

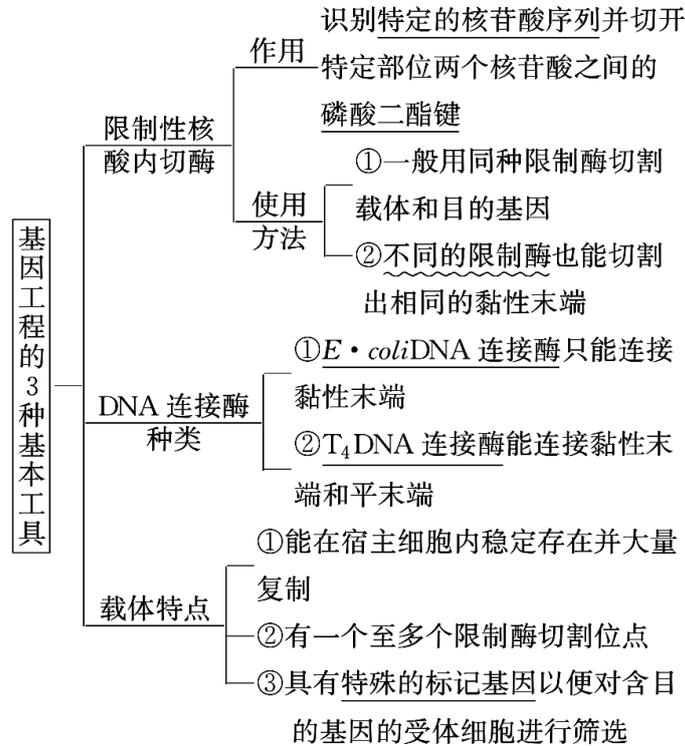
专题十一： 选修三专题

第一课时： 基因工程

编制人： 苏楠楠

【必备知识讲解】

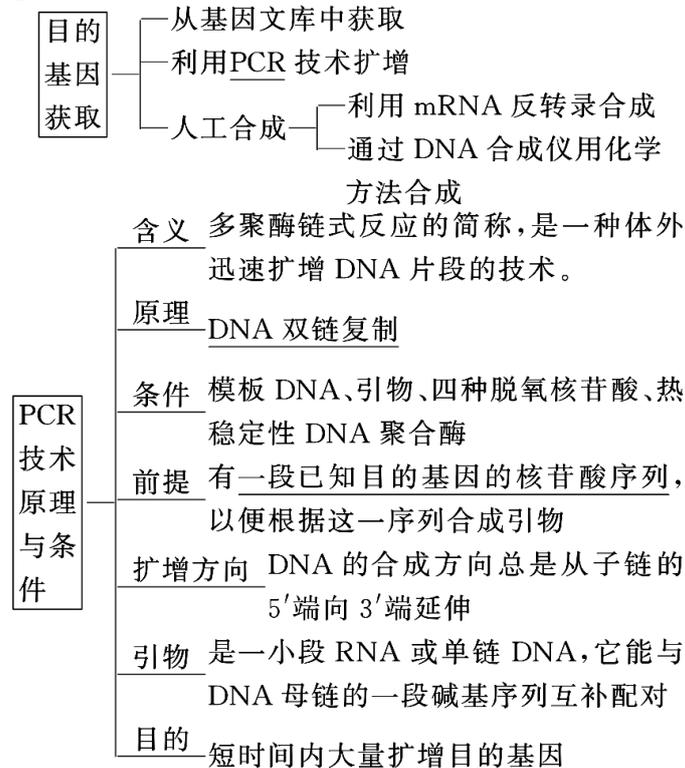
1. 基因工程的 3 种基本工具

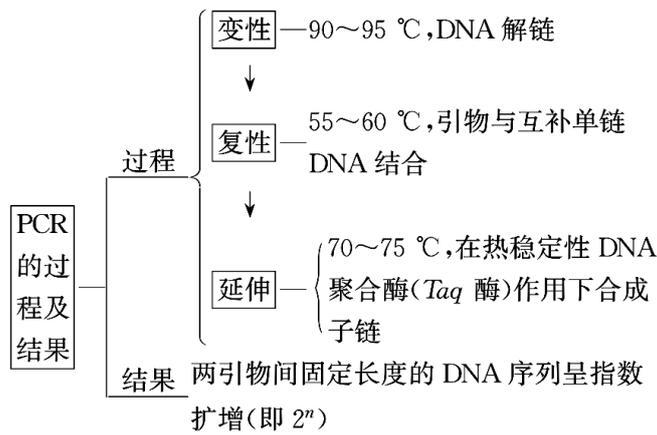


提醒：不同的限制酶切割出不同的黏性末端，则能使基因和载体定向连接，避免自身环化和反向连接，提高连接的有效性。

2. 基因工程的操作流程

(1) 获取目的基因的 3 种途径





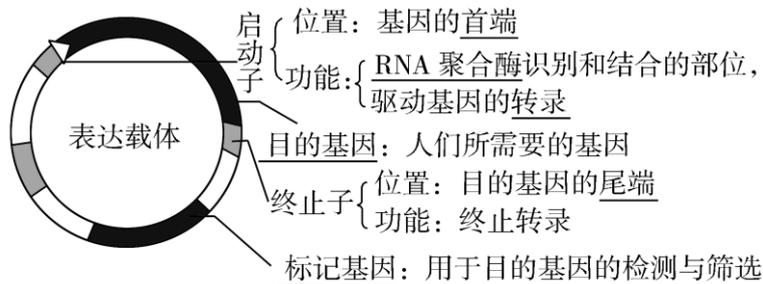
提醒：1. 从 cDNA 文库获取的目的基因不含启动子和终止子。 2. 通过 DNA 合成仪用化学方法合成 DNA 时需要知道 DNA 的碱基排列顺序，不需要模板。

3. 利用乳腺生物反应器生产药物时，应将目的基因与乳腺蛋白基因的启动子连接到一起。

4. 引物设计原则：

- 1) 长度:15-30bp, 其有效长度 $[L_n = 2(G + C) + (A + T)]$ 一般不大于 38, 否则 PCR 的最适延伸温度会超过 Taq 酶的最佳作用温度 (74 度), 从而降低产物的特异性。
