胚胎干细胞经诱导分化形成囊胚，基因选择性表达使细胞分化形成不同功能的囊胚细胞，但是维持细胞基本结构、细胞能量代谢等的管家基因，在所有细胞中均需表达，故**B选项错误**。动物细胞培养需放在CO_2培养箱中进行，一定浓度的CO_2可以缓冲培养液的pH，使培养液的pH维持相对稳定，但同时还需要有O_2的供应，以维持细胞呼吸，为细胞生命活动提供能量，故**C选项错误**。移植胚胎的发育需要母体各种激素的调控，同时发育中的胚胎细胞释放的细胞因子也会影响母体激素的分泌，故**D选项正确**。

11. C

解析：在体外受精前，需要对精子进行获能处理，通常体外获能的方法有培养法和化学诱导法，但精子获能是精子获得与卵细胞受精的能力，不是获得能量，**A选项错误**。哺乳动物体外受精后的早期胚胎培养需要额外提供血清等一些天然成分，**B选项错误**。克隆牛技术涉及体细胞核移植、动物细胞培养、早期胚胎培养、胚胎移植等过程，**C选项正确**。胚胎分割是用机械方法将早期胚胎平均分割成二分胚、四分胚甚至八分胚，经培养后植入受体，以得到同卵双生或同卵多生后代的技术，该过程属于无性生殖，**D选项错误**。

12. D

解析：题中几项技术成果都需要通过胚胎移植最终达成目标。胚胎移植的受体只提供胚胎发育的场所，对移入胚胎的遗传特性无任何影响，故**A选项错误**。①过程为试管动物的培育过程，是由供体母牛超数排卵后经发情配种或人工受精获得胚胎产生后代的过程，若涉及体外受精技术，采集到的卵母细胞需要培养到MⅡ期，但无需去核，卵母细胞去核属于②克隆动物操作程序，故**B选项错误**。②过程为核移植克隆动物，属于无性生殖，保持亲本性状，所以不能大幅改良动物性状，故**C选项错误**。③过程转基因技术获得的动物，可通过②克隆技术实现扩大化生产，而试管动物和克隆动物均可通过③转基因技术，进行外源基因的导入，实现性状改良，故**D选项正确**。

13. (1) 冷冻　只有经过获能处理，精子才具有受精能力　肝素　减数第二次分裂中期　(2) 氨基酸、维生素、核苷酸（其他答案可以酌情给分）　(3) 对受体母羊进行发情处理，等到合适的时期，再将囊胚移植到受体母羊子宫

解析：(1) 精液可以加入抗冻剂（甘油）冷冻保存，使用前再将精液解冻离心分离。刚排出的精子必须在雌性生殖道内发生相应生理变化后才能受精，故在体外受精前要对精子进行获能处理。通常采用的体外获能方法有培养法和化学诱导法，化学诱导法是将精子放在一定浓度的肝素或钙离子载体A23187溶液中，用化学药物诱导精子获能。卵母细胞需要培养到减数第二次分裂中期（MⅡ期）才能具备与精子受精的能力。

(2) 进行早期胚胎培养的培养液中，除了无机盐、激素、血清外，还含有维生素、氨基酸、核苷酸等。

(3) 要利用保存的囊胚和相应数量的非繁殖期受体母羊为材料，获得具有该公羊优良性状的后代，主要是利用胚胎移植技术，即对受体母羊进行同期发情处理，将保存的囊胚进行胚胎移植，对受体母羊进行是否妊娠的检查，一段时间后受体母羊产下具有该公羊优良性状的后代。

知识点7　基因工程

1. C

解析：构建重组表达载体是基因工程的基本环节，其中限制酶和DNA连接酶是基因工程中常用的工具酶。限制酶即限制性内切核酸酶，可识别并切割双链DNA分子中的特定序列。限制酶最初在原核生物中发现，是原核生物限制与修饰系统的主要成分，帮助原核生物识别外源DNA并进行切割，属于原核生物的防御机制。迄今在原核生物中发现的限制酶已有上千种，根据性质不同分为三类，基因工程技术中常用的限制酶多为Ⅱ类限制酶。这类酶对底物DNA的识别和切割位点比较专一，因而广泛应用于DNA重组技术。多数Ⅱ类限制酶切割位点的识别序列为4~8对碱基，识别序列通常具有回文结构。限制酶的切割位点多数在识别序列内，在DNA两条链的对应位点切割后可能产生黏性末端或平末端。有些限制酶识别序列不同，但切割后的DNA黏性末端具有相同的序列，这些酶称为同尾酶。常用的DNA连接酶主要有*E.coli* DNA连接酶和T4 DNA连接酶。*E.coli* DNA连接酶通常连接可以互补配对的黏性末端DNA片段，一般不能连接平末端DNA片段。T4 DNA连接酶既可以连接黏性末端DNA片段，又可以连接平末端DNA片段。相对而言，平末端DNA片段的连接效率低于黏性末端DNA片段的连接效率。从示意图中可知，酶1、酶2、酶4切割后产生黏性末端DNA片段，且酶2、酶4属于同尾酶；酶3切割后产生平末端DNA片段。质粒图中酶4切割位点位于抗生素抗性基因序列中，切割后会破坏抗生素抗性基因。抗生素抗性基因是一种特殊的标记基因，含有完整质粒的大肠杆菌细胞可以在含有抗生素的培养基中生长。重组表达载体的抗生素抗性基因如果被破坏，则导入受体大肠杆菌后，大肠杆菌不能在筛选培养基中生长，不能形成克隆。完整的抗生素抗性基因可以方便筛选重组表达载体，提高筛选效率。质粒和目的基因都用酶3切割，产生平末端DNA片段，一般不能用*E.coli* DNA连接酶连接，A选项叙述不合理。质粒用酶3切割产生平末端DNA片段，目的基因用酶1切割产生黏性末端

DNA 片段，平末端 DNA 片段和黏性末端 DNA 片段无法用 DNA 连接酶直接连接，B 选项叙述不合理。质粒和目的基因都用酶 1 和酶 2 切割，产生黏性末端 DNA 片段，既可以用 *E.coli* DNA 连接酶连接，也可以用 T4 DNA 连接酶连接，而且两种酶切割后的单链 DNA 末端序列不同，不能互补配对形成环状 DNA，目的基因只能以一种方向与质粒连接，构建方案合理且高效。C 选项叙述合理且高效。酶 2 和酶 4 是同尾酶，质粒和目的基因都用酶 2 和酶 4 切割，产生的黏性末端相同，可以用 *E.coli* DNA 连接酶或 T4 DNA 连接酶连接，但是酶 4 会切割质粒中的抗生素抗性基因，构建的重组表达载体不能表达抗生素抗性基因，含有重组表达载体的转化细胞不能在筛选培养基中形成克隆，不利于重组表达载体的筛选。而且因为酶切后产生的黏性末端相同，目的基因能以正、反两个方向与酶切后的质粒相连，会影响目的基因的表达，D 选项叙述不合理。

