

合,常用灭活病毒诱导法、PEG 融合法、电融合法等,体现了细胞膜的流动性,C 正确;步骤④为第一次筛选,应用特定选择培养基进行筛选,步骤⑤为第二次筛选,通过克隆化培养和抗体检测进行筛选,D 错误。

9. D 【解析】克隆动物的核基因组来源于甲,细胞质中的基因来源于乙,A 错误;体外受精需用获能的精子与 M II 期的卵母细胞受精,而不是 M I 期,B 错误;囊胚①的内细胞团可发育为个体,滋养层细胞将来发育为胎膜和胎盘的一部分,C 错误;由题图可知,体细胞核移植后形成的滋养层不足以支持胚胎完成发育,体外受精后形成的滋养层

能够支持胚胎完成发育,故滋养层可影响内细胞团的发育,D 正确。

10. A 【解析】根据表格数据分析,随着甲浓度的增大,卵裂率先增大后减小,说明甲浓度较低时促进卵裂过程,浓度过高时抑制卵裂过程,A 错误;甲浓度过高时,第一极体排出率降低,说明甲浓度过高抑制第一极体的排出,B 正确;用 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的甲处理后受精卵的卵裂率增大,说明添加 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的甲可提高受精后胚胎发育能力,C 正确;由表格中成熟率、卵母细胞数、第一极体排出数之间的数量关系可知,本实验中以第一极体的排出作为卵母细胞成熟的判断标准,D 正确。

第三章 基因工程

第一节 基因工程及其技术

课时 1 基因工程的基本工具和 PCR 技术

刷基础

1. D 【解析】基因工程是指在体外通过人工“剪切”和“拼接”等方法,将外源目的基因与载体 DNA 进行组合形成重组 DNA,然后导入受体细胞,并使其在受体细胞中表达,产生人类需要的基因产物的技术。因此通过基因工程,人类可以定向地改变生物性状,A 正确。基因工程是在 DNA 分子水平上进行设计和施工的,又叫作重组 DNA 技术,B 正确。基因工程可以打破物种界限,实现遗传物质横向转移,在分子水平上定向改变生物的遗传特性,C 正确。几乎所有生物共用同一套遗传密码,基因的表达遵循中心法则,因此遗传物质作用方式的相似性是转基因技术的基础,D 错误。
2. C 【解析】DNA 连接酶的作用是在相邻两个核苷酸的磷酸和脱氧核糖之间形成磷酸二酯键,A、D 错误。在基因工程中,DNA 连接酶作用于两个黏性末端或两个平末端,B 错误。DNA 连接酶与 DNA 聚合酶作用的部位相同,均在磷酸和脱氧核糖之间形成磷酸二酯键;两者作用对象不同,DNA 连接酶作用于两个 DNA 片段,DNA 聚合酶可使游离的脱氧核苷酸连接到 DNA 片段上,C 正确。
3. A 【解析】*EcoR* V 切割 DNA 产生的是平末端,平末端用 *E. coli* DNA 连接酶连接的效率较低,A 正确;两种限制酶均能识别 DNA 的特定序列,并切割磷酸二酯键,B 错误;由图可知,*EcoR* V 和 *Xho* I 切割 DNA 片段分别产生平末端和黏性末端,C 错误;*Xho* I 切割 DNA 产生的末端是黏性末端,T4 DNA 连接酶可用于连接黏性末端和平末端,D 错误。
4. D 【解析】由题图可知,*Bam* H I、*Bgl* II、*Mbo* I 识别序列不同,但切出的黏性末端相同,属于同尾酶,A 错误;根据相关

限制酶的识别序列和切割位点可知,*Bam* H I 的识别序列包含 *Mbo* I 的识别序列,所以当目的基因编码区内有 *Bam* H I 识别序列时,使用 *Mbo* I 切割也会破坏目的基因,B 错误;*Bam* H I、*Bgl* II 的识别序列不同,但会产生相同的黏性末端,若用二者切割目的基因,不能防止目的基因自身的环化,C 错误;用 DNA 连接酶将 *Bam* H I 和 *Bgl* II 形成的黏性末端连接后,不能被二者切开,但可再被图中限制酶 *Mbo* I 切开,D 正确。

5. ACD 【解析】作为载体必须具备的条件之一是具有限制酶切割位点,以利于目的基因插入其中,A 正确;作为载体必须具备的条件之一是具有特殊标记基因以利于重组后进行重组 DNA 分子的筛选,B 错误;作为载体必须具备的条件之一是能在受体细胞稳定保存并复制以利于目的基因的保存和复制,C 正确;作为载体,要对受体细胞没有危害以避免影响受体细胞的正常生命活动,D 正确。

方法总结 质粒作为载体必须具备的条件

- (1) 含有复制起点,能在受体细胞中稳定保存并复制。
- (2) 具有一个至多个限制酶切割位点,以便外源 DNA 片段插入。
- (3) 具有标记基因,如抗生素抗性基因,便于筛选含重组 DNA 分子的细胞。
- (4) 对受体细胞无害,不影响受体细胞正常的生命活动。

6. A 【解析】质粒是一种裸露的、结构简单的环状双链 DNA 分子,独立于原核细胞拟核 DNA 或真核细胞细胞核之外,

易错点: 真核生物也有质粒

A 正确,C 错误;在基因工程操作中,真正被用作载体的质粒,都是在天然质粒的基础上进行过人工改造的,B 错误;质粒一般相对分子质量较小,便于携带 DNA 片段进入受体细胞,D 错误。

7.C

教材变式 本题是教材 P91“走进实验室”的变式题。教材介绍了 PCR 扩增目的基因的原理、步骤及琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段的方法和技术;本题以选择题的形式对 PCR 的过程和条件进行考查,有利于对教材重点知识的掌握,同时培养知识迁移应用能力和辨析能力。

【解析】PCR 扩增 *PacA* 基因时需要以 4 种脱氧核糖核苷酸为原料,**A 正确**;在琼脂糖凝胶电泳中,DNA 分子的大小和构象不同,电泳迁移速率不同,因此 PCR 扩增完成后,常用琼脂糖凝胶电泳来鉴定 PCR 产物,**B 正确**;DNA 复制时,子链是沿着引物的 3'端继续合成的,且引物与母链结合遵循碱基互补配对原则,因此 PCR 扩增 *PacA* 基因时的引物组合是 3'-TACGGA-5'和 3'-TGTGCC-5',**C 错误**;PCR 扩增过程的基本条件包括 *PacA* 基因(模板)、4 种脱氧核苷酸(原料)、耐高温的 DNA 聚合酶、引物、缓冲溶液(含 Mg^{2+})等,**D 正确**。

方法总结 PCR 是聚合酶链式反应的缩写,它是一项根据 DNA 半保留复制的原理,在体外提供参与 DNA 复制的各种组分与反应条件,对目的基因的核苷酸序列进行大量复制的技术。

8.D 【解析】将电泳缓冲液加入电泳槽中,电泳缓冲液没过凝胶 1 mm 为宜,**A 错误**;在凝胶中 DNA 分子的迁移速率与凝胶的浓度、DNA 分子的大小和构象等有关,**B 错误**;电泳时间过长可能会导致 DNA 跑出凝胶或条带模糊等,反而会降低分离效果,**C 错误**;PCR 得到的产物需要与凝胶载样缓冲液混合后方可用于电泳,**D 正确**。

9.AB 【解析】PCR 循环过程包括变性、复性和延伸三个步骤,其中变性温度(a)最高,超过 90 °C,目的是使 DNA 双链解开;复性温度(b)较低,一般为 50 °C 左右,使引物与模板链结合;延伸温度(c)一般为 72 °C 左右,耐高温的 DNA 聚合酶催化 DNA 的合成,因此,PCR 过程中温度高低关系为 $a > c > b$,**A 错误**。延伸过程是在耐高温的 DNA 聚合酶的作用下,以脱氧核苷酸为原料,按照碱基互补配对原则合成 DNA 的过程。延伸的时间与待扩增片段的长度有关,片段越长,所需的延伸时间越长;但延伸温度主要由 DNA 聚合酶的最适温度决定,**B 错误**。PCR 每次循环中,引物 I 和引物 II 需要分别与模板链结合,参与 DNA 的合成,所以每次循环需要的引物 I 与引物 II 的数量是相同的,**C 正确**。PCR 技术中,复性过程是引物与模板链结合的过程,若设计的引物与模板不完全配对,适当降低 PCR 复性的温度,可使引物与模板更易结合,提高引物与模板的结合效率,**D 正确**。

刷易错

★易错点 对限制酶的作用结果分辨不清

10.D 【解析】*Bam*H I 的识别序列中包含 *Sau*3A I 的识别序列,故能被 *Bam*H I 识别并切割的 DNA 也能被 *Sau*3A I 识别和切割,**A 正确**;*Hinc* II、*Sma* I 切割后形成的是平末端,T4 DNA 连接酶可以连接具有平末端的 DNA 片段,**B 正确**;有些限制酶的识别序列只有一种,有些限制酶的识别序列有多种,如限制酶 *Hinc* II 的识别序列为 5'-GTY↓RAC-3',其中 Y 为 C 或 T,R 为 A 或 G,其识别序列有多种,**C 正确**;*Bam*H I 和 *Sau*3A I 切割后产生的黏性末端相同,因此能够相连,连接后仍然存在 GATC 序列,能被 *Sau*3A I 识别,若存在 5'-GGATCC-3'序列,也能被 *Bam*H I 识别,**D 错误**。

易错警示 部分学生会错误地认为“一种限制酶只能识别并切割一种序列”“不同的限制酶切割 DNA 后产生的末端一定不同”等。如 *Bam*H I 和 *Sau*3A I 切割后产生的黏性末端相同,而被 DNA 连接酶连接后的 DNA 片段能不能再被这两种限制酶切割,则要看连接后的 DNA 片段是否仍存在这两种限制酶的识别序列。

