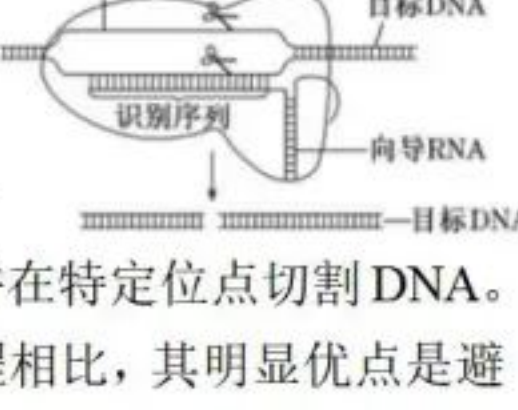


热点微专题 13 基因组编辑技术

CRISPR/Cas9 基因编辑技术能对基因进行定点编辑，其原理是由一条单链向导 RNA(SgRNA)引导内切核酸酶 Cas9 到一个特定的基因位点进行切割(如图)。



CRISPR 复合体中的 SgRNA 的主要功能是与靶向基因(目的基因)上特定碱基序列互补，从而定向引导 Cas9 蛋白与靶向基因结合，并在特定位点切割 DNA。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术培育转基因生物，与传统的基因工程相比，其明显优点是避免了因目的基因随机插入宿主细胞 DNA 引起的生物安全性问题。CRISPR/Cas9 基因编辑技术在基因治疗、基因水平进行动植物的育种、研究基因的功能等方面有广阔的应用前景。

【高考真题研究】

1、(2021 海南卷)CRISPR/Cas9 是一种高效的基因编辑技术，Cas9 基因表达的 Cas9 蛋白像一把“分子剪刀”，在单链向导 RNA (SgRNA) 引导下，切割 DNA 双链以敲除目标基因或插入新的基因。CRISPR/Cas9 基因编辑技术的工作原理如图所示。回答下列问题。



- (1)过程①中，为构建 CRISPR/Cas9 重组质粒，需对含有特定 sgRNA 编码序列的 DNA 进行酶切处理，然后将其插入到经相同酶切处理过的质粒上，插入时所需要的酶是\_\_\_\_\_。
- (2)过程②中，将重组质粒导入大肠杆菌细胞的方法是\_\_\_\_\_。
- (3)过程③~⑤中，SgRNA 与 Cas9 蛋白形成复合体，该复合体中的 SgRNA 可识别并与目标 DNA 序列特异性结合，二者结合所遵循的原则是\_\_\_\_\_。随后，Cas9 蛋白可切割\_\_\_\_\_序列。
- (4)利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除一个长度为 1200bp 的基因，在 DNA 水平上判断基因敲除是否成功所采用的方法是\_\_\_\_\_，基因敲除成功的判断依据是\_\_\_\_\_。
- (5)某种蛋白酶可高效降解羽毛中的角蛋白。科研人员将该蛋白酶基因插入到 CRISPR/Cas9 质粒中获得重组质粒，随后将其导入到大肠杆菌细胞，通过基因编辑将该蛋白酶基因插入到基因组 DNA 中，构建得到能大量分泌该蛋白酶的工程菌。据图简述 CRISPR/Cas9 重组质粒在受体细胞内，将该蛋白酶基因插入到基因组 DNA 的编辑过程：

参考答案：

- (1)DNA 连接酶 (2)感受态细胞法
- (3)碱基互补配对原则 目标 DNA 特定的核苷酸
- (4)DNA 分子杂交技术 出现杂交带
- (5)CRISPR/Cas9 重组质粒在受体细胞内进行转录和表达，转录的产物是 SgRNA，表达的产物是 Cas9 蛋白，二者形成复合体，该复合体中的 SgRNA 可识别并与目标 DNA 序列特异性结合，从而插入到基因组 DNA 中

解析：

(1)基因工程所需的工具酶有限制酶和 DNA 连接酶，限制酶负责切割，DNA 连接酶负责连接，因此为构建 CRISPR/Cas9 重组质粒，需对含有特定 sgRNA 编码序列的 DNA 进行酶切处理，然后将其插入到经相同酶切处理过的质粒上，插入时所需要的酶是 DNA 连接酶。

