

“细胞膜的渗透性实验”在“细胞生物学”实验 教学中的创新实践

吴立柱* 曾凡力 侯春燕 陈琰 侯名语 司贺龙 王冬梅 潘延云*

(河北农业大学, 生命科学学院, 保定 071001)

摘要 细胞生物学实验是高等院校“细胞生物学”课程的重要教学环节。为了适应“细胞生物学”实验教学实际需要和深化实验教学改革, 提高学生学习兴趣, 培养学生创新意识, 该文对细胞膜的渗透性实验进行了优化创新和实践, 增加了必要的实验药品和等渗溶液pH值测定等实验内容, 并在校2017和2018年度实验教学中进行了教学实践。该实践获得了明确的实验结果和分析, 对学生的教育意义深刻, 取得了良好的教学效果, 对高等院校“细胞生物学”实验教学改革具有参考意义。

关键词 教学研究; 细胞生物学实验; 细胞膜渗透性; 创新实践

The Innovative Practice of Cell Membrane Permeability Experiment in Cell Biology Experimental Teaching

WU Lizhu*, ZENG Fanli, HOU Chunyan, CHEN Yan, HOU Mingyu, SI Helong, WANG Dongmei, PAN Yanyun*

(College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract Cell biology experiment is an important component in cell biology teaching in colleges and universities. To meet the requirements for cell biology experiment teaching practice and its innovation deepening need, to improve students' learning interest, and to better cultivate their innovation consciousness, we optimized the laboratory reagents and added the steps for pH value measurement in cell membrane permeability experiment, carried out in cell biology experimental teaching in 2017 and 2018, and obtained clear results and analysis. It gets better teaching effect, and is profound for students' education and referential for cell biology experiment teaching reform in colleges and universities.

Keywords teaching and research; cell biology experiment; cell membrane permeability; innovation practice

细胞生物学实验不仅是高等院校“细胞生物学”课程理论的具体实践, 且是学生实际动手能力和创新能力培养的重要教学环节^[1-2]。随着我国基础教育

质量的普遍提高, 本、专科等高等院校大学生的基本素质和基础理论知识也发生了相应变化, 原有的实验教学大纲、教学内容和教学目标也需要随之进

收稿日期: 2019-05-27 接受日期: 2019-07-22

教育部2013国家植物科学与技术实验教学示范中心(批准号: 教高司函2013-72)、河北农业大学第十批教学研究项目-细胞生物学(批准号: 2018YB50)、河北省教育厅课题“生物技术”品牌特色专业建设研究(批准号: 2012GJJG054)、河北省教育厅2012“生物技术”专业综合改革试点项目(批准号: 201202)资助的课题

*通讯作者。0312-7528245, E-mail: wulizhu2008@163.com; pyycell@163.com

Received: May 27, 2019 Accepted: July 22, 2019

This work was supported by education ministry 2013 national plant science and technology experimental teaching demonstration center(Grant No.Higher Education Department of Education Ministry 2013-72), Hebei agricultural university 10th teaching and research project -- cell biology (Grant No.2018YB50), Hebei education department specialty brand constructional research on "biotechnology" (Grant No.2012GJJG054), Hebei education department comprehensive reform pilot project on "biotechnology" major (Grant No.201202)

*Corresponding authors. Tel: +86-312-7528245, E-mail: wulizhu2008@163.com; pyycell@163.com

网络出版时间: 2019-12-11 11:10:31 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191211.1110.022.html>

行相应调整^[3-4]。为了适应我校细胞生物学实验教学的实际需要,深化实验教学改革,提高学生学习兴趣,培养学生创新意识,本文对细胞生物学实验的经典实验——“细胞膜的渗透性实验”进行了优化创新和实践。

细胞膜渗透性实验是《细胞生物学》实验教材和实验教学中一个经典的基础实验^[5-7]。该实验以红细胞膜的通透性为研究主线,紧密结合“细胞生物学”理论课程^[8-9]被动运输这一章节的理论知识;具有操作简单、结果稳定、可重复性强、揭示的知识理论明确、易于理解,且对实验环境要求不高(一般高校实验室和有条件的中学生物实验室均可满足)等特点。学生在实验过程中通过观察实验现象、分析实验结果,总结推理出不同溶质分子通过简单扩散跨膜的特点和原理,明确细胞膜的选择渗透性,这对学生加深理解细胞膜的基本功能具有重要意义^[10]。

