

脑科学研究中心实验室 操作方法指南



目 录

第一章 动物手术实验室.....	5
1.1 脑立体定位注射.....	5
1.1.1 实验材料.....	5
1.2.1 实验流程.....	5
1.2 动物麻醉.....	7
1.3 颅脑外伤模型.....	8
第二章 形态室.....	9
2.1 小鼠灌注与切片.....	9
2.1.1 实验材料.....	9
2.1.2 实验流程.....	9
2.2 大鼠灌注与切片.....	10
2.2.1 实验介绍.....	10
2.2.2 大鼠灌注取脑操作规程.....	11
2.2.3 注意事项.....	11
2.3 免疫荧光染色.....	12
2.3.1 冰冻组织免疫荧光.....	12
2.3.2 细胞免疫荧光.....	12
第三章 细胞间.....	14
3.1 原代星形胶质细胞培养.....	14
3.1.1 实验材料.....	14
3.1.2 实验流程.....	14
3.2 原代小胶质细胞培养.....	15
3.2.1 实验材料.....	15
3.2.2 实验步骤.....	16
3.3 原代神经元细胞培养.....	16
3.3.1 实验材料.....	16
3.3.2 准备工作.....	17

3.3.3 实验流程.....	17
3.4 脑肿瘤细胞培养、冻存和复苏（酶消化法）	17
第四章 动物行为室.....	19
4.1 转棒实验.....	19
4.1.1 预实验.....	19
4.1.2 正式试验.....	19
4.2 小鼠平台式跑步实验.....	19
4.2.1 实验介绍.....	19
4.2.2 小鼠跑台技术参数.....	19
4.2.3 实验设置.....	20
4.2.4 实验操作.....	21
4.2.5 注意事项.....	21
4.2.6 实验心得.....	21
4.3 小鼠震惊反射条件恐惧.....	22
4.3.1 Panlab Fear condition 仪器参数校准	22
4.3.2 Fear Condition 软件	24
4.4 小鼠听觉刺激惊跳反射前脉冲抑制（PPI）	24
4.5 光遗传实验.....	24
4.5.1 实验操作.....	24
4.5.2 实验心得.....	25
4.6 化学遗传实验.....	25
4.7 小鼠脑电分析仪.....	25
4.8 5-9 孔测试.....	25
4.8.1 实验准备.....	25
4.8.2 Pre-training	26
4.8.3 Training	27
4.8.4 程序设定及进阶要求.....	28
4.8.5 Test.....	29
4.9 Smart 3.0（旷场、Y/T/巴恩斯迷宫、高架十字迷宫、悬尾实验、三	

箱社交行为测试)	29
4.9.1 实验介绍	29
4.9.2 SMART 小动物行为分析系统组成	32
4.9.3 软件操作步骤	32
第五章 分子生物实验室	45
5.1 细胞和组织破碎	45
5.2 转基因小鼠的编号及基因鉴定	45
5.2.1 编号--断指(趾)标记法	45
5.2.2 基因型鉴定	45
5.3 蛋白质的提取分离及定量	46
5.3.1 蛋白样品的提取	46
5.3.2 BSA 法测定蛋白浓度	46
5.4 RNA 的提取与分离	46
5.4.1 实验试剂与耗材	46
5.4.2 实验流程	47
5.5 核酸的定量测定	48
5.5.1 实验试剂与耗材	48
5.5.2 实验流程	48
5.6 实时荧光定量 PCR	49
5.6.1 实验试剂与耗材	49
5.6.2 实验流程	49
5.7 逆转录 PCR	50
5.7.1 实验试剂与耗材	50
5.7.2 实验流程	50
5.8 Western 印迹杂交法	50
5.8.1 实验准备	50
5.8.2 实验步骤	51
5.8.3 常见注意事项	55

第一章 动物手术实验室

1.1 脑立体定位注射

立体定向（或立体）手术是一种用来操作活体动物大脑的方法。该技术使得研究人员能够通过使用立体定位图谱准确地定位大脑内的深层结构。立体定位图谱提供了每个脑区相对于颅骨上的解剖学标志的三维坐标。将颅骨暴露后，麻醉的动物被固定在被称作立体定位仪的专门仪器上，该仪器能使实验工具精确放置在定好的坐标上。立体定位手术是一项用途广泛的技术，可用来产生损伤，操纵基因表达，或将实验试剂施加到大脑里。

1.1.1 实验材料

0.5 M NaOH、无菌水、rAAV 病毒、PBS、聚维酮碘清洁片、注射器、控制器、10 ul 注射器、33-G 针头、灭菌袋、1ml注射器、28-G针头、小鼠剃须刀、小鼠、无菌一次性手术刀、无菌棉球、手持钻压钻头、小鼠立体定位仪。

1.2.1 实验流程

1. 连接立体定位仪和微量注射泵（图 1），也可以通过将针头直接附加到该框架上，使用注射器保持器来进行注射，但手动的速度不好控制。

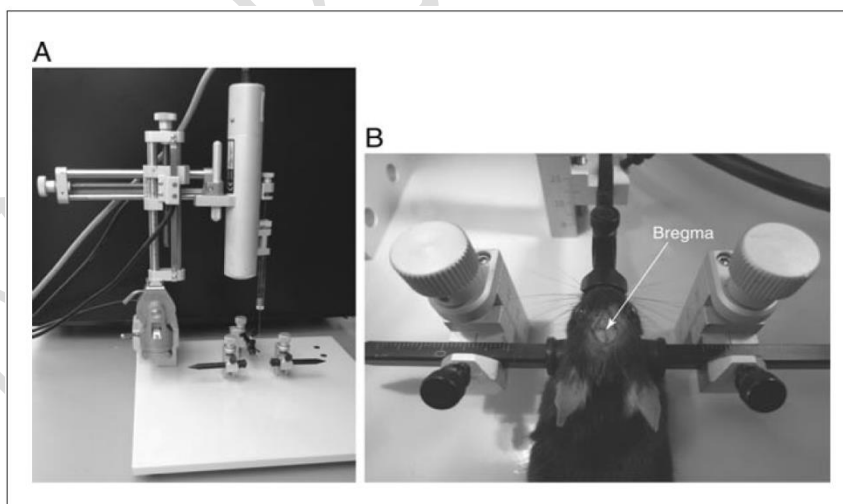


图 1 立体定位仪（A）和微量注射泵（B）

注：耳杆定位在动物的头两侧，固定过程中应避免太紧造成鼻子和耳朵皮肤缺血损伤，头部应保持完全水平。

2. 麻醉小鼠。
3. 取分装好的 rAAV 冰上放置，病毒应避免反复冻融，注射的病毒滴度为

10^{12} - 10^{13} vg/ml, 必要时可用 PBS 稀释。

4. 固定小鼠头部：将小鼠的门齿固定于脑定位仪上颌固定器，然后把一侧的耳杆推入动物的外耳道后，使动物的头在处于两滑道正中。再将另一耳杆推入另一侧的外耳道。这时观察两个耳杆的刻度一致后，将两耳杆上的固定螺丝扭紧，在将牙齿固定器上压鼻环压下后扭紧（鼻环、耳杆的松紧度调节适宜为好），这时从各个方向推压动物头部均不会出现移动。

5. 打开手术光源开关，进行开颅钻孔前的备皮：剪去动物头部毛，用 2% 碘酒及 75% 酒精棉球作头部皮肤的消毒，沿矢状缝作一条 1 cm 长的皮肤切口，分离皮下组织，用双氧水清洁颅骨表面的筋膜及肌肉并剥离，推开骨膜，暴露前囟、人字缝及矢状缝，如果头骨上有出血，用无菌棉球擦拭干净。

6. 打开立体定位仪显示器，参考小鼠脑图谱，定前囟（Bregma），当电极刚接触前囟表面时，停针，以前囟位置为零点，将桌面数显仪的 X、Y、Z 轴坐标归零。左右调平：以前囟为坐标原点左右移动相同的距离（建议 2-2.5mm），下针接触颅骨表面，分别读对应的 Z 轴坐标；通过 Z 轴坐标的读书来判断左右是否齐平。如果读数相隔 0.03mm 以内，则认为小鼠头部 X 轴方向左右已齐平，若相隔 0.03mm 以外，则重新移动支杆重新定前囟，并归零。前后调平：与左右调平方式相似，以前囟为坐标原点向后囟移动，当电极刚接触后囟颅骨表面时，停针，读数。Z 轴读数为前后高度差值，差值若小于 0.03mm，则认为小鼠头部 Y 轴方向前后基本齐平。

7. 小鼠海马定位：用定位针在前囟后 2mm，矢状缝旁开 2.5mm 处定位一点，即为海马的平面位置，然后在此点上用钻孔针在颅骨上钻一小圆孔。

8. 调平之后，打开微量注射器的控制器，调整注射器至圆孔上方，开始注射药物。小鼠海马位于该圆孔下 2 mm，将 1ml 注射器吸入药物安置到微量操作仪上，操作仪器使注射器针头由小鼠脑钻孔处下降 2mm 的深度，等待 2min，然后开始注射，注射速度为 0.1~0.2ul/min，注射完毕后，留针 2-5min。

9. 取出针头，并将小鼠从定位仪中取出，缝合伤口。

10. 将小鼠置于温毯上，直到小鼠从麻醉中恢复。

1.2 动物麻醉

1. 使用前，请仔细检查管路连接是否正确，并确保管路完好、不漏气。
2. 关闭挥发罐：顺时针旋转刻度盘使“0”刻度线对齐下方的“|”标志此时可听到一声“咔嚓”响，表示挥发罐已被锁紧并处于关闭状态。
3. 调节O₂气体流量：打开空气泵，顺时针或逆时针旋转气源阀门使输出的气体达到所需流量。
4. 将气体转换开关拨向“chamber”指示方向，使麻醉气体流向麻醉诱导盒。拧开挥发罐上的加注密封帽，沿入口缓慢倒入麻醉剂，并随时观察挥发罐前部的液面标识，务必使麻醉剂液面处于上下两条刻度线之间，麻醉剂装好后，锁紧加注密封帽。
5. 打开挥发罐：按下控制按钮的同时，逆时针旋转刻度盘使所需麻醉剂的浓度数值和刻度线与刻度盘下方的“|”标志对齐，放开控制按钮，对应的数值即为麻醉气体在混合气体中所占的百分比浓度。
6. 诱导浓度调节好后（对大鼠一般诱导浓度为3-3.5%，对小鼠一般诱导浓度为2-2.5%），迅速将动物放入诱导盒，随即关闭诱导盒，等待动物完全麻醉（此过程约需2-3min）。可通过轻轻摇晃诱导盒以检查动物是否完全麻醉，若动物身体翻倒为侧姿且并未试着恢复其卧姿状态，则表明动物已完全麻醉。
7. 诱导麻醉完成后，逆时针旋转刻度盘，调节合适的维持麻醉浓度（对大鼠一般维持浓度为2-2.5%；对小鼠一般维持浓度为1-1.5%），将气体流向阀拨向Mask，使气体流向麻醉面罩。
8. 将动物头/鼻放置于麻醉面罩里固定（详细操作取决于所使用的麻醉面罩类型），并且检查动物的麻醉状态（可用两手指头捏压动物脚爪或尾巴，若动物无反应，则表明动物依然处于完全麻醉状态，此时可以开始进行手术等实验）。
9. 动物实验完毕后，关闭挥发罐，保持动物在室内空气中呼吸约5-10min，以利于动物快速苏醒。
10. 关闭空气泵气源，顺时针旋转气源阀门，关闭氧气流量计。
11. 若长时间不适用此麻醉设备，须排出挥发罐内剩余的麻醉剂：拧开密封帽露出排液密封螺杆，反转密封帽并使用密封帽顶部的凹槽松开密封螺杆，把排出的药剂装进一个有标记的合适容器以备后续处理（也可将剩余的麻醉剂保留在

挥发罐中，供以后使用）。

12. 最后可用柔软湿布清洗麻醉诱导盒、手术台面等（对金属部件可加酒精擦洗，但麻醉诱导盒属于有机玻璃材质，切忌使用酒精进行擦拭）。

1.3 颅脑外伤模型

1. 按实验需求安装不同直径的打击头。
2. 开机：拧开氮气罐阀门，按压打击器开关开机，设备会自动进行自检，按界面提示接触传感器夹和打击头完成自检。
3. 固定动物：使用立体定向注射的头架固定小鼠头部，使骨窗平面保持水平。
4. 设定打击速度、打击深度和打击停留时间：按 **Experiment Settings** 按钮进行设置。
5. 零点校准：按 **Calibration** 键进入零点校准准备界面，在小鼠后肢皮肤裸露部位先涂上生理盐水，再用导电胶布缠绕 2-3 圈。将两个接触传感器夹到导电胶布上，**confirm** 按键出现，点击进入零点校准界面，然后通过按键选择快速/慢速校准，校准过程中按键调整，打击头缓慢向下移动直到打击头与动物身体完全接触为止，注意：在校准过程中动物夹与动物保持良好的接触，否则校准停止并提示警告，校准方式分自动校准和手动校准，在校准过程中默认为自动校准，如需手动校准只需点击按键即可完成校准。
6. 执行打击：打击前确保打击路径没有任何的障碍物遮挡，切勿把手或者身体的其它部分靠近打击头，否则将会发生危险。在主界面中，单击按钮进入打击流程，首先确认用户设定的打击参数，然后进行打击操作，打击完毕后用户可查看打击数据，包括打击速度、打击深度、打击停留时间。
7. 重复下一次打击：按 **confirm** 键跳转到“打击返回界面”，机架恢复到上位后，再跳转到主界面，等待下一次打击。
8. 关机：关闭气源，按压开关键关机。

第二章 形态室

2.1 小鼠灌注与切片

2.1.1 实验材料

4%多聚甲醛，生理盐水，灌注针，离心管，取材器械，刀片，OCT，脑托，脑槽。

2.1.2 实验流程

灌注流程如下：

小鼠固定于泡沫盒上，开腹开胸，暴露心脏，在心尖偏左处插入灌注针，剪开右心耳同时打开灌注泵，泵速 12 ml/min，灌注生理盐水 4 min，切换为 4%多聚甲醛，泵速 12 ml/min，灌注 4 min，断头取脑后浸泡于多聚甲醛中，后固定 6h 后，更换 20%蔗糖脱水（约 1 天沉底），30%蔗糖脱水（约 1 天沉底）。（将暂时不切片的小鼠脑组织取出后 OCT 包埋，-20 度保存，准备切片）

切片流程如下：

1. 准备脑托：点击屏幕上速冻台按钮，进度条到达 1/10 时，将脑托上涂抹 OCT 胶约 2-3 mm 厚，放置在速冻台上，待底座冷冻完全，切片机将底座修平整。
2. 准备脑组织：根据需要的脑区，修剪脑组织块，保证其头端和尾端均平整。
3. 冰冻脑组织：将脑组织立于脑托上方，周围包埋 OCT 胶适量，再次放入速冻台冷冻，第二个之后的脑组织可以按照上述方法，放在箱内缓慢冷冻也可以。
4. 切片：先冰冻好的脑组织固定于切片机机头，再置入刀片，固定刀片，移动屏幕中前进和后退按钮，直到样本即将到达刀头，切片温度为-13°，修片间距为 50 μm ，切片厚度可以根据实验需要，冰冻贴片厚度为 14-16 μm ，修片至所需脑区后，点击 16 μm 切片按钮，进行切片，一般第一张脑片厚度不准确，建议采用第二到第三张。

注：每切一次准备贴片前右侧旋转轮的锁扣要锁死。

5. 切片方法

方法一：防卷板后方旋钮可以调节其前进和后退，如超过刀片，组织片表现为贴在防卷板上，如过于靠后，组织表现为贴在到头上，调整防卷板前后到达适

当位置，进行切片。（此步骤在更换脑组织块，或者移动刀头位置后均需要细微的调整）

方法二：如果遇到防卷板不好调节，可以尝试练习不用防卷板，而使用毛笔法轻压脑组织周围包埋较多的 OCT 胶，用毛笔带着切脑片。

6. 贴片方法：

方法一：冷贴法，将玻片提前放在机箱内部的机头上方的平台上，此处温度较机头温度高，切片后，将预冷玻片按压脑片，然后用手温将其贴平。

方法二：热贴法，玻片上刷水后，切出十分平整脑片，热帖至玻片。

7. 不论冷贴和热帖法，如果切片厚度较薄如 16 μ m 左右，很难做到脑片完全平整，建议尽量多多练习，保证所观察脑区平整最重要。

8. 将贴好片的载玻片放玻片盒内。（注意：若组织本身有荧光，要注意全过程避光）

9. 实验后整理：

- a. 切片台上组织扫除到下方收纳盒，用吸铁石取下刀片，放置原位；
- b. 取下脑组织块，放置室温的滤纸上自热复温后融化，将脑托清洗干净，擦干放回原位；
- c. 将切片机内部脑组织扫除干净，点击屏幕左下方修片上方的箭头，复位切片机，将收纳盒拿出来清除样本，可用无水乙醇擦洗干净，并完全擦干后放置回原位；
- d. 右侧旋转轮的锁扣锁死；
- e. 点击待机按钮，将切片机待机。

2.2 大鼠灌注与切片

2.2.1 实验介绍

1 实验原理

心脏灌流术能够快速冲净血液并在动物死亡前进行组织的前固定,避免了组织的自溶现象,是脑组织切片观察的常用方法。多聚甲醛使组织蛋白发生交联,以保持蛋白的原位和表面结构不变,从而能使其对应的抗体准确检测其表达位置和量。

2 实验用途

用于免疫组化荧光染色等。

3 必要性

脑组织较软，且细胞成分不易保留，是较易软化的组织之一，血供也较为丰富，所以最好是在取脑组织前用 4% 多聚甲醛灌注固定。

经前固定后，取脑操作时，可减少脑组织损伤。

2.2.2 大鼠灌注取脑操作规程

1 实验流程

①. 麻醉 → ②. 开胸 → ③. 心脏左心室穿针并剪开右心耳 → ④. 生理盐水冲水 → ⑤. 4% 多聚甲醛固定 → ⑥. 取脑 → ⑦. 置于 4% 多聚甲醛后固定 2h → ⑧. 30% 蔗糖脱水，待大鼠脑沉底后切片。

