**《分子生物学技术》教学大纲**

**适用专业：医学实验技术**

**总学时：90 理论学时： 22 实践学时： 68**

1. **课程的性质和任务**

分子生物学作为21世纪的前言学科，一直在与时俱进，学科进展十分迅速，研究方法与科研成果日新月异。了解、熟悉和掌握分子生物学技术，对于理解学科研究思路，把握科学动态和应用学科知识至关重要，是全面提高人才培养素质的关键所在，也是实验技术专业本科生必须掌握的一项技能。《分子生物学技术》是一门集分子生物学基本理论和实验技能、科研探索和应用于一体的全新的综合性课程。

《分子生物学技术》是实验技术专业的基础必修课，由基础医学实验中心分子医学实验教学平台承担本课程的教学工作。该课程分理论和实验两大部分，理论主要讲解常用分子生物学技术基本原理及其应用，实验则包括从目的基因的克隆到原核表达的完整的操作体系。因而，《分子生物学技术》是一门实践性很强的实验课程,通过理论学习和实验操作，让学生能较全面系统的掌握分子生物学的基本操作，加深对专业知识的理解，并注重培养学生的独立实验技能、科学研究思路和独立分析问题、解决问题的能力，为今后的科学研究打下坚实的实验基础。本课程将理论和实验有机结合，实验以学生为主，教师为辅，实验准备到实验操作均由学生自己完成，多种教学手段并进为特色的立体化教学模式，使学生在学习过程中得到全方位，多层面的综合训练。

结合实验技术专业的本科生培养目标，我们致力于加强教学过程管理，强化学生素质教育，提高教学质量，深化考核方式和方法的改革，调动学生学习的积极性，加强学生平时学习的主动性，让学生重视课程的全过程学习，提高学习效果。

**二**、**相关课程的衔接**

先修课程：生物化学、分子生物学、细胞生物学、遗传学

**三、教学的基本要求**

掌握分子生物学的实验操作原理，熟悉实验操作过程，培养学生的基本实验技能，并了解相关实验仪器的使用方法。

**四、学时分配（理论）**

表1 《分子生物学技术》理论课程学时分配

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 章节 | 教学内容 | 学时 |
| 绪论 | 分子生物学技术概述 | 2 |
| 第一章 | 核酸提取技术 | 4 |
| 第二章 | 目的基因的获取及鉴定技术 | 3 |
| 第三章 | 载体的构建和鉴定 | 3 |
| 第四章 | 细菌转化与细胞转染技术 | 2 |
| 第五章 | 外源基因表达的鉴定 | 4 |
| 第六章 | 差异基因表达谱分析 | 2 |
| 第七章 | 基因诊断与基因治疗 | 2 |
| 合 计 | | 22 |

**五、课程考核**

**（一）考核形式及分值权重**

《分子生物学技术》课程考核成绩分为四个部分，包括：实验报告（20%）；操作规范、团队协作纪律及卫生（20%）；阶段实验设计（20%）和期末理论考试（40%），详见下表。

表2  《分子生物学技术》课程考核成绩分值与权重

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 项目 | 考核类型 | 考核内容 | 分值 | 权重 |
| 1 | 实验报告 | 撰写实验报告 | 100分 | 0.2 |
| 2 | 操作规范、团队协作、纪律及卫生 | 操作规范、平时课堂团队协作、打扫卫生及出勤迟到情况 | 100分 | 0.2 |
| 3 | 阶段实验设计 | 撰写完整课题 | 100分 | 0.2 |
| 4 | 期末理论考试 | 期末理论考试 | 100分 | 0.4 |
|  | 总成绩 |  | 100分 |  |

**（二）考核内容及要求**

**1、实验报告（100分）：**

（1）成绩计算方法：

∑（xi）

实验报告部分的最终成绩 ＝ 6

xi —— 每篇实验报告的成绩

此项成绩按0.2的权重折后计入总成绩。

（2）实验报告评分标准:

① 简答题：制作统一答案，按给分点进行打分。

② 实验报告讨论部分要求独立完成，如有雷同或抄袭，则无论抄袭者或被抄袭者均直接扣除当次成绩30分。以实验小组为单位处理实验结果。

表3 《分子生物学技术》实验报告评分标准

|  |  |
| --- | --- |
| 评 分 标 准 | 赋 分 |
| 实验题目 | 5分 |
| 实验目的 | 5分 |
| 实验原理 | 20分 |
| 实验操作 | 10分 |
| 实验结果 | 20分 |
| 实验讨论 | 30分 |
| 简答题 | 10分 |
| 未完成报告 | 0分 |

**2、操作规范、团队协作、纪律及卫生（100分）：**考核学生平时实验课实际操作情况、出勤、课堂纪律以及维护实验室卫生等，每次课记录在案，期末汇总，将各次成绩取平均值后，按0.2权重计入总成绩。

表4 《分子生物学技术》课程出勤、纪律及卫生评分标准

|  |  |
| --- | --- |
| 成绩组成 | 评 分 标 准 |
| 操作规范  （20分） | 实验过程中由于未遵守操作规范，而导致实验仪器、设备损坏者，每次扣20分；不遵守实验室守则每次扣10分。此项所扣总分不超过20分 |
| 团队协作  （20分） | 不与同组同学进行配合完成实验者，每次扣20分；实验结束后应及时整理实验台试剂、仪器等，清洁实验台面，未完成者每次小组成员各扣10分。此项所扣总分不超过20分。 |
| 课堂纪律  （50分） | 不参与实验操作，每次扣40分；每次迟到扣除当次成绩10分；学习态度不端正、不认真听讲、私下讲话、课堂睡觉、使用手机等，每次扣20分, 此项所扣总分不超过40分。经老师指出未加改正者，当次实验课本项100分全部扣除。 |
| 卫生  （10分） | 每人打扫实验室卫生1次，不认真打扫者，扣5分；不打扫者，扣10分。 |
| 出勤 | 课前班长向主讲教师报告出勤情况，包括：班级总人数、实际出勤人数、缺勤人数及理由，缺勤者上交年级办出具的请假条，因事、病假导致的缺勤可在其它班级上课时间补课，由补课教师出具证明、并进行此项内容以及实验报告的打分，不另外安排补课时间。若无补课，则扣除当次本项成绩全部100分无故旷课2次即取消考试资格，计为不及格。 |

