



总主编◎李朝东



修订版

教材

JIAOCAIJIEXI

解析



YZLI0890161326

浙 K 国标

现代生物科技专题

高中生物·选修3



黄河出版传媒集团
宁夏人民教育出版社



总主编◎李朝东

教材

JIAOCAIJIEXI

解析

本册主编：沈 晖



浙 K 国标

现代生物科技专题

高中生物·选修 3



YZLI0890151325



黄河出版传媒集团
宁夏人民教育出版社

图书在版编目(CIP)数据

教材解析. 高中生物. 3, 现代生物科技专题: 选修 / 李朝

东主编. -- 银川: 宁夏人民教育出版社, 2011. 11

ISBN 978 - 7 - 80764 - 656 - 3

I. ①教… II. ①李… III. ①生物课—高中—教学

参考资料 IV. ①G634

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 235259 号

教材解析——生物 选修3 现代生物科技专题(浙 K 国标)

李朝东 主编

责任编辑 杨 柳 超 楠

封面设计 杭永鸿

责任印制 刘 丽



黄河出版传媒集团
宁夏人民教育出版社

出版发行

地 址 银川市北京东路 139 号出版大厦(750001)

网 址 www.yrpubm.com

网上书店 www.hh-book.com

电子信箱 jiaoyushe@yrpubm.com

邮购电话 0951 - 5014294

经 销 全国新华书店

印刷装订 合肥朝阳印刷有限责任公司

开 本 880mm×1230mm 1/16 印 张 8.5 字 数 170 千

印刷委托书号(宁)0009375 印 数 5000 册

版 次 2011 年 11 月第 1 版 印 次 2011 年 11 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978 - 7 - 80764 - 656 - 3/G·1567

定 价 15.00 元

版权所有 翻印必究 36

当一道道疑似难题摆在你面前时，是胸有成竹，还是没有头绪？如果是前者，那么恭喜你，你已经跨越了教材与考试之间的差距；如果是后者，那也不要着急，《经纶学典·教材解析》在教材与考试间为你搭建了一个沟通平台。

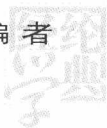
不少同学有这样的感觉：教材都熟悉，课堂上也听懂了，但考试成绩却不尽如人意。原因在于教材内容与考试要求有差距，课堂教学与选拔性考试有差别。这就需要在教材之上、课堂之外能够得到补充、提升，直至达到高考的选拔要求。本书就是从以下两个方面填补这种差距。

首先是对教材的深度挖掘。教材内容通俗易懂，但里面包含着丰富的信息，我们把教材所包含的信息挖掘出来，并进行系统整理，让知识的内涵和外延、知识间的联系充分展现。

第二是对课堂教学的补充和拓展。本书不是对课堂教学的重复，而是在此基础上，对其进行补充、提高，挖掘出那些学生难以理解、难以掌握的内容，进行归纳和总结，为学生串起一条规律性的“线”。生物侧重对重要生物过程进行详细分析，知识与生活热点的联系等。这些由于课堂教学时间限制或教师水平发挥的问题，在课堂上并没有全部传授给学生，而这些恰恰就是考试中要考查的，学生拉开差距的所在。

正是本着上述编写理念，本丛书以学生为中心，用最易理解的表现形式呈现学习中难以理解的部分。希望本书为你的成长助力，您若有更好的想法和意见请登录：www.jing-lun.cn。

编者





目录

第一章 基因工程	
第一节 工具酶的发现和基因工程的诞生	1
第二节 基因工程的原理和技术	11
第三节 基因工程的应用	26
第四节 基因工程的发展前景	26
本章总结	39
第二章 克隆技术	
第一节 什么是克隆	46
第二节 植物的克隆	46
第三节 动物的克隆	63
本章总结	78
第三章 胚胎工程	
第一节 从受精卵谈起	85
第二节 胚胎工程	85
本章总结	102
第四章 生物技术的安全性和伦理问题	109
第五章 生态工程	109
本章总结	125

第 1 章 基因工程

第一节 工具酶的发现和基因工程的诞生

A 教材梳理

知识点一 基因工程

1. 基因工程的概念

基因工程是狭义的遗传工程。广义的遗传工程泛指把一种生物的遗传物质(细胞核、染色体脱氧核糖核酸等)移到另一种生物的细胞中去,并使这种遗传物质所带的遗传信息在受体细胞中表达。基因工程的核心是构建重组 DNA 分子,因此,早期也将基因工程称为重组 DNA 技术。

2. 基因工程的基础

(1) DNA 的规则双螺旋结构是基因工程的物质基础。

(2) 不同生物共用一套密码子是理论基础。

(3) 运载体和工具酶的发现为基因工程提供了技术基础。

注意:从以下几个方面正确理解基因工程的概念:

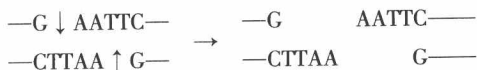
基因工程的别名	基因拼接技术或 DNA 重组技术
操作环境	生物体外
操作对象	基因
操作水平	DNA 分子水平
基本过程	剪切→拼接→导入→表达
实质	基因重组
结果	人类需要的基因产物

知识点二 限制性核酸内切酶

1. 概念:限制性核酸内切酶是能够识别和切割 DNA 分子内一小段特殊核苷酸序列的酶。一种限制性核酸内切酶只能识别一种特定的核苷酸序列,并在特定的切点上切割 DNA 分子。

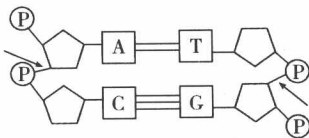
2. 实例:限制性核酸内切酶 *EcoR* I。

识别序列:—GAATTC—



注意:①限制性核酸内切酶识别的 DNA 序列一般为反向重复序列,切割后可形成粘性末端。

②限制性核酸内切酶切割的是磷酸二酯键(下图箭头所指部位)。

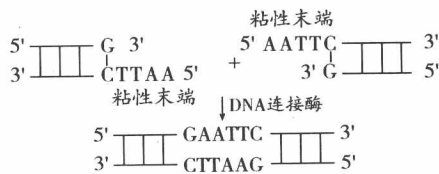


③限制性核酸内切酶不切割自身生物的 DNA 序列。如限制性核酸内切酶来自细菌,则该限制性核酸内切酶不切割细菌的 DNA。

④现已能从 300 多种微生物中分离出约 4 000 种限制性核酸内切酶,所以限制性核酸内切酶是一类酶,根据酶的识别序列和位点又可分许多种。

知识点三 DNA 连接酶

1. DNA 连接酶连接作用示意图



2. 连接的部位:磷酸二酯键(梯子的扶手),而不是氢键(梯子的踏板)。

3. 连接的结果:将两个 DNA 片段相同的粘性末端连接起来。

知识点四 质粒

1. 概念:质粒是能够自主复制的双链环状 DNA 分子,它在细菌中以独立于染色体之外的方式存在,是一种特殊的遗传物质。

2. 作用:质粒是基因工程中最常用的运载载体,可将外源基因送入宿主细胞。



3. 质粒的特点

- (1) 存在于细菌以及酵母菌等生物中。
- (2) 细胞染色体外能自主复制的双链环状 DNA 分子。
- (3) 细菌的质粒比细菌 DNA 小得多。
- (4) 带有少量基因。
- (5) 常有抗生素抗性基因,使细菌有抗药性,这些基因担任基因工程中的标记基因。