刷提升

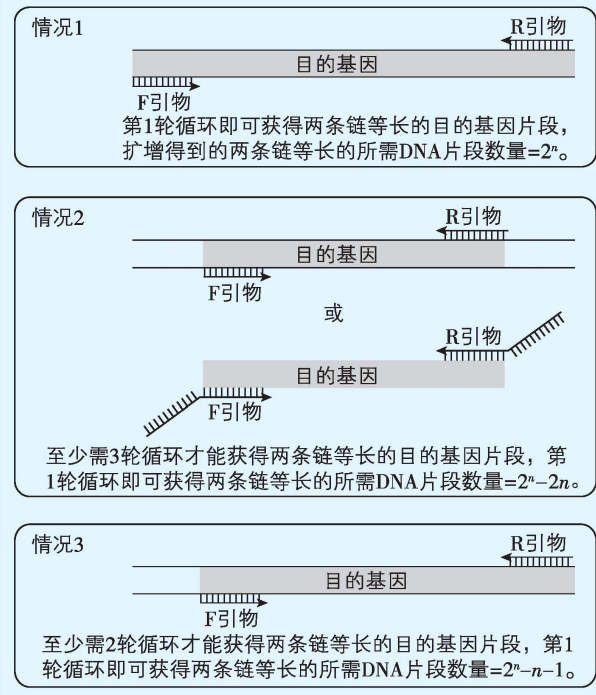
1.D 【解析】a 酶可以把线性 DNA 分子切成 4 段,说明该 DNA 分子上有 3 个 a 酶切割位点,即 a 酶的识别序列有 3 个;由题图可知 b 酶与 a 酶的识别序列不同,由表可知,b 酶在 a 酶切割后,又把大小是 2 100 bp 的 DNA 切成大小分别为 1 900 bp 和 200 bp 的两个片段,把大小是 1 400 bp 的 DNA 切成大小分别为 800 bp 和 600 bp 的两个片段,把大小是 500 bp 的 DNA 切成大小分别为 300 bp 和 200 bp 的两个片段,说明该 DNA 分子上有 3 个 b 酶切割位点,即 b 酶的识别序列有 3 个,**A 正确**。由题图可知,a 酶与 b 酶切出的黏性末端相同,用 DNA 连接酶可以将它们连接起来,**B 正确**。限制酶切割的化学键都是磷酸二酯键,故 a 酶与 b 酶切断的化学键相同,**C 正确**。质粒为环状 DNA 分子,故用 a 酶切割与该线性 DNA 具有相同碱基序列的质粒,可能得到 3 种切割产物,**D 错误**。

2.D 【解析】根据 DNA 分子中两条链的反向平行关系可判断,②链从 L 到 R 的方向为 5'→3',图中①②链均可作为子链合成的模板,**A 错误**;PCR 过程通过高温处理使双链中氢键断裂解聚成为单链,不需要解旋酶,**B 错误**;以 1 个 DNA 为模板经 3 次循环产生的 DNA 分子数目为 $2^3 = 8$,需消耗引物③的数目为 $(8 \times 2 - 2) \div 2 = 7$,**C 错误**;引物③(5'端添加了某序

突破点: PCR 消耗引物的数量和模板 DNA 数、循环次数有关。a 个模板 DNA 经 n 轮循环,可得 $a \cdot 2^n$ 个 DNA 分子,共 $a \cdot 2^{n+1}$ 条 DNA 单链,其中仅 2a 条链不含引物,故消耗引物总量为 $a \cdot 2^{n+1} - 2a$,每种引物消耗量相等,均为 $a \cdot 2^n - a$ 。

列)与模板 DNA 分子一条链的碱基互补配对,至少需经 2 次循环才可获得含该序列的双链 DNA 产物, **D 正确**。

方法总结 根据引物结合的位置,常见 PCR 可分三类,扩增出目的基因所需的最少循环数可按下述公式进行计算。



3. AD 【解析】如果两种限制酶在载体上识别序列相同,则用两种酶切割与用一种酶切割产生的 DNA 片段应该相同,与图示结果不符,因而可推测两种限制酶识别的序列不相同, **A 错误**。当仅用 R1 或 R2 一种限制酶切割载体时,仅产生一种长度的 DNA 片段,当用两种限制酶同时切割时,则产生两种不同长度的 DNA 片段,该载体最有可能为环状 DNA 分子,两种限制酶在载体上可能各有一个酶切位点, **B 正确**。用两种酶单独切割载体,产物长度为 800 bp,两种限制酶同时切割时产生 600 bp 和 200 bp 两种长度的 DNA 片段,所以两种限制酶的切割位点最短相距约为 200 bp, **C 正确**。DNA 分子在凝胶中的迁移速率与 DNA 分子大小、构象、凝胶的浓度等有关, **D 错误**。

4. (1) 不能 原核细胞 DNA 中不存在自身限制酶的识别序列或其识别序列被修饰了

(2) 3 4

5'-T GATCA-3'
(3) 3'-ACTAG T-5'

(4) 能 二者切割后产生的黏性末端相同

(5) DNA 的基本组成单位都是四种脱氧核苷酸;双链 DNA 分子的空间结构都是规则的双螺旋结构;DNA 分子都遵循碱基互补配对原则

【解析】(1) 限制酶能切割外源 DNA,不能切割原核细胞自身的 DNA,原因可能是原核细胞 DNA 中不存在自身限制酶的

识别序列或其识别序列被修饰了。

(2) 若某链状 DNA 分子中含有两个 *Bam*H I 的识别序列,用限制酶 *Bam*H I 切割后,该 DNA 分子将被切成 3 个片段,每个酶切位点被切割的过程中会断裂 2 个磷酸二酯键,共断裂 4 个磷酸二酯键。

(3) 结合表中信息, *Bcl* I 切割后产生的末端见答案。

(4) *Bam*H I 和 *Bcl* I 切割后产生的黏性末端相同,故这两种限制酶切割后产生的黏性末端能被 DNA 连接酶连接。

(5) 不同生物的 DNA 具有相同的基本组成单位,即四种脱氧核苷酸;双链 DNA 的空间结构相同,均为双螺旋结构;不同生物的 DNA 分子都遵循碱基互补配对原则。因此,不同生物的 DNA 分子能在相关酶的催化下拼接起来。

课时 2 基因工程的基本操作程序

刷基础

1. A 【解析】基因工程中,目的基因通常是编码蛋白质的基因,也可以是具有调控功能的核酸序列, **A 错误**。

突破点: 目的基因不一定是编码蛋白质的基因,也可以是非编码序列等

2. A 【解析】以 mRNA 为模板合成单链 cDNA 的过程需要逆转录酶,将双链 cDNA 片段与适当的载体拼接时,需要用限制酶切割载体和 cDNA,使它们产生相同的黏性末端或平末端,再用 DNA 连接酶连接, **A 正确**;由于基因的选择性表达,不同组织细胞中表达的基因不完全相同,即转录出的 mRNA 不完全相同,所以从不同组织细胞中提取的 mRNA 建立的 cDNA 文库也不完全相同, **B 错误**;cDNA 文库中的基因是由常考点: cDNA 文库为部分基因文库,且真核生物的 cDNA 分子中不存在非编码区,可在原核细胞中表达

mRNA 逆转录形成的,终止密码子位于 mRNA 上,逆转录后生成的 cDNA 会保留其对应碱基序列, **C 错误**;cDNA 文库中的基因是由 mRNA 逆转录形成的,真核生物基因转录时,部分序列(如启动子、终止子、内含子序列等)不转录,所以从 cDNA 文库中筛选出的目的基因与真核生物中的原基因不相同, **D 错误**。

3. ABC

教材变式 本题是教材 P96“边做边学”的变式题。教材中详细介绍了 DNA 的粗提取和鉴定的过程及操作;本题以选择题的形式对该重点内容进行考查,帮助我们巩固实验相关知识,提升应用能力和应试能力。

【解析】DNA 不溶于酒精,但细胞中的某些蛋白质溶于酒精,可用酒精将 DNA 与蛋白质等初步分离,加入溶液甲后获得的白色丝状物主要为 DNA,故溶液甲为体积分数为 95% 的冷酒精, **A 错误**;溶液乙为二苯胺试剂,鉴定 DNA 时需要进行沸水浴加热, **B 错误**;猪为哺乳动物,其成熟的红细胞无细胞核等,

不含 DNA,故用猪血作此实验的材料提取的 DNA 很少, **C 错误**;粗提取的 DNA 中含有核蛋白、多糖和 RNA 等杂质, **D 正确**。

方法总结 DNA 的粗提取与鉴定的原理

- (1) DNA 不溶于酒精但某些蛋白质溶于酒精。
- (2) DNA 在不同浓度的 NaCl 溶液中溶解度不同。
- (3) DNA 与二苯胺试剂反应呈现蓝色。

4. B 【解析】启动子是 RNA 聚合酶识别和结合的部位,能启动转录过程, **A 正确**。若 b 表示终止子,其具有终止转录的作用,

教材链接:教材 P97 “启动子是位于目的基因上游的一段 DNA 序列,也是 RNA 聚合酶识别、结合的部位。RNA 聚合酶与启动子的结合能驱动基因开始转录,进而合成出相应的 mRNA。”

用;终止密码子位于 mRNA 上,作用是使翻译停止, **B 错误**。载体中可能含有多个限制酶切割位点,供外源基因插入载体中,便于构建基因表达载体, **C 正确**。若 d 表示复制原点,则其能使载体在受体细胞中进行自我复制, **D 正确**。

5. ACD 【解析】启动子位于基因上游,是 RNA 聚合酶识别和结合的部位,能驱动基因转录,而密码子位于 mRNA 上, **A 错误**;有些不同种限制酶切割后能产生相同的黏性末端,构建基因表达载体时,可以用这些不同种限制酶切割含有目的基因的片段和载体, **B 正确**;转录时 RNA 聚合酶沿着转录模板链的 3'端向 5'端移动,因此构建基因表达载体时,目的基因

常考点:RNA 聚合酶在转录模板链上的移动方向为 3'端→5'端;RNA 链的延伸方向为 5'端→3'端

的转录模板链的 3'端应与启动子连接, **C 错误**;基因表达载体上的抗生素抗性基因常用于重组 DNA 分子的筛选,而抗生素合成基因一般不用于常规的重组 DNA 筛选, **D 错误**。

6. C 【解析】目的基因必须插入启动子和终止子之间才能进行表达, **A 正确**。目的基因和质粒的连接要用到 DNA 连接酶, **B 正确**。切割图中目的基因和质粒时只要形成的黏性末端相同,就可以将二者连接,不一定要选用相同的限制酶,

关键点:切割目的基因和质粒时只要形成的黏性末端相同, DNA 连接酶就可以将二者连接,这类限制酶被称为同尾酶

C 错误。结合图 1、2 和表格可知,图中 *EcoR* I 的酶切位点位于目的基因内, *BamH* I 的酶切位点位于标记基因内, *Nhe* I 在质粒上无相应识别序列,且其他酶与 *BamH* I 和 *Nhe* I 产生的黏性末端不同,故切割目的基因应选 *Mfe* I 和 *Hind* III;质粒上无 *Mfe* I 的酶切位点,但 *Mfe* I 与 *EcoR* I 切出的黏性末端相同,故可选 *EcoR* I 和 *Hind* III 切割质粒, **D 正确**。

