2017

1、张惠展

P53和p21是两个功能相似的蛋白，构建到相同的载体，在大肠杆菌中表达，p21能表达 但是p53不能，可能的原因？

2、何杰

Bright-field microscope，phase-contract microscope，dark-field microscope，以及微分干涉相差显微镜，四选三，说明原理和优缺点

3、严军

CpG岛，在基因中存在的概率20%，正常基因CG比例为50%，给一段序列，用贝叶斯方程算出是CpG岛的概率

4、胡苹

Fox是一个转录因子，缺失小鼠表现为肥胖。设计实验说明Fox调控靶基因的分子机制

16年

1. 费俭

请以线虫为模式生物研究人类的抑郁，设计实验说明你的研究思路

2. 陈荣

2.1 说明负染、冷冻电镜、免疫电镜各自在其应用领域的优点

2.2 冷冻电镜的单电子三维重构较X射线单晶衍射学的的优点

2.3 设计实验证明验证生物大分子有几个亚基，及亚基的空间结构（头对头等等）

3. 廖侃

设计实验证明与蛋白质A相互作用的具体是什么蛋白质，之后验证两蛋白质之间是直接相互作用，紧接着证明两蛋白质相互作用的结构变化及功能作用。

4. 胡苹

已知肌肉萎缩是某个基因

2015年实验生物学期中考试试题

1.主讲老师：张惠展

研究显示，临床上几乎所有的癌症患者体内均伴有肿瘤抑制因子p53蛋白或其编码基因的缺失突变，因此规模化生产重组人p53蛋白有可能为癌症治疗提供一条新的途径。前期相关研究将人类p53及其功能相似的伙伴p21的cDNA编码序列分别克隆在同一种大肠杆菌的表达质粒上，由此获得的p21目的重组子能表达出相应的p21重组蛋白，但p53目的重组子却不能。试分析可能的原因。

2.主讲老师：周兆才

蛋白质结构技术在当今生命科学及医药研发等领域具有不可或缺的作用，请结合实例简述其应用概况及要点。

3.主讲老师：钟杨

假定一个生物学实验室刚刚完成青蒿的全基因组测序，请问可以结合已有的基因组信息（包括疟原虫和人类全基因组等）和已知的青蒿素等靶标开展哪些生物信息学研究？

4.主讲老师：仇子龙

目前需要研究基因A对小鼠神经元形态发育的功能，请设计以下实验完成这个工作。（实验设计细节需要说明，特别要突出设计载体的方法及测试的细胞系统及基因导入方法）

1.利用short hairpin RNA的方法敲减该基因，在293T培养细胞中验证敲减shRNA的效率，注意shRNA载体需要携带GFP标签。（整合载体质粒、包装质粒、信封质粒共转染，做q-PCR）

2.在原代培养的神经元中验证基因敲减效率。（电转进shRNA，做q-PCR或WB）

3.设计基因过表达载体，需要与GFP同时表达。

4.在原代培养的神经元中研究敲减与过表达GeneA对神经元的形态发育影响。（突出基因导入的方法，不需要谈具体的实验细节）

2014年第一学期《实验生物学》考试试题（期中）

考试时间：2h 分值：50分，16.5分/题 考试方式：闭卷，四选三

1.主讲老师：费俭

利用雄原核显微注射方法制备转基因小鼠，经常不能获得转基因正确表达的小鼠品系，其中的原因主要是什么?

2.主讲老师：胡萍

前期实验结果提示常发生于肾脏的疾病甲可能是由于转录因子F发生突变，因而导致对于下游的靶基因调控失灵造成的。F下游的靶基因包括编码蛋白和非编码RNA。请设计是按验证上述假说，并阐述F对靶基因调控失灵诱发疾病甲的可能机制。请写明实验设计的逻辑推理过程，指明每步所需试验的名称和相关的正对照和负对照。

