然基因序列表达出新的抗虫蛋白，属于蛋白质工程技术。

33. (1) 纤维素酶和果胶酶　生长素和细胞分裂素　(2) 花药（或花粉）离体培养　用显微镜观察染色体数量　(3) ① *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ　交链格孢　② PCR 扩增基因 *L* 及其 *pL*；插入 Ti 质粒中；利用农杆菌导入百合 B 体细胞，经培养获得转基因植株；筛选 *L* 表达量提高的转基因百合；用病原微生物侵染转基因百合，检测百合抗病能力

解析：(1) 根据植物体细胞杂交技术可知，在进行不同种百合体细胞杂交前，先用纤维素酶和果胶酶去除细胞壁获得原生质体，使原生质体融合，得到杂种细胞后，继续培养，常用生长素和细胞分裂素诱导愈伤组织形成和分化，获得完整的杂种植株。 (2) 根据单倍体育种原理可知，常用花药（或花粉）离体培养获得单倍体植株。可通过显微镜观察染色体数量鉴定百合单倍体植株。 (3) ①研究病原微生物对 *L* 的启动子 *pL* 活性的影响。需要构建重组质粒，将 Ti 质粒中 *gus* 基因上游启动子序列替换为 *pL*。因此，首先需要将启动子 *pL* 进行酶切，插入 Ti 质粒上获得重组质粒，根据启动子 *pL* 两端的酶切位点和 Ti 质粒的结构特点，用 *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ对 *pL* 进行酶切后，再与 Ti 质粒进行连接。 GUS 酶活性反映启动子 *pL* 活性， GUS 酶活性越高表明启动子活性越高，从图 c 实验结果可发现三种病原微生物都能促进 *pL* 的活性，其中交链格孢侵染后，GUS 酶活性最高，所以其促进作用最强。②中现发现栽培种百合 B 中也有 *L*，但抗病性弱。若要增强该百合中 *L* 的表达量以提高其抗病原微生物的能力，结合基因工程的基本操作程序及植物转基因工程技术等内容可知，实验思路为：利用 PCR 扩增 *L* 基因及其 *pL*；将其插入至 Ti 质粒中；利用农杆菌导入百合 B 体细胞，经培养获得转基因植株；筛选 *L* 表达量提高的转基因百合；用病原微生物侵染转基因百合，检测百合抗病能力。

34. (1) 基因突变、基因重组、表观遗传等　(2) ①采用引物 1 和 4 进行 PCR 扩增（或采用引物 1 和 3 以及引物 2 和 4 分别进行 PCR 扩增），用 *Sac* Ⅱ和 *Eco*R Ⅰ对 PCR 产物进行酶切　②氯霉素（或氯霉素 + 头孢霉素）　③脱水四环素　头孢霉素　④ D

解析：(1) 问，金黄色葡萄球菌属于原核生物，产生可遗传变异的主要来源有基因突变，基因重组、表观遗传等。 (2) 根据题干信息，该研究最终要通过敲除 Sa 基因组中疑似与抗药性产生相关的 *R* 基因来验证 Sa 产生头孢霉素抗性是否与 *R* 基因有关，为此需要依次进行一系列实验：构建质粒 2 →筛选含有质粒 2 的菌株→筛选 *R* 基因敲除且不再含有质粒 2 的菌株→筛选不再具有头孢霉素抗性的菌株→通过分子手段确认所获得的菌株 *R* 基因已被敲除，以此建立起头孢霉素抗性与 *R* 基因的因果关系。①问，题目给出了质粒 2 的部分构建过程，根据题意，需要考生补全获得上、下游片段的实验步骤。根据图 1 中给出的 Sa 部分基因组信息，可以采用引物 1 和 4 进行 PCR 扩增，获取包括上游片段 +*R* 基因 + 下游片段在内的一段 DNA，再用 *Sac* Ⅱ和 *Eco*R Ⅰ对 PCR 产物进行酶切，电泳分离后回收上、下游片段。也可以来用引物 1 和 3 以及引物 2 和 4 分别进行 PCR 扩增，再采用 *Sac* Ⅱ和 *Eco*R Ⅰ对 PCR 产物进行酶切，电泳分离后回收上、下游片段。②问，根据题意，需要利用选择培养基筛选含有质粒 2 的 Sa 单菌落，已知不含 Sa 质粒 2 菌株对氯霉素敏感，质粒 2 可赋予菌株氯霉素抗性，所以应使用含氯霉素的平板筛选来达到目的。因为该菌株是头孢霉素抗性菌株，因此在其中补加头孢霉素也可以。③问，首先，该研究要筛选 *R* 基因敲除不再含有质粒 2 的菌落，以便继续使用质粒 2 对 *R* 基因敲除的 Sa 菌株进行后续研究。选择培养基应满足如下条件：含有质粒 2 的 Sa 无法生存。已知质粒 2 上具有可被脱水四环素诱导表达的 Sa 致死基因，所以应使用含有脱水四环素的平板筛选不再含有质粒 2 的菌落。随后，需要获得不再具有头孢霉素抗性的 *R* 基因敲除菌株，以便进行分子鉴定，根据题意，要筛选的菌株无法在含头孢霉素的选择培养基上增殖，所以应在选择培养基中加入头孢霉素。④问，若 *R* 基因已被敲除，以含有引物 2 或引物 3 的引物组合（引物 1 和 3，引物 2 和 3，引物 2 和 4）进行 PCR 时，均无扩增产物，电泳检测结果应空白，A、B、C 选项均不符合题意；以引物 1 和引物 4 进行 PCR，若 *R* 基因已被敲除，产物的长度应为上游片段 + 下游片段，约为 1.9 (0.7+1.2) kb，故 **D 选项正确**。

35. (1) 缺失　(2) 1　3　1 : 1　(3) 产生了简并密码子（同义突变）　(4) 9 : 7　①有　②有

解析：基因突变是基因中一个或者多个碱基序列的改变，使基因从一种等位基因改变为另一种等位形式的基因，替换（单个）、插入（单个或多个）和缺失（单个或多个）等方式都可以引起基因突变。第 (1) 题，大麦突变体 *Cerl* 为纯合体，其表型为颖壳蜡质合成缺陷，原因是 C 基因突变为 c，该突变为隐性突变。在 C 基因两侧设计引物，经 PCR 扩增，电泳检测 PCR 产物，突变体电泳结果为只有 1 100 bp 的产物，野生型电泳结果为只有 1 960 bp 的产物。由此可知， C 基因和 c 基因在 PCR 扩增时引物相同，但 c 基因的长度比 C 基因更短，突变体 *Cerl* 中 c 基因的突变类型是缺失。第 (2) 题，突变体 *Cerl* 的基因型为 cc，突变体 (cc) 与纯合野生型 (CC) 杂交，F_1 全为野生型，F_1 基因型为 Cc，F_2 与突变体 *Cerl* 杂交，后代为野生型 (Cc) ：突变型 (cc) =1 : 1。利用上述引物 PCR 扩增这些后代的基因组 DNA，电泳检测 PCR 产物，

后代中野生型有C和c基因，电泳结果是1 960 bp条带和1 100 bp条带，与泳道3带型相同；突变型只有c基因，电泳结果是1 100 bp条带，与泳道1带型相同。结合杂交后代表型比例，电泳后两种电泳带型的比例为1∶1。第（3）题，羟基棕榈酸合成蜡质过程中必需的D基因突变产生d_1时，其编码多肽链的DNA序列中有一个碱基由G变为T，判断该突变的实质为碱基的替换，基因表达时以编码多肽链的DNA序列为模板合成的mRNA序列发生改变，相应位置上的密码子也发生相应变化，但题干表明，突变后氨基酸序列没有发生改变，这是因为密码子具有简并性，突变后密码子与突变前密码子决定同一种氨基酸。第（4）题，C基因的遗传符合孟德尔遗传规律，说明C基因位于染色体上，D基因位于另一条染色体上，说明这两对基因的遗传符合自由组合定律。D基因发生了使其丧失功能的突变，产生d_2基因，说明当没有D时，羟基棕榈酸无法合成蜡质。C基因可以将棕榈酸转化为羟基棕榈酸。在群体中，相关表型和基因型对应如下表：

基因型	C_D_	C_d_2d_2	ccD_	ccd_2d_2
表型	野生型 有棕榈酸 有羟基棕榈酸 颖壳蜡质	突变型 有棕榈酸 有羟基棕榈酸 颖壳蜡质缺陷	突变型 有棕榈酸 无羟基棕榈酸 颖壳蜡质缺陷	突变型 有棕榈酸 无羟基棕榈酸 颖壳蜡质缺陷

CCDD与ccd_2d_2个体杂交，F_1基因型为$CcDd_2$，表型为野生型，F_1自交，根据自由组合定律，F_2中C_D_∶C_d_2d_2∶ccD_∶ccd_2d_2=9∶3∶3∶1，综合表格中基因型与表型的关系，F_2野生型与突变型的比例为9∶7。

36. （1）脱氧核糖核苷酸（脱氧核苷酸）　（2）*Eco*R Ⅰ　酶切后形成的片段黏性末端相同，易造成自身环化；不能保证目标片段与载体定向连接（反向连接）　（3）酶切后的空载体片段，启动子D+基因S片段　PCR　（4）品种DN的基因S上游启动子效应比TL强，使得基因S表达量更高，种子更大

解析：（1）启动子（RNA聚合酶识别和结合的位点，驱动mRNA的转录）是一段DNA序列，其基本组成单位是四种脱氧核糖核苷酸。（2）根据图示信息可知，“启动子D+基因S”的DNA序列上存在*Eco*R Ⅰ的识别序列，若使用限制酶*Eco*R Ⅰ，会使目的基因序列被破坏；根据图中限制酶的识别序列可知，酶*Spe* Ⅰ和*Xba* Ⅰ属于同尾酶，切割产生的黏性末端相同，若用这两种限制酶切割，形成的DNA片段在构建基因表达载体时，容易出现自身环化，以及无法保证目的基因片段与载体片段定向连接，影响目的基因在受体细胞中的表达。（3）DNA电泳可以分离不同大小的DNA片段，用限制酶对重组表达载体酶切后的产物不仅有“启动子D+基因S”片段，还有酶切后的空载体片段，因此电泳时，对照样品除指示分子大小的标准参照物外，还应有酶切后的空载体片段和“启动子D+基因S”片段；在分子水平上检测目的基因是否转入成功，可通过PCR等技术检测，也可以用RT-PCR判断是否转录出mRNA。（4）根据题目信息可知，再生植株Y2-1导入的目的基因为取自品种DN的“启动子D+基因S”序列，再生植株YZ-2导入的目的基因为取自品种TL的“启动子T+基因S”序列，结合题干信息“两品种中基因S序列无差异”可推测：品种DN的基因S上游的启动子D的效应强于品种TL的启动子T，启动子D使基因S表达量更高，因而种子更大。

