

课时跟踪检测（十三） 基因工程的基本操作程序

一、选择题

1. 下列过程中没有涉及碱基互补配对原则的是()

- A. 提取目的基因
- B. 目的基因与载体结合
- C. 将目的基因导入受体细胞
- D. 目的基因的表达和检测

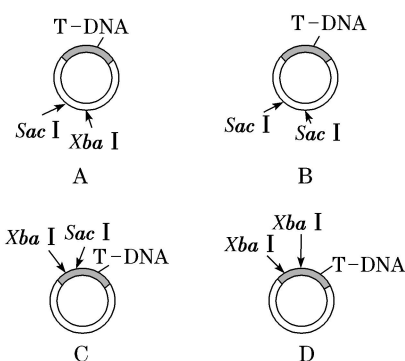
解析：选 C 目的基因的获取方法有从基因文库中获取、利用 PCR 扩增，其中用 PCR 扩增涉及碱基互补配对原则；目的基因与载体结合、目的基因的表达和检测都涉及碱基互补配对原则；将目的基因导入受体细胞不涉及碱基互补配对原则。

2. 下列关于 PCR 扩增 DNA 片段和电泳检测扩增产物实验的叙述，错误的是()

- A. PCR 过程需要耐高温的 DNA 聚合酶
- B. PCR 过程需要 DNA 连接酶
- C. PCR 扩增区域由 2 个引物来决定
- D. 不同大小的 DNA 在电场中迁移速率不同

解析：选 B PCR 在较高温度下进行，因此需要耐高温的 DNA 聚合酶，A 正确；PCR 过程需要耐高温的 DNA 聚合酶，不需要 DNA 连接酶，B 错误；PCR 扩增区域由 2 个引物来决定，C 正确；不同大小的 DNA 在电场中迁移速率不同，D 正确。

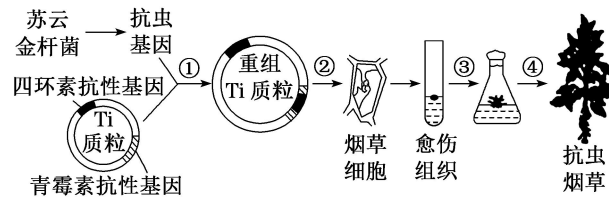
3. 用限制酶 *Xba* I 和 *Sac* I (两种酶切出的黏性末端不同)切割某 DNA，获得含目的基因的片段。若利用该片段构建基因表达载体，应选用如图中的 Ti 质粒是()



注：图中箭头所指的位置是限制酶识别和切割的位点。

解析：选 C Ti 质粒上的 T-DNA 可转移至受体细胞，并且整合到受体细胞染色体的 DNA 上，因此构建基因表达载体时，应该将目的基因插入 T-DNA 上，则限制酶 *Xba* I 和 *Sac* I 的切割位点都应该在 T-DNA 上，C 项符合题意。

4. 如图为转基因抗虫烟草的培育流程，下列相关叙述正确的是()



- A. 培育过程①需要使用纤维素酶和果胶酶
- B. 培育过程②将重组 Ti 质粒导入烟草细胞前需要使用 CaCO_3 处理农杆菌
- C. 培育过程③④仅通过调节生长调节剂的配比可诱导愈伤组织再生出新植株
- D. 可通过观察害虫吞食转基因烟草后的存活情况进行个体生物学水平检测

解析：选 D 过程①表示基因表达载体的构建过程，即形成重组 Ti 质粒的过程，需要使用限制酶和 DNA 连接酶，不需要纤维素酶和果胶酶，A 错误；过程②是将目的基因导入受体细胞的过程，在将重组 Ti 质粒导入烟草细胞前需要先使用 CaCl_2 处理农杆菌，B 错误；过程③④为再分化形成植株的过程，该过程中需要通过调节营养物质和生长调节剂的配比，从而实现由愈伤组织诱导出芽和根的顶端分生组织的目的，并由此再生出新植株，C 错误；可通过进行个体生物学水平的检测判断转基因抗虫烟草是否培育成功，即让害虫吞食转基因烟草，观察害虫的存活情况进行判断，D 正确。

