

教学研究

细胞生物学“细胞凝集反应”实验教学
及凝集判断方法的改进探究

周志华 卢果 何勇锦 赵东岳 陈涵冰 李芹*

(福建师范大学, 生命科学学院, 福州 350117)

摘要 该研究对常规本科细胞生物学实验“细胞凝集反应”实验进行综合性扩展, 在“细胞凝集反应”实验中融入糖抑制实验, 帮助学生充分理解和掌握凝集素特性及细胞表面糖基成分; 通过改良实验方法, 用0.4%锥虫蓝对实验中的细胞进行染色后再用倒置显微镜观察, 可以准确判断细胞凝集的起始浓度; 优化凝集程度判断方法, 采用细胞连接与细胞分散程度比例两个指标来共同判定细胞凝集程度, 可更准确分析实验结果; 通过改进授课方式, 将社会热点问题和思政元素引入课堂, 学生自主学习兴趣得到充分提升。该实验经以上4个方面改进探究, 学生能更直观观察到在凝集素作用下细胞间的黏连现象, 在合理准确分析实验结果的基础上加深理解凝集素对糖位点的特异性结合和细胞质膜上糖基的种类及功能, 培养学生独立发现问题及分析解决问题的能力, 提升实验教学效果。0.4%锥虫蓝染色镜检法和细胞凝集程度判断法为今后本科实验教学和科研工作者直观观察细胞凝集现象及差异性提供更便捷的方法, 也为精准判断凝集素在低浓度下对细胞凝集的起始浓度界定提供可循依据和创新方向。

关键词 细胞生物学实验; 教学改革; 糖配体; 凝集判断

The Improvement of Cell Biology “Cell Agglutination Reaction” Experiment
Teaching and Agglutination Judgment Method

ZHOU Zhihua, LU Guo, HE Yongjin, ZHAO Dongyue, CHEN Hanbing, LI Qin*

(College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

Abstract In this study, the conventional undergraduate cell biology experiment “cell agglutination reaction” experiment was comprehensively expanded, and sugar inhibition experiment was incorporated into the “cell agglutination reaction” experiment to help students fully understand and master the characteristics of lectin and the glycobase components on the cell surface. By improving the experimental method, 0.4% Trypan blue was used to stain the cells in the experiment and then observed with an inverted microscope, the initial concentration of cell agglutination could be accurately determined. the method of judging the degree of agglutination was optimized, and the proportion of cell junction and cell dispersion was used to determine the degree of cell agglutination, which

收稿日期: 2023-08-01 接受日期: 2023-10-19

教育部产学合作协同育人项目(批准号: 220604092010230)和福建师范大学本科教育教学改革研究项目(批准号: I202201112)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15695900365, E-mail: liqin@fjnu.edu.cn

Received: August 1, 2023 Accepted: October 19, 2023

This work was supported by the Industry-University Cooperative Education Project of the Ministry of Education (Grant No.220604092010230) and the Undergraduate Education and Teaching Reform Research Project of Fujian Normal University (Grant No.I202201112)

*Corresponding author. Tel: +86-15695900365, E-mail: liqin@fjnu.edu.cn

could analyze the experimental results more accurately. By improving the teaching method, the hot social issues and ideological and political elements can be organically introduced into the classroom, and the students' interest in independent learning can be fully enhanced. Through the improvement and exploration of the above four aspects, students can more directly observe the adhesion phenomenon between cells under the action of lectins, and further understand the specific binding of lectins to sugar sites and the types and functions of sugar groups on the cell plasma membrane on the basis of reasonable and accurate analysis of the experimental results. Cultivate students' ability to discover and solve problems independently, and improve the experimental teaching effect. 0.4% Trypan Blue staining microscopy method and cell agglutination degree judgment method provide a more convenient method for undergraduate experimental teaching and research workers to visually observe the phenomenon and difference of cell agglutination in the future, and also provide a basis and innovative direction for accurately judging the definition of initial concentration of cell agglutination under low concentration of lectin, and also provide a basis and innovative direction for accurately judging the definition of initial concentration of cell agglutination under low concentration of lectin.

Keywords cell biology experiment; teaching reform; glycoligand; agglutination judgment

自然界中存在的单糖及其衍生物达200种,而存在于动物细胞质膜上的糖类主要有7种,即D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、L-岩藻糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰-D-半乳糖胺、唾液酸。真核细胞质膜中的糖类主要分布于细胞膜的外表面,通过共价键同膜脂或膜蛋白相连,即与表层的脂类和蛋白质结合形成糖蛋白和糖脂存在于细胞质膜上。糖蛋白和糖脂分子伸至细胞表面的分枝状寡糖链在质膜表面形成细胞被(又称糖萼)。糖链作为生物信息分子参与细胞几乎所有的生命和疾病过程,起着特异性的识别、介导、调控等信号转导作用。细胞表面糖缀合物糖链结构的改变与癌变、感染等疾病的发生、发展紧密相关^[1]。

