

基因工程原理教学探索

——以克隆策略教学为例

刘增然* 张光一 张香美 赵士豪

(河北经贸大学生物科学与工程学院 河北 石家庄 050061)

摘要: 克隆策略是分子生物学研究和生物制品开发必不可少的工具, 生物技术及相关专业的学生应该有扎实的理论基础和足够的应用经验。由于实践机会少, 大学生做到学以致用很难。为了让学生更好地掌握克隆技术, 我们在基因工程原理课程教学中采用了基本理论+论文案例的课堂教学模式进行克隆策略的教学。通过创设问题任务、拓展知识点, 完成克隆策略基本原理和主要方法的课堂教学, 使学生全面系统掌握基因克隆的流程和可用方法; 通过教师引导的自学、讨论、自教完成应用论文的学习, 使学生获得基于克隆策略设计实验的技能和选择技能。教学实践证明, 基本理论与论文案例嵌合的教学模式可以弥补课堂学习与实际应用之间的差距, 使学生的实验设计技能、解决问题的能力得以提高, 逻辑思维的严谨性、缜密性得以培养。

关键词: 克隆策略, 实验设计, 应用能力, 自主学习

Exploration into teaching and learning of principles of Genetic Engineering

—Taking cloning strategies as an example

LIU Zeng-Ran* ZHANG Guang-Yi ZHANG Xiang-Mei ZHAO Shi-Hao

(College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang, Hebei 050061, China)

Abstract: Cloning strategies is the most essential tools for molecular biological studies and bio-product development and thus students in biological techniques and related majors should have a solid theoretical foundation and enough practical experience with this technique. As a fact, due to having less training and practice opportunity during their studies, it is difficult for students to apply what they have learned. Aiming to make the undergraduates better master the gene cloning strategies,

Foundation items: High-quality Resource Sharing Courses (2015); Teaching Reform Projects of Hebei University of Economics and Business (2017JYY48); Science and Technology Projects of Hebei Province (15225503D); Funds for Scientific Research Projects of Hebei University of Economics and Business (2014KYZ05)

*Corresponding author: Tel: 86-311-87655680; E-mail: liuzengran@163.com

Received: July 24, 2017; Accepted: September 19, 2017; Published online (www.cnki.net): September 26, 2017

基金项目: 河北经贸大学 2015 年度精品资源共享课建设项目; 2017 年度教学研究项目(2017JYY48); 河北省科技计划项目(15225503D); 河北经贸大学科研基金项目(2014KYZ05)

*通信作者: Tel: 86-311-87655680; E-mail: liuzengran@163.com

收稿日期: 2017-07-24; 接受日期: 2017-09-19; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-09-26

we have adopted a model that combines theory with application case for the teaching-learning of cloning strategies in Genetic Engineering course. The cloning strategies were presented section by section with traditional classroom teaching and the undergraduates were made to fully grasp the process of gene cloning and available methods via designing questions and tasks and enlarging basic knowledge points. Additionally, research papers were introduced into classroom teaching-learning and the students got to know how to use cloning strategies to make an experimental design and select the methods that can be used via self-learning, discussion and self-presentation under instructor's guidance. Our practices show that the model combining cloning theory and research paper can bridge the gap between classroom learning and application, raise the students' experimental design and problem solving skills, and cultivate their logical thinking.

Keywords: Gene cloning strategies, Experimental design, Application ability, Self-directed learning

随着教学改革的不断深化,各高校根据实际情况对传统的课程教学纷纷提出了新思路和新要求,课程教师也充分利用网络化资源,努力开展教学平台建设,如录制微课、引入翻转课堂等,以激发学生的学习兴趣 and 主动性,促进学生的综合素质和创新应用能力的提高。然而,学习一知半解、考试应付、实验参与度低、应用能力提高程度不理想等问题仍然存在。学生学习依旧沿用读书记忆的传统模式,多是通过课堂听课获得专业基础知识,而通过实验获得专业操作技能的应用和实践机会较少。虽然学校鼓励本科生参与教师科研工作以获得实践经验,但只有很少的本科生能得到这样的机会,而且学生大部分时间都在教室上课,参与科研的时间不多,多是参与一些简单的操作。有些学生不太接受花时间做探究,认为重复实验浪费时间,没有什么收获,尤其对于计划考研的学生更是如此。教学安排的企业实践也多是停留在转转看看的模式。

