

## 教学研究

# 盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)用于本科 “细胞膜功能蛋白”探究性实验教学研究

王晓燕 蒋锐达 高润池\*  
(云南师范大学生命科学学院, 昆明 650500)

**摘要** 该研究对细胞生物学经典教学实验“细胞膜渗透性实验”进行重新设计。通过比较兔红细胞和盘基网柄菌细胞的“细胞膜渗透性”实验结果, 配合细胞生物学“细胞质膜结构与功能”一章的教学, 引导学生初步探究盘基网柄菌水孔蛋白(aquaporins, AQPs)在细胞抗低渗环境中的作用, 加深理解细胞质膜中的功能蛋白对于细胞生存的重要意义。

**关键词** 盘基网柄菌; 兔红细胞; 水孔蛋白; 探究性学习

## *Dictyostelium discoideum* is Used in the Exploratory Experimental Teaching Research of “Cell Membrane Functional Protein” for Undergraduates

WANG Xiaoyan, JIANG Ruida, GAO Runchi\*  
(College of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China)

**Abstract** In this study, the classical teaching experiment of Cell Biology “cell membrane permeability experiment” was redesigned. By comparing the experimental results of “membrane permeability” of rabbit erythrocyte and *Dictyostelium discoideum* cells, and combining with the teaching of the chapter “structure and function of cytoplasmic membrane” in Cell Biology, students were guided to preliminarily explore the role of AQPs (aquaporins) in cell anti-hypotonic environment. It could deepen the understanding of the significance of functional proteins in cytoplasmic membrane for cell survival.

**Keywords** *Dictyostelium discoideum*; rabbit erythrocyte; aquaporins; inquiry learning

细胞膜既是细胞与外环境之间物质通透的屏障, 也是细胞膜与外环境沟通的桥梁。屏障作用保障细胞具有相对稳定的细胞内环境, 同时细胞膜上多样的蛋白质承担了细胞与环境之间的选择性物质运输、能量转换和信息传递等重要生物学功能。通过细胞膜的选择通透性, 细胞从环境中摄入食物及代谢底物, 获取能量, 维持自身结构的有序性与功能的稳

定性, 同时排出代谢产物及废物, 以保障生存<sup>[1]</sup>。经典的细胞实验教学中, 红细胞是常用来研究细胞膜通透性的理想材料, 当红细胞处于低渗溶液环境时, 水分子大量渗入到细胞内, 使细胞膨胀直至破裂, 血红蛋白被释放到介质中, 使浑浊的红细胞悬液变为红色透明的血红蛋白溶液, 红细胞发生溶血现象, 该现象极易观察。溶血时间的长短可作为细胞膜对不同

收稿日期: 2021-10-08

接受日期: 2022-01-14

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: 18314599245, E-mail: runchigao@163.com

Received: October 8, 2021

Accepted: January 14, 2022

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

\*Corresponding author. Tel: +86-18314599245, E-mail: runchigao@163.com

物质通透性的衡量指标,该指标极好地验证了细胞膜对水分子、无机离子、有机小分子等不同类别的物质的选择性运输<sup>[2]</sup>。

但是由于该实验中的试剂种类过多、红细胞悬液溶血时间比较接近、学生的实验记录往往不够准确等导致我们对结果的分析判断误差较大。因此我们拟在本学院生物技术专业本科教学实践中对该实验进行重新设计,将该验证性实验改为探究性实验:统一红细胞溶血的计时方法;减少试剂的种类,但增加盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)细胞AX<sub>2</sub>作为平行受试物;利用水孔蛋白(aquaporins, AQP)抑制剂,探讨水孔蛋白在细胞抗低渗环境中的作用。

盘基网柄菌是一种单细胞真核生物,也被称为社会阿米巴。与哺乳类红细胞迥异的是,盘基网柄菌通常以独立生活的方式存在于温带森林腐殖质及岩屑中,它们的生存环境复杂多变,盘基网柄菌时刻面临环境中的各种胁迫,尤其是由于气候突变带来的环境渗透压的改变,如雨水造成的低渗、泥浆造成的高渗,都对盘基网柄菌的生存构成威胁。在与环境长期的互作、适应中,盘基网柄菌进化出了复杂的机制来解决这一问题,其中细胞膜结构中的水孔蛋白发挥了重要的作用<sup>[3]</sup>。

本研究通过比较兔红细胞与盘基网柄菌的抗低渗实验结果,希望能激发学生探索欲望,引导学生深入理解多细胞生物机体内环境稳态对细胞生存的重要意义。细胞膜上特定功能蛋白(水孔蛋白)在维持细胞渗透压、稳定细胞结构中具有重要作用;利用水孔蛋白抑制剂处理兔红细胞和AX<sub>2</sub>,观察两者细胞形态变化的差异,引导学生探究盘基网柄菌抗低渗现象的机理,了解单细胞生物在适应环境过程中的演化和发展,加深学生对细胞质膜结构与功能的理解,巩固其理论知识,培养其科学探究能力。

通过对实验现象的观察和数据的对比分析,本实验还可以引导学生深入了解来自多细胞真核生物与单细胞真核生物的细胞,在体外培养中对培养条件有不同的要求。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验细胞和菌株包括:兔红细胞、盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*) AX<sub>2</sub>菌株(本实验室保存)。药品包括:AgNO<sub>3</sub>、重蒸水、10×磷酸盐缓冲液、葡

萄糖、示蛋白胨、酵母粉、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、硫酸链霉素、氯化钙、硫酸镁。试剂配制方法如下。

