

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. A 考查点 ▶ 质粒

【解析】质粒是独立于真核细胞核或原核细胞拟核 DNA 之外的,能够自主复制的环状 DNA 分子,病毒中没有,A 错误;质粒作为载体应具有标记基因以便于重组 DNA 分子的筛选,有一个至多个限制酶切割位点以便和目的基因拼接,B 正确;质粒为小型环状 DNA 分子,主要存在于细菌拟核外的细胞质中,C 正确;质粒能够避免宿主细胞的酶切,从而稳定保存,并能够在宿主细胞内自主复制,D 正确。

2. D 考查点 ▶ DNA 的粗提取与鉴定、DNA 片段的电泳鉴定

思路分析

DNA 的粗提取和鉴定的原理:DNA 不溶于酒精,但某些蛋白质溶于酒精,利用这一原理,可以初步分离 DNA 和蛋白质。DNA 在不同浓度的 NaCl 溶液中溶解度不同,它能溶于 2 mol/L 的 NaCl 溶液中。

【解析】DNA 粗提取时加入冷酒精出现白色丝状物后,可以用离心法收集,这样能使 DNA 沉淀更集中,A 错误;PCR 缓冲液中 Mg^{2+} 的作用是激活 DNA 聚合酶,但并不是浓度越高酶活性越大,浓度过高可能会对酶活性产生抑制作用,B 错误;核酸染料需要加入融化之后凝固之前的琼脂糖中,载样缓冲液(内含指示剂)应该在点样前与 DNA 样品充分混合后,再缓慢注入加样孔内(凝胶已经凝固)加入,C 错误;DNA 电泳指示剂的作用主要用来指示何时停止电泳,D 正确。

3. AD 突破点 ▶ 图表分析—基因工程的基本工具

【解析】当 Y 为 C、R 为 A 时,*Hind* II 的识别序列为 GTCAAC,当 Y 为 T、R 为 A 时,*Hind* II 的识别序列为 GTTAAC,A 正确。*Sau*3A I 识别序列和切割位点为 5'-↓GATC-3',切割后形成的黏性末端是 GATC-3',破坏的是识别序列中心轴线两侧的磷酸二酯键,*Eco*R I 的识别序列和切割位点为 5'-G↓AATTC-3',切割后形成的黏性末端为 AATTC-3',破坏的也是中心轴线两侧的磷酸二酯键,B 错误。*Bam*H I 和 *Kpn* I 两种限制酶的识别序列不同,切割后形成的黏性末端也不同,C 错误。由表格可知,*Hind* II、*Sma* I 两种限制酶的切割位点在识别序列中心轴线上,切割后形成平末端,D 正确。

4. B 突破点 ▶ 图表分析—基因表达载体的构建

【解析】靛蓝能够稳定显色,不受 pH 的影响,故本题方案中无须转入能调控液泡 pH 的基因,A 正确;将 *sfp* 基因插入 Ti 质粒时若使用的限制酶是 *Pme* I 和 *Bam*H I,则会将终止子一同切除,故只能用 *Bam*H I,B 错误;*sfp* 和 *idgS* 基因具有各自的启动子,表达是相互独立进行的,转录是以 DNA 的一条链为模板并沿固定方向进行的,由启动子方向可知,两基因转录的模板不同,C 正确;将目的基因导入植物细胞可采用农杆菌转化法,农杆菌可将 Ti 质粒上的 T-DNA 整合到白玫瑰染色体 DNA 上,D 正确。

5. 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。

6. (1) 5'-AGCTAGCA-3' 50 (2) *Nhe* I、*Cfo* I 酶切后的序列有 *Nhe* I 的黏性末端序列 CTAGC 和 *Cfo* I 的黏性末端序列 GCG (3) 终止密码子 (4) b 先合成 CD163 蛋白,再合成 RFP 蛋白

突破点 ▶ 图表分析—PCR 技术的应用

【解析】(1) 为了完整地扩增 *CD163* 基因序列,科研人员设计了一对碱基数目相等的引物,其中一个引物序列为 5'-TGCGCAGT-3',其与图 2 中上面那条链右侧序列互补,则另一个引物应与图 2 中下面的那条链左侧序列互补,引物序列为 5'-AGCTAGCA-3'。在 PCR 扩增过程中,引物与两条单链 DNA 结合(复性)时的温度一般要控制在 50 ℃ 左右。

(2) 为了使扩增后的 *CD163* 基因能够与 *RFP* 基因拼接在一起,科研人员从图 3 的三种限制酶中选择了两种,然后对 *CD163* 基因进行切割,切割结果如图 3 所示。科研人员选择的限制酶是 *Nhe* I、*Cfo* I,判断的依据是酶切后的序列有 *Nhe* I 的黏性末端序列 CTAGC 和 *Cfo* I 的黏性末端序列 GCG。

(3) 根据图 1 分析,为了使拼接后的重组基因能够表达成一条多肽,形成融合蛋白,所以需要除去 *CD163* 基因中编码终止密码子的序列。

(4) 将图 1 所示表达载体导入猪的细胞,根据启动子的方向可知,该表达载体转录时以 b 链为模板;翻译时,RFP 蛋白与 CD163 蛋白合成的顺序是先合成 CD163 蛋白,再合成 RFP 蛋白。

