

全国高等学校教材

供临床、基础、预防、药学、检验、影像、护理等专业用

Integrated Experiment
of Basic Medicine

基础医学整合实验

主 编 苏 宁



人民卫生出版社

全国高等学校教材

供临床、基础、预防、药学、检验、影像、护理等专业用

基础医学整合实验

Integrated Experiment
of Basic Medicine

主 编 苏 宁

副主编 邝晓聪 杜 鹃 张 玲 张三印 姜希娟

编 委 (以姓氏笔画为序)

尹艳艳 (安徽医科大学)

陈维平 (广西医科大学)

邝晓聪 (广西医科大学)

吴 宁 (贵州医科大学)

刘 娜 (广州中医药大学)

吴家华 (嘉应学院医学院)

闫福曼 (广州中医药大学)

姜希娟 (天津中医药大学)

苏 宁 (广州中医药大学)

郭茂娟 (天津中医药大学)

杜 鹃 (安徽医科大学)

彭仁才 (江西中医药大学)

张 玲 (沈阳医学院)

韩 莉 (三峡大学医学院)

张三印 (成都中医药大学)

傅 娟 (华南理工大学医学院)

张天娥 (成都中医药大学)

戴建国 (南京中医药大学)

秘 书 (以姓氏笔画为序)

林锐珊 (广州中医药大学)

罗海燕 (广州中医药大学)

指导专家 (以姓氏笔画为序)

马跃荣 (成都中医药大学)

杨宇辉 (嘉应学院医学院)

戈志强 (苏州大学医学部)

汪思应 (安徽医科大学)

刘 佳 (华南理工大学医学院)

苗 戎 (天津中医药大学)

刘传勇 (山东大学齐鲁医学部)

罗广波 (广州中医药大学)

关 喆 (沈阳医学院)

赵 云 (三峡大学医学院)

许能贵 (广州中医药大学)

高兴亚 (南京医科大学)

杨 明 (贵州医科大学)

章文春 (江西中医药大学)

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

基础医学整合实验 / 苏宁主编. —北京: 人民卫生出版社,
2017

ISBN 978-7-117-24596-8

I. ①基… II. ①苏… III. ①基础医学 - 实验 - 医学
院校 - 教材 IV. ①R3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 132482 号

人卫智网	www.ipmph.com	医学教育、学术、考试、健康, 购书智慧智能综合服务平台
人卫官网	www.pmph.com	人卫官方资讯发布平台

版权所有, 侵权必究!

基础医学整合实验

主 编: 苏 宁

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 三河市尚艺印装有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 5.5

字 数: 124 千字

版 次: 2017 年 8 月第 1 版 2017 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-24596-8/R · 24597

定 价: 18.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

前言

医学教育承担着培养高素质卫生人才的重要使命,其根本任务是以医疗卫生人才需求为导向,培养和造就一支为社会主义现代化建设服务,具有职业素质、实践能力和创新精神的卫生人才队伍。而在社会经济飞速发展的今天,传统医学教育模式已不能满足卫生服务模式的重大变革和人民群众日益增长的卫生服务需求。提升医学教育理念、改革医学教学模式势在必行。国家教育部、卫生部于2009年联合发文,号召“积极进行课程体系改革,构建人文社会科学知识、自然科学知识与医学知识相结合,基础医学与临床医学相结合的知识、能力、素质协调发展的新型课程体系……加强学生终身学习能力、批判性思维能力和创新能力的培养”(教高〔2009〕4号)。

基于以上思路,本教材编写团队于2013年开始探索基于医学素质培养的“基础医学与临床医学相结合”实验课程改革。该课程理念打破了原有学科间严格的界线,将不同学科的专业知识和实验技术整合起来,培养学生综合运用知识解决实际问题的能力以及良好的医学素质。4年来,该课程模式得到了越来越多医学院校的认同和接受。“基于医学素质培养的整合实验课程”有望成为一种新的实验教学模式,并在全国医学院校中推广使用。本教材为整合实验创新课程的配套用书,具有以下特点:

1. 基础与临床深度融合 以“常见临床问题”为实验项目设计的切入点,真正体现基础知识为临床专业服务的理念,提高学生对基础课程的兴趣。
2. 实验内容多层次整合 打破学科壁垒,围绕“常见临床问题”进行跨学科、跨专业、多层次的知识整合,主要指导学生学以致用、知行合一。
3. 医学素质培养融入实验项目 以实验项目为载体,塑造学生良好的道德品质、提高人文素养、牢固专业思想、强化团队意识。

