

机能实验学（三）

（大综合性实验）

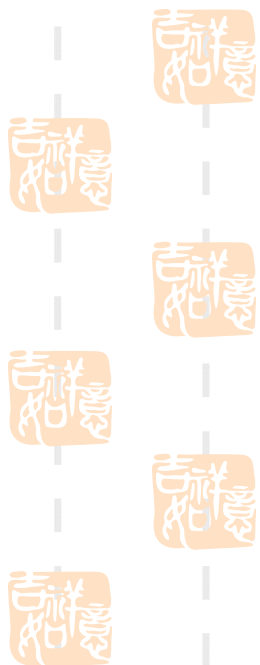


金春华、薛翔

曾嵘、项静、田映红、李翠限
徐小元、陈煜、洪天国、仇欣霞

医学基础实验教学中心
南方医科大学

2022.2.21



课程简介



- 以科研实验方式，观察动物机体在正常与疾病过程中的变化规律的“**大综合性**”实验课程。

- **教学对象：** 医学实验技术专业，基础医学专业，基础医学院士创新班



- **计划学时：** 40学时： 理论4，实验36。



- **目的：** 进一步强化训练和培养医学生的科学实验技能和创新素质。



课题方向:



- 肠缺血再灌注损伤及*****的干预作用

- 干预处理的方向: 钙超载 (维拉帕米)、过氧化 (维生素C)、抗炎 (地塞米松)、缺血预适应处理、缺血后适应处理.....



课程内容及进程安排：



(1) 绪论

(2) 开题设计讨论（查文献、模仿设计）

(3) 大鼠基本操作与插管技术 --- 难度更高的机能学实验技术
(大鼠A、V插管、气管插管、心室插管、肺A插管等)

(4) 大综合性实验预实验 --- 家兔肠缺血再灌注损伤及其干预

(5) 大综合性实验正式实验

(6) 组织细胞生化代谢测定 --- 病理过程中体液分子含量变化的检测

- 核酸、蛋白（酶）、糖，脂
- 各种细胞因子（炎症，免疫）和代谢产物（MDA，肌酐等）

(7) 脏器的形态学变化 --- 组织石蜡切片技术 + 切片染色技术

(8) 结果汇报及论文写作分析



教学目的：进一步加强学生科研能力的培养

科研能力

1. 文献检索和获取信息的能力
2. 专业外语阅读与翻译能力
3. 科研创新与实验设计的能力（敏锐 + 钻研+严谨）
--- 科研基金申请（标书写作） --- 创新性、实用性、先进性
4. 实验实施能力
 - 对实验技巧及设备使用能力
 - 对实验现象的观察能力
 - 对实验问题的处理能力
 - 分析和处理数据的能力
5. 科技论文写作的能力



医学研究的方法 (多水平、多层次)



(一) 整体器官水平---机能学方法

in vivo实验; in vitro实验

(二) 组织细胞水平---细胞学方法

Cell culture; 形态学方法; ...

(三) 分子水平---生化与分子生物学方法

核酸、蛋白(酶)等细胞分子的含量活性, 结构, 功能





(一) 机能学实验基本方法

➤ 动物一般操作技术： 规范性

➤ 动物一般手术方法： 熟练性 (快)

 ➤ 动物各种插管技术： 技巧性 (好)



 ➤ 动物模型复制方法： 代表性、重复性



➤ 离体标本制备技术： 代表性、存活时间



(二) 组织形态学实验方法




- 光学显微镜的使用
- 组织病理学制片技术
- 组织病理学常规染色技术
- 组织与胚胎学标本制作技术

 ■ 病理（尸体）剖检

 ■ 组织（细胞）化学与酶组织化学技术

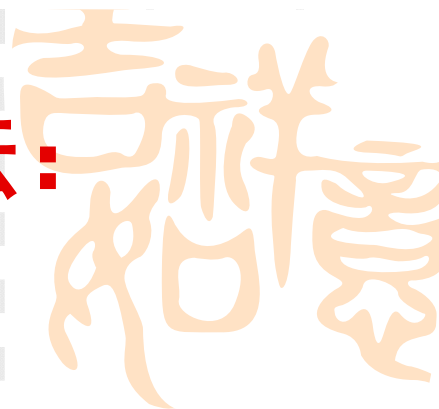
 ■ 免疫组织（细胞）化学技术

 ■ 光学显微镜摄影技术

 ■ 电镜及其生物样品制备技术



(三) 生化代谢分析方法:



