·教学改革·

光遗传学技术及其虚拟仿真实验的脚本设计

吴广延[1]　姚娟[1]　隋建峰[1]　叶建宁[2]
[1]陆军军医大学基础医学院基础医学教学实验中心，重庆　400038；[2]陆军军医大学第二附属医院神经内科，重庆　400037
通信作者：叶建宁，Email：jningye@tom.com

【摘要】 光遗传学实验技术是一种通过联合使用光学技术和遗传工程技术实现对特定细胞功能进行精确干预的变革性研究手段，是近几十年来神经生物学领域最大的突破技术之一。但是该技术涉及多学科交叉的理论知识和方法，而且实验周期长，设备昂贵，除了仿真教学外不便于在本科生实验课堂上广泛开展。在本虚拟仿真实验中，通过仿真病毒包装过程，仿真动物选择、手术及病毒立体定位微注射过程，仿真光敏通道表达情况的观察过程，仿真光敏通道功能在体细胞外的验证过程，仿真光遗传抑制杏仁核谷氨酸能神经元影响动物恐惧行为的观察过程，学习光遗传学技术的基本原理、操作与应用，实验教学效果理想。本文对该虚拟实验的脚本制作内容设计作一探讨。

【关键词】 虚拟仿真实验；　实验教学；　光遗传学；　脚本
【中图分类号】 R33
基金项目：国家自然科学基金面上项目（81571161、81771213）；国家自然科学基金青年项目（31700913）
DOI：10.3760/cma.j.issn.2095-1485.2019.01.012

Study on optogenetics technology and the design of its script for virtual simulation experiment

Wu Guangyan[1], Yao Juan[1], Sui Jianfeng[1], Ye Jianning[2]
[1]Experimental Center of Basic Medicine, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University, Chongqing 400038, China; [2]Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China
Corresponding author: Ye Jianning, Email: jningye@tom.com

【Abstract】 Optogenetics is one of the biggest breakthroughs in neurobiology in recent decades, which is a revolutionary approach to precise intervention of specific cell functions through the combination of optical and genetic engineering techniques. However, this technique involves the interdisciplinary theoretical knowledge and methods, and it requires expensive equipments and long experimental period. Thus, it is not convenient to carry out widely in experiment teaching for undergraduates except the virtual simulation teaching. In present virtual simulation experiment, we aim to learn the basic principle, operation and application of optogenetics and achieve the desired teaching effects by simulating the process of the virus package, simulating the process of the animal selection, surgery and virus stereotactic microinjection, simulating the expression process of photosensitive channel, the extracellular verification process of photosensitive channel function in vivo, and simulating the observation process that optogenetic inhibition of glutamate neurons in the amygdala affect animal fear behavior. In this paper, the content design of the script making of the virtual experiment has been discussed in the above ways.

【Key words】 Virtual simulation experiment;　Experimental teaching;　Optogenetics;　Script
Fund program: National Natural Science Foundation of China (81571161, 81771213); National Natural Science Foundation Youth Project (31700913)
DOI：10.3760/cma.j.issn.2095-1485.2019.01.012

光遗传学实验技术是一种通过联合使用光学技术和重组 DNA 技术实现对特定细胞或分子功能进行精确干预的变革性研究手段,具有高度的时间特异性和空间分辨率,是近几十年来神经生物学领域最大的突破技术之一[1-4]。虽然该技术的出现和推广已逾十年,但目前国内医学院校关于光遗传学实验技术原理及应用的课程教学远没跟上快速发展的神经科学研究的大趋势。其原因主要是光遗传学实验涉及交叉学科技术,成本高,周期长,设备昂贵,除了仿真教学外不便于在本科生实验课堂上广泛开展。鉴于光遗传学实验技术对于多学科领域研究和应用的重要性[5-7],本研究近期以动物恐惧反应的干预效应为观察对象,对光遗传学技术的实验原理、操作与应用的过程进行仿真。在此,就该项目建立过程中的脚本设计作一简单总结回顾,和同行分享该项目仿真和脚本制作的内容与体会,旨在推进国家虚拟仿真实验项目的建设与应用推广。

