

试题资源

作业一：

一、名词解释：

- 1、基因：是遗传的物质基础，是 DNA（脱氧核糖核酸）分子上具有遗传信息的特定核苷酸序列的总称，是具有遗传效应的 DNA 分子片段。
- 2、基因组该指单倍体细胞中包括编码序列和非编码序列在内的全部 DNA 分子
- 3、操纵子：原核生物的几个功能相关的结构基因往往排列在一起，转录生成一个 mRNA，然后分别翻译成几种不同的蛋白质。这些蛋白可能是催化某一代谢过程的酶，或共同完成某种功能。这些结构基因与其上游的启动子，操纵基因共同构成转录单位，称操纵子。
- 4、启动子：是 RNA 聚合酶结合位点周围的一组转录控制组件，包括至少一个转录起始点。在真核基因中增强子和启动子常交错覆盖或连续。有时，将结构密切联系而无法区分的启动子、增强子样结构统称启动子。
- 5、增强子：是一种能够提高转录效率的顺式调控元件，最早是在 SV40 病毒中发现的长约 200bp 的一段 DNA，可使旁侧的基因转录提高 100 倍，其后在多种真核生物，甚至在原核生物中都发现了增强子。增强子通常占 100~200bp 长度，也和启动子一样由若干组件构成，基本核心组件常为 8~12bp，可以单拷贝或多拷贝串连形式存在。
- 6、基因表达：是指细胞在生命过程中，把储存在 DNA 顺序中遗传信息经过转录和翻译，转变成具有生物活性的蛋白质分子。

二、简答题

- 1、说明限制性内切核酸酶的命名原则要点。

答：限制性内切核酸酶采用三字母的命名原则，即属名+种名+株名的各一个首字母，再加上序号。基本原则：3-4 个字母组成，方式是：属名+种名+株名+序号；首字母：取属名的第一个字母，且斜体大写；第二字母：取种名的第一个字母，斜体小写；第三字母：(1) 取种名的第二个字母，斜体小写；(2) 若种名有词头，且已命名过限制酶，则取词头后的第一个字母代替。第四字母：若有株名，株名则作为第四字母，是否大小写，根据原来的情况而定，但用正体。顺序号：若在同一菌株中分离了几种限制酶，则按先后顺序冠以 I, II, III, ... 等，用正体。

- 2、什么是限制性内切核酸酶的星号活性？受哪些因素影响？

答：II类限制酶虽然识别和切割的序列都具有特异性，但是这种特异性受特定条件的限制，即在一定环境条件下表现出来的特异性。条件的改变，限制酶的特异性就会松动，识别的序列和切割都有一些改变，改变后的活性通常称第二活性，而将这种因条件的改变会出现第二活性的酶的右上角加一个星号表示，因此第二活性又称为星号活性。

概括起来，诱发星活性的因素有如下几种：

- (1)高甘油含量(>5%, v / v);
- (2)限制性内切核酸酶用量过高(>100U / ugDNA);
- (3)低离子强度(<25 mmol / L);
- (4)高 pH(8.0 以上); (5)含有有机溶剂，如 DMSO，乙醇等;
- (6)有非 Mg²⁺的二价阳离子存在(如 Mn²⁺，Cu²⁺，Co²⁺，Zn²⁺等)。

3、影响 DNA 连接酶催化连接反应的因素有哪些？

答：(1) DNA 的纯度 (2) DNA 甲基化的程度 (3) 酶切消化反应的温度 (4) DNA 的分子结构 (5) 核酸内切限制酶的缓冲液

4、什么是 Klenow 酶？有哪些活性？在基因工程中有什么作用？

答：Klenow 酶是 1974 年 Klenow 用枯草杆菌蛋白酶水解 DNA 聚合酶 I，得到两个片段，其中大片段的分子量为 75kDa，它具有 5'-3' 聚合酶和 3'-5' 外切核酸酶的活性，小片段具有 5'-3' 外切核酸酶活性。由于大片段失去了 DNA 聚合酶 I 中会降解 5' 引物的 5'-3' 外切核酸酶的活性，所以在基因工程中更有用。

Klenow 酶主要有下列用途：

(1) 修复反应，制备平末端

可用 Klenow 酶修复限制性内切核酸酶或其他方法产生的 5' 或 3' 突出末端，制备平末端，这样可以使原来具有不相容的黏性末端的 DNA 片段通过平末端重组。如在反应系统中加入放射性同位素标记的脱氧核苷酸，用这种末端填补的方法可以制备 3' 末端标记的探针。

用 Klenow 酶修复 5' 突出末端的反应主要是利用了 Klenow 酶的 DNA 聚合酶活性，是填补反应；而修复 3' 突出末端则是用 Klenow 酶的 3'-5' 外切核酸酶的活性，是切割反应。用 Klenow 酶的切割反应来修复 3' 突出末端是不理想的，改用 T4DNA 聚合酶或其他酶是更好的选择。

(2) 标记 DNA 3' 突出末端(protruding end)

该反应分两步进行：先用 3'-5' 的外切核酸酶活性除去 3' 突出末端，产生 3' 隐含末端，然后在高浓度的标记底物(-32p-dNTP)存在下，使降解(3'-5')作用与聚合(5'-3')

作用达到平衡。这种反应也叫交换或取代反应(exchange / replacement reaction)。不过这一反应用 T4DNA 聚合酶的效果更好，因它的 3'-5' 外切核酸酶活性较强。

(3) 其他的一些用途：包括用双脱氧末端终止法进行 DNA 序列分析、用于 cDNA 第二链的合成、在定点突变中用于合成第二链、用引物延伸法(primer extension)制备单链 DNA 探针等。

5、细菌碱性磷酸酯酶和小牛肠碱性磷酸酯酶有什么不同？在基因工程中有什么用途？

答：主要差别是：CIP68° C 时失活，而 BAP68° C 稳定，且耐酚抽提。应用：

(1) dsDNA 的 5' 端脱磷酸，防止 DNA 的自身连接。但是用 CIP 处理后，最好将 CIP 除去后，再进行连接反应。

(2) DNA 和 RNA 脱磷酸，然后用于多核苷酸激酶进行末端标记。

三、论述题

1、如果知道某一基因的功能及其相应的蛋白质的氨基酸序列组成，可以通过何种方法克隆该基因？

答：可以通过合成核苷酸探针或设计简并 PCR 引物从 cDNA 文库或基因组文库中筛选。或者利用相应的抗体从 cDNA 表达文库中筛选相应的克隆。

作业二：

一、名词解释：

1、基因工程：在体外将外源基因进行切割并与一定的载体连接，构成重组 DNA 分子并导入相应受体细胞，使外源基因在受体细胞中进行复制、表达，使目的基因大量扩增或得到相应基因的表达产物或进行定向改造生物性状。简单概括，就是将外源目的基因与载体重组后再进入宿主细胞的过程。

2、载体：能载带微量物质共同参与某种化学或物理过程的常量物质，在基因工程重组 DNA 技术中将 DNA 片段（目的基因）转移至受体细胞的一种能自我复制的 DNA 分子。三种最常用的载体是细菌质粒、噬菌体和动植物病毒。

3、转化：指将质粒或其他外源 DNA 导入处于感受态的宿主菌，并使其获得新的表型的过程。

4、感染：利用噬菌体将外源 DNA 导入宿主细胞的方法。

5、转导：由噬菌体将一个细胞的基因传递给另一细胞的过程。它是细菌之间传递遗传物质的方式之一。其具体含义是指一个细胞的 DNA 或 RNA 通过病毒载体的感染转移到另一个细胞中。

6、转染：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。常用的方法有电穿孔法，磷酸钙共沉淀法，脂质体融合法等。

二、简答题

1、YAC 载体具有什么样的功能性 DNA 序列？为什么在克隆大片段时，YAC 具有优越性？

答：YAC 带有天然染色体所有的功能元件，包括一个着丝粒，一个 DNA 复制起点，两个端粒。YAC 能够容纳长达几百 kb 的外源 DNA，这是质粒和黏粒办不到的。大片段的插入更有可能包含完整的基因，在染色体步移中每次允许更大的步移距离，同时能够减少完整基因组文库所需的克隆数目。

2、列举质粒载体必须具备的 4 个基本特性。

答：(1)独立复制；(2)有选择标记；(3)有独特的酶切位点；(4)能转化但不扩散。

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

答：)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。

(2)至少要预先知道足够合成一对引物的靶 DNA 序列。

4、cDNA 克隆与基因组克隆有何不同？

答：基因组克隆包含所有不在 cDNA 中出现的内含子。

5、怎样将一个平末端 DNA 片段插入到 EcoR I 限制位点中去？

答：化学合成一些长为 10bp 含有 EcoRI 识别位点的短的 DNA 片段，然后与待克隆片段两端连接起来，如果用 EcoRI 切割这种连接片段，就会产生 EcoRI 的单链末端。这种片段就可以插入到任何 EcoRI 的限制性内切酶位点中。

三、论述题

什么是 Western 印迹？它与 Southern 印迹有什么不同

答：Western 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 印迹中使用的探针是抗体(蛋白质)。

作业三：

一、名词解释

1、DNA 变性：DNA 分子由稳定的双螺旋结构松解为无规则线性结构的现象。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。

2、DNA 复性：变性 DNA 在适当条件下，二条互补链全部或部分恢复到天然双螺旋结构的现象，它是变性的一种逆转过程。

3、退火：指模板双链 DNA 经热变性，螺旋解开成单链后，通过缓慢冷却到 55℃左右，使引物(即具有互补碱基的 RNA 片段)与该模板 DNA 单链重新配对，形成新的双链分子的过程。

4、DNA 芯片：是指在固相支持物上原位合成寡核苷酸或者直接将大量的 DNA 探针以显微打印的方式有序地固化于支持物表面，然后与标记的样品杂交，通过对杂交信号的检测分析，即可获得样品的遗传信息。由于常用计算机硅芯片作为固相支持物，所以称为 DNA 芯片。

5、错义突变：碱基替换的结果引起氨基酸顺序的变化。

6、基因诊断：又称 DNA 诊断或分子诊断，通过分子生物学和分子遗传学的技术，直接检测出分子结构水平和表达水平是否异常，从而对疾病做出判断。

二、简答题

1、什么是蓝白斑筛选法？

答：这种方法是根据组织化学的原理来筛选重组体。主要是在 λ 载体的非必要区插入一个带有大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的基因片段，携带有 lac 基因片段的 λ 载体转入 lac 的宿主菌后，在含有 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷(X-gal)平板上形成浅蓝色的噬菌斑。外源基因插入 lac(或 lac 基因部分被取代)后，重组的噬菌体将丧失分解 X-gal 的能力，转入 lac⁻宿主菌后，在含有 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷(X-gal)平板上形成白色的噬菌斑，非重组的噬菌体则为蓝色噬菌斑。

2、什么是基因文库？

用重组 DNA 技术将某种生物细胞的总 DNA 或染色体 DNA 的所有片断随机地连接到基因载体上，然后转移到适当的宿主细胞中，通过细胞增殖而构成各个片段的无性繁殖系(克隆)，在制备的克隆数目多到可以把某种生物的全部基因都包含在内的情况下，这一组克隆的总体就被称为某种生物基因文库。

3、黏性末端连接法是最常用的连接方法，具有许多优点，但是也有一些不足，请指出这些不足之处。

答：黏性末端连接法不足之处有：(1)载体易自身环化；(2)若是用同一种限制性内切核酸酶产生的黏性末端连接又不易定向克隆；(3)难插入特定的基因；(4)再者就是大片段 DNA 的重组率较低，即使用碱性磷酸酶处理了载体，防止了载体的自身环化，载体也有成环的倾向；(5)用这种方法产生的重组体往往含有不止一个外源片段或不止一个载体连接起来的串联重组体，增加筛选工作的困难。

4、什么是同聚物加尾连接法？用何种方法加尾？具有哪些优缺点？

答：所谓同聚物加尾法就是利用末端转移酶在载体及外源双链 DNA 的 3' 端各加上一段寡聚核苷酸，制成人工黏性末端，外源 DNA 和载体 DNA 分子要分别加上不同的寡聚核苷酸，如 dA(dG) 和 dT(dC)，然后在 DNA 连接酶的作用下连接成为重组的 DNA。这种方法的核心是利用末端转移酶的功能，将核苷酸转移到双链 DNA 分子的突出或隐蔽的 3'-OH 上。以 Mg^{2+} 作为辅助因子，该酶可以在突出的 3'-OH 端逐个添加单核苷酸，如果用 Co^{2+} 作辅助因子则可在隐蔽的或平末端的 3'-OH 端逐个添加单个核苷酸。

同聚物加尾法实际上是一种人工黏性末端连接法，具有很多优点：(1) 首先不易自身环化，这是因为同一种 DNA 的两端的尾巴是相同的，所以不存在自身环化。(2) 因为载体和外源片段的末端是互补的黏性末端，所以连接效率较高。(3) 用任何一种方法制备的 DNA 都可以用这种方法进行连接。同聚物加尾法也有一些不便之处：(1) 方法繁琐；(2) 外源片段难以回收。由于添加了许多同聚物的尾巴，可能会影响外源基因的表达。另外要注意的是，同聚物加尾法同平末端连接法一样，重组连接后往往会产生某种限制性内切核酸酶的切点。

5、何谓接头连接法？

答：将人工合成的或来源于现有质粒的一小段 DNA 分子(在这一小段 DNA 分子上有某种限制性内切核酸酶的识别序列)，加到载体或外源 DNA 的分子上，这样便在载体 DNA 和外源 DNA 上制造出新的酶切点。把这一小段含有酶切点的 DNA 分子称为连接器分子，这种方法称为接头连接法。

三、论述题

1、什么是基因组文库(genomic library)? 构建基因组文库，涉及哪些基本过程? 它同遗传学上的基因库有什么不同?

