

实验教材目录

- 医学形态学实验教程
- 医学机能学实验教程
- 生物化学与分子生物学实验教程
- 医学免疫学与病原生物学实验教程
- 医学细胞生物学与医学遗传学实验教程

北京大学生物医学实验教学中心
2008.5

北京大学医学实验系列教材

医学形态学实验教程

(人体解剖学)

主 编 张卫光

副主编 卫 兰 钟延丰 刘永寿



北京大学医学出版社

北京大学医学实验系列教材

医学形态学实验教程

(人体解剖学)

主 编 张卫光

副主编 卫 兰 钟延丰 刘永寿

编 委 (按姓氏笔画排序)

于恩华 王 珂 石敏忠 田 琰

毕振伍 闫军浩 杨立元 杨晓梅

吴 俊 张书永 张 艳 张翔胤

陆 敏 陈庆山 金 铎 赵 莹

赵 靖 秦丽华 袁 健 栾丽菊

郭丽梅 雷季良

秘 书 张 艳

北京大学医学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学形态学实验教程. 人体解剖学/张卫光主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2008. 5

(北京大学医学实验系列教材)

ISBN 978-7-81116-559-3

I. 医… II. 张… III. ① 实验医学—医学院校—教材
② 人体解剖学—实验—医学院校—教材 IV.
R-33 R322-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 040140 号

医学形态学实验教程 (人体解剖学)

主 编: 张卫光

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E-mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京东方圣雅印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 吕证宝 许 立 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 9.25 插页: 8 字数: 228 千字

版 次: 2008 年 5 月第 1 版 2008 年 5 月第 1 次印刷 印数: 1-3000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-559-3

定 价: 21.50 元

版权所有 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

北京大学医学实验系列教材编委会

主任委员 李学军

副主任委员 管又飞 宫恩聪

秘书长 张燕

委员 (按姓氏笔画排序)

卫兰 王宪 王月丹 白云 李彤 刘永寿

吴丹 吴伟 吴立玲 肖军军 宋德懋 张卫光

张涛 范少光 钟延丰 祝世功 贾弘昶 贾竹青

徐海 倪菊华 梁静 谭焕然

序

现代医学是一门实验科学。医学院校在培养学生时一般都很重视实验教学，北京大学医学部也是如此。但在我的印象中，以前都是各学科单独设立实验课程，彼此多有重复。从内容上看，有相当部分只是理论课上某些结论的印证，学生们往往对着实验指导一步一步往下操作，实验结束、报告写完，脑子里并没有留下多少印象。近些年来，北京大学医学部基础医学院围绕培养创新人才的目标，在教学内容、教学方法、课程模式、考核体系等方面进行了新的探索和实践，其中也包括实验教学的改革。他们在1998年创建了生物医学实验教学中心，十年来对12门基础医学课程的实验教学进行了重组、整合和改革，打破了“单一课程”、“单一实验室”的原有模式，形成了以机能、形态、生物化学与分子生物学、病原与免疫、细胞生物与遗传五个模块和基础性实验、综合性实验、研究性实验三个层次所构成的基础医学实验教学体系，并且在实验内容方面注重培养学生科学思维，激发学生创新活力，提高学生解决实际问题的能力。我认为北京大学医学部在基础医学实验课程教学方面进行的改革是扎实的，是成功的。《北京大学医学实验系列教材》是他们十年改革成果的总结，值得各医学院校参考。我也衷心希望我国从事医学教育的同志们再接再厉，在实践中不断摸索新的经验，思想再解放一些，改革的步伐再迈得大一些，为建立具有中国特色的先进医学教育体系做出新的贡献。

是为序。

韩启德

二零零八年四月二十九日

前 言

北京大学医学部的形态学实验教学已有近百年的历史，拥有完整的实验教学体系。医学形态学实验教程是为使五年制及长学制医学生更好地掌握医学形态学而精心编写的一套实验教材，全书分为三册，立足于北京大学基础医学院所开设的系统解剖学、局部解剖学、组织学、胚胎学和病理学实验内容，力求反映我校实验教学改革成果，充分体现了基础知识的掌握、基本技能的培养和创新能力的提高。

医学形态学实验教程人体解剖学分册包括基础实验、综合实验和特色实验三部分，其中基础实验包含了22次系统解剖学实验和9次局部解剖学实验，每次实验又以实验目的、实验材料、实验步骤、思考与讨论4个板块加以编写；综合实验以器官和疾病为主线，立足于解剖学、组织学和病理学，多学科、多角度综合设计实施；特色实验则包括北京大学基础医学院针对在校学生所开设的最具我校特色的形态学实验。

本书简明扼要、图文并茂，既有清晰的框架，又贯穿以启发性的思考，特别注重学生自学能力和动手能力的培养，是学习医学形态学的必备教材。

书中的局部解剖学实验步骤主要参考了我校于恩华教授主编的《解剖学与解剖方法》，谨在此对于恩华教授的大力支持表示诚挚的感谢。为了精减篇幅，书中只列出了部分观察结构的名称，关于其详述请参考相关教材。书中还使用了常用的简称，例如：动脉为“A”，静脉为“V”，神经为“N”。

本书尽管力求“严谨、精练、实用、新颖、有特色”，但自知成书匆忙，定有错误或不妥之处，恭请指正。

张卫光

2008年4月2日

目 录

基本实验

人体解剖学总论	(3)
系统解剖学	(6)
第一篇 运动系统	(6)
实验一 骨	(6)
实验二 骨连结	(10)
实验三 骨骼肌	(13)
第二篇 内脏学	(17)
实验一 消化系统	(17)
实验二 呼吸系统	(21)
实验三 泌尿系统	(23)
实验四 男性生殖系统	(25)
实验五 女性生殖系统	(27)
第三篇 脉管系统及感受器	(29)
实验一 脉管系统总论及心	(29)
实验二 动脉	(31)
实验三 静脉	(34)
实验四 淋巴系统	(36)
实验五 感受器	(38)
第四篇 神经及内分泌系统	(41)
实验一 脊神经	(41)
实验二 脑神经	(44)
实验三 内脏神经	(48)
实验四 脊髓	(50)
实验五 脑干	(52)
实验六 小脑和间脑	(54)
实验七 端脑	(56)
实验八 神经系统的传导通路、脑脊髓被膜、脑血管和脑脊液循环	(58)
实验九 内分泌系统	(61)
局部解剖学	(62)
实验一 胸前区、腋窝和背部	(62)
实验二 上肢	(65)

实验三	胸壁、胸腔和纵隔	(70)
实验四	腹前壁	(75)
实验五	腹膜、结肠上区和结肠下区	(78)
实验六	腹后壁、小骨盆和会阴	(83)
实验七	下肢	(88)
实验八	颈部	(96)
实验九	头面部	(101)

综合实验

实验一	肝纤维化的解剖、组织和病理学观察	(107)
实验二	病毒性肺炎的解剖、组织和病理学表现	(110)
实验三	心的解剖、发生与心铸型标本的制作	(112)
实验四	心肌梗死的解剖、组织和病理学表现	(114)

特色实验

实验一	石蜡切片 HE 染色	(119)
实验二	辣根过氧化物酶 (HRP) 逆行追踪大鼠运动皮质神经元	(125)
实验三	海马结构的神经解剖	(127)
实验四	观察致敏状态小鼠肠系膜肥大细胞的表达	(129)
实验五	Grimelius 银染反应显示豚鼠小肠内分泌细胞	(130)
实验六	免疫双重标记染色法显示大鼠胰岛 A、B 细胞	(131)
实验七	小鼠精子的采集	(133)
实验八	大鼠胚胎致畸实验	(135)

基本实验

人体解剖学总论

【实验目的】

1. 了解人体解剖学的定义和分科。
2. 掌握人体的系统、轴、面和方位术语。
3. 掌握基本解剖方法。
4. 明了解剖实验课的重要性及注意事项。

【实验步骤】

1. 人体解剖学的定义 人体解剖学 (human anatomy) 是研究正常人体的形态结构的一门科学, 是医学的基础课, 属形态学的范畴。

2. 人体解剖学的分科

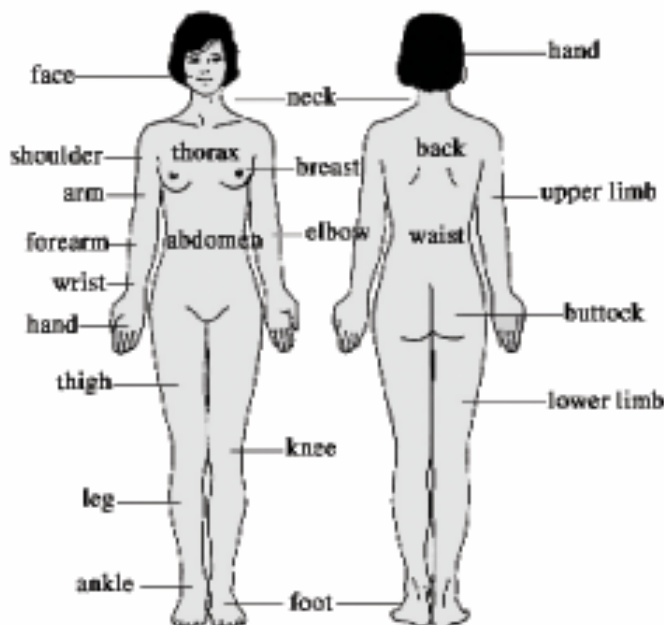
(1) 系统解剖学 (systematic anatomy): 按各系统来研究其各器官形态结构的一门学科。人体可分为运动、消化、呼吸、泌尿、生殖、脉管(循环)、感觉器、神经、内分泌系统。

(2) 局部解剖学 (regional anatomy): 按局部(如头颈部、胸部、腹部、上肢、下肢等)研究各器官构造及其在此局部的位置、毗邻和连属等关系的解剖学。

(3) 断面解剖学 (sectional anatomy): 配合 X 线断层、超声、CT 和磁共振扫描成像技术等研究各局部或器官的断面形态的解剖学。

3. 人体的分部: 人体可分为头、颈、躯干(胸、背、腹、腰)和四肢(附肢)四部, 见下图。

4. 解剖学姿势: 身体直立、两眼向正前方平视, 两臂下垂, 手掌向前, 两足并立, 足尖向前。见下图。



人体的解剖学姿势及分部

断肌时，先将该肌与深方结构游离，以垂直于肌束的方向，整齐地切开。

(6) 解剖深部血管、神经：解剖时应从较粗的一端开始，沿血管、神经走行方向用刀尖划开包绕它们的结缔组织，然后用平镊提起血管、神经，沿其两侧用刀尖背面、刀柄、镊或剪刀双尖的开闭运动作钝性分离，至其进入器官处，分离中可见与该血管、神经相连的分支。剥除结缔组织时，用镊尖夹起清除的组织，确认其中无动脉和神经后，方可在直视下清除。需去除静脉和淋巴结时，务必分离清楚后进行。较大的静脉切除时，需先在切除的两端作双重结扎，在两端的结扎线间切断去除该段静脉，以免淤血流出污染周围结构。

(7) 解剖脏器：首先原位暴露，观察脏器的位置、形态、毗邻和浆膜配布，并理解其体表投影。然后剖查其血管、神经。必要时可切断血管、神经及其它固定装置，完整地取下脏器进行观察；或根据操作要求切开脏器，观察其内腔和腔壁或切面上的结构。

8. 实验注意事项

解剖实验课使用的尸体和标本都是来自于志愿者的遗体。是他（她）们的彻底奉献才使解剖实验教学成为可能。他们是我们大体解剖学的无言的老师。我们不仅应该敬重这些遗体捐赠者，还应该对他们常怀感恩之心、努力学习、早日成材，用自己的医学知识服务患者，回报社会。因此，请同学们注意如下事项：

(1) 必须尊重尸体，严格遵守操作规程。不得任意切割尸体或破坏标本。培养良好的学风和严肃认真的科学态度。



向遗体捐献者纪念碑敬献花圈



向“无言的大体老师”致敬

(2) 注意学习操作过程中的分工协作，小组内相互配合，培养独立思考、分析问题、解决问题的能力 and 互助协作的团队精神。

(3) 解剖操作之前，应仔细阅读教材中所列解剖步骤，根据教材的提示，审慎地寻找、显示有关结构；并学会利用图谱配合操作，独立准确地辨认各局部结构。

(4) 注意骨性标志是寻找有关软组织的重要依据。

(5) 注意尸体标本可能出现的变异类型，随时加以记录，并对照正常情况进行讨论。

(6) 保持尸体标本的湿润。注意不可用普通清水湿润尸体，以防霉变。

(7) 注意保持解剖器械的洁净、锋利，并妥善保管。每次解剖结束，应整理已经解剖的结构，使之恢复原位，并清理台面、洗洁器械，收好尸体标本。保持实验室的整洁。

(张卫光，于恩华)

系统解剖学

第一篇 运动系统

实验一 骨

【实验目的】

1. 了解运动系统的组成（骨、骨连结和骨骼肌）。
2. 掌握骨的形态（长骨、短骨、扁骨、不规则骨和含气骨）、构造（骨质、骨膜、关节软骨、骨髓）。了解骨的化学成分和物理性质。了解骨的血管和神经。
3. 掌握躯干骨的组成（椎骨、肋和胸骨）和体表标志；掌握椎骨一般形态的共同特征和各部椎骨的特征（包括骶骨和尾骨）；掌握胸骨的分部、一般形态、胸骨角的位置及其临床意义；掌握肋的一般形态。了解特殊肋的特征。
4. 掌握颅的组成及体表标志，各分离颅骨的名称、位置和主要形态特点。掌握颅底内外面的形态结构；重点是与血管、神经有关的重要孔裂的名称、位置。掌握眶、骨性鼻腔的构成及交通、鼻旁窦的位置及开口。了解颞下窝、翼腭窝的位置。了解新生儿颅的特点。
5. 掌握四肢骨的组成和体表标志。掌握上肢骨的组成、分部及各骨间的位置关系，锁骨、肩胛骨、肱骨、桡骨、尺骨及手骨的主要形态特点，腕骨的排列顺序。
6. 掌握下肢骨的组成、分部及各骨间的位置关系。掌握髌骨的组成以及髌骨、股骨、髌骨、胫骨、腓骨和足骨的形态特点，跗骨的排列位置。

【实验材料】

1. 标本 ① 骨学总论标本：骨架、各种类型骨标本（长骨、短骨和颅盖骨）的断面标本、新鲜骨、煅烧骨和脱钙骨；② 躯干骨：椎骨、胸骨、肋骨；③ 颅骨：分离颅骨、颅盖、颅底、颅骨正中矢状断、胎儿颅骨；④ 上肢骨：锁骨、肩胛骨、肱骨、桡骨、尺骨及手骨；⑤ 下肢骨：髌骨、股骨、髌骨、胫骨、腓骨和足骨。
2. 挂图及多媒体。

【实验步骤】

骨学总论

1. 骨的分类（图-系-I-01）：
 - (1) 按部位分类：颅骨、躯干骨、附肢骨。
 - (2) 按形态分类：长骨、短骨、扁骨、不规则骨（含气骨）。** 长骨可分一体（骨干）两端（骺、关节面），其内有空腔（骨髓腔）。

** 标记处为观察重点，下同。

2. 骨的构造：骨质（骨密质和骨松质，图-系-I-02）及其分布、骨膜、骨髓（红、黄骨髓）。

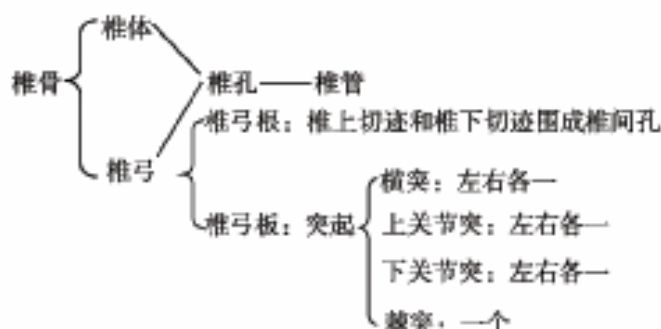
** 红骨髓。

3. 骨的化学成分和物理性质。

躯干骨

1. 椎骨：

(1) 椎骨的一般形态（图-系-I-03）。



(2) 各部椎骨的主要特征列表如下。

椎骨	结构特点
颈椎 (C)	7 块，椎体较小，横突孔，棘突的末端分叉（图-系-I-04）
胸椎 (T)	12 块，椎体肋凹，横突肋凹，棘突长、伸向后下、呈叠瓦状排列
腰椎 (L)	5 块，椎体大，棘突呈宽板状、水平向后、棘突间隙大
骶骨 (S)	由 5 块骶椎融合而成，倒三角形，岬、骶管、骶管裂孔、骶角、耳状面等
尾骨 (Co)	由 4 块退化的尾椎融合而成

2. 肋 可分为真肋（1~7 对）、假肋（8~12 对）。

肋头、肋结节、肋沟。

3. 胸骨 可分为胸骨柄、胸骨体、剑突三部分。

胸骨角、颈静脉切迹。

** 胸骨角平面：

- (1) 向外平对第二对肋软骨；
- (2) 向后平对第四胸椎体下缘；
- (3) 气管的分叉处；
- (4) 上、下纵膈的分界处；
- (5) 升主动脉与主动脉弓的交界处；
- (6) 主动脉弓与胸主动脉的交界处；
- (7) 胸导管的左转处；
- (8) 脊神经 T₂ 的分布区域。

颅骨

1. 组成 (图-系-I-05)

(1) 脑颅骨: 额 1 块、顶 2 块、枕 1 块、颞 2 块、蝶 1 块、筛骨 1 块, 共 8 块。

(2) 面颅骨: 鼻 2 块、泪 2 块、上颌 2 块、颧 2 块、腭 2 块、下鼻甲 2 块、犁 1 块、下颌 1 块、舌骨 1 块, 共 15 块。

2. 颅的整体观

(1) 颅的顶面观:

(2) 颅底的内面观 (图-系-I-06): 颅前、中、后窝。

1) 颅前窝: 鸡冠、筛板、筛孔。

2) 颅中窝: 视神经管、前/后床突、鞍结节、鞍背、颈动脉沟、垂体窝、三叉神经切迹、破裂孔、圆孔、卵圆孔、棘孔。

** 蝶鞍。

3) 颅后窝: 枕骨大孔、内耳门、鼓室盖、颈静脉孔、乙状窦沟、斜坡。

(3) 颅底外面观: 关节结节、下颌窝、颈动脉管外口、乳突、茎突、茎乳孔、腭大孔、鼻后孔。

(4) 颅的侧面观 (图-系-I-07): 颞窝、颞下窝、翼腭窝。

1) 翼点:

2) 翼腭窝的交通:

① 向前经眶下裂通眶;

② 向后经圆孔通颅中窝, 经翼管通颅底外面;

③ 向外经翼上颌裂通颞下窝;

④ 向内经蝶腭孔通鼻腔;

⑤ 向下经翼腭管、腭大孔通口腔。

(5) 颅的前面观 (图-系-I-08): 眶、骨性鼻腔、骨性口腔。

1) 眶的交通:

① 向下经鼻泪管通鼻腔;

② 向后经视神经管和眶上裂通颅中窝;

③ 向前下经眶下管和眶下孔通外界;

④ 向后下经眶下裂通颞下窝和翼腭窝。

2) 骨性鼻腔 (图-系-I-09):

骨鼻中隔; 鼻孔; 梨状孔、鼻后孔; 鼻甲和鼻道 (上、中、下)。

3) 鼻旁窦及其开口: 额窦 (中鼻道)、上颌窦 (中鼻道)、筛窦 (中鼻道和上鼻道)、蝶窦 (蝶筛隐窝)。

4) 骨性鼻腔的交通:

① 向前经梨状孔通外界;

② 向后经鼻后孔通咽;

③ 向上经筛孔通颅前窝, 经鼻泪管通眶;

④ 向下经切牙孔通口腔;

⑤ 与四种鼻旁窦相交通。

3. 新生儿颅的特征和生后变化。

** 颅凶：前凶（额凶）、后凶（枕凶）、蝶凶、乳突凶。

附肢骨

1. 上肢骨（图-系-I-01）：

(1) 上肢带骨：锁骨、肩胛骨。

** 肩胛骨：两面（前、后面）、三缘（上缘、内侧、外侧缘）、三角（上角、下角、外侧角）、肩胛冈、肩峰、喙突、孟上/下结节、关节孟、肩胛下窝、冈上窝、冈下窝。

(2) 自由上肢骨：肱骨、桡骨、尺骨、手骨（腕骨、掌骨、指骨）。

** 肱骨：肱骨头、解剖颈、外科颈、大/小结节、大/小结节嵴、三角肌粗隆、桡/尺神经沟、肱骨小头、肱骨滑车、内/外上髁、桡窝、冠突窝、鹰嘴窝。

2. 下肢骨（图-系-I-01）：

(1) 下肢带骨：髌骨（髌骨、耻骨、坐骨）。

** 髌骨

髌骨：髌骨翼，髌嵴（T₄棘突），髌前上棘、髌后上棘，髌结节，髌窝、弓状线、耳状面。

耻骨：耻骨体，耻骨联合面，耻骨结节，耻骨上、下支。

坐骨：坐骨体，坐骨结节，坐骨棘，坐骨大/小切迹，坐骨支，闭孔，髁臼。

(2) 自由下肢骨：股骨、髌骨、胫骨、腓骨、足骨（跗、跖、趾骨）。

** 股骨：股骨头、股骨颈、股骨头凹、大/小转子、转子间嵴/线、粗线、臀肌粗隆、内/外侧髁、髁间窝、内/外上髁、收肌结节。

【思考与讨论】

1. 全身的骨按形态可分四类，举例说明各类骨的形态特点。
2. 颅底的内/外侧观，颅的前/侧面观。
3. 骨性鼻腔外侧壁的主要结构，鼻旁窦的名称、位置和开口。

实验二 骨 连 结

【实验目的】

1. 了解骨连结的分类。掌握关节的主要结构和辅助结构（滑膜囊、滑液囊、韧带、关节唇、关节盘），关节的分类和关节的运动。

2. 掌握脊柱的组成和分部。掌握椎间盘的形态、结构及其临床意义，前、后纵韧带和黄韧带的位置，椎间关节的构成。了解寰枕、寰枢关节的构成和运动。掌握脊柱的四个生理弯曲和脊柱的运动。

3. 掌握肋与胸椎的连结和运动。了解肋与肋软骨和胸骨的连结概况。掌握胸廓的构成（胸椎、肋和胸骨）、形态、整体观和运动。

4. 了解颅骨的连结形式。掌握颞下颌关节的组成、形态结构及运动。

5. 掌握肩关节、肘关节、腕关节的组成、结构特点及运动。了解掌指关节、手指骨间关节的运动。

6. 掌握骨盆的组成及一些重要的解剖标志，了解骨盆的性差、髋髂关节和耻骨联合的形态结构特点。掌握髌关节、膝关节、距小腿（踝）关节的组成、结构特点及运动。了解跗骨间关节的运动和足弓的形态结构。

【实验材料】

1. 躯干骨的连结标本 骨架、椎体间连结、椎弓间连结、寰枕关节、寰枢关节、胸前壁及胸肋关节、肋头及肋横突关节。

2. 颅的连结标本 颅缝、颞下颌关节。

3. 上肢骨的连结标本 胸锁关节、肩关节、肘关节、腕关节和手的连结。

4. 下肢骨的连结标本 骨盆、髋关节、膝关节、距小腿关节和足的连结。

【实验步骤】

骨连结总论

骨与骨之间借纤维结缔组织、软骨或骨相连，形成骨连结。根据连结的方式不同，可分为直接连结和间接连结。

1. 直接连结：纤维连结、软骨连结和骨性结合。

2. 间接连结：又称关节。

(1) 关节的结构

1) 关节的基本结构：关节面、关节囊、关节腔

2) 关节的辅助结构：韧带、关节盘、关节唇、滑膜囊和滑膜囊

** 韧带包括囊外韧带、囊内韧带（髋关节中的股骨头韧带，膝关节中的前、后交叉韧带）

** 关节盘：出现在胸锁关节、腕关节、颞下颌关节



(2) 关节的运动：屈伸、内收外展、旋内旋外（旋前旋后）、环转运动。

(3) 关节的分类：单关节（肩关节）复关节（肘关节）、联合关节（颞下颌关节）、微动关节（关节突关节）。



躯干骨的连结

1. 椎骨的连结（图-系-I-10, 11）

(1) 椎体间的连结：相邻的椎体间借椎间盘、前纵韧带、后纵韧带连结。

** 椎间盘：髓核、纤维环。

(2) 椎弓间的连结：椎弓间的连结包括韧带和关节突关节，其中韧带包括黄韧带、横突间韧带、棘间韧带、棘上韧带。

(3) 脊柱：颈曲、胸曲、腰曲、骶曲。

2. 肋的连结

(1) 肋与椎骨的连结：（图-系-I-11）；包括肋头关节、肋横突关节。

(2) 肋与胸骨的连结：胸肋关节（第2~7肋软骨）。

3. 胸廓（图-系-I-01）

(1) 胸廓的组成：12个胸椎、12对肋、胸骨。

(2) 胸廓上口：第一胸椎体、第一对肋、胸骨柄的上缘。

(3) 胸廓下口：第12胸椎体、第11和12对肋、肋弓、剑突。

附肢骨的连结

1. 上肢骨的连结：

(1) 上肢带骨的连结：

肩关节 组成：肱骨头、肩胛骨关节盂（图-系-I-12）。

特点：“头大、盂小”，并有孟唇；关节囊薄而松弛，其下壁无韧带和肌腱加强，最为薄弱，易形成脱臼；关节囊内有肱二头肌的长头肌腱。

运动（包括运动的形式、肌肉、神经支配）：可作各种运动

(2) 自由上肢骨的连结：肘关节、桡腕关节。

肘关节 组成：肱骨下端、桡骨和尺骨的上端组成，为复关节，包括肱尺关节（肱骨滑车、尺骨滑车切迹）、肱桡关节（肱骨小头、桡骨头关节凹）、桡尺近侧关节（桡骨的环状关节面、尺骨的桡切迹）。（图-系-I-13）

特点：三关节共囊，关节囊前后壁薄弱，两侧有侧副韧带加强；桡骨环状韧带。

运动：屈伸、旋前旋后。

桡腕关节 组成：桡骨腕关节面、尺骨头下方的关节盘、舟骨、月骨、三角骨。

特点：关节囊薄而松弛。

运动（包括运动的形式、肌肉、神经支配）：各种运动。

2. 下肢骨的连结

(1) 下肢带骨的连结：骨盆与髋关节。

骨盆 组成：髌骨、尾骨、髌骨借耻骨联合、髌髌关节、韧带（髌结节韧带、髌棘韧带）连结而成。

小骨盆上口：髌骨岬、弓状线、耻骨梳、耻骨嵴、耻骨联合上缘围成的界线。

小骨盆下口：尾骨尖、髌结节韧带、坐骨结节、坐骨支、耻骨下支、耻骨联合下缘。

骨盆的性别差异：

大/小骨盆、坐骨大/小孔、骨盆入/出口、盆腔、耻骨弓、耻骨下角。

髋关节 组成：髌臼、股骨头。

特点：“头小、臼深”，并有髌臼唇；关节囊紧张、坚韧，其后下方较薄弱；关节囊内有股骨头韧带。

运动（包括运动的形式、肌肉、神经支配）：各种运动，但运动幅度小。

(2) 自由下肢骨的连结：膝关节、距小腿关节。

膝关节 组成：股骨的内、外侧髌，胫骨的内、外侧髌、髌骨。（图-系-I-14）

特点：关节囊宽阔松弛，周围有韧带加强（前：股四头肌腱、髌骨、髌韧带；内外侧：胫、腓侧副韧带；后：腓斜韧带；囊内：前、后交叉韧带）；内侧、外侧半月板（“内大C、外小O”）；滑膜襞：翼状襞，滑膜囊：髌上囊。

运动（包括运动形式、肌肉、神经支配）：屈伸、半屈曲位时的旋内旋外。

距小腿关节（踝关节）：组成：胫、腓骨的下端，距骨。

特点：关节囊前后壁薄而松弛，两侧有韧带加强。

运动（包括运动的形式、肌肉、神经支配）：屈（跖屈）伸（背屈）、内翻外翻。

颅的连结

颞下颌关节 组成：下颌头、颞骨的下颌窝和关节结节。

特点：关节囊松弛，前部薄弱，外侧有外侧韧带加强；关节腔内因有关节盘而分成上、下两部分。

运动（包括运动的形式、肌肉、神经支配）：属联合关节，可作张口（下降下颌骨）与闭口（上提下颌骨：咬肌、颞肌、翼内肌）、前伸（翼外肌）与后退（颞肌的后部纤维）、侧方运动（一侧的翼外肌）。咀嚼肌由三叉神经的下颌神经支配。

【思考与讨论】

1. 肩关节、肘关节、腕关节、髋关节、膝关节、踝关节、颞下颌关节的组成、特点、运动（相关的肌肉及其神经支配）。

2. 骨盆的界线。坐骨大孔、坐骨小孔的构成。

3. 椎骨的特点，椎骨间连结的结构名称、作用；参与构成椎管的韧带有哪些？

综合实验

实验三 心的解剖、发生与心铸型标本的制作

【实验目的】

1. 掌握心的外形、各心腔的位置、内腔的分部和形态结构。心腔内防止血液逆流结构的形态特点。了解心肌微细结构的特点。

2. 掌握左、右冠状动脉的起始、走行、分支、分布和冠状动脉的分布类型；心传导系的组成、各部的位置、走行、分支、分布和血液供应；冠状窦的位置、与房室结的毗邻关系，冠状窦的属支，了解心的静脉回流途径。了解心的纤维性支架，心房和心室间隔的形态和构造。

3. 了解心的发生、圆锥动脉干的分隔、心房和心室的分隔与先天性心脏畸形。

4. 掌握心肌微血管的墨汁灌注及切片和观察方法，心肌组织的 H-E 染色及观察方法。

5. 了解心血管铸型标本的制作及观察。

【实验材料】

1. 完整胸腔脏器的标本（观察心脏的位置）、心脏各腔的标本、四腔心的断面标本；

2. 心血管的剥制标本和心血管铸型标本。

3. 切除心房的标本、显示房室口和心瓣膜的位置和形态、牛心传导系注色标本。

4. 心脏的发生系列模型、正常胎儿心脏标本及心脏先天畸形标本。

5. 心肌微血管的墨汁灌注切片、心肌组织的 H-E 切片。

【实验步骤】

1. 心的解剖

在完整胸腔脏器的标本上观察心脏的位置和毗邻。提示理解心在人体内三维空间的正确位置，有助于理解不同心电图导联的波形特点。特别要注意观察左心房是最后部的心腔，其后方毗邻的结构有食管、胸主动脉、奇静脉、胸导管和迷走神经等。

(1) 在打开右心房前壁的标本上观察界嵴和梳状肌，固有心房和腔静脉窦的形态特点，观察下腔静脉瓣和冠状窦瓣的形态，观察卵圆窝的位置，观察冠状窦瓣、三尖瓣隔侧尖瓣附着缘和 Todaro 围成的 Koch 三角的位置。

(2) 在打开右心右前壁的标本上观察右心室内的室上嵴，以此嵴为界将右心室分为流入道和流出道 2 部，注意观察 2 部的形态特点，观察隔缘肉柱起始和形态，观察三尖瓣复合体的构成、各瓣的形态特点与瓣膜连合，腱索的形态及与瓣膜的连结形式。

(3) 观察左心房和左心室内腔的形态和分部，二尖瓣复合体的组成和形态特点。

(4) 在心血管的剥制标本和心血管铸型标本上观察左、右冠状动脉的起始、走行、分支、分布和冠状动脉的分布类型。注意多观察数个心脏，可初步找出血管分支、分布的个体之间的差异。

(5) 在冠状静脉的标本上观察冠状窦及心的静脉回流。

(6) 在特殊显示心纤维支架的标本上观察 4 个瓣膜环、2 个纤维三角的位置和形态特征。

(7) 在心的大体标本上观察心传导系的走行及分支分布。

2. 心的发生及心的先天性畸形

(1) 在心脏的发生系列模型上观察心的发生和内腔分隔的过程。

(2) 在正常胎儿心脏标本上观察动脉导管，在心脏先天畸形标本上观察房间隔缺损、室间隔缺损和法鲁四联症等心脏先天畸形。

3. 心肌微血管的墨汁灌注和切片及观察

(1) 动物全身麻醉后，打开胸腔，左心室插管或插入针头灌注配置好的墨汁（大鼠约灌注 100ml）在灌注过程中剪开右心耳。灌注完毕后结扎右心耳，动物放置入 4℃ 冰箱 24 小时。然后进行取材、固定、脱水、包埋、石蜡切片。



(2) 显微镜下观察墨汁灌注心肌微血管切片，辨认心肌内毛细血管、微动脉、微静脉、心肌窦样管及与心腔相通的管道。见右图。

4. 心血管铸型标本的制备及观察

(1) 动物全身麻醉后，打开胸腔，进行左右冠状动脉插管，生理盐水灌流冲洗血管，然后用不同浓度的 ABS 丙烯液注入血管（左右冠状动脉可加入不同颜色）。注意灌流要充分，要防止气泡注入，灌注完毕后标本放置 24~48 小时后，待 ABS 凝固成型，将标本放入 50% 的盐酸中腐蚀，5~7 天后流水冲洗，即可获得血管铸型标本（图-系-III-21, 22）。

(2) 在心血管铸型标本上辨认左右冠状动脉的主要分支和分布范围及血管吻合。

【思考与讨论】

1. 根据你所学的解剖学知识设想引起心瓣膜关闭不全的可能原因。
2. 按你的观察和理解说明：① 心冠状动脉主干及其大的分支的走行部位；② 心传导系统的主要结构及其走行部位。
3. 试述血管铸型方法与墨汁灌注方法的主要步骤，以及二者研究对象有何不同。

（张书永 张卫光 田琬）

实验四 心肌梗死的解剖、组织和病理学表现

【实验目的】

1. 掌握正常人心脏的解剖、组织结构。
2. 掌握心肌梗死的病理学改变。
3. 了解心肌梗死时出现临床症状的解剖、组织学和病理学基础。

【实验步骤】

1. 正常人的心脏解剖标本和组织学切片观察。
2. 病例简介：

患者，男性，67岁，于中午饭后出现胸前及上腹部疼痛，休息一个小时及服用硝酸甘油症状无缓解，并加重出现恶心和呕吐，随即被送往医院，抵达医院后6小时因心律失常，心功能不全，抢救无效死亡。患者5年前曾有一次较严重的心前区疼痛，经休息和医院治疗后缓解。

3. 观察因心肌梗死死亡患者尸体解剖的心脏标本。

(1) 大体观察：冠状动脉病变及心肌病变，右图箭头处示心脏病变。



(2) 镜下观察：冠状动脉病变及心肌病变。

4. 分析讨论 用大体及镜下所见，结合解剖学和组织学来解释患者的临床症状。

【实验结果】

1. 正常人的心脏解剖标本和组织学切片观察所见：

(1) 心的解剖见综合实验三。

(2) 心的组织结构：心脏是个厚壁的肌性管腔器官。心壁由三层膜组成，由内向外依次为：

1) 心内膜：为心壁的最内层，由内向外分为内皮、内皮下层和心内膜下层。内皮与大血管的内皮相延续；内皮下层为结缔组织；心内膜下层为较疏松的结缔组织，除含有小血管和神经外，在心室的心内膜下层中还含有浦肯野纤维，为心脏传导系的分支。

2) 心肌膜：主要由心肌构成，是心壁三层中最厚的一层。心肌纤维呈螺旋状排列，大致可分为内纵、中环和外斜三层。心肌纤维之间的结缔组织中含有大量的毛细血管。

3) 心外膜：为心包浆膜的脏层。表面为间皮，间皮下为薄层结缔组织。心外膜中含有较多的血管、神经、脂肪组织等。

在心房和心室交界处的房室口部位，还可见心瓣膜。心瓣膜为凸向心腔内并折叠而成的薄片状结构，其表面覆有内皮，中心为致密结缔组织。功能为阻止血液逆流。

2. 心肌梗死患者心脏的病理改变：

(1) 大体：

1) 冠状动脉：左冠状动脉左前降支和右冠状动脉可见节段性不规则斑块，管壁不均匀

增厚，管腔狭窄达50%~75%（Ⅲ期）。

2) 心肌：新鲜梗死处的心肌纹理不清楚，失去光泽，呈浅黄色间暗红色，不规则形片状分布。陈旧性梗死灶呈灰白色、略凹陷。

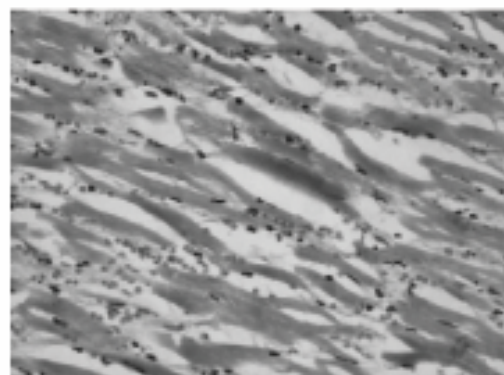
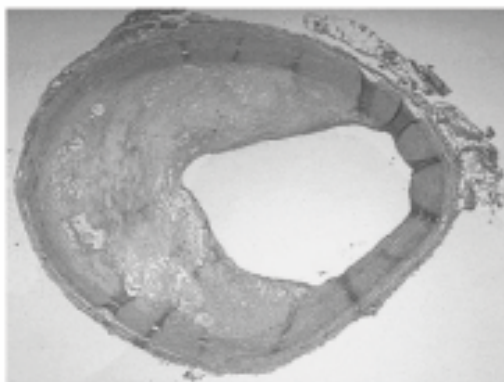
(2) 镜下：

1) 冠状动脉：冠状动脉内膜不规则增厚，粥样斑块形成，管腔狭窄，动脉中膜萎缩。（右上图）

2) 心肌：新鲜梗死处心肌细胞核及横纹消失，肌原纤维结构不清，伴有以中性粒细胞为主的炎细胞浸润，坏死心肌与正常心肌互相交错。陈旧性梗死处心肌细胞消失，代之以纤维组织增生，网状瘢痕形成。（右下图）

【思考与讨论】

1. 患者心脏的病理改变是什么？
2. 患者临床为什么会出现心前区疼痛、心律失常和心功能不全的临床症状，解剖学基础是什么？
3. 此次发病与5年前发病有何关系？



(陆 毅 钟延丰)

特色实验

实验一 石蜡切片 HE 染色

【实验目的】

了解石蜡切片苏木精-伊红染色的整个制作流程，即取材、固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、染色、封固九大实验步骤。

【实验材料】小鼠肝脏

【实验步骤】

1. 取材 指从实验动物体内取下所需观察的组织标本的过程。

(1) 小鼠断髓处死操作（见下图）：

1) 左手拇指和食指捏住小鼠尾巴根部；

2) 右手的拇指和食指从小鼠的背后紧紧按压其耳根部不动；

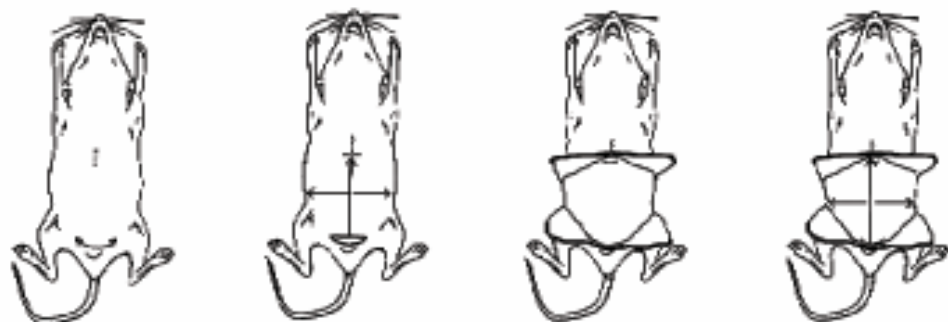
3) 左手拇指和食指向后水平拉其尾巴，当手指感应到“线断”的感觉，即拉断脊髓而致小鼠死亡。



