

专题 14 生物技术与工程

一、单选题

(2021 年山东卷) 1. 粗提取 DNA 时, 向鸡血细胞液中加入一定量的蒸馏水并搅拌, 过滤后所得滤液进行下列处理后再进行过滤, 在得到的滤液中加入特定试剂后容易提取出 DNA 相对含量较高的白色丝状物的处理方式是 ()

- A. 加入适量的木瓜蛋白酶
- B. 37~40℃的水浴箱中保温 10~15 分钟
- C. 加入与滤液体积相等的、体积分数为 95%的冷却的酒精
- D. 加入 NaCl 调节浓度至 2mol/L→过滤→调节滤液中 NaCl 浓度至 0.14mol/L

【答案】A

【解析】

【分析】

DNA 粗提取和鉴定的原理: (1) DNA 的溶解性: DNA 和蛋白质等其他成分在不同浓度 NaCl 溶液中溶解度不同; DNA 不溶于酒精溶液, 但细胞中的某些蛋白质溶于酒精; DNA 对酶、高温和洗涤剂的耐受性。(2) DNA 的鉴定: 在沸水浴的条件下, DNA 遇二苯胺会被染成蓝色。

【详解】

A、木瓜蛋白酶可以水解 DNA 中的蛋白质类杂质, 由于酶具有专一性, 不能水解 DNA, 过滤后在得到的滤液中加入特定试剂后容易提取出 DNA 相对含量较高的白色丝状物, A 正确;

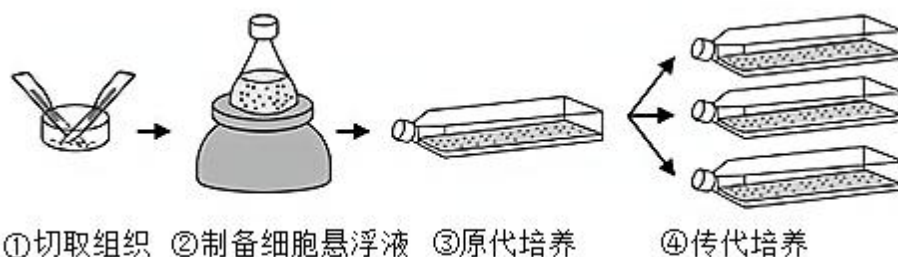
B、37~40℃的水浴箱中保温 10~15 分钟不能去除滤液中的杂质, 应该放在 60~75℃的水浴箱中保温 10~15 分钟, 使蛋白质变性析出, B 错误;

C、向鸡血细胞液中加入一定量的蒸馏水并搅拌, 过滤后在得到的滤液中加入与滤液体积相等的、体积分数为 95%的冷却的酒精, 此时 DNA 析出, 不会进入滤液中, C 错误;

D、加入 NaCl 调节浓度至 2mol/L→过滤→调节滤液中 NaCl 浓度至 0.14mol/L, DNA 在 0.14mol/L 的 NaCl 溶液中溶解度小, DNA 析出, 不会进入滤液中, D 错误。

故选 A。

(2021 年 1 月浙江卷) 2. 下图为动物成纤维细胞的培养过程示意图。下列叙述正确的是 ()



- A. 步骤①的操作不需要在无菌环境中进行
 B. 步骤②中用盐酸溶解细胞间物质使细胞分离
 C. 步骤③到④的分瓶操作前常用胰蛋白酶处理
 D. 步骤④培养过程中不会发生细胞转化

【答案】C

【解析】

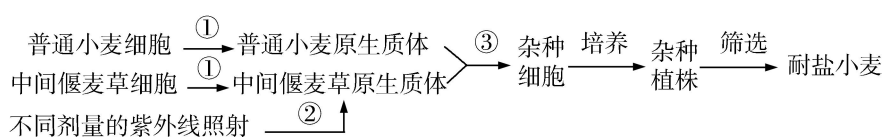
【分析】

动物细胞培养过程：取动物组织块→剪碎组织→用胰蛋白酶处理分散成单个细胞→制成细胞悬液→转入培养液中（原代培养）→放入二氧化碳培养箱培养→贴满瓶壁的细胞用酶分散为单个细胞，制成细胞悬液→转入培养液（传代培养）→放入二氧化碳培养箱培养。

【详解】

- A、动物细胞培养过程需要无菌操作，故步骤①的操作需要在无菌环境中进行，A 错误；
 B、动物细胞培养过程需要用胰蛋白酶或胶原蛋白酶处理动物组织，分散成单个细胞，制成细胞悬液，B 错误；
 C、传代培养时需要用胰蛋白酶处理贴壁生长的细胞，使之分散成单个细胞，再分瓶培养，C 正确；
 D、步骤④为传代培养过程，该过程中部分细胞可能发生细胞转化，核型改变，D 错误。

3. （2020 年山东省高考生物试卷（新高考）• 13）两种远缘植物的细胞融合后会导致一方的染色体被排出。若其中一个细胞的染色体在融合前由于某种原因断裂，形成的染色体片段在细胞融合后可能不会被全部排出，未排出的染色体片段可以整合到另一个细胞的染色体上而留存在杂种细胞中。依据该原理，将普通小麦与耐盐性强的中间偃麦草进行体细胞杂交获得了耐盐小麦新品种，过程如下图所示。下列说法错误的是（ ）



- A. 过程①需使用纤维素酶和果胶酶处理细胞

- B. 过程②的目的是使中间偃麦草的染色体断裂
- C. 过程③中常用灭活的病毒诱导原生质体融合
- D. 耐盐小麦的染色体上整合了中间偃麦草的染色体片段

【答案】C

【解析】

【分析】

从图中看出①是去掉植物细胞壁，②是用紫外线诱导染色体变异，③融合形成杂种细胞。

【详解】

A、过程1是获得植物细胞的原生质体，需要用纤维素酶和果胶酶将细胞壁分解，A正确；

B、根据题干信息“将其中一个细胞的染色体在融合前断裂，形成的染色体片段在细胞融合后可能不会被全部排出，未排出的染色体片段可以整合到另一个细胞的染色体上而留存在杂种细胞中，将普通小麦与耐盐性强的中间偃麦草进行体细胞杂交获得了耐盐小麦新品种，”故过程②通过紫外线照射是使中间偃麦草的染色体断裂，B正确；

C、灭活的病毒诱导是动物细胞融合特有的方法，诱导植物原生质体融合常用物理法、化学法，C错误；

D、实验最终将不抗盐的普通小麦和抗盐的偃麦草整合形成耐盐小麦，说明耐盐小麦染色体上整合了中间偃麦草的染色体片段，D正确。

故选C。

【点睛】

本题的难点是对过程②的分析，考生需要结合题干中的信息作答。

4. (2020年山东省高考生物试卷(新高考)·14) 经遗传改造的小鼠胚胎干细胞注入囊胚，通过胚胎工程的相关技术可以获得具有不同遗传特性的实验小鼠。下列说法错误的是()

- A. 用促性腺激素处理雌鼠可以获得更多的卵子
- B. 体外受精前要对小鼠的精子进行获能处理
- C. 胚胎移植前要检查胚胎质量并在囊胚或原肠胚阶段移植
- D. 遗传改造的小鼠胚胎干细胞可以通过转基因等技术获得

【答案】C

【解析】

【分析】

1、胚胎移植的基本程序主要包括：

①对供、受体的选择和处理。选择遗传特性和生产性能优秀的供体，有健康的体质和正常繁殖能力的受体，

供体和受体是同一物种。并用激素进行同期发情处理，用促性腺激素对供体母牛做超数排卵处理。

②配种或人工授精。

③对胚胎的收集、检查、培养或保存。配种或输精后第 7 天，用特制的冲卵装置，把供体母牛子宫内的胚胎冲洗出来（也叫冲卵）。对胚胎进行质量检查，此时的胚胎应发育到桑椹或胚囊胚阶段。直接向受体移植或放入 -196°C 的液氮中保存。

④对胚胎进行移植。

⑤移植后的检查。对受体母牛进行是否妊娠的检查。

2、体外受精主要包括：卵母细胞的采集和培养、精子的采集和获能、受精。

【详解】

A、促性腺激素可以使雌鼠超数排卵，获得更多的卵子，A 正确；

B、精子只有获能后才能完成受精，故体外受精前要对小鼠的精子进行获能处理，B 正确；

C、胚胎移植通常选择囊胚期之前的阶段，如桑椹胚或囊胚阶段，C 错误；

D、转基因技术可以定向改造小鼠的基因，所以遗传改造的小鼠胚胎干细胞可以通过转基因等技术获得，D 正确。

故选 C。

【点睛】

本题考查胚胎工程的基本知识，考生需要识记基本操作，D 项中需要结合基因工程的目的进行解答。

5.（2020 年天津高考生物试卷·1）在克隆哺乳动物过程中，通常作为核移植受体细胞的是去核的（ ）

A. 卵原细胞

B. 初级卵母细胞

C. 次级卵母细胞

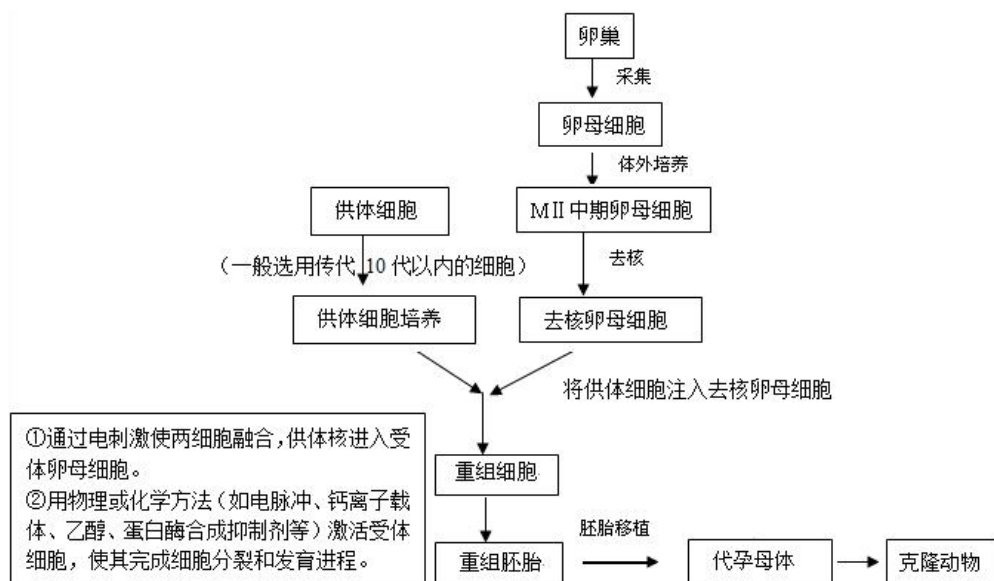
D. 卵细胞

【答案】C

【解析】

【分析】

体细胞核移植过程：



【详解】

在克隆哺乳动物过程中，通常选择减数第二次分裂中期的去核卵母细胞作为受体细胞，即次级卵母细胞。
故选 C。

6. (2020 年浙江省高考生物试卷 (7 月选考) • 15) 下列关于病毒的叙述，错误的是 ()

- A. 有的病毒经灭活处理后，可用于细胞工程中介导动物细胞的融合
- B. 适当增加机体内参与免疫的细胞数量与活性，可提高对新型冠状病毒的抵御能力
- C. 在某人的分泌物中检测到新型冠状病毒，推测该病毒的增殖不依赖于宿主细胞
- D. 用高温高压处理病毒使其失去感染能力，原因之一是病毒的蛋白质发生了热变性

【答案】C

【解析】

【分析】

诱导细胞融合的方法有三种：生物方法（病毒）、化学方法（聚乙二醇 PEG）、物理方法（离心、震动、电刺激）。某些病毒如：仙台病毒、副流感病毒和新城鸡瘟病毒的被膜中有融合蛋白，可介导病毒同宿主细胞融合，也可介导细胞与细胞的融合，因此可以用紫外线灭活的此类病毒诱导细胞融合。

【详解】

- A、有的病毒经灭活处理后，可用于细胞工程中介导动物细胞的融合，如灭活的病毒， A 正确；
- B、适当增加机体内参与免疫的细胞数量与活性，可以参与免疫调节中的体液和细胞免疫，尽可能杀死更多的病毒，可提高对新型冠状病毒的抵御能力， B 正确；
- C、在某人的分泌物中检测到新型冠状病毒，是因为病毒侵入细胞后大量繁殖，病毒从细胞中释放出来，不能说明该病毒的增殖不依赖于宿主细胞， C 错误；

D、用高温高压处理病毒使其失去感染能力，原因之一是病毒的蛋白质在高温高压下，空间结构发生变化，肽链松散，发生了变性，D 正确。

故选 C。

7. (2020 年浙江省高考生物试卷(7 月选考) • 24) 下列关于基因工程的叙述，正确的是 ()

- A. 若受体大肠杆菌含有构建重组质粒时用到的限制性核酸内切酶，则一定有利于该重组质粒进入受体并保持结构稳定
- B. 抗除草剂基因转入某抗盐植物获得 2 个稳定遗传转基因品系，抗性鉴定为抗除草剂抗盐和抗除草剂不抗盐。表明一定是抗盐性的改变与抗除草剂基因的转入无关
- C. 抗除草剂基因转入某植物获得转基因植株，其 DNA 检测均含目的基因，抗性鉴定为抗除草剂和不抗除草剂。表明一定是前者表达了抗性蛋白而后者只表达抗性基因 RNA
- D. 已知不同分子量 DNA 可分开成不同条带，相同分子量的为一条带。用某种限制性核酸内切酶完全酶切环状质粒后，出现 3 条带。表明该质粒上一定至少有 3 个被该酶切开的位置

【答案】D

【解析】

【分析】

基因工程中通常要有多种工具酶、目的基因、载体和宿主细胞等基本要素，并按一定的程序进行操作，包括目的基因的获得、重组 DNA 的形成、重组 DNA 导入受体细胞、筛选含有目的基因的受体细胞和目的基因的表达等几个方面。

【详解】

- A、若受体大肠杆菌含有构建重组质粒时用到的限制性核酸内切酶，则该酶会对进入受体的重组质粒进行切割，不利于其保持结构稳定，A 错误；
- B、抗除草剂基因转入抗盐植物，获得了抗除草剂抗盐品系和抗除草剂不抗盐品系，不抗盐品系的产生可能是转入的抗除草剂基因插入到抗盐基因内，影响其表达造成，B 错误；
- C、转基因植物中均含抗除草剂基因，但存在抗除草剂和不抗除草剂两种植株，前者表达了抗性蛋白，后者可能抗除草剂基因未转录出 mRNA，或转录出的 mRNA 未能翻译成蛋白质，C 错误；
- D、某种限制性内切酶完全酶切环状质粒后，出现 3 条带，即 3 种不同分子量 DNA，因此环状质粒上至少有 3 个酶切位点，D 正确。

故选 D。

8. (2019北京卷·4) 甲、乙是严重危害某二倍体观赏植物的病害。研究者先分别获得抗甲、乙的转基因植株。再将二者杂交后得到F₁，结合单倍体育种技术，培育出同时抗甲、乙的植物新品种，以下对相关操作及

结果的叙述，错误的是

- A. 将含有目的基因和标记基因的载体导入受体细胞
- B. 通过接种病原体对转基因的植株进行抗病性鉴定
- C. 调整培养基中植物激素比例获得F₁花粉再生植株
- D. 经花粉离体培养获得的若干再生植株均为二倍体

【答案】D

【解析】要获得转基因的抗甲或抗乙植株，需要构建基因表达载体（含目的基因、标记基因、启动子、终止子、复制原点），再把基因表达载体导入受体细胞中，A 正确；对转基因植株进行检测时，可以通过抗病接种实验进行个体水平的检测，B 正确；对 F₁ 的花粉进行组织培养时，需要经过脱分化和再分化过程，其中生长素/细胞分裂素比例高时利于根的分化，比例低时利于芽的分化，C 正确；经花粉离体培养获得的植株是单倍体，D 错误。因此，本题答案选 D。

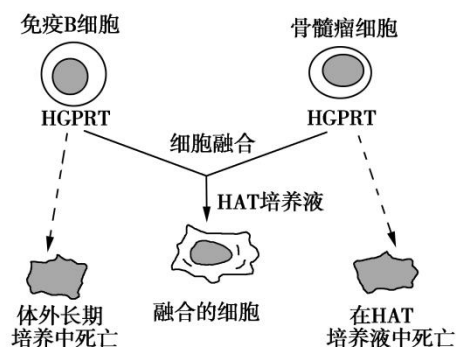
9. （2019江苏卷·16）下列生物技术操作对遗传物质的改造，不会遗传给子代的是

- A. 将胰岛素基因表达质粒转入大肠杆菌，筛选获得基因工程菌
- B. 将花青素代谢基因导入植物体细胞，经组培获得花色变异植株
- C. 将肠乳糖酶基因导入奶牛受精卵，培育出产低乳糖牛乳的奶牛
- D. 将腺苷酸脱氨酶基因转入淋巴细胞后回输患者，进行基因治疗

【答案】D

【解析】将含胰岛素基因表达载体的重组质粒转入大肠杆菌获得的转基因菌，可以通过二分裂将胰岛素基因传给后代，A 不符合题意；将花青素代谢基因导入植物体细胞，再经植物组织培养获得的植株所有细胞均含有花青素代谢基因，花青素代谢基因会随该植物传给后代，B 不符合题意；将肠乳糖酶基因导入奶牛受精卵，培育出产低乳糖牛乳的奶牛所有细胞均含有肠乳糖酶基因，可以遗传给后代，C 不符合题意；该患者进行基因治疗时，只有淋巴细胞含有该腺苷酸脱氨酶基因，性原细胞不含该基因，故不能遗传给后代，D 符合题意。

10. （2019江苏卷·23）下图为杂交瘤细胞制备示意图。骨髓瘤细胞由于缺乏次黄嘌呤磷酸核糖转移酶（HGPRT），在HAT筛选培养液中不能正常合成DNA，无法生长。下列叙述正确的是

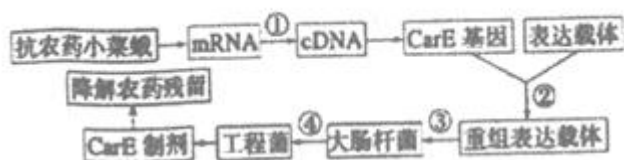


- A. 可用灭活的仙台病毒诱导细胞融合
- B. 两两融合的细胞都能在HAT培养液中生长
- C. 杂交瘤细胞需进一步筛选才能用于生产
- D. 细胞膜的流动性是细胞融合的基础

【答案】ACD

【解析】诱导动物细胞融合的方法有电激、聚乙二醇、灭活的病毒（如灭活的仙台病毒）等，A 正确；两两融合的细胞包括免疫 B 细胞与免疫 B 细胞融合的具有同种核的细胞、骨髓瘤细胞与骨髓瘤细胞融合的具有同种核的细胞、免疫 B 细胞与骨髓瘤细胞融合的杂交瘤细胞，骨髓瘤细胞虽然能无限增殖，但缺乏次黄嘌呤磷酸核糖转移酶，免疫 B 细胞虽然有次黄嘌呤磷酸核糖转移酶，但不具有无限增殖的本领，所以在 HAT 筛选培养液中，两两融合的具有同种核的细胞都无法生长，只有杂交瘤细胞才能生长，B 错误；因每个免疫 B 细胞只分泌一种特异性抗体，因此在 HAT 筛选培养液中筛选出来的众多的杂交瘤细胞所分泌的抗体，不一定是人类所需要的，还需要进一步把能分泌人类所需要抗体的杂交瘤细胞筛选出来，C 正确；动物细胞融合是以细胞膜的流动性为基础的，D 正确。