(2)大肠杆菌是原核生物，属于微生物，将目的基因导入微生物细胞的方法是感受态细胞法。

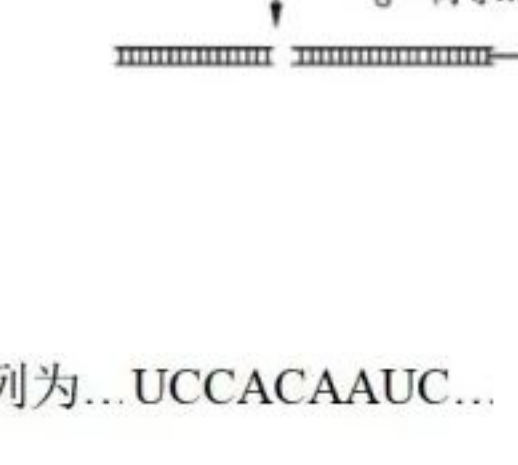
1

(3)根据题图可知：在 CRISPR/Cas9 基因编辑技术中，SgRNA 是根据靶基因设计的引导 RNA，准确引导 Cas9 切割与 SgRNA 配对的靶基因 DNA 序列。Cas9 能借助 SgRNA 分子与目标 DNA 进行特异性结合的原因在于 SgRNA 分子上的碱基序列与目标 DNA 分子上的碱基序列可以通过碱基互补配对原则实现 SgRNA 与目标 DNA 特定序列的特定识别，进而定位；由此可见，Cas9 在功能上属于限制酶，可切割目标 DNA 特定的核苷酸序列。

(4)可利用 DNA 分子杂交技术判断基因敲除是否成功，若出现杂交带，则说明基因敲除成功。

(5)根据图示可知：CRISPR/Cas9 重组质粒在受体细胞内进行转录和表达，转录的产物是 SgRNA，表达的产物是 Cas9 蛋白，二者形成复合体，该复合体中的 SgRNA 可识别并与目标 DNA 序列特异性结合，从而插入到基因组 DNA 中。

2、(2016 江苏卷)近年诞生的具有划时代意义的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可简单、准确地进行基因定点编辑。其原理是由一条单链向导 RNA 引导核酸内切酶 Cas9 到一个特定的基因位点进行切割。通过设计向导 RNA 中 20 个碱基的识别序列，可人为选择 DNA 上的目标位点进行切割(见右图)。下列相关叙述错误的是( )



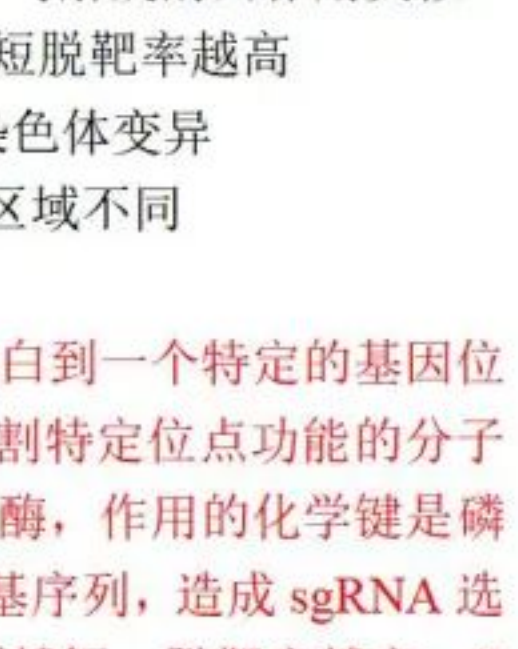
- A、Cas9 蛋白由相应基因指导在核糖体中合成
- B、向导 RNA 中的双链区遵循碱基配对原则
- C、向导 RNA 可在逆转录酶催化下合成
- D、若α链剪切点附近序列为...TCCACAATC...则相应的识别序列为...UCCACAAUC...

