

遗传学实验教学的前沿拓展 ——等温扩增技术和微流控芯片技术的引入与思考

赵雪莹^{a,b}, 李梦欣^b, 卢大儒^b, 乔守怡^{a,b}, 皮妍^{a,b}

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



摘要: 现代遗传学学科与技术的飞速发展对本科生遗传学实验教学提出了更高的要求。探索如何将新知识、新技术、新案例引入传统的实验教学课程正成为当前教学改革的重要方向。等温扩增技术是经典的聚合酶链式反应技术的拓展和延伸,具有极强的应用性。基于等温扩增的微流控芯片核酸检测技术现已广泛应用于转基因鉴定、病原体鉴定等核酸检测工作中。将基于环介导等温扩增的微流控芯片核酸检测技术快速鉴定转基因材料实验作为遗传学实验教学新案例,能够在拓展学生前沿视野的同时,大大激发学生探索科学的兴趣,培养学生的创新精神和解决实际问题的能力。该实验实施以来,深受学生欢迎,取得了较理想的教学效果,有利于后期进一步实践与推广。

关键词: 遗传学实验; 环介导等温扩增; 微流控芯片; 转基因材料鉴定

中图分类号: Q 3-3 文献标志码: A

文章编号: 1006-7167(2022)06-0248-04

Frontier Expansion of Experimental Teaching of Genetics ——Introduction and Feedback of Isothermal Amplification Technology and Microfluidic Chip Technology

ZHAO Xueying^{a,b}, LI Mengxin^b, LU Daru^b, QIAO Shouyi^{a,b}, PI Yan^{a,b}

(a. National Demonstration Center for Experimental Biology Education; b. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: The rapid development of modern genetics disciplines and technology has put forward higher requirements for undergraduate genetics experimental teaching. Introducing new knowledge, new technology, and new cases into traditional experimental teaching courses has become an important direction of current teaching reform. Isothermal amplification technology is an expansion and extension of the classic polymerase chain reaction (PCR) technology, and has strong applicability. The microfluidic chip based on isothermal amplification has been widely used in nucleic acid detection such as transgenic detection and pathogen identification. The rapid identification of genetically modified materials experiment based on microfluidic loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology is used as a new case of genetics experimental teaching, which can greatly stimulate students' interest in exploring science and cultivate students' innovative spirit and ability to solve practical problems. Since the implementation of the experiment, it has been well received by students and achieved satisfactory teaching effects, which is conducive to further practice and promotion in the later period.

Key words: genetic experiment; loop-mediated isothermal amplification; microfluidic chip; detection of genetically modified materials

收稿日期: 2021-08-28

基金项目: 复旦大学本科教学研究及改革实践项目(课程思政, FD2021E002 / FD2021E003 / FD2021E004)

作者简介: 赵雪莹(1986-),女,湖南长沙人,博士,实验师,研究方

向为分子遗传学。

Tel.: 021-65643037; E-mail: xueying_zhao@fudan.edu.cn

通信作者: 皮妍(1979-),女,江西宜春人,博士,高级讲师,研究方向为分子遗传学。

Tel.: 021-65642425; E-mail: yanpi@fudan.edu.cn

0 引言

随着现代生物技术的飞速发展,基因科学越来越广泛而深入地影响了人类的生活与健康,带来了社会对生命科学人才培养的全新要求。遗传学实验课程是生物专业本科生的必修课程之一,如何通过课程内容的精心设计,将新技术、新方法、新思维与经典的遗传学实验教学相结合,聚焦当今社会技术热点,通过新案例的学习拓展学生的知识面,开启学生的创新思维,培养学生从生活中发现问题、分析问题、解决问题的能力,和理论联系实际的能力,值得每一名教学工作者深入思考和探究。

传统的分子遗传学实验课程通常以经典的聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)实验作为典型教学案例,传授学生现代生物技术的基础知识及基本原理。近年来基因技术迅猛发展,PCR技术在原有基础上获得了极大拓展和延伸。其中,等温扩增技术因其特异性强、灵敏度高、操作简便、耗时短、场地及设备要求低等特点^[1-2],较之PCR技术在实际应用中具有极大的优势。研究人员将其与经典的微流控芯片技术相结合,开发出核酸现场快速检验方法,已广泛应用于转基因材料鉴定、病原微生物的快速检测等方向,成为生物技术造福于人类生活的经典案例^[1-4]。

在近年的遗传学实验课程教学中,笔者选取转基因材料鉴定这一社会热点问题,设计以基于环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术的微流控芯片核酸检测技术快速鉴定转基因材料实验作为教学案例,将等温扩增技术和微流控芯片核酸检测技术引入遗传学实验教学,作为经典PCR技术的教学延伸,在拓展教学内容的深度与广度的同时,引导学生关注技术的前沿发展,激发学生探索科学的兴趣,培育学生的创新能力和科研素质。

