

第2节 基因工程的基本操作程序

学有目标——新课程标准必明	记在平时——核心语句必背
1.阐明基因工程的基本操作程序主要包括哪些步骤。 2. 阐述基因工程每个操作步骤涉及的技术和方法。 3.利用聚合酶链式反应扩增DNA片段并完成电泳鉴定。	1.PCR 每次循环都包括变性、复性和延伸三步。 2. 基因表达载体的构建是基因工程的核心，基因表达载体的组成包括目的基因、启动子、终止子和标记基因等。 3. 目的基因导入植物细胞常用花粉管通道法和农杆菌转化法，导入动物细胞常用显微注射法，导入微生物细胞常用感受态细胞法(Ca^{2+} 处理法)。 4. 检测转基因生物的染色体 DNA 上是否插入了目的基因或目的基因是否转录出了 mRNA 常用 PCR 等技术,检测目的基因是否翻译成蛋白质常用抗原抗体杂交技术。

预习新教材——自学区

[理清主干知识]

基因工程的基本操作程序



一、目的基因的筛选与获取

1. 目的基因：在基因工程的设计和操作中，用于改变受体细胞性状或获得预期表达产物等的基因就是目的基因，它主要是指编码蛋白质的基因。

2. 筛选合适的目的基因

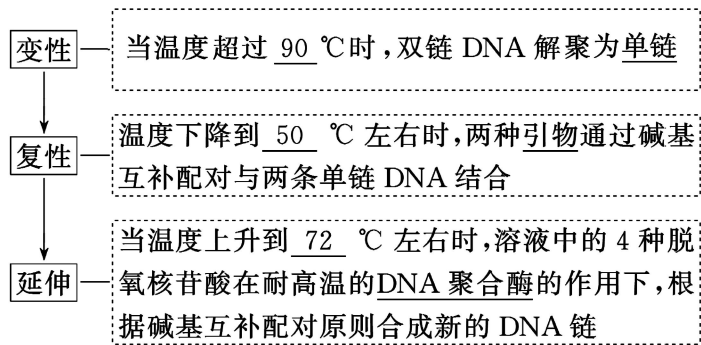
从相关的已知结构和功能清晰的基因中进行筛选是较为有效的方法之一。

3. 利用 PCR 获取和扩增目的基因

(1)PCR(聚合酶链式反应)：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。

(2)PCR 反应的条件：一定的缓冲溶液、DNA 模板、2 种引物、4 种脱氧核苷酸、耐高温的 DNA 聚合酶，以及能自动调控温度的仪器。

(3)PCR 扩增的过程



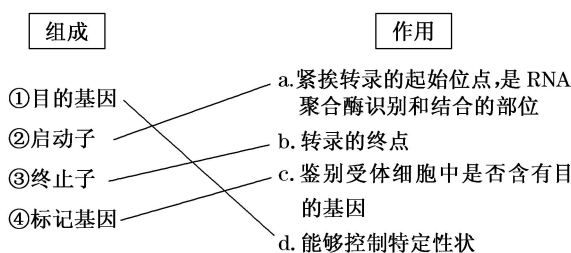
(4)PCR 产物的鉴定: 常采用琼脂糖凝胶电泳来鉴定。

二、基因表达载体的构建

1. 目的

- (1)使目的基因在受体细胞中稳定存在, 并且遗传给下一代。
- (2)使目的基因能够表达和发挥作用。

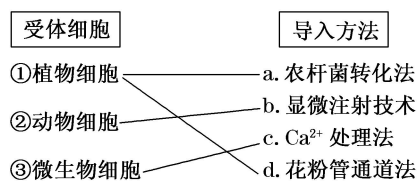
2.组成及作用(连线)



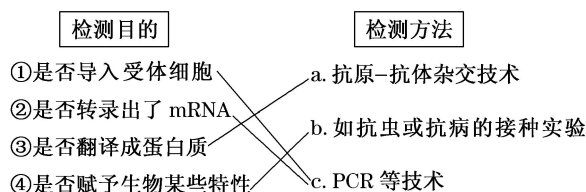
三、将目的基因导入受体细胞

1. 转化的概念: 目的基因进入受体细胞内, 并且在受体细胞内维持稳定和表达的过程。

2. 将目的基因导入不同受体细胞的方法(连线)



四、目的基因的检测与鉴定(连线)



[诊断自学效果]

1. 判断下列叙述的正误

- (1)表达载体的复制和胰岛素基因的表达均起始于启动子(×)
- (2)目的基因导入双子叶植物细胞一般采用农杆菌转化法(√)
- (3)为培育抗除草剂的作物新品种, 导入抗除草剂基因时只能以受精卵为受体(×)
- (4)抗虫基因即使成功地插入植物细胞染色体上也未必能正常表达(√)
- (5)检测目的基因是否导入受体细胞可用抗原抗体杂交技术(×)

2. 下列有关 PCR 的叙述, 错误的是()

- A. PCR 反应是一种酶促反应
- B. PCR 反应所需要的引物, 化学本质为 DNA 或 RNA 片段
- C. PCR 反应所需要的 DNA 聚合酶与细胞内 DNA 复制所需的酶相同
- D. PCR 反应需要在一定的缓冲溶液中进行

解析: 选 C PCR 反应需要 DNA 聚合酶催化, 是一种酶促反应, A 正确; PCR 反应

所需要的引物，化学本质为单链的 DNA 片段或 RNA 片段，B 正确；PCR 反应所需要的酶为耐高温的 DNA 聚合酶，以适应高温下的反应，与细胞内 DNA 复制所需的 DNA 聚合酶不同，C 错误；为保证 pH 的稳定，PCR 反应需要在一定的缓冲溶液中进行，D 正确。

3. 下列关于基因表达载体的说法，错误的是()

- A. 基因表达载体的构建是基因工程的核心步骤
- B. 基因表达载体包含启动子、目的基因、终止子、标记基因等
- C. 启动子位于目的基因的上游，能够启动翻译
- D. 不同的目的基因所需的启动子不一定相同

