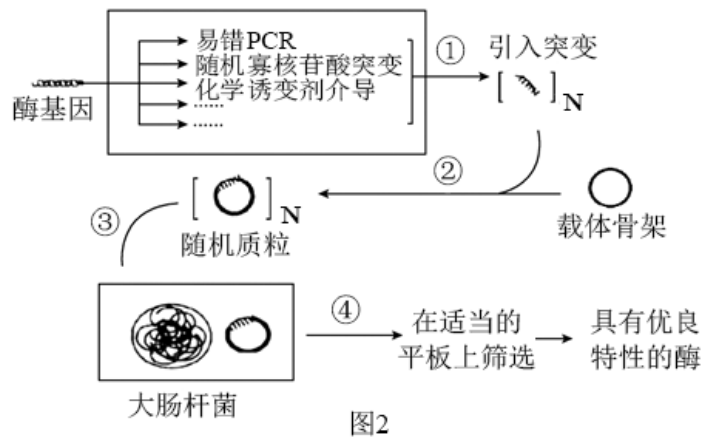
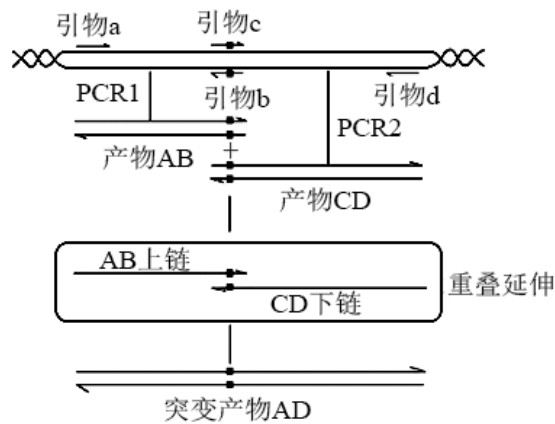


基因工程专题训练

1. 阅读下列材料，并回答问题：纤维素酶的分子改造先后经历了以下 3 个阶段：以定点突变为基础的“定点理性设计”；以易错 PCR 等技术主导的“定向进化”；以数据驱动设计或结构生物信息学指导的“构理性设计”。20 世纪 80 年代，随着定点突变技术的快速发展，纤维素酶理性改变策略应运而生。该技术的基本思路是：先研究分析纤维素酶的三维结构信息，再基于对其结构与功能关系的理解，选定特定的氨基酸进行改造，找到并改变相对应的脱氧核苷酸序列(基因)。常用的定点突变技术是重叠延伸 PCR(过程如图 1)，可对目的基因特定碱基进行定点替换、缺失或者插入，实现对目的蛋白的改造。

然而，目前仅获得了纤维素酶家族的少数成员三维结构，通过定点突变为代的理性设计进行纤维素酶分子的改造在短期内仍难以获得广泛的成效。因此，采用“非理性”设计就成为—种重要的研究手段。所谓“非理性”设计，即定向进化，就是在对蛋白质的三维结构及催化机制不是很清楚的条件 下，模拟自然进化过程，利用易错 PCR 等技术对基因进行随机突变，提高基因突变频率和基因突变的多样性，并与定向筛选策略结合，最终获得具有某些优良特性的酶分子(过程如图 2)。



尽管定向进化技术在对纤维素酶进行改造时可能会得到意想不到的“有益收获”，但由于对要改造的蛋白质分子结构信息并不清楚，因此操作起来具有明显的“盲目性”。

近十年随着计算机运算能力大幅提升以及先进算法不断涌现，计算机辅助蛋白质设计改造得到了较大的重视和发展，形成了“构理性设计”的新策略。这一策略借助蛋白质保守位点及蛋白质的三维结构分析，通过非随机的方式选取若干个氨基酸位点作为改造点，并结合有效密码子的理性选用。构建“小而精”的突变体文库。与定向进化相比，“结构理性设计”可提供明确的改造方案，大幅降低建立、筛选突变体文库所需的工榨量，增大理性设计成功的概率。