37. （1）碳源、氮源　（2）P_{T7}、P_{BAD}和P_{BAD}　基因2和3正常表达无活性产物，被蓝光激活后再启动基因1表达　（3）抑制杂菌；去除丢失质粒的菌株　（4）该处细胞中T7RNAP激活，酪氨酸酶表达并合成黑色素　（5）将酪氨酸酶替换成催化其他色素合成的酶或答“将酪氨酸酶替换成不同颜色蛋白”

解析：（1）培养基的营养物质有水、碳源、氮源、维生素、无机盐等。（2）基因2和3在通用型启动子P_{BAD}的激活下正常表达，使T7RNAP的N端和C端分别携带蓝光光敏蛋白标签，而在蓝光下T7RNAP被激活，此时基因1表达后形成黑色素，从而实现光控染色。（3）抗生素可以抑制杂菌，还可作为标记基因筛选含光控表达载体的菌株，去除丢失质粒的菌株。（4）染色池中添加了酪氨酸，蓝光照射后T7RNAP被激活，酪氨酸酶表达，可催化酪氨酸形成黑色素。（5）酪氨酸酶催化酪氨酸形成黑色素，因此可以将酪氨酸酶替换成催化其他色素合成的酶，或者直接将酪氨酸酶替换成不同的颜色蛋白，如绿色荧光蛋白。

38. （1）根　解旋酶　磷酸基团　扩大　（2）DNA连接酶　热变性使大肠杆菌细胞破裂，DNA流出　（3）划线　振荡培养　（4）梯度稀释　锌吸收缺陷型酵母+空载体　N　转入N基因的这组酵母菌数量多

解析：第（1）小题，由题干可知，锌转运蛋白在植物根部细胞特异性表达，因此只在根部细胞才能转录有相应的mRNA。热变性是指模板DNA双链在高温下使氢键断裂，解旋成2条DNA单链，和细胞内解旋酶的解旋作用效果相似。DNA中的磷酸基团带负电荷。电泳时，不同带电粒子因分子大小、形状、所带电荷等因素不同，迁移速率也会有所差异。当2个PCR产物分子量接近时，迁移的速率相似，因此延长电泳时间，2个条带的距离会扩大，才能更好地区分。第（2）小题，重组质粒和酵母表达载体同时进行双酶切处理，DNA连接酶可以将不同来源的2个DNA分子的双链通过磷酸二酯键分别连接起来，形成一个稳定的重组DNA分子。热变性会使大肠杆菌菌体破裂，DNA渗漏出来为PCR扩增提供模板。第（3）小题，

锌吸收缺陷型酵母菌株在固体培养基进行划线培养得以活化，酵母菌在液体培养基需进行振荡培养，保证氧气供应并充分接触营养物质，使菌体数量增加，有利于重组表达载体转化。第（4）小题，培养液的 OD_{600} 值，从 0.6 到 0.06、0.006、0.0006 可知，菌液是进行了梯度稀释。阴性对照指不具备转运能力的一组，从给定的实验分组可知，“锌吸收缺陷型酵母+空载体”是阴性对照。结合实验结果，加入“锌吸收陷型酵母+N 基因表达载体”培养基中酵母菌数量比加入“锌吸收缺陷型酵母+M 基因表达载体”培养基中的更多，可以初步推测，转运蛋白 N 转运 Zn^{2+} 能力更强。

39. （1）*Eco*R Ⅰ　*Hind* Ⅲ　（2）$CaCl_2$　卡那霉素　S-F 和 P-R　（3）启动子　C　（4）（i）SOD-ELP_{50} 组纯化蛋白数量更多　（ii）高温使蛋白变性　（iii）低温下添加 NaCl 有利于 SOD 蛋白纯化，杂蛋白较少，有利于酶活性的保持

解析：第（1）问，*pET-SOD-*ELP_{50} 载体构建是基于先前构建的 *pET-SOD* 基础上。*Bam*H Ⅰ位于 SOD 的 5′端，*Dra* Ⅲ位于终止子下游。*pET-SOD* 多克隆位点上有 *Eco*R Ⅰ、*Hind* Ⅲ酶切位点，所以限制酶 a 和限制酶 b 分别是 *Eco*R Ⅰ、*Hind* Ⅲ。第（2）问，构建的载体 *pET-SOD-*ELP_{50} 转化大肠杆菌时，大肠杆菌通常用 $CaCl_2$ 处理，使细胞处于感受态，然后再将重组的基因表达载体导入其中。转化后的大肠杆菌需要进行筛选，*pET-SOD-*ELP_{50} 含有的标记基因是卡那霉素抗性基因，所以需要采用含有卡那霉素的培养基进行筛选。成功转入 *pET-SOD-*ELP_{50} 的大肠杆菌，需要使用 PCR 技术进行进一步验证筛选。正向引物选择 S-F，而反向引物首先排除 S-R，因为 S-R 和 S-F 只能 PCR 扩增到 *SOD* 基因片段，而不是 *SOD-*ELP_{50} 片段。因为题干已经明确 ELP_{50} 序列是（GTTCCTGGTGTTGGC）重复 50 次的序列，引物 E-R 与 ELP_{50} 序列就存在着多个结合位点，导致 PCR 产物不能得到特异性目的条带，故不能选用引物 E-R。所以，反向引物只能选引物 P-R。第（3）问，*SOD* 和 ELP_{50} 的片段长度分别是 462 bp 和 750 bp，所以 *SOD-*ELP_{50} 片段约为 1212 bp，表达出的 SOD-ELP_{50} 融合蛋白约含 404 个氨基酸残基。题干中已经告知蛋白质中氨基酸残基平均相对分子质量约 0.11 kDa，所以融合蛋白 SOD-ELP_{50} 平均相对分子质量为 404×0.11=44.44 kDa。参照蛋白标记的相对位置，杂交条带显示的位置在“C”处。第（4）问，由图 3 观察得知 20℃时，加入 NaCl 后 SOD-ELP_{50} 组沉淀蛋白含量比 SOD 组高。高温可使蛋白变性，离心后沉淀。通过横向分析 20℃和 100℃的 SOD-ELP_{50} 相对含量，20℃时的 SOD-ELP_{50} 含量已经占到 100℃时的 SOD-ELP_{50} 的 90% 左右，可得出纯化回收率高的结论。此外 20℃时 SOD-ELP_{50} 组的大肠杆菌自身蛋白含量非常低，而 100℃时 SOD-ELP_{50} 组的大肠杆菌自身蛋白含量很高，这表明纯化得到的 SOD-ELP_{50} 中的杂蛋白很少。20℃情况下有利于酶活性的保持，不会使蛋白变性。

40. （1）低　256　CAAT　GTTT（两空顺序可颠倒）　（2）卡那霉素　*Sac* Ⅰ　④　（3）1/4

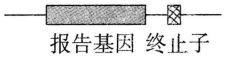
解析：试题内容囊括了基因工程基本操作程序：目的基因的筛选与获取、基因表达载体的构建、将目的基因导入受体细胞、目的基因的检测与鉴定等，通过基因工程技术在农作物新品种培育中的应用，引导考生切实感受基因工程育种在农业生产中的重要性，有助于考生对生物技术与人类生产生活的关系做出正确的理解和理性的判断。

第（1）小题：第一问考查的知识点是 PCR 法获取目的基因。PCR 扩增时需要提供目标基因特异的引物，用于 PCR 的引物长度通常为 20~30 个核苷酸，在复性过程中引物通过碱基互补配对与模板 DNA 单链结合。引物越短，基因组中能够与其配对的 DNA 序列越多，导致其特异性与目标基因配对的概率降低，非特异性扩增增多。由此信息可知，题干中所用的引物越短，引物特异性越低。第二问考查的知识点是限制酶的特性。限制酶在切开 DNA 双链时，形成的单链突出末端为黏性末端。根据图中给出的 *Bsa* Ⅰ识别序列及切割位点的信息，可知 *Bsa* Ⅰ限制酶的识别位点和切割位点不同，其特异性识别 DNA 序列后能够在下游特定位点对 DNA 双链进行切割，形成黏性末端。用 *Bsa* Ⅰ酶切大豆基因组 DNA 后，能够形成的黏性末端种类可以是四种核苷酸的随机组合，所以能够形成 4×4×4×4=256 种不同的黏性末端；第三问和第四问考查的知识点是基因表达载体的构建。最经典的载体构建方法是酶切连接法，即用限制酶切割载体和含有目的基因的 DNA 片段后，经 DNA 连接酶将目的基因片段连接到载体的切口处，形成重组 DNA 分子。根据图中给出的载体酶切位点的序列信息和 *Bsa* Ⅰ识别序列及切割位点的信息，可判断载体经 *Bsa* Ⅰ酶切后可以在载体 DNA 双链上形成 5'-CAAT-3' 和 5'-GTTT-3' 的黏性末端，用于目的片段与载体的连接。这里要求考生能够掌握限制酶切割 DNA 产生的黏性末端类型。通过对题意的解读能够从中提取出 *Bsa* Ⅰ的识别序列位点，找到其切割位点。

第（2）小题：第一问考查的是将目的基因导入受体细胞的方法。农杆菌转化法是将重组载体导入植物细胞最常用的方法。农杆菌在侵染植物细胞后，能够介导重组载体上的 T-DNA 区段导入受体细胞，并最终整合到该细胞的染色体 DNA 上。根据农杆菌的这个特点，为了便于筛选，通常转化植物的表达载体上会带有 2 个以上的标记基因，在载体构建过程中分别

