

第 14 章 基因工程与生物技术的安全性

第 1 节 基因工程的工具及操作程序

刷基础

1. C 考点 ▶ DNA 的粗提取及鉴定

【解析】哺乳动物的成熟红细胞无细胞核和各种细胞器，不能作为 DNA 粗提取与鉴定的实验材料，A 错误；研磨液能够溶解细胞膜，促使细胞破裂，从而释放出细胞内的 DNA，同时能够稳定溶液的 pH，防止 DNA 在 pH 变化时降解或变性，实验中将研磨液更换为蒸馏水，DNA 提取的效率将降低，B 错误；鉴定过程中沸水浴加热时的高温可能使 DNA 双螺旋结构发生改变，C 正确；DNA 析出过程中，用玻璃棒搅拌时动作要轻柔并沿一个方向搅拌，防止 DNA 断裂，从而获得较完整的 DNA 分子，D 错误。

2. D 考点 ▶ 基因表达载体的构建

【解析】PCR 扩增 *GmNF-YA19* 基因的前提是根据已知该基因的一段核苷酸序列合成两种引物，A 错误；由题图可知，在质粒的启动子和终止子中间含有 *Pvu* II、*Kpn* I 和 *Eco*R I 三种限制酶的切割位点，其中 *Kpn* I 在质粒中还有一个识别位点，因此最好选用 *Pvu* II 和 *Eco*R I 进行切割，且在目的基因的两端也存在这两种酶的识别位点，即应选用 *Pvu* II 和 *Eco*R I 两种限制酶切割含目的基因的 DNA 片段和载体，这样可以保证目的基因和质粒的正向连接、避免发生自身环化，B 错误；终止子为一段 DNA 序列，其作用是使转录在所需要的地方停下来，C 错误；重组质粒转化烟草后，重组质粒中含有氨苄青霉素抗性基因，该基因可作为标记基因，可使用含氨苄青霉素的培养基来筛选成功导入重组质粒的目的细胞，D 正确。

3. ACD 突破点 ▶ 图表分析—PCR 扩增的原理与过程

【解析】根据题意可知，常规 PCR 扩增目的基因后，子代 DNA 的 3'端带有一小段 pET20b 载体的序列，故和引物 R 的 5'端相连的 DNA 序列应与 pET20b 质粒上的一段碱基序列相同或互补，A 正确；分析题图可知，用常规 PCR 扩增出来的目的基因作正向引物，VR 作反向引物，最终扩增得到的重组 DNA 分子为线性 DNA，故还需要利用 DNA 连接酶进行连接以获得环状重组质粒，B 错误；由于限制酶 *Dpn* I 只能切割天然来自大肠杆菌的质粒，因此加入限制酶 *Dpn* I 的目的是除去未成功插入目的基因的空质粒，C 正确；目的基因导入微生物细胞前可用 Ca^{2+} 处理微生物细胞以获得感受态细胞，D 正确。

4. A 突破点 ▶ 图表分析—基因表达载体的构建

【解析】据题图可知，用 *Bsa* I 酶对载体进行酶切后，载体上保留的黏性末端为 5'-CAAT-3'及 5'-GTTT-3'，A 错误；卡那霉素抗性基因位于 T-DNA 上，因此可以使用含卡那霉素的培养基筛选出成功导入重组载体的大豆细胞，B 正确；PCR 扩增经 3 次循环可获得两条脱氧核苷酸链等长的 DNA 片段，C 正确；进行个体生物学水平的鉴定，即检测转基因大豆是否具有抗盐碱性，可将转基因大豆与普通大豆共同种植于盐碱地，对比观察确定转基因后是否赋予了大豆抗盐碱的特性，D 正确。

5. (1) 5' 使 DNA 聚合酶能够从引物的 3'端开始连接脱氧核苷酸
- (2) b 链 由于融合基因共用启动子和终止子，因此基因 *XplA* 和 *XplB* 转录的模板链重组后应在 DNA 的一条链上
- (3) 能吸收周围环境中 DNA 分子 筛选得到含融合基因表达载体的农杆菌
- (4) 导入的融合基因不一定能够成功表达

突破点 ▶ 图表分析—融合基因表达载体的构建

【解析】(1) DNA 复制的方向是从子链的 5' 端到 3' 端, 引物是能与目的基因两端序列碱基互补配对的单链, 限制酶识别并切割目的基因所在 DNA 时需保证目的基因的完整性, 因此限制酶识别序列通常加在引物的 5' 端。在 PCR 的反应体系中, 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) 由于融合基因共用启动子和终止子, 因此基因 *XplA* 和 *XplB* 转录的模板链重组后应在 DNA 的一条链上, 结合题图 1 可知, 将基因 *XplA* 和 *XplB* 拼接成融合基因时, 基因 *XplA* 的 a 链的 3' 端与基因 *XplB* 的 b 链的 5' 端相连。

(3) 表达载体导入农杆菌时, 首先用 Ca^{2+} 处理农杆菌, 使其成为能吸收周围环境中 DNA 分子的状态, 再将其与重组表达载体混合, 在一定的温度下促进感受态细胞吸收 DNA 分子, 完成转化过程。若农杆菌得到含目的基因的表达载体, 则也含有潮霉素抗性基因, 因此可以用添加潮霉素的选择培养基把含融合基因表达载体的农杆菌筛选出来。

(4) 农杆菌侵染植物之后, 需要 T-DNA 携带融合基因整合到植物细胞的染色体上, 在整合过程中, 不一定能正确整合, 因此导入的融合基因不一定能够成功表达, 即成功导入融合基因的植株不一定能降解 RDX 物质。

