

## 深化重点，解析难点，培养综合创新素质——细菌接合教学方法的探索

吴根福<sup>1\*</sup> 吴科杰<sup>2</sup>

(1. 浙江大学生命科学学院 浙江 杭州 310058)

(2. 北京师范大学教育学部 北京 100875)

**摘要：**接合是微生物学教学的重点和难点。为了让学生更直观地了解接合，我们除了系统介绍接合的发现过程及分子机理外，还开设了大肠杆菌与希瓦氏菌之间的远缘接合实验。理论教学采用以问题为导向的策略，在提问中培养学生思维的逻辑性，在讨论中传授科学的严谨性；实验教学采用以探究为主的方案，通过比较环境条件对接合的影响，培养学生耐心细致的实验作风。通过这种理论结合实验的教学方式，学生灵活发散的思维能力、不畏权威的质疑精神和宽广智慧的人文情怀得以培养，综合创新素质得以提高。

**关键词：**接合，课程设计，教学策略，实验操作，创新素质

## Cultivation of comprehensive innovation quality by deepening the key and difficult points——probing into the teaching method of bacterial conjugation

WU Gen-Fu<sup>1\*</sup> WU Ke-Jie<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

(2. Faculty of Education, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

**Abstract:** Conjugation is the key and difficult point in microbiology teaching. For student's intuitive understanding of conjugation, we set up a conjugating experiment using *Escherichia coli* and *Shewanella oneidensis*, on the basis of systematic introduction of its discovery procedure and molecular mechanisms. A problem oriented strategy was adopted in theory teaching, thereby student's logic thinking was developed in questions, and the scientific rigor was imparted in discussions. An inquiry based method was applied in lab teaching, where student's meticulous operating style was nourished via exploring conjugation efficiency under different environmental conditions. By this way, student's flexible thinking abilities, questioning spirits, and broad humanistic wisdoms were cultivated, and their comprehensive innovation qualities were improved.

**Foundation item:** Construction for the Undergraduate Education and Teaching Courses in Zhejiang University; Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY17C010003)

\*Corresponding author: Tel: 86-571-88206637; E-mail: wugenfu@zju.edu.cn

**Received:** October 07, 2016; **Accepted:** December 02, 2016; **Published online** (www.cnki.net): December 13, 2016  
基金项目：浙江大学本科教育教学建设项目；浙江省自然科学基金项目(No. LY17C010003)

\*通讯作者：Tel: 86-571-88206637; E-mail: wugenfu@zju.edu.cn

收稿日期：2016-10-07；接受日期：2016-12-02；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2016-12-13

**Keywords:** Conjugation, Curriculum design, Teaching strategy, Lab operation, Innovation quality

接合是微生物学教学的重点和难点,也是学生容易混淆的概念。这一名词出现在微生物学教材的若干章节中,如毛霉和根霉等接合菌纲(Zygomycetes)的霉菌在营养贫乏时,两条不同交配型的菌丝会各向对方伸出一短侧枝,顶端两个膨大细胞通过接合融合在一起,经质配、核配后形成一个厚壁的二倍体接合孢子(Zygospore)<sup>[1]</sup>;又如啤酒酵母等子囊菌纲的真菌具有性别分化,两个不同接合型(Mating type)的单倍体可通过接合形成二倍体接合子(Zygote),而二倍体细胞在营养贫乏时经减数分裂又可形成单倍体的子囊孢子<sup>[2]</sup>。不过,接合这一概念主要出现在微生物遗传变异章节,指细菌的遗传物质以质粒为介导,通过细胞间的直接接触进行转移和重组的现象<sup>[1-2]</sup>。所以从本义上讲,接合是指两个细胞接触并进行遗传重组的过程,对细菌和真菌都适用,但由于其在原核微生物遗传重组中的重要性逐渐被专有化,《微生物学名词》把接合定义为供体菌与其近缘受体菌的完整细胞经性菌毛直接接触而传递大段 DNA 的现象<sup>[3]</sup>。本文讨论的就是这种细菌间的接合。细菌的接合不仅促进了环境中基因的水平转移,而且作为一种实验手段广泛应用于基因注释等基础研究<sup>[4]</sup>,在微生物学教学中占有重要地位。为了让学生更直观地了解细菌间的接合现象,我们不仅在理论上系统介绍接合的发现过程及分子机理,而且结合科研实践,开设了大肠杆菌与希瓦氏菌之间的远缘接合实验,将用框架缺失突变法构建成的基因敲除质粒先转化至大肠杆菌,然后通过接合,转移至希瓦氏菌<sup>[4]</sup>。本文介绍我们通过接合的理论讲解及实验操作,向学生传授严谨科学态度,培养学生细致工作作风,提高学生综合创新素质的一些做法。

