



## 自噬流的诱导与检测综合性实验的设计与实践

杨娇艳<sup>1,2,3</sup>, 刘凯于<sup>1,2,3</sup>, 张金菊<sup>1,2,3</sup>, 王泽群<sup>1,2,3</sup>, 李兵<sup>1,2,3</sup>, 杨勇波<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 华中师范大学生命科学院, 武汉 430079; 2. 华中师范大学生物学国家虚拟仿真实验教学中心, 武汉 430079;  
3. 华中师范大学湖北省高校生物实验教学示范中心, 武汉 430079)

**摘要:** 将国际前沿理论和技术拆解和提炼及时补充到实验教学中, 是提高实验教学水平和人才培养质量的重要途径之一。该研究以科研成果为基础设计了“自噬流的诱导和检测”综合性实验, 包含细胞传代培养、细胞转染、自噬诱导与观察 3 个部分, 形成系统性、综合性和探究性的模块化实验教学内容, 通过细胞培养、转染技术在细胞中表达双荧光标记自噬体标志蛋白, 经饥饿诱导细胞, 在荧光显微镜下观察自噬体和自噬流变化。在本科生实验教学中的实践结果表明, 该实验有助于培养学生科研思维和创新意识、提升学生分析问题和解决问题的能力。

**关键词:** 自噬; 自噬流; 细胞生物学; 综合实验

中图分类号: Q2-33

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20230562

## Design and Practice of the Comprehensive Experiment of Induction and Detection of Autophagic Flux

YANG Jiaoyan<sup>1,2,3</sup>, LIU Kaiyu<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Jinju<sup>1,2,3</sup>, WANG Zequn<sup>1,2,3</sup>,  
LI Bing<sup>1,2,3</sup>, YANG Yongbo<sup>1,2,3\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China;

2. National-Level Virtual Simulation Experimental Teaching Center for Biology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China;

3. Hubei Province-level Experimental Teaching Demonstration Center of Biology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

**Abstract:** One of the important ways to improve the experimental teaching level and the talent training quality is dismantling, refining and adding the international frontier theories and technologies to the experimental teaching in time. The comprehensive experiment of induction and detection of autophagic flux is designed, which includes cell passage culture, cell transfection and induction and observation of autophagy. A systematic, comprehensive and exploratory modular experimental teaching content is formed. Through double fluorescent labeled autophagosome marker protein expressed in cells and starvation inducing, autophagosomes and autophagic flux are observed by the fluorescence microscope. The practice results in undergraduate experimental teaching indicate that it is helpful to cultivate students' scientific research thinking and the innovative spirit, and improve their ability to analyze and solve problems.

**Key words:** autophagy; autophagic flux; cell biology; comprehensive experiment

细胞生物学是高校生命科学的主干课程之一, 是一门实验性很强的学科。目前细胞生物学已成为重要的前沿生物学科, 各种研究新方法、新技术层出不穷, 实验技术的巨大发展也推动细

胞生物学乃至整个生物学科向更深的层次发展。故细胞生物学实验课不仅要让学生掌握细胞生物学研究的基本操作技能, 也要融合前沿的实验技术及成果, 复现真实科学研究方法, 激发学生学

收稿日期: 2023-11-24; 修回日期: 2024-03-26

基金项目: 华中师范大学中央高校基本科研业务费项目(科研成果转化实验教学内容类)(CCNU21KYZHSY11); 湖北省高等学校省级教学研究项目(2022089); 国家自然科学基金面上项目(61977028); 湖北省自然科学基金(2022CFB322)。

作者简介: 杨娇艳(1979-), 女, 博士, 副教授, 主要从事实验教育与实验室管理和研究工作。

\*通信作者: 杨勇波(1979-), 男, 博士, 副教授, 主要从事昆虫细胞生物学和昆虫病原微生物学相关研究工作。

E-mail: [yongboyang@mail.ccnu.edu.cn](mailto:yongboyang@mail.ccnu.edu.cn)