因此,在本科细胞生物学实验教学中,细胞膜表面糖链的组成和性质,及其功能重要性是细胞生物学和相关实验教学中十分重要的内容。

1 实验原理

凝集素(lectin)是一类从不同植物的种子和动物的组织中提纯的糖蛋白或结合糖蛋白。它们具有专一的糖识别能力,并能与特定识别的糖链非共价、可逆地结合^[2]。因最早发现其能凝集红细胞,故名凝集素。

在细胞表面,组成细胞膜的糖脂和糖蛋白的糖链绝大多数是裸露在膜外面(非细胞质)一侧。这些特异性的糖链可作为细胞或蛋白质的“标志”或“天线”。如在ABO血型系统中,各种抗原的特异性就决

定于红细胞膜表面的糖蛋白或糖脂中所含有的特征性糖链。

细胞凝集反应的实验原理是凝聚素分子能识别特异的寡糖链并与之特异性结合。一个凝集素至少具有两个糖结合的位点,能同时参与细胞的识别与黏着。因此,可在细胞间形成稳定交叉连接结构,使分散于体系中细胞形成细胞聚集体,即产生细胞凝集现象^[3]。当凝集素与细胞表面特异性糖链结合的位点预先被其相应单糖或寡糖分子特异性占据时,凝集素便不再与细胞表面的凝集素受体结合,从而细胞不再发生凝集。即,加入与凝集素互补的糖分子可以抑制细胞凝集。

基于凝集素的特性,凝集素在细胞生物学领域可作为研究细胞膜结构与功能的特异性探针^[4]。此外,凝集素也广泛应用于含糖高分子的特异性分离纯化等研究、应用领域。在原有的细胞凝集实验中扩展性融入糖抑制实验,可以更好地加深、扩展学生对理论知识及相关应用知识理解和掌握,提升教学效果。

2 教学目的、重点与难点及授课改革措施

2.1 教学目的

常规本科细胞凝集实验,旨在学习凝集素凝集细胞的特性^[5-7],实验操作简单,所涉及的理论知识点较为单一,未涵盖凝聚素具有糖位点结合特异性和专一性等实验内容和知识。因此,首先本实验在常规实验基础上增加糖配体抑制实验,旨在学生通

过实验理解凝集素对糖位点结合的特异性和专一性,进而理解细胞质膜上所含糖基种类及功能。其次,改良实验方法:用0.4%锥虫蓝对实验中的细胞进行染色,再借助倒置显微镜对凝集结果进行观察,学生可通过倒置显微镜更直观地观察到血红细胞在不同凝集素的不同浓度作用下之间的黏连现象及差异性,同时学生在实验过程中实验操作得到更多的锻炼。优化凝集程度判断方法可以帮助学生更准确地分析实验结果。

2.2 教学重点与难点

本实验教学的重点是将糖抑制实验融入细胞凝集基础实验,希望学生通过了解不同凝集素与细胞表面糖位点结合的特异性与专一性,结合细胞生物学^[8]中“细胞质膜的基本成分与功能”这一教学章节,深入理解细胞质膜上所含糖基种类及功能。通过学习掌握本实验操作步骤及正确控制实验操作中会对实验结果产生影响的操作细节。如使用微量移液器进行溶液浓度梯度稀释的正确操作,精确配制不同浓度的糖溶液,以减小实验误差;熟练掌握倒置显微镜的使用。本实验教学的难点是应用显微观察法对不同凝集素在不同浓度作用下的细胞凝集程度及差异性作出准确判断并分析实验结果。

2.3 授课改革措施

为改变实验课授课仅“针对”实验的教学模式,本课程将通过以下改革措施夯实实验教学、升华理论知识教学。将实验教学与理论知识教学相融合,利用扩充实验内容里的资源,教师在传授知识的同时,将社会热点问题引入课堂、有机融入思政元素,充分调动学生的自主学习兴趣,提升教学效果。

实验课前,任课老师通过布置预习任务,让学生收集、查阅资料。每组学生对拟进行的实验提出实验设计设想,挖掘实验中可能出错的操作细节,尝试解释预测的实验结果,以培养学生的科研思维能力。在课上,通过案例教学,介绍凝集素在生命科学研究与应用中的实例,强化知识的应用价值,拓展学生视野。在讲述中融入思政元素,介绍中国科学家在凝集素相关研究领域的贡献,如上海中医药大学中西医结合研究院的科学家2022年发表于欧洲心脏协会会刊 *European Heart Journal* 的研究发现了基于半乳糖凝集素的心血管疾病治疗新策略,该研究为药物研发并应用于临床提供了新方法和新思路。对国内最新研究进展及其研究意义的介绍,

可提升学生的民族自豪感,激发学生的自主学习热情^[9]。在课后,在完成实验报告的过程中,任课老师鼓励学生整合实验结果与理论知识,撰写思考与心得,加深其对理论知识的理解、更好地培养学生的责任感和爱国情怀。

