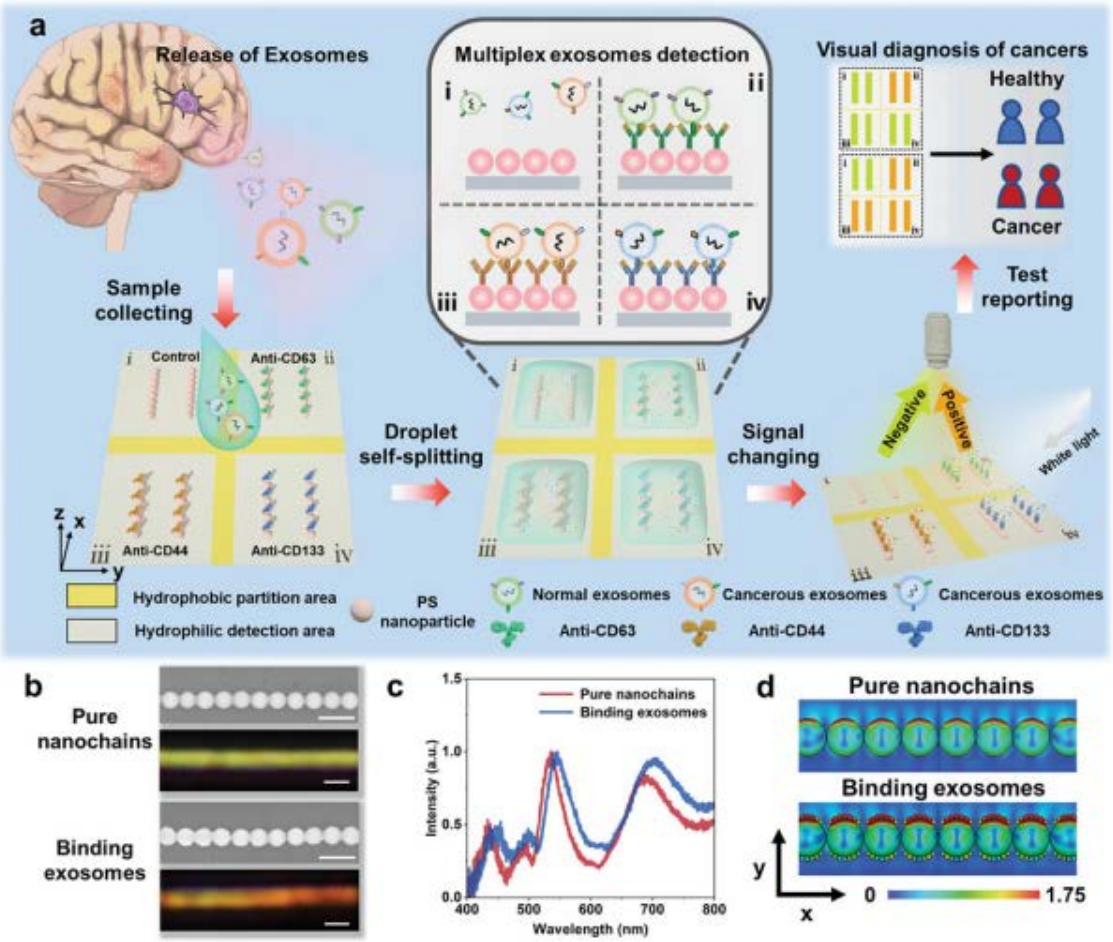
内部学术参考资料汇编
实验技术 · 仪器设备 · 科技前沿

蜂巢

第6期
2023 12月



印刷分区光学生物芯片进行多种外泌体的同时可视化检测
(Adv Mater. doi: 10.1002/adma.202304935.)

上海中医药大学科技实验中心编制

服务内容与形式

蜂巢
2023/12

委托检测

仪器共享

项目合作

技术培训

科研咨询

上海中医药大学科学技术实验中心
Shanghai University of T.C.M. Experiment Center for Science and Technology

平台管理

平台建设

实验教学

人才培养

技术研发

目录

蜂巢
2023/12

- 公共平台动态
  - 科技实验中心全链条技术服务 · · ·

蜂巢
2023/12

科技实验中心全链条技术服务

为了满足科研项目需求，进一步提升公共平台技术服务能力，最大发挥实验技术人员与仪器设备效能，科技实验中心突破内部科室界限，以项目需求为导向，建立13条技术链条。具体服务内容与服务流程，请向相关联系人咨询。

序号	服务名称	服务内容分项	联系人	联系方式
1	中药新药（药学）研究系列服务	中药新药注册法规技术咨询	刘新华	51322390
		中药复方剂型设计与实施	刘新华	51322390
		古代经典名方的研究与注册申报	刘新华	51322390
		中药新药制剂工艺研究	刘新华	51322390
		中药新药质量标准研究	刘新华	51322390
		中药新药稳定性考察	刘新华	51322390
		中药新药（药学）注册申报资料	刘新华	51322390
2	新药研发类药效评价服务	项目设计与整体规划	杨扬	51322263
		动物模型制备	吴文斌	51322649
		动物模型制备评价	杨扬	51322263
		药效评价	杨扬	51322263
		细胞水平药效评价	张幸	51322438
3	药理评价	分子水平病理评价	杨扬	51322263
		亚细胞水平病理评价(透射电镜)	袁琳	51322374
		亚细胞水平病理评价(扫描电镜)	陆敏	51322374
		细胞/组织水平病理评价	王凯	51322379
		细胞与分子水平综合评价	杨扬	51322263
		动物整体评价	朱娴丹	51322609
4	药物靶点蛋白质组学	1，细胞培养；2，样本制备；3，数据采集和数据分析；4，靶点验证	任艳	51322930
5	高通量定量蛋白质组学和代谢组学分析	1，蛋白质组学和代谢组学样本制备；2，蛋白质组学标记定量和非标DIA定量；3，高深度非靶代谢组学定量；4，靶向蛋白质组学和代谢组学定量；5，特殊样本蛋白质组学分析：单细胞蛋白质组学、空间蛋白质组学、体液蛋白质组学等；6，气质连用代谢组学定量；	任艳	51322930
6	中药复方药效物质解析	1. 体内外成分定性分析；2. 体内外成分定量分析；3. 药代动力学研究；4. 代谢组学研究；5. 网络药理学；6. 药效-药动关联性分析	石荣	13564142499
7	实验动物平台设施共建	实验动物设施设计、建设、取证	张超超	51322740
		实验动物平台委托管理与人员培训设施共建	张超超	51322740
8	血管及内皮细胞功能研究	血管内皮细胞损伤动物模型建立及功能、指标检测	可燕	51322539
		离体血管功能检测	可燕	51322539
		血管内皮细胞培养体系	可燕	51322539
		血管内皮细胞过程	可燕	51322539
9	哺乳动物来源细胞的流式分选分析	组织取材，单细胞制备，细胞染色，流式分选和分析	张幸	51322438
10	中药活性成分抗关节炎、肠炎的作用	中药对大小鼠关节炎、肠炎的药效评价、细胞学评价	马骏	51322437
11	单细胞的分选与稳转株构建	细胞质粒转染、培养，构建稳转株，流式分选	张幸	51322438
12	基于免疫细胞中药活性成分的筛选	小鼠脾脏或者人来源PBMC分离T、B细胞，诱导分化，加入中药活性成分进行评价	张幸	51322438
13	中药活性成分抗食物过敏的筛选	中药对小鼠食物过敏的药效评价、细胞学评价	王晓宇	51322438

蜂巢
2023/12

动脉粥样硬化模型—B6J-Apoe KO小鼠

医学实验动物室/内容来自赛业生物订阅号

动脉粥样硬化是一种慢性免疫代谢炎症性疾病，小鼠成为研究动脉粥样硬化的主要动物模型是从1990年代开始，目前常用的动脉粥样硬化小鼠模型为ApoE敲除（约占研究70%）和LDLR敲除（约占27%）。

1 疾病的关键靶点ApoE

载脂蛋白E（Apolipoprotein E, ApoE ）基因编码的脂质颗粒相关多态性载体蛋白是血浆脂蛋白的核心成分，参与脂蛋白的产生、转运和清除。ApoE蛋白与乳糜微粒、乳糜微粒残留物、高密度脂蛋白（HDL）、极低密度脂蛋白（VLDL）和中等密度脂蛋白（IDL）等相关，尤其显示出与高密度脂蛋白（HDL）的优先结合。

