

专题 17 基因工程

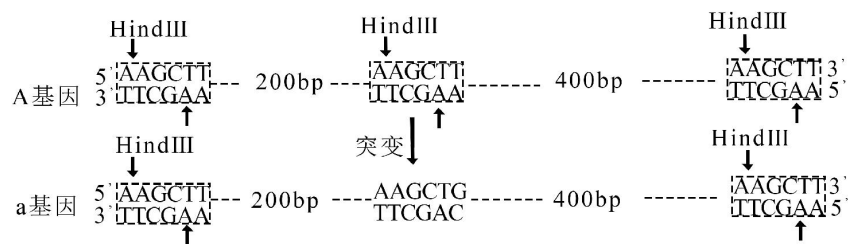
考点 01 重组 DNA 技术的基本工具

一、多选题

(2025·江苏·高考真题)

1. 图示人体正常基因 A 突变为致病基因 a 及 HindIII 切割位点。AluI 限制酶识别序列及切割

位点为 $5' \text{---} \text{AGCT} \text{---} 3'$ ， $3' \text{---} \text{TCGA} \text{---} 5'$ ，下列相关叙述正确的有 ()



- A. 基因 A 突变为 a 是一种碱基增添的突变
- B. 用两种限制酶分别酶切 A 基因后，形成的末端类型不同
- C. 用两种限制酶分别酶切 a 基因后，产生的片段大小一致
- D. 产前诊断时，该致病基因可选用 HindIII 限制酶开展酶切鉴定

考点 02 DNA 的粗提取、PCR、电泳鉴定

一、单选题

(2025·广东·高考真题)

2. Solexa 测序是一种将 PCR 与荧光检测相结合的高通量测序技术。为了确保该 PCR 过程中，DNA 聚合酶催化一个脱氧核苷酸单位完成聚合反应后，DNA 链不继续延伸，应保护底物中脱氧核糖结构上的 ()

- A. 1'-碱基
- B. 2'-氢
- C. 3'-羟基
- D. 5'-磷酸基团

(2025·陕晋青宁卷·高考真题)

3. 对下列关于中学生物学实验的描述错误的是 ()

- ①探究淀粉酶对淀粉和蔗糖的水解作用
- ②观察植物细胞的质壁分离现象
- ③探究培养液中酵母菌种群数量的变化
- ④观察植物细胞的有丝分裂

⑤观察叶绿体和细胞质的流动

⑥DNA 的粗提取与鉴定

- A. ①⑥通过观察颜色判断实验结果 B. ③⑥均须进行离心操作
- C. ②④均可使用洋葱作为实验材料 D. ②⑤实验过程均须保持细胞活性

(2025·湖南·高考真题)

4. 用替代的实验材料或者试剂开展下列实验，不能达成实验目的的是 ()

选项	实验内容	替代措施
A	用高倍显微镜观察叶绿体	用“菠菜叶”替代“藓类叶片”
B	DNA 的粗提取与鉴定	用“猪成熟红细胞”替代“猪肝细胞”
C	观察根尖分生区组织细胞的有丝分裂	用“醋酸洋红液”替代“甲紫溶液”
D	比较过氧化氢在不同条件下的分解	用“过氧化氢酶溶液”替代“肝脏研磨液”

- A. A B. B C. C D. D

(2025·河北·高考真题)

5. 某科创小组将叶绿素合成相关基因转入小麦愈伤组织，获得再生植株，并进行相关检测。

下列实验操作错误的是 ()

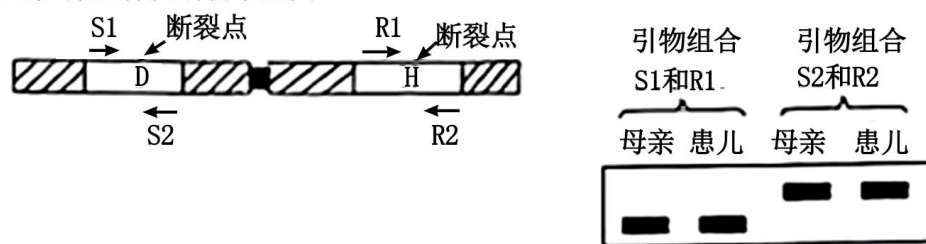
- A. 将种子消毒后，取种胚接种到适当的固体培养基诱导愈伤组织
- B. 在提取的 DNA 溶液中加入二苯胺试剂，沸水浴后观察颜色以鉴定 DNA
- C. 将小麦色素提取液滴加到滤纸条，然后将色素滴加部位浸入层析液进行层析
- D. 对叶片抽气处理后，转到富含 CO₂ 的清水中，探究不同光照下的光合作用强度

二、多选题

(2025·河北·高考真题)

6. X 染色体上的 D 基因异常可导致人体患病，在男性中发病率为 1/3500，某患病男孩（其母亲没有患病）X 染色体上的基因 D 和 H 内各有一处断裂，断裂点间的染色体片段发生颠倒重接。研究者对患儿和母亲的 DNA 进行了 PCR 检测，所用引物和扩增产物电泳结果如图。不考虑其他变异，下列分析错误的是 ()

正常X染色体及引物示意图



注：引物组合 S1 和 S2，R1 和 R2 可分别用于对正常基因 D 和 H 序列的扩增检测

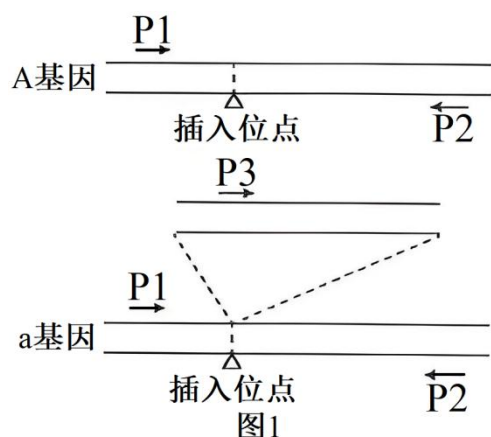
- A. 该病患者中男性显著多于女性，女性中携带者的占比为 1/3500
- B. 用 R1 和 R2 对母亲和患儿 DNA 进行 PCR 检测的结果相同
- C. 与正常男性相比，患病男孩 X 染色体上的基因排列顺序发生改变
- D. 利用 S1 和 S2 进行 PCR 检测，可诊断母亲再次孕育的胎儿是否患该病

二、解答题

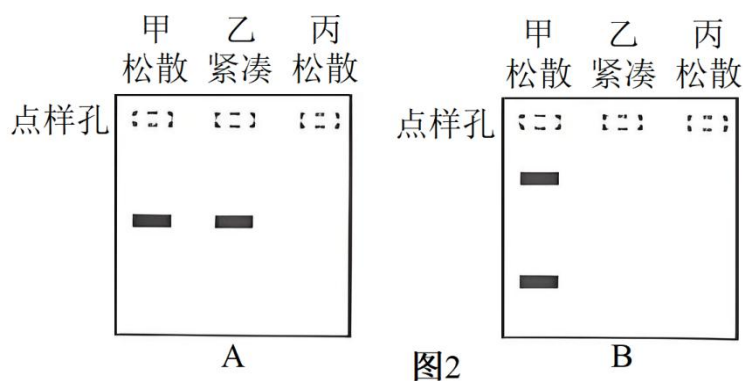
(2025·河南·高考真题)

7. 某二倍体植物松散株型与紧凑株型是一对相对性状，紧凑株型适合高密度种植，利于增产。研究人员获得了一个紧凑株型的植株，为研究控制该性状的基因，将其与纯合松散株型植株杂交， F_1 均为松散株型， F_2 中松散株型：紧凑株型=3：1，控制该相对性状的基因为 A/a。回答下列问题：

- (1) 该紧凑株型性状由_____（填“A”或“a”）基因控制。
- (2) 在 A 基因编码蛋白质的区域中插入一段序列得到 a 基因（图 1），a 基因表达的肽链比 A 基因表达的肽链短。造成此现象的原因是_____。



- (3) 研究人员设计了 3 条引物（P1~P3），位置如图 1（→表示引物 5'→3'方向）。以 3 个 F_2 单株（甲、乙、丙）的 DNA 为模板，使用不同引物组合进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳结果分别为图 2-A 和 2-B（不考虑 PCR 结果异常）。



- ①图 2-A 中使用的引物组合是_____；丙单株无扩增条带的原因是_____。
- ②结合图 2-A 的扩增结果，在图 2-B 中，参照甲的条带补充乙与丙的电泳条带（将正确条带涂黑）_____。
- ③使用图 2-A 中的引物组合扩增 F_2 全部样本，有扩增条带松散株型：无扩增条带松散株型 =_____。

（2025·云南·高考真题）

8. 冬瓜果面有蜡粉可提高果实抗病、耐日灼和耐储性。为探究冬瓜果面蜡粉的遗传方式并对蜡粉基因（用“A”“a”表示）进行定位，科研人员进行了一系列杂交实验，结果如表。

群体	植株总数/株	果面有蜡粉株数/株	果面无蜡粉株数/株
P_1	30	30	0
P_2	30	0	30
F_1	523	523	0
F_2	574	430	144

注： F_1 为 P_1 和 P_2 杂交后代， F_2 为 F_1 自交后代。

回答下列问题：

- (1)根据杂交结果可知，果面蜡粉的遗传遵循基因的_____定律，依据是_____。
- (2)实验证明蜡粉性状的改变是由基因突变引起的，突变基因上出现了一个限制酶 H 的切割位点，可用于在苗期筛选出果实表面有蜡粉的植株，据此设计引物后进行植株基因型鉴定的步骤为：提取基因组 DNA→_____目的 DNA 片段→限制酶 H 切割扩增产物→电泳。结果显示 P_1 植株为 1 条条带， P_2 植株为 2 条条带，则 F_2 中有蜡粉的植株为_____。

条条带，限制酶 H 的切割位点位于_____（填“A”“a”或“A 和 a”）上。

(3)用表中材料设计实验，验证（1）中得到的结论，写出所选材料及遗传图解。

（2025·北京·高考真题）

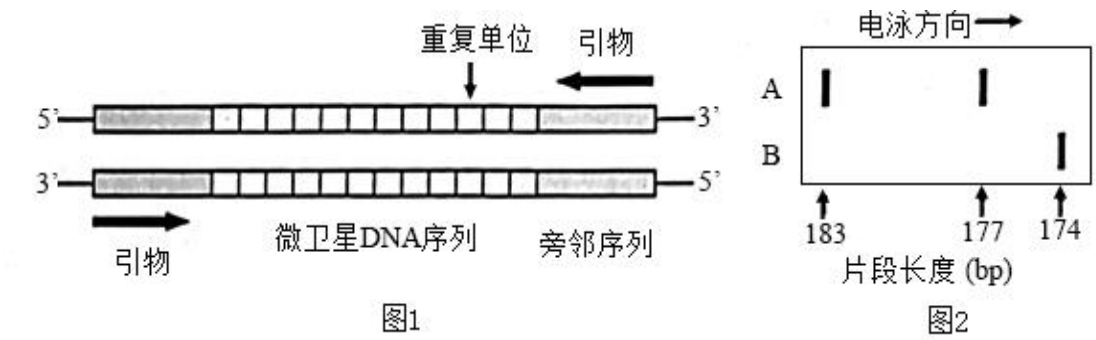
9. 学习以下材料，回答（1）~（4）题。

野生动物个体识别的新方法

识别野生动物个体有助于野外生态学的研究。近年，人们发现可以从动物粪便中提取该动物的 DNA，PCR 扩增特定的 DNA 片段，测定产物的长度或序列，据此可识别个体，在此基础上可以获得野生动物的多种生态学信息。

微卫星 DNA 是一种常用于个体识别的 DNA 片段，广泛分布于核基因组中。每个微卫星 DNA 是一段串联重复序列，每个重复单位长度为 2~6bp（碱基对），重复数可以达到几十个（图 1）。基因组中有很多个微卫星 DNA，分布在不同位置。每个位置的微卫星 DNA 可视为一个“基因”，由于重复单位的数目不同，同一位置的微卫星“基因”可以有多个“等位基因”，能组成多种“基因型”。分析多个微卫星“基因”，可得到个体特异的“基因型”组合，由此区分开不同的个体。

依据微卫星“基因”两侧的旁邻序列（图 1），设计并合成特异性引物，PCR 扩增后，检测扩增片段长度，即可得知所测个体的“等位基因”（以片段长度命名），进而获得该个体的“基因型”。例如，图 2 是对某种哺乳动物个体 A 和 B 的一个微卫星“基因”进行扩增后电泳分析的结果示意图，个体 A 的“基因型”为 177/183。



有一个远离大陆的孤岛，陆生哺乳动物几乎无法到达，人类活动将食肉动物貉带到该岛上。科学家在岛上采集貉的新鲜粪便，提取 DNA，扩增并分析了 10 个微卫星“基因”，结果在 30 份样品中成功鉴定出个体（如表）。几个月后再次采集貉的新鲜粪便，进行同样的分析，在 40 份样品中成功鉴定出个体（如表）。据此，科学家估算出该岛上貉的种群数量。

两次采样所鉴定出的貉的个体编号

第一次采集的 30 份粪便样品所对应的个体编号														
N0	N0	N0	N0	N0	N0	N0	N0	N0	N0	N1	N1	N1	N1	N1
1	2	3	4	5	6	7	8	8	9	0	1	2	2	3
N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
4	4	5	6	7	8	8	9	0	1	2	2	3	4	4
第二次采集的 40 份粪便样品所对应的个体编号														
N0	N0	N0	N0	N0	N0	N1	N1	N1	N2	N2	N2	N2	N2	N2
3	4	5	8	9	9	2	4	8	3	4	5	6	6	6
N2	N2	N2	N3	N3	N3	N3	N3	N3	N3	N3	N3	N3	N3	N3
7	8	9	0	0	1	2	2	3	3	3	4	5	6	7
N3	N3	N4	N4	N4	N4	N4	N4	N4	N4					
8	9	0	1	2	3	4	4	5	6					

- (1)图 2 中个体 B 的“基因型”为_____。
- (2)使用微卫星 DNA 鉴定个体时，能区分的个体数是由微卫星“基因”的数目和_____的数目决定的。
- (3)科学家根据表 1 信息，使用了_____法的原理来估算这个岛上貉的种群数量，计算过程及结果为_____。
- (4)在上述研究基础上，利用现有 DNA 样品，设计一个实验方案，了解该岛貉种群的性别比例_____。

（2025·江苏·高考真题）

10. 川金丝猴是我国特有的珍稀濒危物种，为了更好地保护这一物种，研究者开展了以下研究。请回答下列问题：

- (1)川金丝猴警戒行为具有监测捕食者和同种个体的功能，这说明生物之间的关系有_____。川金丝猴的警戒行为依赖于环境中获取的信息，信息类型有_____。川金丝猴根据这些信息及时作出反应，一方面可以降低被捕食风险，另一方面为争夺_____获得更多机会。
- (2)川金丝猴以植食为主，消化道中部分微生物直接参与高纤维食物的消化，这些微生物与川金丝猴构成_____关系。

(3)研究者为了进一步研究川金丝猴的食性，采集其粪便样本，进行 DNA 提取、扩增，部分实验过程如下。请完成下表：

实验目的	简要操作步骤
释放 DNA	在去杂后的样本中加入裂解液
析出 DNA	离心后取①_____，加入乙醇
②_____	在沉淀物中加入纯水
扩增 DNA	将③_____、引物、样本 DNA、含有 Mg^{2+} 缓冲液、超纯水等加入 PCR 管中，进行 PCR

(4)为分析川金丝猴摄食的植物种类，研究者设计一对引物 F 和 R，能同时扩增出不同种植物叶绿体中的 *rbcL* 基因片段，是因为引物 F 和 R 的碱基能与 *rbcL* 基因的保守序列的碱基_____。用引物 F 和 R 对 4 种植物样本甲~丁的叶绿体基因组 DNA 进行扩增测序，结果如图所示。若对 4 个样本的扩增产物进行 DNA 电泳条带分析，能检出的样本是_____。研究者用引物 F 和 R 对川金丝猴粪便 DNA 进行扩增并测序，得到的序列有图中的 3 种序列，据此可确定川金丝猴摄食的植物有_____。若要更准确鉴定出川金丝猴摄食的植物，参照叶绿体基因库，还需选用_____的保守序列设计引物，对川金丝猴粪便 DNA 进行扩增、测序分析。

