

教学研究

将盘基网柄菌用于本科细胞生物学综合性实验 教学初探——电穿孔转化绿色荧光蛋白

高润池 吴雪 倪娟 周滔 王晓燕*

(云南师范大学生命科学学院, 昆明 650500)

摘要 盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)是一个应用广泛的模式生物, 非常适合用来研究胞质分裂、细胞运动、吞噬作用、趋化性、趋电性、信号转导以及个体发育过程中的细胞分化。该实验主要介绍电穿孔技术转化绿色荧光蛋白标记肌动蛋白基因质粒(Lifeact-GFP)进入盘基网柄菌活细胞中, 抗性筛选(潮霉素B)获得阳性克隆子, 最后借助荧光显微镜观察绿色荧光蛋白标记的微丝在盘基网柄菌的分布情况。综合性实验训练可提高学生的学习兴趣 and 综合运用理论知识的能力, 进而可培养学生的科学研究思维。

关键词 模式生物; 细胞生物学实验; 研究性教学; 盘基网柄菌

Preliminary Study on the Use of *Dictyostelium discoideum* in Comprehensive Undergraduate Laboratory Course of Cell Biology — Transformation of Lifeact-Green Fluorescent Protein by Electroporation

GAO Runchi, WU Xue, NI Juan, ZHOU Tao, WANG Xiaoyan*

(School of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China)

Abstract *Dictyostelium discoideum* is a powerful model organism that is ideal for studying cytokinesis, cell movement, phagocytosis, chemotaxis, electrotaxis, signal transduction, and cell differentiation. This experiment describes the use of electroporation technology to transform the Lifeact-GFP (Lifeact-green fluorescent protein) into living cells of *Dictyostelium discoideum*, then screening for positive clones with resistance to hygromycin B. The Lifeact-GFP-labeled microfilaments distributed in *Dictyostelium discoideum* are observed by fluorescence microscopy. Through comprehensive laboratory course training, the interest of learning and the ability of applying to theoretical knowledge of undergraduate students can be improved, thereby training the students in scientific thinking.

Keywords model organism; laboratory course of cell biology; research teaching; *Dictyostelium discoideum*

细胞生物学(cell biology)是研究细胞结构、功能及生活史的一门科学, 是应用分子生物学的概念

与方法和现代物理学与化学的技术成就, 以细胞作为生命活动基本单位的思想作为出发点, 探索生命

收稿日期: 2019-09-04

接受日期: 2019-11-27

国家自然科学基金青年基金(批准号: 31601130)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18987677526, E-mail: wxy5837@163.com

Received: September 4, 2019 Accepted: November 27, 2019

This work was supported by the National Natural Foundation of China (Grant No.31601130)

*Corresponding author. Tel: +86-18987677526, E-mail: wxy5837@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5206>

活动规律的科学,其内容具有基础与前沿、理论与实践结合的特点。然而,细胞生物学概念抽象难懂,极大地影响了学生自信心和学习积极性。

结合细胞生物学理论学习,细胞生物学本科教学实验课对于加深学生对理论的理解和接受,增强学生实践能力至关重要,但由于受实验教学时间安排不连续、教学软件落后、硬件欠缺等方面的限制,导致云南师范大学生命科学学院(我院)细胞生物学实验课的形式较为单一,缺乏系统性,内容也相对陈旧。我们的实验课只能开展普通光学显微镜的构造及使用、细胞膜通透性、细胞组化、细胞器分离与细胞骨架染色观察等内容,并且实验操作过于简单,学生兴趣不高,不能很好地提升学生的实验技能。通过近年来的努力,本教研室从实验材料的选择出发,重新建立了适合我院本科生培养的综合性和实验。