7. D 【解析】用同一种限制酶切割质粒和含目的基因的 DNA 片段后,目的基因可能会反向连接到质粒上,因此目的基因表达的产物可能不相同, **A 错误**。若只使用 *Sma* I 切割质粒和含目的基因的 DNA 片段,会破坏质粒上的氨苄青霉素抗性基因,使含有目的基因的受体菌不能在含氨苄青霉素的培养基中生长, **B 错误**。若选择 *BamH* I 和 *Sma* I 切割质粒和含目的基因的 DNA 片段,重组质粒上含有正常的四环素抗性基因,能在含四环素的培养基中生长的受体菌有可能导入

了重组质粒,也有可能导入了空质粒, **C 错误**。含目的基因的 DNA 片段上有 *EcoR* I 的识别序列但没有 *Bcl* I 的识别序列,不能使用 *Bcl* I 切割含目的基因的 DNA 片段;因为 *Sau3A* I 切割后产生的黏性末端与 *Bcl* I 切割后产生的黏性末端相同,故若用 *EcoR* I 和 *Bcl* I 切割质粒,则需用 *EcoR* I 和 *Sau3A* I 切割含目的基因的 DNA 片段, **D 正确**。

8. B 【解析】将目的基因导入裸子植物细胞采用最多的方法是农杆菌转化法, **A 错误**;植物的受体细胞可以是受精卵,也可以是叶肉细胞等体细胞, **B 正确**;将目的基因导入大肠杆菌一般需要先利用 Ca^{2+} 处理大肠杆菌,使其处于感受态, **C 错误**;农杆菌细胞内含有 Ti 质粒,目的基因插入 Ti 质粒的 T-DNA 上,侵染植物细胞后, T-DNA 转移到被侵染的细胞,并整合到该细胞的染色体 DNA 上,属于基因重组, **D 错误**。

9. A 【解析】目的基因两侧分别有限制酶 *Sma* I 和 *Pst* I 的识别序列,且质粒上也含有这两种限制酶的切割位点,所以可同时选用限制酶 *Pst* I、*Sma* I 对含目的基因的 DNA 进行切割, **A 正确**;将目的基因导入植物细胞,常用花粉管通道法或农杆菌转化法, **B 错误**;过程③为植物组织培养,不需要用纤维素酶和果胶酶处理, **C 错误**;过程④中,若利用探针在试管苗细胞内检测到目的基因,不能说明转基因成功,转基因成功的标志是目的基因成功表达,并出现相应性状, **D 错误**。

10. C 【解析】可采用分子杂交技术检测目的基因是否转录出了 mRNA,若转录成功,则会出现杂交带, **A 正确**;用相应的抗体进行抗原—抗体杂交,可检测目的基因是否翻译成蛋白质,若有相应蛋白质合成,则会出现相应的条带, **B 正确**;显微镜下无法看到基因,检测受体细胞是否导入了目的基因可以用 PCR 技术, **C 错误**;从个体层面,做抗虫或抗病的接种实验可检测转基因生物是否具有抗性以及抗性的程度, **D 正确**。

11. B 【解析】插入外源基因的细菌能在含氨苄青霉素的培养基上生长,说明抗氨苄青霉素基因没有被破坏;能在含四环素的培养基上生长,说明抗四环素基因没有被破坏,故外源基因插入位置是 c, **A 错误**。插入外源基因的细菌能在含氨苄青霉素的培养基上生长,说明抗氨苄青霉素基因没有被破坏;不能在含四环素的培养基上生长,说明抗四环素基因被破坏,故外源基因插入位置是 b, **B 正确**, **C 错误**。插入外源基因的细菌在含氨苄青霉素的培养基上不能生长,说明抗氨苄青霉素基因被破坏,故外源基因插入位置是 a, **D 错误**。

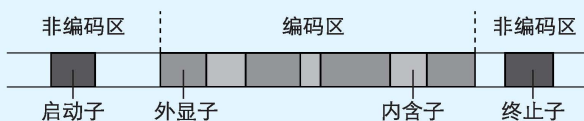
刷易错

★易错点 混淆复制原点、启动子、起始密码子及终止子、终止密码子

12. ABD 【解析】启动子和复制原点均位于 DNA 分子上,是相应的 DNA 序列,起始密码子位于 mRNA 上,是相应的 RNA 序列, **A 正确**;由该质粒的限制酶识别位点可知,用 *BamH* I

切割质粒会破坏标记基因,用 *EcoR* I 切割质粒会破坏复制原点,因此应选择 *Sma* I 和 *Hind* III 切割质粒, **B 正确**;启动子是 RNA 聚合酶识别和结合的部位,驱动相关基因转录出相应的 mRNA, **C 错误**;该质粒中标记基因的作用是便于重组 DNA 分子的筛选, **D 正确**。

易错警示 由于对启动子与终止子、起始密码子与终止密码子及复制原点的本质、作用理解不清楚而出现错误。启动子、终止子和复制原点的本质都是 DNA 序列,而起始密码子和终止密码子的本质是 RNA 序列。启动子是一段有特殊结构的 DNA 片段,位于基因的上游,它是 RNA 聚合酶识别和结合的部位,有了它才能驱动基因转录出 mRNA;终止子相当于一盏红色信号灯,使转录在所需要的地方停止;复制原点要能与特定的受体细胞相匹配,使外源基因在受体细胞中稳定复制并遗传。起始密码子是位于 mRNA 上的密码子,是翻译开始的地方;终止密码子也是位于 mRNA 上的密码子,是翻译结束的位置。一个真核生物基因中编码区与非编码区、内含子与外显子、启动子与终止子的位置关系如下:



刷提升

1. C 【解析】①→②利用两种不同限制酶处理,能避免含抗虫基因的 DNA 片段自身环化, **A 正确**;②→③可用氯化钙处理农杆菌,使之处于易吸收周围环境中 DNA 分子的生理状态,这样有助于促进重组 Ti 质粒转入农杆菌细胞中, **B 正确**;③→④用农杆菌侵染植物细胞,重组 Ti 质粒上的 T-DNA 片段整合到植物细胞的染色体 DNA 上, **C 错误**;④→⑤利用植物组织培养技术,原理是植物细胞的全能性, **D 正确**。

2. B 【解析】若从该 DNA 片段中直接获取蛛丝蛋白基因, DNA 每条链上会破坏 2 个磷酸二酯键,共会破坏 4 个磷酸二酯键, **A 正确**;由于 DNA 聚合酶只能从引物的 3' 端延伸子链,图中的磷酸基团端为 5' 端,羟基端为 3' 端,子链和模板链反向平行,因此根据子链的延伸方向可知,图中与引物结合的部位是 2、3, **B 错误**;若受体细胞为大肠杆菌,先用 Ca^{2+} 处理使其成为感受态细胞,容易从周围环境吸收 DNA 分子, **C 正确**;复性温度过低可能造成引物与模板错配,引物与模板的结合位点增加,可能会导致 PCR 扩增产物不止一种,电泳结果出现不止一条条带, **D 正确**。

3. C 【解析】复性是在高温解旋后降低温度让引物与模板链结合,复性温度不宜太低,避免引物和模板链错配形成双链,

常考点: 复性温度过低将会导致非特异性扩增产物增加

A 正确;电泳时 DNA 分子迁移的速率与 DNA 分子的大小和构象等有关,如电泳一段时间后,较大的 DNA 分子迁移距离小,离加样孔近,而较小的 DNA 分子迁移距离大,离加样孔远, **B 正确**;由于使用的引物是甲和丙,没有与目的基因相应位置配对,因此不管目的基因正向连接还是反向连接,均可能扩增出 450 bp 的片段, **C 错误**;选取引物乙、丙,扩增出 350 bp 的片段时,可以说明目的基因正向连接,若反向连接,则不能扩增出有效片段, **D 正确**。

4. BD 【解析】若 Y 定位于细胞膜,蛋白 y 无法与转录激活结构域(AD)融合,故不能用于验证 X、Y 的相互作用, **A 错误**;若酵母在缺乏组氨酸的 X-Gal 培养基上生长出蓝色菌落,说明 *HIS3* 基因和 *LacZ* 基因均表达,验证了 X、Y 存在特异性相互作用, **B 正确**;培养基中添加的 X-BD、Y-AD 复合物无法进入细胞,无法观察其相互作用, **C 错误**;酵母细胞中报告基因自发激活的转录因子会导致 *HIS3* 基因和 *LacZ* 基因表达,会使酵母菌在缺乏组氨酸的 X-Gal 培养基上生长出蓝色菌落,造成假阳性反应, **D 正确**。

5. B 【解析】DNA 不溶于酒精,但细胞中某些蛋白质等溶于酒精,利用这一原理,可以将 DNA 与蛋白质等初步分离, **A 错误**;由于 DNA 在 2 mol/L NaCl 溶液中溶解度较大,且 DNA 遇二苯胺试剂会呈现蓝色,所以将提取的 DNA 溶于 2 mol/L NaCl 溶液后,可用二苯胺试剂在沸水浴条件进行鉴定, **B 正确**;电泳时,电泳缓冲液没过凝胶 1 mm 为宜, **C 错误**;质粒的本质是环状 DNA,单独用限制酶 I 和 II 处理后电泳均只有一条条带,可能该质粒上各有这些限制酶的一个切割位点, **D 错误**。

6. C 【解析】sgRNA 可指引 Cas9 结合到特定的 DNA 序列,它不是合成 Cas9 的模板,该过程中 sgRNA 的部分碱基序列可与靶基因特定部位的碱基序列互补配对, **A、B 错误**;由题意可知, Cas9 的作用与限制酶类似,可在特定位点切割 DNA,使相应部位的核苷酸之间的磷酸二酯键断裂, **C 正确**;基因编辑可能造成表达的蛋白质功能丧失,但不一定不能转录,故 B 基因被编辑后可能依然可以转录,只是表达的蛋白质会改变, **D 错误**。

7. ABD 【解析】目的基因两侧和质粒中均含有限制酶 *Xho* I、*Nhe* I 的识别序列,将目的基因插入质粒中时,可能用到限制酶 *Xho* I、*Nhe* I 切割目的基因和质粒,再用 DNA 连接酶将目的基因和质粒连接在一起, **A 正确**;将目的基因导入大肠杆菌时,需要用 Ca^{2+} 处理,使其处于易吸收周围环境中 DNA 分子的状态, **B 正确**;按图示构建的重组质粒导入大肠杆菌后,由于目的基因的转录方向和启动子启动转录的方向相反,大肠杆菌不能正常表达该目的基因, **C 错误**;在含 X-gal

