



国家卫生健康委员会“十三五”规划教材配套教材
全国高等学校配套教材
供基础、临床、预防、口腔医学类专业用

第4版

医学细胞生物学 实验指导与习题集

主编 方瑾 黄东阳

副主编 高强国 于敏



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE





国家卫生健康委员会“十三五”规划教材配套教材
全国高等学校配套教材
供基础、临床、预防、口腔医学类专业用

医学细胞生物学

实验指导与习题集

第4版

主 编 方 瑾 黄东阳

副主编 高强国 于 敏

编 者 (按姓氏笔画排序)

于 兵 (海军军医大学)

于 敏 (中国医科大学)

于文静 (潍坊医学院)

王晓静 (山东大学)

文斗斗 (中南大学)

方 瑾 (中国医科大学)

田 强 (西南医科大学)

过健俐 (华中科技大学)

吕 品 (河北医科大学)

向若兰 (北京大学医学部)

李新颖 (安徽医科大学)

吴茉莉 (大连医科大学)

沃晓嫫 (哈尔滨医科大学)

周 侗 (中山大学)

赵凌宇 (西安交通大学)

高强国 (陆军军医大学)

唐 娟 (空军军医大学)

黄东阳 (汕头大学医学院)

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学细胞生物学实验指导与习题集 / 方瑾, 黄东阳
主编. —4 版. —北京: 人民卫生出版社, 2019
全国高等学校五年制本科临床医学专业第九轮规划教
材配套教材

ISBN 978-7-117-28312-0

I. ①医… II. ①方… ②黄… III. ①医学-细胞生
物学-实验-医学院校-教学参考资料 IV.
①R329.2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2019) 第 050840 号

人卫智网 www.ipmph.com 医学教育、学术、考试、健康,
购书智慧智能综合服务平台
人卫官网 www.pmph.com 人卫官方资讯发布平台

版权所有, 侵权必究!

医学细胞生物学实验指导与习题集
第 4 版

主 编: 方瑾 黄东阳
出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)
地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号
邮 编: 100021
E-mail: pmph@pmph.com
购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830
印 刷: 中农印务有限公司
经 销: 新华书店
开 本: 787×1092 1/16 印张: 14
字 数: 367 千字
版 次: 2004 年 12 月第 1 版 2019 年 6 月第 4 版
2019 年 6 月第 4 版第 1 次印刷 (总第 13 次印刷)
标准书号: ISBN 978-7-117-28312-0
定 价: 39.00 元
打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com
(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

前言

医学细胞生物学是医学院校重要的专业基础课程,也是一门实践性非常强的学科。细胞生物学领域许多重要的发现和科学问题的阐明都源于细胞生物学实验技术的发展,因此,学习并掌握细胞生物学基本实验技术对于学生深刻理解学科内容以及培养学生动手能力具有重要意义。

本教材是《医学细胞生物学实验指导与习题集》的第4版,是国家卫生健康委员会“十三五”规划教材《医学细胞生物学》(第6版)的配套教材。本版教材仍延续了前版教材的基本框架,即由实验指导和习题集两部分构成,“实验指导”供医学细胞生物学实验课教学使用,也可作为相关人员学习细胞生物学实验技术的参考教材;“习题集”供学生课后进行教学要点的巩固学习和复习使用。

本次教材修订前,广泛征求了前版教材使用单位教师和学生的意见,在修订中着重强调了本教材作为理论课配套教材的实用性功能,对内容进行了调整。对“实验指导”中的实验项目进行了适当删减,内容上一是选取能够有效验证细胞生物学基础理论的实验技术,如通过“细胞的运动”实验验证由细胞骨架成分构成的纤毛和鞭毛的基本功能;通过“细胞中DNA和RNA显示”等细胞成分的分析实验了解细胞中主要成分的细胞内分布及定位。二是选取进行细胞生物学研究需要掌握的基本实验技术,如细胞培养、免疫荧光技术等;同时也考虑到不同层次教学对象的需求,选取了流式细胞技术、荧光定量PCR等内容。此外,在内容设计上强调在有限的课堂教学时间内给予学生更多的动手操作机会,如“细胞基因组DNA的提取”实验,尽管目前可以使用商品化的试剂盒完成,但为增加学生的实践机会并更好理解实验原理,仍采用了传统的酚氯仿提取方案。经过调整,实验项目由上版的68个删减为33个。此外,为方便课堂教学,大多数实验项目提供了实验结果图;同时,为鼓励和引导学生对教学内容进行总结和思考,增设了“作业与思考题”。与前版相比,“习题集”中的题量进行了适当增加,以涵盖更多的考核知识点。

本教材前三版均由北京协和医学院章静波教授主编,中国医科大学宋今丹教授作为主审,感谢两位前辈为医学细胞生物学教学做出的卓越贡献以及对本版教材修订的关心和指导。

由于编者水平有限,本版教材难免存在不足和错误,衷心希望使用者提出宝贵意见,以便再版时更正和完善。

方瑾 黄东阳

2019年1月

目 录

第一部分 实验指导	1
第一篇 光学显微镜技术	1
实验一 普通光学显微镜的构造及使用方法	1
实验二 动物细胞基本形态的实验观察	6
实验三 细胞显微测量技术	9
实验四 相差显微镜的构造及使用方法	12
实验五 荧光显微镜的构造及使用方法	15
第二篇 细胞结构与成分的显示及分析技术	19
实验六 差速离心法分离细胞器	19
实验七 人染色体标本的制备	21
实验八 石蜡切片制作与 HE 染色	25
实验九 细胞中 DNA 和 RNA 的显示	28
实验十 细胞中过氧化物酶的显示	32
实验十一 细胞中碱性蛋白的显示	34
实验十二 细胞中线粒体的活体染色	36
实验十三 细胞中微丝的染色及形态观察	38
实验十四 细胞中微管的免疫荧光染色与形态观察	41
实验十五 细胞内中间纤维的免疫荧光染色与形态观察	43
实验十六 毛囊细胞核仁组织区银染	45
实验十七 蛋白质印迹技术	47
实验十八 细胞基因组 DNA 的提取	50
实验十九 RNA 的提取及检测	53
实验二十 PCR 技术	56
实验二十一 荧光定量 PCR 技术	58
第三篇 细胞培养技术	62
实验二十二 细胞的原代培养	62
实验二十三 细胞的传代培养	65
实验二十四 细胞的冻存与复苏	68
实验二十五 培养细胞的形态观察和计数	71
实验二十六 鸡血细胞的融合	75

第四篇 细胞功能分析技术	78
实验二十七 细胞的吞噬活动	78
实验二十八 细胞的运动	81
实验二十九 细胞集落形成实验	83
实验三十 MTT 对细胞生长状况的检测	86
实验三十一 流式细胞仪检测细胞周期	88
实验三十二 凋亡细胞荧光染色的形态观察	90
实验三十三 凋亡细胞的琼脂糖凝胶电泳检测——DNA 梯状条带	92
第二部分 习题集	95
第一章 绪论	95
第二章 细胞的概念与分子基础	99
第三章 细胞生物学的研究方法	105
第四章 细胞膜与物质的穿膜运输	114
第五章 细胞的内膜系统与囊泡转运	122
第六章 线粒体与细胞的能量转换	130
第七章 细胞骨架与细胞的运动	136
第八章 细胞核	144
第九章 细胞内遗传信息的传递及调控	152
第十章 细胞连接与细胞黏附	160
第十一章 细胞微环境及其与细胞的相互作用	167
第十二章 细胞间信息传递	173
第十三章 细胞分裂与细胞周期	181
第十四章 生殖细胞与受精	189
第十五章 细胞分化	194
第十六章 细胞衰老与细胞死亡	201
第十七章 干细胞与组织的维持和再生	207
第十八章 细胞工程	214

第一部分 实验指导

第一篇

光学显微镜技术

实验一 普通光学显微镜的构造及使用方法

【实验目的】

1. 掌握低倍镜和高倍镜的正确使用方法。
2. 熟悉油镜的使用方法。
3. 了解普通光学显微镜的构造及成像原理。

【实验原理】

光学显微镜是利用光线照明,将微小物体形成放大影像的仪器。普通光学显微镜的主要部件是物镜和目镜,均为凸透镜。物镜的焦距短,目镜的焦距较长。物镜到被观察物 AB 的距离稍大于物镜的焦距,通过物镜得到倒立的放大的实像 $A'B'$ 。 $A'B'$ 对目镜来说是物体,使 $A'B'$ 位于目镜的焦点以内,这样通过目镜就得到 $A'B'$ 的放大的虚像 $A''B''$ 。从图上可以看出, $A''B''$ 的视角比眼睛直接看 AB 时的视角大得多,所以用显微镜可以看清非常微小的物体(图 1-1)。

【实验用品】

实验对象: a 字片、红绿羊毛交叉片、小鼠血细胞涂片。

实验试剂: 香柏油、二甲苯。

实验器材: 普通光学显微镜、双层油镜瓶、擦镜纸(剪成 $2\text{cm} \times 3\text{cm}$ 大小)。

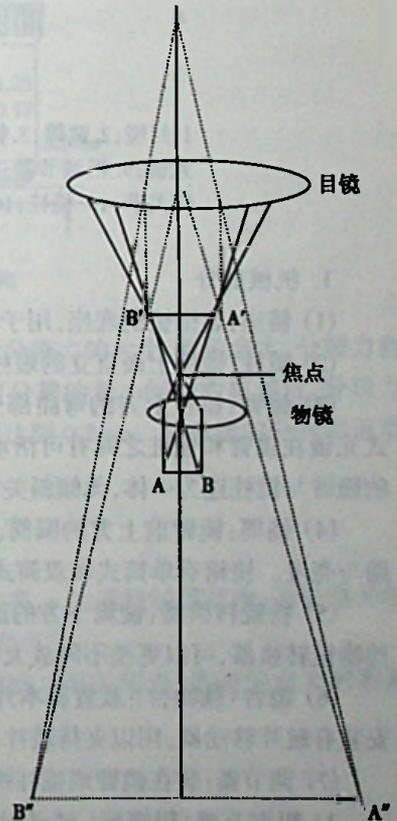


图 1-1 普通光学显微镜成像光路图

【操作步骤】

(一) 普通光学显微镜的主要构造

普通光学显微镜由三部分组成:机械部分、照明部分和光学部分(图 1-2)。

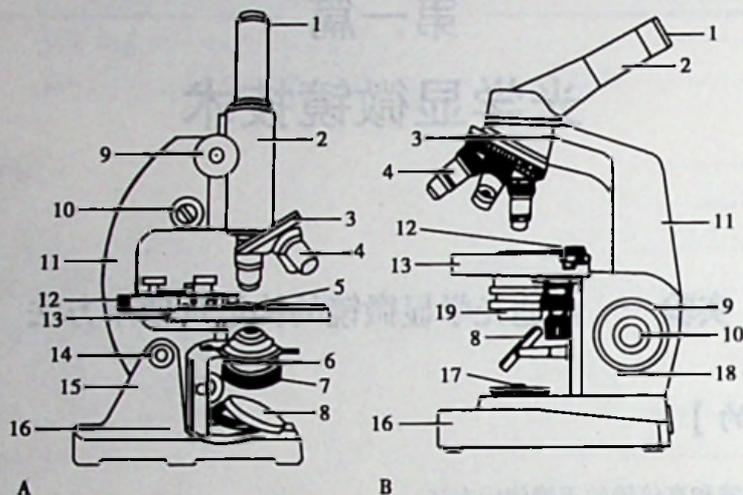


图 1-2 普通光学显微镜

A. 直立式镜筒; B. 倾斜式镜筒

1. 目镜; 2. 镜筒; 3. 物镜转换器; 4. 物镜; 5. 通光孔; 6. 聚光器; 7. 光圈; 8. 反光镜; 9. 粗调节器; 10. 细调节器; 11. 镜臂; 12. 移片器; 13. 载物台; 14. 倾斜关节; 15. 镜柱; 16. 镜座; 17. 照明装置; 18. 粗调限位钮; 19. 滤光片

1. 机械部分

(1) 镜座:显微镜的底座,用于稳定和支持整个镜体。

(2) 镜柱:镜座上面直立的短柱,用于连接镜座和镜臂。

(3) 镜臂:镜柱上方的弯曲部分,用于支持镜筒与载物台,取放显微镜时手握此臂。镜筒直立式光镜在镜臂和镜柱之间有可活动的倾斜关节,可使镜臂适当倾斜,便于观察;镜筒倾斜式显微镜的镜臂与镜柱连为一体,无倾斜关节。

(4) 镜筒:镜臂前上方的圆筒。镜筒上端安装目镜,下端安装物镜转换器,并且保护成像的光路与亮度。镜筒有单筒式和双筒式,前者又有直立式和倾斜式两种,后者均为倾斜式。

(5) 物镜转换器:镜筒下方的圆盘状部件,盘上有 3~4 个圆孔,安装了不同放大倍数的物镜,转动物镜转换器,可以更换不同放大倍数的物镜。

(6) 镜台(载物台):放置标本片的平台,中央有通光孔,光线通过此孔照射在标本片上。镜台上安装有玻片移动器,用以夹持玻片,并使玻片能够前后、左右移动。

(7) 调节器:装在镜臂或镜柱两侧的粗、细螺旋,用以调节焦距。

1) 粗调节器(粗螺旋):转动时可使镜台(镜筒倾斜式显微镜)或镜筒(镜筒直立式显微镜)大幅度升降,迅速调节物镜和标本间距离使物像出现在视野中。在使用低倍镜时,先用粗调节器找到物像。

2) 细调节器(细螺旋):转动时可使镜台或镜筒短距离升降,使用高倍镜、油镜时或低倍镜下为

了得到更清晰的物像时使用。

2. 照明部分 安装在载物台下方,包括反光镜、聚光器、光圈。

(1) 反光镜:安装在镜座上的平、凹两面镜,可向任意方向转动,将光线反射到聚光器。凹面镜聚光作用强,光线较弱的时候使用;平面镜聚光作用弱,光线较强时使用。

电光源普通光学显微镜没有反光镜,一般在镜座内安装有照明装置,光线的强弱由底座上的光亮调节钮控制。

(2) 聚光镜:由一组透镜组成,汇聚光线使其照射到标本上,升降聚光器可以调节视野中光亮的强弱。

(3) 光圈:在聚光镜下方,由一组金属薄片组成,其外侧伸出一柄,拨动它可调节其开孔的大小,控制通过的光量。

3. 光学部分

(1) 目镜:安装在镜筒上端,通常备有 2~3 个,上面刻有 5×、10× 或 15× 符号表示放大倍数,一般用 10× 目镜。

(2) 物镜:安装在物镜转换器上,一般有 3~4 个物镜,通常在物镜上标有主要性能指标——放大倍数、数值孔径、镜筒长度和所要求的盖玻片厚度。如图 1-3 所示,10/0.25 中 10 表示放大倍数为 10,0.25 表示数值孔径为 0.25;160/0.17 中 160 表示镜筒长度,0.17 表示所要求的盖玻片厚度。

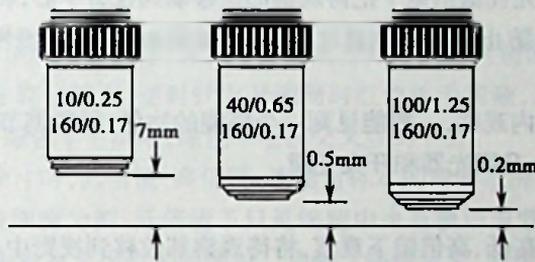


图 1-3 不同倍数物镜的工作距离

数值孔径 (numerical aperture, NA) 又称镜口率,反映该物镜分辨力的大小,数值愈大,分辨力愈高。分辨力是指显微镜能够分辨物体上的最小间隔的能力,可分辨的最小间隔距离越近,分辨力越高。人眼的分辨力可达 0.1mm,普通光学显微镜的分辨力能达到 $0.2\mu\text{m}$ 。显微镜的分辨率通常可由下列公式计算:

$$R=0.61\lambda/NA$$

$$NA=n\cdot\sin(\alpha/2)$$

R 为分辨力, λ 为光波波长,NA 为数值孔径,n 为介质折射率, α 为透镜视锥顶角,折射率大的介质(例如:香柏油的折射率为 1.515,空气的折射率为 1)分辨力也大。

工作距离是指物像调节清楚时物镜下表面与盖玻片上表面之间的距离;物镜的放大倍数越大,工作距离越小(图 1-3)。

(二) 普通光学显微镜的使用方法

1. 低倍镜的使用方法

(1) 取镜和放置:取显微镜时,右手握住镜臂,左手托住镜座,将其轻放在操作者前方略偏左侧,显微镜离实验台边缘应有至少一拳的距离。

(2) 对光:转动粗调节器,使镜台下降(镜筒直立式显微镜需升高镜筒),使物镜与载物台距离拉

开,转动物镜转换器,使低倍镜对准通光孔(转动时听到咔哒声时,表明物镜光轴已对准镜筒中心),打开光圈,上升聚光器,将反光镜凹面转向光源,一边在目镜上观察,一边调节反光镜方向,直到视野内的光线明亮且均匀为止。

若使用电光源显微镜,首先打开显微镜电源开关,然后使低倍镜对准镜台,开大光圈,上升聚光器并调节光亮调节钮至视野内光线明亮适中。

(3) 放置标本片:取标本片,盖玻片面朝上放在镜台上,用玻片移动器将待观察部位移到通光孔的正中。

(4) 调节焦距:从显微镜侧面注视着物镜镜头,同时转动粗调节器,使镜台上升(镜筒直立式显微镜下降镜筒)至物镜距标本片约5mm处,然后一边在目镜上观察,一边缓慢转动粗调节器,使镜台缓慢下降(镜筒直立式显微镜上升镜筒)至视野中出现清晰的物像。

如果看不到物像,可能由以下原因造成:

- 1) 物镜未对正通光孔,应对正后再观察。
- 2) 标本未放到视野内,应移动标本至通光孔中央。
- 3) 调节器转动得太快,超过焦点,应重新调焦。
- 4) 视野内光线太强,不易观察到未染色的标本片,将光线调暗一些再观察。

2. 高倍镜的使用方法

(1) 选好目标:一定要先在低倍镜下把待观察部位移动到视野中心,将物像调节清晰。

(2) 转换高倍物镜:为防止镜头碰撞玻片,从显微镜侧面注视着,慢慢地转动转换器使高倍镜头对准通光孔。

(3) 调节焦距:向目镜内观察,一般能见到一个模糊的物像,稍稍调节细螺旋,即获得清晰的物像。若视野亮度不够,可上升聚光器和开大光圈。

3. 油镜的使用方法

(1) 选好目标:必须先在低、高倍镜下观察,将待观察部位移到视野中心。

(2) 转换油镜:转动转换器,使高倍镜头离开通光孔,在玻片观察部位滴1滴香柏油,然后从侧面注视着镜头与玻片,慢慢转换油镜使镜头浸入油中。

(3) 调节光亮:将聚光器上升到最高位置,光圈开到最大。

(4) 调焦:一边观察目镜,一边稍稍调节细螺旋器,使物像清晰。

若目标不理想或未出现物像需要重找;若在加油区之外重找,应按低倍→高倍→油镜程序进行操作;若在加油区内重找,应按低倍→油镜程序进行操作,以免油玷污高倍镜头。

(5) 擦净油镜头:使用完毕,先用擦镜纸滴少许二甲苯将镜头上和标本上的香柏油擦去,再用干净擦镜纸轻轻擦干净。

(三) 操作练习

1. 低倍镜使用练习 取a字片一张,先用眼直接观察a字的方位和大小,然后按照低倍镜的使用方法练习对光、调焦。注意观察物像是反是正,标本移动的方向与视野中物像移动方向是否相同。

2. 高倍镜使用练习 取红绿羊毛交叉片,先在低倍镜下找到羊毛,并将红绿羊毛的交叉点移到视野的中心,然后换高倍镜观察,注意分辨红绿羊毛的上下位置关系(利用细螺旋升降镜台进行判断)。

3. 油镜使用练习 取小鼠血涂片,先用低倍镜、高倍镜观察,再换油镜观察。比较三种放大倍数的物镜的分辨力并练习擦拭油镜头和标本片。

【实验结果图】

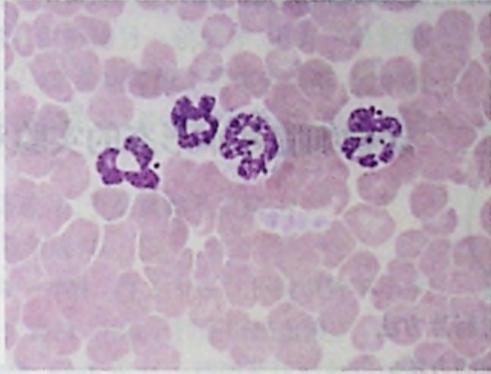


图 1-4 小鼠血细胞涂片

【观察与记录】

1. a 字片在低倍镜下呈倒立的物像,且玻片的移动方向与视野内物像移动的方向相反。
2. 红绿羊毛交叉片在高倍镜下,逆时针上升镜筒时红色羊毛清晰,表明红色羊毛位于交叉点上方,顺时针下降镜筒时,绿色羊毛清晰,绿色羊毛在交叉点的下方。
3. 观察小鼠血细胞涂片时,低倍镜、高倍镜、油镜对标本的观察范围依次减小,但放大倍数、分辨力依次增强。以中性粒细胞为例:低倍镜下只见细胞中央有被染成紫色的核物质,高倍镜下可见其核为分叶状,细胞质中具有大小不等的颗粒。油镜下颗粒更大、更清晰(图 1-4)。

【注意事项】

1. 取、放显微镜时要轻拿轻放,持镜时必须一手握镜臂、另一手托住镜座,不可单手提取,以免零件脱落或碰撞到其他地方。
2. 不可把显微镜放置在实验台的边缘,镜筒倾斜角度不得超过 45° ,以免碰翻落地。
3. 在上升镜台(或下降镜筒)、转换物镜时,一定要从显微镜的侧面注视着,切勿边操作边在目镜上观察,以免物镜与标本片相碰,造成镜头或标本片的损坏。
4. 需要更换标本片时,应先使镜台与物镜远离,方可取下标本片。
5. 标本片上待观察部位要对准通光孔中央,且不能放反,否则高倍镜和油镜下找不到物像。
6. 转换物镜时应转动物镜转换器,切忌手持物镜移动。
7. 显微镜使用完毕后,必须复原,其步骤是:取下标本片,转动转换器使镜头离开通光孔,下降载物台,竖立反光镜,下降聚光器(但不要接触反光镜),关闭光圈,玻片移动器回位,盖上绸布或外罩,放回显微镜柜内。
8. 保持显微镜清洁,光学和照明部分只能用擦镜纸擦拭,切忌口吹、手抹或用布擦,机械部分可以用布擦拭。

【作业与思考题】

绘制光镜下小鼠中性粒细胞及红细胞的形态。

(唐娟)

实验二 动物细胞基本形态的实验观察

【实验目的】

1. 掌握不同细胞的临时制片方法。
2. 掌握捣髓法处死蟾蜍的方法。
3. 了解不同类型细胞的基本形态。

【实验原理】

高等真核生物由多种细胞构成,不同种类的细胞具有不同的形态和功能特征,细胞的形态结构与功能相关是很多细胞的共同特点,在分化程度较高的细胞更为明显,这种合理性是生物在漫长进化过程中所形成的。例如:具有收缩功能的肌细胞伸展为细长形;具有感受刺激和传导冲动功能的神经细胞有长短不一的树枝状突起;游离的血细胞为圆形、椭圆形或圆饼形。

不论细胞的形状如何,细胞的结构一般分为三大部分:细胞膜、细胞质和细胞核。但也有例外,例如:哺乳动物红细胞成熟时细胞核消失。

【实验用品】

实验对象:蟾蜍。

实验试剂:1% 甲苯胺蓝、1% 甲基蓝、0.65% Ringer 液。

实验器材:普通光学显微镜、解剖器材(包括解剖针、大剪刀、眼科剪刀、钝头镊子、有钩镊子、眼科镊子)、解剖盘、小平皿、载玻片、盖玻片、吸管、吸水纸、牙签。

【操作步骤】

1. 捣髓法处死蟾蜍

(1) 取蟾蜍一只,左手中指和无名指夹住蟾蜍前肢,同时无名指和小指夹住蟾蜍后肢,使蟾蜍腹部贴于无名指;示指和拇指分别压住蟾蜍上颌和背部,固定蟾蜍,并使头部和躯干呈一定角度。

(2) 右手持解剖针,对准头和躯干背侧相连的凹陷处(即枕骨大孔)垂直刺入,将针插入颅腔捣毁脑组织,随后刺入椎管捣毁脊髓。

(3) 当蟾蜍四肢松软、呼吸消失时,表明蟾蜍已死亡。

2. 蟾蜍血涂片的制备与观察

(1) 将蟾蜍腹面向上,置于解剖盘中。剪开蟾蜍胸腔、心脏,吸取一滴血液。

(2) 用左手拇指和示指夹持载玻片的两端,将血液滴在载玻片近端处(靠近示指的一端),右手持另一载玻片,用其一端紧贴在血滴的前缘,载玻片之间以 45° 角均匀用力迅速向前推,使血液在载玻片上形成薄层(注意观察图 2-1 中的操作手法),完成血涂片的制备。

(3) 将血涂片晾干,加盖玻片,于显微镜下观察。

3. 蟾蜍肝脏压片的制备与观察

(1) 剪开蟾蜍腹腔,剪取一小块(约 $2\sim 3\text{mm}^3$)肝组织置于小平皿内,用 0.65% Ringer 液洗去血液,用镊子轻压挤出血液。

(2) 将其置于载玻片中央,剪碎,将另一载玻片压在肝组织碎块上,垂直用力挤压使组织散开。将上面的载玻片取下即可得到两张肝脏压片,晾干。

(3) 滴加 1% 甲基蓝染液,染色 $5\sim 10$ 分钟,用 0.65% Ringer 液洗去染液,盖上盖玻片,吸去多余液体,于显微镜下观察。

4. 脊髓压片的制备及脊髓前角运动神经细胞的观察

(1) 在口裂处剪去蟾蜍头部,剪开椎管(注意避免蟾酥迸溅),可见乳白色脊髓,用小镊子挑取少量脊髓置于载玻片中央。

(2) 将另一载玻片压在脊髓上,垂直用力挤压,使脊髓散开。将上面的载玻片取下即可得到两张脊髓压片。

(3) 滴加 1% 甲苯胺蓝染液,染色 $5\sim 10$ 分钟,用 0.65% Ringer 液洗去染液,盖上盖玻片,吸去多余液体,于显微镜下观察。

5. 蟾蜍骨骼肌细胞的剥离与观察

(1) 剪开蟾蜍腿部皮肤,剪下一小块肌肉,置于载玻片上。

(2) 用小镊子和解剖针沿肌丝走向剥离肌肉块成为肌束,继续剥离,可得到很细的肌纤维(即肌细胞)。

(3) 尽可能拉直肌纤维,盖上盖玻片,于显微镜下观察。

6. 人口腔上皮细胞标本的制备与观察

(1) 用牙签刮取口腔黏膜上皮细胞,均匀地涂在载玻片上(不可反复涂抹)。

(2) 滴加 1% 甲苯胺蓝染液,染色 5 分钟,用清水洗去染液,盖上盖玻片,吸去多余液体,于显微镜下观察。



图 2-1 血涂片的制备

【实验结果图】

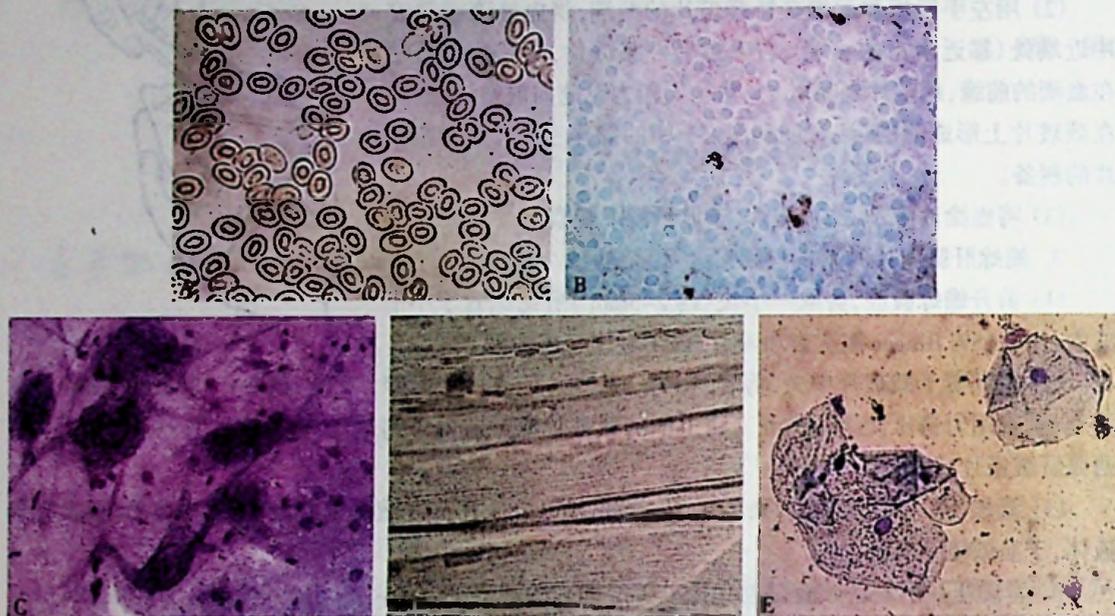


图 2-2 不同类型细胞的形态观察

A. 蟾蜍红细胞; B. 蟾蜍肝细胞; C. 蟾蜍脊髓前角运动神经细胞; D. 蟾蜍骨骼肌细胞; E. 人口腔黏膜上皮细胞

【观察与记录】

1. 蟾蜍红细胞为椭球形,有细胞核。白细胞数目少,为圆形(图 2-2A)。
2. 蟾蜍肝细胞核染成蓝色,肝细胞紧密排列,挤成多角形(图 2-2B)。
3. 蟾蜍脊髓前角运动神经细胞染成蓝紫色,体积较大,胞体呈三角形或星形,有多个突起,中央有圆形细胞核,内有核仁。神经细胞周围染色较深的小细胞是神经胶质细胞(图 2-2C)。
4. 蟾蜍骨骼肌细胞为细长形,可见折光不同的横纹,每个肌细胞有多个核,分布于细胞的周边(图 2-2D)。
5. 人口腔黏膜上皮细胞为扁平椭圆形,中央有椭圆形核,染成蓝紫色(图 2-2E)。

【注意事项】

1. 处死蟾蜍和剪去蟾蜍头部时,应避开蟾蜍两侧耳部突起的耳后腺,以免蟾酥迸溅。
2. 制备血涂片时,须注意操作手法、推片角度和速度。
3. 挑取蟾蜍脊髓的椎管位置应在胸段及以上部位。
4. 制备肝脏压片和脊髓压片时,两张载玻片不可完全重合,应相互交错,仅在组织块所在的中央部位重叠,以利于随后将两张载玻片分开。
5. 进行结果观察时,必须加盖玻片和吸去玻片表面的液体,以保护物镜。

6. 观察蟾蜍血细胞、肌细胞等未经染色的样品时,需调小光圈。

7. 进行细胞生物学实验绘图时,注意选择典型结构进行描绘,要求真实、准确(注意各部分结构的比例关系);线条要明确清晰,图的深浅明暗以点的疏密来表示,点要圆而一致,不得涂暗影或进行其他美术加工;各结构名称要在一侧引直线注明,各引线要平行不得交叉;每幅图的大小、位置在纸面上安排得当。

【作业与思考题】

1. 绘制光镜下蟾蜍红细胞、肝细胞、脊髓前角运动神经细胞、骨骼肌细胞和人口腔黏膜上皮细胞的形态。
2. 如何理解真核生物中细胞的不同形态与功能的关系?

【试剂配制】

1. 0.65% Ringer 液(两栖动物用) 称取 0.65g 氯化钠,0.042g 氯化钾,0.025g 氯化钙,溶于适量蒸馏水中,继续加蒸馏水定容至 100ml,室温保存。
2. 1% 甲基蓝染液 称取 1g 甲基蓝,溶于适量蒸馏水中,继续加蒸馏水定容至 100ml,室温保存。
3. 1% 甲苯胺蓝染液 称取 1g 甲苯胺蓝,溶于适量蒸馏水中,继续加蒸馏水定容至 100ml,室温保存。

(于敏)

实验三 细胞显微测量技术

【实验目的】

1. 掌握细胞显微测量技术的方法。
2. 熟悉细胞显微测量技术的原理。

【实验原理】

显微测微尺可用来测量显微镜下所观察细胞的大小,显微测微尺可分为物镜测微尺(又称镜台测微尺,简称台尺)和目镜测微尺(简称目尺)两种,两尺须配合使用。

物镜测微尺为一块特制载玻片中央封固的具有刻度的标尺(图 3-1A),标尺的长度为 1~2mm,等分成 100 或 200 格,每格的实际长度是 $10\mu\text{m}$ (即 $\text{DIV}=0.01\text{mm}$)。在标尺的外周有一小黑圈,便于找到标尺的位置。

目镜测微尺是一块可以放入目镜内的圆形玻片,在玻片上刻有各种形式的标尺,常见的有直线式和网式(图 3-1B),刻度尺或刻度面积被等分为若干份。用来测量长度的标尺为直线式,被等分成 50 或 100 格,每格的实际长度随不同的物镜放大倍数和镜筒的不同长度而变。因此,在使用

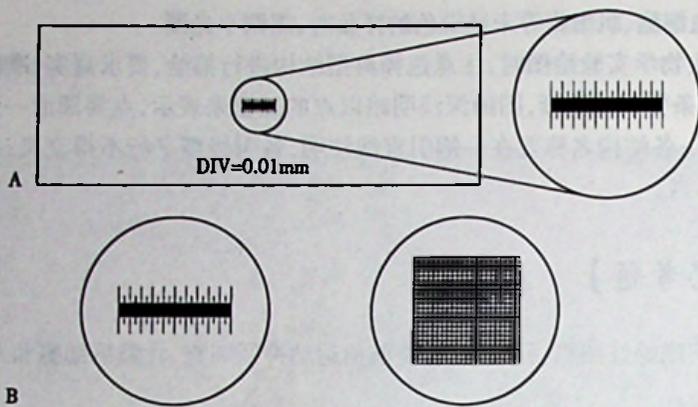


图 3-1 显微测微尺示意图

A. 物镜测微尺; B. 目镜测微尺(左为直线式标尺, 右为网式标尺)

目镜测微尺测量细胞大小前, 需要在不同的物镜下使用物镜测微尺对目镜测微尺每格所代表的实际大小进行标定, 然后再用目镜测微尺去测量细胞的大小。

【实验用品】

实验对象: 人宫颈癌 HeLa 细胞悬液。

实验试剂: 0.2% 次甲基蓝。

实验器材: 普通光学显微镜、物镜测微尺、目镜测微尺、载玻片、盖玻片、吸水纸、镊子、吸管。

【操作步骤】

1. 从显微镜上取下目镜, 卸下目镜的上透镜, 将目尺刻度向下装在目镜的焦平面上, 再旋上上透镜, 将目镜插入镜筒。
2. 将台尺的刻度面向上, 放在镜台上夹好, 调好显微镜的焦距, 先用低倍镜看清台尺的刻度, 再换至用来测量细胞的物镜, 调焦至看清刻度, 这时镜中可同时看清两尺。
3. 小心移动台尺并转动目尺, 使两尺平行、左边的零线对齐, 然后从左向右找出两尺再次对齐的刻度线(图 3-2)。

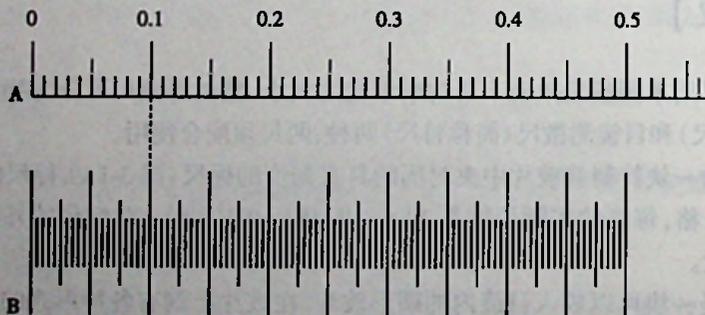


图 3-2 目镜测微尺的标定

A. 物镜测微尺; B. 目镜测微尺

4. 记录下两条重合线之间的目尺和台尺的格数,按公式计算出目尺每格所代表的实际长度。

换算公式:目尺每格长度(μm)=(台尺的格数/目尺的格数) $\times 10$

5. 将 HeLa 细胞悬液(1×10^4 个/ml)滴于载玻片中央,滴 1 滴 2% 次甲基蓝,盖上盖玻片,用吸水纸将多余染液吸走,将载玻片放在镜台上进行细胞大小的检测。

【实验结果图】

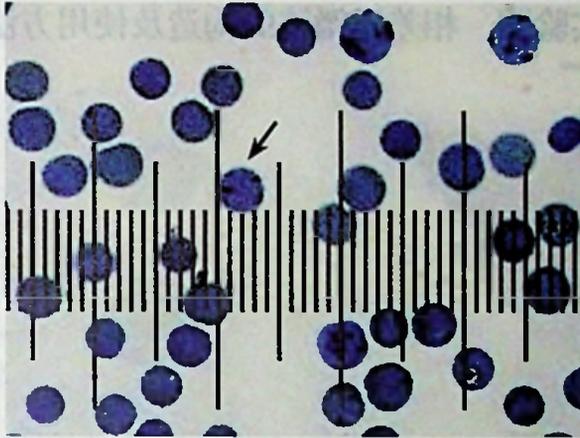


图 3-3 细胞直径大小测量

【观察与记录】

1. 目镜测微尺每格长度的标定(图 3-2) 目镜测微尺 20 格 = 物镜测微尺 10 格,则目镜测微尺每格长度为 $5\mu\text{m}$ 。
2. 根据测量细胞所占目尺的格数计算细胞的实际长度。如图 3-3 箭头所示:细胞约占目镜测微尺 3.5 格,其直径为 $3.5 \times 5 = 17.5(\mu\text{m})$ 。

【注意事项】

1. 细胞悬液中细胞应尽量分散,以避免细胞彼此间重叠,影响细胞长度的测量。
2. 在对齐台尺及目尺左边零线前,应尽量将显微镜焦距调准,将误差减少到最小。
3. 转换物镜后,必须用台尺对目尺每格所代表的长度加以重新计算。
4. 所测定的细胞应不少于 10 个,最后取其平均值。

【作业与思考题】

1. 选取 10 个被测细胞,测量其长度,计算平均值,并计算细胞的核质比。
2. 用显微测微尺测量细胞的直径总是会产生一定的误差,可使用哪些方法减小测量误差?

【试剂配制】

0.2% 次甲基蓝:称取 0.2g 次甲基蓝,加适量蒸馏水溶解后,继续加蒸馏水至 100ml,室温保存。

(于 兵)

实验四 相差显微镜的构造及使用方法

【实验目的】

1. 掌握相差显微镜的工作原理。
2. 熟悉相差显微镜的正确使用方法。
3. 了解相差显微镜的构造。

【实验原理】

光波有振幅(亮度)、波长(颜色)及相位(指在某一时间上光的波动所能达到的位置)的不同。光波通过物体时,波长和振幅发生变化可以被人们的眼睛所感受到,这就是普通光学显微镜下染色标本能够被观察到的原理。而光波通过活细胞和未经染色的生物标本时,波长和振幅并不发生变化,因细胞各部分微细结构的折射率和厚度略有不同,光波通过时,仅相位有变化(相应发生的差异即相差),而这种微小的变化,人眼是无法辨别的,故在普通光学显微镜下难以被观察到。相差显微镜能够改变直射光或衍射光的相位,并且利用光的衍射和干涉现象,将光通过标本产生的相位差转变为人眼可以察觉的振幅差(明暗差),从而使原来透明的物体表现出明显的明暗差异,同时它还吸收部分直射光线,以增大其明暗的反差,因此可用以观察普通光学显微镜和暗视野显微镜下都看不到或看不清的活细胞或未染色标本。

相差显微镜(图 4-1)与普通光学显微镜的主要不同之处是:用环状光阑代替可变光阑,用带相板的物镜代替普通物镜,并带有一个合轴用的望远镜。环状光阑是环状孔形成的光阑,它们的直径和孔宽是与不同的物镜相匹配的,其作用是将直射光所形成的像从一些衍射像中分出来。相板安装在物镜的后焦面处,相板除能推迟直射光线或衍射光线的相位外,还能吸收光使亮度发生变化。调轴望远镜是用来进行合轴调节的。相差显微镜在使用时,聚光镜下面环状光阑的中心与物镜光轴要完全在一直线上,必须调节光阑的亮环和相板的环状圈重合对齐,才能发挥相差显微镜的效能。否则直射光或衍射光的光路紊乱,应被吸收的光不能吸收,该推迟相位的光波不能推迟,就失去了相差显微镜的作用。

观察培养瓶或培养板中的活细胞结构常用倒置相差显微镜,它的组成与普通光学显微镜一样,只不过物镜与照明系统颠倒,物镜安装在载物台的下方,光源及聚光器安装在载物台的上方(图 4-2)。

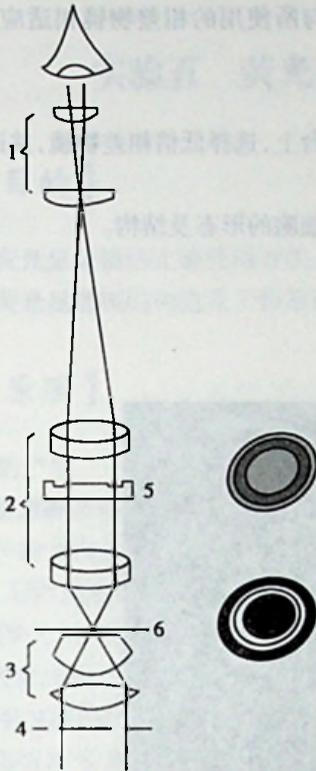


图 4-1 相差显微镜光路图

1. 目镜; 2. 物镜; 3. 聚光器; 4. 环状光阑; 5. 相板; 6. 标本

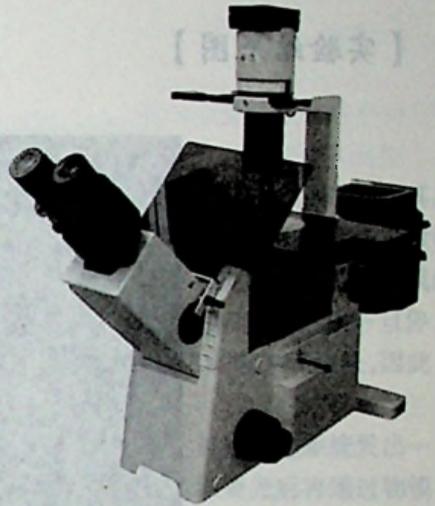


图 4-2 倒置相差显微镜实物图

【实验用品】

实验对象: 人宫颈癌 HeLa 细胞。

实验器材: 倒置相差显微镜。

【操作步骤】

(一) 相差显微镜的使用

1. 打开光源 一般在环状光阑下面选择绿色滤光片置于光路中, 它可吸收红色和蓝色光, 使波长范围小的单色光线进行照明, 并有吸热作用, 能使相差显微镜观察获得良好的效果。此滤光片放置好后一般不再每次更换。

2. 合轴调整 将合轴望远镜换入目镜筒内, 一边向望远镜内观察, 一边用右手转动望远镜内筒使其下降, 当对准焦点就能看到环状光阑的亮环和相板的黑环, 此时可将望远镜固定住。再升降聚光器并调节其下的螺旋使亮环的大小与黑环一致, 然后前后左右调节环状光阑聚光器上的调节钮, 使两环完全重合。合轴调整完毕, 抽出望远镜, 换回目镜, 按常规要领进行观察。在更换不同倍率的相差物镜时, 每一次都要使用相匹配的环状光阑并重新合轴调整。

3. 调焦 旋转物镜转换器, 使低倍相差物镜进入光路, 按普通光学显微镜常规操作方法进行

对光和调焦。使用过程必须使环状光阑的直径和孔宽与所使用的相差物镜相适应。例如:使用40×相差物镜,应选用40×标示孔的光阑。

(二) 倒置相差显微镜使用练习

1. 将培养有 HeLa 细胞的培养瓶或培养皿置于载物台上,选择低倍相差物镜,并进行对光和调焦,观察培养中的 HeLa 细胞。

2. 更换高倍相差物镜,进行对光和调焦,观察 HeLa 细胞的形态及结构。

【实验结果图】

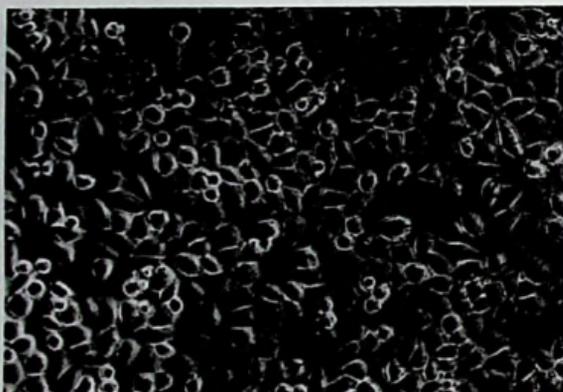


图 4-3 培养中的 HeLa 细胞

【观察与记录】

在倒置相差显微镜下观察细胞,可清楚地分辨细胞的形态及细胞核、细胞质中存在的颗粒状结构(图 4-3)。

【注意事项】

1. 更换相差物镜时,每一次都要使用相匹配的环状光阑。
2. 标本在有水的环境中(如培养液或用水封片)成像效果更明显。
3. 载玻片或培养瓶必须平整、均匀;标本不能太厚。
4. 禁止用手触摸物镜、目镜头。

【作业与思考题】

1. 绘制镜下观察到的 HeLa 细胞的形态及结构。
2. 比较并说明相差显微镜及普通光学显微镜下观察到的细胞形态的异同。

(向若兰)

实验五 荧光显微镜的构造及使用方法

【实验目的】

1. 熟悉荧光显微镜的正确使用方法。
2. 了解荧光显微镜的构造及工作原理。

【实验原理】

1. 荧光的产生 一些化学物质经短波高能光激发后能吸收并储存能量而进入激发态,当其从激发态再回复到基态时,过剩的能量转化为热能或以波长较长的荧光形式发射出来。荧光显微镜利用一定波长的光激发样品中的荧光物质发射荧光,通过物镜、目镜放大系统以对样品结构或组分进行定位、定性和定量观察检测。荧光发射的特点是在接受能量后即刻引起发光,而一旦停止供能,荧光现象也随之瞬间消失;而且每种荧光物质都有一个产生最强荧光的激发光波长,因此要观察不同荧光应选用不同波长的激发光。

2. 荧光显微镜的原理 荧光显微镜采用高压汞灯和弧光等作为光源,经过滤色系统发出一定波长的光作为激发光,激发光激发标本内的荧光物质发射出各种不同颜色的荧光后再通过物镜和目镜的放大进行观察。

图 5-1 是目前常用的荧光显微镜的光路图,高压汞灯发出的光经激发滤片选择后,激发光经一个与光轴呈 45° 的双色束分离器从物镜向下落射到样品表面,样品被激发产生的荧光以及由物镜、盖玻片反射的激发光同时进入物镜,荧光经双色束分离器进入目镜,激发光被双色束分离器阻挡,少量通过双色束分离器的激发光被阻断滤片吸收(图 5-2)。

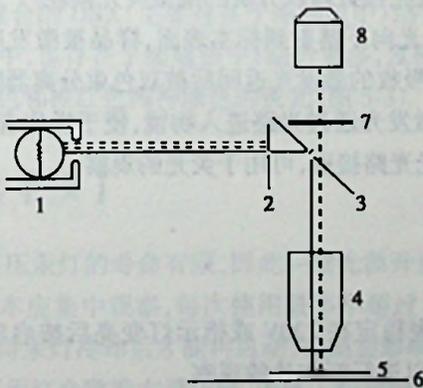


图 5-1 落射式荧光显微镜光路图

1. 高压汞灯;2. 激发滤片;3. 双色束分离器;4. 物镜;5. 标本;6. 载物台;7. 阻断滤片;8. 目镜

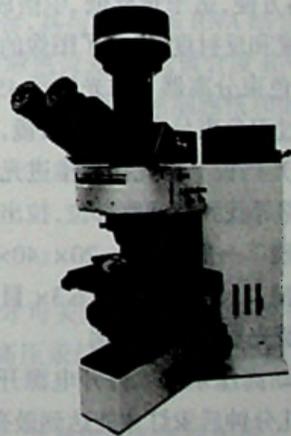


图 5-2 落射式荧光显微镜

【实验用品】

实验对象:人口腔黏膜上皮细胞。

实验试剂:95%乙醇、0.01%吖啶橙染液、PBS。

实验器材:荧光显微镜、牙签、载玻片、盖玻片、吸水纸。

【操作步骤】

(一) 荧光显微镜的构造

荧光显微镜比普通光学显微镜多一些附件,如荧光光源、激发滤片、双色束分离器和阻断滤片等。

1. 光源 普遍采用100~200W的超高压汞灯,它能发射很强的紫外和蓝紫光,足以激发各类荧光物质。荧光显微镜一般也配有普通光源,以方便观察目标的寻找。

2. 滤色系统 滤色系统是荧光显微镜的重要部位,由激发滤片和阻断滤片组成。

(1) 激发滤片:可透过特定波长的激发光,同时阻挡对激发荧光无用的光。一般有紫外、紫色、蓝色和绿色激发滤片,各自提供一定波长范围的激发光。

1) 紫外线激发滤片:可使400nm以下的紫外线通过。

2) 紫外蓝光激发滤片:可使300~450nm范围内的光通过。

3) 紫蓝光激发滤片:可使350~490nm的光通过。

4) 蓝绿光激发滤片:可使500nm的光通过。

(2) 阻断滤片:为能观察到特定的发射光,在物镜后面需加阻断滤片。其作用一是吸收和阻挡激发光进入目镜,以免干扰荧光和损伤眼睛;二是选择并让特定波长的发射光透过,表现出专一的荧光色彩。

3. 聚光器 荧光显微镜的聚光器有明视野聚光器和暗视野聚光器两种。明视野聚光器聚光力强,使用方便,适于观察低、中倍放大的标本。暗视野聚光器产生黑暗的背景,从而增强了荧光图像的亮度和反衬度,提高了图像的质量,能发现亮视野难以分辨的细微荧光颗粒。

4. 双色束分离器 与光轴呈45°,可使激发光向下落射到标本表面,样品被激发后产生荧光,荧光能通过双色束分离器到达目镜,而未被标本吸收的激发光返回后被双色束分离器阻挡。

5. 阻光挡板 将此挡板推进光路,可遮挡激发光通过光路进入物镜,便于操作者用普通光学显微镜光路寻找待观察部位,拉出该挡板,荧光光路接通,可用于荧光的观察。

6. 物镜 一般有10×、20×、40×、60×物镜。

7. 目镜 一般有5×和6.3×目镜。

(二) 荧光显微镜的使用

1. 启动高压汞灯 打开电源开关,当电压表稳定在220V或指示灯变亮后按启动键,汞灯点燃。预热几分钟后汞灯才能达到最亮点,此时可以进行标本片的观察。

2. 放置标本片。

3. 先关闭阻光挡板,用普通光学显微镜光路找到待观察的细胞部位,调节焦距使物像清晰。

4. 关闭普通光源,选择针对所观察的荧光的合适激发滤片及阻断滤片,拉开阻光挡板,这时显微镜转换到荧光光路,观察标本,调节细准焦螺旋便可得到清晰的荧光图像。用油镜观察标本时,

必须用无荧光的特殊镜油或无荧光甘油。

(三) 荧光显微镜的使用练习

1. 用牙签刮取口腔黏膜上皮细胞,均匀涂在载玻片上。
2. 待载玻片上细胞稍干后,浸入 95% 乙醇固定 5 分钟,取出,晾干。
3. 滴加 0.01% 吖啶橙染液避光染色 5 分钟,吸弃染液,用 PBS 漂洗 1 次,盖上盖玻片,用吸水纸吸去多余液体,置于载物台上。选用紫外线激发滤片,进行结果观察。

【实验结果图】

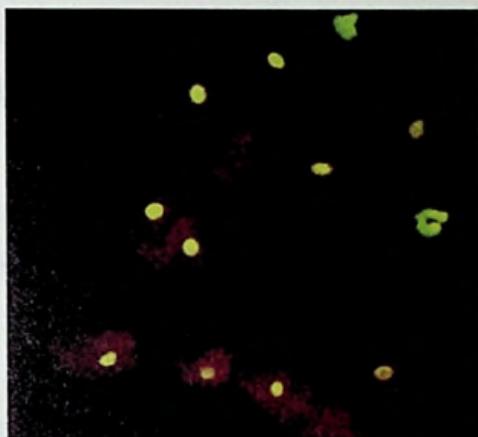


图 5-3 人口腔黏膜上皮细胞的荧光染色

【观察与记录】

吖啶橙可透过完整的细胞膜并与细胞内 DNA 和 RNA 结合,其与 DNA 和 RNA 结合量存在差异:与高度聚合的 DNA(主要存在于细胞核中)结合量少,发黄绿色荧光;与低聚合度 RNA(主要存在于细胞质中,也存在于细胞核中)结合量多,发橙红色荧光。因此镜下可见细胞核和细胞质被激发产生黄绿色和橙红色两种颜色的荧光(图 5-3)。

【注意事项】

1. 超高压汞灯的使用寿命有限,因此一般光源开启 15 分钟后才可关闭,以防止汞蒸发不完全而损坏电极。标本应集中观察,每次使用最多不超过 2~3 小时。高压汞灯关闭后不能立即重新打开,需经 5 分钟待汞灯冷却后才能再启动,否则会影响汞灯寿命。
2. 高压汞灯会散发大量热能,因此工作环境温度不宜太高,并有良好的散热条件。
3. 标本染色后应立即观察,以免时间久了荧光逐渐减弱。
4. 在激发光持续照射下标本上的荧光会衰减或淬灭,应避免长时间在荧光下观察同一部位。
5. 为防止紫外线对眼睛的损害,观察过程中应戴上防护眼镜。

【作业与思考题】

绘制镜下人口腔黏膜上皮细胞的形态。

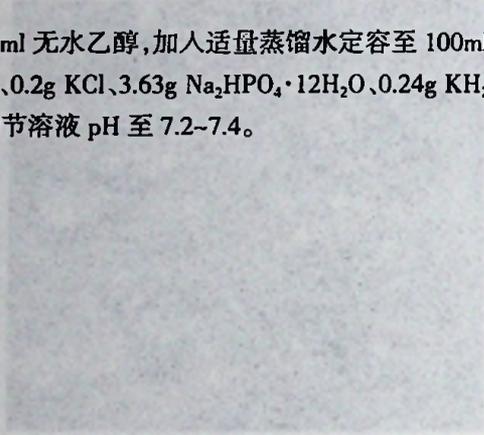
【试剂配制】

1. 0.01% 吡啶橙染液 称取 0.1g 吡啶橙,溶于适量蒸馏水中,继续加蒸馏水定容至 100ml,配制成 0.1% 吡啶橙原液,避光保存。临用时将 0.1% 吡啶橙原液用 PBS 缓冲液稀释 10 倍,成为 0.01% 吡啶橙染液。

2. 95% 乙醇 量取 95ml 无水乙醇,加入适量蒸馏水定容至 100ml,室温密封保存。

3. PBS 称取 8g NaCl、0.2g KCl、3.63g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.24g KH_2PO_4 ,溶于适量蒸馏水中,继续加蒸馏水容至 1000ml,调节溶液 pH 至 7.2~7.4。

(李新颖)



【参考文献】

【注意事项】

第二篇

细胞结构与成分的显示及分析技术

实验六 差速离心法分离细胞器

【实验目的】

1. 掌握细胞核、线粒体等细胞器的分离方法。
2. 了解细胞和细胞器分离的原理。

【实验原理】

各种不同的细胞和细胞内各种细胞器的大小、密度不同,在同一离心场内的沉降速度也不同。根据这一原理,可用差速离心法、速度沉降或平衡沉降法来分离细胞及细胞器。其中差速离心法是以从低到高不同的转速离心,使较大的颗粒先在低转速中沉淀,再用较高的转速将原来悬浮在上清液中的小颗粒物质沉淀下来,从而达到逐级分离细胞或细胞器的目的。但是由于样品中各种大小和密度不同的颗粒在离心时是均匀分布于离心介质中,故每级分离得到的沉淀颗粒需经反复重悬和离心加以纯化。

【实验用品】

实验对象:大白鼠。

实验试剂:生理盐水、0.25mol/L 蔗糖溶液、0.34mol/L 蔗糖溶液、1% 甲苯胺蓝染液、0.2% 詹纳斯绿染液。

实验器材:普通光学显微镜、低温离心机、天平、玻璃匀浆器、烧杯(20ml)、离心管(1.5ml、15ml)、尼龙网、吸管、冰盒、载玻片、盖玻片、滤纸。

【操作步骤】

1. 将空腹 12 小时的大白鼠处死,立即剖开腹部,迅速取出肝脏浸入预冷的生理盐水中,洗净血污,用滤纸吸干。
2. 取约 2g 左右的肝组织,用预冷的 0.25mol/L 蔗糖溶液冲洗数次后,剪碎。再以预冷的 0.25mol/L 的蔗糖溶液悬浮剪碎的组织(9ml/g 组织),倒入匀浆器内,在冰浴条件下匀浆,随后用尼龙网过滤,

即制得肝细胞匀浆,备用。

3. 将制备好的肝细胞匀浆移入离心管,沿管壁小心加入等量的 0.34mol/L 蔗糖溶液覆盖于上层,700g 离心 10 分钟(在低温离心机中进行,下同)。将上清移入新的离心管内并置于冰浴中待用。沉淀用 0.25mol/L 蔗糖溶液洗涤悬浮后以 1000g 离心 10 分钟,共 2 次。弃去上清后,沉淀即为经过纯化的细胞核(表 6-1)。

表 6-1 差速离心形成的沉淀(肝脏)

重量(g)	时间(分钟)	沉淀
700~1000	10	细胞核,细胞膜
3000~3300	10	线粒体,细胞膜碎片
6000	10	线粒体,高尔基复合体
10 000~16 000	10	溶酶体,过氧化物酶体
100 000	10	微粒体

4. 将分离细胞核时收集的上清在低温下以 3300g 离心 10 分钟,将上清移入新的离心管内并置于冰浴中待用。沉淀用预冷 0.25mol/L 的蔗糖溶液悬浮后,在低温离心机中以 3300g 离心 10 分钟,共 2 次。弃去上清后,可获得纯化后的线粒体(表 6-1)。

5. 将分离纯化后的细胞核制成涂片,空气干燥后,滴加 1% 甲苯胺蓝染液染色 15 分钟,清水漂洗,盖上盖玻片,用滤纸吸去多余液体,于显微镜下观察。

6. 取分离纯化的线粒体制成涂片,滴加 0.2% 詹纳斯绿染液染色 20 分钟,盖上盖玻片,用滤纸吸去多余液体,于显微镜下观察。

【实验结果图】

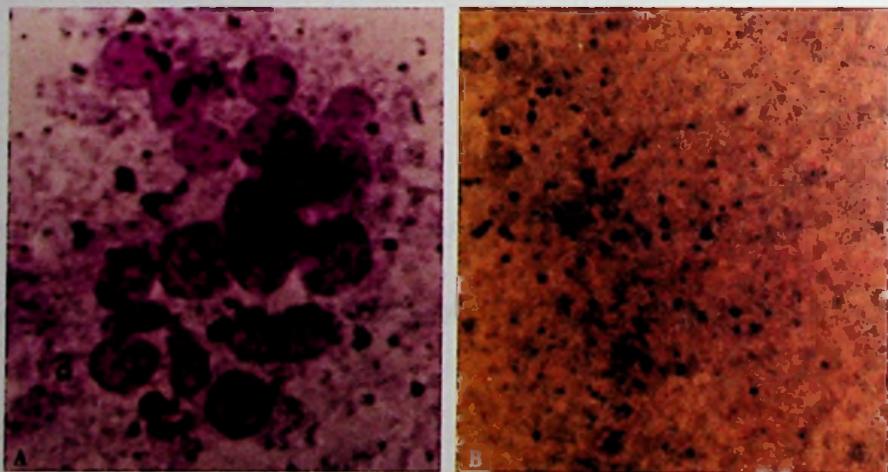


图 6-1 差速离心法分离后的细胞核及线粒体
A. 细胞核; B. 线粒体

【观察与记录】

细胞核呈紫色,核内可见染成深紫色的核仁,线粒体呈蓝绿色颗粒状(图 6-1)。

【注意事项】

1. 在细胞器分离过程中,所有操作应在低温下进行。
2. 制作涂片时,注意细胞器数量及推片角度。
3. 组织匀浆时要尽量使细胞完全破碎。

【作业与思考题】

1. 绘制光镜下细胞核、线粒体的形态。
2. 在细胞器分离过程中,为什么所有操作均应在低温下进行?

