

利用定量 PCR 进行哺乳动物基因表达检测的基因工程实验课程设计

娄慧玲^{1, 2}, 吴燕华^{1, 2}(✉)

1. 生物科学国家级实验教学示范中心(复旦大学), 上海, 200433
2. 复旦大学生命科学学院, 上海, 200433

摘要: 定量 PCR 是现代分子生物学研究领域的常用技术。本文将定量 PCR 引入到基因工程实验中, 通过课题式的内容设计、线上线下相结合的教学方法开展教学实践, 帮助本科生在掌握定量 PCR 实验原理与操作流程的基础上, 增强实验设计、技术操作、数据分析和科学作图的能力, 进而提升科学研究素养。论文介绍了定量 PCR 应用于基因工程实验课程的教学设计思想、实践过程、教学效果与学生反馈, 可为新时代生物学相关实验教学改革提供案例与思路。

关键词: 定量 PCR, 基因工程实验, 教学改革, 研究能力

Genetic Engineering Experimental Design for Gene Expression Detection of Mammalian Cells by Quantitative PCR

LOU Hui-ling^{1, 2}, WU Yan-hua^{1, 2}(✉)

1. National Demonstration Center for Experimental Biology Education, Fudan University, Shanghai 200433, China
2. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

20 世纪 70 年代以来, 基因工程作为自然科学领域发展最迅速、发展潜力最大的前沿学科之一, 在工业、农业及医疗卫生等领域有着广泛的应用。基因工程实验技术成为生物学领域最重要的实验技术之一, 是生物学从业者必备的技术^[1-2]。因此, 大多数高校的生物类专业都将基因工程实验课程纳入

本科生培养计划^[3]。复旦大学基因工程实验课程的授课对象为大三和大四的高年级本科生, 旨在使学生在掌握各项实验技术的基础上, 培养严谨专业的科研素养与创新的学术能力。为此, 课程组充分利用现代分子生物学研究中的先进技术, 围绕目的基因的获取、重组构建、表达分析与功能研究等内容搭建了新的基因工程实验课程内容体系, 并开展线上线下相结合的教学设计与实践, 取得了良好的教学效果^[4-5]。

但在近年的教学实践中, 我们发现学生们还存在重技术轻设计、重结果轻分析, 习惯被动接受操作训练而不适应主动进行课题设计等问题。如何让

收稿日期: 2022-09-27; 修回日期: 2022-12-22

基金项目: 复旦大学教材建设重点研究基地建设项目(FD2020G003); 复旦大学本科教学研究与改革实践项目(课程思政)(FD2018D112)

通讯作者: 吴燕华, E-mail: yanhuawu@fudan.edu.cn

学生通过实验课程的学习，将关键实验技术熟练应用于未来的课题研究中，培养学生的研究能力和创新素养，成为了实验教学改革的新课题。为此，课程团队在过去两年的实践中，以定量 PCR 技术为例，进行了一系列教学改革实践。

定量 PCR (quantitative polymerase chain reaction, qPCR), 又称实时定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR), 被广泛应用于 DNA 或 RNA 的绝对定量分析、基因差异表达分析和基因分型等研究^[6-7], 具有快速、灵敏、特异性强、污染少且能实时监测等优点^[8-10], 通常是在 PCR 反应体系中加入荧光物质, 并对 PCR 反应进程中的荧光信号强度进行实时监测。该方法可以直接对实验数据进行分析而不需要提前分离 PCR 产物^[11-14]。在不同的操作方法中, SYBR Green 荧光染料掺入法最为常用, 这一方法具有设计简单、可快速优化, 成本低等优点^[15], 因此常被选用在本科生实验课程中。

在基因工程实验的课程改革中, 课程组首先将定量 PCR 技术引入基因工程实验下游的基因表达分析模块, 再系统训练学生定量 PCR 实验操作技术, 然后设计与定量 PCR 技术实际应用相关的教学活动, 培养学生利用基因工程核心技术设计实验和解决研究问题的能力, 进而培养学生的创新思维、实践能力和科学规范意识。

1 基因工程实验课程的教学设计与实践

1.1 “课题式”的实验内容设计

为了将定量 PCR 技术充分融入基因工程实验课程, 课程团队设计了“利用定量 PCR 技术分析目的基因在细胞盲样中的表达水平”的子课题。课题要求学生通过 RNA 抽提、反转录和定量 PCR 这一系列

