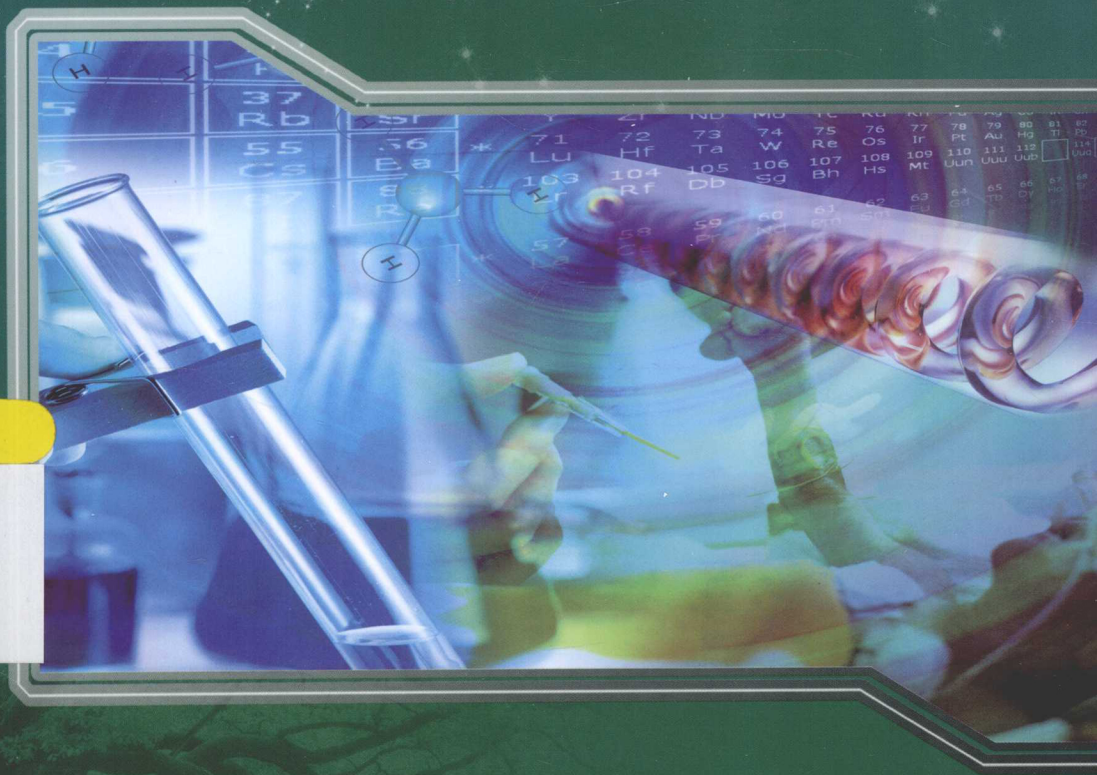


高等医学院校实验系列规划教材

现代生物技术与探索性实验

XIANDAI SHENGWUXUE JISHU YU TANSUOXING SHIYAN

主编 唐宝定



中国科学技术大学出版社

高等医学院校实验系列规划教材

现代生物学技术与探索性实验

XIANDAI SHENGWUXUE JISHU YU TANSUOXING SHIYAN

主 编 唐宝定

副主编 刘长青

编 委 (以姓氏笔画为序)

付应霄 刘长青 吴守伟

李蕾娜 杨清玲 张 鼎

张 静 胡明洁 唐宝定

黄银久 鲍明升 廖亚平

中国科学技术大学出版社

内 容 简 介

全书内容共包括两大部分。第一部分为现代生物学技术实验,共8个实验,均为生物科学中最基本、最重要的技术和方法,涵盖了细胞、实验动物、组织学、遗传学以及分子生物学的基本实验和核心技术,有利于学生系统掌握生物科学实验技术。第二部分为探索性实验,共设6项内容,详细介绍科研的一般过程,培养学生的科研素养与创新能力。

