《细胞与分子生物学实验》教学大纲

（临床医学“5+3”专业用）

前 言

实验教学是高等医学教育的重要内容，是培养学生实践能力和创新精神的重要环节。我们按照天津医科大学教学改革的总体规划、国家实验教学示范中心的改革要求，打破各学科单独的纵向教学模式，有机地整合了生化与分子生物学、细胞生物学、病原与免疫等多学科相关的基础理论与实验技术，设立了《细胞与分子生物学实验》课程，是“以器官-系统为中心”的高等医学院校“5+3”临床医学专业医学整合课程的一部分。根据前期调研，学生更喜欢富有挑战性的、动手机会多、应用性强的综合性实验，因此我们在课程设置时考虑将科研与实验教学有机融合。科研中一个完整的细胞与分子生物学研究通常都经历一个从细胞水平逐渐深入到分子水平这样的过程，而此过程又包括“细胞的获取”、“细胞特性的研究”、“细胞核酸提取”以及“核酸的分离、检测和分析”、“分子克隆”等多个应用模块。基于以上考量，我们根据授课学生群体的已有知识基础，选取败血症这一常见临床疾病，利用其在科研中的常见模型——内毒素休克小鼠模型，用这一小鼠模型的研究作为主线，选取上述各模块中的部分实验，优化重组为两个综合性实验---内毒素休克小鼠模型的建立与鉴定和分子克隆实验，成为跨学科并能解决实际科研问题的一个整体。学会综合运用这些实验技能，就能基本满足实际科研的需要。

