

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00248

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

吴燕华, 郭滨, 娄慧玲, 崔玉良, 顾惠娟, 乔守怡

复旦大学生命科学学院, 上海 200433

摘要: 基因工程实验是一门从基因结构、基因表达和基因功能多个层面上进行实验操作的课程。建立一个系统的知识框架、科学的实验方法是保障基因工程课程质量的前提。以时代发展为向标, 文章对传统的基因工程实验课程进行了教学改革, 初步实现了实验内容前沿化、实验手段多样化、实验项目科研化, 让实验课堂成为学生们科学生涯的起跑点。

关键词: 基因工程; 实验教学; 教学改革; 科学研究; 创新意识

From gene cloning to expressional analysis——Practice and experience from educational reform of experimental gene engineering

WU Yan-Hua, GUO Bin, LOU Hui-Ling, CUI Yu-Liang, GU Hui-Juan, QIAO Shou-Yi

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Experimental gene engineering is a laboratory course focusing on the molecular structure, expression pattern and biological function of genes. Providing our students with a solid knowledge base and correct ways to conduct research is very important for high-quality education of genetic engineering. Inspired by recent progresses in this field, we improved the experimental gene engineering course by adding more updated knowledge and technologies and emphasizing on the combination of teaching and research, with the aim of offering our students a good start in their scientific careers.

Keywords: gene engineering; experimental course; educational reform; scientific research; innovative spirit

从 1972 年美国斯坦福大学 Paul Berg 教授利用限制性内切酶和 DNA 连接酶构建出第一个 SV40/λDNA 重组分子至今^[1], 以重组 DNA 为基础的遗传工程技术已经走过了近 40 年的发展历程。这期间, 随着分子生物学的发展, 遗传工程技术领域也发生着日新月异的变革, 在基础研究和技术应用

方面产生了广泛影响。进入 21 世纪, 生物科学迎来了功能基因组学时代。以遗传工程技术为手段、对人类基因组进行注释、修饰和改造是生物工程学新兴的发展方向。为了顺应科学的发展, 为了让学生在实践课堂中更好地认识和体会前沿科学的探索方法, 在过去两年的基因工程实验课程中, 笔者组织

收稿日期: 2011-07-08; 修回日期: 2011-09-05

基金项目: 国家基础科学人才培养基金项目(编号: J1030627) 资助

作者简介: 吴燕华, 博士, 讲师, 研究方向: 人类医学与分子遗传学。Tel: 021-65643298, E-mail: yanhuawu@fudan.edu.cn

通讯作者: 乔守怡, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类医学与分子遗传学。E-mail: syqiao@fudan.edu.cn

网络出版时间: 2012-1-5 10:17:25

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120105.1017.006.html>

并参与了基因工程实验课程的改革,以认识和探索基因功能为目标重新编排实验内容,强调实践的连贯性、综合性与设计性,在普及基本实践技能的基础上突出科研特色,启发学生思考,锻炼创新能力,深入学习新时代背景下的遗传工程技术。

1 以科学发展为向标,给传统教材增添新内容

我校的基因工程实验课程面向大学四年级的生物科学专业学生,在此之前,他们已经学习了包括细胞生物学、遗传学和微生物学等在内的专业基础课程以及包括细胞生物学实验、遗传学实验和微生物实验等在内的基础实验课程,具备了较完整的理论知识基础,积累了较全面的分子生物学实验操作技能。在此基础上设立的基因工程实验旨在利用系统的、综合的实验内容进一步锻炼学生的科研能力,培养良好的科研态度,激发科研热情和创新意识。

我校早在 20 世纪 80 年代就开设了基因工程实验课程,已积累了近 30 年的教学经验。课程教材为《基因工程实验技术》和《基因工程实验技术教程》^[2,3],由承担基因工程实验教学的一线教师编写。这些教材主要围绕基因的克隆和重组质粒的构建与验证展开,实验原理详实、内容丰富、操作步骤细致,是几位老师多年工作之经验总结。在改革后的实验讲义中,笔者一方面继承和保留了构建和验证重组 DNA 分子等经典实验内容,同时新增了获取功能基因和基因表达分析等研究模块,旨在既保持传统和经典的实验技术,又结合科学技术的进展进行创新和改变。