3.主讲老师：肖华胜

请简述基因芯片的基本原理，主要制备方法以及在生物医学研究中的主要应用。

4.主讲老师：李斌

请简述单细胞测序的概念内涵，主要内容，应用领域以及如何突破当前单细胞应用的技术局限性。

2013年

1. 周兆才

试论述蛋白质结构定性相关的主要化学相互作用（共价与非共价），从四个方面简述蛋白质结构技术应用实例

共价相互作用：二硫键（对环境敏感）

金属配位键（Kd从mM到nM，体外实验需特别考虑弱结合情况）

辅因子共价结合（某些蛋白需要小分子、DNA或者其他蛋白质稳定其结构）

翻译后修饰可改变蛋白质三级结构及其稳定性

非共价相互作用：氢键：在稳定蛋白质的结构中起着极其重要的作用

范德华力：包括定向效应、诱导效应、分散效应，其中最主要为分散效应

疏水作用：蛋白折叠是总是倾向于把疏水基团埋藏在分子内部

盐键（离子键）：正电荷与负电荷之间的一种静电引力

蛋白质结构与技术应用实例：

1. 结构从精确相互作用角度帮助建立蛋白质发挥活性与功能的调控机制

如血红蛋白(hemoglobin,简写Hb)。Hb分子由四个亚基构成，每一亚基结合一分子血红素。正常成人Hb分子的四个亚基为两条α链，两条β链。α链由141个氨基酸残基组成，β链由146个氨基酸残基组成，它们的一级结构均已确定。每一亚基都具有独立的三级结构，Hb是通过其辅基血红素的Fe++与氧发生可逆结合的，血红素的铁原子共有6个配位键，其中4个与血红素的吡咯环的N结合，一个与珠蛋白亚基F螺旋区的第8位组氨酸(F8)残基的咪唑基的N相连接，空着的一个配位键可与O2可逆地结合，结合物称氧合血红蛋白。Hb在体内的主要功能为运输氧气，而Hb的别位效应，极有利于它在肺部与O2结合及在周围组织释放O2。

1. 结构从原子水平上揭示关键蛋白质特定氨基酸突变如何导致人类疾病

在蛋白质的一级结构中，参与功能活性部位的残基或处于特定构象关键部位的残基，即使在整个分子中发生一个残基的异常，那么该蛋白质的功能也会受到明显的影响。被称之为“分子病”的镰刀状红细胞性贫血仅仅是574个氨基酸残基中，一个氨基酸残基即β亚基N端的第6号氨基酸残基发生了变异所造成的，这种变异来源于基因上遗传信息的突变

3、结构的可视化特征帮助进行药物筛选与理性设计和优化：

如GPCR，已知结构，构建模型和计算机算法，导入小分子化合物库搜索与口袋特异性结合的活性分子，再对其进行计算机模拟基团优化，进一步实验合成该小分子化合物

4、结构从构象变化角度帮助建立生物学现象与过程的微观机制：裂解LINC复合物导致细胞失去机械强度和故障。

1. 刘小龙

流式细胞仪一维图细胞周期标注，看图确定是否某药物具有诱导细胞分化的作用，否的话还需要什么参数

略

1. 陈荣

电镜技术在生命科学研究中有着广泛的应用，请分别对负染、免疫电镜、冷冻电镜样品制备方法及应用做简要描述，并试着应用你所学习到的电镜技术回答下列问题：怎样确定某种同源寡聚复合体究竟由几个亚基组成，假定你可以获得其他相关试剂材料。

负染：用重金属盐如磷钨酸或醋酸双氧铀对铺展在载网上的样品进行染色；吸去染料，样品干燥后，样品凹陷处铺了一薄层重金属盐，而凸的出地方则没有染料沉积，从而出现负染效果。有助于用电镜研究小的、游离的悬浮物，如病毒，细胞器，如叶绿体，线粒体等

冷冻电镜：快速冷冻使含水样品中的水处于玻璃态，也就是在亲水的支持膜上将含水样品包埋在一层较样品略高的薄冰内。常用于生物大分子的三维结构研究。

免疫电镜：1低温包埋超薄切片法制备免疫电镜标本；2冰冻超薄切片法制备免疫电镜标本对肿瘤的发病机制、诊断、鉴别诊断等研究有重要意义；可以用于检病毒的检测，灵敏度高；细胞内某些生物活性物质的定位

1. 钟扬

假定人们对已知某种从深海捕获的未知鱼类测定了全基因组序列，你认为哪些生物信息学方法可以用来较好的了解其生物学活性和功能，试简述原因。?