11.（2019 天津市七校联考）利用基因工程技术生产羧酸酯酶（CarE）制剂，用于降解某种农药的残留，基本流程如图。下列叙述正确的是

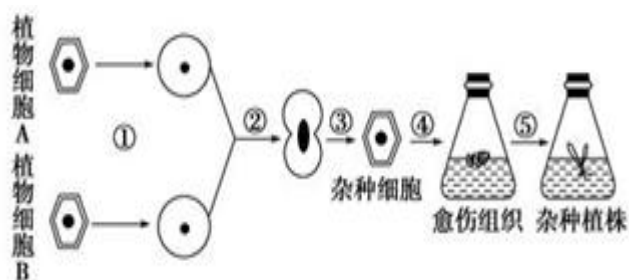


- A. 过程①的反应体系中需要加入逆转录酶和核糖核苷酸
- B. 过程②需使用限制酶和 DNA 聚合酶，是基因工程的核心步骤
- C. 过程③需要使用 NaCl 溶液制备感受态的大肠杆菌细胞
- D. 过程可利用 DNA 分子杂交技术鉴定 CarE 基因是否成功导入受体细胞

【答案】D

【解析】过程①表示通过反转录法合成目的基因，该过程需要逆转录酶和脱氧核糖核苷酸，A 错误；过程②需使用限制酶和 DNA 连接酶构建基因表达载体，是基因工程的核心步骤，B 错误；过程③常用 Ca^{2+} 处理大肠杆菌使其成为易于吸收 DNA 的感受态细胞，C 错误；过程④可利用 DNA 分子杂交技术鉴定 CarE 基因是否成功导入了受体细胞，D 正确。

12. (2019 上海二模) 下图为植物体细胞杂交过程示意图。在利用植物细胞 A 和 B 培育成为杂种植株过程中，运用的技术有



- A. 干细胞技术和细胞融合技术
- B. 细胞融合技术和植物组织培养技术
- C. 细胞融合技术和细胞核移植技术
- D. 干细胞技术和植物组织培养技术

【答案】B

【解析】该图为植物体细胞杂交过程示意图，过程①②③是植物细胞杂交过程，运用了细胞融合技术，体现了细胞膜具有一定的流动性；④⑤是植物组织培养过程，培育成杂种植株，体现了植物细胞的全能性，故选 B。

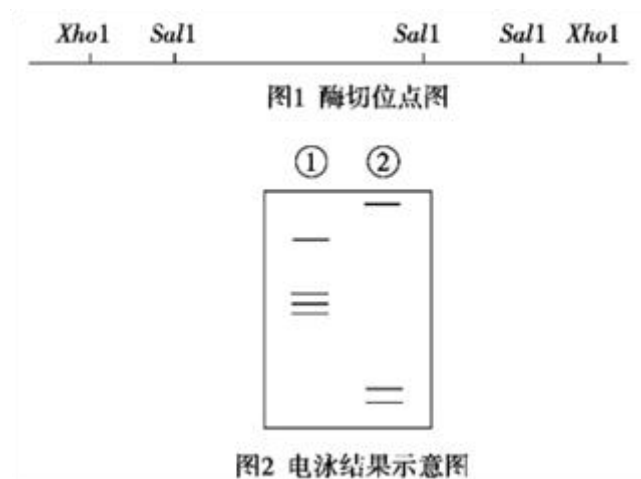
13. (2018 江苏卷，10) 下列关于采用胚胎工程技术实现某良种肉用牛快速繁殖的叙述，正确的是 ()

- A. 采取激素注射等方法对良种母牛作超数排卵处理
- B. 体外培养发育到原肠胚期的胚胎即可进行移植
- C. 使用免疫抑制剂以避免代孕牛对植入胚胎的排斥反应
- D. 利用胚胎分割技术，同卵多胎较同卵双胞胎成功率更高

【答案】A

【解析】用促性腺激素对良种奶牛进行注射处理，可促使其超数排卵，A 正确；进行移植的胚胎是桑椹胚或囊胚，B 错误；受体对移植的胚胎几乎不发生免疫排斥反应，因此无需使用免疫抑制剂，C 错误；利用胚胎分割技术，同卵双胎较同卵多胎成功率更高，D 错误。

14. (2018 北京卷，5) 用 XhoI 和 SalI 两种限制性核酸内切酶分别处理同一 DNA 片段，酶切位点及酶切产物分离结果如图。以下叙述不正确的是 ()

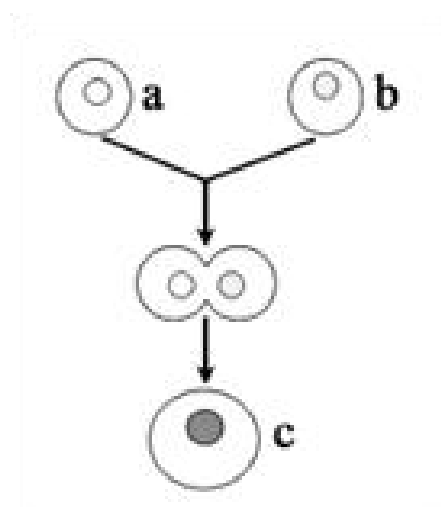


- A. 如图中两种酶识别的核苷酸序列不同
- B. 如图中酶切产物可用于构建重组 DNA
- C. 泳道①中是用 SalI 处理得到的酶切产物
- D. 图中被酶切的 DNA 片段是单链 DNA

【答案】D

【解析】限制酶识别特定的脱氧核苷酸序列，不同的限制酶能识别不同的核苷酸序列，由电泳图可知 XhoI 和 SalI 两种酶分别切割时，识别的序列不同，A 正确；同种限制酶切割出的 DNA 片段，具有相同的粘性末端，再用 DNA 连接酶进行连接，可以构成重组 DNA，B 正确；SalI 将 DNA 片段切成 4 段，XhoI 将 DNA 片段切成 3 段，根据电泳结果可知泳道①为 SalI，泳道②为 XhoI，C 正确；限制酶切割双链 DNA，酶切后的 DNA 片段仍然是双链 DNA，D 错误。

15. (2018 江苏卷, 22) 如图为细胞融合的示意图, 下列叙述正确的是 ()



- A. 若 a 细胞和 b 细胞是植物细胞, 需先去分化再诱导融合
- B. a 细胞和 b 细胞之间的融合需要促融处理后才能实现

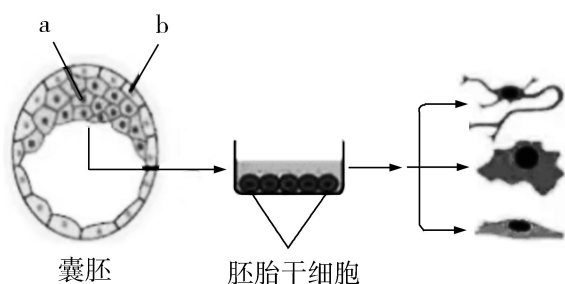
- C. c 细胞的形成与 a、b 细胞膜的流动性都有关
- D. c 细胞将同时表达 a 细胞和 b 细胞中的所有基因

【答案】BC

【解析】若 a 细胞和 b 细胞是植物细胞，应该先用酶解法去掉它们的细胞壁再诱导融合，A 错误；无论是动物细胞还是植物细胞，两个细胞的融合都需要促融处理后才能实现，B 正确；两个细胞融合成一个细胞，利用了细胞膜的流动性，C 正确；c 细胞同时具备了 a 细胞和 b 细胞中的所有基因，但是基因是选择性表达的，因此 c 细胞中基因不一定都能够表达，D 错误。

二、多选题

1. (2020 年江苏省高考生物试卷 • 23) 小鼠胚胎干细胞经定向诱导可获得多种功能细胞、制备流程如图所示。下列叙述错误的是 ()



- A. 为获得更多的囊胚，采用激素注射促进雄鼠产生更多的精子
- B. 细胞 a 和细胞 b 内含有的核基因不同，所以全能性高低不同
- C. 用胰蛋白酶将细胞 a 的膜白消化后可获得分散的胚胎干细胞
- D. 胚胎干细胞和诱导出的各种细胞都需在 CO_2 培养箱中进行培养

【答案】ABC

【解析】

【分析】

- 1、胚胎干细胞简称 ES 或 EK 细胞，来源于早期胚胎或原始性腺（即囊胚期的内细胞团）。
- 2、ES 细胞在饲养层细胞上或在添加抑制因子的培养液中，能够维持不分化的状态。在培养液中加入分化诱导因子，如牛黄酸、丁酰环腺苷酸等化学物质时，就可以诱导 ES 细胞向不同类型的组织细胞分化，这为揭示细胞分化和细胞凋亡机理提供了有效的手段。

【详解】

- A、为了获得更多的囊胚，可以采用激素促进成熟雌性个体超数排卵，然后将卵细胞从母体内取出，在试管内与人工采集的精子进行体外受精，培育成胚胎，A 错误；
- B、细胞 a 和细胞 b 是由同一个受精卵经过有丝分裂形成的，故核基因相同，B 错误；

C、运用细胞培养技术可以从哺乳动物的早期胚胎中获得胚胎干细胞，首先必须用胰蛋白酶处理内细胞团，分解细胞间的胶原蛋白等，使之分散成单个细胞，C 错误；

D、动物细胞培养时需要在 5% CO₂ 的培养箱中进行培养，以维持培养液的 pH，D 正确。

故选 ABC。

三、非选择题

1.（2022·全国甲卷·高考真题）某牧场引进一只产肉性能优异的良好公羊，为了在短时间内获得具有该公羊优良性状的大量后代，该牧场利用胚胎工程技术进行了相关操作。回答下列问题，

(1)为了实现体外受精需要采集良种公羊的精液，精液保存的方法是_____。在体外受精前要对精子进行获能处理，其原因是_____；精子体外获能可采用化学诱导法，诱导精子获能的药物是_____（答出 1 点即可）。利用该公羊的精子进行体外受精需要发育到一定时期的卵母细胞，因为卵母细胞达到_____时才具备与精子受精的能力。

(2)体外受精获得的受精卵发育成囊胚需要在特定的培养液中进行，该培养液的成分除无机盐、激素、血清外，还含的营养成分有_____（答出 3 点即可）等。将培养好的良种囊胚保存备用。

(3)请以保存的囊胚和相应数量的非繁殖期受体母羊为材料进行操作，以获得具有该公羊优良性状的后代。主要的操作步骤是_____。

【答案】(1) 冷冻保存 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获得受精能力 肝素或钙离子载体 A23187 MⅡ中期

(2)维生素、氨基酸、核苷酸

(3)对受体母羊进行发情处理，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

【解析】

【分析】

试管动物技术是指通过人工操作使卵子和精子在体外条件下成熟和受精，并通过培养发育为早期胚胎后，再经移植后产生后代的技术。

(1)

精液可以冷冻保存，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获得受精能力，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中期）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。

2. (2022·全国乙卷·高考真题) 新冠疫情出现后，病毒核酸检测和疫苗接种在疫情防控中发挥了重要作用。回答下列问题。

(1) 新冠病毒是一种 RNA 病毒，检测新冠病毒 RNA (核酸检测) 可以采取 RT-PCR 法。这种方法的基本原理是先以病毒 RNA 为模板合成 cDNA，这一过程需要的酶是_____，再通过 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) 为了确保新冠病毒核酸检测的准确性，在设计 PCR 引物时必须依据新冠病毒 RNA 中的_____来进行。PCR 过程每次循环分为 3 步，其中温度最低的一步是_____。

(3) 某人同时进行了新冠病毒核酸检测和抗体检测 (检测体内是否有新冠病毒抗体)，若核酸检测结果为阴性而抗体检测结果为阳性，说明_____ (答出 1 种情况即可)；若核酸检测和抗体检测结果均为阳性，说明_____。

(4) 常见的病毒疫苗有灭活疫苗、蛋白疫苗和重组疫苗等。已知某种病毒的特异性蛋白 S (具有抗原性) 的编码序列 (目的基因)。为了制备蛋白疫苗，可以通过基因工程技术获得大量蛋白 S。基因工程的基本操作流程是_____。

【答案】(1) 逆转录酶##反转录酶

(2) 特异性核苷酸序列 退火##复性

(3) 曾感染新冠病毒，已康复 已感染新冠病毒，是患者

(4) 获取 S 蛋白基因→构建 S 蛋白基因与运载体的表达载体→导入受体细胞→目的基因的检测与鉴定 (检测受体能否产生 S 蛋白)

【解析】

【分析】

PCR 全称为聚合酶链式反应，是一项在生物体外复制特定 DNA 的核酸合成技术；过程：①高温变性：DNA 解旋过程 (PCR 扩增中双链 DNA 解开不需要解旋酶，高温条件下氢键可自动解开)；低温复性：引物结合到互补链 DNA 上；③中温延伸：合成子链。

(1)

分析题意可知，新冠病毒的遗传物质是 RNA，而 RT-PCR 法需要先得到 cDNA，由 RNA 到 DNA 的过程属于逆转录过程，逆转录过程需要的酶是逆转录酶 (反转录酶)。

(2)

PCR 过程需要加入引物，设计引物时应有一段已知目的基因的核苷酸序列，在该过程中为了确保新冠病毒核酸检测的准确性，在设计 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，分别为变性（90-95℃）、复性（55-60℃）、延伸（70-75℃），故其中温度最低的一步是复性。

(3)

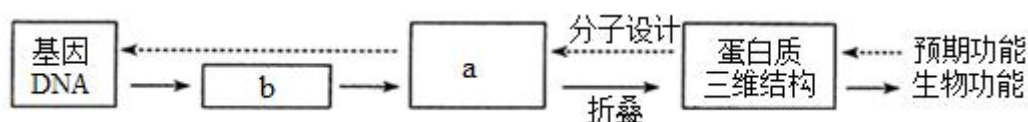
某人同时进行了新冠病毒核酸检测和抗体检测，若核酸检测结果为阴性而抗体检测结果为阳性，说明该个体曾经感染过新冠病毒，机体发生特异性免疫反应，产生抗体，将病毒消灭，则核酸检测为阴性，但由于抗体有一定的时效性，能在体内存在一段时间，故抗体检测为阳性；若核酸检测和抗体检测结果均为阳性，说明该个体体内仍含有病毒的核酸，机体仍进行特异性免疫过程，能产生抗体，则说明该人已经感染新冠病毒，为患者。

(4)

基因工程的基本操作流程是：获取目的基因→基因表达载体的构建（基因工程的核心）→将目的基因导入受体细胞→目的基因的检测与鉴定，结合题意，本基因工程的目的是获得大量的 S 蛋白，故具体流程为：获取 S 蛋白基因→构建 S 蛋白基因与运载体的表达载体→导入受体细胞→目的基因的检测与鉴定（检测受体能否产生 S 蛋白）。

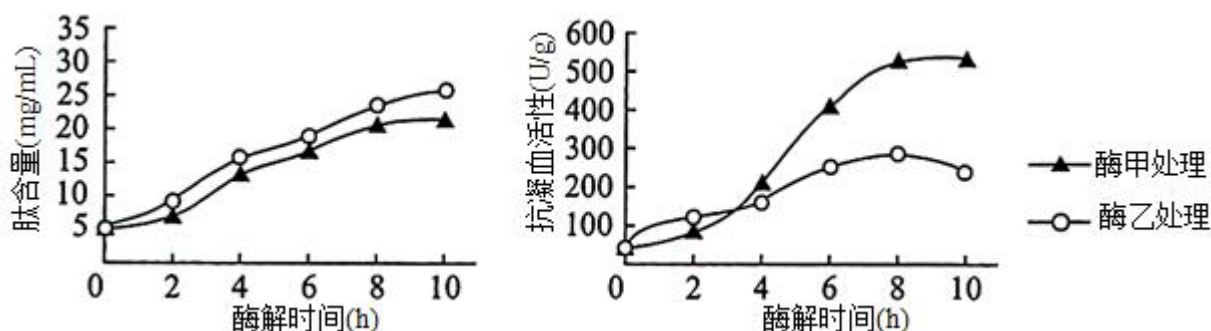
3.（2022·湖南·高考真题）水蛭是我国的传统中药材，主要药理成分水蛭素为水蛭蛋白中重要成分之一，具有良好的抗凝血作用。拟通过蛋白质工程改造水蛭素结构，提高其抗凝血活性。回答下列问题：

(1)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_____。



(2)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_____。

(3)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)若要比较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_____。

【答案】(1) 氨基酸序列多肽链 mRNA 密码子的简并性

(2) 从基因文库中获取目的基因 通过 DNA 合成仪用化学方法直接人工合成 DNA 双链复制

(3) 种类 提取的水蛭蛋白的酶解时间和处理的酶的种类不同，导致水蛭蛋白空间结构有不同程度破坏

(4)取 3 支试管，分别加入等量的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；用酒精消毒，用注射器取同一种动物（如家兔）血液，立即将等量的血液加入 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

【解析】

【分析】

1、蛋白质工程的基本途径是：从预期的蛋白质功能出发→设计预期的蛋白质的结构→推测应有的氨基酸序列→找到相对应的脱氧核苷酸序列；

2、蛋白质工程是指以蛋白质分子的结构规律及其与生物功能的关系作为基础，通过基因修饰或基因合成，对现有蛋白质进行改造，或制造一种新的蛋白质，以满足人类的生产和生活的需求。也就是说，蛋白质工程是在基因工程的基础上，延伸出来的第二代基因工程，是包含多学科的综合科技工程领域。

(1)

据分析可知，物质 a 是氨基酸序列多肽链，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，即一种氨基酸可能有几个密码子。

(2)

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从基因文库中获取目的基因、通过 DNA 合成仪用化学方法直接人工合成和利用 PCR 技术扩增。PCR 技术遵循的基本原理是 DNA 双链复制。

(3)

将提取的水蛭蛋白经甲、乙两种蛋白酶水解后，据图可知，水解产物中的肽含量随着酶解时间的延长均上升，且差别不大；而水解产物中抗凝血活性有差异，经酶甲处理后，随着酶解时间的延长，抗凝血活性先

上升后相对稳定，经酶乙处理后，随着酶解时间的延长，抗凝血活性先上升后下降，且酶甲处理后的酶解产物的抗凝血活性最终高于经酶乙处理后的酶解产物的抗凝血活性，差异明显，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提取的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。

