

本科植物细胞与基因工程研究型实验课程的构建与实践

林晓飞, 征荣, 莫日根

内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021

摘要: 在本科实验教学中开设研究型综合性实验课程是培养创新性人才的重要教改内容。作者利用自身的科研平台, 为本科生开设了植物细胞与基因工程的专业选修课, 主要讲授植物组织培养、原生质体分离与培养、植物遗传转化及转基因植物的筛选与鉴定等植物细胞与分子生物学技术原理及实验操作。通过整合植物组织、细胞和分子3个水平的实验教学内容和操作技术, 采用集中讲解—独立操作—全天候开放的实验教学模式, 并在实验教学中增加自主设计环节, 培养本科生的综合性实验设计能力, 训练独立操作技能, 激发科研兴趣和自主创新意识, 从而达到培养本科创新人才的目标。文章总结了开展植物细胞与基因工程实验教学的经验和教学效果, 介绍了该实验教学的教學模式、教学内容和方法、考核评价体系, 分析了存在的问题, 阐述了以高水平科学研究促进实验教学对于深化本科教学改革和培养现代生物技术创新人才的重要性。

关键词: 植物细胞工程; 基因工程; 研究型实验教学; 创新人才

Research-oriented experimental course of plant cell and gene engineering for undergraduates

Xiaofei Lin, Rong Zheng, Morigen

School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China

Abstract: Research-oriented comprehensive experimental course for undergraduates is an important part for their training of innovation. We established an optional course of plant cell and gene engineering for undergraduates using our research platform. The course is designed to study the cellular and molecular basis and experimental techniques for plant tissue culture, isolation and culture of protoplast, genetic transformation, and screening and identification of transgenic plants. To develop undergraduates' ability in experimental design and operation, and inspire their interest in scientific research and innovation consciousness, we integrated experimental teaching and practice in plant genetic engineering on the tissue, cellular, and molecular levels. Students in the course practiced an experimental teaching model featured by two-week teaching of principles, independent experimental design and bench work, and ready-to-access laboratory. In this paper, we describe the contents, methods, evaluation system and a few issues to be solved in this course, as well as the general application and significance of the research-oriented experimental course in reforming undergraduates' teaching and training innovative talents.

Keywords: plant cell engineering; genetic engineering; research-oriented experimental course; innovative training

收稿日期: 2014-09-18; 修回日期: 2014-10-09

基金项目: 西部高校综合实力提升计划本科教学建设与改革-生物工程专业建设项目

作者简介: 林晓飞, 博士, 副教授, 研究方向: 植物分子生物学。E-mail: linxiaofei04@hotmail.com

通讯作者: 莫日根, 博士, 教授, 研究方向: DNA复制与细胞周期。E-mail: morigenm@life.imu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.14-309

网络出版时间: 2014-12-17 16:13:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20141217.1613.001.html>

20 世纪后半叶, 生命科学的飞速发展是现代生物技术的诞生和发展奠定了基础, 特别是遗传学、细胞生物学、微生物学和分子生物学等学科的迅速发展及相关技术的突破极大地促进了现代生物技术的发展。目前, 生物技术被视为高新技术和优先发展的领域, 已被应用到农林、工业、医药卫生、食品、化工和能源等各个行业。其中, 植物生物技术, 特别是植物细胞与基因工程的发展促使农业生产出现了两次被誉为绿色革命^[1,2]的飞跃, 在生态平衡、能源、医药、食品和人类健康等方面对人类社会的发展起到越来越重要的推动作用。