习的主动性、创造性,培养学生的综合能力,为学生以后的独立研究打下基础。

细胞自噬(autophagy)意为自体吞噬,与细胞凋亡和细胞衰老一样,是十分重要的生物学现象。自噬在细胞稳态、生长发育、免疫、肿瘤发生及神经退行性疾病等多种生理病理过程中发挥重要作用<sup>[1-4]</sup>。自噬这一生物学概念早在 1963 年由比利时科学家 Christian de Duve 首次提出,但因为细胞结构复杂且微小,自噬相关研究一直困难重重,直到 20 世纪 90 年代初,日本科学家大隅良典在一系列实验中,巧妙地利用酵母成功找到了细胞自噬所需的基因,阐明了酵母自噬的分子机理,并发现类似的复杂机制也存在于人体细胞内<sup>[5-8]</sup>。因为这些开创性的工作,大隅良典于 2016 年获诺贝尔生理学 and 医学奖。现有的细胞生物学实验教程中细胞自噬相关的实验较少,仅文献 [9] 中补充了“细胞自噬的诱导和观察”实验。华中师范大学生命科学学院细胞生物学教研团队长期进行昆虫细胞自噬相关的研究<sup>[10]</sup>,可将科研与教学相结合,提高本科生综合科学素养,达到培养高水平科技创新人才的教学目的。

## 1 实验设计思路

从 2019 年起,依托学校科研成果转化实验教

学内容类项目和学院省级生物学实验教学示范中心,团队陆续在本科生细胞生物学实验中开展了昆虫细胞传代培养、昆虫细胞中外源基因的瞬时表达及检测等综合实验,在此基础上本文拟开展“自噬流的诱导与检测”实验研究,综合运用细胞培养和转染技术在昆虫细胞中表达 mRFP-GFP-LC3 融合蛋白(mRFP 红色荧光蛋白和 GFP 绿色荧光蛋白双标记的自噬体标志蛋白 LC3),经饥饿诱导细胞,在荧光显微镜下观察自噬体,分析自噬流变化。本实验对现有为数不多的细胞自噬相关实验进行了补充延伸如表 1 所示。首先,现有实验采用 GFP-LC3 单荧光标记,而本实验采用 mRFP-GFP-LC3 双荧光标记法,不仅可以检测自噬现象,还能动态分析自噬流,区分自噬体的积累是由于自噬的诱导还是下游自噬过程的阻断。其次,现有实验采用人宫颈癌细胞(Hela),而本实验采用昆虫细胞作为材料,昆虫细胞培养仅需要普通生化培养箱,培养条件相对简单,细胞传代采用机械吹打法,过程无需胰酶消化,学生较易控制和掌握。另外,雷帕霉素和饥饿都可以诱导自噬的发生,现有实验采用雷帕霉素处理,本实验采用饥饿处理法,一方面是因为本实验所用的昆虫细胞在饥饿条件下自噬现象非常明显,另一方面可以显著降低实验成本。

表 1 自噬流的诱导与检测实验改进内容

内容	现有实验	本实验	改进后的优点
细胞传代与培养	人宫颈癌细胞Hela细胞	昆虫细胞	昆虫细胞培养相对简单,传代采用机械吹打法,过程无需胰酶消化
细胞转染	GFP-LC3单荧光标记	mRFP-GFP-LC3 双荧光标记法	既检测自噬现象,又能动态分析自噬流
自噬诱导	雷帕霉素处理	饥饿处理	昆虫细胞在饥饿条件下自噬现象非常明显,且显著降低实验成本

“自噬流的诱导与检测”是一个综合性、探究性的实验,学生在掌握细胞自噬、蛋白质分选定位、内膜系统细胞器、荧光显微镜等多个理论知识点的同时,通过动手操作帮助学生掌握荧光蛋白基因标记、细胞传代培养、外源基因瞬时表达与检测(转染)、荧光显微镜使用等多种实际科学研究中常用的实验技术。通过对实验过程与结果的探究,提高学生综合应用基本技术分析细胞生命活动的能力。