2. D

解析：不同的抗性基因，不同的限制酶酶切位点，构建的质粒筛选方法不一样。A 选项中单酶切，目的基因插入载体有正反方向两种情况，由此转录的产物可能不同，故 **A 选项正确**。用 *Pvu* Ⅰ酶切，无论是含空载质粒，还是含重组质粒的受体菌，两者都有四环素抗性基因（Tet^R），都可在含四环素的培养基中生长，故 **B 选项正确**。凝胶电泳技术可用于分离、鉴定不同大小的 DNA 片段，故 **C 选项正确**。用 *Sph* Ⅰ酶切，四环素抗性基因（Tet^R）被破坏，携带目的基因的受体菌不能在含 *Amp* 和 *Tet* 的培养基中形成菌落，故 **D 选项错误**。

3. B

解析：此题考查生物学必修 2 中的“翻译起始 / 终止密码子功能”知识点。根据题干信息，要想使红色荧光蛋白 *RFP* 基因与 *CD163* 基因连为一体，并经转录翻译成一条多肽，必须删除前面基因（即 *CD163* 基因）中的终止密码子编码序列，否则翻译会终止在 CD163 多肽处，故 **B 选项正确**。保留 *RFP* 基因的起始密码子并不影响“连体”翻译，没必要除去；删除 *RFP* 基因的终止密码子会导致表达的多肽发生结构错误；除去 *CD163* 基因的起始密码子，翻译无法进行，故 A、C、**D 选项错误**。

4. B

解析：由于引物只能引导子链从 5' 到 3'，根据碱基互补配对原则，其中一个引物序列为 5'-TGCGCAGT-3'，**A 选项正确**。根据三种酶的酶切位点，左侧的黏性末端是使用 *Nhe* Ⅰ切割形成的，右边的黏性末端是用 *Cfo* Ⅰ切割形成的，**B 选项错误**。用步骤①的酶对载体进行酶切，使用了 *Nhe* Ⅰ和 *Cfo* Ⅰ进行切割，根据他们的识别位点以及原本 DNA 的序列，切割之后至少获得了 2 个片段，**C 选项正确**。图中形成的是黏性末端，而 *E.coli* DNA 连接酶只能连接黏性末端；T4 DNA 连接酶既可连接平末端，又可连接黏性末端，**D 选项正确**。

5. B

解析：分析图中可知，启动子在左侧，*GFP* 基因整合 *Gata3* 基因的右侧，启动子启动转录后，可以使 *GEP* 基因转录，*Gata3* 基因的启动子能控制 *GFP* 基因的表达，**A 选项错误**。因启动子在左侧，转录的方向向右，合成的 mRNA 从左向右为 5′ → 3′，刚好是翻译的方向，所以翻译时先合成 Gata3 蛋白，再合成 GFP 蛋白，**B 选项正确**。整合 GFP 基因后，核酸片段变长，2 号个体只有大片段，所以是 *Gata3-GFP* 基因纯合子，4 号个体只有小片段，是野生型，**C 选项错误**。用引物 1 和引物 3 进行 PCR 扩增，扩增出的片段大小差异较小，无法较好的区分片段，**D 选项错误**。

6. B

解析：预变性过程可使模板 DNA 变性更充分，**A 选项错误**。后延伸过程是使最后一次循环反应的延伸时间增加，使延伸更加充分、目的基因的扩增更充分，**B 选项正确**。延伸过程需要耐高温的 DNA 聚合酶从引物的 3′ 端开始连接脱氧核苷酸，**C 选项错误**。我国对转基因技术的应用坚持依法监管、推广慎重、确保安全，转基因产品上市前须经过专门机构的一系列生物安全评价和监管，**D 选项错误**。

7. A

解析：胰岛素作用于细胞表面的受体，不需要经高尔基体的加工，**A 选项错误**。人工长效胰岛素比人胰岛素的 B 链上多了两个精氨酸，氨基酸与氨基酸之间通过肽键连接，故多 2 个肽键，**B 选项正确**。人工胰岛素和人胰岛素作用相同，都是降血糖的作用，故靶细胞相同，**C 选项正确**。人工长效胰岛素是对天然蛋白质的改造，需要通过基因工程生产，**D 选项正确**。

8. D

解析：裂解是加蒸馏水让细胞吸水涨破，释放出 DNA 等物质，**A 选项正确**。DNA 在不同浓度的 NaCl 溶液中溶解度不同，能溶于 2 mol/L 的 NaCl 溶液，将溶液过滤，即可将混合物中的多糖、蛋白质等与 DNA 分离，**B 选项正确**。DNA 不溶于酒精，而某些蛋白质溶于酒精，可以反复多次用酒精沉淀出 DNA，提高 DNA 纯度，**C 选项正确**。将 DNA 溶解于 NaCl，加入二苯胺试剂，沸水浴五分钟，待冷却后，能呈现蓝色，**D 选项错误**。

9. B

解析：低温时 DNA 酶的活性较低，过滤液沉淀过程在 4℃冰箱中进行是为了防止 DNA 降解，**A 选项正确**。离心研磨液是为了使细胞碎片沉淀，**B 选项错误**。在沸水浴条件下，DNA 遇二苯胺试剂呈现蓝色，**C 选项**

正确。某些不溶于酒精的蛋白质，在95%的冷酒精中与DNA同时析出，故粗提取的DNA中可能含有少量蛋白质，**D选项正确**。

10. B

解析：探究光照强度对光合作用强度的影响，需要测定不同光照强度下光合作用强度，要求精确定量，**A选项错误**。DNA的粗提取与鉴定属于物质提取与鉴定类的实验，只需观察是否有相关现象，不需要定量，故对实验结果不要求精确定量，**B选项正确**。探索生生长素类调节剂促进插条生根的最适浓度，需要明确不同生长素类调节剂浓度下根的生长情况，要求定量，**C选项错误**。模拟生物体维持pH的稳定，需要用pH试纸测定溶液pH，需要定量，**D选项错误**。

11. A

解析：洋葱鳞片叶内表皮的原生质层具有选择透过性，可代替半透膜探究质膜的透性，**A选项正确**。洋葱匀浆中加入新配制的斐林试剂，需要水浴加热才可能出现砖红色沉淀，若出现砖红色，则可说明洋葱匀浆中含有还原糖，**B选项错误**。制作根尖有丝分裂装片时，解离、按压盖玻片得目都是为了获得单层细胞，即这些操作均能更好地将细胞分散开，**C选项错误**。粗提取的DNA溶于2 mol/LNaCl溶液中，加入二苯胺试剂后经过水浴加热可显蓝色，**D选项错误**。

