

## 第 14 章 基因工程与生物技术的安生性

### 第 1 节 基因工程的工具及操作程序

#### 刷基础

#### 1. B 考查点 ▶ DNA 的粗提取与鉴定

【解析】哺乳动物成熟的红细胞中没有细胞核和各种复杂的细胞器,因此不能用猪血来提取 DNA,A 错误。在液体培养基中培养的大肠杆菌也可作为实验材料,因为大肠杆菌是细菌,以 DNA 作为遗传物质,含有拟核和质粒,DNA 含量也较多,适合提取 DNA,B 正确。DNA 能溶于 2 mol/L 的 NaCl 溶液中,提取时在滤液中加入与滤液体积相等的、预冷的酒精溶液后会出现白色丝状 DNA,C 错误。DNA 鉴定时可取两支 20 mL 的试管,各加入 2 mol/L 的 NaCl 溶液 5 mL,将丝状物溶于其中一支试管的 NaCl 溶液中。然后,向两支试管中各加入 4 mL 的二苯胺试剂,混合均匀后,将试管置于沸水中加热 5 min,待试管冷却后,比较两支试管中溶液颜色的变化,因此 DNA 鉴定时可通过是否加入 DNA 设置对照实验来观察实验现象,D 错误。

#### 刷有所得

#### DNA 粗提取和鉴定的原理

- (1) DNA 和蛋白质等其他成分在不同浓度 NaCl 溶液中溶解度不同;DNA 不溶于酒精,但某些蛋白质溶于酒精。
- (2) DNA 对酶、高温和洗涤剂的耐受性不同。
- (3) 在一定温度下,DNA 遇二苯胺试剂会呈现蓝色。

#### 2. D 考查点 ▶ PCR 的原理

【解析】加热会使 DNA 分子两条链之间的氢键断裂,A 错误;A—T 碱基对有两个氢键,C—G 碱基之间有三个氢键,A—T 碱基之间有两个氢键,A—T 碱基对所占比例越高  $T_m$  值越低,B 错误;当温度超过 90 ℃时,双链 DNA 解聚为单链,且 DNA 两条链并不是从一端向另一端逐渐分离的,C 错误;利用 PCR 技术检测目的基因时,需要先将 DNA 变性使 DNA 解聚为单链,D 正确。

#### 3. ABD 考查点 ▶ 基因表达载体的构建

【解析】PCR 扩增目的基因时,高温使目的基因解旋成单链后再进行扩增,该过程不是边解旋边复制,A 错误;由表可知,用 *Bam*H I 和 *Sau*3A I 对质粒和含有目的基因的 DNA 片段进行切割,得到的黏性末端相同,在过程①中容易导致目的基因反向连接,B 错误;将重组质粒导入大肠杆菌前,通常需要用适宜浓度的  $Ca^{2+}$  溶液处理大肠杆菌,使其处于能吸收外界 DNA 的生理状态,即感受态,C 正确;过程③中培养基上长出的一个大肠杆菌菌落是一个种群,D 错误。

刷有所得

基因工程的基本操作程序

(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:基因工程的核心步骤,基因表达载体的组成包括目的基因、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常用  $\text{Ca}^{2+}$  处理法。

(4) 目的基因的检测与鉴定:

①分子水平上的检测:

a. 检测转基因生物染色体的 DNA 上是否插入了目的基因——PCR 等技术。

b. 检测目的基因是否转录出了 mRNA——PCR 等技术。

c. 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。

4. (1)  $5' \rightarrow 3'$  防止过度水解 DNA (2) 过程①形成的末端的长度不同 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶 (3) ABC (4) *PABD* 基因一端的核苷酸序列和载体一端的核苷酸序列 1、4 (5) 草胺磷抗草胺磷:不抗草胺磷=3:1 (6) 绿色荧光点的分布

**突破点** ▶ 图表分析—基因工程的基本操作程序

**【解析】**(1) 由题图可知,无缝克隆时,过程①中的 T5 核酸外切酶沿  $5' \rightarrow 3'$  的方向水解 DNA。温度能影响酶的活性,T5 核酸外切酶催化的最适温度为  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,而过程①选择的温度为  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,其目的是降低酶的活性,防止过度水解 DNA。

(2) 过程②在退火的过程中,两个片段的末端可根据互补序列进行配对结合,但由于过程①形成的末端的长度不同,使这两个片段在过程②退火后存在“缺口”。过程③为补齐缺口处的 DNA 链,可以看作 DNA 分子复制的过程,所需的酶有 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶。

(3) 传统的酶切再连法需要先用特定的限制酶将目的基因和质粒进行切割,再用 DNA 连接酶对目的基因和质粒进行连接,在该过程会形成多个小片段,操作复杂,而无缝克隆技术构建重组质粒不受限制酶酶切位点的限制,不会引入多余碱基,操作时间短,成功率高,但不利于多个小片段(小于  $50\text{ bp}$ ) 连接,A、B、C 正确。

(4) 用于 PCR 扩增的引物是根据一段已知目的基因(*PABD* 基因)的核苷酸序列来设计的,由题图可知,*PABD* 基因(目的基因)需要与载体进行连接,因此 PCR 扩增 *PABD* 基因时需依据 *PABD* 基因一端的核苷酸序列和载体一端的核苷酸序列设计引物 R1。由重组 DNA 图可知,*GFP* 基因和 *PABD* 基因进行连接,PCR 扩增 *GFP* 基因时需根据 *GFP* 基因一端的核苷酸序列和 *PABD* 基因一端的核苷酸序列设计引物 R2,而设计引物 F1 仅需根据 *PABD* 基因一端的核苷酸序列,因此引物 F1 的碱基序列比引物 R2 的碱基序列短,因此扩增目的片段的引物 F1 应对应题表中的 1;引物 R2 的一部分碱基能与引物 F1 进行碱基互补配对,综上所述,引物 R2 应对应题表中的 4。

(5) 由题图可知, *bar* (草胺膦抗性基因) 为标记基因, 位于 T-DNA 上, 农杆菌中 Ti 质粒上的 T-DNA 可转移至受体细胞, 并整合到受体细胞染色体的 DNA 上, 因此利用农杆菌花序侵染法转化拟南芥, 将获得的种子 ( $T_1$ ) 进行表面消毒, 均匀铺在含有草胺膦的 MS 培养基上进行筛选和鉴定。若  $T_1$  为单位点插入的转基因株系, 假设抗性基因用 A 表示, 非抗性基因用 a 表示, 则  $T_1$  的基因型为 Aa,  $T_1$  自交获得的  $T_2$  幼苗的基因型及比例为  $A\_ : aa = 3 : 1$ , 因此  $T_2$  幼苗的抗性表型及比例为抗草胺膦 : 不抗草胺膦 = 3 : 1。

(6) 由题意“将高度专一的 PA 结合蛋白 (*PABD*) 基因与绿色荧光蛋白 (*GFP*) 基因融合, 构建有效监测细胞 PA 变化的荧光探针, 并测定拟南芥细胞内的 PA 含量”可知, 通过观测转基因拟南芥根尖细胞中绿色荧光点的分布, 可了解 PA 的动态变化。

## 5. AC 考查点 ▶ 基因工程的基本工具——载体

【解析】克隆载体的作用是复制出更多的目的基因, 克隆载体必须具备的元件是复制原点、标记基因, 而启动子和终止子是参与转录过程的, 不是必需元件, A 错误;  $Ca^{2+}$  可以使大肠杆菌细胞处于一种能吸收周围环境中 DNA 的生理状态, 即感受态, 因此可将克隆载体导入  $Ca^{2+}$  处理过的大肠杆菌来进行复制, B 正确; 表达载体的作用是使外源基因在受体中维持稳定、可遗传和高效表达, 因此表达载体的元件中必须含有标记基因 (用来筛选表达载体), 也需要复制原点, 保证表达载体能在受体细胞中自我复制, C 错误; 质粒、动植物病毒、噬菌体都能将外源基因导入受体细胞, 故质粒、动植物病毒、噬菌体均可作为克隆载体或表达载体, D 正确。

