

大概念(八) 利用生物技术与工程生产对人类有用的产品

◎背·核心知识

1.传统发酵技术与发酵工程

(1)制作果酒、果醋、腐乳、泡菜利用的微生物分别是酵母菌、醋酸菌、毛霉(主要)和乳酸菌，异化作用类型分别是兼性厌氧型、需氧型、需氧型、厌氧型。

(2)在泡菜的腌制过程中，温度过高、食盐用量不足、腌制时间过短等容易造成细菌大量繁殖，亚硝酸盐含量增加。

(3)制作果酒和果醋的发酵装置中充气口的作用是连接充气泵进行充气，排气口的作用是排出 CO_2 ，出料口的作用是取样。

(4)制作果酒时温度一般控制在 $18\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，时间为 $10\sim 12\text{ d}$ ，前期需氧后期不需氧；制作果醋时温度一般控制在 $30\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，时间为 $7\sim 8\text{ d}$ ，始终需氧。

(5)果醋制作的原理

①当氧气、糖源都充足时，醋酸菌通过复杂的化学反应将糖分解成乙酸。

②当氧气充足、缺少糖源时，醋酸菌直接将乙醇转化为乙醛，再将乙醛变为乙酸。

(6)如果发酵产品是微生物细胞本身，可在发酵结束之后，采用过滤、沉淀等方法将菌体分离和干燥，即可得到产品。如果产品是代谢物，可根据产物的性质采取适当的提取、分离和纯化措施来获得产品。

2.微生物的培养和计数

(1)培养基的化学成分包括水、无机盐、碳源、氮源等。另外，培养基还要满足微生物生长对 pH 、特殊营养物质以及氧气的要求。例如，培养乳酸杆菌时需要在培养基中添加维生素，培养霉菌时，一般需将培养基的 pH 调至酸性；培养细菌时，一般需要将 pH 调至中性或弱碱性；培养厌氧微生物时，则需要提供无氧的条件。

(2)纯化微生物常用的接种方法有平板划线法和稀释涂布平板法，平板划线法可以分离微生物但不能对微生物进行计数，稀释涂布平板法既可以分离微生物也可以对微生物进行计数。

(3)微生物的数量测定：微生物计数常用方法有稀释涂布平板法、显微镜直接计数法等。利用稀释涂布平板法进行计数，当两个或多个细胞连在一起时，平板上观

察到的只是一个菌落，因此，统计的菌落数往往比活菌的实际数目少。显微镜直接计数利用特定的细菌计数板或血细胞计数板，在显微镜下观察、计数，然后再计算一定体积的样品中微生物的数量，统计的结果一般是活菌数和死菌数的总和。

3.植物细胞工程

(1)植物激素的使用：生长素和细胞分裂素比例适中时，促进愈伤组织的形成；生长素用量高于细胞分裂素时，有利于根的分化、抑制芽的形成；生长素用量低于细胞分裂素时，有利于芽的分化、抑制根的形成。

(2)植物体细胞杂交技术

①理论基础：细胞膜的流动性和细胞的全能性。

②基本过程：制备原生质体→原生质体融合→杂种细胞→愈伤组织→杂种植株。

③重要意义：打破生殖隔离，实现远缘杂交育种。

④植物体细胞杂交需要用酶解法制备原生质体，所用的酶包括纤维素酶和果胶酶。

⑤人工诱导植物原生质体融合的方法分为物理法和化学法，物理法包括电融合法、离心法等，化学法包括聚乙二醇融合法、高 Ca^{2+} —高 pH 融合法等。

4.动物细胞培养

(1)过程：动物组织→单个细胞→细胞悬液→原代培养→传代培养。

(2)条件：①营养：除了糖类、氨基酸、无机盐、维生素，通常还需加入血清等天然成分。

②温度和 pH：哺乳动物细胞培养的温度多以 $(36.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 为宜，多数动物细胞生存的适宜 pH 为 7.2~7.4。

