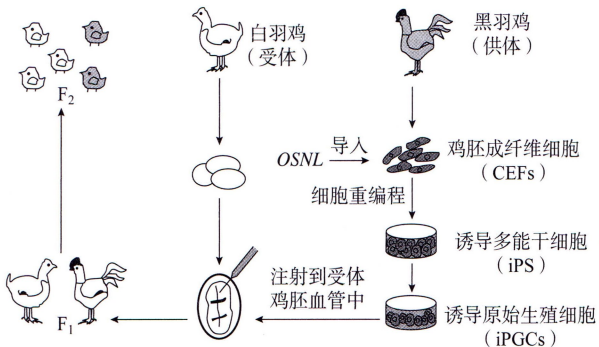


(5) 与常规转化法相比, 采用 CDB 法进行基因递送的优点是_____

(答出 2 点即可)。

47. (2022·海南选考, 20) (13 分) 以我国科学家为主的科研团队将 *OSNL* (即 4 个基因 *Ocr4/Sox2/Nanog/Lin28A* 的缩写) 导入黑羽鸡胚成纤维细胞 (CEFs), 诱导其重编程为诱导多能干细胞 (iPS), 再诱导 iPS 分化为诱导原始生殖细胞 (iPGCs), 然后将 iPGCs 注射到孵化 2.5 天的白羽鸡胚血管中, 最终获得具有黑羽鸡遗传特性的后代, 实验流程如图。回答下列问题:



(1) CEFs 是从孵化 9 天的黑羽鸡胚中分离获得的, 为了获得单细胞悬液, 鸡胚组织剪碎后需用_____处理。动物细胞培养通常需要在合成培养基中添加_____等天然成分, 以满足细胞对某些细胞因子的需求。

(2) 体外获取 *OSNL* 的方法有_____ (答出 1 种即可)。若要在 CEFs 中表达外源基因蛋白, 需构建基因表达载体, 载体中除含有目的基因和标记基因外, 还须有启动子和_____等。启动子是_____识别和结合的部位, 有了它才能驱动_____。

(3) iPS 细胞和 iPGCs 细胞的形态、结构和功能不同的根本原因是_____。

(4) 诱导 iPS 细胞的技术与体细胞核移植技术的主要区别是_____。

(5) 该实验流程中用到的生物技术有_____ (答出 2 点即可)。

48. (2022·河北选考, 24) (15 分) 蛋白酶抑制剂基因转化是作物抗虫育种的新途径。某研究团队将胰蛋白酶抑制剂 (NaPI) 和胰凝乳蛋白酶抑制剂 (StPinA) 的基因单独或共同转化棉花, 获得了转基因植株。回答下列问题:

(1) 蛋白酶抑制剂的抗虫机制是_____。

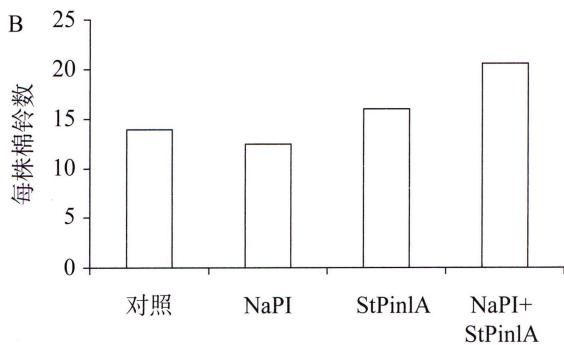
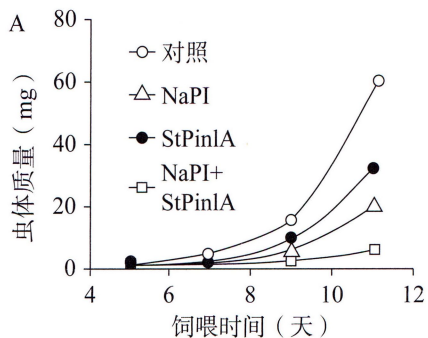
(2) _____是实施基因工程的核心。

(3) 利用农杆菌转化法时, 必须将目的基因插入到质粒的_____上, 此方法的不足之处是_____。

(4) 为检测目的基因在受体细胞基因组中的整合及其转录和翻译, 可采用的检测技术有_____ (写出两点即可)。

(5) 确认抗虫基因在受体细胞中稳定表达后, 还需进一步做抗虫的_____

_____ , 以鉴定其抗性程度。下图为三种不同遗传操作产生的转基因棉花抗虫实验结果, 据结果分析_____ (填 “NaPI” 或 “StPinA” 或 “NaPI+StPinA”) 转基因棉花的抗虫效果最佳, 其原因是_____。



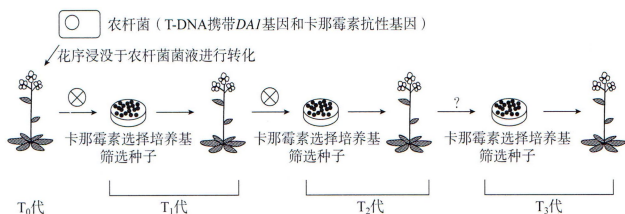
(6) 基因突变可产生新的等位基因, 在自然选择的作用下, 昆虫种群的基因频率会发生_____ , 导致昆虫朝着一定的方向不断进化。据此推测, 被蛋白酶抑制剂转基因作物长期选择后, 某些昆虫具有了抗蛋白酶抑制剂的能力, 其分子机制可能是_____ (写出两点即可)。

49. (2023·广东选考, 20) (14 分) 种子大小是作物重要的产量性状。研究者对野生型拟南芥 ($2n=10$) 进行诱变, 筛选到一株种子增大的突变体。通过遗传分析和测序, 发现野生型 *DA1* 基因发生一个碱基 G 到 A 的替换, 突变后的基因为隐性基因, 据此推测突变体的表型与其有

关,开展相关实验。

回答下列问题:

- 拟采用农杆菌转化法将野生型 *DAI* 基因转入突变体植株,若突变体表型确由该突变造成,则转基因植株的种子大小应与_____植株的种子大小相近。
- 用 PCR 反应扩增 *DAI* 基因,用限制性内切核酸酶对 PCR 产物和_____进行切割,用 DNA 连接酶将两者连接。为确保插入的 *DAI* 基因可以正常表达,其上下游序列需具备_____。
- 转化后, T-DNA (其内部基因在减数分裂时不发生交换)可在基因组单一位点插入也可以同时插入多个位点。在插入片段均遵循基因分离及自由组合定律的前提下,选出单一位点插入的植株,并进一步获得目的基因稳定遗传的植株(如下图),用于后续验证突变基因与表型的关系。



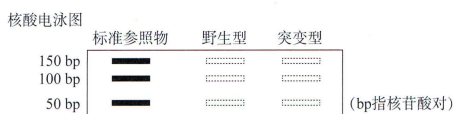
- 农杆菌转化 T₀ 代植株并自交,将 T₁ 代种子播种在选择培养基上,能够萌发并生长的阳性个体即表示其基因组中插入了_____。
- T₁ 代阳性植株自交所得的 T₂ 代种子按单株收种并播种于选择培养基,选择阳性率约_____%的培养基中幼苗继续培养。
- 将②中选出的 T₂ 代阳性植株_____ (填“自交”、“与野生型杂交”或“与突变体杂交”)所得的 T₃ 代种子按单株收种并播种于选择培养基,阳性率达到_____%的培养基中的幼苗即为目标转基因植株。