7. B 考查点 ▶ 基因工程的基本操作程序

【解析】图中重组载体 A 导入受体菌后随着受体菌的繁殖而扩增,因此重组载体 A 是基因克隆载体,而重组载体 B 导入受体菌后,表达产生胰岛素,因此重组载体 B 是基因表达载体,A 错误;基因克隆载体可使目的基因在受体细胞中稳定存在,并进行增殖,B 正确;培养细菌 A 的目的是扩增目的基因,不需要获得表达产物,因此目的基因不一定要插在重组载体 A 的启动子和终止子之间,C 错误;大肠杆菌是原核生物,无内质网和高尔基体等细胞器,不能直接用来加工、分泌有活性的胰岛素,D 错误。

易错警示

不能准确辨析基因克隆载体与基因表达载体

基因克隆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,同时复制出更多的目的基因,需含有复制原点、标记基因;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. ABD 考查点 ▶ 基因工程的基本工具

【解析】根据图示可知,若用 *Bam*H I 酶切 A 基因,则可得到 8.9 kb 基因片段,此片段包含了探针结合位点,A 正确;*Hpa* II 对胞嘧啶甲基化敏感,即不能切割甲基化的酶切位点,第三组使用 *Bam*H I + *Hpa* II 酶切,只得到 8.9 kb 片段,说明 *Msp* I 酶切位点都被甲基化,不能被 *Hpa* II 酶切,B 正确;若表型 2 中 A 基因第三组酶切结果介于 3.5 kb 和 8.9 kb 之间,说明 A 基因至少有 1 个

Hpa II 酶切位点被甲基化, C 错误; 基因中碱基的甲基化会影响基因的表达, 所以小鼠 (Aa) 有两种表型可能是因为 A 基因甲基化程度不同影响了基因的表达, D 正确。

2. C 突破点 ▶ 信息提取—基因敲除技术

【解析】基因表达载体构建过程中需要限制酶和 DNA 连接酶两种工具酶处理, A 正确。分析题图可知, 表达载体 T 中有编码红色、黄色、蓝色荧光蛋白的基因, 前端有脑组织特异性表达的启动子, 因此肌肉细胞不会表达载体 T 上的荧光蛋白基因, 故若小鼠细胞含一个表达载体 T (不含 Cre 酶), 其肌肉组织细胞不会发出荧光, B 正确。loxP1、loxP2 位置如题图 2 白、黑三角符号所示, 两个 loxP1 和两个 loxP2 之间的基因最多会被 Cre 酶敲除一次, Cre 酶识别的 loxP 不同, 则有可能未敲除荧光蛋白基因, 此时表达红色荧光蛋白; 也有可能敲除两个 loxP1 之间的红色荧光蛋白基因, 此时表达黄色荧光蛋白; 也有可能敲除两个 loxP2 之间的红色和黄色荧光蛋白基因, 此时只表达蓝色荧光蛋白, 因而不同脑细胞会差异表达红色、黄色或蓝色荧光蛋白基因, C 错误。若小鼠脑组织细胞内有 2 个表达载体 T (含 Cre 酶), Cre 酶对每个 DNA 片段随机剪切, 因而细胞的颜色由细胞内不同荧光蛋白的颜色叠加而成, 故其脑组织细胞可能出现两种颜色, D 正确。

3. (1) 引物是根据转座酶基因的一段已知序列设计合成的 (或引物能与转座酶基因的 cDNA 特异性结合, 存在与转座酶基因互补的序列) *HPH* (或 *GFP*、*RFP*) (2) 2~9 使用 F_2/R_2 引物进行 PCR 并检测有条带, 说明部分细胞中 D 元件未切离; 使用 F_2/R_4 引物进行 PCR 并检测有条带, 说明部分细胞中 D 元件已切离 (3) ③ (4) 插入的是非基因序列 (或未选择表达的基因或内含子或非编码区等); 插入 D 元件后引发的突变为隐性突变; 插入 D 元件后表达的蛋白质功能未受影响或影响不大

突破点 ▶ 图表分析—双荧光载体的转座系统

【解析】(1) 引物是根据目的基因 (转座酶基因) 两端的碱基序列设计的, 引物 F_1/R_1 能与转座酶基因两端的特定序列互补配对, 所以使用引物 F_1/R_1 通过 PCR 技术可特异性扩增转座酶基因。由图甲可知, 载体上含有 *HPH* (潮霉素抗性基因)、*GFP* (绿色荧光蛋白基因)、*RFP* (红色荧光蛋白基因), 当植物被农杆菌成功转化后, 这些基因会进入植物细胞, 可通过检测这几种基因是否存在来判断植物是否被成功转化, 所以可选用 *HPH* (潮霉素抗性基因)、*GFP* (绿色荧光蛋白基因)、*RFP* (红色荧光蛋白基因) 作为筛选基因检测植物是否被农杆菌成功转化。

(2) 由题意可知, 使用 F_2/R_2 引物扩增的是包含 D 元件的片段, 使用 F_2/R_4 引物扩增时, 若 D 元件未发生切离则扩增不出条带。观察图丙, 植株 2~9 用 F_2/R_2 引物进行 PCR, 均可扩增出条带, 说明植株 2~9 有细胞中 D 元件未切离, 用 F_2/R_4 引物也扩增出条带, 说明部分细胞中的 D 元件发生了切离, 所以既含有完成转座的细胞又含有未发生转座的细胞的是植株 2~9。