连续的实验内容分析 3 株细胞盲样中 *EGFP* 基因在 mRNA 水平的表达差异, 通过绝对定量法对 *EGFP* 在不同细胞株中的绝对表达量进行计算分析, 再通过相对定量法对 *EGFP* 在不同细胞株中的相对表达量进行计算分析。其次, 实验流程主要包括利用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA、利用反转录试剂盒制备 cDNA、利用 *Taq* 酶扩增内参基因 *ACTB* 检测 cDNA 质量, 再利用 SYBR Green 试剂盒进行定量 PCR。绝对定量中选取实验室自制的 *EGFP* 基因片段作为标准品, 相对定量中选择 *ACTB* 作为内参。总 RNA 提取和质检、反转录和质检约 8 课时, 定量 PCR 约 8 课时。最后, 采用小组协作的方式 (2 人 1 组) 内部共享实验设备、试剂和耗材, 并在实验过程中互帮互助、交流讨论。实验材料为每人 1 份, 每位学生独立完成实验。

1.2 “混合式”的教学设计

课程组采用线上实验理论学习与线下实验操作训练结合的混合式教学方法授课 (图 1)。课前, 学生登录课程网站独立完成动态开放的在线资料学习, 包括讲义、视频及自测题等。课上, 在教师和助教的讲解与指导下, 学生进行具体实验操作练习、结果观察和数据分析, 并详细记录实验过程, 总结实验经验。课后, 学生线下完成实验记录, 线上完成相应的数据分析与作图作业, 在规定时间内提交。

1.3 “开放式”的课程实践环节

课程实践环节中定量 PCR 的操作涉及两个部分: 相对定量 PCR 和绝对定量 PCR。相对定量 PCR 中, 学生需要根据内参基因 *ACTB* 和目的基因 *EGFP* 在不同样品中的扩增情况, 根据融解曲线检验扩增产物的特异性, 再通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算出表达差异倍数

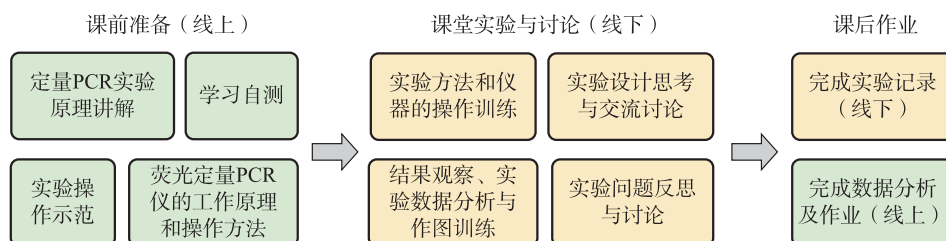


图 1 定量 PCR 实验教学设计流程图

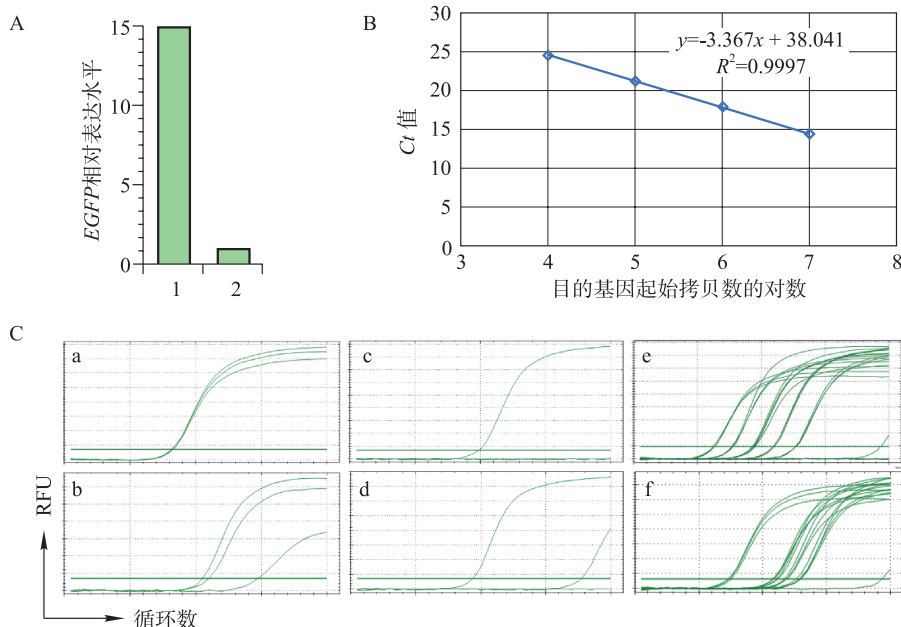


图2 定量 PCR 实验的代表性结果

A. 利用相对定量 PCR 方法分析表达 *EGFP* 基因的 1 和 2 克隆的相对 *EGFP* 表达水平；B. 利用绝对定量 PCR 方法绘制 *EGFP* 基因的标准曲线；C. 定量 PCR 实验中学生的常见问题（a. 正常的技术重复；b. 异常的技术重复；c. 正常的阳性对照和阴性对照；d. 正常的阳性对照和不理想的阴性对照；e. 正常的梯度稀释；f. 异常的梯度稀释）