参考答案：C

解析：蛋白质由相应基因指导在核糖中合成，A 正确；向导 RNA 中双链区遵循碱基互补配对原则，B 正确；向导 RNA 可通过转录形成，逆转录酶以 RNA 为模板合成 DNA，C 错误；由于α链与识别序列的互补序列相同，故两链碱基相同，只是其中 T 与 U 互换，D 正确。

【模拟题汇编】

1、(2022·山东师范大学附中高三月考)CRISPR/Cas9 系统基因编辑是一种对靶向基因进行特定 DNA 修饰的技术，其原理是由一个向导 RNA(sgRNA)分子引导 Cas9 蛋白到一个特定的基因位点进行切割。受此机制启发，科学家们通过设计 sgRNA 中碱基的识别序列，即可人为选择 DNA 上的任一目标位点进行切割(如图所示)。CRISPR/Cas9 系统基因编辑技术有时存在编辑对象出错而造成脱靶。下列相关叙述错误的是(不定项)( )



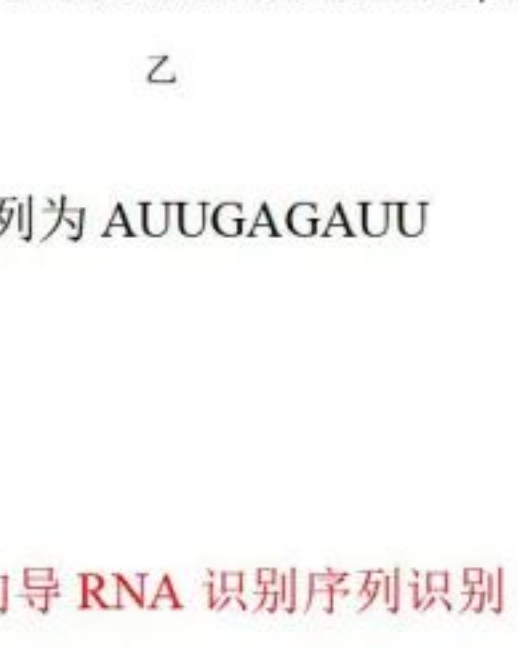
- A、Cas9 蛋白通过破坏目标 DNA 的氢键实现对 DNA 的切割，与解旋酶的作用类似
- B、若脱靶率与 sgRNA 序列的长度有关，则 sgRNA 的序列越短脱靶率越高
- C、利用此技术对目标基因部分 DNA 片段进行切除可能导致染色体变异
- D、sgRNA 的双链区域的碱基互补配对原则与目标基因的双链区域不同

参考答案：AC

解析：根据题干信息“由一个向导 RNA(sgRNA)分子引导 Cas9 蛋白到一个特定的基因位点进行切割”，再结合图解可知能够使特异性识别 DNA 序列并切割特定位点功能的分子是向导 RNA(sgRNA)分子和 Cas9 蛋白，其类似于基因工程中的限制酶，作用的化学键是磷酸二酯键，A 错误；非基因编辑对象也可能含有与 sgRNA 配对的碱基序列，造成 sgRNA 选错对象与之错误结合而脱靶，sgRNA 的序列长短影响成功率，序列越短，脱靶率越高，B 正确；染色体变异会引起基因的数目或排列顺序改变，利用此技术对目标基因部分 DNA 片段进行切除属于基因内部碱基对的改变，不改变基因的数目和排列顺序，故不属于染色体变异，C 错误。

2

2、(2022·辽宁锦州市高三月考)2020 年诺贝尔化学奖——基因组编辑工具 CRISPR，后被用于快速检测病毒，效率可以达到几分钟检测一个样品，也用到了新冠病毒检测中。图甲为 CRISPR/Cas9 基因编辑技术中向导 RNA 引导 Cas9 蛋白准确地在目标 DNA 的特定基因位点进行切割示意图。图乙为切割的某突变的目标基因的片段，箭头“↑”所指处碱基对缺失。下列有关说法错误的是(不定项)( )

