

医学分子生物学习题集

(参考答案)

第二章 基因与基因组

一、名词解释

1. 基因 (gene): 是核酸中储存有功能的蛋白质多肽链或 RNA 序列信息及表达这些信息所必需的全部核苷酸序列。
2. 断裂基因 (split gene): 真核生物基因在编码区内含有非编码的插入序列, 结构基因不连续, 称为断裂基因。
3. 结构基因 (structural gene): 基因中用于编码 RNA 或蛋白质的 DNA 序列为结构基因。
4. 非结构基因 (non-structural gene): 结构基因两侧一段不编码的 DNA 片段, 含有基因调控序列。
5. 内含子 (intron): 真核生物结构基因内非编码的插入序列。
6. 外显子 (exon): 真核生物基因内的编码序列。
7. 基因间 DNA (intergenic DNA): 基因之间不具有编码功能及调控作用的序列。
8. GT-AG 法则 (GT-AG law): 真核生物基因的内含子 5' 端大多数是以 GT 开始, 3' 端大多数是以 AG 结束, 构成 RNA 剪接的识别信号。
9. 启动子 (promoter): RNA 聚合酶特异识别结合和启动转录的 DNA 序列。
10. 上游启动子元件 (upstream promoter element): TATA 盒上游的一些特定的 DNA 序列, 反式作用因子, 可与这些元件结合, 调控基因转录的效率。
11. 反应元件 (response element): 与被激活的信息分子受体结合, 并能调控基因表达的特异 DNA 序列。
12. poly(A)加尾信号 (poly(A) signal): 结构基因末端保守的 AATAAA 顺序及下游 GT 或 T 富含区, 被多聚腺苷酸化特异因子识别, 在 mRNA 3' 端加约 200 个 A。
13. 基因组 (genome): 细胞或生物体一套完整单倍体的遗传物质的总称。
14. 操纵子 (operon): 多个功能相关的结构基因成簇串联排列, 与上游共同的调控区和下游转录终止信号组成的基因表达单位。
15. 单顺反子 (monocistron): 一个结构基因转录生成一个 mRNA 分子。
16. 多顺反子 (polycistron): 原核生物的一个 mRNA 分子带有几个结构基因的遗传信息, 利用共同的启动子及终止信号, 组成操纵子的基因表达调控单元。

17. 转座因子 (transposable element): 能够在一个 DNA 分子内部或两个 DNA 分子之间移动的 DNA 片段。
18. 转座子 (transposon): 转座因子的一种类型, 大小通常为 2-20kb, 常带有抗性基因等其它基因。
19. 基因家族 (gene family): 是指一组有类似功能, 核苷酸序列又有同源性的基因。
20. 基因超家族 (gene superfamily): 由多基因家族及单基因组成, 成员间有不同程度的同源, 但它们的功能不一定相同。
21. 假基因 (pseudogene): 基因家族中与有功能的基因相似, 不表达有功能的基因产物。
22. 自私 DNA (selfish DNA): 在哺乳动物和人类基因组中的没有特定功能的非编码序列。
23. 反向重复 (inverted repeat) : 两个相同序列的互补拷贝在同一 DNA 链上反向排列。
24. 串联重复 (tandem repeat) : 具有相同核心序列的高度重复序列, 在基因组中成串排列。
25. 卫星 DNA (satellite DNA): 通过 CsCl 密度梯度离心后, 在主带 DNA 之外的 DNA, 为具有相同核心序列的高度重复的串联重复序列。
26. 大卫星 DNA (macro-satellite DNA): 卫星 DNA 中重复单位为 5-10bp 的 DNA 序列, 在群体中多态性不显著。
27. 小卫星 DNA (mini-satellite DNA): 卫星 DNA 中重复单位为 9-24bp 的 DNA 序列, 呈高度多态性。
28. 微卫星 DNA (micro-satellite DNA): 卫星 DNA 中重复单位为 2-6bp 的 DNA 序列, 常见为(AC)_n 和(TG)_n, 高度多态性, 可作遗传标记。
29. 可变数目串联重复 (variable number of tandem repeat): 卫星 DNA 中重复单位为 9-24bp 的 DNA 序列, 重复次数变化很大。
30. 短串联重复(short tandem repeat): 卫星 DNA 中重复单位为 2-6bp 的 DNA 序列, 常见为(AC)_n 和(TG)_n, 重复次数 10-60 次, 总长度小于 150bp, 高度多态性, 可作遗传标记。
31. 基因组学 (genomics): 阐明基因组结构、结构与功能的关系以及基因与基因之间相互作用的一门科学。
32. 物理图谱 (physical map): 确定染色体上诸如限制性内切核酸酶识别位点, 或序列标志位点等的位置图。
33. 遗传图谱 (genetic map): 确定标志位点在一条染色体上的线性排列顺序。标志位点间的图距以遗传学距离表示, 单位为分摩尔根 (cM)。

34. 转录图谱 (transcriptional map): 以表达序列标签为位标制作的 cDNA 图或表达序列图
35. 序列图谱 (sequence map): 测定人类 24 条染色体的、由 3×10^9 个核苷酸组成的全部 DNA 序列, 绘制人类基因组图谱。
36. 结构基因组学(structural genomics): 通过对整个基因组的遗传制图、物理制图及 DNA 序列测定研究基因组结构的科学。
37. 功能基因组学(functional genomics): 完成一个生物体全部基因组测序后即进入后基因组测序阶段——详尽分析序列, 描述基因组所有基因的功能, 包括研究基因的表达及其调控模式, 这就是功能基因组学。
38. 比较基因组学(comparative genomics): 比较不同物种的整个基因组, 增强对各个基因组功能及发育相关性认识的科学。
39. 基因型 (genotype): 逐代传递下去的成对基因的集合, 一个来自父本, 一个来自母本。
40. 表型 (phenotype): 指一些容易区分的个体特征的集合。
41. 重叠基因 (overlapping gene): 同一段 DNA 片段能够以两种或两种以上的方式阅读, 可编码两种或两种以上的多肽。
42. 分段基因组(segmented genome): 病毒基因组由数个不同的核酸分子组成。
43. 逆转录病毒(retrovirus): RNA 病毒中的一类, 携带有逆转录酶, 可把基因组 RNA 逆转录为前病毒 DNA。
44. 等基因(isogene): 编码同工酶的一类结构不完全相同, 而功能相同的基因。
45. 同源多聚体 (homomultimer): 由多个同一种亚单位组成的蛋白质。
46. 异源多聚体 (heteromultimer): 由多个不同的亚单位组成的蛋白质。

二、判断题

1. × 2. √ 3. √ 4. × 5. × 6. √ 7. √ 8. × 9. √ 10. √
11. √ 12. × 13. × 14. √ 15. √ 16. √ 17. × 18. √ 19. √ 20. ×
21. √ 22. √ 23. √ 24. × 25. × 26. √ 27. √ 28. √ 29. √ 30. √
31. × 32. √ 33. × 34. √ 35. √

三、填空题

1. 蛋白质多肽链 RNA
2. RNA 蛋白质
3. 启动子 增强子 沉默子 反应元件 加尾信号
4. 细胞 生物体
5. 逆转录病毒
6. 细菌
7. 多肽
8. RNA 逆转录酶
9. gag pol env
10. 帽子 ploy (A) 尾
11. 环状双链 DNA 复制起点
12. 结构基因 调控区 转录终止信号
13. 蛋白质 rRNA
14. 复制起始区 复制终止区 转录启动区 转录终止区
15. DNA 片段
16. 插入序列 转座子
17. 简单 复制性 复制性 共整合体
18. 结构基因
19. 高度重复序列 中度重复序列
20. 假基因
21. 相同 互补
22. 核心序列 串联
23. 单个核苷酸
24. 多 单顺反子
25. 插入序列 断裂
26. GT AG
27. TATA 盒 上
28. AATAA
29. DNA RNA

30. 大于

四、单项选择题

1. C 2. B 3. A 4. B 5. B 6. C 7. C 8. C 9. C 10. D
11. E 12. C 13. A 14. B 15. C 16. C 17. C 18. D 19. A 20. A
21. B 22. 23. B 24. E 25. C 26. C 27. E 28. D 29. D 30. B

五、多项选择题

1. ACE 2. ABCE 3. BC 4. ADE 5. ABDE 6. ABCD 7. AB
8. CE 9. ABCDE 10. BDE 11. ABE 12. ABDE 13. ABCD
14. ABCD 15. AB 16. BC 17. ABCD 18. BDE 19. CDE 20. ABC

六、简答题

1. 什么是转座？

答：转座因子在基因组不同位置间的移动。

2. 病毒基因组有哪些特点？

答：不同病毒基因组大小相差较大；不同病毒基因组可以是不同结构的核酸；除逆转录病毒外，为单倍体基因组；病毒基因组有的是连续的，有的分节段；有的基因有内含子；病毒基因组大部分为编码序列；功能相关基因转录为多顺反子 mRNA；有基因重叠现象。

3. 原核生物基因组有哪些特点？

答：基因组由一条环状双链 DNA 组成；只有一个复制起始点；大多数结构基因组成操纵子结构；结构基因无重叠现象；无内含子，转录后不需要剪接；基因组中编码区大于非编码区；重复基因少，结构基因一般为单拷贝；有编码同工酶的等基因；基因组中存在可移动的 DNA 序列；非编码区主要是调控序列。

4. 真核生物基因组有哪些特点？

答：每一种真核生物都有一定的染色体数目；远大于原核基因组，结构复杂，基因数庞大；真核生物基因转录为单顺反子；有大量重复序列；真核基因为断裂基因；非编码序列多于

编码序列；功能相关基因构成各种基因家族。

5. 基因重叠有什么意义？

答：利用有限的核酸贮存更多的遗传信息，提高自身在进化过程中的适应能力。

6. 质粒有哪些特性？

答：在宿主细胞内可自主复制；细胞分裂时恒定地传给子代；所携带的遗传信息能赋予宿主特定的遗传性状；质粒可以转移。

7. 什么是顺式作用元件？

答：基因中能影响基因表达，但不编码 RNA 和蛋白质的 DNA 序列。顺式作用元件主要包括启动子、增强子、负调控元件等。

七、论述题

1. 比较真核生物基因组与原核生物基因组的结构特点。

答：原核基因组由一条环状双链 DNA 组成；只有一个复制起始点；大多数结构基因组成操纵子结构；结构基因无重叠现象；无内含子，转录后不需要剪接；基因组中编码区大于非编码区；重复基因少，结构基因一般为单拷贝；有编码同工酶的等基因；基因组中存在可移动的 DNA 序列；非编码区主要是调控序列。

每一种真核生物都有一定的染色体数目；远大于原核基因组，结构复杂,基因数庞大；真核生物基因转录为单顺反子；有大量重复序列;真核基因为断裂基因;非编码序列多于编码序列；功能相关基因构成各种基因家族。

2. 比较病毒基因组与原核生物基因组的结构特点。

答：不同病毒基因组大小相差较大；不同病毒基因组可以是不同结构的核酸；除逆转录病毒外，为单倍体基因组；病毒基因组有的是连续的，有的分节段；有的基因有内含子；病毒基因组大部分为编码序列；功能相关基因转录为多顺反子 mRNA；有基因重叠现象。

原核基因组由一条环状双链 DNA 组成；只有一个复制起始点；大多数结构基因组成操纵子结构；结构基因无重叠现象；无内含子，转录后不需要剪接；基因组中编码区大于非编码区；重复基因少，结构基因一般为单拷贝；有编码同工酶的等基因；基因组中存在可移动

的 DNA 序列；非编码区主要是调控序列。

3. 根据流感病毒基因组的结构特点说明流感病毒容易突变的原因。

答：流感病毒基因组：单股负链 RNA、8 节段，每节段均编码蛋白质，5' 端由相同的 13 个核苷酸组成，3' 端有 12 个高度保守的核苷酸序列。基因组复制是以单股负链病毒基因组 RNA 为模板转录合成正链 RNA，再以正链 RNA 为模板复制出病毒基因组 RNA。原因主要有：单链 RNA 基因组易变异；复制时错误率高，病毒 RNA 聚合酶没有 DNA 聚合酶的校正功能。8 节段 RNA 分别编码不同的蛋白质，如果两种流感病毒同时感染宿主细胞，容易发生不同病毒的 RNA 节段重组；流感病毒的两种主要抗原：血凝素（HA）有 15 种亚型、神经氨酸酶（N）有 9 种亚型，通过基因重排（不同的 RNA 节段重组）可形成各种不同的血清型。

4. 根据逆转录病毒基因组结构及病毒复制特点论述如何抑制逆转录病毒的复制。

答：逆转录病毒基因组为二倍体 RNA 基因组，包括三个基本的结构基因：gag、pol 和 env。病毒 RNA 在 5' 端有帽子结构，在 3' 端有 ploy (A) 尾。

逆转录病毒颗粒识别细胞表面受体并与之融合，释放基因组 RNA 及逆转录酶进入宿主细胞内，在逆转录酶作用下，以病毒基因组 RNA 为模板合成第一链 cDNA，并降解与 cDNA 结合的病毒 RNA，然后再合成第二链 cDNA，形成前病毒 DNA，被转运到细胞核，在整合酶的作用下整合到宿主细胞染色体上，在宿主细胞 RNA 合成酶的作用下合成病毒 mRNA 及基因组 RNA，指导合成病毒核衣壳蛋白质及逆转录酶，包装成病毒核衣壳。同时合成病毒膜蛋白质，在病毒蛋白质水解酶的作用下，经过加工后包装成病毒颗粒，通过出芽方式释放出子代病毒颗粒。

在临床实践中分别通过抑制病毒与细胞表面受体识别、抑制逆转录酶活性或以核苷类似物抑制转录过程，抑制病毒蛋白水解酶及整合酶等方式抑制逆转录病毒的复制。

5. 转座作用的机制及其遗传学效应。

答：转座作用可分为复制性转座和简单转座两种类型，复制性转座是转座因子复制出一个新拷贝转移到基因组新的位置，转座可以使供体和受体复制子融合，形成共整合体，解离后释放出两个复制子，每一个都带有一个转座子。简单转座是转座因子从原来位置上切除并转移到基因组新的位置。

遗传学效应：引起插入突变，携带标志基因使受体增添新基因，可形成共整合体，转座的结果使靶点序列倍增，促使染色体畸变。

第五章 遗传信息的复制与表达

一、名词解释

1. 基因表达 (gene expression): 是指原核生物和真核生物基因组中特定的结构基因所携带的遗传信息, 经过转录、翻译等一系列过程, 合成具有特定的生物学功能的各种蛋白质, 表现出特定的生物学效应的全过程。
2. 顺式作用元件 (cis-acting element): 某些能影响基因表达但不编码蛋白质和 RNA 的 DNA 序列, 按照功能分为启动子、增强子、负调控元件-沉默子。
3. 核心启动子 (core promoter): 指足以使 RNA 聚合酶 II 转录正常起始所必需的、最少的 DNA 序列。包括“转录起始位点”即相当于 mRNA 的 CAP 位点及其上游 -25~-30 bp 处的富含 TA 的典型元件“TATA”盒。核心启动子单独起作用时, 其功能为确定转录起始位点并产生基础水平的转录。
4. 增强子 (enhancer): 指位于启动子上游或下游并通过启动子增强邻近基因转录效率的 DNA 顺序, 但增强子本身不具备启动子活性。
5. 沉默子 (silencer): 在真核基因内能抑制基因转录的 DNA 序列。它们与反式作用因子相互结合而起作用。不受距离和方向的限制, 并可对异源基因的表达起作用。
6. 反式作用因子 (trans-acting factor): 指能直接或间接地识别或结合在各顺式作用元件 8~12 bp 核心序列上, 参与调控靶基因转录效率的一组蛋白质。在结构上含有与 DNA 结合的结构域。
7. 转录因子 (transcription factor, TF): 是 RNA 合成起始所必需的因子, TF 不依赖 RNA 聚合酶而独立地结合 DNA, 并且在转录过程中促使 RNA 聚合酶分子与启动子结合。
8. 锌指结构 (zinc finger structure): 是 DNA 识别结合域模型的一种, 指含有一段保守氨基酸顺序的蛋白质与该蛋白的辅基锌整合而形成的环状结构, 它们的共同特点是以锌作为活性结构的一部分。
9. 同源结构域 (homeodomain, HD): 同源盒基因家族各基因间具有一相同的保守序列, 称为同源结构域。在它所含的至少两个 α 螺旋中, 其间由短氨基酸残基形成“转折”, 第三个 α 螺旋与 DNA 大沟相互作用是同源盒蛋白与 DNA 结合的主要力量。
10. 碱性亮氨酸拉链 (basic leucine zipper, bLZ): 有些反式作用因子肽链 C 末端有一段 30 个氨基酸序列以 α -螺旋构型出现的结构单元, 其中每间隔 6 个氨基酸便出现一个亮氨酸残

基，能形成两性 α -螺旋，带电荷的亲水性氨基酸位于一侧，而具有疏水性的亮氨酸残基位于另一侧，其侧链向外伸出，构成状如齿形排列的半拉链。两个具有这种结构的因子接触后可借助侧链疏水性交错对插，象拉拉链一样将两个反式作用因子连在一起，形成具有稳定卷曲螺旋结构的二聚体，即亮氨酸拉链。

11. 转录活化结构域 (transcription activation domain): 是反式作用因子中惟一必须具备的结构基础，通常是依赖于 DNA 结合结构域以外的 30~100 个氨基酸残基。转录因子通常具有一个以上的转录活化区。

12. 选择性剪接 (alternative splicing): 在高等真核细胞中，某个内含子 5' 的供点可以在特定条件下与另一个内含子 3' 受点进行剪接，同时删除这两个内含子及其中间的全部外显子或内含子，即一个外显子或内含子是否出现在成熟的 mRNA 中是可以选择的，这种剪接方式称为选择性剪接。

13. 核不均一性 RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA): 从 DNA 转录产生的原始转录产物称为核内不均一 RNA，真核生物 mRNA 通常都有相应的前体。

14. 管家基因 (housekeeping gene): 在生命的全过程都是必需的，在一个生物体的几乎所有细胞中持续表达的基因。

15. 组成性表达 (constitutive expression): 管家基因在个体生长阶段的几乎全部组织中持续表达或变化很小。

16. 协调表达 (coordination expression): 在一定机制下，功能相关的一组基因，协调一致，共同表达。

17. SD 序列 (Shine-Dalgarno sequence): 在起始密码 AUG 上游 4~13 个碱基之前有一段富含嘌呤的序列，其一致序列为 AGGAGG，能与核糖体 30S 亚基中 16S rRNA 3' 端富含嘧啶的序列结合，与蛋白质合成过程中起始复合物生成有关。

18. 衰减子 (dehancer): 真核基因内能抑制基因转录的 DNA 序列，与反式作用因子相互结合而起作用。不受距离和方向的限制，并可对异源基因的表达起作用。

19. 诱导表达 (induction expression): 在特定环境信号刺激下，有些基因的表达表现为开放或增强。

20. 阻遏表达 (repression expression): 在特定环境信号刺激下，有些基因的表达表现为关闭或下降。

21. 终止子 (terminator): 在模板 DNA 分子的 5' 端有转录终止信号，称终止子，通常具有 poly A 尾的基因终止信号为 G/T 簇。

22. 启动子 (promoter): 见第二章
23. 多顺反子 (polycistron): 见第二章
24. 操纵子 (operon): 见第二章
25. 单顺反子 (monocistron): 见第二章
26. 上游启动子元件 (upstream promoter element, UPE): 见第二章

二、判断题:

1. × 2. × 3. × 4. × 5. × 6. √ 7. √ 8. × 9. √ 10. ×
11. √ 12. √ 13. √ 14. × 15. × 16. √ 17. √ 18. × 19. √ 20. √
21. × 22. √ 23. × 24. × 25. √ 26. √ 27. × 28. × 29. √ 30. √
31. √ 32. × 33. × 34. × 35. √ 36. √ 37. × 38. √ 39. √ 40. √

三、填空题:

1. 结构基因 转录 翻译
2. 蛋白质 小分子 RNA
3. 操纵子
4. 内含子
5. 结构基因 多顺反子
6. 启动子调控 衰减子调控
7. 负调控因子 正调控因子
8. $\alpha_2\beta\beta'\delta$ $\alpha_2\beta\beta'$ δ 因子
9. 多顺反子 结构基因 调控序列
10. 操纵子
11. 乳糖操纵子
12. 依赖 ρ 因子 不依赖 ρ 因子 核糖体
13. RNA 片段 反义基因
14. 戴帽 加 polyA 尾 切除内含子 拼接外显子
15. 单顺反子

16. 反比 愈高 降低
17. 反式作用因子 顺式作用元件 RNA 聚合酶
18. 通用转录因子 DNA 蛋白质-DNA
19. TATA 盒结合因子 转录复合物
20. 顺式作用元件 启动子 增强子 负调控元件/沉默子
21. 起始位点(+1) DNA 序列
22. 启动子 DNA 序列 启动子活性
23. DNA 序列 沉默子 衰减子
24. 顺式作用元件 蛋白质
25. 通用转录因子 组织特异性转录因子 诱导性反式作用因子
26. DNA 识别结合域 转录活化域 调节结构域

四、单项选择题

1. A 2. C 3. C 4. E 5. D 6. C 7. B 8. C 9. B 10. E
11. D 12. B 13. D 14. C 15. E 16. C 17. C 18. C 19. E 20. D
21. C 22. A 23. B 24. D 25. C 26. B 27. A 28. E 29. B 30. D
31. B 32. C 33. C 34. A 35. E 36. A 37. C 38. A 39. E 40. B
41. C 42. B 43. D 44. C 45. A 46. A 47. A 48. D 49. C 50. C
51. E 52. B 53. B 54. C 55. D 56. D 57. A 58. E 59. A 60. E
61. A 62. D 63. B 64. B 65. C 66. C

五、多项选择题

1. AD 2. ABE 3. BCE 4. BC 5. ABCDE 6. ABC 7. BCDE 8. ABCE 9. ACD
10. ABCD 11. ACDE 12. ABCD 13. ABCE 14. ABCDE 15. ABC
16. AB 17. ABCDE 18. AB 19. CE 20. BD 21. CD 22. AD
23. CE 24. CD 25. BD 26. BCDE 27. ACDE 28. ABDE 29. BCD
30. ACDE 31. ABCD 32. CDE 33. ACD 34. BCDE

六、简答题

1.简述原核基因表达的特点。

答：（1）只有一种 RNA 聚合酶。

（2）原核生物的基因表达以操纵子为基本单位。

（3）转录和翻译是偶联进行的。

（4）mRNA 翻译起始部位有特殊的碱基序列—SD 序列。

（5）原核生物基因表达的调控主要在转录水平，即对 RNA 合成的调控。

2.简述 σ 因子在原核基因表达调控中的意义。

答：（1） σ 因子含有识别启动区的结构域，调控 RNA 聚合酶与 DNA 结合，确保 RNA 聚合酶与特异启动区而不是其他位点的稳定结合。

（2） σ 因子使得 RNA 聚合酶选择一套特定启动区起始转录。一旦一种 σ 因子被另一种代替，即引起原来一套基因转录的关闭和新的一套基因转录的开启。

3.在有乳糖而无葡萄糖的条件下，乳糖操纵子是如何调控转录起始的？

答：有乳糖而无葡萄糖时，阻遏蛋白不与操纵基因结合，cAMP 处于高水平，形成 cAMP-CAP 复合物并与 CAP 位点结合，cAMP-CAP 复合物与 *lac*、阿拉伯糖操纵子的调控元件结合后，促进结构基因的转录。

4.简述乳糖操纵子的结构。

答：编码 β -半乳糖苷酶、半乳糖苷通透酶和硫代半乳糖苷转乙酰基酶的基因 Z、Y、A 称为结构基因，结构基因加上调控元件：启动子和操纵基因，即构成乳糖操纵子。

5.原核生物可以通过哪几个层次的表达调控以适应环境的改变？

答：（1）转录起始的调控：

① σ 因子调控转录起始；

② 转录起始的负调控；

③ 转录起始的正调控；

④ 转录起始的复合调控。

（2）转录终止的调控：

① 依赖 ρ 因子的终止调控，通过 ρ 因子的作用使转录终止；

② 不依赖 ρ 因子的终止调控;

③ 核糖体调控转录终止。

(3) 翻译水平的调控:

① 反义 RNA 的调控作用;

② RNA 的稳定性;

③ 蛋白质合成中的自身调控。

6. 简述真核基因表达的特点。

答: (1) 细胞的全能性: 所谓全能性是指同一种生物的所有细胞都含有相同的基因组 DNA。

(2) 基因表达的时间性和空间性: 高等生物的各种不同细胞具有相同的基因组, 但在个体发育的不同阶段, 基因表达的种类和数量是不同的, 在不同组织和器官中, 基因表达的种类和数量不同。

(3) 转录和翻译分开进行: 在核中转录生成 mRNA, 穿过核膜至胞质指导蛋白质合成。

(4) 初级转录产物要经过转录后加工修饰。

(5) 不存在超基因式操纵子结构: 真核生物基因转录产物为单顺反子, 一条 mRNA 只翻译一种蛋白质。

(6) 部分基因多拷贝。

7. 真核生物基因组水平的表达调控包括哪几种方式?

答: (1) 染色质的丢失;

(2) 基因扩增;

(3) 基因重排;

(4) 基因的甲基化修饰;

(5) 染色质结构对基因表达的调控作用。

8. 列举几种真核基因的顺式作用元件。

答: (1) 启动子: Hogness 盒, CAAT 盒;

(2) 增强子: SV40 病毒中, 位于早期启动子 5' 上游约 200 bp, 内含 2 个 72 bp 的重复序列, 其核心序列为 GGTGTGGAAG;

(3) 沉默子: SV40 中的 AGGTTTTTT 序列为终止转录调控元件。

9.简述反式作用因子的基本结构特点。

答：一个完整的反式作用因子通常含有三个主要功能结构域，分别为 DNA 识别结合域、转录活化域和结合其他蛋白质的调节结构域。这些结构域含有几十到几百个氨基酸残基。不同的结构域有自己的特征性结构。

(1) DNA 识别结合域：锌指结构、碱性亮氨酸拉链、同源结构域、螺旋-环-螺旋结构、碱性 α -螺旋。

(2) 转录活化结构域：酸性 α -螺旋、富含谷氨酰胺的结构域、富含脯氨酸结构域。

10.简述真核生物转录水平的调控机制。

答：主要通过反式作用因子与顺式作用元件和 RNA 聚合酶 (RNA polymerase, RNA pol) 的相互作用完成。

(1) 顺式作用元件(cis-acting element)指某些能影响基因表达但不编码新的蛋白质和 RNA 的 DNA 序列，按照功能分为启动子、增强子、负调控元件（沉默子等）。

(2) 反式作用因子(trans-acting factor)指能直接或间接地识别或结合在各顺式作用元件 8~12bp 核心序列上，参与调控靶基因转录效率的一组蛋白质，也称序列特异性 DNA 结合蛋白(sequence specific DNA binding protein, SDBP)，这是一类细胞核内蛋白质因子。在结构上含有与 DNA 结合的结构域。

(3) 反式作用因子的调控机制

①反式作用因子的活性调节：真核基因转录起始的调节，首先表现为反式作用因子的功能调节，即特定的反式作用因子被激活后，可以启动特定基因的转录。

反式作用因子的激活方式如下:表达式调节；共价修饰；配体结合；蛋白质与蛋白质相互作用

②反式作用因子作用方式：成环；扭曲；滑动；Oozing

③反式作用因子的组合式调控：基因表达的调控不是由单一的反式作用因子完成而是几种因子组合，发挥特定的作用。

11.简述基因表达调控的意义及基本调节层次。

答：(1) 在同一机体的各种细胞中虽然含有相同的遗传信息即相同的结构基因，但它们并非在所有细胞中都同时表达，而必须根据机体的不同发育阶段、不同的组织细胞及不同的功能状态，选择性、程序性地表达特定数量的特定基因。通常情况下，真核生物细胞只有 2%~15% 的基因处于有转录活性的状态。为了适应环境的变化，生物体需要不断地调节和控制各种基

因的表达。

(2) 基因表达的调控是一个十分复杂的过程。从 DNA 上的遗传信息到蛋白质功能发挥的整个过程中,存在着基因组、转录、转录后、翻译及翻译后多个水平的调控环节。

12.举例说明什么是管家基因及其基因表达特点。

答:(1)管家基因(house-keeping genes)是指所有细胞中均要表达的一类基因,其产物是维持细胞基本生命活动所必需的。如微管蛋白基因、糖酵解酶系基因与核糖体蛋白基因等。

(2)管家基因表达水平受环境因素影响较小,在个体各个生长阶段的大多数、或几乎全部组织中持续表达,或变化很小。它的表达只受启动序列或启动子与 RNA 聚合酶相互作用的影响,而不受其他机制调节。调控区多呈低甲基化。

13.简述真核生物在翻译水平上的调控。

答:(1)翻译起始的调控:

①翻译起始因子的功能调控:eIF-2 是蛋白质合成过程中重要的起始因子。有些物质可以影响 eIF-2 的活性,调节蛋白质合成的速度。培养的真核细胞处于营养不足(“饥饿”)时,eIF-2 失活,最终导致肽链合成起始效率降低。

②阻遏蛋白的调节作用:所有进入胞浆的 mRNA 分子并不是都可以立即与核糖体结合翻译成蛋白质。由于存在一些特定的翻译抑制蛋白可以与一些 mRNA 的 5'端结合,从而抑制了蛋白质翻译。

