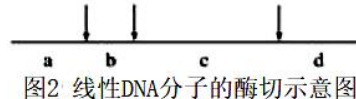


2023 级高二下学期生物培优 5--限制酶

一、限制酶的作用特点和作用结果

1. 限制酶能够识别_____分子的特定_____, 并且使每一条链中特定部位的_____断开。这体现了酶具有_____的特点。

2. 已知某种限制酶在一线性 DNA 分子上有 3 个酶切位点, 如图 2 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。现有多条上述线性 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

3. (2021 年湖北卷) 限制性内切酶 *EcoRI* 识别并切割 $5'-GAATTC-3'$ 双链 DNA, 用 *EcoRI* 完全酶切果蝇基因组 DNA, 理论上得到 DNA 片段的平均长度 (碱基对) 约为()

- A. 6 B. 250 C. 4000 D. 24000

二、判断两个黏性末端是否为同一种限制酶切割产生

4. 根据基因工程的有关知识, 回答下列与限制酶有关的问题:

1) *EcoRI* 限制酶只能识别序列—GAATTC—, 并只能在 G 和 A 之间切割。若在某目的基因的两侧各有 1 个 *EcoRI* 的切割位点, 请画出目的基因两侧被限制酶 *EcoRI* 切割后所形成的黏性末端。

2) 限制酶识别序列越短, 则该序列在 DNA 中出现的概率就越_____, 序列—CATG⁺—和—G⁺GATCC—被限制酶切出的黏性末端碱基数_____ (填“相同”或“不同”)。

3) 质粒载体用限制酶 X (识别的序列由 6 个核苷酸组成) 切割后产生的片段如下:

AATTC.....G

G.....CTTAA

该酶识别的序列为_____, 切割的部位是_____。

4) 请判断图 3 中的五种黏性末端是由_____种限制酶作用产生的。

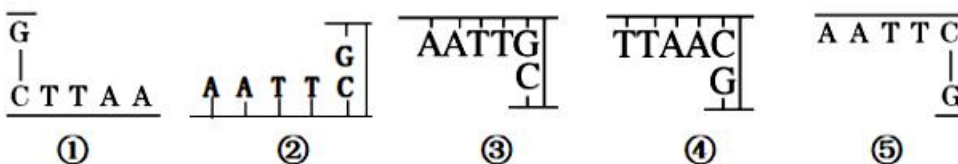
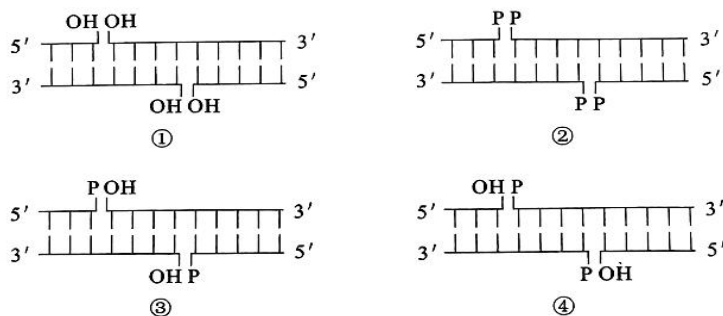


图3 五种黏性末端

三、限制酶与 DNA 连接酶

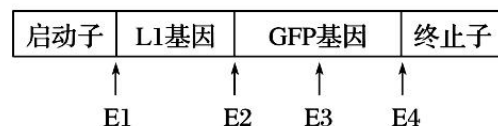
5. (2023 年湖北卷) 构建重组质粒需要使用 DNA 连接酶。下列属于 DNA 连接酶底物的是_____。



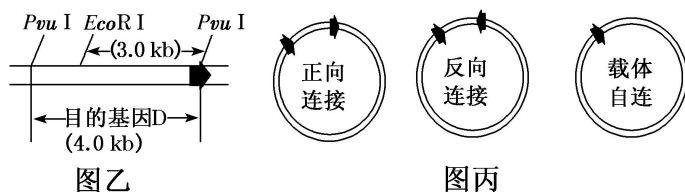
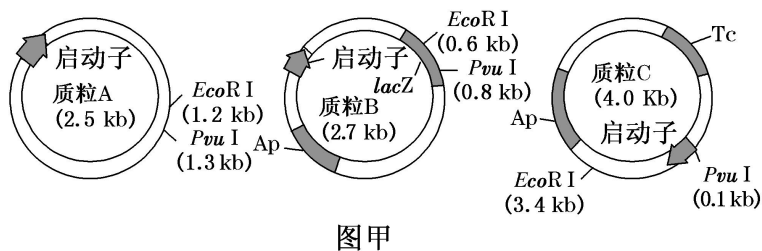
四、构建基因表达载体时限制酶的选择技巧