图书在版编目(CIP)数据

现代生物学技术与探索性实验/唐宝定主编. —合肥:中国科学技术大学出版社,2015.5

ISBN 978-7-312-03689-7

I. 现… II. 唐… III. 生物学—实验—高等学校—教材 IV. Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 045256 号

出版 中国科学技术大学出版社
安徽省合肥市金寨路 96 号,邮编:230026
网址:<http://press.ustc.edu.cn>
印刷 合肥华星印务有限责任公司
发行 中国科学技术大学出版社
经销 全国新华书店
开本 710 mm×960 mm 1/16
印张 9
字数 140 千
版次 2015 年 5 月第 1 版
印次 2015 年 5 月第 1 次印刷
定价 20.00 元

前 言

21 世纪是生命科学的世纪。近年来,生物学实验技术和方法发展迅速,其实际应用日益广泛,已逐渐成为一个新的经济增长点,对国民经济的发展发挥着显著作用。以培养具有创新精神和实践能力的高素质生命科学人才为根本任务的高等学校生物专业,在教学上不仅要做好理论知识的传授,而且应重视学生实践动手能力的培养。一本能够囊括现代生物学多学科交叉的实验内容,适合生物科学与技术专业高年级本科生进行综合科研素质和实践技能训练的实验教材为目前的教学所必需。在此背景下,我们组织多名资深生物学专业教师编写了这本《现代生物学技术和探索性实验》实验教材。

该教材分为现代生物学技术实验和探索性实验两大部分。在现代生物学技术实验部分,拓展和整合了生物科学研究领域里常用、大部分高校在现有实验条件下可开设的实验技术,包括实验动物技术、组织切片技术、细胞培养技术、染色体荧光原位杂交、免疫组织化学技术以及其他分子生物学技术等,以系统培养学生的基本实验操作技能。

探索性实验是以科学的观点和方法针对某项与生物医学有关的未知(或未全知)的问题进行实验研究的一种开放式教学实验。在探索性实验部分,编者按照科研的基本步骤即选题与查新、开题报告、实验方案的设计、实验准备、实

验的实施、结果的分析及论文撰写进行内容撰写,系统地阐述了科研的一般过程,以期通过实验培养学生的科研思维与科研创新,提高学生利用所学知识解决问题的能力。

由于时间仓促,加之编者水平有限,不当之处在所难免,希望使用本书的教师、学生和有关科学工作者提出宝贵意见,以便再版时修改。

编 者

2015年3月20日

目 录

前言	(I)
----------	-------

第一部分 现代生物学技术实验

实验一 实验动物技术	(3)
实验二 动物细胞原代培养	(25)
实验三 人类染色体标本制备及核型分析	(37)
实验四 人类染色体荧光原位杂交	(48)
实验五 石蜡切片与 HE 染色	(56)
实验六 石蜡切片免疫组织化学技术	(63)
实验七 PCR 仪及凝胶成像系统的使用	(66)
实验八 荧光显微镜及激光扫描共聚焦显微镜的使用	(72)

第二部分 探索性实验

一 查新和选题	(85)
二 研究方案设计	(93)
三 预实验	(98)
四 开题报告	(102)
五 实验方案实施	(108)
六 科技论文及英文摘要撰写	(118)

第一部分

现代生物学技术实验

实验一 实验动物技术

【目的与要求】

1. 了解实验动物选取、饲喂和处理方法。
2. 了解实验动物的编号和分组原则。
3. 掌握实验动物的抓取与保定技术。
4. 掌握实验动物常用的给药方法。
5. 掌握实验动物的采血及麻醉方法。
6. 掌握实验动物的处死方法。
7. 了解实验动物尸体及其废弃物的无害化处理方法。