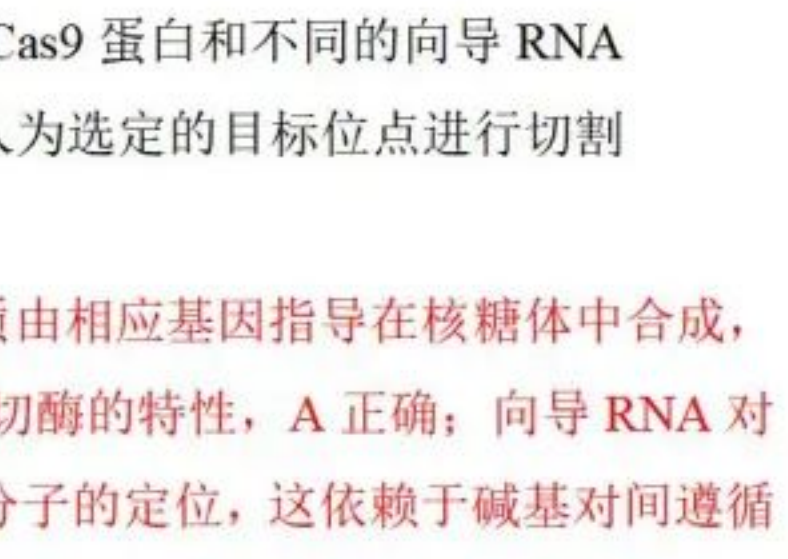


- A、目标 DNA 中存在氢键，向导 RNA 中无氢键
- B、若α链剪切位点附近序列为 TAACTCTAA，则相应的识别序列为 AUUGAGAUU
- C、图乙基因在表达过程中涉及 3 种 RNA，且功能各不相同
- D、图中基因编辑技术中建构“编辑基因”的原理是基因突变

参考答案：AB

解析：向导 RNA 中也有互补配对区域因而有氢键，A 错误；向导 RNA 识别序列识别的是α链的互补链，α链的互补链为...ATTGAGATT...，因此相应的识别序列为...UAACUCUAA...，B 错误；基因在表达过程中涉及 3 种 RNA，且功能各不相同，其中 mRNA 提供翻译的模板，tRNA 转运氨基酸，rRNA 构成核糖体的组成成分，C 正确；基因编辑技术中建构“编辑基因”是通过在原基因组的某一特定基因位点上，剪断目标 DNA 片段并插入新基因的某一片段或者敲除某一基因的片段，从而改造了原有的基因结构，构建成了新的“编辑基因”，因此其原理是基因突变，D 正确。

3、(2022·山东潍坊市高三月考)CRISPR/Cas9 基因编辑技术可简单、准确地进行基因定点编辑，其原理是由一条单链向导 RNA 引导 Cas9 蛋白到一个特定的基因位点对特定的 DNA 序列进行切割。通过设计向导 RNA 中 20 个碱基的识别序列，可人为选择 DNA 上的目标位点进行切割(如图所示)。下列相关叙述正确的是(不定项)( )



- A、Cas9 蛋白由相应基因指导在核糖体中合成，它具有核酸内切酶的特性
- B、Cas9 蛋白借助向导 RNA 对目标 DNA 分子进行定位依赖于碱基互补配对
- C、对不同目标基因进行编辑时，可能使用相同的 Cas9 蛋白和不同的向导 RNA
- D、因向导 RNA 碱基序列的特异性，Cas9 只能对人为选定的目标位点进行切割

参考答案：ABC

解析：核糖体是蛋白质的合成场所，故 Cas9 蛋白质由相应基因指导在核糖体中合成，Cas9 蛋白可对特定的 DNA 序列进行切割，具有核酸内切酶的特性，A 正确；向导 RNA 对目标 DNA 进行序列识别，从而实现 Cas9 蛋白对 DNA 分子的定位，这依赖于碱基对间遵循碱基互补配对原则，B 正确；在使用 Cas9 蛋白对不同目标 DNA 进行编辑时，由于向导 RNA 能识别并结合特定的 DNA 序列，所以应使用 Cas9 蛋白和不同向导 RNA 进行基因编辑，C 正确；因为该蛋白质类似于限制酶，而限制酶的特点是识别特定序列，并在特定位点进行切割所以 Cas9 蛋白借助单链向导 RNA 引导不一定只对人为选定的目标位点进行切割，D 错误。