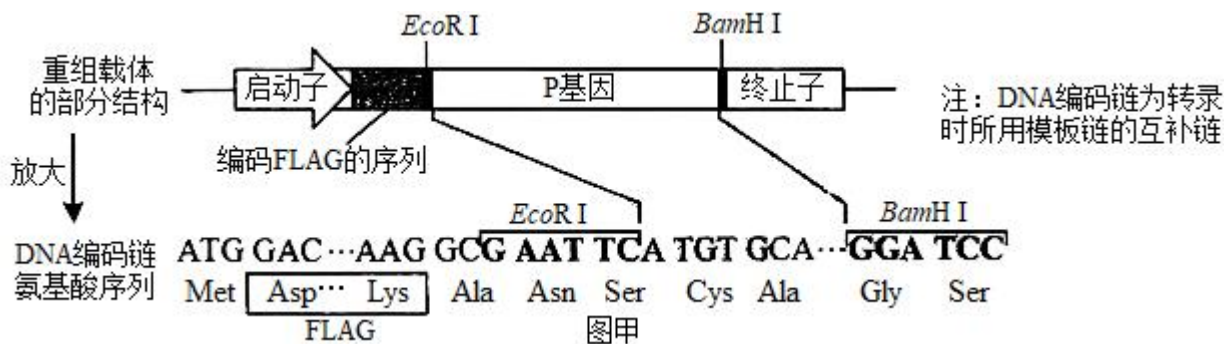
(4)

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，实验设计思路为：取 3 支试管，分别加入等量的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；用酒精消毒，用注射器取同一种动物（如家兔）血液，立即将等量的血液加入 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。

4.（2022·山东·高考真题）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-P Δ 。P Δ 是缺失特定氨基酸序列的 P，FLAG 是一种短肽，连接在 P 或 P Δ 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 P Δ 的功能。

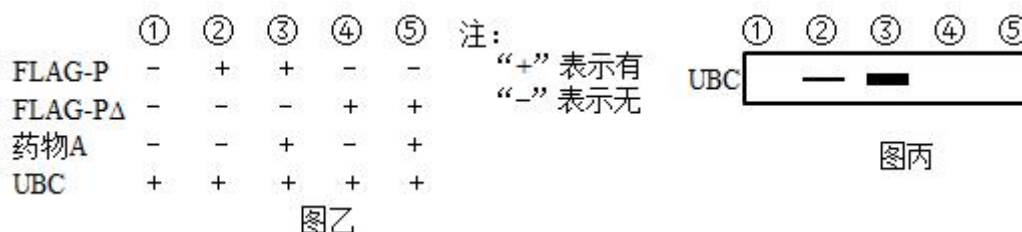
(1)为构建重组载体，需先设计引物，通过 PCR 特异性扩增 P 基因。用于扩增 P 基因的引物需满足的条件是_____、为使 PCR 产物能被限制酶切割，需在引物上添加相应的限制酶识别序列，该限制酶识别序列应添加在引物的_____（填“3'端”或“5'端”）。

(2)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_____。



(3)融合蛋白表达成功后，将 FLAG-P、FLAG-P Δ 、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-P Δ 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，P Δ 中缺失的特定序列的作用是_____。



(4)根据以上结果推测，药物 A 治疗该病的机理是_____。

【答案】(1) 两种引物分别与两条模板链 3'端的碱基序列互补配对 5'端

(2) 在转录出的 mRNA 中，限制酶识别序列对应的最后两个碱基与 P 基因对应的第一个碱基构成一个密码子，导致读码框改变，翻译出的氨基酸序列改变。

在 EcoR I 识别序列前后增加碱基，使其碱基数目加上 FLAG 的碱基数目为 3 的倍数

(3) 促进 UBC 与 FLAG-P 的结合 P Δ 中缺失的特定序列是与 UBC 结合的关键序列

(4)药物 A 促进 UBC 与 FLAG-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。

【解析】

【分析】

PCR 过程：①变性：当温度上升到 90℃以上时，双链 DNA 解旋为单链；②温度下降到 50℃左右时，两种引物通过碱基互补配对与两条单链 DNA 结合；③延伸：当温度上升到 72℃左右时，溶液中的 4 种脱氧核苷酸在耐高温的 DNA 聚合酶的作用下，根据碱基互补配对原则合成新的 DNA 链。

(1)

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苷酸，因此设计扩增 P 基因的引物，需要两种引物分别与两条模板链 3'端的碱基序列互补。DNA 聚合酶延伸时，是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)

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 P 基因翻译时出错。由图可看出，在转录出的 mRNA 中，限制酶识别序列对应的最后两个碱基与 P 基因对应的第一个碱基构成一个密码子，导致读码框改变，翻译出的氨基酸序列改变，可通过在 EcoR I 识别序列前后增加碱基，使其碱基数目加上 FLAG 的碱基数目为 3 的倍数，这样能保证 P 基因转录出的 mRNA 上的读码框不改变，能够正常翻译。

(3)

①组仅添加 UBC，处理后，用 UBC 抗体检测，不出现杂交带；②组添加 UBC 和 FLAG-P，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。由②④组

或③⑤组的差异在于②③组使用 FLAG-P，出现杂交带；④⑤组使用 FLAG-P Δ ，不出现杂交带，据此推测 P Δ 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 FLAG-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。

【点睛】

本题难点在于分析翻译出错的原因，需要结合翻译相关知识对图进行仔细分析方可得出结论。

5. (2022 年 6 月·浙江·高考真题) 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℃ 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：

(4) 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，其目的是一是抑制_____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。

(5) 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。

(6) 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。

【答案】(1) 无菌水 水浴 杀死不耐热微生物

(2) 分离 KI-I₂

(3) 人工诱变 原生质体融合

(4) 农杆菌 过低 敏感性

(5) 再生 细胞核 形态特征和数量

(6) 培养时间 受精卵

【解析】

【分析】

(一) 选择培养基是根据某种微生物的特殊营养要求或对其某化学、物理因素的抗性而设计的培养基使混合菌样中的劣势菌变成优势菌，从而提高该菌的筛选率。

(二) 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。转化过程：目的基因插入 Ti 质粒的 T-DNA 上农杆菌→导入植物细胞→目的基因整合到植物细胞染色体上→目的基因的遗传特性得以稳定维持和表达。

(1)

产生淀粉酶的枯草杆菌的最适温度为 50-75℃，要快速分离枯草杆菌，先将土样加入无菌水制成枯草杆菌悬液，再将含有悬液的三角瓶置于 80℃ 的水浴中保温一段时间，杀死不耐热的微生物。

(2)

将菌种的分离过程与菌种的产酶性能测定同时进行可以提高筛选效率。用稀释涂布平板法可以分离枯草杆菌，在培养基中添加淀粉作为唯一碳源，并且在培养基中添加 KI-I₂，能合成淀粉酶的枯草杆菌因为能利用淀粉而存活，同时淀粉由于被分解在菌落周围会出现透明圈，比较透明圈与菌落直径比值的大小，比值大的说明该菌株产酶性能较高。

(3)

要获得高产淀粉酶的枯草杆菌，可利用诱变育种，由于变异的不定向性，人工诱变后还需要再筛选才能获得高产淀粉酶的枯草杆菌。也可以利用转基因、原生质体融合等技术，从其他生物那里获得与高产淀粉酶有关的基因，进而获得相应的高产性状。

(4)

野生的农杆菌没有抗性基因，用于转化植物细胞的农杆菌一般在其 T-DNA 中插入一种抗生素抗性基因。抗生素的作用是抑制细菌生长，农杆菌属于细菌，在其侵染植物过程中，可以用另一种抗生素抑制农杆菌的生长，从而达到在后续实验中消除转化植物细胞中农杆菌的作用。具有 T-DNA 中抗性基因的细胞能在含有相应抗生素的培养基上存活。当培养基中抗生素浓度过低时，很多没有抗性的细胞也存活下来，因此出现假阳性，故在转基因前要对受体进行抗生素的敏感性检测。

(5)

转基因植株要经过植物组织培育，要提高培育转基因植株的成功率，应该选再生能力和遗传稳定性较强的受体，这种受体全能性较高，能保持生物性状。对培养的受体细胞遗传稳定性的早期检测，可通过观察

细胞核形态是否改变进行判断，也可以直接在光学显微镜下观察分裂期染色体的形态特征和数量，分析染色体组型是否改变。

(6)

植物转基因受体全能性表达程度高低除了与受体基因型、培养环境、继代次数有关外，还与培养时间长短和受体的取材有关，受精卵是没分化的细胞，分裂和分化能力都很强，故受体为受精卵时全能性表达能力最高。

6. (2022 年 1 月·浙江·高考真题) 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 390nm、420nm 和 505nm 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甲的红色素含量时，通常选用 505nm 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) 我国在新冠疫情方面取得了显著的成效，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。

(4) 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。

(5) 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_____。

(6) 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_____。

【答案】(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

(4) 逆转录 核酸探针

(5) 抗原 载体 使腺病毒失去复制能力

(6) 脾 动物血清

【解析】

【分析】

1、无菌操作包括灭菌和消毒两种方式。消毒的方法有巴氏消毒法、酒精消毒、煮沸消毒法；灭菌的方法有干热灭菌、灼烧灭菌和高压蒸汽灭菌。2、微生物接种：微生物接种的方法很多，最常用的是平板划线法和稀释涂布平板法，常用来统计样品活菌数目的方法是稀释涂布平板法。3、平板划线法：通过接种环在琼脂固体培养基表面连续划线的操作，将聚集的菌种逐步稀释分散到培养基表面。

(1)

防止污染，洗菌苔可加适量的无菌水，制成菌悬液并培养，解除休眠获得活化菌种。红曲霉菌丝体与 70%乙醇溶液混合，经浸提、离心，获得的上清液即为红曲色素提取液。为进一步提高红曲色素得率，可将红曲霉细胞进行破碎处理，使细胞内的红曲色素释放出来。

(2)

用光电比色法测定红曲色素提取液甲的红色素含量时，通常选用 505nm 波长测定的原因是其它色素对该波长光的吸收相对较少，干扰相对较小。由于提取红曲色素是用的 70%乙醇溶液，故测定时需用 70%乙醇溶液作空白对照。

(3)

生产上提取红曲色素后的残渣，经灭菌处理残渣后，作为饲料添加剂或有机肥，这属于废弃物的无害化和资源化处理。

(4)

RNA 做模板合成 DNA，利用逆转录酶；PCR 扩增，然后在扩增产物中加入特异的核酸探针，检测新冠病毒核酸。如果检测到特异的杂交分子则核酸检测为阳性。

(5)

腺病毒疫苗的制备技术要点是：将腺病毒的复制基因敲除；以新冠病毒的抗原基因为模板合成的 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载体。将腺病毒复制基因敲除的目的是使

腺病毒失去复制能力。

(6)

单克隆抗体的制备原理是：取免疫阳性小鼠的脾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，如胰岛素和动物血清。

【点睛】

本题考查微生物的分离与培养等相关知识，要求考生识记培养基的成分、无菌技术、微生物分离的过程，能正确理解图形和表格中隐含的知识和结论。

（2021 年全国甲卷）7. PCR 技术可用于临床的病原菌检测。为检测病人是否感染了某种病原菌，医生进行了相关操作：①分析 PCR 扩增结果；②从病人组织样本中提取 DNA；③利用 PCR 扩增 DNA 片段；④采集病人组织样本。回答下列问题：

- （1）若要得到正确的检测结果，正确的操作顺序应该是_____（用数字序号表示）。
- （2）操作③中使用的酶是_____。PCR 反应中的每次循环可分为变性、复性、_____三步，其中复性的结果是_____。
- （3）为了做出正确的诊断，PCR 反应所用的引物应该能与_____ 特异性结合。
- （4）PCR（多聚酶链式反应）技术是指_____。该技术目前被广泛地应用于疾病诊断等方面。

【答案】 ④②③① Taq 酶（热稳定 DNA 聚合酶） 延伸 引物通过碱基互补配对与单链 DNA 结合 病原菌的两条单链 DNA 一项在生物体外复制特定 DNA 片段的核酸合成技术

【解析】

【分析】

PCR 是一项在生物体外复制特定 DNA 片段的核酸合成技术。通过这一技术，可以在短时间内大量扩增目的基因。利用 PCR 技术扩增目的基因的前提，是要有一段已知目的基因的核苷酸序列，以便根据这一序列合成引物。

【详解】

- （1）PCR 技术可用于临床的病原菌检测，若要得到正确的检测结果，正确的操作顺序应该是④采集病人组织样本→②从病人组织样本中提取 DNA→③利用 PCR 扩增 DNA 片段→①分析 PCR 扩增结果。
- （2）在用 PCR 技术扩增 DNA 时，DNA 的复制过程与细胞内 DNA 的复制类似，操作③中使用的酶是 Taq 酶（热稳定 DNA 聚合酶），PCR 反应中的每次循环可分为变性、复性、延伸三步，其中复性的结果是引物通过碱基互补配对与单链 DNA 结合。
- （3）DNA 复制需要引物，为了做出正确的诊断，PCR 反应所用的引物应该能与病原菌的两条单链 DNA 特异

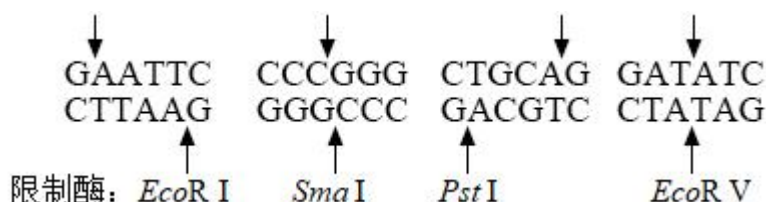
性结合。

（4）据分析可知，PCR（多聚酶链式反应）技术是指一项在生物体外复制特定 DNA 片段的核酸合成技术。该技术目前被广泛地应用于疾病诊断等方面。

【点睛】

本题考查 PCR 技术及应用，难度较小，解答本题的关键是明确 PCR 技术的原理，具体反应过程，以及在临床病原菌检测中的应用。

（2021 年全国乙卷）8. 用 DNA 重组技术可以赋予生物以新的遗传特性，创造出更符合人类需要的生物产品。在此过程中需要使用多种工具酶，其中 4 种限制性核酸内切酶的切割位点如图所示。



回答下列问题：

（1）常用的 DNA 连接酶有 *E. coli* DNA 连接酶和 T₄DNA 连接酶。上图中_____酶切割后的 DNA 片段可以用 *E. coli* DNA 连接酶连接。上图中_____酶切割后的 DNA 片段可以用 T₄DNA 连接酶连接。

（2）DNA 连接酶催化目的基因片段与质粒载体片段之间形成的化学键是_____。

（3）DNA 重组技术中所用的质粒载体具有一些特征，如质粒 DNA 分子上有复制原点，可以保证质粒在受体细胞中能_____；质粒 DNA 分子上有_____，便于外源 DNA 插入；质粒 DNA 分子上有标记基因（如某种抗生素抗性基因），利用抗生素可筛选出含质粒载体的宿主细胞，方法是_____。

（4）表达载体含有启动子，启动子是指_____。

【答案】 *EcoRI*、*PstI* *EcoRI*、*PstI*、*SmaI* 和 *EcoRV* 磷酸二酯键 自我复制 一至多个限制酶切位点 用含有该抗生素的培养基培养宿主细胞，能够存活的即为含有质粒载体的宿主细胞 位于基因首端的一段特殊 DNA 序列，是 RNA 聚合酶识别及结合的部位，能驱动转录过程

【解析】

【分析】

基因工程至少需要三种工具：限制性核酸内切酶（限制酶）、DNA 连接酶、运载体。

【详解】

（1）限制酶 *EcoRI* 和 *PstI* 切割形成的是黏性末端，限制酶 *SmaI* 和 *EcoRV* 切割形成的是平末端，*E. coli* DNA 连接酶来源于大肠杆菌，只能将双链 DNA 片段互补的黏性末端之间的磷酸二酯键连接起来，而 T₄DNA 连接

酶来源于 T4 噬菌体，可用于连接黏性末端和平末端，但连接效率较低。因此图中 EcoRI 和 PstI 切割后的 DNA 片段（黏性末端）可以用 E. coli DNA 连接酶连接，除了这两种限制酶切割的 DNA 片段，限制酶 SmaI 和 EcoRV 切割后的 DNA 片段（平末端）也可以用 T₄DNA 连接酶连接。

（2）DNA 连接酶将两个 DNA 片段连接形成磷酸二酯键。

（3）质粒是小型环状的 DNA 分子，常作为基因表达的载体，首先质粒上含有复制原点，能保证质粒在受体细胞中自我复制。质粒 DNA 分子上有一个至多个限制性核酸内切酶的酶切位点，便于目的基因的导入。质粒上的标记基因是为了鉴定受体细胞中是否含有目的基因，具体做法是用含有该抗生素的培养基培养宿主细胞，能够存活的即为含有质粒载体的宿主细胞。

（4）启动子是一段特殊结构的 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，最终获得需要的蛋白质。

【点睛】

本题考查基因工程的相关知识，要求考生识记基因工程的概念、原理及操作步骤，掌握各操作步骤中需要注意的细节，能结合所学的知识准确答题。

（2021 年广东卷）9. 非细胞合成技术是一种运用合成生物学方法，在细胞外构建多酶催化体系，获得目标产物的新技术，其核心是各种酶基因的挖掘、表达等。中国科学家设计了 4 步酶促反应的非细胞合成路线（如图），可直接用淀粉生产肌醇（重要的医药食品原料），以期解决高温强酸水解方法造成的严重污染问题，并可以提高产率。



回答下列问题：

- （1）研究人员采用 PCR 技术从土壤微生物基因组中扩增得到目标酶基因。此外，获得酶基因的方法还有_____。（答出两种即可）
- （2）高质量的 DNA 模板是成功扩增出目的基因的前提条件之一。在制备高质量 DNA 模板时必须除去蛋白，方法有_____。（答出两种即可）
- （3）研究人员使用大肠杆菌 BL21 作为受体细胞、pET20b 为表达载体分别进行 4 种酶的表达。表达载体转化大肠杆菌时，首先应制备_____细胞。为了检测目的基因是否成功表达出酶蛋白，需要采用的方法有_____。

(4) 依图所示流程，在一定的温度、pH 等条件下，将 4 种酶与可溶性淀粉溶液混合组成一个反应体系。若这些酶最适反应条件不同，可能导致的结果是_____。在分子水平上，可以通过改变_____，从而改变蛋白质的结构，实现对酶特性的改造和优化。

【答案】 基因文库中获取、人工合成法 盐析法、酶解法或高温变性 感受态 抗原-抗体杂交技术 有的酶失活而使反应中断 基因的碱基序列

【解析】

【分析】

基因工程技术的基本步骤：

(1) 目的基因的获取：从基因文库中获取、利用 PCR 技术扩增和人工合成。

(2) 基因表达载体的构建：是基因工程的核心步骤，基因表达载体包括目的基因、启动子、终止子和标记基因等。

(3) 将目的基因导入受体细胞：根据受体细胞不同，导入的方法也不一样。将目的基因导入植物细胞的方法有农杆菌转化法、基因枪法和花粉管通道法；将目的基因导入动物细胞最有效的方法是显微注射法；将目的基因导入微生物细胞的方法是感受态细胞法。

(4) 目的基因的检测与鉴定：分子水平上的检测：①检测转基因生物染色体的 DNA 是否插入目的基因--DNA 分子杂交技术；②检测目的基因是否转录出了 mRNA--分子杂交技术；③检测目的基因是否翻译成蛋白质--抗原-抗体杂交技术。个体水平上的鉴定：抗虫鉴定、抗病鉴定、活性鉴定等。

【详解】

(1) 分析题意，研究人员从土壤微生物基因组中扩增得到目标酶基因采用了 PCR 技术，此外获得酶基因的方法还有从基因文库中获取和人工合成法。

(2) 高质量的 DNA 模板是成功扩增出目的基因的前提条件之一。在制备高质量 DNA 模板时必须除去蛋白，可根据 DNA 和蛋白质的溶解性、对酶、高温和洗涤剂的耐受性去除蛋白质，方法有盐析、酶解法或高温变性法等。