- (1) 纤维素酶的分子改造过程属于_____工程。
- (2) 根据图 1 所示的叠延伸 PCR 过程，回答下列问题。

①PCR 扩增 DNA 的过程中，引物 a、b、c、d 中，PCR1 应选择引物_____，PCR2 应选择引物_____，重叠延伸时应选择引物_____。

②重叠延伸 PCR 通过_____实现定点突变，引物 b 和 c 上的突变位点的碱基应_____。PCR1 和 PCR2 需要分别进行的原因是_____。

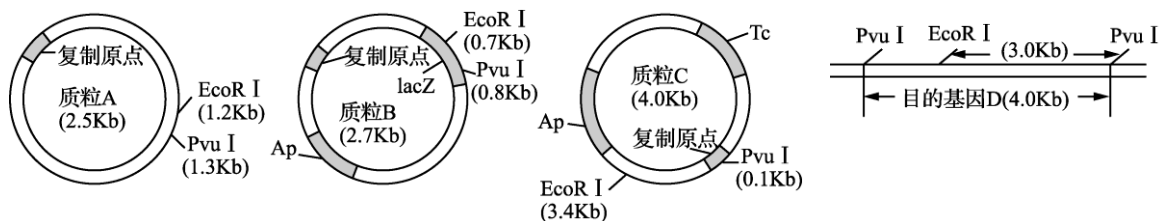
(3) 请据图 2 写出用定向进化策略改造纤维素酶的操作过程：_____ (2 分)。

(4) 用定向进化策略改造纤维素酶，下列哪些说法正确？_____ (2 分)

- A. 定向进化策略可以使纤维素酶朝着人们需要的方向进化
- B. 定向进化策略获得的纤维素酶的基因序列在筛选前是已知的
- C. 定向进化策略的实质是达尔文进化论在分子水平上的延伸和应用
- D. 与定点诱变相比，定向进化策略不需解析酶的结构和功能，更接近自然进化过程
- E. 基因工程技术是定向进化策略改造纤维素的基础

(5) 有人认为，以数据驱动设计或结构生物信息学指导的“结构理性设计”必将成为纤维素酶的分子改造的主流方向，该说法是否正确，请结合本文作出判断，并撰写一段文字，向公众进行科学解释。_____ (2 分)

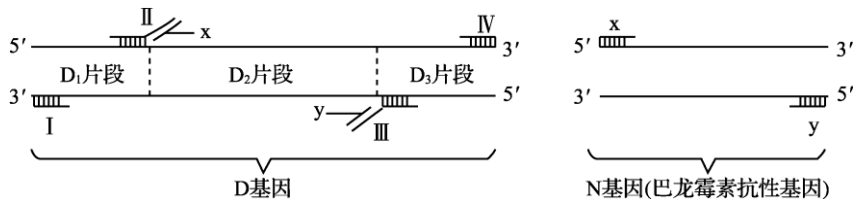
2. 如图所示为 A、B、C 三种质粒和一个含目的基因 D 的 DNA 片段示意图。图中 Ap 为氨苄青霉素抗性基因，Tc 为四环素抗性基因，lacZ 为蓝色显色基因。图中 EcoR I、Pvu I 为两种限制酶，质粒上限制酶括号内的数字表示限制酶切割位点与复制原点的距离。回答下列问题。



(1) 图中三种质粒中不能作为目的基因运载体的是_____，理由是_____、_____。

(2) 在基因工程的操作过程中，需要检查目的基因是否重组到质粒中，应使用_____酶切重组质粒，完全酶切后，进行电泳检测。若电泳图谱中出现长度为 1.1kb 和 5.6 kb，或者_____kb 和_____kb 的片段，则可判断该重组质粒已与目的基因重组成功。

