



藻毒素降解酶 A 与微囊藻毒素 作用条件的分析

郭小亮, 殷月玲, 吴彦东, 冯玲玲*, 郑骧羊, 徐国睿, 周凡惠

(华中师范大学 化学学院, 武汉 430079)

摘要: 化学生物学的一个重要内容是以生物体中的重要调控酶为靶酶, 通过异源表达获得靶酶并研究其性质, 实现靶酶的实际应用。以藻毒素降解酶 A (MlrA) 为中心, 成功制备并表征目的蛋白, 分析其纯度并探讨不同条件(底物浓度、温度、pH、金属离子)对 MlrA 降解微囊藻毒素(MCs)活性的影响。通过实验, 学生掌握制备和表征目的蛋白的方法, 掌握探究不同条件对酶活性影响的实验设计, 熟悉重要仪器的使用, 进而提高分析问题、解决问题的能力, 将理论与实践相结合。在实验教学过程中引导学生思考科学研究对社会的价值和意义, 体会科学道德和社会责任的重要性, 认识作为科学工作者的社会责任和使命, 进而培养并提升学生的科学探究意识和社会责任感。

关键词: 化学生物学; 研究型设计实验; 藻毒素降解酶 A; 微囊藻毒素; 酶活性

中图分类号: Q5

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20230284

Study on the Interaction Conditions between Microcystinase A and Microcystins

GUO Xiaoliang, YIN Yueling, WU Yandong, FENG Lingling*, ZHENG Xiangyang, XU Guorui, ZHOU Fanhui

(College of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: Targeting regulatory enzymes is an important aspect of chemical biology. The approach involves acquiring target enzymes through heterologous expression, studying their properties, and ultimately applying them in practical settings. Microcystinase A (MlrA) was identified and successfully prepared and characterized as a target enzyme. The study analyzed both the purity of the enzyme and its resulting effects, examining how different substrate concentrations, temperature, pH, and metal ions affected MlrA's activity in microcystins (MCs) degradation. Through experimentation and exploration, students can learn to prepare and analyze target proteins, design experiments to explore enzyme activity under different conditions, and use key instruments, which improves their problem-solving skills, their ability to apply chemical biology knowledge, and their scientific inquiry and social responsibility. In the process of experimental teaching, students were guided to think about the value and significance of scientific research to society, realize the importance of scientific ethics and social responsibility, and understand the social responsibility and mission of scientific researchers, which cultivate their senses of scientific inquiry and social responsibility.

Key words: chemical biology; research-oriented experimental design; microcystinase A; microcystins; enzyme activity

近年来, 受气候变化和水体富营养化的影响^[1-2], 有害微囊藻水华 (harmful microcystis blooms, HMBs) 频繁爆发。蓝藻过度生长及其释放的微囊藻毒素不仅损伤水质、破坏水域生态景观, 降低

生态系统的生物多样性, 而且对人类的生产生活、身体健康等造成了极大的影响^[3-4]。针对蓝藻的治理方法主要从控制蓝藻的生物量或去除藻毒素入手, 包括物理法、化学法和生物法^[5]。在众多

收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2023-09-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (22277037, 21472061); 中央高校基本科研业务费专项资金资助科研转化为教学项目 (CCNU22KYZHSY05, CCNU16KYZHSY22); 武汉知识创新专项基础研究项目 (20220208-01010276)。

作者简介: 郭小亮 (1994-), 女, 博士后, 主要从事生物酶的结构与功能研究。

*通信作者: 冯玲玲 (1969-), 女, 博士, 教授, 主要从事天然毒素降解酶筛选及优化方面的研究。E-mail: fl1708@mail.ccnu.edu.cn

