

专题十一 生物技术与工程

考点 35 发酵工程

1. C 【必刷知识】培养基的成分及功能

【解析】从培养基组成来看,该培养基属于合成培养基,因其不含凝固剂,属于液体培养基,A 错误;该培养基的 pH 为 7.2,呈弱碱性,适于细菌的培养,霉菌培养需将 pH 调至酸性,B 错误;去掉 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后,培养基成分缺乏氮源,只有固氮微生物能生长,故可用于固氮微生物的选择培养,C 正确;微量元素在生物体内的含量少,但作用很重要,是生物体必不可少的成分,培养基中必须添加,D 错误。

2. B 【必刷知识】培养基的组成成分及其配制

【解析】由题意可知,培养黑曲霉需要添加有机碳源且需要通气振荡,因此该菌的代谢类型为异养需氧型,A 正确;调节 pH 应该在灭菌之前进行,B 错误;豆粉饼中含有蛋白质、糖类等,可提供黑曲霉生长所需的碳源和氮源,C 正确;工业化生产时,发酵罐体积大,需要大量的微生物,因此黑曲霉接种前一般要进行扩大化培养,增加菌种的数量,D 正确。

3. A 【必刷知识】培养基的成分及培养基的制备

【解析】培养基的配方中一般包含碳源、氮源、水、无机盐,但不是各种微生物的培养基配方中都要包含这四种营养物质,如固氮菌的培养基中不需要加入氮源,A 错误;细菌在中性或弱碱性条件下才能正常生长,因此在培养细菌时,一般需要将培养基调至中性或弱碱性,B 正确;使用涂布器涂布后,需待菌液被培养基吸收后再将平板倒置,放入恒温培养箱中培养,C 正确;使用后的培养基丢弃前一定要进行灭菌处理,以免污染环境和感染操作者,D 正确。

4. C 【必刷知识】无菌操作技术的选择

【解析】试管口等容易被污染的部位通过火焰灼烧 5 秒钟属于灼烧灭菌,A 错误;培养皿等玻璃器皿放入干热灭菌箱中加热 1~2 小时属于干热灭菌,B 错误;牛奶等不耐高温的液体在 63~65 ℃ 条件下煮 30 分钟属于巴氏消毒法,C 正确;含培养基的锥形瓶放入高压蒸汽灭菌锅加热 20 分钟属于高压蒸汽灭菌,是湿热灭菌的一种,D 错误。

刷有所得

(1) 实验室常用的消毒方法:煮沸消毒;化学药物消毒;紫外线消毒。

(2) 实验室常用的灭菌方法:①灼烧灭菌:将微生物的接种工具,如接种环、接种针或其他金属工具,直接在酒精灯火焰的充分燃烧层灼烧,可以迅速彻底地灭菌,此外,在接种过程中,试管口或瓶口等容易被污染的部位,也可以通过火焰灼烧来灭菌;②干热灭菌:耐高温的、需要保持干燥的物品,如玻璃器皿(吸管、培养皿等)和金属用具等,可以采用这种方法灭菌;③高压蒸汽灭菌:将灭菌物品放置在盛有适量水的高压蒸汽灭菌锅内,为达到良好的灭菌效果,一般在压力为 100 kPa,温度为 121 ℃ 的条件下,维持 15~30 min。

5. D 【必刷知识】无菌操作

【解析】100℃煮沸 5~6 min 可以杀死微生物的营养细胞和一部分芽孢,①正确;酒精灯火焰附近存在一个无菌区,为了无菌操作,接种操作要在酒精灯火焰附近进行,②正确;培养基的灭菌方法是高压蒸汽灭菌,该方法应注意将压力达到预定要求,③正确;指示剂和染料可能混有微生物,故加入培养基前需灭菌,④错误;接种室、接种箱或超净工作台在使用前,可以用紫外线消毒,但不能对操作人员进行紫外线消毒,⑤错误;将微生物的接种工具,如接种环、接种针或其他金属工具,直接在酒精灯火焰的充分燃烧层灼烧,可以迅速彻底地灭菌,此外,在接种过程中,试管口或瓶口等容易被污染的部位,也可以通过火焰燃烧来灭菌,⑥正确。综上所述,错误的是④⑤,D 符合题意。

易错警示

(1) 使用强烈的理化因素杀死物体内外一切微生物的细胞、芽孢和孢子的过程称为灭菌,常用的方法有灼烧灭菌、干热灭菌和高压蒸汽灭菌。

(2) 消毒是指用较为温和的物理或化学方法仅杀死物体体表或内部的一部分微生物的过程。常用的方法有煮沸消毒法、巴氏消毒法、紫外线或化学药物消毒法等。

6. B 【必刷题型】信息提取—微生物分离培养的特点及要求

【解析】在纤维素含量丰富的环境中,纤维素分解菌数量多,A 正确;筛选纤维素分解菌应使用以纤维素为唯一碳源的固体培养基,B 错误;当纤维素被纤维素酶分解后,刚果红纤维素复合物就不能形成,培养基中就会出现透明圈,要筛选出能高效分解纤维素的纤维素分解菌,应挑选能产生透明圈且直径较大的菌落,C 正确;应采用稀释涂布平板法进行分离纯化并计数,D 正确。

7. D 【必刷题型】微生物的培养和分离

【解析】抑菌圈越大,说明该种抗生素对该种病原微生物抑制作用越强,说明该病原微生物对该种抗生素敏感性越大,A 正确;图 1 中Ⅳ的抑菌圈中出现了部分菌落,可能是该病原微生物发生了基因突变,产生了耐药性,B 正确;进行药敏试验,需使用稀释涂布平板法将平板上布满测试菌,使用的工具是涂布器,C 正确;接种后的平板在培养时的放置应为倒置,即如图 2 中①所示,倒置培养能防止冷凝形成的水珠滴入培养基,D 错误。

快解

据图分析:抑菌圈有大有小,抑菌圈越大,说明该病原微生物对该种抗生素敏感性越大。

8. A 【必刷题型】微生物的培养和分离

【解析】根据培养后培养基上形成的菌落分布可知,将含目的菌的土壤浸出液接种在 X 培养基上采用的是稀释涂布平板法,A 错误;菌落①不能降解淀粉但能在 X 培养基上存活,可能是硝化细菌,因不能产生淀粉酶所以无透明圈,B 正确;实验目的是筛选对抗生素有抗性、高效降解淀粉的微生物,根据图示中在 X 培养基上滴加碘液后形成了透明圈,说明 X 培养基上含有淀粉,菌体分解淀粉的能力强,在其周围形成的透明圈就大,同时为了筛选到对抗生素有抗性的菌体,X 培养基还应该含有抗生素,Y 培养基是将筛选到的目的菌扩大培养,为不含琼脂的液体培养基,C

正确;碘液遇淀粉会变蓝,淀粉被分解,蓝色消失,图中⑤的透明圈最大,说明菌体⑤降解淀粉的能力最强,不同菌体形成的菌落特征不同,因此可根据菌落特征初步判断微生物类型,D 正确。

刷有所得 微生物常见的接种的方法:

①平板划线法:将已经溶化的培养基倒入培养皿制成平板,接种、划线,在恒温箱里培养。在线的开始部分,微生物往往连在一起生长,随着线的延伸,菌数逐渐减少,最后可能形成单个菌落。