3 实验材料与方法

3.1 实验材料

黄豆粗提液、豌豆粗提液、2%兔子血红细胞悬浮液。

3.1.1 黄豆粗提液 黄豆浸泡10 h,称取150 g浸泡黄豆,按1:1(g/mL)料液比加入PBS缓冲液,用料理机打碎,六层纱布过滤后,以10 000 r/min、4 °C离心5 min,取上清液4 °C冷藏备用。

3.1.2 豌豆粗提液 称取150 g新鲜豌豆,按1:1(g/mL)料液比加入PBS缓冲液,用料理机打碎,六层纱布过滤后,以10 000 r/min、4 °C离心5 min,取上清液4 °C冷藏备用。

3.1.3 2%兔子血红细胞悬浮液制备参照肖义军和张彦定^[5]主编的国家级实验示范中心配套《细胞生物学实验》教材。

3.2 主要仪器、用具及试剂

3.2.1 主要实验仪器、用具 倒置显微镜(XD-202)购自南京江南永新光学有限公司;高速冷冻离心机(CT15RE)购自Hitachi koki.Ltd公司;料理机(BM255)购自美的生活仪器制造有限公司;电子天平(AX124ZH/E)购自奥豪斯仪器(常州)有限公司。各种规格的微量移液器、EP管、96孔微量“U”型血凝板、滴管、烧杯、量筒、六层过滤纱布均购自福州都拜特生物技术有限公司。

3.2.2 主要试剂 PBS缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司;0.171 mol/L NaCl、0.4%锥虫蓝染液购自北京索莱宝科技有限公司;多糖试剂(0.1 mol/L N-乙酰-D-半乳糖胺、0.1 mol/L D-半乳糖、0.1 mol/L α-甲基D-甘露糖苷、0.1 mol/L D-甘露糖、1 mol/L N-乙酰葡萄糖胺、1 mol/L D-甘露糖、1 mol/L N-乙酰-D-半乳糖胺、1 mol/L D-半乳糖、1 mol/L L-岩藻糖、1 mol/L 唾液酸)均购自Macklin公司;1 mol/L葡萄糖购自国药集团化学试剂有限公司(多糖试剂浓度参照马枝秋^[10]、周翔、殷正丰^[11]等的基础上加以改进)。

3.3 实验步骤

黄豆粗提液凝集和抑制血凝实验操作步骤如下

(豌豆粗提液凝集和抑制血凝实验步骤相同)。在96孔板每行1~11孔中加入50 μL 缓冲溶液, 在各行第12孔加入100 μL 缓冲液, 每行第1孔中分别加入一种50 μL 糖配体溶液, 混匀后取50 μL 放入各行第2孔中混匀, 再取50 μL 至第3孔中混匀, 依次进行倍比稀释, 至第10孔混匀后取50 μL 混合液丢弃, 以此类推从而配成 2^{-1} 、 2^{-2} 、 2^{-3} 、 2^{-4} 、 2^{-5} 、 2^{-6} 、 2^{-7} 、 2^{-8} 、 2^{-9} 、 2^{-10} 糖配体液, 然后在各行1~11孔中均加入黄豆粗提液50 μL 混匀, 静置1 h, 接着在各孔中均加入2%兔红细胞悬液50 μL 混匀, 最后在每个孔里加入10 μL 0.4%锥虫蓝染液混匀, 各孔终体积为160 μL 。将96孔板放在实验台上稍振荡后室温静置0.5~1.0 h后观察。每种糖试剂做3个复孔, 取平均值作为该浓度下血凝反应的分值。96孔板1~10孔为糖竞争抑制实验, 11~12孔为凝集反应实验。以每列的第11孔实验结果为糖竞争实验的阳性对照, 以每列的第12孔实验结果为糖竞争实验结果的阴性对照。96孔板溶液加样操作流程见图1。

4 优化凝集程度判断标准及实验结果与分析

4.1 凝集程度判断标准

凝集反应程度判断标准见表1(根据张柏林^[12]、王幸^[13]、张利鑫等^[14]改进)。

4.2 实验结果

依据表1中的凝集反应程度判断标准, 添加不同糖配体对黄豆粗提液和豌豆粗提液凝集兔红细胞能力的影响评价结果分别见表2和表3。

4.3 实验结果分析

本实验分别采用了7种和8种糖配体与黄豆粗提液和豌豆粗提液中的凝集素进行反应, 检测了加入特定糖配体后糖配体与凝集素特异性结合对血凝活性的抑制效果。根据表1和图2A~图2F的凝集度判断标准, 表2展示了向黄豆粗提液中添加不同种类、不同浓度糖配体后对血凝活性产生的影响: 在加入7种的糖配体后, 黄豆粗提液的血凝活性受到了不同程度的抑制。其中, 糖配体N-乙酰-D-半乳糖胺