(图 2A)。绝对定量 PCR 中，学生需要利用 *EGFP* 基因的标准品进行梯度稀释后和待测样品进行定量 PCR 扩增，然后先制作标准曲线，获得扩增效率后，再代入待测样品的 *Ct* 值计算相应的绝对浓度（图 2B）。在线下授课过程中，教师在充分给予学生理论和技术指导的过程中，让每一位学生独立思考和动手实践，并要求他们及时记录操作过程和中间数据。教师汇总实验过程和各组结果之后，带领学生们一起归纳，发现的常见问题包括：①标准品梯度稀释度不准确；②技术重复性差；③ PCR 体系存在污染等（图 2C）。

2 “以学为中心”的教学活动设计

定量 PCR 实验灵敏度高，操作中的“毫厘差错”往往会导致实验结果的“千里谬误”。定量 PCR 的数据是实时记录的，便于发现实验中可能出现的问题。定量 PCR 分析过程相对复杂，需要借助一些统计学方法。因此，我们认为定量 PCR 实验是生物学实验教学的良好案例，能够培养严谨的实验态度，能够利用该实验教学引导学生从自己的真实实验结果中发现问题、分析问题并提出解决问题的方案，还能

够训练学生形成科学的思维方法，提升研究能力。课程团队为此专门开展了以下 3 方面的教学活动。

2.1 线上作业引入案例分析，引导学生独立思考

教师利用线上教学平台，围绕实验中出现的异常案例设计作业题目（如对往年学生的代表性实验结果进行评价并给出原因、分析文献中定量 PCR 实验的实验设计方法与结论的计算过程等），引导学生复盘实验过程、积极查阅文献、思考产生异常实验现象的原因和解决办法。线下课程中，教师根据学生答题结果进行异常案例分析，讨论规避相同错误的方案。

2.2 线下组织学生互评，改进实验方案提升实验结果

教师利用线下课堂，针对本班实验结果，组织学生进行组间讨论与互评，引导学生自主探索定量 PCR 实验中的关键问题，如阴性污染、梯度稀释错误、技术重复不佳、错用模板等。学生通过讨论，提出针对性纠错实验设计，并在教师的引导下完善

实验方案，利用实验室开放时间依照新的实验方案重复实验，获得提升。

2.3 引入量规，规范科学研究的态度与方法

考虑到定量 PCR 中数据分析和科学作图的重要性，也针对学生们在结果和讨论中图表作图不规范的问题，课程团队在定量 PCR 的评分中引入评价量规^[16]，细化图表绘制的各评分项、明确完成度要求，以评促学，使学生能够做到规范处理数据、科学作图、表意清晰、格式标准，充分训练其科学研究的基本素质。

3 教学效果分析

为了进一步巩固并考查学生们独立开展定量 PCR 实验的能力，课程团队在学期末安排了 1 项独立实验，要求学生利用相对定量 PCR 的方法检验教师随机发放的另外 3 个细胞盲样中不同目的基因的表达水平。整个实验过程必须由学生独立完成，包括实验路线设计、实验操作与数据分析、报告撰写等全部过程。近 3 年的考核结果表明，每学期约 91% 的学生能够准确完成实验设计（仅有 9% 的学生需要教师给予一定指导方能完成），约 87% 的学生可 1 次就取得理想的实验结果（仅有 13% 的学生需要重复操作才能取得理想结果）。在提交的综合实验论文中，学生的“实验结果和讨论”均书写规范，图表标题、图注格式、图片剪裁及信息标注的规范性都有长足的进步。考核实验的结果说明改革后的教学方法有效提升了学生的学习成效，使他们具备了一定的独立开展基因工程实验的研究能力。

4 教学评价

课程团队从技术掌握程度、科研素质的培养和提高、对实验内容的改进建议等方面设计了一套调研问卷。问卷结果显示，在实验课之前，八成以上的学生没有定量 PCR 技术的操作经验，其中 38% 的学生完全没有接触过定量 PCR 技术。经过实验课训练之后，所有的学生皆认为自己很好地掌握了定量 PCR 技术，其中半数学生认为自己对实验原理的理解更为透彻，对实验技术的掌握更加熟练，在实

