

## 第 11 单元 基因表达的调控和基因工程

### (一) 名词解释

1. 操纵子； 2. 启动子； 3. 增强子； 4. 衰减子； 5. 反式作用因子； 6. 降解物基因活化蛋白； 7. 克隆技术； 8. 限制性核酸内切酶； 9. 基因组 DNA 文库； 10. cDNA 文库。

### (二) 填充题

1. 正调控和负调控是基因表达的两种最基本的调节形式，其中原核细胞常用\_\_\_\_\_模式，而真核细胞常用\_\_\_\_\_模式。

2. 在原核细胞中，由同一调控区控制的一群功能相关的结构基因组成一个基因表达调控单位，称为\_\_\_\_\_，其调控区包括\_\_\_\_\_基因和\_\_\_\_\_基因。

3. 有些基因的表达较少受环境的影响，在一个生物体的几乎所有细胞中持续表达，因此被称为\_\_\_\_\_；另有一些基因表达极易受环境的影响，在特定环境信号刺激下，相应的基因被激活，基因表达产物增加，这种基因是可\_\_\_\_\_的基因，相反，如果基因对环境信号应答时被抑制，这种基因是可\_\_\_\_\_的基因。

4. 在基因重组技术中，切割 DNA 用\_\_\_\_\_，连接 DNA 用\_\_\_\_\_。

5. 除噬菌体外，\_\_\_\_\_和\_\_\_\_\_也是分子克隆的常用载体。

6. 用动物病毒 DNA 改造的基因载体有\_\_\_\_\_和\_\_\_\_\_。用于植物基因工程的常用载体是\_\_\_\_\_。

7. 将重组质粒导入细菌称\_\_\_\_\_，将噬菌体 DNA 转入细菌称\_\_\_\_\_。

8. Southern 印迹法、Northern 印迹法和 Western 印迹法是分别用于研究\_\_\_\_\_、和\_\_\_\_\_转移和鉴定的几种常规技术。

### (三) 选择题（在备选答案中选出 1 个或多个正确答案）

1. 一个操纵子通常含有

- A. 一个启动序列和一个编码基因
- B. 一个启动序列和数个编码基因
- C. 数个启动序列和一个编码基因
- D. 数个启动序列和数个编码基因
- E. 两个启动序列和数个编码基因

2. 有关操纵子学说的论述，正确的是

- A. 操纵子调控系统是真核生物基因调控的主要方式
- B. 操纵子调控系统是原核生物基因调控的主要方式
- C. 操纵子调控系统由调节基因、操纵基因、启动子和结构基因组成
- D. 诱导物与阻遏蛋白结合启动转录
- E. 诱导物与启动子结合而启动转录

3. 转录因子是

- A. 调节 DNA 结合活性的小分子代谢效应物
- B. 调节转录延伸速度的蛋白质
- C. 调节转录起始速度的蛋白质
- D. 调节转录产物分解速度的蛋白质
- E. 促进转录产物加工的蛋白质

4. 阻遏蛋白（阻抑蛋白）识别操纵子中的

- A. 启动基因
- B. 结构基因
- C. 操纵基因
- D. 内含子
- E. 调节基因

5. 在下列哪种情况下，乳糖操纵子的转录活性最高

- A. 高乳糖，低葡萄糖
- B. 高乳糖，高葡萄糖
- C. 低乳糖，低葡萄糖
- D. 低乳糖，高葡萄糖
- E. 不一定

6. 顺式作用元件是指

- A. 基因的 5' 侧翼序列
- B. 基因的 3' 侧翼序列
- C. 基因的 5' 和 3' 侧翼序列
- D. 基因的 5' 和 3' 侧翼序列以外的序列
- E. 具有转录调节功能的特异 DNA 序列