本综合性实验选用盘基网柄菌作为实验材料,该菌是一种简单的真核微生物,外形像阿米巴虫,通常被称为“细胞黏质霉”,其俗称为黏菌,是研究发育、运动和信号传导的理想模式生物。盘基网柄菌还具有特殊的生命周期。当生活在丰富有机物的土壤中时,它以土壤中的细菌和真菌(主要是酵母菌)为食。在大部分的生命周期中,这个单倍体社会性阿米巴经历营养周期,进行有丝分裂。当外界环境

条件改变,如营养匮乏时,盘基网柄菌将进行有性繁殖,开启它的多细胞发育周期^[1]。尽管盘基网柄菌的多细胞发育比较简单,但涉及到的一系列信号分子调控,与高等生物十分相似,在高等生物发育过程中也能够找到这些信号分子的同源体。盘基网柄菌也是生物医学研究的理想模型生物,它被用来研究分子病理以及各种由细菌和真菌引起的感染性人类疾病等^[2],特别是被用于研究微丝及细胞的趋化运动。

盘基网柄菌细胞的培养,不需要借助昂贵的实验设备,在标准的实验室就可以开展。因此,本文主要介绍本科学学生细胞生物学综合性实验教学设计的主要内容,简述如下:以盘基网柄菌单细胞(Ax2)阶段为材料,通过电穿孔(electroporation)技术将表达绿色荧光蛋白的质粒转化(transformation)到盘基网柄菌细胞中,抗性筛选阳性克隆后,借助荧光显微镜观察细胞微丝的分布情况(图1)。通过完成整个实验,学生可以了解或掌握如下要点:(1)实验器皿的清洗方法;(2)培养基和试剂的正确配制和存储方法;(3)细胞的复苏、传代、冻存方法;(4)无菌操作技术;(5)细胞计数方法;(6)电穿孔转化技术;(7)荧光显微镜使用;(8)初步了解学术论文的写作技巧。这一实验过程同时初步培养学生的科学研究思维,

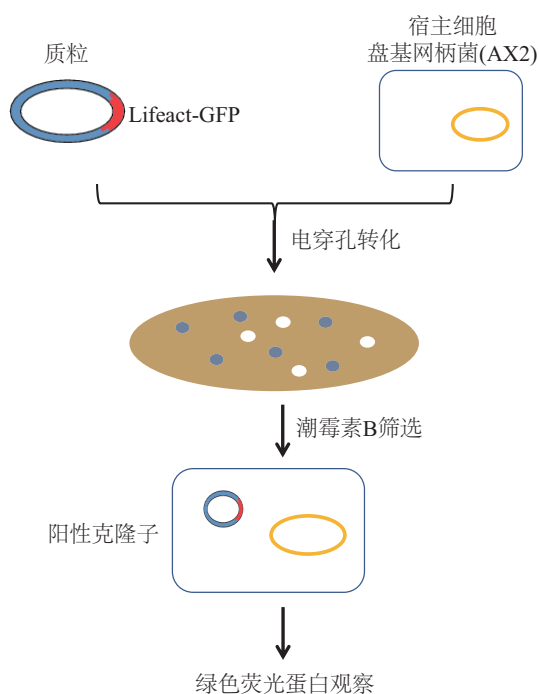


图1 实验流程图

Fig.1 Schemes of experiment

增强学生对细胞生物学的认识, 培养他们的团队合作精神, 从而实现综合培养的目标。

1 实验原理

细胞培养是当前细胞生物学乃至整个生命科学研究与生物工程中最基本的实验技术, 包括原核细胞(如细菌)、真核细胞(如酵母、盘基网柄菌等)、植物细胞与动物细胞的培养。细胞在培养基中会不断增殖, 当细胞群体达到一定密度时, 细胞的生长和分裂速度就会减慢甚至停止, 此时需要对细胞进行传代培养或进行下阶段的实验。

