

科教融合视角下的 EV 综合实验教学设计

邓载安*, 吴明周

深圳技术大学健康与环境工程学院 广东 深圳 518118

[摘要]细胞外囊泡 (Extracellular Vesicles, EV) 在疾病诊疗相关的科研和产业中备受关注。然而, 现有本科实验教材中对 EV 及其纯化的介绍很少涉及。本实验设计中, 我们结合科研经历和本科教学要求, 设计了一个综合性实验。实验内容涵盖文献调研、富含 EV 的样本准备, 分离装置的构建与使用及 EV 鉴定等多个环节。通过本实验的实践, 学生能够建立扎实的 EV 相关基础知识和实验技术体系, 更重要的是, 通过实际操作来培养科研素养, 为今后从事相关的科研和职业工作打下坚实的基础。

[关键词]科教融合; 教学实验; EV; 纳滤分离

[中图分类号]Q592.4 **[文献标识码]**A **[文章编号]**1687-9534(2025)-0068-12 **[收稿日期]**2025-10-27

本科实验教学是高校教育教学改革的一个重要内容和方向^[1], 它不仅有助于增强学生的动手能力和实践技能, 还促进学生的理论知识与实践结合, 能培养学生创新思维和科研素养。重视本科实验教学是培养全面发展人才的关键。许多高校采取多种措施提高本科实验教学质量^[2-3], 如加大实验教学资源、更新课程内容和形式来确保学生获得更加前沿和适用的知识体系和实验技能。开展科教融合相关的实验是提升本科教育质量及培养创新人才的重要途径。高校教师结合自身的科研经历和教学要求可以设计出更具创新性和前瞻性的实验课程, 这为学生接触最新的研究内容和技术提供了重要机会。

细胞外囊泡 (Extracellular Vesicles, EV) 是细胞分泌的纳米级囊泡。由于其具备磷脂双分子层结构, EV 携带的生物分子具有高度稳定性, 被视为液体活检的重要研究对象。

研究表明 EV 应用于多种疾病的早期检测、预后评估和疗效监测等^[4]。美国国家药品监督管理局和中国国家药品监督管理局各自于 2019 和 2024 年批准了基于 EV 的体外诊断产品。鉴于 EV 广泛应用前景, 可在本科教学中对其进行介绍。然而, EV 在现有本科教学教材中很少被提及。

我们开发了多种 EV 相关的分离技术和生物标志物^[5-7]。为了将这一新的体外诊断理念和技术引入教学中, 我们设计了一个以 EV 纳滤分离及鉴定为主题的综合实验。通过该实验设计的实施, 学生对 EV 及其在疾病诊疗中的应用将会有更深入的认识。

一、实验设计

(一) 实验目的

(1) 掌握 EV 纳滤分离及鉴定方法。

(2) 理解 EV 的蛋白表达与其母细胞的蛋白表达的关联。

(3) 了解 EV 产业应用方向及价值。

(二) 实验原理

纳滤是通过半透膜实现分子分离的物理过程, 利用特定孔径的滤膜对液体样品进行处理。纳滤膜的孔径决定了能够通过膜的分子或颗粒的大小。样本中不同尺寸的分子和颗粒会被有效分离: 较大的颗粒 (如 EV) 会被滤膜截留, 而较小的分子或颗粒 (如游离蛋白质、代谢物等) 则可以顺利通过膜孔。EV 一般在 30-150 nm 之间, 因此, 选择孔径 20-50 nm 的滤膜, 可以有效截留 EV, 去除样本中小颗粒的杂质, 从而实现其纯化。

纳米颗粒跟踪分析法可以用来测量样本中纳米颗粒的尺寸和浓度; 免疫印迹法则通过抗原-抗体结合检测 EV 蛋白标志物的表达。本实验设计采用这两种方法来评估分离后 EV 的特征。

(三) 主要试剂与仪器

乳腺癌细胞系: MCF7 和 SKBR3, 细胞培养基, PBS 缓冲液, 纳米滤膜 (滤孔 20-50 nm, 直径 13 mm), 胶水, 亚克力环 (内径 9 mm, 外径 14 mm, 厚度 3 mm), 10 mL 注射器针筒, 真空泵, CD9 抗体, HER2 抗体, 超净工作台, 细胞培养箱, 蛋白电泳仪, 蛋白转膜仪, 离心机, 纳米颗粒跟踪分析仪, 自动化学发光成像分析仪。

(四) 实验内容

1. EV 纳滤分离装置的搭建

首先在两个亚克力圆环单侧面涂抹胶水, 将纳米滤膜粘在两者之间, 组装成纳滤环。

待胶水干燥后, 取下注射器的推杆, 将纳滤环装入注射器的一端, 向下推动使纳滤环上方留出约 1 mL 空间。接着将注射器针头部分与真空泵管道连接, 即得到 EV 纳滤分离装置。

