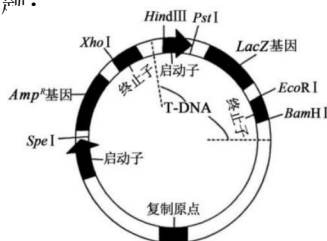


1. 科研人员利用 RT-PCR 技术获得的TaPRX-2A 基因构建的基因表达载体，成功培育出TaPRX-2A 基因能过表达的转基因耐盐玉米。在培育过程中，所用的 Ti 质粒中的限制酶识别位点、标记基因等如图所示。其中，HindIII、PstI、EcoRI、BamHI、XhoI、SpeI表示限制酶；Amp^R 为氨苄青霉素抗性基因，表达产物对氨苄青霉素有抗性；LacZ 基因编码产生的β-半乳糖苷酶可以分解 X-gal 产生蓝色物质，使菌落呈现蓝色，否则菌落为白色；终止子和启动子均能在玉米根细胞中调节基因表达。回答下列问题。

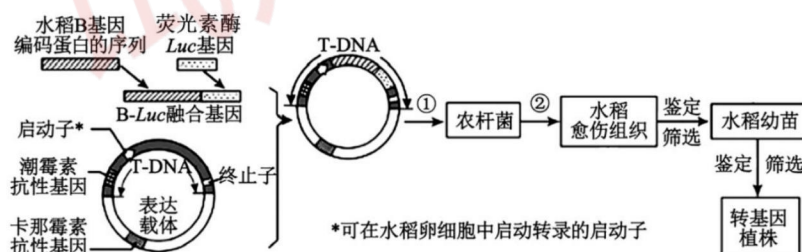


(1)用RT-PCR 技术扩增获得 TaPRX-2A 基因的过程需要先经_____过程得到 cDNA，再根据 cDNA 设计相应的引物，引物的作用是_____。

(2)在构建含 TaPRX-2A 的 cDNA 的表达载体时，宜选用限制酶_____对质粒和 TaPRX-2A 的 cDNA 进行处理，将 TaPRX-2A 的 cDNA 插入质粒中相应酶切位点之间的原因是_____（答两点）。

(3)获得转基因玉米时，先将含 TaPRX-2A 的 cDNA 的表达载体转入农杆菌，筛选含重组质粒的农杆菌与玉米细胞共培养后，利用_____技术将含 TaPRX-2A 的 cDNA 的受体细胞培养为转基因玉米。在这个过程中，筛选含重组质粒的农杆菌时，需要在完全培养基中添加_____，挑选_____色菌落。

2. 水稻基因组中的 B 基因仅在体细胞和精子中正常表达，在卵细胞中不能转录。为研究 B 基因表达对卵细胞的影响，科研人员设计了如图所示的实验。回答下列问题：



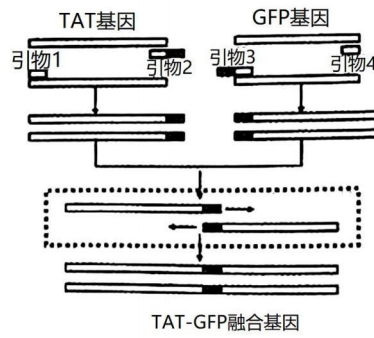
(1)构建表达载体时，将水稻 B 基因编码蛋白的序列与荧光素酶 Luc 基因拼接成 B—Luc 融合基因，其目的是_____。表达载体中潮霉素抗性基因和卡那霉素抗性基因作为_____，可用于筛选含有表达载体的水稻细胞。启动子是_____。

(2)图中①过程常采用感受态细胞法，是利用_____处理农杆菌细胞，使其处于一种能吸收周围环境中DNA 分子的生理状态。②过程中，农杆菌侵染水稻愈伤组织，使 T-DNA 整合到水稻细胞的_____上。鉴定筛选水稻幼苗时，检测指标除了幼苗对潮霉素和卡那霉素的抗性外，还可以检测_____。

(3)若转基因植株中B 基因在卵细胞中正常表达，与野生型相比，其受精能力可能发生改变。为验证这一推测，可进行杂交实验：让转基因植株作母本，野生型植株作父本进行杂交，同时设置_____作为对照，统计并比较_____。

