

Reform and Research of a Comprehensive Biochemistry Experimental Teaching Based on Separation and Purification of eGFP Using Affinity Chromatography

Mushan Xie

Southwest University, Chongqing, 400000, China

Abstract

Biochemistry experiments are a core professional foundation course in the training of undergraduate students in life science disciplines. However, traditional methods of teaching biochemistry experiments often fail to effectively enhance students' overall quality and innovation abilities due to outdated content and a single teaching approach. Comprehensive experiments integrate relevant theoretical knowledge and experimental techniques, serving as an important approach to cultivating students' integrated experimental capabilities. Therefore, introducing comprehensive experiments into biochemistry teaching is a key strategy for improving teaching quality and enhancing educational effectiveness. In this study, a comprehensive experiment focusing on the separation and purification of target proteins was designed using eGFP (enhanced green fluorescent protein). The experiment utilizes modified eGFP as the experimental material, making the entire process visually observable. This approach not only helps students better understand and apply knowledge related to protein expression, purification and identification, but also effectively improves their experimental skills while fostering scientific literacy and innovative capabilities. This represents a positive and meaningful attempt in reforming experimental teaching.

Keywords

Biochemistry experiment; comprehensive experiment; experimental teaching reform

基于亲和层析法分离纯化 eGFP 的综合性生物化学实验教学改革与探索

谢沐杉

西南大学, 中国·重庆 400000

摘要

生物化学实验是生命科学类本科专业人才培养中的核心专业基础课程。然而,传统的生物化学实验教学因内容陈旧、教学方式单一等原因,难以有效提升学生的综合素质与创新能力。综合性实验融合了本课程相关的理论知识与实验技术,是培养学生综合实验能力的重要方式。因此,在生物化学实验教学中引入综合性实验,是提高教学质量增强教学效果的重要途径。本文利用eGFP (enhanced green fluorescent protein) 蛋白设计了目的蛋白分离与纯化的综合性实验。该实验采用改造后的eGFP绿色荧光蛋白为实验材料,使整个实验过程具有可视化特点,不仅有助于学生更好地理解并综合运用蛋白表达、纯化和鉴定等相关知识,还能够有效提升学生的实验技能,培养科研素养和创新能力。这是一次在实验教学改革方面的积极尝试与探索。

关键词

生物化学实验, 综合性实验, 实验教学改革

1 引言

生物化学实验技术是生命科学研究与教学中基础且不可或缺的工具之一,也是生命科学专业课程体系中的重要组

成部分。生物化学实验兼具理论性与实践性,有助于学生夯实理论知识、提升实验技能,同时培养科研素养和创新能力^[1]。因此,高校在本科生生物化学实验教学过程中,不仅要重视基础知识和基本技能的训练,更应注重学生分析问题、解决问题能力以及创新能力的培养^[2]。然而,传统的生物化学实验教学多以基础性、验证性实验为主,综合性实验相对缺乏,不足以调动学生的主观能动性,难以激发学生的探索精神,不利于创新思维的培养。为提升教学质量和本科生综合素质,我们生物化学教研团队针对传统实验教学中的

【项目基金】西南大学2024年实验技术研究项目(项目编号:SYJ2024029)。

【作者简介】谢沐杉(1992-),女,中国重庆人,博士,实验师,从事生物化学教学研究。

不足,结合实际教学经验,积极引入综合性实验设计,取得了良好的教学效果。

2 开设综合性实验的必要性

生物化学实验在培养学生综合能力和科研素养方面发挥着重要作用,然而,传统的生物化学实验教学已难以满足新时代对创新型高素质人才培育的需求^[1]。一方面,传统生物化学实验教学内容相对陈旧。当前的实验课程多基于理论课程设计,以基础性、验证性实验为主,缺乏对近年来生物化学领域新技术、新方法的引入,未能及时反映学科发展的前沿动态。另一方面,传统教学方式较为老化。原有的生物实验教学模式以“传授式”为主,教师在课前准备好药品、试剂和仪器设备,课堂上教师讲解实验目的、原理、步骤及注意事项等,学生只需按照既定流程操作即可获得预期结果。这种方式对学生独立思考和自主设计实验的能力要求较低,难以激发其学习的积极性、主动性和创造性^[2]。

