

基因工程原理及应用

北京市第四中学正高级教师 赵晓刚

高考关注立德树人相关社会议题和科研材料,关注人类和国家的发展,渗透国家情怀。遗传与育种、生物工程与健康、药物研发、生态与环保、稳态与平衡都是每年高考涉及的内容。上述内容均与基因工程的原理和应用相关,复习备考中,考生须要重视基因工程相关原理的理解和应用。

一、基因工程的步骤或技术流程分析

基因工程的基本步骤或流程为:获取目的基因→目的基因与载体结合构建表达载体→将重组DNA分子导入受体细胞→目的基因导入的检测和表达的检测。上述流程在高考和各区一模、二模中均有考查。

2020年北京高考题:

尽管粳-籼杂交稻具有更强的杂种优势,但由于部分配子不育,导致结实率低,从而制约粳-籼杂种优势的应用。研究发现这种不育机制与位于非同源染色体上的两对基因(A_1 、 A_2 和 B_1 、 B_2)有关。通常情况下,籼稻的基因型为 $A_1A_1B_1B_1$,粳稻为 $A_2A_2B_2B_2$ 。 A_1A_2 杂合子所产生的含 A_2 的雌配子不育; B_1B_2 杂合子所产生的含 B_2 的雄配子不育。科研人员在产量低的甲品系水稻中发现了A、B基因的等位基因 A_3 、 B_3 (广亲和基因),含有广亲和基因的杂合子,雌雄配子均可育。请写出利用甲品系培育出育性正常的粳-籼杂交稻的流程。(用文字或图示作答均可)

分析:

本题目考查获取育性正常的粳-籼杂交稻。

①可通过“回交”技术获取“除 A_3 、 B_3 (广亲和基因)基因外其他遗传背景与籼稻相同的水稻”,然后与粳稻杂交,程序如下:

籼稻 × 甲
↓
 F_1 × 籼稻
↓
筛选基因型为 $A_1A_3B_1B_3$ 的植株
↓ × 籼稻(连续多代)
筛选基因型为 $A_1A_3B_1B_3$ 的籼稻
↓ ⊗
筛选基因型为 $A_3A_3B_3B_3$ 的籼稻 × 粳稻 $A_2A_2B_2B_2$
↓
粳-籼杂交种 $A_2A_3B_2B_3$ (育性正常)

②基因工程技术

获取甲品系 A_3 、 B_3 基因→构建含 A_3 、 B_3 基因表达载体→将重组DNA分子导入籼稻受体细胞→ A_3 、 B_3 基因导入的检测和表达的检测→通过植物组织培养技术获得含 $A_3A_3B_3B_3$ 的籼稻→籼稻 $A_3A_3B_3B_3$ × 粳稻 $A_2A_2B_2B_2$ →粳-籼杂交种 $A_2A_3B_2B_3$ (育性正常)。

二、基因工程的重点及难点分析

1. 表达载体

基因工程为什么要构建表达载体?有的同学认为“防止目的基因被受体细胞限制酶切割”,这种理解显然不对,限制酶属于内切酶,构建表达载体不能防酶切。其主要原因如下:

- (1)载体含有复制原点,能协助目的基因在受体细胞中复制
- (2)载体含有启动子和终止子协助目的基因表达

①将原核基因转入真核细胞,真核细胞RNA聚合酶无法识别原核基因的启动子,所以需要载体提供真核基因启动子协助原核基因(编码区)表达。

②将真核基因转入原核细胞,真核基因内含子转录的RNA原核细胞无法切除,无法剪切为成熟的mRNA,因此需要获取真核基因cDNA序列构建表达载体,同时需要载体的原核基因启动子协助真核基因(cDNA)在原核细胞中表达。

③启动子具有组织特异性,在该启动子调控下,外源基因的表达一般只发生在某些特定的器官或组织部位。

(3)协助目的基因插入染色体

载体含有可转移的DNA片段(T-DNA),将目的基因构建在T-DNA片段上,协助目的基因插入染色体DNA。

(4)载体具有标记基因,便于筛选转化细胞。

典型例题:

抗除草剂转基因作物的推广,有效地减轻除草劳动强度、提高农业生产效率。图1为抗除草剂转基因玉米的技术流程。

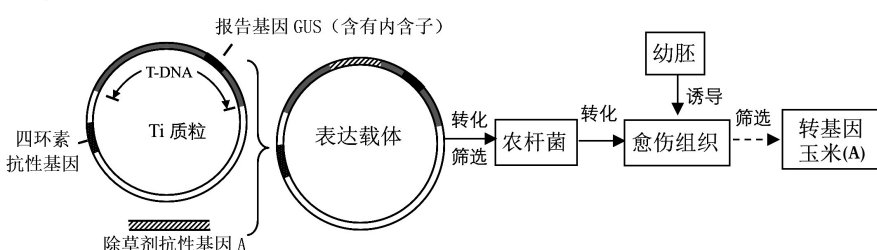


图1 转基因玉米流程

(1)构建含除草剂抗性基因的表达载体,目的基因通过_____酶与载体进行重组。载体上目的基因插入位点的限制酶识别序列_____ (能或不能)出现在目的基因内部,可通过_____技术在目的基因两侧添加相应限制酶识别序列,以便构建表达载体。

(2)农杆菌转化愈伤组织时,用含_____选择培养基筛选转化的愈伤组织。转化过程中,愈伤组织表面常残留农杆菌,导致未转化愈伤组织(假阳性)也可能在选择培养基上生长。已知报告基因GUS表达产物能催化无色物质K呈现蓝色,请叙述排除假阳性的原理。

分析:

本题考查表达载体的构建及目的基因的检测。

(1)参考答案:限制酶、DNA连接酶 不能 PCR

(2)四环素抗性基因协助筛选重组农杆菌;目的基因构建在T-DNA上,随其转移至玉米的染色体DNA上,载体的其他部分并未出现在玉米体内,因此需要用含除草剂的选择培养基筛选转化的愈伤组织;由于重组农杆菌含有抗除草剂基因,导致表面常残留农杆菌未转化愈伤组织(假阳性)也可能在选择培养基上生长,需要用含内含子的报告基因排除假阳性。

培养基中含有除草剂和物质K,转基因的愈伤组织含有GUS基因,GUS表达产物能催化无色物质K呈现蓝色,显蓝色的为阳性;GUS由于含有内含子不能在农杆菌中表达,因此假阳性不显蓝色。

2. 目的基因导入的检测和表达的检测

(1)目的基因是否导入受体细胞的检测

- ①依据标记基因检测
- ②PCR检测,设计目的基因的特异引物进行检测。
- ③DNA分子杂交,依据目的基因设计特异性探针进行杂交检测。

(2)目的基因是否表达的检测

- ①RT-PCR,提取转基因生物总RNA,逆转录成cDNA,PCR检测目的基因是否转录。
- ②核酸分子杂交,提取转基因生物总RNA,依据目的基因设计特异性探针进行杂交检测,检测目的基因是否转录。
- ③抗原-抗体杂交,设计目的基因表达蛋白的单抗,进行蛋白质分子杂交,检测目的基因是否表达。

④构建含目的基因-报告基因的融合基因,可依据报告基因检测目的基因是否表达,如GFP发绿色荧光,可依据荧光的量和位置确定目的蛋白表达量和定位。

⑤检测转基因生物性状。

典型例题:

探究A基因编码的蛋白是否定位在细胞膜上,将绿色荧光蛋白(GFP)基因和A基因融合,构建表达载体,获得转基因拟南芥,荧光鉴定结果如下图2,该结果是否可以确定A蛋白位于细胞膜上,请说明理由。

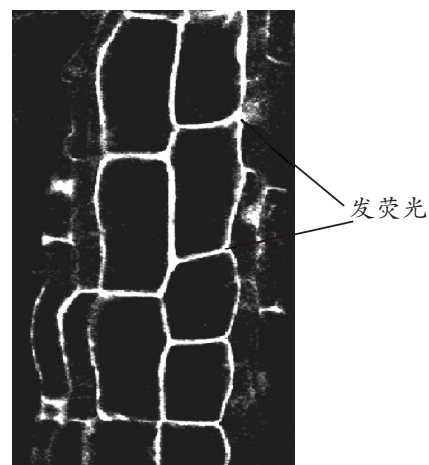


图2 荧光鉴定

分析:

本题目考查实验设计和评价等思辨能力,是北京高考的命题方向。

本实验需要排除载体本身对实验结果的干扰,需要设计导入空载体的对照组,即将含GFP基因的质粒导入拟南芥(其他处理同实验组)。

本实验结果不能排除A蛋白定位于细胞壁上,可设计补充质壁分离实验,用高浓度蔗糖溶液处理液泡较小的转基因成熟荧光细胞,使其发生质壁分离,若观察到荧光区域或面积逐渐缩小,可证明A蛋白在细胞膜上。

本实验选择液泡较小的成熟细胞可以排除液泡膜对实验结论判断的干扰。

高三复习不是知识的简单重复,复习指向能力和素养发展,在理解概念的基础上,注重在真实情境下解决真实的生活问题和科研问题,提高复习的有效性。