③5'AUG 对翻译的调节作用:以真核 mRNA 为模板的翻译开始于最靠近其 5'端的第一个 AUG。90%以上的真核 mRNA 符合第一 AUG 规律。但在有些 mRNA 中,在起始密码子 AUG 的上游(5'端)非编码区有一个或数个 AUG,称为 5'AUG。5'AUG 的阅读框通常与正常编码区的阅读框不一致,不是正常的开放阅读框。如果从 5'AUG 开始翻译,很快就会遇到终止密码子。因此,若从 5'AUG 开始翻译,就会翻译出无活性的短肽。

④mRNA 5'端非编码区长度对翻译的影响:起始密码 AUG 上游非编码区的长度可以影响翻译水平。当第一个 AUG 密码子离 5'端帽子的位置太近时,不容易被 40S 亚基识别。当第一个 AUG 密码子距 5'端帽子结构的距离在 12 个核苷酸以内时,有一半以上的核糖体 40S 亚基会滑过第一个 AUG。当 5'端非编码区的长度在 17~80 核苷酸之间时,体外翻译效率与其长度成正比。所以,第一个 AUG 至 5'端之间的长度同样影响翻译起始效率和翻译起始的准确性。

(2) mRNA 稳定性调节: mRNA 的稳定性是翻译水平调控的重要因素, 是由于 mRNA 是翻译蛋白质的模板, 其量的多少直接影响蛋白质合成的量。mRNA 半衰期越长, 翻译效率越高, 在细胞内合成蛋白质的量愈多。

(3) 小分子 RNA 对翻译的调控作用: 如 lin-4 RNA 由 lin-4 基因编码, 可阻抑 lin-14 蛋白质(一种核蛋白), 从而调控生长发育的时间选择。

14. 简述真核基因转录因子分类及功能。

答: (1) 反式作用因子指能直接或间接地识别或结合在各顺式作用元件 8~12 bp 核心序列上, 参与调控靶基因转录效率的一组蛋白质, 有时也称转录因子。

(2) 目前发现的转录因子有近百种, 根据其作用方式的不同分为三类: ①通用转录因子: 系多数细胞普遍存在的一类转录因子, 如 TATA box 结合因子 TF II D、GC box 结合因子 SP1 等; ②组织特异性转录因子: 在很大程度上, 基因表达的组织特异性取决组织特异性转录因子的存在; ③诱导性反式作用因子: 这些反式作用因子的活性能被特异的诱导因子所诱导, 这种活性的诱导可以是新蛋白的合成。

15. 简述真核和原核基因表达调控共同的要素。

答: (1) DNA 元件: 具有调节功能的 DNA 序列

原核: 启动序列, 操纵序列

真核: 顺式作用元件, 启动子, 增强子, 抑制子

(2) 调节蛋白:

原核: 阻遏蛋白: 负性调节; 激活蛋白: 正性调节

真核: 转录因子——基本转录因子、激活因子、抑制因子

(3) RNA 聚合酶:

RNA 聚合酶主要是通过识别与结合启动子, 参与基因转录起始调控

16. 说明阻遏蛋白在原核基因表达调控中的普遍意义。

答: 阻遏蛋白通常是与基因操纵区结合, 减弱或阻止其调控的基因转录, 其介导的调控方式为负调控。如大肠杆菌乳糖代谢, 在没有诱导剂时, 与 lac 相邻(上游端)的调节基因 I 的产物—lac 阻遏蛋白, 能与操纵子操纵基因 O 特异地结合, 抑制结构基因的转录。

17.请解释正性调节在真核基因表达调控中的普遍意义。

答：在真核细胞中，RNA 聚合酶对启动子的亲和力很低，基本上不能靠其自身来起始转录，而是需要依赖多种激活蛋白的协同作用。真核基因调控中虽然也发现有负性调控元件，但其存在并不普遍；真核基因转录表达的调控蛋白也有起阻遏和激活作用或兼有两种作用者，但总是以激活蛋白的作用为主。即多数真核基因在没有调控蛋白作用时是不转录的，需要表达时就要有激活的蛋白质来促进转录。换言之：真核基因表达以正性调控为主导。

18. 简述乳糖操纵子在有葡萄糖存在而没有乳糖存在时进行转录起始负调控的原理。

答：由于在没有乳糖的条件下，lac 阻遏蛋白能与操纵基因特异地结合，抑制了结构基因的表达。

七、论述题

1.从多个层次论述真核基因的表达调控。

答：（1）基因组 DNA 水平的调控：

基因组水平的调控即转录前调控，指发生在基因组水平的基因结构的改变，这种调控方式较稳定持久，有时甚至是不可逆的。真核生物基因表达在 DNA 水平的调控主要方式为：
①染色体的丢失②基因扩增③基因重排④基因的甲基化修饰⑤染色质结构对基因表达的调控作用

（2）转录水平的调控：

转录水平的调控主要是通过反式作用因子与顺式作用元件和 RNA 聚合酶（RNA polymerase, RNA pol）的相互作用来完成的。顺式作用元件是一些能影响基因表达但不编码蛋白质和 RNA 的 DNA 序列，按照功能分为启动子、增强子、沉默子。反式作用因子是指能直接或间接地识别或结合在各顺式作用元件 8~12 bp 核心序列上，参与调控靶基因转录效率的一组蛋白质。

转录水平的调控机制主要为：

①反式作用因子的活性调节。特定的反式作用因子被激活后，可以启动特定基因的转录。激活方式为：表达式调节，共价修饰，配体结合，蛋白质与蛋白质相互作用。

②反式作用因子作用方式。反式作用因子与顺式元件的结合位点通常与其所调控的基因相距较远，其作用方式模式为：成环，扭曲，滑动，Oozing。

③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元件后虽然可发挥

促进或抑制作用，但反式作用因子对基因表达的调控不是由单一反式作用因子完成的，而是由几种因子组合，发挥特定的作用。

(3) 转录后水平的调控：

① 5'端加帽和 3'端多聚腺苷酸化

② mRNA 前体的选择性剪接

(4) 翻译水平的调控：

① 翻译起始的调控，包括翻译起始因子的功能调控、阻遏蛋白的调节作用、5'AUG 对翻译的调节作用、mRNA 5'端非编码区长度对翻译的影响等。

② mRNA 稳定性调节

③ 小分子 RNA 对翻译的调控作用

(5) 翻译后调控：

指蛋白质生物合成之后对其表现生物活性和特定功能的时空控制过程。主要包括蛋白质分子的折叠(卷曲)、修饰加工、分选和传送。

2. 论述小分子 RNA 在基因表达调控中的意义。

答：反义 RNA 是指能与特定 mRNA 互补结合的 RNA 片段，反义 RNA 由反义基因转录而来。天然的具有功能的反义 RNA 分子一般为 200 个碱基以下的小分子 RNA。反义 RNA 在原核生物翻译水平上有三种作用方式：

(1) 反义 RNA 根据碱基互补配对原则与 mRNA 5'端非翻译区包括 SD 序列相结合。SD 序列是 mRNA 与核糖体小亚基结合的部位，反义 RNA 与 SD 序列结合后，阻止了 mRNA 与核糖体小亚基结合，直接抑制了翻译。

(2) 反义 RNA 与 mRNA 5'端编码区起始密码子 AUG 结合，从而抑制 mRNA 翻译起始。

(3) 反义 RNA 与 mRNA 的非编码区互补结合，使 mRNA 构象改变，影响其与核糖体结合，间接抑制了 mRNA 的翻译。

3. 试述色氨酸操纵子的调节机制。

答：色氨酸操纵子表达的调控有两种方式，一种是通过阻遏蛋白的负调控，另一种是通过衰减子作用。

(1) 阻遏蛋白对色氨酸操纵子的调控：色氨酸操纵子阻遏蛋白是一种由 2 个亚基组成的二聚体蛋白质，是色氨酸操纵子 R 基因的产物。无色氨酸时，该阻遏蛋白不能与操纵基因

结合，对转录无抑制作用；细胞内有大量的色氨酸时，阻遏蛋白与色氨酸形成的复合物能与操纵基因结合，抑制转录。

(2) 衰减子对转录的调控：色氨酸操纵子的衰减子位于前导肽编码基因中，离 E 基因上游约 30~60 个核苷酸。大肠杆菌在无色氨酸的环境下，前导肽编码基因和 5 个结构基因能转录产生具有 6 700 个核苷酸的全长多顺反子 mRNA。当细胞内色氨酸增多时，E、D、C、B 和 A 基因转录受到抑制，但前导肽编码基因转录出 140 个核苷酸 mRNA 引导序列并没有减少，这部分转录称为衰减子转录物。这种现象是由衰减子造成的，而不是由于阻遏蛋白的作用所致。引导序列由一段 14 氨基酸前导肽编码区和一个衰减子组成，前导肽编码区起始部位有核蛋白体结合位点，AUG 密码子后面紧跟 13 个密码子，第 10、11 为色氨酸密码子。根据序列特点可将整个 mRNA 引导序列分为四区，可形成不同的碱基配对结构；1 区和 2 区互补时，3 区和 4 区可以互补配对，形成的发夹结构及随后出现的 8 个 U 即构成典型的不依赖 ρ 因子终止子；1 区不能与 2 区互补时，2 区即与 3 区互补，3 区不再与 4 区互补。四个区域以何种形式配对则取决于核蛋白体翻译 mRNA 引导序列的速度，后者又受控于色氨酸的水平。色氨酸丰富时，核蛋白体可顺利沿引导序列移动直至达最后一个密码子 UGA，合成完整的引导肽。UGA 位于 1 区和 2 区之间，到达此处的核蛋白体占据 2 区，使 3 区不能与 2 区互补而与 4 区互补，形成终止子发夹结构，RNA 聚合酶停止在衰减子部位。色氨酸缺乏时，核蛋白体因原料缺乏终止在 1 区 Trp 密码子部位，2 区无法与 1 区配对且在 4 区被转录出来之前与 3 区互补，致 4 区处于单链状态，不能形成终止发夹，RNA 聚合酶通过衰减子而继续转录。

4. 真核 mRNA 选择性剪接的方式有哪些？举例说明其基本生物学意义是什么？

答：(1) 选择性剪接的方式有：①外显子遗漏；②3'端剪切位点的变化；③5'端剪切位点的变化；④内含子保留。

(2) 转录后选择性剪接在高等生物细胞的高度异质性中起重要作用。由于选择性剪接的多样化，一个基因在转录后通过 mRNA 前体 (hnRNA) 的剪接加工而产生两个或更多的蛋白质，不同的蛋白可能发挥着不同的生物学效应。

(3) 如 bax 基因的编码产物是与细胞凋亡有关的分子。该基因的原始转录产物经过选择性剪接形成几种 (α 、 β 、 γ 等) 不同类型的蛋白质，其结构上的差异主要源于 mRNA 前体的选择性剪接。

5. 说明乳糖操纵子的结构及其正负性协调调控原理。

答：(1) 编码 β -半乳糖苷酶、半乳糖苷通透酶及硫代半乳糖苷转乙酰基酶三种酶蛋白的结构基因 Z、Y、A，加上调控元件——启动子 (promoter, P) 和操纵基因 (operator, O) 即构成乳糖操纵子。

(2) 有葡萄糖无乳糖时，阻遏蛋白与操纵基因结合，*lac* 结构基因不转录，cAMP 处于低水平，CAP 蛋白不能与启动子附近的 CAP 位点结合；葡萄糖和乳糖均存在时，阻遏蛋白与乳糖结合，空间构象改变，不再与操纵基因结合，cAMP 处于低水平，CAP 蛋白不与 CAP 位点结合，结构基因有少量表达；无葡萄糖有乳糖时，阻遏蛋白不与操纵基因结合，cAMP 处于高水平，形成 cAMP-CAP 复合物并与 CAP 位点结合，结构基因大量表达。

第六章 DNA 损伤与修复

一、名词解释

1. DNA 损伤 (DNA damage)：是由 DNA 分子的自发性损伤、物理因素、化学因素等引起的 DNA 分子结构的变化。这种 DNA 分子水平上的突变是整体遗传突变的基础，归纳为点突变、缺失、插入、倒位或转位及 DNA 断裂五种基本类型。

2. 嘧啶二聚体(pyrimidine dimer)：DNA 链上相邻嘧啶以共价键连成的二聚体，由紫外线照射产生。最常见的是胸腺嘧啶二聚体。

3. DNA 缺失(DNA deletion)：由于 DNA 链上一个或一段核苷酸的丢失。由于一部分遗传物质的丢失，常常造成个体生活力下降以至致死。

4. DNA 插入(DNA insertion)：由于一个或一段外源性核苷酸插入到 DNA 链中引起了基因的编码序列或调控序列的改变，而导致突变。插入可以是自发的(如染色体交换)、感染导致的(如前病毒插入基因组)或人工引起的(如基因工程)。插入引起突变可以是由于改变了基因的编码序列或调控序列所致。

5. DNA 倒位(DNA transposition)：染色体上两个断裂点间的断片，倒转 180° 后又重新连接的一种染色体结构变异。

6. DNA 转位(DNA transposition)：染色体上两个断裂点间的断片，从染色体一处迁移到另一处的一种染色体结构变异。

7. 碱基类似物(base analogues)：一种与 DNA 正常碱基结构类似的化合物如 5-溴尿嘧啶、

5-氟尿嘧啶、2-氨基腺嘌呤。其进入细胞后能替代正常碱基掺入到 DNA 链中而干扰 DNA 复制合成。但是这些类似物易发生互变异构，在复制时改变配对的碱基，于是引起碱基对的突变，属于致癌物质。

8. 碱基烷基化(base alkylation)：烷基化剂是极强的化学诱变剂，其中较常见的包括氮芥、硫芥、乙基甲烷磺酸、乙基乙烷磺酸和环磷酰胺等。烷基化剂将 DNA 链中嘌呤或嘧啶的 N 或 O 原子烷基化即为碱基烷基化，最常见的是鸟嘌呤上第 7 位氮原子和腺嘌呤上的第三位氮原子烷基化。烷基化的嘌呤导致分子电荷分布的变化从而改变碱基配对性质。

9. DNA 修复 (DNA repair)：细胞对内外诱变因素造成的 DNA 损伤和复制过程中发生非标准碱基的掺入，以及碱基错配所造成的 DNA 结构和序列错误的一种纠正功能。所有细胞都具有特定的 DNA 修复功能，以应对经常发生的 DNA 损伤，对生物的生存和维持遗传的稳定性至关重要。在哺乳动物细胞中有四个较为完善的 DNA 修复通路，分别是错配修复、核苷酸切除修复、碱基切除修复、重组修复。

10. 错配修复 (mismatch repair)：一种纠正 DNA 复制过程中错配碱基的机制，可校正 DNA 复制和重组过程中非同源染色体偶尔出现的 DNA 碱基错配，错配的碱基可被错配修复酶识别后进行修复。

11. 直接修复 (direct repair)：直接修复是指细胞在酶的作用下，直接将损伤的 DNA 进行修复。该修复方法不用切断 DNA 或切除碱基。例如细菌 DNA 在紫外线的照射下形成嘧啶二聚体是在光分解酶的作用下直接修复的；另外甲基转移酶将鸟嘌呤和胸腺嘧啶 O 位上的甲基转移给自己，从而达到修复 DNA 的目的。

12. 光复活修复 (Photoreactivation Repair)：光复活修复作用是一种高度专一的 DNA 直接修复过程，它只作用于紫外线引起的 DNA 嘧啶二聚体（主要是 TT，也有少量 CT 和 CC）。它的机制是可见光（有效波长为 400nm 左右）激活了光复活酶，它能分解紫外线照射而形成的嘧啶二聚体。

13. 切除修复 (excision repairing)：切除修复也称核苷酸外切修复，这是一种取代紫外线等辐射物质所造成的损伤部位的暗修复系统。此系统是在几种酶的协同作用下，先在损伤的任一端打开磷酸二酯键，然后外切掉一段寡核苷酸；留下的缺口以其互补链为模板合成正常 DNA 片段，再由连接酶将其连接起来。

14. 碱基切除修复 (base excision repair)：是指切除和替换由内源性化学物作用产生的 DNA 碱基损伤，是切除修复的一种。碱基切除修复能够修复大量的碱基损伤，但受损碱基的移除是由多种酶来完成的。它主要针对 DNA 单链断裂和小的碱基改变，细胞内代谢产生的反

应活性氧造成的氧化性 DNA 损伤也是由碱基切除修复通路修复。

15. 核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair): 核苷酸切除修复主要切除由环境因素作用产生的大的加合物, 是体内识别的 DNA 损伤最多的修复通路, 主要修复可影响碱基配对而扭曲双螺旋结构的 DNA 损伤, 以及可阻断基因转录和复制的 DNA 损伤。核苷酸切除修复系统并不识别任何特殊的碱基损伤, 而是识别 DNA 双螺旋形状的改变。

16. 重组修复 (recombination repair): 当基因复制到含有嘧啶二聚体或其它结构损伤的部位时, 子代 DNA 链中与损伤部位相对应的部位出现缺口, 新合成的子链比未损伤的 DNA 链要短一些。完整的母链与有缺口的子链重组, 缺口由母链来的核苷酸片段弥补。合成重组后, 母链中的缺口通过 DNA 多聚酶的作用, 合成核苷酸片段, 然后由连接酶使新片段与旧链联结, 重组修复完成。重组修复不能完全去除损伤, 损伤的 DNA 段落仍然保留在亲代 DNA 链上, 只是重组修复后合成的 DNA 分子是不带有损伤的, 但经多次复制后, 损伤就被“稀释”了, 在子代细胞中只有一个细胞是带有损伤 DNA 的。

17. AP 位点 (apurinic site): 所有细胞中都带有不同类型、能识别受损碱基的糖苷酶, 又称转葡萄糖基酶。糖苷酶能够特异性切除受损核苷酸上的 N- β -糖苷键, 在 DNA 链上形成去嘌呤或去嘧啶位点, 统称为 AP 位点。

18. 着色性干皮病 (xeroderma pigmentosum, XP): 是一种常染色体隐性遗传病, 是第一个被发现与 DNA 修复缺陷相关的遗传病。该病是由于患者对紫外线照射造成的核苷酸损伤切除修复缺陷所致, 易发生光损伤和日光引发的皮肤癌, 患者皮肤和眼睛对太阳光特别是紫外线十分敏感, 身体曝光部位的皮肤干燥脱屑、色素沉着、容易发生溃疡、皮肤癌发病率高, 常伴有神经系统功能障碍, 智力低下等。

19. 诱变剂 (mutagen): 使基因组发生突变的物理、化学、生物因素叫诱变剂。最常见的诱变剂有碱基类似物、碱基的修饰剂、嵌入染料、紫外线和电离辐射等。

20. SOS 修复 (SOS repair): 一种能够引起误差修复的紧急呼救修复, 是在无模板 DNA 情况下合成酶的诱导修复。正常情况下细胞内不存在跨损伤 DNA 聚合酶, DNA 受损伤而复制又受到抑制情况下才被诱导合成。当 DNA 两条链的损伤邻近时, 损伤不能被切除修复或重组修复, 这时在内切核酸酶、外切核酸酶的作用下造成损伤处的 DNA 链空缺, 再由损伤诱导产生的一整套特殊的 DNA 聚合酶即 SOS 修复酶类, 催化空缺部位 DNA 的合成。SOS 修复的进行避免了死亡, 可是带来了高的变异率。

21. 烷化剂 (alkylating agent): 是一类亲电子的化合物, 很容易与生物大分子的亲核位点起反应, 使 DNA 发生各种类型的损伤。

二、判断题

1. × 2. √ 3. × 4. × 5. √ 6. √ 7. √ 8. √ 9. √ 10. √
11. √ 12. √ 13. × 14. √ 15. √ 16. √ 17. √ 18. √ 19. × 20. ×
21. × 22. √ 23. √ 24. √ 25. √ 26. × 27. √ 28. √ 29. × 30. ×
31. √ 32. √ 33. √ 34. × 35. × 36. √ 37. √ 38. × 39. √ 40. √
41. √ 42. √

三、填空题

1. 转换同型碱基 颠换异型碱基
2. 转换 颠换
3. 点突变 缺失 插入 倒位或转位 DNA 断裂
4. 核苷酸切除修复 碱基切除修复 重组修复 错配修复
5. 核苷酸切除修复 碱基切除修复 重组修复
6. 错配修复
7. 核苷酸切除修复
8. 碱基切除修复
9. 核酸内切酶 DNA 聚合酶 DNA 连接酶
10. 5' GATC 3' A
11. 两个 T 两个 C C 与 T 间 T-T 二聚体
12. 胸腺嘧啶 A G G-C
13. 缺失
14. 倒位
15. 识别损伤部位
16. 解旋双链
17. 形成共价连接的嘧啶二聚体
18. 光分解酶
19. mut S mut H
20. 识别错配的核苷酸 为激活内切核酸酶 Mut H 在错配位点附近切断错配核苷酸所在的一条 DNA 链

21. UvrA UvrB UvrC UvrD

22. 发现损伤造成的变形 DNA 双螺旋 负责解链并募集内切核酸酶 UvrC 在 DNA 损伤部位的两侧切断 DNA 链 作为 DNA 解旋酶去除两切口之间的 DNA 片段

23. 发现 DNA 双螺旋中的变形

四、单项选择题

1.A 2.C 3.B 4.C 5.E 6.D 7.C 8.D 9.D 10.A

11.B 12.D 13.E 14.E 15.B 16.B 17.E 18.B 19.D 20.B

21.D 22.E 23.E 24.E 25.E 26.C 27.E

五、多项选择题

1.AB 2.ABCDE 3.C 4.ABDE 5.BC 6.D 7.BD 8.ABDE 9.ABCD

10.ACDE 11.ACDE 12. ABCD 13. ABCD 14. ABCD 15. ABCE 16. ABCD 17.

ACDE 18. ACDE 19. ACDE 20. BCDE

六、简答题

1. DNA 的损伤原因是什么?

答:DNA 的损伤原因包括三大类:

(1) DNA 分子的自发性损伤:1) DNA 复制产生的误差;2) DNA 的自发性化学变化。

(2) 物理因素引起的 DNA 损伤:1) 紫外线照射引起的 DNA 损伤;2) 电离辐射引起的 DNA 损伤。

(3) 化学因素引起的 DNA 损伤:1) 烷化剂对 DNA 的损伤;2) 碱基类似物、修饰剂对 DNA 的损伤。

2. 简述 DNA 分子的自发性损伤。

答: DNA 分子的自发性损伤包括两大类:(1) DNA 复制产生的误差;(2) DNA 的自发性化学变化包括碱基的异构互变、碱基的脱氨基作用、脱嘌呤与脱嘧啶、碱基修饰与链断裂。

3. 简述物理因素引起的 DNA 损伤。

答: 物理因素引起的 DNA 损伤有:(1)紫外线照射引起的 DNA 损伤。当 DNA 受到最易被其吸

收波长（~260nm）的紫外线照射时，同一条 DNA 链上相邻的嘧啶以共价键连成二聚体，相邻的两个 T、或两个 C、或 C 与 T 间都可以环丁基环连成二聚体，其中最容易形成的是 T-T 二聚体。（2）电离辐射引起的 DNA 损伤：有直接和间接的效应，直接效应是 DNA 直接吸收射线能量而遭损伤；间接效应是指 DNA 周围其他分子吸收射线能量而产生具有很高反应活性的自由基，进而损伤 DNA。

4. 简述电离辐射可导致的 DNA 分子变化。

答：电离辐射可导致 DNA 分子的多种变化（1）碱基变化：主要是由-OH 自由基引起，包括 DNA 链上的碱基氧化修饰、过氧化物的形成、碱基环的破坏和脱落，一般嘧啶比嘌呤更敏感。

（2）脱氧核糖变化：脱氧核糖上的每个碳原子和羟基上的氢都能与-OH 反应，导致脱氧核糖分解，最后引起 DNA 链断裂。（3）DNA 链断裂：这是电离辐射引起的严重损伤事件，断裂数随照射剂量而增加。射线的直接和间接作用都可能使脱氧核糖破坏或磷酸二酯键断开而致 DNA 链断裂。（4）交联：包括 DNA 链交联和 DNA-蛋白质交联。

5. 简述哺乳动物中 DNA 损伤的修复类型。

答：对不同的 DNA 损伤，细胞可以有不同的修复反应。目前，已在哺乳动物细胞中发现了四个较为完善的 DNA 修复通路，分别是核苷酸切除修复（nucleotide-excision repair, NER）、碱基切除修复（base-excision repair, BER）、重组修复（recombination repair）和错配修复（mismatch repair）

6. 简述 *E. coli* 错配修复机制。

答：在 *E. coli* 中，错配修复蛋白 MutS 二聚体沿着 DNA 运动，能够发现 DNA 骨架因非互补碱基对之间的不对称而产生的变形，从而识别错配核苷酸。MutS 在错配位点夹住 DNA，利用 ATP 水解释放的能量使 DNA 形成扭结，MutS 自身构象也发生改变。随后，MutS-错配 DNA 复合物募集该修复系统的第二种蛋白因子 MutL，MutL 再激活内切核酸酶 MutH，在错配位点附近切断错配核苷酸所在的一条 DNA 链，在解旋酶 UvrD 和外切核酸酶作用下，将包括错配核苷酸在内的一条单链 DNA 去除，所产生的单链 DNA 缺口由 DNA 聚合酶 III 填补，DNA 连接酶封口，完成错配修复。

7. 以人为例，简述碱基切除修复机制。

答：在人细胞核中已经发现八种 DNA 糖苷酶，他们参与碱基切除修复，具有损伤特异性，通常嘧啶的氧化损伤由 hNTH1、hNEIL1 或 hNEIL2 移除，而嘌呤的氧化损伤由 hOGG1 移除。特异识别的异常碱基包括：胞嘧啶脱氨基产生的尿嘧啶、氧化的鸟嘌呤。脱氨基的腺嘌呤、开环碱基以及碳原子之间双键变成单键的碱基等。

APE-1 是 DNA 碱基切除修复途径中的一种多功能蛋白酶，首先从 HeLa 细胞核内提取出来，后研究发现 APE-1 广泛存在于多种真核细胞内。APE-1 蛋白酶的作用是修复 AP 位点，它从 AP 位点的 5' 端切开，再去除无碱基的残基，然后由 β -多聚酶及连接酶插入一个新合成的碱基，完成修复过程。

近来发现，在碱基切除修复途径中还存在 APE-1 非依赖的修复机制，多聚核苷酸激酶与 DNA 聚合酶 β 、连接酶 III α 和 NEIL1 共同作用，进行碱基切除修复。

X 射线修复交叉互补基团 1 是参与碱基切除修复的另一种蛋白，和 hOGG1、DNA 聚合酶 β 、连接酶 III 相互作用，共同参与碱基切除修复。

8. 简述 *E. coli* 核苷酸切除修复机制。

答：*E. coli* 的核苷酸切除修复主要由四种蛋白组成：UvrA、UvrB、UvrC、UvrD。两个 UvrA 分子和一个 UvrB 分子组成复合物结合于 DNA，并消耗 ATP 沿着 DNA 链移动，UvrA 能够发现损伤造成的 DNA 双螺旋变形，由 UvrB 负责解链，在损伤部位形成单链区，并使之弯曲约 130° ，接着 UvrB 募集内切核酸酶 UvrC，在损伤部位的两侧切断 DNA 链，其中一个切点位于损伤部位 5' 侧八个核苷酸处，而另一个切点位于 3' 侧四或五个核苷酸处。然后，DNA 解旋酶 UvrD 去除两切口之间的 DNA 片段，由 DNA 聚合酶和连接酶填补缺口。

9. 简述人类核苷酸切除修复机制。

答：高等真核生物的核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER) 工作原理与 *E. coli* 大体相同，但该系统更为复杂，参与核苷酸切除修复的多肽链达 25 个以上。人 XPC 蛋白负责发现 DNA 双螺旋中的变形，其功能相当于 *E. coli* 中的 UvrA；人 XPB 和 XPD 蛋白具有解旋酶活性，其功能相当于 *E. coli* 中的 UvrB；核酸酶 ERCC1-XPF 切割损伤部位 5' 侧，XPG 切割 3' 侧，其功能相当于 UvrC。高等生物 NER 切割单链 DNA 片段程度为 24~32 个核苷酸。这一片段被释放后，产生的缺口由 DNA 聚合酶和连接酶填补。NER 不仅能够修复整个基因组的损伤，而且能够拯救因转录模板链损伤而暂停转录的 RNA 聚合酶，即转录偶联修复。在这一过程中，NER 蛋白被募集于暂停的 RNA 聚合酶。

10. 简述人全基因组与转录偶联核苷酸切除修复过程中的异同点。

答：人全基因组与转录偶联核苷酸切除修复的基本过程相同，即都有发现错误，解链并募集内切核酸酶，切割损伤部位，解旋去除损伤位点，DNA 聚合酶和连接酶填补缺口。

转录偶联与全基因组核苷酸切除修复的不同点在于 NER 蛋白被募集于暂停的 RNA 聚合酶，并且转录偶联修复的核心 TF II H 分别参与了两个独立过程：一是在核苷酸切除修复时起 DNA 解旋酶的作用；二是在转录过程中打开 DNA 模板。

11. 简述大肠杆菌重组修复机制。

答: *E. coli* 的 *rec* 基因编码的几种酶 (*recA*、*recB*、*recC* 和 *recD*) 参与重组修复。*recB*、*recC*、*recD* 酶复合物兼有解旋酶和核酸酶活性, 它利用 ATP 水解提供能量沿着 DNA 移动。其中, *recB* 和 *recD* 是两种解旋酶, *recB* 沿 DNA 链 5' 端解旋, 运动速度较慢; 而 *recD* 沿 DNA 链 3' 端解旋, 运动速度较快, 导致单链 DNA 环状结构逐渐累积。当 *recB*、*recC*、*recD* 遇到 *chi* 序列 5' -GCTGGTCC-3' 时, 它就在附近将单链 DNA 切断, 从而使 DNA 重组成为可能。