用于细菌中的筛选和植物细胞中的筛选。由题干中载体信息可知，其携带2个标记基因，分别为氨苄青霉素和卡那霉素抗性基因。氨苄青霉素抗性基因位于T-DNA边界之外，而卡那霉素抗性基因位于T-DNA区，T-DNA区能够整合到大豆的基因组中，因此氨苄青霉素是细菌中表达的筛选标记基因，而卡那霉素是植物中表达的筛选标记基因。所以在筛选转基因植株后代时，使用卡那霉素筛选到的抗性植株中，可能成功转入了重组载体。第二问和第三问考查的知识点是对目的基因的鉴定和酶切结果的分析。基因编辑技术可以实现对目的基因的定点插入、删除和替换。本实验情境中受体细胞的成功编辑使基因L获得了一个新的*Sac* Ⅰ酶切位点，通过PCR扩增目标基因L的部分片段，用*Sac* Ⅰ酶切后，基因L的扩增片段不能被切开，只有1条条带；而以突变纯合植株DNA为模板扩增的产物能够被切开，电泳检测出现2条条带；杂合株系中既有酶切后的2条带，还有1条未被切开条带，具有3条条带。据此判断，其中可以呈现出电泳结果的限制酶是*Sac* Ⅰ酶。如果选用*Bam*H Ⅲ和*Eco*R Ⅰ，因为扩增序列突变前后的酶切结果一致，无法判断目标基因是否成功突变。从图中酶切后电泳的结果来看，④号泳道中扩增产物经*Sac* Ⅰ酶切后有2条切开的条带出现，所以纯合突变植株为④号。这里要求考生了解基因序列的突变不仅能够使酶切位点失效，也可以获得新的酶切位点，在鉴定时可以充分利用这一点，进行高效高通量的筛选。第（3）小题：根据农杆菌转化法，重组载体中的T-DNA区段整合到大豆染色体中伴随着抗生素抗性的获得，表现为显性性状。根据题干信息，重组载体导入大豆细胞后，向导DNA的转录产物可引导核酸酶特异性结合基因组上的目标序列并发挥基因编辑作用。据此推测T-DNA在染色体上的插入位置与核酸酶的编辑位点无关。已知获得的突变体株系为基因L成功突变的纯合植株，其体细胞中只有1条染色体有T-DNA插入，所以在对后代进行抗性筛选时，染色体未插入T-DNA的纯合编辑株系的比例是1/4。这部分株系不携带抗性筛选标记，但是基因L目标序列已经发生突变，与自然界的自发突变情况类似，这也是基因编辑技术能够提高转基因植物安全性的理论基础。

41. （1）稳定性差异　选择性表达　（2）C　（3）各组织器官中G和H的mRNA　（4）



解析：（1）细胞分化是指在个体发育中，由一个或一种细胞增殖产生的后代，在形态、结构和生理功能上发生稳定性差异的过程。分化是基因选择性表达的结果。（2）由题干“增强子位于基因上游或下游，与基本启动子共同组成基因表达的调控序列”可知，增强子是含有特定碱基序列的DNA片段；根据基因、DNA与染色体的关系可知，增强子、基本启动子和它们调控的基因位于同一条染色体上，故A、B选项均正确；第二，由图A可知，一个增强子能作用于一个基本启动子，但由图C可知，一个增强子可作用于两个基本启动子，故**C选项错误**。第三，依据题干“很多增强子具有组织特异的活性”可知，很多增强子在不同组织中的活性不同，故**D选项正确**。所以C选项的说法是错误的。（3）要确定这两个基因是否为心脏特异表达的基因，可通过PCR等技术检测其他器官细胞中G和H两个基因是否转录出相应的mRNA或是否翻译出相应的蛋白质。如果其它器官细胞中G和H两个基因能够转录出相应的mRNA或翻译出相应的蛋白质，则两个基因不是心脏特异表达的基因，反之，则是心脏特异表达的基因。（4）根据题意，在绝大多数表达报告基因的个体中，增强子捕获载体的插入位点位于基因外部，不会造成基因突变。研究者构建了由基本启动子和报告基因组成的“增强子捕获载体”，该捕获载体会随机插入基因组中，当增强子捕获载体的插入位点位于内源基因内部，会引起造成内源基因发生突变，产生突变体，可以用来研究某目的基因的功能。在“捕获”增强子的同时，也造成该增强子所调控的基因发生突变，说明需要增加增强子片段。根据题干中，基因工程所用的表达载体中的启动子实际上包含增强子和基本启动子，所以要将图B所示载体去掉基本启动子，该载体插入基因内部后既符合“增强子捕获载体”的特点，又同时具有C图的特点，激活报告基因的表达，捕获的增强子还会引起基因突变。因此，当改造后的载体随机插入到某内源基因的内部，引起基因突变的同时，也获得增强子，报告基因也能表达。

42. （1）疫苗中不含乙肝病毒DNA　（2）用于筛选含有重组表达载体的细胞　RNA聚合酶　（3）染色体DNA（或答：基因组DNA）　与目的基因特异性互补且带有标记的DNA片段（或答：带标记的含有目的基因的DNA片段）　（4）从酵母细胞中提取蛋白质，再用相应的抗体进行抗原-抗体杂交，检测是否出现杂交带

解析：第（1）题，病毒核酸（遗传物质）进入宿主细胞后，能利用宿主细胞的原料、能量和场所合成自身核酸和蛋白质，并组装产生新的病毒粒子，因此只有病毒的核酸进入宿主细胞才能产生病毒。重组乙肝疫苗的主要成分是一种乙肝病毒表面抗原（病毒外壳蛋白），不含乙肝病毒核酸（DNA），因此接种重组乙肝疫苗不会在人体中产生乙肝病毒。乙肝病毒表面抗原可以刺激人体免疫系统产生相应的抗体。第（2）题，抗生素抗性基因是表达载体中常用的一种标记基因，重组表达载体中通常含有抗生素抗性基因，该基因在宿主细胞中表达的抗生素降解酶可减轻培养基中

抗生素对宿主细胞的杀伤作用，从而有助于筛选分离含有重组表达载体的宿主细胞。启动子是RNA聚合酶识别和结合的部分，RNA聚合酶与启动子结合后可驱动基因转录出mRNA，因此能识别载体中的启动子并驱动目的基因转录的酶是RNA聚合酶。第（3）题，基因工程的一个重要环节是检测目的基因是否正确插入宿主细胞染色体基因组中，此检测通常采用核酸分子杂交的方法，因此需要提取宿主基因组DNA作为分子杂交的实验材料，同时需要用于分子杂交的探针。探针应至少符合两个要求：一是探针的碱基序列与靶基因碱基序列特异性互补配对，能识别并结合到靶基因；二是探针应带有用于检测的信号，通常是放射性标记物、荧光标记物、酶标记物等，当作探针与靶基因结合的检测信号。根据信号的强度与位置，可以确定目的基因是否插入染色体。因此，DNA分子杂交时应使用的探针是与目的基因特异性互补且带有标记的DNA片段。第（4）题，检测目的蛋白在宿主细胞中是否表达。要从细胞表达的众多蛋白中检测目的蛋白，通常采用专一性强的抗原-抗体杂交的实验方法。因此，要检测目的蛋白在酵母细胞中是否表达，首先需要提取酵母细胞的总蛋白，然后用特异性抗体进行杂交，若出现杂交带，则说明酵母细胞表达了目的蛋白。

43. （1）逆转录酶　（2）特异核苷酸序列　复性　（3）被检测者曾经感染过病毒，体内出现抗体但目前没有病毒　被检测者感染了病毒并产生了抗体　（4）获得目的基因→构建表达载体→导入受体细胞→目的基因的检测与鉴定

解析：（1）以病毒RNA为模板合成cDNA是逆转录过程，这一过程需要的酶是逆转录酶。获得cDNA后可通过PCR技术扩增相应的DNA片段。根据检测结果判断被检测者是否感染新冠病毒。（2）为确保PCR扩增获得的是特异性核苷酸序列，从而确保新冠病毒核酸检测的准确性，设计PCR引物时必须依据新冠病毒RNA中的特异性核苷酸序列来进行。PCR过程每次循环分为3步，即变性（超过90℃）→复性（55℃左右）→延伸（72℃左右），其中温度最低的一步是复性。（3）某人同时进行了新冠病毒核酸检测和抗体检测，若核酸检测结果为阴性而抗体检测结果为阳性，说明他体内没有新冠病毒，但曾感染新冠病毒，已经康复；若核酸检测和抗体检测结果均为阳性，说明他已感染新冠病毒，是患者。

44. （1）将含有某种生物不同基因的许多DNA片段，导入受体菌的群体中储存，各个受体菌分别含有这种生物的不同基因　（2）终止子　启动子　提供RNA聚合酶识别和结合的部位，驱动GFP突变基因转录出mRNA　将含有表达载体的细胞筛选出来　（3）GFP基因虽然发生了突变，但由于存在密码的简并现象（密码子的简并性），突变基因所编码的氨基酸序列并未改变　（4）将YFP基因插入表达载体，再将构建成功的重组表达载体导入不能发黄色荧光的真核细胞中，观察黄色荧光是否出现

解析：第（1）题，将含有某种生物不同基因的许多DNA片段，导入受体菌的群体中储存，各个受体菌分别含有这种生物的不同基因。如果基因文库中包含一种生物所有的基因，这种基因文库称为基因组文库。如果基因文库中包含某个细胞中所有mRNA反转录所得的cDNA，则称为cDNA文库。依此类推，包含GFP不同突变基因的基因文库则可以称为GFP基因的突变基因文库。第（2）题，一个基因表达载体的组成部分，除了目的基因外还有启动子、终止子以及标记基因等。启动子是一段有特殊结构的DNA片段，位于基因的前端，是RNA聚合酶识别和结合的部位，用于驱动目的基因的转录。终止子是一段有特殊结构的DNA片段，位于基因的后端，是转录终止所需的信号。模式图中标明了GFP突变基因的转录方向，因此可判断图中②为启动子，①为终止子。②的作用即启动子的作用是提供RNA聚合酶识别和结合的部位，驱动GFP突变基因转录。标记基因用于筛选含有目的基因重组表达载体的细胞。常用的标记基因是抗生素抗性基因，带有抗生素抗性基因的表达载体可以产生相应的抗生素抗性产物，使含有目的基因表达载体的细胞能在含有该抗生素的选择性培养基中正常生长，而不含目的基因表达载体的细胞在含有该抗生素的选择性培养基中不能生长，从而可高效地筛选含有目的基因表达载体的细胞。所以图中氨苄青霉素抗性基因的作用是将含有表达载体的细胞筛选出来。第（3）题，mRNA是蛋白质（多肽链）合成的直接模板，mRNA上每3个相邻的碱基构成1个密码子，决定1个氨基酸。密码子具有通用性、连续性、简并性等特点，其中简并性是指绝大多数氨基酸对应多个密码子，即多种密码子编码同一种氨基酸的现象。比如编码丝氨酸的密码子有6种，编码甘氨酸的密码子有4种。如果基因突变导致密码子改变，但是密码子对应的氨基酸没有改变，则基因编码的蛋白质序列不变、功能不变。如果基因突变导致密码子改变，密码子对应的氨基酸也发生改变，但是突变的氨基酸与原来的氨基酸结构性质相似，或者突变氨基酸所处肽链的位置不影响蛋白质空间结构，则基因编码的蛋白质功能也可能不变。将构建好的重组表达载体导入大肠杆菌中进行表达，发现大肠杆菌有的发绿色荧光，要求结合密码子的特点分析原因，则可能是GFP基因虽然发生了突变，但由于存在密码的简并现象（密码子的简并性），突变基因所编码的氨基酸序列并未改变。第（4）题，通过测序获得YFP基因的序列。根据基因工程的一般步骤，若要探究YFP基因能否在

