

甲

乙

图 22

34. (3 分) 抗药性筛选法、显色筛选同时使用与单用抗药性筛选法两者有何区别? 你认为哪种方法更具有优势? 为什么?

同时使用, 效果更加明显, 利于筛选

(八) 生物技术 (12 分)

乙醛脱氢酶 2 (ALDH2) 是人体酒精代谢中的关键酶, 以 *ALDH2* 基因为目的基因制备的 ALDH2 蛋白存在活性低、溶解度差、不易提取等问题。研究人员参考基因组序列数据库, 将 *ALDH2* 基因和 *NusA* 基因 (促溶基因) 联合后在大肠杆菌中表达, 获得具有较好溶解性的 ALDH2 重组蛋白。图 16 是此过程中使用的质粒。



图 16

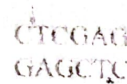


图 17

35. (2 分) 根据题意, 研究者将 *ALDH2* 基因与图 16 所示的质粒重组, 应选用的限制酶为

B

A. *EcoRI* 和 *XbaI*

B. *XhoI* 和 *EcoRI*

C. *NcoI* 和 *XbaI*

D. *EcoRI* 和 *NcoI*

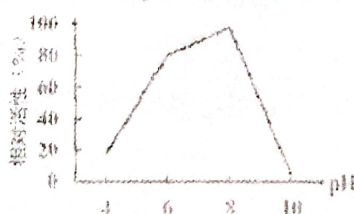
36. (2 分) 图 17 表示 *XhoI* 的识别序列和切割位点, 用 *XhoI* 切割质粒后形成的单链末端为

$\begin{array}{c} \text{CTCGAG} \\ \text{GAGCTC} \end{array}$

37. (2 分) 为筛选导入重组质粒的大肠杆菌, 须在培养基中添加

伊红美蓝

随后, 研究人员进一步研究了 pH 对 ALDH2 重组蛋白的活性影响, 结果如图 18。



36. (1分) 根据图 18, ALDH2 重组蛋白作用的最适 pH 为 8.1。

39. (2分) ALDH2 重组蛋白不适合作为食用解酒药, 原因是 A1。(多选)。

- A. ALDH2 重组蛋白食用后因胃液 pH 过低而失活
- B. ALDH2 重组蛋白食用后会被水解而失活
- C. ALDH2 重组蛋白的催化作用具有专一性
- D. ALDH2 重组蛋白无法在细胞外发挥作用

40. (3分) 结合本题信息和已有知识, 推测 ALDH2 重组蛋白与 ALDH2 蛋白的催化功能是否相同, 并说明理由 不同 二者为单一批二者为双批表达

(九) 有关生物工程问题 (12分)

人体内的 t-PA 蛋白能高效降解由纤维蛋白凝聚而成的血栓, 是心梗和脑血栓的急救药。研究表明, 为心梗患者注射大量 t-PA 会诱发颅内出血, 其原因在于 t-PA 与纤维蛋白结合的特异性不高, 若将 t-PA 第 84 位的半胱氨酸换成丝氨酸, 能显著降低出血副作用。通过基因工程技术可以大量制备改良药物 t-PA。

41. (2分) 根据已测出的人体内 t-PA 基因序列, 将其模板链中决定第 84 位的半胱氨酸的碱基序列 ACA 换成决定丝氨酸碱基序列 AGA, 建构 t-PA 改良基因, 该过程为基因工程步骤中 获取目的基因。

42. (2分) 高纯度的 DNA 模板是成功扩增目的基因的前提条件之一, 在制备 DNA 模板时, 可以用高温处理的方法去除蛋白质, 原因是 AC。(多选)