②稀释涂布平板法:将待分离的菌液经过大量稀释后,均匀涂布在培养基表面,经培养后可形成单个菌落。

9. B 【必刷知识】微生物的培养及计数

【解析】制作题述平板时培养基不需要加入血清,细菌生长不需要动物血清,A 错误;菌落是指在固体培养基上长出的肉眼可见的子细胞群体,因此,实验培养菌落所用的培养基应为固体选择培养基,B 正确;按题述稀释涂布平板法,若三个平板上的菌落平均数为 100 个,则每毫升样品中细菌总数为 $100 \div 0.1 \times 10^5 = 1 \times 10^8$ 个,C 错误;食用常乳前,最佳的消毒方法是巴氏消毒法,该方法不仅能杀死绝大多数微生物,还能避免常乳中的营养成分被破坏,D 错误。

刷有所得 稀释涂布平板法计数:

(1)原理:当样品的稀释度足够高时,培养基表面生长的一个菌落,来源于样品稀释液中的一个活菌。通过统计平板上的菌落数,就能推测出样品中大约含有多少活菌。

(2)操作:①设置重复组,增强实验的说服力与准确性;②为了保证结果准确,一般选择菌落数在 30~300 的平板进行计数。

(3)计算公式:每克样品中的菌株数 = $(C \div V) \times M$,其中 C 代表某一稀释度下平板上生长的平均菌落数, V 代表涂布平板时所用的稀释液的体积(mL), M 代表稀释倍数。

10. (1) 次生 降解苯甲酸的根际菌大多分布在富含苯甲酸的环境中,多年连续种植花生的土壤中苯甲酸含量相对较高

(2) 以苯甲酸为唯一碳源 1.8×10^4

(3) 过滤、沉淀 能否在环境中大量生长繁殖、是否具有广谱降解的特性(是否能降解除苯甲酸以外的苯乙酮、丙三醇等物质)

【必刷题型】微生物的分离及计数

【解析】(1) 因为苯甲酸等物质不是花生生存必需的物质,所以属于次生代谢物。降解苯甲酸的根际菌大多分布在富含苯甲酸的环境中,多年连续种植花生的土壤中苯甲酸含量相对较高,因此从这种土壤中获得降解苯甲酸的微生物的概率要高于普通环境。

(2) 为确保能够分离得到分解苯甲酸的微生物,常将土壤稀释液先进行选择培养,该培养基应以苯甲酸为唯一碳源,其他营养物质适宜。分离、纯化培养时,采用稀释涂布平板法接种,先进行等浓度梯度稀释,如果每次稀释 10 倍,则取 0.2 mL 菌液需要添加 1.8 mL 无菌水,图中一共稀释了 4 次,因此总共稀释了 10^4 倍。

(3) 获得的菌种可通过发酵工程大量增殖,并通过过滤、沉淀等方式将微生物本身分离出来。得到的苯甲酸降解菌能否降解除苯甲酸以外的苯乙酮、丙三醇等物质,能否适应土壤环境等问题均是在推广前要考虑的问题。

刷有所得

培养微生物的培养基按照物理性质划分可分为固体培养基、液体培养基和半固体培养基,固体培养基具有容易观察和记录细胞的生长形态及行为等特点;按照功能划分分为选择培养基和鉴别培养基,选择培养基是指根据某种(类)微生物特殊的营养要求或对某些特殊化学、物理因素的抗性而设计的,能选择性区分这种(类)微生物的培养基。利用选择培养基,可使混合菌群中的某种(类)微生物变成优势种群,从而提高该种(类)微生物的筛选效率。

11. (1) 高压蒸汽灭菌法 选择

(2) 1.28×10^7 个/mL 偏多

(3) 低频性 不含链霉素的培养基中的大肠杆菌未接触过链霉素却产生了链霉素抗性,说明该抗性的产生并非链霉素诱导而是自发产生的

【必刷题型】微生物的分离与计数

【解析】(1) 对培养基灭菌一般使用高压蒸汽灭菌法,使用 3 号培养基的目的是筛选出具有链霉素抗性的大肠杆菌,所以 3 号培养基属于选择培养基。

(2) 菌落平均值为 $(125+126+133) \div 3 = 128$ 个,4 号培养液中大肠杆菌密度为 $128 \times 10^4 \times 10 = 1.28 \times 10^7$ 个/mL;使用血细胞计数板计数会把死菌也计入,所以计数结果偏多。

(3) 3 号培养基属于选择培养基,筛选出具有链霉素抗性的大肠杆菌,3 号培养基上菌落数目较 1 号和 2 号培养基少很多,说明突变产生链霉素抗性的大肠杆菌数量较少,基因突变具有低频性的特点;1 号和 2 号培养基中的大肠杆菌没有接触过链霉素,但是部分却突变产生了链霉素抗性,说明这种突变是自发产生的而不是由于链霉素的诱导,所以说明了基因突变是自发产生而不是环境因素诱导的结果。

12. D 【必刷知识】果酒和果醋的制作原理及流程

【解析】果酒制作所用菌种是酵母菌,其是异养兼性厌氧型真菌,属于真核生物;果酒制作的前期需氧,后期不需氧,果醋制作所用菌种是醋酸菌,属于原核生物,需要持续通入氧气;发酵过程 II 是醋酸菌利用酒精生产醋酸的过程,需要氧但不产生 CO_2 ,A 错误。酒精生产过程中酵母菌无氧呼吸会产生 CO_2 ,使发酵液 pH 降低,醋酸发酵过程中产生的醋酸会使发酵液的 pH 再度降低,B 错误。酒精发酵的适宜温度为 28°C 左右,醋酸发酵的适宜温度为 $30\sim 35^\circ\text{C}$,因此发酵过程 I (酒精发酵) 的温度比发酵过程 II (醋酸发酵) 低,C 错误。酒精发酵是酵母菌在无氧条件下产生酒精的过程,题述醋酸发酵是醋酸菌利用酒精生产醋酸,因此发酵 I、II 过程是此生产过程的中心环节,D 正确。

13. B 【必刷题型】发酵产品的制作

【解析】在发酵初期,有害菌的生长较为旺盛,使得亚硝酸盐的

生成较快,含量较高,故酸笋发酵需要适宜的发酵时间,时间过短可能导致亚硝酸盐含量过高,A 正确;竹笋中含有发酵的天然菌种,故不能对采摘后的竹笋进行灭菌,否则会杀死发酵所需的天然菌种,B 错误;因为上一批次的发酵液中含有大量的发酵菌种,故适当加入上一批次的发酵液可加快发酵进程,C 正确;发酵过程中会产生乳酸,乳酸呈酸性,酸性环境会抑制大多数微生物的生长繁殖,D 正确。

14. (1) 赤霉素 杀灭其他杂菌

(2) 冷却 有利于前期酵母菌进行有氧呼吸并大量繁殖
18~30 ℃

(3) 啤酒中的营养成分不被破坏(或啤酒中的营养成分不流失)

【必刷题型】发酵产品的生产流程

【解析】(1) 赤霉素可以通过促进种子中淀粉酶的合成,进而促进淀粉水解来促进种子萌发,因此利用赤霉素处理大麦,可以使大麦种子无须发芽就可以产生淀粉酶。啤酒制作需要使用酵母菌,加入酵母菌之前,加啤酒花后需要煮沸,其目的是杀灭其他杂菌。

(2) 在加入酵母菌前,还应进行的“?”操作为冷却,以防止高温杀死酵母菌(或保持酵母细胞的活性)。充氧加酵母菌,有利于前期酵母菌进行有氧呼吸并大量繁殖,增加酵母菌的数量。酵母菌进行酒精发酵的最适温度是 18~30 ℃,故发酵的最适温度条件应为 18~30 ℃。

