

10. D 【解析】克隆动物的核基因组来源于甲,乙提供的去核卵母细胞不含核基因,含有细胞质基因,A 错误;体外受精需用获能后的精子与 M II 期的卵母细胞受精,而不是 M I 期,B 错误;囊胚①中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。

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. A 【解析】基因工程又叫作重组 DNA 技术,是在 DNA 分子水平上进行设计和施工的,其生物学原理是基因重组,A 错误;DNA 可以在不同个体之间进行转移是基因工程实现的前提,B 正确;目的基因能跨物种表达,是因为生物界几乎共用一套遗传密码,C 正确;基因工程可以人为选择目的基因导入受体细胞,能够按照人们的愿望定向改造生物性状,D 正确。
2. AC 【解析】限制酶切割双链 DNA 时,每产生 1 个切口会断开 2 个磷酸二酯键(两条单链各 1 个),若获得 1 个外源基因时产生 2 个切口,则共断开 4 个磷酸二酯键,A 正确;限制酶识别序列越短,序列在 DNA 中出现的概率越高,B 错误;序列 C↓ATG 切割后露出的黏性末端碱基数为 2 个,序列 G↓GATCC 切割后露出的黏性末端碱基数为 4 个,二者黏性末端碱基数不同,C 正确;*E. coli* DNA 连接酶不能催化平末端的连接,D 错误。
3. B 【解析】*Bam*H I 的识别序列为 GGATCC,序列中包含 *Sau*3A I 的识别序列 GATC,因此 *Bam*H I 识别的核苷酸序列一定能被 *Sau*3A I 识别,A 正确;*Sau*3A I 仅识别 GATC 序列,但 *Bcl* I 的识别序列为 TGATCA,因此 *Sau*3A I 识别的核苷酸序列不一定能被 *Bcl* I 识别,B 错误;*Bam*H I 和 *Bcl* I 切割后产生的黏性末端均为 5'-GATC-3',能相互连接,C 正确;
- 考点: 同尾酶切割 DNA 产生的黏性末端相同
- Sma* I 切割后产生平末端,T4 DNA 连接酶既可以连接黏性末端,也可以连接平末端,因此该限制酶切割后的片段可用 T4 DNA 连接酶连接,D 正确。
4. D 【解析】同种限制酶识别特定的回文序列并在特定位点切割,若限制酶识别序列为 5'-GGATCC-3',在两个 G 之间切割,即可同时产生②和⑤两种片段,A 正确;③片段对应的完整限制酶识别序列可以是 5'-CGATCG-3',属于 6 个核苷酸组成的回文序列,限制酶在 5'端的 C 和 G 之间切割即可产生③片段,B 正确;DNA 连接酶的作用是催化两个 DNA 片段之间形成磷酸二酯键,可将互补配对的黏性末端或平末端相连,C 正确;①和⑥都是平末端,可用 T4 DNA 连接酶连接,但②的黏性末端和④的黏性末端不匹配,无法互补配对,不能连接(5'、3'的顺序要注意,不能将片段颠倒连接),D 错误。

5. (1) 不能 T4

(2) 自我复制 一个至多个限制酶切割位点 用含有该抗生素的培养基培养宿主细胞,能够存活的即含有质粒载体的宿主细胞

【解析】(1)*Bam*H I 与 *Bgl* II 切割后产生的黏性末端相同,两者分别切割后的 DNA 片段可以用 *E. coli* DNA 连接酶连接,连接后的新序列为 5'-GGATCT-3',不再是两种酶的识别序列,因此不能再被这两种酶切开。*Eco*RV 和 *Sma* I 切割后产

关键点: 可以连接,但序列变化后不能再被这两种限制酶切割

生的是平末端,应该用 T4 DNA 连接酶连接。

(2) 质粒上含有复制原点,能保证质粒在受体细胞中自我复制。质粒 DNA 分子上有一个至多个限制酶的酶切位点,便于目的基因的插入。质粒上的标记基因是为了鉴定受体细胞中是否含有质粒载体,具体做法是用含有该抗生素的培养基培养宿主细胞,能够存活的即含有质粒载体的宿主细胞。

关键点拨 不是所有同尾酶切割再连接后都不能被原来的两种限制酶切割,如 *Bam*H I 和同尾酶 *Sau*3A I (识别序列为 5'-GATC-3')切割的片段连接后的序列能被 *Sau*3A I 切割,如果连接后的序列还能被 *Bam*H I 所识别,则连接后的片段还能被 *Bam*H I 切割。

6. B 【解析】质粒是独立于原核细胞拟核 DNA 或真核细胞细胞核之外的小型环状 DNA 分子,不属于细胞器,真核生物(如酵母菌)中可能存在质粒,A 错误;基因工程操作中,需先将目的基因与质粒载体的特定区域连接构建重组 DNA 分子,再通过转化等适当方法将其导入受体细胞,B 正确;噬菌体是感染真菌、细菌等微生物的病毒,作为载体时受体细胞一般为宿主菌,无法侵染植物体细胞或受精卵,C 错误;动物病毒存在宿主特异性,仅能侵染动物细胞,无法侵染植物细胞,也不能直接将目的基因插入植物细胞染色体 DNA 上,D 错误。

7. ACD 【解析】质粒载体上需要有标记基因便于重组 DNA 的筛选,但标记基因不一定是抗生素抗性基因,也可以是荧光蛋白基因等,A 错误;质粒是一种裸露的、结构简单、具有自我复制能力的环状双链 DNA 分子,B 正确;质粒一般具有一个或多个限制酶切割位点,可适配不同限制酶切割,以便于目的基因与之正确重组,并非只有一个切割位点,C 错误;大多数天然质粒不具备作为载体所需的全部条件,需要经过人工改造后才能作为载体使用,D 错误。

方法总结 质粒作为载体必须具备的条件

- (1) 含有复制原点,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。

8. B 【解析】PCR 通过高温使 DNA 双链氢键断裂实现解旋,不需要解旋酶,仅需要耐高温 (或热稳定) 的 DNA 聚合酶, A 错误。

易错点: 体内 DNA 复制依靠解旋酶解开双链, PCR 依靠高温破坏氢键实现解旋, 二者解旋机制不同, 体现了体外扩增与体内复制条件上的重要区别

PCR 扩增时,DNA 的两条模板链分别结合引物 I 和引物 II,每次循环合成两条子链时需要的引物 I 和引物 II 数量相等。**B 正确。**延伸的温度主要由耐高温的 DNA 聚合酶的最适温度决定,与引物和待扩增片段的长度无关;延伸时间仅和待扩增片段长度有关,片段越长所需延伸时间越长,**C 错误。**PCR 循环过程包括变性、复性(或退火)和延伸三个步骤,其中变性(a)温度最高,约 94℃;复性(b)温度较低,一般为 55℃左右,使引物与模板链结合;延伸(c)温度一般为 72℃左右,因此温度高低关系为 a>c>b,**D 错误。**