答：基因组文库是用基因工程的方法，人工构建的含有某一生物基因组 DNA 的各种片段的克隆群。一般以改造的噬菌体 DNA 或黏粒作为载体，包括下列过程：(1) 高分子量染色体 DNA 的制备；(2) 体外重组连接；(3) 包装蛋白的制备；(4) 重组体的体外包装；(5) 将重组 DNA 导入寄主细胞；(6) 筛选。基因组文库同遗传学上所讲的基因库是完全不同的概念。基因库(gene pool)是指在进行有性生殖的某一群体中，能进行生殖的个体所含总的遗传信息。在基因组文库的构建中，由于使用的载体不同，分为噬菌体载体和黏粒载体构建的基因组文库、YAC 文库、BAC 文库等。

作业四：

一、名词解释

1、DNA 重组：是由于不同 DNA 链的断裂和连接而产生 DNA 片段的交换和重新组合，形成

新 DNA 分子的过程。

2、克隆：科学家把人工遗传操作动物繁殖的过程叫克隆，这门生物技术叫克隆技术，其本身的含义是无性繁殖，即由同一个祖先细胞分裂繁殖而形成的纯细胞系，该细胞系中每个细胞的基因彼此相同。

3、DNA 克隆：应用酶学的方法，在体外将各种来源的遗传物质——同源或异源、原核或真核、天然或人工的 DNA 与载体 DNA 相结合成一具有自我复制能力的 DNA 分子——复制子，继而通过转化或转染宿主细胞、筛选出含有目的基因的转化子细胞，再进行扩增、提取获得大量同一 DNA 分子，即 DNA 克隆。

4、目的基因：把需要研究的基因称为目的基因。（一般把需要分析的基因称靶基因，在基因克隆过程中有时两者均称为插入基因，有时三者含义相近。）

5、基因载体：基因载体是把基因导入细胞的工具，他的作用是①运载目的基因进入宿主细胞，②使之能得到复制和进行表达。

6、质粒：质粒 (plasmid) 是细菌拟核裸露 DNA 外的遗传物质，为双股闭合环形的 DNA，存在于细胞质中，质粒编码非细菌生命所必须的某些生物学性状，如性菌毛、细菌素、毒素和耐药性等。质粒具有可自主复制、传给子代、也可丢失及在细菌之间转移等特性，与细菌的遗传变异有关。

二、简答题 1、常用的工具酶有哪些？其主要用途是什么？

答：限制性内切核酸酶, DNA 聚合酶和 Klenow 大片段, DNA 连接酶, 碱性磷酸酶, 末端脱氧核苷酸转移酶。限制性内切核酸酶，能够识别特异的 DNA 碱基序列，DNA 碱基序列往往呈回文对称结构；DNA 聚合酶 α 位于细胞核内，也许是复合物，有催化细胞增生的作用；Klenow 大片段它也可以通过基因工程得到，分子量为 76kDa。DNA 连接酶负责双链 DNA 中相邻 3'-OH 与 5'-磷酸基团之间的磷酸二酯键的形成。碱性磷酸酯酶的作用是从 DNA 或 RNA 的三磷酸核苷酸上除去 5' 磷酸根残基。末端转移酶的作用是将脱氧核糖核苷酸通过磷酸二酯键加到 DNA 分子的 3'-OH 末端。

2、重组 DNA 技术常包括哪些基本步骤？

答：①获得目的基因；②与克隆载体连接，形成新的重组 DNA 分子；③用重组 DNA 分子转化受体细胞，并能在受体细胞中复制和遗传；④对转化子筛选和鉴定。在具体工作中选择哪条技术路线；⑤对获得外源基因的细胞或生物体通过培养，获得所需的遗传性状或表达出所需要的产物。主要取决于基因的来源、基因本身的性质和该项遗传工程的目的。

3、常用的目的基因的获取方法有哪些？

答：直接获取从基因文库中提取目的基因，使用 PCR 扩增技术获得目的基因；人工合成。

4、常用的目的基因与载体的连接方法有哪些？

答：外源 DNA 片段同载体分子连接的方法，即 DNA 分子体外重组技术，主要是依赖于核酸内切限制酶和 DNA 连接酶的作用。一般说来在选择外源 DNA 同载体分子连接反应程序时，需要考虑到下列三个因素：（1）实验步骤要尽可能地简单易行；（2）连接形成的“接点”序列，应能被一定的核酸内切限制酶重新切割，以便回收插入的外源 DNA 片段；（3）对转录和转译过程中密码结构的阅读不发生干扰。

5、解释质粒，为什么质粒可作为基因载体。

答：质粒是细菌拟核裸露 DNA 外的遗传物质。质粒：（1）具有较小的分子量。经验表明，为了避免在 DNA 的纯化过程中发生链的断裂，克隆载体的分子大小最好不要超过 10Kb。pBR322 质粒这种小分子量的特点，不仅易于自身 DNA 的纯化，而且可容纳较大的外源 DNA 片段；（2）具有两种抗菌素抗性基因可供作转化子的选择记号，能指示载体或重组 DNA 分子是否进入宿主细胞以及外源 DNA 分子是否插入载体分子形成了重组子。

三、论述题 1、何谓限制性核酸内切酶？写出大多数限制性核酸内切酶识别 DNA 序列的结构特点。

答：限制性核酸内切酶是一类能识别双链 DNA 分子中特异性核苷酸序列并由此特异切割 DNA 双链结构的水解酶。是在 DNA 分子内部切割，水解磷酸二酯键的核酸内切酶。能够识别特异的 DNA 碱基序列，DNA 碱基序列往往呈回文对称结构；并具有特异切割位点。

作业五：

一、名词解释

1、限制性核酸内切酶：是由细菌产生的一类能特异识别双链 DNA 中的特定碱基序列，并在识别位点切割磷酸二酯键的核酸内切酶(简称限制酶)。

2、基因文库：将所有的重组 DNA 分子都导入宿主细胞进行扩增，得到分子克隆的混合体，这样一个混合体称为基因文库。

3、cDNA 文库：从组织细胞中分离得到纯化的 mRNA，然后以 mRNA 为模板，利用逆转录酶合成其互补 DNA，再复制成双链 cDNA 片段，与适当载体连接后导入受体菌内，扩增，构建 cDNA 文库。

4、RFLP：RFLP 标记是发展最早的 DNA 标记技术。RFLP 是指基因型之间限制性片段长度

的差异，这种差异是由限制性酶切位点上碱基的插入、缺失、重排或点突变所引起的。

5、核酸探针：是指与特定的靶分子发生特异性相互作用，并可被特殊的方法探知的分子。抗体-抗原、生物素-抗生物素蛋白、生长因子-受体的相互作用都可以看作是探针与靶分子的相互作用。

6、转录：转录是遗传信息由 DNA 转换到 RNA 的过程。作为蛋白质生物合成的第一步，转录是 mRNA 以及非编码 RNA (tRNA、rRNA 等) 的合成步骤。

二、简答题： 1、试回答影响限制性内切核酸酶切割效率的因素？

答：外因：是可以预见的，如反应条件（缓冲液、反应温度、反应时间、终止酶切的方法）、底物的纯度（是否有杂质、是否有盐酚的污染）、何时加酶、操作是否恰当、反应体积等等；内因：星星活性、末端长度、位点偏爱、甲基化底物、底物的构象。

2、何为载体？一个理想的载体应具备那些特点？

答：将外源 DNA 或基因携带入宿主细胞 (host cell) 的工具称为载体 载体具备的特点：①在宿主细胞内必须能够自主复制（具备复制原点）②必须具备合适的酶切位点，供外源 DNA 片段插入，同时不影响其复制③有一定的选择标记，用于筛选④最好具有较高的拷贝数，便于制备。

3、什么叫基因工程 (Gene Engineering)，试从理论和技术两个方面谈谈 Gene Engineering 诞生的基础？

答：基因工程：在体外将核酸分子插入病毒、质粒或其它载体分子，构成遗传物质的新组合，并使之参入到原来没有这类分子的宿主细胞内，而能持续稳定地繁殖。 理论基础：近几十年来，由于受到分子生物学、分子遗传学发展的影响，基因分子生物学的研究取得了前所未有的进步。而这些学科的综合成就，又为基因工程的诞生奠定了坚实的理论基础：①在 40 年代确定了遗传信息的携带者，即基因的分子载体是 DNA 而不是蛋白质，从而明确了遗传的物质基础问题；②在 50 年代揭示了 DNA 分子的双螺旋结构模型和半保留复制机理，解决了基因的自我复制和传递的问题；③在 50 年代末期和 60 年代，相继提出了"中心法则"和操纵子学说，并成功地破译了遗传密码，从而阐明了遗传信息的流向和表达问题。 技术基础：①60 年代-70 年代，限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶解决了对 DNA 分子进行体外的切割和连接；②基因克隆载体的出现③大肠杆菌转化体系的建立④60 年代发展的琼脂糖凝胶电泳和 Southern 转移杂交技术对 DNA 片段的分离和检测十分有用。

4、抗性基因是目前使用的最广泛的选择标记，常用的抗生素抗性有哪几种？并举两例说明其原理？

答：氨苄青霉素抗性基因 ampr 、 四环素抗性基因 tetr、氯霉素抗性基因 Cmr 、 卡那霉素和新霉素抗性基因 kanr ①氨苄青霉素抗性基因 ampr：青霉素可抑制细胞壁肽聚糖的合成，与有关的酶结合并抑制其活性，抑制转肽反应。氨苄青霉素抗性基因编码一个酶，该酶可分泌进入细菌的周质区，抑制转肽反应并催化 b-内酰胺环水解(水解青霉素)，从而解除了氨苄青霉素的毒性。②四环素抗性基因 tetr：四环素可与核糖体 30S 亚基的一种蛋白质结合，从而抑制核糖体的转位。四环素抗性基因编码一个由 399 个氨基酸组成的膜结合蛋白，可阻止四环素进入细胞。

5、YAC 载体具有什么样的功能性元件？为什么它在克隆大片段时具有很大的优越性？

答：YAC 带有天然染色体所有的功能元件，包括自主复制序列 ARS，一个着丝粒，两个端粒，选择标记，筛选模型。优越性：YAC 能够容纳长达几百 Kb 的外源 DNA，这是质粒和粘粒办不到的。大片段的插入更有可能包含完整的基因，在染色体步移中每次允许更大的步移距离，同时能够减少完整基因组文库所需的克隆数目。YAC 有灵活性，可作为质粒在 E. coil 中增殖；与大片段连接时，可导入酵母，作为真正染色体在酵母复制中有丝分裂。

三、论述题 1、分析比较琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳的异同点？

答：同：①原理相同。琼脂糖、聚丙烯酰胺均为无反应活性的稳定支持介质，可降低对流运动，故使电场中的分子电泳迁移率仅与分子的摩擦系数成反比。在一定电场强度下，DNA 分子的迁移率取决于核酸分子的大小和构象。②凝胶浓度的高低影响凝胶介质孔隙大小；浓度越高，空隙越小，其分辨能力也就越强；反之，浓度降低，空隙就增大，其分辨能力也就随之减弱。异：琼脂糖凝胶分辨 DNA 片段的范围为 0.2 Kb-50Kb 之间；而聚丙烯酰胺分辨 DNA 片段的范围为 1-1000bp，分离小片段效果最好，分辨率极高，相差 1bp 的 DNA 也可分开。