综合性实验是指实验内容包含本课程及其相关课程的综合知识,能够全面训练学生知识应用能力、实验技能和综合素质的复合型实验,更有利于调动学生的主观能动性^[3,4]。开设综合性实验有助于学生将理论知识系统化,拓展思维广度,激发探索欲望,进而培养学生的创新意识和能力^[5]。在生物化学实验课教学中强调实验教学与科研实践的紧密结合,增加综合性实验内容,对于培养学生的研究性学习习惯、提升创新意识和实践能力具有重要意义。

3 综合性实验的设计与内容

为了提高高校人才培养质量,我们生物化学教研团队根据实验内容复合性、实验方法多元性、实验手段多样性、人才培养综合性的要求^[6],设计出了亲和层析法分离纯化 eGFP 蛋白的综合性实验。该实验引导学生综合运用原核基因表达调控、蛋白质生物学亲和力、蛋白质性质等相关知识,同时让学生掌握蛋白表达、蛋白提取、蛋白亲和层析、SDS-PAGE 凝胶电泳, Western Blotting 等重要技术,达到综合拓展和提升学生科研素质的目的。

3.1 综合性实验的内容

3.1.1 eGFP 蛋白的表达及粗提取

在 LB (100 mg/L 卡那霉素) 培养基平皿上活化含有 His6-SUMO-eGFP 蛋白表达重组质粒的 BL21 (DE3) 大肠杆菌菌株。待菌落长出后挑取单菌落接种于 5 mL LB (100 mg/L 卡那霉素) 中, 37°C 培养过夜。以 1% 体积比转接于 100 mL LB (100 mg/L 卡那霉素) 中, 37°C 继续培养至 OD₆₀₀ 值至 0.6 左右, 加 IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖苷, 终浓度 0.1-1 mM) 诱导 3-4 h, 同时设立不加 IPTG 诱导的作为对照。eGFP 蛋白诱导成功后菌体带有绿色荧光, 因此可根据菌体颜色直接判断是否诱导成功。诱导结束后取菌液于 4°C, 4000-6000 rpm 离心 10 min, 收集菌体沉淀。用适量预冷的 PBS 缓冲液重悬菌体, 加入 PMSF (苯甲基磺酰氟, 终浓度 10 mM/L), 冰浴中超声破碎至液体澄清。取上述

液体于 4°C, 12000 rpm 离心 30 min, 取上清即得到 eGFP 蛋白粗提液, 用 0.45 μm 滤膜过滤备用。

3.1.2 eGFP 蛋白的分离纯化

首先准备 Ni-IDA 亲和层析柱: 吸取 2 mL Ni-IDA 亲和层析介质于层析柱中, 让介质自由沉降, 放走储存液。在储存液即将放干时加入 4 倍柱体积的平衡缓冲液 (50 mM PBS) 平衡层析介质。然后上样: 平衡好层析柱之后, 调整层析柱流速至约 1 mL/min, 缓慢加入上一步准备好的 eGFP 蛋白粗提液 3-5 mL, 收集此时的穿柱液以待后续分析。由于表达的 eGFP 蛋白有绿色荧光, 成功吸附再介质上层析柱的颜色由蓝色变为绿色。上样结束后洗去杂蛋白: 用 10-20 倍柱体积的洗涤缓冲液 (50 mM PBS + 20 mM 咪唑, pH=7.4-8.0) 洗涤层析柱以去除杂蛋白。接下来洗脱目的蛋白: 少量多次地加入洗脱缓冲液 (50 mM PBS + 200 mM 咪唑, pH=7.4-8.0)。由于目的蛋白有颜色便于观察, 实验中可根据层析柱和穿柱液的颜色变化来收集洗脱液。收集完目的蛋白后依次使用以下试剂洗涤和保存介质: 用 2 倍柱体积的 6 M GuHCl, 0.2 M 乙酸, 3 倍柱体积的 2% 的 SDS 进行洗涤, 5 倍柱体积的无水乙醇进行洗涤, 5 倍柱体积的 100 mM EDTA (pH 8.0) 进行洗涤, 5 倍柱体积的 100 mM NiSO₄ 进行洗涤; 每种不同的试剂洗涤层析柱后用 5-10 倍柱体积的去离子水对层析柱进行过渡洗涤; 为了长时间的保存, 介质应当 2-8°C 保存在 PBS (含 20% 乙醇) 中。

