

教学改革

《动物分子遗传标记》实验教学设计与实践

房希碧¹,刘博群²,张金玉¹,潘英树¹,闫守庆¹,丁雪梅¹,官 员^{1,*}

(1. 吉林大学动物科学学院,吉林 长春 130062;2. 吉林大学食品科学与工程学院)

摘要:基于“新农科”动物生产类专业创新型复合畜牧人才培养的需求,将 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除小鼠模型引入动物分子遗传标记实验课程中,设计了基因缺失分子标记检测与分析实验,采用基于 PBL 的混合式教学模式,学生能系统掌握基因组 DNA 提取、PCR 扩增技术、琼脂糖凝胶电泳分析、基因型判定等相关理论和实验技术,将多门专业课程的实践环节有机结合,促进了学生理论知识与实验技能的融会贯通,激发了学生的学习热情,提升了专业认同感,培养了综合素质和创新能力。

关键词:分子遗传标记;基因缺失鉴定;实验设计;混合式教学

[中图分类号] S814.8 G642.0 [文献标识码] A [文章编号] 1004-6704(2024)03-0075-04

Experimental Teaching Design and Practice of "Animal Molecular Genetic Markers"

FANG Xibi¹, LIU Boqun², ZHANG Jinyu¹, PAN Yingshu¹,YAN Shouqing¹, DING Xuemei¹, GUAN Yuan^{1,*}

(1. College of Animal Science, Jilin University, Changchun Jilin 130062, China; 2. College of Food Science, Jilin University)

Abstract: Based on the needs of "New Agriculture" animal production professional innovative compound animal husbandry talent training, CRISPR/Cas9-mediated gene knockout mouse model is introduced into the experimental course of "Animal Molecular Genetic Markers". The gene deletion molecular marker detection and analysis experiment was designed, and the PBL-based hybrid teaching mode is adopted, so that students can systematically master the relevant theories and experimental techniques such as genomic DNA extraction, PCR amplification technology, agarose gel electrophoresis analysis, and genotype determination. The organic combination of the practical links of multiple professional courses promotes the integration of students' theoretical knowledge and experimental skills, stimulates students' enthusiasm for learning, enhances professional identity, and cultivates comprehensive quality and innovation ability.

Key words: molecular genetic markers; gene deletion identification; experimental design; blended teaching

2019 年随着“安吉共识”、“北大仓行动”、“北京指南”三部曲的唱响,新农科建设全面启动,对学生综合实践能力提出了更高的要求,要培养一批与“新农科”理念内核相适应的具有实用技能、创新能力、国际视野的复合型农林人才。新型农林人才要求本科专业应突破现有农科界限,推进多学科渗透与融

合的新课程建设,优化教学内容和课程设置,及时将农林科技发展前沿成果融入教学内容,激发专业认同感与使命感,为新农科建设培养“新农人”。

随着全球畜禽育种的快速发展和产业升级,在我国种业振兴和生物育种政策实施的背景下,新型农林人才的需求尤为迫切。分子遗传标记技术因其检测通量大,且具有重复性好、准确性高、周期短等优点,已经广泛应用于动物遗传育种、物种间亲缘关系鉴别和大动物的亲子关系鉴定等方面。动物分子遗传标记课程在以往的实践教学过程中以经典的分子遗传标记检测技术作为实践教学的主要内容。本实验项目在经典的分子遗传标记检测基础上进一步优化,引入近年来在动物遗传育种领域中广泛应用的 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑热点技术和常用

[收稿日期] 2023-12-03

[基金项目] 吉林大学本科教学改革研究项目(2021XZC077); 吉林大学研究生教育教学改革研究项目(2022JGY035);2021 教育部产学合作协同育人项目(202102095040);吉林省高教科研课题(JGJX2023D35、JGJX2023D9)

[作者简介] 房希碧(1989-),女,吉林梨树人,博士,副教授,主要从事动物遗传育种工作。E-mail:fangxibi@jlu.edu.cn

*[通信作者] 官员(1989-),女,辽宁抚顺人,硕士,高级实验师,主要从事动物遗传育种与繁殖工作。E-mail:guan_150490@126.com

的实验动物模型,动物模型展示可以让学生更直观的了解基因编辑技术及其应用,并将常规分子标记检测技术聚合酶链式反应(PCR)和琼脂糖凝胶电泳融合其中,结合小鼠模型扩繁、传代和应用过程中必要的基因型鉴定环节,检测与分析基因缺失分子遗传标记,构建多课程交叉的综合性实验(图1),强化实验操作技能。采用基于PBL的混合式教学模式,培养学生自主学习意识,发现问题、分析问题及解决