(3) 为研究目的基因 D 的功能，研究人员用下图所示的引物组合分别扩增 D 基因的 D₁ 片段、D₃ 片段 (DNA 复制子链的延伸方向 5' → 3')。



注：引物 II、III 上的 x、y 片段分别与 N 基因两端互补配对

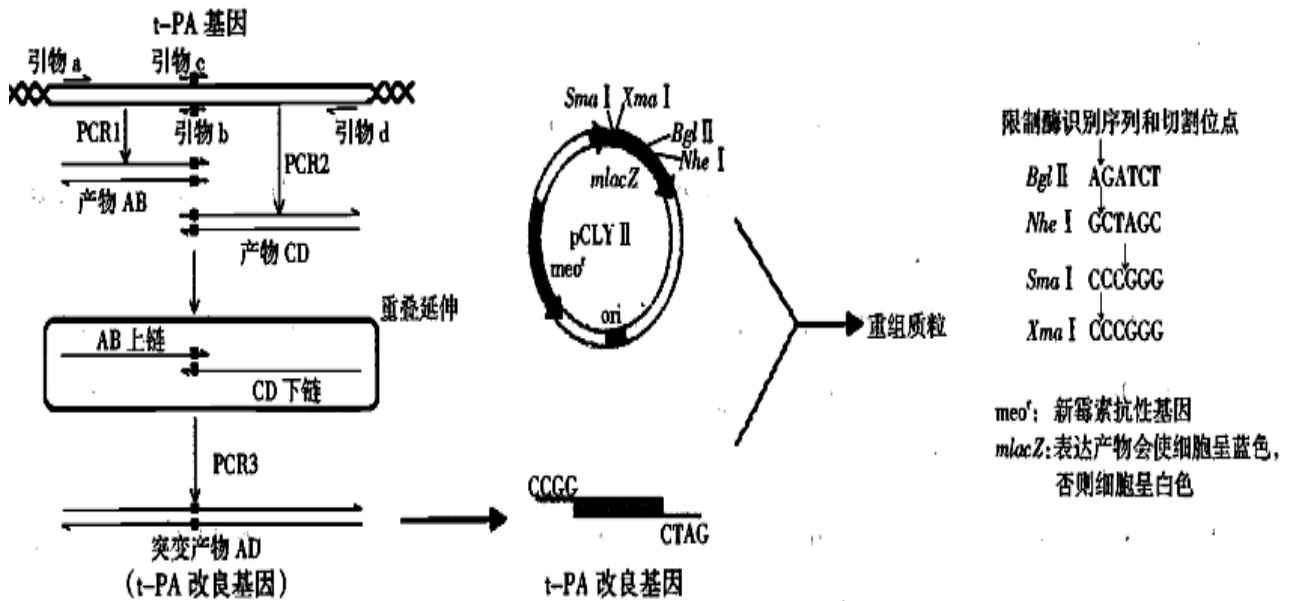
① 用引物 I、II 组合扩增后，得到的绝大部分 DNA 片段是下图中的_____。



② 将大量 N 基因片段与扩增得到的 D₁ 片段、D₃ 片段置于 PCR 反应体系中进行扩增，得到的绝大多数扩增产物是_____ (填“D₁-N”或“D₁-D₃-N”或“D₃-N”或“D₁-N-D₃)。

3. 人体内的 t-PA 蛋白能高效降解血栓，是心梗和脑血栓的急救药，但大剂量使用会诱发颅内出血。如果将 t-PA 蛋白第 84 位的半胱氨酸换成丝氨酸，能显著降低出血副作用。先对天然的 t-PA 基因进行序列改造，然后在大肠杆菌中表达改造后的基因，可得到性能优异的改良 t-PA 蛋白。下图是通过重叠延伸 PCR

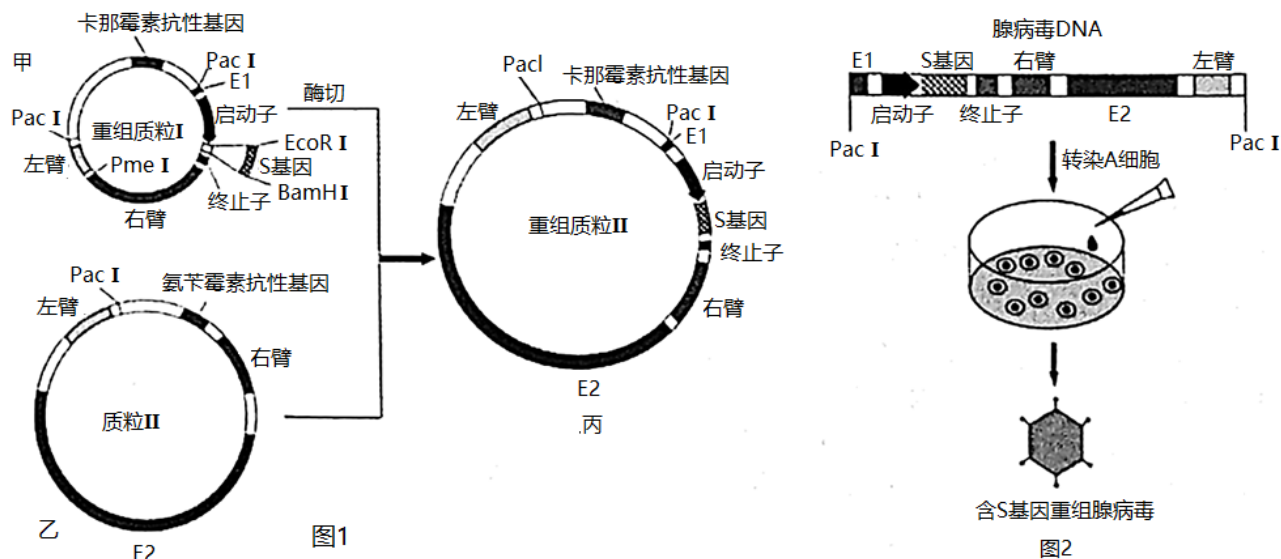
技术获取 t-PA 改良基因和利用质粒 pCLY II 构建含 t-PA 改良基因的重组质粒示意图(图中重叠延伸 PCR 过程中,引物 a、b 用来扩增含有突变位点的上游 DNA 序列,引物 c、d 用来扩增含突变位点的下游 DNA 序列)。请回答:



- 生产改良 t-PA 蛋白的技术属于_____工程。
- 已知 t-PA 蛋白第 84 位是半胱氨酸, 相应的基因模板链(图中 t-PA 基因的上链)。上的碱基序列是 ACA, 丝氨酸的密码子是 UCU。重叠延伸 PCR 示意图中的黑点表示突变部位的碱基, 引物 b 中该部位的碱基是_____, 引物 c 该部位的碱基是_____。PCR 中需要引物的原因是_____。
- 重叠延伸 PCR 中, PCR1 和 PCR2 分别进行, 产物混合后再进行 PCR3。PCR1 和 PCR2 需要分别进行的原因是_____。
- 构建重组质粒时, 选用的限制酶是_____。重组质粒中的新霉素抗性基因的作用是_____。
- 在加入新霉素的培养基中能正常生长的大肠杆菌并非都是目的菌株, 仍需选择呈_____色的菌落, 进一步培养、检测和鉴定, 以选育出能生产改良 t-PA 蛋白的工程菌。

4. 长期高血糖可引发血管细胞衰老。科研人员为研究 S 蛋白在因高血糖引发的血管细胞衰老中的作用, 以腺病毒为载体将编码 S 蛋白的 S 基因导入血管细胞, 实现 S 蛋白在血管细胞中的大量表达。

- 腺病毒的遗传物质为 DNA, 其复制需要 E1、E2、E3 基因共同完成。为将 S 基因导入腺病毒, 科研人员首先构建了含 S 基因的重组质粒, 过程如图 1 所示。



①科研人员将S基因用_____酶切后，用DNA连接酶连入质粒I，得到重组质粒I（图1甲所示），导入用_____处理制备的感受态细菌。用添加抗生素的培养基筛选，对所长出的单菌落提取质粒，通过_____的方法可鉴定重组质粒I是否插入了S基因。

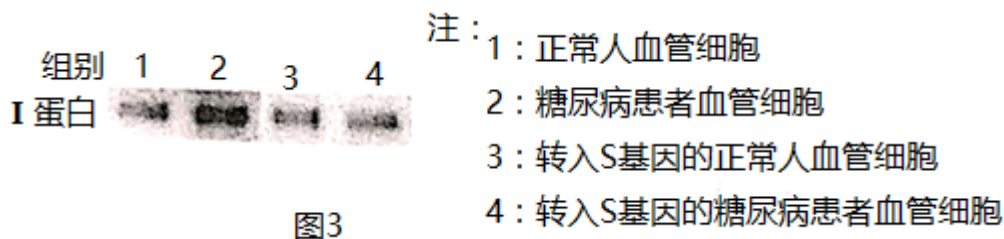
②用PmeI酶切重组质粒I获得DNA片段。将此DNA片段与质粒II（图1乙所示）共同转化BJ细菌。在BJ细菌体内某些酶的作用下，含同源序列的DNA片段（图1甲、乙所示的左臂、右臂）可以发生_____，产生重组质粒II（图1丙所示）。使用添加_____的培养基可筛选得到成功导入重组质粒II的菌落。

③将含S基因的重组质粒II，用_____酶切后，获得改造后的腺病毒DNA。将其导入A细胞（A细胞含有E3基因，可表达E3蛋白），如图2所示。腺病毒DNA在A细胞内能够_____，从而产生大量重组腺病毒，腺病毒进入宿主细胞后不整合到宿主细胞染色体上。