2 实验操作

大鼠麻醉后，固定于自制的手术板上，置于解剖盘中，开胸暴露并游离出心脏，经左心室插入灌流针并固定（由于大鼠心脏较大，跳动较快建议用 10 ml 注射器针头剪去针尖使用），切开右心耳，先灌注 0.9% 生理盐水 100~150 mL（大鼠灌注建议先快后慢），直到肝和肺脏颜色转白及右心房流出液澄清，后再灌注 4% 多聚甲醛 300~400 mL（灌注时采用匀速蠕动泵时速 12~15 转/分钟，刚开始灌注时老鼠剧烈抽动；成功后老鼠后肢绷直，尾部竖起成一直线，所灌注的脑组织白而硬），断头取脑，多聚甲醛浸泡固定过夜。

2.2.3 注意事项

1. 多聚甲醛气味刺激，使用时开启通风做好自我保护。
2. 暴露心脏这一步骤，容易损伤肺、心脏或者肝脏，夹持剑突并向上提拉，用弯剪在膈肌与胸骨柄相连处剪一小口，造成人工气胸，人工气胸后，肺萎缩，胸腔里的空间增大，提拉剑突后，不容易损伤肺、心及肝脏，出血少。
3. 经心脏灌注，有时穿刺针会误进右心室，那样灌注主要在肺循环起作用，对体循环的血液影响不大。所以观察将穿刺针插入到主动脉内可以确保起到体循环灌注冲洗血液的效果，脑组织的血液冲干净后，才不会影响免疫组化的效果，不然到处都是红细胞造成的背景染色。
4. 灌注时注意排空输液管中的气泡不然容易气栓，影响灌注效果。一定要

看到大鼠较剧烈抽搐，不然证明灌注不好。

5. 灌注成功的标志：刚开始灌注时老鼠剧烈抽动；成功后老鼠后肢绷直，尾部竖起成一直线；所灌注的脑组织白而硬。

6. 体循环与肺循环的鉴别：体循环时大鼠肝脏变白现象出现较早，在灌注多聚甲醛后，四肢会出现明显的抽搐现象，尾巴和四肢明显僵硬。若灌流针误插入右心室，会导致灌流液沿肺循环途径灌流，这时肝脏变白出现的较慢，四肢的抽搐现象没有体循环明显，且鼻腔中有时会有灌流液流出。因肺循环会影响组织器官的灌流效果，因此进针时要准确，避免肺循环的发生。一旦出现肺循环指征，应及时调整进针角度。

2.3 免疫荧光染色

2.3.1 冰冻组织免疫荧光

1. 组织贴片后入 PBS 漂洗 3 次，摇床 90 rpm/min，每次 7 min 或 10 min；晾干后用免疫组化油笔将组织圈出来。

2. 0.2%Trion-100+3%BSA 破膜 37°C 30 min。（配方 1:4 ml PBS+8 ul Trion-100 +0.12 g BSA；配方 2:即用型山羊血清 4 ml+8 ul Trion-100；根据实验需要选择配方）

3. 双标一抗 A 和 B 的一抗同时滴加（浓度按照抗体说明书），配方同上一步，4°C过夜。（不同分组最好同一批次染色，同一荧光强度条件拍摄）

4. 第二天用 PBS 漂洗 3 次，摇床 90 rpm/min，每次 7 min 或 10 min。

5. 荧光二抗配方（配方 1: 4 ml PBS+0.12 g BSA；配方 2: 即用型山羊血清 4 ml；配方 3:PBS 根据实验需要选择配方），抗 A 和抗 B 同时滴加，避光室温 2 h。（一抗二抗的区别在于加不加 Trion-100）

6. 加入 DAPI 染核，室温 5 min-7 min 染色(根据说明书进行调整)，PBS 漂洗 3 次，摇床 90 rpm/min，每次 7 min 或 10 min。

7. 晾干后在样品上滴加防荧光淬灭剂，避免有气泡，盖上盖玻片即制作完毕，避光保存。盖玻片和载玻片上之间可用指甲油固定。

2.3.2 细胞免疫荧光

1. 吸除培养基，贴壁注入 PBS 浸洗细胞 3 次，每次 5 min。

2. 4%多聚甲醛 1 ml 固定，室温固定 15-30 min。
3. 吸除多聚甲醛，PBS 浸洗 3 次，摇床 60-70 rpm/min，每次 5 min。
4. 向孔内加入（配方 1:4 ml PBS+ 8ul Trion-100 +0.12g BSA；配方 2:即用型山羊血清 4 ml+8 ul Trion-100；根据实验需要选择配方）；室温通透 20 min，目的是使细胞通透。
5. 加入适量一抗（浓度按照抗体说明书），4℃湿盒内孵育过夜（配方 1:4 ml PBS+8 ul Trion-100 +0.12 g BSA；配方 2：即用型山羊血清 4 ml+8 ul Trion-100；根据实验需要选择配方）。
6. 加入适量二抗（配方 1: 4 ml PBS+0.12 g BSA；配方 2: 即用型山羊血清 4 ml；配方 3: PBS；根据实验需要选择配方），室温避光 2 h。（一抗二抗的区别在于加不加 Trion-100）
7. 加 DAPI 复染细胞核，室温避光 5 min-7 min。
8. PBS 轻洗 3 次，每次 5 min。
9. 晾干后在样品上滴加防荧光淬灭剂，避免有气泡，盖上盖玻片即制作完毕，避光保存。盖玻片和载玻片上之间可用指甲油固定。
10. 取出爬片，吸干液体，滴加防荧光淬灭剂，反过来贴于载玻片上。

第三章 细胞间

3.1 原代星形胶质细胞培养

3.1.1 实验材料

5.5 mM 或 25 mM DMEM, 胎牛血清, 双抗, 0.25%的胰酶, (含 10% FBS 和 1%双抗的 DMEM 培养液配置 100ml: 89 ml DMEM+双抗 1 ml+胎牛血清 10 ml), 6cm 小皿 4 个, 15ml 离心管, 无菌器械, 无菌枪头, 无菌吸管, 隔夜包被 PLL 的培养瓶 (第二天接种前用无菌双蒸水洗 3 遍, 吸干并紫外照射 15 min 较好)。PLL 5mg+10ml 无菌水=0.5 mg/ml, 稀释 10 倍即为星胶原代培养工作浓度 50 ug/ml。

3.1.2 实验流程

1. 新生 2-3 天的仔鼠, 无菌操作台内酒精浸泡 5-10 min, 保障消毒干净; 剪刀+小镊子, 剪颈后将头部置于 DMEM 液中 (6 cm 小皿); 换用另一套无菌直镊和弯镊, 剥离出脑组织置于 DMEM 液中 (6 cm 小皿)。

2. 显微镜下精密仪器 (直镊+弯镊) 剥除脑膜和表面血管, 取目标脑组织 (海马和或前额叶皮层), 置于无菌 DMEM 液中 (6 cm 小皿), (6 cm 小皿全程始终保持放在-20℃冰上), 吸去多余的 DMEM 液体后, 留下目标脑组织。

3. 眼科剪剪碎组织 (剪切 80 次左右, 边剪边搅拌, 小心组织液溢出), 加入 0.25%的胰酶 2-3 ml 37℃培养箱消化 5 min, 摇匀 10 下, 继续消化 5 min, 注意观察是否消化完全变成单细胞。

4. 加入等量的含 10%血清的 DMEM 培养液 2-3 ml 终止消化, 弯头滴管将组织混悬液移至无菌的 15 ml 离心管, 螺旋式上升下降吹打 50 或 80 次, 切记滴管内液体不要打完, 不要将空气吹入。

5. 沉淀 30 s, 将上清移液至 75 um 孔径的尼龙网 (或者 400 目滤网) 过滤, 离心管内沉淀继续加入适量含 10%血清的 DMEM 培养液吹打 50 或 80 次, 反复操作 2 遍, 共计吹打 50 或 80 次 3 遍。

6. 收集滤液, 1000 rpm/min, 离心 10 min, 弃掉上清, 加入适量培养液 3 ml-4 ml, 1 ml 枪头吹匀细胞悬液 (20 次左右不要吹入空气), 细胞计数板计数, 接种于隔夜包被 PLL 的无菌培养瓶中 (3 只仔鼠接种一个 75 cm² 培养瓶)。

7. 前 3 天不要移动, 不要给细胞换液, 3 天换液一次, 利于胶质细胞贴壁

生长，长至 7-9 天时，倾倒掉旧的培养液，换成新的培养液，纯化星形胶质细胞（37℃恒温摇床，300 rpm/min, 20 h-22 h），上清中含有小胶质细胞和少突胶质细胞，贴壁的为星形胶质细胞。

8. 弃掉上清后，用无菌 PBS 清洗细胞 3 次，0.25%的胰酶 3 ml，37℃孵箱中消化 5 min（中途观察，若开始有细胞漂起来，且大面积细胞呈圆球形，立即终止消化）。

9. 等量含 10%血清 DMEM 培养液中和后，弯头滴管将贴壁的星形胶质细胞吹下来，吸至离心管内，1000 rpm/min，离心 10 min，倾倒弃去上清，留底层细胞沉淀，加入适量 10ml 培养液吹成单细胞悬液，细胞计数板计数，10 ul 液体，ABCD 四个象限，每个象限有 16 个小格子，A+B+C+D 的总和除以 4 乘以 $10^4/\text{ml}$ 即为细胞密度，按接种密度进行稀释接种至需要的板子上。

表 1 细胞培养对照表

细胞培养板	接种量	培养基量	胰酶消化用量
96 孔板	5×10^4 个/ml	100 ul	/
24 孔板	5×10^4 个/ml *500 ul 原液	500 ul (500 ul-1 ml)	/
6 孔板	5×10^4 个/ml*2 ml 原液	2 ml	1 ml
6cm 皿	1 个 75 cm 的大 瓶可以接种 6-8 个皿 10^6 个细胞	2.5 ml (2.5-3 ml)	/
10cm 皿	6×10^6 个细胞	10 ml (8-10 ml)	
25cm ²	/	3 ml	3 ml
75cm ²	/	8 ml	3 ml

3.2 原代小胶质细胞培养

3.2.1 实验材料

含 10%FBS 及 1%双抗的完全 DMEM 培养基，10cm 大皿，6cm 小皿，15ml 离心管，无菌器械，无菌枪头，无菌吸管，隔夜包被 PLL 的培养瓶（接种前用无

菌水洗 3 遍)。

3.2.2 实验步骤

1. 新生 1-3 天的仔鼠，无菌操作台内酒精浸泡 5-10 min，消毒彻底。
2. 剪颈后将头部置于 DMEM 液中（10 cm 大皿），换用一套直镊和弯镊，剥离出脑组织置于 DMEM 液中（6 cm 小皿）。显微镜下精密仪器（直镊+弯镊）剥除脑膜和表面血管，取目标脑组织（海马和或前额叶皮层），置于 DMEM 液中（6 cm 小皿）。
3. 吸去多余的 DMEM 液体后，留下目标脑组织，眼科剪剪碎组织，加入 0.25% 的胰酶 2-3 ml 消化 10 min，加入等量的含 10% 血清的 DMEM 培养液 2-3 ml 终止消化，弯头滴管吹打。
4. 75 μ m 孔径的尼龙网（或者 400 目滤网）过滤，收集滤液，1000 rpm/min，离心 10 min，弃去上清，加入适量培养液，1 ml-2 ml 移液管吹匀细胞悬液。
5. 细胞计数板计数，接种于隔夜包被 PLL 的无菌培养瓶中，3 天换液一次，前 3 天不要移动，不要给细胞换液，利于胶质细胞贴壁生长，3 天后根据细胞的生长状态及密度，适量换液。
6. 长至 7-9 天时，观察细胞数，长满后，即可纯化小胶质细胞。
7. 纯化小胶质细胞：37℃ 恒温摇床，300 rpm/min，4 h，上清中含有小胶质细胞和少突胶质细胞，收集上清，离心：1000 rpm，10 min，弃上清，细胞沉淀加入适量的完全培养基重悬，细胞计数板计数，根据细胞数的多少，接种于培养瓶或所需的培养板内。

3.3 原代神经元细胞培养

3.3.1 实验材料

动物：孕鼠（E14-16d）。

耗材：75%酒精，碘伏，眼科剪、显微剪、显微镊、中号镊子、中号剪刀、眼科弯镊、眼科直镊等器械，15ml（50ml）离心管，细胞培养皿等，无菌去离子水、70 μ m 滤网、玻璃滴管。

试剂：多聚赖氨酸，Neurobasal 培养基，DMED 培养基，B27，N2，谷氨酰胺，双抗，胎牛血清，胰酶，HBSS 缓冲液。

3.3.2 准备工作

1. DMEM 完全培养基的配制：按胎牛血清与 DMEM 培养液体积比 1: 10，无菌条件下加入 1% 体积分数的双抗贮存液(青霉素+链霉素)，使青霉素和链霉素的终浓度分别为 100 U/mL 和 100 U/mL，置于 4℃ 冰箱保存。

2. 神经细胞维持培养液（无血清培养液）的制备：Neurobasal；2% B27；0.5mmol/L L-谷氨酰胺；1% N2；1% 青链霉素。

3. 培养皿（瓶）包被：将细胞培养板用多聚赖氨酸包被，培养箱培养 4-6 h，次日细胞培养前，用无菌去离子水洗涤包被过的细胞培养板 3 次，晾干备用。

3.3.3 实验流程

1. 将孕鼠处死后，仰卧位放入消毒盘内进行消毒，使用棉球蘸取碘伏，由中心向外周擦拭腹部，面积尽量大（需包括腹部和外生殖器周围），重复 3 次。消毒结束后，打开腹腔，分离子宫，将胎鼠脐带剪断后取出，放入预冷的 HBSS 缓冲液中。

2. 迅速去除胎鼠的颅骨，在手术显微镜下小心地剥离脑膜，并仔细地分离出胎鼠脑的皮层组织(此步骤非常重要，因为如果脑膜剥离不彻底，会使脑膜中成纤维细胞增殖而抑制神经元生长)，放入另一个盛有预冷 HBSS 缓冲液的培养皿中。

3. 使用虹膜剪将脑组织剪碎呈乳糜状，再向培养皿中加入适量胰酶（以上操作应在冰上完成），放入细胞培养箱内消化 10 min，期间可轻轻摇晃一次以利于完全消化。

4. 消化完成后，将组织吸入离心管中，并加入充足完全培养基终止消化，反复吹打后静置 5 min。使用 70 μm 滤网过滤吹打后的细胞悬液，收集过滤液 1000 r/min 离心 5 min。

5. 离心结束后，弃去上清液，用神经细胞维持培养液重悬细胞，加入细胞培养板内，在细胞培养箱中培养，以后隔天半量换液一次，至第 6-7 d 培养的细胞即可基本铺满瓶底，经鉴定，纯度比例合格后就可以使用。

3.4 脑肿瘤细胞培养、冻存和复苏（酶消化法）

1. 在超净台中将无菌条件下取的新鲜人脑胶质瘤组织用无菌 D-Hanks 清洗。

2. 将组织放入含有 D-Hanks 的培养皿中，用无菌的显微镊和剪刀尽可能地剪碎成小块。
3. 移除培养皿中 D-Hanks，加入含 0.25%胰酶的组织消化液覆盖组织碎块，轻轻振荡，放置 37℃孵箱静置 15 min。
4. 使用 1 ml 枪头反复吹打消化后的组织，用无菌的 200 目筛网过滤细胞悬液。
5. 将上一步过滤得到的细胞悬液放入离心机，离心转速 900 rpm，10 min。
6. 移除上清液，用含有 10%胎牛血清的 DMEM 冲悬细胞团块，使用 1 ml 枪头反复吹打形成单细胞悬液。
7. 将细胞接种于培养皿中， 5×10^4 个/cm²，把培养皿放置于 37℃ 5%CO₂ 孵箱中，次日显微镜下观察是否贴壁。
8. 观察细胞生长情况，每 2-3 天更换一次培养液。
9. 待细胞生长融合度 90%左右，进行传代或细胞冻存。

第四章 动物行为室

4.1 转棒实验

4.1.1 预实验

先进行为期 2 d 的适应性预实验，每天将小鼠放置在转棒疲劳仪上，设置转棒疲劳仪转速 20 r/min，时间 10 min。如有小鼠中途掉落，则将小鼠放回转棒上继续适应。

4.1.2 正式试验

设置转棒疲劳仪转速 40 r/min，记录 5 min 内小鼠从开始到掉棒的时间。本实验为一次性测试结果。

1. 将 5 只小鼠分别放在转棒的 5 个通道上，设置好“日期”、“转速”、“TRAIN”（训练模式）。
2. 转速设置为 2 r/min，按下“启/停”按钮，仪器开始计时，并匀加速运动到设置到的转速后作匀速转动，选择能在棒上 3 min 而不落下的动物进行实验，此时为筛选适应过程，不记录数据。
3. 将已训练的实验动物分组，设置好“转速”、“定时时间”、“TEST0”（顺时针）或“TEST”（逆时针），按下“启/停”按钮，把小鼠放在旋转棒上的同时遮挡一下本通道落棒感应器，系统发出提示音，触发计时，当任意通道的小鼠落棒时，对应的液晶显示器上的通道将停止计时。统计落棒的百分率，并比较对照组和运动组的差异。