- 2) G + C 含量:应在 40%—60% 之间, PCR 扩增中的复性温度一般较 T_m 值低, 等于引物的 T_m 值减去 5-10 度。引物长度小于 20 时, 其 T_m 恒等于 $4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ 。
- 3) 碱基分布的随机性:应避免连续出现 4 个以上的单一碱基。尤其是不应在其 3' 端出现超过 3 个的连续 G 或 C。
- 4) 引物自身:不能含有自身互补序列, 否则会形成发夹样二级结构。
- 5) 引物之间:两个引物之间不应有多于 4 个的互补或同源碱基, 不然会形成引物二聚体, 尤应避免 3' 端的互补重叠。
- 6) 注意扩增方向问题。
- 7) 注意特殊要求, 是否需要添加限制酶序列, 是否需要引入突变。

(2) 基因表达载体的构建——重组质粒的构建



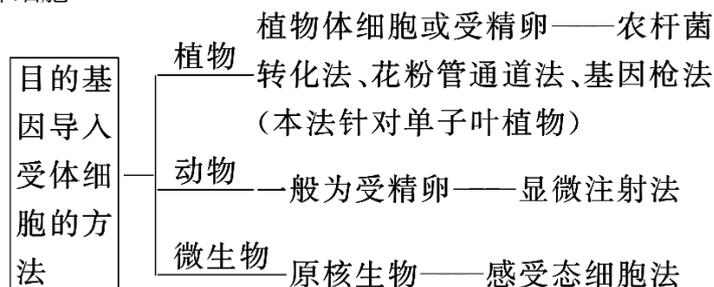
提醒：1. 基因工程中的载体与细胞膜上的载体不同。

2. 启动子、终止子

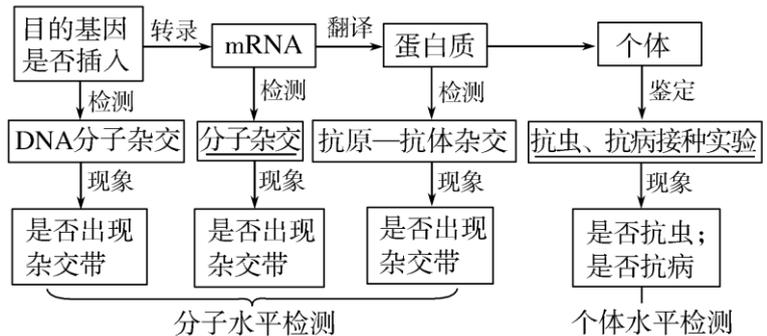
a. 启动子(DNA 片段)≠起始密码子(位于 mRNA 上)。 b. 终止子(DNA 片段)≠终止密码子(位于 mRNA 上)。

