

明悉引物设计 参透 PCR 技术

孙 娟 (首都师范大学附属回龙观育新学校 北京 102208)

摘 要 PCR 是高中生物学的重难点之一,引物设计是 PCR 的核心。本文通过对引物设计题型的分类和解析,促进学生深度理解 PCR 的原理,以及 PCR 技术在基因定点突变、酶切位点添加、突变位点确认等问题解决中的广泛应用。

关键字 PCR 引物设计 题型解析

PCR(Polymerase Chain Reaction)是一种人工合成 DNA 的聚合酶链式反应,PCR 技术是高中生物学选修 3《现代生物科技专题》模块的重点和难点之一,其基本原理和过程如图 1 所示。

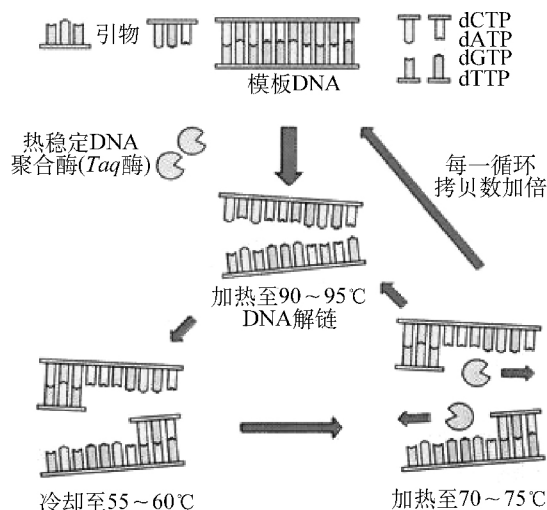


图 1 PCR 原理反应示意图^[1]

在教学实践中,教师一般采用动画演示或者绘图的方式阐释 PCR 的原理和过程。但是,学生在解决 PCR 实际问题时仍然会有很多困惑,其中最为突出的问题是 PCR 的引物设计。引物设计是 PCR 的核心,学生既可以通过 Primer Premier 等软件去设计引物,也可以通过考题去明悉引物设计的意义,从而深刻理解 PCR 的原理和过程。

PCR 除了能完成常规的 DNA 扩增,还可以通过巧妙的引物设计实现基因定点突变、添加酶切位点、特定片段的拼接(搭桥 PCR)等功能。本文结合具体题目明悉引物设计的多种方法,从而对不同的 PCR 进行深度解析。

1 常规 PCR 的引物设计和选择

PCR 的引物包括两条,这两条引物能够分别与待扩增片段(序列已知)的两条链碱基互补配对,而 DNA 的两条新链延伸方向相反,这与 DNA 的空间结构为反向平行双螺旋的特点是一致的。在常规的引物设计中,均应包括两条引物,且位于待扩增片段的两端,引物方向均为 5'→3'。扩增目的不同,选择的引物也会

不同,但基本原则相同。

例 1 (2014 年·北京 30 题)(2) a 基因是通过将 T-DNA 插入到 A 基因中获得的,用 PCR 法确定 T-DNA 插入位置时,应从图 2 中选择的引物组合是_____。(参考答案: II、III)

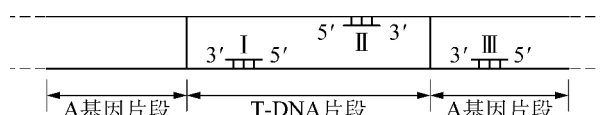
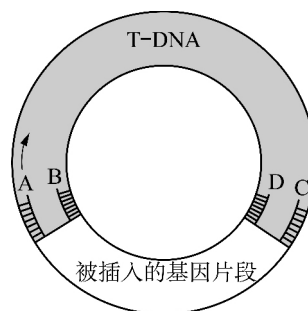


图 2 链式 DNA 引物选择题型

注: I、II、III 为引物

解析: 此题目中 PCR 是为了确认插入位置,故需要将 T-DNA 与 A 基因连接的位置扩增出来,引物应分别与上下两条链互补,图 2 给出了引物的方向(延伸方向为 5'→3'),所以,只能选择 II、III。