4.2 小鼠平台式跑步实验

4.2.1 实验介绍

动物跑台主要用于白鼠类小动物作跑步运动训练，可取代传统的游泳训练，使训练强度指标更加准确，是体能、耐力、运动损伤、营养、药物、生理和病理等实验的必要的手段之一。

4.2.2 小鼠跑台技术参数

1. 进入系统界面后，可以自主切换大小鼠模式。
2. 跑台为 8 小鼠，4 大鼠通用，可自主调节隔板进行大小鼠实验。

3. 8 小鼠跑台架尺寸：长*宽*高：565*630*310mm，单跑道宽 55mm，
- 4 大鼠跑台架尺寸：长*宽*高：565*630*310mm，单跑道宽 116mm。
4. 跑道速度无级可调，速度范围在 0-60 米/分。(大鼠推荐 20 米/分、小鼠推荐 15 米/分)
5. 加速度 0-10 m/s² 可调。
6. 力竭控制：1-999 次力调次数可调，1-300s 力竭时间可调，可同时设置时间和次数来进行精准的判断动物力竭。
7. 电刺激虚拟开关控制，刺激电流 0~5 mA 范围可调，步长 0.1 mA。
8. 跑台倾角-25-+25° 以内可调，步长 5° 。
9. 刺激方式：电刺激、光刺激、声音刺激。

4.2.3 实验设置

1. 总时间：是指跑台总运行时间高位为小时(h)，最大值为 999 h，低位为分钟(m)，最大值 59 min。
2. 运动时间：当休息时间不设置时，以总时间运行，当休息时间设置时，它与休息时间配合工作，直至到总时间。高位为分钟(m)最大值为 99 min，低位为秒(s)，最大值 59 s。
3. 休息时间：如果中途需要定时的让实验动物休息，可设置此项。高位为分钟(m)，最大值为 99 min，低位为秒(s)，最大值 59 s。
4. 加速度设置：1-10 m/s²，值越大加速越快。
5. 刺激设定：设置刺激动物的电流值。参考值：大鼠不低于 10 mA，小鼠不低于 0.6 mA。
6. 力竭次数：需要同时设置次数以及时间，**时间内被电刺**次后，被判定力竭。
7. 速度设置：设置跑步机的运行速度，最大为 60 m/min，步长 1 m/min。可实时设置。
8. 声、光、电刺激，为刺激按钮，在实验的过程中根据需要给予实验动物相应的刺激。
9. 力竭设置：力竭打开，即做力竭实验——实验动物在设定的时间内被电击相应设置的电刺次数后，即判定该实验动物已力竭，仪器记录力竭时间并停止

电击，力竭关即正常实验。

10. 浏览：点击浏览，可以查看之前的实验数据，可以操作打印，以及上传数据用。

4.2.4 实验操作

1. 开机：点击通用，进入主界面。
2. 模式：点击大小鼠，切换所需的大鼠模式或者小鼠模式。
3. 时间：若要调整屏幕右上方的时间，会弹出一个设窗口进行设置。
4. 设置：

(1) 按“设置”按钮，即可用“+”“-”进行调整，可设置的参数包括“总时间”“运动时间”“休息时间”。(注：这些参数在实验后不可更改，再次新建试验后方可修改)

(2) 直接点击“电刺强度”，再点击“+”，“-”，可进行设置。

(3) 力竭次数，加速度，同理设置，且实验开始后不可更改。

(4) 速度可实时更改，实验开始前和实验开始后均可调节。

(5) 声，光，电，力竭均有单独虚拟按键进行开关。

5. 开始：点击开始实验后，只有声，光，电，以及速度可以调节，其他均不能调节

6. 浏览：实验结束后，点击浏览便可查看数据，点击上页下页便可查看所有的实验数据。

7. 打印/上传：连接打印机电脑后，必须在浏览状态下，才能打印上传数据。

4.2.5 注意事项

1. 不要将仪器侧置倒置和重压、碰撞。
2. 仪器应保持清洁，直放在通风干燥处。
3. 实验结束后请立即关闭电源并将实验箱清洗干净、凉干后放回原处。
4. 拭仪器用湿布即可，不可用有机溶剂，否则将破坏仪器表面美观。
5. 由于机械运动损耗，跑步机使用每隔一段时间要使用润滑油进行润滑，推荐每两个月润滑一次，具体视使用总时间而定。

4.2.6 实验心得

1. 尽量不要使用电击方式敦促小鼠跑步（对小鼠刺激过大），建议使用纸板

阻挡跑台，防止小鼠偷懒。

2. 跑步后期小鼠四肢肌肉较强健有力，可以轻松跳跃出跑台，建议配合盖子使用。

3. 小鼠在跑台最边缘活动时，尾巴易被轴带卷入而受伤，建议不要使用最外侧的两个跑道。

4. 中间区域可以不放置隔板，让多只小鼠共同跑步。

4.3 小鼠震惊反射条件恐惧

4.3.1 Panlab Fear condition 仪器参数校准

1. 重力感应模块校准

(1) 打开 LE 111 至 Use 模式 (5) 开始校准，电源拨至 DC 档 (6) 校准模式 (AC 档，使用模式)，Filter 0.5Hz (7)，增益 5000 (8) (推荐：小鼠 5000，大鼠 2000)。

(2) 将实验动物置入箱内，观测重力值参数是否过小或者过大以调节增益 (Gain) 的值。数值偏小则提高增益，偏大甚至超过量程则减小增益。

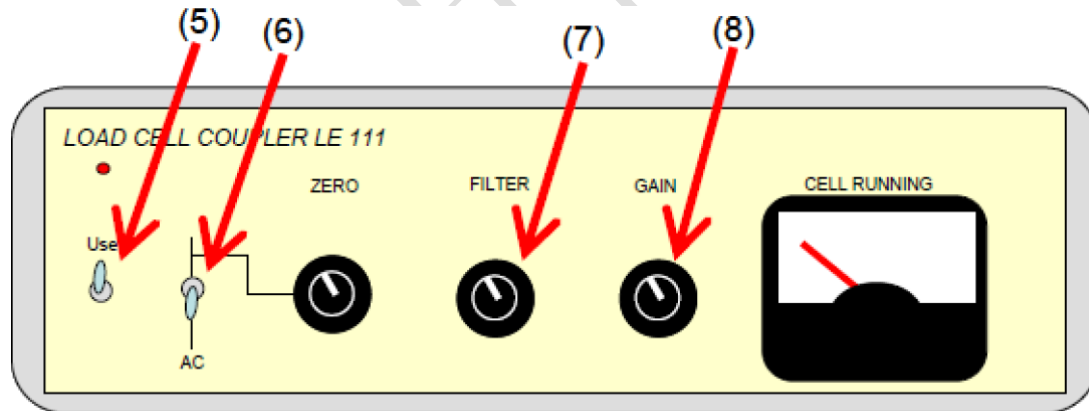


图 2 重力感应模块校准图示

2. 重力感应校正详细步骤

- (1) 确保底板正常放置 (卡在四个感应点上)，且无动物、异物等；
- (2) 将仪器拨至 DC 档，USE，GAIN 200；
- (3) 通过 ZERO 旋钮校准指针至 0 刻度；
- (4) 逐级增加增益 (GAIN) 至 5000，同样校正指针至 0 刻度；

(5) 放置 20 g 的标准物品于仪器上作参照，在增益为 5000（小鼠；PS：大鼠增益推荐 2000，对应的值为 0.4mA）时调整至 1 mA。不同的增益校正值不同，详见对照表（图 3）。

With 20gr, the reading at the different gains will be the following:

GAIN	VU-METER	OUTPUT
5000	1	2V
2000	0.4	800mV
1000	0.2	400mV
500	0.1	200mV
200	0.04	80mV

图 3 不同增益校正值对照表

注：不同动物增益值的选择：将实验动物置入箱内，观测重力值参数是否过小或者过大以调节增益（Gain）的值。数值偏小则提高增益，偏大甚至超过量程则减小增益。

(6) 图示：调教 20 g 参照时螺丝刀需要调节的位置说明（1），参数观察窗口（2），如图 4 所示：

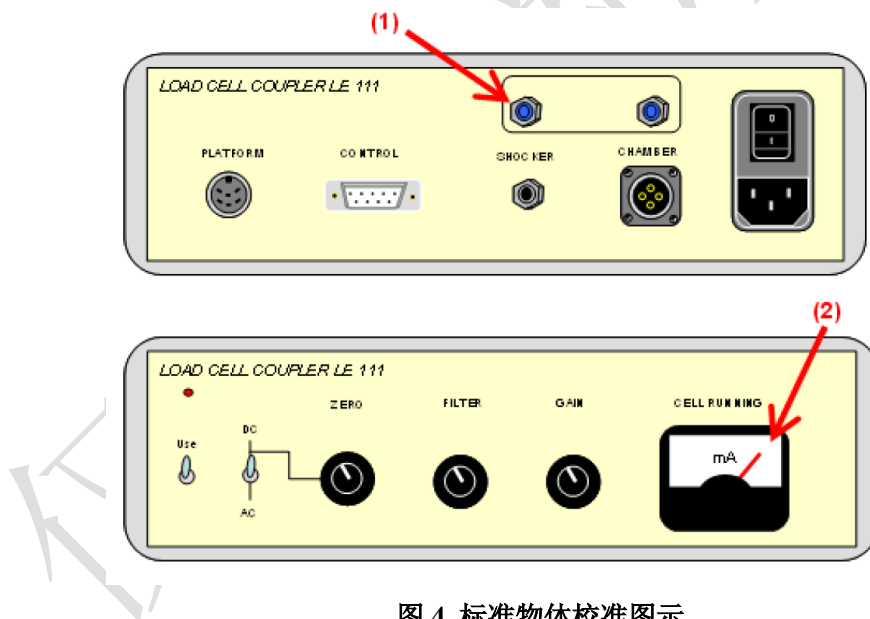


图 4 标准物体校准图示

(7) 完成校正后拨回 AC 档。

3. 设置刺激强度(LE 100-26)

电刺激的电流大小由 LE 100-26 控制。选择测试模式（Calibration control），并且打到 x1 档，电流大小通过旋钮（1）调节，如图 5 所示。完成参数调校后，将仪器拨回 shock 档。

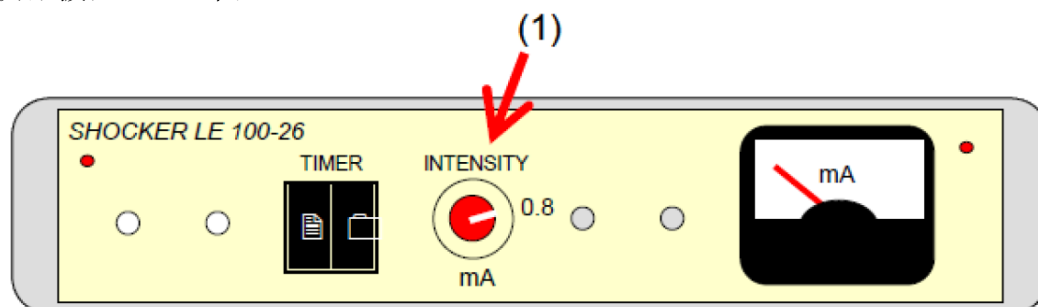


图 5 设置电刺激强度图示

注：旋钮上的数值只是参考值，实际电流大小需要从电流表中读数。

4. 音频校准(详细见厂家说明书，一般重力及电流刺激强度常常需要校准)

完成所有校正后打开软件，测试相应的模块是否运行，指示灯是否点亮。确认无误则完成校正过程。

4.3.2 Fear Condition 软件

1. 打开 Freezing 软件选择 File>New 编辑一个新的实验文件。
2. 编辑实验的 protocol: protocol 根据个人实验流程进行编辑，注意若 protocol 建立有错误，常导致软件无法运行。
3. 根据软件流程指示依次编辑实验组/实验对象并放入相应的 box，选择编辑好的 protocol 开始实验，实验结束后导出数据及对应的图。

注意：实验设备几个模块安装较复杂，工程师已安装好，开启及关闭直接打开或关闭电源即可，请勿随意拔除或拆卸，影响其他人使用；更换实验动物，清除箱体时，请勿移动箱体的底座，以免影响重力感应系统。

4.4 小鼠听觉刺激惊跳反射前脉冲抑制（PPI）

4.5 光遗传实验

4.5.1 实验操作

1. 按照“小鼠立体定位注射实验步骤”进行病毒注射等预备实验。

2. 连接千奥星科光纤记录系统。需要器材包括光纤记录仪、行为学实验电脑、打标黑箱、光纤。将光纤记录仪和打标黑箱通过 USB 接口连接到行为学实验电脑上，将光纤连接到光纤系统记录仪上。

注：光纤连接先连 1 分 4 光纤，再连单根光纤。1 分 4 光纤是贵重器材，请小心操作。连接光纤时注意严禁折断光纤。

3. 打开电脑桌面上的光纤系统记录软件，图标为黑色背景灰色小鼠。

4. 点击界面左上角的白色箭头，选择保存数据的路径。

5. 在软件右侧选择光纤记录区域。

6. 点击 record，记录钙信号。点击 stop，停止记录钙信号。

7. 打开电脑桌面上的光纤记录系统分析软件，分别导入命名中含有 event 的 tmds 文件进入 cue 中；导入另一命名中无 event 的 tmds 文件进入 signal。此时软件自动在 tmds 文件夹下生成 2 个 csv 文件。

8. 根据实验目的将 csv 文件导入 matlab 进行需要目的的数据分析。

4.5.2 实验心得

1. 在进行光纤记录的时候，光强设置为末端 $40\mu\text{W}$ 可提供较好的灵敏度和实验数据。设备已调整完，避光强旋钮无需改动。如果发现光强发生很大变化，需要注意光纤是否折断。由于光纤数量少，订购周期长，光纤折断必须及时报备并订购新光纤。

2. 进行光纤记录时应尽量避免小鼠受到其他刺激，保持行为学实验室安静环境，无特殊气味等。

4.6 化学遗传实验

4.7 小鼠脑电分析仪

4.85-9 孔测试

4.8.1 实验准备

提前 3 天禁水（禁水期间，每天 handle 小鼠，结束后给水 1ml），测量并记录初始体重，实验初期需每天称重，观测体重变化，体重下降过多的小鼠需即时补水。（保证小鼠试验期间体重下降不超过初始体重的 20%）

实验过程中若小鼠出现过度暴躁（在箱中反复跳跃、撞墙等行为）或萎靡不动，每日饮水量仅为几滴，可视情况暂停该小鼠的训练，给水瓶休息 1-2 天，后禁水 1-2 天，再次进入训练。

注：小鼠每天 60 滴（一滴 20 μ l，一共 1.2 ml）饮水量基本可以保证体重不掉、精神状态良好、第二天仍有较强的饮水需求。

4.8.2 Pre-training

1. 程序设定

1st: 程序设定 A--亮灯，自动给水，孔不亮。（间隔 30 s 给一次，共 30 min，共给 60 滴）

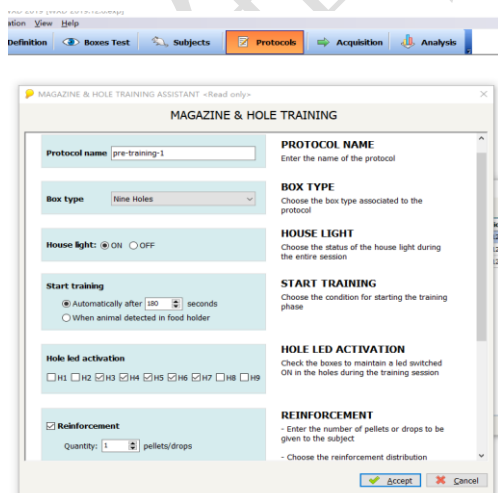
2nd: 程序设定 B--亮灯，一孔亮(推荐第 5 孔)，触碰亮灯孔，给水，设定 30 min，若小鼠表现不佳，可延长时间。（在孔内放置糖豆或面包可引诱小鼠触碰）

3rd: 程序设定 C--亮灯，五孔亮（1、3、5、7、9 孔），触碰任意一亮灯孔，均给水，设定 30 min，若小鼠表现不佳，可延长时间。（在孔内放置糖豆或面包可引诱小鼠触碰）

小鼠在程序 C 下达到 60 次以上的正确触碰次数后，可正式开始试验，程序 B+C 一般持续 3 天左右。

2. 程序设定示例与说明

pre-training 阶段:



水



IT1

Fixed

Duration

5.00

seconds

Variable

Min.Duration

0.00

seconds

Max.Duration

0.00

seconds

Nb. of Values

2

House light: ☒ ON ☐ OFF

Hole LEDs Activation

☐ H1

☐ H2

☐ H3

☐ H4

☒ H5

☒ H6

☐ H7

☐ H8

☐ H9

Duration:

35.00

seconds

House light: ☒ ON ☐ OFF

Limited Holding Time

Duration:

5.00

seconds

House light: ☒ ON ☐ OFF

Reinforcement

Quantity:

1

pellets/drops

House light: ☒ ON ☐ OFF

INTER-TRIAL INTERVAL (ITI)

- Choose between fixed ITI or variable ITI
- If Fixed ITI is selected, enter its duration
- If Variable ITI is selected, enter the minimal and maximal ITI duration and the total number of possible values for the ITI duration
- Switch ON/OFF the light during the ITI

HOLE LEADS ACTIVATION

- Choose the holes in which the LEDs will be switched ON
- Set the duration of the LED activation
- Switch ON/OFF the light during the Hole LED Activation

LIMITED HOLDING (LH) TIME

- Set the duration of the LH period
- Switch ON/OFF the light during the LH period

REINFORCEMENT

- Set the quantity of pellets/drops delivered
- Switch ON/OFF the light during the reinforcement

Time-Out

Start Time-out after:

☒ Incorrect responses
☐ Omission
☒ Premature response

Duration: seconds

House light: ☐ ON ☒ OFF

☒ During Time-out
☐ Until next ITI

☐ Reset time-out when response into the holes

TIME-OUT

- Check the boxes corresponding to the responses that will be followed by a Time-out period

 - Set the duration of the Time-out

 - Switch ON/OFF the light during the time-out

 - Reset: check the box for resetting the Time-out when the animal makes nose-pokes during this period

Start next ITI

☒ When animal detected in food holder
☐ Automatically after seconds

START NEXT ITI

Choose to start a new trial when the animal is detected in the food holder or after a fixed period of time

END

☒ After minutes
☐ After trials

☐ Premature excluded

END

Ends the experiment after a fixed time period and/or a fixed number of trials (including premature response if option checked)

Accept

Cancel

可设定每天每只 30 min 或每天每只 100 trials。

计算公式:

ing a correct response (see Supplemental Material for more detail). The calculated response outcomes were *percent correct*, calculated as $\# \text{ correct responses} / (\text{correct} + \text{incorrect} + \text{premature} + \text{omissions}) \times 100$; *percent incorrect*, calculated as above but with incorrect responses in the numerator; *percent accuracy*, calculated as $\# \text{ correct responses} / (\text{correct} + \text{incorrect}) \times 100$; *percent premature*, calculated as $\# \text{ premature responses} / (\text{correct} + \text{incorrect} + \text{premature} + \text{omissions}) \times 100$; and *percent omissions*, calculated as $\# \text{ omissions} / (\text{correct} + \text{incorrect} + \text{premature} + \text{omissions}) \times 100$.