ApoE是体内最重要的脂质转运蛋白，对脂质代谢影响极大。它与低密度脂蛋白受体（LDLR）的相互作用对于富含甘油三酯的脂蛋白的正常加工（分解代谢）至关重要[2]。在外周组织中， ApoE蛋白主要由肝脏和巨噬细胞产生，并介导胆固醇代谢；在中枢神经系统中，则主要由星形胶质细胞产生，是大脑中主要的胆固醇载体，是胆固醇从星形胶质细胞运输到神经元所必需的[1-4]。此外， ApoE蛋白通过与活化的C1q形成复合物，成为经典补体途径的检查点抑制剂靶点[5]。

ApoE基因的多态性与阿尔茨海默病和脂质堆积、高脂血症、动脉粥样硬化和高胆固醇血症等多种心血管疾病及风险有关。

2 ApoE基因敲除模型构建

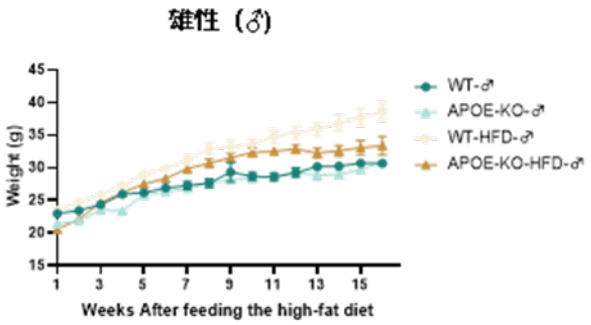
本品系B6J- ApoE KO（产品编号：C001507）为ApoE蛋白缺失小鼠模型，利用基因编辑技术敲除ApoE基因在小鼠体内的同源基因Apoe。该小鼠体内ApoE蛋白合成受阻，导致胆固醇水平升高，并自发形成动脉粥样硬化，使用高脂饮食（HFD）喂养的小鼠胆固醇水平升高程度进一步加剧。

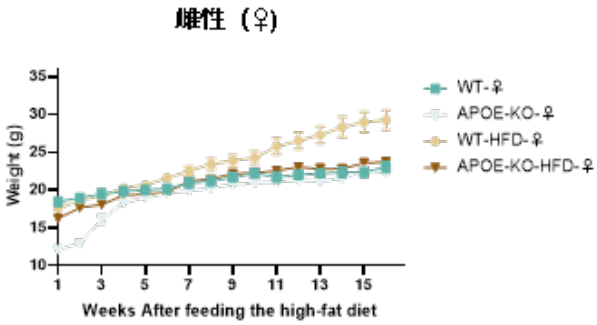
纯合的B6J- ApoE KO小鼠可存活，正常饮食可自发形成动脉粥样硬化斑块，症状较轻；而高脂饲料饲喂诱导的主动脉粥样硬化加剧，症状更重。该模型可用于高胆固醇血症、动脉粥样硬化和阿尔茨海默病等疾病领域的研究。

3 B6J-ApoE KO模型验证数据

3.1 生长曲线

结果显示，B6J-ApoE KO小鼠在正常饮食和高脂饮食条件下生长情况大致相同。高脂喂养的野生型小鼠体重有所上升，内部检测数据显示在20周后，野生型小鼠心脏主动脉弓和主动脉血管均正常，无动脉粥样硬块产生。





3.2 雄性小鼠血脂生化指标

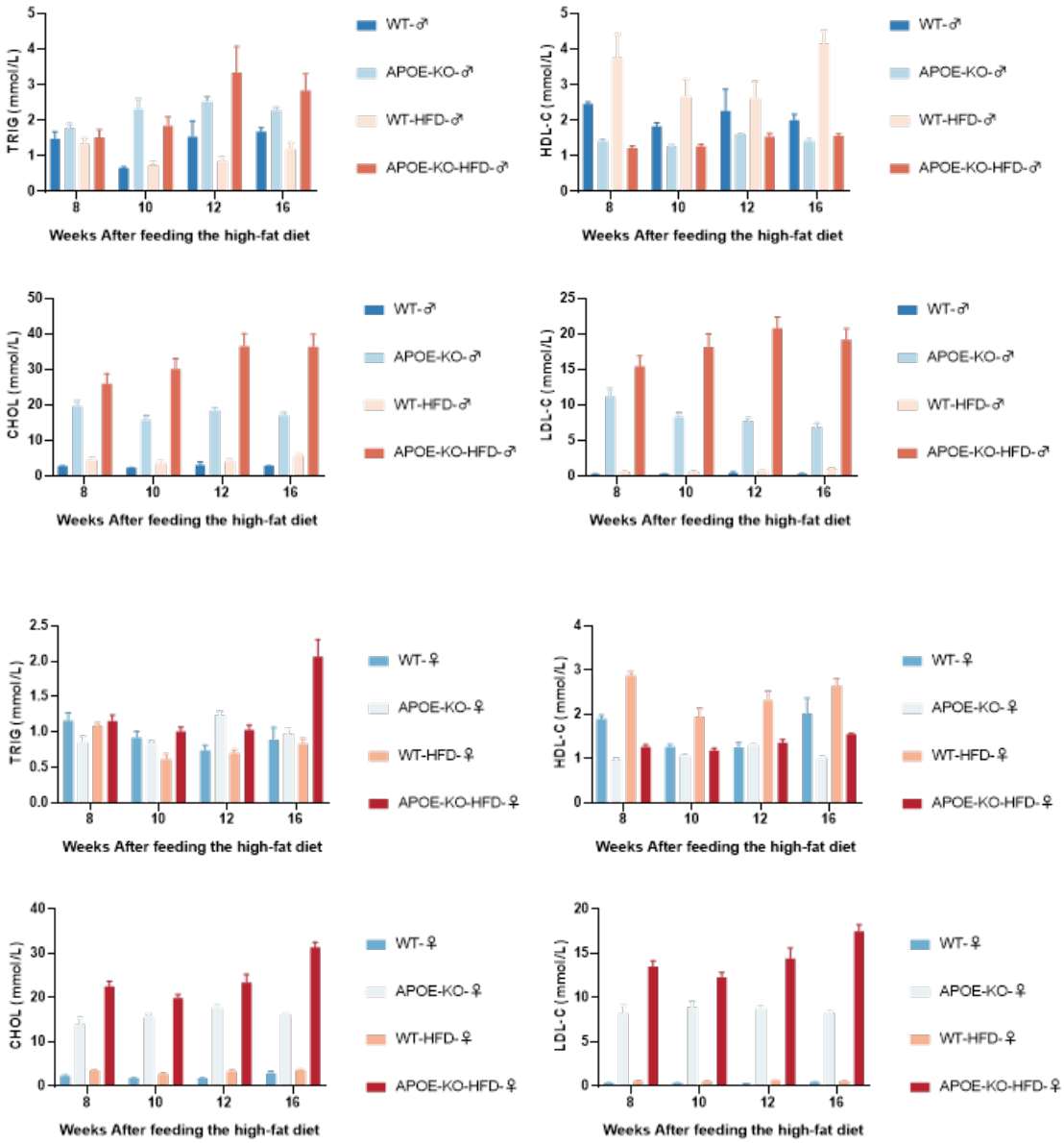
数据显示在正常饮食条件下，与野生型小鼠相比，雄性B6J-ApoE KO小鼠体内甘油三酯（TRIG）、胆固醇（CHOL）和低密度脂蛋白（LDL-C）水平有不同程度升高。高脂饮食进一步提升雄性B6J-ApoE KO小鼠体内以上指标的水平。而雄性B6J-ApoE KO小鼠和野生型（WT）小鼠体内的高密度脂蛋白（HDL-C）水平没有明显差异。

3.3 雌性小鼠血脂生化指标

在正常饮食条件下，与野生型小鼠相比，雌性B6J-ApoE KO小鼠的胆固醇（CHOL）和低密度脂蛋白（LDL-C）水平显著升高。高脂饮食会进一步提升雌性B6J-ApoE KO小鼠体内胆固醇（CHOL）和低密度脂蛋白（LDL-C）水平。而雌性B6J-ApoE KO小鼠和野生型（WT）小鼠体内的高密度脂蛋白（HDL-C）和甘油三酯（TRIG）水平没有明显差异。

