

## 遗传学实验的教学改革

### ——经典实验与新技术相融合(一)

皮妍, 苏明杰, 韦理强, 卢大儒, 乔守怡<sup>(✉)</sup>

复旦大学生命科学学院, 上海, 200433

**摘要:** 血型是人类日常生活中非常常见的一种遗传表型, 拥有丰富的遗传学内涵。随着科技的发展和技术的更新, 血型的检测也越来越快速、精细。在本科生遗传学实验教学中引入 ABO 血型的分子分型实验, 是引导学生思考生活常识、加强遗传学思维训练的一种有效的教学内容, 通过教学实践中的不断优化, 并依据 *SCIENCE* 杂志上发表的“重复提取”比“细化学习”更能促进学习的发生和记忆的保持原则, 针对性地设计实验教学方案, 注重学生自我测试能力的培养, 同时加入新的分子信标技术知识, 既传承了经典, 又紧跟时代发展, 使经典实验与新技术实现非常契合的融合。该实验贴近生活, 大大激发了学生参与实验的积极性和对科研的兴趣, 而且易于根据教学的对象调整教学内容和理论深度, 对于培养学生的遗传学分析思想和科学思维素质能够发挥很好的典范作用。

**关键词:** 血型检测, 分子分型, 分子信标, 分析思想

## An Exploration of Teaching in the Genetic Experiments

### ——Developing a Type with Classic Experiment and New Technology Fused (1)

PI Yan, SU Ming-jie, WEI Li-qiang, LU Da-ru, QIAO Shou-yi<sup>(✉)</sup>

School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China

随着科技的飞速发展, 社会对人才素质的要求不断提高, 培养学生的创新精神, 提高学生的科研能力, 开展高效学习, 是每个教育学科不容忽视的问题<sup>[1]</sup>。血型是人类日常生活中非常常见的一种遗传表型, 拥有丰富的遗传学内涵, 新的研究结果使血型遗传所涵盖的遗传学知识点越来越多, 内容越来越丰富。因此, 在本科生的遗传学实验教学中开

展 ABO 血型实验, 理论联系实际, 不仅可以将复杂的知识点简单化、形象化, 便于理解, 还增强了学生兴趣, 提高了教学效果。卡皮克等人在 *SCIENCE* 杂志上发表的一组实验证明“重复提取”比“细化学习”更能促进学习的发生和记忆的保持<sup>[2]</sup>。在 ABO 血型实验教学开展过程中, 引入更多的“提取”活动, 促进“意义学习”的生成, 并在遗传学实验教学中构建“提取”式学习系统, 将能更有效地促进科学概念的形成。并且, 在经典的 PCR 实验技术基础上引入最新的分子信标技术, 将经典实验与新技术相互融合, 让学生的视野接触到前沿的科学知识, 其科研思维能力在原有的分析思想基础上得到了进

收稿日期: 2016-10-25; 修回日期: 2017-09-10

基金项目: 国家基础科学人才培养基金: 复旦大学生物学基地 (J0630643)

通讯作者: 乔守怡, E-mail: syqiao@fudan.edu.cn

一步提升，可以更加有效地促进学生的学习效果。

## 1 ABO 血型的酶切分型技术原理及教学设计

### 1.1 ABO 血型的酶切分型技术原理

血型是人类血液由遗传控制的个体性状之一，与人类的生活关系密切，用途广泛。临床上常用血清学方法对 ABO 血型进行检测，区分 A、B、AB 和 O 型血的个体，但是该方法无法区分  $i^A i^A$ （纯合子）、 $i^A i^O$ （杂合子）在表型上都是 A 型血，以及  $i^B i^B$ （纯合子）、 $i^B i^O$ （杂合子）在表型上都是 B 型血的个体。