方法中,生物法是一种能够有效去除 HMBs 和 MCs 的方法,因其对环境友好、高效以及低成本的特点而受到学者的高度关注^[6]。MCs 是肝毒性蓝藻毒素,具有稳定的环状七肽结构^[7],对高温环境、pH 变化有极强的抵抗性。目前已经发现 270 多种 MCs 变体^[8],其中研究最多的是 MC-LR。研究表明,许多菌群能够降解 MCs^[9]。文献 [10] 首次从 *Sphingomonas* sp. ACM-3962 中鉴定得到降解 MC-LR 的 *mlr* 基因簇(包括 *mlrA*、*mlrB*、*mlrC*、*mlrD*),并证实由 *mlrA* 编码的藻毒素降解酶 MlrA 是催化降解 MC-LR 所需的第一个关键酶。MlrA 能够水解 MC-LR 中 Adda-Arg 部位的肽键^[11],使环状 MC-LR 变成线型 MC-LR,大大降低 MC-LR 毒性。文献 [12] 在前期研究中,将 *mlrA* 基因克隆到了 pMAL-c2X 载体上,导入工程菌大肠杆菌中,通过在大肠杆菌 K12 TB1 中过量表达,首次成功获得了纯度超过 90% 的 MlrA^[12]。影响 MlrA 降解 MCs 活性的因素有温度、pH、金属离子^[13]等,因此,成功制备高纯度的 MlrA 并找到其降解 MCs 的最适条件对 HMBs 的高效治理具有重要意义。

化学生物学的一个重要内容是以生物体中的重要调控酶为靶酶,通过异源表达获得靶酶^[14],并研究不同条件对靶酶活性的影响,找到靶酶发挥活性的最适条件,实现靶酶的实际应用。MlrA 是 MCs 降解过程中的关键酶,结合化学生物学的知识和技术,以 MlrA 为靶酶,研究 MlrA 降解 MCs 的酶学性质、酶与底物的相互作用,是实现靶酶实际应用的关键。

化学生物学是一门新兴的交叉学科,主要通过运用化学领域发展较成熟的理论知识、研究方法和技术手段来解决生命科学领域存在的复杂问题,在相关科研领域发挥着不可替代的重要作用^[15]。21 世纪以来,我国化学生物学建设获得了科学基金的大力支持,得以蓬勃发展。2016 年,基金委批准化学生物学成立独立学科评审组,自 2017 年起,化学生物学开始作为一个独立的学科领域进行基金评审^[16-17]。在这些措施的推进下,化学生物学的研究队伍增长迅速,研究领域更加多样,逐渐从简单体系拓宽到复杂体系,内涵丰富,独具特色。当前,化学生物学本科教学的理论课程体系迅速发展并在逐步完善,为适应社会发展,满足社会创新型人才的需求,高校化学生

物学的实验教学建设也需要引起高度重视^[18]。

本文以化学专业大三学生的知识背景为基础,根据学生的发展需求,将课题组在科研领域取得的系列研究成果转化,设计了一个化学生物学的研究设计实验。前期研究中报道了 MlrA 的异源表达、降解机理和酶学性质等研究成果^[12,19]。在该项研究设计实验中,实验内容包括探究底物浓度、金属离子配体、温度和 pH 对靶酶活性的影响,进而找到 MlrA 发挥活性的最适条件。通过本实验项目的实际操作和实践体验来验证理论知识,培养学生分析问题和解决问题的能力,并进一步塑造其动手能力、创新意识和团队协作能力,提升学生综合运用化学生物学知识的能力。同时在实验探究过程中,引导学生思考科学道德与社会责任等问题,通过实验探究和分析讨论,让学生认识到科学诚信道德方面的重要性,同时将实验内容与环境保护等社会热点问题相结合,引导学生认识到科学技术进步对于人类社会发展的的重要性,使学生充分领悟到科学研究的价值和意义,以及作为科学工作者的使命,树立科学探究意识并培养社会责任感。

1 实验目的

1) 学习并掌握蛋白表达、纯化的原理和方法,掌握通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术表征蛋白的方法以及探究 MlrA 酶学性质的实验方法。

2) 掌握冷冻离心机、蛋白质电泳仪、高效液相色谱仪(HPLC)等仪器的基本使用方法。

3) 学习研究型实验设计的思路与方法,提升分析和解决问题的能力,提高运用化学生物学实验技术的应用能力。

2 实验原理

2.1 MlrA 的制备

异丙基- β -d-硫代半乳糖苷(IPTG)是一种诱导外源基因表达的诱导剂^[20],将含有 MlrA 基因的质粒转入感受态细胞后,经复苏、活化、扩大培养和 IPTG 诱导,可成功合成目的蛋白。