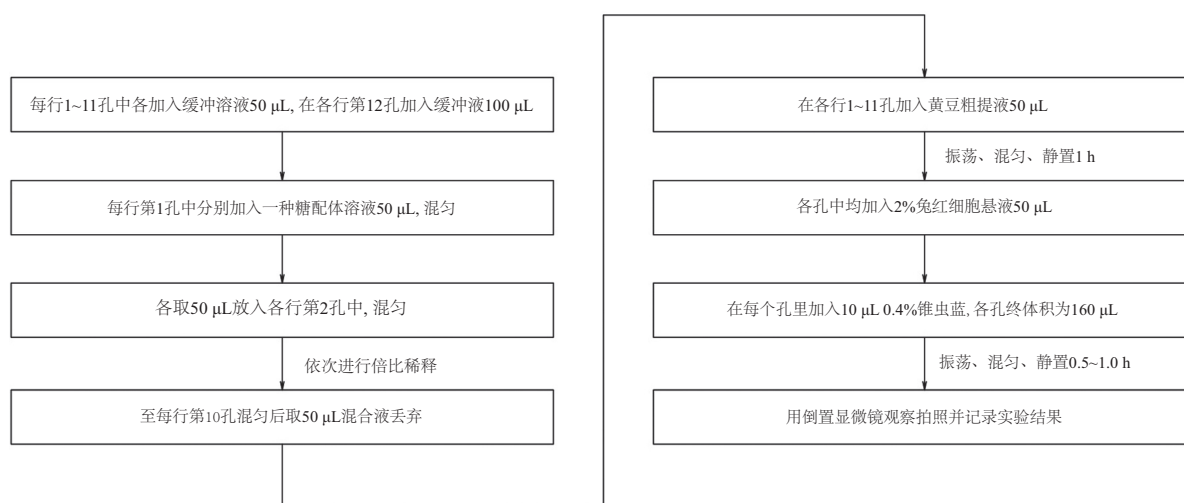


图1 96孔板溶液加样操作流程

Fig.1 96-well plate solution sampling operation flow chart

表1 凝集反应程度判断标准表

Table 1 Criteria for judging the degree of agglutination reaction

凝集反应程度	倒置显微镜镜下所见
-	细胞完全分散, 见图2A
±	开始出现少量细胞相互连接, 1%~10%的细胞连接在一起, 见图2B
+	细胞相互连接量增多, 10%~40%的细胞连接在一起, 见图2C
++	多量细胞连接凝集在一起, 分散细胞减少, 有40%~60%的细胞凝集在一起, 见图2D
+++	细胞连接程度明显变大, 形成团块, 有60%~99%的细胞凝集, 见图2E
++++	各凝块间相连成网, 几乎无分散细胞, 见图2F

表2 黄豆粗提液中分别添加7种不同浓度糖配体对兔红细胞凝集的影响

Table 2 Comparison of the effect of adding seven different concentrations of sugar ligands to soybean crude extract on rabbit red blood cell agglutination

糖配体 Sugar ligands	ρ(糖)倍比稀释 /nmol·L ⁻¹									
	2 ⁻¹	2 ⁻²	2 ⁻³	2 ⁻⁴	2 ⁻⁵	2 ⁻⁶	2 ⁻⁷	2 ⁻⁸	2 ⁻⁹	2 ⁻¹⁰
0.1 mol/L <i>N</i> -乙酰-D-半乳糖胺	-	-	-	-	-	-	±	++	+++	++++
	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098
0.1 mol/L D-半乳糖	-	-	±	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098
1 mol/L D-葡萄糖	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	500	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	1.95	0.98
1 mol/L <i>N</i> -乙酰葡萄糖胺	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	500	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	1.95	0.98
1 mol/L D-甘露糖	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	500	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	1.95	0.98
1 mol/L L-岩藻糖	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	500	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	1.95	0.98
1 mol/L 唾液酸	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	500	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	1.95	0.98

表3 豌豆粗提液中分别添加8种不同浓度糖配体对兔红细胞凝集的影响

Table 3 The effect of adding eight different concentrations of sugar ligands to pea crude extract on rabbit red blood cell agglutination

糖配体 Sugar ligands	ρ(糖)倍比稀释 /nmol·L ⁻¹									
	2 ⁻¹	2 ⁻²	2 ⁻³	2 ⁻⁴	2 ⁻⁵	2 ⁻⁶	2 ⁻⁷	2 ⁻⁸	2 ⁻⁹	2 ⁻¹⁰
0.1 mol/L α-甲基-D-甘露糖苷	-	-	-	-	-	-	±	+	++	++++
	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098
0.1 mol/L D-甘露糖	-	-	-	-	±	++	+++	++++	++++	++++
	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098
0.1 mol/L D-葡萄糖	-	-	-	±	+	++	+++	++++	++++	++++
	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098
0.1 mol/L <i>N</i> -乙酰葡萄糖胺	-	-	±	++	++	++++	++++	++++	+++	++++
	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195	0.098
1 mol/L D-半乳糖	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	500	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	1.95	0.98
1 mol/L <i>N</i> -乙酰-D-半乳糖胺	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	1.95	0.98
1 mol/L L-岩藻糖	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	1.95	0.98
1 mol/L 唾液酸	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	1.95	0.98