2. 乳腺癌细胞培养

将液氮中冻存的 MCF7 和 SKBR3 细胞系放入 37 °C 水浴锅中快速解冻, 离心去除冻存液后接种至 10 cm 培养皿中, 置于培养箱内培养, 根据细胞生长情况及时更换培养基和传代。待细胞覆盖率达到 80 % 时, 换用无血清培养基, 继续培养 24 小时后收集细胞培养液和细胞。收集的样本可保存在 -80 °C 冰箱直至使用。

3. 差速离心处理细胞培养液

将收集细胞培养液依次进行 5 分钟 300 g, 15 分钟 2000 g, 和 30 分钟 10000g 离心, 以去除死细胞、大的细胞碎片及囊泡等, 得到的上清用于 EV 的分离。

4. EV 的纳滤分离

将真空泵最大真空度设置为 -60 KPa, 用移液枪将细胞培养液加到纳滤膜上。启动真空泵, 开始纳滤分离。纳滤过程中及时补充培养液; 待 5 mL 培养液纳滤结束后, 用 3 mL PBS 清洗截留的 EV; 最后用 500 μ L PBS 重悬滤膜上的 EV, 即得到 EV 重悬液。

5. EV 的鉴定

(1) 纳米颗粒跟踪分析仪分析 EV 的尺寸: 使用经过校准的纳米颗粒跟踪分析仪对未经纯化的细胞培养液上清和 EV 悬液中的

囊泡进行定量分析, 计算纯化回收率。

(2) 免疫印迹检法测 EV 蛋白标志物: 取 20 μL EV 重悬液和 10 μg 的细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 经过转膜、封闭、抗体孵育等步骤, 最后在膜上滴加显色液, 利用化学发光成像系统采集图像, 分析 CD9 和 HER2 蛋白在 MCF7、SKBR3 细胞和 EV 中的表达特性。

二、实验安排

本实验为综合性实验, 适合具有一定生物化学、细胞生物学及免疫检测技术基础的本科生。根据我校的学生培养方案, 该实验适合在大三下学期的《体外诊断产业技术》课程中开设, 实验总学时为 18 学时, 具体安排如下:

(一) 背景知识调研 (4 学时)

学生以 2-3 人为一组进行相关知识背景的调研。内容包括: EV 的种类、起源、在疾病诊疗中的最新研究进展和应用前景; EV 的分离方法及其优缺点; EV 的鉴定方法。教师指导学生学习和复习相关实验技能, 包括: 免疫印迹技术、细胞培养技术、离心机的使用、纳米颗粒跟踪分析仪的操作等。这些工作将为学生的实践操作做好充分准备。

(二) 课中实践 (12 学时)

在实验实践中, 教师引导学生按照实验步骤完成各项操作, 并要求学生做好过程及数据的记录。本实验过程包括以下四个主要环节: (1) 细胞及培养液的收集 (3 学时): 由于细胞培养的过程较为繁琐、不可控因素

多, 各组学生可自行安排实验进度。教师在此过程中应密切关注各种细胞培养情况并提供实时建议; (2) EV 分离装置的组装 (3 学时): 教师集中指导学生组装分离装置, 确保纳滤环膜完好、胶水使用适量等。(3) EV 的分离 (2 学时): 教师提醒学生应特别注意压力控制, 防止滤膜损坏、及时添加培养液等; (4) EV 的鉴定 (4 学时): 教师加强 EV 的形态、浓度及其标志物的检测原理和相关仪器操作的教学, 确保学生能准确理解并掌握 EV 的鉴定方法及测试解读的结果。

(三) 课后考核 (2 学时)

课后考核包括检查实验记录, 工作汇报和实验论文三个部分。学生先按小组提交实验记录, 教师特别考查各组实验步骤、结果观察、数据记录等内容, 确保能够反映整个实验过程。在实验课结束一周内, 组织学生按组进行研究汇报, 重点考察学生实验内容的掌握程度、数据解读的正确性以及实验原理的理解。汇报过程中, 学生互相提问与评价, 教师对汇报内容进行总评。汇报工作结束后的一周内, 每个学生独立完成实验论文。教师重点考察论文的逻辑、数据的准确性、排版及语言表达的规范性等。

三、实验设计讨论

各个教学单位可根据教学目的和实验条件对该实验设计内容进行调整以确保实验顺利进行, 并实现不同的教学目。

（一）生物样本选择

本实验设计中选用了两种乳腺癌细胞系：MCF7 和 SKBR3。研究表明这两种细胞系分别为 HER2 阴性和阳性的细胞系^[8]。我们通过同时检测细胞和 EV 的 HER2 表达特征来验证 EV 蛋白能反映母细胞蛋白表达的特征，引导学生思考 EV 的检测如何辅助个体化药物治疗决策。实验也可选择尿液样本来进行，引导学生理解尿液 EV 在无创检测中的潜在应用价值。