7. 反式作用因子是指
- A. 具有激活功能的调节蛋白      B. 具有抑制功能的调节蛋白  
C. 对自身基因具有激活功能的调节蛋白      D. 对另一基因具有激活功能的调节蛋白  
E. 对另一基因有调节功能的蛋白质因子
8. 下列关于限制性内切酶的叙述哪一项是错误的
- A. 它能识别 DNA 特定的碱基顺序，并在特定的位点切断 DNA  
B. 切割点附近的碱基顺序一般呈回文结构  
C. 它能专一性降解经甲基化修饰的 DNA  
D. 是重组 DNA 的重要工具酶  
E. 主要从细菌中获得
9. 基因工程中，不常用到的酶是
- A. 限制性核酸内切酶      B. DNA 聚合酶      C. DNA 解链酶      D. DNA 连接酶      E. 反转录酶
10. 下列哪项不能作为表达载体导入真核细胞的方法？
- A. 磷酸钙转染      B. 电穿孔      C. 脂质体转染      D. 氯化钙转染      E. 显微注射
11. 重组体的筛选方法有
- A. 抗药标志筛选      B. 标记补救      C. 分子杂交      D. 免疫化学      E. 酶联免疫检测
12. cDNA 是指
- A. 在体内合成的与病毒 DNA 或 RNA 互补的 DNA  
B. 在体外经反转录合成的与 DNA 互补的 DNA  
C. 在体外经转录合成的与 DNA 互补的 RNA  
D. 在体外经反转录合成的与 RNA 互补的 DNA  
E. 在体内经转录合成的与 DNA 互补的 RNA
13. 建 cDNA 文库时，首先需分离细胞的
- A. 染色体 DNA      B. 线粒体 DNA      C. 总 mRNA      D. tRNA      E. rRNA

#### (四) 判断题

1. 高等真核生物的大部分 DNA 是不为蛋白质编码的。
2. 大多数管家基因编码低丰度的 mRNA。
3. 乳糖可以诱导乳糖操纵子的表达，所以乳糖对乳糖操纵子的调控属于正调控系统。
4. 某些蛋白质既可以作为阻遏蛋白又可以作为激活蛋白参与基因表达的调控。
5. 准备用原核生物表达真核基因时，最好通过 cDNA 获取目的基因。
6. 用原核生物表达真核生物的糖蛋白，其表达产物不会有正常的生物学功能。
7. Ti 质粒可以随土壤农杆菌进入植物细胞。
8. 用  $\lambda$  噬菌体作克隆载体时，外源 DNA 片断越小，克隆的成功率越高。
9. 基因克隆选择的宿主细胞必须无限制性核酸内切酶。
10. 采用蓝白斑选择法时，蓝色菌落或噬菌斑是含有重组载体的克隆。

#### (五) 分析与计算题

1. 简述操纵子的基本结构。
2. 举例说明基因表达的诱导与阻遏，正调控与负调控。
3. 概述原核生物基因表达调控的特点。
4. 概述真核生物基因组的特点。
5. 概述真核生物基因表达调控的特点。
6. 简答真核生物基因表达的调控方式。

7. 常用的限制性核酸内切酶有哪些特点？
8. 在基因克隆中，目的基因有哪些主要来源？
9. 什么是 cDNA 文库？cDNA 文库与基因组文库有何差别？
10. 用于 DNA 重组的载体应具备什么条件？常用的载体有哪些？各有何特点？
11. 简述连接目的基因与载体的主要方法？
12. 概述筛选和鉴定 DNA 重组体的常用方法。

## 参考答案

### （一）名词解释

1. 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。

顺式调控元件：指可影响自身基因表达活性的真核 DNA 序列。根据顺式作用元件在基因中的位置、转录激活作用的性质及发挥作用的方式，分为启动子、增强子及沉默子等。

2. 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。

3. 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。

4. 在原核生物的 Trp 操纵子结构中，第一个结构基因与启动子 P 之间有一个区域含 Trp 密码子，称衰减子。当环境中 Trp 浓度很高时，它可通过编码并翻译，使正在转录的 mRNA 形成终止信号，从而终止 Trp 操纵子的表达。这种转录衰减实质上是转录与一个前导肽翻译过程的偶联，它是原核生物特有的一种基因调控机制。