常考点: 目的基因应正向插入载体的启动子与终止子之间,才能正常表达

的培养基上培养导入了重组质粒的大肠杆菌, β -半乳糖苷酶

基因编码产生的 β -半乳糖苷酶可分解 X-gal 产生蓝色物质,使菌落呈蓝色,D 正确。

8. (1) 变性、复性、延伸 引物 II、III 使 DNA 聚合酶能够从引物的 3' 端开始连接脱氧核苷酸

(2) 防止 M 蛋白基因自身环化, 保证 M 蛋白基因与质粒正向连接 便于重组 DNA 分子的筛选

(3) *Xma* I 酶切出的黏性末端与 M 蛋白基因一端的黏性末端相同, *Sma* I 酶切出的末端为平末端, 无法直接与 M 蛋白基因的黏性末端连接 *Bgl* II、DNA 连接

【解析】(1) PCR 是一项根据 DNA 半保留复制的原理, 在体外提供参与 DNA 复制的各种组分与反应条件, 对目的基因的核苷酸序列进行大量复制的技术, 其过程一般可分为变性、复性、延伸三步。DNA 分子是由两条链按反向平行方式盘旋成的双螺旋结构, DNA 的每条单链都具有两个末端, 有一个游离的磷酸基团的一端为 5' 端, 另一端有一个羟基 (—OH), 称作 3' 端, 而且 DNA 聚合酶只能将脱氧核苷酸加到引物的 3' 端。据此分析并据图 1 可知, PCR 过程应选择的引物是 II、III, 引物的作用是使 DNA 聚合酶能够从引物的 3' 端开始连接脱氧核苷酸。

(2) 在 M 蛋白基因两端设计不同黏性末端, 其目的是在构建基因表达载体时, 防止 M 蛋白基因自身环化, 保证 M 蛋白基因在质粒上正向连接。质粒中氨苄青霉素抗性基因属于基因工程中的标记基因, 标记基因的作用是便于重组 DNA 分子的筛选。

(3) 分析图 2 可知, *Bgl* II 酶切出的黏性末端的碱基序列能够与 M 蛋白基因右侧的黏性末端的碱基序列互补配对, *Xma* I 酶切出的黏性末端与 M 蛋白基因左侧的黏性末端相同, 而 *Sma* I 酶切出的末端为平末端, 无法直接与 M 蛋白基因的黏性末端连接; *Nhe* I 酶切出的黏性末端无法与 M 蛋白基因的黏性末端互补配对。综上分析, 为实现质粒和 M 蛋白基因的高效连接, 切割质粒时选用限制酶 *Xma* I 而不选用限制酶 *Sma* I。为将 M 蛋白基因连接到质粒上, 还需要用 *Bgl* II 切割质粒, 再用 DNA 连接酶将切割后的质粒与 M 蛋白基因连接。

9. (1) 逆转录 不完全一致 以花生细胞的 mRNA 通过逆转录过程获得的 cDNA 不含内含子、启动子和终止子等非编码序列

(2) 使 DNA 聚合酶能够从引物的 3' 端开始连接脱氧核苷酸 5' 端

(3) *Xba* I 和 *Hind* III 通过农杆菌的转化作用, 使目的基因进入水稻细胞并整合到其染色体 DNA 上

(4) 对转基因水稻植株接种相应的真菌, 观察其是否患稻瘟病

【解析】(1) 由 mRNA 获得 cDNA 的过程为逆转录, 此过程需要逆转录酶的催化。DNA 转录为 mRNA 时, 基因中内含子相对应的序列会被剪切, 启动子和终止子等非编码序列没有被转录。以花生细胞的 mRNA 通过逆转录过程获得的 cDNA, 不含内含子、启动子和终止子等非编码序列, 因此, 通过逆转录获得的 S 基因与花生细胞中的 S 基因的碱基序列不完全一致。

(2) 用 PCR 技术扩增 S 基因时, 需要设计引物, 引物的作用是使 DNA 聚合酶能够从引物的 3' 端开始连接脱氧核苷酸。为了使目的基因能够被限制酶切割, 扩增目的基因时, 需要在引物的 5' 端添加限制酶的识别序列。

(3) 依据图示可知, 选用 *Bam* HI 会破坏目的基因, 而 *Sal* I 的酶切位点不在 T-DNA 中, 选用 *Eco* RI (在 S 基因的左右两侧均有酶切位点) 可能导致错误连接等, 再根据 S 基因的转录方向可知, 只有选用 *Xba* I 和 *Hind* III 切割 S 基因的 cDNA 和载体, 才能确保目的基因插入载体中方向正确。用

常考点: 双酶切法可避免目的基因和质粒任意连接, 还可以避免质粒、目的基因自身环化

农杆菌侵染水稻叶片外植体, 是利用了农杆菌 Ti 质粒的 T-DNA 可转移到被侵染的细胞, 并整合到该细胞的染色体 DNA 上, 通过农杆菌的转化作用, 使目的基因能进入水稻细胞并整合到其染色体 DNA 上。

(4) 转基因水稻是否表现出抗性, 需要进行个体生物学水平的鉴定, 鉴定的方法是对转基因水稻植株接种相应的真菌, 观察其是否患稻瘟病。

刷素养

10. (1) *L-PG* 和 *PD* 两端都分别具有 (同源序列) PA、PB

(2) P_1 和 P_6 。

(3) 不需要目的基因和载体上存在特定的限制性酶酶切位点, 可直接通过同源序列实现连接; 利用同源序列的特异性配对, 能精准实现目的基因的定向插入或替换

(4) 鉴别受体细胞是否含有目的基因, 从而将含目的基因的细胞筛选出来

(5) 转 *L-PG* 基因酵母菌培养液中检测到较高含量的乳酸乙酯

【解析】(1) 图 1 中 *L-PG* 与 *PD* 发生同源重组的前提是 *L-PG* 与 *PD* 两端都分别具有同源序列 PA、PB。

(2) 若要获得图 2 所示的含 PA 和 PB 片段的 *L-PG* 并进行 PCR 扩增, 则最好选择图 2 中的引物 P_1 和 P_6 , 可以将 PA、PB 片段和 *L-PG* 一起扩增。

(3) 与传统双酶切法构建基因表达载体相比, 利用同源重组技术构建基因表达载体的优点是不需要目的基因和载体上存在特定的限制性酶酶切位点, 可直接通过同源序列实现连接; 利用同源序列的特异性配对, 能精准实现目的基因的定向插入或替换。

(4) Amp^R 可作为标记基因用于酵母菌的筛选,标记基因的作用是鉴别受体细胞是否含有目的基因,从而将含目的基因的细胞筛选出来。

(5) 鉴定 $L-PG$ 在转基因酵母菌中成功发挥作用的依据是转基因酵母菌培养液中检测到较高含量的乳酸乙酯。

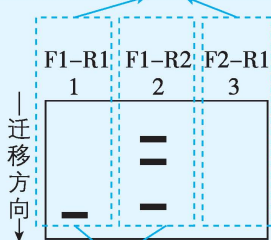
专题4 PCR技术

刷难关

1. C

题图解读

F1-R1能扩增出目的片段,说明F1和R1为有效引物;F2-R1无法扩增出目的片段,说明F2为无效引物



F1-R1只扩增出一种片段,说明能够用于特异性扩增目的基因片段;F1-R2扩增出三种片段,说明其不能用于特异性扩增目的基因片段,即R2引物无法用于特异性扩增目的基因

【解析】引物需根据目的基因的碱基序列进行设计,本研究中 $pfcr$ 基因为目的基因,故 F1、F2、R1 和 R2 四种备选引物是根据 $pfcr$ 基因序列设计的,A 正确;PCR 反应体系中需要加入 Mg^{2+} 以激活耐高温的 DNA 聚合酶,B 正确;由题图解读可知,

破点:真核细胞和细菌的 DNA 聚合酶都需要 Mg^{2+} 激活。因此,PCR 反应缓冲液中一般要添加 Mg^{2+} 。

能用于特异性扩增 $pfcr$ 基因的引物为 F1、R1,C 错误;一个 DNA 分子扩增 n 次,得到 2^n 个 DNA 分子,由于每个新合成的 DNA 子链都需要引物,所以实际上消耗的引物数为 $2^{n+1}-2$,当

关键点:最初的模板 DNA 两条链不需要引物

$n=4$ 时,共消耗引物 $2^{4+1}-2=30$ (个),D 正确。

2. CD 【解析】利用 PCR 技术扩增目的基因时不需要解旋酶,该过程中 DNA 的解聚是通过高温完成的,而子链延伸过程需要耐高温的 DNA 聚合酶,A 正确。引物是子链合成延伸的基础,DNA 聚合酶从引物 3'端开始延伸子链,也可以说子链沿着模板链的 3'→5'方向延伸,B 正确。1 个 DNA 分子在第三轮循环后即 DNA 复制 3 次,共形成 8 个 DNA 分子,其中两条脱氧核苷酸链等长的 DNA 分子只有 2 个,占 $\frac{1}{4}$,C 错误。1 个 DNA 复制 n 次,共形成 2^n 个 DNA,其中 2 个 DNA 含有母链和子链(含有引物 A 或引物 B),(2^n-2) 个 DNA 只有子链(含有引物 A 和引物 B)。理论上推测,第四轮循环产物共有 $2^4=16$ (个) DNA 分子,其中含有引物 A 的有 15 个,占比为 $\frac{15}{16}$,D 错误。

3. B 【解析】 LTB 和 STI 基因能够融合的关键是 P2 和 P3 两种引物的部分区域能发生碱基互补配对,从而将两个基因融合在一起,A 正确;DNA 的合成方向是从子链的 5'端向 3'端延伸的,因此 PCR 扩增时,完整的引物 P2、P3 应位于子链的 5'端才能保证扩增顺利进行,B 错误;②过程不需要加入引物,两条母链碱基互补配对的区域可以作为子链合成的引物,为 DNA 聚合酶提供 3'端,C 正确;电泳时 DNA 的迁移速率主要受 DNA 片段长度影响,DNA 片段越长,其迁移速率越慢, $LTB-STI$ 融合基因长度约是 LTB 基因、 STI 基因长度之和,故最可能是图 2 中的条带 3,D 正确。

4. (1) 耐高温的 DNA 聚合酶 将游离的脱氧核苷酸连到引物的 3'端(或催化合成子链)

(2) T-DNA 两端已知的碱基序列 ①④

(3) 5'-CTGTC-3'

(4) A

(5) 琼脂糖凝胶电泳

【解析】(1)PCR 技术需要在高温条件下进行,故进行 PCR 扩增需要耐高温的 DNA 聚合酶。该酶用于子链延伸,将游离的脱氧核苷酸连到引物的 3'端。

(2)扩增出 T-DNA 插入位置两侧的未知序列时,需要先根据 T-DNA 两端已知的碱基序列设计两种特异性引物序列。PCR 扩增时,子链沿引物的 3'端延伸,故利用图中的引物①④组合可扩增出 T-DNA 两侧的未知序列。