为便于在后续研究中检测该突变,研究者利用 PCR 扩增野生型和突变型基因片段,再使用限制性内切核酸酶 X 切割产物,通过核酸电泳即可进行突变检测,相关信息见下图,在答题卡电泳图中将酶切结果对应位置的条带涂黑。

野生型 5' CCTTTTCATT...CAGGACTCTGCCTT...TTACAAGTTA 3' (150 bp)
3' GGAAAAGTAA...CTCCTGAGACGGAA...AATGTTCAAT 5'

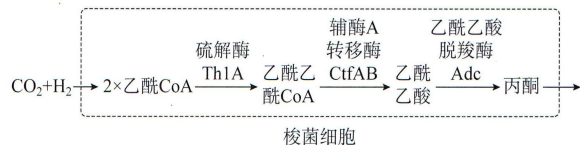
突变型 5' CCTTTTCATT...AAGGACTCTGCCTT...TTACAAGTTA 3' (150 bp)
3' GGAAAAGTAA...TTCTGAGACGGAA...AATGTTCAAT 5' (bp指核苷酸对)

限制性内切酶 X 识别及切割序列 AAGGNNNNNNCCTT
TTCCNNNNNNGGAA (N代表任意核苷酸)



50. (2022·广东选考, 22) (12分) “绿水逶迤去,青山相向开”,大力发展低碳经济已成为全社会的共识。基

于某些梭菌的特殊代谢能力,有研究者以某些工业废气(含 CO₂ 等一碳温室气体,多来自高污染排放企业)为原料,通过厌氧发酵生产丙酮,构建一种生产高附加值化工产品的新技术。

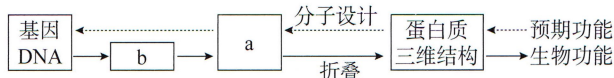


回答下列问题:

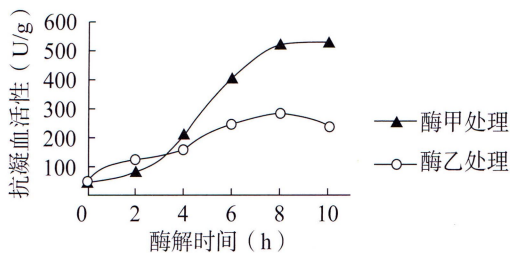
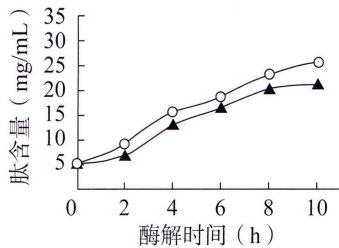
- 研究者针对每个需要扩增的酶基因(如图)设计一对_____,利用 PCR 技术,在优化反应条件后扩增得到目标酶基因。
- 研究者构建了一种表达载体 pMTL80k,用于在梭菌中建立多基因组表达库,经筛选后提高丙酮的合成量。该载体包括了启动子、终止子及抗生素抗性基因等,其中抗生素抗性基因的作用是_____,终止子的作用是_____。
- 培养过程中发现重组梭菌大量表达上述酶蛋白时,出现了生长迟缓的现象,推测其原因可能是_____,此外丙酮的积累会伤害细胞,需要进一步优化菌株和工艺才能扩大应用规模。
- 这种生产高附加值化工产品的新技术,实现了_____,体现了循环经济特点。从“碳中和”的角度看,该技术的优势在于_____,具有广泛的应用前景和良好的社会效益。

51. (2022·湖南选考, 22) (15分) 水蛭是我国的传统中药材,主要药理成分水蛭素为水蛭蛋白中重要成分之一,具有良好的抗凝血作用。拟通过蛋白质工程改造水蛭素结构,提高其抗凝血活性。回答下列问题:

- 蛋白质工程流程如图所示,物质 a 是_____,物质 b 是_____。在生产过程中,物质 b 可能不同,合成的蛋白质空间构象却相同,原因是_____。



- 蛋白质工程是基因工程的延伸,基因工程中获取目的基因的常用方法有_____,_____和利用 PCR 技术扩增。PCR 技术遵循的基本原理是_____。
- 将提取的水蛭蛋白经甲、乙两种蛋白酶水解后,分析水解产物中的肽含量及其抗凝血活性,结果如图所示。推测两种处理后酶解产物的抗凝血活性差异主要与肽的_____ (填“种类”或“含量”)有关,导致其活性不同的原因是_____。



(4) 若要比蛋白质工程改造后的水蛭素、上述水蛭蛋白酶解产物和天然水蛭素的抗凝血活性差异，简要写出实验设计思路：_____。

52. (2022·湖北选考, 24) (18分) “端稳中国碗，装满中国粮”，为了育好中国种，科研人员在杂交育种与基因工程育种等领域开展了大量的研究。二倍体作物 M 的品系甲有抗虫、高产等多种优良性状，但甜度不高。为了改良品系甲，增加其甜度，育种工作者做了如下实验：

【实验一】遗传特性及杂交育种的研究

在种质资源库中选取乙、丙两个高甜度的品系，用三个纯合品系进行杂交实验，结果如下表。

杂交组合	F ₁ 表现型	F ₂ 表现型
甲 × 乙	不甜	1/4 甜、3/4 不甜
甲 × 丙	甜	3/4 甜、1/4 不甜
乙 × 丙	甜	13/16 甜、3/16 不甜

【实验二】甜度相关基因的筛选

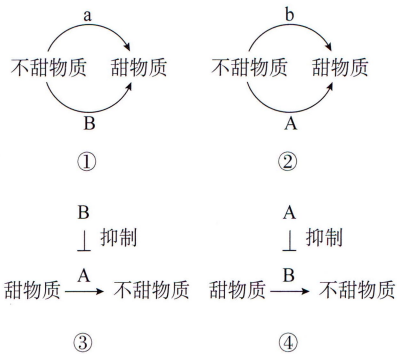
通过对甲、乙、丙三个品系转录的 mRNA 分析，发现基因 S 与作物 M 的甜度相关。

【实验三】转 S 基因新品系的培育

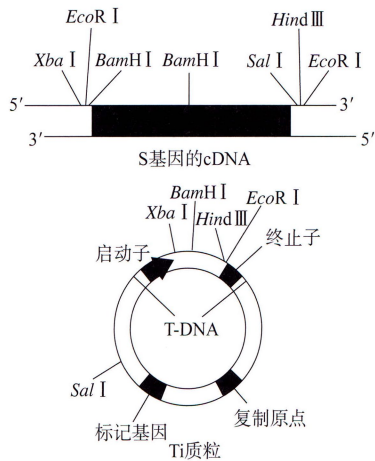
提取品系乙的 mRNA，通过基因重组技术，以 Ti 质粒为表达载体，以品系甲的叶片外植体为受体，培育出转 S 基因的新品系。