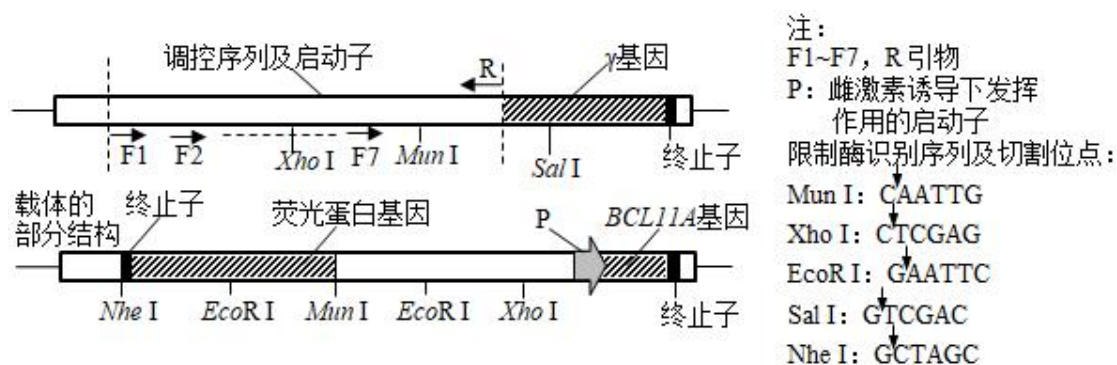
(3) 研究人员使用大肠杆菌 BL21 作为受体细胞、pET20b 为表达载体分别进行 4 种酶的表达。表达载体转化大肠杆菌时，首先应制备感受态细胞，即利用钙离子处理大肠杆菌，使其成为感受态细胞，使其易于接受外来的 DNA 分子。基因工程中，酶基因（目的基因）成功表达的产物酶蛋白的化学本质是蛋白质，常用抗原-抗体杂交技术进行检测。

(4) 依图所示流程，在一定的温度、pH 等条件下，将 4 种酶与可溶性淀粉溶液混合组成一个反应体系。由于酶的作用条件较温和，若这些酶最适反应条件不同，则可能导致有的酶失活而使反应中断。在分子水平上，可以通过改变基因的碱基序列，从而改变蛋白质的结构，实现对酶特性的改造和优化。

【点睛】

本题考查基因工程、DNA 的粗提取和鉴定的相关知识，意在考查考生把握知识间的联系、理论与实际相结合解决实际问题的能力，难度中等。

(2021 年山东卷)10. 人类 γ 基因启动子上游的调控序列中含有 BCL11A 蛋白结合位点，该位点结合 BCL11A 蛋白后， γ 基因的表达被抑制。通过改变该结合位点的序列，解除对 γ 基因表达的抑制，可对某种地中海贫血症进行基因治疗。科研人员扩增了 γ 基因上游不同长度的片段，将这些片段分别插入表达载体中进行转化和荧光检测，以确定 BCL11A 蛋白结合位点的具体位置。相关信息如图所示。



(1) 为将扩增后的产物定向插入载体指导荧光蛋白基因表达，需在引物末端添加限制酶识别序列。据图可知，在 F₁~F₇ 末端添加的序列所对应的限制酶是____，在 R 末端添加的序列所对应的限制酶是____。本实验中，从产物扩增到载体构建完成的整个过程共需要____种酶。

(2) 将构建的载体导入除去 BCL11A 基因的受体细胞，成功转化后，含 F₁~F₆ 与 R 扩增产物的载体表达荧光蛋白，受体细胞有荧光，含 F₇ 与 R 扩增产物的受体细胞无荧光。含 F₇ 与 R 扩增产物的受体细胞无荧光的原因是____。

(3) 向培养液中添加适量的雌激素，含 F₁~F₄ 与 R 扩增产物的受体细胞不再有荧光，而含 F₅~F₆ 与 R 扩增产物的受体细胞仍有荧光。若 γ 基因上游调控序列上与引物序列所对应的位置不含有 BCL11A 蛋白的结合位点序列，据此结果可推测，BCL11A 蛋白结合位点位于____，理由是____。

【答案】 SalI EcoRI 6 F₇ 与 R 扩增产物不含完整的启动子，荧光蛋白基因不表达 引物 F₄ 与 F₅ 在调控序列上所对应序列之间的区段上 根据有无荧光情况判断，F₁~F₄ 与 R 扩增产物上均有结合位点，因此结合位点位于 F₄ 所对应调控序列的下游（右侧）；F₅~F₆ 与 R 扩增产物上均无结合位点，可知结合位点位于 F₅ 所对应调控序列的上游（左侧），所以结合位点位于引物 F₄ 与 F₅ 在调控序列上所对应序列之间的区段上

【解析】

【分析】

1、据题意可知，科研人员扩增了 γ 基因上游不同长度的片段，据图中注释可知，F1~F7 以及 R 位置均为引物，故扩增的序列分别是引物 F1 和引物 R 之间的序列，引物 F2 和引物 R 之间的序列，引物 F3 和引物 R 之间的序列，引物 F4 和引物 R 之间的序列，引物 F5 和引物 R 之间的序列，引物 F6 和引物 R 之间的序列，引物 F7 和引物 R 之间的序列；

2、据图中对限制酶的注释可知，限制酶 *Mun* I 识别并切割后的黏性末端与限制酶 *EcoR* I 识别并切割后的黏性末端相同，限制酶 *Xho* I 识别并切割后的黏性末端与限制酶 *Sal* I 识别并切割后的黏性末端相同。

【详解】

(1) 据题意可知，需要将扩增后的产物定向插入并指导荧光蛋白基因的表达，则含有启动子的扩增后的产物读取方向与荧光蛋白基因的读取方向一致，故扩增后的产物中的 R 端与荧光蛋白基因中限制酶 *Mun* I 识别序列端结合，才能保证扩增后的产物定向插入并指导荧光蛋白基因的表达。要做到定向插入，需要引物末端两端添加限制酶的识别序列，且被限制酶识别并切割后，两端的黏性末端不能相同。而扩增后的产物中可能含有 *Mun* I 和 *Xho* I 的识别位点，故在引物末端添加限制酶的识别序列不能被限制酶 *Mun* I 和 *Xho* I 所识别，故应该选用添加限制酶 *EcoR* I 和限制酶 *Sal* I 识别序列，据图中对限制酶的注释可知，限制酶 *Mun* I 识别并切割后的黏性末端与限制酶 *EcoR* I 识别并切割后的黏性末端相同，故 R 末端添加的序列所对应的限制酶是 *EcoR* I，在 F1~F7 末端添加的序列所对应的限制酶是 *Sal* I；荧光蛋白基因中含有限制酶 *EcoR* I 的识别位点，故对载体使用限制酶 *Mun* I 和 *Xho* I 切割。综上所述，对载体使用限制酶 *Mun* I 和 *Xho* I 切割，对扩增后的产物用限制酶 *EcoR* I 和限制酶 *Sal* I 识别序列，然后在 DNA 连接酶的催化作用下，连接形成重组载体；产物扩增中需要使用 *Taq* 酶催化，合成更多的产物，故从产物扩增到载体构建完成的整个过程共需要 6 种酶，分别是 *Taq* 酶、限制酶 *EcoR* I、限制酶 *Sal* I、限制酶 *Mun* I、限制酶 *Xho* I、DNA 连接酶；

(2) 受体细胞中已经除去 *BCL11A* 基因，故扩增产物中的 *BCL11A* 蛋白结合位点，不会抑制荧光蛋白基因的表达；基因的表达需要 RNA 聚合酶与启动子结合，才能完成荧光蛋白基因的转录过程；含 F1~F6 与 R 扩增产物的载体表达荧光蛋白，受体细胞有荧光，含 F7 与 R 扩增产物的受体细胞无荧光，则可能是 F7 与 R 扩增产物不含完整的启动子，荧光蛋白基因不表达；

(3) 向培养液中添加适量的雌激素，此时重组载体上的 *BCL11A* 基因表达，产生 *BCL11A* 蛋白，*BCL11A* 蛋白与 *BCL11A* 蛋白结合位点结合后，导致荧光蛋白基因被抑制；含 F1~F4 与 R 扩增产物的受体细胞不再有荧光，则说明 *BCL11A* 蛋白结合位点结合后在引物 F4 与引物 R 之间的序列上；含 F5~F6 与 R 扩增产物的受体细胞仍有荧光，则说明 *BCL11A* 蛋白结合位点结合后在引物 F5 的上游序列，故据此结果可推测，*BCL11A* 蛋白结合位点位于引物 F4 与 F5 在调控序列上所对应序列之间的区段上。

【点睛】

对基因工程中 PCR 技术的掌握，对基因工程的第二步，基因表达载体的构建的过程的分析，双酶切法的应用，限制酶的作用和切割特点，是解决本题的关键。

(2021 年 1 月浙江卷) 11. 回答下列 (一)、(二) 小题：

(一) 某环保公司从淤泥中分离到一种高效降解富营养化污水污染物的细菌菌株，制备了固定化菌株。

(1) 从淤泥中分离细菌时常用划线分离法或_____法，两种方法均能在固体培养基上形成_____。对分离的菌株进行诱变、_____和鉴定，从而获得能高效降解富营养化污水污染物的菌株。该菌株只能在添加了特定成分 X 的培养基上繁殖。

(2) 固定化菌株的制备流程如下：①将菌株与该公司研制的特定介质结合；②用蒸馏水去除_____；③检验固定化菌株的_____。菌株与特定介质的结合不宜直接采用交联法和共价偶联法，可以采用的 2 种方法是_____。

(3) 对外，只提供固定化菌株有利于保护该公司的知识产权，推测其原因是_____。

(二) 三叶青为蔓生的藤本植物，以根入药。由于野生三叶青对生长环境要求非常苛刻，以及生态环境的破坏和过度的采挖，目前我国野生三叶青已十分珍稀。

(1) 为保护三叶青的_____多样性和保证药材的品质，科技工作者依据生态工程原理，利用_____技术，实现了三叶青的林下种植。

(2) 依据基因工程原理，利用发根农杆菌侵染三叶青带伤口的叶片，叶片产生酚类化合物，诱导发根农杆菌质粒上 *vir* 系列基因表达形成_____和限制性核酸内切酶等，进而从质粒上复制并切割出一段可转移的 DNA 片段 (T-DNA)。T-DNA 进入叶片细胞并整合到染色体上，T-DNA 上 *rol* 系列基因表达，产生相应的植物激素，促使叶片细胞持续不断地分裂形成_____，再分化形成毛状根。

(3) 剪取毛状根，转入含头孢类抗生素的固体培养基上进行多次_____培养，培养基中添加抗生素的主要目的是_____。最后取毛状根转入液体培养基、置于摇床上进行悬浮培养，通过控制摇床的_____和温度，调节培养基成分中的_____，获得大量毛状根，用于提取药用成分。

【答案】 涂布分离 单菌落 筛选 未固定的细菌 降解富营养化污水污染物的能力 包埋法和吸附法 特定介质能为菌株繁殖提供 X 遗传 间种 DNA 聚合酶 愈伤组织 继代 杀灭发根农杆菌 转速 营养元素以及生长调节剂的种类和浓度

【解析】

1、分离纯化细菌最常用的方法是划线分离法 (平板划线法) 和涂布分离法 (稀释涂布平板法)。接种的目的是使聚集在一起的微生物分散成单个细胞，并在培养基表面形成单个细菌繁殖而成的子细胞群体--菌落。

划线分离法，方法简单；涂布分离法，单菌落更易分开，但操作复杂些。

2、固定化酶(insoluble enzyme)就是将水溶性的酶用物理或化学的方法固定在某种介质上，使之成为不溶于水而又有酶活性的制剂。固定化的方法有吸附法、共价偶联法、交联法和包埋法等。

3、植物组织培养的原理是植物细胞具有全能性，其具体过程：外植体→愈伤组织→胚状体→新植体，其中脱分化过程要避光，而再分化过程需光。

4、在植物组织培养时，通过调节生长素和细胞分裂素的比值能影响愈伤组织分化出根或芽。

【详解】

（一）分析题意可知，本实验目的是从淤泥中分离到一种高效降解富营养化污水污染物的细菌菌株，制备固定化菌株。

（1）分离纯化细菌最常用的方法是划线分离法或涂布分离法，两种方法均能在固体培养基上形成单菌落。为了获得能高效降解富营养化污水污染物的菌株，还需对分离的菌株进行诱变处理，再经筛选和鉴定。

（2）固定化的方法有吸附法、共价偶联法、交联法和包埋法等。由于菌株与特定介质的结合不宜直接采用交联法和共价偶联法，故可以采用的 2 种方法是包埋法和吸附法。

（3）由于该菌株只能在添加了特定成分 X 的培养基上繁殖，可推测特定介质能为菌株繁殖提供 X，故该公司对外只提供固定化菌株，有利于保护该公司的知识产权。

（二）（1）生物多样性包括遗传多样性、物种多样性和生态系统多样性，为保护三叶青的遗传多样性和保证药材的品质；三叶青的林下种植，是利用间种技术。

（2）分析题意可知，从质粒上复制并切割出一段可转移的 DNA 片段（T-DNA），DNA 复制需要 DNA 聚合酶，故可知，酚类化合物诱导发根农杆菌质粒上 *vir* 系列基因表达，形成 DNA 聚合酶和限制性核酸内切酶等。根据植物组织培养技术过程可知，相应植物激素可以促使叶片细胞脱分化形成愈伤组织，再分化形成毛状根。

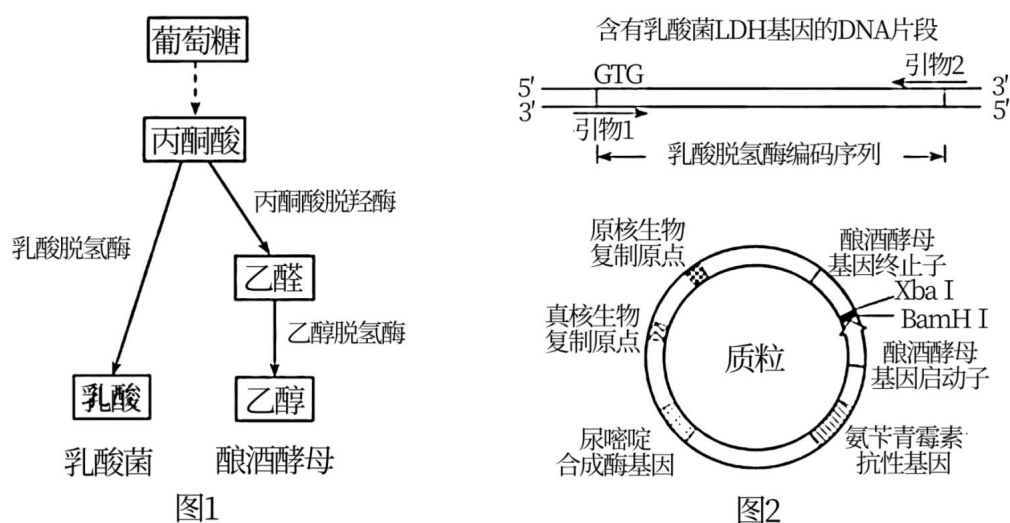
（3）剪取毛状根，转入含头孢类抗生素的固体培养基上进行多次继代培养，培养基中添加抗生素的主要目的是杀灭发根农杆菌。最后取毛状根转入液体培养基、置于摇床上进行悬浮培养，通过控制摇床的转速和温度，调节培养基成分中的营养元素以及生长调节剂的种类和浓度，获得大量毛状根，用于提取药用成分。

【点睛】

本题考查了特定微生物的分离、固定化技术及基因工程、植物组织培养的应用等相关知识，意在考查考生的识记能力和理解所学知识要点，把握知识间内在联系，形成知识网络结构的能力；能运用所学知识，准确判断问题的能力。

（2021 年天津卷）12. 乳酸菌是乳酸的传统生产菌，但耐酸能力较差，影响产量。酿酒酵母耐酸能力较强，但不产生乳酸。研究者将乳酸菌的乳酸脱氢酶基因（LDH）导入酿酒酵母，获得能产生乳酸的工程菌株。下

图1为乳酸和乙醇发酵途径示意图，图2为构建表达载体时所需的关键条件。



(1)乳酸脱氢酶在转基因酿酒酵母中参与厌氧发酵的场所应为_____。

(2)获得转基因酿酒酵母菌株的过程如下：

①设计引物扩增乳酸脱氢酶编码序列。

为使扩增出的序列中编码起始密码子的序列由原核生物偏好的 GTG 转变为真核生物偏好的 ATG，且能通过双酶切以正确方向插入质粒，需设计引物 1 和 2。其中引物 1 的 5'端序列应考虑_____和_____。

②将上述 PCR 产物和质粒重组后，导入大肠杆菌，筛选、鉴定，扩增重组质粒。重组质粒上有_____，所以能在大肠杆菌中扩增。启动子存在物种特异性，易被本物种的转录系统识别并启动转录，因此重组质粒上的乳酸脱氢酶编码序列_____（能/不能）在大肠杆菌中高效表达。

③提取重组质粒并转入不能合成尿嘧啶的酿酒酵母菌株，在_____的固体培养基上筛选出转基因酿酒酵母，并进行鉴定。

(3)以葡萄糖为碳源，利用该转基因酿酒酵母进行厌氧发酵，结果既产生乳酸，也产生乙醇。若想进一步提高其乳酸产量，下列措施中不合理的是_____（单选）。

- A. 进一步优化发酵条件
- B. 使用乳酸菌 LDH 基因自身的启动子
- C. 敲除酿酒酵母的丙酮酸脱羧酶基因
- D. 对转基因酿酒酵母进行诱变育种

【答案】(1)细胞质基质

(2) 包含 BamHI 的识别序列 将 GTG 改为 ATG 原核生物复制原点 不能 缺失尿嘧啶

(3)B

【解析】

【分析】

基因工程技术的基本步骤：

- (1) 目的基因的获取：方法有从基因文库中获取、利用 **PCR** 技术扩增和人工合成。
- (2) 基因表达载体的构建：是基因工程的核心步骤，基因表达载体包括目的基因、启动子、终止子和标记基因等。
- (3) 将目的基因导入受体细胞：根据受体细胞不同，导入的方法也不一样。将目的基因导入植物细胞的方法有农杆菌转化法、基因枪法和花粉管通道法；将目的基因导入动物细胞最有效的方法是显微注射法；将目的基因导入微生物细胞的方法是感受态细胞法。
- (4) 目的基因的检测与鉴定：分子水平上的检测：①检测转基因生物染色体的 **DNA** 是否插入目的基因--**DNA** 分子杂交技术；②检测目的基因是否转录出了 **mRNA**--分子杂交技术；③检测目的基因是否翻译成蛋白质--抗原-抗体杂交技术。个体水平上的鉴定：抗虫鉴定、抗病鉴定、活性鉴定等。

(1)

酵母细胞厌氧发酵即无氧呼吸的场所为细胞质基质。

(2)

