

第1节 重组DNA技术的基本工具

学有目标——新课程标准必明	记在平时——核心语句必背
1.概述 DNA 重组技术所需的三种基本工具及其作用。 2. 阐明基因工程载体需要具备的条件。 3. 理解 DNA 粗提取和鉴定的原理，学会 DNA 的粗提取和鉴定方法。	1.限制性内切核酸酶能够识别双链 DNA 分子的特定核苷酸序列，并且使每一条链中特定部位的磷酸二酯键断开。 2. <i>E.coli</i> DNA 连接酶与 T4 DNA 连接酶都能将双链 DNA 片段“缝合”起来，恢复被限制酶切开的磷酸二酯键，但前者连接具有平末端的 DNA 片段的效率远远低于后者。 3.质粒作为基因工程的载体需具备的条件：能在宿主细胞内稳定保存并自我复制；具有一个至多个限制酶切割位点；具有标记基因。 4.DNA 粗提取与鉴定的原理：DNA 溶于 2 mol/L 的 NaCl 溶液，不溶于酒精，在沸水浴条件下遇二苯胺会呈现蓝色。

预习新教材——自学区

[理清主干知识]

一、基因工程(重组 DNA 技术)的概念

手段	通过转基因等技术，赋予生物新的遗传特性
目的	按照人们的愿望，进行严格的设计，创造出更符合人们需要的新的 <u>生物类型</u> 和 <u>生物产品</u>
操作水平	<u>DNA 分子水平</u>

二、基因工程的诞生和发展

1. 基础理论

- (1)DNA 是遗传物质的证明。
- (2)DNA 双螺旋结构的提出和半保留复制的证明。
- (3)中心法则的确立。
- (4)遗传密码的破译。

2. 技术支持

- (1)基因转移载体和工具酶的发现。
- (2)DNA 体外重组的实现。
- (3)重组 DNA 表达实验的成功。
- (4)DNA 测序和合成技术的发明。

(5)PCR 技术的发明。

三、重组 DNA 技术的基本工具

1. 限制性内切核酸酶(限制酶)——“分子手术刀”

(1)来源：主要从原核生物中分离纯化出来。

(2)作用：识别双链 DNA 分子的特定核苷酸序列，并且使每一条链中特定部位的磷酸二酯键断开。

(3)作用结果：产生黏性末端或平末端。

2. DNA 连接酶——“分子缝合针”

(1)种类

项目	<i>E.coli</i> DNA 连接酶	T4 DNA 连接酶
来源	大肠杆菌	T4 噬菌体
特点	都能将双链 DNA 片段“缝合”起来，恢复被限制酶切开的磷酸二酯键，但 <i>E.coli</i> DNA 连接酶连接具有平末端的 DNA 片段的效率要远远低于 T4 DNA 连接酶	

(2)作用

将双链 DNA 片段“缝合”起来，恢复被限制酶切开的磷酸二酯键。

3. 基因进入受体细胞的载体——“分子运输车”

(1)作用：携带外源 DNA 片段进入受体细胞。

(2)种类：质粒、噬菌体、动植物病毒等。

(3)条件 { 能自我复制
有一个至多个限制酶切割位点
有特殊的标记基因

四、DNA 的粗提取与鉴定

1. 实验原理

DNA、RNA、蛋白质和脂质等在物理和化学性质方面存在差异，可以利用这些差异，选用适当的物理或化学方法对它们进行提取。

(1)DNA 不溶于酒精。

(2)DNA 在不同浓度的 NaCl 溶液中溶解度不同，它能溶于 2 mol/L 的 NaCl 溶液。

(3)在一定温度下，DNA 遇二苯胺试剂会呈现蓝色。

2. 实验流程

取材、研磨 → 过滤或离心 → 粗提取 → 鉴定

[诊断自学效果]

1. 判断下列叙述的正误

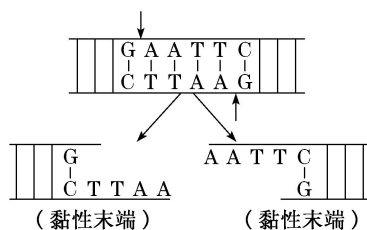
- (1)限制酶只能用于切割目的基因(×)
- (2)DNA 连接酶能将两碱基间通过氢键连接起来(×)
- (3)*E.coli* DNA 连接酶连接具有平末端的 DNA 片段的效率高于 T4 DNA 连接酶。(×)
- (4)用作载体的质粒 DNA 分子上至少含一个限制酶识别位点(√)
- (5)载体质粒通常采用抗生素合成基因作为筛选标记基因(×)
- (6)在溶有 DNA 的 NaCl 溶液中,加入二苯胺试剂即呈蓝色(×)