根据研究组的实验研究，回答下列问题：

- 假设不甜植株的基因型为 AA₁b₁b₁ 和 Aa₁b₁b₁，则乙、丙杂交的 F₂ 代中表现型为甜的植株基因型有_____种。品系乙基因型为_____。若用乙 × 丙中 F₂ 代不甜的植株进行自交，F₃ 代中甜：不甜比例为_____。
- 下图中，能解释 (1) 中杂交实验结果的代谢途径有_____。

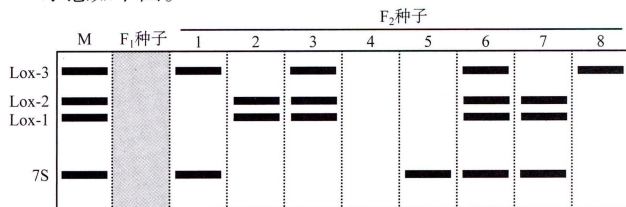


(3) 下图是 S 基因的 cDNA 和载体的限制性内切核酸酶 (限制性核酸内切酶) 酶谱。为了成功构建重组表达载体，确保目的基因插入载体中方向正确，最好选用_____酶切割 S 基因的 cDNA 和载体。



- 用农杆菌侵染品系甲叶片外植体，其目的是_____。
- 除了题中所示的杂交育种和基因工程育种外，能获得高甜度品系，同时保持甲的其他优良性状的育种方法还有_____ (答出 2 点即可)。

53. (2022·福建选考, 12) (14分) 7S 球蛋白是大豆最主要的过敏原蛋白，三种大豆脂氧酶 Lox-1, 2, 3 是大豆产生腥臭味的原因。大豆食品深加工过程中需要去除 7S 球蛋白和三种脂氧酶。科研人员为获得 7S 球蛋白与三种脂氧酶同时缺失的大豆新品种，将 7S 球蛋白缺失的大豆植株与脂氧酶完全缺失的植株杂交，获得 F₁ 种子。F₁ 植株自交得到 F₂ 种子。对 F₁ 种子和 F₂ 种子的 7S 球蛋白和脂氧酶进行蛋白质电泳检测，不同表现型的电泳条带示意如下图。



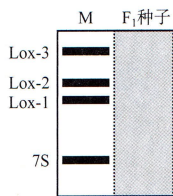
注：图中黑色条带为抗原—抗体杂交带，表示相应蛋白质的存在。M 泳道条带为相应标准蛋白所在位置，F₁ 种子泳道的条带待填写。

根据电泳检测的结果，对 F₂ 种子表现型进行分类统计如下表。

F ₂ 种子表现型		粒数
7S 球蛋白	野生型	124
	7S 球蛋白缺失型	377
脂氧酶 Lox-1, 2, 3	野生型	282
	①	94
	②	94
	Lox-1, 2, 3 全缺失型	31

回答下列问题：

- 7S 球蛋白缺失型属于_____（填“显性”或“隐性”）性状。
- 表中①②的表现型分别是_____、_____。
脂氧酶 Lox-1, 2, 3 分别由三对等位基因控制，在脂氧酶是否缺失的性状上，F₂ 种子表现型只有四种，原因是_____。
- 在答题卡对应的图中画出 F₁ 种子表现型的电泳条带。



- 已知 *Lox* 基因和 7S 球蛋白基因独立遗传。图中第_____泳道的种子表现型为 7S 球蛋白与三种脂氧酶同时缺失型，这些种子在 F₂ 中的比例是_____。利用这些种子选择并获得稳定遗传种子的方法是_____。
- 为提高大豆品质，利用基因工程方法提出一个消除野生型大豆 7S 球蛋白过敏原的设想_____。

54. (2022·福建选考, 13) (12 分) 美西螈具有很强的再生能力。研究表明，美西螈的巨噬细胞在断肢再生的早期起重要作用。为研究巨噬细胞的作用机制，科研人员制备了抗巨噬细胞表面标志蛋白 CD14 的单克隆抗体，具体方法如下。回答下列问题：

(一) 基因工程抗原的制备

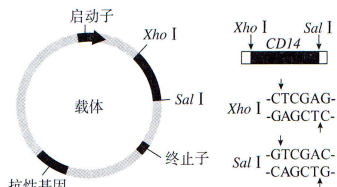


图1

- 根据美西螈 *CD14* 基因的核苷酸序列，合成引物，利用 PCR 扩增 *CD14* 片段。已知 DNA 聚合酶催化引物的 3'-OH 与加入的脱氧核苷酸的 5'-P 形成磷酸二酯键，则新合成链的延伸方向是_____（填“5'→3'”或“3'→5'”）。

(2) 载体和 *CD14* 片段的酶切位点及相应的酶切序列如图 1 所示。用 *Xho* I 和 *Sal* I 分别酶切 *CD14* 和载体后连接，*CD14* 接入载体时会形成正向连接和反向连接的两种重组 DNA。可进一步用这两种限制酶对 *CD14* 的连接方向进行鉴定，理由是_____。

(3) 培养能表达 CD14 蛋白的大肠杆菌，分离纯化目的蛋白。

(二) 抗 CD14 单克隆抗体的制备

流程如图 2 所示：

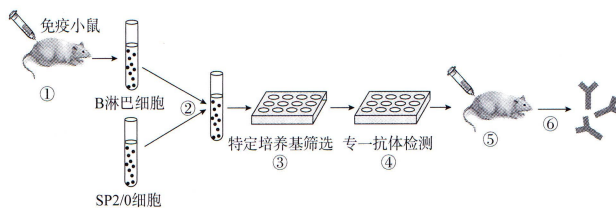


图2

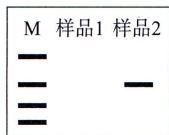
- 步骤①和步骤⑤分别向小鼠注射_____和_____。
- 步骤②所用的 SP2/O 细胞的生长特点是_____。
- 吸取③中的上清液到④的培养孔中，根据抗原—抗体杂交原理，需加入_____进行专一抗体检测，检测过程发现有些杂交瘤细胞不能分泌抗 CD14 抗体，原因是_____。
- 步骤⑥从_____中提取到大量的抗 CD14 抗体，用于检测巨噬细胞。

55. (2023·河北选考, 22) (15 分) 单细胞硅藻具有生产生物柴油的潜在价值。研究者将硅藻脂质合成相关的苹果酸酶 (ME) 基因构建到超表达载体，转入硅藻细胞，以期获得高产生物柴油的硅藻品系。回答下列问题：

- 根据 DNA 和蛋白质在特定浓度乙醇溶液中的_____差异获得硅藻粗提 DNA，PCR 扩增得到目的基因。
- 超表达载体的基本组件包括复制原点、目的基因、标记基因、_____和_____等。本研究中目的基因为_____。
- PCR 扩增时引物通过_____原则与模板特异性结合。根据表达载体序列设计了图 1 所示的两条引物，对非转基因硅藻品系 A 和转 ME 基因硅藻候选品系 B 进行 PCR 检测，扩增产物电泳结果见图 2。其中，样品 1 为本实验的_____组，样品 2 有特异性扩增产物，结果表明_____。