12. B

解析：生长素能促进果实发育，用特异启动子诱导表达*iaaM*（生长素合成基因）可获得无子果实，**A选项正确**。大量表达*ipt*（细胞分裂素合成关键基因），细胞分裂素含量升高，细胞分裂素与生长素的比值较高时，有利于芽的分化，**B选项错误**。赤霉素能促进细胞伸长，从而引起茎秆伸长和植物增高，提高*ga2ox*（氧化赤霉素的酶基因）的表达水平使赤霉素含量降低从而能获得矮化品种，**C选项正确**。乙烯有催熟作用，在果实中表达*acs*（乙烯合成关键酶基因）的反义基因，即抑制乙烯的合成，果实成熟会延迟，**D选项正确**。

13. D

解析：根据题中流程图可知，研究人员利用PCR技术获取目的基因，该过程称为目的基因的“扩增”或“克隆”，是一个化学过程；而“分离”是一个物理过程，**A选项叙述错误**。题干中说明了L-谷氨酸脱羧酶催化L-谷氨酸脱羧是高效生产γ-氨基丁酸的重要途径之一，即L-谷氨酸是高效生产γ-氨基丁酸的底物。*E.coli* B发酵生产γ-氨基丁酸时，L-谷氨酸钠的主要作用是作为发酵中酶促反应的底物，**B选项叙述错误**。*E.coli* A是发酵生产γ-氨基丁酸的菌株，*E.coli* B是往*E.coli* A细胞中导入L-谷氨酸脱羧酶基因后构建的高效生产γ-氨基丁酸的菌株。*E.coli* A和*E.coli* B都不会高效降解γ-氨基丁酸，否则无法实现生产，**C选项叙述错误**。根据图中信息，质粒上含有多克隆位点，其不仅可以被*Nco* Ⅰ和*Kpn* Ⅰ酶切，还可以被其他限制性内切酶酶切。只要在质粒的多克隆位点和目的基因两侧存在除*Nco* Ⅰ和*Kpn* Ⅰ外其他相同的限制性内切酶的酶切位点，就可以用相应酶替代*Nco* Ⅰ和*Kpn* Ⅰ构建重组质粒，**D选项叙述正确**。

14. C

解析：实验一“性状分离比的模拟实验”用不同颜色的彩球分别模拟D和d配子，在实验过程中，从桶内随机摸取出一个彩球（D彩球或d彩球）并做记录。摸取到D彩球或d彩球是等概率的、随机的。若用绿豆和黄豆代替彩球分别模拟D和d配子，由于绿豆和黄豆有明显的大小差异，会影响摸取的等概率和随机性，不符合实验要求，故**A选项错误**。在减数分裂过程中，着丝粒分裂后，纺锤丝牵引姐妹染色体分别移向细胞两极。着丝粒并不是在纺锤丝的牵拉下分开。因此，“建立减数分裂中染色体变化的模型”模拟实验（实验三）中，用细绳模拟纺锤丝牵引使着丝粒分裂的叙述错误，**B选项错误**。DNA分子的重组模拟实验（实验三）中可利用剪刀、订书钉和写有DNA序列的纸条等模拟体外DNA分子重组的过程。核苷酸之间以磷酸二酯键连接，用订书钉将两个纸条片段连接即可模拟，故**C选项正确**。在桶内添加代表另一对等位基因的彩球，每次抽取都是从4种彩球混合物中抽取，在雌配子（或雄配子）中的每一轮抽取中可能抽取出来的是代表控制同一性状基因的彩球，无法模拟控制不同性状的基因的自由组合，**D选项错误**。

15. B

解析：若限制酶失活，会出现DNA完全没有被酶切的情况，可更换同种新的限制酶重新进行酶切，**A选项正确**。DNA完全没有被酶切，可能是酶切条件不合适，但不可能是酶的用量不合适。酶具有高效性，酶用量不合适不会出现DNA完全没有被酶切的情况，**B选项错误**。若质粒DNA突变导致酶识别位点丢失，会出现DNA完全没有被酶切的结果，可更换正常质粒DNA重新进行酶切，**C选项正确**。若酶切位点被甲基化，普通的限制酶将无法识别酶切位点而不能发挥作用，因此需要换用对DNA甲基化不敏感的限制酶重新进行酶切，**D选项正确**。

16. C

解析：动物体内胰岛素在胰岛B细胞核糖体上合成，经内质网、高尔基体加工、修饰后，经胞吐分泌出细胞，故**A选项正确**。胰岛素化学本质为蛋白质，基本组成单位为氨基酸，所以氨基酸是化学合成胰岛素的原料，故**B选项正确**。启动子具有物种及组织特异性，在利用大肠杆菌生产胰岛素时，需将胰岛素基因与大肠杆菌特异性启动子等调控元件重组在一起，导入大肠

杆菌；而用乳腺生物反应器生产，需将胰岛素基因与乳腺中特异性表达基因的启动子等调控元件重组在一起，导入哺乳动物受精卵中，故**C选项错误**。速效胰岛素类似物不是天然胰岛素，科研人员通过对胰岛素基因进行改造，改变了胰岛素的氨基酸序列，从而有效抑制了胰岛素的聚合，由此研发出了速效胰岛素类似物，该技术属于蛋白质工程，故**D选项正确**。

17. A

解析：琼脂糖凝胶浓度的选择需考虑待分离DNA片段的大小，故**A选项正确**。凝胶载样缓冲液中指示剂的作用是指示电泳的前沿，并非指示DNA分子的具体位置，故**B选项错误**。在同一电场作用下，DNA片段越长，迁移速率越慢，故**C选项错误**。琼脂糖凝胶中的DNA分子可在紫外灯下被检测出来，并非紫光灯，故**D选项错误**。

18. B

解析：配制PCR反应体系时，扩增的原料是4种脱氧核苷酸的等量混合液，**A选项叙述错误**。PCR产物为DNA片段，需要和核酸染料结合后才能在紫外灯下被观察到。核酸染料可添加到凝胶中，再对PCR产物进行电泳检测，**B选项叙述正确**。在酵母菌的纯培养实验中，配制的酵母菌培养基必须进行高压蒸汽灭菌，**C选项叙述错误**。在对酵母菌进行划线接种时，接种环灼烧灭菌后，要在酒精灯火焰旁进行冷却，再蘸取酵母菌液，**D选项叙述错误**。

19. AC

解析：根据题干信息可知，子链延伸过程中，结合相应ddNTP之后，延伸就会终止，所以可以找出DNA单链序列中相关碱基的位置，如果加入两种引物，则会有两个方向的子链合成随机终止，分别形成多种两条子链的条带，无法分辨每条链中相关碱基的位置，所以测序反应只能加入一种引物，**A选项正确**。延伸随机终止形成的子链越短，电泳迁移速率就越快，**B选项错误**。根据电泳方向和对照个体的电泳结果，推知对照个体的子链序列为5′-CTACCCGTGAT-3′，其模板所在的DNA双链片段中也会含有该序列，**C选项正确**。对照组及患者组的电泳图对比分析，左图中的C变为右图中的T，**D选项错误**。