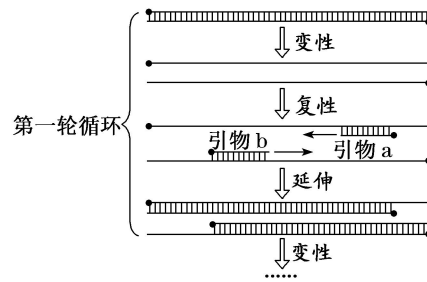
5. 在将目的基因导入受体细胞的相关操作中，叙述正确的是()
- A. 导入植物细胞时均采用农杆菌转化法
 - B. 转基因动物的获得多数运用基因枪法
 - C. 大肠杆菌作为受体细胞时通常需要使用 Ca^{2+} 处理
 - D. 导入目的基因的动物受精卵在培养液中发育成转基因动物

解析：选 C 将目的基因导入植物细胞采用最多的方法是农杆菌转化法；显微注射法是将目的基因导入动物细胞中最为有效的方法；大肠杆菌作为受体细胞时通常需要使用 Ca^{2+} 处理，使其成为感受态细胞；导入目的基因的动物受精卵在培养液中发育成早期胚胎，再经胚胎移植进入母体子宫内，其在母体子宫内发育成转基因动物。

6. 下列关于目的基因的检测与鉴定的叙述，错误的是()
- A. 目的基因在真核细胞中能否稳定遗传的关键是目的基因是否插入质粒 DNA 中
 - B. 检测受体细胞是否含有目的基因及其是否成功转录可使用 PCR 等技术
 - C. 目的基因表达的鉴定通常是在个体水平上进行的
 - D. 如在受体细胞内检测到目的基因表达的蛋白质，可确定目的基因上游含有启动子

解析：选 A 目的基因在真核细胞中稳定遗传的关键是目的基因是否插入转基因生物的染色体 DNA 上，A 错误；通过抗原抗体杂交可以检测目的基因是否翻译成了蛋白质，检测受体细胞是否含有目的基因及其是否成功转录可使用 PCR 等技术，B 正确；目的基因表达的鉴定通常是在个体水平上进行的，如抗虫鉴定、抗病鉴定、活性鉴定等，C 正确；如在受体细胞内检测到目的基因表达的蛋白质，可确定目的基因上游含有启动子，D 正确。

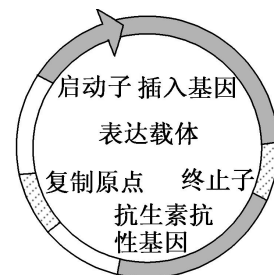
7. 利用 PCR 扩增目的基因, 其原理与细胞内 DNA 复制类似(如图所示)。图中引物为单链 DNA 片段, 它是子链合成延伸的基础。以下相关叙述错误的是()



- A. 变性过程中断裂的是 DNA 分子内碱基对之间的氢键
- B. 复性时引物 a 必须与引物 b 碱基互补配对
- C. 由原来的母链为模板合成的两个新 DNA 分子中, 只含有引物 a 或引物 b
- D. 延伸时需要耐高温的 DNA 聚合酶催化

解析: 选 B 在 PCR 变性过程中高温破坏的是 DNA 分子的双螺旋结构, 使其碱基对间的氢键断裂, A 正确; 复性时引物 a、引物 b 需要与模板进行碱基互补配对, 如果引物 a 和引物 b 发生碱基互补配对, 则不能与相应模板链结合, 无法完成子链的延伸, B 错误; 由于 DNA 复制方式为半保留复制, 而引物为单链 DNA 片段, 所以由原来的母链为模板合成的两个新 DNA 分子中, 只含有引物 a 或引物 b, C 正确; 延伸时的温度为 72 °C 左右, 所以要用耐高温的 DNA 聚合酶催化子链合成, D 正确。

8. 如图为基因表达载体的模式图, 下列有关基因工程中载体的说法, 错误的是()



