

以达托霉素产生菌菌株改造为主线的微生物工程综合实验的探索和实践

廖国建¹ 何颖² 谢建平^{2*}

(1. 西南大学药学院 重庆 400716)

(2. 西南大学生命科学学院 重庆 400715)

摘要: 为使本科学生更好地掌握微生物工程的基本实验操作技能和前沿研究技术, 探索将教师的科研成果转化为教学实验, 构建了以达托霉素产生菌菌株改造为主线的微生物工程综合实验。在教学模式、实验内容设计、教学安排和考核方式等方面进行实践, 取得了较好的教学效果, 培养了本科学生的科研技能、科研思维和研究素质。

关键词: 达托霉素, 基因工程改造, 微生物工程, 大实验

Exploration and practice on Microbiological Engineering experiment teaching based on daptomycin genetic engineering

LIAO Guo-Jian¹ HE Ying² XIE Jian-Ping^{2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China)

(2. School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Experiment teaching played an important role in helping students to grasp operation skill and to improve scientific thinking. To explore the transformation of teacher's scientific results into teaching materials, we build a microbiological comprehensive experiment teaching based on daptomycin genetic engineering. This article discussed the exploration and practice in multi respects such as teaching mode, the experimental design, teaching arrangement, student assessment. Teaching results demonstrated that scientific thinking and scientific research technique of student are significantly improved.

Keywords: Daptomycin, Genetic engineering, Microbiological Engineering, Comprehensive experiment

Foundation items: Teaching Reform Project of Chongqing Municipal Education Commission (163024); Teaching Reform Project of Southwest University (2016JY050)

***Corresponding author:** Tel: 86-23-68367108; E-mail: georgex@swu.edu.cn

Received: September 30, 2017; **Accepted:** December 05, 2017; **Published online** (www.cnki.net): January 10, 2018
基金项目: 重庆市教委教改项目(163024); 西南大学教改项目(2016JY050)

***通信作者:** Tel: 86-23-68367108; E-mail: georgex@swu.edu.cn

收稿日期: 2017-09-30; **接受日期:** 2017-12-05; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-01-10

生物工程作为一个新兴应用学科,发展迅速、行业规模不断扩大^[1]。传统的生物工程包括五大工程,即遗传工程(基因工程)、细胞工程、微生物工程(发酵工程)、酶工程(生化工程)和生物反应器工程。微生物工程主要对微生物进行工程改造,包括基因工程技术、转基因生物技术、合成生物学技术等,以及微生物发酵工艺等,是生物工程的重要组成部分,其专业课程实验教学是培养工程化人才的重要环节。实验教学不仅能培养学生专业技能,也是学生创新意识形成的主要培养途径,是本科教学体系不可缺少的组成部分。然而,传统实验教学项目设置受制于理论课程,验证性实验项目过多,且忽略实验项目之间的有机联系,导致各项目之间相对独立,缺乏内在联系,严重制约学生综合解决问题能力和创新能力的提高^[2]。为了深化实验教学改革,整合微生物工程相关的实验,利用任课教师的科研成果开设新型综合实验,使学生既会基础实验操作,又能初步接触科学研究理念,营造创新性氛围,以提升实验教学的水平,激发学生的研究兴趣,培养科研创新能力。

1 构建微生物工程综合实验的重要性和必要性

近年来,国家对高校投入不断加大,实验室的硬件设施有了显著地改善,实验教学内容和形式也从封闭的课堂小实验改变为全天候的开放式综合大实验^[3-4]。以前教改形成的微生物制药大实验、发酵工程大实验等整合若干有联系的实验技术,教学方式上强调培养学生独立操作能力,但大实验之间尚缺少实验内容与实验技术上的刚性联系,学生们在不同的大实验课程上学到的实验理念和操作技能不能形成一个知识链条,难以综合运用学到的知识和技能解决一个较大的科学问题或生产实践活动。以科研提升教学,将科研实验转化为教学内容,并进一步实现教学内容向科研工作的延伸,对于学生了解前沿性的实验技术与手段,提高创新能力具有不可比拟的效果^[4]。

如何选择恰当的产品作为生物工程综合实验

的突破点?产品选择的标准应包括:时代性、前沿性、市场价值、技术综合性、微生物遗传操作可能性。达托霉素是一种新型环脂肽抗生素,用于治疗耐药革兰氏阳性菌感染,2003年在美国上市,上市后其销售额逐年上升,2016年全球年销售额超过20亿美元,已成为控制耐药菌感染的最后一道防线。2016年我国食品药品监督总局批准了华东医药和恒瑞医药生产达托霉素。达托霉素是一种微生物次级代谢产物,结构复杂,产量非常低,通过微生物工程系统改造是提高达托霉素产量、降低生产成本的重要策略。通过国内外科学家的努力,克隆了达托霉素生物合成基因簇,并对达托霉素生物合成调控有了较为深入的了解^[5-7]。达托霉素具备的突出特点以及课程教师长期从事达托霉素的代谢工程和合成生物学研究,形成了较为丰富的教学材料,使达托霉素产生菌菌株选育成为生物工程实验的突破点。在此基础上提出以达托霉素产生菌基因工程改造为主线,有机地整合基因工程、代谢工程和发酵工程的生物工程综合实验课程,学生将系统地学习现代生物技术的实践理念,基因克隆,质粒构建,链霉菌发酵,抗生素含量测定等分子生物学、微生物学和发酵工程的基础实验方法及原理。本科学生通过该大实验不仅夯实了相关课程的基础理论知识,而且掌握了现代微生物学实验技术,培养了团队合作意识、独立工作能力和科研创新能力。