5. 大多数真核转录调节因子由某一基因表达后，通过与特异的顺式作用元件相互作用（DNA-蛋白质相互作用），或通过与其他调节因子的相互作用（蛋白质-蛋白质相互作用），反式激活另一基因的转录，故称反式作用蛋白或反式作用因子。

6. 也就是 cAMP 受体蛋白（cAMP receptor protein, CRP），它与 cAMP 的复合物可以促进某些原核操纵子（如乳糖操纵子）的转录。

7. “克隆”作为名词指相同的分子或细胞构成的群体，或一个共同的祖先通过无性繁殖所得到的群体，作为动词指获取“克隆”的过程。克隆技术特指获取“克隆”的过程，包括分子克隆，细胞克隆等技术。

8. 就是识别 DNA 的特异序列，并在识别位点或其周围切割双链 DNA 的一类核酸内切酶。限制性核酸内切酶存在于细菌体内，与相伴存在的甲基化酶共同构成细菌的限制、修饰体系，限制外源 DNA，保护自身 DNA，对保持细菌遗传物质的稳定具有重要意义。限制性核酸内切酶分为三类，其中的 II 类酶能特异性在一定的核苷酸序列处切割双链 DNA，因而在基因工程中得到广泛的应用。

9. 利用限制性核酸内切酶将染色体 DNA 切割成一定大小的片段，将这些片段分子与适当的克隆载体拼接成重组 DNA 分子，继而转入受体菌，使每个细菌内都携带一种重组 DNA 分子。不同细菌中的重组 DNA 分子可能包含不同的染色体 DNA 片段，这样，只要得到的转化细菌所携带的重组 DNA 分子种类足够多，则全部转化细菌所携带的各种染色体片段就代表了染色体的整个基因组。存在于转化细菌内，由克隆载体所携带的所有基因组 DNA 片段的集合称基因组 DNA 文库。基因组 DNA 文库涵盖了基因组的全部基因信息。

10. 以 mRNA 为模板，经反转录酶催化，在体外反转录成 cDNA，与适当的载体（常用噬菌体或质粒载体）连接后转化受体菌，则每个细菌含有一段 cDNA，并能繁殖扩增，这样包含着细胞全部 mRNA 信息的 cDNA 克隆集合称为该组织细胞的 cDNA 文库。基因组含有的基因在特定的组织细胞中只有一部分表达，而且处在不同环境条件、不同分化时期的细胞其基因表达的种类和强度也不尽相同，所以 cDNA 文库具有组织细胞特异性。cDNA 文库显然比基因组 DNA 文库小得多，能够比较容易从中筛选克隆得到细胞特异表达的基因。另外，对真核细胞来说，从基因组 DNA 文库获得的基因与从 cDNA 文库获得的不同，基因组 DNA 文库所含的是带有内含子和外显子的基因组基因，而从 cDNA 文库中获得的是已经过剪接，去除了内含子的 cDNA。一般来说，从 cDNA 文库获得的基因，因不含内含子而片段较小，更适用于用作基因工程的目的基因。由于原核生物不存在将 hnRNA 加工成 mRNA 的酶系统，若用原核生物表达真核基因，则目的基因一定要通过 cDNA 获取。

## （二）填空题

1. 负调控，正调控； 2. 启动子，启动，操纵； 3. 管家基因，诱导，阻遏； 4. 限制性核酸内切，DNA 连接； 5. 质粒，病毒； 6. 腺病毒载体，反转录病毒载体，Ti 质粒。 7. 转化，转导； 8. DNA，RNA，蛋白质；