2. 下列关于基因工程的叙述,错误的是()

- A. 基因工程的原理是染色体变异
- B. 基因工程可定向改变生物的性状
- C. 基因工程是在分子水平上进行的设计和施工
- D. 基因工程可以将外源基因导入不同种的生物体内

解析:选 A 基因工程的原理是基因重组, A 错误;基因工程可按照人们的意愿定向改变生物的性状, B 正确;基因工程是在分子水平上进行的设计和施工, C 正确;基因工程可以将外源基因导入不同种的生物体内, D 正确。

3. 在如图过程中发挥作用的酶是()



- A. RNA 聚合酶
- B. DNA 连接酶
- C. DNA 聚合酶
- D. 限制性内切核酸酶

解析:选 D 限制性内切核酸酶能识别双链 DNA 分子的特定核苷酸序列,并且使每一条链中特定部位的磷酸二酯键断开,形成黏性末端。

4. 质粒是某些生物细胞中的有机分子,下列相关叙述错误的是()

- A. 质粒只存在于原核生物中
- B. 质粒能够自主复制
- C. 质粒中不含游离的磷酸基团
- D. 质粒常作为基因工程的运载工具

解析:选 A 质粒是广泛存在于细菌、酵母菌等微生物体内的一种小型的环状 DNA 分子, A 错误;质粒是一种具有自主复制能力的很小的双链环状 DNA 分子,不含游离的磷酸基团, B、C 正确;质粒常作为基因工程的载体, D 正确。

新知探究一 基因工程的工具酶

[在探究中学明]

“工欲善其事，必先利其器”。我国拥有自主知识产权的转基因抗虫棉，就是通过精心设计，用“分子工具”构建成的。培育抗虫棉首先要在体外对含有抗虫基因的 DNA 分子进行切割、改造、修饰和拼接，然后导入棉花体细胞内，并使重组 DNA 在细胞中表达。



图1 抗虫棉(左侧为对照)

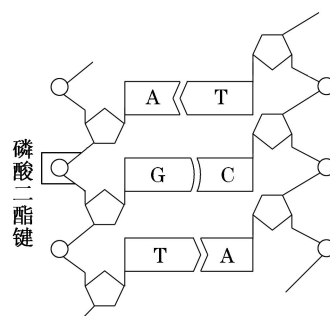
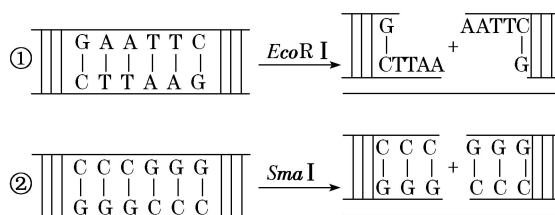


图2 双链 DNA 结构和磷酸二酯键位置

1. 已知限制酶 *EcoR* I 和 *Sma* I 识别的碱基序列和酶切位点分别为

$\downarrow$ GAATTC和 $\downarrow$ CCCGGG，分析回答：



(1)在图中画出两种限制酶切割 DNA 后产生的末端。

(2)写出产生的末端种类：①产生的是黏性末端；②产生的是平末端。

(3)*EcoR* I 限制酶和 *Sma* I 限制酶识别的碱基序列不同，切割位点不同(填“相同”或“不同”)，说明限制酶具有专一性。

(4)要将限制酶 *Sma* I 切割后产生的末端连接起来，需要 T4 DNA 连接酶。

2. 限制酶 I 的识别序列和切点是 $\downarrow$ GGATCC—，限制酶 II 的识别序列和切点是 $\downarrow$ GATC—。在质粒上有限制酶 I 的一个切点，在目的基因的两侧各有 1 个限制酶 II 的切点。

(1)请写出质粒被限制酶 I 切割后形成的黏性末端。

提示： $\begin{array}{l} \text{—G} \quad \text{GATCC—} \\ \text{—CCTAG} \quad \text{G—} \end{array}$