改革后的实验流程如图 1 所示。我们的实验任务仍然围绕基因的克隆、重组 DNA 的构建及重组子的验证,但在每个环节都追加了新颖的内容。其一,基因克隆不再是从原核生物大肠杆菌的基因组或质粒中扩增一段 DNA 序列,而是以真核生物细胞为材料,首先抽提全细胞 RNA,然后利用反转录 PCR 获得 cDNA,再以 cDNA 为模板进行目的基因的扩增。这样,在基因获得这一模块就增添了包括 RNA 抽提、反转录 PCR 等在内的新实验环节,学生对核酸提取和扩增技术有了更全面的认识。其二,开设基因电子克隆的实验内容,向学生介绍如何利用 NCBI 的 EST 数据库的基因资源进行新基因的电子

拼接。这一环节很好地让学生体会如何利用生物信息学资源指导生物学实验。其三,传统的 DNA 重组子验证包括了蓝白斑筛选、酶切鉴定以及 Southern 印迹 3 种实验方法,但都是从 DNA 水平验证重组 DNA 的构建是否成功。改革后的实验中,我们保留了蓝白斑筛选和酶切鉴定,并增加了从 mRNA 和蛋白质水平验证重组 DNA 的实验内容。实验材料仍然是稳定表达外源 GFP 蛋白的哺乳动物细胞株,由笔者所在课题组构建。交给学生的实验任务是如何验证外源 GFP 基因被正确导入到细胞并表达出相应蛋白。具体实验方法有 3 种: 利用从真核生物细胞中获得的 cDNA(前期实验已经制备)进行定量 PCR,这是 mRNA 水平的验证; 利用荧光显微镜观察活体细胞的荧光; 抽提真核细胞的全细胞蛋白质,利用抗 GFP 抗体进行 Western 印迹分析。后面两者都是蛋白质水平的检验。此外,实验中同时提供给学生野生型的细胞株和 GFP 表达水平不同的细胞株,学生可通过以上 3 种实验方法对基因表达水平进行定量或半定量分析。

改革后的实验内容在保留基因工程大实验内在连贯性的同时,整编了一些新颖但日趋流行的基因工程技术,实现了从重组 DNA 构建到基因表达分析的实验线路的转换。实验的核心仍然是重组 DNA 的构建,但围绕重组 DNA 的下游工作很好地向学生们展示了进行基因表达分析,甚至是功能研究的手段与策略。

2 以理论教学为指导,用实践体会强化理论知识

笔者在担任实验课程主讲教师的同时,也是遗传学教学团队的一员,负责包括分子遗传在内等章节的授课。在理论课的授课过程中,笔者常感到学生们对于分子遗传的许多实验设计和方法兴趣浓厚,但缺少实践体会,学习效果不理想。因此,如何在实验课程中整合理论知识一直是笔者思考的问题。创造和设置问题情境,及时引导学生质疑、设疑和释疑的启发式教学同样可以在实践课堂中推广应用^[4]。