(3)通过 PCR 技术制备与 T-DNA 的 b 链相同的单链作为某些检测的探针,则需以 a 链为模板,引物的序列与 b 链 5'端的序列相同,故引物由 5'→3'的前 5 个碱基序列为 5'-CTGTC-3'。

(4)由于 $Sal\ I$ 的识别序列为 5'-G↓TCGAC-3',则扩增的未知序列中应该含有相关序列,A 符合题意。

(5)PCR 扩增产物一般通过琼脂糖凝胶电泳技术进行鉴定。

5. (1) 模板、引物

(2) C、D

(3) 限制酶、DNA 连接酶

(4) P3、P4

(5) 电泳只能检测 DNA 的大小(或长度),不能检测具体的序列

【解析】(1)PCR 反应所需的基本条件:引物、耐高温的 DNA 聚合酶、4 种脱氧核苷酸、模板和缓冲液(其中含 Mg^{2+}) 等。分别进行 PCR 扩增片段 F_1 与片段 F_2 时,配制的两个反应体系中不同的有模板和引物。

(2)由图 1 可知,引物 F_2-F 用于扩增 F_2 片段,引物 F_1-R 用于扩增 F_1 片段。C 项中 5'-GACGAG-3'与 $EGFP$ 基因右侧部分序列相同,5'-CTGCAG-3'与 $AnBI$ 基因左侧部分序列相

同,因此引物 F₂-F 应选用 C。D 项中 5'-CTGCAG-3'能与 *AnB1* 基因左侧部分序列进行碱基互补配对,5'-CTCGTC-3'能与 *EGFP* 基因右侧部分序列进行碱基互补配对,因此引物 F₁-R 应选用 D。

(3)传统构建重组载体需要使用限制酶切割载体、目的基因,使其具有相同的黏性末端,再用 DNA 连接酶将目的基因和载体连接成重组载体。将 PCR 产物片段与线性质粒载体混合后,在重组酶的作用下可形成环化质粒,不需要使用限制酶和 DNA 连接酶。

(4)*EGFP* 长度为 720 bp, *AnB1* 长度为 390 bp,二者之和为 720 bp+390 bp=1 110 bp,用引物 F₁-F 和 F₂-R 进行了 PCR 扩增,扩增产物的大小应接近 1 110 bp,根据图 3 中结果判断,可以舍弃的质粒有 P3、P4。

(5)电泳技术仅能用于分析待检测 DNA 分子的大小,无法确定待检测 DNA 分子的碱基序列,因此对于 PCR 产物电泳结果符合预期的质粒,通常需进一步通过基因测序确认。

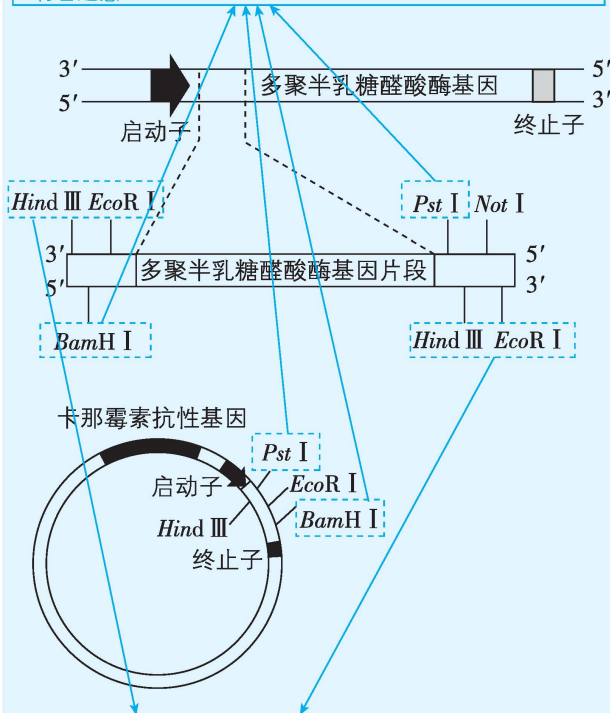
专题 5 基因表达载体的构建

刷难关

1. C

题图解读

*Bam*H I 酶切位点在多聚半乳糖醛酸酶基因所在的 DNA 片段上靠近启动子的位置,在载体上靠近终止子的部位;*Pst* I 酶切位点在多聚半乳糖醛酸酶基因所在的 DNA 片段上靠近终止子的位置,在载体上位于靠近启动子的部位,因此要在载体中反向插入多聚半乳糖醛酸酶基因片段,可以使用 *Bam*H I 和 *Pst* I, C 符合题意



需要将多聚半乳糖醛酸酶基因片段反向插入载体,该基因片段两端均有 *Hind* III 和 *Eco*R I 的切割位点,用 *Hind* III 或 *Eco*R I 酶切载体和多聚半乳糖醛酸酶基因所在的 DNA 片段,均不能保证将多聚半乳糖醛酸酶基因片段反向插入载体, A、B 不符合题意。载体上没有 *Not* I 的酶切位点,因此不能使用 *Not* I, D 不符合题意

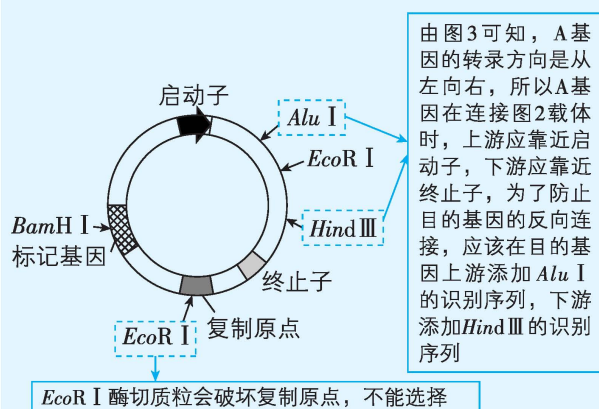
2. D 【解析】PCR 扩增时,只需要少量的外源目的基因作模板,因为 PCR 技术可以在短时间内大量扩增目的基因, A 错误。同源重组需要在外源基因两端分别引入序列 A 和 B,该过程可通过 PCR 实现,引物 P3 和 P4 只能扩增外源基因,引物 P2 和 P5 不能有效扩增外源基因,而引物 P1 和 P6 同时包含短序列(A 或 B)和外源基因部分序列,可在有效扩增外源基因的同时保证外源基因两侧的短序列与受体菌 DNA 上的短序列相同,所以 PCR 时需加入足量且等量的引物 P1 和 P6, B 错误。耐高温的 DNA 聚合酶在 PCR 扩增中催化 DNA 子链的延伸, DNA 酶是催化 DNA 水解的酶,构建表达载体不需要 DNA 酶, C 错误。由于酿酒酵母基因组有多个 AB 短序列,要实现外源基因在受体菌 DNA 特定的 AB 之间定点插入,仅仅有两端引入 A 和 B 的外源基因片段是不够的,还需要导入基因识别工具,来精准地识别特定的 DNA 位点,以便外源基因插入, D 正确。

3. (1) Mg²⁺ 耐高温的 DNA 聚合酶 引物 2 和引物 3

(2) 5' *Alu* I *Hind* III 可以防止目的基因和质粒自身环化以及目的基因与质粒反向连接

(3) b

题图解读



【解析】(1)PCR 技术要在缓冲体系中添加 Mg²⁺(能激活 DNA 聚合酶)、4 种脱氧核苷酸(合成 DNA 的原料)、两种引物(使子链沿引物的 3'端延伸)、模板和耐高温的 DNA 聚合酶等。DNA 分子中游离的磷酸基团端是 5'端,游离的羟基端是 3'端,且引物与母链的方向相反,由于需要在引物的 3'端延伸子链,因此选择引物 2 和引物 3。

(2)由于子链沿着 5'→3'的方向延伸,需要在所选引物的 5'端分别增加相应的限制酶识别序列。由题图解读可知,应该在目的基因上游添加 *Alu* I 识别序列,下游添加 *Hind* III 识别序列。采用“双酶切”法同时处理质粒和目的基因的的优点是可以防止目的基因和质粒自身环化以及目的基因与质粒反向连接。

(3)转录过程中, mRNA 的延伸方向为 5'→3',转录模板链的

方向与之相反,因此图3中的基因表达时,b链作为转录的模板链。

4. (1) 四种脱氧核苷酸、耐高温的 DNA 聚合酶 ①④

(2) *Sma* I *Xho* I DNA 片段浓度、DNA 片段末端类型

(3) 不含 未发生交换

(4) 在细胞中的表达水平相对恒定

【解析】(1) PCR 反应除了图1中已有的组分外,还需要添加缓冲液(含 Mg^{2+})、耐高温的 DNA 聚合酶(用于催化 DNA 的合成)、四种脱氧核苷酸(原料)。PCR 扩增时,引物需要与模板链进行碱基互补配对,且引物的延伸方向是 $5' \rightarrow 3'$,分析 *pflB* 基因两端的序列和各引物序列,①中 $5'$ 端含有 *Bam*H I 识别序列,且其大部分碱基序列能与 *pflB* 基因的一条链的 $5'$ 端部分序列互补配对;④中 $5'$ 端含有 *Pst* I 识别序列,且其大部分碱基序列能与 *pflB* 基因的另一条链的 $5'$ 端部分序列互补配对,所以可选用的引物是①④。

(2) 观察图1可知,要将外源 *vgb* 基因定向插入 *19T-pflB* 质粒中,构建重组质粒,需要用与切割含目的基因的 DNA 片段相同的限制酶切割质粒,由步骤①可知,*pflB* 基因两端具有 *Sma* I 和 *Xho* I 的酶切位点,步骤②双酶切时,是要将 *Kan* 插入 *pflB-L-pflB-R* 片段的外侧,需使用的限制酶 a 和限制酶 b 分别是 *Sma* I 和 *Xho* I。影响 DNA 连接酶反应速率的因素有反应体系的温度、pH、酶浓度、底物浓度、DNA 片段末端的类型等。

突破点: 即 DNA 片段的浓度, DNA 连接酶催化的是 DNA 片段之间的连接反应,底物浓度会影响反应速率

(3) 因为没有选择压力会导致发生双交换的质粒丢失,而发生双交换的重组菌含有四环素抗性基因但不含卡那霉素抗性基因,所以受体菌应对应接种在含四环素和不含卡那霉素的培养基中培养。