4. 质粒与宿主细胞的关系

- (1) 质粒的存在对宿主细胞无影响。
- (2) 质粒的复制只能在宿主细胞内完成。

注意:①基因工程的运载体必须有标记基因的原因:基因工程的最终目的是要在受体细胞内表达目的基因,而一旦把目的基因转化进入受体细胞,检测起来非常困难,而且很难对目的基因的表达定位。为了便于观察和检测,从而引入标记基因,如观察某个蛋白的组织表达特异性(如只在根或叶或花中表达),如果加入了标记基因如 GFP(绿色荧光蛋白,有该基因的位置在紫外光下看到的是绿色),或者 GUS(经组织化学染色后,有标记基因的组织就有蓝色反应),这样就可以很容易检测到目的基因是否已经表达、在哪里表达、表达强度如何。因此,加入标记基因有着特殊的作用,绝不是可有可无的。

②基因工程中的运载体有质粒、噬菌体、动植物病毒等。由于病毒可以比较容易进入细胞,而且因其自身容易在细胞内复制、表达的特性,可以提高目的基因整合进入受体和在受体中表达的概率,所以一般选用病毒作为载体。在此之前会将病毒的致病基因除去,所以不会对宿主细胞造成伤害。

③基因工程中,目的基因不可以直接导入受体细胞,必须要用运载体。理由有:a. 使用适当的载体可以提高转化率;b. 载体上有标记基因,可以“报告”转化是否成功;c. 单独的目的基因片段如果没有能够重组进入受体细胞(重组频率很低),那么会被受体细胞识别、降解;d. 载体具有能在受体细胞内稳定存在并自主复制的能力,能保证目的基因在受体细胞内的复制。

B 教材拓展

拓展点一 限制性核酸内切酶

1. 限制性核酸内切酶的特点

- (1) 化学本质:蛋白质。
- (2) 作用:可用于获取目的基因和对载体的切割。
- (3) 特性:特异性地识别 DNA 分子中特定的核苷酸序列,并且在特定的部位进行切割,形成粘性末端(或平末端),不能切割 RNA 分子。

- (4) 来源:主要从细菌(原核生物)中分离出该种酶,但在

酵母菌(真核生物)中也可分离得到。限制性核酸内切酶不会切割自身 DNA,原因是微生物在长期的进化过程中形成了一套完善的防御机制,对于外源入侵的 DNA 可利用限制性核酸内切酶等将其降解,而本身的 DNA 分子或者不具备这种限制性核酸内切酶的识别切割序列,或者通过甲基化酶将甲基转移到所识别序列的碱基上,使限制性核酸内切酶不能将其切开。

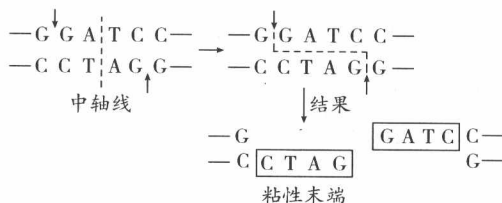
(5) 限制性核酸内切酶是一大类酶,不是一种酶,如限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III 等。

(6) 限制性核酸内切酶切割的是 DNA 分子脱氧核苷酸间的磷酸二酯键。

2. DNA 分子经限制性核酸内切酶切割产生的 DNA 片段末端通常有两种形式:粘性末端和平末端。

(1) 粘性末端:当限制性核酸内切酶在它的识别序列中轴线两侧将 DNA 的两条链分别切开时产生的末端。

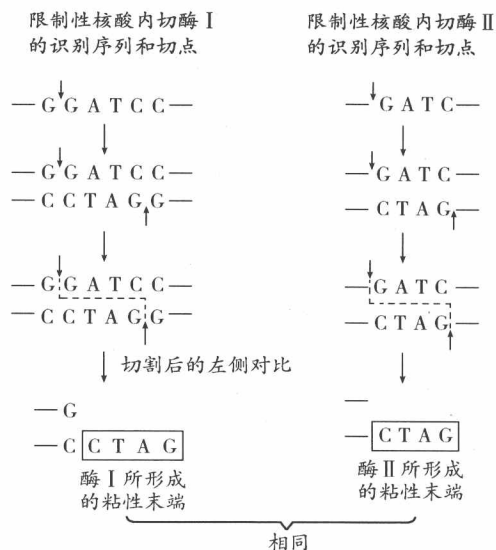
例如:已知限制性核酸内切酶的识别序列和切点是 $\downarrow$ GATC $\downarrow$ 。



①同一种限制性核酸内切酶切割不同的 DNA 分子,产生的粘性末端均相同。

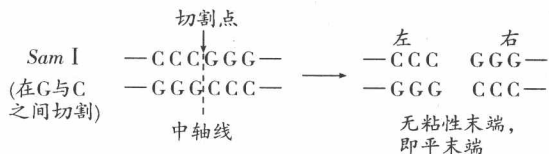
②不同种的限制性核酸内切酶切割 DNA 分子,也可以产生相同的粘性末端。

例如:

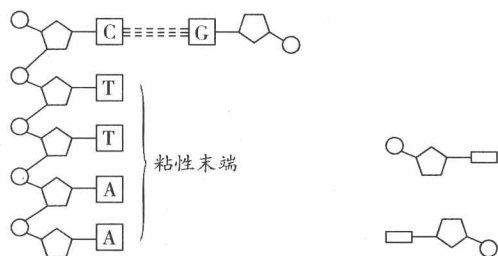


③基因工程中常用相同的限制性核酸内切酶切割获取目的基因和载体。

(2)平末端:当限制性核酸内切酶在它识别序列的中轴线处切开时,产生的则是平末端。如下图所示:



拓展点二 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶



比较项目	DNA 聚合酶	DNA 连接酶
不同点	以 DNA 的一条链为模板,催化游离的脱氧核苷酸逐个进行连接,在单个脱氧核苷酸与 DNA 片段之间形成磷酸二酯键	DNA 连接酶作用时不需要模板,是将 DNA 双链上的两个缺口同时连接起来,在两个 DNA 片段之间形成磷酸二酯键
图像分析	将②相互连接	将具有相同粘性末端的①相互连接或平末端的 DNA 片段连接
相同点	两者作用的结果都是形成磷酸二酯键;均属于酶,具有酶的基本属性和特点	

注意:①两者虽都为蛋白质构成的酶,但在分子结构和组成上有所不同。

②DNA 解旋酶作用于氢键。

拓展点三 最常用的载体——质粒

1. 载体

(1)作用:载体是基因工程的运输工具,在基因工程操作过程中,使用载体有两个目的:一是用它作为运载工具,将目的基因送入宿主细胞中;二是利用它在宿主细胞内对目的基因进行大量复制的特性(将目的基因单独导入宿主细胞,目的基因无法在宿主细胞中自主复制)。

(2)条件:作为载体必须具有多个限制性核酸内切酶切点,以便运载多种目的基因。

2. 质粒

(1)化学本质:能够自主复制的双链环状 DNA 分子。

(2)来源:存在于酵母菌(真核生物)染色体之外、放线菌和细菌(原核生物)拟核 DNA 之外。

(3)特点

①有 1 个或多个限制性核酸内切酶的切割位点。

②一般含几个甚至几百个基因,控制着细菌的抗药性、固氮、抗生素合成等性状,控制这些性状的基因即标记基因,便于基因工程中筛选含目的基因的宿主细胞。

(4)最常用的质粒:大肠杆菌的质粒和农杆菌的质粒。后者是由于土壤农杆菌很容易感染植物细胞,使细胞生有瘤状物,所以科学家培育转基因植物时,常常用土壤农杆菌中的质粒作载体。

C 典型题解

► 考点一 基因工程的概念

【例题 1】下列关于基因工程中有关基因操作的名词及对应的内容,正确的组合是 ()

