



依托大型科研仪器开展创新型本科实验教学的 设计与研究

操媛¹, 邹飘^{1*}, 严霜²

(1. 武汉科技大学 医学部医学分析测试中心, 武汉 430081; 2. 武汉科技大学 化学与化工学院, 武汉 430081)

摘要: 大型科研仪器是先进科学技术的体现, 是培养创新型人才的重要基础条件和硬件保障, 是开展高水平实验教学的宝贵资源。为促进创新型研究人才的培养, 拓展生物医学本科实验教学内容, 该研究设计了一套依托流式细胞仪开展的本科实验教学的具体方案, 针对经典的“细胞增殖/细胞周期”问题, 分别设计两个不同原理的流式细胞术进行对比实验。实践表明, 依托流式细胞仪开展对比实验教学, 能加深本科生对大型科研仪器的了解, 培养学生扎实的动手能力, 激发学生的创新性思维和科研热情。

关键词: 大型科研仪器; 本科实验教学; 流式细胞仪; 细胞增殖; 细胞生物学实验

中图分类号: Q25

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20230262

Research of Innovative Undergraduate Experimental Teaching Based on Large-scale Research Instruments

CAO Yuan¹, ZOU Piao^{1*}, YAN Shuang²

(1. Medicine & Sciences Analysis Center, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China)

Abstract: Large scientific research instruments are a manifestation of the advanced science and technology, an important prerequisite and hardware guarantee for cultivating innovative talents, and a precious resource for conducting high-level experimental teaching. In order to promote the cultivation of innovative research talents and expand the content of undergraduate experimental teaching in biology and medicine, this study has designed a specific teaching plan for undergraduate experimental teaching around a flow cytometer. In order to address the classic “cell proliferation/cell cycle” problem, two different principle flow cytometric techniques are designed as comparative experiments. The practice has shown that teaching comparative experiments using a flow cytometer can deepen undergraduate students' understanding of the large scientific research instruments, cultivate their solid hands-on abilities, and stimulate their innovative thinking and research enthusiasm.

Key words: large-scale scientific research instruments; undergraduate laboratory course; flow cytometer; cell proliferation; cell biology experiments

大型科研仪器是各高校产出高水平科研成果和培养高质量研究人才的重要基础^[1-2]。合理有效地利用大型科研仪器开展本科实验教学, 是培养本科生实践能力、思维创新能力、社会竞争能力的重要环节^[3-5]。当前, 大型科研仪器设备主要服务于高校教师及研究生的科研工作, 极少面向本

科生开放。究其原因, 主要受限于两方面: 一是大型科研仪器精密复杂, 运行成本较高, 不敢放手让本科生操作; 二是对大型科研仪器的教学方法研究不够, 缺乏适应本科生学习的具体实验方案^[6-7]。因此, 如何设计适合本科生的实验教学方案, 使大型科研仪器能充分合理地运用到本科实

收稿日期: 2023-05-22; 修回日期: 2024-03-12

基金项目: 湖北省高等学校省级教学研究项目(2021246); 湖北省高等学校实验室研究项目(HBSY2021-15); 武汉科技大学教学改革项目研究(2022X065)。

作者简介: 操媛(1987-), 女, 博士, 实验师。主要从事大型仪器设备管理研究及教学工作。

* 通信作者: 邹飘(1994-), 女, 硕士, 实验师。主要从事生物医学类大型仪器测试与实验室管理工作。E-mail: 1162942150@qq.com

实验教学,从而切实提高本科生实验教学质量,是各高校在培养创新型本科人才过程中需要思考的重要问题。

作为生物医学领域最广泛使用的大型科研设备之一,流式细胞仪广泛运用于药物筛选、细胞特性鉴定、细胞功能分析等各项研究中^[8-9]。将流式细胞仪的使用引入生物医学专业的本科实验教学,教会本科生运用流式细胞仪分析探究科学问题,能激发本科生的科研热情,培养其创新思维能力,提高综合素质水平。

