|  |  |
| --- | --- |
| 姓名：　　　　　　　报考专业：　　　　　　　　　　　准考证号码： | 密封线内不要写题 |

|  |
| --- |
| **2020年攻读硕士学位研究生入学考试试题参考答案**  科目名称：分子生物学（■A卷□B卷）科目代码：616 |
| 注意：所有答题内容必须写在答题纸上，写在试题或草稿纸上的一律无效；考完后试题随答题纸交回。  一、将下列名词翻译成中文，并简要解释 (共6小题，每小题5分，共30分)  1、replicon：复制子。单独复制的一个DNA单元被称为为一个复制子，它  是一个可移动的单位。一个复制子在任何一个细胞周期只复制一次。  2、overlapping gene：重叠基因。具有部分共用核苷酸序列的基因，即同一段DNA携带了两种或两种以上不同蛋白质的编码信息。重叠的序列可以是调控基因，也可以是结构基因部分。  3、transacting factor：反式作用因子。能够结合在顺式作用元件上调控基因表达的蛋白质或者RNA。  4、codon：密码子：mRNA上每3个核苷酸翻译成多肽链上的一个氨基酸，这3个核苷酸被称为一个密码子（三联体密码）。  5、enhancer：增强子。能使与它连锁的基因转录频率明显增加的DNA序列，因为它也能强化转录的起始，但它们不是启动子的一部分。  6、transcription factor：转录因子。包括转录激活因子和转录阻遏因子。这类调节蛋白能识别并结合转录起始位点的上游序列或远端增强子元件，通过DNA-蛋白质相互作用而调节转录活性，并决定不同基因的时间、空间特异性表达。  二、简答题(共6小题，每小题15分，共90分)  **1、以大肠杆菌为例，简述蛋白质生物合成的基本过程。**  答：从以下四个方面详细论述  (1)氨基酸的活化：游离的氨基酸必须经过活化以获得能量才能参与蛋白质合成，由氨酰-tRNA合成酶催化，消耗1分子ATP，形成氨酰-tRNA。（3分）  (2)肽链合成的起始：由起始因子参与，mRNA与30S小亚基、50S大亚基及起始甲酰甲硫氨酰-tRNA(fMet-tRNAt)形成70S起始复合物，整个过程需GTP水解提供能量。（4分）  (3)肽链的延长：起始复合物形成后肽链即开始延长。首先氨酰-tRNA结合到核糖体的A位，然后，由肽酰转移酶催化与P位的起始氨基酸或肽酰基形成肽键，tRNAf或空载tRNA仍留在P位．最后核糖体沿mRNA5’→3’方向移动一个密码子距离，A位上的延长一个氨基酸单位的肽酰-tRNA转移到P位，全部过程需延伸因子EF-Tu、EF-Ts，能量由GTP提供。（4分）  (4)肽链合成终止，当核糖体移至终止密码UAA、UAG或UGA时，终止因子RF-1、RF-2识别终止密码，并使肽酰转移酶活性转为水解作用，将P位肽酰-tRNA水解，释放肽链，合成终止。（4分）  **2、简述PCR扩增的原理及步骤。**  答：PCR是在试管中进行的DNA复制反应，基本原理是依据细胞内DNA半保留复制的机理，以及体外DNA分子于不同温度下双链和单链可以互相转变的性质，人为地控制体外合成系统的温度，以促使双链DNA变成单链，单链DNA与人工合成的引物退火，然后耐热DNA聚合酶以dNTP为原料使引物沿着单链模板延伸为双链DNA（5分）。PCR全过程每一步的转换是通过温度的改变来控制的。需要重复进行DNA模板解链、引物与模板DNA结合、DNA聚合酶催化新生DNA的合成，即高温变性、低温退火、中温延伸等3个步骤构成PCR反应的一个循环，此循环的反复进行，就可使目的DNA得以迅速扩增（3分）。  