自 1902 年德国植物学家 Haberlandt^[3]提出了细胞培养的概念以来, 各国植物学家在植物组织细胞培养领域进行了 50 多年的不懈努力, 1939 年 Gautheret^[4], White^[5]和 Nobecourt^[6]分别建立了体外愈伤组织培养体系; 1958 年 Steward 等^[7]用胡萝卜韧皮部的细胞进行培养, 得到了完整植株。这些成果证实了 Haberlandt 关于细胞全能性的预言, 开辟了植物细胞工程的新纪元, 其在珍稀植物扩繁、农林作物遗传育种、种质资源保存、人工种子制作和次生代谢产物生产等领域的应用及所取得的效益有目共睹。同时, 植物细胞工程的发展为植物基因工程的建立和发展奠定了基础。1973 年, Stanford 大学的 Cohen 等^[8]成功地利用体外重组实现了细菌间性状的转移, 标志着基因工程的诞生。1983 年第一例转基因植物(烟草)在美国问世^[9], 从此, 转基因植物的研究和应用受到前所未有的瞩目。转基因技术在提高农作物产量, 改善农产品的性状和品质(保质期、口味)、提高药用植物有效成分的含量、提高植物抗逆性(抗虫、抗寒、抗旱、抗倒伏、耐除草剂、耐盐碱)等方面发挥了重要作用。目前, 虽然对转基因植物的安全性尚有争议, 但它对于解决全球粮食问题及在国民经济发展中所起到的作用毋庸置疑。正如诺贝尔和平奖获得者、绿色革命之父 Norman Borlaug 所说: “要想满足全球粮食的供给, 不可能寄希望于耕地面积的扩大和灌溉能力的提高, 只有靠改良和选育出高产作物品种才能实现这一目标, 而能实现这一目标的又唯有植物基因工程技术”。

1 构建植物细胞与基因工程实验课程的必要性

鉴于植物组织培养、细胞工程和基因工程技术在植物生物学研究及农林、医药、食品等应用领域的重要作用, 植物组织培养和基因工程技术一直是

生命科学教学的必修实验。但传统的植物组织培养只是单纯学习愈伤组织培养的实验, 并不给学生演示愈伤组织培养技术的实际用途。植物转基因技术只是基因工程课程理论课教学的一部分内容, 限于经费和时间, 很少能让本科生亲手操作。为了深化实验教学改革, 整合内容相关的实验, 利用任课教师的科研平台和成果, 用高水平的科研技术和研究性思想开设新型综合性研究型大实验, 提升经典的分散性验证型小实验的水平, 使学生既能学会基础实验操作, 又能初步接触科学研究理念, 体会不同的实验技术在科研创新活动中的具体运用模式和有机联系, 内蒙古大学生命科学学院于 2010 年把原来的“植物组织培养”理论及实验课与“植物基因工程”理论课整合为植物细胞与基因工程课程, 作为植物生物学课群的一门综合性专业实验课, 供生物科学、生物技术和生物工程专业学生选读, 旨在提高本科生植物细胞与分子生物学的实验操作技能, 培养学生的综合性和创新型思维方式。此外, 这样的综合性大实验本身就成为一个实践训练平台和创新思维孵化器, 通过在综合性实验中增加自主设计环节或融入新的实验技术, 营造研究型创新性氛围, 以提高实验教学的水平, 并激发学生的研究兴趣, 培养科研创新能力。

2 植物细胞与基因工程实验教学内容的构建

为了追踪生物科学和生物技术的发展前沿, 提高本科生的实践能力和创新能力, 我们设计的植物细胞与基因工程实验教学内容包括植物组织培养、细胞培养及原生质体操作和基因工程 3 个模块, 总课时为 32 学时(2 学时/周×16 周), 2 学分。在这 3 个模块的实验教学中, 我们采用拟南芥作为主要实验材料, 通过在组织、细胞及分子水平上的操作, 使学生在掌握相关操作技术的同时, 体会该植物作为模式植物在植物细胞与基因工程及植物分子生物学领域被广泛应用的优势所在, 同时为学生今后从事植物学相关研究奠定基础。具体实验教学内容和课时安排见表 1, 愈伤组织 3~4 周继代一次, 悬浮培养细胞 2 周继代一次, 由学生自主管理, 要求学生定期对培养物进行观察、记录。

2.1 植物组织培养模块

植物组织培养模块以愈伤组织的诱导及分化培养为主线,其主要内容包括培养基的配制、愈伤组织的诱导及继代培养、愈伤组织的分化培养及植株再生。我们以拟南芥的实生苗为材料,选择根、茎和叶的不同部位作为外植体进行愈伤组织的诱导,并对所形成的愈伤组织进行分化培养以形成不定芽、不定根、进而形成再生植株。通过以上实验,让学生掌握培养基的配制,外植体的选择、消毒、接种,继代培养等无菌操作技术及植物组织培养的关键步骤。

