

第 49 讲 基因工程的基本工具和基本操作程序

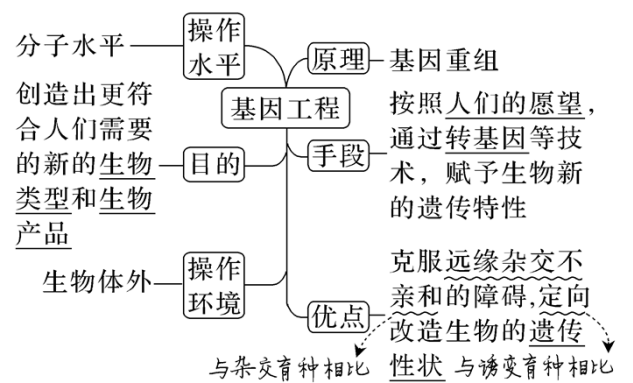
课标内容 (1)阐明 DNA 重组技术的实现需要利用限制性内切核酸酶、DNA 连接酶和载体三种基本工具。(2)阐明基因工程的基本操作程序主要包括目的基因的筛选与获取、基因表达载体的构建、将目的基因导入受体细胞和目的基因的检测与鉴定等步骤。(3)DNA 的粗提取与鉴定实验。(4)利用聚合酶链式反应(PCR)扩增 DNA 片段并完成电泳鉴定，或运用软件进行虚拟 PCR 实验。

考点一 重组 DNA 技术的基本工具

基础·精细梳理

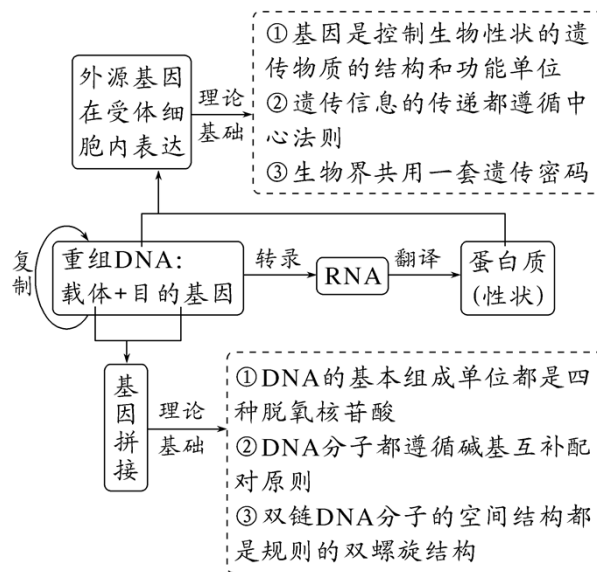
夯实必备知识

1.基因工程概述



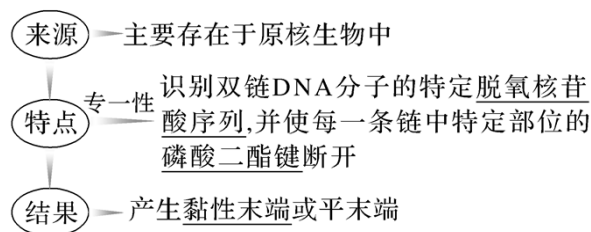
名师解读

基因工程的理论基础



2.重组 DNA 技术的基本工具

(1)限制性内切核酸酶(也称“限制酶”)