- A. 基因的“剪刀”——DNA 连接酶
- B. 基因“针线”——限制性核酸内切酶
- C. 基因的运载体——DNA 解旋酶
- D. 目的基因——编码特定的蛋白质

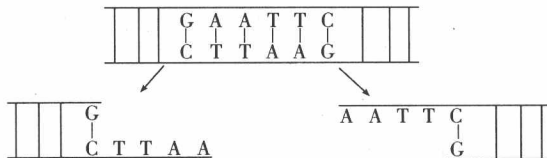
【解析】基因的“剪刀”是指限制性核酸内切酶;基因“针线”是指 DNA 连接酶;基因的运载体是指质粒。

【答案】D

【点评】注意基因工程中各种酶的功能及作用部位。

► 考点二 限制性核酸内切酶及 DNA 连接酶

【例题 2】如图表示限制性核酸内切酶切割 DNA 分子的过程,下列有关叙述不正确的是 ()



- A. 该限制性核酸内切酶能识别的碱基序列是 GAATTC, 切点在 G 和 A 之间
- B. 用此酶切割含有目的基因的片段时,必须用相应的限制性核酸内切酶切割载体,以产生与目的基因相同的粘性末端
- C. 要把目的基因与载体“缝合”起来,需用到基因工程的另一个工具——DNA 聚合酶
- D. 限制性核酸内切酶切割 DNA 分子时,破坏的是同一



条链上相邻脱氧核苷酸之间的化学键,而不是两条链上互补配对的碱基之间的氢键

[解析] 由图示可知,该限制性核酸内切酶识别的碱基序列是 GAATTC,切点在 G 和 A 之间;要获得重组 DNA 分子,必须用同一种限制性核酸内切酶切割载体和目的基因,得到相同的粘性末端;将目的基因与载体“缝合”起来的工具酶是 DNA 连接酶,而不是 DNA 聚合酶;限制性核酸内切酶切割的是同一条链上相邻脱氧核苷酸之间的磷酸二酯键。

[答案] C

[点评] 解答此类题目的关键是了解限制性核酸内切酶的作用特点:①限制性核酸内切酶具有专一性,能专一识别特定的核苷酸序列和酶切位点,切出的 DNA 片段具有两个完全相同的粘性末端,而且两个粘性末端的碱基可互补配对。②用限制性核酸内切酶切割 DNA 分子时断开的是 DNA 链中的磷酸二酯键。

例题 3 下列关于 DNA 连接酶作用的叙述,正确的是

()

- A. 将单个脱氧核苷酸加到某 DNA 片段末端,形成磷酸二酯键
- B. 将断开的两个 DNA 片段的骨架连接起来,重新形成磷酸二酯键
- C. 连接两条 DNA 链上碱基之间的氢键
- D. 只能将双链 DNA 片段互补的粘性末端之间连接起来,而不能将双链 DNA 片段平末端之间进行连接

[解析] DNA 连接酶在两个 DNA 片段之间形成磷酸二酯键,而且把双链上两个缺口同时连接;而 DNA 聚合酶只能将单个脱氧核苷酸加到已有的 DNA 片段上,且在单链上进行操作;DNA 连接酶中的 T₄ DNA 连接酶既能“缝合”双链 DNA 片段互补的粘性末端,又能“缝合”双链 DNA 片段的平末端。

[答案] B

[点评] DNA 连接酶和 DNA 聚合酶,都是作用于磷酸二酯键,与氢键的形成无关。

考点三 质粒

例题 4 下列关于质粒的叙述,正确的是

()

- A. 质粒是广泛存在于细菌细胞中的一种颗粒状细胞器
- B. 质粒是细菌细胞质中能自主复制的小型环状 DNA 分子
- C. 质粒只有在导入宿主细胞后才能在宿主细胞内复制
- D. 细菌质粒的复制过程一定是在宿主细胞外独立进行的

[解析] 质粒可来自细菌及酵母菌中。质粒是一个小型环

状 DNA 分子,不属于细胞器,它可以进入宿主细胞存在于细胞内,完成自我复制。质粒是一个重要的载体,通常利用质粒与目的基因结合形成重组质粒,而后导入宿主细胞。

[答案] C

[点评] 质粒是基因工程中最常用的载体,其具有的特点是:裸露的小型环状 DNA 分子,结构简单,独立于染色体、DNA 之外,具有自我复制能力。

例题 5 下列有关基因工程技术的叙述,正确的是 ()

- A. 重组 DNA 技术所用的工具酶是限制性核酸内切酶、连接酶和载体
- B. 所有的限制性核酸内切酶都只能识别同一种特定的核苷酸序列
- C. 选用细菌作为重组质粒的受体细胞是因为细菌繁殖快
- D. 只要目的基因进入了受体细胞就能成功实现表达

[解析] 重组 DNA 技术所用的工具酶有:限制性核酸内切酶、DNA 连接酶。每一种限制性核酸内切酶只能识别同一种特定的核苷酸序列,而所有的限制性核酸内切酶是一大类酶,有多种不同的酶,不同的限制性核酸内切酶识别的核苷酸序列不同,故所有的限制性核酸内切酶可识别多种核苷酸序列;由于细菌具有繁殖快、易培养等优点,故常选用细菌作为重组质粒的受体细胞;目的基因是否成功表达要通过检测是否产生目的基因产物来判断。

[答案] C

[点评] 解答此类题目需明确以下几方面知识:①基因操作的工具酶是限制性核酸内切酶、DNA 连接酶。②一种限制性核酸内切酶只能识别特定的核苷酸序列,不同的限制性核酸内切酶识别的核苷酸序列不同。③载体是基因的运输工具,不属于酶。④目的基因进入受体细胞后,受体细胞表现出特定的性状才能说明目的基因完成了表达过程。⑤目的基因导入受体细胞中的目的是为了表达生产目的基因的产物,因此能够快速繁殖是选择受体细胞的重要条件之一。

考点四 限制性核酸内切酶的识别序列、切割点及粘性末端

例题 6 以下是几种不同限制性核酸内切酶切割 DNA 分子后形成的部分片段,请回答下列问题:

- ①...CTGCA ②...G ③...TG
- ...G ...CTTAA ...AC
- ④...G ⑤...GC
- ...CTGCA ...CG

(1)以上 DNA 片段是由 _____ 种限制性核酸内切酶切割后产生的。

(2)以上 DNA 片段中,粘性末端是_____,平末端是_____。

(3)找出能连接的对应片段并写出连接后形成的 DNA 分子片段。

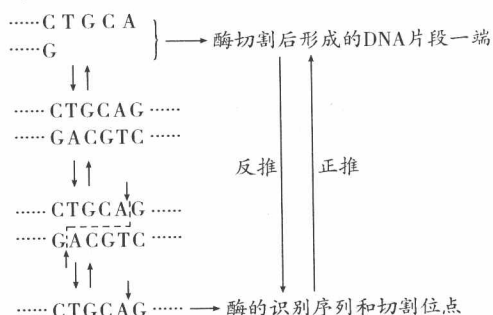
[解析] 本题考查基因工程中限制性核酸内切酶的作用。

(1)一种限制性核酸内切酶只能识别一种特定的核苷酸序列,并在特定位点上进行切割。题中①④的粘性末端相同,是由同一种限制性核酸内切酶切割形成的,其他三种片段的末端都不相同,所以这些片段是由 4 种限制性核酸内切酶切割后产生的。(2)粘性末端具有互补的碱基序列,题中①②④是粘性末端,③⑤是平末端。(3)题中①和④是由同一种限制性核酸内切酶切割后形成,在 DNA 连接酶的作用下可连接为相应 DNA 片段。连接时,将其中一个旋转 180°与另一个进行碱基互补配对即可。

[答案] (1)4 (2)①②④ ③⑤

(3) ...CTGCAG... ...GACGTC...
...GACGTC... 或 ...CTGCAG...