(3) 由图甲可知, 当 D 元件插入绿色荧光蛋白基因 (*GFP*) 中时, 若 D 元件稳定存在, 会破坏 *GFP* 基因, 导致不产生绿色荧光; 红色荧光蛋白基因 (*RFP*) 表达与否与 D 元件是否完成转座无关。

①组 *GFP* (+)、*RFP* (+), 说明 D 元件可能发生了转座, 又从 *GFP* 基因中切离出来, 使得 *GFP* 基因能正常表达; ②组 *GFP* (+)、*RFP* (-), 不符合载体的基因结构特点 (正常载体有 *RFP* 基因), 可能是异常情况; ③组 *GFP* (-)、*RFP* (+), 说明 D 元件稳定存在于 *GFP* 基因中, 破坏了 *GFP* 基因, 且 *RFP* 基因正常表达, 所以含有

D 元件且 D 元件遗传稳定性高的是③组;④组 GFP (-)、RFP (-),不符合载体的基因结构特点(正常载体有 RFP 基因),可能是异常情况。

(4)D 元件随机插入染色体后获得具有突变表型的植物个体的比率较低,可能的原因有插入的是非基因序列(或未选择表达的基因或内含子或非编码区等);插入 D 元件后引发的突变为隐性突变;插入 D 元件后表达的蛋白质功能未受影响或影响不大等。

4. (1)限制酶、DNA 连接酶 1、3、4 (2)显微注射 用含有新霉素和丙氧鸟苷的选择培养基来筛选 (3)② 用外显子 1、3 和外显子 1、5 序列设计的两对引物进行 PCR 扩增,会得到两条长度不同的 DNA 片段,电泳后会出现两条条带,且两条长度不同的 DNA 片段比 RGR 基因长,故这两条条带应距离点样口更近 (4)RGR 蛋白可促进全反式视黄醛转化为 11-顺式视黄醛,杂合子与纯合子中 RGR 基因表达减弱,全反式视黄醛转化为 11-顺式视黄醛受阻,11-顺式视黄醛含量减少

突破点 ▶ 信息提取—同源重组技术

【解析】(1) 基因工程的基本操作程序主要包括四个步骤,即目的基因的筛选与获取、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。构建基因表达载体需要用到的工具酶有限制酶、DNA 连接酶。基因打靶是根据 DNA 同源重组的原理设计的,构建打靶载体时, *neo^r* 基因需插在外显子内部,使 RGR 基因无法正常表达, *neo^r* 基因除插入位点 2 之外,还可以选择位点 1、3、4。

(2) 将目的基因导入动物细胞最常用的方法是显微注射法。据题图 2 可知,打靶载体含有新霉素抗性基因和 *HSV-tk* 基因,打靶成功的小鼠细胞整合了打靶载体上的新霉素抗性基因,而不含 *HSV-tk* 基因, *HSV-tk* 基因表达可以使无毒的丙氧鸟苷转变为毒性核苷酸,导致细胞死亡,故筛选打靶成功的小鼠细胞的方法是用含有新霉素和丙氧鸟苷的选择培养基来筛选。

(3) 基因打靶成功时,同源重组发生在一对同源染色体的一条染色体上,所以该细胞中一条染色体上的 RGR 基因被破坏,另一条染色体上的 RGR 基因正常,用外显子 1、3 和外显子 1、5 序列设计的两对引物进行 PCR 扩增,会得到两条长度不同的 DNA 片段,电泳后会出现两条条带,且两条长度不同的 DNA 片段均比 RGR 基因长,故这两条条带应距离点样口更近,即题图 3 中的②。

(4) 根据题干信息可知,维生素 A 在体内转化为 11-顺式视黄醛后,经一系列变化,接受光信号后,11-顺式视黄醛转变为全反式视黄醛,触发级联反应产生神经信号,从而在大脑皮层产生视觉。产生视觉后,全反式视黄醛经一系列反应再度转变为 11-顺式视黄醛重复利用。依据题图 4 可知,光照条件下,与正常小鼠相比,基因修饰杂合子 (+/-) 与纯合子 (-/-) 的 11-顺式视黄醛总量较少,由于 RGR 蛋白可促进全反式视黄醛转化为 11-顺式视黄醛,基因修饰杂合子 (+/-) 与纯合子 (-/-) 中 RGR 基因表达减弱,全反式视黄醛转化为 11-顺式视黄醛受阻,11-顺式视黄醛含量减少。

专题 1 限制酶及酶切位点的选择

刷 难关

1. D 考查点 ▶ 酶切位点的选择

【解析】该 DNA 分子经酶 M 和酶 N 两种限制酶切割后,产生了三个 DNA 片段且两个切口形成的黏性末端不同,说明该 DNA 分子含有酶 M 的一个切割位点和酶 N 的一个切割位点;质粒为环

状 DNA,其经酶 M 和酶 N 两种限制酶切割后,产生了两个 DNA 片段,观察两个切口形成的黏性末端,可推出质粒含有酶 M 的一个切割位点和酶 N 的一个切割位点,A 正确。根据题图可知,酶

M 和酶 N 识别的序列可能是 $\begin{array}{c} \text{AGCGCT} \\ \text{TCGCGA} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{GTGCAC} \\ \text{CACGTG} \end{array}$,但无法确定其

