

2023 级高二下学期生物培优 6——PCR 技术

1. 常用“荧光 RT-PCR 技术”进行检测甲流病毒感染，方法是取检测者的 mRNA 逆转录出 cDNA，并大量扩增，同时用荧光标记的甲流病毒核酸探针来检测 PCR 产物中是否含有甲流病毒的 cDNA。结合所学知识判断：

- (1) 培育转基因动物时，常选择受精卵作为受体细胞，利用显微注射法将目的基因直接注入受精卵中()
- (2) 将目的基因导入原核细胞时，通常用大肠杆菌作为受体细胞，并需要用 Ca^{2+} 处理大肠杆菌，使其处于一种能吸收周围环境中 DNA 分子的状态()
- (3) 常使用 PCR 等技术从分子水平上检测棉花的染色体 DNA 上是否插入了 Bt 基因或 Bt 基因是否转录出 mRNA()
- (4) 利用 PCR 扩增 DNA 片段时，在第一轮循环的变性之前，通常要用 94°C 的高温处理反应液 5 min 进行预变性()
- (5) PCR 中离心的目的是让反应组分在离心管中分层分布()

2. 通过 PCR 技术可在总 cDNA 中专一性的扩增出 Wx 基因的 cDNA，原因是

_____。

3. 为了确保新冠病毒核酸检测的准确性，在设计 PCR 引物时必须依据新冠病毒 RNA 中的_____来进行。PCR 过程每次循环分为 3 步，其中温度最低的一步是_____。

4. 为构建重组载体，需先设计引物，通过 PCR 特异性扩增基因。用于扩增基因的引物需满足的条件是_____。

5. 2011 年我国首次利用转基因和体细胞核移植技术成功培育了高产赖氨酸转基因克隆奶牛。其基本流程为：①构建乳腺专一表达载体。②表达载体转入牛胚胎成纤维细胞（BEF）。③将转基因的 BEF 作为核供体细胞进行核移植。④重组细胞的体外培养及胚胎移植。⑤检测：DNA 水平检测：利用 PCR 技术，以非转基因牛耳组织细胞作为阴性对照，以_____为阳性对照，检测到转基因牛耳组织细胞中存在目的基因。RNA 水平检测：从非转基因牛乳汁中的脱落细胞、转基因牛乳汁中的脱落细胞和转基因牛耳组织细胞，提取总 RNA，对总 RNA 进行_____处理，以去除 DNA 污染，再经逆转录形成 cDNA，并以此为_____，利用特定引物扩增目的基因片段。

6. 甲植物细胞核基因具有耐盐碱效应，乙植物细胞质基因具有高产效应。某研究小组用甲、乙两种植物细胞进行体细胞杂交相关研究，基本过程包括获取原生质体、诱导原生质体融合（在原生质体融合前，需对原生质体进行处理，分别使甲原生质体的细胞质和乙原生质体的细胞核失活）、筛选融合细胞、杂种植株再生和鉴定，最终获得高产耐盐碱再生植株。用 PCR 技术鉴定再生植株。已知甲植物细胞核具有特异性 DNA 序列 a，乙植物细胞质具有特异性 DNA 序列 b；M1、M2 为序列 a 的特异性引物，N1、N2 为序列 b 的特异性引物。完善实验思路：

- ①提取纯化再生植株的总 DNA，作为 PCR 扩增的_____；
- ②将 DNA 提取物加入 PCR 反应体系，_____为特异性引物，扩增序列 a；用同样的方法扩增序列 b。
- ③得到的 2 个 PCR 扩增产物经_____后，若每个 PCR 扩增产物在凝胶中均出现了预期的_____个条带，则可初步确定再生植株来自于杂种细胞。

7. 热启动 PCR 可提高扩增效率，方法之一是：先将除 TaqDNA 聚合酶以外的各成分混合后，加热到 80°C 以上再混入酶，然后直接从 94°C 开始 PCR 扩增，下列叙述正确的有（ ）多选

A. Taq 酶最适催化温度范围为 $50\sim 60^{\circ}\text{C}$

B.与常规 PCR 相比,热启动 PCR 可减少反应起始时引物错配形成的产物

C.两条子链的合成一定都是从 5' 端向 3' 端延伸

D.PCR 产物 DNA 碱基序列的特异性体现了 *Taq* 酶的特异性

8.反转录 PCR 又称逆转录 PCR(RT-PCR),是以 mRNA 为模板进行的特殊 PCR,过程如图。下列叙述错误的是()

A. 图示过程需要控制温度,否则可能得不到产物

B. RT-PCR 技术中,不需已知 mRNA 的全部序列

C. 过程③中子链沿着模板链的 5'→3'方向延伸

D. RT-PCR 技术可应用于是否被 RNA 病毒感染的检测

9.下列操作过程的叙述中错误的是()

