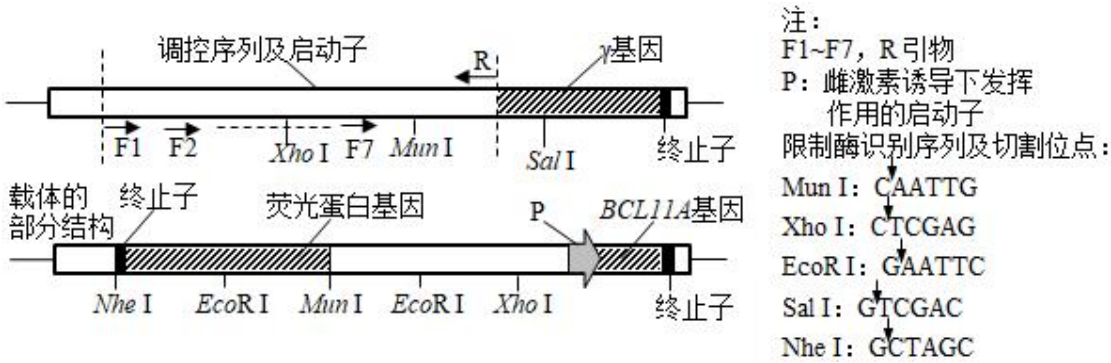


山东高考题练习（4.13）

1.人类 γ 基因启动子上游的调控序列中含有 BCL11A 蛋白结合位点，该位点结合 BCL11A 蛋白后， γ 基因的表达被抑制。通过改变该结合位点的序列，解除对 γ 基因表达的抑制，可对某种地中海贫血症进行基因治疗。科研人员扩增了 γ 基因上游不同长度的片段，将这些片段分别插入表达载体中进行转化和荧光检测，以确定 BCL11A 蛋白结合位点的具体位置。相关信息如图所示。



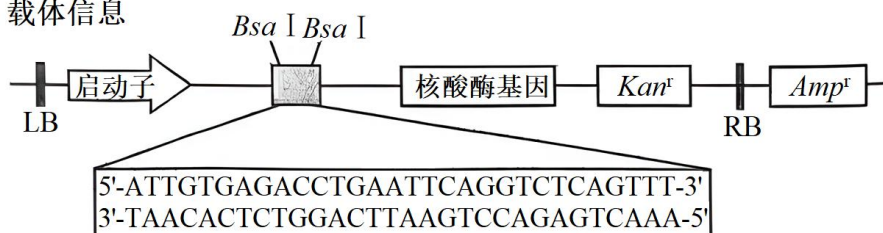
（1）为将扩增后的产物定向插入载体指导荧光蛋白基因表达，需在引物末端添加限制酶识别序列。据图可知，在 F₁~F₇ 末端添加的序列所对应的限制酶是____，在 R 末端添加的序列所对应的限制酶是____。本实验中，从产物扩增到载体构建完成的整个过程共需要____种酶。

（2）将构建的载体导入除去 BCL11A 基因的受体细胞，成功转化后，含 F₁~F₆ 与 R 扩增产物的载体表达荧光蛋白，受体细胞有荧光，含 F₇ 与 R 扩增产物的受体细胞无荧光。含 F₇ 与 R 扩增产物的受体细胞无荧光的原因是____。

（3）向培养液中添加适量的雌激素，含 F₁~F₄ 与 R 扩增产物的受体细胞不再有荧光，而含 F₅~F₆ 与 R 扩增产物的受体细胞仍有荧光。若 γ 基因上游调控序列上与引物序列所对应的位置不含有 BCL11A 蛋白的结合位点序列，据此结果可推测，BCL11A 蛋白结合位点位于____，理由是____。