本教材编委由各校开展整合实验教学改革的一线专家、教师组成。他们来自不同专业,在“基础与临床结合、素质与知识融合”方面进行了有益的尝试,并取得一定成果。现将各校的优质教学成果编撰成册,供各校教学使用和参考。本教材适用于各学制临床医学专业及临床相关专业的实验教学。

教材编委们在行业专家的指导下,查阅了大量文献并做了大量预实验,对每一个

实验项目、检测指标都反复推敲,精益求精。本教材不仅凝聚了全体编委的智慧和心血,也得到了指导专家组的细心指导和无私帮助。在此,对本教材的编委和专家致以崇高的敬意,并对教材出版过程中给予支持和帮助的各参编单位和出版社领导、同仁表示衷心的感谢!

虽然全体参编人员尽心竭力,但由于“基于医学素质培养的基础临床整合实验”课程为新生事物,加之编者水平有限,教材中难免有疏漏和不足之处,还请广大老师和同学批评指正并积极谏言献策,以便再版时进一步完善。

《基础医学整合实验》编委会

2017年4月

目 录

第一章 基础医学整合实验概述.....	1
第一节 基础医学整合实验的课程目标及其在医学体系中的地位.....	1
第二节 基础医学整合实验课程的主要内容和教学方法.....	1
第三节 基础医学整合实验的学习方法.....	3
第二章 动物实验基本知识.....	4
第一节 动物伦理及实验动物保护.....	4
第二节 常用实验动物简介.....	5
第三节 动物实验常用技术.....	6
第三章 医学实验常用技术.....	8
第一节 分子生物学实验常用技术简介.....	8
第二节 细胞培养及相关技术简介.....	11
第三节 组织形态学实验常用技术简介.....	14
第四章 血钾浓度异常对心电图和酸碱平衡的影响.....	17
第五章 实验性肺水肿模型的复制与救治.....	22
第六章 急性失血性休克及药物抢救.....	27
第七章 急性肾损伤及其解救.....	32
第八章 急性酒精中毒小鼠模型及药物醒酒作用的研究.....	37
第九章 脑死亡大鼠模型整合实验.....	46
第十章 进食状态对糖尿病大鼠血糖及肝糖原的影响.....	52
第十一章 小鼠细胞免疫抑制模型.....	59
第十二章 老年痴呆症动物模型制作及其综合评价分析.....	66

第十三章	华支睾吸虫(肝吸虫)综合实验	72
第十四章	课程评价方法	77
第一节	课程成绩的组成	77
第二节	形成性评价量表	78
第三节	实验报告模板	80

第一章

基础医学整合实验概述

第一节 基础医学整合实验的课程目标及其在医学体系中的地位

《国家中长期教育改革和规划纲要(2010—2020年)》明确指出,坚持以人为本、推进素质教育是教育改革发展的战略主题,是贯彻党的教育方针的时代要求。改革的重点是面向全体学生、促进学生全面发展,着力提高学生服务国家和人民的社会责任感、勇于探索的创新精神和善于解决问题的实践能力。实验课作为医学教育体系中重要的组成部分,不仅是训练操作技能、学习专业知识的重要手段,更是营造良好道德品质、提高人文素养、牢固专业思想的有效途径。

《基础医学整合实验》是基于医学素质培养的基础与临床整合实验课程。本课程的特点是:以临床问题为切入点,以实验项目为载体,以素质培养为目的,为培养优秀医学人才服务。

《基础医学整合实验》通过实验项目来综合不同学科的专业知识和实验技术去解决某个临床问题,由此培养学生站在临床角度综合运用所学知识、主动获取未学知识以解决实际问题的能力,同时训练学生观察能力、表达能力、分析总结能力、沟通能力、严谨性、团队合作、创新精神等专业素质。