- A. 蛋白质空间结构容易破坏
- B. 氨基酸容易高温脱氨基
- C. DNA 氢键容易断裂和恢复
- D. DNA 和蛋白质可以碱基配对

图 12 表示构建目的基因、载体及筛选过程。pCLY11 为质粒, 新霉素为抗生素。

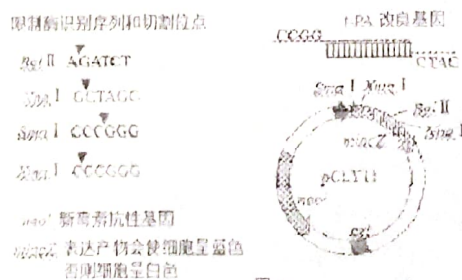


图 12

43. (4分) 图 12 中, 需选用限制酶 Xba I 与 Sma I 切开质粒 pCLY11, 才能与 t-PA 改良基因高效连接。在基因工程的基本操作过程中, 最核心的步骤是基因表达载体 (有效重组载体) 的构建, 其目的是 表达目的基因蛋白质。

44. (4分) 在筛选过程中, 应该选择不含新霉素基因的大肠杆菌作为受体细胞, 以便在加入新霉素的筛选培养基中筛选出导入质粒的大肠杆菌, 但筛选出的大肠杆菌菌落并非都是目的菌株, 原因 质粒导入可能不成功。这时需选择呈 白 色的菌落, 进一步培养、检测和鉴定。

(十) 基因工程与疫苗研发 (12分)

结核病是由结核分枝杆菌(简称结核菌)引起的致死性疾病,接种卡介苗是预防结核病的有效手段。近年来,耐药结核病不断出现。我国科研者研制出了一种重组耐药卡介苗(RdrBCG),即在原有卡介苗的基础上引入 *Ag85B* 和 *Rv2628* 两个新的基因,用于辅助治疗耐药结核病。

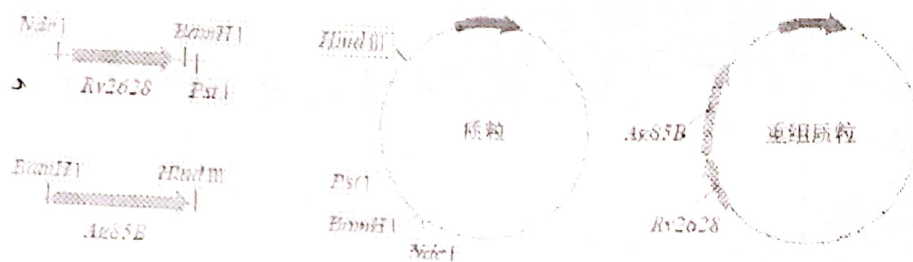


图 13

45. (4分) 在重组质粒建构过程中,使用到了限制酶 *PstI*。结合图 13 示所给酶切位点(灰色底色)等信息,写出重组质粒的制备过程:

使用 *PstI* 限制酶将质粒和 *Rv2628* 基因切割开,再使用 DNA 连接酶将质粒和 *Rv2628* 基因连接起来。

(书写时限制酶可仅保留首字母,如限制酶 *PstI* 简写为酶 P)

46. (3分) 将野生结核菌接种在含有多种治疗结核病药物的培养基中,最终筛选出了一种耐药菌株作为实验材料。下列对于该耐药菌获得的过程说明正确的是 B, C (多选)

- A. 培养基中的药物使结核菌产生耐药性变异
- B. 培养过程中结核菌的变异结果多样
- C. 耐药结核菌在培养基环境的选择作用下存活
- D. 培养基中的药物加剧了结核菌的突变速率

47. (2分) 对免疫缺陷小鼠接种 RdrBCG,下列实验结果能说明 RdrBCG 安全性的是 C。

- A. 肺部检测到 *Ag85B*、*Rv2628* 稳定表达
- B. 肺部提取物经培养可见结核菌菌落
- C. 小鼠未患结核病且存活
- D. 脾部提取物经培养可见结核菌菌落

48. (3分) 为检测 RdrBCG 是否具有辅助治疗耐药结核病的效果,以用耐药结核菌感染的小鼠作为实验对象,应选择的实验组有 ①②③④。(填写编号)