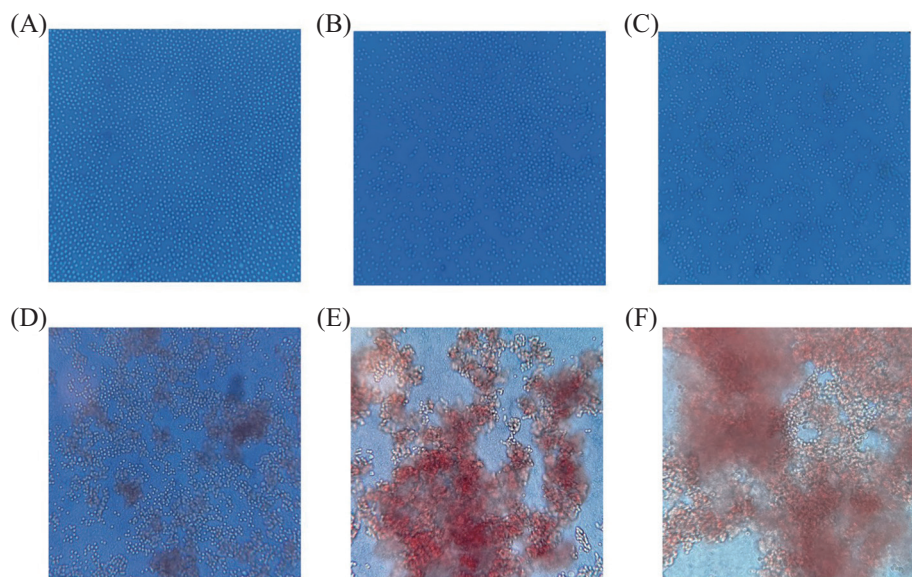
对黄豆粗提液的血凝活性抑制效果最为明显, 表明 *N*-乙酰-D-半乳糖胺对黄豆粗提液中凝集素的特异性结合能力较其他6种糖配体高, 结果与已有文献报道的研究结果相似^[13-14]。该实验结果提示: 兔红细胞膜糖蛋白或糖脂糖链上含有 *N*-乙酰-D-半乳糖胺组分, 当 *N*-乙酰-D-半乳糖胺浓度为0.78 nmol/L时即可使血凝活性受到抑制; 而甘露糖、岩藻糖、D-乙酰葡萄糖对黄豆粗提液中凝集素的血凝活性影响并

不显著, 在高达500 nmol/L的浓度下, 这3种糖配体仍未产生明显的血凝活性抑制效果。图3A、图3B, 图4A~图4E分别展示了黄豆粗提液对血红细胞的正常凝结效果和黄豆粗提液中加入不同浓度的 *N*-乙酰-D-半乳糖胺后对兔红细胞凝集产生的抑制效果。图5展示了在黄豆粗提液中加入不同浓度的D-半乳糖后对兔红细胞凝集产生的抑制效果。图6展示了在黄豆粗提液中加入不同浓度的D-葡萄糖、*N*-乙酰

葡萄糖胺、D-甘露糖、L-岩藻糖、唾液酸后对兔红细胞凝集产生的抑制效果。

表3展示了向豌豆粗提液中加入甘露糖等8种糖配体后,原豌豆粗提液对兔红细胞的血凝活性受到不同程度的抑制。其中,糖配体 α -甲基-D-甘露糖

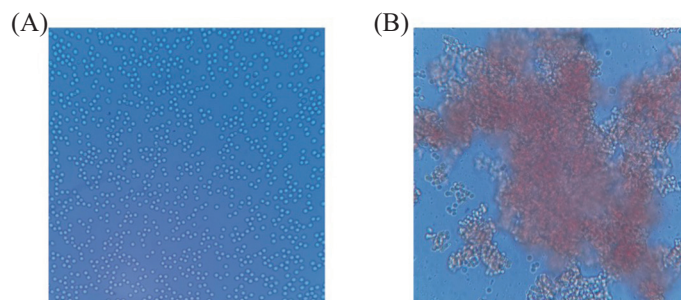
苷在浓度为0.78 nmol/L时便开始对血凝活性产生抑制效果。而D-半乳糖、L-岩藻糖、N-乙酰-D-半乳糖胺、唾液酸在500 nmol/L的浓度下对血凝活性的抑制效果也不显著。在高达500 nmol/L的浓度下,这4种糖配体仍未产生明显的血凝活性抑制效果。通



A: -; B: $\pm$; C: +; D: ++; E: +++; F: ++++.