引物F……TTGAACAAATACGGCCGTCCCCTATTGGATGTACTA……引物R植物甲
 引物F………引物R植物乙
 引物F………G•T•T………引物R植物丙
 引物F……G•A•G•A•T……引物R植物丁

注：“•”表示与植物甲对应位置上相同的碱基；“……”表示省略 200 个碱基

(5)依据上述研究，保护川金丝猴可采取的措施有_____（填字母）。

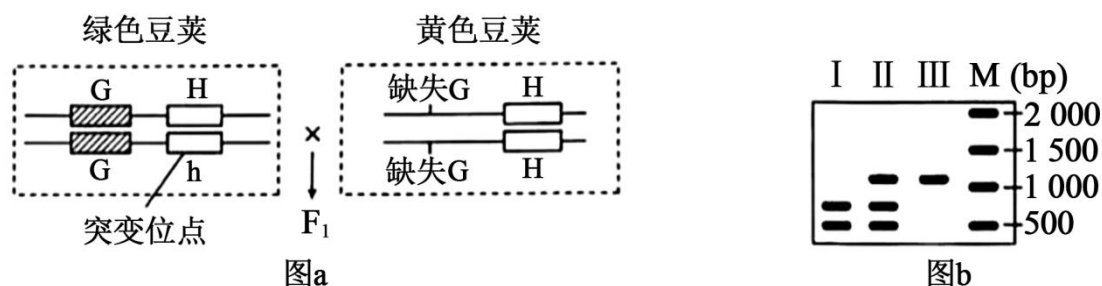
- a. 建立川金丝猴生态廊道，促进种群间基因交流
- b. 保护川金丝猴栖息地的植被和它喜食的植物
- c. 需用标记重捕法定期重捕，以精确监测种群数量
- d. 主要依赖迁地保护，扩大川金丝猴种群数量

（2025·湖南·高考真题）

11. 未成熟豌豆豆荚的绿色和黄色是一对相对性状，科研人员揭示了该相对性状的部分遗传机制。回答下列问题：

(1) 纯合绿色豆荚植株与纯合黄色豆荚植株杂交， F_1 只有一种表型。 F_1 自交得到的 F_2 中，绿色和黄色豆荚植株数量分别为 297 株和 105 株，则显性性状为_____。

(2) 进一步分析发现：相对于绿色豆荚植株，黄色豆荚植株中基因 H（编码叶绿素合成酶）的上游缺失非编码序列 G。为探究 G 和下游 H 的关系，研究人员拟将某绿色豆荚植株的基因 H 突变为 h（突变位点如图 a 所示，h 编码的蛋白无功能），然后将获得的 Hh 植株与黄色豆荚植株杂交，思路如图 a：



① 为筛选 Hh 植株，根据突变位点两侧序列设计一对引物提取待测植株的 DNA 进行 PCR。若扩增产物电泳结果全为预测的 1125bp，则基因 H 可能未发生突变，或发生了碱基对的_____；若 H 的扩增产物能被酶切为 699bp 和 426bp 的片段，而 h 的酶切位点丧失，则图 b（扩增产物酶切后电泳结果）中的_____（填“I”“II”或“III”）对应的是 Hh 植株。

② 若图 a 的 F_1 中绿色豆荚：黄色豆荚=1：1，则 F_1 中黄色豆荚植株的基因型为_____ [书写以图 a 中亲本黄色豆荚植株的基因型（ $\Delta G+H$ ）/（ $\Delta G+H$ ）为例，其中“ ΔG ”表示缺失 G]。据此推测 F_1 中黄色豆荚植株产生的遗传分子机制是_____。

③ 若图 a 的 F_1 中两种基因型植株的数量无差异，但豆荚全为绿色，则说明_____。

考点 03 基因工程的基本操作程序及应用和蛋白质工程

一、单选题

（2025·安徽·高考真题）

12. 质粒 K 中含有 β -半乳糖苷酶基因，将该质粒导入大肠杆菌细胞后，其编码的酶可分解 X-gal，产生蓝色物质，进而形成蓝色菌落，如图所示。科研小组以该质粒作为载体，采用基因工程技术实现人源干扰素基因在大肠杆菌中的高效表达。下列叙述错误的是（ ）

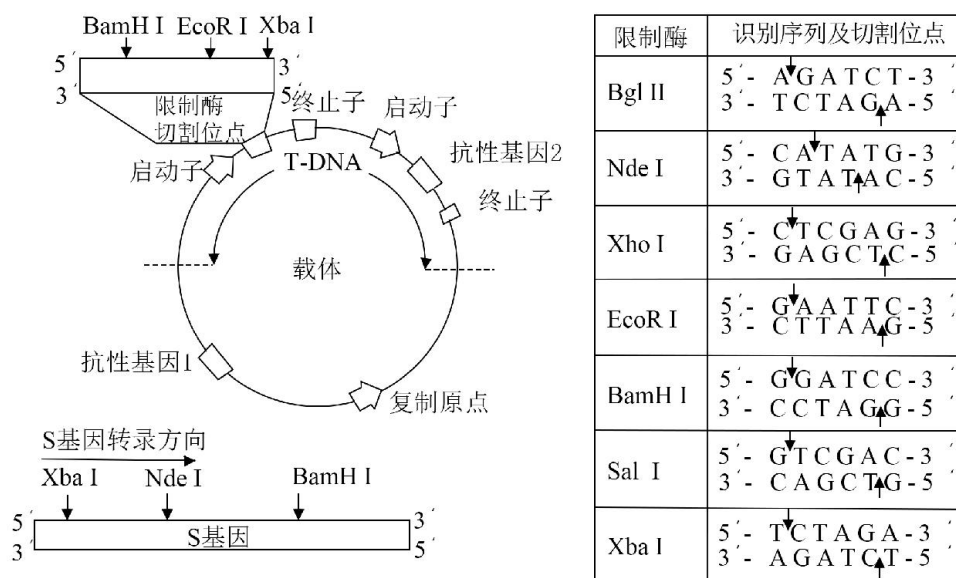


- A. 使用氯化钙处理大肠杆菌以提高转化效率，可增加筛选平板上白色和蓝色菌落数
- B. 如果筛选平板中仅含卡那霉素，生长出的白色菌落不可判定为含目的基因的菌株
- C. 因质粒 K 中含两个标记基因，筛选平板中长出的白色菌落即为表达目标蛋白的菌株
- D. 若筛选平板中蓝色菌落偏多，原因可能是质粒 K 经酶切后自身环化并导入了大肠杆菌

二、解答题

(2025·陕晋青宁卷·高考真题)

13. 马铃薯作为重要农作物，提高其冷耐受性可拓展优质马铃薯的种植区域。我国科研人员发现，野生马铃薯中 S 基因的表达与其冷耐受性调控有关，将该基因导入栽培马铃薯中可显著增强其抗寒能力。回答下列问题。



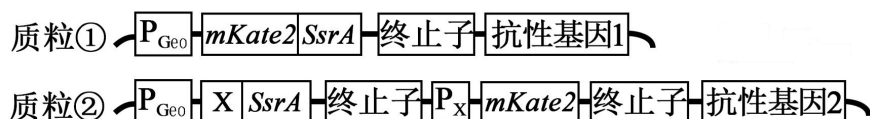
- (1)PCR 扩增目的基因时，需要模板 DNA、引物、_____、含 Mg^{2+} 的缓冲液和耐高温的 DNA 聚合酶。DNA 聚合酶在 PCR 的_____步骤中起作用。
- (2)图中标识了载体和 S 基因中限制酶的切割位点。为将 S 基因正确插入载体，PCR 扩增 S 基因时需在引物的_____（填“5'端”或“3'端”）添加限制酶识别序列，结合上表分析，上游引物应添加的碱基序列是 5'-_____ -3'，切割载体时应选用的两种限制酶是_____，PCR 扩增产物和载体分别被限制酶切割后，经纯化和连接，获得含 S 基因的表达载体并导入农杆菌。

(3)用携带 S 基因的农杆菌侵染栽培马铃薯愈伤组织时,基因表达载体中 T-DNA 进入愈伤组织细胞,将 S 基因整合到_____,抗性基因_____可用于筛选成功转化的愈伤组织。该愈伤组织经_____形成芽、根,继续培育可获得抗寒能力显著增强的马铃薯植株。

(2025·广东·高考真题)

14. 大肠杆菌是重要工业菌株之一,其培养过程可分为快速生长期和生长稳定期两个阶段。为了通过调节蛋白质合成与降解速率来动态调控代谢途径关键酶的蛋白量,使细胞适配不同阶段的生产需求,研究者设计了两种质粒,并以稳定性好的红色荧光蛋白 mKate2 为模式蛋白。测试质粒功能。回答下列问题:

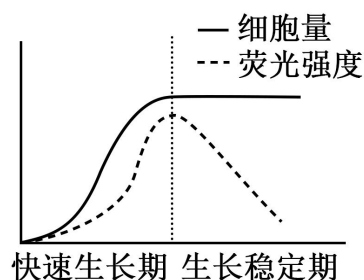
(1)研究者首先构建质粒①(图 a)用于在细胞内表达 C-末端带 SsrA 短肽的 mKate2,将质粒导入感受态细胞后,在添加抗生素的选择培养基上培养。根据培养基上菌落的生长状况,结合 PCR 及_____检测,筛选获得重组菌株 W1。



注: P_{Geo} 为大肠杆菌内源启动子,在细胞快速生长期开启基因转录,但进入生长稳定期后即停止基因转录; *SsrA* 基因编码 SsrA 短肽; C-末端带有 SsrA 短肽的蛋白质可被大肠杆菌内源蛋白酶系统特异性识别并以一定速率降解。

图a

(2)将 W1 在适宜条件下进行摇瓶培养,定时取样检测培养液中细胞密度,方法有_____ (答一种)。接种前需检测液体培养基的荧光强度,其作用是_____。培养结果(图 b)表明,进入生长稳定期后荧光强度快速下降,原因是_____。

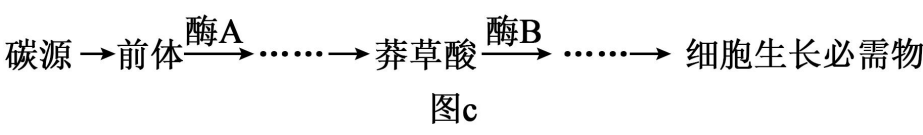


图b

(3)研究者选用启动子 P_X 、X 基因(编码阻遏蛋白 X,阻遏 P_X 开启转录),重新构建质粒②(图 a),导入野生型大肠杆菌中获得重组菌株 W2。在适宜条件下摇瓶培养, W2 的生长趋势不变,培养期间荧光强度的变化趋势为_____。

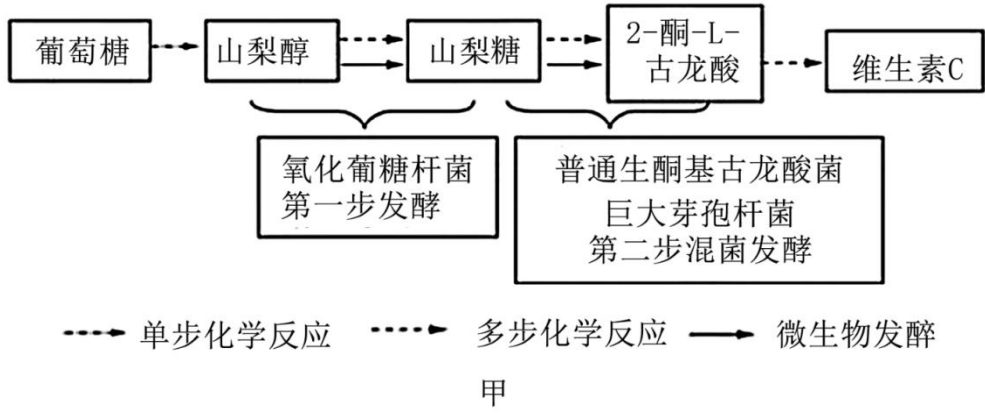
(4)莽草酸是一种重要工业化学品,其胞内合成代谢途径见图 c。由于野生型大肠杆菌胞内酶

A 活性弱，且莽草酸会被快速转化为细胞生长必需物，因此细胞中无法大量积累莽草酸。为了保证细胞正常生长，并在生长稳定期实现莽草酸的大量积累，利用上述两种质粒的调控功能，结合野生型菌株遗传物质的改造，提出重组生产菌株构建思路：_____。

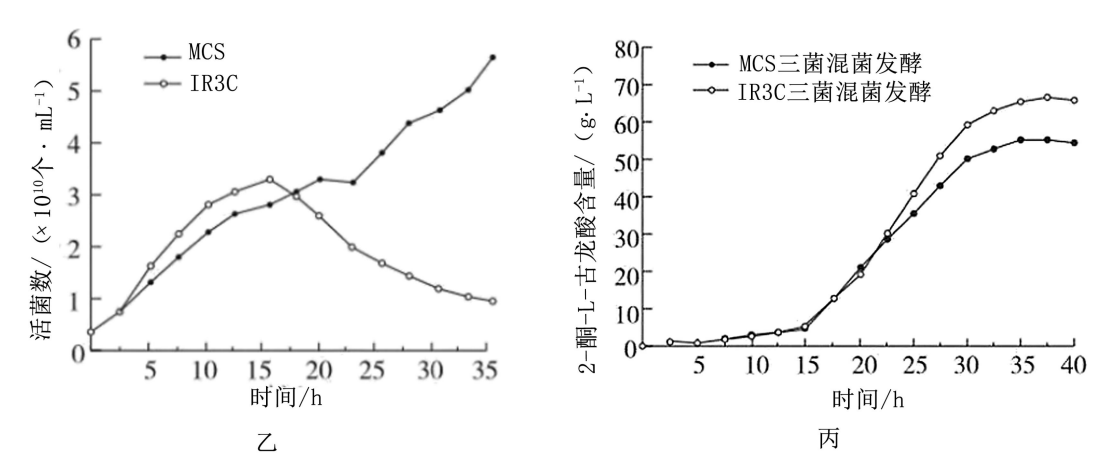


(2025·云南·高考真题)

15. 我国研究人员发明了生产维生素 C 的两步发酵法，流程如图甲。为了减少氧化葡萄糖杆菌竞争性消耗山梨糖，需要进行灭菌以结束第一步发酵。



在两步发酵法的基础上，我国研究人员进一步尝试用三菌混菌体系建立一步发酵法。在氧化葡萄糖杆菌（原始菌 MCS）中利用基因工程技术导入大肠杆菌基因 *ccdB*，得到工程菌 IR3C。MCS 和 IR3C 单菌培养时，活菌数变化曲线如图乙，MCS、IR3C 分别与普通生酮基古龙酸菌和巨大芽孢杆菌进行三菌混菌发酵时，产物含量变化曲线如图丙。



回答下列问题：

(1)要使基因 *ccdB* 在 IR3C 中稳定遗传、表达并发挥作用，构建的基因表达载体除启动子外，

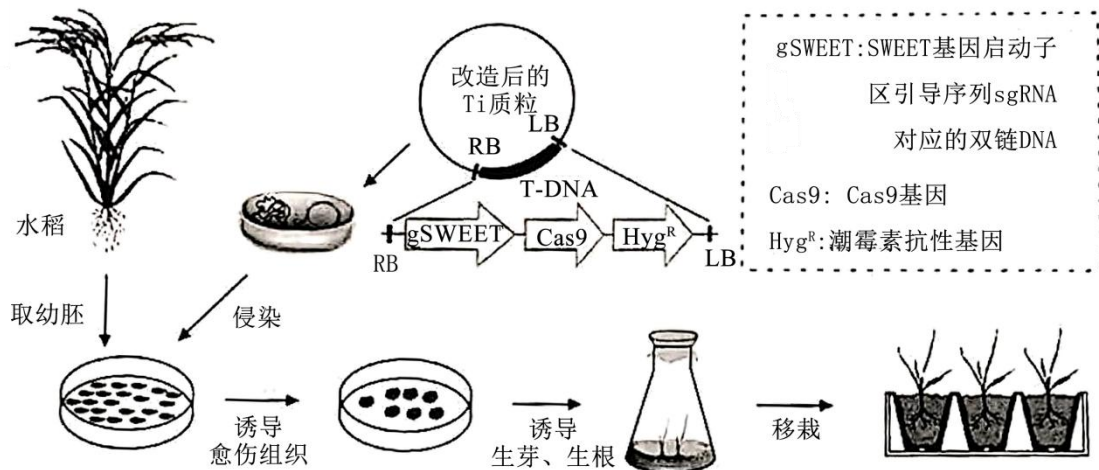
还必须有_____。

(2)绘制图乙需统计活菌数，常用方法是_____。当活菌达到一定数量时，基因 *ccdB* 编码的蛋白质开始发挥作用，推测该蛋白质的作用是_____，开始发挥作用的时间是_____，判断理由是_____。

