



# 实验室注意事项

邓晓蓓

2018.5.30



# 实验操作过程必须戴手套、口罩和穿实验服



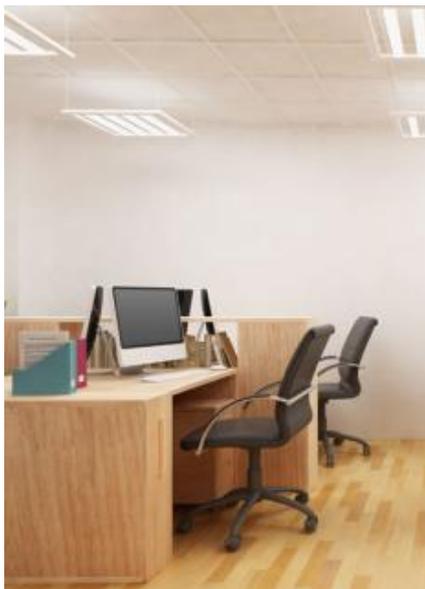


# 实验室基本规章制度—禁止在实验室吃东西





# 禁止穿实验服、戴手套到非实验区





# 禁止在实验室的水龙头洗手





# 实验垃圾分类





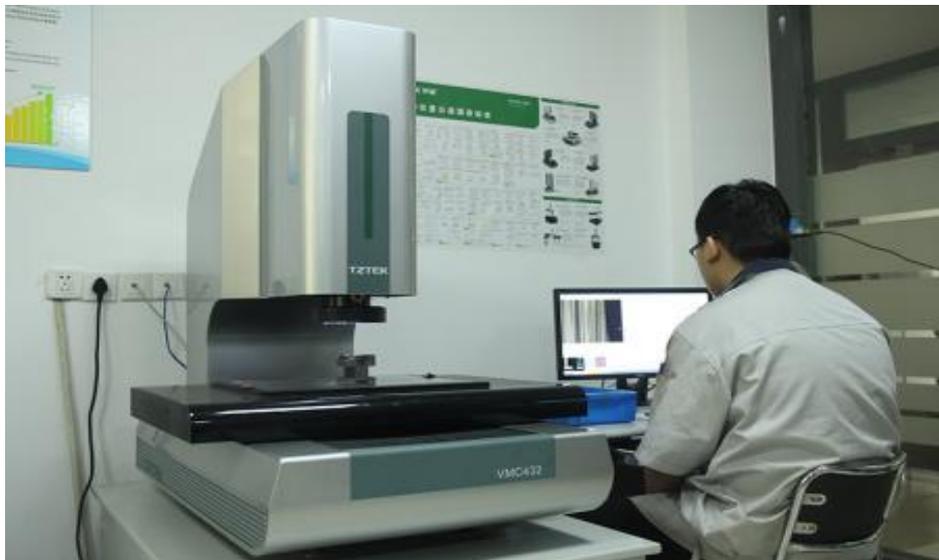
# 实验结束将移液器调至最大量程



移液器的使用方法.....



# 保持实验台面整洁、实验仪器关闭等





# 实验报告的写作



# 实验报告的结构（一）

- **实验名称**

➤ 用最简练的语言反映实验的内容。如**组织血液样本的分离**。

- **学生姓名、学号、及合作者**

- **实验日期和地点**（年、月、日）和（长宁实验中心）



# 实验报告的结构（二）

## ● 实验目的

- 目的要明确，在实践上，掌握使用实验设备的技能技巧和程序的调试方法，如，明确分离临床实验样本的方法等等。

## ● 实验试剂和仪器

- 在实验中需要用到的实验用物，药品以及对环境的要求。如离心机、一次性滴管等等。



# 实验报告的结构（三）

## ● 实验原理

- 在此阐述实验相关的主要原理。

## ● 实验内容

- 这是实验报告极其重要的内容。要抓住重点，可以从理论和实践两个方面考虑。只写主要操作步骤，简明扼要描述实验过程。可以画出实验流程图（实验装置的结构示意图），再配以相应的文字说明等。



# 实验报告的结构（四）

## ● 实验结果

- **文字叙述:** 根据实验目的将原始资料系统化、条理化，用准确的专业术语客观地描述实验现象和结果，要有时间顺序以及各项指标在时间上的关系。
- **图表:** 用表格或坐标图的方式使实验结果突出、清晰，便于相互比较。每一图表应有表目和计量单位，应说明一定的中心问题。