- ①设计引物 1 的 5'端序列，应考虑将编码起始密码子的序列由原核生物偏好的 **GTG** 转变为真核生物偏好的 **ATG**，以便目的基因在酵母细胞中更好的表达；同时能通过双酶切以正确方向插入质粒，需要包含 **BamHI** 的识别序列。
- ②将重组质粒导入大肠杆菌，重组质粒上有原核生物复制原点，所以能在大肠杆菌中扩增。由于启动子存在物种特异性，重组质粒上带有真核酿酒酵母基因的启动子，故重组质粒上的乳酸脱氢酶编码序列在大肠杆菌中不能高效表达。
- ③在缺乏尿嘧啶的选择培养基上，不能合成尿嘧啶的酿酒酵母菌株不能生存，导入重组质粒的酿酒酵母菌株因为获得了尿嘧啶合成酶基因而可以正常生存，从而起到筛选作用。

(3)

- A、进一步优化发酵条件，使其更有利于乳酸菌的繁殖，可以提高其乳酸产量，**A 正确**；
- B、由于启动子存在物种特异性，使用乳酸菌 **LDH** 基因自身的启动子，在酵母细胞中不表达，**B 错误**；
- C、敲除酿酒酵母的丙酮酸脱羧酶基因，使酵母菌不能酿酒，从而提高乳酸产量，**C 正确**；
- D、对转基因酿酒酵母进行诱变育种，可能会出现乳酸菌的高产菌株，**D 正确**。

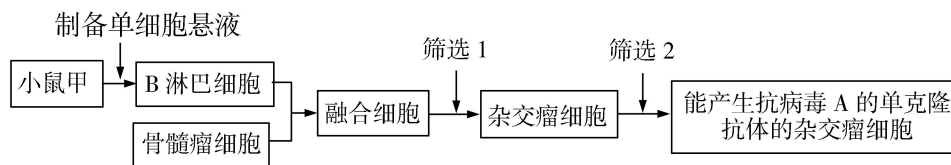
故选 **B**。

【点睛】

本题以获得能产生乳酸的工程菌株为背景，考查基因工程的相关内容，重点考查基因表达载体的构建，掌

握各操作步骤中需要注意的细节问题，识记 PCR 技术的原理和过程，能结合所学的知识准确答题。

13. (2020 年全国统一高考生物试卷 (新课标 I) • 38) 为研制抗病毒 A 的单克隆抗体，某同学以小鼠甲为实验材料设计了以下实验流程。



回答下列问题：

- (1) 上述实验前必须给小鼠甲注射病毒 A，该处理的目的是_____。
- (2) 写出以小鼠甲的脾脏为材料制备单细胞悬液的主要实验步骤：_____。
- (3) 为了得到能产生抗病毒 A 的单克隆抗体的杂交瘤细胞，需要进行筛选。图中筛选 1 所采用的培养基属于_____，使用该培养基进行细胞培养的结果是_____。图中筛选 2 含多次筛选，筛选所依据的基本原理是_____。
- (4) 若要使能产生抗病毒 A 的单克隆抗体的杂交瘤细胞大量增殖，可采用的方法有_____ (答出 2 点即可)。

【答案】(1) 诱导小鼠甲产生能够分泌抗病毒 A 抗体的 B 淋巴细胞

(2) 取小鼠甲脾脏剪碎，用胰蛋白酶处理使其分散成单个细胞，加入培养液制成单细胞悬液

(3) 选择培养基 只有杂交瘤细胞能够生存 抗原与抗体的反应具有特异性

(4) 将杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔内增殖；将杂交瘤细胞在体外培养

【解析】

【分析】

由图可知，筛选 1 指用选择培养基筛选出杂交瘤细胞，筛选 2 指进行克隆化培养和专一抗体检测，筛选出能产生特定抗体的杂交瘤细胞。

【详解】

- (1) 实验前给小鼠甲注射病毒 A，是为了诱导小鼠甲产生能够分泌抗病毒 A 抗体的 B 淋巴细胞。
- (2) 取小鼠的脾脏，剪碎组织，用胰蛋白酶处理获得单个细胞，加入培养液可以制成单细胞悬液。
- (3) 图中筛选 1 需要用到选择培养基，只有杂交瘤细胞可以存活。筛选 2 是为了获得能产生特定抗体的杂交瘤细胞，该过程要用到抗原抗体杂交，故筛选所依据的原理是抗原-抗体反应具有特异性。
- (4) 获得能产生抗病毒 A 的单克隆抗体的杂交瘤细胞后，可以在体外培养液中进行培养，或在小鼠的腹腔中进行培养，使杂交瘤细胞大量增殖。

【点睛】

制备单克隆抗体的过程中，需要用到动物细胞融合和动物细胞培养，需要用到两次筛选，第一次筛选的目的是获得杂交瘤细胞，第二次筛选的目的是获得能产生特定抗体的杂交瘤细胞。

14. (2020 年全国统一高考生物试卷 (新课标 II) • 38) 植树造林、“无废弃物农业”、污水净化是建设美丽中国的重要措施。回答下列有关生态工程的问题：

(1) 在植树造林时，一般认为，全部种植一种植物的做法是不可取的。因为与混合种植方式所构建的生态系统相比，按照种植一种植物方式所构建的生态系统，其抵抗力稳定性_____。抵抗力稳定性的含义是_____。

(2) “无废弃物农业”是我国利用生态工程的原理进行农业生产的一种模式，其做法是收集有机物质。包括人畜粪便、枯枝落叶等，采用堆肥和沤肥等多种方式，把它们转变为有机肥料，再施用到农田中。施用有机肥料的优点是_____ (答出 3 点即可)。在有机肥料的形成过程中，微生物起到了重要作用，这些微生物属于生态系统组分中的_____。

(3) 在污水净化过程中，除发挥污水处理厂的作用外，若要利用生物来回收污水中的铜、镉等金属元素，请提供一个方案：_____。

【答案】(1) 低 生态系统抵抗外界干扰并使自身的结构与功能保持原状或不受损害的能力

(2) 改善了土壤结构；培育了土壤微生物；实现了土壤养分的循环利用 分解者

(3) 种植能吸收这些金属元素的水生植物，再从植物中回收金属

【解析】

【分析】

1、生态系统的稳定性：包括抵抗力稳定性和恢复力稳定性。

2、生态工程的基本原理：

①物质循环再生原理：物质能在生态系统中循环往复，分层分级利用；

②物种多样性原理：物种繁多复杂的生态系统具有较高的抵抗力稳定性；

③协调与平衡原理：生态系统的生物数量不能超过环境承载力（环境容纳量）的限度；

④整体性原理：生态系统建设要考虑自然、经济、社会的整体影响；

⑤系统学和工程学原理：系统的结构决定功能原理：要通过改善和优化系统结构改善功能；

系统整体性原理：系统各组分间要有适当的比例关系，使得能量、物质、信息等的转换和流通顺利完成，并实现总体功能大于各部分之和的效果，即“1+1>2”。

【详解】

(1) 生态系统的抵抗力稳定性取决于生态系统中物种组成的复杂程度，种植一种植物，生态系统的生物种

类过少，抵抗力稳定性较低；所谓抵抗力稳定性是指生态系统抵抗外界干扰并使自身的结构与功能保持原状或不受损害的能力。

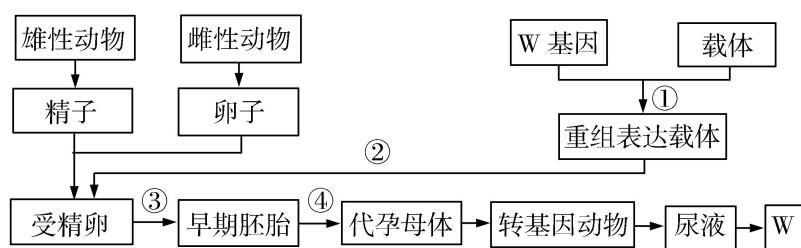
(2) 由于有机肥料中有机物较多，故施用有机肥料可以改善土壤结构、培育土壤微生物、实现了土壤养分的循环利用。分解人畜粪便、枯枝败叶中的有机物质的微生物属于分解者。

(3) 利用生物来回收污水中的金属元素，可以通过种植能吸收这些金属元素的水生植物，再从植物中回收金属。

【点睛】

本题考查生态系统和生态工程的相关知识，要求考生识记生态系统的结构、稳定性以及生态工程的基本原理及生态恢复工程的实例，掌握生态农业的意义，能结合所需的知识准确答题。

15. (2020 年全国统一高考生物试卷 (新课标 III) • 38) W 是一种具有特定功能的人体蛋白质。某研究小组拟仿照制备乳腺生物反应器的研究思路，制备一种膀胱生物反应器来获得 W，基本过程如图所示。



(1) 步骤①中需要使用的工具酶有_____。步骤②和③所代表的操作分别是_____和_____。步骤④称为_____。

(2) 与乳腺生物反应器相比，用膀胱生物反应器生产 W 的优势在于不受转基因动物的_____ (答出 2 点即可) 的限制。

(3) 一般来说，在同一动物个体中，乳腺上皮细胞与膀胱上皮细胞的细胞核中染色体 DNA 所含的遗传信息_____ (填相同或不同)，原因是_____。

(4) 从上述流程可知，制备生物反应器涉及胚胎工程，胚胎工程中所用到的主要技术有_____ (答出 2 点即可)。

【答案】(1) 限制性核酸内切酶、DNA 连接酶 显微注射 体外培养 胚胎移植

(2) 性别、年龄

(3) 相同 两种上皮细胞都是体细胞，且来源于同一个受精卵

(4) 体外受精、胚胎移植

【解析】

【分析】

1、膀胱反应器有着和乳腺反应器一样的优点：收集产物蛋白比较容易,不会对动物造成伤害。此外,该系统可从动物一出生就收集产物,不论动物的性别和是否正处于生殖期。膀胱生物反应器最显著的优势在于从尿中提取蛋白质比在乳汁中提取简便、高效。

2、基因工程技术的基本步骤包括：目的基因的获取；基因表达载体的构建，是基因工程的核心步骤，基因表达载体包括目的基因、启动子、终止子和标记基因等；将目的基因导入受体细胞；目的基因的检测与鉴定。

3、分析题图可知，步骤①为将 W 基因与运载体结合，构建基因表达载体；步骤②为将重组表达载体导入受精卵，常用显微注射法；步骤③为体外培养；步骤④为胚胎移植。

【详解】

(1) 由分析可知，步骤①为构建基因表达载体，需使用同种限制酶切割目的基因和运载体，再由 DNA 连接酶连接粘性末端，形成重组表达载体；步骤②为显微注射；步骤③为体外培养；步骤④为胚胎移植。

(2) 与乳腺生物反应器相比，用膀胱生物反应器生产 W，可从动物一出生就收集产物,不受动物的性别和年龄的限制。

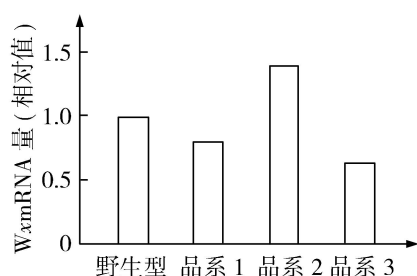
(3) 在同一动物个体中，乳腺上皮细胞与膀胱上皮细胞是由同一个受精卵有丝分裂产生的体细胞，其细胞核中染色体 DNA 所含的遗传信息相同。

(4) 由分析可知，步骤③为体外培养，步骤④为胚胎移植，均属于胚胎工程。

【点睛】

本题考查基因工程和胚胎工程的相关知识，要求考生识记基因工程的基本工具和操作步骤，掌握胚胎工程各项技术的相关细节，能结合所学的知识准确答题，属于考纲识记和理解层次的考查。

16. (2020 年山东省高考生物试卷(新高考) • 25) 水稻胚乳中含直链淀粉和支链淀粉，直链淀粉所占比例越小糯性越强。科研人员将能表达出基因编辑系统的 DNA 序列转入水稻，实现了对直链淀粉合成酶基因(Wx 基因)启动子序列的定点编辑，从而获得了 3 个突变品系。



(1) 将能表达出基因编辑系统的 DNA 序列插入 Ti 质粒构建重组载体时，所需的酶是_____，重组载体进入水稻细胞并在细胞内维持稳定和表达的过程称为_____。

(2) 根据启动子的作用推测，Wx 基因启动子序列的改变影响了_____，从而改变了 Wx 基因的转录水平。

与野生型水稻相比，3 个突变品系中 Wx 基因控制合成的直链淀粉合成酶的氨基酸序列____(填：发生或不发生)改变，原因是_____。

(3) 为检测启动子变化对 Wx 基因表达的影响，科研人员需要检测 Wx 基因转录产生的 mRNA (Wx mRNA) 的量。检测时分别提取各品系胚乳中的总 RNA，经_____过程获得总 cDNA。通过 PCR 技术可在总 cDNA 中特异性地扩增出 Wx 基因的 cDNA，原因是_____。

(4) 各品系 Wx mRNA 量的检测结果如图所示，据图推测糯性最强的品系为_____，原因是_____。

【答案】(1) 限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶 转化

(2) RNA 聚合酶与启动子的识别和结合 不发生 编码直链淀粉合成酶的碱基序列中不含启动子

(3) 逆转录(或：反转录) 引物是根据 Wx 基因的一段已知序列设计合成的(或：引物能与 Wx 基因的 cDNA 特异性结合)

(4) 品系 3 品系 3 的 Wx mRNA 最少，控制合成的直链淀粉合成酶最少，直链淀粉合成量最少，糯性最强

【解析】

【分析】

基因工程的操作步骤：

1、获取目的基因(从基因组文库中获取、利用 PCR 技术扩增目的基因、化学合成法)；

2、基因表达载体的构建(这也是基因工程的核心)：一个完整的基因表达载体包括：

(1) 启动子：位于基因的首端，是 RNA 聚合酶识别并结合的位点，驱动目的基因的转录；(2) 目的基因：编码蛋白质的基因；(3) 终止子：位于基因的尾端，其作用使转录在需要的地方停止；(4) 标记基因：作用是为了鉴别受体细胞中是否含有目的基因，从而将含有目的基因的受体细胞筛选出来。

3、将目的基因导入受体细胞(植物、动物、微生物)：目的基因进入受体细胞内，并且在受体细胞内维持稳定和表达的过程，称为转化。

4、目的基因的检测与鉴定(DNA 分子杂交技术、分子杂交技术、抗原抗体杂交)。

【详解】

(1) 将目的基因与 Ti 质粒构建基因表达载体时，需要限制酶的切割，将目的基因插入载体时需要 DNA 连接酶的连接，重组载体进入水稻细胞并在细胞内维持稳定和表达的过程叫做转化。

(2) 根据以上分析可知，启动子是 RNA 聚合酶识别并结合的位点，如果启动子序列改变将会影响 RNA 聚合酶与之结合和识别，进而影响基因的转录水平，在真核生物中，编码蛋白质的序列是基因中编码区，编码区中不包括启动子序列，因此直链淀粉合成酶的基因碱基序列中不含有启动子，因此 3 个突变品系中 Wx 基因中控制合成直链淀粉酶的氨基酸序列不发生改变。

(3) 以 mRNA 为模板合成 cDNA 的过程为逆转录，利用 PCR 技术扩增 Wx 基因的 cDNA，需要以 Wx 基因合成的引物，这样引物能够在总 cDNA 中与 Wx 基因的 cDNA 特异性结合，从而利用 PCR 扩增技术转移性扩增出 Wx 基因的 cDNA。

(4) 识图分析可知，图中品系 3 的 Wx 基因的 mRNA 的含量最少，那么合成的直链淀粉酶最少，直链淀粉合成量最少，因此该水稻胚乳中含的直链淀粉比例最小，糯性最强。

【点睛】

本题考查基因工程的知识点，要求学生掌握基因工程的操作工具和操作步骤是解决问题的关键。识记并理解基因工程中工具酶的种类和作用，把握基因表达载体构建的过程，理解启动子的功能和编码蛋白质的基因的结构，这是该题考查的难点；把握 PCR 扩增技术的操作过程和引物的作用，这是突破第 (3) 问的关键。

17. (2020 年天津高考生物试卷) 某植物有 A、B 两品种。科研人员在设计品种 A 组织培养实验时，参照品种 B 的最佳激素配比 (见下表) 进行预实验。

品种 B 组织培养阶段	细胞分裂素浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	生长素浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
I 诱导形成愈伤组织	m_1	n_1
II 诱导形成幼芽	m_2	n_2
III 诱导生根	m_3	n_3

据表回答：

- (1) I 阶段时通常选择茎尖、幼叶等作为外植体，原因是_____。
- (2) 在 I、II、III 阶段中发生基因选择性表达的是_____阶段。
- (3) 为确定品种 A 的 I 阶段的最适细胞分裂素浓度，参照品种 B 的激素配比 ($m_1 > 2.0$)，以 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 为梯度，设计 5 个浓度水平的实验，细胞分裂素最高浓度应设为_____ $\mu\text{mol/L}$ 。
- (4) III 阶段时，科研人员分别选用浓度低于或高于 $n_3 \mu\text{mol/L}$ 的生长素处理品种 A 幼芽都能达到最佳生根效果，原因是处理幼芽时，选用低浓度生长素时的处理方法为_____，选用高浓度生长素时的处理方法为_____。
- (5) 在_____阶段用秋水仙素对材料进行处理，最易获得由单个细胞形成的多倍体。

【答案】(1) 细胞分化程度低，容易诱导产生愈伤组织

(2) I、II、III

(3) $m_1 + 1.0$

(4) 浸泡法 (长时间处理) 沾蘸法 (短时间处理)

(5) I

【解析】

【分析】

愈伤组织是由一团未分化的细胞组成的，在组织培养中，条件适宜就会分化成各种组织。如果培养基中细胞分裂素和生长素的比例合适，会促进愈伤组织的生长，分化出根和茎叶；细胞分裂素太多时，有利于芽的分化、抑制根的形成；生长素用量太多时，有利于根的分化、抑制芽的形成；而当生长素少，细胞分裂素也不多时，则愈伤组织继续生长，不发生分化。基因的选择性表达是指基因在特定的时间和空间条件下有选择表达的现象，据此分析。

【详解】

(1) 在诱导愈伤组织形成时，通常采用茎尖、幼叶做外植体，因为这些部位的细胞分裂能力强、分化程度低，全能性容易表达，容易诱导产生愈伤组织。

(2) I 过程愈伤组织形成是离体的植物细胞脱分化的结果，脱分化过程中细胞的结构和功能发生的明显改变，成为未分化状态；II、III过程形成幼芽、根的过程存在细胞的分化，分化和脱分化都存在基因的选择性表达，故 I、II、III阶段都存在基因的选择性表达。

(3) 根据题意，表中数据为品种 B 的最佳激素配比，若要确定品种 A 的 I 阶段最佳细胞分裂素浓度，以 $0.5\mu\text{mol/L}$ 为梯度，可参考 m_1 为中间值，故实验中细胞分裂素最高浓度可设为 $m_1+1.0\mu\text{mol/L}$ 。

(4) 实验中用生长素处理插条的方法可选用浸泡法或沾蘸法，浸泡法时间长、所需浓度低，而沾蘸法处理时间短、所需浓度高；因此III过程中分别选用浓度低于或高于 $n_3\mu\text{mol/L}$ 的生长素处理品种 A 的幼苗芽，选用低浓度生长素时的处理方法为浸泡法，时间长，而选用高浓度生长素时处理方法为沾蘸法，时间短，都能达到比较适宜的浓度，达到最佳生根效果。