分子克隆技术：指将一种生物体（供体）的基因与载体在体外进行拼接重组，然后转入另一种生物体（受体）内，使之按照人们的意愿稳定遗传并表达出新产物或新性状的 DNA 体外操作程序，也称为分子克隆技术

克隆：是指从一个共同祖先无性繁殖下来的一群遗传上相同的 DNA 分子、细胞或个体所组成的特殊的生命群体

载体：携带外源 DNA 进入宿主细胞的工具。化学本质：DNA 1. 运送外源基因高效转入

受体细胞 2. 为外源基因提供复制能力或整合能力 3. 为外源基因的扩增或表达提供条件。

基因工程的含义：按照预先设计好的蓝图，利用现代分子生物学技术，特别是酶学技术，对一种生物（供体）的遗传物质（DNA）直接进行体外重组操作与改造，并转移到另外一种生物（受体）中去，从而实现受体生物的定向改造与改良。

黏性末端是指 DNA 分子在限制酶的作用之下形成的具有互补碱基的单链延伸末端结构，它们能够通过互补碱基间的配对而重新环化起来

DNA 连杆，是指用化学方法合成的一段由 10~12 个核苷酸组成的、具有一个或数个限制酶识别位点的寡核苷酸片段。

DNA 接头 它是一类由人工合成的一头具有某种限制性内切酶粘末端，另一头为平末端的特殊的双链寡核苷酸片段。当它的平末端与平末端的外源 DNA 片段连接之后，便会使后者成为具黏性末端的新的 DNA 分子，而易于连接重组。

载体：携带外源 DNA 进入宿主细胞，并为其提供复制和功能基因表达调控系统的工具。

目的基因：基因工程中克隆的目标 DNA 分子

SD 序列：mRNA 中起始密码子上游 8-13 个核苷酸处有一段富含嘌呤核苷酸的顺序，它可以与 30S 亚基中的 16S rRNA 3' 端富含嘧啶的尾部互补，形成氢键结合，有助于 mRNA 的翻译从起始密码子处开始

启动子：DNA 分子与 RNA 聚合酶特异结合的部位，也是转录开始的部位

基因组文库：某种生物的基因组的全部遗传信息通过克隆载体贮存在一个受体菌的群体之中，这个群体即为该生物的基因组文库。

cDNA：以 mRNA 为模板合成的互补脱氧核糖核苷酸序列。

cDNA 文库：某种生物基因组转录的的全部 mRNA 经反转录产生的各种 cDNA 分别与克隆载体重组，贮存在一个受体菌的群体中，这个群体就称为 cDNA 文库。

转化：受体菌直接吸收供体菌的 DNA 片断而获得后者部分遗传性状的现象。

转化子（transformant）：通过转化方式而形成的杂种后代。

感受态：指受体细胞最易接受外源 DNA 片断并能实现转化的一种生理状态。

转染：将重组 λ DNA 分子直接导入受体细胞的过程。

转导：通过 λ 噬菌体颗粒感染宿主细胞的途径把外源 DNA 分子转移到受体细胞内的过程

重组子的筛选：经过各种方法将外源 DNA 分子导入受体，获得所需目的重组子的过程

选择：转化子的初步筛选：通过某种外加压力（如：抗生素）的辨别作用，呈现具有重组 DNA 分子的特定克隆子的一种方法。

筛选：进一步检测目的重组子：通过某种特定的方法，从受体细胞群体或基因文库中，鉴定出目的重组子的过程。

启动子：DNA 链上一段能与 RNA 聚合酶结合并能起始 mRNA 合成的序列

SD 序列：核糖体结合位点

终止子：在一个基因的 3' 端或是一个操纵子的 3' 端往往还有一特定的核苷酸序列，它有终止转录的功能，这一 DNA 序列称为转录终止子

融合蛋白：是指蛋白质的 N 末端由原核 DNA 序列或其他 DNA 序列编码，C 端由真核 DNA 的完整序列编码。

转染：将重组 λ DNA 分子直接导入受体细胞的过程。

转导：通过 λ 噬菌体颗粒感染宿主细胞的途径把外源 DNA 分子转移到受体细胞内的过程

重组子：含有重组 DNA 分子的转化子

转化子：导入外源 DNA 分子后稳定存在的受体细胞

供体、受体、载体是 DNA 重组技术的三大基本元件

DNA 体外重组的基本步骤 1. 目的基因的获取：从复杂的生物基因组中，经过酶切消化或 PCR 扩增等步骤，分离出带有目的基因的 DNA 片断。 2. 重组体的制备：将目的基因的 DNA 片断插入到能自我复制并带有选择性标记的载体分子上。 3. 重组体的转化：将重组体（载体）转入适当的受体细胞中。 4. 克隆鉴定：筛选转化成功的细胞克隆（含有目的基因） 5. 目的基因表达：使导入寄主细胞的目的基因表达出我们所需要的基因产物。

基因工程的基本操作步骤： 1. 目的基因的获取 从复杂的生物基因组中，经过酶切消化或 PCR 扩增等步骤，分离出带有目的基因的 DNA 片断。 2. 重组体的制备 将目的基因的 DNA 片断插入到能自我复制并带有选择性标记。 3. 重组体的转化 将重组体（载体）转入适当的受体细胞中。 4. 克隆鉴定 筛选转化成功的细胞克隆（含有目的基因） 5. 目的基因表达 使导入寄主细胞的目的基因表达出我们所需要的基因产物

载体应具备的条件： 1. 具有对受体细胞的可转移 2. 具有与特定受体细胞相适应的复制位点或整合位点 3. 长度尽可能小，以提高其载装能力 4. 具有多种单一的酶切位点 5. 具有合适的选择性标记。

限制性内切酶的命名原则 前 3 个字母代表来源的生物，随后 1 个字母或阿拉伯数字代表菌株，最后 1 个罗马字母代表发现或鉴定的次序

star activity 高浓度的酶 ($>100\text{U}/\text{g}$)、高浓度的甘油 ($>5\%$)、低离子强度 ($<25\text{mM}$)、极端 pH 值 ($>\text{pH}8.0$) 等, 会使一些核酸内切酶的识别和切割序列发生低特异性, 即所谓的 star activity 现象.

抑制 star activity 的措施 ① 减少酶的用量, 避免过量酶切, 减少甘油浓度 ② 保证反应体系中无有机溶剂或乙醇 ③ 提高离子强度到 $100\sim150\text{mM}$ ④ 降低反应 pH 至 $\text{pH}7.0$ ⑤ 使用 Mg^{2+} 作为二价阳离子

DNA 连接酶 需要在一条 DNA 链的 $3'$ -末端具有一个游离的羟基 ($-\text{OH}$), 和在另一条 DNA 链的 $5'$ -末端具有一个磷酸基团 ($-\text{P}$), 只有在这种情况下, 才能发挥其连接 DNA 分子的功能作用。

体外连接 DNA 片段的方式 黏性末端 同种内切酶产生的黏性末端的连接, 同尾酶产生的黏性末端的连接, 不同黏性末端的连接。 平末端的直接连接, 末端修饰后的连接, 加上连杆 (linker), 使之形成黏性末端后, 再用 DNA 连接酶连接, DNA 接头(adapter) 连接法。

平末端 DNA 片段的连接 (1) 直接用 T4DNA 连接酶连接; (2) 先用末端核苷酸转移酶, 给平末端 DNA 分子加上同聚物尾巴之后再用 DNA 连接酶进行连接; (3) 用连杆连接平末端 DNA 分子; (4) DNA 接头连接法。

载体应具备的条件 1. 具有针对受体细胞的亲缘性或亲和性 2. 具有与特定受体细胞相适应的复制位点或整合位点 3. 具有多种单一的酶切位点 4. 具有合适的选择性标记 自我复制表达, 外源基因的插入不影响其功能的发挥, 易于从宿主细胞分离出来 5. 分子量尽可能小, 以提高其载装能力

质粒 DNA 的复制类型 严谨型质粒 松弛型质粒

天然质粒的缺陷 (1) 分子量大, 拷贝数低 (2) 筛选标志不理想

构建质粒克隆载体的基本策略 1 能在受体中进行有效的复制 (有复制起始位点)。2 含多克隆位点 3 含有供选择克隆子的标记基因, 如: 常用的标记基因: Apr, Kmr, Smr, Tcr 基因等 4 DNA 分子尽可能小和较高的拷贝数。5 根据特殊需要, 组装各种“元件”, 构建不同用途的质粒克隆载体。

质粒克隆载体的构建 1 选择合适的出发质粒 2 正确获得构建质粒克隆载体的元件 3 组装合适的选择标记基因 4 选用合适的启动子 5 构建过程力求简单

DNA 插入而导致基因失活的现象, 称之为**插入失活效应**。

蓝白斑筛选 Ampicillin 抗性和 lacZ 的 肽互补 (蓝白斑) 相结合。-半乳糖苷酶能

把无色的化合物 Xgal 分解成半乳糖和一个深蓝色的物质 5-溴-4-氯靛蓝

Ti 质粒介导转化的过程 ①根癌农杆菌对植物细胞的识别和附着②根癌农杆菌对植物信号物质的感受③根癌农杆菌 Ti 质粒上的 vir 基因以及染色体上操纵子的活化④ vir 区基因被激活,virD 基因编码的核酸内切酶分别将 T-DNA 的 RB 序列和 LB 序列切出单链切口,释放出 T-DNA 的单链线性拷贝,T-DNA 复合体的产生⑤T-DNA 复合体在 RB 序列的引导下定向地穿过农杆菌的细胞膜、细胞壁、进入植物细胞壁并整合到植物的染色体基因组中

TA 克隆的优点 不需使用含限制酶序列的引物,不需把 PCR 产物做平端处理,不需在 PCR 扩增产物上加接头,即可直接进行克隆。

TA 克隆注意事项 1. 要获得目的基因的 TA 克隆,PCR 产物的特异性要好。2. PCR 产物在 TA 克隆前要通过纯化。3. 在 PCR 产物回收、纯化过程中防止外来 DNA 污染。

真核生物的启动子: 真核生物有三种类型的 RNA 聚合酶,每一种都有对应的启动子。

1. RNA 聚合酶 I 只转录 rRNA,故只有一种启动子。

2. RNA 聚合酶 II 转录 mRNA,其启动子最为复杂;

3. RNA 聚合酶 III 转录 tRNA 和 5S rRNA,其启动子大都是位于转录的 DNA 序列之内,称为下游启动子。

目的基因的获得:直接分离法;PCR 扩增;构建基因组文库法;构建 cDNA 文库法;化学合成法

直接分离法: 限制酶酶切法(DNA 分子已测序/目的基因已定位)

基因组文库的构建(DNA 未测序或未定位):

采用限制酶切割

构建基因组文库

筛选目的基因克隆

基因文库构建的一般步骤:

(1) 染色体 DNA 大片段的制备

①酶切法

②物理切割法

(2) 载体与基因组 DNA 大片的连接

① 粘性末端直接连接

②人工接头法

(3) 转导受体

(4) 筛选重组子

cDNA: 以 mRNA 为模板合成的互补脱氧核糖核苷酸序列。

cDNA 文库: 某种生物基因组转录的的全部 mRNA 经反转录产生的各种 cDNA 分别与克隆载体重组, 贮存在一个受体菌的群体中, 这个群体就称为 cDNA 文库。

cDNA 文库与基因组文库的区别在于 cDNA 文库是**有时效性**的。

cDNA 文库的特点

优点: 分离的目的基因可直接用于表达; 比 DNA 文库小的多, 容易构建

缺点: 只与编码序列有关; 不能反映内含子; 不能反映启动子、终止子以及与核糖体识别的序列

构建 cDNA 文库的一般步骤:

(1) 总 RNA (total RNA) 提取

(2) mRNA 的分离纯化

① **原理:** 利用 mRNA 都含有一段 polyA 尾巴, 将 mRNA 从总 RNA (rRNA、tRNA 等) 中分离纯化。

② mRNA 的分离纯化 Column (柱)

(3) cDNA 的合成

① cDNA 第一链合成

② 降解 mRNA 模板

③ cDNA 第二链合成 (cDNA 第二链合成的方法有四种, 自身引导合成法, 置换合成法, 引导合成法和引物-衔接头合成法。)

(4) cDNA 与载体连接:

(5) 噬菌体颗粒的包装及转染或质粒的转化 (导入宿主中繁殖)

基因的化学合成: 寡核苷酸单链的化学合成; 探针的化学合成; 连接子和接头的合成; 基因的半合成; 全长基因化学合成

目的基因的分离:

目的序列已知: 一般采用 PCR 技术或分子杂交技术分离克隆目的基因

目的序列未知: 差异表达序列; 无差异表达的目的序列, 可采用文库筛选法、功能蛋白分离法、序列克隆法

基因克隆的方法:

一、目的基因的功能克隆

二、序列克隆法

三、差别杂交法

四、减法杂交技术

五、mRNA 差别显示技术

功能克隆：根据已知基因的产物推断出其相应核苷酸序列，再根据此序列合成寡核苷酸探针，从 cDNA 文库或基因组文库中调取目的基因

表型克隆：如差异筛选法、差减杂交 (SH)、mRNA 差别显示技术 (DDRT-PCR)、代表性差异分析 (RAD)、抑制型差减杂交 (SSH) 等

无基因序列及表达功能信息，但具有基因遗传图，转座子标签等条件，常用图位克隆和转座子标签法克隆

目的基因的功能克隆：在纯化相应的编码蛋白后构建 cDNA 文库或基因组文库，然后从文库中筛选目的基因

1、根据特异蛋白分离目的基因

分离、纯化目的蛋白

测定特异的氨基酸顺序

推测编码该蛋白的核苷酸序列

人工合成一段寡核苷酸探针

从 cDNA 文库或基因组文库中筛选编码基因

分离、纯化目的蛋白

目的蛋白免疫动物，制备抗体

从 cDNA 表达文库中筛选目的基因

根据特异蛋白分离目的基因局限性：

特异蛋白已鉴定并分离纯化

某些基因产物，难以分离纯化

非所有基因有蛋白质产物

遗传密码的简并性

2、功能互补法克隆基因：利用被克隆的外源片段与宿主细胞染色体 DNA 具有功能互补。

筛选营养缺陷型互补基因

序列克隆法：根据已知基因序列或同源基因序列分离目的基因；采用核酸探针杂交筛选

或用 PCR 技术进行分离

差别杂交法：组织特异性表达或特定发育阶段表达的基因；受生长因子调节的基因；经特殊处理诱导表达的基因

应用前提：基因在两种不同的细胞群体中的差异性表达（一个细胞群体中正常表达，另一个细胞群体中目的基因不表达）。

基本过程：制备两种细胞群体的 mRNA 提取物；以两种总 mRNA 或 cDNA 为探针；以表达目的基因的细胞群体构建 cDNA 文库

局限性：

灵敏度比较低，不适于低丰度 mRNA 目的基因分离

需要筛选大量的杂交滤膜，鉴定大量的噬菌斑

差别杂交重复性较差

不同滤膜间 DNA 保有量不均一

杂交信号强度不一致

重新点杂交

减法杂交技术：又称差减杂交、扣除杂交、减数杂交、消减杂交

本质：尽量去除两种样品中普遍共同存在的基因序列，从而使目的基因序列得到有效的富集，从而提高基因筛选分离的敏感性

mRNA 减法杂交；基因组减法杂交

感受态细胞的制备：

- 1、挑取平板上的大肠杆菌单菌落接种于 2 mL LB 液体培养基中，37℃振荡培养过夜
- 2、按 1% 的接种量接种于 3 mL 新鲜 LB 培养液，37℃剧烈振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4-0.6 (可见雾状)
- 3、倒至 1.5mL 的 eppendorf 管中，4℃下 12,000 rpm 离心 1 min，倒出培养液，用无菌滤纸尽量吸干
- 4、加入 1mL 预冷的无菌 0.1mol · L⁻¹ CaCl₂ 溶液涡旋，4℃下 12,000 rpm 离心 30 秒，尽量去除上清
- 5、沉淀以 50-100 μL 预冷的 0.1mol · L⁻¹ CaCl₂ 重悬，4℃保存备用，7d 内可用。

大肠杆菌的转化方法：

1. Ca²⁺诱导大肠杆菌转化法

CaCl₂ 的诱导原因：在 0℃的 CaCl₂ 低渗溶液中，细菌细胞发生膨胀，Ca²⁺使细胞

膜磷脂层形成液晶结构，促使细胞外膜与内膜间隙中部分核酸酶解离，诱导形成感受态 Ca^{2+} 能与加入的 DNA 分子结合，形成抗脱氧核糖核酸酶的羟基—磷酸钙复合物，黏附在胞膜的外表面；42 °C 热激处理，细胞膜的液晶结构发生扰动，出现间隙。

对照试验：转化处理过程中，可能感染杂菌，导致假阳性

2. 电穿孔转化法

基本原理：利用高压电脉冲作用，在大肠杆菌细胞膜上进行电穿孔，形成可逆的瞬间通道，促进外源 DNA 的有效吸收。

影响因素：电场强度，电脉冲时间，外源 DNA 浓度

3. 三亲本杂交接合转化大肠杆菌

重组 DNA 分子导入植物细胞

(1) 农杆菌介导的 Ti 质粒载体转化法

作用机制：将待转移的目的基因组入农杆菌中的 Ti 质粒载体；农杆菌识别敏感植物，将 Ti 质粒的 T-DNA 转移到植物细胞内部

基本程序：选择合适的外植体；农杆菌的接种操作；洗菌并筛选培养

常用方法：

1. 创伤植株感染法
2. 共培养感染法：叶盘转化法；植物愈伤组织共培养转化法；植物悬浮细胞共培养转化法；原生质体共培养转化法

(2) DNA 的直接转移法：多聚物介导法；电穿孔转化法；激光微束穿孔转化法；显微注射法；超声波介导转化法；基因枪法；脂质体介导法；花粉管通道法

重组 DNA 分子导入哺乳动物细胞

病毒介导的转染：病毒颗粒转导法

生化转染：磷酸钙转染法；DEAE—葡聚糖转染法；聚阳离子—DMSO 转染法；脂质体介导法

物理转染：显微注射法；电穿孔法

常见的筛选重组子方法

1 **遗传表型直接筛选：**抗药性筛选；插入失活筛选法；插入表达筛选法；显色互补筛选法

2 **PCR 法鉴定**

3 **酶切法鉴定**

4 杂交法鉴定：Southern blot；Northern blot；Western blot 等

5 测序

原核生物基因表达的特点

- ① 只有一种 RNA 聚合酶识别原核细胞的启动子，催化所有 RNA 的合成。
- ② 基因的表达是以操纵子为单位的。
- ③ 原核生物无核膜，所以转录与翻译是偶联的，也是连续进行的。
- ④ 原核基因一般不含有内含子，在原核细胞中缺乏真核细胞的转录后加工系统。
- ⑤ 原核生物基因的控制主要在转录水平，这种控制要比对基因产物的直接控制要慢。
- ⑥ mRNA 的核糖体结合位点上，含有一个 S-D 序列，而真核基因则缺乏此序列。

启动子的特性：列特异性；向性；置特异性；属特异性

几种类型的原核表达载体

非融合蛋白：不与细菌的任何蛋白或多肽融合在一起的表达蛋白

优点：它具有非常接近于真核细胞体内蛋白质的结构，因此表达产物的生物学功能也就更接近于生物体内天然蛋白质。

缺点：易被细菌蛋白酶破坏。

融合蛋白：由一条短的原核多肽或具有其他功能的多肽和真核蛋白质结合在一起。

优点：大大增加，不易被细菌蛋白酶降解；于分离纯化

影响基因表达效率的因素：启动子的强度、DNA 转录起始序列、密码子的选择、mRNA 分子的二级结构、转录的终止、质粒的拷贝数以及质粒的稳定性和寄主细胞的生理特征等

提高基因表达效率的途径：

1. 采用强启动子；35 和-10 区之间保持的距离（16~19bp）
2. 确定合适的 SD 序列后面的几个碱基成分及起始密码子上游的碱基成分
3. 起始密码子和 S-D 序列之间的距离必须接近到一定程度（7 个核苷酸时最合适）
4. 在基因内部的适当位置上存在着转录的终止区，就能够保证使质粒的拷贝数(也就是基因的表达效率)控制在一个正常的水平上。
5. 提高基因的拷贝数（将基因克隆到松弛型的质粒载体上）
6. 减轻细胞的代谢负荷：
 - （1）诱导表达：细菌的生长与外源基因的表达分开，是减轻宿主细胞代谢负荷的最为常用的一个方法
 - （2）表达载体的诱导复制：将宿主菌的生长和质粒的复制分开

7. 高表达蛋白的稳定性, 防止其降解

(1) 克隆一段原核序列, 表达融合蛋白

(2) 采用某种突变菌株, 保护表达蛋白不被降解

(3) 表达分泌蛋白

基因工程的应用:

医药业: 疾病的预防; 病的诊断; 病的治疗

农业及食品工业: 提高作物抗性; 良作物品质; 长果实货架期; 用农作物生产药物

畜牧业; 工食品

环境: 环境检测; 环境净化

第一章 基因工程的概念

第一节 基因工程诞生的理论基础

一. 确定了遗传信息的携带者是 DNA 而不是蛋白质。明确了遗传的物质基础问题

1. 肺炎双球菌转化实验

1944 年 Avery, 确定了基因的分子载体是 DNA, 而不是蛋白质。

2. 噬菌体转染实验

1952 年 Alfred Hershy 和 Marsha Chase 进一步证明遗传物质是 DNA

二. 揭示了 DNA 分子的双螺旋结构模型和半保留复制机理, 解决了基因的自我复制和传递的问题。

1953 年 James D. Watson 和 Francis H. C. Crick 揭示了 DNA 分子的双螺旋结构和半保留复制机制。

三. 提出了“中心法则”和操纵子学说, 并成功地破译了遗传密码, 从而阐明了遗传信息的流向和表达问题

1958 年 Crick 又提出了遗传信息传递的“中心法则”

1964 年 Marshall Nirenberg 和 Gobind Khorana 等终于破译了 64 个遗传密码

F. Jacob 和 J. Monod 在 1961 年提出了操纵子学说

<http://baike.baidu.com/view/225864.htm>

第二节 基因工程诞生的技术基础

DNA 分子的体外切割与连接

1. 限制性内切酶 (restriction enzymes)

Werner Arber 理论预见限制酶

1968 年 H. O. Smith 等分离出第一种限制性核酸内切酶

Daniel Nathans 用限制酶切得 SV40 DNA 片断

3 人于 1978 年获得 Nobel 生理或医学奖

2. DNA 连接酶 (ligase) 1967 年 5 个实验室几乎同时发现了 DNA 连接酶

二. DNA 分子的核苷酸序列分析

1975 年 F. Sanger、A. Maxam 和 W. Gilbert 发明了 DNA 快速测序技术, 1980 年 Nobel 化学奖

三. 载体的构建

1972 年前后使用小分子量的细菌质粒和噬菌体作载体。在细菌细胞里的大量扩增
四. 转化技术

1970 年 M. Mandel 和 A. Higa 发现经过氯化钙处理的大肠杆菌容易吸收噬菌体 DNA。
1972 年 S. Cohen 发现这种处理过的细菌同样能吸收质粒 DNA

五. 琼脂糖凝胶电泳和 southern 转移杂交技术

1960s 发明了琼脂糖凝胶电泳, 可将不同长度的 DNA 分离开; DNA 印迹技术由 Southern 于 1975 创建, 称为 Southern 印迹技术

二. 基因工程的定义和特征

1. 定义

在体外将核酸分子插入病毒、质粒或其它载体分子, 构建遗传物质的新组合, 并使之渗入到原先没有这类分子的寄生细胞内, 而能持续稳定地繁殖

在体外对不同生物的遗传物质 (基因) 进行剪切、重组、连接, 然后插入到载体分子中 (细菌质粒、病毒或噬菌体 DNA), 转入微生物、植物或动物细胞内进行无性繁殖, 并表达出基因产物

第二章 酶学基础

1 拷贝数就是指某目的基因 (可以是质粒) 在某一生物群体或个体中存在的个数。单拷贝就是该基因在基因组中只有一个, 多则指有多个。

(一) 在细菌细胞中, 某种特定质粒的数目。根据复制特性, 质粒分严紧型和松弛型两类, 前者在细胞中只含 1~2 个, 而后者含 10~15 个以上。恒定的拷贝数与质粒复制控制系统、宿主细胞遗传背景及生长条件有关。质粒复制控制系统首先通过调节复制的起始点来控制拷贝数, 调节因素包括阻遏蛋白、反义 RNA 和

某些顺向重复序列。有些质粒还有其他控制系统，如有分配功能的 par 系统和确保质粒稳定遗传的 ccd 系统。一旦质粒上与调控有关的基因或位点突变，可使拷贝数明显增加或减少。