(2) 肝组织取材操作。

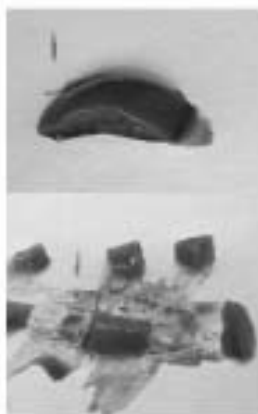
1) 用水浸湿小鼠腹部皮毛，将其仰卧于解剖盘上。

2) 用大解剖镊子夹住小鼠腹下部皮毛并剪一小横口。解剖镊子夹住横口边缘，解剖剪从横口内深入向前、向两侧扩展，以分离表皮与腹壁肌肉，然后经横口向上剪至胸骨剑突处，再以纵口中线为起点向两侧剪至腹底部，使腹部开口呈“十字”形，并将表皮向外侧翻起。同样方法，将小鼠腹壁肌肉剪开并分别向外翻起，见下图。



3) 用解剖镊将胸骨剑突轻轻挑起露出肝脏（见下图），小解剖镊子轻轻夹住肝脏边缘并缓慢向外拉出，小解剖剪尽可能一剪剪下肝组织并放在白卡片纸上。单面刀片首先切去镊子夹过的组织，将肝组织切成近似长方形的标本块（见下图），投入到 10% 甲醛溶液内。

2. 固定 为把从动物体内取下的组织标本立即浸泡在化学试剂（10% 甲醛溶液）中，



借助化学试剂的作用，将组织细胞形态结构保存起来，使其不改变形态结构的一种手段。

常规大小的标本（1.0cm×1.0cm×0.5cm）固定12~24小时。

10%甲醛溶液配制：甲醛溶液（30%~40%甲醛）：100ml，蒸馏水：900ml。

3. 脱水 利用某种化学试剂（酒精）逐步地将标本内部的水分置换出来，以使标本内部处于无水状态的过程称为脱水。

标本脱水过程分为两个阶段：

第一阶段：70%酒精→80%酒精→90%酒精→95%酒精。

标本脱水每级最短停留应不短于3~6小时。

第二阶段：100%酒精。

标本脱水2~4小时，中间换一次新液。

注意：酒精体积与标本体积之比应为（20~30）：1。标本脱水不彻底会影响后续实验操作。

4. 透明 指利用有机试剂（二甲苯）既能与酒精混合，又能与石蜡液相融合的特性，来置换标本内酒精成分为浸蜡做准备的阶段。标本透明2~3小时，中间换一次新液。

5. 浸蜡 指透明后的标本投入到温度适宜（58~60℃）的融化的石蜡液内且置换出透明剂的过程。

用解剖镊子将透明的标本一一夹到滤纸上，吸去标本表面多余的透明剂，再放入浸蜡容器内。标本浸蜡2~3小时，期间更换一次或两次新蜡液。

注意：石蜡液体积与标本体积的比例为（20~30）：1。

6. 包埋 指浸蜡标本埋入盛有新石蜡液的包埋器后，通过冷却过程，使石蜡包埋标本整体冷凝为一个固体的过程。

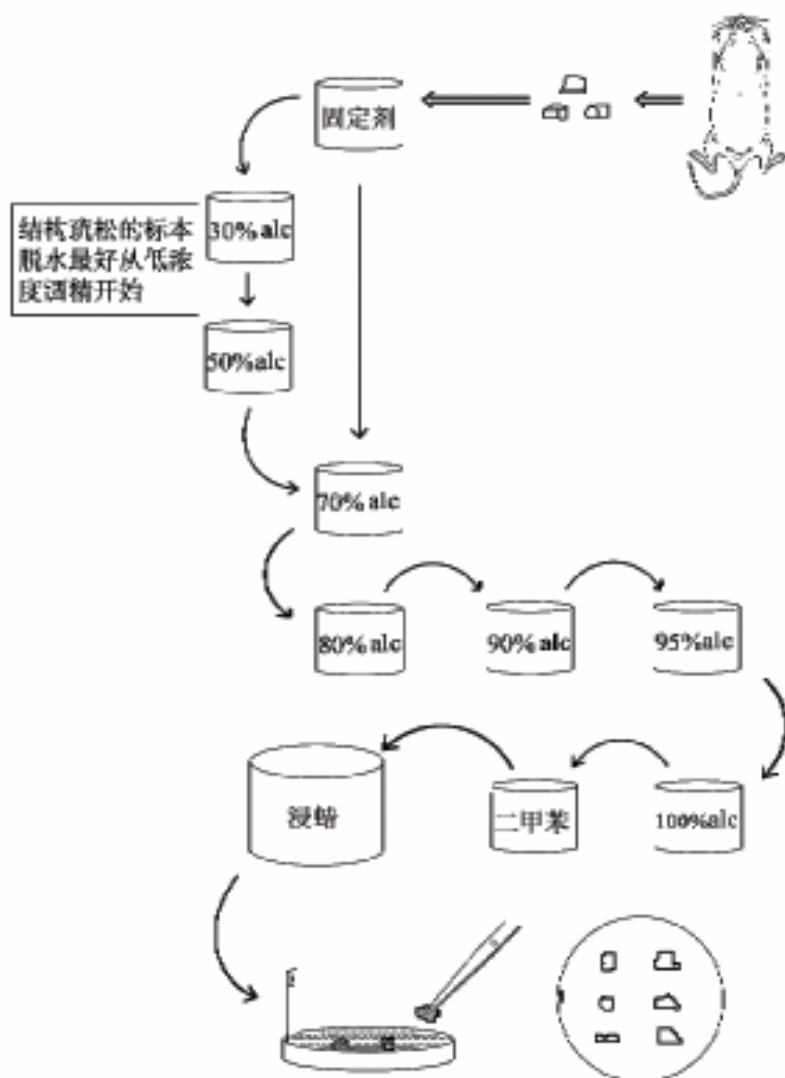
（1）包埋器内表面涂抹微量甘油，并倒入洁净石蜡液。

（2）小解剖镊子在酒精灯上加热，将浸蜡容器中的标本依次夹取放入包埋器内。

（3）标本切面向下且按照一定的行间距排整齐。

（4）轻轻吹凝包埋器表面的石蜡液，慢慢放入冷水中冷却。

取材、固定及标本处理过程（脱水、透明、浸蜡、包埋）流程时间图表



步骤	时间
标本固定	12~24 小时
标本脱水	70%、80%、90%、95%酒精 3~24 小时/每级酒精
	100%酒精 1.5~4 小时 (中间换一次新液)
标本透明	1.5~3 小时 (中间换一次新液)
标本浸蜡	1.5~3 小时 (中间换一次新液)

7. 切片 指将包埋的石蜡标本块制备成石蜡切片的过程。

石蜡切片包括修块与粘块、切片、展片与烤片三个程序。

(1) 修块与粘块：

1) 单面刀片在蜡块包埋面轻轻划直线后稍用力掰开，直至每个标本为单独石蜡块。在标本包埋面四周预留 1~2mm 宽的石蜡边，然后用单面刀片将石蜡边之外的石蜡一刀一刀

地切去，修整为正方形或长方形，其侧面应为梯形状呈上窄下宽样，见下图。



2) 扁铲在酒精灯火焰上加热后迅速在修好的蜡块和木头托之间一抹，使蜡块底部石蜡融化而黏附在木头托上的过程为黏块，见下图。切忌蜡块与木托“虚假”黏附。

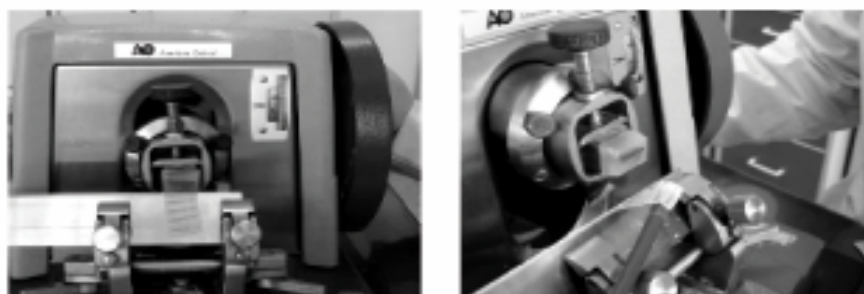


(2) 石蜡切片：

1) 将蜡块木托装在切片机载物台内，粗略地调节标本蜡块的切面。切片刀固定于持刀架内。调整切片厚度，一般为 $5\sim 7\mu\text{m}$ 。

2) 一手持毛笔，一手匀速转动切片机轮盘。当刀刃处存有三~四张石蜡片（蜡带）时，手持毛笔轻轻托接蜡带并慢慢向外抻拉，随着切片蜡带的加长，毛笔托着蜡带缓慢移动，同时连续匀速摇动切片机轮盘图，见下图。

注意：毛笔托接蜡带力量不可过大，否则会造成蜡带断裂。切片速度均匀，不可忽快忽慢。



(3) 展片与烤片：

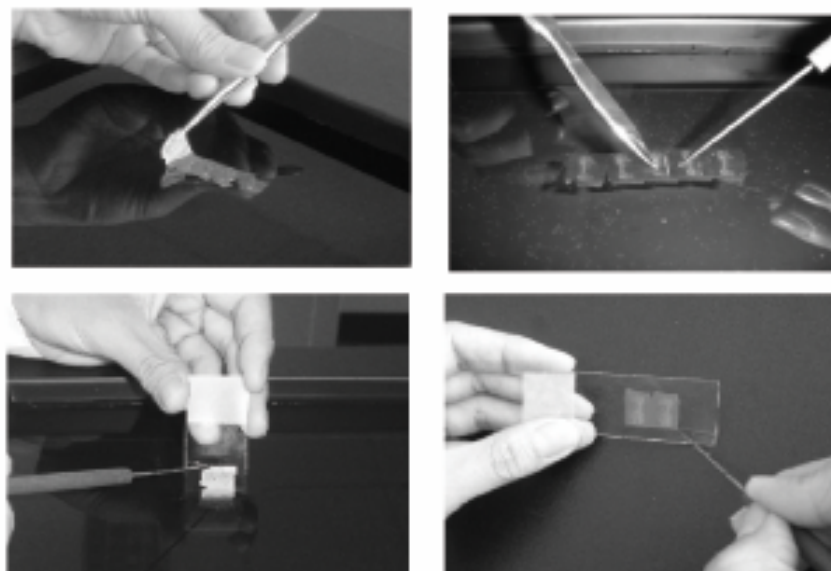
1) 取 2~6 张石蜡片，慢慢放入水温适宜 ($37\sim 40^{\circ}\text{C}$) 的水浴池内，借助水温和水张力，使切片慢慢舒展为平整切片，若切片上有皱褶，可借助解剖刀和解剖针轻轻拉扯，使皱褶消失，见下图。

2) 用解剖剪或解剖镊将石蜡切片一一分割，分别放入载物片（涂抹蛋白甘油）上，见下图。

3) 控去载物片水分，摆放好组织切片位置（见下图），即可放入烤箱 ($45\sim 50^{\circ}\text{C}$ 左右) 内烤片 6 小时以上或过夜。

石蜡切片的标准：标本上无外源性污物（微尘、毛絮等）或内源性物质（其他组织或细胞成分）的黏附；切片厚薄一致；标本结构完整，无撕裂与破损；无刀口和刀痕、无皱褶和

气泡的存在。



8. 苏木精-伊红染色 (HE 染色) H. E 染色是形态学研究中最基本的染色方法。

- (1) 二甲苯脱蜡, 2 次, 每次 5~10 分钟;
- (2) 逐级酒精水化至蒸馏水: 100%酒精 2 次, 每次 3~5 分钟; 95%酒精、90%酒精、80%酒精、70%酒精各 1 次, 每级 2~3 分钟; 蒸馏水, 3 分钟;
- (3) 苏木精 (Ehrlich's) 染液 10 分钟, 自来水洗;
- (4) 分色与蓝化: 0.5%~1%的盐酸酒精 (70%酒精) 分色数秒~数十秒, 自来水速洗, 0.5%~1%氨水蓝化 30 秒~1 分钟, 显微镜镜检细胞核分色程度;
- (5) 流水冲洗, 3 分钟;
- (6) 1%伊红染液 10 分钟, 蒸馏水快洗;
- (7) 70%酒精、80%酒精、90%酒精分色与脱水, 每级快洗数秒~数十秒钟;
- (8) 95%酒精分色与脱水 1 分钟, 显微镜镜检红蓝颜色对比;
- (9) 100%酒精脱水 2 次, 每次 2~3 分钟;
- (10) 二甲苯透明 2 次, 每次 3~5 分钟。

HE 染色结果: 细胞核、嗜碱性颗粒等为蓝紫色; 细胞质、嗜酸性颗粒、红细胞、胶原纤维等为粉红色。

9. 封固 目的在于长久保存染色的组织切片, 更重要的是, 显微镜下能清晰显示组织细胞的细微结构。

(1) 从二甲苯内取出组织切片, 组织面朝上放置在白纸上, 用另外白纸吸去组织外多余的二甲苯。注意组织中的二甲苯不能挥发干。

(2) 滴加适量树胶 (1~2 滴) 于组织上, 将盖玻片从组织一侧慢慢放下, 直到盖玻片缓慢全部覆盖组织, 见下图。



【思考与讨论】

1. 苏木精和伊红染料分别可以使细胞中的什么物质着色？
2. 取材过程中应注意哪些问题？
3. 透明、浸蜡、包埋过程中应注意哪些问题？

(赵 莹)

北京大学医学实验系列教材

医学机能学实验教程

主 编 祝世功

副主编 宋德懋 徐 海 谭焕然



北京大学医学出版社

北京大学医学实验系列教材

医学机能学实验教程

主 编 祝世功
副主编 宋德懋 徐 海 谭焕然
编 者 (按姓氏笔画排序)
马俊江 马铁民 王 昕 王建东
毛一卿 刘秀敏 刘俊昌 李 丽
李学军 李 茵 余晓星 库宝善
宋德懋 张振民 庞 炜 祝世功
耿 彬 徐 海 唐朝枢 符风英
窦 豆 谭焕然

北京大学医学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学机能学实验教程/祝世功主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2008. 6

(北京大学医学实验系列教材)

ISBN 978-7-81116-558-9

I. 医… II. 祝… III. 机能(生物) —人体生理学—实验—医学院校—教材 IV. R33—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 040141 号

医学机能学实验教程

主 编: 祝世功

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E-mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷:

经 销: 新华书店

责任编辑: 许立 韩忠刚 责任校对: 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印 张: 字 数: 千字

版 次: 2008 年 5 月第 1 版 2008 年 5 月第 1 次印刷 印 数: 册

书 号: ISBN 978-7-81116-558-6

定 价: 元

版权所有 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

科学技术的发展和社会的进步,要求高等医学教育以培养具有创造性思维 and 实际工作能力的高素质医学人才为首要任务。多年的教学改革实践证明,通过改革现有课程体系、调整教学内容,整合教学资源,优化教材建设;积极推进多学科的课程融合,开展以器官系统为中心的的教学模式对提高医学生学习效果、开拓其思路有很好的促进作用。

传统的医学实验教学依学科设置,偏重于理论教学,重理论知识的强化、操作技能的训练,轻科学思维的开发和创新能力的培养。在实验教学方面,普遍存在着验证性实验偏多等弊病。在实验内容的设置上是以“分割式”的单科验证实验为主体,相关学科之间缺乏整体的系统性和统一的教学体系,实验内容重复设置,造成实验教学资源的浪费;验证实验为主体的传统教学模式人为地将完整的机能学实验按学科分割开来,使学生所学的知识缺乏完整性和系统性,不利于高素质创新性人才的培养。

新编《医学机能实验教程》紧密配合机能理论课程的融合,以器官系统为主线,以综合性实验、研究性实验、和自主设计性实验为重点,以期增加学生的学习兴趣、培养学生的独立思维和创新能 力,并提高学生对人体机能的整体认识。本教程将正常生理功能,异常(病理)生理和药物作用机理三方面的实验课按照器官系统进行有机整合。通过学习和思考人体正常到异常的变化规律以及治疗药物的作用原理,促进医学生对人体机能调节的理论和研究方法的掌握,培养其以整体观理解生命现象的思路以及创新性思维和探索的能力。

尽管机能实验以离体和整体动物实验为主,其目的主要服务于医学教学。因此,新编《医学机能实验教程》教材中不仅安排了部分人体机能指标的检测,还结合国内外医学机能教学的经验,选择经典的临床病例供医学生讨论,以期加强医学基础学科与临床学科知识的衔接和融合。

本教材的编写是现今医学教育改革的产物,也是新的教学理念的尝试。需要广大师生的支持和参与。希望在今后的教学实践中得到不断的改进和完善。感谢香港中文大学为本教材编写提供了部分人体测试资料;感谢王宪教授,管又飞教授,吴立玲教授,李卫东教授等专家在本教材编写和定稿提出的宝贵建议。

编 者

2008年4月

目 录

第一章 绪 论	(1)
第一节 医学机能学实验概述	(1)
第二节 医学机能学实验课的目的	(1)
第三节 医学机能学实验课的要求	(2)
第四节 实验报告的写作要求及格式	(2)
第二章 动物实验的基本知识	(4)
第一节 实验动物的分类	(4)
第二节 实验动物的应用	(5)
第三节 实验动物的基本操作技术	(9)
第四节 急性动物实验常用手术方法	(14)
第三章 医学机能学实验常用仪器使用方法	(20)
第一节 四道生理记录仪	(20)
第二节 MacLab 实时记录系统	(23)
第三节 PowerLab 实时记录系统	(30)
第四节 BL-420 生物机能实验系统简介	(33)
第五节 238 型酸碱血气分析仪	(35)
第六节 MD200 型半自动生化分析仪	(38)
第四章 机能学实验	(42)
第一节 循环系统	(42)
实验一 人体血压和心率测量	(42)
实验二 血压调节和失血性休克	(48)
实验三 抗高血压作用机制分析	(52)
实验四 喉喷喉对离体血管平滑肌的作用	(54)
实验五 人体心电图及心电向量的记录	(54)
实验六 家兔心电图、心电异常及药物治疗	(55)
实验七 药物对心律失常的作用	(57)
实验八 心功能测定和心功能障碍	(57)
实验九 心输出量测定及急性右心衰竭	(59)
实验十 影响离体心脏灌流的因素及缺血-再灌注损伤	(60)
第二节 呼吸系统	(64)
实验一 家兔呼吸运动的调节	(64)
实验二 人体肺通气功能的测定	(66)
实验三 呼吸运动的调节及缺氧对机体的影响	(68)
实验四 影响小鼠对缺氧耐受的因素	(70)
第三节 泌尿系统	(73)

实验一	影响家兔尿生成的因素	(73)
实验二	人体肾功能	(74)
实验三	家兔肾功能测定及急性肾功能衰竭	(78)
实验四	酸碱平衡的调节及紊乱	(80)
第四节	血液系统	(82)
实验一	人 ABO 血型的检测	(82)
实验二	影响血液凝固的因素	(83)
第五节	神经系统	(84)
实验一	兔减压神经放电	(84)
实验二	兔肾交感神经放电	(86)
实验三	人体运动神经传导速率	(87)
实验四	新斯的明对肌松药物作用的影响	(90)
实验五	传出神经系统药物对血压和血流动力学的影响	(91)
第六节	消化系统	(92)
实验一	家兔小肠平滑肌的生理特性	(92)
实验二	小鼠肝脏细胞色素 P-450 含量的测定及药物影响	(94)
第七节	能量代谢	(96)
实验一	人与动物基础代谢率的比较	(96)
实验二	运动过程中人体心血管和呼吸系统的调节	(100)
第八节	感觉器官	(103)
实验一	人体视觉器官的生理检查	(103)
实验二	人体听觉生理检查	(105)
第九节	药代动力学	(108)
实验一	ED ₅₀ 的测定	(108)
实验二	磺胺药的药代动力学	(110)
第五章	研究性实验	(115)
第一节	科学研究实验设计	(115)
一、	凝练科学问题	(115)
二、	查阅科学文献	(116)
三、	提出科学假说	(116)
四、	根据科学假说设计实验	(117)
五、	建立实验程序	(119)
六、	对实验设计的总体评估	(119)
第二节	实 验	(120)
实验一	农药对肝肾功能及血清胆碱酯酶的影响	(120)
实验二	葡萄糖激酶基因缺陷对小鼠糖耐量的影响	(123)
实验三	利多卡因对氯化钡诱发心律失常的影响	(124)
实验四	药物对大鼠血压的影响及其机制分析	(126)
实验五	血管紧张素转化酶抑制剂对大鼠血压的影响	(128)
实验六	影响大鼠胸主动脉离体血管环张力的因素	(129)

第一章 绪 论

第一节 医学机能学实验概述

《医学机能学实验教程》将正常生理功能，异常（病理）生理和药物作用三方面的实验课进行系统整合。紧密配合机能理论课融合，围绕器官系统从正常到异常的变化特点，培养医学生的基本理论和基本技能，创新思维和探索能力。

《医学机能学实验教程》，以机能融合为基本理念，基本知识和基本技术为基础，以器官系统为主线，以综合性实验为重点，以研究设计性实验为目标，调动学生的积极主动能力，培养学生的独立意识和创新能力。本教材加入中文和英文病例讨论，以期加强基础学科与临床学科知识的衔接和融合。

《医学机能学实验教程》中的实验按器官系统将基础性实验，综合实验分配到所属系统。设计性实验要求学生以实验小组为单位，利用业余时间查阅文献资料，撰写出实验设计方案，然后进行设计答辩。每个小组派一名同学陈述实验设计方案的背景知识、实验目的、实验方法、预期结果，由教师和同学提出问题，对实验的技术路线和可行性作出修改，最后写出完整的小结论文。在实验设计过程中，使学生初步了解科研实验的整个过程，为以后进行科研工作奠定坚实的基础。教材还设置了研究性实验。

第二节 医学机能学实验课的目的

一、培养科学的观点

1. 培养学生理论来自实验的观点。
2. 加深、验证和巩固部分课堂讲授的理论知识，培养学生理论联系实际的能力。
3. 综合运用生理学、药理学和病理生理学等学科的相关知识和实验方法，使学生初步建立整体、全面、系统的人体观和疾病观。
4. 培养学生勤于动手、敏于观察、科学分析和独立工作的能力，初步养成对科学工作的严肃态度、严格要求、严密工作、团结协作以及实事求是的工作作风。

二、训练基本实验技能

1. 学习在动物身上复制典型病理过程和人类疾病的基本实验方法和原理，掌握医学机能学实验常用的基本技术。
2. 通过实验报告的书写，使学生的科学论文写作能力得到初步训练。

三、提高学生的综合能力

1. 掌握获得实验资料一致性和可靠性的一些基本原则，训练学生独立进行动物实验设

计的技能。

2. 通过典型病例讨论，培养学生分析病例的能力和对所学知识的综合运用能力，为临床实践打下初步基础。

第三节 医学机能学实验课的要求

一、实验课前

1. 作好预习，明确实验目的，了解实验方法和操作步骤，做到心中有数。
2. 结合实验，复习有关的理论知识。
3. 检查仪器、手术器械和药品是否完好、齐全。如有缺失、损坏，及时报告老师以便补充。

二、实验课时

1. 严格遵守实验室规则，保持安静和良好秩序，尊重老师指导。
2. 认真听取老师的讲解，特别是本次实验的目的、主要操作步骤及注意事项等。要准备回答老师的提问。
3. 小组成员既要分工负责，又要密切合作，这样既可提高实验的成功率，又能使每个人都得到应有的技能训练。
4. 实验过程要胆大心细，规范操作。
5. 认真、全面和敏锐地观察实验现象，准确、及时和客观地记录实验结果。
6. 积极主动思考，力求理解每个实验步骤和实验结果的意义。

三、实验课后

1. 清洗、擦干、清点手术器材并放回原处，检查实验仪器并妥善安放药品，清洁实验台，打扫整理实验室，关好门窗、水电。
2. 整理、分析实验结果，独立按时书写实验报告。

第四节 实验报告的写作要求及格式

实验报告的书写是一项重要的基本技能训练。它不仅是对每次实验的总结，更重要的是它可以初步地培养和训练学生的逻辑归纳能力、综合分析能力和文字表达能力，是科学论文写作的基础。因此，参加实验的每位学生，均应及时认真地书写实验报告。要求内容实事求是，分析全面具体，文字简练通顺，誊写清楚整洁。

实验报告的格式如下：

- (一) 本次实验题目
- (二) 主要操作者及合作者
- (三) 实验日期(年、月、日)
- (四) 实验动物(种类、性别、体重)
- (五) 实验目的

第二章 动物实验的基本知识

第一节 实验动物的分类

实验动物是指根据研究的需要人工驯养、繁殖、培育的动物。要求动物遗传背景明确，来源清楚，并对其进行微生物控制。实验动物不同于实验用动物，后者是指一切用于实验的动物，其中除了符合严格要求的实验动物外，还包括家畜和野生动物。野生动物家畜化，家畜动物种群化，实验动物纯系化，是野生动物演变为实验动物的过程。

一、按遗传学控制分类

根据实验动物遗传的均一性、敏感性和一致性，将实验动物分为三类：

1. 近交系动物 (inbred strain animals)

又称纯系动物，指全同胞兄妹或亲子之间连续交配二十代以上而培育出的纯品系动物。一般以小鼠为典型代表，较大动物的纯种培育则很难成功。其特点是一个种群的所有同源染色体的相对位置都具有相同基因。这种品系主要应用于遗传、肿瘤和免疫学等领域。

2. 杂交群动物 (hybrid strain animals)

也称杂交一代动物 (first filial generation)，简称 F_1 动物，指两个不同的近交系之间有目的地进行交配，所产生的第一代动物。具有遗传相似、表型一致的特点。此种动物具有杂交优势、生命力旺盛、繁殖率高、生长快、抗病力强、实验结果重复率高等优点。

3. 封闭群动物 (closed colony animals)

又称远交群，指一个种群在 5 年以上不从外部引进新血缘，仅由同一品系的动物在固定场所进行随机交配并保持繁殖的动物群。这类动物和近交系不同，在动物群的个体之间具有某种程度的遗传学差异。因其生活力和繁殖力比近交系强，因此封闭群动物更为常用。例如昆明小鼠、LACA 小鼠、Wistar 大鼠、SD 大鼠、新西兰白兔、青紫蓝兔、大耳白兔等均属此类。

二、按微生物控制分类

通过微生物学的监察手段，按对微生物控制的净化程度，把实验动物分为以下四类：

1. 普通动物 (conventional animals)

指未经积极的微生物控制，饲养在开放系统的动物，是微生物控制程度最低的动物。这类动物只能用于一般性实验及教学，不适用于研究实验。

2. 清洁动物 (clean animals)

又称最低限度疾病动物，指来自屏障系统的 SPF 动物，饲养在设有双走廊的、温湿度恒定的屏障设施中的动物。动物所用的饲料、垫料及用品等应经过高压消毒，空气经过一定的过滤处理，工作人员要穿干净的工作服。这种动物不允许带有人畜共患病原体 and 动物烈性传染病病原，不携带对动物危害大和对科研干扰大的病原。

3. 无特定病原体动物 (specific pathogen free animals, 简称 SPF 动物)

指体内无特定微生物和寄生虫的动物, 而非特定的微生物和寄生虫是允许存在的, 但不带有潜在感染和条件致病菌, 因此其实际上是指无传染病的健康动物。SPF 动物在医学领域中应用广泛。

4. 无菌动物 (germ free animals)

指机体内外不带有任何可检测出的微生物和寄生虫的动物。此种动物在自然界中并不存在, 必须用人为的方法培养。一般将临产前的健康动物处死, 按无菌手术进行剖腹, 切除带胎子宫, 放入隔离器中取胎, 人工喂养。无菌动物要饲养在无菌的隔离器内, 无菌动物所用的饲料、饮水、垫料和用品都必须经过无菌处理, 空气也要经过滤除菌。这类动物由于排除了微生物的干扰, 故研究结果准确、可信。

目前, 按我国的实际情况, 将实验动物分为四级: 一级为普通动物, 二级为清洁动物, 三级为无特定病原体动物, 四级为无菌动物。

第二节 实验动物的应用

一、常用的实验动物

1. 小鼠 (Mouse, *Musculus*)

小鼠属哺乳纲, 啮齿目, 鼠科。小鼠性情温顺, 胆小怕惊, 喜群居在较暗的安静环境, 体小娇弱, 不耐冷热, 不耐饥饿, 对环境的适应性差, 对外来刺激极为敏感, 对多种毒素、病原体和致癌物质具有易感性。

小鼠体型小, 易于饲养管理。6~7 周龄时性成熟, 性周期 4~5 天, 妊娠期 19~21 天, 每胎产仔 8~15 个, 一年产 6~10 胎, 属于全年多发情性动物, 生育期一年, 寿命 2~3 年。由于小鼠繁殖周期短, 产仔多, 生长快, 饲料消耗少, 价格低廉, 温顺易捉, 操作方便, 因此在医学实验中被广泛使用。特别适合于需要大量动物的实验, 如药物筛选, 半数致死量和药物的效价比较等, 还可用于制作各种实验性疾病的病理模型, 在各种药物和疫苗等生物鉴定工作中也很常用。

2. 大鼠 (Rat, *Rattus norvegicus*)

大鼠属哺乳纲, 啮齿目, 鼠科。大鼠性情较凶猛, 易激怒, 抓捕时易咬手。大鼠抗病力较强, 但对营养物质如维生素、氨基酸的缺乏敏感, 可以发生典型症状。大鼠不能呕吐, 无胆囊, 无汗腺, 尾巴为散热器官。大鼠 (包括小鼠) 心电图中没有 S-T 段, 甚至有的导联也不见 T 波。

大鼠繁殖力强, 2 月龄时性成熟, 性周期 4 天左右, 妊娠期 20 天, 一胎产仔 8 只左右, 为全年多发情性动物, 寿命 3~4 年。

大鼠较小鼠体大, 又具有小鼠的其他优点, 所以对需要做较大体型的实验, 用大鼠比较合适, 如离体心脏灌流、直接记录心室内压等。另外, 大鼠对许多药物的反应常与人类一致, 尤其是对人类致病的病毒、细菌等非常敏感, 因此, 大鼠广泛用于高级神经活动、心血管、内分泌、实验性肿瘤及营养等方面的研究。由于大鼠价格较便宜, 所以某些实验 (如缺氧、失血性休克等), 可以用大鼠代替家兔而不影响实验结果, 但实验技术的操作难度较家兔略大。

3. 家兔 (Rabbit, *Oryctolagus curiculus*)

家兔属哺乳纲，啮齿目，兔科，草食性哺乳动物。家兔胆小怕惊，喜安静、清洁、干燥的环境。家兔胸部的中央纵隔将胸腔一分为二，心包膜将心脏单独隔出，因此做心脏手术，如不破坏纵隔，它可以正常呼吸而不必人工辅助呼吸。颈部有单独的减压神经分支。耳朵大，血管清晰可见，便于注射、取血。家兔的抗空气感染力强，术后不易感染。但家兔系草食动物，在消化系统方面与人相差很远，此外家兔缺乏咳嗽和呕吐反射，所以不适于这些问题的研究。另外，家兔心血管系统比较脆弱，常在手术时易反射性衰竭。

家兔为刺激性排卵，雌兔每半个月发情排卵一次，每胎产仔7~10只，寿命8年。家兔是医学机能学实验常用的大动物，多用于急性实验，也用于慢性实验，能复制多种病理过程和疾病，如水肿、发热、炎症、电解质紊乱、失血性休克，动脉粥样硬化等。目前常用的品种有大耳白兔、青紫蓝兔和新西兰白兔。

小鼠、大鼠和兔的常用生理生化指标的正常值见表2-1。

表2-1 小鼠、大鼠和兔的正常生理生化数值

	小鼠	大鼠	家兔
体温 (直肠℃)	37~39	38.5~39.5	38.5~39.5
心率 (平均, 次/分)	600	328	205
收缩压 (清醒, kPa)	12.7~14	11~16	12.7~17.3
呼吸频率 (平均, 次/分)	163	86	51
通气量 (ml/min)	24	73	1070
血红蛋白 (g/L)	100~190	120~175	80~150
红细胞 ($\times 10^{12}/L$)	7.7~12.5	7.2~9.6	4.5~7.0
白细胞 ($\times 10^9/L$)	4.0~12.0	5.0~25.0	6.0~13.0
血小板 ($\times 10^{10}/L$)	15.7~26	10~30	26~30
总血量 (占体重%)	8.3	7.4	8.7
血清 K^+ (mmol/L)	—	3.8~5.4	2.7~5.1
血清 Na^+ (mmol/L)	—	126~155	155~165
血清 Cl^- (mmol/L)	—	94~110	92~112
血清 Ca^{2+} (mmol/L)	—	31~52	5.6~8.0

二、实验动物的选用原则

医学机能学实验研究选用何种动物，是必须认真考虑的问题。任何使用实验动物进行实验的目的，都是用最少的动物数达到最大的准确度、最好的稳定性和可重复性。因此要根据实验的目的、内容和特点选用符合要求的动物。实验动物的选择一般遵循以下几个原则：

1. 选用与人的机能、代谢、结构及疾病特点相似的实验动物。
2. 选用对实验敏感或患有人类疾病的动物。
3. 选用解剖、生理特点符合实验要求的动物。

4. 选用与实验设计、技术条件、实验方法及条件相适应的动物。
5. 选用有利于实验结果解释的动物。
6. 选择符合“实验动物管理条例”的合适动物。

三、实验动物的选择条件

动物对外界刺激的反应存在着个体差异，为了减少实验误差，在选择实验动物时应考虑动物的年龄、体重、性别、生理状态、健康状况以及动物的等级等。

1. 年龄、体重 实验动物的寿命各不相同，所以在选择动物年龄时，应注意到各种实验动物之间、实验动物与人之间的年龄对应，以便进行分析和比较。实验动物的年龄与体重一般呈正比关系，所以可以根据体重估算年龄（表 2-2、2-3、2-4）。急性实验宜选用成年动物，慢性实验可选择年幼动物。减少同一批实验动物的年龄和体重差异，可以增加实验结果的可比度。

表 2-2 大耳白兔年龄与体重的关系

年龄 (天)	雄性体重 (g)	雌性体重	年龄 (天)	雄性体重 (g)	雌性体重
30	510	530	210	3200	3510
60	1170	1180	240	3400	3990
90	1710	1790	270	3500	4240
120	2380	2470	300	3630	4380
150	2650	2880	330	3660	4460
180	2890	3150	360	3730	4550

表 2-3 大鼠年龄与体重的关系

年龄 (天)	体重 (g)	年龄 (天)	体重 (g)
20	18	140	216
40	40	160	228
60	80	180	240
80	130	200	250
100	165	220	260
120	196		

表 2-4 小鼠年龄与体重的关系

年龄 (天)	体重 (g)	年龄 (天)	体重 (g)
10	4	70	25
20	8	80	27
30	14	90	28
40	18	100	30
50	22	120	32
60	24		

第三章 医学机能学实验常用仪器使用方法

第一节 四道生理记录仪

三荣-360型四道生理记录仪是示波器、前置放大器、放大器、记录器组合为一体的插件式多功能记录仪。根据记录指标的不同，更换不同的前置放大器、放大器插件，可记录人体或实验动物的心电、脑电、肌电、动静脉压、心室内压、心率等。通过内部连接微积分放大器，可对各种测量数据进行微分、积分的处理，主机配有输出端子，连接如计算机等仪器，还可对测量数据做进一步的处理。其基本信息流程如下：

信号→换能器→前置放大器→连接器（5593）→放大器插箱→记录装置

下面主要介绍记录仪常用的放大器的使用方法。

一、血压放大器 1257

可放大血压、脑内压等体内外各种压力信号。各部分的名称如图 3-1：

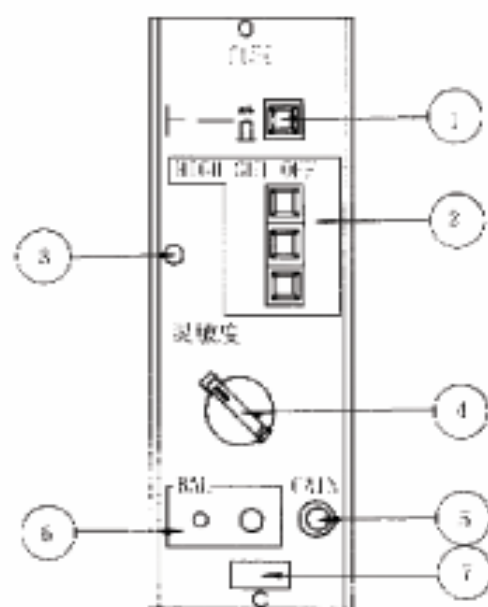


图 3-1 血压放大器 1257

1. 瞬时平均选择开关“MEAN INST”按下时“MEAN”；输出 OUT (F)，OUT (V)，MASTER，D₁，D₂平均血压波形。此时的时间常数是 3 秒，特殊输出也是平均值。特殊输出的顺序是 S/D/M。(S：收缩压值，D：舒张压值，M：平均血压值)。

2. 高频滤波开关“HIGH CUT OFF”能够转换 20、100、230Hz 3 个波段。

3. 放大器选择指示灯“* OH1/·LO”只在使用遥控时工作。使用前置放大器时灯亮。

4. 灵敏度转换旋钮“SENSITIVITY”(mmHg)，能够将输出 OUT (V) 的灵敏度转换为 10~200mmHg/V 和 OFF 6 个波段。输出 OUT (F) 的灵敏度一般是 100mmHg，不能用这个旋钮转换。旋钮置于 OFF 时，OUT (F) 是 0V。校正信号也能通过这个旋钮改变电压和波形。

5. 灵敏度微调“GAIN”能够连续地将灵敏度转换旋钮(4)的灵敏度调整至 1/2~2 倍，通常调整为 1 倍。

6. 自动零点平衡按钮、平衡指示灯“BAL (0mmHg)”、“OVER”自动平衡换能器的零点。方法是：将换能器通空气，使之处于 0mmHg，在测量的状态按“BAL”，按钮平衡指示灯灭，表示平衡；指示灯不灭时，可能是前置放大器或换能器的平衡极端偏移，应先调

整前置放大器的平衡后再按“BAL”按钮。测量血压的过程中，不要按自动零点平衡按钮，否则血压值会偏移，应重新平衡。

7. 手柄。

二、血压放大器 2238

放大血压、脑内压等体内外各种压力信号，主要放大、处理脉压波信号，是数字显示放大器。根据需要还可设置报警。各部分名称如图 3-2。

1. 收缩压指示灯“SYST”。

2. 数字显示器 显示血压数值，警报发生时，显示值一闪一灭。

3. 显示转换开关“S/D MS” 置于 S/D 时，显示器间隔显示收缩压和舒张压。MS 则显示平均压。

4. 放大器选择指示灯“* OH1/• LO”。

5. 报警选择指示灯“ALARM” 置于 ON 时，指示灯亮，处于报警状态。

6. 报警设定转换器 利用上下转换器可在 0~250mmHg 范围内分别设定血压值的上限和下限。显示转换开关置于“M”时，设定平均血压的限值；置于 S 或 S/D 时，设定最高血压的上、下限。报警开关处于 ON 时，如被测指标超过设定范围，警报就会鸣响，同时数字显示器闪灭。