20. D

解析：由题干信息可知，解答本题的关键是要找到反应管中的引物和模板。结合表中信息，可推测只有单链DNA的反应管中，单链DNA既做模板，也做引物；而有2种单链的反应管中，它们之间可互为引物、模板，或每种单链DNA既做模板，也做引物。根据题干信息“已知形成的双链DNA区遵循碱基互补配对原则，且在本实验的温度条件下不能产生小于9个连续碱基对的双链DNA区”，可排除发夹结构和非连续配对的情况。结合PCR技术中DNA聚合酶的作用，构建模型如下：

在反应管①中，2条单链DNA的互补配对情况如下图所示。反应管①中的单链DNA本身因不能碱基互补配对，因此不能既做模板也做引物。因为DNA聚合酶的作用是模板依赖性的、遵循碱基互补配对的原则，将脱氧核苷酸按5'-3'方向加到引物的3'端，而本管中的2条单链DNA配对后，露出的是3'黏性末端，因此反应管①中2条单链DNA在相应位置互补配对后不能按5'-3'方向完成复制，所以该反应管得不到带有荧光标记的DNA探针，不符合题目要求。

5'-GCCGATCTTTATA-3'
3'-GACCGGCTAGAAA-5'

同理可知，在反应管②中，单链DNA既做模板也做引物，互补配对情况如下图所示。反应管②中可以复制，添加上的脱氧核苷酸只有dTTP和dCTP，但反应管中具有荧光标记只有dATP，所以该反应管得不到带有荧光标记的DNA探针，不符合题目要求。

5'-AGAGCCAATTGGC-3'
3'-CGGTTAACCGAGA-5'

在反应管③中，2种单链DNA的互补配对情况如下图所示。反应管③中的同种单链DNA间不能碱基互补配对，因此不能既做模板也做引物。但反应管③中2种单链DNA能互为模板和引物进行复制，又因为在反应管中加入的具有荧光标记的是dATP，所以该反应管能得到带有荧光标记的DNA探针，符合题目要求。

5'-ATTTCCCGATCCG-3'
3'-AGGGCTAGGCATA-5'

在反应管④中，单链DNA既做模板也做引物，互补配对情况如下图所示。反应管④中可以复制，又因为在反应管中加入的具有荧光标记的是dATP，所以该反应管能得到带有荧光标记的DNA探针，符合题目要求。

5'-TTCACTGGCCAGT-3'
3'-TGACCGGTCACTT-5'

综上可知，能得到带有荧光标记的DNA探针的反应管是③和④。因此D选项符合题目要求。

21. D

解析：研磨液有利于蛋白质与DNA分离和稳定DNA的状态，因此将研磨液更换为蒸馏水，DNA提取的效率会降低，**A选项正确**。DNA不溶于酒精，而部分蛋白质溶于酒精，因此利用DNA和蛋白质在酒精中的溶解度差异，可初步分离DNA，**B选项正确**。DNA在不同浓度NaCl溶液中溶解度不同，因此该原理可用于纯化DNA粗提物，**C选项正确**。将溶解的DNA粗提物与二苯胺试剂反应，可鉴定溶液中是否含有DNA，**D选项错误**。

22. A

解析：本题考查教材中“DNA的粗提取与鉴定实验，属于

对基础实验的考查，具有较好的引导教学的作用。如果考生未亲手完成该实验，单纯靠机械记忆而不理解实验原理很容易错选；或部分学生做实验时只动手不动脑，仅仅是机械的按步骤操作，不明白各操作的目的，甚至有大量的不规范操作，例如B选项涉及的“充分摇匀”，也容易错选。

该实验涉及实验材料的研磨、研磨液的获取、DNA的析出及晾干、DNA的鉴定等4个主要步骤。研磨液的获取步骤可以使用离心机，但也可用静置的方式代替；DNA的析出及晾干步骤可以使用离心机，离心后DNA沉在管底。但也可不经离心，直接用玻璃棒搅拌后卷起DNA，**A选项正确**。“研磨液在4℃冰箱中放置几分钟”目的是使研磨液中混杂的少量未被过滤去除掉的组织碎片沉在烧杯底部，以便于后续步骤将其去除，放置后再摇匀无法达到上述实验目的，**B选项错误**。DNA鉴定的实验条件是“沸水中加热5 min”，在此条件下，DNA已发生变性，其双螺旋结构发生了改变，**C选项错误**。鉴定DNA时，两个试管分别为不含DNA的对照组和含DNA的实验组，对照组加热后未变蓝，可以证明二苯胺加热不变蓝，即可以排除二苯胺加热后可能变蓝的干扰，**D选项错误**。

23. D　B

解析：(1) 由题干信息可知，为了特异性扩增*pfcrt*基因所在片段，利用图甲中依据*pfcrt*基因序列设计的4种备选引物，以疟原虫基因组DNA为模板进行PCR，分析图乙中PCR产物的电泳结果，F1-R1引物对可以扩增出一种DNA片段，说明F1、R1可用于特异性地扩增目的片段，**A选项正确**。F1-R2引物对可以扩增出三种不同的DNA片段，说明该引物对不能用于特异性地扩增目的片段、与F1-R1引物的PCR结果比较说明，R2不能用于特异性地扩增目的片段，**B选项正确**，**D选项错误**。F2-R1引物对不能扩增出DNA片段，说明F2不能用于特异性地扩增目的片段，**C选项正确**。

(2) 由题干信息可知，正常*pfcrt*基因可被限制酶*Apo* Ⅰ识别切割，具有正常*pfcrt*基因的疟原虫对氯喹敏感。突变后的*pfcrt*基因不能被限制酶*Apo* Ⅰ识别切割，具有突变*pfcrt*基因的疟原虫对氯喹具有抗性。由第20题图中对6份血样的处理结果可知，对应1号和6号血样的泳道中，都有100和300对碱基的两种条带，说明1号和6号血样中有来自疟原虫的DNA，并且可被限制酶*Apo* Ⅰ识别切割，患者体内的疟原虫对氯喹敏感；对应2号和4号血样的泳道中，只有400对碱基的条带，说明2号和4号血样中有来自疟原虫的DNA，并且不能被限制酶*Apo* Ⅰ识别切割，患者体内的疟原虫对氯喹具有抗性；对应3号和5号血样的泳道中，没有相应条带，说明3号和5号血样中没有来自疟原虫的DNA，相应个体不是患者。**B选项正确**，ACD选项错误。