# 实验报告的结构（五）

## ● 实验结论

- 结论不是具体实验结果的再次罗列，也不是对今后研究的展望，而是**针对这一实验所能验证的概念、原则或理论的简明总结**，是从**实验结果中归纳出的一般性、概括性的判断**，要简练、准确、严谨、客观。



班级	姓名	日期
实验名称		
实验目的		
实验仪器及药品		
实验步骤		
实验结果及讨论		
评分		



# 临床样本的处理



# 主要研究方法-选择测量指标

## 一般原则：

- 1.生物标志应特异、稳定；
- 2.标本采集、储存方便；
- 3.检测方法比较简单、实用，而且操作规范，便于与同类研究结果比较；
- 4.灵敏度和特异度高。



# 标本的采集和储存

## 一般要求：

- 1.在采集和储存过程中不能受到“污染”，包括外界生物的、化学的和其他标本的“交叉污染”。
- 2.储存的生物标本在任何时候进行检测都可以获得一致的结果。
- 3.所有生物标本都应有详细的背景资料和鉴别标识。
- 4.储存时应注意储存条件，一般为冷藏保存。



# 常见的生物标本（1）

## 1. 血液和口腔脱落细胞（液氮或者-80度冰箱）

### ● 血液

- **白细胞**：基因组DNA提取并进行遗传多态性的研究；
- **血清、血浆**：营养素、激素、血脂、以及其它生物标志物的循环水平；
- **淋巴细胞**：分子流行病学表型的检测。

### ● 口腔细胞：无创、来源容易，但是量少。



# 常见的生物标本（2）

## 2. 尿液（0度以下的冰箱内）

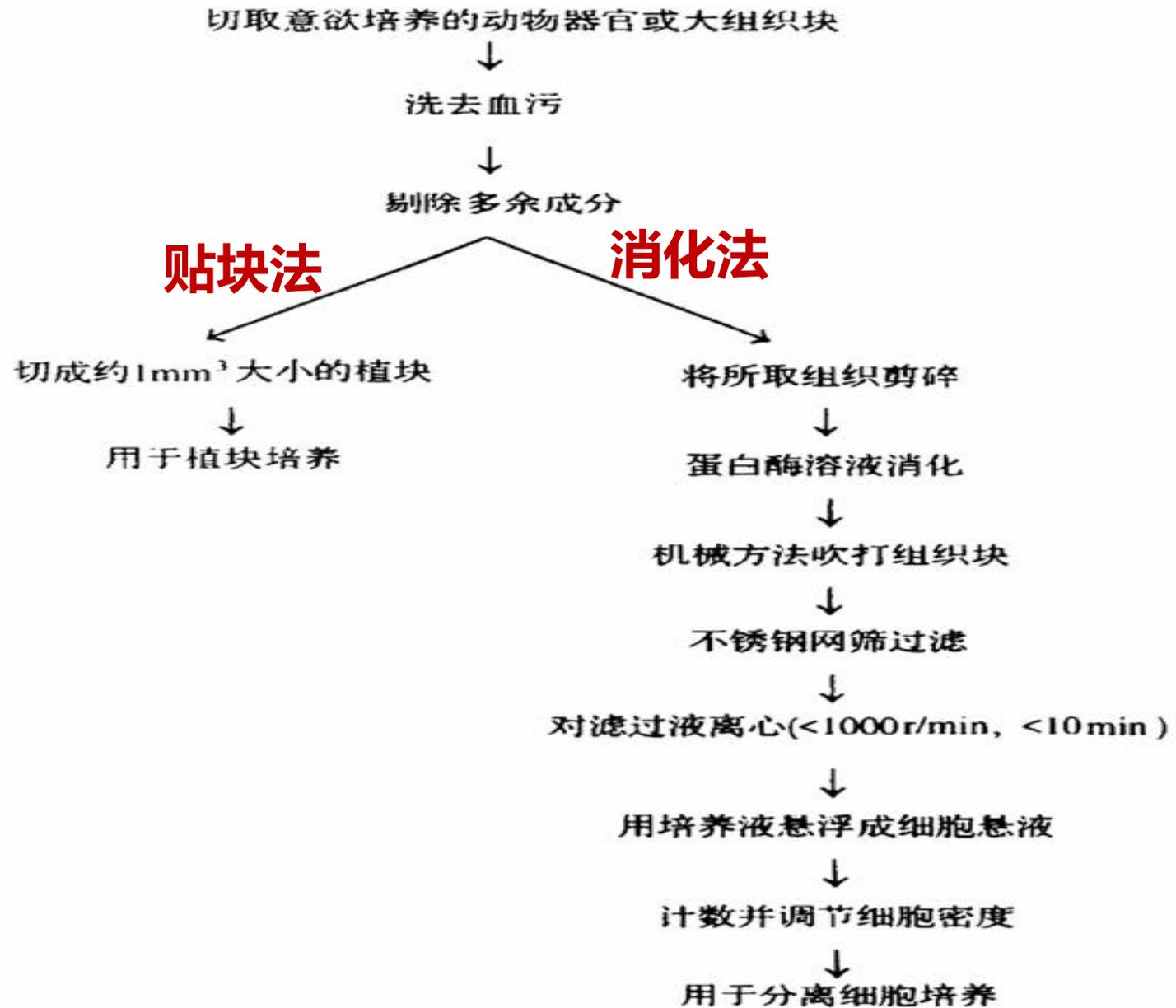
- 用于检测多种与肿瘤有关的暴露和代谢生物标志物，如羟基多环芳烃来评价PAHs；
- 易受细菌和真菌的污染。