3.4 雄性B6J-ApoE KO小鼠主动脉病理

雄性B6J-ApoE KO小鼠在正常饮食10周后可自发形成动脉粥样硬化斑块，症状较轻。在高脂饲料饲喂诱导后，主动脉粥样硬化加剧，在喂养第12周后表现越发明显，第14周症状持续加重并在第16周达中晚期病理表型。



3.5 雌性B6J-ApoE KO小鼠主动脉病理

雌性B6J-ApoE KO小鼠在正常饮食12周后可自发形成动脉粥样硬化斑块，其症状较轻。在高脂饲料饲喂诱导后，其主动脉粥样硬化加剧，在喂养第14周后表现越发明显并在第16周时持续加重。

4 代谢和心血管疾病模型推荐

前面提到，目前动脉粥样硬化模型以Apoe和Ldlr敲除为主，除B6J-ApoE KO外，赛业生物还构建了Ldlr KO (em)小鼠用于动脉粥样硬化及高胆固醇血症等疾病研究。同时，我们还可提供B6-ob/ob(Lep KO)、Uox-KO (Prolonged)、Atp7b KO、Foxj1 KO等多类型代谢相关基因编辑模型，助力新药研发。

参考文献

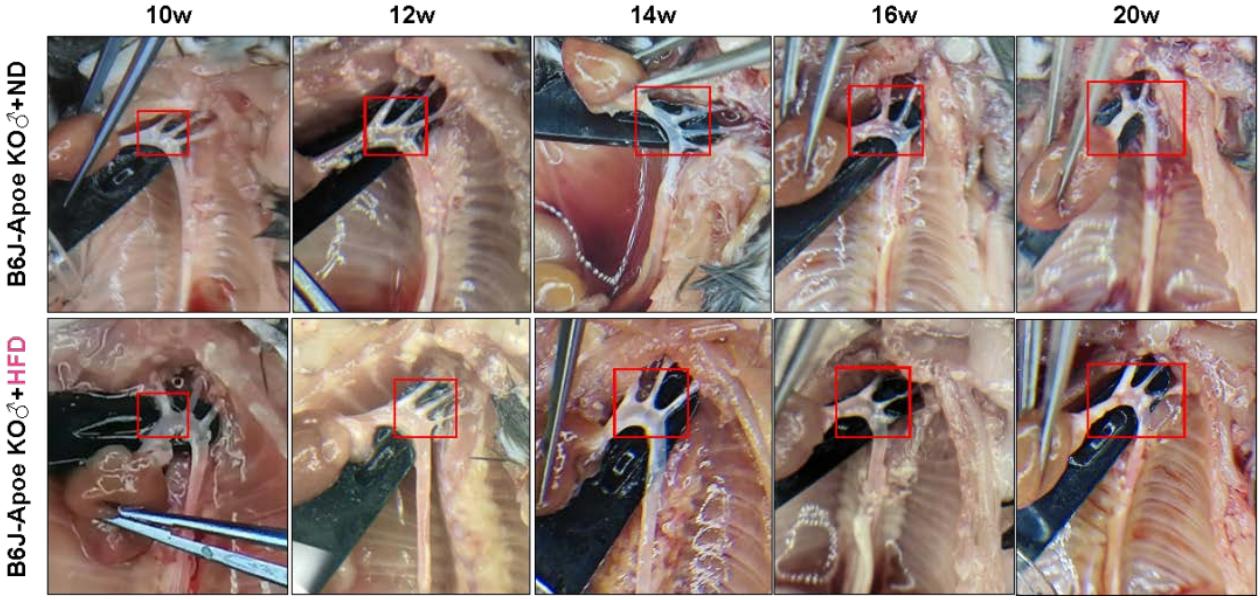
[1]Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. Neurobiol Dis. 2014 Dec;72 Pt A:3-12.

[2]Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. J Lipid Res. 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S183-8.

[3]Wang H, Kulas JA, Wang C, Holtzman DM, Ferris HA, Hansen SB. Regulation of beta-amyloid production in neurons by astrocyte-derived cholesterol. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Aug17;118(33):e2102191118.

[4]Serrano-Pozo A, Das S, Hyman BT. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. Lancet Neurol. 2021 Jan;20(1):68-80.

[5]Yin C, Ackermann S, Ma Z, Mohanta SK, Zhang C, Li Y, Nietzsche S, Westermann M, Peng L, Hu D, Bontha SV, Srikakulapu P, Beer M, Megens RTA, Steffens S, Hildner M, Halder LD, Eckstein HH, Pelisek J, Herms J, Roeber S, Arzberger T, Borodovsky A, Habenicht L, Binder CJ, Weber C, Zipfel PF, Skerka C, Habenicht AJR. ApoE attenuates unresolvable inflammation by complex formation with activated C1q. Nat Med. 2019 Mar;25(3):496-506.



蜂巢
2023/12

通过成像流式量化评价NF-κb信号的技术

分子生物与药理实验室/杨扬

1 NF-κb信号通路

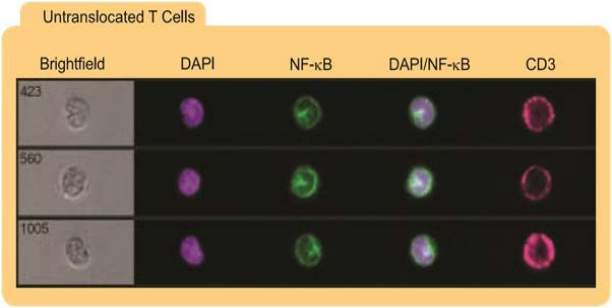
NF-κb 信号通路主要涉及机体防御反应、组织损伤和应激、细胞分化和调亡以及肿瘤生长抑制过程的信息传递。 NF-κb/Rel转录因子家族包含几种结构相关的蛋白（p65/p105,p52/p100,RelA(p65),c-Rel/ NF-κB)形成同源和/或异源二聚体。该转录因子家族成员调控超过150种目的基因，包括炎症细胞因子、趋化因子、免疫受体、细胞粘附分子等的表达。正因为如此，NF-κb被认为是“免疫应答的中心调节物”。作为二聚体，这些转录因子与DNA序列结合（这些结合位点被称为“κb位点”），从而调节目的基因的表达。在大多数细胞中，NF-κb/Rel转录复合物以未活化的形式存在于胞浆中，与抑制剂IκB结合。当细胞受到刺激后，一些列的磷酸化、泛素化反应导致Iκb降解，NF-κb转录因子进入细胞核。

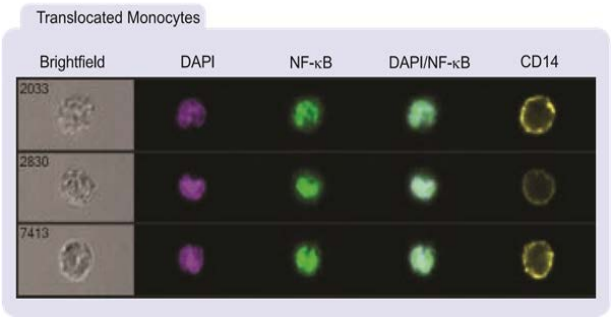
2 NF-κb信号通路的传统检测方法

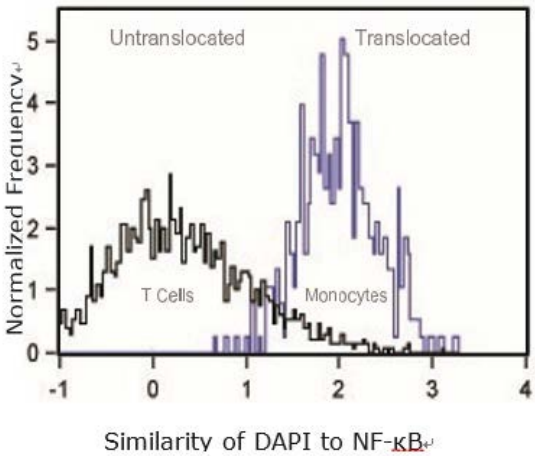
NF-κb信号通路活化或调控的检测一般都通过免疫印迹（WB）法实现。由于WB法是一种半定量的蛋白表达或修饰的检测方法，其定量客观性受到实验原理本身的限制及多种因素的影响。此外，由于NF-κb作为转录因子最终实现其生物学功能，WB法无法实现对于p65/p50与DNA结合的检测。由此，需要进一步进行凝胶迁移实验（EMSA）检测转录因子的入核情况。而上述方法步骤繁多，定量效率低，且实验成本也较高。