24. (1) 磷酸二酯键　片段甲含有启动子和终止子　(2) A-U、A-T　(3) 菌株B2的基因组DNA　无扩增产物　(4) 实现废物利用，减少环境污染

解析：解决农业秸秆绿色利用的问题是我国多年来的重点研究项目，而CRISPR/Cas9技术是近些年发展较为成熟、应用便捷的一种基因组改造技术，本题将重点问题与关键技术相结合，考查内容涉及基因工程在基因组改造中的多个关键技术环节。第(1)题，着重考查的是限制酶的活性特点及其在基因工程中的应用，并结合基因表达特点及关键要素考查了学生合理安排这些限制酶用于实践的设计能力。基因工程中常用的限制酶是通过识别DNA上的特殊序列后，在相应位置将连接核苷酸成链的磷酸二酯键水解，使DNA链断裂。因此，第一空答案应为“磷酸二酯键”。在此基础上思考，如何利用限制酶将基因组改造元件引入质粒作为改造工具或材料，即如何制备符合实验目的的片段甲。片段甲从头至尾并未给出，这也考查学生对题干信息的整理与理解，题干已给出“将纤维素酶基因(N)插入某种细菌(B1)的基因组中，构建高效降解纤维素的菌株(B2)”，这提示了插入的N基因可在菌株B2中表达。N基因插入菌株B1的基因组后可在菌株中恰当地表达，说明参与N基因表达的元件完整，即除了N基因外，还必须含有启动子和终止子两个最基本的元件。有人可能会认为，可以直接替换菌株B1中的某个基因，基因组上自带的启动子和终止子可用于N基因的表达，但问题是题干中并没有给出相关信息，所以此想法在本题背景条件下不适行。另外，菌株本身的启动子和终止子都是受自身调节机制精细调控的，可能会影响自身启动子和终止子直接用于外源基因表达的效率。在基因工程研究中，常通过在插入外源基因的同时，引入一些优化过的、更高效的外源启动子和终止子等调控元件，进而实现真正意义上的“高效”表达。与此同时，本题还考查了学生对CRISPR/Cas9基因组编辑技术基本原理的理解。CRISPR/Cas9基因组编辑技术实际上是，经向导RNA的碱基互补配对特异性地识别基因组上的靶DNA序列，将Cas9核酸酶引导至靶DNA位点，将基因组上的靶位点切断产生DNA“损伤”切口。DNA作为细胞中最重要的遗传物质，细胞中存在大量对DNA“损伤”进行检测与修复的机制，而本题中的CRISPR/Cas9基因组编辑技术就是利用了细胞中的同源重组修复机制，此修复机制会将具有同源序列的DNA作为模板，通过同源重组将同源序列及同源序列间的目的片段整合至基因组，实现对切口处的修复，修复的同时也将含有同源序列的片段甲替换B1基因组上具有相同同源序列的片段，从而实现

片段甲的插入。这种修复机制在教材中介绍CRISPR/Cas9基因组编辑技术时有所介绍。本题中，在构建片段甲时，已经给定情境“将M1与M2片段分别插入质粒的Ⅰ和Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ酶切位点之间”“片段甲两端分别为M1与M2"，这说明用于插入B1基因组的片段甲需要带上外源的启动子和终止子，因此第二空答案应当是“片段甲含有启动子和终止子”。本题虽未直接考查CRISPR/Cas9基因组编辑技术，但学生理解CRISPR/Cas9基因组编辑技术的一些基本原理有助于对“原因”的回答。第（2）题，CRISPR/Cas9基因组编辑技术是当前基因工程中的热点技术，但任何先进的技术都是以所学的基础知识为原理和出发点建立起来的。本题首先对CRISPR/Cas9基因组编辑技术在本题中的应用进行了确定性表述，“CRISPR/Cas9技术”用于“切割细菌B1基因组中与向导RNA结合的DNA”，以此为背景考查了碱基互补配对的原则。只是学生应当注意本题已明确指出是“RNA结合DNA”，RNA上有G、C、A和U 4种核苷酸，可分别与DNA上的C、G、T和A相结合，即存在G-C、A-T和U-A三种结合形式，而G-C结合形式已经给出，因此答案应该是A-T、A-U。第（3）题，考查的是引物和PCR在鉴定中的应用，特别是在对含有目的基因的改造基因组的鉴定中，是重要的基本鉴定手段。本题中主要应用了引物、质粒、B1基因组和B2基因组四种DNA物质，题图中给出引物P1和P2的结合位点在N基因上，说明用引物P1和P2扩增含有N基因的DNA物质可得到特异的扩增片段，而只有改造后的B1基因组即B2基因组中含有N基因，质粒DNA含有N基因，但不是改造产物。因此，“所用的模板”的答案是“B2基因组DNA”。在此基础上，进一步提出了引物鉴定的特异性问题。应用B2的基因组DNA作为模板与引物P3和P4进行PCR，此问题的背景是题干和第（1）题中对CRISPR/Cas9技术应用结果的解释，这些背景信息已经暗示经基因组编辑后，B1基因组中的“片段甲替换区”已经被片段甲替换，B1基因组中的M1片段与M2片段之间的序列已经被片段甲中参与N基因表达的元件所替换。如果使用引物P3和P4与被鉴定的B2基因组进行PCR，尽管引物P3与B1及B2基因组序列均可退火，但B2基因组上已经不存在与引物P4互补配对实现退火的序列，也就无法实现PCR的延伸反应，因此实验结果是“无扩增产物”。第（4）题，考查对所构建的“高效降解纤维素的菌株（B2）”应用意义的理解，引导学生树立专业知识与国家、社会需求相联系的价值观。尽管当前也有关于秸秆绿色应用的各种技术，但由于缺乏特别高效利用秸秆的方法，充分地、绿色地利用秸秆这一难题并未完全解决，这是包括我国在内世界各国专业领域重点研究与关注的问题。焚烧可以快速解决秸秆的累积，实现无机物还田，但因此产生的空气污染及土壤变化也是无法回避的问题，因此实现秸秆充分、高效、绿色利用是各位考生需要关注的问题。本题开放性地考查了“优点”，让学生开放性地思考这一专业难题，激发学生专业兴趣与专业使命感。纤维素酶降解纤维素的原理在教材中有所描述，尽管参考答案给出了常见的“实现废物利用，减少环境污染”，但应用纤维素酶降解可以产生更易应用的糖类物质，提高工业与农业等领域对秸秆的高效、绿色应用效率，其优点远多于“秸秆焚烧”。

25. （1）变性　氢键　（2）避免载体自连，保证目的基因连接方向正确　T4 DNA连接酶　（3）易于吸收外源DNA分子　提取质粒，用特异性引物进行PCR，电泳出现目的条带　（4）甘氨酸 - 脯氨酸 - 丝氨酸

