**重组DNA技术与基因工程-张惠展**

**（2017 张惠展）P53和p21是两个功能相似的蛋白，构建到相同的载体，在大肠杆菌中表达，p21能表达 但是p53不能，可能的原因？(同2015一样)**

**（2015 张惠展）研究显示，临床上几乎所有癌症患者体内均伴有肿瘤抑制因子p53蛋白或其编码基因的缺失突变。因此规模化生产重组人p53蛋白有可能为癌症治疗提供一条新途径。前期相关研究将人类p53蛋白及其功能相似的伙伴p21的cDNA编码序列分别克隆在同一种大肠杆菌的表达质粒上。由此获得的p21目的重组子能表达出相应的p21重组蛋白，但是p53的重组子却不能，试分析可能原因。**

有很多因素能够影响人的基因（外源基因）在大肠杆菌的表达型质粒中的表达。有可能是是转录效率较低，也有可能是翻译效率的影响。由于这两个基因是克隆在同一种质粒上，启动子的影响应该比较小，更有可能是以下因素引起的，例如：

1.核糖体结合位点——影响了mRNA翻译起始效率：翻译起始密码子效率低；SD序列与翻译起始密码子之间的距离及碱基组成影响了核糖体结合；基因编码区5‘端若干密码子的碱基序列不利于核糖体结合

2.密码子——不同生物对密码子的偏爱性不同：tRNA含量少，SD样序列多，稀有密码子

3.质粒拷贝数——少，翻译与复制冲突

4.mRNA不稳定——被降解，无法翻译重组蛋白

5. 除了以上影响重组蛋白产生的原因，也有可能是重组蛋白会被快速降解：异源蛋白稳定性低，或者能被大肠杆菌的蛋白酶降解（具有PEST序列）

“N 端 富 含 Pro、Glu、Ser、Thr 的 真 核 生 物 蛋 白 质 在 真 核 或 原 核 细 胞 中 的 半 衰 期 通 常都很短，至少E1A、c Myc、c Fos和p53等蛋白都具有这种特性，特别是由这四种氨基 酸残基构成的Pro Glu Ser Thr四肽序列(即PEST序列)显示出对细胞内蛋白酶系统 的超敏感性。在大多数情况下，PEST序列的两侧拥有一些带正电荷的极性氨基酸，据推测 PEST序列实质上是一个钙结合位点，它能促进那些钙依赖性蛋白酶系统对蛋白质的降解 作用。尽管有些实验结果并不能证实PEST序列对蛋白质稳定性的负面影响，但当某一真 核生物基因在大肠杆菌中不能稳定表达时，注意PEST序列是否存在，并在不影响异源蛋白 生物功能的前提下对之进行适当的改造，不失为一种提高表达产物稳定性的尝试。”——来自张惠展《基因工程》