转化是将异源DNA分子引入细胞株系使受体细胞获得新的遗传性状的一种手段, 也是微生物遗传、分子遗传、基因工程等研究的基本实验技术。电穿孔是一种常用的转化技术, 其原理主要是在高强度、短时间的电压作用下, 外源性物质克服细胞膜的阻碍而进入细胞。电压的强度超过了细胞膜所能承受的阈值, 使得膜出现瞬时可逆性的结构变化, 从而介导了外源性物质的进入。这个瞬时的可渗透状态不仅导致小分子物质可通过简单扩散大量进入细胞, 而且很多大分子物质如染料分子、DNA分子等也可通过电击介导进入到细胞内部。作为一种基因转导方法, 电穿孔已被广泛用于各种类型的细胞, 包括细菌、真菌(酵母)、植物和动物细胞; 而且它还能作为注射方法(即电注射), 把各种外源物质引入活细胞。

微丝是构成真核细胞骨架的主要成分之一, 在运动细胞中, 微丝通过协同聚合在细胞运动方向的前缘延伸形成伪足, 从而促进细胞的运动。微丝除了参与细胞运动外, 还参与细胞形态维持、细胞分裂、细胞信号转导、个体发育等多种生物学行为的调控, 甚至还与肿瘤发生等重大疾病息息相关^[3]。基于微丝的特殊功能, 人们构建了一系列探针来观察微丝的分布。与前期报道的微丝结合探针相比, 本实验中所用的Lifeact-GFP具有以下优点: (1)探针更小, 因此不容易遭受位阻现象; (2)缺乏位点竞争, 因此可以与微丝任意结合^[4]。荧光信号的分布, 可以反映细胞中微丝的分布与细胞运动方向之间的关系。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 主要实验仪器 主要实验仪器包括: 电穿孔

仪、高压灭菌锅、制冰机、超净工作台、倒置显微镜、荧光显微镜、培养箱、纯水仪、离心机、超低温冰箱、血球计数板、各种规格的移液器。

2.1.2 主要实验材料与试剂 细胞为野生型盘基网柄菌细胞(AX2)。质粒: Lifeact-GFP载体(PDM-1066)^[1](质粒是David Knecht教授赠予, 来自Department of Molecular and Cell Biology, University of Connecticut)。

HL5培养基: 40 g葡萄糖、40 g蛋白胨、20 g酵母粉、3.86 g Na₂HPO₄、1.94 g KH₂PO₄、0.12 g链霉素, 双蒸水定容至4 L, pH6.5(药品购自Sigma公司)。121 °C灭菌30 min后, 自然冷却, 室温(短时间保存, 1个月)或者4 °C保存(6个月)。

细胞冻存液(V/V): 65% HL5培养基、25%胎牛血清、10%二甲基亚砷(DMSO)。

H50(穿孔介质)缓冲液: 20 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、50 mmol/L KCl、10 mmol/L NaCl、1 mmol/L Mg₂SO₄、5 mmol/L NaHCO₃、1 mmol/L NaH₂PO₄, pH7.0, 过滤除菌。

DB缓冲液(development buffer): 10 mmol/L NaH₂PO₄、10 mmol/L KH₂PO₄、2 mmol/L Mg₂SO₄、0.2 mmol/L CaCl₂, pH6.5。

其他试剂和材料: 冻存管、培养皿、离心管、试剂瓶、电击杯、潮霉素B、各种规格移液器枪头、0.22 μm过滤器。

2.2 方法

2.2.1 盘基网柄菌的复苏、传代与冻存 细胞的复苏: 从超低温冰箱中取出冻存管, 室温使之融化; 将冻存管中的所有细胞液转移到预先加有适量HL5培养基的培养皿中; 于22 °C培养箱中使之复苏3 h左右, 移去培养基; 加入新鲜HL5培养基, 于22 °C培养箱培养。

细胞的传代: 当细胞在培养皿底部的覆盖率达80%左右时, 对细胞进行传代培养。

细胞的冻存: 收集处于指数生长期的细胞, 用适量的细胞冻存液重悬, 调节细胞浓度至2×10⁷个/mL, 分装到冻存管, 放入超低温冰箱(-80 °C)中保存。

细胞计数: 细胞计数使用血球计数板, 记录左上、左下、右上、右下4个大方格中所有的细胞, 并遵循“取左不取右, 取上不取下”的计数原则。使用前后都需要将血球计数板清洗干净, 取样时需将细胞彻底悬浮。