6. B 考查点 ▶ 限制酶对酶切位点的识别

【解析】*Sau3A* I 和 *Bam*H I 切割产生的黏性末端相同, 都是 -GATC, 分别用两种酶进行切割, 切割后产生的片段能够相连, 连接后的片段仍含有 GATC 序列, 可被 *Sau3A* I 识别并切割, A 错误; 分析题意, B 基因经 *Sau3A* I 切割后会形成 4 个大小不同的 DNA 片段, 说明 B 基因上有 3 个 *Sau3A* I 的酶切位点, *Bam*H I 的识别序列包含在 *Sau3A* I 识别序列中, 若用两种酶共同处理 B 基因, 相当于用 *Sau3A* I 处理, 故会形成 4 个大小不同的 DNA 片段, B 正确; 题述两种限制酶切割出的末端既可用 *E. coli* DNA 连接酶连接, 也可用 T4 DNA 连接酶连接, C 错误; *E. coli* DNA 连接酶连接平末端的 DNA 片段的效率远低于 T4 DNA 连接酶连接平末端的效率, D 错误。

易错警示

限制酶主要从原核生物中分离纯化出来, 能够识别双链 DNA 分子的某种特定核苷酸序列, 并且使每一条链中特定部位的两个核苷酸之间的磷酸二酯键断裂, 形成黏性末端或平末端, 即限制酶具有特异性。

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. ACD 考查点 ▶ 重组 DNA 技术的基本工具、基因表达载体的构建

【解析】步骤一得到的目的基因片段两端分别为平末端和黏性末端, 推测使用两种限制酶切割目的基因片段, 可防止含目的基因的片段自身环化, A 正确; 外切核酸酶 III 只能从 DNA 双链的 3' 末端逐个水解核苷酸, 可以产生不同长度的 5' 突出末端, 由题图可

知,步骤二应使用外切核酸酶Ⅲ,步骤三应使用 S1 核酸酶去除突出单链区域,B 错误;T4 DNA 连接酶连接平末端的效率更高,故步骤四宜选用 T4 DNA 连接酶处理 DNA 片段,C 正确;质粒载体 2 中目的基因片段 N 的长度有多种,因为步骤二中外切核酸酶Ⅲ处理后可以获得不同长度的 5'突出末端,D 正确。

刷有所得

基因表达载体的构建需要限制酶和 DNA 连接酶,是基因工程的核心步骤;蛋白质工程的实质是合成基因或对基因进行改造,来改造现有蛋白质,或制造一种新的蛋白质。

3. CD 考查点 ▶ 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

【解析】结合题图 a 中启动子两端的限制酶切割位点以及 Ti 质粒中启动子两端的限制酶切割位点可确定,选用的限制酶为 *Hind*Ⅲ、*Bam*H I, A 错误;pL 是启动子,是一段有特殊序列结构的 DNA 片段,位于基因的上游,紧挨转录的起始位点,是 RNA 聚合酶识别和结合的位点,B 错误;将新鲜的烟草叶片与含重组质粒的农杆菌共培养可达到转化目的,因为通过农杆菌的侵染,其 Ti 质粒上的 T-DNA 能转移到烟草细胞的染色体 DNA 上,进而实现转化,C 正确;与对照组相比,三种病原微生物都能诱导增强启动子的活性,其中交链格孢的诱导作用最强,D 正确。

4. (1) 组成型 *Sma* I 和 *Sac* I T4 DNA (2) $\frac{1}{4}$ (3) RNA 3、1

(4) 比较分析 *Mfhb-1* 基因纯合植株和野生型植株的抗旱能力

考查点 ▶ 基因工程的操作程序

【解析】(1) 由题干信息可知,组成型启动子可高效地启动目的基因在植物各种组织中的表达,但常会阻碍植物的生长发育。结合题意,用载体 1 构建含 *Mfhb-1* 基因的表达载体,可以成功转化拟南芥,但会出现抑制抗性芽生长和抑制抗性植株生根的现象,推测³⁵S 启动子属于组成型启动子。若要将载体 1 中的启动子替换为 Rd29A 启动子,需选择载体 1 和载体 2 上都有的限制酶切割位点,且一般选择双酶切法,同时还要考虑启动子插入的方向,因此结合题图 1 分析,需要用限制酶 *Sma* I 和 *Sac* I 切割载体 1、2。由限制酶识别序列及酶切位点可知 *Sac* I 酶切后会形成黏性末端,*Sma* I 酶切后会形成平末端,T4 DNA 连接酶连接平末端的效率远高于 *E. coli* DNA 连接酶,因此选择 T4 DNA 连接酶进行连接。

(2) 通过农杆菌转化法,研究者成功将 *Mfhb-1* 基因整合到拟南芥的一条染色体上,假设 *Mfhb-1* 基因用 M 表示,则这些植株的基因型可表示为 Mm,自交后产生的 F₁ 的基因型及比例为 MM : Mm : mm = 1 : 2 : 1, F₁ 中 *Mfhb-1* 基因纯合植株 (MM) 的概率为 $\frac{1}{4}$ 。