(3)基于图丙，利用 IR3C 三菌混菌发酵的产量_____（填“高于”或“低于”）MCS 三菌混菌发酵的产量，其原因是_____。

（2025·甘肃·高考真题）

16. 水稻白叶枯病（植株的叶片上会出现逐渐扩大的黄白色至枯白色病斑）由白叶枯病菌引起，严重威胁水稻生产和粮食安全。科学家利用 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术，对水稻白叶枯病的感病基因 *SWEET*（该基因被白叶枯病菌利用以侵染水稻）的启动子区进行了定点“修改”，编辑后的水稻幼胚通过植物组织培养技术获得抗病植株（如下图）。回答下列问题。



(1)CRISPR-Cas9 重组 Ti 质粒构建完成后，可通过_____（方法）将该质粒转入植物细胞，并将_____整合到该细胞的染色体上。为了能够筛选出转化成功的细胞，需要在植物组织培养基中添加_____。

(2)实验中用到的水稻幼胚在植物组织培养中被称为_____，对其消毒时需依次使用酒精和_____处理。诱导形成再生植株的过程中需使用生长素和细胞分裂素，原因是_____。

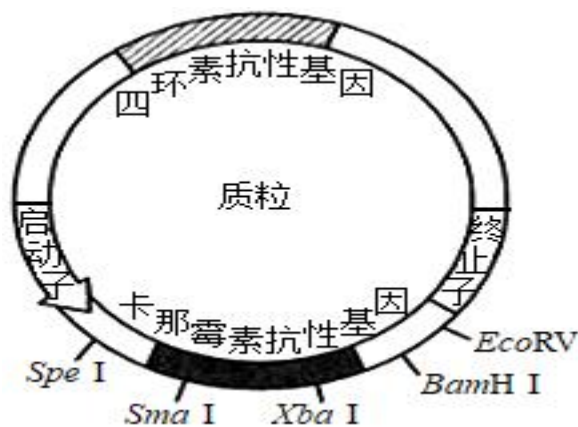
(3)为了检测基因编辑水稻是否成功，首先需采用_____技术检测目标基因的启动子区是否被成功编辑；然后，在个体水平需将基因编辑后的水稻与野生型水稻分别接种白叶枯病菌，通过比较_____来验证抗病性。

(4)在该研究中，基因编辑成功后的水稻可以抗白叶枯病的原因_____。

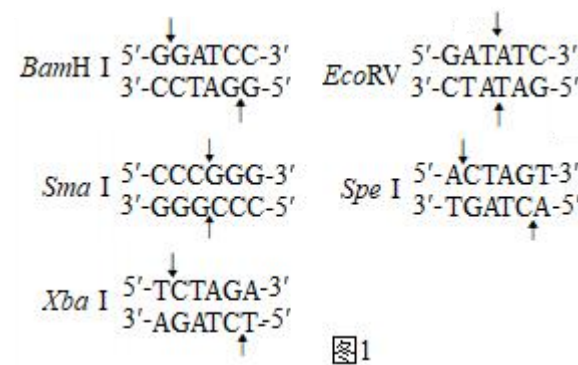
（2025·河南·高考真题）

17. 卡拉胶是一类源于海洋红藻的大分子多糖，可被某些细菌降解为具有多种应用前景的卡拉胶寡糖。某研究小组拟筛选具有高活性卡拉胶酶（CG）的菌种用于生产卡拉胶寡糖。回答下列问题：

- (1)选择海藻和海泥作为样本筛选卡拉胶降解菌的原因是_____。将培养后的菌液混匀并充分_____，再接种至微孔板中，经培养和筛选获得了 CG 活性最高的菌种。
- (2)为构建携带 cg（CG 的编码基因）的大肠杆菌表达载体（图 1），对 cg 的 PCR 扩增产物和质粒进行双酶切，随后用 E.coliDNA 连接酶连接。为保证连接准确性和效率，cg 转录模板链的 5'端最好含有_____酶切位点。另有两组同学选用了各不相同的双酶切组合和 T4DNA 连接酶重复上述实验，获得的部分重组质粒分子大小符合预期，但均无法使用各自构建表达载体的双酶切组合进行切割，其原因是_____。

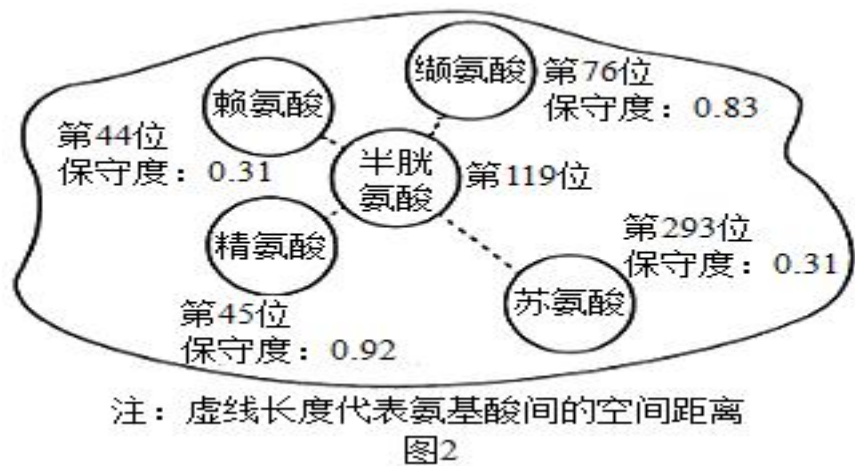


限制酶的识别序列和切割位点如下：



- (3)为将构建好的表达载体转入大肠杆菌，需要先用 Ca^{2+} 处理大肠杆菌细胞，目的是_____，随后在含_____和_____的培养基中培养一段时间后，根据菌落周围有无水解透明圈筛选目的菌株。
- (4)已知空间上邻近的两个半胱氨酸易形成二硫键，从而提升蛋白质的耐热性。为提高 CG 的耐热性，研究人员分析了五个氨基酸位点的空间距离和保守度（保守度值越大表明该位点

对酶的功能越关键)，如图 2 所示。根据分析结果，选择第_____位的氨基酸替换成半胱氨酸最合适，原因是_____。

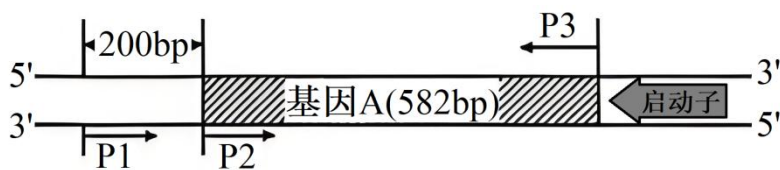


(2025·湖南·高考真题)

18. 非洲猪瘟病毒是一种双链 DNA 病毒，可引起急性猪传染病。基因 A 编码该病毒的主要结构蛋白 A，其在病毒侵入宿主细胞和诱导机体免疫应答过程中发挥重要作用。回答下列问题：

(1)制备特定抗原

①获取基因 A，构建重组质粒（该质粒的部分结构如图所示）。重组质粒的必备元件包括目的基因、限制酶切割位点、标记基因、启动子和_____等；为确定基因 A 已连接到质粒中且插入方向正确，应选用图中的一对引物_____对待测质粒进行 PCR 扩增，预期扩增产物的片段大小为_____bp。



注:P1、P2和P3表示引物

②将 DNA 测序正确的重组质粒转入大肠杆菌构建重组菌。培养重组菌，诱导蛋白 A 合成。收集重组菌发酵液进行离心，发现上清液中无蛋白 A，可能的原因是_____（答出两点即可）。

(2)制备抗蛋白 A 单克隆抗体

用蛋白 A 对小鼠进行免疫后，将免疫小鼠 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，诱导融合的常用方法有_____（答出一种即可）。选择培养时，对杂交瘤细胞进行克隆化培养和_____，多次筛选获得足够数量的能分泌所需抗体的细胞。体外培养或利用小鼠大量生产的抗蛋白 A 单克隆抗体，可用于非洲猪瘟的早期诊断。

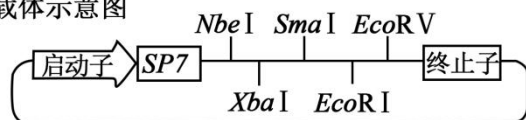
(2025·河北·高考真题)

19. 为治理水体中对生物有毒害的镉污染,研究者构建了分泌信号肽 SP7、镉离子结合蛋白 CADR、定位于细胞壁蛋白 GPI 和黄色荧光蛋白 YFP 编码序列融合表达的载体,转入单细胞衣藻,实现 CADR 大量合成、分泌并定位于细胞壁,以吸附水体中的镉离子。回答下列问题:

(1)在 DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 和脱氧核苷酸中,随着 PCR 反应进行,分子数量逐渐减少的是____和____。模板与引物在 PCR 反应的____阶段开始结合。PCR 中使用的 DNA 聚合酶需耐高温,其原因为_____。

(2)载体中可用的酶切位点信息和拟构建载体的部分结构如图 1 所示。在将 CADR、GPI 和 YFP 基因逐个构建到载体时,为避免错误连接,需向以上三个基因的两端分别添加限制酶识别序列,其中 GPI 两端应添加_____(填两种限制酶)的识别序列。用 DNA 连接酶连接时,可催化载体和目的基因之间形成_____键。

载体示意图



拟构建载体的部分结构示意图:



限制酶识别序列及切割位点:

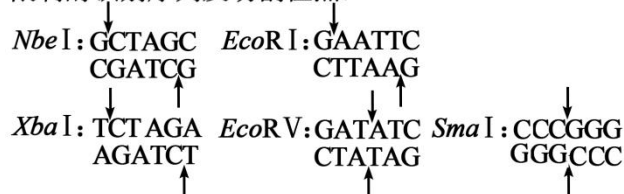


图1

(3)若在荧光显微镜下观察到转基因衣藻表现为_____,初步表明融合蛋白表达成功。将转基因衣藻和野生型衣藻置于含镉离子的培养液中培养一段时间后,若转基因衣藻细胞壁比野生型衣藻细胞壁的镉离子含量_____,则表明融合蛋白能结合镉离子。

(4)将转基因衣藻和野生型衣藻在不同镉离子浓度的培养液中培养 6 天后,检测细胞密度,结果见图 2。转基因衣藻在含有不同浓度镉离子的培养液中生长均优于野生型衣藻的原因可能是_____。240 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉离子浓度下,转基因衣藻和野生型衣藻生长均被明显抑制的原因可能是_____。

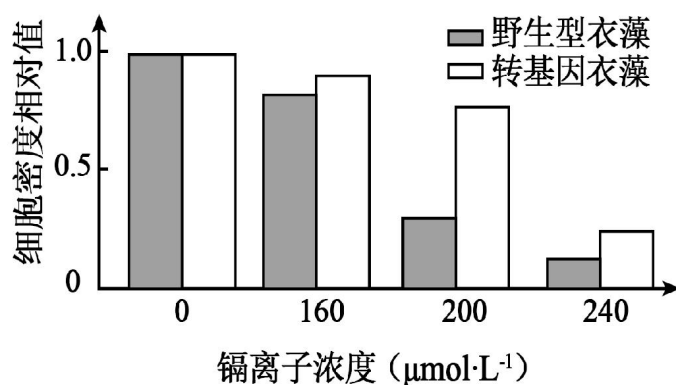


图2

注：镉离子对渗透压的影响忽略不计

(5)转基因衣藻可用于水体镉污染治理，与施加化学药物法相比，能体现出其环境治理优势的两个特性是_____和_____。（填标号）

①衣藻作为生物材料在水体中可自我繁殖②衣藻生长速率受镉离子浓度影响③衣藻可吸收水体中能引起富营养化的物质④衣藻吸附的镉可沿食物链传递

（2025·湖北·高考真题）

20. 某种昆虫病毒的遗传物质为双链环状 DNA.该病毒具有包膜结构，包膜上的蛋白 A 与宿主细胞膜上的受体结合后，两者的膜发生融合，从而使病毒 DNA 进入细胞内进行自我复制。

回答下列问题：

(1)要清楚观察病毒的形态结构需要使用的显微镜类型是_____。

(2)体外培养的梭形昆虫细胞，被上述病毒感染后会转变为圆球形，原因是病毒感染引起了昆虫细胞内_____（填细胞结构名称）的改变。

(3)这类病毒的基因组中通常含有抗细胞凋亡的基因，这类基因对病毒的生物学意义是：_____。

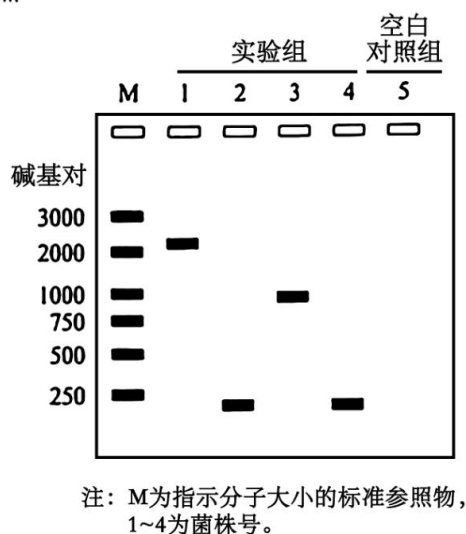
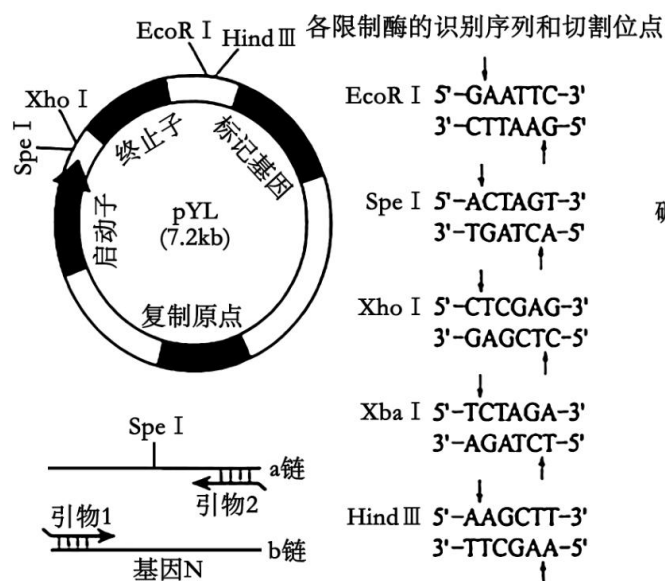
(4)该病毒 DNA 能在宿主细胞中自我复制，却无法在大肠杆菌中复制。为解决这一问题，可在该病毒的 DNA 中插入_____序列，以实现利用大肠杆菌扩增该病毒 DNA 的目的。

(5)用该病毒感染哺乳动物细胞，可以在细胞内检测到该病毒完整的基因组 DNA，但无对应的转录产物。推测其无法转录的原因是：_____。

(6)采用脂溶剂处理该病毒颗粒可使病毒失去对宿主细胞的感染性，其原因是：_____。

（2025·黑吉辽蒙卷·高考真题）

21. 香树脂醇具有抗炎等功效，从植物中提取难度大、产率低。通过在酵母菌中表达外源香树脂醇合酶基因 N，可高效生产香树脂醇。回答下列问题。



(1)可从_____中查询基因 N 的编码序列，设计特定引物。如图 1 所示，a 链为转录模板链，为保证基因 N 与质粒 pYL 正确连接，需在引物 1 和引物 2 的 5'端分别引入_____和_____限制酶识别序列。PCR 扩增基因 N，特异性酶切后，利用_____连接 DNA 片段，构建重组质粒，大小约 9.5kb (kb 为千碱基对)，假设构建重组质粒前后，质粒 pYL 对应部分大小基本不变。