- ① 接种 RdrBCG 的小鼠
- ② 接种普通卡介苗的小鼠
- ③ 药物治疗+接种 RdrBCG
- ④ 药物治疗+接种普通卡介苗
- ⑤ 不作处理的被感染小鼠
- ⑥ 药物治疗被感染的小鼠

(十一) 现代生物技术 (13 分)

基因敲除 (gene knockout) 又称基因打靶 (gene targeting), 其原理如图 11 所示: 通过基因工程手段, 将构建好的打靶质粒导入特定细胞, 打靶质粒上的 A'、B' 序列分别与细胞基因组 DNA 上的 A、B 序列发生交换 (同源重组), 使得基因组 DNA 上的目的基因被阳性标记基因替换, 从而实现对细胞中目的基因的敲除。

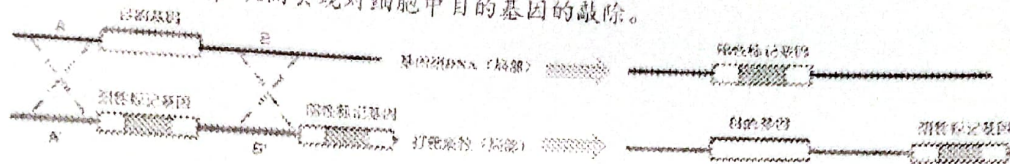


图 11

49. (2 分) 将打靶质粒导入特定小鼠细胞的方法是 显微注射法。
50. (2 分) 若要培育特定基因被敲除的小鼠, 可选取该小鼠的 17 细胞进行上述操作。
A. 去核卵细胞 B. 成体干细胞 C. 造血干细胞 D. 胚胎干细胞
51. (2 分) 动物减数分裂过程中, 可能发生类似于上述阳性标记基因替换目的基因的过程, 具体是在 A。
A. 减数第一次分裂前期 B. 减数第一次分裂后期
C. 减数第二次分裂前期 D. 减数第二次分裂后期

打靶质粒与基因组 DNA 间发生预期同源重组实现基因敲除的几率较低, 多数情况下不发生任何重组, 也可能发生非同源重组 (此时阳性标记基因、阴性标记基因均插入基因组 DNA, 而目的基因也仍在基因组 DNA 上), 因此需要进行筛选。已知阳性标记基因、阴性标记基因均只有位于基因组 DNA 上时才能表达。

现有两种候选标记基因, 相关资料如下, 请阅读资料完成筛选方案设计。

【新霉素抗性基因 neo^R 】可使细胞获得对新霉素的抗性。

【疱疹病毒胸苷激酶基因 $HSV-tk$ 】其表达产物可使无毒的丙氧鸟苷转变为有毒的核苷酸, 从而杀死细胞。

52. (2 分) 在设计打靶质粒时, 应以 $HSV-tk$ 作为阳性标记基因, 以 neo^R 作为阴性标记基因。
53. (2 分) 为筛选出成功实现预期基因敲除的细胞, 对培养基的要求是 C。
A. 含新霉素, 不含丙氧鸟苷 B. 含丙氧鸟苷, 不含新霉素
C. 既含新霉素, 也含丙氧鸟苷 D. 既不含新霉素, 也不含丙氧鸟苷
54. (3 分) 某课题组在小鼠中新发现一个蛋白质编码基因 X, 功能未知。小雷同学拟通过构建敲除基因 X 的纯合小鼠并将其和野生型小鼠作对比, 从而了解基因 X 的功能。小源同学认为这种方案值得一试, 基因 X 敲除后, 也未必能获知该基因的功能。小源同学作出此项判断的理由是 基因 X 可能并不表达, 或无功能。

(十二) 基因工程 (12 分)

三氯生是一种抑菌物质, 可以替代抗生素用于基因工程中筛选含目的基因的受体细胞。2021 年某科研团队通过先筛选出一种对三氯生抵抗性较强的重组质粒, 再将可以受温度调控的基因插入该质粒上, 构建了温度调控表达质粒。