解析：基因工程技术是按照人们的意愿，将目的基因与载体在体外进行拼接重组，再转入另外一个生物体内，使之按人们的意愿遗传并表达出新性状或获取目的蛋白、糖类和脂类等物质的技术。因此，基因工程的研究需要融合各种生物学的原理与技术。本题是利用基因工程技术，以在大肠杆菌中表达蛋白E为线索，综合考查了基因的PCR扩增、限制酶使用、质粒转化、基因突变等相关技术与理论，还进一步考查了学生的实验设计能力及结果预判能力，以确定学生对相关原理的理解及决策能力。第（1）题，考查DNA模板变性与复性阶段的根本原理。PCR技术是基因扩增与鉴定中最常用、最特异的技术之一，一个PCR循环通常包括变性、复性、延伸3个阶段，变性的目的主要是通过高温将模板DNA由双链打开形成单链，为复性阶段引物识别配对作准备，因此在PCR反应循环过程中，将DNA双链“打开”“成为”单链的阶段是变性阶段。复性和延伸阶段也存在单链DNA状态，但不是“打开”“成为”的动作过程，因此答案不能考虑复性和延伸阶段。学生需要理解教材中PCR反应各阶段的变化特点和原理，方可对此作出准确判断。在考查变性原理的基础上，进一步考查了复性时引物与模板链DNA分子间的互作关系，复性时引物分子通过碱基互补配对原则，识别并结合模板DNA上配对的碱基，即在两链之间通过氢键实现A-T和G-C的相互识别与结合，形成双链状态，这就是PCR循环中引物与模板之间的复性过程。问题中还特别强调了“引物与模板DNA链”的“碱基之间”的“化学键”，因此第二空的答案应是“氢键”。第（2）题，考查的是对限制酶自身的识别特点及与基因工程的实际需求相结合的技术理论的理解。限制酶全名为限制性内切核酸酶，在细菌中已经发现上千种限制酶，根据功能和特性不同可分三类，Ⅰ类和Ⅲ类酶又称限制 - 修饰酶，这些酶同时含有限制酶切活

性与甲基化活性，识别和切割的序列特异性低，而Ⅱ类酶的酶分子上只含有限制酶切活性，其识别与切割活性具有很高的序列特异性，因此被广泛用于基因工程研究中，本题考查的主要是Ⅱ类酶。Ⅱ类酶能识别DNA分子上具有特殊排列特点的序列，通常具有回文序列，并在识别的DNA序列上产生切割，形成相应的限制性片段。限制酶的这一特点，在基因工程研究中特别有用，可以在载体和目的基因序列上产生特异的切口端，有助于载体与目的基因之间的连接，从而将目的基因插入载体。由于不同的限制酶所识别的DNA序列可能不同，切割产生的突出端序列可能不同，连接形成的新序列排列方式也可能发生变化等特点，为基因工程研究选择合适的限制酶提供了多种可能。在本题中，使用限制酶a切割载体和目的基因，会使被切割DNA两端产生完全相同的单链突出端，在连接过程中，任何相同的突出端在DNA连接酶的催化下均可发生连接，除可产生质粒载体的自身连接，也可产生质粒载体与目的基因的连接，但质粒载体与目的基因的连接也可能发生在二者的任何突出端，即二者连接无确定的方向，进而增加目的基因插入载体的方向上的错误率，这些都会降低目的基因插入质粒载体的准确率。因此，在无特殊原因情况下，通常不选择使用单酶切方法实现目的基因插入质粒载体。相比之下，使用酶a和酶b双酶切后，会使被切割DNA两端产生序列不同的突出端，根据碱基互补配对原则，目的基因两端会与质粒两端分别识别配对，进而将目的基因按设定方向正确插入质粒载体。因此，本题中双酶切与单酶切相比的优点是“避免载体自连，保证目的基因连接方向正确”。第二空考查的是有关DNA连接酶选择的问题。基因工程中常见的DNA连接酶主要包括T4 DNA连接酶和大肠杆菌DNA连接酶，大肠杆菌DNA连接酶连接黏性末端的活性与T4 DNA连接酶接近，但对平末端的连接效率非常低，需要在连接体系中添加PEG等成分才能使连接效率略有提高，但也无法达到T4 DNA连接酶的连接效率，而T4 DNA连接酶无论是连接黏性末端还是连接平末端，均是目前发现的DNA连接酶中连接效率最高的，因此对于平末端的连接通常选用“T4 DNA连接酶”。第（3）题，考查的是感受态细胞的功能特点。感受态细胞是基因工程中最常用的一种细胞，在一些特殊处理条件下，细胞会出现“易于吸收外源DNA分子”的状态，进而利用热激或电激将核酸（如目的基因、干扰RNA、质粒DNA、病毒基因组等）转入细胞，这是感受态细胞最基本、最重要的特点及应用，因此第一空答案为“易于吸收外源DNA分子”。第二空是验证转化的大肠杆菌中含有重组质粒。通常，对细胞中重组质粒的鉴定可以使用PCR和酶切等方法。以PCR法为例，进行PCR前，要先获取用于PCR反应的模板DNA，也就是本题中的重组质粒，因此需要裂解大肠杆菌菌体提取质粒。然后根据质粒或基因的序列特点设计相应的特异性引物，在PCR反应管中加入适量的引物、模板、dNTP以及合适的缓冲液等，建立PCR反应体系，在PCR反应仪上进行反应。反应后通常使用琼脂糖凝胶电泳分析PCR反应的产物，如果在凝胶中发现目的条带存在，即可验证转化的大肠杆菌中含有重组质粒。因此，简要的验证实验思路和预期结果是“提取质粒，用特异性引物进行PCR，电泳出现目的条带”。第（4）题，考查的是学生对氨基酸密码子的理解与应用。本题通过一个碱基的缺失突变对原编码蛋白序列的影响，考查学生对氨基酸密码子的理解与应用能力。在第一个核苷酸G缺失前，蛋白E的原始序列从GGG开始编码，对应密码子表，这段核酸序列可以翻译产生肽段“甘氨酸-脯氨酸-赖氨酸-亮氨酸-精氨酸”，此翻译过程在TGA处终止。而在第一个核苷酸G缺失后，编码序列将从GGC开始，并在序列中间位置的TGA处终止翻译，进而产生一个较短的肽段“甘氨酸-脯氨酸-丝氨酸”，且氨基酸序列与突变前的原始序列不同。

26. （1）蔗糖　水解蔗糖　蔗糖的减少速率（葡萄糖的增加速率）　（2）*NV*基因　>　T-DNA插入到*NV*基因中　（3）突变体　二次转化时便于筛选转基因菌株

解析：（1）据表中野生型菌株的两组结果对比分析可知，如果培养液中添加了蔗糖，*NV*基因就会表达形成NV酶，否则没有NV酶的形成，由此推测蔗糖透导了*NV*基因表达。表中结果表明，当蔗糖和NV酶同时存在时，培养液中就会出现葡萄糖，由此说明NV酶的作用是催化蔗糖转化成葡萄糖。酶的活性可以用单位时间单位体积反应物的减少量或者生成物的增加量表示，因此NV酶的活性可以用单位时间单位体积的培养液中葡萄糖的增加量（或者蔗糖的减少量）表示。（2）根据题意，突变体是由T-DNA随机插入野生型菌株，使*NV*基因发生了突变产生的，说明T-DNA插入了*NV*基因中，使*NV*基因发生了碱基对的增添，即突变体中*NV*基因突变后的序列比野生型的*NV*基因序列更长，所以用与*NV*基因配对的引物进行扩增，扩增的结果是突变体扩增片段的长度更长。（3）为了进一步验证*NV*基因的功能，在突变体（*NV*基因突变）细胞中，转入*NV*基因，以便将转基因植株与突变体（*NV*基因突变）的结果进行对比。由于突变体的T-DNA上会存在原有的标记基因，干扰*NV*基因表达载体导入成功与否的检测，因此在构建*NV*基因表达载体时，需要添加新的标记基因。