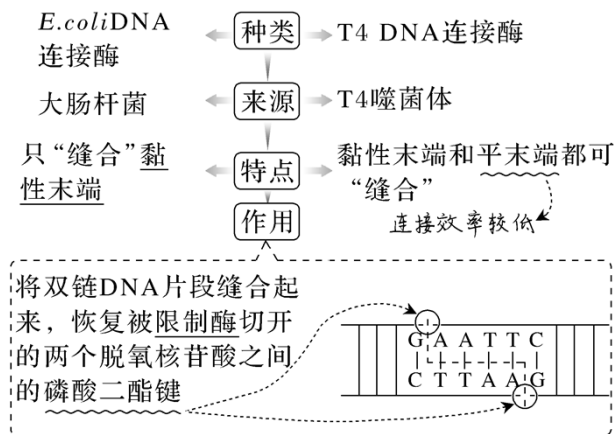


名师解读

①将一个基因从 DNA 分子上切割下来需要切两处,同时产生四个黏性末端或平末端。

②限制酶不切割自身 DNA 的原因是原核生物 DNA 分子中不存在该酶的识别序列或识别序列已经被修饰。

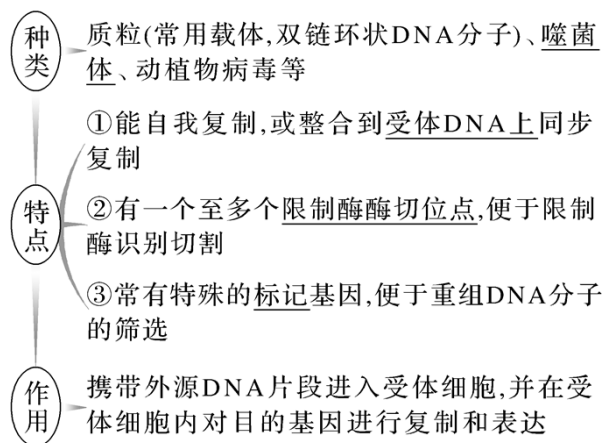
(2)DNA 连接酶



名师解读

①DNA 连接酶连接的是两个 DNA 片段，而 DNA 聚合酶是把单个的脱氧核苷酸连接到已有的 DNA 片段上。②DNA 聚合酶起作用时需要以一条 DNA 链为模板，而 DNA 连接酶不需要模板。

(3)载体



疑难·精准突破

强化关键能力

【情境推理·探究】

1.实践中常用某些病毒载体作为基因工程工具，除具备普通“质粒载体”的条件外，还应具有的条件是_____

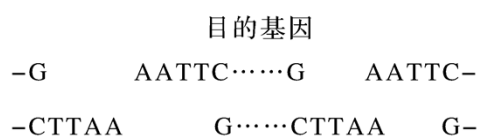
(答出两点即可)。

提示 对靶细胞具有较高的转化效率，不能增殖，对细胞无害。

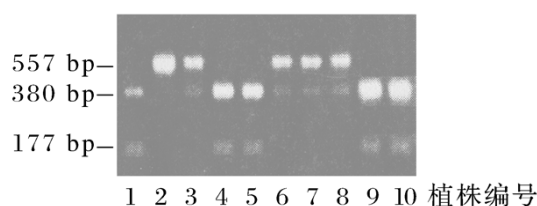
2.限制性内切核酸酶 *EcoR* I

只能识别序列—GAATTC—，并只能在 G 与 A 之间切割。若在某目的基因的两侧各有 1 个 *EcoR* I 的切点，请画出目的基因两侧被限制酶 *EcoR* I 切割后所形成的黏性末端。

提示



3. 软米基因会导致水稻稻米合成直链淀粉含量降低呈现软米特征，人们大多喜欢软米的口感，为获得高产软米粳型水稻，软米基因 W_x^{nq} 与蜡质基因 W_x 互为等位基因，序列长度相同均为 557 碱基对(bp)，但基因内部出现了限制酶 *Nla*III 识别位点，用限制酶 *Nla*III 处理不同植株的 DNA 片段，获得电泳图如下，分析可知含有纯合软米基因的植株为哪几个？(填植株编号)