图1



注: M为标准分子量DNA
样品1的模板为品系A基因组DNA
样品2的模板为品系B基因组DNA

图2

(4) 利用单细胞硅藻生产生物柴油的影响因素包括胞内脂质含量和繁殖速率等。图3为硅藻胞内脂质含量检测结果。据图分析,相对于品系A,品系B的胞内脂质含量平均水平明显_____。同时,还需测定_____以比较在相同发酵条件下品系A与B的繁殖速率。

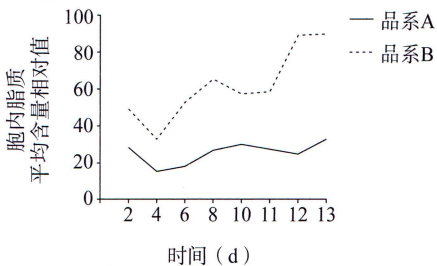
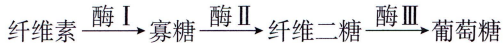


图3

- (5) 胞内脂质合成需要大量 ATP。ME 催化苹果酸氧化脱羧反应产生 NADH。研究表明,品系 B 线粒体中 ME 含量显著高于品系 A。据此分析,ME 基因超表达使线粒体中 NADH 水平升高, _____, 最终促进胞内脂质合成。
- (6) 相对于大豆和油菜等油料作物,利用海生硅藻进行生物柴油生产的优势之处为 _____。
- (答出两点即可)

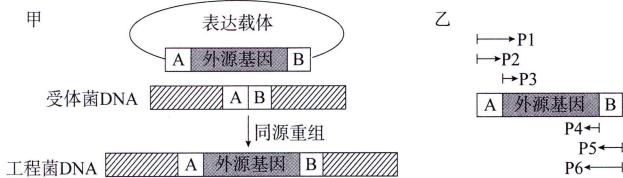
56. (2023·天津选考,17) 构建可利用纤维素产乙醇的转基因酿酒酵母菌株是解决能源危机的手段之一,为此设计表达载体,思路如下。

(1) 外源基因的选择 纤维素常见生物降解途径如下。



酿酒酵母通常无法吸收纤维素、寡糖和纤维二糖,应向酿酒酵母转入上图中三种酶的基因,并使其表达产物在细胞 _____ (内/外) 发挥作用。

(2) 外源基因的插入方法 同源重组是碱基序列基本相同的 DNA 区段通过配对、链断裂和再连接而产生片段交换的过程。通过同源重组将外源基因插入染色体的特定位点可获得遗传稳定的工程菌株,如甲图所示。



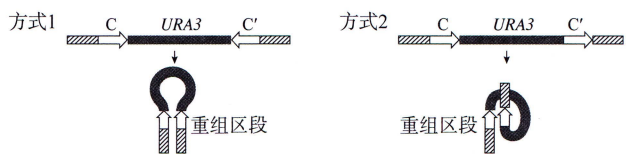
酿酒酵母基因组有多个 AB 短序列。为通过同源重组将外源基因插入 AB 之间,在设计表达载体时,可采

用 PCR 技术在外源基因两端分别引入 A 和 B,获得乙图所示长片段。PCR 时应选用的一对引物为 _____ (从 P1~P6 中选)。

(3) 标记基因的选择 *URA3* 是尿嘧啶合成关键酶基因,常被用作标记基因。另外, *URA3* 编码的蛋白可将外源 5- 氟尿嘧啶转化为有毒物质,导致细胞死亡。

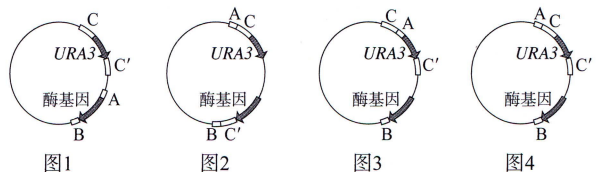
① 为得到成功插入酶 I 基因的菌株 1,需将酶 I 基因同 *URA3* 一起插入 *URA3* 缺陷型酿酒酵母基因组 AB 之间,并利用 _____ 的培养基筛选存活菌株。

② 在后续插入酶 II 基因时,为继续利用 *URA3* 作为筛选标记,需切除菌株 1 的 *URA3*。为此设计表达载体时,还应向 *URA3* 两端引入酿酒酵母基因组中不存在的同源区段 C 和 C', 并以下图方式 _____ 排列才能通过同源重组达到上述目的。



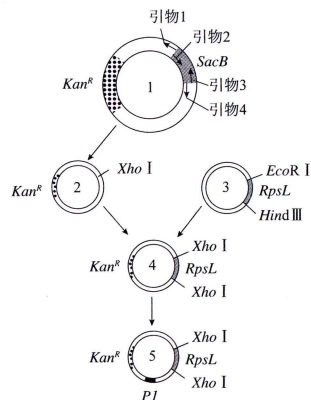
此后,需要将菌株 1 在 _____ 的培养基上培养,存活菌株即为 *URA3* 被成功切除的菌株 1'。

(4) 表达载体的构建 综上,将三种酶基因依次插入酿酒酵母基因组中,在构建表达载体时, A、B、C、C'、*URA3* 和酶基因应采用下图 _____ 的排布方式。



57. (2022·天津选考,15) 研究者拟构建高效筛选系统,将改进的苯丙氨酸合成关键酶基因 *P1* 导入谷氨酸棒杆菌,以提高苯丙氨酸产量。

(1) 如图是该高效筛选系统载体的构建过程。载体 1 中含有 *Kan^R* (卡那霉素抗性基因) 和 *SacB* 两个标记基因,为去除筛选效率较低的 *SacB*,应选择引物 _____ 和 _____,并在引物的 _____ (5' / 3') 端引入 *Xho I* 酶识别序列,进行 PCR 扩增,产物经酶切、连接后环化成载体 2。



- (2) PCR 扩增载体 3 中筛选效率较高的标记基因 *RpsL* (链霉素敏感基因) 时, 引物应包含 _____ (*EcoR* I / *Hind* III / *Xho* I) 酶识别序列, 产物经单酶切后连接到载体 2 构建高效筛选载体 4。
- (3) 将改进的 *PI* 基因整合到载体 4 构建载体 5。将载体 5 导入链霉素不敏感 (由 *RpsL* 突变造成)、卡那霉素敏感的受体菌。为获得成功导入载体 5 的菌株, 应采用含有 _____ 的平板进行初步筛选。
- (4) 用一定的方法筛选出如下菌株: *PI* 基因脱离载体 5 并整合到受体菌拟核 DNA, 且载体 5 上其他 DNA 片段全部丢失。该菌的表型为 _____。
- A. 卡那霉素不敏感、链霉素敏感
B. 卡那霉素敏感、链霉素不敏感
C. 卡那霉素和链霉素都敏感
D. 卡那霉素和链霉素都不敏感
- (5) 可采用 _____ 技术鉴定成功整合 *PI* 基因的菌株。之后以发酵法检测苯丙氨酸产量。