4.8.4 程序设定及进阶要求

“The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats”--2008 NATURE PROTOCOLS

TABLE 1 | 5-CSRTT training schedule.

Training stage	Stimulus duration (s)	ITI (s)	LH (s)	Criterion to move to next stage
1	30	2	30	≥ 30 Correct trials
2	20	2	20	≥ 30 Correct trials
3	10	5	10	≥ 50 Correct trials
4	5	5	5	≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy
5	2.5	5	5	≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy < 20% Omissions
6	1.25	5	5	≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy < 20% Omissions
7	1	5	5	≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy < 20% Omissions
8	0.9	5	5	≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy < 20% Omissions
9	0.8	5	5	≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy < 20% Omissions
10	0.7	5	5	≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy < 20% Omissions
11	0.6	5	5	≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy < 20% Omissions
12 Target parameters	0.5	5	5	≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy < 20% Omissions

Overview of the steps involved in training rats on the 5-choice serial reaction time task (5-CSRTT). Following habituation to the chamber, training proceeds via 12 distinct criterion-based stages. ITI, inter-trial interval; LH, limited hold.

图 6 程序设定及进阶要求参考文献

鲁有明版

Stages	DT (s)	SD(s)	RT (s)	Criteria
1	5	32	36	>50% correct trials
2	5	16	20	> 50% correct trials
3	5	8	12	> 40% correct trials
4	5	4	8	>80% correct trials
5	5/4/3	2	5	> 80% correct trials

DT: delay time; SD: stimulus duration; RT: reaction time

图 7 程序设定及进阶要求鲁有明版

4.8.5 Test

1. 随机化最高 stage 下的 ITI（目前程序只允许设定间隔 2 s 的随机变化，如 3s、5s、7s），进行测试，统计小鼠 correct%，accuracy%，premature%有无差异。（前两者反应学习记忆，后者反应冲动行为）

2. 随机化最高 stage 下的 SD（如 1s、1.5s、2s，但目前程序不允许），进行测试，统计小鼠 correct%，accuracy%，premature%有无差异。（前两者反应学习记忆，后者反应冲动行为）

3. 随机化 ITI 主要看 premature%有无差异。

4. 随机化 SD 主要看 correct%，accuracy%有无差异。

注：此实验需每日观察小鼠状态与情况，及时灵活调整实验流程与方案。

4.9 Smart 3.0（旷场、Y/T/巴恩斯迷宫、高架十字迷宫、悬尾实验、三箱社交行为测试）

4.9.1 实验介绍

1. 旷场试验

动物在中央活动次数反映了焦虑程度，即中央活动次数越多焦虑越少。旷场实验获得的数据主要为中央、边缘活动的时间和运动距离以及平均速度等，是最

经济有效、简单、经典的用于评价动物自发活动以及焦虑状态的行为学试验。

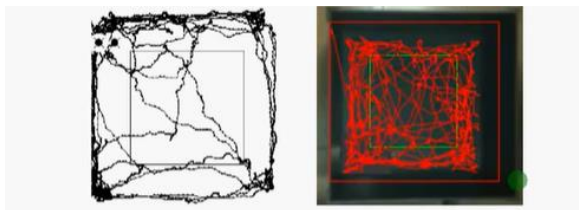


图 8 旷场实验结果示意图

2. Y/T 迷宫

Y/T 迷宫可以进行学习记忆类研究，通过空间定位及路径判断学习能力。啮齿类动物对新异环境具有天然探究的自然习性，不需要动物学习任何规则来趋利避害，能够有效地反映出动物对新异环境的识别记忆能力。任选一臂作为“起始臂”，另一臂作为“新颖臂”，第三臂作为“其他臂”。第一次测试现将动物背朝中央放入“起始臂”，同时关闭“新颖臂”，让其在 2 臂中自由探索 10-15 min，1h 后再动物背朝中央放入“起始臂”，同时打开“新颖臂”，让动物自由探索 5-10 min，检测每个臂进入的次数、在“新颖区”的停留时间、“新颖区”作为动物首选进入臂的百分比、进臂总次数等。

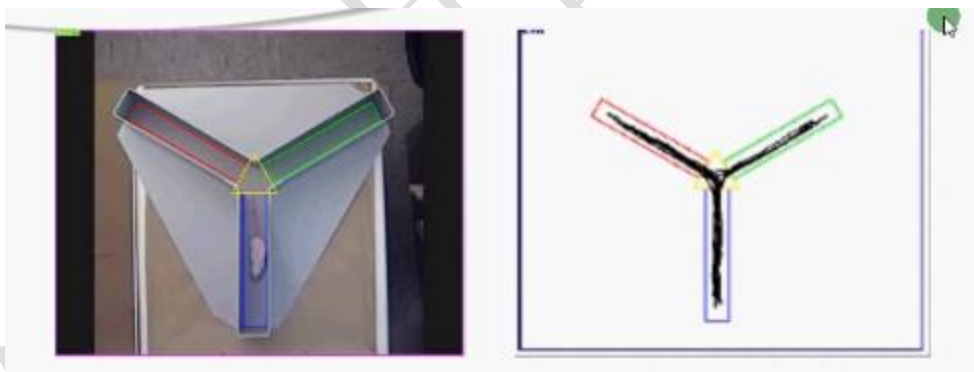


图 9 Y 迷宫示意图

3. 高架十字迷宫

主要记录闭合臂的进入次数、开放臂的进入次数、闭合臂的停留时间、开放臂的停留时间以及各个次数和时间的百分比等，取消高架十字中间区域，可以避免中央交叉区域引起的心理暗示。（动物在中央区域时无法确定是否处于焦虑状态）

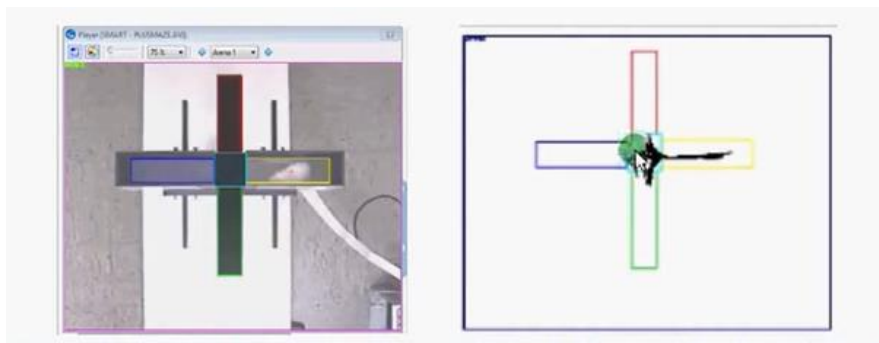


图 10 高架十字迷宫示意图

4. 三腔社交

三腔社会交互箱是常用来评估自闭症行为的实验。动物交际实验系统设计是在小鼠熟悉了环境后，检测小鼠头部靠近位于实验箱中装有另一只陌生小鼠金属笼的时间，来判断小鼠的社交能力。在实验中，通常会比较小鼠靠近关有熟悉小鼠金属笼时间与陌生小鼠金属笼的时间。

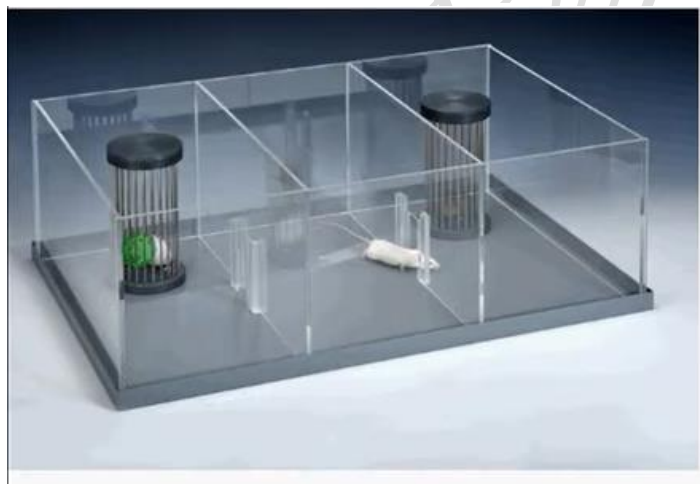


图 11 三腔社会交互箱示意图

5. 巴恩斯迷宫



图 12 巴恩斯迷宫示意图

巴恩斯迷宫用于评估大小鼠的空间学习和记忆能力。迷宫表面使用强光照明让动物产生厌恶，给动物找到正确的洞穿过迷宫表面的机会，下方是一个“安全盒”，研究者测量动物到“安全盒”需要的总的时间。

6. 悬尾实验

悬尾实验是一种经典而又能快速评价抗抑郁药物、兴奋药物、镇静药物药效的方法。其原理是利用小鼠悬尾后企图逃脱但又无法逃脱，从而放弃挣扎，进入特有的抑郁不动状态，实验过程中记录动物不动时间来反映抑郁状态，抗抑郁药物、兴奋药物能明显地缩短改变其状态。



图 13 悬尾实验示意图

4.9.2 SMART 小动物行为分析系统组成



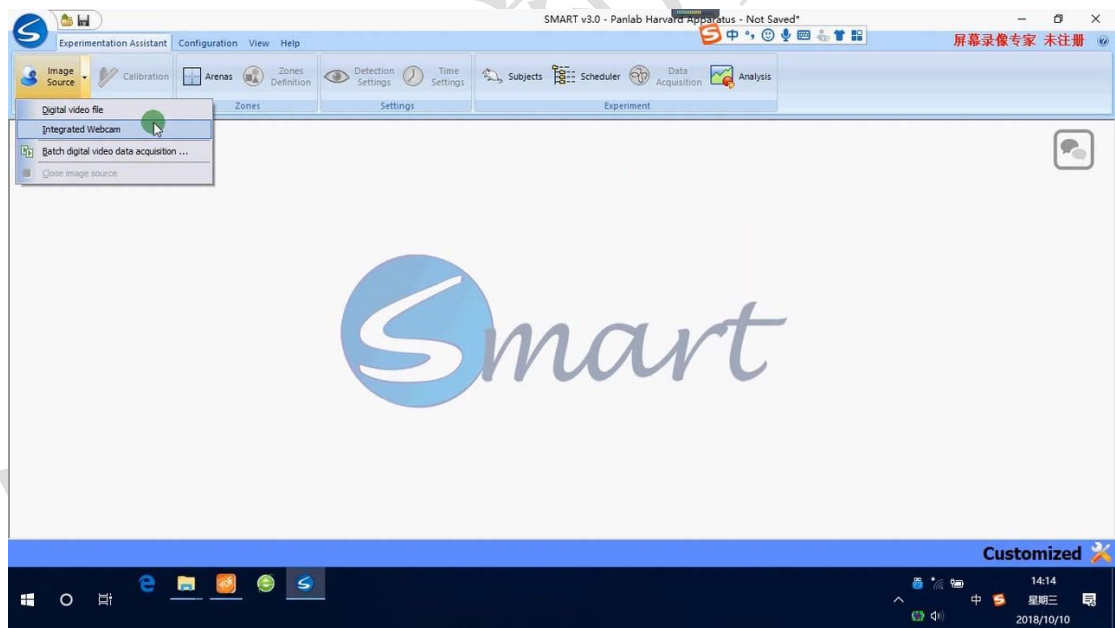
图 14 Y SMART 小动物行为分析系统组成示意图

4.9.3 软件操作步骤

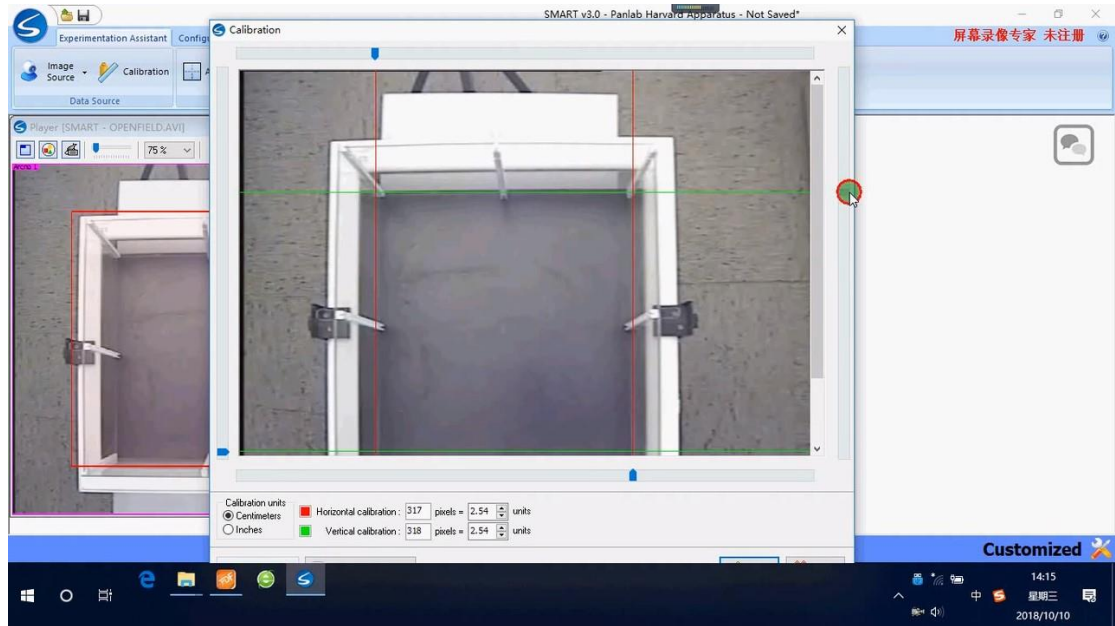
1. 点开 smart 3.0 图标，根据不同实验选择相应模块。



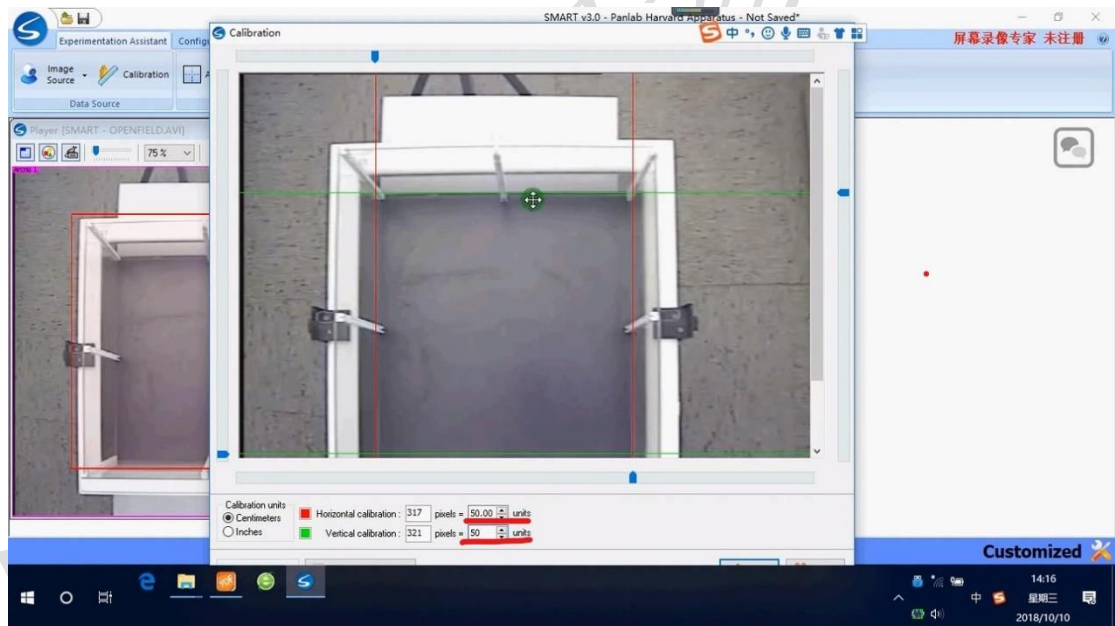
2. 选择保存路径（在 Configuration 中选择保存路径）
3. 选择视频来源（可选择已拍摄的视频或所连接的摄像头）