## 1 通过接合发现史的讲授,培养严谨求实的科学态度

现代教育理论认为“授人以鱼,不如授之以渔。”对实验性学科来说,培养科学的研究方法、开启学

生的智慧比单纯传授知识更重要<sup>[5]</sup>。为此,我们结合细菌接合的发现史,采用以问题为导向的教学策略进行相关知识的传授,在提问中培养思维的逻辑性,在讨论中传授科学的严谨性。

细菌的接合是美国科学家 Joshua Lederberg 和 Edward Tatum 于 1946–1947 年间发现的。他们利用大肠杆菌进行实验,发现营养缺陷型菌株单独培养在基本培养基上不能生长,而两种互补型缺陷菌株混合涂布后却有细菌生长<sup>[1]</sup>。那么怎样来解释这种现象呢?

我们首先提出问题:两种互补型缺陷菌株在基本培养基上混合涂布后长出菌落的可能原因有几种?经过讨论后,同学们一致认为可能原因有两种:(1) 营养互饲,即 A 缺陷菌株将 B 物质分泌到培养基中,使 B 缺陷菌株的营养得到互补,或 B 缺陷菌株将 A 物质分泌到培养基中,使 A 缺陷菌株的营养得到互补;(2) 基因变异,缺陷型菌株经变异后回复为原养型菌株。然后进一步追问怎样来证明发生的是基因变异,而不是营养互饲?部分学生认为可以采用正向实验来证明,即挑取基本培养基上形成的菌落在新鲜基本培养基上划线,如果能生长,说明是基因发生了可遗传的变化;部分学生提出了反向(排除)实验法,即将一个菌株的限量补充培养液(离心除去菌体)加至基本培养基中来培养另一菌株,若不能生长,则可排除营养互饲。排除法的改进型就是类似于转导的 U 型管实验<sup>[2]</sup>,在 U 型管中放入基本培养基,一端接入 A 缺陷菌株,并补充 A,另一端接入 B 缺陷菌株,若用泵抽吸后 B 菌株仍不能生长,则可排除 A 对 B 的营养饲喂,用同样的方法也可排除 B 对 A 的营养饲喂。

尽管排除了营养互饲,但变异仍有两种情形:基因突变或基因重组。我们要求学生认真思考,设计一个实验来排除基因突变。学生们设计的方法之一是比较变异频率,将缺陷型菌株涂布在基本培养基上,如果分开涂布时形成的原养型菌落数大大少于混合涂布,则可排除基因突变;方法之二是采用多重缺陷型菌株,正如 Lederberg 和 Tatum 实验时

用的三重缺陷型菌株一样。因为一个性状的回复突变率约为  $10^{-6}$ , 要三个性状都发生回复突变, 几率仅为  $10^{-18}$ 。如果能在有限数量的平板上长出若干原养型菌落, 则可排除回复突变。

细菌的水平基因转移有转化、转导和接合三种方式, 那么又怎样来排除转化和转导呢? 这个问题难不倒学生们, 因为转化是游离 DNA 的转移和重组, 转导需借助噬菌体的作用, 两者都不需要细胞与细胞的直接接触, 所以可用 U 型管实验来排除。另外, 如果能用电镜观察到遗传物质通过性纤毛转移的过程, 则是接合更为有力的直观证明。