(2)进一步筛选构建的质粒，以 1-4 号菌株中提取的质粒为模板，使用引物 1 和引物 2 进行 PCR 扩增，电泳 PCR 产物，结果如图 2。在第 5 组的 PCR 反应中，使用无菌水代替实验组的模板 DNA，目的是检验 PCR 反应中是否有_____的污染。初步判断实验组_____（从“1~4”中选填）的质粒中成功插入了基因 N，理由是_____。

(3)为提高香树脂醇合酶催化效率，将编码第 240 位脯氨酸或第 243 位苯丙氨酸的碱基序列替换为编码丙氨酸的碱基序列，丙氨酸的密码子有 GCA 等。a 是诱变第 240 位脯氨酸编码序列的引物（GCA 为诱变序列），b、c、d 其中一条是诱变第 243 位苯丙氨酸的引物，其配对模板与 a 的配对模板相同。据此分析，丙氨酸的密码子除 GCA 外，还有_____。

a: 5'-...GCA/CCC/GAG/TTC/TGG/CTG/TTT/CCC/TCT/TTC/TTC...-3'

b: 5'-...GAA/CTG/TGG/GAC/ACC/CTG/AAC/TAC/TTC/TCT/GAG...-3'

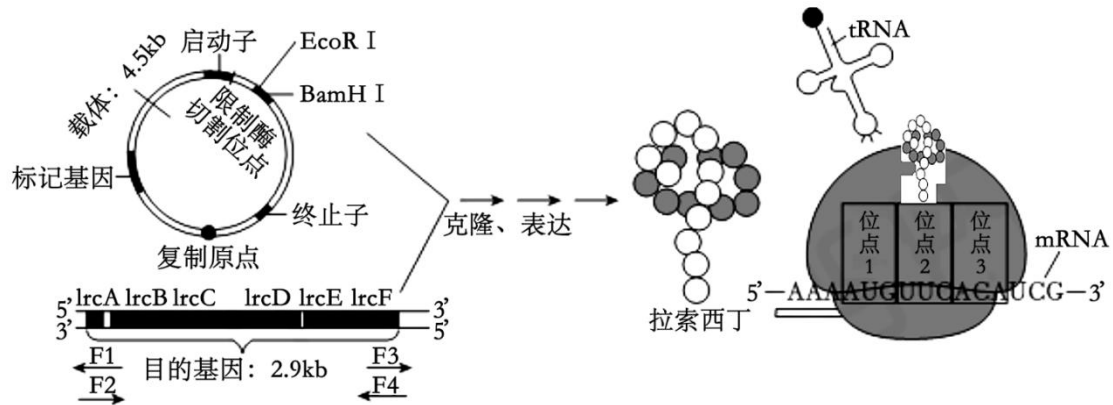
c: 5'-...GCC/TGG/CTG/TTT/CCC/TCT/TTC/TTC/CCC/TAC/CAC...-3'

d: 5'-...GAT/AAT/AAG/ATC/CGA/GAG/AAG/GCC/ATG/CGA/AAG...-3'

(4)进一步检测转基因酵母菌发酵得到的_____含量并进行比较，可以选出最优的香树脂醇合酶基因的改造方案。

(2025·四川·高考真题)

22. 杆菌 M2 合成的短肽拉索西丁能有效杀死多种临床耐药细菌。拉索西丁能与细菌的核糖体结合，阻止携带氨基酸的 tRNA 进入核糖体位点 2。有人将合成拉索西丁的相关基因 (lrcA-lrcF) 导入链霉菌，基因克隆流程及拉索西丁的作用机制如下图。回答下列问题。



注：①F1、F2、F3 和 F4 为与相应位置的 DNA 配对的单链引物，“→”指引物 5-3 方向。②密码子对应的氨基酸：AAA-赖氨酸；AUG-甲硫氨酸（起始）；UUC-苯丙氨酸；ACA-苏氨酸；UCG-丝氨酸。

- (1)用 PCR 技术从杆菌 M2 基因组中扩增 *lrcA-lrcF* 目的基因时，应选用_____引物。本研究载体使用了链霉菌的复制原点，其目的是_____。
- (2)采用 *EcoRI* 和 *BamHI* 完全酶切构建的重组质粒，产物通过琼脂糖凝胶电泳检测应产生_____条电泳条带，电泳检测酶切产物的目的是_____。
- (3)由图可知，拉索西丁与核糖体结合后，会阻止携带_____（填氨基酸名称）的 tRNA 进入结合位点，导致_____，最终引起细菌死亡。
- (4)重组链霉菌的目的基因产物经验证有杀菌活性，但重组菌在实验室多次培养后，提取的目的基因产物杀菌活性丧失，可能的原因是_____。若运用发酵工程来生产拉索西丁工程药物，除产物活性外还需进一步研究的问题有_____（答出 1 点即可）。

(2025·河北·高考真题)

23. T-DNA 插入失活是研究植物基因功能的常用方法，研究者将带有卡那霉素抗性基因的 T-DNA 插入拟南芥 2 号染色体的 A 基因内，使其突变为丧失功能的 a 基因，花粉中 A 基因功能的缺失会造成其不育。回答下列问题：

- (1)基因内碱基的增添、缺失或_____都可导致基因突变。
- (2)以 Aa 植株为_____（填“父本”或“母本”）与野生型拟南芥杂交，F₁ 中卡那霉素抗性植株

的占比为 0，其反交的 F_1 中卡那霉素抗性植株的占比为_____。

(3)为进一步验证基因 A 的功能，将另一个 A 基因插入 Aa 植株的 3 号染色体。仅考虑基因 A 和 a，该植株会产生_____种基因型的可育花粉，其中具有 a 基因的花粉占比为_____。该植株自交得到 F_1 ，利用图 1 所示引物 P1 和 P2、P1 和 P3 分别对 F_1 进行 PCR 检测，电泳结果如图 2 所示。根据电泳结果 F_1 植株分为 I 型和 II 型，其中 I 型植株占比为_____。 F_1 中没有检测到仅扩增出 600bp 条带的植株，其原因为_____。

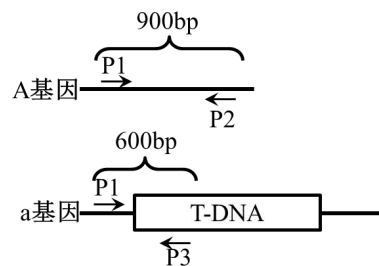


图1

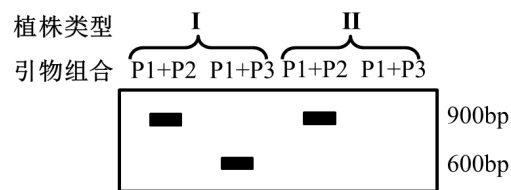


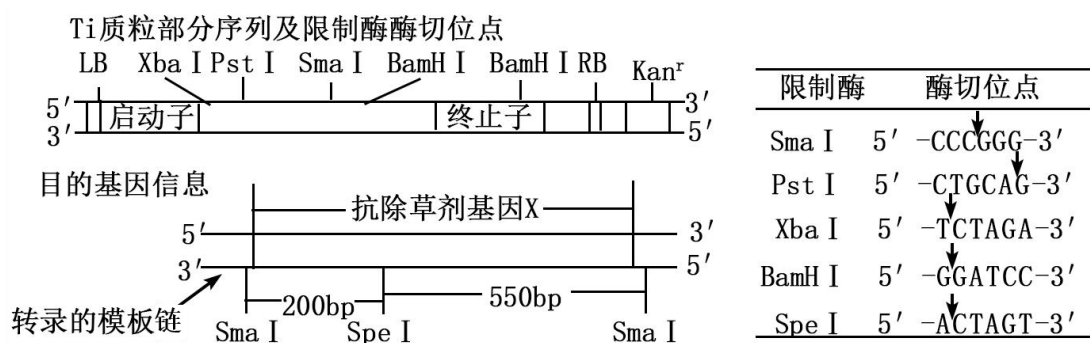
图2

(4)实验中还获得了一个 E 基因被 T-DNA 插入突变为 e 基因的植株，e 基因纯合的种子不能正常发育而退化。为分析基因 E/e 和 A/a 在染色体上的位置关系，进行下列实验：

- ①利用基因型为 AaEE 和 AAEE 的植株进行杂交，筛选出基因型为_____的 F_1 植株。
- ②选出的 F_1 植株自交获得 F_2 。不考虑其他突变，若 F_2 植株中花粉和自交所结种子均发育正常的植株占比为 0，E/e 和 A/a 在染色体上的位置关系及染色体交换情况为_____；若两对基因位于非同源染色体，该类植株的占比为_____。除了上述两种占比，分析该类植株还可能的其他占比和原因：_____。

（2025·山东·高考真题）

24. 种子休眠是抵御穗发芽的一种机制。通过对 Ti 质粒的改造，利用农杆菌转化法将 Ti 质粒上的 T-DNA 随机整合到小麦基因组中，筛选到 2 个种子休眠相关基因的插入失活纯合突变体。与野生型相比，突变体种子的萌发率降低。小麦基因组序列信息已知。

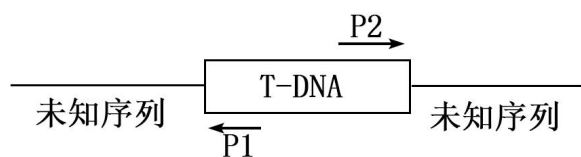


注：LB/RB:T-DNA的边界序列；Kan^r:卡那霉素抗性基因；bp:碱基对

图甲 Ti质粒与抗除草剂基因信息

(1)Ti 质粒上与其在农杆菌中的复制能力相关的结构为_____。选用图甲中的 SmaI 对抗除草剂基因 X 进行完全酶切，再选择 SmaI 和_____对 Ti 质粒进行完全酶切，将产生的黏性末端补平，补平时使用的酶是_____。利用 DNA 连接酶将酶切后的包含抗除草剂基因 X 的片段与酶切并补平的 Ti 质粒进行连接，构建重组载体，转化大肠杆菌；经卡那霉素筛选并提取质粒后再选用限制酶_____进行完全酶切并电泳检测，若电泳结果呈现一长一短 2 条带，较短的条带长度近似为_____bp，则一定为正向重组质粒。

(2)为证明这两个突变体是由于 T-DNA 插入到小麦基因组中同一基因导致的，提取基因组 DNA，经酶切后产生含有 T-DNA 的基因组片段（图乙）。在此酶切过程中，限于后续 PCR 难以扩增大片段 DNA，最好使用识别序列为_____（填“4”“6”或“8”）个碱基对的限制酶，且 T-DNA 中应不含该酶的酶切位点。需首先将图乙的片段_____，才能利用引物 P1 和 P2 成功扩增未知序列。PCR 扩增出未知序列后，进行了一系列操作，其中可以判断出 2 条片段的未知序列是否属于同一个基因的操作为_____（填“琼脂糖凝胶电泳”或“测序和序列比对”）。



注：P1、P2表示引物

图乙 基因组DNA酶切后含T-DNA的片段

(3)通过农杆菌转化法将构建的含有野生型基因的表达载体转入突变植株，如果检测到野生型基因，_____（填“能”或“不能”）确定该植株的表型为野生型。

（2025·安徽·高考真题）

25. 稻瘟病是一种真菌病害，水稻叶片某些内生放线菌对该致病菌有抑制作用。科研小组分

离筛选出内生放线菌，并开展了相关研究。回答下列问题。

(1)采集有病斑的水稻叶片，经表面消毒、研磨处理，制备研磨液。此后，采用_____（填方法）将研磨液接种于不同的选择培养基，分别置于不同温度下培养，目的是_____。

(2)经筛选获得一株内生放线菌，该菌株高效合成铁载体小分子，能辅助内生放线菌吸收铁离子。R 基因是合成铁载体的关键基因之一。科研小组构建 R 基因敲除株，探究铁载体的功能。主要步骤如下：首先克隆 R 基因的上游片段 R-U 和下游片段 R-D；然后构建重组质粒；最后利用重组质粒和内生放线菌 DNA 片段中同源区段可发生交换的原理，对目标基因进行敲除。如图 1 所示。

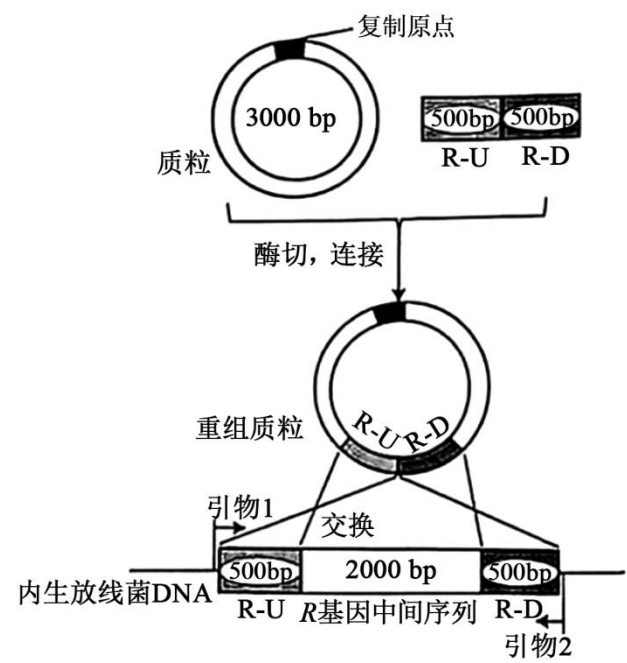


图1

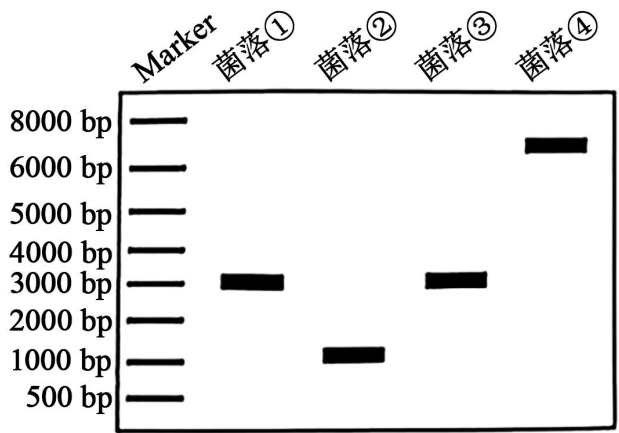


图2

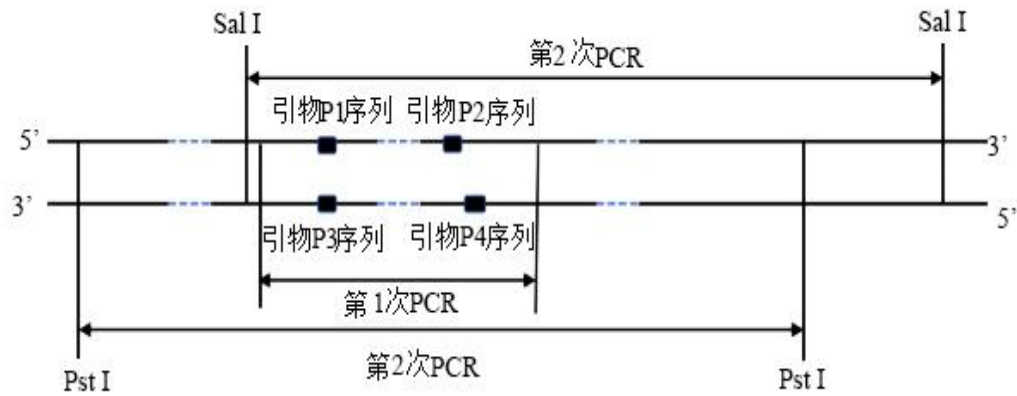
说明：用图1中的引物1和2进行PCR扩增。

采用 PCR 技术鉴定 R 基因的敲除结果。PCR 通过变性、复性和延伸三步，反复循环，可实现基因片段的_____。R 基因敲除过程中，可发生多种形式的同源区段交换，PCR 检测结果如图 2 所示，其中 R 基因敲除株为菌落_____（填序号），出现菌落④的可能原因是_____。

(3)内生放线菌和稻瘟病致病菌的生长均需要铁元素。科研小组推测该内生放线菌通过对铁离子的竞争性利用，从而抑制稻瘟病致病菌生长。设计实验验证该推测，简要写出实验思路_____。