7. 自动零点平衡按钮、平衡指示灯“BAL (0mmHg)”、“OVER”。

8. 灵敏度调整器“GAIN”。

9. 手柄。

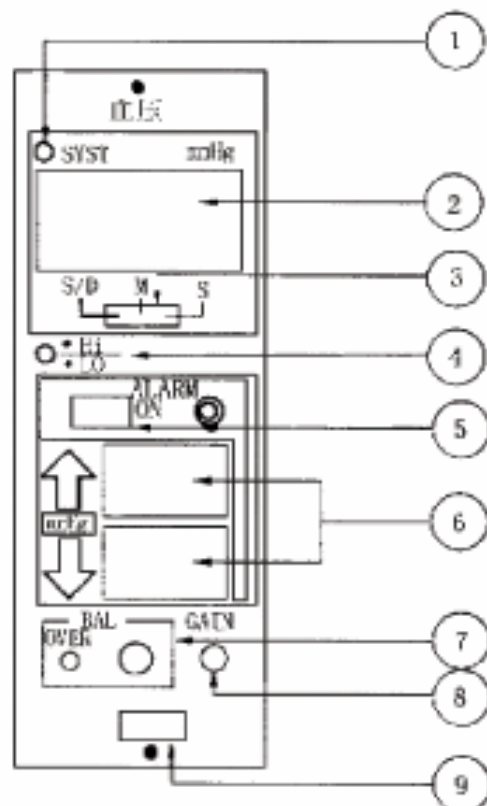


图 3-2 血压放大器 2238

三、脉压波微分放大器

与血压放大器或外部仪器联合，微分处理脉压波，可获得一个有效的判断心脏功能的指标。与示波器联合，也可从矢量图上求得 V_{max} ，各部分名称如图 3-3。

1. 数字显示器 显示 V_{pm} 或 dp/dt 的最大值。显示范围： V_{pm} (0.04~400cm/s, $\pm 3\%$ 读数)， dp/dt (0~600 $\times 10$ mmHg/s, $\pm 3\%$ 读数)，INPUT ADJ (0~300mmHg, 即 0~3V)。OFF 灯灭。

2. 输入选择指示灯 外部输入时灯亮，内部输入时灯灭。

3. 状态选择、灵敏度转换开关“INPUT ADJ”：校正外部输入电压。通过输入电平调整器(4)调整。当输入 0mmHg 时，让数字显示器显示 0，输入 100mmHg 的电压时显示 100。

4. 输入电平调整器“GAIN” 校正外部输入的调整器。

5. 外部输入插座“EXT INPUT” 用于外部血压放大器直接输入。输入电压范围为

1~5V/100mmHg, 输入阻抗 100K Ω 。

6. 输出插座“OUTPUT”“P”：输出脉压波，得到矢量图时，连接示波器的 x 轴。 $dp/dt - dp/dt/KP$ ：输出 dp/dt 或 $dp/dt/KP$ (Vpm 时) 的运算波，得到矢量图时，连接示波器的 y 轴。输出阻抗 10 Ω 以下。

7. 手柄。

四、瞬时计数放大器 1321

与各种放大器或外部仪器联合，显示、输出每分钟心率、呼吸、脉搏等的瞬时值或平均值。各部分名称如图 3-4。

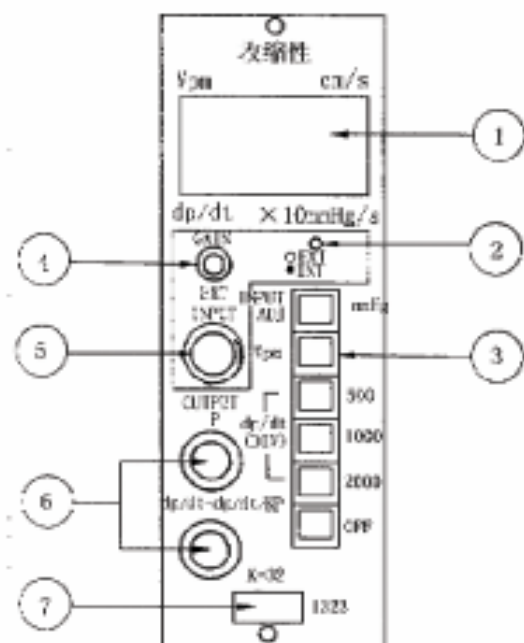


图 3-3 脉压波微分放大器

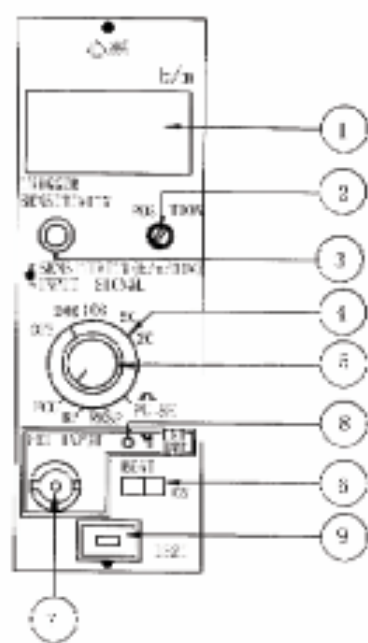


图 3-4 瞬时计数放大器 1321

1. 数字显示器 右侧的圆点同步闪灭显示输入信号每分钟的频率，显示间隔 1 秒。当输入信号的频率比测量范围低时，显示器变为 0，并闪灭；当输入信号的频率比测量范围高时，左侧的圆点闪灭。

2. 位置“POSITION” 放大记录输出信号时，能够移动输出 OUT (V) 的基线 0~1V。

3. 触发电平调整器“TRIGGER SENSITIVITY” 使节律音稳定或数字显示器右边的圆点与输入信号同步闪灭。

4. 灵敏度转换旋钮“SENSITIVITY” 根据输入信号的频率设定灵敏度。

5. 输入选择旋钮“INPUT SIGNAL” 根据输入信号选择心电 (ECG)、血压 (BP)、呼吸 (RESP)、脉搏 (PULSE)。

6. 音拍转换开关“BEAT” 置于 ON 时发出与输入信号同步的节律音。

7. 外部输入插座“EXT INPUT”。

8. 输入选择指示灯。

9. 手柄。

以测定动物血压为例，简要介绍四道生理记录仪的使用方法。

1. 分离被测动物的颈总动脉，将动脉插管（通过三通与换能器相连）插入颈总动脉，开始测量血压。

2. 接通四道生理记录仪电源，打开仪器右下角的总电源，再由下至上依次打开各控制部分和示波器的开关，即处于 ON 状态（关机时则由上至下依次关闭各部分的电源）。

3. 记录 通过控制部分 5592 设定所需走纸速度如 2mm/min，按下走纸开关“START”开始记录。

4. 自动零点平衡 将换能器通大气，在测量状态按血压放大器 1257 或 2238 的自动零点平衡按钮，指示灯灭，表示平衡。

5. 测量 旋转三通阀，使换能器与动脉插管相通，即可在血压放大器 2238 的数字显示器上显示血压数值，并可通过显示转换开关“S/D、MS”分别显示间隔收缩压、舒张压或平均压。同时在记录器上描记相应的血压波形。也可在示波器上扫描出血压波形，进行监测。

（马铁民）

第二节 MacLab 实时记录系统

MacLab 是计算机控制的新式信号记录和分析系统，它具有多导生理记录仪、实时 XY 绘图仪、记忆示波器、程控电刺激仪和色谱工作站的功能。目前已广泛应用于生理学、药理学、病理生理学、心理学、化学及生物学等研究领域。在神经科学、血流动力学、呼吸、体表心电、肌电及脑电图、药动学、离体器官组织实验、药物量效关系、细胞内外电生理记录、色谱分析、生化及电化学等研究中发挥着巨大作用。

MacLab 系统的硬件组成包括计算机、MacLab 主机、相应的前置放大器和换能器。常用的软件有 Chart 和 Scope。下面先介绍一下 MacLab 系统的基本操作，然后再分别介绍 Chart 和 Scope 软件在实际中的应用。

一、基本操作

MacLab 系统最基本的操作步骤如下：

1. 启动 首先检查系统各部的电源是否连好。打开 MacLab 主机开关（在背后面板上），然后打开计算机。

2. 选择程序 在计算机桌面上找到 MacLab 文件夹图标，双击后将其打开，可找到 Chart 和 Scope 两个软件图标。根据不同实验需要选用以上软件。Chart 软件适用于血压、各种生物电信号等的连续记录。具有自动记录、控制、计算等功能，它可以使 MacLab 成为一台用户随意选择设定的多信道图形记录仪；Scope 软件则适于记录快速而短暂的信号，如动作电位诱导、诱发电位、肌肉收缩等，它可以使 MacLab 成为一台两信道的记型示波器。

3. Chart 和 Scope 的基本操作 根据实验设计的需要分别选用 Chart 和 Scope 程序。打开 Chart 和 Scope 后，屏幕上会出现 Chart 或 Scope 的主窗口。用鼠标选取各种按钮和对话框来设定功能。

4. 储存 当记录完毕后，将记录结果进行编辑，删除不必要的部分，尽可能使文件短小，然后在“File”菜单中选“Save as”，起文件名后储存。

第四章 机能学实验

第一节 循环系统

实验一 人体血压和心率测量

Experiment 1. Human blood pressure & heart rate measurement

动脉血压是人体健康状况的一个重要的生命指征，因而测量血压是所有全身体格检查的内容之一。血压异常降低至正常范围以下（或临床休克）是一种医学急症。相反，血压异常升高超出正常范围，即为高血压，而高血压是心血管、脑血管、肾脏血管及其他部位血管疾病的重要危险因素。血压测量也是许多疾病中患者常规检查之一，同时也是评价身体对某些活动或工作身体适宜性和适当性的常规检查之一。

心率（或称脉率，因为它可以在身体任何动脉接近体表的部位直接接触）代表心动周期的频率。心率是四个生命指征之一——另外三个是血压、呼吸和体温。监测心率可辅助反映心脏工作情况（如一般健康状况和适宜性）、心脏对不同的生理/疾病状态（如体能锻炼）和药物治疗的反应性、以及心脏引发其他症状（如心悸、虚弱、气短等）的可能性。

血压和心率的变化是很平常的，即使在同一个体，不同时间测量结果也可能不同，因为血压和心率受众多因素的影响（如自主神经活动、姿势、日常活动、锻炼、精神状态等）。此外，血压测量中的水银血压计的相对不精确以及不同测试者确认 Korotoff 音时的差异均可导致所测结果有所差异。因而，血压值附近 5mmHg 的记录结果均是可接受的。虽然利用血压计测量血压的方法有不足之处，但仍然是医药工作者最常用的间接测量血压的方法。然而，在解释结果时还是应注意到这种方法的缺陷。血压的直接测量方法是有创的，测量时需将特制导管插入动脉并将其连接到压力传感器或汞柱式压力计上。

【实验目的】

1. 学习血压和心率的测量方法。
2. 学习利用简单的统计学检验来比较和确定所得数据的差异。

【实验对象】 人

【仪器和药品】 血压计、听诊器、体重秤。

【实验方法】

1. 需要记录的数据

- (1) 动脉血压（收缩压、舒张压和平均压），单位为 mmHg，使用血压计（和数字血压计）。
- (2) 心率，单位为次/分，计数 30 秒内桡动脉的搏动次数，并重复 2 次。
- (3) 体重，单位为千克，使用刻度体重计。
- (4) 身高，单位为米，使用刻度高度杆。

(5) 受试者的性别。

2. 实验程序

(1) 学生将配对完成实验。

(2) 每个学生测量其合作者三种体位时的血压和心率：①仰卧位（躺下）；②坐位；③立位，每个体位测量2次，每次至少测量30秒。受试者处于相应体位至少3分钟后才能开始测量。将两次重复测量所得结果的平均值录入电子表格中，以便编辑全班的数据。

(3) 前述血压测量使用的是水银血压计。接下来用电子血压计重复测量仰卧位的血压和心率。

(4) 每个同学测量其合作者的身高和体重。将对这些参数与血压（用仰卧位血压计）和心率进行相关性分析，以确定其是否是血压和心率的决定因素。

3. 比较

(1) 确定仰卧位、坐位和立位时血压和心率的测量结果是否有差异。

(2) 确定使用水银血压计测得的血压和计数桡动脉测得的心率（仰卧位）结果与采用用数字血压计所得的相应测量值之间有无差异。

(3) 确定不同性别的血压和心率是否有差异，以及采用简单的统计学检验方式（如不成对 t 检验，相关分析）确定血压和/或心率与身高和体重之间有无相关性。

4. 用水银血压计测量血压（图4-1）

(1) 将袖带舒适地缠绕在受试的裸露的上臂上并固定。

- 袖带捆绑过松会导致血压值读数偏高。
- 避免简单的掀起袖子，使袖子在上臂形成紧绷的止血带。
- 袖带下缘应在肘窝以上2~3cm处，在此位置放置听诊器。
- 过去，将气囊的胶皮管放在袖带下面肱动脉的位置。现在推荐将此胶管放置在上面或后面，这样肘窝的位置可以方便的用来听诊。但是要确保胶管不打结或受挤压，否则会影响气囊正常平稳的充气和放气。

(2) 向袖带内充气，边充气边听诊，待动脉搏动消失（亦即触诊的收缩压），再将汞柱升高20~30mmHg。

(3) 缓慢释放袖带压力（每秒或每次搏动时下降2-3mmHg）并同时用放在肱动脉上的听诊器来听“Korotkoff”音。

收缩压为出现第一个拍打音（I期 Korotkoff）以上2mmHg；

舒张压为声音完全消失时（V期 Korotkoff）以下2mmHg。

- 听诊器的听筒必须向前倾斜以舒适的适应外耳道
- 将听诊器的头部（钟部）放置在肱动脉搏动处（刚刚通过触摸确定），即时窝中间上方但袖带下缘下方。将其扶稳，与皮肤最佳接触，以获取 Korotkoff 音。将听诊器的头部放在袖带下面会腾出一只手，但会导致听诊时背景噪音过大。
- 血压计应放在让操作者清楚容易看见的位置（但没有必要让受试者看到，以避免受试者由此分心）。水银柱应垂直，且应使读数时气压计与测试者眼睛平行。
- Korotkoff 音采集结束后应继续将袖带放松10mmHg，以确保不会继续听到声音。之后应快速完全放松袖带，以免上肢静脉充血淤血。
- 在进行第二次测量前，应使受试者至少休息30秒。

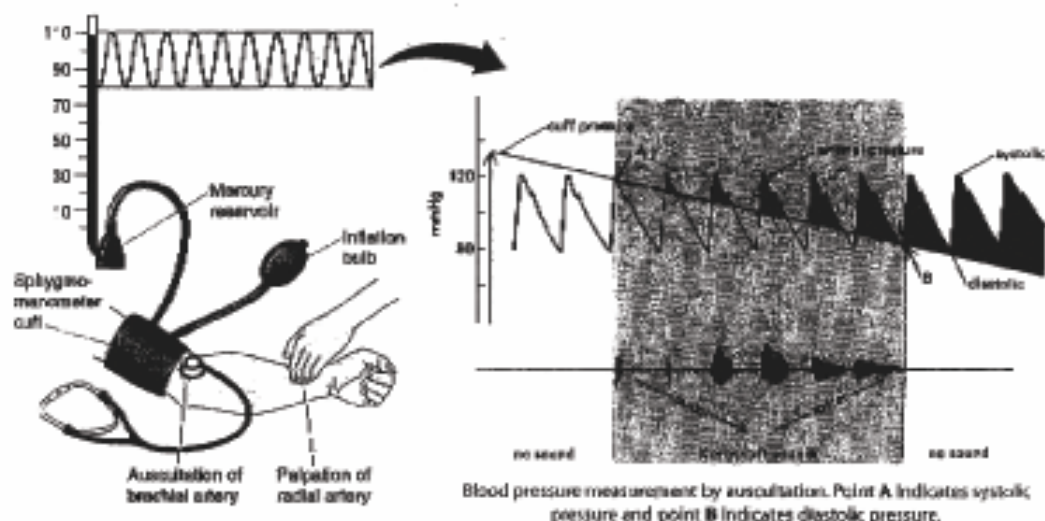


图 4-1 血压测定图

5. 受试者的准备

对于多数监测目的，受试者应采取坐姿并测量上臂血压。受试者必须保持舒适的坐姿并保证上臂中点与心脏持平（大约在第四肋间或标示的胸骨中点水平）。双腿弯曲，双脚平稳而舒适地放在地面上，不要晃动。背部应有所支持或倚靠，因测量时任何形式的等长收缩都会使血压短暂升高。

当受试者取立位时，必须注意的是，应使上臂中点与心脏持平，或使上肢支撑在与心脏持平的位置。当受试者取仰卧位时，上肢应置于体侧，稍从床上或体检台上抬起，与胸部侧中部持平。

测量前应使受试者在一安静、放松的环境中休息一段时间后进行，不应在交谈时进行测量，也不应在锻炼、饮酒或饮用含咖啡因的饮料（如茶、咖啡因、可乐）后立即进行测量。血压水平受到外界环境、情绪（如焦虑——白大褂高血压）和物理刺激的影响。所以应当尽量使测量条件标准化，以使外界因素对血压的影响降低至最小程度。预期疼痛、担忧测量过程（如袖带过紧压迫胳膊）和担心测量结果等，都会导致血压升高，致使过高估计真实血压。

附加信息

1. 血压计测量血压的原理^{2,3,4}

封闭袖带法间接测量血压是 1896 年由意大利内科兼儿科医生 Dr. Riva Rocci 设计的。该方法基于测量挤压肱动脉直至动脉波动不能触及或听不到封闭远端的心音时的外源压力。该外源压力由绕在上臂的充气袖带提供。由于袖带的压力可通过打开充气气球的阀门而降低，当用听诊器听诊时可听到湍流产生的重复音。这种重复音被称为“Korotkoff 音”，其得名于俄罗斯医师 Dr. Nicolai Korotkoff，他于 1905 年首次阐释了听诊法。第一个 Korotkoff 音出现时的袖带内压力是每个心脏周期产生的最大压力——收缩压。声音刚刚完全消失时的压力（动脉不再受到挤压，血流恢复为层流后不再产生响声）表示的是心脏收缩之间的静息压力——舒张压。

随着放气，封闭袖带的压力逐渐降低，Korotkoff 音在音质和强度上均有所变化。该变

化分为五个时相，区别和阐释如下：

第Ⅰ期：第一次出现清晰的，重复的拍击音。大约与重新出现可触及的脉搏（如封闭处远端的桡动脉脉搏）同时出现；

第Ⅱ期：声音更轻更长，伴随间断的杂音；

第Ⅲ期：声音重新变脆变响；

第Ⅳ期：声音被闭塞，不清晰，变轻；

第Ⅴ期：声音彻底消失。

有时 Korotkoff 音第Ⅱ期或第Ⅲ期听不到，只有袖带压力继续下降时才再次出现。这段无声期称为听诊无音间隙，在老年人和高血压患者中尤为常见。

现在通常认为当 Korotkoff 音完全消失（第Ⅴ期）时的压力即为舒张压，但在某些人群中除外——儿童、孕妇、贫血患者和老年患者。对于这些特殊人群，第Ⅳ期（闭塞）和第Ⅴ期（消失）时的舒张压都应该记录，尤其是差别在 10mmHg 以上时 [如 135/85(IV)/70(V)]。

2. 无液压力计和电子血压计的使用

无液压力计由于体积小、重量轻而得以广泛应用。电子血压计由于其对使用技术要求低（即不用听 Korotkoff 音），是水银血压计的方便替代品。然而，为确定无液压力计和电子血压计的可信度，使用一段时间后要对其进行校准和再核对，而校准要在大范围的血压上精确进行。

3. 袖带尺寸

袖带由两部分组成——不可膨胀部分和包着可扩张的长方形胶皮气囊的部分。后者通过胶管与充气气囊和压力计相连。袖带应完全环绕上臂，使得不可充气部分覆盖在含气囊部分的上面，并用自粘尼龙搭扣带固定住。

儿童及某些上臂尺寸相对平均尺寸偏大或偏小的成人可能需要专门尺寸的袖带。由于需要对袖带过度充气来阻止肱动脉血流，使用相对过小的袖带（如肥胖受试者）会使血压读数偏高。使用小的袖带导致的血压读数偏高程度要比使用大的袖带导致的血压读数偏低程度更大。

对于成人，通常推荐气囊宽度占上臂中点周长的 40%（气囊比套袖短），气囊长度占上臂周长的 80%。对于儿童，气囊应该足够长到能整个环绕上臂，且即使气囊末端叠在一起也不算错误。

4. 摸脉

通常用食指和中指触摸脉搏。也可以用拇指，但由于拇指本身存在搏动，所以可能会影响寻找患者的脉搏。另一种确定脉率的方法是用听诊器听诊心跳。

体表多处均可触及动脉搏动

- 桡动脉搏动
- 颈动脉搏动
- 颞动脉搏动
- 股动脉搏动
- 足背动脉搏动
- 尺动脉搏动
- 肱动脉搏动
- 面动脉搏动
- 腘动脉搏动
- 胫骨后动脉搏动

5. 正常值

静息状态下，正常成年人心率约 70 次/分，正常范围为 60~100 次/分。受训运动员由

于每搏输出量增大而心率可明显降低 (<60 次/分)。婴儿和新生儿 (<4 岁) 的心率在 110~160 次/分之间, 年幼儿童 (年龄 4~8 岁) 在 80~120 次/分之间, 年长儿童 (年龄在 9~16 岁之间) 在 60~110 次/分之间。

基于 2004 年发表于 US National Committee on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure 的第七次报告, 成年人 (18 岁以上) 的血压分类如下:

血压分类	收缩压 (mmHg)	舒张压 (mmHg)
正常	<120	<80
前期高血压	120~139	80~89
1 期高血压	140~159	90~99
2 期高血压	≥160	≥100

正常舒张压范围为 60~90mmHg, 收缩压范围为 90~140mmHg, 任何低于此范围的血压值均视为低血压。然而, 在正常的上限处引进了前期高血压的概念。前期高血压并非疾病表现, 而是用以体现一部分人更易发展为高血压。所以患者和临床医师均要警惕这一危险, 并鼓励干预和避免或推迟该情况的进一步发展。处于前期高血压的人群, 基于其血压水平不适合药物治疗, 而更应该建议其通过改善生活方式来降低未来发生高血压的危险。然而, 对于同时还有糖尿病或肾脏疾病的前期高血压人群, 在通过调整生活方式降压仍失败者, 就应该通过适当的药物治疗, 使血压降低到 130/80mmHg 或更低。

血压和心率测量

姓名: _____ 方法册
日期: _____ 学号:

简介 (即实习目的)

方法评论 (即前期准备和影响实验结果的因素)

结果:
自己的数据

性别	身高 (m)	体重 (kg)

	第一次测量	第二次测量	平均值
仰卧位 (电子血压计)			
收缩压 (mmHg)			
舒张压 (mmHg)			
心率 (次/分)			
仰卧位 (水银血压计)			
收缩压 (mmHg)			
舒张压 (mmHg)			
心率 (次/分)			
坐位 (水银血压计)			
收缩压 (mmHg)			
舒张压 (mmHg)			
心率 (次/分)			
立位 (水银血压计)			
收缩压 (mmHg)			
舒张压 (mmHg)			
心率 (次/分)			

讨论 (用另一张纸写)

(下页要填好的全班结果, 在课后分发给大家)

全班的血压和心率 (均值 \pm SD);

用电子血压计和水银血压计的测量值 (仰卧位) 进行比较, 并对男性和女性的学生血压进行比较 (三种体位)。

	全班		P 值 (电子血压计和水银血压计)	
仰卧位 (电子血压计)				
收缩压				
舒张压				
平均血压				
心率				
仰卧位 (水银血压计)	全班	女性学生	男性学生	P 值 (男与女)
收缩压				
舒张压				
平均血压				
心率				

续表

	全班		P 值 (电子血压计和水银血压计)	
坐位 (水银血压计)				
收缩压				
舒张压				
平均血压				
心率				
立位 (水银血压计)				
收缩压				
舒张压				
平均血压				
心率				

血压和心率 (全班仰卧位数据) 与体重和身高的关系:

仰卧位 (水银血压计)	体重		身高	
	相关系数	P 值	相关系数	P 值
收缩压				
舒张压				
平均血压				
心率				

不同体位全班同学数据的比较*:

	P 值		
	仰卧位和坐位	坐位和立位	仰卧位和立位
收缩压			
舒张压			
平均血压			
心率			

* 用成对比较方法分析变异度

第五章 研究性实验

第一节 科学研究实验设计

科学研究的目的是探索人类认识的未知领域，发现新事物，新现象；揭示新规律；提供新认识；建立新方法；开拓新领域。最终目的在于创新，与教学的实验课不同，不是重复、验证与检验已有的知识。

实验设计就是制订实验研究的计划和方案，是实施实验的前提和依据。所以，做实验之前必须进行实验设计，并力求周密。实验设计是否合理与周密直接关系到实验过程的可行性、结果的准确性和结论的可靠性。机能学科学实验研究设计课的目的，是采用研究导向式教学，以学生为主体，充分调动学生的主观能动性，培养学生科学的科学思维模式与严谨求实的科学态度与工作作风，培养学生创新精神与团队合作精神，营造浓厚的学术气氛，并充分利用网络资源，培养学生查阅文献、整理资料与综合、科学思维的能力，提高学生提出问题、分析问题和解决问题的水平，为培养综合性科研型人才打下良好的基础。

科学实验研究的设计要求：研究目标要明确；构思要新颖；立论要依据充分；实验方法和观察指标选择要恰当。

一、凝练科学问题

我们的目的在于用实验手段解决科学问题，所以首先要提出一个明确的科学问题，亦即立题。立题即确定所要研究的课题，是科研中的首要问题，具有战略意义，它决定研究方向和研究内容。立题的基本原则是：

1. 科学性

立题是在已有的科学理论和研究基础上进行的，要有充分的文献依据，不能凭空想象。有根据地提出实验目的和预期目标。

2. 创新性

科学实验的灵魂在于其创造性、新颖性和先进性，简单重复没有创新性的实验毫无价值。因此，立题要有新意，在对相关资料进行综合分析的基础上，进行创造性思维，找出所要解决问题的关键所在，最后确定研究课题。

3. 目的性

即课题的理论意义和实际意义。要明确、具体地提出所要解决的问题，其内容不宜过多，题目不宜过大。要突出主题。

4. 可行性

立题时要综合考虑实验的主、客观条件，特别是实验室条件和经济条件，把课题的创新性和可行性有机地结合起来。

二、查阅科学文献

科学研究要立足于资料与事实。因此，在进行某个问题的研究之前，先要充分地搜集和掌握与所要研究的问题有关的一切资料与事实。它的作用有：①了解这个问题的研究成果、研究动态、发展历史和现状，明确前人及他人对本课题的有关问题已作的工作，避免重复劳动，以此作为选择和确定研究课题的依据；②为研究提供科学的论证依据和研究方法，使研究方法论建立在可靠的材料基础上。完成一项科研课题活动的时间比例中，查阅有关资料要占30%以上。可见，查阅有关的文献资料是进行科学研究的一项重要准备工作。

查寻文献资料时要注意以下问题：

1. 在时间上要采用逆时法。因为新的文献资料总是要总结以前的文献资料，所以近期的资料更新、更全面、更可靠。

2. 应当注重查寻第一手材料。转手的材料，不能保证资料的准确性。另外，在资料来源和时间顺序上对自己也要加以限制，不能没完没了地查寻。

3. 要掌握一定的检索方法。正确的检索资料方法应达到：有较高的查准率和查全率；有较专深的内容；有较快的检索速度。要在准、全、深的基础上做到快，这就要学会利用网络资源。例如，常用的生物医学检索网络为：

检索外文文献的世界医学文献数据库 (Pubmed)：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

检索中文文献的中国生物医学文献数据库 (CBM)：<http://cbm.imicams.ac.cn/>

文献资料查找出来以后，就要阅读并做好笔记。阅读文献资料要有目的有顺序：如果研究方向大致确定，但课题未定，可以选定与自己研究内容、方向有关的书籍、论文、资料精心阅读，再参照附录的参考文献、书目、扩大知识面；同时还可以选读一些与研究内容有关的综述，了解权威的看法，掌握动向，最后确定课题。如果课题已确定，就可以直接围绕课题查找文献、资料，然后进行有针对性地阅读，了解相关专题的发展轨迹或趋势，拓宽相关的理论知识。

三、提出科学假说

科学研究的目的是要解决科学问题。为了解决科学问题，人们根据已知的科学事实和科学原理，对所研究的问题及其相关的现象作出一种猜测性的陈述或假定性的说明，就是假说。假说同理论有着基本相同的结构和功能，但它不同于理论，它对事物未知本质和规律的认识是根据已知的科学知识和科学事实推想出来的，具有一定猜测性质。它是否把握了客观真理，还有待于实践的检验。然而，假说又不同于一般的推测，它是确实可靠的科学事实和经得起实践检验的科学原理为根据合乎逻辑地推论出来的。因此，它与简单的幻想和随意的猜测不同，具有科学性。假说是科学性和猜测性或假定性的辩证统一。

按照现代许多科学家的观点，科学研究不是开始于观察而是始于提出问题。科学假说的形成首先是研究者依据为数不多的事实材料和已有的理论原理，围绕着科学问题，通过头脑的想象和思考，对所遇到的现象产生的原因和发展的规律性，作出初步的假定。这是假说的提出阶段。在这里问题和设想当然也离不开一定的事实材料和已有的理论原理，但主要的是解决问题的设想。在实验科学研究设计中，要注意科学假说提出的原则是：立论要新颖。因为我们的最终目的在于创新，而不是重复、或简单地验证与检验已有的理论。

四、根据科学假说设计实验

有了假说以后，进入下一步，即为论证解决科学问题的这个设想去搜集事实证据，并用这些事实证据去论证原先提出的科学设想，这就要求我们根据科学假说来设计实验。

(一) 实验设计的基本原则

1. 对照原则

在实验研究中须设对照组或者对照实验。其目的在于鉴别处理因素与非处理因素之间的差异以及消除和减少实验误差。对照应符合均衡原则（即齐同可比原则）。所谓均衡，就是在相互比较的各组间（实验组与对照组、实验组与实验组间），除了要研究的处理因素有差别外，其他一切条件如各组间动物的数量、种系、性别、体重等、实验方法、仪器、环境、药品、时间等均应力求一致。对照有以下几种形式：① 空白对照：对照组不加任何处理因素。如观察某种药的作用时，对照组不服药或服安慰剂。② 自身对照：在同一个体上给予两次处理，比较其差异。如同一受试动物用药前、后的对比；先用 A 药后用 B 药的对比等均均为自身对照。③ 组间对照：几个实验组之间相互对照。如用几种药治疗同一疾病，对比这几种药的疗效，即为组间对照。

2. 随机原则

随机分组的目的是：① 使每一个样本在实验中有同等机会，尽量使抽取的样本能够代表总体，减少抽样误差；② 使各组样本的条件尽量一致，消除或减少实验者主观因素产生的误差，从而使处理因素产生的效应更加客观。随机化的方法有抽签法、随机数目表、计算机随机数法等。

3. 重复原则

由于实验动物存在个体差异以及实验误差的影响，仅在一次实验或一个样本上获得的结果往往不够确实可信。要使实验结果精确可靠，必须要有一定的重复数，即实验要有一定的次数或例数。实验样本的大小取决于实验的性质、内容、实验动物的种类以及实验资料的高散度。在实验设计时，对样本大小的估计原则是：在保证正确可信的情况下确定最少的例数。决定样本的例数取决于：① 处理效果大小，效果越明显所需重复数越小；② 实验误差，误差越小所需样本数较少；③ 抽样误差，样本的个体差异越小，反应越一致，所需样本数就小；④ 资料性质，计数资料样本数要多些，计量资料则相应减少。一般而言，计数指标每组不应少于 30 例，计量指标每组不能少于 5 例，10~20 例较好。实验结果的重现率至少要超过 95%，这样做出假阳性的错误判断的可能性小于 5% ($P < 0.05$)。如果一定数量的样本就能获得 $P < 0.05$ 水平的实验，当然要比过量样本获得 $P < 0.05$ 的实验更可取。

(二) 实验内容的确立

设计实验中应根据实验研究立题确立实验内容，通常研究题目中应反映研究内容最基本的三大要素：即实验对象、处理因素、观察指标。

1. 实验对象的选择：在生物医学研究中，实验对象包括动物、离体脏器、原代分离而得的活细胞或在实验室中已长期培养的细胞或细菌。生理学实验课程中的实验对象以实验动物为主。实验动物选择合适与否与实验成败及误差大小有很大关系。实验动物的选择一般遵循以下几个原则：① 选用与人的机能、代谢、结构及疾病特点相似的实验动物。② 选用对实验敏感或患有类似人类疾病的动物。③ 选用解剖、生理特点符合实验要求的动物；动物的健康状态和营养状况必须良好。④ 选用与实验设计、技术条件、实验方法及条件相适应的动

物品种。⑤ 最好选用年龄一致或接近的动物，体重一致或相近的动物。在年龄大小一般应选择发育成熟的年轻动物。⑥ 动物的性别最好相同，如对性别要求不高的实验可雌雄各半；与性别有关者，只能用某一性别的动物。此外，伦理原则和经济费用也应考虑。

2. 处理因素：实验中根据研究目的，由实验者人为地施加给实验对象的因素称为处理因素，如药物、某种刺激及手术等。在设置处理因素时应注意以下几个问题：① 抓住实验的主要因素：由于因素不同和同一因素不同水平造成因素的多样性，因此在实验设计时有单因素和多因素之分。一次实验只观察一个因素的效应称为单因素，同时观察多种因素的效应称为多因素。一次实验的处理因素不宜过多，否则会使分组过多、方法繁杂，受试对象增多，实验时难以控制。而处理因素过少又难以提高实验的广度、深度和效率，同时所需时间较长，费用也很高。因此应根据研究目的确定几个主要的、带有关键性的因素。② 处理因素的强度：处理因素的强度就是因素量的大小，如电刺激的强度、药物的剂量等，处理的强度应适当。同一因素有时可以设置几个不同的强度，如一实验药设几个剂量（高、中、低），即有几个水平或层次，但处理因素的水平也不要过多。③ 处理因素的标准化：处理因素在整个实验过程中应保持不变，即应标准化，否则会影响实验结果的评价。例如电刺激的强度（电压、持续时间、频率等）、药物质量（来源、成分、纯度、生产厂、批号以及配制方法等）、仪器的参数等应作出统一的规定，并在实验的过程中严格按照这一个规定实施，研究结果才有可比性。实行处理因素标准化的有效方法是建立和实施每一类实验的标准操作规程，这将保证每个实验都能够按照统一的标准进行，减少因标准不一造成的失败或误差。重视非处理因素的控制：非处理因素（干扰因素）会影响实验结果，应加控制，如离体实验时的恒温、恒压、供氧等非处理因素。

3. 观察指标：在实验设计中，选取恰当的观察指标十分重要。指标是在实验中用来反映研究对象中某些特征性的、可被研究者或仪器感知的一种现象标志。医学实验指标就是反映实验对象所发生的生理或病理现象的标志。指标可分为主观指标和客观指标，计数指标和计量指标，机能学指标和形态学指标等。所选取的指标必须反映本课题的构思，必须与课题的研究目标密切相关，而不是一味求新，求全。所选定的指标，应符合以下基本条件：① 特异性：指标应特异性地反映所观察事物或现象的本质，即指标能特异性地反映某一特定现象，不致于与其他现象相混淆。如体温可作为发热的特异性指标。② 客观性：最好选用不受主观偏性影响可用具体数值或图形表达的指标，即客观指标，如心电图、血压及呼吸描记、化验检查等。而主观指标如肝脾触诊、目力比色等受到主观偏性的影响。③ 重现性：重现性高的指标一般意味着无偏性或偏性小、误差小，能较真实地反映客观情况。不宜采用重现性小的指标。④ 灵敏性：指标的灵敏度极其重要。指标不灵敏，该测出的变化测不出来，就会得“假阴性”结果；相反如果灵敏度太高，又会出现“假阳性”结果。因此在选用指标时，应根据实验所需的测量水平选用合适灵敏度的指标。⑤ 可行性：应尽量选用既灵敏客观，又切合本单位和研究者技术和设备实际的指标。⑥ 依据性：现成（定型）指标，必须有文献依据；自己创立的指标必须先经过专门的实验鉴定并获得学术界的认可。

（三）实验方法的选用

实验方法是实验设计的基本内容之一，实验方法的水平和可靠性是实验质量高低和成败的关键。随着医学科学的发展，疾病实验性研究的方法也在不断地提高、深化和完善，这为研究疾病提供了极为有利的条件，同时也推动了学科的发展。一般来讲，按学科它可分为生理学、生物化学、生物物理学等方法；按性质它可分为机能学和形态学的方法；按层次或水

平它可分为整体、器官和组织、细胞和亚细胞（如细胞生物学方法）、分子水平（如分子生物学方法）、亚分子水平（如量子生物学方法）等。

在选用实验方法时应根据实验目的和实验条件来选用不同的方法，方法技术应为研究目的服务。整体综合的方法和局部分析的方法都不可偏废，各有自己的适用范围，要综合考虑，使之互相补充，互相印证以获得可信的结论。在选择实验方法时要注意先进性和可行性的统一，经典性与创新性的统一，多样性与协同性的统一。

五、建立实验程序

实验内容和实验方法确立之后，就应建立恰当的操作程序。首先，要落实每个方法的具体操作步骤，写出详细的操作规程（Protocols），并在它的指导下进行预实验。所谓预实验就是根据立题的要求，通过几组非正式的简单实验对所提出的“原始假说”进行初步验证，同时也是对初步确定采用的实验方法和操作步骤进行演习，对实验设计估计将出现的主要技术难点及关键性指标进行初步实验观察以判断实验设计的可行性。根据预实验的结果对“原始假说”、实验方法和技术操作做必要的修改，为正式实验铺平道路，因此我们做实验不仅要用手更要用脑。

其次，要重视设计实验记录与观察内容。观察和记录在科学实验中占有十分重要的地位。观察不仅是用感官去感知，用仪器去观测，还有积极主动的脑力活动。观察时要做到全面、系统、连续、动态、客观和精确。要做到这些，实验者应熟谙实验原理，明确实验目的和要求，在观察中发挥主观能动性，熟悉所使用的技术或仪器设备，观察时要严谨、细致、实事求是，力戒主观片面。

记录是科学实验的结晶，是实验全过程的最终收获，实验记录时严谨、细致，实事求是，力戒主观偏性。要重视原始记录，在实验设计中应预先规定或设计好原始记录方式：文字、数字、表格、图形、照片或录像带等。原始记录要及时、完整、精确和整洁，数据严禁丢失和涂改，要保持原始性，切不可用整理后的记录来代替原始记录。

原始记录要写明：实验题目、实验对象、实验方法、实验条件、实验者、实验日期，测量的结果和数据等。规定填写的项目一定要及时、完整、正确地写明，图形、图片一定要整理保存。

六、对实验设计的总体评估

科学评估是实验设计的一个重要环节。实验方案的设计不是一成不变的，要在评估中改进、在改进中创新，从而设计出合理的实验方案。主要包括以下方面：

1. 预期结果阴性或阳性的解释与再证实，审定设计能否达到目标；
2. 预期结果追踪深入研究的方向和可行性；
3. 预期结果图表设计，明确结果是否单薄；
4. 预期结果的学术价值和地位。

在结束实验后，还要对设计进行再评价，以便再升华设计思路，扩充实验与深入实验，必要时进行补漏实验。如果试验失败，或与预期结果及文献报道不符，则应找出相应的原因，再重复试验，或针对问题设计新实验，以期得到稳定的和明确的科学结果与结论。