1 实验教学方案设计

1.1 方案简介

课程设计使用分析型流式细胞仪(型号:BD FACSCelesta),配置有 405 nm、488 nm、640 nm 三根独立激光器,最高可同时进行 12 色荧光分析。结合学校生物医学学科培养方案和实验教学大纲,在本科生细胞生物学实验课程中增设“运用流式细胞术测定细胞增殖/周期”的教学内容。以羟基喜树碱对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响为研究模式,分别设计两个流式实验方案进行测定、分析和比较。

该课程设计分为理论知识和操作实践两部分。理论知识包括流式细胞仪的工作原理、流式实验设计要点、流式常见术语及其含义、流式细胞术的常见应用等;操作实践包括细胞样本前处理、流式样本制备、上机采集数据、数据分析。学生以小组为单位,分析实验数据、总结并完成实验报告。该课程方案共计 6 学时,其中 2 学时为理论课程,4 学时为实验课程。

1.2 流式细胞仪的工作原理

流式细胞仪(flow cytometer)是集激光技术、电子物理技术、光电测量技术、电子计算机技术、细胞荧光化学技术、单克隆抗体技术为一体的一种先进高科技仪器,一般由液流系统、光学系统和信号检测系统 3 部分组成^[10]。运用流式细胞仪,对处于快速直线流动状态中的单个细胞、生物颗粒进行逐个、多参数、高效的定量分析技术,称为流式细胞术。它具有检测速度快、测量参数多、数据采集广、运用方式灵活等特点。

流式实验流程为:将待测样本制成单细胞或单颗粒悬液,根据待测指标进行特定的荧光染料或荧光抗体标记。待测样本经上样针进入流动

室,在鞘液包裹下形成单行排列的流束依次快速通过光学检测区,经激光器激发后产生荧光信号,由仪器的检测系统转换成电信号值,通过模/数转换器转换为可被计算机软件识别和读取的数字信号,最终可由流式细胞仪的工作站软件进行处理分析,以图形形式呈现。

1.3 运用流式细胞术测定细胞增殖/周期的实验原理

细胞增殖(cell proliferation)是细胞生命活动的基本特征,是通过细胞分裂(cell division)将遗传物质精确稳定地分配给下一代细胞来实现的。一个连续分裂的细胞,从上一次分裂结束到下一次分裂终止经历的全过程为一个细胞周期(cell cycle)。细胞周期一般可分为 4 个时期:DNA 合成前期(G₁期)、DNA 合成期(S期)、DNA 合成后期(G₂期)、分裂期(M期)^[11]。

基于上述知识点,该教学方案采用“同一知识点对比实验”的方式,分别设计下面两种方法来测定细胞增殖/周期。

1.3.1 方法一:CFSE(羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯)染色法

荧光染料 CFSE 是一种带有琥珀亚酰胺(NHS)的染料,可轻易进入活细胞。当 CFSE 的 NHS 和细胞内蛋白质共价结合后,被细胞内酯酶水解发出绿色荧光^[12]。如图 1 所示,在细胞分裂增殖过程中,CFSE 标记的荧光会随着细胞分裂平均分配给两个子代细胞中,因此子代细胞的荧光强度是亲代细胞的一半。通过流式细胞仪检测 CFSE 绿色荧光强度,可检测出未分裂的亲代细胞、分裂一次(强度降为 1/2)的子代细胞,或更多分裂代次(强度降为 1/4 或更多)的细胞,从而反映出细胞的增殖能力。