9. D 【解析】电泳时指示剂的迁移速率快于多数 DNA 片段,待其前沿接近凝胶边缘时停止电泳,可避免目标 DNA 迁移出凝胶,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,凝胶浓度决定孔隙大小,浓度越高,孔隙越小,相同大小的 DNA 分子迁移速率越慢,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;核酸染料通常在制备凝胶时加入凝胶体系,或电泳结束后对凝胶进行染色,无需与 PCR 产物、凝胶加样缓冲液混合后再加样,D 正确。

刷提升

1. **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,由于 *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**。

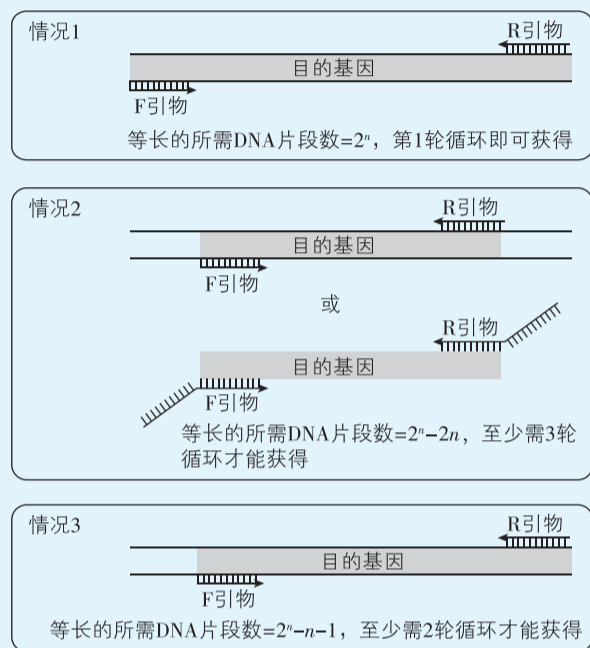
2. D 【解析】根据 DNA 分子中两条链的反向平行关系可判断,②链从 L 到 R 的方向为 $5' \rightarrow 3'$,图中①②链均可作为子链合成的模板,A 错误;PCR 过程通过高温处理使双链中氢键断裂解聚成为单链,不需要解旋酶,B 错误;以 1 个 DNA 为

模板经 3 次循环产生的 DNA 分子数目为 $2^3 = 8$, 需消耗引物 $\textcircled{3}$ 的数目为 $(8 \times 2 - 2) \div 2 = 7$, **C 错误**; 引物 $\textcircled{3}$ (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照下述公式进行计算。



3. ABC 【解析】限制酶作用的化学键都是磷酸二酯键，DNA 连接酶作用的化学键也是磷酸二酯键，**A 正确**。由图可知，酶 a 和酶 b 切割后产生的黏性末端相同，根据 DNA 连接酶的作用特点，相同黏性末端能用 *E. coli* DNA 连接酶相互连接，**B 正确**。从题中信息可知，用酶 a 切割质粒后得到 4 个 DNA 片段，这表明该质粒上酶 a 的识别序列有 4 个；用酶 b 切割酶 a 切割后的产物得到 6 个 DNA 片段，说明酶 b 在酶 a 切割后的产物上有 2 个识别序列，那么该质粒上酶 b 的识别序列有 2 个，**C 正确**。因为酶 a 和酶 b 识别并切割的序列不同，所以先用酶 b 切割再用酶 a 切割，最终得到的切割产物长度与先用酶 a 切割再用酶 b 切割得到的产物长度相同，**D 错误**。

4. B 【解析】*Sma* I 的识别序列为 5'-CCC↓GGG-3'，切割会产生平末端。当虚线方框内的碱基对被 T—A 碱基对替换后，基因 d 中只有一个 *Sma* I 的识别序列，切割后应形成 2 种长度的产物，而不是 3 种，**A 错误**。*Bam*H I 与 *Mbo* I 切割产生的黏性末端均为 5'-GATC-3'，可以互补配对连接；连接后的序列仍含 5'-GATC-3'，即 *Mbo*I 识别位点（5'-GATC-3'），因而仍能被 *Mbo* I 切割，**B 正确**。含目的基因 D 的 DNA 片段中含有 2 个 *Bam*H I 的识别序列，用 *Bam*H I 切割时，每切割一个位点会打开一个切口，产生两个游离的磷酸基团，切割 2 个位点就会增加 4 个游离的磷酸基团，而不是 2 个，**C 错误**。

用 *Sma* I 切割 DNA 产生的是平末端, *E. coli* DNA 连接酶不能连接具有平末端的 DNA 片段, 可以用 T4 DNA 连接酶进行连接, **D 错误**。

课时2 基因工程的基本操作程序

刷基础

1. B 【解析】③表示 PCR 技术, 可用于获取和扩增目的基因, **A 正确**; ②过程将 DNA 切割成不同大小的片段, 需要用到限制性内切核酸酶, 不需要逆转录酶, **B 错误**; 可以根据目的基因的相关信息, 如核苷酸序列、基因功能、基因在染色体上的位置等, 从基因文库中获取所需的基因, **C 正确**; 若基因比较小, 且核苷酸序列已知, 则可以直接通过人工合成的方法获取, **D 正确**。

2. D 【解析】限制酶 *Xho* I 的切割位点位于识别序列中轴线的两侧, 所以切割出的末端为黏性末端, **A 正确**; PCR 过程一般可分为变性、复性(或退火)、延伸三步, 其中复性指的是引物与模板链互补配对结合, 形成局部双链, **B 正确**; PCR 的引物与模板链的 3' 端碱基互补配对, 且依据题意需在目的基因的左端添加限制酶 *Xho* I 的识别序列, 故目的基因左侧的引物序列为 5'-CTCGAGATGCT-3', **C 正确**; 据题意可知, 只需要在目的基因的一端添加限制酶 *Xho* I 的识别序列, PCR 扩增 1 轮只能得到两条单链长度不等的 DNA 片段, 扩增 2 轮才能得到含有 *Xho* I 识别序列的目的基因, **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) 在一定条件下, 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;

常考点: 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, 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, 最终表达出人类需要的蛋白质

终止密码子位于 mRNA 上, 作用是使翻译停止, **B 错误**。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, 载体中可能含有多个限制酶切割位点, **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. B 【解析】终止密码子的作用是使翻译在所需的地方终止, 终止子位于基因的下游, 是一段有特殊序列结构的 DNA 片段, 其作用是终止转录, **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

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

建基因表达载体时, 目的基因的转录模板链的 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, **D 错误**。

