

2023 级高二下学期生物培优 4——PCR 中“引物”

一. 引物的作用

1. (1) 若用 PCR 扩增 *psy* 基因和 *crtI* 基因，需要分别在不同的 PCR 扩增仪中加入_____种引物，其作用是_____。

(2) 在利用 PCR 扩增 R (抗旱) 或 r 基因过程中，利用_____可寻找抗旱基因的位置并进行扩增。

2. 为研究水稻 D 基因的功能，研究者将 T-DNA 插入到 D 基因中 (图 3)，致使该基因失活，失活后的基因记为 d。为验证 F₂ 植株基因型 (DD、Dd 和 dd)，研究者根据 D 基因、T-DNA 的序列，设计了 3 种引物，如图 4 所示：

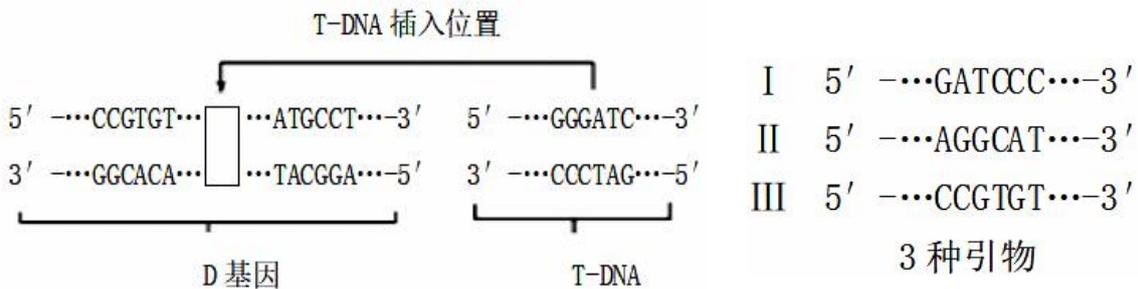


图 3 将 T-DNA 插入到 D 基因

图 4 3 种引物的碱基序列

随机选取 F₂ 植株若干，提取各植株的总 DNA，分别用引物“ I +III”组合及“ II +III”组合进行 PCR，检测是否扩增 (完整的 T-DNA 过大，不能完成 PCR)。

如果引物“ I +III”组及“ II +III”组进行 PCR 均可完成扩增，则相应植株的基因型为_____。

如果_____，则相应植株的基因型为_____。

如果_____，则相应植株的基因型为_____。

二. 引物的设计原则

3. (1) 通过 PCR 技术可在 DNA 分子中专一性扩增出某目的基因，其原因是_____。

(2) 请回答基因工程方面的有关问题：设计引物是 PCR 技术关键步骤之一。某同学设计的两组引物 (图 5) 都不合理，请分别说明理由。

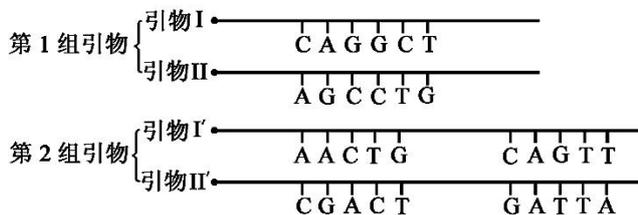


图 5 设计的两组引物部分碱基序列

①第 1 组：_____；

②第 2 组：_____。

(3) 科研过程中，可以用 PCR 技术检测受体细胞是否成功转入了目的基因。提取转染后的细胞的全部 DNA 分子，用目的基因的引物扩增。扩增完毕后，检测发现扩增产物中除目的基因外，还有其他不同大小片段的非目的基因片段，可能的原因一般有_____。

- ①模板受到污染 ②退火温度过高 ③引物太短 ④延伸温度偏低

三. 引物的处理

4. 为生产具有特定性能的 α -淀粉酶, 研究人员从某种海洋细菌中克隆了 α -淀粉酶基因 (1656 个碱基对), 利用基因工程大量制备 α -淀粉酶。为了便于扩增的 DNA 片段与表达载体连接, 需在引物的____端加上限制性酶切位点, 且常在两条引物上设计加入不同的限制性酶切位点, 主要目的是_____。

四. PCR 循环中与引物相关的计算

5. 通过 PCR 方法获得某目的基因, 首先需要设计_____ (填“一对”或“一个”) 引物, PCR 过程经过 4 次循环, 第 4 次循环时需要的引物的数量是_____个, 4 次循环一共需要的引物的总数量是_____个。

6. 请回答基因工程方面的有关问题: 利用 PCR 技术扩增目的基因, 其原理与细胞内 DNA 复制类似 (如图 6 所示)。图中引物为单链 DNA 片段, 它是子链合成延伸的基础。