直链淀粉树脂亲和层析纯化带有 MBP-tag 的融合蛋白是目前蛋白纯化中常用的一种方法。蛋白上样后,目标蛋白中的 MBP-tag 能够被多糖树脂吸附,而杂蛋白则流出。再通过使用麦芽糖进

行温和洗脱,将目的蛋白洗脱下来。

2.2 MlrA 的纯度、大小分析

聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)为网状结构,具有分子筛效应,为蛋白质的电泳提供载体;十二烷基硫酸钠(SDS)是阴离子表面活性剂,与蛋白质结合后使蛋白质-SDS复合物带上负电荷,还能使复合物构象发生改变。SDS-PAGE凝胶电泳的结果不受蛋白质形状和自身所带电荷的影响,只与蛋白质分子的大小有关,可根据蛋白质的分子量不同分析目的蛋白MlrA的纯度和大小。

2.3 MlrA 与底物作用条件的分析

酶作为一类具有高效催化活性的生物大分子,酶促反应速率不仅与酶自身结构和性质有关,还受到外界因素(如底物、温度、pH和金属离子等)的影响。其中,底物能与靶酶特异性结合,酶促反应速率与底物浓度的关系可通过米氏方程表示,米氏常数 K_m 是酶的特征常数,可表征酶与底物的结合能力;金属离子对酶的活性有不同的作用,有的金属离子起抑制作用,有的金属离子起活化作用^[21];酶催化活性最高时缓冲溶液的pH称为酶的最适pH,在过酸或过碱环境会导致酶蛋白变性;酶催化活性最高时的温度称为酶的最适温度,在低温时酶活性受到抑制,高温时构成酶本身蛋白结构的分子热能增加,维持酶三维空间结构的非共价键相互作用破坏的机会增加,导致酶活性降低,甚至变性。

本实验中,通过单一因子变化法分别探究底物浓度、温度、pH和铜离子对MlrA活性的影响。在研究某一因素对酶促反应速率的影响时,维持反应中其他因素不变。

3 实验试剂和仪器

3.1 实验试剂

微囊藻毒素MC-LR标准样品购自Algalchem公司,柠檬酸、柠檬酸钠、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、甘氨酸、NaOH、硫酸铜、30%丙烯酰胺混合液、Tris-HCl、氯化钠、sodium lauryl sulfate(SDS)、过硫酸铵、TEMED等为分析纯,购自国药化学试剂有限公司(中国);麦芽糖-水合物(maltose monohydrate)购自Biofroxx厂家;用于亲和层析纯化带有MBP-tag融合蛋白的直链淀粉树脂购自Novagen公司;SDS-PAGE蛋白分子Marker购自Thermo Fisher Scientific公司;胰蛋白胨、琼脂粉、酵母提

取物购自Biofroxx公司;IPTG、氨苄青霉素、过硫酸铵等为分析纯,购自国药化学试剂有限公司(中国);实验过程中所使用水均为去离子水。

3.2 实验仪器

高速冷冻离心机(eppendorf)、高效液相色谱仪(thermo fisher scientific)、pH计、移液枪、移液管、恒温水浴锅、 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱、制冰机、电热鼓风干燥箱、凝胶成像仪(BIO-RAD)。

4 实验内容

4.1 MlrA 的制备

1) MlrA 的表达

先取 $2\text{ }\mu\text{L}$ 含有目的基因的质粒转入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 感受态细胞,冰浴 30 min , $42\text{ }^\circ\text{C}$ 热激 90 s ,继续冰浴 2 min 后,复苏、涂板, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜培养。第二天挑选单菌落,接种到 10 mL LB液体培养基中(含氨苄青霉素 100 mg/L), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 200 r/min 下活化 $12\sim 16\text{ h}$ 。之后将菌液按照2%的接种量加入到 1 L LB液体培养基中(含氨苄青霉素 30 mg/L),在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 220 r/min 条件下培养至菌液的 OD_{600} 介于 $0.8\sim 1.0$ 之间,加入诱导剂IPTG诱导蛋白表达,诱导温度为 $16\text{ }^\circ\text{C}$,加入诱导剂IPTG终浓度为 0.2 mmol/L ,培养 12 h 左右并测定其 OD_{600} 。