(3) 逆转录是以 RNA 为模板合成 DNA 的过程,因此研究者采用 RT-PCR 技术对 *Mfhb-1* 基因纯合植株进行转录情况鉴定,首先分别提取拟南芥 *Mfhb-1* 基因纯合植株和野生型植株的 RNA 作为模板,经逆转录获得 cDNA。结合题意并分析电泳结果可知,2 号泳道加入的样品是基因表达载体中 *Mfhb-1* 基因的 PCR 产物,比较可得 3 号泳道加入的是 *Mfhb-1* 基因纯合植株的 RT-PCR 扩增产物,野生型植株中不含 *Mfhb-1* 基因,因此在电泳结果中无对应条带,对应 1 号泳道。

(4) 为进一步研究转入拟南芥的 *Mfhb-1* 基因表达产物的功能,还需在个体水平开展的研究是比较分析 *Mfhb-1* 基因纯合植株和野生型植株的抗旱能力。

5. (1) 部分碱基序列互补配对 引物 1 和引物 4 (2) *Eco*R I 可

以保证目的基因的两端出现不同的黏性末端,保证正确连接
终止子 (3) 将待鉴定的植物细胞转移到含有潮霉素的培养基上,在该培养基上能正常生长的细胞即为含重组质粒的植物细胞,而后用该细胞进行植物组织培养即可 Ti 质粒中含有 T-DNA,该 DNA 可以和受体细胞的染色体 DNA 整合在一起,进而可以随着受体细胞的染色体 DNA 复制而复制,可在受体细胞中稳定存在并表达

突破点 ▶ 图表分析—启动子的识别

【解析】(1) 采用 PCR 技术使启动子 1 和基因 X 融合的过程,选用的引物 2 和引物 3 具有部分碱基序列互补的特点,进而可以实现启动子和目的基因的连接。扩增 Z 片段时,选用的引物是引物 1 和引物 4,可以将融合获得的 Z 片段完整地扩增出来。

(2) 根据插入片段两端的碱基序列,为使 Z 片段高效插入 Ti 质粒,宜选择限制酶 *Hind* III 和 *Eco*R I 进行切割,可获得不同的黏性末端,可避免限制酶识别序列重叠,也能保证目的基因与 T-DNA 正确连接。题图中的 N 和 J 所表示的元件是终止子,其功能为可以使基因在该处停止转录。

(3) 潮霉素能与叶绿体和线粒体中的核糖体结合,干扰蛋白质合成。氨基青霉素抑制细菌细胞壁的合成。Ti 质粒含有上述两种物质的抗性基因,将重组质粒导入植物细胞后,进行组织培养。为筛选出含重组质粒的植物细胞,由于植物细胞中有线粒体和叶绿体,因此在培养基中添加潮霉素,则能在其上正常生长的植物细胞即为含有重组质粒的植物细胞。重组 Ti 质粒之所以能够完成转化作用是因为其中的 T-DNA 可以与受体细胞的染色体 DNA 整合到一起,并随着染色体 DNA 复制而复制,进而在受体细胞中能稳定存在和表达。

专题 1 限制酶及酶切位点的选择

刷 难关

1. AD 考查点 ▶ 基因表达载体的构建

【解析】可用 PCR 技术检测芽孢杆菌的 *AmyS2* 基因是否转录,如果经过 PCR 扩增,不出现扩增产物,说明没有转录,反之,则成功转录,A 正确;*Bam*H I 会破坏 *AmyS2* 基因,B 错误;芽孢杆菌无内质网和高尔基体,C 错误;科研人员根据 *AmyS2* 的氨基酸序列设计并人工合成了 *AmyS2* 基因,因此获得 *AmyS2* 基因并将其导入芽孢杆菌得到 *AmyS2* 的过程属于蛋白质工程,D 正确。

2. B 突破点 ▶ 图表分析—中心载体的选取

【解析】基因表达载体的构建是基因工程的核心步骤,A 正确;由于载体 E 只有产生黏性末端的酶切位点,要使中间载体 P 接入载体 E,同时防止载体 E 自身环化,需要用两种限制酶分别切割载体 E 和中间载体 P,据题图可知,中间载体 P 和载体 E 均含有 *Xho* I 和 *Pst* I 识别序列,故可选用限制酶 *Xho* I 和 *Pst* I 进行酶切,载体 P 经上述两种酶识别、切割并接入载体 E 后,使新的载体含有 *Eco*R V 的识别位点,经该酶切割后产生平末端,可以用于连接目的基因,经限制酶 *Sma* I 切割后,虽然能得到平末端,但是其识别位点没有位于限制酶 *Xho* I 和 *Pst* I 识别位点之间,故不能选择 *Sma* I 酶进行切割,B 错误;由题图可知,载体 P 是中间质粒,不含有表达目的基因的启动子和终止子,C 正确;受体细胞表现出抗性基因的相应性状,可能是导入了重组载体,也可能是导入了空载体(不含目的基因的载体),D 正确。

3. ABC 考查点 ▶ 限制酶的选取

【解析】分析题图可知,表达载体中 *sfp* 的启动子为启动子 2,*idgS* 的启动子为启动子 1,两者表达相互独立,A 正确;可利用 DNA 分子杂交技术从链霉菌的基因文库中获取 *sfp* 和 *idgS*,B 正确;分析

题图可知,同时使用限制酶 *Pme* I 和 *Bam*H I 进行切割会将 *sfp* 的终止子切除,因此将 *sfp* 插入 Ti 质粒时只能使用限制酶 *Bam*H I, C 正确;受体白玫瑰不变蓝,原因可能是 *sfp* 和 *idgS* 基因未成功导入,也可能是其未成功表达, D 错误。