(3) 77 ℃保温 30 分钟的操作类似于巴氏消毒法,温度不是很高,该操作的目的既能杀死啤酒中的微生物,又能保证啤酒中的营养成分不被破坏(流失)。

考点 36 细胞工程

1. A 【必刷题型】植物细胞工程的应用

【解析】细胞产物的工厂化生产可利用植物细胞培养技术,通过促进细胞增殖,以从细胞中获得次生代谢物,A 正确;植物顶端分生区附近(如茎尖)的病毒极少,甚至无病毒,因此,切取一定大小的茎尖进行组织培养,再生的植株就有可能不带病毒,从而获得脱毒苗,用这种方法获得的植株不抗病毒,B 错误;利用花药离体培养可获得玉米幼苗的单倍体,再经过诱导染色体数目加倍后,直接从中选择出具有优良性状的个体,这样能够极大缩短育种年限,C 错误;植物的快速繁殖技术是指用于快速繁殖优良品种的植物组织培养技术,它可以保持优良品种的遗传特性,因此在运用此项技术快速繁殖花卉过程中,不能改良植物的性状,D 错误。

2. D 【必刷能力】图表分析—植物组织培养的过程

题图解读 图中①过程是接种外植体的过程,②是脱分化过程,③和④分别是诱导生芽和诱导生根的过程,⑤是幼苗形成新的植株的过程。

【解析】由题图解读可知,①过程是接种外植体,该过程需要消毒以实现无菌操作,A 错误;②是脱分化过程,脱分化过程中也有基因的选择性表达,B 错误;由题图解读可知,③是诱导生芽,④是诱导生根,两个过程所用植物激素的比例不同,C 错误;⑤是幼

苗形成新的植株的过程,该过程中存在细胞的分裂、生长、分化和凋亡,D 正确。

3. B 【必刷知识】植物体细胞杂交

【解析】愈伤组织细胞由杂种细胞脱分化而来,遗传物质未发生变化,A 正确;诱导动物细胞融合时,可用灭活的病毒,但诱导植物原生质体融合不能用灭活的病毒,B 错误;原生质体是植物细胞去除细胞壁之后的结构,植物细胞壁的主要成分为纤维素和果胶,故可用纤维素酶和果胶酶对白菜和甘蓝的体细胞进行去壁处理,C 正确;再分化培养基中需要加入一定量的植物激素,D 正确。

4. D 【必刷能力】图表分析—动物体细胞核移植过程

【解析】在核移植技术中,常选用处于 M II 期去核的次级卵母细胞作为受体细胞,用显微操作去核法去除卵母细胞的细胞核,再用物理或化学方法激活受体细胞,使其完成细胞分裂和发育进程,A、C 正确;体细胞核移植技术在畜牧业生产方面主要可以加速家畜遗传改良进程,促进优良畜群繁育,B 正确;核移植时,提供卵母细胞的动物为雌性,提供细胞核的动物可以不是雌性,D 错误。

5. C 【必刷知识】动物细胞培养的条件

【解析】根据题意,用 Vero 细胞可以培养新冠病毒,因此 Vero 细胞的细胞膜上需存在新冠病毒能够特异性识别的受体,便于病毒识别,A 正确;培养 Vero 细胞时,培养液需要定期更换,及时清除代谢产物,以保证细胞培养的无毒的环境,B 正确;动物细胞培养时,需要置于含 95% 空气和 5% CO_2 混合气体的 CO_2 培养箱中进行培养, O_2 是细胞代谢所必需的, CO_2 主要作用是维持培养液的 pH,C 错误; β -丙内酯灭活会使新冠病毒失去感染能力,但不会破坏其表面的抗原结构,保留其抗原性,D 正确。

6. (1) 生殖隔离 植物体细胞杂交和植物组织培养

(2) 原生质体 愈伤组织 纤维素酶和果胶酶 温度 pH

(3) 高 Ca^{2+} —高 pH 融合法 (4) 3 碘乙酰胺

【必刷知识】植物体细胞杂交

【解析】(1) 中华猕猴桃和美味猕猴桃是两个不同物种,它们之间存在生殖隔离,通过①~⑥培育优良品种杂种植株的过程所应用的技术是植物体细胞杂交和植物组织培养技术。

(2) 图中 B、D 是去除了细胞壁的原生质体,G 为愈伤组织;过程②去除了植物细胞壁,需使用纤维素酶和果胶酶,该过程受到处理时间、温度、pH 等因素的影响。

(3) 过程③为让两个不同种的原生质体进行融合,其中化学方法除了聚乙二醇(PEG)融合法,还有高 Ca^{2+} —高 pH 融合法等。

(4) 过程③将两个不同种的原生质体进行融合,其中两两融合的细胞包括中华猕猴桃自身融合和美味猕猴桃自身融合以及中华猕猴桃和美味猕猴桃融合的细胞共 3 种。X 射线处理会使细胞失去分裂能力,碘乙酰胺处理会使细胞内的酶失活而抑制生长,已经对中华猕猴桃细胞用 X 射线处理,需对美味猕猴桃细胞用碘乙酰胺处理,使它们自身融合的细胞无法生长,只有当两个不同种的原生质体融合才能生长,筛选到杂种细胞 F,以便最终能获得优良杂种植株。

7. ABD 【必刷知识】动物细胞融合与单克隆抗体的制备

【解析】抗原与抗体的结合具有特异性,为制备抗 HA 单克隆抗体,则使用的 B 淋巴细胞应取自注射过 HA 的小鼠脾脏,A 正确;在特定的选择培养基上,未融合的亲本细胞(B 淋巴细胞、骨髓瘤细胞)和融合的具有同种核的细胞(B 淋巴细胞—B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞—骨髓瘤细胞)都会死亡,B 正确;将 B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞融合后,放入 96 孔板,但杂交瘤细胞不一定都能产生所需抗体,还需进行抗体阳性检测,C 错误;据图可知,图中细胞群 a 在加入 HA 抗原后呈阳性,说明细胞群 a 产生了抗 HA 抗原的抗体,故将图中细胞群 a 在体外大规模培养,可以提取出大量的抗 HA 单克隆抗体,D 正确。

8. D 【必刷题】动物细胞融合与单克隆抗体的制备

【解析】杂交瘤细胞若丢失来自 B 淋巴细胞的染色体,可能会导致抗体产生能力下降,A 正确;据题意“EBV 转化细胞能在 HAT 培养基中存活,但对 Oua(乌本苷)敏感。骨髓瘤细胞在 HAT 培养基中不能存活,但对 Oua 不敏感”可知,HAT 培养基筛选去除的是未与 EBV 转化细胞融合的骨髓瘤细胞以及自身融合的骨髓瘤细胞,Oua 筛选去除的是未与骨髓瘤细胞融合的 EBV 转化细胞以及自身融合的 EBV 转化细胞,B、C 正确;图示获得的杂交瘤细胞还要进行克隆化培养和抗体检测,检测呈现阳性的杂交瘤细胞才能用于生产单克隆抗体,D 错误。

9. D 【必刷知识】单克隆抗体的制备

【解析】图中过程①获得的淋巴细胞不都能产生抗新冠病毒的抗体,A 错误;过程③使用的 HAT 培养基中要有糖、氨基酸、促生长因子、无机盐、微量元素等,通常还需加入血清等天然成分,该培养基为选择培养基,还需要加入氨基蝶呤以抑制骨髓瘤细胞的 D 途径,使培养基中只有杂交瘤细胞能增殖,B 错误;过程④是筛选能产生特异性抗体的杂交瘤细胞,可分别从各个小室中提取抗体,与新冠病毒混合,出现抗原—抗体杂交带(阳性)的小室中的细胞就是所需的杂交瘤细胞,C 错误;抗体能与引起它产生的抗原发生特异性结合反应,制备的单克隆抗体可以用于新冠病毒的检测,就是利用了抗原与抗体能发生特异性结合的原理,D 正确。