3 成像流式检测NF-κb信号通路

成像流式技术不仅可通过荧光强度对NF-κb的修饰水平进行量化分析，并且在荧光标记细胞核的条件下，通过对细胞成像结果的共定位分析判断及定量NF-κb的入核情况。更具意义的是，流式细胞检测均在细胞水平，可以细胞为单位进行信号通路活化的评价，而106-108的高通量检测则进一步增加了该技术的量化评价优势。而样本制备同常规流式（胞内）荧光染色无异，步骤简便，所需的实验时间也较WB或EMSA方法大幅缩减。因此，通过成像流式细胞技术可高效、高通量、高质量的量化检测细胞水平的NF-κB信号通路的活化水平。







实验结果显示：脂多糖能够特异性地诱导 CD14 阳性单个核细胞中的 NF-κb 核转位（直方图蓝色部分），而并不诱导 CD3 阳性单个核细胞的 NF-κb 核转位（直方图黑色部分）

流式样本——肿瘤浸润免疫细胞分离纯化方案

病毒与免疫实验室/张幸

肿瘤浸润淋巴细胞（Tumor Infiltration Lymphocyte, TIL）是肿瘤微环境中存在的特异性杀伤淋巴细胞，主要由T细胞、B细胞和NK细胞组成。不同时期激活的TIL存在异质性，具有不同的表型。大多数TIL为CD3阳性，新分离的TIL CD25阳性比例较低，通过添加IL-2刺激后CD25阳性比例增加。在同一病变的不同细胞中，CD4或CD8的表达也呈现多样性。TIL既可作为肿瘤免疫反应的标记物，用于肿瘤进展与预后分析，也可作为过继性T细胞免疫疗法的（TIL疗法）细胞来源。

随着免疫治疗的引入，TIL和肿瘤内免疫环境的评估变得越来越重要。为了表征肿瘤内的细胞群，了解它们的相互作用和相对空间分布，必须能够同时识别多种细胞标记物。目前关于TIL检测的方法主要有两类：基于显微镜成像的技术（如多重免疫荧光组织学）和基于非成像的技术，如多色流式、飞行时间质谱仪（CyTOF）。今天我着重想给大家讲解的是TIL的流式细胞术分析，这也是我们日常实验室中比较容易进行的操作。

1 消化

1.1 剥离肿瘤，转移至1.5mLEP管中，手持弯剪将肿瘤剪碎，剪碎肿瘤的标准:可被1mL的枪头自由吸取；

1.2 将肿瘤组织悬液转移到含有消化酶的离心管中，摇床上以160r/min、37C的条件消化1小时；

1.3 消化完毕后，700g，7min离心，弃上清，4mL重悬沉淀则为肿瘤细胞悬液。

2 梯度离心

1.1 15 mL离心管: 4 mL 70% percoll在底部，巴氏吸管缓慢点4mL 40% percoll于70% percoll上层，再点肿瘤细胞悬液4 mL；

1.2 离心20℃，2000 rpm，30 min，升降速0；

1.3 离心结束后，先吸掉云雾层上的液体，再吸云雾层细胞至50mL离心管，加PBS到40mL并充分颠倒混匀·离心4℃，700 g，5 min，弃上清后加PBS重悬获得肿瘤浸润免疫细胞。

3 流式细胞术分析

取出N等分细胞样品（1 × 106个细胞），各自转移到N个不同1 mL离心管中并标记。加入100 μL含抗体的FACS缓冲液（PBS、0.5%BSA、0.02%NaN3）重悬细胞，室温避光孵育20-40 min。孵育结束后，以1 mL冰冷FACS缓冲液洗涤细胞两次。弃上清液，以0.5 mL FACS缓冲液重悬细胞，进行流式细胞仪检测。

注：为避免仪器堵塞，上样时应尽量使用低流速进行分析，并且每个样品分析结束后，可用去离子水清洗30 s后进下一个样。

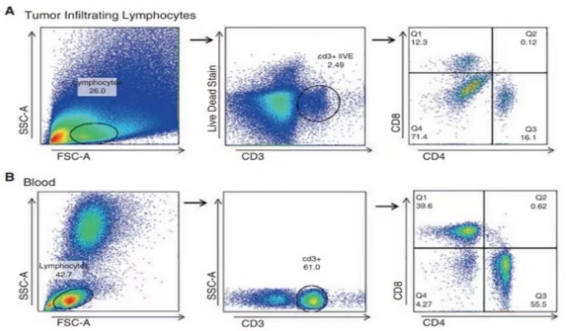
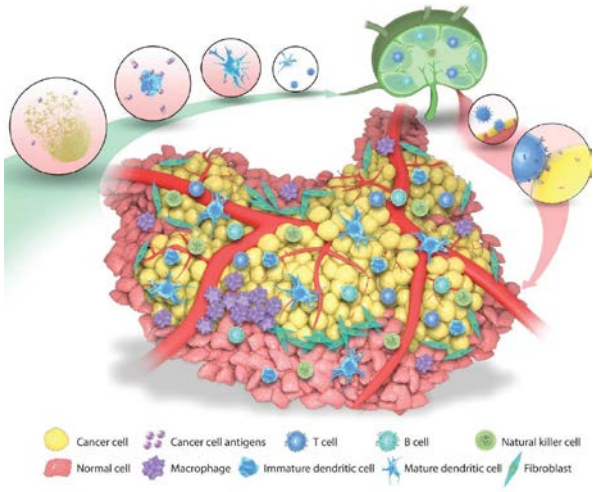


图11 TIL和血样分析画门策略[6]

图注：TIL进行流式分析至少需要进行Live/Dead、CD3、CD4以及CD8染色。SSC -FSC图用于排除非淋巴细胞群体，随后选取$CD3^+$活细胞进行分析。CD4和CD8用于区分$CD4^+$ T和$CD8^+$ T细胞，并排除双阴性或者双阳性自发荧光细胞。对于全血的分析也是类似的画门，但很多情况下不需要Live/Dead染色。



Ren X, et al. 2021 Annu Rev Immunol 39:583–609

小鼠肝窦内皮细胞窗孔的扫描电镜观察

细胞生物与组织病理学实验室/陆敏

肝窦内皮细胞（LSECs）薄而扁平，内衬于肝窦，是构成肝窦壁的主要细胞之一。上世纪70年代科学家们采用化学固定（戊二醛或锇酸）和冷冻蚀刻制样技术，利用电镜发现LSECs细胞质不连续，有很多通过膜结合形成的圆形的细胞质孔——窗孔，丛生聚集的窗孔组成筛板结构。在LSECs下没有连续的基底膜，因此血液中的液体、溶质以及窗孔大小的颗粒物质可以通过LSEC上的窗孔自由地从肝窦腔进入Disse间隙（窦周间隙），流到肝实质细胞的表面，实现血液与肝细胞之间的物质运输和交换，在血液和肝脏实质细胞之间起着筛选屏障的作用 。窗孔作为肝窦内皮重要的形态结构，在脂质代谢、药物代谢和免疫调节中发挥着重要作用，窗孔的异常与多种肝脏疾病，例如脂肪肝、肝纤维化等密切相关。借助于扫描电镜技术观察肝窦内皮窗孔大小以及数量方面的改变，是反映肝脏病变的重要的形态学指标之一。本文详细描述小鼠肝组织取材、制样的过程，采用扫描电镜对肝窦内皮细胞窗孔形态进行观察，并对肝窦内皮细胞窗孔的直径、密度、孔隙率进行了初步的统计分析，以期能为肝脏疾病的研究提供更多形态上的依据。