2 以达托霉素产生菌菌株改造为主线的微生物工程综合实验课程的内容架构

为了追踪微生物工程的发展前沿,提升本科生的实践能力和创新能力,微生物工程综合实验包含基因工程、代谢工程和发酵工程3个模块。以基因工程改造达托霉素产生菌——玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus*)为研究材料,以提高抗生素的产量为实验目标,通过目的基因的克隆,重组质粒的构建和验证,重组质粒整合到链霉菌基因组获得工程菌,工程菌的发酵,抗生素效价的测定等一系列实验为主线,贯穿基因工程实验、代谢工程实验和发

酵工程实验,重排实验课程顺序,建立以微生物学、基因工程和发酵工程为核心的实验模块组合的微生物工程综合实验教学平台。具体实验教学内容和安排见表 1。通过该系列课程的学习,增强学生的基础理论和掌握扎实的实验技术,并体验用现代生物技术构建工业生产菌株的完整过程。

表 1 生物工程大实验内容架构
Table 1 The structure of comprehensive experimental course of bioengineering

实验序号 Number	实验内容 Contents	参考学时数 Class hours
实验 1 Experiment 1	质粒 DNA 的小量制备	4
实验 2 Experiment 2	质粒 DNA 的电泳鉴定	4
实验 3 Experiment 3	质粒 DNA 的酶切	4
实验 4 Experiment 4	PCR 扩增目的基因	4
实验 5 Experiment 5	琼脂糖凝胶回收 DNA 片段	4
实验 6 Experiment 6	目的基因与载体连接	4
实验 7 Experiment 7	感受态大肠杆菌的制备	4
实验 8 Experiment 8	感受态大肠杆菌的转化	4
实验 9 Experiment 9	转化菌落的筛选和鉴定	4
实验 10 Experiment 10	链霉菌培养和孢子收集	4
实验 11 Experiment 11	外源 DNA 通过接合转移导入链霉菌	8
实验 12 Experiment 12	重组菌株基因组 DNA 的提取	6
实验 13 Experiment 13	PCR 扩增鉴定重组菌株	4
实验 14 Experiment 14	发酵罐的使用方法	8
实验 15 Experiment 15	溶氧系数的测定	8
实验 16 Experiment 16	接种物的制备和种子扩大培养	6
实验 17 Experiment 17	机械搅拌发酵罐生产达托霉素	6
实验 18 Experiment 18	发酵曲线绘制和达托霉素含量检测	6

2.1 基因工程实验

基因工程模块是整个综合实验的重要环节,负责构建后续代谢工程实验所需重组质粒。实验主要由 PCR 扩增抗生素高产相关基因,重组质粒的构建和验证,感受态细胞的制备和转化等一系列整套相互关联的实验,获得一系列可用于后续代谢工程实验的重组质粒。本模块共学习 9 项基因工程实验技术。学生通过本模块实验课程的学习,将增强基因工程的基本概念,掌握基因工程常用的核酸操作技术。

2.2 代谢工程实验

以突变和筛选为中心的传统育种技术是工业高产菌株重要来源。随着研究的深入,通过代谢工程技术理性选育高产菌株得到了日益广泛的利用。代谢工程实验模块利用基因工程实验模块制备的含有目的基因的重组质粒,通过转化大肠杆菌 ET12567,通过接合转移技术将目的基因整合到链霉菌基因组,获得重组菌株。实验包括接合转移条件的摸索,重组菌株基因组 DNA 的提取和 PCR 验证等。本模块包含 4 个实验。通过本模块的实验操作学生将会掌握 DNA 转化,利用接合转移将外源 DNA 导入链霉菌,以及通过 PCR 扩增鉴定重组菌株等一系列链霉菌代谢工程实验技术,加深对微生物遗传学和代谢工程理论的理解。

2.3 发酵工程实验

发酵工程模块利用代谢工程实验模块构建的重组菌株,摸索最优发酵条件,测定抗生素的效价和重要发酵参数。本模块包含 5 个实验。通过本模块的实验操作,学生将增加对发酵罐的工作和使用、发酵条件优化、抗生素含量测定等一系列微生物发酵的原理的认识,掌握生产实践中常用的发酵技术,获得达托霉素。