③气体要求：95%空气和 5% CO_2 的混合气体。

④环境要求：无菌、无毒。

5.动物细胞融合与单克隆抗体

(1)动物细胞融合

①原理：细胞膜的流动性。

②方法：PEG 融合法、灭活病毒诱导法、电融合法等。

(2)单克隆抗体的制备

①设法将骨髓瘤细胞与 B 淋巴细胞融合后，要用特定的选择培养基进行筛选，该培养基上，未融合细胞和融合的具有同种核的细胞都会死亡，只有杂交瘤细胞才

能生长。

②抗体—药物偶联物(ADC)通过将细胞毒素与能特异性识别肿瘤抗原的单克隆抗体结合，实现了对肿瘤细胞的选择性杀伤。ADC 通常由抗体、接头和药物(如细胞毒素)三部分组成。

③单克隆抗体具有能准确地识别抗原的细微差异，与特定抗原发生特异性结合，并且可以大量制备的优点。

6.胚胎工程

(1)受精的两个阶段、两个反应

①受精包括准备阶段(精子获能、卵子的准备)和受精阶段。

②防止多精子入卵的两个反应：透明带反应和卵细胞膜反应。

(2)早期胚胎发育过程：受精卵→桑葚胚→囊胚→原肠胚。

(3)体外受精的三个主要步骤：卵母细胞的采集，精子的获取和受精。

(4)胚胎移植操作程序中“两种处理”“两种检查”

①两种处理：对供体母畜注射促性腺激素进行超数排卵处理；对受体母畜注射激素进行同期发情处理。

②两种检查：对收集的胚胎进行质量检查；移植后，对受体母畜进行是否妊娠的检查。

(5)胚胎分割

①材料要求：发育良好、形态正常的桑葚胚或囊胚。

②注意事项：在分割囊胚阶段的胚胎时，将内细胞团均等分割。

7.基因工程

(1)基因工程操作的基本工具有限制性内切核酸酶、DNA 连接酶和载体。

(2)限制酶具有特异性，即一种限制酶只能识别特定的核苷酸序列，并在特定的位点上进行切割。

(3)质粒载体作为基因工程的工具，应具备的基本条件：能在宿主细胞内稳定存在并大量复制、具有标记基因、具有一个至多个限制酶切割位点。

(4)基因工程的基本操作程序：

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→目的基因的检测与鉴定。

(5)PCR 是体外扩增 DNA 技术，所需的基本条件是 DNA 模板、以 4 种脱氧核苷酸为原料、耐高温的 DNA 聚合酶、与两条模板链结合的 2 种引物、含 Mg^{2+} 的缓冲溶液。PCR 扩增的过程是变性→复性→延伸。

(6)基因表达载体的组成包括目的基因、启动子、终止子、复制原点和标记基因等。启动子是一段有特殊序列结构的 DNA 片段，位于基因的上游，是 RNA 聚合酶识别和结合的部位。标记基因的作用是便于重组 DNA 分子的筛选。

(7)将目的基因导入植物细胞常用农杆菌转化法和花粉管通道法，导入动物细胞常用显微注射法，导入微生物细胞常用 Ca^{2+} 处理法。

(8)农杆菌转化法的原理是农杆菌细胞内含有 Ti 质粒，当它侵染植物细胞后，能将 Ti 质粒上的 T-DNA 转移到被侵染的细胞，并且将其整合到该细胞的染色体 DNA 上。

(9)检测转基因生物的 DNA 上是否插入了目的基因或是否转录出了 mRNA 常用 PCR 等技术，检测目的基因是否翻译成蛋白质常用抗原—抗体杂交技术。

(10)蛋白质工程的操作过程

从预期的蛋白质功能出发→设计预期的蛋白质结构→推测应有的氨基酸序列→找到并改变相对应的脱氧核苷酸序列(基因)或合成新的基因→获得所需要的蛋白质。

(11)DNA 不溶于酒精，但细胞中的某些蛋白质可溶于酒精，可利用冷却的酒精对提取的 DNA 进行纯化。

(12)用二苯胺试剂鉴定 DNA，在沸水浴的条件下呈现蓝色。

(13)PCR 产物一般通过琼脂糖凝胶电泳来鉴定。

◎ 悟·易错易混

1.果酒自然发酵时，利用葡萄皮上的野生酵母菌；工业生产时，人工接种纯化的酵母菌，以提高发酵效率。

2.果酒变果醋发酵需改变两个条件：一、通氧，因为醋酸菌是好氧细菌；二、升高温度，因为果酒的发酵温度在 $18\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，而果醋的发酵温度在 $30\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