（2025·浙江·高考真题）

26. 3-磷酸甘油脱氢酶（GPD）是酵母细胞中甘油合成的关键酶。利用某假丝酵母菌株为材料，克隆具有高效催化效率的 3-磷酸甘油脱氢酶的基因（Gpd）。采用的方案是：先通过第 1 次 PCR 扩增出该基因的中间部分，再通过第 2 次 PCR 分别扩增出该基因的两侧，经拼接获得完整基因的序列，如图所示，回答下列问题：



(1)分析不同物种的 GPD 蛋白序列，确定蛋白质上相同的氨基酸区段，依据这些氨基酸所对应的_____，确定 DNA 序列，进而设计 1 对引物。以该菌株基因组 DNA 为模板进行第 1 次 PCR，利用_____凝胶电泳分离并纯化 DNA 片段，进一步测定 PCR 产物的序列。在制备 PCR 反应体系时，每次用微量移液器吸取不同试剂前，需要确认或调整刻度和量程，还需要_____。

(2)若在上述 PCR 扩增结果中，除获得一条阳性条带外，还出现了另外一条条带，不可能的原因是_____。

- A. DNA 模板被其他酵母细胞的基因组 DNA 污染
- B. 每个引物与 DNA 模板存在 2 个配对结合位点

C. 在基因组中 Gpd 基因有 2 个拷贝

D. 在基因组中存在 1 个与 Gpd 基因序列高度相似的其他基因

(3)为获得完整的 Gpd 基因，分别用限制性核酸内切酶 PstI和 SalI单酶切基因组 DNA 后，各自用 DNA 连接酶连接形成环形 DNA，再用苯酚-氯仿抽提除去杂质，最后加入_____沉淀环形 DNA。根据第一次 PCR 产物测定获得的序列，重新设计一对引物，以环形 DNA 为模板进行第二次 PCR，最后进行测序。用于第二次 PCR 的一对引物，其序列应是 DNA 链上的_____（A. P1 和 P2 B. P3 和 P4 C. P1 和 P4 D. P2 和 P3）。根据测序结果拼接获得完整的 Gpd 基因序列，其中的启动子和终止子具有_____功能。

(4)为确定克隆获得的 Gpd 基因的准确性，可将获得的基因序列与已建立的_____进行比对。将 Gpd 基因的编码区与_____连接，构建重组质粒，再将重组质粒导入酿酒酵母细胞中，实现利用酿酒酵母高效合成甘油的目的。

《专题 17 基因工程（全国通用）-【好题汇编】2025 年高考生物真题分类汇编》参考答案：

1. BD

【分析】“分子手术刀”——限制酶：（1）来源：主要是从原核生物中分离纯化出来的。（2）功能：能够识别双链 DNA 分子的某种特定的核苷酸序列，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开，因此具有专一性。（3）结果：经限制酶切割产生的 DNA 片段末端通常有两种形式，即黏性末端和平末端。

【详解】A、对比 A 基因和 a 基因的序列，A 基因中“AAGCTT”变为 a 基因中

“AAGCTG”，是碱基替换（T→G），并非碱基增添，A 错误；

B、HindIII 切割产生黏性末端，AluI 切割后产生的是平末端，二者末端类型不相同，B 正确；

C、a 基因中有 2 个 Hind III 切割位点，切割后产生 3 个片段，有 3 个 Alu I 切割位点，切割后产生 4 个片段，用两种限制酶分别酶切 a 基因后，产生的片段大小不一致，C 错误；

D、因为正常基因 A 和致病基因 a 的 HindIII 切割位点数量不同，所以产前诊断时，该致病基因可选用 HindIII 限制酶开展酶切鉴定，D 正确。

故选 BD。

2. C

【分析】在 DNA 复制过程中，在 DNA 聚合酶的催化作用下，将一个个的脱氧核苷酸连接形成磷酸二酯键，使子链延伸，但是 DNA 聚合酶催化延伸子链方向只能从 5'→3'。

【详解】已知 DNA 聚合酶催化延伸子链方向只能从 5'→3'，原因是脱氧核苷酸的 3'碳有羟基，可以结合下一个脱氧核苷酸的 5'碳的磷酸基团，故为了 DNA 聚合酶催化一个脱氧核苷酸单位完成聚合反应后，DNA 链不继续延伸，应保护底物中脱氧核糖结构上的 3'-羟基，使其不能结合下一个脱氧核苷酸的 5'碳的磷酸基团，C 正确。

故选 C。

3. B

【分析】探索淀粉酶对淀粉和蔗糖的作用的实验中，最后需要用斐林试剂检测，因此需要水浴加热和根据颜色反应来确定。

【详解】A、淀粉和蔗糖都不是还原糖，不能与斐林试剂反应，淀粉和蔗糖水解产物为还原糖，可以与斐林试剂反应，因此可以用斐林试剂鉴定淀粉酶对淀粉和蔗糖的水解作用，若淀粉组出现红黄色，蔗糖组没有出现红黄色，说明淀粉酶可以催化淀粉水解不能催化蔗糖水解；

⑥中 DNA 与二苯胺在沸水浴下显蓝色，因此①⑥均通过颜色判断结果，A 正确；

B、③通过血球计数板直接计数酵母菌，无需离心；⑥需离心去除杂质以提取 DNA，B 错误；
C、②可用洋葱紫色外表皮观察质壁分离，④可用洋葱根尖分生区观察有丝分裂，C 正确；
D、②活的植物细胞原生质体具有选择透性，可以发生质壁分离现象；⑤活细胞的叶绿体和细胞质才能流动，因此

②⑤实验过程均须保持细胞活性，D 正确。

故选 B。

4. B

【分析】制作装片流程：解离→漂洗→染色→制片。解离的目的是用药液使组织中的细胞相互分离开来，漂洗的目的是洗去药液，防止解离过度，染色时用甲紫溶液或醋酸洋红液能使染色体着色。

【详解】A、藓类叶片薄，只有一层细胞，可直接用于观察叶绿体，菠菜叶由多层细胞构成，但可用菠菜叶稍带些叶肉的下表皮细胞来观察叶绿体，因为叶肉细胞中有叶绿体，所以能用“菠菜叶”替代“藓类叶片”进行高倍显微镜观察叶绿体的实验，A 正确；

B、猪是哺乳动物，猪成熟红细胞没有细胞核和众多细胞器，也就不含 DNA，而猪肝细胞含有细胞核和线粒体等含有 DNA 的结构，所以不能用“猪成熟红细胞”替代“猪肝细胞”进行 DNA 的粗提取与鉴定实验，B 错误；

C、醋酸洋红液和甲紫溶液都属于碱性染料，都能使染色体着色，所以在观察根尖分生区组织细胞的有丝分裂实验中，能用“醋酸洋红液”替代“甲紫溶液”，C 正确；

D、肝脏研磨液中含有过氧化氢酶，所以在比较过氧化氢在不同条件下的分解实验中，能用“过氧化氢酶溶液”替代“肝脏研磨液”，D 正确。

故选 B。

5. C

【分析】色素提取的原理：叶绿体中的色素溶解于有机溶剂，如无水乙醇；色素分离的原理：四种色素在层析液中的溶解度不同，因而随层析液在滤纸上扩散的速度不同，溶解度越高，扩散速度越快，溶解度越低，扩散速度越慢。

【详解】A、将种子消毒后，取种胚接种到适当的固体培养基可以诱导愈伤组织，这是植物组织培养中常用的获取愈伤组织的方法，A 正确；

B、在提取的 DNA 溶液中加入二苯胺试剂，沸水浴后会出现蓝色反应，以此来鉴定 DNA，B 正确；

C、在进行色素层析时，色素滴加部位不能浸入层析液，否则色素会溶解在层析液中，无法

在滤纸条上进行层析分离，C 错误；

D、对叶片抽气处理后，转到富含 CO_2 的清水中，通过观察不同光照下叶片上浮的情况等可以探究不同光照下的光合作用强度，D 正确。

故选 C。

6. AB

【分析】分析题意可知，某患病男孩（其母亲没有患病）X 染色体上的基因 D 和 H 内各有一处断裂，断裂点间的染色体片段发生颠倒重接，故出现染色体倒位。

【详解】A、某患病男孩其母亲没有患病，可知该病为伴 X 染色体隐性遗传病，该病患者中男性显著多于女性，在男性中发病率为 $1/3500$ ，则该致病基因 d 频率为 $1/3500$ ，正常基因 D 基因频率为 $3499/3500$ ，女性中携带者的占比为 $2 \times 1/3500 \times 3499/3500$ ，A 错误；

B、该男孩的母亲为携带者，基因型为 $\text{X}^{\text{D}}\text{X}^{\text{d}}$ ，该男孩基因型为 $\text{X}^{\text{d}}\text{Y}$ ，该男孩的染色体倒位，故用 R1 和 R2 不能扩增出产物来，母亲有正常的 H 基因，有产物，故对母亲和患儿 DNA 进行 PCR 检测的结果不同，B 错误；

C、该男孩的染色体倒位，故与正常男性相比，患病男孩 X 染色体上的基因排列顺序发生改变，C 正确；

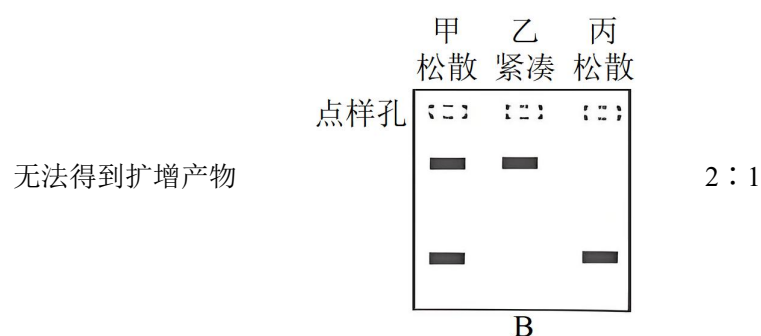
D、利用 S1 和 S2 进行 PCR 检测，有产物则含有正常 D 基因，若无产物，则含有致病基因，故可诊断母亲再次孕育的胎儿是否患该病，D 正确。

故选 AB。

7. (1)a

(2)插入序列后，a 基因中编码终止密码子的序列提前，a 基因转录产生的 mRNA 提前终止翻译

(3) P_2 和 P_3 丙的基因型为 AA，无引物 P_3 的结合序列，利用引物 P_2 和 P_3 扩增时，



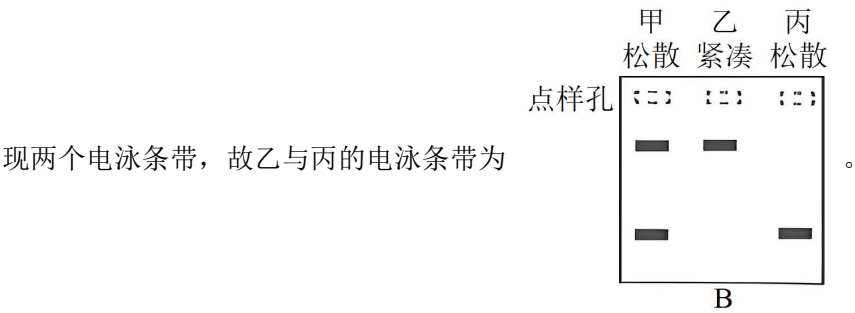
【分析】基因分离定律的实质：杂合体内，等位基因在减数分裂形成配子时随同源染色体的分开而分离，进入两个不同的配子，独立的随配子遗传给后代。

【详解】(1) 根据题意可知，研究人员获得了一个紧凑株型的植株，为研究控制该性状的基因，将其与纯合松散株型植株杂交，F₁均为松散株型，F₂中松散株型：紧凑株型=3：1，说明紧凑株型为隐性性状，由a基因控制。

(2) 在A基因编码蛋白质的区域中插入一段序列得到a基因（图1），a基因表达的肽链比A基因表达的肽链短，说明终止密码子提前出现，因此推测可能是A基因内部插入一段序列后，使a基因中编码终止密码子的序列提前，a基因转录产生的mRNA提前终止翻译。

(3) ①子二代中的基因型为AA、Aa、aa，根据图示可知，A和a基因上均含有P₁和P₂引物互补的序列，而P₃引物识别的序列只有a基因中才存在，若选择引物P₁和P₂进行扩增，则A基因和a基因均能扩增出相应产物，只是a基因扩增的产物长度要大于A基因扩增的产物，即AA的个体扩增产物的电泳条带与aa的个体扩增产物的电泳条带不同，且Aa的个体扩增产物的电泳条带应为两条，与图A不符，若选择引物P₃和P₂进行扩增，则只有Aa和aa的个体中因含有a基因而能扩增出产物，且扩增出的产物电泳条带相同，而AA的个体由于不含与P₃引物结合的序列，因此不能扩增出产物，没有对应的电泳条带。即图2-A中使用的引物组合是P₂和P₃，丙的基因型为AA，无引物P₃的结合序列，利用引物P₂和P₃扩增时，无法得到扩增产物。

②图A是利用引物P₃和P₂扩增后电泳的结果，则图B是利用引物P₁和P₂扩增的产物电泳的结果，由于a基因扩增出来的产物长度大于A基因扩增的产物，因此AA（松散株型）、aa（紧凑株型）基因的个体扩增的产物电泳时均只有一个条带，且aa基因的个体扩增的产物电泳时形成的电泳条带距离点样孔近，而Aa（松散株型）的个体扩增的产物电泳时会出



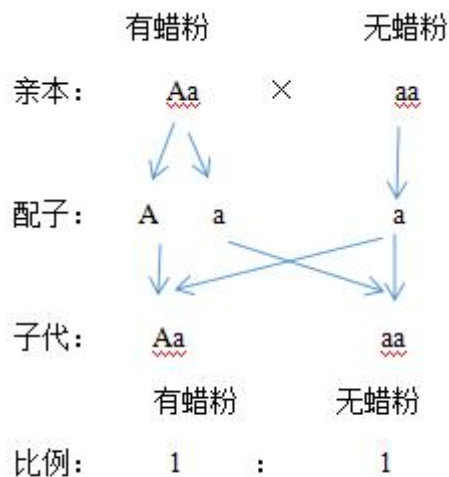
③使用图2-A中的引物组合（P₃和P₂）扩增F₂全部样本，由于只有含a基因的个体才能扩增出相应产物，且A-为松散株型，而子二代中Aa：AA=2：1，所以使用图2-A中的引物组合扩增F₂全部样本，有扩增条带松散株型（Aa）：无扩增条带松散株型（AA）=2：1。

8. (1) 分离 F₂中出现3:1的性状分离比，符合一对等位基因的遗传规律

(2) PCR 扩增 1 或 3 a

(3)选用材料： F_1 植株和 P_2 植株

遗传图解

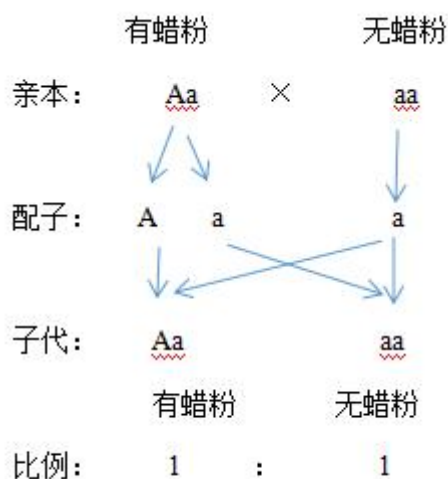


【分析】基因分离定律：在生物的体细胞中，控制同一性状的遗传因子成对存在，不相融合；在形成配子时，成对的遗传因子发生分离，分离后的遗传因子分别进入不同的配子中，随配子遗传给后代。

【详解】（1）根据杂交结果可知，果面蜡粉的遗传遵循基因的分离定律，因为 F_1 自交得到的 F_2 中，果面有蜡粉株数与果面无蜡粉株数之比约为 3：1（430：144≈3：1），符合基因分离定律中杂合子自交后代性状分离比 3：1 的比值。