E. coli 的 *recA* 蛋白在 DNA 重组中起关键作用。*recA* 蛋白紧紧结合于单链 DNA, 每圈结合六个 *recA* 分子。DNA 单链区产生于 *recB*、*recC*、*recD* 酶的作用或 DNA 缺口。*recA* 蛋白结合 DNA 具有正协同效应。*E. coli* 的 *RuvA* 蛋白识别 Holliday 结构连接处, 而 *RuvB* 蛋白具有解旋酶和 ATPase 活性, 能驱动分支移动。最后由内切核酸酶 *RuvC* 特异识别 Holliday 结构中的 ATTG 序列并切割 DNA, 使 Holliday 结构分离, 从而完成 DNA 重组。

12. 人 DNA 双链断裂后的修复机制。

答: 对于 DNA 双链断裂损伤, 细胞必须利用双链断裂修复, 即重组修复, 重组修复分为同源重组 (homologous recombination, HR) 和非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ)。DNA 双链断裂后, 细胞中存在姐妹染色体时, 则通过同源重组的方式进行修复, 如细胞中不存在姐妹染色体时, 则通过非同源末端连接的方式进行修复。

同源重组的修复机制如下:

DNA 断裂末端被 MRE11-Rad50-NBS1 结合形成复合体, 然后断裂末端 5' 端被复合体中的 MRE11 剪去, 留下一个伸出的 3' 端单链, 这个单链与 RAD52 结合。RAD52 是一个大分子七聚体, 保护伸出的 DNA 末端不会被降解。RAD52 环后面的单链 DNA 被 RAD51 结合形成核蛋白细丝 (nucleoprotein filament), 它能够进行链的交换。RAD51 核蛋白细丝是一个松散的螺旋结构, 它能够使受损 DNA 链更容易进入另一个染色质上的同源 DNA 双链。未受到损伤的 DNA 单链与受损的 DNA 单链形成异源双链核酸分子, 然后通过分枝迁移 (branch migration) 进行延伸, 替代原来的互补链, 最终, 被替换的链被内切核酸酶切断, 供体链与受体链 5' 端相连接。第 2 个损伤链可以由二次重组来进行修复, 也可以由被替换的受体链为模板, 合成新的互补链。

非同源末端连接的修复机制如下:

Ku70/Ku80 异二聚体形成空环结合在受损 DNA 末端, 然后将 DNA-PKcs 募集过来, DNA-PKcs 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。DNA-PKcs 和核酸酶 Artemis 形成复合物, DNA-PKcs 使 Artemis 磷酸化, 激活 Artemis 5' 到 3' 的核酸外切酶活性, 切割断裂处的 DNA, 产生互补的末端, DNA-PKcs 将两断端聚集在一起, XRCC4 类似因子 (XLF) 与 XRCC4、连接

酶IV同时形成复合物，最后由 XRCC4-连接酶IV催化断裂 DNA 连接。

13. 简述 SOS 修复机制。

答：在 DNA 受到严重损伤时，SOS 应答能够诱导合成很多参与 DNA 损伤修复的酶和蛋白质。SOS 应答十分迅速，在 DNA 损伤发生后几分钟内就可出现。转录阻遏蛋白 LexA 抑制若干编码参与 SOS 应答的蛋白质基因的表达，具有潜在的蛋白水解酶活性，E. coli 的 DNA 损伤产生的单链 DNA 诱导 recA 蛋白水平提高近 50 倍，而 recA 蛋白能激活 LexA 自我蛋白酶解，导致至少 15 个参与 SOS 应答的损伤修复蛋白基因解除阻遏状态而表达。recA 激活的靶蛋白断裂位点是位于多肽链中央的二肽 Ala-Gly。E. coli 的 recA 蛋白有双重功能，一是在 DNA 重组过程中具有 DNA 链交换活性；二是具有蛋白水解酶激活活性。当 DNA 两条链的损伤邻近时，损伤不能被切除或重组修复，这时在内切核酸酶、外切核酸酶的作用下造成损伤处的 DNA 链空缺，再由损伤诱导产生的一整套特殊 DNA 聚合酶即 SOS 修复酶类，催化空缺部位 DNA 的合成，这时补上去的核苷酸几乎是随机的，但仍然保持了 DNA 双链的完整性，使细胞得以生存。这种修复带给细胞很高的突变率。

七、论述题

1. 试述 DNA 损伤和修复的几种类型。

答：外源性化学物导致的 DNA 损伤主要经核苷酸修复、碱基切除修复和重组修复机制进行修复；DNA 复制和重组过程中所发生的碱基错配以错配修复为主。核苷酸切除修复是体内识别 DNA 损伤种类最多的修复通路，主要修复可影响碱基配对而扭曲双螺旋结构的 DNA 损伤，如苯并芘、紫外线对 DNA 的损伤，并可阻断基因转录和复制的 DNA 损伤。碱基切除修复主要针对 DNA 单链断裂和小的碱基改变，细胞内代谢产生的活性氧造成的氧化性 DNA 损伤也由碱基切除修复通路修复。核苷酸切除修复和碱基切除修复通路修复的 DNA 只涉及 DNA 双螺旋中的一条链，通过“切-补”模式，DNA 损伤（包括损伤 DNA 靶位点周围的几个核苷酸）被切除，形成的单链缺口以完整无误的互补链为模板填补。核苷酸切除修复和碱基切除修复通路均为无错修复通路。

双链DNA断裂主要来源于电离辐射或X射线照射、双功能基烷化剂处理以及单链DNA损伤的修复过程。双链DNA断裂是较难修复的一类DNA损伤。细胞中有两个不同的机制来修复双链DNA损伤，即同源重组和末端连接。同源重组主要发生于已完成DNA复制的S期和G₂期，另一条姐妹染色单体可提供断裂两端双链DNA的连锁关系；而G₁期的双链DNA断裂主要通过准确性较差的末端连接修复机制修复，该通路保真性较差，易导致突变。

DNA 损伤因素	DNA 损伤类型	修复机制
X 射线、氧自由基、烷化剂自 发脱碱基	单链断裂、无碱基位点、氧化 性碱基尿嘧啶	碱基切除修复

紫外线和多环芳烃	环丁烷嘧啶二聚体等大的紫外线光产物和稳定的多环芳烃化合物等大分子 DNA 加合物	核苷酸切除修复
抗癌药	双链断裂和链间交联	双链断裂修复
复制错误和烷化剂	碱基错配和缺失	错配修复

2. 试述紫外线照射后引起人的 DNA 损伤及修复机制。

答：当 DNA 受到最易被其吸收波长（~260nm）的紫外线照射时，同一条 DNA 链上相邻的嘧啶以共价键连成二聚体，相邻的两个 T、或两个 C、或 C 与 T 间都可以环丁基环连成二聚体，其中最容易形成的是 T-T 二聚体。

核苷酸切除修复系统（nucleotide excision repair, NER）通过识别 DNA 双螺旋形状的改变来识别紫外线照射产生的胸腺嘧啶二聚体以及其他嘧啶二聚体造成的变形。NER 在进行修复的时候，是切除含有损伤碱基的那一段 DNA，而不是仅仅切除受损的碱基。这一复杂过程需要大量蛋白质参与。

核苷酸切除修复有两条不同系统，一是 GG-NER（global genome-NER），能在基因组任何部位移除受损 DNA；二是 TC-NER（transcription-coupled NER），即转录偶联修复。多酶复合物 XPC/HHR23B 或 RNA 聚合酶/CSA/CSB 复合物识别受损 DNA，接着由 RPA、XPA 和 XPB/XPD 解旋酶打开受损 DNA 周围，有利于内切核酸酶 ERCC1/XPE 和 XPG 在损伤位点两侧切割 DNA 单链，去除包括损伤部位在内的单链 DNA 短片段，然后由 DNA 聚合酶和连接酶利用未损伤的 DNA 为模板修补缺口，从而恢复正常序列。

第七章 基因结构与表达分析的基本策略

一、名词解释

1. Southern 印迹杂交（Southern blot hybridization）：是利用琼脂糖凝胶电泳分离经限制性内切酶消化的 DNA 片段，将胶上的 DNA 变性并在原位将单链 DNA 片段转移至尼龙膜或其他固相支持物上，经干烤或者紫外线照射固定，再与其互补的标记探针进行杂交，用放射自显影或酶反应显色，从而检测特定 DNA 分子的技术。因为该技术由 Southern 于 1975 年创建，所以称为 Southern 印迹杂交技术。

2. Northern 印迹杂交 (Northern blot hybridization): 指将 RNA 变性及电泳分离后, 将其转移到固相支持物上, 再与其互补的标记探针进行杂交, 用放射自显影或酶反应显色, 从而检测特定 RNA 分子的量与大小。因该技术与 DNA 印迹技术相对应, 故被称为 Northern 印迹杂交。
3. Western 免疫印迹 (Western blot): 是将蛋白质经聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到膜上, 然后和相应抗体杂交对目的蛋白进行检测的一种技术。其被检测物是蛋白质, “探针”是抗体, “显色”用标记的二抗。为了与 DNA 印迹和 RNA 印迹命名统一, 故被叫做 Western 免疫印迹。
4. 斑点杂交 (dot blot hybridization): 是将样品点在支持膜上进行分子杂交的技术。如将核酸点在能与核酸结合的膜 (如硝酸纤维素膜、尼龙膜、聚偏氟乙烯膜等) 上, 经处理 (如 80℃ 烘烤、紫外光照等) 使核酸固定在膜上, 然后与标记探针进行分子杂交, 用放射自显影或非放射性显色检测。可作定性或半定量分析。
5. 原位杂交 (*in situ* hybridization): 是指将特定标记的已知序列核酸为探针与细胞或组织切片中核酸进行杂交, 从而对特定核酸序列进行精确定量定位的过程。原位杂交可以在细胞标本或组织标本上进行。
6. 液相杂交 (solution hybridization): 即在溶液中进行互补核酸链的反应。标记的探针与待测样品存在于同一溶液体系中, 即杂交反应在一均匀的液相中进行, 互补的碱基序列彼此配对形成杂交分子, 杂交反应完成后, 以含变性剂 (通常为尿素) 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并进行信号显示。
7. 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, 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, 具有特异性强、灵敏度高、操作简便、省时等特点。
8. 退火 (annealing): 是指 DNA 热变性后, 将温度缓慢冷却, 并维持在比 T_m 低 25℃~30℃ 左右时, 变性后的单链 DNA 即可恢复双螺旋结构, 这一过程称之为退火。
9. 引物 (primer): 是人工合成的一小段单链 DNA 或 RNA 序列, 作为 DNA 复制的起始点, 在核酸合成反应时, 作为每个多核苷酸链进行延伸的出发点而起作用, 在引物的 3'-OH 上, 核苷酸以二酯链形式进行合成, 因此引物的 3'-OH, 必须是游离的。
10. 简并引物 (degenerate primer): 是针对某一基因编码蛋白的氨基酸区域设计的一组碱基序列不同但有相同碱基数的寡核苷酸混合物。
11. 逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR): 又称为逆转录 PCR, 它是扩增 mRNA

的一种实验技术。先将 mRNA 反转录合成 cDNA，再以此 cDNA 为模板进行 PCR 反应扩增。

12. 半定量反转录 PCR (semi-quantitative reverse transcription PCR, SqRT-PCR): 是近年来常用的一种简捷、特异的定量 RNA 测定方法, 通过 mRNA 反转录成 cDNA, 再进行 PCR 扩增, 并测定 PCR 产物的数量, 可以推测样品中特异 mRNA 的相对数量。以半定量 RT-PCR 为基础建立起来的 mRNA 含量测定技术, 较含内标化的 RT-PCR 定量测定的 mRNA 的方法更为简便可行。
13. 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent PCR): 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。
14. 荧光定量 PCR (fluorescent quantitative PCR, FQ-PCR): 是通过荧光染料或荧光标记的特异性的探针, 对 PCR 产物进行标记跟踪, 实时在线监控反应过程, 结合相应的软件可以对产物进行分析, 计算待测样品模板的初始浓度。
15. 分子信标探针 (molecular beacon probe): 是指是一个发夹样结构的特异探针, 其环状部分与靶序列互补。在室温时, 分子信标的发夹紧闭, 荧光淬灭; PCR 扩增时, 随着温度升高, 发夹松开, 与单链模板特异结合, 发出荧光; 荧光强度与模板呈正比, 故可用于 PCR 产物的定性及定量分析。
16. 反向 PCR (inverse PCR): 是对已知 DNA 片段两侧的未知序列进行扩增和研究的一种简捷方法。其原理是: 用限制性内切酶 A 消化 DNA 片段, 然后用连接酶将酶切产物连接成环状, 再用已知序列上两端相反方向的引物进行 PCR 扩增。
17. 巢式 PCR (nested PCR): 是一种变异的聚合酶链反应 (PCR), 使用两对 (而非一对) PCR 引物扩增完整的片段。第一对 PCR 引物扩增片段和普通 PCR 相似。第二对引物称为巢式引物 (因为他们在第一次 PCR 扩增片段的内部) 结合在第一次 PCR 产物内部, 使得第二次 PCR 扩增片段短于第一次扩增。巢式 PCR 的好处在于, 如果第一次扩增产生了错误片段, 则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低。因此, 巢式 PCR 的扩增非常特异。
18. 不对称 PCR (asymmetric PCR): 是用不等量的一对引物, PCR 扩增后产生大量的单链 DNA (SSDNA)。这对引物分别称为非限制引物与限制性引物, 其比例一般为 50~100:1, 在 PCR 反应的最初 10~15 个循环中, 其扩增产物主要是双链 DNA, 但当限制性引物 (低浓度引物) 消耗完后, 非限制性引物 (高浓度引物) 引导的 PCR 就会产生大量的单链

DNA。因 PCR 反应中使用的二种引物浓度不同，因此称为不对称 PCR。

19. 原位 PCR (*in situ* PCR): 是 Hasse 等于 1990 年建立的技术, 是指直接用细胞涂片或石蜡包埋组织切片在单个细胞中进行 PCR 扩增, 然后用特异探针进行原位杂交检测含该特异序列的细胞的一种方法。
20. 多重 PCR (multiple PCR): 又称多重引物 PCR 或复合 PCR, 它是在同一 PCR 反应体系里加上二对以上引物, 同时扩增出多个核酸片段。根据不同长度序列的存在与否, 检测是否有某些基因片段的缺失或突变的 PCR 反应, 其反应原理、反应试剂和操作过程与一般 PCR 相同。主要用于多种病原微生物的同时检测或鉴定和病原微生物、某些遗传病及癌基因的分型鉴定。
21. Alu-PCR: 是利用哺乳动物基因组中包含许多短的重复 DNA 序列的特点, 其中散布于基因组 DNA 中的 Alu 序列是人类基因组中主要的重复序列, 其拷贝数约为 900 000。利用 Alu 高度保守区序列设计引物, 扩增未知 DNA 片段的方法称 Alu-PCR。
22. 通用引物 (universal primer): 是指与克隆载体上多克隆位点外侧一段序列互补的寡核苷酸。因为任何待测序的 DNA 片段插入多克隆位点, 都可以用该段寡核苷酸作引物来引发测序反应。所以称之为通用引物。
23. 抑制性消减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH): 是一种鉴定、分离组织细胞中选择性表达基因的技术, 其原理是以抑制性多聚酶链反应 (PCR) 反应为基础的 cDNA 消减杂交技术。通过合成两个不同的接头, 连接于测试 cDNA 片段的 5'末端, 达到选择性扩增差异性表达的 cDNA 片段, 抑制非目的 cDNA 的扩增。该技术是 Diatchenko 等 1996 年在抑制性 PCR 的基础上建立起来的 cDNA 消减杂交方法, 它克服了 DD 法的假阳性较高和 RDA 法消减杂交轮次较多的缺点, 十分适用于克隆分析造成某种特殊表型的目的基因及其功能。
24. DNA 微阵列 (DNA microarray): 又称为 DNA 阵列或 DNA 芯片, 是不同的 DNA 或 RNA 与点在固相支持物上的同一探针进行杂交。通过比较两个阵列所有对应点的杂交信号的强度, 可以同时检测数千个基因表达的改变。
25. 平台效应 (plateau effect): PCR 扩增反应经过一定数量的循环后, 随着产物的对数累积趋于饱和, DNA 片段不再呈指数积累, 而是进入线性增长期或静止期, 此过程称为平台效应。
26. 双脱氧核苷酸末端终止法 (dideoxynucleotide chain termination method): 在 DNA 合成反应体系中, 除含有正常脱氧核苷三磷酸底物外, 还加入少量的双脱氧核苷三磷酸 (ddNTPs)

特殊底物，由于这种底物的 5'-磷酸基团是正常的，能够替代相对应的脱氧核苷三磷酸而与引物延伸链的 3'羟基连接，进入部分新合成链；但由于这种特殊底物不存在 3'羟基末端，故下一个核苷酸底物不能通过 5'-磷酸基团与之形成 3',5'-磷酸二酯键，从而导致 DNA 新链的延伸提前终止于这一“异常”核苷酸处，而掺入的双脱氧核苷三磷酸则位于 DNA 延伸链的最末端。

27. *Taq* DNA 聚合酶 (*Taq* DNA polymerase): 是从嗜热水生菌 *Thermus aquaticus* YT-1 株中直接分离出来的一种耐热 DNA 聚合酶，可在 74℃复制 DNA，在 95℃仍具有酶活力。该酶可在离体条件下，以 DNA 为模板，延伸引物，合成双链 DNA。这个酶只有 5'→3'DNA 聚合酶活性和 5'→3'的外切酶活性，缺少 3'→5'的外切酶活性。
28. 基因芯片 (gene chip): 指固定有寡核苷酸、基因组 DNA 或 cDNA 等的生物芯片。利用这类芯片与标记的生物样品进行杂交，可对样品的基因表达谱生物信息进行快速定性和定量分析。
29. DNA 变性 (DNA denaturation): 是指核酸双螺旋碱基对的氢键断裂，双链变成单链，从而使核酸的天然构象和性质发生改变。变性时维持双螺旋稳定性的氢键断裂，碱基间的堆积力遭到破坏，但不涉及到其一级结构的改变。凡能破坏双螺旋稳定性的因素，如加热、极端的 pH、有机试剂甲醇、乙醇、尿素及甲酰胺等，均可引起核酸分子变性。
30. 寡核苷酸探针 (oligonucleotide probe): 是一段与目的基因或 DNA 互补的特异核苷酸序列，它可以包括整个基因，也可以仅仅是基因的一部分；可以是 DNA 本身，也可以是由之转录而来的 RNA。
31. 模板 (template): 是其结构作为另一个分子合成的模型或依据的分子。如转录合成 RNA 时所依赖的模板 DNA，聚合酶链反应扩增时与引物序列互补的模板 DNA，指导蛋白质合成的模板 RNA—信使核糖核酸等。
32. 核酸酶 S1 保护分析法 (nuclease S1 protection assay): 是单链 DNA 探针与待测 RNA 形成 DNA/RNA 杂交双链，加入核酸酶 S1 专一性地降解未形成杂交体的 DNA 或 RNA 单链，DNA/RNA 杂交双链则受到保护而不被降解的技术。
33. RNA 酶保护分析法 (RNase protection assay, RPA): 此法的原理与核酸酶 S1 保护分析法基本相同，只是所采用的探针为单链 RNA 探针，杂交后形成 RNA/RNA 双链。RNA 酶 A 和 RNA 酶 T1 专一性降解单链 RNA，双链 RNA 则不被降解。此法的灵敏度较之核酸酶 S1 保护分析法还要高出数倍。此法可用于 RNA 定量、RNA 末端定位及确定内含子在相应基因中的位置。

34. 抗体 (antibody): 指机体的免疫系统在抗原刺激下, 由 B 淋巴细胞或记忆细胞增殖分化成的浆细胞所产生的、可与相应抗原发生特异性结合的免疫球蛋白。主要分布在血清中, 也分布于组织液及外分泌液中, 可用于 Western blot 等检测。
35. 测序酶 (sequenase): 是修饰了的 T7 DNA 聚合酶, 是采用缺失的方法, 从外切核酸酶结构域中除去 28 个氨基酸, 这样使 T7 DNA 聚合酶完全失去了 3'→5' 的外切核酸酶活性, 只有 5'→3' 聚合酶的活性, 而且聚合能力提高了 3~9 倍, 测序时常 used 此酶, 所以被叫做测序酶。
36. 内参基因 (reference gene): 内参即是内部参照, 它们在各组织和细胞中的表达相对恒定, 在检测基因的表达水平变化时常用它来做参照物。所以叫内参基因。其作用是校正上样量、上样过程中存在的实验误差, 保证实验结果的准确性。借助检测每个样品内参的量就可以用于校正上样误差, 这样半定量的结果才更为可信。一般要选择一个在处理因素作用的条件下不会发生表达改变的基因作内参。常用的内参基因包括 GAPDH、 β -actin、18 sRNA、28sRNA、B2M、ACTB、SDHA、HPRT1、ARBP 内参基因等。
37. TaqMan 探针 (TaqMan probe): 是一种寡核苷酸探针, 荧光基团连接在探针的 5' 末端, 而淬灭剂则在 3' 末端。PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针, 探针完整时, 报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收; PCR 扩增时, Taq 酶的 5'→3' 外切酶活性将探针酶切降解, 使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离, 从而荧光监测系统可接收到荧光信号, 即每扩增一条 DNA 链, 就有一个荧光分子形成, 实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。
38. 狭缝杂交 (slot blot): 是在用于检测生物分子的分子生物学技术。它代表了一种简化的 Northern 杂交, Southern 杂交, 免疫印迹方法。被检测的生物分子在一个斑点杂交不先通过色谱分离。相反, 被检测到含有分子混合物直接应用于膜作为一个点上。随后是由任一核苷酸探针 (为 Northern 杂交和 Southern 杂交) 或抗体为免疫印迹检测。
39. 反向斑点杂交 (reverse dot blot): 是将 ASO 探针固定在尼龙膜上, 用扩增的 DNA 样品与膜上探针杂交。由于 ASO 探针长度有限 (一般为 15~20 个碱基), 为使探针序列不受固定过程的影响, 当 ASO 合成后, 用末端转移酶在其 3' 端加上一段多聚核苷酸 (dT) 尾 (一般为 400 个左右), 这种带尾的 ASO 点在膜上后, 经紫外光照射, 其多聚 dT 即可与尼龙膜表面的氨基发生作用而结合在膜条上。因点杂交技术是将扩增的 DNA 样品固定在尼龙膜上, 探针游离, 而此技术与之相反, 所以着这技术叫做反向打点杂交技术。
40. cDNA 末端快速扩增技术 (rapid-amplification of cDNA ends, RACE): 是通过 PCR 进行

cDNA 末端快速克隆的技术。是一种基于 mRNA 反转录和 PCR 技术建立起来的、一部分的一直区域为起点，扩增基因转录本的未知区域，从而获得 mRNA (cDNA) 完整序列的方法。简言之就是从低丰度的转录本中快速增长 cDNA5'和 cDNA3'末端，进而获得全长 cDNA 的简单有效的方法。该方法具有快捷、方便、高效等优点，可同时获得多个转录本。

41. Ct 值 (Threshold Cycle, Ct): 表示实时定量 PCR 反应中每个 PCR 反应管内荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。研究表明，各模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系，起始拷贝数越多，Ct 值越小，反之亦然。

二、判断题

1. × 2. × 3. × 4. √ 5. √ 6. × 7. × 8. √ 9. × 10. √
11. √ 12. √ 13. × 14. × 15. × 16. √ 17. √ 18. × 19. × 20. √
21. × 22. √ 23. × 24. √ 25. × 26. × 27. × 28. √ 29. × 30. ×

三、填空题

1. Watson Crick 1953
2. 单链寡核苷酸 DNA RNA 片段
3. 聚合酶链式反应 Polymerase Chain Reaction 变性 退火 延伸
4. 切除在第二链合成时形成的发夹环
5. 核酸分子杂交 PCR SSCP (PCR-SSCP) 限制酶酶谱分析 DNA 序列测定
DNA 芯片技术
6. 寡核苷酸探针 双链探针 单链探针
7. 生物素 地高辛 荧光素 缺口平移法 随机引物法 末端标记法 T4 DNA 聚合酶标记法
8. 液相杂交 固相杂交 膜上印迹杂交 细胞原位杂交
9. Southern 印迹杂交 Northern 印迹法 斑点印迹杂交 Western 免疫印迹法
10. 耐热 5'→3'DNA 聚合酶活性 5'→3'外切酶 3'→5'外切酶活性
11. 聚合酶链式反应 (PCR)
12. DNA 探针 RNA 探针 基因组 DNA cDNA
13. 用 M13 噬菌体载体合成单链 DNA 探针 从 mRNA 反转录合成单链 cDNA 探针 用不对称 PCR 合成单链 DNA 探针

14. Northern 印迹

15. Southern 印迹

16. (1) 印迹的对象不同, Northern 是 RNA, Southern 是 DNA (2) 电泳条件不同, 前者是变性条件, 后者是非变性条件。

四、单项选择题

1.A 2.E 3.C 4.A 5.B 6.B 7.C 8.E 9.B 10.D 11.E 12.B 13.C 14.B 15.D 16.D
17.B 18.A 19.D 20.C 21.A 22.A 23.B 24.D 25.E 26. B 27.D 28.D 29.E
30.A

五、多项选择题

1. ACDE 2. AE 3. ACE 4. BE 5. BDE 6. ACD 7. ACE 8. AC 9. ABCDE 10. BCD 11. ABCE
12. ABCDE 13. ABC 14. ABCDE 15. CD 16. CD 17. ACE 18. ABCDE 19. ABCDE 20. ACDE

六、简答题

1. 简述 Sanger DNA 测序法的原理。

答: Sanger DNA 测序法是建立在两个基本原理之上: (1) 核酸是依赖于模板在聚合酶的作用下由 5'端向 3'端聚合; (2) 可延伸的引物必须能提供游离的 3'羟基末端, 双脱氧核苷酸由于缺少游离的 3'羟基末端, 因此会终止聚合反应的进行。如果分别用 4 种双脱氧核苷酸终止反应, 则会获得 4 组长短不同的 DNA 片段。通过比较所有 DNA 片段的长度可以得知核苷酸的序列。

2. 何谓 PCR? 试述 PCR 技术的基本原理和影响因素。

答: PCR 是一种体外酶促扩增特异 DNA 片段的技术, 其原理类似 DNA 的体内扩增。它包括: PCR 包括三个基本过程: ①变性 (denaturation), 即在较高温度 (93℃~98℃) 使双链模板 DNA 变性解链成单链 DNA, 以提供复制的模板; ②退火 (annealing), 即在较低温度 (37℃~65℃) 使加入的引物与待扩增 DNA 区域特异性地结合, 以提供 DNA 复制起始的 3' —OH; ③延伸 (extension), 即在适当的温度 (70℃~75℃) 下, DNA 聚合酶从特异性结合到 DNA 模板上的引物 3' -OH 端开始, 根据碱基互补配对原则, 按照待扩增区域的核苷酸序列, 进行 DNA 链的延伸, 即合成新的 DNA 分子。这三个过程组成一个循环周期; 每个周期合成的产物又可作为下一个周期的模板, 如此循环往复, 经过 n 轮循环后, 靶 DNA 的拷贝数理论上呈 2^n 增长。影响 PCR 反应的因素主要有: 引物、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、模板和 Mg^{2+} 离子, 此外, pH、温度、循环次数也会影响 PCR 反应。

3. 为什么在 DNA 中通常只发现 A: T 和 C: G 碱基配对?

答: 因为 (1) C: A 配对过于庞大而不能存在于双螺旋中; G: T 碱基对则太小, 核苷酸间

的空隙太大无法形成氢键。(2) A 和 T 通常有两个氢键, 而 C 和 G 有三个。正常情况下, 可形成两个氢键的碱基不能与可形成三个氢键的碱基配对。

4. PCR 的基本原理是什么?用 PCR 扩增某一基因, 必须预先得到什么样的信息?

答: PCR 是根据 DNA 半保留复制的原理, 在体外进行 DNA 的变性、复性和引物延伸。用 PCR 扩增某一基因至少要预先知道足够合成一对引物的靶 DNA 序列。

5. 切口平移 (nick translation) 标记探针的主要步骤有哪些?

答: (1) DNase I 造成切口; (2) DNA 聚合酶 III 的 5'→3'外切核酸酶进行切割; (3) DNA 聚合酶 III 的 5'→3'合成酶进行修补; (4) 在修补过程中, 随着切口 (nick) 的移动, 将放射性的底物掺入到双链 DNA 中。

6. 什么是 Western 免疫印迹?它与 Southern 印迹有什么不同?

答: Western 免疫印迹是将蛋白质经电泳分离后从凝胶中转移到固相支持物上, 然后用特异性的抗体进行检测。它与 Southern 的不同在于探针的性质不同, 在 Western 免疫印迹中使用的探针是抗体 (蛋白质)。

7. 什么是随机引物 (random primer)?如何标记 DNA?

答: 随机引物是人工合成的长度为 6 个核苷酸的寡聚核苷酸片段群体, 含有各种可能的排列顺序 ($4^6=4096$); 或是用 DNase 处理小牛胸腺 DNA 后获得的 6~12 个碱基的片段。将待标记的 DNA 片段同随机引物一起进行杂交, 并以杂交体上的寡聚核苷酸为引物, 在 Klenow 酶的作用下合成互补 DNA 链, 当反应底物中有放射性的 dNTP 时, 新合成的 DNA 就带上了标记。

8. 什么是印迹 (blotting) 杂交?

