

临床分子生物学检验技术试题及答案

1、分子生物学检验技术：是以核酸或蛋白质为分析材料，通过分析基因的结构、表达的变化和由此而导致的基因功能的改变，为疾病的研究和诊断提供更准确、更科学的信息和依据的一门学科。

2、请说明分子生物学检验技术在临床诊断中的应用。

(1) 感染性微生物的检测。如：用PCR技术进行甲型肝炎病毒的检测、乙型肝炎病毒的检测和解脲脲原体的检测等。

(2) 基因突变的检测。如：用PCR—限制性片段长度多态性(RFLP)技术检测地中海贫血基因突变。

(3) 法医学检测。如：用PCR微卫星检测技术进行亲子关系的鉴定和个体识别。

(4) 基因异常表达的检测。如：用cDNA表达的芯片技术进行基因异常表达的检测。

(5) 基因定位。如：用原位杂交技术进行组织与细胞中基因表达的定位。

3、基因组：是一个细胞或一种生物体的整套遗传物质。

4、基因：是基因组中一个功能单位，是贮存有功能的蛋白质多肽链信息或RNA序列信息及表达这些信息所必需的全部核苷酸序列。

5、原核生物：是细菌、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体、放线菌和蓝绿藻等原始生物的总称，是最简单的细胞生

物体。

6、操纵子结构：是原核生物基因组的功能单位。

7、质粒：是指细菌细胞染色体外，能独立复制并稳定遗传的共价闭合环状分子。

8、转座因子：又称为转座元件，是一类在细菌染色体、质粒和噬菌体之间自行移动并具有转位特性的独立的DNA序列。

9、原核生物基因组的结构特征：

(1) 原核生物基因组通常仅由一个DNA分子构成，基因组中只有一个复制起点，具有类核结构。

(2) 具有操纵子结构，模板mRNA为多顺反子mRNA。编码区远远大于真核生物基因组，但又远远小于病毒基因组。在基因组中存在多功能的识别区域，如复制起始区、转录启动区和终止区等，这些区域常常含有反向重复序列。