[点评] 解答此题需灵活运用由限制性核酸内切酶的识别序列和切割位点,推导出切割后的 DNA 片段、所形成的粘性末端,反之,由切割结果推出酶的识别序列和切割位点,方法步骤分析如下:



例 7 下表为常用的限制性核酸内切酶及其识别序列和切割位点,由此推断的以下说法中,正确的是 ()

限制性核酸内切酶名称	识别序列和切割位点	限制性核酸内切酶名称	识别序列和切割位点
<i>Bam</i> H I	G ↓ GATCC	<i>Kpn</i> I	GGTAC ↓ C
<i>Eco</i> R I	G ↓ AATTC	<i>Sau</i> 3A I	↓ GATC
<i>Hind</i> II	GTY ↓ RAC	<i>Sma</i> I	CCC ↓ GGG

(注:Y=C 或 T,R=A 或 G)

- 限制性核酸内切酶切割后不一定形成粘性末端
- 限制性核酸内切酶的切割位点一定在识别序列的内部
- 不同限制性核酸内切酶切割后一定形成不同的粘性末端
- 一种限制性核酸内切酶一定只能识别一种核苷酸序列

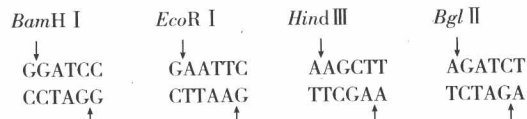
[解析] 由表中信息可知,*Hind* II 能识别不同的核苷酸序列;核苷酸序列经限制性核酸内切酶切割后不一定形成粘性末端,可形成平末端,如 *Sma* I 切割 DNA 形成的末端;*Sau*3A I 的切割位点在识别序列的外部;不同限制性核酸内切酶切割后可能形成相同的粘性末端,如 *Bam*H I 与 *Sau*3A I 切割形成的末端。

[答案] A

[点评] 限制性核酸内切酶是一类酶,内有多种酶,区分这些酶种类的依据是识别序列与切割位点,而不是粘性末端。

D 针对性练习

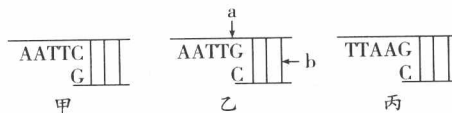
- 下列有关基因工程的叙述,正确的是 ()
 - DNA 连接酶只能将同一种限制性核酸内切酶切割形成的粘性末端连接起来
 - 目的基因导入受体细胞后,受体细胞即发生基因突变
 - 限制性核酸内切酶识别序列越短,则该序列在 DNA 中出现的几率就越大
 - 常使用的运载体有大肠杆菌、噬菌体和动植物病毒等
- 限制性核酸内切酶可识别并切割 DNA 分子上特定的核苷酸序列。下图为四种限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III 及 *Bgl* II 的识别序列及每一种限制性核酸内切酶的特定切割部位。



其中哪两种限制性核酸内切酶切割出来的 DNA 片段末端可以互补结合? 其末端互补序列是 ()

- Bam*H I 和 *Eco*R I; 末端互补序列: AATT—
- Bam*H I 和 *Hind* III; 末端互补序列: GATC—
- Bam*H I 和 *Bgl* II; 末端互补序列: GATC—
- Eco*R I 和 *Hind* III; 末端互补序列: AATT—

- 对下图所示粘性末端的说法,错误的是 ()

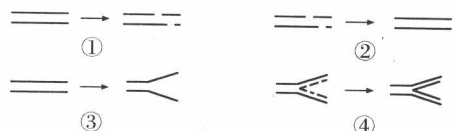


- 甲、乙、丙粘性末端是由各自不同的限制性核酸内切酶催化产生的
- 甲、乙具有相同的粘性末端,可形成重组 DNA 分子,但甲、丙之间不能
- DNA 连接酶作用位点在 b 处,催化磷酸基团和脱氧核糖之间形成化学键
- 切割甲的限制性核酸内切酶不能识别由甲、乙片段形



成的重组 DNA 分子

4. 下图为 DNA 分子在不同酶的作用下所发生的变化, 图中依次表示限制性核酸内切酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶、解旋酶作用的正确顺序是 ()



- A. ①②③④
B. ①②④③
C. ①④②③
D. ①④③②
5. 为了解基因结构, 通常选取一特定长度的线性 DNA 分子, 先用一种限制性核酸内切酶切割, 通过电泳技术将单酶水解片段分离, 计算相对大小; 然后再用另一种酶对单酶水解片段进行降解, 分析片段大小。下表是某小组进行的相关实验。

已知一 线性 DNA 序 列 共 有 5 000 bp (bp 为 碱 基 对)	第一步 水解	产物 (单位:bp)	第二步 水解	产物 (单位:bp)
	A 酶切割	2 100	将 第 一 步 水 解 产 物 分 离 后 , 分 别 用 B 酶 切 割	1 900、200
		1 400		800、600
		1 000		1 000
		500		500
	B 酶切割	2 500	将 第 一 步 水 解 产 物 分 离 后 , 分 别 用 A 酶 切 割	1 900、600
		1 300		500
		1 200		1 000、200
	经 A 酶和 B 酶同时 切割	1 900、1 000、800、600、500、200		

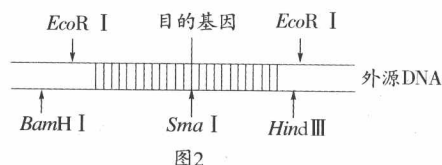
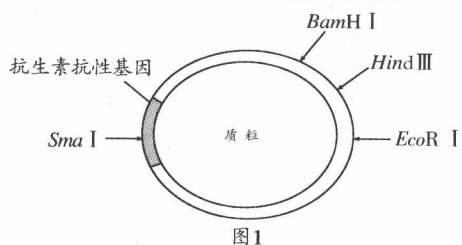
由实验可知, 在这段已知序列上, A 酶与 B 酶的识别序列分别有 ()

- A. 1 个, 1 个
B. 2 个, 2 个
C. 3 个, 2 个
D. 4 个, 3 个
6. 下面是 4 种限制性核酸内切酶所识别的 DNA 分子序列和剪切位点 (↓ 表示剪切位点, 切出的断面为粘性末端):
- 限制性核酸内切酶 1: —↓GATC—
限制性核酸内切酶 2: —CATG↓—
限制性核酸内切酶 3: —G↓GATCC—
限制性核酸内切酶 4: —CCGC↓GG—
- 下列表达正确的是 ()
- A. 限制性核酸内切酶 1 和 3 剪出的粘性末端相同
B. 在使用限制性核酸内切酶的同时还需要解旋酶

- C. 限制性核酸内切酶 1、2、4 识别的序列都是由 4 个脱氧核苷酸组成的
D. 限制性核酸内切酶 1 和 2 切出的 DNA 片段可通过 T₄ DNA 连接酶拼接

7. 关于基因工程中 DNA 连接酶的叙述正确的是 ()
- A. 连接两个肽链片段
B. 催化单个核苷酸和单链 DNA 分子间形成磷酸二酯键
C. 需 ATP 供能
D. 连接两个 DNA 片段
8. 下表列出了几种限制性核酸内切酶识别序列及其切割位点, 图 1、图 2 中箭头表示相关限制性核酸内切酶的酶切位点。下列说法错误的是 ()