例 2 (2011 年·北京 31 题)(6) 根据 T-DNA 的已知序列,利用 PCR 技术可以扩增出被插入的基因片段。其过程是: 提取突变体植株的 DNA,用限制酶处理后,再用_____将获得的 DNA 片段连接成环(图 3),以此为模板,从图中 A、B、C、D 四种单链 DNA 片段中断选取_____作为引物进行扩增,得到的片断将用于获取该基因的全序列信息。(参考答案: DNA 连接酶; B、C)



环状 DNA 示意图

图 3 环状 DNA 引物选择题型

注: A、B、C、D 表示能与相应 T-DNA 链互补、长度相等的单链 DNA 片段;箭头指示 DNA 合成方向

解析: 此题通过 PCR 可以获取未知基因的全部序

列信息,因此,需要将“被插入的基因片段”全部扩增出来,引物应位于其两端,且分别于两条链互补。图 3 给出了 A 的方向,根据 DNA 的结构特点可知,C 与 A 方向相同,B、D 的方向与 A 相反,选用 A、D 能够扩增出 T-DNA 序列,选用 B、C 才能扩增出包含“被插入的基因片段”的序列信息,故选择 B、C。

例 3 (北京·西城 2017.1,26 题)(2)②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_____。在 PCR 体系中需加入其中的_____引物(填“全部”或“任意 1 种”或“其中 2 种”)。(参考答案:全部)

解析:此题的难度较例 1、2 有所增加,考查了引物与模板碱基互补配对的特点,由于密码子具有简并性(一种氨基酸对应多种密码子),并不能确定哪一种引物可以和未知序列碱基互补配对,因此,需要将全部引物加入,配对成功的引物可以完成 PCR 扩增过程,其他引物因无法配对不形成干扰。

2 基因定点突变的引物设计

例 4 (北京·海淀 2017.11,34 题)(2)萝卜的蛋白 A 具有广泛的抗植物病菌作用,而且对人体没有影响。检测发现,转入的蛋白 A 基因在大肠杆菌细胞中表达效率很低,研究者推测不同生物对密码子具有不同的偏好,因而设计了与蛋白 A 基因结合的两对引物(引物 B 和 C 中都替换了一个碱基),并按图 4 方式依次进行 4 次 PCR 扩增,以得到新的蛋白 A 基因。①这是一种定点的_____技术。②图 4 所示的 4 次 PCR 应该分别如何选择图中所示的引物?请填写以下表格(若选用该引物划“√”,若不选用该引物则划“×”)。(参考答案:(2)①基因突变 ②如下表所示)

	引物 A	引物 B	引物 C	引物 D
PCR1	√	√	×	×
PCR2	×	×	√	√
PCR3	×	×	×	×
PCR4	√	×	×	√

解析:此题的引物设计与以往都不同,B 和 C 中都替换了一个碱基,从图 4 分析可知,这两个引物位于基因的不同位置,替换的碱基应该能够互补配对,如此便可以实现将基因 A 的特定位置替换为新的碱基对。因此,属于一种基因突变的技术。后续的 PCR 过程就是为了完成基因的定点突变,根据引物设计原则,学生可以从 PCR1、PCR2 的图示中选出引物 A&B、C&D。

PCR1、PCR2 的产物混合后退火,由图 4 可见,引物 B、C 所在位置的序列可以碱基互补配对结合在一起,从而使蛋白 A 基因的两条链以局部配对的方式结合,并彼此充当引物(不需要额外添加引物),完成 5'→3'方向的延伸过程。因此,PCR3 的结果是在替换了一个碱基的位置发生基因的定点突变。PCR4 过程是为了获取更多新的蛋白 A 基因,选取的引物应位于其两端,根据扩增方向为 5'→3'的原则,选择的引物应该是 A 和 D。