（2）要进行植株基因型鉴定，在提取基因组 DNA 后，需要通过 PCR 扩增目的 DNA 片段。 P_1 植株为 1 条条带， P_2 植株为 2 条条带，说明 P_1 为纯合子且其基因不能被限制酶 H 切割（假设 P_1 基因型为 AA）， P_2 为纯合子且其基因能被限制酶 H 切割（假设 P_2 基因型为 aa），限制酶 H 的切割位点位于 a 上。 F_1 基因型为 Aa， F_2 中有蜡粉的植株基因型为 AA 或 Aa。AA 只有 1 条条带（不能被切割），Aa 会有 3 条条带（A 不能被切割为 1 条，a 被切割为 2 条），所以 F_2 中有蜡粉的植株为 1 条或 3 条条带。

（3）验证分离定律，采用测交的方法，所选材料： F_1 Aa 与 P_2 aa（测交实验可以验证基因的分离定律）。



9. (1)174/174

(2)每个微卫星“基因”的“等位基因”

(3) 标记重捕 根据标记重捕法的计算公式 $N = (M \times n) / m$ ，则该岛上豹的种群数量 $N = (24 \times 32) / 10 \approx 77$ (只)。

(4)选取 X 和 Y 染色体上长度不同的 DNA 片段，设计貉的特异性引物，对现有 DNA 样品进行扩增。产物中只有 X 片段为雌性，同时有 X 和 Y 片段的为雄性。计数 46 个个体中的雌雄数目，可得性别比例

【分析】标记重捕法是一种用于估算动物种群数量的常用方法。其原理是在被调查种群的活动范围内，捕获一部分个体，做上标记后再放回原来的环境，经过一段时间后进行重捕，根据重捕到的动物中标记个体数占总个体数的比例，来估计种群密度。标记重捕法适用于活动能力强、活动范围大的动物，使用时需要满足一定条件，比如标记个体与未标记个体在重捕时被捕获的概率相等，在调查期间没有个体迁入、迁出、出生、死亡等。

【详解】(1) 从图 2 中可知，个体 B 扩增后的电泳条带对应的片段只有长度为 174，根据“以片段长度命名”等位基因进而确定基因型的规则，个体 B 的“基因型”为 174/174。

(2) 根据题干信息“每个位置的微卫星 DNA 可视为一个‘基因’，由于重复单位的数目不同，同一位置的微卫星‘基因’可以有多个‘等位基因’，能组成多种‘基因型’，分析多个微卫星‘基因’，可得到个体特异的‘基因型’组合，由此区分开不同的个体”可知，使用微卫星 DNA 鉴定个体时，能区分的个体数是由微卫星“基因”的数目和重复单位的数目决定的。

(3) 科学家采用了标记重捕法的原理来估算种群数量。第一次采集 30 份粪便样品鉴定出 24 个不同个体 (相当于标记数 $M=24$)，第二次采集 40 份粪便样品鉴定出 32 个不同个体 (相当于重捕数 $n=32$)，其中两次都有的个体数为 10 个 (相当于重捕中被标记的个体数

$m=10$)。根据标记重捕法的计算公式 $N=(M \times n)/m$, 则该岛上貉的种群数量 $N=(24 \times 32)/10 \approx 77$ (只)。

(4) 选取 X 和 Y 染色体上长度不同的 DNA 片段, 设计貉的特异性引物, 对现有 DNA 样品进行扩增。产物中只有 X 片段为雌性, 同时有 X 和 Y 片段的为雄性。计数 46 个个体中的雌雄数目, 可得性别比例。

10. (1) 捕食和种内竞争 物理信息、化学信息、行为信息 食物和空间、配偶等

(2) 互利共生

(3) 上清液 溶解 DNA 4 种脱氧核苷酸、耐高温的 DNA 聚合酶

(4) 互补配对 丁 丙丁 叶绿体基因组其他 DNA 片段

(5) ab

【分析】生态系统中信息的种类(1)物理信息: 生态系统中的光、声、温度、湿度、磁力等, 通过物理过程传递的信息, 如蜘蛛网的振动频率; (2)化学信息: 生物在生命活动中, 产生了一些可以传递信息的化学物质, 如植物的生物碱、有机酸, 动物的性外激素等; (3)行为信息: 动物的特殊行为, 对于同种或异种生物也能够传递某种信息, 如孔雀开屏。

【详解】(1) 捕食者与川金丝猴是捕食关系, 川金丝猴和同种个体之间是种内竞争关系。生态系统中信息的种类有物理信息、化学信息和行为信息。川金丝猴根据这些信息及时作出反应, 一方面可以降低被捕食风险, 另一方面为争夺食物和空间等资源获得更多机会。

(2) 川金丝猴以植食为主, 消化道中部分微生物直接参与高纤维食物的消化, 这些微生物从川金丝猴胃内获取营养物质, 又能为川金丝猴分解纤维素, 两者构成互利共生关系。

(3) 研究者为了进一步研究川金丝猴的食性, 采集其粪便样本, 进行 DNA 提取、扩增, 部分实验过程如下: 释放 DNA: 在去杂后的样本中加入裂解液, 细胞裂解, 内容物释放, $\rightarrow$ 析出 DNA: DNA 呈溶解状态, 离心后取①上清液, 再加入乙醇, DNA 不溶于酒精 $\rightarrow$ 故在沉淀物中加入纯水, ②再次溶解 DNA $\rightarrow$ 扩增 DNA: PCR 扩增 DNA, 需要将③4 种脱氧核苷酸、耐高温的 DNA 聚合酶、引物、样本 DNA、含有 Mg^{2+} 缓冲液、超纯水等加入 PCR 管中, 进行 PCR。

(4) 为分析川金丝猴摄食的植物种类, 研究者设计一对引物 F 和 R, 能同时扩增出不同种植物叶绿体中的 rbeL 基因片段, 是因为引物 F 和 R 的碱基能与 rbeL 基因的保守序列的碱基互补配对, 从而在耐高温的 DNA 聚合酶的作用下延伸子链。用引物 F 和 R 对 4 种植物样本甲~丁的叶绿体基因组 DNA 进行扩增测序, 结果如图所示, 可知植物甲乙丙的条带一样长,

植物丁的短，对 4 个样本的扩增产物进行 DNA 电泳条带分析，只能区分不同长度的 DNA 片段，故能检出的样本是丁。研究者用引物 F 和 R 对川金丝猴粪便 DNA 进行扩增并测序，得到的序列有图中的 3 种序列，说明摄食的植物有三种，甲和乙的序列相同，不能确定，故据此可确定川金丝猴摄食的植物有丙和丁。选用叶绿体的其他基因的保守序列设计引物，对川金丝猴粪便 DNA 进行扩增、测序分析，能更准确鉴定出川金丝猴摄食的植物。

(5) a、建立川金丝猴生态廊道，促进种群间基因交流，能够保护川金丝猴遗传多样性和物种多样性，a 正确；

b、保护川金丝猴栖息地的植被和它喜食的植物，能够保护川金丝猴，b 正确；

c、川金丝猴是我国特有的珍稀濒危物种，不能用标记重捕法定期重捕，c 错误；

d、保护川金丝猴主要依赖就地保护，d 错误。

故选 ab。

11. (1)绿色豆荚

(2) 替换 II $(\Delta G+H)/(G+h)$ G 调控下游基因 H 的表达，缺失 G 时，基因 H 的表达量下降；另一条染色体上的 h 无功能。 G 不调控下游基因 H 的表达。

【分析】判断性状显隐性通常有两种方法。一是具有相对性状的纯合亲本杂交，子一代所表现出来的性状就是显性性状，比如本题中纯合绿色豆荚植株与纯合黄色豆荚植株杂交， F_1 只有一种表型，此表型对应的性状即为显性性状。二是杂合子自交，后代出现性状分离，分离比中占比多的那个性状为显性性状，像本题 F_1 自交得到 F_2 ，绿色和黄色豆荚植株数量比约为 3:1，绿色植株数量多，所以绿色是显性性状。

【详解】(1) 纯合绿色豆荚植株与纯合黄色豆荚植株杂交， F_1 只有一种表型，说明 F_1 表现的性状为显性性状。 F_1 自交得到 F_2 ，绿色和黄色豆荚植株数量比约为 297:105 $\approx$ 3:1，符合孟德尔分离定律中杂合子自交后代显性性状与隐性性状的分离比，所以显性性状为绿色。

(2) ①用待测植株的 DNA 进行 PCR,产物电泳结果全为预测的 1125bp,推测可能 没有突变发生，若发生突变，只能是碱基对的替换；扩增片段全长为 1125bp,野生型 H 的扩增产物被酶切为 699bp 和 426bp 的片段，而 h 的酶切位点丧失，所以 Hh 扩增产物的 酶切结果应该为 1125 bp、699bp 和 426bp 三种片段，选 II。

② 据图 a,亲代绿色豆荚植株和黄色豆荚植株的基因型分别为(G+H)/(G+h)和

(AG+H)/(AG+H),根据分离定律， F_1 的基因型为两种：(G+H)/(AG+H)和(AG+H)/(G+h),且数量相等。据题意，基因型(G+H)/(AG+H)应为绿色豆荚，黄色豆荚植株 的基因型为

(AG+H)/(G+h)。推测 G 调控 H 表达，当缺失 G 时 H 表达量下降，等位基因 h 无功能，因

此豆荚表现为黄色性状。

③ 若 F_1 中两种基因型植株数量无差异，表明 F_1 没有出现致死；但 F_1 表型全为绿色，所以基因型 $(AG+H)/(G+h)$ 的豆荚也呈绿色，提示该基因型植株下游 H 正常表达，没有受到 G 缺失的影响。说明 G 不调控下游 H 的表达。

12. C

【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；（4）目的基因的检测与鉴定。

【详解】A、使用氯化钙处理大肠杆菌，可使其处于感受态，提高转化效率，即更多的大肠杆菌能吸收质粒，无论吸收的是含目的基因的重组质粒（可能形成白色菌落）还是未重组的质粒 K（形成蓝色菌落），都可增加筛选平板上白色和蓝色菌落数，A 正确；

B、由于仅含卡那霉素，未添加 X-gal，无论导入的是重组质粒还是空白质粒，因不含 X-gal，无法产生蓝色物质，故生长出的菌落均为白色，B 正确；

C、筛选平板中长出的白色菌落，可能是导入了重组质粒（含目的基因），但也可能是虽然导入了质粒但目的基因没有成功表达目标蛋白，不能仅仅因为是白色菌落就判定为表达目标蛋白的菌株，C 错误；

D、若筛选平板中蓝色菌落偏多，原因可能是质粒 K 经酶切后自身环化并导入了大肠杆菌，因为自身环化的质粒 K 中 β -半乳糖苷酶基因完整，能表达活性 β -半乳糖苷酶，分解 X-gal 形成蓝色菌落，D 正确。

故选 C。

13. (1) 4 种脱氧核苷酸 延伸

(2) 5'端 AGATCT BamHI、EcoRI

(3) 栽培马铃薯愈伤组织细胞的染色体上 2 再分化

【分析】1、基因工程的步骤：目的基因的提取、目的基因与运载体结合、目的基因导入受体细胞、目的基因的检测与鉴定。

2、对限制酶选择条件：不能破坏目的基因和启动子、终止子，以便于目的基因和载体正确连接。

【详解】（1）PCR 扩增目的基因时，需要模板 DNA、引物、4 种脱氧核苷酸、含 Mg^{2+} 的缓冲液和耐高温的 DNA 聚合酶。PCR 一般分为变性、复性和延伸三步，其中 DNA 聚合酶在

PCR 的延伸步骤中起作用。

(2) 为了使目的基因能够被限制酶切割, 扩增目的基因时, 需要在引物的 5'端添加限制酶的识别序列。结合图表分析, 在载体的启动子和终止子之间有 BamH I、EcoR I 和 Xba I 的识别序列, 而 S 基因内部含有 Xba I、Nde I 和 BamH I 的识别序列, 要用 BamH I、EcoR I 或 Xba I 切割载体, 又不能用 Xba I、Nde I 或 BamH I 切割 S 基因, 再根据各种限制酶的识别序列及切割位点, 可知, 需要用 BamH I、EcoR I 切割载体, 用 BamH I 的同尾酶 Bgl II 和 EcoR I 切割 S 基因, 故 PCR 扩增 S 基因时需在上游引物添加的碱基序列是 5'-AGATCT-3'。

(3) T-DNA 属于可转移 DNA, 用携带 S 基因的农杆菌侵染栽培马铃薯愈伤组织时, 基因表达载体中 T-DNA 进入愈伤组织细胞, 将 S 基因整合到栽培马铃薯愈伤组织细胞的染色体上, 抗性基因 1 位于 T-DNA 外部, 用于筛选含有重组载体的农杆菌, 而抗性基因 2 位于 T-DNA 内部, 可用于筛选成功转化的愈伤组织。该愈伤组织经再分化形成芽、根, 继续培育可获得抗寒能力显著增强的马铃薯植株。

14. (1)mKate2 蛋白或荧光

(2) 细菌计数板计数法 作为 mKate2 蛋白的荧光对照 P_{Gro} 在生长稳定期停止基因转录, 且带有 SsrA 短肽的 mKate2 被降解

(3)快速生长期荧光值较低, 生长稳定期快速增强

(4)先敲除野生菌株中的酶 B 基因, 再将质粒①中的 mKate2 基因替换为酶 B 基因, 将质粒②中的 mKate2 基因替换为酶 A 基因, 并将两种质粒导入敲除酶 B 基因的野生菌株中

【分析】1、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。(4)目的基因的检测与鉴定。

2、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。引物能使 DNA 聚合酶能够从引物的 3'端开始连接脱氧核苷酸。用于 PCR 的引物长度通常为 20—30 个核苷酸。

3、启动子是一段有特殊序列结构的 DNA 片段, 位于基因的上游, 紧挨转录的起始位点, 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, 最终表达出人类需要的蛋白质。

【详解】(1)在基因工程中, 筛选重组菌株时, 常用的检测方法除了 PCR, 根据质粒中存在红色荧光蛋白基因, 可利用荧光检测, 筛选获得重组菌株 W1。

(2)检测培养液中细胞密度常用的方法是细菌计数板计数法。接种前检测液体培养基的荧

光强度，作用是作为 mKate2 蛋白的荧光对照。进入生长稳定期后，由于 P_{Gro} 在生长稳定期停止基因转录，所以不再合成带有 SsrA 短肽的 mKate2，同时 C-末端带有 SsrA 短肽的蛋白质可被大肠杆菌内源蛋白酶系统特异性识别并以一定速率降解，导致荧光强度快速下降。

(3) 在重组菌株 W2 中，启动子 PX 被阻遏蛋白 X 阻遏转录。在细胞快速生长阶段，阻遏蛋白 X 阻遏 mKate2 基因的表达；随着细胞进入生长稳定期，阻遏蛋白 X 停止表达并被降解，对 PX 启动子的阻遏作用降低，mKate2 基因开始表达，荧光强度开始上升，由于原料的限制，最后保持稳定，所以培养期间荧光强度的变化趋势为快速生长期荧光值较低，生长稳定期快速增强。

(4) 为了保证细胞正常生长，并在生长稳定期实现莽草酸的大量积累，利用上述两种质粒的调控功能，结合野生型菌株遗传物质的改造，提出重组生产菌株构建思路是：首先对野生型大肠杆菌进行改造，敲除酶 B 基因；然后将质粒①中的 mKate2 基因替换为酶 B 基因，使相关代谢途径关键酶在快速生长期正常表达以保证细胞正常生长，进入生长稳定期后该酶降解，减少对莽草酸的转化；同时将质粒②中的 mKate2 基因替换为酶 A 基因，利用其调控机制在生长稳定期实现莽草酸合成相关基因的稳定表达，从而大量积累莽草酸，最后将两种质粒导入敲除酶 B 基因的野生菌株。

15. (1)目的基因、终止子、复制原点

(2) 稀释涂布平板法 能抑制细菌增殖 15h 在 15h 时，IR3C 数量下降，而 MSC 数量上升

(3) 高于 IR3C 转入了 ccdB 基因，阻止细胞增殖，减少氧化葡萄糖杆菌竞争性消耗山梨糖，从而更多山梨糖被用于合成维生素 C。

【分析】基因工程是指按照人类的愿望，将不同生物的遗传物质在体外人工剪切并和载体重组后转入细胞内进行扩增，并表达产生所需蛋白质的技术，基因工程能够打破种属的界限，在基因水平上改变生物遗传性，并通过工程化为人类提供有用产品及服务。