1 材料与方法

1.1 动物

C57BL/6J小鼠，8周龄，雄性，体重约18g。

1.2 方法

小鼠以乌拉坦麻醉，打开腹腔暴露肝脏。从肝门静脉进针，通过HL-1S恒流泵，以8-10ml/min流速，灌注生理盐水，约2min后剪开下腔静脉，作为放血引流处，待肝脏内血液充分灌洗干净（约5min）后，以2.5%戊二醛固定液代替生理盐水，继续灌流，此时肝的颜色从深红棕色变为浅棕色，稠度由软变硬，15min后结束灌注。取下肝脏，在固定液中用吉利双面刀片在肝脏左外叶(最大叶)上切下约1mm厚的薄片（图1），修成3mm（长）×3mm（宽）×1mm（高）小块，浸泡于2.5%戊二醛固定液中，4℃保存，备用。

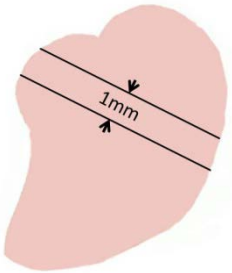


图1 小鼠肝脏左外叶取材部位示意图

将上述肝组织薄片，在2.5%戊二醛中4℃固定3h以上，以0.1M PBS（pH 7.2）清洗3次，15min/次，然后用1%锇酸进行后固定（0.2 M PBS 1:1配置），4℃，2h，再用PBS清洗3次，15min/次，乙醇梯度脱水：30%→50%→70%→90%乙醇各1次，无水乙醇2次，每次15min，4℃。脱水后的样品放入Leica全自动临界点干燥仪中干燥。用导电胶将干燥后的样品固定在样品托上，在Leica高真空镀膜仪中喷金，镀膜厚度为21nm，之后用Quanta 250 FEG场发射扫描电镜观察肝窦内皮窗孔形态并拍照，加速电压为10kV。拍摄10张肝窦图片（放大倍率为40000倍），采用ImageJ图像分析软件测量窗孔孔径大小及孔隙率，密度为手动计数。

2 实验结果

低倍镜下小鼠肝脏表面结构，血管周围略呈放射状排列着的是由肝细胞构成的肝索，肝索之间为肝窦（图2，a）。肝窦腔中偶见残留的血细胞，肝窦内皮层相对的凹凸不平，其上具有窗孔结构，有的簇状排列形成筛板，有的单独存在，肝窦内皮与肝细胞之间为Disse间隙，肝细胞表面有大量的微绒毛伸向Disse间隙（图2，b-c）。在高倍率下小鼠肝窦内皮窗孔清晰可见（图2，d），通过ImageJ图像分析软件测得小鼠肝窦内皮窗孔孔径为109.3±27.7 nm（n=1000），孔隙率为8.9±1.5（%）（n=10），手动计数密度为18.0±5.5个/μm2（n=60）。

3 讨论

窗孔是LSEC 重要的形态结构，据报道，鱼类、鸟类以及哺乳类动肝脏的肝窦内皮上都存在窗孔，在不同种属的动物中其窗孔的直径和数量是不一样的，兔子的窗孔直径为59.4±4.8nm，密度为17.3±3.8个/μm2，人的窗孔直径在 50-300nm，密度为15-25个/μm2，大鼠的窗孔直径为98.0±13.0nm，密度为20.0±6.3个/μm2，而小鼠的窗孔直径与密度与大鼠基本相似（直径：99.0±18.0nm，密度：14.0±5.0个/μm2）。本实验中在扫描电镜下测得小鼠肝窦内皮细胞的窗孔为109.3±27.7nm，密度为18.0±5.5个/μm2，与文献报道基本相符，存在的差异可能是选取的样本数量过少引起。窗孔在体内会受到许多因素的影响，据报道，酒精、压力、CCl4、缺氧、辐照、内毒素、血清素和去甲肾上腺素等均会使窗孔的直径和数量发生改变。

肝窦内皮细胞具有窗孔、缺乏基底膜，并具有高内吞能力，使它们成为体内独一无二的结构。在各种病理因素作用下，LSEC出现去窗孔化（窗孔数量减少，直径变小甚至消失）和基底膜，

呈现肝窦毛细血管化，就会影响脂蛋白和脂质等各种物质在肝脏的摄取，伴随着LSEC内吞能力的减弱，可导致严重的高脂蛋白血症和肝脏脂肪变性，最终发展成为肝纤维化。王炳元以及常冰等人报道，采用乙醇对大鼠进行灌胃造成酒精性肝损伤模型，在电镜下观察LSEC的变化，发现随着乙醇的慢性刺激，LSEC的去窗孔化和基底膜的形成也逐渐发生，而去窗孔化则要先于基底膜的形成，表明肝窦窗孔大小和数量的改变可能是肝窦毛细血管化和肝纤维化最早出现的形态学改变之一。

阳金等人用脂多糖（LPS）刺激体外培养的LSEC，在扫描电镜下观察LSEC窗孔数目和孔径的变化，发现丹参多糖大大改善了LPS引起的LSEC窗孔数量和孔径的减少。随着对LSEC研究的深入，针对LSEC结构和功能的研究将会成为干预肝脏疾病研究的又一个新的热点，而扫描电镜在观察肝窦内皮窗孔大小和数量的变化上具有更为直观的优点，也必定会成为助力肝脏疾病研究的有力技术手段。

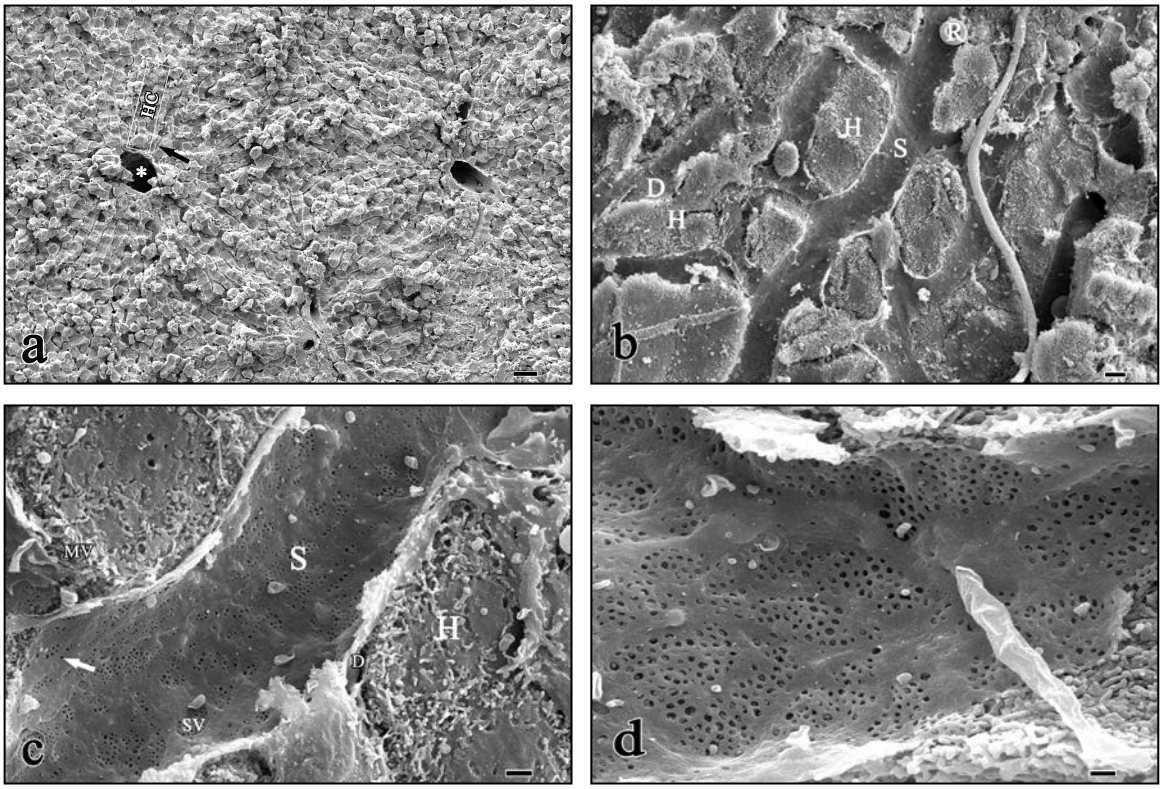


图2 小鼠肝窦结构

a. 低倍镜下小鼠肝脏表面结构，矩形框中为呈放射状排列的肝索。白色星号：血管；HC：肝细胞构成的肝索；黑色箭头：肝索之间的肝窦，bar=30μm。b. 放大后的肝脏表面结构，S：肝窦；H：肝细胞；D：在肝窦内皮与肝细胞之间的Disse间隙；R：肝窦腔中残留的红细胞，bar=3μm。c. 肝窦内皮上的窗孔结构，SV：筛板；MV：肝细胞表面的微绒毛；白色箭头：单独存在的窗孔，bar=1μm。d. 肝窦内皮上的窗口，bar=0.4μm。