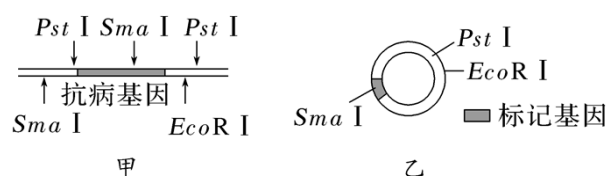


软米基因检测结果

提示 1、4、5、9、10。

【重点难点·透析】

1. 限制酶的选择原则



(1) 不破坏目的基因原则：如图甲中可选择 *Pst* I，而不选择 *Sma* I。

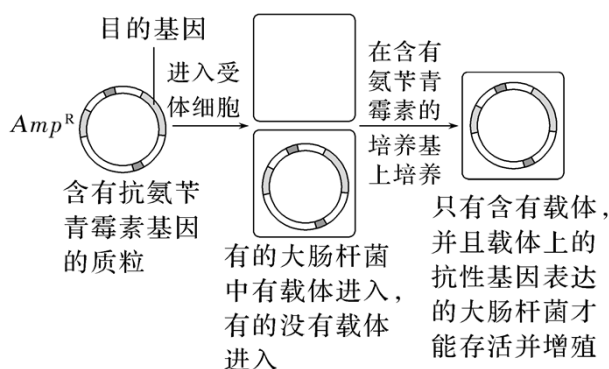
(2) 保留标记基因、启动子、终止子、复制原点原则：所选择的限制酶尽量不要

破坏这些结构，如图乙中不选择 *Sma* I。

(3)确保出现相同黏性末端原则：通常选择与切割目的基因相同的限制酶切割质粒，如图中 *Pst* I；为避免目的基因和质粒自身环化和随意连接，也可使用不同的限制酶切割目的基因和质粒，如图也可选择 *Pst* I 和 *EcoR* I 两种限制酶。

2.标记基因的作用

标记基因可用于检测目的基因是否导入受体细胞：

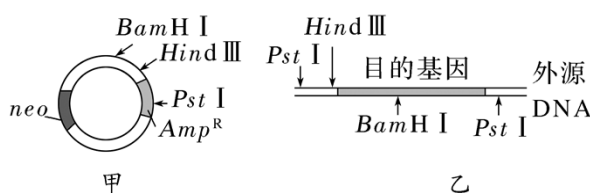


典例·精心深研

提升学科素养

考向 围绕基因工程的基本工具，考查科学思维

1.(2023·江苏盐城调研)图甲、乙中的箭头表示三种限制性内切核酸酶的酶切位点，*Amp^R* 表示氨苄青霉素抗性基因，*neo* 表示新霉素抗性基因。下列叙述错误的是 ()



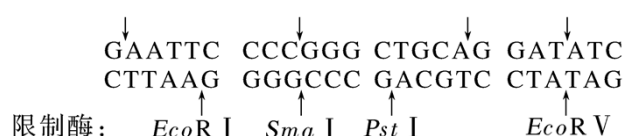
- A.在构建重组质粒时，可用 *Pst* I 和 *Hind*III 切割质粒和外源 DNA
- B.在酶切过程中，不能破坏质粒中全部的标记基因
- C.若只用 *Pst* I 处理质粒和外源 DNA 分子片段，无法避免自身环化和反向连接
- D.导入重组质粒的大肠杆菌可以在含氨苄青霉素的培养基中生长

答案 D

解析 切割目的基因时，用 *Bam*H I 切割会破坏目的基因，只用 *Pst* I

切割目的基因和质粒载体，会出现目的基因和质粒的自身环化，或目的基因和质粒的反向连接，而用 *Pst* I 和 *Hind* III 进行酶切，能确保目的基因和质粒的正向连接，并且质粒上保留新霉素抗性基因作为标记基因，A、C 正确；在酶切过程中，不能破坏质粒中全部的标记基因，至少需保留其中的一个，B 正确；用 *Pst* I 切割后，质粒上氨苄青霉素抗性基因被破坏了，导入重组质粒的大肠杆菌不可以在含氨苄青霉素的培养基中生长，D 错误。

2.(2021·全国乙卷，38)用 DNA 重组技术可以赋予生物以新的遗传特性，创造出更符合人类需要的生物产品。在此过程中需要使用多种工具酶，其中 4 种限制性内切核酸酶的切割位点如图所示。



回答下列问题：

(1)常用的 DNA 连接酶有 *E.coli* DNA 连接酶和 T4 DNA 连接酶。上图中_____酶切割后的 DNA 片段可以用 *E.coli* DNA 连接酶连接。上图中_____酶切割后的 DNA 片段可以用 T4 DNA 连接酶连接。

(2)DNA 连接酶催化目的基因片段与质粒载体片段之间形成的化学键是_____。

(3)DNA 重组技术中所用的质粒载体具有一些特征。如质粒 DNA 分子上有复制原点，可以保证质粒在受体细胞中能_____；质粒 DNA 分子上有_____，便于外源 DNA 插入；质粒 DNA 分子上有标记基因(如某种抗生素抗性基因)，利用抗生素可筛选出含质粒载体的宿主细胞，方法是_____。