总之，在科学探究中，一个优秀的实验设计，可以让学生经历真实的科学探究、构建正确的知识体系，提高科学探究的效率。在实验设计中应注意以下问题：在掌握实验目的、原

理的基础上确定实验方法；严格遵循实验设计的基本原则，准确设置对照或变量；注意实验程序的科学性、合理性；对实验现象进行准确的观察、测量、记录；能够预测可能出现的实验结果及其导致原因，并能够得出科学的实验结论。

第二节 实验

实验一 农药对肝肾功能及血清胆碱酯酶的影响

Experiment 1. Effect of pesticide on the hepatic function & nephric function

【实验目的】

1. 观察有机磷酸酯类农药急性中毒后出现的症状和体征。
2. 观察阿托品和碘解磷定对急性有机磷酸酯类农药中毒的解救效果，并比较两药解毒的作用原理和作用特点。
3. 学习血清肝肾功能及全血胆碱酯酶活性的测定方法。

【实验原理】

有机磷酸酯类农药进入机体后，可与胆碱酯酶牢固结合，抑制胆碱酯酶活性，使其失去水解乙酰胆碱的能力，造成体内乙酰胆碱大量聚积，引起一系列急性中毒症状，主要表现为 M 样和 N 样症状。

阿托品 (atropine) 为选择性的 M 胆碱受体阻断剂，大剂量时还可阻断 N₁ 受体，可与乙酰胆碱竞争占领 M、N₁ 受体，从而阻断乙酰胆碱对这些受体的激动作用，能有效解除有机磷酸酯类中毒的 M 样症状和 N₁ 样症状，起效较快，是解救有机磷酸酯类中毒的对症治疗药物。

碘解磷定 (pyraloxime iodide, PAM) 是胆碱酯酶复活药，可恢复胆碱酯酶水解乙酰胆碱的能力，还能和游离的有机磷酸酯类直接结合，因而能彻底解除有机磷酸酯类农药急性中毒的症状和体征，是解救有机磷酸酯类中毒的对因治疗药物，但其解救作用起效较慢。

全血胆碱酯酶活力测定原理：血样中胆碱酯酶能催化乙酰胆碱水解为乙酸和胆碱。在一定条件下 (温度、pH、时间)，乙酰胆碱水解的量和血中胆碱酯酶活力成正比。因此在一定量的血液中加入一定量的乙酰胆碱，经过一定反应时间后，测定剩余的乙酰胆碱含量，即可计算出被水解乙酰胆碱的量，从而推算出血样中胆碱酯酶的活力。

剩余乙酰胆碱含量测定原理：乙酰胆碱可与羟胺反应生成羟胺酸，后者在酸性条件下可与 Fe²⁺ 形成羟胺酸铁络合物，该络合物呈红棕色，在 525nm 波长有较强吸收峰，通过比色法即可算出乙酰胆碱的含量。

【实验对象】

家兔，体重 2.5kg 左右，雌雄兼用。

【药品与器材】

5% 敌百虫 (dipterex)，0.1% 硫酸阿托品 (atropine sulfate)，2.5% 碘解磷定 (或氯解磷定)，pH7.2 磷酸盐缓冲液，0.007mol/L 乙酰胆碱底物溶液，14% NaOH 溶液，14% 盐酸羟胺，4N 盐酸，10% 三氯化铁溶液，注射器 (1ml, 2ml, 5ml, 20ml 各 1 支)，6 号针头，瞳孔测量尺，烧杯，滤纸，漏斗，试管，试管架，移液枪，吸头，手术刀片，干棉球，

婴儿磅秤, 听诊器, 秒表, 兔固定箱, 恒温水浴箱, 分光光度计。

【方法与步骤】

1. 取家兔 2 只, 称重并编号。观察家兔的活动情况, 测量并记录正常指标, 包括呼吸频率、心率、大小便、唾液分泌、瞳孔大小、肌肉紧张及有无肌震颤情况。

2. 从 1 号家兔耳中动脉取血约 0.5ml, 分别加入 2 号试管和 4 号试管各 0.15ml, 充分震荡, 混合均匀, 其中 2 号试管为对照管, 4 号试管用以测定正常家兔全血胆碱酯酶活性。(取血法: 先轻弹兔耳, 使血管充分扩张, 耳中动脉用手术刀片割破约 2mm 伤口, 让血液自流, 以刻度吸管取血, 其中一份血采用肝素法抗凝, 另一份血不抗凝。

3. 1 号家兔从耳缘静脉注射 5% 敌百虫 75mg/kg, 密切观察上述指标有何改变, 待家兔瞳孔明显缩小, 中毒症状明显时, 记录中毒时间, 按上法取血 0.15ml 加入 5 号试管, 用以测定家兔中毒后血液胆碱酯酶活性。

同时从耳缘静脉注射 0.1% 阿托品 1mg/kg, 密切观察上述指标有何改变。当毒覃碱样症状消失时 (约 10min), 记录作用时间, 按上法取血 0.15ml 加入 6 号试管, 用以测定家兔阿托品解救后的胆碱酯酶活性。

4. 2 号家兔按 1 号家兔同样方法取空白血测定中毒前胆碱酯酶活性; 敌百虫中毒后, 以 2.5% PAM 50mg/kg 代替阿托品进行解救, 同样按上法采取中毒后和解救后血样, 测定各血样胆碱酯酶活性。

5. 将实验中所采集的非抗凝血的血样离心取血清用于肝肾功能的检测 (采用半自动生化仪)。

6. 将抗凝血的血样按下表实验操作步骤测定全血胆碱酯酶活性, 比较 1 号和 2 号家兔解救后的症状、体征变化以及胆碱酯酶活性变化有何不同。

全血胆碱酯酶活性测定实验操作步骤

试剂 (ml)	对照管			测定管		
	1	2	3	4 给药前	5 给药后	6 解救后
磷酸盐缓冲液	1.0	0.85	1.0	0.85	0.85	0.85
血样	0	0.15	0	0.15	0.15	0.15
37℃水浴 3~5min						
乙酰胆碱底物	0	0	1.0	1.0	1.0	1.0
蒸馏水	1.0	1.0	0	0	0	0
37℃水浴 40min						
碱性羟胺溶液	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
4N 盐酸	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
三氯化铁溶液	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
混匀, 过滤, 蒸馏水调零, 波长 525nm 处比色						
吸光度 A	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6

碱性羟胺溶液: 临用前 20min 取 14% NaOH 溶液和 14% 盐酸羟胺溶液等量混合既可。

$$\text{酶活力值} = \frac{A_3 + A_2 - A_1 - A_{\text{管}}}{A_3 - A_1} \quad \text{酶活力百分比} = \frac{\text{酶活力值 (给药后或解救后)}}{\text{酶活力值 (给药前)}} \times 100\%$$

【实验结果】

将观察实验结果填入下表。

实验结果

观察指标	甲兔			乙兔		
	给药前	给药后	阿托品解救后	给药前	给药后	PAM解救后
一般活动						
呼吸频率						
心 率						
瞳孔大小						
唾液分泌						
大小便						
肌紧张						
肌震颤						
胆碱酯酶活力						
肝功能						
肾功能						

【注意事项】

1. 敌百虫局部刺激性大，耳缘静脉注射时家兔易挣扎，要注意固定好家兔头部。
2. 敌百虫可经皮吸收，如果手接触药物，应立即用自来水冲洗，切勿用肥皂，因敌百虫在碱性条件下可生成毒性更强的敌敌畏。
3. 每只家兔要从耳中动脉取血三到五次，应尽可能从同一伤口取之。取血部位宜从兔耳的根部开始。取血后要注意用棉球压迫止血。
4. 由耳缘静脉推注阿托品时，速度要快。而推注 PAM 时速度宜慢。进针部位宜从兔耳的远心端开始。取血和注射药物应分别在不同的兔耳上进行。
5. 试验用具需干燥而洁净。各血样的保温与时间，要求相同，实验中剂量应准确。
6. 测量家兔瞳孔时要注意光线对瞳孔的影响，最好采用同一人的测量结果。

【思考题】

1. 有机磷酸酯类农药急性中毒的症状有哪些？结合试验分析敌百虫的中毒机制。
2. 有机磷酸酯类农药急性中毒的抢救措施有哪些？
3. 分析阿托品和 PAM 的解毒机制，两药解救敌百虫中毒各有何特点？如何解救疗效最好？

(毛一卿 谭焕然)

第六章 病例讨论

【病例 1】

某糖尿病患者，血气分析结果如下：pH7.3，PaCO₂ 4.0kPa (30mmHg)，[HCO₃⁻] 16mmol/L，[K⁺] 4.5mmol/L，[Na⁺] 140mmol/L，[Cl⁻] 104mmol/L，试诊断其酸碱失衡类型？

【病例 2】

某肺心病患者，因受凉肺部感染而住院，血气分析结果为：pH 7.33，PaCO₂ 9.3kPa (70mmHg)，[HCO₃⁻] 36mmol/L，AG10mmol/L，问其酸碱失衡类型？

【病例 3】

某溃疡病并发幽门梗阻患者，因反复呕吐住院，血气分析结果如下：pH 7.49，PaCO₂ 6.4kPa (48mmHg)，[HCO₃⁻] 36mmol/L，问其酸碱失衡类型？

【病例 4】

某肝性脑病患者，血气分析结果如下：pH 7.47，PaCO₂ 3.5kPa (26.6mmHg)，[HCO₃⁻] 19.3mmol/L，试诊断其酸碱失衡类型？

【病例 5】

某肺心病患者，血气及电解质测定结果如下：pH 7.26，PaCO₂ 11.4kPa (85.8mmHg)，[HCO₃⁻] 35.8mmol/L，[Na⁺] 140mmol/L，[Cl⁻] 93mmol/L，问其酸碱失衡类型？

【病例 6】

患儿刘伟，男，1岁半，腹泻5天，近2天来加重，于1997年8月7日入院。据患儿母亲说：患儿于5天前，因饮食不当出现腹泻，为水样便，无脓血，每日6~7次，近2天来加重，每日大便10余次。伴有呕吐，每日3~4次，吐物为乳汁，不能进食，患儿并有口渴、尿少、腹胀、气喘等症。

体检：T39℃，R34次/分，BP10.7/7.5kPa (80/56mmHg)。患儿发育、营养欠佳，精神萎靡不振。嗜睡，皮肤呈大理石花纹，全身肌肉弛缓，呼吸深快，张口呼吸，唇围发绀，皮肤紧张度下降，弹性减退，皮下脂肪减少，两眼凹陷（前囟下陷），心跳快而弱，肺无异常所见，腹胀，肠鸣音减退，腹壁反射减弱，膝反射迟钝，四肢发凉。

化验：RBC $5.1 \times 10^{12}/L$ ，Hb 140g/L，WBC $1.98 \times 10^{10}/L$ ，N 80%，L 19%，M 1%，血清 [K⁺] 3.3mmol/L，[Na⁺] 140mmol/L，pH7.20，BE -5mmol/L，AB=18mmol/L，CO₂CP 17.1mmol/L (38Vol/dl)，PaCO₂ 4.4kPa (33mmHg)，大便为水样便，无脓血，小便 400ml/24h。入院后在输液时发现静脉萎陷，当输入 500ml 葡萄糖盐水后情况稍有好转，但当晚 8 时体温又增至 39.8℃，患儿出现惊厥，又发生腹泻、呕吐多次，先后补液

北京大学医学实验系列教材

生物化学与 分子生物学实验教程

主 编 倪菊华

副主编 梁 静 贾竹青



北京大学医学出版社

北京大学医学实验系列教材

生物化学与分子生物学实验教程

主 编 倪莉华

副主编 梁 静 贾竹青

编 者 (按姓氏笔画排序)

马利伟 王卫平 王海英 朱 滨

杨 洋 杨笑蕊 李淑艳 吴 歌

张晓伟 陈 颖 易 霞 俞文华

贾竹青 倪莉华 梁 静

秘 书 朱 滨

北京大学医学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验教程/倪菊华主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2008. 5

(北京大学医学实验系列教材)

ISBN 978-7-81116-557-9

I. 生… II. 倪… III. ①生物化学—实验—医学院校—教材②分子生物学—实验—医学院校—教材 IV. Q5-33
Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 040142 号

生物化学与分子生物学实验教程

主 编: 倪菊华

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E-mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京东方圣雅印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 朱文玉 韩忠刚 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 8.5 字数: 208 千字

版 次: 2008 年 5 月第 1 版 2008 年 5 月第 1 次印刷 印数: 1-3000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-557-9

定 价: 15.60 元

版权所有 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

生物化学与分子生物学是生命科学的重要组成部分，其发展日新月异。生物化学与分子生物学理论的形成和发展几乎都以实验技术为基础。为适应实验教学的需要、提高学生的动手能力、加深学生对生物化学及分子生物学理论的理解，编写《生物化学及分子生物学实验教程》作为高等医药院校生物化学及分子生物学实验教材，已是当务之急。

本书是在我们多年使用的本科生及研究生生物化学与分子生物学实验讲义的基础上，经修订和改编而成。根据学科发展，在原有实验讲义的基础上，删去了部分验证性实验，增加了一些反映最新进展的实验技术。全书包括总则、基本实验和高级实验三部分。总则介绍生物化学与分子生物学实验操作基本要求以及常用仪器的使用与维护。基本实验包括蛋白质分离与纯化、酶学实验和核酸提取与分析。除了常规经典的生化分析技术，新增了 SDS-PAGE、等电聚焦电泳、DNA 重组与鉴定、PCR 等分子生物学热门技术，可作为本科生的普通生物化学与分子生物学实验教材。高级实验收集了 RT-PCR、GST pull-down、Northern Blot 等分子生物学最新研究技术，有一定难度，可作为生物化学与分子生物学专业研究生的实验教材。

本书编写者均为北京大学医学部生物化学与分子生物学系的青年骨干教师，多数具有博士学位。他们承担生物化学与分子生物学教学与科研工作多年，既有丰富的教学经验，又有扎实的实验室工作基础，他们编写的实验教材有较强的针对性和实用性。

本书在编写和出版过程中，得到了北京大学医学出版社领导和编辑的大力支持与协助，在此表示感谢。由于编写时间仓促、编者水平有限，本书难免存在疏漏与错误，恳请同行与使用者予以指正赐教。

倪菊华

2008 年 3 月

目 录

总 则

实验室规则	(1)
基本操作	(2)
常用仪器简介	(6)

基本实验

蛋白质分离与纯化	(15)
实验一 血清的盐析及含量测定	(16)
实验二 凝胶过滤层析	(20)
实验三 醋酸纤维素膜电泳	(26)
实验四 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	(30)
实验五 等电聚焦电泳	(35)
酶学实验	(39)
实验一 底物浓度对酶促反应速度的影响	(40)
实验二 酶浓度对酶促反应速度的影响	(43)
实验三 pH 对酶促反应速度的影响	(45)
实验四 温度对酶促反应速度的影响	(47)
实验五 抑制剂对酶促反应速度的影响	(49)
实验六 乳酸脱氢酶粗提液的制备及活力测定	(52)
核酸提取与分析	(56)
实验一 质粒 DNA 的微量快速提取	(57)
实验二 质粒 DNA 的酶切与鉴定	(62)
实验三 DNA 重组与鉴定	(65)
实验四 聚合酶链反应技术 (PCR)	(71)

高级实验

实验一 牛肌蛋白的诱导表达和提取	(77)
实验二 蛋白质免疫印迹分析 (Western Blot)	(80)
实验三 免疫共沉淀	(84)
实验四 GST pull-down 分析	(90)
实验五 肝细胞总 RNA 提取及鉴定	(94)
实验六 RT-PCR 技术	(98)
实验七 探针标记	(102)
实验八 Southern Blot	(105)

总 则

生物化学与分子生物学实验有其独特的实验操作技能，多数实验需要用到特殊的仪器设备。在进入正式实验课程之前，有必要让学生系统了解实验室的基本规则、实验操作的基本要求以及常用仪器、设备的使用方法与维护，便于培养学生良好的实验室工作习惯。

本部分主要介绍实验室基本规则、玻璃仪器的清洗方法、移液器的使用方法以及混匀、保温、离心等常用实验操作基本技能。对分光光度计、离心机、PCR 仪、洁净工作台等常用仪器设备的工作原理、使用方法及维护也逐一介绍。

实验室规则

1. 生物化学与分子生物学实验不同于化学和生物学实验，而有其独特的实验技能和操作规程。课前必须认真预习，明确实验目的、熟悉实验原理、了解操作关键步骤及注意事项。

2. 不迟到早退，自觉遵守课堂纪律，认真听老师讲解，保持室内安静，不高声谈笑。

3. 常用仪器在首次实验时，按仪器清单进行清点，并负责保管，如有破损，到实验教学准备室换领。使用过程中如有破损必须到准备室登记，按规定进行赔偿。期末如数归还。

4. 应本着积极、认真的态度，在老师的指导下完成每次实验。注意观察实验过程中出现的现象和结果，结果不良时，必须重做。

5. 应及时将实验结果和原始数据如实记录在实验报告上，并请老师当场审核，根据实验结果进行分析，按时将实验报告交老师评阅。

6. 实验后，必须把仪器洗净，有序放入仪器柜，并防止碰撞造成玻璃制品破损。

7. 爱护实验器材，特别是贵重仪器。非本次实验使用的仪器设备未经允许不得乱动。本次实验必须使用的仪器设备，在充分了解仪器性能和操作规程之后，严格按规程操作。不可擅自拆卸仪器或将部件带出室外。实验过程中，如发现设备损坏或运转异常，应立即报告。

8. 对实验室内公用仪器，如分光光度计、电动振荡器、离心机等，每组同学使用时间不宜过长，以免影响全班实验进度。

9. 使用试剂前应仔细辨认标签，看清名称及浓度，确定其是否为本次实验所需要。

10. 取出试剂后应立即将瓶塞盖好，放回原处，切勿盖错，以免造成试剂交叉污染，取出而未用完的试剂不得倒回原试剂瓶内。

11. 实验室内严禁吸烟！对腐蚀性或易燃性试剂，操作时要格外小心。如酒精、乙醚等低沸点有机溶剂，使用时应禁明火，远离火源，若需加热要用水浴加热，不可直接在火上加热。

12. 凡属发烟或可产生有毒气体的化学实验，均应在通风柜内进行，避免对人体造成危害。配制挥发性有机试剂时也在通风柜内进行。

13. 若发生酸碱灼伤事故，应立即用大量自来水冲洗，酸灼伤者再用饱和 NaHCO_3 溶液

中和，碱灼伤者用饱和 H_2BO_3 溶液中和。氧化剂伤害者用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理，严重者应立即送医院救治。

14. 若发生起火事件，马上用灭火器扑灭。

15. 实验后要清洁实验台面、地面；试剂瓶要摆放整齐。经常保持实验室内清洁，不得随地吐痰，不乱丢纸屑。

16. 所有固体废弃物应丢弃在垃圾桶内。浓酸及对环境有害的废弃物应放在指定的容器中，由实验教学准备室交有关部门统一处理。

17. 课后由值日生负责打扫实验室的卫生，关好窗户，切断电源、水源及关好天然气阀门，经老师检查后，值日生方能离开实验室。

基本操作

【实验目的】

1. 掌握清洗玻璃仪器的正确方法。
2. 学会铬酸洗液的配制方法。
3. 学会正确使用移液管和可调式取液器。
4. 了解混匀法、保温法、沉淀法的适用范围。

【实验内容】

1. 玻璃仪器的清洗

生物化学与分子生物学实验常需使用各种玻璃仪器，玻璃仪器的清洁程度直接影响测量体积的可靠性和实验结果的准确性。因此，玻璃仪器的洗涤是生物化学与分子生物学实验一项重要的基本技术。

清洗过的玻璃仪器要求清洁透明，玻璃表面不含可溶解的物质，倒置时水沿器壁自然下流，器壁不挂水珠。

(1) 新购玻璃仪器的清洗

新出厂的玻璃制品表面往往黏附有可游离的金属离子、油污和灰尘，首次使用前需要用洗涤剂刷洗，流水冲净后，浸于 10% Na_2CO_3 溶液中煮沸，取出后用流水冲净，再浸泡于 1% HCl 溶液中过夜。用流水冲净酸液后，用纯水少量多次冲洗后，晾干备用。

新购砂芯玻璃滤器使用前应以热的盐酸或铬酸洗液边抽滤边清洗，再用纯水洗净。

(2) 使用过的玻璃仪器的洗涤

应根据污物性质和玷污程度选用合适的清洁方法。

1) 非计量敞口玻璃仪器，如试管、离心管、烧杯、量筒等，均可直接用毛刷蘸洗涤剂或洗衣粉刷洗，然后用自来水反复冲洗干净，最后用蒸馏水少量多次冲洗后，晾干备用。

注意：洗前检查毛刷顶端铁丝是否裸露，洗刷时不可用力过猛，以免损坏仪器。

2) 容量分析仪器，如滴定管、吸量管、容量瓶等。先用自来水冲洗晾干，然后于铬酸洗液中浸泡数小时，取出待沥净铬酸洗液后，用流水充分冲洗，最后用蒸馏水冲洗 2~3 遍，晾干备用。

3) 比色杯用毕立即用流水反复冲洗，再用蒸馏水或纯水冲洗干净。避免用碱液或强氧化剂清洗，切不可用试管刷刷洗或粗糙布、滤纸等擦拭。洗净后，倒置在比色杯架上晾干备用。

2. 常用铬酸洗液的配制 (浓度为 5%)

铬酸洗液广泛用于玻璃仪器的洗涤,由重铬酸钾 ($K_2Cr_2O_7$) 和浓硫酸配制而成,其清洁效力来自于它的强氧化性和强酸性。硫酸越浓,产生的铬酐越多,其清洁效力越强。新配制的铬酸洗液一般呈棕红色,为黏稠状液体,变为绿色时不宜再用。

其配制方法如下:

称取 $K_2Cr_2O_7$	5 g	置于 300 ml 烧杯中
加 dH_2O	5 ml	使其尽量溶解 (可加热使其加速溶解)
缓缓加入 浓硫酸	100 ml	边加边搅拌,待冷却后使用。

因硫酸加入后即放出大量的热,所以要缓慢注入,并随加随搅拌,注意不要溅出来灼伤操作者。配好的洗液待冷却后,装瓶备用,盖严以防吸水失去去污效力。

3. 移液操作

(1) 吸量管的使用

1) 常用吸量管的种类

a. 奥氏吸量管:此类吸管中下部有一橄榄形的膨大,每根奥氏吸量管只有一个刻度,适用于量取黏度较大的溶液。规格为 0.5 ml, 1 ml, 2 ml, 此类吸量管不常使用。

b. 刻度吸量管:供量取 10 ml 以下体积的溶液。每根吸量管上有许多等分的刻度,刻度标记有自上而下和自下而上两种,规格为 0.1 ml, 0.2 ml, 0.5 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml 等。此类吸量管常用。

刻度吸量管上方印有各种彩环,以示容积区别,红色单环:0.1 ml, 5 ml; 绿色或红色双环:0.5 ml; 黑色单环:0.2 ml, 2 ml; 黄色单环:1 ml; 桔色单环:10 ml。

2) 吸量管的使用

a. 选用原则

在一次完成移液的前提下,应选用容量最接近的吸量管;

对于同一次实验中同一种试剂的移取,应选用同一支吸量管。

b. 刻度吸量管取液的操作方法

执管:拇指和中指执吸量管上部,使吸量管保持垂直,食指按管上口调节流速,刻度朝向操作者。

取液:把吸量管插入液体,用洗耳球吸取液体至所需量(取刻度上方);移开洗耳球,迅速用食指压紧管口,然后抽离液面。(必要时用小滤纸片将管尖端外围拭净)。

调准刻度:用食指控制液体至所需刻度(此时液体凹面、视线和刻度应在同一水平线上)。

放液:移开食指,让液体自然流入容器内。此时,管尖应接触容器内壁,但不应插入容器的原有液体中(否则管尖会沾上容器内试剂,再移液时致使试剂交叉污染)。待液体流尽,将最后液滴吹出或转动吸量管使其沿容器内壁流出。

洗涤:吸取血浆、尿及黏稠试剂的吸量管,用后应及时用自来水冲洗干净。如果吸取一般试剂的吸量管,可待实验完毕后再洗。

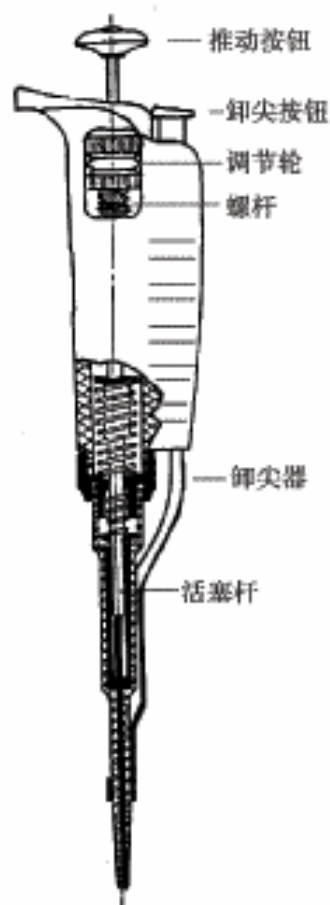
注意:①对于刻度由上至下的吸量管应尽量使用上端刻度。②管尖残液是否需吹,视具体情况而定。一般来说,移取 1 ml 及 1 ml 以下液体时均需吹出;移取大于 1 ml 的液体时可不吹,使管尖贴壁尽量排净残液。

(2) 可调式取液器的使用

随着科学技术的不断进步,实验中样品加样量也越来越精确,从半微量到微量甚至痕

量，从毫升到微升。可调式取液器因其使用方便，取液精确，已逐步取代刻度吸量管成为生化实验室中的必备工具。

1) 可调式取液器的结构



注：推动按钮内部的活塞分 2 段行程，第一档为吸液，第二档为放液，手感十分清楚。

2) 规格及有效量程

规格	2.5 μl	10 μl	20 μl	100 μl	200 μl	1000 μl
有效量程	0.1~2.5 μl	1~10 μl	2~20 μl	10~100 μl	20~200 μl	100~1000 μl

3) 操作规程

旋转调节轮至所需体积值；

套上吸头，旋紧；

垂直持握可调式取液器用大拇指按至第一档；

将吸头插入溶液，徐徐松开大拇指，使其复原；

将吸头移出液面，必要时可用纱布或滤纸拭去附于吸头表面的液体（注意：不要接触吸头孔口）；

基本实验

蛋白质、酶和核酸是三类重要的生物大分子。蛋白质是生命活动的物质基础，具有多种重要的生理功能；核酸是遗传物质，决定着遗传信息的传递；酶催化体内各种物质代谢的进行，是生物体新陈代谢的基本保证。研究生物大分子的结构与功能是现代分子生物学的重要内容。三类大分子的分离、纯化及分析技术是研究其结构功能的基础。

本部分按分子类别分为三节。第一节介绍蛋白质分析常用技术，包括盐析、凝胶过滤和电泳等，按由粗到细，由易到难的层次排列。第二节介绍酶学相关实验，包括酶促反应动力学实验和乳酸脱氢酶活性测定方法。酶促反应动力学实验已为本科生开设多年，对学生理解理论上关于酶学知识起很好的辅助作用。乳酸脱氢酶活性测定原为研究生实验课内容，供选学。第三节主要介绍 DNA 的提取、鉴定、重组以及 PCR 技术。这部分实验难度较大，可酌情选学。

蛋白质分离与纯化

蛋白质是一切活细胞和有机体的重要组成成分。细胞和体液中蛋白质都是成千上万种相混合而存在，要分析单个蛋白质的结构和功能需先分离纯化蛋白质。通常利用蛋白质的两性解离、等电点、紫外吸收等理化性质，采取盐析、电泳、层析等方法对蛋白质进行分离、纯化。蛋白质分离、纯化过程一般可分为以下几个步骤：

（一）材料的预处理及细胞破碎

分离提纯某一种蛋白质时，首先要把蛋白质从组织或细胞中释放出来，并保持其天然状态及活性。因此要采用适当的方法将组织和细胞破碎。常用的破碎组织细胞的方法有：①机械破碎法，可使用高速组织捣碎机、匀浆器、研钵等设备；②渗透破碎法，即在低渗条件使细胞溶胀而破碎；③反复冻融法，生物组织经冻结后，细胞内液结冰膨胀而使细胞胀破；④超声波法，使用超声波振荡器使细胞破碎；⑤酶法，用溶菌酶破坏微生物细胞等。

（二）蛋白质的抽提

通常选择适当的缓冲液将蛋白质提取出来。抽提所用缓冲液的 pH、离子强度、组成成分等条件的选择应根据欲制备的蛋白质的性质而定。如膜蛋白的抽提需加入表面活性剂（十二烷基磺酸钠、TritonX-100 等），使膜结构破坏，利于蛋白质与膜分离。在抽提过程中，应注意在低温下操作，避免剧烈搅拌等，以防止蛋白质的变性。

（三）蛋白质粗制品的获得

选用适当的方法将目的蛋白与其他杂蛋白分离。比较简便、有效的方法是根据蛋白质溶解度的差异进行分离。常用的有下列几种方法：①等电点沉淀法，不同蛋白质的等电点不同，可用等电点沉淀法使它们相互分离；②盐析法，根据不同蛋白质盐析所需要的盐饱和度不同，通过调节盐浓度将目的蛋白沉淀析出，盐析沉淀的蛋白质不变性；③有机溶剂沉淀法，中性有机溶剂如乙醇、丙酮可沉淀蛋白质，其沉淀机制是降低水的介电常数，导致具有表面水层的蛋白质分子脱水，相互聚集而析出。由于有机溶剂会使蛋白质变性，使用该法时，要注意在低温下操作，并选择合适的有机溶剂浓度。

（四）样品的进一步分离、纯化

用等电点沉淀法、盐析法所得到的蛋白质一般含有其他蛋白质杂质，须进一步分离提纯才能得到有一定纯度的样品。常用的纯化方法有：凝胶过滤层析、离子交换纤维素层析、亲和层析等。有时还需要这几种方法联合使用才能得到较高纯度的蛋白质样品。

实验一 血清的盐析及含量测定

【实验目的】

1. 掌握盐析的原理和方法。
2. 掌握考马斯亮蓝法测定蛋白质的原理和方法。
3. 了解血清蛋白质定量测定的临床意义。

【实验原理】

1. 蛋白质的盐析

(1) 在蛋白质溶液中加入中性盐至一定浓度时，蛋白质就会被沉淀，这种作用称为盐析。其机制与下列因素有关：蛋白质分子表面水化层被破坏，蛋白质分子所带电荷被中和。盐析沉淀的蛋白质，其性质不变，经透析或加水稀释后仍可溶解，因此盐析是可逆过程。

(2) 正常人的血清总蛋白中清蛋白占 60% 以上，其余为球蛋白，两者比例为 (1.5~2.5) : 1。清蛋白在水中的溶解性大于球蛋白，在血清中加入硫酸铵至半饱和时，球蛋白可被完全沉淀，而清蛋白保持溶解状态，依此可将清蛋白和球蛋白分离。

2. 蛋白质浓度的测定

蛋白质浓度测定根据原理不同分为以下三大类：

(1) 紫外吸收法：由于蛋白质分子中酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键，因此蛋白质有紫外吸收性质，吸收峰在 280 nm 波长处。在此波长范围内，蛋白质溶液的光吸收值 (A_{280}) 与其含量成正比关系，可用作定量测定。此法迅速，简便，不消耗样品，且低浓度盐类不干扰测定，但对于那些与标准蛋白质中酪氨酸、色氨酸含量差异较大的蛋白质会有一定误差。

(2) 定氮法：蛋白质是一类复杂的含氮化合物，每种蛋白质都有其恒定的含氮量 [约在 14%~18%，平均为 16% (质量分数)]。凯氏定氮法测定出的含氮量，再乘以系数 6.25，即为蛋白质含量。

(3) 比色法：即用分光光度计测蛋白质含量的方法。通常是在蛋白质溶液中加入某种显色剂或染料，以产生有色化合物，由于其颜色深浅与待测蛋白质的含量成正比，故成为非常普遍的蛋白质定量方法。比色法一般有：双缩脲法 (Biuret 法)、Folin-酚试剂法 (Lowry 法)、BCA 及 Bradford 等几种方法。

1) Biuret 法：双缩脲 ($\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2$) 在碱性溶液中与硫酸铜反应生成紫红色化合物，称为双缩脲反应。蛋白质分子中含有许多肽键 ($-\text{CONH}-$)，在碱性溶液中也能与 Cu^{2+} 反应产生紫红色化合物，在一定范围内，其颜色的深浅与蛋白质浓度成正比。本法操作简便，迅速，是蛋白质浓度分析的常用方法之一，缺点是灵敏度较低，蛋白质的量须在 1~20 mg/ml 方有较佳结果。在需要快速，但准确性要求不高的测定中，常用此法。

2) Lowry 法：蛋白质在碱性溶液中其肽键与 Cu^{2+} 螯合，形成蛋白质-铜复合物，此复合物使酚试剂的磷钼酸还原，产生蓝色化合物。此法敏感性较高，但反应需要的时间较长，且容易受到非蛋白物质的影响，含 EDTA, TritonX-100, ammonia sulfate 等物质的蛋白样品不适合此种方法。

3) BCA (Bicinchoninic acid assay) 法：这是一种较新的、更敏感的蛋白测试法。待测蛋白在碱性溶液里与 Cu^{2+} 反应产生 Cu^+ ，后者与 BCA 形成螯合物，形成紫色化合物，吸

管号	1	2	3	4
0.9% NaCl	200 μ l	200 μ l	200 μ l	
标准蛋白液 (1mg/1ml)				400 μ l

2) 从4号管中取出200 μ l至3号管中,混匀后再取200 μ l至2号管中,依次稀释至1号管,备用。此为倍比稀释。

(2) 血清样品的稀释:

取2支1.5ml Ep管,标1'、2'号,按下表稀释:

管号	1'	2'
0.9% NaCl	180 μ l	380 μ l
血清	20 μ l	

1'号管中加血清20 μ l后混匀,然后取20 μ l至2'号管中混匀,备用。2'号管最终稀释倍数为200。

(3) 盐析上清(清蛋白)的稀释:

取2支1.5ml Ep管,标1''、2''号,按下表稀释:

管号	1''	2''
0.9% NaCl	180 μ l	380 μ l
盐析上清	20 μ l	

在1''号管中加盐析上清20 μ l后混匀,然后取20 μ l至2''号管中混匀备用。2''号管最终稀释倍数为200。

(4) 测定:

1) 取7支干净1.5cm \times 15cm的大试管,标记0至6号。按下表加入试剂:

管号	0	1	2	3	4	5	6
考马斯亮蓝 G-250	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml
0.9%NaCl	100 μ l	—	—	—	—	—	—
对应加入倍比稀释的蛋白标准液	—	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	—	—
稀释血清 (2'管)	—	—	—	—	—	100 μ l	—
稀释盐析上清 (2''管)	—	—	—	—	—	—	100 μ l
蛋白质含量 (μ g)	0	12.5	25	50	100	?	?
OD _{550nm}							

2) 将各试管中溶液充分混合, 放置 2min 后开始测吸光度, 波长 595nm, 以 0 号管为空白调零点, 1 小时内测完。记录各管测定的光密度 OD_{595nm} 。

3. 绘制标准曲线, 计算血清总蛋白浓度、清蛋白浓度及清/球比值

(1) 以标准蛋白 (0~4 号管) 含量为横坐标, 相应的 Abs 值为纵坐标, 绘制标准曲线。

(2) 根据未知管的 Abs 值, 利用标准曲线在横坐标上找出其相应的浓度值 (图示值), 并分别代入下列公式, 计算出未知管的蛋白质浓度。

血清蛋白 (总蛋白) 的浓度 = 图示值 \times 200 (稀释倍数) = (mg/ml)

盐析上清 (清蛋白) 的浓度 = 图示值 \times 200 (稀释倍数) = (mg/ml)

(3) 计算清/球比值

清蛋白的浓度 : (总蛋白的浓度 - 清蛋白的浓度) = : 1

【分析与思考】

请同学们根据自己的实验结果进行分析, 若所测清蛋白含量过低或过高, 则可能与盐析时过硫酸铵加的量较多或较少有关, 导致清蛋白被沉淀或球蛋白沉淀不够; 如计算所得清/球比与实际差异很大, 则除了分析盐析过程外, 还要分析蛋白定量过程中的操作误差, 因为考马斯亮蓝法是较敏感的蛋白质定量方法, 因此加样的准确与否直接影响蛋白的定量结果。

思考题: 蛋白质定量测定的方法有哪些? 并简要说明其原理。

【注意事项】

1. 考马斯亮蓝 G-250 溶液必须贮存在棕色瓶内, 此液可长期使用, 但如变为蓝绿色, 则不能使用。

2. 标准蛋白溶液应新鲜配制, 现用现稀释, 避免蛋白质降解。

(杨笑蕊)

酶学实验

酶 (enzyme) 是由活细胞产生, 能在体内外对其作用物 (底物) 起同样催化作用的、具有高度催化效能和高度特异性的一类生物催化剂, 其化学本质基本上是蛋白质。受酶催化的物质称为底物, 酶催化的化学反应称酶促反应, 酶催化化学反应的能力称酶活性。

酶促反应动力学是研究底物浓度、抑制剂浓度、酶浓度、pH、温度等因素改变时, 酶促反应速度的变化。酶促反应动力学的研究有助于我们了解酶与底物的结合机制和作用方式, 以及酶的结构与功能的关系。

由于酶蛋白的含量甚微和难于提纯的原因, 很难直接测定酶的含量。在生化研究和临床检验中经常测定某一酶的活性大小来间接反映该酶含量的多少。因此酶活性测定的目的就是对样品中的酶进行定性、定量。

酶的催化活性以单位时间内底物的消耗量或产物的生成量来表示。一般以测定单位时间内产物的生成量为主, 这是因为在反应体系中底物量往往过量, 在测定时间内底物的消耗占其比例较少, 因此测定结果不易准确。而在反应体系中原来不存在的产物一旦生成, 只要测定方法灵敏即可测定单位时间内酶促反应的速度即酶活性。在具体实验中, 通常设置对照组以消除反应体系中除反应底物外的其他因素的影响。

酶的活性单位是指在规定条件下 (一定温度、pH 和底物浓度等), 酶促反应在单位时间内生成一定量的产物或消耗一定量的底物所需的酶量。由于测定酶活性的方法较多, 活性单位的表示也不一致, 为了统一标准, 国际生化学会 (IUB) 酶学委员会 1976 年规定: 在特定的条件下, 1 分钟 (min) 能转化 $1\mu\text{mol}$ 底物的酶量为一个国际单位 (IU), 即 $1\text{IU} = 1\mu\text{mol}/\text{min}$ 。

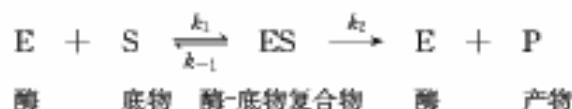
实验二 酶浓度对酶促反应速度的影响

【实验目的】

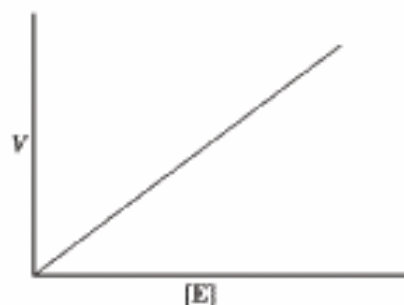
1. 熟记酶浓度对酶促反应速度的影响。
2. 掌握酶浓度对酶促反应速度影响的测定方法。

【实验原理】

在一定的温度和 pH 条件下，当底物浓度大大超过酶的浓度时，随着酶浓度的增加，酶促反应的速度与酶的浓度成正比。因为酶催化反应时，首先要与底物形成所谓中间物，即酶-底物复合物 [ES]。