限制性核酸内切酶	<i>Bam</i> H I	<i>Hind</i> III	<i>Eco</i> R I	<i>Sma</i> I
识别序列及切割位点	GGATCC CCTAGG ↑	AAGCTT TTCGAA ↑	GAATTC CTTAAG ↑	CCCGGG GGGCCC ↑

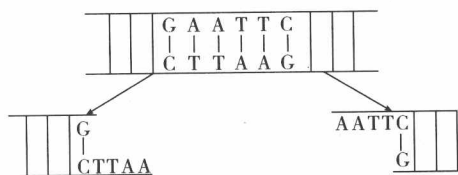


- A. 一个图 1 所示的质粒分子经 *Sma* I 切割后, 含有 4 个游离的磷酸基团
B. 用图 1 中的质粒和图 2 中的目的基因构建重组质粒, 不能使用 *Sma* I 切割
C. 图 2 中为防止酶切后单个含目的基因的 DNA 片段自身连接成环状, 不能使用 *Eco*R I
D. 为了获取重组质粒, 最好用 *Bam*H I 和 *Hind* III 同时切割质粒和外源 DNA
9. 下表关于基因工程中有关基因操作的名词及对应的内容, 正确的组合是 ()

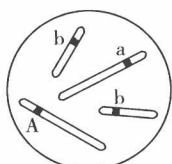
	供体	剪刀	针线	载体	受体
A	质粒	限制性核酸内切酶	DNA 连接酶	提供目的基因的生物	大肠杆菌等

	供体	剪刀	针线	载体	受体
B	提供目的基因的生物	DNA 连接酶	限制性核酸内切酶	质粒	大肠杆菌等
C	提供目的基因的生物	限制性核酸内切酶	DNA 连接酶	质粒	大肠杆菌等
D	大肠杆菌等	DNA 连接酶	限制性核酸内切酶	提供目的基因的生物	质粒

10. 图①表示限制性核酸内切酶切割某生物 DNA 分子的过程;图②表示该生物体细胞部分基因和染色体的关系;该生物的黑素产生需要如图③所示的 3 类基因参与控制,三类基因的控制均表现为完全显性。下列说法正确的是 ()



图①



图②

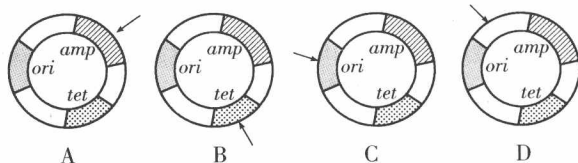


图③

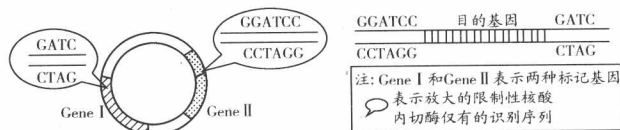
- A. 图②所示的生物体中肯定存在含有 2 个 a 基因的细胞
B. 用限制性核酸内切酶可以从图②所示基因型的细胞中提取合成黑色素的所有目的基因
C. 若图③中的 1 个 b 基因突变为 B,则该生物体仍然可以合成出物质乙
D. 图①所示限制性核酸内切酶能识别的碱基序列是 TTAA,切点在 G 和 A 之间
11. 生物体内的下列物质,不具有特异的识别作用的是 ()

- A. RNA 聚合酶 B. 限制性核酸内切酶
C. DNA 探针 D. DNA 连接酶

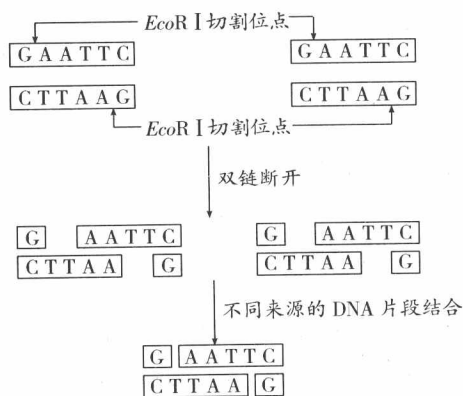
12. 下面是四种不同质粒的示意图,其中 ori 为复制必需的序列,amp 为氨苄青霉素抗性基因,tet 为四环素抗性基因,箭头表示某种限制性核酸内切酶的酶切位点。下列质粒中不能作为该基因工程载体的是 ()



13. 在基因工程中,要用特定的限制性核酸内切酶切割目的基因和质粒,以便于重组和筛选。已知限制性核酸内切酶 I 的识别序列和切点是—G ↓ GATCC—,限制性核酸内切酶 II 的识别序列和切点是—↓ GATC—。根据图示判断,下列操作正确的是 ()



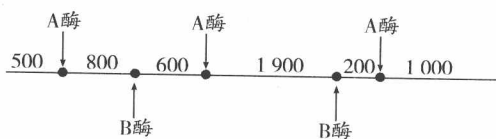
- A. 质粒用限制性核酸内切酶 I 切割,目的基因用限制性核酸内切酶 II 切割
B. 质粒用限制性核酸内切酶 II 切割,目的基因用限制性核酸内切酶 I 切割
C. 目的基因和质粒均用限制性核酸内切酶 I 切割
D. 目的基因和质粒均用限制性核酸内切酶 II 切割
14. 如图为 DNA 分子的切割和连接过程,请据图回答:



- (1) EcoR I 是一种 _____ 酶,其识别序列是 _____,切割位点是 _____ 与 _____ 之间的 _____ 键,切割产生的 DNA 片段的末端形式为 _____。
- (2) 不同来源的 DNA 片段结合,在这里需要的酶应是 _____ 连接酶,此酶的作用是在 _____ 与 _____ 之间形成 _____ 而起“缝合”作用的。

【参考答案】

1. C 解析:DNA 连接酶连接的是脱氧核苷酸之间的磷酸二酯键,不具备特异性;导入的目的基因是完整的基因,不符合基因突变的概念,应属于人工参与的基因重组;限制性核酸内切酶识别序列越短,说明对序列的特异性要求越低,则该序列在 DNA 中出现的几率就越大;常用的运载体有质粒,大肠杆菌常被用作宿主细胞,即受体细胞。
2. C 解析:*Bam*H I 和 *Bgl* II 切出的粘性末端碱基能互补配对,互补序列都含有 GATC—。
3. C 解析:由图分析可知,切割产生甲、乙、丙的限制性核酸内切酶的识别序列和切割位点分别是:—G[↓]AATTC—、—C[↓]AATTC—和—C[↓]TTAAG—,所以甲、乙、丙分别由 3 种不同的酶催化产生;相同的粘性末端才能形成重组 DNA;甲、乙片段形成的重组 DNA 分子为:
—CAATTC—
—CTTAAG—
而这并不能被切割甲的酶所识别;b 处表示的是 DNA 两条链之间的氢键,解旋酶作用于此处,限制性核酸内切酶作用于 a 处。
4. C 解析:限制性核酸内切酶将 DNA 切割为两个片段,如①。DNA 聚合酶在 DNA 复制过程中能连接单个脱氧核苷酸,延长子链,如④。DNA 连接酶能连接两个互补 DNA 片段之间的磷酸二酯键,如②。解旋酶能解开 DNA 双链,如③。
5. C 解析:用 A 酶进行切割可得到 4 个 DNA 片段,可知有 3 个识别序列;用 B 酶切割可得到 3 个 DNA 片段,可知有 2 个识别序列;如果两种酶同时切割,其具体切割情况如图所示:



6. A 解析:使用限制性核酸内切酶时不需要解旋酶解旋,一般用加热解旋;限制性核酸内切酶 4 识别的序列是由 6 个脱氧核苷酸组成的;限制性核酸内切酶 1 和 2 切出的 DNA 片段不互补,不能连接。
7. D 解析:DNA 连接酶连接的是两个 DNA 片段,而不是两个肽链;催化单个脱氧核苷酸和单链 DNA 分子间形成磷酸二酯键的是 DNA 聚合酶。
8. A 解析:DNA 上的磷酸二酯键是形成于磷酸和五碳糖之间的,图 1 所示的一个环状 DNA 分子上只有一个 *Sma* I 切点,切割后形成一条线形 DNA 分子,只含有 2 个游离的磷酸基团;*Sma* I 会破坏目的基因和标记基因,不能使用其进行切割;图 2 中,如果只用 *Eco*R I,会在目的基因两侧

出现相同的粘性末端,使含目的基因的 DNA 片段自身连接成环状;用 *Bam*H I 和 *Hind* III 同时切割质粒和外源 DNA,会形成不同的粘性末端,自身不会连接成环状。

9. C 解析:基因工程中供体指的是提供特殊目的基因的生物;“剪刀”指的是限制性核酸内切酶;“针线”指的是 DNA 连接酶;常见的载体有质粒、λ 噬菌体、动物病毒和植物病毒;受体指的是有待定向改造的大肠杆菌等微生物或者动植物细胞。
10. A 解析:图②所示的生物体中细胞分裂时会存在含有 2 个 a 基因的细胞。用限制性核酸内切酶可以从图②所示基因型的细胞中提取合成黑色素的的目的基因 A、b,但不一定含有 C 基因。若图③中的 1 个 b 基因突变为 B,则该生物体不能合成物质乙。图①所示限制性核酸内切酶能识别的碱基序列是 GAATTC,切点在 G 和 A 之间。
11. D 解析:酶具有专一性,RNA 聚合酶能识别并结合 RNA 聚合酶的结合位点;限制性核酸内切酶能识别特定的碱基序列,并在特定位点进行切割;DNA 探针是利用 DNA 分子杂交的原理进行检测,所以也具有特异识别功能;DNA 连接酶只是将两 DNA 片段之间的切口连接起来形成磷酸二酯键,不具有特异的识别作用。
12. C 解析:质粒作为基因工程的载体,有两个作用:一是通过标记基因对重组 DNA 分子是否进入受体细胞进行鉴定;二是在受体细胞中通过自我复制完成目的基因的扩增。图中 *ori* 为复制必需序列,该序列不能被破坏,否则重组质粒就无法在受体细胞中进行自我复制;图中的 *amp*、*tet* 均为标记基因,只需保留 1 个即可。
13. A 解析:Gene I 和 Gene II 均为标记基因,为完成基因工程只能破坏一个,故将 Gene II 用限制性核酸内切酶 I 切割开,这样 Gene I (另一标记基因)并未遭到破坏,仍保留功能,为基因工程的筛选而服务。目的基因需在其两端均切割,因此需要使用限制性核酸内切酶 II。
14. (1)限制性核酸内切 GAATTC 鸟嘌呤脱氧核苷酸(G) 腺嘌呤脱氧核苷酸(A) 磷酸二酯 粘性末端 (2) *E. coli* DNA 鸟嘌呤脱氧核苷酸(G) 腺嘌呤脱氧核苷酸(A) 磷酸二酯键 解析:本题考查限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶的作用。(1)从图中可以看出 *Eco*R I 将 DNA 片段切割,应为限制性核酸内切酶,其识别序列是 GAATTC,切点是 G 与 A 之间的磷酸二酯键,切割后产生的 DNA 片段的末端是粘性末端。(2)DNA 连接酶可将不同来源的 DNA 片段连接,从图中可以看出,此酶是通过在 G 与 A 之间形成磷酸二酯键的形式连接两个片段,连接粘性末端的连接酶是 *E. coli* DNA 连接酶。还有一种 *T₄* DNA 连接酶,既可连接粘性末端,也可连接平

末端。

E 教材答案与提示

[思考与练习]

一、判断题

1. × 提示:限制性核酸内切酶的种类很多,不同的限制性核酸内切酶识别与切割 DNA 的序列不同。

2. × 提示:DNA 连接酶的作用是将具有末端碱基互补的 2 个 DNA 片段连接在一起。

3. ✓

4. × 提示:基因工程的载体有多种,如质粒、λ 噬菌体、动植物病毒等。

二、简答题

限制性核酸内切酶可作为切割 DNA 分子的手术刀,它的发现和应用使 DNA 重组成为可能;DNA 连接酶的作用是将具有末端碱基互补的 2 个 DNA 片段连接在一起,形成的 DNA 分子称为重组 DNA 分子,因此 DNA 连接酶具有缝合 DNA 片段的作用,可以将外源基因和载体连接在一起。

F 拓展阅读

基因工程的诞生

人类与动物的许多疾病都是由单细胞原核生物——细菌引起的。曾在一段时间,细菌成为人类的第一大杀手,成千上万的生命被其感染吞噬。虽然青霉素以及磺胺类等抗菌药物的出现拯救了无数的生命,但是好景不长,青霉素使用不到 10 年,即在 20 世纪 50 年代中期,就发现了严重的细菌抗药性,并且这种抗药性具有“传染性”,也就是说,一种细菌的抗药性可以传给另一种细菌。

基因工程的“开山鼻祖”科恩,就是一位最早从事细菌抗药性的专家。他本科毕业于生物专业,后在美国宾夕法尼亚大学获得医学博士学位,1968 年到美国斯坦福大学担任助教,并选择细菌抗药性作为自己的主要研究课题。

他的实验与其他研究组的工作表明,细菌的抗药性基因不是由染色体 DNA 编码的,而是由一种叫“质粒”的小型环状 DNA 分子携带的。质粒 DNA 中有一叫做“复制区”的序列,它控制着质粒的自主复制。由于这个复制区的作用,质粒可以独立于染色体进行复制。科恩等人的研究表明,细菌抗药性的秘密就在质粒 DNA 上。

1971 年底,美国斯坦福医学院有一位一年级的学生在科

恩的实验室实习时,发现了一个有意思的现象,这就是质粒的转化现象。在这之前,人们发现用氯化钙溶液处理大肠杆菌的细胞,可以增加细胞的通透性,使细胞能从溶液中吸收 DNA 分子。这位学生发现经过处理的大肠杆菌可以吸收质粒 DNA 分子,而且细胞分裂繁殖产生的后代细胞里也都有质粒。这实际上是找到了一种把一个质粒 DNA 分子扩增为成千上万个完全一样的分子的方法,这种得到大量、均一的 DNA 分子复制品的过程就叫 DNA 克隆。用质粒 DNA 转化大肠杆菌方法的建立,使科恩信心倍增。他设想,质粒的复制区如果连接上不同的 DNA 片段,得到的人工质粒 DNA 分子应该可以通过转化进入大肠杆菌细胞,并且在细胞内繁殖,这就使他们能够在大肠杆菌中观察到不同 DNA 片段的功能。就在科恩研究小组建立了质粒 DNA 克隆方法的时候,由美国加州大学博耶领导的研究小组发明了一种通过酶的作用切割和连接 DNA 分子的技术,为第一个重组 DNA 分子的诞生创造了条件。