小鼠尾静脉注射的方法，要点和注意事项

医学实验动物室/吴文斌

1 小鼠尾静脉注射

做实验的人员都很担心尾静脉注射给药，无论是小鼠，还是大鼠，尾静脉注射是不容易的事，需要手感、需要练习、需要耐心，实验时，多次打不进去，还会产生一种崩溃的心情。要想掌握它只有多打、勤练，找“感觉”，那所谓的感觉是什么呢？

我们先来说说小鼠，打尾静脉首先要保证三点：一是动物的固定一定要牢固，二是鼠尾血管的充盈程度，三是针入血管的位置、深浅和去向问题。对于新手和不熟练的人员，第一点和第二点可通过小鼠固定器和其他实验人员的帮忙来达成，助手帮忙按压固定器起到稳定的作用，同时可以捏住小鼠尾根部来达到血管充盈固定尾巴的目的（避免注射器刺破尾部皮肤时因疼痛甩尾而造成注射失败）。第三点小鼠的静脉非常表浅，注射时几乎无角度，刺破表皮后针头向前送很顺畅无阻塞感。

小鼠尾静脉注射难度会因为体重，品系，血管充盈等有关。同等体重的情况下 小白鼠优于裸鼠，裸鼠优于小黑鼠。对于多次注射或者是C57品系的小鼠可以借助可视化尾静脉注射器来辅助。此仪器使用特殊的黄光照射鼠尾，使鼠尾的血管显现出来，在可视的情况下使针尖的刺入做到有的放矢，不再是单凭手感的盲打，针是否进入血管，甚至可以轻微摆动针头看血管是否跟着动就知道针是否在血管中，不再追求那种针进血管中的落空感。

2 可视化小鼠尾静脉注射使用方法

①通电源：将电源适配器分别连接电源和仪器上，接通后主机面板处有绿色指示灯亮。

②连接鼠尾透视灯：将L型鼠尾托板上的灯线插头插在主机箱相应的插座上，按动右侧面上的黄色按钮，黄色灯亮起。

3 装鼠

①快装鼠筒可盛装17-40g的小鼠，是后拉尾式装鼠方式，小鼠被拉入筒后，可用前堵头将其堵在里面，固定位置应以动物不能自由活动但又不影响动物肺部扩张，能正常呼吸为准。

②装好鼠的筒放置于主机上面板的滑槽上，鼠筒应侧放（因静脉血管在鼠尾的两侧），定位销进入定位孔，鼠尾通过开口的档板，将其放置在鼠尾挤压板下板的沟槽里，按动右侧面的黄色按钮，黄色灯亮，观察鼠尾血管是否摆正，用酒精棉擦拭，让鼠尾血管充盈，使血管达到最清楚（如果酒精棉擦拭后血管仍然不明显，可以调转鼠筒的方向观察对侧的血管）。

③注射位置的调整：不管使用多大的小鼠均应从鼠尾部的下1／3处进针，这样逐渐从下向上打可避开打过的针眼出现漏液现象。因使用动物的品系、大小不同，尾长度也不同，这样就需要调整注射时的位置，其方法是松开左边金属旋钮，拉动L型鼠尾托板至合适位置后旋紧即可。

④放大镜的使用：放大镜是为了能更清楚地看到尾静脉血管和针头进入的情况（一般情况下都可拆掉不用），放大镜能进行角度位置的调整，可以适合不同视角的人，放大镜支架的上螺丝松开后可以改变放大镜的角度，松开下螺丝可以改变入视角的角度，支架转动的中轴可以在装鼠时放大镜暂时离开，总之放大镜的合理设计既方便了使用又不会影响到其它操作。

⑤注射：注射使用的针头应在5号针以下，4.5或4号较为合适，（推荐使用针头较长的胰岛素针）过粗的针对血管损伤过大，用后止血困难。

4 注意事项

① 动物在被装筒捉持时会有应激反应，粪尿过多，应及时清理上板面和鼠筒内的粪便。

②药物推入静脉，推入时应缓慢，避免动物出现充血性心衰，每次注射量不超过0.2ml。注射完成后应用棉球按压针孔处半分钟以上，避免皮下出血或药液回流，影响下次注射。

③自带的固定鼠尾的按压器可以不用，如果确实需要注射的时候，要通过脚踏板把按压开关弹开后再注射。

④如果接种过皮下瘤的小鼠打尾静脉使用可视化尾静脉注射器，要注意避免在装入固定器的时候蹭破肿瘤块。

蜂巢
2023/12

常见的动物行为学实验（小鼠篇）

医学实验动物室/黄辉

1 为什么要做动物行为学实验？

通过动物行为学实验，我们可以评估小鼠的学习记忆能力、焦虑情况、抑郁情况、恐惧情况、社交情况、运动能力等。

2 有哪些类型的动物行为学实验？

学习记忆行为实验

学习是神经系统接受外界环境变化后获得新行为和经验的过程，记忆是指对学习获得的经验或行为的保持，包括获得、巩固、再现及再巩固等环节。学习记忆行为实验可用来评估小鼠的学习能力、记忆能力，可通过横向、纵向比较获得不同变量影响下或不同时期的小鼠学习记忆能力。常见的实验包括迷宫实验（Morris水迷宫、T迷宫、Y迷宫、巴恩斯迷宫等），新物体识别，条件性恐惧(fear conditioning，FC) 实验等。

情绪行为实验

情绪行为是一种瞬时变化的心理与生理现象，反映了机体对不断变化的环境所采取的适应模式。从心理学的层面来说，情绪是对客观事物的态度体验和行为反应，为人和动物所共有，主要包括抑郁、焦虑、恐惧三类行为。由于动物的情绪体验难以用语言表达，行为实验是其主要的评价方法。主要包括：旷场实验（open field）、强迫游泳（forced swimming）、悬尾实验、糖水偏好实验、高架十字迷宫、旷场实验等。

运动行为实验

运动行为实验可用于评估小鼠的自发活动情况、运动协调能力、平衡能力、耐力等。常见的实验方法包括旷场实验（open field test），滚轴实验(rotarod test），平衡木实验，握力实验等。

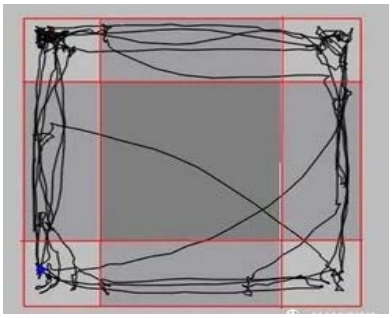
3 有哪些常用的小鼠动物行为学实验？

旷场实验（open field test）

是一个常用的动物行为学实验，可以检测小鼠自发活动行为和探索行为，是评价实验动物在新异环境中自主行为、探究行为与紧张度的一种方法。

实验在安静的环境下进行。将动物放入箱内底面中心，同时进行摄像和计时。观察一定时间后停止摄像，观察时间可根据实验拟定。一般为3-10 min。

分析数据时，将箱子底面虚拟划分为中心区域和外周区域（一般为4:12，或者1:8），通过轨迹分析小鼠进入中心区域的次数、在中心区域停留时间、运动总距离等，评估小鼠的焦虑抑郁状态、自主运动能力。