见下

BLAST：~P,~X（结构）,~N(功能),T~N,T~X,双向BLAST,Mega-BLAST,PSI-BLAST

2012年实验生物学期中考试

1. 张惠展

简述将基因A构建到载体B上面的方法。

即重组载体构建策略，切、接—转—增—筛

1. 廖侃

现通过Co-IP实验得到蛋白A与蛋白B之间有相互作用，如何设计实验验证此相互作用不是非特异性相互作用。再以此相互作用为基础进行进一步实验使其成为一篇能发表的文章。

1、设计实验组：将A蛋白作为靶蛋白，B蛋白作为目的蛋白进行免疫共沉淀，在体系中加入A，B蛋白，加入一种A蛋白的抗体，孵育后加入于抗体特异性结合的固定于Pansobin珠上的SPA，离心，得到一种复合物，进行western blot。

为避免抗体与B蛋白结合的情况，设计一个对照组：体系中加入B蛋白，加入同一种A蛋白的抗体，孵育后加入于抗体特异性结合的固定于Pansobin珠上的SPA，离心，得到一种复合物，进行western blot。

若实验组得到A,B，而对照组没有得到B，则可证明蛋白A,B可能是特异性相互作用。

2、为进一步验证A,B是否是特异性相互作用，设计以下实验：

➀用放射性同位素标记A蛋白，A蛋白溶液测其放射性

➁在A蛋白中加入B蛋白，孵育后，加入一种B蛋白的抗体，孵育，加入与抗体特异性结合的固定于Pansobin珠上的SPA，离心。测其上清液的放射性。

➂寻找一种于蛋白A特异性相互作用的蛋白X，将蛋白A和X混合孵育，加入一种X蛋白的抗体，孵育，加入与抗体特异性结合的固定于Pansobin珠上的SPA，离心。测其上清液的放射性。

若➁➂测得放射性量相似，且小于➀中的量，说明蛋白A,B是特异性相互作用

3、使用其他方法验证，根据AB结合后的功能，进行酵母双杂交等

1. 仇子龙

题目过长，主要为选择载体构建基因A与shRNA重组载体转染神经元细胞，设计实验方案研究过表达与敲低基因A对神经元生长的影响。

略

1. 肖华胜

简述基因芯片的原理、制作方法以及在生命科学中的应用。

基因芯片的原理：

是通过微阵列技术将高密度DNA片段通过高速机器人或原位合成方式以一定的顺序或排列方式使其附着在如膜、玻璃片等固相表面，以同位素或荧光标记的DNA探针，借助碱基互补杂交原理，进行大量的基因表达及监测等方面研究的最新革命性技术。

基因芯片的制作方法：

基因芯片的制作一般有2 种方法，一种为原位合成，适用于寡核苷酸；另一种为合成后交联（微点阵），多用于大片段DNA，有时也适用于寡核苷酸，甚至mRNA。

1、原位合成法

此方法制作的芯片常被称作DNA 芯片，即在芯片上原位合成寡核苷酸探针，合成的探针被直接有序地固化于支持物上，以用于杂交分析。原位合成法制备的芯片是高密度的，核酸探针长度一般小于25mer，最适用于DNA 再测序、查明点突变，以及基因转录表达分析等。在固相介质表面制作基因芯片的方法有以下几种。

(1)光导原位合成法

在经过处理的载玻片表面铺上一层连接分子（linker），其羟基上加有光敏保护基团，可用光照除去，用特制的光栏（light mask）保护不需要合成的部位，而暴露合成部位。在光作用下去除羟基上的保护基团，游离羟基，利用化学反应加上第一个核苷酸，所加核苷酸种类及在芯片上的部位预先设定，引入的核苷酸带有光敏保护基团，以便下一步合成。然后按上述方法在其他位点加上另外3种核苷酸完成第一位核苷酸的合成。