在知识拓展需求增加,课程教学时数缩减的背景下,教师势必要解决如何吸引学生眼球的问题,促使学生跟着节奏完成课堂安排,提高课堂教学效率。为了激发学生的学习兴趣,使学生能够把所学的基础知识和实验技能用以解决实际问题,我们在基因工程原理的克隆策略教学中,尝试了教师讲解基本原理和知识点,学生互助学习技术应用的嵌合教学模式。实践证明基本理论与科研论文应用案例嵌合的模式,缩短了课堂学习与实际应用之间的差距,提高了学生的实验设计技能,利于学生将来解决科学研究和生物制品研发生产中的实际问

题;促进了以知识传授为主向能力培养为主的转变,同时也提高了学生逻辑思维的严谨性和缜密性。希望和从事相关教学的同行探讨交流,以期对相关课程的教学改革提供参考依据。

1 教学存在的问题及改革设计

克隆策略广泛应用于生物研究的各个领域,是生物技术人才必须掌握的基本技能,是基因工程课程教学的重点,其涉及的知识点包括:目的基因获得、合适载体选择及与 PCR (RT-PCR)产物的酶切连接、合适受体转化、转化子筛选及重组子鉴定。涉及的实验技能包括 DNA 序列分析、PCR (RT-PCR)引物设计、PCR (RT-PCR)体系建立、凝胶电泳、目的基因纯化、载体的选择与构建、宿主转化、Blotting 检测等。

为了提高学生的分子生物技术操作水平,将分子生物学课程(第五学期开课)的实验与基因工程原理课程(第六学期开课)的实验合并,开设了分子生物学综合实验课程(第六学期开课),拟通过 PCR、质粒提取、转化、转化子鉴定等一系列克隆相关的实验,培养学生的实验操作技能及解决实际问题的能力。由于条件限制,学生只能按教师给出的方案和步骤操作,不可能了解实验方案设计的细节,学生的科研思维培养、实验设计和实际问题解决能力的提高不够。

多年教学实践了解到,学生对概念原理方法的掌握没有大的困难,真正的难度体现在能否用克隆策略解决实际问题。借助克隆策略进行生物制品表达

或基因功能等相关研究,除了要有实验技能,还需能设计实验方案。为此,我们在课程的克隆策略教学中采用了两步走的模式,借助问题任务创设、翻转课堂、知识拓展、总结提高等手段开展课堂教学,使学生掌握基本原理和知识点;通过研究论文学习,探究克隆策略相关技术的技术实质和在生物产品生产设计的应用思路,使学生获得基于克隆策略进行实验设计的技能,进而提高学生的实际应用能力。

2 创设情景,解决问题、完成任务

对克隆策略流程和方法的学习,采用翻转课堂模式进行教学。录制克隆策略的微课视频,提出思考问题,包括获得基因片段的方法有哪些?基因片段如何插入合适的载体?重组载体转化受体的方法有哪些?转化子筛选方法(DNA层面、蛋白层面和生理功能层面)有哪些?学生课前通过网络课堂视频进行预习、思考提出的问题;教师通过课堂检查学生完成情况,强调关键问题和学生疏忽的问题,促进学生克隆策略流程及可用方法的掌握(图1)。

如何获得双链 cDNA? 学生通过基本技能的学习,已经掌握了通过 RT-PCR 由 mRNA 反转录出第一链 cDNA,然后 cDNA 作为模板进行 PCR,获得