对应关系,B 正确。题图中经酶切后形成的片段均是黏性末端,T4 DNA 连接酶和 *E. coli* DNA 连接酶均能将具有互补黏性末端或平末端的 DNA 片段连接起来,而片段乙和片段丁具有互补的黏性末端,C 正确。根据题图可知,片段乙、片段丁、片段戊只有两个互补的黏性末端,这三个片段不能连接成环状 DNA 分子,D 错误。

2. (1)b —COOH (2)① *Bam*H I、*Not* I ②引物 2 15 (3)①
② 在红光条件下,A 系植株表达的蛋白质含叶绿体转移信号,B 系植株表达的蛋白质没有

突破点 ▶ 信息提取—基因工程的应用

【解析】(1)分析题图可知,X①和 X②蛋白质 b 末端的氨基酸序列相同,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一COOH 末端。

(2)①限制酶能识别 DNA 分子中的特定核苷酸序列,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酸。由于引物 1 不含有 *Bam*H I 酶切位点、引物 3 方向错误无法扩增、引物 4 后面 6 个碱基无法与模板链配对,故应选择引物 2 对 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,共形成 16 个 DNA 分子,有一个 DNA 分子不含有引物 2,故含有该引物的 DNA 片段数为 15 个。

(3)在红光条件下,A 系植株表达的蛋白质含叶绿体转移信号,B 系植株表达的蛋白质没有,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。

专题 2 PCR 技术的原理与应用

刷 难关

1. D **突破点** ▶ 信息提取—巢式 PCR

【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。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 反应正确性的鉴定,B 正确。外侧两个引物大小为 25 bp,复性温度较高(68 ℃);内侧两个引物大小为 17 bp,复性温度较低(46 ℃)。推测一定范围内,复性温度与引物长度呈正相关,C 正确。第一轮 PCR 使用一开始投放的模板 DNA,第二轮以第一轮 PCR 产物为模板进行再次扩增,D 错误。

2. D **考查点** ▶ PCR 改造 β -淀粉酶基因

【解析】PCR 的原理是 DNA 双链复制,利用的酶是耐高温的 DNA 聚合酶,合成子链时以 DNA 为模板,A 错误;根据 β -淀粉酶的编码序列,替换的碱基在编码序列中,则利用的引物应该把编码序列全部扩增在内,故所用的引物应为②③,B 错误;改造后的基因应该插入 pLN23 质粒的启动子的下游,C 错误;转录是以 DNA 为模板合成 RNA 的过程,若要通过 PCR 在分子水平上确

定目的基因是否转录,则需要以 RNA 为模板逆转录出 DNA 作为 PCR 反应的模板,该过程需要用到逆转录酶,D 正确。

3. C 突破点 ▶ 信息提取—PCR 技术

【解析】分析题图可知,引物的延伸方向为 $5' \rightarrow 3'$,故图示所给引物 1 设计区碱基序列所在的 DNA 链为非模板链,即引物 1 的碱基序列与非模板链的碱基序列相同,而引物 2 要以引物 2 设计区碱基序列所在的 DNA 链为模板,故引物 2 的碱基序列应与所给序列碱基互补配对,该实验中需设计的引物 2 为 $5'-ATGATTTA-ACGAGAGTTGAA-3'$,A 错误;PCR 产物从 71 bp 开始,到 530 bp 为止,共 460 bp,若酶切并电泳后出现约 160 bp、300 bp 的两个片段,说明 PCR 产物可被 *Acc I* 酶切,对应水稻基因型应为 GG,若 PCR 产物无法被酶切,则电泳后只有 460 bp 左右的一个条带,对应水稻基因型为 TT,故 GT 杂合型水稻品种的 G 能被酶切成两段,而 T 不能被酶切,酶切电泳结果为 3 条条带,B 错误,C 正确;由题干可知,*Wx* 基因第 226 位碱基为 G 时,该位点所在内含子能被正常剪接,突变为 T 后不能被正常剪接,故组成两种淀粉合成酶的氨基酸的数目不同,D 错误。

4. (1) 温度升高到超过 90°C 使 *Taq* DNA 聚合酶能够从引物的 $3'$ 端开始连接脱氧核苷酸 (2) 耐高温 Ca^{2+} 目的基因进入受体细胞内,并且在受体细胞内维持稳定和表达的过程 (3) 提高提高 (4) 易错 PCR 技术是利用基因突变的原理来改造天然酶,是不定向的;而蛋白质工程是利用基因重组的原理来改造天然酶,是定向的

突破点 ▶ 图表分析—易错 PCR

【解析】(1) 在体外利用 PCR 技术扩增目的基因时,利用 DNA 高温变性的特点加热至超过 90°C ,破坏双链之间的氢键,使 DNA 解链变为单链。用 PCR 技术扩增目的基因时,需要在 PCR 扩增仪中加入 2 种引物,其作用是使耐高温的 DNA 聚合酶(*Taq* DNA 聚合酶)从引物的 $3'$ 端开始连接脱氧核苷酸。

(2) PCR 技术需要高温加热使 DNA 双链解旋,而 *Taq* DNA 聚合酶热稳定性高,在高温条件下不会失活,因此在降温时仍可发挥作用。步骤②是将重组质粒导入不同受体菌,由于受体菌用 Ca^{2+} 处理后更容易吸收周围环境中的 DNA,因此步骤②是将构建的重组质粒溶于缓冲液中与用 Ca^{2+} 处理的受体菌混合,在一定温度下完成转化。转化是指目的基因进入受体细胞内,并且在受体细胞内维持稳定和表达的过程。