## （三）选择题（在备选答案中选出 1 个或多个正确答案）

1. (B) 操纵子均含有数个编码基因，但启动序列只有 1 个。
2. (B, C, D) 操纵子调控系统由调节基因，操纵基因，启动子和多个结构基因组成，是原核生物基因表达调控的主要方式，诱导物与阻遏蛋白结合启动转录。诱导物不能直接与启动子结合。真核生物不存在操纵子调控系统。
3. (C) 转录因子是调节转录起始的蛋白质，对转录延伸的速度，转录产物分解的速度和转录产物的加工均无影响。
4. (C) 操纵基因位于启动基因与结构基因之间，阻遏蛋白与操纵基因结合后，与启动基因结合的 RNA 聚合酶不能转录结构基因。
5. (A) 参与乳糖代谢的三种酶的表达同时受控于正负调控两种机制，只有在正调控发挥作用，负调控不起作用的时候，这三种酶才能有效的表达。当培养基中加入乳糖的时候，参与负调控的阻遏蛋白将失去活性，但如果培养基中含有葡萄糖，则细菌优先利用葡萄糖，这时参与乳糖代谢的酶仍然不能有效的表达，这是因为葡萄糖降低了细胞内的 cAMP 水平，而 cAMP 浓度的降低，导致降解物激活蛋白丧失活性，正调控的机制失去作用，这时三种酶不可能正常的表达。
6. (E) 顺式作用元件是对某基因自身有调节功能的 DNA 序列，其中的启动子多在基因的 5' 侧翼，但增强子既可以在 5' 侧翼，又可以在 3' 侧翼，一般距基因较远。有些顺式作用元件甚至可以在基因内部。
7. (E) 反式作用因子是指对另一基因的表达有激活或抑制作用的蛋白质因子。
8. (C) 限制性核酸内切酶主要存在于细菌，它可以水解外源 DNA，而自身 DNA 因在特定位点被甲基化而可以免遭水解。限制性核酸内切酶由于可识别特定的碱基序列并在特定的位点切割双链 DNA，因而在基因工程中得到广泛的使用。
9. (C) DNA 聚合酶可用于获取目的基因，测序和 PCR 等工作，限制性核酸内切酶用于 DNA 酶切片段长度的多态性分析，载体和目的基因的特异性切割等工作，DNA 连接酶可用于基因重组的连接反应。DNA 解链酶在基因工程中几乎用不到。
10. (D)  $\text{CaCl}_2$  处理受体细胞是提高细菌转化率的常用方法，不适用于真核生物，题中列出的其余 4 种方法均可用于将表达载体导入真核细胞。
11. (A, B, C, D, E) 题中列出的 5 种方法均可用于重组体的筛选。
12. (D) cDNA 指在体外经反转录合成的与 RNA 互补的 DNA。

13. (C) cDNA 文库应包含某一细胞在某一状态下所表达的基因，因此，构建 cDNA 文库首先要分离细胞的总 mRNA。

#### (四) 判断题

1.对。高等真核生物的 DNA 中含有不少高度重复序列的非编码序列，基因内部又有内含子，不少基因内含子的总长度远远大于外显子。因此，真核生物的编码区只占 DNA 总长度的一小部分，一般认为，编码区不超过总长度的 5%。

2.对。管家基因是持续表达的，mRNA 丰度不高，但寿命较长，翻译效率较高。

3.错。乳糖被转化为别乳糖后，与乳糖操纵子调节基因产生的阻遏蛋白结合，使阻遏蛋白失去活性。由于这一调控方式起作用的是阻遏蛋白，故属于负调控。

4.对。某些蛋白质能够与 DNA 分子的不同区域结合，分别发挥激活蛋白或阻遏蛋白的作用。

5.对。真核生物的基因多数含有内含子，原核生物缺乏从转录初级产物切除内含子的加工系统，另外，如果将基因组 DNA 作为目的基因，基因片段因含有内含子而过大，也会降低基因转移的成功率。cDNA 是以成熟 mRNA 为模板经过反转录制成的，不含内含子，适合于作为目的基因用于基因的克隆或表达。

6.对。原核生物缺乏真核生物的翻译后加工系统。不能对蛋白质进行糖基化。因此，表达糖蛋白要用真核表达系统。

7.错。土壤农杆菌可以促进 Ti 质粒进入植物细胞，但农杆菌本身并不进入植物细胞。

8.错。 $\lambda$  噬菌体的外壳蛋白只能包装长度为  $\lambda$  噬菌体 DNA 78%~105% 的 DNA，若外源 DNA 片段太小，重组体 DNA 的长度小于  $\lambda$  噬菌体 DNA 的 78%，就不能在体外包装成噬菌体，因而，克隆很难成功。