**（2012 张惠展）简述将基因A构建到载体B上面的方法。**

即重组载体构建策略，切、接—转—增—筛

1.DNA的的体外重组（切与接）

同种内切酶，同尾酶，不同粘性末端，人工粘性末端，平头末端；同源重组infusion，CRISPR系统体内切接

需要先计算重组率来指导实验

2.重组DNA分子的转化与扩增

Ca诱导的，电击转化；还有其他穿刺，微流体剪切，局部加热，激光等

计算转化率（载体本身，受体细胞，方法）

3.转化细胞的扩增

4.转化子的筛选和鉴定-区分转化子，重组子，目的重组子

基于载体的遗传标记检测：抗药性，营养缺陷型，显色筛选

基于克隆DNA序列检测：PCR扩增检测，限制性酶切图谱法，菌落噬菌斑原位杂交法，DNA序列分析法

基于外源基因产物检测：蛋白质生物功能（淀粉酶，抗菌素，DNA结合蛋白），蛋白质生物结构（放射免疫原位杂交鉴定），分子量（聚丙烯酰胺凝胶电泳法）

**基因克隆的方法**

1.鸟枪法

2.cDNA法

3.PCR法，基于同源重组的infusion法，盒式PCR扩增法，反向PCR扩增法

4.化学合成法

**（2009 张惠展）如何分析一段多少长的序列是不是启动子 ，如何把它克隆出来？**



**（2007 张惠展）根据给出的一段需要表达的肽段的序列，设计载体，宿主，限制性内切酶的选择，写出关键的注意点。**

构建克隆的一般方法及步骤参见下面几题，下面列出过程中的注意点。

1.设计载体：根据目的基因的大小、宿主的不同、宿主中拷贝数的多少、标记基因的不同、是否含有所需的酶切位点、是否需要整合入宿主DNA、目的基因是否需要表达以及转化效率的高低等等需求从而选择合适的载体。

2.宿主的选择：

a.根据研究的目的基因的种类如真核原核或者植物动物等特征进行选择

b.根据研究对象的不同，如细胞内蛋白功能研究或者规模化生产，从而选择合适的宿主。

C．宿主应具备的条件

限制酶缺陷型、重组整合缺陷型、与载体筛选标记互补的表型、感染寄生缺陷型

D．更具体的不同宿主菌株的选择参见http://www.bbioo.com/bio101/2008/23150.htm

3.限制性内切酶的选择：限制性核酸内切酶识别双链DNA分子中的特定序列，并切割DNA双链，常用的都为II型限制性内切酶。根据引物设计过程中加入的不同酶切位点，从而选择想应的限制性内切酶。酶切位点的选择主要由以下角度考虑。

A．引物的需求。

B．一般目的基因用于克隆表达的情况下，目的基因片段内部不含有所选的酶切位点（不然鉴定阳性重组子双酶切时会将目的基因切断）。

C．实验后继应用的所有载体(真核、原核、酵母、昆虫)都尽可能含有所选的酶切位点．并且要保证在载体上的插入方向正确（定向克隆）。（不然换载体表达时，还要重新设计引物，以引进新的酶切位点）。

D．尽可能选比较常用的酶切位点。（常用切点酶的价格比较便宜）

**生物信息学，基因组分析-严军**

**（2017 严军）CpG岛，在基因中存在的概率20%，正常基因CG比例为50%，给一段序列，用贝叶斯方程算出是CpG岛的概率**

该题目争论中

**基因表达与分析-胡苹**

**（2017 胡苹）Fox是一个转录因子，缺失小鼠表现为肥胖。设计实验说明Fox调控靶基因的分子机制。**

（脂肪细胞？）

1.已经明确Fox为转录因子，转录因子一般对靶基因的调控机制是通过结合到靶基因的特定序列，招募其他一些转录影响因子来调控靶基因的表达的。常用的研究手法如：ChIP-seq。

有较好的Fox抗体时，可以对WT小鼠和Fox KO小鼠的基因组做ChIP-seq实验，找到Fox蛋白在基因组上的结合位点，就可以找出Fox调控的下游靶基因。

2.在KO 与WT中，在mRNA水平（RTqPCR）和蛋白水平（WB）观察这些靶基因的表达量。从而得知Fox是激活这些靶基因的表达，还是抑制他们。

3.对结合位点构建luciferase报告基因系统，可以通过KO fox或过表达Fox，研究Fox对靶基因的影响是否直接，并且是何影响。

4….MS IP

5.in vitro transcription 转录调控的验证

**（2016 胡苹) 通过查阅文献和数据库发现，在远端肌肉萎缩患者中转录因子Msx1突变比例增高，同时基因组中的一段目前已知不编码的3kb区域也是突变高发区。请根据上述初步结果设计实验，证实Msx1和突变高发的3kb非编码区域是否与远端肌肉萎缩的发病相关。如果实验结果证明相关，请设计实验说明Msx1和突变高发的3kb非编码区域在远端肌肉萎缩中的功能。**