3. 目的基因插入位置：启动子与终止子之间。

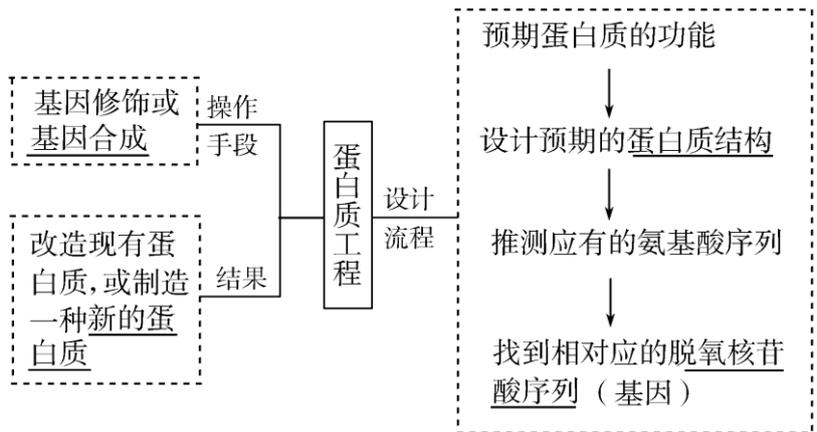
(3) 将目的基因导入受体细胞



(4) 目的基因的检测与鉴定



4. 蛋白质工程



【典型例题训练】

- 限制性内切酶 *Hind*III 和 *Xho* I 的识别序列及切割位点分别为 A⁺AGCTT 和 C⁺TCGAG，相关叙述正确的是
 - 两种限制酶的识别序列在 DNA 分子中出现的概率不同
 - 两种限制酶切割形成的黏性末端都是一AGCT
 - 分别用这两种酶切割目的基因和质粒后能形成重组质粒
 - 实验中可通过控制反应时间、酶的浓度等控制酶切效果
- 用 *Xho* I 和 *Sal* I 两种限制性核酸内切酶分别处理同一 DNA 片段，酶切位点及酶切产物分离结果如图。以下叙述不正确的是

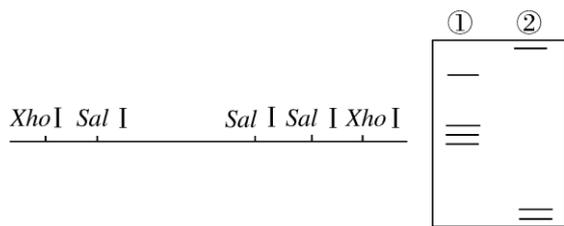
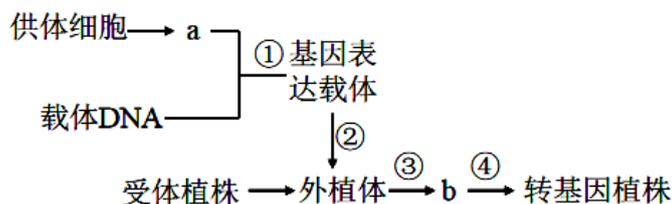


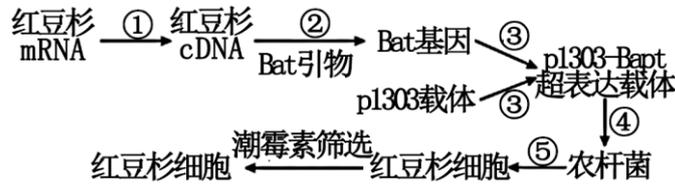
图 1 酶切位点图

图 2 电泳结果示意图

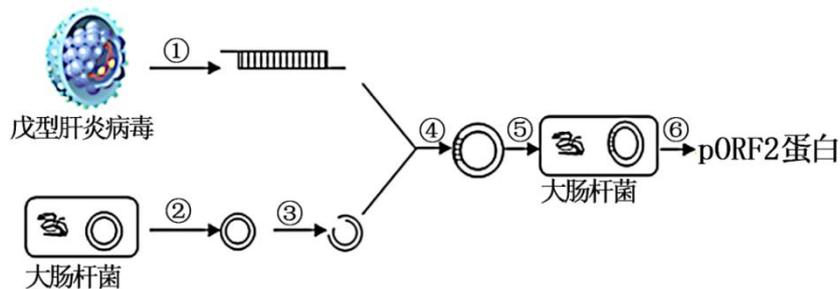
- 图 1 中两种酶识别的核苷酸序列不同
 - 图 2 中酶切产物可用于构建重组 DNA
 - 泳道①中是用 *Sal* I 处理得到的酶切产物
 - 图中被酶切的 DNA 片段是单链 DNA
- 基因工程打破了物种之间交流的界限，为花卉育种提供了新的技术保障。如图为花卉育种的过程（字母代表相应的物质或结构，数字代表过程和方法）。下列说法正确的是