3.1.3 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度及测定蛋白质分子量

按表 2.1 和表 2.2 中溶液的顺序及比例, 配置 12% 的分离胶和 5.1% 的浓缩胶。等待 SDS-PAGE 胶凝固的同时可处理待上样的纯化的 eGFP 蛋白。测完蛋白含量后, 取 50 μg eGFP 蛋白, 加入 5×SDS 蛋白上样缓冲液至终浓度为 1×。将样品于沸水中煮 5 min 使蛋白变性。待浓缩胶聚合后拔出样品梳, 将电极缓冲液注满电泳槽上下槽, 用微量进样器将样品贴壁缓慢加入加样孔中。加样完毕, 盖好电泳槽上盖, 连接电泳仪, 打开电泳仪后, 样品进胶前电压控制在 80-100 V, 大约 15-30 min; 样品中的溴酚蓝指示剂到达分离胶之后, 电压升到 180-200 V, 当溴酚蓝指示剂迁移到距前沿 1-2 cm 处即可停止电泳, 约 0.5-1 h。电泳结束后, 关掉电源, 取出玻璃板, 剥离出胶片放入合适容器中, 使用 0.25% 的考马斯亮蓝染色液染色, 染色 2-4 h, 必要时可过夜。弃去染色液, 用去离子水漂洗胶面后, 加入脱色液, 进行扩散脱色, 经常更换脱色液, 直至蛋白质带清晰为止。根据蛋白质条带及迁移距离, 判断目的蛋白的纯度并计算蛋白质分子量。

3.1.4 eGFP 蛋白的 Western Blotting

按上述方法进行 eGFP 蛋白的 SDS-PAGE 胶电泳, 待电泳快结束时根据实验需要裁剪合适大小的滤纸和 PVDF 膜, 滤纸用转膜缓冲液浸泡, PVDF 膜用甲醇激活 5 min 后用去离子冲洗, 然后浸泡在转膜缓冲液中备用。电泳完成后, 按照滤纸、PVDF 膜、SDS-PAGE 胶、滤纸的顺序叠放好, 插上电极, 设置好电压及转膜时长。转膜结束后, 观察

蛋白 Marker 是否转移到膜上,若转膜成功,用 TBST 溶液配制 5% 脱脂奶粉溶液, PVDF 膜至于其中室温封闭 2 h。封闭完成的 PVDF 膜用 TBST 洗去残留的脱脂奶粉,随后将膜平铺在抗体孵育盒中,加入适量稀释的一抗, 4℃ 孵育过夜。一抗孵育完成后, PVDF 膜用 TBST 清洗 5 次,每次

8 min。然后按同样的方法孵育二抗, 37℃ 孵育 1.5 h。二抗孵育结束后取出 PVDF 膜,用 TBST 清洗,尽量吸尽 PVDF 膜上残留的 TBST,平铺在显色板上,滴加适量 ECL 显色液,使用凝胶成像系统拍照并分析实验结果。

表 2.1 12% 分离胶组成成分

试剂 (体积)	5 mL	8 mL	10 mL	15 mL	25 mL	30 mL	60 mL
30% Acr-Bis(mL)	2	3.2	4	6	10	12	24
1.5M Tris-HCl pH8.8 (mL)	1.25	2	2.5	3.75	6.25	7.5	15
ddH ₂ O(mL)	1.65	2.64	3.3	4.95	8.25	9.9	19.8
10% SDS(μL)	50	80	100	150	250	300	600
10% APS(μL)	50	80	100	150	250	300	600
TEMED(μL)	3	4.8	6	9	15	18	36