6. A 【解析】根据图中信息, 在质粒的启动子和终止子中间含有 *Pvu* II、*Kpn* I 和 *Eco*R I 三种限制酶切割位点, 由于 *Kpn* I 在质粒中不止一个识别位点, 用其切割质粒会丢失终止子, 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, **A 错误**; 启动子是位于基因上游的 DNA 片段, 是 RNA 聚合酶识别和结合的部位, 能驱动基因启动转录, **B 正确**; 终止子是一段 DNA 序列, 是转录的终止信号, 可使转录在所需要的地方停止, **C 正确**; 载体上含有氨苄青霉素抗性基因, 正确导入 *GmNF-YA19* 基因的细胞可在含有氨苄青霉素的培养基中生长, **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 *Bam*H 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 *Eco*R 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 *Sau*3A 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 *Eco*R I 和 *Bcl* I 切割质粒, 则需用 *Eco*R I 和 *Sau*3A I 切割含目的基因的 DNA 片段, **D 正确**。

8. AB 【解析】农杆菌是一类生活在土壤中的微生物, 能在自然条件下侵染双子叶植物和裸子植物, 农杆菌转化法是将目的基因导入植物细胞常用的方法, **A 正确**; 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**;目的基因进入受体细胞后,是否能稳定维持和表达其遗传特性只有通过检测和鉴定才能知道, **D 错误**。

- 9. A 【解析】**农杆菌转化法中,农杆菌感染植物细胞时仅将自身 Ti 质粒上的 T-DNA 整合到植物细胞的染色体 DNA 上, **A 错误**。花粉管通道法的原理是借助受粉后尚未闭合的花粉管通道,外源 DNA 可进入胚囊,进而作用于受精卵, **B 正确**。方案一的受体是离体的愈伤组织,需要经过植物组织培养的再分化过程才能发育为完整植株;方案二直接将外源 DNA 导入胚囊的受精卵,受精卵可在植株体内发育为种子,播种后即可得到植株,无需离体组织培养,操作更简单, **C 正确**。方案一的愈伤组织是离体培养的细胞,可利用标记基因对应的抗性初步筛选出成功转化的细胞;方案二的受精卵位于大豆的子房内,无法在受精卵时期直接进行标记基因相关的筛选, **D 正确**。

- 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 DNA 分子杂交技术, **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**。

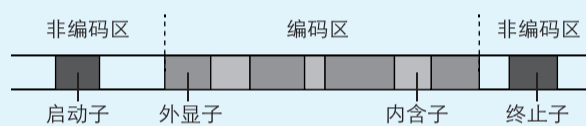
刷易错

★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 *Bam*H I 切割质粒会破坏标记基因,用 *Eco*R 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,是翻译开始的位置;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:



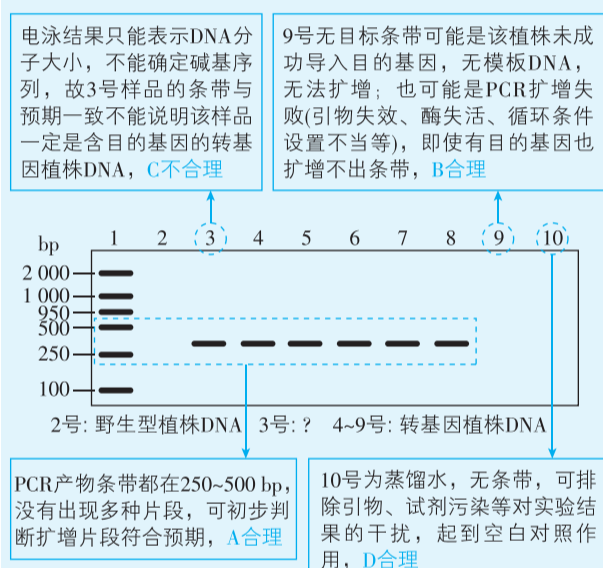
刷提升

- 1. B 【解析】**ddNTP 一旦掺入 DNA 子链, DNA 链直接终止延长,而该特殊脱氧核苷酸整合在 DNA 链末端,无法脱离,不能重复利用,即不能反复参与多条 DNA 链的合成, **A 错误**;测序过程中产生的长短不同的 DNA 片段可通过琼脂糖凝胶电泳依据分子量差异实现分离,短片段迁移速率更快, **B 正确**;体外合成 DNA 时, DNA 聚合酶无法从头启动合成过程,需要以一段具有 3' 端游离羟基的引物作为起点, **C 错误**;该测序反应需经历变性、退火、延伸等不同温度阶段,全程需要调整温度, **D 错误**。
- 2. A 【解析】** DNA 不溶于酒精,粗提取 DNA 时,向研磨获得的滤液中加入预冷的酒精溶液,可使 DNA 的絮状物从滤液中析出, **A 错误**;该实验的自变量为植物材料种类和保存温度,因变量为二苯胺试剂鉴定后的颜色变化(反映 DNA 粗提取量,“+”越多代表 DNA 含量越高),因此可用于探究不同材料和不同温度对 DNA 粗提取量的影响, **B 正确**;由表格数据可知,相同保存温度下,圣女果组的“+”数量最少,说明等质量的不同实验材料中,圣女果的 DNA 提取量均最少, **C 正确**; DNA 酶会降解 DNA,低温可能抑制核酸酶(如 DNA 酶)的活性,减少 DNA 的降解,因此低温下保存时 DNA 提取量更多, **D 正确**。

3. CD 【解析】退火是在高温解旋后降低温度让引物与模板链结合,退火温度不宜太低,以避免引物和模板链错配形成双链,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,均会扩增出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错误。

4. C

题图解读



5. C 【解析】sgRNA可指引Cas9酶结合到特定的DNA序列,它不是合成Cas9酶的模板,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酶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。

6. BCD 【解析】200 bp的DNA分子量较小,800 bp的DNA分子量较大,200 bp的DNA分子迁移速率快,所以根据图示,在电泳时,核酸的移动方向是从负极到正极,A错误。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,B正确。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,因此该载体最有可能为环状DNA分子;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,推测两种限制酶在载体上可能各有一个酶切位点,C正确。该载体可能为环状DNA分子,且长度为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200 bp,D正确。

7. C 【解析】在构建基因表达载体时,在目的基因两端添加不同限制酶的识别序列,使目的基因在酶切后产生不同的黏性末端,可以避免反向连接、自连,保证目的基因以正确方向插入载体,A正确;由题图可知,双向启动子向两个相反方向驱动转录,GUS基因转录方向向左、LUC基因转录方向向右,转录过程中RNA聚合酶沿转录模板链的3'端向5'端移动,故两个基因的模板链是T-DNA的两条不同DNA链,B正确;由图可知,壮观霉素抗性基因位于T-DNA区域外,农杆菌转化法中,只有T-DNA会整合到受体细胞的染色体DNA上,因此无法通过在培养基中添加壮观霉素筛选出成功导入目的基因的植物受体细胞,C错误;根据题干信息,LUC基因表达的荧光素酶可催化产生荧光,GUS基因表达的 β -葡萄糖苷酶可催化底物产生蓝色物质,若双向启动子能正常发挥作用,两个基因都会表达,可通过观察是否出现荧光和蓝色物质,检测双向启动子的作用效果,D正确。