1 技术原理

1.1 环介导等温扩增技术原理

LAMP技术是一种新型的核酸扩增方法,其基本原理在于,通过对目标基因的6个区域设计4种特异性引物,利用*Bst* DNA聚合酶的链置换活性,在60~65℃恒温环境中进行循环置换合成,可在15~60 min完成 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍核酸扩增^[2,5-7]。与经典的PCR技术相比,LAMP技术具有灵敏度高、特异性高、反应设备要求低、速度快等优势,如表1所示^[6-7]。

目前,我国已发布并实施了针对出口食品中转基因产品的出入境检验检疫行业标准——SN/T3767 出口食品中转基因成分环介导等温扩增检测方法(第3-30部分),规定了12个转基因玉米品系、5个转基因大豆品系、8个转基因水稻品系、1个转基因小麦品系、

表1 LAMP技术和普通PCR技术特点比较

	LAMP	PCR
灵敏度	高,可达fg级	pg级
特异性	高,6个区域、4个引物匹配	2个区域、2个引物匹配
反应条件	恒温65℃	必须要有热循环
反应时间	30~60 min	> 1 h

1个转基因甜菜品系及1个转基因油菜品系的检测方法^[8-11]。LAMP技术因其优点突出,成为了目前转基因产品快速检测的重点发展方向。

1.2 微流控芯片核酸检测技术原理

微流控技术是一种在微纳米级别的空间内精确操控微尺度流体的新兴技术,能够将生物或化学样品的整个反应和分析过程的基本操作集成在一片由微结构和微通道构成的芯片上,通过对微流体的精确控制,实现样品的自动化检测和分析^[12-13]。与传统的检测方法相比,微流控芯片体积小、操作简便、耗样量少、检测成本低、设计灵活,已经发展成为一个生物、化学、医学、材料学、机械、电子等多学科交叉的崭新研究领域^[14]。

微流控芯片具有高度集成化的优势,能够减少检测反应对实验场地与大型仪器的依赖性,而基于LAMP的核酸检测技术仅需简单控温装置即可实现对目标核酸高灵敏度的检测。微流控芯片与LAMP技术相结合,通过开发小型便携化的核酸检测装置,能够极大地简化操作、节约时间和样本,且反应灵敏、特异性强,在食品检测、病原微生物检测、转基因检测等方向均具有较好的应用前景^[15-16],用于实验课程教学案例中,既具有较强的可操作性,也具有很好的现实意义。

2 教学方案设计

转基因大豆MON89788是由孟山都远东有限公司研发的抗除草剂草甘膦大豆品种,我国农业部于2013年批准其进口用作加工原料。实验中,将转基因大豆MON89788为实验对象,利用基于LAMP的微流控芯片核酸检测技术对MON89788及对照的非转基因大豆进行检测,建立转基因检测的实验课程教学案例。通过该实验教学,传授学生等温扩增技术、微流控芯片技术及转基因检测技术等前沿知识,引导学生了解前沿科技,激发其探索科学问题的兴趣。

实验安排在遗传学实验课程的最后一次进行。首先,对转基因及非转基因大豆粉末进行核酸提取,获得待测样本的基因组DNA后,将预设好的转基因大豆MON89788品系特异序列引物和通用的大豆内源基因引物分别与荧光染料混合,加至微流控芯片的引物孔中,完成引物预处理;然后,配置LAMP反应液,并加入待测样本DNA,混合后加至微流控芯片的反应孔中,

将芯片置于等温扩增微流控芯片反应仪,实时收集扩增反应的荧光值;最后,导出荧光数据,完成数据分析及实验报告。

实验中每位学生独立完成1份转基因大豆样品的检测;每2人为1小组,小组内共享实验设备及耗材,并在实验过程中交流讨论,互帮互助;每12人为一大组,使用一张微流控芯片完成检测。每一大组完成一次非转基因大豆检测对照实验及以水为检测对象的阴性对照实验。

本次实验课程将等温扩增技术和微流控芯片技术作为一种全新的基因检测方法引入了遗传学实验教学,课程内容包括技术原理讲解、实验操作指导、学生独立完成检测实验、数据分析与处理、问题讨论与反思等环节,鼓励学生发现问题,培养学生科学探索和科学应用的能力,提高学生的创新意识。

3 教学效果

3.1 实验结果

转基因大豆样本的检测结果如图1所示。采用大豆通用引物分别对转基因及非转基因大豆样本进行检测,均取得了较好的扩增结果,荧光强度值在反应7.15 min左右时出现了指数级上升,提示其检测结果为阳性;采用转基因大豆特异性引物分别对转基因及非转