表 2.2 5% 浓缩胶组成成分

试剂 (体积)	4 mL	6 mL	8 mL	12 mL	16 mL	20 mL	24 mL
30% Acr-Bis(mL)	0.66	0.99	1.32	1.98	2.64	3.3	3.96
1M Tris-HCl pH6.8 (mL)	0.5	0.75	1	1.5	2	2.5	3
ddH ₂ O(mL)	2.74	4.14	5.48	8.28	11.02	13.7	16.56
10% SDS(μL)	40	60	80	120	160	200	240
10% APS(μL)	40	60	80	120	160	200	240
TEMED(μL)	4	6	8	12	16	20	24

3.2 综合性实验的设计

为了实现对学生理论知识与实践能力的综合培养,我们设计开发了以亲和层析分离纯化 eGFP 绿色荧光蛋白为核心的综合性实验。该实验以蛋白质的生命活动为主线,围绕核酸的结构与功能、氨基酸的理化性质以及蛋白质的表达、提取、纯化和鉴定等核心内容展开,旨在帮助学生构建完整的知识体系,并掌握现代生物化学的关键实验技术。

在实验流程的设计上,首先从基因工程入手,通过质粒构建和细菌转化,使学生了解基因表达载体的设计原理及其在蛋白质表达中的作用。随后进入蛋白质表达与诱导阶段,使用 His6-SUMO-eGFP 这一具有绿色荧光特性的融合蛋白作为实验材料,使得蛋白质的表达和提取过程能够通过荧光颜色直观呈现,将原本不可见的分子操作可视化,提高学习兴趣。在蛋白质的纯化环节,实验引入亲和层析技术,利用 His 标签与层析柱的特异性结合实现目标蛋白的高效纯化。

4 结语

亲和层析分离纯化 eGFP 的综合性实验,在实验内容设计上,采用了重组绿色荧光蛋白 eGFP 作为研究对象。该蛋白具备良好的可视化特性,能够在各个实验环节中直观、便捷地判断实验的成败。这种设计不仅增强了实验的可视化效果,还极大地提高了学生对实验过程的理解力与参与度,有效激发了他们的学习兴趣、探索欲望以及实验操作的成就感。该实验通过将蛋白质的表达、提取、纯化分离以及检测鉴定等整个流程有机串联,为学生提供了一个系统化、全流程的实验训练平台。该实验不仅有助于学生梳理和整合所学

的理论知识,还使他们能够掌握当前生物化学领域的前沿实验技术,如蛋白亲和层析、SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western Blotting 等。更重要的是,实验的设计强调了科研素质的培养,通过真实科研情境的模拟,全面提升学生的实验设计能力、问题分析能力以及科研创新能力。

经过实践验证,该实验已成功应用于本科生的生物化学实验教学中,并取得了良好的教学效果。学生普遍反馈,通过本实验不仅掌握了多种实验技术与方法,还提升了综合运用知识、设计实验的能力。此外,该实验还促进了学生从“被动操作”向“主动探究”的转变,为他们今后开展科研工作打下了坚实基础。同时该综合性实验的设计理念与实践经验,为生物化学其他模块的综合性实验开发提供了宝贵的借鉴。

参考文献

- [1] 张桂春. 生物化学综合性与设计性实验的研究与实践[J]. 卫生职业教育, 2008(04): 124-125.
- [2] 张效云,董明纲,宋桂芹,等. 开设综合性、设计性生物化学实验的探索与实践—以河北北方学院医学检验学院生物化学实验教学改革为例[J]. 河北北方学院学报(社会科学版), 2013, 29(05): 102-104.
- [3] 宋凤艳. 生物化学综合性及设计性实验教学的探索[J]. 科技信息, 2012, (03): 264.
- [4] 谭甲凡,成运,黎建辉,等. “三性”实验教学的研究与探讨[J]. 湖南人文科技学院学报, 2009, (02): 139-140.
- [5] 黄体冉,刘悦萍,张国庆,等. 生物化学综合性实验的设计与实现—以亲和层析法纯化猪胰蛋白酶为例[J]. 实验室研究与探索, 2017, 36(04): 179-182.