3.消毒方法常用到煮沸消毒法、巴氏消毒法(对于一些不耐高温的液体)，还有化学药剂消毒(如酒精、氯气、石炭酸等)、紫外线消毒。

4.灭菌方法有灼烧灭菌、干热灭菌、湿热灭菌。

(1)接种环、接种针、试管口等使用灼烧灭菌法；

(2)玻璃器皿、金属用具等使用干热灭菌法，所用器械是干热灭菌箱；

(3)培养基、无菌水等使用高压蒸汽灭菌法，所用器械是高压蒸汽灭菌锅。

5.有关细菌培养和计数方法的四个易错点

(1)制备固体培养基最后要将平板倒置，其主要目的是防止培养皿皿盖上的水珠滴入培养基造成污染。

(2)平板划线法中的“连续划线”及稀释涂布平板法中的“系列稀释”的目的都是保证菌种单个分布(平板划线法中最后一次划线的末端)。

(3)稀释涂布平板法能分离细菌，也能计数(结果偏小)。平板划线法只能纯化细菌，不能计数。

(4)显微镜直接计数法不能区分细菌死活(结果偏大)。

6.植物组织培养的几个关键点

(1)植物组织培养中添加蔗糖的目的是提供营养和调节渗透压。

(2)接种时注意外植体的方向，应将外植体的形态学下端插入培养基，不能倒插。

(3)培养一株完整的试管苗，必须先进行生芽培养再进行生根培养。如果顺序颠倒，先诱导生根，就不好诱导生芽了。

(4)菊花的组织培养中，脱分化阶段不需要给予光照，再分化阶段需要给予光照，以利于叶绿素的形成。

7.分清植物脱毒苗培养时选择的要求及原理

由于植物顶端分生区附近(如茎尖)的病毒极少，甚至无病毒，所以常采用茎尖组织培养技术获得脱毒苗。

8.动物细胞培养时加入 5%CO₂ 的目的不是维持气体平衡或用于呼吸

动物细胞培养时，通常采用培养皿或松盖培养瓶，并将它们置于含 95%空气和 5%CO₂ 的混合气体的 CO₂ 培养箱中进行培养，加入 CO₂ 的目的是维持培养液的 pH。

9.单克隆抗体的制备

(1)第一次筛选的目的是筛选出杂交瘤细胞，方法是用特定的选择培养基培养。经过筛选后未融合的细胞或者融合后具有同种核的细胞都会死亡，只有融合的杂交瘤细胞才能生长。

(2)第二次筛选的目的是筛选出能产生所需抗体的杂交瘤细胞，方法是专一抗体检

测。

10.动物体细胞核移植

(1)减数分裂Ⅱ中期(MⅡ期)卵母细胞中的“核”其实是纺锤体—染色体复合物。

文中所说的“去核”是去除该复合物。

(2)动物体细胞核移植过程中，去核的方法是显微操作法，将供体细胞注入去核的卵母细胞，通过电融合法使两细胞融合，供体核进入卵母细胞，形成重构胚。

(3)激活重构胚的方法是物理或化学方法(如电刺激、 Ca^{2+} 载体、乙醇、蛋白酶合成抑制剂等)。

(4)目前动物细胞核移植技术中普遍使用的去核方法是显微操作法。也有人采用梯度离心、紫外线短时间照射和化学物质处理等方法。这些方法是在没有穿透卵母细胞透明带的情况下去核或使其中的DNA变性。