【器材与试剂】

1. 材料

健康成年小鼠、大鼠、家兔。

2. 器材

剪刀、镊子、一次性注射器(1 mL、5 mL、20 mL 针管)、动物固定架、电子天平、大烧杯、大的 EP 管、弹簧秤等。

3. 试剂

- (1) 各种麻醉剂：普鲁卡因、乙醚、吗啡、苯巴比妥钠和戊巴比妥钠。
- (2) 其他试剂：灭菌生理盐水、消毒酒精及碘酒、75%的酒精棉球。

【内容与操作】

一、实验动物的选取、日常饲喂与处理方法

(一) 实验动物的选取

实验动物种类繁多,在进行实验时,应根据课题的需要和动物的特性加以选择,使研究目的与动物的种属、特性和个体差异相吻合,才能保证研究工作的顺利进行。不同的科学实验要求选择和开发最适宜的实验动物,正确选择动物是保证动物实验成功的第一步。如进行肿瘤研究,就必须弄清哪些品系是高癌系,哪些品系是低癌系,哪些品系自发率高,哪些品系容易诱发等。

首先要从研究目的和实验要求来选择实验动物,其次要考虑是否容易获得、是否经济、是否容易饲养等因素。一般对多物种进行实验时,应先选小型物种,再推广到大型物种;要求只能建立在对多个物种进行实验的基础上,才能推广到人类,也称动物实验外推。常用顺序为小鼠、大鼠、兔、犬、猴。

1. 尽量选用功能、代谢、结构及其他方面机能与人相似的实验动物

动物实验研究的最终目的是要解决人类疾病的预防和治疗问题。因此,应尽量选择那些在机能、代谢、结构诸多方面与人类相似的实验动物做实验,利用其与人类某些相近的特征,通过实验观察对人类疾病的过程进行推断和探索。一般来说,动物的进化阶段愈高,机能、代谢、结构愈复杂,也就愈接近人类,如灵长类动物是最近似人类的实验动物。

2. 选用标准化的实验动物

标准化实验动物是指遗传背景明确、饲养环境与动物体内的微生物得

到控制、符合一定标准的实验动物。只有选用标准化实验动物,而且实验过程中也在标准环境下饲养的动物,才能在实验中排除因动物杂交、遗传上的不均质及环境条件的变化,所引起的个体反应不一致,排除因动物携带细菌、病毒、寄生虫和潜在疾病的影响,才能便于分析实验结果,减少实验误差,提高科学性、准确性,把所获得的结果与同类研究进行比较、交流,并得到承认。在实验研究中应避免使用随意交配繁殖的动物,而应根据研究目的选择用遗传学控制的方法培育出来的近交系、突变系、系统杂交或封闭群动物。同时应对实验动物进行微生物控制,发展使用无菌动物、已知菌动物或无特定病原体(SPF)动物。

3. 选用解剖、生理特点符合实验目的与要求的实验动物

根据实验目的,选用解剖、生理特点相符的动物进行实验,是保证实验成功的关键。各种实验动物会具有某些解剖、生理特点方面的差别,如选择恰当,将使实验的操作难度降低,利于实验的进行。例如:

(1) 催吐实验:此实验适宜选用猴、猫,不选用大、小鼠,因为大、小鼠无呕吐反应。

(2) 胆囊功能实验:此实验不选用大鼠,因为大鼠无胆囊。

(3) 慢性支气管炎实验:此实验不能选用大、小鼠,因为大、小鼠气管及支气管腺不发达。

(4) 计划生育研究:此实验常选用小鼠和大鼠。因其繁殖力强,性周期和妊娠期短,生长快。如常用小鼠做抗生育、抗着床、抗早孕、抗排卵等实验。

(5) 心血管病研究:以猪(辛克莱小型猪、广西巴马小型猪、欧米尼猪)作为实验动物。猪冠状动脉,在解剖学、血液动力学上与人类相似。对高胆固醇食物的反应与人一样,很容易出现动脉粥样硬化的典型病灶。

(6) 实验外科学研究:选用犬(比格犬、华北犬、西北犬、狼犬)作为实验动物。其内脏与人相似,比例近似。临床医生在研究新的手术或麻醉方法时往往选用犬来做动物实验,取得经验和技巧后用于临床。如断肢再植、器官和组织移植等。