1　教学导入

该内容以图文方式展示,作为可选项供阅读学习。光遗传学技术具有非常强的综合性和应用性,因此该技术的教学过程也强调应用。本研究建议的教学导入方案是,从实际问题特别是各类常见精神类疾病(抑郁、焦虑、恐惧、精神分裂等)的研究出发,通过图文展示,强调这些脑疾病的发生基础是相应的神经回路出现功能障碍。因为方法学的限制,神经回路(包括生理性或病理性回路)的研究长期以来一直面临巨大的挑战,转而引出光遗传学技术在这方面的独特优势以及学习该技术的必要性、迫切性,进而提出以动物恐惧反应的干预效应为观察对象开展该仿真项目的学习训练,切入后续内容,包括该技术的基本原理及实验步骤、关键环节、注意事项和应用拓展。

2　实验目的和实验原理

该内容以图文和动画方式展示,供选择性阅读学习。本仿真项目的实验目的是通过虚拟仿真光遗传学实验技术及应用的全过程,学习该技术的基本操作,特别是通过观察分析光激活神经元对于恐惧行为的干预效应,促进对光遗传学实验技术以及恐惧反应基本原理的理解。项目的基本原理强调了四项内容:①通过病毒注射使杏仁核谷氨酸能神经元表达的特定的光敏通道;②细胞膜上的光敏通道的活动将引起细胞电活动的变化(表现为细胞兴奋或抑制,这里是抑制反应),并通过细胞外记录检测;③杏仁核的谷氨酸能神经元被抑制可引起动物恐惧反应的抑制;④杏仁核的谷氨酸能神经元被激活会引起动物的恐惧行为的增加。

实验涉及的相关理论和知识点如下。膜离子通道,包括去极化和超激化离子通道等。单细胞动作电位,是可兴奋细胞兴奋的标志。动物恐惧行为,以呆立持续时间为重要的行为学指标。兴奋性神经元,这里强调的是以谷氨酸为神经递质的神经元主要位于外侧杏仁核的一组神经元,在恐惧过程中发挥关键性作用。光遗传学,是一种通过联合使用光学技术和重组 DNA 技术实现对特定细胞或分子进行精确操控的技术。常用的病毒载体。常用的神经元特异性启动子。常用的光敏感通道蛋白,兴奋性 ChR2、抑制性 eNpHR3.0 等。常用的荧光蛋白,mCherry(红色荧光蛋白)、EYFP(增强型黄色荧光蛋白)、EGFP(增强型绿色荧光蛋白)等。免疫组化,通过应用免疫学基本原理——抗原与抗体特异性结合的原理,使被荧光素标记的抗体发生显色,以确定病毒表达的细胞类型。细胞外记录,细胞外记录技术检测光遗传学技术干预神经的动作电位(诱导或抑制神经元的动作电位)。

3　实验仪器设备和材料

该内容以图文方式展示,作为可选项供阅读学习。根据我们前期开展实体实验的经验和体会,列出开展该项目必需的常见仪器和材料。必需的实验仪器包括工作电脑、双臂数显脑立体定位仪、垂直玻璃电极拉制仪、垂直微量注射泵、Hamilton 微量注射器、颅骨钻、冷光源、冰冻切片机、荧光显微镜、差分放大器、生理信号记录仪、电刺激器、微步推进器、473 nm 激光器等。实验动物选用 Wistar 大鼠(250~350 g)。实验器材有手术刀柄、22 号手术刀、组织剪、眼科剪、显微弯镊、显微直镊、血管钳、棉球、手术无菌单、玻璃电极、载玻片、盖玻片、不锈钢螺丝钉、光纤插芯、光纤跳线、光电极、肌电电极、脑电电极。试剂、病毒载体有 pAAV 2/9-CaMKIIα-eNpHR3.0-mCherry、0.9%氯化钠、1%戊巴比妥钠、牙托粉、75%乙醇、碘伏、4%多聚甲醛、0.01 mol/L PBS、30%蔗糖/4%多聚甲醛、OCT 冷冻切片包埋剂、Fluorescent-G 荧光封片剂。