通过这样的逐步推理, 学生们严谨求实的科学态度得到了培养。科学是来不得半点虚假的, 要得出一个正确的结论, 必须从正反两个方面设计多个实验来证明。就细菌接合而言, 不但要通过电镜观察和接合子的获得来证明细胞的直接接触, 还需要排除互养、回复突变、转化、转导的可能(图 1), 只有多个实验相互印证, 得出的结论才不会有争议。学生们如果日后想在国际权威期刊上发表论文, 就必须从实验设计开始周全考虑各种可能途径, 然后采用多种方法, 从各个侧面来验证自己的猜想, 得出令人信服的结论。

## 2 通过质粒整合位点多样性的分析, 培养综合全面的思考能力

未来教育不再是以教师为中心的知识灌输, 而是以学生为主体的启发式教育。教师的职责不再是单纯地传授知识, 而是激励思考、启迪分析<sup>[5]</sup>。为此, 在细菌接合的讲授过程中, 我们要求学生通过阅读教材和参考资料, 分析 F 因子在细菌染色体上整合位点的多样性以及 F' 质粒所含细菌染色质基因类型的多样性。

现有教材根据 F 质粒的有无, 把大肠杆菌分成

“雄性”和“雌性”两类, “雄性”菌株又根据质粒的存在方式, 分成  $F^+$ 、Hfr 和  $F'$  三种类型<sup>[1-2]</sup>。受局限性转导定势思维的影响, 不少同学认为 F 因子只能整合入细菌染色体的某一特定位点,  $F'$  质粒中携带的细菌染色体基因只能是两类: 插入位点左边或右边的部分基因。这种理解方式虽有正确的部分, 但不够全面。由于大肠杆菌的 F 质粒上含有 3 个插入序列(IS)和一个转座位点(Tn), 细菌染色质体上也存在多个 IS 和 Tn<sup>[6]</sup>, 所以 F 因子在染色质体上的插入可有多种方式, 再加上插入时有正反两个方向, 致使 Hfr 菌株中 F 质粒的位置和基因顺序有多种变化, 同样, 当 F 质粒发生不正常脱离时, 形成的  $F'$  也多种多样。

通过 F 质粒存在方式的分析, 学生们理解了大肠杆菌基因组序列的多样性, 从而加深了对物种多样性的认识。

## 3 通过接合敏感性的实验操作, 培养耐心细致的工作作风

现代教育理论还认为, 科学教育不应是一种纯粹的学术性练习, 而应立足于实用主义观点, 在解决具体问题的过程中培养学生的科学精神<sup>[7]</sup>。为了锻炼学生的动手能力, 增加对接合的感性认识, 我们开设了大肠杆菌与奥奈德希瓦氏菌之间的远缘杂交实验, 探究固体平板、液体静止培养和液体摇床培养下的细菌接合进程, 期望通过这类探究性实验, 培养学生耐心细致的工作作风。

接合过程对环境比较敏感, 轻微的扰动就会使性纤毛断裂, 造成接合中断<sup>[1]</sup>。接合最好在固体平板上进行, 如果用液体培养基, 必需保证处于静止状态, 一旦扰动, 就得不到接合子。我们以希瓦氏菌野生株和大肠杆菌二氨基庚二酸(DAP)缺陷株(表 1)为亲本进行远缘接合。由于 DAP 为赖氨酸合