## 2 实验设计

### 2.1 实验目的

了解细胞自噬的基本过程;掌握细胞培养、

传代与转染、荧光蛋白基因标记、荧光显微镜使用等技术;了解细胞自噬以及自噬流的检测方法。

### 2.2 实验原理

细胞自噬是真核细胞在自噬相关基因(auto-phagy related gene, Atg)的调控下利用溶酶体降解自身受损、变性或衰老的大分子物质以及细胞器的自我消化过程。自噬是维持细胞稳态的管家机制,包括生理条件下的基础型自噬和应激条件下的诱导型自噬<sup>[11]</sup>。在缺乏营养和能量供应时,细胞通过自噬为自身提供合成生物大分子或腺苷三磷酸(ATP)所需要的前体物质。但自噬过度可能导致代谢应激、降解细胞成分,甚至引起细胞死亡等。

根据细胞内物质运输到溶酶体的方式以及生理功能的差异,动物细胞自噬可以分为3种类型:巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)<sup>[12]</sup>。巨自噬通过形成具有双层膜结构的自噬体(autophagosome)包裹胞内物质,接着自噬体与溶酶体融合,最终自噬体内的待降解物被溶酶体水解酶降解。一般情况下所说的自噬指的是巨自噬。从自噬体发生到底物被降解重新利用的这一连续过程又称为自噬流。

细胞自噬通路受多种信号通路的调控,其中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)和腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路是两条最经典的通路<sup>[13]</sup>。当细胞处于营养物质充足条件下时, mTOR 被激活,磷酸化下游 Unc-51 样激酶 1 (ULK1)使其失去活性,抑制自噬发生;当细胞处于营养物质缺乏时, AMPK 被磷酸化激活,进一步磷酸化下游 ULK1 使其被激活,起始自噬。最常用的自噬诱导方法是对细胞进行饥饿或雷帕霉素处理。细胞饥饿处理是指移除培养基中的氨基酸、细胞生长因子、血清或糖等多种营养物质,而雷帕霉素是一种 mTOR 通路的抑制剂。两种处理方法均可很好地诱导自噬的发生。

目前对自噬过程进行观察和检测的常用技术有以下3种。

#### 1) 电镜观察自噬体或自噬溶酶体的形成

自噬体和自噬溶酶体属于亚细胞结构,最直观的检测手段是通过电镜观察。人类第一次观察到自噬体就是通过电镜,在电镜下可以观察到双层膜的自噬体和单层膜的自噬溶酶体结构。自噬体的基本特征为:双层或多层膜的液泡状结构,内含胞浆成分,如线粒体、内质网、核糖体等。自噬溶酶体的特征为:单层膜,胞浆成分已降解。

#### 2) 基于 LC3 的自噬检测方法

LC3 也叫微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein1 light chain 3, MAP1LC3), 是酵母 Atg8 在哺乳动物中的同源物,包括两种可相互转化的形式即 LC3-I 和 LC3-II,参与自噬体的形成。LC3 前体蛋白 pro-LC3 被 Atg4 切割,形成胞浆可溶形式的 LC3-I。自噬发生时, LC3-I 通过

类泛素化反应在 E1 酶 Atg7、E2 酶 Atg3 和 E3 连接酶 Atg5-Atg12-Atg16L 复合物的共同作用下与自噬体膜表面的底物磷脂酰乙醇胺(PE)共价偶联,形成膜结合形式的 LC3-II。LC3-II 是自噬体的重要标志分子,随自噬体膜的增多而增加<sup>[14]</sup>。

由于 LC3 在自噬过程中发生聚集,因此可以在荧光显微镜下通过免疫荧光检测内源性 LC3 蛋白或采用 GFP-LC3 融合蛋白来示踪自噬体。无自噬时,内源性 LC3 蛋白或 GFP-LC3 融合蛋白弥散在胞浆中;自噬体形成时,内源性 LC3 蛋白或 GFP-LC3 融合蛋白转位至自噬体膜,在荧光显微镜下形成多个明亮的荧光斑点,一个斑点相当于一个自噬体,可以通过比较或计数荧光斑点数量来评价细胞自噬活性的高低。另外还可以利用免疫印迹(western blot)来检测 LC3-II 和 LC3-I 的表达,通过表达量比值的大小变化以评估自噬水平的高低,通常比值越大,细胞自噬水平越高。