9.对。如果宿主细胞有限制性核酸内切酶，将会水解进入宿主细胞的重组体 DNA，导致克隆失败。

10.错。采用蓝的斑选择法时，克隆位点被选在表达  $\alpha$ -肽的基因内，含有空载体的受体菌可以在 IPTG (异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷) 的诱导下，表达  $\alpha$ -肽，通过与受体菌的  $\alpha$ -互补，能够水解 X-gal (5-溴-4 氯-3-吡啶 - $\beta$ -D-半乳糖苷) 生成蓝色的水解产物，因而菌落或噬菌斑为蓝色。含有重组 DNA 的受体菌，由于外源基因插入表达  $\alpha$ -肽的基因内，不能表达  $\alpha$ -肽，因而，菌落或噬菌斑为白色。

#### (五) 分析与计算题

1.操纵子的调控区有一个操纵序列，一个启动序列及一个 CAP 位点，调控区下游有几个结构基因，还有一个调节基因编码阻遏蛋白，阻遏蛋白与操纵序列结合，使操纵子受阻遏而处于关闭状态。若 cAMP 与 CAP 结合，形成的复合物与 CAP 位点结合，可增大操纵子的转录活性。阻遏蛋白的负性调节和 CAP 的正性调节共同调节结构基因的表达，操纵子机制在原核基因表达调控中具有较普遍的意义，因其多是几个功能相关基因串联于同一操纵子上，故在同一启动序列控制下，可转录出能为多种蛋白质编码的 mRNA，即多顺反子 mRNA。

2.在特定的环境信号刺激下，相应的基因被激活，基因表达产物增加，则这种基因是可诱导的。可诱导基因在特定的环境中表达增强的过程称为诱导。例如有 DNA 损伤时，修复酶基因就会在细菌内被诱导激活，使修复酶的活性增加。相反，如果基因对环境信号应答时被抑制则这种基因是可阻遏的，可阻遏基因表达产物水平降低的过程称为阻遏，例如，当培养液中色氨酸供应充分时，在细菌内编码色氨酸合成相关酶的基因表达会被抑制。如果某种基因在没有调节蛋白存在时是表达的，加入某种调节蛋白后基因表达活性便被关闭，这样的控制为负调控。例如，乳糖操纵子。相反，若某种基因在没有调节蛋白存在时是关闭的，加入某种调节蛋白后基因活性就被开启，这种控制称为正调控。例如代谢物阻遏。

3.原核基因表达调控与真核存在很多共同之处，但因原核生物没有细胞核和亚细胞结

构，其基因组结构要比真核生物简单，基因表达的调控因此而比较简单。虽然原核基因的表达也受转录起始、转录终止、翻译调控及 RNA、蛋白质的稳定性等多级调控，但其表达开、关的关键机制主要发生在转录起始。其特点包括以下 3 方面：（1） $\sigma$  因子决定 RNA 聚合酶的识别特异性：原核生物只有一种 RNA 聚合酶，核心酶催化转录的延长， $\sigma$  亚基识别特异启动序列，即不同的  $\sigma$  因子协助启动不同基因的转录。（2）操纵子模型的普遍性：除个别基因外，原核生物绝大多数基因按功能相关性成簇地连续排列在染色体上，共同组成一个转录单位即操纵子，如乳糖操纵子等。一个操纵子含一个启动序列及数个编码基因。在同一个启动序列控制下，转录出多顺反子 mRNA。（3）阻遏蛋白与阻遏机制的普遍性：在很多原核操纵子系统，特异的阻遏蛋白是控制启动序列活性的重要因素。当阻遏蛋白与操纵基因结合或解离时，结构基因的转录被阻遏或去阻遏。