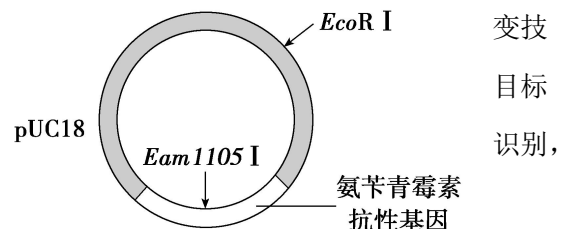
A. PCR 实验中使用的微量离心管、枪头、缓冲液及蒸馏水等在使用前必须进行高压灭菌

B. PCR 所用缓冲液和酶从冰箱拿出之后,应缓慢融化

C. PCR 所用的缓冲液和酶应分装成小份,并常温储存

D. 在微量离心管中添加反应成分时,每吸取一种试剂后,移液器上的枪头都必须更换

10.下图为质粒 pUC18,为生产出满足需求的质粒载体,利用定点诱变技术,通过设计具有诱变位点的引物 P1 和引物 P2 进行 PCR,来实现载体的单碱基突变,目的是使质粒 pUC18 不能被限制酶 *Eam*1105 I 但依然具有氨苄青霉素抗性。下列相关叙述,错误的是()



A. 诱变位点位于限制酶 *Eam*1105 I 识别序列中

B. PCR 反应体系由 P1、P2 两种引物、脱氧核苷酸、*Taq* DNA 聚合酶及含 Mg^{2+} 的缓冲液组成

C. 诱变成功的质粒依然具有氨苄青霉素抗性,利用了密码子具有简并性的原理

D. 诱变成功的质粒 pUC18 经过 *Eco*R I、*Eam*1105 I 双酶切后进行电泳,只能产生 1 条条带

11.某研究小组利用转基因技术,将绿色荧光蛋白基因(*GFP*)整合到野生型小鼠 *Gata3* 基因一端,如图甲所示。实验得到能正常表达两种蛋白质的杂合子雌雄小鼠各 1 只,交配以期获得 *Gata3-GFP* 基因纯合子小鼠。为了鉴定交配获得的 4 只新生小鼠的基因型,设计了引物 1 和引物 2 用于 PCR 扩增,PCR 产物电泳结果如图乙所示。下列叙述正确的是()

A.*Gata3* 基因的启动子无法控制 *GFP* 基因的表达

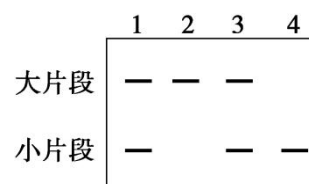
B.翻译时先合成 *Gata3* 蛋白,再合成 *GFP* 蛋白

C.2 号条带的小鼠是野生型,4 号条带的小鼠是 *Gata3-GFP* 基因纯合子

D.若用引物 1 和引物 3 进行 PCR,能更好地区分杂合子和纯合子



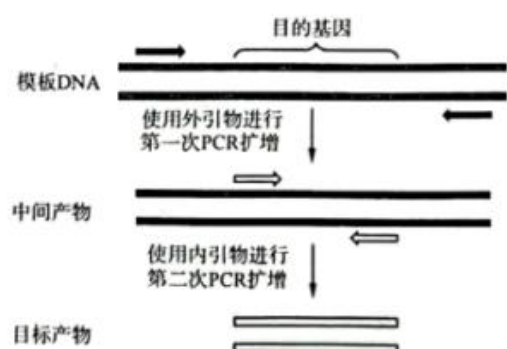
图甲



图乙

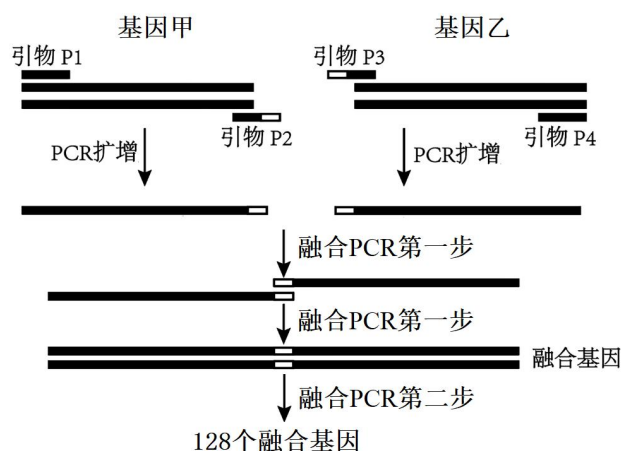
12.目的基因表达检测过程中需要大量探针,若仅扩增探针这段单链,需要利用不对称 PCR,即采用不等量的一对引物,经若干次循环后,低浓度的引物被耗尽,以后的探针循环只产生高浓度引物的延伸产物,结果产生大量的单链 DNA。这两种引物分别引物 1 引物 2,为限制性引物与非限制性引物,其最佳比例一般为 1:50~1:100。据此分析,上图中的引物_____应该为非限制性引物。假设反应体系中原来有 1 个模板 DNA 分子,最初 25 个循环扩增产生双链 DNA,后 15 个循环均只扩增一条链,则需要非限制性引物_____个。