答: 通过一定的物理学方法将 DNA、RNA 或蛋白质从凝胶上转移到固体支持物, 然后同液体中的探针 (抗体) 进行杂交, 以检测特异 DNA、RNA 或蛋白质的一种方法。因为 DNA、RNA 或蛋白质从凝胶向滤膜转移的过程称为印迹, 故此将这种杂交称为印迹杂交。

9. 什么是原位菌落杂交 (colony hybridization)?

答: 原位菌落杂交是根据微孔滤膜杂交和原位杂交的原理而改良的一种筛选重组体的一种核酸杂交方法。它是将生长在或影印在微孔滤膜上的菌落 (或噬菌斑) 原位溶菌, 原位进行 DNA 变性并原位固定在滤膜上, 然后用放射性标记的探针同固定了的 DNA 进行杂交经放射自显影后, 确定哪一个菌落含有重组的 DNA 分子, 再从参比平板上选取重组体。

10. 简述 Southern 印迹杂交的原理和方法。

答: Southern 印迹杂交是 1975 年 Southern 建立起来的一种杂交方法, 属固相—液相杂交。该法的主要特点是利用毛细现象将 DNA 转移到固体支持物上, 称为 Southern 转移或 Southern

印迹 (Southern blot)。它首先用合适的限制性内切核酸酶将 DNA 切割, 进行电泳分离后, 利用干燥的吸水纸产生毛细作用, 使液体经过凝胶, 从而使 DNA 片段由液流携带从凝胶转移并结合在固体支持物表面, 在通过和探针杂交来检测固体支持物表面的 DNA。

11. Northern 印迹与 Southern 印迹有什么不同?

答: Northern 印迹的原理同 Southern 印迹相比有两点不同: (1) 转移的对象不同, Northern 印迹是将 RNA 变性及电泳分离后, 将其转移到固相支持物上的过程。(2) 虽然 RNA 电泳前不需像 DNA 那样进行酶切, 但也需要变性。不过变性方法是不同的, 它不能用碱变性, 因为碱变性会导致 RNA 的降解。

12. Southern 印迹杂交、Northern 印迹杂交及 Western 免疫印迹彼此之间有哪些不同?

答: (1) 检测目标物质不同: Southern 印迹杂交检测的是 DNA, Northern 印迹杂交检测的是 RNA, Western 免疫印迹杂交检测的是蛋白质。(2) 所用凝胶不同: Southern 印迹杂交和 Northern 印迹杂交用的是琼脂糖凝胶, 而 Western 免疫印迹用的是 SDS-聚丙烯酰胺凝胶。(3) 是否变性电泳不同: Southern 印迹杂交是跑非变性琼脂糖凝胶电泳, 电泳之后在凝胶上用 NaOH 处理使 DNA 变性, 然后转印; Northern 印迹杂交实在电泳上样前用甲基氢氧化银、乙二醛或甲醛使 RNA 变性, 而不用 NaOH, 因为它会水解 RNA 的 2'-OH; Western 免疫印迹则是跑变性的聚丙烯酰胺电泳或非变性的聚丙烯酰胺电泳。(4) 探针不同: Southern 印迹杂交、Northern 印迹杂交的探针是单链的 DNA 或 RNA, 而 Western 免疫印迹用的探针是特异性抗体蛋白质, 而非核酸。

13. *Taq* DNA 聚合酶有哪些特性?

答: *Taq* DNA 聚合酶特性具有以下特性: (1) 较高的热稳定性; (2) 5'→3'聚合酶活性; (3) 5'→3'外切酶活性; (4) 具有转录酶活性; (5) 较弱的非模板依赖性; (6) 缺乏 3'→5'外切酶活性。

14. 如何提高 PCR DNA 聚合酶的保真性?

答: (1) 使用 *Taq* DNA 聚合酶时, 掺入少量具有 3'→5'外切酶活性的耐热 DNA 聚合酶, 错配率可降为原来的 1/10; (2) 使四种 dNTP 底物浓度相等; (3) MgCl₂ 浓度尽可能低; (4) 减少循环数。

15. PCR 引物设计的原则主要有哪些?

答: (1) 引物长度: 10~30 Nt; (2) 碱基分布: A、T、G、C 随机分布; (3) G+C 含量: 40%~60% $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$; (4) 引物之间: 避免 3'端互补; (5) 引物自身: 不应形成二级结构; (6) 引物 3'末端碱基: 最好选 T、C、G, 不选 A; (7) 引物 5'末端碱基: 可不与模

板 DNA 互补。

16. 影响 PCR 扩增平台期的因素有哪些？

答：（1）引物及 dNTP 底物浓度降低。（2）酶与模板比例下降。

17. 简述基因表达谱芯片的原理？

答：基因表达谱芯片是在一块有多聚赖氨酸包被的硅片上或其它固相支持物（如玻璃片、硅片、聚丙烯膜、硝酸纤维素膜、尼龙膜等）将生物分子探针（Oligo 或 cDNA）以大规模阵列的形式排布，形成可与带有标记的目的分子（如荧光染料 Cy3、Cy5 标记的 cDNA）相互作用、交联反应的固相表面，在激光的顺序激发下标记荧光根据实际反应情况分别呈现不同的荧光发射谱征，电压耦合元件相机或激光共聚焦显微镜根据其波长及波幅特征收集信号，作出比较和检测，从而迅速得出所要的信息。

18. cDNA 芯片在医学中的应用？

答：（1）cDNA 芯片可定量监测大量基因表达水平，阐述基因功能，探索疾病原因及机制、发现诊断及治疗靶基因等。（2）可用于 Northern blot 或 RT-PCR 验证。（3）用于基因表达数据的生物信息学分析。

七、论述题

1. 影响 PCR 结果的因素有哪些？

答：（1）引物及浓度：①长度：15~30 bp。②碱基：G+C 含量以 40%~60%为宜，ATGC 最好随机分布，避免 5 个以上的碱基成串排列。③避免引物内部出现二级结构、两条引物间互补，特别是 3'端的互补。④引物 3'端的碱基，特别是最末及倒数第二个碱基，应严格要求配对。⑤与其它序列无明显同源性。⑥浓度为 0.1~1 μmol 或 10~100 pmol。

（2）酶及其浓度：催化一典型的 PCR 反应约需酶量 2.5 U（指总反应体积为 100 μl 时），浓度过高可引起非特异性扩增，浓度过低则合成产物量减少。

（3）dNTP 的质量与浓度：dNTP 应为 50~200 $\mu\text{mol/L}$ ，4 种 dNTP 的浓度要相等（等摩尔配制），过高 dNTP 能与 Mg^{2+} 结合，使游离的 Mg^{2+} 浓度降低。

（4）模板：模板的量与纯化程度，是 PCR 成败与否的关键环节之一，避免 DNA 纯化中的 SDS 和蛋白酶 K 等杂质。

（5） Mg^{2+} 浓度：一般的 PCR 反应中，各种 dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时， Mg^{2+} 浓度为 1.5~2.0 mmol/L 为宜。 Mg^{2+} 浓度过高，反应特异性降低，出现非特异扩增，浓度过低会降低 Taq DNA 聚合酶的活性，使反应产物减少。

（6）温度与时间：①变性：93℃~94℃ 1 min，过高或过低的温度影响酶的活性。②退火：取决于引物的长度、碱基组成及其浓度，还有靶基序列的长度。一般高于 T_m

值 5℃~10℃，时间为 30~60 s。③延伸：常用温度为 72℃，时间根据待扩增片段的长度而定。

(7) 循环次数：主要取决于模板 DNA 的浓度。一般的循环次数选在 30~40 次，循环次数越多，非特异性产物的量亦随之增多。

2. 试述 PCR 基本技术过程中引物设计的原则。

答：(1) 引物的长度一般 15~30 bp；(2) 引物扩增跨度：以 500 bp 为宜，特定重要条件下可扩增长至 10 kb 的片段；(3) 引物碱基：G+C 含量以 40%~60%为宜，A、T、G、C 最好随机分布，避免 5 个以上的嘌呤或嘧啶核苷酸的成串排列；(4) 避免引物内部出现二级结构：避免两条引物间互补，特别是 3'端的互补，否则会形成引物二聚体，产生非特异性的扩增条带；(5) 引物 3'端的碱基必须与模板严格配对，而且尽量不要为 A，最好选择 T，因为 3'末端位为 T 时错配几率大大降低。(6) 产物有或能加上合适的酶切位点；(7) 被扩增的靶序列最好有适宜的酶切点，这对酶切分析或分子克隆很有好处。

3. 建立了一个基因文库后，如何鉴定一个携带目的基因的克隆？

答：带有某一细菌基因的克隆通常可以直接看出来，因为基因表达引起了宿主细胞表型的可见变化。然而，真核生物的基因不都表达，则需用相应的方法找出带有所需基因特定克隆。一个常用方法是菌落或原位杂交分析，具体方法如下：

(1) 从不同的克隆将少量菌落转移到硝酸纤维素滤膜上，固定于硝酸纤维素滤膜上，然后用 NaOH 使之变性。

(2) 用特异探针与膜杂交检测。探针必须能与所需的基因互补且被³²P标记。探针可以是来自另一不同生物体的相关的基因，或是依据与基因特异相关蛋白质的氨基酸序列设计并经化学合成的一小段DNA分子。

(3) 探针只会与特定基因进行碱基配对（杂交），冲洗滤膜后，未结合上的标记探针会被除去。

(4) 烘干滤膜后进行放射自显影后，所需的克隆就以一个黑点在胶片上显示出来，这就是菌落或原位杂交分析。

4. 现在对人类基因组的主要研究工作是进行基因组的序列测定。然而，有人根据人类基因组是由重复序列组成为由，认为反复对同一种 DNA 进行测序是不明智的。你能否拟定两份计划，一份计划应保证仅仅单一序列 DNA 被测序，第二个计划应允许仅仅转录的单一 DNA 序列被测序。请简述你的两份计划。

答：计划一：进行一个复性实验，在从不同的温育时间取出等量样品。当所有重复 DNA 都发生退火时，从反应中去除双链 DNA（可以使用一个仅能结合双链 DNA 的柱或过滤器）。

接着继续进行复性反应直到所有的单拷贝 DNA 都发生复性；以这一单拷贝 DNA 建立克隆文库，用于测序。计划二：仅测序能够表达的单拷贝基因。用计划一中分离纯化得到的单一序列 DNA 与细胞总 RNA 杂交，使复性完全，然后从反应液中除去单链 DNA，只有能表达的单拷贝 DNA 以 DNA-RNA 杂合体的形式留下来。克隆这一 DNA 并进行测序（现在可采用 EST 法，从细胞总 RNA 中制备表达序列的 cDNA，进行测序）。

5. 你在做 Southern 印迹分析，并且刚完成了凝胶电泳这一步。根据方案，下面步骤是用 NaOH 溶液浸泡凝胶，使 DNA 变性为单链。为了节省时间，你略过了这一步，直接将 DNA 从凝胶转至硝酸纤维素膜上。然后用标记探针杂交，最后发现放射自影片是空白。错在哪里？试分析其原因。

答：错在了膜上的 DNA 没有变性为单链，所以无法和探针结合，所以最后发现放射自影片是空白。当然，也有可能是实验时膜上的 DNA 和双链探针都忘记变性，导致其无法杂交，所以最后发现放射自影片是空白。

6. 已知目的 cDNA 序列，拟采用基因工程技术使其在哺乳细胞中表达，请写出设计方案。

答：提取目的基因的 mRNA，逆转录生成 cDNA，根据已知的 cDNA 序列设计引物，以 cDNA 为模板进行 PCR，琼脂糖凝胶电泳，纯化 PCR 产物，用限制性核酸内切酶切割 PCR 产物和载体，用 DNA 连接酶连接切割后的 PCR 产物和载体，将连接产物导入大肠杆菌，筛选阳性克隆，DNA 序列分析，提取重组 DNA，采用合适的方法将其导入哺乳动物细胞，使目的基因在哺乳动物细胞中得以表达。

7. 以某一序列已知的真核生物基因为例，如编码动物激素的基因，使其在 *E.coli* 中表达。

简要说明实验中可能遇到的问题及可能的解决办法。

答：要使动物中编码激素的基因在 *E.coli* 中表达，通常遇到的问题有：

(1) *E.coli* 的 RNA 聚合酶不能识别真核生物的启动子。

(2) 大多数真核基因有内含子，这些内含子在转录后从前体 mRNA 中被切除而形成成熟 mRNA。*E.coli* 细胞没有这样的机制来去除内含子。

(3) 产生的真核生物的蛋白质产物可以被细菌的蛋白酶所识别和降解。

针对上述可能出现的问题，建议在克隆的过程中采取以下措施：

(1) 应将激素的编码序列置于含有核糖体结合位点和起始密码子 ATG 的细菌强启动子的附近(含有这种序列的载体称表达载体)。

(2) 可以以激素的 mRNA 为模板用反转录酶合成激素的基因。这种 DNA 不含内含子可插入到载体中进行克隆。此外，如果蛋白质序列短则可通过化学合成得到该基因。

合成的基因应含起始密码 ATG、通过该激素蛋白的氨基酸序列推测而来的编码序列，以及 1~2 个终止密码：ATG——编码序列——TGATAG。

(3) 选用合适的突变型宿主从而防止蛋白酶水解。如果用酵母作为宿主上述许多问题都可以较容易地解决，尤其是现在有既能在大肠杆菌中又能在酵母中复制的穿梭质粒载体。

第八章 基因工程与体外表达

一、名词解释

1. 基因工程(gene engineering): 是指在体外对 DNA 分子按照既定的目的和方案, 对 DNA 进行剪切和重新连接, 然后把它导入宿主细胞, 从而能够扩增有关 DNA 片段, 表达有关基因产物, 进行 DNA 序列分析、基因治疗, 研究基因表达的调节元件(如启动子、增强子等), 以及研究基因的功能等。
2. 载体(vector): 可以插入核酸片段、能携带外源核酸进入宿主细胞, 并在其中进行独立和稳定的自我复制的核酸分子。
3. 质粒(plasmid): 存在于包括细菌、酵母在内的多种微生物中, 在宿主细胞的染色体外以稳定的方式遗传。结构上, 它是一种双链环状的 DNA 分子, 含有复制起始点, 此复制起始点与其他一些顺式调控因子构成复制子, 能利用细菌染色体 DNA 复制和转录的同一套酶系统, 在细菌体内独立地进行自我复制及转录。
4. 黏性质粒(cosmid): 是由 λ DNA 的 cos 区与质粒重新构建的载体。
5. 表达载体(expressing vector): 是指用来在受体细胞中表达(转录和翻译)外源基因的载体。
6. 定向克隆(directional cloning): 是指对外源 DNA 及载体均用两种不同的限制酶消化, 再将二者用 DNA 连接酶连接起来的方法, 该法可以使外源 DNA 以固定的方向插入到载体中。
7. 感受态细胞(competent cell): 大肠杆菌悬浮在 CaCl_2 溶液中, 并置于低温($0\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)环境下一段时间, 钙离子使细胞膜的结构发生变化, 通透性增加, 从而具有摄取外源 DNA 的能力, 这种细胞称为感受态细胞
8. 转染(transfection): 指真核细胞主动摄取或被动导入外源 DNA 片段而获得新的表型的过程。指真核细胞主动摄取或被动导入外源 DNA 片段而获得新的表型的过程。若

此 DNA 未与宿主细胞 DNA 整合而获表达, 称“瞬时转染(transient transfection)”; 若与宿主细胞 DNA 整合并随后者的复制而复制称“稳定转染(stable transfection)”。

9. 转化 (transformation): 转化是指将质粒或其他外源 DNA 导入处于感受态的宿主细胞, 并使其获得新的表型的过程。
10. 限制性核酸内切酶 (restriction endonuclease): 限制性核酸内切酶是一种核酸内切酶, 又称限制性内切酶, 能识别双链 DNA 分子内部的特异位点并且裂解磷酸二酯键。
11. 逆转录酶 (reverse transcriptase): 以 RNA 为模板催化合成 DNA 的酶。
12. α 互补 (α complementary): 许多载体都含有 β -半乳糖苷酶基因 (lacZ) 的调控序列和氨基端 145 个氨基酸的编码序列。这个编码区中插入了一个多克隆位点。这种载体适用于可编码 β -半乳糖苷酶羧基端部分序列的宿主细胞。宿主和载体编码的片段各自均无酶活性, 但它们可以互补形成具有活性的 β -半乳糖苷酶。
13. 融合蛋白 (fusion protein): 由两段或多段基因序列串联形成的融合基因表达所产生的蛋白质。
14. 末端脱氧核苷酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT): 是一种无需模板的 DNA 聚合酶, 催化脱氧核苷酸结合到 DNA 分子的 3' 羟基端。
15. 人工接头 (linker): 用化学合成法合成的一段 8-12bp 的含有特定限制性核酸内切酶识别位点的平端双链
16. 基因组文库 (genomic library): 是指将某生物的全部基因组 DNA 切割成一定长度的 DNA 片段, 克隆到某种载体上形成的集合。
17. cDNA 文库 (cDNA library): 以特定的组织或细胞 mRNA 为模板逆转录产生的 cDNA 与适当的载体重组得到的重组 DNA 克隆群。
18. Klenow 片段 (Klenow fragment): DNA 聚合酶 I 用枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)裂解后产生的大片段。
19. 黏性末端 (sticky end): 限制性核酸内切酶切割 DNA 后, 在切割处形成的单链突出末端。
20. 平端或钝端 (blunt end): DNA 双链末端平齐而无突出单链。
21. 同尾酶 (isodamers): 有些限制性内切酶识别序列不同, 但是产生相同的粘性末端, 这些酶称为同尾酶。
23. 同工异源酶 (isoschizomers): 来源不同的酶, 但能识别和切割同一位点, 这些酶称为同工异源酶。

二、判断题

1. × 2. × 3. × 4. √ 5. × 6. × 7. √ 8. × 9. × 10. ×
11. × 12. × 13. √ 14. √ 15. × 16. × 17. √ 18. √ 19. × 20. √
21. √ 22. √ 23. √ 24. √ 25. × 26. √ 27. √ 28. √ 29. √ 30. √
31. √

三、填空题

1. 三 I III II
2. 碱性磷酸酶
3. 核酸外切酶活性
4. 平端连接 同聚物加尾连接 人工接头连接
5. 转化 转染
6. 从基因组 DNA 文库获取目的基因 从 cDNA 文库获取目的基因 聚合酶链反应法
7. 电穿孔 脂质体转染 显微注射
8. 磷酸根 磷酸二酯键
9. 磷酸根
10. 同聚物尾
11. 遗传标志
12. λ DNA 的 cos 区 质粒 40~50
13. 单链 DNA
14. 表达（转录和翻译）
15. 免疫学方法 核酸杂交法 PCR
16. 同工异源酶
17. 同尾酶
18. $3' \rightarrow 5'$ 及 $5' \rightarrow 3'$
19. $3' \rightarrow 5'$ $5' \rightarrow 3'$
20. 属 种 株
21. 4~6

22. 核糖体 RNA
23. 将目的基因和有关载体进行连接 将重组的 DNA 导入受体细胞 DNA 重组体的筛选和鉴定 DNA 重组体的扩增 表达和其他研究
24. 表达融合蛋白 采用某种突变菌株 表达分泌蛋白
25. cDNA 内含子
26. 阻抑
27. 蓝
28. 失活
29. 核酸外切酶

四、单项选择题

1. C 2. B 3. A 4. A 5. E 6. C 7. B 8. B 9. B 10. A
11. B 12. A 13. C 14. A 15. B 16. D 17. A 18. D 19. D 20. E
21. D 22. B 23. B 24. A 25. B 26. E 27. C 28. E 29. A 30. C

五、多项选择题

1. ABCDE 2. ABCD 3. ABC 4. ABCE 5. ABCDE 6. ABCD 7. ABCD
8. ABCDE 9. ABCDE 10. ABC 11. AB 12. ABCDE 13. ABCE
14. ABCDE 15. ABCDE 16. DE 17. ABCDE 18. ABCD 19. ABCDE 20. BDE

六、简答题

1. 简述基因克隆的主要过程。

答：①制备目的基因和相关载体；②将目的基因和有关载体进行连接；③将重组的 DNA 导入受体细胞；④DNA 重组体的筛选和鉴定；⑤DNA 重组体的扩增、表达和其他研究。

2. 简述寡核苷酸介导的定点诱变技术的原理。

答：基本原理是：利用 *Klenow* 片段（DNA 聚合酶 I 大片段）延伸与单链环状 DNA 模板相配对的寡核苷酸引物，这个寡核苷酸引物除了有一处与模板的碱基错配外，其余部分均与模板互补，由寡核苷酸的错配处诱发突变，并在体外新合成一个杂合双链 DNA，用 T4 DNA 连接酶将新合成的杂合双链 DNA 连接成双链闭环 DNA 分子，将体外合成的杂合闭环双链 DNA 转化

到 *E. coli* 细胞，由于环状 DNA 复制的特点，就会同时产生野生型与诱变型两种 DNA 分子，最后通过筛选，将诱变型 DNA 分子筛选出来。

3. 蓝-白筛选的原理。

答：有些载体含有 β -半乳糖苷酶基因 (*lacZ*) 的调控序列和氨基端 145 个氨基酸的编码序列，这个编码区中插入了一个多克隆位点，这种载体适用于可编码 β -半乳糖苷酶羧基端部分序列的宿主细胞。宿主和载体编码的 β -半乳糖苷酶片段各自均无酶活性，但它们可以互补形成具有酶学活性的蛋白质，使 X-gal 转化成蓝色的代谢产物，出现蓝色的菌落（菌斑）。如果在多克隆位点上插入外源 DNA 片段，将使载体的 *lac Z* 基因灭活，不能互补形成有活性的 β -半乳糖苷酶，结果菌落（菌斑）呈现白色。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，这种筛选方法称为“蓝-白筛选”。

4. Klenow 片段的主要用途有哪些？

答：(1) 补齐双链 DNA 的 3' 末端。

(2) 通过补齐 3' 端，标记 3' 末端。

(3) 在 cDNA 克隆中，合成第二股链。

(4) DNA 序列分析。

5. 末端脱氧核苷酸转移酶的作用。

答：末端脱氧核苷酸转移酶能将脱氧核苷酸加到 DNA 的 3'-OH 上，主要用于探针标记；或者在载体和待克隆的片段上形成同聚物尾，以便于进行克隆。

6. 将 DNA 分子进行体外连接的方法有哪些？

答：黏性末端连接、平端连接、同聚物加尾连接、人工接头连接

7. 表达融合蛋白有何优点？

答：表达融合蛋白的优点如下：

(1) 融合蛋白较稳定，不易被细菌蛋白酶水解；

(2) 如果大肠杆菌的结构基因是一段信号肽，可产生分泌型产物。

(3) 可利用针对原核部分的单抗进行亲和层析，便于纯化。

(4) 原核蛋白部分可用蛋白酶切掉，释放出天然的真核蛋白质。

(5) 目的蛋白溶解性好 由于受体蛋白的存在，融合蛋白往往能在胞内形成良好的空间构象，

且大多具有水溶性。

8. 限制性核酸内切酶及其特点。

答：限制性核酸内切酶（restriction enzyme）是一种核酸内切酶，又称限制性内切酶，能识别双链 DNA 分子内部的特异位点并且裂解磷酸二酯键。根据酶的基因、蛋白质结构、依赖的辅助因子及与 DNA 结合和裂解的特异性，将限制性内切酶分为三型。I 型酶具有限制和 DNA 修饰作用。这种酶在非特异性位点，通常在识别位点下游 100 到 1 000 bp 处切割 DNA。III 型酶与 I 型酶一样，具有限制与修饰活性，能在识别位点附近切割 DNA，切割位点很难预测。在基因克隆中，II 型酶是最重要的工具酶，它能在 DNA 分子内部的特异位点，识别和切割双链 DNA，其切割位点的序列可知、固定。

9. 碱性磷酸酶在基因克隆中的作用。

答：碱性磷酸酶（alkaline phosphatase）能去除 DNA 或 RNA 5' 端的磷酸根。制备载体时，用碱性磷酸酶处理后，可防止载体自身环化，提高重组效率。

10. DNA 聚合酶 I 在基因克隆中的作用

答：DNA 聚合酶 I (DNA polymerase I) 是从大肠杆菌中发现的第一个 DNA 聚合酶，分子量为 109 kD。它能以 DNA 为模板，以 4 种脱氧核苷酸为原料（dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP）以及 Mg^{2+} 的参与下，在引物的游离 3'-OH 或缺口的 3' 端上合成 DNA，方向是 5' → 3'。该酶将与模板配对的相应脱氧核苷酸连接在引物的 3'-OH 上，形成 3', 5' 磷酸二酯键。这个酶除有 5' → 3' 聚合酶活性外，尚有 3' → 5' 及 5' → 3' 核酸外切酶活性。由于它具有 5' → 3' 核酸外切酶活性，当用缺口平移法（nick translation）标记 DNA 探针时，常用 DNA 聚合酶 I。

11. 真核细胞转染的 DEAE-葡聚糖（DEAE-Dextran）法基本原理。

答：外源 DNA 或重组质粒 DNA 与 DEAE 葡聚糖混合，DEAE 葡聚糖带有大量正电荷的化学基团，可与 DNA 中带负电荷磷酸基团结合，并粘附于细胞表面，借助细胞内吞过程促使外源 DNA 进入细胞。此法简单、快速、有效，常用于外源基因的短暂表达研究。

12. 真核细胞转染的脂质体（liposome）法基本原理。

答：利用脂质体将外源基因导入到真核细胞是一种常用的简单而快速的基因导入方法。其原理是阳离子脂质体试剂与 DNA 混合后，形成一种稳定的脂质双层复合物，DNA 被包在脂质体中间。这种脂质双层复合物可直接加到培养的细胞中，脂质体粘附到细胞表面并与细胞

膜融合，DNA 被释放到胞浆中。

13. 酵母表达系统的特点。

答：酵母菌是一种单细胞真核生物，各种不同酵母菌株对表达和分析真核蛋白是非常有用的。酵母菌株的遗传背景都很清楚，都能象哺乳动物细胞那样进行翻译后加工和修饰。酵母菌在特定的培养基中生长迅速，与哺乳动物细胞相比，易于操作、价格便宜。因此，酵母表达系统是大规模表达重组真核蛋白的理想工具。

14. 电子克隆的基本步骤。

答：随着人类基因组计划和多种模式生物全基因组测序的完成，基因数据库的不断完善，以及各种计算机分析软件的开发与互联网的广泛应用，使人们有可能通过与基因数据库进行序列搜索、对比分析、拼接，预测新的、假定的全长基因，然后通过分子生物学实验方法，加以证实，并从相应的组织、细胞中获得这种基因。

15. 限制性核酸内切酶的命名原则。

答：第一个字母取自产生该酶的细胞属名，用大写；第二、第三个字母是该细胞的种名，用小写；第四个字母代表株；用罗马数字代表同一菌株中不同限制性内切酶的编号，现在常用来表示发现的先后次序。

16. 基因克隆过程中，获得目的基因的途径有哪些？

答：（1）从基因组文库（genomic library）中获得

（2）从 cDNA 文库中获得

（3）PCR 扩增特定基因

（4）人工合成

17. 菌落原位杂交的过程。

答：对菌斑或菌落进行原位分子杂交是从基因组文库、cDNA 文库或重组质粒中筛选目的基因的最有效的方法之一，而且这种筛选不取决于目的基因是否表达。

进行原位杂交时，先将含重组质粒或重组噬菌体的细菌生长在琼脂平板上，形成单个菌落或噬菌斑，再把圆型硝酸纤维膜或尼龙膜覆盖于长有菌落或噬菌斑的琼脂平板的表面，定好位，把膜轻轻揭起，这样就有部分细菌或噬菌体吸附于膜上，再用碱处理膜上的DNA，

使之变性。烘干固定DNA，然后用³²P或其它标记物标记的DNA或RNA探针杂交、洗膜、用X光片曝光。凡是含有与探针DNA互补序列的菌落或噬菌斑，在显影后，会在X光片上产生阳性斑点。然后根据斑点在平板上的相应位置，找出阳性克隆。

18. 含U模板法定点诱变的基本原理。

答：为了提高诱变效率，1985年，Kunkel对寡核苷酸定点诱变法进行改进，从而建了含U模板法，它是当今应用最为广泛的一种寡核苷酸定点诱变法。这种方法的基本原理是：在单链DNA模板中用尿嘧啶核苷酸取代胸腺嘧啶核苷酸，这种模板称为含U模板。它可以在体外进行正常定点诱变实验，即通过DNA聚合酶，以此含U单链DNA作为诱变模板在体外延伸寡核苷酸引物，合成杂合双链DNA分子。当双链DNA分子转化至野生型的*E.coli*细胞中时，由于这种细胞内含尿嘧啶核苷酶，含U的正链DNA受到破坏，而新合成的带有诱变碱基而不含尿嘧啶核苷酸的负链，则不被正常细胞中的尿嘧啶核苷酶所破坏。因此只有带诱变位点的新合成负链可以保存下来。以此负链为模板合成的双链DNA均为突变体，从而大大提高了诱变效率。

19. PCR介导的定点诱变法。

答：PCR介导的定点诱变法是一种高效定点诱变方法。其基本原理是：除了合成所需的5'端及3'端常规引物(a, d)之外，再合成一对带有诱变位点的互补寡核苷酸引物(b, c)，具体步骤如图7-1所示。分别利用诱变引物b和5'端引物a，以及诱变引物c和3'端引物d，扩增出两个诱变的DNA片段(a/b片段和c/d片段)。经去除扩增反应的剩余引物后，将扩增出两个诱变的DNA片段(a/b片段和c/d片段)等量混合、变性、退火，用Klenow DNA聚合酶补齐。再利用5'端及3'端引物(a, d)进行PCR扩增反应，从而得到所需的含诱变位点的DNA片段。