(4)表达载体含有启动子，启动子是指_____。

答案 (1)*Eco*R I、*Pst* I *Eco*R I、*Sma* I、*Pst* I、*Eco*R V

(2)磷酸二酯键 (3)自我复制 限制酶切割位点 用含有该抗生素的培养基培养宿主细胞,能够存活的即为含有质粒载体的宿主细胞

(4)RNA 聚合酶识别、结合和驱动转录的一段 DNA 序列

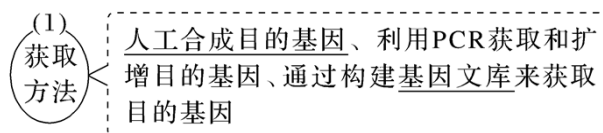
解析 (1)由题图可以看出, *EcoR* I、*Sma* I、*Pst* I、*EcoR* V 切割后分别形成黏性末端、平末端、黏性末端和平末端, *E.coli* DNA 连接酶可用于连接黏性末端, T4 DNA 连接酶可用于连接黏性末端和平末端。(2)DNA 连接酶催化 DNA 链的 5' 端与另一 DNA 链的 3' 端生成磷酸二酯键。(3)复制原点是在基因组上复制起始的一段序列,可以保证质粒在宿主细胞中进行自我复制。质粒上有限制酶切割位点,该位点可被限制酶切开并使外源目的基因插入其中。若质粒 DNA 分子上有某种抗生素抗性基因,则可以用含有该抗生素的培养基培养宿主细胞,能够存活的即为含有质粒载体的宿主细胞。(4)启动子是 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,最终获得所需要的蛋白质。