3

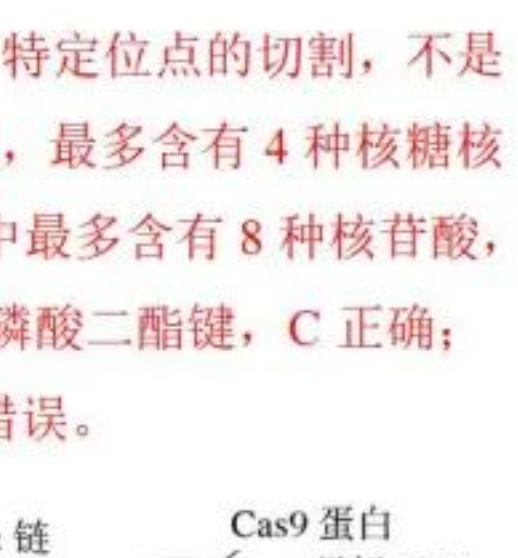
4、2019 年，中国科学院神经科学研究所利用 CRISPR—Cas9 基因编辑技术，用基因敲除的猴的体细胞通过克隆技术培育出 5 只克隆疾病猴。下列相关叙述错误的是(不定项)( )

- A、克隆猴基因组组成差异小，可减少个体差异对实验的干扰
- B、受精卵经基因编辑后形成的胚胎都成功发育为克隆疾病猴
- C、克隆疾病猴有助于研究该疾病致病机制和开发相应药物
- D、可以运用该基因编辑技术进行生殖性克隆人的研究

参考答案：BD

解析：动物细胞核移植技术是指将动物的一个细胞的细胞核移入一个已经去掉细胞核的卵母细胞中，使其重组并发育成一个新的胚胎，这个新的胚胎最终发育成动物个体。用核移植的方法得到的动物称为克隆动物。5 只克隆疾病猴是由猴的体细胞通过克隆技术(属于无性繁殖)获得的，所以其基因组组成差异小，可减少个体差异对实验的干扰，A 正确；经基因编辑后形成的胚胎不一定都能发育成克隆疾病猴，B 错误；克隆疾病猴有助于研究该疾病致病机制和开发相应药物，C 正确；不能利用该技术进行克隆人的研究，D 错误。故选 BD。

5、CRISPR/Cas9 是近年来生物学科研究的热门技术，该技术的来源于细菌的一种防御机制。如图所示，当细菌感知到噬菌体侵入时，会通过 sgRNA 识别噬菌体 DNA，并通过 Cas9 蛋白切断目标 DNA，从而起到防御作用。下列关于该机制的叙述错误的是(不定项)( )

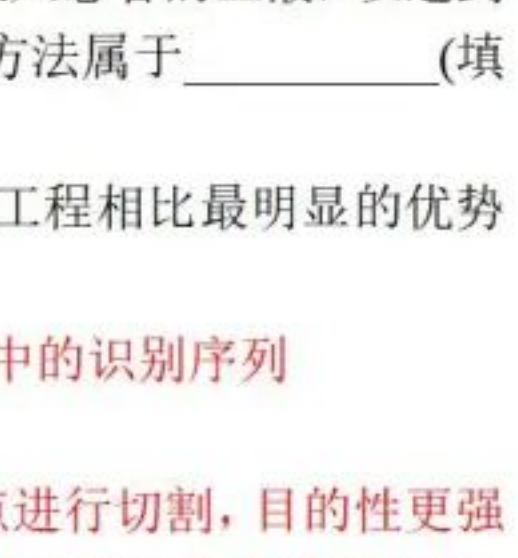


- A、噬菌体 DNA 的变化体现了基因突变的不定向性
- B、sgRNA 与目标 DNA 结合片段中最多含有 5 种核苷酸
- C、Cas9 蛋白可破坏 DNA 分子的磷酸二酯键
- D、高倍光学显微镜可观察到该现象