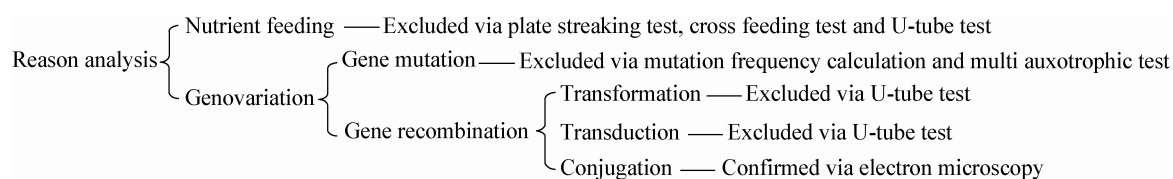


图 1 细菌接合的证明

Figure 1 Certification of bacterial conjugation

表 1 接合实验所用菌株  
Table 1 The strains used in conjugation experiment

菌株 Strain	分类 Classification	类别 Category	基因型 Gene type	培养特征 Culture characteristics
<i>Escherichia coli</i> WM3064	Enterobacteriales	Donor	<i>dap<sup>-</sup>, km<sup>r</sup></i>	No growth on LB plate, kanamycin resistance
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Alteromonadales	Recipient	<i>dap<sup>+</sup>, km<sup>s</sup></i>	Grows on LB plate, kanamycin sensitivity

成和肽聚糖短肽链合成所必需,所以 *dap<sup>-</sup>* 菌株在普通培养基上不能生长。接合后,大肠杆菌的抗性质粒通过性纤毛传递到希瓦氏菌中,得到的希瓦氏菌(接合子)就可在含卡那霉素的普通 LB 平板上生长<sup>[4]</sup>。

实验结果显示,静置的固态平板上容易得到接合子,液体静置培养下接合效率较低,而在摇床培养下几乎得不到接合子。通过接合频率的比较,同学们深切体会到接合对环境的敏感性,逐渐培养起耐心细致的工作作风。

#### 4 通过基因横向传递普遍性的认识,培养灵活发散的思维能力

在新兴学科不断出现、知识大爆炸的今天,人们对知识的掌握进度远远跟不上新知识的产生速度;互联网的日益普及使得短时间内快速收集所需材料成为可能。因此,教学的重心已逐渐从巩固知识向启迪思维和掌握认知手段转移<sup>[8]</sup>。为了培养学生的认知能力和思维能力,我们要求学生通过互联网查找资料,对基因的转移途径进行分析比较,对基因交流的普遍性进行思考。

一个生物体的基因通常由亲代通过染色体复制传给后代,这种转移方式称为基因的垂直传递。由于高中生物学教学的局限,学生们大都形成了一种思维定势,认为生物体的基因都是从亲代遗传得来的,最多发生部分突变。通过接合等知识的了解,学生们认识到遗传物质还可以横向(水平)转移,而且这种转移方式在细菌间具有普遍性。不但大肠杆菌之间能转移,绿脓杆菌、霍乱弧菌、天蓝色放线菌等细菌间也能转移。大肠杆菌不但能和沙门氏菌、变形杆菌等肠道杆菌接合,而且能与非发酵型

的希瓦氏菌接合;接合后不但能传递致育因子,还能传递某些大肠杆菌素因子和抗性因子。

基因组序列的测定表明,细菌基因组中总会包含某些噬菌体基因,说明在细菌进化过程中,这些噬菌体通过整合逐渐演变成细菌基因组的一部分<sup>[6]</sup>;同样,人类基因组中也有多达 8% 的基因来自病毒,有些还发挥着特定的生理学功能,说明基因的水平转移在高等生物中也存在,具有普遍性。通过这种“发现式”学习<sup>[5]</sup>,学生们不但熟悉了资料检索的手段,认识到自己原有知识的局限,而且通过独立思考,培养了灵活发散的思维能力。

#### 5 通过基因转移相对性的论证,培养不畏权威的质疑精神

现代教育理论还认为,教育成功的标准并不是学生都懂了,不再有问题了,而是学生的问题意识是否得到培养,质疑精神是否得到激发<sup>[5]</sup>。“学贵有疑,小疑则小进,大疑则大进”。为了培养学生的质疑精神,我们在教学过程中提倡师生互动,注重培养学生的独立性与自主性,鼓励并引导学生提问,哪怕是教师一时不能回答的问题。其实学生大都具有质疑精神,只要稍加引导,就会提出非常好的问题。

如上所述,基因既可垂直传递,又可水平转移,*F<sup>-</sup>* 菌株与 *F<sup>+</sup>* 菌株接合后会变成 *F<sup>+</sup>* 菌株,我们要求学生就这一现象展开联想,提出疑问。在我们的引导下,有学生提出了这样的问题:既然杂交后雌性菌株变成了雄性,那么环境中的雄性菌株必将越来越多,若干年后,环境中的大肠杆菌是否会全部变成雄性呢?如果会,那大肠杆菌在地球上已存在了几亿年,为什么现在还会有雌性菌株呢?