图2 不同细胞凝集程度代表图

Fig.2 Representative graphs of different cell agglutination degrees

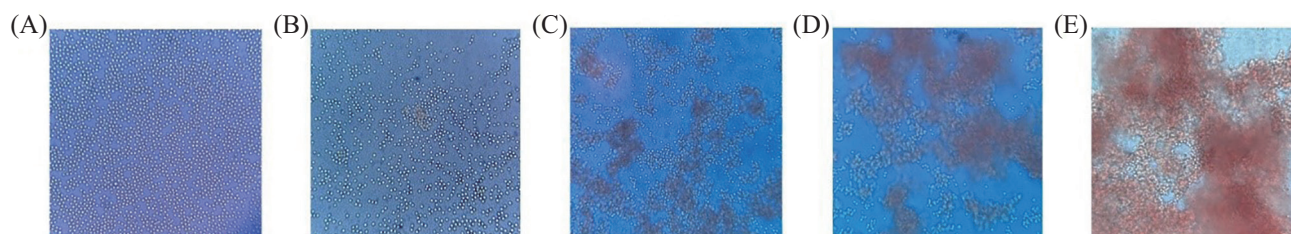


PBS缓冲液(A)和黄豆粗提液(B)对兔红细胞的凝集效果。

The agglutination effect of PBS buffer (A) and soybean crude extract (B) on rabbit red blood cells, respectively.

图3 PBS缓冲液(对照组)与黄豆粗提液对兔红细胞的凝集效果代表图

Fig.3 The agglutination effect of PBS buffer (control group) and soybean crude extract on rabbit red blood cells



A: 1.56 nmol/L; B: 0.78 nmol/L; C: 0.39 nmol/L; D: 0.195 nmol/L; E: 0.098 nmol/L.

图4 不同浓度N-乙酰-D-半乳糖胺细胞凝集程度代表图

Fig.4 Cell agglutination degree of N-acetyl-D-galactosamine at different concentrations

过以上结果对比这8种糖配体添加至豌豆粗提液后对兔红细胞凝集的抑制效果差异, 表明 α -甲基-D-甘露糖苷对豌豆粗提液中凝集素的特异性结合能力较其他7种糖配体高, 结果与文献报道研究结果相似^[11]。此实验结果提示: 兔红细胞膜糖蛋白或糖脂糖链上含有 α -甲基-D-甘露糖苷成分。

传统的凝集程度判定方法基本以细胞沉积相对大小进行判定, 如马秋枝^[10]、杨明亮等^[3]采用的方法对观察高浓度凝集素的凝集结果判定方便快捷。

但在低浓度凝集素的凝集效果判定中, 以细胞沉积相对大小进行判定临界浓度可能会造成一定误差, 同时用普通显微镜观察细胞间的黏连现象, 效果不直观。本实验用0.4%锥虫蓝对凝集过程进行染色并用倒置显微镜观察凝集现象, 学生可通过倒置显微镜在40倍物镜下直观、清晰地观察到低浓度凝集素作用下血红细胞的黏连情况, 精确区分细胞凝集的临界浓度。如图7A、图7B、图7C三个图展示了N-乙酰-D-半乳糖胺浓度0.78 nmol/L与黄豆粗提液中

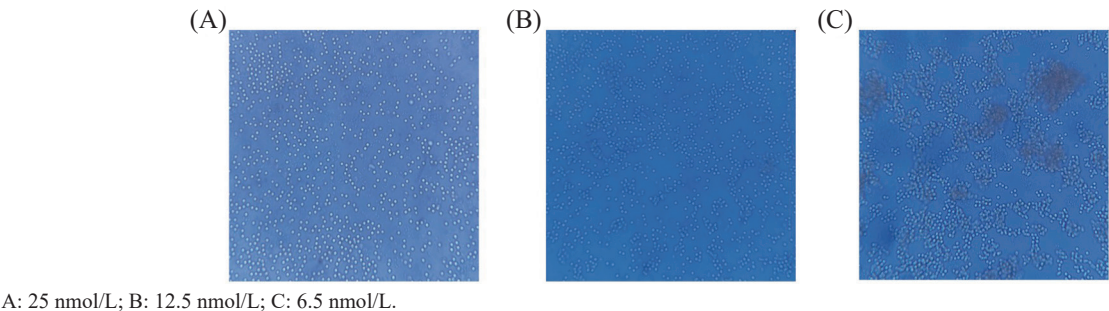


图5 不同浓度D-半乳糖细胞凝集程度代表图

Fig.5 Represents the agglutination degree of D-galactose cells at different concentrations

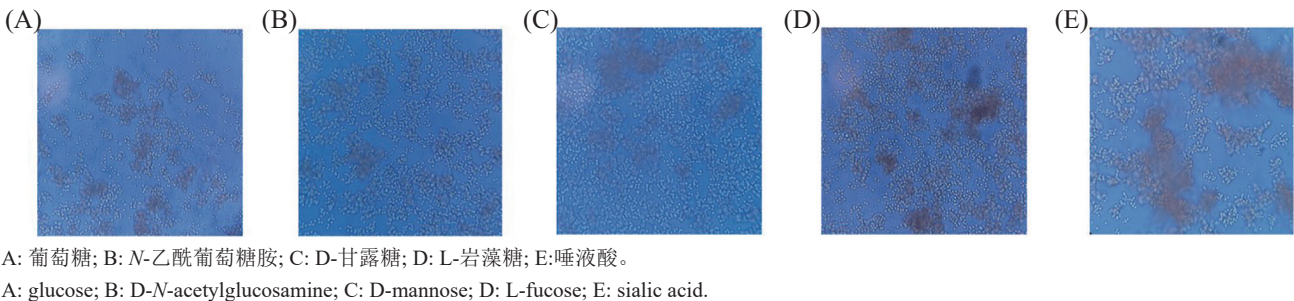


图6 500 nmol/L浓度(葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺、D-甘露糖、L-岩藻糖、唾液酸)糖配体细胞凝集程度代表图