2.2.2 质粒的制备 质粒制备方法参考试剂盒使用说明, 步骤如下: 挑选固体培养基上单克隆接种到3 mL LB(Amp, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡(220 r/min)培养16 h; 将扩增的单克隆菌液转移至1.5 mL微量离心管中, 13 000 r/min室温离心1 min, 弃上清; 加250 μL 的Buffer P1, 用漩涡振荡混合器重悬细胞沉淀, 使细胞彻底分散; 加250 μL 的Buffer P2, 轻微翻转4~6次, 混合均匀, 溶液变为蓝色, 菌体裂解充分; 加入350 μL 的Buffer N3, 迅速混匀, 翻转4~6次, 溶液转为澄清, 13 000 r/min室温离心10 min; 将上清液转移到制备管中, 13 000 r/min室温离心1 min, 弃去滤液; 加500 μL 的Buffer PB, 13 000 r/min室温离心1 min, 弃去滤液; 加750 μL 的Buffer PE(预先加无水乙醇稀释)洗涤离心柱, 13 000 r/min室温离心1 min, 弃去滤液; 13 000 r/min室温离心1 min; 将制备管移入新的1.5 mL无菌微量离心管, 于制备管底部吸附膜中央加入50 μL 去离子水, 室温静置5 min, 13 000 r/min室温离心1 min; 凝胶电泳检测, 并于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.2.3 质粒的转化与阳性克隆的筛选 收集指数生长期的AX2细胞, 冰上静置15 min后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min离心5 min, 弃去上清液; 用冰浴处理的H50缓冲液洗2次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min离心5 min, 弃去上清。用H50缓冲液重悬细胞(最终细胞浓度为 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 个/mL)。将100 μL 的细胞悬液(使用

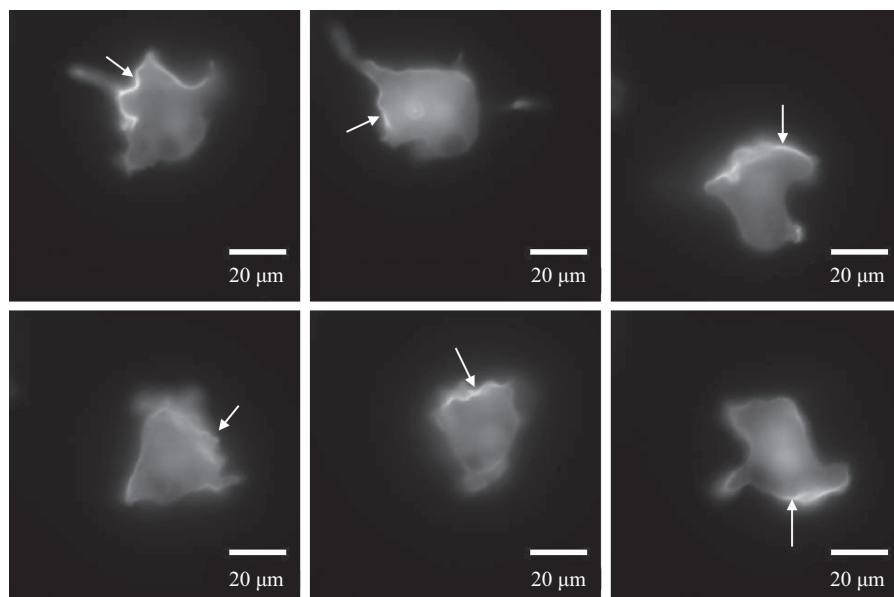
前轻轻混匀)与5 μL Lifeact-GFP质粒DNA混匀, 转入0.1 cm的电击杯中, 电击条件: 850 V、25 μF 、0.1 cm电击杯; 电击2次, 中间间隔5 s。以不加质粒DNA为对照组。电击结束后, 将电击杯放置于冰浴上5 min, 使细胞恢复。在超净工作台中, 用微量移液器将电击转化的细胞转入加有HL5培养基的培养皿中, 22 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后, 在培养基中加入潮霉素B(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行阳性克隆子的筛选。约3天后, 未转化的细胞逐渐死亡, 而转化细胞开始贴壁。7~10天后, 阳性克隆被筛选出来。