8. (1) 变性、退火、延伸 引物Ⅱ、Ⅲ

(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) XmaⅠ酶切出的黏性末端与M蛋白基因一端的黏性末端相同,SmaⅠ酶切出的末端为平末端,无法与M蛋白基因的黏性末端连接 BglⅡ、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、退火、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。

(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 蛋白基因与质粒正向连接。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。综合分析,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

(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 转录为成熟 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,因此,通过逆转录获得的 S 基因与花生细胞中的 S 基因的 DNA 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*H I 会破坏目的基因,而 *Sal* I 的酶切位点不在 T-DNA 中,选用 *Eco*R I (在 S 基因的左右两侧均有酶切位点)可能导致错误连接,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。用农杆菌

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

侵染水稻叶片外植体,是利用了农杆菌的侵染特性,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。

方法总结 构建基因表达载体时限制酶的选择依据

- (1)切割位点应位于目的基因两侧,不能破坏目的基因。
- (2)为避免目的基因和质粒的自身连接、目的基因和质粒反向连接,可使用两种限制酶分别切割目的基因和质粒。
- (3)质粒作为载体必须具备启动子、终止子、标记基因等,所选择的限制酶不能将所有的标记基因都破坏,也不能破坏启动子和终止子。
- (4)所用限制酶的切割位点应位于启动子和终止子之间。

素养

10. (1)模板 DNA、4 种脱氧核苷酸、热稳定的 DNA 聚合酶

(2)*Bam*H I A 位点 145 kb 和 8 kb 水稻胚乳细胞中特异表达的基因

(3)农杆菌转化 潮霉素

(4)抗原—抗体杂交

【解析】(1)PCR 反应体系需包含模板 DNA (扩增的目标基因)、引物、4 种脱氧核苷酸 (原料)、热稳定的 DNA 聚合酶、缓冲液和无菌水等。

(2)目的基因两端含 *Bam*H I 和 *Bgl* II 酶切位点,而 *Bam*H I 与 *Bgl* II 切割后产生的黏性末端相同,因此选择 *Bam*H I 切割 Ti 质粒,能产生和目的基因两端相同的黏性末端,可实现目的基因与质粒的连接。根据目的基因的转录方向,若目的基因正向连接到 Ti 质粒中,则 A 位点连接的是 *Bam*H I 切割产生的黏性末端,连接之后的碱基序列能被 *Bam*H I 识别; B 位点连接的是 *Bgl* II 切割产生的黏性末端,连接之后的碱基序列不能被 *Bam*H I 识别。故仍能被 *Bam*H I 切割的是 A 位点。原质粒用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 切割会形成大小为 145 kb 和 5 kb 的两个片段。正向连接时若用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 切割基因表达载体,因 *Bam*H I 的酶切位点在 A 位点,原来长度为 5 kb 的片段一端插入了长度为 3 kb 的目的基因片段,故电泳条带的大小为 145 kb 和 8 kb。为保证目的基因的成功表达,需在目的基因的上游添加水稻胚乳细胞中特异表达的基因的启动子,这样目的基因就能够在胚乳中特异性表达。

(3)目的基因插入了 Ti 质粒的 T-DNA 中,可通过农杆菌转化法将目的基因导入植物细胞。卡那霉素抗性基因在 T-DNA 之外, Ti 质粒的 T-DNA 区域含潮霉素抗性基因,因此可用潮霉素筛选出转化成功的愈伤组织细胞。

(4)检测目的基因的表达产物 (蛋白质),需采用抗原—抗体杂交技术 (利用人白蛋白的抗体与表达的蛋白质特异性结合)。

专题 4 PCR 技术

刷难关

1. B 【解析】若引物之间互补配对形成局部双链,会导致引物无法与模板链结合,无法启动扩增过程,因此多重 PCR 加入

的引物之间不能互补配对, **A 正确**;不同对引物的退火温度差异越大,越难找到适宜的退火温度保证所有引物都能特异性结合对应模板,会导致扩增特异性下降,不同对引物退火温度相近时扩增特异性更强, **B 错误**;不同大小的 DNA 片段在凝胶中电泳时迁移速率不同,因此多重 PCR 扩增出的大小不一的 DNA 片段可用电泳检测, **C 正确**;多重 PCR 可同时加入针对多种病原体的特异性引物,扩增出对应病原体的 DNA 片段,因此可用于多种病原体感染的检测, **D 正确**。

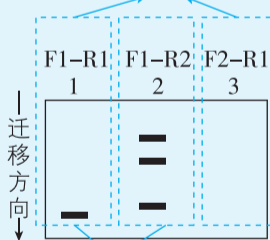
2. D 【解析】由图 2 可知,四种不同的细胞中成熟的 mRNA 两端都有 A 和 F 片段,由题干信息可知,PCR 需引物成对存在且只能扩增两种引物之间的序列,因此想要以不同组织细胞成熟 mRNA 逆转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR,则选取的引物组合为 a、f, **D 符合题意**。

3. C 【解析】PCR 所用的引物是一小段单链 DNA,也就是脱氧核糖核酸, **A 正确**;第一阶段,扩增产物是双链 DNA,因此该阶段扩增是以 DNA 的两条链为模板进行的, **B 正确**;限制性引物的作用是增加第二阶段扩增(单链扩增)的模板,进而获得更多的非限制性引物扩增的单链 DNA 探针, **C 错误**;第二阶段中,非限制性引物结合目标 DNA 的 β 链并以其为模板进行延伸,合成的单链 DNA 探针与 β 链互补,即与 α 链序列相同, **D 正确**。

4. ABD

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 *pfert* 基因为目的基因,故 F1、F2、R1 和 R2 四种备选引物是根据 *pfert* 基因序列设计的, **A 正确**;PCR 反应体系中需要加入 Mg^{2+} 以激活热稳定的 DNA 聚合酶, **B 正确**;由题图解读可知,

考点: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 *pfert* 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**。

5. AD 【解析】1 个 DNA 分子经过 PCR 扩增 n 次后,共产生 2^n 个 DNA 分子,其中含初始模板链的两个 DNA 中有一个不含引物 a,其余每个产物 DNA 都含 1 个引物 a,因此 PCR 循环 20 次,消耗引物 a 的数量为 $2^{20}-1$, **A 错误**;重叠延伸 PCR 的核心就是引物 b 和引物 c 互补,使扩增得到的 AB、CD 产物的末端形成互补重叠链,后续才能合成 AD, **B 正确**;过程①需要加热使 AB、CD 的双链变性解开为单链,再冷却复性让互补的 AB 上链和 CD 下链配对结合, **C 正确**;过程②不需要添加引物,但需要热稳定的 DNA 聚合酶, **D 错误**。