在实际教学实验过程中不同实验组得到的溶血时间和溶血速率等实验数据差异较大,很难得出一致的实验结论。马超颖^[11]、程旺元^[10]和马云^[12]等就这些问题从不同角度进行了分析和讨论,但在溶血速率和铵盐溶液的溶血原因等问题上存在较大争议。本文在原有细胞膜渗透性实验^[6]的基础上增加了1种强酸弱碱铵盐(硫酸铵)和2种钾盐试剂(氯化钾和醋酸钾)等实验试剂,增加了溶液pH值测定的实验内容,同时对相应的实验步骤和实验结果与分析进行了优化和创新,并结合本校2017和2018年度该课程的实验教学进行了教学实践,获得了明确的实验结果和分析,以期对该实验的相关教学研究提供参考。

1 实验原理

细胞质膜是细胞与外界环境进行物质交换的基本结构,可以选择性地输入或输出不同性质的物质分子。在等渗环境中水分子通过细胞质膜进出细胞的速率相等,细胞的体积不会发生变化。如果等渗溶液中的溶质分子通过简单扩散进入细胞,则会增加细胞内含物的浓度并降低细胞内的水势,水分子进入细胞内的速率大于流出速率,红细胞的体积膨胀增大;当红细胞体积增加30%时呈球形,体积增加45%~60%时由于细胞膜损伤而发生溶血^[10],此时血红蛋白溢出至等渗溶液内,溶液由红细胞的悬浊液变为非细胞结构的澄清液,这也是判别细胞是否发生溶血的一个直接现象依据。通过等渗溶液中的

红细胞是否发生溶血和溶血速率的快慢,推断细胞膜对各类溶质分子的渗透性大小和强弱。

红细胞是否发生溶血以及溶血时间快慢则与细胞外溶质分子能否扩散进入细胞以及进入细胞的速率直接相关,这也是细胞膜通透性的直接反映。通过记录红细胞的溶血时间,测定等渗溶液的pH值,分析溶质的电离和水解平衡,结合《细胞生物学》教材^[8-9]和实验教材^[5-7]相关理论知识(图1),我们总结出如下结论:(1)非极性的小分子容易跨膜;(2)极性的小分子可以跨膜;(3)带电荷的离子不能自由跨膜;(4)大分子不能自由跨膜。

2 实验用品

在杨洪武和潘延云主编的高等农林院校基础生物学系列实验教材——《细胞生物学实验教程》^[1]的基础上,对其实验试剂和操作步骤进行了优化和改良,增加了1种强酸弱碱铵盐(0.17 mol/L硫酸铵)和2种钾盐(0.17 mol/L氯化钾和0.17 mol/L醋酸钾)试剂(表1)。

3 实验方法与步骤

实验步骤如下:

(1)以蒸馏水为对照,取5 mL蒸馏水加入0.5 mL稀释的血液,迅速混匀,观察溶液变化,由浑浊的红色悬浊液变成均一溶液,说明细胞发生溶血,记录下溶血时间。该步骤重复3次,求平均值。

(2)细胞膜的通透性观察,分别用另外13种等渗溶液(表1)进行同样的溶血实验,步骤同(1)。

(3)等渗溶液的pH值测定,使用PHSJ-3F型pH计测定等渗溶液的pH值。

4 实验结果与分析

实验结果(表1)表明,没有发生溶血的试剂分别为氯化钠、硝酸钠、硫酸钠、氯化钾、醋酸钾、硫酸铵和葡萄糖,发生溶血的试剂分别为蒸馏水、醋酸铵、氯化铵、草酸铵、乙醇、丙酮和甘油。比较其溶血所用时间的结果为:蒸馏水<乙醇<丙酮<醋酸铵<甘油<氯化铵<草酸铵,其中甘油溶液溶血时间远大于醋酸铵溶液溶血时间,草酸铵溶液溶血时间远大于氯化铵溶液溶血时间。

对实验试剂的特性进行分析,不难发现乙醇、丙酮、甘油和葡萄糖均为有机成分,但发生溶血所

需的时间不同, 其中乙醇、丙酮和甘油溶液的溶血时间分别0.43 min、0.48 min和22.57 min, 而葡萄糖不发生溶血现象。这是因为细胞膜是由脂类组成的脂双层膜结构, 根据相似相溶原理, 有机分子更容易完成跨膜过程。其中乙醇为二碳化合物, 其分子空

