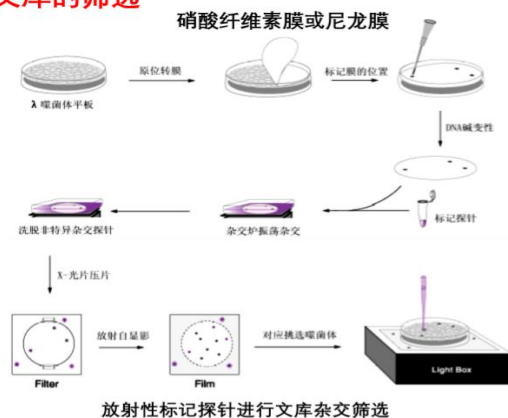
9. 建立基因文库，鉴定目的基因克隆

（基因文库的扩增筛选：放射性标记探针进行文库的杂交筛选，具体方法：原位转硝酸纤维素滤膜，标记膜位置，DNA 变形，标记探针（与所需要的基因互补），磷 32 标记，杂交（探针与匹配基因配对杂交），杂交洗脱非特异性探针（去除假阳性），烘干、放射自显影、胶片上看阳性黑点）

答：基因文库的构建程序：基因组 DNA 的制备、基因组 DNA 的片段化（超声波处理、部分酶切法）、载体和受体的选择（ λ -DNA/考斯质粒、YAC/BAC 载体，大肠杆菌/酵母菌）、**从基因文库筛选目的基因**（除抗性基因等可用抗药性筛选法、酵母双杂交技术直接筛选外，一般的基因组文库筛选需多轮步骤）、**基因文库的扩增筛选**。

文库的扩增： λ 载体的基因组文库是以噬菌斑的形式获得重组噬菌体的集合；cosmid 载体的基因文库是存在于细菌中的大分子重组质粒，以独立的转化菌落形成集合；BAC 文库也是以细菌菌落形式存在；YAC 文库则以酵母菌形式出现。噬菌体文库的扩增可以通过感染宿主，每一噬菌斑便是一个重组噬菌体扩增后的产物。用缓冲液将这些噬菌斑中的病毒洗脱下来，便获得了扩增后的文库。粘粒载体、BAC 和 YAC 文库，则对转化的菌落单独编号、扩增和保存

2) 文库的筛选



文库的筛选：

放射性标记探针进行文库杂交筛选

10. 假定你分离到一个 E.Coli 的 Thy-突变体，并推测有可能是 thyA 基因突变。请设计一个方案用 PCR 从染色体 DNA 扩增突变的 thyA 基因，测定突变的序列。（注：E.Coli 野生型的 thyA 基因的序列是已知的）

答：（根据已知序列设计引物，5'端引物与 ThyA5'端相同，3'端引物和基因的 3'端互补，在 5'端加入限制性内切酶识别序列，将引物和突变 DNA 进行混合进行 PCR，PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳，纯化扩增的片段（切胶）回收、直接测序或克隆到载体中（T 载体）测序，测序后便可测定突变序列）

11. 质粒载体具有 Tet^r 和 Kan^r 的表型，抗性筛选

答：（载体上有四环素、卡那霉素，卡那霉素抗性基因中有 Bgl1 的切点，用 Bgl1 切割载体，连接外源基因克隆，转化涂平板时加入四环素抗性；平板上菌株有两种基因表型出现：四环素、卡那霉素抗性和四环素抗性、卡那霉素敏感型。

筛选：两种平板，1、只含有四环素的平板 2、同时含有卡那霉素和四环素的平板，用影印法。1 四环素长、2 卡那霉素不长的菌落即为所选的重组子）

12. 在质粒中增减酶切位点

答：修减酶切位点（完全酶切和部分酶切）：比如质粒环上有 2 个 EcoRI 位点，要去掉一个，先分析看 EcoRI 位点在抗性基因内还是在抗性基因外，如果在抗性基因外，直接用 EcoRI 酶切，**完全酶切**然后再连接起来，用抗性基因筛选；如果刚好有个 EcoRI 位点在抗性基因内，考虑部分酶切方法，**部分酶切**后，再用 S1 切平，然后再连接，再筛选有抗性标记的。