■ 分光光度法（比色）

- 通过化学反应使物质显色，对不同波长有光吸收的原理，来检测物质的浓度与含量，包括使用紫外、荧光分光光度计等方法；

■ 离心、电泳和层析技术

- 分离提取糖、蛋白、核酸等分子及其代谢产物；

■ 免疫学方法

- 根据抗原抗体起免疫学反应的原理，采用来检测物质含量；

■ 药理学方法

- 根据配体-受体亲和力强的原理，采用来检测物质含量；

■ 新技术方法

- 酶学(包括PCR)方法、同位素标记、荧光标记、质谱等方法。



分光光度法

Spectrophotometry



1. 一切物质都会对某些波长的光进行吸收，而物质对不同波长的射线，表现为不同的吸收现象，这一性质称为**选择性吸收**。
2. 有色**溶液**之所以呈现不同**颜色**，就是由于这种对光的选择性吸收所致。
3. 某些无色物质虽对可见光无吸收作用，但也能选择性吸收在可见光范围外的部分光能，即吸收特定波长的紫外线或红外线。
4. 物质的吸收光谱与它们本身的分子结构有关，不同物质由于其分子结构不同，对不同波长光线的吸收能力也不同。因此每种物质都具有其**特异的吸收光谱**，在一定条件下，其吸收程度与该物质浓度成正比。
5. 故可利用各种物质的不同的吸收光谱特征及其强度对不同物质进行定性和定量的分析。



分光光度法的原理



- 分光光度法的基本原理是根据**Lambert**和**Beer**定律。
- 1. **Lambert定律** ----- 一束平行单色光垂直照射于一均匀物质(溶液)时，由于溶液吸收一部分光能，使光的强度减弱，若溶液的浓度不变，则溶液的厚度愈大，光线强度的减弱也愈显著。
- 2. **Beer定律** ----- 当一束单色光通过一溶液时，光能被溶液介质吸收一部分，若溶液的厚度不变，则溶液浓度**C**愈大，光吸收愈大，透射光线强度的减弱也愈显著，光强度减弱的量与溶液浓度增加量成正比。
- 3. **Lambert-Beer定律**(又称吸收定律)

$$A=KCL$$

$$C_{\text{样}} = A_{\text{样}} / A_{\text{标}} \cdot C_{\text{标}}$$

A为吸光度(光密度、消光度) **C**为溶液的浓度 **L**为溶液的厚度

其中**K**为常数，又称消光系数(**extinction coefficient**)，表示物质对光线吸收的本领，其值因物质种类和光线波长而异。对于相同物质和相同波长的单色光则消光系数不变。