## 3. 肿瘤组织（液氮或者-80度冰箱）

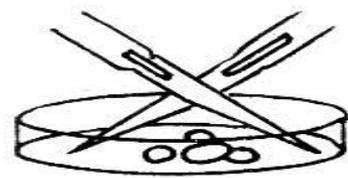
- 免疫组化、原位核酸杂交、Western blot的方法检测某些特异蛋白的表达；
- **RT-PCR检测目的基因的mRNA表达水平。**



# 原代培养方法分类-复习

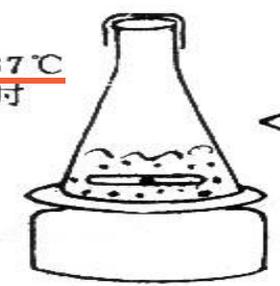


# 消化法培养步骤图解- 复习



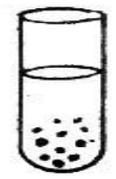
切成2~3mm<sup>3</sup>小块

加胰蛋白酶37℃  
消化1~4小时



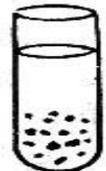
温消化

加胰蛋白酶4℃  
消化(6~24小时)



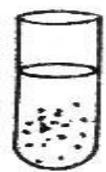
冷消化

清洗静沉  
去上清



静沉去上清

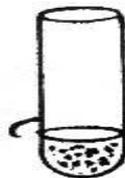
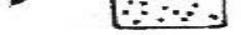
加新消化液  
37℃消化  
(20~30分钟)



必要可重  
复

分次消化

滤过



离心  
去上清

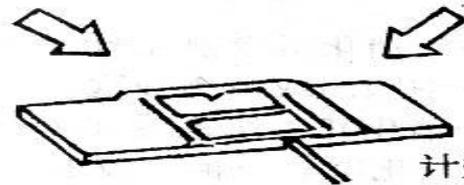
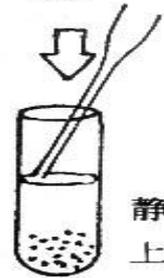
加营养液  
并吹打