2.2 细胞培养及原生质体操作实验模块

植物细胞培养及原生质体操作模块的内容包括:细胞悬浮培养系的建立、原生质体的分离(酶解法)及培养、PEG 介导原生质体的遗传转化等,基本涵盖了植物细胞工程领域的主要实验技术。我们以植物组织培养模块中所诱导的愈伤组织作为材料进行细胞的悬浮培养,利用悬浮培养细胞分离原生质体,并利用 PEG 法进行原生质体的遗传转化。通过以上实验学生能够掌握细胞悬浮培养系的建立、原生质体的分离和培养、原生质体的遗传转化及转基因细胞的观察(GFP 荧光观察)等一系列关键技术。在原生质体的遗传转化实验中,我们利用课题研究中所构建的包含编码定位于不同亚细胞组分上的 GFP 融合蛋白基因的 pUC18 载体(定位于叶绿体、细胞核和液泡膜等^[10])进行转化,通过对转化细胞的观察,可使学生深入体会原生质体转化技术在蛋白质亚细胞定位分析中的应用。

2.3 植物基因工程实验模块

本模块以转基因植物(拟南芥)的构建及检测为主线,主要包括:农杆菌的遗传转化(CaCl₂ 法)及重组菌的筛选与鉴定(菌落 PCR 检测)、拟南芥的培育及遗传转化(花序浸染法)、利用抗生素筛选转基因植株以及外源基因的 PCR 检测。要求学生掌握细菌的转化及筛选鉴定、植物的遗传转化、转基因植物的构建及后期管理、植物 DNA 的提取、PCR 及电泳检测等一系列技术。在拟南芥的遗传转化实验中,我们利用课题研究中所构建的含有卡那霉素抗性基因和功能性基因(促进营养生长^[11]、调控叶片形状^[12]、提高耐盐性等^[10])的 pBI101 双元载体,通

过对转基因植物表型的观察,使学生深入理解转基因技术在农林生产及科学研究中的应用价值,进而为独立从事植物分子生物学领域的相关研究打下坚实的基础。

3 实验教学模式

教学模式在很大程度上影响教学效果。研究型实验教学内容的设置和独立操作实验教学模式的建立有助于培养学生的科研兴趣,提升学生分析问题和解决问题的能力^[13]。我们以培养创新人才为目标,结合本实验课程的特点,采用了集中讲解—独立操作—全天候开放的实验教学模式。

3.1 独立操作的实验教学模式

独立操作是培养独立思维和创新能力的关键,通过独立操作可培养学生的科研兴趣及独立从事科研工作的能力和自信。针对实验课所涉及的实验内容较多,各个实验间的关联性较强、部分实验耗时较长等特点,我们在实验教学初对本实验课的主要教学内容、教学方式、进度安排(表 1)及所要进行的前期准备(相关文献的查阅、自主实验的设计和课程讨论等)进行详细的说明;每一项实验开始时由实验教师集中讲解实验目的、实验原理、操作步骤、技术要点、相关设备的使用及注意事项;要求学生在规定的时间内择时独立完成各项实验内容。指导教师实验过程中进行指导和监督。

3.2 全天候开放的实验室管理模式

根据植物再生体系、细胞悬浮培养系及转基因植物株系的构建所需实验周期长、而且需要不间断地对培养物进行管理和观察等特点,我们选择全天候开放的实验室管理模式。学生可根据自身情况,自主选择时间进行实验操作、培养物的观察和管理。实验教师及协助实验课的研究生轮流值班,对实验过程进行监督和管理,对学生在操作中的问题及时予以解答,并通过对培养物的适时观察,指导学生及时发现问题并采取相应的措施进行处理。