解析：选 C 基因表达载体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，是基因工程的核心步骤，A 正确；基因表达载体包括启动子、终止子、目的基因、标记基因等，B 正确；启动子位于目的基因的上游，是驱动转录的一段 DNA，C 错误；不同的目的基因具有不同的核苷酸序列，其启动子也不尽相同，D 正确。

4. 目的基因导入受体细胞后，是否可以维持稳定和表达其遗传特性，只有通过检测和鉴定才能知道。下列不属于目的基因检测和鉴定的是()

- A. 检测受体细胞是否有目的基因
- B. 检测受体细胞是否有致病基因
- C. 检测目的基因是否转录出 mRNA
- D. 检测目的基因是否翻译成蛋白质

解析：选 B 目的基因的检测包括：检测转基因生物的染色体 DNA 上是否插入了目的基因，可以用 PCR 等技术；检测目的基因是否转录出 mRNA，也可以用 PCR 等技术；检测目的基因是否翻译成蛋白质，方法是进行抗原抗体杂交。

探究新知能——互动区

新知探究一 目的基因的筛选与获取、基因表达载体的构建

[在探究中学明]

1. 获取目的基因是实施基因工程的第一步，目前获取目的基因的常用方法有利用 PCR 获取和扩增目的基因、通过构建基因文库来获取目的基因等。聚合酶链式反应简称 PCR，是一种体外迅速扩增 DNA 片段的技术，这项技术中 DNA 复制的过程和细胞内 DNA 复制的过程是类似的。请结合已学过的 DNA 分子结构和复制的相关知识，回答下列问题：

(1)什么是引物？DNA 复制时为什么需要引物？

提示：所谓引物是指两段与待扩增的 DNA 序列互补的一小段 DNA 或 RNA 片段。在 DNA 扩增时，DNA 聚合酶不能从头开始合成 DNA，只能从引物的 3' 端延伸 DNA 链，因此克隆 DNA 时应加入两种引物。

(2)PCR 扩增目的基因需要知道目的基因的全部核苷酸序列吗？

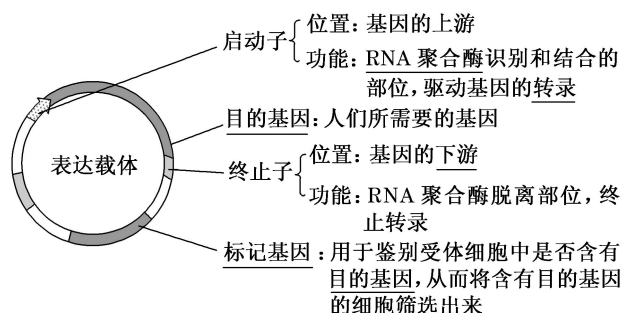
提示：不需要，只要知道目的基因两端的部分核苷酸序列即可(以便根据这部分序列合成两种引物)。

(3)PCR 过程中需要解旋酶吗？所需要的 DNA 聚合酶应具有什么特点？

提示：PCR 过程中，DNA 双链解开是在高温下完成的，不需要解旋酶；由于 PCR 过程温度较高，所以需要耐高温的 DNA 聚合酶。

2. 基因表达载体的构建是实施基因工程的第二步，也是基因工程的核心。其目的是使目的基因在受体细胞中稳定存在，并且可以遗传给下一代，同时使目的基因能够表达和发挥作用。填图并回答下列问题：

(1)完善基因表达载体构成图



(2)基因表达载体的构建需要限制酶和 DNA 连接酶。

(3)目的基因的插入位点是随意的吗？为什么？

提示：不是。基因表达需要启动子与终止子的调控，所以目的基因应插入启动子与终止子之间，若目的基因插入启动子内部，启动子将失去原有的功能。

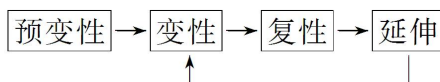
(4)启动子和终止子与起始密码子和终止密码子相同吗？

提示：不相同。启动子和终止子位于 DNA 上，是基因表达必需的部分；起始密码子和终止密码子位于 mRNA 上，决定翻译的开始和结束。

[在深化中提能]

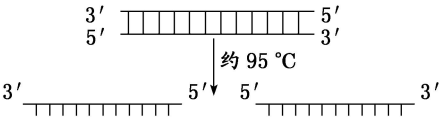
1. 聚合酶链式反应(PCR)

(1)PCR 反应的过程

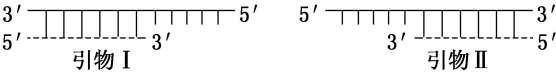


PCR 一般要经历三十多次循环，每次循环可以分为变性、复性和延伸三步。在循环之前，常要进行一次预变性，以便增加大分子模板 DNA 彻底变性的概率。

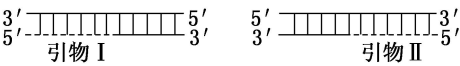
①变性：当温度超过到 90 ℃时，双链 DNA 解聚为单链。



②复性：当温度下降到 50 ℃左右时，两种引物通过碱基互补配对与两条单链 DNA 结合。



③延伸：当温度上升到 72 ℃左右时，溶液中的 4 种脱氧核苷酸在耐高温的 DNA 聚合酶的作用下，根据碱基互补配对原则合成新的 DNA 链。



(2)PCR 反应的结果

从第二轮循环开始，上一次循环的产物也作为模板参与反应，并且由引物 I 延伸而成的 DNA 单链会与引物 II 结合，进行 DNA 的延伸，这样，耐高温的 DNA 聚合酶只能特异地复制处于两个引物之间的 DNA 序列，使这段固定长度的序列呈指数式扩增。

