

高等院校农林专业基因工程实验教学改革探索与实践

段永波, 赵丰兰, 宋运贤, 盛 玮, 薛建平 (淮北师范大学生命科学学院, 资源植物生物学安徽省重点实验室, 安徽淮北 235000)

摘要 针对基因工程实验课程基于分子水平操作难以获得较好教学效果的问题, 利用报告基因, 以基因表达框的启动子和目的基因 2 个重要元件为切入点, 在有限的教学课时内完成克隆真核生物基因启动子和报告基因并成功实现了报告基因在真核细胞中的表达。以此改变该课程主要以验证为主, 且实验结果主要以单一的酶切图谱形式展示而不够直观的问题, 进而提高了教学效果。

关键词 基因工程实验; 启动子; 报告基因; 生菜瞬时表达

中图分类号 S-01 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)35-12780-02

Exploration and Practice of Genetic Engineering Experiments for Students in Agriculture and Forestry Colleges

DUAN Yong-bo, ZHAO Feng-lan, SONG Yun-xian et al (Key Laboratory of Resource Plant Biology of Anhui Province, College of Life Sciences, HuaiBei Normal University, HuaiBei, Anhui 235000)

Abstract Focusing on the trouble in getting satisfied teaching effectiveness in the course *Genetic Engineering Experiments*, we employed reporter gene in our teaching design. With two elements promoter and target gene required in any cassette as beginning point, we make the cloning of promoter and reporter gene and its expression in eukaryotic cells in limited class hours. It changed the previous teaching style of mainly for confirmation, and successfully overcame the shortages of nonintuitive presentation of experimental results singly by enzymatic pattern, improving the teaching effectiveness.

Key words *Genetic Engineering Experiments*; Promoter; Reporter gene; Transient expression

作为生命科学的重要组成部分, 基因工程与细胞工程、酶工程和蛋白质工程在分子、细胞、酶学、蛋白水平共同组成了现代生物工程。其通过将所需的生物遗传物质——脱氧核糖核酸(DNA)从供体生物分离出来, 用适当的限制性内切酶进行切割后连接至表达载体, 将重组质粒导入受体细胞并整合至其基因组, 使得目标基因在受体细胞内复制、转录和翻译, 进而发挥其功能。自上世纪 70 年代诞生以来^[1], 基因工程已广泛应用于医学、农业、工业和环保等各领域, 在推动现代生命科学的发展中发挥了非常重要的作用。

目前, 基因工程已作为生物科学和生物工程专业的一门核心专业基础课, 在综合性大学、农业大专院校、师范和医科大学等各类高校陆续开设。该课程的整条主线都是基于 DNA 水平的操作, 基本属于“无实物”教学, 给课程学习带来了很大难度。因此, 基因工程实验就成了非常必要的辅助课, 也是引导学生将理论知识应用于实践, 培养科学分析思维能力和创新能力的一门方法学课程。因其要求学生具备生化及分子生物学基本知识和操作技能, 单个试验中间有时间间隔, 实验周期较长, 涉及昂贵仪器和试剂的使用, 给课程教学带来很大挑战。

传统的基因工程实验技术教程主要集中于基因克隆与重组质粒的构建与验证^[2], 所开设实验常涉及一整套该课程实验技术, 包括培养基配制和高压灭菌等常规实验。原来该课程教学目的主要是验证基因工程操作原理, 在创新研究方面的内容不多。此外, 验证性的实验结果难以带给学生创造性的“成就感”, 实验过程多是填鸭式的被动完成。这会导致学生完全机械性地“做实验”, 以致教学效果不佳。为提高教

学效果, 培养实践技巧和科学思维能力, 针对高等院校农林专业特点, 笔者将系统工程与模块化设计相结合, 应用于该课程教学并取得很好的教学效果。

1 课程建设思路与设计

该课程在淮北师范大学主要针对师范专业学生开设, 多数学生在毕业后将从事高中生物教学。近年来, 基因工程及分子生物学实验设计在高考中占有非常重要的地位。在开设此门课程之前, 学生已经累积了微生物学、遗传学、分子生物学等课程及其相应的实验技术。因此, 该课程建设旨在保证学生在完全理解基因工程内涵的基础上, 进一步培养学生的科研态度和创新思维。