4. 调节比例尺（点击 Calibration）



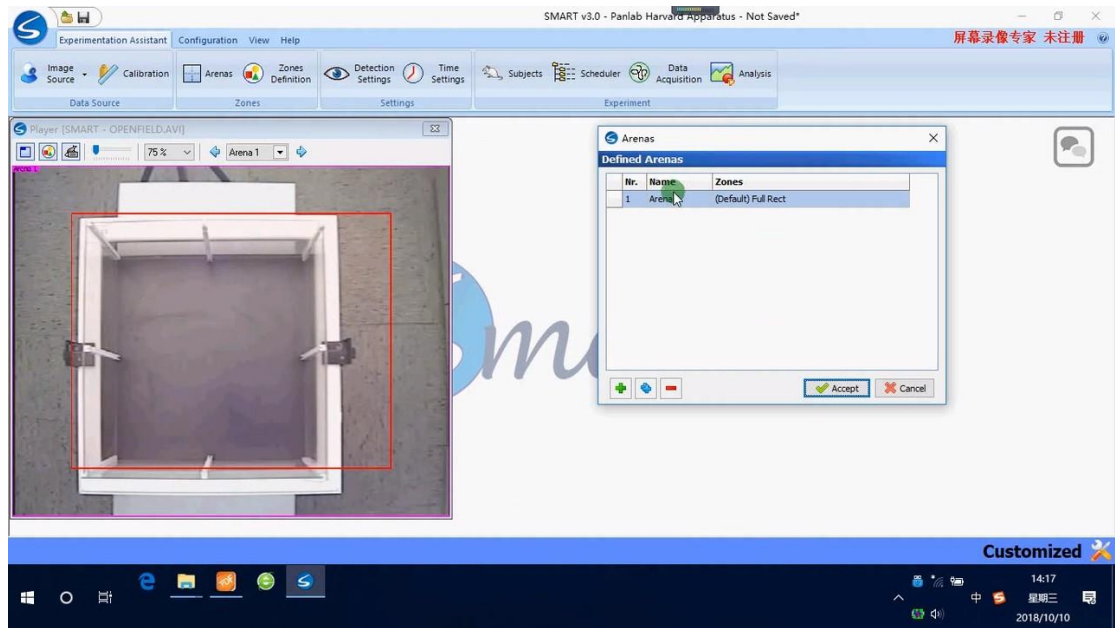
1) 调节比例标尺（放到内圈，即动物可以跑的范围）



2) 输入实际测量的距离，单位为 cm

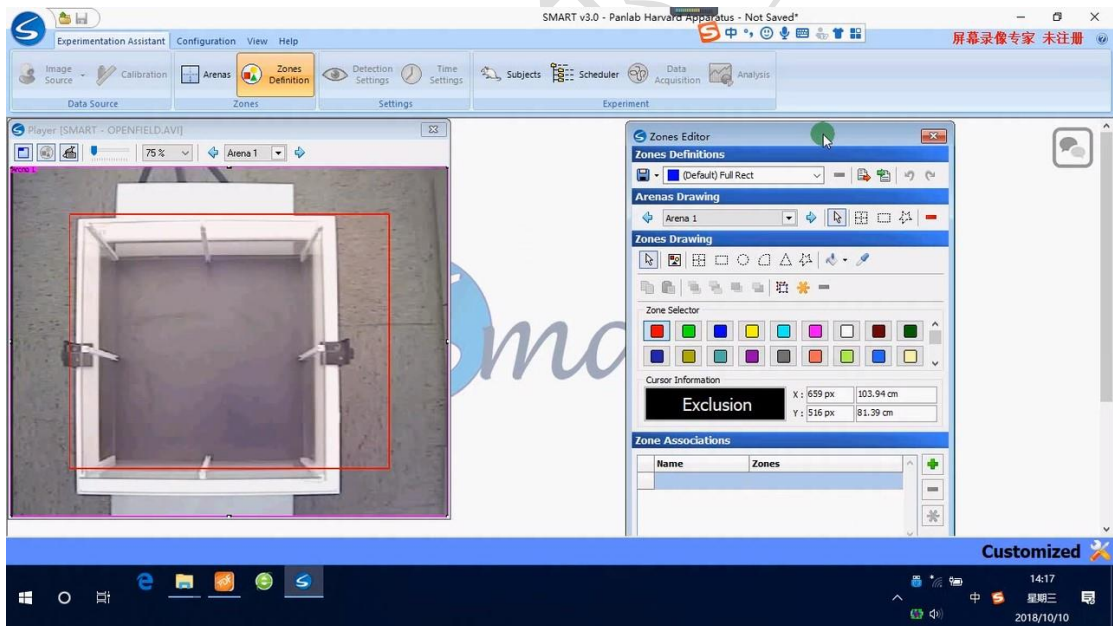
3) 点击右下角 accept

5. 选择区域（点击左上角 Arenas），点击左下角“+”添加区域，一般旷场试验总共 4 个区域，Y 迷宫为 3 个区域。

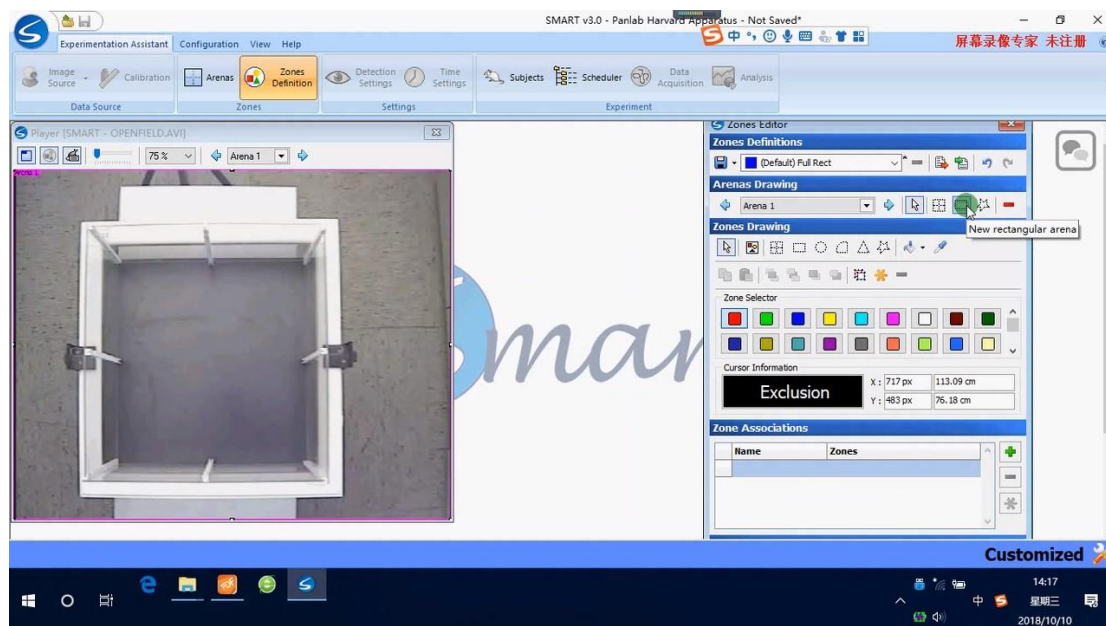


6. 绘制区域（点击左上角 Zones Definition）

- 1) 选中红色框，将原来的区域删掉，点击右边“-”号。

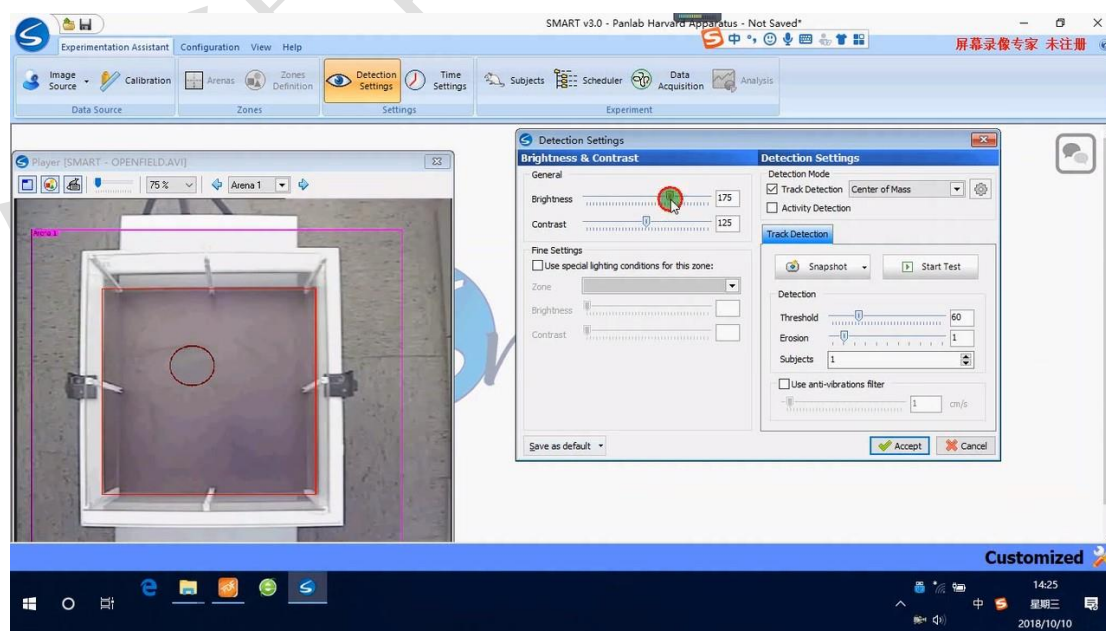


2) 重新绘制区域, 如图中鼠标位置所示, 旷场实验选择田字格, 画 1 次即可, Y 迷宫选择矩形, 画 3 个, 选中内圈。(Y 迷宫注意这里绘制区域时, 边框选择不同的颜色, 可参考第一部分试验介绍种的图片)



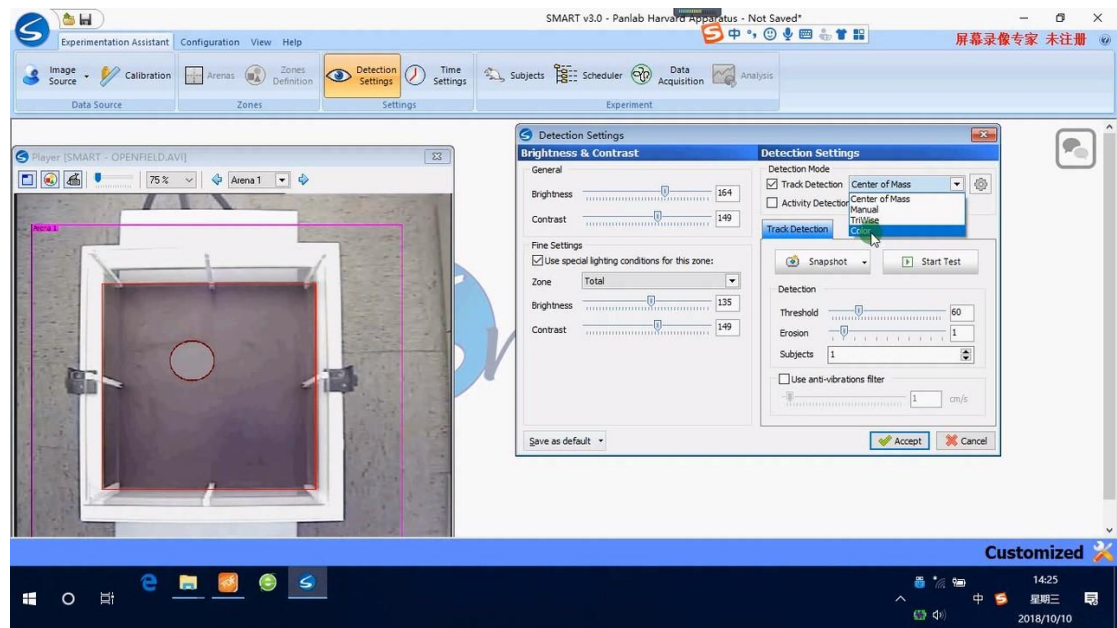
3) 绘制中心区域 (旷场试验需要), 旷场试验共有 Area1-4 四个区域, 在上图右侧 Arenas Drawing 部分选择相应区域绘制中心区, 先选择九宫格画, 再将除最中间区域的其它 8 个格子删掉。

7. 调试 (点击 Detection Settings)

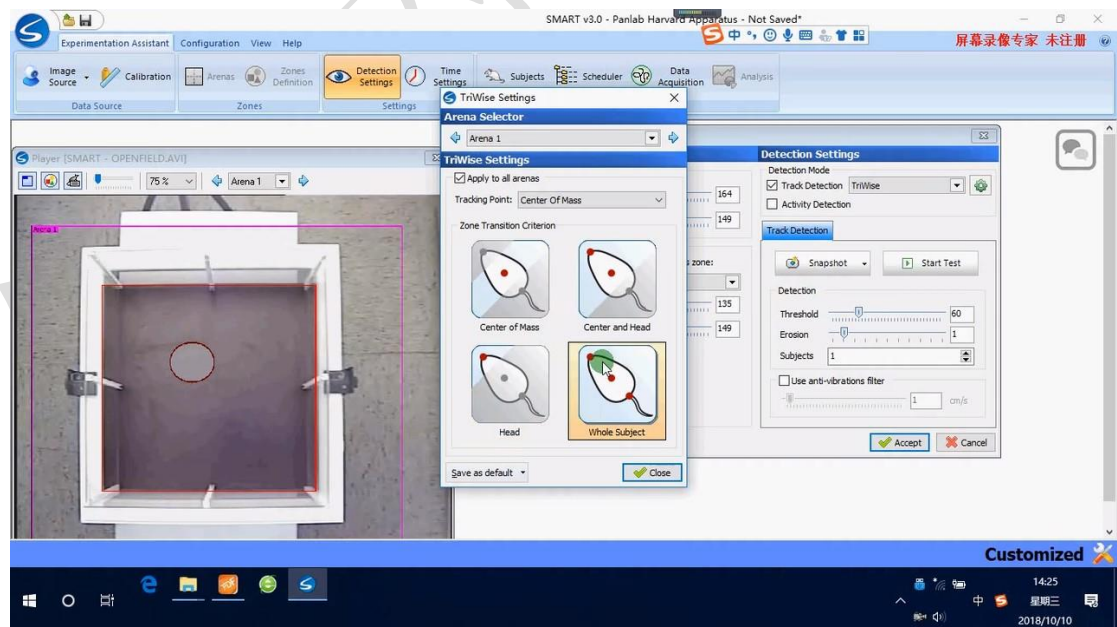


1) 在 General 部分选择整个区域的明暗对比度。

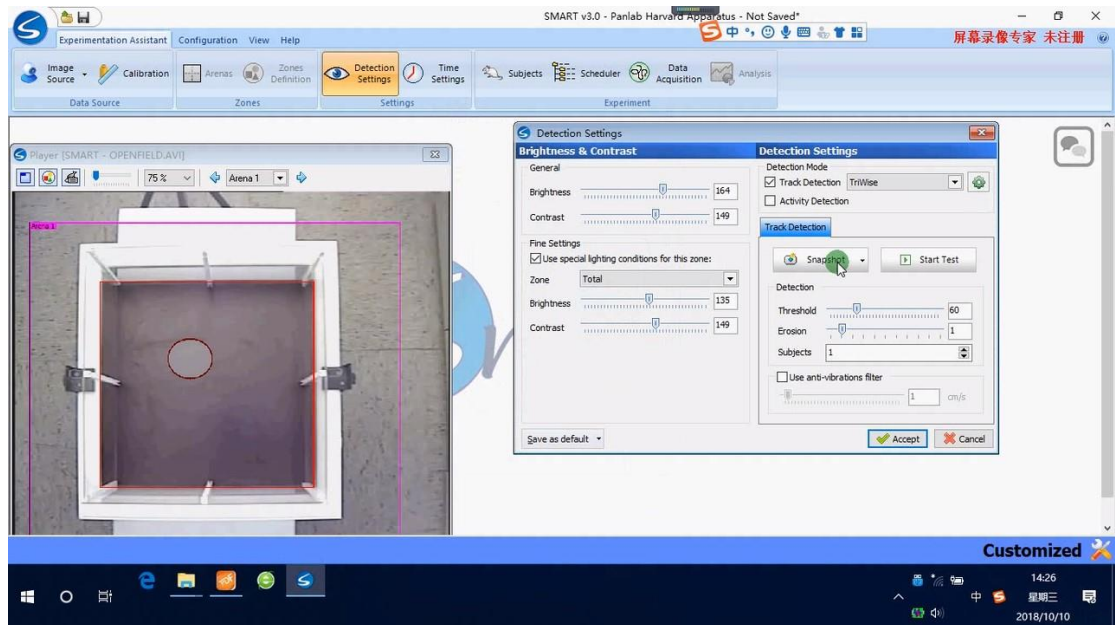
2) 如需要选择单个区域的明暗对比度，勾选“use special lighting conditions for this zone” 选择相应区域进行调试。



3) 选择监测模式，见上图鼠标位置。一般选择 center of mass（单点监测）或 triwise（三点监测），最常选择单点监测，三点监测模块对动物的头部、中心和尾巴根部进行监测，用于监测综合行为，例如站立、蜷缩/伸展和转圈行为。