(二)。

工具酶：进行 DNA 操作经常要用到的“工具”——酶

四大工具酶: 核酸酶 nucleases 连接酶 ligase 聚合酶 polymerase

修饰酶 modification enzyme

第一节 限制性内切酶 【命名、识别位点、切割过程、末端特征（粘端、平端）、酶活单位及定义】

限制性内切酶：指能识别特定的 DNA 序列，在一定的条件下，可在识别位置上或附近对 DNA 进行切割的酶。

二. 限制性内切酶的命名 与种类

按照国际命名法,限制性内切核酸酶属于水解酶类。由于限制性酶的数量众多,而且越来越多,并且在同一种菌中发现几种酶。为了避免混淆,1973 年 Smith 和 Nathans 对内切酶的命名提出建议,1980 年,Roberts 对限制性酶的命名进行分类和系统化。

限制性酶采用三字母的**命名原则**，即属名 + 种名 + 株名的个一个首字母，再加上序号，

- A、 第一个字母大写，表示该酶来源的细菌属名的第一个字母
- B、 第二、三个字母小写，表示该酶来源的细菌的种名的前 2 个字母
- C、 第四个字母 大写 代表不同的变种/品系
小写 代表不同的菌株和型
- D、 最后罗马字母，代表同一菌株中不同的限制性内切酶

注意限制性内切酶的正确写法:

- 1、前3个字母一定斜体 2、字母与罗马数字间空格 如: *EcoR* I *Pst* I
- I 类限制性内切核酸酶

I 类酶不仅是一种核酸内切酶，同时在酶分子上还具有甲基化酶和 ATPase 的活性，所以是具有多种酶活性的复合酶类。作用时除了需要 Mg^{2+} 作辅助因子外，还要求 ATP 和 S 腺苷甲硫氨酸 (SAM) 的存在。I 类酶具有特异的识别序列，大约 15 个碱基对。

I 类酶虽然能够在一定序列上识别 DNA 分子,并能同 DNA 分子作用,因其识别 DNA 后,要朝一个方向或两个方向移动一段距离(通常为 1000 个碱基左右),并且要形成

一个环才能切割 DNA(图), 所以识别位点和切割位点不一致, 产生的片段较大。

III 类限制性内切核酸酶

III 类限制性内切核酸酶也是基因工程中不常用的酶, 分子量和亚基组成类似于 I 类酶, 作用方式基本同 II 类酶。如 *EcoP* 1 是由两个亚基组成, 一个亚基(M 亚基)负责位点识别和修饰。另一个亚基(R 亚基)具有核酸酶的活性(图 3-5)。切割 DNA 时需要 ATP, Mg^{2+} , 也能被 SAM 激活, 但并非必需。

II 类限制性内切核酸酶

这类酶的分子量较小。一般在 2-4 万道尔顿, 通常由 2-4 个相同的亚基所组成。它们的作用底物为双链 DNA, 极少数 II 类酶也可作用于单链 DNA, 或 DNA/RNA 杂种双链。这类酶的专一性强, 它不仅对酶切点邻近的两个碱基有严格要求, 而且对更远的碱基也有要求, 因此, II 类酶既具有切割位点的专一性, 也具有识别位点的专一性, 一般在识别序列内切割。切割的方式有平切和交错切, 产生平末端的 DNA 片段或具有突出粘性末端的 DNA 片段(5' 或 3' 粘性末端)。作用时需要 Mg^{2+} 作辅助因子, 但不需要 ATP 和 SAM。II 类酶与对应的甲基化酶在蛋白亚基上尚未发现有什么关系, 第一个被分离的 II 类酶是 Hind II。

a. 识别位点:

绝大多数的 II 型核酸内切限制酶, 都能够识别由 4~8 个核苷酸组成的特定的核苷酸序列。我们称这样的序列为核酸内切限制酶的识别序列。而 II 型限制酶就是从其识别序列内切割 DNA 分子的, 因此识别序列又称为核酸内切限制酶的切割位点或靶序列。

有些识别序列是连续的(如 GATC),

有些识别序列则是间断的(如 GATC), N 是代表任意一种核苷酸碱基

切割位点的一个共同特点是, 它们具有双重旋转对称的结构形式, 换言之, 这些核苷酸对的顺序是呈回文结构。

这段序列有两个基本的特征, 第一是能够在中间划一个对称轴, 两侧的序列两两对称互补配对, 第二个特点是两条互补链的 5' 到 3' 的序列组成相同, 即将一条链旋转 180°, 则两条链重叠。

b. 切割类型

检验了非常大量的实验事例之后发现, 由核酸内切限制酶的作用所造成的 DNA 分子的切割类型, 通常是属于下述两种独特的排列方式之一:

(1) 两条链上的断裂位置是交错地、但又是对称地围绕着一个对称轴排列, 这种

形式的断裂结果形成具有**粘性末端**的 DNA 片段；

(2) 两条链上的断裂位置是处在一个对称结构的中心，这样形式的断裂是形成具有**平末端**的 DNA 片段。

c. 产生的**末端特征**：

II 类限制性内切酶的切割产物有**平末端**和**粘性末端**(cohesive end)。

粘性末端是指 DNA 分子的两端具有彼此互补的一段突出的单链部分，这一小段单链部分和同一分子的另一端或其它分子末端的单链部分如果互补的话，则能通过互补碱基之间的配对，形成双链。并在 DNA 连接酶的作用下，使同一 DNA 分子的两端连接成环状，或使两个分子连成一大线状分子。

已知有两种不同类型的限制酶都可以产生粘性末端，但一种是形成具有 3' 粘性末端，例如 Pst I 酶就是属于这种类型；另一种则是形成具有 5' 粘性末端，例如 EcoR I 酶便是此种类型的一个代表。

粘性末端能够通过互补碱基间的配对而重新环化起来，

平末端的 DNA 片段则不易于重新环化。

酶活性单位：

1 单位限制性内切酶 (1 U) 通常定义：在建议使用的 Buffer 及温度下，在 20 μ l (50 μ l) 反应体系中反应 1 小时，使 1g 入 DNA 完全消化所需的酶量。

星活性 (star ctivity)

在非最适的反应条件下，酶的识别特异性降低，产生非特异性带，这种酶切特异性降低的现象，称为星活性。所谓非最适的反应条件：过量酶、低盐浓度、过量甘油、高 pH (8.0 以上)、有机溶剂 ex: 酒精 (EcoR I 对酒精敏感)、SDS、苯酚、氯仿等。

五. 影响限制性核酸内切酶活性的因素

1、DNA 样品的纯度：

蛋白质、苯酚、氯仿、乙醇、EDTA、SDS、NaCl 等将影响 DNA 样品的纯度。

如果 DNA 样品难以纯化时，可以采取下列方法进行酶切：

加大酶的用量，1 mg DNA 用 10U 酶(但是不能超总体积 1/10

加大反应总体积

延长反应时间

2、DNA 样品的甲基化程度：

核酸内切限制酶是原核生物限制—修饰体系的组成部分，因此识别序列中特定核

苷酸的甲基化作用，便会强烈地影响酶的活性。

为避免产生这样的问题，在基因克隆中使用的是失去甲基化酶的大肠杆菌菌株制备质粒 DNA。

可以利用不同的限制性内切酶对甲基化敏感程度不同，研究不同条件下 DNA 的甲基化程度。

3、缓冲液性质：

标准缓冲液的组份包括：氯化镁、氯化钠或氯化钾、Tris-HCl, β -巯基乙醇或二巯苏糖醇 (DTT) 以及牛血清白蛋白 (BSA) 等。酶活性的正常发挥，是绝对地需要二价的阳离子，通常是 Mg^{2+} 。不正确的 NaCl 或 Mg^{2+} 浓度，不仅会降低限制酶的活性，而且还可能导致识别序列特异性的改变。

缓冲液 Tris-HCl 的作用在于使反应混合物的 pH 恒定在酶活性所要求的最佳数值的范围之内。对绝大多数限制酶来说，在 pH=7.4 的条件下，其功能最佳。

巯基试剂对于保持某些核酸内切限制酶的稳定性是有用的，而且还可保护其免于失活。但它同样也可能有利于潜在污染杂质的稳定性。

有一部分核酸内切限制酶对于钠离子或钾离子浓度变化反应十分敏感，而另一部分核酸内切限制酶则可适应较广的离子强度的变化幅度。

4、酶切反应的温度

DNA 酶切反应的温度，是影响核酸内切限制酶活性的另一个重要因素。不同的核酸内切限制酶，具有不同的最适反应温度，而且彼此之间有相当大的变动范围。大多数核酸内切限制酶的标准反应温度都是 37℃。

但也有许多例外的情况，它们要求 37℃ 以外的其它反应温度。其中有些核酸内切限制酶的最适反应温度低于标准的 37℃，例如 Sma I 是 25℃、Apa I 是 30℃。

有些核酸内切限制酶的最适反应温度则高于标准的 37℃，例如 Mae I 是 45℃、Bcl I 是 50℃、Mae III 是 55℃；还有些核酸内切限制酶的最适反应温度可高达 60℃ 以上。

消化反应的温度低于或高于最适温度，都会影响核酸内切限制酶的活性，甚至最终导致完全失活。

酶切的方式：

1、完全酶切：内切酶在 DNA 上的所有识别位点都被切开。

2、不完全酶切：只有有限数量的酶切位点被切开，可以通过缩短保温时间、降低反应温度或减少酶的用量可达到局部消化的目的。

第二节 连接酶 (ligase)

连接酶的作用机理与反应条件:

1、作用机理:

- (1) ATP (NAD⁺) 提供激活的 AMP
- (2) ATP 与连接酶形成共价“连接酶-AMP”复合物, 并释放出焦磷酸 PPi。
- (3) AMP 与连接酶的赖氨酸 ϵ -氨基相连。
- (4) AMP 随后从连接酶的赖氨酸 ϵ -氨基转移到 DNA 一条链的 5' 端 P 上, 形成“DNA-腺苷酸”复合物。
- (5) 3' -OH 对磷原子作亲核攻击, 形成磷酸二酯键, 释放出 AMP。

2、反应条件

- (1) 必须是两条双链 DNA, 如果为粘性末端, 末端必须配对。
- (2) DNA 的 3' 端有游离的 -OH', 5' 端有一个磷酸基团 (P)。
- (3) 需要能量:

动物或噬菌体中: ATP

大肠杆菌中: NAD⁺

连接酶的种类: T4-DNA 连接酶、E. coli DNA 连接酶、T4-RNA 连接酶、

连接酶的活性单位与定义:

一般采用 Weiss 单位来衡量 T4 DNA 连接酶的活性。在 37℃ 下 20 分钟催化 1 nmol 32p 从焦磷酸根置换到 [γ , β , 32P]ATP 所需的酶量, 定义为 1 个 Weiss 单位。该定义方法基于 ATP 和焦磷酸的交换, 是最常用的连接酶单位,

但该定义所展示的直观生物学意义不显著。New England Biolabs 公司也提出了一种定义方式, 通过粘性末端的连接效率来表示。即, 在 20 μ l 反应体系中于 16℃, 使 *Hind* III 切过的 DNA (300 μ g/ml, 0.12 μ M 5' 末端) 在 30 分钟内连接 50% 所需的酶量为 1 个 NEB 单位。1 NEB 单位等于 0.015 Weiss 单位, 1 Weiss 单位等于 67 NEB 单位。

影响连接酶效果的因素

1、酶切片段的状态:

粘性末端连接效率比平端至少大 100 倍

5' 突出粘性末端大于 3' 突出粘性末端

不同的限制性内切酶片段连接效率不同, 以 *Hind* III 最好。

2、插入片段与载体的浓度比例：

DNA 一端与另一端的连接可认为是双分子反应，在标准条件下，其反应速度完全由互相匹配的 DNA 末端的浓度决定。不论末端位于同一 DNA 分子（分子内连接）还是位于不同分子（分子间连接），都是如此。现考虑一种简单的情况，即连接混合物中只含有一种 DNA，也就是用可产生粘端的单个限制酶切割制备的磷酸化载体 DNA。

如果反应中 DNA 浓度低，则配对的两个末端为同一 DNA 分子的机会较大（因为 DNA 分子的一个末端找到同一分子的另一末端的概率要高于找到不同 DNA 分子的末端的概率）。

因此，在 DNA 浓度低时，质粒 DNA 重新环化将卓有成效。如果连接反应中 DNA 浓度有所增高，则在分子内连接反应发生以前，某一个 DNA 分子的末端碰到另一 DNA 分子末端的可能性也有所增大。因此在 DNA 浓度高时，连接反应的初产物将是质粒二聚体和更大一些的寡聚体。