2.2.4 荧光显微镜观察细胞肌动蛋白的分布 待阳性克隆子筛选出来后, 将转化的细胞种植到玻璃载玻片上, 用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的分布情况。如果需要观察细胞的运动, 可以用DB缓冲液(作用是饥饿诱导盘基网柄菌从单细胞向多细胞的发育, 此过程细胞会发生极化, 运动速度也会增强)处理3 h以上, 就可以明显看到细胞的运动, 同时也可以进行细胞的趋化性、趋电性等实验研究。

3 实验结果分析及综合性实验报告撰写指导

3.1 实验结果及分析

在倒置荧光显微镜下, 可以观察到绿色荧光蛋白在细胞膜上的分布情况(图2)。对于随机运动的



箭头指处为强荧光分布区域, 同时也是细胞运动的前沿。

The arrow points toward the strong signal of GFP and the leading edge of cell movement.

图2 Lifeact-绿色荧光蛋白在细胞运动前端的分布

Fig.2 Lifeact-GFP distribute to the leading edge during cell migration

细胞, 绿色荧光蛋白会随细胞运动方向的改变而改变, 但始终是在细胞前进方向的前端分布, 即伪足部位分布较多。营养状态下的盘基网柄菌细胞运动能力相对较弱, 如果想观察理想的运动情况, 可以将细胞进行适当的饥饿处理, 甚至提供一个定向信号, 将更容易观察到绿色荧光蛋白在细胞运动前沿的分布。

3.2 综合性实验报告撰写指导

写作是本科学生必须具备的一项基本技能。对于实验报告的撰写, 教师将提供两种报告方案, 其一为学校通用的综合性实验报告, 主要提纲内容包括实验课题名称、实验目的、实验原理、主要的仪器及材料、实验方法步骤、实验流程图、实验结果及分析、注意事项、实验成败反思等内容。其二, 教师提供一份学术论文提纲, 主要内容包括研究题目、摘要、关键词、前言、方法、结果、讨论、致谢、参考文献。学生可根据自己的需要选择报告方式, 但不论学生选择哪一种报告方式, 都可以使其在整理思路和论文撰写上得到提高。

4 注意事项

在细胞培养过程中, 细胞污染是造成实验失败的直接原因。而操作不当又是学生培养细胞中造成污染的最主要的原因, 因此在无菌操作环节, 教师都要强调操作细节并做演示, 同时提供相关视频资源以方便学生在课前或课后学习。在完成科学研究的同时, 也要培养学生节约的美德, 因此, 实验用过的离心管、电击杯等易耗品都将被正确清洗后重复利用。

5 结语

生命科学的许多重大发现与生物学实验技术的不断创新、发展是分不开的。因此, 学习和掌握细胞生物学最基本的技术和最新的实验方法, 对于从事生命科学研究工作者来说是非常重要和完全必要的。在本科细胞生物学实验教学中, 选择适合于学生当前学情的实验材料不仅可以增加实验的成功率, 而且还可以拓展学生的科研训练机会, 从而使学生获得成就感, 增加学习的兴趣和自信心。盘基网柄菌作为研究真核生物细胞发育、运动和信号传导、医学病理模式等的理想模式生物, 我们将它引入到本科细胞生物学实验教学中, 通过三年的实践教学,

