

### PCR 难点问题

1. PCR 扩增 DNA 的原理是什么?过程? (3 个词语) 温度分别是多少?

DNA 半保留复制; 变性(90°C), 复性(50°C), 延伸(72°C).

2. 变性过程破坏的是哪种化学键? 是否需要酶? 利用的是什么原理? 复性的目的?

氢键; 无需酶; DNA 热变性; 使引物与单链 DNA 模板结合

3. 引物是什么? PCR 为什么需要引物? 引物的作用?

一小段能与 DNA 母链的一段碱基序列互补配对的短单链核酸; (DNA 复制不能从头开始, DNA 聚合酶只能从引物 3' 端延伸 DNA 链)

使 DNA 聚合酶能够从引物的 3' 端开始连接脱氧核糖核苷酸; 结合在模板 DNA 上, 提供 DNA 延伸起始位点.

4. 延伸过程是否需要 ATP 供能? 需要什么酶? 延伸温度为什么设定 72°C? 延伸时间的设定与什么有关?

不需要 而高温的 DNA 聚合酶, 酶活性高

目的基因的长度

5. dNTP 作用?

提供原料和能量

6. 引物通常为 20-30 个核苷酸, 引物不能过长或过短, 为什么?

过长或过短, 缺乏特异性, 引发错配, 导致非特异性扩增.

7. 引物设计的要求?

(1) 不能过长或过短

(2) 不能发生自身碱基互补配对, 两种引物之间不能发生碱基互补配对

(3) 引物的 5' 端加限制酶识别序列

8. 两种引物都结合在 DNA 模板链的 3' 端, 脱氧核苷酸连接在引物的 3' 端进行延伸, 子链延伸方向是什么? 设计引物的依据是

一段已知的 DNA 序列 目的基因两端的核苷酸序列。扩增目的基因必须知道其全部核苷酸序列吗? 否。引物的 5' 端一般会加入限制酶识别序列, 有利于扩增 DNA 片段与表达载体连接 目的基因与质粒定向连接

9. 退火温度的设定与什么有关? 退火温度过高、过低, 会造成什么影响?

引物长度、碱基组成

无法结合; 错配, 缺乏特异性, 导致非特异性扩增.

长度个, C-G 个, 温度个

10. PCR 为什么可以特异性扩增目的基因片段?

引物与模板链特异性结合

11. PCR 扩增双链 DNA: ①n 代后, DNA 分子有  $2^n$  个 ②n 代后, DNA 链有  $2^{n+1}$  条

③第 3 代出现等长的目的基因 ④n 代后, 含引物的 DNA 分子有  $2^n$  个

⑤n 代后, 共消耗  $2^{n+1}-2$  个引物, 含引物 A 的 DNA 占的比例  $\frac{2^n-1}{2^n}$ , 同时含有引物 A 和引物 B 的 DNA 占的比例  $\frac{2^n-2}{2^n}$

⑥第 n 代复制, 消耗了  $2^n$  个引物

⑦n 代后, 等长的目的基因有  $2^n-2n$  个

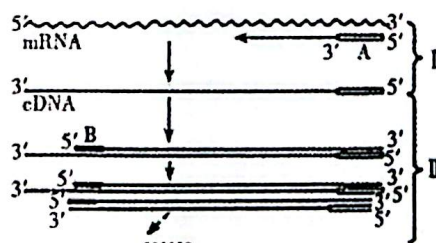
PCR 扩增单链 cDNA (如图):

①n 代后, DNA 分子有  $2^{n-1}$  个

②n 代后, DNA 链有  $2^n$  条

③第 2 代出现等长的目的基因

④n 代后, 共消耗  $2^n-1$  个引物, 消耗引物 A  $2^{n-1}-1$  个, 消耗引物 B  $2^{n-1}$  个。含引物 A 的 DNA 占的比例  $\frac{1}{2}$ , 含引物 B 的 DNA 占的比例  $\frac{1}{2}$  同时含有引物 A 和引物 B 的 DNA 占的比例  $\frac{1}{2}$



12. 假设每个双链 DNA 分子含有 100 个腺嘌呤脱氧核苷酸, 那么, 扩增 n 次, 需要加入多少个腺嘌呤脱氧核苷酸作为原料? 第 n 次需要加入多少个腺嘌呤脱氧核苷酸作为原料?