双链 cDNA。基于这些基本知识,在后续的 cDNA 定向克隆方法学习中,不再沿用过去对照图示直接讲解的方式,而是力图提高学生的实际应用技能。因此,首先提出问题:能否实现 cDNA 的定向克隆以减少后续筛选?然后给出图 2,再提出能否借助质粒获得与载体相连的 cDNA?让学生用 5 min 时间尝试理解图 2 的应用技巧。通过师生合作总结方法策略:(1)携带聚 T 粘性末端的质粒作为引物,退火与 mRNA 的聚 G 互补,启动第一链 cDNA 合成;(2)为与载体相连的 cDNA+mRNA 杂合子加聚 C;(3)用 *Hind* III 酶切,使得质粒携带一个聚 C 的粘性末端;(4)与有 *Hind* III 和聚 G 粘末端的片段连接成环;(5)用 RNaseH 降解 mRNA 链,DNA 聚合酶合成第二链 cDNA,切口经 DNA 连接酶连接,获得插入双链 cDNA 的重组载体。该方法实现了 RT-PCR 和载体重组同时完成。这样通过学生看明白、讲清楚教师引导的课堂合作学习,使学生随堂掌握借助载体实现 cDNA 定向克隆的技巧。通过这一学习过程,让学生了解看明白与讲清楚之间有一定的距离,学生通过尝试解释清楚,真正掌握相关知识,提高表达能力。

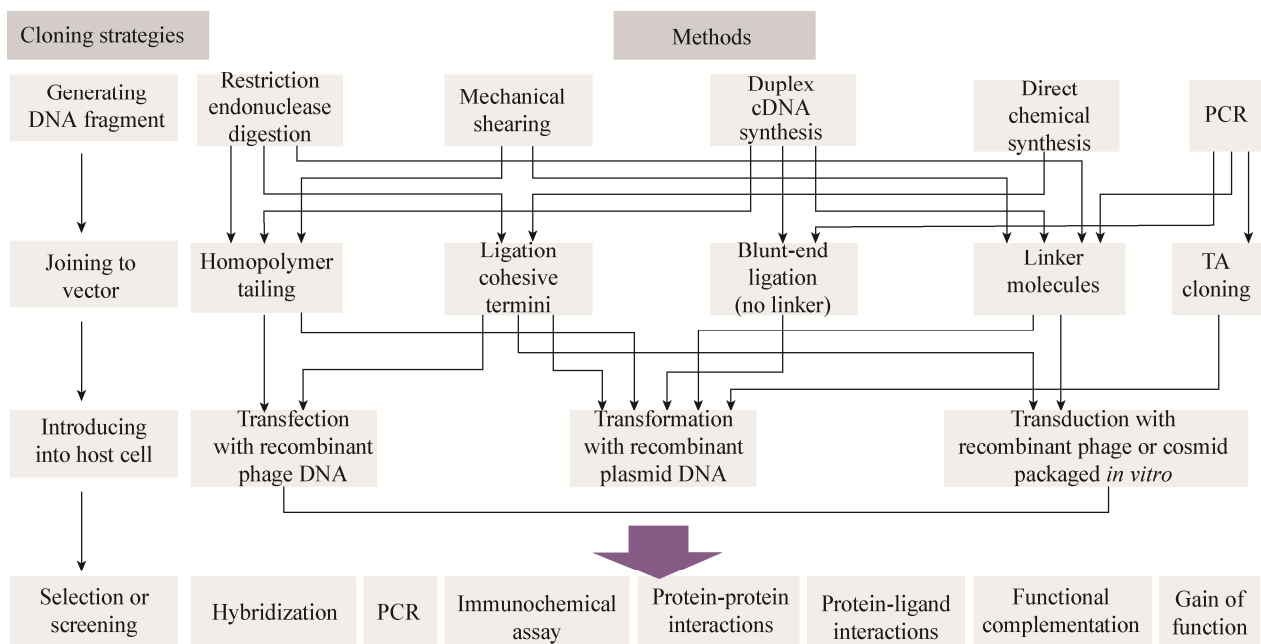


图1 克隆策略和可用方法^[1]