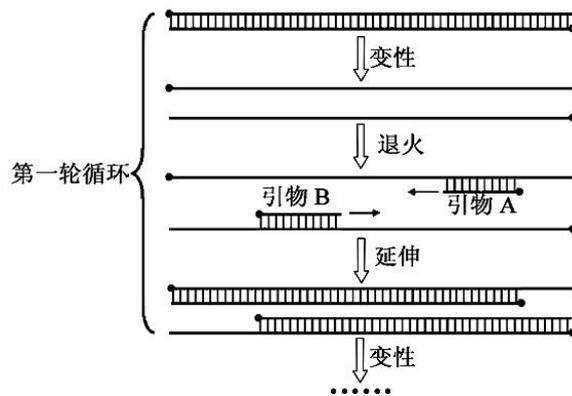


图 6 PCR 的原理示意图

- ①从理论上推测, 第四轮循环产物中含有引物 A 的 DNA 片段所占的比为_____。
- ②在第_____轮循环产物中开始出现两条脱氧核苷酸链等长的 DNA 片段。

五. 引物的选择和互补链的判断

7. 为了筛选出转入了重组质粒的大肠杆菌, 应在筛选平板培养基中添加四环素, 平板上长出的菌落, 常用 PCR 鉴定, 所用的引物组成为图 7 中的_____。

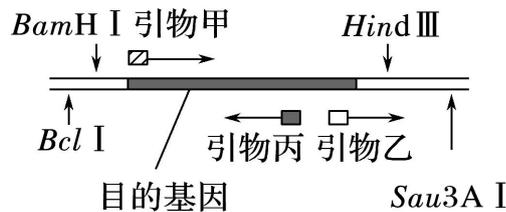


图 7 引物组成图

8. 下图是为了扩增某目的基因所用引物的分布示意图 (图 8), 已知引物组合 1 和 2、3 和 4 可扩增相关的目的基因, 则引物 1、3 与_____ (填 α 链或 β 链) 形成碱基互补配对关系。

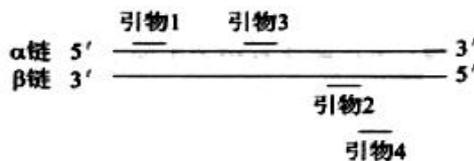


图 8 引物的分布示意图

六. 引物与 PCR 反应时复性温度高低的关系

9. 将动物致病菌的抗原基因导入马铃薯制成植物疫苗，饲喂转基因马铃薯可使动物获得免疫力。以下是与植物疫苗制备过程相关的图和表。PCR 过程中退火（复性）温度必须根据引物的碱基数量和种类来设定。表 1 为根据模板设计的两对引物序列，图 9 为引物对与模板结合示意图。请判断哪一对引物可采用较高的退火温度？_____。

表 1 引物对序列表

引物对 A	P1	AACTGAAATGTAGCTATC
	P2	TTAAGTCCATTACTCTAG
引物对 B	S1	GTCCGACTAGTGGCTGTG
	S2	AGCTGGCGTTTAGCCTCG

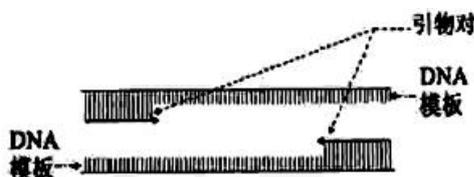


图 9 引物对与模板结合示意图

10. 请回答 PCR 扩增时与退火温度、延伸温度和延伸时间有关的问题：

(1) 进行 PCR 扩增时，反应的温度和时间需根据具体情况进行设定，下列选项中_____的设定与引物有关，_____的设定与扩增片段的长度有关。（填序号）

①变性温度 ②退火温度 ③延伸温度 ④变性时间 ⑤退火时间 ⑥延伸时间

(2) PCR 扩增时，退火温度的设定是成败的关键。退火温度过高会破坏_____的碱基配对。退火温度的设定与引物长度、碱基组成有关，长度相同但_____的引物需要设定更高的退火温度。

(3) 如果 PCR 反应得不到任何扩增产物，则可以采取的改进措施有_____（填序号）。

①升高退火温度 ②降低退火温度 ③重新设计引物

(4) 通过 PCR 方法获得 eGFP 目的片段，首先需要设计_____（填“一对”或“一个”）引物，在体外选择性扩增 eGFP 目的片段。PCR 反应一般由 95℃ 热变性、55~60℃ 引物和模板配对、72℃ 延伸三个步骤，经过多次循环完成。延伸阶段选用 72℃ 是综合考虑了两个因素，这两个因素是_____和_____。

11. 利用 PCR 技术获取目的基因，实验结果显示除目的基因条带（引物与模板完全配对）外，还有 2 条非特异条带（引物和模板不完全配对）。为了减少反应非特异条带的产生，以下措施有效的是（ ）

A. 增加模板 DNA 量 B. 延长热变性的时间 C. 延长延伸的时间 D. 提高复性的温度

12. 水体中的雌激素能使斑马鱼细胞产生 E 蛋白，激活卵黄蛋白原（vtg）基因（如图 1）的表达，因此斑马鱼可用于监测环境雌激素污染程度。为实现可视化监测，科学家将斑马鱼的 vtg 基因，与人工构建的含萤火虫荧光素酶（Luc）基因（无启动子）的载体（如图 2）连接，形成 vtg-Luc 基因重组载体，成功培育了转基因斑马鱼。图 2 中 Luc 表示萤火虫荧光素酶基因，可以催化荧光素氧化产生荧光。请回答下列问题。