2) MlrA 的纯化

在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下,通过高速离心机在 8000 r/min 条件下离心 10 min 收集细菌,用重悬液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol/L NaCl)重悬菌体,然后利用超声破碎仪破碎蛋白,破碎功率 300 W ,工作时间 3 s ,间歇时间 3 s ,超声 20 min 。破碎后的菌在 9000 r/min 条件下离心 $40\sim 60\text{ min}$ 分离沉淀与上清,将得到的上清粗酶液用于MBP蛋白标签亲和层析柱纯化,先将粗酶液重复上样两次后,再用wash buffer(25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl)洗杂蛋白,最后用含 10 mmol/L 麦芽糖的Elution Buffer洗脱液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L 麦芽糖-水合物)洗脱目标蛋白。

4.2 MlrA 的纯度、大小分析

SDS-PAGE凝胶电泳的实验步骤如下。

1) 制样

在样品蛋白中加入适量的蛋白上样缓冲液,充分振荡均匀,在 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下加热 10 min ,使蛋白质变性。

2) 制备 SDS-PAGE 凝胶

清洗制胶板, 晾干后固定, 按表 1 配方先后制备 15 mL 12% 分离胶和 5 mL 5% 浓缩胶, 将分

离胶液加入制胶板中, 用无水乙醇液封, 静置 30 min。待分离胶凝固后去除无水乙醇, 加入浓缩胶, 插入相应孔径的梳子, 静置。

表 1 SDS-PAGE 凝胶电泳配方

	水	30% 丙烯酰胺混合液	1.5 mol/L Tris(pH=8.8)	10% SDS	10% 过硫酸铵	TEMED
15 mL 下层胶(12% 分离胶)	4.9	6.00	3.80	0.15	0.15	0.006
	水	30% 丙烯酰胺混合液	1 mol/L Tris(pH=6.8)	10% SDS	10% 过硫酸铵	TEMED
5 mL 下层胶(5% 浓缩胶)	3.4	0.83	0.63	0.05	0.05	0.005

3) 电泳

将凝固后的胶板置于电泳槽中, 加入甘氨酸电泳液, 上样, 设置电压仪为 100 V、40 mA。

4) 染色脱色

电泳结束后取下蛋白胶, 用考马斯亮蓝染色 30 min 后, 倒入脱色剂脱色至凝胶透明干净。

5) 成像

用凝胶成像仪拍照成像。

4.3 MlrA 与底物作用条件的分析

4.3.1 MlrA 比活力的测定

反应体系 400 μ L, 磷酸缓冲液 pH=7.0。底物初始浓度 10 μ g/mL, 加入体积 10 μ L, 则底物终浓度为 0.25 μ g/mL。将 MlrA 稀释至 0.25 mg/mL, 加入体积分别为 0、2、4、6 μ L, 室温下反应 5 min 后加入 4 μ L 20% 磷酸溶液终止反应。用 HPLC 测试不同浓度 MlrA 对 MCs 的降解速率并计算比活力, 选择一个酶浓度作为酶学性质研究的最佳酶浓度。

4.3.2 底物浓度对 MlrA 活性的影响

室温、pH=7.0 条件下, 设置 MCs 浓度的浓度梯度为 0.025、0.050、0.075、0.100、0.150、0.200、0.250、0.300、0.375、0.500、0.750、1.000 μ g/mL。反应体系 400 μ L, 磷酸缓冲液 pH=7.0, 在最佳酶量下, 与不同浓度底物反应 5 min, 加入 4 μ L 20% 磷酸溶液终止反应。用 HPLC 测试 MlrA 对 MC-LR 的降解速率, 测定酶促反应动力学参数。

4.3.3 温度对 MlrA 活性的影响

pH=7.0、底物浓度 0.25 μ g/mL, 将 MlrA 样品分别在 25、35、40、45、50、55、60、65 $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育 1 h。反应体系 400 μ L, 磷酸缓冲液 pH=7.0, 在最佳酶量下, 室温下反应 5 min, 终止反应后用 HPLC 测试 MlrA 对 MC-LR 的降解效率, 确定最适温度。