清洗方箱内壁及底面，以免上次动物余留的信息（如动物的大、小便、气味）影响下次测试结果。更换动物，继续实验。

Morris水迷宫

Morris水迷宫实验主要测定空间学习记忆能力，主要的实验内容有隐蔽站台试验、空间探索试验、反向试验和可视站台试验等。

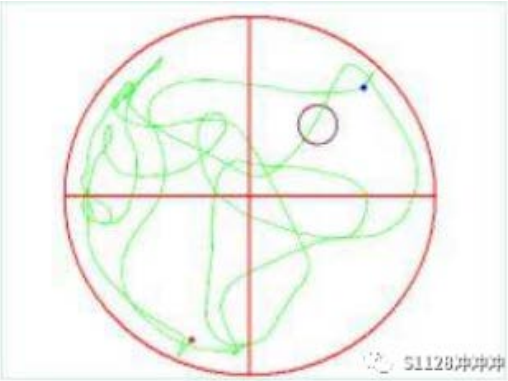
隐蔽站台实验

小鼠第一次游泳时,一般不会找到藏于水面下的不可见的站台。入水游泳60-90s以内仍未能找到水池中的站台或未能爬上站台时，实验人员可将小鼠引导置于站台上站立10-30s，使小鼠体会站在站台上的感觉，这样从第二次开始，学习成绩就能迅速提高。小鼠爬上站台后，让小鼠在站台上站立5-10s。将小鼠从站台上拿下来，休息30-60s以后再进行下一次训练。在一般情况下，正常小鼠很快就能学会以最快最佳的轨迹搜索到站台的确切位置。

每天开始时，将小鼠任意从四个象限（东北、西北、东南、西南）之一面向池壁放入水中，站台放置于东南象限， 每次实验鼠共游泳60-90s来寻找隐藏的站台。如果成功地找到站台，鼠可以得到在站台上的10-30s休息时间；如果60-90s内未能成功的找到站台，就由实验人员将鼠人工置于站台上，且同样给予10-30s的休息时间。有时鼠可能会在10-30s间隔时间到达之前从站台上掉下或跳入水中继续游泳。一旦这种情况发生，则将鼠重新放回站台，并重新计时，使时间间隔到达（10-30s）。这样可以确保每只鼠在每次实验后有相等的时间来观察和获取空间信息。

空间探索实验

隐蔽站台试验结束24h后，撤除站台。然后任选一相同入水点将鼠放入水中，记录鼠在60s或120s内的游泳路径，记录鼠在原站台象限的停留时间和穿越原站台次数，观察受试鼠的空间定位能力，及在空间探索过程中的变化规律。在电脑屏幕上用圆形环标记出站台原所在位置，这样可以记录穿越原站台所在位置的次数。

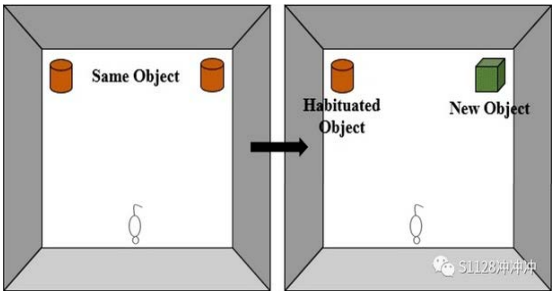


新物体识别实验

在进行测试或训练前24小时，将动物放在测试的房间内，适应测试环境。

开始训练时，将A，B两个物体放在场地一侧壁的左右两端，小鼠背朝两物体放入场地内，并且小鼠鼻尖距离两物的长度要一致。放入后，开启录像设备，实验者离开测试房间，记录小鼠与这两个物体接触的情况，包括鼻子或嘴巴触及物体的次数和距离物体2-3cm范围内探索的时间（前爪搭在物体上、鼻子嗅物体、舔物体等均属探索物体，爬到物体上不动不能算是对新物体的探究）。

探索一段时间后，将小鼠移出休息。后将B物体替换为C物体，重复上述操作。小鼠对新旧物体的探索的次数、时间和距离，可用于评估小鼠的认知情况：若小鼠认知能力差，则在新旧物体的探索无差异；若小鼠认知能力正常，则对新事物的探索较旧事物长。认知指数(recognition index,RI)计算公式为：RI=新物体/ (新物体+旧物体) ×100 %。



糖水偏好实验

同人一样，甜味剂也能给小鼠带来欣快感。糖水偏好实验是反应快感是否缺失的一种检测指标，快感缺失指的是对奖励刺激缺乏兴趣，这是一种情感障碍(包括抑郁症)的表现形式。蔗糖偏好实验包括两个部分，分别为适应训练部分和测试部分。在训练中，老鼠在前24h每笼放入两瓶蔗糖溶液，紧接着24h将其中的一瓶换成纯水，适应结束后，禁食禁水一段时间。

测试阶段，小鼠只能选择事前称量好的两个瓶子，一瓶为1%（w/v的蔗糖溶液，另一瓶为纯水，禁食，12h 后，取走两瓶并称重，记录小鼠的总液体消耗，糖水消耗和纯水消耗。期间需调换两瓶的位置以消除位置影响。糖水偏好指数%＝糖水消耗量/（糖水消耗量＋纯水消耗量）×100%。

高架十字迷宫(High plus maze）

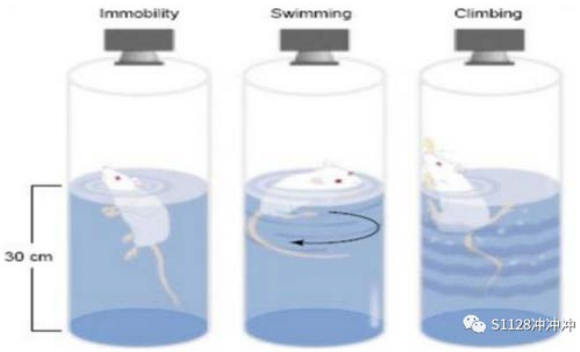
高架十字迷宫是利用动物对新异环境的探究特性和对高悬敞开臂的恐惧形成矛盾冲突行为来考察动物的焦虑状态。高架十字迷宫具有一对开臂和一对闭臂，啮齿类动物由于嗜暗性会倾向于在闭臂中活动，但出于好奇心和探究性又会在开臂中活动，在面对新奇刺激时，动物同时产生探究的冲动与恐惧，这就造成了探究与回避的冲突行为，从而产生焦虑心理。

实验开始时将小鼠从中央格面向闭合臂放入迷宫，记录活动情况。观察指标包括：开放臂进入次数，开放臂停留时间，闭合臂进入次数，闭合臂停留时间。计算开放臂停留时间比例，开放臂进入次数比例，高架十字迷宫中总进入次数。

进入开放臂次数及停留时间与小鼠的焦虑情绪成负相关，进入开放臂次数越少，停留时间越短，说明老鼠的焦虑情绪越严重。

强迫游泳实验（Forced Swimming Test，FST）

强迫游泳实验是一种行为绝望实验法，通过将动物置于一个局限的环境中（如水中），动物在该环境中拼命挣扎试图逃跑又无法逃脱，从而提供了一个无可回避的压迫环境，一段时间后，动物即表现出典型的“不动状态”，观察并记录实验动物产生绝望的不动状态过程中的一系列参数，可以用来评价抑郁状态。



平衡木实验

检测小鼠运动能力的方法有很多，如转棒实验、爬杆实验、斜坡实验、动物步态实验、强迫跑轮实验、小动物跑步机实验、抓力（握力）实验、平衡木实验等。平衡木实验用于检测小鼠平衡能力、肌力以及运动协调力。平衡木的形状主要分为长形和方形，以方形居多，平衡木常用尺寸为长1m，直径17mm的圆形平衡木或者长1m，宽度14mm的方形平衡木。平衡木一侧放置在黑色方盒内，将小鼠放置在平衡木另一侧。记录小鼠在60s内通过平衡木进入黑色方盒内的时间和打滑次数。实验分为训练期和测试期，为期3天。

4 小鼠动物行为学实验中的注意事项

① 设计实验时，注意控制好变量，避免性别、年龄等其他因素影响实验结果；
② 安排实验时，如果同一批实验对象要进行多种行为学实验，要注意安排好顺序，避免前期的操作影响后期实验结果；
③ 进行动物行为学实验时，动物需要提前适应环境，并保持环境温度、气味、声音等因素稳定；
④ 记录实验数据应客观准确，避免主观因素影响实验结果；
⑤ 两次实验之间，应注意清洁实验器材，清除小鼠粪便、尿液等残留物，消除气味，以避免影响；
⑥ 动物行为学实验过程中，最好不要更换实验者，尤其是一些对周围环境稳定性要求较高的实验，如水迷宫实验，不可更换实验者；
⑦ 进行动物行为学实验时应着实验服，不可穿戴涂抹有气味的物品。