因此,《基础医学整合实验》是现有医学教育体系的重要补充,其“寓素质教育于能力培养之中”的课程目标符合临床医学人才培养目标。

第二节 基础医学整合实验课程的主要内容和教学方法

(一) 基础医学整合实验课程主要内容

基础医学整合实验的主要内容包括实验基础知识、整合实验项目、课程评价方法3部分。

1. 实验基础知识 包括第二至第三章的内容:动物实验基本知识、医学实验常用技术。主要介绍基础医学实验常用的动物知识和技术方法。

2. 整合实验项目 包括第四至第十三章的内容。这些实验项目均来源于临床常



见疾病或症状。每个项目均有不同的知识侧重点和技术侧重点,但在人文素质训练上的要求是一样的。

3. 课程评价方法 本课程以素质培养为主要课程目标,故课程评价以形成性评价和终结性评价相结合的方式进行。第十四章主要介绍了课程评价的方法。

(二) 基础医学整合实验课程教学方法

基础医学整合实验课程以素质教育为主要教学目标,其教学方法与其他专业课程有明显区别。

1. 教学团队 团队成员的素质不仅决定了教学效果的好坏,也将对学生的学习兴趣、专业素养有潜移默化的影响,唯有高素质的教师才能培养出高素质的人才。教师的人生观、价值观、治学态度、敬业精神以及人格魅力都会在教学过程中不断感染和教化学生,从而使素质教育润物细无声。

本课程教学团队由实验教师、技术员、临床医生共同组成。实验教师的主要职责为:培养学生良好的实验室习惯,传递动物伦理思想,指导学生熟悉实验流程,训练学生主动学习、独立思考、互相协作、分析表达等素质。技术员的主要职责为:规范学生的实验室习惯,传递动物伦理思想,帮助学生完成部分对实验结果影响大但不属于项目核心技术的操作,指导学生完成部分有难度的实验操作,提供学生实验所需物品。临床医生的主要职责为:指导学生从临床的角度分析实验数据及其与临床的关系,训练临床思维习惯并介绍临床人文特点。

2. 课堂设计 实验项目只是教学形式,而贯穿其中的素质教育才是本课程的核心,故而在教学过程中需注意在细节上的引导。从实验项目来说,学生是整个实验的主导,教师和技术员只是辅助。但在素质教育方面,教师、技术员和临床医生需在实验的各个环节主动进行医学素养的渗透和引导。全部课程由4部分组成,分别是课程概述课、实验课、讨论课和课程总结课。

(1) 课程概述课:介绍本课程的目的和意义、实验室守则和安全制度、动物伦理、本课程的学习方法和考核方法等。

(2) 实验课:每个实验项目的流程包括:学生以小组为单位在实验教师的指导下,根据实验指导设计实验方案。方案交实验教师审阅并与学生一起修订后定稿。学生在技术员指导下准备实验所需物品和实验动物。学生以小组为单位分工合作完成实验过程所需的全部操作,期间实验教师和技术员给予指导和帮助。学生以小组为单位整理实验记录和数据。实验教师审阅实验记录和数据格式后交临床医生讨论课使用。

(3) 讨论课:由临床医生组织讨论课。学生在课前根据自己小组的实验结果查阅文献、分析讨论并得出初步结论。讨论课上,学生以小组为单位汇报实验过程、结果、讨论和结论。临床医生从临床的角度引导学生思考并分析实验结果,推荐参考图书和资料,灌输临床人文思想。讨论课结束后,学生根据临床医生的意见修改并完成正式实验报告。

(4) 课程总结课:在全部实验项目完成后,由实验教师组织课程总结课。总结课内容包括:教师对课程全过程的总结,对班级的整体评价,对共性问题的回复,以及对个别突出现象的点评。听取学生对课程、教学团队的反馈信息及学习心得。



3. 医学素质 在课程概述课上就要首先说明本课程与众不同的教学目的,让学生在学习过程中“自我培养”,减少对老师的依赖。将各种素质要求融入到整个实验流程中,不能为了完成实验项目而忽视了其中的素质要求。学生在设计方案、执行实验以及分析数据等过程中遇到的各种困难,要鼓励他们尽量通过自己或团队的力量去解决,适当的时候可以给予指导和引导,切不可拔苗助长或越俎代庖。临床医生从临床角度解释实验现象、分析实验结果,可使学生真实感受到基础知识与临床的关系,而且优秀临床医生的现身说法,更能牢固学生的专业思想,激发对病患深切的同情,从而使素质教育事半功倍。

第三节 基础医学整合实验的学习方法

《基础医学整合实验》课程是应时代需要而产生的新鲜事物,在基础医学与临床医学间架起一座桥梁,其目的是培养同学们良好的学习习惯,将知识的融会贯通落到实处,并提前进入“医生”角色,从临床应用出发去主动学习各门基础和专业课程。