### 易错警示 无法准确辨析克隆载体与表达载体的区别

克隆载体的作用是复制出更多的目的基因, 需含有复制原点、标记基因; 表达载体的作用是使外源基因在受体细胞中稳定存在, 并遗传给下一代, 同时能表达和发挥作用, 故需含有复制原点、标记基因、启动子、终止子等。

## 刷提分

### 1. C 考查点 ▶ 目的基因的检测与鉴定

【解析】由题图可知, sgRNA 特异性识别目标 DNA, Cas9 蛋白可以对基因特定位点进行切割, A 正确; 细胞内的 Cas9 蛋白在配对区域定点剪切, 切除 *Badh2* 基因的部分碱基, 引起水稻发生基因突变, B 正确; 采用抗原—抗体杂交的方法可检测基因是否表达, 基因敲除载体可能导入了受体细胞但不表达, 因此该方法不能检测基因敲除载体是否导入水稻细胞, C 错误; 由题图可知, 基因敲除载体中有 sgRNA 编码序列、Cas9 基因和潮霉素抗性基因, 因此转基因水稻中也含有潮霉素抗性基因, 所以在培养基中加入潮霉素可筛选出导入基因敲除载体的水稻细胞, D 正确。

### 2. C 突破点 ▶ 图表分析—In-Fusion 技术构建基因表达载体

【解析】由题意可知, 该技术的关键是在目的基因两端构建与线性化质粒末端相同的 DNA 序列 (即同源序列), 然后用 In-Fusion 酶处理, 使同源序列形成黏性末端, 最终形成的重组质粒会在受体细胞内形成完整的重组序列, 推测 In-Fusion 酶的作用可能是

识别同源序列、形成黏性末端,A 正确;若用限制酶切割后黏性末端相同,会导致目的基因与载体自身环化和反向连接等,载体 A 端和 B 端的序列不同,可防止目的基因与质粒反向连接及自身环化,B 正确;由题图可知,重组质粒形成时需要加入 In-Fusion 酶,如果温度远高于 50 ℃,黏性末端的碱基不容易互补配对,C 错误;分析题意,传统方法常受限于限制酶的识别序列,结合题图可知,该技术无需识别特定切割位点,用 In-Fusion 酶处理,使同源序列形成黏性末端,故需识别目的基因与线性化质粒任意同源序列,D 正确。

3. (1) 5' *Bam*H I 和 *Hind* III (2) 既作为原料又提供能量 引物中 G 和 C 的含量 非特异性扩增片段增多 (3) 9 (4) 启动子、终止子  $\text{Ca}^{2+}$  (5) 植物激素(或生长素和细胞分裂素) (6) 氨苄青霉素(或氨苄青霉素和四环素) 4 和 6

考查点 ▶ 基因工程

### 思路分析

图 1 所示为转基因抗盐烟草的培育过程,其中

- ①表示重组质粒的构建过程;②表示重组质粒导入农杆菌;③表示采用农杆菌转化法将目的基因导入受体细胞;④表示植物组织培养;表中 *Bam*H I、*Bcl* I 和 *Sau*3A I 三种限制酶的识别序列有共同的碱基序列。

【解析】(1) 为了防止目的基因和质粒自身环化以及二者反向连接,应选用 *Bam*H I 和 *Hind* III 对质粒进行切割,这样可以使目的基因和质粒正确连接。故在两种引物的 5' 端分别连接上 *Bam*H I 和 *Hind* III 的识别序列,以便重组质粒的构建和筛选。

(2) PCR 反应体系中的 dNTP 既可以为反应提供能量,也可以作为反应的原料。PCR 过程中,退火指的是复性,即引物和模板链结合,故引物中 G、C 含量多,其与模板之间形成的 G—C 碱基对越多,设置的退火温度越高,引物越长,设置的退火温度也越高。如果退火温度过低,引物与模板将产生非特异性结合,会导致非特异性扩增片段增多。

(3) *Sau*3A I 可以识别 *Bam*H I 和 *Bcl* I 的识别序列,即相当于在重组质粒上有三个 *Sau*3A I 的酶切位点,则会出现三种情况:①三个酶切位点均被切开,则会形成三种片段,假设分别为 a、b、c;②两个酶切位点被切开,则会新形成 a+b、b+c、c+a 三种片段;③只切开一个酶切位点,则会形成 a+b+c、b+c+a、c+a+b 三种片段,则一共是 9 种片段。

(4) 基因表达载体包括启动子、终止子、标记基因、复制原点等,图 1 中运载体未标出启动子、终止子。步骤②中需先用  $\text{Ca}^{2+}$  处理农杆菌使其处于感受态,以便重组质粒导入农杆菌细胞。

(5) 植物组织培养时除了需要在培养基中添加营养物质,还需要添加相应的植物激素。

(6) 根据题干及题图可知,重组质粒中的氨苄青霉素抗性基因被破坏,故可以用氨苄青霉素将导入重组质粒和空白质粒的农杆菌筛选出来。图 2 表示影印培养法,培养基 B 除了含有细菌生长繁殖必需的成分外,还含有氨苄青霉素(或氨苄青霉素和四环素),既能在培养基 B 上生长也能在培养基 A 上生长的农杆菌导入的是空白质粒(有氨苄青霉素抗性基因),不能在培养基 B 上生长但能在培养基 A 上生长的农杆菌导入的是重组质粒(重组

质粒构建时破坏了氨苄青霉素抗性基因),对比培养基 A 和 B 可知,含有目的基因(重组质粒)的是 4 和 6 菌落中的细菌。

4. (1) 获得大量病毒,降低生产成本 (2) 无法在人体宿主细胞内复制(增殖) (3) 逆转录酶、*Taq* 引物 4、引物 5 (提纯的) RBD 蛋白基因片段 模板受到污染;引物的特异性不强;退火温度偏低 *Bam*H I 和 *Hind* III (4) ①病毒的基因对应的部分核苷酸序列 ②不变 *a* (5) 抗原—抗体杂交 *ab*

**突破点** ▶ 信息提取—基因工程的应用

**【解析】**(1) 分析题意可知,工业生产利用 Vero 细胞能无限增殖的特性培养病毒,而病毒需要寄生在活细胞内才能增殖,故工业生产利用 Vero 细胞能无限增殖的特性培养病毒,可实现获得大量病毒,降低生产成本的目的。

(2) 由题意可知,在疫苗研发中,改造后的腺病毒不能在人体内复制,也无法整合进宿主细胞基因组中,故从理论性上来讲对人体不会造成危害,安全性更高。

(3) RT-PCR 技术是将 RNA 的反转录和 cDNA 的聚合酶链式扩增(PCR)相结合的技术,利用 RT-PCR 技术,获取 S 蛋白基因时,需加入逆转录酶(催化 RNA→DNA 过程)、*Taq* 酶(催化 PCR 过程);引物需要与模板的 3'端结合,且一对引物的方向相反,引物与模板链的 3'端碱基互补配对,故引物 1、引物 2、引物 7 和引物 8 不合适,扩增得到的 RBD 蛋白基因也应该含有限制酶的酶切位点,故引物 3 和引物 6 不合适,即应选择引物 4 和引物 5。PCR 的产物可通过电泳鉴定,设置如下:1 号泳道为标准(Marker),2 号泳道是以 RBD 蛋白基因片段为材料做的阳性对照组,3 号泳道为实验组。PCR 技术受到温度、酶、所用其他材料等因素的影响,出现杂带的原因可能是引物的特异性不强(结合到模板的其他地方)、模板不纯受到污染(引物结合到其他模板)、目的片段与引物有多处结合、退火温度偏低等。*Sma* I 会切割到目的基因且质粒上没有其酶切位点,不能选择;若使用 *Eco*R I 酶切,易造成目的基因和质粒自身环化和反向连接,故应该选择限制酶 *Bam*H I 和 *Hind* III。

