

第23届国际生物学奥林匹克竞赛试题

实验1·分子生物学和细胞生物学

王健¹ 李俊红² 范六民³ 梁前进¹

(1 北京师范大学生命科学学院 北京 100875 2 中国科学院动物研究所 北京 100101

3 北京大学生命科学学院 北京 100871)

中国图书分类号:G634.915 文献标识码:E

总分:100分 时间:90 min

本次实验需要完成以下任务:利用限制性核酸内切酶切割DNA片段,并进行基因作图。

A部分 确定是否已将人类DNA插入到了1个克隆质粒中(80分)。

B部分 确定DNA片段插入的方向(20分)。

材料、仪器设备

材料、仪器设备	数量	单位
限制性核酸内切酶 RE1 (<i>NdeI</i>) (保存在冰上)	4 μL	管
限制性核酸内切酶 RE2 (<i>EcoRI</i>) (保存在冰上)	4 μL	管
在酶缓冲液中的 DNA 待测样本 (标有“T”字样) (在冰上)	10 $\mu\text{L} \times 4$	管
miliQ 品牌的纯水 (标有“W”字样)	1	管
DNA 凝胶电泳槽和电源	1	套
微量移液器和装在盒子中的吸头 (量程为 10 μL 和 100 μL)	2	件
秒表	1	件
DNA marker (标有“L1”字样的 marker 为 100 bp, 标有“L2”字样的 marker 为 1 000 bp) (在冰上)	2	管
DNA 上样染液 (蓝色)	1	管
配好的凝胶 (已放置在电泳缓冲液中)	1	件
大培养皿 (电泳成像时存放电泳凝胶)	1	件
标有中国代码的卡片 (在一个卡片盒中), 供你请求帮助时使用	1	件
可以漂浮在水面上的离心管架 (标有中国代码)	1	件
小型离心机	1	套
37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴设备 (供你使用的水浴设备已分配好)	1	套
凝胶成像设备 (供你使用的成像设备已分配好)	1	套

任务 利用限制性核酸内切酶切割DNA片段,并进行基因作图

简介

遗传作图技术是目前在DNA片段顺序和特异性分析工作中普遍使用的一项技术。在这项技术中,用多种不同的限制性核酸内切酶切割DNA后,可以产生特定的DNA片段,然后通过DNA凝胶电泳呈现出DNA片段的特异性。它在基因克隆、基因功能和调节的研究、寻找疾病的候选基因,以及疾病诊断和司法工作中起到非常重要的作用。

A部分 确定是否已将人类DNA插入到了1个克隆质粒中

运用这项技术确定已经将人类的基因片段“X”(约760 bp)插入到了1个克隆质粒或运载体“V”(环状,约2 570 bp)中。你需要根据以下DNA温育和电泳步骤,设计和实施DNA切割实验。对DNA“T”和限制性核酸内切酶进行温育,然后进行电泳。电泳结束后,电泳结果将通过DNA染色(染色过程由实验技术人员进行操作)显示出来,并对结果进行分析和数据解释。

步骤

1. 根据下表设计总量为20 μL 的DNA酶切反应系统(最多设计4管反应体系)。

	离心管 1	离心管 2	离心管 3	离心管 4
DNA 'T' (带有缓冲液)	10	10	10	10
酶 RE1 (<i>NdeI</i>)		1		
酶 RE2 (<i>EcoRI</i>)		0		
水		9		
总计		20		

Q1.1. 在表格中写出各反应物的体积(单位: μL)。表格中已经给出一个示例。(20分)

2. 根据表格中的数据,用移液器吸取相应体积的反应物,加入到各离心管中,并用移液器轻轻吹打几次,以使反应体系混匀。注意对每个离心管

进行标记。在混合反应物制备反应体系时,请勿污染各个样品。每次操作都需更换新吸头。(20分)

注意:1)吸取的液体量少于 10 μL 时需使用量程为 10 μL 的微量移液器(吸放液按钮为白色);2)操作时要细心,如果由于个人原因导致样品不足,需额外补充样品,考试成绩将被扣掉。