真核细胞中表达，则可以将YFP基因插入表达载体，再将构建成功的重组表达载体导入真核细胞中，观察受体细胞能否表达导入的YFP基因。YFP基因表达则会产生黄色荧光，为了便于观察和判断，应选用不能产生黄色荧光的真核细胞作为受体细胞。

45. 花药离体培养获得的单倍体经秋水仙素处理后所得植株为纯合子，后代不会发生性状分离　秋水仙素　胚状体　(2) cDNA文库是由编码蛋白质的mRNA逆转录来的基因导入菌落而成的，基因工程中只需要获得编码蛋白质的DNA，筛选比较简单易行　限制酶和DNA连接酶　抗生素　愈伤组织　DNA分子杂交技术

解析：(1) 单倍体育种过程中，单倍体经秋水仙素处理后所得植株为纯合子，后代不会发生性状分离，所以可以明显缩短育种年限。将水稻花粉进行脱分化处理，可产生单倍体的愈伤组织，秋水仙素能抑制纺锤体的形成，导致染色体不能移向细胞两极，从而引起细胞内染色体数目加倍，故将其培养于含秋水仙素的培养基上，可促进产生二倍体愈伤组织。胚状体可用于制造人工种子。(2) cDNA文库又叫部分基因文库，是由编码蛋白质的mRNA逆转录来的基因导入受体菌而形成的，而基因组文库包含了本物种全部基因，基因工程中只需转录出编码蛋白质的基因部分就即可，故选cDNA文库。在构建重组Ti质粒时，必须使用限制酶切割质粒使其具有与目的基因相同的黏性末端，之后再用DNA连接酶将目的基因和质粒连接成重组质粒。该重组的Ti质粒中含有抗生素抗性基因，故应在培养基中添加抗生素，以便对重组质粒进行筛选和鉴定。将目的基因导入到植物细胞常用农杆菌转化法，即用含*eui*基因的农杆菌侵染愈伤组织，以便将*eui*基因导入愈伤组织，获得转基因再生植株。检测植株是否含有*eui*基因，可采取DNA分子杂交技术的方法。

46. (1) 脱分化　细胞分裂素　诱导叶绿素的合成　(2) 遗传特性　转基因种子　(3) 农杆菌可特异性感染植株，农杆菌Ti质粒上的T-DNA可转移至受体细胞，并且整合到受体细胞染色体的DNA上　(4) 紫外光照射下，筛选发出绿色荧光的毛状根进行剪切　观察转化植株B是否出现白化现象（或抗原抗体杂交法，或PCR法）　若白化，说明PDS基因被敲除，导致PDS酶缺失，因此载体发挥作用　(5) 无需组织培养，操作简单等

解析：(1) 图1中，从外植体转变成愈伤组织的过程属于脱分化过程，该过程的本质是使细胞失去原来特定的结构和功能；从愈伤组织到幼苗的培养过程需要的激素有生长素和细胞分裂素，这两种激素的比值能调控愈伤组织的分化方向，该过程还需要光照，因为叶绿素的形成需要光；且叶绿体利用光能制造有机物，供试管苗生长发育。(2) 图1中的愈伤组织，若不经过共培养环节，直接诱导培养得到的植株可以保持植株A的遗传特性。图1中，含有外源基因的转化植株A若用于生产种子，其包装需标注转基因种子，即进行转基因标识。(3) 图1与图2中，农杆菌侵染植物细胞时，利用了农杆菌含有的Ti质粒的作用，Ti质粒中的T-DNA能将外源基因递送到植物细胞中，并与植物细胞的染色体DNA整合到一起。(4) 已知某酶（PDS）缺失会导致植株白化。某团队构建了用于敲除PDS基因的*CRISPR/Cas9*基因编辑载体（含有绿色荧光蛋白标记基因），利用图2中的CDB法将该重组载体导入植株B，长出毛状根，成功获得转化植株B，该过程中通过荧光检测选择带有绿色荧光标记的毛状根即为阳性毛状根段，图2中，鉴定导入幼苗中的基因编辑载体是否成功发挥作用的方法是观察幼苗是否表现出白化特征，因为PDS缺失会导致植株白化，而白化苗的出现意味着通过基因编辑技术成功实现PDS基因的敲除。(5) 与常规转化法相比，采用CDB法进行基因递送的优点主要表现在操作方法简单，不需要借助植物组织培养技术进行操作，且培养周期较短。

47. (1) 胰蛋白酶（或胶原蛋白酶）　动物血清　(2) PCR法（或人工合成法）　终止子　RNA聚合酶　基因转录出mRNA　(3) 基因的选择性表达　(4) 前者（诱导iPS细胞技术）需要将特定的基因（或特定蛋白）导入细胞，诱导其形成iPS细胞（或在培养基中添加小分子物质，诱导所培养的细胞形成iPS细胞）；后者（体细胞核移植技术）需将供体细胞的细胞核移入去核的卵母细胞中，使其成为重新组合的细胞　(5) 转基因技术、动物细胞培养（细胞重编程技术）

解析：(1) 动物细胞培养时，鸡胚组织剪碎后需用胰蛋白酶处理，以获得单细胞悬液。动物细胞培养时一般需要在合成培养基中添加血清等天然成分，以满足细胞对某些细胞因子的需求。(2) OSNL为目的基因，体外获取目的基因可通过PCR技术大量扩增或通过人工合成法来合成。基因表达载体中除目的基因外，还必须有启动子、终止子、复制原点和标记基因等。启动子是一段有特殊结构的DNA片段，位于基因的首端，它是RNA聚合酶识别和结合的部位，有了它才能驱动基因转录出mRNA，最终获得所需要的蛋白质。(3) 据图可知，由iPS细胞诱导形成iPGCs细胞经过了细胞分化，该过程遗传物质没有改变，导致其细胞的形态、结构和功能不同的根本原因是基因的选择性表达。(4) 诱导iPS细胞的技术是将已经分化的细胞诱导为类似胚胎干细胞的一种细胞（iPS），再诱导iPS分化为诱导原始生殖细胞（iPGCs）的技术，而细胞核移植技术是将动物的一个细胞的细胞核移入去核的卵母细胞内，使这个重组的细胞发育为胚胎，继而发育为动物个体的技术。(5) 由图可知，

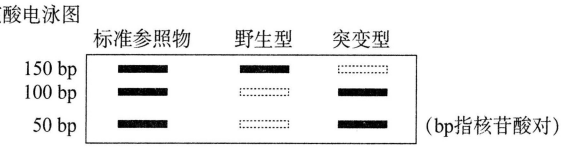
该实验流程中将OSNL基因导入鸡胚成纤维细胞利用了基因工程技术，诱导多能干细胞过程利用了动物细胞培养的技术。

48. (1) 蛋白酶抑制剂抑制昆虫消化道内蛋白酶的活性 (2) 基因表达载体的构建 (3) T-DNA 不是所有植物都能被农杆菌感染 (4) DNA分子杂交技术、抗原-抗体杂交技术 (5) 接种实验 NaPI+StPin1A 两种蛋白酶抑制剂共同作用能够更有效地抑制棉铃虫的消化功能 (6) 定向改变 从“昆虫过量表达消化道蛋白酶”、“昆虫产生不被抑制的消化道蛋白酶”、“昆虫产生能降解蛋白酶抑制剂的蛋白酶”中任选两点

解析：(1) 蛋白酶抑制剂的抗虫机制是调节害虫胰蛋白酶活性，从而使害虫不能正常消化食物达到抗虫的目的。 (2) 基因工程的核心是基因表达载体的构建。 (3) 农杆菌转化法的原理：农杆菌中的Ti质粒上的T—DNA可转移至受体细胞，并且整合到受体细胞染色体的DNA上。根据农杆菌的这一特点，如果将目的基因插入到Ti质粒的T—DNA上，通过农杆菌的转化作用，就可以把目的基因整合到植物细胞中染色体的DNA上。其不足之处是该方法不适合用于单子叶植物。 (4) 目的基因是否整合的检测，在分子水平上可通过检测转基因生物染色体的DNA是否插入目的基因、是否能转录出目的基因对应的mRNA、是否能合成目的基因所控制合成的蛋白质等；在个体水平可检测抗虫性、抗病性、活性等。即可利用DNA分子杂交技术、分子杂交技术、抗原—抗体杂交技术等。

49. (1) 野生型 (2) 基因表达载体 启动子和终止子 (3) ① T-DNA片段或答“*DA1*基因”或答“目的基因” ② 75 ③自交 100

核酸电泳图



解析：(1) 根据题干信息可知，突变后的基因为隐性基因，则野生型DA1基因为显性基因，因此采用农杆菌转化法将野生型DA1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野生型植株的种子大小相近。 (2) 利用PCR技术扩增DA1基因后，应该用同种限制性内切核酸酶对DAI基因和载体进行切割，再用DNA连接酶将两者连接起来；在基因表达载体中，启动子位于目的基因的首端，终止子位于目的基因的尾端，因此为确保插入的DAI基因可以正常表达，其上下游序列需具备启动子和终止子。 (3) ①根据题干信息和图形分析，将T_0代植株的花序浸没在农杆菌（T-DNA上含有DAI基因和卡那霉素抗性基因）液中转化，再将获得的T_1代种子播种在选择培养基（含有卡那霉素）上，若在选择培养基上有能够萌发并生长的阳性个体，则说明含有卡那霉素抗性基因，即表示其基因组中插入DA1基因和卡那霉素抗性基因。② T_1代阳性植株都含有DA1基因，由于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，所以不确定是单一位点插入还是多位点插入，若是单一位点插入，相当于一对等位基因的杂合子，其自交后代应该出现3∶1的性状分离比，而题干要求选出单一位点插入的植株，因此应该选择阳性率约75%的培养基中幼苗继续培养。③将以上获得的T_2代阳性植株自交，再将得到的T_3代种子按单株收种并播种于选择培养基上，若某培养基上全部为具有卡那霉素抗性的植株即为需要选择的植株，即阳性率达到100%的培养基中的幼苗即为目标转基因植株。根据图形分析，野生型和突变型基因片段的长度都是150 bp，野生型的基因没有限制酶X的切割位点，而突变型的基因有限制酶X的切割位点，结合图中的数据分析可知电泳图中，野生型只有150 bp，突变型有50 bp和100 bp，如答案图。