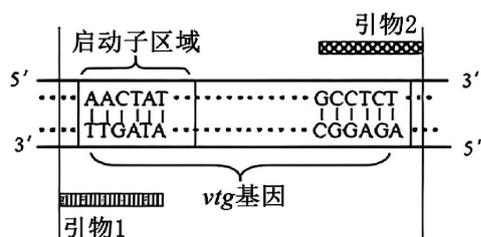


图 1

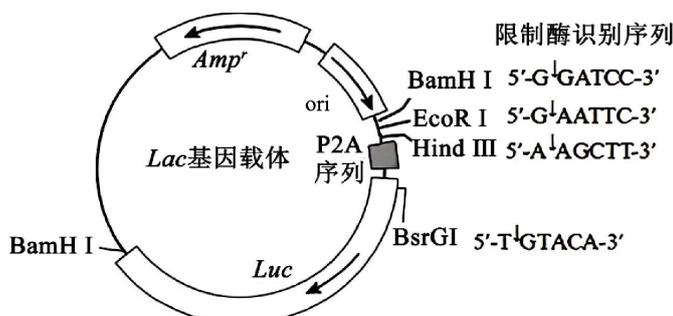


图 2

注：图 1 DNA 片段不含有图 2 所示限制酶的识别序列；图 2 中 Amp^r 为氨苄青霉素抗性基因，ori 为复制起点，BamH I、EcoR I、Hind III、BsrGI 为限制酶，→ 表示转录方向。

(1)为使 vtg 基因与 Luc 基因载体形成重组载体,选用限制酶_____切割 Luc 基因载体可降低“空载”概率。通过 PCR 技术获取 vtg 基因时,需设计合适的引物。依据图 1、图 2 信息,推测引物 1 包含的碱基序列为_____。

- A. 5'-AACTAT-3' B. 5'-GAATTCAACTAT-3' C. 5'-TTGATA-3' D. 5'-AAGCTTAACTAT-3'

(2) 将“vtg-Luc 基因重组载体”导入大肠杆菌中进行扩增,为便于筛选,应将大肠杆菌接种在含_____的培养基中;若要判断斑马鱼转基因是否成功,可在水体中添加_____进行检测。

(3) Luc 基因载体上有一段 P2A 序列,其表达产生的 2A 肽的功能如图 3 所示。P2A 序列能与 vtg 基因、Luc 基因一起完成_____过程。Luc 基因载体上有一段 P2A 序列的意义是_____。

(4)进一步研究发现,E 蛋白能与 vtg 基因启动子中的特定序列结合,启动该基因的表达。已知 vtg 基因启动子长度约为 1000 碱基对,为了找到 E 蛋白在启动子上的结合位点,请运用本题研究成果完成设计思路:

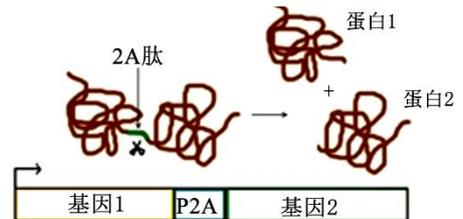


图3

①用限制酶将_____切割成多个长度的 DNA 片段,将酶切片段分别与 Luc 基因载体连接,连接位点在 Luc 基因的_____游,形成多种重组载体。

②将每种重组载体分别导入斑马鱼的_____中,待发育成熟后添加荧光素等进行检测,能发出荧光的说明导入的酶切片段中_____ (填“含有”或“不含有”)能与 E 蛋白结合的序列。

③将该片段继续切割成多个长度,重复上述操作,进一步缩小该特定序列的位点区域。

参考答案

1、1) 2 引物与 DNA 模板链通过碱基互补配对结合,使 DNA 聚合酶从引物的 3' 端开始连接脱氧核苷酸,从而延伸 DNA 子链 2) 引物

2、Dd 仅引物“ I+III”组进行 PCR 能完成扩增,而“ II+III”组不能完成扩增 dd 仅引物“ II+III”组进行 PCR 能完成扩增,而“ I+III”组不能完成扩增 DD

3、1) 引物是根据目的基因的一段已知核苷酸序列设计合成的(或引物能与目的基因通过碱基互补配对结合) 2) 第 1 组:引物 I 和引物 II 局部发生碱基互补配对而失效;第 2 组:引物 I' 自身折叠后会出现局部碱基互补配对而失效 3) ①③

4、5' 使 DNA 片段能定向插入表达载体,减少自连

5、一对 16 30

6、① 15/16 ②三

7、引物甲和引物丙

8、β 链

9、引物对 B

10、1) ② ⑥ 2) 引物与模板 GC 含量高

3) ②③ 4) 一对 防止 DNA 变性 保证 Taq 酶所需温度条件

11、D

12、(1)EcoRI、HindIII B

(2)氨苄青霉素 雌激素、荧光素

(3)基因的表达(转录和翻译) P2A 序列产生的 2A 肽能将融合蛋白切割成独立的两种蛋白,有助于序列两侧的基因平衡表达成两种独立的蛋白质

(4)启动子 上 受精卵 含有