【试剂配制】

1. 0.25mol/L 蔗糖溶液 称取 85.5g 蔗糖加蒸馏水定容至 1L。
2. 0.34mol/L 蔗糖溶液 称取 110.16g 蔗糖加蒸馏水定容至 1L。
3. 1% 甲苯胺蓝染液 称取 1g 甲苯胺蓝加蒸馏水定容至 100ml。
4. 0.2% 詹纳斯绿染液 0.2g 詹纳斯绿溶于适量生理盐水中,继续加生理盐水定容至 100ml,避光保存。

(王晓静)

实验七 人染色体标本的制备

【实验目的】

1. 掌握人染色体标本制备的基本方法。
2. 熟悉正常人类染色体数目和形态特征。

【实验原理】

染色体是遗传信息的载体。每种生物都有一定数目、形态和结构的染色体。染色体的形态结构在细胞周期中是不断变化的,有丝分裂中期是分析染色体的最佳阶段。染色体标本的制备包括非显带分析技术和显带分析技术两种。非显带技术相对简单,但只能准确鉴别出少数几条染色体,大部分染色体只能鉴别到组。显带分析技术能显示染色体更细微的结构,利用带型可准确识别每一条染色体并分析结构的变化。

人类染色体标本的取材来源主要有外周血淋巴细胞、皮肤组织、绒毛细胞、羊水细胞、骨髓等。通常情况下,可采取少量外周静脉血、绒毛或羊水细胞,做短期培养以获得足够数量的分裂期细胞,经秋水仙素处理细胞使正在分裂的细胞停止于分裂中期,再经过低渗、固定等处理,即可得到较多的中期染色体以供分析。

【实验用品】

实验对象:人外周静脉血。

实验试剂:RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清)、500U/ml 肝素、植物血凝素、 $10\mu\text{g/ml}$ 秋水仙素、 0.075mol/L KCl 低渗液、Carnoy 固定液、吉姆萨(Giemsa)染液原液、磷酸盐缓冲液(pH6.8)。

实验器材:超净工作台、二氧化碳培养箱、恒温水浴箱、普通光学显微镜、离心机、酒精灯、培养瓶、采血器材、离心管(15ml)、吸管、载玻片、盖玻片、吸水纸。

【操作步骤】

1. 在酒精灯外焰处,用一次性注射器抽取肝素溶液约 0.2ml,套上针头,抽动针筒,使肝素湿润至针筒 5ml 刻度处,然后将剩余的肝素排出。
2. 常规消毒后,采集肘外周静脉血约 5ml,抽动注射器使血液与肝素混匀。
3. 在超净工作台中,将 10ml RPMI 1640 培养基、0.7ml 植物血凝素依次加入灭菌培养瓶中,向培养瓶中滴加 30 滴全血,水平晃动混匀。
4. 将培养瓶置于二氧化碳培养箱中培养 70 小时(培养 24 小时后,水平晃动培养瓶,使血液均匀悬浮,再继续培养)。
5. 加入秋水仙素,使其终浓度为 $0.2\mu\text{g/ml}$ 。轻轻摇动培养瓶,使秋水仙素在培养基中混合均匀,继续静置培养至 72 小时,使大量生长的细胞被阻断于 M 期。
6. 用吸管吸取培养液,反复冲洗瓶壁,使贴壁细胞脱离瓶壁,然后将全部液体吸入离心管中,1000rpm 离心 6~8 分钟。
7. 吸弃上清液,加入 37°C 预温的 9ml KCl 低渗液,用吸管轻轻吹散细胞团,混匀后置 37°C 恒温水浴箱低渗处理 10~15 分钟。
8. 加入 1ml 新配制的 Carnoy 固定液,轻轻混合均匀,1000rpm 离心 6 分钟。
9. 吸弃上清液,加入 10ml Carnoy 固定液,轻轻吹散细胞团制成细胞悬液后,室温下固定 30 分钟,1500rpm 离心 6 分钟。
10. 吸弃上清液,重复步骤 9。
11. 吸弃上清液,根据细胞数量的多少加入数滴 Carnoy 固定剂,轻轻吹散细胞制成悬液。
12. 吸取少量细胞悬液,于 20cm 左右高度滴 2~3 滴于预冷的载玻片上,吹散,空气晾干。
13. 取 3 滴 Giemsa 原液加 10 滴磷酸盐缓冲液,混匀后滴在玻片标本上,染色 6 分钟。
14. 流水轻轻冲洗玻片,将染液冲掉,加盖玻片,用吸水纸吸去多余液体,分别在高倍镜和油镜下观察染色体标本分裂象的多少及分散情况。

【实验结果图】

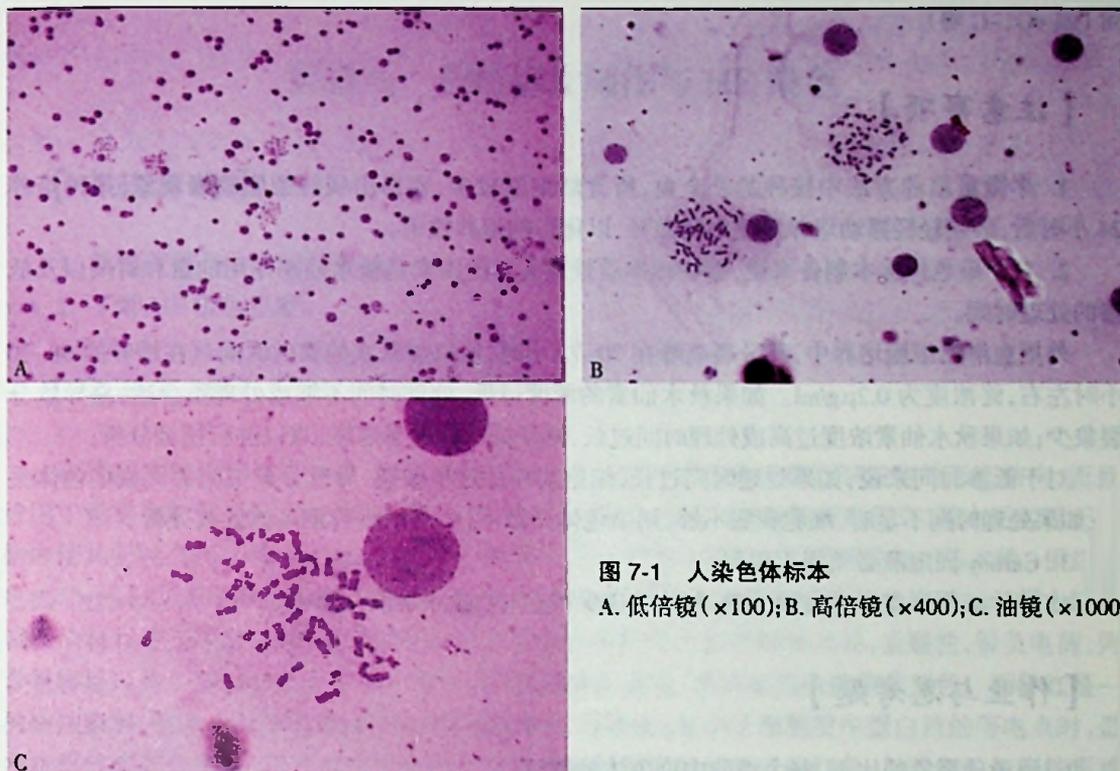


图 7-1 人染色体标本
A. 低倍镜(×100); B. 高倍镜(×400); C. 油镜(×1000)

【观察与记录】

首先在低倍镜下观察整张玻片,找到分散良好且染色体长短适中的细胞分裂象,然后于高倍镜下进一步观察,可清楚地分析染色体的数目及较大结构(图 7-1)。各组染色体特征见表 7-1。

表 7-1 各组染色体的特征

分组	染色体号数	染色体大小	着丝粒位置	随体有无	组内染色体能否鉴别
A	1,3	最大	中央着丝粒	无	能
	2		亚中央着丝粒		
B	4,5	次大	亚中央着丝粒	无	难以鉴别
C	6-12,X	中等	亚中央着丝粒	无	难以鉴别
D	13-15	中等	近端着丝粒	有	难以鉴别
E	16	较小	中央着丝粒	无	能
	17,18		亚中央着丝粒		
F	19,20	次小	中央着丝粒	无	难以鉴别
G	21,22Y	最小	近端着丝粒	有	难以鉴别
				无	长臂并拢,易鉴别

正常人的染色体在各组之间较易鉴别,但组内各染色体间除第 A 组、E 组和 Y 染色体可以识别外,其他组内染色体很难鉴别,只能按大小顺序或着丝粒位置大致区分。因此,用一般染色方法,对某一具体染色体的增加或遗失,难以做出明确鉴定,这时可不明确写出编号,只写明组的增减即可(如 +G、-G 等)。

【注意事项】

1. 半微量培养方法中接种的是全血,所含红细胞较多,容易出现红细胞凝聚现象,接种培养 24 小时后,必须轻轻摇动培养瓶使细胞散开,以免影响培养效果。

2. 对于染色体标本制备来说,影响标本质量最关键的因素是秋水仙素作用的量和时间以及低渗的处理时间。

外周血淋巴细胞培养中,其分裂高峰在 70~72 小时,所以加秋水仙素的时间可在培养的 68~70 小时左右,终浓度为 $0.2\mu\text{g/ml}$ 。如果秋水仙素的浓度过低、处理时间不够或处理不合适,易导致分裂象少;如果秋水仙素浓度过高或处理时间过长,则使染色体过于缩短,难以进行核型分析。

对于低渗时间来说,如果处理时间过长,细胞膜往往过早破裂,导致分裂细胞丢失或染色体丢失;如果处理时间不足时,细胞膨胀不够,则染色体分散不佳,难以进行染色体计数分析。

3. Carnoy 固定液必须现用现配。

4. 玻片必须事先经过去油处理,制片前应保存在 4°C 或冰水混合物中。

【作业与思考题】

1. 记录分裂象的比例、每个细胞中染色体的数目。
2. 如果染色体数目及长短出现异常,请分析其可能的原因。

【试剂配制】

1. 肝素溶液 取肝素注射液(12 500U),用 25ml 无菌生理盐水在超净工作台中稀释成 500U/ml 的使用液。使用时每毫升血加 0.2ml 肝素液(100U 肝素一般可抗凝 5ml 血)。

2. RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清) 依 RPMI 1640 粉剂型培养基说明书,称取规定的重量和蒸馏水按比例溶解。加入 2g NaHCO_3 ,待完全溶解后,用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,分装后置于 4°C 冰箱中保存备用。使用时分别加青霉素(终浓度为 100U/ml)、链霉素(终浓度为 0.1mg/ml)和胎牛血清(终浓度为 10% 或 15%)。

3. 植物血凝素溶液 将 10mg 植物血凝素粉剂溶于 2ml 0.85% 无菌生理盐水中,使用时每 5ml 培养液中加 0.2~0.3ml 该溶液,使培养液中植物血凝素的浓度达到 200~300 $\mu\text{g/ml}$ 。

4. 100mg/ml 秋水仙素 称取 10mg 秋水仙素,加 0.85% 生理盐水定容至 100ml,用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌, 4°C 保存备用。

5. 0.075mol/L KCl 低渗液 称取 0.559g KCl,加蒸馏水定容至 100ml。

6. Carnoy 固定液 取甲醇和冰醋酸,按 3:1 体积比进行配制,需现用现配。

7. Giemsa 原液 称取 1g Giemsa 粉置于研钵中加少量甘油,充分研磨,呈无颗粒的糊状后,继续加入甘油至 66ml,置于 56°C 温箱中 2 小时。然后边研磨边加入 66ml 甲醇,保存于棕色瓶中,

2周后过滤备用。常规染色时,取 1ml Giemsa 原液加 9ml 磷酸缓冲液(pH6.8)配成工作液,染色 20~30 分钟。

(田 强)

实验八 石蜡切片制作与 HE 染色

【实验目的】

1. 掌握石蜡切片的制作方法。
2. 了解 HE 染色原理。

【实验原理】

石蜡切片是组织学中常规应用的制片技术,不仅被用于观察正常组织细胞的形态结构,而且被用于观察及判断组织细胞的病理学变化。一般情况下,石蜡切片是组织经固定、脱水后包埋于石蜡内使其变硬,随后切成薄的组织切片,再根据研究和实验目的进行不同的染色。苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining),简称 HE 染色,是石蜡切片技术里常用的染色法之一。苏木精是碱性染料且带正电荷,细胞核中的脱氧核糖核酸(DNA)链上的磷酸基向外,呈酸性,带负电荷,两者很容易以离子键相互结合。苏木精在碱性溶液中呈蓝色,所以细胞核被染成蓝色。而伊红是一种酸性染料,在水中被离解成带负电荷的阴离子,当染液 pH 小于细胞质中蛋白质的等电点时,蛋白质带较多正电荷,可以被带负电荷的伊红染成不同程度的红色或粉红色,与蓝色的细胞核形成鲜明对比,可以更清楚地显示组织细胞的形态特征。由于组织细胞的不同成分对苏木精的亲合力不同及染色性质不一样,经苏木精染色后,细胞核呈蓝色,可用盐酸酒精分化和弱碱性溶液显蓝,如处理适宜,可使细胞核着清晰的深蓝色,胞质中的其他成分脱色。再利用胞质染料伊红染胞质,使胞质的各种不同成分又呈现出深浅不同的粉红色。

【实验用品】

实验对象:ICR 小白鼠。

实验试剂:10% 中性甲醛溶液(福尔马林)、苏木精染液、伊红染液、去离子水、0.5%~1% 盐酸乙醇、梯度乙醇(70% 乙醇、80% 乙醇、85% 乙醇、90% 乙醇、95% 乙醇 I、95% 乙醇 II、100% 乙醇 I、100% 乙醇 II)、乙醇二甲苯、二甲苯 I、二甲苯 II、中性树胶。

实验器材:普通光学显微镜、石蜡包埋机、切片机、蜡杯、载玻片、盖玻片、染色缸。

【操作步骤】

1. 石蜡组织块制作

(1) 取材和固定:颈椎脱位法处死小鼠后,立即切取组织(本实验以膀胱作为实验材料),并快速放入 10% 中性福尔马林中,固定时间为 2~24 小时(需视组织块的大小而定)。

(2) 冲洗:组织块自固定液中取出后,需立即冲洗,使其中所有的固定液全部除去,以免妨碍染色。

(3) 脱水:将组织块经70%乙醇→80%乙醇→95%乙醇Ⅰ→95%乙醇Ⅱ→100%乙醇Ⅰ→100%乙醇Ⅱ脱水,每步1~2小时。

(4) 透明:将脱水后的组织块经乙醇二甲苯(无水乙醇与二甲苯按1:1体积比配制)→二甲苯Ⅰ→二甲苯Ⅱ,每步0.5~2小时,使组织透明为止。

(5) 浸蜡:将透明的组织块放入蜡杯Ⅰ→蜡杯Ⅱ→蜡杯Ⅲ。浸蜡时间视材料大小而定,一般总的浸蜡时间为2~4小时。

(6) 包埋:使用石蜡包埋机进行包埋。

① 打开电源总开关,让包埋机处于工作状态。

② 设置温度,让包埋蜡温度处于65℃左右。

③ 打开冷冻台。

④ 取出包埋模型,注入少量的石蜡后,放入组织块,压上包埋盒,包埋盒上再注入少量石蜡,包埋完后,将其置于冷冻台上,冷冻台旁边备有冷水盒,当包埋块表面出现凝固时,迅速将它放入水中,然后取出蜡块,修削去周围的余蜡,保存备用(注意:小的多块组织应放在一起,大块组织应压平,管状和皮肤组织应竖起来包埋)。

2. 石蜡切片的制作

(1) 修整蜡块:切片前先修整蜡块,切去组织周围多余的石蜡,一般留下约2~4mm宽度的蜡边为宜。

(2) 将切片刀安装在刀架上后,将蜡块放在切片机固定装置上,调整蜡块与刀片至合适位置。

(3) 开始切片:先粗切标本,直至组织面暴露完整;调整切片厚度至4~6 μm ,再连续切出所需蜡带。

(4) 一手持毛笔将蜡片带下端轻轻托起,另一手用镊子轻轻夹起蜡片上端,正面朝上将蜡片放入预先准备好的水盒内(去离子水,水温45℃左右)展片,待蜡片带中的组织展平后,可进行分片和捞片,将载玻片垂直插入水中,靠近切片,随即将玻片直立提起,用铅笔在玻片毛玻璃处做好标记。

(5) 将带有切片的载玻片放入60℃的烤箱内干烤2小时左右,取出后备用。

3. HE染色

(1) 将石蜡组织片按照此顺序进行脱蜡、水化:二甲苯Ⅰ(10分钟)→二甲苯Ⅱ(10分钟)→100%乙醇Ⅰ(5分钟)→100%乙醇Ⅱ(5分钟)→95%乙醇(5分钟)→90%乙醇(5分钟)→85%乙醇(5分钟)→清水冲洗(1分钟)。

(2) 浸入苏木精染液染色5~7分钟。

(3) 流水洗去染液,浸入1%盐酸乙醇中分色1~2秒。

(4) 流水冲洗10分钟进行蓝化,使切片由淡红色变为灰蓝色。

(5) 浸入70%乙醇→85%乙醇→90%乙醇,每步1~2分钟。

(6) 浸入伊红染液中染色2~5分钟。

(7) 浸入95%乙醇Ⅰ(2分钟)→95%乙醇Ⅱ(2分钟)→100%乙醇Ⅰ(2分钟)→100%乙醇Ⅱ(5分钟)→二甲苯Ⅰ(2分钟)→二甲苯Ⅱ(2分钟)中脱水、透明。

(8) 中性树脂胶封片。

【实验结果图】

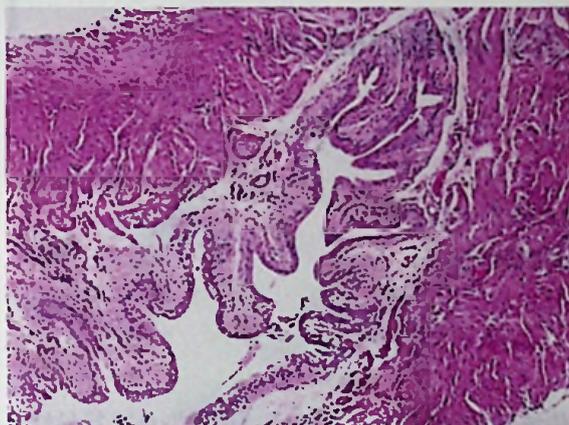


图 8-1 ICR 小鼠膀胱 HE 染色

【观察与记录】

细胞核染成蓝紫色,细胞质染成粉红色(图 8-1)。

【注意事项】

1. 切片经苏木精染色后,分色这一步是关键,应在显微镜控制下进行,一般以细胞核染色清晰而细胞质基本无色为佳。如果分色时间过久易导致染色太浅,应重新染色后再行分色。
2. 若切片经梯度乙醇脱水后,浸入二甲苯时呈现白色不透明状,则表明脱水不彻底,应更换无水乙醇、二甲苯,并将切片重新浸入无水乙醇中以求彻底脱水与透明。
3. 在染色过程中不要让切片干燥,以免切片收缩、变形,影响细胞形态。
4. 切片从二甲苯中取出或浸入二甲苯前,切片周边均应擦干净或吸干多余水分。
5. 使用中性树脂进行封片可防止日后褪色,盖玻片要选大于组织块的面积;所用树脂浓度要适当,且封片时不能有气泡。

【试剂配制】

1% 盐酸乙醇分色液:将 1ml 浓盐酸加入 99ml 的 70% 乙醇中混匀。

(吴茉莉)

实验九 细胞中 DNA 和 RNA 的显示

一、Feulgen 反应显示细胞中的 DNA

【实验目的】

1. 熟悉 Feulgen 反应的染色方法。
2. 了解 Feulgen 反应的基本原理。

【实验原理】

Feulgen 反应是一种传统的、也是最为经典的通过化学染色来特异性显示细胞中 DNA 的方法,其基本原理是首先采用稀酸作用并水解 DNA,使其脱去嘌呤碱,暴露核糖上的游离醛基,该醛基与 Schiff 试剂中的无色品红反应生成含有醌基的紫红色产物,细胞中存在有 DNA 的部位即呈现紫红色阳性反应。该反应既可检测细胞或组织中 DNA 的存在部位及其分布,也可利用其显色强度与 DNA 含量成正比的特性,用于对细胞或组织中的 DNA 含量进行测定。由于反应对含有 DNA 的核结构显示细致、清晰,染色稳定,有利于鉴别不同核结构和分化程度的细胞,如白血病细胞等。该反应也可以与流式细胞仪结合,测定细胞在细胞周期推进过程中 DNA 含量的变化,推测和了解某一细胞群体的周期变化特点,进行细胞周期分析。

【实验用品】

实验对象:人宫颈癌 HeLa 细胞(或其他贴壁细胞)。

实验试剂:Hanks 液、1mol/L 盐酸、Schiff 试剂、Carnoy 固定液、0.5% 亮绿、70% 乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇、二甲苯、蒸馏水、中性树胶。

实验器材:普通光学显微镜、恒温水浴箱、眼科镊子、染色缸、载玻片、吸管、吸水纸。

【操作步骤】

1. 将培养的 HeLa 细胞接种于盖玻片,24~48 小时后生长为单层。
2. 取细胞盖片一张(注意辨别细胞面),用 Hanks 液漂洗 3 次。
3. 浸入 Carnoy 固定液中,固定 30 分钟,蒸馏水漂洗 3 次。
4. 将盖玻片浸于 1mol/L 盐酸中,60℃水浴水解 15 分钟,蒸馏水洗 1 次。
5. 将盖玻片移入 Schiff 试剂中,避光反应 30 分钟,取出,用流水冲洗 5 分钟,再用蒸馏水洗 3 次。
6. 加 0.5% 亮绿复染 3~4 分钟。
7. 分别浸入 70% 乙醇→80% 乙醇→95% 乙醇→100% 乙醇中进行梯度脱水,每步 3~5 分钟。
8. 浸入二甲苯中透明 5 分钟,取出,晾干。

9. 滴一滴中性树胶于载玻片上,将盖片的细胞面向下,置于中性树胶上封片,晾干。
10. 置于显微镜下进行观察。

【实验结果图】



图 9-1 Feulgen 反应显示 HeLa 细胞中的 DNA

【观察与记录】

因为 DNA 主要分布于细胞核中,经 Feulgen 反应后,细胞核呈现粉红至紫红色,而细胞的其他区域无色。但由于亮绿的复染,细胞质和核仁呈现浅绿色(图 9-1)。

【注意事项】

1. 本实验采用盖玻片培养细胞,因此在整个操作过程中,应注意区分盖玻片的正反面,防止破坏细胞面,尤其在流水冲洗步骤时,应避免水流直接接触细胞面。

2. Feulgen 反应的关键步骤是有效地控制 DNA 水解的程度,包括:稀酸的浓度,水解的时间、温度等等。水解不足,会使游离醛基的暴露不完全,反应变弱;水解过度,会导致 DNA 异常降解,也同样使反应变弱,染色深度下降,严重时出现阴性反应。一般的水解时间应控制在 10~15 分钟,同时应考虑不同标本材料的影响。

3. Schiff 试剂的质量也是影响 Feulgen 反应实验结果的重要因素,试剂暴露于空气中易被氧化而变成红色,使试剂失效。操作及保存中不宜过多暴露于空气,并应注意避光。

【作业与思考题】

1. 绘制光学显微镜下 Feulgen 反应显示的细胞结构及 DNA 分布。
2. 说明 Feulgen 反应的基本原理。
3. 除了 Feulgen 反应,还有哪些细胞化学方法可用于显示细胞中 DNA 的分布情况?

【试剂配制】

1. Carnoy 固定液 将甲醇和冰醋酸按 3:1 体积比进行配制,需现用现配。
2. 5.6% NaHCO_3 溶液 称取 5.6g NaHCO_3 溶于 100ml 蒸馏水中,室温保存。如需要也可高压灭菌 15 分钟,4℃ 冰箱保存。
3. 0.5% 酚红指示剂 称取 0.5g 酚红置研钵中,缓慢滴加 15ml 0.1mol/L (0.4%) NaOH 溶液,边加边研磨,并不断吸出已溶解的酚红液,直至全部溶解,然后加入双蒸水至 100ml,颜色为深红。经滤纸过滤后使用,室温保存。
4. Hanks 液
 - (1) 原液甲:称取 160g NaCl 、8g KCl 、2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 800ml 蒸馏水中。称取 2.8g 无水 CaCl_2 溶于 100ml 蒸馏水中。将两种液体混合后,加蒸馏水定容至 1000ml,用滤纸过滤,再加 2ml 氯仿防腐,置 4℃ 冰箱备用。
 - (2) 原液乙:称取 3.04g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1.2g KH_2PO_4 、20g 葡萄糖溶于 800ml 蒸馏水中,用滤纸过滤,然后加 0.5% 酚红 80ml,再加水至 1000ml,最后加入 2ml 氯仿防腐,置 4℃ 冰箱备用。
 - (3) 工作液:取甲乙两液各 1 份,双蒸水 18 份,混匀分装,经高压灭菌 15 分钟后置 4℃ 冰箱中保存。临用前用无菌的 5.6% NaHCO_3 调节 pH 值 (pH7.2~7.4)。
5. 1mol/L 盐酸 取 8.25ml 比重为 1.19 的浓盐酸,加蒸馏水至 100ml。
6. Schiff 试剂 将 0.5g 碱性品红加入 100ml 煮沸的蒸馏水中,持续煮沸 5 分钟,并随时搅拌使之充分溶解。然后将其冷却到 50℃,过滤到棕色瓶中,加 1mol/L HCl 10ml,冷却至 25℃ 时加入 1g 无水亚硫酸氢钠 (NaHSO_3),需充分振荡后,避光过夜。次日取出(此时溶液呈淡黄色),加 0.25g 活性炭剧烈振荡 1 分钟,过滤后即得 Schiff 试剂,此时溶液应完全无色。避光、低温、密封保存。用前应先取出使其恢复至室温。
7. 0.5% 亮绿 称取 0.5g 亮绿,加蒸馏水溶解,定容至 100ml。

二、Brachet 反应显示细胞中的 DNA 和 RNA

【实验目的】

1. 熟悉 Brachet 反应的染色方法。
2. 了解 Brachet 反应的基本原理。

【实验原理】

甲基绿、派洛宁为带有正电荷的碱性染料,可与带有负电荷的核酸分子结合,两种染料的作用具有选择性,甲基绿带有两个正电荷,易与双链的 DNA 分子结合,使其显示蓝绿色;派洛宁带有一个负电荷,易与单链的 RNA 分子结合,使其显示红色。也有人认为其染色原理与 DNA 和 RNA 分子的不同聚合程度有关。细胞经甲基绿-派洛宁混合液处理后,其 DNA 和 RNA 出现不同的显色反应,以此可对细胞中的 DNA、RNA 进行定位、定性和定量分析。

【实验用品】

实验对象:人宫颈癌 HeLa 细胞(或其他贴壁细胞)。

实验试剂:Carnoy 固定液、甲基绿 - 派洛宁混合液、PBS(pH7.2)、丙酮。

实验器材:普通光学显微镜、眼科镊子、染色缸、载玻片、吸管、吸水纸。

【操作步骤】

1. 将培养的 HeLa 细胞接种于盖玻片,24~48 小时后生长为单层。
2. 取细胞盖片一张(注意辨别细胞面),用 PBS(pH7.2)漂洗 3 次。
3. 浸入 Carnoy 固定液中,固定 30 分钟,蒸馏水漂洗。
4. 滴加甲基绿 - 派洛宁混合液,染色 30 分钟。
5. 蒸馏水轻轻漂洗 2~3 次(每次 2~3 秒),用滤纸吸去多余水分。
6. 将细胞盖片浸入丙酮中分色 2~3 秒,迅速用蒸馏水漂洗。
7. 将细胞盖片细胞面向下,倒扣于载玻片上,用吸水纸吸净多余液体,置于显微镜下进行观察。

【实验结果图】

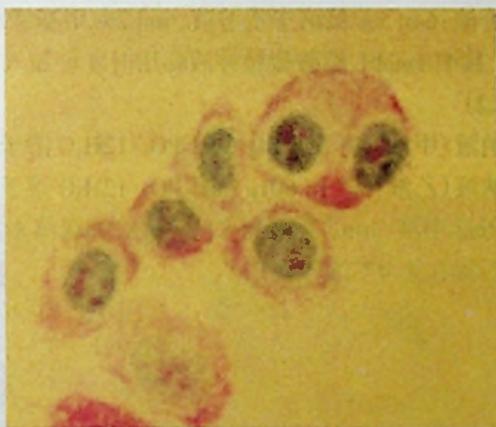


图 9-2 Brachet 反应显示 HeLa 细胞中的 DNA 和 RNA

【观察与记录】

DNA 主要分布于细胞核中, RNA 主要分布于核仁及细胞质中,因此,经甲基绿 - 派洛宁混合染料染色后,细胞质被染成红色,细胞核被染成蓝绿色,其中核仁被染成紫红色(图 9-2)。

【注意事项】

1. 本实验采用盖玻片培养细胞,因此在整个操作过程中,应注意区分盖玻片的正反面,防止破

坏细胞面,尤其在进行流水冲洗步骤时,应避免水流直接接触细胞面。

2. Brachet 反应的关键是使细胞中的 DNA 和 RNA 同时呈现不同的颜色,这与操作过程和试剂的使用密切相关,需要特别注意的是:①派洛宁易溶于水,在用水漂洗盖玻片时要严格控制时间,并注意观察颜色变化,防止过度脱色;②丙酮在本实验中起分色作用,目的是使两种颜色均能清晰显示。分色效果主要受时间影响,当染色试剂的批次,细胞的种类和状态不同时,需要的分色时间通常会有差别。在实际操作时,可先以短时间进行预试,或预设不同时间进行试验,把握好这一环节,通常可以得到较好的结果。

【作业与思考题】

1. 绘制光学显微镜下 Brachet 反应显示的细胞结构及 DNA 和 RNA 分布。
2. 说明 Brachet 反应的基本原理。
3. 根据自己的实验结果,分析影响 Brachet 反应实验的关键因素有哪些。

【试剂配制】

1. 甲基绿 - 派洛宁混合液

(1) 1mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 4.8): 将 6ml 冰醋酸溶于蒸馏水中,定容至 100ml。将 13.5g 醋酸钠溶于蒸馏水中,定容至 100ml。用时分别取两液 40ml、60ml 混匀即可。

(2) 甲基绿 - 派洛宁混合液: 6ml 5% 派洛宁水溶液、6ml 2% 甲基绿水溶液、16ml 蒸馏水和 16ml 1mol/L 醋酸盐缓冲液混匀。其中 1mol/L 醋酸盐缓冲液临用时才可加入染液中。

2. 0.01mol/L PBS (pH 7.2)

(1) 0.2mol/L 磷酸氢二钠液 (甲液): 将 35.814g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于双蒸水中,定容至 500ml。

(2) 0.2mol/L 磷酸二氢钠液 (乙液): 将 15.601g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于双蒸水中,定容至 500ml。

(3) 0.01mol/L PBS: 取 36ml 甲液、14ml 乙液和 8.2g NaCl,加双蒸水定容至 1000ml。混匀,待完全溶解后分装,经高压灭菌后保存于 4℃ 冰箱备用。

(方 瑾)

实验十 细胞中过氧化物酶的显示

【实验目的】

1. 掌握过氧化物酶显示的方法。
2. 了解过氧化物酶显示的反应原理。

【实验原理】

过氧化物酶是肝、肾、中性粒细胞及小肠黏膜上皮细胞中存在丰富的酶类,多存在于细胞的过

氧化物酶体中,参与细胞中的各种氧化反应,可将各种底物氧化。本实验利用过氧化物酶的上述性质,将底物 H_2O_2 分解,产生新态氧,使无色联苯胺氧化成蓝色联苯胺蓝,进而变成棕色产物,可根据颜色反应来判定过氧化物酶的有无或多少。

【实验用品】

实验对象:小白鼠。

实验试剂:联苯胺混合液、0.5% 硫酸铜、1% 番红。

实验器材:普通光学显微镜、解剖器材、注射器、染色缸、解剖盘、载玻片、盖玻片、吸管、吸水纸。

【操作步骤】

1. 取小白鼠一只,以颈椎脱位法将其处死,迅速剖开后肢暴露股骨,将股骨从一端剪断,用 PBS 润湿过的注射器吸出骨髓滴到载玻片一端。
2. 用另一张载玻片进行推片,制备骨髓涂片(详细步骤参见实验二),室温晾干。
3. 将涂片浸入 0.5% 硫酸铜中 30 秒。
4. 浸入联苯胺混合液中反应 6 分钟,流水冲洗。
5. 浸入 1% 番红溶液中复染 2 分钟,流水冲洗,室温晾干。
6. 加盖玻片,用吸水纸吸去多余液体,于显微镜下观察。

【实验结果图】

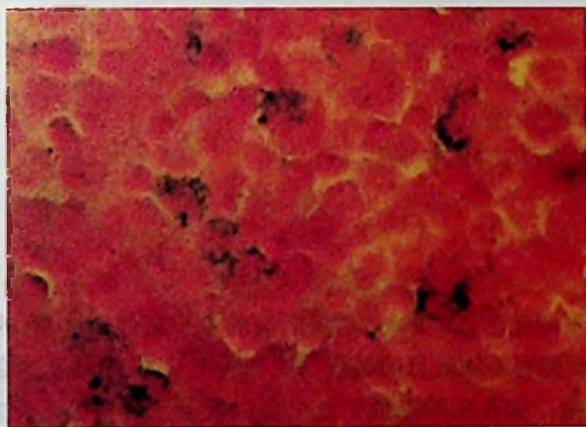


图 10-1 小鼠骨髓细胞中过氧化物酶的显示

【观察与记录】

细胞中存在数量不等的棕色颗粒,即为过氧化物酶存在的部位(图 10-1)。

【注意事项】

1. 颈椎脱位法处死小鼠 将小鼠放在铁丝笼上,右手抓住鼠尾向后拉,左手拇指和示指向下按住头部,在颅骨和脊椎间同时向外用力拉,使颅脑与脊髓分离,造成脊髓与脑髓脱离,小鼠会迅速死亡。

2. 本实验中联苯胺混合液在空气中极易被氧化而呈现棕色,降低显色效果,因此,该溶液应现用现配,并注意减少与空气接触。

【作业与思考题】

1. 绘制光学显微镜下过氧化物酶的显示结果。
2. 真核细胞中过氧化物酶是如何分布的?

【试剂配制】

1. 0.5% 硫酸铜 称取 0.5g 硫酸铜溶于蒸馏水中,定容至 100ml。
2. 联苯胺混合液 称取 0.2g 联苯胺,溶于 100ml 95% 乙醇中,使用前滴加 2 滴 3% 过氧化氢。
3. 1% 番红 称取 1g 番红溶于蒸馏水中,定容至 100ml。

(方 瑾)

实验十一 细胞中碱性蛋白的显示

【实验目的】

1. 掌握碱性蛋白的染色方法。
2. 熟悉碱性蛋白显示反应的基本原理。

【实验原理】

不同的氨基酸带有不同化学性质的侧链基团,有的带有碱性侧链,有的带有酸性侧链,这使由氨基酸组成的不同蛋白质拥有不同数目的碱性基团和酸性基团,这些基团会使蛋白质在不同的 pH 溶液中带有不同的净电荷。如在生理条件下整个蛋白质分子所带负电荷多,则为酸性蛋白质;带正电荷多,则为碱性蛋白质。因此,如果将细胞或组织标本用酸处理提取出核酸后,用带负电荷的碱性染液固绿(pH8.2~8.5)染色,可使在此 pH 环境中带正电荷的碱性蛋白显示出来。

细胞中含量最为丰富的碱性蛋白是组蛋白,组蛋白与 DNA 紧密包裹形成的复合物称为染色质,它作为遗传信息的储存载体存在于真核细胞的细胞核中。组蛋白合成于细胞周期 S 期的细胞质中,合成后迅速由核孔转运进入核中参与 DNA 的组装,因此,细胞中显示的碱性蛋白较多存在于细胞核中。

【实验用品】

实验对象:蟾蜍。

实验试剂:5% 三氯醋酸、0.1% 碱性固绿、70% 乙醇。

实验器材:普通光学显微镜、恒温水浴箱;解剖器材、解剖盘、染色缸、载玻片、盖玻片、吸管,吸水纸。

【操作步骤】

1. 取蟾蜍一只,以捣髓法处死,将其腹面朝上固定于解剖盘中,打开胸腔,将心脏剪一小口,吸取一滴血液滴于载玻片一端,推片,制备血涂片(具体操作参见实验二),室温晾干。
2. 将血涂片浸入 70% 乙醇中固定 5 分钟,室温晾干。
3. 浸入 5% 三氯醋酸中,于 60℃ 水浴中孵育 30 分钟,流水充分冲洗,除去三氯醋酸。
4. 浸入 0.1% 碱性固绿中染色 15 分钟,清水冲洗。
5. 盖上盖玻片,用吸水纸吸去多余液体,置于显微镜下进行观察。

【实验结果图】

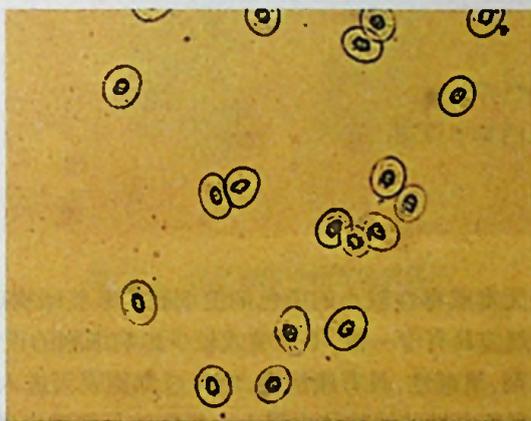


图 11-1 蟾蜍红细胞中碱性蛋白的显示

【观察与记录】

细胞中典型的碱性蛋白为参与染色质包装的组蛋白,主要存在于细胞核中,因此细胞经碱性固绿染色后,胞质、核仁不着色,细胞核大部分被染成绿色(图 11-1)。

【注意事项】

1. 血涂片的制备过程中,注意取血量和推片手法。

2. 三氯醋酸作用后的载玻片一定用流水充分、彻底地冲洗,以免干扰碱性固绿的染色。

【作业与思考题】

1. 绘制光镜下细胞的形态。
2. 为什么经三氯醋酸作用后的载玻片必须充分冲洗?

【试剂配制】

1. 0.1% 碱性固绿(pH8.0~8.5)
 - (1) 0.1% 固绿水溶液:称取 0.1g 固绿溶于蒸馏水中,定容至 100ml。
 - (2) 0.05% Na_2CO_3 溶液:称取 50mg Na_2CO_3 溶于蒸馏水中,定容至 100ml。用时将(1)和(2)液按 1:1 体积混合。
2. 5% 三氯醋酸 称取 5g 三氯醋酸溶于蒸馏水中,定容至 100ml。

(于敏)

实验十二 细胞中线粒体的活体染色

【实验目的】

1. 掌握线粒体活体染色方法。
2. 熟悉细胞活体染色的基本原理。

【实验原理】

活体染色是利用某些无毒或毒性较小的染色剂使细胞内某些结构或组分以天然状态显示出来的一种染色方法。染色剂应具有专一性,不影响或较少影响细胞的正常生命活动。詹纳斯绿 B 是线粒体的专一活体染色剂,呈碱性,具有脂溶性,能穿过细胞膜而进入细胞,并通过其结构中带有正电荷的染色基团结合到负电性的线粒体内膜上。线粒体是细胞内进行能量代谢的重要场所,内含多种与能量代谢有关的酶类,其中内膜上的细胞色素氧化酶可使结合的詹纳斯绿 B 保持氧化状态而呈现蓝色,而在周围的细胞质中染料呈无色。

【实验用品】

实验对象:家兔。

实验试剂:1:300 詹纳斯绿 B、0.9% Ringer 液。

实验器材:普通光学显微镜;兔固定器、解剖器材、解剖盘、注射器(50ml)、平皿、载玻片、盖玻片、吸管、吸水纸。

【操作步骤】

1. 取家兔一只,置于兔固定器中,使用注射器以空气栓塞法处死家兔,将其腹面向上置于解剖盘中,迅速打开腹腔,取兔肝边缘较薄的肝组织一块(约 $1\sim 2\text{cm}^3$)。
2. 将组织块置于平皿中,用剪刀剪成数块,滴加 0.9% Ringer 液清洗 3 次,除去血液。
3. 滴加 1:300 詹纳斯绿 B 染液,染色 30 分钟,注意让组织块表面暴露在染液外面,以保持染料的氧化状态;其间翻动组织块数次,使其各表面均有机会接触空气和染液。
4. 将组织块移至载玻片上,用镊子将其拉碎后,除去大块组织,留下细胞团。
5. 滴加 1 滴 0.9% Ringer 液,盖上盖玻片,用滤纸从盖玻片侧面吸去多余液体,置于显微镜下进行观察。

【实验结果图】



图 12-1 兔肝细胞中线粒体的显示

【观察与记录】

肝细胞中线粒体被染成蓝绿色,呈颗粒状或线条状(图 12-1)。

【注意事项】

1. 在实验的整个过程中,应注意保持标本的活体状态,当细胞死亡或开始死亡时,随着酶的失活,细胞质和细胞核也被染色。因此在取材时,要做到准确、快速;在染色时,要让组织块表面暴露在染液外面,使细胞内线粒体的酶可充分进行氧化作用,保持染料的氧化状态,发挥染色效能。
2. 詹纳斯绿 B 有微弱毒性,染色时间过长,有可能导致线粒体形成空泡,在操作中应加以注意。

【作业与思考题】

1. 绘制光镜下细胞及细胞线粒体的形态。
2. 简述詹纳斯绿 B 的作用原理。

【试剂配制】

1. 0.9% Ringer 液(哺乳动物用) 称取 0.9g 氯化钠、0.042g 氯化钾、0.025g 氯化钙,溶于蒸馏水中,定容至 100ml。
2. 1:300 詹纳斯绿 B 称取 1g 詹纳斯绿 B,溶于 0.9% Ringer 液中,定容至 100ml,装入棕色瓶保存,最好临用前现配。

(于 敏)

实验十三 细胞中微丝的染色及形态观察

【实验目的】

1. 掌握考马斯亮蓝 R250 显示微丝的原理和步骤。
2. 熟悉鬼笔环肽标记法显示微丝的原理和步骤。
3. 熟悉微丝骨架纤维基本形态及分布。

【实验原理】

细胞骨架是真核细胞中的蛋白质纤维网架体系,在维持细胞形状和运动方面起重要作用。根据纤维直径、组成成分和组装结构的不同,细胞骨架分为微管、微丝和中间纤维。

微丝是由肌动蛋白组成的细丝,以束状、网状有序分布在特定细胞空间。骨架纤维的直径很小,需借助电子显微镜才可呈现基本结构,1989年,S. D. Pone 利用普通光学显微镜观察到了用考马斯亮蓝染液染色的人成纤维细胞的细胞骨架,实践证明,考马斯亮蓝法是一种简单易行的细胞骨架染色方法。

考马斯亮蓝 R250 染色法是目前细胞骨架纤维观察常用的一种方法,具有简单易行的特点。但由于是非特异蛋白染色剂,因而无法区分细胞骨架的类型,仅能用于骨架形态及完整性研究。因本实验前期操作破坏微管纤维,因此在光镜下显示胞内的骨架纤维主要为微丝组成的应力纤维。应力纤维在体外培养的贴壁细胞中尤为发达,形态长而直,常与细胞的长轴平行并贯穿细胞全长。

鬼笔环肽是从毒蘑菇中分离的剧毒生物碱,只特异性结合聚合的微丝,并能抑制微丝的解聚,从而破坏微丝的聚合和解聚的动态平衡。因此,用荧光染料标记的鬼笔环肽可以特异地显示微丝在细胞中的精确定位,具有更普遍的应用意义。与考马斯亮蓝染色法相比,其对所显示蛋白的特异性更强,但价格较前者贵。

【实验用品】

实验对象:小鼠成纤维细胞 3T3(或中国仓鼠卵巢细胞 CHO)。

实验试剂:DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)、0.25% 胰酶、PBS、FITC 标记的鬼笔环肽、DAPI 染液、3% 戊二醛溶液、4% 多聚甲醛、M-缓冲液(pH7.2)、0.2% Triton X-100、1% Triton X-100、2% BSA、0.2% 考马斯亮蓝 R250 染液、蒸馏水。

实验器材:二氧化碳培养箱、超净工作台、普通光学显微镜、荧光显微镜、离心机、眼科镊子、平皿、1.5ml 离心管、盖玻片、载玻片、吸管、吸水纸。

【操作步骤】

(一) 考马斯亮蓝 R250 染色法

1. 将培养的 3T3 细胞接种于盖玻片上,24~48 小时后生长为单层。
 2. 抽提杂蛋白 取出细胞盖片(注意辨别细胞面),用 PBS 轻轻漂洗 2~3 次。滴加 1% Triton X-100 于室温或 37℃处理 20~30 分钟,以去掉细胞骨架以外的部分蛋白质。
 3. 稳定细胞骨架 吸去 1% Triton X-100,用 M-缓冲液轻轻漂洗 3 次,每次 3 分钟,以稳定细胞骨架。
 4. 固定 吸去 M-缓冲液,滴加 3% 戊二醛溶液,固定 15 分钟,吸弃固定液,用 PBS 轻轻漂洗 3 次。
 5. 染色 滴加 0.2% 考马斯亮蓝 R250 染液,染色 15 分钟,用 PBS 轻轻漂洗 3 次。
 6. 镜检 将玻片倒扣于载玻片中央,用吸水纸吸净多余液体,置于显微镜下进行观察。
- *注:可增加两个对照组:对照组 1 省略第 2、3 步;对照组 2 省略第 3 步,对比三种操作的差别。

(二) 鬼笔环肽荧光标记法

1. 将培养的 3T3 细胞接种于盖玻片上,24~48 小时后生长为单层。
2. 固定 用 PBS 轻轻漂洗 3 次,滴加 4% 多聚甲醛溶液,固定 15 分钟,吸弃固定液,用 PBS 轻轻漂洗 3 次。
3. 透膜 滴加 0.2% Triton X-100 溶液,处理 20 分钟,用 PBS 漂洗 5 分钟。
4. 封闭 滴加 2% BSA,封闭 30 分钟,以降低非特异性反应。
5. 染色 吸弃 BSA,滴加 FITC 标记的鬼笔环肽,37℃或室温避光反应 1 小时,用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟。
6. 复染 滴加 DAPI 染液避光染色 5 分钟,用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟。
7. 镜检 将细胞盖片的细胞面向下,倒扣于载玻片中央,用吸水纸吸净多余液体,置于荧光显微镜下进行观察。

【实验结果图】

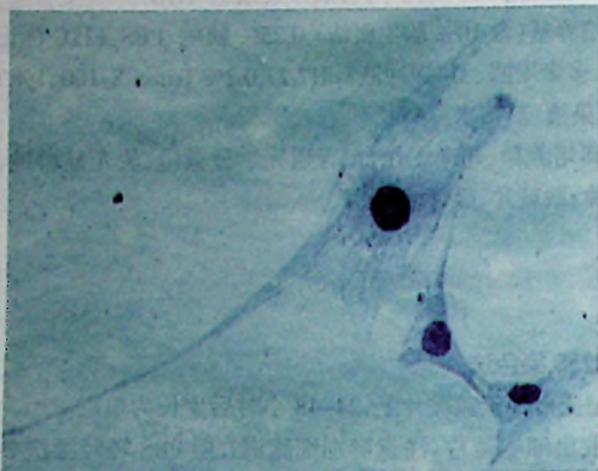


图 13-1 3T3 细胞中微丝的考马斯亮蓝染色

【观察与记录】

1. 在光镜下,可见细胞质中分布着许多被染成蓝色的纤维网络,大多沿细胞长轴方向和细胞突起部分分布。微管在该实验条件下不够稳定;中间纤维太细,在光学显微镜下无法分辨,因此,通过考马斯亮蓝染色法观察到的主要是由微丝形成的应力纤维(图 13-1)。

2. 在荧光显微镜下可见细胞核呈蓝色荧光,细胞质中分布有呈绿色荧光的纤维状细丝,多沿细胞长轴方向分布,为微丝形成的应力纤维。

【注意事项】

1. 夹取细胞盖片要小心操作,避免夹碎,并辨别细胞面。
2. Triton X-100 抽提杂蛋白的时间要做预实验,既避免时间过长破坏细胞结构,又要避免抽提时间过短导致显色背景干扰大。
3. 各洗涤步骤中,动作要轻,减少细胞脱落和细胞骨架的破坏。
4. 荧光染色及结果观察时注意避光操作。

【作业与思考题】

1. 绘制光学显微镜下细胞内微丝的分布。
2. 思考 M- 缓冲液中咪唑、 $MgCl_2$ 、EGTA、EDTA、巯基乙醇或二硫苏糖醇(DTT)在稳定细胞骨架中的作用。
3. 解释考马斯亮蓝 R250 法中不做第 2、3 两步和不做第 3 步对实验结果有什么影响。

4. 如果提前向细胞培养基中添加一定浓度的细胞松弛素 B, 可能导致细胞出现怎样的变化?

【试剂配制】

1. M-缓冲液(pH7.2) 称取 3.4g 咪唑、3.7g KCl、101.65mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、380.35mg EGTA、29.22mg EDTA 溶于适量蒸馏水中, 滴加 0.07ml 巯基乙醇, 加入 292ml 甘油, 继续加蒸馏水定容至 1000ml, 用 1mol/L HCl 调节 pH 至 7.2。
2. 1% Triton X-100 溶液 将 1ml Triton X-100 与 99ml M-缓冲液混匀即可。
3. 0.2% 考马斯亮蓝 R250 染液 称取 0.2g 考马斯亮蓝 R250, 加入 46.5ml 无水乙醇、7ml 冰醋酸溶解, 加蒸馏水定容至 100ml。
4. 3% 戊二醛固定液 将 12ml 戊二醛(25%)与 88ml PBS 混匀。
5. 4% 多聚甲醛溶液 称取 4g 多聚甲醛溶于 PBS 中, 定容至 100ml。
6. PBS 的配制参见实验五。

(沃晓嫫)

实验十四 细胞中微管的免疫荧光染色与形态观察

【实验目的】

1. 掌握微管骨架纤维基本形态结构及分布。
2. 熟悉间接免疫荧光染色技术的操作过程。
3. 了解微管免疫荧光染色的原理。

【实验原理】

微管是真核细胞中普遍存在的骨架成分之一, 以微管蛋白 α 、 β 异二聚体为基本构件, 结合少量微管结合蛋白聚合而成, 呈中空管状, 在不同类型的细胞中有相似的结构。微管是一种动态结构, 参与多种细胞器的定位及胞内物质运输, 还能与其他蛋白质共同装配成纤毛、鞭毛、纺锤体等结构, 参与细胞形态的维持、细胞运动和细胞分裂等。

观察微管可用电镜和免疫细胞化学技术, 其中较常用的有间接免疫荧光法。本实验中, 先用抗微管蛋白的抗体(一抗)与体外培养细胞进行孵育, 该抗体可特异性识别结合细胞内的微管蛋白; 然后用荧光标记的抗体(二抗)与一抗孵育结合, 从而使微管间接地被标记, 在荧光显微镜下显示出细胞中微管的形态和分布。

【实验用品】

实验对象: 人宫颈癌细胞 HeLa。

实验试剂: 75% 乙醇、PBS、100% 甲醇、1% Triton X-100、兔抗人微管蛋白抗体(一抗)、罗丹明-羊抗兔抗体(二抗)、DAPI 染液。

实验器材: 荧光显微镜、微量移液器(100 μ l)、染色缸、湿盒、小平皿、眼科镊子、吸管、载玻片、吸水纸。

【操作步骤】

1. 将培养的 HeLa 细胞接种在盖玻片上, 24~48 小时后生长为单层。
2. 取出细胞盖片(注意辨别细胞面), 置于小平皿中, 用 PBS 漂洗 3 次。
3. 滴加预温的 1% Triton X-100 溶液, 室温孵育 30 分钟, 用 PBS 漂洗 3 次。Triton X-100 是非离子型去污剂, 可增加细胞膜的通透性, 使抗体容易进入细胞, 同时抽提部分杂蛋白, 使胞质背景清晰。
4. 滴加 100% 甲醇于室温下固定 30 分钟, 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 分钟。
5. 用微量移液器吸取稀释的一抗(1:500)滴加在细胞上(40 μ l/片), 连同小平皿一起放入湿盒内, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1~2 小时或 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
6. 取出细胞盖片, 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 分钟。
7. 用微量移液器吸取稀释的二抗(1:400)滴加在细胞上(40 μ l/片), 连同小平皿一起放入湿盒内, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1~2 小时, 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 分钟。
8. 滴加 DAPI 染液, 避光染色 5 分钟, 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 分钟。
9. 将细胞盖片的细胞面向下, 倒扣在载玻片中央, 用吸水纸吸去多余液体, 于荧光显微镜下进行观察。

* 注: 可设置对照组: 对照组细胞以 BSA 代替一抗, 其余与上述各步骤相同。

【实验结果图】

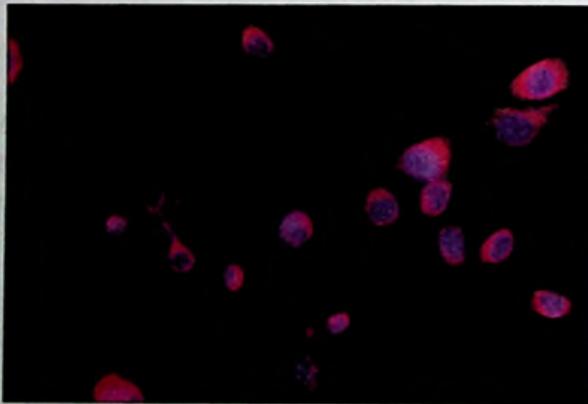


图 14-1 HeLa 细胞中微管的荧光染色

【观察与记录】

荧光显微镜下可见细胞核呈蓝色, 细胞质内可见微管形成的纤维网状结构, 呈红色荧光(图 14-1)。

【注意事项】

1. 细胞的漂洗要充分,可避免本底过高;动作要轻柔,并注意辨别细胞面,以防止细胞脱片;漂洗后应用滤纸靠在盖片边缘处吸去水分(但不要让其空气中干燥),以免稀释下一步的抗体或试剂,以得到清晰的荧光图像。
2. 应提前进行预实验,确定一抗及二抗的最佳稀释度,以特异性反应的荧光最强,而非特异性染色阴性为佳。
3. 使用 37℃ 的孵育温度可增强抗原抗体反应,但应在湿盒中进行,防止细胞干燥导致实验失败。
4. 细胞染色后应立即观察,以免时间过长导致荧光减弱。

【作业与思考题】

绘制荧光显微镜下细胞内微管的分布。

【试剂配制】

PBS 的配制参见实验五、1% Triton X-100 溶液的配制参见实验十三。

(沃晓嫒)

实验十五 细胞内中间纤维的免疫荧光染色与形态观察

【实验目的】

1. 掌握间接免疫荧光法观察角蛋白纤维的方法。
2. 了解细胞内角蛋白的分布。

【实验原理】

中间纤维是细胞骨架中结构最复杂、最坚韧的一种蛋白质纤维,根据其组织分布、生化、遗传及免疫学标准分为六种类型:角蛋白、波形蛋白、结蛋白、神经胶质纤维酸性蛋白、神经纤维蛋白和核纤层蛋白。

不同类型的中间纤维严格分布于不同类型的细胞中,并且绝大多数肿瘤细胞通常表达其来源细胞特征的中间纤维类型,即使发生转移,转移灶中的肿瘤细胞仍表达其原发肿瘤的中间纤维类型。例如,上皮细胞特异性表达角蛋白,在上皮组织来源的恶性肿瘤细胞中仍表达角蛋白,但多出现异常表达现象,这对肿瘤细胞的恶性特征有重要影响。因此对不同类型中间纤维蛋白表达情况的检测有助于进行肿瘤的诊断、鉴别诊断、分期和预后判定。

【实验用品】

实验对象:人宫颈癌细胞 HeLa。

实验试剂:PBS、4% 多聚甲醛固定液、丙酮、0.2% Triton X-100 溶液、兔抗人角蛋白抗体(一抗)、罗丹明-羊抗兔抗体(二抗)、DAPI 染液。

实验器材:荧光显微镜、微量移液器(100 μ l)、染色缸、眼科镊子、湿盒、吸管、载玻片、吸水纸。

【操作步骤】

1. 将培养的 HeLa 细胞接种在盖玻片上,24~48 小时后生长为单层。
2. 取出细胞盖片(注意辨别细胞面),置于小平皿中,用 PBS 漂洗 3 次。
3. 滴加 4% 多聚甲醛固定 15 分钟。
4. 吸去固定液,用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟。
5. 滴加 0.2% Triton X-100 溶液处理 20 分钟,用 PBS 漂洗 3 次。
6. 用微量移液器吸取稀释的一抗(1:200)滴加在细胞上(50 μ l/片),连同小平皿一起放入湿盒内,37 $^{\circ}$ C 孵育 1~2 小时或 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟,用吸水纸吸去多余液体。
7. 用微量移液器吸取稀释的二抗(1:400)滴加在细胞上(50 μ l/片),连同小平皿一起放入湿盒内,37 $^{\circ}$ C 孵育 1~2 小时,用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟。
8. 滴加 DAPI 染液,避光染色 5 分钟,用 PBS 漂洗 3 次。
9. 将细胞盖片的细胞面向下,倒扣在载玻片中央,用吸水纸吸去多余液体,于荧光显微镜下进行观察。

【实验结果图】



图 15-1 HeLa 细胞中角蛋白的免疫荧光染色

【观察与记录】

荧光显微镜下可见 HeLa 细胞核呈蓝色,细胞质中可见由角蛋白纤维形成的纤维网状结构,呈红色荧光(图 15-1)。

【注意事项】

注意事项参见实验十四。

【作业与思考题】

描绘镜下观察到的角蛋白纤维的形态结构。

(沃晓嫒)

实验十六 毛囊细胞核仁组织区银染

【实验目的】

1. 掌握银染法显示核仁组织区的原理与方法。
2. 熟悉核仁组织区在细胞中的分布情况。

【实验原理】

核仁组织区(nucleolus organizer region, NOR)是 rDNA 所在的部位,位于核仁的纤维中心,是参与形成核仁的染色质区。人类染色体的 NOR 位于第 13、14、15、21 和 22 号染色体的次缢痕处。细胞分裂间期,与活性 rDNA 转录密切相关的酸性蛋白(C23 蛋白和 B23 蛋白)富含巯基和二硫键,具有很强的嗜银性,能将 AgNO_3 中的 Ag^+ 还原成黑色 Ag 颗粒,从而将具有转录活性的核仁组织区特异性地染成黑色,称为银染核仁形成区,而且染色的深浅程度还可以反映出基因转录的活性度。

联合使用保护性胶显影剂(2% 白明胶显影剂)和硝酸银,使得非银染区的银离子在短时间内不发生还原作用,可降低实验结果的背景,增加实验的可靠性。这种银染方法简单省时、特异性强,目前在遗传、肿瘤、药物毒理及预防医学等各领域研究中,均有广泛应用。特别是电镜银染活性核仁形成区技术,可以在同一个细胞中显示银染蛋白、活性 rDNA 和 rRNA 三者间关系,并在亚细胞水平进行分析。

【实验用品】

实验对象:带有毛囊组织的头发。

实验试剂:50% AgNO_3 溶液、2% 白明胶显影液、40% 乙酸液、Carnoy 固定液、5mol/L 盐酸、去离

子水。

实验器材:恒温水浴箱、光学显微镜、解剖刀、酒精灯、眼科镊子、培养皿、载玻片、盖玻片、烧杯、吸管、吸水纸、擦镜纸。

【操作步骤】

1. 用眼科镊子拔取带毛囊细胞的头发 2~3 根,置于载玻片中央,滴加 2~3 滴 40% 乙酸液,室温放置 10 分钟左右,使毛囊软化。
2. 用解剖刀刮下毛囊细胞,弃去头发,用刀尖将毛囊细胞分散并均匀涂于载玻片中央,在酒精灯外焰上远火干燥。
3. 滴加 2~3 滴 Carnoy 固定液,固定 15 分钟(固定过程中可适当补加固定液),自然干燥。
4. 滴加 5mol/L 盐酸 2~3 滴,室温静置 10 分钟,用去离子水冲洗,自然干燥或火焰干燥。
5. 在培养皿底部放一张用去离子水润湿的滤纸,将载玻片细胞面向上,平放于滤纸之上,向细胞处滴加 1~2 滴 2% 白明胶显影剂,再滴加 2~4 滴 50% AgNO_3 ,置于 70℃ 恒温水浴箱中保温 3~5 分钟,此过程应注意避光。
6. 取出玻片标本后立即用去离子水充分冲洗,用滤纸轻轻吸去周边多余水分,自然干燥或火焰干燥后,加盖玻片,于显微镜下进行观察。

【实验结果图】

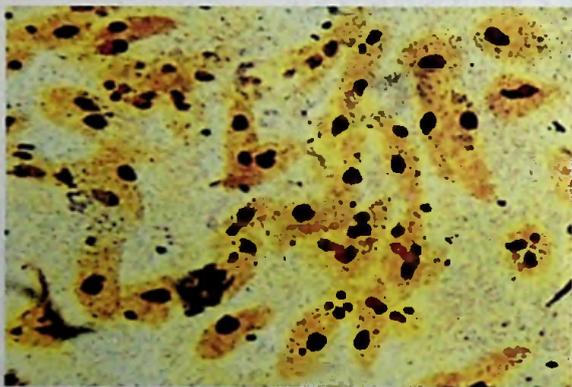


图 16-1 毛囊细胞核仁组织区的银染

【观察与记录】

经过银染后的毛囊细胞,细胞质不着色,细胞核呈淡黄色,银染颗粒为棕黑色,通常情况下银染颗粒大小均匀,呈圆形或椭圆形,位于细胞核的中央或偏中央处(图 16-1)。

【注意事项】

1. 载玻片要求清洁,无尘、无细胞碎片,否则本底会有银粒。

2. 细胞须均匀分散,不要重叠。
3. 使用硝酸银溶液时要注意在避光条件下操作,并且不要滴洒在地面、桌面、手和衣物上,否则会生成黑色污渍而难以除去。

【作业与思考题】

1. 人类细胞核仁的形成与哪几条染色体相关?
2. 银染方法为何只在核仁组织区显色?
3. 核仁组织区银染有哪些意义?