当底物浓度大大超过酶浓度时，酶的活性部位可被底物全部占据，反应达到该酶浓度下的最大速度 V_m ，如果此时增加酶的浓度，可增加反应速度，酶反应速度与酶浓度成正比关系。



酶浓度对酶促反应速度的影响

由于影响酶促反应速度的因素很多，在设计酶活性测定的方法中，应使反应处于零级反应的条件下，即底物浓度因转化而降低后，仍不改变反应速度，即仍能够近似地表现最大速度，此时酶的活性部位仍旧全部被底物占据。为此，底物浓度一般应该选择在 K_m 值的 20 倍到 100 倍之间。

【实验材料】

1. 试剂

- (1) 4mmol/L PNPP; (同实验一)
- (2) 碱性磷酸酶溶液 (3.2 U/ml)
- (3) 0.2 mol/L 碳酸盐缓冲液 (同实验一)
- (4) 反应终止液: 1mol/L NaOH 溶液; NaOH 4g, ddH₂O 定容至 100ml

2. 仪器

TU-1800 分光光度计, 比色杯, 吸量管, 试管, 可调式移液器。

3. 耗材

可调式移液器吸头

【实验步骤】

1. 准备不同浓度的酶应用液：取小试管 5 支，标号，各加入 pH 10.0 的 0.2 mol/L 碳酸盐缓冲液 0.5 ml，用 1ml 的可调式移液器吸取 3.2 U/ml 碱性磷酸酶溶液 0.5ml 加入第一管中，上下吹打 3 次并充分混匀；然后吸取 0.5 ml 放入第二管；如此进行系列稀释至最后一管，分别得到 1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 U/ml 的碱性磷酸酶应用液。

2. 取 12 只试管，标号，按下表加入试剂：

管号	4 mmol/L. PNPP (ml)	酶应用液	
		液量 (ml)	浓度 (U/ml)
1a	4.0	0.1	3.2
1b	4.0	0.1	3.2
2a	4.0	0.1	1.6
2b	4.0	0.1	1.6
3a	4.0	0.1	0.8
3b	4.0	0.1	0.8
4a	4.0	0.1	0.4
4b	4.0	0.1	0.4
5a	4.0	0.1	0.2
5b	4.0	0.1	0.2
6a	4.0	0.1	0.1
6b	4.0	0.1	0.1

3. 注意 a 管为测定管，b 管为对照管，各 b 管中先加反应终止液 0.4ml，然后再加酶液，比色时以此管调零。各 a 管加入酶液后，开始计时 3min 整，加入 0.4ml 反应终止液，记 Abs_{405nm} 。

4. 数据处理：以各管的酶浓度为横坐标， Abs_{405nm} 值为纵坐标作图。

【分析与思考】

本实验在相同底物浓度、pH、温度条件下，检测了不同浓度的碱性磷酸酶催化 PNPP 反应相同时间所生成的产物量，用这个产物量来粗略地代替碱性磷酸酶所催化反应的反应速度，从而得到酶浓度和反应速度的关系曲线。

思考题：

1. 分析酶浓度与酶促反应速度关系曲线有何意义？
2. 试列举能更精确测量酶促反应速度的方法。

【注意事项】

1. 在所需的试管上做好明确标记。
2. 具体保温时间随酶活性而异，但同一实验各管保温时间必须一致。
3. 各管的加样量要准确，混匀一定要充分，起始反应和终止反应时间要控制准确。
4. 勿将反应管底部握在手中，以免影响反应温度。
5. 分光光度计要事先打开预热 10min 以上。

(俞文华)

核酸提取与分析

核酸 (nucleic acid) 是细胞中最重要的生物大分子之一, 它的构件分子是核苷酸, 天然存在的核酸可分为核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 和脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 两大类。核酸与生长、发育、遗传及变异均有着密切关系。

1953 年 Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构模型, 为现代分子生物学的研究发展奠定了基础, 是生物化学、分子遗传学和分子生物学发展历史上的巨大里程碑。1973 年美国斯坦福大学首次将两个基因在体外切割与连接, 从而促进了遗传工程技术突飞猛进地发展。1985 年 PCR 技术的诞生更使核酸的研究进入了崭新的发展时期, 也为 1986 年人类基因组计划的提出及随后的开展提供了坚实的技术保障。

研究核酸尤其是 DNA 的结构与功能, 有助于人们从分子水平了解和揭示生命现象的本质。核酸的提取与分析是研究核酸结构与功能的基础。

实验三 DNA 重组与鉴定

【实验目的】

1. 学习和掌握 DNA 重组技术, 包括: DNA 酶切、纯化及外源片段与载体的连接、感受态细胞的制备和转化以及阳性克隆的鉴定。

2. 学习氯化钙法制备大肠杆菌感受态细胞和蓝白斑筛选法筛选 DNA 重组子。

【实验原理】

DNA 重组技术是分子生物学的基本技术之一, 是 DNA 片段扩增、纯化、外源基因表达、基因转录调节、核酸结构与功能研究的基础, 多种分子生物学领域的研究都需要首先进行 DNA 重组。

DNA 重组是通过酶学方法将不同来源的 DNA 分子在体外进行特异切割, 重新连接, 组成新的 DNA 杂合分子, 使之能在宿主细胞中进行扩增, 形成大量的子代分子。DNA 重组涉及一系列的分子生物学技术, 它的基本过程可以用分、切、接、转、筛五个步骤来简单概括。

“分”即目的 DNA 片段和载体 DNA 的分离纯化。目的 DNA 片段一般来自目的生物基因组 DNA 或目的细胞 mRNA 逆转录合成的双链 cDNA; “切”即用适当的限制性内切酶对载体和目的 DNA 进行酶切以产生匹配末端; “接”是指载体和目的 DNA 在 DNA 连接酶的作用下形成重组体; “转”是指将重组体导入适当的宿主菌 (又称受体细胞) 进行扩增, 进入受体细胞的 DNA 分子通过复制、表达实现遗传信息的转移, 使受体细胞出现新的遗传性状; “筛”是指对转化后的受体细胞在筛选培养基中培养, 并进行筛选和鉴定以获得所需的重组体 (图 5)。

转化是将外源 DNA 分子引入受体细胞, 使之获得新的遗传性状的一种手段。转化率的高低与受体菌的感受态有关, 只有处于感受态的细胞才能摄取外源 DNA 分子。受体菌经过一些特殊方法处理后, 细胞膜的通透性发生了暂时性的改变, 能允许外源 DNA 分子进入, 即处于感受态。目前常用的感受态细胞制备方法有 CaCl_2 和电击法。电击法虽然转化效率较高, 但需要特殊设备, 不如 CaCl_2 法常用。本实验采用 CaCl_2 法, 用预冷的 CaCl_2 溶液处理对数期的细菌培养物, 使细菌处于感受态。转化混合物中的 DNA 可形成抗 DNase 的羟基-钙磷酸复合物黏附于细菌表面, 经 42°C 短暂热冲击后, DNA 复合物被受体菌吸收。经培养扩增, 外源 DNA 得以在受体细胞表达。此方法简便易行, 其转化效率完全可以满足一般实验的要求。制备出的感受态细胞暂时不用时, 可加入占总体积 15% 的无菌甘油, 于 -70°C 保存, 但保存时间不宜超过半年, 否则影响转化效率。

蓝白斑筛选是常用的重组子筛选方法, 其原理如下: pUC18 载体携带有细菌的 LacZ 基因, 编码 β -半乳糖苷酶的一段是由 146 个氨基酸残基组成的 α 肽, 此 α 肽可与宿主细菌的缺失 α 肽的 β -半乳糖苷酶组成完整的、有活性的 β -半乳糖苷酶, 此即为 α 互补作用。该酶能分解生色底物 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷) 产生蓝色, 从而使菌株变蓝。当外源 DNA 插入后, LacZ 基因不能表达, 形成白色菌落, 而含有非重组质粒的细菌则形成蓝色菌落, 称之为蓝白斑筛选。

本实验采用高级实验六中 RT-PCR 方法制备的 DNA 为模板, 利用 EcoRI 和 BamHI 限制性内切酶酶切目的基因和 pUC18 载体, 然后进行粘性末端连接, 最后用蓝白斑筛选法对

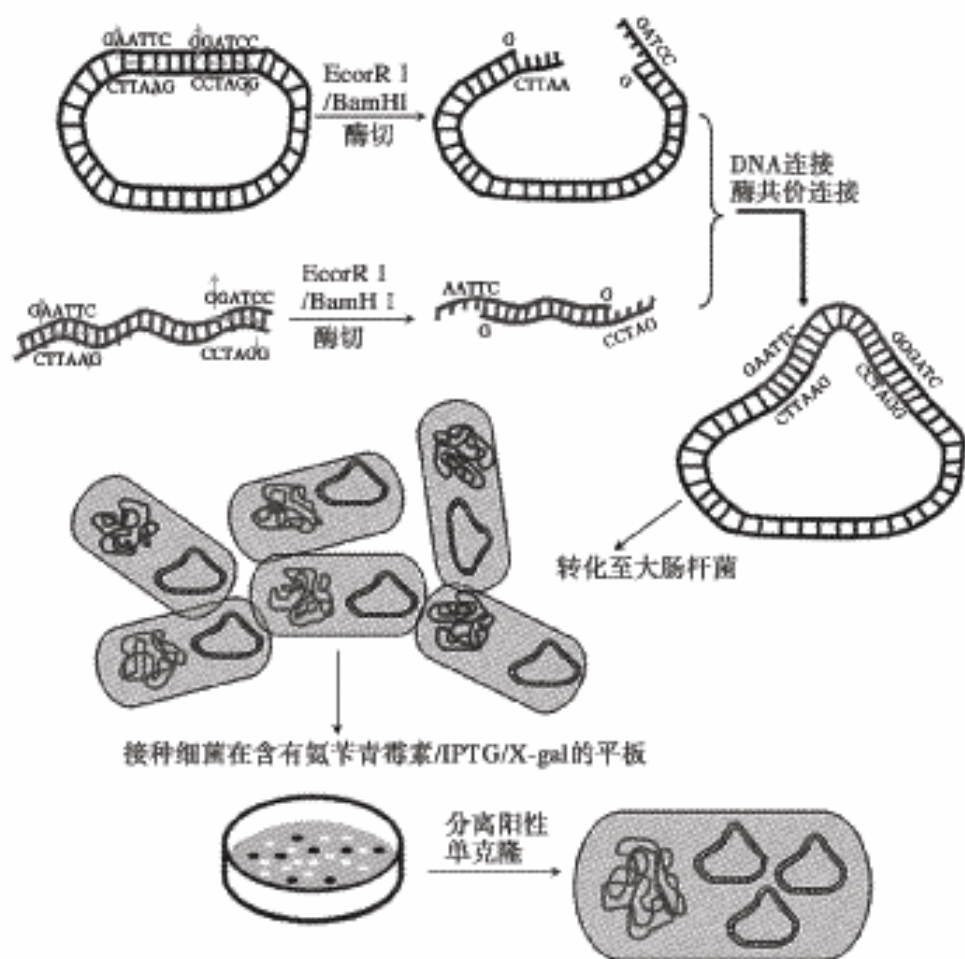


图5 DNA重组示意图

阳性克隆进行初步筛选，并在小量制备质粒后用PCR法进一步鉴定重组体。

【实验材料】

1. 试剂

- (1) RT-PCR产物、质粒pUC18、JM109。
- (2) 限制性核酸内切酶EcoR I和BamH I。
- (3) T₄连接酶/10×T₄连接反应缓冲液。
- (4) 酚/氯仿(1:1)：避光保存。
- (5) 无水乙醇：分析级。
- (6) 75%乙醇：75ml无水乙醇加25ml超纯水。
- (7) 醋酸钠(3mol/L, pH5.2)：在80ml水中溶解40.8g三水乙酸钠，用冰乙酸调节pH值至5.2，加水定容至100ml，高压灭菌。
- (8) LB/LA培养液：1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、1%NaCl，高压灭菌即为LB培养液。待培养液冷却至70℃左右加入100 μg/ml氨苄青霉素即为LA培养液。
- (9) LB培养基：LB培养液、1.5%琼脂。高压灭菌后铺板。配制LA培养基时铺板前需待培养液冷却至70℃左右加入100 μg/ml氨苄青霉素。

(10) 100 mg/ml 氨苄青霉素：溶解 1g 氨苄青霉素钠盐于足量的水中，最后定容至 10 ml。0.22 μm 滤膜过滤除菌，分装成小份于 -20°C 贮存。

(11) 1 mol/L CaCl_2 ：在 200 ml 纯水中 (Milli-Q 水或相当级别的水) 溶解 54 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，0.22 μm 滤膜过滤除菌，分装成 10 ml 小份，贮存于 -20°C (制备感受态细胞时，取出一小份解冻并用无菌水稀释至 100 ml，然后骤冷至 0°C)。

(12) X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖)：用二甲基甲酰胺溶解 X-gal 配制成 20 mg/ml 的贮存液，不需过滤、避光保存。

(13) 400 mmol/L IPTG：溶解 0.96g IPTG 于 ddH₂O，定容至 10ml，用 0.22 μm 滤器过滤除菌，分装成 1ml， -20°C 贮存。

(14) 质粒提取液 TELT：2.5 mol/L LiCl、50 mmol/L Tris-Cl (pH8.0)、62.5 mmol/L EDTA、4% TritonX-100。

(15) 5 \times TBE：54 g Tris 碱、27.5 g 硼酸盐、20 ml 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)、加水定容至 1L。

(16) 6 \times 上样缓冲液：0.25% 溴酚蓝、0.25% 的二甲苯青 FF、40% (w/v) 蔗糖水溶液。

(17) 1.0 mg/ml 溴化乙锭 (EB)：戴手套谨慎称取 EB 20 mg 于棕色试剂瓶中，加 20 ml 双蒸水，溶解后贮于 4°C 备用，配制琼脂糖凝胶时，每 100 ml 凝胶加 50 μl EB。

(18) 1% 琼脂糖凝胶：称取 1 g 琼脂糖，用 100 ml 1 \times TBE 加热完全溶解后，待冷却至 70°C 左右加入 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EB，制板。

2. 仪器

洁净工作台，酒精灯，接种环，5415R 型离心机，电泳仪，微型水平电泳槽，恒温培养箱，TU-1800 型紫外-可见分光光度计，紫外检测仪，可调式取液器，恒温摇床，恒温水浴箱，制冰机，电热消毒锅。

3. 耗材

一次性无菌平皿，1.5 ml、0.5 ml Ep 管、吸头。

【实验步骤】

1. 载体与目的 DNA 的制备

(1) 载体与目的 DNA 的酶切 (总体积 20 μl)：

	载体 DNA (pUC18)	目的 DNA (RT-PCR 产物)
载体 DNA	3 μl	—
目的 DNA	—	10 μl
10 \times multi-core buffer	2 μl	2 μl
EcoR I	1 μl	1 μl
BamH I	1 μl	1 μl
ddH ₂ O	13 μl	6 μl

混匀， 37°C 水浴 2~4 小时。

(2) 载体与目的 DNA 的纯化：

1) 向酶切后含载体与 RT-PCR 产物的 Ep 管中加入 180 μl ddH₂O，再加入等体积的酚/

氟仿，混匀 5min，4℃，10 000 r/min 离心 10min。

2) 小心取上层水相，加入 1/10 体积的醋酸钠 (3 mol/L, pH5.2)、2 倍体积无水乙醇，混匀，室温或 -20℃ 放置 30min。

3) 4℃，12 000 r/min 离心 10min，弃上清。

4) 加入 1 ml 75% 乙醇，混匀，4℃，7 000 r/min 离心 5min，小心弃上清 (注意不要丢失 DNA 沉淀)。待乙醇挥发干净后，溶于 10~20 μ l 无菌蒸馏水。

2. 连接反应

取两支 Ep 管，分别标记连接管和对照管，按下表加入试剂 (总体系 20 μ l)。

	连接管	对照管
载体 DNA	2 μ l	2 μ l
目的 DNA	2 μ l	—
10×T ₄ DNA 连接酶缓冲液	2 μ l	2 μ l
T ₄ DNA 连接酶	1 μ l	1 μ l
ddH ₂ O	13 μ l	15 μ l

混匀，22℃ 反应 2 小时或 16℃ 反应 5 小时。

3. 大肠杆菌感受态细胞的制备

(1) 将冻存的 JM109 菌株按 1% 浓度接种于 LB 培养液中，置于 37℃ 恒温摇床过夜培养。

(2) 取 0.5 ml 菌液加到 50 ml LB 培养液中，置于 37℃ 恒温摇床，以每分钟 200~300 转摇至细菌对数生长期 (OD_{600nm} 值 0.4~0.6)，约需 2.5~3 小时。

(3) 取 1.5 ml 菌液至无菌 Ep 管中，冰浴 10min (每组做 4 管)。

(4) 4℃，3000 r/min 离心 5min，弃上清 (倒出培养液，将管倒置 1min 以使最后残留的痕量培养液流尽)。

(5) 沉淀中加入 1 ml 预冷转化液，轻轻混悬后，冰浴 15min。

(6) 4℃，3000 r/min 离心 5min，弃上清。

(7) 沉淀中加入 200 μ l 预冷转化液，混悬后，置 4℃ 冰箱 (2 小时以上) 待用。

4. 转化大肠杆菌

(1) 混合：将 10 μ l 连接产物、10 μ l 对照和 2 μ l pUC18 质粒，分别加入 200 μ l 感受态细胞中，冰浴 30min。

(2) 热击：42℃ 水浴 90 秒，进行热休克，不要摇动离心管。

(3) 冰浴：冰浴 2min。

(4) 复苏：加入 500 μ l LB 培养液，置于 37℃ 恒温摇床轻摇 1 小时，使细菌复苏，抗性得以表达。

(5) 涂皿：每管加入 25 μ l IPTG、20 μ l X-gal，按下列要求分别取 200 μ l 菌液均匀地涂布在新鲜琼脂培养皿。

(6) 培养：置 37℃ 温箱中过夜，倒置培养 16~18 h，观察实验结果并记录结果。

高级实验

最近几十年，分子生物学领域的研究发展迅猛，取得了许多前所未有的重大成果，这一切都离不开一系列新技术、新方法的不断涌现。蛋白质和核酸分子的定性、定量分析，蛋白质-蛋白质相互作用分析、蛋白质-DNA 相互作用分析等已成为现代分子生物学实验室不可或缺的技术方法。

本部分收集的 RT-PCR、蛋白质免疫印迹、核酸杂交、GST pull-down 等 10 个实验，均为现今分子生物学研究领域常用的高级技术，此部分内容可作为生物化学与分子生物学专业及其他相关专业研究生的实验教材，也可作为专业研究人员的参考材料。

实验十 电泳迁移率变动分析 (EMSA)

【实验目的】

1. 掌握 EMSA 实验原理。
2. 掌握核蛋白质提取方法。

【实验原理】

电泳迁移率变动分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 又称为“凝胶阻滞”，是检测 DNA 结合蛋白质的一种简单迅速而又灵敏可靠的实验方法。当蛋白质与含有假定蛋白质结合位点的³²P 末端标记的 DNA 片段结合后，形成 DNA-蛋白质复合物，使 DNA 片段的分子量及电荷发生改变，因而在非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳体系中其电泳迁移率发生改变，通常较游离的 DNA 片段的泳动速率慢得多，在放射自显影 X 光胶片上形成一较游离 DNA 片段滞后的带型。

EMSA 是研究蛋白质对其 DNA 位点结合特征的最灵敏的方法之一。该方法可用于推断一种蛋白质对一个或多个位点的结合参数和相对亲和力，也可用于比较不同蛋白质对同一位点的亲和力，用未标记的竞争物 DNA 进行竞争分析，或者用抗体进行的超变动分析可以进一步确定 DNA 与相应蛋白质结合的特异性。

【实验材料】

1. 试剂

(1) 5×binding buffer:	甘油	20%
	MgCl ₂	5 mmol/L
	EDTA	2.5 mmol/L
	DTT	2.5 mmol/L
	NaCl	250 mmol/L
(2) 10×上样缓冲液:	Tris HCl (pH 7.5)	50 mmol/L
	Tris HCl (pH 7.5)	250 mmol/L
(3) 溶液 A	溴酚蓝	0.2%
	甘油	40%
	Tris HCl (pH 7.4)	250 mmol/L
	EDTA	1 mmol/L
	NaCl	100 mmol/L
(4) 低渗缓冲液	MgCl ₂	13 mmol/L
	HEPES	10 mmol/L
	MgCl ₂	1.5 mmol/L
	KCl	10 mmol/L
	PMSF	0.2 mmol/L
(5) 低盐缓冲液	DTT	0.5 mmol/L
	HEPES (PH7.9)	20 mmol/L
	甘油	25%
	MgCl ₂	1.5 mmol/L

KCl	0.02 mmol/L
PMSF	0.2 mmol/L
DTT	0.5 mmol/L

2. 仪器

电泳装置, 干胶仪, 离心机, 增感屏, X光片。

3. 耗材

细胞, Ep管, 吸头, 滤纸。

【实验步骤】

1. 提取核蛋白 (4℃进行)

(1) 收细胞 ($>6 \times 10^6$) 于离心管中, 用预冷的 PBS 洗 2 次, $600 \text{ g} \times 10 \text{ min}$, 去上清。

(2) 细胞重悬于 $400 \mu\text{l}$ 低渗缓冲液 (4℃预冷), 冰浴 15 min。

(3) 加入 10% NP-40 至终浓度 0.5%, 振荡 20 秒, 继续冰上孵育 30 min。

(4) 600 g , 4℃, 离心 10 min, 弃上清。

(5) 沉淀悬于 $50 \mu\text{l}$ 低盐缓冲液中, 剧烈振荡, 冰上静置 30 min。

(6) 1500 g , 4℃离心 10 min。

(7) 取上清分装入 EP 管中, -70°C 保存。同时留 $2 \mu\text{l}$ 上清, 做蛋白质浓度测定。

2. 标记探针

(1) 探针溶解: 用溶液 A 溶解干粉寡核苷酸, 终浓度 $100 \mu\text{M}$, -20°C 保存。

(2) 探针配对: 将互补寡核苷酸链各取 $10 \mu\text{l}$, 加在一起 (共 $20 \mu\text{l}$), 100°C 煮沸, 5 min, 自然冷却至室温。

(3) 探针稀释 10 倍, 即取上述体系内探针 (配对探针) $10 \mu\text{l}$, 加 $90 \mu\text{l}$ 水。

(4) ^{32}P 标记探针 ($20 \mu\text{l}$ 体系):

双链探针	$1 \mu\text{l}$ (10 pmol)
$10 \times \text{T4 buffer}$	$2 \mu\text{l}$
$\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$ ($10 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)	$3 \mu\text{l}$
T4 激酶	$1 \mu\text{l}$
ddH ₂ O	$13 \mu\text{l}$

37°C 孵育 30 min, 加入 $1 \mu\text{l}$ 0.5 mol/L EDTA 终止反应, 然后用 QIAGEN Qiaquick Nucleotide Removal Kit 纯化标记好的探针, -20°C 保存。另取 $1 \mu\text{l}$ 探针, 用液闪仪测定标记探针的放射比活度。

3. 胶制备

配置 7% 聚丙烯酰胺凝胶 (50 ml):	30% 丙烯酰胺	11.76 ml
	$5 \times \text{TBE}$	5 ml
	甘油	0.5 ml
	超纯水	32.33 ml
	TEMED	$35 \mu\text{l}$
	10% APS	$375 \mu\text{l}$

100 V 电压, 预电泳 1 小时

4. DNA 与蛋白质结合

设置两组, 一组为阴性对照, 一组为实验组

	阴性对照	实验组
5× binding buffer	4 μ l	4 μ l
蔗糖 DNA	2 μ l	2 μ l
核蛋白	0	10 μ g
32 P-探针	0	3 μ l
ddH ₂ O	14 μ l	至体系 20 μ l

室温 (25℃) 放置 30~40min。

5. 电泳

泳道 1: 上样缓冲液; 泳道 2: 对照组; 泳道 3: 实验组。

将样品上样后, 140 V 电压, 电流 23 mA, 直到泳道 1 中溴酚蓝到达胶底部, 终止电泳。尽量低温下电泳。

6. 干胶

小心撬开凝胶玻璃板, 裁好两张比胶略大的滤纸, 覆盖在凝胶上, 然后翻转玻璃板, 轻轻揭开玻璃板, 凝胶滞留在滤纸上, 用塑料保鲜膜包裹在凝胶上, 干胶仪上干燥凝胶 (70℃, 90min)。

7. 胶片曝光

在暗室中将干好的凝胶压于 X 线胶片下, -70℃ 曝光 1 小时至过夜 (根据放射强度调整)。洗像。

【分析与思考】

显影时若没有结合条带, 可能的原因是: ①蛋白质浓度不够, 不能与 DNA 位点结合; ②缓冲液条件不合适, 影响了蛋白质与 DNA 结合; ③阻滞条带过多可能由蛋白质与 DNA 非特异结合引起, 可以适当减少蛋白质的量。若阻滞条带模糊, 说明电泳中蛋白质解离, 一是蛋白质加入太多, 或者电泳时温度过高引起。

思考题:

1. 如何设计实验证明阻滞条带的特异性?
2. 在 EMSA 反应体系中加入待检蛋白的抗体, 阻滞条带会发生何种变化?

【注意事项】

1. PMSF 与 DTT 临用前加入, PMSF 0.2 mmol/L 贮存液用无水异丙醇配制, 可稳定保存 9 个月。

2. 注意设置对照组, 一般包括阴性对照, 阳性对照, 特异性竞争, 非特异性竞争及加入特异抗体的超阻滞实验, 有时可以将蛋白质与 DNA 结合位点突变, 用突变探针做竞争实验。

3. 提取核蛋白时, 尽量在 4℃ 或冰上操作。
4. 注意放射线的防护, 操作要规范。

(贾竹青)

附录 化学试剂的规格与保管

一、化学试剂的规格

化学试剂根据其质量分为各种规格（品级），我国常用的分级标准见下表。

级别	名称	简写	纯度和用途
一	优级纯（保证试剂）	GR	纯度高，杂质含量低，适用于科研和配制标准液
二	分析纯	AR	纯度较高，杂质含量较低，适用于定性定量分析
三	化学纯	CP	质量略低于二级，适用于一般的微量分析实验
四	实验试剂	LR	质量较低，比“工业用”的高，用于一般定性检验
五	生物试剂	BR	用于生化研究和检验试剂
六	生物染色素	BS	用于生物组织学，细胞学和微生物染色

其他还有一些不属于表中规格的试剂，如纯度很高的“光谱纯”、“层析纯”、“电泳纯”；纯度较低的“工业用”、“药典”、“纯”等。此外，有的化学试剂还有同分异构体。

实验用试剂需要按实验要求的一定规格进行选择，如用于精确的定量分析或配制标准液，需用二级以上。有的实验不用更高级的试剂也可达到要求，尽量不用，如配清洁液只需用粗硫酸。

二、化学试剂的保管

化学试剂一般应按其性质分别存于阴凉避光、通风、干燥处。

(1) 一般试剂：应存放阴凉避光、干燥处。

(2) 易燃试剂：如乙醚、石油醚、二甲苯、汽油、丙酮、乙醇等，应存放于远离火源、阴凉、通风处。

(3) 易爆试剂：如硝酸盐类、苦味酸、叠氮钠等化学性质不稳定，受撞击、热、强烈摩擦或与其他物质接触后易爆。应单独存放于阴凉、通风处。

(4) 腐蚀性试剂：如盐酸、硫酸、硝酸、氢氧化钠等，应密封存放在阴凉处。

(5) 剧毒和麻醉试剂：如氰化钾、氰化钠、砷酸、亚砷酸、氯化汞等，毒性很强，需专人保管。

三、易变质和需要特殊方法保存的常用试剂

	保管要求	试剂
需要密封	防潮解吸热	氧化钙、氯化钙、氢氧化钠、氢氧化钾、碘化钾、三氯化铁、三氯醋酸、浓硫酸
	防失水风化	结晶硫酸钠、硫酸亚铁、含水磷酸氢二钠、硫代硫酸钠
	防止挥发	氨水、氯仿、醚、碘、麝香草酚、甲醛、乙醇、丙酮

	保管要求	试剂
	防吸收 CO ₂	氢氧化钠、氢氧化钾
	防止氧化	硫酸亚铁、醚、酚、醛类等、抗坏血酸和一切还原剂
	防止变质	四硼酸钠、丙酮酸钠、乙醚
需避光	防见光变色	硝酸银 (变黑)、酚 (变红)、茚三铜 (变淡红)
	防见光分解	过氧化氢、氯仿、漂白粉、氰氢酸
	防见光氧化	乙醚、醛类、亚铁盐和一切还原剂
特殊方法保存	防震、防爆	苦味酸、硝酸盐类、过氧酸、叠氮钠
	防剧毒	氰化钾 (钠)、汞、砷化物、溴、铀化合物及放射性元素
	防火	乙醚、甲醇、乙醇、丙酮、石油醚、汽油、二甲苯、苯
	防腐蚀	强酸、强碱
	防高温失效	一切生物制剂、如免疫血清、菌液、标准参考、酶和辅酶等常需冷藏

(朱 滨)

北京大学医学实验系列教材

医学免疫学与 病原生物学实验教程

主 编 王月丹

副主编 李 彤 吴 伟



北京大学医学出版社

北京大学医学实验系列教材

医学免疫学与病原生物学实验教程

主 编 王月丹

副主编 李 彤 吴 伟

编 委 (按姓氏笔画排序)

王月丹	王承志	邓路逸	李 彤
李 杰	李 爽	刘树林	闫 玲
朱蕴兰	吴 伟	陈慧红	周 琦
张秀春	孟佳子	贺 琼	贾默雅
徐 兰	曹 杰	彭宜红	程眉芬

北京大学医学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学免疫学与病原生物学实验教程/王月丹主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2008. 5

(北京大学医学实验系列教材)

ISBN 978-7-81116-556-2

I. 医… II. 王… III. ①医药学: 免疫学—实验—医学院校—教材②病原微生物—实验—医学院校—教材

IV. R473. 71

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 040143 号

医学免疫学与病原生物学实验教程

主 编: 王月丹

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E-mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京东方圣雅印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 朱文玉 周传敬 韩忠刚 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 15.25 字数: 379 千字

版 次: 2008 年 5 月第 1 版 2008 年 5 月第 1 次印刷 印数: 1-3000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-556-2

定 价: 26.00 元

版权所有 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

本教材是北京大学医学实验系列教材之一，主要包括医学微生物学、医学寄生虫学和医学免疫学的教学实验内容，是帮助医学生验证病原学与免疫学基本理论、理解病原微生物致病机制和掌握免疫学与病原学检验与诊断方法的基本原理和基本操作的指导用书。

本实验教材设计的实验包括三个层次，通过基本实验培养学生掌握病原学与免疫学基本操作技术（如显微观察技术、无菌操作技术、分离培养技术、免疫荧光技术、免疫酶标记和免疫细胞功能检测等）；通过综合实验使学生认识如何将病原学与免疫学的基本操作和分析技术应用于医学实践（如病原微生物的分离鉴定和细胞因子的检测等）；通过高级实验使学生了解本学科在技术上和认识上最新的发展动态，培养学生的创新意识和参与科学研究的能力（如病原体特异性T细胞识别的抗原表位分析与鉴定等）。在实验中，通过标本观察、实验操作、分析实验结果及计算机多媒体辅助教学等手段对学生进行基本理论、基本操作、基本诊断方法以及建立基本科研思路的训练。

在本教材的编写过程中，不仅有北京大学生物医学实验教学中心病原与免疫综合实验室教师的参与，同时也得到了北京大学基础医学院免疫学系和病原生物学系广大教师与研究生的支持。其中，病原生物学系刘树林教授、吴伟副教授、彭宜红副教授、李彤副教授和免疫学系王月丹博士等一批相关专业的专家担任本书的编委，这不仅保证了本教材中的实验能满足医学本专科学生掌握免疫学与病原学基本实验技能和原理的需要，而且也使本教材介绍的实验（尤其是高级实验部分）更能与时俱进，具有一定的先进性，更有利于培养学生的创新意识与创新能力。

本教材可供基础医学、临床医学、口腔医学、预防医学、医学检验、护理学、药学及卫生事业管理等专业的医学生实验课使用，针对不同专业的学生可根据实际情况对实验内容进行适当调整与删减。由于本教材在编写形式和实验内容方面进行了新的尝试，经验不足，而且时间仓促，难免存在各种各样的错误与不足，希望各位使用本教材的老师与同学批评指正。

编 者

2008年4月5日

目 录

总 论

- 一、实习课的基本要求..... (1)
- 二、实验室规则..... (1)
- 三、实验室生物安全简介..... (1)
- 四、医学寄生虫学实验中光学显微镜的使用..... (4)

基本实验

- 实验一 细菌形态学观察基本技术..... (9)
- 实验二 细菌分离培养相关技术及应用 (16)
- 实验三 微生物的控制 (24)
- 实验四 细菌代谢产物检查 (31)
- 实验五 细菌变异现象的观察 (35)
- 实验六 螺旋体实验 (38)
- 实验七 真菌形态学观察 (41)
- 实验八 病毒学基本技术 (44)
- 实验九 免疫器官的观察 (50)
- 实验十 免疫沉淀反应试验 (52)
- 实验十一 免疫凝集反应试验 (56)
- 实验十二 酶联免疫吸附试验 (59)
- 实验十三 补体功能检测试验 (61)
- 实验十四 免疫细胞功能检测试验 (65)
- 实验十五 线虫 (74)
- 实验十六 吸虫 (80)
- 实验十七 绦虫 (86)
- 实验十八 医学原虫 (92)
- 实验十九 医学节肢动物..... (101)

综合实验

- 实验一 病原性球菌的分离鉴定..... (113)
- 实验二 肠道杆菌的分离鉴定..... (120)
- 实验三 流行性感冒病毒的分离鉴定..... (128)
- 实验四 白细胞介素 2 活性测定..... (132)

实验五	超敏反应试验	(134)
实验六	消化道寄生虫的检查	(140)
实验七	血液、排泄物、分泌物与组织器官中的寄生虫检查	(146)
实验八	感染血吸虫家兔的病理解剖和实验室诊断	(152)

高级实验

实验一	脉冲场电泳技术在细菌基因组物理图构建中的应用	(159)
实验二	沙眼衣原体临床标本的分离培养与鉴定	(171)
实验三	病毒样品感染滴度的测定	(173)
实验四	乙型肝炎病毒基因分型实验	(177)
实验五	多克隆抗体的制备	(182)
实验六	单克隆抗体的制备	(187)
实验七	特异性 T 细胞识别的抗原表位分析与鉴定	(191)
实验八	卡氏肺孢子虫感染动物模型的建立及 PCR 检测	(203)
附录 I	常用培养基制备	(205)
附录 II	微生物染色法	(213)
附录 III	常用指示剂、试剂、溶液和缓冲液	(218)
附录 IV	实验动物的管理、接种、采血及解剖法	(224)
附录 V	实验仪器介绍	(227)
参考文献		(230)

总论

一、实习课的基本要求

病原生物学实验室是分离、培养、鉴定和保藏病原微生物之处，为避免感染和污染的发生，在实验中必须注意树立无菌观念，掌握无菌操作技术。为使同学们通过实习课加深和巩固基础理论知识，学习并掌握病原生物学的基本实验操作技能，并保证自身和他人的安全，特制定以下规则，希望同学们严格遵守。

(一) 课前预习，明确实验目的、原理、内容、操作步骤及注意事项，并做好必要准备工作。

(二) 课上认真听讲并仔细观察示教内容；对自己操作的实验要严格按实验步骤进行操作，注意分工协作，合理分配和利用时间；有问题随时提问解决。

(三) 客观真实地记录结果，及时完成实验报告。

(四) 确实遵守实验室规则，避免各种事故发生。

二、实验室规则

(一) 实验前穿好白大衣，除实习讲义外，其他个人物品不要放在实验台上。实验室内严禁吸烟、饮食及大声喧哗。

(二) 实验中严格按无菌操作技术要求操作。当出现污染时，应立即报告老师以便及时处理。

(三) 沾有微生物的用品，如吸管和玻片等，用后应立即放入装有消毒液的专用容器内。

(四) 爱护示教标本、仪器和室内设施。注意易燃物品的使用，防止火灾发生。

(五) 节约水电、燃气、酒精、试剂及一切实验材料。损坏公物和实验器材，需视情节进行批评及赔偿。

(六) 实验完毕后，将标本和材料按原样摆好送还老师，要消毒处理的物品，应送到指定地点。须将显微镜按要求维护好，登记并对号放入柜中。

(七) 每次实验课后，按小组值日。值日要求如下：实验物品还原，台面、地面和白板面干净，凳子放齐，检查水、电、门、窗、培养箱温度、水浴锅等，该关闭的关闭，该保温的保温。

(八) 离开实验室前，脱去白大衣并反折叠好，用肥皂洗手后再离开。

三、实验室生物安全简介

医学病原微生物学实验室是分离、培养、鉴定和保藏病原微生物之处，确保操作人员和环境安全至关重要。

(一) 病原微生物分类

2004年11月12日国务院发布了424号令，开始实施《病原微生物实验室生物安全管理条例》。根据《条例》病原微生物分为4类。第一类病原微生物，是指能够引起人类或动

物非常严重疾病的微生物，以及我国尚未发现或者已经宣布消灭的微生物，例如马尔堡病毒和天花病毒。第二类病原微生物，是指能够引起人类或者动物严重疾病，比较容易直接或间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物，如 SARS 冠状病毒、HIV I 型和 II 型、炭疽芽孢杆菌和结核分枝杆菌。第三类病原微生物，是指能够引起人类或者动物疾病，但一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害，传播风险有限，实验室感染后很少引起严重疾病，并且具备有效治疗和预防措施的微生物，如 HBV、登革病毒、破伤风梭菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌。第四类病原微生物，是指在通常情况下不会引起人类或者动物疾病的微生物，如小鼠白血病病毒。其中，第一类和第二类称为高致病性病原微生物。医学微生物学教学实验中使用的微生物主要为第三类和第四类病原微生物。

（二）生物安全实验室分类

生物安全实验室 (Biosafety Laboratory)，简称“BSL 实验室”，在结构上由一级防护屏障（安全设备）和二级防护屏障（设施）这两部分硬件构成，实验室生物安全防护的安全设备和设施的不同组合，构成了四级生物安全防护水平，一级最低，四级最高。其中，BSL-1 和 BSL-2 实验室被称为基础实验室，BSL-3 被称为生物安全防护实验室，BSL-4 被称为高度生物防护实验室。医学微生物学教学实验通常要求在 BSL-1 和 BSL-2 实验室开展。

（三）实验室生物安全操作规程的要点

在医学微生物学教学实验中，虽然所用微生物一般危害较轻，但学生应该注意树立预防为主观点。实验室生物安全操作规程的要点是：①把所有的微生物培养物当成有潜在危害的生物对待；②把所有的操作当成有潜在危险的操作对待。之所以有必要把所有的微生物培养物当成有潜在危害的生物对待，原因有三。首先，已知对人无害的微生物有可能经变异而对人产生危害；其次，某种微生物在自然情况下其总量和单位体积（或单位重量）样品中的量（即浓度）较之实验室纯培养物要低很多，不能据其在量小、浓度低时对人体无害就推断其在量大、浓度高时对人体就一定无害；最后，要考虑人群中存在个体免疫力的差异，某种微生物可能对大多数个体无害，但对少数个体可能就能致病。