(5) 秋水仙素可抑制纺锤体形成，导致染色体加倍形成多倍体，愈伤组织分裂旺盛，故在 I 阶段用秋水仙素处理，最易获得由单个细胞形成的多倍体。

【点睛】

本题以植物组织培养为背景，主要考查组织培养过程激素的使用，意在考查考生能理解所学知识的要点，把握知识间的内在联系和分析数据、处理数据的能力。

18. (2020 年浙江省高考生物试卷 (7 月选考)) 回答下列 (二) 小题：

(二) 回答与基因工程和植物克隆有关的问题：

(1) 天然农杆菌的 Ti 质粒上存在着一段 DNA 片段 (T-DNA)，该片段可转移并整合到植物细胞染色体上。为便于转基因植物在组织培养阶段的筛选，设计重组 Ti 质粒时，应考虑 T-DNA 中要有可表达的目的基因，还需要有可表达的_____。

(2) 结合植物克隆技术进行转基因实验，为获得转基因植株，农杆菌侵染的宿主一般要选用具有优良性状、较高的遗传稳定性、_____及易被农杆菌侵染等特点的植物材料。若植物材料对农杆菌不敏感，则可用_____的转基因方法。

(3) 利用带侧芽的茎段获得丛状苗的过程与利用茎段诱导产生愈伤组织再获得丛状苗的过程相比，前者总培养时间_____，且不经_____过程，因而其遗传性状稳定，是大多数植物快速繁殖的常用方法。

(4) 与发芽培养基相比，配制转基因丛状苗生根培养基时，可根据实际情况适当添加_____，促进丛状苗基部细胞分裂形成愈伤组织并进一步分化形成_____，最终形成根。还可通过改变 MS 培养基促进生根，如_____ (A. 提高蔗糖浓度 B. 降低培养基浓度 C. 提高大量元素浓度 D. 不添加琼脂)。

(二)(1) 抗性基因

(2) 全能性表达充分 显微注射

(3) 短 脱分化

(4) 生长素 根的分生组织 B

【解析】

(二)(1) 设计重组质粒时，除了要含有可表达的目的基因，还需要有可表达的抗性基因（如抗生素抗性基因），在添加抗生素的培养基上，含重组质粒的宿主细胞能够生长，因而被筛选出来。

(2) 转基因实验要求宿主细胞性状优良、遗传稳定性较高、全能性（细胞发育成个体的潜能）较高及易被农杆菌侵染等特点。若植物材料对农杆菌不敏感，可采用显微注射的方法。

(3) 利用带侧芽的茎段获得丛状苗的过程，比利用茎段诱导产生愈伤组织获得丛状苗的过程时间更短，因为不需要经历脱分化的过程，而且遗传性状稳定。植物器官的分化需要一定的营养物质及适宜的激素配比，配制丛状苗生根培养基需根据实际情况添加生长素，促进基部细胞形成愈伤组织，并进一步分化形成根的分生组织，最终形成根。比较发芽培养基和生根培养基可知 MS 培养基的浓度下降，因此可降低培养基的浓度促进生根。故选 B。

19. (2020 年江苏省高考生物试卷) 新型冠状病毒可通过表面的刺突蛋白 (S 蛋白) 与人呼吸道粘膜上皮细胞的 ACE2 受体结合，侵入人体，引起肺炎。图 1 为病毒侵入后，人体内发生的部分免疫反应示意图。单克隆抗体可阻断病毒的粘附或入侵，故抗体药物的研发已成为治疗新冠肺炎的研究热点之一。图 2 为筛选、制备抗 S 蛋白单克隆抗体的示意图。请据图回答下列问题：

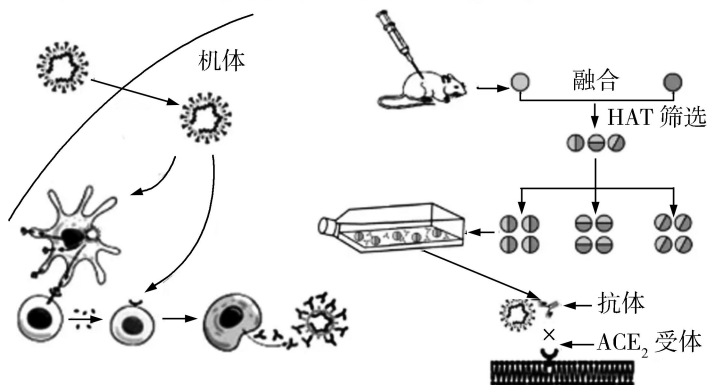


图 1

图 2

- (1) 图 1 中人体内抗原递呈细胞吞噬病毒，并将病毒的抗原暴露在细胞表面，被_____细胞表面的受体识别后激活该细胞。
- (2) B 细胞识别入侵的病毒后，在淋巴因子作用下，经过细胞的_____，形成_____细胞。
- (3) 为判断疑似患者是否为新型冠状病毒感染者，采集鼻咽拭子主要用于病原学检查，检测病毒的_____；采集血液样本主要用于血清学检查，检测_____。
- (4) 据图 2 所示，研制抗 S 蛋白单克隆抗体，需先注射_____免疫小鼠以激活小鼠的免疫细胞，再提取激活的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，用 HAT 培养基筛选获得_____细胞。因为同一种抗原可能激活_____细胞，还需继续筛选才能获得分泌单克隆抗体的细胞株。

【答案】(1) T

(2) 增殖、分化 浆细胞和记忆

(3) 核酸 抗新型冠状病毒抗体

(4) 刺突蛋白（或 S 蛋白） 杂交瘤 多种 B

【解析】

【分析】

本题以新冠病毒为载体考查体液免疫、核酸检测和单克隆抗体的有关知识。体液免疫包括三个阶段：(1) 感应阶段：除少数抗原可以直接刺激 B 细胞外，大多数抗原被吞噬细胞摄取和处理，并暴露出其抗原决定簇；吞噬细胞将抗原呈递给 T 细胞，再由 T 细胞呈递给 B 细胞；(2) 反应阶段：B 细胞接受抗原刺激后，开始进行一系列的增殖、分化，形成记忆细胞和浆细胞；(3) 效应阶段：浆细胞分泌抗体与相应的抗原特异性结合，发挥免疫效应。制备单克隆抗体的具体过程：1、用目的抗原免疫小鼠，使小鼠产生致敏 B 淋巴细胞；2、将准备好的同系骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞按一定比例混合，并加入促融合剂聚乙二醇。在聚乙二醇作用下，各种淋巴细胞可与骨髓瘤细胞发生融合，形成杂交瘤细胞；3、在 HAT 选择性培养基中，未融合的骨髓瘤细胞因缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶，不能利用补救途径合成 DNA 而死亡。 未

融合的淋巴细胞虽具有次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶，但其本身不能在体外长期存活也逐渐死亡。只有融合的杂交瘤细胞由于从脾细胞获得了次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶，并具有骨髓瘤细胞能无限增殖的特性，因此能在 HAT 培养基中存活和增殖；4、在 HAT 培养基中生长的杂交瘤细胞，只有少数是分泌预定特异性单克隆抗体的细胞，因此，必须进行筛选和克隆化。筛选出能产生所需单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞，并进行克隆扩增；5、单克隆抗体的大量制备 单克隆抗体的大量制备重要采用动物体内诱生法和体外培养法。

【详解】

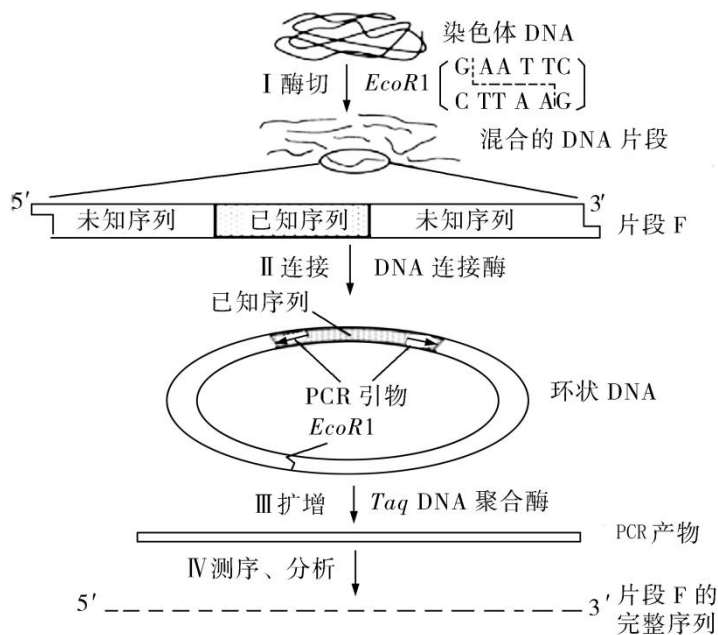
（1）据题图 1 可知，人体内抗原递呈细胞吞噬新冠病毒，并将新冠病毒的抗原暴露，呈递给 T 细胞，被 T 细胞表面的受体识别后激活 T 细胞；

（2）激活的 T 细胞释放淋巴因子，并将抗原呈递给 B 细胞，B 细胞识别入侵的病毒后，迅速增殖分化成浆细胞和记忆细胞；

（3）临床上为判断疑似患者是否为新型冠状病毒感染者，采集鼻咽拭子主要用于病原学检查，检测疑似患者的呼吸道是否有新冠病毒的核酸，采集血液样本主要用于血清学检查，检测血清中是否产生抗新型冠状病毒的抗体；

（4）据题中图 2 所示，结合单克隆抗体制备方法，要研制抗刺突蛋白单克隆抗体，需先注射新冠病毒的刺突蛋白（或 S 蛋白），以激活小鼠的免疫细胞，再提取激活的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，获得融合的、未融合的细胞，用 HAT 筛选培养基培养，未融合的 B 细胞不能长期生存而死亡，未融合的骨髓瘤细胞不能合成 DNA 而死亡，只有杂交瘤细胞能成活；由于同一种抗原可能激活多种 B 细胞，筛选出的融合的骨髓瘤细胞就可能分泌多种抗体，还需继续筛选才能获得分泌单克隆抗体的细胞。

20.（2020 年江苏省高考生物试卷）如果已知一小段 DNA 的序列，可采用 PCR 的方法，简捷地分析出已知序列两侧的序列，具体流程如下图（以 EcoRI 酶切为例）：



请据图回答问题：

- (1) 步骤 I 用的 *EcoR* I 是一种_____酶，它通过识别特定的_____切割特定位点。
- (2) 步骤 II 用的 DNA 连接酶催化相邻核苷酸之间的 3'-羟基与 5'-磷酸间形成_____；PCR 循环中，升温到 95℃ 是为了获得_____；TaqDNA 聚合酶的作用是催化_____。
- (3) 若下表所列为已知的 DNA 序列和设计的一些 PCR 引物，步骤 III 选用的 PCR 引物必须是_____（从引物①②③④中选择，填编号）。

	DNA 序列（虚线处省略了部分核苷酸序列）
已知序列	5'-AACTATGCGCTCATGA-----GCAATGCGTAGCCTCT-3' 3'-TTGATACGCGAGTACT-----CGTTACGCATCGGAGA-5'
PCR 引物	①5'- AACTATGCGCTCATGA-3' ②5'- GCAATGCGTAGCCTCT-3' ③5'- AGAGGCTACGCATTGC-3' ④5'- TCATGAGCGCATAGTT-3'

(4) 对 PCR 产物测序，经分析得到了片段 F 的完整序列。下列 DNA 单链序列中（虚线处省略了部分核苷酸序列），结果正确的是_____。

- A. 5'- AACTATGCG-----AGCCCTT-3'
- B. 5'- AATTCCATG-----CTGAATT-3'
- C. 5'- GCAATGCGT-----TCGGGAA-3'

D. 5'-TTGATACGO-----CGAGTAC-3'

【答案】(1) 限制性核酸内切 (或限制) 核苷酸序列

(2) 磷酸二酯键 DNA 单链 以 DNA 为模板的 DNA 链的延伸

(3) ②④

(4) B

【解析】

【分析】

采用 PCR 技术扩增 DNA 的过程为：变性、退火、延伸、终止，PCR 技术扩增目的基因的原理：DNA 双链复制，引物是一小段单链 DNA，引物 5'端的碱基可以与 DNA 两条链的 3'端的碱基进行碱基互补配对，可作为 DNA 复制的起始点，子链的延伸方向从 5'→3'。

【详解】

(1) EcoR I 是一种限制性核酸内切酶，它通过识别特定的核苷酸序列切割特定的位点。

(2) DNA 连接酶可催化相邻核苷酸之间的 3'-羟基和 5'-磷酸之间形成磷酸二酯键；PCR 循环中，升温到 95℃ 时，DNA 受热变性后解旋为单链；Taq DNA 聚合酶是一种耐高温的依赖于 DNA 模板的 DNA 聚合酶，能催化以 DNA 链为模板的 DNA 链的延伸。

(3) 引物是一小段单链 DNA，引物 5'端的碱基可以与 DNA 两条链的 3'端的碱基进行碱基互补配对，可作为 DNA 复制的起始点，子链的延伸方向从 5'→3'，据题图分析，结合已知序列可知，能与片段 F 左边配对的引物为④，与右边配对的引物为②，故步骤Ⅲ选用的 PCR 引物应当为②④。

(4) 对 PCR 产物测序，得到片段 F 的完整序列，因为片段 F 是被限制酶 EcoR I 剪切的末端，它识别的序列是 GAATTC，且在 G 与 A 之间切割，所以 5'端应该是 AATTC，3'端是 GAATT，故选 B。

【点睛】

本题主要考查 PCR 的过程和应用，意在强化考生对 PCR 技术的理解，要求考生能分析题图提取有效信息，从引物碱基序列、延伸方向等方面进行分析和解答，对考生的理解和分析能力提出了较高要求。

21. (2019 全国卷I·38)

基因工程中可以通过PCR技术扩增目的基因。回答下列问题。

(1) 基因工程中所用的目的基因可以人工合成，也可以从基因文库中获得。基因文库包括_____和_____。

(2) 生物体细胞内的DNA复制开始时，解开DNA双链的酶是_____。在体外利用PCR技术扩增目的基因时，使反应体系中的模板DNA解链为单链的条件是_____。上述两个解链过程的共同点是破坏了DNA双

链分子中的_____。

(3) 目前在 PCR 反应中使用 *Taq* 酶而不使用大肠杆菌 DNA 聚合酶的主要原因是_____。

【答案】(1) 基因组文库 cDNA 文库

(2) 解旋酶 加热至 90~95 °C 氢键

(3) *Taq* 酶热稳定性高，而大肠杆菌 DNA 聚合酶在高温下会失活

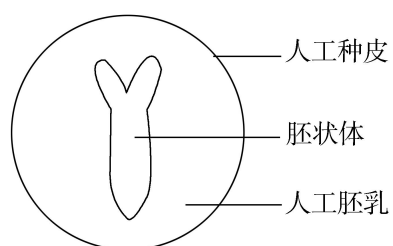
【解析】

(1) 基因文库包括基因组文库和部分基因文库（cDNA 文库），前者包括一种生物的全部基因，后者只包括一种生物的部分基因。

(2) 体内进行 DNA 复制时，需要解旋酶和 DNA 聚合酶，解旋酶可以打开双链之间的氢键，DNA 聚合酶可以催化磷酸二酯键的形成。在体外进行 PCR 扩增时，利用高温变性即加热至 90-95°C，破坏双链之间的氢键，使 DNA 成为单链。解旋酶和高温处理都破坏了 DNA 双链中碱基对之间的氢键。

(3) 由于在 PCR 过程中，需要不断的改变温度，该过程中涉及较高温度处理变性，大肠杆菌细胞内的 DNA 聚合酶在高温处理下会变性失活，因此 PCR 过程中需要用耐高温的 *Taq* DNA 聚合酶催化。

22. （2019 全国卷 II·38）植物组织培养技术在科学研究和生产实践中得到了广泛的应用。回答下列问题。



(1) 植物微型繁殖是植物繁殖的一种途径。与常规的种子繁殖方法相比，这种微型繁殖技术的特点有_____（答出2点即可）。

(2) 通过组织培养技术，可把植物组织细胞培养成胚状体，再通过人工种皮（人工薄膜）包装得到人工种子（如图所示），这种人工种子在适宜条件下可萌发生长。人工种皮具备透气性的作用是_____。人工胚乳能够为胚状体生长提供所需的物质，因此应含有植物激素、_____和_____等几类物质

(3) 用脱毒苗进行繁殖，可以减少作物感染病毒。为了获得脱毒苗，可以选取植物的_____进行组织培养。

(4) 植物组织培养技术可与基因工程技术相结合获得转基因植株。将含有目的基因的细胞培养成一个完整植株的基本程序是_____（用流程图表示）。

【答案】(1) 能保持植物原有的遗传特性，繁殖速度快

(2) 有利于胚状体进行呼吸作用 矿质元素 糖

(3) 茎尖

(4) 含目的基因的细胞 $\xrightarrow{\text{培养}}$ 愈伤组织 $\xrightarrow{\text{诱导分化}}$ 小植株

【解析】

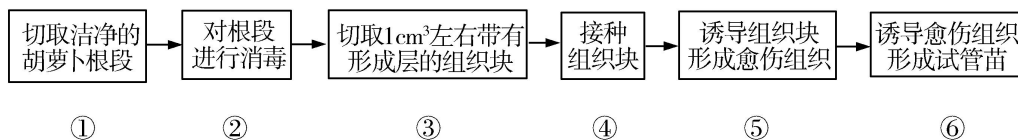
(1) 植物微型繁殖是指用于快速繁殖优良品种的植物组织培养技术，与常规的种子繁殖方法相比，这种微型繁殖技术的特点有：保持优良品种的遗传特性；高效快速地实现种苗的大量繁殖。

(2) 人工种子的胚状体在进行细胞呼吸时，需要从外界环境吸收 O_2 ，并将产生的 CO_2 释放到外界环境中，因此人工种皮具备透气性的作用是：有利于胚状体进行呼吸作用，以保持胚状体的活力。人工胚乳的作用是为胚状体的发育提供营养，因此应含有植物激素、矿质元素、糖等物质。

(3) 植物分生区附近（如茎尖）的病毒极少，甚至无病毒，因此为了获得脱毒苗，可以选取植物的茎尖进行组织培养。

(4) 将含有目的基因的植物细胞培养为一个完整的转基因植物，需借助植物组织培养技术才能实现，其基本程序是：含目的基因的细胞 $\xrightarrow{\text{培养}}$ 愈伤组织 $\xrightarrow{\text{诱导分化}}$ 小植株。

23. (2019 全国卷 III·38) 培养胡萝卜根组织可获得试管苗，获得试管苗的过程如图所示。



回答下列问题。

(1) 利用胡萝卜根段进行组织培养可以形成试管苗。用分化的植物细胞可以培养成完整的植株，这是因为植物细胞具有_____。

(2) 步骤③切取的组织块中要带有形成层，原因是_____。

(3) 从步骤⑤到步骤⑥需要更换新的培养基，其原因是_____。在新的培养基上愈伤组织通过细胞的_____过程，最终可形成试管苗。

(4) 步骤⑥要进行照光培养，其作用是_____。

(5) 经组织培养得到的植株，一般可保持原品种的_____，这种繁殖方式属于_____繁殖。

【答案】(1) 全能性（或答：形成完整植株所需的全部基因）

(2) 形成层容易诱导形成愈伤组织

(3) 诱导愈伤组织形成和诱导愈伤组织分化形成试管苗所需的生长素和细胞分裂素的比例不同 分化
(或答：再分化)