(4) ①引物需要与目的基因的核苷酸碱基互补配对,根据 PCR 原理,加入自动化 PCR 体系配置中的引物和探针的设计依据是病毒的基因对应的部分核苷酸序列。

②利用荧光定量 PCR 仪可监测待测样液中病毒的核酸数量。若每断裂一个 *Taq* Man 探针,设置 R 发出的荧光信号的值为 1,荧光强度与核酸数量相对应原理,若经  $n$  次的 PCR 扩增,样液中病毒的核酸数量为 0,则实时荧光信号强度应不变;该病毒是单链结构,PCR 扩增时以指数增加,经  $n$  次的 PCR 扩增后得到  $2^n$  个病毒,最初没有荧光信号,若荧光信号强度值为  $a(2^n - 1)$ ,推测样液中病毒的核酸数量为  $a$ 。

(5) 抗原与抗体的结合具有特异性,故两种试剂盒的检测原理为抗原—抗体杂交;疫苗相当于抗原,能激发机体的特异性免疫,已注射过灭活疫苗的人员,已经产生了相应的抗体,应选择核酸检测和抗原检测。故选 a、b。

## 专题 1 限制酶及酶切位点的选择

### 刷 难关

1. (1) b —COOH (2) ①*Bam*H I、*Not*I ②引物 2 15 (3) ①②

在红光条件下,A 系植株表达的蛋白质可进入叶绿体,含叶绿体

转移信号, B 系植株表达的蛋白质不能进入, 不含叶绿体转移信号

**突破点** ▶ 信息提取—基因工程的应用

**【解析】**(1) 分析题图 1 可知, X①和 X②蛋白质 b 末端的氨基酸序列是相同的, 由于肽链的合成方向为氨基端到羧基端, 故 b 末端对应的是蛋白质的—COOH 末端。

(2) ①限制酶能识别 DNA 分子中特定的核苷酸序列, 并使每一条链中特定部位的磷酸二酯键断开, 分析题图 2 可知, *GFP* 基因两侧的碱基序列中含有 GGATCC 序列和 GCGGCCGC 序列, 故应选择题表中的 *Bam*H I 和 *Not* I 将 *GFP* 基因从染色体 DNA 上切割下来。

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苷酸序列。a 侧引物引导子链从左向右(5'→3'端)合成, 故其碱基序列应为 5'—TATGGATCC—3', 与引物 2 相同, 故应选择引物 2 在 a 侧进行 PCR 扩增; 每次 PCR 循环后, 目的基因的量可以增加一倍, 故在 PCR 仪中完成 4 个循环后, 形成 16 个 DNA 分子, 有一个 DNA 分子不含有该引物, 故含有该引物的 DNA 片段数为 15 个。

(3) 在红光条件下, A 系植株发出荧光的局部部位在叶绿体, 而 B 系植株的在细胞质基质, 说明 A 系植株表达的蛋白质可以进入叶绿体, 即该蛋白质含叶绿体转移信号, 而 B 系植株表达的蛋白质不含, 所以红光条件下 A 系植株与 B 系植株基因 X 表达所使用的分别是启动子①②。

2. (1) 非特异性 ②③ (2) 脱氧核苷酸 厌氧(或低氧或缺氧)  
(3) ②含基因 *TyrP* 的 DNA 片段和质粒 pUC57 ③白 ⑤*Bgl* II、*Eco*R I ⑥氯霉素 (4) C (5) ACD (6) EcN-HT 可以吸收酪氨酸, 使其转变成无毒物质

**考查点** ▶ 基因工程的应用

**【解析】**(1) EcN 的鞭毛通过单个菌之间的相互作用在肠道上皮形成紧密的防护网, 可抑制病原菌的侵袭, 这种防御不针对某一类特定的病原体, 因此属于非特异性免疫。题图 1 中, *TyrP* 需要表达在 EcN-HT 的细胞膜上, 由于 EcN-HT 为原核生物, 故与膜蛋白的合成与定位的结构有②核糖体和③细胞膜, 无内质网、高尔基体。

(2) 题图 2 中 *pfmr* 为厌氧启动子, 其基本组成单位是脱氧核苷酸。在厌氧(或低氧或缺氧)条件下, 会激活该启动子, 启动其下游基因的转录。

(3) 根据题干信息, 应用限制酶 *Eco*R I 和 *Sma* I 分别切割含目的基因的片段和质粒, 由题意知, 切割的为含基因 *TyrP* 的 DNA 片段和质粒 pUC57, 当用 *Eco*R I 和 *Sma* I 切割质粒 pUC57 时, 卡那霉素抗性基因保留, 基因 *lacZ* 的结构被破坏, 无法表达相关酶蛋白, 所以当工程菌接种在含有 X-gal、卡那霉素的固体培养基甲上时, 成功导入 pUC57-T 的菌落呈白色。构建重组质粒 pUC57-T 时选用了限制酶 *Eco*RI 和 *Sma*I, 这两种酶破坏了氯霉素抗性基因 *Cm<sup>r</sup>* 和 *lacZ*, 保留了卡那霉素抗性基因 *Kan<sup>r</sup>*, 为了和 pUC57-T 区分, pUC57-H 需要保留不同的标记基因, 即保留氯霉素抗性基因 *Cm<sup>r</sup>*, 分析图中的限制酶识别序列, *Bgl* II 和 *Bam*H II 的识别序列中含有 *Mbo* I 识别序列, 如果使用 *Mbo* I, *Bgl* II 和 *Bam*H II 的识



别序列也会被切割, 综上, 选择限制酶 *Bgl* II、*Eco*R I, 且培养基乙中特有(而甲没有)的成分是氯霉素。

(4) 由于构建重组质粒 pUC57-T 时, 选用限制酶 *Eco*R I 和 *Sma* I 分别切割含基因 *TyrP* 的 DNA 片段和质粒 pUC57, 根据该基因的转录方向和质粒中启动子和终止子的位置, 该基因的左侧应该加上 *Eco*R I 的识别序列, 右侧应该加上 *Sma* I 的识别序列, 同时考虑引物延伸方向, 左侧的引物应该是 5'-GAATTCAAGGCA-3', 右侧的引物是 5'-CCCGGGCATTGT-3', C 符合题意。

(5) 与装载在同一个质粒的方法相比, 将 *TyrP* 基因和 *HpaBC* 基因分别构建两种重组质粒, 这两种重组质粒均较小, 因此能提高导入受体细胞的效率, A 正确; 将外源基因导入受体细胞, 构成的工程菌也可能存在生物安全风险, B 错误; 与装载在同一个质粒的方法相比, 将 *TyrP* 基因和 *HpaBC* 基因分别构建两种重组质粒, 这两种重组质粒上的目的基因均容易表达, 增强了基因表达的灵活性, 同时也使基因的稳定性得以提高, 进而增强治疗的效果, C、D 正确。

(6) 在肠道工程益生菌(EcN-HT)体内, 基因 *TyrP* 编码的酪氨酸转运蛋白 TyrP 有助于细胞吸收酪氨酸, 基因 *HpaBC* 编码的酶 HpaBC 能催化酪氨酸代谢生成无毒物质 L-DOPA。

## 专题 2 PCR 技术的原理与应用

### 刷 难关

#### 1. D 考查点 ▶ PCR 技术的原理

【解析】巢式 PCR 中, 如果第一次扩增产生了错误片段, 则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低, 提高了扩增的特异性和敏感性, A 正确。由题干可知, 第二轮 PCR 使内侧引物以第一轮 PCR 产物为模板进行再次扩增, 第二轮 PCR 反应能否进行, 是对第一轮 PCR 反应是否正确的鉴定, B 正确。两对引物的碱基序列不相同, 但均应为单链 DNA 片段, 以便与模板互补配对, C 正确。第一轮 PCR 以一开始投放的 DNA 为模板, 第二轮 PCR 以第一轮 PCR 产物为模板进行再次扩增, 两轮 PCR 反应使用的模板不相同, D 错误。