(1)兔红细胞等渗液:0.32 mol/L乙醇、0.17 mol/L氯化钠、0.32 mol/L甘油、0.17 mol/L醋酸铵、0.17 mol/L NaCl; (2)兔红细胞低渗、中渗和高渗液:0.065 mol/L蔗糖、0.102 mol/L、0.5 mol/L蔗糖; (3)抗凝剂:3.8%柠檬酸钠; (4)AX<sub>2</sub>细胞培养液:HL-5(10 g葡萄糖、10 g示蛋白胨、5 g酵母粉、0.965 g磷酸氢二钠、0.485 g磷酸二氢钾、0.007 5 g硫酸链霉素,水定容到至1 L, pH6.5; 121 °C灭菌30 min); (5)缓冲液:DB缓冲液(100 mL 10×磷酸盐缓冲液、0.2 mL 1 mol/L氯化钙、1 mL 2 mol/L硫酸镁,水定容至1 L)。实验设备包括:倒置显微镜(济南千司生物技术有限公司, MotiC 2000E)及配套电脑。

### 1.2 方 法

1.2.1 兔红细胞的准备 于广口试剂瓶中加入适量的3.8%的柠檬酸钠溶液,按体积比为1:9的比例倒入新鲜兔血,轻轻混匀,即为兔抗凝血,4 °C保存(可用1周左右)。

1.2.2 盘基网柄菌AX<sub>2</sub>细胞的培养 盘基网柄菌AX<sub>2</sub>细胞传代培养<sup>[3]</sup>:将AX<sub>2</sub>接种于HL-5,用6孔和12孔板(2~5 mL/孔)于22 °C培养过夜达指数生长期,备用(实验前教师准备)。

1.2.3 兔红细胞膜渗透性探究(实验一,2学时) 兔血用0.17 mol/L氯化钠稀释10倍,制成10%兔红细胞悬液。溶血阳性和阴性对照:取2支1.5 mL离心管,分别加入1.2 mL重蒸水和1.2 mL 0.17 mol/L氯化钠溶液,再分别加入0.3 mL兔红细胞悬液,迅速颠倒混匀,要求学生注意观察2支离心管中溶液的变化。加入兔血后观察5 min,将2支离心管置于有字符+的A4纸上,加重蒸水的离心管溶液澄清,透过管壁,可清晰观察到A4纸上的字符,此为溶血阳性;加氯化钠溶液的离心管溶液浑浊,看不见字符,此为溶血阴性。

再取3支1.5 mL离心管,分别加入1.2 mL 0.32 mol/L乙醇、0.32 mol/L甘油、0.17 mol/L醋酸铵,每管加入0.3 mL兔红细胞悬液,迅速颠倒混匀,注意观察离心管溶液的变化,并记录溶液由浑浊红色悬浊液变成完全透明溶液的时间,做3组平行实验,取平均值。30 min后,将所有样品置于4 °C、1 200 r/min条件下离心4.5 min,吸取沉淀30 μL滴在载玻片上,加盖玻片,在显微镜下进行镜检。于40倍物镜和10倍目镜下可以判断细胞是否破裂。

1.2.4 盘基网柄菌AX<sub>2</sub>细胞膜渗透性探究(实验二, 2学时) 培养于6孔板(HL-5)中的AX<sub>2</sub>细胞, 待其贴壁生长至铺展到80%孔板面积时(教师提前准备), 吸去培养基, DB缓冲液洗1次, 在6个孔中分别加入5 mL重蒸水、0.17 mol/L氯化钠、0.32 mol/L乙醇、0.32 mol/L甘油、0.17 mol/L醋酸铵、0.5 mol/L蔗糖。用倒置显微镜观察AX<sub>2</sub>细胞是否有细胞变形、涨破或皱缩等现象, 并于加入试剂后1 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min拍照记录实验结果。

1.2.5 兔红细胞水孔蛋白抑制实验(实验三, 2学时) 按参考文献[4]稍作修改进行以下实验: 取3支1.5 mL离心管, 标记为1、2、3号管, 分别加入兔血47.5  $\mu$ L、45  $\mu$ L、47.5  $\mu$ L, 再对应1、2、3号管, 分别加入2.5  $\mu$ L 100  $\mu$ mol/L、5  $\mu$ L 100  $\mu$ mol/L、2.5  $\mu$ L 1 mmol/L的AgNO<sub>3</sub>溶液, 使1、2、3号管AgNO<sub>3</sub>浓度为5  $\mu$ mol/L、10  $\mu$ mol/L、50  $\mu$ mol/L, 各自混匀, 室温静置10 min。以上操作重复做3组。其中第1组的1、2、3号管分别加入1 mL 0.065 mol/L的蔗糖(低渗); 第2组加入0.102 mol/L的蔗糖; 第3组加入0.5 mol/L的蔗糖(高渗)。室温静置5 min后, 各取30  $\mu$ L滴于培养皿底, 加盖玻片, 置于倒置显微镜, 在40倍物镜和10倍目镜下观察细胞形态变化并记录结果。

对照实验: 另取3支1.5 mL离心管, 标记为1、2、3号管, 分别加入兔血50  $\mu$ L, 在1号管中加入1 mL

0.065 mol/L的蔗糖, 2号管中加入0.102 mol/L的蔗糖; 3号管中加入0.5 mol/L的蔗糖。室温静置5 min后, 各取30  $\mu$ L滴于培养皿底, 加盖玻片, 置于倒置显微镜, 在40倍物镜下观察细胞形态变化并记录结果。