4.3.4 pH 对 MlrA 活性的影响

室温、底物浓度 0.25 μ g/mL、最佳酶浓度条

件下, 将 MlrA 在 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0、11.0 的缓冲溶液中孵育 1 h, 反应体系 400 μ L, 磷酸缓冲液 pH=7.0, 在最佳酶量下, 室温下反应 5 min, 终止反应后用 HPLC 测试 MlrA 对 MC 的降解效率, 确定最适 pH。

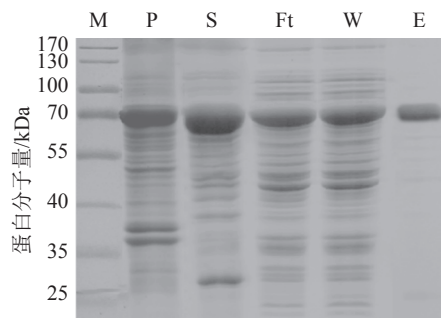
4.3.5 Cu^{2+} 对 MlrA 活性的影响

其他条件一定时, 分别向体系中加入不同体积的 Cu^{2+} , 使其浓度梯度为 0、0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、0.5、1、10 mg/mL, 反应体系 400 μ L, 磷酸缓冲液 pH=7.0, 在最佳酶量下, 室温下反应 5 min, 终止反应后用 HPLC 测试 MlrA 对 MC-LR 的降解效率。

5 实验结果与讨论

5.1 MlrA 的纯度、大小分析

通过 SDS-PAGE 实验分析 MlrA 的含量情况如图 1 所示。纯化的蛋白分子量在 70 kDa 附近, 与标准蛋白的分子量接近, 证明成功制得了纯度较高的 MlrA。



条带 M—蛋白 Marker; 条带 P—细胞破裂离心后的沉淀; 条带 S—离心后的上清液; 条带 Ft—纯化时的流穿液; 条带 W—洗杂蛋白; 条带 E—目的蛋白。

图 1 用 SDS-PAGE 分析 MlrA 的表达及纯化情况

5.2 MlrA 的比活力

U 被定义为室温下, 1 min 内降解 1 μ g MCs 所需 MlrA 的酶量。实验结果得出 MlrA 的比活力为 3.81 ± 0.68 U/mg, 后续实验以 MlrA 初始浓

度为 0.25 mg/mL, 加入体积 6 μ L 进行测定。

5.3 底物浓度对 MlrA 活性的影响

底物浓度可直接影响酶的活性。为了分析底物浓度对 MlrA 活性的影响, 在一定酶浓度下, 改变底物浓度, 测定酶活性, 酶活性与底物浓度的关系可以通过 Hill 方程拟合, 结果如图 2 所示。MlrA 的最大反应速度 V_{\max} 为 19.67 ± 0.73 U/mg, 米氏常数 K_m 为 0.35 ± 0.02 μ g/mL。米氏常数是酶的特征常数, 可表征酶与底物的结合能力。

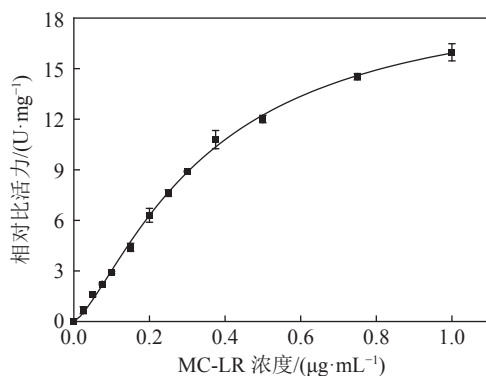


图2 底物浓度对 MlrA 活性的影响

5.4 温度对 MlrA 稳定性的影响

在最佳酶浓度、一定底物浓度和适宜 pH 下, 改变酶的孵育温度, 结果如图 3 所示。25~60 $^{\circ}$ C 范围内孵育 1 h 后, MlrA 均能保持最高活性的 28% 以上, 说明 MlrA 具有良好的热稳定性。同时, 随着温度升高, MlrA 的活性先增大后减小, 在 40 $^{\circ}$ C 时, MlrA 的热稳定性最高。