在基因工程实验内容的改革中笔者也进行了这样的尝试。其中较为成功的一个案例是在获取目的

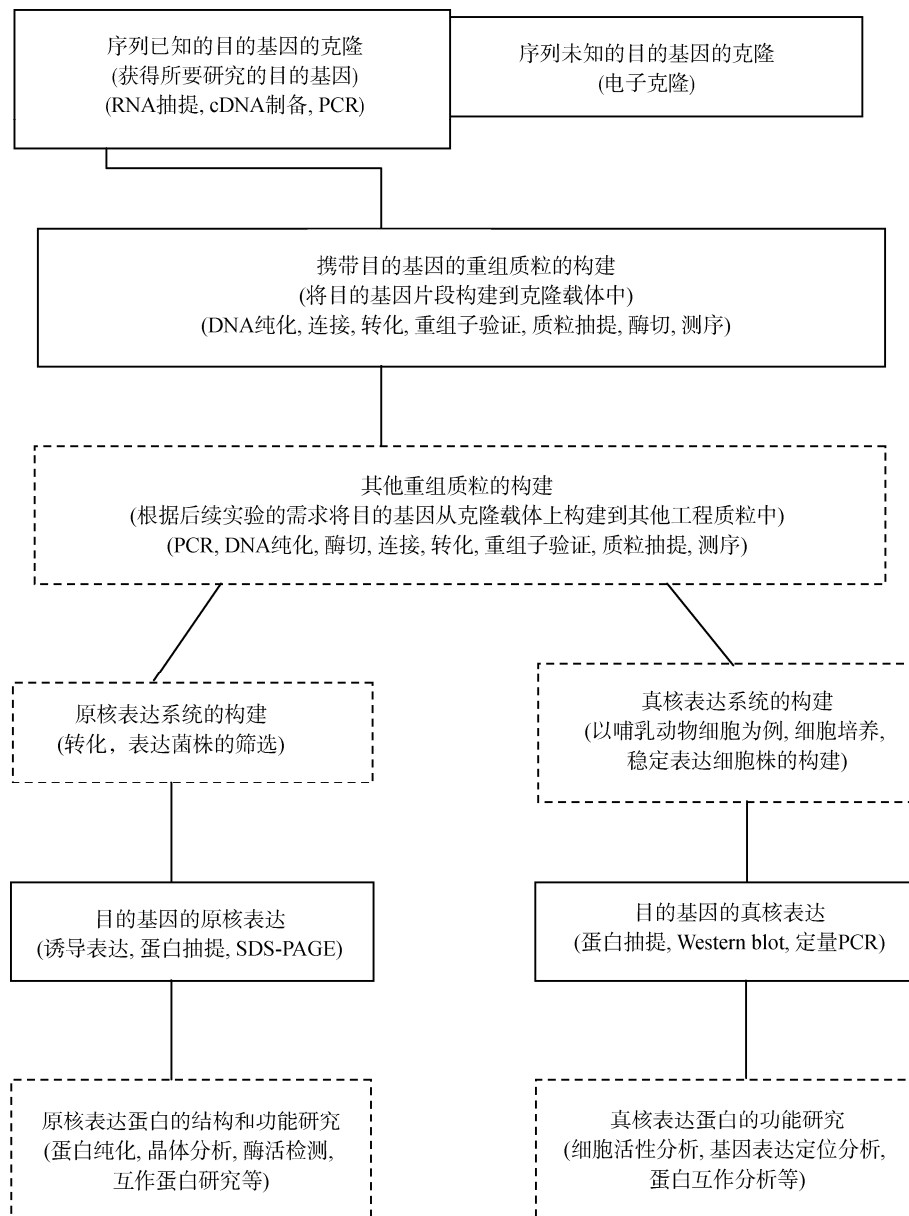


图 1 实验课程大纲

实黑线框的内容为具体的实践内容, 虚线框的内容为讲解或演示内容。

基因这一实验模块中, 引入了真核生物基因的可变剪接(Alternative splicing)这一理论知识。实验提供给学生多对人血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor)编码基因 *VEGF* 的扩增引物, 其中有的是 *VEGF* 不同剪接体的通用引物, 有的是各个剪接体的独特性引物。它们分别能够扩增出 *VEGF* 基因的不同长度的剪接本^[5]。在实验中, 学生们自己选择引物, 在得到互不相同的结果后, 学生随即思

考为什么不同的引物序列甚至是相同的引物序列可扩增出长度不同的基因产物。结合他们在课堂中刚刚学习的生物信息学知识, 学生可利用引物和基因序列分析产物的具体序列信息并解释实验结果。通过这种先实践再理论的学习方式, 学生们很好地消化吸收了“可变剪接”这一专业名词, 体会到了真核生物利用可变剪接增加遗传信息复杂性这一生物学意义。