Figure 1 Overview of the cloning strategies and available methods^[1]

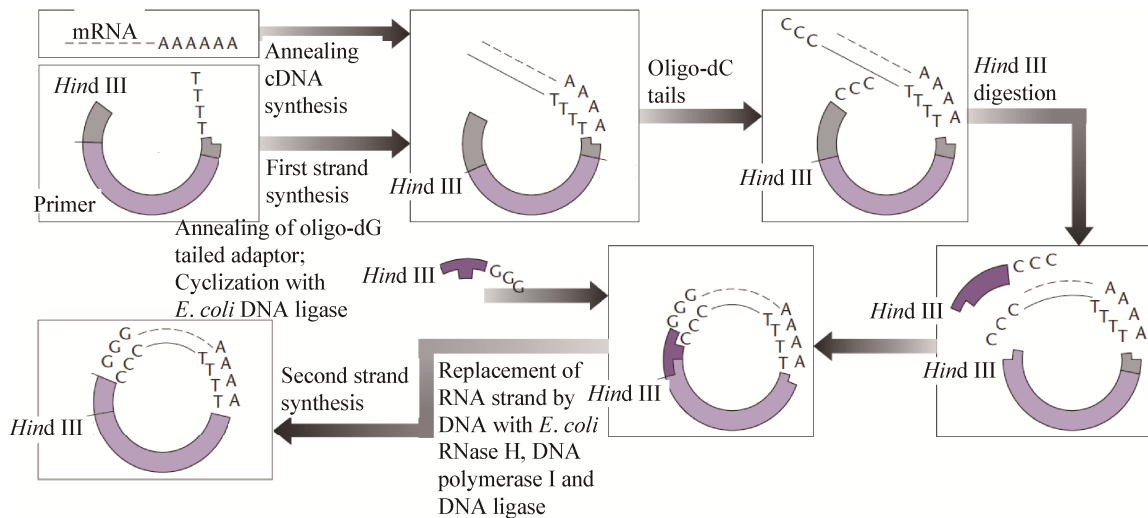


图2 mRNA直接连接到克隆载体实现cDNA定向克隆的策略^[1]

Figure 2 Strategy of directional cDNA cloning by linking mRNA to the cloning vector directly^[1]

课后给出该技能引用出处及原文，便于学习能力强的学生进一步自主学习，了解到教科书上未涉及的技能。如引物设计中可以引入与目的基因特异序列不互补的大片段、甚至质粒片段，以便于后续步骤的实施，而教材介绍引物大小一般为18–27 bp；实验中加EDTA使PCR反应终止，实验中各步产物要经过纯化才能进行后续操作。因此，通过创设任务开展课堂教学，将理论知识讲授及应用技能训练融合到任务完成中，使学生产生完成任务的渴望，获得完成任务的成就感，并实现知识拓展。

3 拓展基础知识，提高应用能力

在分子生物技术不断丰富、新应用不断出现的网络时代，快速收集所需资料成为可能。因此，我们教学的模式从系统讲授课程内容、巩固知识向启迪思维、掌握应用转移，不再像传统课堂那样用较多时间来系统讲解概念、原理、分类和不同方面的应用，而是通过应用案例学习，将知识点与应用紧密衔接，使学生在应用案例学习中掌握基本知识。“PCR原理及应用”教学模式：网络课堂提供PCR微课视频和思考题；学生课前通过观看视频，自主学习PCR的基本原理、反应体系组成和反应过程；教师课堂分析讲解PCR应用的典型案例，如用PCR

方法检测玉米样品是否污染黄曲霉^[2]、是否是转基因玉米^[3]。让学生了解通过确定目标基因，借助引物设计软件，根据报道的特异序列设计引物；参考试剂盒说明书设计PCR的反应参数和反应体系，完成PCR扩增；PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，通过分析PCR产物大小，初步确定结果。