#### 3) 自噬流检测方法

电镜观察、LC3 蛋白免疫印迹或免疫荧光分析只能提供静态信息,不能检测自噬流,无法区分自噬体的积累是由于自噬的诱导还是下游自噬过程的阻断。目前用于分析自噬流变化的常用方法是 LC3 双荧光标记法<sup>[15]</sup>,如细胞中表达同时带有 mRFP 红色荧光蛋白和 GFP 绿色荧光蛋白标记的 mRFP-GFP-LC3 融合蛋白,可以实时监测自噬体到自噬溶酶体的变化过程,从而监控自噬流。mRFP-GFP-LC3 串联荧光蛋白检测自噬流的原理如图 1 所示,自噬体内 pH 值约为 7,而溶酶体内 pH 值为 4~5。自噬体与溶酶体融合后,腔室内 pH 降为 4 左右。利用 GFP 在酸性环境中淬灭而 mRFP 则稳定发光的特点,来观察细胞自噬体的成熟或自噬流的变化。当自噬发生时,自噬体被 mRFP 与 GFP 同时标记;当自噬体和溶酶体融合时,自噬溶酶体内部酸性使 GFP 绿色荧光淬灭,只能观测到红色光点,从而指示自噬溶酶体。因此 GFP 的减弱可指示自噬溶酶体形成的顺利程度,通过 GFP 与 mRFP 的光点比例来评价自噬流进程,如图 2 所示。如果自噬体与溶酶体可正常融合,那么 mRFP 红色光点数量大于红绿光同时标记光点;如果自噬降解受阻,自噬体与溶酶体不能正常融合,那么仅红绿同时标记光点数量增加。

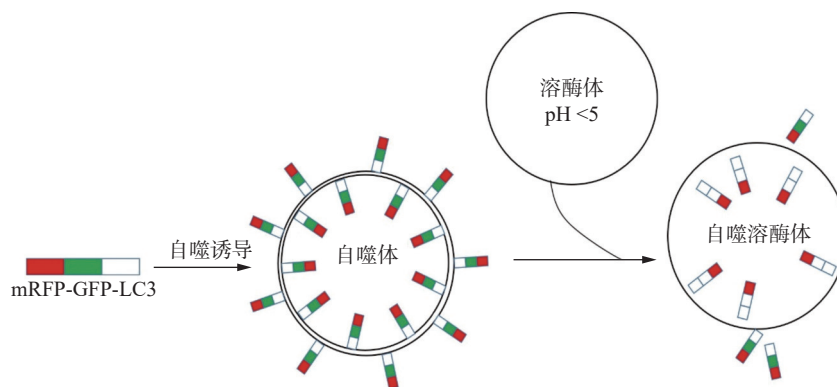


图 1 mRFP-GFP-LC3 串联荧光蛋白检测自噬流的原理<sup>[15]</sup> 图

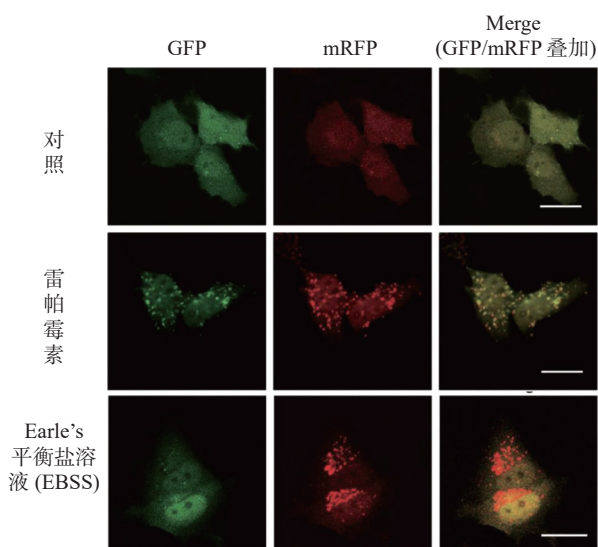


图 2 荧光显微镜观察细胞自噬流<sup>[15]</sup>

## 2.3 实验材料、仪器与试剂

实验材料：斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* SI-HP 传代细胞系或草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 传代细胞系，或粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* TN5B1-4 (Hi5) 传代细胞系，可表达 mRFP-GFP-LC3 融合蛋白的质粒 DNA。