- A. 基因工程的核心步骤是基因表达载体的构建
- B. 不同基因表达载体的构建方法是不同的
- C. 图中启动子位于基因的上游, 是 DNA 聚合酶识别和结合的部位

D. 抗生素抗性基因的作用是作为标记基因, 用于鉴别受体细胞中是否导入了目的基因

解析: 选 C 启动子是 RNA 聚合酶识别和结合的部位。

9. 下列有关聚合酶链式反应(PCR)扩增目的基因的叙述, 错误的是()

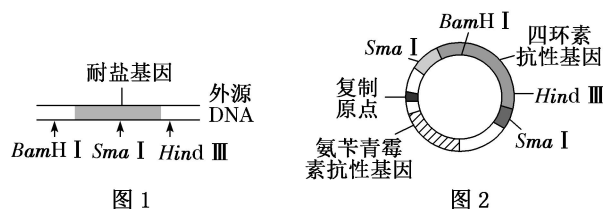
- A. 为方便构建重组质粒, 在引物中需要适当添加限制酶的切割位点
- B. 设计引物时需要避免引物之间形成碱基互补配对, 而造成引物自连
- C. PCR 扩增时, 复性所需温度的设定与引物的长度和碱基组成无关
- D. PCR 扩增一般需要经历多个循环, 每个循环分为变性、复性和延伸 3 步

解析: 选 C 为方便构建重组质粒, 在引物中需要增加适当的限制酶的切割位点, A 正确; 设计引物时需要避免引物之间的碱基互补配对, 以防止造成引物自身连接, B 正确; 复性温度与时间取决于引物的长度、碱基组成及其比例, 还有靶基因序列的长度, 如果引物中 GC 含量高, 需要设定更高的复性温度, C 错误; PCR 扩增一般需要经历多个循环, 每个循

环分为变性、复性和延伸 3 步，D 正确。

二、非选择题

10. 某实验小组利用转基因技术培育耐盐水稻，如图 1 表示含有耐盐基因的外源 DNA 分子，图 2 表示质粒，其上含有 *Bam*H I、*Sma* I 和 *Hind*III 三种限制酶的酶切位点。请回答下列问题：



(1)分析上图可知，欲构建重组 DNA 分子，应选用_____两种限制酶切割质粒和外源 DNA 分子，使用两种不同的限制酶切割含目的基因的外源 DNA 和质粒的优点是_____。

(2)题(1)中不使用另外一种限制酶切割的原因是_____，题(1)中构建成功的重组质粒若用该酶切割能产生_____种不同的 DNA 片段。

(3)质粒中抗性基因的作用是_____。成功导入了目的基因的受体细胞(受体细胞本身不含四环素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因)，不能在含_____ (填“氨苄青霉素”或“四环素”)的培养基中进行培养。

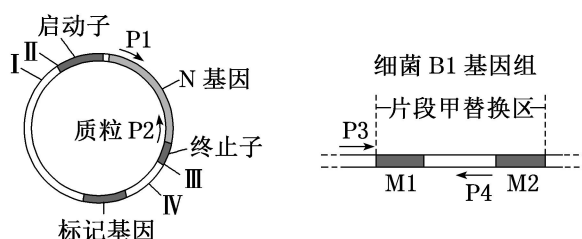
(4)从个体水平上鉴定耐盐基因是否成功表达的方法是_____。

解析：(1)外源 DNA 和质粒上都含有限制酶 *Bam*H I、*Hind*III 和 *Sma* I 的识别序列和切割位点，但限制酶 *Sma* I 的识别序列位于目的基因中，因此构建基因表达载体时，应该选用限制酶 *Bam*H I 和 *Hind*III 切割质粒和外源 DNA 分子；使用两种不同的限制酶切割含目的基因的外源 DNA 和质粒可防止质粒和目的基因的自身环化及质粒与目的基因的反向连接。(2)构建成功的重组质粒含有 3 个限制酶 *Sma* I 的识别序列和切割位点，因此若用该酶切割构建成功的重组质粒能产生 3 种不同的 DNA 片段。(3)质粒中抗性基因的作用是筛选和鉴定目的基因；构建基因表达载体时，四环素抗性基因被破坏，但氨苄青霉素抗性基因没有被破坏，因此成功导入了目的基因的受体细胞(受体细胞本身不含四环素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因)，不能在含四环素的培养基中进行培养。(4)从个体水平上鉴定耐盐基因是否成功表达的方法是将转基因水稻置于盐碱地中培育(或用一定浓度的盐水浇灌转基因水稻)，观察其能否正常生长。