在课堂讲解中，鼓励学生勤于思考，善于提出问题，努力拓展思路，以促进学生开拓创新精神的养成。在PCR讲解时(包括各种教材的PCR原理讲解)，强调实现PCR需要获得目的基因的一段特异序列的组成信息，进而能设计引物。可喜的是在2017年PCR相关内容教学中，有个学生提出看到了最近发表的一篇研究论文^[4]，质疑了引物必需的问题。根据该论文，来自海底火山噬菌体的DNA聚合酶能识别特定的模板序列，在没有引物的情况下专一性的用脱氧核糖核苷三磷酸体外合成DNA。他提出将来这种DNA聚合酶是不是能被广泛应用，使体外合成DNA变得更容易？课后教师下载这篇文章，上传课程网络课堂，利于有兴趣、有能力的学生进行研读以拓展知识。

为了培养学生的认知能力和思维缜密性，要求学生通过互联网查找PCR应用案例进行互助学习，

了解 PCR 应用的广泛性, 促进 PCR 相关知识延伸, 拓展发展机会。学生根据自己的计划目标, 选择不同类型的应用案例, 对其引物设计策略及实验步骤进行总结。基础较好、计划考研的学生, 研读学习基因克隆、基因诱变、基因敲除方面的应用案例; 计划直接就业的学生, 学习致病菌检测、遗传病检测、亲子鉴定方面的案例。

4 案例探究, 获得实验设计经验

应用案例学习是学生掌握克隆策略的有效途径。我们挑选 *Nature* 2008 年发表的科研论文“Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels”^[5]进行应用案例学习, 包括完成任务、学生讲解和教师总结 3 个环节。克隆策略课堂教学完成后, 教师用 10 min 对案例论文做课堂引导; 介绍论文研究背景, 支链高级醇合成策略和设计理念; 明确论文学习要求, 布置任务。学习委员根据全班同学的具体情况, 划分学习小组; 小组围绕论文进行协作学习。课程结束前二周, 学生用 PPT 分别讲解不同段落, 教师评价学生讲解情况, 总结实验设计思路。

4.1 论文背景知识

能源和环境问题刺激了生物能源的研究。传统生物能源的合成是通过糖的 CoA 代谢途径, 而该篇研究论文基于宿主的氨基酸代谢途径, 用代谢工程的方法使中间代谢产物 2-酮酸的代谢途径改线, 实现高级支链醇的高效合成(图 3)。

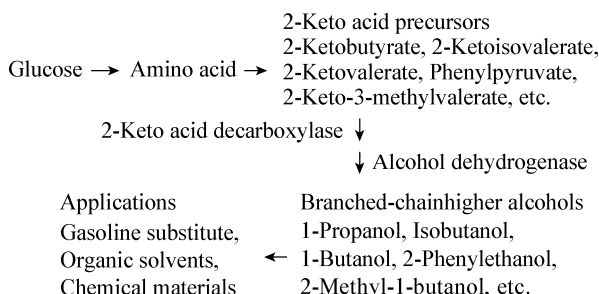


图 3 支链高级醇合成策略

Figure 3 Strategies for synthesis of branched-chain higher alcohols

4.2 学生协作学习

教师基于克隆策略设计学习表, 包括基因获得、重组载体构建、受体转化、转化子筛选验证 4 个环节的目的、设计思路、所用的材料与方法、主要实验步骤、实验中可能出现的问题及解决方法、论文的结果等问题。要求学生通读论文, 理解文中句子, 了解论文内容; 学习小组协作回答学习表的问题, 总结研究者的实验设计思路。如有疑问, 可以在课程网络课堂讨论区、班内 QQ 群或微信群与教师或同学探讨。考虑到学生看懂句子、了解内容、总结实验流程用时较长, 任务提前布置, 让学生有足够的时间完成学习。