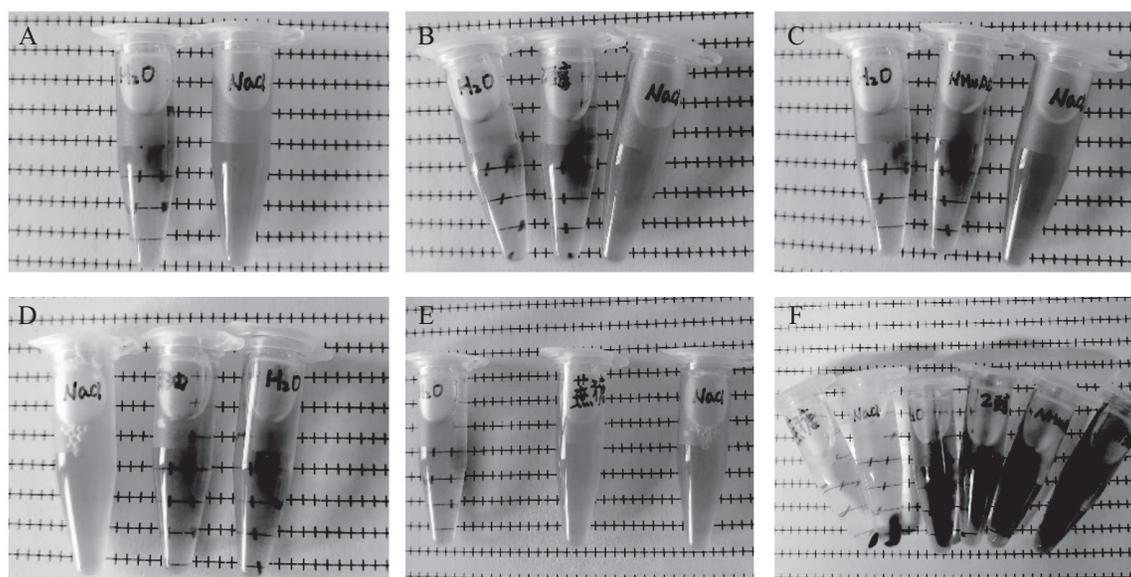
1.2.6 盘基网柄菌细胞AX<sub>2</sub>水孔蛋白(AQPs)抑制实验(实验四, 4学时) 培养于12孔板(HL-5)中的盘基网柄菌细胞AX<sub>2</sub>, 待其贴壁生长铺展到80%孔板面积时(教师提前准备), 吸去培养基, DB缓冲液洗1次, 在6个孔中分别加入1 mL AgNO<sub>3</sub>水溶液(AQPs抑制剂), 浓度为5  $\mu$ mol/L、4  $\mu$ mol/L、3  $\mu$ mol/L、2  $\mu$ mol/L、1  $\mu$ mol/L、0.5  $\mu$ mol/L<sup>[4]</sup>, 在空白孔加1 mL重蒸水(对照)。用倒置显微镜观察AX<sub>2</sub>细胞是否有细胞变形、涨破或皱缩, 并于加入试剂后0 min、2 min、4 min、6 min、8 min、10 min、12 min、14 min、16 min拍照记录实验结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 兔红细胞膜渗透性实验结果及分析

水是极性小分子, 由于水孔蛋白的运输作用, 水极易完成跨红细胞膜运输, 导致红细胞涨破而发生溶血, 红细胞在纯水中溶血速度最快(图1A和表1)。该组设置为溶血阳性对照。

氯化钠是电解质, 在水溶液中电离产生Na<sup>+</sup>和Cl<sup>-</sup>, 离子不能自由穿过细胞膜, 因此实验30 min内,



A~F: 水与氯化钠、乙醇、醋酸铵、甘油、蔗糖、离心沉淀。

A-F: water and sodium chloride, ethanol, ammonium acetate, glycerol, sucrose, centrifugal precipitation.

图1 兔红细胞在不同等渗溶液中的溶血现象

Fig.1 Haemolysis of rabbit erythrocytes in different isotonic solutions

表1 兔红细胞在不同等渗溶液中的溶血时间

Table 1 Hemolysis time of rabbit erythrocytes in different isotonic solution

试剂 Reagent	是否溶血 Hemolysis or not	溶血时间/min Time of hemolysis /min	沉淀镜检 Precipitation test
重蒸水 (ddH <sub>2</sub> O)	是(阳性对照)	0.34	细胞破裂, 上清液红色
0.17 mol/L氯化钠 (NaCl)	否(阴性对照)	—	细胞完好, 上清液无色
0.32 mol/L乙醇 (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	是	0.67	细胞破裂, 上清液红色
0.17 mol/L醋酸铵 (NH <sub>4</sub> Ac)	是	1.84	细胞破裂, 上清液红色
0.17 mol/L甘油 (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	是	10.23	细胞破裂, 上清液红色
0.5 mol/L蔗糖 (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	否(高渗液)	—	细胞皱缩, 未破裂, 上清液无色

红细胞在等渗的氯化钠溶液中也不发生溶血现象(图1A和表1): 镜检可观察到该溶液中的红细胞失水皱缩。离心沉淀后的上清液无色(图1F), 证明细胞没破裂。该组设置为溶血阴性对照。