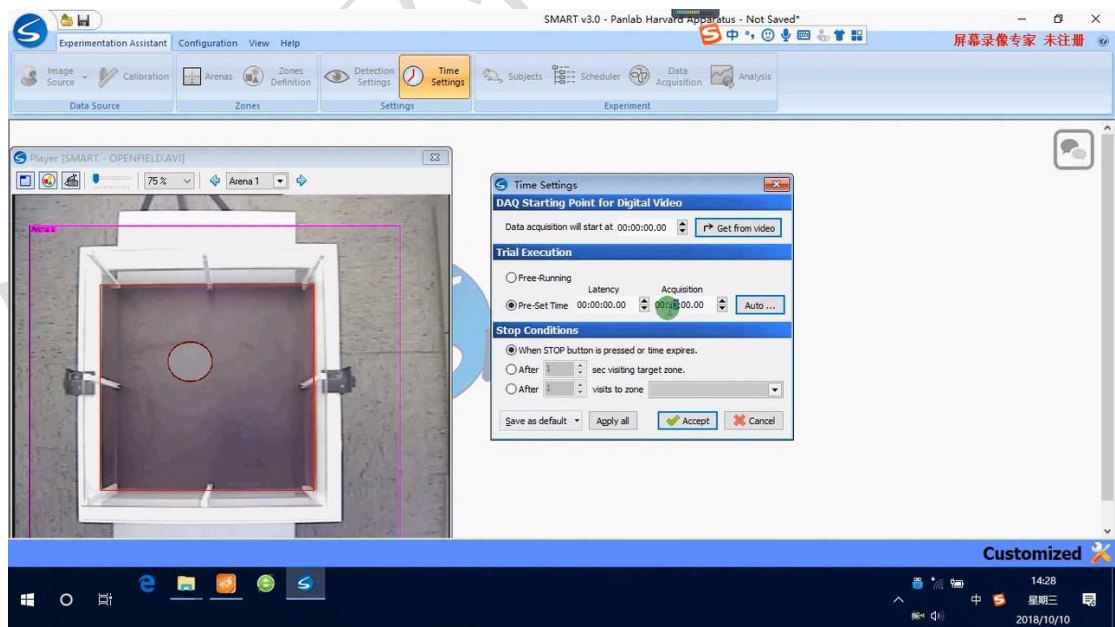
4) 点击 Track Detection 最右侧图标，可以进行更具体的设置。



4) Snapshot 为清底板，每次调试或正式试验之前均需选择一遍，正式实验前可点击右侧 Start Test 可以看是否活动范围内每个点都可以监测到。

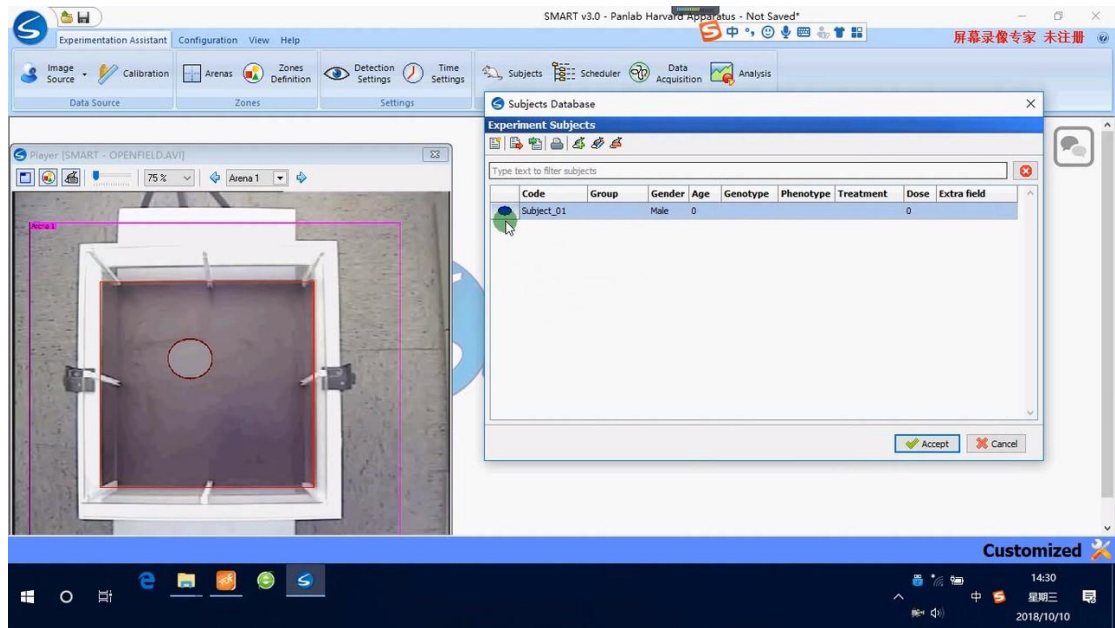
8. 设置试验时间（点击 Time Settings）

设置潜伏期和正式试验的时间，潜伏期一般可设置为 2 秒，即放小鼠过程的时间，避免识别到人手的路径。

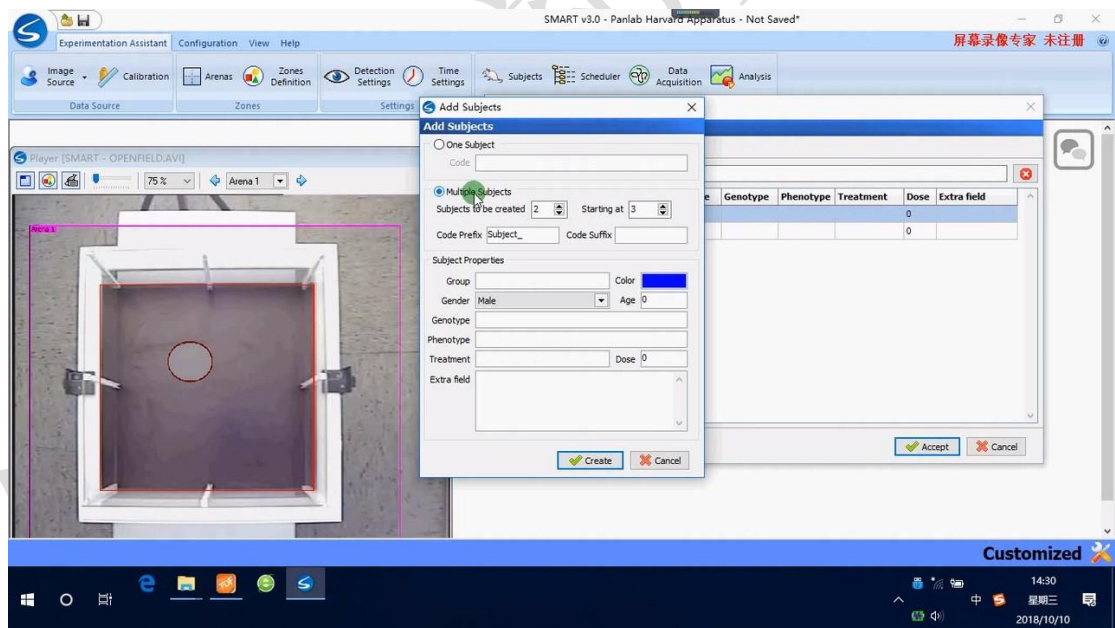


9. 设置实验动物（点击 Subjects）

选择 Add new subjects 添加实验动物。

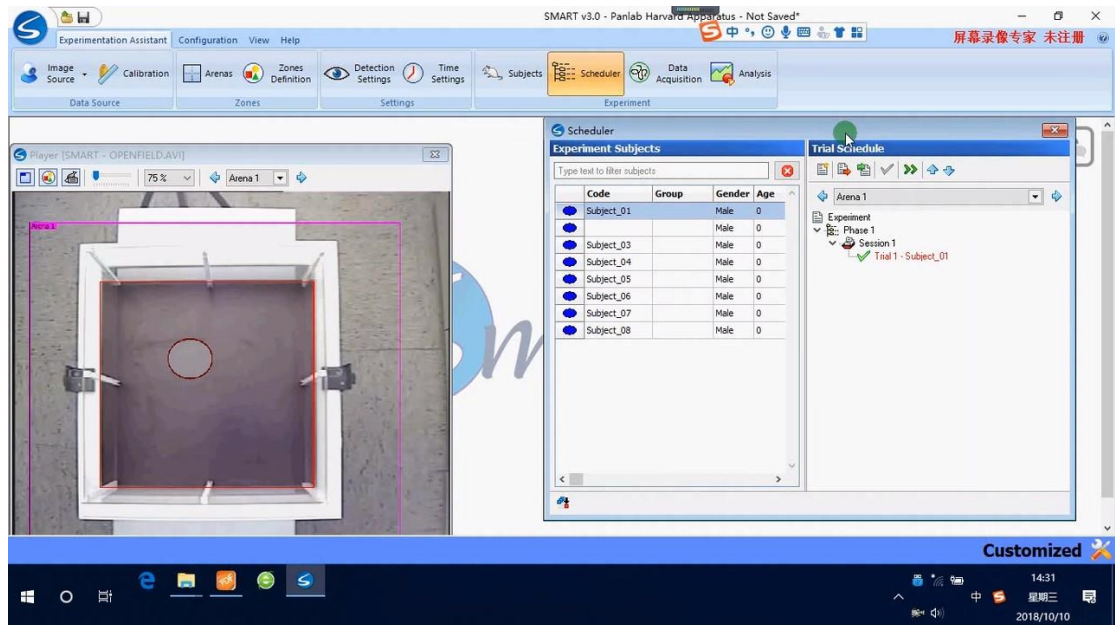


可一次添加单只（One subject）或多只（Mutiple Subjects），这里可以提前设置好实验分组等信息，设置好后选择右下角“Creat”和“Accept”。

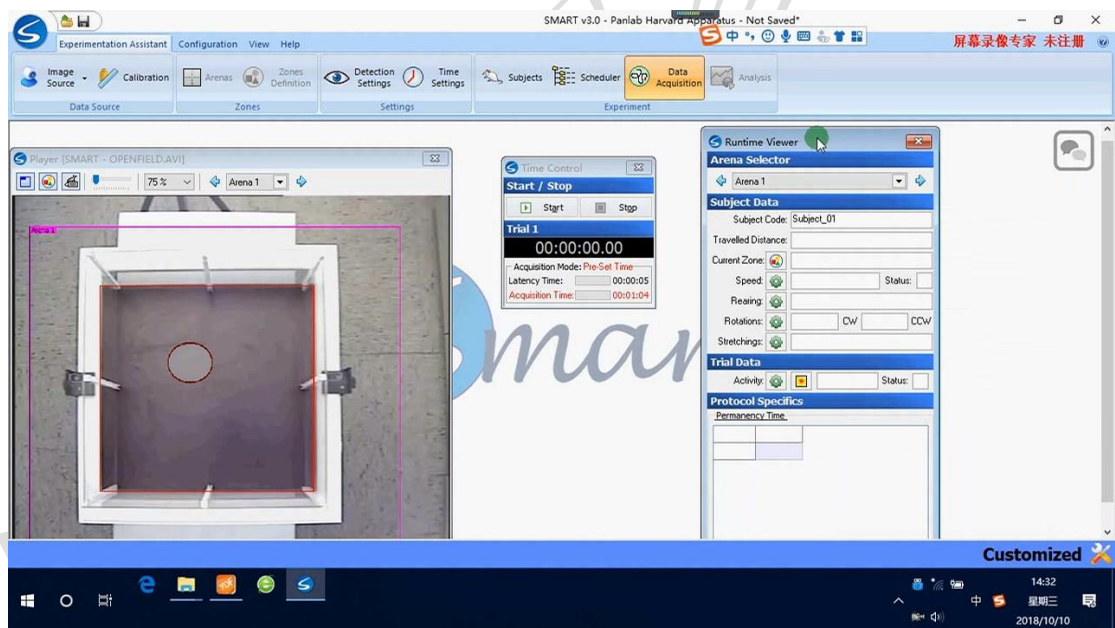


10. 设置实验方案（点击 Scheduler）

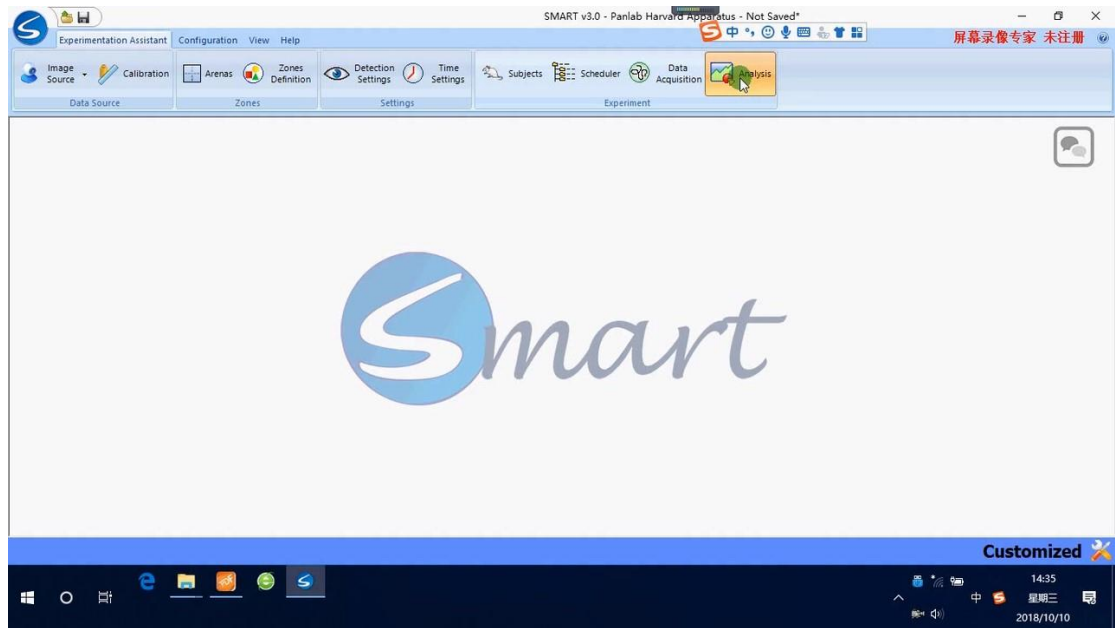
根据自己的实验设计，将实验动物选择拖至相应的区域中，右上角 Arena 选择不同区域。



11. 正式实验记录（点击 Data Acquisition）

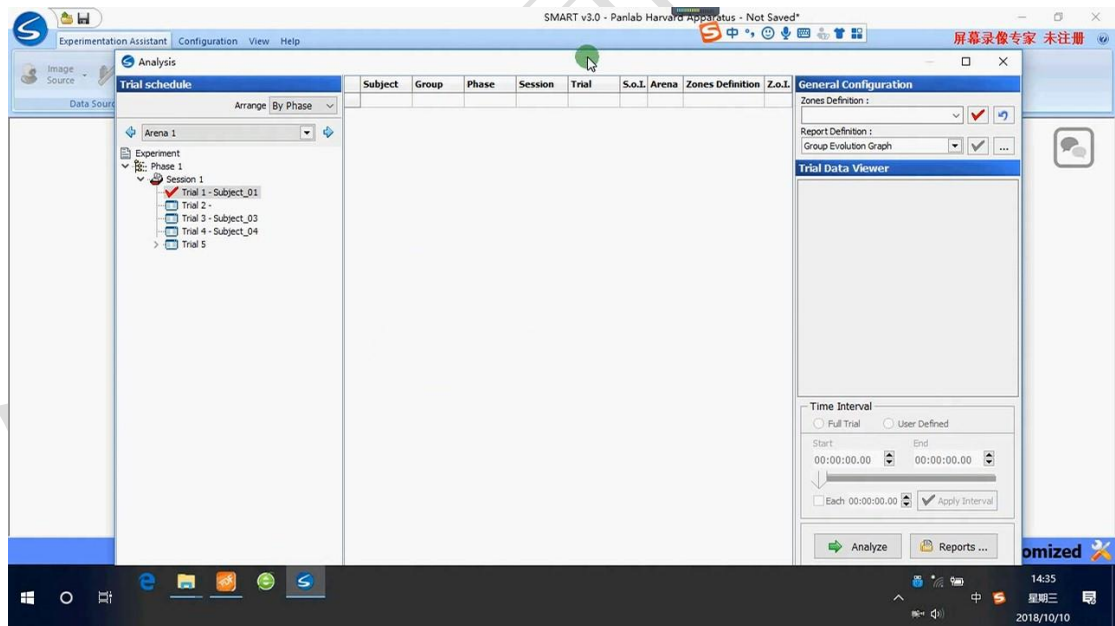


1) 先点击左下角的开始录制视频按钮，再点击“Start”，在摄像头识别到有物体在动时，才会开始及时，放实验动物过程的时间必需少于所设置的潜伏期的时间。结束时自动计时结束，不需要点击”stop“，但需要点击左下角停止视频录制按钮，之后将所有对话框关闭，如下图：

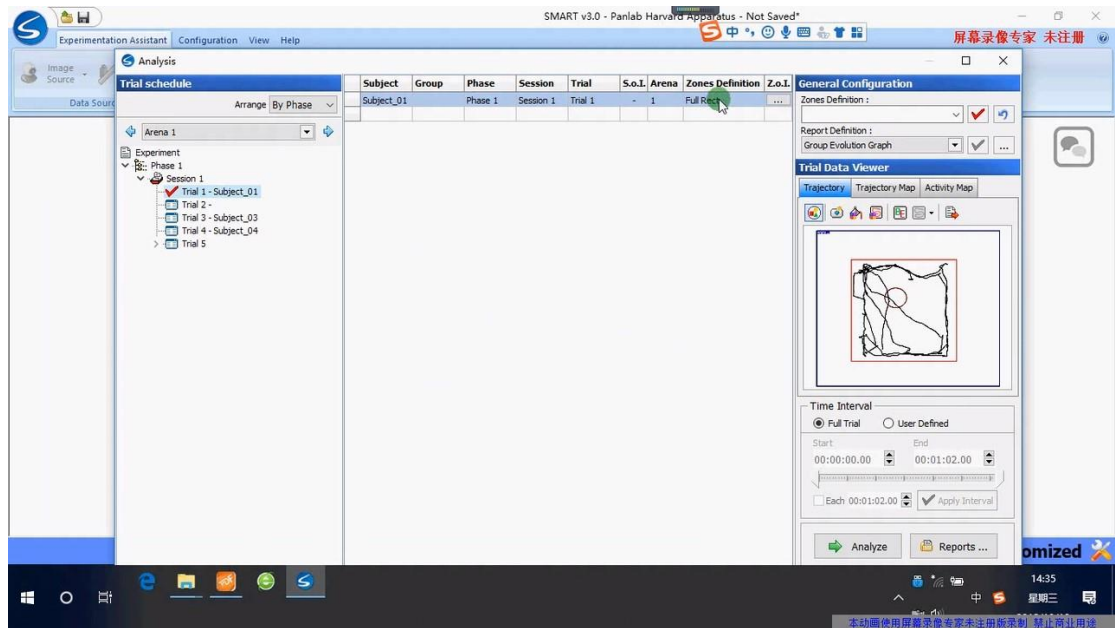


2)再开始下一个实验前,用酒精擦一遍实验环境,可回到“Detection Settings”中选择“Snapshot”清底板,再点击“Data Acquisition”开始下一个实验。