刷有所得

在制备单克隆抗体时,首先要给小鼠注射相应抗原,产生相应的 B 淋巴细胞,然后将 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,经过选择培养基两次筛选,最后获得能产生所需抗体的杂交瘤细胞。在单克隆抗体的制备过程中,使用了动物细胞培养和动物细胞融合等动物细胞工程技术。

10. (1) 逆转录 质粒 (2) 二次免疫后,产生的 B 淋巴细胞更多 (3) 骨髓瘤细胞 (4) 维持培养液的 pH (5) 单克隆抗体 A;能特异性地识别病毒且中和效果好 (6) 快速检测是否感染,以便有效治疗患者

【必刷知识】单克隆抗体的制备和应用

【解析】(1) 以 RNA 为模板构建 cDNA 需要经过逆转录过程。质粒是基因工程最常用的载体,除此之外,还可以用噬菌体、动植物病毒等作为载体,将目的基因导入大肠杆菌时需要构建表达载体,常用的表达载体是质粒。

(2) 在小鼠腹腔内注射 VP1 蛋白进行免疫 35 天,在获取 B 淋巴细胞前 3 天再次注射 VP1 蛋白,可以通过二次免疫产生更多的 B 淋巴细胞。

(3) 由于缺失 *HPRT* 基因的细胞无法在 HAT 培养基中生存, HAT 培养基可以筛选出骨髓瘤细胞与 B 淋巴细胞融合的杂交瘤细胞,其他细胞都会死亡, B 淋巴细胞的存活时间较短,不需要特别筛选,所以缺失 *HPRT* 基因的细胞就是不能在 HAT 培养基上生存的细胞,即为骨髓瘤细胞。

(4) 在杂交瘤细胞筛选培养过程中需在培养基中添加胎牛血清,并置于 37℃、50 mL/L CO₂ 培养箱中培养,培养箱中 CO₂ 的作用是维持培养液的 pH。

(5) 由题图可以看出,使用单克隆抗体 A 后检测出的感染 EV71 的细胞要多于使用单克隆抗体 B,所以单克隆抗体 A 更能特异性识别病毒;且由题图可以看出,单克隆抗体 A 的中和效果好。

(6) 该单克隆抗体具有很高的特异性,能够快速检测是否感染,以便有效治疗患者。

考点 37 基因工程

1. D 【必刷知识】基因表达载体的构建

【解析】使用 PCR 技术扩增时需要一对引物, A 错误;选择 *Sma* I 获得的是平末端,无法与改良基因上的黏性末端连接, B 错误;从各种限制酶的酶切位点分析,除使用 *Xma* I 外,还需使用 *Bgl* II 切除相应黏性末端,产生 GATC 与改良基因 CTAG 一侧进行连接,同时需要用 DNA 连接酶构建基因表达载体, C 错误; *LacZ* 基因编码的酶能分解 β-半乳糖苷,产生蓝色物质,菌落为蓝色,如果没有分解,则菌落为白色,因此可以将菌液涂布在含氨苄青霉素和 β-半乳糖苷的平板上,由于重组质粒的 *LacZ* 基因在重组过程中被切断,即构建改良基因质粒时破坏了 *LacZ* 基因,不能编码相应的酶分解 β-半乳糖苷,菌落呈现白色,所以白色菌落含有重组质粒, D 正确。

2. C 【必刷知识】基因工程的工具

【解析】选用 *Sma* I 限制酶会破坏目的基因和质粒上的标记基因, A 错误;选用 *Pst* I 限制酶断开目的基因和质粒,连接的时候目的基因、质粒容易出现自身环化,目的基因和质粒连接的方向也容易出错, B 错误;选用限制酶 *Pst* I 和 *EcoR* I 断开目的基因和质粒,能避免目的基因和质粒的自身环化及反向连接,因而成功率更高, C 正确;结合 B、C 项的分析可知,选用一种限制酶或两种限制酶断开目的基因和质粒,构建的基因表达载体的成功率是不同的, D 错误。

3. C 【必刷题型】基因表达载体的构建

【解析】基因工程的核心步骤是构建基因表达载体,不是通过 PCR 扩增获取目的基因, A 错误;由于载体 E 只有产生黏性末端的酶切位点,要使用中间载体接入载体 E,同时防止载体自身环化,需要用两种限制酶分别切割载体 E 和中间载体 P,据图可知,中间载体 P 和载体 E 均含有 *Xho* I 和 *Pst* I 酶识别序列,故可选用 *Xho* I 和 *Pst* I 酶进行酶切,载体的这两种酶识别序列中含有 *EcoR* V 识别位点,并且其切的为平末端,可以用于连接目的基因, *Sma* I 酶虽然也能切割得到平末端,但是其识别位点没有位

于 *Xho* I 和 *Pst* I 酶识别位点之间,故不能选择其对中间载体 P 进行切割,B 错误;由图可知,载体 P 是中间质粒,不含有表达该目的基因的启动子与终止子,C 正确;受体细胞表现出抗性基因的相应性状,可能是导入了重组质粒,也可能只导入了空质粒(不含目的基因的质粒),D 错误。

4. D 【必刷知识】基因表达载体的构建

【解析】引物是根据目的基因两侧序列制备的,需要与目的基因两端互补,故若通过 PCR 技术大量扩增该目的基因,应该选用引物甲和引物丙,A 正确;图中 *Bam*H I 会破坏两种抗性基因,不能选用,故图乙中目的基因左侧只能选用 *Bcl* I,而质粒上没有目的基因右侧 *Sau*3A I 的切点,两者都有 *Hind* III 的切点,为了防止目的基因与质粒随意连接,质粒和目的基因构建表达载体,应选用 *Bcl* I 和 *Hind* III 剪切,B 正确;若将基因表达载体导入受体细胞大肠杆菌,需用钙离子等处理,使其处于易于吸收外源 DNA 的状态,C 正确;在受体细胞中,插入目的基因时氨苄青霉素抗性基因被破坏,不能和目的基因同时表达,D 错误。

5. D 【必刷能力】图表分析—基因表达载体的构建

【解析】由题图可知,*Bgl* II、*Sau*3A I 及 *Eco*R I 三种酶在目的基因和 P1 噬菌体上都有酶切位点,三种酶切割后不破坏目的基因与质粒上的标记基因,故可用 *Bgl* II 和 *Sau*3A I 或 *Eco*R I 切割目的基因所在片段和 P1 噬菌体载体,A、B 正确;从图乙知 P1 噬菌体载体为环状 DNA,只用 *Eco*R I 切割后产生一条链状 DNA,含有 2 个游离的磷酸基团,C 正确;用 *Eco*R I 切割目的基因所在片段和 P1 噬菌体载体,再用 DNA 连接酶连接,可能形成目的基因与目的基因连接,目的基因与载体连接、载体和载体连接等不同的情况,D 错误。

6. A 【必刷能力】信息提取—基因工程的工具分析

【解析】选用了 *Xho* I 和 *Bcl* I 对 pUC18 进行切割后,为切出相同的黏性末端并且防止目的基因自身环化,应选用 *Xho* I 和 *Bcl* I 对目的基因所在 DNA 进行切割,因此,可在人 *APP* 基因两端分别添加 *Xho* I 和 *Bcl* I 的识别序列,A 符合题意;*Sac* I 与 *Xho* I 切割形成的末端方向相反,不能在目的基因其中一端添加 *Sac* I 酶的识别序列,B 不符合题意;*Bcl* I 和 *Bam*H I 的识别序列不同,但切出的黏性末端互补,会导致目的基因自身环化,C 不符合题意;若添加 *Sac* I 和 *Bam*H I 的识别序列,目的基因所在 DNA 经 *Bam*H I 切割后末端可连接在 pUC18 被 *Bcl* I 切割处,但 *Sac* I 切出的末端不能连接在 pUC18 被 *Xho* I 切割处,D 不符合题意。