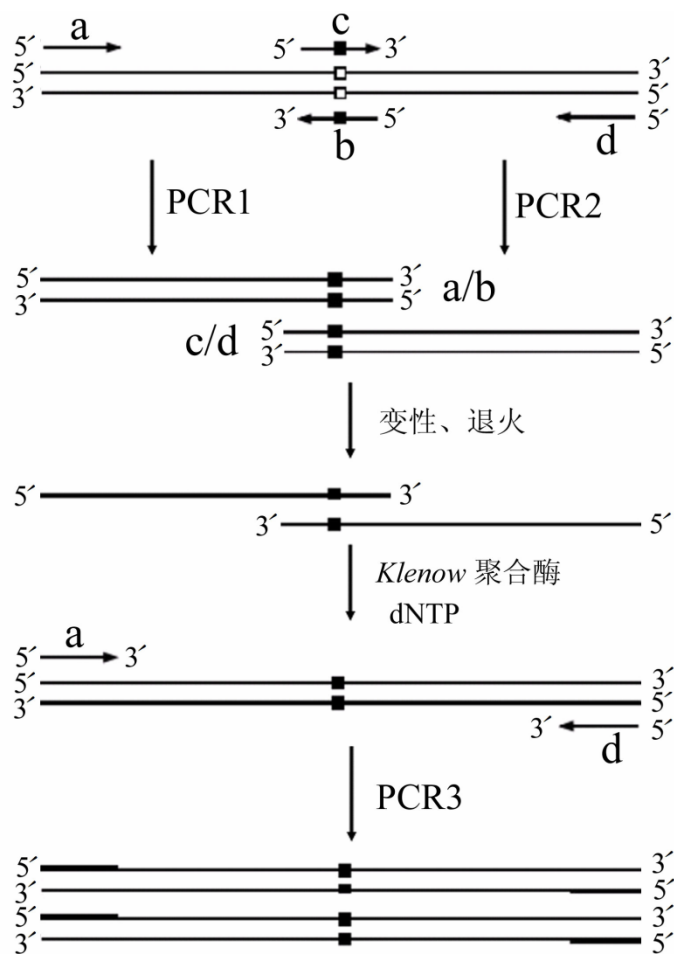


图 7-1 PCR 介导的定点诱变法

20. 大肠杆菌表达系统的特点。

答：该系统的优点是繁殖迅速、培养简单、操作方便、适合大规模生产。缺点是缺乏对真核生物蛋白质的修饰加工系统。

七、论述题

1. 作为克隆载体的质粒应具备哪些特点？

答：（1）分子量相对较小，能在细菌内稳定存在，有较高的拷贝数。

（2）具有一个以上的遗传标志，便于对宿主细胞进行选择，如抗生素的抗性基因、 β -半乳糖苷酶基因（*lac Z*）等。

（3）具有多个限制性内切酶的单一切点，便于外源基因的插入。如果在这些位点有外源基因的插入，会导致某种标志基因的失活，而便于筛选。

2. 提高外源基因表达水平的措施有哪些？

答：（1.）提高翻译水平

①调整 SD 序列与 ATG 之间的距离。

②用点突变的方法改变起始密码子下游的几个密码子。

③增加 mRNA 的稳定性。

（2.）使细菌的生长与外源基因的表达分开

将宿主菌的生长和外源基因的表达分成两个阶段，是减轻宿主细胞代谢负荷最为常用的一个方法。常采用温度诱导或药物诱导基因表达。

（3.）提高表达蛋白的稳定性

在大肠杆菌中表达的外源蛋白往往不够稳定，易被细胞的蛋白酶降解，因而会使外源基因的表达水平大大降低。因此，提高表达蛋白的稳定性，防止细菌蛋白酶的降解是提高外源基因表达水平的有力措施。

①表达融合蛋白。②采用某种突变菌株，可使大肠杆菌蛋白酶合成受阻，从而使表达蛋白得到保护，不被降解。③表达分泌蛋白。

第九章 蛋白质组学的研究方法和进展

一、名词解释

1. 蛋白质组(proteome)：指由一个细胞或一个组织的基因组所表达的全部蛋白质。
2. 蛋白质组学(proteomics)：是应用各种技术手段来研究蛋白质组的一门新兴科学，是在整体水平上研究细胞内蛋白质组成及其活动规律的科学。
3. 功能蛋白质组学(functional proteomics)：是指研究细胞在一定阶段或某一生理现象相关的所有蛋白质，从局部入手研究蛋白质组的各个功能亚群体，以便把多个亚群体组合起来，逐步描绘出接近生命细胞的“全部蛋白质”的蛋白质组图谱。
4. 电泳(electrophoresis)：在外界电场的作用下，带电粒子（包括蛋白质等）在电场中向与其自身所带电荷相反方向移动的现象称为电泳。移动的速度取决于蛋白质分子所带的净电荷性质及多少，也与分子的大小与形状有关。
5. 蛋白质变性(protein denaturation)：是指天然蛋白质分子受到某些物理因素，如热、

紫外线照射、高压和表面张力等或化学因素，如有机溶剂、脲、胍、酸、碱等的影响时，生物活性丧失，溶解度降低，不对称性增高以及其他的物理、化学常数发生改变的过程。变性不涉及共价键的断裂，一级结构仍保持完好。

6. 双向电泳 (two dimension electrophoresis, 2-DE): 双向电泳根据蛋白质的两个一级属性, 即等电点和分子量的特异性, 将蛋白质混合物在电荷 (等电聚焦) 和分子量 (变性聚丙烯酰胺电泳) 两个水平上进行分离。

7. 等电聚焦电泳 (isoelectric focusing electrophoresis, IFE): 是依据蛋白质分子的净电荷或等电点进行分离的技术。在等电聚焦过程中, 电场所采用的载体两性电解质含有脂肪族多氨基多羧酸, 可在电场中形成正极为酸性, 负极为碱性的连续 pH 梯度。蛋白质分子在一个载体两性电解质形成的连续而稳定的线性 pH 梯度中电泳, 当蛋白质迁移到其等电点位置时, 净电荷为零, 在电场中不再移动。因此可将各种不同等电点性质的蛋白质分离开来。

8. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE): 用于分离和纯化蛋白质。这种凝胶用强阴离子去污剂 (如 SDS) 与某一还原剂并用, 并通过加热使蛋白质解离。由于十二烷基硫酸根所带电荷量远远超过蛋白质分子原有的电荷量, 而掩盖了不同蛋白质间原有的电荷差别, 从而使蛋白质在凝胶中的迁移率只取决于蛋白质分子的大小。

9. 蛋白质测序 (protein sequencing): 利用 Edman 降解法、质谱法、酶降解法或其他方法测出多肽链的氨基酸的组成、数目及排列方式。

10. Edman 降解 (Edman degradation): 是由 P. Edman 于 1950 年首先提出来的, 最初用于 N 端氨基酸残基分析, 现在用于肽端氨基酸序列的测定。其原理是异硫氰酸苯酯 (PITC) 能与多肽或蛋白质游离-末端氨基的反应, 切下与之反应的那个氨基酸残基, 这样蛋白质或多肽链就减少了一个残基, 而且在它的 N 端又暴露出一个新的游离的 α -末端氨基, 又可参加第二轮反应, 如此反复, 就可以测出 n 个残基的顺序。

11. 生物质谱技术 (mass spectrometry, MS): 是通过测定生物样品离子的质荷比 (m/z) 来进行成分和结构分析的分析方法。生物质谱技术可以使核酸或蛋白质、多肽等生物大分子产生带单电荷或多电荷的分子、离子, 从而能够测定其分子量。

12. 肽质量指纹图谱 (peptide mass fingerprinting, PMF): 是指蛋白质被识别特异酶切位点的蛋白酶水解后得到的肽片段质量图谱。由于每种蛋白质的氨基酸序列都不同, 蛋白质被酶水解后, 产生的肽片段序列也各不相同, 肽混合物的质量数亦各具特征, 所以称为指纹谱, 用于蛋白质的鉴定。用实验测得的蛋白质酶解肽段质量数可以在蛋白质数据库中检索, 寻找

具有相似肽指纹谱的蛋白质。

13. 荧光差异显示双向电泳 (F-2D-DIGE)：是在传统双向凝胶电泳基础上发展起来的可以在同一块凝胶上比较两种不同来源或不同处理样本的蛋白质表达谱，能比较精确地在较宽的动态范围内对感兴趣的蛋白质进行定量的定量分析蛋白质的新方法。

14. 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)：酶联免疫吸附测定的原理是以待测抗原 (或抗体) 和酶标抗体 (或抗原) 的特异结合反应为基础，然后通过酶活力测定来确定抗原 (或抗体) 含量。

15. 蛋白质翻译后修饰 (post translational modification)：肽链合成的结束，并不一定意味着具有正常生理功能的蛋白质分子已经生成。已知很多蛋白质在肽链合成后还需经过一定的加工或修饰，由几条肽链构成的蛋白质和带有辅基的蛋白质，其各个亚单位必须互相聚合才能成为完整的蛋白质分子。

16. 亚细胞蛋白质组学 (subcellular proteomics)：是以亚细胞结构如亚细胞区室、特定蛋白质组分、细胞器等所包含的所有蛋白质为研究对象的一个蛋白质组学的分支学科。亚细胞结构在细胞的生命活动中都与特定的细胞功能相联系。分离、鉴定其在不同生理状态下的蛋白质表达情况对于全面了解细胞的功能具有重要意义。

17. 串联质谱 (tandem mass spectrometry)：串联质谱法是指用质谱作质量分离的质谱方法。

还可以称为质谱-质谱法、多级质谱法、二维质谱法和序贯质谱法。其作用有：

诱导第一级质谱产生的分子离子裂解，有利于研究子离子和母离子的关系，进而给出该分子离子的结构信息；从干扰严重的质谱中抽取有用数据，大大提高质谱检测的选择性，从而能够测定混合物中的痕量物质。

18. 肽序列标签 (peptide sequence tag)：将蛋白质进行酶切降解做电喷雾质谱产生包括多电荷峰在内的肽质量指纹谱，选择有一定丰度的双电荷峰经气体碰撞活化池碰撞后产生碎片，其中包含着结构信息，由这些信息可以推出蛋白质的某一肽段的部分氨基酸序列，测定出的部分氨基酸序列和其序列两段的质量称为肽序列标签。

19. 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)：是近年来发展起来的一种新型的软电离生物质谱，仪器主要由两部分组成：基质辅助激光解吸电离离子源 (MALDI) 和飞行时间质量分析器 (TOF)。MALDI 的原理是利用一定波长的激光脉冲，在极短的时间间隔内，对含被测样品靶物的一个微小区域提供高能量，从固相直接获得离子的电离方法。TOF 的离子分离是用非磁方式达到的，离子在离子源中形成后被电场加速，进入真空无场漂移区，

具有不同质荷比的离子因其通过漂移区的时间不同而实现分离，先后到达检测器而产生信号。

20. 电喷雾电离质谱法 (electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS): 电喷雾质谱法是另一种软电离技术，是利用强静电场从溶液直接产生气态离子化分子的一种方法。

21. 免疫共沉淀 (immunoprecipitation, IP): 免疫沉淀是抗原和抗体之间专一性地相互作用而沉淀，从而保留下来，其是一种经典的检测蛋白质相互作用的方法。其实验过程比较简单，裂解细胞后，加入抗体，抗原被沉淀下来后洗涤，去除非特异性结合，再分析复合体。抗体可以是单克隆，也可以是多克隆。

22. 软电离 (soft ionization): 是指样品分子电离时保留整个分子的完整性，不会形成碎片离子。

23. 亲和层析 (affinity chromatography): 是利用生物大分子所具有的特异性亲和能力进行分离的方法。该方法常把可亲和的一对分子中的一方固定在不溶于水的固相支持载体上；另一方随流动相流经固定相，双方即可发生特异性结合。用流动相经过一段时间的洗涤，可将杂质除去，然后再利用亲和吸附的可逆特性，改用特殊的流动相使所需分离的物质被解离下来，从而得到纯化物质。

24. 酵母单杂交 (yeast one-hybrid): 是体外分析 DNA 与细胞内蛋白质相互作用的一种方法，通过对酵母细胞内报告基因表达状况的分析，来鉴别 DNA 结合位点并发现潜在的结合蛋白基因，或对 DNA 结合位点进行分析。运用此技术能筛选到与 DNA 结合的蛋白质，并可直接从基因文库中得到编码该蛋白质的核苷酸序列。

25. 酵母双杂交系统 (yeast two-hybrid system): 是利用杂交基因通过激活报告基因的表达探测蛋白-蛋白的相互作用。真核生物转录因子具有 DNA 结合结构域 (BD) 和转录激活结构域 (AD)，这两个结构域分开时仍分别具有功能，但不能激活转录，只有它们以适当途径在空间上较为接近时，才能重新具有转录因子活性，并激活报告基因表达。

26. 噬菌体显示技术 (phage display): 是一种用于筛选和改造功能性多肽的技术，通过将编码多肽的基因片段与编码噬菌体表面蛋白的基因融合进而以融合蛋白形式表达于噬菌体表面。目前主要用于体内蛋白质相互作用的预测，或筛选多肽药物。

27. 串联亲和纯化耦联质谱技术 (tandem affinity purification conjugated mass spectrometry, TAP-MS): 用于研究蛋白质在生理条件下的相互作用的一种方法。通过嵌入一段蛋白质标记，在目的蛋白的一端或中部导入蛋白质标记，这样便在没有破坏目的蛋白调控序列的基础上，使得被标记的目标蛋白其表达量与其在细胞中自然表达水平相当，避免了

由于过量表达的导致非自然条件下的蛋白质相互作用。经过特异性的两步亲和纯化，在生理条件下与目标蛋白发生真实作用的蛋白便可被一起洗脱下来，然后用质谱技术或 Edman 降解法对得到的蛋白质复合体进行鉴定。

28. 定量蛋白质组学 (quantitative proteomics): 是把一个基因组表达的全部蛋白质或一个复杂体系中所有的蛋白质进行精确的定量和鉴定。

29. 疾病蛋白质组学 (disease proteomics): 是指从蛋白质整体水平来揭示疾病的发生发展规律，阐明疾病的发病机制的一门新兴学科。

30. 蛋白质芯片 (protein chips): 是一种高通量、平行、自动化、微型化的蛋白质表达、结构和功能分析技术。目前已被应用于蛋白质相互作用研究、疾病诊断、药物设计和筛选等多个领域。

31. 数据库 (database): 是存放在计算机中有组织的数据集合，其作用在于存储和生成用户所需要的信息，为他们提供快速简捷的信息服务。

32. ExPASy: 由 Geneva 大学及其医院在 1993 年创立，是首批生命科学 www 服务站点之一，其目的主要是收集和整理蛋白质相关的数据。该服务站允许链接数据库中包括 Swiss-Prot、Prosite、Swiss-2D page、Swiss-3D page、Enzyme、CD40Lbase 和 SeqAnalRef 等重要的蛋白质参考数据库。

33. 液相色谱-质谱联用技术 (Liquid chromatography MS/MS, LC-MS/MS): 蛋白质混合物直接通过液相色谱分离以代替 2-DE 的分离，然后进入 MS 系统获得肽段分子量，再通过串联 MS 技术，得到部分序列信息，最后通过计算机联网查询、鉴定蛋白质。

34. 差速离心 (differential centrifugation): 指在密度均一的介质中不同大小的颗粒通过在不同的离心力场的作用下沉降而分离。

35. 密度梯度离心 (density gradient centrifugation): 是用一定的介质在管中形成连续或不连续的梯度，将细胞混悬液置于介质的顶部，通过重力或离心力场的作用使细胞分层分离。

36. 固相 pH 梯度 (immobilized pH gradient, IPG): 是利用合成一系列具有弱酸或弱碱性质的丙烯酰胺衍生物，它们与丙烯酰胺和甲叉丙烯酰胺具有相似的聚合性质，可以参与丙烯酰胺的共价聚合，从而形成稳定的不随环境电场等条件变化的 pH 梯度。

37. 源后衰变 (post source decay, PSD): 发生在离子源后的第一个无场区域，时间跨度为微秒；由于发生在无场区域，所以产生的不同片段离子和母离子保持同样速度，用离子镜反射，将片段离子和母离子分离，按质量大小排列可形成离子谱，称为 PSD 谱。

二、判断题

1. √ 2. × 3. × 4. × 5. √ 6. × 7. × 8. √ 9. √ 10. √
11. × 12. × 13. × 14. √ 15. × 16. × 17. × 18. √ 19. × 20. √
21. √ 22. × 23. √ 24. √ 25. × 26. × 27. √ 28. × 29. √ 30. √

三、填空题

1. 双向电泳 质谱
2. 载体两性电解质 pH 梯度 固相 pH 梯度;
3. 蛋白质免疫印迹 检测及鉴定
4. 等电点 分子量 表达量
5. 酵母双杂交 免疫共沉淀 噬菌体显示
6. 分子量大小 等电点
7. 催化剂 防止形成凹面 使胶更容易聚合
8. 电荷 分子筛 浓缩
9. 破坏蛋白质二级结构 与多肽主链竞争氢键
10. 先 大
11. 负 正
12. 质谱法
13. 生物化学芯片 化学型芯片 生物反应器芯片
14. 等电聚焦电泳 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
15. 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 电喷雾质谱
16. 电荷 溶解度 吸附性质 对配体分子的生物学亲和力
17. 蛋白酶或化学试剂 Edman 降解
18. 凝胶过滤 SDS-PAGE 沉降分析法
19. 丙烯酰胺 甲叉丙烯酰胺 负 慢
20. 常规聚丙烯酰胺凝胶电泳
21. 水化层破坏 带电性质改变

四、单项选择题

1. D 2. B 3. B 4. C 5. E 6. A 7. C 8. A 9. C 10. C
11. D 12. B 13. E 14. A 15. A 16. D 17. B 18. E 19. A 20. B
21. B 22. C 23. C 24. A 25. A 26. A 27. E 28. C 29. E 30. C
31. D 32. A

五、多项选择题

1. ABD 2. ADE 3. ACDE 4. ACD 5. ABCDE 6. ABCDE 7. CDE
8. ABCDE 9. ABCDE 10. ABCDE 11. ACDE 12. ABE 13. ABC 14. BCDE
15. ABDE 16. CE 17. ABCE 18. ABCD 19. ACDE 20. ABCD

六、简答题

1. 简述蛋白质组学的研究策略。

答：（1）采用高通量的蛋白质组研究技术分析生物体内尽可能多乃至接近所有的蛋白质，这种观点从大规模、系统性的角度来看待蛋白质组学，也更符合蛋白质组学的本质。但是，由于蛋白质表达随空间和时间不断变化，要分析生物体内所有的蛋白质是一个难以实现的目标。

（2）研究不同时期细胞蛋白质组成的变化，如蛋白质在不同环境下的差异表达，以发现有差异的蛋白质种类为主要目标。这种观点更倾向于把蛋白质组学作为研究生命现象的手段和方法。

2. 简述蛋白质组学研究成果的应用前景和展望。

答：（1）在基础研究方面：近几年来蛋白质研究技术已被应用于各种生命科学领域，如细胞生物学、神经生物学等。在研究对象上，覆盖了原核微生物、真核微生物、植物和动物等范围，涉及各种重要的生物学现象，如信号转导、细胞分化、蛋白质折叠等等。在未来的发展中，蛋白质组学的研究领域将更加广泛。

（2）在应用研究方面：蛋白质组学将成为寻找疾病分子标记和药物靶标最有效的方法之一。在对癌症、老年性痴呆等人类重大疾病的临床诊断和治疗方面蛋白质组技术也有十分诱人的前景，目前国际上许多大型药物公司正投入大量的人力和物力进行蛋白质组学方面的应用性研究。

（3）在技术发展方面：蛋白质组学的研究方法将出现多种技术并存，各有优势和局限的

特点，而难以像基因组研究一样形成比较一致的方法。除了发展新方法外，更强调各种方法间的整合和互补，以适应不同蛋白质的不同特征。另外，蛋白质组学与其他学科的交叉也将日益显著和重要，这种交叉是新技术新方法的活水之源，特别是蛋白质组学与其他大规模科学如基因组学，生物信息学等领域的交叉，所呈现出的系统生物学研究模式，将成为未来生命科学最令人激动的新前沿。

3. 简述蛋白质组表达模式研究的主要技术及其中样品分离技术的原理。

答：蛋白质组表达模式的主要技术有双向凝胶电泳、以质谱为代表的蛋白质鉴定技术及生物信息学技术。双向凝胶电泳包括等电聚焦电泳（IEF）和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）。质谱技术主要有电喷雾质谱（ESI-MS）和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）。

原理：根据蛋白质等电点的不同进行第一向等电聚焦电泳分离；然后转移到二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上，再根据相对分子量大小不同进行分离。

4. 简述蛋白质分离纯化的一般程序。

答：首先根据所需蛋白质的性质选取生物体组织细胞作为材料，对所选材料进行细胞破碎、离心等前期处理，获得粗提蛋白质溶液。其次利用蛋白质溶解度的差异对蛋白质进行盐析，使其与杂蛋白分离开来，称为蛋白质的粗分离，再次根据蛋白质的分子大小及形状、电离性质、生物学功能的差异选用凝胶过滤层析、离子交换层析、电泳法、亲和层析等方法进行细分离，可得到较纯的蛋白质，此为蛋白质分离纯化的一般程序。

5. 2-DE 的基本操作步骤是什么？

答：（1）样品制备，包括蛋白质的溶解、变性、还原以及去除蛋白质杂质等；

（2）IPG 胶的制备，利用不同 pK 固定化电解质的组合可配制不同 pH 范围的凝胶；

（3）双向电泳，先进行第一向电泳：等电聚焦凝胶电泳，再进行第二向电泳：SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳；

（4）蛋白质的染色，电泳后对蛋白质的检测方法有很多种，其灵敏度和分辨率有差异，主要根据上样量的多少及样品进一步分析要求等加以选择，常用的方法有考马斯亮蓝染色、银染、铜染等。

6. 简述双向电泳的实验原理。

答：目前双向电泳主要是指 O' Farrell 建立的等电聚焦-SDS-聚丙烯酰胺双向凝胶电泳的模式。其基本原理是：先将蛋白质根据其等电点在 pH 梯度胶内（载体两性电解质 pH 梯度或固相 pH 梯度）进行等电聚焦，即按照它们分子量的大小进行 SDS-PAGE 第二次电泳分离。样品中的蛋白质经过等电点和分子量两次分离后，可以得到分子的等电点、分子量和表达量等信息。双向电泳分离的结构是蛋白质点而不是条带。

7. 简述双向电泳研究蛋白质组的优缺点。

答：优点：（1）双向电泳技术，特别是固相 pH 梯度等电聚焦为第一向的双向电泳技术是当前分辨率最高，信息量最大的电泳技术。目前，一次双向电泳最高可达 11000 个蛋白点的分辨率；（2）双向电泳能将组织和细胞中成千上万种蛋白高分辨率，高灵敏度的分离以满足随后的质谱分析，结合质谱鉴定技术可查明大型蛋白复合物各组分，与其他生物技术相结合，可以快速准确地发现和鉴定新的蛋白质。

缺点：（1）低拷贝蛋白质的鉴定受限；（2）极酸或极碱蛋白的分离比较困难；（3）分子质量极大（>200kDa）或极小（<200kDa）蛋白的分离较难；（4）难溶蛋白的检测比较困难；（5）由于蛋白多样性的存在，很难确定一张正常状态的图谱作为病理状态的对照；（6）重复性仍然不理想；（7）得到高质量的双向凝胶电泳需要精湛的技术。

8. 荧光差异显示双向电泳的优点是什么？

答：优点：荧光差异显示双向电泳采用了荧光试剂来标记蛋白质并通过荧光成像以获取电泳图像，可以在同一块凝胶上比较两种不同来源或不同处理样本的蛋白质表达谱。

9. 酵母双杂交技术是利用其什么特点建立起来的？在科学研究中有什么作用？

答：酵母双杂交技术是利用真核生物转录调控因子的组件式结构特征，因为这些蛋白质往往是由两个以上相互独立的结构域构成，其中 DNA 结合结构域（BD）和转录激活结构域（AD）是转录因子发挥功能所必需的。单独的 BD 能与特定基因的启动区结合，但不能激活基因的转录，而由不同转录调控因子的 BD 和 AD 所形成的杂合蛋白却能行使激活转录的功能。将拟研究的编码“猎物”蛋白的基因与 AD 序列结合，编码“诱饵”蛋白的基因与 BD 序列结合，形成两段融合基因，并在同一菌株内表达，若“诱饵”蛋白与“猎物”蛋白在核内存在相互作用，就可以重新形成完整的有活性的转录因子，从而激活报告基因的转录。因此根据报告

基因的表达与否，即可判断“诱饵”蛋白与“猎物”蛋白之间是否有相互作用。酵母双杂交常用于研究新蛋白质的相互作用和发现蛋白质的功能。

10. 简述酵母双杂交系统的主要优点。

答：优点：不仅能筛选已知蛋白质的配体，而且能快速获得蛋白质的编码基因，使蛋白质表现型和基因型相联系；可以筛选 cDNA 文库中编码的、与已知蛋白质作用的成分；真实反应细胞内蛋白质间相互作用情况；不需要分离靶蛋白；敏感性高，能检测到较弱的蛋白质之间相互作用。

11. 简述免疫共沉淀的原理和免疫共沉淀耦联质谱技术的特点。

答：原理：当细胞在非变性条件下被裂解时，完整细胞内存在的许多蛋白质—蛋白质间的相互作用被保留了下来。如果用蛋白质 X 的抗体免疫沉淀 X，那么与 X 在体内结合的蛋白质 Y 也能沉淀下来。

特点：研究的是生理条件下蛋白质之间的相互作用；检测的是细胞裂解液中所有蛋白质与靶蛋白的相互作用；可检测依赖于修饰的蛋白质相互作用。

12. 简述生物传感器耦联质谱技术的基本原理。

答：生物传感器耦联质谱技术是定性和定量检测蛋白质间相互作用并对其进行鉴定的简便而快速的方法。它是以表面等离子共振 (SPR) 为基础的生物大分子相互作用的分析技术 (BIA) 与 MALDI-TOF 质谱技术的有机结合，其原理是采用 1cm*1cm 大小的生物传感芯片，该芯片以金黄色的玻璃作为支持物，上面结合有羧甲基葡聚糖聚合物，通过化学修饰可将感兴趣的蛋白质 (肽) 固定在葡聚糖聚合物上形成传感片，将待测蛋白质或肽溶液通过微射流卡盘流过该固相载体，那些与固相蛋白质 (肽) 发生相互作用的蛋白质 (肽) 被滞留在聚合物的表面上，由于芯片表面蛋白质含量增加从而导致入射光的折射率改变，使其表面等离子共振光的共振角发生改变，该改变与表面蛋白的含量呈线性关系，通过 SPR-BIA 检测系统可实时检测该变化从而实现对蛋白质间相互作用的分析。

13. 简述蛋白质免疫印迹法的基本原理和主要操作步骤。

答：蛋白质印迹法又称蛋白质免疫印迹法，是 20 世纪 70 年代末 80 年代初在蛋白质凝胶电泳和固相免疫测定的基础上发展起来的蛋白质检测技术，为检测样品中是否存在蛋白质抗原

提供了一种可靠的方法。该法鉴定蛋白质的原理是根据被测蛋白能与特定抗体的结合特性和该蛋白的相对分子质量。

免疫印迹法程序可分为 5 个步骤：

- (1) 蛋白样品的制备；
- (2) 经过 SDS-PAGE 分离样品；
- (3) 分离的蛋白转移到膜载体上，转移后首先将膜上未反应的位点封闭起来以抑制抗体的非特异性吸附；
- (4) 用固定在膜上的蛋白质作为抗原，与对应的非标记抗体（一抗）结合；
- (5) 洗去未结合的一抗，加入酶耦联或放射性同位素标记的二抗，通过显色或放射性自显影法检测凝胶中的蛋白成分。

14. 目前蛋白质翻译后修饰的研究面临的困难有哪些？

答：目前蛋白质翻译后修饰的研究面临的困难有：

- (1) 被翻译后修饰的蛋白质经常只是很少的拷贝数，因此修饰肽的检测需要高灵敏度的方法；
- (2) 蛋白质翻译后修饰要求在确定其修饰位点和修饰数目的同时进行定量分析；
- (3) 蛋白质多肽之间的键经常是脆弱的，很难找到一定的条件在修饰状态下进行处理和电离；
- (4) 已经有超过 400 种蛋白质翻译后修饰被发现，且测定所有可能的蛋白质序列修饰的工作量是巨大的。

15. 蛋白质组学研究哪些主要内容？

答：蛋白质组学的研究内容不仅包括对各种蛋白质的识别和定量化，还包括确定它们在细胞内外的定位、修饰、相互反应、活性和最终确定它们的功能，如蛋白质与疾病的关联性。随着学科的发展，蛋白质组学的研究内容也在不断完善和扩充。目前涉及如下几个方面：(1) 蛋白质：如蛋白质组作图、蛋白质组成分鉴定、蛋白质差异显示、同工体比较、新型蛋白质发掘和蛋白质组数据库构建等；(2) 基因：如完善功能基因组计划，可进行基因产物（蛋白质）识别、进一步进行基因功能鉴定、基因调控机制分析；(3) 重要生命活动的分子机制：包括细胞周期、细胞分化与发育、肿瘤发生与发展、环境反应与调节、物种进化等；(4) 医药靶分子寻找与分析：靶分子类型包括新型药物靶分子、肿瘤恶性标志，人体病理介导分子、

