

PCR 重难点辨析及常见问题解决思路

北京市第四中学教师 郭羽

PCR 的原理和应用是高中考等级考试考查的重点。PCR 技术应用广泛,被不断创新用于解决各种生物学、医学问题。考生在考试中会遇到各种科研情境,应牢固掌握 PCR 的条件和过程,深入理解 PCR 的特征,熟悉真实的科研情境,在此基础上解决问题。

一、PCR 的条件和特征

1. PCR 的条件

PCR 的反应体系中须有模板、引物、原料(4种 dNTP)、耐高温的 DNA 聚合酶(Taq 酶)、缓冲液。模板可以是基因组 DNA、cDNA,只要模板 DNA 中包含要扩增的目的基因即可。关于引物,应加入两条各自与目的基因两条链的 3' 端互补配对的单链 DNA 作为引物,既不能只加一条,也不能加一对同方向引物。PCR 的产物通过电泳进行鉴定。考生要知道电泳的原理是基于分子量大小的差别,最后通过观察电泳条带的位置鉴别不同的 DNA 片段。

【例】Ac 片段能编码转座酶,可自主移动。Ds 片段需在转座酶作用下,才可以从原来的位置上切离下来,然后随机插入到所在染色体的其他位置或其他染色体上。用 T-DNA 将 Ac、Ds 片段转入同一株水稻,用 PCR 检测 Ds 是否转座。如图 1, Ds 未发生切离的 DNA 位点,通过引物(b、d)可得到 400bp 的扩增产物;Ds 已发生切离的 DNA 位点通过引物(c、d)可得到 870bp 的扩增产物。则图 1 中的 A、B、C 类型分别代表什么?(A: Ds 转座杂合子, B: Ds 转座纯合子, C: Ds 未转座杂合子)

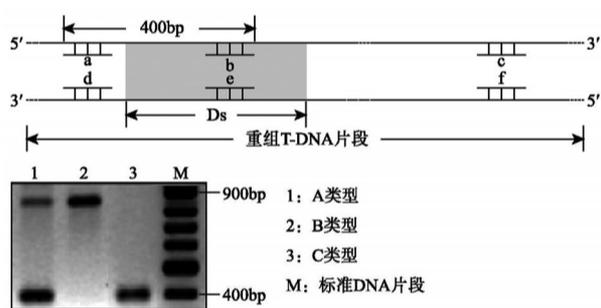


图 1

2. 注意事项

在实际中,引物是最重要、注意事项最多的因素。PCR 退火的温度取决于引物的 GC 含量,PCR 的两大特征——指数扩增和特异性扩增,也取决于引物。指数扩增依赖于两条引物的对向扩增,1 条双链 DNA 分子经过 n 轮 PCR (n ≥ 30), 分子数是 2ⁿ。而如果只加入一条引物,最终能得到 n 条单链 DNA, 不能获得目的基因,不符合指数扩增的特征,PCR 失败。

【例】下图是快速逆转录-PCR 过程示意图,①和②表示什么过程?(逆转录)③表示什么过程?(PCR),③过程能否只用引物 b?(不能,必须用一对引物进行 PCR)

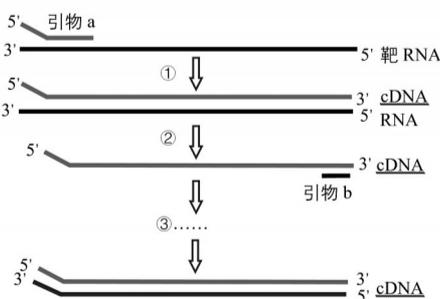


图 2

二、PCR 的应用

1. 基因工程中用 PCR 获取目的基因

用 PCR 获取目的基因有多个步骤,需要考生理解应用:一是准备模板:提取基因组 DNA 或总 RNA 再反转录得到 cDNA;二是根据受体细胞类型选定载体及酶切位点;三是设计引物,在引物的 5' 端添加酶切位点;四是 PCR;五是电泳检测。