【试剂配制】

1. 50% AgNO_3 溶液 称取 5g 硝酸银溶于去离子水中,定容至 10ml,避光保存。
2. 2% 白明胶显影液 称取 2g 明胶溶于去离子水中,定容至 100ml,加热融化冷却后再加入 1ml 甲酸,混匀。
3. Carnoy 固定液的配制参见实验九。

(文斗斗)

实验十七 蛋白质印迹技术

【实验目的】

1. 掌握蛋白质印迹技术的操作方法。
2. 熟悉蛋白质印迹技术的原理。
3. 了解 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质的原理。

【实验原理】

蛋白质印迹技术(Western blot)又称免疫印迹技术,是将经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜,经抗体(一抗、二抗)的特异性结合、发色底物显色对特定分子量的蛋白质进行定性和定量检测。

蛋白质在电场中的迁移率与各种蛋白质分子所带电荷、大小和形状有关,在 SDS-PAGE 前,蛋白质样品先经 SDS(十二烷基硫酸钠)和巯基乙醇处理,SDS 为离子型表面活性剂,可使蛋白质分子带上负电荷,并借助负电荷所导致的蛋白分子内排斥力使蛋白质伸展为直链形状,巯基乙醇可还原蛋白质分子中的二硫键,使借助二硫键形成特定形状的蛋白质也伸展为直链,因此消除样品中不同蛋白质分子间的电荷和形状差异,此时电泳迁移率只取决于蛋白质的分子量。聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺单体和交联剂甲叉双丙烯酰胺在催化剂的作用下形成的均匀网络状结构,具有分子筛的作用,不同分子量的蛋白质将按照分子大小被分离,分子量小的分子迁移速度快,分子量大的分子迁移速度慢,所获得的电泳条带可以通过考马斯亮蓝或丽春红染色得到显示。经过转膜、

抗体孵育,与蛋白分子量标准参照物相比较,可确定蛋白分子的相对分子量。通过选择合适的内参蛋白,可对目的蛋白的表达进行半定量分析。

【实验用品】

实验对象:人肺癌 A549 细胞。

实验试剂:0.25% 胰酶消化液、PBS(pH 7.4)、30% 聚丙烯酰胺、1mol/L Tris-HCl(pH 6.8)、1.5mol/L Tris-HCl(pH 8.8)、10% SDS、10% 过硫酸铵、甲醇、去离子水、TEMED、4× 上样缓冲液、正丁醇、彩色预染蛋白质分子量标准参照物、电泳缓冲液、转移缓冲液、0.5% 丽春红 S 染料、鼠抗人 E-cadherin 抗体(一抗)、鼠抗人 β -actin 抗体(一抗)、羊抗鼠抗体(二抗)、印迹缓冲液(TBST)、封闭缓冲液、ECL 化学发光液。

实验器材:电转移仪、电泳玻璃板、垂直电泳槽、边条梳子、加样器、稳压直流电源、硝酸纤维素薄膜、3MM 滤纸、离心管(1.5ml)。

【操作步骤】

(一) 蛋白质提取

1. 将培养中的 A549 细胞(1×10^5 个)用 PBS 清洗 3 次。
2. 0.25% 胰酶消化细胞,用 PBS 吹打细胞,并将细胞收集于离心管中,1000rpm 离心 5 分钟,吸弃上清液。
3. 用 PBS 重悬细胞,1000rpm 离心 5 分钟,吸弃上清液。
4. 加入 100 μ l 细胞裂解液,吸打混匀,冰浴 20 分钟,13 000rpm 离心 5 分钟。
5. 吸取上清液移至新的离心管中,测量蛋白样品与标准液在波长 595nm 处的吸光值,求出蛋白浓度。
6. 将蛋白质样品按一定比例稀释,加入 4× 上样缓冲液,煮沸变性 5~10 分钟,备用。

(二) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

1. 灌胶 将电泳玻璃板安置于电泳槽上,灌制 8% 分离胶 15ml,分离胶上以 5ml 正丁醇覆盖,静置;待胶凝固后,倒去覆盖物,用去离子水冲洗凝胶上部;将 8ml 5% 浓缩胶灌注于分离胶上,插入梳子,静置。

2. 上样 浓缩胶凝固后拔除梳子,电泳缓冲液冲洗梳孔;将蛋白质分子量标准参照物和样品分别加入加样孔中。

3. 电泳 添加电泳缓冲液,将样品侧接负极,开始电泳。先设置电流为 10mA,待样品进入分离胶后,将电流加大到 20mA,继续电泳直到蓝色指示剂达分离胶底部,停止电泳。

(三) 转膜

1. 将硝酸纤维素薄膜和滤纸用转移缓冲液浸泡 30 分钟,电泳后的凝胶和硝酸纤维素薄膜叠合,平放除去气泡,两侧均夹以 3MM 滤纸各 3 层。

2. 将上述夹心凝胶置于电转移仪中,凝胶朝向负极,加入转移缓冲液覆盖凝胶。

3. 按 2.5mA/cm² 设置电泳电流,电泳 1~2 小时后,停止转膜。

4. 取出膜片,置于丽春红染液中,直至样品蛋白条带出现。按参照物所示分子量分别裁切硝酸纤维素薄膜(注意标记正面)。

5. 将膜片用蒸馏水漂洗至完全脱色。

(四) 抗原抗体反应

1. 将膜片置于平皿中,加入封闭缓冲液室温振荡 1~2 小时。

2. 将膜片用 TBST 室温振荡清洗 3 次,每次 10 分钟。

3. 向两张膜片分别滴加封闭液稀释的鼠抗人 E-cadherin 抗体、鼠抗人 β -actin 抗体(抗体稀释度通常为 1:200~1:2000,具体视抗体效价而定),室温平缓摇动孵育 4 小时或 4℃孵育过夜。

4. 取出膜片,用 TBST 室温振荡清洗 3 次,每次 10 分钟。

5. 加入稀释后的二抗(抗体稀释度通常为 1:1000~1:2000,具体视抗体效价而定),室温平缓摇动孵育 1~2 小时。

6. 取出膜片,用 TBST 室温振荡清洗 3 次,每次 10 分钟。

7. 配制 ECL 化学发光反应液,进行显色和条带灰度值的定量分析。

【实验结果图】



图 17-1 A549 细胞 E-cadherin 的表达

【观察与记录】

观察膜片上的条带,与标准分子量蛋白条带比较。使用 Image J 软件对条带进行灰度值定量分析,以 β -actin 作为内参蛋白,比较目的蛋白与内参蛋白的比值(图 17-1)。

【注意事项】

1. 分离胶和浓缩胶均需临用时现配,且在配制最后再加入 TEMED,以防胶过早凝聚。
2. 丙烯酰胺有神经毒性,实验时应小心。
3. 电泳时间视样品迁移情况而定,到染料达分离胶底部为止。
4. 滤纸和膜需裁剪得与胶一样大小,如果滤纸或膜面积大于凝胶,滤纸和膜的边缘有可能相接触而引起短路。
5. 硝酸纤维素薄膜和 3MM 滤纸事先要用转移缓冲液湿润。如用 PVDF 膜,使用前需将膜在甲醇中浸泡 15 秒,并注意标注膜的正面。
6. 膜片与一抗和二抗作用后,要用缓冲液冲净。

【作业与思考题】

1. 记录 E-cadherin 与 β -actin 条带灰度值,并计算二者的比值。

2. 分析出现非特异性条带的原因有哪些。

【试剂配制】

1. 细胞裂解液 50mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 150mmol/L NaCl, 0.02% 叠氮钠, 0.1% SDS, 100 μ g/ml PMSF, 1 μ g/ml 抑肽酶, 1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠。
2. 4 \times 上样缓冲液 称取 0.8g SDS 溶于 2.5ml Tris-HCl (1mol/L, pH 6.8) 中, 缓慢振摇至充分溶解, 依次加入 20mg 溴酚蓝、4ml 甘油和 2ml β - 巯基乙醇, 以双蒸水补齐至 10ml。混合液煮沸 10 分钟至全部溶解, 静置至室温, 分装, -20 $^{\circ}$ C 保存。
3. 5% 浓缩胶 (8ml) 1.3ml 30% 丙烯酰胺溶液、1ml Tris-HCl (1mol/L, pH6.8)、0.08ml 10% SDS、0.08ml 10% 过硫酸铵与 5.5ml 去离子水混匀, 滴加 8 μ l TEMED, 混匀, 现用现配。
4. 8% 分离胶 (15ml) 4ml 30% 丙烯酰胺溶液、3.8ml Tris-HCl (1.5mol/L, pH8.8)、0.15ml 10% SDS、0.15ml 10% 过硫酸铵与 6.9ml 去离子水混匀, 滴加 9 μ l TEMED, 混匀, 现用现配。
5. 电泳缓冲液 称取 3.03g Tris-Base, 14.4g 甘氨酸和 1g SDS, 溶于双蒸水中, 定容至 1L。
6. 转移缓冲液 称取 3.03g Tris-Base, 14.4g 甘氨酸, 溶于适量双蒸水中, 加 200ml 甲醇, 用双蒸水定容至 1L, 现用现配。
7. 0.5% 丽春红 S 染料 称取 0.5g 丽春红, 吸取 1ml 冰醋酸, 溶解后加去离子水定容至 100ml, 现用现配。
8. TBST 称取 2.42g Tris-Base, 8g 氯化钠, 溶于双蒸水中, 滴加 1ml Tween-20、1.5ml 盐酸, 加双水定容至 1L, 置于 4 $^{\circ}$ C 保存, 备用。
9. 封闭缓冲液 称取 10g 脱脂奶粉溶于 70ml TBST, 充分溶解后, 定容至 100ml, 加入 10% 叠氮钠 200 μ l (终浓度为 0.02%), 4 $^{\circ}$ C 保存。

(周 偶)

实验十八 细胞基因组 DNA 的提取

【实验目的】

1. 掌握 DNA 提取的方法和步骤。
2. 掌握琼脂糖凝胶电泳分离核酸的方法。
3. 了解 DNA 提取的实验原理。

【实验原理】

DNA 是细胞遗传信息的储存载体, 在真核细胞中, 基因组 DNA 通常与蛋白质相结合构成染色质存在于细胞核中。因此进行 DNA 的分离纯化就是使 DNA 与细胞内的其他成分分离, 并保持核酸一级结构的完整性。

DNA 比蛋白质、脂类、多糖等其他细胞组分具有更高的亲水性, 可通过选择性沉淀使核酸与它们分离。本实验采用的 DNA 提取方法是在 SDS 和 EDTA 溶液中, 以蛋白酶 K 消化细胞蛋白质, 由

SDS 破坏核膜而使 DNA 释放入水溶液。其中 EDTA 螯合 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属离子,抑制 DNA 酶对 DNA 的降解作用,SDS 还可破坏细胞膜上的脂肪和蛋白,并与蛋白质结合成为复合物使蛋白质变性而沉淀下来。酚 / 三氯甲烷 / 异戊醇可使蛋白进一步沉淀,使 DNA 纯化。大分子 DNA 在乙醇中会析出絮状物,因此高速离心可使 DNA 沉淀下来。经离心而分离纯化的 DNA 样品可通过紫外分光光度计检测其纯度和浓度。琼脂糖凝胶电泳是用琼脂糖作为支持体的一种电泳方法。琼脂糖凝胶具有分子筛的作用,在碱性条件下带负电荷的核酸分子向阳极移动,并可按照其构成碱基数的多少被有效地分离。因此通过琼脂糖凝胶电泳可直接判定核酸分子的纯度、完整性及片段大小。

【实验用品】

实验对象:人胚肾细胞 HEK-293。

实验试剂:0.25% 胰蛋白酶、PBS、DNA 消化缓冲液、20mg/ml 蛋白酶 K、酚 / 三氯甲烷 / 异戊醇、3mol/L 醋酸钠、预冷无水乙醇、预冷 70% 乙醇、TE 缓冲液、灭菌双蒸水、琼脂糖、TAE、DNA marker、EB 荧光染料、6× 上样缓冲液。

实验器材:低温高速离心机、普通离心机、恒温水浴箱、紫外分光光度计、离心管(1.5ml、15ml)、微量移液器(1000 μl 、100 μl 、20 μl)、枪头、三角烧瓶、电泳仪、电泳槽、涡流振荡器、微波炉、紫外透射仪。

【操作步骤】

(一) 细胞基因组 DNA 的提取

1. 0.25% 胰蛋白酶消化收集对数生长期细胞于 1.5ml 离心管中,1000g 离心 5 分钟,弃上清液。
2. 用预冷的 PBS 重悬细胞,1000g 离心 5 分钟,吸弃上清液,收集细胞。
3. 重复步骤 2。
4. 加入 500 μl DNA 消化缓冲液,再加入 5 μl 20mg/ml 蛋白酶 K,翻转混匀(动作轻柔),55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 小时。
5. 加入等体积的酚 / 三氯甲烷 / 异戊醇(按体积比 25 : 24 : 1 配制),慢慢旋转混匀,倾斜离心管使两相接触面积增大,4 $^{\circ}\text{C}$,10 000g,离心 10 分钟。
6. 小心吸取上层含 DNA 的水相至新离心管中,加入 1/10 体积的 3mol/L 醋酸钠,小心充分混匀,再加 2.5 倍体积的预冷无水乙醇,混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 分钟。
7. 4 $^{\circ}\text{C}$,12 000g 离心 15 分钟,吸弃上清液。加入 1ml 预冷 70% 乙醇洗涤沉淀。
8. 4 $^{\circ}\text{C}$,12 000g 离心 5 分钟,吸弃上清液,室温干燥约 10 分钟(不必完全干燥,否则难溶)。
9. 加适量(约 40 μl)TE 缓冲液溶解,用紫外分光光度计测定 DNA 样品的吸光度值和浓度(以 TE 缓冲液作为对照)。

(二) 琼脂糖凝胶电泳

1. 配制 1% 琼脂糖凝胶(含荧光染料)
 - (1) 备好注胶槽,插上梳子。将 1g 琼脂糖加入 100ml TAE 中,微波炉加热溶解(中高火,1~2 分钟)。室温静置片刻,滴加 10 μl EB 荧光染料,混匀。
 - (2) 向胶槽中注满温热的琼脂糖胶,室温静置 30~45 分钟,使琼脂糖胶完全凝结。
 - (3) 小心拔出梳子,将凝胶放入电泳槽,使梳孔端靠近阴极(黑色);加入 TAE,让液面没过凝胶约 1mm。

2. 上样、电泳

- (1) 用微量移液器将 DNA marker 缓慢加至加样孔中。
- (2) 用微量移液器向 10 μ l DNA 样品溶液中滴加 2 μ l 6 \times 上样缓冲液, 混匀, 缓慢加至加样孔中, 注意操作手法。
- (3) 盖上电泳槽盖, 接好电极插头, 打开电源, 调电压为 $\leq 5V/cm$, 开始电泳。
- (4) 待蓝色标记带接近凝胶另一端时, 将电压调至零, 关电源, 拔出电极插头, 打开电泳槽盖, 取出凝胶。在紫外透射仪中进行观察。

【实验结果图】

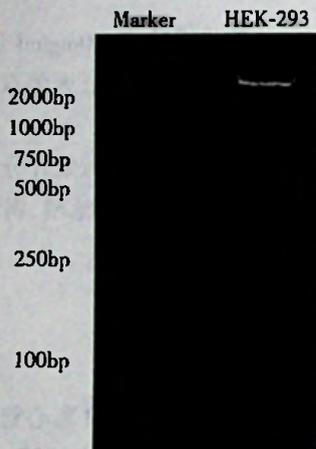


图 18-1 HEK-293 细胞基因组 DNA 条带

【观察与记录】

1. DNA 样品的浓度及纯度可利用紫外分光光度计进行测定。DNA 的纯度可根据 260nm、280nm 处的吸光度的比值(即 A_{260}/A_{280})进行判断。纯化 DNA 的比值应在 1.8~1.9 之间, 比值过低表明样品含有蛋白质杂质。

2. 观察琼脂糖凝胶电泳结果 与 DNA marker 相比较, 观察 DNA 片段大小。在加样孔附近可见一明亮的荧光条带, 为基因组 DNA 条带(图 18-1)。若条带呈弥漫片状表明 DNA 可能有降解。

【注意事项】

1. 生物样品要防止污染, 以免混入其他来源的 DNA。
2. 本方法成功的关键在于蛋白酶 K 的消化, 55 $^{\circ}C$ 孵育时要时不时轻轻振摇, 否则蛋白质不易除去, 且 DNA 得率低。
3. 整个实验过程中动作要轻, 防止猛烈振动使 DNA 断裂。
4. 吸取上层含 DNA 水相时, 注意不要吸取到中间层。
5. 室温离心与低温离心要明确区别, 未注明离心温度者可室温下进行。

6. 采用紫外分光光度法测定 DNA 的含量和纯度时,应根据样品的大致浓度确定适当的稀释倍数。
7. EB 为强诱变剂,操作时须戴手套,EB 污染物及废弃液应单独存放。

【作业与思考题】

1. 记录你所提取的 DNA 样品的纯度和浓度。
2. 分析 DNA 样品纯度过低、浓度过低的原因。

【试剂配制】

1. 20mg/ml 蛋白酶 K 称取 200mg 蛋白酶 K 溶于 9.5ml 蒸馏水中,注意不要涡旋混合。继续加蒸馏水定容到 10ml,分装,贮存于 -20°C 。
2. TE 缓冲液 (pH8.0) Tris-HCl 终浓度为 10mmol/L,EDTA 终浓度为 1mmol/L,高压消毒。
3. DNA 消化缓冲液 NaCl 终浓度为 100mmol/L、Tris-HCl 终浓度为 10mmol/L、EDTA 终浓度为 25mmol/L、SDS 浓度为 0.5% (W/V)。
4. TAE 称取 4.84g Tris、0.744g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 800ml 蒸馏水中,加入 1.142ml 冰醋酸充分搅拌,加蒸馏水将溶液定容至 1L,室温保存。
5. EB 荧光染料 称取 200mg EB,溶于 20ml 双蒸水中,充分搅拌使之完全溶解,分装,避光保存。

(吕 品)

实验十九 RNA 的提取及检测

【实验目的】

1. 掌握组织及细胞中总 RNA 的提取方法。
2. 掌握紫外分光光度法进行 RNA 分子检测的基本原理和方法。
3. 了解组织及细胞中 RNA 的结构、功能、种类及分布。

【实验原理】

组织及细胞中的 RNA 主要分布在细胞质中,包括 mRNA、tRNA 和 rRNA 三种。其中 mRNA 含量最低,半衰期短,易于降解。在 RNA 的提取过程中,主要采用强变性剂如异硫氰酸胍等破坏细胞的结构,灭活 RNA 酶;细胞碎片、蛋白质等经酚、氯仿等有机溶剂的抽提可被去除。本实验使用商品化 Trizol 试剂(含有异硫氰酸胍和酚的单相裂解试剂)破裂细胞,抑制 RNA 酶活性并同时释放 RNA 分子。RNA 提取的关键是防止内源性和广泛存在的外源性 RNA 酶,如器皿、试剂和手上都存在的 RNA 酶对核酸的降解作用,因此,所用材料、器皿均需经 DEPC 处理(包括 0.1% DEPC 溶液浸泡过夜,蒸馏水冲洗及高压灭菌 15 分钟去除残存的 DEPC)。真核生物中的 18S rRNA 和 28S rRNA 经琼脂糖凝胶电泳后,在紫外线照射下可观察到两条清晰的条带。有时可见 5S rRNA (图 19-1)。

组成核酸分子的碱基含共轭双键,均具有一定的吸收紫外线的特性,最大吸收值位于波长250~270nm之间,例如尿嘧啶的最大紫外线吸收值在259nm处,腺嘌呤在260.5nm,胸腺嘧啶在264.5nm,胞嘧啶在267nm,鸟嘌呤在276nm。这些碱基与戊糖、磷酸形成核苷酸后,其最大吸收峰的位置不会改变,核酸的最大吸收波长为260nm,吸收低谷在230nm处。核酸所具有的这种物理特性为核酸溶液的浓度测定提供了理论基础。在波长为260nm的紫外线下,1OD的光密度值相当于双链DNA的浓度为50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、单链DNA或RNA的浓度为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。所以:

$$\text{RNA 浓度}(\mu\text{g}/\mu\text{l})=40\mu\text{g}/\text{ml}\times A_{260}\times \text{稀释倍数}/1000$$

蛋白质由于含有芳香族氨基酸,因此对紫外线也有吸收,通常蛋白质在280nm波长处存在特异吸收峰,因此核酸的 A_{260}/A_{280} 比值可反映样品中核酸的纯度。若DNA样品 A_{260}/A_{280} 大于1.9,表明存在RNA污染,可以考虑用RNase处理样品; A_{260}/A_{280} 小于1.6时表明样品中存在蛋白质或酚污染。当然也会出现既含有蛋白质又含RNA的DNA样品比值为1.8的情况,所以应结合凝胶电泳等方法鉴定有无RNA或用测定蛋白质的方法检测是否存在蛋白质。纯的RNA样品 A_{260}/A_{280} 比值应在1.7~2.0之间。若RNA样品 A_{260}/A_{280} 比值太小,表明存在蛋白质或酚污染。注意,当用TE作为缓冲液检测吸光度时, A_{260}/A_{280} 比值可能会大于2(一般应小于2.2)。当 A_{260}/A_{280} 比值大于2.2时,说明RNA已经水解成单核苷酸。另外,紫外分光光度法只能用于测定浓度大于0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的核酸样品。

【实验用品】

实验对象:新鲜组织、培养的细胞。

实验试剂:Trizol试剂、氯仿、异丙醇、75%乙醇(用高压过的0.1% DEPC水配制)、0.1% DEPC水、PBS(需高压灭菌)。

实验器材:低温冷冻高速离心机、电子天平、匀浆器、微量移液器、紫外分光光度计、Eppendorf管(1.5ml)、冰盒、比色杯、手套、口罩、帽子。

【操作步骤】

1. 样品准备

(1) 新鲜或冰冻组织:组织离体后,迅速切成质量小于2g的组织块,可直接进行RNA提取,或迅速放入液氮中速冻,待提取RNA之前将组织从液氮中取出。快速称取100mg,移入高压处理过的匀浆器中,加入1ml Trizol试剂进行匀浆,将匀浆液转移到1.5ml离心管中。

(2) 体外培养的细胞:将培养的细胞悬浮后,收集至1.5ml离心管中,用预冷PBS洗涤,3000g离心5分钟,吸弃上清液,加入1ml Trizol试剂重悬细胞,使Trizol试剂充分裂解细胞。

2. 细胞或组织中加入Trizol试剂后,冰浴10分钟,使其充分裂解。

3. 加入200 μl 氯仿(Trizol体积的1/5),充分振荡混匀,静置分层。

4. 4 $^{\circ}\text{C}$,12 000g离心15分钟。

5. 吸取上层水相移至另一新的1.5ml离心管中。

6. 加入500 μl 异丙醇(4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷,Trizol体积的1/2)混匀,冰浴5~10分钟。

7. 4 $^{\circ}\text{C}$,12 000g离心10分钟,此时RNA沉淀于管底,吸弃上清液。

8. 加入1ml(与Trizol等体积)75%乙醇,轻柔振荡离心管,使沉淀悬浮。

9. 4℃, 8000g 离心 5 分钟, 吸弃上清液, 置于冰上晾干或真空干燥。
10. 加入适量 0.1% DEPC 水或无 RNA 酶的去离子水溶解 RNA 沉淀。
11. 将 RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测(具体步骤参见实验十八)。

【实验结果图】

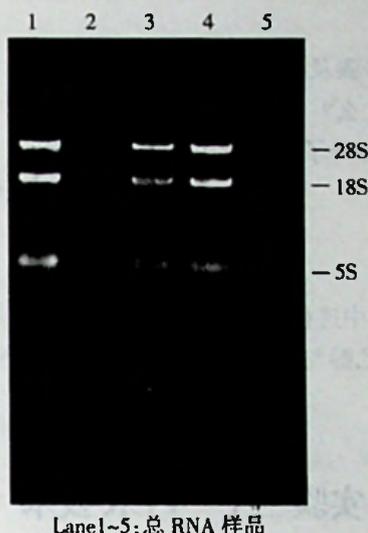


图 19-1 细胞总 RNA 的电泳图

【观察与记录】

1. 取 10 μ l RNA 样品, 与 990 μ l 0.1% DEPC 水混匀, 以 0.1% DEPC 水做对照, 分别在波长 260nm 和 280nm 处读出 A_{260} 和 A_{280} ; 按公式计算 RNA 的含量: RNA 浓度 (μ g/ μ l) = 40μ g/ml $\times A_{260} \times$ 稀释倍数 / 1000; 根据 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值判断其纯度。

2. 在琼脂糖凝胶中, 可见 28S、18S、5S rRNA 分别呈现高亮度荧光条带, 其中 28S 的条带最亮, 18S 次之(图 19-1)。通过比较 28S 与 18S 的比例可判断 RNA 是否存在降解。

【注意事项】

1. 整个实验过程必须严防 RNase 的污染。
2. 实验中用到的玻璃器皿在使用前均应用水冲洗干净后, 200℃ 干烤 4 小时。
3. 实验中用到的所有试剂均需用 0.1% DEPC 水配制, 之后经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。
4. 实验中尽量使用一次性塑料制品, 并用 0.1% DEPC 水浸泡过夜或者 37℃ 2 小时, 然后 1.2atm 高压 30 分钟去除残留的 DEPC。
5. 测定 RNA 浓度时, 要确保比色杯无 RNase 污染, 实验之前可用 0.1mol/L NaOH \cdot 1mmol/L EDTA 溶液清洗比色杯, 之后使用无 RNase 的水进行淋洗。
6. 采用紫外分光光度法测定 RNA 的含量和纯度时, 应根据样品的大致浓度确定适当的稀释

倍数,以保证 OD 值在浓度公式的线性范围内。

7. 整个过程要在低温环境下进行(冰上)。
8. 实验操作人员戴一次性口罩、帽子、手套。
9. 提取的 RNA 应立即置于 -80°C 保存或立即进行反转录。

【作业与思考题】

1. RNA 提取过程中的关键步骤及注意事项有哪些?
2. RNA 提取的基本原理是什么?
3. 紫外分光光度法进行 RNA 分子检测的基本原理是什么?

【试剂配制】

1. 0.1% DEPC 水 在通风橱中进行配制。吸取 1ml DEPC 于 1000ml 蒸馏水中,充分混匀。
2. 75% 乙醇 将 75ml 无水乙醇与 0.1% DEPC 水混合,定容至 100ml。

(吴茉莉)

实验二十 PCR 技术

【实验目的】

1. 掌握 PCR 的步骤。
2. 熟悉 PCR 的实验原理。
3. 熟悉低温高速离心机的使用方法。

【实验原理】

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是指在体外对特定 DNA 序列进行重复性复制(即扩增)的反应。其反应体系包括模板 DNA、耐热的 DNA 聚合酶、引物、4 种脱氧核苷酸(dNTP)及适当的反应缓冲液。通过 PCR 反应可以对特定的目的 DNA 片段进行高效扩增,结合琼脂糖凝胶电泳能够灵敏地检测目的 DNA 片段(基因)。

PCR 反应一般分为变性、退火、延伸三步骤进行。首先在 95°C 进行 DNA 双链解离;然后在 $50\sim 65^{\circ}\text{C}$ 之间进行引物与 DNA 链的互补结合,即退火;最后在 72°C 通过耐热 DNA 聚合酶的作用,以 dNTP 为原料合成与模板互补的新的 DNA 链。此三步骤重复 20~30 个循环即可完成扩增反应,随后通过琼脂糖凝胶电泳,可检测所扩增基因片段的大小(本实验检测 *B-raf* 基因)。

【实验用品】

实验对象:人肠癌 CL187 细胞。

实验试剂:0.25% 胰蛋白酶、PBS、DNA 消化缓冲液、20mg/ml 蛋白酶 K、酚 / 三氯甲烷 / 异戊醇、3mol/L 醋酸钠、预冷无水乙醇、预冷 70% 乙醇、TE 缓冲液、灭菌双蒸水、10×PCR Buffer、dNTP、Taq DNA 聚合酶、*B-raf* 上游引物、*B-raf* 下游引物、琼脂糖、TAE 缓冲液、DNA marker、EB 荧光染料、6×上样缓冲液。

实验器材:低温高速离心机、普通离心机、恒温水浴箱、紫外分光光度计、PCR 仪、离心管(1.5ml、15ml)、PCR 管、微量移液器(1000 μ l、100 μ l、20 μ l)、枪头、三角烧瓶、电泳仪、电泳槽、涡流振荡器、微波炉、紫外透射仪、冰盒。

【操作步骤】

(一) 细胞基因组 DNA 的提取

实验步骤同实验十八。

(二) PCR 扩增

1. 按表 20-1 配制 PCR 反应体系(以 25 μ l 为例)。

表 20-1 PCR 反应体系

成分	加样量(μ l)	成分	加样量(μ l)
ddH ₂ O	17	<i>B-raf</i> 下游引物	1
10×PCR Buffer	2.5	Taq DNA 聚合酶	0.5
dNTP	2	模板 DNA	1
<i>B-raf</i> 上游引物	1		

2. 在 PCR 仪中进行 PCR 反应 94℃ 预变性 5 分钟,94℃ 变性 30 秒,60℃ 退火 30 秒,72℃ 延伸 30 秒,30 个循环。

(三) 琼脂糖凝胶电泳

实验步骤同实验十八。

【实验结果图】

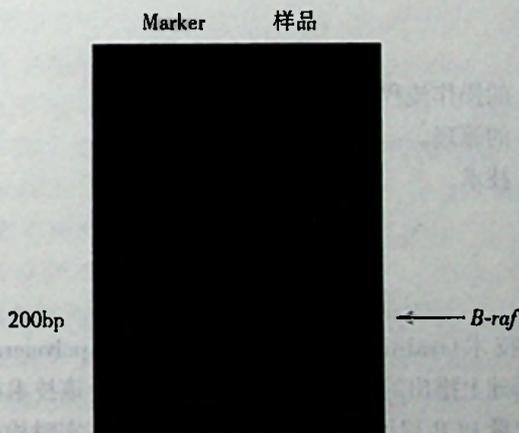


图 20-1 CL187 细胞中 *B-raf* 基因条带

【观察与记录】

琼脂糖凝胶电泳结果显示(图 20-1):与 DNA marker 比较,在 200bp 附近可见一目的条带(如箭头所示),为 *B-raf* 基因(224bp)所显示的条带。

【注意事项】

1. PCR 反应体系的配制须在冰盒中操作。
2. 进行琼脂糖凝胶电泳检测时,PCR 扩增产物加入量一般为 5~10 μ l,DNA marker 加入量一般为 3~5 μ l。
3. 紫外线对皮肤有伤害,须注意做好防护。
4. EB 为强诱变剂,操作时须戴手套,EB 污染物及废弃液应单独存放。

【作业与思考题】

如果电泳图中出现除目的基因外的其他条带,分析可能的原因。

【试剂配制】

1. EB 荧光染料 称取 200mg EB 溶于 20ml 双蒸水中,充分搅拌使之完全溶解,分装,避光保存。
 2. TE 缓冲液、DNA 消化缓冲液、TAE 缓冲液、20mg/ml 蛋白酶 K 的配制参见实验十八。
- (于 敏)

实验二十一 荧光定量 PCR 技术

【实验目的】

1. 掌握荧光定量 PCR 的操作流程。
2. 熟悉荧光定量 PCR 的原理。
3. 了解其他定量 PCR 技术。

【实验原理】

实时荧光定量 PCR 技术(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, real-time PCR)是在定性 PCR 技术基础上推出的一种新的核酸定量技术。该技术在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用自动化荧光定量 PCR 仪读出每次循环的荧光强度,实时检测整个反应进程中的 PCR 产物,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。Real-time PCR 最大的优点是克服了普通 PCR

进入平台期后定量的较大误差,不但实现了对 DNA/RNA 模板的精确定量,而且具有灵敏度和特异性高、自动化程度高、无污染、实时和准确等特点,在生命科学研究中得到广泛的应用。

荧光定量 PCR 的原理是随着 PCR 反应的进行,PCR 反应产物不断积累,荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环,收集一个荧光强度信号,通过监测荧光强度的变化可以得到一条荧光扩增曲线(图 21-1)。荧光扩增曲线可分为三个阶段,即荧光背景信号阶段、荧光信号指数扩增阶段及平台期。在 PCR 反应早期,产生的荧光水平不能与背景明显地区别,无法判断产物量的变化。只有荧光信号指数扩增阶段,PCR 产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系,从而可以在这个阶段进行定量分析。为了定量和比较的方便,在实时荧光定量 PCR 技术中引入了荧光阈值和 C_t 值两个重要的概念。荧光阈值是在荧光扩增曲线上人为设定的一个值,一般荧光阈值的缺省设置是 PCR 反应前 3~15 个循环荧光信号标准偏差的 10 倍。当荧光信号增强到荧光阈值时,此时的循环次数即为循环阈值 C_t (cycle threshold, C_t)。 C_t 值与 PCR 体系中起始模板数的对数之间有严格的线性关系,利用已知拷贝数的标准品可绘出标准曲线。以不同梯度浓度的标准模板扩增的 C_t 值为纵坐标,以标准模板拷贝数的对数为横坐标,作图制成标准曲线。将未知浓度的待测样品以相同条件进行 PCR 反应,求出其 C_t 值,通过标准曲线就可以准确地确定待测样品起始模板的数量。

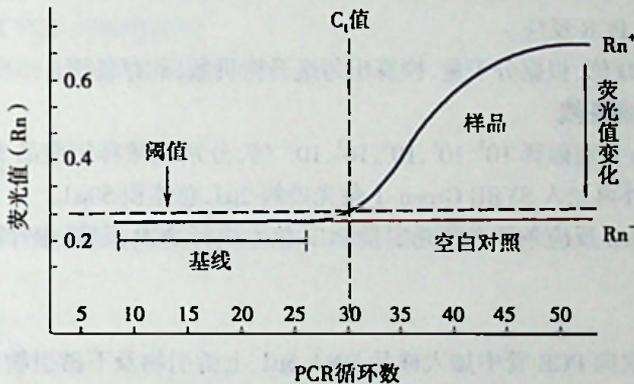


图 21-1 荧光定量 PCR 扩增曲线及 C_t 值的确定

荧光定量检测根据所使用的标记物不同可分为荧光探针和荧光染料。荧光探针主要有 Taqman 探针、Beacon 技术(分子信标技术)和 FRET 技术等;荧光染料包括饱和荧光染料如 EvaGreen、LC Green 等,以及非饱和荧光染料,如现在最常用的 SYBR Green I。

本实验以 SYBR Green I 为例进行荧光实时定量 PCR 实验。SYBR Green I 是不对称薈类荧光素,它可以非特异嵌合于 DNA 双螺旋结构中的小沟内。在游离状态下,SYBR Green I 发出微弱的荧光,但一旦与双链 DNA 结合,其荧光增加 1000 倍,所以 PCR 反应发出的荧光信号与生成的双链 DNA 量成正比,且会随着扩增产物的增加而增加。此方法避免了设计、标记荧光探针和使用价格昂贵、复杂的试剂,适用于任何 PCR 扩增体系。此外,由于一个 PCR 产物可以与多分子的染料结合,所以 SYBR Green I 的灵敏度很高。但是内嵌染料没有序列特异性,还可以结合到非特异性产物,引物二聚体、单链 DNA 二级结构和错误扩增的 DNA 产物上,造成假阳性结果而影响定量的精确性。

荧光定量 PCR 可用于测定样品中 DNA 的模板量,也可测定特定基因表达的变化。测定基因表达时需先提取细胞总 RNA,通过逆转录获得 cDNA,然后以 cDNA 为模板设计特异的引物进行 PCR 反应。

【实验用品】

实验对象:标准 DNA 模板、样品 DNA。

实验试剂:SYBR Green I 荧光染料、上游引物及下游引物(20 μ mol/L)、dNTP 混合液(各 2mmol/L)、Taq DNA 聚合酶(5U/ μ l)、10 \times PCR 反应缓冲液、灭菌去离子水。

实验器材:PCR 仪、荧光定量 PCR 仪、紫外分光光度计、微量移液器(20 μ l, 2 μ l)、PCR 管(0.2ml)、枪头(灭菌)、冰盒。

【操作步骤】

(一) 定量标准品的制备

1. 在冰盒中,依次向 PCR 管中加入标准 DNA 模板 1 μ g、特异上游引物及下游引物各 2 μ l、10 \times PCR 反应缓冲液 5 μ l、Taq DNA 聚合酶 5U,用灭菌去离子水补足 50 μ l,混匀。

2. 将 PCR 管置于 PCR 仪中,设置扩增反应条件:95 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,55 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟,30 个循环,进行 PCR 反应。

3. 测定产物的 OD 值,根据分子量,换算出每毫升拷贝数,贮存备用。

(二) 制作定量标准曲线

1. 将定量标准品分别稀释 10²、10⁴、10⁶、10⁸、10¹⁰ 倍,分别取稀释标准品 5 μ l,按上面的方法加入 PCR 反应试剂,另外再加入 SYBR Green I 荧光染料 2 μ l,总体积 50 μ l。

2. 分别按上述 PCR 反应条件在荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应,由计算机自动生成定量标准曲线。

(三) 样品测定

1. 在冰盒中,依次向 PCR 管中加入样品 DNA 5 μ l、上游引物及下游引物各 2 μ l、10 \times PCR 反应缓冲液 5 μ l、Taq DNA 聚合酶 5U、SYBR green I 荧光染料 2 μ l,用灭菌去离子水补足 50 μ l,混匀。按上述 PCR 反应条件在荧光定量 PCR 仪中进行扩增反应。

2. 根据样品测定的结果,结合定量标准曲线,由计算机自动计算样品中的拷贝数。

【实验结果图】

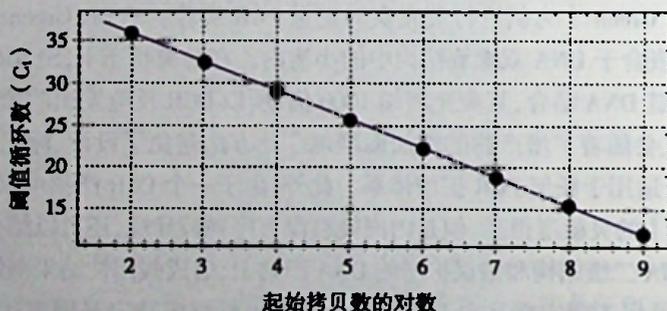


图 21-2 荧光定量 PCR 标准曲线

标准曲线: $Y = -3.472X + 43.063$, 斜率: -3.472 , 截距: 43.063 , 相关系数 (R^2): 0.999

【观察与记录】

1. 记录定量标准曲线。
2. 记录样品中的 DNA 拷贝数。

【注意事项】

1. 使用纯化的 DNA 样品, 并避免 DNA 的降解。
2. 退火温度和时间因引物的解链温度、长度、浓度、碱基中 GC 的含量而定。
3. 设置阳性对照及阳性对照或空白对照可确保结果的准确性。
4. 应设置复孔, 以对同一种样品或多次独立制备的样品进行重复实验。

【作业与思考题】

1. 分析荧光定量 PCR 的标准曲线。
2. 分析 C_t 值过高的可能原因有哪些。

【试剂配制】

10×PCR 反应缓冲液: 500mmol/L KCl, 100mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 15mmol/L MgCl₂。

(过健俐)

第三篇

细胞培养技术

实验二十二 细胞的原代培养

【实验目的】

1. 掌握原代细胞培养中的无菌操作。
2. 熟悉原代细胞培养的基本方法和操作步骤。
3. 了解原代培养细胞的类型和形态特点。

【实验原理】

原代培养是指在无菌条件下,从供体取得组织或细胞分离之后至第一次传代之前的细胞培养阶段,是建立各种细胞系的第一步。原代培养的细胞其生物学特性与在体细胞接近,更能表达所来源的组织细胞的特征,故在细胞生物学研究领域被广泛应用,较适合进行药物测试、细胞分化及病毒学等方面的研究。但原代培养细胞的部分生物学特征尚不稳定,如要做较为严格的对比性研究,还需对细胞进行纯化。

培养的细胞根据生长方式大体可分为贴壁型和悬浮型两大类。贴壁型细胞是必须附着在某一支持物表面才能生长的细胞;悬浮型细胞则是不必附着于固相支持物表面,而在悬浮状态下即可生长的细胞。绝大多数的有机体细胞属于贴壁型细胞,只有少数细胞类型如多数血细胞、某些血液来源的肿瘤细胞可在悬浮状态下生长。

原代培养的方法很多,最基本方法有两种,即组织块法和消化法。

组织块法是最常用的原代培养方法。该方法利用刚刚离体的、有旺盛生长活力的组织作为实验材料,将其剪成小块接种在培养瓶中,大约 24 小时后,细胞可从贴壁的组织块四周游出并生长。利用组织块法进行的原代培养,操作过程简便、易行,培养的细胞较易存活,在对一些来源有限、数量较少的组织进行原代培养时,选择该法尤为合适。

消化法是一种结合化学与生化手段进行的原代培养方法。该方法的主要特点是利用消化试剂将动物较小体积组织中妨碍细胞生长的间质(基质、纤维等)加以分解、消化,使组织中结合紧密的细胞连接松散、相互分离,形成含单细胞或细胞团的悬液。因单细胞或细胞团易于从外界吸收养分和排出代谢产物,经体外适宜条件培养后,可以得到大量活细胞,在短时间内细胞可生长成片。

酶是常用的消化试剂,在原代培养中,对于一些间质少、较软的组织,如上皮、肝、肾、胚胎等,选择胰蛋白酶(含 EDTA)来加以消化可收到较好的效果,EDTA 是非酶性消化试剂,其作用原理是

EDTA 能与维持组织完整性的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 结合形成螯合物,从而促进细胞相互分离。胶原酶因其对胶原有较强的消化作用,因此适合用在对纤维性组织、一些较硬的癌组织等的消化中。本实验中将以胰蛋白酶(含 EDTA)为例,介绍原代培养的酶消化法。

【实验用品】

实验对象:新生 1~3 日大鼠。

实验试剂:0.01mol/L PBS、DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)、0.25% 胰蛋白酶消化液、75% 乙醇。

实验器材:二氧化碳培养箱、超净工作台、倒置相差显微镜、细胞计数板、离心机、酒精灯、酒精棉球;培养瓶或培养皿、眼科剪、眼科镊子、吸管、离心管。

【操作步骤】

(一) 组织块法(以新生大鼠大腿肌细胞的原代培养为例)

1. 颈椎脱位法处死新生大鼠,浸入 75% 乙醇中数秒,置于平皿中,移入超净工作台。
2. 在超净工作台中,再次用 75% 酒精棉球将大鼠全身消毒一次。
3. 用剪刀于肩关节和髋关节处剪取四肢(去爪),剥去皮肤,用 PBS 液洗涤 2 次,移入新的平皿中。
4. 用 PBS 冲洗组织 3 次,以去除血细胞。
5. 用剪刀将组织块上所附的脂肪和结缔组织尽可能去除,以减少杂细胞的干扰。
6. 将肌组织从骨骼上剪切下来,用 PBS 液清洗后转移至培养皿中,加 0.5ml 培养基,在培养基中将组织剪成小于 1mm^3 的小块。
7. 用吸管小心地将剪碎的肌组织吸到培养瓶中,并用吸管头将组织块在瓶底均匀摆放,每小块间距 0.5cm 左右,25ml 培养瓶中放置 20~30 块。
8. 在培养瓶中加少量培养基,保持组织块湿润但不会漂浮起来。翻转瓶底朝上,将培养瓶置于二氧化碳培养箱中静置 0.5~1 小时,使组织与瓶壁结合牢固。
9. 去除培养瓶,加入培养液,注意不要使培养液接触组织块,轻轻翻转培养瓶,使组织浸入培养液中(勿使组织漂起),置于培养箱中继续培养。
10. 24 小时后取出培养瓶,于倒置相差显微镜下观察,可见有少量细胞从组织块周围游离而出,视需要补以少量培养基。

(二) 消化法(以胰蛋白酶消化为例)

1. 颈椎脱位法处死新生大鼠,浸入 75% 乙醇中数秒,置于平皿中,移入超净工作台。
2. 在超净工作台中,再次用 75% 酒精棉球将大鼠全身消毒一次。
3. 打开腹腔,剪取肝组织,用 PBS 液漂洗 3 次,移入新的平皿中,用眼科剪和眼科镊除去附着在肝组织上的结缔组织。
4. 将肝组织剪成 $1\sim 2\text{mm}^3$ 左右的小块,用 PBS 液漂洗 3 次。
5. 视组织块量加入 5~10 倍的 0.25% 胰蛋白酶,37℃ 水浴中消化 30 分钟,每隔 5 分钟振荡一次,使细胞分离。
6. 此时可见组织颜色略微发白,并变得疏松,可用吸管吹打组织,使之松散并释放出细胞,加

入 3~5ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 终止消化。

7. 1000rpm 离心 5 分钟, 除去含胰蛋白酶的上清液。
8. 用 PBS 液漂洗 1~2 次, 每次 1000rpm 离心 5 分钟, 吸弃上清液。
9. 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 吹打沉淀制备细胞悬液。
10. 吸取一滴细胞悬液滴于细胞计数板, 于镜下进行细胞计数(具体步骤参见实验二十五), 按 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度接种到培养瓶, 于 37°C 条件下培养。

【实验结果图】

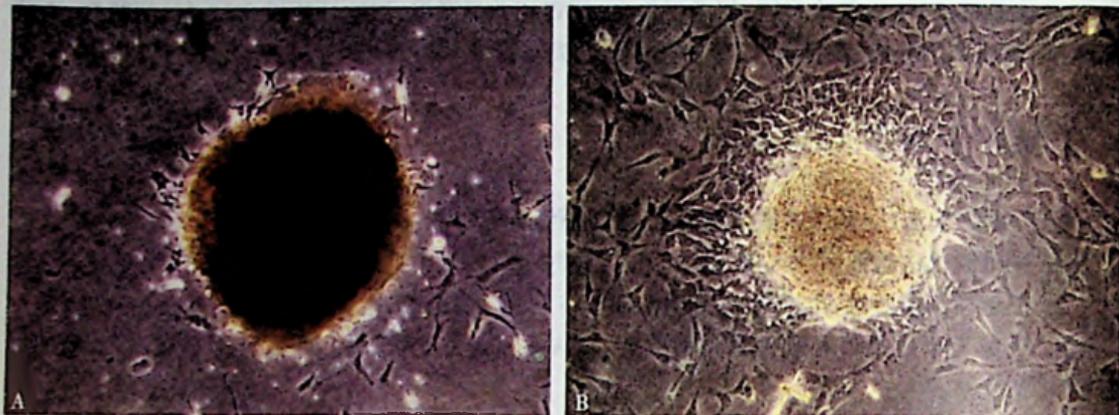


图 22-1 大鼠肌细胞原代培养——组织块法
A. 培养 24 小时($\times 200$); B. 培养 96 小时($\times 200$)

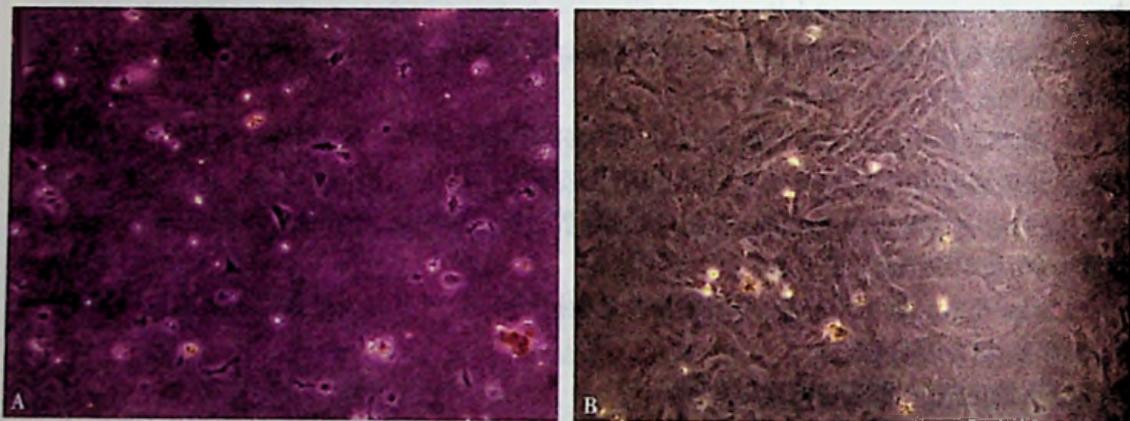


图 22-2 大鼠肝细胞原代培养——消化法
A. 培养 24 小时($\times 200$); B. 培养 96 小时($\times 200$)

【观察与记录】

1. 组织块法培养细胞的观察(图 22-1) 培养 24 小时后, 可见少量细胞从组织块游离出来; 48 小时后, 可见大量的细胞呈放射状排列于组织块周围, 这些细胞透明度高, 彼此间排列紧密。靠近

组织块的细胞胞体较小、较圆,离组织块较远的区域可见有多角形的细胞,体积较大,有些细胞的形态间于圆形与多角形之间。

2. 胰蛋白酶消化法培养细胞的观察(图 22-2) 刚接种于培养瓶中的细胞胞体均成圆形,悬浮于培养液中。24 小时后,大多数细胞已贴附于培养瓶底部,胞体伸展,重新呈现出其肝细胞原有的不规则、多角形上皮性细胞特征。48 小时后,细胞开始增殖,细胞数量明显增多,在接种的细胞或细胞团周围可见有新生的细胞,这些细胞因内含物少而较为透明。96 小时以后,新生的细胞逐渐连接成片,胞体轮廓清晰,核仁明显,细胞透明度减弱。

【注意事项】

1. 细胞培养所用的试剂、器材均需经过消毒灭菌。
2. 实验过程要注意无菌操作,避免细菌、真菌等的污染。
3. 组织块法培养细胞时,组织块要尽可能小,以保证组织块中的细胞获得养分;添加的培养基量要少,以免组织块漂浮,细胞不能长出;观察时动作要轻,以免培养基振荡使组织块漂浮。

【作业与思考题】

1. 绘制光镜下原代培养细胞的形态。
2. 细胞原代培养获得成功的关键是什么?
3. 组织块法培养的注意事项有哪些?

【试剂配制】

1. 0.01M PBS 称取 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na_2HPO_4 和 0.24g KH_2PO_4 ,溶于 800ml 蒸馏水中,调节溶液的 pH 至 7.4,最后加蒸馏水定容至 1L 即可。高压下蒸汽灭菌(至少 20 分钟),保存于室温或 4℃ 冰箱中。

2. DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清) 依 DMEM 粉剂型培养基说明书,称取规定的重量和蒸馏水按比例溶解,加入 3.73g NaHCO_3 ,待完全溶解后,用 0.22 μm 滤膜过滤除菌;或向购买的 500ml DMEM 液体培养基中加入 56ml 胎牛血清。培养基置于 4℃ 冰箱中保存备用,使用前加入青霉素、链霉素。

3. 0.25% 胰蛋白酶消化液 称取 0.25g 胰蛋白酶溶于 PBS 中,定容至 100ml,过滤除菌,于 4℃ 冰箱中保存。

(高强国)

实验二十三 细胞的传代培养

【实验目的】

1. 掌握细胞传代培养的操作方法和无菌操作技术。

2. 熟悉细胞的生长过程及生长特点。
3. 了解传代培养的特点和一般方法。

【实验原理】

培养的细胞通过增殖达到一定数量后,为了避免因为生存空间不足或密度过大,造成细胞营养枯竭进而影响其生长,需要对培养的细胞从培养瓶中取出,按一定的比例稀释并转移至另外的培养瓶中进行培养,这一过程即为传代培养。

细胞类型的不同,传代的方法也有差异。对于大多数贴壁细胞的传代,主要采用消化法,即利用蛋白水解酶(常为0.25%胰蛋白酶消化液)和螯合剂(EDTA)分解细胞外的胞外蛋白,使细胞彼此间发生分离并使贴壁细胞与培养瓶底部分开,然后进行稀释、再培养。而悬浮细胞的传代过程相对较为简单,直接吹打或离心后,可加以传代。

【实验用品】

实验对象:人胚肾细胞 HEK293、人急性髓性白血病细胞 MOLM-13。

实验试剂:PBS、DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)、RPMI1640 培养基(含 10% 胎牛血清)、0.25% 胰蛋白酶消化液、75% 乙醇。

实验器材:二氧化碳培养箱、超净工作台、倒置相差显微镜、细胞计数板、离心机、酒精灯、酒精棉球;培养瓶或培养皿、离心管、吸管。

【操作步骤】

(一) 贴壁细胞的传代培养

1. 在进行传代培养前,将培养瓶置于倒置相差显微镜下观察,若细胞已长成致密单层,即可进行传代。
2. 弃去培养瓶中的培养液,加入适量的 PBS,轻轻摇动、清洗残留在细胞表面的培养液,倒掉。
3. 加入适量的胰蛋白酶消化液,使其覆盖整个细胞培养面,轻轻摇动培养瓶,于倒置相差显微镜下观察,当发现细胞胞质回缩、细胞间间隙增大时,快速吸出消化液,加入含血清的培养液终止消化。
4. 用吸管吸取培养瓶中的培养液,反复轻轻吹打瓶壁,制备细胞悬液。吹打的过程应按一定的顺序进行,即从培养瓶底部的一边开始,到另一边结束,尽量使瓶底的各个部位的细胞均能被吹到。吹打时不能用力过猛,尽量不出现气泡,以免损伤细胞。
5. 在倒置显微镜下观察细胞,若发现原贴壁的细胞均已悬浮于培养液中,且细胞已分散成小的细胞团或单细胞,可终止吹打。
6. 将细胞悬液收集于离心管中,1000rpm 离心 3~5 分钟,吸弃上清液。
7. 对细胞进行计数(具体操作参见实验二十五),按照 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /ml 的密度接种细胞于新培养瓶中,置于二氧化碳培养箱中进行培养。

(二) 悬浮细胞的传代培养

1. 选生长良好的 MOLM-13 细胞,将细胞连同 RPMI1640 培养基一并转移到离心管中,

1000rpm 离心 5 分钟,吸弃上清液。

2. 向离心管中加入新鲜培养基,用吸管吹打、制备细胞悬液。将悬液按 1:2 或 1:3 的比例分别接种于新的培养瓶中。若实验需要,可在分瓶前计数,细胞的密度一般不低于 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。

【实验结果图】

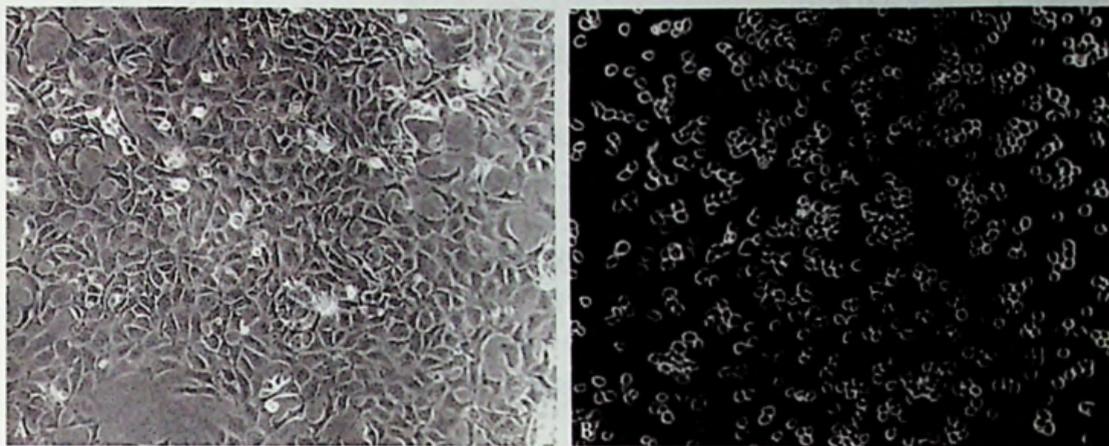


图 23-1 HEK293 细胞

A. 消化前细胞($\times 200$); B. 消化后接种的细胞($\times 200$)

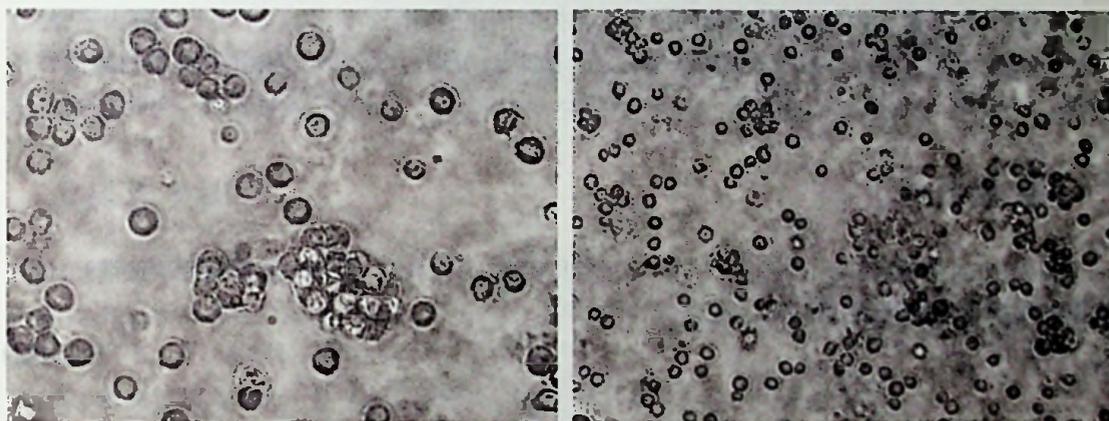


图 23-2 MOLM-13 细胞

A. 传代前细胞($\times 200$); B. 传代培养后接种的细胞($\times 100$)

【观察与记录】

1. 镜下贴壁细胞的观察(图 23-1) 当培养细胞占瓶壁 80% 以上即可进行传代。加胰蛋白酶后,显微镜下可见细胞间发生分离,细胞缩小、变圆。接种后的细胞最初呈分散状态,8 小时左右即可贴壁生长。

2. 镜下悬浮细胞的观察(图 23-2) 细胞聚集生长,呈串珠状或球状,当占瓶壁 80% 以上时即

可进行传代。更换培养基、吹打分散后,可见细胞呈分散状态,随培养时间增加,细胞逐渐聚集。

【注意事项】

1. 传代培养的过程通常较长,细胞被污染的可能增加,因此必须严格进行无菌操作。
2. 用胰蛋白酶液进行消化前,需用 PBS 液清洗培养细胞表面残留的培养液,以免其所含的血清抑制胰蛋白酶活性的发挥。
3. 消化时间要严格控制。消化过度会损伤细胞,导致细胞死亡;消化不足会导致细胞难以从瓶壁吹下,若反复吹打会损伤细胞。
4. 消化液作用的时间常随细胞的种类、消化液配制的时间及消化液加入的量的多少而发生变化,消化过程中应密切注意培养细胞形态的变化,发现胞质回缩、细胞间的连接变松散时,应立刻终止消化。通常上皮样细胞因细胞间连接较为紧密,其消化的时间较成纤维样细胞长一些。此外,首次传代的细胞与已建系的细胞相比,也需要更多的消化时间。
5. 对于悬浮细胞的培养,换液时不需要每次都完全更换为新的培养基;如需完全更换培养基,可将细胞悬液离心后,吸弃旧培养基,加入新的培养基重悬细胞。
6. 细胞培养相关试剂均需进行灭菌或过滤除菌,实验过程中均需注意无菌操作。

【作业与思考题】

1. 传代培养的目的是什么?
2. 传代培养过程中,如何从细胞的形态变化控制消化的时间?
3. 进行传代培养时,若选择胰蛋白酶液消化细胞,可通过哪些方式来促进胰蛋白酶活性的发挥?