刷有所得

限制酶:能够识别双链 DNA 分子的某种特定核苷酸序列,并且使每一条链中特定部位的两个核苷酸之间的磷酸二酯键断裂。

7. B 【必刷知识】基因表达载体构建

【解析】酵母菌 GS115 是组氨酸缺陷菌,不能合成组氨酸,导入组氨酸合成基因后可以合成组氨酸,可以用不含组氨酸的培养基筛选导入了重组质粒的酵母菌 GS115,A 正确;据图可知,为保证目的基因(*Avr* II 会破坏目的基因)和启动子(*Sac* I 会破坏启动子)的完整性,可用 *Eco*R I 和 *Not* I 分别切割含有 *IL-2* 基因的

DNA 片段和 pPIC9K 质粒, B 错误; 质粒上的启动子可作为 RNA 聚合酶识别并结合的位点, 驱动基因转录, C 正确; 酵母菌是真核细胞, 其含有的内质网和高尔基体能对蛋白质进行加工修饰, D 正确。

8. D 【必刷知识】质粒的结构

【解析】图中有启动子和终止子等, 因此质粒还需具备的结构有限制酶的切割位点、标记基因、复制原点等, A 正确。启动子是 RNA 聚合酶识别和结合的部位, 能驱动基因转录出 mRNA, B 正确。引物 F_2 与 R_1 或 F_1 与 R_2 结合部位包含 J 基因的碱基序列, 因此推测, 为了确定 J 基因连接到质粒中且插入方向正确, 进行 PCR 检测时, 若仅用一对引物, 应选择图甲中的引物 F_2 和 R_1 或 F_1 与 R_2 , C 正确。b 链是模板链, 而根据图上启动子和终止子的位置可知转录方向是图上从左向右, 对应的模板链方向应该是 $3' \rightarrow 5'$, 非模板链(也就是 a 链)是 $5' \rightarrow 3'$; 考虑到 DNA 复制的方向是子链的 $5' \rightarrow 3'$, 引物基础上延伸的方向肯定是 $5' \rightarrow 3'$, 所以引物结合的单链其方向是 $3' \rightarrow 5'$; 图中 F_1 是前引物, 在左侧, 所以其配对的单链是 $3' \rightarrow 5'$ 的 b 链, 故其序列应该与 a 链相应部分的序列相同, D 错误。

关键点拨

基因工程的关键步骤是构建基因表达载体, 基因表达载体主要由启动子、目的基因、标记基因和终止子组成, 其中标记基因用于筛选重组 DNA 分子, 可以是四环素、氨苄青霉素等抗性基因, 也可以是荧光蛋白基因或产物能显色的基因。

9. (1) 逆转录酶 DNA 连接酶 (2) Ca^{2+} (或 $CaCl_2$) 感受态 (3) 大肠杆菌 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细胞筛选出来 (4) 抗原—抗体杂交(或抗原与抗体特异性结合)

【必刷知识】基因工程的主要工具与操作

【解析】(1) 戊型肝炎病毒是一种 RNA 病毒, 过程①是以病毒 RNA 为模板合成 DNA 的过程, 需要的酶是逆转录酶; 过程④是将目的基因与质粒连接在一起, 需要的酶是 DNA 连接酶。

(2) 将目的基因导入大肠杆菌需要用 Ca^{2+} 处理大肠杆菌, 增大大肠杆菌细胞膜的透过性, 使其处于感受态, 利于吸收周围环境中 DNA, 以完成转化过程。

(3) 启动子是一段有特殊结构的 DNA 片段, 其作用是驱动目的基因的转录, 启动子具有物种或组织特异性, 构建在大肠杆菌细胞内特异性表达 pORF2 蛋白的载体时, 需要选择大肠杆菌细胞的启动子。标记基因的作用是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细胞筛选出来。

(4) 戊肝抗体诊断试剂盒利用抗原—抗体杂交原理, 通过观察是否产生杂交带检测被测个体体内是否产生 pORF2 的特异性抗体。

10. (1) 真核基因启动子不能被原核 RNA 聚合酶识别, 转录不能正确起始, 且从真核基因组克隆的基因含有内含子, 大肠杆菌中没有转录后剪接系统 肝脏 模板 DNA Taq DNA 聚合酶(或者耐高温的 DNA 聚合酶) 62 (2) 限制酶 *Sau3A I* 会破坏

目的基因 *Bam*H I、*Eco*R I 对目的基因是否导入进行检测

(3) Ca^{2+} 抗原—抗体杂交 目的基因前后的启动子和终止子设计不理想,导致目的基因不能正常表达

【必刷知识】基因工程在医用方面的应用

【解析】(1) 基因表达包括转录和翻译过程,由于真核基因启动子不能被原核 RNA 聚合酶识别,转录不能正确起始,且从真核基因组克隆的基因含有内含子,大肠杆菌中没有转录后剪接系统,翻译不能正常进行,故从人体细胞中直接提取的 *HSA* 基因,导入到大肠杆菌细胞中不能表达。人血清白蛋白(*HSA*)主要在肝脏中合成,人体的肝脏细胞中含有 *HSA* 基因转录的 mRNA,PCR 反应体系的主要成分应该包含:4 种脱氧核苷酸、引物、 Mg^{2+} 、模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶。若扩增后得到了 32 个 *HAS* 基因,则该过程共需要 $32 \times 2 - 2 = 62$ 个引物。

(2) 由图 2 可知,限制酶 *Sau*3A I 会破坏目的基因。为了防止目的基因与质粒间的任意连接,应该选择 *Sau*3A I、*Eco*R I 切割质粒。*Sau*3A I 和 *Bam*H I 切出的黏性末端相同,故采用 *Bam*H I、*Eco*R I 充分切割目的基因,产生与质粒相同的黏性末端,便于连接。质粒上抗生素抗性基因作为标记基因的主要作用是有利于对目的基因是否导入进行检测。

(3) 将目的基因导入大肠杆菌时,常用 Ca^{2+} 处理细胞;为了检测水稻胚乳细胞中是否合成了 *HSA* 蛋白,可采用抗原—抗体杂交的方法,若胚乳细胞中含有 *HAS* 基因,但是检测不到 *HSA* 蛋白,说明目的基因不能正常表达,可能的原因是目的基因前后的启动子和终止子设计不理想,导致目的基因不能正常表达。

11. D 【必刷能力】图表分析—PCR 技术扩增目的基因

【解析】③过程为变性,变性过程使用 $90 \sim 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的高温处理是为了让目的基因的氢键断裂,使双链解开,充分变性,A 正确;⑤过程为延伸,延伸过程使用 $70 \sim 75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温度处理既可以防止 DNA 变性,还能促进子链的延伸,B 正确;④过程为复性,复性过程使用 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的温度处理,使两种引物通过碱基互补配对与两条单链 DNA 结合,C 正确;DNA 中不含有 U,含有 T,D 错误。

关键点拨

PCR 技术过程:变性→复性→延伸。变性:当温度上升到 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上时,双链 DNA 解聚为单链;复性:温度下降到 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,两种引物通过碱基互补配对与两条单链 DNA 结合;延伸:温度上升到 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时,*Taq* DNA 聚合酶有最大活性,可使 DNA 新链由 5'端向 3'端延伸。

12. B 【必刷知识】PCR 引物的特点

【解析】退火温度与时间取决于引物的长度、碱基组成及其浓度,引物的碱基数量越少,能与引物发生配对的片段就越多,目标 DNA 获得率越低,为了减少引物与模板链的非特异性结合,需要适当升高温度,A 错误;根据需要可在引物的 5'端添加限制酶识别序列、点突变序列等,以便获得两侧带有限制酶切割位点或特殊序列的目的基因,B 正确;两种引物的退火温度差异较大时不能同时退火,甚至一条链在延伸,一条链在退火,可增加引物与模板的非特异性结合,C 错