(5)动物体细胞核移植技术，选择受体细胞为去核卵母细胞的原因：①营养丰富；

②体积大，易操作；③含有激发细胞核全能性表达的物质。

11.胚胎工程

(1)聚集在胚胎一端的细胞形成内细胞团，将来发育成胎儿的各种组织；而沿透明带内壁扩展和排列的细胞，称为滋养层细胞，它们将来发育成胎膜和胎盘。

(2)胚胎移植实质上是早期胚胎在相同生理环境条件下空间位置的转移。

(3)进行胚胎移植的优势是可以充分发挥雌性优良个体的繁殖潜力。

(4)超数排卵是指应用外源促性腺激素，诱发卵巢排出比自然情况下更多的成熟卵子。

(5)胚胎分割所需要的主要仪器设备为体视显微镜和显微操作仪。

12.基因工程

(1)使用2种不同的限制酶可切割出不同的末端，确保基因和载体定向连接，避免自身环化和反向连接，提高连接的有效性。

(2)目的基因的插入位点不是随机的

基因表达需要启动子和终止子的调控，所以目的基因插入启动子与终止子之间的部位，若目的基因插入启动子内部，启动子将失去原功能。

(3)启动子 $\neq$ 起始密码子，终止子 $\neq$ 终止密码子

①启动子：一段有特殊序列结构的DNA片段，位于基因的上游。它是RNA聚

合酶识别和结合的部位。

②终止子：一段有特殊序列结构的 DNA 片段，位于基因的下游。作用是使转录过程停止。

③起始密码子和终止密码子位于 mRNA 上，分别控制翻译过程的启动和终止。

④标记基因：一般为抗生素抗性基因或荧光基因等，其作用是鉴别受体细胞中是否含有目的基因(目的基因是否导入成功)，从而将含有目的基因的细胞筛选出来。

(4)基因表达载体要包括以下五个基本的结构：目的基因、启动子、终止子、标记基因、复制原点。

(5)构建基因表达载体的目的：使目的基因在受体细胞中稳定存在，并且遗传给下一代；同时，使目的基因能够表达和发挥作用。

(6)PCR 技术操作中需要用 2 种不同的引物的原因

每个 DNA 分子由两条反向平行的脱氧核苷酸链构成，PCR 扩增时只能从各自模板链的 3'端开始，故需碱基序列不同的 2 种引物。

◎练·长句表达

1.(2023·全国乙卷，37 节选)采用液体培养基培养酵母菌，可以用淋洗液为原料制备培养基，培养基中还需要加入氮源等营养成分，氮源的主要作用是

_____。
(答出 1 点即可)。

提示 用于合成微生物细胞中的含氮化合物，如核酸、蛋白质等

2.(2022·浙江 6 月选考，29 节选)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_____。

提示 无菌水 水浴 杀死不耐热微生物

3.(2022·河北卷，23 节选)枯草芽孢杆菌为好氧微生物，液体培养时应采用_____ (填“静置”或“摇床振荡”)培养。培养过程中抽样检测活菌数量时，应采用_____ (填“稀释涂布平板法”或“显微镜直接计数法”)，其原因是_____。

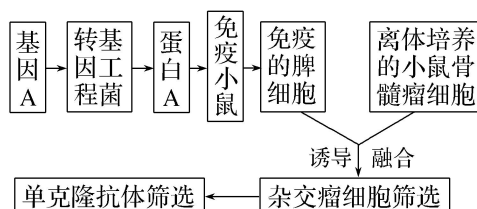
提示 摇床振荡 稀释涂布平板法 用稀释涂布平板法在培养基上看到的每一

个菌落一般都来自一个活细胞，而显微镜直接计数法会将死亡的枯草芽孢杆菌也计算在内

4.(2023·全国甲卷，38 节选)若要通过实验检测目的基因在酵母细胞中是否表达出目的蛋白，请简要写出实验思路。_____。

提示 ①通过使用基因探针，利用分子杂交技术，检测目的基因是否插入酵母细胞染色体 DNA 上；②通过使用基因探针，利用核酸分子杂交技术，检测目的基因是否转录形成 mRNA；③通过使用相应抗体，利用抗原—抗体杂交技术，检测 mRNA 是否翻译形成蛋白质

5.(2023·湖北卷，22 节选)某病毒对动物养殖业危害十分严重。我国学者拟以该病毒外壳蛋白 A 为抗原来制备单克隆抗体，以期快速检测该病毒，其主要技术路线如图所示。



回答下列问题：

(1)与小鼠骨髓瘤细胞融合前，已免疫脾细胞(含浆细胞)_____ (填“需要”或“不需要”)通过原代培养扩大细胞数量；添加脂溶性物质 PEG 可促进细胞融合，该过程中 PEG 对细胞膜的作用是

_____。

(2)在杂交瘤细胞筛选过程中，常使用特定的选择培养基(如 HAT 培养基)，该培养基对_____和_____生长具有抑制作用。

(3)单克隆抗体筛选中，将抗体与该病毒外壳蛋白进行杂交，其目的是

_____。

提示 (1)不需要 使细胞接触处的磷脂分子重新排布，细胞膜打开，细胞发生融合 (2)未融合的亲本细胞 融合的具有同种核的细胞 (3)通过抗体检测呈阳性来获得分泌所需抗体的杂交瘤细胞