(2)电压打印法

其技术原理与喷墨打印机相似。由打印机将4 种核苷酸合成试剂分别打印到经包被的支持物的特定区域上，然后冲洗、去保护，进行寡核苷酸合成的下一循环。

(3)流体通道合成法

在玻璃介质的表面铰链一系列的1mm硅胶管，形成通道，DNA合成试剂被引入通道，通过变换微流体模板，可以在玻片上合成不同序列的寡聚核苷酸探针。

(4）分子印章法

其原理是通过光刻硅胶板，形成分子印章，涂覆DNA合成试剂，按一定顺序压印在基片表面，合成不同的寡聚核苷酸探针。

(5)机械点涂法

通过高精密机械控制的墙头与芯片表面接触而将寡聚核苷酸定位点滴到芯片特定的位置上。

2 合成后交联法

以此方法制作的芯片多被称为微点阵，即将较大的核酸片段（大于100bp）物理地固定在介质上。该方法的探针制备是在芯片以外采用常规分子生物学技术获得的，如PCR、分子克隆、人工合成DNA 片段等。将制备好的探针通过手工或自动点样装置点在经特殊处理的载玻片或其他材料上即可，主要用于诊断、检测病原体及其他特殊要求的中、低密度芯片的制备。

基因芯片在生命科学研究中的应用：

1、 基因表达分析

同一组织细胞在不同的发育阶段、不同外界环境因素影响下，其基因的表达模式不同。同一个体的不同组织器官的基因表达模式也不相同。基因芯片技术由于具有高度并行性和高通量的特点正适合于此项研究。

2 、基因突变和多态性分析

在进化过程中同一物种不同种群和个体之间存在着不同的基因型，这些不同的基因型与生物个体间不同的性状有着密切的关系。利用基因芯片可以对基因型与性状之间的关系进行研究。

3、 基因组DNA序列分析

 由A、T、C、G4种核苷酸单体组合所形成的所有可能把具体寡核苷酸探针共 有65536种。将这些种类的探针全部固定于活化的载体表面，形成寡核苷酸阵列。然后芯片与样品进行杂交，通过计算机对杂交模式进行分析，就可以得出样品的核苷酸序列信息。

4、 核酸和蛋白质相互作用的研究

蛋白质与特定的核酸片段结合对基因的表达起着重要的调控作用，通过对蛋白质与核酸相互作用的研究，人们可以更深入地了解生命活动的内在机制。

2011年实验生物学期中考试

1、胡苹

初步实验证明细胞在生长因子的作用下，可产生核蛋白X，核蛋白X可能影响基因A的表达。请设计实验证明核蛋白X是否直接与基因A的转录因子结合，并证明核蛋白X对基因A的影响，以及如何影响。

（1）核蛋白X和基因A转录因子互作验证

酵母双杂交，构建核蛋白X基因+GAL4 DB和基因A转录因子编码基因+GAL4 转录因子结合域+基因A两个重组载体，做两个对照，GAL4对基因A的表达影响以及转录因子对基因A的影响，再根据基因A的表达差异性判断是否存在直接相互作用

（2）、核蛋白X和基因A

敲除核蛋白X编码基因，方法有crisper CAS 9、RNAi等，观察基因A的表达情况，上调或下调或不变

过表达核蛋白X，对比

单独表达A，对比

2、钟杨

请列举目前较为可靠的基因功能预测的方法，并分别说明其优势和局限性。

1，翻译蛋白质比对:BLASTX,TBLASTN,TBLASTX

2，蛋白质结构预测：二级结构预测，三级结构预测（从头预测，同源预测）

3，蛋白功能预测：同源类比，虚拟筛选，模拟生物过程

优点：1、能够定义出内含子、外显子结构，确定基因结构、检测假基因等；2、检测编码区中核苷酸的相关性准确度更高；2、可以较方便区别编码与非编码区1、可以提高敏感性和特异性；2、既能处理完整的基因，也能处理不完整的基因

以上方法主要存在的问题有： 假阳性，假阴性，融合化，片段化，过界预测等

3、陈荣

现在的电镜主要分为透射电镜和扫描电镜两大类。请分别说明这两类电镜的成像原理，举一例说明其在生物研究中的应用。透射电镜与光学显微镜光路设计相似，但前者的分辨率比后者高很多，请说明决定分辨率的因素是什么？电镜观察中有许多技术的应用，请说明负染技术和免疫电镜技术，并举一例其在生物学研究中的应用。