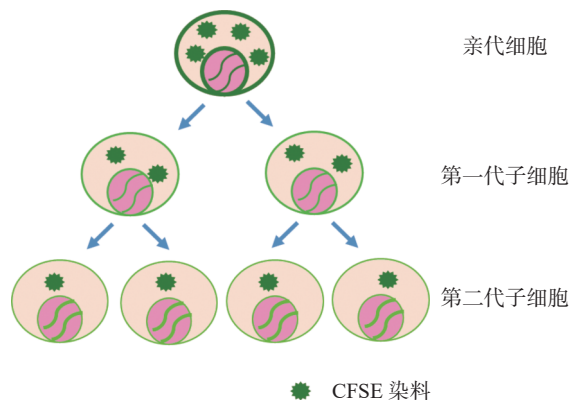


图 1 CFSE 染色法检测细胞增殖原理示意图

1.3.2 方法二: PI(碘化丙啉)染色法

荧光染料 PI 是一种可对细胞 DNA 染色的染料, 当细胞经固定处理后, PI 进入细胞内、嵌入双链 DNA 后释放红色荧光。在细胞周期的各个时相中, 细胞 DNA 的含量出现周期性的变化。如图 2 所示, G₀/G₁ 期具有 2 倍体细胞的 DNA 含量; G₂/M 期具有 4 倍体细胞 DNA 含量; S 期 DNA 含量介于 2N 到 4N 之间。PI 标记细胞样本的 DNA 后, 通过流式细胞仪检测的 PI 红色荧光强度可直接反映细胞 DNA 含量。由此可计算出细胞周期各时相的比例分布, 可反映细胞的增殖状态^[13]。

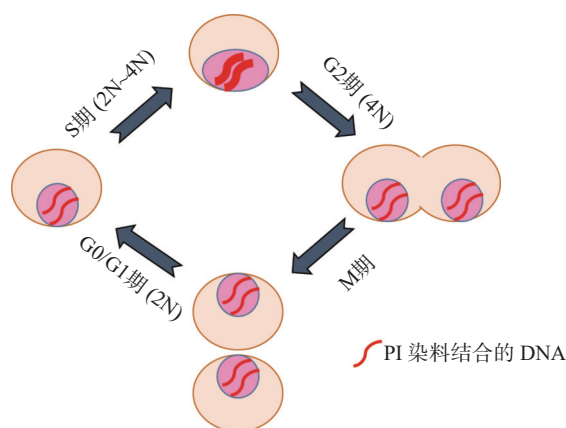


图 2 PI 染色法检测细胞增殖原理示意图

2 实验教学内容

2.1 细胞培养、药物处理及样本制备方法

取对数生长期的 HeLa 细胞, 按每孔 2×10^6 个接种于 6 孔板中, 置于 CO₂ 培养箱 (5% CO₂、37 °C) 中过夜培养。显微镜下观察, 待细胞生长至 60%~70% 左右融合度时, 分别进行以下处理。

2.1.1 方法一: CFSE 染色法药物处理及样本制备

使用终浓度为 5 μmol/L 的 CFSE 染色液孵育细胞 10 min, 染色完成后使用 PBS 洗涤细胞 3 次。随即进行药物处理。实验组加入使用 DMEM 培养基配置的终浓度为 5 μmol/L 的 (S)-10-羟基喜树碱, 对照组加入同体积的新鲜达尔伯克氏必需基本培养基 (Dalbecco's modified eagle medium, DMEM)。

药物处理 12 h 后, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤细胞 1 次, 使用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 制备成浓度为 1×10^6 /mL 的单细胞悬液, 经 200 目筛网过滤后进行上机检测。

2.1.2 方法二: PI 染色法药物处理及样本制备

药物处理及细胞悬液的制备同方法一。

染色方法: 取 1 mL 细胞悬液, 加入 PBS 洗涤并离心去上清后, 细胞沉淀逐滴加入终浓度为 70% 的乙醇, 4 °C 固定过夜。加入新鲜 PBS 洗涤细胞, 再加入 100 μL 终浓度为 50 μg/mL 的 RNaseA 溶液 37 °C 孵育 30 min。最后加入 50 μg 的 PI 染液 (终浓度为 50 μg/mL), 室温避光染色 10 min 后, PBS 洗涤并离心去除染色液, 细胞沉淀用 0.5 mL 新鲜 PBS 重悬, 经 200 目筛网过滤后可上机检测。