(2)请写出目的基因两侧被限制酶 II 切割后形成的黏性末端。

提示：GATC—……—目的基因

—……—CTAG

(3)在 DNA 连接酶的作用下，上述两种不同限制酶切割后形成的黏性末端能否连接起来？为什么？

提示：能。因为上述两种不同限制酶切割后形成的黏性末端是相同的。

[在深化中提能]

1. 对基因工程概念的理解

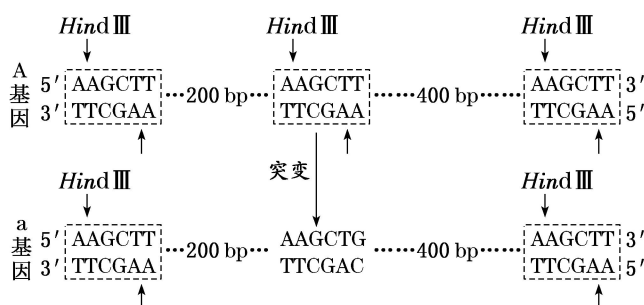
基因工程的别名	基因拼接技术或重组 DNA 技术
操作环境	生物体外
操作对象	基因
操作水平	DNA 分子水平
基本过程	剪切→拼接→导入→表达
原理	基因重组
结果	获得符合人们需要的新的生物类型和生物产品
优点	克服远缘杂交不亲和的障碍；定向改造生物的遗传性状

2. 与 DNA 有关的酶的比较

名称	作用部位	作用底物	作用结果
限制酶	磷酸二酯键	DNA	将 DNA 分子切成两个片段
DNA 连接酶	磷酸二酯键	DNA 片段	将两个 DNA 片段连接为一个 DNA 分子
耐高温的 DNA 聚合酶	磷酸二酯键	脱氧核苷酸	将单个脱氧核苷酸依次连接到单链末端
DNA (水解)酶	磷酸二酯键	DNA	将 DNA 片段水解为单个脱氧核苷酸
解旋酶	碱基对之间的氢键	DNA	将双链 DNA 分子局部解旋为单链，形成两条长链
RNA 聚合酶	磷酸二酯键	核糖核苷酸	将单个核糖核苷酸依次连接到单链末端

[典例] (2025·江苏高考，改编)图示人体正常基因 A 突变为致病基因 a 及 Hind III 切割

位点。*Alu* I 限制酶识别序列及切割位点为 $\begin{array}{c} 5'-AGCT-3' \\ 3'-TCGA-5' \end{array}$ ，下列相关叙述正确的是()



- A. 基因 A 突变为 a 是一种碱基增添的突变
- B. 用两种限制酶分别酶切 A 基因后，形成的末端类型相同
- C. 用两种限制酶分别酶切 a 基因后，产生的片段大小一致
- D. 产前诊断时，该致病基因可选用 *Hind* III 限制酶开展酶切鉴定

[解析] 由图可知，基因 A 突变为基因 a，是由于 T—A 替换成了 G—C，属于碱基的

替换，A 错误；*Hind* III 切割后形成的是黏性末端，*Alu* I 切割后形成的是平末端，B 错误；突变后的基因 a 中间片段不存在 *Hind* III 的切割位点，存在 *Alu* I 的切割位点，基因 a 分别用 *Hind* III 和 *Alu* I 酶切后产生的片段大小不一致，C 错误；正常的基因 A 用 *Hind* III 酶切后产生 4 个片段，突变后的基因 a 用 *Hind* III 酶切后产生 3 个片段，D 正确。

[答案] D

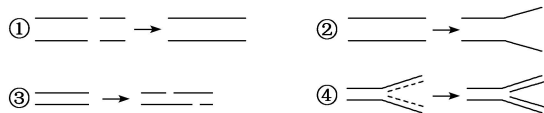
[在应用中落实]

1. 下列有关限制酶和 DNA 连接酶的叙述，错误的是()

- A. 一种限制酶只能识别双链 DNA 分子的特定核苷酸序列
- B. DNA 连接酶可催化两个脱氧核苷酸之间形成磷酸二酯键
- C. *E.coli* DNA 连接酶是从大肠杆菌中分离出来的，可用于连接黏性末端
- D. T4 DNA 连接酶既可连接黏性末端，也可连接平末端，但连接平末端的效率与 *E.coli* DNA 连接酶相比较低