2. 生物体内 DNA 复制与 PCR 反应的比较

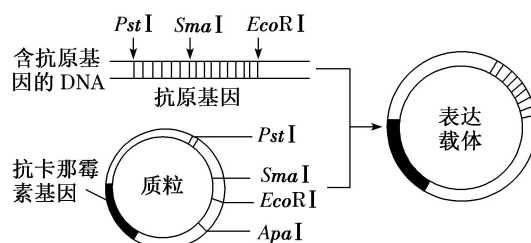
比较项目	体内 DNA 复制	PCR 反应
解旋	在解旋酶作用下，细胞提供能量，部分 DNA 双链解开	90 ℃以上高温下解旋，DNA 双链全部解开，不需要解旋酶
酶	解旋酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶	耐高温的 DNA 聚合酶
引物	一小段 RNA	可以是 RNA 或单链 DNA 分子片段
合成子链	在引物基础上，一条链连续合成；另一条链不连续合成，再由 DNA 连接酶连接	分别从两条链的引物的 3' 端开始延伸，都是连续合成
过程		
循环次数	受生物体自身控制	30 多次
产物	完整 DNA	两个引物之间的 DNA 片段
相同点	都需要 DNA 模板、4 种脱氧核苷酸、分别与两条模板链相结合的两种引物；都是半保留复制，严格遵循碱基互补配对原则	

3. 构建基因表达载体的过程

目的基因与载体的结合过程，实际上是不同来源的基因重组的过程。其过程大体为用一定的限制酶切割质粒，使其出现一个切口，露出黏性末端。用同一种限制酶或能产生相同末端的限制酶切割目的基因，使其产生相同的黏性末端。将切下的目的基因片段插入质粒的切口处，再加入适量 DNA 连接酶，形成了一个重组 DNA 分子(重组质粒,如图)。



[典例] 如图是利用基因工程技术培育转基因植物，生产可食用疫苗的部分过程示意图，其中 *Pst* I、*Sma* I、*Eco*R I、*Apa* I 为四种限制酶。下列说法错误的是()



- A. 图示对质粒和目的基因切割用到了两种限制酶
- B. 抗卡那霉素基因的存在有利于将含有抗原基因的细胞筛选出来
- C. 构建基因表达载体时需要用到限制酶 *Sma* I
- D. 除图示组成外，表达载体中还应该含有启动子和终止子等结构

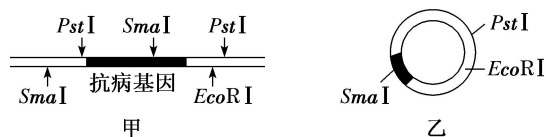
[解析] 为防止酶切后单个含目的基因的 DNA 片段及质粒自身连接成环状，图示对质

粒和目的基因切割用到了两种限制酶，A 正确；抗卡那霉素基因作为标记基因，主要作用是筛选含有目的基因的受体细胞，B 正确；限制酶 *Sma* I 的识别序列和切割位点位于目的基因上，因此构建基因表达载体时不能用限制酶 *Sma* I，应用限制酶 *Pst* I、*Eco*R I，C 错误；基因表达载体一般包括目的基因(抗原基因)、标记基因(抗卡那霉素基因)、启动子和终止子等，D 正确。

[答案] C

[方法规律]

构建基因表达载体时限制酶的选择



(1)根据目的基因两端的限制酶切点确定限制酶的种类

①应选择切点位于目的基因两端的限制酶，如图甲可选择 *Pst* I。

②不能选择切点位于目的基因内部的限制酶，如图甲不能选择 *Sma* I。

③为避免含目的基因的外源 DNA 片段和质粒的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，如图甲也可选择用 *Pst* I 和 *EcoR* I 两种限制酶；但要确保质粒上也有这两种酶的切点。

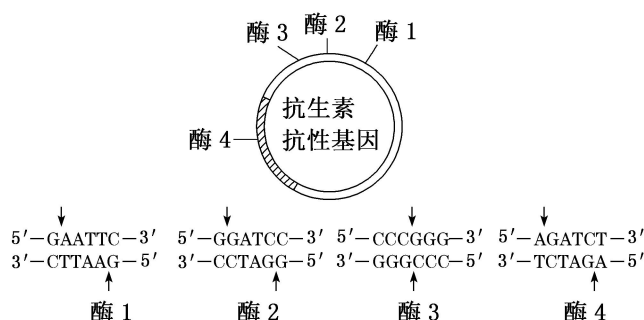
(2)根据质粒的特点确定限制酶的种类

①所选限制酶要与切割目的基因的限制酶一致，以确保具有相同的黏性末端。

②质粒作为载体必须具备标记基因等，所以选择的限制酶尽量不要破坏这些结构，如图乙中限制酶 *Sma* I 会破坏标记基因。

[在应用中落实]

1. (2023·新课标卷)某同学拟用限制酶(酶 1、酶 2、酶 3 和酶 4)、DNA 连接酶为工具，将目的基因(两端含相应限制酶的识别序列和切割位点)和质粒进行切割、连接，以构建重组表达载体。限制酶的切割位点如图所示。



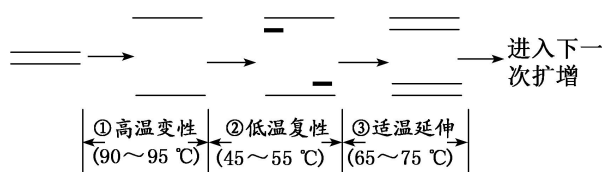
下列重组表达载体构建方案合理且效率最高的是()

- A. 质粒和目的基因都用酶 3 切割，用 *E.coli* DNA 连接酶连接
- B. 质粒用酶 3 切割、目的基因用酶 1 切割，用 T4 DNA 连接酶连接
- C. 质粒和目的基因都用酶 1 和酶 2 切割，用 T4 DNA 连接酶连接
- D. 质粒和目的基因都用酶 2 和酶 4 切割，用 *E.coli* DNA 连接酶连接