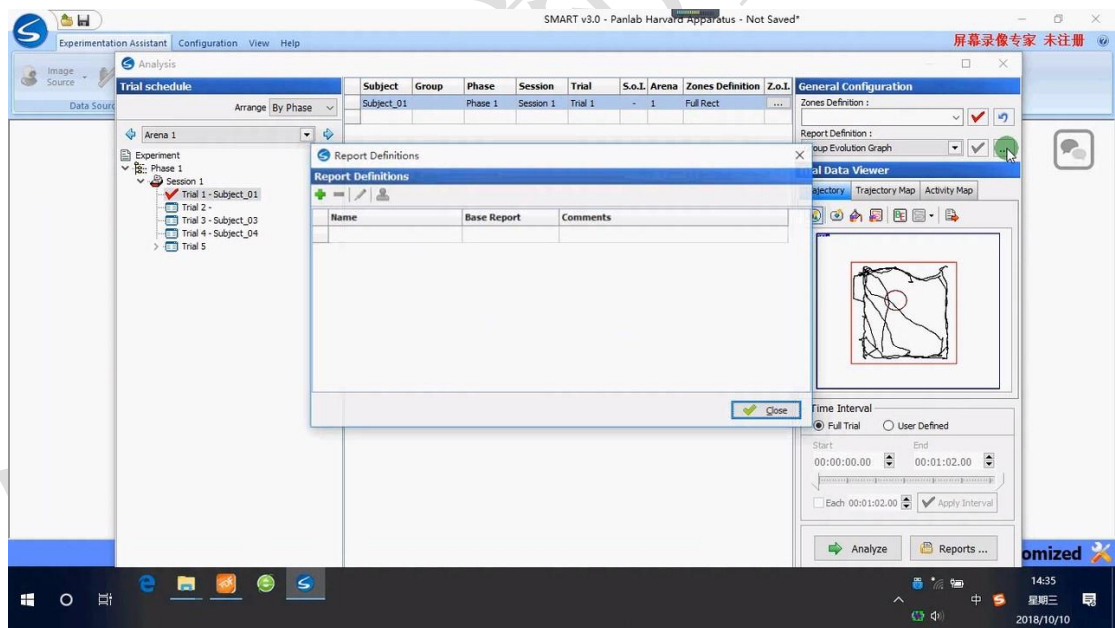
12. 实验结果的保存（先关闭所有对话框，再点击 Analysis）



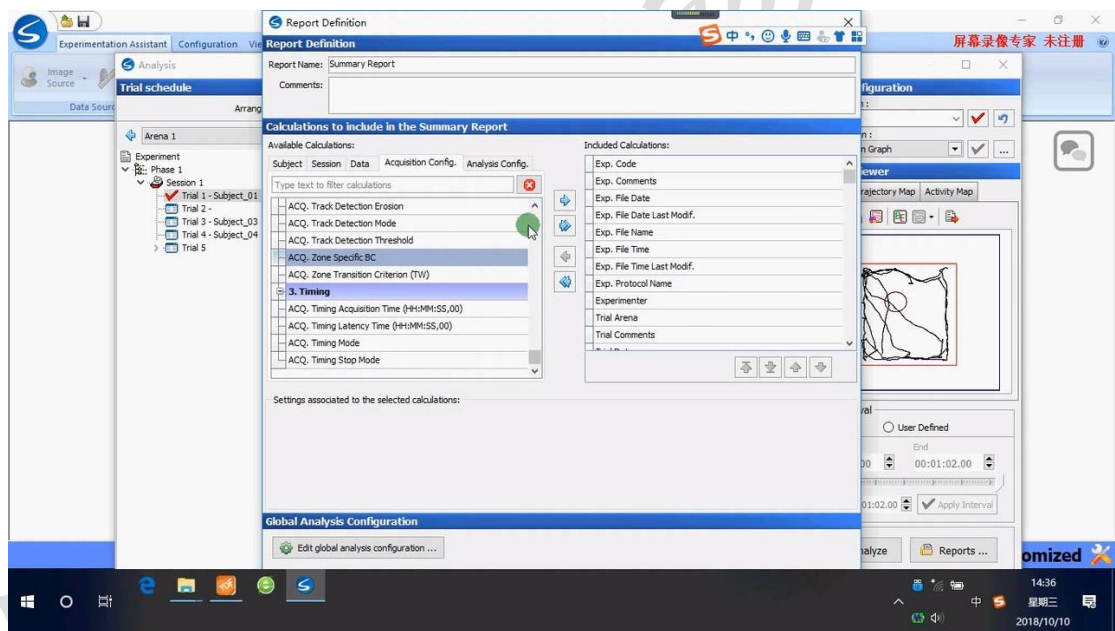
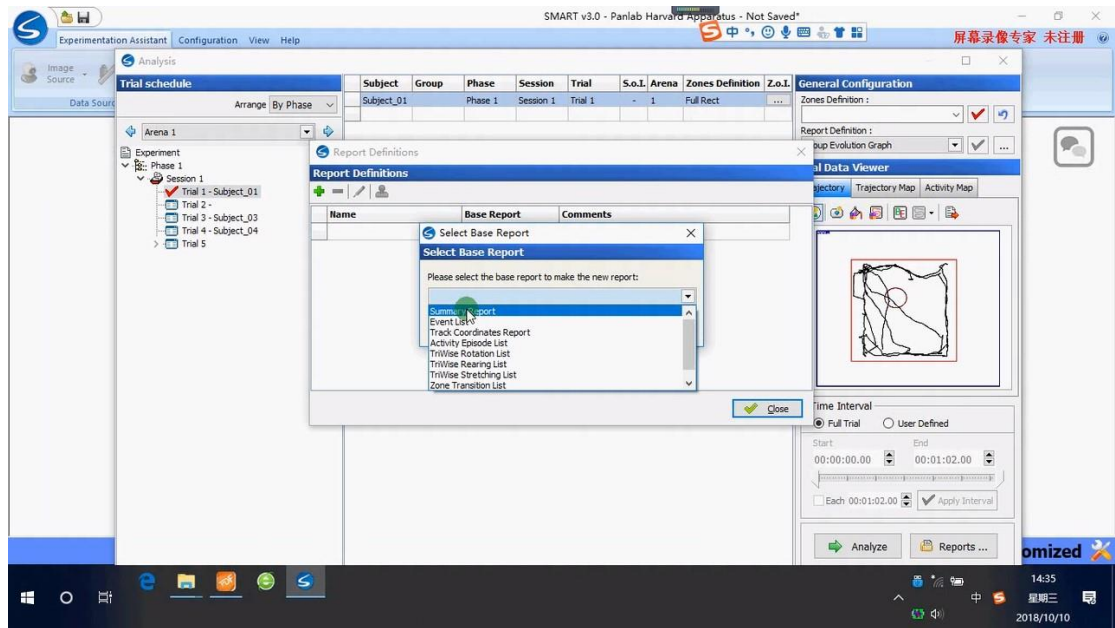
1) 有实验结果的 Trail 前对勾会变成红色。



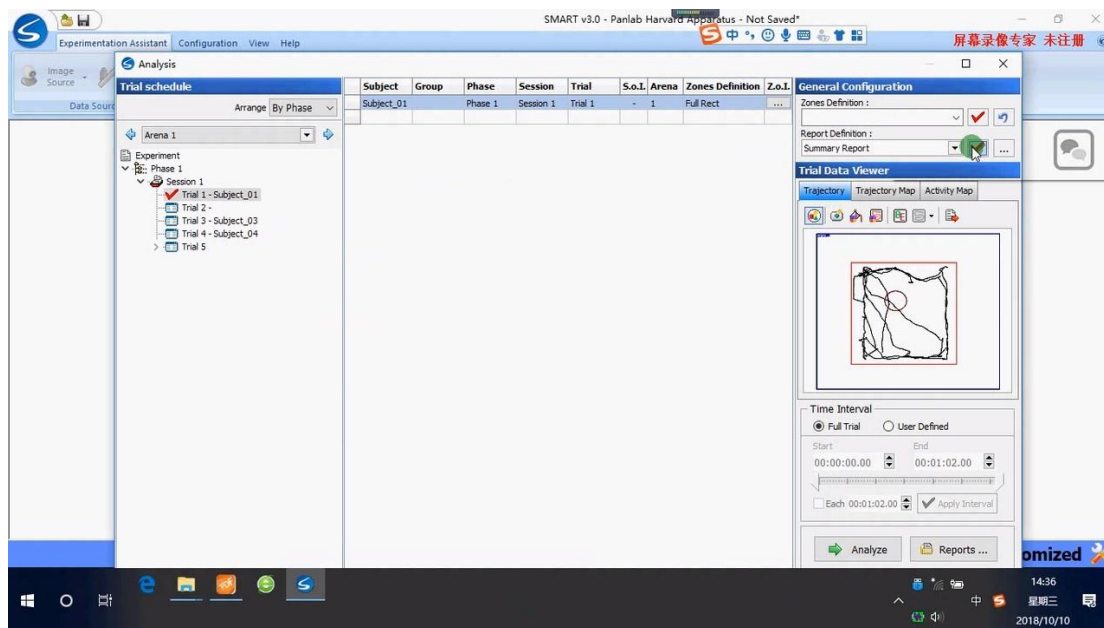
2) 将 Trail 拖至中间区域，右侧“Trial Data Viewer”处会显示出轨迹图，可逐个导出并保存。



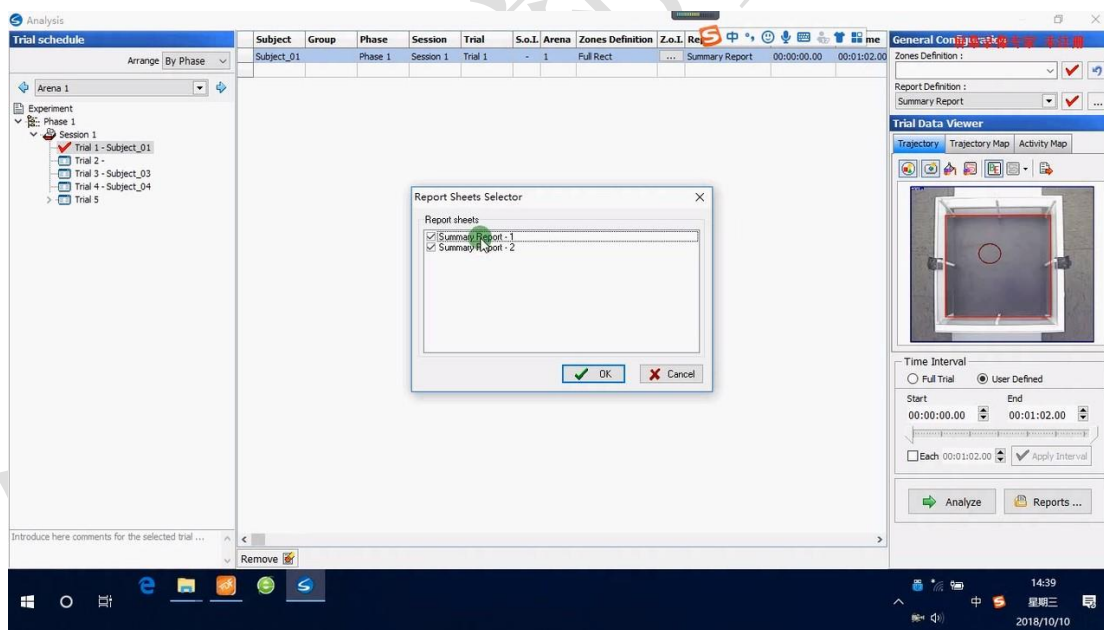
3) 在中心区域选中实验结果，点击鼠标选中的位置——点击左上角添加报告——选择 Summary Report（见下图）——Accept。



4) 选择所需要的实验数据，添加至右侧，完成后选择 Accept。



5) 回到上图的界面，点击鼠标位置的红色对勾，等待分析完成，中间区域的“Report Definition”会变成“Summary Report”。



6) 点击右下角“Analyze”——点击“OK”——选择“Export”导出并保存

注：所有行为学实验的 smart 操作的原理相同，只是记录的指标不同，根据不同的实验选择合适的指标即可。上面以矿场和 Y 迷宫为例详细列举了每一步的操作，其余行为学实验均参照上面设置自行设置即可。具体操作可观看爱奇艺视频：[smart3.0 行为学记录分析软件操作讲解视频](https://www.iqiyi.com/w_19s1ssmwdx.html)

https://www.iqiyi.com/w_19s1ssmwdx.html

第五章 分子生物实验室

5.1 细胞和组织破碎

超声条件：超声功率：5%；开 3 秒，停 5 秒，共 3 次；其余参数不予调节，每个标本后双蒸水清洗探头。

5.2 转基因小鼠的编号及基因鉴定

5.2.1 编号--断指(趾)标记法

对于新生仔鼠(8-12d)，可根据前肢四指、后肢五趾的方式来标记，小鼠腹面向人，后肢从左到右表示 1-10 号，前肢从左到右表示 20、30、40、50、100、200、300、400。剪脚趾时不能只剪指尖，应剪掉一段指骨，以防伤口痊愈后辨认不清。

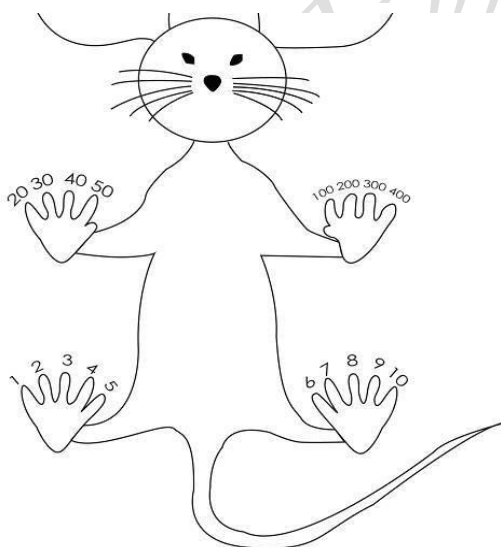


图 15 断指(趾)标记法图示

注：小鼠日龄超过 12d 不宜采用此法，否则会引起小鼠明显疼痛及失血过多。无论是在行为还是动物福利方面，采用此法最好选择 7 日龄左右的小鼠并与基因型鉴定相结合。

5.2.2 基因型鉴定

1. DNA 的提取：将剪下的指(趾)组织放入编号的 EP 管中，使用翊圣的 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。
2. PCR 反应：按照说明书选择合适的反应体系和程序进行 PCR。
3. PCR 产物电泳鉴定：PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳（浓度需根据目的

条带的片段进行选择), 电压 140 V, 时间约 30 min, 当溴酚蓝至距凝胶下端 1/3 处时停止电泳。在凝胶成像仪下观察条带判断基因型。

注意: 电泳时 DNA 从负极向正极移动, 切勿放反。

5.3 蛋白质的提取分离及定量

5.3.1 蛋白样品的提取

2. 细胞总蛋白样品的制备: 取 >90% 融合度的细胞培养瓶, 弃去培养基, 在冰上用 4℃ 预冷无菌 PBS 3 ml 冲洗 2 次。

3. 按说明书将在 10 ml RIPA 裂解液中加入蛋白酶抑制剂一片, 磷酸酶抑制剂一片配制为蛋白裂解液; ①细胞蛋白: 将适量蛋白裂解液加入培养皿中, 4℃ 摇床 30 min, 保持裂解液与细胞充分接触, 后用细胞刮刀将细胞刮至一侧, 将细胞碎片及液体移至 EP 管中, 冰中静置裂解 10-15 min; ②组织蛋白: 每 60 mg 组织标本中加入蛋白裂解液 200 μ l, 用玻璃匀浆器充分碾磨组织, 移至 EP 管中, 冰中静置 30 min。

4. 在 4℃ 条件下 12000 rpm 离心 15 min, 吸取上清液即为总蛋白样品至另一 EP 管中。

5. 取少量作为蛋白定量所用, 剩余蛋白样品置于 -80℃ 保存, 以备后续实验使用。

5.3.2 BSA 法测定蛋白浓度

1. 用 96 孔板制作 BSA 蛋白标准样, 配标准浓度梯度, 绘制标准曲线。
2. 分别取待测样品 2.5 μ l, 加入 BCA 工作液 200 μ l, 混匀, 恒温 37℃ 孵育 30 min。
3. 以空白孔为对照, 测量 562 nm 处吸光值, 以标准蛋白含量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。
4. 根据待测蛋白的吸光值从标准曲线上定量样品的蛋白浓度。

5.4 RNA 的提取与分离

5.4.1 实验试剂与耗材

试剂: Trizol (异硫氰酸胍/酚), 氯仿, 异丙醇, 75%乙醇 (用 RNase-Free 水配制), RNase-Free 水。

耗材：1 mL 注射器，1.5 mL 无酶 EP 管（DEPC 处理），无酶枪头（DEPC 处理）。

5.4.2 实验流程

1. 样品处理：

培养细胞：收集处于生长旺盛时期的细胞，细胞老化后 RNA 含量较少。

（1）单层贴壁培养细胞

倒掉培养基后，直接在培养板中加入 Trizol 裂解细胞，每 10 cm^2 面积加 1mL，细胞会迅速裂解。

（2）悬浮培养细胞

迅速离心细胞。每 $5\times 10^6\sim 10^7$ 的细胞加 1mL Trizol，混匀；用 1mL 注射器反复抽取（约 30 次），使细胞充分破裂。

注：离心收集细胞后，留约 50ul 上清，将细胞悬浮后再加入 Trizol，以防止 Trizol 瞬间裂解表面细胞，无法完全裂解里面的细胞。

组织：取湿重 30~100mg 组织（新鲜或 -70°C 及液氮中保存的组织均可）置 1.5 mL EP 管中，可以直接在液氮中磨碎后加入 1mL Trizol，也可以用匀浆仪在冰上进行匀浆处理。

注：总 RNA 往往都需要其 mRNA，而 mRNA 的表达量和细胞组织的生长状态息息相关，取组织块应该避免取到坏死组织，尽量取生长旺盛的组织部位；在研磨中，边研磨边加液氮，保证样品不融化，保证内源性 RNase 不发挥作用。

2. 裂解：将处理好的材料与 Trizol 充分混匀，室温放置 5 min。

注：材料的量与所加入的 Trizol 的量要相对，以保证细胞裂解的效果；（可选步骤）如样品中含有较多蛋白质，脂肪，多糖或胞外物质（肌肉，植物结节部分等）可于 4°C 12000rpm 离心 5 分钟，取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜，多糖，高分子量 DNA，上清中含有 RNA。