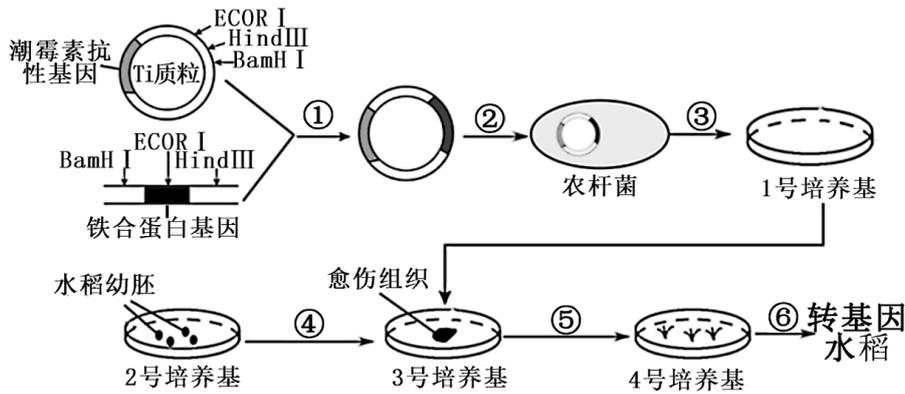
- A. ①过程需要的酶有限制酶和 DNA 聚合酶
 - B. 检测转基因生物的 DNA 上是否插入了目的基因，采用抗原—抗体杂交技术
 - C. ②过程所常用的方法是农杆菌转化法
 - D. 经培育获得的转基因植株一定能表达出外源基因性状
4. 从红豆杉细胞中提取的紫杉醇是目前最好的抗肿瘤药物之一。为提高红豆杉细胞培养物中紫杉醇的产量，研究人员构建紫杉醇合成关键酶基因（Bapt）的超表达载体，并将其导入红豆杉细胞，具体流程如下图。相关说法正确的是



- A. 过程①和②使用的酶均为 DNA 聚合酶
 - B. p1303 载体上可能含有增强 Bapt 基因表达的序列
 - C. 可使用 Bapt 基因制成的探针检测过程⑤是否成功
 - D. 改造的 红豆杉 细胞需组织培养至完整植株再进行紫杉醇提取
5. 研究者将苏云金芽孢杆菌（Bt）的 Cry1Ab 基因导入水稻细胞培育成抗螟虫的克螟稻，克螟稻与普通水稻杂交，子代抗螟虫与不抗螟虫的比例为 3：1。相关叙述正确的是
- A. 可能原因是两条非同源染色体上整合了 2 个 Cry1Ab 基因
 - B. 克螟稻与普通水稻都是杂合子，后代发生性状分离
 - C. 转入的 Cry1Ab 基因位于细胞质中的质粒上
 - D. 克螟稻降低了农药的使用量，害虫不会出现抗药性
6. “筛选”是生物工程中常用的技术手段，下列关于筛选的叙述错误的是
- A. 基因工程中通过标记基因筛选出的细胞必定含重组质粒
 - B. 在诱变育种中需通过筛选才能得到数量较少的有利变异
 - C. 植物体细胞杂交过程中，原生质体融合后获得的细胞需进行筛选
 - D. 单抗制备过程中，第二次筛选的目的是获得足够数量的能产生所需抗体的杂交瘤细胞
7. 戊型肝炎病毒是一种 RNA 病毒，ORF2 基因编码的结构蛋白（pORF2）位于病毒表面，构成病毒的衣壳。我国科研人员利用基因工程技术，在大肠杆菌中表达 pORF2，制备戊型肝炎疫苗，过程如图。下列关于该疫苗的叙述正确的是