针对血型基因的特点，开展血型的基因检测却可以很好地区分 A 型血、B 型血的杂合子和纯合子。其原理主要是利用 ABO 等位基因之间的核苷酸序列之间存在几个核苷酸的差异，其中以 261 del G, 526 C>G, 703 G>A, 796 C>A, 802 G>A 较为重要（261 位 G 缺失，其他为置换），主要分布在第 6 和第 7 外显子中<sup>[3, 4]</sup>。在对 ABO 血型进行基因型分型实验过程中，SNP 位点的选择是实验设计的关键。ABO 等位基因 Exon 6 上的 SNP 是一处单碱基缺失，可导致 Exon 6 大部分序列移码，提前产生终止密码子，ABO 基因编码的蛋白失去活性。PCR 过程可扩增获得 Exon 6 的 200/199 bp 的片段，用 *Kpn* I 限制性内切酶检测鉴定  $i^A$  和  $i^O$  基因。Exon 7 上的 SNP 是一处碱基置换，对蛋白质功能的影响不明确，但该位点对于 ABO 基因分类具有保守性。PCR 过程可扩增获得 Exon 7 的 159 bp 片段，用 *Alu* I 限制性内切酶检测可鉴定  $i^B$  和  $i^O$  基因。实验设计中所采用的 ABO 基因的两个 SNP 位点如图 1 所示。两个位点结合后，即可对 ABO 血型的 6 种基因型  $i^A i^A$ 、 $i^A i^O$ 、 $i^B i^B$ 、 $i^B i^O$ 、 $i^A i^B$  和  $i^O i^O$  进行分型。其基因型与 DNA 产物长度对应的信息如表 1 所示。

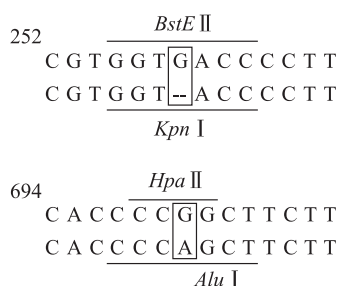


图 1 ABO 基因的 SNP 位点

目前针对 ABO 血型系统的基因检测技术主要有 PCR-DNA 检测法、PCR-RFLP 法、PCR-SSP 法等<sup>[2, 5, 6]</sup>。在实验教学过程中，我们对这些方法进行了比较和优化，利用限制性酶切片段长度多态性，应用 PCR 与限制性内切酶片段长度多肽相结合的技术方法，通过琼脂糖凝胶电泳后就可对 ABO 血型的基因型进行准确的鉴定。

表 1 ABO 血型基因型与 DNA 产物长度对应信息

基因型	血型	<i>Kpn</i> I 扩增产物长度 (bp)	<i>Kpn</i> I 酶切产物长度 (bp)	<i>Alu</i> I 扩增产物长度 (bp)	<i>Alu</i> I 酶切产物长度 (bp)
$i^A i^A$	A	200	200	159	159
$i^A i^O$	A	200/199	200/171	159	159
$i^B i^B$	B	200	200	159	118
$i^B i^O$	B	200/199	200/171	159	159/118
$i^A i^B$	AB	200	200	159	159/118
$i^O i^O$	O	199	171	159	159

### 1.2 ABO 血型分子分型实验教学设计方案

在实验教学过程中，教师往往比较信赖那些支持细化学的学习活动，而对需要学生练习提取和对知识进行重构的活动兴致不高，也没能构建出很好的学习系统。卡皮克等<sup>[2]</sup>的研究表明，记忆的保持不是由学习的过程决定，而是被学习过后的练习方式影响。重复提取能够比重复学习保持更持久的记忆<sup>[1]</sup>。ABO 血型的分子分型是分子遗传学教学中 PCR 技术拓展应用的经典案例，涉及的分子操作技术有 DNA 提取、PCR 扩增、限制性内切酶的酶切、琼脂糖凝胶电泳等。这些常规的分子操作技术有不少学生已经在实验室里接触过，如何在运用这些常规的分子操作技术中激发学生的兴趣，调动学生的学习积极性？在实验设计安排的时候，我们不是让学生简单地进行重复，而是更加关注学生对知识的“输出”，让学生更多地去“提取”——也就是更多地去和大脑中存储的信息进行交互，从而保持更持久的记忆。在实验教学过程当中的实验设计如图 2 所示：