6. C 【解析】PCR 扩增时,引物需要与模板链的 3' 端互补配对,从图中环化的 DNA 模板来看,要扩增序列 L 和 R,应选择引物是引物 1 和引物 4, **A 正确**;过程①是酶切,目的是将线性 DNA 切割后便于环化,通常用同种限制酶或同尾酶切割目标 DNA 两侧,使 DNA 片段产生相同的黏性末端, **B 正确**;过程②是环化,需要 DNA 连接酶催化形成磷酸二酯键, **C 错误**;PCR 第一轮循环得到的产物含一条单链 DNA 和一个环状单链 DNA,第二轮循环得到的 DNA 片段两条链不等长,至少要到第三轮循环才可获得两条链等长的 DNA 片段, **D 正确**。

7. D 【解析】抗体 1 固定在固相支持物上,用于捕获 A β ,抗体 2 带有 DNA 标记,与 A β 结合后,通过 PCR 扩增 DNA 标记,从而间接检测 A β ,抗体 1 和抗体 2 的作用不同, **A 错误**;在免疫 PCR 过程中,抗体 2 上的 DNA 标记作为模板 DNA, **B 错误**;对 PCR 产物进行鉴定,常采用琼脂糖凝胶电泳技术,但核酸染料是加在琼脂糖凝胶中的, **C 错误**;免疫 PCR 检测特定抗原时,即使样品中仅存在少量抗原,在抗体 2 与抗原结合后,以抗体 2 上结合的 DNA 分子作为模板,通过 PCR 扩增即可产生大量 DNA 分子,因而能够提高检测灵敏度, **D 正确**。

8. C 【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热稳定的 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' $\rightarrow$ 5' 方向延伸, **B 正确**。第三轮循环后即 DNA 复制 3 次,共形成 8 个 DNA 分子,其中只有 2 个两条脱氧核苷酸链等长的 DNA 片段,占 $\frac{1}{4}$, **C 错误**。一个 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 正确。

9. C 【解析】每合成一个新的 DNA 分子就会降解一个探针并释放一个荧光分子,因此荧光信号的强度与扩增的 DNA 分子数量呈正相关,A 错误;根据图中子链的延伸方向可知,荧光探针连接 Q 的是 3'端,连接 R 的是 5'端,B 错误;荧光探针与模板 DNA 的某条链互补配对,每扩增出一个 DNA 分子,就有一个荧光分子生成,经过 6 轮 qPCR 循环一共会生成 $2^6 - 1 = 63$ (个) 荧光分子,C 正确;子链延伸时 Taq DNA 聚合酶可催化磷酸二酯键形成,在子链的 3'端添加脱氧核苷酸,当子链延伸至探针处时,Taq DNA 聚合酶可催化磷酸二酯键断裂,降解探针并释放荧光基团,D 错误。

10. (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、热稳定的 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 F_2 -F 应选用 C。D 项中 5'-CTGCAG-3'能与 AnBI 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 F_1 -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,AnBI 长度为 390 bp,二者之和为 720 bp+390 bp=1 110 bp,用引物 F_1 -F 和 F_2 -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。

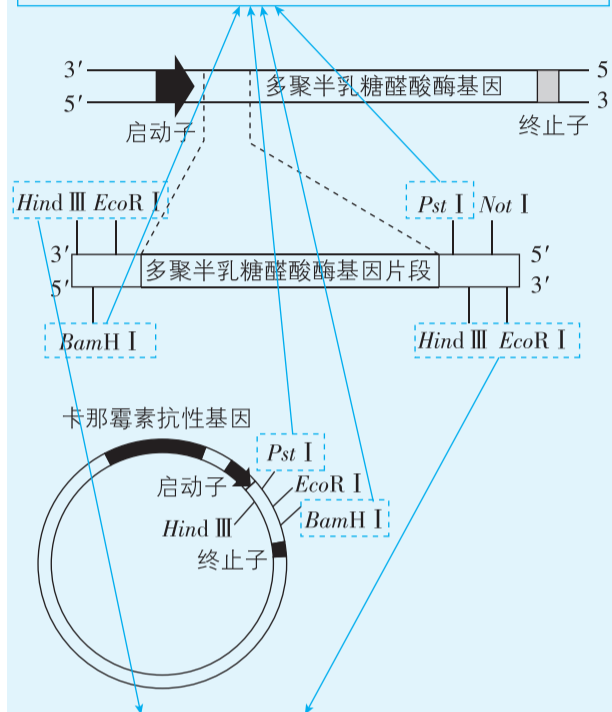
专题 5 基因表达载体的构建

刷难关

1. C

题图解读

BamH 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,在载体上靠近终止子的一端;Pst I 酶切位点也在多聚半乳糖醛酸酶基因所在的 DNA 片段上靠近终止子,在载体上靠近启动子的一端,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 BamH 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 EcoR I 的切割位点,用 Hind III 或 EcoR 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。热稳定的 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. ABC 【解析】传统构建重组载体需要限制酶切割载体和目的基因,再用 DNA 连接酶连接,In-Fusion 酶可直接连接两端带有相同 15 bp 序列的线性 DNA,能替代限制酶的切割作用与 DNA 连接酶的连接作用,**A 正确**;目的基因两端需要和载体两端各有 15 bp 相同序列,因此 PCR 扩增目的基因时,要在引物 5' 端添加与载体相同的 15 bp 序列,**B 正确**;目的基因左右两端序列分别对应载体两端的特殊序列,两端序列不相同,只能按照唯一方向完成连接,可避免目的基因反向插入载体,**C 正确**;该技术依靠两端相同序列实现连接,不需要使用限制酶切割目的基因,不受目的基因内部限制酶识别序列的影响,即便内部存在大量酶切位点也能正常使用,**D 错误**。

4. (1) 四种脱氧核苷酸、热稳定的 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+})、热稳定的 DNA 聚合酶(用于催化 DNA 的合成)、四种脱氧核苷酸(原料)等。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'→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*^R 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

端类型等。

(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,另外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(*neo*^R) 疱疹病毒胸苷激酶基因(*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,以此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处选用的启动子为 Jub,②处选用的启动子为 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培养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. BD 【解析】目的基因表达时,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 错误;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. D 【解析】将与淀粉合成有关的基因转入水稻,能改善其蒸煮品质和食味品质, A 正确;将与脂质合成有关的基因转入大豆、油菜,能改善其油脂品质, B 正确;科学家通过改变植物代谢过程,能培育出富含 β -胡萝卜素的水稻、高赖氨酸含量的玉米等作物, C 正确;我国对转基因食品的研究和应用采取了积极扶持、严格监管的政策,目前许多转基因食品已进入商业化生产, D 错误。