2. (1) 高尔基体 抗原抗体的特异性结合(或抗原抗体杂交) 外泌体上存在 CD63 蛋白, 且与 CD63 抗体特异性结合 (2) dNTP、缓冲液和  $Mg^{2+}$  影响引物和模板链的结合 降低 5' (3) 探针数、引物数、dNTP 数及 *Taq* 酶的活性(至少答 2 点) 甲 1: 2<sup>20</sup> 利用 DNA 抗体偶联物可将蛋白质信号转变为核酸信号, 并通过实时荧光定量 PCR 的灵敏性实现定量检测

突破点 ▶ 图表分析—免疫磁珠外泌体聚合酶链反应技术

【解析】(1) 根据题意“血浆外泌体是由活细胞分泌到血液中的囊泡”可知, 外泌体上的蛋白质需要经过内质网和高尔基体的依次加工, 故外泌体上蛋白质的成熟常发生在高尔基体中。题图 1 为外泌体与抗体—磁珠偶联物及 DNA 抗体偶联物的结合示意图, 由图 1 可知, 外泌体与 DNA 抗体偶联物的特异性结合依赖于外泌体上的  $A\beta_{1-42}$  与 DNA 抗体偶联物上的抗  $A\beta_{1-42}$  抗体的特异性结合。由于外泌体上存在 CD63 蛋白, CD63 蛋白可以与 CD63 抗体特异性结合, 故选择 CD63 蛋白制备抗体磁珠。

(2) 题图 2 为实时荧光定量 PCR 的过程示意图, 图中显示已经

加入引物、*Taq* Man 探针和 *Taq* 酶,除此之外,实时荧光定量 PCR 的反应体系中还需加入 dNTP(原料)、缓冲液和  $Mg^{2+}$ 。由于引物要结合在模板链的两端,故设计 *Taq* Man 探针的序列的依据是模板 DNA 的中部序列,以避免影响引物和模板链的结合。题图 2 中过程①为复性,若 PCR 循环中过程①温度设置过高,会导致探针不能与待测目标有效结合,故相同循环次数下总荧光强度会降低。延伸时,脱氧核苷酸的添加方向为 5'到 3',故探针的左侧为 5'端。过程②中,*Taq* 酶可催化 *Taq* Man 探针的磷酸二酯键断裂,导致位于探针 5'端的 R 基团远离 Q 基团,其能量不再被吸收,从而发出荧光信号。

(3) 由于探针数、引物数和 dNTP 的数目有限,以及受 *Taq* 酶的影响,PCR 的循环达到一定次数后,再进行 PCR,总荧光强度基本不增加,会出现平台期。荧光信号强度达到设定的阈值时所经历的循环数越少,说明待测样本中含有的  $A\beta_{1-42}$  的密度越大,故甲更可能为 AD 患者。由于甲循环 10 次就可达到乙循环 30 次的 Ct 值,二者相差了 20 次循环的量,故甲、乙体内分泌体中  $A\beta_{1-42}$  含量比约为  $1:2^{20}$ 。结合题图 2 和题图 3 可知,利用 DNA 抗体偶联物可将蛋白质信号转变为核酸信号(题图 2 显示),并通过实时荧光定量 PCR 的灵敏性实现定量检测(题图 3 显示),故利用 iMEP 技术可快速诊断 AD。

3. (1)② (2)5' CAATTG 等于 *Bam*H I 和 *Bcl* I 是同尾酶,*Eco*R I 和 *Mfe* I 是同尾酶,过程⑦⑧形成的黏性末端相同,易导致融合基因错误连接 (3)*amyE* 基因两端的部分序列 (4)淀粉 周围没有透明圈 (5)A、B、C 芽孢抗逆性强,芽孢能顺利通过胃肠道进入内环境;适宜条件下芽孢萌发成菌体并表达 *SpaA*, 激活体液免疫

**突破点** ▶ 实验探究—基因表达载体的构建

【解析】(1) 已知引物 R1 与引物 F2 部分序列互补配对,②中 5'-GGTGGCGG-3'序列与 R1 的序列 5'-CCGCCACC-3'互补配对,PCR 后可以通过重叠延伸 PCR 合成融合基因 *spoJ-spaA*,因此引物 F2 的序列为②对应的序列。

(2) 融合基因 *spoJ-spaA* 两端的引物为 F1 和 R2,结合接入质粒的位置,两边的限制酶序列对应为 *Mfe* I 和 *Bcl* I,因此 F1 的 5'端应加上 *Mfe* I 的识别序列,R2 的 5'端应加上 *Bcl* I 的识别序列,接入融合基因 *spoJ-spaA*,同理在 *Bam*H I 和 *Eco*R I 之间接入 *cotC-cbpB* 融合基因。质粒 pDG 中 *Mfe* I 和 *Bcl* I 之间的长度为  $7\ 602-(9\ 876-2\ 295)=21\ (bp)$ ,*Bam*H I 和 *Eco*R I 之间的长度为  $9\ 876-(11\ 377-1\ 522)=21\ (bp)$ ,二者相等;*Bam*H I 和 *Bcl* I 形成的黏性末端均为 5'-GATC-3',*Eco*R I 和 *Mfe* I 形成的黏性末端均为 5'-AATT-3',若在同一体系中进行会导致两种融合基因错接入质粒,酶切后的连接产物多,因此过程⑦⑧不能同时在同一体系中进行。

(3) 将重组质粒 pDG-CBJA 导入枯草芽孢杆菌,与序列 A、B 所在的地方发生同源重组,即融合基因的两侧序列与序列 A、B 相同,发生同源替换,故序列 A、B 应与 *amyE* 基因两端的部分序列相同。

(4) 转化的枯草芽孢杆菌含有壮观霉素抗性基因和不完整的淀粉酶基因,应将菌种接种在含壮观霉素和淀粉的平板上进行筛



选;由于淀粉酶基因被破坏,因此不能降解淀粉,菌落周围无透明圈。

(5)①红斑丹毒丝菌表面抗原 A 蛋白 (SpaA) 和胆碱结合蛋白 B (ChpB) 能诱导猪等产生特异性抗体,为研究不同疫苗体液免疫应答的效果,A、B、C 均为对照组,D、E 为实验组。②菌体疫苗在消化道内易死亡,而芽孢是细菌休眠体,抗逆性强,芽孢能顺利通过胃肠道进入内环境;适宜条件下芽孢萌发成菌体并表达 SpaA,激活体液免疫。

## 第 2 节 基因工程的应用及蛋白质工程

### 刷基础

#### 1. A 考查点 ▶ AI 技术和蛋白质工程

【解析】利用 AI 技术设计新药物,没有对现有蛋白质进行改造,或制造一种新的蛋白质,不属于蛋白质工程技术,A 错误;利用 AI 技术,通过智能穿戴设备和移动应用程序,能够实时监测患者的生理参数,预测健康风险,并提供相应的诊断和治疗建议,AI 技术为临床诊断和治疗等方面带来了革命性的变化,B 正确;AI 技术在基因组数据处理和分析中,通过识别疾病相关的基因突变,为精准医疗的实现提供了强大的技术支持,C 正确;密码子具有简并性,故由 AI 技术设计的某种蛋白质的氨基酸序列推导出的对应基因序列不唯一,而启动子和终止子为非编码区,由氨基酸序列推导出的基因序列中不包含启动子和终止子,D 正确。

#### 2. A 突破点 ▶ 信息提取—干扰素的改造

【解析】蛋白质工程的目标是根据人们对蛋白质功能的特定需求,通过改造或合成基因进而改造或制造蛋白质,理论基础是蛋白质的结构与功能相适应,A 错误;比较半胱氨酸和丝氨酸的密码子,若第二个碱基由 G 替换为 C,就可引起氨基酸的替换,所以基因上发生定点突变(C 替代 G),可实现基因的改造,B 正确;基因的表达需要启动子和终止子,新的干扰素基因必须插入载体的启动子和终止子之间才能表达,C 正确;蛋白质工程的实质是对基因进行操作,且能遗传给后代,即题图中改造干扰素结构的实质是改造干扰素基因的结构,D 正确。