(3) PCR 技术通过 DNA 的半保留复制,在 *Taq* DNA 聚合酶的催化下,遵循碱基互补配对原则,扩增 DNA 片段。*Taq* DNA 聚合酶与一般 DNA 聚合酶相比最大的特点是高温下可以保持酶的活性(或耐高温、或热稳定),其某一区域负责将碱基与模板链正确地互补配对, Mn^{2+} 可以降低这一功能,提高碱基的错配,而 Mg^{2+} 可以提高错配区的稳定性,故易错 PCR 反应体系中应适当提高 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度。

(4) 通过易错 PCR 技术改造天然酶属于基因工程,与通过蛋白质工程改造天然酶原理的本质区别为易错 PCR 技术是利用基因突变的原理来改造天然酶,是不定向的;而蛋白质工程是利用基因重组的原理来改造天然酶,是定向的。

5. (1) 激活耐高温的 DNA 聚合酶 引物较短 (2) J109 启动 *MerR* 基因转录出 mRNA 甲、丙 (3) 增强 *MerR* 与启动子 a 的结合、修改启动子 b 以增强 *MerR* 的表达、增加重组质粒中 *MerR* 基因的数量(拷贝数)、修改启动子 a 以降低 *GFP* 基因的表达量

突破点 ▶ 图表分析—PCR 技术的原理、过程和应用

【解析】(1)PCR 反应缓冲液中加入 Mg^{2+} 的作用是激活耐高温的 DNA 聚合酶,图 2 中③实验结果出现的原因可能是引物较短,导致扩增特异性减弱。

(2)J109 为组成型启动子,在不同细胞发挥作用的效果基本一致,图中启动子 b 应选择 J109,其作用是启动 *MerR* 基因转录出 mRNA。在反应体系中加入引物的作用是目的基因的模板链配对,使 *Taq* DNA 聚合酶从引物的 3'端开始连接脱氧核苷酸,延伸子链。甲的 2 个引物分别与 J109 和 *MerR* 基因序列互补,丙的 2 个引物分别与 PmerT 和 *GFP* 基因序列互补,为确保 *MerR* 基因、*GFP* 基因分别与相应启动子正确连接,科研人员应选择表 2 中甲、丙组引物对重组 DNA 进行扩增,并作进一步验证。

(3)研究发现,全细胞生物传感器在无 Hg 状态下 *GFP* 基因的表达量偏高,传感器灵敏度低,可通过增强 *MerR* 与启动子 a 的结合、修改启动子 b 以增强 *MerR* 的表达、增加重组质粒中 *MerR* 基因的数量(拷贝数)、修改启动子 a 以降低 *GFP* 基因的表达量,来改造重组质粒以提高灵敏度。

第 2 节 基因工程的应用及蛋白质工程

刷基础

1. D 考查点 ▶ 基因工程在器官移植中的应用

【解析】基因编辑猪的成功属于基因工程的应用范畴,其原理不是动物细胞的全能性,A 错误;出现蛋白尿的原因主要是肾小球通透性增强,不是肾小管细胞凋亡,B 错误;猪和猕猴肾脏的差异体现了不同遗传物质对性状的决定,不是基因选择性表达的体现,因为猪和猕猴肾脏的基因不同,C 错误;*β4GalNT2* 是糖抗原合成基因,因而敲除 *β4GalNT2* 能改变膜蛋白种类,进而降低免疫排斥反应,D 正确。

2. D 考查点 ▶ 蛋白质工程

【解析】密码子具有简并性,故 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,启动子和终止子为非编码序列,由氨基酸序列推理的基因序列中不包含启动子和终止子,A 正确;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的应用,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;蛋白质工程是指以蛋白质分子的结构规律及其与生物功能的关系作为基础,通过基因修饰或基因合成,对现有蛋白质进行改造,或制造一种新的蛋白质,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,D 错误。

3. D 考查点 ▶ 基因工程在医药方面的应用

【解析】重组 DNA 含启动子 P、药物 A 基因和 *Neo* 基因,导入受体细胞中,目的基因会插入受体细胞的基因组中,发生的可遗传变异类型为基因重组,A 正确;诱变处理所依据的原理是基因突变,基因突变是不定向的,所以诱变处理可能使培养液中的链霉菌产生不同突变,B 正确;药物 A 基因和 *Neo* 基因共用一个启动子,二者共表达,所以新霉素抗性强弱可在一定程度上反映药物 A 基因的表达量,C 正确;诱变处理后将菌液稀释后涂布,在含不同浓度新霉素的培养基上各接种等量同一稀释度的培养液,应该选择含新霉素浓度最高的培养基上所长出的菌落,其生产药物 A 的能力强,D 错误。

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, 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, 很多蛋白质的空间结构十分复杂, 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