关键点: 发生双交换后卡那霉素抗性基因随质粒丢失

只发生单交换会使受体菌含有四环素抗性和卡那霉素抗性,而未发生交换的受体菌也对四环素和卡那霉素有抗性,所以在两种培养基中均能生长的菌株是只发生单交换或未发生交换的受体菌。

(4) *rpsE* 基因是核糖体 S5 蛋白基因,核糖体是细胞进行蛋白质合成的场所,在细胞中的表达相对稳定,即该基因表达的特点是在细胞中的表达水平相对恒定。

5. (1) 显微注射法 减数第一次分裂前期

(2) 新霉素抗性基因(或 *neo*^R) 疱疹病毒胸苷激酶基因(或 *HSV-tk*) G418 和丙氧鸟苷

(3) 胰岛素基因和 *FGF1* 基因

【解析】(1) 将质粒导入动物细胞常用显微注射法。阳性标记基因替换目的基因的过程属于基因重组(同源重组),图中

阳性标记基因替换目的基因,类似于减数第一次分裂前期的染色体互换。

(2) 根据题干信息,新霉素抗性基因 *neo*^R 可使动物细胞获得对 G418 的抗性,应以新霉素抗性基因作为阳性标记基因;目的基因是被敲除的基因,操作后目的基因应该与阴性标记基因连接在打靶质粒上(无法表达),故以疱疹病毒胸苷激酶基因(*HSV-tk*)作为阴性标记基因,便于对发生非同源重组的基因组 DNA 进行筛选。由于导入新霉素抗性基因后,动物细胞对 G418(氨基糖苷类抗生素)有抗性,未导入的没有抗性,且 *HSV-tk* 的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,因此在培养基中添加 G418 和丙氧鸟苷,以筛选出基因敲除成功的细胞。

(3) FGF1 可能通过提升胰岛素敏感性降低血糖水平但不能直接降低血糖水平,也可能具有直接降低血糖水平的作用。若设计实验探究 FGF1 降低血糖浓度的原理,需敲除正常小鼠的胰岛素基因和 *FGF1* 基因作为模型小鼠进行实验。对模型小鼠进行 FGF1 和胰岛素处理,研究 FGF1 的作用。

6. (1) TCTAGAGG 琼脂糖凝胶电泳

(2) 组成型表达 与结合在启动子上的 S 蛋白结合 RNA 聚合

(3) 快速表达大量 E 蛋白,进而激活 F 基因的表达

(4) T 蛋白、L 蛋白

(5) 黑暗 红光照射 蓝光照射

【解析】(1) 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,已知 H 基因编码链编码区的 $3'$ 端 8 个碱基序列是 $5'-CCTCTAGA-3'$,故扩增 H 基因的编码区段时,结合到编码链上的引物序列是 $5'-TCTAGAGG-3'$ 。获得 H 基因产物后需要进行琼脂糖凝胶电泳,将符合要求的条带切割和回收,以便提取纯化并进行测序。

(2) 分析题意可知,P 和 S 基因的表达不需要其他条件诱导,因此其表达属于组成型表达,H 基因的表达属于红光诱导型表达。由图1可知,在没有红光诱导时,S 基因指导合成的 S 蛋白直接与启动子 Jub 结合,红光调控下,P 基因指导合成的 P 蛋白与结合在启动子上的 S 蛋白结合,启动 H 基因的表达。启动子是 RNA 聚合酶识别和结合的位点。

(3) 依据题意可知,科研人员引入蓝光激活系统的目的是激活 F 基因表达产生 F 蛋白,使酵母细胞彼此结合,进而沉淀在发酵罐底部。分析图2和图3可知,与 CYC 相连的 E1 基因的作用是接受蓝光照射后,快速表达大量 E 蛋白,进而激活 F 基因的表达。

(4) 依据题干可知,启动子 Jub 接受红光的诱导调控,启动子 CYC 接受蓝光的诱导调控,③和④为阻遏蛋白的结合位点,

其与阻遏蛋白结合后会抑制相关基因的表达。致死基因 N 的表达会诱导工程菌死亡,若①选用的启动子为 *Jub*,②处启动子为 *CYC*,在红光和蓝光同时照射时,红光调控 *Jub* 启动子使 T 基因表达出 T 蛋白,结合在③处,抑制了 L 基因的表达,④处无 L 蛋白与之结合,在蓝光调控下,*CYC* 启动 N 基因的表达而使酵母菌死亡,故③④处结合的阻遏蛋白分别是 T 蛋白、L 蛋白。

(5)根据题目信息,红光照射使产物增多,蓝光照射使菌体凝集,红、蓝光同时照射使工程菌死亡,Ⅰ菌种培养阶段应在黑暗条件下,使种群数量达到最适;Ⅱ菌种发酵阶段应在红光照射下,使抗菌肽 HI-3 在培养液中达到适宜浓度;Ⅲ产物分离阶段应使用蓝光照射,使工程菌凝集,回收发酵产物;Ⅳ安全处理阶段应使用红光、蓝光同时照射,杀死工程菌。

第二节 基因工程的应用价值

刷基础

1. B 【解析】植物细胞具有全能性,将目的基因导入植物体细胞,再利用植物组织培养技术,也能获得转基因植物, A 错误;将必需氨基酸含量多的蛋白质基因导入农作物,可提高农产品的品质, B 正确;将外源生长激素基因导入动物体内可提高动物生长速率,而生长素是植物激素, C 错误;将来源

易错点:生长素是植物激素,生长激素是动物激素

于某些病毒的特定基因导入植物细胞中,可培育出转基因抗病植物,并不是病毒的所有基因都可以, D 错误。

2. D 【解析】目的基因表达包括转录和翻译,转录过程需依赖 RNA 聚合酶, A 正确;重组 DNA 进入受体细胞后,不一定能稳定维持和表达其遗传特性, B 正确;培育转基因抗虫棉时,需将目的基因与运载体结合形成重组 DNA,以便将目的基因导入受体细胞中, C 正确;转基因抗虫棉可能会与野生植物杂交,造成基因污染,还可能会对生物多样性构成潜在的风险和威胁, D 错误。

常考点:通常在转基因抗虫或抗病作物附近种植同种非转基因作物,以免害虫或病菌种群对转基因作物的抗性基因频率迅速升高

3. C 【解析】天然产物中酶的种类较多,相比从天然产物中提取的酶,用基因工程获得的工业用酶的纯度较高, C 错误。

4. ABD 【解析】由于猪与人类的亲缘关系比灵长类与人类的亲缘关系更远,因此,与灵长类动物相比,猪体内隐藏的、可导致人类疾病的病毒更少, A 正确;利用基因编辑等方法对猪的器官进行改造,如设法导入某种调节因子抑制抗原决定基因的表达,可减小人体免疫系统对猪器官的免疫排斥反应, B 正确;器官移植后应使用免疫抑制剂,降低人体免疫系统的功能,提高移植器官的成活率, C 错误;器官短缺和免疫排斥是目前制约人体器官移植的两大难题, D 正确。

5. D 【解析】将目的基因导入动物细胞常用受精卵作受体细胞,采用显微注射技术进行操作, D 错误。

第三节 蛋白质工程

刷基础

1. D 【解析】该工程通过改造天然胰岛素的基因来改造其氨基酸序列,属于蛋白质工程,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为基础,对编码该蛋白的基因进行有目的的设计改造,以改造现有蛋白质或制造新的蛋白质, A 错误;天然蛋白质的合成过程是按照中心法则进行的,蛋白质工程的基本思路与中心法则相反, B 错误;蛋白质工程的实质是通过改造或合成基因,来改造现有蛋白质,或制造一种新的蛋白质,而非用特定的蛋白酶将特定部位的肽键水解, C 错误;蛋白质发挥功能必须依赖正确的高级结构, D 正确。

2. BCD 【解析】蛋白质工程直接操作的对象是基因,是在分子水平上对 DNA 分子直接进行操作,定向改变分子的结构, A 正确;图中的 b 为 mRNA, a 为具有氨基酸序列的多肽链,但密码子具有简并性, b 对应的单体序列不都是唯一的, B 错误;由于新水蛭素经过了重新设计,因而指导形成改造后的水蛭素的新水蛭素基因的碱基序列可能发生了改变, C 错误;蛋白质工程需要改造的基因进行表达得到目标蛋白,涉及了中心法则, D 错误。

3. (1)设计蛋白质的三维结构 推测氨基酸序列 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 中心
(2)(胰岛素)基因 没有 大肠杆菌是原核生物,没有内质网和高尔基体,不能对合成的蛋白质进行加工
(3)乳腺中特异表达的基因的启动子 显微注射
(4)将生理状况相同的糖尿病模型鼠随机均分为三组,一组皮下注射适量速效胰岛素,一组皮下注射等量天然胰岛素,一组皮下注射等量生理盐水,定时检测三组糖尿病模型鼠的血糖情况

【解析】(1)改造蛋白质从根本上来说就是改造基因,蛋白质工程的基本思路即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。速效胰岛素的生产过程遵循中心法则。

(2)研制速效胰岛素的过程中,科研人员的直接操作对象是(胰岛素)基因。在大肠杆菌中表达的新的胰岛素没有完全的生物活性,原因是大肠杆菌是原核生物,没有内质网和高尔基体,不能对合成的蛋白质进行加工。

关键点:大肠杆菌是原核生物,细胞中只有核糖体一种细胞器

(3)若想通过乳腺生物反应器来实现速效胰岛素的批量生产,则需要将新的胰岛素基因与乳腺中特异表达的基因的启动子等调控元件重组在一起,用显微注射的方法,导入哺乳动物如羊的受精卵中,培育出转基因动物,待其进入泌乳期,其乳汁中即含速效胰岛素。

(4)本实验的自变量是胰岛素的种类(速效胰岛素和天然胰岛素),检测指标是鼠的血糖情况,实验思路见答案。

刷易错

★易错点 混淆基因工程与蛋白质工程

4. A 【解析】蛋白质工程的直接操作对象是基因, A 错误;基因工程原则上只能生产自然界中已存在的蛋白质, B 正确;蛋白质工程通过改造或合成基因,来改造现有的蛋白质,或制造新的蛋白质, C 正确;蛋白质工程是在基因工程基础上延伸出来的第二代基因工程, D 正确。

易错警示 蛋白质工程与基因工程的区别与联系

		蛋白质工程	基因工程
区别	原理	中心法则的逆推	基因重组
	过程	预期蛋白质功能→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	获取目的基因→构建基因表达载体→将目的基因导入受体细胞→目的基因的检测与鉴定
	实质	定向改造现有蛋白质或制造人类所需要的新的蛋白质	定向改造生物的遗传特性,以获得人类所需的生物类型或生物产品
	结果	可以生产自然界中没有的蛋白质	生产自然界中已有的蛋白质
联系		蛋白质工程是在基因工程的基础上延伸出的第二代基因工程,两者都需要在分子水平上对基因进行操作	