**3、阶段实验设计（100分）**：

（1）上交时间：第14周。

（2）实验设计内容：

①项目背景及研究意义（含参考文献）（20分）

②研究内容和拟解决的关键问题（40分）

③创新之处（20分）

④项目进度安排（5分）

⑤项目经费预算（5分）

⑥预期研究成果（10分）

（3）提交形式：电子版和纸质版各一份

满分100分,之后按权重0.2折合，计入总成绩。

**4、 期末理论考试（100分）**

（1）考试时间：18周

（2）考核内容：全部课程内容

（3）考核形式：闭卷、统一考试

①题型：选择题、名词解释、问答题、综合论述题

②题数：35-40道

③共100分，之后按权重0.4折合，计入总成绩。

**（三）成绩记载与管理**

本课程的综合成绩按以下方法记载：

1、本课程各部分考核均由主讲教师组织、实施、评定。成绩一经评定，不得随意改动，以体现客观、公正、准确。

2、本课程各部分考核成绩按100分记录，按权重折合后累加获得本课程最后总成绩。具体计算方法为：

　　X=∑（xi）

　　X——学生本课程考核总成绩

　　xi——第i部分按权重折合考核成绩

3、本课程总成绩不及格（按百分制计算，60分为及格），按该门课程不及格认定。

4、补考原则及成绩认定

（1）补考原则：总成绩不及格学生给予一次理论补考机会。

（2）成绩认定：

①补考后，将补考理论成绩按原比例折合，计入总成绩，总成绩仍不及格，计为挂科。

②补考后成绩及格者，总成绩计为60分。

**六、教材及主要参考书**

（一）教科书

[1] 魏群.分子生物学实验指导．北京：高等教育出版社，2015.3

（二）参考书

[1]邢万金. 基因工程—从基础研究到技术原理. 北京：高等教育出版社，2018.2

[2]叶棋浓.现代分子生物学技术及实验技巧.北京：化学工业出版社，2015.10

[3]吴乃虎.基因工程原理.北京：科学出版社，2001.3

[4]查锡良，药立波. 生物化学与分字生物学.北京：人民卫生出版社，2013.3

[5]萨姆布鲁克 J，拉塞尔D W著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社，2002

**七、教学内容（理论）**

**绪论** 分子生物学技术概述

【教学内容】

1.目的基因的获取

2.克隆载体的构建和选择

3.载体的转化

4.重组子的筛选

5.基因表达

6.基因工程技术的应用

【教学基本要求】

1.了解基因工程技术的应用

2. 掌握分子生物学技术基本过程

【重点与难点】

分子生物学技术基本过程

【教学方法与教学手段】

教学方法：讲授法

教学手段：多媒体、板书等

**第一章 核酸提取技术**

【教学内容】

1.质粒DNA结构、特点和提取

2.基因组DNA结构、特点和提取

3.RNA的分类、结构、功能和提取

4.核酸的定性及定量检测

【教学基本要求】

1.掌握碱裂解法提取质粒DNA、Trizol法提取RNA的方法

2.掌握核酸定性及定量鉴定方法

3.熟悉质粒、原核及真核基因组的结构和特点

4.熟悉RNA的种类、结构和特点

5.了解植物、动物、细菌中提取基因组DNA的方法

【重点与难点】

重点：碱裂解法提取质粒DNA；Trizol法提取RNA的方法和结果分析；核酸定性及定量检测

难点：对核酸提取后实验结果的分析

【教学方法与教学手段】

教学方法：理论与实验穿插进行

教学手段：多媒体教学

**第二章 目的基因的获取及鉴定技术**

【教学内容】

1.真核生物DNA复制

2.普通PCR

3.实时荧光定量PCR

【教学基本要求】

1.掌握PCR的基本概念、原理和方法

2.熟悉DNA复制、实时荧光定量PCR的原理

【重点与难点】

重点：PCR基本原理与方法

难点：PCR实验过程中的疑难解析

【教学方法与教学手段】

教学方法：理论与实验穿插进行

教学手段：多媒体教学

**第三章 载体的构建和鉴定**

【教学内容】

1.克隆载体