4　实验方法与步骤

该内容需全程计算机仿真,并结合展示实体实

验中关键步骤的视频和图片。实验方法与步骤是脚本设计的重要内容,需要进行全程计算机仿真。考虑到该实验复杂的项目内容以及便于仿真的可行性需要,经过反复讨论,将全部实验步骤共分解为五大模块,共 37 步具体操作,其中包括 16 步交互操作(图 1)。全部过程包括如下:①仿真病毒包装过程。共分解为以下四步操作,包括模拟选择病毒载体类型;模拟选择启动子类型;模拟选择光敏感通道类型;模拟选择荧光蛋白种类。②仿真动物的选择、手术及病毒立体定位微注射过程。共分解为以下九步操作,包括动物选择、称重、麻醉、固定,头部手术,病毒抽取,病毒立体定位微注射,退针,缝合皮肤。③仿真光敏通道表达情况的观察过程。共分解为以下八步操作,包括称重、麻醉、灌注、固定、脱水、冰冻切片、贴片封片、观察拍照。④仿真光敏通道功能在体细胞外电活动的验证过程。共分解为以下八步操作,包括称重、麻醉、固定、头部手术、选择激光器和连接光电极、光电极推进、光刺激激发或抑制神经元动作电位并记录,刺激参数变化效应观察。⑤仿真光遗传学技术抑制杏仁核谷氨酸能神经元影响动物恐惧活动的过程。共分解为以下八步操作,包括称重、麻醉、固定、头皮手术、光纤和电极植入、电极固定、连接光刺激和记录设备、抑制杏仁核谷氨酸能神经元对恐惧行为的效应观察。

另外,在拓展实验中,设计了学生自主仿真实验,内容是激活表达在海马谷氨酸能神经元上的兴奋性光敏通道 ChR2,观察如何影响神经元电活动。学生需自行查阅相关资料并完成以下仿真过程,包括:①选择病毒载体(AAV)、启动子(CaMKIIa)、光敏感通道蛋白(ChR2)、荧光蛋白(如 EFYP、mCherry),选错一项扣 1 分,选择正确将进入后续界面。②选择激光器。有 2 种,选错一次扣 2 分,选择正确将进入后续界面。③选择激光器的输出光强。有 3 种,选错一次扣 2 分,选择正确将进入后续界面。④选择放大器的高通和低通。有 2 种,选错一次扣 2 分,选择正确将进入后续界面。⑤选择记录系统的采样频率。有 3 种,选错一次扣 2 分,选择正确将进入后续界面。⑥完成后续操作。

