

# 从淀粉酶产生菌筛选和基本鉴定 谈探究性实验教学

侯进慧\*

(徐州工程学院 江苏 徐州 221008)

**摘要:** 本文结合微生物学探究性实验教学实践,以淀粉酶产生菌筛选和基本鉴定为例,讨论了在微生物学实验中进行探究性实验的经验,为微生物学探究性实验教学改革提供参考。

**关键词:** 探究性实验,教学改革,淀粉酶产生菌,筛选

## Talking About Exploratory Experiment Teaching Base on Screening and Preliminarily Identification of Amylase-producing Strain

HOU Jin-Hui\*

(Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou, Jiangsu 221008, China)

**Abstract:** In the paper, taking screening and preliminarily identification of amylase-producing strain as an example, tips on exploratory experiment teaching were summarized base on microbiology teaching experience. The paper provides reference for reform of microbiology exploratory experiment teaching.

**Keywords:** Exploratory experiment, Teaching reform, Amylase-producing strain, Screening

实验教学是高校微生物学教学的基础和重要组成部分。随着教学改革的深入,探究性实验在微生物学实验教学中的地位越来越受到重视。探究性实验是一种开放式的教学实验,需要学生根据已掌握的知识进行科学分析、大胆设计、探索研究,是创新型人才培养的有效途径<sup>[1]</sup>。相对于传统实验教学中的验证性实验,探究性实验的实验方法和步骤需要学生自己去制定,实验结果也具有不可知性。探究性实验不但可以向学生传授专业知识、锻炼学生实验技能,更是对学生独立科研和解决问题能

力的培养。我校在微生物学实验教学过程中,为了提高学生科研素养,设立了一些探究性实验。相关实验在我校的江苏省实践教学示范中心——食品与生物工程实验中心开展实施。淀粉酶产生菌的筛选分析实验就是其中一个比较成功的实验,该实验共8学时,实行开放式实验管理。实验指导教师在准备实验阶段和总结评价阶段进行集中指导,在实验实施过程中及时接受学生反馈,进行实时指导答疑。该探究性实验要求学生在规定的时间段里完成,具体实验时间由各组学生自行安排。现将其实验要点

和教学经验进行总结,希望能给微生物学探究性实验教学提供启示。

## 1 准备实验

淀粉酶是一类能催化淀粉糖苷键水解的酶类,作用于淀粉分子产生糊精、低聚糖及葡萄糖等多种产物。淀粉酶广泛分布于动物、植物和微生物有机体中<sup>[2]</sup>。对于淀粉酶产生菌的筛选分析,要求学生查阅相关文献,获得实验的基本方法,同时强调注意微生物的安全性,防止筛选到一些对人体有害的病原微生物。

由于已经学过文献检索课程,同学们在筛选方法的选择上,很快通过相关文献,查找到了一些可行的方法,其中最常用的是卢哥氏碘液染色法<sup>[3]</sup>。使用卢哥氏碘液染色,若出现透明水解圈,则说明该菌株可产生淀粉酶,对初筛到的菌株进行复筛。测量水解圈与菌落直径的比值初步确定产酶活性高的菌株。这一方法简便易行,准确性高。学生们基本都可以找到这种试验方法。在注意微生物的安全性、防止筛选到病原菌的要求上,一些学生不知到哪里采样;有的学生想法很巧妙,在人们的食物来源中进行筛选,比如在市售鲫鱼的肠道中筛选淀粉酶菌株,可基本保证菌株的安全性。在菌株的分类分析方面,有的采用生理生化特性进行分析,有的结合更简单有效的 16S rDNA 或 18S rDNA 序列分析方法。实践证明,第二种方法更简便易行,对初步确定菌种分类有很好的作用。最终确定的基本方法是,提取菌株基因组 DNA<sup>[4]</sup>,作为 PCR 反应模板。根据细菌 16S rDNA 和真菌 18S rDNA 序列保守性合成引物<sup>[3-5]</sup>,16S rDNA 引物是: F: 5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3', R: 5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3'; 18S rDNA 引物是 FU1: 5'-GTAGTCATATG CTTGTCTC-3', RU1: 5'-TCCGCAGGTTACCTACG GA-3'。反应步骤是: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 退火温度 60 s, 72°C 90 s, 24 个循环; 72°C 10 min。将获得的 16S 或 18S rDNA 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。用 Blast 程序在 GenBank 基因库中将获得的 16S 或 18S rDNA 序列,进行比对分析。同时,对菌株采用生理生化指标分析的方法,参考分类标准,初步确定菌株的分类地位。

在选择好实验方法后,学生们要进行可行性论证,即结合设计者的学术水平、技术水平和实验室条件,使实验能够顺利实施。实验准备过程中,教师要进行必要的指导、提示,减少学生不必要的错误。在实验正式开始前,教师组织学生进行类似于开题报告式的讲评。这样可以解决学生实验方案中存在的问题,也可以使学生开阔思路,培养学生的科学思维和创新意识。

## 2 实施实验

实验实施阶段是探究性实验的关键阶段。为推进实验教学改革,保障探究性实验的开展,我校对食品与生物工程实验中心实行开放式管理。实验中心每天从早晨 8 点至晚上 8 点全面向学生开放,学生可以根据自己的情况具体安排实验时间。实验室每天都安排一名实验教师值班,便于指导学生的规范操作并及时解决实验中出现的問題。要求实验学生认真观察实验现象,做好实验记录,对数据进行细致分析。