这个实验安排在最后一个，提供给学生 3 次课堂教学的时间（每次 3 课时，共 9 课时），第一次

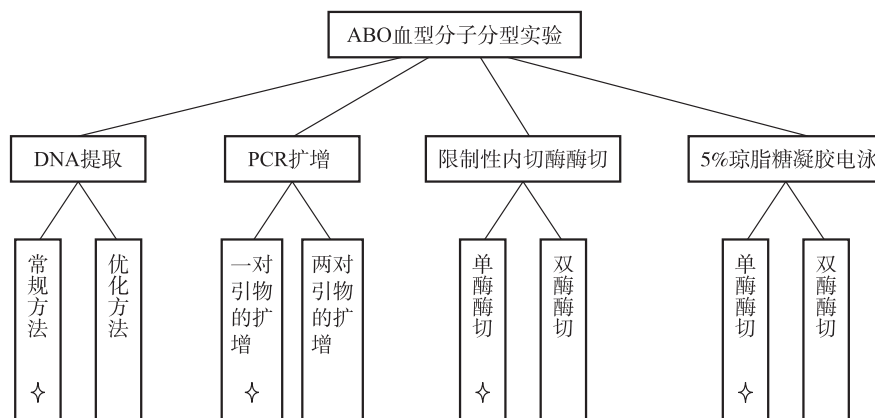


图2 ABO血型分子分型实验设计安排（“◇”表示该种方法的操作流程提供给学生）

教学主要讲解简单的实验原理，以讨论和设计为主。针对以上四个常规的实验操作模块（DNA提取、PCR扩增、限制性内切酶酶切、琼脂糖凝胶电泳），每个模块提供给学生一种实验室常用的操作流程，但是完全按照这些操作流程的组合最终得不到ABO血型的分子分型实验结果。每个学生都需要根据自己已有的实验基础知识对每个模块的操作步骤进行思考、探索和优化，才能最终获得理想的实验结果。组织学生开展分组协作式实验方式，给予更多的自由实验和研究空间，让他们形成协作小组进行讨论，在讨论过程中小组成员之间进行交互，主动激发对已有信息的大量“提取”过程，最终设计出最佳的实验方案。第二次教学以学生操作为主，教师辅助。第三次教学以学生调整参数重复实验为主，对于实验结果较好的学生可以开始设计用分子信标检测ABO血型的分子分型方法。将不同层次的学生错开，开展梯度教学，较好地提高了实验效果。

而且，在实验设计中还引入比较探究的学习方式。在制备5%的高浓度琼脂糖凝胶时，通过普通的琼脂糖和低熔点琼脂糖的制备比较，学生们充分感受并理解了为什么高浓度的琼脂糖凝胶的制备用低熔点琼脂糖更好，为什么低熔点凝胶可以更有效地对小片段DNA进行分离等问题。在实验设计和操作过程中，引导学生们通过不断对已有知识的重复“提取”，大大提高了发现问题的能力，进一步拓展了独立思考和探索能力，提高了科学应用的能力，为后期的科研工作养成了良好的科学思维

和探索的习惯。

## 2 ABO血型的分子信标分型技术原理

在开展遗传学实验教学改革的时候，必须坚持经典的优势与特色，又需要扬长避短，与时俱进。随着生命科学的迅猛发展，血型的基因检测研究也取得了突破性进展。有通过双链探针，采用实时PCR方法对个体进行ABO血型基因的分型，也有应用单管PCR，通过基因扫描（Gene Scan）的方法进行ABO血型基因的分型等<sup>[7, 8]</sup>。分子信标检测技术是最近发展起来的一种基于探针分子上荧光共振能量转移现象和碱基互补配对原则建立起来的分子分析技术<sup>[4]</sup>。这些技术在分子检测上具有更加灵敏，更加快速的优点。因此，在开展ABO血型分子分型教学实验的时候，引入最新的分子信标技术，可以让学生充分领略到前沿科学技术的魅力。分子信标是由长度为15~30个碱基的寡核苷酸探针形成的一个环状区与两端各5~8个碱基序列互补配对形成的短的茎杆区共同构成。荧光基团和淬灭基团分别连接在5'端和3'端，在自由状态时，由于茎杆区的互补序列结合使探针分子形成发夹状结构，荧光基团和淬灭基团相距较近，荧光基团发出的荧光被淬灭基团吸收，荧光几乎完全被淬灭。当分子信标与靶分子结合时，荧光基团和淬灭基团之间的距离加大，荧光得以恢复。所以检测到的荧光强度与溶液中的靶向DNA量成正比<sup>[9]</sup>。图3为经典的分子信标结构及其工作原理。