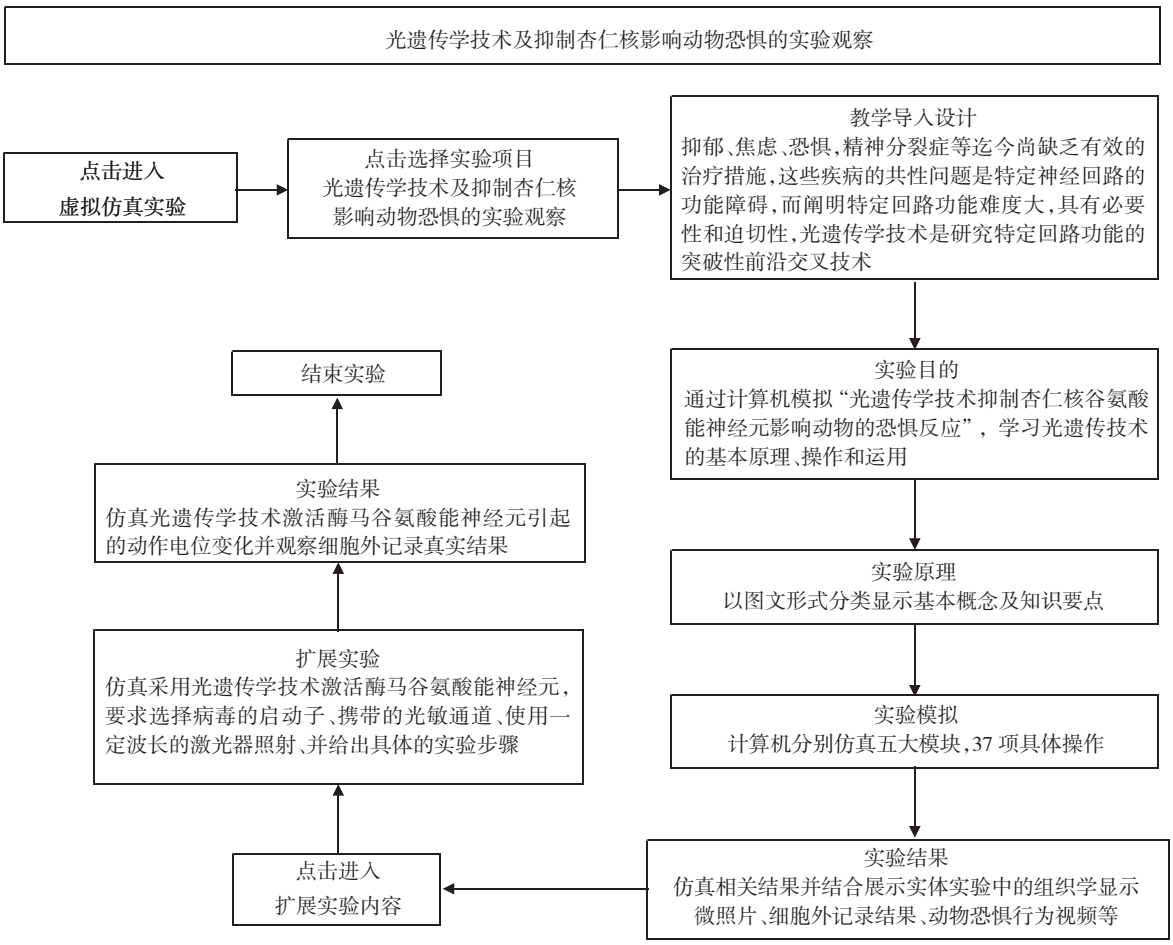


图 1　仿真项目的整体设计架构及关键实验步骤示例

5　对学生的基本要求

该内容以图文方式展示可选项，供阅读学习。本实验项目对学生专业与年级要求为，临床医学、药学、预防医学、检验医学、心理学、生物工程(专业基础课)，且要求大学本科三年级或以上。对学生的基本知识和能力的要求：①知识能力。要求具备生物学、人体解剖学、生理学、生物化学和分子生物学、神经生物学等课程的基础知识，对细胞膜结构和功能、膜离子通道、生物电生理、重组 DNA 技术、神经元兴奋与抑制、恐惧行为等具有较好的知识储备。②技能能力要求。前期通过生物学、人体解剖学、生理学、生物化学和分子生物学、神经生物学等相关学科的基础实验或实训课程的学习，初步掌握小动物麻醉、头部立体定位固定、开颅手术、电极埋置等实验基本操作，了解生物信号采集处理系统的使用等。

6　成效与展望

从初步的实施效果看，光遗传学技术虚拟仿真项目的开展既能克服该实体实验中面临的教学实验条件限制，成为医科院校开展实验教学的补充。也通过虚拟仿真实验的互动功能和反复演示等自身优势，结合启发式教学，大大增强学生对该复杂技术和应用的整体把握度，以及对于重要知识点和实验关键步骤的理解和记忆能力。有效提高了学生的学习积极性，促进了学生对光遗传学技术及其研究应用的深刻认识，培养了学生发现问题、解决问题的能力，提高了学生的综合技能，开阔了他们的视野，提高了他们对于相关前沿技术和应用的理解和求知欲。