蔗糖属极性有机分子, 不能自由穿过红细胞膜, 细胞膜上也没有相应转运载体, 因此蔗糖高渗溶液处理30 min后, 镜检可观察到红细胞失水皱缩(图1E和表1)。离心沉淀后的上清液无色(图1F), 证明细胞没破裂。

在乙醇(图1B和表1)、甘油(图1D和表1)两种等渗液中, 由于两种溶质分子的极性和分子量大小的差异, 以及细胞膜上转运载体的运输效率的差异导致乙醇跨过细胞膜进入细胞的速度显著快于甘油, 引起细胞外渗透压降低的速度更快, 因而细胞溶血时间也短得多。醋酸铵在水溶液中电离后产生NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 由于NH<sub>4</sub><sup>+</sup>可与水电离出的OH<sup>-</sup>结合生成弱电解质NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O属极性小分子, 可以跨膜, 因而NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O能够进行自由扩散, 完成跨膜, 进入细胞, 导致胞外渗透压下降, 进而发生溶血现象(图1C)<sup>[5]</sup>。

## 2.2 盘基网柄菌AX<sub>2</sub>细胞膜渗透性实验与分析

该实验结果表明, 盘基网柄菌AX<sub>2</sub>细胞在纯水中直至实验结束, 没有发生吸水变形现象(图2A和表2); 而在0.17 mol/L氯化钠中, 5 min后细胞失水皱缩, 10 min后细胞脱壁(死亡)(图2B和表2); 在0.32 mol/L乙醇中5 min内细胞被固定(杀死), 直至30 min细胞无任何运动现象(图2C和表2); 在0.17 mol/L醋酸铵中5 min内细胞吸水膨胀变圆, 10 min后脱壁破裂(图2D和表2); 在0.17 mol/L甘油中5 min后细胞失水皱缩,

10 min后脱壁(图2E和表2); 在0.5 mol/L蔗糖中5 min后细胞失水皱缩, 10 min内细胞脱壁(图2F和表2)。

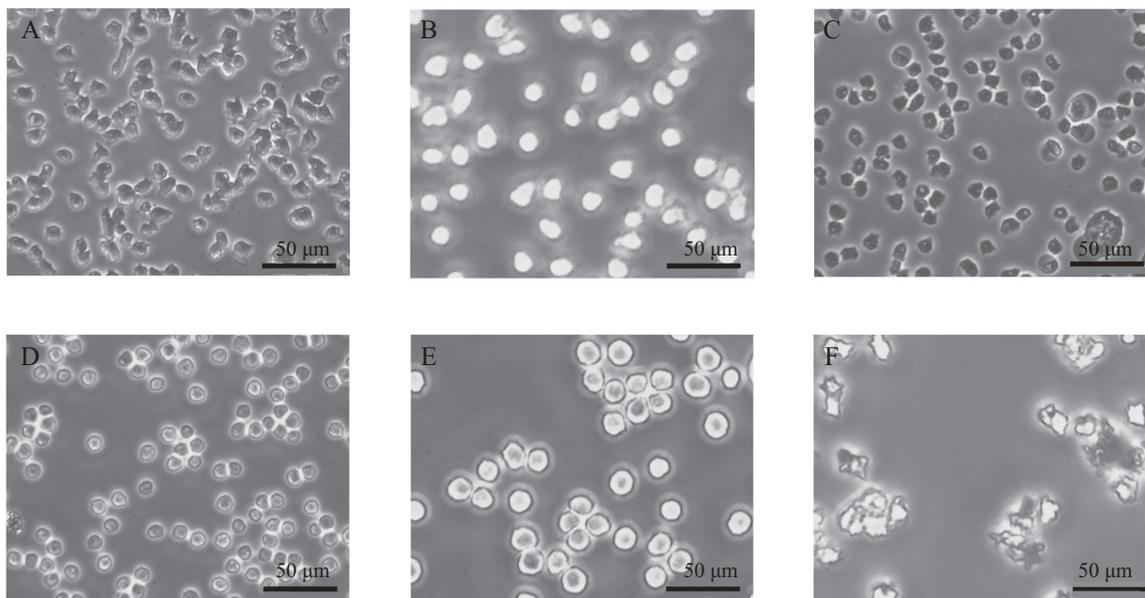
AX<sub>2</sub>细胞对上述不同溶液反应敏感性均较强, 在5 min内就出现细胞形态变化。但在纯水中却反应异常, 直至30 min, AX<sub>2</sub>细胞形态没有任何改变, 与兔红细胞在纯水中的快速溶血有极大的差异。

## 2.3 兔红细胞水孔蛋白抑制实验结果与分析

兔红细胞加入0.065 mol/L的蔗糖(低渗)液中, 细胞大部分破裂(图3A), 加入0.102 mol/L的蔗糖液中, 细胞轻微吸水, 形态保持双凹圆盘形(图3B); 加入0.5 mol/L的蔗糖液中, 细胞失水皱缩(图3C); 兔红细胞经5 μmol/L、10 μmol/L、50 μmol/L的AgNO<sub>3</sub>处理后, 再加入蔗糖, 与对照组相比, 10 μmol/L处理后, 在高渗液中细胞失水皱缩程度减小; 在低渗液中细胞破裂数量减少, 0.102 mol/L的蔗糖液中, 细胞形态基本不变(图3)。细胞变形程度与AgNO<sub>3</sub>浓度有关。该结果表明细胞形态变化可能与AgNO<sub>3</sub>抑制水孔蛋白相关。

