

浙 江 大 学

二〇〇六年攻读硕士学位研究生入学考试试题

考试科目 分子生物学

注意：答案必须写在答题纸上，写在试卷或草稿纸上均无效。

(含答案，90 分以上)

一、名词解释：(25%)

1、RFLP:限制性片段长度多态性，是由 DNA 变异(产生新的酶切位点或消除原有的酶切位点)导致在限制性核酸内切酶酶切时产生不同的长度片段。可借助 Southern Blotting 或 PCR 的方法进行检测。

2、SSR: 简单序列重复多态性，引物是根据微卫星 DNA 重复序列两翼的特定短序列设计，用来扩增重复序列本身。由于重复的长度变化极大，所以是检测多态性的一种有效方法。其特点包括：一般检测到的是一个单一的多等位基因位点，共显性遗传，故可鉴别杂合子与纯合子；得到的结果重复性很高。

3、EST: 表达序列标签，是指从不同的组织构建的 cDNA 文库中，随机挑选不同的克隆，进行克隆的部分测序所产生的 cDNA 序列。随着高通量测序技术的进步，使人们越来越相信，大规模地产生 EST，结合生物信息学的手段，将为人们提供一种快速有效的发现新基因的方法。

4、STS: 序列标签位点，是由特定引物序列所界定的一类标记的统称，短的在基因组上是可以被唯一操作的序列，因而可以确定在物理图谱上的特定位置。

5、CAP: CAP 即分解代谢物基因活化蛋白是一种激活蛋白，因为细菌的许多启动子为弱启动子，本身与 RNA 聚合酶的作用较弱，在有 CAP 蛋白这类激活蛋白存在下，可使 RNA 聚合酶与启动子的亲和力增强，CAP 蛋白的活性强烈依赖 cAMP。

6、AFLP: 扩增片段长度多态性，其特点是把 RFLP 和 PCR 结合了起来。其基本步骤是：把 DNA 进行限制性内切酶酶切，然后选择特定的片段进行 PCR 扩增(在所有的限制性片段两端加上带有特定序列的“接头”，用与接头互补的但 3'端有几个随机选择的核苷酸的引物进行特异 PCR 扩增，只有那些与 3'端严格配对的片段才能得到扩增)，再在高分辨力的测序胶上分开这些扩增产物，用放射性法、荧光法或银染染色法均可检测之。

7、SNP: 单核苷酸多态性，是一种较为新型的分子标记，其依据的是一位点的不同等位基因之间常常只有一个或几个核苷酸的差异，因此在分子水平上对单个核苷酸的差异进行检测是很有意义的。

8、FISH: 荧光原位杂交技术, 是一种利用非放射性的荧光信号对原位杂交样本进行检测的技术。它将荧光信号的高灵敏度、安全性, 荧光信号的直观性和原位杂交的高准确性结合起来, 通过荧光标记的 DNA 探针与待测样本的 DNA 进行原位杂交, 在荧光显微镜下对荧光信号进行辨别和计数, 从而对染色体或基因异常的细胞、组织样本进行检测和诊断, 为各种基因相关疾病的分型、预后和预后提供准确的依据。

9、Genome: 基因组, 有机体或细胞中的所有 DNA, 包括核中的染色体和线粒体中的 DNA。

10、RNA in situ hybridization: RNA 原位杂交, 是利用 cDNA 为探针来检测与其互补的 mRNA 链在细菌或其他真核细胞中的位置, 是检测基因组织特性表达的常用方法。

11、单克隆抗体: 每个 B 淋巴细胞有合成一种抗体的遗传基因。动物脾脏有上百万种不同的 B 淋巴细胞系, 含遗传基因不同的 B 淋巴细胞合成不同的抗体。当机体受抗原刺激时, 抗原分子上的许多决定簇分别激活各个具有不同基因的 B 细胞。被激活的 B 细胞分裂增殖形成该细胞的子孙, 即克隆由许多个被激活 B 细胞的分裂增殖形成多克隆, 并合成多种抗体。如果能选出一个制造一种专一抗体的细胞进行培养, 就可得到由单细胞经分裂增殖而形成细胞群, 即单克隆。单克隆细胞将合成一种决定簇的抗体, 称为单克隆抗体。

12、基因芯片: 所谓基因芯片, 是指将大量探针分子固定于支持物上, 然后与标记的样品进行杂交, 通过检测杂交信号的强弱进而判断样品中靶分子的数量。由于用该技术可以将极其大量的探针同时固定于支持物上, 所以一次可以对大量的 DNA 分子或 RNA 分子进行检测分析, 从而解决了传统核酸印迹杂交, 技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少、效率低, 等不足, 而且, 通过设计不同的探针阵列, 用一定的分析方法, 还可以用于序列分析, 称作杂交测序。

二、描述 cDNA 文库构建原理与方法 (25%):