进行克隆时，Vector DNA 和 Insert DNA 的摩尔数比一般为 1: 2~10，增加插入片段与载体的接触机会，减少载体自我连接的现象。

3、反应温度：

37℃ 连接酶活性最高，但 37℃ 时粘性末端 DNA 分子形成的配对极不稳定，故最佳 12-16℃，最大限度地发挥连接酶的活性，又要有助于短暂配对结构的稳定。

4、反应液中的成分（特别针对平端连接）：

由于 DNA 很容易成为平端，所以这是一个极为有用的酶学特性。有了这样的特性，才能使任何 DNA 分子彼此相连。然而，相对而言，平端连接是低效反应，它要求以下 4 个条件：

- | | |
|-------------------------------|----------------|
| 1) 低浓度 (0.5mmol/L) 的 ATP | 2) 不存在亚精胺一类的多胺 |
| 3) 极高浓度的连接酶 (50 Weiss 单位. ml) | 4) 高浓度的平端。 |

凝聚剂：

反应混合物中加入一些可促进大分子群聚作用并可导致 DNA 分子凝聚成集体的物质，如聚乙二醇或氯化六氨全高钴，可以使如何取得适当浓度的平端 DNA 的总是迎刃而解。在连接反应中，这些物质具有两作用：

1) 它们可使平端 DNA 的连接速率加大 1 — 3 个数量级，因此可使连接反应在酶 DNA 浓度不高的条件下进行。

2) 它们可以改变连接产物的分布, 分子内连接受到抑制, 所形成的连接产物一律是分子间连接的产物。

第三节 DNA 聚合酶 (原理、用途)

聚合酶的种类:

1、依赖 DNA 的 DNA 聚合酶: 大肠杆菌 DNA 聚合酶、Klenow fragment、T7 DNA 聚合酶、T4 DNA 聚合酶和修饰过的 T7 DNA 聚合酶

2、不依赖 DNA 的 DNA 聚合酶: 末端转移酶

3、依赖 RNA 的 DNA 聚合酶: 反转录酶

4、依赖 DNA 的 RNA 聚合酶: E.coli RNA 聚合酶, phage SP6、T7 和 T3 RNA 聚合酶

5、不依赖 DNA 的 RNA 聚合酶: polyA 聚合酶

DNA 聚合酶

1、DNA 聚合酶 I: 聚合酶活性: $5' \rightarrow 3'$, 需要引物

外切酶: $5' \rightarrow 3'$

$3' \rightarrow 5'$ 校正功能

应用: 缺平移探针标记

2、Klenow fragment:

聚合酶活性: $5' \rightarrow 3'$, 需要引物

外切酶: $3' \rightarrow 5'$

用途:

A: 末端标记法

B: 合成 cDNA 的第二链

C: 随机引物 (6nt) 标记

D: 末端终止法进行 DNA 序列分析

3、T4-DNA 聚合酶:

聚合酶活性: $5' \rightarrow 3'$,

外切酶: $3' \rightarrow 5'$

外切酶活性较 klenow 片段的活性大 200 倍, 对单链 DNA 的活性大于双链 DNA。

特点: 当没有 dNTP 时, T4DNA 聚合酶行使 $3' \rightarrow 5'$ 外切酶功能, 制造出 $3'$ 隐蔽端。

如果只有一种 dNTP, 则降解到该 dNTP 的位置。

用途:

A、填补或标记限制酶切割 DNA 后产生的凹缺 $3'$

B、末端标记带 3' 突出末端的 DNA:

利用 3' 5' 外切酶活性作用于所有末端形式的 3' 端 (平端、3' 隐蔽端、5' 隐蔽端) 制造出 3' 隐蔽端, 再利用它的 5' 3' 聚合酶活性补平, 并加入放射性标记的 dNTP

C、标记用作杂交探针的 DNA 片段

D、将双链 DNA 的末端转化成平

E: 体外诱变

4、T7-DNA 聚合酶:

从 T7 噬菌体感染大肠杆菌细胞中纯化出来的, 由两个亚基组成:

(1) T7 基因 5 编码的大亚基: 有 5' 3' 聚合酶和 3' 5' 外切酶活性。

(2) 大肠杆菌编码的小亚基: 硫氧还蛋白, 增加大亚基对模板的亲水性

T7-DNA 聚合酶的用途:

A、用填补或交换 (取代) 反应快速进行末端标记;

B、将双链 DNA 的末端转化成平末端;

C、复制较长的模板进行引物延伸反应, 在测序中读出较长的序列。

5、修饰的 T7DNA 聚合酶

通过修饰使 3' 5' 外切酶活性下降 99% 以上, 但聚合能力不受影响, 修饰后的 T7DNA 聚合酶在聚合反应中有很高的持续性; 进一步改进的基因工程生产的测序酶 2.0, 完全没有核酸外切酶活性。

用途:

(1) DNA 序列分析, 可读出较长的序列,

(2) 标记 DNA 3' 隐蔽末端和更有效地补平末端。

6、末端转移酶: 罕见的 DNA 聚合酶: 从小牛胸腺中纯化出的碱性蛋白质, 催化单链或双链 DNA 分子的 3' -OH 末端添加一个至多个脱氧核苷酸的反应。

用途:

(1) 在载体或 cDNA 上加换互补的同源多聚尾, 以便连接。

(2) 标记 DNA 片段的 3' 末端。

(3) 快速扩增 cDNA 末端 (Rapid Amplification of cDNA End 简称为 RACE)。

7、反转录酶 (依赖 RNA 的 DNA 聚合酶) (Reverse transcriptase, RT)

用途:

合成 cDNA。以 oligo dT 为引物（与 mRNA 的 polyA 尾巴互补结合）。

四、RNA 聚合酶：

1、依赖 DNA 的 RNA 聚合酶

包括：E. coli RNA 聚合酶，phage SP6、T7 和 T3RNA 聚合酶

以 DNA 为模板，从启动子开始，经过延伸、终止，合成转录产物。

用途：

A：合成单链 RNA 探针 B：体外翻译，基因表达分析

2、不依赖 DNA 的 RNA 聚合酶：

多聚（A）聚合酶，ATP 存在下，催化在单链 RNA 3' 末端加上 AMP，任何 RNA 可作底物。

用途：

A：在 RNA 末端加上多聚（A）尾，以合成 cDNA；

B：标记 RNA 的 3' 端。

第四节 修饰酶

修饰酶：主要为三类：末端转移酶（在 DNA 聚合酶中已述），碱性磷酸酶，多核苷酸激酶

多核苷酸激酶的用途：DNA 5' -OH 端磷酸化、标记 DNA 的 5' 端。

碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, AP）

种类：细菌性碱性磷酸酶、小牛肠碱性磷酸酶

用途：

A：载体 5' 末端脱磷，防止载体自我环化。

B：在 RNA/DNA 末端除去 5' 磷酸，便于标记 5' 末端。

四 基因工程技术

凝胶电泳技术

电泳（electrophoresis）：带电物质在电场中向相反电极移动的现象。

电泳技术：就是利用在电场的作用下，由于待分离样品中各种分子带电性质以及分子本身大小、形状等性质的差异，使带电分子产生不同的迁移速度，从而对样品进行分离、鉴定或提纯的技术。

电荷效应：

分子筛效应：一个含有各种分子的样品溶液缓慢地流经凝胶色谱柱时，各分子在柱内同时进行着两种不同的运动：垂直向下的移动和无定向的扩散运动。大分子物

质由于直径较大，不易进入凝胶颗粒的微孔，而只能分布颗粒之间，所以在洗脱时向下移动的速度较快。小分子物质除了可在凝胶颗粒间隙中扩散外，还可以进入凝胶颗粒的微孔中，即进入凝胶相内，在向下移动的过程中，从一个凝胶内扩散到颗粒间隙后再进入另一凝胶颗粒，如此不断地进入和扩散，小分子物质的下移速度落后于大分子物质，从而使样品中分子大的先流出色谱柱，中等分子的后流出，分子最小的最后流出，这种现象叫分子筛效应。

电泳迁移率：是指在单位电场强度（1V/cm）时带电分子的迁移速度。迁移率与带电分子所带净电荷成正比，与分子的大小和缓冲液的粘度成反比。

影响凝胶电泳迁移率的因素

（一）样品的物理性质

1、分子大小：线状双链 DNA 分子长度（碱基对数目 bp）的对数（log10）与迁移距离成反比，以此来测定 DNA 片段（线性双链）的分子量准确且方便。

当 DNA 分子大小超过 20kb 时，普通琼脂糖凝胶就很难将它们分开。此时电泳的迁移率不再依赖于分子大小，因此，就用琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 时，分子大小不宜超过此值。

2、分子的空间构型：即使分子量相同，构型不同，其迁移率也不同。

共价闭合环状 DNA（covalently close circular DNA，ccc DNA，超螺旋构型） > lDNA（linear form，线型，质粒的两条链均断裂；线性分子） > ocDNA（开环 DNA，open circular DNA，ocDNA，它的双链中的一条保持完整的环状结构，另一条单链上有一到几个切口）。

但是由于琼脂糖浓度、电场强度、离子强度和溴化乙锭等的影响，会出现相反的情况。

3、带电量：核酸分子是两性解离分子，pH3.5 是碱基上的氨基解离，而三个磷酸基团中只有一个磷酸解离，所以分子带正电，在电场中向负极泳动；而 pH8.0-8.3 时，碱基几乎不解离，而磷酸基团解离，所以核酸分子带负电，在电场中向正极泳动。不同的核酸分子的电荷密度大致相同，因此对泳动速度影响不大。

4、碱基组成：对迁移率影响不明显，单链 DNA 形成发夹结构，影响迁移率，单链（1kb）小于双链 DNA（1kb）

不同浓度琼脂糖凝胶的有效分离范围

DNA 在聚丙烯酰胺凝胶中的有效分离范围

聚丙烯酰胺 浓度	有效分离范围 (bp)	二甲苯青FF	溴酚蓝
3.5	1000—2000	460	100
5.0	80—500	260	65
8.0	60—400	160	45
12.0	40—200	70	20
15.0	25—150	60	15
20.0	6—100	45	12

DNA 电泳带糊的原因：

- 1、DNA 降解，应 避免核酸酶污染；
- 2、电泳缓冲液陈旧 电泳缓冲液多次使用后，离子强度降低，pH 值上升，缓冲能力减弱，从而影响电泳效果。建议经常更换电泳缓冲液；
- 3、所用电泳条件不合适 电泳时电压不应超过 20V/cm，温度<30℃；巨大 DNA 链电泳，温度应<15℃；核查所用电泳缓冲液是否有足够的缓冲能力 ；
- 4、 DNA 上样量过多 减少凝胶中 DNA 上样量；
- 5、DNA 样含盐过高 电泳前通过乙醇沉淀去除过多的盐；
- 6、 有蛋白污染 电泳前酚抽提去除蛋白；
- 7、 DNA 变性 电泳前勿加热，用 20mM NaCl 缓冲液稀释 DNA。

染色剂及其原理

染色剂：核酸电泳后，需经染色后才能显现出带型，最常用的是溴化乙锭染色法，其次是银染色，目前还有其他不仅安全的染色剂。

溴化乙锭 (ethidium bromide,EB) 最常用 260nm, 300nm, 360nm, 发出 590nm 橙红色。

原理 溴化乙锭：含有一个可以嵌入 DNA 堆积碱基之间的一个三环平面基团。它与 DNA 的结合几乎没有碱基序列特异性。在高离子强度的饱和溶液中，大约每 2.5 个碱基插入一个溴化乙锭分子。当染料分子插入后，其平面基团与螺旋的轴线垂直并通过范德华力与上下碱基相互作用。这个基团的固定位置及其与碱基的密切接近，导致与 DNA 结合的染料呈现荧光，其荧光产率比游离溶液中染料有所增加。

DNA 吸收 254nm 处的紫外辐射并传递给染料，而被结合的染料本身吸收 302nm 和 366nm 的光辐射。这两种情况下，被吸收的能量在可见光谱红橙区的 590nm 处重新发射出来。

由于溴化乙锭-DNA 复合物的荧光产率比没有结合 DNA 的染料高出 20-30 倍，所以当凝胶中含有游离的溴化乙锭 (0.5ug/ml) 时，可以检测到少至 10ng 的 DNA 条带。