4（1）基因组结构庞大：哺乳动物基因组 DNA 由约  $3 \times 10^9$  bp 的核苷酸组成。大约有 3 万个左右的基因，90% 以上的 DNA 不为蛋白质编码。真核细胞 DNA 与组蛋白结合形成复杂的染色质结构，基因表达调控机制更加复杂。（2）单顺反子：真核基因转录产物为单顺反子，即一个编码基因转录生成一个 mRNA 分子，经翻译生成一条多肽链。许多蛋白质由几条不同的多肽链组成，因此存在多个基因的协调表达。（3）重复序列：重复序列在真核 DNA 中普遍存在，重复序列长短不一，短的在 10 个核苷酸以下，长的达数百，乃至上千个核苷酸。据重复频率不同分为高度重复序列、中度重复序列及单拷贝序列。（4）基因的不连续性：结构基因的两侧有不被转录的非编码序列，往往是基因表达的调控区。在编码基因内部有一些不为蛋白质编码的间隔序列，称内含子，而编码序列称外显子，因此真核基因是不连续的。

5. 同原核生物一样，真核基因表达调控的最基本环节也是转录起始，而且某些机制是相同的，但也存在明显差别：（1）RNA 聚合酶：真核有 3 种 RNA 聚合酶，分别负责 3 种 RNA 转录。（2）活性染色质结构变化：当基因被激活时，可观察到染色体相应区域发生结构和性质变化。包括对核酸酶敏感，DNA 拓扑结构变化，DNA 碱基修饰变化和组蛋白变化。（3）正调节占主导地位：真核 RNA 聚合酶对启动子的亲和力极小或根本没有实质性的亲和力，二者的结合必须依赖一种或多种激活蛋白。尽管发现少量基因存在负性顺式作用元件，但普遍存在的是正性调节机制。（4）转录与翻译分隔进行：真核细胞有胞核及胞质等区间分布，转录与翻译在不同亚细胞结构中进行。（5）转录后加工：真核基因的内含子和外显子均被转录，内含子在转录后要被剪接去除，使外显子连接在一起，形成成熟的 mRNA。不同剪接方式可形成不同的 mRNA，翻译出不同的多肽链。因此，转录后加工是真核基因表达调控的另一重要环节。

6.（1）DNA 水平的调控：a. 基因丢失，即 DNA 片段或部分染色体的丢失，如蛔虫胚胎发育过程有 27% 的 DNA 丢失。b. 基因扩增，即特定基因在特定阶段的选择性扩增，如非洲爪蟾卵母细胞中的 rDNA 是体细胞的 4000 倍。c. DNA 序列的重排，如哺乳动物免疫球蛋白各编码区的连接。d. 染色质结构的变化，通过异染色质关闭某些基因的表达。e. DNA 的修饰，如 DNA 的甲基化关闭某些基因活性。（2）转录水平的调控。a. 染色质的活化，如核小体结构的解开、非组蛋白的作用等。b. 转录因子的作用，转录因子与 RNA 聚合酶及特定的 DNA 序列（启动子、增强子）相互作用实现对转录的调控。（3）转录后水平的调控。a. mRNA 前体的加工，如 5' 端加帽、3' 端加尾、拼接、修饰、编辑等。B. mRNA 的选择性拼接，如抗体基因的选择性拼接。（4）翻译水平的调控。a. 控制 mRNA 的稳定性，如 5' 端的帽子结构、3' 端 polyA 尾巴和 mRNA 与蛋白质的结合有利于 mRNA 的稳定。b. 反义 RNA 的作用，反义 RNA 可以选择性抑制某些基因的表达。c. 选择性翻译，如血红素缺乏时，通过级联反应使 eIF<sub>2</sub> 磷酸化。d. 抑制翻译的起始。（5）翻译后水平的调控。a. 多肽链的加工和折叠，如糖基化、乙酰化、磷酸化、二硫键形成、蛋白质的降解。b. 氨基酸的重排，如合成伴刀豆蛋白 A 时，氨基酸序列大幅度地被剪接重排。c. 通过肽链的断裂等的加工方式产生