4. (1) 逆转录 (2) *Pst* I、*Eco*R I *TaPRX-2A* 的 cDNA 不含启动子和终止子;需要玉米细胞的启动子和终止子调节 *TaPRX-2A* 的 cDNA 表达;Ti 质粒的 T-DNA 能转移并整合到受体细胞的染色体 DNA 上 (3) 植物组织培养 氨苄青霉素、X-gal 白

考查点 ▶ 限制酶的选择、基因表达载体的构建

【解析】(1) 逆转录是以 RNA 为模板,在相关酶的作用下,按照碱基互补配对原则,合成与 RNA 互补的 DNA 链的过程,即获得 cDNA 的过程。用 RT-PCR 技术扩增获得 *TaPRX-2A* 基因的过程需要先提取细胞组织中的总 RNA,然后以其中的 mRNA 为模板,经逆转录得到 cDNA。

(2) 在构建含 *TaPRX-2A* 的 cDNA 的表达载体时,首先要保证不破坏标记基因,第二要防止质粒自身环化和目的基因的反向连接,第三要保证不含启动子的目的基因片段连在 T-DNA 的启动子与终止子之间。*TaPRX-2A* 的 cDNA 不含启动子和终止子,所以需要玉米细胞的启动子和终止子调节 *TaPRX-2A* 的 cDNA 表达,且要保证 Ti 质粒的 T-DNA 能转移并整合到受体细胞的染色体 DNA 上,由题图可知宜选用限制酶 *Pst* I、*Eco*R I 对质粒和 *TaPRX-2A* 的 cDNA 进行处理。

(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,利用植物组织培养技术将含 *TaPRX-2A* 的 cDNA 的受体细胞培养为转基因玉米。重组质粒中含有的抗性基因是 *Amp*^R 基因(氨苄青霉素抗性基因),因此筛选含重组质粒的农杆菌时,需要在完全培养基中添加氨苄青霉素,又因为 *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,而重组质粒中 *LacZ* 基因已被切除,所以完全培养基中还应添加 X-gal,最后挑选白色菌落作为目标菌落。

5. (1) DNA 半保留复制 ②④ (2) *Mfe* I、*Hind* III *Eco*R I、*Hind* III

(3) 含有某种限制酶的原核生物,其 DNA 分子中不存在该酶的识别序列或识别序列已经被修饰 (4) 将转基因玉米田间种植后收获玉米籽粒,检测其蛋白质含量

突破点 ▶ 实验探究—转基因高蛋白玉米新品种

【解析】(1) PCR 扩增技术的原理是 DNA 半保留复制,PCR 过程需要两种引物,能分别与目的基因两条链的 3'端通过碱基互补配对结合,所以依据 *THP9* 基因编码链首端到末端(其中一条链)的序列为 5'-ATCTACGCGCTCATCCG...(省略 3n 个核苷酸序列)...CGCAGCAATGAGTAGCG-3'可推知,引物为②④。

(2) 由题干可知,题图中 *THP9* 基因转录方向为从左往右,即在重组质粒中启动子位于目的基因左侧,终止子位于目的基因右侧,因为该基因右侧只有一个酶切位点,故一定需要用 *Hind* III 切割质粒和目的基因,对于质粒来说,*Eco*R I 不只有一个酶切位点,故不能用 *Eco*R I 进行切割,*Bam*H I 的酶切位点在启动子上,故不能用 *Bam*H I 切割,那么在 *Hind* III 上游的仅剩 *Mfe* I 的识别序列,而目的基因内部含 *Mfe* I 的识别序列,不能用该酶切割目的基因,与 *Mfe* I 酶切割能形成相同黏性末端的是 *Eco*R I,故质粒用 *Mfe* I、*Hind* III 切割,目的基因用 *Eco*R I、*Hind* III 切割。

(3) 限制酶一般来源于原核生物,其 DNA 分子中不存在该酶的识别序列或识别序列已经被修饰,故不会切割其本身的 DNA

分子。

(4) 为了检测转基因技术是否成功, 可进行分子水平、个体生物学水平的检测, 个体水平上的检测方法是转基因玉米田间种植后收获玉米籽粒, 检测其蛋白质含量。

专题 2 PCR 技术的原理与应用

刷 难关

1. AD 考查点 ▶ PCR 扩增的原理与过程

【解析】基因型为 Aa 的样品, 含有基因 A 和基因 a, 分析题图可知, 以基因 A 为模板时, 用引物 1 和引物 3 进行 PCR 扩增可得到 1 种双链等长的片段, 用引物 1 和引物 4 进行 PCR 扩增可得到 1 种双链等长的片段; 以基因 a 为模板时, 用引物 1 和引物 4 进行 PCR 扩增可得到 1 种双链等长的片段, 用引物 2 和引物 4 进行 PCR 扩增可得到 1 种双链等长的片段, 其中基因 A 和基因 a 用引物 1 和引物 4 进行 PCR 扩增可得到相同的双链等长的片段, 所以基因型为 Aa 的样品经 PCR 扩增可得到 3 种双链等长的片段, A 正确。基因 A 及其等位基因的碱基序列不同, 经电泳鉴定得到的条带数相同, 但长度不一定相同, B 错误。由于 Taq DNA 聚合酶缺少 3'→5' 外切酶活性, 对于基因 A, 引物 2 的 3' 端碱基与模板形成错配, 链延伸反应受阻; 对于基因 a, 引物 3 的 3' 端碱基与模板形成错配, 链延伸反应受阻, 所以 PCR 反应体系中不会出现引物 2 和引物 3 扩增得到的短片段, C 错误。依题意, 引物 3' 端的碱基与核酸模板形成错配, 链延伸反应就会因 3', 5'-磷酸二酯键形成障碍而受阻, 无法进行 PCR 延伸, 所以增加引物 3' 端碱基错配率, 能有效抑制非目标基因的扩增, 从而避免出现假阳性的结果, D 正确。