2.表达载体

3.基因重组

4.构建载体的关键工具和步骤

5.载体构建的应用举例

【教学基本要求】

1.掌握载体构建的关键步骤、克隆载体和表达载体的结构和特点、载体构建的关键工具

2.熟悉基因重组

3. 了解载体构建的应用举例

【重点与难点】

重点：载体构建的关键工具和步骤、克隆载体和表达载体的结构和特点

难点：定向克隆、DNA重组

【教学方法与教学手段】

教学方法：理论与实验穿插进行

教学手段：多媒体教学

**第四章 细菌转化与细胞转染技术**

【教学内容】

1.细菌转化

2.细胞转染

3.感染与噬菌体

【教学基本要求】

1.掌握细菌转化的概念、方法和原理

2.了解细胞转染的概念、方法和原理

3.了解感染的概念、噬菌体的生物学性状、分类及在分子生物学上的应用

【重点与难点】

重点：感受态细胞的制备和化学转化法

难点：转化和转染的区别

【教学方法与教学手段】

教学方法：理论与实验穿插进行

教学手段：多媒体教学

**第五章 外源基因表达的鉴定**

【教学内容】

1.逆转录

2.原核细胞基因的表达

3.真核细胞基因的表达

4.RT-PCR

5.Western blot

6.ELISA

7.Northern blot

8.蓝白斑筛选

【教学基本要求】

1.掌握RT-PCR和Western blot原理、方法及应用

2.熟悉逆转录原理

3.熟悉印迹技术种类及用途

4.熟悉ELISA类型、原理及应用

5.熟悉蓝白斑筛选原理

6.了解原核细胞及真核细胞的表达

7.了解Northern blot的原理方法

【重点与难点】

重点：RT-PCR、Western blot的原理和方法；ELISA类型和原理

难点：Western blot的基本原理和操作；ELISA类型和原理

【教学方法与教学手段】

教学方法：理论与实验穿插进行

教学手段：多媒体教学

**第六章 差异基因表达谱分析**

【教学内容】

1.基于双向电泳技术的蛋白质组学分析

2.基因芯片

【教学基本要求】

1.了解双向电泳的基本操作步骤

2.熟悉基因芯片的基本概念、分类、基本特点和工作原理、应用

【重点与难点】

重点：基因芯片的基本概念、分类、基本特点、应用

难点：基因芯片的工作原理

【教学方法与教学手段】

教学方法：讲授法

教学手段：多媒体教学

**第七章 基因诊断与基因治疗**

【教学内容】

1.基因诊断技术

2.基因诊断的医学应用

3.基因治疗的基本策略

4.基因治疗的基本程序

【教学基本要求】

1.了解基因诊断技术及医学应用；

2.了解基因治疗的基本策略、基本程序及临床应用现状

【重点与难点】

重点：基因诊断技术；基因治疗的基本程序

难点：基因诊断技术；基因治疗的基本程序

【教学方法与教学手段】

教学方法：讲授法

教学手段：多媒体教学

**八、实验教学**

**（一）学时分配**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 实验项目 | 实验类型 | 是否书写  实验报告 | 学时 |
| 实验一 | 总RNA的提取、定性及定量 | 综合性 | 是 | 8 |
| 实验二 | RT-PCR及琼脂糖凝胶电泳 | 综合性 设计性 | 是 | 8 |
| 实验三 | 表达载体的提取及鉴定 | 综合性 | 是 | 6 |
| 实验四 | 载体/目的基因的酶切及切胶回收 | 综合性 | 是 | 8 |
| 实验五 | 载体与目的基因的连接、转化用试剂及培养基的制备 | 综合性 | 是 | 7 |
| 实验六 | 感受态细胞制备及重组质粒转化 | 综合性 | 是 | 8 |
| 实验七 | 转化克隆的提取及鉴定 | 综合性  设计性 | 是 | 8 |
| 实验八 | 目的基因的诱导表达及蛋白提取 | 综合性 设计性 | 是 | 8 |
| 实验九 | SDS-PAGE法检测表达蛋白 | 综合性 | 是 | 7 |
| 合 计 | | | | 68 |