（四）减少实验室感染实用指南

1. 学会洗手

实验室中规范的洗手流程参见图总-1。洗手时间为 20~30s，即将“祝你生日快乐”歌唱 1~1.5 遍。





图总-1 规范的洗手流程图

2. 学会安全使用注射器和利器

- (1) 必须用时（如取血和注射）才使用；
- (2) 只使用一次；
- (3) 使用后不得将针头帽重新套上或折弯针头；
- (4) 使用者即丢弃者原则；使用者不要将用过的注射器或利器交给别人丢弃；
- (5) 使用后丢弃在专用的防穿透的容器内；
- (6) 最后的处理要按国家、地方或单位的规定。

3. 学会危害评估

对实验材料和实验活动的危险性评估主要考虑的因素见表总-1。

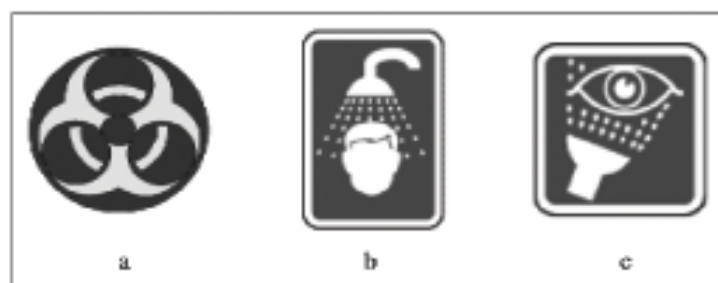
表总-1 潜在危险性大的实验材料和实验活动

潜在危险性大的实验材料	潜在危险性大的实验活动
<ol style="list-style-type: none"> 1. 致病性强 2. 经呼吸道传播 3. 稳定性强，去除污染难 4. 感染剂量 LD₅₀ 低 5. 单位体积内感染性微生物量大 6. 样品总体积大 7. 对其致病性了解不详的变异株、我国没有的菌毒株、转基因生物 8. 没有有效疫苗预防的 9. 没有有效治疗方法的 10. 本实验室人员从未操作过的 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 产生气溶胶的操作（如离心、组织研磨、混合培养液、真空抽滤、打开装有冻干物的安瓿管、收集微生物培养物、使用匀浆器、摇床和超声处理器、热的接种环放在菌液或菌苔上、在玻璃片上做触酶试验、液体从吸管滴落到工作台上、从吸管中将最后一滴液体吹出、用移液管反复吹吸混合液体、磨口瓶子打开瓶塞时、快速地脱实验服） 2. 使用针头和利器的操作 3. 操作纯培养物或浓缩的培养液 4. 操作大体积样品（如 10 L）

4. 掌握减少污染和降低感染风险的实用措施

实用措施很多，这里仅举几例，起到抛砖引玉的作用。大家可以在实践中不断总结。

- (1) 将普通废弃物丢弃在普通垃圾箱（袋）内；将有生物危害的废弃物丢弃在专用垃圾箱（袋）内，并妥善处理；
- (2) 尽量减少有生物危害的废弃物直接暴露于环境中的机会；
- (3) 规范使用手套、防护眼和口罩等个人防护用品，真正保护好自己；
- (4) 注意实验室中张贴的警示标志及提示标志（图总-2），在开始实验前对工作环境有清楚的认识。



图总-2 实验室中警示标志及提示标志举例。a. 生物危害警告标志；
b. 紧急淋浴标志；c. 洗眼器标志。

5. 掌握污染事故处理的实用原则

- (1) 做好个人防护；
- (2) 立刻处理；
- (3) 不扩大污染；
- (4) 视情况隔离观察；
- (5) 根据条件进行适当预防治疗；
- (6) 向实验室负责人汇报；
- (7) 有事故及处理记录。

(五) 有关实验室生物安全规章制度的详细内容可参见“中国生物安全信息网”(<http://www.biosafety.com.cn/Html/Article/Index.html>)。

四、医学寄生虫学实验中光学显微镜的使用

寄生虫标本大多为完整的虫体，在使用显微镜观察标本时，要经常旋转粗、细调节器，依次观察标本各层的结构和关系，以获得整体结构的概念。

光线的调节：将寄生虫学标本置于载物台上，将光栅完全打开，提升聚光器，调节反光镜至最大亮度。

根据观察标本的厚薄与颜色，通过光栅和聚光器把光线调至适宜强度，用低倍镜（ $\times 10$ 物镜）粗调调至能看清物像后，再用细调调至最清晰。通常高倍、油镜和比较厚的标本需要较强的光；低倍、无色标本光线宜弱。

观察标本时，要详细观察每一个视野。为了减少遗漏，可按一定方向，如自上而下、自左而右推进。如有可疑物像，可放大倍数观察。

将待观察部位移至视野中央，转高倍镜（ $\times 40$ 物镜）。若高倍与低倍焦点不一致，则须先摸索好高倍和低倍的位置和焦距的关系，并熟悉二者相应的关系，以便自如转换高、低倍镜。

用油镜（ $\times 100$ 物镜）时，先进行高倍观察，将待观察部位移至视野中央，在载玻片上加一滴显微镜油，转换至油镜，然后用细调上下旋转至清晰后观察。注意不要将高倍镜浸入显微镜油。

显微镜使用完毕，按要求清洁后，将亮度调至最小，关闭电源，将显微镜罩上防尘罩。

基本实验

实验六 螺旋体实验

实验 6.1 暗视野法检查钩端螺旋体

螺旋体 (Spirochaetes) 是介于细菌与原虫之间的一类细长弯曲、具有轴丝、运动活泼呈螺旋状的原核细胞型微生物。螺旋体多数为非致病性,对人类致病的主要有问号钩端螺旋体、梅毒螺旋体、回归热疏螺旋体,以及条件致病的奋森疏螺旋体等。除问号钩端螺旋体能人工培养外,其他致病性螺旋体多不易人工培养。临床微生物学检查通常是采集标本直接镜检,亦可做血清学试验。

【实验目的】

了解暗视野显微镜的基本构造和原理,并熟悉其使用方法。掌握问号钩端螺旋体的形态及运动特征。

【实验原理】

暗视野显微镜 (图 1-6-1) 与普通显微镜不同之处在于聚光器,暗视野聚光器中央有一个黑色挡光板,使光线不能直接进入镜筒,而只能从挡光板周边缝隙折射到载玻片的标本上。当光线斜射到螺旋体上,由于螺旋体的折光率比周围液体强,从而使菌体发出亮光并反射到接物镜上,于是在黑色背景中可见闪烁发光、细长、一端或两端弯曲呈钩状、运动活泼的钩端螺旋体。

【实验材料】

1. 试剂 液体石蜡。
2. 器械 暗视野显微镜,无菌尖吸管,玻片及盖玻片。
3. 标本 钩端螺旋体 7~10 日液体培养物。

【实验步骤】

1. 取洁净的载玻片,用尖吸管吸取钩端螺旋体液体培养物 1 滴于载玻片上,加盖玻片。
2. 调节聚光器的高度至最高,转动反光镜,使光线集中投入到聚光器上 (此时可见原来是黑暗的聚光器中央有微弱的光线)。
3. 在聚光器上加 1 滴石蜡油,然后将标本片放于其上。注意勿产生气泡,以减少光线的分散与折射。
4. 将高倍镜摆正,对准标本,调节粗调或微调。如用油镜检查时,则在盖片上加 1 滴石蜡油,换油镜头进行观察。
5. 检查完毕,先下降聚光器,取下标本片,用擦镜纸擦净聚光器上的油渍。
6. 预期结果 背景为黑色,螺旋体为闪光发亮、呈丝状,运动活泼。

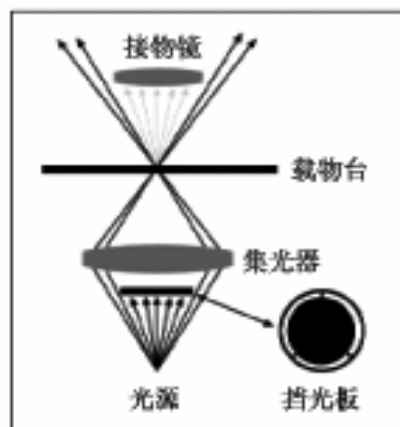


图 1-6-1 暗视野显微镜原理示意图

实验 6.2 快速血浆反应素试验 (Rapid plasma reagin test, RPR test)

RPR 试验是快速血浆反应素环状卡片试验的简称,它是筛查梅毒的一种非特异性血清学试验。由于操作简便、快速,有较好的敏感性和特异性,临床常将其用做梅毒的初步诊断试验及临床疗效的参考。凡 RPR 阳性者,应再做梅毒特异性血清学试验进行确证。

【实验目的】

熟悉和掌握 RPR 试验的原理和方法,了解 RPR 试验以及梅毒特异性血清学试验在临床诊断中的意义。

【实验原理】

梅毒患者血清中存在着能与类脂抗原发生凝集反应的反应素,即抗类脂抗体。利用这一原理,将正常牛心肌类脂作为抗原,并吸附于活性炭颗粒表面,当待检血清中存在反应素时,即与其发生凝集反应,出现肉眼可见的黑色颗粒状或絮状凝块。

【实验材料】

1. 试剂 RPR 抗原(即吸附于炭粒上的类脂质抗原)悬液。
2. 器械 专用滴管、RPR 卡片。
3. 标本 梅毒阳性血清及阴性血清、待检血清。

【实验步骤】

1. 分别吸取梅毒阳性对照血清和阴性对照血清各 50 μ l,均匀铺加在纸卡的两个圆圈中。
2. 另吸取 50 μ l 待检血清,均匀铺加在纸卡的另一圆圈中。
3. 摇匀 RPR 抗原,用专用针头、滴管吸取 RPR 抗原,分别垂直滴加 1 滴于上述血清和对照中。
4. 用手摇均匀或用 RPR 旋转仪水平转动纸卡 8 分钟,100 转/分钟,然后 3 分钟内在光线充足处肉眼判断结果。
5. 判断结果
 - (1) 阴性反应(-):可见均匀的抗原颗粒并集中在中央,而无凝集物。
 - (2) 弱阳性反应(+~++):可见较小的黑色凝集物。
 - (3) 阳性反应(+++~++++):可见中等或较大黑色凝块,溶液清亮。出现絮片状凝集者为强阳性。

【分析与思考】

1. 简要说明问号钩端螺旋体的形态特征及鉴别要点。
2. 螺旋体常用的检查方法有哪些?
3. 梅毒血清学试验的方法有几种?临床意义分别是什么?

【注意事项】

1. 梅毒血清学定性试验为阳性的患者血清,可将血清做(1:2)~(1:32)稀释,进行阳性滴度的半定量试验。
2. 梅毒血清学定性试验呈弱阳性或阳性反应者,需结合临床进行综合分析判断,同时再做特异性血清学试验加以确诊。

(国玲)

实验七 真菌形态学观察

真菌是一大类不含叶绿素，不分根、茎、叶，由单细胞或多细胞组成，行有性或无性繁殖的真核细胞型微生物。真菌的种类繁多，分布极广，其中许多对人类有利，仅少数对人和动物致病，称为病原性真菌，包括浅部真菌和深部真菌两大类。真菌引起的疾病多种多样，以皮肤、毛发和指甲等浅部疾患较多。临床真菌的微生物学检查，通常采用直接镜检和培养检查，根据真菌菌落特征以及特殊的菌丝和孢子形态来确定真菌的种类。

实验 7.1 观察真菌菌落形态（真菌大培养）

【实验目的】

初步掌握真菌的培养方法（大培养），观察真菌三种典型菌落的形态特征。

【实验原理】

真菌（fungi）菌落的形态特征及颜色有助于病原性真菌的鉴定。一般观察真菌的菌落特征可将真菌培养于沙保弱（Sabouraud）氏培养基，经数日培养后肉眼可看到典型菌落，俗称大培养。

【实验材料】

1. 试剂 沙保弱氏固体培养基。
2. 器械 恒温培养箱、接种环、试管、酒精灯。
3. 标本 待检菌种。

【实验步骤】

1. 制备沙保弱氏固体培养基，然后将培养基装入大试管中，使其成为斜面。
2. 将酵母及类酵母真菌以划线法接种于沙保弱氏培养基上；丝状菌以接种钩钩取材料，点种在沙保弱氏培养基上。
3. 置 22℃ 至 28℃ 恒温培养箱培养（深部真菌可培养于 37℃ 环境），一周后观察菌落生长情况。

4. 观察结果

(1) 酵母型菌落 (yeast type colony)：多数单细胞真菌的菌落为酵母型菌落，代表菌为新型隐球菌，其菌落较大，呈浅棕色至褐色，表面湿润、光滑，边缘整齐。有荚膜真菌的菌落外观粘稠，无荚膜者不黏稠。

(2) 酵母样（类酵母型）菌落 (yeast-like type colony)：代表菌为白色念珠菌，菌落较大，呈白色奶油状，表面湿润、光滑。陈旧培养物颜色变深，菌落逐渐变硬或皱褶。因有伸长的芽生孢子与母细胞连接所形成的假菌丝长入培养基内，故称作类酵母型菌落。

(3) 丝状菌落 (filamentous type colony)，为多细胞真菌的菌落特征，又可分为 3 种：① 棉絮状菌落，如絮状表皮癣菌的菌落；② 绒毛状及粉末状菌落，如石膏样小孢子菌；③ 颗粒状菌落，如毛癣菌属真菌菌落。丝状菌落的共同特点是带有颜色，呈棉絮状、绒毛状、粉末状或颗粒状等，可看到伸向空间的菌丝及深入到培养基深部的营养菌丝。

实验 7.2 观察真菌菌丝和孢子形态 (真菌小培养)

【实验目的】

熟悉真菌小培养的方法。了解病原性真菌显微镜下的形态结构特点,熟悉青霉菌和白色念珠菌菌丝及孢子的特征。

【实验原理】

用小培养的方法培养真菌后,置普通光镜下可对各种菌丝和孢子进行形态观察。

【实验材料】

1. 试剂 沙保弱固体培养基。
2. 器械 恒温培养箱、特制小培养钢圈、接种针、玻片、盖片、酒精灯、蜡碗、注射器。
3. 标本 待检菌种。

【实验步骤】

1. 制备由特制钢圈与玻片、盖片组成的培养小室(图 1-7-1)。
2. 用注射器由侧孔将沙保弱固体培养基装入培养小室内。
3. 待琼脂凝固后,用接种针由接种孔接种菌种于培养基表面。
4. 置 26℃ 恒温培养箱培养 3~7d。
5. 将培养物直接放显微镜下观察。
6. 观察结果

白色念珠菌:可见较大、圆形、壁厚的厚膜孢子及假菌丝。

青霉菌:可见小分生孢子及气中菌丝。

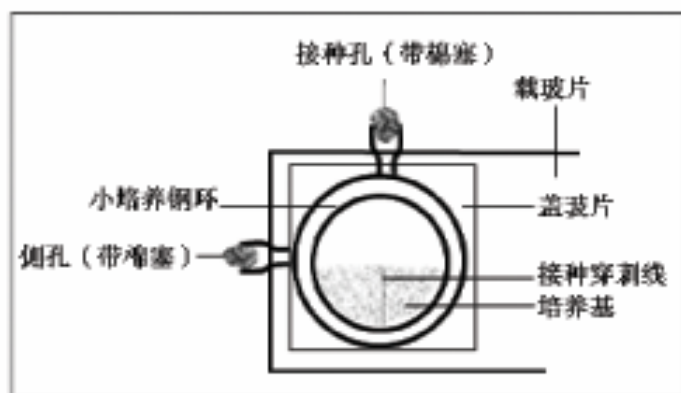


图 1-7-1 真菌小培养示意图

实验 7.3 浅部真菌感染临床标本的检查

浅部真菌病在临床上极为常见,包括各种毛发、指甲及皮肤癣病。临床上采用的诊断方法主要有直接镜检和分离培养。取感染部位的样品进行直接压片镜检,是临床最为简单而重要的常规检查方法。

【实验目的】

了解和熟悉临床浅部真菌感染不染色标本的直接检查方法。掌握显微镜下菌丝和孢子的

形态特征。

【实验原理】

取真菌感染病损处标本，溶于氢氧化钠溶液中并微加热，以使标本组织和角质溶解，标本清晰透明，易于镜下观察。

【实验材料】

1. 试剂 10%NaOH 溶液。
2. 器械 小镊子、载玻片、盖片、酒精灯。
3. 标本 毛发癣或足癣患者的皮屑。

【实验步骤】

1. 用小镊子拔取病损部位毛发，对皮癣患者可用小刀刮取皮损部位边缘处皮屑，或用小刀刮取甲癣患者病指（趾）甲。

2. 将标本置于清洁载玻片上，加 10%NaOH 1~2 滴，稍等片刻，盖上盖片，于火焰上微微加热，静置 3~5min，轻压盖片，使组织分散并除去气泡。

3. 观察结果

先用低倍镜检查有无菌丝和孢子，再换高倍镜观察菌丝和孢子的特征。如镜下看到典型的菌丝和孢子即可诊断为真菌感染。

【分析与思考】

1. 什么是真菌大培养和小培养？
2. 真菌菌落有几种类型？各有何特征？
3. 什么是厚膜孢子和假菌丝？在临床诊断上有何意义？

【注意事项】

1. 临床直接压片镜检有菌丝和孢子，可确诊为真菌感染，但不能确定是哪一种真菌，必要时可做培养进一步鉴定。

2. 临床制作直接镜检标本时，加热要适度，以免角质细胞溶解过度或造成氢氧化钠结晶而影响结果观察。

（闻玲）

综合实验

实验一 病原性球菌的分离鉴定 (Isolation and Identification of Pathogenic Cocci)

实验 1.1 病原性球菌检验程序 (Procedure for identifying pathogenic cocci)

病原性球菌在临床上主要引起化脓性疾病，因此又称作化脓性球菌 (*pyrogenic cocci*)。病原性球菌中 G^+ 菌主要有金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、乙型溶血性链球菌 (β -hemolytic streptococcus)、肺炎链球菌 (*pneumococcus*)； G^- 菌主要有脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*) 和淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoea*)。另外某些条件致病菌如表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) 和甲型溶血性链球菌 (α -hemolytic streptococcus) 在机体抵抗力低下时也可引起疾病。本综合实验将介绍重要病原性球菌的分离鉴定程序及重要的试验方法。

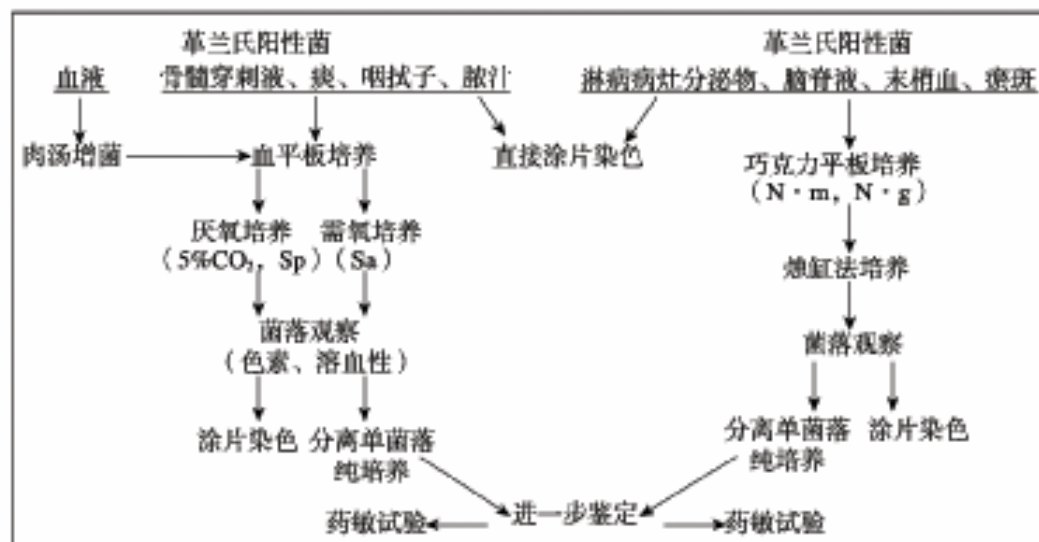


图 2-1-1 病原性球菌检验程序

【注意事项】

1. 标本采集后应以严格无菌操作尽快分离培养，以提高检出率。
2. 采集的脑膜炎奈瑟氏菌和淋病奈瑟氏菌标本，要保温保湿，并尽快进行分离培养。
3. 有些标本在分离培养前应做预处理，如尿液和脑脊液可离心后取沉渣培养。
4. 可疑为化脓性球菌引起的败血症患者，可在病床旁以无菌操作取静脉血 5~6ml，加入 50ml 肉汤内摇匀，进行增菌培养。
5. 培养由厌氧菌感染引起的封闭性脓肿物标本，应尽量避免取材污染杂菌及减少暴露于空气中。
6. 在实际工作中，根据临床需要和条件，可对上述检验程序进行选择 and 取舍。

实验 1.2 病原性球菌形态与菌落 (The morphological characteristics and typical colonies of pathogenic cocci)

【实验目的】

掌握病原性球菌形态与菌落特征及观察方法。

【实验原理】

利用光学显微镜油镜观察病原性球菌形态学标本片。分别在血平板和巧克力平板培养基上培养常见病原性球菌，观察其菌落特征。

【实验材料】

1. 标本片 葡萄球菌、链球菌、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟氏菌、淋病奈瑟氏菌及肺炎链球菌荚膜标本片。

2. 菌落 金黄色葡萄球菌（金葡）、表皮葡萄球菌（表葡）、甲型溶血性链球菌（甲链）、乙型溶血性链球菌（乙链）、肺炎链球菌（肺双）血平板及脑膜炎奈瑟氏菌（脑双）和淋病奈瑟氏菌（淋球）巧克力平板，37℃ 24h 菌落培养物。

3. 器械与用品 显微镜、镜油、镜头纸和擦片纸等。

【实验步骤】

1. 标本片观察 应注意细菌的染色性、形态排列、荚膜情况及体液标本的组织细胞内是否存在细菌。

2. 菌落观察 应注意菌落的大小、形态、颜色及溶血情况。上述细菌的菌落类型均为光滑型，在不发生变异情况下各菌种的菌落形态不同。

金葡菌落为中等大小、金黄色、周围有透明溶血环；表葡菌落为中等大、白色或柠檬色、周围无溶血环；甲链菌落细小，暗灰色，周围有窄半透明溶血环；乙链菌落中等偏小，灰白发乳光，周围有宽透明溶血环；肺双菌落开始较小，经 48h 以上时间培养逐渐增大，菌落中央可出现自溶现象，呈“肚脐”状，周围有半透明溶血环；脑双菌落为浅蓝或无色透明状，早期培养似露滴故称露滴状菌落；淋病奈瑟氏菌落浅灰色或半透明状，中心凸起有光泽。

3. 致病性球菌的分离培养、菌落和涂片镜下观察形态比较（表 2-1-1）

表 2-1-1 病原性球菌分离培养、菌落和涂片镜下观察形态比较

项目	金葡	表葡	乙链	甲链	肺双	脑双	淋球
取材部位	脓液	皮肤	咽部	咽部	咽部	咽、脑脊液末梢血、瘀斑	泌尿生殖系
培养基	血平板	血平板	血平板	血平板	血平板	巧克力平板	巧克力平板
气体条件	需 O ₂	需 O ₂	需 O ₂	需 O ₂	5%~10% CO ₂	5%~10% CO ₂	5%~10% CO ₂
菌落直径 (mm)	1.0~2.0	2.0~3.0	0.5~0.7	0.3~0.5	0.7~1.0	0.9~1.1	0.5~1.0
菌落颜色	金黄	白或柠檬	灰白	暗灰	暗灰	透明	浅灰
溶血特征	全溶	不溶	全溶	半溶	半溶		

染色性	G ⁺	G ⁺	G ⁺	G ⁺	G ⁺	G ⁻	G ⁻
形态排列	葡萄串状	葡萄串状	链状	链状	短链或成对	肾形成对	咖啡豆形成对

【分析与思考】

1. 如果菌落形态不典型时应考虑哪些问题?
2. 观察半透明溶血环不容易掌握的原因是什么?

【注意事项】

1. 如果开盖观察菌落应防止污染情况发生。
2. 对病原性球菌的镜下观察应注意细菌的排列。

实验 1.3 咽拭子分离培养 (Isolation of bacteria from throat swab)

【实验目的】

学习从临床标本中分离病原性球菌的方法。

【实验原理】

口腔和上呼吸道中有很多细菌,大部分是非致病菌,小部分是致病菌。当机体抵抗力下降时,某些非致病菌也能引起疾病。咽部是某些致病菌集聚的重要部位,用灭菌棉拭子(咽拭子)取咽部细菌,进行分离培养称咽培养。

【实验材料】

1. 试剂 血平板。
2. 器械(仪器) 酒精灯、接种环、灭菌棉拭子和恒温培养箱。

【实验步骤】

1. 用灭菌咽拭子于患者咽部黏膜表面上下滚动,保证棉签头全部浸湿。注意不要污染其他口腔微生物。
2. 从患者口中取出后,将棉拭子前端在血平板边缘处涂布一个 1cm×2cm 大小区域,将棉拭子丢弃在石炭酸缸中。
3. 用灭菌接种环于上述区域中心处拉出一条小瓣,接种环再次灭菌后,从小瓣处平行划线接种,直到划满整个平板。
4. 置 37℃ 培养 18~24h 后观察结果。如分离厌氧菌应在无氧条件下培养 48~72h 后观察。
5. 预期结果:可见血平板上有多种口腔常见菌的菌落,个别菌落可能有溶血现象。

【分析与思考】

分离单菌落有不同的划线接种方式,你认为此实验中为何选择小瓣法划线接种方式?

【注意事项】

采集的标本如不能及时培养,应放入甘油盐水中保存。

实验 1.4 血浆凝固酶试验 (Coagulase test)

【实验目的】

了解致病性葡萄球菌的初步鉴定方法。

【实验原理】

血浆凝固酶是由致病性葡萄球菌产生使人或兔抗凝血浆发生凝固的酶，非致病葡萄球菌不产生此酶，因此该酶是鉴定葡萄球菌有无致病性的指标之一。该酶类有两种：分泌于菌体外的称为游离凝固酶（free coagulase），它可被人和兔血浆中协同因子激活产生凝固活性，使血浆中液态纤维蛋白原变成固态纤维蛋白；而结合于菌体表面的称为结合凝固酶（bound coagulase），它可在血浆纤维蛋白作用下使菌体相互发生凝集。

【实验材料】

1. 试剂 兔或人 1:4 稀释之抗凝血浆。
2. 器械与用品 载玻片、滴管。
3. 菌种 金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌接种琼脂平板，18~24h 培养物。

【实验步骤】

1. 将抗凝血浆用滴管分别加 1 滴于载玻片两端，用灭菌接种环取少量金黄色葡萄球菌与一滴血浆混匀，同法取表皮葡萄球菌与另一滴血浆混匀，然后边倾动玻片边观察。

2. 预期结果：含表皮葡萄球菌的血浆呈均匀浑浊，为阴性；而含金黄色葡萄球菌的血浆发生凝固，且细菌成团聚集不易分开，为阳性。

3. 自主实验：可以在同一张玻片上检测咽拭子分离培养物。以表皮葡萄球菌为阴性对照，以金黄色葡萄球菌为阳性对照。

【分析与思考】

1. 致病性葡萄球菌产生的血浆凝固酶在侵害机体时发挥什么作用？
2. 金黄色葡萄球菌除产生血浆凝固酶外还产生哪些其他致病物质？

【注意事项】

1. 抗凝血浆的量不宜太少。
2. 应相互对照着观察阴性样品和阳性样品的反应现象。

实验 1.5 抗链球菌溶血素 O 测定—ASO 溶血试验 (Anti-streptolysin O test, ASO test)

【实验目的】

了解抗“O”实验的临床意义，通过实验提高动手操作能力。

【实验原理】

乙型溶血性链球菌 A 族（简称乙链）产生的溶血素“O”（streptolysin O, SLO）具有溶血作用和较强的抗原性。溶血素“O”为含-SH 基蛋白质，有氧时，-SH 氧化成-S-S-，失去溶血活性，而加入还原剂（还原溶血素“O”）可恢复其溶血活性。SLO 抗原性强，刺激机体产生的抗溶血素 O 抗体（antistreptolysin O, ASO）可中和溶血素活性。

大多数人在感染乙链后，其血清中会出现高滴度抗体——抗“O”，且在病愈后数月甚至数年才消失。临床上测定抗“O”抗体效价（简称 ASO 试验），可作为诊断链球菌感染的辅助手段。

ASO 试验分为溶血试验和胶乳凝集试验，本节介绍 ASO 溶血试验。ASO 溶血试验是利用还原溶血素“O”在不同稀释度的抗“O”血清作用下，可失去或部分失去溶血作用。根据溶血程度，用以判定患者抗体水平高低的方法。

【实验材料】

1. 试剂

(1) 1:50 待检血清: 取患者血 0.1ml 放入 0.4% 0.9ml 枸橼酸钠溶液内, 低速离心或静置一段时间后, 轻轻吸取上清, 用 pH7.2 PBS 配成 1:50 浓度。

(2) 2% 红细胞悬液 (兔或人)、pH7.2 PBS、1:60 效价溶血素“O”及 0.01g 还原剂 (1 份亚硫酸钠和 2 份亚硫酸氢钠研磨而成)。

2. 器械与用品 吸管、试管、水浴箱及试管架。

【实验步骤】

按表 2-1-2 操作。

1. 加入 PBS 及待检血清 取 6 支试管, 按 1~6 做好标记, 按表 2-2-2 所示在各管内加入相应溶液。

表 2-1-2 ASO 溶血试验操作

单位: ml

操作步骤	试管号					
	1	2	3	4	5	6
pH 7.2 PBS	0.80	0.20	0.30	0.00	0.50	0.75
1:50 待检血清	0.20 ^a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1:500 待检血清	0.00	0.30	0.20	0.75	0.00	0.00
还原溶血素 O	从 1 号试管弃去 0.25ml, 以保证 1 号试管内反应液的总体积与其他试管相同 ^b					
保温	将各管内溶液混匀, 置 37℃ 水浴箱内 5min					
2% 红细胞	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
保温	将各管内溶液混匀, 置 37℃ 水浴箱内 15min 后观察结果					
血清稀释度及对照	1:500	1:833	1:1250	血清对照	抗原对照	血球对照

^a1:50 待检血清加入到 1 号试管后, 被 PBS 稀释为 1:500 倍稀释的待检血清。

^b每管总体积为 1ml。

2. 加入溶血素 O 先在含有还原剂的试管内加 1.5ml 溶血素“O”混匀后, 按 6→1 号试管顺序加入还原溶血素 O。

3. 加入红细胞 按 6→1 号试管顺序加 2% 红细胞。

4. 预期结果

以完全不溶血之血清最大稀释度为抗“O”效价。临床标准: 效价 < 1:500 为正常, ≥ 1:500 为阳性。应在 1~2 周后重复试验一次再作出临床诊断。抗“O”效价计算公式:

$$\text{抗“O”效价} = \frac{\text{血清稀释后 ml 数}}{\text{原血清稀释度}} \times \text{血清稀释前 ml 数}$$

例如第 2 管完全不溶血其效价是:

$$\frac{0.5}{0.3} \times 500 = 833$$

【分析与思考】

1. ASO 试验的效价判定及其临床意义。
2. 致病性链球菌分哪些型?

【注意事项】

1. 溶血素批号不同，还原剂的量有所不同。
2. 溶血素“O”还原后，应在短时间内使用，如时间过长，则溶血活性降低。
3. 在上述各步骤中，应注意加液顺序，要保证高滴度的血清不能污染低滴度的血清。此外，加液时不能碰管壁或液面，加液后要注意混匀。

实验 1.6 透明质酸酶试验 (Hyaluronidase test)

【实验目的】

通过观察透明质酸酶对组织的破坏作用，了解细菌的侵袭性。

【实验原理】

致病性链球菌可产生多种侵袭性酶，其中透明质酸酶可水解组织间质的透明质酸，使结缔组织疏松，通透性增高，利于细菌和毒素的扩散及增强细菌侵袭力，因此又称作扩散因子 (spreading factor)。

【实验材料】

1. 试剂 乙型溶血性链球菌接种于 2% 血清肉汤培养后，取滤液 (内含透明质酸酶) 1ml 和 2 滴过滤墨汁混合，为试验液。取 1ml 生理盐水和 2 滴过滤墨汁混合，为对照液。
2. 器械与用品 1ml 注射器、小号针头、试管 2 支。
3. 动物 白色家兔腹部刮毛备皮待用。

【实验步骤】

1. 将家兔腹部用 75% 乙醇消毒，用注射器取试验液在一侧皮内注射直径为 0.5cm 皮丘；同法取对照液于另一侧注射同样大小皮丘，2h 后观察结果。
2. 预期结果：试验侧皮内黑色区域与对照侧黑色区域比较 ≥ 3 倍为阳性。

【分析与思考】

1. 乙型溶血性链球菌产生的致病物质及致病机制。
2. 乙型溶血性链球菌的局部感染有什么特点？

【注意事项】

3. 刮毛时勿将皮肤划破。
4. 皮内注射时，避免液体注入皮下。

高级实验

实验一 脉冲场电泳技术在细菌基因组物理图构建中的应用 (Pulsed Field Gel Electrophoresis; Application in Physical Mapping of Bacterial Genomes)

【实验目的】

通过脉冲场电泳技术将细菌 DNA 片段分开, 综合应用各种技术分析手段如 Southern 杂交、*Tn10* 插入失活、双酶切、DNA 内切酶不完全酶切等构建细菌的基因组物理图谱。

【实验原理】

1. DNA 内切酶

DNA 内切酶可以在 DNA 上特定的酶切位点将 DNA 切断。通过选择性使用特定的内切酶, 可以将需要研究的 DNA 切成所需片段。

2. 脉冲场电泳

酶切片段在特定的电泳系统中通过电场方向不断交替变换及合适的脉冲时间等条件下而得到良好的分离。

3. Southern 印迹

将待检测的 DNA 分子用内切酶消化后, 通过琼脂糖凝胶电泳进行分离, 继而将其变性并按其在凝胶中的位置转移到硝酸纤维素薄膜或尼龙膜上, 固定后再与同位素或其他标记物标记的 DNA 或 RNA 探针进行反应。如果待检物中含有与探针互补的序列, 则二者通过碱基互补的原理进行结合。洗净游离探针, 然后用自显影或其他合适的技术进行检测, 从而显示出待检的片段及其相对大小。

4. 转座子插入失活

转座子是染色体上一段可移动的 DNA 片段, 可从染色体的一个位置跳到另一个位置。当转座子跳跃而插入到某个功能基因时, 就会引起该基因的失活, 导致突变型。本实验使用 *Tn10* 转座子。

5. 不完全酶切、双酶切和作图

根据不完全酶切的片段大小与完全酶切片段大小对比可以得到各个片段在基因组中的相对位置。为了得到精确的图谱, 需要联合多种限制性内切酶进行交叉双酶切。根据酶切片段的大小排定各片段的顺序即可构建出全基因组的物理图。

【实验材料】

1. 试剂 (参见注意事项 1)

(1) 细菌培养、细胞裂解和基因组 DNA 分离

1) LB 肉汤 (每升): 胰蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, LB 平板还含有 15g 琼脂。如果需要还可以加入四环素和卡那霉素。四环素可以加到 $15\mu\text{g}/\text{ml}$, 卡那霉素可以加到 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2) $0.5\text{mol}/\text{L}$ EDTA, pH8.0; 乙二胺四乙酸 (EDTA, 二钠盐) 186.12g, H_2O 600 ml, NaOH 30g。EDTA 和 NaOH 都完全溶解后, 用浓 HCl 或 NaOH 调节 pH 到 8.0。对于 EDTA 游离酸, 用 142.12 g EDTA 和大约 60g NaOH, 然后用浓 HCl 或 NaOH 调节 pH 到 8.0, 高压灭菌后用灭菌水调节容量到 1L (参见注意事项 2)。

3) $1\text{mol}/\text{L}$ Tris HCl (pH 8.0); Tris 碱 121.14 g, H_2O 600 ml, 浓 HCl 60 ml。在玻

璃烧杯中放入磁力搅拌子，磁力搅拌直到 Tris 碱完全溶解。用浓 HCl 或 NaOH 调节 pH 到 8.0，高压灭菌后，用灭菌水调节容量到 1L。

4) 10% 十二烷基硫酸钠 (SDS): SDS 100 g, H₂O (灭菌) 600 ml。68°C 下磁力搅拌，直到 SDS 完全溶解。用灭菌水调节容量到 1L，无需高压灭菌。

5) 结核菌素注射器 (去尖端，使用前浸于 70% 酒精中)。每个 DNA 样品都需要一个注射器。

6) 1.4% 琼脂糖: 配制 10ml (实际操作中应根据具体情况增减) 的 1.4% 琼脂糖，应先将水加入塑料或玻璃容器，再加入 140mg 琼脂糖在水中。摇动容器后煮沸，然后置于 72°C 水浴中。

7) 细胞悬浮液 (1 mol/L Tris HCl [pH 8.0] 10 ml, 5 mol/L NaCl 4 ml, 0.5 mol/L EDTA 200 ml, H₂O 400 ml, 高压灭菌后用无菌水加至 1L)。

8) 细胞裂解液 (1 mol/L Tris HCl [pH 8.0] 10 ml, 5 mol/L NaCl 10 ml, N-laurylsarcosine sodium 10g, 0.5 mol/L EDTA 200 ml, H₂O 400 ml。高压灭菌后加 10% SDS 20 ml 并用无菌水加总容积至 1L。N-laurylsarcosine sodium 有毒，因此称取时需戴口罩。

9) 洗液 (1 mol/L Tris HCl [pH 8.0] 10 ml, 0.5 mol/L EDTA 200 ml, H₂O 600 ml, 高压灭菌后用无菌水加至 1L)。

10) 蛋白酶 K 溶液 (0.5 mol/L EDTA 200 ml, H₂O 700 ml, N-laurylsarcosine sodium 10g, 高压后加 10% SDS 20 ml 并用无菌水加至 1L。使用前将蛋白酶 K 粉末加入溶液中调节浓度，一般 1 mg/ml)。

11) 100 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF) (PMSF 870 mg, 用异丙醇 50 ml 溶解，储存于 -20°C。使用前将冻结的 PMSF 异丙醇溶液放入温水浴 (如 37~50°C, 1~2min) 中融化，用毕立即放回 -20°C。

12) DNA 标本储存液 (1 mol/L Tris HCl [pH 8.0] 1 ml, 0.5 mol/L EDTA 20 ml, H₂O 600ml, 高压灭菌后用无菌水加至 1L)。

(2) 核酸内切酶和脉冲场电泳

1) 核酸内切酶: I-CeuI (NEBiolabs), XbaI (Roche), AvrII (NEBiolabs), 和 SpeI (NEBiolabs)。

2) 电泳缓冲液: 5×Tris/硼酸电泳缓冲液 (TBE) Tris 碱 54 g, 硼酸 27.5 g, 0.5 mol/L EDTA 20 ml, H₂O 900ml, 高压灭菌后用无菌水加至 1L, 使用前稀释 10 倍至 0.5×TBE。

3) 溴化乙锭 (EB) 原液 (10 mg/ml): EB 1g, H₂O 100 ml, 在磁力搅拌器上搅拌至 EB 完全溶解。容器用铝箔包好或盛于不透光容器室温保存。

4) 0.5% 琼脂糖胶: 琼脂糖 2 g 加入 200 ml H₂O, 煮沸 10s, 再加 200 ml H₂O 和 12μl EB 溶液，摇匀后倒入模板 (底面积 400 cm², 厚度 1 cm 的长方体)。

(3) Southern 杂交

1) Immobilon-P 转移薄膜 (Millipore 公司)