(7) 制造和鉴定脊髓灰质炎疫苗:猕猴是该实验唯一可以选用的实验动物。

4. 选用不同种属品系实验动物某些特殊反应,使适合于不同研究目的的需要

不同种属实验动物对同一因素的反应虽然是相似的,但往往程度不一样,有些甚至还会出现特殊反应。实验研究中要常选用那些对实验因素最敏感的动物作为实验对象。

(1) 肿瘤研究:常选用近交系小鼠,如 AKR 小鼠白血病发生率可达 90%, C_3H 小鼠乳腺癌发病率达 97%,而不选用 $C_{57}BL$ 等小鼠,因其乳腺癌发病率极低($<5\%$)。

(2) 高血压病研究:选用 SHR 大鼠,因自发性高血压、心血管疾病发病率高,对降压药物有反应。

(3) 免疫学研究:豚鼠易引起变态反应,产生大量抗体,是过敏性休克和变态反应研究的首选动物。

(二) 实验动物的日常饲喂与处理方法(大、小鼠的日常饲养管理)

实验动物必须饲养于屏障环境中,屏障环境必须执行清洁级实验动物室操作规程。在进入清洁级动物实验室前,换上经过消毒的特制防护服、手套和口罩。所有接触实验动物的各类物品均按消毒规程消毒。饲料、饮水都要经过消毒处理,并补充消毒过程中损失的维生素。对于特殊实验要求,在普通正压的清洁级动物实验室不得进行大、小鼠传染病,人畜共患病病原体的实验研究,应在 P 级动物实验室进行。如有放射性、同位素等处理则应有防护措施。药理、毒理、代谢实验选用的动物要采用笼养,使动物与排泄物分开,这一饲养方式也有利于动物卫生防疫。

1. 进入实验动物室的准备

人员进入屏障环境前必须沐浴、穿无菌隔离服,佩戴帽、口罩和乳胶手

套等。

2. 大、小鼠的饲喂

(1) 实验动物室内的动物宜采用每天加料的饲养方法。这能减少因动物磨牙、咬碎饲料而造成的浪费;在潮湿的梅雨季节,也能防止饲料的霉变。

(2) 每天给鼠盒加料一次,加料时打开饲料袋,用加料勺向盒盖上加料。

(3) 加料的量取决于动物的大小和数量,以到第二天上午检查时每盒剩下 1~2 粒饲料为宜。

(4) 应注意观察记录动物采食的量。饲料太硬或霉变时,动物采食减少;饲料太松,鼠因磨牙啃咬,撒漏的碎料太多,浪费大。

3. 大、小鼠的饮水

(1) 饮水瓶每周更换 2~3 次,换水瓶时将经洗涤灭菌的饮水瓶装满洁净的水,塞紧瓶塞。

(2) 将饮水瓶装箱推入动物房,从鼠盒的盒盖上取下用过的水瓶,丢入存放箱中,同时取一新装满水的水瓶插在盒盖上。

(3) 每插上一个水瓶,都要观察一会儿,确信饮水瓶不会漏水,漏水的饮水瓶不得使用。

(4) 一般不采用直接向瓶中加水的方式,要把更换下的水瓶移出屏障,清洗灭菌后再进入。

4. 卫生消毒

(1) 每日工作结束后及时打扫房间,保持动物房的地面、墙壁、顶棚室内一切设施洁净卫生,无饲料和垫料的碎屑、无垃圾、无污迹。

(2) 用配好的消毒液,每天擦拭墙壁 1 次,每周擦拭顶棚 1 次。换盒料后,用消毒液擦拭饲养架及其他器具。

(3) 饲育区内各类用具、物品摆放整齐,并保持清洁。与饲育动物无关的物品不得带入或存放在饲育区内。

(4) 工作过程中的废弃物用垃圾袋收集好,送至焚烧间。

二、实验动物的编号和分组

1. 编号

实验动物常需要标记以示区别。编号的方法很多,根据动物的种类数量和观察时间长短等因素来选择合适的标记方法。

(1) 挂牌法:将号码烙压在圆形或方形金属牌上(最好用铝或不锈钢的,可长期使用不生锈),或将号码按实验分组编号烙在拴动物颈部的皮带上,将此颈圈固定在动物颈部。该法适用于狗等大型动物。