问题的综合能力,促进新农科背景下动物科学专业创新人才的培养。实验方案设计流程如图2所示。

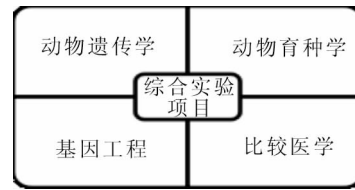


图1 综合性实验项目课程间交叉

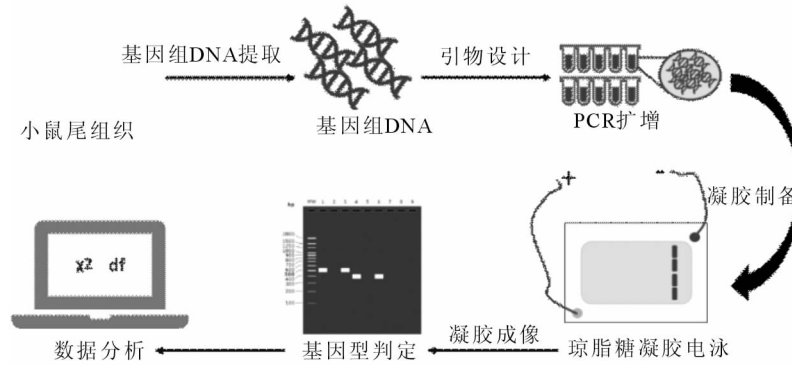


图2 实验方案流程图

1 材料与方法

1.1 样品

杂合型CD44基因敲除小鼠(CD44^{+/-})的F1代小鼠的尾组织样品。

1.2 试剂

DL15000, DL 2000 Marker, 6× Loading Buffer (TaKaRa), 2× Power Taq PCR DNA 琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒、2× Taq PCR MasterMix、GelRed (南京诺唯赞), 动物血液 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司), 琼脂糖(BIOWEST), 无水乙醇(北京化工厂), 50× TAE(Biosharp)等。

1.3 实验仪器

电泳仪、离心机、PCR仪、凝胶成像仪、移液器。

1.4 实验步骤

1.4.1 基因组DNA提取 小鼠尾组织基因组

DNA提取参照TIANGEN动物组织基因组DNA提取试剂盒说明书。

1.4.2 引物设计 根据GenBank数据库中小鼠CD44基因DNA序列(Gene ID:12505)和CD44基因敲除小鼠设计的sgRNA的位置和敲除片段在基因组中的定位,以及敲除后基因组的序列特征,共设计了3条引物,序列如下:

F1: 5' - AAGCACATTACAAAGGTGT-GTCC-3';

R1: 5' - CTTAAGACTTTGCCCGATCT-CAGT-3';

R2: 5' - GGGTAAATCAGAGTA-CAGTTTCAAGC-3'。

设计方案和引物定位如图3所示。



图3 小鼠基因型鉴定引物设计方案

1.4.3 PCR扩增 以提取的小鼠尾组织基因组DNA为模板,采用常规PCR法,每个样品分别使F1和R1, F1和R2两组引物进行PCR扩增,获得的PCR产物分别定义为P1和P2。反应体系:DNA

2.0μL,上游和下游引物各0.5μL, 2× Taq PCR MasterMix 10.0μL, ddH₂O加至20.0μL,反应条件:95℃ 5min; 95℃ 30s; 56℃ 30s; 35个循环; 72℃ 10min。取8μL的PCR产物,利用2%的琼脂

糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果,使用凝胶成像系统(GelDoc-It2),拍照留存结果。

1.4.4 基因型判定 通过琼脂糖凝胶电泳结果,当两组 PCR 产物中仅 P1 有 532 bp 的产物,P2 无条带,该样品判定为纯合子;当 P1 有 532 bp 的产物,P2 有 418 bp 条带,该样品判定为杂合子;当两组 PCR 产物,P1 无条带,P2 有 418 bp 条带,该样品评定为野生型;当 P1 和 P2 均无条带时此样品存疑,需重新鉴定,如图 4 所示。