第三章素养检测

刷速度

1. C 【解析】对水蛭素进行改造的直接操作对象为水蛭素基因, A 错误;改造好的水蛭素基因需要构建基因表达载体,再用显微注射法导入奶牛的受精卵中, B 错误;通过奶牛乳腺生物反应器批量生产活性高的水蛭素,需要将乳腺中特异表达的基因的启动子与目的基因重组在一起, C 正确;转基因

→ 常考点: 目的基因在特定组织细胞中选择性表达, 构建基因表达载体时, 需要将特异性表达的基因的启动子与目的基因相连

奶牛的绝大多数细胞(成熟的红细胞等无核细胞除外)中都含有水蛭素基因,该基因只在乳腺细胞中进行选择性表达,故水蛭素基因可以从大多数细胞中提取并检测,其 mRNA 只能从转基因奶牛的乳腺细胞中提取并检测, D 错误。

2. B 【解析】过程 a 是由 mRNA 合成 DNA 的过程,表示逆转录, b 表示 PCR, 可获得大量 GNA 基因, A 正确;在基因工程操作中,真正被用作载体的质粒,都是在天然质粒的基础上进行过人工改造的, B 错误;由图可知,将目的基因导入受体细胞时采用的是农杆菌转化法,由于 Ti 质粒的 T-DNA 可以转移到受体细胞并整合在受体细胞的染色体 DNA 上,因此过程 c 需将 GNA 基因插入 Ti 质粒的 T-DNA 中, C 正确;进行个体生物学水平鉴定时,可通过桃蚜接种实验检测图中菊花植株对桃蚜的抗性, D 正确。

3. B 【解析】①构建重组质粒过程中,增加载体和目的基因的浓度,可以增加目的基因与载体接触的机会,提高目的基因和载体重组的效率, A 正确;过程②表示将重组质粒导入受体细胞,培养基中加青霉素和 X-gal 可以用于筛选含有重组质粒的大肠杆菌,分析题图可知,应采用 BamH I 和 EcoR I 酶切,由于破坏了质粒中 LacZ 基因,导入重组质粒的大肠杆菌在该培养基上形成的菌落呈白色,故白色的大肠杆菌菌落才为所需菌落, B 错误;乙肝病毒外壳为蛋白质,可用抗原-抗体杂交法检测大肠杆菌是否成功表达出乙肝病毒外壳, C 正确;乙肝基因工程疫苗主要是利用重组细胞表达的乙肝病毒表面抗原蛋白制成的,不含和致病相关的基因,所以不会出现病毒的增殖和感染, D 正确。

→ 常考点: 与传统疫苗(由灭活的或减毒的病原体制成)相比,该乙肝基因工程疫苗由乙肝病毒表面抗原蛋白制成,因此其安全性较高

4. CD 【解析】表达载体需包含复制起点(自主复制)、转录和翻译信号(表达目的基因), A 正确;若两个 T-DNA 插入同一条染色体中,则目的基因和标记基因连锁在一起,自交后代不可能出现含 D6D 不含 bar 的植株, B 正确;两个 T-DNA 插入同源染色体中,减数分裂时同源染色体分离,自交后代中含 D6D 不含 bar 的植株占 $\frac{1}{4}$, C 错误;两个 T-DNA 插入非同源染色体中,可类比两对等位基因的自由组合,自交后代中含 D6D 不含 bar 的植株占 $\frac{3}{16}$, D 错误。

5. (1)防止 DNA 被水解 上清液

(2)原料和能量 Mg^{2+} 降低

(3)5' 空质粒、ErsI 与质粒正向连接的重组质粒、ErsI 与质粒反向连接的重组质粒 300 bp 和 6 400 bp

(4)CaCl₂ 溶液(或 Ca²⁺) 潮霉素 植物组织培养 反义 ErsI 的转录产物与草莓体内 ErsI 的转录产物结合,使翻译过程受阻

【解析】(1) EDTA 是一种 DNA 酶抑制剂,加入它的目的是抑制 DNA 酶的活性,防止 DNA 被水解。氯仿、异戊醇密度均大于水且不溶于水,DNA 不溶于氯仿、异戊醇,而蛋白质等杂质可溶,实验中加入氯仿、异戊醇离心后,DNA 存在于上清液。

(2) 在 PCR 体系中,加入的 dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP) 可为 DNA 的复制提供原料和能量。耐高温的 DNA 聚合酶需要 Mg^{2+} 激活。添加引物的序列不能过短,若过短,DNA 分子内部可能存在与引物结合的序列,会导致引物的特异性降低。

(3) 为使目的基因与质粒连接,在设计 PCR 引物扩增 *Ers1* 时,需在引物的 5' 端添加限制酶 *Xho* I 的识别序列。经 *Xho* I 酶切后的质粒和 *Ers1* 进行连接,连接产物经筛选得到的质粒主要有空质粒(质粒自身环化)、*Ers1* 与质粒正向连接的重组质粒、*Ers1* 与质粒反向连接的重组质粒三种类型。为表达出反义 RNA,需要筛选出反向连接的重组质粒,根据 *Ers1* 的转录方向,选择 *Hpa* I 和 *Bam* H I 对筛选的质粒进行双酶切,若产生长度约为 $200+100=300$ (bp) 和 $6\ 000+700-200-100=6\ 400$ (bp) 的两个片段,则该重组质粒为所需的基因表达载体。

(4) 农杆菌是原核生物,需要用 $CaCl_2$ 溶液 (Ca^{2+}) 处理,使其处于易吸收外源 DNA 的状态,进而将基因表达载体导入农杆菌细胞。基因表达载体上含有潮霉素抗性基因和卡那霉素抗性基因,属于标记基因,但卡那霉素抗性基因不在 T-DNA 上,无法整合到植物细胞的染色体 DNA 上,因此只能在含潮霉素的培养基上培养,筛选所需的植物细胞,再进

→ 常考点: 只有 T-DNA 上的基因才能整合到植物细胞染色体 DNA 上

行植物组织培养获得转基因植株。反义 *Ers1* 的转录产物与草莓体内 *Ers1* 转录出的 mRNA 碱基互补配对,使翻译过程受阻,得到的植株乙烯受体的合成受阻。

→ 关键点: 反义基因转录出的 RNA 和正常 mRNA 碱基互补可形成双链,导致 mRNA 无法翻译

6. (1) 启动子、终止子

(2) 牛的受精卵 显微注射

(3) 用这两种限制酶切割 DNA 形成不同的黏性末端,可避免质粒和目的基因的自身环化和反向连接

(4) 能 不能

(5) 乙、丙

【解析】(1) 基因工程的关键步骤是构建基因表达载体,基因表达载体含有启动子、目的基因、标记基因、复制原点和终止子等,因此人工构建 pBR322 质粒除了含特定限制酶切割位点、标记基因、复制原点外,还必须有启动子、终止子等。

(2) 受精卵具有全能性,因此若选用牛作为受体动物,可用牛的受精卵作为受体细胞。受体细胞不同,目的基因导入的方法也可能不一样,将目的基因导入动物细胞最常用的方法是显微注射法。

(3) *Eco* R I 和 *Pst* I 这两种酶切割质粒和目的基因形成不同的黏性末端,可避免质粒和目的基因的自身环化和反向连接,因此在构建基因表达载体时,与单独使用 *Eco* R I 相比,选择 *Eco* R I 和 *Pst* I 作为切割质粒和目的基因的限制酶可提高目的基因和载体正确连接的效率。

→ 常考点: 双酶切的优点是防止质粒和目的基因自身环化和反向连接

(4) 分析题图 1 可知,用 *Pst* I 酶切破坏了氨苄青霉素抗性基因 (Amp^R),导入重组质粒的受体细胞无氨苄青霉素抗性,但有新霉素抗性。甲培养基中不含氨苄青霉素,含重组质粒的受体细胞在甲培养基上能生存;乙培养基含新霉素和氨苄青霉素,含重组质粒的受体细胞在乙培养基上不能生存。

(5) 进行 PCR 扩增时,DNA 子链是沿引物的 3' 端延伸的,因此,据图 2 分析,利用 PCR 技术获取 *HSA* 基因时,应选择乙、丙作为引物。

7. (1) 逆转录 胰岛素基因在胰岛 B 细胞中才能表达

(2) ②③ 5' 端 30

(3) *Bam* H I 和 *Sal* I GGATCCGCTGCATGTTTA

(4) (经 $CaCl_2$ 溶液处理的) 大肠杆菌与重组质粒混合培养一段时间后,将大肠杆菌接种到添加了氨苄青霉素和 X-gal 的培养基上培养,筛选出白色的菌落即为工程菌

【解析】(1) 先提取胰岛 B 细胞中的总 RNA,通过一定方法分离纯化出胰岛素基因的 mRNA,经逆转录过程得到 cDNA,然后设计引物并利用 PCR 扩增胰岛素基因。选择胰岛 B 细胞提取 RNA 是因为胰岛素基因在胰岛 B 细胞中才能表达。

(2) DNA 复制时,子链延伸的方向是从 5' 端到 3' 端,因此 PCR 所需的引物组合是 ②③;据题干和题图 1 可知,在构建重组 DNA 分子时需要用 *Bam* H I 和 *Sal* I 酶切目的基因,已知胰岛素基因的 α 链为编码链,则 β 链为转录模板链,因此在引物 ② 的 5' 端添加 *Bam* H I 识别序列和强启动子。1 个胰岛素基因经过 4 个循环的 PCR,共消耗引物的数量为 $2^{4+1}-2=30$ (个)。

→ 常考点: DNA 分子进行 PCR 扩增消耗引物的数量和循环次数有关。1 个模板 DNA 经 n 轮循环,可得 2^n 个子代 DNA,共 2^{n+1} 条链,其中仅 2 条原始的母链不含引物,故消耗引物总量为 $2^{n+1}-2$

(3) 据题图和上述分析可知,为确保胰岛素基因正确插入题图 2 的载体中,需选择的限制酶组合是 *Bam* H I 和 *Sal* I。已知胰岛素基因 α 链的碱基序列为 5'-TTTAAAGGG...-3',强启动子的碱基序列为 5'-GCTGCATG-3',则胰岛素基因上游引物的碱基序列应依次包含 *Bam* H I 的识别序列、强启动子序列和 β 链 3' 端部分序列的互补序列,即其 18 个碱基序列为 5'-GGATCCGCTGCATGTTTA-3'。