3. TAT 是一种能直接穿过细胞膜的多肽，对细胞几乎无毒性；GFP 较难进入细胞，在特定波长的光的照射下能发出绿色荧光。为了方便运送 GFP 进入细胞，研究者将 TAT 和GFP 融合形成 TAT-GFP，并测试了其穿膜活性。回答下列问题：

(1)获取融合基因：采用PCR 融合技术，将 TAT 基因和GFP 基因拼接起来（示意图如右），需要在引物的_____端引入与另一个基因相应末端互补的序列，形成重叠区域。虚线框中的过程不需要加入引物，原因是_____。PCR 产物可通过琼脂糖凝胶电泳来鉴定，在凝胶中 DNA 分子的迁移速率与_____和_____有关，凝胶要浸没于电泳缓冲液中，电泳缓冲液的作用是_____。



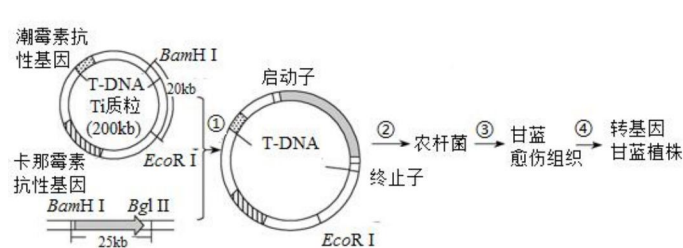
(2)工程菌的制备与培养：将获得的融合基因与相应载体质粒一起进行双酶切，选用限制酶时除了考虑其作用位点外，还需注意两种酶的_____等接近（写两点）以保证它们能在相同的条件下均发挥作用，再用_____酶将融合基因与载体质粒连接起来形成重组质粒。将重组质粒加入大肠杆菌培养液中共同培养，所用大肠杆菌一般需经过 CaCl_2 处理。经筛选、鉴定获得含有_____的大肠杆菌作为工程菌并进行扩大培养。

(3)融合蛋白（TAT-GFP）的表达与分离：诱导工程菌表达 TAT-GFP 后，通过_____将菌体和菌液分开，弃掉菌液，对菌体进行_____处理后在适宜条件下分离出目标蛋白。为保证 TAT-GFP 的活性，操作过程中需严格控制环境条件，并加入适量的_____。

(4)检测 TAT-GFP 的穿膜活性：在细胞培养板上加入等量某种细胞，培养至贴壁 30%时分别加入等量的不同浓度的 TAT-GFP，实验组分为低浓度、中浓度和高浓度组，对照组加入_____。继续培育一段时间后取出细胞培养板，沿细胞培养空壁加入适量的胰蛋白酶消化细胞，并用缓冲液反复冲洗细胞，目的是_____，在荧光显微镜下观察细胞中的荧光强度并对荧光细胞进行计数，计算穿膜率。

(5)若要将 TAT 作为载体运送药物进入细胞，除了进行上述实验外，还需要进一步检测融合蛋白_____。

4.某科研团队利用农杆菌转化法将抗除草剂基因导入甘蓝，过程如图所示，①~④为操作步骤，限制酶 BamH I、Bgl II、EcoR I 酶切位点唯一，BamH I 和 EcoR I 之间的距离为 20kb，BamH I 和 Bgl II 之间距离为 25kb，识别序列和切割位点如表所示。请回答：



限制酶	识别序列和切割位点
BamH I	—G [↓] GATCC—
Bgl II	—A [↓] GATCT—
EcoR I	—G [↓] AATTC—

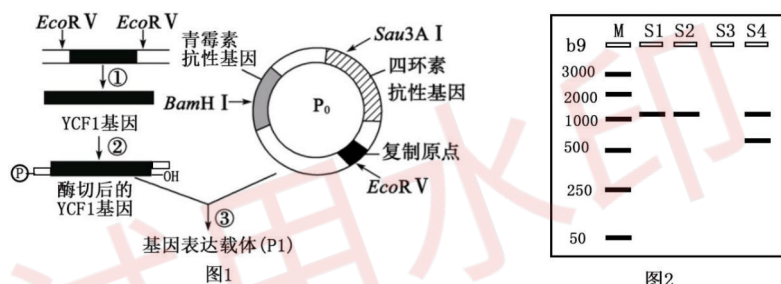
(1)基因表达载体包括了启动子、终止子及抗生素抗性基因等，其中终止子的作用_____。步骤②和③的目的是_____，步骤④的培养基中添加_____以便筛选出含目的基因的甘蓝植株。