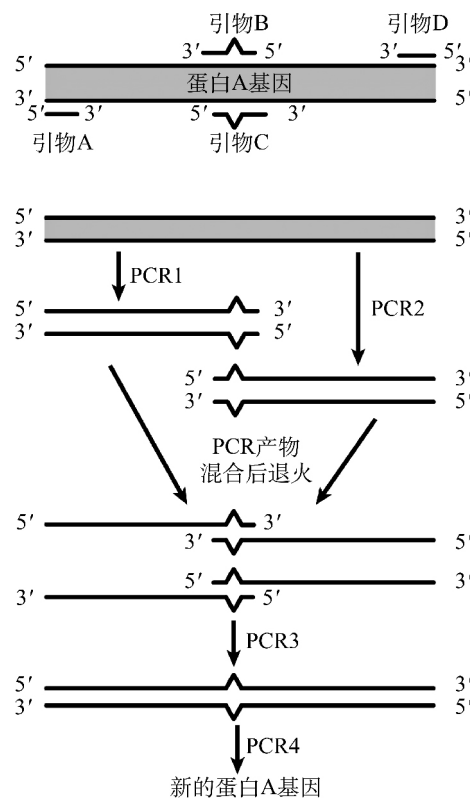


图 4 基因定点突变原理示意图

注:图中“▲”为碱基序列变化点

此题进行 PCR 扩增的目标是实现某一个特定位置碱基对的替换,因此,需要根据目的基因的序列进行分段 PCR,最后再将两段拼接起来,是一种比较传统和实用的体外基因突变方法。随着科技的发展,CRISPR-Cas9 定点突变技术应用更为广泛,其原理见例 5。

例 5 (北京·海淀 2016.5)敲除基因时,sgRNA 与红眼基因 B 的部分序列互补配对,细胞内的 Cas9 酶在配对区域定点剪切,引起红眼基因 B 发生碱基对_____,导致基因突变。该过程中,sgRNA 和 Cas9 酶共同剪切 DNA 的作用类似于_____酶的作用,敲除后需要_____酶对 DNA 上的切口进行修复。(参考答案:缺失,限制,DNA 连接)

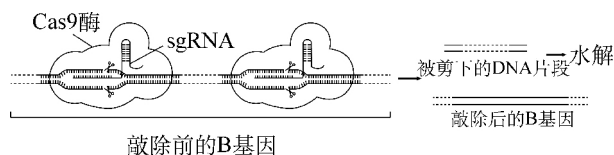


图 5 CRISPR-Cas9 技术原理图

解析: 此题中, 基因突变是通过 sgRNA (small guide RNA, 向导序列) 实现的, sgRNA 是人工设计的能够与特定基因碱基互补配对的一小段 RNA, 当其目的基因结合后, Cas9 酶就可以对目的基因进行剪切, 从而实现基因突变。

3 搭桥 PCR 与酶切位点的添加

例 6 (北京·海淀 2017.5, 30 题) (3) 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 6 所示的引物组合, 分别扩增 A 基因的 A₁ 片段、A₃ 片段。

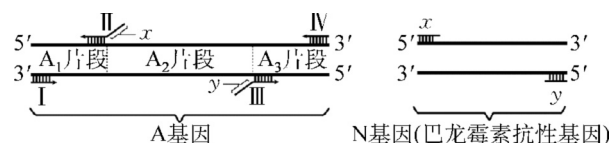
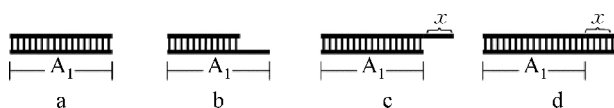


图 6 添加特定序列的 PCR 引物选择

注: 引物 II、III 上的 x、y 片段分别与 N 基因两端互补配对

① 据图 6 分析, 用引物 I、II 组合扩增后, 得到的绝大部分 DNA 片段是下图中的_____。



② 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_____。(参考答案: (3) ①d ②A₁-N-A₃)

解析: 此题的难点在于对 PCR 过程的分析, 引物与模板链结合后, 在 Taq 酶的作用下开始延伸, 延伸的终点为模板链的终点 (图 7), 第二轮扩增后会出现 “A₁-x” 序列, 之后以 2” 扩增, 同时, 以 “A₁-A₂-A₃” 为模板进行的扩增在两轮后都会产生 “A₁+x” 片段, 最终反应体系中 “A₁-x” 数量最多。同理, 用 III 和 IV 扩增出的应为 “y-A₃”。