Fig.6 Representation of agglutination degree of glycosylated cells at 500 nmol/L concentration (glucose, D-N-acetylglucosamine, D-mannose, L-fucose, sialic acid)

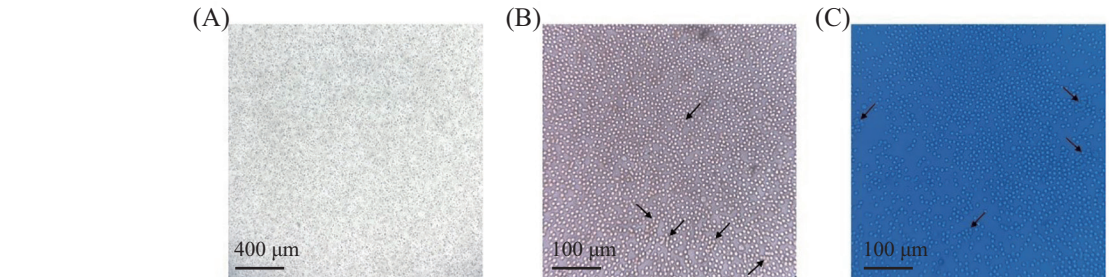


图7 不同方法比较观察细胞凝集效果代表图

Fig.7 Comparison of different methods to observe the effect of cell agglutination

的凝集素结合时,血凝活性抑制能力下降,血红细胞开始出现凝集。图7A为光学显微镜在10倍物镜下观察到的凝集结果,图7B为倒置显微镜在40倍物镜下没有染色观察到的凝集结果,图7C为用0.4%锥虫蓝染色后在倒置显微镜40倍物镜下观察到的凝集结果。从图7A、图7B、图7C三个图对比可以看出图7A很难观察到凝集现象,图7B有箭头所指可以看到细胞开始出现凝集现象,但是观察费力,不直观;而图7C可以很直观地观察到低浓度N-乙酰-D-半乳糖胺抑制能力下降时细胞开始黏连的现象。以上实验结果说明,采用0.4%锥虫蓝染色镜检法更利于学生直观观察到细胞黏连现象及凝集结果的差异性,更精准地判断出临界的凝集起始浓度,获得准确的实验结果。

5 讨论

本工作通过对实验内容的增设,即在原实验教学内容——“细胞凝集实验”基础上增加糖抑制实验来进一步提高学生对原有教学内容理解的广度和深度,也通过糖抑制实验的增设提高了学生实验操作的熟练和准确度。在改革过程中,通过使用不同种类、不同浓度的糖配体去竞争结合凝集素中与细胞表面糖基特异性结合的位点,考查是否对细胞凝集结果产生影响,可以让学生深入了解细胞表面糖基种类、含量的差异。在教学过程中,教师辅以启发性教学法,与学生探讨细胞表面糖蛋白糖链种类、含量差异的生物学意义,可更好地开启学生的发散性思维,使学生对科学研究产生浓厚的兴趣。

从教学效果层面分析,本实验改革实施后,从学生实验所获得实验结果代表图3可知,学生对改革后的实验操作掌握良好,0.4%锥虫蓝染色镜检方法可以清晰明确地判定细胞凝集现象是否发生,且通过该改良方法对结果进行分析判定,不同小组间实验结果重复性良好。

在本研究中,学生在改革增设的糖抑制实验中也取得了良好的、重复性高的实验结果,教学改革效果良好。如学生获得的实验结果图3、图4、图5、图6所展示,不同糖配体和不同浓度的糖配体对凝集素产生的细胞凝集效果差异影响显著,且0.4%锥虫蓝染色镜检法在低浓度糖配体对细胞凝集效果影响的判断中起到了高度识别的作用。该实验结果让学生更深入理解细胞表面糖基种类多样性、糖蛋白含

量之间存在差异。以所得到的实验现象、结果作为探讨细胞膜糖成分的切入点^[15]将凝集素的特性和细胞膜糖成分与生物学功能、相关领域的研究进展、我国科学家在该领域的工作串联到实验教学中,可使实验教学立足于实验又高于实验,真正做到实验教学的理论联系实际,提升学生的科研思维,增强学生的社会责任感。同时,思政元素的有机融入,更是增强了学生的民族自豪感与自主学习热情,将整体的教学效果推进到一个新的高度。