（二）EV 分离方法的选择

在本实验设计中，我们采用纳滤技术对细胞培养液中的 EV 进行纯化。教师可根据实际情况选择其他 EV 分离方法，如超速离心法或聚合物沉淀法。教师也可采用多种方法进行平行对比或联用，让学生认识现有 EV 分离方法的多样性与局限性，激发学生探索不同技术的兴趣和创新思维。

（三）EV 鉴定方法的选择

对 EV 的鉴定往往采用三种方法：透射电镜分析，纳米颗粒跟踪分析和蛋白标志物分析^[9]。实验中也可选择 EV 中特定 miRNA 作为靶标，结合分子诊断学技术对纯化的 EV 进行鉴定。本部分，我们建议教师选用至少两种鉴定方法，以培养学生采用多角度验证实验结果的科学严谨性。

此外，以本实验设计为基础，实验指导

教师还进一步拓展实验内容，以满足不同学科的教学目标。如结合标记技术和细胞摄取实验来验证 EV 在信号传递中的作用；结合电转技术和细胞体外实验展示 EV 作为药物载体的可能性等。

四、结语

目前，EV 是科研和产业关注的重要对象。该实验设计提供一个可行的 EV 相关的实验教学方案。实验内容涉及到细胞培养、纯化装置搭建、免疫印迹检测技术等，旨在培养学生的综合能力和科研思维。通过对实验过程的分步指导、集中实验操作教学以及严格的课后考核，学生将在理论和实践两方面获得提升，为其今后从事 EV 相关的科研和职业工作奠定坚实的基础。

基金项目：2023 年度深圳技术大学教学改革研究项目“校企合作模式下的‘体外诊断产业技术’课程建设”（20231027）。

作者简介：邓载安（1983-），男，江西瑞昌人，博士，深圳技术大学健康与环境工程学院，副教授（通讯作者），主要研究方向为生物标志物筛选与检测技术研发；吴明周（1988-），女，山东聊城人，博士，深圳技术大学健康与环境工程学院，高级实验师，主要研究方向为荧光探针构建与生物成像性能评价。

参考文献：

[1]宋敬敬,黄华存,冯家勋. 一流本科实验教学保障体系的研究与构建[J]. 实验技术与管理 2023, 40

(09):1-8.

[2]陈阿娜,叶生梅,汤文晶, et al. 多项并举提高生物化学实验教学质量研究[J]. 广东化工 2022, 49

(09):208-210.

[3]赵玉红,李欣,李登文, et al. 加强实验教学内涵建设提高人才培养质量——以生物化学与分子生物学实验为例[J]. 高校生物学教学研究(电子版) 2022, 12 (04):39-43.

[4]Wang, X.,Tian, L.,Lu, J., et al. Exosomes and cancer - Diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic vehicle[J]. Oncogenesis 2022, 11 (1):54.

[5]Gao, P.,Li, S.,Dong, Z., et al. A plasma-derived exosomal microRNA signature by small RNA sequencing for early detection of postmenopausal osteoporosis[J]. Clinical and Translational Medicine 2024, 14 (4):e1637.

[6]Zhang, Y.,Deng, Z.,Lou, D., et al. High-Efficiency Separation of Extracellular Vesicles from Lipoproteins

in Plasma by Agarose Gel Electrophoresis[J].

Analytical Chemistry 2020, 92 (11):7493-7499.

[7]Deng, Z.,Wang, Y.,Hu, L., et al. A facile, rapid, high-throughput extracellular vesicles analytical platform for cancer detection[J]. Anal Chim Acta 2020, 1138:132-140.

[8]Dai, X.,Cheng, H.,Bai, Z., et al. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping[J]. Journal of Cancer 2017, 8 (16):3131-3141.

[9]Welsh, J. A.,Goberdhan, D. C. I.,O'Driscoll, L., et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches[J]. J Extracell Vesicles 2024, 13 (2):e12404.

Experimental Teaching Design for the Integration of Scientific Research and Teaching: A Case Study of Nano-Filtration Separation and Identification of Extracellular Vesicles

Deng Zaian*, Wu Mingzhou

College of Health Science and Environmental Engineering, Shenzhen Technology University,
Shenzhen 518118

Abstract: Extracellular vesicles have attracted significant attention in both disease diagnostics-related research and industry. However, existing experimental teaching regarding extracellular vesicles and their purification is lacking. This experiment is designed as a comprehensive project that combines the research experience of the instructor with the requirements of undergraduate teaching. The experiment includes several key parts: literature review, collection of culture medium contained extracellular vesicles, construction of a nano-filtration separation device for extracellular vesicles, nano-filtration separation and identification of extracellular vesicles, and more. Through this experiment, students will establish a solid knowledge framework related to extracellular vesicles, but more importantly, they will have the opportunity to cultivate research skills through hands-on experience, laying a strong foundation for their future research and professional careers.

Keywords: Integration of Research and Education; Experimental Teaching; Extracellular
Vesicles; Nano-Filtration Separation