离心 Centrifugation

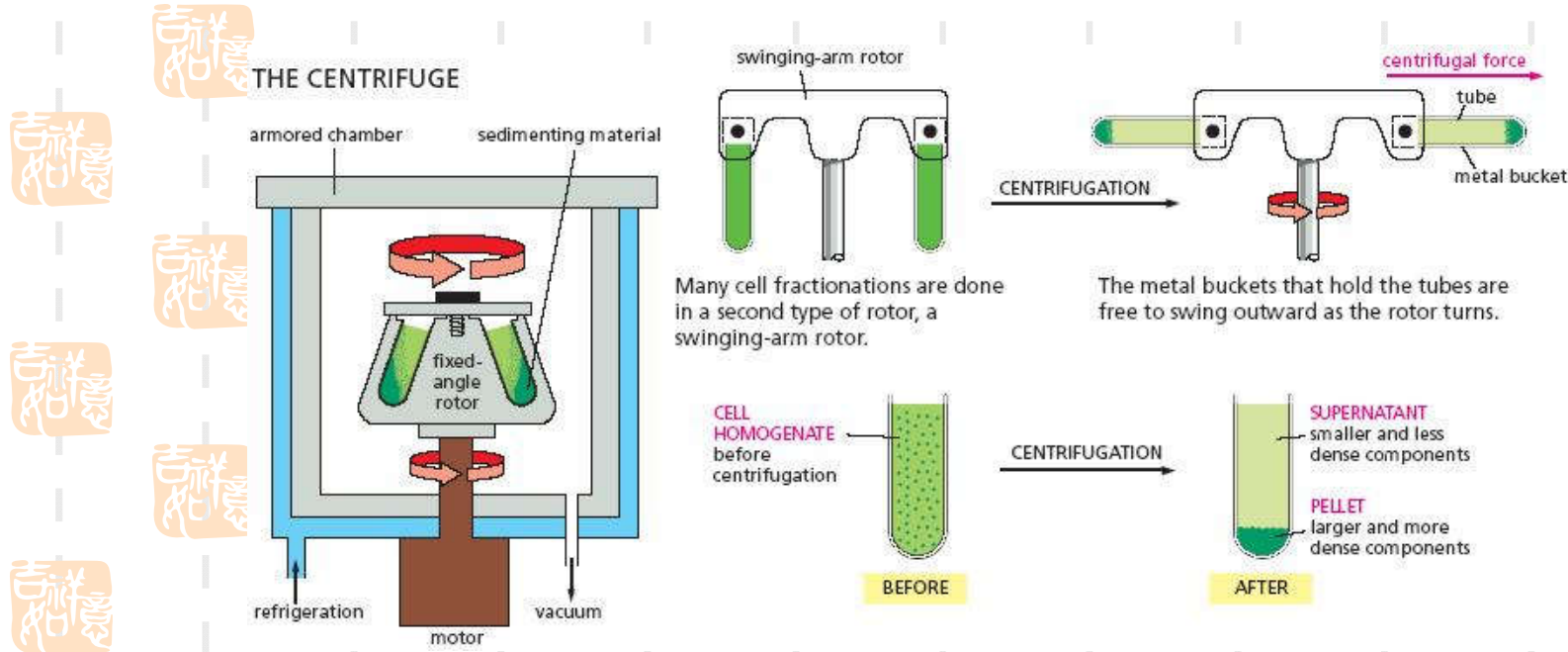


■ 实验室常用离心机:

- 普通离心机——台式 (3000-16000rpm) 和地面式 (3000-6000rpm), 一般不带冷冻设备。
- 高速冷冻离心机——台式与地面式, 18000-25000rpm, 0-4°C。上述 + 制冷设备及温度检测器。
- 超速离心机——地面式, 达30000rpm以上, 0-4°C。
上述 + 真空设备及真空检测器。

■ 转子: 角式与水平式转子.

- 角式常用于沉降离心, 水平式还常用于梯度离心。



离心原理



- **离心原理**: 利用转子高速旋转时所产生的强大离心力, 加速颗粒的沉淀速度, 把样品中不同沉降系数或浮力密度的物质分离开。

离心力 $F = \omega^2 r$ 。

ω --- 角速度 (弧度/秒)。

r --- 颗粒的旋转半径 (厘米)

$RCF = \omega^2 r / 980$ 。

RCF 是相对离心力, 单位为 **G**;

980 是地心引力, 单位为厘米/秒²。

$RCF = 1.119 \times 10^{-5} n^2 r$, n 为每分钟的转数。



- **离心时间**: $t = [(\ln r_2 - \ln r_1) / \omega^2] / S$



t 为样品颗粒完全沉降到离心管底的时间(秒).

S 为沉降系数.



r_2 为旋转轴中心到离心管底部的距离(厘米).

r_1 为旋转轴中心到样品液液面的距离(厘米).



离心方法



(1) **差速离心法** --- 用于沉降系数相差一~几个数量级颗粒的分离。

缺点:

- a. 分离效果差,不能一次得到纯颗粒,经再悬浮和再离心(2~3次),才能得到较纯的颗粒。
- b. 壁效应严重,在离心管一侧会出现沉淀。
- c. 颗粒被挤压,可能变形,聚集而失活。

(2) **梯度离心** ----- 用于相差较少(<20%)或分子量相差三倍的蛋白质。

优点:

- a. 分离效果好,可一次获得较纯颗粒。
- b. 适应范围广,能象差速离心法一样分离具有沉降系数差的颗粒,又能分离有一定浮力密度差的颗粒。
- c. 颗粒不会挤压变形。

缺点: 离心时间较长; 需要制备梯度; 操作严格, 不易掌握。

- 常用的方法有: 蔗糖密度梯度离心; 氯化铯等密度梯度离心。



电泳 Electrophoresis

- 带有电荷的颗粒在电场中泳动的现象叫**电泳** (Movement of electrically charged particles in a fluid under the influence of an electric field. The particles migrate toward the electrode of the opposite electric charge.)。
- 许多生物分子都带有电荷，其电荷的多少取决于分子性质及其所在介质的pH及其组成。
- 混合物中各组分在电场中的泳动速度，首先和本身所带的净**电荷**多少、**分子量**大小和**形状**有关。
- 一般来说，带电越多，分子量（颗粒）越小而且是球形的，则泳动速度就快。反之，则慢。
- 在一定时间内，由于各组分移动距离的不同，而达到分离鉴定各组分的目的。