1. 积极参与,主动学习 本课程的实验项目均来自临床问题。解决这些问题所需要的知识有些可能尚未学到。在面对未知的难题时,同学们要有克服困难的勇气和信心,要主动想办法去获取有效知识和技能,积极参与到团队活动中来,寻找自己的位置,并帮助团队完成课程目标。

2. 跳出框架,融会贯通 本课程的所有实验项目都是跨学科、跨专业、深层次知识和技能整合的结果。同学们要圆满地完成学习任务,就需要跳出原有课程体系的思维框架,将知识综合起来去解决实际问题,学以致用。

3. 角色转变,学以致用 本课程将临床医生引入课堂,是为了让同学们早日进入“医生”角色,站在临床的角度去学习和生活,早日完成从“医学生”到“医生”的心理转变。

4. 严于律己,自我塑造 自古以来,医学被认为是最具有人文精神的学科,人文素质教育不是医学之外的附加,而是医学本质的回归,但目前我国的医学教育仍以医学知识传授和技能培养为主,素质教育远远落后于知识技能的学习。本课程就是为了填补素质教育的空缺而开设。故同学们在学习过程中要明确课程目标,严于律己,努力自我完善和自我培养,争取成为医术精湛、医德高尚的优秀人才。

(苏宁)



动物实验基本知识

实验动物是医药学、生命科学研究的基础和重要支撑条件。实验动物是灵敏的活仪器、是生命科学的探针,常作为人的替身,承受各种各样的科学实验。实验动物的质量和相应的实验条件,直接影响医学和生命科学研究成果的建立和认可。

人们根据实验研究的目的,应用遗传育种理论和特殊方法,通过驯化和选育,将具有遗传均一性和生物学特征一致性、被用于相适应实验研究的动物统称为实验动物。根据遗传特点的不同,实验动物分为近交系、封闭群和杂交群。我国按照实验动物体内外存在微生物和寄生虫的情况,将实验动物分为普通动物、清洁级动物、无特殊病原体动物和无菌动物。

第一节 动物伦理及实验动物保护

1822年,世界上第一部反对人类任意虐待动物的法令《禁止虐待动物法令》在英国首先出台并在英国国会获得了通过,即著名的《马丁法案》。2年后,世界上第一个动物福利组织“反虐待动物协会”(PSPCA)成立。20世纪80年代,美国、德国、瑞士、荷兰等国家相继制定和实施了《动物保护法》。1966年美国出台了第一部《实验室动物福利法》,随后许多国家成立了实验动物管理委员会并进行了立法,加大了对实验动物使用的监督和管理。我国于1988年颁布了《实验动物管理条例》(简称《条例》),2001年11月对该《条例》修订,增加了生物安全和动物福利章节。2006年国家科技部发布了我国第一个法规性文件《关于善待实验动物的指导性意见》。2016年3月,中英第三届实验动物福利伦理国际论坛上讨论了中国首个实验动物福利与伦理的国家标准草案。

为了确保动物福利的实施,1965年,Brambell提出了动物福利的核心内容,得到国际上普遍认可,即必须让动物享有“五大自由”:生理自由、环境自由、卫生自由、心理自由、行为自由。

就实验动物而言,各种形式的实验给动物带来了不同程度的疼痛和痛苦,为了更好地保护实验动物,英国的动物学家 William Russell 和微生物学家 Rex Burch 通过大量的调查研究,提出了科学、合理、人道地使用实验动物的理论,即“3R”原则(the 3R



principles):

1. 替代(replacement)原则 是指使用没有知觉的实验材料代替活体动物,或使用低等动物替代高等动物进行实验,并获得相同实验效果的科学方法。根据是否使用动物或动物组织,可分为相对性替代和绝对性替代;根据替代动物的不同,可分为直接替代和间接替代;根据替代的程度,又分为部分替代和全部替代。

2. 减少(reduction)原则 是指在科学研究过程中,使用较少量的动物获得同样多的实验数据或使用一定数量的动物能获得更多的实验数据的科学方法。用最少量的动物达到所需要的目的,同时也是对动物的一种保护。

3. 优化(refinement) 是指在必须使用动物进行有关实验时,要尽量减少非人道程序对动物的影响范围和程度。可通过改进和完善实验程序,避免、减少或减轻给动物造成的疼痛和不安,保证动物实验结果可靠性并提高实验动物福利。