证明盘基网柄菌作为实验材料非常适合我院教学条件, 而且通过实验教学, 可以有效地将该菌与科学研究结合起来, 促进本科生的科学研究思维和综合能力的培养。

本综合性实验与以往学院开展的单纯以学习培养哺乳动物细胞为目的的实验相比较, 用盘基网柄菌作为实验材料并设计综合性实验, 具有其独特的优势。一方面, 由于实验材料的培养过程更为简单, 操作步骤更为简化, 学生更容易获得学习上的满足和信心; 另一方面, 学生可基于实验课上获得的实验技能, 将盘基网柄菌材料拓展到其他学科或科研训练中, 例如, 利用盘基网柄菌较强遗传操作性特点, 学生可以用限制性内切酶介导的整合技术[restriction enzyme-mediated integration (REMI) mutagenesis]构建盘基网柄菌的突变库^[5], 也可以用目前最前沿的基因编辑技术(CRISPR/CAS9和RNAi)对目的基因进行编辑和研究^[6-8]。

以盘基网柄菌为实验材料, 设计细胞生物学综合性实验, 其具有较好的综合性、连贯性、探究性和前沿性, 有助于学生将理论知识和实践相结合。学生通过完成本实验, 可以学习细胞生物学的一系列基本技术, 包括实验器皿的清洗、常用的实验室消毒和灭菌技术、实验试剂的配制、细胞的复苏与冻存、细胞计数、死活细胞的鉴定、细胞传代培养、电穿孔技术、荧光显微镜的实验等方法。另外, 开展适合本科生能力的综合性研究实验, 对提高学生主动学习的兴趣、增强学生综合运用理论知识能力以及培养学生科学研究思维等方面均起到了很好的促进作用。同时, 利用盘基网柄菌作为实验材料, 可以有效地将科研成果和教学有机结合, 以培养学生自主学习及独立工作等能力^[9]。

参考文献 (References)

- [1] GAO R, JIANG X, ZHAO S, et al. A large-scale screen reveals genes that mediate electrotaxis in *Dictyostelium discoideum* [J]. *Sci Signal*, 2015, 8(378): ra50.
- [2] TATISCHEFF I. *Dictyostelium*: a model for studying the extracellular vesicle messengers involved in human health and disease [J]. *Cells*, 2019, 8: 225-42.
- [3] 陆云昆, 谢珊珊, 周天华. 微丝的信号调控机制和体内功能[J]. *中国细胞生物学学报*(LU Y K, XIE S S, ZHOU T H. The signal regulatory mechanism and function of actin filaments [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2019, 41(3): 387-98.
- [4] LEMIEUX G, HWANG R, ROLDAN J, et al. Visualization of the actin cytoskeleton: different F-actin-binding probes tell

- different stories [J]. *Cytoskeleton*, 2014, 71: 157-69.
- [5] KUSPA A. Restriction enzyme-mediated integration (REMI) mutagenesis [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 346: 201-9.
- [6] 宋宏涛, 向本琼, 张伟. 基于绿色荧光蛋白的RNAi技术在细胞生物学实验课程中的应用实例[J]. *中国细胞生物学学报* (SONG H T, XIANG B Q, ZHANG W. RNAi technique based on green fluorescent protein and its application in course cell biology experiment [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2010, 32(6): 902-7.
- [7] MURAMOTO T, IRIKI H, WATANABE J, et al. Recent advances in CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Dictyostelium* [J]. *Cell*, 2019, 8: 46.
- [8] SEKINE R, KAWATA T, MURAMOTO T. CRISPR/Cas9 mediated targeting of multiple genes in *Dictyostelium* [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 8471.
- [9] 孙铮, 孙媛, 王茜, 等. 探索细胞生物学综合性实验课促进科研与教学的紧密结合[J]. *中国细胞生物学学报* (SUN Z, SUN Y, WANG Q, et al. Exploring the integration experimental courses of cell biology: a proposed approach for promotion the combination of research and teaching [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2016, 38(6): 715-20.