58. (2023·辽宁选考, 25) (11分) 天然 β -淀粉酶大多耐热性差, 不利于工业化应用。我国学者借助 PCR 改造 β -淀粉酶基因, 并将改造的基因与 pLN23 质粒重组后导入大肠杆菌, 最终获得耐高温的 β -淀粉酶。回答下列问题:

- (1) 上述过程属于 _____ 工程。
- (2) PCR 中使用的聚合酶属于 _____ (填写编号)。
- ①以 DNA 为模板的 RNA 聚合酶
②以 RNA 为模板的 RNA 聚合酶
③以 DNA 为模板的 DNA 聚合酶
④以 RNA 为模板的 DNA 聚合酶
- (3) 某天然 β -淀粉酶由 484 个氨基酸构成, 研究发现, 将该酶第 476 位天冬氨酸替换为天冬酰胺, 耐热性明显提升。在图 1 所示的 β -淀粉酶基因改造方案中, 含已替换碱基的引物是 _____ (填写编号)。

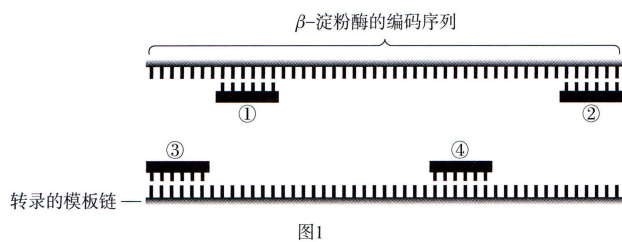


图1

- (4) 为了使上述改造后的基因能在大肠杆菌中高效表达, 由图 2 所示的 pLN23 质粒构建得到基因表达载体。除图示信息外, 基因表达载体中应该还有目的基因 (即改造后的基因) 和 _____。

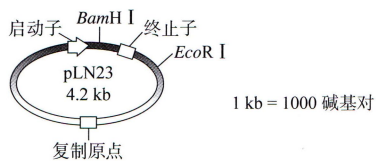


图2

- (5) 目的基因 (不含 *EcoR* I 酶切位点) 全长为 1.5 kb, 将其插入 *Bam*H I 位点。用 *EcoR* I 酶切来自于不同

大肠杆菌菌落的质粒 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳确定 DNA 片段长度, 这一操作的目的是 _____。正确连接的基因表达载体被 *EcoR* I 酶切后长度为 _____ kb。

- (6) 采用 PCR 还能在分子水平上确定目的基因是否转录, 根据中心法则, 可通过 _____ 反应获得 PCR 的模板。

59. (2023·江苏选考, 22) (12分) 为了将某纳米抗体和绿色荧光蛋白基因融合表达, 运用重组酶技术构建质粒, 如图 1 所示。请回答下列问题:

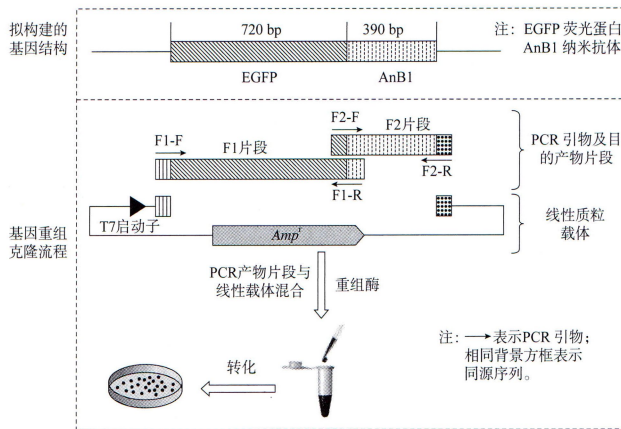


图1

- (1) 分别进行 PCR 扩增片段 F1 与片段 F2 时, 配制的两个反应体系中不同的有 _____, 扩增程序中最主要的不同是 _____。
- (2) 有关基因序列如图 2。引物 F2-F、F1-R 应在下列选项 中选用 _____。

EGFP基因序列: 5' ATGGTGAGCAAGGGC.....GACGAGCTGTACAAG 3'
AnB1基因序列: 5' CATGTCCAGCTGCAG.....CCAAAACCAACAACCA 3'

图2

- A. ATGGTG.....CAACCA
B. TGGTTG.....CACCAT
C. GACGAG.....CTGCAG
D. CTGCAG.....CTCGTC
- (3) 将 PCR 产物片段与线性质粒载体混合后, 在重组酶作用下可形成环化质粒, 直接用于转化细菌。这一过程与传统重组质粒构建过程相比, 无需使用的酶主要有 _____。
- (4) 转化后大肠杆菌需采用含有抗生素的培养基筛选, 下列叙述错误的有 _____。
- A. 稀释涂布平板需控制每个平板 30~300 个菌落
B. 抗性平板上未长出菌落的原因一般是培养基温度太高
C. 抗性平板上常常会出现大量杂菌形成的菌落
D. 抗性平板上长出的单菌落无需进一步划线纯化
- (5) 为了验证平板上菌落中的质粒是否符合设计, 用不同菌落的质粒为模板, 用引物 F1-F 和 F2-R 进行了 PCR 扩增, 质粒 P1~P4 的扩增产物电泳结果如图 3。根据图中结果判断, 可以舍弃的质粒有 _____。

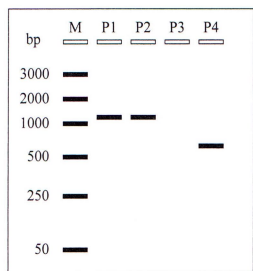


图3

(6) 对于 PCR 产物电泳结果符合预期的质粒，通常需进一步通过基因测序确认，原因是_____。

60. (2022·江苏选考, 24) (12分) 纤毛是广泛存在的细胞表面结构，功能异常可引发多种疾病。因此，研究纤毛形成的作用机制具有重要意义。请回答下列问题。

(1) 纤毛结构如图 I 所示，由细胞膜延伸形成的纤毛膜主要由_____组成。基体由中心体转变而来，中心体在有丝分裂中的功能是_____。

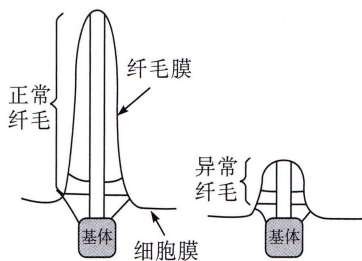


图 I

(2) 某病人肾小管上皮细胞纤毛异常，为了分析纤毛相关基因 X 是否发生了变异，对基因 X 进行了 PCR 扩增与产物测序。从细胞样品中分离 DNA 时，可通过交替调节盐浓度将与核蛋白结合的 DNA 分离出来，溶液中添加 NaCl 至 2.0 mol/L 的目的是_____。PCR 扩增时，需在_____催化下，在引物的_____端进行 DNA 链的延伸，获得扩增产物用于测序。