3R 原则的提出和应用,是在不影响实验要求和实验结果的基础上。如果违背了科学研究的目的,过分地强调 3R 原则,反对使用动物进行实验,3R 原则也就失去了它的价值和意义。

第二节 常用实验动物简介

在医药学和生命科学研究中,最常用的实验动物品种为有小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、猫、狗、猪、猕猴等。

一、小鼠(mouse)

早在 18 世纪就有人开始使用小鼠进行实验研究。小鼠由于体形小,易于控制,性周期短,生长繁殖快,且饲养管理方便,又有明确的质量标准,已培育成大量的近交系、封闭群和基因突变动物。近交系有 500 多个,突变系有 410 多种,远交群有 200 多种,因而常为科学工作者选择应用,在生物医学研究的各个领域得到广泛应用,成为使用最多的实验动物。

小鼠可用于药物急性毒性试验,生物药品和制剂的效价测定,药物筛选试验,某些药物药效和毒副作用的评价,肿瘤学研究,传染性疾病研究,遗传学和遗传性疾病的研究,老年病学的研究,计划生育研究,免疫学研究,微生物学和寄生虫学研究等。

二、大鼠(rat)

实验大鼠是由亚洲产野生褐色大鼠(*Rattus norvegicus*)培育而来。18 世纪后期开始人工饲养,19 世纪中叶首次用于动物实验,大鼠使用量仅次于小鼠。

大鼠主要用于生理学研究,药物安全性评价,药物药效研究,营养学、代谢性疾病的研究,肿瘤研究,遗传疾病研究,口腔医学研究,外科学的研究等。

三、豚鼠(guinea pig)

豚鼠又名荷兰猪、天竺鼠、海猪。原产南美洲西北部,17 世纪开始用于热原实验,此后开始实验动物化,并传遍世界各国。豚鼠主要用于传染病研究,免疫学研究,营



养学研究,耳科学研究,出血和血管通透性变化的实验研究等。

四、兔(rabbit)

家兔是实验中常用的动物之一。易饲养及驯服,抗病力强,繁殖率高,耳大,血管清晰,便于注射给药及采血,主要应用于免疫学和生物制品的研究、热原实验、心血管疾病研究、生殖生理研究等。

第三节 动物实验常用技术

一、实验动物的捉拿与固定

动物的捉拿与固定是实验操作中最基本的一项技术。在进行动物实验时,为了保证动物的安静状态,正确观察和记录动物的反应情况,防止被动物咬伤,实验人员必须掌握正确的捉拿方法,在抓取、固定实验动物前,应对各种动物的一般习性有所了解。操作时要遵循爱护动物的原则,动作敏捷、准确、轻柔,且保证操作成功。如果动物处于兴奋状态,可以等待它安静后再抓取。

1. 小鼠的抓取和固定 小鼠较温顺,一般不咬人,容易捉拿固定。徒手操作时动作宜轻缓,最好佩戴手套。抓取时,用右手拇指和示指的指腹提起小鼠尾部,放在粗糙的桌面上或者笼盖上。在动物向前挣扎爬行时,用左手的拇指和示指捏住双耳及中间头颈背部皮肤,将小鼠翻转置于左手掌心,再用无名指和小指夹住小鼠背部和尾部,保持小鼠头部不能自由转动。此时可以进行灌胃、腹腔注射等实验操作。操作时,要注意力度适中,避免用力过度造成小鼠窒息,或者用力较小,小鼠头部翻转咬伤操作者。如进行尾静脉注射,可使用小鼠固定器进行固定。

2. 大鼠的抓取与固定 大鼠的牙齿很尖锐锋利,抓取不当时,容易咬伤操作者手指,宜佩戴棉纱手套。大鼠的抓取方法与小鼠相似,抓取时,将其尾部提起来,置于粗糙的实验台面或者笼盖上,左手拇指和示指抓住两耳及之间头颈部皮肤,将大鼠翻转,抓在左手掌心,再用小指和无名指夹住尾部牢牢固定,将其固定在左手中,进行灌胃、腹腔注射等实验操作。如进行尾静脉注射,可使用大鼠固定器进行固定。