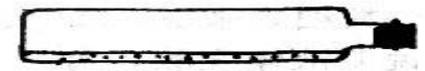
加培养液  
并吹打



静沉去  
上清



计数

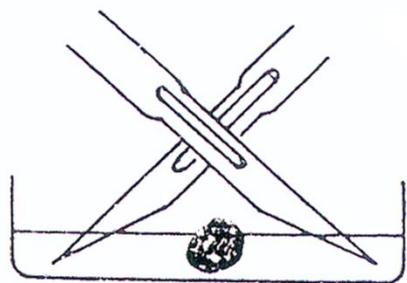


接种培养

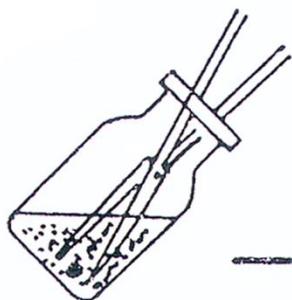
图 5-5 消化初代培养法基本步骤



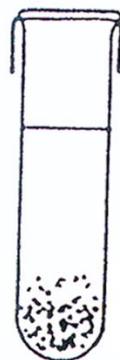
# 贴块培养步骤图解-复习



粗切



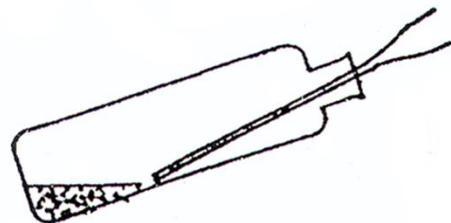
细切



冲洗, 自然沉降



留少许BSS



移入培养瓶中  
并吸净BSS



细胞生长



继续培养



翻转干涸法  
(置37℃温箱中)



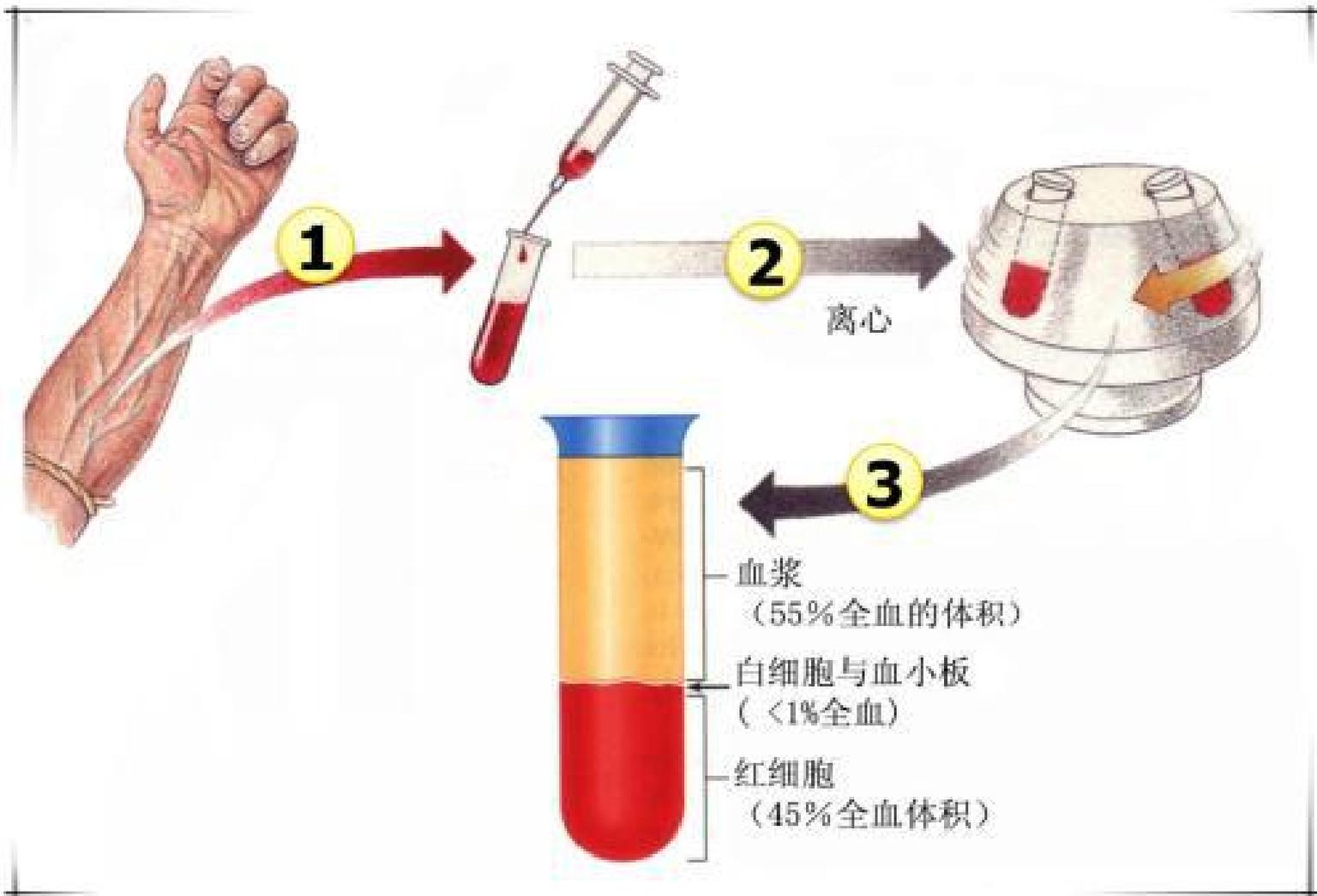
培养24小时后  
补液



薄层营养液  
培养法



# 血液样本







# 样本储存





# 组织RNA的提取



# 基于RNA来源的核酸分子标志物（1）

- 蛋白编码功能的相关基因的mRNA；
  - 信使RNA是由DNA的一条链作为模板转录而来的、携带遗传信息的，能指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸。