1.验证患者和正常人的Msx1基因表达差异-蛋白水平，mRNA水平；以及3kb非编码区在患者中的突变概率

2.在正常细胞中引入突变，肌肉细胞的表型出现问题；纠正两种突变，肌肉细胞的表型有所恢复？

3.转录因子：ChIP-seq，报告基因

4.非编码区：RNA-IP，RIP-seq？？ enhancer-trap；chip-loop；

5.in vitro transcription 转录调控的验证

**（2014 胡苹）前期实验结果提示常发生于肾脏的疾病甲可能是由于转录因子F发生突变，因而导致对于下游的靶基因调控失灵造成的。F下游的靶基因包括编码蛋白和非编码RNA。请设计是按验证上述假说，并阐述F对靶基因调控失灵诱发疾病甲的可能机制。请写明实验设计的逻辑推理过程，指明每步所需试验的名称和相关的正对照和负对照。**

A对基因B和RNAC的影响。 对照：证明患病时A在mRNA水平和蛋白质水平表达都升高，过表达A敲出A观察影响。 基因修饰（甲基化乙酰化磷酸化泛素化）染色体结构，SNP，转录因子，将编码转录因子的geneA构建成一个质粒，基因B构建成另一个质粒共转染细胞 看蛋白B的表达 利用凝胶电泳迁移率实验，放射性标记RNAC，将纯化的蛋白A和RNAC一同保温，在非变性的聚丙烯凝胶电泳中，结合的跑得慢。

**（2011 胡萍）初步实验证明细胞在生长因子的作用下，可产生核蛋白X，核蛋白X可能影响基因A的表达。请设计实验证明核蛋白X是否直接与基因A的转录因子结合，并证明核蛋白X对基因A的影响，以及如何影响。**

（1）核蛋白X和基因A转录因子互作验证

酵母双杂交，构建核蛋白X基因+GAL4 DB和基因A转录因子编码基因+GAL4 转录因子结合域+基因A两个重组载体，做两个对照，GAL4对基因A的表达影响以及转录因子对基因A的影响，再根据基因A的表达差异性判断是否存在直接相互作用

（2）核蛋白X和基因A

敲除核蛋白X编码基因，方法有crisper CAS 9、RNAi等，观察基因A的表达情况，上调或下调或不变

过表达核蛋白X，对比

单独表达A，对比

**生物芯片技术及其应用-肖华胜**

**（2014 肖华胜）请简述基因芯片的基本原理，主要制备方法以及在生物医学研究中的主要应用（2013 在生命科学中的应用）。**

概念：是通过微阵列技术microarray将高密度DNA片段通过高速机器人或原位合成方式以一定的顺序或排列方式使其附着在如膜、玻璃片等固相表面，以同位素或荧光标记的DNA探针，借助碱基互补杂交原理，进行大量的基因表达及监测等方面研究的最新革命性技术。

制作方法：一种为原位合成，常见有光蚀保护，ink-jet，digital micromirror device，分子印章等方法；另一种为合成后点样（微点阵），多用于cDNA PCR产物，oligo，其他形式的基因产物。

基因芯片在生命科学研究中的应用：

1、 基因表达分析

同一组织细胞在不同的发育阶段、不同外界环境因素影响下，其基因的表达模式不同。同一个体的不同组织器官的基因表达模式也不相同。基因芯片技术由于具有高度并行性和高通量的特点正适合于此项研究。

2 、基因突变和多态性分析

在进化过程中同一物种不同种群和个体之间存在着不同的基因型，这些不同的基因型与生物个体间不同的性状有着密切的关系。利用基因芯片可以对基因型与性状之间的关系进行研究。

3、 基因组DNA序列分析

由A、T、C、G4种核苷酸单体组合所形成的所有可能把具体寡核苷酸探针共 有65536种。将这些种类的探针全部固定于活化的载体表面，形成寡核苷酸阵列。然后芯片与样品进行杂交，通过计算机对杂交模式进行分析，就可以得出样品的核苷酸序列信息。

4、 核酸和蛋白质相互作用的研究

蛋白质与特定的核酸片段结合对基因的表达起着重要的调控作用，通过对蛋白质与核酸相互作用的研究，人们可以更深入地了解生命活动的内在机制。

5.DNA甲基化芯片

6.临床诊断芯片