学生分 4 人一组, 小组内自行分工进行样本制备, 每组均需要按以上两种方法分别制备流式样品。

2.2 上机操作

首先由教师讲解 BD FACSCelesta 的组成, 重点讲解上机的操作步骤和注意事项, 介绍细胞样本在流式细胞仪中的“行动路径”, 使学生对仪器运行有更直观深刻的认识。

由教师演示运行 BD FACSDiva 软件, 讲解参数设置、上机步骤和数据采集方法。此过程重点讲解流式细胞术的圈门过程, 流式结果图的表现方式 (散点图、直方图), 流式图的判读、上机参数设置和数据采集方法。

学生分小组轮流进行样本上机测试。CFSE 法制备的样本, 上机时选择异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 通道, 每管样本记录 2 万个细胞总数; PI 法制备的样本, 上机时选择 PI 通道, 圈定细胞主群后, 以 PI-A 为横坐标、PI-W 为纵坐标圈定单个细胞群, 每管样本记录 2 万个单细胞群。最终每组获取的数据, 导出流式细胞术标准 (flow cytometry standard, FCS) 原始文件。

2.3 结果分析

2.3.1 CFSE 染色法检测药物对细胞增殖的影响

使用 Flowjo 软件, 圈定细胞主群后, 以 FITC 为横坐标作直方图, 以表示样本中 CFSE 荧光强度的表达, 测定子代细胞所占比例。如图 3 所示, 对照组可观察到明显的增殖峰, 子代细胞比例约为 66.5%; 与对照组相比, 5 μmol/L 羟基喜树碱处理 HeLa 细胞 12 h 后, 增殖峰明显变低, 子代细胞比例下降至 18.8%, 说明羟基喜树碱处理组细胞分裂受到抑制。

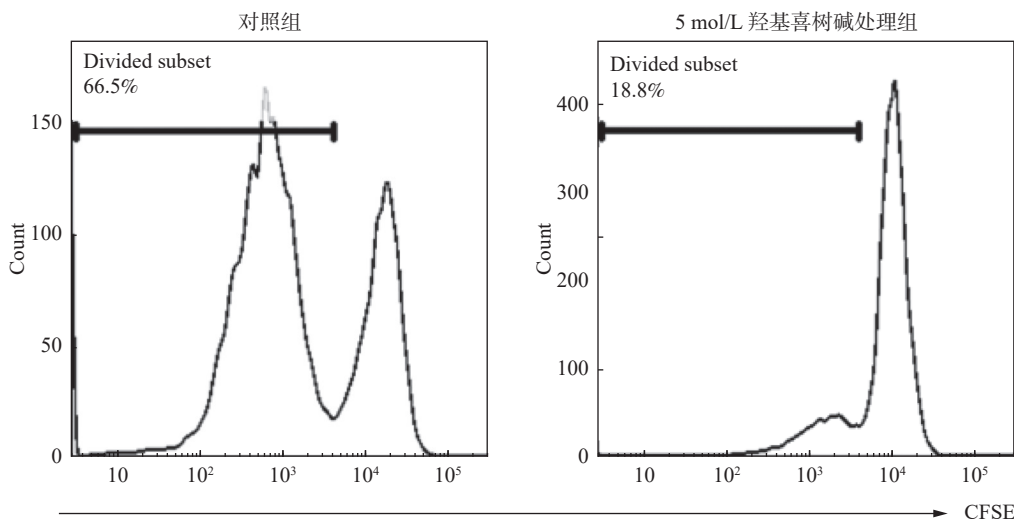


图 3 CFSE 染色法检测羟基喜树碱对 HeLa 细胞增殖的影响

2.3.2 PI 染色法检测药物对细胞周期的影响

使用 Flowjo 软件进行细胞周期结果拟合。如图 4 所示，对照组细胞 G0/G1 期比例为 61.72%，S 期比例为 22.85%，G2 期比例为 12.73%；5 μmol/L 羟基喜树碱处理 12 h 后，细胞 G0/G1 期比例为