如何增加：1.采用人工接头 link adaptor 人工合成接头/天然接头 link 接头，接头中都含有限制性内切酶位点，利用接头引入 2.质粒改造的使用，可以利用现成的 MCS 位点的片段，比如在 pSC101 质粒上面，有 800bp 的片段，有很多酶切位点，把片段直接切下来，放在要改造的质粒上，增加酶切位点。）

13. 你从朋友处得到一个重组的质粒 DNA，该质粒含有一个在果蝇神经细胞中表达的基因，根据初步实验，你推测表达产物与信号转导有关。如何证实你的推测？

答：（首先进行 DNA 序列分析，然后进行生物信息学的分析，如果是基因组 DNA，确定内含子外显子，同时确定转录起点，可以根据 DNA 序列和生物信息学分析，推测氨基酸序列，通过氨基酸序列用软件分析蛋白质的功能和作用部位、结构，分析后根据氨基酸的信息可以合成短蛋白质片段，通过短肽制备抗体，通过抗体分离纯化蛋白质，从果蝇的蛋白提取物中分离纯化蛋白质，鉴定蛋白质功能）

14. 逆转录病毒载体在基因治疗中的应用

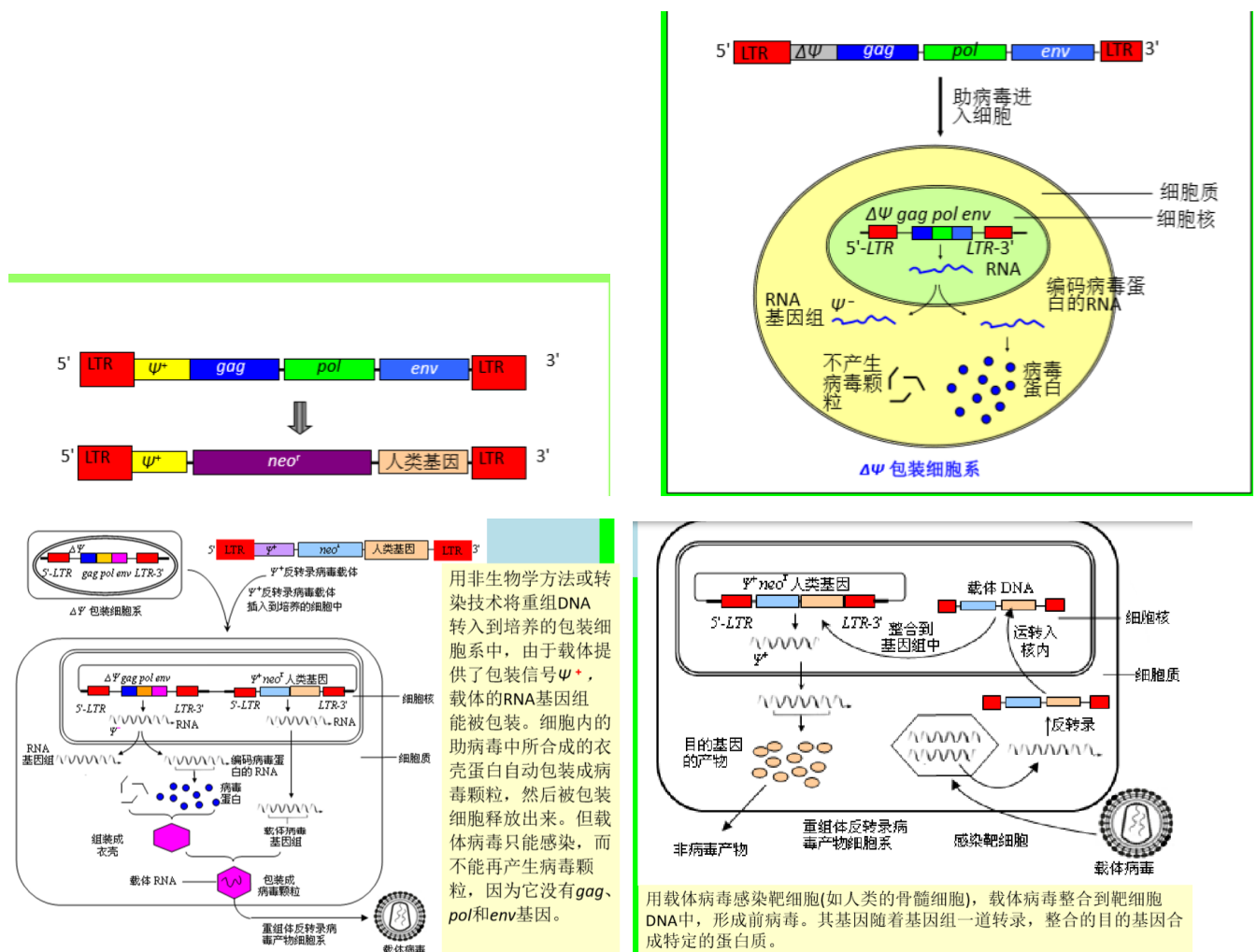
（应用的原理和优缺点 ppt!!!!，

基因治疗中用外源基因/标记基因替换，包装细胞系，获得载体病毒，感染细胞，逆转录病毒载体的优缺点）

答：逆转录病毒根据亲嗜性分为 3 种，①单嗜性逆转录病毒(ectropic retrovirus),只感染 小鼠和少数几个品种的大鼠;②兼嗜性逆转录病毒(amphotropic retrovirus),能 感染小鼠的细胞,也能感染其他种属动物的细胞;③异嗜性逆转录病毒(xenotropic retrovirus),能感 染多种动物细胞,但不能感染小鼠细胞。目前使用较多的是兼嗜性逆转录病毒，如鼠白血病病毒 (Mo-MLV)，以兼嗜性包装细胞包装病毒颗粒。