$(2^n-1) \times 100$

$2^{n-1} \times 100$

# 基因工程的重难点问题

1、基因工程的四个步骤是什么？核心步骤是？基因工程的原理是什么？

答：(1) 目的基因的筛选与获取、**基因表达载体的构建**、将目的基因导入受体细胞、目的基因检测与鉴定。  
(核心)

## (3) 基因重组

2、获取目的基因的方法有哪些？基因组文库和 cDNA 文库有什么区别？cDNA 怎么获得？

答：(1) 从基因文库中获取、化学方法人工合成、利用 PCR 技术扩增

(2) 基因组有全部基因、cDNA 有部分基因

(3) mRNA 逆转录

3、基因表达载体由哪些组成？各部分功能是什么？辨析启动子与起始密码子。

答：目的基因、控制特定性状

标记基因：便于重组 DNA 分子的筛选

启动子：RNA 聚合酶识别和结合位点驱动转录

终止子：使转录停止

复制原点：DNA 复制起始位点

启动子：DNA、转录

起始密码子：mRNA、翻译

4、将目的基因导入受体细胞的方法：导入植物有哪些方法？常用的是？选用的是什么质粒？

花粉管通道法、农杆菌转化法、农。Ti 质粒

农杆菌转化法适合什么植物？目的基因必须插在什么部位？需要什么工具？花粉管通道法的优点？  
双子叶、裸子 T-DNA 上 限制酶、DNA 连接酶

操作简单、直接、无需经过植物组织培养 转化成功后可直接获得种子

5、导入动物用什么方法？为什么用受精卵作为受体细胞？

显微注射法。

具有全能性、体积大、易操作。

6、导入微生物用什么方法？为什么选用原核细胞作为受体细胞？钙离子处理的原理是什么？原核细胞作为受体细胞产生的真核生物的分泌蛋白通常没有生物活性，为什么？

Ca<sup>2+</sup>处理法；繁殖快、单细胞、遗传物质少、易于培养；

尚可增加细胞壁通透性；没有高尔基体、内质网加工

使细胞处于一种能吸收周围环境中 DNA 分子的生理状态。

7、为什么细菌的抗虫基因能转移到棉花 DNA 上？

FDNA 能整合到棉花细胞染色体。DNA 分子结构和化学组成相同

8、为什么抗虫基因在棉花体内也能合成同样的抗虫蛋白？

生物共用一套遗传密码

9、DNA 连接酶种类？区别？DNA 连接酶和 DNA 聚合酶的区别？相同点？

E. coli DNA 连接酶

平末端效率低

本质蛋白 连接磷酸二酯键

T<sub>4</sub> DNA 连接酶

DNA 片段

单链模版、单脱氧核苷酸

10、用 1 种限制酶切和两种酶切，连接后产生的结果分别有哪些？用两种酶同时切可以防

单酶切：目-目、质-质、目环化、质环化、目-质(正、反)

双酶切：目-目、质-质、目-质(正)

防止目的基因、质粒自身环化以及反向连接

	四环	青	
未导入质粒	x	x	} 影印法
导入普通质粒	✓	✓	
导入重组质粒	✓	x	

止什么?

11、将目的基因导入受体细胞的方法这一步骤，导入的结果可能有哪些？利用什么可以检测目的基因已经导入受体细胞？怎么筛选？

12、目的基因稳定存在的关键是什么？怎么检测？

- 插入受体细胞染色体DNA上。
- PCR等技术

13、目的基因成功表达的标志是什么？怎么检测？基因工程成功的标志？

- 目的基因表达出相应的蛋白质。
- 抗原-抗体杂交
- 有相应的性状(个体水平检测)