实验仪器：倒置荧光显微镜、生物安全柜、生化培养箱、微量移液器、吸头、1.5 mL 离心管、酒精灯、75% 酒精棉球、培养皿、细胞爬片、载玻片等。

实验试剂：转染试剂为阳离子聚合物聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI)、双抗 (青霉素与链霉素)、Grace 昆虫细胞培养基、胎牛血清 (FBS)、磷酸盐缓冲液 (PBS)、封片液、4% 多聚甲醛等。

## 2.4 实验方法与步骤

实验流程如图 3 所示。

### 2.4.1 细胞培养与传代

将生长状态良好的昆虫细胞 SI-HP 采用机械吹打法传代接种于铺有盖玻片的 35 mm 培养皿中，用含 10% FBS 和 1% 双抗的 Grace 培养基，27 °C 条件下培养至 40%~70% 密度。注意无菌操作，勿用手碰触吸管尖头部或是容器瓶口，亦不要在开口容器的正上方操作实验，避免污染，下同。

### 2.4.2 表达 mRFP-GFP-LC3 的质粒 DNA 转染 (阳离子聚合物聚乙烯亚胺 (PEI) 转染法)

1) 转染前 1~4 h，将 SI-HP 细胞培养皿中的旧培养基吸除，加入 1 mL 新鲜的无血清 Grace 培养基。

2) 准备 A 液和 B 液。A 液：加入 3 μg mRFP-GFP-LC3 质粒到 100 μL 无血清 Grace 培养基中，用吸头吹打混匀，室温静置 2 min。B 液：加入 6 μL PEI 到 100 μL 无血清 Grace 培养基中，用吸头吹打混匀，室温静置。

3) 将 B 液缓慢加入 A 液，用吸头轻轻吹打数次混匀，室温下静置 20 min。注意：A 液和 B 液混匀时动作要轻柔，缓慢吸入再轻轻吹出，切勿用力吹打。

4) 将 A/B 混合液加入培养皿中，轻摇混匀，在生化培养箱中 27 °C 培养。

5) 4 h 后，换成含有 10% FBS 和 1% 双抗的 Grace 培养基在生化培养箱中 27 °C 继续培养过夜。

### 2.4.3 自噬诱导

36~48 h 后，将细胞培养皿中的旧培养基吸除，用 27 °C 预温的 PBS 漂洗 3 次，加入 2 mL 常温的 PBS 液，生化培养箱中 27 °C 静置 1~2 h；