在 N 基因片段与扩增得到的 A₁ 片段、A₃ 片段的 PCR 反应体系中, 通过引物中 x、y 片段局部配对的方式, 两条链可以结合并分别充当彼此的引物, 不再需要额外添加引物, 其原理与例 4 的 PCR3 过程 (图 4) 相同。最终, 通过搭桥 PCR 的方式实现 “A₁-N-A₃” 的拼接。

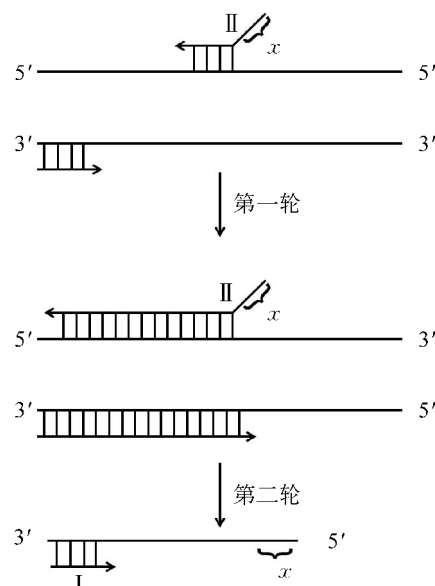


图 7 添加特定序列的 PCR 原理

4 简并引物与突变位点确认

例 7 原创试题 (节选): 采用电击转化法将已知序列的外源 DNA 片段随机插入野生型衣藻基因组中可获得衣藻的鞭毛突变体, 为进一步确定突变体衣藻的突变基因, 设计以下实验 (图 8)。若要确定外源 DNA 片段插入 X 基因的位置, 需要选用引物_____及_____, 分别扩增出对应序列, 再通过测序和序列比对确定外源 DNA 片段插入 X 基因的 a 和 b 两个位置。(参考答案: 1、3; 2、4)

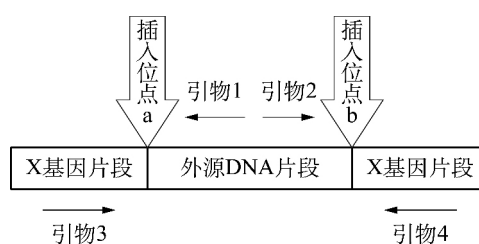


图 8 确认突变位点的 PCR 引物选择

解析: 此题需要找出外源 DNA 在 A 基因中的插入位点 a、b, 因此, 需要分别扩增出包含 a、b 两个位点的序列, 按照图示应选择 1、3 扩增出左侧片段, 选择 2、4 扩增出右侧片段, 测序后即可得知插入位点的序列。

此项 PCR 技术中的 X 基因序列是未知的, 因此, 并不能设计出与其碱基互补配对的引物 3、4。在实际操作中, 通常会通过查询衣藻的全基因组序列找出其较为保守的一些序列, 从而设计出一些能够与多个位点结合的简并引物 (degenerated primers), 在 PCR 过程中, 同时加入简并引物 3、4 和 1、2 (与已知序列结合), 通过调整退火温度, 促使 3、4 引物与多个位点发生特

传感器在初中植物呼吸作用实验教学中的应用

谷 青 (江苏省常熟实验中学 常熟 215500)

摘 要 利用 O_2 、 CO_2 、温度、湿度传感器对植物呼吸作用过程进行实时检测,并对得到的直观数据加以分析,得出呼吸作用的实质。同时利用传感器能在短时间内快速检测出气体变化这一优点,进一步对不同植物材料呼吸作用过程中释放 CO_2 的量进行检测,从而得出植物的不同器官都可以进行呼吸作用这一结论。