3. 豚鼠的抓取和固定 豚鼠胆小易受惊,抓取时不能突然袭击。先用手掌扣住鼠背,抓住其肩胛上方的皮肤,再用手指环握豚鼠颈部,另一只手托住臀部,便可以轻轻抓起。

4. 家兔的抓取和固定 家兔较驯服,一般不咬人,但爪子尖锐,易抓伤。抓取时,轻轻打开笼门勿使家兔受惊,一只手抓住家兔颈背部皮毛,将其提起来,另一只手托住家兔臀部拿出来放在实验台上。轻轻抚摸,待家兔安定就可以进行采血、耳缘静脉注射等操作。固定可以采取盒式固定和台式固定。采血和耳缘静脉注射等操作适于选用盒式固定,而台式固定适于测量呼吸、血压和手术操作等。

二、实验动物的标记

实验时,为了区别动物,需要对动物进行编号和标记。根据不同的实验、不同的



动物选择合适的标记法。

1. 小鼠、大鼠、沙鼠、豚鼠 可采用双色涂染法,用苦味酸(黄色)染色标记作为个位数,涂染顺序是从左到右、从上到下。左前肢为1号、左侧腹部2号、左后肢3号、头部4号、背部5号、尾根部6号、右前肢为7、右侧腹部8号、右后肢9号;用品红(红色)染色标记作为十位数,十位数的染色标记方法参照个位数标记法,即左前肢为10号、左侧腹部20号、左后肢30号、头部40号、背部50号、尾根部60号、右前肢70号、右侧腹部80号、右后肢90号,第100号不做染色标记。比如标记第12号实验动物,在其左前肢涂染品红(红色),在其左侧腹部涂上苦味酸(黄色)即可。双色涂染法可标记100位以内的号码。

2. 家兔 采用中粗的黑色记号笔在兔耳反面写号码,实验过程中若编号模糊,可及时涂加。

三、实验动物的常用给药方法

在实验中,经常需要观察药物对机体功能、代谢及形态的影响,这就需要将药物注入实验动物体内。给药的途径有多种,可根据不同的实验动物、实验目的、药物剂型等来进行选择。

(一) 经口给药法

1. 口服法 一般将药物溶于饮水或者放入饲料中,让动物自由摄取。此法简单方便,但是不能准确定量,不能保证药物剂量的准确。

2. 灌胃法 用灌胃器将药物注入动物胃内。灌胃器由注射器和灌胃针组成,常用不锈钢、头端球形的灌胃针。小鼠的灌胃针约4~5cm长,直径1mm,大鼠灌胃针长5~7cm,直径约1.2mm,灌胃针的前端有一个微小的中空圆形金属球,可以防止灌胃针尖刺入气管或损伤消化道。小鼠的灌胃容积一般是0.1~0.2ml/10g,最大0.35ml/10g,每只小鼠的灌胃最大容积不超过0.8ml。大鼠的灌胃容积一般在1~2ml/100g。

(二) 注射给药法

1. 皮下注射 用左手拇指和示指捏起背部皮肤,将注射针头刺入皮下,稍微摆动针头,如果易摆动表示针尖在皮下,即可进行注射。

2. 腹腔注射 左手固定动物,腹部用酒精消毒,右手拿注射器,从左侧或者右侧下腹部成45°进针。针头穿过腹肌进入腹腔,有落空感,回抽无血液、尿液、肠液等,即可缓慢推入药物。

3. 肌肉注射 一般选择后肢股部肌肉,肌肉发达且无血管经过的部位。大、小鼠肌肉注射,可以选择大腿外侧肌肉进行注射。

4. 静脉注射 大、小鼠的静脉注射可选择尾部静脉或舌下静脉。豚鼠一般多采用后掌外侧静脉注射。家兔多采用耳缘静脉注射。

(张三印 尹艳艳)



医学实验常用技术

第一节 分子生物学实验常用技术简介

20 世纪 50 年代,James Watson 和 Francis Crick 提出 DNA 双螺旋结构,标志着现代分子生物学的兴起,它是一门从分子水平上阐述生命现象和本质的科学,是现代生命科学的“共同语言”。目前,分子生物学理论和技术已经渗透到基础医学和生物学的各个领域,其核心内容是通过研究生命的物质基础——核酸、蛋白质等生物大分子的结构、功能及其相互作用的规律来阐明生命分子基础,从而探讨生命的奥秘。尤其是人类基因组计划的顺利实施与完成,引发了科学家运用各种“组学”或“组学”的集成研究生命现象。所谓组学(-omics),就是通过检测、分析某一层面所有构成要素(如机体整个基因组、所有蛋白分子、所有代谢物等),以及构成要素之间的相互作用关系研究生命状态的一种方法,是一门在系统整体水平进行研究的新型学科,是目前生命科学最活跃的领域之一。组学研究最常用的技术则为具有高通量检测能力“生物芯片”技术、测序技术等,可以看做是现代分子生物学技术的集合。