(2)目的基因用 **BamH I** 和 **Bgl II** 剪切, 质粒用**BamH I** 剪切, 剪切后的目的基因和质粒能连接在一起, 原因是_____。酶切后的目的基因存在正向与反向两种连接方式, 可用_____酶对两种重组质粒进行剪切, 通过凝胶电泳分析产物大小进行区分, 如图所示, 图中_____ (填“样品 1”或“样品 2”) 为所需基因表达载体。

(3)步骤②用 **CaCl₂** 处理农杆菌后获得感受态细胞, 以便_____。步骤③将农杆菌与甘蓝愈伤组织共同培养后, 在步骤④的培养基中添加_____以便筛选出含目的基因的甘蓝植株。若要检测甘蓝是否具有抗除草剂的性状, 需要在个体水平通过_____进行检测。请以甘蓝的生长状况为检测指标, 设计实验方案, 简要写出实验思路: _____。

5. 科研人员将酵母液泡 Cd 转运蛋白基因 (YCF1, 1200bp) 与质粒 P0 构建基因表达载体 P1 用于基因工程实验, 过程如下图 1 所示, 其中部分限制酶的识别序列与切割位点如下:

EcoR V:GAT↓ATC, **SauAI**: ↓GATC, **BamHI**: G↓GATCC。请回答下列问题。



(1)为获取YCF1 基因, 将酵母细胞的全部DNA 提取后通过①过程用**EcoRV** 酶切割_____ 键, 得到含_____末端的 YCF1 基因。

(2)②过程利用PCR 技术扩增目的基因时, 需要根据目的基因_____设计出一对引物, 此外还需要在引物的两端加上限制酶识别序列, 酶切后形成的黏性末端碱基序列为 5'_____。

(3)用_____酶切质粒 P0 后与②过程产物在_____酶的作用下, 形成基因表达载体 P1。图中质粒 P0 除标注元件外, 还缺少_____结构。

(4)为了筛选出含 P1 的受体菌, 首先需要在添加_____的平板培养基上进行培养, 之后利用影印平板法在含_____的平板培养基上继续培养, 观察对比即可得到含 P1 受体菌。

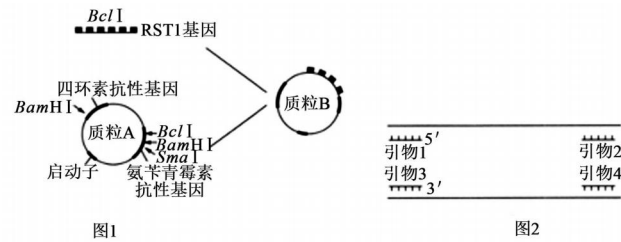
(5)科研过程中还可以采用PCR 技术检测受体菌是否成功转入了 P1。提取转染后的四个受体菌 S1-S4 的总 DNA, 用目的基因的引物扩增后进行琼脂糖凝胶电泳, 结果如图2 所示:

①图 2 中 M 泳道为标准对照组 (Marker), 其实质为_____。

②图 2 中样本_____为成功转入了 P1 的受体菌, S4 样本出现的结果可能原因有_____ (在下列选项中选择)。

A. 模板受到污染 B. 引物特异性不强 C. 退火温度偏低 D. 退火温度偏高

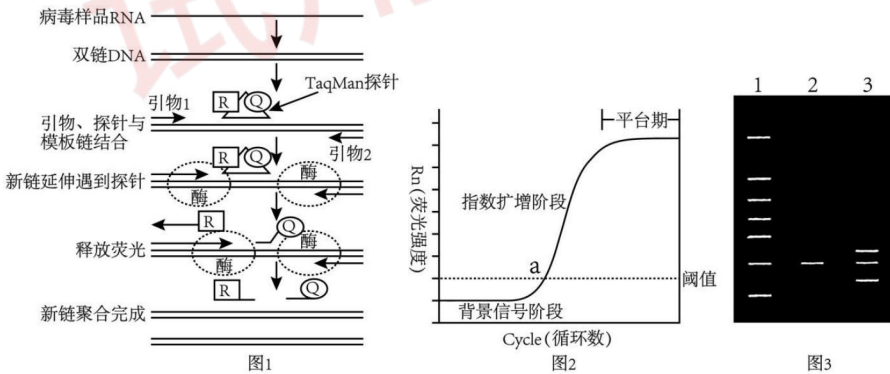
6. 土壤盐渍化是限制作物生长的主要非生物胁迫之一。土壤中过多的盐分会破坏植物细胞中正常的营养代谢，导致作物生长受抑、产量下降。某团队对 EMS 诱变的水稻突变体库进行筛选，获得一株耐盐性和产量均显著提高的突变体，并从该突变体中分离到一个新的耐盐基因 RST1，该团队利用基因 RST1 通过基因工程培育耐盐碱水稻新品种。图 1 为构建重组质粒的过程示意图，BamHI、BclI、SmaI 三种限制酶的识别序列见表。请回答下列问题：



限制酶	BamHI	BclI	SmaI
识别序列及切割位点（5'→3'）	G↓GATCC	T↓GATCA	CCC↓GGG

- (1) 在扩增 RST1 基因时，应选择图 2 中的引物_____进行 PCR，原因是_____。若 PCR 进行了 4 轮循环，则同时含两种引物的 DNA 占_____。
- (2)构建重组质粒时选用限制酶_____切割质粒 A。为保证质粒与目的基因的正确连接，应在两个引物的 5'端分别添加序列_____和 5'-_____3'。
- (3)将重组质粒导入普通水稻细胞，受体细胞应该是_____（填“叶肉细胞”“茎尖细胞”“受精卵”或“以上都可以”），原因是_____。把转基因细胞培育成转基因植株，利用的技术是_____。
- (4)为确定 RST1 基因能否在实践应用中发挥作用，科研人员在正常条件下种植相同数量的普通水稻和转基因水稻，给予相同的水肥条件，至成熟期后，检测两组水稻的产量。该实验思路需完善之处是_____。除产量外，还可以检测哪些指标？_____（写出两个即可）。

7. 新冠病毒是一种单链 RNA 病毒，常用“荧光 RT-PCR 技术”（实时荧光逆转录聚合酶链式反应）进行检测，如图 1 所示。该过程中当 TaqMan 探针完整时，荧光基团（R）发出的荧光信号被淬灭基团（Q）吸收而不发荧光；当探针水解释放出游离的 R 和 Q，R 发出的荧光信号被相应仪器检测到，荧光信号的累积与 PCR 产物数量完全同步。请分析并回答下列问题。



- (1)“荧光 RT-PCR 技术”所用的试剂盒中应该含有：检测者 mRNA、荧光标记的新冠病毒核酸探针、_____、_____、_____、2 种引物、含_____（离子）的缓冲体系。
- (2)PCR 循环中，引物、探针与模板结合发生在_____阶段。探针核苷酸序列的设计依据是_____。
- (3)每扩增一个 DNA 便释放一个荧光信号，从而实现荧光信号的积累与 PCR 产物的完全同步。最终可以得到一条荧光扩增曲线，如图 2 所示。荧光一般要达到或超过阈值时才确诊为感染了新冠病毒。现有甲、乙两个待检样本，检测时都出现了图示形态的曲线，但甲的 a 点比乙的 a 点明显左移。在试剂盒合格且正常，操作过程规范且准确的前提下，该现象出现的原因是甲样本中的新冠病毒含量较_____，达到阈值所需的循环数更_____。
- (4)常采用_____来鉴定 PCR 的产物，设置如下：1 号泳道为标准（Marker），2 号泳道为阳性对照组，3 号泳道为实验组。图 3 中 3 号泳道出现杂带，原因一般有_____（至少写出 2 点）。