【试剂配制】

RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清)配制参见实验七,DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)、0.25% 胰蛋白酶消化液配制参见实验二十二。

(高强国)

实验二十四 细胞的冻存与复苏

【实验目的】

1. 掌握细胞冻存和复苏的操作和无菌技术。
2. 熟悉细胞冻存和复苏操作的原理。
3. 了解冻存和复苏的细胞形态特点。

【实验原理】

细胞冻存是细胞保存的主要方法之一。利用冻存技术将细胞置于 -196°C 液氮中低温保存,使细胞暂时脱离生长状态而将其细胞特性保存起来,在需要的时候可以再复苏细胞用于实验,同时也起到了细胞保种的作用。除此之外还可以利用细胞冻存的形式来购买和运送某些细胞。

在不加任何保护剂的情况下,直接对细胞加以冻存,会导致细胞内外的水分迅速形成冰晶,由此可使细胞内部发生一系列变化,如机械损伤,电解质升高,蛋白质变性等,进而可引起细胞死亡。因此,在冻存细胞时常向培养液中加入适量的二甲亚砜(DMSO)或甘油,这是两种对细胞无毒性的物质,因其分子量较小而溶解度大,较易穿透进入细胞中,使细胞内冰点下降并可提高细胞膜对水的通透性,配合以缓慢冷冻的方法,可使细胞内的水分逐步地渗透出胞外,避免了冰晶在细胞内大量的形成。

将冻存的细胞从 -196°C 的液氮中取出融化,使其活力恢复的过程即为复苏。快速融化的手段可以保证细胞外结晶在很短时间内融化,避免由于缓慢融化使水分渗入细胞重新结晶对细胞造成损害,成功复苏的细胞可以保持很高的活力。

【实验用品】

实验对象:人胚肾细胞 HEK293。

实验试剂:PBS、DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)、0.25% 胰蛋白酶消化液、DMSO 或甘油、75% 乙醇、异丙醇。

实验器材:二氧化碳培养箱、超净工作台、倒置相差显微镜、细胞计数板、离心机、 -80°C 冰箱、液氮罐、酒精灯、酒精棉球、镊子、水浴锅;培养瓶或培养皿、冻存管、冻存盒、离心管、吸管。

【操作步骤】

(一) 细胞的冻存

1. 在进行冻存前,将培养瓶置于倒置相差显微镜下观察,若细胞已长成致密单层,或细胞占瓶壁 80% 以上(处于对数生长期),即可进行冻存(图 24-1A)。
2. 依照传代培养的方法对培养细胞进行消化,具体步骤参见实验二十三。
3. 把消化好的细胞收集于离心管中,进行细胞计数(具体步骤参见实验二十五),1000rpm 离心 5 分钟。
4. 吸弃上清液,加入适量冻存液,调整冻存液中的细胞密度为 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7/\text{ml}$ 。
5. 用吸管吹打细胞制备细胞悬液,每个冻存管分装细胞悬液 1~1.5ml,旋紧冻存管。
6. 做好标记,在冻存管上注明细胞的名称、细胞代数、冻存日期、冻存者等。
7. 将冻存管置于如下条件下逐步加以冻存:

放于冻存盒(含异丙醇)中,置于 -80°C 冰箱进行线性降温($-1^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$),随后放入液氮罐中。或 4°C 10 分钟 $\rightarrow -20^{\circ}\text{C}$ 30 分钟 $\rightarrow -80^{\circ}\text{C}$ 16~18 小时(或过夜) \rightarrow 液氮。

(二) 细胞的复苏

1. 从液氮中取出细胞冻存管一支,用镊子夹住冻存管于 37°C 水浴中,不断摇动使其尽快融化。

2. 将细胞已融化的冻存管,经 75% 乙醇擦拭消毒后移入超净工作台中。
3. 将细胞悬液用吸管移入离心管中,加 10 倍体积的培养液,吹打均匀。
4. 1000rpm 离心 5 分钟,吸弃上清液。
5. 加入适量培养液吹打细胞,使其分散,在倒置相差显微镜下观察细胞(如有必要,需进行计数,以 5×10^5 细胞/ml 为宜)。
6. 将细胞接种在培养瓶中,置于二氧化碳培养箱中培养。
7. 24 小时后观察细胞的生长状况。

【实验结果图】

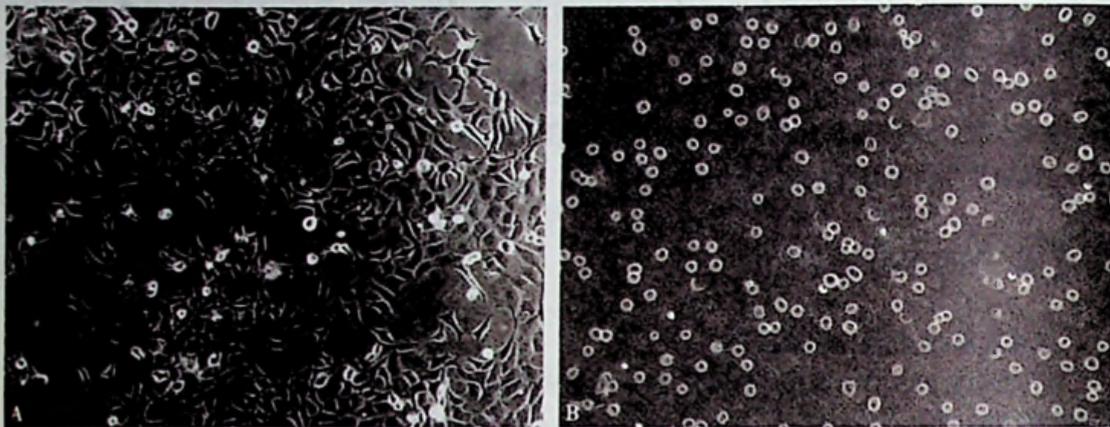


图 24-1 HEK293 细胞

A. 消化冻存前的细胞状态 ($\times 200$); B. 复苏后的细胞状态 ($\times 200$)

【观察与记录】

刚接种的细胞悬浮于培养液中,复苏成功的细胞最初呈球形的悬浮状态(图 24-1B),0.5 小时后开始贴壁,24 小时后可见贴壁细胞有突起,48 小时后细胞开始生长、增殖。未能成功复苏的细胞将悬浮于培养液中,不能贴壁。

【注意事项】

1. 细胞冻存时,应尽量选择处于对数期的细胞加以冻存,这类细胞增殖能力强,冻存后生存率较高。消化细胞时注意掌握好时间,切忌消化过度损伤细胞,以致在复苏时细胞不易存活。
2. 为了保证冻存的质量及复苏后细胞的存活率,冻存液中细胞的密度不能太低,最好控制在 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /ml。
3. 冻存管的瓶盖应封盖严密,以免复苏时细胞外溢;对一些冷冻耐受性较差的细胞,如胚胎细胞,冻存时应特别小心,可在冻存管外包裹一层棉花,以避免冻存过程中细胞受损伤。
4. 使用 DMSO 不需要进行高压灭菌,高压灭菌反而会破坏它的分子结构,降低其冷冻保护效果。在常温下,DMSO 对人体有害,故在配制时最好戴上手套操作。甘油需高压灭菌后使用。

5. 细胞冻存时, -20°C 处理不宜超过 1 小时, 以防止冰晶过大, 造成细胞大量死亡; 或跳过此步骤直接放入 -80°C 冰箱中, 但存活率会稍微降低一些。

6. 在细胞复苏时, 从液氮取出细胞到水浴融化要快, 在取细胞过程中应带上棉质手套, 以防冻伤。

【作业与思考题】

1. 为何冻存细胞的原则是要求慢而复苏细胞要求快?
2. 哪些措施可减少冻存过程中冰晶的形成?
3. 控制冻存液中细胞的密度对于保证冻存的质量及复苏后细胞的存活率均有重要意义, 试分析其原因。

【试剂配制】

1. 冻存液 向 90ml DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)中加入 10ml 二甲亚砜(DMSO)或已灭菌的甘油, 混匀, 置于 4°C 冰箱中保存。为保证冻存后复苏细胞的成活率, 可提高胎牛血清的比例或直接用含有 10% (V/V) 的 DMSO 或甘油的胎牛血清冻存液。

2. RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清)配制参见实验七, DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清) 0.25% 胰蛋白酶消化液配制参见实验二十二。

(高强国)

实验二十五 培养细胞的形态观察和计数

【实验目的】

1. 掌握细胞计数的基本方法。
2. 熟悉体外培养细胞的一般形态和生长状态。

【实验原理】

体外培养的细胞根据其生长方式的特点可分为贴壁型与悬浮型两大类型。能附着于支持物表面生长的细胞属贴壁型细胞, 大多数活体细胞在体外培养的条件下, 均呈现出贴壁型生长的特点。有些细胞在培养时可悬浮于培养基中生长, 而不需贴附于支持物上, 此类细胞即为悬浮型细胞。

贴壁型细胞在体外培养时形态常出现类似于“返祖”的现象, 即失去原有在体内的特征、趋向于单一化, 并反映出其胚层起源的情况。如来源于内、外胚层的细胞多呈上皮细胞型, 来自中胚层的细胞多呈成纤维细胞型。这种现象与供体的年龄密切相关, 供体越幼小则“返祖”现象越明显。贴壁型细胞在形态上主要可分为上皮细胞型与成纤维细胞型两大类(图 25-1)。属上皮细胞型的细胞形态与上皮细胞类似, 呈扁平、不规则的多角形。胞核圆形、通常位于细胞中央, 细胞间连接紧密, 呈铺路石样相嵌排列, 相互衔接成单层。起源于内胚层和外胚层的细胞, 如表皮、乳腺、消化道

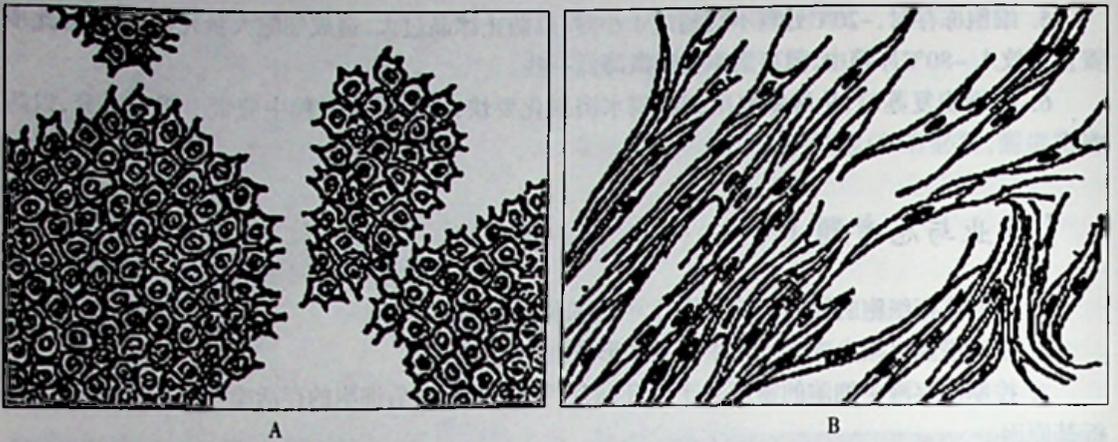


图 25-1 贴壁型细胞的主要类型

A. 上皮细胞型; B. 成纤维细胞型

上皮、肝和肺泡上皮等组织细胞均属上皮细胞型。成纤维细胞型形态与成纤维细胞类似,胞体呈梭形或不规则的三角形,有数个长短不等的突起,细胞彼此间呈漩涡状、放射状的排列,起源于中胚层的组织细胞,如纤维结缔组织、血管内皮、平滑肌、心肌等组织细胞均属成纤维细胞型。

悬浮型细胞的形态较为单一,无论其来源如何,在体外培养条件下均为圆形,如淋巴细胞、白血病细胞等。因此,本实验主要以贴壁型细胞作为材料,对细胞的形态进行观察。

在倒置相差显微镜下观察到的生长状态良好的活细胞,其胞质是匀质、透明的,胞质中颗粒较少,细胞的轮廓不明显。随着培养时间的延长,细胞中的颗粒物质逐渐增多,细胞的透明度减弱,胞轮廓增强,核仁数量增多,因此通过观察培养细胞内颗粒多少、透明度的高低及轮廓的清晰程度,可以对培养细胞的生长状态加以判定。

细胞计数是细胞生物学实验的一项基本技术,它是了解培养细胞生长状态,借以测定培养基、血清、药物等物质生物学作用的重要手段。

细胞计数主要利用血细胞计数板来完成。血细胞计数板每一大方格长为 1mm,宽为 1mm,高为 0.1mm,体积为 0.1mm^3 ,可容纳的溶液是 $0.1\mu\text{l}$,那么每毫升溶液中所含细胞数即是视野中每一大方格中数出的细胞数的 10 000 倍(图 25-2)。

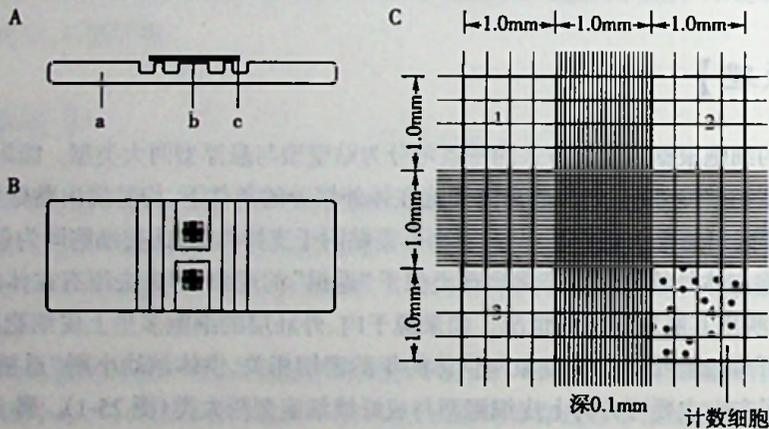


图 25-2 细胞计数板示意图

A. 侧面观(a. 计数板, b. 计数室, c. 盖玻片); B. 正面观; C. 计数室

【实验用品】

实验对象:培养3日的鼠肝细胞、鼠成纤维细胞,培养7日的鼠肝细胞、鼠成纤维细胞。

实验试剂:D-Hanks液、0.25%胰蛋白酶消化液、DMEM培养基(含10%胎牛血清)、乙醇。

实验器材:细胞计数板、倒置相差显微镜、超净工作台、二氧化碳培养箱、吸管、盖玻片。

【操作步骤】

(一) 培养细胞的形态观察

1. 从二氧化碳培养箱中取出已培养3日的肝细胞。
2. 在倒置相差显微镜下,对培养细胞的形态、细胞排列方式及彼此间连接的程度加以观察,记录观察的结果。
3. 将肝细胞放回培养箱,取出已培养3日的传代成纤维细胞。
4. 在倒置相差显微镜下,观察成纤维细胞的形态、细胞排列方式及彼此间连接的程度,记录观察的结果,并与肝细胞的形态特征加以比较。

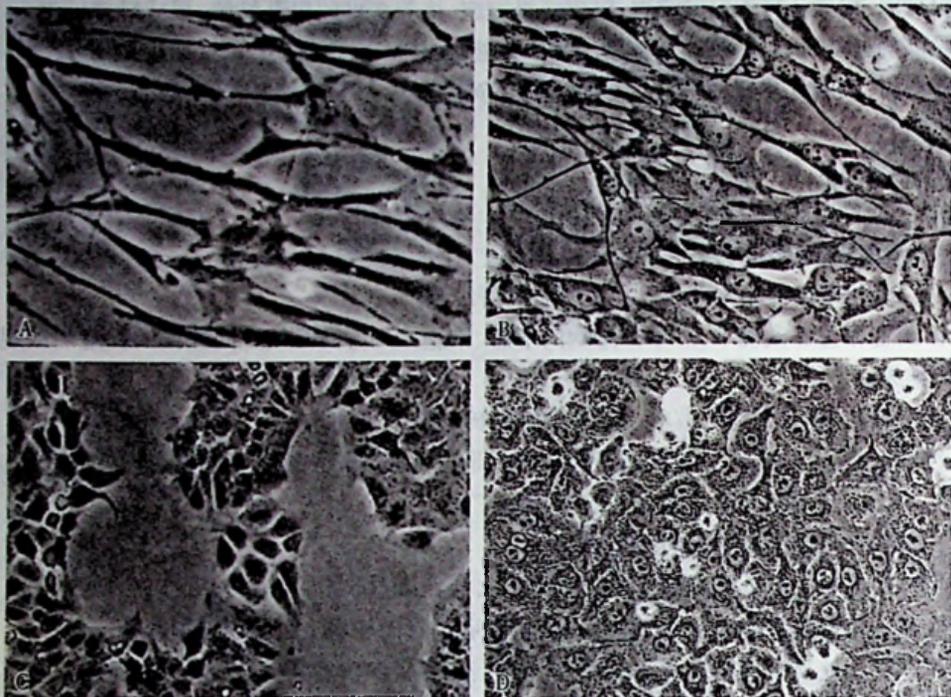
(二) 细胞形态结构及生长状况的观察

1. 将传代培养3日的肝细胞或成纤维细胞从培养箱中取出。
2. 在倒置相差显微镜10×的物镜下,观察细胞的形态轮廓、细胞的透明度。
3. 将倒置相差显微镜转换至40×物镜,对细胞的结构、内容物等作进一步的观察。
4. 记录上述观察结果,并将细胞放回培养箱,同时取出传代培养7日的肝细胞或成纤维细胞。
5. 在倒置相差显微镜下,分别用10×及40×的物镜对细胞的透明度、轮廓及内容物等进行观察。
6. 记录观察的结果,并与传代培养3日的细胞加以比较。

(三) 细胞的计数

1. 准备细胞计数板 用70%乙醇清洁计数板和盖玻片,晾干。
2. 制备单细胞悬液 用胰蛋白酶消化贴壁细胞或收集悬浮细胞,制成单细胞悬液。要求细胞密度不低于 $10^4/\text{ml}$,若细胞数很少,应将细胞悬液离心(1000rpm,离心2分钟),重新悬浮于适量DMEM培养基中。
3. 加样 将盖玻片盖在计数板两槽中间。用吸管轻轻吹打细胞悬液,吸取少量细胞悬液,在计数板上盖玻片一侧边沿缓慢滴加细胞悬液,使之充满计数板和盖玻片之间的空隙中,注意不要使细胞悬液溢出到旁边的凹槽或带有气泡。否则要将计数板和盖玻片擦干净重新加样。
4. 计数 将滴加细胞悬液后的计数板静置片刻,在显微镜下用10×物镜计数计数板四个大方格(每个大方格分为16个小方格)中的细胞数。计数时,只计数完整的细胞,如聚集成团的细胞则按一个细胞进行计数。在一个大方格中,如果细胞位于边界上,一般只计数位于左侧和上方边线的细胞,而不计位于右侧和下方边线的细胞。两次重复计数误差不应超过5%。

【实验结果图】

图 25-3 培养细胞的形态($\times 400$)

A. 培养 3 日的成纤维细胞; B. 培养 7 日的成纤维细胞; C. 培养 3 日的肝细胞; D. 培养 7 日的肝细胞

【观察与记录】

1. 培养细胞形态类型的观察(图 25-3A、C)

(1) 传代培养 3 日的肝细胞具有典型的上皮型细胞的特点,即细胞呈不规则的多角形,细胞间连接紧密、呈铺路石样相嵌排列。

(2) 传代培养 3 日的成纤维细胞具有典型的成纤维型细胞的特点,胞体多呈梭形,部分细胞有数个长短不等的突起,细胞彼此间连接较为疏松,细胞呈放射状的排列。

2. 培养细胞结构的观察(图 25-3B、D) 培养 3 日的细胞,无论是上皮型或是成纤维型,细胞均具有较高的透明度,折光性强,胞质中颗粒较少,表明细胞处于良好的生长状态。但培养 7 日的细胞在高倍镜下可见胞质中颗粒数明显增多,颗粒较为粗大,致使整个细胞的透明度降低,胞核中存在多个核仁,细胞的整体轮廓增强。

3. 细胞计数 将记录的计数板四个大方格中的细胞数代入以下公式,可得出细胞密度:

$$\text{细胞数 / 毫升原液} = (4 \text{ 大格细胞数之和} / 4) \times 10^4 \times \text{稀释倍数}$$

【注意事项】

1. 观察细胞形态时,应注意取放细胞时的无菌操作,以免污染。同时注意限制观察的时间,尤其是在对多瓶细胞进行观察时,应分批取放,以免细胞在培养箱外的时间过长影响细胞的状态。
2. 细胞计数时,消化单层细胞应尽量使细胞分散良好,以制备单个细胞悬液,否则会影响细胞计数结果。
3. 取样计数前,应充分混匀细胞悬液。在连续取样计数时,特别应该注意这一点,否则前后计数结果会有很大误差。
4. 镜下计数时,遇到2个以上细胞组成的细胞团,应按单个细胞计算。如细胞团占10%以上,说明消化不充分;或细胞数少于200个/ 10mm^2 或多于500个/ 10mm^2 时,说明稀释不当,需重制备细胞悬液、计数。
5. 加样时,应尽量避免气泡的产生,否则不但会妨碍对计数细胞的观察,同时也会造成计数结果的误差。

【作业与思考题】

1. 绘制传代肝细胞和成纤维细胞的形态图。
2. 计数每毫升细胞悬液中的细胞数。
3. 细胞计数时,细胞悬液溢出凹槽外或有气泡时分别会对计数结果产生何种影响?

【试剂配制】

1. D-Hanks液 称取8g NaCl,0.4g KCl,0.06g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,0.06g KH_2PO_4 ,0.02g 酚红,加蒸馏水定容至1L,用 NaHCO_3 调节pH至7.2~7.4,经 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。
2. 0.25%胰蛋白酶消化液 称取0.25g胰蛋白酶溶于100ml D-Hanks液中,用 NaHCO_3 调节pH至7.2,经 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。
3. DMEM培养基(含10%胎牛血清)的配制参见实验二十二。

(于兵)

实验二十六 鸡血细胞的融合

【实验目的】

1. 掌握PEG诱导细胞融合的基本操作。
2. 熟悉PEG诱导细胞融合的基本原理。
3. 了解其他细胞融合的方法及其优缺点。

【实验原理】

细胞融合是指两个或两个以上细胞合并成一个细胞的过程。细胞融合过程包括质膜的连接与融合,胞质合并,细胞核、细胞器和酶等互成混合体系。细胞融合包括同种细胞的融合和异种细胞的融合。其中异种细胞的融合也称细胞杂交或体细胞杂交,是指在离体条件下用人工的方法把不同种的细胞通过无性方式融合成一个杂合细胞的技术。细胞融合是细胞工程的重要工具,为研究细胞的遗传变异、进化、发育等提供了有利的方法,并且可用于生产单克隆抗体。

细胞融合的方法有生物法、化学法和物理法。生物法是指病毒诱导法,主要以病毒(如仙台病毒)为媒介,使单个细胞间发生凝聚,并在病毒酶作用下产生融合细胞。化学法主要是用化学融合剂聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG), 该法使用方便,活性稳定,容易制备和控制,目前已成为人工诱导细胞融合的主要手段。由于PEG对细胞是一种毒性物质,所以在操作时应严格掌握作用时间和强度。PEG的一个重要参数是其分子量,常用的PEG分子量范围是600~6000kD,浓度为40%~60%。物理法有显微操作、电融合法等,其中电融合法是利用特定波长及波形的电脉冲使细胞发生融合,融合效率较高,操作也较简便,但需要专用的设备。

本实验主要介绍PEG介导的细胞融合。PEG分子量1000以下者为液体,1000以上者为固体。该多聚物靠醚键的连接使其分子末端带弱电荷。PEG法诱导原生质体融合的机制尚不十分清楚,可能是由于带有大量负电荷的PEG和原生质体表面的负电荷间,在钙离子的连接下形成静电键,促使异源的原生质体间的黏着和结合,在高pH、高钙离子的作用下,将钙离子和与质膜结合的PEG分子洗脱,导致电荷平衡失调并重新分配,使两种原生质体上的正负电荷连接起来,进而形成具有共同质膜的融合体。

【实验用品】

实验对象:鸡血。

实验试剂:50% PEG(MW4000)、Hanks液(pH 7.4)。

实验器材:普通光学显微镜、普通低速离心机、恒温水浴箱、刻度离心管、玻璃试管、酒精灯、试管夹、吸管、载玻片、盖玻片、吸水纸。

【操作步骤】

1. 取新鲜鸡血用0.85%生理盐水制成10%的鸡血细胞悬液。
2. 称取0.5g PEG(MW=4000)放入试管内,在酒精灯上融化后,迅速加入0.5ml预热的Hanks液混匀制成50%的PEG溶液。置于37℃水浴中待用。
3. 取1ml上述10%的鸡红细胞悬液加入离心管中,再加入5ml Hanks液混匀,以1000rpm离心5分钟,小心弃去上清,用指弹法将细胞团块弹散。
4. 取0.5ml上述50%PEG溶液,在1分钟内滴加到鸡血细胞悬液中,边加边轻轻摇动混匀。待PEG全部加入后静置1分钟左右。此全部过程都要求在37℃水浴内进行。
5. 缓慢滴加9ml Hanks液以终止PEG的作用,在37℃水浴内静置5分钟。
6. 离心弃上清,取一滴融合后的细胞悬液滴于载玻片中央,加盖玻片,于显微镜下观察。

【观察与记录】

1. 在高倍镜下可以看到有两个或两个以上的鸡红细胞膜融合在一起,形成一个异核体细胞。要注意辨别融合细胞与重叠的鸡红细胞。

2. 融合率的计算 在高倍镜下随机计数 200 个细胞(包括融合的与未融合的细胞),以融合细胞(含两个或两个以上的细胞核的细胞)的细胞核数除以总细胞核数(包括融合与未融合的细胞核)即得出融合率。公式如下:

$$\text{融合率} = \frac{\text{融合的细胞核数}}{\text{总细胞核数}} \times 100\%$$

【注意事项】

1. 在酒精灯上融化 PEG 并滴加 Hanks 液时,试管口须避开周围人,并防止液体迸溅。
2. 滴加 50% PEG 时,应缓慢、逐滴加入,而且每加一滴应轻弹试管底部,滴加完后用滴管充分混匀。

【作业与思考题】

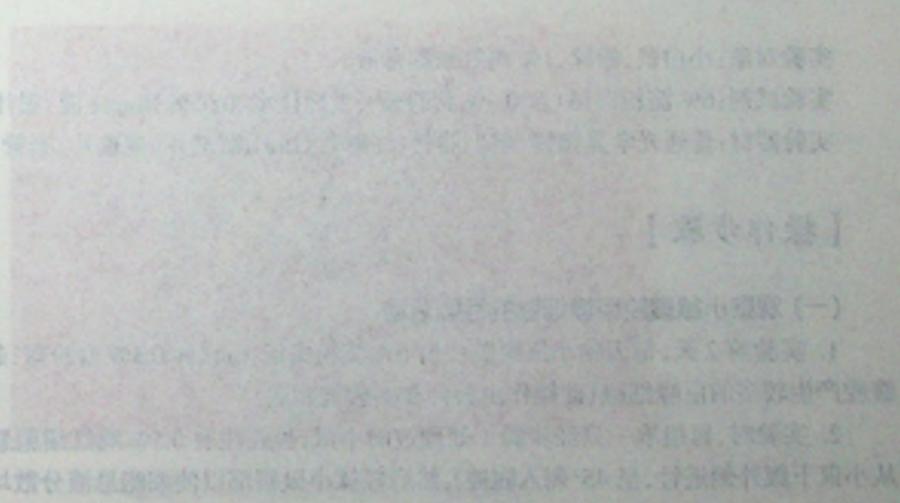
1. 按顺序绘制所观察到的细胞融合各阶段,并注明主要特点。
2. 计算细胞融合率。

【试剂配制】

Hanks 液的配制参见实验九。

(唐娟)

【实验结果图】



第四篇

细胞功能分析技术

实验二十七 细胞的吞噬活动

【实验目的】

1. 掌握诱导小鼠腹腔产生巨噬细胞的原理。
2. 掌握颈椎脱位法处死小鼠的方法及小鼠腹腔注射操作的要点。
3. 熟悉巨噬细胞吞噬活动的基本过程。

【实验原理】

高等动物体内存在着具有防御功能的吞噬细胞系统,它是由单核细胞和粒细胞等白细胞构成,是机体内免疫系统的重要组成部分。在白细胞中,以粒细胞和单核细胞的吞噬活动较强,故被称为吞噬细胞。单核细胞由血液进入组织后逐渐演变成巨噬细胞。巨噬细胞主要靠吞噬作用处理异物,当机体受到细菌等病原体或其他异物入侵时,巨噬细胞首先在趋化因子的作用下向异物移动,然后伸出伪足包裹异物,吞入胞质内形成吞噬泡,随后溶酶体与吞噬泡融合并消化异物。

【实验用品】

实验对象:小白鼠、蟾蜍、1% 鸡红细胞悬液。

实验试剂:6% 淀粉肉汤(含 0.3% 台盼蓝)、生理盐水、0.65% Ringer 液、墨汁。

实验器材:普通光学显微镜、解剖器材、注射器(1ml)、载玻片、盖玻片、吸管、吸水纸。

【操作步骤】

(一) 观察小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活动

1. 实验前 2 天,每天向小鼠腹腔注射 6% 淀粉肉汤 1ml(含 0.3% 台盼蓝,起标记作用),以诱导腹腔产生较多的巨噬细胞(此操作由教师在实验前完成)。
2. 实验时,每组取一只经步骤 1 处理过的小鼠,腹腔注射 0.5% 鸡红细胞悬液 0.5~1ml(注射时从小鼠下腹外侧进针,呈 45° 刺入腹腔),然后轻揉小鼠腹部以使细胞悬液分散均匀。

3. 30 分钟后,颈椎脱位法处死小鼠,剖开腹腔,用吸管向腹腔内滴加 0.5ml 生理盐水,轻轻搅动使生理盐水与腹腔液混匀。

4. 吸取腹腔液,滴于载玻片中央,盖上盖玻片,吸去多余液体,置于显微镜下观察。

(二) 观察蟾蜍白细胞的吞噬活动

1. 用注射器吸取适量 0.65% Ringer 液稀释墨汁,将 0.5~1ml 稀释墨汁注入蟾蜍尾杆骨两侧背淋巴囊内,将蟾蜍放在室温环境中。

2. 约 2~3 小时后,用注射器抽取背淋巴囊内的淋巴液(图 27-1),滴在载玻片上,加盖玻片,吸去多余液体,置于显微镜下进行观察。

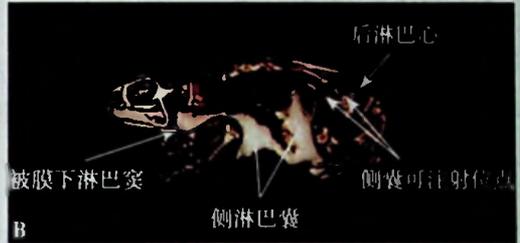
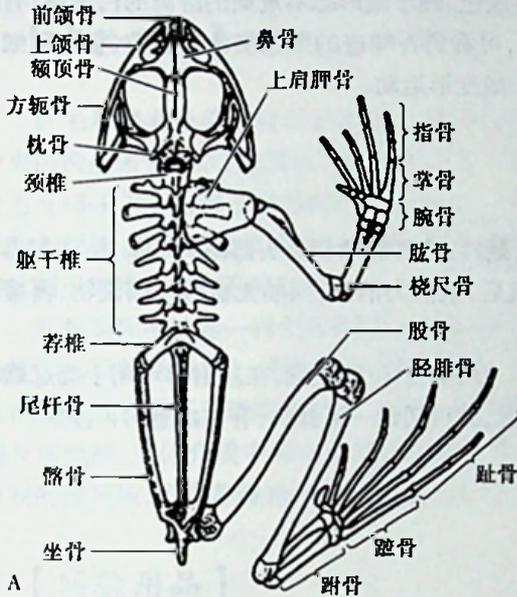


图 27-1 蟾蜍尾杆骨两侧背淋巴囊
A. 蟾蜍尾杆骨; B. 蟾蜍侧囊可注射位点

【实验结果图】

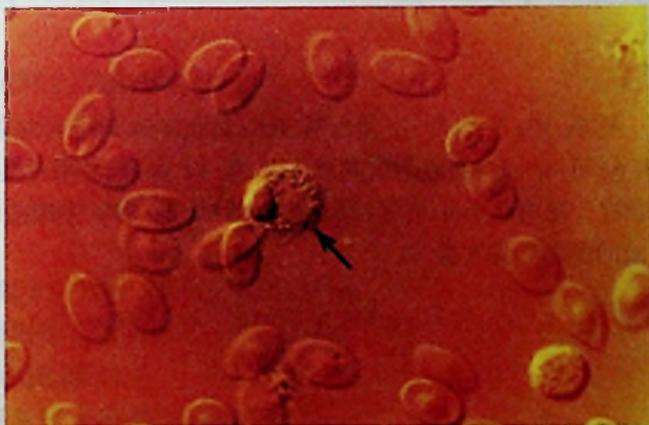


图 27-2 小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活动

【观察与记录】

1. 小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活动 高倍镜下,可见到许多体积较大的圆形或形态不规则的细胞,其胞质中含有数量不等的蓝色颗粒(这是吞入的含台盼蓝淀粉肉汤的吞噬泡),即巨噬细胞(图 27-2)。鸡红细胞为淡黄色,椭圆形,有核。慢慢移动载玻片,仔细观察巨噬细胞吞噬鸡红细胞的过 程:有的鸡红细胞紧贴附于巨噬细胞表面;有的鸡红细胞部分或全部被巨噬细胞吞入,形成吞噬泡;有的巨噬细胞内的吞噬泡已与溶酶体融合,正在被消化。

2. 蟾蜍白细胞的吞噬活动 高倍镜下,见许多浅色、圆形或形态不规则的游离的白细胞(有时见有少量浅红色椭圆形的红细胞)。部分白细胞中,可看到吞噬进的黑色墨汁小颗粒,它们随细胞的变形运动而运动;有的白细胞正在吞噬墨汁颗粒,做变形运动。

【注意事项】

1. 小鼠腹腔注射 抓取小鼠颈部皮肤和尾部,翻转,使其腹部朝上头部略向下垂,持注射器于小鼠下腹外侧进针,呈 45°刺入腹腔,针尖通过腹肌后,抵抗力消失,回抽无血液及回流物,再缓慢注入细胞悬液。注意不要刺伤内脏。

2. 蟾蜍尾杆骨两侧背淋巴囊的位置(图 27-1) 为了注射位置正确,在注射时可用手提起蟾蜍尾杆骨一侧的皮肤,然后把注射针头刺入皮下淋巴囊,并可活动一下针头,有空虚感时再注射。

3. 光学显微镜观察时,请适当将视野调暗。

【作业与思考题】

1. 绘制光镜下小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的各 种形态。
2. 绘制光镜下蟾蜍白细胞的形态。
3. 思考吞噬泡的形成需要有哪些骨架蛋白的帮助,用什么药物处理细胞,可阻断吞噬泡的成 成?
4. 为什么要在实验前两天向小鼠腹腔注射淀粉肉汤?

【试剂配制】

1. 6% 淀粉肉汤 称取 0.3g 牛肉膏、1g 蛋白胨、0.5g 氯化钠和 0.3g 台盼蓝,分别加入到 100ml 蒸馏水中溶解,再加入 6g 可溶性淀粉,混匀后煮沸灭菌,置 4℃保存,使用时温浴溶解。
2. 1% 鸡血细胞悬液 取鸡血 1ml(肝素抗凝)加入到 99ml 0.85% 生理盐水中。
3. 0.65% Ringer 液的配制参见实验二。

(于文静)

实验二十八 细胞的运动

【实验目的】

1. 掌握暗视野显微镜观察细胞纤毛和鞭毛运动的方法。
2. 熟悉纤毛和鞭毛的结构特点及其运动方式。

【实验原理】

纤毛和鞭毛是单细胞或多细胞生物细胞表面伸出的特化结构,其内部是由微管组成的轴,轴中央由两条微管组成,外围由九组二联微管环绕;轴的基部与基体相连,周围被细胞膜所包绕。直径为 $0.15\sim 0.30\mu\text{m}$,属于细胞的运动器官,其运动是由二联微管间的相互滑动所引起,鞭毛运动方式为波浪式,纤毛运动为波动式。本实验利用蟾蜍上颌黏膜上皮细胞观察纤毛的运动,利用雄性蟾蜍精子细胞观察鞭毛的运动。

暗视野照明法是一种使照射被检测物体的光线不直接进入物镜的照明方法,即将光源以一定角度倾斜照射到样品上,照射光无法进入物镜,只有被照样品发出的散射光能进入物镜被放大,因此在黑暗的背景下呈现明亮的像。暗视野显微镜即利用此原理成像,用于观察未经染色的活体细胞及细胞核、液体介质中的细菌和真菌以及胶体粒子等,但是分辨不清其内部的微细结构。使用自制的遮光板,可将普通光学显微镜变为简单的暗视野显微镜。

【实验用品】

实验对象:雄性蟾蜍。

实验试剂:0.65% Ringer 液。

实验器材:普通光学显微镜、解剖器材、蜡盘、大头针、小平皿、载玻片、盖玻片、吸管、吸水纸。

【操作步骤】

(一) 蟾蜍上颌黏膜上皮细胞的纤毛运动

1. 捣髓法处死蟾蜍(参照实验二),将蟾蜍腹部向上,用大头针固定在蜡盘中。

2. 沿蟾蜍两侧口角向后剪开约 1cm,将下颌翻转固定在腹部。

3. 用解剖针刮取少许蜡屑,置于上颌中线距喉头 1cm 处,观察蜡屑向什么方向移动,记录蜡屑开始移动到消失的时间(图 28-1)。

4. 用眼科剪剪取喉头前部上颌黏膜组织约 $5\text{mm}\times 3\text{mm}$ 小块,夹取剪下的黏膜,将纵切面贴到载

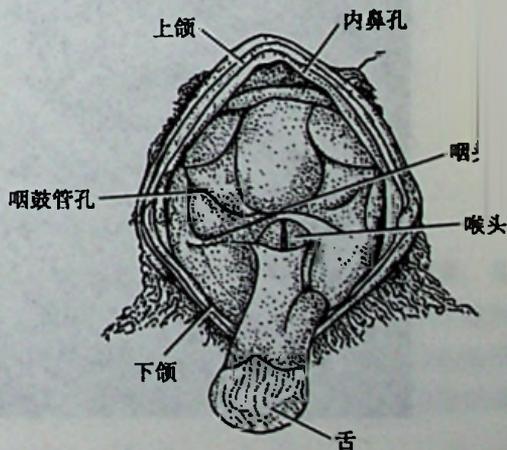


图 28-1 蟾蜍口腔内面图

玻片上。

5. 滴加 0.65% Ringer 液至标本上, 盖上盖玻片, 于光镜下观察。

(二) 蟾蜍精子的鞭毛运动

1. 捣髓法处死雄性蟾蜍, 沿腹中线剪开腹腔, 暴露出黄色圆柱状精巢(图 28-2)。

2. 剪取一侧精巢, 洗去血污, 置于小平皿中, 用眼科剪将精巢充分剪碎后, 加入数滴自来水混匀。

3. 用吸管吸取一滴液体, 滴于载玻片中央, 盖上盖玻片, 吸净多余液体, 稍待 2~3 分钟, 于显微镜下观察。

(三) 自制暗视野显微镜

将自制遮光板放置在滤光框上, 使普通光学显微镜变为简单的暗视野显微镜。

1. 将显微镜聚光器调到最高位, 低倍镜下调焦至清楚。

2. 取下目镜, 从镜筒中观察并调节光圈大小, 使其与镜筒中所见物镜的视野相等。

3. 放一块透明玻璃于载物台透光孔上, 用尺子测量光圈孔径。

4. 按图 28-3 的形状, 用黑纸剪成与调节后光圈孔径一样大小的中央遮光板。

5. 将中央遮光板放置在显微镜的滤光框上, 即可进行标本的暗视野观察。

6. 使用高倍镜观察标本时, 应按高倍镜调焦的视野大小重新制作中央遮光板。



图 28-2 蟾蜍的精巢

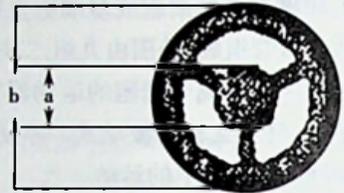


图 28-3 中央遮光板
a. 光圈孔径; b. 遮光片直径

【实验结果图】

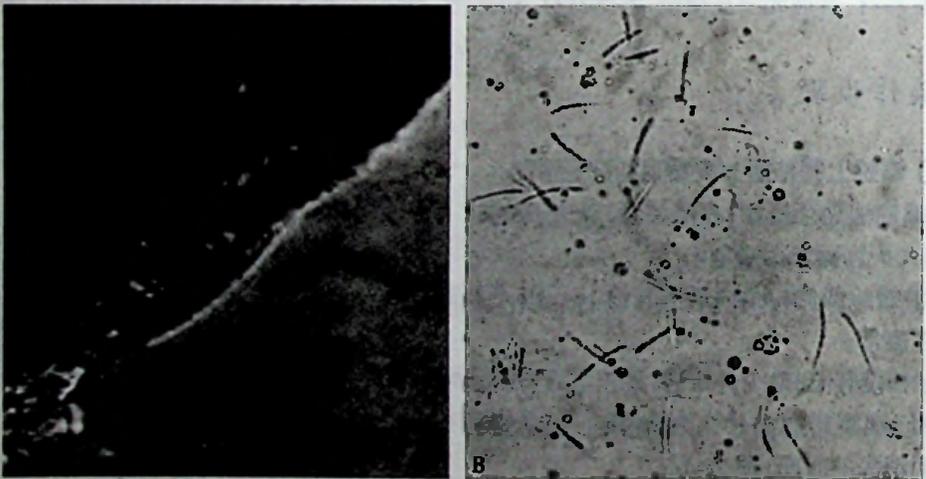


图 28-4 蟾蜍上颌黏膜上皮细胞与精子细胞
A. 上颌黏膜上皮细胞; B. 精子细胞

【观察与记录】

1. 于低倍镜下观察纤毛运动的现象(图 28-4A),换高倍镜仔细观察纤毛有规律的运动。
2. 低倍镜下可看到视野中有许多精子,头部呈长锥形,尾为细长的线状结构(图 28-4B);高倍镜下,可见精子靠尾部鞭毛弯曲摆动驱使运动。

【注意事项】

1. 蟾蜍精巢呈圆柱形,颜色存在个体差异,一般为黄色或灰褐色。
2. 蟾蜍精子细胞须使用自来水进行悬混。

【作业与思考题】

1. 记录蜡屑移动的方向,并计算移动速度。
2. 绘制光镜下观察到的蟾蜍精子细胞形态。
3. 思考为什么用自来水重悬精子细胞?

【试剂配制】

0.65% Ringer 液的配制参见实验二。

(于文静)

实验二十九 细胞集落形成实验

【实验目的】

1. 掌握细胞集落形成实验技术。
2. 熟悉细胞集落形成实验的应用领域。
3. 了解 Giemsa 染色的基本原理。

【实验原理】

单个细胞在体外持续增殖 6 代以上,其后代所形成的一个细胞群体,称之为集落或克隆。每个克隆含有 50 个以上的细胞,大小在 0.4~1.0mm 之间。再通过计算克隆形成率,分析测试细胞的增殖能力。细胞集落形成实验是检测培养细胞增殖能力的有效方法之一。由于它是通过检验活细胞的增殖能力,因此可避免在生长曲线绘制时将死细胞或不能再分裂细胞计数在内而导致的实验结果误差。

影响细胞集落形成率的因素很多,包括培养液、血清、温度、酸碱度及细胞密度等。一般情况

下,原代培养细胞集落形成率较低,传代细胞较高;正常细胞较低,转化细胞较高。集落形成实验在干细胞和肿瘤的研究中得到广泛使用。骨髓干细胞在体外半固体培养过程中,添加不同造血因子能诱导干细胞或定向造血祖细胞形成某一种或某些种类细胞的集落,通过对形成集落形态学、酶学鉴定,计算不同种类集落形成的数量和比例,反映待测标本中集落刺激因子的种类和活性水平。肿瘤系由不同增殖及分化能力的瘤细胞群构成,其中仅有部分细胞具有自我更新能力,即肿瘤干细胞。肿瘤干细胞与肿瘤的治疗、复发或转移关系密切。目前认为肿瘤干细胞具有形成集落的能力,细胞集落形成实验可以作为抗癌药物或致癌物质检测的有效手段。对于抗癌药物而言,集落抑制率或集落存活分数是重要的指标。

$$\text{集落抑制率} = (1 - \text{实验组集落形成率} / \text{对照组集落形成率}) \times 100\%$$

常用的细胞集落形成方法包括平板克隆形成实验与软琼脂克隆形成实验。

【实验用品】

实验对象:人胃癌 BGC-823 细胞。

实验试剂:RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清)、PBS、0.25% 胰蛋白酶消化液、Carnoy 固定液、Giemsa 染液、5% 琼脂。

实验器材:倒置相差显微镜、二氧化碳培养箱、超净工作台、水浴锅、离心机、细胞计数板、微量移液器、枪头、培养皿(直径 60mm)、烧杯、离心管。

【操作步骤】

(一) 平板克隆形成实验

此方法适用于贴壁生长的各种正常细胞与肿瘤细胞。

1. 取对数生长期的 BGC-823 细胞,采用常规消化传代方法,制成细胞悬液。使用细胞计数板进行计数,并用培养液调整细胞浓度,备用。

2. 依据细胞增殖能力的不同,将单细胞悬液进行梯度稀释。一般按照每皿含 50、100、200 个细胞的浓度,将 5ml 细胞悬液分别接种至 60mm 培养皿中,以十字方向轻轻晃动培养皿,使细胞分散均匀。

3. 将培养皿置于二氧化碳培养箱内,在 37℃、5% CO₂、饱和湿度下,静止培养 2~3 周,中间根据培养液 pH 变化适时更换新鲜培养液。

4. 当培养皿中出现肉眼可见克隆时,终止培养,弃去培养液,PBS 小心浸洗 2 次,空气干燥。加 Carnoy 固定液固定 15 分钟,吸弃固定液,空气干燥。加适量 Giemsa 染液染色 10 分钟,清水缓慢漂洗,去除染色液,空气干燥。

5. 肉眼计数克隆数(图 29-1),或在显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数,计算克隆形成率。

(二) 软琼脂克隆形成实验

此法适用于非附着依赖性生长的细胞,如骨髓造血干细胞、肿瘤细胞株、转化细胞系等。利用琼脂液无粘着性又可凝固的特性,将肿瘤细胞混入琼脂液中,琼脂液凝固使肿瘤细胞置于一定位置,琼脂中肿瘤细胞可能向周围作全方位的移动,因此可以用来检测肿瘤细胞的主动移动能力。肿瘤细胞在适宜培养基中又可以增殖,从而可以测定肿瘤细胞克隆形成率。造血系统软琼脂集落形成试验方法相同,主要用于有关细胞分化的研究,但使用培养基不同。

1. 制备单细胞悬液,方法同上。

2. 制备底层琼脂 取 5% 琼脂置沸水浴中使琼脂完全融化。取出一份 5% 琼脂移入小烧杯中,待冷却至 50℃,迅速加入 9 份培养液,混合均匀后分装于 60mm 培养皿中,每皿 4ml 底层琼脂液,水平静置,室温冷却凝固。

3. 制备上层琼脂 取 5% 琼脂置沸水浴中使琼脂完全融化。取出 0.6ml 5% 琼脂移入小烧杯中,待冷却至 40℃,加入 37℃ 保温的不同密度的细胞悬液 9.4ml 迅速混匀,随后迅速吸取 0.5ml 加入到铺有底层琼脂的培养皿中,于室温下静置,使上层琼脂凝固。

4. 克隆形成 将培养皿置于二氧化碳培养箱内,静止培养 2~3 周。

5. 在显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数,计算克隆形成率。

【实验结果图】



图 29-1 Giemsa 染色后的细胞集落

【观察与记录】

1. 定期观察培养过程中的克隆形成情况。

2. 在显微镜或倒置相差显微镜下观察计数大于 50 个细胞的克隆数,并按以下公式计算克隆形成率:

$$\text{克隆形成率}(\%) = \text{克隆数} / \text{接种细胞数} \times 100\%$$

【注意事项】

1. 细胞悬液中的细胞应充分分散,单个分散细胞应不低于 90%。

2. 在平板培养早期尽量不要晃动培养皿。培养期间根据培养液 pH 的变化适时更换培养液。

3. 软琼脂培养的底层琼脂中,培养液与琼脂应充分混匀,彻底凝固后,再铺上层琼脂。软琼脂培养的上层琼脂,琼脂与细胞混合时,温度不要超过 40℃。

4. 接种细胞的密度不宜过高。

【作业与思考题】

1. 计算克隆形成率。
2. 若使用抗癌药物作用于人胃癌 BGC-823 细胞,如何计算集落抑制率?

【试剂配制】

1. 5% 琼脂 称取 0.25g 琼脂溶于适量双蒸水中,继续加双蒸水定容至 5ml,高压灭菌,备用。
2. Giemsa 染液的配制参见实验七。

(赵凌宇)

实验三十 MTT 对细胞生长状况的检测

【实验目的】

1. 掌握 MTT 比色法测定细胞的活性。
2. 熟悉 MTT 比色法的原理。
3. 了解 MTT 比色法应用领域。

【实验原理】

MTT 的化学名称为 4-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐,商品名为噻唑蓝,可接受氢原子而发生显色反应。活细胞中,线粒体内的琥珀酸脱氢酶能够使外源性的 MTT 还原为蓝紫色不溶性结晶物甲瓖而沉积于细胞中,而死细胞线粒体缺乏活性,因此不发生显色反应。蓝紫色结晶物可以溶解在二甲基亚砜中,用酶标仪在 490nm 波长处可以检测其光吸收值,并根据吸收值的高低判断活细胞数量。在一定数量的细胞范围内,吸收值与细胞数目成正比。研究显示 MTT 法与其他检测细胞活性的方法具有良好的相关性,而且因为其灵敏度高、重复性好、操作简便、经济安全,不仅可用于检测细胞生长状况,还可用于细胞毒性实验、抗肿瘤药物筛选及肿瘤放疗敏感性测定等。

【实验用品】

实验对象:人宫颈癌 HeLa 细胞。

实验试剂:RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清)、PBS、0.25% 胰蛋白酶消化液、MTT 溶液、二甲基亚砜。

实验器材:倒置相差显微镜、二氧化碳培养箱、混合振荡器、摇床、水浴锅、酶联免疫检测仪、离心机、细胞计数板、96 孔培养板、微量移液器、枪头、一次性注射器(1ml)、吸管、离心管。

【操作步骤】

1. 用 0.25% 胰蛋白酶消化 HeLa 细胞,用 RPMI-1640 培养基制备单细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔体积为 200 μ l。另设若干仅含有 200 μ l 培养基的空白对照孔。
2. 将 96 孔培养板置于二氧化碳培养箱中共计培养 3~5 天(根据实验目的决定总培养时间)。每隔 24 小时选取 3 个复孔进行如下操作。
3. 每孔加入 20 μ l MTT 溶液,混匀,在培养箱中继续孵育 4 小时。
4. 用注射器小心吸净孔内的液体(对悬浮细胞要求离心,离心后吸弃上清液),加入 150 μ l DMSO,轻轻振荡 3~5 分钟,使紫色结晶溶解。
5. 在酶联免疫检测仪上,选择 490nm 波长,测定各孔光吸收值(OD 值),记录结果。

【实验结果图】

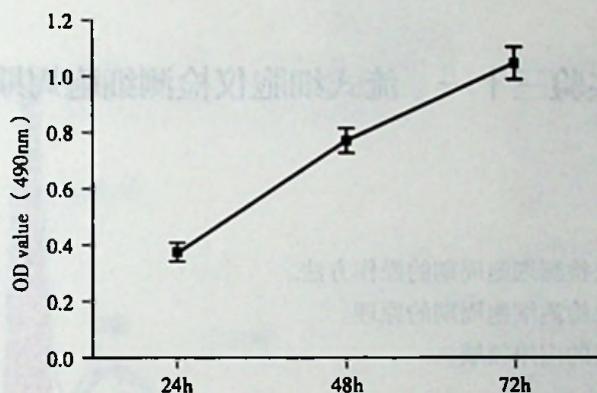


图 30-1 HeLa 细胞的生长曲线

【观察与记录】

1. 记录不同培养时间各孔的 OD 值,以空白对照孔的 OD 值进行调零,得出细胞在相应时间下的 OD 值。再以时间为横轴,以 OD 值为纵轴,绘制细胞生长曲线(图 30-1)。
2. 若使用抗肿瘤药物抑制细胞生长与增殖,则通过比较对照与实验组间的光吸收值,按下列公式计算细胞的存活率,进而推断抗肿瘤药物的作用强度。

$$\text{细胞存活率} = \text{实验组光吸收值} / \text{对照组光吸收值} \times 100\%$$

【注意事项】

1. 酶联免疫检测仪测试的 OD 值仅在适当的细胞浓度时才与细胞数目呈线性关系。因此,在实验时必须将细胞调整到适当的浓度。
2. 设置实验复孔可提高检测的准确性。
3. 设空白对照。在相同时间点,设置与实验孔平行但仅加培养基的空白对照孔,其它实验步

骤保持一致。比色时,以空白对照孔调零。

4. 血清会干扰 OD 值,因此在显色后尽可能用注射器将孔内残余培养基吸净。

【作业与思考题】

1. 绘制 HeLa 细胞的生长曲线。
2. MTT 分析的结果代表的含义是什么?
3. 细胞增殖能力与细胞活性一样吗? 如果不同,请说明二者的区别。

【试剂配制】

MTT 的配制 称取 250mg MTT 溶于 50ml PBS 中(可在电磁搅拌机上搅拌 30 分钟),用 $0.22\mu\text{m}$ 的微孔滤器除菌,分装,避光保存。

(赵凌宇)

实验三十一 流式细胞仪检测细胞周期

【实验目的】

1. 掌握流式细胞仪检测细胞周期的操作方法。
2. 熟悉流式细胞仪检测细胞周期的原理。
3. 了解流式细胞仪的应用领域。

【实验原理】

流式细胞仪(flow cytometer, FCM)又称荧光激活细胞分类仪(fluorescence activated cell sorter, FACS),由光学系统、电子控制系统以及计算机分析系统三个部分组成。其工作原理是荧光素标记的细胞或生物微粒从 $50\sim 100\mu\text{m}$ 的喷嘴中逐个高速喷出,由激光光源激发荧光,通过荧光检测器和前向散射检测器分为荧光和散射光,经计算机分析和处理获得的信息参数。可用于细胞计数、不同细胞类型的计数和分选、细胞周期测定、细胞凋亡的检测等,已在细胞生物学、免疫学、肿瘤生物学、病理学以及临床诊断中得到了广泛应用。

流式细胞仪检测细胞周期的原理是根据细胞在不同的细胞周期时相中 DNA 含量存在的差异,应用 DNA 荧光染料染色,检测细胞内 DNA 荧光强度变化,可判断细胞所处的细胞周期,目前常用碘化丙啶(PI)作为染料。PI 为核酸嵌入型染料,可以插入双股螺旋多聚核苷酸结构中,导致 DNA 和 RNA 着色,因此做细胞周期检测时,要加入 RNA 酶以消化 RNA。

【实验用品】

实验对象:人宫颈癌 HeLa 细胞。

实验试剂: RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清)、PBS、70% 乙醇、PI 染液。

实验器材: 流式细胞仪、离心机、水浴锅、培养瓶、吸管、离心管、6 孔培养板、微量移液器、枪头。

【操作步骤】

1. 依据不同的实验目的, 在培养结束时消化、收集细胞, 用 PBS 制备成单细胞悬液。
2. 1000g 离心 8 分钟, 吸弃上清液, 缓慢加入预冷的 70% 乙醇重悬及固定细胞, 防止细胞成团, 冰上固定过夜。
3. 1000g 离心 8 分钟, 吸弃上清液, 吸净乙醇, 用预冷的 PBS 离心 2 次, 吸弃上清液。
4. 滴加 100 μ l PI 染液处理细胞, 4 $^{\circ}$ C 避光染色 20 分钟, 用预冷的 PBS 离心洗涤 2 次。
5. 在流式细胞仪 488nm 激发波长下测定荧光。

【实验结果图】

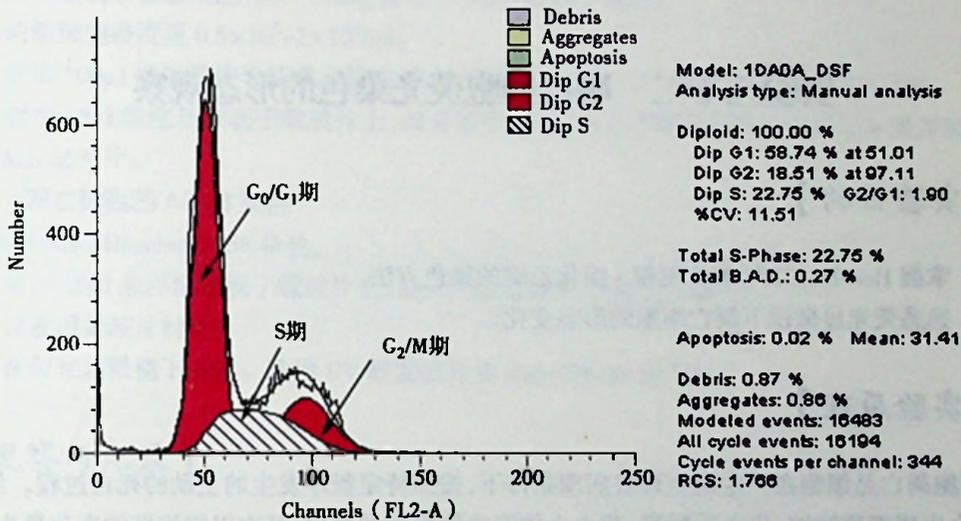


图 31-1 流式细胞仪检测细胞周期

【观察与记录】

细胞周期分布特点分析: 纵坐标为计数到的有效细胞数, 横坐标为 DNA 含量, G_0/G_1 、S、 G_2/M 期在图中由箭头所示(图 31-1)。 G_0/G_1 期细胞通常具有二倍体细胞的 DNA 含量(2N), G_2/M 期细胞具有四倍体细胞的 DNA 含量(4N), S 期细胞的 DNA 含量介于 2N 和 4N 之间。PI 与 DNA 结合后的荧光强度直接反映了细胞内 DNA 含量。因此, 通过流式细胞仪可将细胞周期各时相区分为 G_0/G_1 期, S 期和 G_2/M 期, 同时可获得各时相细胞的百分率(图 31-1)。

【注意事项】

1. PI 为致癌物质, 避免用手直接接触。

2. 检测的细胞数目应该达到 2×10^4 , 细胞数目过少影响实验结果的准确性。
3. 样品制备时, 离心次数不宜过多, 防止细胞丢失。

【作业与思考题】

1. 统计分析细胞周期不同时相的细胞分布比例, 绘制分布图。
2. 若向细胞中加入一定浓度的抗肿瘤药物诱导细胞凋亡, 细胞周期分布可能发生怎样的变化?

【试剂配制】

PI 染液 称取 0.2mg PI 和 2mg 不含 DNA 酶的 RNA 酶 A, 溶于 10ml 含 0.1% Triton X-100 的 PBS 中, 4℃ 避光可保存 2 周。

(赵凌宇)

实验三十二 凋亡细胞荧光染色的形态观察

【实验目的】

1. 掌握 Hoechst33258 和吖啶橙 - 溴化乙锭的染色方法。
2. 熟悉荧光显微镜下凋亡细胞的形态变化。

【实验原理】

细胞凋亡是细胞在一定的生理或病理条件下, 按照特定程序发生的主动的死亡过程。细胞凋亡时, 会出现细胞皱缩、染色质凝聚、凋亡小体形成等形态学变化, 其中以细胞核的变化最为显著。凋亡细胞核染色质的 DNA 会出现缺口甚至断裂, 致使染色质凝聚、边缘化甚至出现 DNA 碎片。利用与 DNA 结合的荧光染料染色后, 在荧光显微镜下可观察到上述变化。

荧光染料 Hoechst33258 能够穿过完整的细胞膜(活细胞或固定细胞), 与 DNA 在 AT 序列富集区域的小沟处结合, 在荧光显微镜紫外线激发时, Hoechst-DNA 发出亮蓝色荧光。

吖啶橙(acridine orange, AO)可透过完整的细胞膜(活细胞和死细胞)并与细胞内 DNA 和 RNA 的碱基和磷酸基团结合, 但其与 DNA 和 RNA 结合量存在差异: 与高度聚合的 DNA 结合量少, 发黄绿色或绿色荧光; 与低聚合度 RNA 结合量多, 发红色荧光。溴化乙锭(ethidium bromide, EB)仅能透过失去完整性的细胞膜(死细胞), 可嵌入 DNA 双链碱基对之间形成复合物, 在紫外线激发下发橘红色或红色荧光。

【实验用品】

实验对象: 人宫颈癌 HeLa 细胞。

实验试剂:凋亡诱导剂(根据情况自定)、0.02% EDTA、PBS、蒸馏水、4%多聚甲醛、1mg/ml Hoechst33258 染液、AO-EB 染液。

实验器材:倒置相差显微镜、荧光显微镜、超净工作台、二氧化碳培养箱、离心机、细胞计数板、微量移液器、枪头、离心管(1.5ml、10ml)、吸管、载玻片、盖玻片、吸水纸。

【操作步骤】

(一) 凋亡细胞的 Hoechst33258 染色

1. 向对数生长期的 HeLa 细胞加入药物,诱导凋亡(在超净台进行)。
2. 收集细胞 先用滴管轻轻吹打,收集已脱落的细胞至离心管。加入适量(3~4ml)0.02% EDTA 消化未脱壁细胞并收集至上述离心管。1000g 离心 5 分钟,吸弃上清液(悬浮细胞直接收集)。
3. 加入 PBS(37℃)漂洗重悬细胞。
4. 滴加 4% 多聚甲醛(4℃)固定 5 分钟,500~1000g 离心 5 分钟,吸弃上清液。
5. 加入蒸馏水重悬细胞,500~1000g 离心 5 分钟,吸弃上清液。
6. 调整细胞密度至 $0.5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6/\text{ml}$ 。
7. 吸取 100 μl 细胞悬液于新离心管中,加入 1 μl Hoechst33258 染液,避光染色 10 分钟。
8. 吸取 10 μl 细胞悬液滴于载玻片上,加盖玻片,于荧光显微镜下观察。选用 UV 激发滤片和 400~500nm 滤光片。

(二) 凋亡细胞的 AO-EB 染色

1~6 步骤同 Hoechst33258 染色。

7. 吸取 25 μl 悬浮细胞滴于载玻片上,加入 1 μl AO-EB 染液,轻微混合。
8. 直接用盖玻片封片。
9. 在荧光显微镜下观察。选用 UV 激发滤片和 400~500nm 滤光片。

【观察与记录】

1. Hoechst33258 染色

- (1) 正常细胞的细胞核呈均一蓝色。
- (2) 凋亡细胞的核染色质凝聚且边缘化,并可呈现 DNA 荧光碎片。

2. AO-EB 染色

- (1) 正常细胞的细胞核呈较均匀绿色荧光。
- (2) 凋亡早期细胞的胞质浓缩,核 DNA 浓缩致密,核中有鲜绿色的斑点,低倍镜下呈荧光亢进的圆珠状小体,高倍镜下可见不规则的块状荧光。
- (3) 晚期凋亡细胞的细胞膜通透性增加,EB 透过膜性结构(细胞膜和核膜),细胞质减少呈红色,核为浓染的红色碎片(核碎裂)或凋亡小体。
- (4) 细胞坏死时,细胞膜的完整性已被破坏,细胞体积明显增大,呈不均匀的橙红色荧光。

【注意事项】

1. Hoechst33258 染液应 4℃ 避光保存。与 Hoechst33258 相似的染料还有 Hoechst33342 和

DAPI,观察条件和结果判读与 Hoechst33258 相同。

2. 由于荧光染料可以染活细胞或固定过的细胞,在实验中可以根据实验条件,选择合适的方法。在本实验中,选用了先固定、后染色的方法进行观察。对于正培养的细胞,可以直接染色进行观察(即不进行固定)。

3. EB 为强诱变剂,有中度毒性。提示学生操作时应戴手套。EB 污染物及废弃液应单独存放。

4. 上述两种染色法尽管可以用来进行凋亡比例的计算,但主观性较强;若进行定量分析,应尽量采用 Annexin V 流式细胞术进行分析。

【作业与思考题】

1. 绘制镜下凋亡细胞的形态。
2. 如何使用 AO-EB 鉴别活细胞、凋亡细胞和坏死细胞?

【试剂配制】

AO-EB 染液 称取 1mg AO、1mg EB 分别溶于 10ml PBS 中,避光保存,使用前等量混合。

(吕 品)

实验三十三 凋亡细胞的琼脂糖凝胶电泳 检测——DNA 梯状条带

【实验目的】

1. 熟悉琼脂糖凝胶电泳的过程及原理。
2. 熟悉凋亡细胞 DNA 经琼脂糖凝胶电泳后的带形。

【实验原理】

细胞凋亡时,细胞内限制性核酸内切酶被激活,将染色质 DNA 自核小体间降解,形成相差 180~200bp 的大小不等的寡核苷酸片段。提取凋亡细胞 DNA,经琼脂糖凝胶电泳分离,不同长度的 DNA 片段,再经 EB 染色,在 UV 灯下观察可见特征性的梯状条带(ladder)。

【实验用品】

实验对象:人宫颈癌 HeLa 细胞。

实验试剂:凋亡诱导剂(根据情况自定)、0.02% EDTA、PBS、DNA 消化缓冲液、裂解液、20mg/ml 蛋白酶 K、酚/三氯甲烷/异戊醇(25:24:1)、3mol/L 乙酸钠(pH5.2)、预冷无水乙醇、预冷 70% 乙醇、TE 缓冲液、TAE、琼脂糖、DNA marker、10mg/ml EB 荧光染料、6× 上样缓冲液。

实验器材:相差倒置显微镜、超净工作台、二氧化碳培养箱、低温高速离心机、普通离心机、恒温水浴箱、紫外分光光度计、离心管(1.5ml、15ml)、微量移液器(1000 μ l、100 μ l、20 μ l)、枪头、三角烧瓶、电泳仪、电泳槽、涡流振荡器、微波炉、紫外透射仪。

【操作步骤】

(一) 药物处理

1. 准备两瓶对数生长期的 HeLa 细胞,一瓶于二氧化碳培养箱中持续培养(为对照组),向另一瓶细胞中加入凋亡诱导剂(为实验组)。上述操作均在超净工作台中进行。

2. 将 5×10^6 个已诱导凋亡的细胞收集至离心管中,1000g 离心 5 分钟,吸弃上清液。加入 PBS 重悬细胞,悬浮细胞,1000g 离心 5 分钟,吸弃上清液。

(二) 细胞基因组 DNA 的提取

具体步骤参见实验十八。

(三) 琼脂糖凝胶电泳

具体步骤参见实验十八。

【观察与记录】

1. DNA 经在琼脂糖凝胶电泳后出现梯状条带(ladder),可以判定细胞或组织出现凋亡。梯状条带是细胞凋亡较晚期的事件,而且只有当凋亡细胞在总的细胞中达到一定的比率时才能出现。

2. 正常细胞,由于基因组完整,带型为在加样孔附近有一亮带。

3. 坏死细胞,由于 DNA 断裂是无规律性的,所形成的带型为弥漫片状图谱。

【注意事项】

1. 实验中所用到的苯酚、三氯甲烷等试剂均有致癌性,操作时应戴手套,穿白大衣在化学通风橱内操作,其废弃物应有专门的容器。

2. 注意标记区分对照组与实验组。

3. EB 为强诱变剂,提示学生操作时应戴手套。EB 污染物及废弃液应单独存放。

【试剂配制】

裂解液 NaCl(100mmol/L),Tris-HCl(10mmol/L),EDTA(25mmol/L,pH8.0),SDS(0.5% W/V)。

(吕品)

... 100% ... 100% ... 100% ...

【参考文献】

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...

【参考文献】

... DNA ...

【参考文献】

1. ...
2. ...
3. ...

【参考文献】

... NaCl ...