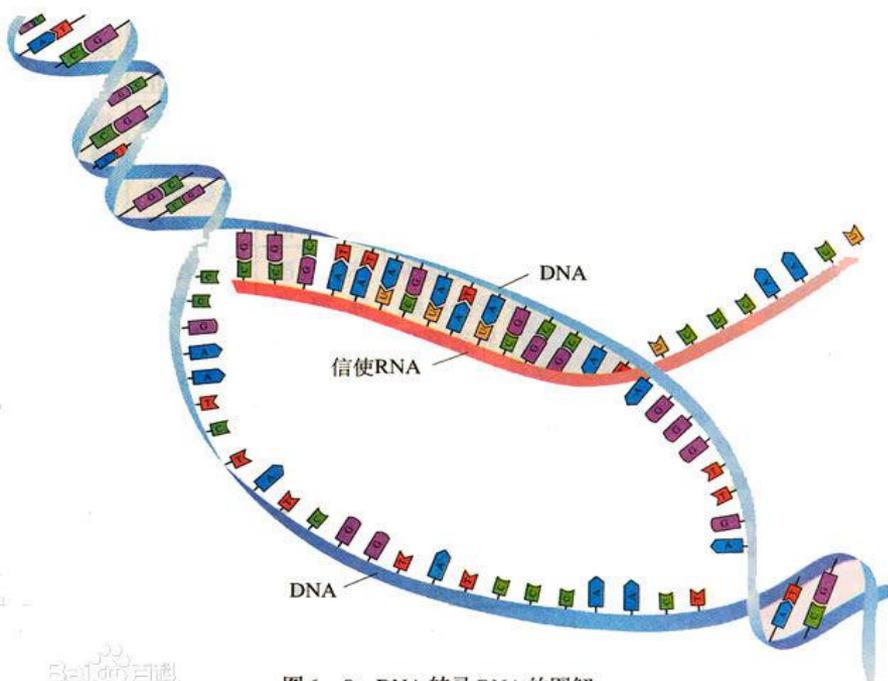
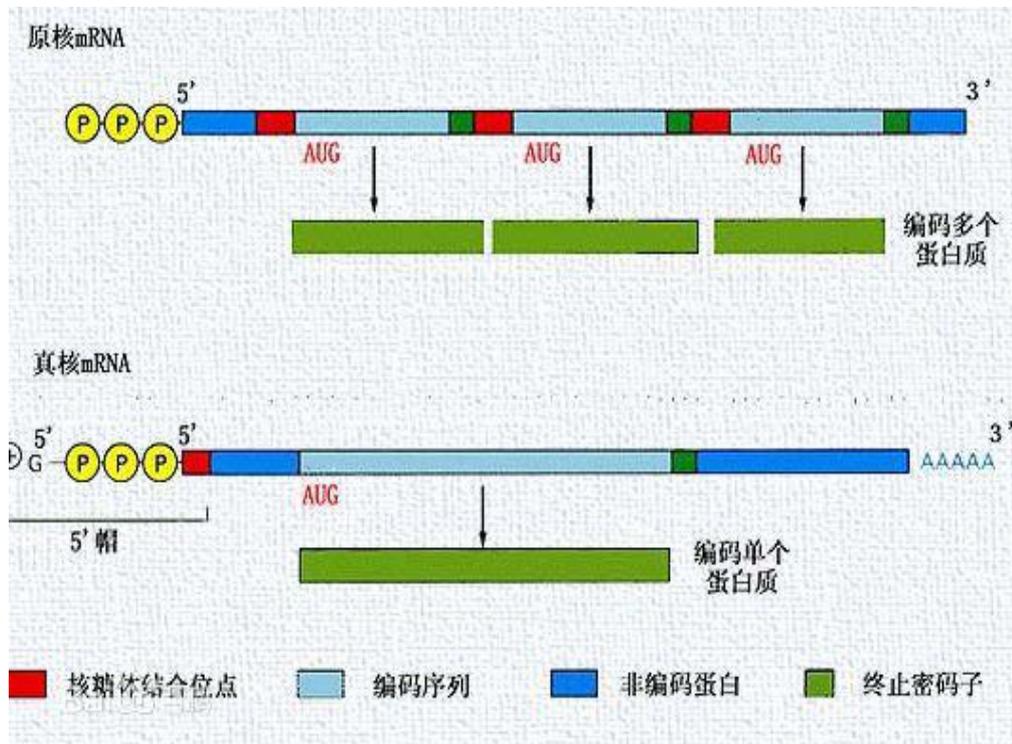