间要小于三碳化合物丙酮, 故有机分子乙醇更易进入细胞, 所以其溶血时间小于丙酮。丙酮与甘油的分子量相当, 但丙酮的极性远小于甘油, 故丙酮较甘油更易发生溶血现象。葡萄糖是六碳糖分子, 其分子空间较大, 不能自由跨膜, 它需要协助蛋白的作用

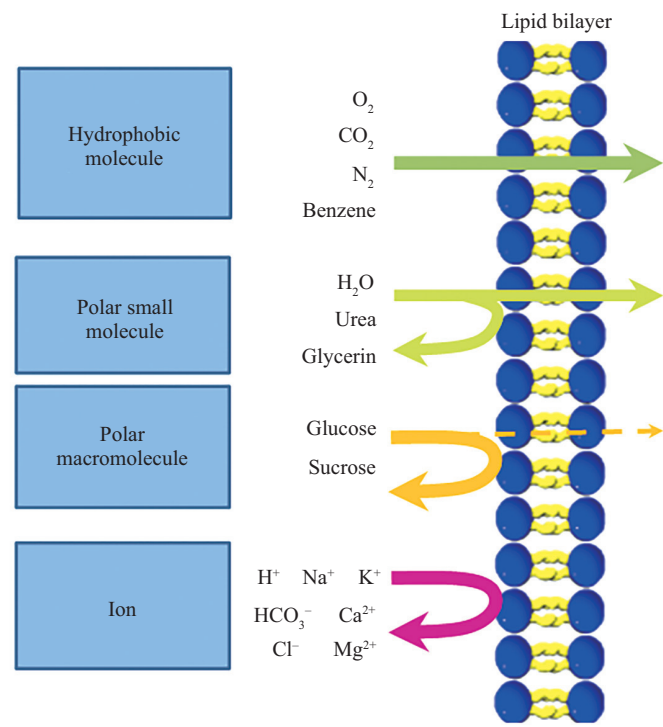


图1 不同性质的物质分子通过简单扩散透过脂双分子层的趋势(根据参考文献[8]修改)

Fig.1 The tendency of different material molecules across lipid bilayer by simple diffuse (modified from reference [8])

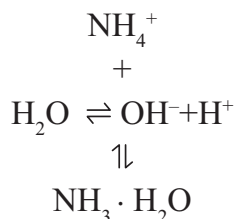
表1 鸡血红细胞在不同等渗溶液中的溶血统计及pH值测定

Table 1 The hemolysis of chicken red blood cells in different reagents and the pH value of reagents

试剂 Reagents	浓度/mol·L ⁻¹ Concentration /mol·L ⁻¹	是否溶血 Hemolysis	溶血时间/min Time /min	pH
H ₂ O	/	Yes	0.11±0.01	6.85
NaCl	0.17	No	—	6.16
NaNO ₃	0.17	No	—	6.22
KCl*	0.17	No	—	6.39
NH ₄ Cl	0.17	Yes	25.51±0.67	5.85
CH ₃ COOK*	0.17	No	—	7.51
Na ₂ SO ₄	0.12	No	—	6.44
CH ₃ COONH ₄	0.12	Yes	4.29±0.28	6.95
(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	0.12	Yes	2.52×10 ³	6.03
(NH ₄) ₂ SO ₄ *	0.17	No	—	6.07
Ethyl alcohol	0.32	Yes	0.43±0.02	/
Acetone	0.32	Yes	0.48±0.02	/
Glycerinum	0.32	Yes	22.57±0.45	/
Glucose	0.32	No	—	/

*在参考文献[6]基础上新增加的等渗溶液试剂; —: 没有发生溶血; /: 没有检测。

*The added isosmotic solution based on reference [6]; — : no hemolysis; / : no tested.