(3) 结构基因通常为单拷贝基因，编码顺序一般不重叠。

(4) 具有编码同工酶的基因。

(5) 含有可移动的DNA序列。

10、病毒基因组的结构特点：

(1) 与细菌和真核生物基因组相比，病毒基因组结构简单，基因数少，所含信息量也少。

(2) 病毒基因组的核酸类型较多，有双链DNA、单链DNA、双链RNA和单链RNA；有环状分子，也有线性分子。但无论是

哪种核酸类型，一种病毒颗粒中核酸成分只能为一种，或DNA，或RNA。

(3) 基因组中有基因重叠现象，这种结构的意义在于使较小的基因组能携带较多的遗传信息。

(4) 基因组中具有操纵子结构。

(5) 病毒基因可连续也可间断。

(6) 基因组中重复序列少。

(7) 基因组中非编码区少。

(8) 病毒基因组是单倍体。

(9) 病毒基因组核酸序列中功能相关的蛋白质基因往往丛集在基因组的一个或几个特定部位，形成一个功能单位或转录单元。

(10) 病毒基因组含有不规则的结构基因。

11、真核生物基因组的结构特点：

(1) 真核生物基本上不存在操纵子结构，一个结构基因转录生成一条mRNA，即mRNA是单顺反子，许多蛋白是由相同或不同的亚基构成，因此涉及多个基因的协调表达。

(2) 基因组中非编码的区域多于编码区域，并且，编码蛋白质的基因一般是不连续的断裂基因，即有外显子和内含子，在转录后经剪切成熟mRNA后，才能翻译成蛋白质。

(3) 基因组DNA有重度、中度和低度三种重复序列。(4) 基因组DNA具有多基因家族与假基因。

(5) 基因组DNA结构存在不同程度的差异，即基因多态性。

(6) 基因组DNA也有基因重叠现象。

(7) 真核细胞的染色体末端存在一种由DNA片段和蛋白质组成的独特结构，即端粒。它能维持染色体的稳定性。

12、乙型肝炎病毒（HBV）基因组的结构：HBV基因组的长度为3.2kb，是带有部分单链区的环状双链DNA分子，是目前已知感染人类最小的DNA病毒。HBV的两条链长度不等，长的链为负链，用“L(-)”表示，其长度是固定的，携带有病毒全部的编码信息；短的为正链，用“S(+)”表示，正链在不同的分子中长度不等，一般长约1.6-2.8kb，大约是负链的50%-100%，并且短链的5'端位置是固定的，而3'端的位置是可变的。在负链的5'端有一低分子量的蛋白质，在正链的末端则有一段短RNA，它们是引导DNA合成的引物。两条链的5'端有约250-300bp可互补结合，所以也称为黏性末端，这种互补结合是DNA保持双链环状的基础。此外，这部分核苷酸序列也是HBV最常整合到肝细胞染色体DNA中得序列。在黏性末端的两侧还各有11个核苷酸构成的顺向重复序列，分别称为DR1和DR2，DR1在负链5'端，DR2在正链5'端，中间相隔223个核苷酸。DR区域是DNA成环及病毒复制的关键区域。HBV基因组已经确定在负链DNA核苷酸序列为模板转录的RNA上含有4个公认的阅读框，分别成为S、C、P、X区。

13、丙型肝炎病毒基因组（HCV）的结构：呈球形颗粒，直径

约50nm，有一脂质包膜。基因组为单链正链RNA病毒，链长约9.5kb，整个基因组只有一个ORF，编码3011或3010个氨基酸。5'端和3'端分别有短的非编码区（UTR）。5'端UTR由324-341个核苷酸组成，可能在病毒的复制和翻译过程中起重要的调节作用。5'端UTR的核苷酸序列保守性强，可用于基因检测诊断。3'端UTR由27-55个核苷酸组成，其长度取决于病毒的来源，由病毒固有顺序与各种长度的“多U序列”组成，是HCV的独特结构。HCV基因产物均来自一个大的多蛋白前体，经宿主与病毒编码的蛋白酶的联合作用，在翻译中或翻译后被加工成为结构蛋白及非结构蛋白。结构蛋白包括两种：核心蛋白和包膜糖蛋白。非结构蛋白包括四种：NS2、NS3、NS4、NS5。

14、人类免疫缺陷病毒基因组（HIV）的结构：（主要有两型：HIV-1和HIV-2。两型病毒的核苷酸序列差异超过40%，范围的 AIDS大多由HIV-1所致，HIV-2只在西非呈地区性流行。）HIV基因组由2条相同的正链RNA在5'端通过氢键互相连接在一起形成二聚体，其单链RNA含有9749个核苷酸。HIV基因组共有9个基因，其中3个是结构基因，6个是调控基因。在病毒基因组的5'端和3'端各有相同的一段核苷酸序列，称为长末端重复序列（LTR）。LTR中含有启动子、增强TATA序列等，它们对病毒基因组转录的调控起关键作用。

15、质粒的一般性质：质粒作为一个完整的复制子，在转化

菌细胞后能自主复制，并对细菌的一些代谢活动和抗药性表现具有一定的作用。在质粒只有在宿主细胞内才能完成自我复制，一旦离开宿主细胞就无法复制和扩增，相反，宿主细胞失去了质粒依旧能存活。质粒也是一种游离基因，既可整合到细菌染色体中，又可在游离出来。质粒具有不相容性。

16、基因结构异常：广义上是指染色体畸变和基因突变，狭义上一般是指基因突变。

17、基因结构异常的类型：通常分为单基因病和多基因病。单基因病包括：三联体重复、血红蛋白病、苯丙酮尿症和遗传性原发性痛风。多基因病包括：原发性高血压、糖尿病和实体瘤。

18、端粒：真核细胞染色体末端存在着一种由DNA片段和蛋白质组成的独特结构，即为端粒。它对维持染色体的稳定性具有重要作用。

19、端粒的主要作用：

- (1) 维持染色体的稳定性，防止染色体重组及末端被降解。
- (2) 保证细胞在有丝分裂时染色体准确的分离，在减数分裂是保证染色体的成对及运动。
- (3) 端粒在细胞生长中有很大的作用，其与肿瘤和衰老有关。