基因大豆进行检测,转基因大豆样本在反应15 min左右时即出现了指数级上升,获得阳性检测结果,而非转基因大豆样本未出现荧光信号的指数级增强,提示检测结果为阴性。

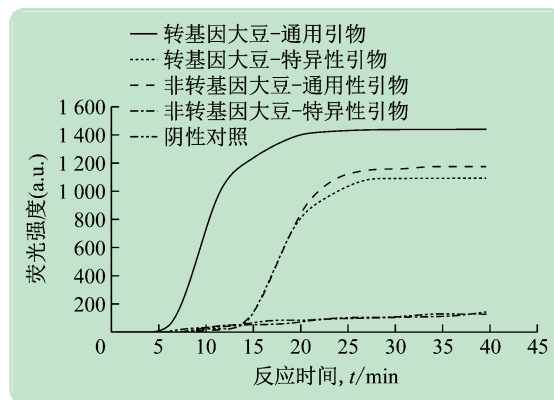


图1 微流控荧光技术快速鉴定转基因大豆实验检测结果

3.2 问卷调查

在连续两年课堂教学的实践之后,通过问卷的形式,针对学生对课堂教学的满意度及知识掌握程度、实验开设的必要性等问题进行了调查与评估,同时收集了学生对实验设计和课堂教学模式的意见与建议。调查结果如图2~3所示。

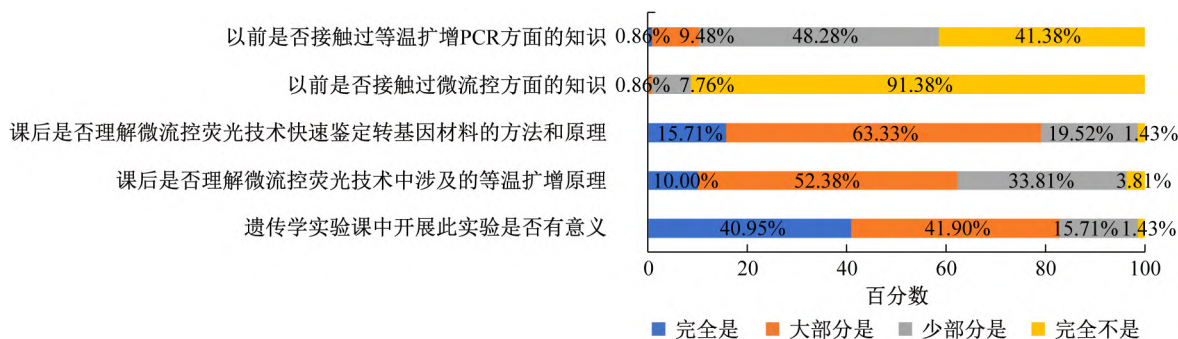


图2 对教学效果调查结果

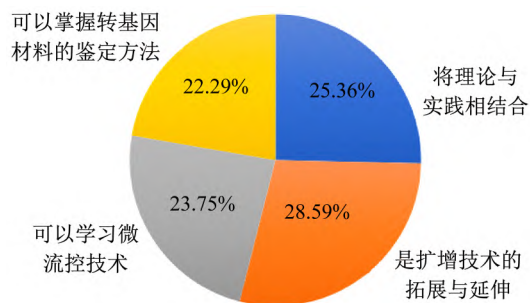


图3 对实验的学习意义调查结果

问卷调查结果显示,针对等温扩增技术,41.38%的学生表示之前从未接触过该技术,48.28%的学生反映仅接触过一点相关知识;针对微流控技术,91.38%的学生表示之前从未接触过相关知识。通过课堂上技术原理的讲解和实际动手实验操作,实验教学达到了

较好的效果,其中79.04%的学生对微流控技术快速鉴定转基因材料的方法和原理有了较好的理解,而对于更深层次的LAMP技术,62.38%的学生能够有较好的理解。对于该实验课程的设置,82.85%的学生认为该实验选题新颖,能够学习到生命科学最前沿的知识和技术,且与日常生活密切相关,应用性很强,实验的开展很有意义。学生也对该实验课程的学习意义进行了肯定,认为在该实验中能够同时学习到微流控技术、等温扩增技术和转基因材料鉴定技术,使课堂知识与实践生活得到了很好的结合。

在课堂教学过程中,学生对该实验表现出了浓厚的兴趣,课堂气氛活跃,讨论热烈,在完成实验任务的同时,也为该实验的课堂教学设计提出一些很好的意见和建议,如希望教师在讲解过程中多增加一些对等

温扩增技术基础原理的讲述,以及进一步提高实验参与度,并希望在等温扩增引物设计、微流控芯片工作原理等方面有更多的了解,学生的积极反馈也为教师后期进一步优化实验设计、提高教学效果提供了很大助力。