4.3 学生课堂展示

自主授课是学生知识内化的过程。安排所有学生用 PPT 分别讲授论文的不同部分, 每人 5 min。学生作为讲课新手, 缺乏授课技能, 往往很难把内容表达清楚。因此, 建议学生课前在室外或在宿舍对着镜子反复演练要讲的内容。学生授课结束, 教师做针对性补充、修正, 凸显教师的主导作用。并将学生的课堂讲授录制视频, 上传课程网络课堂, 让学生观看、互评、找出不足、实现自我完善。为了提高学生参与的积极性, 在课程总成绩中设置 10 分自主授课表现分, 让学生为每个人打分。

4.4 教师补充总结

课后总结是重要的知识拓展环节。学生自授课结束, 教师基于论文学习表, 引导学生对相关知识点进行梳理、总结与提升, 使学生把克隆策略融会贯通, 形成完整的知识应用体系。论文学习结束后, 教师提出一个需要学生思考的问题。氨基酸的 Ehrlich 代谢途径早在 1907 年就提出了, 而案例是 2008 年 *Nature* 发表的论文。你能想到利用氨基酸代谢途径合成高级醇吗? 研究中涉及到的知识点是不是都学过了? 如果都学过了, 你能想到所用的策略, 将来会有这种能力吗? 以激励学生明确学习动机, 促进创新意识的形成。

4.5 学生学习收获

设计实验是开展科学研究的核心^[6], 对大学生

表 1 改革成效问卷调查

Table 1 Survey on the effects of our education reform

问题 Questions	选择 Choices
对教学改革实施的满意度 Satisfaction degree to education reform	坚决反对; 不接受; 接受; 赞成; 非常赞成
克隆策略掌握程度 Learning degree of gene cloning strategies	能表述原理; 能解释克隆策略; 能根据克隆策略总结他人的实验设计; 能基于克隆策略进行实验设计
能力提升情况 Capability development	自主学习能力; 团队协作能力; 逻辑思维能力; 科研探究能力
英语科技论文阅读能力变化 Improvement of english paper reading skills	词汇量增加; 能看明白科技英语的句子; 英文阅读能力有提高; 能阅读英文论文; 较顺畅地阅读英语论文

很有挑战性。学生通过论文案例学习, 获得了基于克隆策略进行实验设计的经验, 掌握了找目的、寻策略、看结果、学方法的论文研读模式; 了解了发现问题、提出假设需查阅大量的相关资料、找到假设的依据, 验证假设需要设计实验方案、确定实验方法、购买仪器材料、开展实验、得出结论。还了解了论文写作的一般格式(包括文献综述、实验方法与材料、结果及分析、讨论等部分)。同时学生通过拓展学习和协同完成任务, 既提高了专业能力, 又获得了与人沟通合作的技能, 利于满足现代社会对专业技术人才的要求^[7]。

5 教学改革成效分析

克隆策略的教学探索证明, 基础理论与应用案例结合, 教师指导与学生自学、讨论、自教结合的探究式教学模式, 为学生提供了获得实践经验的另一种途径, 也使课程的教学质量有了明显提高。不仅利于学

生掌握克隆策略的基本原理及方法, 也利于调动学生的学习主动性, 使学生的综合素质和能力得到不同程度地提高; 同时还利于发现有潜力的学生, 让他(她)们树立远大理想, 确定努力目标和考研单位。

为了评价课程改革成效, 对 3 个班级共 101 名学生进行问卷调查(表 1), 了解学生对课程教学改革的评价、对克隆策略的掌握、能力提升及英语论文阅读能力提高情况。

结果显示 11% 学生对尝试的教学模式非常赞成、76% 能接受、9% 坚决不接受。61% 学生能基于克隆策略看明白他人的实验设计, 13% 能基于克隆策略进行实验设计。32% 学生 4 种能力都得到提高, 42% 学生的 3 种能力有提高, 9% 学生只提高了自主学习能力。通过英文论文学习, 学生科技英语阅读能力得到不同程度提高, 35% 学生能够阅读英文论文, 但 7% 学生反映提高较少(图 4)。考