20、人类基因组：包括细胞核内的核基因组和细胞质内的线粒体基因组。核基因组由 3.16×10^9 bp组成，线粒体基因组

由16569bp组成。

21、核酸：是以核苷酸为基本组成单位的生物信息大分子。

（天然存在的核酸有两类，即DNA和RNA。）

22、核酸分离纯化应遵循的原则：一是保证核酸一级结构的完整性，因为完整的一级结构是核酸结构和功能研究的基本要求；二是尽量排除其他分子的污染，保证核酸样品的纯度。

23、简述核酸分离纯化技术路线的设计：

（1）核酸的释放：①细胞破碎方法中机械剪切法不能用于基因组DNA的提取；②非机械法常用化学试剂或酶细胞溶解法。

（2）核酸的分离与纯化：①除去蛋白质、多糖、脂类等大分子物质；②除去非目的核酸组分；③除去实验溶液和试剂。

（3）核酸的浓缩、沉淀与洗涤：①浓缩：提高样品浓度；②沉淀：常用的浓缩方法，如醋酸钠、醋酸铵等；③洗涤：除去共沉淀的盐，常用70%-75%的乙醇。

24、简述酚抽提法分离纯化基因组DNA的方法，并绘制出流程图示意图：

（1）将分散好的真核生物组织、细胞在含EDTA、SDS及无DNA酶裂解缓冲溶液裂解细胞，破坏细胞膜、核膜，EDTA能抑制细胞中DNA酶的活性，使DNA分子完整地以可溶形式存在于溶液中。SDS主要引起细胞膜的降解并能乳化脂质和蛋白质，并使它们沉淀，同时还有降解DNA酶的作用。再经蛋白酶K处

理后，用PH8.0的Tris饱和酚抽提DNA，重复抽提至一定纯度后，得到的DNA溶液经乙醇沉淀进一步纯化，此法可获得100-200kb的DNA片段。

(2) 书本82页

25、简述低熔点琼脂糖凝胶挖块回收法如何回收基因组DNA，有何优点：本方法是从低熔点琼脂糖凝胶中切出含待回收的DNA凝胶块，利用其纯度高、熔点低及凝固温度低的特点，对DNA片段回收的方法。该法对高分子量的DNA特别有用，也能有效的分离小分子量的DNA片段。

26、质粒DNA纯化的主要方法与原理：

(1) csc1-EB法：是一种沉降平衡离心法。经超速离心，离心介质csc1形成一连续的密度梯度，在过量EB存在的条件下，各种不同密度的物质经离心平衡后得以分开。该法主要用于纯化容易出现切口的极大质粒DNA和具有某些特殊用途的闭环质粒DNA。

(2) 聚乙二醇沉淀法：是一种分级沉淀法。质粒DNA的粗制品首先用LiCl沉淀大分子RNA，并用RNase消化小分子RNA，然后在高盐条件下，用PEG选择性地沉淀大的质粒DNA，沉淀的质粒DNA进一步用酚/氯仿抽提和乙醇沉淀。PEG沉淀法简单、经济、试用广泛，尤其对碱裂解法提取的质粒纯化效果好，适用于分子克隆中所有常规的酶学反应，也能用于高效的哺乳动物细胞学的转染。但不能有效分离带切口的环状质

粒DNA与闭环质粒DNA。

(3) 柱层析法：柱层析法纯化质粒DNA的关键是用于填充层析柱的树脂。树脂可分两类：一类是利用疏水的相互作用纯化质粒DNA样品；另一类是通过离子交换与吸附的相互作用进行纯化。以硅基质作为填充材料的柱层析作用原理是：在多盐条件下，依靠DNA与硅基质的可逆性结合进行纯化。多盐造成磷酸二酯骨架的脱水，通过暴露的磷酸盐残基，是DNA吸附到硅基质上。以50%的乙醇溶液洗去RNA和糖类等生物大分子后，加入TE缓冲液或水溶液使DNA分子重新水合，并通过离心洗脱出来。DNA与硅基质的吸附作用与DNA的碱基组成和拓扑结构无关，因此可用于环形质粒DNA和线性DNA的纯化。由于<100-200bp的DNA分子与硅基质的吸附力很弱，因此柱层析不能用于小分子DNA片段的纯化。