病原菌毒性成分。

16. 电泳是分离生物大分子的主要方法之一，请简述其原理。

答：生物大分子，如蛋白质、核酸、多糖等常以颗粒分散在溶液中，它们的静电荷取决于介质的 H^+ 浓度或与其他大分子的相互作用。在电场中，带电颗粒向阴极或阳极迁移，迁移的方向取决于它们带电的符号，这种现象即电泳。

17. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳可以测定蛋白质的分子质量，其原理是什么？

答：SDS 是一种阴离子去污剂，作为变性剂和助溶性试剂，它能断裂分子内和分子间的氢键，使分子去折叠，破坏蛋白质分子的二级和三级结构。强还原剂，如 β -巯基乙醇和二硫苏糖醇则能使半胱氨酸残基之间的二硫键断裂。在样品和凝胶中加入 SDS 和还原剂后，分子被解聚为组成它们的多肽链。解聚后的氨基酸侧链与 SDS 充分结合形成带负电荷的蛋白质-SDS 胶束，所带的负电荷大大超过了蛋白质分子原有的电荷量，这就消除了不同分子之间原有的电荷差异。蛋白质-SDS 胶束在水溶液中的形状像一个长椭圆棒，椭圆棒的短轴对不同的蛋白质-SDS 胶束基本上是相同的。但长轴的长度与亚基分子质量的大小成正比。因此这种胶束在 SDS-PAGE 系统中的电泳迁移率不再受蛋白质原有电荷的影响，而主要取决于椭圆棒的长轴的长度，即蛋白质或亚基分子质量的大小。

18. 什么是噬菌体表面显示技术？

答：噬菌体表面显示技术是将基因表达产物与亲和选择相结合的技术，其基本原理是将编码“诱饵”蛋白的 DNA 片段插入噬菌体基因组，并使之与噬菌体外壳蛋白编码基因相融合。该重组噬菌体浸染宿主细菌后，复制形成大量带有杂合外壳蛋白的噬菌体颗粒，直接用于捕获靶蛋白库中与“诱饵”相互作用的蛋白质。基于生物分子与药物靶分子（抗体、受体、抗原、酶的底物等）的亲和力，应用噬菌体表面显示技术可以从多肽库中进行快速筛选，从而成为药物开发的强有力工具。

19. 简述目前噬菌体表面显示技术在蛋白质研究中的应用

答：（1）展示功能蛋白结构域：噬菌体显示技术被广泛应用于研究蛋白质与其他配基的相互作用。完整的蛋白质或结构域与噬菌体蛋白形成融合噬菌体，为研究结构与功能的相互关系提供了一个非常有效的工具。

(2) 研究蛋白质相互作用：用靶蛋白质（如受体、抗体等）对该随机文库进行筛选，就可以获得与之结合的短肽序列。对所得序列测定分析，并合成相应的短肽从而可以来研究两个蛋白质之间的相互作用。

(3) 蛋白质定向设计和空间结构改造：可利用靶蛋白从蛋白质随机展示文库中筛选一个与其相互作用的蛋白质，并定点突变，以实现对其特定位点和功能域进行定向选择。因此定点突变结合噬菌体显示技术成了筛选蛋白功能域的一个有力工具。

(4) 新受体和配体的发现：从多肽库中可分离到与天然激素相似的，与受体结合的高亲和力的多肽，利用完整细胞从多肽库中找到受体的高选择性配体，如利用噬菌体显示技术研究发现，人白细胞介素-4 受体（IL-4）作为靶标是对药物筛选，及动脉粥样硬化分子成像的重要工具。

(5) 噬菌体显示技术还可用于筛选酶抑制剂、研究细胞信号转导及抗原表位分析等。

20. 简述目前噬菌体表面显示技术的局限性。

答：(1) 受大肠杆菌转化效率的限制，高效转化大肠杆菌的转化效率为 10^7 - 10^8 ，故一般肽库的容量只有 10^9 ，高于此限制的基因难以表达，受到库容量的限制；

(2) 由于噬菌体显示技术依赖于宿主细胞内基因的表达，因此难以对毒性分子进行有效表达和展示；

(3) 编码肽的基因带有一定的偏爱性，决定了肽库的多样性受到局限；

(4) 氨基酸的修饰受宿主菌限制。

七、论述题

1. 何谓后基因组研究，主要包含哪些研究内容？

答：后基因组研究是指在人类基因组计划完成后，为进一步利用基因组结构信息，进而阐明基因的功能，并应用于医学等各个领域的各种研究工作。目前主要涉及以下几个方面的研究内容：

(1) 功能基因组学将揭示不同细胞在不同的发育阶段，不同的生理病理条件下的基因表达状态，从而深入认识这些基因在发育、分化、病理等状态下的功能变化，认识其表达调控方式及调控机制。

(2) 蛋白质组学是后基因组研究中的一个重要内容，是研究不同生命时期，或正常、或疾病、或给药前后细胞和组织中蛋白质的表达变化。

(3) 蛋白质的空间结构的分析与预测。

(4) 细胞信号转导机制研究。

除上述几个领域以外,基因组学在其他生物及其他研究中的应用也是后基因组研究的进一步扩展。例如病原微生物基因组学、药物基因组学、环境基因组学等。

2. “一个基因一个蛋白质”的说法对吗?为什么?

答:“一个基因一个蛋白质”的说法不合适。

(1) 一个基因的转录产物在不同的发育阶段、分化细胞和生理状态下,通过不同的剪接方式,可以得到不同的 mRNA 和翻译产物,称为选择性剪接。选择性剪接方式有:平衡剪接;拼接产物缺失一个或几个外显子;拼接产物保留一个或几个内含子作为外显子的编码序列;外显子中存在 5' 拼接点或 3' 拼接点,从而部分缺失该外显子;内含子中存在 5' 拼接点或 3' 拼接点,从而使部分内含子变为编码序列。

由于转录起点不同和加 poly(A) 位点不同,再加上不同的编辑,增加了最后成熟 mRNA 的种类,它们翻译成不同的蛋白质。

(2) 同一蛋白质可能以许多形式进行翻译后修饰。越是高等的真核生物,其基因表达调控机制越复杂,每个基因能够产生更多的蛋白质。多肽链合成通常需经过加工与折叠才能成为有活性的蛋白质。翻译后加工过程包括:除去起始的甲硫氨酸残基或随后几个残基;切除分泌蛋白或膜蛋白 N 端的信号序列;形成分子内二硫键,以固定折叠构象;肽链断裂或切除部分肽段;末端或内部某些氨基酸的修饰,如甲基化、乙酰化、磷酸化等;加上糖基(糖蛋白)、脂类分子(脂蛋白)、配基(复杂蛋白)。

此外,蛋白质需要在酶和分子伴侣帮助下进行折叠,并正确定位。某些翻译产物经不同加工过程可形成不同活性产物。

(3) 许多蛋白质往往又是由两条或多条多肽链组成(特别是那些由不同的多肽链组成的蛋白质),如成人血红蛋白 A 由 4 条多肽链组成 $\alpha_2\beta_2$,而每个基因只有一种遗传信息,编码一种多肽链。显然 α 和 β 多肽链是由不同基因所控制的。而且在不同发育阶段同一种多肽链也是由不同基因编码的,如人在胚胎期,胎儿期,从出生到死亡, α 亚基分别是由 ξ , α , α 编码的, β 亚基分别是由 ϵ 、 γ 、 β 或 δ 编码的。所以一个蛋白并非由一种基因编码。

(4) 有些基因如 rDNA、tDNA 只转录 rRNA、tRNA,而不是翻译肽链,还有些基因,如操纵基因根本就没有基因的产物,但不能说它们不是基因。

3. 简述 2-3 种检测蛋白质间相互作用的方法。

答：（1）酵母双杂交系统：是利用杂交基因通过激活报告基因的表达探测蛋白-蛋白的相互作用。真核生物转录因子具有 DNA 结合结构域（BD）和转录激活结构域（AD），这两个结构域分开时仍分别具有功能，但不能激活转录，只有它们以适当途径在空间上较为接近时，才能重新具有转录因子活性，并激活报告基因表达。

（2）免疫共沉淀（IP）：基本原理是抗原和抗体之间专一性地相互作用而沉淀，从而保留下来，其是一种经典的检测蛋白质相互作用的方法。其实验过程比较简单，裂解细胞后，加入抗体，抗原被沉淀下来后洗涤，去除非特异性结合，再分析复合体。抗体可以是单克隆，也可以是多克隆。

（3）蛋白质芯片：蛋白质芯片可以用来大规模筛选蛋白质之间的相互作用，将一个蛋白质芯片与荧光标记的探针蛋白孵育，洗脱非特异性结合的蛋白后，可以通过扫描芯片上的荧光点来检测稳定的相互作用蛋白点。

4. 试回答蛋白质串联亲和纯化分离原理、方法及步骤。

答：串联亲和纯化（TAP），用于研究蛋白质在生理条件下的相互作用，通过嵌入一段蛋白质标记，在目的蛋白的一端或中部导入蛋白质标记，这样便在没有破坏目的蛋白调控序列的基础上，使得被标记的目标蛋白其表达量与其在细胞中自然表达水平相当，避免了由于过量表达的导致非自然条件下的蛋白质相互作用。经过特异性的两步亲和纯化，在生理条件下与目标蛋白发生真实作用的蛋白便可被一起洗脱下来，这样得到的蛋白质复合体接着可以用质谱技术或 Edman 降解法进行鉴定。

方法及步骤：

（1）蛋白质标记：由蛋白 A 的 IgG 结合区（ProtA）和钙调蛋白结合区（CBP）构成，中间被一个 TEV 蛋白酶的酶切位点隔开；

（2）构建表达标记蛋白的细胞或组织：将编码蛋白质标记的基因片段导入目标蛋白质编码基因的特定部位；

（3）细胞抽提物的准备；

（4）串联亲和纯化；

（5）蛋白质复合体的鉴定。

5. SDS-PAGE 上样缓冲液成分有哪些？各有何作用？若无此成分电泳会出现什么问题？

答：SDS-PAGE 上样缓冲液成分有：SDS、还原试剂（二硫苏糖醇或 β -巯基乙醇）、溴酚蓝和甘油。

（1）SDS：是一种阴离子去污剂，作为变性剂和助溶剂。SDS 使蛋白质本身的电荷变化被屏蔽，氢键被断裂，疏水相互作用被取消，多肽被去折叠（二级结构被破坏），最后形成椭圆形。如果不加，会使电泳条带出现拖尾、纹理现象；

（2）还原试剂：使半胱氨酸残基之间的二硫键断裂，蛋白质完全去折叠，只根据亚基分子质量分离。如果不加，在高分子质量范围会产生“鬼带”；

（3）溴酚蓝：指示剂，用于指示样品的迁移过程，如果不加，则无法看到样品的迁移过程；

（4）甘油：使样品沉入孔底。如果不加，会使样品漂移影响电泳效果。

第十一章 疾病产生的分子基础

一、名词解释

1. 基因突变 (gene mutation)：在基因的特定 DNA 序列中，其碱基组成及排列顺序可因机体内外因素的作用发生改变，导致 DNA 一级结构发生改变，形成基因突变。
2. 点突变 (point mutation)：在基因一级结构某个位点上，一个碱基被另一个碱基取代产生的 DNA 一级结构改变称为点突变。
3. 缺失突变(deletion mutation)：基因的一级结构中因一个碱基或一段序列丢失造成基因结构改变的突变。
4. 插入突变(insertion mutation)：基因一级结构中某个位置增加一个碱基或一段序列，改变基因结构的突变。
5. 转换(transition)：同类型碱基之间的取代，即嘧啶与嘧啶之间或嘌呤与嘌呤碱基之间取代形成的点突变。
6. 颠换(transversion)：不同类型碱基之间即嘧啶与嘌呤之间的相互取代所形成的点突变。
7. 倒位突变 (inverse mutation)：基因内部 DNA 序列重组，使一段序列方向由原来的 5' → 3' 方向排列变为 3' → 5' 方向的突变。
8. 配子突变(karyotic mutation)：发生在生殖细胞中的突变叫做配子突变，将传递给子代。
9. 体细胞突变(somatic mutation)：个体生存过程中发生在机体细胞中的基因突变称为体细胞突变。

胞突变，可以产生相应的表型性状，但不能传递给子代。

10. 动态突变(dynamic mutation): 微卫星序列串联重组拷贝数随着世代传递而不断扩大的现象被称为动态突变，为迄今只见于人类的一种普遍基因突变情况，与一些遗传病和某些肿瘤发生有关。

11. 无义突变(nonsense mutation): 由于碱基的取代、缺失或插入等，使编码某种氨基酸的密码子变成了终止密码子，导致翻译过程提前终止，形成截短的多肽链的基因突变。

12. 移码突变(frame-shift mutation): 基因 DNA 序列中发生单个、数个碱基或一段 DNA 片段的缺失或插入，导致突变点后三联密码阅读框发生改变，翻译的多肽链氨基酸序列与突变前不同的突变。

13. 错义突变(missense mutation): 由于 DNA 分子中碱基对被取代，导致相应三联密码编码的氨基酸被改变，即突变前后某一位置上的氨基酸被另一种所取代，对编码蛋白质的功能会产生不同程度的影响。

14. 同义突变(synonymous mutation): 导致 DNA 序列中发生了碱基取代，即 DNA 一级结构发生变化，但不引起表达产物蛋白质中氨基酸性质变化的突变。

15. 中性突变(neutral mutation): DNA 一级结构的变化不影响蛋白质生物活性、不表现明显表型效应的突变称为中性突变，如同义突变和某些错义突变。

16. 剪接突变(splicing mutation): 发生在剪接供、受体识别位点或其相似序列中，使正常剪接位点消失或新生剪接位点、导致核内不均一 RNA 的剪接异常的基因突变。

17. 珠蛋白基因簇(globin gene clusters): 人类珠蛋白基因在染色体上成簇排列，位于 16 号染色体短臂(16p13.3)、覆盖约 30kb 的数个串联排列基因称为 α 珠蛋白基因簇；位于 11 号染色体短臂(11p12)、覆盖约 60kb 的数个串联基因称为 β 珠蛋白基因簇。

18. 异常血红蛋白血症(abnormal hemoglobin syndrome): 血红蛋白是红细胞中运输氧和二氧化碳的重要蛋白，其结构异常可能导致功能变化，影响红细胞运输氧和二氧化碳的能力，导致多种疾病发生，这些疾病统称为异常血红蛋白血症。

19. 地中海贫血(thalassemia): 血红蛋白是由两条 α 珠蛋白链和两条 β 珠蛋白链组成的四聚体，具有完整功能的复合蛋白要求 α 和 β 珠蛋白的数量保持平衡，当任一蛋白的合成受到抑制甚至完全缺失时，会使两种蛋白之间的量平衡丧失，引发贫血症状，因其最先在地中海地区被报道而称为地中海贫血，简称地贫。珠蛋白合成受到抑制或缺失引发的地贫中，因 α -珠蛋白基因变异导致 α -珠蛋白合成障碍者称为 α -地中海贫血，相应 β -珠蛋白基因变异导致 β -珠蛋白合成障碍者为 β -地中海贫血。

20. DNA 甲基化(DNA methylation): DNA 序列中 C 碱基加入一个甲基基团的修饰称为甲基化, 常发生在基因转录调控区 CpG 岛中, 是人类基因组常见的精确调控方式, 特定序列的去(或低)甲基化或高甲基化变化会使基因表达发生变化, 即表达激活或沉默, 或表达增强或表达减弱。

21. mRNA 差异显示(mRNA differential display): 通过分离表型相区分(如特定疾病的病例和对照)样本总 RNA(或 mRNA)、逆转录为 cDNA 后进行 PCR 随机扩增, 凝胶电泳后比较扩增产物条带, 其中的差异片段可视为引起表型差异(如疾病发生相关)候选基因。

22. 基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE): 以转录物(cDNA)上特定区域的 9-11bp 特异寡核苷酸序列作为标签, 并用该标签来特异地代表该转录物; 通过连接酶随机串联多个标签并克隆至载体中, 建立文库; 通过对标签的序列分析获得基因转录的分布及其表达丰度, 从而充分了解基因转录组的全貌。

23. 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells): 胚胎发育早期保持多潜能未分化状态、具备发育成胚系各种组织的能力的细胞。

24. 泄漏突变(leaky mutation) 基因敲除中发生不完全敲除而导致被敲除基因表达得以维持或发生非预期变化的情况。

25. 反义技术(antisense technique): 根据碱基互补原理, 用人工或生物合成的特异性互补 DNA 或 RNA 片段(反义核酸), 使之特异地与目的核酸片段互补结合, 从而特异地抑制甚至阻断目的基因表达的一种技术。

26. 反义寡核苷酸技术(antisense oligonucleotide technique): 根据碱基互补结合原理, 人工或生物合成与目的 DNA 或 RNA 互补的寡核苷酸, 将其导入细胞后与胞内目的 DNA 或 RNA 特异结合, 从而抑制甚至阻断目的基因表达或目的 RNA 翻译, 达到人工调控基因表达的目的。

27. 肽核酸(peptide nucleic acid, PNA): 反义寡核苷酸技术中以 2-氨基乙基甘氨酸为基本骨架的多肽链是一种核酸类似物, 每个氨基酸残基间由酰胺键连接到多肽骨架上, 碱基通过亚甲基羰基连接到多肽骨架, 即一酰胺键连接骨架取代核酸中以磷酸二酯键连接骨架。由于它能与 RNA 或 DNA 互补结合形成稳定的多肽链而被称为肽核酸。

28. 反义 RNA 技术(antisense ribonucleic acid technique): 采用自身无编码功能、但能通过配对碱基间氢键与目的 RNA 特别是 mRNA 的特定区域互补结合的小分子 RNA, 抑制目的 RNA 功能、调控相应基因表达的技术。

29. 自剪接(self-splicing): 某些 RNA 分子内通过自我催化完成自身剪接过程, 如四膜虫 rRNA 前体分子, 这种现象称为自剪接。

30. 自剪切 (self-cleavage): RNA 分子识别并切断自身分子的功能称为自剪切。
31. 转录后基因沉默 (post-transcription gene silencing, PTGS): 正常基因转录产生 RNA 分子后,因各种体内因素导致其降解而不能成为有效的蛋白质翻译模板的现象称为转录后基因沉默。
32. 泛素蛋白酶体途径(ubiquitin proteasome pathway, UPP): 在泛素、特异性泛素激活酶、泛素结合酶、泛素连接酶、蛋白酶体的依次作用下,发生目的蛋白泛素化及泛素化蛋白质最终被降解为小肽的过程,是细胞质和细胞核内依赖于 ATP、非溶酶体途径蛋白质降解通路,能高效、高选择性地细胞内蛋白质降解。

二、判断题

1. √ 2. × 3. √ 4. √ 5. √ 6. √ 7. √ 8. √ 9. √ 10. √ 11. × 12. ×
13. √ 14. √

三、填空题

1. 替换 插入 缺失 (位置可互换) 2. 同源重组 3. mRNA cDNA
4. 插入 5. SNP (或单核苷酸多态性) 点突变
6. 基因敲除 基因打靶 7. 定点突变
8. 溶酶体 UPP (或泛素蛋白酶体降解)

四、单项选择题

1. D 2. C 3. A 4. A 5. B 6. B
7. D 8. A 9. A 10. B 11. A 12. D

五、多项选择题

1. ABCDE 2. ABCD 3. ABDE 4. AE
5. ABCDE 6. ABD 7. ABCD 8. ABC

六、简答题

1. 什么是基因突变? 它有哪些主要类型?

在特定 DNA 序列中,碱基组成及排列顺序可因机体内因素的作用发生改变,导致

DNA 一级结构变化，称为基因突变（gene mutation）。主要类型分为：1）点突变（point mutation），在 DNA 序列某个位点上，一种碱基（核苷酸）被另一种取代所产生的改变。2）缺失（deletion），一个碱基或一段碱基序列丢失的改变。3）插入（insertion），某个位置增加一个碱基或一段碱基序列的改变。4）重排（rearrangement），常见有反置或迁移倒位，即基因 DNA 序列内部重组。5）配子突变和体细胞突变；6）动态突变（dynamic mutation），微卫星序列串联重复拷贝数随着世代传递而不断增加的现象。

2. 简述基因突变的不同遗传学效应。

基因突变的遗传学效应包括错义突变、无义突变、同义突变和移码突变。1）错义突变（missense mutation）是因 DNA 分子中碱基对被取代，突变基因 mRNA 中相应密码子所编码氨基酸被另一种所取代。2）无义突变（nonsense mutation）是由于碱基取代、缺失或插入后使得编码某种氨基酸的密码子变成了终止密码子，导致蛋白质翻译过程被提前终止。3）同义突变（synonymous mutation）是由于遗传密码的简并性，使突变前后相应密码子编码同一氨基酸。4）移码突变（frameshift mutation）是指 DNA 序列中发生单碱基、多个碱基或 DNA 片段的缺失或插入，导致突变点后三联密码阅读框改变。5）基因突变使正常剪接位点消失或产生新的位点，导致 mRNA 剪接错误。

3. 什么是移码突变？简述其可能导致的蛋白质多肽链变化情况。

移码突变是指基因的碱基序列中发生了单个碱基、数个碱基或碱基序列片段的缺失或插入，导致突变之后的三联密码阅读框发生改变，突变点以后的碱基序列所编码的多肽链氨基酸序列与突变前不同。

如果插入或缺失的碱基数目恰好是 3 或 3 的整数倍，多肽链有一个或数个氨基酸的增加或减少，突变区域以后的氨基酸序列不会发生改变；如果变化碱基为非 3 的整数倍，就会使三联密码的阅读向左或右移动，突变区域以后的氨基酸序列全部发生改变。

4. 简述病原生物基因引起人体疾病的机理。

第一，病原生物感染后导致外源性基因在人体特定组织器官表达，病原生物得以生存、繁殖，引起机械或生物学损伤；第二，病原生物及其基因在人体内大量繁殖、表达，与机体争夺营养物质，造成人体营养缺乏；第三，病原生物产生毒素作用于人体细胞，使特定生理功能或代谢发生异常；第四，某些病原生物如病毒基因可整合至人体基因组中，改变某些正

常基因的结构和/或基因表达。

5. 试述基因突变可能引起的 hnRNA 剪接变化情况。

初级转录产物核内不均一性 RNA (heterogeneous nucleic RNA, hnRNA) 的剪接是一种重要的 RNA 转录后加工方式, 并取决于 hnRNA 一级结构。剪接只发生在特定的剪接供体和受体位点上, 其序列高度特异, 常遵循 “GA-AT” 法则, 因此, 当基因变异发生在这些剪接位点时就会影响 hnRNA 的剪接, 方式主要有两种: 一是使得 hnRNA 的正常剪接位点消失, 二是产生新的剪接位点。无论哪一种都可导致 mRNA 发生剪接错误, 产生异常 mRNA, 最终产生异常的蛋白表达产物, 并改变相应的生物学性状。

6. 请举例说明细胞内信号异常可导致特定疾病发生。

细胞内信号是调节基因表达、蛋白质合成的重要因素之一。错误的细胞内信号通过破坏基因表达的时间和空间特异性, 或使基因表达水平过高或过低等方式, 导致疾病发生。

如 1) 持续高血糖使糖尿病患者心肌细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞中二酰甘油(DAG) 从头合成增加, 进而导致血清和组织中血管紧张素 II (AngII) 增多, 后者具有强大的直接刺激蛋白质合成的作用, 可致心肌重塑和心肌肥大; 2) 高血糖也使 PKC 基因表达增强, PKC 合成增加, 其下游效应基因表达及其产物的变化同样造成心肌肥大、心肌细胞受损、纤维化、收缩和舒张功能障碍等, 因此糖尿病高血糖作为一种异常细胞内信号分子, 使心肌细胞内一系列基因表达发生改变, 最终导致糖尿病心肌病发生。

7. 简述核糖核酸酶切技术分析基因突变的基本原理及其优、缺点。

核糖核酸酶切分析 (RNase cleavage) 的基本原理是在一定条件下, 异源双链核酸分子 RNA:RNA 或 RNA:DNA 中的错配碱基可被核糖核酸酶 RNase 识别并切割; 利用含 SP6 或 T7 噬菌体启动子的质粒, 在体外合成与野生型 DNA 或 RNA 互补的标记 RNA 探针, 将其与待检核酸样品杂交后再用 RNase 处理, 形成的异源双链核酸分子如有单碱基错配, 会被 RNase 识别切割, 通过分析酶切片段数量及大小可检出有无突变及点突变位置。优点: 一步反应确定突变在片段中的位置, 不使用有害化学试剂。缺点: 突变检出率不高, 因为错配为嘌呤碱基时 RNase 的切割效率低下, 即使同时检测正、反义两条链, 检出率也只能达到 70%, 且需要制备特异性 RNA 探针。

8. 简述杂合双链分析检测基因突变的基本原理及其优、缺点。

杂合双链分析 (heteroduplex analysis, HA) 原理在于有缺失突变的待检 DNA 与野生型 DNA 探针杂交后, 形成的异源杂合双链 DNA 在错配处会产生单链的环形突起, 无突变则无此结构, 这两种杂交后形成的双链 DNA 在凝胶电泳时会产生不同的迁移率, 据此可以判断待检 DNA 样品中是否有缺失突变。优点: 简单、快速。缺点: 适用范围较小, 限于 200-300bp 片段, 且不能确定突变位置, 检出率一般为 80%。

9. 简述化学切割错配检测基因突变的基本原理及其优、缺点。

化学切割错配 (chemical cleavage of mismatch, CCM) 通过在 DNA:DNA 或 DNA:RNA 异源杂合双链核酸分子中发生 C 错配 (如 A-C、T-C、C-C 配对) 处, 能被羟胺和哌啶切割, 如系 T 错配, 能被四氧化锇切割的特点, 先将野生型探针与待检样品杂交, 再分别用羟胺、哌啶和四氧化锇处理; 根据凝胶电泳中 DNA 片段数量和大小判断样品中是否有突变、突变位置及类型等。优点: 准确率高, 无非特异性切割, 检出率高, 达 100%, 结合荧光检测系统还可提高其灵敏度达 1 突变/10 个细胞, 可用于长达 2kb 片段。缺点: 步骤多, 费时, 使用有毒化学物质。

10. 简述酶促切割错配检测基因突变的原理及其优、缺点。

酶促切割错配 (enzyme mismatch cleavage, EMC) 利用 T4 内切核酸酶 VII 识别 12 种错配碱基并在附近进行酶切的特性, 将核酸探针与待检分子杂交, 有突变时杂交分子中有错配出现, 为 T4 内切核酸酶 VII 识别切割, 根据凝胶电泳中片段数量和大小判断有无突变。优点: 能对 DNA: RNA 异源杂合分子进行分析, 最长检测片段达 1.5kb。缺点: 产生非特异性切割, 检出效率不能保证 100%, 必须设立内对照。

11. 简述 mRNA 差异显示筛选差异表达基因的基本原理及其优、缺点。

mRNA 差异显示技术基于逆转录 PCR (RT-PCR) 而建立: 抽提配对样品如正常和疾病细胞内 mRNA (或总 RNA), 分别逆转录成为 cDNA, 然后行 PCR 随机扩增; 一条引物为 oligo(dA), 能与单链 cDNA 5'端 oligo(dT)结合, 另一条为随机引物, 能与 3'端互补核苷酸序列结合, 因此经过 RT-PCR 扩增后, 能将 mRNA 逆转录为 cDNA、扩增获得双链 cDNA 及其不同 PCR 产物; 扩增产物经过凝胶电泳分析, 比较组间扩增产物异同, 回收差异片段为探针在 cDNA 文库或基因组文库中筛选相关基因, 从而确定这些基因在疾病过程中的参与

情况。

优点：简单易行；灵敏度高；重复性好；多能性；快速。缺点：假阳性率高，达 70% 以上；逆转录产物仅为 mRNA 3'非翻译区，需要进一步的文库筛选确定有关基因。

12. 简述基因表达系列分析的原理及其基本过程。

基因表达系列分析（serial analysis of gene expression, SAGE）以逆转录产物 cDNA 上特定区域的 9-11bp 特异寡核苷酸序列作为标签（tag）来代表各转录物；用连接酶随机串联将多个标签（20-60 个）并克隆到载体中，建立 SAGE 文库；通过对标签的序列分析，获得基因转录的分布以及表达丰度，从而充分了解基因转录组的全貌。SAGE 的基础是能特异性代表转录物并含有足够信息的标签。

13. 何谓转基因？简述常用细胞转染方法。

将人工分离和修饰过的外源基因导入培养细胞和/或生物体内，通过导入基因的表达改变细胞或生物体性状，并形成性状的可遗传性修饰的过程称为转基因，用于研究基因功能或确定基因在疾病中的作用。转基因技术的基本策略是基因的细胞转染。转染基因包括质粒 DNA、RNA 和寡核苷酸等，分为瞬时转染和稳定转染，前者将外源基因导入宿主细胞核内但不整合至染色体中，后者则实现整合或形成染色体附加体。

常用转染方法有物理方法如电穿孔法、化学方法如磷酸钙、阳离子脂质体、非脂质体脂类介导法和生物学方法如逆转录病毒、腺病毒介导法等。要获得理想的转染效率，通常要对包括转染方法及相关试剂、细胞培养体系、载体 DNA、导入基因纯度和含量等在内的转染条件进行优化。

14. 何谓反义技术？简述其主要分类。

反义技术（antisense technique）是根据碱基互补原理，用人工或生物合成特异性互补 DNA 或 RNA 片段（即反义核酸），使之能特异地与目的核酸片段互补结合，从而抑制甚至阻断目的基因表达的一种技术。根据所用反义核酸的不同，反义技术可分为反义寡核苷酸技术、反义 RNA 技术和核酶技术等。