- A. 过程①需要的酶是 RNA 聚合酶，原料是 A、U、G、C
 - B. 重组基因表达载体上的启动子需来源于戊型肝炎病毒
 - C. 过程⑤需要用聚乙二醇处理大肠杆菌使其处于感受态
 - D. 过程⑥大量制备 pORF2 蛋白前应做相应的检测与鉴定
8. 大米铁含量极低，科研人员通过基因工程、植物组织培养等现代生物技术，培育出了铁含量比普通大米高 60% 的转基因水稻，改良了稻米的营养品质。下图为培育转基因水稻过程示意图，其中①—⑥为过程，ECOR I、HindIII、BamH I 为限制酶。

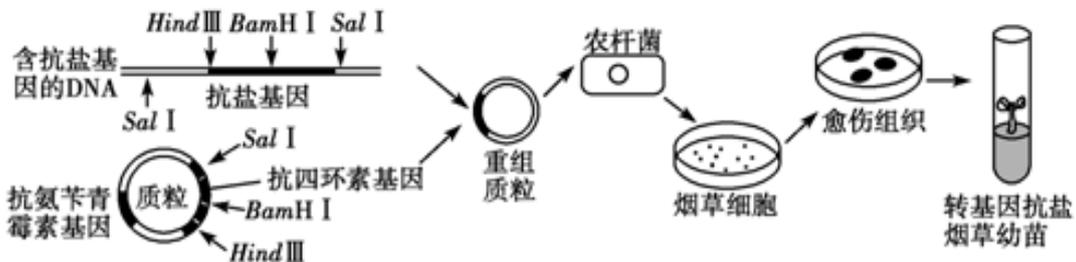


(1) 该转基因水稻培育过程中选取的目的基因是_____。PCR 是获取大量目的基因的一种方法，PCR 反应体系的成分中有两种引物，在复性时引物会结合到互补 DNA 链，对两种引物的设计要求之一是：两种引物之间不能碱基互补配对，试分析原因_____ (2 分)；PCR 反应体系的成分中能够决定复制特定 DNA 片段的是_____ (填“模板”、“引物”或“taq 酶”)；从引物设计的角度考虑，如果目的基因两侧没有酶切位点，用 PCR 技术_____ (“可以”或“不可以”) 为目的基因设置酶切位点。

(2) 完成图中①过程需选用_____限制酶处理 Ti 质粒和含目的基因的 DNA。为了筛检成功导入重组质粒的农杆菌，1 号培养基需要加入_____。诱导组织细胞失去分化的是_____号培养基。

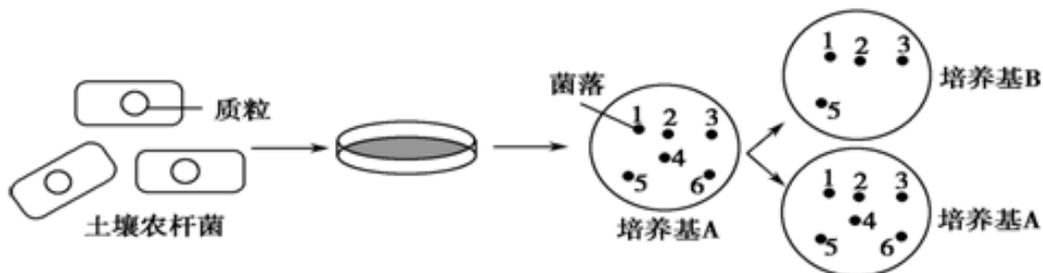
(3) 图中④⑤⑥过程，属于_____技术，④与⑤培养过程都需要光照条件吗？_____。该技术依据的基本原理(理论基础)是_____。

9. 某种质粒上有 Sal I、HindIII、BamH I 三种限制酶切割位点，它们的识别序列和黏性末端各不相同，该质粒同时含有抗四环素基因和抗氨苄青霉素基因。科学家利用此质粒培育转基因抗盐作物，提高粮食种植面积取得重大进展。其培育过程如下图，请回答下列问题。



(1) 在构建重组质粒时，应选用_____两种酶对质粒和含抗盐基因的 DNA 进行切割，以保证重组质粒序列的唯一性。

(2) 基因工程中的检测筛选是一个重要的步骤。为筛选出导入了重组质粒的农杆菌，下图表示运用影印培养法(使一系列培养皿的相同位置上能出现相同菌落的一种接种培养方法)检测重组质粒是否导入了土壤农杆菌。



培养基除了含有土壤农杆菌生长繁殖必需的成分和琼脂外，培养基 A 和培养基 B 分别还要含有_____、_____。从检测筛选的结果分析，含有目的基因的是_____ (填数字) (2 分) 菌落中的细菌。