13. 为减少引物与模板之间的非特异性配对,人们在常规 PCR 技术的基础上进行了改良,发明了巢式 PCR 技术。其原理是利用两套 PCR 引物进行两轮 PCR 扩增,首先利用第一对引物(外引物)对目的基因所在 DNA 进行 15-30 个循环的扩增;第二轮扩增以第一轮扩增产物为模板,利用第二对引物(内引物或巢式引物)进行 15-30 个循环扩增,具体过程如图所示。下列叙述错误的是()



- A. 巢式 PCR 中加入的组分与常规 PCR 相同,但扩增产物比常规 PCR 特异性更强
- B. 两套引物需进行两次 PCR, 由于和两套引物都互补的靶序列较少, 因此大大提高了扩增的特异性
- C. 内引物扩增的模板是外引物扩增后的产物, 第二阶段反应能否进行, 也是对第一阶段反应正确性的鉴定
- D. 如果第一次扩增产生了错误片段, 则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率将会增加

14. 融合 PCR 技术采用具有互补末端的引物, 形成具有重叠链的 PCR 产物, 通过 PCR 产物重叠链的延伸, 从而将不同来源的任意 DNA 片段连接起来。其原理如图所示, 据图分析, 正确的是()



- A. 融合 PCR 的第一步两条链重叠部位可互为另一条链的引物
- B. 设计引物的目的是为了能够从其 3'端开始连接脱氧核苷酸
- C. 上述过程中使用的引物 P2 和 P3 的碱基需要完全互补配对

D. 若融合 PCR 的第二步获得 128 个融合基因, 理论上该过程消耗了 256 个引物

15. 新型冠状病毒是一种单链 RNA 病毒, 新型冠状病毒的常规检测方法是通过实时荧光 PCR 鉴定。

(1) 首先, 从样本中提取病毒 RNA, 经_____催化生成 cDNA。然后以 cDNA 为模板, 以_____为原料, 进行实时荧光 PCR 扩增, 测定样品中病毒核酸量。

(2) 通过实时荧光 PCR 扩增目的基因, 需额外添加荧光标记探针 (一小段单链 DNA, 可与目的基因中部序列特异性结合)。当探针完整时, 不产生荧光。在 PCR 过程中, 与目的基因结合的探针对 TaqDNA 聚合酶水解, R 与 Q 分离后, R 发出的荧光可被检测到 (如图甲)。

②在 PCR 循环的_____阶段, 由于 TaqDNA 聚合酶催化子链的合成并水解探针, 检测到的荧光强度与反应体系中 DNA 分子数呈_____关系。

(3) 实时荧光 PCR 检测新型冠状病毒感染时, 检测到的荧光强度变化如图乙所示。

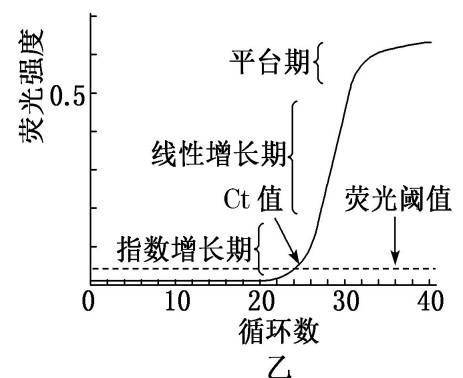
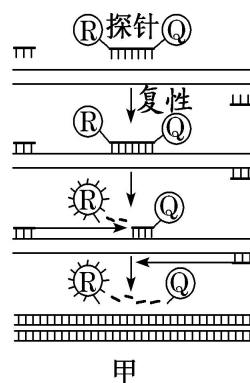
①与指数增长期相比, 线性增长期目的基因数量的增长率下降, 可能的原因是_____ (答一点)。

②Ct 值的含义: 在 PCR 扩增过程中, 每个反应管内的荧光信号达到设定的荧光阈值时所经历的扩增循环数。因此, 当样本中初始模板越多时, Ct 值就_____。

③某新型冠状病毒核酸检测说明书标明, $Ct \leq 37$ 判定为阳性, $Ct > 40$ 或无 Ct 值判定为阴性。图乙所示新型冠状病毒核酸检测结果应判定为_____。

(4) 阴性结果也不能排除新型冠状病毒感染。可能产生假阴性的因素有_____ (多选)。

- a. 取样太早, 样本中病毒量少, 达不到实时荧光
- b. 样本被污染, RNA 酶将病毒 RNA 降解
- c. 病毒发生变异



正确 正确 正确 正确 错误

2. 引物能与 W_x 基因的 cDNA 特异性结合

3. 特异性核苷酸序列 复性

4. 两种引物分别与两条模板链 3' 端的碱基序列互补配对

5. 转基因的 BEF (含目的基因的 BEF) DNA (水解) 酶 模板 (扩增模板)

6. 模板 M1、M2 电泳 1

BC C C B B

10. 1 2²⁹—1 D AB

13. 逆转录酶 4 种脱氧核糖核苷三磷酸 氢键

50-65°C CG 延伸 正相关/正比例

引物浓度下降、酶活性下降、原料浓度下降 越小 阳性 abc