解析：选 C 只用一种限制酶切割质粒和目的基因，会使质粒和目的基因发生自身环化或者使目的基因在质粒中反向连接，且 *E.coli* DNA 连接酶无法连接酶 3 切出的平末端，A 不符合题意；用酶 1 切割目的基因，产生的是黏性末端，用酶 3 切割质粒，产生的是平末端，两者切割后无法相互连接，B 不符合题意；质粒和目的基因都用酶 1 和酶 2 切割后，可使用 T4 DNA 连接酶连接，使目的基因定向插到质粒中，C 符合题意；酶 2 和酶 4 切割后产生的黏性末端相同，易导致目的基因和质粒自身环化或者使目的基因在质粒中反向连

接，并且用酶 4 切割会破坏标记基因，D 不符合题意。

2. PCR 是将某一特定 DNA 片段在体外酶的作用下，复制出大量相同片段的一种方法，利用它能快速扩增特定目的基因或 DNA 分子片段。它的基本过程如下：



注：图中“—”表示每次扩增过程中需要的引物。每个引物含 20 个脱氧核苷酸，并分别与 DNA 片段两端碱基互补，其作用是引导合成 DNA 子链。

请据图分析回答下列问题：

(1)PCR 的原理是模拟生物体内_____的过程。

(2)PCR 扩增过程中对 DNA 片段进行高温加热处理，其目的是_____，其作用相当于细胞内_____酶的作用。

(3)在③适温延伸过程中，必须加入一种特定的 DNA 聚合酶，从图示中可判断，该酶与一般人体细胞中的 DNA 聚合酶相比，最主要的特点是_____。

(4)假如引物都用 ^3H 标记，从理论上计算，DNA 片段经 3 次扩增所得的 8 个 DNA 分子中，含有 ^3H 标记的 DNA 分子占_____ %。

(5)假如 DNA 片段含 200 对脱氧核苷酸，经 3 次扩增，从理论上计算，除需要引物 14 个外，还需要游离的脱氧核苷酸_____个。

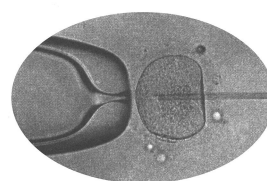
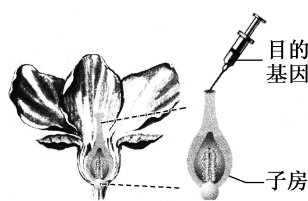
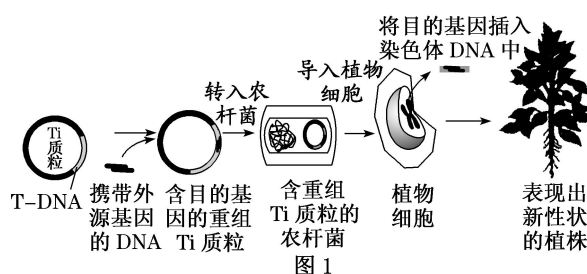
解析：(1)PCR 是指在体外模拟生物体内 DNA 分子复制的过程，因此其原理是 DNA 复制。(2)PCR 扩增过程中对 DNA 片段进行高温加热处理，其目的是使 DNA 分子的双螺旋结构打开，形成单链 DNA 分子，而在生物体内 DNA 分子解旋形成单链是在解旋酶的作用下完成的。(3)在③适温延伸过程中，必须加入一种特定的 DNA 聚合酶，从图示中可判断，该酶与一般人体细胞中的 DNA 聚合酶相比，最主要的特点是耐高温。(4)DNA 分子的复制方式为半保留复制，如果引物都用 ^3H 标记，从理论上计算，所得所有 DNA 分子中都含有 ^3H 标记。(5)DNA 片段含 200 对脱氧核苷酸，经 3 次扩增，形成了 8 个 DNA 分子，其中只有两条 DNA 单链上没有引物，因此该过程中需要的游离脱氧核苷酸数是 $200 \times 2 \times (8 - 1) - 14 \times 20 = 2\,520$ (个)。

答案：(1)DNA 复制 (2)使 DNA 双链解开成为单链 解旋 (3)耐高温 (4)100 (5)2 520

新知探究二 将目的基因导入受体细胞、目的基因的检测与鉴定

[在探究中学明]

1. 将目的基因导入受体细胞是实施基因工程的第三步。目的基因进入受体细胞内，并且在受体细胞内维持稳定和表达的过程，称为转化。结合图 1、图 2、图 3，根据教材相关内容完成下列问题：



(1)将目的基因导入植物细胞的方法有农杆菌转化法和花粉管通道法等，其中由我国科学家独创的一种方法是花粉管通道法，适用于双子叶植物和裸子植物的是农杆菌转化法。

(2)农杆菌转化法利用了农杆菌的什么特性？

提示：农杆菌中 Ti 质粒上的 TDNA(可转移的 DNA)可转移至受体细胞，并且整合到受体细胞的染色体 DNA 上。

(3)为什么植物基因工程常用的受体细胞可以是体细胞，而动物基因工程一般只用受精卵？

提示：植物体细胞的全能性较高，可经植物组织培养过程形成完整植物体，因此受体细胞可以是体细胞；动物体细胞的全能性受到严格限制，因此动物基因工程中的受体细胞一般只用受精卵。

(4)从细胞器的功能上分析，若通过基因工程生产人的糖蛋白，可以用大肠杆菌做受体细胞吗？

提示：不可以。因为糖蛋白上的糖链是在内质网和高尔基体上加工完成的，而内质网和高尔基体存在于真核细胞中，大肠杆菌是原核生物，细胞中不含有这两种细胞器。

2. 目的基因导入受体细胞后，是否可以维持稳定和表达其遗传特性，只有通过检测与鉴定才能知道。这是基因工程的第四步工作，也是检查基因工程是否成功的一步。结合相关内容，回答下列问题：

(1)目的基因能否在真核生物中稳定遗传的关键是什么？如何检测？

提示：目的基因是否插入受体细胞的染色体 DNA 上，这是其能否在真核生物中稳定遗传的关键。可以用 DNA 分子杂交、PCR 等技术进行检测。

(2)检测棉花中导入的抗虫基因是否表达的最简便的方法是什么？

提示：用叶片饲喂棉铃虫，观察棉铃虫是否死亡。如果棉铃虫死亡，说明抗虫基因已经表达；否则，抗虫基因没有表达。

[在深化中提能]