(3) 为研究蛋白质 X 在细胞中的定位，构建绿色荧光蛋白 GFP 与 X 的融合蛋白，融合蛋白具有绿色荧光，可指示其在细胞内位置。将 X-GFP 基因融合片段 M 导入如图 II 所示载体质粒 Y，构建 Y-M 重组质粒（在 EcoR V 位点插入片段）。请完成下表。

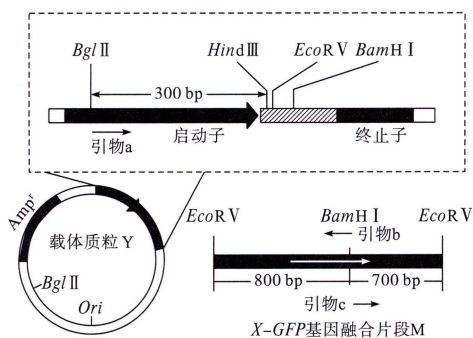


图 II

限制酶	识别序列
<i>Bam</i> H I	G↓GATCC
<i>Eco</i> R V	GAT↓ATC
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT
<i>Bgl</i> II	A↓GATCT

序列编号 Y-M 连接处测序后部分序列

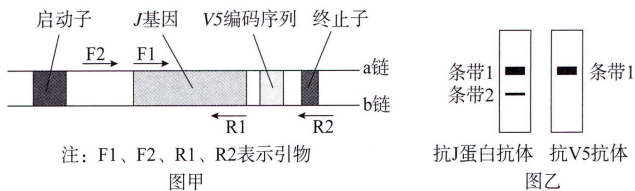
- Q1 5'...AGATCTCCGATATT...3'
- Q2 5'...AGATCTCCAAGCTT...3'
- Q3 5'...AAGCTTCCGATCC...3'
- Q4 5'...AAGCTTCCGATATC...3'

图 III

分步实验目标	简易操作、结果、分析
PCR 鉴定正向重组质粒 Y-M	①选择图 II 引物_____；② PCR 目的产物约为_____ bp
确保 M 及连接处序列正确	③质粒测序，图 III 中正确的是_____（选填序列编号）
检测融合蛋白定位	④对照质粒 Y-GFP（仅表达 GFP）与实验质粒 Y-M 分别导入细胞，发现对照组整个细胞均有绿色荧光而实验组荧光集中在纤毛基部，说明_____

(4) 为研究另一纤毛病相关基因 Z 表达的变化，采用荧光定量 PCR 法检测健康人与病人基因 Z 的转录水平。采集样本、提取总 RNA，经_____形成 cDNA 作为模板，PCR 扩增结果显示，在总 cDNA 模板量相等的条件下，健康人 *Ct* 值为 15，而病人 *Ct* 值为 20 (*Ct* 值是产物荧光强度达到设定阈值时的 PCR 循环数)。从理论上估算，在 PCR 扩增 20 个循环的产物中，健康人样品的目的产物大约是病人的_____倍。

61. (2023·山东选考, 25) (10分) 科研人员构建了可表达 J-V5 融合蛋白的重组质粒并进行了检测，该质粒的部分结构如图甲所示，其中 V5 编码序列表达标签短肽 V5。



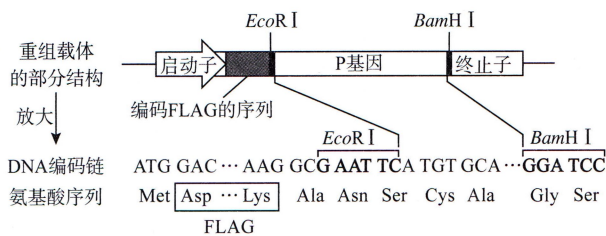
(1) 与图甲中启动子结合的酶是_____。除图甲中标出的结构外，作为载体，质粒还需具备的结构有_____（答出 2 个结构即可）。

(2) 构建重组质粒后，为了确定 J 基因连接到质粒中且插入方向正确，需进行 PCR 检测，若仅用一对引物，应选择图甲中的引物_____。已知 J 基因转录的模板链位于 b 链，由此可知引物 F1 与图甲中 J 基因的_____（填“a 链”或“b 链”）相应部分的序列相同。

(3) 重组质粒在受体细胞内正确表达后, 用抗 J 蛋白抗体和抗 V5 抗体分别检测相应蛋白是否表达以及表达水平, 结果如图乙所示。其中, 出现条带 1 证明细胞内表达了_____, 条带 2 所检出的蛋白_____ (填“是”或“不是”) 由重组质粒上的 J 基因表达的。

62. (2022·山东选考, 25) (12分) 某种类型的白血病由蛋白 P 引发, 蛋白 UBC 可使 P 被蛋白酶识别并降解, 药物 A 可通过影响这一过程对该病起到治疗作用。为探索药物 A 治疗该病的机理, 需构建重组载体以获得融合蛋白 FLAG-P 和 FLAG-PA。PA 是缺失特定氨基酸序列的 P, FLAG 是一种短肽, 连接在 P 或 PA 的氨基端, 使融合蛋白能与含有 FLAG 抗体的介质结合, 但不影响 P 或 PA 的功能。

- 为构建重组载体, 需先设计引物, 通过 PCR 特异性扩增 P 基因。用于扩增 P 基因的引物需满足的条件是_____。为使 PCR 产物能被限制酶切割, 需在引物上添加相应的限制酶识别序列, 该限制酶识别序列应添加在引物的_____ (填“3' 端”或“5' 端”)。
- PCR 扩增得到的 P 基因经酶切连接插入载体后, 与编码 FLAG 的序列形成一个融合基因, 如图甲所示, 其中“ATGTGCA”为 P 基因编码链起始序列。将该重组载体导入细胞后, 融合基因转录出的 mRNA 序列正确, 翻译出的融合蛋白中 FLAG 的氨基酸序列正确, 但 P 基因对应的氨基酸序列与 P 不同。据图甲分析, 出现该问题的原因是_____。修改扩增 P 基因时使用的带有 EcoR I 识别序列的引物来解决该问题, 具体修改方案是_____。



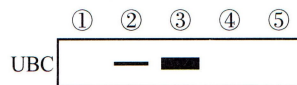
图甲

(3) 融合蛋白表达成功后, 将 FLAG-P、FLAG-PA、药物 A 和 UBC 按照图乙中的组合方式分成 5 组。各组样品混匀后分别流经含 FLAG 抗体的介质, 分离出与介质结合的物质并用 UBC 抗体检测, 检测结果如图丙所示。已知 FLAG-P 和 FLAG-PA 不能降解 UBC, 由①②③组结果的差异推测, 药物 A 的作用是_____ ; 由_____

②④组或③⑤组的差异推测, PA 中缺失的特定序列的作用是_____。

	①	②	③	④	⑤	注:
FLAG-P	-	+	+	-	-	“+”表示有
FLAG-PA	-	-	-	+	+	“-”表示无
药物 A	-	-	+	-	+	
UBC	+	+	+	+	+	