2) 0.4 mol/L NaOH

3) 0.25 mol/L HCl

4) 20×SSC 溶液: NaCl 175.3 g, 枸橼酸钠 88.2 g, H₂O 800 ml, 高压灭菌后用无菌

水加至 1L。

5) 随机引物 DNA 标记试剂盒。

6) 50×Denhardt 溶液 (水相): 1% Ficoll 400, 1% polyvinylpyrrolidone, 1% 牛血清白蛋白 (Fraction V), 过滤灭菌后储存于 -20℃。

7) 杂交液: 45% 甲酰胺, 5×SSC, 1×Denhardt 溶液, 20 mmol/L 磷酸钠 [pH 6.5], 0.02% 剪切变性鲑精 DNA, 5% 右旋糖酐。除 Denhardt 溶液和甲酰胺外高压灭菌。Denhardt 溶液已经通过过滤除菌, 甲酰胺无需过滤除菌或高压灭菌。

8) 洗膜液: 溶液 1 (2×SSC 和 0.5% SDS)、溶液 2 (2×SSC 和 0.1% SDS)、溶液 3 (0.1×SSC 和 0.1% SDS)、溶液 4 (0.1×SSC)。

(4) 噬菌体 P22 介导的 Tn10 转导插入

1) 在 *S. typhimurium* LT2 菌株已知基因中插入 Tn10 转座子 (Salmonella Genetic Stock Center, SGSC; 搜索并获得相关信息: www.ucalgary.ca/~kesander)

2) 噬菌体 P22 (Salmonella Genetic Stock Center, SGSC; 搜索并获得相关信息: www.ucalgary.ca/~kesander)

(5) 表型测定

1) 5×M9 盐: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 64 g, KH_2PO_4 15 g, NaCl 2.5 g, NH_4Cl 5 g, 加水至 1L, 高压灭菌。

2) M9 基本培养基: 5×M9 盐 200 ml, 灭菌水 600 ml, 1 mol/L MgSO_4 2 ml, 20% 碳源溶液 20 ml, 1 mol/L CaCl_2 0.1 ml。加灭菌水至 1L。1 mol/L MgSO_4 和 1 mol/L CaCl_2 需分别制备和高压灭菌并在 5×M9 盐溶液稀释后加入。

3) Tn10 插入失活菌表型测定所用的氨基酸和其他营养成分。

4) 用于细菌动力测定的 LB 半固体琼脂平板: LB 肉汤中加琼脂至 0.3%, 做出 2% 凝胶。高压灭菌后摇匀倒于平放在操作台上的培养皿内。此步骤以后不得再移动培养皿。将菌株接种于培养皿中央可以观察细菌运动的情况以测定细菌动力。

5) 用于细菌动力测定的软营养明胶琼脂 (NGA) 平板: 倒入营养肉汤 (Difco Laboratories, Detroit, Mich), 加入 8.0% 的明胶和 0.3% 的琼脂。

(6) 双酶切

1) 选择核酸内切酶 (沙门氏菌最常用的酶为 I-CeuI, XbaI, AvrII 和 SpeI)。

2) 安全刀片。

3) 末端标记液 (使用成品随机引物寡聚合成试剂盒 Random Priming Oligo-synthesis kit): dNTP (混合试剂) 3μl, α - ^{32}P -dCTP 1μl, H_2O 1 ml, Klenow 片段 1μl (做末端标记反应时需迅速加入 Klenow 片段, 轻轻上下摇动溶液 2~3 次, 不能甩动或吹吸)。

2. 仪器脉冲场电泳仪、离心机、摇床、微波炉、恒温水浴箱、恒温湿箱。

3. 标本待测基因图谱的沙门氏菌。

【实验步骤】

1. 将培养细菌的完整 DNA 包埋入琼脂小片

(1) 挑选新鲜单个菌落于 LB 肉汤 5ml 中培养, 37℃ 摇床孵育过夜 (15~18 h)。

(2) 离心, 3500r/min, 10min, 弃上清, 将细菌混悬于 0.5 ml 细胞悬浮液待用。

(3) 也可也从琼脂平板培养基上取菌, 在 LB 平板上划线分区, 一块 LB 平板上可以培养 4~8 个菌落, 但必须密切注意不能相互污染。当细菌生长起来以后用接种环挑取半环细

菌于 0.5 ml 细胞悬液，吹吸混匀待用（参见注意事项 3）。

(4) 制备 1.4% 琼脂糖，煮沸后置于 72℃ 水浴，取 0.5ml 琼脂糖与 0.5ml 细胞悬液混匀（参见注意事项 4）。

(5) 立即将混合液吸入去头结核菌素注射器，避免产生气泡。

(6) 注射器室温静置 10min，在石蜡膜上把已经凝固的琼脂糖小圆柱从注射器中挤出并用安全刀片切成约 1mm 厚的小片。

(7) 将琼脂糖小片装入 12ml 塑料试管中并加入 3ml 细胞裂解液，盖严小管。在 72℃ 水浴中以 20r/min 的速度振摇小管。振摇中避免标签脱落或标记褪色。

(8) 轻轻倒出液体，确保琼脂糖小片完整（参见注意事项 5）。加入 3ml 洗液，室温 20r/min 振摇 15min，重复一次。

(9) 轻轻倒出液体，加入 3ml 新鲜制备的蛋白酶 K。42℃、12r/min 水浴振摇 72 h（参见注意事项 6）。

(10) 轻轻倒出蛋白酶 K 溶液，加入 3ml 洗液，室温 20r/min 振摇 15min，重复一次。

(11) 加入 3ml 洗液和 0.03 ml PMSF 储存液（参见注意事项 7），室温 20r/min 振摇 2h。

(12) 轻轻倒出 PMSF 溶液，加入 3ml 洗液，室温 20r/min 振摇 15min，重复一次。

(13) 轻轻倒出洗液，加入 3ml 储存液，室温 20r/min 振摇 15min，重复一次。

(14) 轻轻倒出储存液，加入 3ml 新鲜储存液，保存于 4℃。DNA 在这种条件下可以保持稳定至少 10 年（参见注意事项 8）。

2. 酶切与脉冲场电泳

(1) 离心未开封的内切酶的小管，使所有液体都集中到管底。

(2) 倍数稀释找到内切酶作用合适的浓度（参见注意事项 9）。记录下各种酶的合适浓度。

(3) DNA 中加入酶，在合适的浓度下作用一定时间。各种酶的最佳作用时间虽然没有定则，但一般来说各个供应商提供的 XbaI, AvrII a 和 SpeI 消化 6 h 都比较理想。而 I-CeuI 一般最佳作用时间 2 h。

(4) 在等待酶消化的时间里，制作脉冲场电泳的凝胶。除了一些特殊的实验以外，0.5% 琼脂糖凝胶对于 1~2000 kb 的 DNA 分离都是适合的。凝胶在室温下至少静置 0.5h，但为了 PFGE 的条带清晰和不发生弯曲，一般至少要静置 2h 以上。

(5) 将内切酶消化完毕的 DNA 小片加入琼脂糖凝胶的加样孔内，用融化的液态琼脂糖封好加样孔。小心将凝胶加入电泳槽中。第一轮电泳的条件设置应将全基因组 DNA 分开，如从数千到数百万碱基，这需要将脉冲时间设置为 10~100s，泳动 10~16h。第二轮电泳一般分离小片段，如从数千到约 10 万碱基，可将脉冲时间设置为 3~12s，泳动 6~8h。中等大小（200~500 kb）和大片段（超过 1000 kb）需要两轮以上电泳。它们分别需要设置为 20~30s 和 60~100s。对不同大小的 DNA 片段分别设置条件的效果要好过设置一个固定的条件。电压一般设置为 6 V/cm。对于非常大的片段，如 2~3Mb，则要降低电压，如 2~3 V/cm，这通常要跑 1 周甚至更久。电泳液一般需保持在 16℃。电泳液温度升高 DNA 片段移动会加快，但通常并不能得到最好的效果，因此要确保冷却器工作正常。

(6) 使用凝胶成像系统观测和记录电泳结果（参见注意事项 10）。

3. Southern 印迹（包括杂交探针的制备）以定位或鉴定脉冲场电泳条带

- (1) 按凝胶的大小裁剪一块 Immobilon-P 膜，避免手指触碰膜（使用镊子或戴手套）。
- (2) 甲醇浸湿 Immobilon-P 膜，用水洗去甲醇，将膜置于 0.4mol/L NaOH 溶液中待用。
- (3) 紫外线下将胶上不含 DNA 的部分切去，将胶浸入 0.25mol/L HCL 中 15min 以脱嘌呤，使 DNA 更易转移到膜上。
- (4) 倒掉 0.25mol/L HCL，用水把凝胶漂洗一次，后将胶置于 0.4mol/L NaOH 溶液中使 DNA 变性成单链。
- (5) 取一宽和长分别大于胶 2~3 cm 和 4~5 cm 的玻璃或塑料容器。在容器中央放置一个 4~8 cm 高的支持物。在支持物上平铺一块 3~5 mm 厚的玻璃或塑料薄板。薄板大小与胶的大小相同或稍大。薄板上放一层滤纸。滤纸与薄板同宽但应稍长，两端达到容器底部。容器中倒入 0.4mol/L NaOH 至支持物的三分之二高度。
- (6) 0.4mol/L NaOH 浸湿滤纸，将胶反面向上倒扣在滤纸上。除尽滤纸与薄板以及胶与滤纸之间的气泡。
- (7) 标记 IP 膜的方向，如在左上角剪掉一个小角。将膜覆盖在胶上（此时剪掉的角应在右上方）。膜上覆盖三张与膜等大的滤纸。
- (8) 在滤纸上放一叠（约 10cm）吸水纸，其大小与膜相当或稍大。在吸水纸上放一块与膜大小相当或稍大的玻璃或塑料平板。在平板上放 500g 左右的重物。
- (9) 容器用保鲜膜（在超市可买到的任何品牌的食物保鲜塑料薄膜）封好，防止 0.4mol/L NaOH 溶液蒸发。静置容器 18~24h 使 DNA 随着 0.4mol/L NaOH 通过毛细作用转移到膜上。
- (10) 小心地将膜从胶上取下。将膜正面（与胶接触的面）朝上放在吸水纸上风干至少 30min。
- (11) 80℃真空烤箱烤膜 2h。
- (12) 将膜卷起放入杂交滚筒中，放入杂交液，调节温度至 42℃预杂交。如果探针相同可以将几张膜同时放入一个杂交滚筒中，但膜之间必须用尼龙布隔开。预杂交实验最佳为 6~12h。
- (13) 把含有探针 DNA 的小管放入沸水中 5min 以变性探针 DNA，然后立即放入冰水中，冰浴 5min。
- (14) 探针 DNA 有时埋藏于低熔点凝胶中。在这种情况下，可将低熔点凝胶放置于 80℃数分钟使其融化，然后超声处理以打碎 DNA。将小管在沸水中加热 5min 后放在 37℃水浴箱并立即进行以下操作：按照试剂盒的说明将 dNTP, α -³²P-dCTP 和 Klenow 片段加入变性 DNA 中，37℃水浴 30min。
- (15) 小管沸水浴 5min 后立即将内容物（已标记的探针）加至 5~10ml 杂交液中，稍加混合后立即倒入正在预杂交的含有杂交膜的杂交滚筒中，保持滚筒于 42℃滚动 2d。
- (16) 在一个长宽都超过膜 2cm 以上的容器中加入适量溶液 1（参见实验材料-试剂-Southern 杂交-洗膜液），溶液量需能盖过整张膜。停止杂交，将膜从杂交滚筒中直接转移至溶液 1 中。轻轻摇动容器 15min。回收杂交液并存于 -20℃（参见注意事项 11）。记录所使用的探针。
- (17) 在另一个同样大小的容器中加入 200~300ml 溶液 1，尽快将膜从第一个容器中转移至第二个容器中。轻轻摇动容器 15min。同上操作方法将膜顺序在溶液 2、溶液 3、溶液 4

中分别洗 2 遍，每遍 15min。洗完后将膜正面朝上，放在一张吸水纸上吸干洗膜液，转移膜至另一张吸水纸上风干。

(18) 把膜放在一张薄纸板或滤纸上，用保鲜膜封好放入 X 线胶片盒内，在其上放一张 X 线胶片曝光。准确记录曝光时间。

(19) 更换胶片以不同时间曝光。一般至少需要 3 张以上曝光度不同的胶片。其中一张正常曝光用于分析或发表，一张曝光不足使多个条带拥挤区域易于观察，一张曝光过度用以显示在正常曝光度显示不了的条带 (图 3-1-1)。

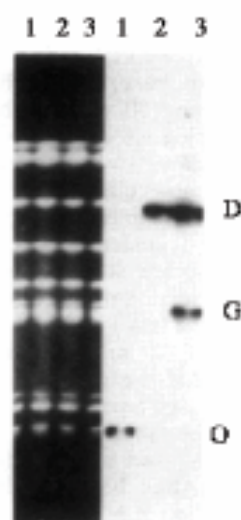


图 3-1-1 XbaI 消化的 *S. typhimurium* 菌株基因组的 PFGE 分型 (图左) 和 Southern 印迹 (图右) 的分析

图左显示的胶已印迹到膜上，各泳道的探针如下：泳道 1 为质粒 pJN13 探针，该质粒含有 *pyrE* 基因，可以和 O 片段杂交。泳道 2 为 D 片段 *pyrF* 杂交探针。泳道 3 为 TT15246 *pyrF*: *MudP* 探针，这个探针含有 XbaI 的酶切位点，可以和 D 和 G 片段杂交 (引自 *J Bacteriol* 杂志)。

4. 从 *S. typhimurium* LT2 菌株中转导 Tn10 以定位基因

(1) 选择高滴度噬菌体 P22 (10^{11} pfu/ml 或更高) 以 10 倍浓度梯度稀释，在 *S. typhimurium* LT2 菌膜上试验。

(2) 在含四环素的 LB 平板上，划线接种 Tn10 插入到已知基因的 *S. typhimurium* LT2 突变株。

(3) 挑选单个菌落，接种于 1 ml LB 肉汤，37℃ 振荡过夜。

(4) 加入 3ml 新鲜 LB 肉汤到小管中，继续振荡 3h。

(5) 加入 10 μ l P22 裂解液 (10^{11} pfu/ml 或更高)，在 37℃ 下孵育 6 h。

(6) 为释放和收集噬菌体，在噬菌体培养物中加入 100 μ l 氯仿，用涡旋振荡器剧烈振荡小管 20s，离心，转移上清液到一新的小管中。操作之前需确认塑料小管对氯仿稳定。裂解液在 -4℃ 可以保持稳定 10 年以上。这种裂解液中含有 Tn10 插入片段和 *S. typhimurium* LT2 基因组 DNA 的邻近区域的颗粒，总长度大约 45kb，这些都包含在 P22 的蛋白头部中。这种伪噬菌体能黏附到沙门氏菌体上，并且像野生 P22 噬菌体一样以沙门氏菌的 O12 抗原为受体，与之结合并把 DNA 注入到菌体中。许多情况下，伪噬菌体颗粒的 DNA 能整合到宿主的 DNA 的同源位置。这样，经过 XbaI 或 AvrII 切割的基因组 DNA 在 PFGE 分离后，

可以对靶基因在沙门菌基因组中的位置进行定位 (图 3-1-2)。

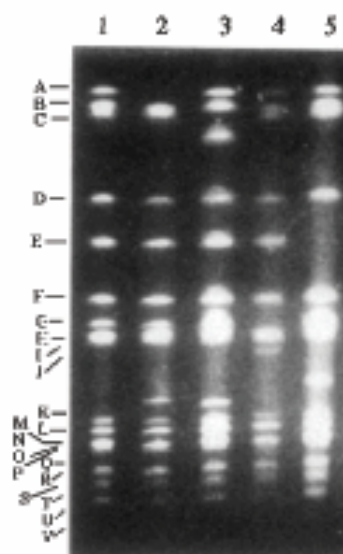


图 3-1-2 XbaI 消化的 *S. typhimurium* LT2 菌株和 Tn10 插入的转化株基因组的 PFGE 分型

泳道 1, 野生型 LT2; 泳道 2, A 片段中 *zbf* 基因中 Tn10 插入; 泳道 3, C 片段中 *sel* 基因中 Tn10 插入; 泳道 4, G 片段中 *ompD* 基因中 Tn10 插入; 泳道 5, E 片段中 *mel* 基因中 Tn10 插入 (引自 *J Bacteriol* 杂志)。

(7) Tn10 转座子含有 XbaI 或 AvrII 的切割位点, 所以额外的 XbaI 或 AvrII 的切割位点处就是 Tn10 转座子或靶基因定位处。

(8) 对于能表达抗原 O12 的菌株, 为了确定 P22 所携带 Tn10 转座子在新的沙门氏菌基因组中的定位, 挑选单个菌落在 1ml LB 培养基中培养过夜。第二天早晨取 100 μ l 细菌培养液放置于一个含有四环素的 LB 平板中央, 另取 1~2 μ l *S. typhimurium* LT2 Tn10 插入变异株裂解液到细菌培养液上。用 T 形涂布棒把细菌和噬菌体混合物在 LB 平板上均匀涂布。

(9) 对于不能表达抗原 O12 的菌株, 为了确定 P22 所携带 Tn10 转座子在新的沙门氏菌基因组中的定位, 首先要将编码 O12 抗原的 cosmid pPR1347 (此 cosmid 含有卡那霉素抗性基因) 引入到该沙门氏菌中, 使其对 P22 敏感。这个 cosmid 可以通过 F 菌毛接合转移, 但接合转移要求该沙门氏菌对某种抗生素如链霉素耐受。将细菌放在链霉素浓度梯度的环境中生长。链霉素的浓度从 5 μ g/ml 开始 (参见注意事项 12)。

(10) 当链霉素抗性达到 1000 μ g/ml 时, 将培养的菌株与含有 F 质粒和 pPR1347 质粒的大肠杆菌 (*E. coli*) 按 5:1 的比例混合, 如 5ml 链霉素抗性沙门氏菌和 1ml 大肠杆菌混合。离心混合菌, 把混合菌放到 2ml 新鲜 LB 肉汤中, 37 $^{\circ}$ C 下培养 3~6h。培养中避免晃动。然后将细菌涂布在含有链霉素 (500~1000 μ g/ml) 和卡那霉素 (50 μ g/ml) 的平板上。检测在含有链霉素和卡那霉素的平板上生长的细菌对 P22 的敏感性。挑取 P22 敏感细菌的单个菌落在 1ml LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜。第二天早晨取 100 μ l 细菌培养液到一个含有四环素的 LB 平板中央, 取 1~2 μ l *S. typhimurium* LT2 Tn10 菌株裂解液到细菌培养液上。用 T 形涂布棒把噬菌体混合物在 LB 平板上均匀涂布。

(11) 从 LB 平板上挑取 3~6 个四环素耐受性菌株用以表型测定。

5. 表型测定

(1) 营养需求试验：取四环素耐受性转化菌株在 M9 基础培养基上生长，同时在 M9 基础培养基上加入细菌插入 Tn10 以后生物合成所必需的营养后培养（参见注意事项 13）。

(2) 动力测定：四环素耐受性转化菌株在 LB 平板上生长，取一个菌落在半固体 LB 琼脂平板或软 NGA 平板上培养，或在以上两种平板上同时培养。*S. Typhi* 菌株的鞭毛缺陷型、动力缺陷型、趋向缺陷型的判定见后（图 3-1-3）。

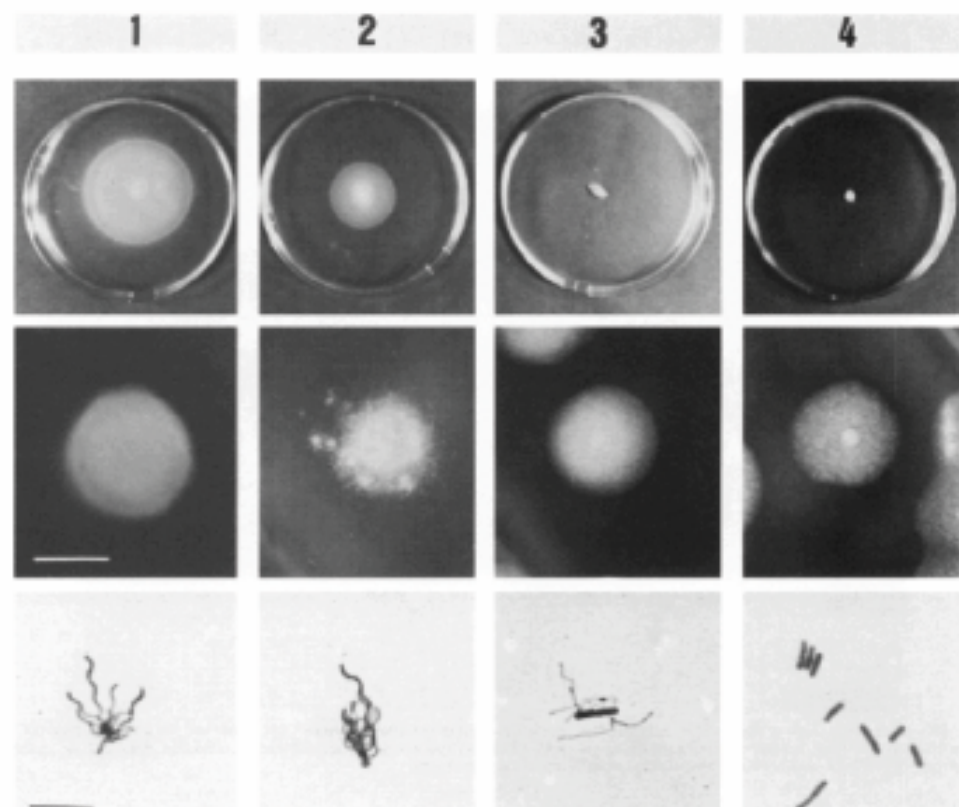


图 3-1-3 野生株和动力突变株的表型差异

在 LB 半固体琼脂培养基上培养的动力观察；中行，NGA 平板上的菌落形态（图示比例尺为 1mm）；末行，鞭毛染色（图示比例尺为 5 μ m）。菌株从左至右依次为：1，野生型 *S. typhi*；2，*che*-突变株；3，*mot*-突变株；4，*fla*-突变株（引自 *Infection and Immunity* 杂志）。

6. 双酶切法制作沙门氏菌基因图谱

(1) 双酶切法每个酶一般需要 3~5 个 PFGE 泳道。例如，I-CeuI 可以把沙门氏菌的基因组切成 7 个片段。为了确定这 7 个片段在基因组中的物理距离，常应用其他内切酶如 XbaI, AvrII, SpeI 等。一般至少需要 3 条泳道，每种酶一条。每个酶多跑两个或更多泳道则更好，因为切下来的胶可能破损，丢失或质量达不到要求。切下的胶条可以保持稳定一周左右。

(2) 在 PFGE 照相的图片上标记要剪切下来的条带。

(3) 标记将要盛放切下的胶条的离心管，每管加 0.5ml 储存液。

(4) 在紫外灯下按图中的标记用刀片切下含有 DNA 的胶条，不含有 DNA 的部分弃之。把 DNA 胶条放入标记好的小离心管中。注意不要使 DNA 在紫外灯下暴露超过 10s，也不要放错离心管。

(5) 用第二种酶作用于 DNA，一般酶用量和作用时间均小于第一种酶。因为经电泳分

离的 DNA 纯度远高于第一次植入琼脂糖时的纯度。

(6) 第二种酶切以后，大部分 DNA 由于随机断裂和各种操作丢失了。一般剩下的 DNA 不到 20%。这时一些条带在紫外灯下或 EB 染色后照相时已变得模糊，这时往往需要用同位素末端标记。

(7) 末端标记时，吸尽储存液，加入 0.5ml H₂O，5min 后吸干水加入 50 μ l 末端标记液在 37 $^{\circ}$ C 条件下作用 30min。

(8) 将样品加入 PFGE 胶加样孔，进行脉冲场电泳。因为末端标记的 DNA 含有放射性，不能在每一轮跑胶中在紫外灯下直接看到 DNA 分离情况，因此所有条件在一开始就应全部设置好。大部分沙门氏菌双酶切实验中，以下设置都是适用的（有时会根据第一轮跑胶情况做适当调整）：① 脉冲时间 10~80s 电泳 12h；② 3~18s 电泳 3h；③ 20~30s 电泳 6h。设置电压为 6 V/cm，电泳液温度为 16 $^{\circ}$ C。要确保冷却器工作正常。

(9) 细心清理做同位素操作的区域，妥善处理固体和液体有放射性的废物。

(10) 在 PFGE 电泳过程中，没有结合的同位素会从样品上洗脱下来游离到电泳槽中。这些游离的放射性同位素需要清除掉，否则整块胶都会含有放射性在 X 线片上会形成浓重的背景。如在第一天下午或晚上开始跑胶，在第二天清晨将所有电泳液放掉，收集到放射性液体专用的容器中（参见注意事项 14）。用足量蒸馏水（大约 3~4L）冲洗电泳槽，冲洗的时候保持水泵运转约 15min，重复冲洗一次。然后用 0.5 \times TBE 电泳液把剩下的时间跑完。

(11) PFGE 电泳结束以后，排干电泳液，同上一步骤清洗电泳槽两次后拿出胶。在 Bio-Rad 干胶仪（gel dryer）上放一张比凝胶四边都长大约 1cm 的滤纸，把胶放在滤纸上。用比滤纸稍大的保鲜膜包好胶，滤纸和胶之间以及包装膜和胶之间都要尽可能地保持平整。把干胶仪的软页放在胶上后打开真空泵。当软页紧贴胶周围的金属网眼和液体被抽到真空瓶中时，关上干胶仪的硬盖并加热。条件为 80 $^{\circ}$ C 加热 2h。2h 后，加热会自动停止，但要等到金属网眼冷却到室温时才能关掉真空泵。

(12) 在滤纸背面用铅笔记录下胶的编号，这项工作也可以在干燥之前完成。剪掉胶周围没有覆盖住胶的滤纸和保鲜膜。在暗室把胶放入 X 线暗盒，放入 X 线胶片。X 线下曝光 3h 后显影和定影。根据情况确定下一张胶片曝光时间。至少保存适度曝光，过度曝光以及曝光不足照片各一张。图 3-1-4 为适度曝光举例。

7. I-CeuI 不完全酶切确定全基因组图谱

(1) 滴定法确定 I-CeuI 的适宜浓度，用 I-CeuI 处理细菌全基因组 DNA。

(2) 确定完全和不完全酶切的 DNA 片段。

(3) 利用完全和不完全酶切片段的大小计算出各片段的上下游顺序。如图 3-1-5，如果完全酶切片段之间的大小相差很大时，如 50kb 以上，定位各片段则比较容易。

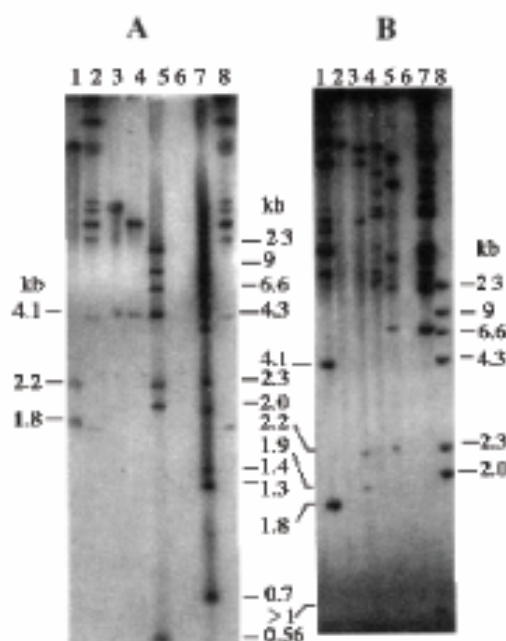


图 3-1-4 *Salmonella typhimurium* LT2 基因组 DNA 的双酶切和³²P 末端标记

(A) 设置 1. 泳道 1: I-CeuI 酶切 C 片段用 AvrII 再次酶切; 泳道 2 和泳道 8: LT2 的 DNA 只用 AvrII 酶切; 泳道 3: I-CeuI 酶切 E 片段用 AvrII 再次酶切; 泳道 4: I-CeuI 酶切 D 片段用 AvrII 再次酶切; 泳道 5: HindIII 标准酶切; 泳道 6: DNA 多联体 (未用³²P 末端标记); 泳道 7: BstEII 标准酶切, 标准酶切的部分片段大小见右图, 部分小片段见左图。

(B) 设置 2. 泳道 1: LT2 的 DNA 只用 AvrII 酶切; 泳道 2: I-CeuI 酶切 A 片段用 AvrII 再次酶切; 泳道 3: I-CeuI 酶切 B 片段和 G 片段用 AvrII 再次酶切 (这些片段分子质量相差很小, 很难用 PFGE 完全分开); 泳道 4: I-CeuI 酶切 A 片段用 XbaI 再次酶切; 泳道 5: I-CeuI 酶切 B 片段和 G 片段用 XbaI 再次酶切; 泳道 6: DNA 多联体 (未用³²P 末端标记); 泳道 7: LT2 的 DNA 只用 XbaI 酶切; 泳道 8: HindIII 标准酶切, 标准酶切的部分片段大小见右图, 部分小片段见左图 (引自 *J Bacteriol* 杂志)。

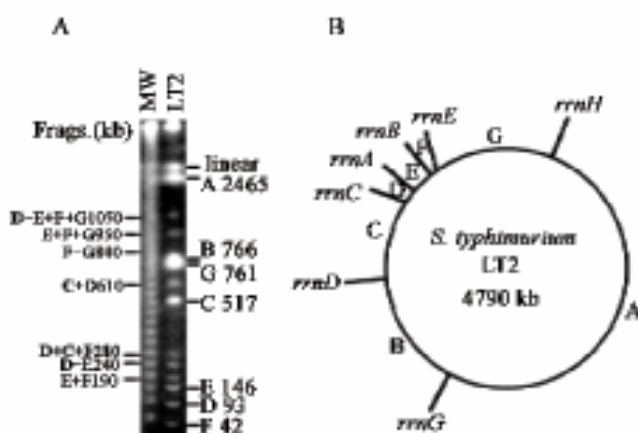


图 3-1-5 *S. typhimurium* LT2 用 I-CeuI 部分酶切得到的全基因组结构

A 图: I-CeuI 酶切基因组 DNA 后 PFGE 的图像。右边较大字体显示的是完全酶切片段, 左边较小字体显示的是不完全酶切片段。MW 泳道是分子质量 marker。B 图: 利用完全和不完全酶切的数据做出的环状基因组图 (引自 *J Bacteriol* 杂志)。

(4) 如果确定一个不完全酶切片段时出现了问题, 把相应的片段从胶上切下用 I-CeuI 重新消化。把双酶切的结果和单酶切完全酶切片段的结果对比就能很好地发现问题所在。

【分析与思考】

1. 简述脉冲场凝胶电泳的原理。结合实验说明脉冲场凝胶电泳基因作图与全基因组测序相比有哪些优缺点。

2. 本实验很多试剂中很多配制时使用了 EDTA, 已知它是一种二价阳离子螯合剂, 请思考它在实验的试剂中有什么作用, 查阅相关资料证实你的猜想。

3. 脉冲场凝胶电泳每一轮的条件设置(电场变换周期、电压、电泳时间)的依据是什么? 为什么第一轮要对全基因组分离?

4. 简述 Southern 印迹的原理, 步骤。为什么 Southern 印迹要用高盐溶液? 预杂交有什么作用?

5. 在使用 I-CeuI 对基因组酶切时为什么要不完全酶切? 控制什么条件才能达到不完全酶切?

6. 为什么第二种酶切以后要使用末端标记法?

7. 联合多种限制性内切酶进行双酶切的目的是什么?

【注意事项】

1. 除非有特别用途, 塑料或玻璃容器的化学材料没有特别要求。

2. 本章中提到的水 (H_2O) 是指电阻为 18.2 M 的纯水。

3. 上下震荡常不能充分分散细菌, 使细菌加入琼脂糖时常聚集成簇。

4. 使用的塑料或玻璃小管应为平底, 容积约为 1.5~2ml。不推荐使用普通离心管, 因为结核菌素注射器不能伸到较窄的底部。

5. 倒出液体时可用类似纱窗的网状物盖住管口。

6. 对许多沙门氏菌株来说, 蛋白酶 K 的在 42°C 下作用 3h 就足够了, 但绝大多数沙门菌和其他肠道菌来说 72h 为最佳。

7. PMSF 在使用前不要与水接触。

8. 不要冷冻 DNA 样品。如果 DNA 偶尔放置在不低于 -3°C 条件下且不超过 6h, DNA 一般还可以使用, 但不保证能获得好的数据。

9. 不同的供应商提供的同一种酶活性差异很大。一般同一个供应商提供的不同批次的酶质量比较稳定。最好使用同一个供应商提供的内切酶。一般滴定一批酶以后, 从同一个供应商购买的酶一般不需要重复滴定。

10. 许多实验者在胶跑完以后染色, 但 EB 直接加在胶中通常会使条带更清晰。

11. 当放射性同位素 ^{32}P 几乎完全衰变以后回收的杂交液可以重复使用。

12. 链霉素耐受性筛选时从 5 $\mu g/ml$ 开始。在含有 10 $\mu g/ml$ 链霉素的 LB 平板上涂布 100 μl 培养肉汤过夜培养。从其中挑取一个菌落在含有 20 $\mu g/ml$ 链霉素的 LB 肉汤中培养。重复以上操作直到 LB 平板只能够含有 1000 $\mu g/ml$ 链霉素。

13. 一些沙门氏菌是特定营养缺陷株。例如 *S. Typhi* 在 M9 平板上生长时需要半胱氨酸。这些营养素需要在实验中加入培养基。

14. 放射性废物应按照国家有关部门的规定处理。

(王承志 刘树林)

北京大学医学实验系列教材

医学细胞生物学与 医学遗传学实验教程

主 编 肖军军

副主编 张 涛 吴 丹 白 云



北京大学医学出版社

北京大学医学实验系列教材

医学细胞生物学与医学遗传学实验教程

主 编 肖军军

副主编 张 涛 吴 丹 白 云

编 委 (以姓氏笔画排序)

王小竹 刘 卉 刘 林 闫 明

闫 武 吴白燕 宋书娟 邹俊华

李 莉 杨 华 宋 青 张 沙

孟书聪 林 明 赵 翔 董晓敏

梁红业 章远志 黄 昱 韩 玲

北京大学医学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学细胞生物学与医学遗传学实验教程/肖军军主编. —北京:
北京大学医学出版社, 2008. 5
(北京大学医学实验系列教材)
ISBN 978-7-81116-555-5

I. 医… II. 肖… III. ①人体细胞学: 细胞生物学—实
验—医学院校—教材 ②医学遗传学—实验—医学院校
—教材 IV. R329.2-33 R394-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 040144 号

医学细胞生物学与医学遗传学实验教程

主 编: 肖军军

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E-mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京东方圣雅印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 吕征宝 许立 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 6.75 字数: 160 千字

版 次: 2008 年 5 月第 1 版 2008 年 5 月第 1 次印刷 印数: 1-3000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-555-5

定 价: 13.00 元

版权所有 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

21世纪被认为是生命科学的世纪。医学细胞生物学与遗传学作为生命科学的微观世界的重要基础学科，近年发展非常迅速，广泛地影响着基础医学与临床医学，已成为现代医学教育中的重要课程。掌握这两门学科实验的方法与技术对于从事基础医学和临床医学工作是十分必要的。

本教材是为《医学细胞生物学》和《医学遗传学》理论课配套的实验教材，实验包括：基本实验与综合实验两个部分。

在基本实验中，医学细胞生物学实验包括：细胞的原代培养、细胞的传代培养、各种光学显微镜与临时制片方法、荧光显微镜技术、吖啶橙荧光染色法、细胞化学染色（Feulgen反应显示DNA）、细胞骨架——微丝的显示与观察、电子显微镜术及电子显微镜生物样品制备。在医学遗传学实验中包括了细胞遗传学实验技术、分子遗传学实验技术和生化遗传学实验技术等主要领域的基础实验，结合了目前临床实用需求。实验中包括：人类基因组DNA提取、亨廷顿病的基因诊断与溶酶体酶贮积病的生化检测。

综合实验包括：遗传咨询、遗传病分析及风险评估、人类正常性状的遗传学分析、人类遗传病、人类皮纹分析、氨基酸分析（氨基酸分析仪）、单细胞凝胶电泳、磷酸钙介导的绿色荧光蛋白细胞转染技术。

融合实验包括：人体外周血淋巴细胞培养与非显带染色体标本的制备、正常人非显带染色体的核型分析与细胞分离。

这些实验既包括了经典实验，又增加了一些内容新颖、技术先进、教学实用性强的实验，有利于培养学生的综合实验素质和科研能力。本实验教材是北京大学医学部实验教学中心的系列实验教材之一，可供国内医科院校和综合性大学的医学和生物专业的专科生、本科生和研究生的实验教学使用，亦可作为基础医学和临床医学研究工作者的参考书籍。

编者

2008. 4. 2

目 录

基本实验

实验一 细胞遗传学实验技术	(5)
实验 1.1 小鼠骨髓染色体标本制备	(5)
实验 1.2 正常人非显带染色体的核型分析	(7)
实验 1.3 人类染色体 G 显带核型分析	(9)
实验二 分子遗传学实验技术	(13)
实验 2.1 人类基因组 DNA 提取	(13)
实验 2.2 亨廷顿病的基因诊断	(15)
实验三 生化遗传学实验技术	(18)
实验 3.1 溶酶体酶贮积病的生化检测	(18)
实验四 细胞生物学实验技术	(21)
实验 4.1 细胞的原代培养	(21)
实验 4.2 细胞的传代培养	(25)
实验 4.3 各种光学显微镜与临时制片方法	(27)
实验 4.4 荧光显微镜技术	(31)
实验 4.5 吖啶橙荧光染色法	(33)
实验 4.6 细胞化学染色 (Feulgen 反应显示 DNA)	(35)
实验 4.7 细胞骨架——微丝的显示与观察	(37)
实验 4.8 电子显微镜术及电子显微镜生物样品制备	(41)

综合实验

实验一 遗传咨询	(55)
实验二 遗传病分析及风险评估	(60)
实验三 人类正常性状的遗传学分析	(65)
实验四 人类遗传病分析 (观看光盘)	(69)
实验五 人类皮纹分析	(70)
实验六 氨基酸分析——氨基酸分析仪	(76)
实验七 单细胞凝胶电泳	(79)
实验八 磷酸钙介导的绿色荧光蛋白细胞转染技术	(83)

融合实验

实验一 人体外周血淋巴细胞培养及染色体标本制备	(87)
实验二 细胞分离	(90)

总 则

一、实验程序和要求

1. 预习 学生实验前必须认真预习实验指导及教材有关内容，应了解实验的目的要求、实验内容、基本原理和操作方法。

2. 讲解 教师只对实验原理、内容安排及注意事项进行讲解，让学生有充分时间进行独立的操作和观察。

3. 操作与观察 学生在实验中要按操作程序进行独立操作，仔细观察实验现象和结果并记录。

4. 示教 实验中的示教是对某些较难的实验操作过程和观察材料进行演示，学生初步认识后，再独立操作，仔细观察。

5. 作业 实验报告必须根据自己的观察，以实事求是和一丝不苟的科学精神忠实地记录、分析、思考、综合和总结。实验报告一般应于实验结束时呈交。

6. 总结 实验结束后，由教师进行实验总结。

二、实验规则和注意事项

1. 学生实验必须穿好工作服，要求携带教材、实验指导、实验报告纸和文具，按规定座位入座。

2. 学生实验前应检查所用仪器、实验用品、材料是否完好齐全，如有缺损要及时向教师报告，不得随意调换仪器和实验用品。实验时要爱护实验仪器、用品和标本，如有损坏应主动报告，说明情况。