(1) cDNA 获得方法, (2) 克隆方法, (3) 文库质量定义。

答: cDNA: 以 mRNA 为模板, 利用反转录酶合成与 mRNA 互补的 DNA(complementary DNA, cDNA), 再复制成双链 cDNA 片段, 与适当载体连接后转入受体菌, 扩增为 cDNA 文库(cDNA library), 然后再采用适当方法从 cDNA 文库中筛选出目的 cDNA。与基因组 DNA 文库类似, 由总 mRNA 制作的 cDNA 文库包括了细胞全部 mRNA 信息, 自然也含有我们感兴趣的编码 cDNA。当前发现的大多数蛋白质的编码基因几乎都是这样分离的。

(1) cDNA 获得方法: ①Total RNA 的提取; ②mRNA 的分离; ③cDNA 双链合成: Superscript II—RT 合成第一链, cDNA 第二链的合成, 双链 cDNA 末端补平, EcoR I adaptor 加接, 双链 cDNA 末端的磷酸化及 Xho I 酶切, 胶回收 cDNA。

(2) 克隆方法: ①载体制备: pBlueScriptII 的提取, pBlueScriptII 的双酶切消化, 载体去磷酸化, 载体效率检测; ②cDNA 双链和载体的连接: 连接, 检测 (PCR 方法); ③电转化: 电转化感受态细胞的制备, 连接产物纯化, 电转化; ④快速鉴定、菌落 PCR⑤pBlueScript cDNA 文库扩增。

(3) 文库质量定义: 评价一个文库是否有实用价值主要在于文库的含量和插入片段的大小两个方面。所构建的文库中必须有足够多的克隆数, 这样才能确保基因组 cDNA 中的每一个序列至少有一个拷贝存在于重组文库中, 为达到这一要求, 文库的容量应不小于 1.7×10^5 , 同时为保证 cDNA 片段的完整性, 插入片段的平均大小应不小于 1kb。

三、阐述基因突变的概念及引起突变的可能途径(25%):

- (1) 化学诱变 (2) 物理诱变 (3) T-DNA 插入,
(4) 缺失、插入 (5) 无意突变概念 (6) 碱基修复概念

答: 基因突变 属分子水平上的变异,是指染色体上个别基因所发生的分子结构的变化, 基因突变在自然界普遍存在。

基因突变的方式很多, 主要有: (1) 化学诱变, 基因突变可以由某些化学物质所引起, 这些化学物质称为化学诱变剂。现已知很多的化学诱变剂, 它们诱变的机制是不同的。在 DNA 复制过程由于碱基类似物的取代, 碱基的化学修饰以及碱基的插入和缺失都会引起突变。(2) 物理诱变, 利用物理因素引起基因突变的称物理诱变, 如 X 射线、紫外线、电离辐射等物理因素可造成 (3) T-DNA 插入, 改变读码或变成假基因。(4) 移码突变: 基因中插入或者缺失一个或几个碱基对, 会使 DNA 的阅读框架(读码框) 发生改变, 导致插入或缺失部位之后的所有密码子都跟着发生变化, 结果产生一种异常的多肽链。移码突变诱发的原因是一些像吡啶类染料分子能插入 DNA 分子, 使 DNA 复制时发生差错, 导致移码突变。(5) 无意突变, 由于一对或几对碱基对的改变而使决定某一氨基酸的密码子变成一个终止密码子的基因突变。(6) 碱基修复: DNA 损伤的修复系统主要有以下几个: ①损伤碱基的直接修复; ②切除修复, 包括碱基切除修复、核苷酸切除修复和 DNA 交链的切除修复; ③错配修复; ④重组修复, 又称复制后修复; ⑤跨损伤 DNA 合成, 这是一种利用损伤核苷酸为模板, 通过 DNA 聚合酶 I 使碱基掺入到复制终止处进行 DNA 合成, 从而延长 DNA 链的修复。

基因突变的特点为:

第一, 基因突变在生物界中是普遍存在的。

第二, 基因突变是随机发生的。

第三, 在自然状态下, 对一种生物来说, 基因突变的频率是很低的。

第四, 大多数基因突变对生物体是有害的, 由于任何一种生物都是长期进化过程的产物, 它们与环境条件已经取得了高度的协调。

第五, 基因突变是不定向的。

四、阐述一条反向遗传克隆功能基因的途径(25%)

答: 反向遗传学是相对于经典遗传学而言的。经典遗传学是从生物的性状、表型到遗传物质来研究生命的发生与发展规律。反向遗传学则是在获得生物体基因组全部序列的基础上, 通过对靶基因进行必要的加工和修饰, 如定点突变、基因插入\缺失、基因置换等, 再按组成顺序构建含生物体必需元件的修饰基因组, 让其装配出具有生命活性的个体, 研究生物体基因组的结构与功能, 以及这些修饰可能对生物体的表型、性状有何种影响等方面的内容。

比较典型的反向遗传克隆功能基因的途径如 RNAi。

RNAi 的机制可能是细胞内双链 RNA 在 Dicer 酶的作用下, 可形成-22 bp 大小的小干扰 RNA(small interfering RNAs, siRNAs), siRNAs 可进一步掺入多组分核酸酶并使其激活, 从而精确降解与 siRNAs 序列相同的 mRNA, 完全抑制了该基因在细胞内的翻译和表达(下略)。