一、基础分子生物学技术简介

分子生物学技术在目前医学科学研究中越来越占据主导地位,本章主要介绍的基础技术有:核酸纯化技术、凝胶电泳技术、核酸定量技术、聚合酶链反应(PCR)、实时荧光定量技术(RT-q-PCR)、凝胶电泳技术、蛋白免疫印迹杂交(Western blot)技术及双向电泳技术(2-DE)等。

(一) 核酸纯化技术

1. 真核细胞 DNA 的制备 制备基因组 DNA 是进行基因结构和功能研究的重要步骤,通常要求得到的片段长度不小于 100~200kb。在 DNA 提取过程中应尽量避免使 DNA 断裂和降解,以保证 DNA 的完整性,为后续的实验打下基础。一般真核细胞基因组 DNA 有 $10^7 \sim 10^9$ bp,可以从新鲜组织、培养细胞或低温保存的组织细胞中提取,常在 EDTA 以及 SDS 等试剂存在下用蛋白酶 K 消化细胞,随后用酚抽提而获得。这一方法获得的 DNA 经酶切后可用于 Southern 分析,还可用于 PCR 的模板、文库构建等实验。

2. RNA 的提取、纯化和 cDNA 合成 细胞内总 RNA 制备方法很多,如异硫氰酸胍热苯酚法等。许多公司有现成的总 RNA 提取试剂盒,可快速有效地提取到高质量的总 RNA。目前动植物总 RNA 提取广泛使用的是 Trizol 法。该方法提取的总 RNA 几乎没有蛋白和 DNA 污染,且能保持 RNA 的完整性,因此对纯化 RNA 及标准化 RNA 的生产十分有用。此法提取的 RNA 可直接用于 Northern 斑点分析、斑点杂交、Poly(A)+ 分离、体外翻译及分子克隆等。纯化的 mRNA 在 70% 乙醇中于 -70°C 可保存 1 年以上。

模板 mRNA 的质量直接影响到 cDNA 合成的效率。由于 mRNA 分子的结构特点,容易受 RNA 酶作用而降解,同时 RNA 酶极为稳定且广泛存在,因而在提取过程要严禁 RNA 酶的污染,并设法抑制其活性,这是实验成败的关键。

(二) 电泳技术

电泳是指带电颗粒在电场的作用下发生迁移的过程。许多生物分子都具有电离基团,它们在某个特定的 pH 值下可以带正电或负电,在电场的作用下,带电分子会向着与其所带电荷极性相反的电极方向移动。电泳技术就是利用在电场的作用下,待分离样品中各种分子带电性质以及分子本身大小、形状等性质的差异,使带电分子产生不同的迁移速度,从而对样品进行分离、鉴定或提纯的技术。此外,现今通过图像分析软件,可对电泳条带进行半定量分析。

电泳必须在一种支持介质中进行,目前使用得最多的是琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。琼脂糖凝胶通常用水平装置在强度和方向恒定的电场下电泳,用于等电聚焦、免疫电泳,以及 DNA、RNA 的大小和完整性的检测。聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)可用于蛋白质、酶、核酸等生物大分子的分离、定性、定量和少量制备,还可测定分子量和等电点等,尤其分离小片段 DNA (5~500bp)效果较好,其分辨力极高,甚至相差 1bp 的 DNA 片段也能够分开。

此外,在 PAGE 的基础上,又发展了 SDS-PAGE、等电聚焦(isoelectric focusing, IEF 或 EF),其中前者可以测定蛋白的分子量,后者不仅用来分离、鉴定和测定蛋白质的等电点、分离复合蛋白,同时还可以结合前者,组合为双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)来分析蛋白质的亚基、分子大小和各种蛋白质成分的图谱,2-DE 技术现今为蛋白质组学研究技术之一。