答案：(1)*Bam*H I 和 *Hind*III 防止质粒和目的基因的自身环化及质粒与目的基因的反向连接 (2)*Sma* I 会破坏目的基因 3 (3)筛选和鉴定目的基因 四环素 (4)将转基因水稻置

于盐碱地中培育(或用一定浓度的盐水浇灌转基因水稻), 观察其能否正常生长

11. (2024·全国新课标卷)某研究小组将纤维素酶基因(N)插入某种细菌(B1)的基因组中, 构建高效降解纤维素的菌株(B2)。该小组在含有 N 基因的质粒中插入 B1 基因组的 M1 与 M2 片段; 再经限制酶切割获得含 N 基因的片段甲, 片段甲两端分别为 M1 与 M2; 利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术将片段甲插入 B1 的基因组, 得到菌株 B2。酶切位点(I~IV)、引物(P1~P4)的结合位置、片段甲替换区如图所示, →表示引物 5' →3' 方向。回答下列问题。



(1)限制酶切割的化学键是_____。为保证 N 基因能在菌株 B2 中表达, 在构建片段甲时, 应将 M1 与 M2 片段分别插入质粒的 I 和 II、III 和 IV 酶切位点之间, 原因是_____。

(2)CRISPR/Cas9 技术可以切割细菌 B1 基因组中与向导 RNA 结合的 DNA。向导 RNA 与 B1 基因组 DNA 互补配对可以形成的碱基对有 G—C 和_____。

(3)用引物 P1 和 P2 进行 PCR 可验证片段甲插入了细菌 B1 基因组, 所用的模板是_____; 若用该模板与引物 P3 和 P4 进行 PCR, 实验结果是_____。

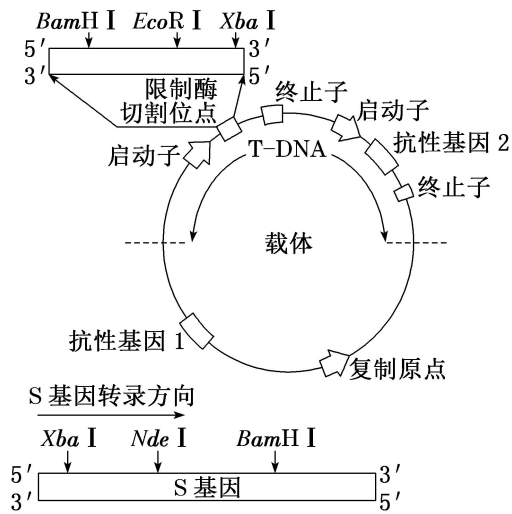
(4)与秸秆焚烧相比, 利用高效降解纤维素的细菌处理秸秆的优点是_____ (答出 2 点即可)。

解析: (1)限制酶(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。N 基因表达需要 RNA 聚合酶与启动子结合启动转录, 还需要终止子终止转录, 在题述对应位置插入 M1 与 M2 片段, 可以防止 N 基因上游的启动子和下游的终止子在插入 B1 的基因组时被破坏, 保证 N 基因能在菌株 B2 中表达。(2)向导 RNA 中存在碱基 A、G、C、U, 而 B1 基因组 DNA 中存在碱基 A、G、C、T, RNA 与 DNA 互补配对时也遵循碱基互补配对原则, 可以形成的碱基对有 G—C、C—G、A—T 和 U—A。(3)根据题意, 为验证片段甲是否插入了细菌 B1 基因组中, 应该以菌株 B2 的基因组 DNA 为模板进行 PCR。该模板没有引物 P4 的结合位置, 若用该模板与引物 P3 和 P4 进行 PCR, 实验结果是无法扩增出目的产物。(4)解析略。