图乙

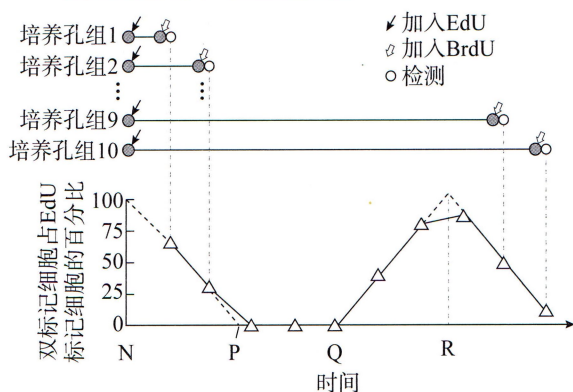


图丙

(4) 根据以上结果推测, 药物 A 治疗该病的机理是_____。

63. (2023·北京选考, 21) (10分) 变胖过程中, 胰岛 B 细胞会增加。增加的 B 细胞可能源于自身分裂 (途径 I), 也可能来自胰岛中干细胞的增殖、分化 (途径 II)。科学家采用胸腺嘧啶类似物标记的方法, 研究了 L 基因缺失导致肥胖的模型小鼠 IK 中新增 B 细胞的来源。

- EdU 和 BrdU 都是胸腺嘧啶类似物, 能很快进入细胞并掺入正在复制的 DNA 中, 掺入 DNA 的 EdU 和 BrdU 均能与_____ (用字母表示) 互补配对, 并可以被分别检测。未掺入的 EdU 和 BrdU 短时间内即被降解。
- 将处于细胞周期不同阶段的细胞混合培养于多孔培养板中, 各孔同时加入 EdU, 随后每隔一定时间向一组培养孔加入 BrdU, 再培养十几分钟后收集该组孔内全部细胞, 检测双标记细胞占 EdU 标记细胞的百分比 (如图)。图中反映 DNA 复制所需时长的是从_____点到_____点。



(3) 为研究变胖过程中 B 细胞的增殖, 需使用一批同时变胖的小鼠。为此, 本实验使用诱导型基因敲除小鼠, 即饲喂诱导物后小鼠的 L 基因才会被敲除, 形成小鼠 IK。科学家利用以下实验材料制备小鼠 IK:

- 纯合小鼠 Lx: 小鼠 L 基因两侧已插入特异 DNA 序列 (x), 但 L 的功能正常;
- Ce 酶基因: 源自噬菌体, 其编码的酶进入细胞核

后作用于 x，导致两个 x 间的 DNA 片段丢失；

③Er 基因：编码的 Er 蛋白位于细胞质，与 Er 蛋白相连的物质的定位由 Er 蛋白决定；

④口服药 T：小分子化合物，可诱导 Er 蛋白进入细胞核。

请完善制备小鼠 IK 的技术路线：

 _____→连接到表达载体→转入小鼠 Lx→筛选目标小鼠→_____→获得小鼠 IK。

(4) 各种细胞 DNA 复制所需时间基本相同，但途径 I 的细胞周期时长 (t_1) 是途径 II 细胞周期时长 (t_2) 的三倍以上。据此，科学家先用 EdU 饲喂小鼠 IK， t_2 时间后换用 BrdU 饲喂，再过 t_2 时间后检测 B 细胞被标记的情况。研究表明，变胖过程中增加的 B 细胞大多数来源于自身分裂，与之相应的检测结果应是_____。

64. (2023·浙江 6 月选考, 23) (14 分) 赖氨酸是人体不能合成的必需氨基酸，而人类主要食物中的赖氨酸含量很低，利用生物技术可提高食物中赖氨酸含量。回答下列问题：

(1) 植物细胞合成的赖氨酸达到一定浓度时，能抑制合成过程中两种关键酶的活性，导致赖氨酸含量维持在一定浓度水平，这种调节方式属于_____。根据这种调节方式，在培养基中添加_____，用于筛选经人工诱变的植物悬浮细胞，可得到抗赖氨酸类似物的细胞突变体，通过培养获得再生植株。

(2) 随着转基因技术与动物细胞工程结合和发展，2011 年我国首次利用转基因和体细胞核移植技术成功培育了高产赖氨酸转基因克隆奶牛。其基本流程为：

①构建乳腺专一表达载体。随着测序技术的发展，为获取富含赖氨酸的酪蛋白基因（目的基因），可通过检索_____获取其编码序列，用化学合成法制备得到。再将获得的目的基因与含有乳腺特异性启动子的相应载体连接，构建出乳腺专一表达载体。

②表达载体转入牛胚胎成纤维细胞 (BEF)。将表达载体包裹到磷脂等构成的脂质体内，与 BEF 膜发生_____，表达载体最终进入细胞核，发生转化。

③核移植。将转基因的 BEF 作为核供体细胞，从牛卵巢获取卵母细胞，经体外培养及去核后作为_____。将两种细胞进行电融合，电融合的作用除了促进细胞融合，同时起到了_____重组细胞发育的作用。

④重组细胞的体外培养及胚胎移植。重组细胞体外培养至_____，植入代孕母牛子宫角，直至小牛出生。

⑤检测。DNA 水平检测：利用 PCR 技术，以非转基因牛耳组织细胞作为阴性对照，以_____为阳性对照，检测到转基因牛耳组织细胞中存在目的基因。RNA 水平检测：从非转基因牛乳汁中的脱落细胞、转基因牛乳汁中的脱落细胞和转基因牛耳组织细胞，提取总 RNA，对总 RNA 进行_____处理，以去除 DNA 污染，再经逆转录形成 cDNA，并以此为_____，利用特定引物扩增目的基因片段。结果显示目的基因在转基因牛乳汁中的脱落细胞内表达，而不在牛耳组织细胞内表达，原因是什么？_____。

65. (2022·浙江 6 月选考, 29) (15 分) 回答下列 (一)、(二) 小题：

(一) 回答与产淀粉酶的枯草杆菌育种有关的问题：

(1) 为快速分离产淀粉酶的枯草杆菌，可将土样用_____制成悬液，再将含有悬液的三角瓶置于 80 °C 的_____中保温一段时间，其目的是_____。

(2) 为提高筛选效率，可将菌种的_____过程与菌种的产酶性能测定一起进行：将上述悬液稀释后涂布于以淀粉为唯一碳源的固体培养基上培养，采用_____显色方法，根据透明圈与菌落直径比值的大小，可粗略估计出菌株是否产酶及产酶性能。

(3) 为了获得高产淀粉酶的枯草杆菌，可利用现有菌种，通过_____后再筛选获得，或利用转基因、_____等技术获得。

(二) 回答与植物转基因和植物克隆有关的问题：

(1) 在用农杆菌侵染的方法进行植物转基因过程中，通常要使用抗生素，其目的一是抑制_____生长，二是筛选转化细胞。当选择培养基中抗生素浓度_____时，通常会出现较多假阳性植株，因此在转基因前需要对受体进行抗生素的_____检测。