51.25%，S 期比例为 32.81%，G2 期比例为 15.27%。说明羟基喜树碱处理能明显改变 HeLa 细胞周期分布，具体表现在 G0/G1 期占比减少，S 期细胞比例明显增多，即羟基喜树碱处理组细胞出现 S 期细胞阻滞，其增殖受到抑制。

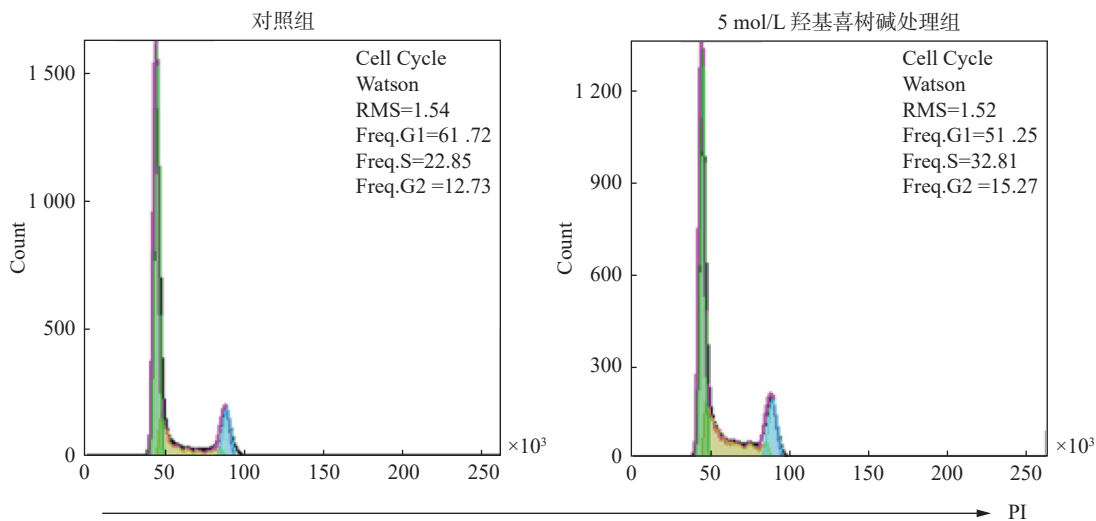


图 4 PI 染色法检测羟基喜树碱对 HeLa 细胞增殖的影响

此环节重点讲解 Flowjo 软件的使用方法，并演示上述分析过程。教师演示完成后，各小组在课堂现场讨论并完成数据分析，教师现场指导答疑。学生课后均独立完成整体的实验报告。

3 教学要点分析

“制备单细胞悬液”是流式细胞术操作成功与否的根本关键点。因此，在处理细胞样本上，即需要动作轻柔以保证细胞形态完整，又需要使

样本充分分散成单个细胞，在消化细胞、吹打及过滤等步骤上需要格外注意。

对于初次接触流式细胞仪的本科生来说，实验操作不宜太难。因此本课程选择了最基础的单荧光实验，而不涉及多重荧光的多参数分析。针对同一检测目的，又分别设计两种不同的单荧光染色方案，即 CFSE 染色法来检测细胞分裂完成的终点；PI 染色法检测细胞分裂过程的中间阶段。通过对比学习两个单荧光流式实验，既能加