#### 3. BC 考查点 ▶ 蛋白质工程操作流程

【解析】蛋白质工程的基本思路是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,即图中④⑤⑥①②③过程,A 正确;利用该蛋白质工程生产出的赖脯胰岛素的化学本质为蛋白质,若口服,会被消化道内的蛋白酶等水解,失去其作用,故不能口服,B 错误;物质 a 和物质 b 分别代表 mRNA 和多肽链,C 错误;a(mRNA)序列改变,由于密码子的简并性,一个氨基酸可能由多个密码子编码,故最终编码的氨基酸序列可能不变,D 正确。

#### 4. C 考查点 ▶ 蛋白质工程与基因工程

【解析】蛋白质工程的实质是在 DNA 分子水平上进行设计和改造蛋白质,A 正确;氨基酸序列存在的差异,导致胰岛素的空间结构有所改变,影响了它的功能及稳定性,B 正确;胰岛素属于蛋白质,改造胰岛素应首先从预期的蛋白质功能出发,C 错误;多数蛋白质除具有一级结构(即氨基酸顺序)外,还具有复杂的高级

结构,即空间结构,很多蛋白质的空间结构是十分复杂的,因此实施蛋白质工程的难度很大,D 正确。

### 易错警示 无法准确辨析基因工程与蛋白质工程的区别

蛋白质工程是在基因工程的基础上延伸出来的第二代基因工程,是对现有蛋白质进行改造或制造新的蛋白质的综合科技工程,其必须通过基因改造或基因合成实现。

### 刷 提分

#### 1. ABC 考查点 ▶ 嵌合抗原受体 T 细胞

【解析】分析题意,步骤②是根据靶抗原设计 CAR 结构,是从蛋白质的预期结构开始,属于蛋白质工程,A 错误;CAR 是 CAR-T 细胞表面的嵌合抗原受体,受体只有识别作用,没有杀伤癌细胞的功能,B 错误;基因工程中常见的载体有质粒、动植物病毒、噬菌体等,噬菌体载体只能侵染细菌,因此将 CAR 基因导入 T 细胞不能用噬菌体作为载体,C 错误;动物细胞培养时,为补充营养物质并清除代谢废物,防止细胞代谢物积累对细胞自身造成危害,需定期更换培养液,D 正确。

#### 2. (1) 确定预期的蛋白质功能 解旋 6 (2) AAA 和 TTT (或 AAG 和 CTT) (不能颠倒顺序) (3) *Xma* I、*Bam*H I *Xma* I、*Bcl* I DNA 连接 氨苄青霉素

##### 考查点 ▶ 基因工程与蛋白质工程

【解析】(1) 蛋白质工程的第一步通常是确定预期的蛋白质功能。与细胞内的 DNA 复制相比,PCR 不需要用到解旋酶。由题图 1 可知,完成一处突变需要 2 种通用引物和 2 种突变引物,如果要完成两处位点的突变,则至少需要 2 种通用引物和 4 种突变引物,即至少要设计 6 种引物。

(2) 由题图 2 可知,该酶编码链中 372 位天冬氨酸对应的序列为 GAC,AAA、AAG 可编码赖氨酸,根据碱基互补配对原则可知,替换 372 位天冬氨酸到赖氨酸的引物 FP2 和 RP1 的 372 位对应的 3 个碱基为 AAA 和 TTT (或 AAG 和 CTT)。

(3) 由题图 3 可知,应选用 *Xma* I、*Bam*H I 对 T 载体进行酶切处理,这两种限制酶不会破坏重组 *cgt* 基因的完整性,由重组载体 *cgt*-p 上重组 *cgt* 基因的方向可知,应选用 *Xma* I、*Bcl* I (与 *Bam*H I 同尾) 对 p 载体进行酶切处理,并用 DNA 连接酶构建重组载体 *cgt*-p,导入目的工程菌。培养基中除基本营养物质外,还需加入氨苄青霉素完成筛选。

## 第 3 节 生物技术的安全性与伦理问题

### 刷 基础

#### 1. D 考查点 ▶ 生物技术的安全性和伦理问题

【解析】我国对农业转基因生物实行标识制度,要求对转基因生物产品和加工品进行标识,并没有要求在标签上警示性注明可能危害,A 错误;我国不赞成、不允许、不支持、不接受任何生殖性克隆人实验,B 错误;利用基因编辑技术设计完美试管婴儿,已经涉及新生命的诞生,会造成生物技术伦理问题,C 错误;针对转基因技术的应用,我国的方针是研究上要大胆,坚持自主创新,推广上要慎重,做到确保安全,D 正确。

## 2. A 考查点 ▶ 生物安全风险

【解析】病原体免疫后的动物血浆中可能含有病原体和其他抗原,采集后不能直接注射到人体内,否则被输入者存在被病原体感染的风险,A 符合题意;试管婴儿技术是指通过人工操作使卵子和精子在体外条件下成熟和受精,并通过培养发育为早期胚胎后,再移植到母体子宫内发育而诞生的婴儿,试管婴儿可以通过基因筛查技术来规避遗传病,从而大大降低遗传病风险,一般不会带来生物安全风险,B 不符合题意;利用生物技术改造的工程菌获得大量的抗生素,生产出来的抗生素是自然界原有的物质,且被改造后的工程菌通过技术手段可以被控制并灭活,一般不会带来生物安全风险,C 不符合题意;利用克隆技术克隆器官可以达到治疗疾病的目的,但我国禁止生殖性克隆人,避免克隆技术带来的生物安全风险,D 不符合题意。

## 3. D 考查点 ▶ 转基因生物安全性

【解析】转基因作为一项技术本身是中性的,由这项技术研发出来的产品需要经过一系列的安全性评价,符合相应标准后才能上市,A 正确。外源基因插入宿主基因组的部位往往是随机的,有可能会出意想不到的后果,因此可能会存在安全性问题,B 正确。国家有关部门制定实施了《农业转基因生物安全评价管理办法》《农业转基因生物进口安全管理办法》等法规,这些法规的制定既维护了消费者对转基因产品的知情权和选择权,又最大程度地保证了转基因技术和已上市转基因产品的安全性,C 正确。对微生物的基因改造是基因工程中研究最早、最广泛和取得实际应用成果最多的领域,D 错误。

## 4. C 考查点 ▶ 生物技术中的伦理问题

【解析】转基因抗虫棉在世界范围内被广泛种植,有效控制了棉铃虫的危害,但棉铃虫也会对抗虫蛋白产生抗性,A 正确;为避免转基因生物威胁生物多样性,可将转基因生物与传统农业种植区隔离,B 正确;生殖性克隆是指通过克隆技术产生独立生存的新个体,治疗性克隆是指利用克隆技术产生特定的细胞、组织和器官,用它们来修复或替代受损的细胞、组织和器官,从而达到治疗疾病的目的,两者有着本质的区别,C 错误;人体会对转基因技术制造的超强致病性的新型病毒产生免疫反应,D 正确。

## 5. A 考查点 ▶ 治疗性克隆与生殖性克隆

【解析】生殖性克隆和治疗性克隆都涉及伦理问题,我国政府不允许进行任何生殖性克隆人实验,也同样重视治疗性克隆所涉及的伦理问题,A 正确。生殖性克隆和治疗性克隆两种技术都涉及体细胞核移植技术,属于无性繁殖;试管婴儿是体外精卵结合属于有性生殖,所以它们存在本质上的区别,B 错误。生殖性克隆由于涉及新个体的产生,面临诸多伦理问题,不能用于解决人体移植器官短缺问题,C 错误。中国政府的态度是禁止生殖性克隆人,主张对治疗性克隆进行有效监控和严格审查,D 错误。