6. (2018 年全国 II 卷) 某种荧光蛋白 (GFP) 在紫外光或蓝光激发下会发出绿色荧光，这一特性可用于检测细胞中目的基因的表达。某科研团队将某种病毒的外壳蛋白 (L1) 基因连接在 GFP 基因的 5' 末端，获得了 L1-GFP 融合基因 (简称为甲)，并将其插入质粒 P0，构建了真核表达载体 P1，其部分结构和酶切位点的示意图如下，图中 E1~E4 四种限制酶产生的黏性末端各不相同。据图推断，该团队在将甲插入质粒 P0 时，使用了两种限制酶，这两种酶是_____。使用这两种酶进行酶切是为了保证_____，也是为了保证_____。

总结：遵循“三不定位”原则：不破坏目的基因、启动子、终止子、复制原点和所有的标记基因，不自身环化，不反向连接；限制酶的酶切位点应该位于启动子和终止子之间。



7. 苯丙酮尿症是单基因遗传病，科学家将正常基因 D 导入该病患者的细胞，以治疗该病。图甲为 A、B、C 三种质粒，图乙为含有目的基因 D 的 DNA 片段，图丙为重组载体的示意图。Ap 为氨苄青霉素抗性基因，Tc 为四环素抗性基因，*lacZ* 为蓝色显色基因，其表达产物可以将无色化合物 X-gal 转化成蓝色物质，使菌落呈蓝色。*EcoR* I、*Pvu* I 为限制酶，其后面括号内数字为切割位点与启动子最前端之间的距离。回答下列问题：



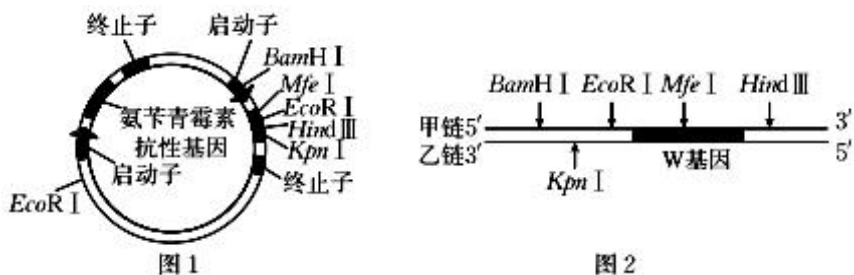
1) 基因工程操作的核心步骤是_____。图甲中三种质粒适宜作为载体的是质粒_____，与另外两种质粒相比，其作为载体的优点是_____。

2) 获取目的基因 D 时应选择图乙中的_____对其所在的 DNA 进行切割。如果仅知道 D 基因首尾的部分核苷酸序列，根据 D 基因已知核苷酸序列合成_____，利用 PCR 扩增目的基因。

3)将目的基因 D 和图甲中相应质粒连接后,得到图丙中三种方式。为选出正向连接的重组质粒,使用_____对质粒完全酶切后,进行电泳分析。若是正向连接载体,电泳图谱中出现长度为_____kb 和_____kb 两条带。

4)利用自身不含 *lacZ* 基因且对抗生素敏感的大肠杆菌作为受体细胞,要在已转化的含重组质粒、已转化的含空质粒的受体细胞和未转化成功的细胞中筛选出已转化的含重组质粒的受体细胞的方法是_____。

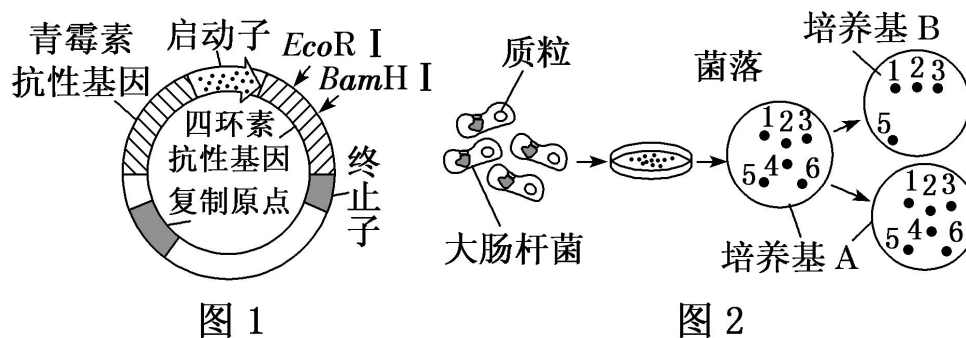
5) W 基因以乙链为转录模板链,转录时 mRNA 自身延伸的方向为 5' → 3', 下表是几种限制酶的识别序列及切割位点, 图 1、图 2 标注了相关限制酶的酶切位点。为获得能正确表达 W 基因的重组质粒, 应分别使用哪些限制酶对质粒和含 W 基因的 DNA 片段进行切割? 对质粒使用的限制酶是: _____; 对含 W 基因的 DNA 片段使用的限制酶是: _____。