参考答案：A、B、D

解析：噬菌体 DNA 被细菌 sgRNA 识别并被 Cas9 蛋白切割属于特定位点的切割，不是基因突变，不能体现基因突变的不定向性，A 错误；sgRNA 为 RNA，最多含有 4 种核糖核苷酸，DNA 含有 4 种脱氧核苷酸，故 sgRNA 与目标 DNA 结合片段中最多含有 8 种核苷酸，B 错误；Cas9 蛋白可切断目标 DNA，该过程破坏的是 DNA 分子的磷酸二酯键，C 正确；该过程属于分子水平的改变，光学显微镜下无法观察到该现象，D 错误。

6、CRISPR/Cas9 是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御机制，可用来对抗入侵的病毒及外源 DNA，受此机制启发，科学家们研发了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，这是一种对靶向基因进行特定 DNA 修饰的技术，其原理是由一个向导 RNA 分子引导核酸内切酶 Cas9 到一个特定的基因位点进行切割。通过设计向导 RNA 中 20 个碱基的识别序列，可人为选择 DNA 上的任一目标位点进行切割(见下图)。请据图分析回答下列问题：



(1)CRISPR/Cas9 基因编辑复合体中 Cas9 蛋白是由相应基因指导，在细胞的\_\_\_\_\_中合成的，其工作原理是特异性地切断目标 DNA 的\_\_\_\_\_ (填具体部位)；向导 RNA 中的识别序列与目标 DNA 的识别遵循\_\_\_\_\_原则，该复合体中，决定其在 DNA 上切割位点的是\_\_\_\_\_。

4

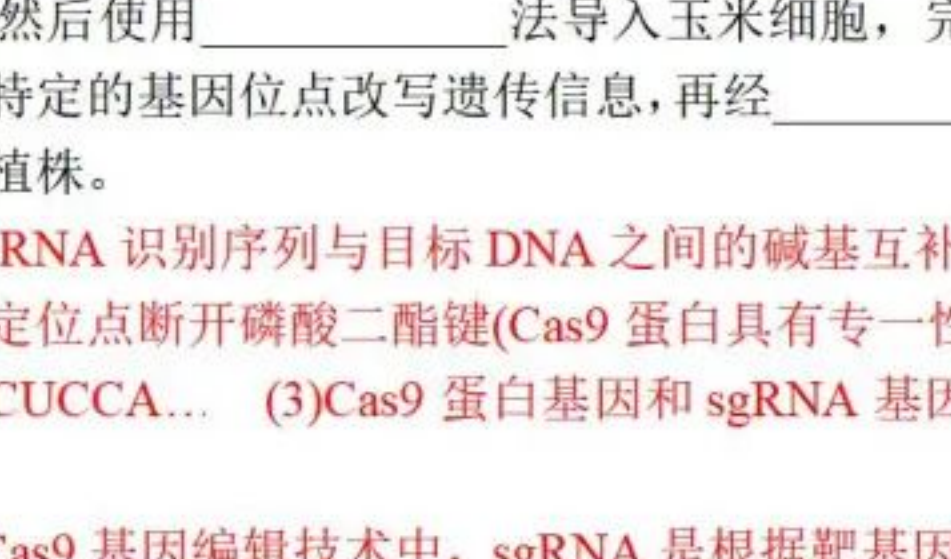
(2)中国科学家从肺癌患者血液中提取某种细胞，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术加入一个帮助这种细胞定向清除肿瘤的新基因序列，然后再把这些细胞注入患者的血液，以达到杀死癌细胞的目的。这些细胞应该是人体的\_\_\_\_\_，这种治疗方法属于\_\_\_\_\_ (填“体内”或“体外”)基因治疗。