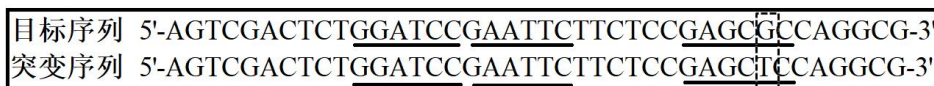
2. 研究发现基因 L 能够通过脱落酸信号途径调控大豆的逆境响应。利用基因工程技术编辑基因 L,可培育耐盐碱大豆品系。在载体上的限制酶 BsaI 切点处插入大豆基因 L 的向导 DNA 序列，将载体导入大豆细胞后，其转录产物可引导核酸酶特异性结合基因组上的目标序列并发挥作用。载体信息、目标基因 L 部分序列及相关结果等如图所示。

图甲：载体信息

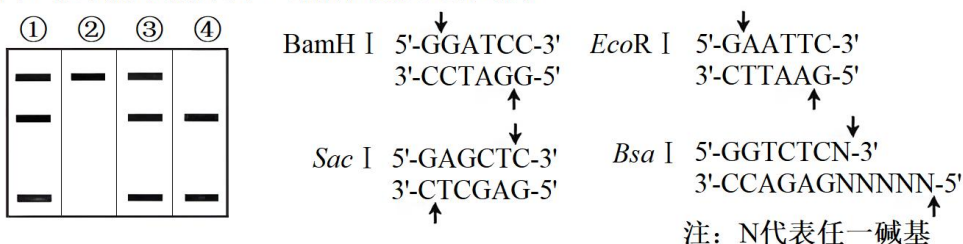


LB/RB:T-DNA的边界序列；*Kan^r*:卡那霉素抗性基因；*Amp^r*:氨苄青霉素抗性基因

图乙：目标基因L部分序列



图丙：限制酶识别序列、切割位点及电泳结果

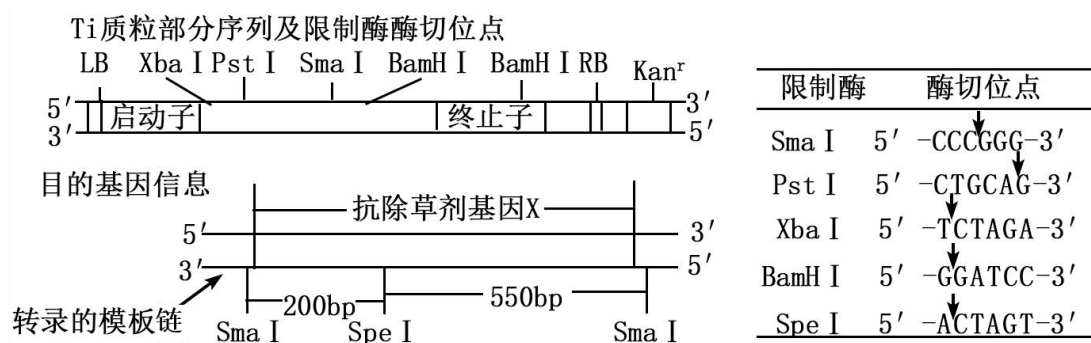


(1)用 PCR 技术从大豆基因组 DNA 中扩增目标基因 L 时，所用的引物越短，引物特异性越_____（填“高”或“低”）。限制酶在切开 DNA 双链时，形成的单链突出末端为黏性末端，若用 *Bsa*I 酶切大豆基因组 DNA，理论上可产生的黏性末端最多有_____种。载体信息如图甲所示，经 *Bsa*I 酶切后，载体上保留的黏性末端序列应为 5'-_____3'和 5'-_____3'。

(2)重组载体通过农杆菌导入大豆细胞，使用抗生素_____筛选到具有该抗生素抗性的植株①~④。为了鉴定基因编辑是否成功，以上述抗性植株的 DNA 为模板，通过 PCR 扩增目标基因 L，部分序列信息及可选用的酶切位点如图乙所示，PCR 产物完全酶切后的电泳结果如图丙所示。据图可判断选用的限制酶是_____，其中纯合的突变植株是_____（填序号）。

