

# 高中生物学PCR及电泳技术实验理论教学的优化与改进

潘为娴

(扬州大学 生物科学与技术学院 江苏 扬州 225000)

**[摘要]**通过对高中生物基因工程专题中PCR及电泳实验理论教学的优化与改进,将高中开展困难的PCR实验的教学重点放在实验理论教学与实验前准备教学中,学生虽不能参与完整实验过程,但实际参与了整个实验的设计,并能利用所学原理知识分析PCR及电泳检测实验中遇到的问题,提出合理的解决方案,弥补PCR及电泳技术实验无法开展的缺失。

**[关键词]**PCR; 理论教学优化; 实验理论教学; 实验前准备教学

**[DOI]** 10.12252/j.issn.2096-627X.2021.06.188

多聚酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是一种体外迅速扩增DNA片段的技术,它能以极少的DNA为模板在几小时内复制出上百万份的DNA拷贝。在生活实践中常常需要分析DNA,却往往因体内提取含量过低而难以比对,PCR技术恰恰能解决了这类问题,因此被广泛应用到遗传疾病诊断、考古、刑侦破案等方面。

PCR技术是选择性必修课程概念5中最重要的实验内容,《新课标》也强调了其重要性,并且要求了应开展相对应的实验教学活动:利用聚合酶链式反应(PCR)扩增DNA片段并完成电泳鉴定,或运用软件进行虚拟PCR实验。另外,现阶段高中生物教学都提高了对实验教学的要求,许多中学生物实验室均已配备了PCR仪、电泳仪、分光光度计、微量移液器等器具。通过对理论教学的改进,增加学生在理论学习中的手脑并用环节,学生切身体会目的基因的PCR扩增实验实验前准备,激发学习兴趣,促进学生加深对知识点的理解,提升学生的动手能力,提高学生生物核心素养。

高中生物学课程本身的时间有限,大多数的课堂时间都用于理论课程的教学,实验课程容易被忽视,而对于生物选修班学生来说,选修课程中的PCR原理及其相关实验又是重点和难点内容,课堂上的理论教学往往很难讲的明白,需要教师带领学生走进实验室,真正的实验操作,才能深入理解,也是对现代生物技术的了解,但PCR实验教学需要占用很多的课程时间,一般学校由于各科课程的压力,生物学教师无法有充分的课时开展。因此,对于生物学老师而言,可将PCR实验的重点安排在学生课堂理论教学活动中增设实验前准备过程、预设实验如何开展活动以及对实验中可能出现的问题进行分析和利用所学原理寻求解决方案,让学生能参与其中,加深对PCR原理的理解,同时也弥补了无法开展PCR实验教学使学生概念模糊的缺陷。

PCR法扩增基因实验包括PCR法扩增基因以及对扩增产物的凝胶电泳检测,该实验中涉及许多分子实验技术和方法,操作过程复杂,难度较大,对于只开展过基础实验的高中生十分困难。故而,教学重点要落在学生对PCR原理和基本操作的理解以及学生能对实验中可能PCR及电泳过程遇到的问题分析,并思考解决方案。

第一部分、复习必修二《遗传与进化》中DNA复制

通过对该部分内容的简单复习回顾,学生能总结出DNA的复制是半保留复制,大致分为三个步骤,依次是双链的打开(解旋)、以母链为模板合成子链、每条子链与母链盘绕形成双螺旋。

在必修二中学生只是粗略的了解DNA体内复制条件和过程,但对DNA体内复制需要引物及如何延伸只是一知半解,在实验原理教学中需要讲解这部分知识。DNA聚合酶无法从开头合成DNA,只能从3'端延伸子链DNA,因此DNA的合成还需要引物。引物先与母链碱基互补配对,DNA聚合酶再从引物的3'端开始延伸。最后由学生自主总结出DNA体内复制所需的条件及作用。

第二部分、设想DNA体外复制所需环境

在课堂教学的过程中,学生对PCR的原理已经有了初步了解,能大致说出PCR技术的基本过程和必须条件。根据DNA体内复制所需的条件,从复制模板、原理、酶以及引物出发,设想体外PCR扩增需要的条件,分析对比其异同点。

PCR技术是模拟体内DNA复制,能够快速且大量的合成DNA分子,因此在反应条件上也应与体内复制相仿,学生回答出:

①相同的条件有哪些?

原料、模板

②不同的条件有哪些?

引物、酶

表1 仪器操作说明

仪器	操作说明
可调微量移液器	选量程→调量程→装枪头→取液→放液 完成5步操作为一次加样(学生练习加样,实际感受微量概念)
PCR仪	开机进入菜单→设置时间和温度→加反应管→运行程序→结束程序取出反应管(模拟操作)
琼脂糖凝胶电泳系统及凝胶成像仪	拔“梳子”→加样→电泳→成像系统检测(教师示范“拔梳”,凝胶实验材料教贵避免凝胶的浪费,学生再次练习加样)