该课程仅保留基因工程实验课程中“分、切、接、转、筛”的经典内容^[3], 在有限的课时内完成了从目的基因克隆到载体构建过程, 并实现所构建载体在植物中表达的整个过程。基于传统实验课程中所获结果直观性不强的缺点, 笔者在教学中引入了启动子、报告基因和终止子 3 个元素, 通过从植物基因组 DNA 中克隆启动子、相关质粒中扩增报告基因连接至表达载体, 并实现其在植物细胞中表达, 让学生完成从基因水平到蛋白表达水平整个过程, 同时检测报告基因表达, 直观地感受实验的魅力, 提高教学效果。

整体实验流程设计划分为 3 个相对独立的模块, 每个模块都可独立考核, 其后也能放置较长时间至下一个实验(图 1)。整个课程中学生将完成基因表达所需元件中启动子和基因的功能分析。同时, 以水稻或玉米 2 中植物作为实验材料克隆启动子, 还提供含 β -1,4 糖苷酶 *gus* 的大肠杆菌供克隆报告基因^[3]。让学生提前查询资料熟悉引物设计的原则及方法, 亲自设计 PCR 引物(包括在引物末端添加酶切位点), 掌握报告基因 *gus* 作用机理, 并根据自身兴趣选择实验材料, 进而提高其完成实验的主动性。

2 教学方案实施

笔者以基因表达框为出发点, 以报告基因为研究对象,

基金项目 安徽省教育厅高校自然科学基金重点项目(KJ2014A226); 资源植物生物学安徽省重点实验室开放项目(ZYZWSW2014001); 淮北师范大学细胞生物学精品课程建设项目。

作者简介 段永波(1981-), 男, 贵州贵阳人, 讲师, 博士, 从事植物分子生物学教育研究。

收稿日期 2014-11-06

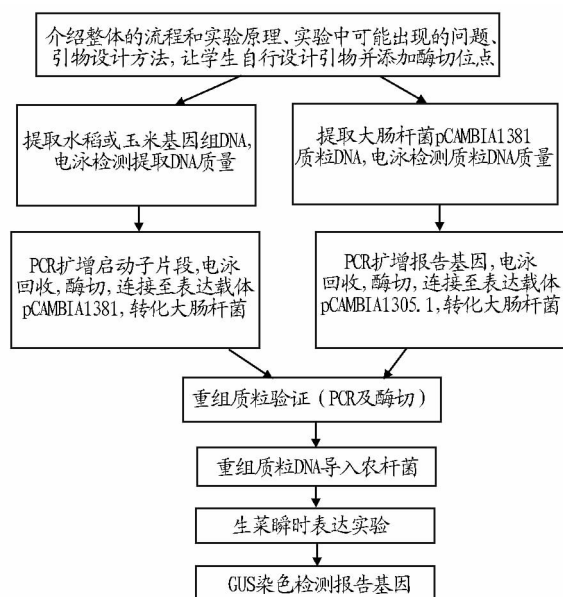


图1 整体教学设计流程

改变了传统基因工程实验课程中实验结果主要以电泳图谱的单一形式呈现的缺点,将实验最终结果以报告基因在植物细胞中的表达检测来呈现。同时,将系统工程和模块化设计思路引入课程教学,形成整个课程于一个完整实验,又将其划分为3个独立模块,既提高了学生对实验的兴趣,又解决了实验课时间安排的难题。采用小班教学模式,分2人一小组,保证师生间充分交流及学生对实验的充分理解。

在介绍实验整体流程时,根据实验内容创造问题情景,引导学生实验前查询所设置问题可能出现的原因及解决办法。比如:研究水稻及玉米等作物基因工程技术的目的、意义及发展方向,报告基因 *gus* 作用机理,电泳中 EB 染色原理,基因克隆及载体构建过程中的难点,农杆菌介导基因转化植物细胞的原理等。