50. (1) 引物 (2) 筛选含有目的基因的细胞 提供转录终止信号 (3) 酶蛋白大量表达需要消耗大量能量，而厌氧代谢供能不足（或其他合理答案） (4) 工业废气的资源化 通过捕获二氧化碳，实现固碳减排

解析：(1) 利用PCR技术扩增目标酶基因，首先需要根据目标酶基因两端的碱基序列设计一对引物，引物与模板链结合后，耐高温的DNA聚合酶才能从引物的3′—端延伸子链。 (3) 重组梭菌大量表达上述酶蛋白时，在这些酶蛋白的作用下，二氧化碳等气体大量用于合成丙酮，而不是用于重组梭菌的生长，所以会导致生长迟缓。 (4) 根据题意可知，这种生产高附加值化工产品的新技术，以高污染企业排放的二氧化碳等温室气体为原料，实现了废物的资源化，体现了循环经济的特点。从“碳中和”的角度看，该技术生产丙酮的过程不仅不排放二氧化碳，而且还可以消耗工业废气中的二氧化碳，有利于减缓温室效应，并实现较高的经济效益，所以具有广泛的应用前景和良好的社会效益。

51. (1) 特定氨基酸序列的多肽链 mRNA 密码子的简并性 (2) 从基因文库中获取 人工合成 DNA的半保留复制 (3) 种类 两种蛋白质的酶切位点不同，产生的肽的种类不同 (4) 在相同体积的新鲜血浆中，加入等量的蛋白质工程改造后的水蛭素、上述水蛭素蛋白酶解产物和天然水蛭素，比较抗凝血活性的强弱

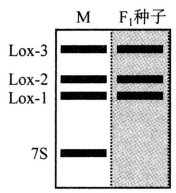
解析：(1) 蛋白质工程的基本途径：从预期的蛋白质功能出发→设计预期的蛋白质结构→推测应有的氨基酸序列→找到并改变相对应的脱氧核苷酸序列。分析可知，物质a是特定氨基酸序列的多肽链，物质b是

mRNA；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，原因是密码子的简并（性），即一种氨基酸可能对应多个密码子。（2）基因工程中获取目的基因的常用方法：构建基因文库获取目的基因，人工合成和利用PCR技术扩增；PCR技术的基本原理是DNA半保留复制。（3）据图可知，两种酶的水解产物中肽含量差别不大，但水解产物的抗凝血活性有明显差异，据此推测，两种处理后酶解产物的抗凝血活性差异主要与肽的种类有关；导致其活性不同的原因是水蛭蛋白的酶解时间和酶的种类不同，导致水蛭蛋白空间结构有不同程度破坏。（4）若要比较蛋白质工程改造后的水蛭素、题（3）所述水蛭蛋白酶解产物和天然水蛭素的抗凝血活性差异，实验设计思路：取三支试管，分别加入等量的三种待测物质，编号1、2、3；酒精消毒后，用注射器取同一种动物（如家兔）血液，立即将等量的血液分别加入1、2、3号三支试管中，静置相同时间，统计三支试管中血液凝固时间。

52.（1）7　aabb　1∶5　（2）①③　（3）*Xba* Ⅰ和*Hind* Ⅲ　（4）将目的基因转入受体细胞　（5）诱变育种、单倍体育种

解析：（1）根据自由组合定律可以判断，甲的基因型为AAbb，乙的基因型为aabb，丙的基因型为AABB。据题意可知，乙、丙杂交的F_2代中表现型为甜的植株基因型有7种。若用乙×丙中F_2代不甜的植株进行自交，F_2代不甜的植株的基因型及比例为：Aabb∶AAbb=2∶1，它们进行自交，F_3中甜∶不甜比例为1∶5。（2）据（1）中可知，不甜植株的基因型为A_bb，甜的基因型为A_B_和aa__。据图可以推测，①③符合上述要求。（3）构建基因表达载体时，选择酶的原则有以下几点：①不能切断目的基因；②最好用不同的酶切，保证目的基因与载体的正向连接；③切割后的目的基因要连接在启动子与终止子之间。所以，最好用*Xba* Ⅰ与*Hind* Ⅲ酶切割。（4）用农杆菌的目的就是将目的基因转入受体细胞中。（5）除了题中的育种方法之外，能够达到目的的育种方法还有诱变育种、单倍体育种。

53.（1）显性　（2）Lox-1，2缺失型　Lox-3缺失型　控制Lox-1，2的基因在同一对同源染色体上并且不发生互换，控制Lox-3的基因位于另一对同源染色体上



（3）如右图

（4）4　3/64　将这些种子长成的植株自交，对单株所得的所有种子进行蛋白质电泳检测，若某植株所有种子均不出现7S球蛋白条带，则该植株的种子能稳定遗传　（5）敲除7S球蛋白基因/导入7S球蛋白的反义基因，使7S球蛋白不能合成

解析：第（1）小题，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F_1种子，F_1植株自交得到F_2种子，由表可知F_2种子中7S球蛋白缺失型与野生型的比为3∶1，则7S球蛋白缺失型为显性性状。第（2）小题，表中①②的表现型需结合杂交过程、表格中性状分离比及电泳条带分析。只看Lox-1，2，3的电泳条带示意图，一共有四种类型：F_2种子中泳道3和6表现为野生型；泳道4和5表现为Lox-1，2，3全缺失型；泳道1和8表现为Lox-1，2缺失型；泳道2和7表现为Lox-3缺失型。说明①②的表现型应为1ox-3缺失型、Lox-1，2缺失型。脂氧酶由三对等位基因控制，F_2种子在脂氧酶的性状上表现型只有四种，结合表中四种表现型比例为9∶3∶3∶1，说明控制Lox-1，2的两对等位基因在同一对同源染色体上并且不发生互换，控制Lox-3的一对等位基因位于另一对同源染色体上。第（3）小题，根据题中的杂交育种过程分析，F_1应为杂合子，表现出显性性状7S球蛋白缺失型及脂氧酶Lox-1，2，3野生型，电泳条带应为仅有Lox-1，2，3三条电泳条带。第（4）小题，由电泳条带图可知第4泳道没有电泳条带，说明其种子表现型为7S球蛋白缺失型与Lox-1，2，3全缺失型，这些种子在F_2中的比例是3/64。利用这些种子选择并获得稳定遗传种子的方法是先将这些种子长成的植株自交，因杂合子的后代会发生性状分离，故对单株所得的所有种子进行蛋白质电泳检测。若某植株所有种子均不出现7S球蛋白条带，则该植株的种子能稳定遗传。第（5）小题，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以提高大豆品质，可从7S球蛋白基因不存在或不表达的方向思考，如敲除7S球蛋白基因或导入7S球蛋白基因的反义基因。

54.（一）（1）5′→3′　（2）正向连接的重组DNA有这两种酶切位点（限制酶的识别序列）；而反向连接的重组DNA会形成新的序列，没有这两种酶的酶切位点（没有限制酶的识别序列）　（二）（1）CD14蛋白/CD14抗原　分泌抗CD14抗体的杂交瘤细胞　（2）能在体外无限增殖　（3）CD14蛋白　参与形成杂交瘤细胞的B淋巴细胞种类多，有的不能分泌抗CD14抗体　（4）小鼠腹水

解析：（一）第（1）小题，PCR扩增过程，引物链的延伸方向为5′→3′。第（2）小题，两种酶虽然能切出相同的黏性末端，但正向连接的重组DNA，限制酶的识别序列没有变，原来的两种酶仍能酶切；反向连接的重组DNA，不存在*Xho* Ⅰ和*Sal* Ⅰ两种限制酶的识别序列，无法再进行酶切。

（二）第（1）小题，根据制备单克隆抗体的流程可

知，步骤①要注射特定的抗原，在本题中应为CD14蛋白（CD14抗原），步骤⑤向小鼠注射能产生特异性抗体的杂交瘤细胞，在本题中应为分泌抗CD14抗体的杂交瘤细胞。第（2）小题，步骤②所用的SP2/0细胞为骨髓瘤细胞，其特点是能在体外无限增殖。第（3）小题，专一抗体检测是检测其中是否含有抗CD14蛋白的抗体，因此用CD14蛋白检测。由于形成杂交瘤细胞的B淋巴细胞种类多，因此，有些杂交瘤细胞并不能分泌抗CD14抗体。第（4）小题，从制备单克隆抗体的流程可知，要从小鼠的腹水中提取抗CD14抗体。

55. （1）溶解度　（2）启动子　终止子（答案“启动子”和“终止子”不分顺序）　苹果酸酶基因（或“ME基因”）　（3）碱基互补配对　对照　引物间的载体序列整合到硅藻细胞基因组中（或“ME基因序列整合到硅藻细胞基因组中”）　（4）增加　细胞数量　（5）有氧呼吸生成的ATP增多　（6）节约土地资源，不受季节和气候限制（或“节约粮食资源”或“节约淡水”或“能够通过发酵大量生产”）