考点二 基因工程的基本操作程序

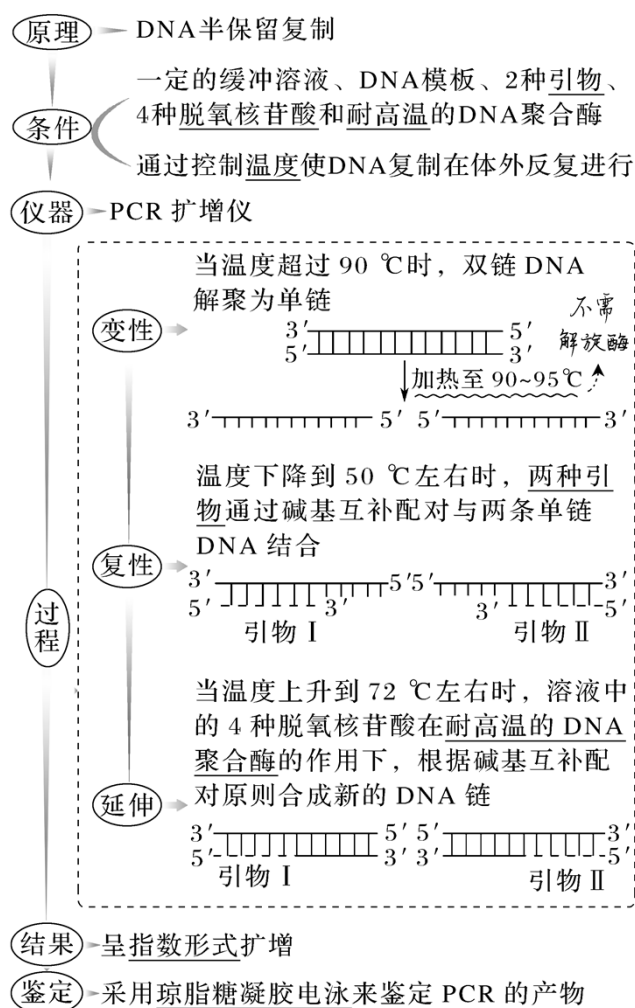
基础·精细梳理

夯实必备知识

1.目的基因的筛选与获取



(2)利用 PCR 获取和扩增目的基因

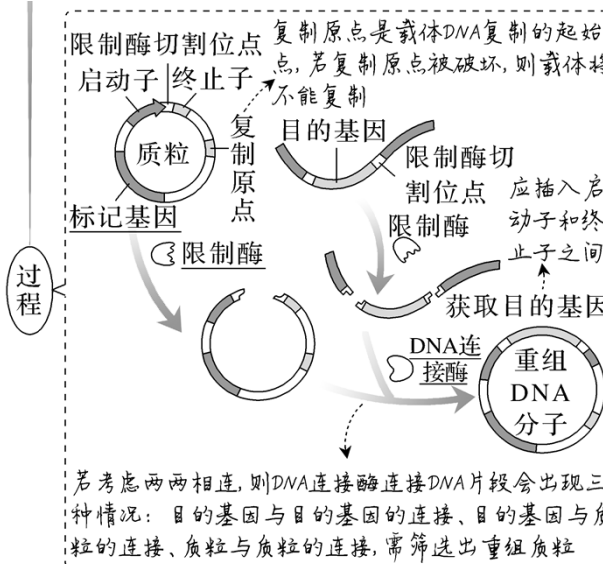
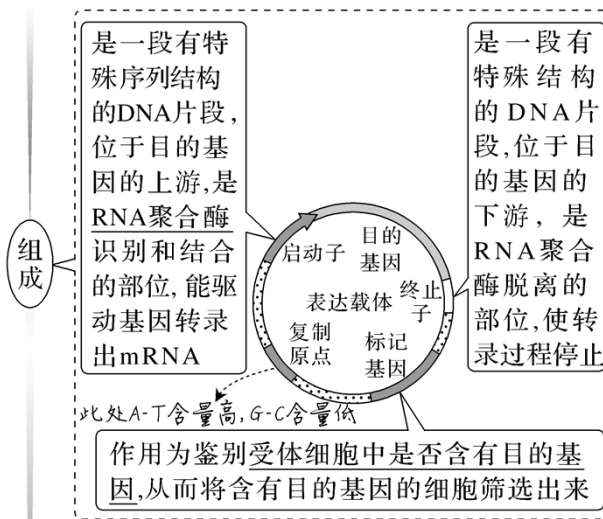


名师解读

- ①在 PCR 过程中实际加入的原料为 dNTP(即 dATP、dGTP、dTTP、dCTP)，既可作为合成 DNA 子链的原料，又可为 DNA 的合成提供能量。
- ②引物是一小段能与 DNA 母链的一段碱基序列互补配对的短单链核酸，作为新子链的合成起点，只能结合在母链的 3'端，使 DNA 聚合酶能够从引物的 3'端开始连接脱氧核苷酸。
- ③复性温度过高，则引物难以与模板链结合，温度过低则易使两条母链配对结合，均无法获得 PCR 产物。
- ④真核细胞和细菌的 DNA 聚合酶都需要 Mg^{2+} 激活。因此，PCR 反应缓冲溶液中一般要添加 Mg^{2+} 。