3. 实验课不得迟到、早退或无故缺课。实验时要遵守课堂纪律，保持肃静，严禁谈笑喧哗或随意走动，有问题时举手提问，不得进行和实验无关的其他活动。

4. 实验时要听从教师安排和指导，严格遵守实验操作规程，按照实验指导的要求进行，要求操作规范、观察仔细、思维活跃和记录认真，及时完成实验报告。

5. 实验结束后，学生应自觉清理好实验台面、实验仪器、试剂及其他实验用品，物归原处。值日生负责清扫地面，整理实验用品，处理垃圾，关好水电、门窗后再离开实验室。

基本实验

实验四 细胞生物学实验技术

实验 4.1 细胞的原代培养

【实验目的】

1. 了解原代培养细胞的基本知识。
2. 掌握细胞原代培养的一般方法与步骤。
3. 掌握无菌操作技术。

【实验原理】

原代培养 (primary culture) 是从供体获取器官、组织、细胞后所进行的首次培养。由于组织和细胞刚刚离体, 生物性状尚未发生很大的变化, 具有二倍体遗传性状, 在供体来源充分、生物条件稳定的情况下, 在一定程度上可以反映体内的状态, 适用于做药物检测、细胞分化等实验研究; 另外, 进行培养的细胞不再形成组织。

【实验材料】

1. 试剂 乙醚、75%酒精、PBS 溶液、0.25%胰蛋白酶液、含 10%小牛血清的 1640 培养液。
2. 仪器/器械 超净工作台、倒置显微镜、二氧化碳培养箱、离心机、计数板、盖片、细胞筛、酒精灯、剪子、镊子、试管、吸管、烧杯、培养瓶、废液瓶。
3. 动物 乳鼠。

【实验步骤】

1. 消化培养法 以乳鼠大腿肌肉为例进行实验 (图 4-1)
 - (1) 取各种已消毒好的培养用品置于超净工作台面, 紫外线消毒 15~20 分钟;
 - (2) 洗手, 穿消毒衣, 穿鞋套;
 - (3) 打开超净台, 所需实验用品按规定位置摆好;
 - (4) 点燃酒精灯, 将实验用品过火, 放到支架上备用;
 - (5) 用乙醚杀死出生后 1~2 天的乳鼠, 立即浸入装有 75%酒精的瓶内消毒 1~2 分钟, 取出乳鼠, 放到消毒好的弯盘中, 拿到超净台;
 - (6) 无菌取乳鼠大腿肌肉, 切成 3~5mm³ 小块;
 - (7) 用 PBS 漂洗 2~3 次, 去除血污, 用 0.25%胰蛋白酶消化 5 分钟;
 - (8) 加入含 15%小牛血清的 1640 培养液, 用尖吸管反复吹打分散细胞;
 - (9) 将细胞悬液过筛至烧杯, 转入加入离心管中;
 - (10) 平衡后, 1000r/min 离心 3~5 分钟, 吸去上清液;
 - (11) 加入少量培养液, 制成均匀细胞悬液;
 - (12) 取少量细胞悬液, 用计数板进行细胞计数;
 - (13) 根据细胞数量加入培养液, 使细胞密度为 40 万~50 万个细胞/ml, 将细胞悬液移入培养瓶, 盖上培养瓶盖;
 - (14) 在培养瓶壁上写好细胞名称、日期, 镜下观察后, 放置于 37℃5% CO₂ 培养箱;
 - (15) 操作完毕后, 盖好酒精灯, 关闭超净台, 新洁尔灭液擦净台面。

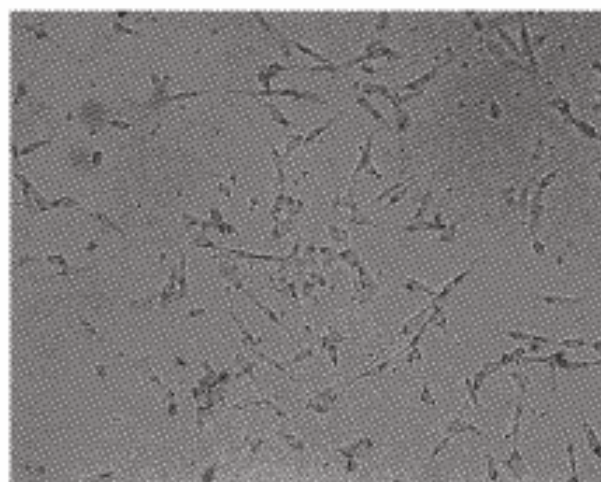
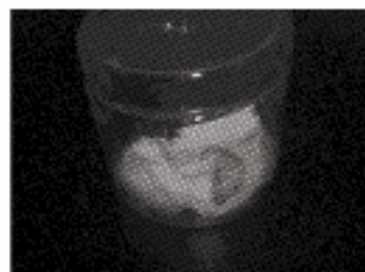


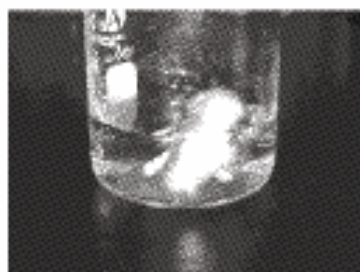
图 4-1 原代体外培养的乳鼠大腿骨骼肌细胞

2. 组织块培养法 (以乳鼠肝组织为例实验图 4-2)

- (1) 取各种已消毒好的培养用品置于超净工作台面, 紫外线消毒 15~20 分钟;
- (2) 洗手, 穿消毒衣, 穿鞋套;
- (3) 开超净台, 所需实验用品按规定位置摆好;
- (4) 点燃酒精灯, 将实验用品过火, 放到支架上备用;
- (5) 用乙醚杀死死后 1~2 天的乳鼠, 立即浸入装有 75% 酒精的瓶内消毒 1~2min, 取出乳鼠, 放到消毒好的弯盘中, 拿到超净台 [图 4-2 (1), (2)];
- (6) 切取乳鼠肝组织放进小烧杯中, 用 PBS 漂洗 2~3 次, 去除血污 [图 4-2 (3), (4), (5)];
- (7) 加少量培养液, 用剪子把组织剪碎 1mm^3 左右的小块, 用弯头吸管吸取小块, 置入培养瓶中, 把组织小块均匀摆放在培养瓶底上 [图 4-2 (6), (7)];
- (8) 在培养瓶壁上写好细胞名称、日期, 轻轻翻转培养瓶, 加入少量培养液, 45 度倾斜 (瓶底向上), 置于 37°C $5\%\text{CO}_2$ 培养箱 2~4 小时 [图 4-2 (8), (9)];
- (9) 取出培养瓶, 缓慢将培养瓶翻转过来, 让培养液慢慢覆盖附于瓶底部的组织小块, 置温箱中继续培养;
- (10) 操作完毕后, 盖好酒精灯, 关闭超净台, 新洁尔灭液擦净台面。



(1)



(2)



(3)

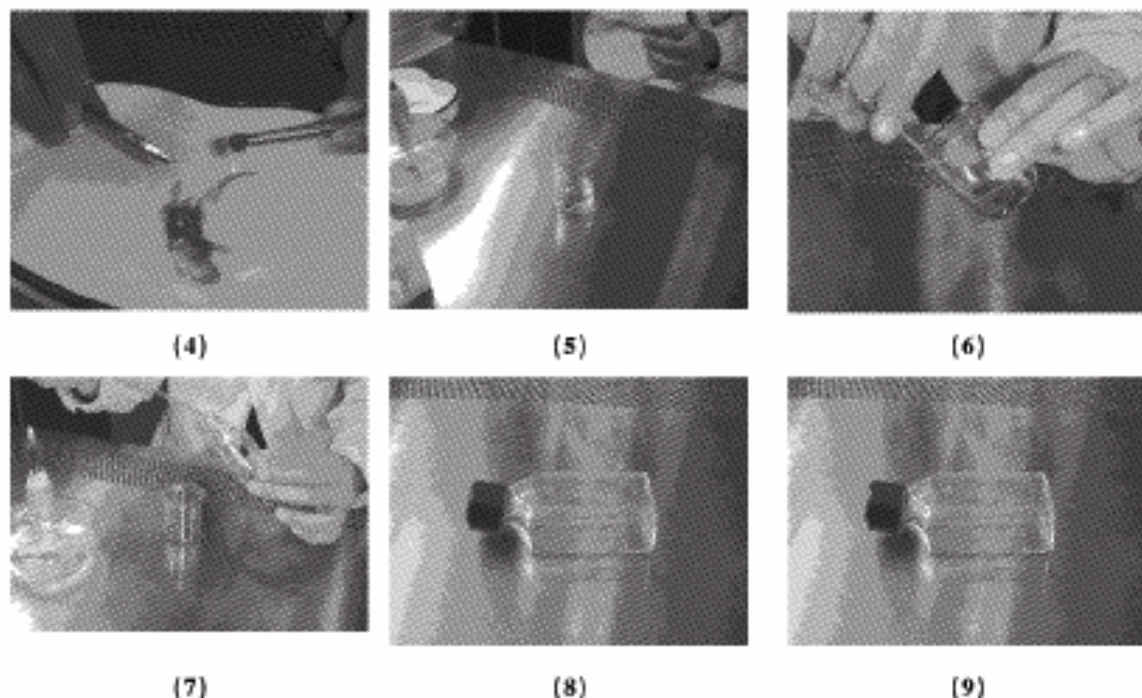


图 4-2 乳鼠肝组织的取材、细胞分离与培养过程

【分析与思考】

1. 简述原代培养的基本要点。
2. 什么是细胞培养的污染？

【注意事项】

1. 细胞培养的污染

(1) 细胞培养污染应包括以下几个方面：

微生物：真菌、细菌、支原体和病毒。

化学物：影响细胞生存的非细胞所需的化学成分。

细胞：非同种的其他细胞。

(2) 污染途径：空气、清洗消毒、操作、血清、组织。

(3) 污染对细胞的影响

细菌污染：细菌是一种原核细胞微生物，其大小以微米计，早期对培养的细胞影响不明显，镜下不易判断。但细菌增值旺盛时培养液外观混浊，镜下可见点状的细菌颗粒，原来清晰的背景变得模糊，大量的细菌甚至可以覆盖培养物，对培养物的生存构成直接的威胁。

真菌污染：真菌是一种真核细胞微生物，比细菌大几十倍以上。单细胞真菌称为酵母菌，多细胞真菌能长出菌丝及孢子并交织成团，称丝状菌，又称霉菌。污染了酵母菌的培养物，类似细菌污染。在镜下可见圆形或卵圆形的酵母菌。开启培养器皿，可闻到像酒或酸的发酵样异味。随着培养液酸度下降，培养液外观呈黄绿色。污染了真菌的培养物，在镜下能观察到呈丝状或树枝状生长的菌丝。

支原体污染：支原体大小为 $0.2\mu\text{m}$ 左右，是一种无细胞壁、具有高度异型性、可以穿过常规除菌滤膜的最小的原核生物。受支原体污染的培养细胞在镜下无特殊的外观表现，培

养液可不发生混浊。在细胞培养过程中，如果在镜下发现破碎的细胞甚多，培养细胞需要频繁改善营养环境才能支持长期传代培养时，应怀疑培养物可能受支原体污染。

病毒污染：病毒是一种能通过细菌滤器，大小以纳米（nm）计，不能独立利用外界营养物质进行自体繁殖的微生物，病毒可改变培养物生物学性状，影响培养细胞的生长或干扰实验结果的客观性。

2. 微生物污染的排除 ①销毁；②抗生素；③巨噬细胞共培养；④小鼠皮下/腹腔过继培养。

3. 污染的预防

(1) 培养操作前的准备，主要包括如下方面：

①应当按厂家规定定期清洗或更换超净工作台的空气滤网，请专职人员定期检查超净台的空气净化标准；

②检查培养器皿是否有消毒标志，有条件的实验室应尽可能使用一次性无菌器皿；

③检查新配制的培养液，取样检菌一周后确认无菌方可应用；

④操作前提前半小时启动超净台及其紫外消毒灯；

⑤操作者应清洗双手，如有呼吸道感染应戴口罩。

(2) 培养操作时的注意事项主要包括：

①在超净工作台面放置的所有培养瓶瓶口不能与超净台的风向相逆，不允许用手触及器皿的无菌部分，如瓶口和瓶塞内侧；

②在安装吸管帽、开启或封闭瓶口操作时要经过火焰烧灼，并在火焰附近进行。

③吸取培养液、细胞悬液等液体时，应专管专用，以防止污染扩大或造成培养物之间的交叉污染；

④使用培养液前，不宜过早开瓶。开瓶后的培养液应保持斜位，避免直立。不再使用的培养液应立即封闭瓶口。培养的细胞在处理之前勿过早暴露于空气中；

⑤吹打细胞时动作不易过猛，吹出液体的力度要适中，否则会直接损伤细胞并产生能伤害细胞的气泡。

⑥操作时不要交谈、咳嗽，以防止来自唾液和呼出的气流所造成的污染；

⑦操作完毕后应整理好工作面，用消毒剂抹拭工作面，关闭超净工作台。

(3) 其他注意事项

①为了确保培养物的安全，应及早冻存有价值的培养物。重要细胞系（株）的传代工作应由两人独立进行；

②购入的未灭活血清应采取 56℃ 水浴灭活 30 分钟的措施，以使血清中的补体和支原体灭活；

③为了避免诱导抗药细菌，应定期更换培养系统中的抗生素或尽可能不用抗生素；

④对新引进的细胞株应加强观察，防止外来的污染源；

⑤定期清洁 CO₂ 培养箱，使用消毒剂抹拭以防止和清除真菌的生长。

(宋青)

综合实验

实验一 遗传咨询

【实验目的】

了解遗传咨询的主要原则及过程。

【实验原理】

遗传咨询又称为遗传商谈，是指遗传咨询医生运用医学遗传学的基本原理，对前来的咨询者所提出的有关遗传学的问题予以解答和商谈的过程。在这一过程中，咨询医生不仅要关注咨询者所遇到的生理问题，同时也要关注他所承受的心理伤害。疾病的发病原理、传递方式以及子女的复发风险都是咨询人希望得到解答的问题。咨询医生要以 Carl Roger 提出的“非指令性”为基本原则，努力提高咨询者恰当运用所获得信息的能力，以期咨询者能够获得最大的利益。

【实验材料】

遗传咨询的文字材料（讨论过程中，按照病例发放各组）。

【实验步骤】

学生以小组的形式对以下病例进行讨论，通过分角色演示，按照遗传咨询的程序及基本原理提出最佳的咨询方案。

病例 1. 这是一个真实的家族性腺瘤样息肉病（familial adenomatous polyposis, FAP）的家系。基于保密的原则，成员的姓名已经更改。罗杰是一个 24 岁的建筑学研究生，他的母亲和舅舅分别在 32 岁和 29 岁时因结肠癌而去世。罗杰记得他的母亲曾经说过医生讲在她的肠道中“满是肿块”。罗杰怀疑自己也遗传了这种可以导致结肠癌的遗传基础。因此他决定到遗传门诊就诊，医生建议他收集详细的家族史，于是他打电话给他的一位姑奶奶，也就是他外祖父的妹妹，详细询问关于这个家庭的患病情况。她在电话中告诉罗杰，他的外祖父在 45 岁时也死于结肠癌。她自己的一个儿子和一个女儿以及她自己都没有患结肠癌，其他的家庭成员也没有发现患有这种肿瘤。由于罗杰注意到几代人中多个成员受累于结肠癌，且发病年龄早，因此他非常担心他和他的哥哥罗毅、妹妹罗娟有较高的风险罹患结肠癌。于是他和哥哥、妹妹一同来到遗传咨询门诊就诊。罗毅 26 岁，罗娟 22 岁。现在请同学们以咨询师的身份对这一家系进行咨询。

相关资料：

(1) 家族性结肠息肉病简介：家族性结肠息肉病归属于腺瘤性息肉综合征，是一种常染色体显性遗传性疾病，偶见于无家族史者，全结肠与直肠均可有多发性腺瘤，多数腺瘤有蒂，乳头状较少见，息肉数从一百左右到数千个不等，自黄豆大小至直径数厘米，常密集排列，有时成串，其组织结构与一般腺瘤无异。

家族性腺瘤性息肉病多在 20~30 岁时结肠内出现息肉，随着年龄的增长息肉数目逐渐增多并出现症状，Gardner 综合征息肉和症状出现可延迟至 30~40 岁。子女中有 50% 的机会发病，男女发病机会均等。

本病患者大多数可无症状，最早的症状为腹泻，也可有腹绞痛、贫血、体重减轻和肠梗阻。常在青春期或青年期发病，好发年龄为 20~40 岁。根据其临床表现、经纤维结肠镜及活组织检查一般可确诊。

研究发现，本病息肉并不限于大肠。发现伴有小肠息肉、十二指肠息肉，同时还发现有

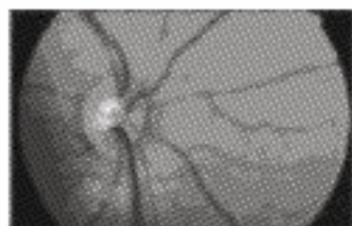
半数患者伴有骨骼发育异常，少数患者有软组织肿瘤，提示本病与 Gardner 综合征（一种伴有骨和软组织肿瘤的肠息肉病）有一定关系。

平时最多见的息肉是炎症性和腺瘤性两种。前者与大肠炎症反应有关，后者则由于结肠黏膜表面细胞更新的不平衡引起。炎症性息肉在炎症治愈后可自行消失，对腺瘤性息肉，我们必须有所警惕，它一般不会自行消失，如果长久存在于肠腔内，则有恶变的可能。

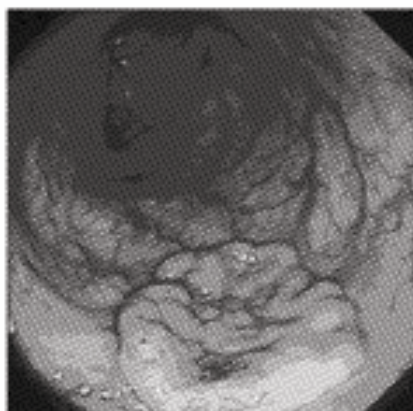
对本病的治疗，应尽早行全结肠切除术与回肠-肛管吻合术或回肠-直肠吻合术。术后仍需定期作直肠镜检查，发现新的息肉可予电灼治疗。

有研究报道，在家族性腺瘤性息肉病许多患者中均伴有先天性视网膜色素上皮细胞肥大 (CHRPE)，因此眼底检查可以作为 FAP 辅助诊断，是家系成员筛选安全、有效的手段。

(2) 给妹妹罗娟做了眼底结肠镜检查，报告结果下图。



眼底检查报告

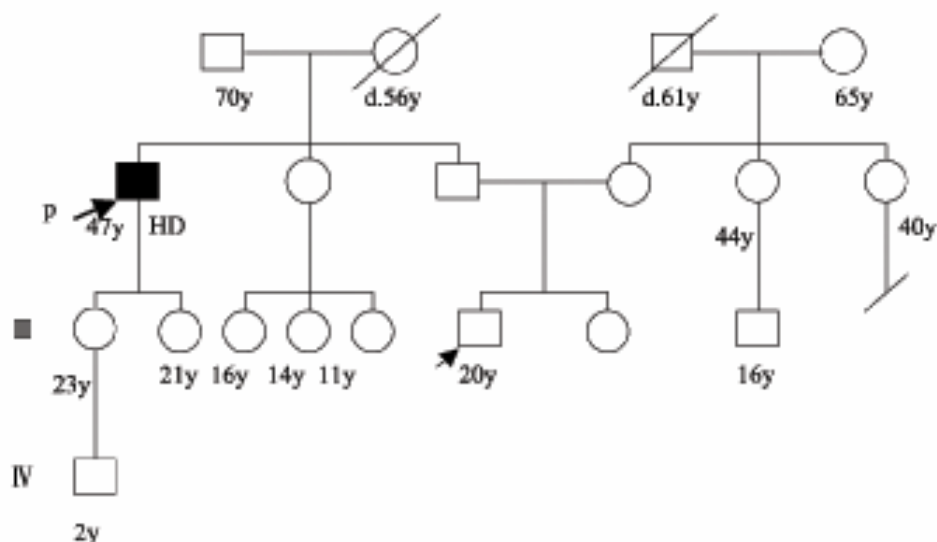


结肠镜检查报告

(3) 分子诊断结果：将 DHPLC 分析显示有异常的 PCR 产物进行测序来确定突变，结果在 cDNA 第 481 核苷酸位点测出一个 C>T 的单碱基置换，该碱基置换导致第 161 位编码谷氨酸的密码子突变成终止密码子 (Q161X)。

病例 2. 李森是一位 20 岁的健康男性，目前在大学学习。一天他的父亲来电话告诉他，他的伯父得了一种叫做 Huntington 舞蹈症 (Huntington Disease, HD) 的遗传病，家里人和医生现在都怀疑李森的祖母也是因这个病而去世的。李森的父亲向他解释道，由于 HD 在家庭中传递，所以他和李森都存在着遗传到这一疾病的风险。他的父亲 (45 岁) 建议他到学校附近的遗传门诊做检查。李森模糊地记得他的祖母是在 50 多岁时去世的。当时他 6 岁。在祖母去世前，他曾经去医院看过她。他记得她被捆坐在轮椅中，手臂、腿和面部不时出现奇怪的抽搐样运动。她不能说话，而且由于吞咽困难而不停地流口水。这些都让还是一个孩子的李森感到非常惊恐。家里人一直在讲祖母是怎么“精神失常”的。有时父亲的亲戚们在一起会回忆起李森的祖母做过的一些稀奇古怪的事情，她会经常丢钥匙，把正在烹调的饭菜烧焦。李森从没有真正了解他的祖母到底发生了什么事，他只知道她由于一些不明的原因而“精神错乱”了。目前李森对 HD 的认识完全来自他的回忆以及关于他“疯祖母”的故事。他非常害怕自己也会像祖母那样。现在他在你的咨询室，慌乱地描述了一切。之后，他脱口而出的第一个问题就是“我会得这个病吗？”现在请为李森提供咨询服务。

李森家系谱图

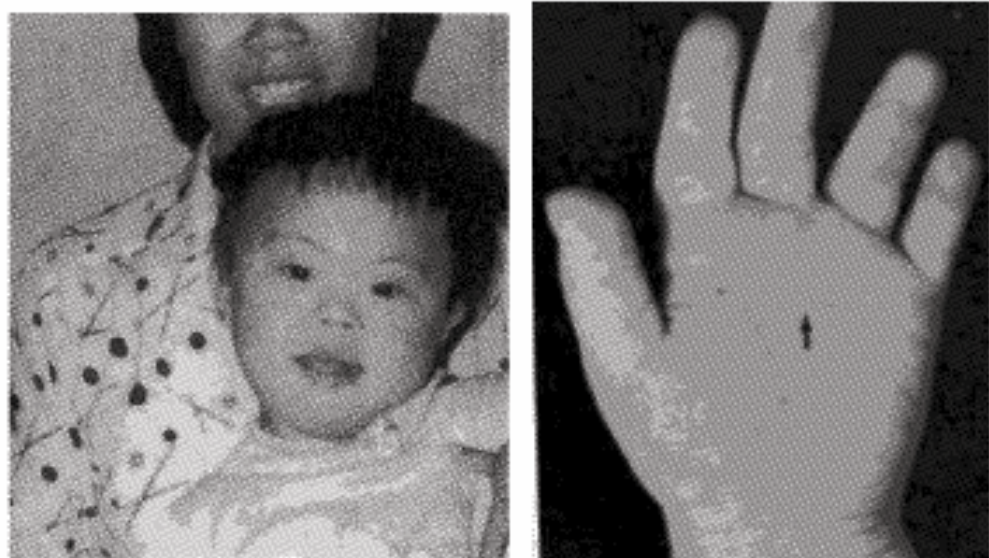


HD 舞蹈症的表达率

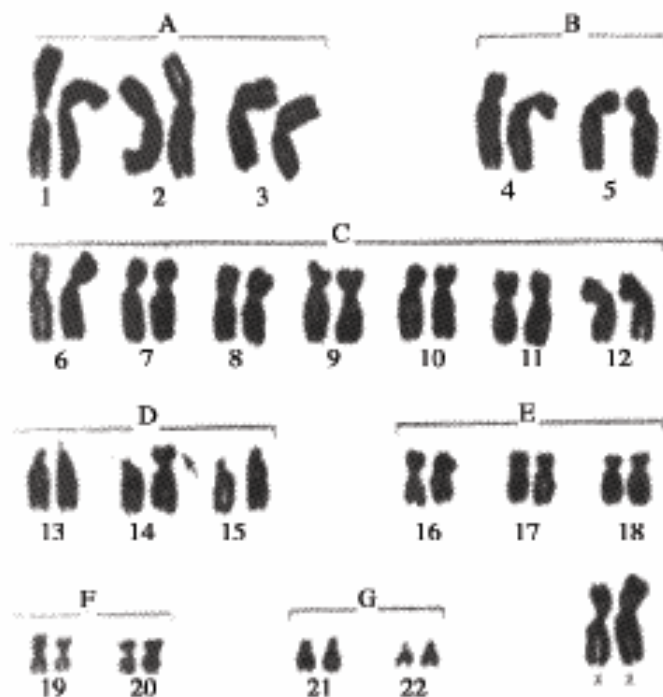
检测年龄	HD 突变表达率
20 岁	10%
25 岁	20%
30 岁	30%
35 岁	50%
40 岁	70%
45 岁	80%
50 岁	85%
55 岁	90%
60 岁	92%
65 岁	95%
70 岁	98%

病例 3. 秦娜结婚两年后第一次怀孕了。她兴奋的同时又很担心，因为她的妈妈在婚后首先经历了两次自然流产，在 25 岁时生育了秦娜的哥哥秦鑫。之后又一次发生流产。27 岁时生育了秦娜的姐姐秦玉。秦鑫从小就表现出智力发育上的障碍。秦玉 24 岁结婚。婚后连续三次自然流产，现有一个 1 岁的女儿。秦娜很担心自己也会发生流产或者生育一个智力发育障碍的孩子。这天秦娜和丈夫一起到医院检查。她向医生流露出了自己的忧虑。医生建议她到遗传咨询门诊咨询。于是秦娜在怀孕 3 个月时来到遗传咨询门诊，希望得到你的帮助。

秦鑫的体征照片及染色体核型



秦鑫核型分析结果



病例 4. 韩霖雨是一位 25 岁的女性，怀孕 9 周。由于她的父亲在 30 岁的时候死于肌萎缩，而她又听说肌萎缩具有遗传性，所以极其担心自己怀的孩子将来也会患有这种病。在她的家族中，除了父亲是这种病的患者，她的叔叔也是由于这种病去世的。她的姑姑生育了两儿两女，大儿子已经由于肌萎缩而不得不依靠轮椅。韩霖雨想知道现在应该怎么办，怎样才能有一个健康的孩子。

【病例分析与思考】

病例 1：有研究报道，在家族性腺瘤性息肉病许多患者中均伴有先天性视网膜色素上皮

细胞肥大 (CHRPE)，因此眼底检查可以作为 FAP 辅助诊断，是家系成员筛选安全、有效的手段。提示对女性咨询者可以推荐首选的筛查。

病例 2：对于异常紧张的咨询者，应该怎样处理？对延迟显性的遗传病如何进行正确的风险评估？

病例 3：平衡易位型 21 三体患者是如何形成的？其发病风险如何计算？平衡易位携带者与平衡易位型 21 三体患者的临床表现以及核型的表示？

病例 4：对于 X 连锁的遗传性，孕前咨询的注意事项？

【注意事项】

1. 咨询过程中，要注意“非指令性”原则，包括推荐病理检查及下一步的抉择，都要由咨询者自己决定，咨询师不能运用指令性主观语言。

2. 咨询师对于咨询者提供的家庭信息，要经过判断、考证，特别是由于咨询者文化背景或者智力等方面的个体差异不能全面、准确地提供信息时，要通过各种渠道考证（诊断报告、照片等）。

3. 整个过程的语言交谈要采用非专业语言坦诚交流，同时注意心理交谈，使对方愿意接受推荐意见。

（章运志 吴 丹）

融合实验

实验二 细胞分离

【实验目的】

根据实验要求，从混合细胞悬液中获得尽可能多的满足实验要求的活细胞；并能够通过分析混合细胞悬液之活率、特点等，选择适当的细胞分离方法。

【实验原理】

1. 细胞根据生存状态可分为死细胞与活细胞两种。通常认为细胞膜丧失完整性，细胞即可被认为已经死亡。台盼蓝 (Trypan Blue) 是检测细胞膜完整性最常用的生物染色试剂。活细胞能够排斥台盼蓝，死亡细胞，其细胞膜的完整性丧失，通透性增加，细胞可被台盼蓝染成蓝色。依据此原理，细胞经台盼蓝染色后，显微镜下计数或拍照后计数，可以精确地计算出细胞存活率。

2. 细胞根据来源不同可分为上皮细胞、间质细胞、血细胞等；相同来源的细胞如血细胞又可分为红细胞、粒细胞、单核细胞等。从外周血、骨髓、外周淋巴器官或各种组织分离出来的细胞是多种细胞的混合物，如要研究某种特定细胞的结构、功能或表面标志等特征，首先要分离纯化细胞。密度梯度沉降法是根据细胞密度差异，借助细胞分离液和离心，进行细胞分离纯化的常用方法之一。

细胞分离液是一类能产生一定密度的密度梯度，高密度时粘度不高，浓度不同时渗透压变化不大，经洗涤去除后能用于体外培养，而对细胞没有毒性的细胞分离介质。以分离血细胞为例，最常用的细胞分离液有 Ficoll 和 Percoll。

Ficoll 是蔗糖的多聚体，呈中性，吸水性强，分子量为 400 000，当密度为 1.2g/ml 仍未超出正常生理性渗透压，也不穿过生物膜。红细胞、粒细胞比重大，离心后沉于管底；淋巴细胞和单核细胞的比重小于或等于分层液比重，离心后漂浮于分层液的液面上。红细胞和粒细胞密度大于分层液，因红细胞遇到 Ficoll 而凝集成串钱状而沉积于管底。血小板则因密度小而悬浮于血浆中，唯有与分层液密度相当的单个核细胞密集在血浆层和分层液的界面中，呈白膜状，吸取该层细胞经洗涤离心重悬。本法分离单个核细胞纯度可达 95%，淋巴细胞约占 90%~95%，细胞获得率可达 80% 以上，其高低与室温有关，超过 25℃ 时会影响细胞获得率。Percoll 是一种经聚乙烯吡咯烷酮 (pvp) 处理的硅胶颗粒，对细胞无毒性。利用 Percoll 液经高速离心后形成一个连续密度梯度的原理，将密度不等的细胞分离纯化。用 Percoll 原液 (密度 1.135) 与约等量双离子强度的磷酸缓冲液均匀混合，高速离心后，使分层液形成一个从管底到液面密度逐渐递减的连续密度梯度，再将已制备的单个核细胞悬液轻轻叠加在液面上，低速离心后，便得到四个细胞层。表层为死细胞残片和血小板，底层为粒细胞和红细胞，中间有两层，上层富含单个核细胞 (75%)，下层富含淋巴细胞 (98%)。

3. 细胞根据表面所表达的特殊表面标志物如 CD3、CD4 等而分为 CD3⁺、CD4⁺ 的细胞。流式细胞仪在分选过程中，包在鞘液内的细胞通过高频振荡控制的喷嘴，形成包含单个细胞的液滴，在激光束的照射下，这些细胞发出荧光，经探测器检测，转换为电信号，送入计算机处理，计算机根据选定的某个参数由逻辑电路判明是否将被分选，而后由充电电路对选定的细胞液滴充电，带电液滴携带细胞通过静电场而发生偏转，落入收集器中，输出统计结果。利用免疫学中的抗体技术和细胞筛选中的流式细胞仪技术的结合应用而达到特异性分离 CD3⁺、CD4⁺ 等细胞的目的。这是一种更加精密的细胞分离技术，可以达到 99% 以上纯

度特异分离兴趣细胞的目的，但其操作性复杂，价格昂贵。

4. 细胞根据表面荷电、吸附能力等的差异，可通过细胞电泳、贴附、亲和层析、花环形成、补体介导杀伤溶解以及免疫磁珠分选等实现对目的细胞的分离与纯化。

【实验材料】

1. 试剂 0.25%胰蛋白酶、无菌 PBS、0.4% 台盼蓝、Ficoll、Percoll、BSA、小鼠单克隆 CD3 抗体及荧光素标记之小鼠单克隆 CD3 抗体、小鼠正常 IgG 抗体及荧光素标记之小鼠正常 IgG 抗体、荧光素标记抗小鼠二抗、无菌双蒸水。

2. 仪器/器械 流式细胞分选仪、台式冷冻离心机、各量程移液器、各量程枪头、细胞计数板、流式上样管、载玻片、巴氏吸管、10ml 刻度离心管。

3. 动物（或标本） 待分离细胞或新鲜血样本。

【实验步骤】

1. 细胞活率检测

(1) 收集细胞

贴壁细胞：先用胰蛋白酶和（或）EDTA 消化，吹打分散成单个细胞悬液；悬浮细胞：直接吹打瓶底使成细胞悬液；收集细胞悬液，用细胞稀释液适当稀释；或离心弃上清，估测细胞数量，向沉淀中适量加入细胞稀释液，吹打重悬细胞。

(2) 台盼蓝染色：吸取 100 μ l 细胞悬液到 EP 管内，加入台盼蓝染色液 100 μ l，轻轻吹打混匀，3~5 分钟（染色时间不宜过长）后滴板计数。

(3) 细胞存活率分析：吸取适量加有台盼蓝染色液的细胞悬液，滴加血细胞计数板计数。于大方格内分别计数细胞总数和蓝染细胞数。

细胞存活率 = (细胞总数 - 蓝色细胞数) / 细胞总数 \times 100%

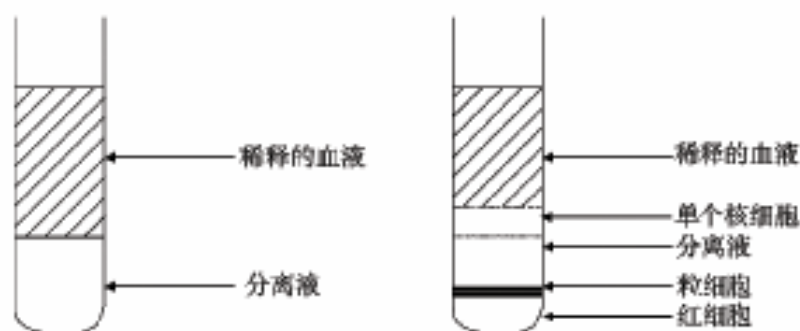
2. 血细胞分离

(1) Ficoll 分层液单次密度梯度离心分离法。

①取 1.5 ml Ficoll 分层液置试管底层；

②将 1.5 ml 肝素化全血以 Hanks 液或 PBS 液稀释至 2ml 后，轻轻叠加在分层液上面，使二者形成一个清晰的界面；

③1000rpm 水平式离心 10 分钟，离心管中会出现几个不同层次的液体和细胞带，如下图所示；



Ficoll 分层液分离血细胞成分示意图

④用巴氏吸管将分离后的细胞带分别置于不同试管中；

⑤分别吸取各试管中 1 滴细胞悬液于载玻片上，显微镜下观察细胞形态，并记录细胞分离情况；

⑥按照细胞活率检测方法，检测各试管中细胞活率。

(2) Percoll 分层液连续密度梯度离心分离法。

①取 1.5 ml Percoll 原液（密度 1.135）置于试管底层；

②加入 1.5 ml 双离子强度的磷酸缓冲液并均匀混合；

③高速离心后，使分层液形成一个从管底到液面密度逐渐递减的连续密度梯度；

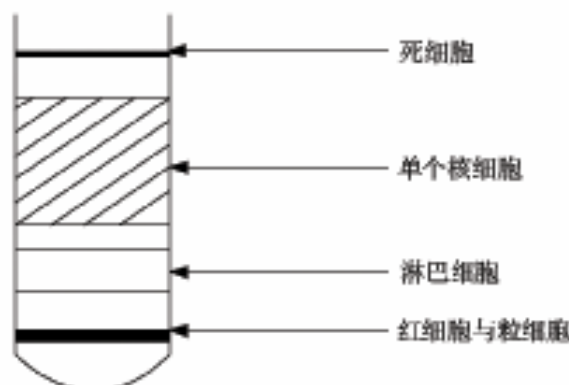
④将已制备的 2ml 血细胞悬液轻轻叠加在液面上，低速离心；

⑤离心后获得四个细胞层。表层为死细胞残片和血小板，底层为粒细胞和红细胞，中间有两层，上层富含单个核细胞（75%），下层富含淋巴细胞（98%），如下图所示；

⑥用巴氏吸管将分离后的细胞带分别置于不同试管中；

⑦分别吸取各试管中 1 滴细胞悬液于载玻片上，显微镜下观察细胞形态，并记录细胞分离情况；

⑧按照细胞活率检测方法，检测各试管中细胞活率。



Percoll 分层液分离血细胞成分示意图

3. 流式细胞仪细胞分选：

(1) 利用荧光素直标抗体进行流式细胞仪细胞分选 CD3⁺ 细胞

①收集细胞悬液，离心弃上清，3%BSA 的 PBS 溶液重悬，重复操作一次后细胞计数；

②检测细胞活率，将活率大于 95% 的细胞悬液 1000r/min 离心 5 分钟；

③用预冷的含 3%BSA 的 PBS 溶液将细胞重悬至 1×10^7 细胞/ml；

④分别转移 100 μ l 细胞悬液至两个流式管中；

⑤分别向两个流式管中加入鼠源荧光素标记的 CD3 单克隆抗体及鼠源正常 IgG 对照抗体至 0.1 μ g/ml；

⑥室温避光孵育 30~60 分钟；

⑦将细胞悬液 1000rpm 离心 5 分钟，预冷的 PBS 重悬，重复操作 3 次，洗去未与细胞结合的荧光抗体；

⑧将细胞置于冰浴中保存，直至流式细胞仪分选。

(2) 利用荧光素间接抗体进行流式细胞仪细胞分选 CD3⁺ 细胞

①收集细胞悬液，离心弃上清，3%BSA 的 PBS 溶液重悬，重复操作一次后细胞计数；

- ②检测细胞活率，将活率大于95%的细胞悬液1000rpm离心5分钟；
- ③用预冷的含3%BSA的PBS溶液将细胞重悬至 1×10^7 细胞/ml；
- ④分别转移100 μ l细胞悬液至两个流式管中；
- ⑤分别向两个流式管中加入鼠源CD3单克隆抗体及鼠源正常IgG对照抗体至0.1 μ g/ml；
- ⑥室温孵育30~60分钟；
- ⑦将细胞悬液1000r/min离心5分钟，预冷的PBS重悬，重复操作3次，洗去未与细胞结合的抗体；
- ⑧用100 μ l预冷的含3%BSA的PBS溶液稀释荧光素标记的抗小鼠二抗至适当浓度，重悬第7步离心所获得的细胞；
- ⑨室温避光孵育30分钟；
- ⑩将细胞悬液1000r/min离心5分钟，预冷的PBS重悬，重复操作3次，洗去未与细胞结合的荧光抗体；
- ⑪将细胞置于冰浴中保存，直至流式细胞仪分选。

【分析与思考】

利用本实验所学，设计如何从血液中分离出CD4⁺活细胞？

【注意事项】

1. 如果分选之后的细胞要求继续培养，在操作过程中严格控制无菌操作；
2. 细胞密度梯度离心分离细胞时应避免振荡及摇动；
3. 流式细胞仪分选细胞时需注意荧光抗体避光孵育；
4. 贴壁细胞进行流式细胞仪分选时，胰酶消化处理后，如有较多细胞聚团，需400目筛网过滤，以免堵塞流式细胞仪。

(杨 华)