原理 银染：银染色液中的银离子(Ag⁺)可与核酸形成稳定的复合物，然后用还原剂如甲醛使 Ag⁺ 还原成银颗粒，可把核酸电泳带染色黑褐色。主要用于聚丙烯酰胺凝胶电泳染色，也用于琼脂糖凝胶染色。其灵敏度比 EB 高 200 倍。但银染色后，DNA 不宜回收。

EB 的替代物：

GoldView DNA 染料是一种可代替溴化乙锭 (EB) 的新型 DNA 染料，使用方法与之完全相同。采用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 时，GoldView 与核酸结合后能产生很强的荧光信号，其灵敏度与 EB 相当，在某些波段甚至超过 EB。

GeneFinder 具有安全、灵敏等突出优点，可以代替溴化乙锭 (EB) 作为各种核酸电泳的染色剂。

第五章 PCR 技术

PCR 的英文全称：Polymerase Chain Reaction

PCR 技术的基本原理：类似于 DNA 的天然复制过程，其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。

过程：

PCR 由变性--退火--延伸三个基本反应步骤构成：

①模板 DNA 的变性：模板 DNA 经加热至 93℃左右一定时间后，使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应作准备；

②模板 DNA 与引物的退火(复性)：模板 DNA 经加热变性成单链后，温度降至 55℃左右，引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合；

③引物的延伸：DNA 模板--引物结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下，以 dNTP 为反应原料，靶序列为模板，按碱基配对与半保留复制原理，合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链。

重复循环变性—退火—延伸三过程，就可获得更多的“半保留复制链”，而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟，2~3 小时就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。

反应体系：

影响 PCR 特性、扩增效率的因素

影响 PCR 产量及准确性的因素：

1、酶的浓度：常用范围为 1~4U/100 μ l。由于 DNA 模板的不同和引物不同，以及其它条件的差异，多聚酶的用量亦有差异，酶量过多会导致非特异产物的增加。酶量低，扩增产物不够。

2、dNTPs 的浓度：dNTPs 的浓度：主要影响产量、特异性和保真度。

在 PCR 反应体系中 dNTP 终浓度高于 50mmol/L 会抑制 Taq 酶的活性，使用低浓度 dNTP 可以减少在非靶位置启动和延伸时核苷酸错误掺入，高浓度 dNTPs 易产生错误掺入，而浓度太低，势必降低反应物的产量。PCR 常用的浓度为 50~200 μ mol/L，不能低于 10~15 μ mol/L。四种 dNTP 的浓度应相同，其中任何一种浓度偏高或偏低，都会诱导聚合酶的错误掺入，降低合成速度，过早终止反应。

决定最低 dNTP 浓度的因素是靶序列 DNA 的长度和组成，例如，在 100 μ l 反应体系中，4×dNTPs 浓度若用 20 μ mol/L，基本满足合成 2.6 μ g DNA 或 10pmol 的 400bp 序列。50 μ mol/L 的 4×dNTPs 可以合成 6.6 μ g DNA，而 200 μ mol/L 足以合成 25 μ g/DNA。

3、PCR 缓冲液：72℃时，反应体系的 pH 值将下降 1 个单位，接近于 7.2。二价阳离子的存在至关重要，影响 PCR 的特异性和产量。实验表明，Mg²⁺优于 Mn²⁺，而 Ca²⁺无任何作用。

(1) Mg²⁺：对引物退火、解链的温度、PCR 产量和特异性、引物二聚体形成和酶的活性和特异性有影响。

Mg²⁺的最佳浓度为 1.5mmol/L(当各种 dNTP 浓度为 200 μ mol/L 时)，但并非对任何一种模板与引物的结合都是最佳的。首次使用靶序列和引物结合时，都要把 Mg²⁺浓度调到最佳，其浓度变化范围为 1~10mmol/L。Mg²⁺过量易生成非特异性扩增产物，Mg²⁺不足易使产量降低。样品中存在的较高浓度的螯合剂如 EDTA 或高浓度带负电荷的离子基团如磷酸根，会与 Mg²⁺结合而降低 Mg²⁺有效浓度。

dNTP 含有磷酸根，其浓度变化将影响 Mg^{2+} 的有效浓度。标准反应体系中 $4 \times dNTPs$ 的总浓度为 $0.8 mmol/L$ ，低于 $1.5 mmol/L$ 的 Mg^{2+} 浓度。因此，在高浓度 DNA 及 dNTP 条件时，必须相应调整 Mg^{2+} 的浓度。

常用范围： $0.5-2.5 mmol/L$ 之间，常用为 $1.5-2.0 mmol/L$

(2) Tris -HCl 缓冲液：在 PCR 中使用 $10-50 mmol/L$ 的 Tris -HCl 缓冲液，很少使用其他类型的缓冲液。Tris 缓冲液是一种双极化的离子缓冲液， $20 mmol/l$ Tris pH8.3 ($20^{\circ}C$) 时，在典型的热循环条件下，真正的 pH 值在 $7.8-6.8$ 之间。

(3) KCl 浓度： K^{+} 浓度在 $50 mmol/L$ 时能促进引物退火。但现在的研究表明，NaCl 浓度在 $50 mmol/L$ 时，KCl 浓度高于 $50 mmol/L$ 将会抑制 Taq 酶的活性，少加或不加 KCl 对 PCR 结果没有太大影响。

(4) 明胶：明胶和 BSA 或非离子型去垢剂具有稳定酶的作用。一般用量为 $100 \mu g/ml$

(5) 二甲基亚砜 (DMSO)：加入 10%DMSO 有利于减少 DNA 的二级结构，使 (G+C) % 含量高的模板易于完全变性，在反应体系中加入 DMSO 使 PCR 产物直接测序更易进行，但超过 10% 时会抑制 Taq DNA 聚合酶的活性、降低保真性，因此，大多数并不使用 DMSO。

4、退火(复性)温度与时间：

退火温度是影响 PCR 特异性的的重要因素。变性后温度快速冷却至 $40^{\circ}C-60^{\circ}C$ ，可使引物和模板发生结合。由于模板 DNA 比引物复杂得多，引物和模板之间的碰撞结合机会远远高于模板互补链之间的碰撞。

退火温度与时间，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。对于 20 个核苷酸，G+C 含量约 50% 的引物， $55^{\circ}C$ 为选择最适退火温度的起点较为理想。引物的复性温度可通过以下公式帮助选择合适的温度：

$$T_m \text{ 值(解链温度)} = 4(G+C) + 2(A+T)$$

$$\text{复性温度} = T_m \text{ 值} - (5 \sim 10^{\circ}C)$$

在 T_m 值允许范围内，选择较高的复性温度（特别是开始的阶段）可大大减少引物和模板间的非特异性结合，提高 PCR 反应的特异性。复性时间一般为 $30-60 sec$ ，足以使引物与模板之间完全结合。

5、变性温度及时间：

考虑模板的因素和酶的因素

普通 TaqDNA 聚合酶	92.5 $^{\circ}C$	95 $^{\circ}C$	97 $^{\circ}C$
	2h	40m	5m

变性温度低，解链不完全是导致 PCR 失败的最主要原因。一般情况下，93℃～94℃ 1min 足以使模板 DNA 变性，若低于 93℃则 需延长时间，但温度不能过高，因为高温环境对酶的活性有影响。此步若不能使靶基因模板或 PCR 产物完全变性，就会导致 PCR 失败。常用 94℃ 30 秒

6、延伸温度与时间：

主要考虑 Taq DNA 聚合酶的生物学活性以及引物与模板结合的温度：

75～80℃时每个酶分子每秒钟可延伸约 150 个核苷酸，70℃延伸率大于 60 个核苷酸/秒，55℃时为 24 个核苷酸/秒。温度过高(90℃以上) 或过低(22℃)都可影响 Taq DNA 聚合酶的活性，该酶虽然在 90℃以上几乎无 DNA 合成。

PCR 反应的延伸温度一般选择在 70～75℃之间，常用温度为 72℃，过高的延伸温度不利于引物和模板的结合。

PCR 延伸反应的时间，可根据待扩增片段的长度而定，一般 1Kb 以内的 DNA 片段，延伸时间 1min 是足够的。3～4kb 的靶序列需 3～4min；扩增 10Kb 需延伸至 15min。延伸时间过长会导致非特异性扩增带的出现。对低浓度模板的扩增，延伸时间要稍长些。

7、循环次数：

循环次数决定 PCR 扩增程度。PCR 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 次之间，循环次数越多，非特异性产物的量亦随之增多。

8、引物浓度：

引物在 PCR 反应中的浓度一般在 0.1～1 μmol/L 之间。浓度过高易形成引物二聚体且产生非特异性产物。一般来说用低浓度引物经济、特异，但浓度过低，不足以完成 30 个循环的扩增反应，则会降低 PCR 的产率。

9、模板浓度：模板浓度高易产生非特异扩增。

能将皮克(pg=10⁻¹²g)量级的起始待测模板扩增到微克(ug=10⁻⁶g)水平。能从 100 万个细胞中检出一个靶细胞；在病毒的检测中，PCR 的灵敏度可达 3 个 RFU(空斑形成单位)；在细菌学中最小检出率为 3 个细菌。

模板靶序列的浓度因情况而异，往往非实验人员所控制，实验可按已知靶序列量递减的方式(1ng, 0.1ng, 0.001ng 等)，设置一组对照反应，以检测扩增反应的灵敏度是否符合要求。

10、平台效应：

反应初期，靶序列 DNA 片段的增加呈指数形式，随着 PCR 产物的逐渐积累，被扩增的 DNA 片段不再呈指数增加，而进入线性增长期或静止期，这种现象称为平台效应。

PCR 扩增效率及 DNA 聚合酶，PCR 的种类和活性及非特异性产物的竞争等因素。大多数情况下，平台期的到来是不可避免的。

定量 PCR 时，一定要在平台期前进行检测。

11、温度与时间的设置：

基于 PCR 原理三步骤而设置变性-退火-延伸三个温度点。在标准反应中采用三温度点法，双链 DNA 在 90~95℃ 变性，再迅速冷却至 40~60℃，引物退火并结合到靶序列上，然后快速升温至 70~75℃，在 Taq DNA 聚合酶的作用下，使引物链沿模板延伸。

对于较短靶基因(长度为 100~300bp 时)可采用二温度点法，除变性温度外、退火与延伸温度可合二为一，一般采用 94℃ 变性，65℃ 左右退火与延伸(此温度 Taq DNA 酶仍有较高的催化活性)。

第六章 核酸分子杂交

概念：

1、分子杂交 (hybridization) : 有一定同源性的两条核酸单链，在适宜的温度和离子浓度等条件下，通过碱基互补退火形成稳定的双链分子的过程。

2、印迹 (blotting) : 将 DNA、RNA 或蛋白质固定到固体支持物上的过程。

3、探针 (probe) : 核酸探针是指用放射性核素、生物素或其他活性物质标记的，能与特定的核酸序列发生特异性互补的已知 DNA 或 RNA 片段。

杂交的种类：

固相杂交 (solid-phase hybridization) 是将变性的 DNA 固定于固体基质 (硝酸纤维素膜或尼龙滤膜) 上，再与探针进行杂交，故也称为膜上印迹杂交。

液相杂交 (solution hybridization) 指使变性的待测核酸单链与已知的核酸单链 (探针) 在溶液中保温，使之形成杂交复合物。

DNA 与 DNA 杂交

DNA 与 RNA 杂交

RNA 与 RNA 杂交

几种常见的杂交：

分子杂交是通过各种方法将核酸分子固定在固相支持物上，然后用放射性标记的探针与被固定的分子杂交，经显影后显示出目的 DNA 或 RNA 分子所处的位置。根据被测定的对象，分子杂交基本可分为以下几大类：

(1) Southern 杂交：DNA 片段经电泳分离后，从凝胶中转移到硝酸纤维素滤膜或尼龙膜上，然后与探针杂交。被检对象为 DNA，探针为 DNA 或 RNA。

(2) Northern 杂交：RNA 片段经电泳后，从凝胶中转移到硝酸纤维素滤膜上或尼龙膜，然后用探针杂交。被检对象为 RNA，探针为 DNA 或 RNA。

Southern 杂交原理和步骤

原理：将待检测的 DNA 分子用/不用限制性内切酶消化后，通过琼脂糖凝胶电泳进行分离，继而将其变性并按其在凝胶中的位置转移到硝酸纤维素薄膜或尼龙膜上，固定后再与同位素或其它标记物标记的 DNA 或 RNA 探针进行反应。如果待检物中含有与探针互补的序列，则二者通过碱基互补的原理进行结合，游离探针洗涤后用自显影或其它合适的技术进行检测，从而显示出待检的片段及其相对大小。