2.基因表达载体的构建——核心

目的 使目的基因在受体细胞中稳定存在,并且遗传给下一代,同时使目的基因能够表达和发挥作用



提醒 启动子、起始密码子、终止子、终止密码子的区别

位置	作用
位于DNA分子上	启动子
位于mRNA分子上	起始密码子
位于DNA分子上	终止子
位于mRNA分子上	终止密码子

RNA聚合酶识别和结合位点,启动转录过程

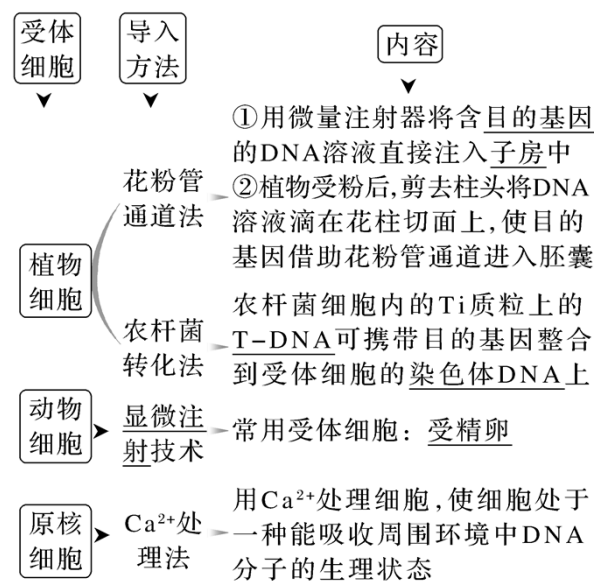
决定翻译的开始

决定转录的结束

决定翻译的结束

3.将目的基因导入受体细胞

只有该步骤没涉及碱基互补配对原则



名师解读

(1)农杆菌特点

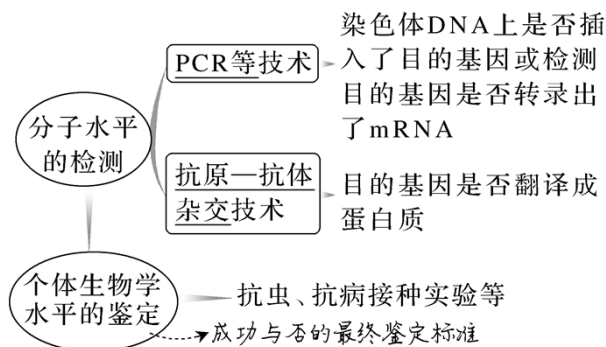
①能在自然条件下侵染双子叶植物和裸子植物,而对大多数单子叶植物没有侵染能力。

②农杆菌细胞内含有Ti质粒,当它侵染植物细胞后,能将Ti质粒上的T-DNA转移到被侵染的细胞,并且将其整合到该细胞的染色体DNA上。

(2)农杆菌转化法中的两次拼接: 第一次拼接是将目的基因拼接到Ti质粒的T-DNA上,第二次拼接(非人工操作)是指插入目的基因的T-DNA拼接到受体细胞的染色体DNA上;两次导入: 第一次导入是将含目的基因的Ti质粒导入农杆菌,第二次导入(非人工操作)是指含目的基因的T-DNA导入受体细胞。

(3)导入的目的基因,可能存在于细胞质中,也可能整合到染色体DNA上。存在于染色体DNA上的目的基因有可能通过花粉传播进入杂草或其他作物中,造成“基因污染”。

4.目的基因的检测与鉴定

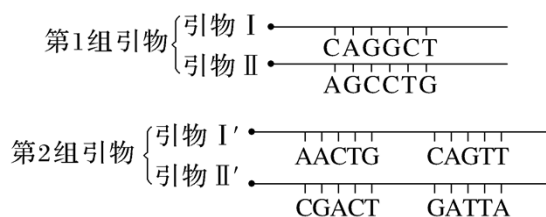


疑难·精准突破

强化关键能力

【情境推理·探究】

1. 设计引物是 PCR 技术关键步骤之一。某同学设计的两组引物(只标注了部分碱基序列)都不合理(如图), 请分别说明理由。



①第1组: _____;

②第2组: _____。

提示 引物 I 和引物 II 局部发生碱基互补配对而失效; 引物 I 自身折叠后会出现局部碱基互补配对而失效。

2. 如果将某种抗性基因导入受体细胞后, 仅一条染色体含抗性基因, 该基因的传递遵循孟德尔分离定律。判断依据是_____

提示 仅一条染色体含有抗性基因, 另一条没有其等位基因。

3. 利用大肠杆菌可生产出人的胰岛素, 联系前面各种细胞器功能的知识, 结合基因工程操作程序的基本思路, 思考一下, 若要生产人的胰岛素, 可用大肠杆菌吗?

提示 不可用。大肠杆菌为原核生物, 没有真核生物所具有的内质网、高尔基体等结构, 无法对核糖体合成的肽链进行加工。

考向 1 PCR 技术及其应用

1.(2021·湖北卷, 16)某实验利用 PCR 技术获取目的基因, 实验结果显示除目的基因条带(引物与模板完全配对)外, 还有 2 条非特异条带(引物和模板不完全配对)。为了减少反应中非特异条带的产生, 以下措施中有效的是()

A.增加模板 DNA 的量

B.延长热变性的时间

C.延长延伸的时间

D.提高复性的温度

答案 D

解析 PCR 过程中, 引物和模板不完全配对会形成非特异条带, 增加模板 DNA 的量不会减少反应中非特异条带的产生, A 错误; 延长热变性的时间, 有利于双链 DNA 解聚为单链, 不能减少反应中非特异条带的产生, B 错误; 延长延伸的时间, 有利于合成新的 DNA 链, 但不能减少反应中非特异条带的产生, C 错误; 在一定温度范围内, 选择较高的复性温度可减少引物和模板间的非特异性结合, D 正确。

2.(2022·全国乙卷, 38)新冠疫情出现后, 病毒核酸检测和疫苗接种在疫情防控中发挥了重要作用。回答下列问题:

(1)新冠病毒是一种 RNA 病毒, 检测新冠病毒 RNA(核酸检测)可以采取 RT—PCR 法。这种方法的基本原理是先以病毒 RNA 为模板合成 cDNA, 这一过程需要的酶是_____, 再通过 PCR 技术扩增相应的 DNA 片段。根据检测结果判断被检测者是否感染新冠病毒。