解析：选 D 限制酶具有专一性，即一种限制酶只能识别双链 DNA 分子的特定核苷酸序列，A 正确；DNA 连接酶可催化两个脱氧核苷酸之间形成磷酸二酯键，B 正确；*E.coli* DNA 连接酶是从大肠杆菌中分离出来的，可用于连接黏性末端，C 正确；T4 DNA 连接酶连接平末端的效率高于 *E.coli* DNA 连接酶，D 错误。

2. 下图为 DNA 在不同酶的作用下所发生的变化，图中依次表示限制酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶、解旋酶作用的正确顺序是()



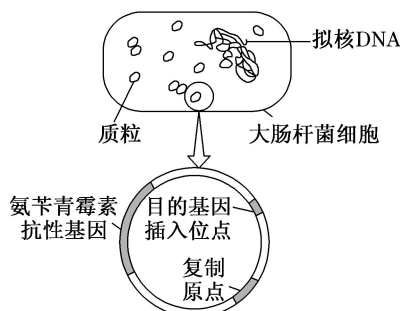
- A. ①④②③ B. ①②④③
C. ③④①② D. ①④③②

解析：选 C 限制酶能够识别双链 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，因此作用于③；DNA 聚合酶用于 DNA 分子的复制，能在单链上将一个个游离的脱氧核苷酸连接起来，因此作用于④；DNA 连接酶能将双链 DNA 片段连接起来，因此作用于①；解旋酶能够将 DNA 分子的双螺旋解开，故作用于②。

新知探究二 基因进入受体细胞的载体——“分子运输车”

[在探究中学明]

载体作为运载工具，将目的基因转移到受体细胞中，并在受体细胞内大量复制。常用的载体有质粒、病毒等。阅读教材，观察图示回答相关问题。



1. 质粒是一种裸露的、结构简单、独立于细菌拟核 DNA 之外，并具有自我复制能力的环状双链 DNA 分子。

2. 若质粒 DNA 分子的切割末端为 $\begin{array}{c} \text{—A} \\ \text{—TGCGC} \end{array}$ ，则与之连接的目的基因切割末端应为 $\begin{array}{c} \text{CGCGT—} \\ \text{A—} \end{array}$ ；可使用 DNA 连接酶把质粒和目的基因连接起来。

3. 氨苄青霉素抗性基因在质粒 DNA 上，称为标记基因，其作用是供重组 DNA 分子的鉴定和选择。

[在深化中提能]

1. 使用载体的目的

在基因工程中，使用载体有两个目的：一是用它作为运载工具，将目的基因转移到宿主细胞中；二是利用它在宿主细胞内对目的基因进行大量的复制(称为克隆)。

2. 作为载体必需具备的条件

(1)有一个或多个限制酶切割位点，供外源 DNA 片段(基因)插入其中。

(2)能够在受体细胞中保留下来，且载体 DNA 必须具备自我复制能力；或能够整合到受体 DNA 上，并随受体 DNA 同步复制。

(3)带有特殊的标记基因，便于重组 DNA 分子的筛选，常用的标记基因有抗生素抗性基因、荧光蛋白基因等。

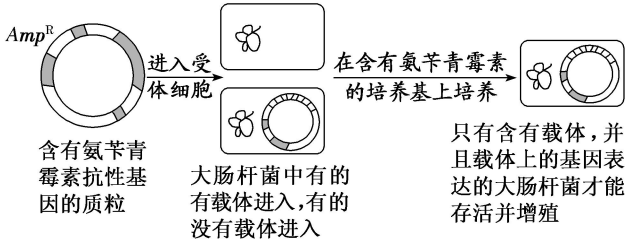
(4)对受体细胞无害，不影响受体细胞的正常生命活动。

3. 常用载体的种类及用途

种类	用途
质粒	将外源基因导入大肠杆菌等受体细胞
噬菌体	
植物病毒	将外源基因导入植物细胞
动物病毒	将外源基因导入动物细胞

4. 载体上标记基因的标记原理

载体上的标记基因一般是一些抗生素的抗性基因，目的基因要转入的受体细胞没有抵抗相关抗生素的能力。当含有抗生素抗性基因的载体进入受体细胞后，抗生素抗性基因在受体细胞内表达，使受体细胞能够抵抗相应抗生素，所以在受体细胞的培养体系中加入该种抗生素就可以只保留转入载体的受体细胞，原理如下图所示：