DNA模板变性：模板双链DNA单链DNA，94℃。（2分）  退火：引物＋单链DNA杂交链，引物的Tm值。引物的延伸：温度至70 ℃左右， Taq DNA聚合酶以４种dNTP为原料，以目的DNA为模板，催化以引物3’末端为起点的5’→3’。（3分）  DNA链延伸反应，形成新生DNA链。新合成的引物延伸经过变性后又可作为下一轮循环反应的模板PCR，就是如此反复循环，使目的DNA得到高效快速扩增。（2分）  **3、简述蓝白斑筛选的原理。**  答：某些质粒带有大肠杆菌的半乳糖苷酶基因片段，在半乳糖苷酶基因的基  因区外又另外引入了一段含多种单一限制酶位点的DNA序列（5分）。这些位点上如果没有克隆外源性DNA片段，在质粒被导入lac-的大肠杆菌后，质粒携带的半乳糖苷酶基因将正常表达，与大肠杆菌的半乳糖苷酶基因互补，产生有活性的半乳糖苷酶，加入人工底物X-gal和诱导剂IPTG后，出现蓝色的菌落（5分）。如果在多克隆位点上插入外源DNA片段，将使lac Z基因灭活，不能生成半乳糖苷酶，结果菌落出现白色。根据这种颜色标志，从而区别重组克隆和非重组克隆。（5分）  **4、参与蛋白质生物合成的组分有哪些？它们具有哪些功能？**  答：参与蛋白质生物合成的组分有：  1）、mRNA：蛋白质合成的模板；（3分）  2）、tRNA：蛋白质合成的氨基酸运载工具；（3分）  3）、核糖体：蛋白质合成的场所；（3分）  4）、辅助因子：  （a）、起始因子—--参与蛋白质合成起始复合物形成；（2分）  （b）、延长因子—--肽链的延伸作用；（2分）  （c）、释放因子一--终止肽链合成并从核糖体上释放出来。（2分）  **5、简述真核生物与原核生物mRNA的区别。**  答：从分子结构上来看，真核生物和原核生物的mRNA是完全一样的，都是  核糖核酸，由四种核糖核苷酸组成，并且都是由基因转录而来。（3分）  但两者有很多区别，如下：  （1）原核生物mRNA常以多顺反子的形式存在。真核生物mRNA一般以单顺反子的形式存在。（3分）  （2）原核生物mRNA的转录与翻译一般是偶联的，真核生物转录的mRNA前体  则需经转录后加工，加工为成熟的mRNA后才开始工作。（3分）  （3）原核生物mRNA半寿期很短，一般为几分钟。真核生物mRNA的半寿期较长，有的可达数日。（3分）  （4）原核与真核生物mRNA的结构特点也不同。真核生物mRNA由5′端帽子结构、5′端不翻译区、翻译区、3′端不翻译区和3′端聚腺苷酸尾巴组成，原核生物mRNA无5′端帽子结构和3′端聚腺苷酸尾巴。（3分）  **6、简述RNAi技术原理及作用机制。**  答：RNA干扰技术利用双链小RNA高效、特异性降解细胞内同源mRNA从而阻断靶基因表达，是细胞出现靶基因缺失的表型。（3分）  其作用机制如下：双链RNA是RNAi的触发物，引发与之互补的单链RNA的降解。[核酸内切酶](https://baike.baidu.com/item/%E6%A0%B8%E9%85%B8%E5%86%85%E5%88%87%E9%85%B6)Dicer将dsRNA切割成多个具有特定长度和结构的小片段RNA（大约21～23 bp），即siRNA，并有效地定位目标mRNA。（3分）siRNA在细胞内RNA解旋酶的作用下解链成正义链和反义链，继之由反义siRNA再与体内一些酶（包括内切酶、外切酶、解旋酶等）结合形成RNA诱导的沉默复合物（RNA-induced silencing complex，RISC)。（3分）RISC与外源性基因表达的mRNA的同源区进行特异性结合，RISC具有核酸酶的功能，在结合部位切割mRNA。