## 2.4 盘基网柄菌细胞AX<sub>2</sub>水孔蛋白抑制实验结果与分析

盘基网柄菌AX<sub>2</sub>细胞在含3~5 μmol/L的AgNO<sub>3</sub>水溶液中, 2 min后全部细胞出现吸水变圆, 部分脱壁; 在含1~2 μmol/L的AgNO<sub>3</sub>溶液中, 2 min后部分细胞出现吸水变圆, 4 min后全部细胞出现吸水变圆; 在含0.5 μmol/L的AgNO<sub>3</sub>溶液中处理细胞2 min后, 部分细胞出现吸水变圆, 14 min后, 大部分细胞才出现吸水变圆。AgNO<sub>3</sub>的浓度对AX<sub>2</sub>细胞抗低渗作用有显著的影响(表3和图4)。



A~F: H<sub>2</sub>O、0.17 mol/L氯化钠、0.32 mol/L乙醇、0.17 mol/L醋酸铵、0.17 mol/L甘油、0.5 mol/L蔗糖。  
A-F: H<sub>2</sub>O, 0.17 mol/L sodium chloride, 0.32 mol/L ethanol, 0.17 mol/L ammonium acetate, 0.17 mol/L glycerol, 0.5 mol/L sucrose.

图2 盘基网柄菌AX<sub>2</sub>细胞在六种试剂中的变化(处理5 min)

Fig.2 Changes of *Dictyostelium discoideum* AX<sub>2</sub> cells in six reagents (5 min treatment)

表2 六种试剂对盘基网柄菌AX<sub>2</sub>细胞膜的渗透性的影响

Table 2 Effects of six reagents on the permeability of *Dictyostelium discoideum* AX<sub>2</sub> cell membrane

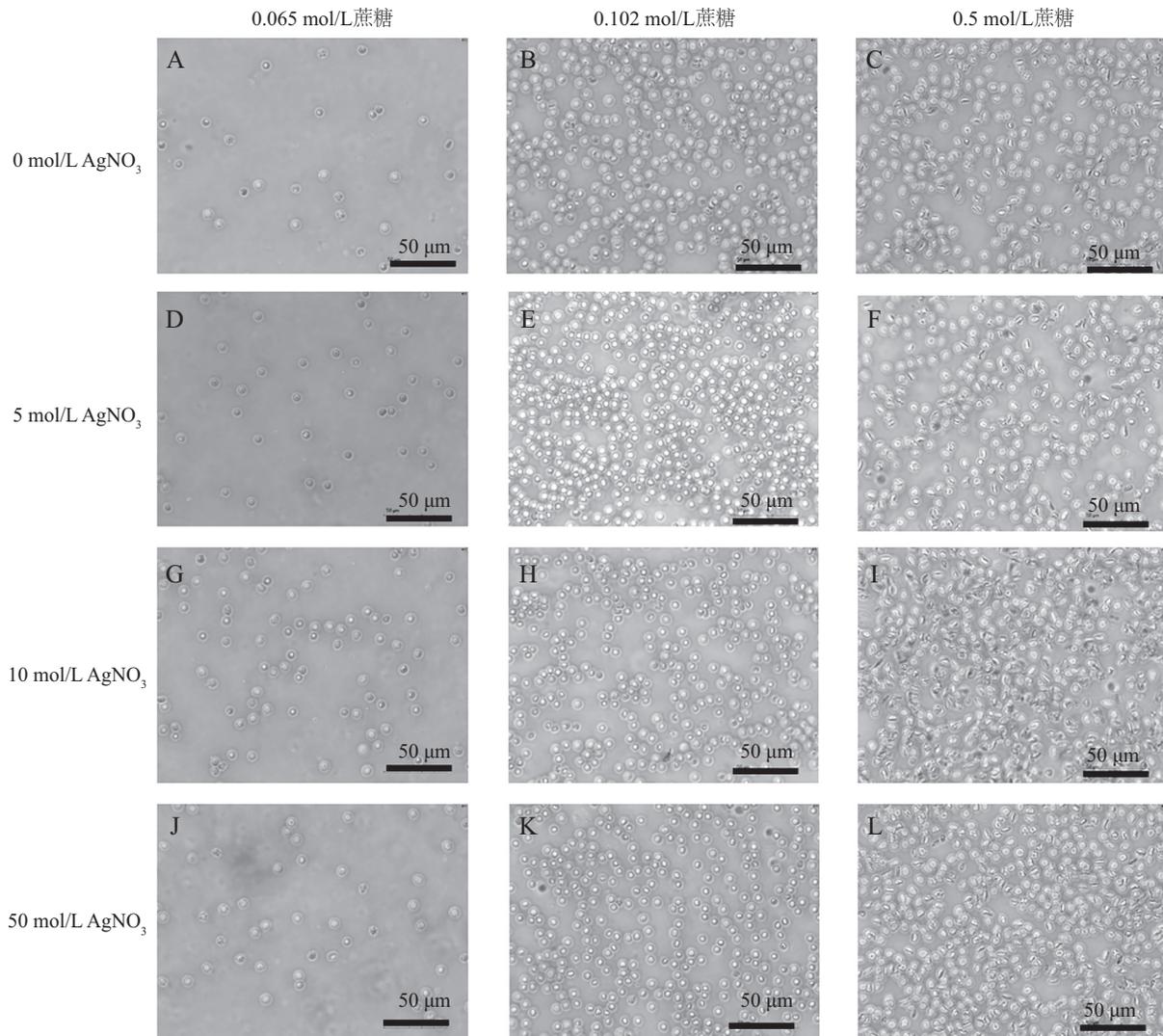
试剂 Reagent	细胞是否破裂 Rupture or not	细胞形态变化(22 °C) Cell morphology changes (22 °C)						
		0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
重蒸水 (ddH <sub>2</sub> O)	否	不变	不变	不变	不变	不变	不变	不变
0.17 mol/L氯化钠 (NaCl)	否	不变	细胞皱缩	细胞皱缩、 脱壁	细胞皱缩、 脱壁	细胞皱缩、 脱壁	细胞皱缩、 脱壁	细胞皱缩、 脱壁
0.32 mol/L乙醇 (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	否	不变	细胞被固定	细胞被固定	细胞被固定	细胞被固定	细胞被固定	细胞被固定
0.17 mol/L醋酸铵 (NH <sub>4</sub> Ac)	否	不变	吸水变型	变圆、膨大	变圆、膨大	变圆、膨大	变圆、膨大	变圆、膨大
0.17 mol/L甘油 (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	否	不变	部分皱缩	皱缩、脱壁	皱缩、脱壁	皱缩、脱壁	皱缩、脱壁	皱缩、脱壁
0.5 mol/L蔗糖 (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	否	不变	皱缩	皱缩	皱缩	皱缩	皱缩	皱缩