[典例] 下列有关基因工程中载体的叙述，错误的是()

- A. 载体将目的基因带入受体细胞中，可自我复制或整合到受体 DNA 上
- B. 基因工程的载体有质粒、动植物病毒和噬菌体等
- C. 携带目的基因的载体不必有标记基因
- D. 能表达目的基因的载体必须有 RNA 聚合酶识别和结合的特定部位

[解析] 载体将目的基因导入受体细胞，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，A 正确；基因工程的载体有质粒、动植物病毒和噬菌体等，B 正确；携带目的基因的载体需要有标记基因，以便于筛选重组后含有目的基因的受体细胞，C 错误；能表达目的基因的载体必须有 RNA 聚合酶识别位点和结合的特定部位，以便与 RNA 聚合酶结合发生转录，从而使目的基因得以表达，D 正确。

[答案] C

[易错提醒]

细胞膜上的“载体”与基因工程中“载体”的区别

(1)化学本质不同：细胞膜上的载体化学成分是蛋白质。基因工程中的载体可能是物质，如质粒(DNA)、噬菌体；也可能是生物，如动植物病毒等。

(2)功能不同：细胞膜上的载体协助细胞膜控制物质进出细胞；基因工程中的载体是一种“分子运输车”，把目的基因导入受体细胞。

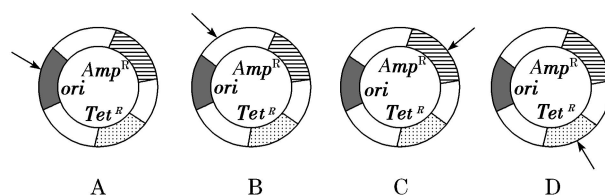
[在应用中落实]

1. 某研究所的研究人员拟将生长激素基因通过质粒介导进入大肠杆菌细胞内，已知质粒中存在两个抗性基因：A 是链霉素抗性基因，B 是氨苄青霉素抗性基因；目的基因要插入到基因 B 中，且大肠杆菌本身不带有任何抗性基因。下列叙述正确的是()

- A. 导入大肠杆菌的质粒一定为重组质粒
- B. 抗生素抗性基因是目的基因表达的必要条件
- C. 成功导入重组质粒的大肠杆菌可以在含氨苄青霉素的培养基上生长
- D. 能在含链霉素的培养基中生长的大肠杆菌不一定符合生产要求

解析：选 D 导入大肠杆菌的质粒可能为重组质粒，也可能为普通质粒，A 错误；抗生素抗性基因是标记基因，是为了鉴定受体细胞中是否含有目的基因，从而将含有目的基因的细胞筛选出来，与目的基因表达无关，B 错误；由于目的基因要插入到基因 B 中，即氨苄青霉素抗性基因被破坏，工程菌不能抗氨苄青霉素，因此成功导入重组质粒的大肠杆菌不能在含氨苄青霉素的培养基上生长，C 错误；能在含链霉素的培养基中生长的大肠杆菌可能含有重组质粒或普通质粒，因此不一定符合生产要求，D 正确。

2. 下面是四种不同质粒的示意图，其中 *ori* 为复制原点，*Amp^R* 为氨苄青霉素抗性基因，*Tet^R* 为四环素抗性基因，箭头表示一种限制性内切核酸酶的酶切位点。若要得到一个能在四环素培养基上生长而不能在氨苄青霉素培养基上生长的含重组 DNA 的细胞，应选用的质粒是()



解析：选 C A 图中酶切位点在 *ori* 序列上，该序列被破坏，重组质粒将无法进行复制，因此受体细胞既不能在四环素培养基上生长，也不能在氨苄青霉素培养基上生长。B 图中限制性内切核酸酶没有破坏三个基因，因此含重组 DNA 的细胞既能在四环素培养基上生长，也能在氨苄青霉素培养基上生长。C 图中酶切位点在氨苄青霉素抗性基因上，氨苄青霉素抗性基因被破坏，则含重组 DNA 的细胞能在四环素培养基上生长而不能在氨苄青霉素培养基上生长。D 图中酶切位点在四环素抗性基因上，由于仅四环素抗性基因被破坏，则含重组 DNA 的细胞能在氨苄青霉素培养基上生长而不能在四环素培养基上生长。