27. （1）胚乳特异表达基因的　终止转录　*Hind*Ⅲ　*Eco*RⅠ（答案“*Hind*Ⅲ”和“*Eco*RⅠ”

不分顺序）　(2) 农杆菌转化　*r2HN* 是否转录　抗原-抗体杂交　(3) 1/4　子代不发生性状分离　(4) 体液　细胞（答案“体液”和“细胞”不分顺序）　(5) 生产成本低；转基因水稻易获得（或“安全性高”或“种子蛋白易纯化”或“水稻自花传粉不易发生基因污染”）

解析：第 (1) 题，基因表达载体的构建是基因工程实施的重要环节。植物基因组含有多种类型的启动子，如果使 *r2HN* 在水稻胚乳特异表达，基因表达载体需要使用水稻胚乳特异表达基因的启动子。表达载体中终止子的作用是使目的基因的转录完成后及时终止。在构建基因表达载体时，选用的限制酶不能破坏载体的启动子、终止子等关键元件。若选用 *Kpn* Ⅰ会破坏启动子，选用 *Sac* Ⅰ会造成终止子的缺失，因此只能选用 *Hind* Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ。第 (2) 题，对于植物遗传转化而言，目前应用较广泛的是农杆菌转化法和花粉管通道法。本题对水稻愈伤组织的遗传转化只能采用上述两种方法中的农杆菌转化法。目的基因表达包含两个阶段，即 DNA 转录和翻译。检测 *r2HN* 是否成功表达，可利用 PCR 技术检测 *r2HN* 是否转录，通过抗原-抗体杂交技术检测是否翻译出目的蛋白。第 (3) 题，利用转基因技术获得的单一位点插入 *r2HN* 基因的水稻植株相当于杂合子，自交一代即可获得 1/4 的 *r2HN* 纯合体植株。纯合体植株自交后代不发生性状分离，更有利于进行后续研究。第 (4) 题，由图 2 的免疫实验结果可知，当接种 r2HN 疫苗后，实验组鸡体内抗新城疫病毒抗体水平和特异应答的 $CD8^+T$ 细胞水平均显著高于对照组，说明该疫苗既可激活体液免疫，也可激活细胞免疫，进而提高机体对新城疫病毒的免疫力。第 (5) 题，利用水稻作为生物反应器生产 r2HN 疫苗具有多方面的优点，如水稻自花传粉不易发生基因污染、安全性高，水稻种子蛋白易纯化，水稻转基因技术更加成熟，生产成本低。

28. (1) 允许特定种类的微生物生长，同时抑制或阻止其他种类微生物生长　产生纤维素酶分解能力大小（产生纤维素酶的多少）　(2) *Taq* DNA 聚合酶　(3) 表达载体的构建　限制性内切核酸酶和 DNA 连接酶　(4) 大肠杆菌繁殖迅速、结构简单、操作较容易　能吸收周围环境中 DNA 分子　(5) 纤维素的结构与组分不同（生物质原料不同）、三种酶混合物比例不同

解析：(1) 选择培养基只允许特定的微生物生长，而同时抑制或阻止其他微生物生长，在以羧甲基纤维素钠为唯一碳源的选择培养基中，只有能利用羧甲基纤维素钠的微生物才能生长繁殖；刚果红能与培养基中的纤维素形成红色复合物，使得含有纤维素的培养基呈现红色，当纤维素被纤维素酶分解时，刚果红与纤维素的复合物无法形成，培养基中就会出现以纤维素分解菌为中心的透明圈，这个透明圈的大小直接反映了纤维素分解菌分解纤维素的能力；透明圈越大，说明纤维素分解菌分解纤维素的能力越强，即菌落产生的纤维素酶的活性强、量多。(2) 扩增目的基因片段在 PCR 仪中进行，由于 PCR 过程中所需温度较高，而酶活性的发挥需要适宜温度，因此需要耐高温的 DNA 聚合酶（*Taq* DNA 聚合酶）。(3) 据图可知，酶基因与质粒载体经过过程⑤构成重组质粒，则⑤为基因表达载体的构建，该过程需要限制酶（限制性内切核酸酶）和 DNA 连接酶。(4) 大肠杆菌是原核生物，作为受体细胞的优点繁殖迅速、结构简单、操作较容易等；将目的基因导入微生物细胞时，先用 Ca^{2+} 处理细胞，使其成为感受态细胞，使其处于一种能吸收周围环境中 DNA 分子的生理状态，即处于感受态。(5) 根据表中可以看出，同一种生物质原料条件下，混 1 和混 2（均是三种酶的混合物）的协同系数不同，可能是三种酶混合物比例不同；生物质原料不同，混 1 和混 2 的协同系数不同，可能是纤维素的结构与组分不同（生物质原料不同）。

29. (1) 在 PCR 反应中，需要利用高温使 DNA 双链解旋，普通的 DNA 聚合酶在高温下会变性失活，而 *Taq* DNA 聚合酶能够耐高温，在高温条件下依然具有活性　(2) 在平板中添加氯霉素，再将在含氯霉素的培养基中生长的菌落利用影印法影印到添加四环素的培养基中，在含有四环素的培养基中不能正常生长的菌落就是由导入目的基因的菌株形成　(3) 乳酸或有机酸　9　(4) 大肠杆菌进行细胞呼吸时会释放大量热量　(5) 提取、分离、纯化

解析：(1) 利用 PCR 扩增 X 基因时需要使用 *Taq* DNA 聚合酶，是因为其耐高温且能催化合成 DNA 子链。(2) 由题可知，使用 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ限制酶处理质粒和 X 基因，会导致质粒中的四环素抗性基因会被 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ限制酶切断，而氯霉素抗性基因完整，故可通过氯霉素来进一步筛选含目的基因的菌株。具体实验思路为采用影印法将在无抗生素培养基中长出的大肠杆菌接种到另外一个含氯霉素的培养基中，观察菌株的存活情况，含有目的基因的菌株能在该培养基中生存，不含目的基因的菌株不能在该培养基中生存。(3) 如果培养基中碳源相对过多，容易使其氧化不彻底，形成较多的乳酸或 CO_2，引起发酵液 pH 值下降。由题可知，设置不同浓度的木薯淀粉（$90\ g\cdot L^{-1}$、$100\ g\cdot L^{-1}$、$110\ g\cdot L^{-1}$）和酵母粉（$12\ g\cdot L^{-1}$、$15\ g\cdot L^{-1}$、$18\ g\cdot L^{-1}$）筛选碳源和氮源浓度的最佳组合，以获得较高发酵产量，故理论上应设置 3（碳源）×3（氮源）=9 组实验（重复组不计算在内）。(4) 大肠杆菌在发酵罐内进行高密度发酵时，由于其呼吸作用产生的能量绝大部分以热能的形式散失，导致发酵液温度升高。(5) 发酵工业中常通过菌种选育、扩大培养和发酵后，再经分离、提纯产物，最终获得发