1972 年 11 月,在美国夏威夷的檀香山召开了一次有关细菌质粒研究的国际研讨会。科恩在会上报道了他们建立的克隆质粒 DNA 的方法。随后不久,博耶也向大会宣读了一篇文章,他详细介绍了他们实验室以及国际上几个小组有关限制性核酸内切酶的研究进展,特别提到一种名为 *EcoR I* 的限制性核酸内切酶可以产生具有互补粘性末端的 DNA 片段,非常便于 DNA 连接酶的连接。科恩对博耶的工作非常感兴趣,这正是他在苦苦寻找的把不同质粒 DNA 切成片段再重新组合连接,进而研究不同部分功能的方法。博耶其实也意识到,自己发现的限制性核酸内切酶可以用来把质粒切成独特的片段,进而研究其功能。就在那天晚上,博耶和科恩等人在离海滩不远的快餐店里相聚,他们一边聊天,一边喝着啤酒、吃着牛肉三明治。或许他们当时都没有想到这个夜晚会被载入当代科学发展的史册。正是在这样一种轻松、随意的气氛中,科恩向博耶建议两个实验室联手来进行重组 DNA 的实验,博耶非常愉快地接受了这个建议。两人马上就对合作实验的方案进行了详细地讨论。一个伟大的设想就这样诞生了。

1973 年的早春,对科恩和博耶这两个研究小组来说,是一个激动人心的进展季节。研究计划比预计的进展要顺利得多,几乎每天都有新进展。当第一个重组 DNA 分子从大肠杆菌中提纯出来送到博耶的实验室后,博耶马上让人对这个 DNA 样品进行酶切和电泳分析。电泳结束后,他们两人怀着忐忑不安的心情来到暗室观察结果,当看到发着荧光的 DNA

条带整齐地排列在凝胶上,清楚地显示出新质粒比质粒 pSC I 01(原来的载体)多出 1 个条带时,他们激动万分。他们完全明白这个工作对整个生物科学将会产生的巨大影响,人类社会也将因此发生历史性的变化。

1973 年 5 月,报道这项研究结果的论文手稿完成,并投寄到美国国家科学院会刊。同年 11 月,论文正式发表,立即在科学界引起轰动。论文发表前,斯坦福大学和加州大学联合完成了“重组 DNA 技术”的专利申请工作。这是一个非常典型的、因基础理论研究突破而形成实用新技术的事例,整个现代生物技术产业就是从这里萌芽的。

实践证明,利用重组 DNA 技术可以对不同生物的基因进行新的组合,得到性状发生改变的新生物。这意味着人类可以根据自己的意愿设计新的生物,并把它构建出来,使人的创造性得到生动的体现。从此,生物科学完全超越了经验科学的阶段,第一次具备了工程学科的性质,以至于我们今天把基于重组 DNA 技术的新的学科分支,称为目前众所周知的“基因工程”。

G 五年高考回放

1 (2010·全国 II)下列叙述符合基因工程概念的是 ()

- A. B 淋巴细胞与肿瘤细胞融合,杂交瘤细胞中含有 B 淋巴细胞中的抗体基因
- B. 将人的干扰素基因重组到质粒后导入大肠杆菌,获得能产生人干扰素的菌株
- C. 用紫外线照射青霉菌,使其 DNA 发生改变,通过筛选获得青霉素高产菌株
- D. 自然界中天然存在的噬菌体自行感染细菌后,其 DNA 整合到细菌 DNA 上

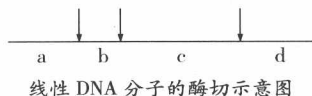
[解析] 基因工程是指按照人们的愿望,进行严格的设计,并通过体外 DNA 重组和转基因等技术,赋予生物以新的遗传特性,从而创造出更符合人们需要的新的生物类型和生物产品。B 淋巴细胞与肿瘤细胞融合,属于细胞工程;用紫外线照射青霉菌,使其 DNA 发生改变,进而筛选出青霉素高产菌株,属于人工诱变;自然界中天然存在的噬菌体自行感染细菌后,其 DNA 整合到细菌 DNA 上,并没有进行人为的加工,不属于基因工程。

[答案] B

2 (2008·全国 I)已知某种限制性内切酶在一线性 DNA

分子上有 3 个酶切位点,如图中箭头所指。如果该线性 DNA 分子在 3 个酶切位点上都被该酶切断,则会产生 a、b、c、d 四种不同长度的 DNA 片段。现有多个上述线性 DNA 分子,若在每个 DNA 分子上至少有 1 个酶切位点被该酶切断,则从理论上讲,经该酶酶切后,这些线性 DNA 分子最多能产生长度不同的 DNA 片段种类数是

()

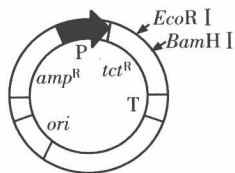


- A. 3 B. 4 C. 9 D. 12

[解析] 本题考查基因工程中限制性核酸内切酶的应用。由题意知,不同的限制性核酸内切酶切割后的 DNA 片段不一样,如果将图中的三个切割位点自左向右依次标为甲、乙、丙,只从甲处切割,可产生 2 种片段,即 a 和 b+c+d 片段;如果只从乙处切割,则有 a+b 和 c+d 2 种片段;如果只从丙处切割,则有 a+b+c 和 d 2 种片段;甲、乙同时切割,则有 a、b 和 c+d 3 种片段;乙、丙同时切割,则有 a+b 和 c、d 3 种片段;甲、丙同时切割,则可有 a、b+c、d 3 种片段;甲、乙、丙三者同时切割,则有 a、b、c、d 4 种片段。故对题中多个线性 DNA 分子进行随意切割,最多可产生 a、b、c、d、a+b、a+b+c、b+c、b+c+d、c+d 9 种不同的片段。

[答案] C

3 (2008·海南)下图为某种质粒表达载体简图,小箭头所指分别为限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 的酶切位点,*amp^R* 为青霉素抗性基因,*tet^R* 为四环素抗性基因,P 为启动子,T 为终止子,*ori* 为复制原点。已知目的基因的两端分别有包括 *EcoR* I、*Bam*H I 在内的多种酶的酶切位点。



据图回答:

(1)将含有目的基因的 DNA 与质粒表达载体分别用 *EcoR* I 酶切,酶切产物用 DNA 连接酶进行连接后,其中由两个 DNA 片段之间连接形成的产物有 _____、_____、_____ 三种。若要从这些连接产物中分离出重组质粒,需要对这些连接产物进

行_____。

- (2) 用上述 3 种连接产物与无任何抗药性的原核宿主细胞进行转化实验。之后将这些宿主细胞接种到含四环素的培养基中,能生长的原核宿主细胞所含有的连接产物是_____;若接种到含青霉素的培养基中,能生长的原核宿主细胞所含有的连接产物是_____。

- (3) 目的基因表达时, RNA 聚合酶识别和结合的位点是_____,其合成的产物是_____。

- (4) 在上述实验中,为了防止目的基因和质粒表达载体在酶切后产生的末端发生任意连接,酶切时应选用的酶是_____。

[解析] (1) 在基因表达载体的构建过程中,用同种限制性核酸内切酶切割目的基因和质粒,使之产生相同的粘性末端,以利于 DNA 片段的连接。将切割后的目的基因和质粒用 DNA 连接酶进行连接,它们之间随机连接,可有三种产物:目的基因—载体连接物、载体—载体连接物和目的基因—目的基因连接物。获得 DNA 连接产物以后,必须通过筛选才能得到所需的基因表达载体,导入宿主细胞后通过表达获得基因