新知探究三 DNA 的粗提取与鉴定

[在探究中学明]

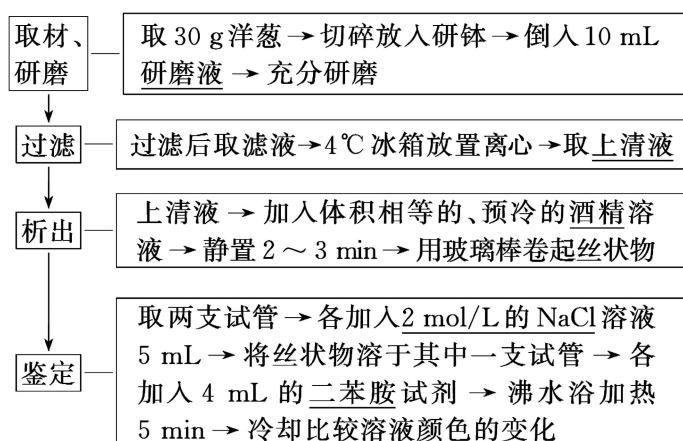
1. 可否选用哺乳动物成熟红细胞作实验材料，为什么？

提示：不可以，因为哺乳动物成熟红细胞无细胞核。

2. DNA 和蛋白质在酒精中的溶解性有何特点？根据该特点如何将 DNA 与蛋白质初步分离？

提示：DNA 不溶于酒精，某些蛋白质能溶于酒精。向溶解有 DNA 和蛋白质的溶液中加入冷却的酒精，溶液中会出现白色丝状物，即粗提取的 DNA。

3. 完善 DNA 粗提取与鉴定的实验流程图：



[在深化中提能]

1. DNA 的粗提取与鉴定实验的注意事项

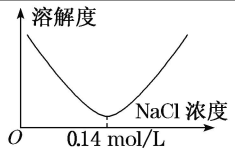
(1) 本实验不能用哺乳动物成熟的红细胞作实验材料，原因是哺乳动物成熟的红细胞无细胞核(无 DNA)，可选用鸡血细胞作材料。

(2) 二苯胺试剂要现配现用，否则会影响鉴定的效果。

(3) 提取植物细胞的 DNA，在研磨时加入 NaCl 的目的是溶解 DNA。

(4) 在 DNA 进一步提纯时，选用冷却的体积分数为 95% 的酒精溶液的作用是溶解杂质和析出 DNA。

2. DNA 与蛋白质在不同浓度 NaCl 溶液中的溶解度不同

项目	溶解规律	物质的量浓度为 2 mol/L 的 NaCl 溶液	物质的量浓度为 0.14 mol/L 的 NaCl 溶液
DNA		溶解	析出

蛋白质		部分发生盐析沉淀	溶解
总结	①DNA 和蛋白质等其他成分在不同浓度的 NaCl 溶液中溶解度不同。当 NaCl 溶液的物质的量浓度低于 0.14 mol/L 时，DNA 的溶解度随 NaCl 溶液物质的量浓度的增加而逐渐降低；NaCl 溶液的物质的量浓度为 0.14 mol/L 时，DNA 的溶解度最小；当 NaCl 溶液的物质的量浓度继续增加时，DNA 的溶解度又逐渐增大。②选择适当的盐溶液能使 DNA 充分溶解，而使杂质沉淀，或者相反，以达到分离目的		

[典例] (2024·安徽高考)下列关于“DNA 粗提取与鉴定”实验的叙述，错误的是()

- A. 实验中如果将研磨液更换为蒸馏水，DNA 提取的效率会降低
- B. 利用 DNA 和蛋白质在酒精中的溶解度差异，可初步分离 DNA
- C. DNA 在不同浓度 NaCl 溶液中溶解度不同，该原理可用于纯化 DNA 粗提物
- D. 将溶解的 DNA 粗提物与二苯胺试剂反应，可检测溶液中是否含有蛋白质杂质