影响电泳的主要因素

- 1. 电泳介质的pH** ----- 当介质的pH等于某种两性物质的等电点时，该物质处于等电状态，即不向正极或负极移动。当介质pH小于其等电点时，则呈正离子状态，移向负极；反之，介质pH大于其等电点时，则呈负离子状态，移向正极。因此，任何一种两性物质的混合物电泳均受介质pH的影响，即决定于两性物质的带电状态及其量。
- 2. 缓冲液的离子强度** ----- 离子强度低，电泳速度快，分离区带不易清晰；离子强度高，电泳速度慢，但区带分离清晰。如离子强度过低，缓冲液的缓冲量小，不易维持pH的恒定；离子强度过高，则降低蛋白质的带电量(压缩双电层)使电泳速度减慢。所以常用离子强度为**0.02~0.2**之间。
- 3. 电场强度** ----- 电场强度和电泳速度成正比关系。电场强度以每厘米的电势差计算，也称电势梯度。如纸电泳的滤纸长**15cm**，两端电压(电势差)为**150V**，则电场强度为 **$150 / 15 = 10 \text{ V / cm}$** ，电场强度愈高，则带电粒子的移动愈快。电压增加，相应电流也增大，电流过大时易产生热效应可使蛋白质变性而不能分离。
- 4. 电渗作用** ----- 在电场中，液体对固体的相对移动，称为电渗。如滤纸中含有表面带负电荷的羧基，溶液则向负极移动。由于电渗现象与电泳同时存在，所以电泳的粒子移动距离也受电渗影响，如纸上电泳蛋白质移动的方向与电渗现象相反，则实际上蛋白质泳动的距离，等于电泳移动距离减去电渗距离。如电泳方向和电渗方向一致，其蛋白质移动距离，等于二者相加。

琼脂糖凝胶电泳



- 琼脂糖是从琼脂中精制分离出的胶状多糖。
- 优点：
 - 琼脂糖凝胶是具有大量微孔的基质，其孔径尺寸取决于它的浓度。浓度越低，孔径越大。
 - 琼脂糖具有较高的机械强度，允许在**1%**或更低的浓度下使用。
 - 琼脂糖无毒，不给操作者带来不便。
 - 染色、脱色程序简单、快速，背景色较低。
 - 琼脂糖凝胶很容易干成薄膜，适于光密度扫描和永久保存。



聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

- 聚丙烯酰胺凝胶电泳是以聚丙烯酰胺凝胶作为载体的一种区带电泳，这种凝胶由丙烯酰胺和交联剂N, N'-甲叉基(亚甲基)双丙烯酰胺聚合而成。
- 聚丙烯酰胺凝胶具有机械强度高，弹性大，透明，化学稳定性高，无电渗作用，设备简单，样品用量少(1~100 μg)和分辨率高等优点。
- 可通过控制单体浓度或单体与交联剂的比例聚合成孔径大小不同的凝胶，可用于蛋白质、核酸等物质的分离、定性和定量分析。还可结合去垢剂十二烷基硫酸钠(SDS)，以测定蛋白质亚基分子量。

PAGE凝胶浓度的选择



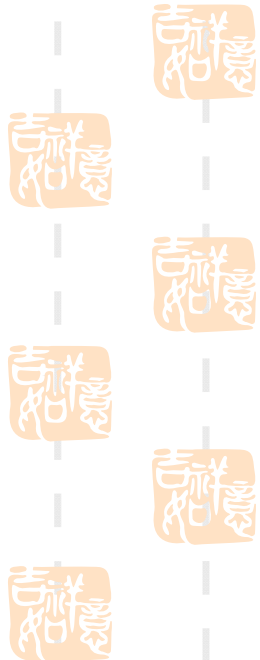
分子量范围	凝胶浓度%
<10000	20~30
蛋 10000~40000	15~20
白 40000~100000	10~15
质 100000~500000	5~10
>500000	2~5
<10000	15~20
核 10000~100000	5~10
酸 100000~2000000	2~2.6

Western Blot



目前研究中用得非常多的技术手段

- 电泳
- 电转印
- 免疫杂交
- 显色
- 图像分析（灰度检测）



层析（色谱）

Chromatography

- **Chromatography**, a method of separating and identifying the components of a complex mixture by differential movement through a two-phase system, in which the movement is effected by a flow of a liquid or a gas (**mobile phase**) which percolates through an adsorbent (**stationary phase**) or a second liquid phase.