### 3 讨论

多细胞真核生物,尤其是脊椎动物由高度分化的细胞组成,每类细胞于特定的组织中存在,由不同的组织形成器官和系统。每一类细胞都生活于由细胞外液、组织液和血清构成的机体内环境中。在机体神经-体液的共同调节下,动物机体得以保持内环境稳态(温度、pH值、渗透压等),为不同的细胞提供相对恒定的生存环境,从而保证机体功能的协调和对外环境的适应。因而来自多细胞机体的细胞对

体外培养条件也相对苛刻。兔红细胞正是生活于这种温度、pH值、渗透压等都相对恒定的血浆中,因而对其中任何因素的明显波动都非常敏感。

通过实验一,观察不同等渗溶液中兔红细胞的溶血现象,让学生验证不同试剂的溶质成分通过兔红细胞膜的渗透性的差别,导致渗透压的不同改变,从而引起细胞溶血速度的差异。通过实验二,用相同的试剂作用于盘基网柄菌,细胞形态的变化却有极大的差别,要求学生分析原因,深入理解膜蛋白的



A~L: 不同浓度蔗糖和AgNO<sub>3</sub>处理。

A-L: treatment of different concentrations of sucrose and AgNO<sub>3</sub>.

图3 使用不同浓度的硝酸银处理不同渗透压条件下的兔红细胞

Fig.3 Use different concentrations of AgNO<sub>3</sub> to treat rabbit erythrocytes under different osmotic pressure conditions

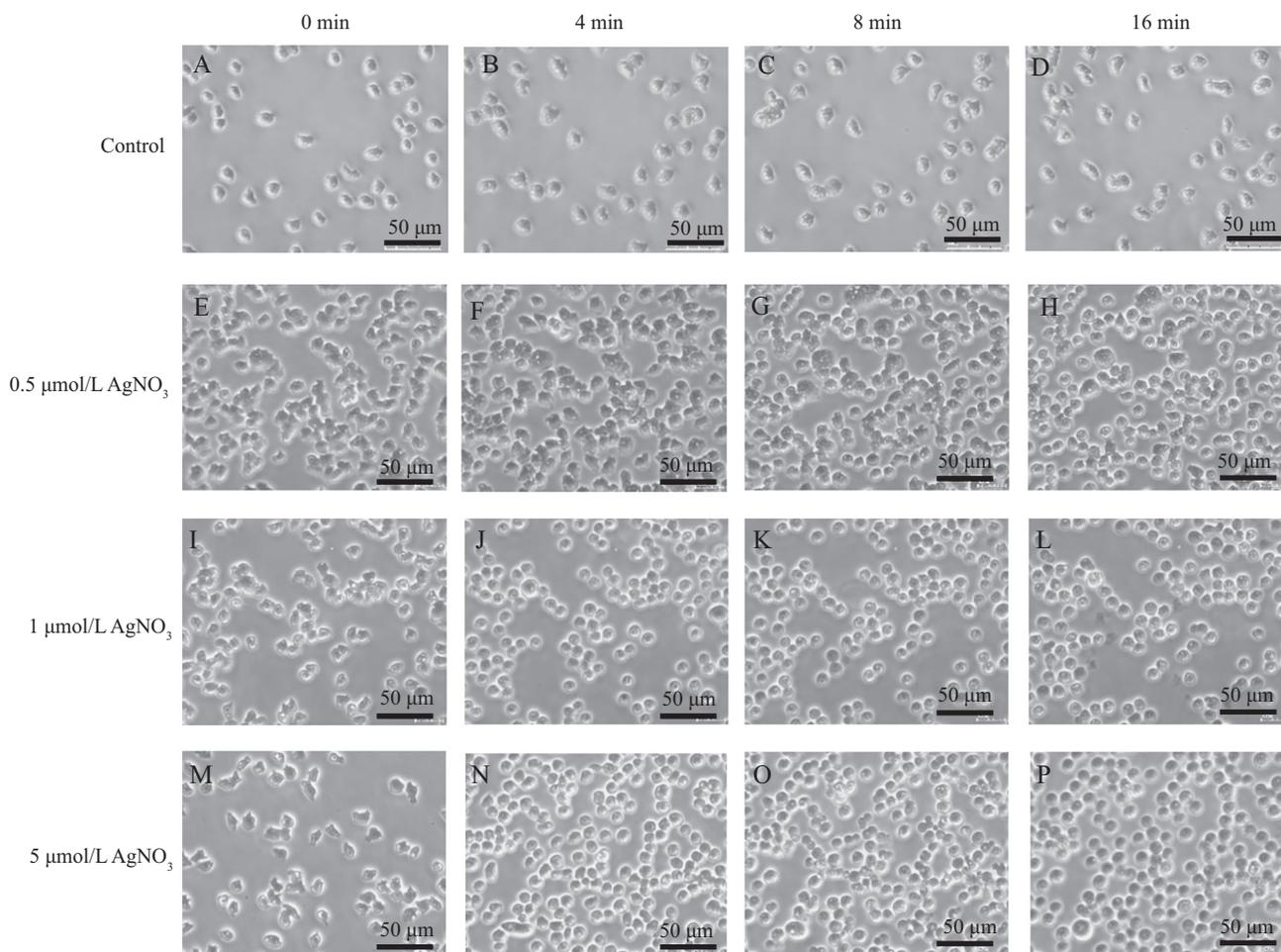
表3 不同浓度AgNO<sub>3</sub>处理对盘基网柄菌AX<sub>2</sub>细胞抗低渗(H<sub>2</sub>O)的影响