(3) 为了确定抗盐作物是否培育成功，要用_____标记的含抗盐基因的 DNA 片段作探针进行分子杂交检测，还要从个体水平用_____ (方法) 鉴定作物的耐盐性。

(4) 将转入抗盐基因的工程细胞培育成完整植株需要用组织培养技术，组织培养技术依据的原理是_____。

(5) 将抗盐基因导入作物细胞内，使作物具有了抗盐性状，这种变异类型属于_____。

10. CRISPR/Cas9 基因编辑方法的建立在生命科学领域掀起了一场技术革命，最近科学家又进一步设计了新的 Cas9 融合蛋白，可作为“单碱基编辑器”，作用原理如图 1 所示。这种融合蛋白包含 dCas9 蛋白和大鼠胞苷脱氨酶 APOBEC1 两部分。dCas9 蛋白可以结合一段 sgRNA，这段 sgRNA 可以引导 dCas9 蛋白部分与特定的 DNA 序列结合。该融合蛋白的另一部分胞苷脱氨酶 APOBEC1 具有将识别部位特定位置的胞嘧啶转化为尿嘧啶（步骤①）的能力，之后通过 DNA 复制或修复，尿嘧啶被转化成胸腺嘧啶（步骤②）最终实现定点单个碱基的编辑替换。

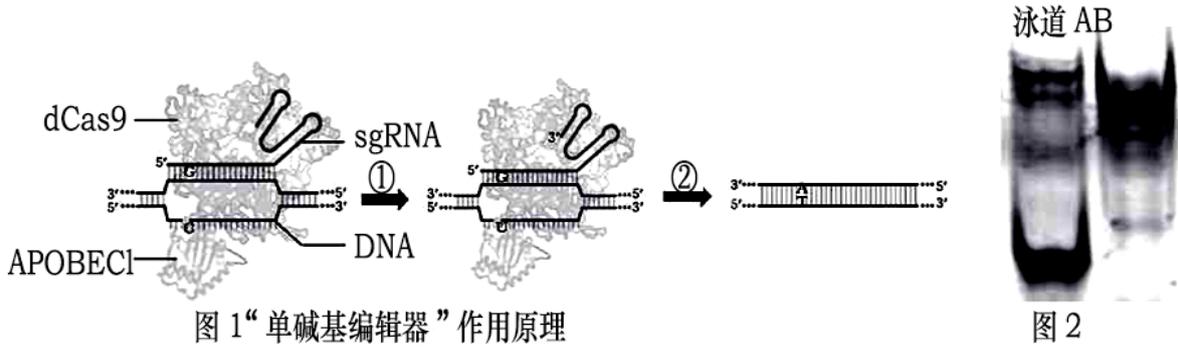


图 1“单碱基编辑器”作用原理

图 2

(1) 在上述“单碱基编辑器”中，sgRNA 能特异识别某段特定 DNA 序列的原理是_____，被编辑的靶基因发生了_____。为了检测步骤①的编辑效率，科学家用 USER 酶（能识别 DNA 中尿嘧啶并将其切割成短片段）处理编辑后的 DNA（染料标记），电泳后结果如图 2，泳道_____代表 DNA 中的胞嘧啶转化为了尿嘧啶。

(2) 科学家将以上方法用于斑马鱼体内基因组 DNA 的定点单碱基编辑。首先构建含特定 sgRNA 基因和_____基因的表达载体；利用_____法将体外表达的 RNA 导入斑马鱼的受精卵中。在细胞中经过_____形成 dCas9 和 APOBEC1 的融合蛋白质实现靶基因的编辑。

(3) 已知 tyr 基因的点突变会导致人体眼白化疾病患者无法正常合成色素。图 3 为正常人体部分 tyr 基因序列和对应的氨基酸序列，其中第 301 位的脯氨酸（P）突变为亮氨酸（L）就会导致眼白化。

①为验证该位点脯氨酸（P）的作用。科学家找到斑马鱼 tyr 基因对应的位点和序列（见图 3）。用上述方法单碱基编辑对应脯氨酸位点，将脯氨酸突变为丝氨酸，结果斑马鱼出现了如图 4 所示症状（箭头处），该实验说明_____。这为治疗疾病提供了有效的动物模型。

301
 正常人体碱基序列 CGT AAT CCT GGA AAC CAT GAC
 人体对应氨基酸序列 R N P G N H D
 斑马鱼对应氨基酸序列 R N P G D H D
 正常斑马鱼碱基序列 CGC AAT CCC GGG GAC CAC GAC