3.3 引入研究型实验教学方法

为使学生得到全面的科研训练,本课程引入研究型教学模式^[13,14]。要求学生查阅相关文献,把握该领域的前沿进展,独立设计实验方案;独立进行

表 1 植物细胞与基因工程实验教学内容及课时安排

周次	实验模块		
	植物组织培养	细胞培养及原生质体操作	植物基因工程
1	MS 培养基配制, 包括 MS 母液及主要植物激素的配置(2)		
2	拟南芥种子的消毒及播种(2)		
3	拟南芥愈伤组织诱导(2)		
4	拟南芥试管苗的移栽及驯化(2)		
5	拟南芥愈伤组织的继代培养(2)		
6	农杆菌的转化及重组菌的筛选鉴定(2)		
7	利用花序浸染法进行拟南芥的遗传转化(2)		
8	细胞悬浮培养系的建立(2)		
9	不定芽的分化培养(2)		
10		悬浮细胞的继代培养(1)	拟南芥种子的采收(1)
11			转基因拟南芥的抗性筛选(2)
12		原生质体分离及培养(2)	
13	不定根的诱导及植株再生(1)		转基因拟南芥的移栽(1)
14		原生质体的遗传转化(2)	
15		转化细胞的荧光观察(2)	
16			基因组 DNA 的提取及 PCR 检测(2)

注: 括号里的数字为课时数。

实验操作, 做好详细规范的实验记录; 整理实验结果并进行深入分析; 以学术论文形式提交实验报告(包括中英文摘要、前言、材料与方法、实验结果、讨论和参考文献等部分)。实验结束后, 每个实验小组(2人1组)集中进行实验汇报, 并针对实验结果及在实验过程中出现的问题进行讨论。通过以上各环节的训练, 使学生经历和体会科学研究的全过程, 为今后独立从事科研工作打下基础。另外, 我们增加了课程讨论环节, 要求每位学生介绍一篇该领域高水平的实验论文, 以加强学生对该领域前沿进展的把握, 深刻理解和体会植物细胞与基因工程在科学研究及应用领域所发挥的巨大作用。

4 考核评价体系

本实验课的主要考核内容包括实验总结报告(论文形式)、实验操作、实验理论闭卷考试及课程讨论。实验部分占 50%, 包括每次实验的预习情况、实际操作过程、自主实验的设计方案及创新性、实验报告撰写的规范性及实验结果的分析与讨论; 实验理论闭卷考试部分占 30%, 主要考核本实验教学中所涉及的实验原理及实验操作过程中的关键性步

骤; 课程讨论环节占 20%, 根据所选文献的影响指数、与本实验教学内容的相关性及在文献介绍过程中 PPT 文件的制作和表达等进行综合评价。

5 教学成效

本实验教学实施 3 年来, 受到了同学们的欢迎。2013 年度, 生物科学专业学生的选课率达到了 92.7%(51/55 人)。同学们普遍反映, 该实验课程虽然时间较长, 工作较为辛苦, 但通过该课程的训练, 切实掌握了该领域的主要操作技能, 体验了科学研究的全过程。在教学过程中, 我们本着学院提出的以高水平科学研究促进实验教学的理念^[15], 在激发学生的兴趣和培养创新能力上下功夫, 进行了一系列的尝试。在实验教学设计中增加了自主环节, 例如, 在愈伤组织诱导及分化培养实验中, 我们让同学们查阅文献自主选择不同的外植体, 自主设计培养方案; 在拟南芥的遗传转化实验中, 我们让学生自主选择研究生在课题研究中构建的形态特征表型明显的载体进行转化。转基因植物产生后, 通过表型观察, 使学生对于转基因技术的实际应用有更加

深刻的体会,进而提高了他们对于科学研究的兴趣;全天候开放式的实验教学方式对于营造良好科研氛围起到了重要作用。另外,课程讨论环节对于开拓学生的视野、了解植物细胞与基因工程领域的研究进展及应用和激发对该领域的研究兴趣起到了很好的促进作用。实验课结束后,部分同学选择本实验室进行毕业研究,有些同学成功申请了国家大学生创新研究项目和内蒙古大学本科创新基金项目。2013年度,我们指导的研究小组利用 PEG-介导原生质体遗传转化的方法分析了兴安落叶松 MurE 蛋白的亚细胞定位,该研究成果获得了内蒙古自治区大学生“挑战杯”课外学术作品三等奖。本实验教学也荣获 2013 年度内蒙古自治区教学成果三等奖及内蒙古大学教学成果一等奖。