限制酶	EcoR I	BamH I	Kpn I	Mfe I	Hind II
识别位点	5' -GAATTC-3' 3' -CTTAAG-5' ↑	5' -GGATCC-3' 3' -CCTAGG-5' ↑	5' -GGTACC-3' 3' -CCATGG-5' ↑	5' -CAATTG-3' 3' -GTTAAC-5' ↑	5' -AAGCTT-3' 3' -TTCGAA-5' ↑

五、有两个及以上标记基因时的筛选

8. 基因工程是一种 DNA 操作技术, 其表达载体的构建和检测筛选是两个重要步骤。如图 1 为某种质粒简图, 箭头所指分别为限制酶 *EcoR* I、*Bam*H I 的酶切位点。已知目的基因 X 的两端分别有包括 *EcoR* I、*Bam*H I 在内的多种酶的酶切位点。图 2 表示运用影印培养法(指在一系列平板培养基的相同位置上接种并培养出相同菌落的一种微生物培养方法)检测表达载体是否导入大肠杆菌。下列有关叙述错误的是()



- A. 同时使用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 切割质粒, 可避免酶切后质粒的自身环化
- B. 转化方法是将质粒表达载体溶于缓冲液后与经 Ca^{+} 处理的大肠杆菌混合
- C. 培养基 A 和培养基 B 分别含有四环素和青霉素
- D. 从筛选结果分析, 含目的基因 X 的菌落是 4 和 6

六、限制酶与电泳

9. (2021 年辽宁卷) PHB2 蛋白具有抑制细胞增殖的作用。为初步探究某动物 PHB2 蛋白抑制人宫颈癌细胞增殖的原因, 研究者从基因数据库中获取了该蛋白的基因编码序列 (简称 phb2 基因), 大小为 0.9kb (1kb=1000 碱基对), 利用大肠杆菌表达该蛋白。

图 1 为所用载体图谱示意图, 图中限制酶的识别序列及切割位点见下表。为使 phb2 基因 (该基因序列不含图 1 中限制酶的识别序列) 与载体正确连接, 在扩增的 phb2 基因两端分别引入_____和_____两种不同限制酶的识别序列。经过这两种酶酶切的 phb2 基因和载体进行连接时, 可选用_____ (填 “E. coliDNA 连接酶” 或 “T₄DNA 连接酶”)。

相关限制酶的识别序列及切割位点 注: 箭头表示切割位点

名称	识别序列及切割位点	名称	识别序列及切割位点
HindIII	A ↓ AGCTT TTCGA ↑ A	EcoRI	G ↓ AATTC CTTAA ↑ G
PviII	CAG ↓ CTG GTC ↑ GAC	PstI	CTGC ↓ AG GA ↑ CGTC
KpnI	G ↓ GTACC CCATG ↑ G	BamHI	G ↓ GATCC CCTAG ↑ G

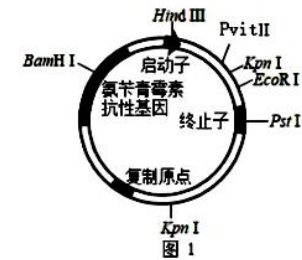


图 1
相关限制酶的识别序列及切割位点 (注: 箭头表示切割位点)

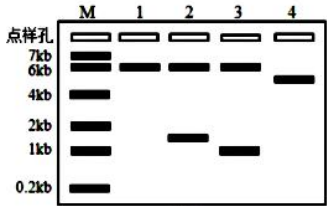


图 2

注: M 为指示分子大小的标准参照物; 小于 0.2kb 的 DNA 分子条带未出现在图中

将转化后的大肠杆菌接种在含氨苄青霉素的培养基上进行培养, 随机挑取菌落 (分别编号为 1、2、3、4) 培养并提取质粒, 用上述选用的两种限制酶进行酶切, 酶切产物经电泳分离, 结果如图 2, _____号菌落的质粒很可能是含目的基因的重组质粒。

参考答案

C C
—G AATTC—…… —G AATTC—
—CTTAA G—…… —CTTAA G—
2) 大 相同 3)—GAATTC—或—CTTAAG— G 和 A 之间的磷酸二酯键 4) 四
例 4: 答案: 1) —G GATCC— 2) —A GATCT—
—CCTAG G— —TCTAG A—
6) ④
答案: E1 和 E4 甲的完整性 甲与载体正确连接
答案: 1) 基因表达载体的构建 B 有标记基因, 启动子不会被限制酶切割 2) Pvu I 引物 3) EcoR I 1.2
5.5 4) 在含有氨苄青霉素和 X-gal 的固体培养基上培养, 形成白色菌落的为已转化的含重组质粒的受体细胞 5) Mfe
I 和 HindIII EcoR I 和 HindIII
答案: C 答案: D
答案: EcoRI PviII T4DNA 连接酶 3