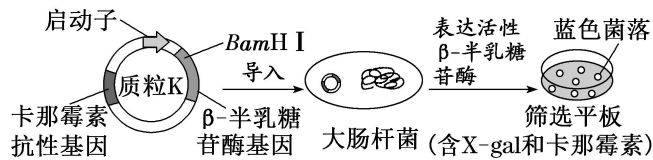
1. 目的基因导入不同受体细胞的过程

项目	植物	动物	微生物
常用方法	农杆菌转化法	显微注射技术	感受态细胞法
受体细胞	体细胞或受精卵	受精卵	原核细胞
转化过程	将目的基因插入到 Ti 质粒的 TDNA 上→农杆菌→导入植物细胞→整合到受体细胞染色体的 DNA 上→表达	将含有目的基因的表达载体提纯→取卵(受精卵)→显微注射→受精卵发育→获得具有新性状的动物	Ca^{2+} 处理细胞→感受态细胞→重组表达载体与感受态细胞混合→感受态细胞吸收 DNA 分子

2. 目的基因的检测与鉴定的方法

类型	检测内容	方法	结果显示
分子水平检测	目的基因是否插入转基因生物的 DNA 上	DNA 分子杂交技术(DNA 和 DNA 之间)或 PCR 等	是否成功 显示出杂交带
	目的基因是否转录出 mRNA	核酸分子杂交技术(DNA 和 mRNA 之间)或 PCR 等	
	目的基因是否翻译成蛋白质	抗原抗体杂交(蛋白质和蛋白质之间)	
个体生物学水平鉴定	是否具有抗性及其程度	对转基因生物进行抗性的接种实验	是否赋予了 预期抗性或 蛋白质活性
	基因工程产品与天然产品的功能活性是否相同	比较基因工程产品与天然产品的功能活性	

[典例] (2025·安徽高考)质粒 K 中含有β-半乳糖苷酶基因，将该质粒导入大肠杆菌细胞后，其编码的酶可分解 X-gal，产生蓝色物质，进而形成蓝色菌落，如图所示。科研小组以该质粒作为载体，采用基因工程技术实现人源干扰素基因在大肠杆菌中的高效表达。下列叙述错误的是()



- A. 使用氯化钙处理大肠杆菌以提高转化效率，可增加筛选平板上白色和蓝色菌落数
- B. 如果筛选平板中仅含卡那霉素，生长出的白色菌落不可判定为含目的基因的菌株
- C. 因质粒 K 中含两个标记基因，筛选平板中长出的白色菌落即为表达目标蛋白的菌株
- D. 若筛选平板中蓝色菌落偏多，原因可能是质粒 K 经酶切后自身环化并导入了大肠杆菌

[解析] 氯化钙处理大肠杆菌能增强其对质粒的摄取能力，使更多大肠杆菌获得质粒，

提高其转化效率。若获得空载质粒(β -半乳糖苷酶基因未被破坏)，则会在筛选平板上形成蓝色菌落；若获得重组质粒(人源干扰素基因的插入会破坏 β -半乳糖苷酶基因)，则会在筛选平板上形成白色菌落。因此，使用氯化钙处理可增加筛选平板上白色和蓝色菌落数，A 正确。若筛选平板中仅含卡那霉素，导入空载质粒和含目的基因质粒的大肠杆菌均会形成白色菌落，无法判定菌株是否含有目的基因，B 正确。筛选平板中长出白色菌落，只能说明菌株中导入了 β -半乳糖苷酶基因被破坏的质粒，但该质粒中是否正确连接目的基因，且目的基因是否转录、翻译，是否表达出目标蛋白未知，还需要进一步鉴定，C 错误。质粒 K 经过 *Bam*H I 酶切后，若未与目的基因连接，其可能会自身环化重新形成完整质粒，导入大肠杆菌后， β -半乳糖苷酶基因正常表达，分解 X-gal 产生蓝色物质，形成蓝色菌落，D 正确。

[答案] C

[在应用中落实]

1. 为了增加菊花花色类型，研究者从其他植物中克隆出花色 C 基因(图 1)，拟将其与质粒(图 2)重组，再借助农杆菌导入菊花中。下列操作与实验目的不符的是()

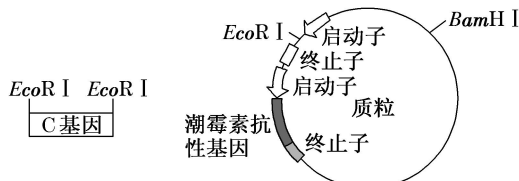


图 1

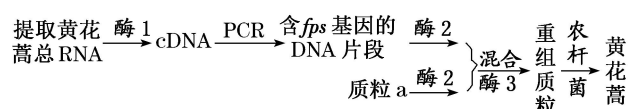
图 2

- A. 用限制性内切核酸酶 *Eco*R I 和 DNA 连接酶构建重组质粒
- B. 用含 C 基因的农杆菌侵染菊花愈伤组织，将 C 基因导入细胞
- C. 在培养基中添加卡那霉素，筛选被转化的菊花细胞

D. 用 PCR 技术检测 C 基因是否整合到菊花染色体上

解析：选 C 目的基因(C 基因)两端有 *EcoR* I 酶切割位点，可用限制性内切核酸酶 *EcoR* I 和 DNA 连接酶构建重组质粒，A 正确；一般用农杆菌等作为媒介去侵染植物的愈伤组织等，将含有目的基因的质粒导入细胞，B 正确；据图可知，质粒中含有潮霉素抗性基因，不含卡那霉素抗性基因，故无法用卡那霉素来筛选被转化的菊花细胞，C 错误；检测 C 基因是否整合到菊花染色体上，常采用 PCR 技术，D 正确。