↑
 注：基因序列为非模板链
 图 3

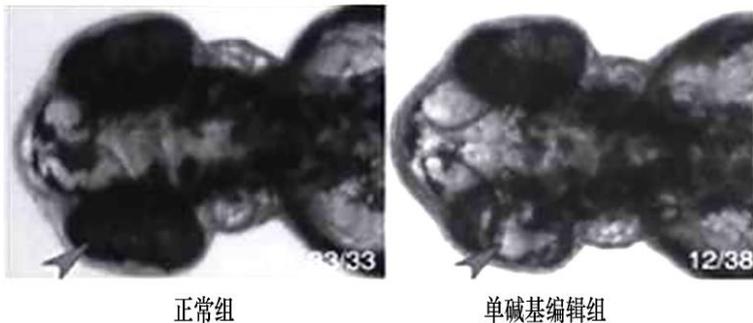


图 4

②若斑马鱼被编辑的碱基为图 3 箭头所示的 C 碱基，据图 1 和图 3 分析丝氨酸的密码子为_____。在正常个体中编码脯氨酸的密码子在人体和斑马鱼中却并不相同，这体现了密码子的_____。这种特点的存在具有什么意义_____。

11. TALEN 技术是一种靶向基因敲除技术，使用的基因敲除工具 TALEN 由人造 TALE 蛋白和 Fok I (核酸内切酶)等组成。图 1 是 TALE 蛋白中的二联氨基酸(如 NI、NG、NN、HD 等，其中字母 N、I、G、H、D 分别代表一种氨基酸)与恒定识别 DNA 的四种碱基之间的对应关系，图 2 是 TALEN 技术的基本原理示意图，其中 Fok I 形成二聚体后才能切断 DNA，导致 DNA 双链断裂，使基因被敲除。基因敲除基本步骤如下：

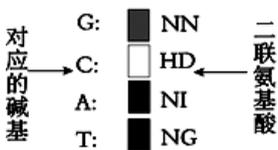


图 1



图 2

步骤 1 :TALE 靶点识别模块构建 TALE 的核酸识别单元中二联氨基酸 NI 识别 A，NG 识别 T，HD 识别 C，NN 识别 G。因此设计相应 TALE 单元串联，使 TALEN 特异识别某靶点基因。

步骤 2: 获得完整的 TALEN 将构建好的一对 TALE 靶点识别模块融合其他必要的序列，并与质粒构建基因表达载体 (TALEN 质粒对)。

步骤 3: 将 TALEN 质粒对转入细胞中实现目标基因敲除 将 TALEN 质粒对转入细胞后，其表达的蛋白可分别找到其 DNA 上的靶位点并与靶位点特异结合。FokI 形成二聚体，发挥内切酶活性，于两个靶位点之间打断目标基因，诱发 DNA 损伤修复机制。由于在此修复过程中总是有一定的错误率存在，在修复中发生错误的个体即形成目标基因敲除突变体。

请回答：

(1) 步骤 1 中，欲使 TALEN 特异识别靶点基因，需根据_____构建一对 TALE 靶点识别模块。若图 2 中左侧 TALE 蛋白识别的基因部分序列为-GTC-，则对应的二联氨基酸序列应为_____。

(2) 步骤 2 中需要_____和_____的催化，要获得完整的 TALEN，构建的基因表达载体中还需要融合_____序列。

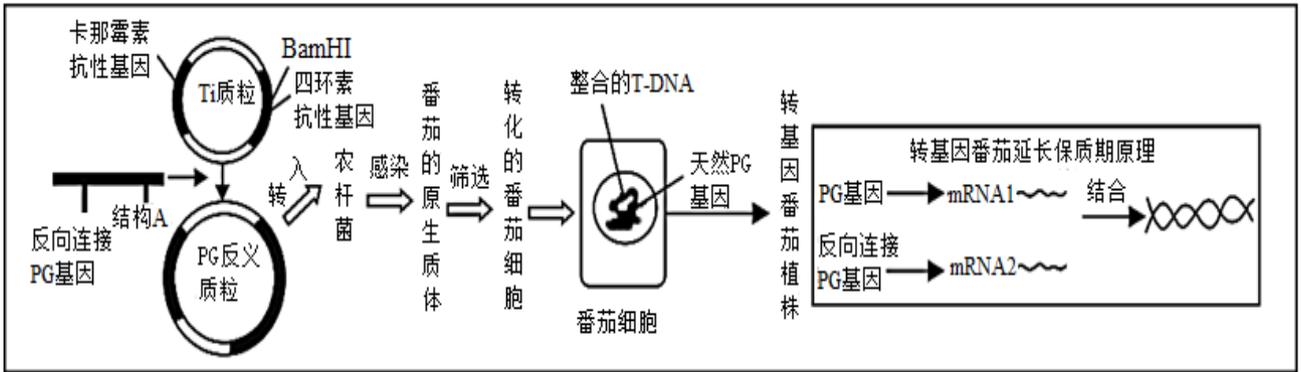
(3) 步骤 3 中 FokI 二聚体作用的化学键是_____。步骤 3 完成后可能获得多种 DNA，可利用限制酶对相邻靶位点之间的相应片段进行切割，再根据切割后形成的 DNA 分子大小，运用_____ (技术)分离筛选出发生目标基因敲除的突变个体。