(1) 依据氨基酸序列设计引物

【例】利用 PCR 技术从 cDNA 文库中获取 AtNX1 基因(基因序列未知),需根据 AtNX1 蛋白氨基酸序列设计引物,引物的序列可以有多种,原因是(一个氨基酸有多个密码子,对应生物 DNA 碱基序列就会有多种)。在 PCR 体系中需加入其中的(全部)引物(选填“全部”“任意 1 种”或“其中 2 种”)。

(2) 目的基因引入限制酶切点

【例】图 3 为质粒限制酶酶切图谱(注:图中限制酶的识别序列及切割形成的黏性末端均不相同)。bglB 基因不含图中限制酶识别序列。为使 PCR 扩增的 bglB 基因重组进该质粒,扩增的 bglB 基因两端需分别引入的酶切位点是?(Nde I 和 BamH I)

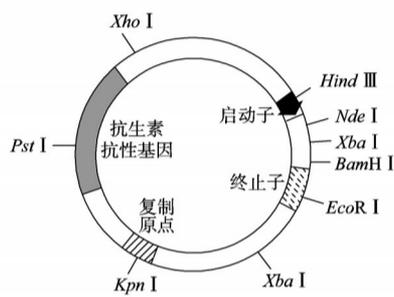


图 3

2. 检测目的基因是否导入受体细胞或生物

【例】为了对重金属污染的土壤进行生物修复,研究者将从杨树中克隆的重金属转运蛋白(HMA3)基因与外源高效启动子连接,导入杨树基因组中(如图 4)。

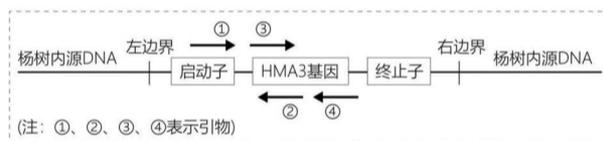


图 4

为检测获得的转基因杨树苗中是否含有导入的 HMA3 基因,同时避免内源 HMA3 基因的干扰,在进行 PCR 扩增时,应选择的引物组合是?(①+②或①+④)

3. 检测目的基因的表达(表达量)

【例】温敏雄性不育系 S2 的雄性不育性状由 RNZ 基因控制。为了研究高温对 RNZ 基因表达的影响,写出用 PCR 检测 S2 叶片 RNZ 基因表达情况的基本程序。(分别提取叶片或幼穗总 RNA,进行反转录;根据 cDNA 序列设计引物,PCR,从而检测 RNZ 基因表达情况)

4. 基因定位

【例】PCR 经常与酶切、电泳结合,检测基染色体上的分子标记类型进行基因定位。

水稻的紫粒和白粒是 1 对等位基因控制,利用 SSR 技术可以进行基因在染色体上的定位。SSR 是 DNA 中的简单重复序列,非同源染色体上的 SSR 重复单位不同(如 CA 重复或 GT 重复),不同品种的同源染色体上的 SSR 重复次数不同(如 CACACA 或 CACACACA),因此常用于染色体特异性标记。研究者将纯种紫粒和白粒水稻杂交, F₁ 全为紫粒, F₁ 自交后提取 F₂ 中结白色籽粒的 50 株单株的叶肉细胞 DNA, 利用 4 号和 8 号染色体上特异的 SSR 进行 PCR 扩增, 结果如下图。

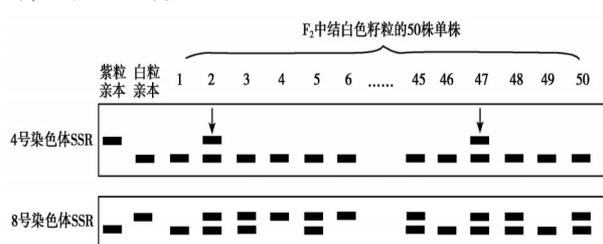


图 5

据图可判断:控制籽粒颜色的基因位于 4 号染色体上,依据是什么?(参考答案: F₂ 白粒植株 4 号染色体的 SSR 扩增

结果多数与白粒水稻亲本 4 号染色体的 SSR 扩增结果一致。)