安捷伦四级杆-飞行时间质谱联用仪

分析测试室实验室/王雨

1 仪器介绍

安捷伦四级杆-飞行时间质谱联用仪（1290-G6530 Q-TOF MS/MS）是一款高性能的液相色谱-质谱仪，融合了超高效液相色谱（UHPLC）和飞行时间质谱（Q-TOF MS）的先进技术，其核心构件包括超高效液相色谱系统、四级杆和飞行时间质谱模块。该仪器的设计旨在提供高灵敏度、高分辨率和广泛的质谱扫描范围，以满足在中药成分定性和代谢组学等领域的高要求。

2 技术优势

该仪器具有多项技术优势，使其成为实验室中重要的分析工具。

高分辨率：分辨率可达40,000以上。能够在复杂样品中准确分辨不同的化合物，包括同分异构体和同位素峰，提供更为精准的分析结果。

高灵敏度：该仪器采用先进的电喷雾离子源技术，提高了样品的离子化效率，从而提高了质谱的灵敏度。高灵敏度使得在低浓度下的物质也能被有效检测，尤其对于生物样品和天然产物的分析具有重要意义。

飞行时间质谱技术：这种技术能够在极短的时间内收集大量的质谱数据。这不仅提高了分析速度，同时也为复杂样品的全面分析提供了可能，为高通量的实验提供支持。

广泛的质谱扫描范围：该仪器具有广泛的质谱扫描范围，质荷比范围可达3200m/z。能够同时检测大分子和小分子，覆盖了多种样品类型，包括蛋白质、脂质、糖类等，使其在复杂混合物的分析中表现出色。

碎裂能力强大：四级杆在碎裂能力上具备优势。这使得它能够对分子进行更精准的碎裂，产生更丰富的质谱信息，有助于化合物的结构鉴定和定性分析。

高度可控的分析条件：通过该仪器的高度可控参数，例如碰撞能量、离子源温度等，灵活地调整分析条件，以适应不同类型和复杂度的样品分析，提高实验的可定制性。

数据处理和分析软件支持：安捷伦提供强大的数据处理和分析软件，有助于高效地处理和解读实验数据，进行定性和定量分析，进一步提升实验效率。

3 在中药研究方面的应用

中药成分分析：通过高分辨率和高灵敏度的特性，能够准确鉴定中药中的多种化合物，包括传统成分和新型活性成分。这为中药的质量评估、成分标准的制定以及中药新药的发现提供了可靠的数据支持。

中药质量控制：通过对中药样品的全面分析，该仪器有助于建立中药的质量控制标准。科研人员可以追踪和定量各种草药中的活性成分，确保中药产品的质量和一致性，提高中药的临床疗效和安全性。

新药研发：在中药新药研发中，提供了高效、精确的分析手段。通过深入分析中药中的活性成分和其代谢产物，有助于揭示中药的药效机制，为新药的设计和开发提供关键信息。

4 在代谢组学方面的应用

代谢物鉴定和定量：在代谢组学研究中可用于对生物体内代谢物的准确鉴定和定量。其高分辨率和广泛的质谱扫描范围使其能够捕捉大量的代谢产物，为代谢组的构建提供全面的信息。

生物标志物的筛选：通过对正常和疾病状态下的生物样本进行比较分析，科研人员可以使用该仪器筛选潜在的生物标志物。这对于疾病的早期诊断和治疗策略的制定具有重要意义。

总体而言，安捷伦 1290-G6530 Q-TOF 质谱联用仪在中药研究和代谢组学研究领域的应用丰富多彩，为科研人员提供了先进而全面的分析手段，推动了相关领域的深入研究和创新。

实验室急救处理方法

在实验过程中不慎发生受伤事故，应立即采取适当的急救措施。

- 受玻璃割伤及其他机械损伤:首先必须检查伤口内有无玻璃或金属等物碎片，然后用硼酸水洗净，再擦碘酒或紫药水，必要时用纱布包扎。若伤口较大或过深而大量出血，应迅速在伤口上部和下部扎紧血管止血，立即到医院诊治。

- 烫伤:一般用浓的(90%~95%)酒精消毒后，涂上苦味酸软膏。如果伤处红痛或红肿(一级灼伤)，可用橄榄油或用棉花沾酒精敷盖伤处;若皮肤起泡(二级灼伤)，不要弄破水泡，防止感染;铬伤处皮肤呈棕色或黑色(三级灼伤)，应用干燥而无菌的消毒纱布轻轻包扎好，急送医院治疗。

- 强碱(如氢氧化钠，氢氧化钾)、钠、钾等触及皮肤而引起灼伤时，要先用大量自来水冲洗，再用5%乙酸溶液或2%乙酸溶液涂洗。

- 强酸、溴等触及皮肤而致灼伤时，应立即用大量自来水冲洗，再以5%碳酸氢钠溶液或5%氢氧化铵溶液洗涤。

- 如酚触及皮肤引起灼伤，应该用大量的水清洗，并用肥皂和水洗涤，忌用乙醇。

- 水银容易由呼吸道进入人体，也可以经皮肤直接吸收而引起积累性中毒。严重中毒的征象是口中有金属气味，呼出气体也有气味;流唾液，牙床及嘴唇上有硫化汞的黑色;淋巴腺及唾液腺肿大。若不慎中毒时，应送医院急救。急性中毒时，通常用碳粉或呕吐剂彻底洗胃，或者食入蛋白(如1 升牛奶加3 个鸡蛋清)或蓖麻油解毒并使之呕吐。

- 触电：触电时可按下述方法之一切断电路:
  (1)关闭电源;
  (2)用干木棍使导线与被害者分开;
  (3)使被害者和土地分离，急救时急救者必须做好防止触电的安全措施，手或脚必须绝缘。

- 液氮、干冰冻伤：
  - ✓ 程度分级：

Ⅰ度冻伤：局部皮肤从苍白转为斑块状的蓝紫色，出现红肿、发痒、刺痛和感觉异常。冻伤处症状可自行消退。

Ⅱ度冻伤：局部皮肤红肿、发痒、灼痛，早期有水疱出现。冻伤处不留疤痕，但可能出现持久的冷敏感。

Ⅲ度冻伤：皮肤由白色逐渐变为蓝色，再变为黑色，感觉消失，冻伤周围的组织可出现水肿和水疮，并有较剧烈的疼痛。冻伤处将留有疤痕并影响功能。

Ⅳ度冻伤：伤部的感觉和运动功能完全消失，呈暗灰色，由于冻伤组织与健康组织交界处的冻伤程度相对较轻，交界处可出现水肿和水疱。冻伤处深层组织坏死，造成残端。

- ✓ 应急处理

脱离环境：立即停止实验活动，将冻伤者转移入温暖的房间，给予温暖的饮料（可适量饮用含酒精饮料），使其体温尽快提高。

温水浸泡：将冻伤部位浸泡在38-42℃的温水中，水温不宜超过45℃，浸泡时间不能超过20分钟。恢复到正常温度后，仍需把冻伤部位抬高，在正常温度下不需要绷带包扎，保持安静。

体温捂热：若没有温水或冻伤部位不便浸水，如耳朵等部位，可用体温（如手、腋下）将其捂暖。

应急处理后，及时就医。

STIC 中医药科技创新中心

INNOVATION CENTER FOR TRADITIONAL CHINESE MEDICINE

服务优质
共享开放
管理先进
运行高效

科技实验中心

蜂巢

2023/12

工匠精神

精益求精　追求卓越

传承弘扬　专心专注

ECST

服务理念

团结敬业　协作奉献

奋进探索　求实创新

声明：《蜂巢》为内部学术参考资料汇编，每月汇编一期，由上海中医药大学科技实验中心编写并仅在上海中医药大学系统内部科研人员中推送、传播，仅供内部科研人员参考使用，不得用于商业宣传。

欢迎投稿。

《蜂巢》编辑工作组：
主编：王宇
主审：可燕
编委：任艳、陆雄、杨扬、张超超
编辑排版：周莉、张文超
组稿：刘聪颖
宣传：张文超

仪器预约网址：https://kjsyzx.shutcm.edu.cn
投稿信箱：kjsyzx_shutcm@163.com
地址：蔡伦路1200号，上海中医药大学创新楼6楼
邮编：201203
电话：021-51322387