这确实是一个比较有趣的问题。学生的推论没错, 接合的理论也没错, 那现在为什么还会有雌性的大肠杆菌存在呢? 也许教师一时回答不上来, 但通过查阅资料, 还是能找到这个问题的答案的。我们知道, F 质粒是一种严紧型质粒, 其 DNA 上包含两个复制起始位点: *oriT* 和 *oriV*。*oriT* 的复制不依赖于细菌染色体, 而受接合的控制, 使接合后的雌性菌株转变成雄性; 而 *oriV* 的复制依赖于细菌染色体, 使雄性菌株通过无丝分裂繁殖的后代仍为雄性<sup>[6]</sup>。所以, 在某一特定生境中, 通过接合确实会使雄性菌株越来越多。

但是质粒的存在对细菌是一种负担, 细菌需要花费额外的原料和能量来合成质粒编码基因及其蛋白质, 使得具有质粒的菌株繁殖代时会比不含质粒的菌株长。所以在没有选择压力时, 雄性菌株的竞争力不如雌性菌株<sup>[9]</sup>。而且, 质粒在某些情况下也会丢失, 已知一些理化因子可抑制质粒 DNA 的复制, 而对染色体 DNA 的复制没有影响, 从而导致代过程中质粒的丢失<sup>[6]</sup>; 另外, 如果一个生境中雌性菌株很少, 雄性菌株的性纤毛也就失去了存在的意义, 细菌也就用不着浪费大量的原料和能量来合成这些没用的结构。根据用进废退的理论, 细菌会阻遏这些基因的表达, 性纤毛会逐渐退化, 甚至消失。

质疑是创新的基础, 质疑精神的培养是创新型教育的灵魂。教师应积极鼓励学生提出自己的见解, 要教导他们“我爱我师, 我更爱真理”, 勇于对老师及课本上的观点提出质疑, 并通过平等自由的讨论, 使他们的聪明才智得以发挥, 逐渐做到“博学而笃志, 切问而近思”。

## 6 通过接合现象与生活实践的联系, 培养宽广智慧的人文素质

人文素养对创新能力的提升起着不可或缺的作用, 它不但能磨砺人的意志, 还能拓展人的思维<sup>[5]</sup>。为了丰富学生的想象力, 培养学生的人文情怀, 我们在完成了细菌基因重组课程的讲授后, 布置了

一个选做题, 要求学生联系生活实践, 谈谈对接合等现象的感想<sup>[10]</sup>。从上交的作业来看, 学生们的想象力相当丰富, 有的学生结合 2014 年高考浙江卷作文题“门与路”, 把基因的垂直转移比喻成一扇门, 把基因通过性纤毛进行水平转移比喻成一扇窗。对大多数基因而言, “上帝”只为它们打开一扇门, 即基因只能通过垂直传递遗传到下一代, 而少部分基因还可通过“窗”, 即通过质粒的水平转移来传递, 从而在竞争中取得优势。由此联想到当代大学生, 他们幸运地考上了大学, 就好比已经为他们打开了一扇门, 但若想以后在竞争中脱颖而出, 还必须找到那扇窗。大学的学习过程就是一个克服迷茫、寻找窗口的过程。每门课好比是通往窗口的一段路, 部分学生通过这段路找到了窗的方向, 选定了今后努力的目标; 少部分学生经过一番挣扎, 发现此路不通, 只得重修或转学; 但更多学生则需继续修读不同类型的课程, 去寻找通往窗口的路(自己感兴趣的领域)。