### 2.4.4 荧光显微观察

1) 静置 1~2 h 后，吸弃 PBS，加入 4% 多聚甲醛 250 μL，室温下固定 20 min，PBS 漂洗 1 次。

2) 载玻片上滴加 2  $\mu\text{L}$  封片剂, 将细胞爬片从培养皿中取出, 反扣在封片剂上。

3) 荧光显微镜下, 用蓝光激发观察 GFP 的绿色荧光, 用绿光激发观察 mRFP 的红色荧光, 观察比较同一个细胞中红绿荧光斑点数量或荧光

强度。

#### 2.4.5 实验结果

荧光显微镜下观察, 拍照记录自噬细胞, 描述实验现象, 并根据细胞中红绿荧光点数量和强度分析自噬情况。

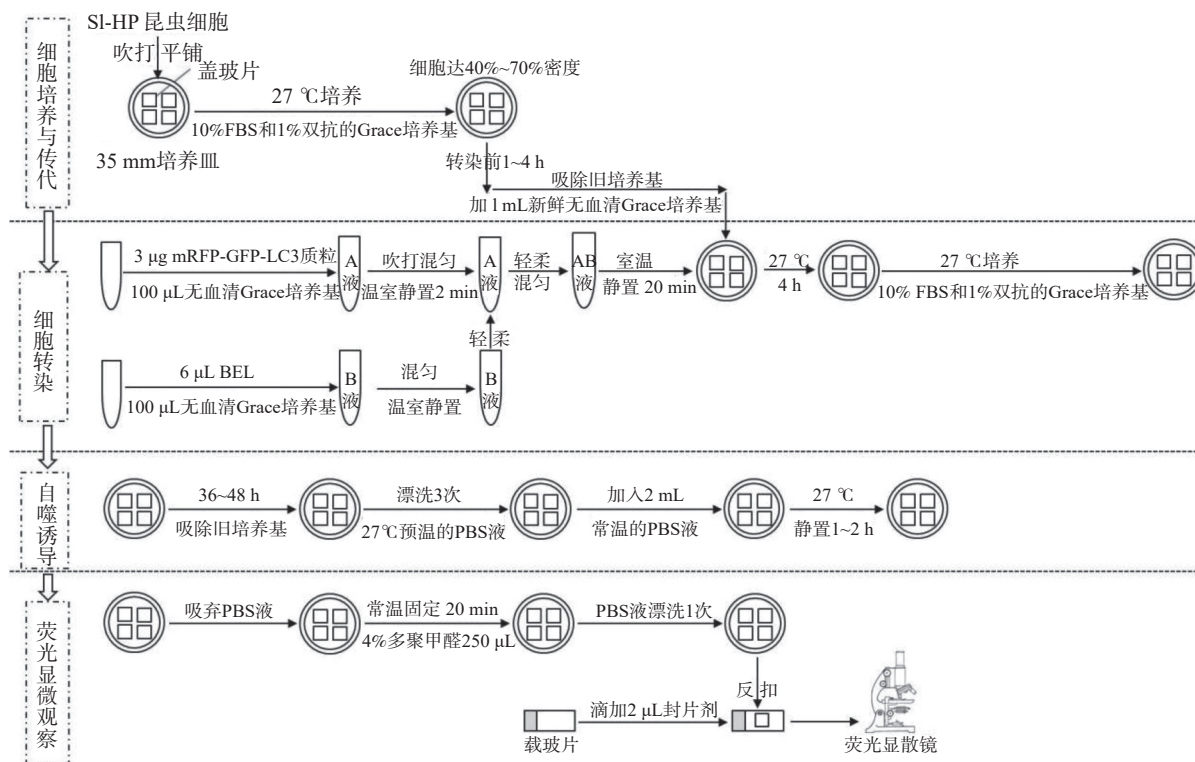


图3 实验流程图

### 3 实验教学实践

2022—2023 学年面向生命科学学院 2020 级本科生开设实验, 共 8 个课堂 242 人参与。授课教师从实验引论、思政融入、问题式教学等方面由浅入深地带领学生掌握最前沿的实验技术。

#### 3.1 引入前沿理论和技术, 激发学生科研兴趣

科教融合, 加强科研成果向实验教学转化, 以科研促进教学是提高高校教学质量的重要途径<sup>[16]</sup>。把国际前沿理论和技术进行拆解和提炼, 及时补充到实验教学中, 使实验教学内容具有前沿性和挑战性, 对学生实验动手能力、解决实际问题的能力和创新思维能力的培养起到积极的作用<sup>[17]</sup>。本实验涉及 2016 年诺贝尔生理与医学奖“细胞自噬机制”、2008 年诺贝尔化学奖“绿色荧光蛋白的发现和改进”, 把新的科学成果及时补充到实验教学中, 在吸引学生注意力和好奇心

的基础上潜移默化地渗入专业知识, 由此提高实验教学水平 and 人才培养质量。

#### 3.2 在课堂上融入思政元素, 既启智又润心

习近平总书记指出“要针对青少年成长的不同阶段, 有针对性地开展思想政治教育”“挖掘其他课程和教学方式中蕴含的思想政治教育资源, 实现全员、全程、全方位育人”。高校专业课教师应立足学科特点, 充分发掘专业课程中蕴含的思政教育元素, 有机地融入课堂教学中, 从而实现专业知识教育、思政教育和价值引领的完美融合, 达到润物无声的育人效果。