【详解】(1) 要使基因 ccdB 在 IR3C 中稳定遗传、表达并发挥作用，基因工程中构建的基因表达载体，除启动子外、还要有目的基因、终止子、复制原点等。

(2) 统计活菌数日常用稀释涂布平板法，从图 2 看出，随着时间推移，种群数量不断增加，在 15h 时，IR3C 数量下降，而 MSC 数量上升，所以推测转入的基因 ccdB 编码的蛋白质诱导能抑制细菌增殖或诱导细菌凋亡，发挥作用的时间大约在 15h。

(3) 从图丙看出，IR3C 三菌混菌发酵产生的 2-酮-L-古龙酸含量比 MSC 三菌混菌发酵产量高，因此可以推测，IR3C 三菌混菌发酵维生素 C 产量更高，可能的原因是 IR3C 转入了 ccdB

基因，诱导细菌死亡，减少氧化葡萄糖杆菌竞争性消耗山梨糖，从而更多山梨糖被用于合成维生素 C。

16. (1) 农杆菌转化法 Ti 质粒上的 T - DNA 潮霉素

(2) 外植体 次氯酸钠 生长素和细胞分裂素是启动细胞分裂、脱分化和再分化的关键激素

(3) PCR - 测序 病斑的大小（或病斑面积、发病情况等合理答案）

(4) 对感病基因 SWEET 的启动子区进行定点修改后，白叶枯病菌无法利用该基因侵染水稻。

【分析】基因工程的基本操作程序包括：目的基因的获取、基因表达载体的构建、将目的基因导入受体细胞，目的基因的检测和鉴定。植物组织培养技术是指在无菌和人工控制的环境下，将离体的植物器官（如根、茎、叶、花、果实等）、组织、细胞以及原生质体，培养在人工配制的培养基上，给予适宜的培养条件，使其长成完整植株的技术。

【详解】(1) 将重组 Ti 质粒转入植物细胞常用农杆菌转化法。因为农杆菌中的 Ti 质粒上的 T - DNA（可转移 DNA）能够整合到植物细胞的染色体 DNA 上。利用农杆菌侵染植物细胞，从而将重组 Ti 质粒导入植物细胞。为了筛选出转化成功的细胞，由于重组 Ti 质粒上含有潮霉素抗性基因（Hyg^R），所以需要在植物组织培养的培养基中添加潮霉素，只有成功导入重组 Ti 质粒的细胞才能在含有潮霉素的培养基上存活。

(2) 在植物组织培养中，离体的植物器官、组织或细胞被称为外植体，所以实验中用到的水稻幼胚被称为外植体。对水稻幼胚消毒时需依次使用酒精、次氯酸钠处理。在植物组织培养诱导形成再生植株的过程中，生长素和细胞分裂素是启动细胞分裂、脱分化和再分化的关键激素。不同浓度的生长素和细胞分裂素的配比可以调控细胞的分裂和分化方向，从而诱导形成根和芽等不同的器官，最终形成再生植株。

(3) 为了检测基因编辑水稻是否成功，首先需采用 PCR - 测序技术检测目标基因的启动子区是否编辑成功。通过 PCR 扩增目标基因的启动子区片段，然后进行测序，与编辑前的序列进行对比，看是否发生了预期的改变。在个体水平需将基因编辑后的水稻与野生型水稻分别接种白叶枯病菌，通过比较病斑的大小（或病斑面积、发病情况等）来验证抗病性。如果基因编辑后的水稻病斑明显小于野生型水稻，说明其抗病性增强。

(4) 在该研究中，基因编辑成功后的水稻可以抗白叶枯病的原因：对感病基因 SWEET 的启动子区进行定点修改后，白叶枯病菌无法利用该基因侵染水稻，从而使水稻获得了抗病性。

17. (1) 在富含卡拉胶的环境中，存在能够分解卡拉胶的微生物的可能性较大 稀

释

(2) BamHI 重组质粒连接处的序列不再是原来的限制酶识别序列

(3) 使细胞处于一种能吸收周围环境中 DNA 分子的生理状态 卡拉胶 四环素

(4) 44 该位点的氨基酸空间上离半胱氨酸更近，容易形成二硫键，而且保守度低，替换后对酶功能的影响较小

【分析】基因工程的基本操作步骤主要包括四步：①目的基因的获取；②基因表达载体的构建；③将目的基因导入受体细胞；④目的基因的检测与表达。其中，基因表达载体的构建是基因工程的核心。

【详解】(1) 卡拉胶是一类源于海洋红藻的大分子多糖，可被某些细菌降解为具有多种应用前景的卡拉胶寡糖。由于在富含卡拉胶的环境中，存在能够分解卡拉胶的微生物的可能性较大，因此可选择海藻和海泥作为样本筛选卡拉胶降解菌。将培养后的菌液混匀并充分稀释，再接种至微孔板中，经培养和筛选获得了 CG 活性最高的菌种。

(2) E.coliDNA 连接酶只能连接具有黏性末端的片段，因此切割质粒和目的基因时不能选择切成平末端的限制酶，即不能选择 EcoRV 酶和 SmaI 酶，而 SpeI 酶与 XbaI 酶切割后的黏性末端相同，若选择 SpeI 酶与 XbaI 酶切割，会出现质粒和目的基因的自连、甚至目的基因倒接，因此切割质粒时 SpeI 酶与 XbaI 酶中只能选择一个，而另一个限制酶需要选择 BamHI 酶，又由于转录的方向是由启动子→终止子，且 mRNA 形成的方向是 5'→3'，且 mRNA 与 DNA 的模板链方向相反，因此基因模板链的 3' 应靠近启动子，故为保证连接准确性和效率，cg 转录模板链的 5' 端最好含有 BamHI 酶切位点。T4DNA 连接酶既可以连接平末端，也可连接黏性末端，不同的平末端均可由 T4DNA 连接酶连接，由于限制酶的识别序列具有专一性，若连接后的序列不存在最初限制酶的识别序列，则可能导致重组质粒无法使用各自构建表达载体的双酶切组合进行切割。故另有两组同学选用了各不相同的双酶切组合和 T4DNA 连接酶重复上述实验，获得的部分重组质粒分子大小符合预期，但均无法使用各自构建表达载体的双酶切组合进行切割，其原因是重组质粒连接处的序列不再是原来的限制酶识别序列。

(3) 为将构建好的表达载体转入大肠杆菌，需要先用 Ca^{2+} 处理大肠杆菌细胞，目的是使细胞处于一种能吸收周围环境中 DNA 分子的生理状态，便于重组 DNA 进入受体细胞。由于具有高活性卡拉胶酶 (CG) 的菌种可分解卡拉胶，使其菌落周围形成透明圈，且重组质粒上含有四环素抗性基因，因此导入目的基因的大肠杆菌可接种在含卡拉胶和四环素的培养基中培养一段时间后，根据菌落周围有无水解透明圈筛选目的菌株。

(4) 据图可知，虚线长度代表氨基酸间的空间距离，由于第 44 位点的氨基酸空间上离半胱

氨酸更近，容易形成二硫键，而且保守度低，替换后对酶功能的影响较小，因此选择第 44 位的氨基酸替换成半胱氨酸最合适。

18. (1) 终止子（复制原点） P1 和 P3 782 蛋白 A 在大肠杆菌细胞内合成，缺失分泌到细胞外的信号，不能分泌到细胞外；基因 A 未表达；基因 A 丢失

(2) 聚乙二醇（PEG）融合法（或灭活病毒诱导法、电融合法） 抗体检测

【分析】1 基因工程的操作步骤：（1）目的基因的选与获取：从基因文库中获取目的基因、利用 PCR 技术获取和扩增目的基因、化学方法直接合成目的基因。（2）基因表达载体的构建：基因表达载体是载体的一种，除目的基因、标记基因外，它还必须有启动子、终止子（terminator 等，这是基因工程的核心步骤。（3）将目的基因导入受体细胞：构建好的基因表达载体需要通过一定的方式才能进入受体细胞。（4）目的基因的检测与鉴定。首先是分子水平的检测，包括通过 PCR 等技术检测受体细胞的染色体 DNA 上是否插入了目的基因或检测目的基因是否转录出了 mRNA；从转基因生物细胞中提取蛋白质，用相应的抗体进行抗原-抗体杂交，检测目的基因是否翻译成相应的蛋白等。其次，还需要进行个体生物学水平的鉴定。

【详解】（1）重组质粒的必备元件包括目的基因、限制酶切割位点、标记基因、启动子和终止子，复制原点等，终止子能终止转录过程。要确定基因 A 已连接到质粒中且插入方向正确，应选用引物 P1 和 P3。因为 P1 与基因 A 下游的非编码区互补配对，P3 与基因 A 上游且靠近启动子的区域互补配对，这样扩增的片段大小为 $200+582=782\text{bp}$ 。

将 DNA 测序正确的重组质粒转入大肠杆菌构建重组菌，培养后上清液中无蛋白 A，可能的原因有：缺失分泌到细胞外的信号，重组菌没有将蛋白 A 释放到细胞外；基因 A 未表达；基因 A 丢失。

（2）①诱导动物细胞融合的常用方法有聚乙二醇（PEG）融合法、灭活病毒诱导法、电融合法等，这里答出其中一种即可，比如聚乙二醇（PEG）融合法。

②选择培养时，对杂交瘤细胞进行克隆化培养和抗体检测，多次筛选获得足够数量的能分泌所需抗体的细胞。

19. (1) 脱氧核苷酸 引物 复性 PCR 反应需要在高温条件下进行变性步骤（ $90-95^{\circ}\text{C}$ 使双链 DNA 解旋为单链），普通的 DNA 聚合酶在高温下会变性失活，而耐高温的 DNA 聚合酶能在高温环境中保持活性，保证 PCR 反应的正常进行。

(2) SmaI 和 EcoR I 磷酸二酯键

(3) 细胞表面发出黄色荧光 高

(4) 转基因衣藻表达的融合蛋白能结合镉离子，降低了镉离子对衣藻的毒害作用

镉离子浓度过高，超出了融合蛋白的吸附能力，对衣藻产生了严重的毒害作用

(5) ① ③

【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。(4) 目的基因的检测与鉴定。

【详解】(1) 在 PCR 反应中，原料是脱氧核苷酸，随着反应进行不断被消耗，分子数量逐渐减少；引物在 PCR 过程中会结合到模板 DNA 上参与子链合成，也会逐渐减少，所以分子数量逐渐减少的是引物和脱氧核苷酸。模板与引物在 PCR 的复性阶段开始结合。在复性过程中，温度降低，引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合。PCR 中使用的 DNA 聚合酶需耐高温，是因为 PCR 反应需要在高温条件下进行变性步骤(90 - 95℃使双链 DNA 解旋为单链)，普通的 DNA 聚合酶在高温下会变性失活，而耐高温的 DNA 聚合酶能在高温环境中保持活性，保证 PCR 反应的正常进行。

(2) 观察图 1，要避免错误连接，GPI 两端应添加 SmaI 和 EcoR I 的识别序列。因为将 CADR、GPI 和 YFP 基因逐个构建到载体时，使用这两种限制酶切割可以产生不同的黏性末端，能保证目的基因准确插入载体。又因为 Nhe I 和 XbaI 限制酶切割后产生的黏性末端相同，所以这两种限制酶只能选一个，按照连接的顺序在将 GPI 连接到载体时应该用 SmaI 和 EcoRI。DNA 连接酶连接时，可催化载体和目的基因之间形成磷酸二酯键，从而将载体和目的基因连接起来。

(3) 若在荧光显微镜下观察到细胞表面发出黄色荧光，初步表明融合蛋白表达成功，因为融合蛋白中有黄色荧光蛋白 YFP，其表达后会发出黄色荧光。将转基因衣藻和野生型衣藻置于含镉离子的培养液中培养一段时间后，若转基因衣藻细胞壁比野生型衣藻细胞壁的镉离子含量高，则表明融合蛋白能结合镉离子。因为融合蛋白中的 CADR 可吸附水体中的镉离子，若融合蛋白发挥作用，会使细胞壁镉离子含量升高。

(4) 转基因衣藻在含有不同浓度镉离子的培养液中生长均优于野生型衣藻的原因可能是转基因衣藻表达的融合蛋白能结合镉离子，降低了镉离子对衣藻的毒害作用。240 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉离子浓度下，转基因衣藻和野生型衣藻生长均被明显抑制的原因可能是镉离子浓度过高，超出了融合蛋白的吸附能力，对衣藻产生了严重的毒害作用。

(5) 转基因衣藻可用于水体镉污染治理，与施加化学药物相比，能体现出其环境治理优势

的两个特性是①和③。①衣藻作为生物材料在水体中可自我繁殖，能够持续发挥作用；③衣藻可吸收水体中能引起富营养化的物质，便于后续处理，而化学药物可能存在二次污染等问题。

20. (1)电子显微镜

(2)细胞骨架

(3)防止细胞凋亡，有利于病毒的繁殖

(4)大肠杆菌复制原点 DNA

(5)哺乳动物细胞的 RNA 聚合酶无法识别该病毒基因的启动子

(6)溶解该病毒的包膜，使病毒无法与宿主细胞膜上的受体结合

【分析】病毒的结构较为简单，无细胞结构，主要由核酸（DNA 或 RNA）和蛋白质外壳组成。有些病毒在核衣壳之外还有包膜结构。核酸是病毒的遗传物质，储存着病毒的遗传信息，控制着病毒的繁殖、变异等生命活动。蛋白质外壳则起到保护核酸的作用，同时还能介导病毒与宿主细胞的识别与结合。具有包膜的病毒，其包膜一般来源于宿主细胞膜或核膜，包膜上镶嵌着一些糖蛋白刺突，这些刺突有助于病毒吸附和侵入宿主细胞。

【详解】（1）病毒个体极其微小，普通光学显微镜无法清晰观察其形态结构，需要使用电子显微镜才能清楚观察病毒的形态结构。

（2）细胞骨架对于维持细胞的形态具有重要作用，体外培养的梭形昆虫细胞被病毒感染后转变为圆球形，很可能是病毒感染引起了昆虫细胞内细胞骨架的改变。

（3）病毒需要在宿主细胞内进行生存和繁殖，细胞凋亡会导致宿主细胞死亡，不利于病毒的生存和繁殖。病毒基因组中含有的抗细胞凋亡基因可以抑制宿主细胞的凋亡，为病毒的复制和繁殖提供更多的时间和场所。

（4）要使病毒 DNA 能在大肠杆菌中复制，需要在病毒 DNA 中插入大肠杆菌复制原点序列，这样才能利用大肠杆菌细胞内的复制系统进行复制。

（5）转录需要特定的酶等条件，该病毒 DNA 能进入哺乳动物细胞，但无对应的转录产物，可能是因为病毒基因组没有在哺乳动物细胞中表达的启动子。

（6）该病毒具有包膜结构，包膜的主要成分是脂质等，脂溶剂可以溶解病毒的包膜，蛋白镶嵌或贯穿于膜上，脂溶剂处理该病毒颗粒使得包膜溶解，包膜上的蛋白 A 游离，蛋白 A 与细胞膜受体结合不能使病毒 DNA 进入细胞内。

21. (1) 序列数据库 Xho I Xba I DNA 连接酶

(2) 外源 DNA 1 目的基因 N 大小为 2.3kb

(3)GCC

(4)香树脂醇

【分析】PCR 原理：在解旋酶作用下，打开 DNA 双链，每条 DNA 单链作为母链，以 4 种游离脱氧核苷酸为原料，合成子链，在引物作用下，DNA 聚合酶从引物 3'端开始延伸 DNA 链，即 DNA 的合成方向是从子链的 5'端自 3'端延伸的。实际上就是在体外模拟细胞内 DNA 的复制过程。DNA 的复制需要引物，其主要原因是 DNA 聚合酶只能从 3'端延伸 DNA 链。PCR 反应过程是：变性→复性→延伸。