Table 3 Effects of different concentrations of AgNO<sub>3</sub> on the hypotonic (H<sub>2</sub>O) resistance of *Dictyostelium discoideum* AX<sub>2</sub> cells

试剂 Reagent	细胞是否破裂 Rupture or not	细胞形态变化 (22 °C) Cell morphology changes (22 °C)								
		0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	12 min	14 min	16 min
H <sub>2</sub> O(对照)	否	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H <sub>2</sub> O/AgNO <sub>3</sub> (5 μmol/L)	是	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
H <sub>2</sub> O/AgNO <sub>3</sub> (4 μmol/L)	是	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
H <sub>2</sub> O/AgNO <sub>3</sub> (3 μmol/L)	是	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
H <sub>2</sub> O/AgNO <sub>3</sub> (2 μmol/L)	是	—	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
H <sub>2</sub> O/AgNO <sub>3</sub> (1 μmol/L)	否	—	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
H <sub>2</sub> O/AgNO <sub>3</sub> (0.5 μmol/L)	否	—	—	—	—	+	+	+	++	++

+号数量反映细胞吸水变形程度。+++：全部细胞吸水变圆；++：部分细胞吸水变圆；+：少数细胞吸水变圆；—：细胞没有明显变形。

The degree of cell deformation by water absorption is indicated by the number of +. +++: all cells become round after absorbing water; ++: some cells become round after absorbing water; +: a few cells become round after absorbing water; —: cells have no obvious deformation.



A~P: 不同浓度蔗糖和AgNO<sub>3</sub>处理。

A-P: treatment of different concentrations of sucrose and AgNO<sub>3</sub>.

图4 不同浓度AgNO<sub>3</sub>处理后对盘基网柄菌AX<sub>2</sub>细胞抗低渗(ddH<sub>2</sub>O)的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of AgNO<sub>3</sub> on the hypotonic (ddH<sub>2</sub>O) resistance of *Dictyostelium discoideum* AX<sub>2</sub> cells

功能,引导学生特别关注兔红细胞和盘基网柄菌对纯水的反应差异:兔红细胞在纯水中34 s就吸水涨破,完全溶血;而盘基网柄菌则可以在纯水中长时间安然无恙,甚至可以由于饥饿诱导发生细胞聚集(4 h),直到发育到多细胞孢子堆(8 h)阶段。这一实验现象可作为探讨细胞膜功能蛋白——水孔蛋白的良好切入点。

水是所有活细胞的主要组成部分,有效调节水的稳态(即渗透压的稳定),无论对多细胞生物还是对单细胞生物的许多生命过程都至关重要。水孔蛋白是存在于细胞膜的古老蛋白家族,从古细菌到哺乳动物的所有生物中都有该家族成员的分布<sup>[6]</sup>。

在单细胞和多细胞生物中,人们已经发现了水孔蛋白的许多亚型,它们通过翻译后的差异加工和修饰,实现精细的组织特异性的渗透调节<sup>[7]</sup>。水孔蛋

白有六个跨膜螺旋,通常形成四聚体,每个单体有一个单独的水孔,可以选择性地允许水或其他一些不带电的小分子沿着渗透梯度通过<sup>[8-9]</sup>,对于调节细胞渗透压有极为重要的作用。

现已发现许多水孔蛋白的抑制剂,其中AgNO<sub>3</sub>是最常用的一种<sup>[10]</sup>。

通过实验三的结果分析得知,10 μmol/L的AgNO<sub>3</sub>处理兔红细胞,可以影响其吸水膨胀和失水皱缩,那么盘基网柄菌细胞又会有什么反应呢?以这个问题为引导,教师可帮助学生设计实验,用不同浓度梯度的AgNO<sub>3</sub>处理盘基网柄菌AX<sub>2</sub>细胞,发现当AgNO<sub>3</sub>浓度≥3 μmol/L时,AX<sub>2</sub>细胞在2 min内吸水膨胀,直至脱壁破裂,其水孔蛋白抵抗低渗的功能明显被抑制;当AgNO<sub>3</sub>浓度≤2 μmol/L时,随着浓度下降,细胞吸水变圆的时间逐渐延长,因此可以引导学生思考