误;引物的 G、C 含量过高,容易发生引物自行配对形成二级结构,不利于目标 DNA 的扩增,D 错误。

13. AD 【必刷题型】信息提取—PCR 技术

【解析】PCR 扩增依据的是 DNA 分子半保留复制的原理,A 正确;进行 PCR 扩增需要耐高温的 DNA 聚合酶 (*Taq* DNA 聚合酶),但不需要解旋酶,B 错误;DNA 的两条链反向平行,子链从引物的 3'端开始延伸,则利用图中的引物②③组合可扩增出 T-DNA 序列,C 错误;通过与受体细胞的基因组序列比对,即可确定 T-DNA 的插入位置,D 正确。

14. D 【必刷知识】PCR 原理和反应过程

【解析】DNA 的合成方向是从子链的 5'端到 3'端,据此可知,限制酶 a 和限制酶 b 的识别序列应分别加在引物 1 和引物 2 的 5'端,A 错误;PCR 反应体系中需要加入脱氧核苷酸、耐高温的 DNA 聚合酶和缓冲液等物质,PCR 过程中的能量可由 dNTP 水解提供,B 错误;图中②是由引物 2 与①结合,在第 2 轮 PCR 中形成的子代链,故在第 3 轮 PCR 中,引物 1 与图中②结合将形成两条链等长的突变基因,C 错误;在第 3 轮 PCR 结束后,会产生 $2^3=8$ 个 DNA 分子,其中含突变碱基对且两条链等长的 DNA 分子有两个,其他的 DNA 分子均是不等长的,因此含突变碱基对且两条链等长的 DNA 分子所占比例为 $\frac{1}{4}$,D 正确。

15. (1)C B 可以减少目的基因及质粒的自身环化、使目的基因定向连接到质粒上,以增大目的基因正向(正确)连接的概率

(2)*Bam*H I、*Sac* I 依次使用含卡那霉素的培养基和含潮霉素的培养基筛选,能够在含卡那霉素培养基中生长,而不能在含潮霉素培养基中生长的大肠杆菌即为导入重组质粒的大肠杆菌

(3)*ALKBH5* 基因过表达导致 *STC2* 基因表达的 mRNA 去甲基化,进而导致 *STC2* 基因过表达而引起癌细胞迁移

【必刷题型】基因表达载体的构建及 PCR 过程

【解析】(1)据图 1 分析,利用 PCR 扩增目的基因 *STC2* 时,在 DNA 复制过程中,子链的延伸方向是从 5'端到 3'端,且 *STC2* 基因的 α 链为转录的模板链,需要在引物 C 的 5'端添加 *Bam*H I 识别序列和强启动子序列,在引物 B 的 5'端添加 *Sac* I 识别序列。目的基因两端用不同限制酶切割的原因是可以减少目的基因及质粒的自身环化、使目的基因定向连接到质粒上,以增大目的基因正向(正确)连接的概率。

(2)图 1 显示,目的基因 *STC2* 的两侧有 *Bam*H I、*Sac* I 的识别位点,二者不会把强启动子切割掉,因此为确保目的基因正确插入质粒,需要选择 *Bam*H I、*Sac* I 限制酶切割质粒。将重组质粒导入大肠杆菌时,可利用潮霉素和卡那霉素筛选出导入重组质粒的大肠杆菌。由于限制酶 *Bam*H I 和 *Sac* I 破坏了潮霉素抗性基因,故可依次使用含卡那霉素的培养基和含潮霉素的培养基筛选,能够在含卡那霉素培养基中生长,而不能在含潮霉素培养基中生长的大肠杆菌即为导入重组质粒的大肠杆菌。

(3)根据结果可知,*ALKBH5* 基因沉默会减少癌细胞迁移量,*STC2* 基因过表达会恢复癌细胞迁移量。因此推测 *ALKBH5* 基

因过表达导致 *STC2* 基因表达的 mRNA 去甲基化,进而导致 *STC2* 基因过表达而引起癌细胞迁移。

刷有所得

基因工程的基本操作程序: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。

16. (1)③④ (2)5' (3)*EcoR* I (4) Ca^{2+} (或 CaCl_2) (5) 选择 ab 鼠李糖脂

【必刷知识】基因工程的基本操作程序

【解析】(1)由题意可知,可合成鼠李糖脂的天然菌株存在致病性等缺点,而异源菌株中往往存在合成鼠李糖脂的重要前体物质,理论上只要将外源基因插入该菌株进行异源表达即可合成鼠李糖脂,故外源基因 *rhIA* 应存在于天然菌株中,可提供外源基因 *rhIA* 模板的菌株有③*P. aeruginosa* 和④*Burkholderia sp.* 两种天然菌株。

(2)引物延伸方向为 5'→3',故二次 PCR 所使用的引物应该在第一次 PCR 引物的 5'端插入包含限制酶切位点的序列。

(3)由图可知四种限制酶的识别序列,已知目的基因上游引物所插入的序列含有 5'AGGCGGAATTGGAGCTC3',下游引物插入的序列含有 5'GCTTGATATCGAATTCGA3',*Sac* I 可以特异性识别并切割位于上游引物的 GAGCTC 序列,下游引物中含有的 GAATTC 序列可以被 *EcoR* I 识别并切割,故将表达载体 pBBRmcs-5 与上述扩增产物用 *Sac* I 和 *EcoR* I 限制性内切核酸酶酶切后进行连接。

(4)用 Ca^{2+} (或 CaCl_2) 处理菌株,会使菌株形成能够吸收外源 DNA 的生理状态,可以将重组的基因表达载体导入其中。

(5)①重组的基因表达载体含有庆大霉素的抗性基因,用稀释涂布法将培养液接种到含庆大霉素的选择培养基上,只有含有表达载体的菌株可以正常生长,以检测表达载体是否导入重组菌株。②可以直接利用 PCR 技术检测表达载体 pBBRmcs-5 是否含有外源基因 *rhIA* 或外源基因 *rhIA* 是否转录出 mRNA,其原理为碱基互补配对原则,故选 ab。③外源基因的插入使该菌株进行异源表达即可合成鼠李糖脂,若菌株成功导入外源基因 *rhIA*,则发酵液中可以检测到鼠李糖脂。

17. (1)脱氧核苷酸 复制原点、终止子、标记基因 表达和发挥作用 (2)DNA 半保留复制 *GhMnaA2* 两端部分核苷酸序列 5' (3)因为棉花细胞中本来就有 *GhMnaA2*,不管是否导入都能与该探针发生碱基互补配对 (4)6.0 kb 11.7 kb

(5)反义 *GhMnaA2* 转录的反义 RNA 能与棉花细胞内的 *GhMnaA2* 转录的 mRNA 互补配对,从而抑制基因的表达(翻译)

【必刷题型】信息提取—基因工程的应用

【解析】①和②过程表示基因表达载体的构建过程,在①过程中,纤维细胞 E6 启动子前后含有限制酶 *Hind* III 和 *Bam* H I 的切割位点,因此可以用这两种酶切割;②是构建反义 *GhMnaA2* 基因表达载体的过程,反义 *GhMnaA2* 基因前后有限制酶 *Sma* I 的切割位点,因此可以用该酶切割获取目的基因;③是扩增、鉴