15. 简述反义寡核苷酸技术原理及其调节基因表达的主要机理。

反义寡核苷酸（antisense oligonucleotide, ASON）技术根据碱基互补结合原理，人工或

生物合成与目的 DNA 或 RNA 互补的寡核苷酸，将其导入细胞，通过其与胞内目的 DNA 或 RNA 特异结合，抑制甚至阻断目的基因转录和/或翻译，达到人工调控基因表达的目的。

ASON 主要通过以下几种机理调节基因表达：1) 形成三螺旋 DNA (triplex DNA) 或 D 环 (D-loop) 结构；2) 与细胞内目的 mRNA 互补结合，形成 DNA-RNA 异源杂交体，激活核糖核酸酶 H (RNase H) 特异性降解 mRNA；3) 与核内不均一 RNA (hnRNA) 互补结合，破坏正常剪接形成 mRNA 的过程；4) 与核糖体 rRNA 的 mRNA 结合位点互补结合，阻止 mRNA 的结合和翻译启动；5) ASON 与 mRNA 互补结合，破坏其进入正确翻译部位的途径。

16. 简述反义 RNA 技术及其调节基因表达的主要机理。

反义 RNA (antisense RNA) 是一类自身没有编码功能，但能通过配对碱基间氢键与目的 RNA 特别是 mRNA 的特定区域补结合，从而抑制基因表达的小分子 RNA。一般将自然存在或人工合成的反义 RNA，通过基因重组反向插入到表达载体，以此转染细胞、在细胞内产生大量反义 RNA。其作用机理包括：1) 与引物 RNA 结合或作用于引物前体，阻止引物与 DNA 结合，抑制 DNA 复制；2) 在转录水平或转录后加工过程中，阻止特定基因转录，或与 mRNA 5'端结合，阻止加帽过程；或与剪接位点结合，阻止 mRNA 的剪接形成等；3) 与 SD 序列或编码区关键点如 AUG 结合，阻止 mRNA 与核糖体结合，阻断翻译等。

17. 简述核酶的定义、主要分类和应用方式。

核酶是具有生物催化活性的 RNA，能按碱基互补原理识别特定核苷酸序列并特异地剪切底物 RNA 分子。根据其分子大小可分为大分子核酶和小分子核酶两种，前者包括 I 型内含子 (group I intron)、II 型内含子 (group II intron) 和核糖核酸酶 P 的 RNA 亚基，均由数百到数千核苷酸组成；小分子核酶按结构分为锤头 (hammerhead) 型、发夹 (hairpin) 型等，大小多在 35-155 个核苷酸之间，应用广泛。根据核酶结构特点和靶 RNA 的特异性序列特征，设计并合成针对性核酶基因，构建表达载体，导入细胞内，基因表达后通过特异序列识别降解靶 RNA。

18. 何谓基因诱导超表达技术？

将目的基因全长序列与高活性启动子或组织特异性启动子融合，转化后在诱导剂作用下或在特定的组织细胞中，目的基因发生高水平表达，导致相应基因产物大量积累的过程。该技术实现了基因在时间、空间和数量上有效的人工调节。比较诱导表达前后的表型变化，能了解目的基因的功能，确定目的基因在疾病发生中的作用。

七、论述题

1. 基因突变及其主要类型？

在基因特定 DNA 序列中，碱基组成及排列顺序可因机体内外因素的作用发生改变，导致 DNA 一级结构的变化，形成基因突变 (gene mutation)。它可以是单个核苷酸改变，也可以是多个核苷酸甚至一段核苷酸序列的改变；其分子机制可以是替换、插入或缺失等，其主要类型分为：1) 点突变 (point mutation)，在 DNA 序列某个位点上，一种碱基 (核苷酸) 被另一种取代所产生的改变。又分为转换 (transition) 和颠换 (transversion) 两种，前者指同类型碱基 (核苷酸) 即嘧啶与嘧啶、嘌呤与嘌呤之间的取代，后者指不同类型碱基即嘧啶与嘌呤之间的相互取代。2) 缺失 (deletion)，因一个碱基或一段碱基序列丢失造成基因结构的改变。3) 插入 (insertion)，某个位置增加一个碱基或一段碱基序列的基因结构改变。4) 重排 (rearrangement)，常见有反置或迁移倒位，即基因 DNA 序列内部重组，导致一段 DNA 片段方向反置，由原来的 5'-3' 方向排列整段变为 3'-5' 方向排列，或一段 DNA 序列迁移到他处，故同时在原位置和插入位置表现为缺失和插入突变，其自身还可发生反置。5) 根据基因突变发生载体不同区分为配子突变和体细胞突变。6) 动态突变 (dynamic mutation)，微卫星序列串联重复拷贝数随着世代传递而不断增加的现象，是迄今只见于人类的基因突变，与数种遗传病和肿瘤发生有关。

2. 基因突变的不同遗传学效应。

就合成蛋白质而言，基因突变会产生多种遗传学效应，包括错义突变、无义突变、同义突变和移码突变。1) 错义突变 (missense mutation) 是因为 DNA 分子中碱基对被取代，突变基因转录产物 mRNA 中相应密码子发生了变化，所编码氨基酸被另一种所取代。通常发生在蛋白质功能域或活性中心的错义突变对蛋白质的结构和功能影响较大，可能导致疾病发生；否则影响较小；甚至有些不影响蛋白质生物活性，无明显的表型效应 (这种突变也称为中性突变)。2) 无义突变 (nonsense mutation) 是由于碱基取代、缺失或插入后使得编码某种氨基酸的密码子变成了终止密码子，导致蛋白质翻译过程被提前终止，形成截短的、不完整的多肽链，影响蛋白质的正常功能活性直至完全消失。3) 同义突变 (synonymous mutation) 是由于遗传密码的简并性，使突变前后相应密码子编码同一氨基酸，因此既不引起蛋白质产物错义、也不使翻译提前终止。4) 移码突变 (frameshift mutation) 是指 DNA 序列中发生单碱基、多个碱基或 DNA 片段的缺失或插入，导致突变点后三联密码阅读框改

变，往往严重影响蛋白质结构、理化性质和生物学功能，引起表型改变或导致疾病发生。5) 如果基因突变发生在 hnRNA 的剪接位点或类似序列处，会使正常剪接位点消失或产生新的位点，导致 mRNA 剪接错误，产生异常 mRNA 及蛋白表达产物，改变相应表型性状。

3. 试述移码突变可能导致的蛋白质多肽链变化的情况。

移码突变是指基因的碱基序列中发生了单个碱基、数个碱基或碱基序列片段的缺失或插入，导致突变之后的三联密码阅读框发生改变，突变点以后的碱基序列所编码的多肽链氨基酸序列与突变前不同。

如果插入或缺失的碱基数目恰好是 3 或 3 的整数倍，经表达合成的多肽链就会有一个或数个氨基酸的增加或减少，突变区域以后的氨基酸序列不会发生改变，对蛋白质结构的影响相对较小。如果缺失或插入的碱基数不是 3 的整数倍，就会使 mRNA 中碱基的编码向左或右移码，使突变位点之后的所有密码子都发生改变，突变区域以后的氨基酸序列全部发生改变，包括产生新的终止密码子，改变编码区的长度，这些都会严重影响蛋白质的结构、理化性质和生物学功能，引起相应的表型改变或导致疾病的发生。

4. 基因突变导致蛋白质结构改变和合成量的变化均能导致特定疾病发生，各举一例说明之。

基因分类中的结构基因发生改变会改变其所编码蛋白质的一级结构，进而改变蛋白质的理化性质，如果这些改变造成了蛋白质生物学功能的紊乱直至完全丧失，就会引起疾病。

如血红蛋白 (hemoglobin, Hb) 是红细胞中运输 O_2 和二氧化碳 (CO_2) 的一种重要功能蛋白，是由 α 和 β 两种珠蛋白肽链各两分子构成的四聚体复合蛋白，每个亚基结合 1 分子血红素。血红蛋白结构异常可导致其功能变化，影响红细胞运输 O_2 和 CO_2 的能力，从而产生多种症状，形成所谓异常血红蛋白血症 (abnormal hemoglobin syndrome)。当 α 或 (和) β 珠蛋白基因突变、使得珠蛋白肽链的氨基酸组成或排列顺序发生变化时，其理化性质也发生相应改变，导致血红蛋白分子不稳定，形成不稳定血红蛋白病。以镰状红细胞贫血症为例，其分子病因在于 β 珠蛋白基因第六位密码子发生一点突变，使密码子 GAG (谷氨酸) 突变为 GTG (缬氨酸)，引起血红蛋白结构和功能的根本性改变，大大降低其稳定性及结合 O_2 和 CO_2 的能力，并导致红细胞由正常双面凹状圆盘形变成扁平的镰刀形。

结构基因的突变还能使基因表达水平发生改变，改变蛋白质合成数量，造成功能紊乱和疾病发生。仍然以血红蛋白为例，具有完整功能的血红蛋白要求 α 和 β 珠蛋白的量保持平衡，任何一种蛋白合成受到抑制直至完全缺失时，会使两种蛋白之间的量失去平衡，引起珠

蛋白生成障碍性贫血，又称地中海贫血（thalassemia），根据表达受抑制或缺失种类分别为 α -地贫和 β -地贫，多种 α 和 β 珠蛋白结构基因突变都能抑制相应蛋白合成。在我国南方多个省区常见 β 地贫。如 β 链第17位赖氨酸密码子AAG（Lys）发生无义突变，产生新的终止密码子TAG； β 珠蛋白基因开放阅读框内插入或缺失1、2、4或7个核苷酸，导致突变点后移码突变等，使 β 珠蛋白链合成提前终止、正常 β 珠蛋白含量减少甚至完全消失，引发 β 地贫。

5. 蛋白质降解的泛素-蛋白酶体途径主要内容有哪些？请举例说明蛋白质降解异常引发特定疾病。

蛋白质合成后，在执行完功能、衰老后或在执行功能过程中，甚至在执行功能前的成熟及加工运输过程中，可以被机体降解；正常机体功能需要不同蛋白质以稳定水平存在，而蛋白质合成与降解的相对速度大小决定了体内蛋白质含量。因此，蛋白质降解也是调节蛋白质功能的重要因素。

哺乳动物体内蛋白质降解有两条基本途径，一是溶酶体，主要降解细胞吞入的胞外蛋白质；另一条为泛素-蛋白酶体途径（ubiquitin proteasome pathway, UPP），主要降解细胞内泛素化的蛋白质，是细胞质和细胞核内依赖于ATP、非溶酶体途径的蛋白质降解通路，能高效并高度选择性地对细胞内蛋白质降解，尤其是对半衰期短、癌基因产物及变性、变构蛋白等。

泛素-蛋白酶体途径主要由泛素（ubiquitin, Ub）、特异性泛素激活酶（ubiquitin-activating enzyme, E1）、泛素结合酶（ubiquitin-conjugating enzyme, E2）、泛素连接酶（ubiquitin ligase, E3）、蛋白酶体（proteasome）组成；蛋白质降解是在这些酶的依次作用下发生底物蛋白质泛素化及泛素化蛋白质最后被降解为小肽的过程。泛素首先被E1活化，然后被转移至E2，通过E3的催化作用或直接通过泛素结合作用，泛素被转运至目标蛋白；泛素化的实质是泛素羧基（C）端氨基酸残基与目标蛋白质赖氨酸残基的 ϵ -氨基以共价键连接，该酶促反应反复进行，通过泛素分子间第48位赖氨酸连接，在蛋白质分子上形成多聚泛素链；多聚泛素为启动降解信号，可被26S蛋白酶体识别并最终将目标蛋白质降解。

泛素-蛋白酶体途径对于疾病发生表现出正、负性双向影响。在某些有害环境下，如氧化应激、内质网应激和老化过程中，蛋白质因受损害而发生折叠错误；正常情况下，即使是新合成蛋白质，在翻译后修饰加工过程中，受损害的蛋白质会被泛素-蛋白酶体系统识别、降解，从而将其清除；但如果该系统出现功能障碍，不能将受损蛋白降解清除，就会使其在

细胞内积聚，造成细胞功能障碍，引起相应疾病。相反，当该系统功能异常增强时，可能使某些行使正常功能的蛋白质被降解，导致蛋白功能紊乱或细胞结构破坏，引发疾病。如载脂蛋白（apolipoprotein, apo）主要作为脂类的运输载体，具有稳定脂蛋白颗粒结构、修饰并影响脂蛋白代谢有关酶的活性，而机体泛素-蛋白酶体功能障碍，可导致血浆中 apo 含量异常升高或降低，引发血浆脂蛋白代谢紊乱，是高脂血症、动脉粥样硬化、冠心病、卒中等心脑血管疾病的重要病因。同样，阿尔茨海默病（AD）患者中发现脑组织泛素-蛋白酶体活性下降，其淀粉样蛋白（amyloid protein β , A β ）在病理状态下可通过抑制 26S 蛋白酶体活性而影响泛素依赖性蛋白质的降解。

6. 请举例说明蛋白质的加工运输障碍导致的特定疾病发生。

机体细胞内新合成的未成熟蛋白质即使没有任何突变、所含遗传信息完全正确，也不具有生物活性，不能正确完成其生物学功能；要使新合成蛋白质具有完整活性需要对其进行翻译后加工，包括除去信号肽、基团修饰、蛋白质折叠、亚基聚合、运输至发挥功能的靶部位等，其中任何一个环节的障碍都会使蛋白质功能紊乱，导致疾病发生。

如白化病主要表现为眼、毛发、皮肤的色素缺失，易发生皮肤及眼部肿瘤，是先天性酪氨酸酶缺陷引起。酪氨酸酶是黑色素细胞中催化黑色素生成的限速酶。酪氨酸酶肽链合成后，需首先在内质网进行折叠，再运输至高尔基体进行糖基化加工，然后由转运囊泡将其转运至黑色素体发挥发挥作用，多种蛋白质参与了酪氨酸酶的这一成熟和转运过程，它们的异常引发了不同分子病因的白发病：1）酪氨酸酶结构基因变异如发生在 Cu²⁺结合位点即催化结构域的点突变，可使酪氨酸酶活性降低甚至消失，黑色素合成减少或完全不能合成，导致 I 型泛发性白发病；2）催化结构域外某些点突变，导致突变型酪氨酸酶蛋白在内质网中与分子伴侣结合受阻，蛋白质不能正常折叠，因而不能从内质网输出而滞留在内质网中，无法完成其成熟及运输过程，也是 I 型泛发性白化病的重要机制；3）P 蛋白参与酪氨酸酶蛋白从高尔基体到黑色素体的运输，P 蛋白结构基因突变、使 P 蛋白功能障碍，导致酪氨酸酶不能正确转运至黑色素体而发生黑色素合成障碍，引发 II 型泛发性白化病。

7. 请举例说明基因组水平上的 DNA 甲基化异常在疾病发生发展中的作用。

DNA 甲基化是人类基因组常见的精确调控方式，在基因组特定序列的低甲基化或高甲基化会使基因表达发生变化，包括激活或“沉默”及表达增强或表达减弱，不同的 DNA 甲基化模式形成不同的表观遗传学（epigenetics）特征。

DNA 甲基化异常导致基因表达变化是肿瘤形成的重要原因。不同的甲基化模式下产生不同的基因表达谱，异常甲基化导致正常基因表达谱变化，如原癌基因过度扩增、表达异常增强和/或抑癌基因的“沉寂”，都会使细胞增殖平衡受到破坏而引起恶性肿瘤发生。如人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotrophin, hCG）基因 5'转录起始区的异常低甲基化发生在多种肿瘤的发生发展中起重要作用。hCG 系胚胎期表达，成人细胞中处于静息状态，当恶性肿瘤发生时，癌细胞 hCG 基因的 5'转录起始区发生低甲基化，导致静息的基因激活、癌细胞以自分泌或旁分泌方式产生 hCG，即 hCG 异位表达，具有生长因子功能；癌细胞表面有 hCG 受体，与 hCG 结合激活胞内 cAMP 信号传导途径，调节肿瘤细胞其他生长因子、细胞因子的产生，进一步促进和调控肿瘤细胞的增殖、分化和生长。所以，hCG 在 5'转录起始区域的异常低甲基化改变，违背其表达的时间和空间特异性，使本来胚胎滋养层细胞表达的 hCG 在胚胎期后非滋养层细胞内表达，使肿瘤细胞通过 hCG 及其受体相互作用独立地调节肿瘤生长。

8. 请举例说明细胞间异常信号导致基因表达异常并参与疾病的发生发展过程。

人体各种细胞间通过激素、神经递质、旁分泌信号等保持细胞间联系，调节彼此代谢，协调各种生命活动，实现正常生理功能。正常细胞间信号能保证基因表达时间、空间特异性及表达水平，相反，错误信号破坏正常基因表达，导致疾病发生。如甲胎蛋白（AFP）具有胚胎表达特异性，胚胎发育中 AFP 增强子激活而沉默子受抑制；胎儿出生后，沉默子活化而使 AFP 表达受抑。但在异常增殖信号作用下，癌细胞中 c-myc、c-fos 和 c-jun 等原癌基因表达上调，其表达产物与 AFP 基因增强子及其他顺式作用元件结合，重新激活 AFP 基因表达，AFP 通过膜受体介导，影响淋巴细胞或肝癌细胞的肿瘤坏死因子 TNF 及其受体表达，导致肝癌细胞逃避机体免疫监视，同时又促进癌基因表达，引起肝癌细胞大量生长。正常肝细胞接受癌变细胞来源的异常增殖信号，通过破坏 AFP 表达时间特异性，使 AFP 参与肝癌发生发展的相关信号途径。

尘肺发生是由于肺泡巨噬细胞受粉尘刺激大量分泌转化生长因子 B1（transforming growth factor-B1, TGF-B1），作用于成纤维细胞、促进细胞分裂和细胞外基质（extracellular matrix, ECM）蛋白基因表达，相应蛋白合成和分泌增加，造成 ECM 在肺组织病理性蓄积。

9. 基因表达系列分析的原理及其基本过程。

基因表达系列分析（serial analysis of gene expression, SAGE）以逆转录产物 cDNA 上特

定区域的 9-11bp 特异寡核苷酸序列作为标签 (tag) 来代表各转录物; 用连接酶随机串联将多个标签 (20-60 个) 并克隆到载体中, 建立 SAGE 文库; 通过对标签的序列分析, 获得基因转录的分布以及表达丰度, 从而充分了解基因转录组的全貌。SAGE 的基础是能特异性代表转录物并含有足够信息的标签。

SAGE 的基本过程是 1) 先 Oligo(dT) 将 mRNA 逆转录获得单链 cDNA, 然后以生物素标记的、核心序列为 tag 的特异性引物单链扩增获得双链 cDNA (不改变基因表达丰度); 2) 用锚定酶 (anchoring enzyme, AE) - 一般采用具有 4bp 识别位点的限制性核酸内切酶 NlaIII 消化; 3) 消化后通过生物素与抗生物素蛋白结合分离 cDNA, 得到的 cDNA 片段分为两组, 分别与接头 A 和 B 连接 (接头 A 和 B 5'端分别为 NlaIII 粘性末端, 3'端分别为非 NlaIII 的某限制性酶粘性末端), 二者分别含有 PCR 引物 A 和 B 互补结合序列; 4) 经 T4 DNA 连接酶连接 cDNA 片段, 形成两端分别带有连接子 A、B 的标签二聚体; 5) 以引物 A 和 B (应稍长于接头 A 和 B, 覆盖完整的 NlaIII 位点及其旁侧保护序列) 扩增二聚体, 产物再以锚定酶消化, 纯化后连接成为标签二聚体的串联体, 可长达 30-40EST, 克隆到载体上, 进行 DNA 序列测定。一种标签的丰度即反映相应转录物的转录水平。可获得疾病组织中基因表达的全貌; 或与正常组织对照分析, 发现新的疾病基因或相关基因, 并确定特定基因在疾病发生中的作用。

10. 何谓反义技术? 试述其主要分类及其原理。

反义技术 (antisense technique) 是根据碱基互补原理, 用人工或生物合成特异性互补 DNA 或 RNA 片段 (即反义核酸), 使之能特异地与目的核酸片段互补结合, 从而抑制甚至阻断目的基因表达的一种技术。根据所用反义核酸的不同, 反义技术可分为反义寡核苷酸技术、反义 RNA 技术和核酶技术等。

反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASON) 技术根据碱基互补结合原理, 人工或生物合成与目的 DNA 或 RNA 互补的寡核苷酸, 将其导入细胞, 通过其与胞内目的 DAN 或 RNA 特异结合, 抑制甚至阻断目的基因转录和/或翻译, 达到人工调控基因表达的目的。ASON 主要通过以下几种机理调节基因表达: 1) 形成三螺旋 DNA (triplex DNA) 或 D 环 (D-loop) 结构; 2) 与细胞内目的 mRNA 互补结合, 形成 DNA-RNA 异源杂交体, 激活核糖核酸酶 H (RNase H) 特异性降解 mRNA; 3) 与核内不均一 RNA (hnRNA) 互补结合, 破坏正常剪接形成 mRNA 的过程; 4) 与核糖体 rRNA 的 mRNA 结合位点互补结合, 阻止 mRNA 的结合和翻译启动; 5) ASON 与 mRNA 互补结合, 破坏其进入正确翻译部位的途径。

反义 RNA (antisense RNA) 是一类自身没有编码功能, 但能通过配对碱基间氢键与目的 RNA 特别是 mRNA 的特定区域补结合, 从而抑制基因表达的小分子 RNA。在实际操作中, 可采用自然存在或人工合成的反义 RNA, 通过基因重组将其反向插入到表达载体, 然后以此重组表达载体转染细胞, 在细胞内产生大量翻译 RNA。其作用机理包括: 1) 与引物 RNA 结合或作用于引物前体, 阻止引物与 DNA 结合, 抑制 DNA 复制; 2) 在转录水平或转录后加工过程中, 阻止特定基因转录, 或与 mRNA 5'端结合, 阻止加帽过程; 或与剪接位点结合, 阻止 mRNA 的剪接形成等; 3) 与 SD 序列或编码区关键点如 AUG 结合, 阻止 mRNA 与核糖体结合, 阻断翻译等。

核酶是具有生物催化活性的 RNA, 能按碱基互补原理识别特定核苷酸序列并特异地剪切底物 RNA 分子。根据其分子大小可分为大分子核酶和小分子核酶两种, 前者包括 I 型内含子 (group I intron)、II 型内含子 (group II intron) 和核糖核酸酶 P 的 RNA 亚基, 均由数百到数千核苷酸组成; 小分子核酶按结构分为锤头 (hammerhead) 型、发夹 (hairpin) 型等, 大小多在 35-155 个核苷酸之间, 应用广泛。根据核酶的结构特点和目的 RNA 的特异性序列特征, 设计并合成针对目的 RNA 的核酶基因, 构建表达载体, 导入细胞内, 核酶基因表达后通过特异序列识别并降解目的 RNA。

第十二章 基因诊断

一、名词解释

1. 基因诊断 (gene diagnosis): 用分子生物学的理论和技术, 通过直接探查基因的存在状态或缺陷, 同基因结构、定位、复制、转录或翻译水平分析基因的功能, 从而对人体状态与疾病作出诊断的方法。
2. 斑点杂交 (dot blot hybridization): 见第七章
3. 原位杂交 (in situ hybridization): 见第七章
4. 单链构象多态性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP): 是一种基于单链 DNA 构象差别的快速、敏感、有效的检测 DNA 突变位点和多态性的方法, 在非变性条件下, DNA 分子为维持其稳定而自身折叠形成具有一定空间结构的构象, 这种构象是由单链 DNA 分子中的碱基序列所决定, DNA 分子中的碱基变异 (即使只有一个碱基) 可导致其空间构型的

改变，形成不同的构象，导致电泳迁移率发生改变。

5. 限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP): 基因组中存在着许多限制性核酸内切酶位点，当用某种或几种限制性核酸内切酶对某一段基因消化时，就会产生大小不同的特定片段，这些片段称为限制性片段。在同种生物不同个体中出现的不同长度限制性片段类型就称为限制性片段长度多态性。如果由于缺失、重排或核苷酸置换使 DNA 分子中原有的某种限制性核酸内切酶的识别位点发生改变，使原有的酶切位点消失或形成了新的酶切位点，于是用这种酶进行酶切后，生成的 DNA 片段的长度或数目随之发生改变。这种变化如与某种遗传病的基因有关，就可作为这种遗传病的诊断指标。

6. 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP): 指基因组水平上由于单个核苷酸位置上存在转换或颠换等变异所引起的 DNA 序列多态性。SNP 在人类基因组中广泛存在，是人类可遗传变异中最常见的一种。

7. DNA 指纹图谱 (DNA fingerprint): 利用人类染色体上小卫星 DNA 的核心序列为探针进行 RFLP 分析时，检测到大量的高度可变区，产生相应的图谱，并具有高度的个体特异性，达到了如同人类指纹那样的高度专一性，所以称其为 DNA 指纹图谱。

8. 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH): 是利用特定的荧光基团标记探针进行原位杂交，若同时利用不同的荧光标记则可检测同一细胞核中两种或多种序列。

二、判断题

1. × 2. √ 3. √ 4. × 5. × 6. √ 7. √ 8. √ 9. √ 10. × 11. √ 12. √ 13. √ 14. √ 15. × 16. √ 17. √ 18. √ 19. √ 20. √ 21. ×

三、填空题

1. 高特异性 高灵敏性 早期诊断性 应用广泛性
2. DNA RNA
3. 探针
4. 直接诊断 间接诊断
5. 核酸分子杂交 PCR

四、单项选择题

1. E 2. C 3. A 4. C 5. E 6. D 7. B 8. E 9. D 10. B 11. B 12. D 13. D 14. E

15. B 16. B 17. A 18. E 19. D 20. E 21. A 22. D 23. C 24. B 25. C 26. B 27. E
28. C 29. D 30. E 31. D 32. E 33. B 34. C

五、多项选择题

1. ABC 2. AB 3. ABE 4. ABCD

六、简答题

1. 何谓基因诊断？与传统医学诊断相比，它具有哪些特点？

答：用分子生物学的理论和技术，通过直接探查基因的存在状态或缺陷，同基因结构、定位、复制、转录或翻译水平分析基因的功能，从而对人体状态与疾病作出诊断的方法。
具有高特异性、高灵敏性、早期诊断性、应用的广泛性等特点。

2. 简述 SSCP 分析的原理。

答：在非变性条件下，DNA 分子为维持其稳定而自身折叠形成具有一定空间结构的构象，这种构象是由单链 DNA 分子中的碱基顺序所决定，DNA 分子中的碱基变异（即使只有一个碱基）可导致其空间构型的改变，形成不同的构象，导致电泳迁移率发生改变。

3. 简述限制性片段长度多态性分析的原理。

答：在人类基因组中存在着许多限制性内切酶位点，当用某种或几种限制性内切酶对某一段基因消化时，就会产生大小不同的特定片段，这些片段称为限制性片段。在同种生物不同个体中出现的不同长度限制性片段类型就称为限制性片段长度多态性。如果由于缺失、重排或核苷酸置换使 DNA 分子中原有的某种限制性内切酶的识别位点发生改变，使原有的酶切位点消失或形成了新的内切位点，于是用这种酶进行酶切后，生成的 DNA 片段的长度或数目随之发生改变。这种变化如与某种遗传病的基因有关，就可作为这种遗传病的诊断指标。PCR 扩增后用相应的内切酶进行切割而得不同长度的 DNA 片段，或借助 Southern 印迹杂交，然后分析酶切片段的多态性，通过与正常人的限制性酶谱比较而推断该个体是否患有该种疾病。

4. 单核苷酸多态性用作遗传标志具有那些突出优势？

答：分布更广泛；高度稳定性；部分位于基因内部，直接影响基因功能发挥；是二等位基因性的易于自动化分析。

5. 简述 DNA 指纹分析的基本流程。

答：DNA 指纹分析的基本流程为：DNA 的提纯与纯化→限制性内切酶消化→电泳分离→分子杂交→指纹图的显示。

6. 简述基因诊断在传染病检测中的应用。

答：任何类型的病原体，包括病毒、支原体、细菌、真菌和寄生虫，它们感染宿主细胞后均携带有自身特异的遗传信息 DNA 及/或 RNA，它们侵入机体后引起的传染病和寄生虫病等，都可以用基因诊断技术来进行检测或诊断。

7. 试述内源基因结构突变的主要类型以及内源基因结构突变所致的疾病。

答：内源基因结构突变包括点突变、缺失或插入突变、染色体易位、基因重排、基因扩增等。突变若发生在生殖细胞，可引起各种遗传性疾病；若发生在体细胞，可导致肿瘤、心血管疾病等。

8. 简述核酸分子杂交的基本原理。

答：核酸分子杂交的基本原理是依据 DNA 双链碱基互补、变性和复性的原理，用已知碱基序列的核酸片段作为探针来检测样本中是否存在与其互补的同源核酸序列。

9. 目前基因诊断可应用于哪些疾病？

答：目前基因诊断可应用于遗传性疾病、肿瘤、感染性疾病和某些传染性流行病等的诊断、分类分型；还可用于器官移植的组织配型；法医学鉴定。

10. 荧光原位杂交的特点及应用包括哪些？

答：（1）其探针比放射性探针更稳定，不需要特殊的安全防护和污物处理措施；
（2）与原位杂交一样，不需要提取和纯化核酸；
（3）多色 FISH 可以在同一核中显示不同的颜色，从而同时检测两种或多种序列；
（4）应用不同的探针可以显示某一物种的全部基因或某一染色体、染色体片段及单拷贝序列。