图6-9 DNA转录RNA的图解



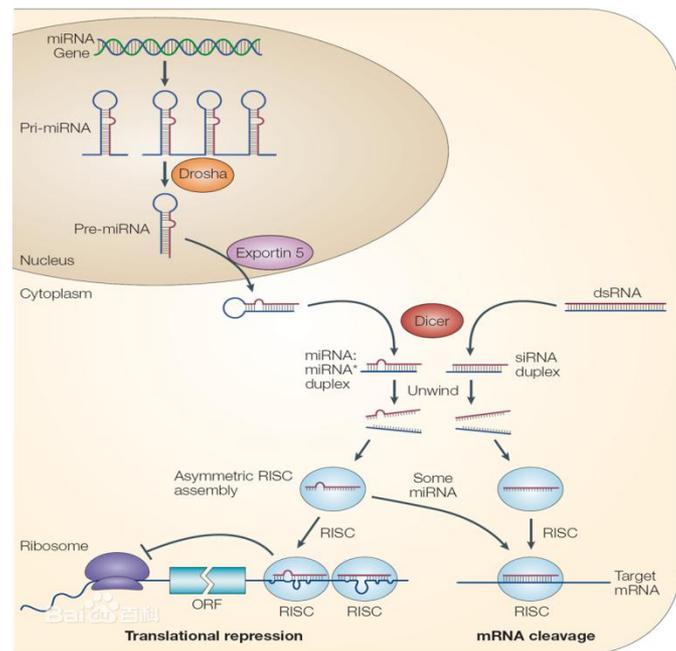




# 基于RNA来源的核酸分子标志物（2）

## ● 不具有蛋白编码功能，但行使重要调节功能的 microRNA ( miRNA )

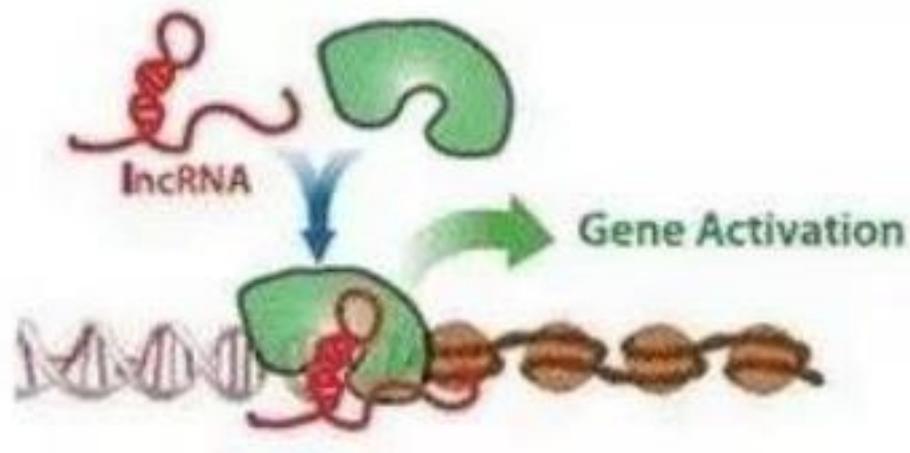
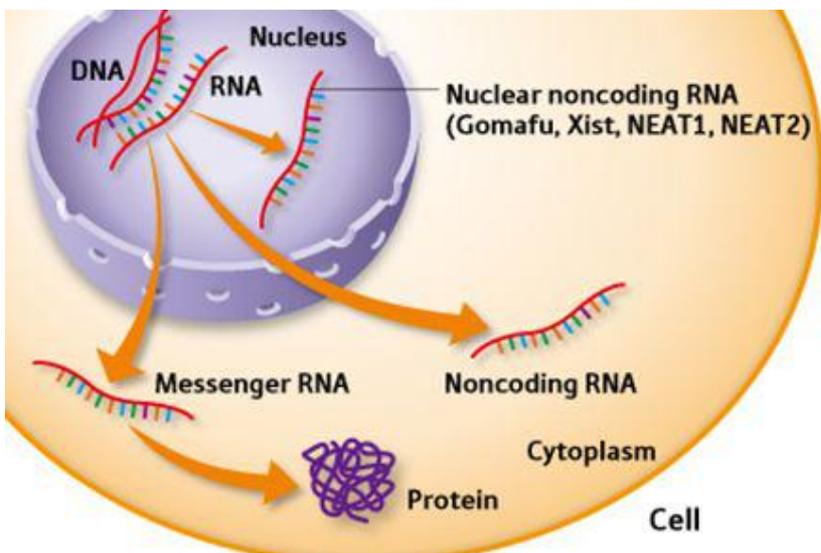
➤ microRNA：是一类由内源基因编码的长度约为**22个核苷酸的非编码单链RNA分子**，它们在动植物中**参与转录后基因表达调控**。