④综合上述信息，从生物安全性角度分析重组腺病毒载体的优点：_____（写出2点）（2分）。

（2）用含S基因的重组腺病毒分别感染正常人及糖尿病患者的血管细胞，使S蛋白在血管细胞中大量表达。

①提取正常人、糖尿病患者及两者转入S基因后的血管细胞的蛋白，用_____方法检测I蛋白（一种能促进细胞衰老的蛋白）的表达量，结果如图3所示。



②实验结果显示_____血管细胞中I蛋白表达量最高，推测S蛋白对高血糖引发的血管细胞衰老的作用及机制是_____。

5. 随着夏天临近，小龙虾将成为我们餐桌上不可或缺的美味，美中不足的是，小龙虾体内的某些蛋白分子或小分子多肽能使部分人产生过敏反应。已知基因表达时，双链DNA的一条链是编码链，另一条链是模板链，虾过敏基因的编码链如图1。四种限制酶和三种质粒如图2、图3，箭头表示限制酶的切割位点。研究人员拟按照图4操作步骤研发一种虾过敏疫苗。请回答下列问题：

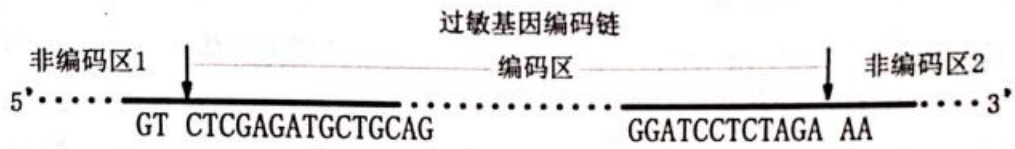


图 1

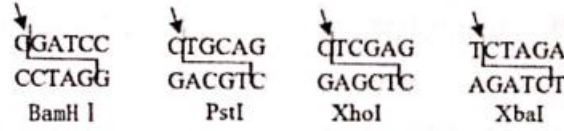


图 2

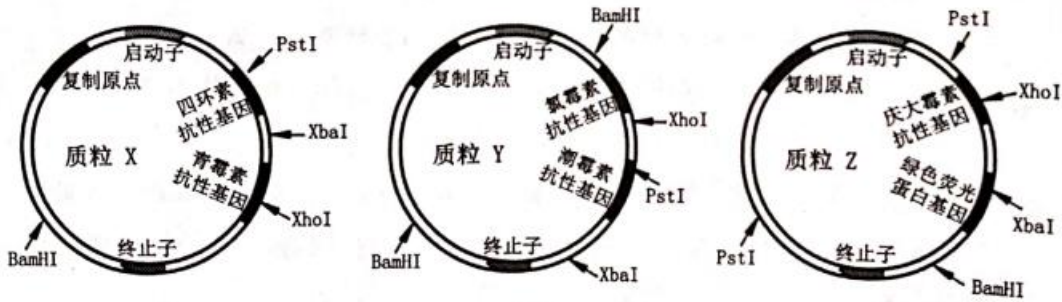


图 3

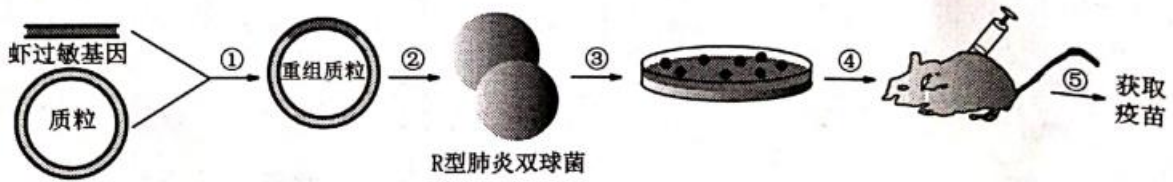


图 4

- (1) 过敏基因转录时，RNA 聚合酶的结合位点和终止密码的编码序列分别位于图 1 中的_____、_____区段；转录产生的 mRNA 碱基序列为（“方向为“5'→3'”）.若通过 PCR 技术大量扩增过敏基因的编码区段，则需要设计的一对引物序列分别是_____、_____（方向为 5'→3'，只要写出 5'端 8 个核苷酸序列）。
- (2) 据图 1、2、3 分析，构建基因表达载体时，应选用的限制酶是 X，最适合用作载体的质粒是_____。
- (3) 图 4 中，筛选含过敏基因的受体细胞时，按照上述选择的载体，培养基中需添加的抗生素是_____。
- (4) 能否用 S 型肺炎双球菌替代 R 型菌？_____，理由是_____。若在小鼠细胞中过敏基因得到表达，该蛋白质是一种_____（选填“抗原”或“抗体”），经提取分离后，制备疫苗。