4. C 【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,因此猪更适合用于解决人类移植器官短缺的问题, 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. B 【解析】蛋白质工程的操作对象是编码蛋白质的基因,通过改造或合成基因实现对蛋白质的改造, A 错误;蛋白质的功能依赖其特定的空间结构,改造蛋白质时需要充分考虑空间结构,确保改造后的蛋白质正确折叠以行使预期功能, B 正确;天然蛋白质合成遵循中心法则,沿 DNA→RNA→蛋白质的方向进行,蛋白质工程的基本思路:从预期蛋白质功能出发→设计预期的蛋白质结构→推导氨基酸序列→获得对应的脱氧核苷酸序列或合成新的基因→获得所需要的蛋白质,二者流程并不完全相同, C 错误;AI 技术预测蛋白质结构仅为理论推导结果,仍需通过实验室检测验证结构和功能,无法完全替代实验室检测, D 错误。

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) 转录 翻译

(2) ④⑤ 相反

(3) 获得满足人类生产和生活需求的蛋白质 基因

(4) 显微注射 乳腺生物反应器

教材变式 本题是教材 P110“图 3-3-2 蛋白质工程的一般过程示意图”的变式题。本题围绕天然蛋白质合成与蛋白质工程的比较、蛋白质工程的目的、乳腺生物反应器等考点设置问题,考查蛋白质工程的基本原理、操作流程以及转基因动物生产药物的相关知识。

【解析】(1) 根据中心法则的过程判断:①是以 DNA 的一条链为模板合成 mRNA 的过程,属于转录;②是以 mRNA 为模板合成多肽链的过程,属于翻译。

(2) 蛋白质工程操作思路的特有过程是从预期蛋白质功能出发进行反向推导,先设计预期蛋白质的三维结构,再推测对应的氨基酸序列,改造相对应的基因或合成新的基因,对应图中④⑤过程。中心法则是遗传信息从 DNA→RNA→蛋白

第三章素养检测

质的正向传递路径,蛋白质工程的基本途径与中心法则方向相反。

(3) 蛋白质工程的最终目的是对现有蛋白质进行改造,或者合成自然界不存在的新的蛋白质,满足人类生产和生活的特定需求。蛋白质工程的最终操作对象是基因,通过修饰或合成基因实现对蛋白质的改造。

易错点: 蛋白质工程的操作对象并不是蛋白质

(4) 将目的基因导入哺乳动物受精卵的常用方法是显微注射法。培育的转基因动物在进入泌乳期后,可以通过分泌乳汁来生产目标药物,这称为乳腺生物反应器。

易错警示 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,实现对现有蛋白质的改造或制造新的蛋白质。蛋白质工程离不开基因工程,必须通过基因修饰或基因合成来实现,是对基因操作而不是直接对蛋白质分子进行操作(间接改造),因为改造基因易于操作且改造后能够遗传。

刷易错

★易错点 混淆基因工程与蛋白质工程

4. BCD 【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	

刷速度

1. B 【解析】A 项中的单链核酸过长,不适合用作扩增题述目的基因的引物, **A 不符合题意**; B 项中的单链核酸长度为 17 个核苷酸,与 DNA a 链的 5'端碱基序列相同,与 b 链的 3'端互补,可作为扩增题述目的基因的引物, **B 符合题意**; C 项中单链核酸的 3'端部分序列无法与模板链互补配对,且该单链核酸自身会发生碱基互补配对,不适合用作扩增题述目的基因的引物, **C 不符合题意**; D 项中的单链核酸与目的基因 b 链的 3'端碱基序列相同,与 a 链的 5'端互补,新合成的子链应该由引物的 5'端向 3'端延伸,引物应与 DNA 模板链的 3'端互补配对,不适合用作扩增题述目的基因的引物, **D 不符合题意**。

2. 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,使用 *EcoR* V 会出现反向连接和自连等问题,应采用 *Bam* H 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

3. D 【解析】质粒和目的基因都用酶 2 切割,会产生相同的黏性末端,目的基因和质粒都可能发生自身环化,而且目的基因插入质粒时可能会出现反向连接的情况, **A 不符合题意**; 酶 3 切割产生平末端,酶 1 切割产生黏性末端,二者末端不匹配,无法完成连接, **B 不符合题意**; 酶 2 和酶 4 切割产生相同的黏性末端,目的基因和质粒都可能发生自身环化,而且目的基因插入质粒时可能会出现反向连接的情况, **C 不符合题意**; 酶 1 和酶 2 切割产生不同的黏性末端,且二者的切割位点不在抗生素抗性基因(标记基因)内部,双酶切可避免载体和目的基因自身环化、保证目的基因正确插入质粒,黏性末端可被 *E. coli* DNA 连接酶高效连接,该方案合理, **D 符合题意**。

4. A 【解析】发生染色体的断裂和重接后,选择引物 S_1 和 R_1 能扩增出变异后的 D 基因, DNA 聚合酶只能沿引物的 3'端连接脱氧核苷酸, **A 正确**, **B 错误**; 引物在退火阶段与模板链结合, **C 错误**; 选择引物 S_1 和 R_1 对 D 基因进行扩增,从第 3 轮开始才出现等长的变异后的 D 基因片段,至少消耗的引物个数为 $2^3 \times 2 - 2 = 14$ (个), **D 错误**。

5. ABD 【解析】由题意及题图可知,当培养基中缺少色氨酸时, P_{trp} 启动子开启,阻遏蛋白 cI 合成,A 正确;结合图示可知,阻遏蛋白 cI 与 P_L 启动子结合,目的基因转录关闭,目的基因不能表达,B 正确;培养基中富含色氨酸时, P_{trp} 启动子关闭,阻遏蛋白 cI 无法合成,目的基因表达水平上升,C 错误;当色氨酸缺乏时 P_{trp} 启动子开启,目的基因转录关闭,而色氨酸充足时 P_{trp} 启动子关闭,目的基因可以转录,可见调节培养基中色氨酸含量能控制目的基因表达水平,D 正确。

6. CD 【解析】表达载体需包含复制原点(自主复制)、转录信号(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。

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 Ca^{2+} 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)。

【考点】DNA 分子进行 PCR 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+1} 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