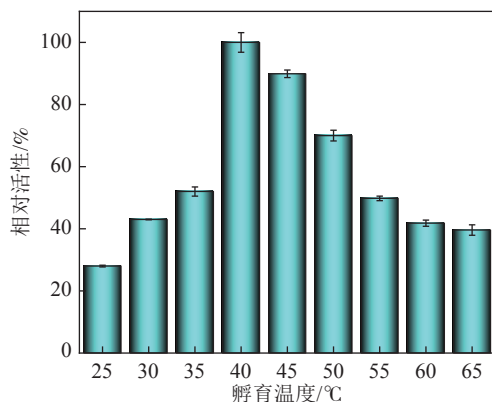


图3 温度对 MlrA 活性的影响

5.5 pH 对 MlrA 稳定性的影响

在最佳酶浓度、一定底物浓度和室温下, 改变酶的孵育 pH, 结果如图 4 所示。随 pH 升高, MlrA 的活性先增大后减小, 在 pH=7.5 时, MlrA

的 pH 稳定性最高。在 pH=11 时, MlrA 仍能保持最大活性的 30%, 说明 MlrA 具有一定的耐碱性。

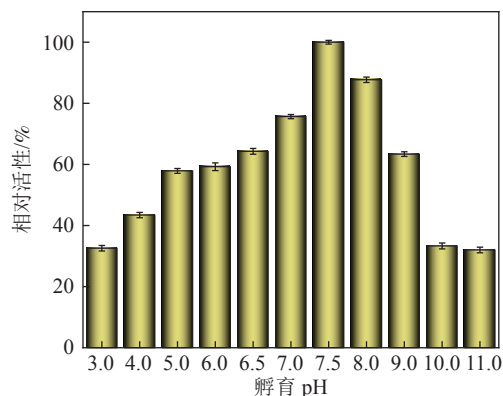


图4 pH 对 MlrA 活性的影响

5.6 Cu²⁺对 MlrA 活性的影响

Cu²⁺在 0~10 mg/L 不同浓度下对 MlrA 活性的影响如图 5 所示。该实验结果表明, 0.1 mg/L 的 Cu²⁺对 MlrA 的活性有促进作用, 当浓度高于 0.1 mg/L 时, Cu²⁺对 MlrA 的活性有不同程度的抑制, 并且随铜离子浓度增大, 抑制作用增强。当 Cu²⁺浓度为 10 mg/L 时抑制作用最大, 酶活性仅有最高活性的 42%。

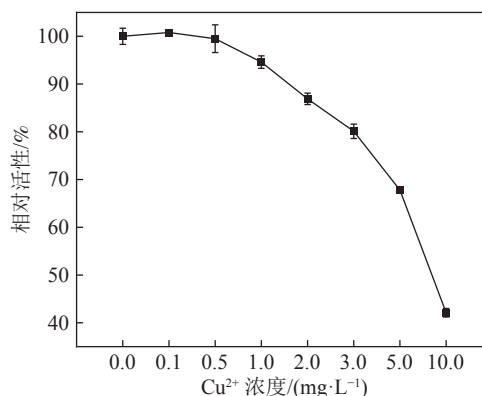


图5 Cu²⁺浓度对 MlrA 活性的影响

6 实验教学模式、教学设计及教学安排

本研究设计实验结合社会现状, 以蓝藻水华暴发及藻毒素污染为背景, 基于化学生物学的研究技术和研究成果, 培养学生发现问题、解决问题的能力, 为学生从事科学研究工作提供思路。通过理论学习和实践, 学生能够综合运用所学知识, 掌握实验方法, 提升科学探究、服务社会的意识和责任感。本实验教学设计为 24 学时, 在 12 周内完成。它由阅读文献(4 学时)和实验项目

(20 学时)共同组成,其中阅读文献的目的是提前了解藻毒素降解酶相关的研究文献,并完成对应的文献汇报;实验项目则由必做实验项目、选做实验项目和说课汇报项目等环节组成,目的是锻炼学生的动手能力、数据分析能力和汇报能力。班级内学生 4 人组成一个小组,小组成员分工完成相应的实验项目。具体安排如下。