被切割后的断裂mRNA随即降解，从而诱发宿主细胞针对这些mRNA的降解反应。（3分）siRNA不仅能引导RISC切割同源单链mRNA，而且可作为引物与靶RNA结合并在RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase，RdRP）作用下合成更多新的dsRNA，新合成的dsRNA再由Dicer切割产生大量的次级siRNA，从而使RNAi的作用进一步放大，最终将靶mRNA完全降解。（3分）  三、论述题 (共1小题，共30分)  假设A基因编码的蛋白与B基因表达蛋白存在相互作用。请你根据自己熟悉的生物学知识设计至少三种实验方案进行验证，并阐述所选用实验技术的原理。  答:已知A基因编码的蛋白与B基因表达蛋白存在相互作用，我们可以通过以下试验来验证。  1）、酵母双杂交试验。酵母双杂交系统的建立得力于对真核生物调控转录起始过程的认识，是将待研究的两种蛋白质分别克隆（融合）到酵母表达质粒的转录激活因子的DNA结合结构域（DNA-BD）和转录激活域（AD）上，构建成融合表达载体，从表达产物分析两种蛋白质相互作用的系统。  转录激活因子往往由两个或两个以上相互独立的结构域构成，其中有BD和AD，它们是转录激活因子发挥功能所必需的。单独的BD虽然能和启动子结合，但是不能激活转录。而不同转录激活因子的BD和AD形成的杂合蛋白仍然具有正常的激活转录的功能。在酵母双杂交系统中，将蛋白A克隆至DNA-BD载体中，表达DNA-BD/A融合蛋白；待测试蛋白B克隆至AD载体中，表达AD/B融合蛋白。一旦A与B蛋白间有相互作用，则DNA-BD和AD也随之被牵拉靠近，恢复行使功能，激活酵母双杂交系统中报告基因的表达。（10分）  2）、免疫共沉淀试验：免疫共沉淀（Co-Immunoprecipitation）是以抗体和抗原之间的专一性作用为基础的用于研究蛋白质相互作用的经典方法。是确定两种蛋白质在完整细胞内生理性相互作用的有效方法。其原理是：当细胞在非变性条件下被裂解时，完整细胞内存在的许多蛋白质－蛋白质间的相互作用被保留了下来。当用预先固化在Agarose beads上的蛋白质A的抗体免疫沉淀A蛋白，那么与A蛋白在体内结合的蛋白质B也能一起沉淀下来。再通过蛋白变性分离，对B蛋白进行检测，进而证明两者间的相互作用。这种方法得到的目的蛋白是在细胞内与兴趣蛋白天然结合，符合体内实际情况，得到的结果可信度高。这种方法常用于测定两种目标蛋白质是否在体内结合；也可用于确定一种特定蛋白质的新的作用搭档。（10分）  3）、表面等离子共振技术：表面等离子共振技术（Surface Plasmon Resonance， SPR），是一种光学现象，可被用来实时跟踪在天然状态下生物分子间的相互作用。先将一种生物分子（靶分子）结合在生物传感器表面，再将含有另一种能与靶分子产生相互作用的生物分子（分析物）的溶液注入并流经生物传感器表面。生物分子间的结合引起生物传感器表面质量的增加，导致折射指数按同样的比例增强，生物分子间反应的变化即被观察到。（10分）  4）、GST pull-down技术：该技术 GST（glutathione-S-transferase），即谷胱甘肽-S-转移酶蛋白，可以与谷胱甘肽（Glutathione，GSH）结合。将GSH固定于琼脂糖珠上，形成GSH-琼脂糖珠，将已知蛋白X与GST融合表达，获得的GST-X可与GSH-琼脂糖珠结合，若环境中存在与X蛋白互做的蛋白Y，则会形成“琼脂糖珠-GSH-GST-X-Y”复合物，与X蛋白互做的蛋白即可被分离并检测。 |