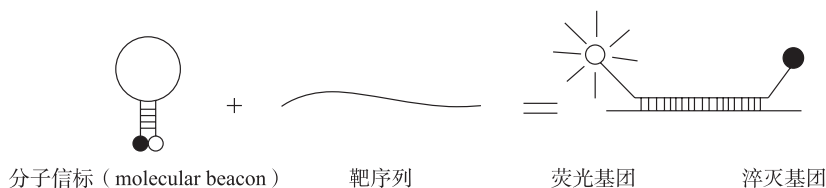


图3 分子信标的工作原理

### 3 ABO 血型两种分型技术的比较教学及拓展

基因的分子操作技术将 ABO 血型分型由血清学水平深入到基因水平。目前，DNA 分型的方法都是针对核苷酸序列的差异进行设计。遗传学实验教学中采用的 PCR 与酶切分型的方法是根据 ABO 血型等位基因的序列，设计具有序列特异性的引物，对样本进行 DNA 分型，而分子信标检测技术，选用的是一种荧光标记的探针分子，灵敏度更高，特异识别性更强，操作也更简单。在实验教学过程中，用这两种方法针对 ABO 血型同时检测，既可以进行相互比较验证，又可以加深对这两种操作技能的理解，同学们很快就掌握了这两种分型技术的差异。这两种分子分型实验的技术差异见表 2。

表 2 ABO 基因酶切分型与分子信标分型技术的比较

	ABO 基因酶切分型	ABO 基因信标分型
技术	包含 PCR、酶切、电泳	PCR 一步完成
时间	需要 PCR 与酶切两步，耗时较长	PCR 与分子杂交同时进行，耗时较短
操作	须开管加酶与两次电泳鉴定，电泳结果容易影响观察，产生误差	PCR 与分子杂交同时完成，全程闭管操作，计算机直接观察结果
灵敏和特异性	引物设计，具有序列特异性	荧光探针，灵敏度和特异性更强

在实验课程开展过程中，我们还可以将 ABO 血型涉及的遗传学理论知识与实验技术相结合，应用互联网教学辅助系统，与学生们进行实时实地以及线上的教学探讨。在进行人体 ABO 血型基因的分子分型实验过程中，学生们初步接触了分子遗传领域的相关知识，并且可以将个体遗传学与群体遗传学的相关知识点进行结合，了解并应用前沿技术在一定程度上对自己和其他同学的遗传学特征进行研究。

在教学过程中，给学生们更多的自由空间，教师通过引领式与启发式的教学，使学生们在进行实验的过程中能够及时发现问题，提出问题并通过独立思考与团队合作共同解决问题，提高了学生们对遗传学知识和实验技能的理解能力、应用能力与思考能力。

### 4 反馈与总结

遗传学的发展离不开经典实验，现代遗传学的产生与发展也没有离开经典，二者的关系是基础与提高、继承、发展的关系。教师在传统的实验课中只是让学生在预习实验、实验操作和完成实验报告的过程中重复学习，而在探究性的实验课中，学生由被动接受转为主动探究，带着任务做实验，对于实验内容有更深刻的认识；在没有给出最优化的实验方案的情况下，学生需要对各种可能的实验方法有充分的理解，在实验中反复提取所学知识，并结合新的知识，来探寻解决方法，在提取的过程中学生们的记忆得到加深，这是传统的实验课无法比拟的<sup>[10]</sup>。在 ABO 血型分子分型教学设计方案中，学生必须在原有实验基础上进行实验条件的设计和优化，对设计的操作流程进行验证，并可以对设计的参数进行调整重复实验，这充分提高了学生的实验主动性和参与度，而且大大提高了实验效果，全班有 90% 以上的学生都获得了比较理想的实验结果。