2. B 考查点 ▶ PCR 扩增的原理与过程

【解析】据题图可知, PCR1 应该使用引物 a 和引物 b, PCR2 应该使用引物 c 和引物 d, A 正确; 虚线框中的复性产物无法从 5' 端延伸, 故不能延伸获得基因 2, B 错误; 转基因果蝇 G_0 中的 RTA 的第 212 位甘氨酸替换为了精氨酸, 会出现冷敏感效应 (cs), 其在 18 °C 培养条件可以存活, 18 °C 下筛选出具有冷敏感效应的雌雄个体并使其相互交配, 直到不发生性状分离即可得到纯合转基因果蝇 G_1 , C 正确; 获得转基因果蝇 G_0 的过程需要用到基因工程技术, 故需要用到限制酶和 DNA 连接酶等工具酶, D 正确。

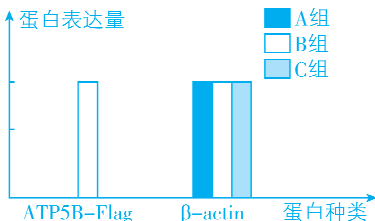
关键点拨

基因工程是指按照人们的愿望, 通过转基因等技术, 赋予生物新的遗传特性, 创造出更符合人们需要的新的生物类型和生物产品; 基因工程是在 DNA 分子水平上进行的, 又叫作重组 DNA 技术。

3. (1) 线粒体内膜 总 RNA 脱氧核苷酸 (2) ① 保证目的基因的正确表达, 保证转录起始密码子和终止密码子的完整性

(3) 1 664 (4) ①鼠抗体 ATP5B-Flag 成功表达 β -actin

②导入空载体 pcDNA3.0



考查点 ▶ PCR 技术的原理及应用

【解析】(1) ATP 合酶可利用膜两侧 H^+ 浓度梯度合成 ATP, 人体细胞中 ATP 合酶分布在线粒体内膜。以 RNA 为模板合成 DNA

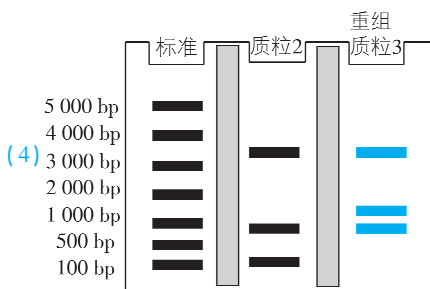
(cDNA), 需要提取细胞中的总 RNA; Flag 标签序列是一段 DNA 序列, 其基本单位是脱氧核苷酸。

(2) 引物设计要求两条引物反向且与模板链结合, 引物 ATP5B-F 的序列已知, 引物 ATP5B-F 与模板链 3' 端结合, 应与下链结合, 引物 ATP5B-R 的序列应与上链结合, 即与下链序列相同, 包括下游同源序列、Not I 识别序列和 Flag 标签序列。分析给出的四个选项, ①符合要求。引物 ATP5B-F 和 ATP5B-R 中分别增加 5'-ATG-3' (对应起始密码子 AUG) 和 5'-TCA-3' (对应终止密码子 UGA) 的目的是保证目的基因的正确表达, 保证转录起始密码子和终止密码子的完整性。

(3) 由题图已知 ATP5B 基因为 1 590 bp、Flag 标签序列为 24 bp, 题图中 PCR 过程获得产物应该包括 EcoR I 的识别序列、Not I 的识别序列、起始密码子对应的序列、终止密码子对应的序列以及上、下游同源序列, PCR 过程获得的产物的长度约为 $6+8+3+3+15+15+1\ 590+24=1\ 664$ (bp)。

(4) ①因为二抗是能与一抗结合的抗体, 所以应以鼠抗体作为抗原来制备马抗鼠酶标二抗; 由于 Flag 标签是融合在 ATP5B 基因上的, 如果能检测到 Flag 标签, 就意味着带有 Flag 标签的 ATP5B 成功表达了, 因此可通过抗原—抗体杂交实验检测到 Flag 标签, 说明 ATP5B-Flag 成功表达; β -actin 是内参蛋白, 需用特异性的一抗检测, 以作为实验的对照, 因此 “?” 处的一抗应与 β -actin 特异性结合。②为了排除载体本身对实验结果的影响, 使实验结果更严谨, 应该增加 C 组实验, C 组大肠杆菌的处理方式是导入空载体 pcDNA3.0; 预期实验结果为 C 组在 ATP5B-Flag 对应的条带位置应该没有条带 (空载体没有导入 ATP5B-Flag 基因), 在 β -actin 对应的条带位置应该有和 A 组、B 组相似强度的条带 (β -actin 是内参蛋白, 表达量相对稳定), 结果图见答案。

4. (1) 逆转录酶、耐高温的 DNA 聚合酶 启动子、终止子、内含子等 (2) bd (3) 氨苄青霉素



(5) $4.0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 在该浓度下未发生转化的细胞全部死亡, 能存活生长的即为已转化的细胞