1) 阅读文献

阅读藻毒素降解酶(MlrA)降解微囊藻毒素的相关文献并完成文献汇报,本部分安排为 4 个学时。实验教师准备 6 篇文献,学生通过阅读提炼文献要点,总结 MlrA 降解 MCs 的机理、研究 MlrA 学性质的思路、技术路线和方法,能够初步构建实验框架,设计实验方案,实现信息输入。自主学习完成后,以小组讨论和个人汇报的形式呈现学习成果,由教师或助教参与,完成信息的输出过程。本环节旨在提高学生阅读、筛选科研文献的能力,了解化学生物学的研究进展,掌握化学生物学的研究思路,并通过自主设计实验提升逻辑思维能力、问题解决能力和语言表达能力。

2) 确定实验项目

设置必做实验项目(1 个)、选做实验项目(4 个)、说课汇报项目(2 个),本部分共计 20 个学时。

必做实验项目为 MlrA 比活力的测定。这部分实验是后续实验的基础,通过该实验熟悉实验仪器的操作,学会处理和分析数据,进而确定最佳酶量,建议 2 学时。

选做实验项目包含底物浓度对 MlrA 活性的影响、温度对酶活性的影响、pH 对酶活性的影响、金属离子对酶活性的影响、反应时间对 MlrA 活性的影响等项目中,实验小组选择其中的 4 个实验项目为实操项目,且根据自主意愿,每人统筹 1 个实验,完成实验方案、分析实验结果并完成实验报告。建议每个项目 4 学时。如果学生能继续探究其他因素对 MlrA 活性的影响,进一步优化 MlrA 的催化条件,可与课题组的教师讨论,在教师帮助下得到更多的锻炼,进一步加深对化学生物学研究设计实验的认识。

说课汇报项目 1 在课程中期开展,对阶段性实验成果及后期安排进行汇报,交流分享实践经验和所遇困难,以便后续实验顺利进行,共 1 学时。

说课汇报项目 2 为课程总结汇报。小组完成

所有实验后进行小组讨论,分析实验结果并得出结论,形成完整的实验报告,最后以小组汇报的形式展示实验成果,共 2 学时。

3) 实验管理

以 4 人小组为单位,在实验室学长的指导下,学生结合自身时间安排,确定实验的设计方案、开始时间及完成时间。在此过程中,学生应定期向指导教师汇报实验进展,教师对实验设计的可行性进行审核,并统筹安排整个实验项目,及时解决相关问题,确保实验顺利开展。

4) 考核评价方式

同时从多个维度进行考量,整体评判学生的学习情况和综合能力。充分发挥学生的自主性和主体性,从文献汇报、实验设计、实验操作、小组合作、数据分析、研究汇报、个人总结等多个方面打分,总分 100 分,综合考查和评价学生学习与收获情况,发掘学生更多的可能性。具体的考核打分标准如下。

① 文献汇报(15 分):所汇报文献重点突出,阐述逻辑清晰,总结到位,图文并茂。

② 实验设计(15 分):实验目的清晰明确,实验步骤简明易懂,实验设计合理。

③ 实验操作(30 分):实验前检查仪器药品,实验过程中操作正确规范,及时记录实验现象,实验结束后整理实验器材。

④ 数据分析(10 分):数据处理和分析过程清晰,结果描述严谨。

⑤ 研究汇报(10 分):研究内容及研究结果的汇报逻辑正确,结论清晰。

⑥ 团队合作(10 分):小组成员间团结互助、积极交流,共同设计并完成实验内容。

⑦ 个人总结(10 分):对于研究内容重要性的感悟,科学态度严谨,对科学研究价值的认识。

7 结束语

国家的建设和发展离不开科研人才,进入新时代后,我国在高校人才培养上投入了巨大资源。为落实国家要求,华中师范大学在向社会输送科研人才中发挥着重要作用,并且积极进行实验课程教学改革,旨在提高学生的自主科研能力,增强学生的创新意识,提升其社会责任感。本研究设计实验从化学专业的特点出发,结合学科发展的必要性,面向化学学院本科三年级的学

生开设,并综合考虑学生的专业背景、成长需求和个人能力,将课题组的科研成果转化为研究设计实验。通过该项目的锻炼,学生能够拓宽思维,掌握化学生物学的研究思路和研究手段,提高分析、解决问题的能力,为今后从事相关的科研活动打下基础,助力国家科研人才的发展。