### 易错警示

#### 无法准确辨析治疗性克隆与生殖性克隆

(1) 治疗性克隆:指利用克隆技术产生特定的细胞、组织和器官,从而达到治疗疾病的目的。

(2) 生殖性克隆:指通过克隆技术产生独立生存的新个体。

## 全章综合提升

### 刷素养

#### 1. ABC 考查点 ▶ 基因表达载体的构建和蛋白质工程的原理及操作流程

【解析】对蛋白质结构进行改造,最终要通过改造或合成基因来完成,A 正确; $\alpha$ -淀粉酶(AmyS1)的化学本质是蛋白质,蛋白质工程的基本思路是: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糖核苷酸序列(基因)或合成新的基因→获得所需要的蛋白质,B 正确;将质粒 B 与信号肽(一段能够引导目标蛋白质分泌到细胞外的肽链)基因构建成质粒 C,可以从导入质粒 C 的工程菌的培养液中提取获得 AmyS2,C 正确;若用 *Bam*H I 酶进行切割,会导致目的基因被破坏,因此选择 *Nde* I 和 *Eco*R I,既不会破坏目的基因,也能防止目的基因片段反向连接与质粒自身环化等问题,根据质粒 C 的结构以及信号肽基因上的酶切位点可知,将质粒 B 与信号肽基因构建成质粒 C,应选择的限制酶是 *Mlu* I 和 *Eco*52 I,D 错误。

#### 2. (1)总 RNA 逆转录 (2)5' CTCGAG(或 5'-CTCGAG-3') (3)电泳 (4)能吸收周围环境中 DNA 分子 (5)2、3、5 (6)杂交瘤(动物细胞培养和动物细胞融合)

考查点 ▶ 基因工程的基本操作程序

【解析】(1)为获得 SOAT1 的 cDNA,需要从肝癌细胞 Huh-7 中提取总 RNA,再通过逆转录过程获得。

(2)引物在 DNA 聚合酶作用下进行延伸时,将脱氧核苷酸加到引物的 3'端,为了不破坏目的基因,引物 F 加入的 *Eco*R I 酶切位点应位于 5'端;由题图可知,引物 R 上添加的 *Xho* I 酶识别的回文序列的 6 个碱基是 CTCGAG。

(3)产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,对 PCR 产物进行胶回收。

(4)将重组质粒导入大肠杆菌前用  $\text{CaCl}_2$  处理大肠杆菌,使其处于能吸收周围环境中 DNA 分子的生理状态,以提高转化效率。

(5)观察电泳图,在条带 2、3、5 中含有 50 kD 的蛋白质分子,而 SOAT1 重组蛋白的质量为 50 kD 左右,所以图 2 中基本符合要求的条带包括 2、3、5。

(6)获得 SOAT1 单克隆抗体细胞株可以利用杂交瘤(动物细胞培养和动物细胞融合)技术,其特点是可以无限增殖,并产生特异性抗体。

### 刷真题

#### 1. (1)脱氧核苷酸 延伸

(2)5'端 AGATCT *Bam*H I 与 *Eco*R I

(3)染色体 DNA 2 再分化

命题点 ▶ 基因工程及其应用

【解析】(1)PCR 扩增目的基因时,需要模板 DNA、引物、(4 种)脱氧核苷酸、含  $\text{Mg}^{2+}$  的缓冲液和耐高温的 DNA 聚合酶。PCR 过程一般可以分为变性、复性、延伸,DNA 聚合酶在延伸步骤中起作用,即 DNA 聚合酶将脱氧核苷酸加到引物的 3'端进行子链的延伸。

(2)为将 S 基因正确插入载体,PCR 扩增 S 基因时需要在引物的

5'端添加相应的限制酶识别序列。为保证目的基因的正确插入,应使用双酶切;载体中含有 *Bam*H I、*Eco*R I 和 *Xba* I 的酶切位点,*S* 基因上含有 *Xba* I、*Nde* I、*Bam*H I 的酶切位点,为保证 *S* 基因结构的完整性,不能在 *S* 基因两端添加 *Xba* I、*Nde* I、*Bam*H I 的识别序列;分析表格数据,*Bgl* II 切割产生的黏性末端和 *Bam*H I 切割产生的黏性末端相同,结合 *S* 基因的转录方向和载体上启动子的转录方向可知,应在 *S* 基因上游添加 *Bgl* II 的识别序列,即 5'-AGATCT-3',下游添加 *Eco*R I 的识别序列。因此,切割载体应选用的两种限制酶为 *Bam*H I 和 *Eco*R I。

(3) 用携带 *S* 基因的农杆菌侵染栽培马铃薯愈伤组织时,农杆菌能将基因表达载体中的 T-DNA 转移到愈伤组织细胞的染色体 DNA 上。分析载体,T-DNA 中含有抗性基因 2,若 T-DNA 成功整合到被侵染细胞的染色体 DNA 上,则该细胞具有抗性基因 2 对应的抗性,因此,抗性基因 2 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加的马铃薯植株。

## 2. (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) 快速扩增 ② 只有 *R-U* 或 *R-D* 一处发生了同源重组

(3) 将野生型内生放线菌、*R* 基因敲除内生放线菌分别与稻瘟病致病菌混合培养在含铁培养液中,统计培养液中铁离子含量及两种菌的数量变化。

**命题点** ▶ 微生物的培养、PCR 技术、实验设计

**【解析】**(1) 可采用稀释涂布平板法将研磨液接种于不同的选择培养基,并分别置于不同温度下培养的目的是探究内生放线菌最适的营养条件和温度。

(2) PCR 的实质是体外的 DNA 复制,所以 PCR 可以实现基因片段的快速扩增。由图 1 可知,未发生同源重组前,在引物 1、2 的作用下可扩增出的片段为 3 000 bp,故菌落①③未发生同源重组。若 *R-U* 和 *R-D* 都发生同源重组,则会减少 *R* 基因中间的 2 000 bp 的序列,从而使扩增的片段减小到 1 000 bp,故菌落②为发生同源重组后的 *R* 基因敲除株。根据题干信息,*R* 基因敲除过程中可发生多种形式的同源区段交换,菌落④的大小约为 7 000 bp,则可以推测在同源重组过程中,只发生了 *R-U* 或 *R-D* 一处同源重组,导致整个质粒片段接入。

(3) 若要验证内生放线菌通过与稻瘟病致病菌竞争性利用铁离子抑制稻瘟病致病菌的生长,则实验的自变量应为内生放线菌是否能利用培养液中的铁离子,即 *R* 基因的有无,因变量应该为稻瘟病致病菌的生长情况,最后可观测两种菌的数量和培养液中的铁离子含量变化情况来看验证实验结论。所以实验可分为两组,甲组:将适量的含 *R* 基因的内生放线菌和稻瘟病致病菌混合培养在含铁的培养液中;乙组:将等量的 *R* 基因敲除内生放线菌与稻瘟病致病菌混合培养在相同的含铁培养液中;将两组培养液放在适宜的条件下,间隔合适时间记录每组培养液中铁离子含量变化和两种菌的数量变化。

## 3. (1) 复制原点 *Xba* I DNA 聚合酶 *Sma* I 和 *Spe* I 550

(2) 4 连接(或环化) 测序和序列比对

(3) 不能

**命题点** ▶ 基因工程及其应用

**【解析】**(1) Ti 质粒含有复制原点,使其在农杆菌细胞中能进行自我复制。质粒上含有的酶切位点有 *Xba* I、*Pst* I、*Sma* I 和 *Bam*H I,*Bam*H I 酶切会破坏质粒上的终止子,故不能选择 *Bam*H I 对质粒进行酶切。由于目的基因应插入在启动子和终止子之间,所以应选择 *Xba* I 和 *Sma* I (或 *Pst* I 和 *Sma* I) 对 Ti 质粒进行完全酶切。由于抗除草剂基因 X 使用 *Sma* I 对其进行完全酶切,两端均为平末端,为构建基因表达载体,Ti 质粒被 *Xba* I 或 *Pst* I 酶切产生的黏性末端需要被补平,如图表示 *Xba* I 或 *Pst* I 酶切产生的黏性末端:

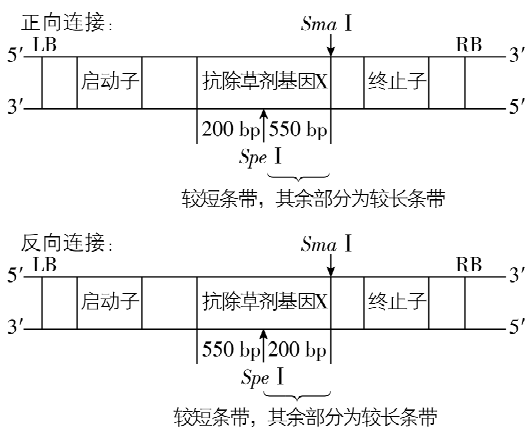
*Pst* I :5'-CTGCA

3'-G

*Xba* I :5'-T

3'-AGATC

由上图可知,只有 *Xba* I 酶切产生的黏性末端能被补平( **关键点: DNA 链的延伸方向** ),故应选择 *Xba* I 和 *Sma* I 对 Ti 质粒进行完全酶切。DNA 聚合酶能将单个脱氧核苷酸加到 DNA 链的 3'端,因此,将黏性末端补平时使用的酶是 DNA 聚合酶。根据抗除草剂基因 X 的转录方向,构建基因表达载体的正向连接和反向连接的示意图如下:



由上图可推知,应选择限制酶 *Sma* I 和 *Spe* I 对重组质粒进行酶切并电泳检测。若重组质粒为正向连接,则电泳结果呈现一长一短 2 条带,较短的条带长度近似为 550 bp( **易错点: 若为反向连接,电泳结果也呈现一长一短 2 条带,但较短的条带长度近似为 200 bp** )。

(2) 本实验目的为证明这两个突变体是由 T-DNA 插入小麦基因组中同一基因导致的。实验步骤:提取基因组 DNA,经酶切后产生含有 T-DNA 的基因组片段,由于后续 PCR 难以扩增大片段 DNA,因此,在对基因组 DNA 酶切过程中,应使用识别序列为 4 个碱基对的限制酶(且 T-DNA 不含该酶的酶切位点),因为识别序列越短,基因组 DNA 可能存在的限制酶酶切位点越多,获得较短 DNA 片段的概率越大。分析图乙,因为引物 P1 和 P2 向外侧延伸,利用引物 P1 和 P2 扩增未知序列,应先将该 DNA 片段连成环状。PCR 扩增出未知序列后,可通过测序和序列比对来判断 2 条片段的未知序列是否属于同一个基因,琼脂糖凝胶电泳只可判断 2 条片段未知序列的大小,不能确定两者的碱基排列顺序。

(3) 通过农杆菌转化法将构建的含野生型基因的表达载体转入突



变植株,如果能在突变植株内检测到野生型基因,但由于不知道该突变是否为显性突变,故不能确定该植株的表型是否为野生型。

4. (1) 引物 脱氧核苷酸 复性 变性过程中温度较高

(2) *Sma* I 和 *Eco*R I 磷酸二酯

(3) 发出黄色荧光 高

(4) 转基因衣藻细胞壁上的融合蛋白可吸附培养液中的镉离子,减小了镉离子对细胞的毒害 培养液中的镉离子浓度过高,融合蛋白的吸附能力有限,镉离子对转基因衣藻和野生型衣藻均造成了较强的毒害

(5) ① ③

命题点 ▶ 基因工程

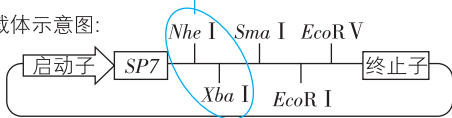
题图解读

(2) 为了防止目的基因出现自身环化和反向

连接,目的基因的两端不能添加同尾酶的识别序列。

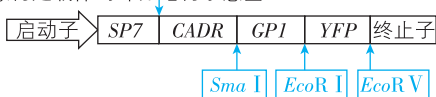
二者酶切后的黏性末端相同,为同尾酶,其识别序列不能添加在同一个目的基因的两端

载体示意图:



*Nhe* I 或 *Xba* I

拟构建载体的部分结构示意图:



【解析】(1) PCR 过程中,每进行一轮的扩增,都需要消耗引物和作为原料的脱氧核苷酸,所以随着 PCR 反应进行,引物和脱氧核苷酸的数量逐渐减少,可作为模板的 DNA 会越来越多, DNA 聚合酶的数量基本保持不变。PCR 的过程包括变性(温度超过  $90^{\circ}\text{C}$ , 双链 DNA 解聚为单链)、复性(温度下降到  $50^{\circ}\text{C}$  左右,引物和模板结合)、延伸(温度上升到  $72^{\circ}\text{C}$  左右,耐高温的 DNA 聚合酶从引物的  $3'$  端开始连接脱氧核苷酸)。由于 PCR 反应中,变性过程温度较高, DNA 聚合酶的化学本质为蛋白质,为防止高温导致蛋白质变性失活,所以 PCR 过程中需要用耐高温的 DNA 聚合酶。

(2) 由题图解读可知, *GP1* 基因两端应分别添加 *Sma* I 和 *Eco*R I 的识别序列。DNA 连接酶催化 DNA 片段之间磷酸二酯键的形成,完成 DNA 片段的连接。

(3) 结合题干信息可知,该转基因体系构建了 SP7、CAGR、GP1、YFP 融合蛋白表达载体,其中黄色荧光蛋白(YFP)基因可看作标记基因。若在荧光显微镜下观察到转基因衣藻发出黄色荧光,说明 YFP 表达成功,即融合蛋白表达成功。将两种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的镉离子含量高于野生型衣藻,则说明融合蛋白可结合镉离子。

(4) 结合题图 2 可知,在不同镉离子浓度的培养液中培养 6 天后统计细胞密度,镉离子浓度为 0 时,两组的细胞密度相对值差异不大,镉离子浓度增大后,两组的衣藻数量均出现不同程度的减少,但转基因衣藻的细胞密度相对值均大于野生型衣藻,可能是转基因衣藻细胞壁上的融合蛋白可吸附培养液中的镉离子,减小

了镉离子对细胞的毒害。当外界镉离子浓度为  $240 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,转基因衣藻的生长也被明显抑制,原因可能是培养液中的镉离子浓度过高,融合蛋白的吸附能力有限,镉离子对转基因衣藻也造成了较强的毒害。

(5)与施加化学药物相比,转基因衣藻在环境治理上的优势有衣藻作为生物材料在水体中可进行自我繁殖,免去了反复施加药物的危害和麻烦;同时衣藻可吸收水体中的 N、P 等元素,在一定程度上减轻了水体富营养化。衣藻生长速率受镉离子浓度影响和衣藻吸附的镉可沿食物链传递不是其在环境治理上的优势。

## 5. (1) 密码子 琼脂糖 更换移液器枪头

(2) C

(3) 冷的 95% 乙醇 D 调控基因转录

(4) 基因数据库(或序列数据库) 表达载体

**命题点** ▶ PCR、凝胶电泳、重组载体的构建

**【解析】**(1) 已知 GPD 蛋白的氨基酸序列,可根据中心法则推测出这些氨基酸所对应的密码子,推测出 mRNA 序列,再推测出 DNA 序列,进而设计 1 对引物。可利用琼脂糖凝胶电泳对 DNA 进行分离、纯化。在使用移液器时,每次吸取不同试剂前都要更换枪头,避免污染。