此大纲适用于“5+3”一体化培养临床医学专业。

本课程总计学时数：36学时

第一部分 内毒素休克小鼠模型的建立与鉴定

实验一 小鼠腹腔注射LPS及常用仪器的使用

一、目的和要求

（一）了解模拟败血症的动物模型构建方法。

（二）熟悉LPS腹腔注射建立内毒素休克小鼠模型的方法。熟悉离心机、超净台等仪器的使用。

（三）掌握小鼠抓取、腹腔注射等操作。掌握微量加样器的使用。

二、教学内容

（一）实验总论（整体实验设计）

（二）小鼠腹腔注射LPS

（三）微量加样器的使用

（四）离心机、超净台等仪器的使用

三、教学学时安排

2学时

四、教学方法

线上线下混合教学（线上课程预习、线下课堂讲授）、实验教学（教师演示、小组合作）

实验二 小鼠腹腔巨噬细胞的分离及体外培养

一、目的和要求

（一）了解内毒素LPS诱导小鼠全身性炎症的表现。了解小鼠中枢和外周免疫器官的解剖位置和形态特点。

（二）熟悉台盼蓝细胞染色法区分死活细胞及细胞计数。

（三）掌握分离小鼠腹腔巨噬细胞的方法。掌握体外培养及刺激巨噬细胞的方法。

二、教学内容

（一）小鼠腹腔巨噬细胞的分离

（二）台盼蓝细胞染色法区分死活细胞及血球计数板计数

（三）小鼠腹腔巨噬细胞的体外培养

（四）培养上清及巨噬细胞的收集

三、教学学时安排

4学时

四、教学方法

线上线下混合教学（线上课程预习、线下课堂讲授）、实验教学（教师演示、小组合作）

实验三 小鼠腹腔巨噬细胞总RNA的提取及反转录

一、目的和要求

（一）了解总RNA提取的方法分类。

（二）熟悉紫外吸收法检测RNA纯度的原理。熟悉微量核酸蛋白浓度测定仪测定RNA浓度的方法。

（三）掌握TRIzol法提取细胞总RNA的基本原理和方法。掌握RNA反转录的原理及方法。

二、教学内容

（一）TRIzol法提取动物细胞总RNA

（二）RNA浓度及纯度的检测

（三）总RNA反转录为cDNA

三、教学学时安排

4学时

四、教学方法

线上线下混合教学（线上课程预习、线下课堂讲授）、实验教学（教师演示、小组合作）

实验四 PCR扩增腹腔巨噬细胞 IL-1β基因及琼脂糖凝胶电泳

一、目的和要求

（一）了解荧光定量PCR。了解炎症细胞因子及细胞因子风暴。

（二）熟悉PCR的基本原理。熟悉琼脂糖凝胶电泳检测DNA的基本原理。

（三）掌握PCR的基本操作。掌握琼脂糖凝胶电泳的基本操作。

二、教学内容

（一）PCR扩增腹腔巨噬细胞IL-1β基因

（二）琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物

三、教学学时安排

4学时

四、教学方法

线上线下混合教学（线上课程预习、线下课堂讲授）、实验教学（教师演示、小组合作）

实验五 ELISA检测巨噬细胞培养上清中IL-1β的含量

一、目的和要求

（一）熟悉ELISA的分类。

（二）掌握ELISA的原理和方法。

二、教学内容

（一）ELISA检测小鼠腹腔巨噬细胞培养上清中IL-1β的含量

三、教学学时安排

4学时

四、教学方法

线上线下混合教学（线上课程预习、线下课堂讲授）、实验教学（教师演示、小组合作）

第二部分 分子克隆实验

实验一 质粒DNA的提取、纯化及浓度测定

一、目的和要求

（一）了解质粒作为载体在基因工程中的应用。

（二）熟悉提取质粒的基本原理。

（三）掌握碱裂解法小量制备质粒DNA的方法。掌握分光光度法测定DNA浓度和纯度的方法。

二、教学内容

（一）碱裂解法小量制备质粒DNA

（二）DNA浓度及纯度的检测

三、教学学时安排

4学时

四、教学方法

线上线下混合教学（线上课程预习、线下课堂讲授）、实验教学（教师演示、小组合作）

实验二 质粒DNA的酶切鉴定及琼脂糖凝胶电泳

一、目的和要求

（一）了解限制性核酸内切酶在基因工程中的应用。

（二）掌握DNA限制性核酸内切酶酶切的基本原理。掌握琼脂糖凝胶电泳检测DNA的基本原理。

二、教学内容

（一）质粒DNA双酶切鉴定

（二）质粒DNA的琼脂糖凝胶电泳鉴定

三、教学学时安排

3学时

四、教学方法

线上线下混合教学（线上课程预习、线下课堂讲授）、实验教学（教师演示、小组合作）

实验三 目的 DNA和载体DNA酶切片段的回收

一、目的和要求

（一）了解琼脂糖凝胶回收DNA的常用方法。

（二）熟悉离心吸附柱法回收琼脂糖凝胶DNA的原理。

（三）掌握离心吸附柱法回收琼脂糖凝胶DNA的方法。

二、教学内容

（一）琼脂糖凝胶回收DNA的常用方法

（二）离心吸附柱法回收琼脂糖凝胶DNA

三、教学学时安排

3学时

四、教学方法

线上线下混合教学（线上课程预习、线下课堂讲授）、实验教学（教师演示、小组合作）

实验四 目的基因与载体的体外连接及转化

一、目的和要求

（一）掌握DNA体外连接反应的基本原理。掌握将DNA分子转化进入受体菌的方法。

二、教学内容

（一）DNA体外连接反应

（二）DNA分子转化进入受体菌

三、教学学时安排

4学时

四、教学方法

线上线下混合教学（线上课程预习、线下课堂讲授）、实验教学（教师演示、小组合作）

实验五 PCR法鉴定阳性克隆

一、目的和要求

（一）熟悉常用的鉴定阳性菌落克隆的方法。

（三）掌握PCR的基本原理。掌握菌落PCR鉴定阳性克隆的基本方法。

二、教学内容

（一）常用筛选阳性克隆的方法

（二）菌落PCR鉴定阳性克隆

（三）琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物

三、教学学时安排

4学时

四、教学方法

线上线下混合教学（线上课程预习、线下课堂讲授）、实验教学（教师演示、小组合作）