(4) 科研人员使用 TALEN 技术对水稻光周期敏感蛋白基因 P 进行靶向敲除，以获得长日照条件下纯合光敏雄性不育新品种。已知水稻光周期敏感蛋白基因 P 只在花粉细胞中表达，使其能够合成淀粉。不含光周期敏感蛋白的水稻在长日照条件下表现为雄性不育，短日照条件下均为雄性可育。

①将 TALEN 技术处理得到的亲本水稻植株，种植在_____日照条件下自交获得 F₁。

②若要鉴定 F₁ 是否为纯合光敏雄性不育新品种，可将 F₁ 植株种植在_____日照条件下，然后_____，若未出现蓝色，则该植株为所需新品种。

12. 番茄果实在成熟的过程中，多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 合成显著增加，以降解果胶使细胞壁破损，从而使果实变红变软，但不利于保鲜。科学家利用基因工程得到转基因番茄，大大延长果实保质期。操作流程如下，回答下列问题：



- (1) 利用 RT-PCR 技术即逆转录—多聚酶链式反应制备 PG 基因，最好从番茄的_____细胞中提取 mRNA，此技术所需要的酶主要有_____。
- (2) 据图可知，转基因番茄主要通过抑制 PG 基因的_____过程，使 PG 合成量减少，从而延长果实保质期。
- (3) 图中的农杆菌。能够在含_____的培养基中生存，而在含_____的培养基中不能生存的即为已转化的所需农杆菌。
- (4) 图中将反向连接 PC 基因导入番茄细胞的方法称为_____。要检测感染农杆菌后的番茄细胞染色体 DNA 上是否插入了反向连接 PC 基因，_____（填“能”或“不能”）用标记的 PG 基因的单链作为探针进行检测，理由是_____。
- (5) 在将转化的番茄细胞通过植物组织培养技术形成番茄幼苗过程中，培养基_____（填“要”或“不要”）添加有机营养物质，原因是_____。

8. 【答案】 (1). 铁合蛋白基因 (2). 防止引物之间结合形成双链, 降低引物与 DNA 模板链结合的效率 (3). 引物 (4). 可以 (5). BamH I 和 HindIII (6). 潮霉素 (7). 2 (8). 植物组织培养 (9). ④不需要, ⑤需要 (10). 植物细胞的全能性

9. 【答案】 Sal I HindIII 氨苄青霉素 四环素 (或答氨苄青霉素和四环素) 4 和 6 放射性同位素 (或荧光素) 一定浓度的盐水浇灌作物 (将作物移栽到盐碱地中种植) 细胞的全能性 基因重组

10. 【答案】 (1). 碱基互补配对 (2). 基因突变 (3). A (4). APOBEC1 基因和 dCas9 基因 (5). 显微注射 (6). 翻译 (7). 脯氨酸是眼部合成色素所必需的。 (8). UCC (9). 简并性 (10). 降低基因突变的多害性

11. 【答案】 靶点基因两端的核苷酸序列 $\begin{matrix} \text{NNH} \\ \text{NGD} \end{matrix}$ 限制酶 DNA 连接酶 FokI 磷酸二酯键

电泳 短 长 在开花期随机选择各植株的花粉, 用碘液染色

12. 【答案】 果肉 逆转录酶和 Taq 酶 (或热稳定 DNA 聚合酶) 翻译 卡那霉素 四环素 农杆菌转化法 不能 番茄细胞内原有的天然 PG 基因和插入的反向连接 PG 基因, 均会与该探针形成杂交带 要 该培养过程中植物细胞不能进行光合作用 (或光合作用很弱)