解析：（1）DNA不溶于酒精，但某些蛋白质溶于酒精，利用这一原理，可以初步分离DNA和蛋白质。因此，根据DNA和蛋白质在特定浓度乙醇溶液中的溶解度差异可以得到硅藻的粗提DNA。以此方法得到的粗提DNA可以作为PCR扩增目的基因的模板。（2）基因表达载体除目的基因、标记基因外，还必须有启动子、终止子等。启动子和终止子均为一段有特殊序列结构的DNA片段。它们分别位于目的基因的上下游。本研究中的目的基因是来源于硅藻的苹果酸酶（ME）基因。（3）PCR是一项根据DNA半保留复制原理，在体外提供参与DNA复制的各种组分与反应条件，对目的基因的核苷酸序列进行大量复制的技术。引物是一小段能与DNA母链的一段碱基序列互补配对的短单链核酸。对照实验一般要设置对照组和实验组。本实验的对照组中以非转基因的硅藻细胞基因组DNA作为PCR模板，而在实验组中以转ME基因的硅藻细胞基因组DNA作为模板。如此比较两个实验扩增结果可以判定引物间的载体序列是否整合到硅藻细胞的基因组中，从而推测ME基因序列是否整合到硅藻细胞基因组中。（4）硅藻细胞内的脂质含量和繁殖速率是利用单细胞硅藻生产生物柴油的两个重要影响因素。据图3分析可知，相对于非转基因硅藻细胞品系A，转基因硅藻细胞品系B的胞内脂质含量平均值显著提高。在测定硅藻细胞内脂质含量的同时，还需测定在相同发酵条件下品系A与B的硅藻细胞数量，从而可筛选获得高产生物柴油的优良硅藻细胞品系。（5）细胞内脂质的合成需要大量ATP。苹果酸酶（ME）可催化苹果酸生成NADH。研究表明，品系B线粒体中ME含量显著高于品系A。据此分析可知，ME基因的超表达导致线粒体中的NADH水平升高，NADH进一步通过有氧呼吸产生大量ATP，最终促进细胞内脂质的合成。（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为：能够通过发酵大量生产、不受季节和气候限制、节约土地资源、节约淡水以及节约粮食资源等。

56. （1）外　（2）P1和P6　（3）①不含尿嘧啶　②2　含有5-氟乳清酸和尿嘧啶（只答5-氟乳清酸给2分）　（4）4

解析：（1）据题意，酿酒酵母需利用纤维素作为生产乙醇的原料，但酿酒酵母菌株无法直接吸收利用纤维素等糖类，所以酶Ⅰ、酶Ⅱ和酶Ⅲ应为胞外酶，在细胞外催化纤维素生物降解葡萄糖后，再被酿酒酵母吸收利用，故应在细胞外发挥作用。（2）同源重组需要在外源基因两端分别引入A和B，可通过PCR方法实现三个片段的连接。引物对P3/P4只能扩增外源基因，引物对中含P2或P5则不能有效扩增。而引物P1（P6）同时包含A（B）和外源基因部分序列，可达到设计要求。故选用的一对引物为P1和P6。（3）①*URA3*作为标记基因，其表达产物可以合成细胞代谢所必需的尿嘧啶，所以在筛选被转化的受体细胞时，需在培养基中去除尿密啶，无*URA3*（连同目的基因）的酵母细胞将无法存活，因此可筛选出含有目的基因及*URA3*的受体细胞。②如题图所示，方式1中*URA3*两侧C、C′是反向同源序列，方式2中*URA3*两侧C、C′是同向同源序列。在发生同源重组时，方式1只是导致*URA3*序列倒位，但不会切除*URA3*；而方式2将导致*URA3*以环状小分子形式被切除，并在细胞分裂过程中因不能复制而丢失。故选方式2。此后，菌株1′因不含*URA3*，可在含有5-氟乳清酸和尿嘧啶的培养基上存活，而没有成功切除*URA3*的菌株，会将5-氟乳清酸转化为有毒物质，导致细胞死亡。（4）在明确了表达载体整体构建思路后，最终的表达载体需要同时满足两个条件：一是需要将*URA3*标记基因与目的基因（酶基因）一起插入酿酒酵母基因组AB之间，所以A、B应置于标记基因与目的基因最外侧；二是需要利用C、C′片段切除*URA3*标记基因，同时不能影响酶基因，所以C、C′应紧邻*URA3*两侧。同时满足上述条件的只有图4。

57. （1）1　4（以上两空可调换）　5′　（2）*Xho* Ⅰ　（3）卡那霉素　（4）B　（5）PCR（聚合酶链式反应，答案合理即给分）

解析：本题以利用转基因技术获得可高效生产苯丙氨酸的谷氨酸棒杆菌为背景，考查考生对基因工程的基本工具和基本操作程序等主干知识的理解，对识图辨析、获取信息、综合运用等能力均进行了考查，引导考生关

注生物学知识对实际生产生活的重要作用，增强社会责任感。（1）问，PCR的模板为环状DNA载体，载体的两条单链方向相反，扩增时需选择方向相反的两个引物。根据题目要求，选择引物时应保证扩增后去除*SacB*区域，故引物应选1和4。引物与单链DNA结合后，利用底物从引物的3′端开始延伸并扩增，为使产物可被酶切连接，所以应在引物5′端引入合适的限制酶识别序列。（2）问，根据图中利用载体2构建载体4的图示过程，应使用*Xho* Ⅰ限制酶对从载体3中已经扩增出的*RpsL*基因片段进行酶切，才能保证在载体2的*Xho* Ⅰ的位点插入*RpsL*片段，构建出载体4，所以引物应包含*Xho* Ⅰ酶识别序列。（3）问，因受体菌的表型为链霉素不敏感、卡那霉素敏感，载体5.上具有*RpsL*（链霉素敏感基因）和Kan^R（卡那霉素抗性基因），所以，为初步筛选成功导入载体5的菌株，应当利用含有卡那霉素的平板来进行筛选，选择平板上出现的菌落即可。（4）问，据题意，*P1*基因脱离载体5并整合到受体菌拟核DNA时，载体5上其他DNA片段全部丢失，所以该菌的表型依然是受体菌的表型，即链霉素不敏感、卡那霉素敏感，故**B选项正确**。（5）问，以拟核DNA为模板，采用*P1*基因特异性引物进行PCR扩增，若获得相应大小片段，即可初步表明该菌株成功整合了*P1*基因。

58.（1）蛋白质　（2）③　（3）②　（4）标记基因　（5）鉴定目的基因是否插入pLN23质粒　5.7　（6）逆转录（反转录）

解析：（1）根据题干信息可知，目的基因为借助PCR技术改造的β-淀粉酶基因，因此将其导入受体细胞并收获表达产物的技术属于蛋白质工程（第二代基因工程）。（2）根据教材知识“PCR反应的基本原理和过程”，用于PCR的聚合酶应以DNA为模板聚合生成新生的DNA链，因此，这种聚合酶应为以DNA为模板的DNA聚合酶。（3）根据图示信息可知，只有使用引物②和③才能扩增出全长的目的基因（引物①和④均与目的基因的内部序列而非两端序列互补）；又根据题干信息，突变氨基酸位于β-淀粉酶的羧基端，相当于mRNA的3′端。因此，引物②含有替换碱基。（4）根据教材中有关载体必要组分的论述以及图示信息，可以得出缺少标记基因。（5）根据题干和图示信息可知，用*Eco*R Ⅰ切割质粒DNA，若目的基因未接入载体可得原基因长度4.2 kb，若目的基因接入载体（即基因表达载体），则酶切片段的终长应为5.7 kb。因此，该步酶切操作可区分载体“空载”与“满载”状态，即目的基因是否插入载体。基因表达载体总长＝载体质粒长度（4.2 kb）＋目的基因长度（1.5 kb）。（6）根据题干信息，若要借助PCR技术检测目的基因表达产物mRNA，需要先将mRNA转换成DNA，即教材中“中心法则”相关知识点。

59.（1）模板、引物　退火温度　（2）CD　（3）限制性内切核酸酶、DNA连接酶　（4）ABC　（5）P3、P4　（6）电泳只能显示扩增片段的大致长度，不能显示精准的DNA碱基数量，也不能呈现DNA碱基序列

解析：第（1）问考查PCR原理相关的基本知识。不同的PCR反应体系中，模板和引物是不同的；扩增程序中依据不同引物设置不同的退火温度是最重要的环节，恰当地选择退火温度，尽量避免引物与模板的非特异性结合，以保证目的产物的有效扩增。而对于延伸时间而言，以常用的*Taq* DNA聚合酶为例，催化DNA延伸的速度为1000~2000 bp/min，通常在实验室中可根据目的片段大小在30 s~2 min的时长内大致设置延伸时间，一般不需要精确控制。第（2）问对于引物F2-F、F1-R，根据图中信息分析，应该包含EGFP尾部和AnB1头部的序列，且反向互补。因此，应选择引物C和D。第（3）问根据图中示意的同源重组过程，两个插入片段与线性载体在重组酶作用下，可形成环状质粒，直接转化细菌，这一过程省去了传统质粒构建过程中酶切、连接两个过程，所以无需使用限制性内切核酸酶、DNA连接酶。第（4）问延伸考查了对微生物操作实验的理解。A选项，“稀释涂布平板需控制每个平板30~300个菌落”是微生物计数的实验步骤，与抗性平板筛选的目的完全不同。B选项，涂布平板时，培养基已凝固，不会烫死细菌。抗性平板上没有出现菌落，最常见的原因是未能有效实现重组质粒构建，或未能进行有效转化，导致抗性平板上未长出带有抗性质粒的菌落。C选项，由于筛选平板中含有抗生素，在正常的无菌操作过程中，不会出现大量的杂菌污染。D选项，单菌落无需进行纯化，如携带非目标质粒，可通过鉴定排除。故符合题意的选项为A、B、C。第（5）问结合图1中的设计目标，从PCR产物电泳结果判断：P3无目的片段，P4产物片段大小不符，故P3、P4可直接丢弃。而P1、P2产物大小与理论值相近，需进一步分析确认。第（6）问考查对PCR产物电泳实验原理的理解。电泳条带依据其和参照分子（Marker）的相对位置，仅能显示扩增片段的大致长度，即不能显示精准的DNA碱基数量，也不能呈现DNA碱基序列，必须通过DNA测序最终确认构建的质粒符合设计。

60.（1）脂质和蛋白质　与纺锤体形成有关　（2）溶解DNA　耐高温的DNA聚合酶　3′　（3）①a和b　②1100　③**Q4**　④蛋白质X在细胞内集中定位于纤毛基部　（4）逆转录　32