诺贝尔奖的背后凝聚了科学家们不忘初心、执着追求, 在日复一日平凡的工作中长久坚持的科学精神, 包含着科学家们在探索真理的过程中不随波逐流、独立思考, 带着批判和怀疑去分析、实践和创新的科学精神等<sup>[18]</sup>。课程教学中将诺贝尔奖案例细胞自噬有机融入, 2016 年诺贝尔

生理与医学奖获得者日本科学家大隅良典在 20 世纪 80 年代末建立自己实验室时,大多数人关注重点在脂膜上的离子和小分子转运,很少有人探究其他细胞器膜上的转运机制。大隅良典另辟蹊径,把注意力放在了液泡上,液泡在当时被普遍认为是细胞里的垃圾箱。他以模式单细胞微生物酵母为研究对象,借助光学显微镜观测液泡里的降解情况,很幸运地观察到了自噬体形成和液泡融合的现象。然后通过遗传筛选并比较了数以千计的酵母菌变异样本,从中找到了与自噬过程密切相关的 15 组基因。在整个细胞自噬机制的发现过程中,充满不随波逐流、长久坚持和勇于创新的科学精神,激发同学们透过科学现象发现生命活动本质差异。诺贝尔奖案例元素与学科知识点的有机融合,启智润心,既帮助学生建立正确的三观,也提高了学生的学习兴趣,加深了学生对学科知识的理解和掌握。

### 3.3 基于问题探索和研究的互动教学模式,培养科研思维

“以问题为导向的学习”(problem-based learning, PBL)教学,是在老师引导下,以学生为主体、科学问题为导向,使学生在实验过程中发现问题、解决问题,重在提高学生创新能力和自主学习能力<sup>[19]</sup>。在本实验中老师对实验教学内容进行梳理,结合学习目标,凝练实验课的核心知识点,给学生提出 2 个实验相关的问题:

1) 实验中 mRFP-GFP-LC3 质粒发挥了怎样的

作用?

2) 如何根据红绿荧光强度判定是自噬增强还是自噬溶酶体融合受阻?

在引导学生回答上述问题的过程中,教会学生理解和掌握荧光蛋白标记、荧光显微镜使用和自噬的诱导等知识点。在结果描述中,教师通过文献阅读的引导,让学生模仿文献中结果的呈现方式和描述思路,进一步培养学生的科学思维。实验结束后提出下一个思考性问题:氯喹(chloroquine)可以导致溶酶体 pH 值升高,如果实验细胞中加入氯喹后可能的实验现象是什么?引导学生结合理论知识和科学假设,主动思考实验预期的结果,并能够对其所获得的结果进行评价,引导学生比对氯喹处理和饥饿处理效果,分析出现不同现象的原因,从而培养学生的科研思维,提升学生发现问题和解决问题的能力。

实验结束后对学生满意度进行问卷调查,如表 2 所示。97.5% 的同学认为在细胞生物学实验中有必要开设综合性实验,96.3% 的同学认为对理论知识点的理解和掌握有帮助,92.5% 的同学认为可以增强学习的兴趣,100% 的同学认为可以帮助开阔视野,95% 的同学认为可以培养创新意识,96.2% 的同学认为可以提升分析和解决问题的能力,98.8% 的同学认为可以提升动手能力,97.5% 的同学认为可以培养科研思维能力,95% 的同学认为可以帮助树立正确的“三观”。

表 2 自噬流的诱导与检测实验教学的效果评价

问卷内容	非常必要/%	必要/%	一般/%	不必要/%
开设综合性实验	45.0	52.5	2.5	0
理论知识点理解和掌握	50.0	46.3	3.7	0
增强学习的兴趣	60.0	32.5	7.5	0
开阔视野	57.5	42.5	0	0
培养创新意识	47.5	47.5	5.0	0
提升分析和解决问题的能力	51.2	45.0	3.8	0
提升动手操作能力	55.0	43.8	1.2	0
培养科研思维能力	51.3	46.2	2.5	0
树立正确的“三观”	57.5	37.5	3.8	1.2