3. 纯化： 4°C 12000rpm 离心 10 分钟，取上清。转移到新的无 RNase 的离心管中。每使用 1mL Trizol 加入 0.2mL 氯仿，盖好管盖，剧烈振荡 15~30s，室温放置 3 min。

注：要使氯仿与上清液充分混匀，如不能涡旋混匀，可手动颠倒混匀 2 min 代替。

4. 分层： 4°C ，12000rpm 离心 10-15 min。样品分为三层：底层为黄色有机

相,上层为无色水相和一个中间层。RNA 主要在水相中,水相体积约为所用 Trizol 试剂的 60%。小心吸取上清转移到新的 EP 管中。

注:在吸取上层水相时,一定不要吸到中间层和最下层的有机相,也不要试图将所有水相都吸出,以避免 DNA 或其他杂志的污染。

5. 沉淀:在得到的水相中加入等体积的异丙醇,将管中液体轻轻混匀,室温放置 10 min。4℃ 12000rpm 离心 10 min。离心前看不出 RNA 沉淀,离心后在管侧和管底出现胶状沉淀。弃上清。

6. 洗涤:加入 1ml 75%乙醇(冰冷)洗涤沉淀。每使用 1mL Trizol 至少 1mL 75%乙醇洗涤。振摇,将沉淀悬浮起来充分洗涤,然后再次 4℃ 12000rpm 短暂离心 5 分钟。将 75%乙醇小心吸弃,室温放置晾干或超净台吹干 5 分钟左右。

注:75%乙醇要用 RNase-Free 水配制;残留乙醇一定要去除干净,可以用小枪头吸弃,然后再晾干;但是要注意不要晾得太干,否则 RNA 沉淀不易溶解。

7. 溶解:加入适量(20μL) RNase-Free 水,混匀,使 RNA 充分溶解。

5.5 核酸的定量测定

5.5.1 实验试剂与耗材

加样枪(上样均为 2 ul),白枪头,滤纸,双蒸水,洗脱液,样本。

5.5.2 实验流程

1. 打开紫外分光光度计仪器,当听到第二声“滴”后,仪器上的绿灯常亮。
2. 使用双蒸水清洗上样处三次、洗脱液清洗一次,滴加 2ul 洗脱液,盖上盖子。(务必轻柔)
3. 打开电脑上的软件,点击右上角连接,连接后点击左上角空白检测。
4. 用滤纸擦干后,滴加 2 ul 洗脱液,仪器会自动检测,检测浓度是否为零(不是的话断开连接,重复 2-4),也可以直接点重新空白即重新进行调零。
5. 依次滴加需测的样本。
6. 测完后断开仪器连接,导出结果,使用双蒸水清洗仪器三次。
7. 关闭电脑、仪器(确认仪器断开连接状态再关闭仪器)。
8. 登记仪器使用信息,整理台面。

5.6 实时荧光定量 PCR

5.6.1 实验试剂与耗材

试剂：SYBR Green qPCR 试剂盒、合成的 cDNA、用于扩增目的基因的引物

耗材：0.1 ml 薄壁八连管、无酶枪头（DEPC 处理）

5.6.2 实验流程

1. 反应体系的配制：按照不同仪器推荐的试剂盒反应体系配制反应液。

注：反应液的配制与试剂盒和 PCR 仪有关，不同的 PCR 仪，配制 PCR 反应液的方法可能不同，提前结合实验室的仪器型号选择匹配的试剂盒，具体操作参照试剂的说明书；试剂盒内的产品避免反复冻融，防止酶活性降低。含荧光的试剂操作过程中注意避光；注意不同体系中 DNA 模板的添加量，必要时进行梯度稀释，以确定合适的模板添加量。

2. 进行 Real Time PCR 反应：按照试剂盒说明书进行两步法或三步法的 PCR 扩增反应。

3. PCR 结果：反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和溶解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。分析方法参见仪器操作手册。

4. 数据分析：

绝对定量：是用一系列已知浓度的标准品制作标准曲线，在相同的条件下目的基因测得的荧光信号量同标准曲线进行比较，从而得到目的基因的量。

注：如果想知道每毫升样品中的某基因的拷贝数时，使用绝对定量；需要校准。

相对定量：检测实验组和对照组中一个目的基因的倍数差异。

注：如果对 RNA 模板的数量不能精确定量，或者只需要知道目的基因的表达差异时，可以使用相对定量法；需要进行归一化处理。

	目的基因 (Ct值)	参照基因 (Ct值)	待测基因扩增效率 (E)	参照基因扩增效率 (E)
对照组	A	B	C对照	D对照
实验组	E	F	C实验	D实验
数据处理方法	参考条件		计算方法	
双标曲线法	不受扩增效率差异的干扰。对每一个基因，每一轮实验都必需做标准曲线，而且必需有固定的标准品做标准曲线。		表达水平=实验组目的基因表达量/实验组内参表达量/(对照组目的基因表达量/对照组内参表达量)	
ΔCt 法	扩增效率为100%，仅需目标基因		表达水平= $2^{-\Delta Ct}=2^{-(E-A)}$	
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(Livak法)	目的基因和参照基因扩增效率都接近100%，且相对偏差不超过5%，需要目标基因和参照基因。(90-110%之间都是可以接受的)		表达水平= $2^{-\Delta\Delta Ct}=2^{-[(E-F)-(A-B)]}$	
用参照基因的 ΔCt 法	同 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法		表达水平= $2^{(F-B)-(E-A)}$	
Pfaffl法	目的基因和参照基因扩增效率不同，但目的基因间的扩增效率相同		表达水平= $C_{实验}^{(A-E)}/C_{对照}^{(B-F)}$	

图 16 相对定量计算方法比较

相对定量计算方法：常用的相对定量数据分析方法有双标曲线法， ΔC_t 法， $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法(Livak 法)，用参照基因的 ΔC_t 法和 Pfaffl 法。

5.7 逆转录 PCR

5.7.1 实验试剂与耗材

试剂：反转录试剂盒、提取的模板 RNA

耗材：0.2 mL PCR 薄壁管、无酶枪头（DEPC 处理）

5.7.2 实验流程

1. 将提取的模板 RNA 在冰上解冻；逆转录试剂盒内的各个试剂在室温解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

注：避免模板 RNA 的反复冻融，以防止模板降解。

2. 按照试剂盒的逆转录体系配制混合液，彻底混匀，涡旋振荡时间不超过 5 秒，简短离心，并置于冰上。

注：反应液配制在冰上进行。当同时需要进行多次逆转录 PCR 时，将试剂盒内各组分加倍混合后再分装到每个反应管中，可以减少实验操作产生的误差，使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失；根据不同试剂盒内的制品特点不同，配制反应液时需小心操作。

比如，粘度较高的制品混匀时需用枪头缓慢吹打。

3. 将模板 RNA 加入到每个反应管的混合液中，彻底混匀，涡旋振荡不超过 5 秒，简短离心以收集管壁残留的液体。

注：反转录体系可以根据需要相应扩大。

4. 启动 PCR 仪器并将反应管放入其中，按照试剂盒说明书设置 PCR 反应条件，反应结束后 4℃ 保存备用，合成的 cDNA 用于后续定量 PCR 分析。

注：合成的 cDNA 需要长期保存时，于 -20℃ 或更低温度保存。

5.8 Western 印迹杂交法

5.8.1 实验准备

玻璃板、制胶架、梳子、电泳仪、转膜仪、滤纸、海绵、PVDF 膜、配胶试剂、缓冲液等。

5.8.2 实验步骤

1. 安装玻璃板

提前洗净并烘干玻璃板，将玻璃板下端在一个平面对齐后安装在制胶架上，夹紧备用，水平放置在桌面上。

2. 配制分离胶

①. 不同分子大小的蛋白质，选择相应浓度的分离胶(表 2)先配置下层胶，TEMED, PAGE 胶促凝剂最后加入，否则易凝固。将分离胶充分混匀后加入两个玻璃板间隙中，再加入异丙醇压胶使胶与空气隔绝并排出气泡，室温放置约 45min 即可凝固。不同分离胶浓度和最佳分离范围及配方见表 2 和表 3。

表 2 SDS-PAGE 分离胶浓度与最佳分离范围

SDS-PAGE 分离胶浓度	最佳分离范围
6 % 胶	50 ~ 150 kD
8 % 胶	30 ~ 90 kD
10 % 胶	20 ~ 80 kD
12 % 胶	12 ~ 60 kD
15 % 胶	10 ~ 40 kD

表 3 SDS-PAGE 分离胶浓度与最佳分离范围

成分	配置不同体积 SDS-PAGE 分离胶所需各成分体积 (ml)					
6 % 胶	5	10	15	20	30	50
蒸馏水	2.0	4.0	6.0	8.0	12.0	20.0
30% Acr-Bis (29:1)	1.0	2.0	3.0	4.0	6.0	10.0
1M Tris, pH 8.8	1.9	3.8	5.7	7.6	11.4	19.0
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
10% 过硫 酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.024	0.04
成分	配置不同体积 SDS-PAGE 分离胶所需各成分体积 (ml)					
8 % 胶	5	10	15	20	30	50
蒸馏水	1.7	3.3	5.0	6.7	10.0	16.7
30% Acr-Bis (29:1)	1.3	2.7	4.0	5.3	8.0	13.3
1M Tris, pH 8.8	1.9	3.8	5.7	7.6	11.4	19.0
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
10% 过硫 酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.018	0.03

成分	配置不同体积 SDS-PAGE 分离胶所需各成分体积 (ml)					
10 % 胶	5	10	15	20	30	50
蒸馏水	1.3	2.7	4.0	5.3	8.0	13.3
30% Acr-Bis (29:1)	1.7	3.3	5.0	6.7	10.0	16.7
1M Tris, pH 8.8	1.9	3.8	5.7	7.6	11.4	19.0
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
10% 过硫 酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.012	0.02
成分	配置不同体积 SDS-PAGE 分离胶所需各成分体积 (ml)					
12 % 胶	5	10	15	20	30	50
蒸馏水	1.0	2.0	3.0	4.0	6.0	10.0
30% Acr-Bis (29:1)	2.0	4.0	6.0	8.0	12.0	20.0
1.5 M Tris, pH 8.8	1.9	3.8	5.7	7.6	11.4	19.0
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
10% 过硫 酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.012	0.02
成分	配置不同体积 SDS-PAGE 分离胶所需各成分体积 (ml)					
15 % 胶	5	10	15	20	30	50
蒸馏水	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	5.0
30% Acr-Bis (29:1)	2.5	5.0	7.5	10.0	15.0	25.0
1.5 M Tris, pH 8.8	1.9	3.8	5.7	7.6	11.4	19.0
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
10% 过硫 酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.012	0.02

②. 下层胶凝固前 5 min, 开始配置浓缩胶 (上层胶), 待下层胶凝固后, 倒掉异丙醇, 用蒸馏水洗涤分离胶上缘, 用滤纸将剩余的水吸干净, 再将 TEMED 加入上层胶中混匀, 然后将上层胶加在下层胶上方, 直至溢出玻璃板, 然后排除气泡, 迅速水平插入梳子, 室温静置 20~30 min 后凝固 (Tips: 梳子提前放置在 ddH₂O 中湿润备用), 不同体积浓缩胶配方见表 4。

③. 待胶凝固后, 将胶联通玻璃板从支架上取出, 直接上样或用 PE 手套/保鲜膜包好后置于 4℃ 备用。

表 4 SDS-PAGE 浓缩胶配方（也称上层胶）

成分	配置不同体积 SDS-PAGE 分离胶所需各成分体积 (ml)					
5 % 胶	2	3	4	6	8	10
蒸馏水	1.4	2.1	2.7	4.1	5.5	6.8
30% Acr-Bis (29:1)	0.33	0.5	0.67	1.0	1.3	1.7
1 M Tris, pH 8.8	0.25	0.38	0.5	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.02	0.03	0.04	0.06	0.08	0.1
10% 过硫 酸铵	0.02	0.03	0.04	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.002	0.003	0.004	0.006	0.008	0.01

3. 上样

① . 将提前定量好的蛋白样品从-20℃取出，置于冰上溶解后上样（如果蛋白样品存放过久，需 100℃加热煮沸 10 min，4℃，12000 rpm 离心 10 min）。

② . 将胶板固定槽中，注意检查是否漏液，加入 running buffer。

③ . 上样，蛋白上样 10 μ l，蛋白 Marker 5 μ l + 1 $\times$ loading 5 μ l。

1 $\times$ loading = 5 $\times$ loading + ddH₂O(或 ripa)，上样要慢，避免样本上浮，空板用 1 $\times$ loading 配平。

4. 电泳

上层胶：80V，约 30 min，待 75 Kda，红带出现。

下层胶：120V，约 40~60 min，具体时间由 Marker 确定。

目的条带所对应的 Marker 条带位置充分分开即可，或分子量小的跑到最下端即可，分子量大的可将条带跑出胶外，使大分子蛋白分离更清楚。

5. 转膜

Tips: trans-buffer（转膜液）需提前配制好，4℃冰箱预冷。

① . 切胶，取 Marker 和所有样本所在凝胶范围大小，放入 tris-buffer。

② . 剪膜，整块胶大小为 5.5cm $\times$ 8.5cm，PVDF 膜，一个方格为 1cm。

③ . 将 PVDF 膜放入甲醇中激活（1~5s 或 1min 内），操作时不要触摸，也不要使膜有折痕，甲醇可激活 PVDF 膜上正电荷，可使其与带负电荷的蛋白结合。

④ . 安装转膜装置

转膜夹通常为黑白两面，放置顺序为：白板（+） $\rightarrow$ 多孔海绵 $\rightarrow$ 厚滤纸 $\rightarrow$ PVDF 膜 $\rightarrow$ 凝胶 $\rightarrow$ 厚滤纸 $\rightarrow$ 多孔海绵 $\rightarrow$ 黑板（-），速记口诀：黑胶白膜

(胶靠近黑色转膜夹, PVDF 膜靠近白色转膜夹, 可防止把条带转反), 示意图如下所示:

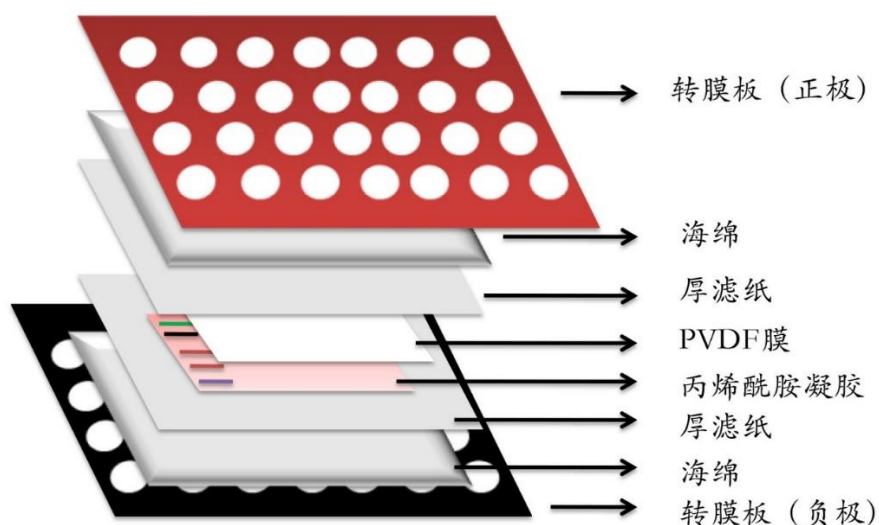


图 17 转膜装置安装示意图

⑤. 加 tris-buffer 在转膜槽的空处放冰袋; 电流 300 mA, 2 h; 70 Kda, 1.5 h
70~180 Kda, 2.5 h。

6. 封闭

- ① TBST, 洗 3×10 min。
- ② 配封闭液: 5%牛奶, 2.5g 奶粉+50ml TBST。
- ③ 裁膜: 目标蛋白和内参之间最小相隔 10 以上时, 将两者裁成 2 块膜, 相距太近时, 裁在一块膜上, 先染目标蛋白, 然后洗掉, 再染内容。

④. 将膜放入封闭液中, 慢速摇床 2 h。

7. 一抗孵育

- ① TBST, 洗一下。
- ② 用 TBST 配一抗。
- ③ 裁塑料膜, 加一抗, 排气泡, 4℃过夜。

8. 二抗孵育

- ①. 取出膜于低速摇床复温 30 min, TBST 洗 10 min。
- ②. 将膜放入塑料袋中加入二抗孵育 2 h。

9. 凝胶成像发光

- ①. 准备发光液 A:B=1:1, 混匀避光。

② . TBST 洗膜 425×10 min。

③ . 尽量去除 TBST 残液，将膜放入皿中（含 TBST）保持膜湿润，将发光液均匀滴在膜上约 1 min，然后将 PVDF 膜放入凝胶成像仪中曝光，保存图片。

④ . Western blot 条带经凝胶成像仪扫描成像后用 Quantity One 软件测量目的分子与内参分子的发光度比值。

10. 洗膜（根据条带和曝光情况选做）

① . 将上述发光完毕的 PVDF 膜放入加有 Stripping buffer 的洗膜盒内，置于摇床 15min。

② . TBST 洗膜 3×10 min。

④ . 一抗孵育（同 7）。

⑤ . 二抗孵育（同 8）。

⑥ . 凝胶成像发光（同 9）。

5.8.3 常见注意事项

1. 配胶时应快速混匀，尽量避免有气泡，最后加 TEMED。
2. 蒸馏水用 III 级水，待屏幕指示 >10 再接 III 级水。
3. 每块胶先加 3ml 分离胶，裁 PVDF 膜，配电泳液，浓缩胶，配好的胶用纱布包起来。
4. 加完样过 10 min 再开始电泳，配电转液（封口）。
5. PVDF 膜和胶之间，以及膜和厚滤纸、胶和厚滤纸直接都不能有气泡，放置转膜夹时黑板靠黑色槽，白板靠红色槽面。
6. 甲醇激活膜，转膜里外要放冰。