(4) 诱导叶绿素的形成，使试管苗能够进行光合作用

(5) 遗传特性 无性

【解析】

(1) 根据题意分析，用胡萝卜的组织细胞可以培育成完整的植株，其原理是植物细胞的全能性。

(2) 形成层细胞具有分裂能力，分化程度低，易形成愈伤组织，因此步骤③中切取胡萝卜块时强调要切取含有形成层的部分。

(3) 步骤⑤为脱分化过程，步骤⑥为再分化过程，由于营养物质的消耗以及两个过程需要激素的比例要求等有所不同，因此由步骤⑤到步骤⑥的过程需要更换新的培养基；愈伤组织形成试管苗的过程为再分化。

(4) 步骤⑥为再分化过程，需要进行光照，以利于叶绿素的合成。

(5) 植物组织培养技术属于无性繁殖，获得的后代可以保持亲本的优良性状。

24. (2019北京卷·31) 光合作用是地球上最重要的化学反应，发生在高等植物、藻类和光合细菌中。

(1) 地球上生命活动所需的能量主要来源于光反应吸收的_____，在碳(暗)反应中，RuBP羧化酶(R酶)催化CO₂与RuBP(C₅)结合，生成2分子C₃，影响该反应的外部因素，除光照条件外还包括_____ (写出两个)；内部因素包括_____ (写出两个)。

(2) R酶由8个大亚基蛋白(L)和8个小亚基蛋白(S)组成。高等植物细胞中L由叶绿体基因编码并在叶绿体中合成，S由细胞核基因编码并在_____中由核糖体合成后进入叶绿体，在叶绿体的_____中与L组装成有功能的酶。

(3) 研究发现，原核生物蓝藻(蓝细菌)R酶的活性高于高等植物，有人设想通过基因工程技术将蓝藻R酶的S、L基因转入高等植物，以提高后者的光合作用效率。研究人员将蓝藻S、L基因转入某高等植物(甲)的叶绿体DNA中，同时去除甲的L基因。转基因植株能够存活并生长。检测结果表明，转基因植株中的R酶活性高于未转基因的正常植株。

①由上述实验能否得出“转基因植株中有活性的R酶是由蓝藻的S、L组装而成”的推测？请说明理由。

②基于上述实验，下列叙述中能够体现生物统一性的选项包括_____。

- a. 蓝藻与甲都以DNA作为遗传物质
- b. 蓝藻与甲都以R酶催化CO₂的固定
- c. 蓝藻R酶大亚基蛋白可在甲的叶绿体中合成
- d. 在蓝藻与甲的叶肉细胞中R酶组装的位置不同

【答案】(1) 光能 温度、CO₂浓度 R酶活性、R酶含量、C₅含量、pH (其中两个)

(2) 细胞质 基质

(3) ①不能，转入蓝藻 S、L 基因的同时没有去除甲的 S 基因，无法排除转基因植株 R 酶中的 S 是甲的 S 基因的表达产物的可能性。

②a、b、c

【解析】

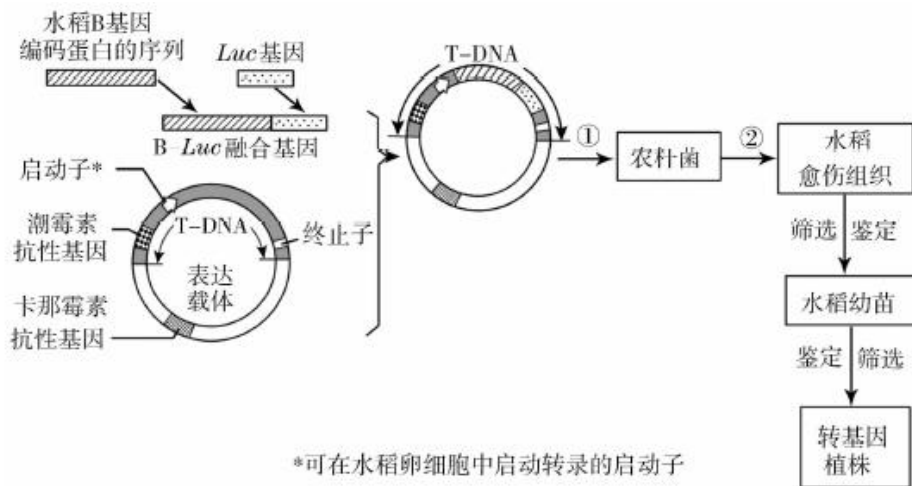
(1) 地球上生物生命活动所需的能量来自有机物，有机物主要来自植物的光合作用，光合作用合成有机物需要光反应吸收光能，转化为 ATP 的化学能，然后 ATP 为暗反应中 C_3 的还原提供能量，合成糖类。在暗反应中，RuBP 羧化酶(R 酶)催化 CO_2 与 RuBP (C_5) 结合，生成 2 分子 C_3 ，这是光合作用的暗反应的二氧化碳的固定。暗反应的进行需要相关酶的催化，二氧化碳做原料，需要光反应提供[H]和 ATP，光反应需要色素、酶、水、光照等，故影响该反应的外部因素有光照、温度、 CO_2 浓度、水、无机盐等；内部因素包括色素含量及种类、酶的含量及活性等。

(2) 高等植物细胞中 L 由叶绿体基因编码并在叶绿体中合成，S 由细胞核基因通过转录成 mRNA，mRNA 进入细胞质基质，与核糖体结合，合成为 S 蛋白；因 R 酶是催化 CO_2 与 C_5 结合的，在叶绿体基质中进行，故 S 蛋白要进入叶绿体，在叶绿体的基质中与 L 组装成有功能的酶。

(3) ①据题设条件可知，将蓝藻 S、L 基因转入某高等植物(甲)的叶绿体 DNA 中，只去除甲的 L 基因，没有去除甲的 S 基因。因此，转基因植株仍包含甲植株的 S 基因，不能排除转基因植株中 R 酶是由蓝藻的 L 蛋白和甲的 S 蛋白共同组成。故由上述实验不能得出“转基因植株中有活性的 R 酶是由蓝藻的 S、L 组装而成”的推测。

②根据上述实验，可以看出蓝藻的基因能导入到甲的 DNA 中，说明蓝藻和甲植株都以 DNA 为遗传物质；蓝藻中 R 酶的活性高于高等植物，说明两者都以 R 酶催化 CO_2 的固定；由于蓝藻 S、L 基因均转入甲的叶绿体 DNA 中，且去除了甲的 L 基因，结果转基因植株合成了 R 酶，说明蓝藻 R 酶大亚基蛋白 L 在甲的叶绿体中合成，以上体现了生物界的统一性。在蓝藻中 R 酶组装是在细胞质基质，甲的叶肉细胞组装 R 酶是在叶绿体基质，则说明了不同生物之间具有差异性。因此，选 abc。

25. (2019 天津卷·9) B 基因存在于水稻基因组中，其仅在体细胞(2n)和精子中正常表达，但在卵细胞中不转录。为研究 B 基因表达对卵细胞的影响，设计了如下实验。



据图回答：

(1) B 基因在水稻卵细胞中不转录，推测其可能的原因是卵细胞中_____ (单选)。

- A. 含 B 基因的染色体缺失
- B. DNA 聚合酶失活
- C. B 基因发生基因突变
- D. B 基因的启动子无法启动转录

(2) 从水稻体细胞或_____中提取总 RNA，构建_____文库，进而获得 B 基因编码蛋白的序列。将该序列与 Luc 基因（表达的荧光素酶能催化荧光素产生荧光）连接成融合基因（表达的蛋白质能保留两种蛋白质各自的功能），然后构建重组表达载体。

(3) 在过程①、②转化筛选时，过程_____中 T-DNA 整合到受体细胞染色体 DNA 上，过程_____在培养基中应加入卡那霉素。

(4) 获得转基因植株过程中，以下鉴定筛选方式正确的是_____ (多选)。

- A. 将随机断裂的 B 基因片段制备成探针进行 DNA 分子杂交
- B. 以 Luc 基因为模板设计探针进行 DNA 分子杂交
- C. 以 B 基因编码蛋白的序列为模板设计探针与从卵细胞提取的 mRNA 杂交
- D. 检测加入荧光素的卵细胞中是否发出荧光

(5) 从转基因植株未成熟种子中分离出胚，观察到细胞内仅含一个染色体组，判定该胚是由未受精的卵细胞发育形成的，而一般情况下水稻卵细胞在未受精时不进行发育，由此表明_____。

【答案】 (1) D

(2) 精子 cDNA

(3) ② ①

(4) BCD

(5) B 基因表达能使卵细胞不经受精直接发育成胚

【解析】

(1) 通过题干信息可知，B 基因可以在体细胞和精子中，说明含 B 基因的染色体未缺失，也没有发生基因突变，AC 错误；基因表达过程中的转录需要 RNA 聚合酶，不是 DNA 聚合酶，B 错误；B 基因在卵细胞中不能转录，可能是 B 基因的启动子在卵细胞中不能启动转录，D 正确；故选 D。

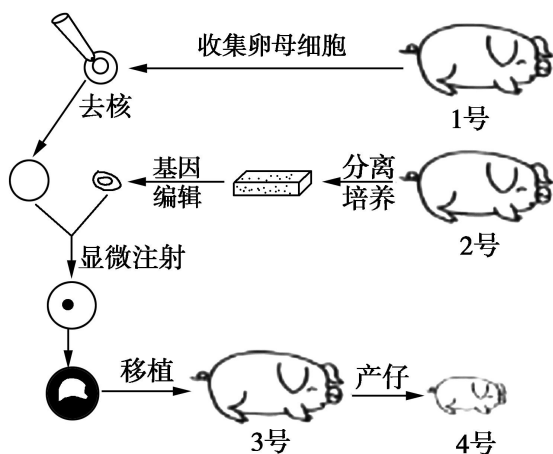
(2) 通过题干信息可知，水稻的体细胞和精子中 B 基因可表达，故可从水稻的体细胞和精子中提取 RNA。通过逆转录产生 DNA，从而构建 cDNA 文库，进而获得 B 基因编码蛋白的序列。

(3) 图示中过程①表示筛选含有目的基因的重组质粒的农杆菌，图示中质粒有抗卡那霉素标记基因和抗潮霉素标记基因，如果选择培养基中加入的是卡那霉素，起作用的是抗卡那霉素标记基因。过程②表示将筛选出含有重组质粒的农杆菌，将其 T-DNA 整合到水稻细胞染色体 DNA 上。

(4) 获得转基因植株，鉴定筛选方式有：①DNA 分子杂交技术，即以 Luc 基因为模板设计探针进行 DNA 分子杂交，故 A 错误；B 正确；②用标记的目的基因作探针与 mRNA 杂交，即以 B 基因编码蛋白的序列为模板设计探针与从卵细胞提取的 mRNA 杂交，C 正确；③检测目的基因是否翻译成蛋白质，通过 (2) 可知 B 基因与 Luc 基因连接形成 B-Luc 融合基因，即可通过 Luc 基因表达，检测加入荧光素的卵细胞中是否发出荧光，D 正确；故选 BCD。

(5) 当从转基因植株未成熟种子中分离出胚，观察到细胞内仅含有一个染色体组，推断该胚是由未受精的卵细胞发育形成的，而一般情况下水稻卵细胞在未受精时不进行发育，由此表明 B 基因表达能使卵细胞不经受精作用直接发育成胚。

26. (2019江苏卷·29) 利用基因编辑技术将病毒外壳蛋白基因导入猪细胞中，然后通过核移植技术培育基因编辑猪，可用于生产基因工程疫苗。下图为基因编辑猪培育流程，请回答下列问题：



(1) 对1号猪使用_____处理，使其超数排卵，收集并选取处在_____时期的卵母细胞用于核移植。

(2) 采集2号猪的组织块, 用_____处理获得分散的成纤维细胞, 放置于37℃的CO₂培养箱中培养, 其中CO₂的作用是_____。

(3) 为获得更多基因编辑猪, 可在胚胎移植前对胚胎进行_____。产出的基因编辑猪的性染色体来自于_____号猪。

(4) 为检测病毒外壳蛋白基因是否被导入4号猪并正常表达, 可采用的方法有_____ (填序号)。

①DNA测序 ②染色体倍性分析

③体细胞结构分析 ④抗原—抗体杂交

【答案】(1) 促性腺激素 减数第二次分裂中期

(2) 胰蛋白酶 (胶原蛋白酶) 维持培养液的pH

(3) 分割 2

(4) ①④

【解析】

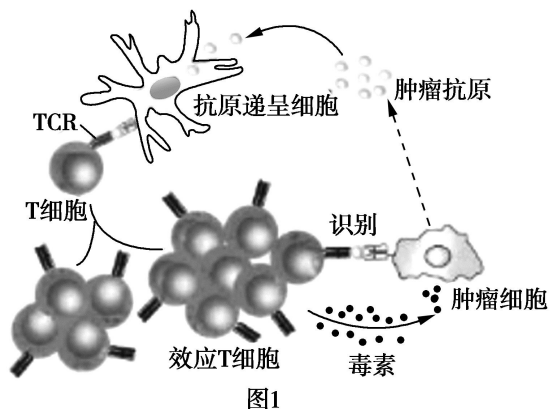
(1) 据图分析可知, 1号猪提供的是卵母细胞, 对其注射促性腺激素可使其超数排卵, 获得的卵母细胞需要培养到减数第二次分裂中期才能进行核移植。

(2) 将2号猪的组织块分散成单个的成纤维细胞需要用胰蛋白酶或胶原蛋白酶处理, 该细胞的培养应在37℃含5%的CO₂的恒温培养箱中进行, 其中CO₂的主要作用是维持培养液的pH。

(3) 利用胚胎分割技术对图示早期胚胎进行分割, 可以获得更多的基因编辑猪; 据图分析可知, 核移植的细胞核来自于2号猪, 因此产出的基因编辑猪的性染色体来自于2号猪。

(4) 检测病毒外壳蛋白基因 (目的基因) 是否导入4号猪, 可以采用DNA分子杂交法检测目的基因的序列; 目的基因表达的最终产物是蛋白质 (病毒外壳蛋白), 可以利用抗原-抗体杂交法进行检测, 故选①④。

27. (2019江苏卷·31) (8分) 图1为T细胞通过表面受体 (TCR) 识别抗原递呈细胞呈递的肿瘤抗原后被激活, 进而攻击肿瘤细胞的示意图。图2为肿瘤细胞的一种免疫逃逸机制示意图。肿瘤细胞大量表达PD-L1, 与T细胞表面的PD-1结合, 抑制T细胞活化, 逃避T细胞的攻击。请回答下列问题:



- (1) 图1中抗原递呈细胞通过_____方式摄取肿瘤抗原。
- (2) 图1中T细胞识别肿瘤抗原后被激活，增殖并_____形成效应T细胞群和_____细胞群。
- (3) 图1中效应T细胞通过TCR只能识别带有同样抗原的肿瘤细胞，故发挥的免疫作用具有_____性，效应T细胞分泌毒素，使肿瘤细胞_____死亡。
- (4) 为阻断图2中肿瘤细胞的免疫逃逸通路，利用单克隆抗体制备技术，制备了抗PD-L1抗体。该抗体注入体内后通过_____传送与_____结合，可解除T细胞的活化抑制。

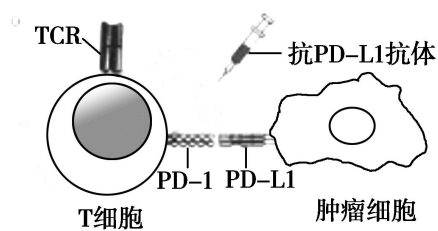


图2

- (5) 为应用于肿瘤的临床免疫治疗，需对该抗体进行人源化改造，除抗原结合区域外，其他部分都替换为人抗体区段，目的是_____。

【答案】(1) 胞吞

(2) 分化 记忆

(3) 特异 裂解

(4) 体液 肿瘤细胞表面的 PD-L1

(5) 降低免疫排斥

【解析】

(1) 抗原属于大分子物质，抗原呈递细胞通过胞吞摄取肿瘤抗原，处理后呈递给 T 细胞，引起 T 细胞的增殖分化。

(2) 图 1 中，T 细胞表面的 TCR 识别肿瘤抗原后，可以增殖分化出记忆 T 细胞和效应 T 细胞。其中的效应 T 细胞会攻击肿瘤细胞，引起其裂解死亡。

(3) 效应 T 细胞通过 TCR 特异性识别携带同种肿瘤抗原的肿瘤细胞，该过程具有特异性。由图可知，效应 T 细胞可以分泌毒素，引起肿瘤细胞的裂解死亡。

(4) 由图 2 可知，肿瘤细胞表面的 PD-L1 通过与 T 细胞表面的 PD-1 蛋白特异性结合，抑制 T 细胞增殖分化，从而逃避免疫系统的攻击，故可以通过注射抗 PD-L1 抗体阻断肿瘤细胞的逃逸通路。抗 PD-L1 抗体进入人体后，通过体液运输与肿瘤细胞表面的 PD-1 蛋白结合，从而解除 T 细胞的活化抑制。

(5) 由于单克隆抗体是利用鼠的骨髓瘤细胞与浆细胞融合的杂交瘤细胞分泌产生，对人来说是异物，为了降低免疫排斥，需要对单克隆抗体进行改造，出抗原结合区域外，其他部分都替换成人抗体区段。

28. (2019 江苏卷·33) (8 分) 图 1 是某基因工程中构建重组质粒的过程示意图, 载体质粒 P0 具有四环素抗性基因 (tet^r) 和氨苄青霉素抗性基因 (amp^r)。请回答下列问题:

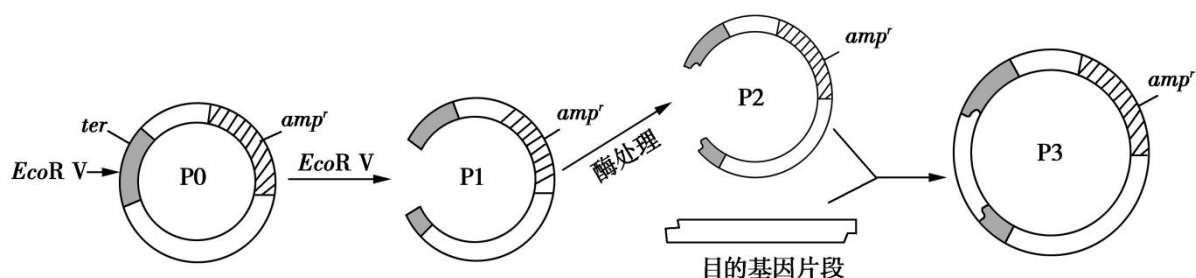


图1

...GAT↓ATC...