27、简述RNA提取的关键步骤：91页

28、DNA重组：不同来源的DNA通过磷酸二酯键连接而重新组合成新的DNA分子的过程，称为DNA重组。

29、DNA重组技术（分子克隆或基因工程）：用人工手段对DNA进行改造和重新组合的技术。包括对DNA分子的精细切割、部分序列的去除、新序列的加入和连接、DNA分子扩增、转入细胞的复制繁殖、筛选、克隆、鉴定和序列测定等等，是基因工程技术的核心。 30、克隆：来自同一始祖的相同副本或拷贝的集合。

31、DNA克隆：是指应用DNA重组技术，在体外对DNA进行重组，构建成具有自主复制能力的重组DNA分子，再导入宿主细胞，然后从单个细胞开始大量扩增，最终获得大量同一的DNA分子。

32、限制性内切酶：是存在于细菌体内，能识别和水解双链DNA分子内特定序列的核苷酸水解酶类。

33、DNA连接酶：催化双链DNA或RNA中并列的5' -磷酸和3' -羟基之间形成磷酸二酯键的酶。

34、载体：时携带靶DNA（目的DNA）片段进入宿主细胞进行扩增和表达的运载工具。

35、作为载体应具备的条件：

- ①在宿主细胞中具有自主复制能力或能整合到宿主染色体上与染色体基因组一同复制的能力；
- ②有合适的限制性酶切位点供外源DNA片段插入；
- ③分子量不宜过大，以便于容纳较大的外源DNA片段并获得较高的拷贝数，也有利于体外重组操作；
- ④具有合适的筛选标记，以便于区分阳性重组体和阴性重组体，常用的筛选标记有抗药性、酶基因、营养缺陷型或形成噬菌斑的能力等；
- ⑤配备与宿主相适应的调控元件，如启动子、增强子和前导序列等。

36、用作克隆载体的理想质粒应具备的特点：①具有松弛复

制子，复制子是质粒自我增殖所必不可少的基本条件，并可协助维持使每个细胞含有一定数量的质粒拷贝；②在复制子外存在数个单一的酶切位点，以便目的DNA片段插入；③具有插入失活的筛选标志，理想的质粒载体应具有两种抗生素抗性标志；④分子量相对较小和较高的拷贝数。

*37、重组DNA的步骤：①获得目的基因；②与克隆载体连接，形成新的重组DNA分子；③用重组DNA分子转化或感染宿主细胞，并能在宿主细胞中复制和遗传；④对重组子的筛选和鉴定；⑤DNA序列测定。

38、原核生物表达体系对外源目的基因的要求：要求真核生物的目的基因不应具有5'端非编码区以及内含子结构。

39、原核生物表达载体的特点：①含大肠杆菌适宜的选择标志；②具有能调控转录、生产大量mRNA的启动子；③含适当的翻译调控序列；④含合理设计的多接头克隆位点，以确保目的基因按一定的方向与载体正确连接。

40、真核生物基因在原核细胞中的表达类型：包括融合型表达蛋白、非融合型表达蛋白和分泌型表达蛋白。

41、酵母重组表达蛋白的分离与纯化：

包括酵母细胞内表达的蛋白和分泌型蛋白的分离与与纯化。

(1) 酵母细胞内表达的重组蛋白的分离与纯化：这种蛋白质的分离与纯化过程比较简单，以 α -蛋白酶抑制剂的纯化为例：收集酵母细胞→玻璃珠破碎→离心取上清液→DEAE

Sepharose柱层析→梯度洗脱→收集活性部分→浓缩→葡聚糖凝胶G75柱层析→收集、浓缩→SDS-PAGE纯度鉴定。

(2) 酵母表达分泌型重组蛋白的分离与纯化：以酵母表达干扰素纯化为例：发酵液用0.45um孔径滤膜过滤浓缩→DEAE-Trisacryl柱层析→梯度洗脱→收集干扰素部分→SephadexG75柱层析→洗脱
→收集干扰素→稀释→层析聚焦缓冲液洗脱→电泳鉴定。