无论是 DNA 电泳图、RNA 电泳图还是蛋白的凝胶电泳图,以及 Western blot 膜,或者是化学发光膜图,均可以通过电泳条带专门的图像分析软件(常见的有 Bandscan、Quantity One 等)把电泳条图像灰度信号转换成数字,实现半定量分析,获取目的基因或某一蛋白分子在组别间的差异。

(三) 聚合酶链反应技术

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)是一种选择性体外扩增 DNA 或 RNA 的方法,类似于 DNA 的天然复制过程。它包括三个基本步骤:①模板 DNA 的变性:模板 DNA 经加热至 93°C 左右一定时间后, DNA 双链解离成为单链,以便与引物结合,为下轮反应做准备;②模板 DNA 与引物退火(复性):模板 DNA 经加热变性成单链后,温度降至 55°C 左右,引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合;③引物的延伸:DNA 模板-引物结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下,以 dNTP 为反应原料,靶序列为



模板,按碱基配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链。重复循环变性-退火-延伸三过程,就可获得更多的“半保留复制链”,而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟,经 25~35 轮循环就可使 DNA 扩增达 10^6 倍。

PCR 反应中的主要成分包括:①上下游引物;② 4 种三磷酸脱氧核苷酸(dNTP);③ Mg 离子;④ TaqDNA 聚合酶;⑤反应缓冲液;⑥模板。其中②③④⑤各组分按照最佳配比混合在一起的混合液,有商品供应,统称为 PCR MIX,指的是做 PCR 时的预混液,使用时直接加入模板和引物即可,大大缩短了 PCR 反应体系配制时间。

PCR 技术是一种极为重要的分子生物学基础技术,除体外扩增目的基因,PCR 技术的应用似乎是无止境的,在不断地发展。它在分子生物学领域的应用,主要包括克隆目的基因、制备及筛选 cDNA 文库、序列测定、检测突变碱基、标记探针、寻找新基因方面等。在医学方面,PCR 技术已广泛地应用在亲子鉴定、个体识别、免疫配型、疾病诊断等方面。可以说,PCR 技术已经渗透到生物科学的各个领域。

(四) 实时荧光定量技术

荧光定量 PCR (realtime fluorescence quantitative PCR, RT-q-PCR) 是 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出的一种定量技术。它不同于常规 PCR 借助电泳对扩增反应的终产物进行定量及定性分析,而是通过荧光标记的特异性的探针或荧光染料,对 PCR 产物进行标记跟踪,实时在线监控反应过程,结合相应的软件可以对产物进行分析,计算待测样品模板的初始浓度。

目前实时荧光 PCR 技术已经被广泛应用于基础科学研究、临床诊断、疾病研究及药物研发等领域。其中最主要的应用集中在以下几个方面:

(1) DNA 或 RNA 的绝对定量分析:包括病原微生物或病毒含量的检测,转基因动植物转基因拷贝数的检测,RNAi 基因失活率的检测等。

(2) 基因表达差异分析:例如比较经过不同处理样本之间特定基因的表达差异(如药物处理、物理处理、化学处理等),特定基因在不同时相的表达差异以及 cDNA 芯片或差显结果的验证。

(3) 基因分型:例如 SNP 检测,甲基化检测等。随着实时荧光定量 PCR 技术的推广和普及,该技术必然会得到更广泛的应用。

(五) 蛋白免疫印迹杂交技术(Western blot)

免疫印迹法(immunoblotting test, IBT)亦称酶联免疫电转移印斑法(enzyme linked immunoelectrotransfer blot, EITB),因与 Southern 早先建立的检测核酸的印迹方法 Southern blot 相类似,亦被称为 Western blot。免疫印迹(Western blotting, WB)是在蛋白质电泳分离和抗原抗体检测的基础上发展起来的一项检测蛋白质的技术,是进行蛋白质分析最流行和成熟的技术之一。它将 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的高分辨力与抗原-抗体反应的特异性相结合。典型的印迹实验包括三个步骤:①蛋白质的电泳分离;②将电泳后凝胶上的蛋白质转移至固体膜上,用非特异性非反应活性分子封闭固体膜上未吸附蛋白质区域;③免疫学检测。免疫印迹克服了聚丙烯酰胺凝胶电泳后直接在凝胶上进行免疫学分析的弊端,极大地提高了其利用率、分辨率和灵敏度,使其成为使用最广泛的免疫化学方法之一。