(2) 打号法:用刺数钳(又称耳号钳)将号码打在动物耳朵上。打号前用蘸有酒精的棉球擦净耳朵,用耳号钳刺上号码,然后在烙印部位用棉球蘸上溶在食醋里的黑墨水擦抹。该法适用于耳朵比较大的兔、狗等动物。

(3) 针刺法:用7号或8号针头蘸取少量碳素墨水,在耳部、前后肢以及尾部等处刺入皮下,在受刺部位留有一黑色标记。该法适用于大小鼠、豚鼠等。在实验动物数量少的情况下,也可用于兔、狗等动物。

(4) 化学药品涂染动物被毛法:经常应用的涂染化学药品有:

① 涂染红色:0.5%中性红或品红溶液。

② 涂染黄色:3%~5%苦味酸溶液。

③ 涂染黑色:含煤焦油的酒精溶液。

根据实验分组编号的需要,可用一种化学药品涂染实验动物背部被毛就可以。如果实验动物数量较多,则可以选择两种染料。该方法对于实验周期短的实验动物较合适,时间长了染料易褪掉;对于哺乳期的子畜也不适合,因母畜容易咬死子畜或把染料舔掉。

(5) 剪毛法:该法适用于大、中型动物,如狗、兔等。方法是用剪毛刀在动物一侧或背部剪出号码,此法编号清楚可靠,但只适于短期观察。

(6) 打孔或剪缺口法:可用打孔机在兔耳一定位置打一小孔来表示一定的号码。如用剪子剪缺口,应在剪后用滑石粉捻一下,以免愈合后看不出来。该法可以编1~9999号,常在饲养大量动物时作为终身号采用。

2. 分组

(1) 分组的原则:进行动物实验时,经常需要将选择好的实验动物按研究的需要分成若干组。动物分组应按随机分配的原则,使每只动物都有同等机会被分配到各个实验组与对照组中去,以避免各组之间的差别,影响实验结果。特别是进行准确的统计检验,必须在随机分组的基础上进行。

每组动物数量应按实验周期长短、实验类型及统计学要求而定。如果是慢性实验或需要定期处死动物进行检验的实验,就要求选较多的动物,以补足动物自然死亡和认为处死所丧失的数量,确保实验结束时有合乎统计学要求的动物数量存在。

(2) 建立对照组:分组时应建立对照组。

① 建立自身对照组。自身对照组,是对实验数据而言的。实验动物本身在实验处理前、后两个阶段的各项相关数据就分别是对照组和实验组的实验结果。此法可排除生物间的个体差异。

② 建立平行对照组。平行对照组有正对照组和负对照组两种。给实验组动物某种处理,而给正对照组用同样方法进行处理,但并不采用实验所要求的药物或手段,负对照组则不给任何处理。

③ 具体分组时,应避免人为因素。可随机把所有的动物进行编号,然后令其双数为 A 组(实验组),单数为 B 组(对照组)即可或反之。如果要分若干个组时,应该用随机数字表示进行完全随机分组。

三、实验动物的抓取和固定

1. 小鼠的抓取和固定

(1) 用右手拇指和食指捏住小鼠尾巴中部将小鼠提起,放在饲养盒的面罩上。

(2) 用左手拇指和食指迅速、准确地捏住小鼠的两耳后及颈背部的皮肤,将小鼠提起。

(3) 翻转左手掌,以左手掌心和中指夹住小鼠背部的皮肤,使小鼠整个

躯体呈一条直线。

(4) 用左手无名指压住小鼠背部的皮肤,小指压住小鼠的尾巴根部。

(5) 松开捏住小鼠尾巴的右手拇指和食指。此法适用于肌注、腹腔注射、灌胃等实验。

2. 大鼠的抓取和固定

4~5 周内的大鼠的抓取和固定,方法同小鼠的;周龄较大的,方法如下:

(1) 首先戴好防护手套。

(2) 用右手拇指和食指抓住大鼠尾巴中部将大鼠提起,放在大鼠饲料盒的面罩上。

(3) 左手顺势按、卡在大鼠躯干背部,稍加压力向头颈部滑行。

(4) 以左手拇指和食指捏住大鼠两耳后部的头颈皮肤,其余三指和手掌握住大鼠背部皮肤,完成抓取、固定。

3. 家兔的抓取和固定

家兔比较容易驯服,不会咬人,但脚爪较尖锐,应避免家兔在挣扎时抓伤皮肤。常用的抓取方法是先轻轻打开笼门,勿使其受惊,随后手伸入笼内,从头前阻拦它跑动。然后一只手抓住兔的颈部皮毛,将兔提起,用另一只手托其臀,或用手抓住背部皮肤提起来,放在实验台上,即可进行采血、注射等操作。

因家兔耳大,故人们常误认为抓其耳可以提起,或有人用手挟住其腰背部提起均为不正确的操作。在实验工作中常用兔耳作采血、静脉注射等用,所以家兔的两耳应尽量保持不受损伤。家兔的固定方法有盒式固定和台式固定。盒式固定适用于采血和耳部血管注射,台式固定适用于测量血压、呼吸和进行手术操作等。

4. 蟾蜍的抓取和固定

抓取蟾蜍时,可先在蟾蜍体部包一层湿布,用左手将其背部贴紧手掌固定,把后肢拉直,并用左手的中指、无名指及小指夹住,前肢可用拇指及食指压住,右手即可进行实验操作。抓取蟾蜍时不要挤压两侧耳部突起的毒腺,以免蟾蜍将毒液射到操作者眼睛里。需要长时间固定时,可将蟾蜍麻醉或

毁脑脊髓后,用大头针钉在蛙板上。

四、实验动物的给药方法

在动物实验中,为了观察药物对机体功能、代谢及形态引起的变化,常需要将药物注入动物体内。给药的途径和方法多种多样,可根据实验目的、实验动物种类和药物剂型、剂量等情况确定。

1. 皮下注射

注射时用左手拇指及食指轻轻捏起皮肤,右手持注射器将针头刺入,固定后即可进行注射。一般小鼠的注射部位在其背部或前肢腋下,大鼠的注射部位在其背部或侧下腹部;豚鼠的注射部位在其后大腿内侧、背部等脂肪少的部位;兔的注射部位在其背部或耳根部注射。

2. 皮内注射

此法用于观察皮肤血管的通透性变化或观察皮内反应,作为皮肤血管通透性观察指标之一。

将动物注射部位的被毛剪去,消毒后,用皮试针头紧贴皮肤皮层刺入皮内,然后使针头向上挑起并再稍刺入,即可注射药液。注射后可见皮肤表面鼓起一白色小皮丘。

3. 腹腔注射

先将动物固定,腹部用酒精棉球擦拭消毒,然后在左侧或右侧腹部将针头刺入皮下,沿皮下向前推进约 0.5 cm,再使针头与皮肤呈 45°角方向穿过腹肌刺入腹腔,此时有落空感,回抽无肠液、尿液后,缓缓推入药液,此法常用于大、小鼠(见图 1.1)。

4. 静脉注射

静脉注射是将药液直接注射于静脉管内,使其随着血液分布全身,迅速奏效。但排泄较快,作用时间较短。

(1) 大、小鼠的静脉注射。大、小鼠的静脉注射,常采用尾静脉注射。鼠尾静脉共有 3 根,左右两侧和背侧各 1 根,两侧尾静脉比较容易固定,故常