(2) 为提高培育转基因植株的成功率，植物转基因受体需具有较强的_____能力和遗传稳定性。对培养的受体细胞遗传稳定性的早期检测，可通过观察细胞内_____形态是否改变进行判断，也可通过观察分裂期染色体的_____，分析染色体组型是否改变进行判断。

(3) 植物转基因受体全能性表达程度的高低主要与受体的基因型、培养环境、继代次数和_____长短等有关。同时也与受体的取材有关，其中受体为_____时全能性表达能力最高。

66. (2022·浙江 1 月选考, 29) (15 分) 回答下列 (一)、(二) 小题：

(一) 红曲霉合成的红曲色素是可食用的天然色素，具有防腐、降脂等功能。研究者进行了红曲色素的提取及红色素的含量测定实验，流程如下：



- (1) 取红曲霉菌种斜面，加适量_____洗下菌苔。制成菌悬液并培养，解除休眠获得_____菌种。经液体发酵，收集红曲霉菌丝体，红曲霉菌丝体与 70% 乙醇溶液混合，经浸提、_____，获得的上清液即为红曲色素提取液。为了进一步提高红曲色素得率，可将红曲霉细胞进行_____处理。
- (2) 红曲色素包括红色素、黄色素和橙黄色素等，红色素在 390 nm、420 nm 和 505 nm 波长处均有较大吸收峰。用光电比色法测定红曲色素提取液中的红色素含量时，通常选用 505 nm 波长测定的原因是_____。测定时需用_____作空白对照。
- (3) 生产上提取红曲色素后的残渣，经_____处理后作为饲料添加剂或有机肥，这属于废弃物的无害化和_____处理。

(二) 我国在新冠疫情防控方面取得了显著的成绩，但全球疫情形势仍然非常严峻，尤其是病毒出现了新变异株——德尔塔、奥密克戎，更是威胁着全人类的生命健康。

- (1) 新冠病毒核酸定性检测原理是：以新冠病毒的单链 RNA 为模板，利用_____酶合成 DNA，经 PCR 扩增，然后在扩增产物中加入特异的_____，如果检测到特异的杂交分子则核酸检测为阳性。
- (2) 接种疫苗是遏制新冠疫情蔓延的重要手段。腺病毒疫苗的制备技术要点是：将腺病毒的复制基因敲除；以新冠病毒的_____基因为模板合成的 DNA 插入腺病毒基因组，构建重组腺病毒。重组腺病毒在人体细胞内表达产生新冠病毒抗原，从而引发特异性免疫反应。在此过程中，腺病毒的作用是作为基因工程中目的基因的_____。将腺病毒复制基因敲除的目的是_____。
- (3) 单克隆抗体有望用于治疗新冠肺炎。单克隆抗体的制备原理是：取免疫阳性小鼠的_____细胞与骨髓瘤细胞混合培养，使其融合，最后筛选出能产生特定抗体的杂交瘤细胞。与植物组织培养相比，杂交瘤细胞扩大培养需要特殊的成分，如胰岛素和_____。

知识点 8 生物技术的安全性与伦理问题

1. (2024·浙江1月选考,1) 生物技术在造福人类社会的同时也可能带来安全与伦理问题。我国相关法规明令禁止的是 ()
- A. 试管动物的培育 B. 转基因食品的生产
- C. 治疗性克隆的研究 D. 生物武器的发展和生产
2. (2023·北京选考,6) 抗虫作物对害虫的生存产生压力，

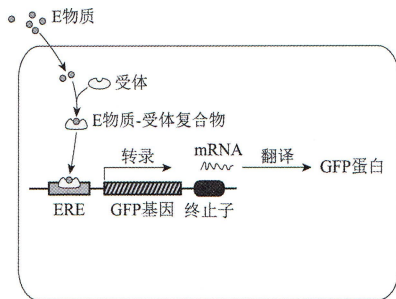
会使害虫种群抗性基因频率迅速提高，导致作物的抗虫效果逐渐减弱。为使转基因抗虫棉保持抗虫效果，农业生产上会采取一系列措施。以下措施不能实现上述目标的是 ()

- A. 在转基因抗虫棉种子中混入少量常规种子
- B. 大面积种植转基因抗虫棉，并施用杀虫剂
- C. 转基因抗虫棉与小面积的常规棉间隔种植
- D. 转基因抗虫棉大田周围设置常规棉隔离带
3. (2023·浙江1月选考,2) 以哺乳动物为研究对象的生物技术已获得了长足的进步。对生物技术应用人类，在安全与伦理方面有不同的观点，下列叙述正确的是 ()
- A. 试管婴儿技术应全面禁止
- B. 治疗性克隆不需要监控和审查
- C. 生殖性克隆不存在伦理道德方面的风险
- D. 我国不赞成、不允许、不支持、不接受任何生殖性克隆人实验

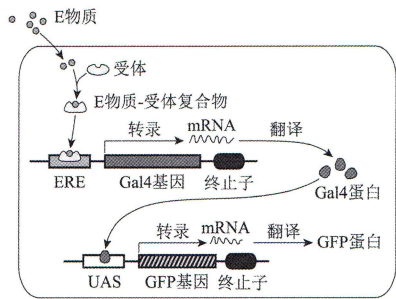
4. (2022·北京选考,21) (11分) 生态文明建设已成为我国的基本国策。水中雌激素类物质(E物质)污染会导致鱼类雌性化等异常，并通过食物链影响人体健康和生态安全。原产南亚的斑马鱼，其肌细胞、生殖细胞等存在 E 物质受体，且幼体透明。科学家将绿色荧光蛋白(GFP)等基因转入斑马鱼，建立了一种经济且快速的水体 E 物质监测方法。

(1) 将表达载体导入斑马鱼受精卵的最佳方式是_____。

(2) 为监测 E 物质，研究者设计了下图所示的两种方案制备转基因斑马鱼，其中 ERE 和酵母来源的 UAS 是两种诱导型启动子，分别被 E 物质-受体复合物和酵母来源的 Gal4 蛋白特异性激活，启动下游基因表达。



方案1



方案2

与方案 1 相比，方案 2 的主要优势是_____。

_____，因而被用于制备监测鱼 (MO)。

- (3) 现拟制备一种不育的监测鱼 SM，用于实际监测。SM 需经 MO 和另一亲本 (X) 杂交获得。欲获得 X，需从以下选项中选择启动子和基因，构建表达载体并转入野生型斑马鱼受精卵，经培育后进行筛选。请将选项的序号填入相应的方框中。
- I. 启动子：
- ① ERE
 - ② UAS
 - ③ 使基因仅在生殖细胞表达的启动子 (P 生)
 - ④ 使基因仅在肌细胞表达的启动子 (P 肌)
- II. 基因：
- A. GFP
 - B. Gal4
 - C. 雌激素受体基因 (ER)
 - D. 仅导致生殖细胞凋亡的基因 (dg)
- (4) SM 不育的原因是：成体 SM 自身产生雌激素，与受体结合后_____造成不育。
- (5) 使拟用于实际监测的 SM 不育的目的是_____。
- _____。