验设计（包括实验对照的设置、技术重复的设置等）方面有了很大的提升，学会了如何科学地进行实验数据分析，能够发现一些定量 PCR 实验中存在的问题并提出改进意见，进而将实验课所学技能熟练地运用到科研活动中。在评估哪些教学活动对实验技能提高有帮助时，六成以上的学生认为课前的在线学习与自测很有帮助，而且课后线上作业的完成与反馈非常重要，九成以上的学生认为课堂上教师及时针对实验过程和结果提出的问题和改进建议使之受益，五成以上的学生认为课堂外小组内与小组间的结果讨论分析很有效，八成学生则更看重后续课堂对前序实验结果的复盘和分析。此外，学生普遍认为参照评价量规可以有效弥补自己作图的不足并加以改进。一些学生评价道：“通过定量 PCR 实验的训练和学习，我学会了多种 PCR 的技术和分析方法，能够根据实验原理自己设计一些简单的实验并分析实验结果，为后续科研实验室的学习和实践提供了更系统的理论知识支撑和实验技术基础。”

5 结语和展望

自定量 PCR 引入基因工程实验以来，我们发现，教研结合的实验设计使得学生的学习积极性有了显著提升。在线上线下的授课过程中，为了确保学生接受基础实验技术训练的同时，对科学研究的整体性有更加直观的感受，课程团队改变了过去“实验结果即终点”的教学方式，设计了多阶段、多元化的教学活动，引导学生查阅文献、独立思考、完善实验方案，优化实验结果，有助于学生批判性、创造性思维的培养。教师对学生实验记录、结果与分析讨论的撰写，以及对实验作图格式的严格要求，有助于培养学生良好的实验习惯、科研素质和端正的科研态度，于学生后续的科学研究活动有益，紧紧贴合我校“双一流”研究型大学的建设目标。

定量 PCR 技术在基因工程实验课程中的成功运用可以为生物学实验教学提供一个良好的案例与思路。随着教学实践的深入与教学经验的积累，我们将努力把更多先进的生物学技术融入到实践教学，设计更加实用、多样的教学活动，搭建更为便利的教学平台，为培养研究型人才不断提升教育质量。

参考文献

- [1] 吴乃虎. 基因工程原理 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2018.
- [2] 曾驰. “基因工程实验”教学改革实践与体会 [J]. 科教导刊: 中旬刊, 2020 (2): 128-129.
- [3] 朱常香, 王芳, 李滨, 等. 一体化生物技术专业实验课程体系的构建与实践 [J]. 实验室科学, 2016, 19 (3): 76-78.
- [4] 娄慧玲, 杨熙, 尚凌月, 等. 以“学”为中心的基因工程实验混合式教学设计与实施 [J]. 生物工程学报, 2021, 37 (8): 2956-2966.
- [5] 吴燕华, 郭滨, 娄慧玲, 等. 从基因克隆到表达分析——改革基因工程实验课程的实践与体会 [J]. 遗传, 2012, 34 (2): 248-252.
- [6] 徐丽华, 刘春雷, 常玉梅, 等. 双标准曲线相对定量 PCR 试验原理与方法 [J]. 生物技术通报, 2011 (1): 70-75.
- [7] 李丽, 赵成萍, 李宏, 等. 质粒制备绝对定量 PCR 标准曲线方法的建立 [J]. 农业生物技术学报, 2011, 19 (6): 1157-1162.
- [8] 安钢力. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用 [J]. 中国现代教育装备, 2018 (21): 19-21.
- [9] 赵玉红, 李欣, 赵立青, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在实验教学中的应用 [J]. 实验室研究与探索, 2018, 35 (4): 61-64.
- [10] DORAK M T. Real-time PCR [M]. New York: Taylor & Francis, 2007.
- [11] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. Nature Protocols, 2008, 3 (6): 1101-1108.
- [12] KUBISTA M, ANDRADE J M, BENGTSSON M, et al. The real-time polymerase chain reaction [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2006, 27 (2-3): 95-125.
- [13] 杨怡姝, 孙晓娜, 王小利, 等. 实时荧光定量 PCR 技术的操作实践 [J]. 实验室研究与探索, 2011, 30 (7): 16-19.
- [14] 靳溪, 薛秀花, 李洁, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在发育生物学实验 [J]. 实验室研究与探索, 2014, 33 (7): 214-217.
- [15] NAVIDSHAD B, LIANG J B, JAHROMI M F. Correlation coefficients between different methods of expressing bacterial quantification using real time PCR [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13 (2): 2119-2132.
- [16] 杨鲜梅, 陆红, 何正平, 等. 基于评价量规的实验报告新评估模式 [J]. 高校生物学教学研究 (电子版), 2019, 9 (3): 37-42.

(责编 靳然)