【详解】(1) GenBank 是目前国际上广泛使用的序列数据库之一，它的数据主要是各国的实验室、测序机构等发布的序列信息。利用这个数据库，我们可以便捷地检索到基因和蛋白质的序列信息；故可从序列数据库中查询基因 N 的编码序列，设计特定引物。保证基因 N 与质粒 pYL 正确连接，需要使用双酶切法，为了目的基因能正确表达，目的基因需要插入质粒的启动子和终止子之间，且质粒和目的基因需要使用相同的酶或能产生相同黏性末端的酶；分析图 1 可知，质粒 pYL 应该选用 Spe I 和 Xho I 酶切，由于目的基因 N 含有 Spe I 识别序列，故 N 基因不能使用 Spe I 酶切，但 Xba I 与其具有相同的黏性末端，基因 N 酶切时可以用 Xba I 替换 Spe I，即 N 基因两端应该含有 Xba I 和 Xho I 识别序列；题干信息：N 基因 a 链为转录模板链，才有引物 1 和引物 2 扩增 N 基因，则扩增后模板链的 5'端含有引物 1 序列，而编码链的 5'端含有引物 2 序列，结合质粒 pYL 上的启动子和终止子方向，可知应该在引物 2 需要 5'端添加 Xba I、引物 1 5'端添加 Xho I 识别序列。PCR 扩增基因 N，特异性酶切后，利用 DNA 连接酶连接 DNA 片段，构建重组质粒，大小约 9.5kb (kb 为千碱基对)，假设构建重组质粒前后，质粒 pYL 对应部分大小基本不变。

(2) 构建重组质粒，大小约 9.5kb (kb 为千碱基对)，假设构建重组质粒前后，质粒 pYL 对应部分大小基本不变，而质粒 pYL 本身 7.2kb，可知目的基因 N 大小为 2.3kb；分析电泳图可知，初步判断实验组 1 的质粒中成功插入了基因 N。在第 5 组的 PCR 反应中，使用无菌水代替实验组的模板 DNA，目的是检验 PCR 反应体系是否存在污染，即检验 PCR 反应中是否有外源 DNA 污染。

(3) 编码第 240 位脯氨酸或第 243 位苯丙氨酸的碱基序列替换为编码丙氨酸的碱基序列，丙氨酸的密码子有 GCA；密码子位于 mRNA 上，mRNA 上的序列与编码链序列相似，而 a 是诱变第 240 位脯氨酸编码序列的引物 (GCA 为诱变序列)，可知 a 引物延伸后的序列为编码链；b、c、d 其中一条是诱变第 243 位苯丙氨酸的引物，其配对模板与 a 的配对模板相同，分析题图 bcd 序列可知 c 是诱变第 243 位苯丙氨酸的引物，且 c 引物延伸后的序列为编码链，

根据 a 引物 5'-端首位 GCA 为 240 位，则 c 引物 5'-端 GCC 为 243 位，故据此分析，丙氨酸的密码子除 GCA 外，还有 GCC。

(4) 题干研究目的是通过在酵母菌中表达外源香树脂醇合酶基因 N，可高效生产香树脂醇；由此可知，进一步检测转基因酵母菌发酵得到的香树脂醇含量并进行比较，可以选出最优的香树脂醇合酶基因的改造方案。

22. (1) F2、F4 保证载体能在链霉菌细胞中能正常复制

(2) 2 验证重组质粒是否构建成功

(3) 苯丙氨酸或 phe 翻译受阻

(4) 目的基因发生突变 发酵条件优化

【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：(1) 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。(2) 个体水平上的鉴定：抗虫鉴定、抗病鉴定、活性鉴定等。

【详解】(1) 引物需要结合到模板的 3'端，且与目的基因的部分碱基序列互补配对，子链延伸方向为 5'端→3'端，因此用 PCR 技术从杆菌 M2 基因组中扩增 lrcA-lrcF 目的基因时，应选用 F2、F4 引物。载体使用链霉菌的复制原点，是为了保证载体能在链霉菌细胞中复制，也使目的基因能够在链霉菌中稳定存在并遗传给后代。

(2) 采用 EcoRI 和 BamHI 完全酶切构建的重组质粒，会得到载体片段和目的基因片段，共 2 条电泳条带。电泳检测酶切产物的目的是检测重组质粒是否构建成功，若能得到预期的载体片段和目的基因片段大小的条带，说明酶切成功，重组质粒构建可能成功，但是还需要进一步的鉴定。

(3) 观察拉索西丁的作用机制图，结合所给密码子信息，可知拉索西丁与核糖体结合后，会阻止携带苯丙氨酸的 tRNA 进入结合位点。因为位点 2 对应的密码子是 UUC，编码苯丙氨酸。拉索西丁阻止携带苯丙氨酸的 tRNA 进入结合位点，会导致翻译过程无法正常进行，进而使细菌无法合成蛋白质，最终引起细菌死亡。

(4) 重组链霉菌在实验室多次培养后, 提取的目的基因产物杀菌活性丧失, 可能的原因是目的基因发生突变, 导致其表达的产物结构改变, 从而失去杀菌活性; 也可能是目的基因的表达受到抑制等。若运用发酵工程来生产拉索西丁工程药物, 除产物活性外还需进一步研究的问题有: 优化发酵条件, 如温度、pH、溶氧量等; 如何提高发酵产物的产量; 产物的分离和纯化方法等。

23. (1) 替换

(2) 父本 1/2

(3) 3 1/3 2/3 a 花粉不育, 无法形成纯合 aa 植株

(4) AaEe E/e 和 A/a 连锁且无交换, F₂中无同时含 A 和 E 的配子 1/6 若基因连锁但发生交换, 正常植株占比介于 0~1/6

【分析】自由组合定律的实质: 控制不同性状的遗传因子的分离和组合是互不干扰的; 在形成配子时, 决定同一性状的成对的遗传因子彼此分离, 决定不同性状的遗传因子自由组合。

【详解】(1) 基因突变是指 DNA 分子上碱基对增添、缺失或替换引起基因结构的改变。基因内碱基的增添、缺失或替换都可导致基因突变。

(2) 据题分析可知, 带有卡那霉素抗性基因的 T-DNA 插入拟南芥 2 号染色体的 A 基因内, 使其突变为丧失功能的 a 基因, 花粉中 A 基因功能缺失 (a 基因) 会导致不育, 因此 Aa 植株作为父本时, 其含 a 基因花粉不育, 无法参与受精, 仅产生含 A 基因的花粉, 故以 Aa 植株为父本与野生型 (AA) 拟南芥杂交, F₁ (AA) 中卡那霉素抗性植株的占比为 0; 若 Aa 植株作为母本, 其卵细胞可育 (含 a 基因), 而野生型父本花粉 (含 A 基因) 可育, F₁ 基因型为 Aa (抗性) 和 AA (非抗性), 比例为 1: 1, 因此卡那霉素抗性植株占比为 1/2。

(3) 为进一步验证基因 A 的功能, 将另一个 A 基因插入 Aa 植株的 3 号染色体。仅考虑基因 A 和 a, 插入 A 基因后, 植株基因型为 Aa (2 号染色体为 Aa, 3 号染色体为 A0)。该植株会产生 4 种基因型的花粉, 即 AA、A0、Aa、a0, 其中 a 不育, 即产生 3 种可育基因型的花粉, 而具有 a 基因的花粉占比为 1/3。该植株雌配子即 AA、A0、Aa、a0, 均可育, 其自交得到 F₁, 利用棋盘法可知, F₁ 的基因型为 AAAA: AAA0: AA00: AAAa: AAa0: AAaa: Aa00: Aaa0=1: 2: 1: 2: 3: 1: 1: 1。利用图 1 所示引物 P1 和 P2、P1 和 P3 分别对 F₁ 进行 PCR 检测, 电泳结果如图 2 所示。根据电泳结果 F₁ 植株分为 I 型和 II 型, I 型 (含 A、a): PCR 扩增出 900bp (A) 和 600bp (a) 条带。II 型 (仅含 A): 仅扩增出 900bp 条带。其中 I 型植株占比为 (2+3+1+1+1) / (1+2+1+2+3+1+1+1) = 2/3。F₁ 中没有检测到仅扩增出 600bp 条带的植株, 其原因为 a 花粉不育, 无法形成纯合 aa 植株。

(4) ①利用基因型为 AaEE 和 AAEE 的植株进行杂交，筛选出 F₁ 中 AaEe 植株（双杂合）。若 E/e 和 A/a 连锁且无交换，F₂ 中无同时含 A 和 E 的配子（花粉或种子致死），正常植株占比为 0。若两基因独立遗传（非同源染色体），F₁ 植株（AaEe）产生雌配子为 AE: Ae: aE: ae=1: 1: 1: 1，均可育，而雄配子 AE: Ae=1: 1，aE 和 ae 不可育，利用棋盘法可知，F₂ 为 AAEE: AAEE: AaEE: AaEe=1: 2: 1: 2，其中只有 AAEE 的花粉和自交所结种子均发育正常，即正常植株（AAEE）占比为 1/6。其他可能：若基因连锁但发生交换，正常植株占比介于 0~1/6。

24. (1) 复制原点 XbaI DNA 聚合酶 SmaI 和 SpeI 550bp

(2) 4 环化 测序和序列比对

(3)不能

【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；

(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) DNA 复制的起点是复制原点，因此 Ti 质粒上与其在农杆菌中的复制能力相关的结构为复制原点。根据 SmaI 限制酶识别序列可知，酶切形成的是平末端，若质粒仅用 SmaI 酶切，抗除草剂基因和质粒可以正向接入也可以反向接入，且无法区分，为了确定是否是正向重组质粒，因此在构建重组质粒时需要用到另一种限制酶，抗除草剂因需要插入到启动子和终止子之间，因此不能选择 BamHI，因为该限制酶会破坏终止子，因此可选择 XbaI 和 SmaI 进行酶切，XbaI 酶切会形成黏性末端，需要用 DNA 聚合酶聚合脱氧核糖核苷酸单体将产生的黏性末端补平（可使重组质粒最小，同时 PstI 酶切后产生的黏性末端无法用 DNA 聚合酶抹平，因为 DNA 聚合酶只能从 3'延伸子链）。利用 DNA 连接酶将酶切后的包含抗除草剂基因 X 的片段与酶切并补平的 Ti 质粒进行连接，构建重组载体，转化大肠杆菌。重组的 T-DNA 片段上含有一个 SmaI 酶切位点和一个 SpeI 酶切位点，可以选择用 SmaI 和 SpeI 进行酶切，转录的方向是从模板的 3'→5'，和质粒对应的方向相同，经过两种酶的酶切后并电泳呈现一

长一短 2 条带，较短的条带长度近似为 550bp，若反向接，较短的条带长度近似为 200bp。

(2) 由于后续 PCR 难以扩增大片段 DNA，所以最好选择识别序列为 4 个碱基的限制酶，原因是识别序列越短，酶切位点越多，切割产生的片段可能越小，更有利于后续的 PCR 扩增。由于引物是根据已知序列设计的，但此时需要扩增未知序列，因此可以将图乙的片段环化，这样就可以利用现有引物扩增出未知序列。为了确定未知序列是否是同一基因，需要准确比对其上的碱基序列，因此对同一个基因的操作为测序和序列比对。

(3) 突变植株成功导入野生型基因，但野生型基因未必可以正常表达，因此不能确定该植株的表型为野生型。

25. (1) 稀释涂布平板法 探究内生放线菌最适的营养条件和温度

(2) 指数级扩增 ② 重组质粒通过（单交换）同源重组整合到了内生放线菌的基因组中

(3)

设置两组培养实验：对照组在低（或常规）铁浓度的培养基上进行，实验组在高铁浓度的培养基上进行。在两组培养基的相同位置分别接种内生放线菌和稻瘟病致病菌。在相同且适宜的条件下培养一段时间后，观察并比较两组中稻瘟病致病菌菌落的生长情况（如菌落大小或抑制圈大小）。若高铁组的抑制效果明显弱于低铁组，则支持该推测

【分析】基因敲除主要是应用 DNA 同源重组原理，用同源 DNA 片段替代靶基因片段，从而达到基因敲除的目的，由此可见，基因敲除可定向改变生物体的某一基因。基因敲除既可以用突变基因或其它基因敲除相应的正常基因，也可以用正常基因敲除相应的突变基因。

【详解】(1) 从含有多种微生物的研磨液中分离出单一菌落，并接种到选择培养基中常用的接种方法是稀释涂布平板法。使用选择培养基和不同的温度条件，目的是为了探究内生放线菌最适的营养条件和温度。

(2) PCR 技术的核心原理是通过多次循环（变性、复性、延伸），使目标 DNA 片段的数量以指数形式快速增加，实现体外扩增。PCR 鉴定是利用引物 1 和引物 2 进行的。在野生型菌株中，引物 1 和引物 2 之间的 DNA 片段长度为 $R-U(500bp) + R \text{ 基因 } (2000bp) + R-D(500bp) = 3000 \text{ bp}$ 。对应图 2 中的菌落①和③。在成功发生双交换的 R 基因敲除株中，R 基因(2000bp)被替换，引物 1 和引物 2 之间的 DNA 片段长度为 $R-U(500bp) + R-D(500bp) = 1000 \text{ bp}$ 。对应图 2 中的菌落②。菌落④的 PCR 产物大小约为 7000 bp。这个大小可以通过以下方式解释：发生了单交换同源重组事件。整个重组质粒（大小为 3000bp 质粒骨架 + 500bp R-U + 500bp R-D = 4000bp）整合到了基因组中。整合后，引物 1 和引物 2 之间的区

域长度变为原来的长度(3000bp)加上整个质粒的长度(4000bp)，即 $3000 + 4000 = 7000 \text{ bp}$ 。

因此，这是单交换同源重组整合的结果。

(3) 设置两组培养实验：一组为对照组，在常规（或低铁）浓度的培养基上进行；另一组为实验组，在添加了足量铁离子的培养基上进行。在两组培养基的相同位置分别接种内生放线菌和稻瘟病致病菌。在相同且适宜的条件下培养一段时间后，观察并比较两组中稻瘟病致病菌菌落的生长情况（如菌落大小或抑制圈大小）。预期结果与结论：如果实验组（高铁培养基）中内生放线菌对稻瘟病致病菌的抑制作用明显减弱或消失，而对照组（低铁培养基）中抑制作用明显，则说明该内生放线菌是通过竞争铁离子来抑制稻瘟病致病菌生长的。

26. (1) 密码子##遗传密码 琼脂糖 更换微量移液器的枪头

(2)C

(3) 预冷的体积分数为 95%的酒精 D 调控

(4) 基因数据库##序列数据库 表达载体

【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、复制原点和标记基因等。(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) 分析不同物种的 GPD 蛋白序列，确定蛋白质上相同的氨基酸区段，依据这些氨基酸所对应的密码子，根据碱基互补配对，确定 DNA 序列，进而设计 1 对引物。可通过琼脂糖凝胶电泳分离并纯化目标 DNA 片段。在制备 PCR 反应体系时，每次用微量移液器吸取不同试剂前，需要更换微量移液器的枪头，以避免交叉污染。

(2) A、DNA 模板被其他酵母细胞的基因组 DNA 污染，可能扩增出其他 DNA，从而出现另外一条条带，A 不符合题意；

B、每个引物与 DNA 模板存在 2 个配对结合位点，从而扩增出不同的 DNA 片段，从而出现另外一条条带，B 不符合题意；

C、在基因组中 Gpd 基因有 2 个拷贝，扩增出的 DNA 是相同 DNA，电泳时只会出现一个条

带，C 符合题意；

D、在基因组中存在 1 个与 Gpd 基因序列高度相似的其他基因，可能将相似的基因扩增出来，从而出现另外一条条带，D 不符合题意。

故选 C。

(3) DNA 在冷的 95%乙醇中溶解度较低，可通过将酶切后的 DNA 经苯酚-氯仿抽提除去杂质，在加入冷的 95%乙醇中沉淀，得到环形 DNA。因为引物 P1 与 P2 序列位于模板链上，从左向右为 5'→3'，引物 P3 与 P4 的序列从右向左为 5'→3'，以环形 DNA 为模板进行第二次 PCR 时，应选择对已知序列反向，但对未知序列却是相向的引物，即 P2 和 P3，从而得以扩增出未知序列。启动子可启动转录，终止子可终止转录，即启动子和终止子具有调控功能。

(4) 为确定克隆获得的 Gpd 基因的准确性，可将获得的基因序列与已建立的基因数据库进行对比，若二者相同，则说明克隆获得的 Gpd 基因准确。将 Gpd 基因的编码区与表达载体连接，构建重组质粒，再将重组质粒导入酿酒酵母细胞中，使之进行表达，实现利用酿酒酵母高效合成甘油的目的。