分析AgNO<sub>3</sub>对盘基网柄菌水孔蛋白的抑制作用具有剂量效应,而兔红细胞与盘基网柄菌对AgNO<sub>3</sub>的浓度敏感性的差异,可能与其水孔蛋白分属不同亚型相关。

更进一步,要求学生查询相关资料、合作学习,启发学生思考、探讨“为什么同为真核细胞,兔红细胞在低渗环境中如此脆弱,而盘基网柄菌为何对水有如此巨大的抗性?除了水孔蛋白的作用,还有什么因素?这与其对生活环境的适应有什么关系?”等。

膜蛋白是细胞膜的重要功能执行者,在跨膜运输、信号转导、能量转换等过程中,各种特定功能蛋白承担了运输载体、信号受体、能量转换等功能。如何选择适当的实验材料,设计相对简单的实验过程,让学生直观地了解、认识、接受课堂理论教学中的基本概念和基础理论,一直是细胞生物学实验教学中的难点。生物技术专业在师范类院校中属于非师范类专业,培养目标对该专业学生的科学研究能力的要求更高,因此我们拟在细胞实验教学中增加综合性、探究性实验来助力培养学生的科研能力。AX<sub>2</sub>细胞的培养技术<sup>[11]</sup>已在前两轮实验教学改革中成功应用<sup>[3]</sup>。通过近年的教学实践<sup>[12]</sup>,我们认为模式生物盘基网柄菌为我们提供了一个良好的选择。

由于盘基网柄菌贴壁生长,形成单层细胞,因此可直接观察,方便在短时间(2~3 min)内捕捉其形态变化;而兔红细胞悬浮于液体中,需加盖玻片、待液体停止流动才能观察拍照,短时间内的细胞形态变化难以捕捉。

更为重要的是,盘基网柄菌分离自温带森林土壤腐殖质,无毒、无致病性,在生物学上是安全的;其最适生长温度22 °C,也可在室温下生长,繁殖快、对培养条件要求不高<sup>[13-14]</sup>。作为一种研究历史悠久的模式生物,盘基网柄菌有专业网站(<http://dicty-base.org/>)提供丰富的文献支持,尤其是其细胞活动(单细胞和多细胞阶段)过程可在倒置显微镜下(培养皿中)观察,具有直观、强烈的视觉刺激效果,特别适宜用于本科教学。

## 参考文献 (References)

- [1] 丁明孝,王喜忠,张传茂,等. 细胞生物学,5版[M],北京:高等教育出版社,2020,54-5.
- [2] 王金发,何炎明,刘兵. 细胞生物学实验教程,2版[M],北京:科学出版社,2011,64-5.
- [3] 高润池,吴雪,倪娟,等. 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[J]. 中国细胞生物学报(GAO R C, WU X, NI J, et al. Preliminary study on the use of *Dictyostelium discoideum* in comprehensive undergraduate laboratory course of cell biology: transformation of lifeact-green fluorescent protein by electroporation [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2020, 42(3): 493-8.
- [4] 邹方东,苏都莫日根,王宏英,等. 细胞生物学实验指南,3版[M]. 北京:高等教育出版社,2020,105-6.
- [5] 吴立柱,曾凡力,侯春燕,等. “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[J]. 中国细胞生物学报(WU L Z, ZENG F L, HOU C Y, et al. The innovative practice of cell membrane permeability experiment in cell biology experimental teaching [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2019, 41(11): 2178-82.
- [6] KRUSE E, UEHLEIN N, KALDENHOFF R. The aquaporins [J]. Genome Biol, 2006, 7: 206.
- [7] VON BÜLOW J, BEITZ E. Number and regulation of protozoan aquaporins reflect environmental complexity [J]. Biol Bull, 2015, 229: 38-46.
- [8] VON BÜLOW J, MÜLLER-LUCKS A, KAI L, et al. Functional characterization of a novel aquaporin from *Dictyostelium discoideum* amoebae implies a unique gating mechanism [J]. J Biological, 2012, 287(10): 7487-94.
- [9] ESTEVA-FONT C, JIN B J, LEE S, et al. Experimental evaluation of proposed small-molecule inhibitors of water channel aquaporin-1 [J]. Mol Pharmacol, 2016, 89: 686-93.
- [10] ABIR-AWAN M, KITCHEN P, BILL R M. Inhibitors of mammalian aquaporin water channels [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 1589.
- [11] EICHINGER L, RIVERO F. *Dictyostelium discoideum* protocols. 2nd ed [M]. London: Springer New York Heidelberg Dordrecht, 2013, 113-4.
- [12] 高润池,吴雪,王晓燕. 基于科研能力培养的分子生物学实验教学改革初探——carA基因是否与盘基网柄菌细胞的趋化运动有关[J]? 中国细胞生物学报(GAO R C, WU X, WANG X Y. Reform of molecular biology experimental teaching for improving scientific research ability: whether carA gene was related to the chemotaxis of *Dictyostelium discoideum* [J]? Chinese Journal of Cell Biology), 2021, 43(4): 797-804.
- [13] BOZZARO S. The past, present and future of *Dictyostelium* as a model system [J]. Int J Dev Biol, 2019, 63: 321-31.
- [14] FEY P, KOWAL A S, GAUDET P, et al. Protocols for growth and development of *Dictyostelium discoideum* [J]. Nat Protoc, 2007, 2(6): 1307-16.