解析：第（1）问图Ⅰ是纤毛细胞结构示意图，纤毛膜由细胞膜延伸而成，主要由脂质和蛋白质组成。另外，图Ⅰ显示纤毛由基体长出，题干中注明了基体由中心

体转变而来。根据所学知识中关于中心体的功能与有丝分裂过程特点，得出中心体在有丝分裂中的功能与形成纺锤体有关。第（2）问以检测纤毛相关基因*X*是否发生变异的纤毛疾病为情境，设计了DNA的扩增与检测实验，主要考查DNA提取的基本实验原理与PCR基本要点。DNA在0.14 mol/L的NaCl溶液的析出物中最多，而调整至2.0 mol/L的NaCl溶液后，含有DNA的析出物可以复溶。通过此方法，调节NaCl浓度而达到反复沉淀与溶解，去杂质。DNA提取后，需扩增目的基因*X*，主要考查可扩增目标DNA序列的PCR基本要点。在PCR扩增时，扩增体系中的关键成分是：模板DNA、序列特异的一对上下游引物、DNA聚合酶、dNTP和缓冲液。DNA聚合酶的主要作用是在上下游引物与模板的目的区域进行碱基互补配对后，引物提供游离的3'末端，在引物的3'末端根据碱基互补配对原则，逐个添加相应的dNTP。因此，扩增时需在DNA聚合酶催化下，在引物的3'末端进行DNA链延伸，获得扩增产物用于测序。第（3）问承接第（2）问，接着研究目标基因*X*对应蛋白质X在细胞中的定位。该研究涵盖重组质粒构建、PCR鉴定、片段测序、细胞转染与蛋白定位结果分析。图Ⅱ显示载体质粒Y和融合片段M的几个关键位点：引物a在*Bg*Ⅱ处，距离*Eco*RⅤ约300 bp，*Eco*RⅤ为插入片段位点，启动子与终止子分别在*Eco*RⅤ的左侧和右侧（注意箭头方向性）；而*X-GFP*基因融合片段M已在图中合并显示（注意片段方向性），其中引物*b*和*c*在M的*Bam*HⅠ处，两个方向不同，分别距离片段M的末端有800 bp和700 bp。只有引物*a*和*b*才可以组合成一对上下游引物进行PCR鉴定，扩增产物大小约为1100 bp（300 bp+800 bp）。③为保证克隆基因的正确性，需对片段M和连接处序列进行测定。参考图Ⅲ给出的四个限制酶及其对应序列，应寻找序列编号Q1~Q4中哪些显示的部分序列里含有边界序列*Eco*RⅤ序列，并且注意图Ⅱ中显示的在*Eco*RⅤ位点临近的两侧序列分别为*Hind*Ⅲ和*Bam*HⅠ，通过限制酶序列与不同限制酶图中的相对位置进行判断。因此该题中若出现的部分序列中含有……*Hind*Ⅲ……*Eco*RⅤ……，……*Eco*RⅤ……*Bam*HⅠ……或者仅含有……*Eco*RⅤ……，应都是潜在的正确序列。图Ⅲ中只有Q4含*Eco*RⅤ序列，故选择Q4为正确答案。④将鉴定完毕的Y-M质粒（表达X-GFP蛋白，实验组）与对照质粒*Y-GFP*（仅表达GFP，对照组）分别导入细胞，发现对照组细胞内均匀分布，伴有绿色荧光，而实验组的绿色荧光集中在纤毛基部，说明蛋白质X在细胞内集中定位于纤毛基部，由此可见：蛋白质的定位实验，可以通过融合蛋白的方式，指示待研究蛋白在细胞内的定位。另外，在研究过程中对照组的作用是表明GFP蛋白不会集中于纤毛基部，而造成假定位的实验结果，对照组排除了GFP会引导定位的功能。此实验的综合分析，也培养学生在进行实验设计时，认识到对照组实验的合理性与重要性。第（4）问该部分实验设计是基于PCR反应的荧光定量PCR检测法，属于知识的拓展。该方法主要检测目的是样品中目标基因的转录水平（即mRNA的含量）。在该方法中，需要首先提取总RNA，在逆转录酶（反转录酶）的作用下，将RNA逆转录成cDNA，在一对特定引物下，扩增某一基因的部分片段，间接表征该基因的转录强度（例如，题目中基因Z的转录水平）。与普通PCR不同的是，荧光定量PCR检测的是每一轮实时产物的量，需要在PCR反应体系中另外加入能显示新合成DNA链的荧光染料，从而使仪器检测出荧光，产物荧光强度与产物的量是正比例关系。“阈值”，即*Ct*值，在荧光定量PCR中常见。题目中已给出定义：产物荧光强度达到设定阈值时的PCR循环数，而已知PCR产物的量与PCR循环数的关系式为2^n。在题目给出的情境下，健康组循环15轮达到阈值，而病人组循环20轮达到阈值，若初始模板量健康组为x，病人组为y，那么使用公式表达为：$x\times2^{15}=y\times2^{20}$。假定两组均扩增到20个循环，那么在线性的扩增范围内，$x/y=2^5$倍，即反映的是达到相同阈值时，二者之间模板比例为2^5倍，在相同循环数时，产物之间比例为2^5（32）倍。

61. （1）RNA聚合酶　标记基因、复制原点（或限制酶切割位点）　（2）F2和R1或F1和R2　a链　（3）J-V5融合蛋白　不是

解析：（1）启动子是RNA聚合酶识别和结合的部位，有了它才能驱动基因的转录。质粒作为载体，需要有复制原点、一个至多个限制酶切割位点和便于重组质粒筛选的标记基因等。（2）用PCR扩增分析法确定重组质粒中目的基因插入方向是否正确时，常设计一对引物，一个引物与目的基因序列互补，另一个引物与质粒序列互补，两引物延伸方向相反，以扩增出两引物间的序列，若插入方向正确，则可扩增出相应序列，反之，则不能扩增出相应序列，故选用的引物应为F2、R1或F1、R2，若选用引物F1、R1，不论目的基因插入方向是否正确，都可扩增出目的基因序列。因为J基因的b链为转录的模板链，启动子在左侧，所以转录方向为从左到右，由于转录沿模板链3'到5'端方向合成RNA，所以J基因b链左侧为3'端，引物要与DNA的3'端互补配对，所以F1与b链互补，a链也与b链互补，由此推知引物F1与a链相应部分序列相同。（3）抗J蛋白抗体和抗V5抗体均能检测到条带1，说明条带1为J-V5融合蛋白，条带2仅能由抗J蛋白抗体检测到，说明该蛋白仅含J蛋白，不含V5标签，故条带2检出的蛋白不是由重组质粒

上的J基因表达的。

62. (1) 能与P基因母链的一段碱基序列互补配对、短单链核酸　5′端　(2) P基因编码链的第一个碱基与*Eco*R Ⅰ识别序列的最后两个碱基编码一个氨基酸，导致mRNA的密码子被错位读取　在引物中的*Eco*R Ⅰ识别序列3′端添加1个碱基　(3) 增强FLAG-P与UBC的结合　参与P与UBC的结合　(4) 药物A通过增强P与UBC结合促进P降解

解析：(1) 引物是能够与DNA母链特定的碱基序列互补配对的单链核酸片段，由于扩增目的基因时有两条模板链，设计引物时，两种引物要分别与两条模板链3′端的碱基序列互补。DNA聚合酶延伸时，将脱氧核苷酸加到引物的3′端，为了不破坏目的基因，该限制酶识别序列应添加在引物的5′端。(2) 根据题意，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，说明翻译P基因相应的序列时出错。由图甲分析可知，在转录得到的mRNA序列（与DNA编码链序列一致）中，*Eco*R Ⅰ识别序列的后两个碱基与P基因对应的第一个碱基构成一个密码子，导致翻译时核糖体读取的密码子顺序发生改变，从而使翻译出的氨基酸序列改变。要解决这个问题，可以在PCR扩增时在*Eco*R Ⅰ识别序列前后增加碱基，使融合基因中FLAG基因的碱基数目加上P基因的碱基数为3的倍数，从而保证翻译时P基因转录出的mRNA也能被正确读取。(3) 根据图乙分析可知，①组仅添加UBC，用UBC抗体检测，不出现杂交带；②组添加UBC和FLAG-P，检测出现杂交带；③组添加UBC、药物A和FLAG-P，杂交带更加明显，说明药物A的作用是促进UBC与FLAG-P的结合。②④组末添加药物A，两组的差异在于添加FLAG-P或FLAG-PΔ；③⑤组添加了药物A，两组的差异也在于添加FLAG-P或FLAG-PΔ；结合图丙可知，②③组使用FLAG-P，出现杂交带；④⑤组使用FLAG-PΔ，不出现杂交带，据此推测PΔ中缺失的特定序列是与UBC结合的关键序列。(4) 根据(3)的分析推测，药物A促进UBC与蛋白P的结合，从而促进蛋白P被蛋白酶识别并降解，达到治疗的目的。

63. (1) A　(2) N　P/**Q**　R　(3) Ce和Er基因融合　饲喂T　(4) 带标记的细胞大部分是单标记

解析：(1) EdU和BrdU均为胸腺嘧啶类似物，在DNA分子结构及复制过程中胸腺嘧啶（T）与腺嘌呤（A）进行碱基互补配对。(2) EdU和BrdU均可在DNA复制中掺入子链，故所有处于S期的细胞均会带上EdU和BrdU标记。培养孔1-2数据显示双标细胞百分比逐渐降低，说明S期细胞比例逐渐降低；到达P点，双标记细胞比例下降为0，说明该培养孔中的细胞均不处于S期，到达**Q**点以后，双标记（这里需要注意，图中虽然是一条连续的曲线，但是培养孔1-10所有数据连接起来的曲线，并非一组培养的细胞连续检测的结果）所占比例出现并在之后逐渐上升，说明从**Q**点开始细胞开始进入S期，当该细胞完成S期后，S期中所有的细胞均将带有双标记（或者所有细胞均将要或开始进入S期），此时双标记细胞比例达到最大值，即R点，故S期经历的时间为**Q**R。(3) “使用一批同时变胖的小鼠”可保证由于生理状态、肥胖原因、不同生存环境等对实验造成的影响，排除无关变量。通过基因工程构建，向小鼠体内导入两侧含有x序列的L基因，经替换、筛选后获得纯合小鼠Lx。若小鼠体细胞中同时存在两端含有x序列的L基因（x-L-x）、Ce酶基因，Ce酶基因表达的Ce酶进入细胞核，作用于x序列，导致两个x之间的L基因被敲除。Ce酶来源于噬菌体，噬菌体侵染大肠杆菌，故Ce酶无法直接通过核孔进入细胞核。若将Er基因和Ce酶基因连接形成融合基因，表达的融合蛋白Er-Ce酶可在Er的作用下在细胞内进行定位。将融合基因Er-Ce酶基因导入小鼠受精卵准备转基因小鼠，对该转基因小鼠喂食药物T，该小鼠细胞内表达的Er-Ce酶可进入细胞核。(4) 依据“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”，结合“各种细胞DNA复制所需时间基本相同”，可知对于途径Ⅰ的细胞周期，处于S期细胞的比例显著降低，因此t_2时间后换用BrdU饲喂，双标记的细胞所占比例显著低于途径Ⅱ。