3. 将上述 4 个离心管放在小型离心机中旋转(注意离心机的平衡,4 个离心管两两相对放置)。在实验操作过程中,以及离心旋转后,4 个离心管要一直放在冰上。

4. 待 4 个离心管中的反应体系都准备完毕,将其从冰上转移到可漂浮在水上的离心管架中,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中温育 20 min。请做好标记,确保 20 min 后能够找到自己的样品。

5. 在等待温育的 20 min 内,请回答问题 Q1.2 和 Q1.3:

Q1.2. 判断下列说法的正误,正确的画“ \checkmark ”,错误的画“ \times ”。(2分 \times 5=10分)

a. 每种限制性核酸内切酶在特定序列处对 DNA 进行切割

b. 每种限制性核酸内切酶只在 3'端和 5'端对 DNA 进行切割

c. 限制性核酸内切酶在 4 $^{\circ}\text{C}$ 时对 DNA 的切割效果最佳

d. 限制性核酸内切酶可以在室温下保存数月之久

e. 与核酸外切酶不同,限制性核酸内切酶只能切割 DNA 的内部

Q1.3. 判断下列说法的正误,正确的画“ \checkmark ”,错误的画“ \times ”。(2分 \times 5=10分)

a. DNA 片段都带有正电荷

b. 较小的 DNA 片段在电流的作用下能够较快地在凝胶中移动

c. 较小的 DNA 片段比较大的片段携带的电荷少,因此,小片段在凝胶中的穿行速度更快

d. 凝胶的相对密度影响 DNA 分离所需的时间

e. 电泳所用的电压取决于凝胶中的 DNA 上样量

6. DNA 切割温育 20 min 后,从水浴中取出你的 4 个装有反应体系的离心管。

7. 在每个离心管中分别加入 4 μL 上样染液(蓝色),用移液器轻轻吹打几次,使染液与反应

体系混合;用小型离心机离心,使内壁上的残留液体混入反应体系。

8. 使用 100 μL 量程的微量移液器(吸放液按钮为黄色)吸取 15 μL 上述液体,然后将其滴加到琼脂糖凝胶的上样孔中。要确保移液器的吸头在上样孔正上方,轻轻地将样品滴加到上样孔中,而不能滴在孔外。然后再分别取 15 μL DNA marker L1 和 L2,滴加到相应的上样孔中。在凝胶的上样孔中由左到右按照如下顺序上样。

左

Marker L1	离心管 1	离心管 2	离心管 3	离心管 4	Marker L2
-----------	-------	-------	-------	-------	-----------

 右

9. 盖上电泳槽的盖子,然后连接电源,在 100 V 电压下电泳 20 min。应小心操作,不要碰触电极的任何部位和电源。

10. 要定期检查上样孔中的样品,以确保其向正极移动。如果你需要帮助,以确保样品在凝胶中的正确移动,请用操作台右侧墙壁边上的信号卡片向实验技术人员示意。

11. 在等待电泳时,请回答问题 Q1.4,并将答案写在答题纸上。

Q1.4. 现有一个线性的人类 DNA 片段(1 kbp),若用一种特定的限制性核酸内切酶 RE3 切割,产生大小分别为 650 bp 和 350 bp 的 2 个片段。若用限制性核酸内切酶 RE4 切割,则产生的 2 个片段大小为 800 bp 和 200 bp。若用 RE3 和 RE4 2 种酶同时切割该人类 DNA 片段,则可产生 3 个片段,大小分别为 650 bp、200 bp 和 150 bp。

请根据下图所示的范例,画出该 DNA 片段的线性图,需在图上标出酶 RE3 和 RE4 的切点部位。(20分)



12. 电泳 20 min 结束后,关闭电源,打开电泳槽的盖子。小心地将凝胶(一直放在凝胶托盘上)转移到大培养皿中。将凝胶带到为你分配好的凝胶成像设备处,由实验技术人员为凝胶照相。

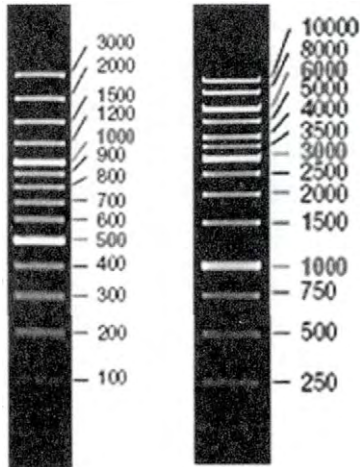
13. 将凝胶和成像图一同带回到你的实验台,出示信号卡,由监考人员帮助你为成像图钉在答题纸上相应的空白处。