2. 某课题组为得到青蒿素产量高的新品系，让青蒿素合成过程中的某一关键酶基因 *fps* 在野生黄花蒿中过量表达，其过程图如下：



结合图示回答下列问题：

(1)酶 1 是_____。利用 PCR 扩增目的基因时，使反应体系中的模板 DNA 解旋为单链的条件是加热至 90~95℃，目的是破坏 DNA 分子中的_____键。

(2)在构建重组 Ti 质粒的过程中，需将目的基因插入 Ti 质粒的_____中。

(3)检验目的基因是否整合到黄花蒿基因组中，可以将放射性同位素标记的_____做成分子探针与黄花蒿基因组 DNA 杂交。理论上，与野生型相比，该探针与转基因黄花蒿 DNA 形成的杂交带的量_____ (填“较多”或“较少”)。

(4)判断该课题组的研究目的是否达到，必须检测转基因黄花蒿植株中的_____。

解析：(1)据图示可知，酶 1 催化逆转录的过程，故为逆转录酶；利用 PCR 扩增目的基因时，使反应体系中的模板 DNA 解旋为单链的条件是加热超过 90℃，目的是破坏 DNA 分子中的氢键，使 DNA 解旋为单链。(2)在构建重组 Ti 质粒的过程中，需将目的基因插入 Ti 质粒的 TDNA 中，以使目的基因转移到受体细胞的染色体 DNA 上。(3)检验目的基因是否整合到黄花蒿基因组中，可用 DNA 分子杂交法，即将 *fps* 基因、*fps* 基因的 mRNA 做成分子探针与青蒿基因组 DNA 杂交。由于青蒿素产量增高，故与野生型相比，该探针与转基因黄花蒿 DNA 形成的杂交带的量较多。(4)判断该课题组的研究目的是否达到，必须检测转基因黄花蒿植株中的青蒿素产量，若产量增高，则说明达到了目的。

答案：(1)逆转录酶 氢 (2)TDNA (3)*fps* 基因、*fps* 基因的 mRNA 较多 (4)青蒿素产量

新知探究三 DNA 片段的扩增及电泳鉴定

[在探究中学明]

1. 实验原理

(1)PCR 反应的原理

PCR 利用了 DNA 的热变性原理,通过调节温度来控制 DNA 双链的解聚与结合,PCR 仪实质上就是一台能够自动控制温度的仪器。

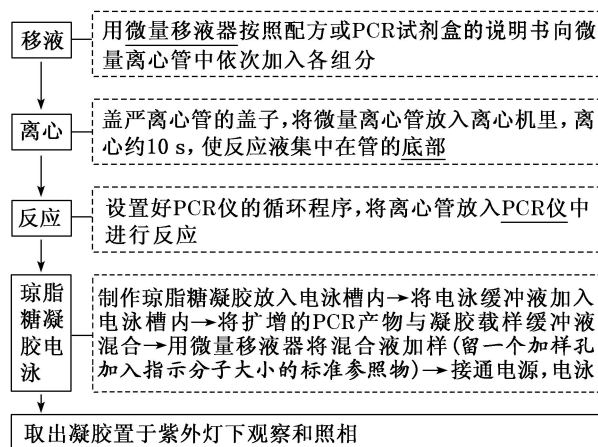
(2)电泳鉴定的原理

①DNA 分子具有可解离的基团,在一定的 pH 下,这些基团可以带上正电荷或负电荷。在电场的作用下,这些带电分子会向着与它所带电荷相反的电极移动,这个过程就是电泳。

②PCR 的产物一般通过琼脂糖凝胶电泳来鉴定。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。

③凝胶中的 DNA 分子通过染色,可以在波长为 300 nm 的紫外灯下被检测出来。

2. 实验操作



[在深化中提能]

1. PCR 过程中用到的重要仪器

(1)PCR 仪: 该仪器能自动调控温度,实现 DNA 的扩增。如果没有 PCR 仪,可用 3 个恒温水浴锅代替,操作时按程序在 3 个水浴锅中来回转移 PCR 反应的微量离心管。

(2)微量离心管: 总容积为 0.5 mL,实际上是进行 PCR 反应的场所。

(3)微量移液器: 用于向微量离心管中转移 PCR 配方中的液体。

2. DNA 片段的扩增及电泳鉴定的注意事项

(1)为避免外源 DNA 等因素的污染,PCR 实验中使用的微量离心管、枪头、蒸馏水等在使用前必须进行高压灭菌处理。

(2)缓冲液和酶应分装成小份,并在 -20°C 储存。使用前,将所需试剂从冰箱拿出,放在冰块上缓慢融化。

(3)在向微量离心管中添加反应组分时,每吸取一种试剂后,移液器上的枪头都必须更

换。

(4)在进行操作时，一定戴好一次性手套。

[例 1] (2024·黑龙江高考)关于采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物的实验，下列叙述正确的是()

- A. 琼脂糖凝胶浓度的选择需考虑待分离 DNA 片段的大小
- B. 凝胶载样缓冲液中指示剂的作用是指示 DNA 分子的具体位置
- C. 在同一电场作用下，DNA 片段越长，向负极迁移速率越快
- D. 琼脂糖凝胶中的 DNA 分子可在紫外灯下被检测出来

[解析] 琼脂糖凝胶的浓度、待测样品中 DNA 分子的大小和构象等都会影响 DNA 分子在电泳中的迁移速率，故琼脂糖凝胶浓度的选择需考虑待分离 DNA 片段的大小，A 正确；在电泳过程中，凝胶载样缓冲液中的指示剂不会与 DNA 结合，而是随着电流的通过而移动，可用于确定样品的迁移方向和距离，不能用于指示 DNA 分子的具体位置，B 错误；在同一电场作用下，DNA 片段越长，即 DNA 相对分子质量越大，迁移速率越慢，C 错误；琼脂糖凝胶中的 DNA 分子通过染色，可以在波长为 300 nm 的紫外灯下被检测出来，D 错误。