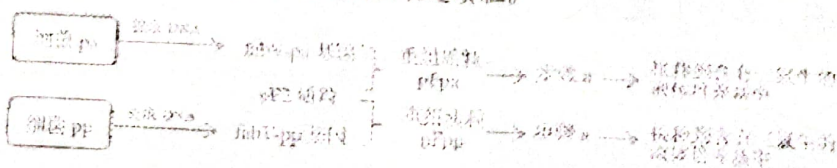


图 9

55. 图9中步骤a是基因工程四个步骤之一, 则步骤a为 重组质粒导入受体细胞。
56. 已知 *fabV* 基因 (*pa* 和 *pp* 代表从不同菌中获得) 可以使大肠杆菌抵抗三氯生。在图9中, *fabV-pa* 基因和 *fabV-pp* 基因是 标记 (目的/标记) 基因。
57. 为获得一种增强大肠杆菌对三氯生的抵抗作用效果较好的重组质粒, 将含有不同质粒的大肠杆菌分别接种到含三氯生或者不含三氯生的培养基中。培养一段时间后, 结果如图10。

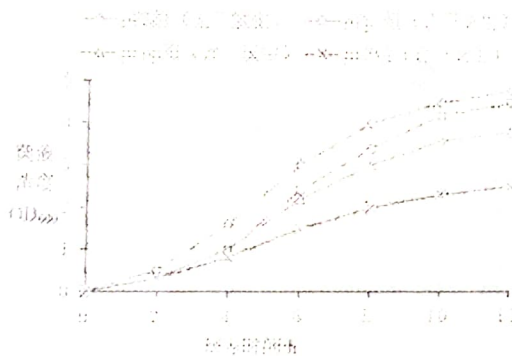


图 10

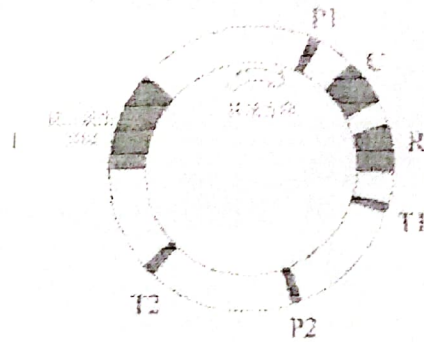


图 11

- (1) 设置 pF2 组 (无三氯生) 和 pF2 组 (含三氯生) 的原因是 ()

- A. 验证 pF2 质粒可以促进大肠杆菌生长
B. 验证 pF2 质粒可以抑制大肠杆菌生长
C. 验证三氯生对含 pF2 质粒的大肠杆菌生长无影响
D. 验证三氯生可以抑制含 pF2 质粒的大肠杆菌生长

- (2) 结合图 10, 说说哪种质粒会被用于构建温度调控表达, 并说明理由。_____

58. 科学家对上述选出质粒进行改造, 获得了图 11 所示质粒。其中 P1 和 P2 是启动了, 可以启动转录; C 基因在低温下会抑制 P1; R 基因在高温下会抑制 P2; T1 和 T2 是终止了, 可以终止转录。

- (1) 如果将 *lacZ* 基因和 GFP 基因插入图 11 质粒中, 使得最后表现为低温下只表达 GFP 蛋白, 而高温下只表达 *lacZ* 蛋白。则以下说法正确的有 DA (多选)

- A. GFP 基因插在 R 基因和终止子 T1 之间
B. *lacZ* 基因插在 R 基因和终止子 T1 之间
C. GFP 基因插在启动了 P2 和终止子 T2 之间
D. *lacZ* 基因插在启动了 P2 和终止子 T2 之间

- (2) 如果仅将 GFP (绿色荧光蛋白) 基因插入图 11 质粒, 构建成一个新的重组质粒。利用该重组质粒进行基因工程, 受体细胞为大肠杆菌, 那么, 在筛选含有目的基因的受体细胞时, 如何判断是否成功? (不考虑温度因素) 看荧光, 有荧光就是含有目的基因

有荧光, 无荧光。