(3)实验中获得 1 株基因 L 成功突变的纯合植株，该植株具有抗生素抗性，检测发现其体细胞中只有 1 条染色体有 T-DNA 插入。用抗生素筛选这个植株的自交子代，其中突变位点纯合且对抗生素敏感的植株所占比例为_____，筛选出的敏感植株可用于后续的品种选育。

3. 种子休眠是抵御穗发芽的一种机制。通过对 Ti 质粒的改造，利用农杆菌转化法将 Ti 质粒上的 T-DNA 随机整合到小麦基因组中，筛选到 2 个种子休眠相关基因的插入失活纯合突变体。与野生型相比，突变体种子的萌发率降低。小麦基因组序列信息已知。

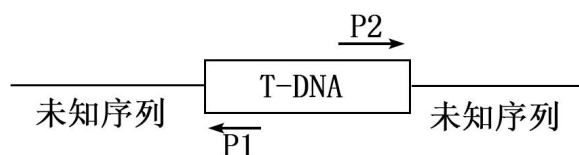


注：LB/RB:T-DNA的边界序列；Kan^r:卡那霉素抗性基因；bp:碱基对

图甲 Ti质粒与抗除草剂基因信息

(1)Ti 质粒上与其在农杆菌中的复制能力相关的结构为_____。选用图甲中的 SmaI 对抗除草剂基因 X 进行完全酶切，再选择 SmaI 和_____对 Ti 质粒进行完全酶切，将产生的黏性末端补平，补平时使用的酶是_____。利用 DNA 连接酶将酶切后的包含抗除草剂基因 X 的片段与酶切并补平的 Ti 质粒进行连接，构建重组载体，转化大肠杆菌；经卡那霉素筛选并提取质粒后再选用限制酶_____进行完全酶切并电泳检测，若电泳结果呈现一长一短 2 条带，较短的条带长度近似为_____bp，则一定为正向重组质粒。

(2)为证明这两个突变体是由于 T-DNA 插入到小麦基因组中同一基因导致的，提取基因组 DNA，经酶切后产生含有 T-DNA 的基因组片段（图乙）。在此酶切过程中，限于后续 PCR 难以扩增大片段 DNA，最好使用识别序列为_____（填“4”“6”或“8”）个碱基对的限制酶，且 T-DNA 中应不含该酶的酶切位点。需首先将图乙的片段_____，才能利用引物 P1 和 P2 成功扩增未知序列。PCR 扩增出未知序列后，进行了一系列操作，其中可以判断出 2 条片段的未知序列是否属于同一个基因的操作为_____（填“琼脂糖凝胶电泳”或“测序和序列比对”）。



注：P1、P2表示引物

图乙 基因组DNA酶切后含T-DNA的片段

(3)通过农杆菌转化法将构建的含有野生型基因的表达载体转入突变植株，如果检测到野生型基因，_____（填“能”或“不能”）确定该植株的表型为野生型。

答案:

1. **Sall** **EcoRI** 6 F7 与 R 扩增产物不含完整的启动子, 荧光蛋白基因不表达 引物 F4 与 F5 在调控序列上所对应序列之间的区段上 根据有无荧光情况判断, F1~F4 与 R 扩增产物上均有结合位点, 因此结合位点位于 F4 所对应调控序列的下游 (右侧); F5~F6 与 R 扩增产物上均无结合位点, 可知结合位点位于 F5 所对应调控序列的上游 (左侧), 所以结合位点位于引物 F4 与 F5 在调控序列上所对应序列之间的区段上

2. (1) 低 256 5'-CAAT-3' 5'-GTTT-3'

(2) 卡那霉素 **Sac I** ④

(3) 1/4

3. (1) 复制原点 **XbaI** DNA 聚合酶 **SmaI** 和 **SpeI**

550bp

(2) 4 环化 测序和序列比对

(3) 不能