Q1.5. 将电流成像图粘贴于答题纸上,通过电泳成像图的质量评价你的凝胶电泳技术水平。

(10分)

14. 根据凝胶电泳图,回答问题 Q1.6~Q1.10, 并将答案写在答题纸上。

Q1.6. 根据下图所示的 DNA marker(分子量标准。单位为碱基对,即 bp),估测电泳结果中的片段大小。可以在所需估测大小的条带与 marker 之间划一条横线,以便于估测。用酶 RE1 和 RE2 对样品 DNA 进行切割后,分别可以产生几个片段? 其大小分别为多少? 请用数字作答。(1分×5=5分)



L1:100 bp DNA Marker L2:1 kb DNA Marker

	RE1	RE2
酶切后形成的片段数		
估测片段大小		

Q1.7. DNA 样品(T)的估测大小是多少? 用数字作答。(1分)

Q1.8. 根据估测结果,请判断 DNA 样品(T)比空的运载体大、小,还是一样大。在正确选项的对应空格中画“√”。(1分)

大	小	一样大

Q1.9. 你所检测的 DNA 样品(T)中是否含有插入序列? 如果有插入序列,请在 _____ 上画“√”;如果没有,则画“×”。(1分)

Q1.10. 在电泳时,未经切割的 DNA 比任何用酶 RE2 切割后的片段移动得都要快,为什么? 请在正确选项后画“√”。(2分)

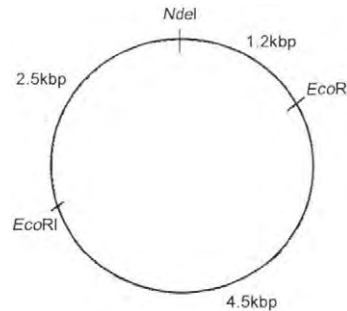
a. 未经切割的 DNA 片段较小是 DNA 降解的缘故

b. 未经切割的 DNA 更加紧凑致密,因此在凝胶中的移动速度更快

c. 切割后,酶 RE2 依然结合在 DNA 上,因此降低了 DAN 片段在凝胶中的移动速度

B 部分 确定 DNA 片段的插入位点(20分)

Q1.11. 构建 DNA 样品(T)可能的限制性酶切图谱。请根据下图所示的范例,在答题纸上画出 DNA 样品(T)的限制性酶切图谱,并标出酶 RE1 和 RE2 的相对酶切位点及其之间的距离。



(待续)

(E-mail:wangj@bnu.edu.cn)

病毒活体示踪技术问世

中国科学院深圳先进技术研究院生物医药与技术研究所研究员蔡林涛、马轶凡两课题组通力合作,在前期研究工作基础上,进一步发展出病毒活体示踪技术用于观察病毒颗粒在体内的实时分布,这一技术将为解析病毒在体内的感染路径提供重要的手段。

两课题组合作,用生物正交化学方法对流感病毒(颗粒)进行了标记,在活体水平对其侵染宿主的过程进行了长时效示踪,发展了一种非侵入的实时示踪病毒(颗粒)感染途径的光学活体成像方法,并应用于抗病毒药物的筛选与评估。

摘自《中国科学报》2014年5月19日

破解“转录中央控制器”模块架构

近日,中国科学技术大学生命科学学院教授蔡刚研究组在国际权威杂志《细胞研究》在线发表的最新研究成果首次破解了“转录中央控制器”——中介体的模块化结构,颠覆了影响转录研究领域长达十余年的错误认识。

中介体在转录中扮演关键角色,被称为“转录中央控制器”。蔡刚研究组采取“庖丁解牛”的研究策略,将完整中介体肢解成各个模块和模块的组合,通过细致比较中介体及其各个功能模块组合的精细三维结构,首次清晰划分了各个模块,重新定义了中介体的模块化的组织架构。该成果对揭示基因表达及其调控的分子机制,理解细胞增殖、发育及分化的机理具有重大意义。

摘自《中国科学报》2014年5月26日