3 生物工程综合实验的教学安排及效果

生物工程大实验由一系列的微生物学实验和分子生物学实验组成,学生需要具备遗传学、发酵工程和基因工程的知识。遗传学和基因工程在我校是大三上下学期开课,微生物学和发酵工

程原理是大二开课。为了保证效果,在学院的支持下,其他课程的教学和考试在大学三年级下学期提前一个月结束,避免与微生物工程综合实验的冲突。本课程在最后一个月统一开课,持续四周,共96学时,全天候进行,以保证3个模块的连续性、实验完整性、实验操作和科研思路训练的连贯性。

3.1 教学模式

将教师的科研项目转化为本科生综合实验,是一个新的尝试和探索,具有相当的难度和不确定性。为了全面锻炼学生的综合素质和保证实验的顺利进行,我们采用了基于问题的教学模式,并采用模块化的教学设计。基于提高达托霉素产量的问题,引导学生查阅中英文文献,产生候选改造基因,通过学生的小组讨论以及和指导教师讨论确定最终的基因,在指导教师的帮助下自行设计引物开展基因扩增和克隆,整个过程以学生为中心,基于问题的学习,极大地激发了学生的实验热情和锻炼他们的综合能力。实验进行中,每个模块都以目标导向的项目形式进行,学生有机会在规定的时间内重复某个失败的实验,有助于学生探究实验成功的秘诀和总结失败的教训。通过综合实验,学生深刻体会到了微生物工程的连贯性、综合性和前瞻性。

3.2 考核方式

本实验的教学内容相互关联,具有上中下的时间顺序,相对独立,对于每个模块的具体实验教学由各模块实验教师对实验操作进行考核。整个实验按照科研项目的形式展开,每个研究小组选择的目的基因各不相同,学生在进入实验室之前查阅文献资料,撰写开题报告,详细陈述立项依据,实验方案和预期实验结果,全部实验结束后按照西南大学毕业论文格式提交实验论文。每个研究小组整理实验结果进行汇报答辩,并针对实验结果及在实验过程中出现的问题进行讨论。最终的实验成绩基于上述表现综合判定。

3.3 教学效果

综合实验运行后得到学生普遍好评。课程结束后,很多学生都会对本课程的项目设计、教学方式、

考核方式以及自己在实验过程的体会、感悟等进行认真评价,并提交许多建设性意见,为课程的不断完善奠定了坚实的基础。部分学生在综合实验结束后选择达托霉素菌株改造作为本科毕业论文的内容,以及选择微生物学或微生物与生化药学作为攻读研究生的方向,这表明本实验的教学模式和内容受到了学生的欢迎和认可。

总之,基于科研课题形成的教学材料开设微生物工程综合实验是一个系统工程,需要在教学观念、内容设置、教学方式和结果评定等多方面协调和改革。随着探索和实践的不断深入,有望在培养本科学生的科研技能、科研思维和研究素质等方面发挥重要作用。

REFERENCES

- [1] Huang JL, Pan ZM, Li QC, et al. Optimizing and integrating the course experiment of bioengineering to establish comprehensive experiment course system[J]. Education and Teaching Forum, 2014(26): 176-178 (in Chinese)
黄金林, 潘志明, 李求春, 等. 优化整合生物工程专业课程实验建立综合大实验课程体系[J]. 教育教学论坛, 2014(26): 176-178
- [2] Morigen, Xing WJ, Wang ZG, et al. Construction and development of an undergraduate super comprehensive experimental course of biotechnology[J]. Journal of Biology, 2014, 31(3): 104-107 (in Chinese)
莫日根, 邢万金, 王志钢, 等. 本科生物技术综合性超大实验课程的架构与建设[J]. 生物学杂志, 2014, 31(3): 104-107
- [3] He Y, Liao GJ, Xie JP. New teaching paradigm for microbiological experiments based on constructivism learning theory[J]. Microbiology China, 2011, 38(12): 1843-1847 (in Chinese)
何颖, 廖国建, 谢建平. 基于建构主义学习理论的微生物学实验课程教学新模式[J]. 微生物学通报, 2011, 38(12): 1843-1847
- [4] Liao GJ, Guo X, He Y, et al. The application of PBL to designing experimental teaching of Microbial Pharmaceutics[J]. Microbiology China, 2013, 40(5): 877-880 (in Chinese)
廖国建, 郭欣, 何颖, 等. PBL (Problem-based learning)教学模式在微生物制药设计性实验教学中的应用[J]. 微生物学通报, 2013, 40(5): 877-880
- [5] Huang X, Ma T, Tian J, et al. *wblA*, a pleiotropic regulatory gene modulating morphogenesis and daptomycin production in *Streptomyces roseosporus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(3): 669-677
- [6] Liao GJ, Liu Q, Xie JP. Transcriptional analysis of the effect of exogenous decanoic acid stress on *Streptomyces roseosporus*[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 19
- [7] Miao V, Coëffet-LeGal MF, Brian P, et al. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry[J]. Microbiology, 2005, 151(Pt 5): 1507-1523