- 层析系统包括两个相：**固定相**，**流动相**。当以流动相流过加有样品的固定相时，由于样品各组分的理化性质（吸附力、分子形状和大小、分子极性、分子亲和力、分配系数等）的差异，受固定相的阻力与流动相的推力的影响不同，因而各组分在固定相与流动相之间的分配也不同，从而使各组分以不同的速度移动而达到分离的目的。

- 配合相应的光学、电学和电化学检测手段，可用于定性、定量和纯化某种物质，其纯度高达**99%**。

- 层析法是分离率、灵敏度(**pg~fg级**)、选择性均高的一种分离方法，尤其适合样品含量少，而杂质含量多的复杂生物样品的分析。

层析：按原理分类



1. **吸附层析**-----固定相是固体吸附剂，利用各组分在吸附剂表面吸附能力的差别而分离。
2. **分配层析**-----固定相为液体，利用各组分在两液相中分配系数的差别或溶解度不同使物质分离。
3. **离子交换层析**-----固定相为离子交换剂，利用各组分对离子交换剂的亲和力不同而进行分离。
4. **凝胶层析**-----固定相为多孔凝胶，利用各组分在凝胶上受阻滞的程度不同而进行分离。
5. **亲和层析**-----根据生物特异性吸附进行分离，固定相只能和一种待分离组分有高度特异性的亲和能力者结合，而与无结合能力的其他组分分离。



层析：按操作方式分类



1. **纸层析**-----用滤纸作为支持物，作为液体的载体，点样后，用流动相展开，以达到组分分离目的。纸层析结果的好坏除了与选用展开剂的种类、实验中的点样量多少、点样时是否扩散和实验条件是否稳定有关外，还与所用层析滤纸的质量好坏密切相关。
2. **薄层层析**-----利用玻璃板、塑料板、铝板、聚酰胺膜等作为固定相的载体，在板上涂一薄层不溶性物质为固定相，再把样品涂铺在薄层的一端，然后用合适的溶剂作为流动相(展开剂)展开，使组分达到分离。
3. **柱层析**-----将固定相装柱后，使样品沿一个方向移动，以达到分离目的。



期末总分构成

平时成绩	自主学习内容	课题集体得分	课题个人得分
20%	30%	20%	30%
<p>1. 上课情况评价: (按组给分, 老师课堂打分, 包括实验完成情况、课后打扫卫生等等)</p> <p>2. 加分减分项: 加分项: 协助处理动物尸体、搬运实验器材等等 扣分项: 迟到早退、故意损坏仪器等等。</p>	<p>1. 每人检索阅读一篇SCI外文文献 (IF>5.0), 内容为有关“肠缺血再灌注损伤”</p> <p>2. 翻译摘要部分, 要求500字以上 (中文), 提交Word版本。</p>	<p>1. 以组为单位, 设计并提交实验方案, 主要写材料与方法</p> <p>2. 每个专业取最佳的2份上台汇报答辩, 最终挑选1个项目实施。</p> <p>3. 按组评分, 不搞大锅饭, 参与讨论设计的同学才署名</p>	<p>一般6人一组*, 每人挑其中一项。</p> <p>1.上台汇报: 2人 其中1人ppt制作、1人上台汇报 (开题、生化、结题)</p> <p>2. 结果展板: 3人</p> <p>3.原始记录: 1人 (预实验、正式实验、生化检测、形态学4次内容)</p>
	<p>提交截止时间: 2月15日</p>	<p>提交截止时间: 2月15日</p>	<p>*如5人/组, 只需2人写结果展板。 如7人/组, 则4人写结果展板。</p>

注意事项



- 实验锻炼越来越少，望上课认真操作；
- 实验成本较高，望爱惜动物、器材、试剂；
- 大鼠插管技术难度较大，认真仔细练习体会；
- 实验注意安全，防止电、化学伤、咬伤；
- **注意防疫：** 口罩、手套、洗手、消毒等。



吉祥

谢谢！

祝愿大家在今后学习和工
作中，能努力钻研，真正学
到本领，事业取得成功！

..... 金春华 2022.2.14