突破点 ▶ 信息提取—PCR 与电泳图谱的结合

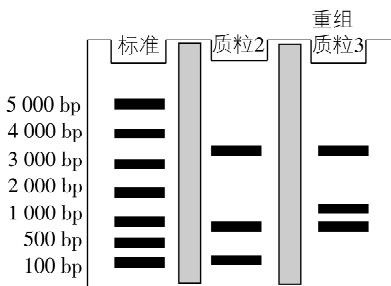
【解析】(1) 过程①为以 RNA 为模板合成 DNA, 为逆转录过程, 此过程需要用到逆转录酶、耐高温的 DNA 聚合酶。通过逆转录获得的基因与细胞内的基因相比, 在结构上缺少启动子、终止子和内含子 (非编码序列) 等。

(2) PCR 所用引物之间不能进行配对, 且引物需与经限制酶剪切过的目的基因的两端进行互补配对, 为防止基因发生自身环化和反向链接, 通常需要两种限制酶酶切, 分析题图 1 质粒 1 的酶切位点及表格中相关限制酶的切割位点和识别序列, 氨苄青霉素抗性基因上含限制酶 Bcl I 的识别位点, Sau3A I 为 Bcl I 的同尾酶, 也可破坏氨苄青霉素抗性基因, 故选择 Xba I 和 Not I 两种限制酶对质粒及目的基因进行切割, 对应引物中的 b、d, 故选 b、d。

(3) 重组质粒转化处于感受态的大肠杆菌, 质粒 1 含有氨苄青霉

素抗性基因,则转化后采用含氨苄青霉素的平板筛选。

(4) 基因位于启动子与终止子之间才能正常表达,所以过程⑤需将 *SLA-2* 基因插入启动子与终止子之间。根据(2)分析可知,用 *Not* I 和 *Sau*3A I 完全酶切质粒 2 后获得的 DNA 片段长度为 177、963、3 305,用 *Not* I 和 *Sau*3A I 完全酶切重组质粒 3 获得的 DNA 片段长度应为 963、1 240、3 305,结果如图:



(5) 最低致死浓度既可以让所有没有抗性的细胞死亡又不会让具有抗性的细胞死亡,即在该浓度下未发生转化的细胞全部死亡,能存活生长的即为已转化的细胞,因此根据实验结果分析可得,最佳的嘌呤霉素筛选浓度为 $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

第2节 基因工程的应用及蛋白质工程

刷基础

1. B 考查点 ▶ 蛋白质工程原理及操作流程

【解析】蛋白质工程生产的蛋白质也可能是自然界中不存在的新的蛋白质,A 错误;蛋白质工程的基本途径是从预期的蛋白质功能出发,设计预期的蛋白质结构,因为蛋白质的结构决定其功能,所以要先预期功能再设计结构,B 正确;由于密码子具有简并性,一种氨基酸可能有多种密码子对应,所以根据中心法则推断出的新的天然 β -淀粉酶的脱氧核苷酸序列不是唯一的,C 错误;蛋白质工程是在分子层次上进行的,但它不是对天然 β -淀粉酶的氨基酸序列进行直接改造,而是通过对基因的改造来实现对蛋白质的改造,D 错误。

2. D 考查点 ▶ 蛋白质工程原理及操作流程

【解析】天然蛋白质的合成方向是 $\text{DNA} \rightarrow \text{mRNA} \rightarrow \text{蛋白质}$,而 T4 溶菌酶耐热性改造设计思路是根据需要改变的蛋白质氨基酸序列确定 mRNA 上的碱基序列,再得出对应基因的碱基序列,说明 T4 溶菌酶耐热性改造设计思路与天然蛋白质的合成方向相反,A 正确;据题图可知,半胱氨酸有两种密码子,不同的密码子对应不同的脱氧核苷酸序列,因此根据设计的 T4 溶菌酶的氨基酸序列可推测出多种脱氧核苷酸序列,B 正确;根据异亮氨酸和半胱氨酸对应的密码子序列可知,两种氨基酸的密码子至少有两个碱基不同,即利用基因定点诱变技术对相关基因进行改造,至少需替换两个碱基对,C 正确;T4 溶菌酶耐热性改造没有改变氨基酸的数量,仅是将该酶第 3 位的异亮氨酸替换为半胱氨酸,D 错误。

3. BC 考查点 ▶ 蛋白质工程原理及操作流程

【解析】根据题意,ProGen 将蛋白质的功能和序列信息进行映射来设计蛋白质,是以蛋白质的结构规律及其与功能的关系为基础的,A 正确;由题干信息可知,ProGen 可以设计出具备预期功能的 AI 预测蛋白质,而不是直接设计出相应基因的碱基序列,B 错误;有的 AI 预测蛋白质与天然蛋白质的氨基酸序列相似度不高,但活性的相似度较高,说明活性相似度与结构相似度并非呈正相关,C 错误;ProGen 可用于蛋白质结构设计和预测,这有助于人类正确认识蛋白质的高级结构,从而突破蛋白质工程的难点,D 正确。

4. C 考查点 ▶ 蛋白质工程原理及操作流程

【解析】蚕合成像蛛丝蛋白一样坚韧的丝的过程包括转录、翻译两个过程,遵循中心法则,A 正确;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,即蛋白质→RNA→DNA→RNA→蛋白质,B 正确;核酸分子杂交技术不能检测蛋白质,可用抗原—抗体杂交技术检测是否有目标蛋白质的合成,C 错误;利用基因工程技术可以改变基因上特定位点的核苷酸序列,进而实现对蛋白质的改造,D 正确。