8. (1) 复制原点 GAATTCTCTCCG EcoR I 和 Hind III P1、P4

(2)RNA 聚合酶识别和结合的部位,可驱动融合基因转录
确保融合蛋白能够连续翻译

(3)卡那霉素 C

【解析】(1)质粒能在受体细胞中复制依赖复制原点,因此 Ti 质粒上与其在农杆菌中复制能力相关的结构为复制原点。*StPin1A* 基因上无限制酶的识别序列,为了使扩增后的 *StPin1A* 基因能够与 Ti 质粒上的 *NaPI* 基因正确连接,用 PCR 技术扩增 *StPin1A* 基因时,需要设计合适的引物,依据图 1 及表中信息推测,*StPin1A* 要连接到 *NaPI* 的后面形成融合基因,且转录模板链的 3'端应与启动子接近,切割 Ti 质粒时需要用限制酶 *Eco*R I 和 *Hind* III,故引物 P2 包含的碱基序列为 5'-GAATTCTCTCCG-3'。对获得的 *NaPI-StPin1A* 融合基因进行扩增,上游引物选 P1,下游引物选 P4。

(2)融合基因启动子是 RNA 聚合酶识别和结合的部位,可驱动融合基因转录。为了使连接后的融合基因 *NaPI-StPin1A* 能够表达出融合蛋白,应剔除 *NaPI* 基因中终止密码子对应的碱基序列,确保融合蛋白能够连续翻译。

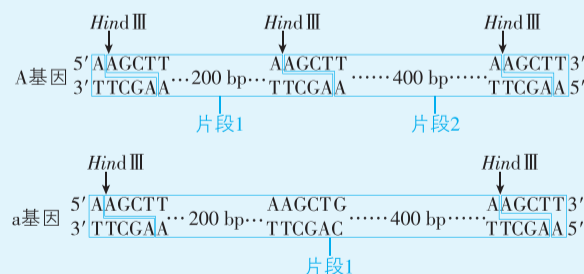
(3)Ti 质粒上存在卡那霉素抗性基因,将构建好的重组 Ti 质粒导入农杆菌中进行转化,并将农杆菌涂布在含有卡那霉素的固体培养基上,选择生长正常的菌落中的农杆菌与棉花的叶肉细胞共培养。在愈伤组织阶段取部分细胞提取 DNA 进行 PCR 和凝胶电泳,此操作的目的是检测融合基因 *NaPI-StPin1A* 是否导入,由于 *NaPI* 基因长度为 462 bp,*StPin1A* 基因长度为 750 bp,融合基因长度大约为 $462+750=1\,212$ (bp),对照题图 2 电泳结果可知,其中成功导入融合基因 *NaPI-StPin1A* 的细胞是 C。

第三章高考强化

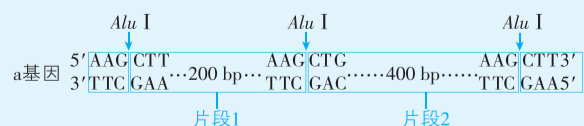
刷真题

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. B 【解析】基因工程的核心是构建基因表达载体,不同来源的启动子和基因编码序列可以重新组合,由转基因鱼生长速率加快可知,转入的重组生长激素基因成功表达,A 正确。启动子是驱动基因转录的位点,不同转基因鱼中启动子活性不一定相同,因此重组生长激素基因表达水平不一定相同,B 错误。若外源基因游离在细胞质中,细胞分裂时容易丢失;只有外源基因整合到染色体 DNA 上后,才能够随染色体复制和分配,稳定遗传给子代,C 正确。启动子是调控基因转录的关键 DNA 片段,通过调控启动子活性改变生长激素基因表达水平,检测转基因鱼的生长速率是否发生相应变化,可以验证两者的关系,D 正确。

3. (1) ①抗体 ②使 *CAR* 基因编码序列在星形胶质细胞中特异性表达 *Kpn* I、*Bam* H I

(2) C

(3) 没有携带 *CAR* 基因的病毒 携带 *CAR* 基因的病毒能减少阿尔茨海默病模型小鼠大脑的 A β 聚集体,减轻神经元损伤

【解析】(1) ① *CAR*-A 细胞能特异性识别、吞噬和降解 A β (β -淀粉样蛋白) 聚集体,据此可推知,图 a 中 *CAR* 基因编码序列中胞外识别区表达产物能特异性识别 A β 聚集体,此时 A β 聚集体作为抗原,所以胞外识别区应选用 A β 聚集体的抗体特定片段编码序列,这样细胞才能识别 A β 聚集体。

② 分析图 a,特异性启动子能启动 *CAR* 基因编码序列表达,使用特异性启动子能确保 *CAR* 基因编码序列只在星形胶质细胞内表达,避免 *CAR* 基因在其他类型细胞中表达,减少非特异性损伤。为使 *CAR* 基因正确插入病毒载体,应使用双酶切,可避免自身环化,同时需要通过绿色荧光蛋白示踪 *CAR* 基因成功导入星形胶质细胞,故病毒载体需保留 *GFP* 基因,因此不能选择 *Hind* III 切割病毒载体;为保证 *CAR* 基因在星形胶质细胞中特异性表达,需将特异性启动子和 *CAR* 基因编码序列同时插入病毒载体,并且破坏病毒载体上的非特异性启动子,则应选择限制酶 *Kpn* I 和 *Bam* H I 构建基因表达载体。

(2) 用含 A β 聚集体的培养基培养 *CAR*-A 细胞,让细胞吞噬并降解 A β 聚集体,一段时间后更换不含 A β 聚集体的培养基继续培养,为鉴定 *CAR*-A 细胞能吞噬和降解 A β 聚集体,应检测 0 h 和 24 h 细胞内的 A β 聚集体含量,检测 0 h 细胞内 A β 聚集体含量的目的是确认 *CAR*-A 细胞是否吞噬了 A β 聚集

体并提供初始对照数据,检测 24 h 细胞内 A β 聚集体含量,与 0 h 的对照,以确定细胞是否降解 A β 聚集体,C 正确。

(3) 该实验组的处理为给 6 月龄阿尔茨海默病模型小鼠注射携带 *CAR* 基因的病毒,为遵循单一变量原则,对照组的处理应为给 6 月龄阿尔茨海默病模型小鼠注射没有携带 *CAR* 基因的病毒;该实验结果为实验组模型小鼠大脑 A β 聚集体减少,且神经元损伤标志蛋白相对表达量下降,说明携带 *CAR* 基因的病毒可减少阿尔茨海默病模型小鼠大脑内 A β 聚集体,减轻神经元损伤,对阿尔茨海默病具有治疗效果。