逆转录病毒的宿主范围由病毒颗粒表面的包被蛋白 Env 决 定,病毒基因组不影响其靶向性,不同的基因组可用相同的 Env 包被,且 Env 来自何种病毒,包装出的病毒颗粒就叫该病 毒的假病毒。通过改变 Env 蛋白可以改变载体的靶向性。

用一个或多个外源基因来置换病毒基因组中的 gag,pol 和 env 基因。此病毒载体能以不同的方式插入到细胞的染色体中。在此例中,用供选择的标记基因 (neo^r) 置换了病毒的 gag 和 pol 基因，而用一个人类的基因置换了 env 基因

包装细胞系：敲除掉包装信号，含 gag pol env，为目的基因提供包装蛋白



优点：有效地整合入靶细胞 基因组，并稳定持久地表达所带的外源基因。

缺点：存在载体与人内源性逆转录病毒（HERV）序列之间发生重组、产生有复制能力的人逆转录病毒的潜在危险，也存在原病毒 DNA 随机整合靶细胞染色体而激活染色体上癌基因或失活抑癌基因的可能性。感染分裂的细胞。

15. 黏性末端连接法的不足之处

答：自身环化、不易定向克隆，难插入特定基因、大片段 DNA 重组低、重组体往往含有不止一个克隆片段或载体，是一个串联重组体，对筛选造成困难

16. 质粒改造的基本内容

答：A、删除非必要 DNA 区段和对宿主有不良影响的区段，尽量缩小质粒的分子量，以提高外源 DNA 片段的装载量

B、减少限制性酶切点。缺失突变，限制性酶、核酸外切酶和连接酶的共同作用，机械破碎和质粒之间的重组等方法

C、加入易于识别的选择性标记，便于检测含有重组质粒的受体细胞。通过质粒之间的重组，可以使质粒带有合适的选择性标记。

D、关于质粒安全性能的改造。灭活质粒在细菌之间转移的 mob 基因，限定载体的宿主范围

E、加上调控原件和 MCS 位点