3 以项目研究为依托,探索建设开放型实验课堂

笔者所在课题组的研究方向是人类医学与分子遗传学,具体研究领域是肿瘤分子遗传机制。作为人类遗传学的一个重要分支,肿瘤分子遗传着重对与肿瘤发生和肿瘤转移相关的基因结构、表达和功能进行探索。近年来,肿瘤分子遗传领域不断取得重大突破,为解释肿瘤发生和转移的分子机制,探索临床可用的预防和治疗方法提供了重要的实验数据和理论证据。如何发挥自身所在科研团队的优势和特长,改革基因工程实验课堂是笔者在教学实验过程中思考的又一个问题。

过去两年中,笔者做了以下两方面的尝试。一方面,借鉴教学团队成员们多年科研工作的积累,将多种成熟的分子实验技术和实验材料成功地应用到实验教学中。比如,新开设的基因电子克隆、实时定量 PCR、Western 印迹等实验技术均是肿瘤分子遗传研究领域流行的常用技术。能够成功地将这些技术移植到学生实验中得益于实验教学团队出色的科研背景,团队中有专攻基因组数据挖掘和分析的老师,有专攻肿瘤相关基因功能注释的老师,他们利用自己多年的科研实践经验,将成熟稳定的实验体系、科学完整的操作方法引进到学生的实验台上。另外,实验流程中的中间环节的实验材料也来自笔者所在科研小组,如稳定表达外源 GFP 蛋白的大肠杆菌菌株和哺乳动物细胞株。正是利用这些实验材料,学生们尝试了更多的实验技术和方法。其他高校的实践也共同表明^[6],依托教师所在科研团队和研究项目,利用科研平台和项目背景促进实验教学的发展,在学生实验中融入应用性广、科研性强的实验技术和方法是一条行之有效、立竿见影的改革途径。

此外,开展以教师科研课题为载体的第二课堂实践教学也是高校实验课程的发展方向^[7]。因此,笔者对基因工程实验课程的另一个改革措施是以肿瘤分子遗传领域为依托,向学生展示项目研究的整体过程,包括线路设计、实验方案、数据分析,问题解决等;强调实验内容设计的连贯性,使学生在有限的实验课堂中学习尽可能多的实验设计思路和技术路线。改革后的课程内容紧密围绕一个目的基因,

从基因获取、重组质粒构建与验证到原核表达分析与真核表达分析,学生不是完成独立的实验操作,而是完成一个简单的研究项目,内在联系性强。即使一些暂时未列入实验内容的模块,也在课堂中以讲解或讨论的形式进行学习。改革同样强调实验的科学性,在实验设计,数据分析中体现科学性的思维方法。学生的能力各有不同,一些同学在某些实验环节中可能得不到预期的结果。这时候学生需要在他们的报告中反映实验失误的原因。在其他一些实验环节,学生们会在不清楚实验材料的遗传背景下进行操作,然后根据各自的结果分析样品的性质,阐述实验本身所说明的科学问题。那如何查找失误的原因,如何解读实验数据?一个最基本的科学思想就是学会设计对照组实验、对比分析数据。改革后的所有实验,从 PCR 到 Western 印迹都设有对照。在学生思考实验失误或是分析实验样品性质的过程中,他们能够切身体会到许多科学问题,比如为什么要设立对照;阴性对照、阳性对照甚至空白对照有什么不同;对照结果能够反映什么问题等等。学生们的实验课程不是重复一个既定的实验结果,而是回答一个新鲜的科学问题,学生们不仅需要学习如何做这个实验,更需要明白为什么如此设计实验才能让实验结果具有科学性和可信性。

学生们对改革后的实验内容设计反响很好,普遍认为课堂所学内容实用、连贯、技术全面、缜密。更为重要的是,不少学生将所学技术应用到了自己的毕业论文的设计和实践中,获益良多。高校实验教学的最终目标不是培训娴熟的技术员,而是锻炼学生独立的实践能力和科学的思维方法。现在,笔者还尝试将自己的研究项目向学生开放,采用双向选择的方式,欢迎学生参加教师的研究团队,在实验课程学习的同时,开展毕业论文的设计和实验。