图2 NH_4^+ 的水解反应Fig.2 Hydrolysis reaction of NH_4^+

才能完成跨膜过程,而在该体系中由于细胞外界环境的改变,没有协助蛋白参与,葡萄糖不能完成跨膜运输,故不能发生溶血现象。根据该实验现象可得出前述结论(1)和(4),即“(1)非极性的小分子容易跨膜”和“(4)大分子不能自由跨膜”,该结论与教材^[8]中的膜的通透性原理相一致。

血红细胞在蒸馏水中发生溶血所需时间最短(表1),这是因为水是极性小分子且渗透势最大,极易完成跨膜而发生溶血现象^[7]。该结论与前述结论(2),即“(2)极性的小分子可以跨膜”的理论知识相一致。

在没有发生溶血现象的试剂中,包括氯化钠、硝酸钠、硫酸钠、氯化钾和醋酸钾在内的5种试剂溶液。这是因为它们均为强电解质,在水溶液中发生强电离。发生电离后的带电荷离子或基团不能自由穿过细胞膜,故不能发生溶血现象。根据该强电解质试剂的实验现象得出前述结论(3),即“(3)带电荷的离子不能自由跨膜”。

不同铵盐溶液存在不同的溶血现象和溶血时间。其中硫酸铵不发生溶血现象,而醋酸铵、草酸铵、氯化铵等3种铵盐均发生了溶血现象,但其溶血时间存在明显差异(表1),即醋酸铵<<氯化铵<<草酸铵。具体分析如下:盐酸和醋酸的钾盐(氯化钾和醋酸钾)没有发生溶血,而两种酸的铵盐(氯化铵和醋酸铵)却发生了溶血,说明红细胞的溶血现象不是由电离后产生的 Cl^- 或 CH_3COO^- 导致的,而是与铵盐在水溶液中电离后产生的 NH_4^+ 有关。 NH_4^+ 是如何使红细胞发生溶血的呢?不难发现 NH_4^+ 是带正电荷的离子,依据前述结论(3)“(3)带电荷的离子不能自由跨膜”,可推理 NH_4^+ 不能完成跨膜,应该是以其他方式完成跨膜和发生溶血的。由于 NH_4^+ 可与水电离出的 OH^- 结合生成弱电解质 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (图2),依据前述结论(2)“(2)极性的小分子可以跨膜”可推理 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 能够进行自由扩散,完成跨膜,进而发生溶血现

象。那么,铵盐的溶血时间是否与 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的浓度相关呢?在铵盐中醋酸铵是弱酸弱碱盐,在水溶液中可发生双水解反应(水解公式为 $\text{NH}_4^+ + \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} = \text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3\text{COOH}$),其水溶液的pH检测结果为6.95(表1),接近于7,说明醋酸铵在水溶液中发生的双水解程度很大,大大增加了水溶液中 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 浓度,所以醋酸铵在铵盐试剂中发生溶血的速度最快。其他铵盐(氯化铵、草酸铵和硫酸铵)均为强酸弱碱盐,不发生双水解反应。氯化铵,草酸铵和硫酸铵的水溶液pH值分别为5.85、6.03和6.07(表1),说明溶液中的 NH_4^+ 水解程度依次降低,即溶液中的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 浓度依次降低,与红细胞的溶血时间依次增加相一致。这进一步验证了铵盐溶液中发生的红细胞溶血现象是由于铵盐水溶液中的 NH_4^+ 水解产生的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 进入细胞而产生的。

5 讨论

学生在实验数据统计分析时发现各实验组的溶血时间不尽一致,甚至差异很大,这是由于各小组计时起始时间和溶血终止时间的判断标准不一致。如有的实验小组是将红细胞中加入等渗溶液的时间作为开始计时的时间,有的小组却是将两者混匀后再开始计时;由于不同实验组对溶血现象的判断标准的把握程度不一,在同一组内经常出现组员意见不一致的情况,组间更难取得相一致的溶血时间。因此同一试剂的溶血时间在组间差异较大,但各组间不同试剂的溶血速率的快慢结果基本一致,这是因为各组分别用各组的判断标准进行比较溶血发生的快慢速率,不受组间影响,从而得到基本一致的溶血快慢速率。此现象也说明科学实验需要严谨性和可重复性,并在实验教学时可作为问题讨论,对学生的教育意义深刻。