第二部分 习题集

第一章

绪论

一、名词解释

1. 细胞生物学 (cell biology)
2. 细胞学说 (cell theory)
3. 医学细胞生物学 (medical cell biology)
4. 蛋白质组 (proteome)
5. 表观遗传学 (epigenetics)
6. 组蛋白密码 (histone code)

二、单项选择题

1. 发现细胞的时间和科学家分别是
A. 1665, R. Hooke B. 1673, A. Van Leeuwenhoek C. 1831, R. Brown
D. 1855, R. Virchow E. 1864, H. Von Mohl
2. 生物体结构和功能的基本单位是
A. 细胞 B. 基因组 C. 蛋白质组
D. 染色体 E. 基因
3. 细胞生物学发展过程的实验细胞学阶段的主要标志是
A. 研制成功第一台光学显微镜
B. 观察到活体细胞
C. 利用各种实验手段研究细胞的生化代谢过程及生理功能
D. 研制成功第一台电子显微镜
E. 明确了遗传信息流向的“中心法则”
4. 发表了“中心法则”的是
A. F. Crick B. G. Gamow C. J. Watson
D. M. J. Schleiden E. T. Schwann
5. 细胞学说的建立发生于
A. 16世纪 B. 17世纪 C. 18世纪 D. 19世纪 E. 20世纪
6. 使细胞生物学研究深入到亚细胞水平的是
A. 光学显微镜技术 B. 电子显微镜技术 C. DNA重组技术
D. DNA序列分析技术 E. 体细胞克隆技术

7. 下列与细胞骨架网状结构的发现有关的技术是
- A. 光学显微镜 B. 原子力显微镜 C. 扫描隧道显微镜
D. 分子生物学技术 E. 超高压电子显微镜
8. 细胞生物学学科形成于
- A. 20世纪30年代 B. 20世纪40年代 C. 20世纪50年代
D. 20世纪60年代 E. 20世纪70年代
9. 下列不属于表观遗传学改变的是
- A. DNA甲基化 B. 基因点突变 C. 组蛋白乙酰化
D. 组蛋白磷酸化 E. 基因组印记
10. 下列不属于亚细胞水平的细胞结构是
- A. 线粒体 B. 内质网 C. 溶酶体
D. 高尔基复合体 E. 细胞
11. Feulgen染色技术用于显示细胞中的
- A. DNA B. RNA C. 蛋白质
D. 膜成分 E. 细胞骨架
12. 下列属于分子水平的研究成果是
- A. DNA双螺旋结构 B. 三联体密码
C. 蛋白运输的信号假说 D. 膜的液态镶嵌模型
E. 以上都是
13. 人类基因组计划启动和完成的时间分别是
- A. 1990,2005 B. 1990,2003 C. 1990,2000
D. 1993,2003 E. 1993,2005
14. Genomics指
- A. 基因组 B. 遗传学 C. 基因组学
D. 蛋白质组学 E. 表观遗传学
15. 细胞发现距今的时间是
- A. 100年 B. 200年 C. 300年 D. 400年 E. 500年
16. 研制出第一台电子显微镜的是
- A. E. Ruska B. G. Binning C. H. Rohrer D. H. Janssen E. Z. Janssen
17. 有丝分裂发现于
- A. 16世纪 B. 17世纪 C. 18世纪 D. 19世纪 E. 20世纪
18. 与细胞分化相关的研究成果是
- A. 克隆羊多莉 B. “端粒钟”学说
C. 程序性细胞死亡基因 D. 免疫球蛋白基因重排机制
E. 遗传信息传递中心法则
19. 细胞被看作是由细胞膜包围的一大团原生质,来自于
- A. 细胞学说 B. 原生质理论 C. 细胞生物学
D. 基因学说 E. 中心法则
20. 1910年,T. Morgan建立了
- A. 细胞学说 B. 染色体遗传理论 C. 细胞生物学

D. 基因学说

E. 原生质理论

三、多项选择题

1. 提出细胞学说的科学家是

A. M. J. Schleiden

B. T. Schwann

C. R. Hooke

D. F. Crick

E. J. Watson

2. 19 世纪自然科学的三大发现是

A. 细胞学说

B. 能量转换定律

C. 达尔文进化论

D. 爱因斯坦相对论

E. 孟德尔遗传定律

3. 关于细胞学的经典时期的正确叙述是

A. 发生于 19 世纪中叶到 20 世纪初期

B. 提出并建立了原生质理论

C. 主要研究内容是利用固定和染色技术在光镜下观察细胞

D. 与其他学科相互渗透而发展了多个分支学科

E. 提出遗传的染色体学说

4. 电子显微镜的应用使下列细胞器的微细结构得以发现或明确的是

A. 内质网

B. 溶酶体

C. 高尔基复合体

D. 核糖体

E. 线粒体

5. 提出 DNA 双螺旋的是

A. F. Crick

B. G. Gamow

C. J. Watson

D. M. J. Schleiden

E. T. Schwann

6. 20 世纪 70~80 年代, 细胞生物学在分子水平的重要研究成果有

A. 提出生物膜的液态镶嵌模型

B. 提出遗传信息传递的“中心法则”

C. 提出内质网膜上蛋白质合成的信号肽假说

D. 发现真核细胞基因中的内含子

E. 发现 MPF 细胞周期相关因子

7. 可用于机体水平的细胞结构与功能研究的模型动物是

A. 果蝇

B. 线虫

C. 爪蟾

D. 斑马鱼

E. 小鼠

8. 细胞生物学的主要研究领域有

A. 细胞结构与功能的信号基础

B. 蛋白质的分选与运输

C. 细胞分化与干细胞特性

D. 细胞衰老与细胞死亡

E. 细胞与组织工程

9. 实验细胞学阶段, 主要提出了

A. 原生质理论

B. 染色体遗传理论

C. 基因学说

D. 细胞学说

E. 中心法则

10. 组蛋白密码是指组蛋白的

A. 乙酰化

B. 甲基化

C. 磷酸化

D. 糖基化

E. 泛素化

参考答案

一、名词解释

1. 细胞生物学 (cell biology): 以细胞为研究对象, 从显微、亚显微和分子水平对细胞的结构、生命活动规律及细胞间的相互关系开展研究的学科。
2. 细胞学说 (cell theory): 细胞学说由 Schleiden 和 Schwann 在总结自己和前人工作的基础上提出, 其主要内容是一切生物, 从单细胞生物到高等动物和植物均由细胞组成, 细胞是生物形态结构和功能活动的基本单位。
3. 医学细胞生物学 (medical cell biology): 医学细胞生物学以揭示人体各种细胞在生理和病理过程中的生命活动规律为目的, 期望能对人体各种疾病的发病机制予以深入阐明, 为疾病的诊断、治疗和预防提供理论依据和策略。
4. 蛋白质组 (proteome): 指由一个细胞, 一个组织或生物的基因组所表达的全部蛋白质。
5. 表观遗传学 (epigenetics): 是研究没有 DNA 序列变化并且可以遗传的基因功能变化的学科, 包括 DNA 甲基化、基因组印记以及表观基因组学等。
6. 组蛋白密码 (histone code): 指组蛋白的乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、糖基化和羧基化等影响转录因子与 DNA 结合的动态转录调控。

二、单项选择题

1. A 2. A 3. C 4. A 5. D 6. B 7. E 8. D 9. B 10. E
11. A 12. E 13. B 14. C 15. C 16. A 17. D 18. A 19. B 20. D

三、多项选择题

1. AB 2. ABC 3. ABC 4. ABCDE 5. AC
6. ACDE 7. ABCDE 8. ABCDE 9. BC 10. ABCDE

(方 瑾)

第二章

细胞的概念与分子基础

一、名词解释

1. 原核细胞 (prokaryotic cell)
2. 真核细胞 (eukaryotic cell)
3. 质粒 (plasmid)
4. 有机小分子 (organic molecules)
5. 生物大分子 (biological macromolecule)
6. DNA 半保留复制 (semiconservative replication)
7. 转录 (transcription)
8. 小核 RNA (small nuclear RNA, snRNA)
9. 微小 RNA (microRNA, miRNA)
10. 核酶 (ribozyme)

二、单项选择题

1. 人体生命活动的基本结构单位和功能单位是
A. 细胞膜 B. 细胞核 C. 核糖体 D. 细胞 E. 细胞器
2. 由非细胞原始生命演化为细胞生物的转变中,首先出现的是
A. 细胞器 B. 细胞膜 C. 细胞核 D. 核仁 E. 内质网
3. 目前发现的最小细胞是
A. 杆菌 B. 球菌 C. 支原体 D. 衣原体 E. 立克次体
4. 关于原核细胞遗传物质的存在方式,正确的叙述是
A. DNA 与组蛋白结合在一起 B. DNA 与 RNA、组蛋白结合在一起
C. DNA 是一条裸露的环形 DNA D. DNA 以线性结构形式存在
E. 由多条裸露的 DNA 组成
5. 区别原核细胞与真核细胞的主要标志是
A. 细胞膜 B. 细胞核 C. 基因组 D. 细胞壁 E. 细胞器
6. 原核细胞与真核细胞都有的细胞器是
A. 细胞骨架 B. 线粒体 C. 高尔基复合体
D. 核糖体 E. 中心体
7. 下列不属于原核细胞的是
A. 肺炎杆球菌 B. 大肠杆菌 C. 真菌
D. 蓝藻 E. 支原体
8. 使得真核细胞能在氧气充足的地球上生存下来的细胞器是

- A. 蛋白质 B. 酶 C. 核酸 D. 氨基酸 E. 多糖
22. 维持核酸的多核苷酸链的主要化学键是
A. 酯键 B. 肽键 C. 磷酸二酯键
D. 离子键 E. 氢键
23. 蛋白质的一级结构是指
A. α 螺旋和 β 折叠 B. 亚基
C. 多肽链的螺旋和折叠 D. 多条独立结构的肽链
E. 多肽链中氨基酸的种类和排列顺序
24. 关于真核细胞, 下列说法错误的是
A. 由多条 DNA 分子与组蛋白构成染色质
B. 基因表达的转录和翻译过程同时进行
C. 有完整的细胞核结构
D. 体积较大, 直径 10~100 μm
E. 膜性细胞器发达
25. DNA 双链中, 连接两条多核苷酸链的化学键是
A. 氢键 B. 糖苷键 C. 磷酸酯键
D. 3', 5'-磷酸二酯键 E. 离子键
26. 关于蛋白质的空间结构, 下列叙述错误的是
A. 蛋白质的空间结构可分为二级、三级和四级结构
B. 蛋白质的空间结构又称为构象
C. 所有蛋白质都有四级结构
D. 蛋白质的空间结构由多种化学键维持
E. 蛋白质的空间结构由一级结构决定
27. 真核细胞中的 RNA 分布情况是
A. 只在细胞质中 B. 主要在细胞质中, 细胞核中也有
C. 主要在细胞核中, 也在细胞质中 D. 主要在细胞膜上
E. 只在细胞核中
28. 有关核酶的说法, 正确的是
A. 是由 RNA 和蛋白质构成的 B. 是 RNA 分子, 但具有酶的催化功能
C. 是细胞核内的酶 D. 是由 DNA 和蛋白质构成的
E. 是专门水解核酸的酶
29. 构成蛋白质分子和酶分子的基本单位是
A. 氨基酸 B. 磷酸 C. 核苷酸 D. 乳酸 E. 脂肪酸
30. DNA 合成中, 多核苷酸链的延伸方向是
A. 5' \rightarrow 3' B. 3' \rightarrow 5'
C. 无一定方向 D. 主要是 3' \rightarrow 5', 部分是 5' \rightarrow 3'
E. 主要是 5' \rightarrow 3', 部分是 3' \rightarrow 5'
31. 多肽链形成的方式是
A. 氨基酸分子与侧链基团之间的离子键 B. 侧链基团与侧链基团之间的疏水键
C. 氨基与氨基之间的连接 D. 氨基与羧基之间脱水缩合

- E. 羧基与羧基之间的脱水缩合
32. 由含氮碱基、戊糖、磷酸 3 种分子构成的小分子化合物称为
A. 脂肪酸 B. 核苷酸 C. 葡萄糖 D. 核酸 E. 氨基酸
33. 有关真核生物 mRNA 的描述,正确的是
A. 在 5' 端存在一个 7- 甲基腺嘌呤的帽子结构
B. 在 3' 端的 polyA 尾是从 DNA 上转录下来的
C. 5' 端帽子结构下游紧接着的是起始密码 AUG
D. 在细胞核内转录的初级转录物称为 hnRNA
E. 3' 端 polyA 尾紧接在终止密码的下游
34. β 折叠属于蛋白质分子的
A. 一级结构 B. 二级结构 C. 三级结构
D. 亚基 E. 四级结构
35. 关于 DNA 双螺旋模型的正确叙述是
A. 双股链反向平行 B. 两条链碱基对之间以共价键相连
C. 是 DNA 的三级结构 D. 碱基对平面与螺旋轴平行
E. 两条链碱基键配对是 A 与 G、T 与 C
36. 关于酶的叙述,下列错误的是
A. 具有高度专一性 B. 具有高度稳定性 C. 具有高度催化效能
D. 是具有催化功能的蛋白质 E. 高温变性
37. 核酸分子的基本结构单位是
A. 碱基 B. 戊糖 C. 磷酸 D. 核苷酸 E. 氨基酸
38. DNA 双链中一条链上的碱基顺序是 5' ACTCGT3', 另一条链上的碱基顺序是
A. 3' TGAGCA5' B. 5' TGAGCA3' C. 3' ACTCGT5'
D. 5' ACTCGT3' E. 5' TGCTCA3'
39. 下列属于细胞内微量元素的是
A. C B. P C. Fe D. N E. Zn
40. 糖蛋白是指
A. 参与糖分解代谢过程的酶
B. 参与糖苷键形成的酶
C. 参与蛋白质糖基化的蛋白质
D. 具有(N-连接或O-连接)寡糖侧链的糖基化的蛋白质
E. 催化蛋白质糖基化的酶

三、多项选择题

1. 作为生命的基本结构单位和功能单位的细胞,具有的共有结构是
A. DNA B. 细胞膜 C. RNA D. 核糖体 E. 内膜系统
2. 原核细胞具有的结构是
A. 质粒 B. 线粒体 C. 核糖体
D. 高尔基复合体 E. 溶酶体
3. 维持蛋白质或酶分子三级结构的化学键有
A. 酯键 B. 肽键 C. 疏水键 D. 氢键 E. 离子键

4. DNA 是细胞内重要的生物分子,是因为 DNA
- A. 能够转录 B. 能够翻译 C. 能够自我复制
D. 是构成细胞膜的结构成分 E. 可作为催化生化反应的酶
5. 下列结构属于膜性细胞器的是
- A. 核糖体 B. 线粒体 C. 染色体
D. 细胞骨架 E. 内质网
6. tRNA 分子二级结构呈三叶草状,包括的部分有
- A. 氨基酸臂 B. 反密码环 C. 额外环
D. T ψ C 环 E. 二氢尿嘧啶
7. 下列细胞是真核细胞的有
- A. 巨噬细胞 B. 红细胞 C. 支原体
D. 肺炎双球菌 E. 浆细胞
8. 原核细胞与真核细胞都有的细胞结构是
- A. 核糖体 B. 中心体 C. 高尔基复合体
D. 细胞骨架 E. 细胞膜
9. 下列细胞结构属于非膜性结构的是
- A. 中心体 B. 微体 C. 染色体
D. 核仁 E. 细胞骨架
10. 蛋白质分子在细胞中的主要功能是
- A. 结构成分 B. 收缩运动 C. 代谢调节
D. 催化作用 E. 物质运输

参考答案

一、名词解释

1. 原核细胞 (prokaryotic cell): 细胞体积较小、结构简单,细胞质中无膜性细胞器,只在拟核区域含有一条不与蛋白结合的 DNA 链。常见的原核细胞有支原体、细菌、放线菌和蓝绿藻(蓝细菌)等。

2. 真核细胞 (eukaryotic cell): 由原核细胞产生,进化程度较高、结构复杂的细胞。其基本特征是具有由核膜包绕的细胞核和由膜包裹的多种细胞器。

3. 质粒 (plasmid): 在细菌的细胞质内含有的基因组 DNA 以外的遗传性 DNA 片段,常为能够自我复制的小环状 DNA 片段。

4. 有机小分子 (organic molecules): 分子量在 100~1000 范围内的碳化合物,分子中的碳原子可达 30 个左右。细胞中含有 4 种主要的有机小分子:单糖、脂肪酸、氨基酸和核苷酸。

5. 生物大分子 (biological macromolecule): 细胞中由有机小分子构成的分子量从 10 000 到 1 000 000 的分子,其分子结构复杂,功能多样。细胞内主要的大分子有核酸、蛋白质、多糖和脂肪。

6. DNA 半保留复制 (semiconservative replication): DNA 复制中,新形成的双链 DNA 分子在核苷酸或碱基序列上与充当模板的亲代 DNA 分子完全相同,由于每条亲代 DNA 单链成为子代 DNA 双链中的一条链,故称为 DNA 半保留复制。

7. 转录 (transcription): 以 DNA 为模板合成 RNA 的过程称为转录。

8. 小核 RNA (small nuclear RNA, snRNA): 在真核细胞的细胞核中存在一类独特的 RNA,分子

相对较小,约含 70~300 个核苷酸,参与基因转录产物的加工过程。

9. 微小 RNA (microRNA, miRNA): 普遍存在的,具有高度的保守性的一类长约 21~25nt 的非编码 RNA,其前体含有 70~90 个核苷酸,具有发夹结构。miRNA 通过与靶基因 mRNA 3' 端 UTR 互补结合,抑制靶基因的蛋白质合成或促使靶基因的 mRNA 降解,从而参与基因表达调控。

10. 核酶(ribozyme):是具有酶活性的 RNA 分子,其底物是 RNA 分子,核酶通过与序列特异性的靶 RNA 分子配对而发挥作用。

二、单项选择题

1. D 2. B 3. C 4. C 5. B 6. D 7. C 8. B 9. C 10. A
 11. B 12. B 13. C 14. C 15. D 16. D 17. E 18. C 19. D 20. D
 21. D 22. C 23. E 24. B 25. A 26. C 27. B 28. B 29. A 30. A
 31. D 32. B 33. D 34. B 35. A 36. B 37. D 38. A 39. E 40. D

三、多项选择题

1. ABCD 2. AC 3. CDE 4. AC 5. BE
 6. ABCDE 7. ABE 8. AE 9. ACDE 10. ABCDE

(田 强)

第三章

细胞生物学的研究方法

一、名词解释

1. 分辨率(resolution)
2. 细胞培养(cell culture)
3. 原代培养(primary culture)
4. 传代培养(secondary culture)
5. 细胞系(cell line)
6. 等电聚焦电泳(isoelectric focusing)
7. cDNA 克隆(cDNA cloning)
8. 非细胞体系(cell free system)
9. 蛋白质组学(proteomics)
10. 核酸原位杂交技术(*in situ* hybridization, ISH)
11. 放射性自显影技术(autoradiography)
12. 显微结构(microscopic structure)
13. 超微结构(ultramicroscopic structure)
14. 单细胞测序技术(single cell sequencing)
15. 转基因小鼠(transgenic mouse)

二、单项选择题

1. 离心法是分离细胞器及细胞组分的重要手段,下面描述错误的是
A. 差速离心法只能将大小显著不同的成分分开
B. 平衡沉降法分离取决于细胞成分的大小和形状
C. 利用免疫磁珠,无需高速离心,即可将膜性细胞器分离出来
D. 速度沉降可以使 tRNA 与其他成分分开
E. 超速离心法可以根据生物大分子的沉降系数较精确的测定其分子量
2. 检测特异 DNA 分子的方法是
A. 噬菌体展示
B. ISH
C. Western blot
D. Southern blot
E. ChIP
3. 苏丹染料可以显示的细胞中成分是
A. 蛋白质
B. DNA
C. RNA
D. 糖
E. 脂肪
4. 扫描隧道显微镜的侧分辨率约为
A. 2 μm
B. 0.2 μm
C. 0.2nm
D. 2nm
E. 2 \AA
5. 目前广泛应用的高效基因敲除技术是

- A. cDNA 克隆
B. RNAi
C. CRISPR/Cas9
D. ChIP
E. 转基因
6. 可得到完整的细胞三维结构图像的显微镜是
A. 透射电子显微镜
B. 荧光显微镜
C. 暗视野显微镜
D. 相差显微镜
E. 共聚焦激光扫描显微镜
7. 关于免疫沉淀技术的错误描述是
A. 用耦联在磁珠上的目的蛋白抗体将目的蛋白及其相互作用的蛋白沉淀出来
B. 可通过 SDS-PAGE 或生物质谱对沉淀出来的蛋白进行鉴定
C. 属于体内实验方法,能得到细胞内蛋白相互作用的动态结果
D. 细胞内本来没有相互作用的蛋白质在破碎细胞时可能发生凝聚,产生假阳性
E. 简便易行
8. 无需染色、标记,即可直接用于观察活细胞状态的显微镜是
A. 扫描电子显微镜
B. 透射电子显微镜
C. 普通光学显微镜
D. 倒置相差显微镜
E. 荧光显微镜
9. 关于 RNAi 的基本原理,错误的描述是
A. Dicer 酶将外源性双链 RNA 切割成短 siRNA
B. siRNA 参与形成 RNA 诱导沉默复合物
C. 每个 RISC 都包含一个 siRNA 和一个 Dicer
D. 激活 RISC 需要依赖 ATP 将小分子 RNA 解双链
E. 激活的 RISC 通过碱基配对定位到同源 mRNA 转录本上
10. 制作透射电子显微镜超薄切片时,下列不必要的是
A. 固定
B. 包埋
C. 切片
D. 金属投影
E. 染色
11. 能够在溶液中对生物大分子进行高分辨率结构测定的技术是
A. X 射线晶体衍射技术
B. 核磁共振技术
C. 扫描电子显微镜
D. 冷冻电镜
E. 共聚焦激光扫描显微镜
12. 透射电子显微镜借助一定的技术手段可获取细胞亚显微结构的三维图像,下面手段不可行的是
A. 金属投影
B. 金属复型
C. 金属染色
D. 冰冻断裂
E. 冰冻蚀刻技术
13. 与化学合成的 siRNA 相比,利用慢病毒构建的短发卡 shRNA 载体所具有的显著优势是
A. 更特异地阻断体内特定基因表达
B. 效率更高
C. 可以整合到受感染细胞的基因组,进行长时间的稳定表达
D. 操作更简便
E. 有正反义互补的短干扰 RNA 序列
14. 关于冷冻电子显微镜技术的错误描述是
A. 对溶液中生物分子进行高分辨率结构测定
B. 需要比较大量的样品
C. 结构解析主要是指单颗粒三维重构技术

- D. 不需要样品结晶
E. 快速冷冻可以使蛋白质保持其天然结构状态
15. 能够从组织切片中精确分离单一细胞的方法是
A. 免疫磁珠法
B. 荧光激活细胞分选仪
C. Percoll 精细密度梯度离心
D. 细胞克隆
E. 激光捕获显微切割技术
16. 有关原子力显微镜的错误描述是
A. 在扫描隧道显微镜基础之上发展起来的
B. 不需要所检测的样品具有导电性
C. 可对单个分子进行操控
D. 分辨率比扫描隧道显微镜高
E. 显示样品表面微细结构的三维特征
17. 用物理的方法裂解细胞产生的微粒体,主要来自的细胞器是
A. 过氧化物酶体
B. 高尔基复合体
C. 线粒体
D. 溶酶体
E. 内质网
18. 一般情况下,细胞裂解液中不能含有的成分是
A. 渗透压维持剂
B. 蛋白酶
C. 阴离子去垢剂 SDS
D. 非离子型去垢剂 Triton X-100
E. 两性离子型去垢剂 CHAPS
19. 生物医学研究中,最常用于个体水平基因操作特别是基因敲除的模式动物是
A. 小鼠
B. 果蝇
C. 秀丽隐杆线虫
D. 斑马鱼
E. 爪蟾
20. 操作简单、特异性强,能够在多细胞悬液中分离特定细胞的方法是
A. 免疫磁珠法
B. 荧光激活细胞分选仪
C. Percoll 精细密度梯度离心
D. 利用细胞贴壁生长和悬浮生长的特性进行细胞培养
E. 激光捕获显微切割技术
21. 细胞培养时所用的培养基中不包含
A. 血清
B. 氨基酸
C. 二氧化碳
D. 维生素
E. 微量元素
22. 考察细胞侵袭和转移能力变化的方法是
A. 嵌套小室(transwell 法)
B. 软琼脂集落形成实验
C. 细胞生长曲线绘制
D. 流式细胞仪的 DNA 倍体分析
E. 细胞活力检测(MTT 法)
23. 常用于细胞 DNA 和 RNA 抽提的试剂是
A. 渗透压维持剂
B. 蛋白酶抑制剂
C. 异硫氰酸胍
D. 阴离子去垢剂
E. 两性离子型去垢剂
24. 将细胞匀浆以 100 000g 超速离心,上清液部分含有
A. 线粒体
B. 溶酶体
C. 细胞核
D. RNA
E. 微粒体
25. 超分辨显微技术可使光学显微镜的分辨率达到
A. 2 μ m
B. 50nm
C. 0.2nm
D. 2nm
E. 2 \AA

26. 对体外非细胞体系进行蛋白翻译,不需要的成分或结构是
- A. 已知序列的 mRNA B. tRNA C. 核糖体
D. ATP E. RNA 聚合酶 II (Pol II)
27. 一般来说,分离纯化蛋白质最有效的方法是
- A. 亲和层析 B. 阴离子交换层析 C. 阳离子交换层析
D. 凝胶滤过层析 E. 疏水性层析
28. 能揭示蛋白质精确三维结构的方法是
- A. 扫描电子显微镜 B. 柱层析
C. X 射线晶体衍射技术 D. SDS-PAGE
E. 共聚焦激光扫描显微镜
29. 用凝胶滤过层析分离蛋白,最先流出的蛋白的分子量为
- A. 500kDa B. 200kDa C. 100kDa D. 50kDa E. 10kDa
30. 从细胞中分离染色质,抽提液中不能含有
- A. DNA 酶 B. RNA 酶 C. 异硫氰酸胍
D. 氯仿 E. 蛋白酶 K
31. 二硫苏糖醇(DTT)在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中的作用是
- A. 与蛋白质疏水区结合 B. 使蛋白质带负电荷
C. 使蛋白质中的二硫键断裂 D. 使蛋白质分子折叠
E. 控制凝胶孔的大小
32. 电子显微镜观察生物标本的分辨率约为
- A. 2 μ m B. 0.2 μ m C. 0.2nm D. 2nm E. 2 \AA
33. SDS 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中的作用是
- A. 与蛋白质亲水区结合 B. 控制凝胶孔的大小
C. 使蛋白质中的二硫键断裂 D. 使蛋白质分子折叠
E. 使蛋白质带负电荷
34. 高通量测序技术可与其他基因组水平研究技术相联合,但不包括
- A. Protein-seq B. RNA-seq C. ChIP-seq
D. CLIP-seq E. Methyl-seq
35. 关于核酸电泳的错误描述是
- A. 是核酸分离鉴定的主要方法
B. 样品不需事先处理就可直接进行电泳
C. 核酸在碱性条件下向阳极移动
D. 可直接判定核酸的纯度、完整性及片段大小
E. 琼脂糖凝胶电泳分辨率高于聚丙烯酰胺凝胶电泳
36. 下列关于生物芯片技术的错误叙述是
- A. 由生物学、微电子学、物理学和计算机科学等多学科交叉融合而成
B. 主要包括基因芯片和蛋白质芯片
C. 基因芯片中,荧光素直接标记待检测的 mRNA 分子
D. 可用于筛选候选基因
E. 可通过蛋白质-蛋白质间的相互作用对靶蛋白分子进行高通量检测

37. 关于免疫细胞化学技术,错误的描述是
- 利用抗原抗体特异性结合的原理来研究细胞中生物大分子的定位
 - 利用荧光染料标记的抗体可以对细胞中的特定分子进行定位
 - 将荧光物质或酶类直接标记一级抗体可以提高检测灵敏度
 - 利用胶体金标记抗体,可在电镜下观察特定分子的分布情况
 - 可对器官、组织、细胞中的生物分子进行定性、定位研究
38. Western blot 不可以用于检测蛋白质的
- 含量
 - 大小
 - 三维结构
 - 磷酸化
 - 泛素化
39. 放射性自显影技术是用放射性同位素标记生物样品中的大分子或其前体物质,下列属于强放射性同位素的是
- ^{131}I
 - ^{35}S
 - ^3H
 - ^{32}P
 - ^{14}C
40. 可用于观察细胞表面三维结构的显微镜是
- 扫描电子显微镜
 - 透射电子显微镜
 - 暗视野显微镜
 - 相差显微镜
 - 荧光显微镜
41. 关于绿色荧光蛋白(GFP)的错误描述是
- 是研究蛋白质亚细胞定位的报告分子
 - 是从水母中分离的一种构象很稳定的蛋白质
 - 在蓝色光源的激发下,可发射出绿色荧光
 - GFP 基因可以很容易地导入到多种类型的细胞中表达
 - 与目的基因融合后,所表达的融合蛋白的定位是由 GFP 决定的
42. 关于 Northern 印迹分析的错误描述是
- 可检测组织或细胞中特定的 mRNA
 - 可使用放射性物质标记的寡核苷酸为探针
 - 不能有效地检测小 miRNA 分子
 - 能够定量检测 mRNA 的变化
 - 能够提供基因不同转录本的转录长度信息
43. 双向电泳显现的未知差异蛋白质条带或点,常常需要进一步鉴定,最精确的判定方法是
- 免疫沉淀
 - 亲和层析
 - 质谱
 - 高压液相层析
 - Western blot
44. 研究蛋白质与核酸相互作用的技术是
- 酵母双杂交
 - 染色质免疫沉淀
 - 噬菌体展示
 - 基因芯片
 - 免疫沉淀
45. 使基因表达下调的常用技术是
- cDNA 克隆
 - RNAi
 - 同源重组
 - ChIP
 - 转基因
46. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质的依据是
- 疏水性
 - 分子量大小
 - 所带正电荷多少
 - 所带负电荷多少
 - 形状特点
47. 有关扫描电子显微镜的错误描述是

- A. 可以直接观察标本表面的三维形态
 B. 分辨率比透射电镜高
 C. 通过电子束照射在标本后产生的二次电子成像
 D. 样品需经固定、干燥并用重金属膜覆盖
 E. 多用于细胞整体的观察
48. 将蛋白质进行分级分离并最终进行纯化,常需要综合运用多种分离手段才能够完成,但不包括
- A. 盐析
 B. 有机溶剂沉淀
 C. 亲和层析
 D. 高压液相层析
 E. 双向电泳
49. 能够将特定基因插入到基因组的技术是
- A. cDNA 克隆
 B. RNAi
 C. 酵母双杂交
 D. ChIP
 E. CRISPR/Cas9
50. 最早制造出第一台显微镜并用它观察到细菌的科学家是
- A. L. Hoek
 B. R. Hooke
 C. M. J. Schleiden
 D. R. Virchow
 E. A. van Leeuwenhoek
51. 与普通 PCR 不同的是,荧光实时定量 PCR 在反应体系中需加入
- A. 模板 DNA
 B. 耐热的 DNA 聚合酶
 C. dNTP
 D. 荧光染料
 E. 引物
52. 关于超分辨显微技术的错误叙述是
- A. 利用 380~740nm 可见光
 B. 具有非接触、无损伤的特点
 C. 可观测细胞内部结构的特点
 D. 难以进行内部深层三维结构成像
 E. 可以观测活的组织或细胞
53. 以脂质体为载体,将外源性基因导入真核细胞的过程称
- A. 转化
 B. 转导
 C. 转染
 D. 感染
 E. 转位
54. 检测特异蛋白质分子的方法是
- A. PCR
 B. FISH
 C. Southern blot
 D. Northern blot
 E. Western blot
55. 关于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的错误描述是
- A. Cas 有核酸酶活性
 B. Cas 是 CRISPR 连接蛋白
 C. CRISPR 序列转录产生两个非编码 RNA 分子
 D. Cas 蛋白能够将异二聚体 RNA 剪切加工成为成熟 RNA 分子
 E. Cas 识别靶 DNA 位点的特异性完全由向导序列所决定
56. 细胞内离子有着重要的生理功能,其中能够起信号转导和促进膜融合作用的离子是
- A. 钠
 B. 钾
 C. 钙
 D. 铜
 E. 铁
57. 高压液相层析的反向层析柱常常被用来分离小分子蛋白,其进行分离原理是根据蛋白的
- A. 疏水性
 B. 分子量大小
 C. 所带正电荷多少
 D. 所带负电荷多少
 E. 形状特点
58. 可用于研究 DNA 与蛋白质相互作用,并能捕捉基因表达调控的瞬事件的方法是
- A. ChIP
 B. EMSA
 C. 酵母单杂交系统

D. CLIP E. 噬菌体展示

59. 单分子荧光成像是活细胞体系中单分子研究的核心技术,其在细胞生物学研究中的应用不包括

- A. 蛋白质结构的解析 B. 配体与受体的结合
C. 蛋白质的聚合和解聚 D. mRNA 的动力学行为
E. 病毒的示踪

60. 关于紫外交联免疫沉淀技术的错误叙述是

- A. 能检测整个细胞内与特定 RNA 结合蛋白结合的 RNA 分子
B. 分辨率可达单个碱基水平
C. 常与高通量测序技术联合应用
D. 254nm 紫外线照射交联对细胞没有损伤
E. 能够在全基因组水平揭示 RNA 与 RNA 结合蛋白相互作用

三、多项选择题

1. 从实体组织中分离活细胞的第一步是制备游离的细胞悬液,关于常用的酶解方法的正确描述是

- A. EDTA 和 EGTA 能够增加胰蛋白酶的活性
B. 胰蛋白酶、胶原酶消除细胞间的连接和细胞外基质
C. 分离体系所用的溶液必须是等渗的
D. 分离体系应保持低温,以降低细胞的代谢活动
E. 所用的试剂、器皿需要过滤除菌或高压灭菌

2. 关于染色质免疫沉淀技术的正确描述是

- A. 是一种体内研究 DNA 与蛋白质相互作用的方法
B. 仅限于低通量的研究
C. 能够捕捉到发生在染色质上的基因表达调控的瞬态事件
D. 分离得到的 DNA 可直接测序获得基因序列信息
E. 比电泳迁移率变动分析更能反映基因表达调控的真实情况

3. 关于核酸抽提的正确叙述是

- A. 异硫氰酸胍可使膜脂、蛋白变性
B. 氯仿可去除细胞内的脂类
C. 在纯化过程中加入对应的核酸酶可选择性地保留 DNA 或 RNA 分子
D. 通过离心沉淀的方式可获得保留在水相中的核酸分子
E. 蛋白酶 K 能使 DNA 酶和 RNA 酶失活,不能添加在抽提液中

4. 酶细胞化学反应的基本原理是将酶与其底物共同孵育,使产物与显色剂反应,生成物一般包括

- A. 荧光分子 B. 细胞色素 C. 有色沉淀
D. 高电子密度沉淀 E. 有色可溶性化合物

5. 单细胞测序技术取得突破的主要原因包括

- A. 全基因组及转录组扩增的效率大幅度提高
B. 高通量测序技术的使用
C. 高效微流体技术分离单细胞技术的应用

- D. 高精密的荧光活化细胞分选技术的应用
E. 激光显微切割技术的应用
6. 可用于活细胞内分子示踪的技术是
A. 离子探针技术
B. 绿色荧光蛋白示踪
C. 荧光共振能量转移
D. 单分子示踪
E. 印迹杂交
7. 基因芯片技术可应用于
A. 细胞的基因表达谱测定
B. 筛选与基因相互作用的蛋白质
C. 基因多态性分析
D. 基因突变分析
E. 筛选候选基因
8. 基因表达定量分析技术包括
A. 印迹杂交技术
B. 原位杂交技术
C. 嵌套小室(transwell法)
D. 荧光实时定量PCR技术
E. 基因克隆技术
9. 关于蛋白质组学的正确描述是
A. 是基因组学研究进入功能基因组时代的主要标志
B. 双向电泳和质谱技术是蛋白质组学研究的基本技术
C. 双向电泳能有效分离高分子量及微量蛋白
D. 质谱法能够实现高通量分析
E. 蛋白质的质谱测序通常借助串联质谱
10. 研究或利用蛋白质与蛋白质相互作用的技术包括
A. 酵母双杂交
B. 蛋白质芯片
C. 噬菌体展示
D. 紫外交联免疫沉淀技术
E. 免疫沉淀

参考答案

一、名词解释

1. 分辨率(resolution):指显微镜或人眼能够区分相近两点的最小距离。
2. 细胞培养(cell culture):指细胞在体外的培养技术,即无菌条件下,从机体中取出组织或细胞,模拟机体内正常生理状态下生存的基本条件,让它在培养器皿中继续生存、生长和繁殖的方法。
3. 原代培养(primary culture):直接从体内获取的组织或细胞进行首次培养。
4. 传代培养(secondary culture):当原代细胞经增殖达到一定密度后,将细胞分散,从一个培养器以一定比例移到另一个或几个容器中的扩大培养。
5. 细胞系(cell line):指可以无限繁殖、传代的肿瘤细胞或正常组织培养的细胞在某些条件处理后产生的“不死”的变异细胞。
6. 等电聚焦电泳(isoelectric focusing):是在丙烯酰胺凝胶两端形成电场,使含有不同等电点的两性电解质在电场当中形成pH梯度,样品中所有的蛋白质在电泳时都向自己的等电点处移动,最后聚集、静止于各自的等电点。
7. cDNA克隆(cDNA cloning):又称基因克隆,即将mRNA逆转录形成的cDNA或通过体外聚合酶链式反应得到的基因片段,插入到能进行自我复制的载体(通常是质粒),实现在受体细菌内大

量扩增的过程。

8. 非细胞体系 (cell free system): 用分级分离得到的具有生物学功能的细胞抽提物组成的活性反应体系。

9. 蛋白质组学 (proteomics): 以特定时空条件下某种细胞、组织或器官所含有的全部蛋白质的存在及其活动方式为研究对象的学科。

10. 核酸原位杂交技术 (*in situ* hybridization, ISH): 以短的单链 cDNA、RNA 片段或寡核苷酸为探针, 与经过固定并提高了通透性的细胞、组织切片或胚胎进行杂交, 以荧光分子或显色酶为报告基团, 显示特定 RNA (mRNA) 分子在组织或细胞内分布和含量的变化。

11. 放射性自显影技术 (autoradiography): 用放射性同位素标记生物样品中的大分子或其前体物质, 然后通过乳胶感光 (卤化银还原成为银原子), 显示出被标记物在组织和细胞内的位置、数量及其变化。

12. 显微结构 (microscopic structure): 光镜下所见的物体结构被称为显微结构。

13. 超微结构 (ultramicroscopic structure): 电子显微镜下观察到的细胞的结构被称为亚显微结构或超微结构。

14. 单细胞测序技术 (single cell sequencing): 是在单细胞水平对全基因组或转录组等进行扩增与测序的一项新技术。

15. 转基因小鼠 (transgenic mouse): 在小鼠中引入一个额外的基因或对基因进行改变, 来观察其效应, 进行这种基因操作的小鼠被称为转基因小鼠。

二、单项选择题

- | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. B | 2. D | 3. E | 4. C | 5. C | 6. E | 7. C | 8. D | 9. C | 10. D |
| 11. D | 12. C | 13. C | 14. B | 15. E | 16. D | 17. E | 18. B | 19. A | 20. A |
| 21. C | 22. A | 23. C | 24. D | 25. B | 26. E | 27. A | 28. C | 29. A | 30. A |
| 31. C | 32. D | 33. E | 34. A | 35. E | 36. C | 37. C | 38. C | 39. D | 40. A |
| 41. E | 42. C | 43. C | 44. B | 45. B | 46. B | 47. B | 48. E | 49. E | 50. E |
| 51. D | 52. D | 53. C | 54. E | 55. E | 56. C | 57. A | 58. A | 59. A | 60. D |

三、多项选择题

- | | | | | |
|---------|---------|---------|---------|----------|
| 1. BCDE | 2. ACDE | 3. ABCD | 4. ACDE | 5. ABCD |
| 6. ABCD | 7. ACDE | 8. ABD | 9. ABDE | 10. ABCE |

(黄东阳)

第四章

细胞膜与物质的穿膜运输

一、名词解释

1. 脂质体 (liposome)
2. 囊泡运输 (vesicular transport)
3. 流动镶嵌模型 (fluid mosaic model)
4. 脂筏 (lipid rafts)
5. 主动运输 (active transport)
6. 易化扩散 (facilitated diffusion)
7. 协同运输 (cotransport)
8. 受体介导的胞吞作用 (receptor-mediated endocytosis)
9. 简单扩散 (simple diffusion)
10. 被动运输 (passive transport)
11. 单位膜 (unit membrane)
12. 连续性分泌 (continuous secretion)
13. 受调分泌 (regulated secretion)

二、单项选择题

1. 生物膜的主要化学成分是
 - A. 蛋白质与核酸
 - B. 蛋白质与脂类
 - C. 蛋白质与糖类
 - D. 糖脂
 - E. 糖蛋白
2. 乙酰胆碱的出胞方式是
 - A. 受调分泌
 - B. 固有分泌
 - C. 被动运输
 - D. 易化扩散
 - E. 离子通道扩散
3. 蛋白聚糖的出胞方式是
 - A. 固有分泌
 - B. 受调分泌
 - C. 协同运输
 - D. 易化扩散
 - E. 离子通道扩散
4. 膜脂分子最主要的运动方式是
 - A. 侧向扩散
 - B. 翻转运动
 - C. 旋转运动
 - D. 弯曲运动
 - E. 伸缩振荡运动
5. 细胞吞噬过程中参与伪足形成与伸出的蛋白质主要是
 - A. 网格蛋白
 - B. 微管蛋白
 - C. 肌球蛋白
 - D. 中间纤维
 - E. 肌动蛋白
6. 胞吞过程中,提供牵动质膜内陷的包被蛋白是

- A. COPII 蛋白 B. 肌动蛋白 C. COPI 蛋白
D. 网格蛋白 E. 肌球蛋白
7. 在生理条件下,胆固醇对膜脂流动性的影响在于
A. 增加膜的流动性 B. 增加膜的稳定性 C. 增加膜的无序性
D. 增加膜的通透性 E. 增加膜的选择性
8. 葡萄糖穿红细胞膜的运输过程中载体蛋白发生
A. 在脂双层中来回移动 B. 可逆的构象改变 C. 形成通道
D. 在脂双层中翻转 E. 在脂双层中扩散
9. 不能自由扩散进出脂双层的物质是
A. 尿素 B. 乙醇 C. O₂ D. CO₂ E. Na⁺
10. 构成动物细胞细胞外被的是细胞膜表面的
A. 细胞壁 B. 糖蛋白 C. 离子
D. 糖蛋白与糖脂外伸的糖链 E. 水
11. 细胞膜的流动镶嵌模型认为
A. 两层蛋白质分子中间夹着一层类脂
B. 脂双分子层两侧附着蛋白质
C. 脂双分子层中间夹着一层蛋白质
D. 脂分子与蛋白质间隔排列
E. 脂双分子层镶嵌着蛋白质
12. 物质不需要膜蛋白帮助,不消耗能量,顺浓度梯度通过膜的自由扩散称为
A. 简单扩散 B. 易化扩散 C. 主动运输
D. 胞吞作用 E. 胞吐作用
13. 以简单扩散方式快速通过细胞膜的物质有
A. Na⁺ B. CO₂ C. 氨基酸
D. 葡萄糖 E. 甘油
14. 由载体蛋白参与而不消耗代谢能,顺浓度梯度进行的穿膜运输方式是
A. 简单扩散 B. 主动运输 C. 易化扩散
D. 胞吞作用 E. 胞吐作用
15. 易化扩散与主动运输的共同点是
A. 顺浓度梯度转运 B. 逆浓度梯度转运 C. 需要消耗能量
D. 不需要消耗能量 E. 需要有载体蛋白
16. 与生物膜流动性呈正相关的是
A. 鞘磷脂 B. 膜蛋白 C. 胆固醇
D. 卵磷脂 E. 糖蛋白
17. 膜功能的特异性主要取决于
A. 膜脂的种类 B. 膜脂的含量
C. 膜蛋白的种类和数量 D. 膜糖的种类
E. 膜糖的含量
18. 细胞中的膜糖分布于
A. 细胞核膜表面 B. 膜的非胞质面 C. 内质网表面

- D. 高尔基复合体表面 E. 线粒体表面
19. 电子显微镜下单位膜的结构是
- A. 二层深色带,中间夹一层浅色带 B. 一层深色带和一层浅色带
- C. 二层浅色带,中间夹一层深色带 D. 一层深色带
- E. 二层浅色带和二层深色带
20. 单位膜的总厚度约为
- A. 5nm B. 6nm C. 7.5nm D. 8nm E. 9nm
21. 载体蛋白顺浓度梯度转运 Na^+ 入胞的同时,将葡萄糖逆浓度梯度一起带入胞内,此种穿膜运输方式为
- A. 被动运输 B. 单运输 C. 同向协同运输
- D. 胞吞作用 E. 对向协同运输
22. 葡萄糖经载体蛋白的介导,进入大多数动物细胞内的方式是
- A. 简单扩散 B. 易化扩散 C. 离子泵
- D. 协同运输 E. 通道运输
23. 细胞膜中的脂锚定蛋白与膜脂类相结合的化学键是
- A. 氢键 B. 肽键 C. 共价键
- D. 疏水键 E. 磷酸二酯键
24. 细胞膜上的钠钾泵可间接驱动
- A. 简单扩散 B. 易化扩散 C. 胞吐作用
- D. 共运输 E. 胞吞作用
25. 低密度脂蛋白(LDL)进入细胞的方式是
- A. 协同运输 B. 易化扩散 C. 主动运输
- D. 吞噬作用 E. 受体介导的胞吞作用
26. 小肠和肾小管上皮细胞膜吸取葡萄糖的转运方式是
- A. 共运输 B. 对向运输 C. 被动运输
- D. 易化扩散 E. 简单扩散
27. 维持细胞内 Na^+ 浓度低于细胞外 Na^+ 浓度 10~20 倍的是
- A. Na^+-H^+ 交换器 B. Na^+-K^+ 泵 C. $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换载体
- D. 电压门控 Na^+ 通道 E. Na^+ 驱动的葡萄糖转运体
28. 人体内 O_2 、 CO_2 、 N_2 、水和甘油等进出细胞膜的穿膜运输方式是
- A. 简单扩散 B. 易化扩散 C. 主动运输
- D. 胞吞作用 E. 胞吐作用
29. 氨基酸通过小肠黏膜上皮细胞游离面进入细胞的方式通常为
- A. 简单扩散 B. 离子通道扩散 C. 易化扩散
- D. 协同运输 E. 胞吞作用
30. 在细胞膜的物质转运中, Na^+ 穿膜运输的方式有
- A. 简单扩散和易化扩散 B. 简单扩散和主动运输
- C. 易化扩散和主动运输 D. 易化扩散和离子通道扩散
- E. 离子通道扩散和主动运输
31. 影响细胞膜流动性的主要因素不包括

- B. 接受环境信号并传递到胞内
 C. 连接相邻细胞或细胞外基质成分
 D. 结合于膜上的酶可催化细胞的某些化学反应
 E. 使膜发生相变和相分离
43. 关于细胞膜的错误叙述是
 A. 高度选择性的半通透性膜
 B. 动态的流体结构
 C. 膜载体蛋白只参与主动运输
 D. 接受化学信号的感受器
 E. 膜中的胆固醇是两亲性分子
44. 受体介导的胞吞作用不具有的特点是
 A. 在细胞膜的特定区域进行
 B. 形成有被小窝和有被小泡
 C. 吸入大量的细胞外液
 D. 其物质转运速度很快
 E. 吸取特定大分子的有效途径
45. 通过连续性分泌途径排出细胞的物质是
 A. 胶原蛋白
 B. 肾上腺素
 C. 消化酶
 D. 神经递质
 E. 多糖
46. 下列不属于甘油磷脂的是
 A. 卵磷脂
 B. 鞘磷脂
 C. 磷脂酰肌醇
 D. 脑磷脂
 E. 磷脂酰丝氨酸
47. 目前被普遍接受的细胞膜分子结构模型是
 A. 单位膜模型
 B. 流动镶嵌模型
 C. 片层结构模型
 D. 脂筏模型
 E. 捕鱼笼模型
48. 下列关于 Ca^{2+} 泵的错误叙述是
 A. 可维持细胞内外的 Ca^{2+} 浓度梯度
 B. 是 ATP 酶
 C. 通过对向运输方式转运 Ca^{2+}
 D. 分布于质膜、内质网膜上
 E. 每次能逆浓度梯度转运 2 个 Ca^{2+} 进入肌浆网
49. 下列属于非离子型去污剂的是
 A. 十二烷基磺酸钠
 B. 十六烷基三甲基
 C. Triton X-100
 D. 硬脂酸
 E. 甘油三酯
50. 与家族性高胆固醇血症无关的是
 A. LDL 受体不能与 LDL 结合
 B. LDL 受体的基因突变
 C. LDL 进入细胞后不能被降解
 D. LDL 受体缺乏
 E. LDL 受体结构异常
51. 下列关于水通道的错误叙述是
 A. AQP1 是红细胞膜上的主要水通道
 B. 经典的选择性水通道只能通透水分子
 C. 水-甘油通道对水分子、甘油、尿素具有通透性
 D. 属于内在膜蛋白
 E. 属于配体门控通道
52. 下列不属于两亲性分子的是
 A. 卵磷脂
 B. 胆固醇
 C. SDS

D. 糖脂 E. 甘油三酯

53. 下列关于脂锚定蛋白的正确叙述是

- A. 可位于细胞膜的外侧
 B. 以共价键与脂双层内的脂分子结合
 C. 可位于细胞膜的胞质侧
 D. 可通过与磷脂酰肌醇分子相连的寡糖链共价键结合而锚定到质膜上
 E. 以上都正确

54. 测定膜蛋白的侧向扩散可使用的技术是

- A. 冰冻蚀刻技术 B. 荧光漂白恢复技术 C. 细胞周期同步化
 D. 冷冻电镜技术 E. Western 印迹分析

55. 下列不属于内在膜蛋白的是

- A. 孔蛋白 B. 钙泵 C. 水通道
 D. Src 激酶 E. 钙黏着蛋白

三、多项选择题

1. 关于细胞膜上的钠钾泵,下列叙述正确的是

- A. 具有 ATP 酶的活性 B. 由大小两种亚基组成
 C. 钠离子的结合位点位于胞膜外侧 D. 乌本苷为其抑制剂
 E. 介导逆浓度梯度运输

2. 外在膜蛋白的主要特点有

- A. 可与内在膜蛋白相互作用,间接与膜结合
 B. 均分布在膜的外表面
 C. 在膜蛋白中含量少,占 20%~30%
 D. 可通过离子键、氢键与膜脂分子的极性头部相结合
 E. 改变溶液离子浓度即可从膜上分离出来

3. 穿膜蛋白的主要特点有

- A. 在膜蛋白中含量多,占 70%~80% B. 穿膜蛋白是双亲性分子
 C. 嵌入脂双层分子中 D. 多以 α 螺旋方式穿越脂双层
 E. 与膜结合紧密

4. 膜糖类分布在

- A. 脂类双层分子层中 B. 细胞膜非胞质侧 C. 细胞膜胞质侧
 D. 内膜系统中糖残基面向膜腔内 E. 内膜系统中糖残基面向膜外表面

5. 在人的红细胞膜中,下列脂类主要分布于脂双层外层的是

- A. 鞘磷脂 B. 磷脂酰胆碱 C. 磷脂酰丝氨酸
 D. 磷脂酰乙醇胺 E. 胆固醇

6. 穿膜转运方式中的简单扩散和易化扩散的共同点是

- A. 从高浓度向低浓度方向转运 B. 从低浓度向高浓度方向转运
 C. 需要消耗能量 D. 不需消耗能量
 E. 需要膜转运蛋白

7. 影响膜脂流动性的因素有

- A. 环境温度 B. pH C. 膜蛋白的含量

- D. 胆固醇含量
E. 细胞体积
8. 在调节细胞内 pH 方面,起作用的跨膜载体蛋白是
A. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 泵
B. Ca^{2+} 泵
C. $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交换器
D. $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ 交换器
E. 离子闸门通道
9. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 泵的生理作用是
A. 产生和维持膜电位
B. 维持细胞内外特殊的钠钾离子环境
C. 调节渗透压保持细胞容积恒定
D. 为细胞主动运输葡萄糖等物质提供条件
E. 调节细胞的 pH
10. 在人的红细胞膜中,主要分布于脂双层膜质面的脂类分子是
A. 磷脂酰肌醇
B. 磷脂酰胆碱
C. 磷脂酰丝氨酸
D. 磷脂酰乙醇胺
E. 鞘磷脂
11. 下列可以降低细胞膜流动性的是
A. 脂肪酸链的长度增加
B. 脂肪酸链的不饱和程度增加
C. 卵磷脂与鞘磷脂比例增加
D. 相变温度以上胆固醇含量增加
E. 相变温度以下胆固醇含量增加
12. 载体蛋白介导的穿膜运输的特点是
A. 均介导顺浓度梯度运输溶质
B. 通过构象改变介导物质运输
C. 扩散速率随溶质浓度的升高可无限增大
D. 有选择性地转运特异性分子
E. 对被转运物质不进行共价修饰
13. 通道蛋白介导的跨膜运输的特点是
A. 逆电化学梯度转运物质
B. 对被转运物质有高度选择性
C. 转运速度快
D. 通道蛋白形成贯穿膜脂双层的亲水孔道
E. 多数通道不持续开放
14. 关于细胞膜对离子和小分子物质的穿膜运输,下列说法正确的有
A. 钠泵对 Na^+ 和 K^+ 的转运属于被动运输
B. O_2 和 CO_2 的穿膜运输方式为简单扩散
C. 小肠对葡萄糖和氨基酸的吸收属于协同运输
D. 钙通道可逆电化学梯度特异性的转运 Na^+
E. 多数离子通道不持续开放
15. 细胞外被的功能包括
A. 细胞的迁移和黏附作用
B. 作为保护层
C. 细胞周围的水盐平衡
D. 与细胞通讯有关
E. 参与细胞识别

参考答案

一、名词解释

1. 脂质体(liposome):是根据磷脂分子可以在水相中自我装配成稳定的脂双层膜的球形结构

的趋势而制备的人工球形脂质小囊。

2. 囊泡运输 (vesicular transport): 大分子和颗粒物质被运输时并不直接穿过细胞膜, 都是由膜包围形成囊泡, 通过一系列膜囊泡的形成和融合来完成转运过程, 故称为囊泡运输。

3. 流动镶嵌模型 (fluid mosaic model): 是由 Singer 和 Nicolson 在 1972 年提出的细胞膜结构模型, 该模型认为生物膜是嵌有蛋白质的脂类二维排列的液态体, 膜是一种动态的、不对称的、具有流动性特点的结构。膜中蛋白质分子以不同形式与脂双分子层结合。

4. 脂筏 (lipid rafts): 脂双层内局部较厚、富含胆固醇、鞘磷脂及特定类型膜蛋白的、流动性较低的微区, 参与信号转导、受体介导的胞吞以及胆固醇代谢运输等。

5. 主动运输 (active transport): 载体蛋白介导的、直接或间接消耗能量的物质逆浓度梯度或电化学梯度进行的穿膜运输方式。

6. 易化扩散 (facilitated diffusion): 由载体蛋白介导的, 不消耗能量, 顺物质浓度梯度或电化学梯度进行的穿膜运输方式。

7. 协同运输 (cotransport): 即一种物质的运输依赖另一种物质同时转运的穿膜运输方式。

8. 受体介导的胞吞作用 (receptor-mediated endocytosis): 细胞通过受体的介导选择性高效摄取细胞外特定大分子物质的过程, 可使细胞特异性地摄取细胞外含量很低的成分。

9. 简单扩散 (simple diffusion): 无需膜运输蛋白的参与, 小分子靠热运动通过膜脂分子间隙, 从高浓度向低浓度一侧进行的穿膜扩散方式。

10. 被动运输 (passive transport): 无需消耗能量, 小分子或离子通过简单扩散、离子通道扩散、易化扩散实现物质顺浓度梯度或电化学梯度的穿膜运输。

11. 单位膜 (unit membrane): 是膜性结构或细胞器的膜具有的相似结构, 电镜下呈内外两层致密的深色带和中间层的浅色带 (两暗一明) 结构。

12. 连续性分泌 (continuous secretion): 又称固有分泌, 指外输性蛋白质在糙面内质网合成之后, 转运至高尔基复合体, 经修饰、浓缩、分选, 形成分泌泡, 随即被运送至细胞膜, 与质膜融合将分泌物排出细胞外的过程。

13. 受调分泌 (regulated secretion): 见于特定类型细胞中, 分泌性蛋白合成后先储存于分泌囊泡中, 只有当细胞接受到细胞外信号 (如激素) 的刺激, 引起分泌囊泡与细胞膜融合, 将分泌物释放到细胞外。

二、单项选择题

- | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. B | 2. A | 3. A | 4. A | 5. E | 6. D | 7. B | 8. B | 9. E | 10. D |
| 11. E | 12. A | 13. B | 14. C | 15. E | 16. D | 17. C | 18. B | 19. A | 20. C |
| 21. C | 22. B | 23. C | 24. D | 25. F | 26. A | 27. B | 28. A | 29. D | 30. E |
| 31. E | 32. B | 33. C | 34. A | 35. E | 36. B | 37. A | 38. A | 39. E | 40. E |
| 41. C | 42. E | 43. C | 44. C | 45. A | 46. B | 47. B | 48. C | 49. C | 50. C |
| 51. E | 52. E | 53. E | 54. B | 55. D | | | | | |

三、多项选择题

- | | | | | |
|---------|---------|----------|---------|-----------|
| 1. ABDE | 2. ACE | 3. ABCDE | 4. BD | 5. AB |
| 6. AD | 7. ABCD | 8. CD | 9. ABCD | 10. ACD |
| 11. AD | 12. BDE | 13. BCDE | 14. BCE | 15. ABCDE |

(沃晓嫫)

第五章

细胞的内膜系统与囊泡转运

一、名词解释

1. 内膜系统 (endomembrane system)
2. 糙面内质网 (rough endoplasmic reticulum, RER)
3. 光面内质网 (smooth endoplasmic reticulum, SER)
4. 微粒体 (microsome)
5. 网质蛋白 (reticulo-plasmin)
6. 分子伴侣 (molecular chaperone)
7. 囊泡 (vesicle)
8. 囊泡转运 (vesicular transport)
9. 门控运输 (gated transport)
10. 穿膜运输 (transmembrane transport)
11. 网格蛋白 (clathrin)
12. 衔接蛋白 (adaptin)
13. 发动蛋白 (dynamin)
14. COP I 有被小泡 (COP I-coated vesicle)
15. COP II 有被小泡 (COP II-coated vesicle)

二、单项选择题

1. 光面内质网的主要功能是
 - A. 合成蛋白质
 - B. 脂类物质合成
 - C. 蛋白质加工
 - D. 蛋白质分泌
 - E. 氧化代谢
2. 吞噬溶酶体在完成对大部分底物的消化分解后,不能被消化、分解的部分成为
 - A. 内体
 - B. 残余体
 - C. 微体
 - D. 脂质体
 - E. 自噬体
3. 在高尔基复合体中,溶酶体水解酶形成的分选信号是
 - A. MTS
 - B. KDEL
 - C. M-6-P
 - D. RGD
 - E. NLS
4. 初级溶酶体内的酶是
 - A. 有活性的中性水解酶
 - B. 有活性的碱性水解酶
 - C. 有活性的酸性水解酶
 - D. 无活性的中性水解酶
 - E. 无活性的酸性水解酶
5. 光面内质网的功能不包括

- A. 合成分泌性蛋白
D. 合成甾体类激素
- B. 参与糖原分解
E. 参与脂类转运
- C. 参与脂类代谢
6. 高尔基复合体的主要功能是
- A. 合成蛋白质
D. 合成甾体激素
- B. 合成脂类
E. 参与蛋白质的修饰与加工
- C. 合成糖类
7. 可与外核膜相连的细胞器是
- A. 内质网
D. 线粒体
- B. 高尔基复合体
E. 过氧化物酶体
- C. 溶酶体
8. 肌细胞中与 Ca^{2+} 的摄取和释放以及传导兴奋作用有关的细胞器是
- A. 微管、微丝
D. 光面内质网
- B. 溶酶体
E. 过氧化物酶体
- C. 糙面内质网
9. 下列能够协助核编码蛋白质进入线粒体的是
- A. 核输入信号
D. 细胞周期蛋白
- B. 基质导入序列
E. 核输出信号
- C. 分子伴侣
10. 高尔基复合体的小囊泡主要来自
- A. 溶酶体
D. 吞噬体
- B. 内质网
E. 微粒体
- C. 内体
11. 内质网驻留蛋白进入高尔基复合体后会形成包被小泡,并将其从高尔基复合体运输到内质网中,此种包被小泡的主要包被成分为
- A. Clathrin
D. KDEL
- B. COPI
E. Sar
- C. COPII
12. 内质网的标志酶是
- A. 糖基转移酶
D. 葡萄糖-6-磷酸酶
- B. 酸性水解酶
E. 过氧化氢酶
- C. 酸性磷酸酶
13. 细胞内蛋白质定向转运的机制是蛋白质含有特殊的
- A. M-6-P 分选信号
D. 寡糖链
- B. 信号序列
E. 编码序列
- C. RGD 序列
14. 内质网中能识别错误折叠的蛋白并促使其重新折叠的分子伴侣是
- A. Bip
D. PDI
- B. 易位子
E. Hsp70
- C. Hsp90
15. 下列不参与多肽从胞质溶胶转移到内质网膜上合成的过程的是
- A. 信号识别颗粒
D. 易位子
- B. 停靠蛋白质
E. Bip
- C. 信号肽
16. 分泌蛋白的运输途径为
- A. 囊泡运输
D. 自由扩散
- B. 门控运输
E. 易化扩散
- C. 穿膜运输
17. 下列不属于糙面内质网功能的是
- A. 蛋白质合成
C. 多肽链的折叠与组装
E. 蛋白二硫键的形成
- B. 蛋白质的分选与包装
D. 蛋白质的糖基化修饰
18. 与矽肺发生密切相关的细胞器是

- A. 溶酶体
D. 糙面内质网
- B. 光面内质网
E. 线粒体
- C. 高尔基复合体
33. 细胞内合成脂类的重要场所是
- A. 糙面内质网
D. 胞质溶胶
- B. 光面内质网
E. 细胞膜
- C. 高尔基复合体
34. 分选信号为甘露糖-6-磷酸的是
- A. 溶酶体水解酶
D. 网质蛋白
- B. 糖基转移酶
E. LDL-R
- C. 过氧化物酶
35. 膜蛋白在膜上的插入是有方向性的,确定其插入方向性的细胞内区域是
- A. 胞质溶胶
D. 质膜
- B. 高尔基复合体
E. 运输小泡
- C. 内质网
36. 从骨髓瘤细胞中提取的免疫球蛋白分子的 N 端比分泌到细胞外的免疫球蛋白分子的 N 端氨基酸序列多出一截,最有可能的原因是
- A. 分泌到细胞外的免疫球蛋白分子的 N 端直接被泛素化降解
B. 是由于免疫球蛋白在细胞内较稳定,而在细胞外不稳定造成的
C. 分泌到细胞外的免疫球蛋白分子 N 端信号肽被信号肽酶切除
D. 它们由不同的基因编码
E. 细胞中的蛋白分子 N 端在内质网中被加上了一段信号肽
37. 在高尔基复合体 TGN 区,网格蛋白有被小泡由外向内生物分子的排列序列为
- A. 网格蛋白→受体→衔接蛋白→配体分子
B. 网格蛋白→衔接蛋白→受体→配体分子
C. 网格蛋白→配体分子→衔接蛋白→受体
D. 配体分子→衔接蛋白→受体→网格蛋白
E. 衔接蛋白→配体分子→受体→网格蛋白
38. 负责从顺面高尔基网到内质网进行囊泡运输的是
- A. 网格蛋白有被小泡
D. 三者都可以
- B. COP I 有被小泡
E. 三者都不可以
- C. COP II 有被小泡
39. 分泌蛋白信号肽的切除发生在
- A. 胞质溶胶
D. 溶酶体
- B. 高尔基复合体
E. 线粒体
- C. 内质网
40. 高尔基复合体中,N-连接和 O-连接的糖基化最后一步都是加上唾液酸残基,由此可推测催化唾液酸转移的酶最有可能存在于高尔基复合体的
- A. CGN
D. 反面膜囊和 TGN
- B. 顺面膜囊
E. 小囊泡
- C. 中间膜囊
41. 少量溶酶体酶泄露到胞质溶胶中并不会引起细胞损伤的主要原因是
- A. 溶酶体酶迅速被特异的机制召回溶酶体中
B. 胞质中的一些蛋白因子与溶酶体酶结合抑制其活性
C. 胞质溶胶中的 pH 为 7.0 左右,溶酶体酶的活性大大降低
D. 溶酶体酶进入胞质溶胶随即被降解成无活性的肽段
E. 溶酶体酶在胞质溶胶中被泛素化降解