64. (1) 负反馈调节　过量赖氨酸类似物　(2) 基因数据库　融合　核受体细胞　激活　早期囊胚　转基因BEF　DNA酶　PCR的模板　构建的表达载体只含有乳腺特异性启动子，只能在乳腺细胞中启动转录，而在牛耳细胞中不能表达

解析：(1) 负反馈调节是指在一个系统中，系统工作的效果，反过来又作为信息调节该系统的工作，并且使系统工作的效果减弱或受到限制，有助于系统保持稳定。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，这种调节方式属于负反馈调节。如果想得到抗赖氨酸类似物的细胞突变体可在培养基中添加过量赖氨酸类似物。(2) ①从基因数据库获取获取目的基因编码序列，用化学合成法制备可得到目的基因。②表达载体包裹到磷脂等构成的脂质体内，根据细胞膜成分，其与BEF膜发生融合。③去核的卵母细胞作为受体细胞，其处于减数第二次分裂中期，因为卵母细胞中含有促使细胞核表达全能性的物质和营养条件。电融合的作用除了促进细胞融合，同时起到了激活重组细胞发育的作用。④胚胎发育到适宜阶段可取出向受体移植。牛、羊一般要培养到桑葚

胚或囊胚阶段；植入代孕母牛子宫角，直至小牛出生。⑤阳性对照：按照当前实验方案一定能得到正面预期结果的对照实验。阳性对照是已知的对测量结果有影响的因素，目的是确定实验程序无误。阴性对照和阳性对照相反，按照当前的实验方案一定不能得到正面预期结果的对照实验。排除未知变量对实验产生的不利影响。本实验以非转基因牛耳组织细胞作为阴性对照，为了检测到转基因牛耳组织细胞中存在目的基因。应该以含有目的基因的牛耳组织细胞为阳性对照。为了除去DNA污染，可以使用DNA酶使其水解。经逆转录形成cDNA，并以此为PCR的模板进行扩增。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，原因是构建的表达载体只含有乳腺特异性启动子，只能在乳腺细胞中启动转录，而在牛耳细胞中不能表达。

65.（一）（1）无菌水　水浴　杀死不耐热微生物　（2）分离　KI-I_2　（3）人工诱变　原生质体融合

（二）（1）农杆菌　过低　敏感性　（2）再生　细胞核　形态特征和数量　（3）培养时间　受精卵

解析：（一）（1）在快速分离枯草杆菌时，先将土样用无菌水制成悬液，再将含悬液的三角瓶置于80℃的水浴中保温一段时间，可以杀死不耐热的微生物。水浴及其作用错误率较高，很多学生回答成扩增，说明对微生物的分离不熟悉。（2）根据本题后文的表述可分析出，将悬液稀释后涂布于固体培养基上的过程即是微生物的分离，可将菌种的分离过程与产酶性能测定一起进行。在性能测定时，可用KI-I_2的方法进行显色，从而粗略估计出菌种是否产淀粉酶及产酶性能。本小题的回答中，分离这个空的错误率相对较高，学生容易回答为筛选或纯化等错误答案。（3）本小题主要考查了枯草杆菌的育种方法。利用现有菌种，可通过诱变育种、转基因、原生质体融合等方法和技术进行菌株育种。本小题中原生质体融合或细胞融合法，要求学生具有对学科知识的深度理解和高阶迁移能力，难度较大。

（二）本小题以转基因植物和植物克隆为情境，考查了学生对农杆菌转化法、植物克隆及植物细胞全能性等重要概念的理解，要求学生熟练掌握并应用所学的相关生物学知识和原理解决实际问题，属于难题。（1）在用农杆菌侵染的方法进行转基因过程中，通常使用抗生素主要有两个目的，一是完成转化后抑制农杆菌生长，二是筛选转化细胞。当抗生素浓度较低时，会导致未导入目的基因或抗生素敏感性低的一些植物也生存下来，从而导致出现假阳性植株，因此在转基因前需要对受体进行抗生素的敏感性检测。本小题抑制“农杆菌”生长，很多学生容易回答为“杂菌”，敏感性这个空难度也较大，很多学生容易回答为抗性、抗药性、耐药性等错误答案。（2）为提高培育转基因植株的成功率，植物转基因受体需要具有较强的再生能力和遗传稳定性。在检测遗传稳定性时，可通过观察细胞内细胞核形态是否改变及观察分裂期染色体的形态特征和数量是否改变进行判断。在回答过程中，“再生”这个空，填写“全能性表达”“细胞全能性表达”“发育成完整植株”均可以。学生容易误写为分裂分化、基因表达、基因全能性等。染色体的形态特征和数量容易填写不完整，错误率较高。（3）植物转基因受体全能性表达程度的高低受多种因素的影响，除试题中给定的因素外，还受培养时间的影响。同时，受体的取材也影响全能性的高低，其中受精卵的全能性表达能力最高。“培养时间”很多学生回答成生长周期、分裂周期或侵染时间等错误答案，而“受精卵”很多学生回答成胚性细胞、分生组织等错误答案。

66.（一）（1）无菌水　活化　离心　破碎　（2）其它色素对该波长光的吸收相对较少，干扰相对较小　70%乙醇溶液　（3）灭菌　资源化

（二）（1）逆转录　核酸探针　（2）抗原　载体　使腺病毒失去复制能力　（3）脾　动物血清

解析：（一）（1）小题考查菌种培养和产物提取的操作技术。红曲霉菌种先用无菌水制成菌悬液，并在适宜条件下进行活化后才能用于发酵生产；发酵结束后用70%乙醇杀死并浸提溶出红曲色素，经离心或沉淀后得到的上清液即为红曲色素提取液；若提取前先将红曲霉细胞进行破碎处理，则更有利于提高红曲色素得率。第（2）小题考查混合物中不同成分的定量测定技巧。红色素在不同波长光下有多个吸收峰，光电比色法测定红色素含量时，选择红色素吸收率高且其他色素吸收率低的波长光（即505 nm波长），有利于减小其他色素对检测结果的干扰。由于测定时以70%乙醇为溶剂，所以用70%乙醇作对照。第（3）小题，依据微生物实验操作规则，试验结束后必须对实验材料和残渣进行灭菌处理（无害化处理），灭菌后的残渣作为饲料添加剂或有机肥属于废弃物的资源化处理。

（二）（1）小题考查核酸检测的基本原理：处理采集的样本获得RNA，经逆转录酶作用合成DNA，由于微量的核酸分子杂交反应难以被观察到，所以要利用PCR技术扩增DNA分子。加入序列已知的特异性探针后，若样品中存在与探针互补的核苷酸序列，则可与探针形成杂交分子，经检测信号分析表现为阳性反应。第（2）小题考查基因工程疫苗制备原理：获取新冠病毒的抗原基因（目的基因），插入敲除复制基因的腺病毒（载体）基因组，并将改造后的腺病毒（重组载体）接种到人体内；新冠病毒的抗原基因表达产生抗原分子，激发人体针对新冠病毒抗原的免疫反应。将腺病毒复制基因敲除的目的是使病毒失

去复制能力，防止腺病毒大量增殖而危害人体健康。第（3）小题，单克隆抗体制备的基本原理是：取特异抗原免疫的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合，经选择培养、细胞克隆和抗体检验等技术筛选出既能无限增殖，又能产生特定抗体的杂交瘤细胞，再经扩大培养用于单克隆抗体生产。与植物组织培养相比，杂交瘤细胞扩大培养需要加入胰岛素、动物血清等特殊成分。

知识点 8　生物技术的安全性与伦理问题

1. D

解析：试管动物、转基因食品和治疗性克隆等生物技术在造福人类社会的同时也可能会带来安全与伦理问题，而生物武器的发展和生产是被全面禁止的，**D 选项正确**。

2. B

解析：转基因抗虫棉与常规棉混合种植，可改变自然条件对害虫的选择作用，可避免害虫种群抗性基因频率迅速提高，进而保持转基因抗虫棉的抗虫效果，A、C、D 选项不符合题意。大面积种植转基因抗虫棉，并施用杀虫剂，可使害虫种群抗性基因频率提高，导致转基因抗虫棉的抗虫效果减弱，B 选项符合题意。

3. D

解析：试管婴儿技术可为某些不孕不育的夫妇提供生育服务。在我国，可以在《人类辅助生殖技术管理办法》《人类辅助生殖技术规范》和《人类辅助生殖技术和人类精子库伦理原则》的规范下开展人类辅助生殖，不应全面禁止，**A 选项错误**。治疗性克隆是利用克隆技术产生特定的细胞、组织和器官，并利用这些细胞、组织和器官来修复或替代患者的细胞、组织和器官，从而达到治疗疾病的目的。治疗性克隆不会像生殖性克隆那样产生严重的道德、伦理、社会和法律等问题，但必须在国家的监控和审查下才能被允许，**B 选项错误**。生殖性克隆是指通过克隆技术产生独立生存的新个体的技术，存在诸多的伦理道德方面的风险，我国不赞成、不允许、不支持、不接受任何生殖性克隆人实验，故 C 选项说法错误，**D 选项正确**。

4. （1）显微注射　（2）监测灵敏度更高　（3）②　D　（4）激活 ERE 诱导 Gal4 表达，Gal4 结合 UAS 诱导 dg 表达，生殖细胞凋亡　（5）避免转基因斑马鱼逃逸带来生物安全问题

解析：（1）将目的基因导入动物细胞最有效的方法是显微注射法，所以将表达载体导入斑马鱼受精卵的最佳方式是显微注射。（2）由题图分析可知，方案 1 E 物质—受体复合物激活 ERE，使 *GFP* 基因表达，方案 2 E 物质—受体复合物先激活 ERE 获得 Gal4 蛋白，然后 Gal4 蛋白激活 UAS 启动子，使 *GFP* 基因表达，方案 2 GFP 蛋白表达量大，更灵敏。（3）MO 和另一亲本（X）杂交获得 SM，MO 是方案 2 获得，所以亲本 X 启动子选择 UAS。要获得 SM 不育个体，MO 是可育的，所以 X 必须有仅导致生殖细胞凋亡的基因（*dg*）。（4）成体 SM 自身产生雌激素，与受体结合后形成复合物，激活 ERE 诱导 *Gal4* 基因表达，Gal4 蛋白与 UAS 启动子结合诱导 *dg* 表达，使生殖细胞凋亡。（5）监测鱼属于转基因生物，目前安全性不确定，为了避免转基因斑马鱼逃逸带来生物安全问题，需要 SM 不育。