(1) $EcoRV$ 酶切位点为 ...CTA↑TAG..., $EcoRV$ 酶切出来的线性载体 P1 为_____末端。

(2) 用 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增获得的目的基因片段, 其两端各自带有一个腺嘌呤脱氧核苷酸。载体 P1 用酶处理, 在两端各添加了一个碱基为_____的脱氧核苷酸, 形成 P2; P2 和目的基因片段在_____酶作用下, 形成重组质粒 P3。

(3) 为筛选出含有重组质粒 P3 的菌落, 采用含有不同抗生素的平板进行筛选, 得到 A、B、C 三类菌落, 其生长情况如下表 (“+”代表生长, “-”代表不生长)。根据表中结果判断, 应选择的菌落是_____ (填表中字母) 类, 另外两类菌落质粒导入情况分别是_____、_____。

菌落类型\平板类型	A	B	C
无抗生素	+	+	+
氨苄青霉素	+	+	-
四环素	+	-	-
氨苄青霉素+四环素	+	-	-

(4) 为鉴定筛选出的菌落中是否含有正确插入目的基因的重组质粒, 拟设计引物进行 PCR 鉴定。图 2 所示为甲、乙、丙 3 条引物在正确重组质粒中的相应位置, PCR 鉴定时应选择的一对引物是_____。某学生尝试用图中另外一对引物从某一菌落的质粒中扩增出了 400 bp 片段, 原因是_____。

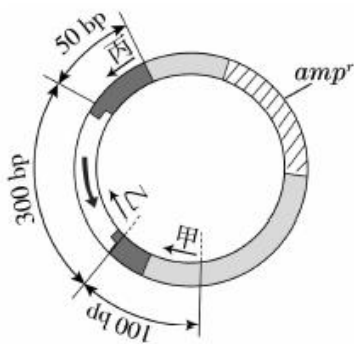


图 2

【答案】（1）平

（2）胸腺嘧啶（T） DNA 连接

（3）B A 类菌落含有 P0 C 类菌落未转入质粒

（4）乙丙 目的基因反向连接

【解析】

（1）根据题意分析，EcoRV 酶识别的序列是-GATATC-，并且两条链都在中间的 T 与 A 之间进行切割，因此其切出来的线性载体 P1 为平末端。

（2）据图分析，目的基因两侧为粘性末端，且漏出的碱基为 A，则在载体 P1 的两端需要加一个碱基 T 形成具有粘性末端的载体 P2，再用 DNA 连接酶将 P2 与目的基因连接起来形成重组质粒 P3。

（3）根据以上分析已知，限制酶切割后破坏了四环素抗性基因，但是没有破坏氨苄青霉素抗性基因，因此含有重组质粒 P3 的菌落在四环素中应该不能生长，而在氨苄青霉素的培养基中能生长，结合表格分析可知，应该选择 B 类菌落。根据表格分析，A 类菌落在氨苄青霉素和四环素的培养基中都能够生长，说明其导入的是 P0；C 类菌落在任何抗生素的培养基中都不能生长，说明其没有导入任何质粒。

（4）据图分析，根据目的基因插入的位置和 PCR 技术的原理分析，PCR 鉴定时应该选择的一对引物是乙和丙；根据题意和图形分析，某同学用图中的另外一对引物（甲、乙）从某一菌落的质粒中扩增出了 400bp 的片段，说明其目的基因发生了反向连接。

29.（2019 浙江 4 月选考·32）回答下列（二）小题：

回答与利用生物技术培育抗病品种有关的问题：

（1）通过抗病性强的植株获取抗病目的基因有多种方法。现已获得纯度高的抗病蛋白（可作为抗原），可通过_____技术获得特异性探针，并将_____中所有基因进行表达，然后利用该探针，找出能与探针特异性结合的表达产物，进而获得与之对应的目的基因。

（2）将上述抗病基因通过转基因的方法导入植物的分生组织可获得抗病性强的植株。若在试管苗期间用分子水平方法判断抗病基因是否表达，应检测_____（A. 质粒载体 B. 转录产物 C. 抗性基因 D. 病原

微生物)。

(3) 植物细胞在培养过程中往往会发生_____, 可利用这一特性筛选抗致病真菌能力强的细胞。筛选时在培养基中加入_____, 并将存活的细胞进一步培养至再生植株。若利用_____培养建立的细胞系用于筛选, 则可快速获得稳定遗传的抗病植株。

(4) 用抗病品种与高产品种进行杂交育种过程中, 有时会遇到因胚发育中止而得不到可育种子的情况。若要使该胚继续发育获得植株, 可采用的方法是_____。

【答案】(1) 单克隆抗体 基因文库

(2) B

(3) 变异 高浓度致病真菌 花粉离体

(4) 胚的离体培养

【解析】

(1) 抗病蛋白可作抗原, 则特异性探针应为抗体, 则需要通过单克隆抗体技术获得特异性探针; 基因文库包含了某个 DNA 分子的所有基因, 故是将基因文库中的所有基因进行表达, 再利用探针获得目的基因;

(2) 质粒载体只能检测目的基因是否转入受体细胞, A 选项错误; 转录产物为 RNA, 可以通过 DNA-RNA 分子杂交检测抗病基因是否表达, B 选项正确; 检测抗性基因只能检测抗性基因是否导入受体细胞, 无法检测该基因是否表达, C 选项错误; 检测病原微生物是个体水平检测目的基因是否表达的方式, D 选项错误; 故正确的选项选择 B;

(3) 抗致病真菌基因是原本植物细胞不含的基因, 则需要利用植物细胞在培养过程中的变异来筛选抗致病真菌能力强的细胞; 由于需要筛选抗致病真菌能力强的细胞, 故需要在培养基中加入高浓度致病真菌; 快速稳定遗传的抗病植株需要通过单倍体培养获得, 故需要利用花粉离体培养建立细胞系用于筛选;

(4) 要利用胚的发育获得植株, 可利用胚细胞的全能性, 采用胚的离体培养获得植株。

30. (2018 全国I卷·38) 回答下列问题:

(1) 博耶 (H. Boyer) 和科恩 (S. Cohen) 将非洲爪蟾核糖体蛋白基因与质粒重组后导入大肠杆菌细胞中进行了表达, 该研究除证明了质粒可以作为载体外, 还证明了_____ (答出两点即可)。

(2) 体外重组的质粒可通过 Ca^{2+} 参与的_____方法导入大肠杆菌细胞; 而体外重组的噬菌体 DNA 通常需与_____组装成完整噬菌体后, 才能通过侵染的方法将重组的噬菌体 DNA 导入宿主细胞, 在细菌、心肌细胞、叶肉细胞中, 可作为重组噬菌体宿主细胞的是_____。

(3) 真核生物基因 (目的基因) 在大肠杆菌细胞内表达时, 表达出的蛋白质可能会被降解。为防止蛋白质被降解, 在实验中应选用_____的大肠杆菌作为受体细胞, 在蛋白质纯化的过程中应添

加_____的抑制剂。

【答案】(1) 体外重组的质粒可以进入体细胞；真核生物基因可在原核细胞中表达

(2) 转化 外壳蛋白（噬菌体蛋白） 细菌

(3) 蛋白酶缺陷型 蛋白酶

【解析】(1) 将非洲爪蟾核糖体蛋白基因与质粒重组后导入大肠杆菌细胞中进行了表达，该过程证明了体外重组的质粒可以进入体细胞，真核生物基因可在原核细胞中表达等。

(2) 体外重组的质粒可通过 Ca^{2+} 处理，目的是以增大细胞的通透性，使重组的质粒能够导入到受体细胞内，因此体外重组的质粒可通过 Ca^{2+} 参与的转化方法导入大肠杆菌细胞。体外重组的噬菌体 DNA 通常需与蛋白质外壳组装成完整的噬菌体后，才能通过侵染的方法将重组噬菌体 DNA 导入受体细胞，噬菌体侵染的是细菌，而不能寄生在其它细胞中，因此可作为重组噬菌体宿主细胞的是细菌。

(3) 真核生物基因（目的基因）在大肠杆菌细胞内表达时，表达出的蛋白质可能会被降解，为防止蛋白质被降解，可以选用不能产生该蛋白酶的缺陷细菌以及使用能够抑制蛋白酶活性的药物，因此为防止蛋白质被降解，在实验中应选用蛋白酶缺陷型的大肠杆菌作为受体细胞，在蛋白质纯化的过程中应添加蛋白酶的抑制剂。

31. (2018 全国 II 卷·38) 某种荧光蛋白 (GFP) 在紫外光或蓝光激发下会发出绿色荧光，这一特性可用于检测细胞中目的基因的表达。某科研团队将某种病毒的外壳蛋白 (L1) 基因连接在 GFP 基因的 5' 末端，获得了 L1-GFP 融合基因 (简称为甲)，并将其插入质粒 P0，构建了真核表达载体 P1，其部分结构和酶切位点的示意图如下，图中 E1~E4 四种限制酶产生的黏性末端各不相同。



回答下列问题：

(1) 据图推断，该团队在将甲插入质粒 P0 时，使用了两种限制酶，这两种酶是_____。使用这两种酶进行酶切是为了保证_____，也是为了保证_____。

(2) 将 P1 转入体外培养的牛皮肤细胞后，若在该细胞中观察到了绿色荧光，则说明 L1 基因在牛的皮肤细胞中完成了_____和_____过程。

(3) 为了获得含有甲的牛，该团队需要做的工作包括：将能够产生绿色荧光细胞的_____移入牛的_____中、体外培养、胚胎移植等。

(4) 为了检测甲是否存在于克隆牛的不同组织细胞中，某同学用 PCR 方法进行鉴定。在鉴定时应分别以该牛不同组织细胞中的_____（填“mRNA”“总 RNA”或“核 DNA”）作为 PCR 模板。

【答案】(1) E1 和 E4 甲的完整 甲与载体正确连接

(2) 转录 翻译

(3) 细胞核 去核卵母细胞

(4) 核 DNA

【解析】(1) 要保证目的基因在受体细胞中能够正确表达，目的基因的首端应有启动子，尾端应有终止子。甲是将某种病毒的外壳蛋白(L1)基因连接在 GFP 基因的 5'末端而获得的 L1-GFP 融合基因，据此结合题意并分析图示可知：该团队在将甲插入质粒 P0 时，如果用 E2 或 E3，则目的基因不完整，而使用 E1 和 E4 这两种限制酶进行酶切保证了甲的完整，而且也保证了甲与载体正确连接，因此，使用的两种限制酶，是 E1 和 E4。

(2) 构建的真核表达载体 P1 中含有 GFP 基因，而 GFP 基因的表达产物“某种荧光蛋白(GFP)”在紫外光或蓝光激发下会发出绿色荧光。若在导入 P1 的牛皮肤细胞中观察到了绿色荧光，则说明 L1 基因在牛的皮肤细胞中完成了表达，基因的表达过程包括转录和翻译。

(3) 若要获得含有甲的牛，可采用核移植技术，即将能够产生绿色荧光细胞的细胞核移入牛的去核卵母细胞中获得重组细胞，并将该重组细胞在体外培养成重组胚胎，再经过胚胎移植等获得含有甲的牛。

(4) PCR 是多聚酶链式反应的缩写，是一种在生物体外复制特定 DNA 片段的核酸合成技术。若利用 PCR 方法检测甲是否存在于克隆牛的不同组织细胞中，则应分别以该牛不同组织细胞中的核 DNA 作为 PCR 模板。

32. (2018 全国III卷·38) 2018 年《细胞》期刊报道，中国科学家率先成功地应用体细胞对非人灵长类动物进行克隆，获得两只克隆猴——“中中”和“华华”。回答下列问题：

(1) “中中”和“华华”的获得涉及核移植过程，核移植是指_____。通过核移植方法获得的克隆猴，与核供体相比，克隆猴体细胞的染色体数目_____ (填“减半”“加倍”或“不变”)

(2) 哺乳动物的核移植可以分为胚胎细胞核移植和体细胞核移植，胚胎细胞核移植获得克隆动物的难度_____ (填“大于”或“小于”) 体细胞核移植，其原因是_____。

(3) 在哺乳动物核移植的过程中，若分别以雌性个体和雄性个体的体细胞作为核供体，通常，所得到的两个克隆动物体细胞的常染色体数目_____ (填“相同”或“不相同”)，性染色体组合_____ (填“相同”或“不相同”)。

【答案】(1) 将动物的一个细胞核，移入一个已去掉细胞核的卵母细胞 不变

(2) 小于 胚胎细胞分化程度低，恢复全能性相对容易

(3) 相同 不同

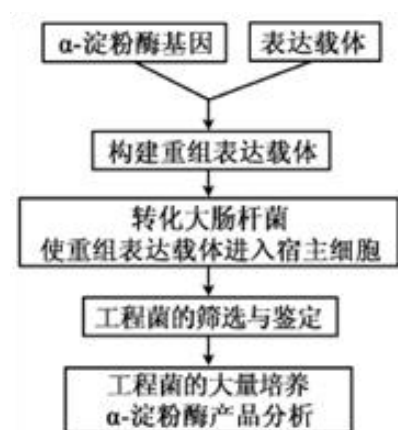
【解析】(1) 核移植是指将动物的一个细胞的细胞核，移入一个已经去掉细胞核的卵母细胞中，使其重组

并发育成一个新的胚胎，这个胚胎最后发育成为动物个体；通过核移植方法获得的克隆猴的细胞核来自供体，因此克隆猴体细胞的染色体数目和供体一致。

(2) 胚胎细胞核移植的难度小于体细胞核移植，其原因是动物胚胎细胞分化程度低，恢复其全能性相对容易。

(3) 哺乳动物雌性个体和雄性个体的体细胞染色体常染色体相同，性染色体前者是 XX，后者是 XY，因此分别以雌性个体和雄性个体的体细胞作为核供体，通常所得到的两个克隆动物体细胞的常染色体数目相同，性染色体组合不同。

33. (2018 江苏卷·32) 为生产具有特定性能的 α -淀粉酶，研究人员从某种海洋细菌中克隆了 α -淀粉酶基因(1656 个碱基对)，利用基因工程大量制备 α -淀粉酶，实验流程见下图。请回答下列问题：



(1) 利用 PCR 技术扩增 α -淀粉酶基因前，需先获得细菌的_____。

(2) 为了便于扩增的 DNA 片段与表达载体连接，需在引物的_____端加上限制性酶切位点，且常在两条引物上设计加入不同的限制性酶切位点，主要目的是_____。

(3) 进行扩增时，反应的温度和时间需根据具体情况进行设定，下列选项中_____的设定与引物有关，_____的设定与扩增片段的长度有关。(填序号)

- | | |
|-------|-------|
| ①变性温度 | ②退火温度 |
| ③延伸温度 | ④变性时间 |
| ⑤退火时间 | ⑥延伸时间 |

(4) 下图表示筛选获得的工程菌中编码 α -淀粉酶的 mRNA 的部分碱基序列：

5'-AUGCCAUCAACAAAUACUAACACUU·····-3'

图中虚线框内 mRNA 片段包含_____个密码子，如虚线框后的序列未知，预测虚线框后的第一个密码子最多有_____种。

(5) 获得工程菌表达的 α -淀粉酶后，为探究影响酶活性的因素，以浓度为 1%的可溶性淀粉为底物测定酶活性，结果如下：

缓冲液	50mmol/LNa ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄				50mmol/LTris-HCl				50mmol/LGly-NaOH			
pH	6.0	6.5	7.0	7.5	7.5	8.0	8.5	9.0	9.0	9.5	10.0	10.5
酶相对活性%	25.4	40.2	49.8	63.2	70.1	95.5	99.5	85.3	68.1	63.7	41.5	20.8

根据上述实验结果，初步判断该 α -淀粉酶活性最高的条件为_____。

【答案】(1) 基因组 DNA

(2) 5' 使 DNA 片段能定向插入表达载体，减少自连

(3) ② ⑥

(4) 8 13

(5) pH 为 8.5，缓冲液为 50mmol/LTris-HCl

【解析】(1) α -淀粉酶基因来自于海洋细菌，因此为了利用 PCR 技术扩增 α -淀粉酶基因，必须先获得细菌的基因组 DNA。

(2) 目的基因与运载体结合前需要用限制酶对两者进行切割，延伸是在引物的 3'端延伸，为了保证目的基因的完整性，因此需在引物的 5'端加上限制性酶切位点，且为了使 DNA 片段能定向插入表达载体，减少自连，常在两条引物上设计加入不同的限制性酶切位点。

(3) 进行扩增时，退火温度的设定与引物有关，延伸时间的设定与扩增片段的长度有关。

(4) 根据题意分析，虚线框内 mRNA 片段内含有 24 个碱基，每 3 个碱基构成一个密码子，因此包含 $24 \div 3 = 8$ 个密码子；构成 mRNA 的碱基有 4 种，若虚线框后的序列未知，预测虚线框后的第一个密码子最多有 $4 \times 4 \times 3 = 13$ 种。

(5) 根据表格数据分析可知，在 pH 为 8.5，缓冲液为 50 mmol/LTris-HCl 的条件下， α -淀粉酶相对活性为 99.5%，活性最高。

34. (2018 海南·31) 甜蛋白是一种高甜度的特殊蛋白质。为了改善黄瓜的品质，科学家采用农杆菌转化法将一种甜蛋白基因成功导入黄瓜细胞，得到了转基因植株。回答下列问题：

(1) 用农杆菌感染时，应优先选用黄瓜_____ (填“受伤的”或“完好的”) 叶片与含重组质粒的农杆菌共培养，选用这种叶片的理由是_____。

(2) 若在转基因黄瓜中检测到这种甜蛋白，则表明该重组质粒中_____ 已转移到植物细胞中且能够表达；用该转基因黄瓜的某一植株与一株非转基因植株杂交，发现子代中含甜蛋白个体数与不

含甜蛋白个体数之比为 1: 1, 则说明甜蛋白基因已经整合到_____ (填“核基因组”“线粒体基因组”或“叶绿体基因组”) 中。

(3) 假设某种转基因作物因为受到病毒感染而减产, 若要以该转基因作物为材料获得脱毒苗, 应选用_____作为外植体进行组织培养。

(4) 通常, 基因工程操作主要有 4 个步骤, 即目的基因获取、重组表达载体的构建、将目的基因导入受体细胞、目的基因的检测与鉴定。因此, 基因工程的含义可概括为_____。

【答案】(1) 受伤的 叶片伤口处的细胞释放出大量酚类物质, 可吸引农杆菌移向这些细胞

(2) 甜蛋白基因 核基因组

(3) 茎尖

(4) 按照人们的愿望进行设计, 并通过体外重组和转基因等技术, 赋予生物新的遗传特性, 创造出符合人们需要的新生物类型

【解析】(1) 用农杆菌感染时, 应优先选用黄瓜受伤的叶片与含重组质粒的农杆菌共培养, 理由是叶片伤口处的细胞释放出大量酚类物质, 可吸引农杆菌移向这些细胞。

(2) 若在转基因黄瓜中检测到这种甜蛋白, 则表明该重组质粒中甜蛋白基因已转移到植物细胞中且能够表达; 用该转基因黄瓜的某一植株与一株非转基因植株杂交, 发现子代中含甜蛋白个体数与不含甜蛋白个体数之比为 1: 1, 则说明甜蛋白基因已经整合到核基因组中。

(3) 假设某种转基因作物因为受到病毒感染而减产, 若要以该转基因作物为材料获得脱毒苗, 应选用茎尖作为外植体进行组织培养。

(4) 通常, 基因工程操作主要有 4 个步骤, 即目的基因获取、重组表达载体的构建、将目的基因导入受体细胞、目的基因的检测与鉴定。因此, 基因工程的含义可概括为按照人们的愿望进行设计, 并通过体外重组和转基因等技术, 赋予生物新的遗传特性, 创造出符合人们需要的新生物类型。