[答案] A

[例 2] PCR 技术可用于临床的病原菌检测。为检测病人是否感染了某种病原菌，医生进行了相关操作：①分析 PCR 扩增结果；②从病人组织样本中提取 DNA；③利用 PCR 扩增 DNA 片段；④采集病人组织样本。回答下列问题：

(1)若要得到正确的检测结果，正确的操作顺序应该是_____ (用数字序号表示)。

(2)操作③中使用的酶是_____。PCR 反应中的每次循环可分为变性、复性、_____ 三步，其中复性的结果是_____。

(3)为了做出正确的诊断，PCR 反应所用的引物应该能与_____ 特异性结合。

(4)PCR(多聚酶链式反应)技术是指_____。该技术目前被广泛地应用于疾病诊断等方面。

[解析] (1)PCR 技术可用于临床的病原菌检测，若要得到正确的检测结果，正确的操作顺序应该是④采集病人组织样本→②从病人组织样本中提取 DNA→③利用 PCR 扩增 DNA 片段→①分析 PCR 扩增结果。(2)在用 PCR 技术扩增 DNA 时，DNA 的复制过程与细胞内 DNA 的复制类似，操作③中使用的酶是 *Taq* 酶(耐高温的 DNA 聚合酶)，PCR 反应中的每次循环可分为变性、复性、延伸三步，其中复性的结果是 *Taq* 酶从引物起始进行互补链的合成。(3)DNA 复制需要引物，为了做出正确的诊断，PCR 反应所用的引物应该能与两条单链 DNA 特异性结合。(4)PCR(多聚酶链式反应)技术是一项在生物体外复制特定 DNA 片段的核酸合成技术。该技术目前被广泛地应用于疾病诊断等方面。

[答案] (1)④②③① (2)*Taq* 酶(耐高温的 DNA 聚合酶) 延伸 *Taq* 酶从引物起始进行互补链的合成 (3)两条单链 DNA (4)一项在生物体外复制特定 DNA 片段的核酸合成技术

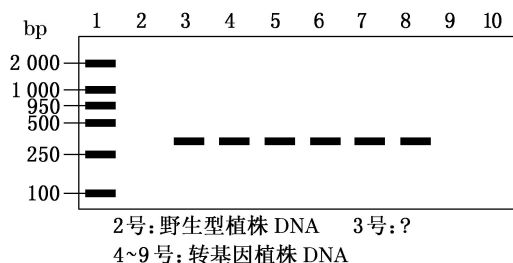
[在应用中落实]

1. 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(引物与模板不完全配对)。为了减少反应非特异条带的产生, 以下措施有效的是()

- A. 增加模板 DNA 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

解析: 选 D 增加模板 DNA 的量可以提高反应速度, 但不能有效减少非特异条带, A 错误; 延长热变性的时间和延长延伸的时间会影响变性、延伸过程, 但对引物与单链 DNA 的结合配对影响不大, 故不能有效减少反应非特异条带, B、C 错误; 非特异产物增加的原因可能是复性温度过低会造成引物与模板的结合位点增加, 故可通过提高复性的温度来减少反应非特异条带的产生, D 正确。

2. 用 PCR 方法检测转基因植株是否成功导入目的基因时, 得到以下电泳图谱。其中 1 号为 DNA 标准样液(Marker), 10 号为蒸馏水, PCR 时加入的模板 DNA 如图所示。据此作出的分析, 不合理的是()



- A. PCR 产物的分子大小在 250~500 bp 之间
- B. 3 号样品为不含目的基因的载体 DNA
- C. 9 号样品对应植株不是所需的转基因植株
- D. 10 号确定反应体系等对结果没有干扰

解析: 选 B PCR 过程中, 可以通过设计特定的引物来扩增特定的 DNA 片段。4~9 号是转基因植株, 理论上都应包含目的基因, 结合 2 号野生型和 10 号蒸馏水组的结果, 推测包含目的基因的片段大小应为 250~500 bp, A 正确; 3 号 PCR 结果包含 250~500 bp 片段, 应包含目的基因, B 错误; 9 号 PCR 结果不包含 250~500 bp 片段, 所以不是所需转基因植株, C 正确; 10 号为蒸馏水, 可排除反应体系等对结果的干扰, D 正确。

[课堂巩固落实]

1. 下列对基因工程的叙述, 正确的是()

- A. 基因工程必须使用的工具酶是限制酶、DNA 连接酶和 RNA 聚合酶
- B. 基因工程的核心步骤是将目的基因导入受体细胞
- C. 载体上的标记基因可用于检测目的基因是否导入受体细胞
- D. 目的基因是否表达可通过 PCR 来检测

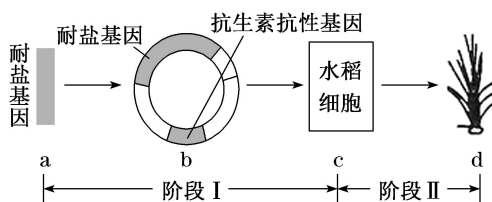
解析: 选 C 基因工程使用的工具酶是限制酶和 DNA 连接酶, 其核心步骤是基因表达载体的构建; 标记基因的作用是鉴别和筛选含目的基因的细胞; 目的基因是否表达可通过 PCR 和抗原抗体杂交来检测, 因为基因表达包括转录和翻译两个过程。

2. (2025·广东高考)Solexa 测序是一种将 PCR 与荧光检测相结合的高通量测序技术。为了确保该 PCR 过程中, DNA 聚合酶催化一个脱氧核苷酸单位完成聚合反应后, DNA 链不继续延伸, 应保护底物中脱氧核糖结构上的()

- A. 1' -碱基
- B. 2' -氢
- C. 3' -羟基
- D. 5' -磷酸基团

解析: 选 C 已知 DNA 聚合酶催化延伸子链方向只能从 5' → 3', 原因是脱氧核苷酸的 3' 碳有羟基, 可以结合下一个脱氧核苷酸的 5' 碳的磷酸基团, 故为了 DNA 聚合酶催化一个脱氧核苷酸单位完成聚合反应后, DNA 链不继续延伸, 应保护底物中脱氧核糖结构上的 3' -羟基, 使其不能结合下一个脱氧核苷酸的 5' -磷酸基团, C 正确。