扫描电子显微镜：电子束不穿过样品，仅以电子束尽量聚焦在样本的一小块地方，然后一行一行地扫描样本。入射的电子导致样本表面被激发出次级电子。显微镜观察的是这些每个点散射出来的电子，放在样品旁的探测器接收这些次级电子，通过放大后调制显像管的电子束强度，从而改变显像管荧光屏上的亮度。显像管的偏转线圈与样品表面上的电子束保持同步扫描，这样显像管的荧光就显示出样品表面的形貌图像。

透射电子显微镜：因电子束穿透样品后，再用电子透镜成像放大而得名。它的光路与光学显微镜相仿，可以直接获得一个样本的投影。通过改变物镜的透镜系统，可以获得电子衍射像。样品较薄或密度较低的 部分，电子束散射较少，这样就有较多的电子通过物镜光阑，参与成像，在图像中显得较亮。反之，样品中较厚或较密的部分，在图像中则显得较暗。如果样品太厚 或过密，则像的对比度就会恶化，甚至会因吸收电子束的能量而被损伤或破坏。

决定透射电镜分辨率的因素：1、电磁透镜的分辨本领受到透镜像差的影响。 2、电磁透镜中的球差至今无法通过某种方法得到有效的补偿，以致球差便成为限制电磁透镜分辨本领的主要因素。提高透镜分辨本领的可行的方法之一是采用很小的孔径角成像

负染，免疫电镜见上

4、费俭

请列举现在常用的三种模式生物，说明其在生命科学研究中的贡献及现在的主要应用。

（1）大肠杆菌：是分子生物学，遗传学和生物化学研究中的重要模式生物，也用于人感染性疾病和其他微生物研究的模式生物。

优势：①适合实验室培养（可以液体培养和固体培养） ，培养条件简单，生长迅速。②安全，克隆方便，基因操作简便。③已完成测序，4400 基因。

（2） 酵母：是分子生物学，遗传学，生物化学，真核细胞周期调控，信号转导等研究

优势：① 它是单细胞的真核生物，适合实验室培养（可以液体培养和固体培养）。② 安全性好，克隆方便，基因操作简单③ 可以有丝分裂，也可以出芽生殖；可以以单倍体和双倍体生长，且可在实验条件下较方便地控制单倍体和二倍体之间的相互转换④ 完整基因组已测序，有 16 条染色体，约 6000 个蛋白编码基因，基因结构紧凑

（3）线虫：是研究发育（细胞命运决定）、 细胞凋亡、细胞迁移、 神经系统的重要模式生物，

优势：① 成虫大小约 1mm，实验室饲养简单，以细菌为食，生命周期短，保种方便，大部分为雌雄同体（雄虫占 0.05%），且不具寄生性② 所有的细胞谱系清楚，人们已经建立了完整的线虫从受精卵到所有成体细胞的谱系图。③ 转基因和RNAi等遗传操作成熟 ④已完成基因组测序，有 5 对常染色体，1对性染色体，约20000个基

因

（4）果蝇：是遗传学，发育生物学理想的模式生物

优势：①个体小，3mm，适合实验室饲养，生命周期短，繁殖力强②具有成熟的遗传操作的方法，具备众多的突变品系，有特殊的染色体结构。③有比较复杂的行为能力④ 测序已完成，3对常染色体， 1 对性染色体，14000 基因

（5）斑马鱼：主要用于遗传和发育学研究，是进行胚胎发育机理和基因组研究的好材料

优势：① 个体小，淡水饲养，繁殖周期短，产仔频繁且量高，适合实验室养殖。② 脊椎动物，胚胎发育周期短，遗传操作方法成熟，其个体发育是在全透明状态下完成的，是进行胚胎发育机理和基因组研究的好材料③拥有大量突变体，可以模拟人类疾病模型。④测序完成，25 对染色体，30000基因