深学生们对于细胞增殖/周期这一理论知识的理解,又能让其体会流式细胞术在科研运用上的灵活多样性。使用多项实验测试来互相印证实验结论,也是科学研究中的常用手段之一。

4 结束语

目前,多数高校的本科实验教学内容多以基础性、验证性实验为主,涉及学科相关的大型科研仪器内容较少,实验教学的综合性和创新性不足^[14-15]。本研究基于流式细胞仪设计了一套具有可行性的本科生实验教学具体方案,在保证大型科研仪器合理运用到本科实验教学的同时,锻炼生物医学本科生的实验技能、激发其科研兴趣、拓展其科学视野,对提高该学科的本科实验教学质量有积极促进作用。近年来,已有部分高校开展了本科实验教学改革,将各学科的大型仪器设备运用到本科实验教学中,均取得了良好的实践效果^[16-19]。这充分证明了大型科研仪器面向本科生的深度开放有可行和必行趋势。期待今后有更多面向本科生深度开放大型仪器设备的实验教学内容,并逐步形成各学科有系统的教学体系,为探索创新性的本科实验教学提供更多新思路新方法。

参考文献

- [1] 马淑凤,卢莉璟,王文龙,等.高校大型仪器设备SOP规范化管理及其应用[J].实验室研究与探索,2022,41(1):282-285.
- [2] 蔡晚拴.国家一流学科背景下大型仪器开放共享平台建设[J].实验科学与技术,2023,21(1):152-156.
- [3] 樊梅,蒋宝晴.高校大型仪器设备在本科生创新能力培养中的应用探索[J].中国现代教育装备,2023(7):1-2.
- [4] 宜原原,刘亚丰,雷敏,等.大型仪器共享平台助力生命科学拔尖创新人才培养[J].实验室研究与探索,2023,42(10):254-257.
- [5] 曹培,杨阳.高校大型仪器在本科创新人才培养中的应用探讨[J].科教导刊,2023(36):10-12.
- [6] 彭超,王榆元,邓昌爰,等.大型仪器在本科开放性实验教学中的应用实践[J].广东化工,2020,47(1):169-170.
- [7] 李聪,堵艳艳,王鑫铭.大型仪器设备对本科生开放共享的难点和对策研究[J].广州化工,2022,50(8):213-215.
- [8] 苗雨蕾.流式细胞术在临床检验中的应用及前景[J].中文科技期刊数据库(全文版)医药卫生,2023(9):66-69.
- [9] 卢春丽,薛雯,莫秋菊,等.流式细胞术在临床检验中的应用及前景[J].临床医学进展,2023,13(5):8355-8360.
- [10] 梁智辉,胡豫.流式细胞术:从基础研究到临床医学应用[M].武汉:华中科技大学出版社,2019.
- [11] 卢群伟,曾小美.细胞生物学实验教程[M].武汉:华中科技大学出版社,2023.
- [12] 陈蕾蕾,陈军浩,孙雪梅,等.荧光染料CFSE作为细胞标记的特性研究[J].细胞与分子免疫学杂志,2004,20(2):140-141.
- [13] 陈鸿琪,夏闽.荧光染料吖啶红作测定蛋白质的生物探针:蛋白质的染料分析法新进展[J].理化检验:化学分册,2001,37(2):53-55.
- [14] 魏凤江,景亚青,赵玉霞,等.医学细胞生物学实验课教学改革需求的现状分析[J].中国高等医学教育,2021(3):65-66.
- [15] 李绍军,陈坤明,黄伟伟.细胞生物学实验教学模式的反思与重构[J].黑龙江教育:高教研究与评估,2020(5):4-5.
- [16] 彭宇,钱匡亮,余世策,等.大型仪器XCT在本科生探究性与创新性实验中的应用[J].实验室研究与探索,2022,41(1):241-244.
- [17] 赵玉红,李登文,周浩,等.大型仪器应用于本科开放性实验教学的探索与实践:以高效液相色谱仪为例[J].高校生物学教学研究(电子版),2023,13(1):39-42.
- [18] 倪春花,张国玲,简慧敏,等.依托大型仪器服务中心推进本科实验教学改革[J].实验室科学,2023,26(3):177-180.
- [19] 何寿成,刘超,王金山,等.材料专业大型仪器开放共享及在实验教学中的应用[J].中文科技期刊数据库(全文版)教育科学,2023(11):175-178.

编辑 钟晓