酵产品。

30. (1) 两种引物分别与含 *hCD46* 基因的两条模板链结合　(2) *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ　*Age* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ　(3) 超数排卵　桑葚胚易于在小鼠子宫着床　(4) 排除 PCR 体系中外源 DNA 的污染　(5) 该小鼠能被麻疹病毒感染，且干扰素无法作用于 IFNAR 以应对感染

解析：第 (1) 小题，PCR 每次循环包括变性、复性和延伸三步，复性温度下的扩增过程就是把复性这个步骤进行具体描述，即“两种引物分别与含有 *hCD46* 基因的两条模板链结合”。第 (2) 小题，从不破坏目的基因的角度出发，限制酶组合应选择 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ。在将重组质粒线性化、去除标记基因的同时，还要保持 hCD46 基因结构的完整性，即要有启动子和终止子，才能保证该基因进入受体细胞后正常表达，因此应选择 *Age* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ。第 (3) 小题，用促性腺激素处理小鼠 a，使其超数排卵，受精后能获得更多的胚胎；将胚胎植入子宫模拟的是胚胎着床的过程，因此选择什么时期的胚胎用于移植，需要考虑该胚胎着床的成功率。第 (4) 小题，PCR 实验可能会受到外源 DNA 等因素的污染，可通过设置不加 DNA 模板的对照组，来确定 PCR 体系中是否存在外源 DNA 的污染。第 (5) 小题，据题干信息，hCD46 受体是麻疹病毒入侵细胞的主要受体，而机体分泌的干扰素应对麻疹病毒感染依赖 IFNAR 受体，因此既表达 hCD46 受体又敲除 IFNAR 基因的小鼠容易被麻疹病毒感染。

31. (1) 5′　两端含 LoxP 位点的终止子　两端含 LoxP 位点的能够转录出终止密码子的 DNA 序列　电泳　(2) 补充营养物质或成分；清除有害代谢产物等　(3) Cre/+A/+M-GFP/+floxM/floxM　(4) 添加四环素，可以与 A 蛋白竞争结合位点，T 启动子无法被激活，M 基因无法表达；不添加四环素，则 A 蛋白可以激活 T 启动子，通过 M-GFP 表达功能恢复 M 基因作用，形成自身对照作用

解析：(1) 根据教材 PCR 扩增示意图（教材 p78，图 3-5），考查了子链扩增方面，是沿着 5′ → 3′ 合成，而载体最终被限制酶识别的序列在扩增的目的基因 5′（教材 p80，图 3-6），考查了限制酶序列添加的位置，当然也暗含考查了 DNA 聚合酶的功能；根据中心法则，最基本的信息流动是从 DNA → RNA → 蛋白质，而了为控制目的基因 A 的表达，应从转录和翻译两面考虑：在教材（选必 3，p80），基因表达载体构建时，终止子的作用是终止转录，因此为了阻断 A 基因转录，可在 A 基因前连入终止子序列，而而强调“两端包含 LoxP 位点”的终止子，是因为最终构建成功的模型小鼠需要通过特异性表达 Cre 重组酶来敲除两个 LoxP 间的终止子，恢复 A 基因表达；在教材（必修 2，p68，图 4-7）终止密码子可终止 mRNA 的翻译，因此连入可转录出含有终止密码子的 DNA 序列，可从翻译水平阻断 A 基因的表达，同样，强调“两端包含 LoxP 位点”的终止密码子的 DNA 序列，原因同上；电泳可用于 PCR 产物、DNA 等的鉴定，故鉴定载体 2 是否构建成功，可以采用酶切后电泳、测序等方法，单独酶切是不能鉴定的，因为 DNA 分子是看不见，摸不着的，因此强调是电泳。(2) 通过合成代谢和分解代谢的科学思维出发，大方向的考查了更换培养基的目的，而非培养基内含物和无菌等操作，题目相对开放和简单，但考查学生知识的整合，树立起生物学的核心素养。(3) 提取题干关键信息“制备 M 基因表达可控的实验模型小鼠”，“该小鼠通过特异性表达 Cre 重组酶敲除两个 LoxP 位点间的序列”，说明实验模型小鼠具有 Cre 基因，在“利用体内表达的蛋白 A 激活诱导型 T 启动子”，说明实验模型小鼠具有 A 基因，“利用 T 启动子融合绿色荧光蛋白基因的 M 基因（M-GFP）的表达”，说明实验模型小鼠具有 M-GFP 基因，而要实现 M 基因可控表达，就需要敲除小鼠本身未连接 GFP 的 M 基因，故该类 M 基因两端接入 LoxP 位点，以确保该类 M 基因会被敲除，即实验模型小鼠具有 floxM 基因。综上，根据获得实验模型小鼠的杂交图，最终培育出的小鼠应同时含有 Cre、A 和 M-GFP、floxM 四种基因。试题中将基因型 Cre/+A/+ 小鼠和 M-GFP/+floxM/+ 小鼠分别与基因型 floxM/floxM 小鼠杂交后，可获得基因型为 Cre/+A/+floxM/+ 和基因型为 M-GFP/+floxM/floxM 的两种小鼠，将这两种基因型的小鼠杂交，即可获得基因型为 Cre/+A/+M-GFP/+floxM/floxM 的实验模型小鼠。(4) 通过对试题 (3) 的理解，推理演绎出 A 蛋白激活诱导性启动子 T 的工作原理，随后通过添加竞争性结合 A 蛋白的四环素，考查实验的对照，实验的结果分析。

32. (1) 水解蛋白质　析出 DNA　(2) PCR　人工合成（顺序可颠倒）　(3) RNA 聚合酶识别和结合的部位　提高基因转录效率　(4) $HygB^R$（潮霉素 B 抗性）　(5) F3　R2（顺序可颠倒）　(6) D

解析：(1) 蛋白酶用于水解蛋白质。体积分数为 95% 的酒精用于析出 DNA。(2) 在本操作中，使用了 PCR 技术，来扩增苏云金杆菌中的 *Bt* 基因，同时人工合成 *Bt* 基因中 1-1362 基因序列。(3) 启动子是 RNA 聚合酶识别和结合位点。插入两个启动子可以更大概率与 RNA 聚合酶结合，从而提高基因转录效率。(4) T-DNA 经过转化，导入棉花细胞后，$HygB^R$ 在 T-DNA 上，能被转入棉花细胞，可通过其对应的抗生素进行筛选。(5) 重组基因包括 1-1362 人工合成基因序列和 1363-1848 天然序列，使用 PCR 技术检测棉花细胞中是否导入该基因，应选用对应的引物 F3 和 R2。(6) 通过 1-1362 合成基因序列和 1363-1848 天