**（二）实验内容**

分子生物学技术实验从RNA水平上克隆基因、构建重组表达载体、诱导表达于原核细胞并检测，是一门综合性实验，实验流程如下：

小鼠组织总RNA提取

提表达质粒pGEX4T-1，pET-His

RT-PCR法扩增目的基因

双酶切表达质粒

双酶切目的基因

感受态细胞BL21（DE3）制备

T4DNA连接酶连接

连接

转化BL21（DE3）

提取重组质粒

酶切/PCR鉴定

保存菌种

IPTG诱导表达重组质粒

收集蛋白，SDS-PAGE检测表达蛋白

**实验一：总RNA的提取、定性及定量**

【目的与要求】

1. 掌握Trizol法提取哺乳动物组织总RNA的原理和方法

2. 掌握琼脂糖凝胶电泳法定性检测总RNA的原理和方法

3. 掌握紫外吸收法定量测定RNA浓度及纯度的方法

4. 熟练使用微量移液器、高速离心机等分子生物学常用仪器

【内容提要】

1.小鼠不同组织的总RNA的提取

2.RNA浓度和纯度的测定

3.琼脂糖凝胶电泳的原理、制备凝胶过程及核酸染料

4.低温高速离心机的使用

5.微量移液器的使用

**实验二：RT-PCR及琼脂糖凝胶电泳**

【目的与要求】

1.掌握RT-PCR原理和方法，了解其应用

2.熟悉引物设计原则

3.了解PCR的种类及应用

【内容提要】

1.RNA反转录（RT）的基本原理

2.聚合酶链式反应的基本原理

3.引物设计原则

4.PCR体系各原料的作用

5. PCR技术的种类及应用

6. PCR仪的使用（示教）

**实验三：表达载体的提取及鉴定**

【目的与要求】

1.掌握碱裂解法小量提取质粒DNA的原理和方法

2.熟悉质粒DNA定性和定量检测方法

【内容提要】

1.碱裂解法提取质粒的原理

2.琼脂糖凝胶电泳法分析质粒条带

3.质粒浓度的测定

4.质粒纯度的测定

**实验四：载体/目的基因的酶切及切胶回收**

【目的与要求】

1.掌握限制性核酸内切酶酶切原理和方法

2.熟练从琼脂糖凝胶中回收DNA片段的技术

【内容提要】

1.载体质粒DNA的双酶切

2.目的基因的双酶切

3.载体/目的基因的酶切产物的回收

**实验五：载体与目的基因的连接、转化用试剂及培养基的制备**

【目的与要求】

1. 掌握DNA片段的体外连接技术

2. 了解固体和液体培养基的配制

【内容提要】

1.载体与目的基因的体外连接

2.液体LB培养基的配制

3.固体LB培养基的配制

4.离心管（15ml）的清洗及灭菌

5.CaCl2的溶液的配制、高压灭菌及保存

**实验六：感受态细胞制备及重组质粒转化**

【目的与要求】

1. 熟悉CaCl2法制备感受态细胞

2. 掌握转化的原理和方法

【内容提要】

1. CaCl2法制备感受态细胞

2. 热击法转化重组质粒

3. 摇床的使用

4. 分光光度计的使用

5. 超净工作台的使用

**实验七：转化克隆的提取及鉴定**

【目的与要求】

1.掌握重组质粒的鉴定方法

2.了解菌落克隆挑取方法和大肠杆菌培养、保存方法

【内容提要】

1.固体培养板上挑取菌落克隆

2.扩培菌落

3.质粒提取

4.重组质粒的酶切鉴定

5.菌落PCR鉴定重组质粒

6.表达培养基的配制

**实验八：目的基因的诱导表达及蛋白提取**

【目的与要求】

1.熟悉在IPTG诱导下外源基因在原核细胞中的表达特点和方法

2.了解大肠杆菌总蛋白提取的方法

【内容提要】

1. 扩培含重组质粒的菌落

2. IPTG诱导表达外源蛋白

3. 收集细胞并超声破碎细胞

4. 超声波破碎仪的使用

**实验九：SDS-PAGE 法检测表达蛋白**

【目的与要求】

1. 掌握SDS-PAGE的基本原理和方法

2. 了解用SDS-PAGE法检测蛋白

【内容提要】

1. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质的基本原理和方法

2. SDS-PAGE的基本操作流程

3. 外源基因的表达结果分析

**八、《分子生物学技术》课程主讲教师职责**

分子医学实验教学平台负责《分子生物学技术》课程考核方案的制定、考核过程的监督，组织主讲教师对《分子生物学技术》课程进行考核方案的实施，对学生实验课情况进行评估考核，对学生实验课考核资料（实验报告等）进行归类存档等。

主讲教师在《分子生物学技术》课程的考核中，主要负责《分子生物学技术》实验课程考核方案的实施，考核结果的汇总与记录等。

（一）依据教学大纲安排授课内容及进度。要求任课教师参加每次集体理论备课及预实验，以保证能将当次课程的所有理论内容对学生进行讲解，以及实验过程的顺利进行。

（二）第一次课对学生公布《分子生物学技术》课程考核方案，使全体学生知情本课程考核相关要求、考核时间、考核方式、考核内容、评分标准。

（三）平台要依据教学大纲要求及讲授内容，制定考核实施办法及步骤。协助主讲教师根据考核计划安排对学生日常实验课情况进行记录评估；收取学生的实验报告，并进行评分。

（四）主讲教师协助平台完成期末实践操作考核的各项组织工作。

（五）本课程各部分考核成绩按相应分值记录，按权重折合后累加获得本课程最后总成绩。

（六）每学期末，分子医学实验教学平台会组织主讲教师，对本课程考核方案的科学性、执行情况和教学效果进行系统评价，并形成评价分析报告和整改意见上报学校教务处。