答案: (1)磷酸二酯键 可以防止 N 基因上游的启动子和下游的终止子被破坏, 保证 N 基因能在菌株 B2 中表达

(2)C—G、A—T、U—A (3)菌株 B2 基因组 DNA 无法扩增出目的产物 (4)减少环境污染; 实现废物利用(合理即可)

12. (2025·陕晋宁青高考)马铃薯作为重要农作物，提高其冷耐受性可拓展优质马铃薯的种植区域。我国科研人员发现，野生马铃薯中 S 基因的表达与其冷耐受性调控有关，将该基因导入栽培马铃薯中可显著增强其抗寒能力。回答下列问题。



限制酶	识别序列及切割位点
<i>Bgl</i> II	5'- A↓G A T C T -3' 3'- T C T A G↑A -5'
<i>Nde</i> I	5'- C A↓T A T G -3' 3'- G T A T↑A C -5'
<i>Xho</i> I	5'- C↓T C G A G -3' 3'- G A G C T↑C -5'
<i>EcoR</i> I	5'- G↓A A T T C -3' 3'- C T T A A↑G -5'
<i>BamH</i> I	5'- G↓G A T C C -3' 3'- C C T A G↑G -5'
<i>Sal</i> I	5'- G↓T C G A C -3' 3'- C A G C T↑G -5'
<i>Xba</i> I	5'- T↓C T A G A -3' 3'- A G A T C↑T -5'

- (1)PCR 扩增目的基因时，需要模板 DNA、引物、_____、含 Mg^{2+} 的缓冲液和耐高温的 DNA 聚合酶。DNA 聚合酶在 PCR 的_____步骤中起作用。
- (2)图中标识了载体和 S 基因中限制酶的切割位点。为将 S 基因正确插入载体，PCR 扩增 S 基因时需在引物的_____ (填“5' 端”或“3' 端”)添加限制酶识别序列，结合上表分析，上游引物应添加的碱基序列是 5' - _____-3'，切割载体时应选用的两种限制酶是_____。PCR 扩增产物和载体分别被限制酶切割后，经纯化和连接，获得含 S 基因的表达载体并导入农杆菌。
- (3)用携带 S 基因的农杆菌侵染栽培马铃薯愈伤组织时，基因表达载体中 T-DNA 进入愈伤组织细胞，将 S 基因整合到_____，抗性基因_____可用于筛选成功转化

的愈伤组织。该愈伤组织经_____形成芽、根，继续培育可获得抗寒能力显著增强的马铃薯植株。

解析：(1)PCR 扩增目的基因时，需要模板 DNA、引物、4 种脱氧核苷酸、含 Mg^{2+} 的缓冲液、耐高温的 DNA 聚合酶。PCR 反应过程分变性、复性和延伸三步，在延伸阶段，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)DNA 复制时，子链的延伸方向为 5' 端→3' 端，故通过 PCR 扩增 S 基因时，需在引物的 5' 端添加限制酶识别序列。结合载体上限制酶切割位点以及 S 基因上的切割位点分析，可用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 切割载体，又 *Bam*H I 和 *Bgl* II 为同尾酶(能切割产生相同的黏性末端)，因此需在 S 基因上游引物中添加 *Bgl* II 的识别序列，即 5' -AGATCT-3' 。(3)农杆菌细胞内含有 Ti 质粒，当它侵染栽培马铃薯愈伤组织时，能将 Ti 质粒上的 T-DNA(可转移的 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。分析载体结构可知，抗性基因 2 位于 T-DNA 内部，上下游含有启动子和终止子，该基因可以正常表达，而抗性基因 1 位于 T-DNA 外部，故抗性基因 2 可用于筛选成功转化的愈伤组织。愈伤组织能重新分化成芽、根等器官，该过程称为再分化。

答案：(1)4 种脱氧核苷酸 延伸 (2)5' 端 AGATCT *Bam*H I 和 *Eco*R I (3)马铃薯细胞的染色体 DNA 上 2 再分化