七、论述题

1. 列举常用 5 种不同基因诊断技术，简述其原理及优、缺点。

答：核酸分子杂交：错配时杂交信号减弱或消失，可用于基因结构和表达检测，须制备合适的探针。

PCR：变异引起扩增产物不同，灵敏度高，须选择合适引物，有假阴性或假阳性结果。

SSCP: 突变引起核酸二级结构改变, 可检测已知或未知突变, 检测的灵敏度被片段长度稀释。

RFLP: 基因变异改变酶切图谱, 须选择合适的限制性核酸内切酶; 当变异没有引起任何酶切结果的改变时, 则无法使用。

DNA 序列测定: 直接检测核酸序列比较差异, 最准确的一种诊断方法。

基因芯片: 多元杂交分析杂交差异, 一次杂交可检测一个样品的多个基因不同突变或表达变化。

2. 根据镰状细胞贫血病的发病分子机理, 设计两套基因诊断方案, 并给出正常人、杂合体及患者所对应的诊断结果。

答: (1) 限制性酶切图谱分析: 限制性核酸内切酶 Mst II 识别的核苷酸序列为 CCTGAGG。

基因组 DNA 被此酶消化并与 β -珠蛋白基因探针进行杂交后, 正常 β -珠蛋白基因 (CCTGAGGAG) 产生 1.15kb 与 0.20kb 的片段; 而 HBS 的 β -珠蛋白基因 (CCTGTGGAG) 因不含有 Mst II 酶切位点, 因此不被切割而产生 1.35kb 的片段。之后通过凝胶电泳, 放射自显影分析完成基因诊断。

(2) PCR 分析: 设计引物扩增 β -珠蛋白基因第 6 密码子区域 110bp, 之后将扩增的 β -珠蛋白基因用限制性内切酶 Mst II 消化, 作 2% 琼脂糖凝胶电泳。Mst II 识别的核苷酸序列为 CCTGAGG, 是 β -珠蛋白基因编码的第 5、6 密码子序列和第 7 密码子序列的第一个碱基。如下图 1: 正常人的扩增产物经 Mst II 消化可生成 54bp 和 56bp 两个片段, 电泳条带显示为两条非常接近的条带, 而患者扩增的 DNA 片段不被酶切, 仍为 110bp, 电泳条带为一条 (图中 2), 3 为镰状细胞贫血症 HBS 杂合体。

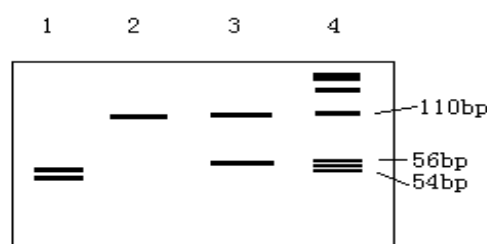


图 11-1 PCR 扩增后限制性酶切图谱

还可以对扩增产物作寡核苷酸 (ASO) 探针杂交来诊断 HBS: 设计 ASO 探针 (正常: 5'-CTCCTGAGGAGAAGTCTGC-3'; 异常: 5'-CTCCTGTGGAGGAAGTCTGC-3'), 之后用 γ -³²PdATP 作 5' 端标记, 与尼龙膜上扩增的 β -珠蛋白基因 DNA 片段做分子杂交。然而, PCR-ASO 法虽增加了特异性, 但却需要合成 ASO 探针, 并需放射性

同位素标记，不利于推广应用。

第十三章 基因治疗的原理与研究进展

一、名词解释

1. 核酶(ribozyme): 是具有酶活性的 RNA, 可降解特异的 mRNA 序列。用于基因治疗的核酶分子由三个部分组成, 中间是保守序列 (能够组成酶活性结构域), 两端是引导序列。与一般的反义 RNA 相比, 核酶具有较稳定的空间结构, 不易受到 RNA 酶的攻击。更重要的是, 核酶在切断 mRNA 后, 又可从杂交链上解脱下来, 重新结合和切割其它的 mRNA 分子。
2. 旁观者效应 (bystander effect): “自杀基因” 导入后, 不仅使导入了“自杀基因”的肿瘤细胞在用药后被杀死, 而且与其相邻或远处的未转导“自杀基因”的肿瘤细胞也被杀死。旁观者效应明显增强了自杀基因的肿瘤杀伤作用。
3. 基因治疗 (gene therapy): 是指将某个遗传物质转移到患者细胞内, 使其在体内发挥作用, 以达到治疗疾病目的方法。
4. 基因置换 (gene substitution): 是指将特定的目的基因导入特定细胞, 通过定位重组, 导入的正常基因, 以置换基因组内原有的缺陷基因。可对缺陷基因的缺陷部位进行精确的原位修复, 不涉及基因组的任何改变。
5. 基因矫正 (gene correction): 或称基因置换是指将特定的目的基因导入特定细胞, 通过定位重组, 导入的正常基因, 以置换基因组内原有的缺陷基因。可对缺陷基因的缺陷部位进行精确的原位修复, 不涉及基因组的任何改变。
6. 基因添加 (gene augmentation): 是指通过导入外源基因使靶细胞表达其本身不表达的基因。
7. 基因干预 (gene interference): 是指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的结构而使之不能表达, 以达到治疗疾病的目的。例如反义核酸、核酶或干扰 RNA 技术等。
8. RNA 干扰 (RNA interference, RNAi): 是由双链 RNA 诱发的基因沉默现象: 与其有同源序列的 mRNA 被降解, 从而抑制了该基因的表达。
9. 三链 DNA 形成脱氧寡核苷酸 (triple helixforming oligonucleotides, TFO): 脱氧寡核苷酸能与双链 DNA 特异序列结合, 形成三链 DNA 来阻止基因转录或复制, 这种脱氧寡核苷酸称为 TFO。

10. 腺相关病毒载体 (adeno-associated virus vector, AAV) :AAV 是一类单链线状 DNA 缺陷型病毒。其基因组 DNA 小于 5 kb, 无包膜。AAV 不能独立复制, 只有在辅助病毒存在时, 才能进行复制和溶细胞性感染, 否则只能建立溶源性潜伏感染。AAV 能高效定点整合至人染色体中, 避免随机整合可能带来的抑癌基因失活和原癌基因激活的潜在危险性。

11. 经活体 (ex vivo) :是指在体外将目的基因导入靶细胞, 经过筛选和增殖后将细胞回输给患者, 使该基因在体内有效地表达相应产物, 以达到治疗的目的。

二、判断题

1. × 2. √ 3. √ 4. × 5. × 6. × 7. × 8. × 9. √ 10. √
11. √ 12. √ 13. √ 14. × 15. √ 16. √ 17. √ 18. × 19. √ 20. √
21. × 22. × 23. × 24. × 25. √ 26. √ 27. √
28. √ 29. √ 30. ×

三、填空题

- DNA 整合
- 反义 RNA RNA 干扰 核 酶
- gag pol env
- LTR U3 R U5
- 有毒性的药物 自杀基因
- 随机整合 7
- 受体 染色体 不整合。
- 定位重组 基因 置换
- 细胞因子 MHC 基因
- 另一种缺陷型逆转录 包装蛋白 包装信号
- DNA 无关
- 衣壳蛋白 病毒复制基因
- 核酸酶 重新结合
- 保守区域 (酶活性) 与靶序列互补的区域
- 时间 空间 水平

16. 转录激活剂 特异性基因表达调控
17. 药物增敏基因治疗, 耐药基因治疗
18. Tet 阻遏蛋白 四环素 抗性操纵子
19. 基因外部调节机制 治疗基因的诱导表达
20. RNA mRNA
21. RNA 同源 mRNA

四、单项选择题

1. B 2. C 3. A 4. C 5. A 6. D 7. D 8. E 9. A 10. B
11. C 12. D 13. A 14. C 15. B 16. E 17. A 18. A 19. B 20. D
21. A 22. D 23. E 24. A 25. D 26. D 27. E 28. D 29. D 30. A
31. B 32. C

五、多项选择题

1. AE 2. AE 3. BD 4. ACE 5. BCDE 6. AC 7. AD 8. BC 9. BCDE 10. ABCDE

六、简答题

1. 简述自杀基因治疗的原理。

答：将“自杀”基因导入宿主细胞中，这种基因编码的酶能使无毒性的药物前体转化为细胞毒性代谢物，诱导靶细胞产生“自杀”效应，从而达到清除肿瘤细胞的目的。为恶性肿瘤基因治疗的主要方法之一。

2. 简述 ex vivo 和 in vivo 两种基因治疗途径。

答：根据基因转移的途径不同，基因治疗分为：（经活体）是指在体外将目的基因导入靶细胞，经过筛选和增殖后将细胞回输给患者，使该基因在体内有效地表达相应产物，以达到治疗的目的。in vivo（活体内）是指将目的基因直接应用于患者体内。

3. 非病毒载体介导的真核细胞基因转移技术有哪些？

答：（1）脂质体介导的基因转移技术基本原理：利用阳离子脂质体单体与 DNA 混合后，可以自动形成包埋外源 DNA 的脂质体，然后与细胞一起孵育，即可通过细胞内吞作用将

外源 DNA（即目的基因）转移至细胞内，并进行表达。（2）受体介导转移技术将 DNA 与细胞或组织亲和性的配体偶联，可使 DNA 具有靶向性。（3）基因直接注射技术如：肌肉注射凝血因子 IX 基因，可产生血友病所需的凝血因子 IX。此外还有磷酸钙共沉淀，细胞核显微注射，基因枪颗粒轰击，多种物理化学等方法。

4. 反义 RNA 结合受体转移技术有何优点？

答：受体介导反义 RNA 转移技术可以实现：

- ① 受体介导的 RNA 转移十分专一，而且效率高；
- ② 被转移的 RNA 是被保护的，与周围环境之间存在多聚赖氨酸的保护层，可以抵抗环境中的核酸酶的降解作用。

5. 逆转录病毒基因治疗载体的特点有哪些？

答：逆转录病毒介导的基因转移系统有逆转录病毒载体和辅助细胞株组成。逆转录病毒载体保留了病毒颗粒的包装信号，而缺失病毒颗粒包装蛋白基因；它可以克隆并表达外源基因，但不能自我包装成有增殖能力的病毒颗粒。而辅助细胞株它由另一种缺陷型逆转录病毒感染构建而成。该细胞株能合成包装蛋白，用于逆转录病毒载体包装。由于缺乏包装型号，本身不能被包装成病毒颗粒。逆转录病毒携带的遗传物质高效地进入靶细胞。逆转录病毒结构基因缺失，但不影响其他部分的活性。前病毒通过 LTR 高效整合至靶细胞基因组中，有利于外源基因在靶细胞中的永久表达。包装好的假病毒颗粒易于分离制备。主要缺点是随机整合，有插入突变、激活癌基因的潜在危险；逆转录病毒载体的容量较小，只能容纳 7 kb 以下的外源基因。

6. 腺病毒基因治疗载体的特点有哪些？

答：腺病毒是一种大分子 (36 kb) 双链无包膜 DNA 病毒。它通过受体介导的内吞作用进入细胞内，然后腺病毒基因组转移至细胞核内，保持在染色体外，不整合进入宿主细胞基因组中。腺病毒载体的优点是基因导入效率高；宿主范围广；基因转导与细胞分裂无关；重组腺病毒可通过口服经肠道吸收、或喷雾吸入或气管内滴注；腺病毒载体容量较大，可插入 7.5 kb 外源基因。其缺点是不能整合到靶细胞的基因组 DNA 中。治疗基因表达时间相对较短。宿主的免疫反应导致腺病毒载体表达短暂。部分环节可能产生复制型腺病毒。靶向性差。

7. 腺相关病毒基因治疗载体的特点有哪些？

答：AAV 是一类单链线状 DNA 缺陷型病毒。其基因组 DNA 小于 5 kb，无包膜。AAV 不能独立复制，只有在辅助病毒存在时，才能进行复制和溶细胞性感染，否则只能建立溶源性潜伏感染。AAV 的特点是以潜伏感染为主；高效定点整合至人染色体中，避免随机整合可能带来的抑癌基因失活和原癌基因激活的潜在危险性。AAV 载体容量小，最多只能容纳 5 kb 外源 DNA 片段。感染效率比逆转录病毒载体低。在 40%–80% 的成人中存在过感染，可能会引起免疫排斥。

8. 比较逆转录病毒、腺病毒及腺相关病毒基因治疗载体特点的异同。

答：逆转录病毒载体：可随机整合，效率高；可能致病；主要感染分裂细胞。克隆容量小于 7 kb。腺病毒载体：不整合，可能丢失；安全性较高；感染分裂或非分裂细胞。克隆容量小于 7.5 kb。腺相关病毒载体：定点整合；安全性高；感染分裂或非分裂细胞。克隆容量小于 5 kb。

9. 以逆转录病毒载体为例，阐述载体系统的两大部分。

答：逆转录病毒介导的基因转移系统有逆转录病毒载体和辅助细胞株组成。逆转录病毒载体保留了病毒颗粒的包装信号，而缺失病毒颗粒包装蛋白基因；它可以克隆并表达外源基因，但不能自我包装成有增殖能力的病毒颗粒。而辅助细胞株它由另一种缺陷型逆转录病毒感染构建而成。该细胞株能合成包装蛋白，用于逆转录病毒载体包装。由于缺乏包装型号，本身不能被包装成病毒颗粒。逆转录病毒携带的遗传物质高效地进入靶细胞。

10. 简述 RNA 干扰的作用机制。

答：RNA 干扰包括起始阶段和效应阶段 (initiation and effector steps)。在起始阶段，加入的小分子 RNA 被切割为 21–23 核苷酸长的小分子干扰 RNA 片段 (small interfering RNAs, siRNAs)。证据表明：一个称为 Dicer 的酶，是 RNase III 家族中特异识别双链 RNA 的一员，它能以一种 ATP 依赖的方式逐步切割由外源导入或者由转基因，病毒感染等各种方式引入的双链 RNA，切割将 RNA 降解为 19–21 bp 的双链 RNAs (siRNAs)，每个片段的 3' 端都有 2 个碱基突出。在 RNAi 效应阶段，siRNA 双链结合一个核酶复合

物从而形成所谓RNA诱导沉默复合物（RNA-induced silencing complex, RISC）。激活RISC需要一个ATP依赖的将小分子RNA解双链的过程。激活的RISC通过碱基配对定位到同源mRNA转录本上，并在距离siRNA3'端12个碱基的位置切割mRNA。

11. 基因干预的方法有哪些？

答：基因干预的方法有：反义RNA 指能与特定基因 mRNA 互补结合的一类 RNA，可抑制一些有害基因的翻译。RNA 干扰是指由双链 RNA 诱发的基因沉默现象：与其有同源序列的 mRNA 被降解，从而抑制了该基因的表达。核酶是具有酶活性的 RNA，可降解特异的 mRNA 序列。

12. 简述反义 RNA、RNA 干扰及核酶三种基因干预方法的差异。

答：反义 RNA 指能与特定基因 mRNA 互补结合的一类 RNA，可抑制一些有害基因的翻译。RNA 干扰是指由双链 RNA 诱发的基因沉默现象：与其有同源序列的 mRNA 被降解，从而抑制了该基因的表达。核酶是具有酶活性的 RNA，可降解特异的 mRNA 序列。

13. 可用于病毒性疾病基因治疗方法有哪些？

答：RNA 干扰可以被看成是一种与免疫系统类似的防御机制。用 siRNA 抑制人类免疫缺陷病毒（HIV）某些基因的表达，如 P24、Vif、nef、tat 或 rev，阻碍 HIV 在细胞内复制。用 RNA 干扰技术抑制 HIV 的受体（CD4）或辅助受体（CXCR4 或 CCR5）在细胞内表达，可阻碍 HIV 感染细胞。也可通过 RNA 干扰抑制其他病毒在细胞内复制，如脊髓灰质炎病毒、人乳头状瘤病毒、乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒等。在基因治疗时，利用核酶分子结合到靶 RNA 分子中适当的部位，形成锤头状核酶结构，将靶 RNA 分子切断，通过破坏靶 RNA 分子而达到治疗疾病的目的（如清除病毒基因组 RNA，癌基因表达的 mRNA 等）。

14. 治疗基因的受控表达策略有哪些？

答：治疗基因的受控表达包括控制治疗基因表达的时间、空间和水平三个方面。要实现治疗基因的受控表达，必须建立完善的基因表达调控体系。基因调控策略大致有以下几种：基因内部调节机制、基因外部调节机制、利用病灶微环境使治疗基因特异性表达以及治疗基因的诱导表达等。

15. 列举肿瘤基因治疗的常用方法。

答：通过基因置换和基因补充，导入多种抑癌基因以抑制癌症的发生、发展和转移；抑制癌基因的活性，通过干扰癌基因的转录和翻译，发挥抑癌作用；增强肿瘤细胞的免疫原性，通过对肿瘤组织进行细胞因子修饰，刺激机体免疫系统产生对肿瘤细胞的溶解和排斥反应；通过导入“自杀基因”杀伤癌细胞。

16. 简述基因治疗的几种策略。

答：一、基因置换。二、基因添加。三、基因干预。四、自杀基因治疗。五、基因免疫治疗。

17. 人类基因治疗按基因转移的途径可分为哪两种？

答：根据基因转移的途径不同，基因治疗分为：（经活体）是指在体外将目的基因导入靶细胞，经过筛选和增殖后将细胞回输给患者，使该基因在体内有效地表达相应产物，以达到治疗的目的。in vivo（活体内）是指将目的基因直接应用于患者体内。即将无复制能力的、含外源基因的重组病毒直接应用于患者体内，此外还包括将脂质体包埋或裸露 DNA 直接注射到试验者体内等方法。

18. 结合四环素抗性操纵子分析 Tet-On 基因表达调控系统的作用机制。

答：四环素抗性操纵子系统原理：四环素抗性基因的转录受 Tet 阻遏蛋白的负调控。无四环素存在时，阻遏蛋白与四环素抗性操纵子序列结合阻断四环素抗性基因的表达。四环素存在时，阻遏蛋白与四环素具有极高的亲和性，造成阻遏蛋白对四环素抗性操纵子阻遏解除，使四环素抗性基因的转录得以进行。Tet-Off 系统：转录激活物保留了原阻遏蛋白的四环素结合特性，即与四环素结合时将不能与对应的表达调控元件结合，而无法发挥转录激活作用。Tet-On 系统：转录激活物改造了原阻遏蛋白的四环素结合特性，即与四环素结合时才能与对应的表达调控元件结合，而发挥转录激活作用。

19. 论述自杀基因治疗的原理及在肿瘤基因治疗中的应用。

答：自杀基因治疗是恶性肿瘤基因治疗的主要方法之一。原理：将“自杀”基因导入宿主细胞中，这种基因编码的酶能使无毒性的药物前体转化为细胞毒性代谢物，诱导靶细胞产生“自杀”效应，从而达到清除肿瘤细胞的目的。“自杀基因”导入后，不仅使转

导了“自杀基因”的肿瘤细胞在用药后被杀死，而且与其相邻的未转导“自杀基因”的肿瘤细胞也被杀死。自杀基因治疗的前提条件是“自杀基因”的表达必须局限于肿瘤细胞中，而不伤及正常细胞。自杀基因转移常用方法有①利用免疫脂质体、受体介导等技术进行定向基因转移。②利用病毒载体进行基因转移。③瘤内直接注射。

20. 简述治疗基因的受控表达原理。

答：治疗基因的受控表达包括控制治疗基因表达的时间、空间和水平三个方面。要实现治疗基因的受控表达，必须建立完善的基因表达调控体系。基因调控策略大致有以下几种：基因内部调节机制、基因外部调节机制、利用病灶微环境使治疗基因特异性表达以及治疗基因的诱导表达等。基因内部的调节机制是利用使用正常细胞或病变的组织特异性启动子、增强子元件调控基因的表达。除利用基因内部的调节机制以外，还可通过施加外部刺激，促进治疗基因在特定细胞或组织中表达。病灶微环境与正常时往往不同，因此可利用这些变化控制治疗基因的表达。采用组织特异性启动子控制治疗基因的表达，可能造成这些基因在靶细胞中表达，不再受外界控制。为了避免这种情况发生，研究人员正在开发和完善一些可诱导性基因表达系统。这种系统的必要成分：一种是转录激活剂，它只在诱导药物存在时才能与 DNA 结合；另一种则是特异性基因表达调控元件，仅对这种转录激活剂有所响应。

21. 简述逆转录病毒前病毒的结构特点。

答：（1）两端各有一长末端重复序列 LTR。（2）LTR 由 U3、R 和 U5 三部分组成。（3）病毒有三个结构基因。（4）5' 端 LTR 下游有一段病毒包装所必需的序列（ ψ ）及剪接供体位点(SD)和剪接受体位点(SA)。（5）含有负链 DNA 转录的引物结合位点(PBS)和正链 DNA 转录的引物结合位点。

22. 常用的基因转移的基本技术有哪些？

答：病毒载体介导的基因转移效率较高，因此它也是使用最多的基因治疗载体。据统计，有 72% 的临床实验计划和 71% 的病例使用了病毒载体，其中用得最多的是逆转录病毒载体。非病毒载体介导的基因转移技术有（一）脂质体介导的基因转移技术基本原理：利用阳离子脂质体单体与 DNA 混合后，可以自动形成包埋外源 DNA 的脂质体，然后与细胞一起孵育，即可通过细胞内吞作用将外源 DNA（即目的基因）转移至细胞内，并进行表

达。(二)受体介导转移技术将 DNA 与细胞或组织亲和性的配体偶联,可使 DNA 具有靶向性。(三)基因直接注射技术如:肌内注射凝血因子 IX 基因,可产生血友病所需的凝血因子 IX。此外还有磷酸钙共沉淀,细胞核显微注射,基因枪颗粒轰击,多种物理化学等方法。

七、论述题

1. 论述自杀基因治疗的原理及四环素诱导的 TK/GCV 自杀基因系统在肿瘤基因治疗中的应用。

答:自杀基因治疗是恶性肿瘤基因治疗的主要方法之一。原理:将“自杀”基因导入宿主细胞中,这种基因编码的酶能使无毒性的药物前体转化为细胞毒性代谢物,诱导靶细胞产生“自杀”效应,从而达到清除肿瘤细胞的目的。“自杀基因”导入后,不仅使转导了“自杀基因”的肿瘤细胞在用药后被杀死,而且与其相邻的未转导“自杀基因”的肿瘤细胞也被杀死。自杀基因治疗的前提条件是“自杀基因”的表达必须局限于肿瘤细胞中,而不伤及正常细胞。自杀基因转移常用方法有①利用免疫脂质体、受体介导等技术进行定向基因转移。②利用病毒载体进行基因转移。③瘤内直接注射。四环素抗性操纵子系统原理:四环素抗性基因的转录受 Tet 阻遏蛋白的负调控。无四环素存在时,阻遏蛋白与四环素抗性操纵子序列结合阻断四环素抗性基因的表达。四环素存在时,阻遏蛋白与四环素具有极高的亲和性,造成阻遏蛋白对四环素抗性操纵子阻遏解除,使四环素抗性基因的转录得以进行。四环素诱导的 Tet-On 系统:转录激活物改造了原阻遏蛋白的四环素结合特性,即与四环素结合时才能与对应的表达调控元件结合,而发挥转录激活作用。TK/GCV 单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) I 型胸苷激酶 (thymidine kinase, tk) 基因编码胸苷激酶,特异性地将无毒的核苷类似物丙氧鸟苷 (ganciclovir, GCV) 转变成毒性 GCV 三磷酸核苷,后者能抑制 DNA 聚合酶活性,导致细胞死亡。

2. 结合一种基因治疗策略及治疗基因的受控表达原理,设计一套乳腺癌基因治疗的方案。

答:自杀基因治疗是恶性肿瘤基因治疗的一种基因治疗策略。其原理是将“自杀”基因导入宿主细胞中,这种基因编码的酶能使无毒性的药物前体转化为细胞毒性代谢物,诱导靶细胞产生“自杀”效应,从而达到清除肿瘤细胞的目的。四环素抗性操纵子系统是调节基因表达的系统,其原理是四环素抗性基因的转录受 Tet 阻遏蛋白的负调控。无四环素存在时,

阻遏蛋白与四环素抗性操纵子序列结合阻断四环素抗性基因的表达。四环素存在时，阻遏蛋白与四环素具有极高的亲和性，造成阻遏蛋白对四环素抗性操纵子阻遏解除，使四环素抗性基因的转录得以进行。四环素诱导的 Tet-On 系统：转录激活物改造了原阻遏蛋白的四环素结合特性，即与四环素结合时才能与对应的表达调控元件结合，而发挥转录激活作用。TK/GCV 单纯疱疹病毒（herpes simplex virus, HSV）I 型胸苷激酶（thymidine kinase, tk）基因编码胸苷激酶，特异性地将无毒性核苷类似物丙氧鸟苷（ganciclovir, GCV）转变成毒性 GCV 三磷酸核苷，后者能抑制 DNA 聚合酶活性，导致细胞死亡。因此，可以设计 TK 自杀基因插入到四环素诱导的 Tet-On 系统中，使得自杀基因在乳腺癌细胞中的表达受 Tet 阻遏蛋白的负调控，加入诱导剂四环素时增加自杀基因的转录与表达，去除诱导剂时关闭或减低自杀基因的表达，从而控制自杀基因杀伤乳腺癌细胞。

3. 论述逆转录病毒前病毒的结构特点以及重组逆转录病毒颗粒的产生机制。

答：简述逆转录病毒前病毒的结构特点。（1）两端各有一长末端重复序列 LTR。（2）LTR 由 U3、R 和 U5 三部分组成。（3）病毒有三个结构基因。（4）5' 端 LTR 下游有一段病毒包装所必需的序列（ Ψ ）及剪接供体位点（SD）和剪接受体位点（SA）。（5）含有负链 DNA 转录的引物结合位点（PBS）和正链 DNA 转录的引物结合位点。逆转录病毒介导的基因转移系统有逆转录病毒载体和辅助细胞株组成。逆转录病毒载体保留了病毒颗粒的包装信号，而缺失病毒颗粒包装蛋白基因；它可以克隆并表达外源基因，但不能自我包装成有增殖能力的病毒颗粒。而辅助细胞株它由另一种缺陷型逆转录病毒感染构建而成。该细胞株能合成包装蛋白，用于逆转录病毒载体包装。由于缺乏包装信号，本身不能被包装成病毒颗粒。逆转录病毒携带的遗传物质高效地进入靶细胞。包装好的假病毒颗粒（携带目的基因的重组逆转录病毒载体）以出芽的方式分泌至辅助细胞培养的上清液中，易于分离制备。

4. 论述辅助基因治疗在肿瘤治疗中的应用。

答：（1）药物增敏基因治疗：为了使化疗药物能够最大程度地杀死肿瘤细胞，可以考虑将某些药物增敏基因导入肿瘤细胞，特别是对化疗药物原本不敏感的肿瘤细胞，使其对抗肿瘤药物的敏感性大大增加，从而达到增强化疗效果的目的。（2）耐药基因治疗：肿瘤细胞耐药性的产生与多种糖蛋白或酶有关，包括多药耐药（mdr-1）基因编码的 P-糖蛋白、多药耐药相关蛋白（MRP）以及近年来发现的肺耐药相关蛋白等；还有细胞内氧化和解毒作用的酶系统，包括细胞色素 P-450（cytochrome P-450）、谷胱甘肽 S-转移酶（GST）以及谷胱甘肽

过氧化物酶（GSH-PX）等等。

5. 论述肿瘤基因治疗的策略与应用。

答：肿瘤发生是一个极为复杂的过程，许多基因的突变会导致肿瘤的发生。（1）通过基因置换和基因补充，导入多种抑癌基因以抑制癌症的发生、发展和转移；（2）抑制癌基因的活性，通过干扰癌基因的转录和翻译，发挥抑癌作用；（3）增强肿瘤细胞的免疫原性，通过对肿瘤组织进行细胞因子修饰，刺激机体免疫系统产生对肿瘤细胞的溶解和排斥反应；（4）通过导入“自杀基因”杀伤癌细胞。从临床治疗的应用角度来看，肿瘤基因治疗的策略包括：

- （1）直接杀伤肿瘤细胞或抑制其生长。
- （2）增强机体免疫系统，间接杀伤或抑制肿瘤细胞。
- （3）改善肿瘤常规治疗方法，提高疗效。

肿瘤基因治疗的常用方法包括：基因干预技术：通过基因干预，抑制肿瘤细胞中过度表达的癌基因，从而降低其恶性表型。自杀基因治疗：直接杀死肿瘤细胞。肿瘤的免疫基因治疗：激发机体肿瘤免疫效应或提高免疫效应细胞功能。提高化疗效果的辅助基因治疗：药物增敏基因治疗；耐药基因治疗。

6. 论述病毒基因治疗的策略与应用。

答：病毒性疾病的基因治疗策略包括：1. 调节机体免疫应答：（1）将细胞因子（如干扰素、白细胞介素等）的基因，导入机体免疫细胞，激活免疫细胞并促进其增殖分化，增强机体的细胞和体液免疫应答，促进机体清除病毒感染的细胞和游离病毒。（2）将能够诱导机体产生保护性免疫应答的病毒抗原基因，如乙型肝炎病毒表面抗原基因等，导入机体，表达的抗原不仅可以诱导机体产生保护性抗体，还可以引发特异性的细胞免疫应答，产生对野生型致病病毒攻击的防御作用。2. 抗病毒复制：根据病毒在机体细胞中复制周期的各个环节来设计的，主要包括：（1）抑制病毒与宿主细胞结合：即阻断病毒表面抗原决定簇与宿主细胞受体间的特异性结合。（2）干扰病毒基因组的转录起始和调控。（3）抑制病毒基因组的复制和蛋白质合成。（4）RNA 干扰技术。（5）将抗病毒蛋白质基因，如 2'→5' 腺苷酸合成酶等基因，导入细胞并持续表达，可以激活核酸酶 F，降解病毒 RNA，对 RNA 病毒的感染产生明显的抵抗作用。