# 基于RNA来源的核酸分子标志物（3）

- 不具有蛋白编码功能，但行使重要调节功能的长链non-coding RNA(lncRNA)
  - 长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA。





# Trizol法提取RNA的原理（一）

- **Trizol试剂**是一个包含**酚**、**异硫氰酸胍**和**SDS**的**单相酸性溶液**，其在裂解细胞的同时抑制RNase的活性，随后加入**氯仿**，酚会大量的溶解在氯仿中。





# Trizol法提取RNA的原理（二）

- 由于**DNA和RNA在酸性酚中的溶解性不同**，造成**DNA分布在下层的氯仿酚溶液中**，**RNA则分布在上层的水相中**；
- 最后用**异丙醇沉淀水相中的RNA**，并用**70%乙醇洗涤沉淀**，这样就可以得到比较纯净的总RNA。



**产品介绍**

■ 安全技术说明

本试剂为无色透明液体。微有乙醇气味，能与水、醇、醚相混溶。该品高度易燃。使用现场禁止吸烟。应远离火种密封保存。

**异丙醇**  
Isopropyl alcohol  
富宇试剂 CHEMICAL REAGENT  
分析纯 (AR) 500ML

示性式：(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH  
相对分子量：60.10  
(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH含量不少于，ω/%：≥99.7  
密度 (20℃)，g/mL：0.784-0.786

杂质最高含量 (指标以≤%计)  
蒸发残渣，ω/%：≤0.001  
与水混合试验：合格  
还原高锰酸钾物质：合格  
易挥发物质：合格  
甲醇 (CH<sub>3</sub>OH)，ω/%：≤0.1  
铁 (Fe)，ω/%：≤0.00001  
水分 (H<sub>2</sub>O)，ω/%：≤0.2

羰基化合物 (以CO计)，ω/%：≤0.005  
酸度 (以H<sup>+</sup>计)，mmol/g：≤0.0003

产品包装	瓶装		桶装		塑料瓶	
产品类别	500ML 2500ML 3000ML				因产品 选定塑 料包装	500ML 2500ML



## 对人体有害，请注意防护

# 异丙醇 Isopropanol

### 健康危害

吸入高浓度蒸气可引起头痛倦睡、共济失调以及眼鼻喉刺激症状；口服可致恶心、呕吐、腹痛腹泻、倦睡昏迷甚至死亡；长期皮肤接触可致皮肤干燥皴裂。

### 理化特性

无色透明具有乙醇气味的可燃性液体，能与水互溶。其蒸气与空气可形成爆炸性混合物，遇明火、高热能引起燃烧爆炸。

## 当心中毒



### 应急处理

皮肤接触：脱去被污染衣着，用肥皂水和清水彻底冲洗皮肤。  
眼睛接触：提起眼睑，用流动清水或生理盐水冲洗。就医。  
吸入：迅速脱离现场至空气新鲜处。保持呼吸道通畅。  
食入：饮足量温水，催吐，就医。