(2)为了确保新冠病毒核酸检测的准确性，在设计 PCR 引物时必须依据新冠病毒 RNA 中的_____来进行。PCR 过程每次循环分为 3 步，其中温度最低的一步是_____。

(3)某人同时进行了新冠病毒核酸检测和抗体检测(检测体内是否有新冠病毒抗体)，若核酸检测结果为阴性而抗体检测结果为阳性，说明_____(答出 1 种情况即可)；若核酸检测和抗体检测结果均为阳性，说明_____。

(4)常见的病毒疫苗有灭活疫苗、蛋白疫苗和重组疫苗等。已知某种病毒的特异性蛋白 S(具有抗原性)的编码序列(目的基因)。为了制备蛋白疫苗，可以通过基因工程技术获得大量蛋白 S。基因工程的基本操作流程是_____。

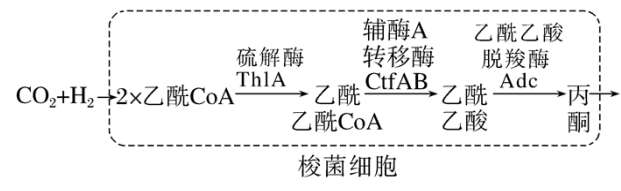
答案 (1)逆转录酶(或反转录酶) (2)特异性核苷酸序列 复性(或退火) (3)曾感染新冠病毒，已康复 已感染新冠病毒，是患者 (4)获取目的基因→构建基因表达载体→导入受体细胞→目的基因的检测与鉴定

解析 (1)以病毒 RNA 为模板合成 cDNA 是逆转录过程，这一过程需要的酶是逆转录酶(或反转录酶)。获得 cDNA 后可通过 PCR 技术扩增相应的 DNA 片段。根据检测结果判断被检测者是否感染新冠病毒。(2)为确保 PCR 扩增获得的是特异性序列，从而确保新冠病毒核酸检测的准确性，设计 PCR 引物时必须依据新冠病毒 RNA 中的特异性核苷酸序列来进行。PCR 过程每次循环分为 3 步，即变性(超过 90 ℃)→复性(50 ℃左右)→延伸(72 ℃左右)，其中温度最低的一步是复性(或退火)。(3)某人同时进行了新冠病毒核酸检测和抗体检测，若核酸检测结果为阴性而抗体检测结果为阳性，说明他体内没有新冠病毒，但曾感染新冠病毒，已经康复；若核酸检测和抗体检测结果均为阳性，说明他体内已感染新冠病毒，是患者。(4)基因工程的基本操作流程是：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。

考向 2 结合基因工程的基本操作程序，考查科学探究能力

3.(2022·广东卷，22)“绿水逶迤去，青山相向开。”

大力发展低碳经济已成为全社会的共识。基于某些梭菌的特殊代谢能力，有研究者以某些工业废气(含 CO_2 等一碳温室气体，多来自高污染排放企业)为原料，通过厌氧发酵生产丙酮，构建一种生产高附加值化工产品的新技术。



回答下列问题：

- (1)研究者针对每个需要扩增的酶基因(如图)设计一对_____，利用 PCR 技术，在优化反应条件后扩增得到目标酶基因。
- (2)研究者构建了一种表达载体 pMTL80k ,用于在梭菌中建立多基因组合表达库，经筛选后提高丙酮的合成量。该载体包括了启动子、终止子及抗生素抗性基因等，其中抗生素抗性基因的作用是_____，终止子的作用是_____。
- (3)培养过程中发现重组梭菌大量表达上述酶蛋白时，出现了生长迟缓的现象，推测其原因可能是_____，此外丙酮的积累会伤害细胞，需要进一步优化菌株和工艺才能扩大应用规模。
- (4)这种生产高附加值化工产品的新技术，实现了_____，体现了循环经济的特点。从“碳中和”的角度看，该技术的优势在于_____，具有广泛的应用前景和良好的社会效益。

答案 (1)引物 (2)作为标记基因，筛选含有基因表达载体的受体细胞 终止转录，使转录在需要的地方停下来 (3)二氧化碳等气体用于大量合成丙酮，而不是用于重组梭菌的生长 (4)废物的资源化 不仅不排放二氧化碳，而且还可以

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。

如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/265134143000012014>