[解析]研磨液有利于 DNA 的溶解并保护 DNA 不被破坏，若换为蒸馏水，则 DNA 提取的效率会降低，A 正确；DNA 不溶于酒精，但细胞中的某些蛋白质溶于酒精，利用这一原理，可初步分离 DNA，B 正确；DNA 在不同浓度的 NaCl 溶液中溶解度不同，该原理可用于纯化 DNA 粗提物，C 正确；在沸水浴的条件下，DNA 遇二苯胺试剂会呈现蓝色，二苯胺试剂用于鉴定 DNA，不能检测溶液中是否有蛋白质杂质，D 错误。

[答案] D

[归纳拓展]

根据 DNA 的溶解性判断 DNA 的去向

- (1)DNA 在 2 mol/L 的 NaCl 溶液中溶解，过滤后要保留滤液。
- (2)DNA 在 0.14 mol/L 的 NaCl 溶液中析出，过滤后要保留黏稠物，舍弃滤液。
- (3)DNA 在加入体积分数为 95%的预冷的酒精溶液中析出，用玻璃棒卷起丝状物即可，不用过滤。

[在应用中落实]

1. (2023·广东高考)“DNA 粗提取与鉴定”实验的基本过程是：裂解→分离→沉淀→鉴定。下列叙述错误的是()

- A. 裂解：使细胞破裂释放出 DNA 等物质
- B. 分离：可去除混合物中的多糖、蛋白质等

C. 沉淀：可反复多次以提高 DNA 的纯度

D. 鉴定：加入二苯胺试剂后即呈现蓝色

解析：选 D DNA 主要存在于细胞核内，而裂解的目的是使细胞破裂，释放出 DNA 等物质，A 正确；DNA、RNA、蛋白质和多糖等物质在物理和化学性质方面存在差异，可以利用这些差异，通过适当的分离方法去除混合物中的多糖、蛋白质等，B 正确；DNA 在不同浓度的 NaCl 溶液中溶解度不同，通过控制 NaCl 溶液的浓度使 DNA 溶解或析出，可反复多次以提高 DNA 的纯度，C 正确；进行 DNA 鉴定时可以使用二苯胺试剂，但要进行沸水浴加热后才能观察到颜色变化，D 错误。

2. “SDS 法”是提取 DNA 的常用方法，其提取液成分中的 SDS 能使蛋白质变性，EDTA 是 DNA 酶抑制剂，Tris 作为缓冲剂。下列说法错误的是()

A. SDS 能破坏蛋白质空间结构，从而促进 DNA 和蛋白质分离

B. EDTA 能减少 DNA 水解，提高 DNA 的完整性

C. Tris 作为缓冲剂能维持 pH 的稳定，保证 DNA 结构正常

D. 提取到的 DNA 可在常温下用二苯胺试剂进行鉴定

解析：选 D 由题干可知，SDS 能使蛋白质变性，破坏蛋白质空间结构，从而促进 DNA 和蛋白质分离，A 正确；EDTA 是 DNA 酶抑制剂，能减少 DNA 水解，提高 DNA 的完整性和总量，B 正确；Tris 作为缓冲剂能维持 pH 的稳定，可以防止 DNA 结构被破坏，保证 DNA 结构正常，C 正确；鉴定 DNA 的方法是沸水浴条件下用二苯胺试剂鉴定，D 错误。

训练高素养——体验区

[课堂巩固落实]

1. 有关基因工程操作工具的叙述正确的是()

A. 一种限制酶只能识别一种特定的核苷酸序列

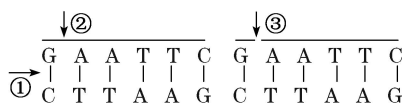
B. 质粒是基因工程中唯一的载体

C. 载体必须具备的条件之一是具有多个限制酶切点，以便与外源基因连接

D. DNA 连接酶使黏性末端的碱基之间形成氢键

解析：选 A 限制酶具有专一性，一种限制酶只能识别一种特定的核苷酸序列，A 正确；质粒是基因工程中最常用的载体，此外还可以用动植物病毒或噬菌体等，B 错误；载体必须具备的条件之一是具有一个或多个限制酶切点，以便与外源基因连接，C 错误；DNA 连接酶的作用部位是磷酸二酯键，D 错误。

2. 如图为 DNA 分子的某一片段，①②③表示某种酶的作用部位，则相应的酶依次是()