长期以来被广泛接受和认同的观点是，教育改革的核心问题是学生的素质培养问题，应积极转变教育模式，不仅强调知识的传授过程，更应重视对学生的能力培养和素质提高[8]。而高等院校实践教学的改革对于学生的能力培养和素质提高具有举足轻重的作用。医学生在前期学习解剖、生理、病生、生物化学和分子生物学、药理等课程的基础上，已具备基本的开展综合性和研究型实验的能力，通过对有深度和广度的研究型实验的全面仿真，能激发学习兴趣，提高教学效果，通过学习和仿真相对复杂的动物实验达成对重要的前沿技术和科研工作的初步了解，为其未来的临床和科研工作打下一定基础[9-10]。该项目的开展也有利于培养学生的自主学习习惯、创新思维和创新意识，有利于培养学生的独立探索和工作能力。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明　吴广延、姚娟：提出论文构思及撰写论文；隋建峰、叶建宁：总体把关，审订论文

参考文献

[1] Deisseroth K. Optogenetics [J]. Nat Methods, 2011, 8(1): 26-29. DOI: 10.1038/nmeth.f.324.

[2] Figueiredo M, Lane S, Tang F, et al. Optogenetic experimentation on astrocytes [J]. Exp Physiol, 2011, 96(1): 40-50. DOI: 10.1113/expphysiol.2010.052597.

[3] Mohammad F, Stewart JC, Ott S, et al. Optogenetic inhibition of behavior with anion channelrhodopsins [J]. Nat Methods, 2017, 14(3): 271-274. DOI: 10.1038/nmeth.4148.

[4] 吴广延，孙琳，何超. 光遗传诱发神经元单位放电的实验教学设计与思考[J]. 中华医学教育探索杂志，2017，16(1)：53-55. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-1485.2017.01.012.
Wu GY, Sun L, He C. The design and experience of experiment teaching in neuronal discharge evoked by the optogenetics [J]. Chin J Med Edu Res, 2017, 16(1): 53-55. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-1485.2017.01.012.

[5] Allsop SA, Wichmann R, Mills F, et al. Corticoamygdala transfer of socially derived information gates observational learning [J]. Cell, 2018, 173(6): 1329-1342.e.18. DOI: 10.1016/j.cell.2018.04.004.

[6] Wahlstrom KL, Huff ML, Emmons EB, et al. Basolateral amygdala inputs to the medial entorhinal cortex selectively modulate the consolidation of spatial and contextual learning [J]. J Neurosci, 2018, 38 (11): 2698-2712. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2848-17.2018.

[7] Johansen JP, Hamanaka H, Monfils MH, et al. Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(28): 12692-12697. DOI: 10.1073/pnas.1002418107.

[8] 张明昊，李玉洁，孙曙光，等. 医学机能实验教学模式改革研究与实践[J]. 中国中医药现代远程教育，2015，13(20)：95-96. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2779.2015.20.049.
Zhang MH, Li YJ, Sun SG, et al. The research and practice on teaching model research of medical function experiment [J]. Chinese Medicine Modern Distance Education of China, 2015, 13(20): 95-96. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2779.2015.20.049.

[9] 张介平，李育娴，谢冬萍，等. 在基于实验的生理学教学中培养学生思维能力的探索[J]. 中华医学教育探索杂志，2015，14(4)：385-387. DOI: 10. 3760/cma.j.issn.2095-1485.2015.04.015.
Zhang JP, Li YX, Xie DP, et a1. Practice on developing students' thinking ability in physiological LBL [J]. Chin J Med Edu Res, 2015, 14(4): 385-387. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-1485.2015.04.015.

[10] 梁向艳，张璨，邢金良，等. 医学机能虚拟实验教学的现状及发展趋势用[J]. 中华医学教育探索杂志，2016，15(2)：185-188.DOI: 10.3760/cma/j/issrd2095-1485.2016.02.019.
Liang XY, Zhang C, Xing JL, et al. The current situation and development tendency of medical functional virtual experiments teaching [J]. Chin J Med Edu Res, 2016, 15(2): 185-188. DOI: 10.3760/cma/j/issrd2095-1485.2016.02.019.

（收稿日期：2018-10-04）
（本文编辑：唐宗顺）