(3)分析上述信息可知，CRISPR/Cas9 基因编辑技术与早期基因工程相比最明显的优势是\_\_\_\_\_。

- 参考答案：(1)核糖体 磷酸二酯键 碱基互补配对 向导 RNA 中的识别序列
- (2)T 淋巴细胞 体外
- (3)CRISPR/Cas9 基因编辑技术可人为地选择 DNA 上的目标位点进行切割，目的性更强

解析：(3)与早期基因工程相比，CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以对特定位点进行编辑，故其最明显的优势是可人为地选择 DNA 上的目标位点进行切割，目的性更强。

7、(2022·湖南高三三模)CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以按照人的意愿精准剪切、改变任意靶基因的遗传信息，对该研究有突出贡献的科学家被授予 2020 年诺贝尔化学奖。其原理是由一条单链向导 RNA(sgRNA)引导 Cas9 蛋白到一个特定的基因位点进行切割，从而达到基因定点敲除、敲入、突变的。通过设计向导 RNA 中 20 个碱基的识别序列，可人为选择 DNA 上的目标位点进行切割(如图所示)。请据图分析回答下列问题：



(1)CRISPR/Cas9 基因编辑技术中，sgRNA 是根据靶基因设计的引导 RNA，准确引导 Cas9 切割与 sgRNA 配对的靶基因 DNA 序列。Cas9 借助向导 RNA 对目标 DNA 分子进行精准定位，依赖于\_\_\_\_\_；Cas9 蛋白能对目标位点进行准确切割，是因为\_\_\_\_\_，由此可见，Cas9 在功能上属于\_\_\_\_\_酶。

(2)在使用 Cas9 对不同目标 DNA 进行编辑时，应使用 Cas9 蛋白和\_\_\_\_\_ (填“相同”或“不同”)的向导 RNA 进行基因编辑。在设计向导 RNA 识别序列时，若目标 DNA 的α链切点附近序列为...GAATCTCCA...，则向导 RNA 上识别序列为\_\_\_\_\_。

(3)已知玉米中赖氨酸含量较低，原因是与赖氨酸合成过程中的两个关键酶——天冬氨酸激酶和二氢吡啶二羧酸合成酶的活性，受细胞内赖氨酸浓度影响较大。当赖氨酸浓度达到一定量时就影响这两种酶的活性，从而使赖氨酸含量很难提高，不能满足需求。现使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对天冬氨酸激酶和二氢吡啶二羧酸合成酶基因进行改造，首先需要构建启动子、\_\_\_\_\_ (目的基因)、标记基因、终止子等组成的基因表达载体，然后使用\_\_\_\_\_法导入玉米细胞，完成转化后 CRISPR/Cas9 系统可在玉米体细胞中特定的基因位点改写遗传信息，再经\_\_\_\_\_技术培育成赖氨酸高产的玉米植株。

- 参考答案：(1)向导 RNA 识别序列与目标 DNA 之间的碱基互补配对 Cas9 蛋白能识别特定核苷酸序列并在特定位点断开磷酸二酯键(Cas9 蛋白具有专一性) 限制性内切核酸酶
- (2)不同 ...GAAUCUCCA... (3)Cas9 蛋白基因和 sgRNA 基因 农杆菌转化 植物组织培养

解析：(1)CRISPR/Cas9 基因编辑技术中，sgRNA 是根据靶基因设计的引导 RNA，能准确引导 Cas9 切割与 sgRNA 配对的靶基因 DNA 序列。Cas9 能借助向导 RNA 与目标 DNA 进行精确定位的原因在于向导 RNA 上的碱基序列与目标 DNA 分子上的碱基序列可以通过碱基互补配对原则实现向导 RNA 与目标 DNA 分子特定序列的特定识别，进而定位；对目标位点的切割则依赖于 Cas9 的专一识别，Cas9 蛋白能识别特定核苷酸序列并在特定位点剪切特定的碱基序列，使磷酸二酯键断裂。由此可见，Cas9 在功能上属于限制性内切核酸酶。

5