步骤：

Southern 杂交可用来检测经限制性内切酶切割后的 DNA 片段中是否存在与探针同源的序列，它包括下列**步骤：**

- (1) 酶切 DNA，凝胶电泳分离各酶切片段，然后使 DNA 原位变性。
- (2) 将 DNA 片段转移到固体支持物(硝酸纤维素滤膜或尼龙膜)上。
- (3) 预杂交滤膜，掩盖滤膜上非特异性位点。
- (4) 让探针与同源 DNA 片段杂交，然后漂洗除去非特异性结合的探针。
- (5) 通过显影检查目的 DNA 所在的位置。

转膜的方式：

将 DNA 从凝胶中转移到固体支持物上的方法主要有 3 种：

- (1) 毛细管转移：**本方法由 Southern 发明，故又称为 Southern 转移(或印迹)。毛细管转移方法的优点是简单，不需要用其他仪器。缺点是转移时间较长，转移后杂交信号较弱。
- (2) 电泳转移：**将 DNA 变性后，可电泳转移至带电荷的尼龙膜上。该法的优点是不需要脱嘌呤/水解作用，可直接转移较大的 DNA 片段。缺点是转移中电流较大，温度难以控制。通常只有当毛细管转移和真空转移无效时，才采用电泳转移。
- (3) 真空转移：**有多种真空转移的商品化仪器，它们一般是将硝酸纤维素膜或尼龙膜放在真空室上面的多孔屏上，再将凝胶置于滤膜上，缓冲液从上面的一个贮液槽中流下，洗脱出凝胶中的 DNA，使其沉积在滤膜上。该法的优点是快速，在 30 分钟内就能从正常厚度(4-5mm)和正常琼脂糖浓度(<1%)的凝胶中定量地转移出来。转移后得到的杂交信号

比 Southern 转移强 2-3 倍。缺点是如不小心，会使凝胶碎裂，并且在洗膜不严格时，其背景比毛细转移要高。

探针标记的方法：

1、缺口平移法 (Nick Translation)

原理及过程：反应体系中 DNA 酶 I 随机在探针 DNA 上打开缺口，然后利用 DNA 聚合酶 I 5' → 3' 外切酶活性，在缺口处按 5' → 3' 方向切除单核苷酸；同时 DNA 聚合酶 I 有 5' → 3' 的聚合酶活性，在缺口处 3' 端加入底物中的单核苷酸，弥补缺口处的核苷酸链。随着反应的进行底物中被标记单核苷酸，并被随机掺入。DNA 聚合酶 I 的两种作用交替进行，探针即被标记。

2、随机引物法 (6 核苷酸引物标记法)

原理及过程：利用 E. coli DNA 聚合酶 I 的 Klenow 亚单位，合成含有标记核苷酸的 DNA 链。Klenow 具有 5' → 3' 聚合酶活性。

被标记的 DNA (探针) 变性成单链，引物与模板结合。在 Klenow 的催化下，以引物 3' 端为起点，沿模板 3' → 5' 方向合成 DNA 新链。反应体系中含有标记的 dNTP，随机掺入新合成的 DNA 链中，探针即被标记。

3、末端标记

多核苷酸激酶的用途: DNA 5'-OH 端磷酸化、标记 DNA 的 5' 端

(1) 正向反应 (2) 交换反应标记法

影响杂交的因素：

1、温度 杂交技术最重要的因素之一是选择最适的杂交反应温度。若反应温度低于 $T_m - 10 \sim 15^\circ\text{C}$ ，碱基顺序高度同源的互补链可形成稳定的双链，错配对减少。若反应温度再低 ($T_m - 30^\circ\text{C}$)，虽然互补链之间也可形成稳定的双链，但互补碱基配对减少，错配对增多、氢键结合的更弱。如两个同源性在 50% 左右或更低些的 DNA，调整杂交温度可使它们之间的杂交率变化 10 倍，因此在实验前必须首先确定杂交温度。

通常有三种温度可供试验，即最适复性温度、苛刻复性温度及非苛刻复性温度。温度的选择及温度对杂交的影响见下表。最适复性温度 (Optimum renaturation

temperature, TOR) : $T_{or} = T_m - 25^\circ\text{C}$

苛刻复性温度: $T_s = T_m - (10 \text{ 或 } 15^\circ\text{C})$

非苛刻复性温度: $T_{ns} = T_m - (30 \text{ 或 } 35^\circ\text{C})$

在 $2 \times \text{SSC}$ 反应液中，可以根据下列公式计算最适复性温度: $T_{or} = 0.51 (G+C\%) + 47^\circ\text{C}$ 。

2、离子强度

离子强度增加， T_m 值增加，一般用 0.9-0.75 mol/L 的 NaCl

3、DNA 的浓度

最低检测水平为单拷贝为：0.5pg

4、探针的浓度：

总的来说，随探针浓度增加，杂交率也增加。另外，在较窄的范围内，随探针浓度增加，敏感性增加。要获得较满意的敏感性，膜杂交中 ^{32}P 标记探针与非放射性标记探针的用量分别为 5~10ng/ml 和 25~1000ng/ml

探针质量衡量的指标：比活性即 cpm/ μ g 如果比活性为 108cpm/ μ g，用的浓度为 10 μ g/ml，

比活性为 109cpm/ μ g，用的浓度为 2 μ g/ml。

5、探针的长度和同源性：

为了保证杂交的特异性，一般需要用 500pb 左右的长度的探针。但是，探针过量的条件下，杂交率主要依赖于探针长度（复杂度）和探针浓度。在浓度一定时，杂交率主要影响因素是探针的长度，长的探针杂交时间很长，而短探针容易退火，因此标记好的探针长度为 100 nt 左右，太短将探针与目的序列的结合。

6、杂交液的成分：

反应液中每增加 1% 的甲酰胺浓度， t_m 值可降低 0.72℃。6M 尿素，降低 T_m 约 30℃ 惰性多聚体可用来促进 250 个碱基以上的探针的杂交率。对单链探针可增加 3 倍，而对双链探针、随机剪切或随机引物标记的探针可增加高达 100 倍。

7、杂交的时间

在条件都得到满足的情况下，杂交的成败就取决于保温时间。时间短了，杂交反应不完成；时间长了也无益，会引起非特异结合增多。一般杂交反应要进行 16h 左右。

8、杂交液的体积：一般来说使用较小体积的杂交液比较好，因为在小体积溶液中，核酸重新配对的速度快、探针用量少，从而使滤膜上的 DNA 在反应中起主要作用。但在杂交中必须保证有足够的杂交溶液覆盖杂交膜。一般杂交液的用量为 1ml/10cm²

一、名词解释

基因工程：在体外将核酸分子插入病毒、质粒或其它载体分子，构建遗传物质的新组合，并使之渗入到原先没有这类分子的寄主细胞内，而能持续稳定地繁殖。

穿梭载体：人工构建的、具有两种不同复制起点和选择标记、可以在两种不同的寄主细

胞中存活和复制的质粒载体。指带有两种宿主复制子，因而能在两种生物体内复制的载体分子。

southern 杂交：DNA 片段经电泳分离后，从凝胶中转移到硝酸纤维素滤膜或尼龙膜上，然后与探针杂交。被检对象为 DNA，探针为 DNA 或 RNA。

PCR：聚合酶链反应 Polymerase Chain Reaction，通过模拟体内 DNA 复制的方式，在体外选择性地将 DNA 某个特殊区域扩增出来的技术。

载体：在基因工程操作中，把能携带外源 DNA 进入受体细胞进行扩增和表达的 DNA 分子叫载体。

克隆：(名词)是指从一个共同祖先无性繁殖下来的一群遗传上同一的 DNA 分子、细胞或个体所组成的特殊的生命群体。(动词)是指产生在遗传上同一的 DNA 分子、细胞或个体所组成的特殊的生命群体的过程。

二、填空

1、基因工程所用的工具酶有 核酸酶、聚合酶、连接酶、修饰酶 四大酶类。

2、限制性内切酶 1U 酶定义为 在建议使用的 Buffer 及温度下，在 20 μ l (50 μ l) 反应体系中反应 1 小时，使 1 μ g 入 DNA 完全消化所需的酶量，weiss 和 TNB 为 连接酶 酶活性单位。

3、在抽提 DNA 中，酚的作用是 去除蛋白，氯仿的作用是 增加比重，有助于分相。

加入异戊醇的作用是 防止起泡把 DNA 碰断，同时有助于离心后界面更清晰。

4、限制性内切酶识别序列具有 旋转对称，反向重复 结构特征。

5、质粒有 严紧型 和 松弛型 两种类型，在克隆基因中常用的是 松弛 型，在表达研究中常用的是 严紧 型。

6、在沉淀 DNA 时，常用 2 倍体积的无水乙醇。若反应体系中无单价离子存在，常加入 1/10 体积的 3MNaAc 或 KAc，其作用是 中和 DNA 上的负电荷，减小排斥力，使其易于沉淀。

7、为提高重组转化效果，对同一种酶切后载体进行 脱磷 处理。

8、在制备感受态细胞时，为了提高转化率，常用冰冻的 CaCl₂ 处理 和短暂的 42°C 热击处理。

9、当目的片段无限长时，使用识别碱基数为 4 和 6 的限制性内切酶进行切割时，理论

上产生的片段数之比是16: 1。

10、DNA 分子标记的方法有缺口平移法、随机引物法、末端标记法、交换反应标记法 四种。

11. DNA 带负 电荷，在电场中从负 极向正 极移动。

三、判断题

1、双酶切不需脱磷，单酶切一定要脱磷。(对)

2、在基因工程实验中，为了保证实验成功，所有的器具包括枪头、培养皿和所有试剂都需要高温高压灭菌。(错)

3、不同构型质粒电泳的速率判断。超螺旋>线性>开环

4、无水乙醇消毒效果最好，但价格昂贵，因此用 70%酒精消毒。(错)

5、酶切后的载体和目的片段（不用脱）都必须脱磷。(错)

6. 重组子一定是转化子，转化子不一定是重组子。(对)

7. 抽提 DNA 时，水饱和酚的作用。酚的作用主要使 DA 蛋白质变性，沉淀蛋白质，提纯 DNA。饱和后不吸收 DNA 的水分，减少 DNA 的损失。

8. α 互补筛选原理

四、综合题

1、配 0.8%的琼脂糖凝胶的过程。

答：称取 0.8g 琼脂糖加入盛有 100ml 1×TBE 电泳缓冲液的 500ml 三角瓶中，摇匀，用电子天平称三角瓶的总重量。在微波炉或电炉上加热至琼脂糖完全溶解，放在天平上加蒸馏水至原重量。冷却到约 60°C 后，加入 100 μ l 的 0.5mg/ml 的 goldenvue 或溴化乙锭（终浓度为 0.5 μ g/ml），并摇匀。用胶带将制胶板两端封好，将溶解的琼脂糖（约 50°C）倒入其中，直至厚度为 4~6mm。插入适当的梳子，在室温下冷却凝固。然后撕掉两端胶布，小心垂直向上拔出梳子，以保证点样孔完好。

2、有一学生用 *Hind* III 对质粒 DNA、水稻 DNA 进行酶切后，进行电泳检测，发现有拖尾现象，后用抽提的质粒 DNA（未酶切）进行电泳，也发现有拖尾现象。试解释这三种拖尾现象的原因。

答：未酶切完全，产生长短不一的片段原因是有：加入影响酶切的因素，还有存在 RNA。另外加样量过多；蛋白质阻碍 DNA 的泳动。样品浓度过高。

抽提的质粒不好，含有核酸酶，有不同程度的降解；另一个原因是里面含有细菌的染色

体 DNA。

3、分析快速鉴定重组子的电泳图，实验原理和讨论。

4、Southern 杂交实验中，1) 分别用 *EcoR* I 和 *Hae* III 对水稻 DNA 切割，画出电泳结果示意图。2) southern 杂交可能出现的结果，结果具体操作过程进行分析。

5、某载体有 Amp^r 和 Kan^r 表型，只有 Amp 基因内有 *EcoR* I 酶切位点，某目的 cDNA 两侧有 *EcoR* I 位点，对其酶切再与经酶切及脱磷处理的载体连接转化宿主菌。(1) 用哪一种抗生素筛选重组转化子？(2) 如何获得含插入目的片断的重组转化子，简述实验流程。

答：(1) Amp 抗生素筛选重组转化子。(2) 在 Amp 板上不能生长

6. “重组 DNA 的转化”实验中的对照处理，蓝白斑筛选，细节问题。

7. PCR 原理的图示（前 3 个循环）（原理及过程。中英文名称）

8. （实验：碱性磷酸酶）