3. 如图为科学家利用耐盐碱植物中的耐盐基因培育耐盐水稻新品系的过程。下列相关说法错误的是()



- A. 阶段 I、II 应用的技术分别是重组 DNA 技术、植物组织培养技术
- B. 对耐盐基因表达产物的检测可采用抗原抗体杂交技术
- C. 可用抗生素抗性基因作为探针来检测受体细胞中是否导入了目的基因
- D. 可用 PCR 检测受体细胞中的耐盐基因是否转录出 mRNA

解析: 选 C 阶段 I 将目的基因导入水稻细胞需要采用重组 DNA 技术, 阶段 II 将水稻细胞培养成完整植株需要采用植物组织培养技术, A 正确; 耐盐基因表达产物是蛋白质,

可用抗原抗体杂交技术检测，B 正确；可以用含有耐盐基因的 DNA 探针检测细胞中是否插入了目的基因，而不能用抗生素抗性基因作为探针来检测目的基因，C 错误；可用 PCR 检测受体细胞中的耐盐基因是否转录出 mRNA，D 正确。

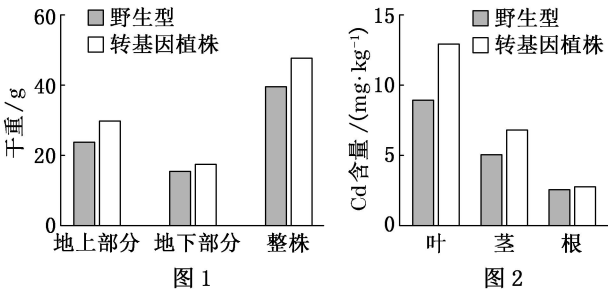
4. 采矿污染和不当使用化肥导致重金属镉(Cd)在土壤中过量积累。利用植物修复技术将土壤中的 Cd 富集到植物体内，进行后续处理(例如，收集植物组织器官异地妥善储存)，可降低土壤中 Cd 的含量。为提高植物对 Cd 污染土壤的修复能力，研究者将酵母液泡 Cd 转运蛋白(YCF1)基因导入受试植物，并检测了相关指标。回答下列问题：

(1)为获取 YCF1 基因，将酵母细胞的全部 DNA 提取、切割后与载体连接，导入受体菌的群体中储存，这个群体称为_____。

(2)将 DNA 序列插入 Ti 质粒构建重组载体时，所需要的两种酶是_____。构建的重组基因表达载体中必须含有标记基因，其作用是_____。

(3)进行前期研究时，将含有 YCF1 基因的重组载体导入受试双子叶植物印度芥菜，采用最多的方法是_____。研究者进一步获得了转 YCF1 基因的不育杨树株系，采用不育株系作为实验材料的目的是_____。

(4)将长势一致的野生型和转基因杨树苗移栽到 Cd 污染的土壤中，半年后测定植株干重(图 1)及不同器官中 Cd 含量(图 2)。据图 1 可知，与野生型相比，转基因植株对 Cd 具有更强的_____(填“耐性”或“富集能力”)；据图 2 可知，对转基因植株的_____进行后续处理对于缓解土壤 Cd 污染最为方便有效。



(5)已知 YCF1 特异定位于转基因植物细胞的液泡膜上。据此分析，转基因杨树比野生型能更好地适应高 Cd 环境的原因是_____。

相较于草本植物，采用杨树这种乔木作为 Cd 污染土壤修复植物的优势在于

_____ (写出两点即可)。

解析：(1)为获取 YCF1 基因，将酵母细胞的全部 DNA 提取、切割后与载体连接，导入受体菌的群体中储存，这个群体含有酵母菌的全部基因，称为基因组文库。(2)将 DNA 序列插入 Ti 质粒构建重组载体时，需要用限制酶切割供体 DNA 和质粒，以产生相同的黏性末端，然后用 DNA 连接酶进行连接。基因表达载体中的标记基因可用于目的基因的鉴定和筛

选。(3)农杆菌容易侵染双子叶植物，其质粒中的 T-DNA 可转移并插入受体细胞 DNA 中，将含有 *YCF1* 基因的重组载体导入受试双子叶植物印度芥菜，采用最多的方法是农杆菌转化法。考虑转基因技术的安全性，采用不育株系作为实验材料，可避免目的基因在自然界中的扩散。(4)根据图 1 分析可知，与野生型相比，转基因植株地上部分、地下部分和整株干重均增加，说明转基因植株在 Cd 污染的土壤中生长较好，即对 Cd 具有更强的耐性；据图 2 分析可知，转基因植株的茎、叶中 Cd 含量高于野生型，而根中 Cd 含量无明显差异，因此对转基因植株的茎、叶进行后续处理，可使转基因植株持续发挥富集 Cd 的作用，对于缓解土壤 Cd 污染最为方便有效。(5)*YCF1* 特异定位于转基因植物细胞的液泡膜上，可通过主动运输将 Cd 运到液泡中，提高了细胞液的浓度，有利于植株吸水，所以转基因杨树比野生型能更好地适应高 Cd 环境。相较于草本植物，杨树具有发达的根系和高大的树冠，更适应污染矿区等不良环境，同时可充分吸收土壤中的 Cd，木材也方便运输、利用，作为 Cd 污染土壤修复植物更具有优势。

答案：(1)基因组文库 (2)限制酶和 DNA 连接酶 便于目的基因的鉴定和筛选 (3)农杆菌转化法 避免目的基因在自然界中的扩散 (4)耐性 茎、叶 (5)*YCF1* 可通过主动运输将 Cd 运到液泡中，提高了细胞液的浓度，有利于植株吸水 杨树具有发达的根系和高大的树冠，更适应污染矿区等不良环境，同时可充分吸收土壤中的 Cd，木材也方便运输、利用