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, 必须通过基因改造或基因合成实现。

刷提分

1. C 考查点 ▶ 基因工程的应用

【解析】分析题意可知, ClyA 是外膜囊泡(OMV)表面的特异蛋白, 而 OMV 能穿越肠道上皮屏障活化肠黏膜内的免疫细胞, 所以, ClyA 基因的作用为表达出相关蛋白将融合蛋白定位到 OMV 表面, 进而使融合蛋白可以被免疫细胞识别, A 正确; Ag 是肿瘤细胞表面特异性抗原基因, Ag 表达产物可以激活机体的特异性免疫反应, B 正确; mFc 表达产物能够与树突状细胞表面的特异性受体结合, 进而提高树突状细胞(而非 T 细胞)识别、摄取和传递抗原信息的能力, C 错误; 利用该大肠杆菌可制备预防肿瘤的口服疫苗, 属于基因工程在免疫方面的应用, D 正确。

2. D 突破点 ▶ 信息提取—蛋白质工程在医学方面的应用

【解析】由图可知, 可变区能够与抗原特异性结合, 可变区决定了抗体的特异性, A 错误; 鼠源抗体对人体具有免疫原性, 人体的不良反应与鼠源抗体有关, 即主要与可变区有关, B 错误; EGF 是人体内促进细胞生长和增殖的因子, EGF 受体在人体其他细胞中也能表达, C 错误; 西妥昔的制备过程通过对原有抗体基因的改造实现对原有单抗的改造, 属于蛋白质工程, D 正确。

3. D 考查点 ▶ 基因工程的应用

【解析】依题意, 该工程菌通过体外 DNA 重组技术制得, 细胞的遗传物质发生了变化, 故该变异可以遗传给子代, A 正确; 依题意, 可利用超声诱导产生的短暂热效应调控工程菌的基因表达, 因此“细菌疗法”可根据需要无创调控 IFN- γ 的量, B 正确; 依题意, Clts 蛋白能抑制 IFN- γ 基因启动子的活性, 大于 42 °C 时 Clts 蛋白失活, 人体正常体温为 37 °C 左右, 故正常体温条件下患者体内 IFN- γ 不会增加, C 正确; 工程菌发挥作用后会被机体免疫系统清除, 不能持久发挥效应, D 错误。

4. (1) 植物细胞培养 不占用土地; 不受季节、天气等的限制

(2) 叶绿体有双层膜结构, 蛋白质产物分离(提取)不易; 叶绿体中只有核糖体, 没有内质网和高尔基体, 蛋白质没有经过正确加工(没有活性) (3) ①启动子和终止子 保证所用启动子只在水稻胚乳细胞中启动转录过程 ②农杆菌转化 不能; 细胞匀浆中有 DNA, 其中的目的基因会对检测造成干扰, 也可能有 RNA 酶能将待测 RNA 水解掉而检测不到

考查点 ▶ 植物细胞工程与基因工程

【解析】(1) 植物组织培养过程是离体的植物器官、组织或细胞脱分化形成愈伤组织, 然后再分化生成根、芽, 最终形成植物体。悬浮细胞生物反应器是指将脱分化的愈伤组织在液体培养基中繁殖以提取产物, 用到了植物细胞培养技术, 植物细胞培养技术

具有不占用土地且不受季节、天气等的限制等优点。

(2) 叶绿体生物反应器是指通过特定的技术手段使外源基因能够进入叶绿体中,与植物叶绿体基因组进行同源片段重组,在叶绿体中进行转录、翻译的技术体系,但由于叶绿体中只有核糖体,没有内质网和高尔基体,蛋白质没有经过正确加工,生产出的蛋白质没有生物活性;且叶绿体有双层膜结构,蛋白质产物分离提取不易,这都是该技术所存在的问题。

(3) ①启动子是驱动基因转录的元件,而终止子指示转录终止的位置,重组载体中 *HN* 基因(目的基因)应该正确连接到启动子和终止子序列之间。构建基因表达载体时,需将 *HN* 基因与水稻胚乳蛋白基因的启动子等调控组件重组在一起,从而实现 *HN* 基因只在水稻胚乳细胞中正确表达。

②将目的基因导入植物细胞,采用最多的方法是农杆菌转化法。为证明 *HN* 基因在水稻胚乳中已经转录,将待测胚乳细胞制成匀浆,采用逆转录 PCR 法进行检测,不能达成目的,因为细胞匀浆中有 DNA,其中的目的基因会对检测造成干扰,也可能有 RNA 酶能将待测 RNA 水解掉而检测不到,因此该方案不能达到目的。

第3节 生物技术的安全性与伦理问题

刷基础

1. B 考查点 ▶ 生殖性克隆和治疗性克隆

【解析】生殖性克隆和治疗性克隆都利用了体细胞核移植技术,克隆是无性生殖,故治疗性克隆和生殖性克隆都属于无性生殖,A 正确;生殖性克隆和治疗性克隆都涉及伦理问题,我国政府不赞成、不允许、不支持、不接受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,B 错误;人的克隆面临着严峻的技术难关,如体细胞核移植后如何重新编程等问题,在这些克隆技术关键问题尚未解决的情况下,可能孕育出有严重生理缺陷的克隆人,C 正确;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,对解决供体器官缺乏和器官移植后的免疫排斥反应具有重要意义,D 正确。

2. B 考查点 ▶ 转基因生物安全性

【解析】用农业转基因生物加工制成的产品需提供标识,以确保消费者的知情权,A 正确;试管婴儿技术需要将体外受精获得的人类胚胎植入人体生殖系统,这是被法律允许的,B 错误;生物武器包括致病菌类、病毒类和生化毒剂类等,我国已申明在任何情况下不发展、不生产、不储存生物武器,C 正确;我国禁止非医学需要的胎儿性别鉴定和选择性别别人工终止妊娠,以避免引发伦理等方面的问题,D 正确。