4 结语

以分子生物学的发展方向为导向的基因工程实验课程改革,在过去两年的实践中取得了良好的成绩。改革既注重实践教学与理论教学的配套,利用内容全面、思考性强的实验平台辅助书本学习,提高学生的理论基础,引导他们发现问题思考问题;也注重实践教学与科学研究的接轨,利用内容紧凑、设计科学的技术流程,锻造学生的科研素质,教授他们分析解决问题的方法。在高校的实验教学实

践中,教师们应积极锻炼和提升自己的科研素质,紧跟学科前进的步伐培养人才,利用实验课堂为学生架起通向科学研究殿堂的桥梁。

参考文献(References):

- [1] Jackson DA, Symons RH, 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*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69(10): 2904-2909.
- [2] 彭秀玲,袁汉英. 基因工程实验技术. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997.
- [3] 盛小禹. 基因工程实验技术教程. 上海: 复旦大学出版社, 1999.
- [4] 邹克琴, 叶子弘, 李素芳. 改进《基因工程》教学效果的探讨. 中国科教创新导刊, 2007, (23): 51-53.
- [5] Krüssel JS, Behr B, Milki AA, Hirchenhain J, Wen Y, Bielfeld P, Lake Polan M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7(1): 57-63.
- [6] 齐凤慧, 詹亚光. 《基因工程》实验教学改革的探索. 实验科学与技术, 2008, 6(1): 111-113.
- [7] 许崇波, 迟彦, 高凤山. 基因工程实践教学改革的探索. 实验科学与技术, 2008, 6(4): 109-112.

•综合信息•

“2012 年国际高等植物表观遗传调控机理研讨会”即将召开 2012 International Symposium on Epigenetic Regulation in Higher Plants

主办单位: 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 国际植物表观遗传学协会

会议日期: 2012 年 4 月 19-21 日

会议地点: 北京, 中国科学院遗传与发育生物学研究所

邀请报告:

Frederic Berger: Diversity and impact of histone variants on chromatin regulations in *Arabidopsis*

Xiaofeng Cao: Histone demethylation is involved in regulation of plant growth and genome stability

Xuemei Chen: Nuclear RNA metabolism impacting DNA methylation

Zhizhong Gong: Characterization of more repressor of silencing genes by using a T-DNA locus

Huishan Guo: Different effects of RdDM components on silencing of exogenous and endogenous genes

Bin Han: Constructing a map of rice genome variations

Fangpu Han: De novo centromere formation without canonical centromere sequence arrays

Mitsuyasu Hasebe: H3.3 chaperon complex HIRA functions in regulating H3K27me3 modification

Ildoo Hwang: Decrease in DNA methylation leads to enhanced defense Priming

Tetsuji Kakutani: Genetics of DNA methylation in genes and transposons in *Arabidopsis*

Marjori Matzke: RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*

Blake Meyers: Differentiated truncation and uridylation patterns of microRNAs in *Arabidopsis hen1* mutants reveal distinct routes of microRNA turnover

Yoo-Sun Noh: Control of seed germination by posttranslational histone modification

Jim Peacock/Elizabeth Dennis: Hybrid vigour, small RNAs and methylation

Yijun Qi: Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of Argonaute4/siRNA complexes

Wenhui Shen: 'Writing and reading' histone methylations in regulation of plant growth and development

Zhixi Tian: Polymorphism of transposable elements reveals their dynamic evolutions in re-sequenced soybean genomes

Doris Wagner: Introduction for EPIC overcoming polycomb repression during flower patterning

Jiawei Wang: Temporal control of leaf complexity by a miRNA network

Wen Wang: Population methylomics of wild and cultivated rice

Xiujie Wang: Endogenous non-coding RNAs as natural microRNA targetmimics in *Arabidopsis* and rice

Jiankang Zhu: Active DNA demethylation in plants

会议网址 <http://iserhp2012.csp.escience.cn>

会务组联系人: 李杭序

E-mail: ISERHP@genetics.ac.cn; hxli@genetics.ac.cn

电话: 010-64843252