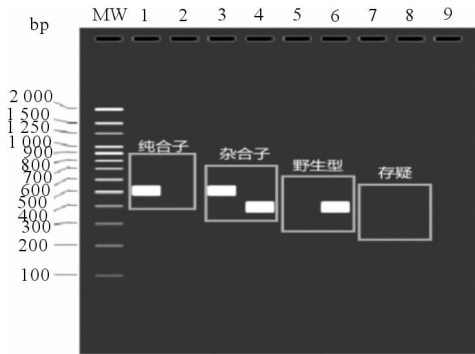


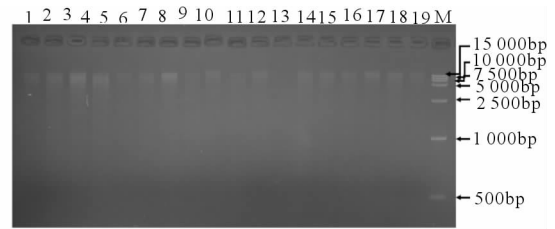
图 4 琼脂糖凝胶电泳结果判定基因型示意图

1.4.5 统计分析 统计分析个体的基因型数据,计算该样品群体中的缺失基因型和野性基因型频率,利用卡方检验确定该基因缺失在给定群体中是否符合孟德尔遗传定律。

2 结果与分析

2.1 小鼠鼠尾组织基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳

C57/BL 小鼠鼠尾组织基因组提取结果见图 5。图 5 结果显示基因组完整,无蛋白质污染,可用于下一步 PCR 扩增。部分鼠尾的基因组 DNA 有拖尾带型,表明在提取过程中存在降解情况。



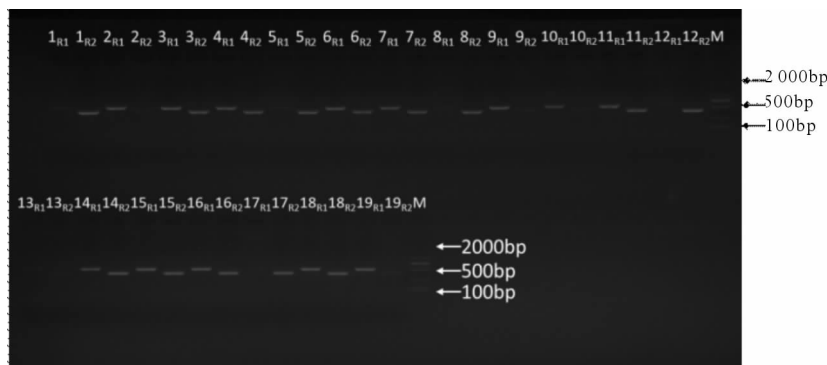
注:M. DL15000 DNA marker;1-19 表示样品顺序号;

1-19 泳道为小鼠鼠尾基因组 DNA

图 5 C57/BL 小鼠鼠尾基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳及基因型判定

根据基因型判定示意图(图 4),将每个样品的两组 PCR 产物分别加入相邻的上样孔,以便更容易观察和判定基因型。PCR 产物琼脂糖电泳结果见图 6。由图 6 可知检测的 19 个个体中,仅 18 个体基因型鉴定成功,1 个样品存疑。其中,4 个缺失纯合型、10 个杂合型和 4 个野生型,缺失和野生的等位基因频率分别为 50%和 50%(表 1),提示该基因座位的缺失和野生在 18 个小鼠群体里得分布比例为 1:1,等位基因符合孟德尔遗传定律。但是由于目前群体数量较少,若想准确判定等位基因的遗传规律仍需扩大群体数量,进一步获得更准确的结果。



注:M. DL2000 DNA Marker;1-19 表示样品模板序号;R1 代表引物 F1 和 R1 组合的 PCR 产物;

R2 代表引物 F1 和 R2 组合的 PCR 产物

图 6 PCR 产物琼脂糖电泳结果

表 1 小鼠基因缺失纯合子、杂合子与野生型频率

基因型	个体数	基因型频率%	基因频率%		χ^2
			缺失	野生	
纯合	4	22.22	50%	50%	0
杂合	10	55.55			
野生	4	22.22			
存疑	1	—	—	—	