也有学生把知识的获取比喻成 F 菌株通过接合获取外源基因的过程。上课只是完成了外源基因的转移, 传授的知识还处于游离状态, 如果不进行复习巩固, 就像 F 因子一样会丢失; 只有主动学习, 像 Hfr 一样将学到的知识整合到自己的基因组中, 内化成自己的知识, 建构成自己的知识体系, 才会有所成就。

## 7 结语

细菌的接合虽然只是微生物学课程中的一个知识点, 但只要教师潜心设计、认真备课、精心组织、耐心交流, 学生仍可以学到很多。通过这种理论与实践相结合的学习方式, 不但可掌握相关的微生物学知识, 而且可培养严谨的科学态度、灵活的思维方法、综合的分析能力、细致的工作作风和无畏的质疑精神。经过三年多的实践, 我们发现, 这种授课方式不仅陶冶了学生的情感, 端正了学习态度, 树立了正确的价值观, 还提高了他们的综合创新素质。

## 参 考 文 献

- [1] Zhou DQ. Essential Microbiology[M]. 3rd Edition. Beijing: Higher Education Press, 2011 (in Chinese)  
周德庆. 微生物学教程[M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2011
- [2] Shen P, Chen XD. Microbiology[M]. 8th Edition. Beijing: Higher Education Press, 2016 (in Chinese)  
沈萍, 陈向东. 微生物学[M]. 第 8 版. 北京: 高等教育出版社, 2016
- [3] The Second Session of the Committee on the Examination and Approval of Microbiology. Chinese Terms in Microbiology[M]. 2nd Edition. Beijing: Science Press, 2012: 71 (in Chinese)  
第二届微生物学名词审定委员会. 微生物学名词[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2012: 71
- [4] Gao HC, Wu GF. Laboratory Manual for Microbiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2015: 103-106 (in Chinese)  
高海春, 吴根福. 微生物学实验简明教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2015: 103-106
- [5] Pei TN. The Modern Teaching Theory[M]. Beijing: People's Education Press, 2005 (in Chinese)  
裴娣娜. 现代教学论[M]. 北京: 人民教育出版社, 2005
- [6] Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, et al. Brock Biology of Microorganisms[M]. 14th Edition. Boston: Pearson, 2014
- [7] UNESCO. Learning to Be: The World of Education Today and Tomorrow[M]. Beijing: Education Science Press, 1996 (in Chinese)  
联合国教科文组织. 学会生存: 教育世界的今天和明天[M]. 北京: 教育科学出版社, 1996
- [8] UNESCO. Learning: The Treasure Within[M]. Beijing: Education Science Press, 2014 (in Chinese)  
联合国教科文组织. 教育: 财富蕴藏其中[M]. 北京: 教育科学出版社, 2014
- [9] Wu GF. Experimental Guide for Fermentation Engineering[M]. 2nd Edition. Beijing: Higher Education Press, 2013: 62-66 (in Chinese)  
吴根福. 发酵工程实验指导[M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2013: 62-66
- [10] Wu GF. Pay attention to the guiding role of assessment, to improve the education quality in Microbiology[J]. Microbiology China, DOI: 10.13344/j.microbiol.china.160466 (in Chinese)  
吴根福. 利用评价的导向功能, 提高微生物学教学质量[J]. 微生物学通报, DOI: 10.13344/j.microbiol.china.160466

## 稿件书写规范

## 高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目, 是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目, 也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟, 一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台, 同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表, 是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告, 特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线, 撰写的稿件内容必须要有新意、要实用, 不是泛泛地叙述教学设计与过程, 而是确实有感而发, 是教学工作中的创新体会, 或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性, 做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进, 注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中, 只有这样才能真正起到教与学的互动, 促进高校生物学教学的发展, 更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时, 为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台, 本栏目还开辟了“名课讲堂”版块, 邀约相关生命科学领域, 如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点, 推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文, 为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台, 促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!