3. 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,但仍存在部分棉铃虫对抗虫蛋白具有抗性,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新型致病菌产生免疫反应,D 正确。

4. B 考查点 ▶ 生物技术中的伦理问题

【解析】与经典的胚胎干细胞技术相比,诱导多能干细胞不使用胚胎,因此一般不涉及伦理问题,但是涉及安全问题,A 错误;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,需要在严格的监管下进行,B 正确;中国政府不赞成、不允许、不支持、不接受任何生殖性克隆人的实验,但不反对治疗性克隆,C 错误;转基因大豆与当地大豆杂交,会造成基因污染,可能会降低当地生物的多样性,D 错误。

5. D 考查点 ▶ 转基因技术的安全性

【解析】转基因技术中,只要有证据表明产品有害,就应该禁止该产品的使用,而不是禁止转基因技术的应用,A 错误;利用基因编辑技术设计试管婴儿或设计完美试管婴儿,已经涉及新生命的诞生,会引起生物技术安全与伦理问题,B 错误;从外来入侵害虫的原产地引入天敌进行治理,由于短期内天敌没有资源和空间等的限制,可能会对入侵地造成生态影响,C 错误;高致病性微生物必须在高等级生物安全实验室中开展实验活动,防止致病性微生物外泄,造成污染,危害生物健康,D 正确。

易错警示

(1) 生物技术安全性问题包括食物安全、生物安全、环境安全三个方面。

(2) 伦理问题主要在生殖性克隆人等问题上出现争议。

(3) 转基因生物的安全性问题:食物安全(滞后效应、过敏源、营养成分改变)、生物安全(对生物多样性的影响)、环境安全(对生态系统稳定性的影响)。对待转基因技术正确的做法应该是趋利避害,不能因噎废食。

全章综合提升

刷素养

1. D 突破点 ▶ 图表分析—重组 DNA 技术的基本工具

【解析】该实验研究的是加入 DNase I 后,DNA 分子与转录因子蛋白质结合及切割情况,不需要设置不添加 DNase I 的对照组,因为重点是对比结合蛋白和未结合蛋白时 DNA 被 DNase I 切割的差异,而不是与不添加酶的情况对比,A 错误;由题意可知,用 DNase I 切割 DNA 分子可产生一系列不同长度的 DNA 片段,且相邻片段只相差 1 个核苷酸,这说明对照组的 DNA 分子被多次切割,磷酸二酯键多次断裂,而不是只发生一次磷酸二酯键的断裂,B 错误;因为用 DNase I 切割 DNA 分子会产生一系列不同长度的 DNA 片段,所以未与特定蛋白结合的 DNA 切割后的片段长度是不同的,C 错误;由于当 DNA 分子中的某一区段与特异的转录因子蛋白质结合后,加入 DNase I 时该区段会得到保护,在凝胶电泳放射性自显影图片上会出现一个空白区“足迹”,通过观察是否有“足迹”,就可以判断是否有能与 DNA 进行特异性结合的目标蛋白,所以此方法可筛选能与 DNA 进行特异性结合的目标蛋白,D 正确。

2. (1) 未感染病毒 A 感染病毒 A (2) 密码子具有简并性 256 (3) 磷酸二酯键 ④和⑥ (4) 连续多个胸腺嘧啶脱氧核苷酸构成的单链 不可以 如果为②链添加多个连续的胸腺嘧啶脱氧核苷酸单链,混合后⑤链会和③链结合并扩增出错误的 DNA

突破点 ▶ 信息提取—RACE PCR

【解析】(1) 为获得较高纯度的病毒 A 的 mRNA,先提取未感染病毒 A 的香石竹细胞内的 mRNA,通过逆转录得到 DNA 单链,将该 DNA 单链与感染病毒 A 的香石竹细胞内提取的 mRNA 混合,因为未感染病毒 A 的香石竹细胞逆转录出的 DNA 单链没有病毒 A 的 mRNA 的互补序列,感染病毒 A 的香石竹细胞内含有病毒 A 的 mRNA,混合后未配对部分即为病毒 A 的 mRNA。

(2) 一种氨基酸可能由多种密码子编码,即密码子具有简并性,由于密码子的简并性,大多数氨基酸可对应多种密码子,所以利用已知的氨基酸序列无法准确推知该病毒 mRNA 中的对应序列。对于病毒 A 蛋白中“一半胱氨酸—酪氨酸—组氨酸—丝氨酸—组氨酸—酪氨酸—”这一段氨基酸序列,根据密码子表,每个氨基酸对应的密码子种类数相乘可得引物 GSP 的种类数。半胱氨酸对应 2 种密码子,酪氨酸对应 2 种密码子,组氨酸对应 2 种密码子,丝氨酸对应 4 种密码子,氨基酸序列可能是正向的也可能是反向的,所以引物 GSP 的种类数为 $2 \times 2 \times 2 \times 4 \times 2 \times 2 \times 2 = 256$ (种)。

(3) PCR 过程中形成的化学键是磷酸二酯键。题图 1 中过程完成后,将“3'-RACE”和“5'-RACE”获得的双链 DNA 置于同一 PCR 反应体系中,不额外添加引物即可获得完整病毒 DNA 片段,这是因为 3'-RACE 和 5'-RACE 获得的片段互为引物,即④和⑥充当引物可获得完整 DNA 片段。