本实验改革可根据实验教学过程中学生分组及教学大纲课时安排的具体情况,老师准备好实验材料进行糖抑制实验,也可让学生根据自己日常生活中的经验或查阅文献资料,灵活地选择自己感兴趣的实验材料进行糖抑制实验。在实验课前,教师通过布置预习任务、布置文献资料查阅,让学生对拟进行的实验提出实验设计设想。学生通过资料检索、实验操作、结果分析等过程全面了解细胞膜质膜上的糖分子种类及功能。这一实验教学模式能够充分调动学生参与实验的积极性,提高学生创新实践能力。

6 总结

凝集素的本质是糖蛋白,其对特定的寡糖或其衍生物具有特异的结合特性。这种特性,即本实验需要学生掌握的实验原理在机体生理活动、科研、生产中多具有非常重要的作用。因此,本实验首先以此细胞生物学基础理论知识为基础,拓展性地在原细胞凝集教学实验中增加糖抑制实验。学生在实验中验证和比较了不同凝集素在不同浓度下对血红细胞凝集的影响和效果,并对实验结果进行分析,这对学生了解凝集素的特性、深刻理解细胞表面糖基种类及功能很有帮助,这个拓展实验非常适用于本科实验教学。教师在授课过程中,充分利用扩充实验内容里的资源,将社会热点问题引入课堂、有机融入思政元素,以调动学生自主学习的兴趣,培养学生的科学精神和爱国情怀^[16]。其次采用0.4%锥虫蓝染色镜检法和优化凝集反应程度判断标准,为本科生和科研工作者直观观察细胞凝聚现象提供更便捷的方法,同时,为精准判断凝集素在低浓度下对血红细胞凝集的起始浓度界定提供可循依据和创新方向。

参考文献 (References)

- [1] 徐晓强,郭佳,关锋.胞外囊泡表面糖缀合物研究进展[J].生

- 物化学与生物物理进展(XU X Q, GUO J, GUAN F. Research progress of extracellular vesicle surface glycoconjugates [J]. *Advances in Biochemistry and Biophysics*), 2017, 44(10): 857-64.
- [2] 孙册. 谈谈凝集素作用的基本原理和糖蛋白的寡糖结构[J]. 生命的化学(SUN C. Discuss the basic principle of lectin action and oligosaccharide structure of glycoprotein [J]. *Chemistry of Life*), 1994, 14(2): 36-7.
- [3] 杨明亮, 李宁, 李海燕, 等. 大豆凝集素(SBA)含量遗传分析与QTL定位[J]. 东北农业大学学报(YANG M L, LI N, LI H Y, et al. Genetic analysis and QTL mapping of SBA (soybean lectin) content [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*), 2017, 48(5): 9-20.
- [4] 王钰清, 邢雪聪, 柴许然, 等. 植物凝集素的生物学功能与应用[J]. 广西科学(WANG Y Q, XING X C, CHAI X R, et al. Biological function and application of plant lectins [J]. *Guangxi Science*), 2020, 27(1): 27-39.
- [5] 肖义军, 张彦定. 细胞生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [6] 余光辉. 图解细胞生物学实验教程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013.
- [7] 赵自国, 王彦美. 细胞生物学实验教程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2020.
- [8] 丁明孝, 王喜忠, 张传茂, 等. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2020.
- [9] YU F C, WANG R F, YUN B Z, et al. Galectin 3 enhances platelet aggregation and thrombosis via Dectin-1 activation: a translational study [J]. *European Heart Journal*, 2022, 43(37): 3556-74.
- [10] 马秋枝. 大豆凝集素糖配体的筛选及其对体内结合率的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [11] 周翔, 殷正丰. 豌豆凝集素的分离纯化及性质鉴定[J]. 第二军医大学学报(ZHOU X, YIN Z F. Isolation, purification and characterization of pea lectin [J]. *Journal of the Second Military Medical University*), 1990, 11(6): 551-3.
- [12] 张柏林, 刘宁, 王双双, 等. 大豆凝集素纯化及凝集活性测定的研究[J]. 江苏农业科学(ZHANG B L, LIU N, WANG S S, et al. Study on purification and determination of agglutinin activity of soybean [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*), 2019, 47(12): 221-4.
- [13] 王幸, 马秋枝, 刘强. 大豆凝集素的分离纯化和血凝活性研究[J]. 家畜生态学报(WANG X, MA Q Z, LIU Q. Isolation, purification and hemagglutination activity of soybean lectin [J]. *Chinese Journal of Animal Ecology*), 2006, 6(27): 57-60.
- [14] 张利鑫. 大豆凝集素的凝集活性及其抗营养活性消除的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [15] 王晓燕, 蒋锐达, 高润池. 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[J]. 中国细胞生物学学报(WANG X Y, JIANG R D, GAO R C. Application of *Dictyostelium discoideum* in the exploratory experimental teaching of “Cell membrane functional proteins” at undergraduate level [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2022, 44(3): 443-50.
- [16] 李翡翠, 杨宁, 王玮, 等. 细胞生物学中融入课程思政的思考[J]. 中国细胞生物学学报(LI F F, YANG N, WANG W, et al. Thinking on integrating curriculum thinking and politics into cell biology [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2022, 44(12): 2287-93.