- A. 限制酶、解旋酶、DNA 连接酶
 B. 解旋酶、限制酶、DNA 连接酶
 C. 解旋酶、DNA 连接酶、限制酶
 D. 限制酶、DNA 连接酶、解旋酶

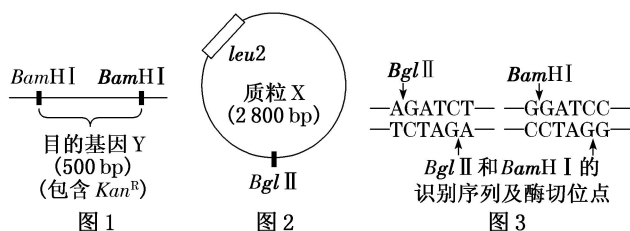
解析：选 B ①处为氢键，是解旋酶的作用部位；②处为磷酸二酯键，是限制酶的作用部位；③处为两个 DNA 片段的缺口，是 DNA 连接酶的作用部位。

3. 下列关于 DNA 粗提取与鉴定的叙述，错误的是()

- A. 用同样方法从等体积兔血和鸡血中提取的 DNA 量相近
 B. DNA 析出过程中，搅拌操作要轻柔以防 DNA 断裂
 C. 预冷的乙醇可用来进一步纯化粗提的 DNA
 D. 用二苯胺试剂鉴定 DNA 需要进行水浴加热

解析：选 A 哺乳动物(如兔)成熟的红细胞无细胞核和众多的细胞器，细胞内基本不含 DNA，故兔血不宜作为该实验的材料，A 错误；DNA 析出过程中，搅拌要轻柔且沿着一个方向，以防止 DNA 断裂，B 正确；DNA 不溶于冷乙醇，向 DNA 提取液中加入适量预冷的乙醇，会使 DNA 析出，从而进一步提纯 DNA，C 正确；向溶有 DNA 的溶液中加入二苯胺试剂，沸水浴加热数分钟，溶液出现蓝色，D 正确。

4. 为制备目的基因 Y(图 1)与质粒 X(图 2)的重组 DNA，将质粒 X 与含 Y 的 DNA 片段加入含有限制性内切核酸酶 *Bgl*Ⅱ与 *Bam*H I 的反应混合物中，酶切后的片段再加入含有连接酶的反应体系中。其中，质粒 X 含有 *leu2* 基因，可用于合成亮氨酸，目的基因 Y 含有卡那霉素抗性基因 *Kan^R*。请回答下列问题：



(1)根据图 3 分别写出 *Bgl*Ⅱ与 *Bam*H I 酶切后形成的末端序列：_____、

_____。

(2)使用 *Bgl*Ⅱ处理重组质粒，可以得到_____。

(3)*Bgl*Ⅱ酶切后的质粒 X 与 *Bam*H I 酶切后的目的基因 Y 能够连接的原因是

_____。

(4)将连接后的产物转入一种 Z 细菌，Z 细菌对卡那霉素敏感，且不能在缺乏亮氨酸的培养基中培养。要筛选含有重组质粒的 Z 细菌，应选择_____的培养基。

解析：(1)限制酶 *Bgl* II 与 *Bam*H I 切割形成的序列依次为：

—A 或 GATCT— —G 或 GATCC—
—TCTAG A— —CCTAG G—

切后的目的基因形成的重组 DNA 分子上没有 *Bgl* II 酶的识别序列，因此使用 *Bgl* II 处理重组质粒，得到的是长度为 3 300 bp 的环状双链 DNA。(3)*Bgl* II 酶切后的质粒 X 与 *Bam*H I 酶切后的目的基因 Y 具有相同的黏性末端，根据碱基互补配对原则，它们能够连接形成重组 DNA。(4)由于质粒 X 含有 *leu2* 基因，可用于合成亮氨酸，目的基因 Y 含有卡那霉素抗性基因 *Kan^R*，因此要筛选含有重组质粒的 Z 细菌，应选择含卡那霉素但不含亮氨酸的培养基。

答案：(1) —A 或 GATCT— —G 或 GATCC—
—TCTAG A— —CCTAG G—

(2)长度为 3 300 bp 的环状双链 DNA (3)酶切后产生相同的黏性末端，并遵循碱基互补配对原则 (4)含卡那霉素但不含亮氨酸