产物。(2) 从图中可以看出,目的基因的插入位点在抗四环素基因上,可推知:目的基因—载体连接物的抗四环素基因被破坏,丧失了抗四环素的能力,但保留了抗青霉素的能力;载体—载体连接物既保留了抗四环素的能力也保留了抗青霉素的能力;目的基因—目的基因连接物既无抗青霉素基因也无抗四环素基因,不具备抗性。(3) 一个基因表达载体的组成中,启动子是 RNA 聚合酶识别结合的部位,有了它才能驱动基因转录出 mRNA。(4) 若只用 *EcoR* I (或只用 *Bam*H I) 切割质粒及目的基因,连接时有三种产物,所以在实际操作过程中,为避免切割后的末端任意连接,可用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 同时对目的基因和质粒进行切割,目的基因两端的粘性末端不同,就不存在目的基因—目的基因连接物;质粒切口处两端的粘性末端不同,就不存在载体—载体连接物,只能得到目的基因—载体一种连接物。

[答案] (1) 目的基因—载体连接物 载体—载体连接物 目的基因—目的基因连接物 分离纯化(其他合理答案也可) (2) 载体—载体连接物 目的基因—载体连接物、载体—载体连接物 (3) 启动子 mRNA (4) *EcoR* I 和 *Bam*H I

第二节 基因工程的原理和技术

A 教材梳理

知识点一 基因工程的概念及原理

1. 基因工程的概念:以分子遗传学为理论基础,以分子生物学和微生物学的现代方法为手段,将不同来源的基因(DNA 分子),按预先设计的蓝图,在体外构建重组 DNA 分子,然后导入受体细胞,以改变生物原有的遗传特性,获得新品种。

2. 基因工程的原理:让人们感兴趣的基因(即目的基因)在宿主细胞中稳定和高效地表达。

3. 基因工程属于可遗传变异中的基因重组。

注意:基因工程属于基因重组的原因:不同 DNA 链的断裂和连接产生 DNA 片段的交换和重新组合,形成了新的 DNA 分子,因此基因工程的操作中交换了 DNA 片段,属于基因重组。

知识点二 基因工程的基本操作步骤

(一) 获得目的基因

1. 目的基因:是基因工程操作中需要的外源基因,即人

们感兴趣的基因,如生物的抗逆性基因、抗虫基因等。

2. 获得目的基因的方法

(1) 目的基因的序列已知

① 化学方法合成,如胰岛素基因。

② 聚合酶链式反应(PCR 技术)扩增目的基因。PCR 是聚合酶链式反应的缩写,是一项在生物体外复制特定 DNA 片段的核酸合成技术。通过这一技术,可以快速获取大量的目的基因。利用 PCR 技术获取目的基因的前提是要有一段已知目的基因的核苷酸序列,以便根据这一序列合成引物。

PCR 扩增是获取目的基因的一种非常有用的方法,也是进行分子鉴定和检测的一种很灵敏的方法。

(2) 目的基因序列未知:从基因文库中提取目的基因。

① 基因文库:用多种限制性核酸内切酶或者机械的方法,将某种生物的细胞 DNA 切割成不同片段,并把所有片段随机地分别连接到用相同的限制性核酸内切酶切过的基因载体上,然后分别转移到适当受体细胞如细菌中,通过细胞增殖而构成各个片段的无性繁殖系。如果所制备的基因克隆数目已多到可把某种生物的全部基因都包含在内时,则这一组克隆

就成为该种生物的基因文库。

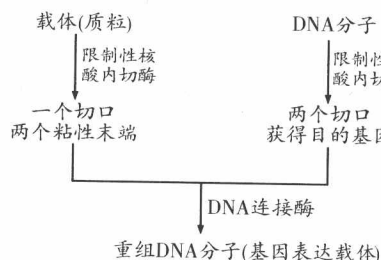
②从基因文库中找到所需要的目的基因的依据:基因的核苷酸序列、基因的功能、基因在染色体上的位置、基因的转录产物 mRNA 以及基因的翻译产物——蛋白质等特性来获取目的基因。

(二)形成重组 DNA 分子

1. 过程:通常用相同的限制性核酸内切酶分别切割目的基因和载体 DNA(质粒),这样会在目的基因和载体 DNA 的两端形成相同的粘性末端,然后用 DNA 连接酶将目的基因和载体 DNA 连接在一起,形成重组 DNA 分子。

(1)图解过程

目的基因与运载体结合的过程,实质上是不同来源的 DNA 重新组合的过程,是基因工程的核心,其基本过程如下(以质粒作为运载体):



(2)构建的具体步骤

①用一定的限制性核酸内切酶切割质粒,使其出现一个有粘性末端的切口。

②常用同种限制性核酸内切酶切割目的基因,产生相同的粘性末端。

③将切下的目的基因片段插入到质粒的切口处,再加入适量 DNA 连接酶,使质粒与目的基因结合形成重组 DNA 分子。

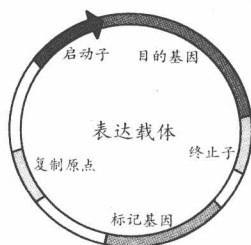
2. 该过程中用到的酶:限制性核酸内切酶、DNA 连接酶。

3. 该过程中对目的基因和载体 DNA(质粒)都要用限制性核酸内切酶进行切割,但是所用的限制性核酸内切酶并不一定要相同,只要切出来的粘性末端相同即可。

注意:用同一种限制性核酸内切酶(单酶切)分别切割目的基因与运载体是最简单的一种方法,因为切割后能产生相同的粘性末端,末端之间能发生碱基互补配对而形成重组 DNA 分子,操作简单,但连接后会出现两种不需要的连接产物:目的基因—目的基因(环状)连接物、质粒—质粒(环状)连接物,加大了筛选的工作量。所以可用两种不同限制性核酸内切酶(双酶切)分别同时切割含目的基因的 DNA 片段和质粒,这样可以防止目的基因与质粒自身连接体的产生,克服单酶切的缺点。但由于每种限制性核酸内切酶作用的条件不同,一般两种酶不能同时使用,而是用完一种酶后就要更换另一种酶作用的外界条件,以保证酶的高效性,因此双

酶切操作较复杂。

4. 重组 DNA 分子的组成(以质粒为载体)



(1)目的基因:外源 DNA 分子的有效片段。

(2)启动子:一段有特殊结构的 DNA 片段,位于基因的首端,它是 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,最终翻译获得所需的蛋白质。

(3)终止子:位于基因的尾端,也是一段有特殊结构的 DNA 短片段。终止子相当于一盏红色信号灯,使转录到此终止。

(4)标记基因:鉴别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,如抗生素抗性基因就可以作为标记基因。

注意:①“目的基因”与“标记基因”是掌握的重点。

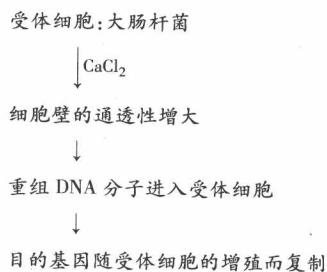
②由于受体细胞有植物、动物、微生物之分,以及目的基因导入受体细胞的方法不同,因此,重组 DNA 分子的构建上也会有所差别,不可能是千篇一律的。

(三)将重组 DNA 分子导入受体细胞

1. 用适当的方法将形成的重组 DNA 分子转移到合适的受体细胞中。

2. 常用的受体细胞:微生物(如大肠杆菌、枯草杆菌、酵母菌)、动物细胞、植物细胞。

3. 导入过程(以质粒导入大肠杆菌为例)



注意:重组 DNA 分子导入不同。受体细胞的方法也不同。

①导入微生物细胞(如大肠杆菌):用氯化钙处理大肠杆菌,以增加大肠杆菌细胞壁的通透性,使含有目的基因的重组 DNA 分子进入大肠杆菌宿主细胞。

②导入植物细胞:土壤农杆菌转化法、花粉管通道法等。

③导入动物细胞:显微注射法等。

(四)筛选含有目的基因的受体细胞