不同的活性多肽。

7. II型限制性核酸内切酶（限制酶）是基因工程中常用的重要工具酶，是一类能识别双链DNA分子中特异核苷酸序列的核酸内切酶，常用的限制酶主要有以下特点：（1）均来自于微生物，并以其来源的微生物学名进行命名；（2）相对分子质量小，仅需 $Mg^{2+}$ 作为辅助因子，无需ATP；（3）识别特异性DNA双链顺序，在序列内特异切割产生特异性DNA片段；（4）识别序列长度为连续的4/6/8bp；（5）识别序列呈二重旋转对称，称回文结构，富含GC；（6）有3种切口：5'端突出的黏性末端（如HindIII），3'端突出的黏性末端（如Pst I）和平末端（如H加工）。

8. （1）从染色体DNA中直接分离：主要针对原核生物。（2）化学合成法：由已知多肽的氨基酸序列，推得编码这些氨基酸的核苷酸序列，利用DNA合成仪人工合成其基因。（3）从基因组DNA文库中筛选分离组织/细胞染色体DNA：利用限制性核酸内切酶将染色体DNA切割成片段，与适当的克隆载体连接后转入受体菌扩增，即获得基因组DNA文库，用核酸探针将所需目的基因从基因文库中“钓”取出来。（4）从文库中筛选cDNA：提取mRNA，利用反转录酶合成与其互补的DNA（cDNA）分子，再复制成双链cDNA片段，与适当载体连接后转入受体菌，即获得cDNA文库，然后采用适当方法从cDNA文库中筛选出目的cDNA。（5）用PCR从基因组DNA或cDNA中扩增目的基因。

9. 同mRNA互补的DNA称为cDNA。cDNA文库是以某一细胞的总mRNA为模板，在无细胞系统中，在反转录酶的作用下，首先合成互补DNA的第一链，破坏RNA模板后，再以第一链为模板合成第二链，得到双链cDNA。选用适合的载体，与合成的cDNA重组，导入寄主细胞，经筛选得到的cDNA克隆群称为cDNA文库。由于cDNA技术合成的是不含内含子的功能基因，因此是克隆真核生物基因的一种通用方法。由于细胞内的基因在表达的时间上并非是一致的，具有发育的阶段性和时间性，有些则需要特殊的环境条件。所以，cDNA文库不可能构建得十分完全，也就是说任何一个cDNA文库都不可能包含某一生物的全部编码基因。cDNA文库与基因组文库的主要差别是：（1）基因组文库克隆的是任何基因，包括未知功能的DNA序列，cDNA文库克隆的是具有蛋白质产物的结构基因，包括调节基因。（2）基因组文库克隆的是全部遗传信息，不受时空影响，cDNA文库克隆的是被转录DNA序列（因它受发育和调控因子的影响）。（3）基因组文库中的编码基因是含有内含子和外显子，而cDNA克隆的基因不含内含子。

10. DNA重组载体应具备的条件：（1）能自主复制；（2）具有一种或多种限制性内切酶的单一切割位点，并在位点中插入外源基因后，不影响其复制功能；（3）具有1~2个筛选标记；（4）克隆载体必须是安全的，不应含有对受体细胞有害的基因，并且不会任意转入其他生物细胞；（5）易于操作，转化效率高。常用的基因载体有以下几种：（1）质粒：是细菌染色体以外的小型环状双链DNA分子，本身有复制功能，且带有某些选择信息，但可插入的目的基因片段较小。（2）噬菌体DNA：是一种病毒DNA，能插入比较大的外源DNA片段，在DNA分子上有多种限制性核酸内切酶识别位点，便于多种外源DNA酶切片段的克隆。（4）柯斯质粒载体和酵母人工染色体：前者结合了质粒和 $\lambda$ 噬菌体载体的优点，也是一种环形双链DNA分子，具有质粒的性质，可以转化大肠杆菌，并自行复制和增殖，但它不会产生子代噬菌体，构建成的此种载体较小，因此能插入比较大的外源DNA片段，所以被广泛地用于构建基因组文库。后者既含有大肠杆菌来源的质粒复制起始位点，又含有酵母菌染色体DNA着丝点，端粒和复制起始位点的序列，以及合适的选择标记基因，可在转化的酵母菌细胞内，按染色体DNA复制的形式复制重组DNA，容纳外源DNA片段的能力比前3种载体大得多。