易错警示

蛋白质工程是指以蛋白质的结构规律及其与生物功能的关系作为基础,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,以满足人类的生产和生活的需求。蛋白质工程的目标是根据人们对蛋白质功能的特定需求,对蛋白质的结构进行设计改造。由于基因决定蛋白质,因此要对蛋白质的结构进行设计改造,还必须通过改造或合成基因来完成。

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受体特异性结合,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. C 考查点 ▶ 基因工程和蛋白质工程综合

【解析】①是利用 PCR 技术短时间内扩增目的基因,PCR 过程需要设计一对引物,②是构建人 EPO 基因的表达载体,②原理是基因重组,③是将目的基因导入受体细胞,利用显微注射技术将目的基因导入动物细胞,A 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,通过改造或合成基因,来改造现有的蛋白质,或制造一种新的蛋白质,以满足人类生产和生活的需求,由题干信息可知,第二代 rhEPO 的生产运用了蛋白质工程技术,本质是改造基因,B 正确;大肠杆菌是原核生物,没有内质网和高尔基体等细胞器,不能加工促红细胞生成素,用大肠杆菌代替 CHO 不能得到高活性 rhEPO,C 错误;促红细胞生成素能有效促进红细胞的产生,提升血液携氧能力,rhEPO 被列入兴奋剂名录,禁止运动员使用以保证比赛公平性,D 正确。

3. (1) 抗 PD-1 的抗体 清除代谢物,防止细胞代谢物积累对细胞自身造成危害 (2) ①二 ②改造或合成基因 (3) CAR 能够特异性地识别并结合肿瘤细胞表面的特定抗原 (4) DNA 连接酶 PCR

考查点 ▶ 蛋白质工程原理及操作流程

【解析】(1) 替雷利珠单抗指的是抗 PD-1 的抗体,所以利用基因工程技术获得抗 PD-1 的抗体,所需目的基因应该是人源化抗 PD-1 的抗体基因。进行动物细胞培养时,需要定期更换培养液,目的是清除代谢物,防止细胞代谢物积累对细胞自身造成危害。

(2) ①蛋白质工程又称第二代基因工程。②蛋白质工程的基本

思路中,需要人为干预的步骤是改造或合成基因。

(3) 嵌合抗原受体 T 细胞疗法 (CAR-T) 的基本原理是通过基因工程技术,将患者的 T 淋巴细胞分离出来,并在体外进行基因改造,使其表面表达嵌合抗原受体 (CAR)。这种 CAR 能够特异性地识别并结合肿瘤细胞表面的特定抗原,进而引导 T 细胞对肿瘤细胞进行精准攻击。

(4) 基因工程需用到的工具酶有限制酶和 DNA 连接酶。体外扩增 DNA 常用 PCR 技术。

第 3 节 生物技术的安全性与伦理问题

刷基础

1. A 考查点 ▶ 禁止生物武器

【解析】干扰素不属于生物武器,A 错误;干细胞培养在临床医学等领域前景广泛,比如用于治疗一些疑难疾病,但也面临安全性问题,如干细胞强大的自我更新能力可能导致肿瘤形成等,B 正确;研究转基因农作物时应采取多种方法防止转基因花粉的传播,避免基因污染,符合生物技术的安全与伦理规范,C 正确;为了防止有人滥用设计试管婴儿技术选择性设计婴儿性别等,我国严格控制试管婴儿技术的使用,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。

4. B 考查点 ▶ AI 与生物技术的安全性

【解析】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,A 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,B 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,C 正确;AI 技术在生物医药领域的应用会涉及众多的法规和伦理问题,例如,如何处理 AI 决策中的错误和责任,以及如何避免 AI 技术加剧医疗不平等问题,当 AI 系统在医疗决策中发挥作用时,如何确保其决策合法且不违反人类伦

理道德是一个重要的问题,D 正确。

5. ABC 考查点 ▶ 转基因技术的安全性

【解析】若有证据表明某转基因产品有害,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品安全、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。

全章综合提升

刷

素养

1. ACD 考查点 ▶ PCR 扩增的原理与过程

【解析】转录方向是从启动子到终止子,题图中启动子位于左侧,则转录时 mRNA 的延伸方向是从左向右,*Gata3* 基因和 *GFP* 基因共用一条模板链,翻译时先合成 *Gata3* 蛋白,A 正确,B 错误;DNA 或构成染色体的组蛋白的甲基化等修饰都属于表观遗传的一种方式,都会影响基因的表达,C 正确;若用引物 1 和引物 3 进行 PCR,杂合子和 *Gata3-GFP* 基因纯合子都能扩增出相应的片段,即无法区分杂合子和纯合子,D 正确。

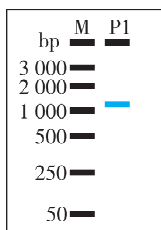
2. B 考查点 ▶ 基因工程的操作程序

【解析】提取铝耐受型大豆根尖细胞中的总 RNA,然后以 mRNA 为模板,在逆转录酶的催化下可合成 cDNA,最终获得 *SGF14a* 基因,A 正确;根据 *SGF14a* 基因的核苷酸序列设计相应的引物进行 PCR 扩增,DNA 聚合酶从引物的 3'端连接脱氧核苷酸,且题图中大豆 *SGF14a* 基因的 A 位点和 B 位点转录后分别是起始密码子和终止密码子对应的位置,PCR 扩增时要扩增该基因 A 位点和 B 位点之间的片段,所以选用的引物组合应为引物 1 和引物 4,B 错误;将含 *SGF14a* 基因的农杆菌与烟草细胞共培养,农杆菌可将携带 *SGF14a* 基因的 T-DNA 整合到烟草细胞的染色体 DNA 上,获得转基因烟草细胞,C 正确;卡那霉素抗性基因在 T-DNA 片段上,要筛选出含目的基因的烟草细胞,可用卡那霉素进行筛选,D 正确。