整个实验课程均始终贯穿以学生为主,教师为导的教学思想。目前表达载体构建中质粒 DNA 提取、酶切、连接等操作都有相应的试剂盒,因此将课程重点由原来的克隆验证转到从目标基因克隆直至在真核细胞中的表达上。

在开始各实验单元模块前,介绍实验原理及操作步骤,同时引出相应的问题供学生讨论。在目的基因 PCR 扩增实验中,引导学生对其所选植物研究意义进行讨论,最后教师总结,指出采用基因工程技术改良玉米和水稻等重要农作物对保障人类粮食安全的重要意义。同时在 PCR 和酶切实验间歇增加了电子克隆知识介绍、引物设计方法以及如何通过酶切位点实现基因工程中的“剪切—拼接”过程,采用多媒体展

示现代生物学知识发展的日新月异。这样即可将学生兴趣、理论知识和实践很好地结合,使学生加深对实验的理解,提高教学效果。

笔者以表达报告基因 *gus* 为目标,让每组同学都克隆启动子和目的基因这2个表达框中的重要元件,并在生菜中瞬时表达。提供给学生由笔者构建的含有 *gus* 但无启动子的载体 pCambia1381,以及有 CaMV35S 启动子但不含报告基因的载体 pCambia1305.1。将所构建的启动子及报告基因功能分析的载体导入农杆菌,瞬时转化生菜,会得到2组对照载体及上述所构建载体。通过报告基因表达分析会得出这样的结果:只有启动子或报告基因都不能表达,必须要2个元件同时存在才能检测到外源基因表达。结合实验过程中介绍的基因内含子及表达框中终止子功能,学生即可直观地理解基因表达框中各个元件的作用。

鼓励学生以科技论文的形式完成实验报告,包括题目、作者姓名、摘要、引言、材料与方法、结果与分析、讨论、参考文献等内容,重点注意结果分析与讨论部分,以此加深对实验的理解。强调实验报告是课程考核的重要部分,实验操作完成不够理想的学生也可以在此环节获得好成绩。

3 结语

基因工程实验课程涉及实验内容多、周期长、实验结果感官性不强,给学生和教师都带来了很大挑战。笔者以基因表达框为基础,引入启动子和报告基因2个元件,不仅让学生同时完成2个元件的克隆及其各自在基因表达中的作用,还避免了外源蛋白检测所需的蛋白抽提和 Western blot 等复杂且不易控制的操作。课程完成后,采用双向选择的方式引导学生参与基因工程技术方向的毕业设计与实践。很多学生将该课程所学知识应用到毕业论文中,也培养了学生的科学思维方法。

基因工程技术更新极快,但每项技术发明后生物技术公司就会在很短时间内研制并发布相应操作规程,因此未来基因工程实验技术的主要目标应该转向培养学生的创新创造能力。在今后课程改革中,笔者将尝试以科研课题为载体,进一步加深基因工程实验课程与学生毕业论文设计的结合,拓宽学生科研思维,以助于其今后从事教学、科研等工作。

参考文献

- [1] JACKSON D A, SYMONS R H, BERG P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40; circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli* [J]. PNAS, 1972, 69(10): 2904–2909.
- [2] 盛小禹. 基因工程实验技术教程 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 1999.
- [3] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.

(上接第12779页)

参考文献

- [1] 张顺岭, 倪飞. 我国农村剩余劳动力转移的现状、特征与对策 [J]. 科技进步与对策, 2004(11): 79–81.
- [2] 贾先文, 黄正泉. 制度倒逼下产业结构升级与农村劳动力转移困境 [J]. 现代经济探讨, 2008(8): 62–66.
- [3] 郑慧娟. 我国新生代农民工转移、就业的主要特点和趋势 [J]. 农业现

代化研究, 2011(4): 409–412, 417.

- [4] 李培林, 李炜. 农民工在中国转型中的经济地位和社会态度 [J]. 社会学研究, 2007(3): 1–17, 242.
- [5] 黄锬, 楚瑞. 农民工职业技能培训的现状、特征与对策 [J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2008(4): 51–53.
- [6] 四川省社会科学院课题组. 关于“用工荒”的形势判断及应对策略 [J]. 农村经济, 2010(5): 3–6.