参考文献

- [1] O'NEIL J M, DAVIS T W, BURFORD M A, et al. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change[J]. *Harmful Algae*, 2012, 14: 313-334.
- [2] 郑英. 浅谈敖江山仔水库蓝藻水华成因及防治对策[J]. *广东化工*, 2022, 49(23): 199-202.
- [3] 丁志良, 张事, 高兆波, 等. 蓝藻水华应急防治处理技术研究进展[C]//2022中国水利学术大会论文集(第二分册). 北京: 中国水利学会, 2022: 396-402.
- [4] 刘立鹤, 蒋加鹏, 吴鹏飞. 蓝藻水华产生的原因及防治方法[J]. *渔业致富指南*, 2016(19): 52-54.
- [5] 李媛. 浅析蓝藻水华的危害及防治[J]. *中国水产*, 2023(2): 65-66.
- [6] 王敏, 刘浩, 王江南, 等. 生物法治理蓝藻水华研究进展[J]. *环境工程技术学报*, 2022, 12(1): 92-99.
- [7] RASTOGI R P, SINHA R P, INCHAROENSAKD A. The cyanotoxin-microcystins: Current overview[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2014, 13(2): 215-249.
- [8] LIN W, HUNG T C, KUROBE T, et al. Microcystin-induced immunotoxicity in fishes: A scoping review[J]. *Toxins*, 2021, 13(11): 765.
- [9] 李小玉, 黄飞羽, 冯海, 等. 微囊藻毒素-LR降解酶microcystinase的酶活性研究[C]//2020中国环境科学学会科学技术年会论文集(第二卷). 北京: 中国环境科学学会, 2020: 1690-1697.
- [10] BOURNE D G, RIDDLES P, JONES G J, et al. Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR[J]. *Environ Toxicol*, 2001, 16: 523-534.
- [11] 潘禹, 王华生, 詹鸿峰, 等. 微囊藻毒素降解酶MlrA的生物学特征及催化机理研究进展[J]. *化工学报*, 2020, 71(3): 945-954.
- [12] LIU H L, GUO X L, LIU L, et al. Simultaneous microcystin degradation and microcystis aeruginosa inhibition with the single enzyme microcystinase A[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54 (14): 8811-8820.
- [13] 包子云, 王沛芳, 钱进, 等. 藻毒素的生物降解研究进展[J]. *长江科学院院报*, 2015, 32(5): 28-36.
- [14] 冯玲玲, 陈琼, 李玉梦, 等. 蓝藻FBP/SBPase的制备及其与配体相互作用的分析: 科研转化的化学生物学综合实验设计[J]. *大学化学*, 2021, 36(6): 116-123.
- [15] 王雨琦. 化学生物学领域的发展现状[J]. *当代化工研究*, 2017(9): 64-65.
- [16] 邢曦雯, 杨财广, 杨俊林, 等. 化学生物学2017—2021年回顾及未来发展规划[J]. *中国科学:化学*, 2022, 52(4): 580-592.
- [17] 张艳, 郑企雨, 杜灿屏, 等. 九层之台, 起于累土: 从化学生物学成长浅析基金支持对交叉学科的引领作用[J]. *中国科学:化学*, 2021, 51(4): 440-450.
- [18] 董献刚, 顾显明. 化学生物学实验教学探索与创新[J]. *化工学报*, 2021, 72(4): 2337.
- [19] JASON D, ALISTAIR J, MCCORMICK, et al. Microcystinase-a review of the natural occurrence, heterologous expression, and biotechnological application of MlrA[J]. *Water Research*, 2021, 189: 116646.
- [20] 唐梅, 蔡松, 杨东成, 等. 不依赖IPTG诱导产木糖醇大肠杆菌工程菌的构建[J]. *中国酿造*, 2021, 40(9): 173-179.
- [21] 蔡述杰, 邓开英, 李九玉, 等. 不同金属离子对稻田自然生物膜磷酸酶活性的影响[J]. *土壤*, 2020, 52(3): 525-531.

编辑 钟晓