对于淀粉酶产生菌的筛选,首先是菌株的分离和碘液染色初筛,若出现透明水解圈,则进行单菌落分离和复筛。有些组的同学开始没有筛选到淀粉酶产生菌,其原因并非没有淀粉酶产生菌,而是实验过程的失误。比如培养时间不够,淀粉酶产生菌一般产酶需要在培养后 2-3 d 才可见明显透明圈。而有的同学在培养 1 d 就进行碘液染色,这样就很难分离到产酶菌株。要解决这类问题,在实验过程中,教师与学生的实时互动交流是十分关键的,可以帮助学生更好地将实验开展下去。对于菌株的分类分析,很多组的同学采用了 rDNA 序列分析方法。这其中也有两个关键的步骤会影响到结果。一是基因组 DNA 的提取,有很多学生提取的基因组 DNA 质量不过关,导致无法获得相关 DNA 序列;另外就是 PCR 的退火温度把握不准,有的由于温度低导致产物的杂带很多,有的由于温度过高而无法获得目的条带。这需要指导教师对学生进行 PCR 原理的讲解,使学生掌握基本的 PCR 实验方法。经过多次实验,基本确定所采用的引物进行 16S 和 18S rDNA 序列扩增的最佳温度分别是 57°C 和 60°C。

在实验实施过程中,学生独立动手能力、分析

问题和解决问题的能力都得到了提高。同时, 由于学生在实验中靠自己的努力, 解决了所遇到的困难, 不仅培养了他们实事求是的科研品质, 而且丰富了学生的科研经历、增强了学生的自信心。

### 3 总结评价

总结评价阶段, 既是对学生实验学习成果的总结评定, 也是对教师实验教学的总结分析。指导教师对探究实验的全过程进行总结, 鼓励评价同学们的学习热情和创造能力, 总结一般性问题。同时, 教师要接受学生对于探究性实验的反馈, 通过问卷调查的形式, 组织学生对这一阶段的实验进行评价。

通过淀粉酶产生菌的筛选分析实验, 同学们不但掌握了生物技术学科中有经济价值性微生物筛选分析的一般方法, 还筛选到了一些有研究价值的产淀粉酶菌株(图 1)。结合生理生化分析方法和 rDNA 序列分析法, 初步将筛选到的菌株进行了分类鉴定, 把确定分类地位的菌株提交到 NCBI GenBank 中, 获得了登录号(表 1)。在探究性实验后对参加的 77 位同学进行的问卷调查(表 2)结果显示, 学生们认为探究性实验有利于学生对理论知识和实验技能的学习, 有利于激发学生的学习兴趣、有利于培养优良的科研素质和创新思维。教学过程中激发学生的兴趣是达到教学效果的重要环节, 在微生物学理论课和实践课中都应注意改革和创新教学方法, 激发学生的学习兴趣<sup>[6]</sup>。本文的实践证明, 在微生物学实验中引入探究性实验, 使学生们对于微生物学相关课程有了更大的兴趣, 达到了较好的教学效果。

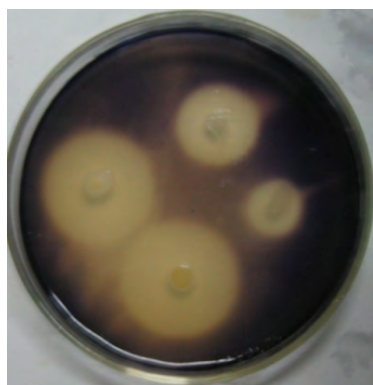


图 1 产淀粉酶菌株  
Fig. 1 Amylase-producing strain

菌株编号 Strain	采集地点 Sampling location	初步分类 Preliminary classification	基因编号 GenBank No.
T34	农田土壤	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	FJ796222
P1	植株表面	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	FJ796223
F2	鲫鱼肠道	气单孢菌 <i>eromonas</i>	FJ796224
F14	鲫鱼肠道	气单孢菌 <i>eromonas</i>	FJ796225

问题 Question	答案 Answer	
	是 Yes	否 No
有利于提高学习兴趣 Be conducive to the enhancement of study interest	85.7	14.3
有利于掌握理论知识 Be conducive to the mastery of theoretical knowledge	83.1	16.9
有利于掌握实验技能 Be conducive to the mastery of experiment skills	94.8	5.2
有利于提高科研能力 Be conducive to the promotion of research capability	89.6	10.4
有利于培养创新思维 Be conducive to the cultivation of innovative thinking	87.0	13.0

### 参 考 文 献

- [1] 孟庆繁, 逯家辉, 王贞佐, 等. 探索性实验是创新型人才培养的有效途径. 实验室研究与探索, 2004, 23(1): 85-88.
- [2] 柯涛.  $\alpha$ -淀粉酶的分子定向进化及其突变体结构与功能研究. 华中科技大学. 博士学位论文, 2006.
- [3] 张应玖, 朱学军, 关键, 等. 一种新型淀粉酶的鉴定及其产酶菌株的筛选. 微生物学通报, 2002, 29(5): 38-41.
- [4] 李莉. 草鱼肠道菌群的变化和免疫机能的关系. 华中农业大学. 硕士学位论文, 2003.
- [5] White TJ, Bruns T, Lee S, *et al*. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In PCR Protocols. Academic Press, San Diego, 1990: 315-322.
- [6] 朱宏飞. 微生物教学中激发学生兴趣的几点探索. 微生物学通报, 2007, 34(1): 173-175.