4. (1) 启动子 复制原点

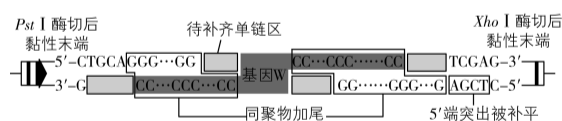
(2) *Pst* I 和 *Xho* I

(3) DNA 聚合酶、DNA 连接酶 不需要 单链区存在暴露的 3' 端, DNA 聚合酶可直接从此开始延伸合成 DNA

(4) 抗原—抗体杂交法

【解析】(1) 启动子是一段有特殊序列结构的 DNA 片段,载体上 RNA 聚合酶识别和结合的部位是启动子;载体上与其能自我复制相关的结构是复制原点。

(2) 结合题干及题图可知,基因 W 内部含有 *Sal* I 的识别序列,不能使用 *Sal* I 进行酶切。由 *Xho* I 酶切后产生的黏性末端(5' 端突出,需先用 DNA 聚合酶补平后再进行同聚物加尾)可知,欲使重组载体仍能被 *Xho* I 酶切,载体进行同聚物加尾时提供的脱氧核苷酸应为鸟嘌呤(G)脱氧核苷酸,同理,用 *Pst* I 酶切时同聚物加尾应提供鸟嘌呤(G)脱氧核苷酸,用 *Kpn* I 酶切时同聚物加尾应提供胞嘧啶(C)脱氧核苷酸。因为对载体进行同聚物加尾只提供 1 种脱氧核苷酸,所以应利用鸟嘌呤脱氧核苷酸进行同聚物加尾,这样切开的载体就能够与同聚物加尾[提供的脱氧核苷酸为胞嘧啶(C)脱氧核苷酸]后的基因 W 连接且保留 2 种限制酶的识别序列(见下图)。



综上分析,选用的 2 种限制酶为 *Pst* I 和 *Xho* I。

(3) 基因 W 和载体两者的同聚物尾配对后形成的重组载体存在部分单链区,需要用 DNA 聚合酶将单链区补齐,再用 DNA 连接酶将片段相连,该过程不需要添加引物,因为单链区存在暴露 3' 端,可以直接从现有的 3' 端进行延伸。

(4) 检测基因 W 是否表达出相应的蛋白质,在分子水平上采用的方法是抗原—抗体杂交法。

5. (1) 简并 ③

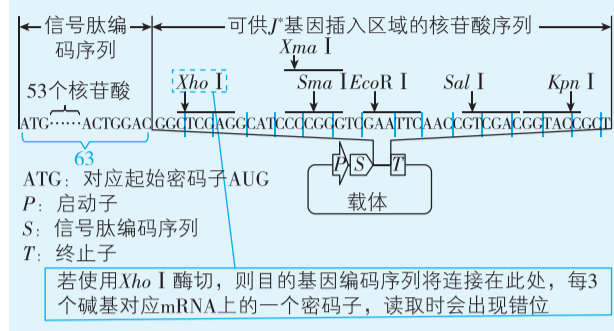
(2) 诱导 RNA 聚合 引导融合蛋白分泌到细胞外

(3) *Eco* R I 和 *Kpn* I *Eco* R I 和 *Sal* I 这两种组合的限制酶可在载体上产生不同的黏性末端,防止载体自身环化和

J^* 基因反向连接,且不会引起基因碱基信息的错位,从而保证“ $S-J^*$ 融合基因”正确表达

(4) 让菌体充分接触氧气和营养物质 农杆菌转化 抑制

题图解读



【解析】(1) 为避免外源 J 基因与内源 J 基因序列相同而引起的 J 基因表达抑制, 外源基因既要与内源基因序列不同, 又要表达出来相同的 J 蛋白, 可根据密码子的简并性来设计外

考点: 密码子的简并性为多种密码子可对应同一种氨基酸

源 J 基因(J^*)。为确定获得的 J^* 基因是否与设计相符, 应采用测序并序列比对的方法; PCR 只需要引物序列与目标 DNA 匹配, 即可扩增出目标基因, 无法检测基因序列是否完全符合设计; 琼脂糖凝胶电泳可检测目的基因的大小, 但无法检测基因序列是否完全符合设计。

(2) 启动子 P 只能在棉花被棉铃虫啃食后才能启动 J^* 基因的表达, 因此属于诱导型启动子。启动子是 RNA 聚合酶识别和结合的部位, 有了 RNA 聚合酶才能驱动基因转录出 mRNA, 最终表达出蛋白质。由题可知, 启动融合基因 $S-J^*$ 表达后检测到 J^* 蛋白在细胞外积累, 因此信号肽 S 的作用是引导融合蛋白分泌到细胞外。

和结合的部位, 有了 RNA 聚合酶才能驱动基因转录出 mRNA, 最终表达出蛋白质。由题可知, 启动融合基因 $S-J^*$ 表达后检测到 J^* 蛋白在细胞外积累, 因此信号肽 S 的作用是引导融合蛋白分泌到细胞外。

(3) 由题可知, 已合成的 J^* 基因两端仅含有对应的限制酶识别序列, 无额外碱基序列, 因此, 为使目的基因插入载体后正确表达, 需确保从信号肽编码序列 ATG 开始, 到目的基因所含限制酶识别序列(含 6 个碱基)前面的碱基数为 3 的整数倍, 才可使目的基因插入后能够正确翻译, 不会发生错位, 从而保证“ $S-J^*$ 融合基因”正确表达。由题图解读可知, 左端的限制酶只能选择 Eco R I, 可正常翻译, 不会发生错位。且为了防止载体、目的基因自身环化以及目的基因反向连接, 应选用能产生不同黏性末端的两种限制酶酶切载体, 所以 Eco R I 和 Kpn I 与 Eco R I 和 Sal I 限制酶组合均可。

(4) 振荡培养时, 使用的是液体培养基, 通过摇床振荡可让菌体与氧气和营养物质充分接触, 有利于菌体的培养。将目的基因导入植物细胞常用农杆菌转化法, 农杆菌转化法

可将目的基因导入植物的体细胞中, 如导入棉花的茎尖细胞, 再通过植物组织培养获得转基因植株。组蛋白去乙酰化酶活性低, 有利于组蛋白乙酰化水平升高, 因此 J^* 蛋白进入肠道细胞核, 会抑制棉铃虫的组蛋白去乙酰化酶活性, 组蛋白乙酰化水平升高, 最终诱导肠细胞凋亡, 引起棉铃虫死亡。

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更大 稀释

(2) Bam H I Sma I 和 Eco R V 切割后均产生平末端, Spe I 和 Xba I 切割后产生的黏性末端相同, 两种情况均会导致部分 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(使细胞处于感受态) 四环素 卡拉胶

(4) 44 该位点保守度低, 且该位点在空间上与第 119 位的半胱氨酸接近

【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切组合进行切割。

(3) Ca^{2+} 处理大肠杆菌细胞, 可以提高细胞膜通透性, 使细胞处于一种能吸收周围环境中 DNA 分子的生理状态(使细胞处于感受态), 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。

(4) 第 44 位的赖氨酸的保守度为 0.31, 与第 293 位的苏氨酸的保守度一致, 均较小, 说明这两个位点对酶功能影响较小, 替换风险低; 且第 44 位的赖氨酸比第 293 位的苏氨酸与第 119 位的半胱氨酸的空间距离更近, 替换后容易形成二硫键, 故选择第 44 位的赖氨酸进行替换最合适。