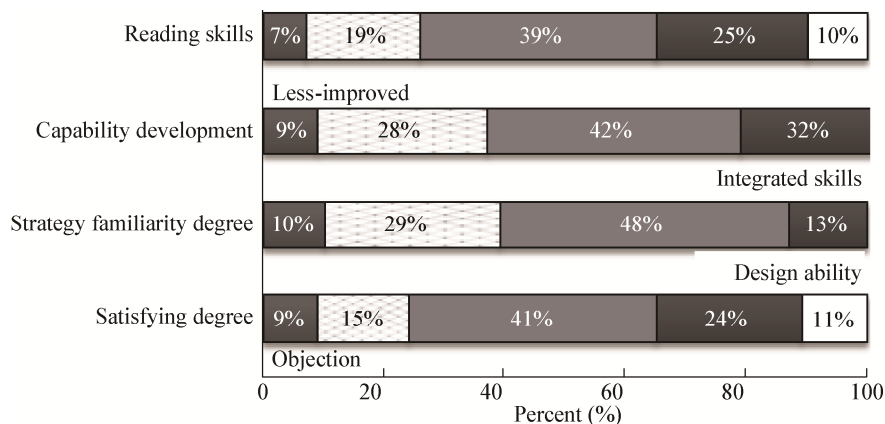


图 4 课程教学改革成效

Figure 4 The effects of teaching-learning reform

研的学生认为克隆策略的教学模式对他们考研准备起到了促进作用, 对面试帮助非常大, 2017 年有 3 个学生考上中国科学院的研究生, 创专业历史最好成绩。

对课程教学改革进行了一些有益尝试, 取得了一些成绩, 也发现了一些问题。在学期初布置任务时, 学生都想做好, 动力也足; 因为看完整篇论文耗时长, 尤其英语不过关的学生, 完成任务难度较大, 过程经历比较痛苦, 少数学生会中途放弃。从课程教学实践和学生访谈还发现, 学生的科研思维和创新能力的培养需要多个部门、多门课程的协作努力。针对这些问题, 我们今后课程教学将尝试从以下几方面进行探索以提高学生接受度及受益度:

(1) 加强过程监督、指导和交流, 让学生有压力、有动力、有依靠; (2) 倡议学生间互相帮助, 提高学生参与度; (3) 学习小组划分注意英语水平、学习主动性和表达能力高低搭配, 促使学生协同完成。

REFERENCES

- [1] Primrose SB, Twyman RM. Principles of Gene Manipulation and Genomics[M]. 7th ed. Malden. MA, Oxford: Wiley-Blackwell, 2006: 98,108
- [2] Shweta S, Madhavan S, Paraniharan V, et al. Detection of *Aspergillus flavus* in maize kernels by conventional and real-time PCR assays[J]. International Food Research Journal, 2013, 20(6): 3329-3335
- [3] Yuan JQ, Chang H, Zhao JH, et al. Detection of transgenic components in animal feeds on Shanxi markets[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(11): 1576-1589 (in Chinese) 袁建琴, 常泓, 赵江河, 等. 山西市场动物饲料中转基因成分的检测[J]. 生物工程学报, 2016, 32(11): 1576-1589
- [4] Zhu B, Wang LF, Mitsunobu H, et al. Deep-sea vent phage DNA polymerase specifically initiates DNA synthesis in the absence of primers[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(12): E2310-E2318
- [5] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels[J]. Nature, 2008, 451(7174): 86-89
- [6] Dasgupta AP, Anderson TR, Pelaez NJ. Development of the neuron assessment for measuring biology students' use of experimental design concepts and representations[J]. CBE Life Sciences Education, 2016, 15(2): ar10
- [7] Ministry of Education, National Development and Reform Commission, Ministry of Finance. Ministry of Education, Num. 7 Guidance for some local colleges and universities to implement application-centered shift[S]. Beijing: Ministry of Education, National Development and Reform Commission, Ministry of Finance (in Chinese) 教育部, 国家发改委, 财政部. 教发[2015]7号 教育部 国家发展改革委 财政部关于引导部分地方普通本科高校向应用型转变的指导意见[S]. 北京: 教育部, 国家发展改革委, 财政部