在 ABO 血型分子分型经典遗传学实验中引入卡皮克等重复“提取”的教学设计理念，与前沿分子信标技术相互融合开展教学实践，可获得如下收获：①重复“提取”的实验设计，可以使学生形成更加持久的记忆，更加牢固地掌握分子分型等相关实验的背景知识与理论基础；②分组协作讨论式教学模式，使学生在讨论中相互激发已有知识信息的“提取”，主动探索合理的实验步骤，培养学生解决问题的能力，使学生的独立思考能力和探索能力得到了



很好的拓展; ③由经典的分子操作实验到新技术的引入, 整体化的实验设计可以更好地帮助学生形成协同创新的科研思维模式与比较联合分析的思考模式; ④学生在获得相关技术与理论知识的同时, 也深刻体会到了知识与技术统一的重要意义, 同时也使教师更深刻认识到了将前沿技术普及化并引入本科生实验课程的重要性与积极意义。由于 ABO 血型的分子分型检测结果还涉及个人隐私的问题, 在实验过程中恰好可以适当插入有关生命伦理的教育, 把握自主性和不伤害原则, 使学生能够客观、理性的面对个人隐私的问题<sup>[11]</sup>。

ABO 血型分子分型实验的开展在教学方面取得一定成绩的同时, 也展示出了后续实验所具有的巨大改革与发展空间, 尤其是该实验的组成体系非常便于调整相应的教学内容, 可以编制不同理论深度的教学方案, 覆盖社会公众、中学生、本科生、研究生等不同层次的教学对象。在接下来的教学实践与改革中, 我们会进一步在将前沿技术引入经典实验的同时, 增加更多技术史、科学史的介绍; 在激发学生科研与科学兴趣的同时, 帮助学生更加牢固地掌握学科基础知识与实验原理。除此之外, 需要制定更加完善的考评体系, 将学生实验态度、团队合作能力、操作和科学思考积极性与规范操作等指标纳入对学生实验的考评中, 在帮助学生养成规范操作和实验习惯的同时促进学生树立更为严谨的科学思想。

## 参考文献

[1] 叶建圣, 冯虎元, 孙国钧. 高校生物学学科核心能力与实

践讨论 [J]. 高校生物学教学研究 (电子版), 2016, 6 (1): 61-64.

[2] Karpicke JD, Roediger HL. The critical importance of retrieval for learning [J]. *Science*, 2008, 319 (5865): 966-968.

[3] 皮妍, 李晓莹, 怀聪, 等. 以人类血型为遗传学案例教学的思考与实践 [J]. *遗传*, 2013, 35 (8): 1-6.

[4] 张硕, 孙海燕, 王诗铭, 等. 分子信标技术在 ABO 血型基因型检测方面的重要应用 [J]. *国际遗传学杂志*, 2014, 37 (6): 282-285.

[5] 白丽萍, 姜先华, 黄斌. 应用 PCR-SSP 方法进行 ABO 基因分型的研究 [J]. *中国法医学杂志*, 2004, 19 (1): 41-42.

[6] 程丽, 刘雅诚, 陈国弟, 等. 50 例强奸案混合斑中精子 ABO 基因分型 [J]. *中国法医学杂志*, 2004, 18 (4): 222-223.

[7] 赵会安, 阮力, 夏邦勇, 等. 单管实时 PCR 快速检验 ABO 基因型 [J]. *中国法医学杂志*, 2007, 22 (6): 363-365.

[8] 刘长利, 苗天红, 龚晓燕, 等. 复合 PCR 技术在 ABO 血型基因分型中的应用 [J]. *北京医学*, 2007, 29 (2): 109-111.

[9] Khodakov D, Wang C, Zhang DY. Diagnostics based on nucleic acid sequence variant profiling: PCR, hybridization, and NGS approaches [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 105: 3-19.

[10] 赵国庆, 郑兰琴. 重复提取胜过细化学习——卡皮克记忆研究进展及其对教学的启示 [J]. *中国电化教育*, 2012, 3: 16-21.

[11] 程焉平. 应对生命科学超速发展, 开展生命伦理教育 [J]. *高校生物学教学研究 (电子版)*, 2013, 3 (2): 36-40.