定、筛选反义表达载体;④是利用农杆菌转化法将目的基因整合到受体细胞基因组中;最后采用植物组织培养技术将受体细胞培养形成植物体。

(1) 启动子位于基因的首端,是一段特殊的 DNA 序列,故其基本组成单位是脱氧核苷酸;基因表达载体除了图示组成(启动子和酶切位点)外,还应包括复制原点、终止子、标记基因;构建基因表达载体的目的是使目的基因稳定存在并且可以遗传到下一代,使目的基因能够表达和发挥作用。

(2) PCR 技术扩增目的基因的原理是 DNA 半保留复制;该过程除需要根据目的基因(*GhMnaA2*) 两端部分核苷酸序列设计特异性引物;DNA 聚合酶只能使新合成的 DNA 子链从 5'→3' 方向延伸,为保证 *GhMnaA2* 能插入质粒 2 中,还需要在引物的 5' 端添加限制酶识别序列。

(3) 因为棉花细胞中本来就有 *GhMnaA2*,不管反义表达载体是否导入都能与该探针发生碱基互补配对,故不能用 *GhMnaA2* 探针进行 DNA 分子杂交来鉴定反义表达载体是否导入棉花细胞。

(4) ③过程中,用 *Sma* I 酶和 *Not* I 酶切正义基因表达载体获得 0.05 kb、3.25 kb、5.95 kb、8.45 kb 四种长度的 DNA 片段,单独用 *Not* I 酶切割正义表达载体获得 8.5kb 和 9.2kb 两种长度的 DNA 片段,则用 *Not* I 酶切反义基因表达载体获得 DNA 片段的长度应是 $0.05\text{ kb} + 5.95\text{ kb} = 6.0\text{ kb}$ 、 $3.25\text{ kb} + 8.45\text{ kb} = 11.7\text{ kb}$ 。

(5) 由于反义 *GhMnaA2* 转录的反义 RNA 能与棉花细胞内的 *GhMnaA2* 转录的 mRNA 互补配对,从而抑制基因的表达(翻译),故导入细胞内的反义 *GhMnaA2* 能阻止 β -甘露糖苷酶合成,使棉纤维更长。

18. C 【必刷题型】图表分析—目的基因的获取

【解析】由于乙酰胆碱受体大量分布于神经细胞的细胞膜上,所以在神经细胞中更易获得该基因的 mRNA,A 错误;构建基因表达载体最常用的载体是质粒,B 错误;①是逆转录过程,需要逆转录酶,②是 DNA 的复制,需要 DNA 聚合酶,C 正确;探针筛选的目的是保留被感染的细菌,因为细菌被感染证明基因已经成功转入,应淘汰未被感染的细菌,D 错误。

19. A 【必刷知识】目的基因导入受体细胞

题图分析 图中①为转录过程,②为翻译过程,图中 α 和 β 可互补配对,这样能使多酚氧化酶基因转录形成的 mRNA 沉默,使翻译过程不能进行,即不能形成多酚氧化酶。

【解析】构建基因表达载体需要的工具酶有限制酶、DNA 连接酶,不需要 RNA 聚合酶,A 错误;苹果属于双子叶植物,可采用农杆菌转化法将目的基因成功导入苹果细胞,B 正确;要使目的基因转录形成的 mRNA 和多酚氧化酶基因转录形成的 RNA 互补配对,应使目的基因的表达序列与多酚氧化酶基因的表达序列互补,且要同时在同一细胞内表达,C 正确;“RNA 沉默”的含义是 mRNA 不能指导相关多肽链的合成,即不能翻译产生多酚氧化酶,D 正确。

20. (1) (基因) 分离 一对隐性(核) 氨基酸改变 空间结构

(2) BC (3) 卡那霉素抗性 潮霉素 与 M 植株(非转基因植株)相比,该转基因植株花粉粒数变多、单荚结种数变多,接近野生型植株

【必刷能力】图表分析—转基因技术与作物育种

【解析】(1) 由题意知, A 品系与 Am 杂交, F_2 可育株 377 株, 不育株 136 株, 性状分离比近似 3:1, 符合孟德尔的分离定律; 说明雄性不育性状受一对隐性基因的控制。突变体 Am 中, Br 基因对应的 mRNA 第 160 号位为 U(在 A 植株中为 C), 说明根本原因是发生了碱基的替换, 导致氨基酸改变进而使蛋白质的空间结构变化, 该基因功能丧失。

(2) 根据题目信息, 若 PCR 目的片段包括完整 T-DNA, 无条带, 则图中利用 LP+RP 来扩增, 就包括完整的 T-DNA, 不能扩增出条带, 利用 BP+RP 能扩增出条带, 故选 BC。

(3) 由题图及题干信息可知, 农杆菌对卡那霉素敏感, 白菜对潮霉素敏感, 而基因工程中, 标记基因的作用是便于重组 DNA 分子的筛选, 故图中卡那霉素抗性基因一般用于检测农杆菌是否导入了质粒, 然后利用添加了潮霉素的培养基筛选转基因植株。若与 M 植株相比, 该转基因植株花粉粒数变多、单荚结种数变多, 接近野生型植株, 说明 Br 基因异常是导致雄性不育的原因, 可用于后续研究。

21. (1) BamH I、Xba I

(2) Ca^{2+} 卡那霉素 筛选并扩大培养含重组质粒的农杆菌

(3) ACD

(4) 无菌水 切割 脱分化 潮霉素抗性基因在植物细胞中表达水平低 胚状体 人工种子

【必刷题型】目的基因的检测与鉴定

【解析】(1) 根据题目信息, 目的基因应插入 T-DNA 中, T-DNA 中含有 Bgl II 和 Nhe I 两酶的酶切位点, 则可使用这两个酶处理 T-DNA; 根据表格的信息, Bgl II 形成的黏性末端和 BamH I 形成的黏性末端一致, Nhe I 形成的黏性末端与 Xba I 形成的黏性末端一致, 根据目的基因序列上面的链为编码链, 下面的链是模板链, 为了保证定向连接, 需要把目的基因的左边插入接近启动子的一侧, 故引物 F 上应添加 BamH I 序列, 而引物 R 上应添加 Xba I 序列。

(2) 细菌经过 Ca^{2+} 处理后, 可处于易于吸收外源 DNA 的状态, 有利于表达载体进入农杆菌。因基因表达载体中含有卡那霉素基因, 可作为标记基因用于筛选目的基因, 故需要加入卡那霉素。用含有卡那霉素的 LB 培养基振荡培养, 可筛选的同时增大含有重组质粒的农杆菌的数量, 即目的是筛选并扩大培养含重组质粒的农杆菌。

(3) 目的基因在 T-DNA 上, T-DNA 可转移到染色体 DNA 上, 提取质粒进行检测未必检测到, A 错误; F 和 R 作为引物可扩增出目的基因, 用二者作为引物进行 PCR 扩增后, 有 X 基因的证明含有目的基因, 导入成功, B 正确; 35S 是真核细胞的启动子, 目的基因在真核细胞中才能表达, 在细菌中不能表达, 用抗 X 蛋白抗体检测不到基因表达产物, C 错误; 发出绿色荧光证明

绿色荧光蛋白基因成功表达,不能说明目的基因导入,D 错误。故选 ACD。

(4)消毒的试剂长时间存在可影响细胞活性,需要用无菌水进行冲洗;冲洗后需要对外植体即猕猴桃枝条进行切割,因为植物细胞具有全能性,在适宜条件下脱分化形成愈伤组织,愈伤组织再经过诱导可再分化;当侵染后部分愈伤组织细胞的染色体上已整合了 T-DNA 时,目的基因及标记基因的表达水平很低,潮霉素抗性基因在植物细胞中处于低表达水平,抗性不够,不能马上使用潮霉素杀灭残留农杆菌。愈伤组织再分化可形成一定的结构,如胚状体、体细胞胚或者芽等,加入一定的营养物质和种皮可形成人工种子,方便储存和运输。