## ③PCR技术是否需要能量?

不需要

教师帮助学生总结: PCR技术在高温反应体系中, 体内的DNA聚合酶会失活, 因此需要能够耐高温的DNA聚合酶(Taq DNA聚合酶), 还需要一定的缓冲溶液模拟体内DNA复制环境。体内DNA复制时DNA聚合酶无法从头合成DNA, 因此需要在RNA聚合酶的作用下, 先合成一小段RNA引物, 而后由DNA聚合酶接着延伸DNA链, DNA复制完成后引物RNA被水解, 再由对应的DNA片段接上。体外DNA扩增的引物由人工设计, 没有体内的酶体系, 因此引物可以是DNA, 也可以是RNA。

第三部分、教师对相关仪器的原理介绍与演示, 安排学生逐个练习

第四部分、设计实验方案——PCR法扩增大肠杆菌磷酸酶基因

## (1) 实验教学设计原理与技术路线

碱性磷酸酶广泛存在于生物体(高等植物除外)中, 可直接参与磷代谢, 同时也能帮助钙、磷的消化和吸收以及骨化, 目前对碱性磷酸酶的基因研究很多, 并且也经常应用到了基因工程中。本实验以大肠杆菌 $K_{12}$ 磷酸酶的基因作为模板, 设计特异性引物, 应用PCR技术体外扩增基因, 最后进行凝胶电泳检测。

## (2) 实验教学材料

PCR反应选用材料的一般是浓度较低的模板, 往往进行三十多次的循环, 可能得到的扩增产物浓度也不高。在这部分教学中, 可以让学生预设实验材料如何选择, 才能保证反应得到的产物浓度合适, 电泳检测结果更明显。可适当提示学生从原料的选择上考虑、加样如何操作。

可采用浓度较高的模板, 实验引物的设计要根据模板DNA决定, 通过Primer Premier软件设计特异性较强的引物, 保证目的基因的PCR扩增成功进行。一般用琼脂糖凝胶电泳技术对PCR扩增产物的检测, 只有产物浓度到达一定限制才能有较为明显的电泳结果, 实验中可适当增加加样液体积。

## (3) 预设实验

A. 总DNA的提取 购买大肠杆菌 $K_{12}$ 磷酸酶DNA试剂盒。

B. PCR扩增 将PCR反应体系中的各物质混合后, 放入PCR仪扩增, 得到一组扩增产物。

C. 实验试剂的分装 实验试剂的体积量较小, 价格较贵, 为了避免浪费, 需在实验前将材料分装完 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。(学生思考: 将实验试剂分装后为什么需要 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存?)

因为PCR反应中用到了酶,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存防止酶失活。

D. PCR仪设置好参数(30-40个循环)并提前预热。学生在此过程中学会预测PCR反应时间(如让学生计算进行30个循环

结束需要多长时间? 如1个模板循环30次后, 能扩增出多少个目的基因DNA片段?)

$$(30+30+30) \times 30 \div 60 + 5 + 10 = 60\text{min} \quad 2^{30}\text{个}$$

## E. 实验操作

按照试剂盒中的反应体系, 依次将对应试剂加入0.2ml PCR反应管, 混合均匀后将PCR反应管放入预热好的PCR仪中, 启动程序。

将扩增的PCR产物先进行加染料染色, 电泳槽中加入对应缓冲液, 将胶板放入电泳槽, 第一个点样孔加入同体积的DNA marker, 再加样, 连接好设备, 设置好参数, 开始电泳。(思考: 为什么缓冲液要高于胶板2mm左右, 以保证胶板完全浸入?)

教师给出资料: 凝胶电泳成像原理。

学生阅读后理解原因是要在缓冲液中形成闭合回路。

## (4) 分析实验结果

教师给出实验室已完成的电泳条带标本, 学生观察条带并思考回答以下问题, 检测学习效果:

①扩增出的目的基因DNA片段一定与模板一模一样吗?

②设计的引物是否有可能与非目的基因DNA片段结合, 还是只能与目的基因DNA片段结合?

教师适时给出提示, 引导学生回答出: 可通过设计引物和退火温度使得引物只能与目的基因DNA片段结合。

③学生课后查阅资料: 如何根据电泳条带, 确定最终获得的DNA片段是所需的目的基因?(如目的基因片段长度为720bp)

## 第五部分、心得与感悟

PCR扩增和电泳技术属于现代分子生物学技术。如果教师只靠课堂上的理论讲解, 学生很难深刻理解其含义。在改进理论教学策略后, 将一部分实验前准备工作、实验设计思路放在PCR实验理论教学中, 增强课堂丰富性和趣味性的同时, 也给予学生切身体会实验部分操作流程的锻炼机会。整体的教学内容难度也比仅仅理论教学加深了, 学生的科学思维能力也得到训练, 并且整个教学过程的需要师生协作、生生合作, 学生的协作能力也得到训练。与此同时, 学生对于这部分内容的掌握也不再生涩, 而是在实验前准备教学的过程中实际操作了部分实验过程, 整个教学过程中穿插适时的问题让学生边学边思考、边做边思考, 对PCR实验内容的掌握更透彻。

## 参考文献

[1] 杨佩娟. “利用PCR技术来扩增目的基因”教学的思考[J]. 生物学教学, 2009, 34(05): 22-23

[2] 黄建华. 对高中生物学课本中PCR技术的几点思考[J]. 生物学教学, 2008(03): 72-73.