3. (1) 变性 PCR 的引物 F2-F 与 F1-R 的碱基序列互补配对

(2) 上链 下链 否 F1 片段的上链与 F2 片段的下链在 3'末端能碱基互补配对结合,互为引物 (3) 通过 T-DNA 将目的基因(*Bt-Bar* 融合基因)整合到植物的染色体 DNA 上 筛选含重组 Ti 质粒的农杆菌

(4)



考查点 ▶ 目的基因的检测与鉴定

【解析】(1) PCR 扩增一般可分为变性、复性和延伸三个步骤;据题图 1 可知,PCR 的引物 F2-F 与 F1-R 的碱基序列可以互补配对,若在一个反应体系中进行 PCR 扩增,则这两个引物会发生碱基互补配对,使得 PCR 反应失败,故需要在两个反应体系中进行。

(2) 据题图可知,第一次扩增产物为 F1 片段和 F2 片段,最终扩增得到的 PCR 产物为 *Bt-Bar* 融合基因,因此在第二次扩增时,以 F1 片段的上链为引物,F2 片段的下链为模板进行延伸,补全 *Bt-Bar* 融合基因的上链,以 F2 片段的下链为引物,F1 片段的上链为模板进行延伸,补全 *Bt-Bar* 融合基因的下链,从而得到完整的双链 *Bt-Bar* 融合基因,而 F1 片段的下链与 F2 片段的上链在中间处结合,且延伸方向相反,则无法获得扩增产物,故该过程需用 F1 片段的上链与 F2 片段的下链作为模板;该次扩增过程不需要再加入引物,原因是 F1 片段的上链与 F2 片段的下链在 3' 末端能碱基互补配对结合,互为引物。

(3) 由于 T-DNA 能自发地整合到植物的染色体 DNA 上,故将扩增后的产物插入 Ti 质粒的 T-DNA 上,目的是通过 T-DNA 将目的基因(*Bt-Bar* 融合基因)整合到植物的染色体 DNA 上,以完成转化过程;题图 1 中的 *Tet^R* 是四环素抗性基因,该基因的作用是筛选含重组 Ti 质粒的农杆菌。

(4) 据题图 1 可知,*Bt-Bar* 融合基因长度为 1 110(720+390) bp,若玉米植物 P1 成功导入该融合基因,用引物 F1-F 和 F2-R 进行 PCR 扩增可得到 1 110 bp 大小的片段,扩增产物的电泳结果见答案。

刷真题

1. B 命题点 ▶ 基因工程的基本工具

【解析】限制酶失活后无法切割 DNA,此时应更换新的限制酶,A 正确;酶切条件不合适可能使酶失活,无法发挥作用,但限制酶的用量过多或过少都不会出现 DNA 完全不被酶切的情况,B 错误;质粒 DNA 突变导致限制酶识别位点缺失会使 DNA 完全不被酶切,此时应更换正常质粒 DNA,C 正确;酶切位点被甲基化修饰,会导致对 DNA 甲基化敏感的限制酶无法进行酶切,出现 DNA 完全不被酶切的情况,此时应换用对 DNA 甲基化不敏感的限制酶,D 正确。

2. (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 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。

3. (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。

4. (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:

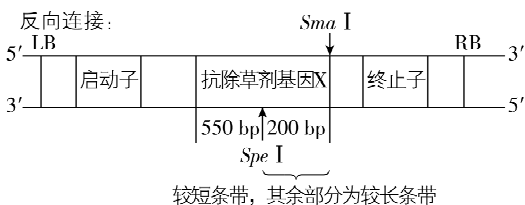
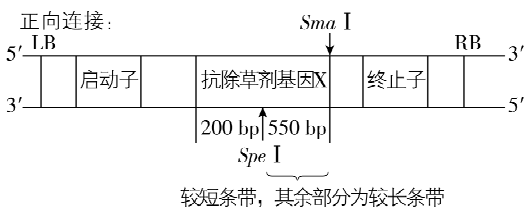
Pst I : 5'-CTGCA

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。

5. (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

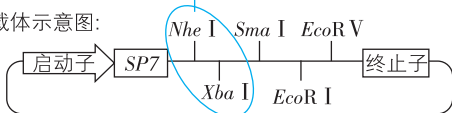
命题点 ▶ 基因工程

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。

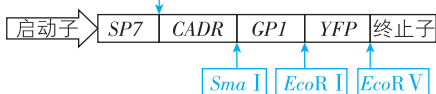
二者酶切后的黏性末端相同,为同尾酶,其识别序列不能添加在同一个目的基因的两端

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°C ,双链 DNA 解聚为单链)、复性(温度下降到 50°C 左右,引物和模板结合)、延伸(温度上升到 72°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,*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。

6. (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。

7. (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

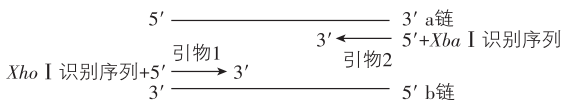
命题点 ▶ 基因表达载体的构建、PCR 及电泳鉴定

思路分析

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。

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。