(2) 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;每个引物与 DNA 模板存在 2 个配对结合位点,可扩增出不同的 DNA 片段,从而出现另外一条条带,B 不符合题意;在基因组中 *Gpd* 基因有 2 个拷贝,扩增出的 DNA 是相同的,电泳时只会出现一条条带,C 符合题意;在基因组中存在 1 个与 *Gpd* 基因序列高度相似的其他基因,可能将该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。

(3) DNA 在冷的 95% 乙醇(关键点:乙醇的体积分数不能为 75%)中溶解度较低,可用冷的 95% 乙醇沉淀 DNA。PCR 过程中,子链的延伸方向为  $5' \rightarrow 3'$ ,第二次 PCR 的目的是扩增出基因的两侧序列,因此第二次 PCR 的一对引物的扩增方向应该朝着基因的两端进行扩增,即选择 P2 和 P3 引物。启动子是 RNA 聚合酶的结合位点,调控基因转录的启动,而终止子则调控基因转录的结束,二者具有调控基因转录的功能。

(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。*Gpd* 基因的编码区不含启动子和终止子,为了实现 *Gpd* 基因在酿酒酵母细胞中高效表达,需将其与含有启动子和终止子的表达载体连接,构建重组质粒并导入酿酒酵母细胞中使之表达,实现利用酿酒酵母高效合成甘油的目的。

## 6. (1) 基因序列数据库(或 GenBank 或 DNA 序列数据库) *Xho* I *Xba* I DNA 连接酶 (2) 外源 DNA(或外源基因、基因 N) 1 基因 N 大小为重组质粒大小和质粒 *pYL* 大小的差值,约为 2.3 kb,对应实验组 1 的电泳条带(或实验组 1 电泳条带大小加质粒 *pYL* 大小约等于重组质粒大小) (3) GCC (4) 香树脂醇

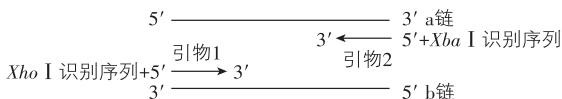
**命题点** ▶ 基因表达载体的构建、PCR 及电泳鉴定

### 题图解读

据图 1 分析:

(1) 为保证目的基因 *N* 与质粒 *pYL* 正确连接, 需要把基因 *N* 插入启动子和终止子之间, 便于基因 *N* 的转录。因为 *a* 链为转录的模板链, RNA 聚合酶识别和结合启动子之后, 会从模板链 *a* 链的 3' 端向 5' 端转录, 所以 *a* 链的 3' 端需要连接到启动子右侧, 故在引物 2 的 5' 端引入 *Spe* I 限制酶识别序列; *a* 链的 5' 端需要连接到终止子左侧, 故需要在引物 1 的 5' 端引入 *Xho* I 限制酶识别序列。

(2) 因为 *a* 链上有 *Spe* I 限制酶识别序列, 用 *Spe* I 限制酶识别切割基因 *N* 时会破坏基因 *N*, 所以需要在引物 2 的 5' 端引入与 *Spe* I 限制酶识别序列具有相同黏性末端 (5'-CTAG-3') 的限制酶识别序列, 即在引物 2 的 5' 端引入 *Xba* I 限制酶识别序列。结果如图:



**【解析】**(1) 可从基因序列数据库中查询基因 *N* 的编码序列, 设计特定引物。由题图解读可知, 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 *Xho* I 和 *Xba* I 限制酶识别序列。PCR 扩增基因 *N*, 特异性酶切后, 利用 DNA 连接酶连接 DNA 片段。

(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 反应中是否有外源 DNA 的污染。质粒 *pYL* 大小为 7.2 kb, 重组质粒大小约 9.5 kb, 假设构建重组质粒前后, 质粒 *pYL* 对应部分大小基本不变, 基因 *N* 大小为二者的差值, 约为 2.3 kb (2~2.3 kb), 结合图 2 电泳结果可知, 实验组 1 的电泳条带大小约为 2 300 bp, 说明实验组 1 的质粒中成功插入了基因 *N*。

(3) *a* 是诱变第 240 位脯氨酸编码序列替换为丙氨酸编码序列的引物 (GCA 为诱变序列, 与丙氨酸的密码子序列相同), *b*、*c*、*d* 其中一条是诱变第 243 位苯丙氨酸编码序列替换为丙氨酸编码序列的引物, 其配对模板与 *a* 的配对模板相同, 据此分析, 除编码第 243 位苯丙氨酸的碱基序列 TTC 替换为诱变序列, 与丙氨酸的密码子序列相同, 其后的编码序列应该与 *a* 相同, 为 TGG/CTG/TTT……, 所以该引物是 *c*, 其中 GCC 为第 243 位诱变序列, 故丙氨酸的密码子还可以是 GCC。

(4) 本题旨在通过在酵母菌中表达外源香树脂醇合酶基因 *N* 并进行改造, 提高香树脂醇合酶的催化效率, 高效生产香树脂醇, 所以检测转基因酵母菌发酵产物香树脂醇的含量并进行比较, 可以选出香树脂醇合酶催化效率较高的香树脂醇合酶基因改造方案。

## 7. (1) 碳源、氮源

(2)  $P_{T7}$ 、 $P_{BAD}$  和  $P_{BAD}$  (或“特异型启动子、通用型启动子和通用型启动子”) 基因 2 和 3 可正常表达出无活性物质 (无活性 T7RNAP), 被蓝光照射后再激活基因 1 表达

(3) 抑制杂菌; 去除丢失质粒的菌株

(4) 该处细胞 T7RNAP 激活, 酪氨酸酶表达并合成黑色素

(5) 将酪氨酸酶替换成催化其他色素合成的酶(或“将酪氨酸酶替换为形成不同颜色的蛋白”)

**命题点** 微生物的实验室培养、基因工程的应用

**【解析】**(1) 微生物生长需要的主要营养物质包括碳源、氮源、水、无机盐,培养不同微生物都需要水,无机盐基本相似,但是碳源、氮源可能存在差异,所以研究者优化了培养基的碳源、氮源等营养条件,并控制环境条件,大规模培养工程菌株。

(2) 根据图二 a 可知,蓝光调控的基因表达载体的光控原理是在蓝光的作用下,细胞中无活性的 T7RNAP 被激活,变成有活性的 T7RNAP,该 RNA 聚合酶与图中启动子  $P_{T7}$  特异性结合,从而调控目的基因的表达。根据图二 b 可知,基因 1 编码酪氨酸酶,属于图二 a 中的目的基因,应该在蓝光的调控下才表达。基因 2 和 3 编码的是 T7RNAP 的两个部分,它们正常表达的产物是无活性的 T7RNAP,所以启动子②及③用通用型启动子  $P_{BAD}$ ,在蓝光的作用下,两者表达的无活性的 T7RNAP 被激活,再启动基因 1 表达,所以启动子①是特异型启动子  $P_{T7}$ ,仅被有活性的 T7RNAP 识别。

(3) 光控表达载体携带大观霉素(抗生素)抗性基因,其表达产物对大观霉素具有抗性,可以作为表达载体的标记基因,因此,长时间培养时在培养液中加入大观霉素,其他微生物由于不具有相应抗性而被抑制生长,此外,丢失质粒的菌株也因为不具有抗性而被淘汰,从而筛选出具有目的基因的大量菌株。

(4) 根据第(2)问分析可知,用蓝光照射已长出的 BC 菌膜,细胞中 T7RNAP 被激活(即 T7RNAP 的 C 端与 N 端结合或 T7RNAP 与  $P_{T7}$  结合),会调控酪氨酸酶基因表达形成酪氨酸酶,随后将其转至含有酪氨酸等的染色池处理,只有经蓝光照射的区域可表达出酪氨酸酶并催化酪氨酸形成黑色素,即只有经蓝光照射的区域被染成黑色。

(5) 按照题述菌株的构建模式,要生产其他颜色图案的 BC 膜,可将酪氨酸酶替换成催化其他色素合成的酶,或将酪氨酸酶替换为形成不同颜色的蛋白。