3 基于 PBL 的混合式教学模式

实验以小组为单位,每组 2 名学生,分 2 次课完成,共 8 学时,具体教学模式见表 2。

表 2 基于 PBL 的混合式教学模式

时间	角色	活动
课前	教师	教师发布任务,上传微课程、课件等教学资源、对设计方案给出意见
	学生	学生复习 PCR 实验原理相关知识、查阅 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除小鼠模型构建相关文献及使用的鉴定基因型的方法、设计实验方案、互相讨论
课堂	教师	教师讲授要点及原理、细节操作示范、答疑解惑、点评
	学生	学生动手实操、协作交流、讨论分析
课后	教师	批改实验报告、评价教学效果,总结反思
	学生	科研论文形式提交报告、小组 PPT 汇报

4 教学效果

实验项目将动物科学专业三个方向(动物科学、生物技术、实验动物)的研究内容融合于一个实验当中,实现多课程内容的整合与衔接,学生能够掌握以 CRISPR/Cas9 技术介导的 CD44 基因敲除小鼠为模型,通过基因组 DNA 提取、PCR 技术和琼脂糖凝

胶电泳分析判定小鼠基因型,学习检测基因缺失鉴定的方法。采用基于 PBL 的混合式教学,培养了学生分析问题、解决问题、科研思维、合作精神、实践操作等综合能力(图 7),加强了学生对专业研究方向的认识和思考,更深刻的理解动物科学的研究和应用范畴,有助于新农科背景下复合型创新人才的培养。

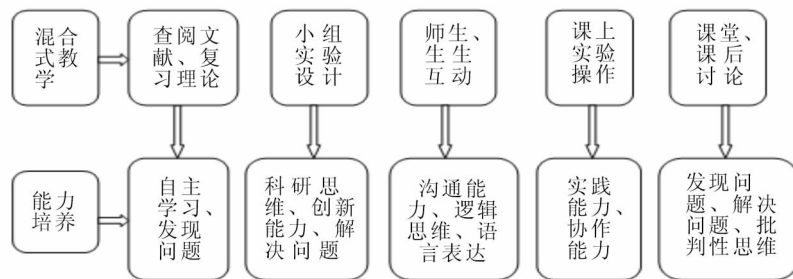


图 7 混合式教学模式对学生能力的培养

5 结语

本文设计了一个基于基因片段缺失标记检测的项目式实验,内容包括提取动物组织样品基因组 DNA;利用基因敲除小鼠模型的构建原理设计基因缺失鉴定引物;结合常规的分子标记检测 PCR 和琼脂糖凝胶电泳技术;通过群体遗传学分析解释获得 DNA 缺失标记的遗传规律。该实验引入了 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除动物模型,能够使学生了解基因编辑技术的原理,亲身体会缺失标记鉴定和分析过程,加深对基因突变、孟德尔遗传定律和群体遗传理论知识的理解,提高对于动物科学、生命科学、基础医学多学科交叉的认识,建立科研思维和探索意识,促进综合实验素质的全面提升。团队将继续以“新农科”人才培养理念为导向,结合生物育种领域发展方向和人才需求,在教学与实践不断革新教学内容,结合智能化教学平台建设虚

拟仿真实验项目,不断探索新的教学模式,为我国畜牧产业发展和乡村振兴战略的实施培养高素质的动物科学专业人才。

参考文献:

- [1] 张旭,杨国庆,姚拥军,等. 新农科背景下实践教学体系的建设与实践[J]. 实验室研究与探索, 2023, 42 (2): 263-267.
- [2] 王正加,王晨,黄坚钦,等. 新农科背景下农林类专业实践教学探索与实践[J]. 实验室研究与探索, 2021, 40 (3): 203-207.
- [3] 麦宇红. 新农科背景下现代农业复合型人才培养实验教学平台的建设实践[J]. 实验技术与管理, 2020, 37 (6): 254-258.
- [4] 田雨佳,孙跃,赵瑞利,等. 面向“新农科”的动物生产类和动物医学类专业“五链三位”实践创新体系与平台构建[J]. 畜牧兽医杂志, 2022, 41(5): 78-81.

(下转第 81 页)