结合我校对该课程教学的深化改革,该文在经典实验的基础上增加了1种强酸弱碱铵盐(0.17 mol/L硫

酸铵)和2种钾盐(0.17 mol/L氯化钾和0.17 mol/L醋酸钾)试剂,同时增加了试剂pH值测定等操作步骤。通过实验结果和分析讨论步骤,学生可充分理解细胞膜的通透性和物质通过简单扩散进入细胞内的一般特性和规律;结合铵盐电离水解平衡原理完全揭示了细胞膜的通透性原理,是《细胞生物学》教材中细胞膜相关的基本理论和实践相结合的完美呈现。对该实验的创新改革使实验结果更加明晰,实验数据更加充分,实验分析更加有据可循,理论与实践结合更加紧密,更加直观;本实验采用翻转课堂的形式^[1],由学生自主学习查找资料课上讨论,让学生感到学有所用、学以致用;极大提高了学生对理论结合实践的充分认识和体会,提高了对实验严谨性的认识和科学态度,取得了良好的教学效果,也为进一步的实验教学改革奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 孙铮,孙媛,王茜,张开立,程晓馨,马景昕,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.中国细胞生物学学报(Sun Zheng, Sun Yuan, Wang Qian, Zhang Kaili, Cheng Xiaoxin, Ma Jingxin, *et al.* Exploring the integration experimental courses of cell biology: a proposed approach for promoting the combination of research and teaching. Chinese Journal of Cell Biology) 2016; 38(6): 715-20.
- 2 卜文婕,宫磊,林爱琴.提高细胞生物学实验课教学效果的改革措施.现代农业科技(Bu Wenjie, Gong Lei, Lin Aiqin. Reform measures of improving teaching effect of cell biology experiment course. Modern Agricultural Science and Technology) 2017; 8: 281-2.
- 3 王洁,张智海,蔡亮.启发式细胞生物学实验教学的设计与尝试.中国细胞生物学学报(Wang Jie, Zhang Zhihai, Cai Liang. Pedagogical design and Ppractice of heuristic teaching in cell biology laboratory course. Chinese Journal of Cell Biology) 2017; 39(10): 1329-37.
- 4 覃永华,徐鑫,余光辉,王春台.细胞生物学实验教学模式的探索.实验科学与技术(Qin Yonghua, Xu Xin, Yu Guanghui, Wang Chuntai. Exploration of experimental teaching model in cell biology. Experiment Science and Technology) 2014; 12(2): 127-9.
- 5 杨汉民.细胞生物学实验,第2版.北京:高等教育出版社,1997: 23-5.
- 6 杨洪武,潘延云.细胞生物学实验教程,第1版.北京:高等教育出版社,2011: 96-8.
- 7 王崇英,侯岁稳,高欢欢.细胞生物学实验,第4版.北京:高等教育出版社,2017: 45-7.
- 8 翟中和,王喜忠,丁明孝.细胞生物学,第4版.北京:高等教育出版社,2011: 68-73.
- 9 王金发.细胞生物学,第1版.北京:科学出版社,2003, 102-22.
- 10 程旺元,余光辉,陈雁,刘学群,王春台.红细胞膜通透性实验及分析.实验科学与技术(Cheng Wangyuan, Yu Guanghui, Chen Yan, Liu Xuequn, Wang Chuntai. Result analysis of the experiment of red blood cell membrane permeability experiment. Experiment Science and Technology) 2009; 7(5): 39-41.
- 11 马超颖,石洪凌,陈超.还原思维在“细胞膜的渗透性实验”中的应用.唐山师范学院学报(Ma Chaoying, Shi Hongling, Chen Chao. The application of restoring thought on the experiment of cell membrane permeability. Journal of Tangshan Teachers College) 2006; 28(2): 27-8.
- 12 马云,梁小娟,刘英,程珍珍,豆佳丽,陈志娥.细胞膜渗透性实验的改进及鸡血液DNA的提取.新乡学院学报(自然科学版)(Ma Yun, Liang Xiaojuan, Liu Ying, Cheng Zhenzhen, Dou Jiali, Chen Zhie. The improvement of cell membrane permeability experiment and the extraction of DNA from chicken blood. Journal of Xinxiang University. Natural Science Edition) 2010; 27(6): 43-6.
- 13 张颢. PBL结合翻转课堂在细胞生物学教学中的探讨.教育教学论坛(Zhang Hao. PBL in combination with flipping classroom in cell biology teaching. Education Teaching Forum) 2018; 51: 175-6.