小鼠：是生物医学研究中广泛使用的模式生物，可用于生物效应测定和药物效价比较、药物的筛选、放射学研究，以及各种生理病理研究，是研究哺乳动物和人类基因功能的模式生物。

优势：① 是最小的哺乳动物之一，时代周期较短，饲养管理费用低② 生物进化上与人类接近③胎盘形成和早期胚胎发育与人类相近，组织器官结构和细胞功能与人类相近④ 有高级神经活动⑤ 小鼠基因测序计划已经完成，人类 99%的基因存在于小鼠，基因同源性高

达 78.5%；基因组 93%的区域基因排列顺序与人类相同⑥ 基因组改造技术成熟，

何杰 （四大成像原理）

1. Bright-field microscopy明视野显微镜

透射光通过聚焦镜汇聚到样品上，形成一个锥形的明亮光束并通过样品进入物镜，标本中各点依其光吸收的不同在明亮的背景中成像；用于观察经染色或本身具备颜色的细胞（活细胞）、组织片等标本，不适于无色（完全透明）的样本。

1. Phase-contrast microscopy相差显微镜

光源通过环状光阑的透明环，经聚光器后聚成光束，这束光线通过被检物体时，因细胞各部分的折射率和厚度的不同，导致透过各部分光线的光程不同而发生不同程度的偏斜（衍射）。由于透明圆环所成的像恰好落在物镜后焦点平面和相板上的共轭面重合。因此，未发生偏斜的直射光便通过共轭面，而发生偏斜的衍射光则经补偿面通过。由于相板上的共轭面和补偿面的性质不同，它们分别将通过这两部分的光线产生一定的相位差和强度的减弱，两束光线再经后透镜的会聚发生光的干涉，变相位差为振幅差（明暗差），从而使原来透明的物体表现出明显的明暗差异，对比度增强，可观察活细胞及细胞内的某些细微结构。

1. Nomarski differential-interference-contrast microscopy微分干涉差显微镜

两束偏振光在穿过标本相邻的区域后，由于标本的厚度和折射率不同，引起了两束光产生了光程差，在物镜的后焦面的DIC滑行器，它把两束光波合并成一束,检偏器将两束垂直的光波组合成具有相同偏振面的两束光，从而使二者发生干涉,两束偏振光的光程差决定着透光的多少。光程差值为0时，没有光穿过检偏器;光程差值等于波长一半时，穿过的光达到最大值。于是在灰色的背景上，标本结构呈现出亮暗差。不仅能观察无色透明的物体，显示结构的三维立体投影影像。

4 Dark-field microscopy暗视野显微镜

利用丁达尔(Tyndall)光学效应的原理，聚光镜中央有挡光片，使照明光线不直接进人物镜，只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜，因而视野的背景是黑的，物体的边缘是亮的。常用来观察未染色的透明样品。这些样品因为具有和周围环境相似的折射率，不易在一般明视野之下看的清楚，于是利用暗视野提高样品本身与背景之间的对比。只能看到物体的存在、运动和表面特征，不能辨清物体的细微结构。

切片技术

1 石蜡切片：取材、固定、洗涤和脱水、透明、浸蜡、包埋、切片与粘片、脱蜡、染色、脱水、透明、封片

2 冰冻切片：在低温条件下使组织快速冷却到一定硬度，然后进行切片的方法。低温恒冷箱冰冻切片法，二氧化碳冰冻切片法，甲醇循环制冷冰冻切片法。能够比较完好地保存各种抗原活性及酶类，特别是对于那些对有机溶剂或热的温度耐受能力较差的细胞膜表面抗原和水解酶保存较好。

3 震动切片：对于成年小鼠或胚胎脑部、脊髓、肝脏、眼睛及其他器官组织，我们的方法是用低熔点琼脂糖包埋，然后将封装在琼脂糖里的组织进行切片，刀片振动原理，用来将新鲜的活体组织或固定过的组织切成20微米的薄片到1毫米以上厚片。取下的组织厚片可以浸泡在如六孔板内进行组织化学或免疫组织化学染色。然后，用激光扫描共聚焦显微镜或双光子显微镜等进行观察。而对于或新鲜活体组织则不需要包埋，直接固定在切片槽中切片。