3.3 教学成效

微流控芯片核酸检测技术快速鉴定转基因材料实验课程实施两年来,取得了较为理想的教学效果。本实验的设计聚焦社会技术热点,选取转基因材料为实验对象,吸引学生浓厚的兴趣,具有较强的应用性;选取等温扩增技术和微流控芯片技术相结合的微流控芯片核酸检测技术为检测方法,操作简便,反应迅速,有利于课堂教学的顺利实施;等温扩增技术作为经典的PCR扩增技术的拓展和延伸,在实际应用中具有特殊的优势,是技术创新的典型案列,是遗传学教学内容很好的补充,能够帮助学生拓展思路、培育创新精神;微流控芯片核酸检测技术作为生物学与化学、材料学等学科交叉融合的创新成果,同时也是生命科学应用于实际生活的最前沿技术,能够开阔学生的视野,培养学生从实践中发现问题、解决问题的能力。课程实践的初步结果显示,学生对该实验的认可度很高,这有利于后期的进一步实践和推广。

4 结 语

遗传学是一门历史悠远的学科,近年来的发展十分迅猛。在经典的遗传学实验教学课程基础上引入新技术、新方法、新案例,对于提高实验课程的趣味性,充分调动学生学习的积极性,激发学生主动学习的热情,具有极大的意义。在近两年的教学实践中尝试引入微流控芯片核酸检测技术快速鉴定转基因材料实验的案列,获得了学生的高度认可,取得了较好的教学效果。未来将进一步探索新技术与经典遗传学实验教学相融合的教学模式,在传授学科基础知识和基本原理的同时,帮助学生开阔视野,紧跟前沿科技的发展,提升学

生的创新意识和科学素养,培育出更多适应于当代生物科技发展需求的创新型人才。

参考文献(References):

- [1] 何祥鹏,邹秉杰,齐谢敏,等. 基于核酸等温扩增的病原微生物微流控检测技术[J]. 遗传, 2019, 41(7): 611-624.
- [2] 刘旺,靳晶豪,陈孝仁. 环介导等温扩增技术的应用进展[J]. 生物技术进展, 2021, 11(2): 128-135.
- [3] 李博,邹秉杰,马雪萍,等. 用于新型冠状病毒检测的核酸等温扩增技术研究进展[J]. 病毒学报, 2021, 37(1): 191-200.
- [4] 梁晋刚,徐俊锋,焦悦,等. 转基因作物快速检测技术进展与展望[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(21): 71-74.
- [5] 张曼,刘宝林. 环介导等温扩增技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 6124-6130.
- [6] 谢佳芮,寇美玲,苗海生. 环介导等温扩增技术的最新研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(2): 119-125.
- [7] 王静,许鑫,王雪雨,等. 环介导等温扩增技术检测食品安全的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(11): 84-91.
- [8] 郭丹,匡佩琳,张威,等. 转基因食用农产品的快速检测方法[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(11): 3398-3407.
- [9] 梁晋刚,杜再慧,黄春蒙,等. 环介导等温扩增技术在转基因作物成分检测中的应用[J]. 中国油料作物学报, 2021, 43(1): 51-55.
- [10] 张晓磊,章秋艳,熊炜,等. 转基因植物检测方法标准化概述[J]. 中国农业大学学报, 2020, 25(9): 1-12.
- [11] SN/T 3767-2014 出口食品中转基因成分环介导等温扩增(LAMP)检测方法[S]. 第3-30部分.
- [12] 李顺基,肖育劲,陈鹏,等. 微流控芯片技术在体外诊断领域中的应用进展[J]. 分析科学学报, 2020, 36(5): 639-645.
- [13] 郝良玉,曲晗,李志萍,等. 微流控技术在病原微生物检测中的应用[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(21): 3299-3302.
- [14] 杨家树,戚丽华,吴方,等. 微流控LAMP技术在呼吸道病原体检测中的临床应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(13): 1645-1648.
- [15] 辛亮,张兰威. 核酸-微流控芯片检测食品病原微生物的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 266-272.
- [16] 周杰,黄文胜,邓婷婷,等. 转基因检测微流控恒温扩增芯片的研制[J]. 现代食品科技, 2017, 33(6): 293-302, 270.

(上接第202页)

- [13] Krizhevsky A, Sutskever I, Hinton G E. ImageNet classification with deep convolutional neural networks [C] //Neural Information Processing Systems (NIPS). [S.l.]: [s.n.], 2012: 1097-1105.
- [14] He K, Zhang X, Ren S, et al. Deep residual learning for image

recognition [C] //2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR). [S.l.]: [s.n.], 2016: 770-778.

- [15] Xu Y, Szczecinski L, Rong B, et al. Variable LLR scaling in Min-Sum decoding for irregular LDPC Codes [J]. IEEE Transactions on Broadcasting, 2014, 60(4): 606-613.

好奇——创新意识的萌芽;
 兴趣——创新思维的营养;
 质疑——创新行为的举措;
 探索——创新学习的方法