(4) 病毒 A 的 mRNA 的 3'端为连续多个腺嘌呤核糖核苷酸,所以其对应的序列是连续多个胸腺嘧啶脱氧核苷酸。5'-RACE 中,为链②的 3'端添加的脱氧核苷酸不可以是胸腺嘧啶脱氧核苷酸,如果为②链添加多个连续的胸腺嘧啶脱氧核苷酸单链,混合后⑤链会和③链结合并扩增出错误的 DNA。

刷真题

1. (1) 脱氧核苷酸 延伸

(2) 5'端 AGATCT BamH I 与 EcoR 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 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 BamH I、EcoR I 和 Xba I 的酶切位点,S 基因上含有 Xba I、Nde I、BamH 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、BamH I 的识别序列;分析表格数据,Bgl II 切割产生的黏性末端和 BamH 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 EcoR I 的识别序列。因此,切割载体应选用的两种限制酶为 BamH I 和 EcoR 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:

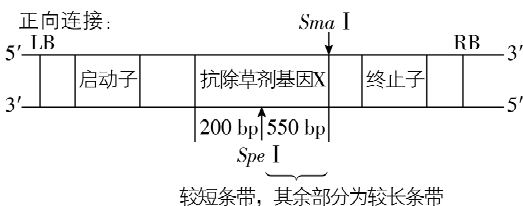
Pst I : 5'-CTGCA

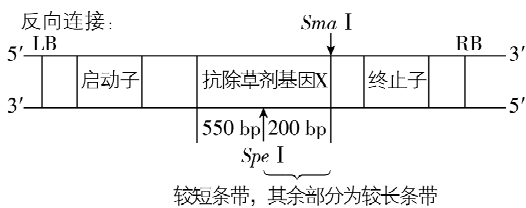
3'-G

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

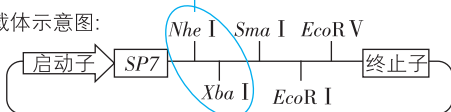
命题点 基因工程

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。

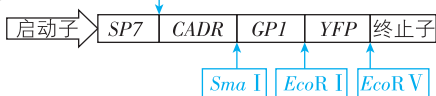
二者酶切后的黏性末端相同,为同尾酶,其识别序列不能添加在同一个目的基因的两端

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 ℃,

双链 DNA 解聚为单链)、复性(温度下降到 50 ℃ 左右,引物和模板结合)、延伸(温度上升到 72 ℃ 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,GPI 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、CADR、GPI、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'→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

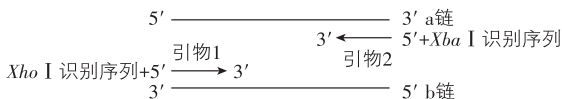
命题点 ▶ 基因表达载体的构建、PCR 及电泳鉴定

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) 能与 P 基因母链的一段碱基序列互补配对、短单链核酸 5'端

(2) P 基因编码链的第一个碱基与 *EcoR* I 识别序列的最后两个碱基编码一个氨基酸,导致 mRNA 的密码子被错位读取 在引物中的 *EcoR* I 识别序列 3'端添加 1 个碱基

(3) 增强 FLAG-P 与 UBC 的结合 参与 P 与 UBC 的结合

(4) 药物 A 通过增强 P 与 UBC 结合促进 P 降解

命题点 ▶ 基因工程、PCR 技术与凝胶电泳

【解析】(1) 引物是能与 DNA 模板链上的一段碱基序列互补配对的短单链核苷酸,子链的合成方向是 5'→3',因此设计扩增 P 基因的引物,需要 2 种引物分别与两条模板链 3'端的碱基序列互补。在耐高温的 DNA 聚合酶的作用下,脱氧核苷酸被加到引物的 3'端,为了不破坏目的基因,因此该限制酶识别序列应添加在引物的 5'端。

(2) 融合基因转录出的 mRNA 序列正确,翻译出的融合蛋白中 FLAG 的氨基酸序列正确,但 P 基因对应的氨基酸序列与 P 不同,说明 P 基因翻译时出错。由图分析可知,在转录出的 mRNA 中,限制酶识别序列对应的最后两个碱基与 P 基因对应的第一个碱基构成一个密码子,导致读码框改变,翻译出的氨基酸序列改变,可通过在 *EcoR* I 识别序列前后增加碱基,使其碱基数目加上 FLAG 的碱基数目为 3 的倍数,这样能保证 P 基因转录出的 mRNA 上的读码框不改变,使其能够正常翻译。

(3) ①组仅添加 UBC,处理后用 UBC 抗体检测,不出现杂交带;②组添加 UBC 和 FLAG-P,出现杂交带;③组添加 UBC、药物 A 和 FLAG-P,杂交带更加明显,说明药物 A 的作用是促进 UBC 与 FLAG-P 的结合。②④组或③⑤组的差异在于②③组添加 FLAG-P,出现杂交带;④⑤组添加 FLAG-PΔ,不出现杂交带,据此推测 PΔ 中缺失的特定序列是与 UBC 结合的关键序列。

(4) 根据(3)的分析推测,药物 A 可促进 UBC 与 FLAG-P 的结合,从而促进蛋白 P 被蛋白酶识别并降解,达到治疗的目的。

8. (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。