关键词 初中生物学实验 呼吸作用 传感器应用

苏科版七年级生物学上册第 3 单元第 7 章“能量的释放和利用”一课中利用 O_2 的助燃性和 CO_2 使澄清石灰水变浑浊的特性,通过两个传统实验来突破重难点,让学生通过实验现象的观察最后总结出植物呼吸作用的实质。教材中的传统实验方法只能定性检测植物呼吸作用后气体变化的最终结果,而对于植物呼吸作用过程中气体的变化过程无法得知。利用传感器和计算机组成的数字化实验系统实时监测植物呼吸过程中各指标的变化,颠覆传统的教学思路,成为实验教学的一种新手段^[1]。

1 背景分析

1.1 教学背景 教材中“植物呼吸过程产生 CO_2 ”这一实验将等量的新鲜菠菜和烫过的菠菜分别放入两个密封完好的黑色塑料袋中,将软管一端插入袋口并系紧,用止水夹夹紧另一端,放置 24 h。学生实验时,分别使每一袋蔬菜的软管插入澄清石灰水中,松开止水夹,轻轻挤压塑料袋,通过观察石灰水的浑浊程度来判断 CO_2 的释放量。“植物呼吸作用消耗 O_2 ”实验中,将等量的新鲜菠菜和烫过的菠菜放入两个广口瓶。将其放在温暖的地方,封闭、遮光处理 24 h,学生分别将点燃的蜡烛迅速伸入甲、乙两瓶中,观察蜡烛的燃烧情况。

这两个实验涉及的材料较多,准备时间较长。装置的密闭性和澄清石灰水的质量都会对实验结果造成一定影响。且 CO_2 的释放量和 O_2 消耗量都要达到一定程度才能观察到明显的实验现象,使得实验的实施有很大的局限性^[2]。实验结果只能呈现最终时刻 CO_2 和 O_2 的有无,无法对这段时间内气体的变化过程做实时监测。且教材中重点对呼吸作用消耗 O_2 释放 CO_2

这两个结论进行了实验验证,而学生通过这两个实验并不能得出呼吸作用产生水、释放能量的结论。如果利用温度和湿度传感器就可以检测出植物呼吸作用过程中温度和湿度的变化,通过直观的实验数据来得出结论,能使学生更深刻地理解呼吸作用的实质。

1.2 生物传感器 结合计算机与传感器的数字化实验系统进入中学生物学实验室,这是信息技术与生物学课程相整合的突破口和教育手段现代化的标志^[3]。通过 pH、 O_2 、 CO_2 等传感器测量实验数据,利用计算机强大的数据处理功能绘制曲线,通过数字和图表等直观数据的分析来准确反映定量实验的结果^[4]。这一方法将复杂实验简单化,有效地缩短了实验时间,同时在极短的时间内大量采集并处理实验数据,确保实验结果的可靠性。传统实验得到的数据只是某个时刻的,而传感器可以在一段时间内不间断地采集数据,具有持续性。通过这些连续的数据就可以展示出实验中某个指标的动态变化。例如,植物的呼吸作用过程中,利用传感器检测就可以看出 CO_2 或 O_2 的含量在 24 h 中的变化过程^[5],有助于更好地分析实验,根据实验现象来反思原理、归纳总结。同时利用现代化实验技术,使得枯燥的实验过程变得有趣,学生乐于参与其中,改变以往被动按部就班做实验的状态,真正实现学生的主动探究,有利于提高实验教学效率,培养学生的主动探索、自主探究的创新能力。

2 实验设计与实施

2.1 实验设备与材料 器材:带 USB 接口的计算机,数据采集器,数据线, CO_2 传感器, O_2 传感器,温度传感器,湿度传感器,密封罐,密封盖,橡胶塞。材料:菠菜。

划课题“高中‘微生物在线’校本课程开发与实践”, No.G087)

主要参考文献

- [1] 生物课程教材研究开发中心.生物选修 3《现代生物科技专题》[M].北京:人民教育出版社,2007:4-15.◆

异或非特异结合,其中有一部分即为包含 a 或者 b 的产物。之后,通过琼脂糖凝胶电泳技术,使不同长度的 PCR 产物分离开,选择含量较高的(条带较宽)的位置切下胶块进行 DNA 回收,测序后通过与外源 DNA 序列比对得出 a、b 所在具体位点。

(基金项目:北京市昌平区教育科学“十三五”规