42. 糖原代谢受阻引起Ⅱ型糖原累积病是由于缺乏
- A. 葡萄糖-6-磷酸酶 B. 糖基转移酶 C. α -糖苷酶
D. 氨基己糖酶 A E. 糖基化酶
43. 如果一种多肽含有多个起始转移序列和多个停止转移序列,那么下列说法最确切的是
- A. 该多肽将转移到内质网上继续合成
B. 该多肽合成结束后将最终被定位在内质网中
C. 该多肽将最终成为多次跨膜的膜蛋白
D. 该多肽将最终被运送至溶酶体而被降解
E. 该多肽将最终被分泌到细胞外
44. 下列蛋白不属于分子伴侣的是
- A. Grp94 B. Bip C. PDI D. 泛素 E. Hsp70
45. 下列膜性细胞器不属于内膜系统的是
- A. 内质网 B. 溶酶体 C. 运输小泡
D. 线粒体 E. 高尔基复合体
46. COPⅡ有被小泡主要负责的蛋白质转运过程是
- A. 高尔基复合体到内质网 B. 质膜到内体
C. 高尔基复合体到内体 D. 内质网到高尔基复合体
E. 内体到溶酶体
47. 高尔基复合体的功能不包括
- A. 蛋白质的分泌 B. 糖蛋白的加工修饰 C. 蛋白质的水解
D. 蛋白质的合成 E. 蛋白质的分选
48. 转录因子在细胞质中合成后进入细胞核的方式是
- A. 囊泡运输 B. 门控运输 C. 穿膜运输
D. 易化扩散 E. 协同运输
49. LDL受体在细胞质中合成后运输到细胞膜上发挥作用的方式是
- A. 囊泡运输 B. 门控运输 C. 穿膜运输
D. 易化扩散 E. ATP驱动泵
50. 内体性溶酶体的形成过程不包括
- A. 酶蛋白的N-糖基化与内质网转运
B. 酶蛋白在高尔基复合体内的加工与转移
C. 溶酶体酶前体从与之结合的M-6-P膜受体上解离
D. 酶蛋白的分选与转运
E. 晚期内体与吞噬体融合
51. COPⅡ有被小泡的形成需要激活的蛋白是
- A. 网格蛋白 B. 衔接蛋白 C. 发动蛋白
D. Rab蛋白 E. Sar蛋白
52. 线粒体蛋白在细胞质中合成后进入线粒体的方式是
- A. 囊泡运输 B. 门控运输 C. 穿膜运输
D. ATP驱动泵 E. 自由扩散
53. 网格蛋白参与的囊泡运输过程是

- A. 高尔基复合体到内质网 B. 内质网逃逸蛋白的捕捉 C. 内体到质膜
D. 内质网到高尔基复合体 E. 高尔基复合体到溶酶体
54. 下列由溶酶体酶的异常释放或外泄造成的疾病是
A. 泰-萨病 B. II型糖原累积症 C. 痛风
D. Zellweger 脑肝肾综合征 E. 蚕豆病
55. COP I 有被小泡主要负责的转运过程是
A. 高尔基复合体到内质网 B. 高尔基复合体到内体 C. 质膜到内体
D. 内质网到高尔基复合体 E. 内体到溶酶体
56. 下列小 G 蛋白中, 参与了囊泡融合的是
A. Rab 蛋白 B. Raf 蛋白 C. Ras 蛋白
D. ARF 蛋白 E. Ran 蛋白
57. 受体介导的胞吞作用不具有的特点是
A. 有受体参与 B. 发生在有被小窝处
C. 对被摄取物有选择性 D. 有网格蛋白参与
E. 有 COP I 蛋白参与
58. 缺乏可导致 Zellweger 脑肝肾综合征发生的是
A. 葡萄糖-6-磷酸酶 B. 过氧化氢酶 C. 氨基己糖酶 A
D. 糖基转移酶 E. α -糖苷酶
59. 参与囊泡融合的蛋白是
A. 衔接蛋白 B. 发动蛋白 C. SNAREs 蛋白
D. COP I 蛋白 E. COP II 蛋白
60. 下列关于内质网应激的错误叙述是
A. 与内质网内 Ca^{2+} 平衡紊乱有关
B. 未折叠或错误折叠蛋白在内质网腔中积累聚集
C. 其发生与营养不足、缺氧有关
D. 可导致细胞凋亡
E. 可激活 MAPK 信号通路

三、多项选择题

1. 下列属于蛋白质分选信号序列的是
A. 信号斑 B. 密码子 C. M-6-P 受体
D. SRP E. 信号肽
2. 网格蛋白包被小泡的形成, 需要参与的蛋白是
A. 网格蛋白 B. 衔接蛋白 C. 发动蛋白
D. 质膜上存在特定受体 E. Sar 蛋白
3. 光面内质网的功能包括
A. 合成分泌性蛋白 B. 参与糖原分解 C. 参与脂类代谢
D. Ca^{2+} 的储存 E. 参与脂类转运
4. 胞内蛋白质运输的主要运输途径包括
A. 囊泡运输 B. 门控运输 C. 穿膜运输
D. 离子通道蛋白介导的运输 E. 自由扩散

5. 下列属于内膜系统的细胞器有
 - A. 内质网
 - B. 高尔基复合体
 - C. 溶酶体
 - D. 细胞膜
 - E. 线粒体
6. 承担细胞内物质定向运输的囊泡类型包括
 - A. 网格蛋白有被小泡
 - B. 液泡
 - C. 内体
 - D. COP I 有被小泡
 - E. COP II 有被小泡
7. 属于高尔基复合体功能的是
 - A. 蛋白质的分泌
 - B. 蛋白质的糖基化
 - C. 蛋白质的水解
 - D. 蛋白质的合成
 - E. 蛋白质的分选
8. 主要由网格蛋白有被小泡负责的囊泡运输是
 - A. 高尔基复合体到内质网
 - B. 质膜到内体
 - C. 高尔基复合体到溶酶体
 - D. 内质网到高尔基复合体
 - E. 内体到溶酶体
9. 下列属于糙面内质网功能的是
 - A. 蛋白质合成
 - B. 蛋白质的分选与包装
 - C. 多肽链的折叠与组装
 - D. 蛋白质的运输
 - E. 蛋白质的糖基化
10. 在 LDL 的内吞过程中,内吞泡的形成需要
 - A. 网格蛋白
 - B. 衔接蛋白
 - C. 发动蛋白
 - D. LDL 受体
 - E. Sar 蛋白

参考答案

一、名词解释

1. 内膜系统(endomembrane system):是细胞质中在结构、功能及其发生上相互密切关联的膜性结构细胞器之总称,主要包括:内质网、高尔基复合体、溶酶体、各种转运小泡以及核膜等。
2. 糙面内质网(rough endoplasmic reticulum, RER):又称颗粒内质网,以内质网膜胞质面有核糖体颗粒附着为主要形态特征,多呈排列较为整齐的扁平囊状。
3. 光面内质网(smooth endoplasmic reticulum, SER):又称无颗粒内质网,表面没有核糖体附着,电镜下呈表面光滑的管、泡样网状形态结构,常与糙面内质网相互连通。
4. 微粒体(microsome):应用超速分级分离法,从细胞匀浆中分离出直径在 100nm 左右的球囊状封闭小泡,可体现其来源的细胞器的化学特征与生理功能。
5. 网质蛋白(reticulo-plasmin):是普遍存在于内质网网腔中的一类蛋白质,其共同特点是在多肽链的羧基端均含有一个 KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) 或 HDEL (His-Asp-Glu-Leu) 的氨基酸序列驻留信号。
6. 分子伴侣(molecular chaperone):细胞内一类能够识别多肽链的非天然结构,帮助多肽链转运、正确折叠和组装的保守蛋白,但其本身却并不参与最终产物的形成。
7. 囊泡(vesicle):是真核细胞内由单位膜包围而成的含有特殊内含物的膜泡结构,大小从几十纳米到数百纳米不等,可呈小的球形或较大的无规则形状,主要负责细胞内物质的定向运输。
8. 囊泡转运(vesicular transport):是由不同膜性运输小泡承载的一种蛋白质运输形式。其实质

是由膜包裹、以出芽的方式从供体细胞器或质膜断裂形成囊泡,携带运送的物质到达受体细胞器或质膜并与之融合而完成转运的过程。

9. 门控运输(gated transport):是指由特定的分拣信号(如核定位信号)介导,并通过核孔复合体的选择性作用,在细胞质溶胶与细胞核之间所进行的蛋白质运输。

10. 穿膜运输(transmembrane transport):是指通过结合在膜上的蛋白质转运体进行的蛋白质运输,可介导蛋白质从细胞质溶胶运输到内质网、线粒体。

11. 网格蛋白(clathrin):由3条重链和3条轻链组成,每条重链和轻链组成二聚体,三个二聚体又形成三腿蛋白复合体。网格蛋白可聚合成网篮状结构覆盖于转运囊泡表面,提高囊泡的张力,并参与捕获特定的膜受体使其聚集于有被小窝内。

12. 衔接蛋白(adaptin):是网格蛋白有被小泡包被的组成成分,位于网格蛋白与配体-受体复合物之间,参与包被的形成并介导网格蛋白与受体的连接。

13. 发动蛋白(dynammin):是细胞质中的一种可结合并水解GTP的特殊蛋白质。在膜囊芽形成时,发动蛋白与GTP结合,并在芽生膜囊的颈部聚合形成环状物,通过对GTP的水解,环状物向心缢缩,促进囊泡断离与形成。

14. COP I 有被小泡(COP I-coated vesicle):COP I 有被小泡表面覆盖有衣被蛋白 I,主要负责内质网逃逸蛋白的捕捉、回收转运以及高尔基复合体膜内蛋白的逆向运输。

15. COP II 有被小泡(COP II-coated vesicle):COP II 有被小泡由糙面内质网所产生,因覆盖有衣被蛋白 II 而得名,主要负责介导从内质网到高尔基复合体的物质转运。

二、单项选择题

- | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. B | 2. B | 3. C | 4. E | 5. A | 6. E | 7. A | 8. D | 9. B | 10. B |
| 11. B | 12. D | 13. B | 14. A | 15. E | 16. A | 17. B | 18. A | 19. C | 20. B |
| 21. C | 22. B | 23. C | 24. A | 25. B | 26. A | 27. B | 28. C | 29. D | 30. D |
| 31. A | 32. C | 33. B | 34. A | 35. C | 36. C | 37. B | 38. B | 39. C | 40. D |
| 41. C | 42. C | 43. C | 44. D | 45. D | 46. D | 47. D | 48. B | 49. A | 50. E |
| 51. E | 52. C | 53. E | 54. C | 55. A | 56. A | 57. E | 58. B | 59. C | 60. E |

三、多项选择题

- | | | | | |
|--------|---------|---------|---------|----------|
| 1. AE | 2. ABCD | 3. BCDE | 4. ABC | 5. ABC |
| 6. ADE | 7. ABCE | 8. BCE | 9. ACDE | 10. ABCD |

(唐娟 过健俐)

第六章

线粒体与细胞的能量转换

一、名词解释

1. 呼吸链 (respiratory chain)
2. 基质导入序列 (matrix-targeting sequence, MTS)
3. 细胞呼吸 (cellular respiration)
4. 化学渗透假说 (chemiosmotic coupling hypothesis)
5. 基粒 (elementary particle)
6. 转位接触点 (translocation contact site)
7. 热休克蛋白 (heat shock protein, HSP)
8. 线粒体动力学 (mitochondrial dynamics)

二、单项选择题

1. 线粒体核糖体的沉降系数是
A. 45S B. 40S C. 50S D. 70S E. 80S
2. 线粒体的嵴源于
A. 外膜 B. 膜间腔 C. 内膜
D. 基质颗粒 E. 内膜外膜共同形成
3. 细胞中进行生物氧化和能量转换的主要场所是
A. 核糖体 B. 糙面内质网 C. 线粒体
D. 过氧化物酶体 E. 高尔基复合体
4. 线粒体疾病不具有的特征是
A. 高突变率 B. 阈值效应 C. 遗传异质性
D. 父系遗传 E. 母系遗传
5. 下列因素中与细胞内线粒体的数目改变无关的是
A. 氧气充足 B. 有害物质渗入 C. 病毒入侵
D. 细胞癌变 E. 细胞缺血性损伤
6. 线粒体中具有高度选择通透性的结构是
A. 外膜 B. 基粒 C. 内腔 D. 基质 E. 内膜
7. 下列疾病与线粒体有关的是
A. Kjer 病 B. 硅肺 C. 糖原累积病
D. 泰 - 萨病 E. 痛风
8. 线粒体内膜的标志酶是
A. 细胞色素氧化酶 B. 单胺氧化酶 C. 腺苷酸激酶

- D. 过氧化物酶体
E. 溶酶体
18. 线粒体基质的标志酶是
A. 细胞色素氧化酶
B. 单胺氧化酶
C. 腺苷酸激酶
D. 苹果酸脱氢酶
E. 糖基转移酶
19. 线粒体中能催化 ADP 磷酸化生成 ATP 的结构是
A. 基粒头部
B. 基粒柄部
C. 基粒基片
D. 嵴内腔
E. 嵴间腔
20. 下列关于线粒体外膜的正确叙述是
A. 化学组成中 20% 是脂类, 80% 是蛋白质
B. 允许一些小分子多肽通过
C. 外膜比内膜稍薄
D. 膜上有大量向内腔突起的折叠形成嵴
E. 几乎没有转运蛋白
21. 在心肌, 一分子葡萄糖在有氧氧化途径中, 通过氧化磷酸化可生成 ATP 的数是
A. 18
B. 22
C. 28
D. 32
E. 38
22. 有关线粒体 DNA 复制, 错误的是
A. 线粒体 DNA 的两条链有各自的复制起始点
B. 轻链的复制要晚于重链
C. mtDNA 的复制需要 RNA 引物作为 DNA 合成的起始
D. 一般情况下, 重链的合成方向是逆时针的, 轻链的合成方向是顺时针的
E. mtDNA 复制贯穿于整个细胞周期
23. 三羧酸循环的反应中, 不为呼吸链提供氢原子的是
A. 柠檬酸→异柠檬酸
B. 异柠檬酸→ α -酮戊二酸
C. 琥珀酸→延胡索酸
D. 苹果酸→草酰乙酸
E. 丙酮酸
24. 呼吸链中既能传递电子又能传递氢的传递体是
A. 铁硫蛋白
B. 细胞色素 b
C. 细胞色素 c
D. 细胞色素 a₃
E. 辅酶 Q
25. 将葡萄糖的生物氧化与体外燃烧进行比较, 发现二者
A. 终产物完全相同
B. 总能量不同
C. 耗氧量不同
D. 反应所需活化能相同
E. 反应条件相似
26. ATP 生成的主要方式是
A. 肌酸磷酸化
B. 氧化磷酸化
C. 糖的磷酸化
D. 底物水平磷酸化
E. 有机酸脱羧
27. 在呼吸链中能将电子直接传递给氧的传递体是
A. 铁硫蛋白
B. 细胞色素 b
C. 细胞色素 c
D. 细胞色素 a₃
E. 细胞色素 c₁
28. 线粒体膜间腔的标志酶是
A. 细胞色素氧化酶
B. 单胺氧化酶
C. 腺苷酸激酶
D. 苹果酸脱氢酶
E. 糖基转移酶
29. 呼吸链存在于

- A. 细胞膜 B. 线粒体外膜 C. 线粒体内膜
D. 微粒体 E. 过氧化物酶体
30. 下列关于线粒体内膜的正确叙述是
A. 允许分子量小于 1000 的分子通过 B. 标志酶为苹果酸脱氢酶
C. 蛋白质的含量占 50% D. 具有高度的选择通透性
E. 比外膜稍厚
31. 参与呼吸链传递电子的金属离子是
A. 镁离子 B. 铁离子 C. 锌离子
D. 钴离子 E. 铜离子
32. 线粒体外膜的标志酶是
A. 细胞色素氧化酶 B. 单胺氧化酶 C. 腺苷酸激酶
D. 苹果酸脱氢酶 E. 糖基转移酶
33. 关于细胞色素,叙述正确的是
A. 均为递氢体 B. 均为递电子体
C. 都可与一氧化碳结合并失去活性 D. 辅基均为血红素
E. 只存在于线粒体
34. Tim 和 Tom 分别位于线粒体的
A. 外膜、内膜 B. 内膜、外膜 C. 内膜、膜间腔
D. 外膜、膜间腔 E. 膜间腔、外膜
35. 可进行底物水平磷酸化的是
A. 琥珀酰 CoA B. 葡萄糖 -6- 磷酸 C. UTP
D. 果糖 -1,6- 二磷酸 E. 2,3 二磷酸甘油酸
36. 1 分子琥珀酸脱下的 2H 经呼吸链传递与氧结合成水,生成的 ATP 分子数是
A. 1 B. 1.5 C. 2.5 D. 2 E. 5
37. 呼吸链各成分排列顺序的依据是
A. 各成分的结构
B. 各化合物的类型
C. 分子的结构与性质
D. 按各成分的氧化还原电位的高低来排列
E. 分子的大小
38. 下列关于线粒体内膜的错误叙述是
A. 通透性很小
B. 具有高度的选择通透性
C. 由转运蛋白控制内外腔的物质交换
D. 蛋白质的含量明显低于其他膜成分
E. 比外膜稍薄
39. 关于底物水平磷酸化的正确叙述是
A. 底物分子上脱氢传递给氧产生能量,生成 ATP 的过程
B. 底物中的高能键直接转移给 ADP 生成 ATP 的过程
C. 体内产生高能磷酸化合物的主要途径

- D. 底物分子的磷酸基团被氧化,释放出大量能量的过程
E. 高能底物水解 ATP 的过程

40. 存在于线粒体中,外漏时会引发细胞凋亡的是

- A. 细胞色素 a₃ B. 细胞色素 a C. 细胞色素 c
D. 细胞色素 b E. 细胞色素 b₅

三、多项选择题

1. 线粒体的自主性体现在

- A. 线粒体含有核糖体
B. mtDNA 具有自我复制的能力
C. 在遗传上被核基因组控制
D. mtDNA 与核 DNA 遗传密码有所不同
E. mtDNA 在 S 期合成

2. 相对于核 DNA,线粒体 DNA 分子的特点是

- A. 呈线状 B. 呈环状 C. 与组蛋白结合
D. 不与组蛋白结合 E. 信息量较小

3. 线粒体的增殖方式主要有

- A. 出芽分裂 B. 收缩分裂 C. 间壁分裂
D. 减数分裂 E. 有丝分裂

4. 疾病过程中的线粒体变化有

- A. 线粒体发生肿胀甚至破裂 B. 液泡状线粒体的形成 C. 线粒体融合
D. 线粒体基质颗粒大量增加 E. 线粒体凝集

5. 在胞浆中糖酵解产生的 NADH,进入线粒体而被氧化的通过方式是

- A. α -磷酸甘油穿梭 B. 柠檬酸穿梭 C. 苹果酸穿梭
D. 丙酮酸穿梭 E. 谷氨酸穿梭

6. 目前线粒体疾病治疗的基本措施包括

- A. 补充疗法 B. 选择疗法 C. 基因疗法
D. 靶向治疗 E. 营养补充

7. 呼吸链中有 3 个主要的质子由基质转运到膜间腔的部位,分别是

- A. $\text{NADH} \rightarrow \text{FMN}$ B. 细胞色素 b \rightarrow 细胞色素 c 之间
C. 细胞色素 a $\rightarrow \text{O}_2$ 之间 D. 细胞色素 b \rightarrow 细胞色素 c₁ 之间
E. $\text{FMN} \rightarrow \text{Fe-S}$

8. 线粒体内的生物氧化酶类有

- A. 不需氧脱氢酶 B. 加单氧酶类 C. 过氧化物酶
D. 氧化酶类 E. 过氧化氢酶

9. 含有高能键的化合物有

- A. 乙酰 CoA B. 1,6-二磷酸果糖 C. 1,3-二磷酸甘油酸
D. 2,3-二磷酸甘油酸 E. 磷酸烯醇式丙酮酸

10. 生物体内重要的呼吸链有

- A. 以 NAD^+ 为辅酶的呼吸链 B. 以细胞色素氧化还原开始的呼吸链
C. 以 FAD 为辅酶的呼吸链 D. 以 NADPH 氧化开始的呼吸链

E. 以 FMNH 氧化开始的氧化呼吸链

参考答案

一、名词解释

1. 呼吸链 (respiratory chain): 位于线粒体内膜上的一系列的递氢和递电子体, 按一定顺序排列成相互关联的链状, 可将还原氢传递给氧生成水, 同时释放出的能量用于 ATP 合成。

2. 基质导入序列 (matrix-targeting sequence, MTS): 是定位于输入线粒体的蛋白质的 N-端、由 20~50 个氨基酸残基组成的特殊序列, 带正电荷, 富含精氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸, 介导细胞质中的蛋白质向线粒体的转运。

3. 细胞呼吸 (cellular respiration): 在细胞特定的细胞器 (主要是线粒体) 内, 在 O_2 的参与下, 分解各种大分子物质, 产生 CO_2 , 与此同时, 分解代谢所释放出的能量储存于 ATP 中, 这一过程称为细胞呼吸, 也称为生物氧化或细胞氧化, 是细胞内提供生物能源的主要途径。

4. 化学渗透假说 (chemiosmotic coupling hypothesis): 该假说认为氧化磷酸化耦联的基本原理是电子传递中的自由能差造成 H^+ 穿膜传递, 暂时转变为横跨线粒体内膜的电化学质子梯度。然后, 质子顺梯度回流并释放出能量, 驱动结合在内膜上的 ATP 合酶, 催化 ADP 磷酸化合成 ATP。

5. 基粒 (elementary particle): 又称 ATP 合酶 (ATP synthase), 是线粒体内膜 (包括嵴) 的内表面附着的许多突出于基质腔的颗粒。分为头部、柄部、基片三部分, 由多种蛋白质亚基组成, 头部有酶活性, 是生成 ATP 的关键部位。

6. 转位接触点 (translocation contact site): 位于线粒体的内、外膜上存在的一些内膜与外膜相互接触的地方, 局部膜间隙变狭窄, 其间分布有物质进出线粒体的通道蛋白和特异性受体, 包括内膜转位子和外膜转位子。

7. 热休克蛋白 (heat shock protein, HSP): 属于分子伴侣蛋白, 可以与部分折叠或没有折叠的蛋白质分子结合, 稳定它们的构象, 使其免遭其他酶的水解, 或促进蛋白质折叠成正确的空间结构, 但并不参与最终产物的形成。

8. 线粒体动力学 (mitochondrial dynamics): 活细胞中的线粒体可持续不断地进行分裂与融合, 线粒体可相互融合连接形成网络状结构, 也可以分裂形成彼此分散存在的个体, 这种动态变化被称为线粒体动力学。

二、单项选择题

1. D 2. C 3. C 4. D 5. A 6. E 7. A 8. A 9. B 10. D
 11. A 12. C 13. E 14. D 15. A 16. D 17. A 18. D 19. A 20. B
 21. D 22. D 23. A 24. E 25. A 26. B 27. D 28. C 29. C 30. D
 31. B 32. B 33. B 34. B 35. A 36. B 37. D 38. D 39. B 40. C

三、多项选择题

1. ABD 2. BDE 3. ABC 4. ABCDE 5. AC
 6. ABC 7. ABC 8. AD 9. ACE 10. AC

(目 品)

第七章

细胞骨架与细胞的运动

一、名词解释

1. 细胞骨架 (cytoskeleton)
2. 微管 (microtubule)
3. 微管组织中心 (microtubule organizing center, MTOC)
4. 中心体 (centrosome)
5. 马达蛋白 (motor protein)
6. 微丝 (microfilament, MF)
7. 细胞皮层 (cell cortex)
8. 应力纤维 (stress fiber)
9. 中间纤维 (intermediate filament)
10. γ -微管蛋白环形复合体 (γ -tubulin ring complex, γ -TuRC)

二、单项选择题

1. 细胞质中,组成单管管壁的原纤维根数是
A. 9 B. 13 C. 23 D. 26 E. 33
2. 细胞骨架不参与下列细胞活动或细胞结构的是
A. 细胞迁移 B. 有丝分裂 C. 胞吞作用
D. 有被小泡 E. 信号转导
3. 下列不属于中间纤维蛋白的是
A. 单体隔离蛋白 B. 结蛋白 C. 波形蛋白
D. 角蛋白 E. 核纤层蛋白
4. 下列不属于微管的功能的是
A. 参与色素颗粒的运输 B. 参与构成鞭毛、纤毛 C. 构成伪足
D. 参与细胞内信号转导 E. 维持高尔基复合体的位置
5. 中间纤维装配最常见的调节方式是
A. 磷酸化 B. 糖基化 C. 泛素化
D. 甲基化 E. 羟基化
6. 核纤层蛋白属于
A. 微管蛋白 B. 肌动蛋白 C. 中间纤维蛋白
D. 驱动蛋白 E. 动力蛋白
7. 微管体外装配可分为三个时期,其中为微管的限速过程的是
A. 成核期 B. 聚合期 C. 延长期

- D. 稳定期 E. 平衡期
8. 微丝在聚合过程中所需要的能量形式是
A. ATP B. ADP C. GTP
D. GDP E. CTP
9. 下列以微丝为运行轨道的马达蛋白是
A. 微管蛋白 B. 动力蛋白 C. 驱动蛋白
D. 肌动蛋白 E. 肌球蛋白
10. 使用秋水仙素可抑制细胞的有丝分裂并使其停滞于
A. 间期 B. 前期 C. 中期 D. 后期 E. 末期
11. 下列基因的突变可导致大疱性表皮松解症的是
A. GLUT-1 B. SGLT C. keratin-5 D. tau E. LDL-R
12. 可作为细胞中微管组织中心的结构是
A. 星体微管 B. 中心体 C. 中心粒 D. 纤毛 E. 鞭毛
13. 微丝组装过程中,当微丝长度基本不变,正端延长长度等于负端缩短长度时,微丝处于
A. 成核期 B. 聚合期 C. 延长期 D. 限速期 E. 平衡期
14. 微管在聚合过程中所需要的能量形式是
A. ATP B. ADP C. GTP D. GDP E. CTP
15. 具有组织特异性分布的细胞骨架成分是
A. α 管蛋白 B. β 管蛋白 C. γ 微管蛋白
D. G-肌动蛋白 E. 角蛋白
16. 影响微管组装的主要条件中,不包括
A. GTP 浓度 B. 微管蛋白的浓度 C. 秋水仙素
D. 温度 E. 压力
17. 纤毛和鞭毛体部的微管均以“9+2”形式构成,其中
A. “2”表示 2 个单管 B. “9”表示 9 个单管
C. “2”表示 2 个二联管 D. “9”表示 9 个三联管
E. “2”表示 2 个三联管
18. 构成细胞皮层的主要成分是
A. 微管蛋白 B. 核纤层蛋白 C. 肌球蛋白
D. 马达蛋白 E. 肌动蛋白
19. 主要由微管构成的细胞结构是
A. 鞭毛 B. 伪足 C. 核纤层
D. 微绒毛 E. 细胞皮层
20. 影响微丝组装的最关键的因素是
A. ATP 和肌动蛋白的浓度 B. ATP 和温度 C. GTP 和温度
D. GTP 和肌动蛋白的浓度 E. 肌动蛋白的浓度和温度
21. 能够促进微管聚合的药物是
A. 紫杉醇 B. 长春花碱 C. 秋水仙素
D. 细胞松弛素 B E. 鬼笔环肽
22. 关于细胞松弛素 B 的叙述,错误的是

- A. 抑制微丝聚合
B. 对微管没作用
C. 可抑制细胞的吞噬
D. 去除药物后细胞功能可恢复
E. 可影响肌肉收缩
23. 导致人纤毛不动综合征的结构异常是
A. 动力蛋白臂缺失
B. 中央微管缺失
C. 中央微管异常
D. 轴丝缺乏
E. tau 蛋白过度磷酸化
24. 可介导物质沿微管负端向正端运动的马达蛋白是
A. MAP-1
B. MAP-2
C. tau
D. 驱动蛋白
E. 动力蛋白
25. 构成微丝的主要成分是
A. 肌球蛋白
B. 交联蛋白
C. 肌动蛋白
D. 毛缘蛋白
E. 结蛋白
26. 鞭毛和纤毛基体的微管排列方式是
A. 9+2
B. 9+0
C. 9×2
D. 9×3
E. 9×2+2
27. 细胞分裂进入末期时,核纤层蛋白发生
A. 磷酸化
B. 去磷酸化
C. 甲基化
D. 去甲基化
E. 泛素化
28. 影响微管组装的最关键的因素是
A. ATP 和微管蛋白的浓度
B. ATP 和温度
C. GTP 和温度
D. GTP 和微管蛋白的浓度
E. 微管蛋白的浓度和温度
29. 下列关于中间纤维的组装的正确叙述是
A. 受 ATP 调节
B. 受中间纤维单体浓度的影响
C. 受 Triton X-100 的影响
D. 受浓盐溶液的影响
E. 受丝氨酸残基磷酸化的调节
30. 下列参与构成有丝分裂器的细胞骨架结构是
A. 核纤层
B. 核基质
C. 中心体
D. 动粒
E. 收缩环
31. 波形蛋白主要分布于
A. 肌细胞
B. 表皮细胞
C. 血管内皮细胞
D. 神经细胞
E. 成纤维细胞
32. 可介导物质沿微管正端向负端运动的马达蛋白是
A. MAP-1
B. MAP-2
C. tau
D. 驱动蛋白
E. 动力蛋白
33. 下列以微丝为主要组成的细胞结构是
A. 纤毛
B. 鞭毛
C. 细胞皮层
D. 核纤层
E. 纺锤体
34. γ -微管蛋白位于
A. 细胞膜
B. 细胞核
C. 中心体
D. 线粒体
E. 鞭毛体部
35. 肌动蛋白不参与的细胞结构是
A. 微绒毛
B. 粗肌丝
C. 应力纤维

D. 片状伪足 E. 收缩环

36. 使用细胞松弛素 B 作用于成纤维细胞后,发现细胞突起回缩,细胞形状变圆;经充分清洗、继续培养 2h 后,发现细胞形状又接近正常,表明细胞松弛素 B
- A. 不可逆地抑制微管聚合 B. 不可逆地抑制微丝解聚
C. 抑制微丝解聚且具有可逆性 D. 不可逆地抑制微丝聚合
E. 抑制微丝聚合且具有可逆性
37. 下列属于微管功能的是
- A. 参与锚定连接的形成 B. 参与核孔定位 C. 参与细胞运动
D. 参与肌肉收缩 E. 参与胞质分裂
38. 下列关于中间纤维极性的错误叙述是
- A. 中间纤维蛋白具有极性 B. 螺旋二聚体具有极性 C. 四聚体不具有极性
D. 中间纤维的两端是相同的 E. 中间纤维沿纤维长轴上具有不对称性
39. 关于肌动蛋白的错误叙述是
- A. 由两个亚基组成 B. 装配时蛋白单体首尾相接
C. 含有阳离子结合位点 D. 有 GTP 结合位点
E. 蛋白单体具有极性
40. 关于微丝功能的叙述,错误的是
- A. 参与细胞的迁移 B. 参与染色单体的分离
C. 参与细胞形态的维持 D. 参与微绒毛的组成
E. 参与胞质分裂
41. 在体内装配时,微丝的成核作用发生在
- A. 中心体 B. MTOC C. 细胞核
D. 星体 E. 质膜
42. 中间纤维在组装过程中,非极性结构起始于
- A. 单体 B. 二聚体 C. 四聚体
D. 八聚体 E. 原纤维
43. 下列影响微丝装配的因素是
- A. ATP B. GTP C. 紫杉醇
D. 秋水仙素 E. 长春新碱
44. 下列关于中间纤维的错误叙述是
- A. 可见于细胞核中 B. 分布具有组织特异性 C. 参与构成锚定连接
D. 由管家基因编码 E. 参与核膜崩解和重建
45. 非稳态动力学模型认为影响微管组装的主要因素是
- A. ATP B. GTP C. pH
D. 温度 E. 离子浓度
46. 下列可用于特异性地显示微丝在细胞内分布的是
- A. 紫杉醇 B. 长春新碱 C. 细胞松弛素 B
D. 肌动蛋白抗体 E. 肌球蛋白抗体
47. 能够与微丝结合而抑制微丝解聚的药物是
- A. 紫杉醇 B. 长春新碱 C. 秋水仙素

- D. 鬼笔环肽
E. 细胞松弛素 B
48. 中间纤维组装的基础亚单位是
A. 七位复件
B. 中间纤维蛋白单体
C. 螺旋二聚体
D. 四聚体
E. 八聚体
49. 在白细胞变形游走的过程中,涉及
A. 微丝和微丝结合蛋白的相互作用
B. 微管和微管结合蛋白的相互作用
C. 钙黏着蛋白对内皮细胞的黏附作用
D. 通过微管的解聚促进细胞变形
E. 中间纤维蛋白的磷酸化作用
50. 下列关于细胞骨架在有丝分裂中作用的叙述,正确的是
A. 微丝在染色单体分离中起主要作用
B. 微丝参与纺锤体的形成
C. 微管和微管结合蛋白参与收缩环的形成
D. 中间纤维参与核膜的崩解
E. 微管参与胞质分裂
51. 角蛋白主要分布于
A. 肌细胞
B. 表皮细胞
C. 神经细胞
D. 白细胞
E. 成纤维细胞
52. 关于细胞运动的正确叙述是
A. 细胞通过纤毛摆动进行游走
B. 细胞通过鞭毛摆动清除细胞表面异物
C. 精子细胞运动涉及二联管间的滑动
D. 细胞运动与微丝无关
E. 微管聚合可促进细胞伪足的形成
53. 关于 Rho GTP 酶家族的错误叙述是
A. Cdc42 的活化可促进肌动蛋白聚合
B. Cdc42 的活化可促进丝状伪足的形成
C. Rac 的活化可促进片状伪足形成
D. Rac 的活化可促进微绒毛的形成
E. Rho 活化可促进应力纤维的形成
54. 动物细胞中微管的负极位于
A. 内质网
B. 中心体
C. 细胞膜
D. 细胞核
E. 线粒体
55. 核纤层蛋白主要分布于
A. 肌细胞
B. 神经细胞
C. 神经干细胞
D. 表皮细胞
E. 各种类型细胞
56. 与游离的肌动蛋白单体结合后使其聚合的是
A. GTP
B. GDP
C. ATP
D. ADP
E. UTP
57. 只存在于轴突中的微管结合蛋白是
A. MAP-1
B. MAP-2
C. MAP-4
D. tau
E. 肌球蛋白
58. 关于阿尔茨海默病的错误叙述是

- A. 患者的神经细胞中可见不溶性神经纤维缠结
- B. 与 tau 蛋白的过度磷酸化有关
- C. 患者的神经细胞中微管蛋白数量显著减少
- D. 患者的神经细胞中存在微管聚集缺陷
- E. 患者的神经细胞中微管稳定性降低

59. 下列关于中间纤维结构的错误叙述是

- A. 均含 4 段高度保守的 α -螺旋
- B. 亚基装配时靠 α -螺旋配对形成二聚体
- C. 均含有中间杆状区
- D. 均含 3 段间隔区
- E. N 端和 C 端均呈无规则卷曲状

60. 下列关于培养细胞爬行过程的错误叙述是

- A. 通过肌动蛋白聚合形成伪足
- B. 通过微丝与微丝结合蛋白相互作用介导微丝生长
- C. 肌动蛋白在中心体处成核
- D. ARP2/3 复合物促进片状伪足的形成
- E. 需要整联蛋白的参与

三、多项选择题

1. 中间纤维组装过程中,具有极性的是

- A. 单体
- B. 二聚体
- C. 四聚体
- D. 八聚体
- E. 原纤维

2. 下列属于细胞中微管组织中心的结构是

- A. 纺锤体
- B. 中心体
- C. 纤毛基体
- D. 鞭毛基体
- E. 鞭毛

3. 以下药物可以直接抑制动物细胞的胞质分裂的是

- A. 秋水仙素
- B. 肌球蛋白抗体
- C. 细胞松弛素
- D. 微管蛋白抗体
- E. 肌动蛋白抗体

4. 下列属于马达蛋白的是

- A. 微管蛋白
- B. 肌动蛋白
- C. 驱动蛋白
- D. 动力蛋白
- E. 肌球蛋白

5. 中间纤维组装的动态调节方式包括

- A. 甲基化
- B. 磷酸化
- C. 泛素化
- D. 去甲基化
- E. 去磷酸化

6. 参与构成细胞连接的细胞骨架成分是

- A. 微管
- B. 微丝
- C. 中间纤维
- D. 钙黏着蛋白
- E. 整联蛋白

7. 中间纤维组装过程中,呈非极性的结构是

- A. 单体
- B. 二聚体
- C. 四聚体
- D. 八聚体
- E. 原纤维

8. 鬼笔环肽可影响的细胞活动是

- A. 胞质分裂
- B. 肌肉收缩
- C. 纺锤体的形成
- D. 变形运动

E. 肠上皮细胞的吸收作用

9. 动物细胞中微管的负极位于

A. 鞭毛基体

B. 中心体

C. 纤毛基体

D. 纤毛

E. 鞭毛

10. 下列药物只抑制胞质分裂的是

A. 长春花碱

B. 紫杉醇

C. 秋水酰胺

D. 细胞松弛素

E. 鬼笔环肽

参考答案

一、名词解释

1. 细胞骨架(cytoskeleton):真核细胞质中的蛋白质纤维网架体系,包括微管、微丝和中间纤维。对于细胞的形状、细胞的运动、细胞内物质运输、染色体的分离和细胞分裂等起重要作用。

2. 微管(microtubule):真核细胞中普遍存在的细胞骨架成分之一,是由微管蛋白和微管结合蛋白组成的中空圆柱状结构,参与细胞形态的维持、膜性细胞器的定位、胞内物质运输、细胞运动和细胞分裂等。

3. 微管组织中心(microtubule organizing center, MTOC):细胞质中微管组装的起始点和核心,常见的有中心体、鞭毛和纤毛基体。对微管的形成、微管极性的确定及细胞分裂中纺锤体的形成起重要作用。

4. 中心体(centrosome):是动物细胞中与微管形成和细胞分裂密切相关的细胞器,包括中心粒和中心粒旁物质。在细胞间期,位于细胞核的附近,在有丝分裂期,位于纺锤体的两极。

5. 马达蛋白(motor protein):指指导细胞内物质沿细胞骨架运输的蛋白。包括动力蛋白、驱动蛋白和肌球蛋白三大家族。其中驱动蛋白和动力蛋白是以微管作为运行轨道,而肌球蛋白则是以肌动蛋白纤维作为运行轨道。

6. 微丝(microfilament, MF):又称肌动蛋白丝,是普遍存在于真核细胞中,由肌动蛋白组成的细丝,以束状、网状等方式存在于细胞质中,参与细胞形态维持、细胞运动等功能。

7. 细胞皮层(cell cortex):也叫肌动蛋白皮层,是指细胞质膜下方的一层由微丝和各种微丝结合蛋白组成的网状结构,具有很高的动态性,为细胞膜提供强度和韧性,维持细胞形态。

8. 应力纤维(stress fiber):是真核细胞中广泛存在的由微丝束构成的较为稳定的纤维状结构,紧邻质膜下方,常与细胞的长轴大致平行并贯穿细胞的全长,具有收缩功能。

9. 中间纤维(intermediate filament):由中间纤维蛋白聚合而成,是细胞骨架中最复杂的一种蛋白质纤维系统,由于其直径介于微管和微丝之间而得名。与细胞连接、物质运输、细胞核稳定等密切相关。

10. γ -微管蛋白环形复合体(γ -tubulin ring complex, γ -TuRC):含有 10~13 个 γ -微管蛋白分子的环形结构,与微管直径相同,可刺激微管核心形成,影响微管从中心粒上的释放。

二、单项选择题

1. B 2. D 3. A 4. C 5. A 6. C 7. A 8. A 9. E 10. C
 11. C 12. B 13. E 14. C 15. E 16. E 17. A 18. E 19. A 20. A
 21. A 22. E 23. A 24. D 25. C 26. B 27. B 28. D 29. E 30. C
 31. E 32. E 33. C 34. C 35. B 36. E 37. C 38. E 39. D 40. B

41. E 42. C 43. A 44. D 45. B 46. D 47. D 48. D 49. A 50. D
 51. B 52. C 53. D 54. B 55. E 56. C 57. D 58. C 59. E 60. C

三、多项选择题

1. AB 2. BCD 3. BCE 4. CDE 5. BE
 6. BC 7. CDE 8. AD 9. ABC 10. DE

(于敏)

- A. DNA 和组蛋白
 B. RNA 和蛋白质
 C. 核小体
 D. 核小体蛋白
11. 下列物质不能由细胞骨架参与完成的是
 A. 细胞运动
 B. 细胞分裂
 C. 细胞内物质运输
 D. 细胞内信号转导
12. 下列物质不属于细胞骨架成分的是
 A. 微管
 B. 微丝
 C. 中间丝
 D. 核纤丝
13. 下列物质不属于细胞骨架成分的是
 A. 微管
 B. 微丝
 C. 中间丝
 D. 核纤丝
14. 下列物质不属于细胞骨架成分的是
 A. 微管
 B. 微丝
 C. 中间丝
 D. 核纤丝
15. 下列物质不属于细胞骨架成分的是
 A. 微管
 B. 微丝
 C. 中间丝
 D. 核纤丝
16. 下列物质不属于细胞骨架成分的是
 A. 微管
 B. 微丝
 C. 中间丝
 D. 核纤丝
17. 下列物质不属于细胞骨架成分的是
 A. 微管
 B. 微丝
 C. 中间丝
 D. 核纤丝
18. 下列物质不属于细胞骨架成分的是
 A. 微管
 B. 微丝
 C. 中间丝
 D. 核纤丝
19. 下列物质不属于细胞骨架成分的是
 A. 微管
 B. 微丝
 C. 中间丝
 D. 核纤丝

第八章

细胞核

一、名词解释

1. 核纤层 (nuclear lamina)
2. 亲核蛋白 (karyophilic protein)
3. 染色质 (chromatin)
4. 常染色质 (euchromatin)
5. 异染色质 (heterochromatin)
6. 核型 (karyotype)
7. 核小体 (nucleosome)
8. 核孔 (nuclear pore)

二、单项选择题

1. 不参与染色质构成的是
A. 组蛋白 B. 非组蛋白 C. DNA
D. RNA E. 脂类
2. 关于核膜的错误叙述是
A. 由两层单位膜组成 B. 与内质网相连续 C. 有核孔复合体
D. 外核膜有核糖体附着 E. 染色质直接附着于内核膜
3. 组成核小体核心颗粒的组蛋白八聚体是
A. $2H1+2H2A+2H3+2H4$ B. $2H1+2H2A+2H3+2H4$
C. $2H1+2H2A+2H2B+2H4$ D. $2H1+2H2B+2H3+2H4$
E. $2H2A+2H2B+2H3+2H4$
4. 关于细胞核的错误叙述是
A. 有无细胞核是原核细胞与真核细胞的主要区别
B. 细胞核的主要功能是贮存遗传信息
C. 细胞核的形态常与细胞的形态相适应
D. 一个真核细胞只能有一个细胞核
E. 核仁存在于细胞核内
5. 电镜下观察到的核膜内侧高电子密度物质是
A. RNA B. 组蛋白 C. 异染色质
D. 常染色质 E. 核仁
6. 细胞核内最重要的物质是
A. 核蛋白 B. 组蛋白 C. 非组蛋白

- D. RNA
E. DNA
7. 染色体形态特征最明显的有丝分裂时期是
A. 前期
B. 前中期
C. 中期
D. 后期
E. 末期
8. 组成核小体的主要物质是
A. DNA 和组蛋白
B. RNA 和组蛋白
C. DNA 和非组蛋白
D. RNA 和非组蛋白
E. DNA 和 RNA
9. 下列物质不能自由通过核孔复合体进行转运的是
A. K^+
B. 双糖
C. 氨基酸
D. 核糖体蛋白
E. 核苷酸
10. 蛋白质合成旺盛的细胞所具有的特点是
A. 细胞体积明显增大
B. 细胞体积明显减小
C. 核仁明显增大
D. 核仁明显减小
E. 异染色质比例增加
11. 染色质的基本结构单位是
A. 染色单体
B. 祥环
C. 核小体
D. 螺线管
E. 超螺线管
12. 下列不属于核孔复合体结构的是
A. 胞质环
B. 核质环
C. 辐
D. 核纤层
E. 中央栓
13. 具有组织特异性的组蛋白是
A. H3 和 H2A
B. H4 和 H2B
C. H3 和 H4
D. H2A 和 H2B
E. H1
14. 下列组蛋白中,结合在连接 DNA 分子上并参与染色质高级结构形成的是
A. H1
B. H2A
C. H2B
D. H3
E. H4
15. 下列不属于核仁结构的是
A. 纤维中心
B. 颗粒组分
C. 致密纤维组分
D. 核纤层
E. 核仁基质
16. 常染色质与异染色质的相同点是
A. 在核内的分布
B. 功能状态
C. 转录活性
D. 折叠和螺旋化程度
E. 化学组成
17. 亲核蛋白之所以能通过核孔复合体进入核内,是因为其具有
A. 核定位信号
B. 亲水的 N 端
C. 疏水的 C 端
D. 多个 α 螺旋结构
E. 多个 β 折叠结构
18. 关于异染色质的正确叙述是
A. 螺旋化程度高
B. 具有较高转录活性
C. 在 S 期比常染色质先复制
D. 位于核中央
E. 螺旋化程度低
19. 核糖体大亚基的装配场所是
A. 内质网
B. 高尔基复合体
C. 核仁
D. 核膜
E. 细胞质

20. 关于核定位信号的**错误**叙述是
- 含有碱性氨基酸
 - 亲核蛋白入核需要核定位信号
 - 核定位信号可位于蛋白质任何部位
 - 核蛋白入核后核定位信号会被切除
 - 核定位信号是从病毒研究中被发现的
21. 关于核仁的**错误**叙述是
- 一个细胞有一个或多个核仁
 - 核仁的主要成分为蛋白质、RNA 和 DNA
 - 核仁的形成与核仁组织者有关
 - 核仁只存在于细胞核内
 - 在有丝分裂间期,核仁消失
22. 唐氏综合征(Down syndrome)患者多出的一条染色体是
- A. 7 B. 9 C. 15 D. 17 E. 21
23. 下列**不属于**亲核蛋白的是
- 核糖核蛋白
 - 组蛋白
 - RNA 聚合酶
 - N-乙酰葡萄糖胺转移酶
 - 转录因子
24. 动物细胞遗传物质 DNA 的分布是
- 仅在细胞核中
 - 仅在线粒体中
 - 在细胞核和线粒体中
 - 在细胞核和内质网中
 - 在细胞核和高尔基复合体中
25. 下列蛋白中与核纤层蛋白含有同源的 α -螺旋区氨基酸顺序的是
- 微管蛋白
 - 肌动蛋白
 - MAP-4
 - 角蛋白
 - 肌球蛋白
26. 下列**不属于**核仁功能的是
- 转录 5S rRNA
 - 转录 45S rRNA
 - 核糖体大亚基的装配
 - 核糖体小亚基的装配
 - 剪切 45S rRNA
27. 关于核膜的**错误**叙述是
- 为基因表达提供隔离屏障
 - 内核膜核质侧附着有核纤层
 - 核膜是一种不对称的双层膜结构
 - 外核膜表面虽附有核糖体,但并不合成蛋白质
 - 核孔复合体是由多种蛋白质构成的复合结构
28. 常染色质是指间期细胞核中
- 螺旋化程度低的无转录活性染色质
 - 螺旋化程度低的有转录活性的染色质
 - 螺旋化程度高的无转录活性的染色质
 - 螺旋化程度高的有转录活性的染色质
 - 位于核膜内侧

29. 细胞内合成 rRNA 的部位是
- A. 核糖体
B. 核仁
C. 糙面内质网
D. 光面内质网
E. 高尔基复合体
30. 下列不属于中度重复序列的基因是
- A. rRNA 基因
B. DNA 解旋酶基因
C. tRNA 基因
D. 核糖体蛋白的基因
E. 组蛋白的基因
31. 成熟核糖体装配的场所是
- A. 核膜
B. 核基质
C. 内质网
D. 胞质溶胶
E. 核仁
32. 染色质二级结构是
- A. 祥环
B. 螺线管
C. 超螺线管
D. 核小体
E. 染色单体
33. 下列蛋白所携带的信号序列在到达目的结构后不被切除的是
- A. 核纤层蛋白
B. ATP 合成酶
C. Grp94
D. 葡萄糖-6-磷酸酶
E. 胶原蛋白
34. 每个核小体包含的 DNA 片段长度是
- A. 143bp
B. 200bp
C. 400bp
D. 50bp
E. 60bp
35. 间期核中核仁的大小主要取决于
- A. 纤维中心
B. 致密纤维组分
C. 颗粒组分
D. 核仁相随染色质
E. 核基质
36. 染色体中保证遗传物质自我复制及平均分配的序列是
- A. 着丝粒序列 + 端粒序列 + 随体
B. 复制源序列 + 着丝粒序列 + 随体
C. 着丝粒序列 + 随体 + 端粒序列
D. 复制源序列 + 着丝粒序列 + 端粒序列 + 动粒
E. 复制源序列 + 着丝粒序列 + 端粒序列
37. 有关非组蛋白的错误叙述是
- A. 具有种属特异性
B. 数量少,种类多
C. 整个周期都能合成
D. 调控基因的转录
E. 是一类带正电荷的碱性蛋白质
38. 有关端粒的错误表述是
- A. 位于染色体的末端
B. 对染色体起保护作用
C. 在细胞的衰老、死亡中起作用
D. 保证染色体末端的完全复制
E. 在间期表现为常染色质
39. 关于核孔复合体介导物质运输的错误叙述是
- A. 主动运输时需要核定位信号的介导
B. 分为主动运输和被动运输
C. 主动运输的功能孔径比被动运输大
D. 需要 Ran-ATP

- E. 捕鱼笼模型是目前普遍接受的核孔复合体模型
40. 核仁中包含处于不同转录阶段 rRNA 分子的区域是
 A. 纤维中心
 B. 致密纤维组分
 C. 颗粒组分
 D. 核仁相随染色质
 E. 核仁基质
41. 下列关于核纤层和核纤层蛋白的错误叙述是
 A. 核纤层蛋白具有激酶活性,可以直接磷酸化 MPF
 B. 核纤层参与核膜的崩解与重建过程
 C. 核纤层具有维持细胞核形状的功能
 D. 核纤层蛋白与波形蛋白在 α -螺旋区有 70% 的氨基酸相同
 E. 核纤层蛋白磷酸化,导致核纤层解聚
42. 由 RNA 聚合酶 I 催化合成的是
 A. 45S rRNA
 B. 5S RNA
 C. mRNA
 D. tRNA
 E. miRNA
43. 下列蛋白中,含有核定位信号的是
 A. 雄激素受体
 B. 表皮生长因子
 C. 胰岛素
 D. 表皮生长因子受体
 E. 胶原蛋白
44. 与正常细胞相比,肿瘤细胞中可能出现的变化是
 A. 异染色质增加
 B. 核膜皱缩
 C. 核仁缩小
 D. 核孔数目增多
 E. 核质比降低
45. 细胞核与细胞质之间的物质转运通道被称为
 A. 核孔
 B. 核间隙
 C. 外核膜
 D. 内核膜
 E. 核纤层
46. 核膜的区域化作用是指
 A. 防止小分子的自由扩散
 B. 使不同种类蛋白质在不同区域合成
 C. 使 DNA 的复制和转录分区进行
 D. 使 RNA 的合成和加工分区进行
 E. 使 DNA 复制、转录与蛋白质翻译过程分区进行
47. 构成核糖体小亚基的 rRNA 是
 A. 5S rRNA
 B. 5.8S rRNA
 C. 18S rRNA
 D. 28S rRNA
 E. 20S rRNA
48. 与 DNA 复制起始有关的序列是
 A. 端粒
 B. 着丝粒
 C. 复制源
 D. 启动子
 E. 动粒
49. 关于组蛋白的错误叙述是
 A. 富含碱性氨基酸
 B. 合成于 S 期
 C. 可通过甲基化修饰调节基因转录
 D. 都具有种属和组织特异性
 E. 与 DNA 结合构成染色体
50. 45S rRNA 被剪切后形成的 rRNA 类型是
 A. 32S、18S、5.8S
 B. 28S、18S、5.8S
 C. 28S、18S、5S

3. 下列物质可通过核孔进入细胞核的是
 - A. 核小体组蛋白
 - B. 核糖体蛋白
 - C. 转录因子
 - D. RNA 剪切因子
 - E. RNA 聚合酶
4. 关于核纤层功能的正确叙述是
 - A. 对核膜起支持和固定作用
 - B. 与核膜的崩解和重建密切相关
 - C. 与染色质凝集成染色体相关
 - D. 参与 DNA 的复制
 - E. 参与蛋白质的合成
5. 间期细胞核的基本结构包括
 - A. 核被膜
 - B. 核仁
 - C. 染色质
 - D. 核基质
 - E. 核纤层
6. 染色质 DNA 包含的功能序列是指
 - A. 单一序列
 - B. 复制源序列
 - C. 端粒序列
 - D. 着丝粒序列
 - E. 重复序列
7. 中期染色体的特征性结构包括
 - A. 着丝粒
 - B. 主缢痕
 - C. 端粒
 - D. 次缢痕
 - E. 随体
8. 核基质的主要功能有
 - A. 作为 DNA 复制的支架
 - B. 参与基因转录
 - C. 参与染色体的构建
 - D. 参与核膜的重建
 - E. 参与核质间物质交换
9. 肿瘤细胞染色质结构异常的主要表现是
 - A. 易位
 - B. 重复
 - C. 倒位
 - D. 缺失
 - E. 环状
10. 细胞核的功能包括
 - A. 遗传信息的储存
 - B. 遗传信息的复制
 - C. 遗传信息的转录
 - D. RNA 的加工
 - E. 成熟核糖体的装配

参考答案

一、名词解释

1. 核纤层 (nuclear lamina): 位于内核膜内侧与染色质之间的一层由核纤层蛋白组成的片层结构, 在细胞分裂中对核膜的破裂和重建起调节作用。
2. 亲核蛋白 (karyophilic protein): 由游离核糖体合成、经核孔转运入细胞核发挥作用的蛋白质, 一般都有一段特殊的氨基酸信号序列——核定位序列, 保证蛋白质通过核孔复合体向核内输入。
3. 染色质 (chromatin): 是间期细胞遗传物质的存在形式, 由 DNA、组蛋白、非组蛋白及少量 RNA 构成的细丝状复合结构。
4. 常染色质 (euchromatin): 间期细胞核内碱性染料着色较浅、处于伸展状态的染色质细丝, 螺旋化程度较低, 具有基因转录活性。常位于细胞核中央。
5. 异染色质 (heterochromatin): 是指间期细胞核中, 螺旋化程度高, 处于凝缩状态, 用碱性染料染色时着色较深的染色质, 一般位于核的边缘或围绕在核仁的周围, 是转录不活跃或者无转录活性的染色质。

6. 核型(karyotype):是指一个体细胞中的全部染色体,按其大小、形态特征顺序排列所构成的图像。

7. 核小体(nucleosome):是染色体的基本结构单位,由 200bp 左右的 DNA 分子、一个组蛋白八聚体及一分子 H₁ 组蛋白构成,是染色质组装的一级结构。

8. 核孔(nuclear pore):是内外核膜在某些部位相互融合形成的圆环状结构,由多种蛋白质构成,也称核孔复合体,是细胞核与细胞质之间物质交换的通道。

二、单项选择题

- 1. E 2. E 3. E 4. D 5. C 6. E 7. C 8. A 9. D 10. C
- 11. C 12. D 13. E 14. A 15. D 16. E 17. A 18. A 19. C 20. D
- 21. E 22. E 23. D 24. C 25. D 26. A 27. D 28. B 29. B 30. B
- 31. D 32. B 33. A 34. B 35. C 36. E 37. E 38. E 39. D 40. B
- 41. A 42. A 43. A 44. D 45. A 46. E 47. C 48. C 49. D 50. B
- 51. A 52. E 53. D 54. B 55. C 56. E 57. B 58. C 59. B 60. B

三、多项选择题

- 1. ABC 2. ABDE 3. ABCDE 4. ABCD 5. ABCD
- 6. BCD 7. ABCDE 8. ABC 9. ABCDE 10. ABCD

(文斗斗)

第九章

细胞内遗传信息的传递及调控

一、名词解释

1. 基因组 (genome)
2. 外显子 (exon)
3. 顺式作用元件 (*cis*-acting element)
4. 翻译 (translation)
5. 遗传密码 (genetic code)
6. 启动子 (promoter)
7. 操纵子 (operon)
8. 转录因子 (transcription factor, TF)
9. 染色质重塑 (chromatin remodeling)

二、单项选择题

1. 下列关于真核生物结构基因的说法中,错误的是
A. 结构基因大都为断裂基因
B. 结构基因的转录是不连续的
C. 编码序列被非编码序列所隔断
D. 结构基因在基因组中所占比例较小
E. 产物多为单顺反子 RNA
2. 将一段 DNA 序列插入某基因启动子下游,能够使该基因表达水平增加 4 倍,这段 DNA 序列具有的特征是
A. 操纵子
B. 反式作用因子
C. 增强子
D. 沉默子
E. 绝缘子
3. 关于蛋白质生物合成,叙述错误的是
A. 氨基酸必须活化
B. 必须有起始因子参与
C. 必须有 GTP 参与
D. mRNA 做模板
E. 可以在任意的 AUG 起始
4. 下列关于复制的错误叙述是
A. 形成 3',5'-磷酸二酯键
B. 子链的延伸方向是 5'→3'
C. 模板链的复制方向是 3'→5'
D. 子链走向与模板链复制方向相反
E. 子链一条延伸的方向是 5'→3',另一条延伸的方向是 3'→5'
5. 蛋白质生物合成过程中,终止密码子为
A. AUG
B. AGG
C. UAA
D. UUG
E. UUA
6. 遗传密码的简并性是指

- A. 密码子与反密码子配对不严格
 B. 大多数氨基酸有一个以上的密码子
 C. 一些三联体密码子可缺少一个嘌呤或嘧啶碱基
 D. 一些密码子适用于一种以上的氨基酸
 E. 所有生物使用同一套遗传密码
7. 直接以 DNA 为模板合成的物质是
 A. 转录因子
 B. 调节蛋白
 C. 引物酶
 D. hnRNA
 E. 反式作用因子
8. 真核生物转录终止修饰点序列是
 A. TATA box
 B. Pribnow 盒
 C. TTGACA
 D. ρ 因子
 E. AATAAA 和其下游 GT 序列
9. 参与 RNA 剪接的是
 A. mRNA
 B. tRNA
 C. snRNA
 D. 45S rRNA
 E. hnRNA
10. 关于转录因子(TF)的正确叙述是
 A. 本质是 DNA 分子
 B. 是真核生物的启动子
 C. 是原核生物 RNA 聚合酶的组分
 D. 是真核生物 RNA 聚合酶的组分
 E. 是真核生物转录调控中的反式作用因子
11. 人类基因组比大肠杆菌基因组大 700 倍左右,然而人类基因组复制的时间仅比大肠杆菌基因组复制长 6~8 倍,这是因为
 A. 人类基因组的 GC 含量低,两条链更容易解链
 B. 组蛋白的存在提高了人染色体 DNA 的复制速率
 C. 人染色体 DNA 上具有多个复制起始区,大肠杆菌只有一个
 D. 人基因组的许多序列不被复制
 E. 人染色质 DNA 复制贯穿整个细胞周期,而大肠杆菌的 DNA 复制每小时启动一次
12. 某 RNA 为 5'-UGACGA-3',与其对应的 DNA 双链中的编码链为
 A. 5'-ACTGCT-3'
 B. 5'-TCGTCA-3'
 C. 5'-TGACGA-3'
 D. 5'-UCGTCA-3'
 E. 5'-ACTGCU-3'
13. 真核细胞中由 RNA 聚合酶 I 催化生成的产物是
 A. mRNA
 B. hnRNA
 C. tRNA
 D. snRNA
 E. 45SRNA
14. 对基因表达的调控,不能发生在
 A. DNA 复制
 B. 转录起始
 C. 转录后调控
 D. 翻译起始
 E. 翻译后水平
15. 以下对真核生物 tRNA 合成的描述,错误的是
 A. 成熟的 tRNA 中含有内含子对应序列
 B. tRNA 前体在酶作用下切除 5'-和 3'-末端处多余的核苷酸
 C. RNA 聚合酶 III 参与 tRNA 前体的生成

- D. tRNA^{3'} - 末端需加上 CCA-OH
E. tRNA 前体还需要进行化学修饰加工
16. 蛋白质生物合成的方向是
A. 定点双向进行
B. 从 C 端到 N 端
C. 从 N 端到 C 端
D. 从 5' 端到 3' 端
E. 从 3' 端到 5' 端
17. 合成 DNA 的原料是
A. dAMP、dGMP、dCMP、dTTP
B. dATP、dGTP、dCTP、dTTP
C. dADP、dGDP、dCDP、dTDP
D. AMP、GMP、CMP、TMP
E. ATP、GTP、CTP、TTP
18. 有关遗传密码的错误描述是
A. 每种氨基酸至少有一个密码子
B. 位于 mRNA 分子上
C. 有起始密码子和终止密码子
D. 由 mRNA 排列顺序决定的
E. 所有密码子都负责编码氨基酸
19. 蛋白质合成过程中,需要形成碱基配对的步骤是
A. 移位
B. 进位
C. 转肽
D. 结合终止因子
E. 释放肽链
20. 下列关于遗传密码的描述,错误的是
A. 一种氨基酸可有一个以上的密码子
B. 遗传密码阅读有方向性,5' 端起始,3' 端终止
C. 遗传密码有种属特异性,所以不同生物合成不同的蛋白质
D. 密码子第 3 位碱基在决定掺入氨基酸的特异性方面重要性较小
E. 个别氨基酸的同义密码子可多达 6 个
21. 真核生物转录发生的部位是
A. 细胞核
B. 细胞质
C. 线粒体
D. 内质网
E. 微粒体
22. 氨酰-tRNA 合成酶的特点是
A. 只存在于细胞核内
B. 对氨基酸的识别没有专一性
C. 对 tRNA 的识别没有专一性
D. 催化反应需 GTP
E. 对氨基酸识别有专一性
23. 关于反式作用因子的描述,错误的是
A. 绝大多数反式作用因子属转录因子
B. 大多数的反式作用因子是 DNA 结合蛋白质
C. 指具有激活功能的调节蛋白
D. 包括基本转录因子和特异性转录因子
E. 通常含有 DNA 结合域
24. 不直接参与蛋白质合成的是
A. mRNA
B. 氨基酸
C. DNA
D. 蛋白因子
E. tRNA
25. 遗传密码的特点不包括
A. 通用性
B. 连续性
C. 多样性

- D. 某些基因表达经历基因转录及翻译等过程
E. 某些基因表达只经历基因转录过程
35. 关于基因表达调控的说法,错误的是
- A. 环境因素影响管家基因的表达
B. 转录起始是调控基因表达的关键
C. 在发育分化和适应环境上有重要意义
D. 表现为基因表达的时间特异性和空间特异性
E. 真核生物基因表达调控较原核生物复杂得多
36. 基因表达调控是多级的,其主要环节是
- A. 翻译
B. 基因活化
C. 转录
D. 转录后加工
E. 翻译后加工
37. 乳糖操纵子模型调节基因表达的环节是
- A. 复制水平
B. 转录水平
C. 转录后水平
D. 翻译水平
E. 翻译后水平
38. 下列关于启动子的叙述,正确的是
- A. 能与 RNA 聚合酶结合
B. 属于负性顺式调节元件
C. 能编码阻遏蛋白
D. 发挥作用的方式与方向无关
E. 位于操纵子的第一个结构基因处
39. 下列 RNA 分子中具有调节基因表达功能的是
- A. rRNA
B. tRNA
C. mRNA
D. hnRNA
E. siRNA
40. 下列物质与真核生物翻译起始无关的是
- A. AUG
B. 核糖体
C. RNA 聚合酶
D. 帽子结构
E. eIF
41. Lac 阻遏蛋白结合乳糖操纵子的
- A. 启动序列
B. 操纵序列
C. I 基因
D. CAP 结合位点
E. 结构基因
42. 外源基因在大肠杆菌中高效表达受很多因素影响,其中 SD 序列起的作用是
- A. 提供一个 mRNA 转录终止子
B. 提供一个 mRNA 转录起始子
C. 提供一个核糖体结合位点
D. 提供翻译终点
E. 提供选择性剪接位点
43. 蛋白质中可作为潜在的磷酸化修饰位点的氨基酸是
- A. 甘氨酸
B. 酪氨酸
C. 苯丙氨酸
D. 谷氨酸
E. 赖氨酸
44. 关于蛋白质生物合成叙述,错误的是
- A. 包括起始、延长、终止三个阶段
B. 延长阶段可以分为进位、成肽、转位三个步骤
C. 每个阶段都需要各种蛋白质因子参与
D. 蛋白质的合成过程就是翻译的过程
E. 原核生物在细胞液中完成,真核生物在细胞核中完成
45. 关于转录因子的描述,错误的是