(4)将胰岛素基因导入大肠杆菌并利用“蓝白斑”法筛选工程菌的过程见答案。

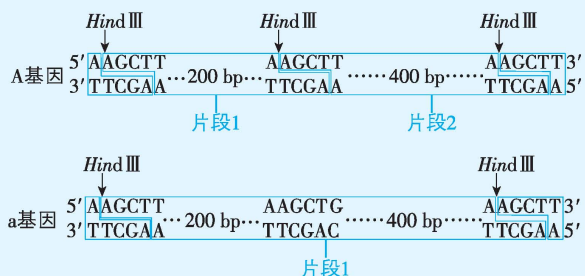
★**关键点:** ①采用感受态细胞法将目的基因导入细菌细胞; ②选择培养基中需要加入相应的抗生素和 X-gal

第三章高考强化

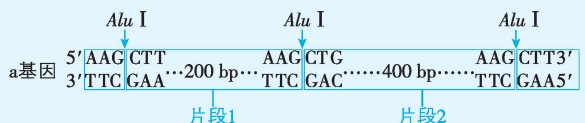
刷真题

1. BD

题图解读



由上图可知,产前诊断时,可用 *Hind* III 开展酶切鉴定, **D 正确**。



用两种限制酶分别酶切 a 基因后,产生的片段大小不一致, **C 错误**。

【解析】分析题图可知,基因 A 突变为致病基因 a 是 T—A 被 G—C 替换造成的, **A 错误**;用限制酶 *Hind* III 酶切 A 基因后会形成黏性末端,用限制酶 *Alu* I 酶切 A 基因后,形成的是平末端, **B 正确**。

★**考点:** 限制酶在它识别序列的中心轴线两侧切开 DNA 分子,产生的是黏性末端;限制酶在它识别序列的中心轴线处切开 DNA 分子,产生的是平末端

2. C

思路导引 将质粒导入大肠杆菌,可能会出现 3 种情况:

①无任何质粒导入大肠杆菌;②人源干扰素基因成功插入的重组质粒导入大肠杆菌;③目的基因未成功插入的质粒 K 导入大肠杆菌。这三种大肠杆菌用含卡那霉素和 X-gal 的平板培养,②③两种大肠杆菌均含卡那霉素抗性基因,故能存活,①不能存活;③由于 β -半乳糖苷酶基因完整,菌落呈蓝色,而②由于插入的人源干扰素基因破坏了 β -半乳糖苷酶基因,导致菌落呈白色,故含目的基因的菌落为白色。

【解析】提高大肠杆菌转化效率的常用方法是使用氯化钙(或 Ca^{2+})处理细胞,使其处于一种能吸收周围环境中 DNA 分子的生理状态,可增加筛选平板上白色和蓝色菌落数, **A 正确**;由思路导引可知,若筛选平板中仅含卡那霉素,目的基因成功插入的重组质粒导入的大肠杆菌以及目的基因未插入成功的质粒 K 导入的大肠杆菌在平板上均为白色菌落,故无法

判断哪个是含目的基因的菌株, **B 正确**;因质粒 K 中含两个标记基因,筛选平板中长出的白色菌落应为含目的基因的菌株,能否表达相应蛋白,需进一步检测, **C 错误**;如果筛选平板上蓝色菌落明显偏多,说明大量没有插入目的基因的质粒 K 导入了大肠杆菌,推测原因可能是酶切后的载体发生自身环化并导入了大肠杆菌, **D 正确**。

3. (1)脱氧核苷酸 延伸

(2)5'端 AGATCT *Bam*HI 与 *Eco*RI

(3)染色体 DNA 2 再分化

【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 *Bam*HI、*Eco*RI 和 *Xba*I 的酶切位点, S 基因上含有 *Xba*I、*Nde*I、*Bam*HI 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*HI 的识别序列;分析表格数据, *Bgl*II 切割产生的黏性末端和 *Bam*HI 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*RI 的识别序列。因此,切割载体应选用的两种限制酶为 *Bam*HI 和 *Eco*RI。

(3)用携带 S 基因的农杆菌侵染栽培马铃薯的愈伤组织时,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。

4. (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。

【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来验证实验结论。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培养液中铁离子含量变化和两种菌的数量变化。

5. (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

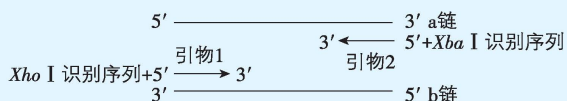
(4)香树脂醇

思路导引

分析题图 1:

(1)为保证目的基因 N 与质粒 pYL 正确连接,以及基因 N 能够转录,需要把基因 N 插入启动子和终止子之间。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)因为基因 N 上有 Spe I 限制酶识别序列,用 Spe I 限制酶切割基因 N 时会破坏基因 N ,所以需要在引物 2 的 5' 端引入与 Spe I 限制酶切割产生相同黏性末端 (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。由思路导引可知,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 ,经特异性酶切后,利用 DNA 连接酶连接 DNA 片段,构建重组质粒。

(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。

6. (1) 在红藻原生环境中筛选到具有卡拉胶降解能力的微生物的可能性大 稀释

(2) Bam H I Sma I 和 Eco R V 切割后产生平末端, Spe I 和 Xba I 切割后产生的黏性末端相同,两种情况均会导致 cg 反向连接,新的序列无法被原有酶识别

(3)使细胞处于一种能吸收周围环境中 DNA 分子的生理状态 四环素 卡拉胶

【解析】(1)海洋红藻含卡拉胶,即海藻是卡拉胶的天然来源,而海泥中可能富集了海藻残体,因此,这两类样本中可能存在能高效降解卡拉胶的菌种。将培养后的菌液混匀并充分稀释,目的是使接种后的微孔板的一个孔中最多有一个菌种,确保后续筛选的菌种为纯培养物。

(2)PCR 产物与质粒经双酶切产生的末端可用 DNA 连接酶连接,其中 $E. coli$ DNA 连接酶连接具有平末端的 DNA 片段的效率远低于 T4 DNA 连接酶。为保证连接准确性, cg 转录模板链的 5' 端应位于重组质粒中靠近终止子的一端,根据质粒上限制酶的种类和酶切位点可知, cg 转录模板链的 5' 端最

好含有 *Bam*H I 的酶切位点。另两组同学选用了各不相同的双酶切组合并用 T4 DNA 连接酶连接,连接后形成的序列不再是原限制酶的识别序列,故无法使用各自构建表达载体时的双酶组合进行切割。

(3) Ca^{2+} 处理可以提高细胞膜通透性,使细菌处于一种能吸

收周围环境中 DNA 分子的生理状态,便于外源 DNA 的导入。能表达 CG 的菌株可降解卡拉胶,在平板上形成透明圈,重组载体含四环素抗性基因,转化成功的菌株可在含四环素的培养基中存活,而卡那霉素抗性基因可能被破坏,不能作为筛选标记。

第四章 生物技术安全与伦理问题

第一节 转基因产品的安全性

刷基础

1. B 【解析】由于导入了新的外源基因,转基因作物的生存竞争力和繁殖能力可能增强,若将这些转基因作物释放到环境中,可能影响生态平衡,A 正确。作物中转入外源基因后不一定成为新物种,是否为新物种,要看与原物种之间是否存在生殖隔离;且若作物中转入外源基因后缺乏对环境的适应能力,则可能不存在安全隐患,B 错误。转基因作物与近缘野生种间可能进行相互传粉,从而发生基因漂移,将转入基因扩散到近缘种中,C 正确。若转基因抗病作物长期大规模种植,会对目标病菌进行选择,则可能导致侵染力和致病力更强的超级病菌出现,D 正确。

2. C 【解析】根据题意可知,转基因作物的基因可传播到野生植物中,对天然植物的遗传多样性构成威胁,A、B 正确;为防止基因污染,应当采取一定的措施,如将目的基因导入细胞质基因中,而不是禁止转基因作物的研究,C 错误;转基因作物的基因可能传播到其他物种中,如近缘种,造成基因污染,D 正确。

方法总结 转基因生物安全性问题的争论

(1) 关于转基因生物安全性的争论主要有三个方面:食品安全、生物安全和环境安全。即转基因食品对人体健康的影响(滞后效应、新的过敏原、营养成分改变)、转基因生物对生物圈中其他生物的影响(对生物多样性的影响)、转基因生物对生态环境的影响(对生态系统稳定性的影响)。

(2) 转基因作为一项技术本身是中性的,我们要理性看待转基因技术。

① 科学合理地利用转基因技术,认识到这项技术的广阔应用前景。

② 正视转基因技术带来的安全性问题,趋利避害,但不能因噎废食。

③ 完善相应的政策和法规。

④ 增强科学家的法治意识,提高科学家的科学研究道德水平。

3. BCD 【解析】由于花粉中不含叶绿体,故叶绿体遗传转化体系中的外源基因不会随花粉转移到近缘物种中,因此安全性

较高,A 错误;由题意知,叶绿体转化是将外源基因转入叶绿

体基因组中,因此,构建的基因表达载体中含有叶绿体特异启动子,使目的基因只能在叶绿体中表达,B 正确;同源重组可以实

现精确插入,所以外源基因通过同源重组的方式插入叶绿体基因组中,可减少插入位点的不确定性,C 正确;叶绿体中 DNA 的表达具有一定的自主性,且通常有众多拷贝,这可能是叶绿体转化体系高表达的原因,D 正确。

4. C 【解析】转基因既可以造福人类,也可能产生风险,要基于科学和理性来讨论转基因作物的安全性问题;转基因作物需要经过一系列的安全性评价,符合相应标准后才能推广种植,A、D 正确,C 错误。需对转基因生物进行标识管理,让消费者有知情权和选择权,B 正确。

5. B 【解析】该玉米合成的蛋白酶抑制剂有可能在玉米的果实(种子)中存在,食用后可能对人的消化酶有影响,也可能没有影响,因为人的消化酶与害虫的消化酶的结构不同,A、C 不符合题意;生物体摄取的蛋白酶抑制剂基因会在消化道内消化为小分子核苷酸后被吸收,该基因不会在人体内表达,是安全的,B 符合题意;高温会使蛋白酶抑制剂变性失活,因此食用煮熟的玉米食品,其中的蛋白酶抑制剂不会对人造成影响,D 不符合题意。

易错警示 从生物学的角度出发,不论是正方还是反方,只要符合生物学基本规律、基本原理,就都是有道理的。如题目中的 A、C 两个选项,是不安全和安全两种截然相反的观点,但其依据都符合生物学原理,都是有道理的。因此关于转基因技术的安全性问题需要辩证地看待。

第二~三节 我国禁止生殖性克隆人/禁止生物武器

刷基础

1. D 【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