42、RNAi（小干扰RNA）的作用机制与设计原则：

(1) 作用机制：①起始阶段：外源的DsRNA通过导入或者转基因、病毒感染、转座子活化及特异重复序列或其他未知方式进入细胞，被Dicer酶识别并将dsRNA切割成21-23个核苷酸的由正反义链组成的小分子干扰RNA（siRNA）；②效应阶段：siRNAs的双链结构需被解螺旋后组装到RNA诱导的沉默复合物中，该复合物中解旋酶活性将siRNA双链解开，并定位到siRNA的反义链互补的靶mRNA转录本上，在距离siRNA3' 12个碱基的位置切割mRNA；③倍增阶段：仅需少量siRNA即可引起强烈的同源基因表达抑制。

(2) 设计原则：①siRNA中G+C碱基含量：一般为30%-70%，50%时siRNA产生的沉默效应较高，但过高的G+C碱基含量会降低沉默活性；②siRNA的作用位点：一般选择2-4个不同序列针对目的DNA，3'端非编码区域可以作为目的序列，避免选择起始密码下游500-100个碱基处、终止密码上游100碱基

处及5'端非编码区域，因为此区域中含有阻止靶向识别的蛋白质结合位点；③ siRNA序列：避免连续四个以上腺嘌呤及3个鸟嘌呤或胞嘧啶核苷酸的序列；④ siRNA碱基数：选择以A或G开始的21-23碱基大小的目的mRNA；⑤环碱基数：一般为9个碱基，其序列为TTCAAGAGA；⑥对照系统：将以设计的siRNA碱基序列随机排列，以保证与其他基因无同源性，才可作为实验的对照系统。

43、核酸分子技术杂交：单链的核酸分子在合适的条件下，与具有碱基互补序列的异源核酸形成双链杂交体的过程称作核酸分子杂交。

44、探针：是用放射性核素或非放射性物质标记的一段单链或双链核苷酸，可依碱基配对规律与具有互补序列的待测核酸进行杂交，以探测它们的同源程度。

45、变性：在一定条件下，双螺旋之间氢键断裂，双螺旋解开，DNA分子成为单链，形成无规则线团，这一过程称作变性。

46、融解温度：DNA的变性会在一个狭窄的温度范围内发生，这一温度范围的中点被称为溶解温度。

47、复性：变性DNA只要消除变性条件，具有碱基互补区域的单链又可以重新结合形成双链，这一过程称之为复性。

48、杂交：将一种核酸单链标记成为探针，再与另一种核酸单链进行碱基互补配对，可以形成异源核酸分子的双链结

构，这一过程称作杂交。

49、核酸分子杂交原理：互补的DNA单链能够在一定条件下结合成双链，即能够进行杂交。这种结合是特异的，即严格按照碱基互补的原则进行，它不仅能在DNA和DNA之间进行，也能在DNA和RNA之间进行。因此，当用一段已知基因的核酸序列作出探针，与变性后的单链基因组DNA接触时，如果两者的碱基完全配对，它们即互补地结合成双链，从而表明被测基因组DNA中含有已知的基因序列。

50、杂交核酸分子的种类：液相杂交、固相杂交、原位杂交和基因芯片技术。

51、原位杂交：是应用核酸探针与组织或细胞中的核酸按碱基互补配对原则进行特异性结合形成杂交体，然后应用组织化学或免疫组织化学法在显微镜下进行细胞内定位的检测技术。

52、试述Southern印记杂交的基本操作步骤：149页

53、简述核酸分子杂交过程：包括核酸分子与固相介质的结合、杂交和杂交后信号的检测3个过程。而杂交又可分为预杂交、杂交和洗脱三个步骤。

54、聚合酶链反应（PCR）：一种在体外特异性地复制已知序列的DNA片段的重要技术。

55、PCR反应原理及反应过程：

（1）原理：PCR技术的基本原理类似于DNA的天然复制过程，

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/118106054045006035>