11. （1）黏性末端连接：用同一限制酶切割载体及目的基因后，产生完全相同的黏性末端，可以用DNA连接酶直接进行共价连接。或两种不同的限制性核酸内切酶切割产生的配伍末端（相同类型的黏性末端）之间也可以进行黏性末端连接。（2）平端连接：某些限制酶

切割 DNA 后产生平头末端，由于平头末端 5' 端带有磷酸，3' 带有游离羟基，可在 DNA 连接酶作用下直接连接，并且不管末端序列如何均可连接，但连接效率要比黏性末端之间的连接低。(3) 同聚物加尾连接：利用同聚物序列，如多聚 A 与多聚 T 之间的退火作用完成连接。如果载体和目的基因上找不到共同的酶切点时，可经不同的限制酶切割后，用单链核酸酶将其各自的黏性末端切平，在末端核苷酸转移酶作用下，在 DNA 片段末端加上同聚物序列，制造出黏性末端，而后连接。(4) 人工接头连接：将磷酸化接头连到平末端，使产生新的有限制性酶切核酸酶位点，再用限制酶切割，产生黏性末端后连接。

12. 在转基因操作以后，载体只能进入部分宿主细胞，即使含有载体的细胞，也并非都含有目的基因，有些宿主细胞可能含有自身连接成环的载体分子或非目的基因与载体形成的重组体。因此，须在不同层次不同水平上进行筛选和鉴定，以确定哪一菌落所含的重组 DNA 分子确实带有目的基因，这一过程为筛选。根据载体体系、宿主细胞特性及外源基因在受体细胞表达情况的不同，可采用：(1) 直接选择法：针对载体携带某种或某些标志基因和目的基因，直接测定该基因或基因表型的方法。a. 抗药标志的筛选：载体具有某种抗生素的抗性基因，在转化后只有含载体的细菌才能在含该抗生素的培养平板上生长并形成单菌落，而未转化细胞则不能生长，这样即可将转化菌与非转化菌区别开来。b. 插入失活法：将目的基因插入载体某一耐药基因内使该基因失活，可区分单纯载体或重组载体（含目的基因）的转化菌落。如 pBR322 含  $amp^r$ 、 $Tet^r$  双抗药基因，若将目的基因插入载体的  $Tet^r$  基因中，则含目的基因的转化细胞只能在含 Amp 的培养液中生长，而不能在含 Tet 的培养液中生长。c. 标志补救：若克隆的基因能在宿主菌表达，且表达产物与宿主菌的营养缺陷互补，那么就可以利用营养突变菌株进行筛选，这称为标志补救。如重组体为亮氨酸自养型 ( $Leu^+$ )，将重组子导入亮氨酸异养型 ( $Leu^-$ ) 的宿主细胞后，在不含 Leu 的培养液中可生长，而不含重组体的细胞则不能生长。 $\alpha$ -互补法筛选（见 43 题）也是一种标志补救选择方法。d. 酶切图谱筛选：分别挑取独立的菌落，培养后快速提取重组体 DNA，用重组时所采用的限制酶切割后，进行琼脂糖凝胶电泳，可以从 DNA 片段的大小和有无判断所选的菌落是否为阳性克隆。e. 核酸杂交筛选：将转化子 DNA 或克隆的 DNA 分子片段转移至合适的膜上，利用标记探针进行杂交，直接选择并鉴定目的基因。f. 原位杂交筛选：是将待选菌在平板上培养成菌落，按相应位置（原位）转移至合适的膜上，经变性使膜上的 DNA 成单链，再与标记的探针（与目的基因互补）杂交，找出平板上的菌落位置，即为重组的阳性菌落。(2) 免疫学方法筛选：利用特异抗体与目的基因表达产物的特异相互作用进行筛选。这种方法不直接鉴定基因，属非直接筛选法。分为免疫化学方法及酶联免疫检测分析等。基本的工作原理是将琼脂培养板上的转化子菌落经氯仿蒸汽裂解、释放抗原，再将固定有抗血清的膜覆盖在裂解菌落上，在膜上得到抗原抗体复合物，最后用合适的方法检出阳性反应菌落。