5. 用 PCR 检测病原体

【例】若要研究病毒,必须先培养动物细胞。而培养的动物细胞常常被支原体污染,导致存活状态差。以培养的动物细胞中支原体的检测为例,实验设计和结果如下:

	阴性对照	阳性对照	待测样本
PCR 预混液	23μL	23μL	23μL
样本		2μL 支原体 rRNA 编码基因片段	2μL 细胞培养上清液

表 1

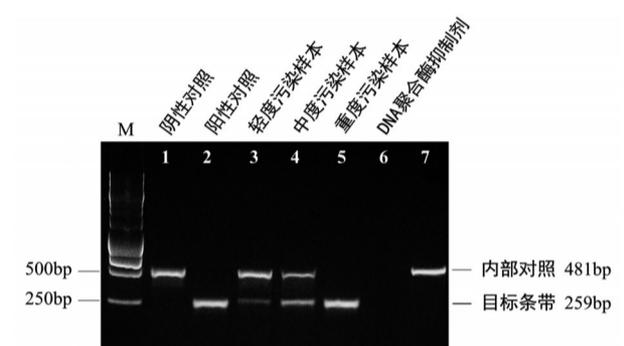


图 6

(1) 根据已知知识和图中信息,PCR 预混液中含有哪些成分?(参考答案:支原体 rRNA 编码基因引物、taq 酶、4 种 dNTP、缓冲液、内部对照 DNA。)

(2) 阴性对照组添加什么样本?(参考答案: 2μL 新的培养液)

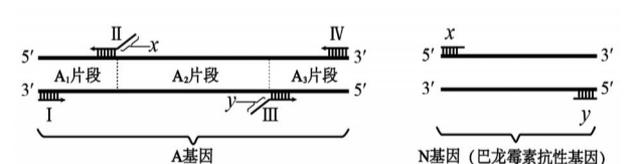
(3) 阴性对照组的作用是什么?内部对照的作用是什么?(参考答案: 排除 PCR 体系本身被支原体污染的可能;证明 PCR 体系能正常工作。)

(4) 阳性对照组的作用是什么?(参考答案: 提供支原体 rRNA 编码基因的阳性参照。)

(5) 解释 3/4/5 泳道内部对照条带逐渐变暗的原因。(参考答案: 内部对照条带与目标条带之间竞争结合引物和 DNA 聚合酶,支原体污染越严重,支原体 rRNA 编码基因越多,扩增后的目标条带越深,而内部对照条带越浅。)

6. 用 PCR 构建融合基因

【例】为研究基因 A 与四膜虫的耐药性是否有关,科研人员提取耐药个体的 DNA, 用图 7 所示的引物组合, 分别扩增 A 基因的 A₁ 片段、A₃ 片段。



注: 引物 II、III 上的 x、y 片段分别与 N 基因两端互补配对

图 7

将大量 N 基因片段与扩增得到的 A₁ 片段、A₃ 片段置于 PCR 反应体系中进行扩增, 得到的绝大多数扩增产物是什么?(参考答案: A₁-N-A₃)

7. PCR 分子育种技术

在 PCR 扩增 bglB 基因的过程中, 加入诱变剂可提高 bglB 基因的突变率。经过筛选, 可获得能表达出热稳定性高的 BglB 酶的基因。与用诱变剂直接处理嗜热土壤芽孢杆菌相比, 上述育种技术获取热稳定性高的 BglB 酶基因的效率更高, 其原因是什么?(参考答案: 仅针对 bglB 基因进行诱变, bglB 基因可快速累积突变)

北京高考注重对考生获取信息能力、整合信息能力、科学思维能力、实验探究能力的考查。科学探究的考查, 既考查提出问题和解决问题的能力, 也注重考查利用科学的原理观点和技术完成工程学任务的能力。考生要注意 PCR 等相关工程技术的复习, 重视用所学原理解决生活和科研情境中的真实问题。