- A. 指具有激活功能的特异性调节蛋白
 B. 通过蛋白质-蛋白质或 DNA-蛋白质相互作用来发挥作用
 C. 转录因子的调节作用可是 DNA 依赖或 DNA 非依赖
 D. 转录因子的调节作用通常属反式调节
 E. 转录因子都含有转录激活域和 DNA 结合域
46. 乳糖操纵子的调控方式是
 A. CAP 的正调控
 B. 阻遏蛋白的负调控
 C. 正、负调控机制不可能同时发挥作用
 D. CAP 拮抗阻遏蛋白的转录封闭作用
 E. 阻遏作用解除时,仍需 CAP 加强转录活性
47. 下列不属于真核基因顺式作用元件的是
 A. GC 盒
 B. TATA 盒
 C. CAAT 盒
 D. 增强子
 E. Pribnow 盒
48. 以下不影响染色质结构变化的是
 A. 染色质重塑
 B. 组蛋白修饰
 C. DNA 修饰
 D. mRNA 修饰
 E. 非编码 RNA
49. RNA 聚合酶识别并结合的 DNA 片段是
 A. 启动子
 B. 绝缘子
 C. 沉默子
 D. DNA 结合结构域
 E. 增强子
50. 下列不参与调控真核基因特异性表达的是
 A. 基本转录因子
 B. 转录抑制因子
 C. 转录激活因子
 D. 增强子
 E. 沉默子
51. 多肽链上可发生乙酰化修饰的氨基酸残基是
 A. 赖氨酸
 B. 酪氨酸
 C. 脯氨酸
 D. 甲酰甲硫氨酸
 E. 甲硫氨酸
52. 关于增强子作用特点的描述,错误的是
 A. 可远距离作用
 B. 无基因特异性
 C. 是顺式作用元件
 D. 某些增强子具有组织特异性
 E. 无需结合反式作用因子即能发挥作用
53. 真核生物转录时结合 RNA 聚合酶的蛋白质称为
 A. 启动子
 B. 增强子
 C. 转录因子
 D. σ 因子
 E. ρ 因子
54. 蛋白质合成终止不包括
 A. RF 进入 P 位
 B. 核糖体停止移动
 C. mRNA 从核糖体分离
 D. 肽链从核糖体释放
 E. 大小亚基分开
55. 下列关于转录后加工修饰反应描述错误的是
 A. 5'-端加上帽子结构
 B. 3'-端加多聚腺苷酸尾巴
 C. RNA 编辑
 D. 内含子去除
 E. 外显子对应序列去除

56. CpG 序列的高度甲基化对多数基因而言,是
- A. 染色质呈转录活性状态 B. 抑制转录 C. 促进转录
D. 既不抑制也不促进转录 E. 与基因表达无关
57. 关于内含子的叙述,正确的是
- A. hnRNA 除去外显子对应序列的过程称为剪接
B. hnRNA 除去内含子对应序列的过程称为剪接
C. hnRNA 上只有外显子对应序列而无内含子对应序列
D. 内含子对应序列可存在于成熟的 mRNA
E. 内含子对应序列没有任何功能
58. 核编码蛋白质合成的起始部位是
- A. 核小体 B. 线粒体 C. 游离核糖体
D. 细胞核 E. 附着核糖体
59. 核糖体 A 位功能是
- A. 接受游离氨基酸 B. 接受氨基酰-tRNA C. 活化氨基酸
D. 催化肽键形成 E. 释放肽链
60. DNA 复制发生在
- A. 内质网 B. 高尔基复合体 C. 核糖体
D. 细胞核 E. 细胞质

三、多项选择题

1. 直接以 DNA 为模板合成的物质是
- A. 转录因子 B. rRNA C. tRNA D. hnRNA E. lncRNA
2. 蛋白质生物合成过程中,终止密码子包括
- A. AUG B. UAG C. UAA D. UGA E. UUA
3. 下列过程属于转录后调控的是
- A. mRNA 的稳定性 B. mRNA 在核内的加工修饰
C. mRNA 的细胞质定位 D. mRNA 的转运
E. hnRNA 的形成
4. 蛋白质生物合成体系包括
- A. mRNA B. 氨基酸 C. DNA D. 起始因子 E. ATP
5. 遗传密码的基本特点是
- A. 通用性 B. 连续性 C. 摆动性 D. 简并性 E. 方向性
6. 肽链延长的步骤包括
- A. 进位 B. 成肽 C. 转位
D. 氨基酸活化 E. 结合核糖体
7. 下列属于真核细胞上游启动子的是
- A. GC 盒 B. TATA 盒 C. CAAT 盒
D. 增强子 E. Pribnow 盒
8. 蛋白质生物合成的三个阶段包括
- A. 起始 B. 延长 C. 终止 D. 进位 E. 转位
9. 基因表达调控的主要环节包括

- A. 基因活化
D. 蛋白质翻译
- B. 转录起始
E. 蛋白质降解
- C. 转录后加工和转运
10. 蛋白质合成后的加工包括
A. 磷酸化
D. 乙酰化
- B. 信号肽去除
E. 折叠
- C. 亚基聚合

参考答案

一、名词解释

1. 基因组(genome):指细胞或生物体的一套完整的单倍体遗传物质,是所有染色体全部基因和基因间的 DNA 总和,含有一个生物体进行各种生命活动所需要的全部遗传信息。

2. 外显子(exon):指在真核生物的断裂基因及其成熟 RNA 中都存在的核酸序列,是基因内部能够被转录,并能指导蛋白质生物合成的编码序列。

3. 顺式作用元件(cis-acting element):在真核基因的转录调控区,含有能与特异转录因子结合并影响转录水平的 DNA 序列,可分为启动子、增强子、沉默子和绝缘子。

4. 翻译(translation):细胞内以 mRNA 为模板,按照 mRNA 分子中由核苷酸组成的密码信息合成蛋白质的过程。

5. 遗传密码(genetic code):在 mRNA 分子上,以每 3 个相邻的核苷酸为一组,代表一种氨基酸或其他信息,这种存在于 mRNA 分子上的三联体形式的核苷酸序列称为密码子。

6. 启动子(promoter):是位于编码区上游为 RNA 聚合酶识别结合并启动转录的 DNA 序列,至少包括一个转录起始点及一个以上的功能组件。

7. 操纵子(operon):由结构基因和表达调控元件组成,是原核细胞中最常见的表达调控单位。

8. 转录因子(transcription factor, TF):在真核细胞中,能够帮助 RNA 聚合酶转录 RNA 的蛋白质统称转录因子,主要通过蛋白质-蛋白质间作用与 DNA 序列联系并调节转录。

9. 染色质重塑(chromatin remodeling):是指染色质位置和结构的动态变化过程,主要涉及核小体的置换或重新排列,改变了核小体在基因启动序列区域的排列,增加了基因转录装置和启动序列的可接近性。

二、单项选择题

1. B 2. C 3. E 4. E 5. C 6. B 7. D 8. E 9. C 10. E
11. C 12. C 13. E 14. A 15. A 16. C 17. B 18. E 19. B 20. C
21. A 22. E 23. C 24. C 25. C 26. A 27. E 28. C 29. A 30. B
31. E 32. A 33. E 34. C 35. A 36. C 37. B 38. A 39. E 40. C
41. B 42. C 43. B 44. E 45. A 46. E 47. E 48. D 49. A 50. A
51. A 52. E 53. C 54. A 55. E 56. B 57. B 58. C 59. B 60. D

三、多项选择题

1. BCDE 2. BCD 3. ABCD 4. ABDE 5. ABCDE
6. ABC 7. ABC 8. ABC 9. ABCDE 10. ABCDE

(周 例)

第十章

细胞连接与细胞黏附

一、名词解释

1. 细胞黏附分子 (cell adhesion molecule, CAM)
2. 细胞连接 (cell junction)
3. 锚定连接 (anchoring junction)
4. 间隙连接 (gap junction)
5. 钙黏着蛋白 (cadherin)
6. 整联蛋白 (integrin)
7. 通讯连接 (communicating junction)
8. 细胞黏附 (cell adhesion)

二、单项选择题

1. 关于整联蛋白的**错误**叙述是
 - A. 胞外区可以识别含有 RGD 三肽序列的配体
 - B. 是细胞表面非依赖于 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的异亲型细胞黏附分子
 - C. 可介导细胞和细胞、细胞与细胞外基质之间相互识别和黏附
 - D. 具有将细胞外部作用因素与细胞内部结构整合的功能
 - E. 由 α 和 β 两个亚基组成的异二聚体穿膜蛋白
2. 下列细胞连接中, **不属于**锚定连接的是
 - A. 桥粒
 - B. 半桥粒
 - C. 紧密连接
 - D. 黏着带
 - E. 黏着斑
3. 关于细胞连接的**错误**叙述是
 - A. 细胞连接结构属于细胞外基质
 - B. 心肌收缩依赖于间隙连接
 - C. 紧密连接在小肠绒毛上皮细胞中具有保证物质定向运输的作用
 - D. 细胞连接的结构特征在电镜下才能观察到
 - E. 结缔组织中没有细胞连接
4. 连接子是间隙连接的基本单位, 中间有一直径为 1.5~2nm 的孔道, 可允许通过的分子质量上限是
 - A. 5kD
 - B. 1kD
 - C. 10kD
 - D. 50kD
 - E. 60kD
5. 关于细胞黏附分子的**错误**叙述是
 - A. 是穿膜糖蛋白
 - B. 钙黏着蛋白在胚胎发育中起重要作用

- C. 选择素能特异性识别其他细胞表面寡糖链中的特定糖基
 D. 整联蛋白不依赖于 Ca^{2+} 的调节
 E. 免疫球蛋白家族成员不依赖于 Ca^{2+} 的调节
6. 桥粒存在于承受强拉力的组织中,其细胞黏附分子属于
 A. 钙黏着蛋白
 B. 选择素
 C. 免疫球蛋白超家族
 D. 整联蛋白
 E. 层粘连蛋白
7. 人工合成的 RGD 短肽通过抑制血小板凝聚可治疗心绞痛,原理是合成短肽可以竞争性地阻止血小板与血浆中含有 RGD 序列的纤维蛋白原结合,从而预防血凝块的形成。其中涉及的血小板的成分是
 A. 钙黏着蛋白
 B. 纤连蛋白
 C. 免疫球蛋白超家族
 D. 选择素
 E. 整联蛋白
8. 关于间隙连接的错误叙述是
 A. 连接子是间隙连接的基本结构单位
 B. 连接子由 8 个连接子蛋白环绕而成
 C. 间隙连接可以允许分子量在 1000Da 以下的分子通过
 D. 细胞内 Ca^{2+} 过量时可导致间隙连接关闭
 E. 连接子可以由相同或相似的连接子蛋白构成
9. 位于细胞侧面,有中间纤维参与的锚定连接是
 A. 紧密连接
 B. 黏着带
 C. 黏着斑
 D. 桥粒
 E. 半桥粒
10. 对钙黏着蛋白家族分子的错误叙述是
 A. 钙黏着蛋白介导同亲性细胞黏附
 B. E-钙黏着蛋白主要存在于胎盘、表皮等组织中
 C. 钙黏着蛋白的作用可被 Ca^{2+} 调节
 D. 钙黏着蛋白在锚定连接中起信号传递作用
 E. 阳离子整合剂 EDTA 可破坏钙黏着蛋白介导的细胞黏附
11. 与黏着斑相连的骨架纤维是
 A. 微丝
 B. 微管
 C. 中间纤维
 D. 核纤层
 E. 肌球蛋白
12. 紧密连接不具有的功能是
 A. 将上皮细胞紧密整合的机械作用
 B. 维持物质运输的方向性
 C. 限制较大分子在上皮细胞质膜顶部和基侧部的自由扩散
 D. 介导细胞连接的作用受钙离子调节
 E. 可构成血脑屏障
13. 下列不是整联蛋白的功能是
 A. 在细胞外基质中形成水化凝胶
 B. 可将细胞锚定在基质上
 C. 可将细胞外信号传递到细胞内
 D. 介导细胞间黏附
 E. 含有结合 RGD 的结构域
14. 下列说法错误的是

- A. 紧密连接中的封闭蛋白是 4 次跨膜的膜整合蛋白
 B. 参与形成黏着带的跨膜粘连蛋白是整联蛋白
 C. 天疱疮是因为桥粒结构发生病变而产生的自身免疫缺陷病
 D. 心肌细胞因为具有丰富的间隙连接,所以可以同步收缩和舒张
 E. 间隙连接可介导细胞间通讯
15. 体外培养的成纤维细胞在培养瓶底部的附着介质是
 A. 紧密连接
 B. 黏着带
 C. 桥粒
 D. 半桥粒
 E. 黏着斑
16. 关于细胞黏附分子的错误描述是
 A. 钙黏着蛋白介导细胞与细胞之间的同亲型结合
 B. 选择素介导细胞与细胞之间的异亲型结合
 C. 免疫球蛋白超家族可介导细胞之间的同亲型结合
 D. 整联蛋白介导细胞之间的同亲型结合
 E. 免疫球蛋白超家族成员可介导细胞之间的异亲型结合
17. 如果人体内某基因突变,导致编码的 L-选择素丧失功能,会出现的症状是
 A. 皮肤上出现水疱
 B. 凝血障碍
 C. 肿瘤转移
 D. 不能抵抗组织感染
 E. 细胞连接缺失
18. 关于细胞连接的错误描述是
 A. 紧密连接主要由闭合蛋白和密封蛋白构成
 B. 半桥粒的穿膜黏着蛋白是选择素蛋白
 C. 连接子蛋白的分布具有组织细胞特异性
 D. 天疱疮与桥粒结构的破坏有关
 E. 参与形成黏着带的穿膜黏着蛋白是钙黏着蛋白
19. 胚胎发育中,位于神经上皮细胞之间,在微丝束收缩作用下内陷形成管状结构,从而形成神经管的结构是
 A. 紧密连接
 B. 间隙连接
 C. 黏着带
 D. 黏着斑
 E. 桥粒
20. 下面说法中,错误的是
 A. Ca^{2+} 结合越多,钙黏着蛋白刚性越强
 B. 选择素通过 N-末端凝集素结构域识别白细胞和血小板上的寡糖链
 C. 免疫球蛋白超家族是依赖 Ca^{2+} 的细胞黏附分子
 D. 整联蛋白胞外区可以识别含有 RGD 的三肽序列的配体
 E. 钙黏着蛋白常以同源二聚体的形式存在
21. 间隙连接的基本单位是连接子,环绕而构成每个连接子的相同或相似的穿膜连接蛋白亚单位的数目是
 A. 4
 B. 6
 C. 8
 D. 10
 E. 12
22. 关于细胞连接的错误叙述是
 A. 细胞连接存在于机体所有组织中
 B. 小肠平滑肌细胞蠕动同步化依赖于间隙连接
 C. 紧密连接参与小肠上皮细胞物质的定向运输

- D. 参与桥粒连接的细胞骨架成分是中间纤维
E. 胚胎发育过程中黏着带可使上皮细胞内陷形成管状结构
23. 细胞黏附分子中,既能介导细胞之间也能介导细胞与细胞外基质之间的相互识别和黏附的是
- A. 钙黏着蛋白 B. 整联蛋白 C. 免疫球蛋白超家族
D. 选择素 E. 纤连蛋白
24. 关于锚定连接的错误叙述是
- A. 锚定连接的主要作用是形成抵抗机械张力的牢固黏合
B. 黏着带是由肌动蛋白丝参与的锚定连接
C. 黏着斑主要通过膜上的 α - 辅肌动蛋白与细胞外基质连接
D. 桥粒中穿膜黏着蛋白属于钙黏着蛋白家族成员
E. 桥粒连接是有中间纤维参与的锚定连接
25. 下列连接方式中,不具有细胞通讯作用的是
- A. 桥粒连接 B. 间隙连接 C. 缝隙连接
D. 胞间连丝 E. 化学突触
26. 关于细胞黏附分子的错误叙述是
- A. 细胞黏附是选择性的细胞识别过程
B. 钙黏着蛋白是依赖于 Ca^{2+} 的同亲型细胞黏附分子
C. 选择素的 EGF 样结构域是识别特异糖基,参与细胞黏附的活性部位
D. NCAM-L1 是不依赖 Ca^{2+} 的细胞黏附分子
E. 整联蛋白的 α 、 β 亚基分别有不同的类型
27. 在下列蛋白中,不是黏着连接所需要的为
- A. 钙黏着蛋白 B. 肌动蛋白 C. α - 辅肌动蛋白
D. 整联蛋白 E. 中间纤维
28. 在半桥粒连接中,整联蛋白可以
- A. 组成连接线 B. 与另一细胞的整联蛋白结合
C. 与基底膜结合 D. 与另一细胞的钙黏着蛋白结合
E. 与另一细胞的连接子相联
29. 紧密连接主要存在于
- A. 上皮细胞 B. 神经细胞 C. 肝细胞
D. 肾细胞 E. 骨骼肌细胞
30. 带电的离子能把电信号从一个细胞传递到另一个细胞而形成心肌细胞同步收缩和舒张,这是通过
- A. 桥粒连接 B. 间隙连接 C. 紧密连接
D. 黏着带 E. 黏着斑
31. 下列可与钙黏着蛋白结合的蛋白是
- A. I-CAM B. 整联蛋白 C. 钙黏着蛋白
D. 选择素 E. 蛋白聚糖
32. 抗选择素的抗体起到消炎作用是通过
- A. 限制激活的内皮细胞表达选择素

- B. 与糖配基竞争嗜中性粒细胞表面的选择素结合位点
 C. 限制中性粒细胞暂时结合到血管壁上
 D. 限制内皮细胞的激活而生成血小板激活因子
 E. 限制中性粒细胞上整联蛋白的激活
33. 下列结构中,无法为细胞提供抗机械张力的牢固黏合作用的是
 A. 桥粒 B. 间隙连接 C. 半桥粒
 D. 黏着带 E. 黏着斑
34. 小肠肠腔内的物质不能随便进入组织是因为小肠上皮细胞内有对腔内大部分物质起着阻隔作用的
 A. 黏着带 B. 黏着斑 C. 桥粒
 D. 间隙连接 E. 紧密连接
35. 从上皮细胞的顶端到底部,各种细胞表面连接出现的顺序是
 A. 紧密连接→黏着连接→桥粒→半桥粒
 B. 桥粒→半桥粒→黏着连接→紧密连接
 C. 黏着连接→紧密连接→桥粒→半桥粒
 D. 紧密连接→黏着连接→半桥粒→桥粒
 E. 桥粒→半桥粒→紧密连接→黏着连接
36. 关于细胞黏附的错误叙述是
 A. 需要细胞黏附分子介导
 B. 同一组织的细胞优先黏附聚集
 C. 选择素通过异亲型结合介导细胞黏附
 D. 整联蛋白通过同亲型结合介导细胞黏附
 E. 细胞黏附对胚胎发育中细胞的定向迁移、组织形成起重要作用
37. 细胞间不存在细胞连接的是
 A. 内皮细胞 B. 神经细胞 C. 肝细胞
 D. 白细胞 E. 骨骼肌细胞
38. 关于紧密连接的错误叙述是
 A. 广泛分布于各种上皮细胞的侧面和底部区域
 B. 两个相邻细胞质膜以断续的点状结构连在一起
 C. 点状接触部位细胞间隙消失
 D. 维持上皮细胞的极性
 E. 封闭索是由两个相邻细胞膜上的特殊穿膜蛋白质颗粒构成
39. 下列细胞类型中,桥粒最多的是
 A. 肝细胞 B. 红细胞 C. 皮肤上的表皮细胞
 D. 神经细胞 E. 肾细胞
40. 下面说法错误的是
 A. 锚定连接需要细胞骨架纤维参与
 B. 黏着带中的穿膜黏着蛋白为钙黏着蛋白
 C. 黏着斑参与肌细胞与肌腱的连接
 D. 桥粒连接是由微管参与的锚定连接

5. 有钙黏着蛋白参与的细胞连接是

- A. 黏着带 B. 黏着斑 C. 间隙连接 D. 半桥粒 E. 桥粒

参考答案

一、名词解释

1. 细胞黏附分子(cell adhesion molecule, CAM): 一类介导细胞与细胞之间或细胞与细胞外基质之间相互结合并起黏附作用的穿膜糖蛋白的统称, 包括钙黏着蛋白、选择素、免疫球蛋白超家族和整联蛋白家族。

2. 细胞连接(cell junction): 细胞表面与其他细胞或细胞外基质结合的特化区域, 用以加强细胞间的机械联系和维持组织的完整性和协调性。

3. 锚定连接(anchoring junction): 一类有细胞骨架纤维参与、存在于细胞间或细胞与细胞外基质之间的连接结构, 能够形成抵抗机械张力的牢固黏合。

4. 间隙连接(gap junction): 是动物组织细胞间普遍存在的一种通讯连接方式, 其基本结构单位是连接子, 通过相邻质膜上的两个连接子对接而使细胞连通, 用以加强相邻细胞的连接, 介导细胞间通讯。

5. 钙黏着蛋白(cadherin): 是一类依赖于 Ca^{2+} 的同亲型细胞黏附分子, 为单次穿膜糖蛋白, 可介导细胞与细胞之间的同亲型细胞黏附, 在个体发育过程中影响细胞的分化, 参与组织器官的形成。

6. 整联蛋白(integrin): 是一类依赖于 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的异亲型细胞黏附分子, 为异二聚体穿膜蛋白, 介导细胞与细胞之间以及细胞与细胞外基质之间的相互识别和黏附。

7. 通讯连接(communicating junction): 存在于大多数组织相邻细胞膜上的特殊的连接方式, 不仅具有机械的细胞连接作用, 还可进行细胞间电信号和化学信号的通讯联系, 从而完成群体细胞间的合作和协调。

8. 细胞黏附(cell adhesion): 在细胞识别的基础上, 通过细胞表面特定的细胞黏附分子介导, 使同类细胞发生聚集形成细胞团或组织的过程。

二、单项选择题

1. B 2. C 3. A 4. B 5. D 6. A 7. E 8. B 9. D 10. B
11. A 12. D 13. A 14. B 15. E 16. D 17. D 18. B 19. C 20. C
21. B 22. A 23. B 24. C 25. A 26. C 27. E 28. C 29. A 30. B
31. C 32. C 33. B 34. E 35. A 36. D 37. D 38. A 39. C 40. D
41. C 42. A 43. C 44. D 45. C

三、多项选择题

1. AB 2. ABCDE 3. BD 4. ABD 5. AE

(王晓静)

第十一章

细胞微环境及其与细胞的相互作用

一、名称解释

1. 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)
2. 糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG)
3. 透明质酸 (hyaluronic acid, HA)
4. 蛋白聚糖 (proteoglycan, PG)
5. 层粘连蛋白 (laminin, LN)
6. 胶原 (collagen)
7. 纤连蛋白 (fibronectin, FN)
8. 基膜 (basal lamina 或 basement membrane)

二、单项选择题

1. 发育早期基膜中主要的细胞外基质成分是
A. 层粘连蛋白 B. I型胶原蛋白 C. 纤连蛋白
D. 蛋白聚糖 E. 糖胺聚糖
2. 胶原蛋白 α 肽链中的氨基酸以 Gly-X-Y 三肽序列重复排列, 其中“X”多为
A. 羟脯氨酸 B. 脯氨酸 C. 赖氨酸
D. 丝氨酸 E. 色氨酸
3. 纤连蛋白与细胞结合的最小结构单位是
A. Gly-X-Y 序列 B. Arg-Gly-Asp 序列 C. 信号肽
D. 二硫键 E. KDEL 序列
4. 构成基膜的主要胶原类型是
A. I型胶原蛋白 B. II型胶原蛋白 C. III型胶原蛋白
D. IV型胶原蛋白 E. V型胶原蛋白
5. 分别赋予细胞外基质弹性和抗张性的成分是
A. 弹性纤维和胶原纤维 B. 蛋白聚糖和糖胺聚糖
C. 纤连蛋白和层粘连蛋白 D. 弹性纤维和蛋白聚糖
E. 巢蛋白和凝集素
6. 胶原纤维最终完成装配是在
A. 内质网 B. 高尔基复合体 C. 细胞质基质
D. 溶酶体 E. 细胞外基质
7. 下列有关纤连蛋白的叙述中, 错误的是
A. 血浆中纤连蛋白主要来自肝细胞 B. 可促进细胞迁移

- C. 含有多个大分子结合位点
D. 属于分泌型糖蛋白
E. 通过与胶原结合而作用于细胞

8. II型胶原蛋白主要存在于

- A. 皮肤 B. 肌腱 C. 软骨 D. 肌肉 E. 血液

9. 下列细胞外基质成分中,起细胞外基质骨架作用的是

- A. 胶原 B. 层粘连蛋白 C. 纤连蛋白
D. 蛋白聚糖 E. 糖胺聚糖

10. 蛋白聚糖是由糖胺聚糖侧链与核心蛋白的氨基酸残基以共价键结合形成的巨型分子。其中氨基酸指

- A. 脯氨酸 B. 酪氨酸 C. 丝氨酸 D. 甘氨酸 E. 赖氨酸

11. 下列是基底膜主要结构成分的是

- A. 纤连蛋白 B. 层粘连蛋白 C. 弹性蛋白
D. 黏结蛋白聚糖 E. 聚集素

12. 在胚胎发育早期,生成特别旺盛,并具有促进细胞增殖、迁移和阻止细胞分化作用的是

- A. 蛋白聚糖 B. 纤连蛋白 C. 层粘连蛋白
D. 胶原 E. 透明质酸

13. 细胞外基质中非糖基化的蛋白是

- A. 弹性蛋白 B. 层粘连蛋白 C. 胶原
D. 细胞纤连蛋白 E. 血浆纤连蛋白

14. 胶原蛋白的合成可分为胞内与胞外阶段,其前体分泌到细胞外的方式是

- A. 前 α 链 B. 前胶原 C. 胶原原纤维
D. 原胶原 E. 胶原分子

15. 下列关于层粘连蛋白的错误叙述是

- A. 由三条多肽链通过离子键连接而成 B. 属于分泌型糖蛋白
C. 具有IV型胶原结合的区域 D. 含有 RGD 序列
E. 主要存在于基底膜

16. 下列关于弹性蛋白的正确叙述是

- A. 糖基化、高度不溶、很少羟化 B. 非糖基化、高度不溶、羟化
C. 非糖基化、可溶、很少羟化 D. 非糖基化、高度不溶、很少羟化
E. 糖基化、可溶、很少羟化

17. 胶原 α 链的一级结构富含的三肽重复序列是

- A. RGD B. KDEL C. Gly-X-Y
D. Asn-X-Ser/Thr E. SKL

18. 关于蛋白聚糖的错误叙述是

- A. 蛋白聚糖由糖胺聚糖与核心蛋白共价连接形成
B. 蛋白聚糖单体与透明质酸非共价结合形成多聚体
C. 蛋白聚糖分子中含有 O—连接的糖基
D. 糖链为无分支直链型
E. 先合成二糖单位,再将其连接到糖链上

19. 不同组织胶原蛋白的分子类型不同,其中皮肤中含量较多的是

- A. I型胶原蛋白 B. II型胶原蛋白 C. III型胶原蛋白
 D. IV型胶原蛋白 E. V型胶原蛋白
20. 下列组织中,细胞外基质含量最高的是
 A. 上皮组织 B. 肌组织 C. 脑
 D. 结缔组织 E. 脊髓
21. 弹性蛋白的肽链之间相互交联形成网络通过的残基是
 A. Gly B. Pro C. Lys D. Hypro E. Ser
22. 原胶原直径和长度为
 A. 0.5nm;200nm B. 1.0nm;200nm C. 1.0nm;300nm
 D. 1.5nm;300nm E. 1.5nm;200nm
23. 下列不属于整联蛋白功能的是
 A. 在细胞外基质中形成水化凝胶
 B. 将细胞锚定在基质上
 C. 将信号传递到细胞内部
 D. 参与细胞黏连结构的形成
 E. 有些细胞外基质蛋白可被多种整联蛋白识别
24. 动物体内含量最多的蛋白是
 A. 弹性蛋白 B. 层粘连蛋白 C. 胶原
 D. 纤连蛋白 E. 巢蛋白
25. 血浆纤连蛋白的主要来源细胞是
 A. 肝实质细胞 B. 间质细胞 C. 干细胞
 D. 巨噬细胞 E. 成纤维细胞
26. 在胶原分子的氨基酸组成中,占 1/3 的是
 A. Gly B. Pro C. Lys D. Hypro E. Ser
27. 细胞外基质中不含有的蛋白是
 A. 胶原蛋白 B. 渗滤素 C. 弹性蛋白
 D. 纤连蛋白 E. 角蛋白
28. 下列分子中不含硫酸基团,并且直接参与蛋白聚糖多聚体形成的糖胺聚糖是
 A. 硫酸皮肤素 B. 硫酸角质素 C. 硫酸乙酰肝素
 D. 透明质酸 E. 硫酸软骨素
29. 胚胎发育中出现最早的细胞外基质成分是
 A. 层粘连蛋白 B. 胶原蛋白 C. 纤连蛋白
 D. 蛋白聚糖 E. 糖胺聚糖
30. 下列关于糖胺聚糖的错误描述是
 A. 是由重复的二糖单位构成的直链多糖
 B. 构成细胞外亲水性凝胶,赋予组织良好的弹性和抗压性
 C. 由氨基己糖和糖醛酸构成
 D. 糖残基上通常带有硫酸基团或羧基
 E. 带有大量正电荷
31. 细胞外基质中含量最高,刚性及抗张力强度最大的成分是

- A. 胶原
D. 纤连蛋白
32. 膳食中缺乏维生素 C 会导致维生素 C 缺乏症,与其有关的细胞外基质异常是
A. 层粘连蛋白
D. 蛋白聚糖
33. 胶原中含量最多的氨基酸是
A. Ser
B. Thr
C. Tyr
D. Gly
E. Val
34. 下列蛋白的基因突变与马方综合征有关的是
A. 胶原蛋白
D. 纤连蛋白
35. 不溶性的细胞纤连蛋白主要来源于
A. 肝实质细胞
D. 巨噬细胞
36. 胶原合成过程中,三条多肽链自发聚合形成三股超螺旋结构发生在
A. 细胞质基质
D. 反面高尔基网
37. 基膜中,层粘连蛋白的结构是
A. 哑铃状
D. 无规卷曲
38. 胚胎时期,注射纤连蛋白受体的抗体或含 RGD 序列的短肽可主要阻断细胞的
A. 增殖
D. 贴壁
39. 与糖胺聚糖和蛋白聚糖无关的功能是
A. 使角膜柔软并具有透光性
D. 将细胞外信号传递到细胞内
40. 胶原转换率最慢的组织是
A. 牙齿
B. 骨骼
C. 软骨
D. 巩膜
E. 皮肤

三、多项选择题

1. IV型胶原不具有的特征是
A. α -螺旋结构
D. 重复的 Gly-X-Y 序列
2. 细胞外基质中,凝胶样基质的主体成分是
A. 蛋白聚糖
D. 胶原
3. 胶原具有的特性包括
A. 胶原是糖蛋白
C. 组织分布具有特异性
E. 由游离核糖体合成
4. 细胞外基质中,参与形成纤维网架的主要成分是
A. 蛋白聚糖
B. 纤连蛋白
C. 层粘连蛋白

- D. 胶原
E. 弹性蛋白
5. 下列疾病与胶原有关的是
A. 维生素 C 缺乏症
B. 成骨发育不全综合征
C. 爱 - 唐综合征
D. 扩张性心肌病与心肌炎
E. 黏多糖累积病
6. 下列关于肿瘤微环境的描述,正确的是
A. 微环境中的细胞和基质成分的异常是肿瘤发生的重要因素
B. 成纤维细胞是肿瘤微环境中主要的基质细胞
C. 实体肿瘤附近往往可见成纤维细胞活化
D. 肿瘤微环境中存在大量的巨噬细胞
E. 肿瘤微环境可导致 T 细胞免疫功能下降
7. 胚胎结缔组织的细胞外基质主要成分是
A. I 型胶原
B. III 型胶原
C. 弹性蛋白
D. 透明质酸
E. 纤连蛋白
8. 基膜的主要成分包括
A. IV 型胶原
B. 层粘连蛋白
C. 渗滤素
D. 巢蛋白
E. 纤连蛋白
9. 与细胞外基质成分降解有关的是
A. 基质金属蛋白酶
B. 丝氨酸蛋白酶
C. 胶原酶
D. 去垢剂
E. 透明质酸
10. 成年结缔组织中细胞外基质主要成分是
A. I 型胶原
B. III 型胶原
C. 弹性蛋白
D. 透明质酸
E. 纤连蛋白

参考答案

一、名称解释

1. 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM): 是细胞微环境的核心组分, 指分布在细胞外空间, 由细胞分泌的蛋白质和多糖所构成的精密有序的三维网状结构, 参与组织结构的维持, 影响细胞的存活、形态、代谢、增殖、分化、迁移等。

2. 糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG): 是高分子量的含糖化合物, 由重复的二糖单位 (氨基己糖和糖醛酸) 构成的长链多糖, 参与形成细胞外亲水性的凝胶, 赋予组织良好的弹性和抗压性。

3. 透明质酸 (hyaluronic acid, HA): 是结构最简单的糖胺聚糖, 由葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖二糖单位重复排列构成, 在胚胎发育早期和组织创伤修复时起到促进细胞迁移和增殖的作用。

4. 蛋白聚糖 (proteoglycan, PG): 是由糖胺聚糖与核心蛋白的丝氨酸残基共价结合形成的高分子复合物, 参与形成细胞外亲水性的凝胶, 赋予组织良好的弹性和抗压性。

5. 层粘连蛋白 (laminin, LN): 是由一条重链和两条轻链构成的高分子糖蛋白, 分子呈不对称的十字形, 层粘连蛋白是基膜的主要成分, 在胚胎发育及组织分化中发挥重要作用。

6. 胶原 (collagen): 是遍布于体内各种器官和组织、含量最丰富的纤维蛋白家族, 构成细胞外基质的框架结构, 使组织具有韧性和抗拉性。

7. 纤连蛋白(fibronectin, FN):广泛存在于人和动物组织中的一类高分子量非胶原糖蛋白,分子呈V字形,介导细胞与细胞外基质的黏着,参与细胞的迁移。

8. 基膜(basal lamina 或 basement membrane):也称基底膜,是细胞外基质特化而成的一种柔软、坚韧的网膜结构,主要由IV型胶原、层粘连蛋白、巢蛋白及渗滤素构成,具有支持、屏障、选择渗透、调节细胞增殖、迁移等作用。

二、单项选择题

1. A 2. B 3. B 4. D 5. A 6. E 7. E 8. C 9. A 10. C
11. B 12. E 13. A 14. B 15. A 16. D 17. C 18. E 19. A 20. D
21. C 22. D 23. A 24. C 25. A 26. A 27. E 28. D 29. A 30. E
31. A 32. B 33. D 34. B 35. B 36. B 37. B 38. C 39. E 40. B

三、多项选择题

1. ACD 2. AC 3. ABCD 4. BCDE 5. ABC
6. ABCDE 7. BCD 8. ABCD 9. ABC 10. AE

(于文静)

第十二章

细胞间信息传递

一、名词解释

1. 细胞间信息传递 (cell communication)
2. 信号转导 (signal transduction)
3. 受体 (receptor)
4. 第二信使 (second messenger)
5. 钙调蛋白 (calmodulin)
6. G 蛋白 (GTP protein)
7. 蛋白激酶 A (cAMP-dependent protein kinase A, PKA)

二、单项选择题

1. 细胞内传递激素信息的小分子物质是
A. 第一信使 B. 第二信使 C. 递质
D. 第三信使 E. 载体
2. 下列不属于第一信使的是
A. 胰岛素 B. Ca^{2+} C. 前列腺素
D. 乙酰胆碱 E. 多巴胺
3. 胞内受体的化学本质为
A. 糖脂 B. 磷脂 C. 糖蛋白
D. DNA 结合蛋白 E. 脂蛋白
4. PIP_2 分解后生成的, 可以促进 Ca^{2+} 释放的是
A. IP_3 B. CaM C. PKC D. NO E. DAG
5. 激活的 G 蛋白直接影响
A. 磷脂酶 C B. 蛋白激酶 G C. 蛋白激酶 A
D. 蛋白激酶 C E. 磷脂酶 A
6. 肾上腺素的第二信使是
A. cAMP B. GTP C. ADP D. cGMP E. ATP
7. 组成 G 蛋白的 α 亚基具有的酶活性是
A. UTP 酶 B. GTP 酶 C. ATP 酶 D. CTP 酶 E. TTP 酶
8. 可溶性鸟苷酸环化酶位于
A. 细胞膜 B. 细胞质 C. 细胞核 D. 线粒体 E. 内质网
9. 不属于受体与配体结合特点的是
A. 非共价键结合 B. 可饱和性 C. 高度亲和性

- D. 高度专一性 E. 不可逆性
10. 配体属于
A. 第一信使 B. 抗体 C. 第二信使
D. 细胞膜中的类脂分子 E. 细胞膜中的蛋白质分子
11. 通过胞内受体发挥作用的物质是
A. γ -氨基丁酸 B. 甲状腺素 C. 胰岛素
D. 表皮生长因子 E. 乙酰胆碱
12. 大多数膜受体的化学本质为
A. 类固醇 B. 脂蛋白 C. 糖蛋白
D. 磷脂 E. 糖脂
13. 可被 PKA、PKC、PKG、CaMK、MAPK 可催化其磷酸化的是
A. 酪氨酸残基 B. 亮氨酸残基 C. 甘氨酸残基
D. 缬氨酸残基 E. 丝氨酸 / 苏氨酸残基
14. 雌激素受体位于
A. 线粒体 B. 内质网 C. 细胞膜 D. 细胞质 E. 细胞核
15. 腺苷酸环化酶的底物是
A. ADP B. GTP C. ATP D. cGMP E. cAMP
16. 细胞内传递信息的第二信使是
A. G 蛋白 B. 腺苷酸环化酶 C. 受体
D. 钙离子 E. NO
17. 通过膜受体发挥作用的激素是
A. 肾上腺素 B. 甲状腺素 C. 活性维生素 D₃
D. 性激素 E. 糖皮质激素
18. cAMP 能激活
A. 磷脂酶 C B. 蛋白激酶 C C. 蛋白激酶 A
D. 蛋白激酶 G E. 酪氨酸蛋白激酶
19. G 蛋白是
A. 鸟苷酸环化酶 B. 鸟苷酸结合蛋白 C. 蛋白激酶 C
D. 蛋白激酶 A E. 生长因子结合蛋白 -2
20. 下列能够被霍乱毒素抑制其 GTP 酶活性的是
A. 磷脂酶 C 型 G 蛋白(G_p) B. 抑制型 G 蛋白(G_i) C. G-Ras
D. 激动型 G 蛋白(G_s) E. GDP
21. 下列属于催化型受体的是
A. 干扰素受体 B. 胰岛素受体
C. 活性维生素 D₃ 受体 D. 生长激素受体
E. 甲状腺素受体
22. 影响离子通道开放的配体主要是
A. 胰岛素 B. 甲状腺素 C. 生长因子
D. 类固醇激素 E. 神经递质
23. 细胞中促进内质网和肌浆网向胞浆释放钙的第二信使是

- A. cAMP B. cGMP C. IP_3 D. Ca^{2+} E. DAG
24. cGMP 能激活
- A. 蛋白激酶 G B. 酪氨酸蛋白激酶 C. 蛋白激酶 C
D. 蛋白激酶 A E. 磷脂酶 C
25. 不属于细胞间信息物质的是
- A. 前列腺素 B. NO C. 乙酰胆碱
D. 葡萄糖 E. 谷氨酸
26. 关于细胞内信息物质的描述中,错误的是
- A. 细胞内信息物质大部分通过酶促级联反应传递信息
B. 无机离子可以作为一种细胞内信息物质
C. 胞内受体是激素作用的第二信使
D. 多数信号转导蛋白分子为原癌基因产物
E. 细胞内信息物质组成多样化
27. 与受体结合后,引发 β -catenin 从胞质入核、促进基因表达的通路是
- A. 细胞因子信号转导通路 B. NF- κ B 信号通路 C. MAPK 信号通路
D. TGF- β 信号通路 E. Wnt 信号通路
28. G 蛋白耦联受体是
- A. 细胞内受体 B. 核内受体 C. 环状受体
D. 催化型受体 E. 7 次跨膜受体
29. PKA 磷酸化的氨基酸主要是
- A. 甘氨酸 / 丝氨酸 B. 丝氨酸 / 苏氨酸 C. 酪氨酸
D. 酪氨酸 / 甘氨酸 E. 甘氨酸
30. 肾上腺素与膜受体结合后,激活 G 蛋白后能
- A. 激活腺苷酸环化酶 B. 激活磷脂酶 C C. 抑制鸟苷酸环化酶
D. 抑制腺苷酸环化酶 E. 激活鸟苷酸环化酶
31. 蛋白质中容易发生磷酸化与去磷酸化的是
- A. 酪氨酸、缬氨酸、甘氨酸 B. 苯丙氨酸、苏氨酸、缬氨酸
C. 丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸 D. 甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸
E. 丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸
32. NO 的第二信使是
- A. cAMP B. cGMP C. ATP D. GTP E. ADP
33. 参与细胞内应激、炎症和免疫反应的通路是
- A. 细胞因子信号转导通路 B. NF- κ B 信号通路 C. MAPK 信号通路
D. TGF- β 信号通路 E. Wnt 信号通路
34. 与 G 蛋白活化密切相关的核苷酸是
- A. CTP B. ATP C. TTP D. GTP E. UTP
35. 胰岛素受体具有的活性是
- A. 蛋白激酶 A B. 蛋白激酶 C C. 蛋白激酶 G
D. 酪氨酸蛋白激酶 E. Ca^{2+} -CaM 激酶
36. 可以直接激活蛋白激酶 C 的是

- A. IP₃ B. cGMP C. DAG D. cAMP E. PIP₂
37. 蛋白激酶的生物学作用是使蛋白质发生
A. 甲基化 B. 乙酰化 C. 脱磷酸 D. 泛素化 E. 磷酸化
38. 不属于第二信使的物质是
A. Ca²⁺ B. cGMP C. PIP₂ D. cAMP E. IP₃
39. 受体的特异性取决于
A. 受体与配体的构象 B. 细胞膜的选择通透性 C. 受体的类型
D. 受体与细胞膜分子的构象 E. 受体与 G 蛋白分子的构象
40. 与激活的 Ras 结合的是
A. GDP B. ATP C. GTP D. ADP E. cGMP
41. 在 TPK-Ras 蛋白信号通路中,能被细胞内含有 SH₂ 结构域的信号蛋白识别、磷酸化的氨基酸残基是
A. 酪氨酸残基 B. 丝氨酸残基 C. 甘氨酸残基
D. 缬氨酸残基 E. 丝氨酸 / 苏氨酸残基
42. 鸟苷酸环化酶的底物是
A. cAMP B. GTP C. ATP D. cGMP E. ADP
43. CaM 是
A. cAMP 应答元件结合蛋白 B. 钙结合蛋白 C. 补体 4b 结合蛋白
D. 鸟苷酸结合蛋白 E. DNA 结合蛋白
44. 借助 JAKs 激活 STAT 从而调节基因表达的通路为
A. 细胞因子信号转导通路 B. NF-κB 信号通路 C. MAPK 信号通路
D. TGF-β 信号通路 E. Wnt 信号通路
45. 硝酸甘油治疗心脏病的原理是
A. 激活 PLC,生成 DAG B. 激活细胞膜上的 GC,生成 cGMP
C. 激活鸟苷酸环化酶,生成 cAMP D. 激活腺苷酸环化酶,生成 cAMP
E. 分解生成 NO,生成 cGMP
46. 细胞内的钙离子储存于
A. 内质网 B. 细胞核 C. 细胞质
D. 细胞膜 E. 线粒体
47. 受体可进行自我磷酸化的通讯系统是
A. MAPK 系统 B. 肌醇磷脂系统
C. 酪氨酸蛋白激酶系统 D. 鸟苷酸环化酶系统
E. 腺苷酸环化酶系统
48. 与表皮生长因子跨膜信号转导实现有关的酶是
A. 活化磷酸二酯酶 B. 活化酪氨酸激酶 C. 活化鸟苷酸环化酶
D. 活化腺苷酸环化酶 E. 抑制腺苷酸环化酶
49. 可造成重症肌无力的信号转导障碍的是
A. 有毒物质与乙酰胆碱受体结合 B. 乙酰胆碱分泌减少
C. 体内产生抗乙酰胆碱受体抗体 D. 乙酰胆碱与其受体结合障碍
E. Na⁺ 通道障碍

50. 能够透过细胞膜与细胞内受体结合而发挥作用的是
- A. 穿膜糖蛋白 B. G 蛋白 C. 酪氨酸受体蛋白
D. 甾体类激素 E. 磷脂酶 C
51. G 蛋白中, α 亚基的活性状态是
- A. 与 GTP 结合, 与 β 、 γ 聚合 B. 与 GTP 结合, 与 β 、 γ 分离
C. 与 GDP 结合, 与 β 、 γ 分离 D. 与 GDP 结合, 与 β 、 γ 聚合
E. α 、 β 、 γ 形成三聚体, 与 GDP 结合
52. 霍乱毒素引起腹泻的原因是
- A. 蛋白激酶 PKC 功能异常 B. G 蛋白持续激活 C. 受体封闭
D. G 蛋白不能被激活 E. 蛋白激酶 PKA 功能异常
53. 属于 cGMP 依赖性蛋白激酶的是
- A. PKC B. CaMK C. PKG D. MAPK E. 蛋白激酶 A
54. 肾上腺素可诱导一些酶水解肝细胞和肌细胞中的糖原, 第一个被激活的酶是
- A. 蛋白激酶 A B. 糖原合成酶 C. 糖原磷酸化酶
D. 腺苷酸环化酶 E. 磷酸酯酶
55. 迄今发现细胞膜受体中最大的受体家族是
- A. 离子通道型受体家族 B. 酪氨酸蛋白激酶型受体家族
C. 细胞因子受体超家族 D. G 蛋白耦联受体超家族
E. 蛋白丝氨酸 / 苏氨酸受体超家族
56. 调节细胞增殖和分化的最主要途径是
- A. 腺苷酸环化酶途径 B. 蛋白激酶 C 途径 C. 鸟苷酸环化酶途径
D. 非受体酪氨酸蛋白激酶途径 E. 受体酪氨酸激酶途径
57. 非胰岛素依赖性糖尿病发生原因之一是
- A. 体内存在抗酪氨酸受体的抗体
B. 遗传因素导致胰岛素受体量减少或功能异常
C. G 蛋白失去 GTP 酶活性
D. 体内存在抗 G 蛋白受体的抗体
E. 不分泌胰岛素
58. 关于细胞信号转导的错误叙述是
- A. 通过细胞内信号转导蛋白的构象、活性或功能变化来实现
B. 细胞受体分为膜受体和胞内受体
C. 不同信号转导通路之间可以相互联系
D. 酪氨酸蛋白激酶型受体属于核受体
E. 细胞内信使分子能激活细胞内受体和蛋白激酶
59. 关于 G 蛋白的错误叙述是
- A. G 蛋白是由 α 、 β 、 γ 组成的异三聚体
B. G 蛋白耦联受体是 7 次穿越细胞膜的单一肽链
C. G α 上的 GTP 被 GDP 取代是 G 蛋白激活的关键步骤
D. 小分子 G 蛋白只具有 G 蛋白的 α 亚基
E. G 蛋白是指与鸟嘌呤核苷酸可逆性结合的蛋白质家族

60. 信号转导通路对靶蛋白调节最重要的方式是
- A. 通过可逆性磷酸化调节 B. 通过受体亲和力调节 C. 通过配体调节
D. 通过 G 蛋白调节 E. 通过受体数量调节
61. 属于肌醇磷酸信号系统的信号分子是
- A. Ca^{2+} B. IP_3 C. GTP
D. ATP E. cAMP
62. 由一系列蛋白激酶的酶促级联反应,将胞外信号传递到细胞核内的是
- A. 细胞因子信号转导通路 B. NF- κ B 信号通路 C. MAPK 信号通路
D. TGF- β 信号通路 E. Wnt 信号通路
63. 通过 Smad 将细胞外信号转导到核内的通路为
- A. 细胞因子信号转导通路 B. NF- κ B 信号通路 C. MAPK 信号通路
D. TGF- β 信号通路 E. Wnt 信号通路
64. 重症肌无力是由于
- A. 乙酰胆碱抗体数目减少 B. 乙酰胆碱量减少
C. 乙酰胆碱受体数目增多 D. 乙酰胆碱受体数目减少
E. 乙酰胆碱量增多
65. 下列能被第二信使 DAG 激活的是
- A. 蛋白激酶 A B. 蛋白激酶 C C. 蛋白激酶 G
D. 磷脂酶 C E. 酪氨酸激酶

三、多项选择题

1. 关于外泌体的正确叙述是
- A. 是直径为 30~100nm 的膜性小泡 B. 是一种介导细胞间信息传递的新载体
C. 由多种细胞分泌,存在于多种体液中 D. 含有蛋白质、脂类和核酸
E. 揭示存在于机体自身的 RNA 细胞间的转移途径
2. 受体与配体结合特点包括
- A. 可饱和性 B. 高度亲和力 C. 高度专一性
D. 特定的作用模式 E. 可逆性
3. 常见的调节受体活性的机制包括
- A. 酶促水解作用 B. G 蛋白的调节 C. 磷酸化作用
D. 脱磷酸化作用 E. 膜磷脂代谢的影响
4. 可以与 GDP/GTP 结合的蛋白质是
- A. Raf 蛋白 B. G 蛋白 C. Rel A 蛋白
D. Ras 蛋白 E. Grb-2 蛋白
5. 胞内受体可以
- A. 与配体结合 B. 激活转录 C. 与 DNA 结合
D. 使受体二聚体化 E. 与 G 蛋白耦联
6. 磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C 可以水解磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸,产生
- A. DAG B. cGMP C. cAMP
D. 花生四烯酸 E. IP_3
7. G 蛋白的特点包括

- A. 各种 G 蛋白的功能差别主要是在 α 亚基
 B. 二聚体 G 蛋白是抑制型 G 蛋白
 C. α 亚基本身具有 GTP 酶活性
 D. 三聚体 G 蛋白具有 ATP 酶活性
 E. 是鸟苷酸结合蛋白
8. 关于受体酪氨酸激酶的正确叙述是
 A. 是一种生长因子受体
 B. 受体蛋白一次跨膜
 C. 与配体结合, 2 个受体相互靠近, 相互激活
 D. 是一类磷酸转移酶
 E. 具有 SH₂ 结构域
9. 细胞内环核苷酸增加可直接激活
 A. PKA B. PKC C. AC D. GC E. PKG
10. 涉及第二信使的细胞信号转导途径包括
 A. TPK 途径 B. PKC 途径 C. PKG 途径
 D. NF- κ B 途径 E. PKA 途径
11. 配体包括
 A. 生长因子 B. 神经递质 C. 激素
 D. 药物 E. cAMP
12. 可能是 G 蛋白的效应蛋白的是
 A. 一氧化氮合酶 B. MAPK C. 离子通道
 D. 磷脂酶 C E. 腺苷酸环化酶
13. 信号转导蛋白通常具有活性和非活性两种形式, 信号转导蛋白活性的调节方式有
 A. 通过受体调节 B. 通过配体调节 C. 通过去磷酸化调节
 D. 通过 G 蛋白调节 E. 通过磷酸化调节
14. 关于 PKA 的正确叙述是
 A. PKA 可导致蛋白磷酸化 B. PKA 是 G 蛋白的效应蛋白
 C. PKA 由 cAMP 激活 D. PKA 由 cGMP 激活
 E. 转录因子 CREB 是 PKA 的效应蛋白
15. 关于钙调蛋白的正确叙述是
 A. 必须与 Ca²⁺ 结合才能发挥作用 B. 每一个钙调蛋白可结合 4 个 Ca²⁺
 C. 在 Ca²⁺ 信号系统中起作用 D. 激酶是钙调蛋白的靶酶之一
 E. 与 Ca²⁺ 结合后构型发生改变

参考答案

一、名词解释

1. 细胞间信息传递 (cell communication): 即细胞通讯, 是指一个细胞发出信息, 通过介质传递至另一个细胞产生特定反应的过程。

2. 信号转导 (signal transduction): 细胞外信号分子通过与细胞膜上或胞内的受体特异性结合,

将信号转换后传给相应的胞内系统,使细胞对外界信号做出适当反应的过程。

3. 受体(receptor):指一类存在于细胞膜或细胞内的特殊蛋白质,能特异性识别并结合细胞外信号分子,进而激活细胞内一系列生物化学反应,使细胞对外界刺激产生相应的效应。

4. 第二信使(second messenger):即细胞内信使,是指受体被激活后在细胞内产生的、能介导信号转导的活性物质。

5. 钙调蛋白(calmodulin):是广泛分布于真核细胞中的、能够与钙离子结合的、功能复杂的蛋白质,钙调蛋白由一条多肽链组成,与钙离子结合后构象发生改变从而被活化并激活靶蛋白。

6. G 蛋白(GTP protein):即 GTP 结合蛋白,是指在信号转导过程中,与受体耦联的并能与鸟苷酸结合的一类膜外蛋白质,位于细胞膜胞质面。G 蛋白由 α 、 β 和 γ 三种蛋白亚基组成,可通过其自身构象的变化激活效应蛋白,进而实现信号从细胞外向细胞内的传递。

7. 蛋白激酶 A(cAMP-dependent protein kinase A,PKA):即依赖于 cAMP 的蛋白激酶 A,是由 4 个亚基组成的蛋白复合物,可将 ATP 上的磷酸基团转移到特定蛋白质的丝氨酸或苏氨酸残基上,使蛋白质被磷酸化,被磷酸化的蛋白质进而调节下游靶蛋白的活性。

二、单项选择题

- | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. B | 2. B | 3. D | 4. A | 5. A | 6. A | 7. B | 8. B | 9. E | 10. A |
| 11. B | 12. C | 13. E | 14. E | 15. C | 16. D | 17. A | 18. C | 19. B | 20. D |
| 21. B | 22. E | 23. C | 24. A | 25. D | 26. C | 27. E | 28. E | 29. B | 30. A |
| 31. C | 32. B | 33. B | 34. D | 35. D | 36. C | 37. E | 38. C | 39. A | 40. C |
| 41. A | 42. B | 43. B | 44. A | 45. E | 46. A | 47. C | 48. B | 49. C | 50. D |
| 51. B | 52. B | 53. C | 54. D | 55. D | 56. E | 57. B | 58. D | 59. C | 60. A |
| 61. B | 62. C | 63. D | 64. D | 65. B | | | | | |

三、多项选择题

- | | | | | |
|----------|----------|----------|---------|-----------|
| 1. ABCDE | 2. ABCDE | 3. ABCDE | 4. BD | 5. ABCD |
| 6. AE | 7. ACE | 8. ABCD | 9. AE | 10. BCDE |
| 11. ABCD | 12. CDE | 13. BCDE | 14. ACE | 15. ABCDE |

(吴茉莉)

第十三章

细胞分裂与细胞周期

一、名词解释

1. 细胞分裂 (cell division)
2. 细胞周期 (cell cycle)
3. 有丝分裂 (mitosis)
4. 纺锤体 (spindle)
5. 有丝分裂器 (mitotic apparatus)
6. 减数分裂 (meiosis)
7. 联会 (synapsis)
8. 细胞周期蛋白 (cyclin)
9. 细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, Cdk)
10. 成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF)
11. 检测点 (check point)
12. 原癌基因 (proto-oncogene)
13. 癌基因 (oncogene)
14. 抑癌基因 (tumor suppressor genes)

二、单项选择题

1. 下列关于无丝分裂的错误叙述是
A. 分裂中细胞仍可执行其功能 B. 是一种直接分裂方式 C. 能量消耗少
D. 分裂迅速 E. 仅见于低等生物
2. 同源染色体分离发生在减数分裂的
A. 第一次减数分裂前期 B. 第一次减数分裂中期
C. 第一次减数分裂后期 D. 第二次减数分裂中期
E. 第二次减数分裂后期
3. 下列结构不属于有丝分裂器的是
A. 染色体 B. 纺锤体 C. 星体 D. 赤道面 E. 中心粒
4. 细胞周期的长短主要取决于
A. G₀期 B. G₁期 C. S期 D. G₂期 E. M期
5. 有丝分裂的后期, 姐妹染色单体分离的主要原因是
A. 星体的牵引 B. 细胞两极的距离增大 C. 着丝粒的分裂
D. 动粒微管的去组装 E. 染色体凝集程度的增加
6. Cdk1 与 Cyclin B 结合, 可促进细胞

- A. 从 G_1 期向 S 期的转变 B. 从 S 期向 G_2 期的转变
 C. 从 G_2 期向 M 期的转变 D. 从 M 期向 G_1 期的转变
 E. S 期的启动
7. 与细胞分裂时染色体的移动有关的结构是
 A. 中心体 B. 线粒体 C. 核糖体
 D. 溶酶体 E. 过氧化物酶体
8. 下列关于有丝分裂的错误叙述是
 A. 在前期染色质开始凝集
 B. 在前中期完成纺锤体装配
 C. 染色单体完全到达两极便进入后期
 D. 中期染色体最粗短
 E. 当染色体移向两极时,着丝粒最先到达
9. 同源染色体重组发生在第一次减数分裂前期中的
 A. 细线期 B. 偶线期 C. 粗线期 D. 双线期 E. 终变期
10. 有丝分裂中,对细胞分裂极的确定起决定作用的是
 A. 染色体的移动方向 B. 中心体的位置 C. 细胞核的位置
 D. 微管的方向 E. 收缩环的位置
11. Cyclin A 含量的高峰最早出现在
 A. G_1/S 期交界处 B. S/G_2 期交界处 C. G_2/M 期交界处
 D. M/G_1 期交界处 E. S 期
12. 重组结最早被观察到的时期是在第一次减数分裂过程前期的
 A. 细线期 B. 偶线期 C. 粗线期
 D. 双线期 E. 终变期
13. 有丝分裂前中期细胞变化的特征是
 A. 染色质凝集 B. 核仁缩小解体
 C. 核膜崩解 D. 染色体排列在细胞中央的赤道面
 E. 姐妹染色单体分离
14. MPF 形成于
 A. G_0 期 B. G_1 期 C. S 期 D. G_2 期 E. M 期
15. 特别适合于进行染色体数目、结构等细胞遗传学研究的有丝分裂阶段是
 A. 前期 B. 前中期 C. 中期
 D. 后期 E. 末期
16. 关于有丝分裂后期染色体的行为,下列叙述错误的是
 A. 解螺旋成染色质 B. 着丝粒分裂 C. 染色单体形成
 D. 染色单体向两极移动 E. 动粒微管长度缩短
17. 有丝分裂器是指
 A. 由微管、微丝、中间纤维构成的复合细胞器
 B. 由着丝粒、纺锤体、中心体构成的复合细胞器
 C. 由纺锤体、中心体和染色体组成的复合细胞器
 D. 由着丝粒、中心体、染色体组成的复合细胞器

- E. 由纺锤体、中心体组成的复合细胞器
18. 下列药物不能抑制纺锤体形成的是
- A. 秋水仙素 B. 长春花碱 C. 长春新碱
D. 阿糖胞苷 E. 秋水酰胺
19. 纺锤体形成于细胞有丝分裂的
- A. 前期 B. 前中期 C. 中期
D. 后期 E. 末期
20. 不属于有丝分裂末期特征的是
- A. 动粒微管消失 B. 核膜重新形成
C. 核仁重新出现 D. 子代染色体到达纺锤体两极
E. 染色体形态继续保持
21. 姐妹染色单体分离发生在减数分裂的
- A. 第一次减数分裂前期 B. 第一次减数分裂中期
C. 第二次减数分裂后期 D. 第二次减数分裂中期
E. 第一次减数分裂后期
22. 只发生于真核生物生殖细胞成熟阶段的是
- A. 无丝分裂 B. 有丝分裂 C. 减数分裂
D. 有丝分裂和减数分裂 E. 无丝分裂和减数分裂
23. 动物细胞有丝分裂前期不具有的特征是
- A. DNA 复制 B. 染色体凝集 C. 分裂极确定
D. 纺锤体形成 E. 核仁缩小解体
24. 联会复合体的形成发生在第一次减数分裂过程前期的
- A. 细线期 B. 偶线期 C. 粗线期
D. 双线期 E. 终变期
25. 细胞有丝分裂后期开始的标志是
- A. 核膜消失 B. 染色体排列在赤道面上 C. 核仁消失
D. 染色体形成 E. 姐妹染色单体开始分离
26. 一个卵母细胞经过减数分裂形成的卵细胞个数是
- A. 1 个 B. 2 个 C. 3 个 D. 4 个 E. 8 个
27. 姐妹染色单体分离并移向细胞的两极发生在有丝分裂的
- A. 前期 B. 前中期 C. 中期
D. 后期 E. 末期
28. 二价体形成发生在第一次减数分裂前期中的
- A. 细线期 B. 偶线期 C. 粗线期
D. 双线期 E. 终变期
29. 细胞周期中 DNA 含量增加一倍发生在
- A. G₁ 期 B. S 期 C. G₂ 期
D. M 期 E. G₀ 期
30. 核仁消失、核膜崩解发生在减数分裂的
- A. 前期 II B. 中期 II C. 后期 II