## 4 结束语

自噬流的诱导和检测综合性实验包含“细胞传代培养”“基因瞬时表达与检测(细胞转染)”和“自噬诱导与荧光显微镜观察”连续的 3 个实

验内容,形成系统性、综合性和探究性的模块化教学内容。

通过本实验的学习,能够促进学生对细胞生物学诸多理论知识的深入理解,如细胞自噬、蛋白质分选定位、内膜系统细胞器等;能够促进学

生对细胞培养与传代、细胞转染、荧光蛋白标记及荧光显微镜使用等技术的掌握。该实验有助于培养学生创新精神,开阔学生视野,提升学生分析问题和解决问题的能力,培养学生科研思维能力,树立正确的“三观”等,实现培养高水平科技创新人才的目的。

在后续实验教学中还可以持续改进,如改变传统教学模式,抛弃传统的教师灌输式教授专业基础知识和学生被动式学习与应试的教学模式,而是让学生自行设计并进行实验;改变实验过程评价机制,建立多维评价机制,不仅仅以实验结果的成败作为评分的依据,而是重视实验过程和实验结果的分析;引导学生实验报告向科研论文写作转变,助力研究性人才培养;对细胞培养、细胞转染及自噬诱导条件进行优化,保证实验结果的稳定性与可重现性,并尽可能降低实验成本。

### 参考文献

- [1] FIMIA G M, PIACENTINI M. Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(10): 1581–1588.
- [2] PAPINSKI D, KRAFT C. Regulation of autophagy by signaling through the Atg1/ULK1 complex[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(9): 1725–1741.
- [3] KAUFMANN A, BEIER V, FRANQUELIM H G, et al. Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly[J]. *Cell*, 2014, 156(3): 469–481.
- [4] SAHU R, KAUSHIK S, CLEMENT C C, et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes[J]. *Development Cell*, 2011, 20(1): 131–139.
- [5] MIZUSHIMA N, NODA T, YOSHIMORI T, et al. A protein conjugation system essential for autophagy[J]. *Nature*, 1998, 395(6700): 395–398.
- [6] TSUKADA M, OHSUMI Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEBS Letters*, 1993, 333(1): 169–174.
- [7] TAKESHIGE K, BABA M, TSUBOI S, et al. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction[J]. *Journal of Cell Biology*, 1992, 119(2): 301–311.
- [8] ICHIMURA Y, KIRISAKO T, TAKAO T, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation[J]. *Nature*, 2000, 408(6811): 488–492.
- [9] 邹方东, 苏都莫日根, 王宏英, 等. 细胞生物学实验指南[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2020.
- [10] YANG Y, HUANG X, YUAN W, et al. *Bacillus thuringiensis* cry toxin triggers autophagy activity that may enhance cell death[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2021, 171: 104728.
- [11] RAVIKUMAR B, VACHER C, BERGER Z, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease[J]. *Nature Genetics*, 2004, 36(6): 585–595.
- [12] YOSHIMOTO K. Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53(8): 1355–1365.
- [13] 李乐兴, 戴汉川. 细胞自噬调控的分子机制研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(2): 263–270.
- [14] MIZUSHIMA N. *Methods in enzymology*[M]. London: Academic Press, 2009.
- [15] ZHOU C H, ZHONG W, ZHOU J, et al. Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescently-tagged LC3 (mTagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells[J]. *Autophagy*, 2012, 8(8): 1215–1226.
- [16] 焦雪, 李新民, 吴庆, 等. 基于科研成果转化的无机化学创新型实验设计[J]. *实验科学与技术*, 2022, 20(4): 66–69.
- [17] 李佳, 唐红, 张琳, 等. 以诺贝尔奖为案例的细胞生物学课程思政教学探索[J]. *中国细胞生物学学报*, 2023, 45(7): 1075–1081.
- [18] 高润池, 蒋锐达, 王晓燕. 基于科学精神的细胞生物学实验课程思政设计与实践[J]. *中国细胞生物学学报*, 2023, 45(8): 1201–1207.
- [19] 刘泽昆, 陆蒙, 尉丁, 等. 以问题为导向的混合式医学细胞生物学实验课探索与实践[J]. *中国细胞生物学学报*, 2023, 45(9): 1370–1375.

编辑 钟晓