### 注意防护

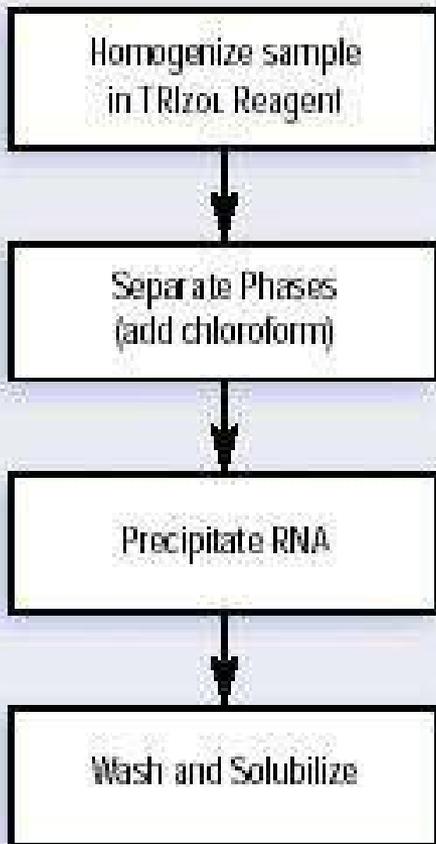


急救电话：120

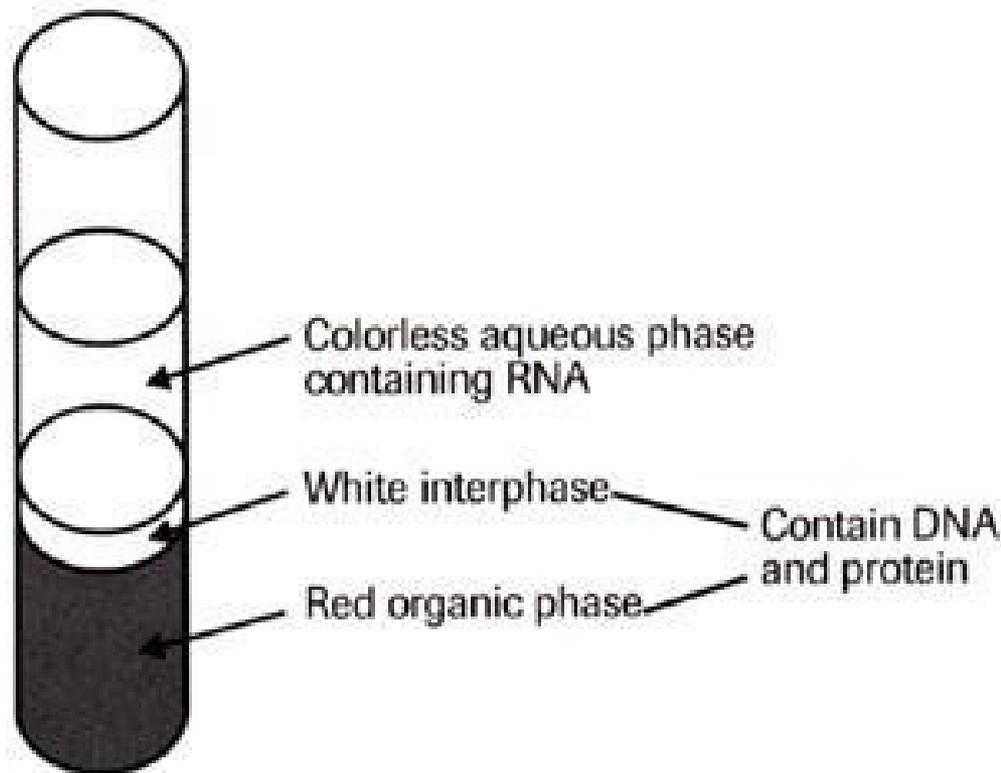
消防电话：119



# 大致实验流程



*Elapsed Time < 1 h*





# RNA纯度分析（1）

- RNA质检参数OD260/OD280、OD260/OD230的意义。
- 260、280、320、230 nm下的吸光度分别代表了核酸、蛋白质、盐浓度和有机溶剂的值。
- **A230: 测定其它碳源物质，如酚，糖类等。**
- **A260：核酸的吸收峰测，测RNA，DNA，引物等的浓度。**
- **A280：蛋白质的吸收峰。**



## RNA纯度分析（2）

- OD260/OD280(Ratio)在1.8~2.1范围内时，RNA中蛋白的污染是可以容忍。
- **当 $R < 1.8$ 时，溶液中蛋白的污染比较明显。**
- **当 $R > 2.2$ 时，说明RNA已经水解成单核酸了。**
- **纯RNA的OD260/OD280的比值为2.0。**