关键点拨 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 分子杂交技术或 PCR 技术;②检测目的基因是否转录出了 mRNA——分子杂交技术或 PCR 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。

专题训练

1. B 【必刷知识】传统发酵食品的制作流程

【解析】无氧条件下,乳酸菌能将葡萄糖分解成乳酸,不会产生 CO_2 ,A 错误;毛霉等多种微生物参与腐乳的制作,B 正确;饭煮熟后温度过高,立即接种会导致酵母菌死亡,C 错误;与酒精发酵相比,醋酸发酵需要在较高的温度条件下进行,D 错误。

2. C 【必刷能力】图表分析—微生物的实验室培养和应用

【解析】由题意可知,热纤梭菌是一种嗜热厌氧细菌,牛粪堆的深层比表层氧气含量更低,温度更高,更适合热纤梭菌生存,故从牛粪堆的深层取样比从表层取样更加合理,A 正确;图示是筛选能高效降解纤维素的嗜热厌氧细菌,因此甲、丙都是以纤维素为唯一碳源的选择培养基,B 正确;当两个或多个菌体连在一起时,平板上观察到的只有一个菌落,因此用平板乙统计的菌体数往往比活菌的实际数量少,C 错误;题干中热纤梭菌可分泌一种多酶复合体将纤维素水解为可溶性糖,因此丙中纤维素的残留量可反映该菌降解纤维素的能力,D 正确。

3. ABC 【必刷能力】图表分析—单克隆抗体制备

【解析】该实验的自变量为抗 CD47 的单克隆抗体的有无,根据单一变量原则可知,应设置不加单克隆抗体的巨噬细胞和肿瘤细胞的共培养体系作为对照,A 错误;肿瘤细胞有内质网和高尔基体,参与细胞膜上糖蛋白的形成,但癌细胞表面糖蛋白减少,B 错误;过程②表示用特定的选择培养基筛选出杂交瘤细胞,由于小鼠处在多种抗原刺激下,因此筛选出来的杂交瘤细胞不一定能产生所需的抗体,还需要对第一次筛选的细胞进行克隆化培养和抗体检测,C 错误;抗 CD47 的单克隆抗体可以解除 CD47 对巨噬细胞的抑制作用,对照组没有抗体,CD47 对巨噬细胞有抑制作用,因此对照组中巨噬细胞的吞噬指数显著低于实验组,D 正确。

4. A 【必刷题型】PCR 的基本操作及应用分析

【解析】DNA 子链合成的方向为 5'端到 3'端,因此要通过已知序

列设计引物对未知序列进行扩增应选择引物 1 和引物 4, A 正确; GC 碱基含量越高, 碱基对间氢键的含量越多, 复性的温度越高, B 错误; PCR 产物是包含所有已知序列和未知序列的链状 DNA 分子, C 错误; 整个过程需用到限制酶、DNA 连接酶和耐高温的 DNA 聚合酶, 不需要逆转录酶, D 错误。

关键点拨 PCR 只能扩增两端序列已知的基因片段, 反向 PCR 可扩增一段已知序列的两端未知序列。反向 PCR 的目的在于扩增一段已知序列旁侧的 DNA, 也就是说这一反应体系不是在一对引物之间而是在引物外侧合成 DNA。

5. (1) 附着在蓝莓皮上的野生酵母菌 兼性厌氧 $C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{酶}} 2C_2H_5OH(\text{酒精}) + 2CO_2 + \text{少量能量}$

(2) 缺氧、呈酸性 (3) 醋酸菌 氧气充足 醋酸菌把酒精转化成醋酸 菌膜 (4) 糖源 碳源和能源 (5) 酸性 灰绿

【必刷题型】信息提取—果酒、果醋的制作过程

【解析】(1) 制作蓝莓酒的微生物来自附着在蓝莓皮上的野生酵母菌, 因此过程①冲洗时不要过度冲洗, 防止微生物被冲洗掉。该酵母菌的呼吸类型是兼性厌氧型, 利用该生物生产蓝莓酒的原理是 $C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{酶}} 2C_2H_5OH(\text{酒精}) + 2CO_2 + \text{少量能量}$ 。

(2) 在过程③发酵阶段, 发酵液中缺氧、呈酸性, 酵母菌能生长繁殖, 而绝大多数其他微生物都因无法适应这一环境而受到抑制。

(3) 酿制蓝莓醋的微生物是醋酸菌, 该生物只有在氧气充足时, 才能进行旺盛的生理活动; 在酿制蓝莓酒的过程中会出现酒变酸的原因是醋酸菌把酒精转化成了醋酸, 同时在酒的表面观察到的菌膜就是醋酸菌在液面大量繁殖而形成的。

(4) 当氧气、糖源都充足时, 醋酸菌将蓝莓汁中的糖分解成醋酸; 当缺少糖源时, 醋酸菌将乙醇变为乙醛, 再将乙醛变为醋酸, 此时酒精为醋酸菌提供了碳源和能源。

(5) 酒精在酸性条件下与重铬酸钾反应呈灰绿色。

6. (1) ①启动子 2 ②C 突变基因转录的 mRNA (2) 取适量正常斑马鱼胚胎经阻断 C 基因转录或翻译处理后, 均分为 A、B 两组: A 组注入 C8 与 C12 的 mRNA 和蛋白质, B 组不做处理; 在相同且适宜条件下培养一段时间后, 观察两组肝脏发育情况 A 组肝脏发育正常, B 组为小肝脏 (3) 终止密码子提前出现 C 基因转录的 mRNA 具有同源(相同)序列

【必刷知识】基因工程及其应用

【解析】(1) ①在转录时, RNA 聚合酶与 DNA 上的启动子结合; 翻译时, 核糖体与 mRNA 结合, 核糖体上有 2 个 tRNA 结合位点, tRNA 携带氨基酸进入核糖体中。②当阻断正常斑马鱼胚胎的 C 基因的转录或翻译时, 乙组的肝脏不能正常发育; 而丙组 C 基因发生突变, 产生的蛋白质无任何功能, 但肝脏发育依旧正常, 说明 C 突变基因转录的 mRNA 能发挥作用。

(2) 检测各组中 C 基因的同源基因(部分碱基序列与 C 基因相同或相似) C8 与 C12 的表达情况, 发现甲组和乙组中二者表达量极低, 而丙组表达量较高。进行如下实验分析, 实验目的: 探究基因 C8 与 C12 表达的提高, 利于 C 蛋白功能缺陷时肝脏正常发育; 自变量: 有无 C8 与 C12 的表达产物; 因变量: 肝脏的发育

情况。设计实验思路:取适量正常斑马鱼胚胎经阻断 C 基因转录或翻译处理后,均分为 A、B 两组,A 组注入 C8 与 C12 的 mRNA 和蛋白质,B 组不做处理,在相同且适宜条件下培养一段时间后,观察两组肝脏发育情况。预期结果:A 组肝脏发育正常,B 组为小肝脏,说明基因 C8 与 C12 表达的提高,利于 C 蛋白功能缺陷时肝脏正常发育。

(3)检测 5 种转基因斑马鱼的自身原有 C 基因的表达情况,其中转入 Tg2、4、5 表达载体的斑马鱼 C 基因表达显著增加,对比 Tg2、4、5 表达载体的共同特点,说明终止密码子的提前出现是同源基因表达加强的必要条件。对比 Tg2、3,Tg3 中的 C 基因核苷酸序列被其他无关序列替代,导致斑马鱼 C 基因表达无明显变化,故 C 基因转录的 mRNA 具有同源(相同)序列是同源基因表达加强的必要条件。