44. 细胞在分裂期不会发生的现象是
 A. 核膜崩解与重建 B. 纺锤体形成与消失
 C. RNA 合成非常活跃 D. 收缩环出现与胞质分裂
 E. 姐妹染色单体分离
45. 组蛋白合成的主要时期是细胞周期的
 A. G_0 期 B. G_1 期 C. S 期 D. G_2 期 E. M 期
46. 人体中具有增殖潜能但暂不增殖的细胞称为
 A. G_1 期细胞 B. S 期细胞 C. G_2 期细胞
 D. G_0 期细胞 E. M 期细胞
47. 细胞有丝分裂中期发生的是
 A. 核膜消失 B. 染色体排列在赤道面上 C. 核仁消失
 D. 染色体形成 E. 染色体复制
48. Z-DNA 的合成是发生在减数分裂前期的
 A. 细线期 B. 偶线期 C. 粗线期
 D. 双线期 E. 终变期
49. 微管蛋白的合成主要是在细胞周期的
 A. G_0 期 B. G_1 期 C. S 期 D. G_2 期 E. M 期
50. 体细胞经过一次有丝分裂的结果是产生
 A. 多个相同的子细胞 B. 多个不同的子细胞 C. 两个相同的子细胞
 D. 两个不同的子细胞 E. 一个与母细胞相同的子细胞
51. 中心粒的复制完成于
 A. G_0 期 B. G_1 期 C. S 期 D. G_2 期 E. M 期
52. 减数分裂中染色体段的交换发生在
 A. 姐妹染色单体之间 B. 非姐妹染色单体之间 C. 非同源染色体之间
 D. 同源染色体之间 E. 同一染色体长短臂之间
53. Cyclin B 含量的高峰最早出现在
 A. G_0 期 B. G_1 期 C. S 期 D. G_2 期 E. M 期
54. 可作为 MPF 成分之一的周期蛋白是
 A. Cyclin A B. Cyclin B C. Cyclin C D. Cyclin D E. Cdk1
55. 有丝分裂中,核仁缩小解体事件发生在
 A. 前期 B. 前中期 C. 中期 D. 后期 E. 末期
56. 细胞周期中钙调蛋白的大量合成发生在
 A. G_0 期 B. G_1 期 C. S 期 D. G_2 期 E. M 期
57. 有丝分裂后期的特点是
 A. 染色体排列在赤道面上
 B. 同源染色体分开,向两极移动
 C. 同源染色体配对,并位于赤道面上
 D. 同源染色体交叉互换
 E. 姐妹染色单体分开,移向细胞的两极
58. 细胞周期检测点不包括

- A. 未复制 DNA 检测点 B. 纺锤体组装检测点 C. 染色体分离检测点
D. DNA 损伤检测点 E. 核仁消失检测点
59. 细胞周期中核膜的周期性变化发生在
A. G₀期 B. G₁期 C. S期 D. G₂期 E. M期
60. 细胞周期中,遗传物质的复制规律是
A. 异染色质先复制
B. 常染色质先复制
C. 异染色质大量复制,常染色质较少复制
D. 常染色质大量复制,异染色质较少复制
E. 常染色质和异染色质同时复制

三、多项选择题

1. 有丝分裂末期的形态变化主要表现在
A. 染色体螺旋化 B. 子细胞核形成 C. 核膜、核仁重现
D. 纺锤体消失 E. 着丝粒分裂
2. 下列属于癌基因的是
A. *src* B. *ras* C. *myc* D. *c-jun* E. *Rb*
3. 有丝分裂活动中的三个重要的特征是
A. 染色质凝集 B. 染色体列队 C. 纺锤体的形成
D. 分裂极确定 E. 收缩环的形成
4. MPF 在细胞周期中的作用是
A. 促进染色质凝集 B. 促进核膜崩解 C. 促进纺锤体的形成
D. 促进姐妹染色单体的分离 E. 促进有丝分裂进程
5. 抑癌基因包括
A. *ras* B. *myc* C. *Rb* D. *cyclinB* E. *p53*
6. 破坏框存在的分子是
A. *cyclin A* B. *cyclin B* C. *cyclin D* D. *cyclin E* E. *cyclin C*
7. MPF 可以磷酸化的蛋白是
A. H1 组蛋白 B. 核纤层蛋白 C. 肌动蛋白
D. 肌球蛋白 E. 分离酶
8. 表达仅限于 G₁ 期的细胞周期蛋白是
A. *cyclin A* B. *cyclin B* C. *cyclin C* D. *cyclin D* E. *cyclin E*
9. 下列因素在细胞周期调控中起作用的是
A. 基因 B. 生长因子 C. 胆固醇
D. cAMP E. 抑素
10. 发生于 MPF 活化过程的分子事件是
A. *cyclin B* 与 Cdk1 相结合
B. Thr161 与 Tyr15 磷酸化
C. Tyr15 被 *wee1* 激酶磷酸化
D. Tyr15 被 Cdc25 磷酸酶催化发生去磷酸化
E. Thr161 被 CAK 磷酸化

参考答案

一、名词解释

1. 细胞分裂 (cell division): 是细胞生命活动的重要特征之一, 指一个亲代细胞形成两个子代细胞的过程。通过细胞分裂, 亲代细胞的遗传物质和某些细胞组分可以相对均等地分配到两个子代细胞中, 这有效地保证了生物遗传的稳定性。

2. 细胞周期 (cell cycle): 将细胞从上次分裂结束到下次分裂结束所经历的规律性变化过程称为一个细胞周期。

3. 有丝分裂 (mitosis): 也称间接分裂, 是高等真核生物的体细胞分裂的主要方式。通过核分裂及胞质分裂两个过程, 借助于细胞骨架的重排, 有丝分裂的细胞实现了染色体及胞质在子代细胞中的均等分配。

4. 纺锤体 (spindle): 是在细胞分裂期出现的临时性细胞骨架结构, 由星体微管、极微管和动粒微管纵向排列组成, 由中心体作为两极, 因状如纺锤而得名。

5. 有丝分裂器 (mitotic apparatus): 在有丝分裂前中期由纺锤体 (包括星体和三种星体周围微管) 及与之结合的染色体共同构成。

6. 减数分裂 (meiosis): 是生殖细胞形成过程中的特殊有丝分裂过程, DNA 只复制一次, 而细胞连续分裂两次, 产生四个子代细胞, 每个子代细胞中染色体数目比亲代细胞减少一半, 成为仅具单倍体遗传物质的配子细胞。

7. 联会 (synapsis): 在第一次减数分裂前期 I 的偶线期, 染色质进一步凝集, 分别来自父母的、形态及大小相同的同源染色体相互靠近、配对的过程。

8. 细胞周期蛋白 (cyclin): 是真核细胞中的一类蛋白质, 它们能随细胞周期进程周期性地出现 (合成) 及消失 (降解)。Cyclin 通过选择性与 Cdk 结合, 形成复合物, 通过介导 Cdk 激活过程而参与细胞周期的调控。

9. 细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, Cdk): 一类必须与特定的细胞周期蛋白结合后才具有激酶活性的蛋白激酶, 通过磷酸化多种细胞周期相关蛋白, 在细胞周期调控中发挥关键核心作用。

10. 成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF): 又称为有丝分裂促进因子, 是指由 cyclin B 和 Cdk 1 结合形成的蛋白激酶复合物, 在促进细胞从 G_2 期向 M 期转换的过程中起着关键作用。

11. 检测点 (check point): 细胞中存在的一系列复杂的监控系统, 可对细胞周期发生的重要事件及出现的故障加以检测, 只有当这些事件完成或故障修复后, 保证细胞周期的每个关键环节准确完成后才能进入下个环节, 该监控系统即为检测点。

12. 原癌基因 (proto-oncogene): 是细胞内与细胞增殖、细胞周期调控相关的基因, 是维持机体正常生命活动所必需的, 在进化上高等保守。原癌基因包括 *src*、*ras*、*sis*、*myc*、*myb* 等基因家族成员。

13. 癌基因 (oncogene): 当原癌基因发生点突变、基因扩增、重排等基因改变时, 即转化成为癌基因, 而癌基因通常因获得新的表达产物而过度刺激细胞增殖。

14. 抑癌基因 (tumor suppressor genes): 是正常细胞所具有的、能抑制细胞恶性增殖的一类基因。这类基因编码的蛋白质通常能与转录因子结合或本身即为转录因子, 作为负调控因子调控细胞周期的进程。

二、单项选择题

- 1. E 2. C 3. D 4. B 5. C 6. C 7. A 8. C 9. D 10. B
- 11. A 12. C 13. C 14. D 15. C 16. A 17. C 18. D 19. B 20. E
- 21. C 22. C 23. A 24. B 25. E 26. A 27. D 28. B 29. B 30. A
- 31. D 32. E 33. B 34. A 35. C 36. E 37. C 38. B 39. A 40. C
- 41. E 42. B 43. E 44. C 45. C 46. D 47. B 48. B 49. D 50. C
- 51. C 52. D 53. D 54. B 55. A 56. B 57. E 58. E 59. E 60. B

三、多项选择题

- 1. BCD 2. ABCD 3. ACE 4. ABCDE 5. CE
 - 6. AB 7. ABD 8. CDE 9. ABDE 10. ABCDE
- (高强国)

第十四章

生殖细胞与受精

一、名词解释

1. 受精 (fertilization)
2. 透明带 (zona pellucida)
3. 顶体反应 (acrosome reaction)
4. 精子获能 (sperm capacitation)
5. 精子发生 (spermatogenesis)
6. 卵子发生 (oogenesis)
7. 辅助生殖技术 (assisted reproductive technology, ART)

二、单项选择题

1. 哺乳类精子发生顶体反应时接触到的结构是
A. 透明带 B. 卵细胞细胞质 C. 滤泡细胞
D. 卵质膜 E. 基底层
2. 人类出生时, 卵巢中的卵母细胞处于
A. 细线期 B. 粗线期 C. 偶线期
D. 双线期 E. 终变期
3. 卵原细胞的两次减数分裂分别完成于
A. 排卵时和受精时 B. 排卵前和受精后
C. 青春期前和青春期后 D. 出生前和出生后
E. 青春期前和排卵时
4. 在受精过程中, 存在于发育成熟的卵子细胞中, 可保证物种相近或相同的精子进入卵子细胞的结构是
A. 透明带 B. 皮层颗粒 C. 基底层
D. 卵泡细胞 E. 上皮细胞
5. 一个卵原细胞经过两次成熟分裂, 形成的卵子个数是
A. 一个 B. 二个 C. 一个或两个
D. 三个 E. 四个
6. 在精 - 卵融合过程中, 可以永久阻止多精入卵作用的是受精卵的
A. 透明带反应 B. 皮层反应 C. 顶体反应
D. 质膜通透性变化 E. 细胞质 pH 的升高
7. 胚胎移植前遗传学诊断 (PGD) 所用的细胞是
A. 羊水或羊水细胞 B. 卵细胞 C. 绒毛膜滋养层细胞

- D. 6-8 细胞期时的胚胎细胞 E. 受精卵
8. 哺乳动物的精子在受精之前通过经历一系列变化而使其运动力增加的过程称为
- A. 获能 B. 皮层反应 C. 透明带反应
D. 顶体反应 E. 蜕膜反应
9. 卵子受精后,其升高引起了皮层反应的是
- A. 钙离子浓度 B. 钾离子浓度 C. 钠离子浓度
D. 氯离子浓度 E. pH 值
10. 与性别决定无关的基因是
- A. *SRY* B. *SOX9* C. *DAX1* D. *Wnt4* E. *p53*
11. 精子获能的部位发生在
- A. 女性生殖管道内 B. 输精管内 C. 生精小管内
D. 曲细精管内 E. 精液内
12. 精子的顶体来源于
- A. 线粒体 B. 过氧化物酶体 C. 高尔基复合体
D. 中心体 E. 生发泡
13. 精原细胞产生精细胞后,为了在功能和形态上成为精子,精细胞所发生的变化是
- A. 顶体消失 B. 纤毛形成 C. 鞭毛形成
D. 线粒体体积变小 E. 细胞核变圆
14. 卵子细胞的皮层颗粒不含有
- A. 蛋白酶 B. 黏多糖 C. 黏性糖蛋白
D. 糖苷酶 E. 纤连蛋白
15. 获能后的精子
- A. 为二倍体细胞 B. 运动能力增加 C. 运动能力降低
D. 无授精能力 E. 代谢能力降低
16. 受精时
- A. 精子头钻入成熟卵细胞 B. 精子头和尾钻入成熟卵细胞
C. 精子头和尾钻入次级卵细胞 D. 精子头和尾钻入初级卵细胞
E. 精子头和尾钻入成熟卵泡
17. 卵子完成第二次减数分裂是在
- A. 受精后 B. 排卵时 C. 成熟卵泡时间
D. 初级卵泡时间 E. 原始卵泡时间
18. 在卵裂过程中,细胞周期包含
- A. G_1 期、 G_2 期、S 期、M 期 B. G_1 期、S 期、M 期 C. S 期、M 期
D. G_2 期、S 期、M 期 E. G_1 期、 G_2 期、M 期
19. 性别的决定因素是
- A. 精子发生中成熟分裂情况 B. 卵子发生中成熟分裂情况
C. 受精时的卵子染色体组型 D. 受精时的精子染色体组型
E. 受精后胚胎早期发育中的激素作用
20. 关于 ZP3 的错误叙述是
- A. 是卵子透明带的重要成分

- B. 由受精卵细胞产生
 C. 是精子与透明带结合的主要受体
 D. 可诱导顶体反应
 E. ZP3 受体的特异性由其肽链上的 O- 连接寡糖所决定
21. 哺乳动物的卵细胞在受精时处于
 A. 第一次减数分裂的前期 B. 第一次减数分裂的中期
 C. 第一次减数分裂的末期 D. 第二次减数分裂的前期
 E. 第二次减数分裂的中期
22. 人类的受精作用发生的部位是
 A. 输卵管伞部 B. 输卵管峡部 C. 输卵管壶腹部
 D. 阴道 E. 子宫
23. 人类原始生殖细胞起源于
 A. 内胚层 B. 中胚层 C. 外胚层
 D. 生殖腺索 E. 尿生殖嵴
24. 将卵子与精子取出后,置于试管内使其受精,经过数天的生长后,再将胚胎移植到母体子宫内发育成胎儿并分娩的技术称为
 A. IVF-ET B. PGD C. ICSI
 D. 卵浆置换技术 E. 精子及胚胎冻融技术
25. 精子与卵子透明带结合的主要受体是
 A. ZP1 B. ZP2 C. ZP3
 D. 整联蛋白 E. ADAM
26. 最适于少精患者的辅助生殖技术是
 A. AIH B. AID C. PGD
 D. ICSI E. IVF-ET
27. 性别决定开始时原始生殖细胞迁移到
 A. 卵巢 B. 外胚层 C. 卵黄囊
 D. 生殖嵴 E. 初级性索
28. 精母细胞的减数分裂期是
 A. 增殖期 B. 生长期 C. 成熟期
 D. 变形期 E. 静息期
29. 在精子细胞的变形期,会发生
 A. 精原细胞的减数分裂 B. 精原细胞形成初级精母细胞
 C. 次级精母细胞形成精细胞 D. 初级精母细胞形成次级精母细胞
 E. 精细胞形成精子
30. 顶体反应实际上是一种特殊的下列过程的是
 A. 胞吞 B. 胞吐 C. 增殖
 D. 自噬 E. 凋亡
31. 受精过程中,精子抵达卵细胞膜需穿过
 A. 放射冠 B. 透明带 C. 卵丘
 D. 皮层颗粒 E. 皮层

32. 精子与卵子透明带结合,可诱导
- A. 减数分裂 B. 有丝分裂 C. 受精过程
D. 精子获能 E. 顶体反应
33. 下列关于皮质反应的错误叙述是
- A. 可阻止多精入卵
B. 发生在精-卵膜融合后
C. 卵子通过胞吐作用将皮质颗粒释放出来
D. 不影响卵外被的结构
E. 皮质颗粒中的糖苷酶可降解透明带中的 ZP3
34. 受精开始和完成的标志分别是
- A. 顶体反应、精-卵膜融合 B. 顶体反应、精-卵核融合
C. 精-卵膜接触、精-卵核融合 D. 精-卵膜接触、精子细胞核进入卵细胞
E. 精子细胞核进入卵细胞、精-卵核融合
35. 下列能够调控卵母细胞减数分裂的复合物是
- A. cyclin A-Cdk 2 B. cyclin B-Cdk 1 C. cyclin D-Cdk 4
D. cyclin D-Cdk 6 E. cyclin E-Cdk 2

三、多项选择题

1. 参与精子发生调控的基因包括
- A. *AZFa* B. *MILI* C. *MIWI* D. *AZFb* E. *MIWI2*
2. 在生殖器官发生中,参与构成生精上皮的是
- A. 间充质细胞 B. 生精细胞 C. 支持细胞
D. 睾丸白膜 E. 睾丸间质
3. 对男性生殖细胞产生不利影响的环境因子包括
- A. 邻苯二甲酸盐 B. 多环芳烃 C. Piwi 蛋白
D. 溴系阻燃剂 E. 重金属铅
4. 受精过程包括
- A. 精子获能 B. 精子与透明带识别与结合
C. 顶体反应 D. 精子穿过卵外被
E. 精子与卵子质膜的融合
5. 目前常用的辅助生育技术有
- A. 克隆胚胎 B. PGD C. IVF-ET D. 代孕 E. ICSI

参考答案

一、名词解释

1. 受精 (fertilization): 精子和卵子相互融合形成受精卵的过程, 标志着一个新生命的开始, 是胚胎发育的起点。
2. 透明带 (zona pellucida): 由卵泡细胞和初级卵母细胞共同分泌形成的, 具有较强的组织特异性和抗原性, 能对同种精子进行专一性的识别与结合, 从而使受精过程具有相当的物种专一性。
3. 顶体反应 (acrosome reaction): 精子的质膜和顶膜外部发生多处融合, 使这两层膜泡状化, 在

精子顶体外方出现了许多孔洞,顶体内贮藏的水解酶从这些孔洞泄出来,这些水解酶作用于透明带,分解其中的组分,形成供精子穿透的通道。

4. 精子获能(sperm capacitation):指射出的精子在雌性生殖管道的液体环境作用下,精子膜发生变化,产生生化和运动方式的改变,精子因此穿越卵母细胞周围的滤泡细胞和透明带,获得授精能力。

5. 精子发生(spermatogenesis):精原细胞发育为精子的过程。人类精子发生过程分为增殖期、生长期、成熟期和变形期。

6. 卵子发生(oogenesis):卵原细胞发育为卵子的过程称为卵子发生,一般可分为增殖期、生长期、成熟期三个时期。

7. 辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART):是应用现代生物医学知识、技术及方法对配子、合子及胚胎进行人工操作,代替人类自然生殖过程中的某些步骤,以达到受孕目的的一项技术,主要包括体外受精、胚胎移植及其衍生技术。

二、单项选择题

- 1. A 2. D 3. B 4. A 5. A 6. B 7. D 8. A 9. A 10. E
- 11. A 12. C 13. C 14. E 15. B 16. A 17. A 18. C 19. D 20. B
- 21. E 22. C 23. C 24. A 25. C 26. D 27. D 28. C 29. E 30. B
- 31. B 32. E 33. D 34. C 35. B

三、多项选择题

- 1. ABCDE 2. BC 3. ABDE 4. BCDE 5. BCE

(李新颖)

第十五章

细胞分化

一、名词解释

1. 细胞分化 (cell differentiation)
2. 全能性细胞 (totipotent cell)
3. 多能细胞 (pluripotent cell)
4. 细胞决定 (cell determination)
5. 去分化 (dedifferentiation)
6. 转分化 (transdifferentiation)
7. 持家基因 (house-keeping gene)
8. 奢侈基因 (luxury gene)
9. 胚胎诱导 (embryonic induction)
10. 卵裂 (cleavage)
11. 组合调控 (combinatory control)
12. 可变剪接 (alternative splicing)

二、单项选择题

1. 多细胞生物的个体发育包括的两个阶段是
 - A. 胎儿阶段和成体阶段
 - B. 青春期和成年期
 - C. 胚胎发育和胚后发育
 - D. 性成熟前期和性成熟期
 - E. 生存和死亡
2. 下列蛋白质由奢侈基因表达的是
 - A. 核小体组蛋白
 - B. 核糖体蛋白
 - C. 细胞骨架蛋白
 - D. 糖酵解酶类蛋白
 - E. 血红蛋白
3. 机体前-后轴结构的分化与发育蓝图的决定机制是
 - A. 同源异形框基因的时空表达
 - B. 多个基因调节蛋白的组合
 - C. 激活基因表达的起始事件
 - D. 某些基因的激活和某些基因的关闭
 - E. 基因座控制区按序调节不同基因的打开和关闭
4. 下列人体细胞中分化程度最高的细胞是
 - A. 胚胎干细胞
 - B. 造血干细胞
 - C. 受精卵
 - D. 心肌细胞
 - E. 多能干细胞
5. 发育和分化为心血管系统的是

- A. 内胚层 B. 中胚层 C. 外胚层
D. 囊胚层 E. 桑葚胚
6. miRNA 与靶基因互补结合的位置是
A. mRNA 5' 端 UTR B. mRNA 3' 端 UTR C. 蛋白质的编码区
D. 5' 端帽子结构 E. 3' 端聚腺苷酸尾巴
7. 在个体发育过程中,细胞在发生可识别的分化特征之前就已经确定了未来的发育命运,只能向特定方向分化的状态称为
A. 细胞决定 B. 细胞分裂 C. 细胞分化
D. 细胞增殖 E. 细胞凋亡
8. 细胞不对称分裂时,核酸蛋白颗粒(RNP)中的转录因子 mRNA 在细胞质中的分布特点是
A. 均一性 B. 不均一性 C. 稳定性
D. 遗传性 E. 专一性
9. 为大量基因转录时需要并在许多细胞类型中都存在的因子是
A. 通用转录因子 B. 组织细胞特异性转录因子 C. 启动子
D. 增强子 E. 抑制子
10. 细胞决定在遗传过程中的特点是
A. 均一性 B. 不均一性 C. 异质性
D. 特异性 E. 遗传稳定性
11. 在生物的个体发育过程中,由一个受精卵发育成为复杂的生物体,起主要作用的生理过程是
A. 细胞分裂 B. 细胞生长 C. 细胞成熟
D. 细胞死亡 E. 细胞的分裂和分化
12. 在生物体内,细胞没有表现出全能性而是分化成为不同的组织器官,其原因是
A. 丧失了遗传信息
B. 不同细胞中遗传信息的执行情况不同
C. 不同细胞中遗传信息不完全相同
D. 在个体发育的不同时期,细胞内的遗传物质发生了变化
E. 在个体发育的不同时期,细胞内的蛋白质发生了变化
13. 人体中具有分化上的全能性的细胞是
A. 心肌细胞 B. 脂肪细胞 C. 造血干细胞
D. 受精卵 E. 神经细胞
14. 细胞分化最旺盛的时期是
A. 有丝分裂期 B. 减数分裂期 C. 受精卵时期
D. 细胞凋亡期 E. 胚胎期
15. 细胞的全能性是指
A. 在一定条件下能分化发育成为完整的个体
B. 在任何条件下均能分化发育成为完整的个体
C. 只能向本胚层组织和器官的方向分化发育
D. 只能向特定的组织和器官方向分化发育
E. 分化为胎盘和其他一些发育时所需的胚外组织

- B. 一种转录因子能同时调控几个基因的表达
 C. 所有的转录起始都只能受一种转录因子的调控
 D. 基因的表达过程是固定的,不能调控
 E. 转录因子无需与基因直接结合就能调控基因的表达
37. 发育和分化为神经系统、表皮及其附属物的是
 A. 内胚层
 B. 中胚层
 C. 外胚层
 D. 囊胚内细胞团
 E. 胚外组织
38. DNA 甲基化是指
 A. RNA 分子中的鸟嘌呤转变成 5- 甲基鸟嘌呤
 B. RNA 分子中的尿嘧啶转变成 5- 甲基尿嘧啶
 C. DNA 分子中的胸腺嘧啶转变成 5- 甲基胸腺嘧啶
 D. DNA 分子中的鸟嘌呤转变成 5- 甲基鸟嘌呤
 E. DNA 分子中的胞嘧啶转变成 5- 甲基胞嘧啶
39. 下列不属于肿瘤细胞特性的是
 A. 未分化
 B. 低分化
 C. 高增殖
 D. 高侵袭
 E. 接触抑制
40. 导致哺乳动物(雌性)和人类女性的两条 X 染色体中其中一条灭活(钝化)的机制是
 A. 乙酰化
 B. 甲基化
 C. 磷酸化
 D. 泛素化
 E. 糖基化
41. 下列有关细胞分化和细胞分裂的正确叙述是
 A. 细胞分裂是细胞分化的基础
 B. 细胞分化是细胞分裂的基础
 C. 细胞分化的实质就是细胞分裂
 D. 细胞分化发生于细胞分裂的 G₀ 期
 E. 细胞分化发生于细胞分裂的 S 期
42. 实现胚胎诱导是通过诱导组织释放的下列因子
 A. 旁分泌因子
 B. 自分泌因子
 C. 内分泌因子
 D. 表皮生长因子
 E. 胎盘生长因子
43. 哺乳动物基因组中的甲基化位点主要集中于
 A. 常染色质区
 B. 异染色质区
 C. DNA 双螺旋上的大沟
 D. DNA 双螺旋上的小沟
 E. RNA
44. 人类具有再生能力的器官是
 A. 心脏
 B. 肝脏
 C. 肾脏
 D. 小肠
 E. 胰腺
45. 长链非编码 RNA 调控基因表达的方式不包括
 A. 通过在蛋白编码基因上游启动子区发生转录,干扰下游基因的表达
 B. 通过抑制 RNA 聚合酶 II 或者介导染色质重建,影响下游基因表达
 C. 引起组蛋白的甲基化
 D. 通过与蛋白编码基因的转录本形成互补双链而干扰 mRNA 的剪接
 E. 通过结合到特定蛋白质上,调节相应蛋白的活性

三、多项选择题

1. 下列蛋白质由持家基因表达的是

- A. 角蛋白 B. 核小体组蛋白 C. 微管蛋白
D. 胶原蛋白 E. 胰岛素
2. 影响染色质结构变化的因素包括
A. 组蛋白修饰 B. 组蛋白组分的改变 C. DNA 甲基化
D. 非编码 RNA E. 线粒体的融合和分裂
3. DNA 甲基化导致基因失活(或沉默)的可能机制是
A. 甲基化直接干扰转录因子与启动子中特定结合位点的结合
B. 特异的转录抑制因子直接与甲基化 DNA 结合
C. 甲基化导致的基因沉默是由染色质结构的改变引起的
D. DNA 甲基化在染色质浓缩形成致密结构后可抑制基因的转录
E. DNA 甲基化不能导致基因失活
4. 发育过程中常见的旁分泌因子有
A. 成纤维细胞生长因子 B. Hedgehog 家族蛋白 C. Wnt 家族蛋白
D. TGF- β 超家族 E. 免疫球蛋白超家族
5. 下列蛋白质由奢侈基因表达的是
A. 角蛋白 B. 微管蛋白 C. 胶原蛋白
D. 血红蛋白 E. 卵清蛋白

参考答案

一、名词解释

1. 细胞分化 (cell differentiation): 由单个受精卵产生的细胞, 在形态结构、生化组成和功能等方面均有明显的差异, 形成这种稳定性差异的过程称为细胞分化。

2. 全能性细胞 (totipotent cell): 能在一定条件下分化发育成为整个个体的细胞称为全能性细胞。

3. 多能细胞 (pluripotent cell): 在胚胎发育中, 由于细胞所处的空间位置和微环境的差异, 细胞的分化潜能受到限制, 各胚层细胞只能向本胚层组织和器官的方向分化发育, 这种细胞称为多能细胞。

4. 细胞决定 (cell determination): 在个体发育过程中, 细胞在发生可识别的分化特征之前就已经确定了未来的发育命运, 只能向特定方向分化的状态, 称之为细胞决定。

5. 去分化 (dedifferentiation): 在某些条件下, 分化细胞的基因活动模式发生可逆性的变化, 失去原来分化特征, 回到未分化状态, 这一变化过程称为去分化。

6. 转分化 (transdifferentiation): 在高度分化的动物细胞中, 细胞从一种分化状态转变为另一种分化状态, 这种情况称为转分化。

7. 持家基因 (house-keeping gene): 也称管家基因。是生物体各类细胞中都表达, 为维持细胞存活和生长所必需的蛋白质编码的基因。

8. 奢侈基因 (luxury gene): 又称组织特异性基因 (tissue-specific gene), 是特定类型细胞中表达, 为其执行特定功能蛋白质编码的基因, 不同奢侈基因的选择性表达赋予了分化细胞的不同特征。

9. 胚胎诱导 (embryonic induction): 胚胎发育过程中, 一部分细胞对邻近细胞产生影响并决定其分化方向的现象, 称为胚胎诱导, 是胚胎细胞间相互作用的主要表现形式。

10. 卵裂 (cleavage): 卵细胞在受精后立刻进入反复的有丝分裂阶段, 这一快速的分裂时期称为卵裂。

11. 组合调控 (combinatory control): 转录起始受一个基因调节蛋白的组合而不是单个基因调节蛋白调控的现象称为组合调控。

12. 可变剪接 (alternative splicing): 在同一基因中, 其剪接位点和拼接方式可以改变, 从而导致一个基因能产生多个具有明显差异的相关蛋白产物。

二、单项选择题

1. C 2. E 3. A 4. D 5. B 6. B 7. A 8. B 9. A 10. E
 11. E 12. B 13. D 14. E 15. A 16. A 17. B 18. E 19. C 20. A
 21. D 22. E 23. C 24. A 25. D 26. D 27. D 28. A 29. E 30. B
 31. A 32. D 33. B 34. C 35. B 36. B 37. C 38. E 39. E 40. B
 41. A 42. A 43. B 44. B 45. C

三、多项选择题

1. BC 2. ABCD 3. ABCD 4. ABCD 5. ACDE

(向若兰)

第十六章

细胞衰老与细胞死亡

一、名词解释

1. 细胞衰老 (cell senescence)
2. 早熟性衰老 (premature senescence)
3. 复制性衰老 (replicative senescence)
4. Hayflick 界限 (Hayflick life span)
5. 细胞凋亡 (apoptosis)
6. 凋亡小体 (apoptotic body)
7. 细胞坏死 (necrosis)
8. 细胞焦亡 (pyroptosis)
9. 失巢凋亡 (anoikis)
10. 细胞自噬 (autophagy)
11. 细胞死亡 (cell death)

二、单项选择题

1. 不属于细胞衰老特征的是

- | | | |
|----------|-------------|------------|
| A. 细胞皱缩 | B. 膜脂分子之间交联 | C. 线粒体数目减少 |
| D. 脂褐质减少 | E. 染色质固缩 | |

2. 不属于细胞凋亡的抑制因素的是

- | | | |
|--------|-------------------|----------|
| A. 缺氧 | B. 突变型 <i>p53</i> | C. 细胞外基质 |
| D. 雌激素 | E. CD40 配体 | |

3. 下列学说与细胞衰老无关的是

- | | | |
|-----------|----------------|-----------|
| A. 自由基学说 | B. 端粒钟学说 | C. 遗传决定学说 |
| D. 克隆选择学说 | E. 基因转录或翻译差错学说 | |

4. 下列细胞中,能持续分裂增殖的细胞是

- | | | |
|--------|----------|--------|
| A. 神经元 | B. 唾液腺细胞 | C. 肝细胞 |
| D. 肌细胞 | E. 基底细胞 | |

5. 下列是衰老的生物学标志的为

- | | | |
|---------------|------------|-----------|
| A. 色素颗粒沉积减少 | B. 线粒体数目增多 | C. 端粒长度缩短 |
| D. 血清中自由基数量减少 | E. 免疫功能增强 | |

6. 下列不是细胞凋亡的特征的是

- | | | |
|--------------------|----------|-----------|
| A. 核 DNA 在核小体连接处断裂 | B. 核膜断裂 | C. 形成凋亡小体 |
| D. 细胞破裂,释放内容物 | E. 不引起炎症 | |

- D. 线粒体 DNA 完整 E. 端粒 DNA 丢失
22. 细胞凋亡与细胞坏死最主要的区别是
- A. 细胞核碎裂 B. DNA 降解 C. 细胞变形
- D. 炎症反应 E. 细胞连接减少
23. 衰老细胞的膜流动性降低,原因是
- A. 卵磷脂/鞘磷脂的比值升高 B. 不饱和脂肪酸被氧化
- C. 不饱和脂肪酸含量高 D. 脂肪酸链长度缩短
- E. β -半乳糖苷酶活性降低
24. 细胞凋亡时 DNA 片段长度的规律是
- A. 100bp 的整数倍 B. 200bp 的整数倍 C. 300bp 的整数倍
- D. 400bp 的整数倍 E. 500bp 的整数倍
25. 下列基因功能丧失可能导致细胞凋亡发生的是
- A. *Bax* B. *bcl-2* C. *Rb* D. *c-myc* E. *p16*
26. 下列与衰老无关的是
- A. 自由基产生 B. 端粒缩短 C. 代谢废物沉积
- D. *WRN* 基因突变 E. DNA 随机降解
27. 下列不属于细胞凋亡的是
- A. 皮肤上皮每天大量死亡脱落 B. 骨折时造成的细胞死亡
- C. 蝌蚪变态发育中尾部消失 D. 红细胞 120 天后的死亡
- E. 人指间隙的形成
28. 能够诱导内质网凋亡途径的酶是
- A. Caspase-3 B. Caspase-6 C. Caspase-7
- D. Caspase-8 E. Caspase-12
29. 下列不是 *p53* 正常功能的是
- A. 引起细胞周期阻滞 B. 在 DNA 修复中起作用
- C. 触发损伤细胞的凋亡 D. 在小鼠胚胎发育中起主导作用
- E. 促进细胞终末分化
30. 下列基因具有促进细胞存活的作用的是
- A. *bax* B. *ced-3* C. *c-myc* D. *ice* E. *bcl-2*
31. 与凋亡细胞形态无关的描述是
- A. 细胞膜完整 B. 出现凋亡小体 C. 核染色体呈新月状
- D. 细胞体积减小 E. 溶酶体破坏
32. 由溶酶体转变而来,含有不溶性脂蛋白颗粒的细胞内小体称为
- A. 核仁 B. 细胞核 C. 染色体
- D. 脂褐素 E. 线粒体
33. 下列关于 *Bcl-2* 家族的正确叙述是
- A. *Bcl-2* 有促进凋亡的作用 B. *Bcl-2* 仅存在于 B 细胞淋巴瘤
- C. *Bax* 仅存在于 B 细胞淋巴瘤 D. *Bcl-2* 和 *Bax* 均有抗凋亡作用
- E. *Bax* 具有促进细胞凋亡的作用
34. 不属于细胞凋亡的诱发因素是

- A. 肿瘤坏死因子
D. 热休克
35. 下列不属于细胞衰老变化的是
A. 细胞核增大
D. 线粒体体积减小
36. 机体中寿命最长的细胞是
A. 神经元
D. 白细胞
37. 下列基因不参与自噬调控的是
A. *Hox*
D. 磷酸酶基因
38. 复制性衰老的诱发原因是
A. 基因突变
D. 氧化应激
39. 细胞抗凋亡时,含量比值大于 50% 的是
A. Bcl-2/Bcl-xl
D. Bax/Bcl-2
40. 微自噬发生的细胞器是
A. 线粒体
D. 溶酶体
- B. 多巴胺
E. 自由基
- B. 内质网呈弥散状
E. 细胞内水分减少
- B. 红细胞
E. 肝细胞
- B. ATG
E. Hsc73
- B. 端粒缩短
E. 代谢废物累积
- B. Bad/Bcl-xl
E. Bcl-2/Bak
- B. 内质网
E. 核糖体
- C. 雄激素
E. 线粒体数目减少
- C. 表皮细胞
- C. 蛋白激酶基因
- C. 自由基
- C. Bcl-2/Bax
- C. 高尔基复合体

三、多项选择题

1. 程序性死亡细胞的染色质 DNA 降解特点是
A. 发生在细胞凋亡的早期
C. 电泳时呈现弥散样
E. DNA 片段可以被细胞膜包围
2. 细胞衰老伴随的形态学变化是
A. 核增大、染色深、核内有包含物
B. 染色质凝聚、固缩、碎裂、溶解
C. 质膜黏度增加、流动性降低
D. 细胞质色素积累、空泡形成
E. 线粒体数目减少、体积增大、mtDNA 突变或丢失
3. 凋亡小体的形态学特征有
A. 具有完整的膜结构
D. 包含染色质的片段
4. 细胞衰老时,内膜系统的变化是
A. 糙面内质网排列不规则
D. 溶酶体增加
5. 关于细胞凋亡的正确叙述是
A. 细胞凋亡是坏死
C. 细胞凋亡包括细胞焦亡
- B. 染色质片段大小是 200bp 的倍数
D. 断裂部位多位于核小体间的连接部位
- B. 胞膜表面微绒毛消失
E. 包含结构尚完整的细胞器
- B. 光面内质网减少
E. 线粒体增加
- B. 只在生理情况下发生
D. 是程序性死亡
- C. 胞内容物外漏
- C. 高尔基复合体碎裂

- E. 形成凋亡小体
6. 促进细胞凋亡的蛋白有
- A. p53 B. Bcl-2 C. Fas D. Bax E. Ced-3
7. 下列属于细胞衰老时发生的变化是
- A. DNA 复制与转录受到抑制 B. mRNA 和 tRNA 含量降低 C. 蛋白质含量下降
D. 酶的活性中心被氧化,失活 E. 不饱和脂肪酸被氧化
8. 细胞凋亡的特征是
- A. 细胞以出芽方式形成凋亡小体 B. DNA 降解,凝胶电泳图谱呈梯状
C. 细胞器溶解 D. 细胞膜流动性降低
E. 细胞膜破碎
9. 细胞自噬的发生过程主要包括
- A. 自噬前体的形成 B. 自噬体形成
C. 自噬体与溶酶体融合 D. 自噬内容物被降解
E. 自噬体溶解、消失
10. 凋亡细胞的特点包括
- A. 细胞膜破裂 B. 细胞膜保持完整 C. 被邻近的细胞吞噬
D. 常引起炎症 E. 不引起炎症

参考答案

一、名词解释

1. 细胞衰老 (cell senescence): 指随着时间的推移,细胞的增殖能力和生理功能逐渐发生衰退以及细胞形态发生改变,并趋向死亡的现象。
2. 早熟性衰老 (premature senescence): 指氧化应激诱导的非端粒依赖性衰老。
3. 复制性衰老 (replicative senescence): 指端粒缩短诱发的细胞衰老。
4. Hayflick 界限 (Hayflick life span): 由 Hayflick 等发现并提出,主要指体外培养的细胞具有增殖分裂的极限,并且细胞分裂能力与物种的寿命、个体的年龄等有关。
5. 细胞凋亡 (apoptosis): 是细胞在一定的生理或病理条件下,细胞内的死亡级联反应被触发所致的生理或病理性、主动性的死亡过程。
6. 凋亡小体 (apoptotic body): 细胞凋亡时,由完整的细胞膜包被形成的、内含细胞器、核碎片等内容物的囊状小体。
7. 细胞坏死 (necrosis): 指在外来致病因子作用下,细胞生命活动被强行终止所致的病理性、被动的死亡过程。
8. 细胞焦亡 (pyroptosis): 又称细胞炎性坏死,表现为细胞不断胀大直至细胞膜破裂,导致细胞内容物的释放进而激活强烈的炎症反应,是一种程序性细胞坏死。
9. 失巢凋亡 (anoikis): 是因细胞与细胞外基质和其他细胞脱离接触而诱发的细胞程序死亡。
10. 细胞自噬 (autophagy): 通过溶酶体与双层膜包裹的细胞自身物质融合,从而降解细胞自身物质的过程。目前发现自噬参与蛋白质、脂质、受损细胞器和蛋白聚集体的降解。
11. 细胞死亡 (cell death): 是细胞衰老的结果,是细胞生命现象不可逆的停止及细胞生命的结束。

二、单项选择题

- 1. D 2. A 3. D 4. E 5. C 6. D 7. A 8. B 9. B 10. A
- 11. A 12. D 13. B 14. B 15. E 16. C 17. B 18. C 19. A 20. A
- 21. D 22. D 23. B 24. B 25. B 26. E 27. B 28. E 29. D 30. E
- 31. E 32. D 33. E 34. C 35. D 36. A 37. A 38. B 39. C 40. D

三、多项选择题

- 1. ABDE 2. ABCDE 3. ABDE 4. ABCD 5. DE
- 6. ACDE 7. ABCDE 8. ABD 9. ABCD 10. BCE

(赵凌宇)

第十七章

干细胞与组织的维持和再生

一、名词解释

1. 干细胞 (stem cells)
2. 全能干细胞 (totipotent stem cell)
3. 多能干细胞 (pluripotent stem cell)
4. 诱导性多潜能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)
5. 组织特异性干细胞 (tissue-specific stem cell)
6. 不对称分裂 (asymmetry division)
7. 过渡放大细胞 (transit amplifying cell, TAC)
8. 干细胞巢 (stem cell niche)

二、单项选择题

1. 关于干细胞的基本特性的正确叙述是
 - A. 干细胞均具有发育全能性
 - B. 干细胞具有自我更新和多向分化潜能
 - C. 干细胞分化产生的细胞不可能是干细胞
 - D. 干细胞至少能分化为两种体细胞类型
 - E. 干细胞只存在于个体发育的早期阶段
2. 关于诱导性多潜能干细胞 (iPSCs) 的**错误**叙述是
 - A. iPSC 细胞具有自我更新能力
 - B. iPSC 细胞具有多向分化潜能
 - C. 通过诱导 iPSC 细胞分化有可能培育出人造组织器官
 - D. 在形态上与人 ES 细胞极其相似
 - E. 分化后的动物细胞将一直保持分化的状态, 不可逆转
3. 下列关于造血干细胞的**错误**叙述是
 - A. 在临床上已用于治疗白血病
 - B. 大多数表达 CD34
 - C. 低表达 CD38
 - D. 存在于骨髓中
 - E. 属于胚胎干细胞
4. 关于去分化的正确叙述是
 - A. 细胞去分化时, 分化细胞会失去其特有的形态结构和功能
 - B. 高度分化的细胞不能发生去分化
 - C. 细胞发生去分化后, 其核内的染色体数目会发生变化
 - D. 神经干细胞变成星形胶质细胞的现象属于去分化
 - E. 微环境的改变不会引起肿瘤细胞的去分化

5. 下列关于干细胞的叙述中,正确的是
- 胚胎干细胞在形态上表现为体积大,细胞核小,核仁明显
 - 干细胞分化形成不同组织细胞是基因选择性表达的结果
 - 异体造血干细胞移植成功后,不影响患者的血型
 - 肝脏干细胞分化形成肝脏细胞的过程表现了细胞的全能性
 - 嵌合体实验是人胚胎干细胞分化评价的“金标准”
6. 胚胎干细胞属于
- 全能干细胞
 - 多能干细胞
 - 单能干细胞
 - 成体干细胞
 - 组织干细胞
7. 下列由胚胎干细胞分化获得的细胞中,属于外胚层的是
- 心肌细胞
 - 神经细胞
 - 肝细胞
 - 胰腺 β 细胞
 - 肺泡上皮细胞
8. 人体最早的造血干细胞来源于
- 肝脏
 - 骨髓
 - 脾脏
 - 卵黄囊
 - 淋巴结
9. 关于诱导性多潜能干细胞(iPSCs)的**错误**叙述是
- iPS 细胞的多潜能性质与人 ES 细胞完全一致
 - 成纤维细胞经重编程可转变为 iPS 细胞
 - 在体外能分化形成三胚层
 - 在免疫缺陷小鼠体内能形成畸胎瘤
 - 为人类疾病的细胞治疗提供了可能性
10. 关于干细胞不对称分裂的正确叙述是
- 分裂产生两个不同大小的子代干细胞
 - 分裂产生两个不同核型的子代干细胞
 - 分裂产生两个不同功能的子代干细胞
 - 分裂产生两个不同大小的子代分化细胞
 - 产生一个子代干细胞和一个子代分化细胞
11. 下列细胞是全能干细胞的是
- 卵细胞
 - 间充质干细胞
 - 卵裂期的细胞
 - 肝细胞
 - 造血干细胞
12. 下列实验**不能**用来证明胚胎干细胞具有分化的多能性的是
- 胚胎干细胞在体外培养形成胚状体
 - 将体外培养的胚胎干细胞移植到免疫缺陷小鼠皮下形成畸胎瘤
 - 将体外培养的胚胎干细胞移植到小鼠囊胚腔中形成“嵌合体小鼠”
 - 将胚胎干细胞诱导分化为神经细胞
 - 将人胚胎干细胞移植到免疫缺陷小鼠皮下后形成胚胎组织瘤
13. 既有自我复制能力,又具有多向分化潜能的细胞是
- 肝细胞
 - 干细胞
 - 神经细胞
 - 红细胞
 - 淋巴细胞
14. 造血干细胞异常可导致

- A. 缺铁性贫血 B. 慢性失血性贫血 C. 再生障碍性贫血
D. 海洋性贫血 E. 巨幼细胞性贫血
15. 下列属于细胞去分化的是
- A. 神经干细胞分化成神经元 B. 神经干细胞分化成神经胶质细胞
C. 造血干细胞分化成造血细胞 D. 间充质干细胞分化成肌细胞
E. 成纤维细胞逆转成为胚胎干细胞
16. 以下关于造血干细胞的错误叙述是
- A. 造血干细胞是低分化的细胞
B. 造血干细胞具有再殖损伤骨髓的能力
C. 与骨髓中其他细胞的放射敏感性相同
D. 造血干细胞具有多向分化潜能
E. 造血干细胞是最原始的血细胞
17. 关于肿瘤干细胞的正确叙述是
- A. 具有自我更新能力
B. 组织特异性干细胞可作为肿瘤干细胞的来源
C. 正常干细胞和肿瘤干细胞的基因表达情况存在差异
D. 在免疫缺陷型小鼠体内可形成与原发肿瘤类型相同的肿瘤
E. 以上均正确
18. 以下关于组织干细胞的错误叙述是
- A. 组织干细胞是一种多能干细胞
B. 组织干细胞主要依赖不对称分裂方式来维持干细胞数量恒定
C. 组织干细胞具有自我更新能力和多向分化潜能
D. 神经干细胞是一种组织干细胞
E. 组织干细胞在临床上具有广阔的应用前景
19. 关于诱导性多潜能干细胞(iPSCs)的正确叙述是
- A. 具有全能性
B. 可通过导入转录因子 Klf4、Sox2、Oct4、c-Myc 来获得
C. 在分裂时很容易发生突变
D. 不具有完整基因组
E. 分化潜能与人 ES 细胞完全一致
20. 下列关于转分化的错误叙述是
- A. 在特定环境下,一种分化细胞可以转变为另一种分化细胞
B. 转分化表明细胞分化具有潜在的可塑性
C. 成纤维细胞转化为多能性干细胞属于转分化
D. 在特定条件下,皮肤的复层扁平细胞转化为柱状细胞属于转分化
E. 在胆管结扎的情况下,成熟肝细胞可以转分化为胆管细胞
21. 关于组织干细胞的描述,错误的是
- A. 造血干细胞可以通过刺激因子将其由骨髓动员至外周血中
B. 成体干细胞在体内通常通过不对称分裂维持群体的稳定
C. 造血干细胞间充质干细胞均是一类异质性的干细胞

- D. 成体干细胞通常无法无限增殖分裂
E. 间充质干细胞具有很强的免疫原性
22. 干细胞巢的组成成分包含
- A. 干细胞相邻的细胞
B. 干细胞相邻的细胞外基质
C. 干细胞相邻的黏附分子
D. 干细胞周围的细胞外基质中的调控因子
E. 以上都正确
23. 胚胎干细胞和成体组织干细胞均可分化形成多种类型细胞,下列关于细胞分化的叙述中,正确的是
- A. 多能干细胞分化程度高于专能干细胞
B. 干细胞分化的过程是不可逆转的
C. 细胞分化是基因的选择性表达造成的
D. 细胞分化只发生在胚胎时期
E. 成年个体组织中无细胞分化现象
24. 间充质干细胞来源于胚胎发育早期的
- A. 外胚层
B. 中胚层
C. 内胚层
D. 外胚层和中胚层
E. 外胚层和内胚层
25. 下列有关过渡放大细胞的错误叙述是
- A. 是干细胞经过不对称分裂产生的
B. 可用于增加分化细胞的数目
C. 不具有分化潜能
D. 增殖速率显著高于干细胞
E. 对维持组织稳态有重要作用
26. 下列分子可作为神经干细胞的分子标志的是
- A. CD34
B. 碱性磷酸酶
C. nestin
D. CD133
E. CD44
27. 下列关于干细胞巢的正确叙述是
- A. 是干细胞与赖以生存和维持功能的微环境
B. 干细胞周围的细胞外基质是干细胞巢的重要组成成分
C. 干细胞巢中的分泌因子参与调控干细胞的增殖与分化
D. 干细胞具有调控干细胞巢的功能
E. 以上都正确
28. 通常情况下造血干细胞只能分化产生各种血细胞,但在特定的诱导条件下,造血干细胞可以分化为神经细胞和肝细胞。其根本原因是
- A. 造血干细胞有旺盛的分裂能力
B. 造血干细胞是完全没有分化的细胞
C. 造血干细胞有能合成神经细胞或肝细胞需要的酶
D. 造血干细胞具有与受精卵相同的全套基因
E. 造血干细胞是全能干细胞
29. 下列关于干细胞的正确叙述是
- A. 细胞分化改变干细胞的遗传信息
B. 造血干细胞分化成红细胞的过程是可逆的
C. 干细胞不会发生衰老和凋亡

- D. 组织干细胞发生癌变可形成肿瘤干细胞
E. 干细胞中内质网、高尔基复合体比较发达
30. 下列关于正常干细胞和肿瘤干细胞差异的叙述中,正确的是
A. 正常干细胞的增殖过程受到基因调控,肿瘤干细胞的增殖过程不受基因调控
B. 正常干细胞只能迁移到特定组织,而肿瘤干细胞可迁移到很多部位
C. 二者都失去了正常分化的能力
D. 二者的遗传信息都没有发生改变
E. 二者具有快速增殖能力
31. 出生后人类造血干细胞主要来源于
A. 肝 B. 淋巴结 C. 胸腺 D. 骨髓 E. 脾
32. 研究发现,直肠癌中存在癌细胞和肿瘤干细胞。用姜黄素治疗,会诱发癌细胞凋亡,而肿瘤干细胞膜上具有高水平的 ABCG2 转运体蛋白,可排出姜黄素,使细胞逃避凋亡,并增殖分化形成癌细胞。由此可以推测出
A. 肿瘤干细胞与癌细胞中基因的表达不尽相同
B. 联合使用 ABCG2 转运体蛋白抑制剂和姜黄素治疗大肠癌,可促进肿瘤干细胞的凋亡
C. 治疗肿瘤的关键是杀死肿瘤干细胞
D. 肿瘤干细胞是化疗后肿瘤复发的主要原因
E. 以上都正确
33. 干细胞治疗是一项很新的生物治疗技术,这类干细胞
A. 具有分裂能力,但不能进一步分化成不同类型的细胞
B. 不具有分裂能力,也不能进一步分化成不同类型的细胞
C. 不具有分裂能力,但能进一步分化成不同类型的细胞
D. 具有分裂能力,也能进一步分化成不同类型的细胞
E. 以上特点都不具有
34. 临床上应用最多的造血干细胞标志物是
A. CD34 B. CD38 C. SSEA-3 D. CD133 E. CD44
35. 下列关于乳腺癌干细胞的正确叙述是
A. 具有自我更新能力
B. 易于形成转移灶
C. 可在免疫缺陷型小鼠体内形成与原发肿瘤类型相同的肿瘤
D. 是乳腺癌治疗的重要目标
E. 以上均正确

三、多项选择题

1. 干细胞具有的特征是
A. 干细胞本身不是终末分化细胞
B. 干细胞具有自我更新的能力
C. 干细胞的分化是不可逆的
D. 干细胞可连续分裂几代,也可较长时间处于静息状态
E. 干细胞分裂产生的子细胞或者保持为干细胞或者分化为特定细胞
2. 干细胞根据发育的潜能可以分为

细胞。

8. 干细胞巢 (stem cell niche): 指干细胞所在的微环境, 一般由与干细胞相邻的外围细胞、黏附分子和细胞外基质以及其中的细胞因子等成分组成, 它们与干细胞的相互作用决定了干细胞的休眠、增殖或分化状态的转变, 维持着干细胞的稳态。

二、单项选择题

1. B 2. E 3. E 4. A 5. B 6. B 7. B 8. D 9. A 10. E
 11. C 12. D 13. B 14. C 15. E 16. C 17. E 18. A 19. B 20. C
 21. E 22. E 23. C 24. B 25. C 26. C 27. E 28. D 29. D 30. B
 31. D 32. E 33. D 34. A 35. E

三、多项选择题

1. ABDE 2. ACD 3. ABCDE 4. CDE 5. ABCDE

(于 兵)

第十八章

细胞工程

一、名词解释

1. 细胞工程 (cell engineering)
2. 悬浮培养 (suspension culture)
3. 三维细胞培养 (three-dimensional cell culture, TDCC)
4. 细胞融合 (cell fusion)
5. 细胞核移植 (nuclear transfer)
6. 基因转移 (gene transfer)
7. 细胞重编程 (cell reprogramming)

二、单项选择题

1. 细胞大规模培养时培养容量通常至少为
A. 0.5L B. 1L C. 2L D. 4L E. 5L
2. 在悬浮培养中,为有效保护细胞免受机械破坏作用,需加入保护性添加剂,主要成分是
A. 羧甲基纤维素 B. EDTA C. SDS
D. 甘油 E. DMSO
3. 作为新的学科领域,细胞工程的形成来源于
A. 基因工程,组织工程 B. 细胞生物学,生物工程
C. 细胞生物学,组织工程 D. 细胞生物学,基因工程
E. 基因工程,生物工程
4. 用于杂交细胞筛选的培养基通常是
A. L15 B. 1640 C. DMEM D. HAT E. Eagle
5. 细胞在培养液中呈悬浮状态的生长与增殖被称为
A. 细胞培养 B. 原代培养 C. 传代培养
D. 悬浮培养 E. 贴壁培养
6. 乳腺上皮细胞的细胞成分与另外一种细胞的细胞成分融合后制备的杂交细胞可用来产生克隆羊多利,涉及的细胞或细胞成分是
A. 细胞核,受精卵细胞 B. 细胞质,受精卵细胞 C. 细胞核,卵细胞
D. 细胞核,卵细胞质 E. 细胞,受精卵细胞
7. 用于大规模工业生产的生物反应器的容积多为
A. 1000~2000L B. 2000~3000L C. 3000~4000L
D. 4000~5000L E. 5000~20 000L
8. 通过包裹外源 DNA 并与细胞膜融合进行基因转移的方法是

- A. 多价阳离子脂质体 B. 磷酸钙介导法 C. PEG 转染法
D. 慢病毒介导法 E. 电转染法
9. 固定化细胞培养系统 Nunc 工厂一次的细胞产量可高达
A. $3 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ B. $3 \times 10^6 \sim 3 \times 10^7$ C. $3 \times 10^7 \sim 3 \times 10^8$
D. $3 \times 10^8 \sim 3 \times 10^9$ E. $3 \times 10^9 \sim 3 \times 10^{10}$
10. 2 个或 2 个以上的细胞合并成一个细胞的过程称为
A. 细胞培养 B. 细胞融合 C. 细胞克隆
D. 核质交换 E. 基因转移
11. 将外源基因导入受体细胞使其发生遗传性状及表型改变的技术是
A. 转化 B. 转染 C. 细胞融合
D. 基因转移 E. 细胞移植
12. 可用于构建人工工程组织或器官的细胞被称为
A. 干细胞 B. 种子细胞 C. 周期性细胞
D. 多能诱导干细胞 E. 杂交细胞
13. 使用电穿孔法进行基因转移时,轰击细胞的场强通常为
A. 100~220kV/cm B. 200~500kV/cm C. 500~1500kV/cm
D. 1500~3000kV/cm E. 3000~5000kV/cm
14. 制备单克隆抗体过程中,能在 HAT 选择性培养基中存活的细胞是
A. T 细胞 B. B 细胞 C. 骨髓瘤细胞
D. 杂交细胞 E. 淋巴细胞
15. Nunc 细胞工厂由一组长方形的 Petri 培养板组成,总面积可达
A. 100~600cm² B. 600~1200cm² C. 600~2400cm²
D. 1200~2400cm² E. 2400cm²
16. 1962 年,由 Y. Okada 和 J. Tadokoro 发现的可以促进细胞融合的是
A. 灭活的疱疹病毒 B. PEG C. 溶血卵磷脂
D. 油酸 E. 灭活的仙台病毒
17. 病毒载体转导技术中,通过在细胞内复制而不整合进行外源基因的表达,从而具有良好安全性的是
A. HIV 病毒 B. 逆转录病毒 C. 腺病毒
D. 慢病毒 E. 牛痘病毒
18. 核移植胚胎干细胞具有
A. 专一分化能力 B. 多向分化能力和高增殖能力
C. 低分化特性 D. 专一化和高增殖能力
E. 多向分化潜能和低增殖能力
19. 单克隆抗体制备过程中,杂交瘤细胞的培养方式是
A. 悬浮培养 B. 固定化培养 C. 微载体培养
D. 三维细胞培养 E. 贴壁培养法
20. 胚胎干细胞技术与核移植技术相结合,用于产生疾病替代治疗细胞的高新技术是指
A. 同源克隆技术 B. 生殖性克隆技术 C. 治疗性克隆技术
D. 体细胞克隆技术 E. 胚胎干细胞技术

21. 通过与外源 DNA 形成复合共沉淀物进行基因转移的技术是
 A. 多价阳离子载体 B. 单价阳离子载体 C. PEG 转染法
 D. 慢病毒介导法 E. 磷酸钙介导法
22. 显微注射技术中,将外源 DNA 注射到受精卵的部位是
 A. 细胞质 B. 细胞核 C. 雄原核
 D. 雌原核 E. 融合后的雌雄原核
23. 2006 年,日本京都大学 Yamanaka 实验室工作人员将 4 种转录因子导入小鼠分化细胞中,成功逆转了分化过程并得到功能上类似胚胎干细胞的细胞,该技术被称为
 A. 多能性重编程 B. 谱系重编程
 C. 多能细胞提取物共培养重编程 D. 体细胞重编程
 E. 诱导性多能干细胞重编程
24. 单克隆抗体制备时,体内 (*in vivo*) 培养杂交瘤细胞的方法是
 A. 悬浮培养方法 B. 三维细胞培养方法
 C. Nunc 细胞工厂培养方法 D. 兔子腹水培养
 E. 小鼠腹水培养
25. 通过在细胞膜上所形成的可复性小孔使 DNA 进入细胞质内,然后整合入细胞的基因组并得到表达的基因转移方法是
 A. 多价阳离子脂质体 B. 磷酸钙介导法 C. PEG 转染法
 D. 慢病毒介导法 E. 电转染法
26. 谱系重编程策略不包括
 A. 转分化 B. iPSC 编程 C. 去分化
 D. 转决定 E. 化生
27. 杂交瘤细胞的无限增殖能力来自
 A. B 淋巴细胞 B. T 淋巴细胞 C. 淋巴瘤细胞
 D. 骨髓瘤细胞 E. 浆细胞
28. 下列不属于细胞工程的主要技术的是
 A. 细胞融合 B. 单细胞测序 C. 核移植
 D. 基因转移 E. 细胞重编程
29. 药用蛋白是生物制品的重要类别,下列不属于药用蛋白的是
 A. 疫苗 B. 凝血因子 IX C. 免疫调节剂
 D. 单克隆抗体 E. 抗生素
30. 由杂交瘤细胞分泌的、针对单一表位、具有高亲和力和高特异性的蛋白被称为
 A. 第二抗体 B. 多克隆抗体 C. 双特异性抗体
 D. 单克隆抗体 E. 单链抗体
31. 以转基因动物作为生物反应器来生产蛋白质最早由美国 K. Gordon 等人于 1987 年报道,他们用表达组织型纤溶酶原激活因子的细胞是
 A. 小鼠乳腺细胞 B. 奶羊乳腺细胞 C. 小鼠表皮细胞
 D. 小鼠造血干细胞 E. 小鼠单核细胞
32. 产生多利羊的克隆技术是
 A. 同源克隆 B. 治疗性克隆

C. 显微注射的基因转移技术

D. 生殖性克隆

E. 胚胎干细胞技术

33. 在细胞大规模培养技术中,培养细胞的浓度均一,工艺可控性强,细胞的浓度可以得到及时有效的调控,细胞的产量比较恒定的培养技术是

A. 贴壁培养

B. 固定化培养

C. 微载体培养

D. 悬浮培养

E. 三维细胞培养

34. 可有效保护细胞免受搅拌和通气反应器中的流体机械破坏作用的非离子表面活性剂是

A. Pluronic F68

B. EDTA

C. DMSO

D. 胰蛋白酶

E. SDS

35. 杂交瘤细胞表达和分泌抗体的能力来自

A. B 淋巴细胞

B. T 淋巴细胞

C. B 淋巴瘤细胞

D. 骨髓瘤细胞

E. 浆细胞

三、多项选择题

1. 生物工程又称生物技术,其在内容和层次上已有了迅速发展,如今它主要包括

A. 酶工程

B. 生化工程

C. 基因与基因组工程

D. 发酵工程

E. 细胞与组织工程

2. 细胞工程根据不同的操作对象可分为

A. 动物细胞工程

B. 微生物细胞工程

C. 细菌细胞工程

D. 植物细胞工程

E. 细胞与组织工程

3. 大规模细胞培养的方法实际应用中常包括

A. 悬浮培养技术

B. 贴壁细胞培养技术

C. 三维细胞培养技术

D. 固化培养技术

E. 微载体培养

4. 细胞融合之后,需要对融合细胞进行筛选以获得所需要的杂交瘤细胞,通常可进行的筛选方法有

A. 抗生素筛选

B. 荧光标记筛选

C. 抗药性筛选

D. 营养缺陷筛选

E. 温度敏感筛选

5. 在细胞基因工程的应用中,包括多种基因转移技术,其中生物学基因转移方法包括

A. 磷酸钙介导的转染

B. 病毒介导法

C. 脂质体包埋法

D. 体细胞核移植法

E. 精子载体法

参考答案

一、名词解释

1. 细胞工程 (cell engineering): 是将细胞生物学知识与生物工程学技术相结合而形成的一门新的学科领域。主要通过细胞融合或拆合、核质交换或核移植、染色体或基因转移以及经由细胞培养和筛选,按照人们预先的设计,产生出新的细胞,用于生产或医疗实践。

2. 悬浮培养 (suspension culture): 细胞在培养液中呈悬浮状态生长和增殖的培养方法。适用于血液淋巴组织细胞及其肿瘤细胞、转化细胞、融合细胞的培养。

3. 三维细胞培养 (three-dimensional cell culture, TDCC): 是指将具有不同三维结构的材料作为载体,与各种不同种类的细胞在体外共同培养,使细胞能够在载体的三维立体空间结构中迁移、生

长,构成三维的细胞载体复合物。这种培养方法获得的细胞与体内细胞生长情况极为相似。

4. 细胞融合 (cell fusion): 又称细胞杂交 (cell hybridization), 是指 2 个或 2 个以上的细胞合并成 1 个细胞的过程。可用于研究细胞的遗传变异、进化、发育及用于生产单克隆抗体等。

5. 细胞核移植 (nuclear transfer): 是指通过显微操作将一个细胞的细胞核移植到一个去核的卵母细胞内的技术过程。

6. 基因转移 (gene transfer): 是将外源基因导入受体细胞并整合至受体细胞的基因组中, 使受体细胞遗传性状及表型发生一定改变的技术。借此可以选择出所需的新型细胞, 乃至新的个体。

7. 细胞重编程 (cell reprogramming): 是指不改变基因序列, 通过表观遗传修饰来改变细胞的命运, 使已分化细胞的核基因组恢复其分化前的功能状态, 该技术可用于细胞治疗。

二、单项选择题

1. C 2. A 3. B 4. D 5. D 6. D 7. E 8. A 9. D 10. B
 11. D 12. B 13. C 14. D 15. C 16. E 17. C 18. B 19. A 20. C
 21. E 22. C 23. E 24. E 25. E 26. B 27. D 28. B 29. E 30. D
 31. A 32. D 33. D 34. A 35. A

三、多项选择题

1. ABCDE 2. ABD 3. ADE 4. CDE 5. BDE

(唐娟)