6 存在的问题及采取的措施

该课程作为本科生 3 年级秋季学期的选修课,每年选修该课程的学生较多,从而增加了实验教师的工作量。为了解决这一问题,我们增加了 1 名专职实验教师,并安排研究生协助任课教师对实验课进行监督管理。目前,本实验教学团队有 1 名任课教师,2 名专职实验师和 3 名研究生,最大能够承担 90 名学生(30 人/组×3 组)的实验教学任务。在实验教学改革初期,实验设备短缺是我们遇到的最大困难。我们本着以科研反哺教学,以高水平的科学研究促进实验教学的观念,充分利用任课教师的科研平台,顺利完成了教学任务。上一年度,在“西部高校综合实力提升计划本科教学建设与改革”项目的支持下,补充了必需的实验设备(离心机、超净工作台、PCR 仪、凝胶成像系统、荧光显微镜等),目前已经能够很好地满足实验教学需要。

另外,由于本实验课所设计的实验较多,且各实验内容间的连贯性较强,例如拟南芥的遗传转化大实验,要经过拟南芥的播种、移栽、遗传转化、种子的采收、抗性筛选、DNA 的提取及 PCR 检测等(表 1),中间任何一个环节出现问题都会影响实验的进度。本学科方向研究生结合自己的课题研究,经过多次的预实验,在各项实验的时间安排及各实验环节关键技术的把握上进行了周密的设计,保证了实验的顺利进行。截至目前,由于受课时和实验条件的限制,一些相关实验未能被列入教学计划,

特别是包括外源基因表达检测等转基因植物解析的实验未能深入开展。今后我们计划逐步增加“利用 RT-PCR 检测外源基因表达、利用 GUS 染色检测基因表达模式及利用 Southern 杂交调查外源基因拷贝数”等相关实验,使本科植物细胞与基因工程实验教学更加系统、完善,让学生掌握更多高水平的实验技术。

参考文献

- [1] Gaud WS. The green revolution: accomplishments and apprehensions. March 8, 1968.
- [2] Steinhart P. The second green revolution. October 25, 1981.
- [3] Haberlandt G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber Akad Wiss Wien Math Naturwiss Kl Abt*, 1902, 111: 69–92.
- [4] Gautheret RJ. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C R Acad Sci*, 1939, 208: 118–120.
- [5] Nobecourt P. Sur la perennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C R Seanc Soc Biol*, 1939, 130: 1270–1271.
- [6] White PR. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. *Amer J Bot*, 1939, 26: 59–64.
- [7] Steward FC, Mapes MO, Mears M. Growth and organized development of cultures cells. II Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am J Bot*, 1958, 45: 705–708.
- [8] Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci*, 1973, 70: 3240–3244.
- [9] Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1983, 80: 4803–4807.
- [10] 王丽. 白刺液泡膜 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因的克隆及特性分析[学位论文]. 内蒙古大学, 2013.
- [11] Li NN, Wang L, Zhang WB, Takechi K, Takano H and Lin XF. Overexpression of UDP-glucose pyrophosphorylase from *Larix gmelinii* enhances vegetative growth in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 2014, 33: 779–791.
- [12] Lin XF, Minamisawa N, Takechi K, Zhang WB, Soto H, Takio S, Tsukaya H, Takano H. Isolation and characterization of *Larix gmelinii* ANGUSTIFOLIA (*LgAN*) gene. *Planta*, 2008, 228(4): 601–608.
- [13] 邢万金, 莫日根, 苏慧敏. 生物学教学中研究型教学方法与内容的探索. *遗传*, 2014, 36(7): 732–738.
- [14] 莫日根, 邢万金, 王志钢, 阿拉坦高勒, 哈斯阿古拉. 本科生物技术综合性超大实验课程的架构与建设. *生物学杂志*, 2014, 31(3): 104–107.
- [15] 莫日根, 邢万金, 王潇. 以高水平科学研究促进分子遗传学教学. *高校生物学教学研究(电子版)*, 2012, 2(1): 33–35.

(责任编辑: 谢建平)