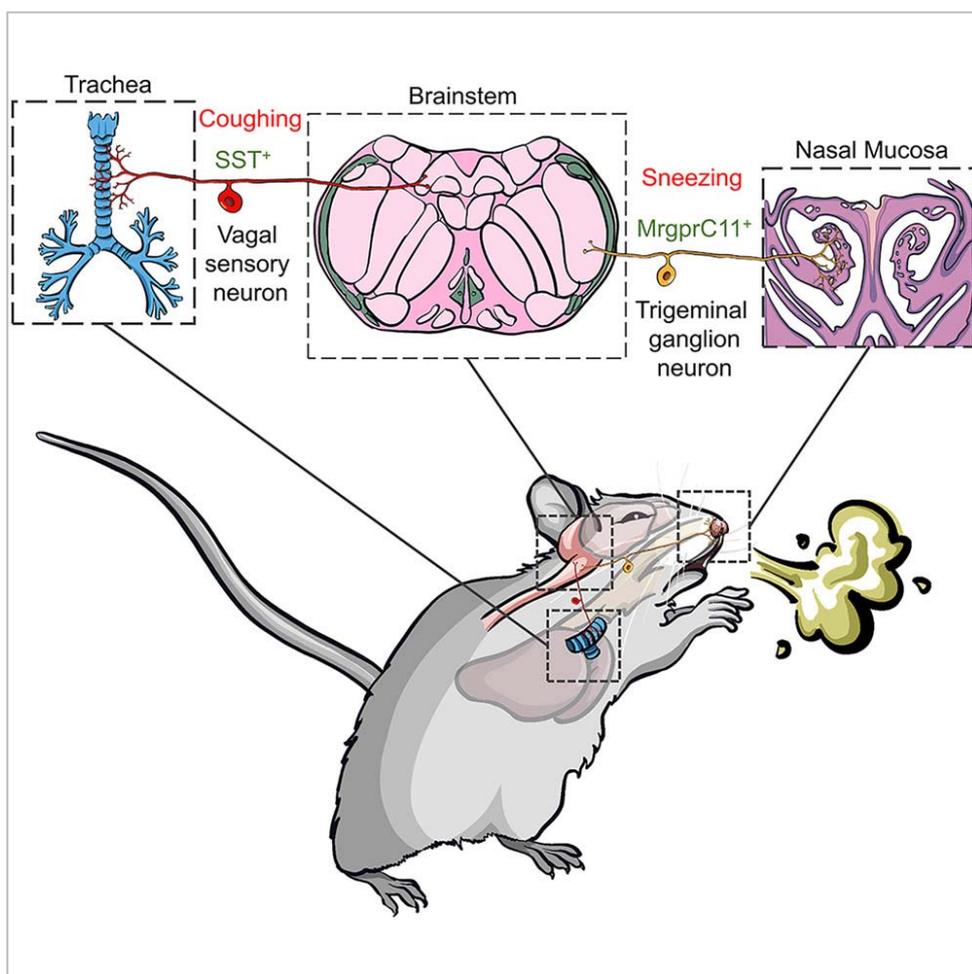


蜂巢

总第11期
202409月



成功地分离出在哺乳动物呼吸道中引发喷嚏和咳嗽的神经元
(Cell, 2024, doi:10.1016/j.cell.2024.08.009)

上海中医药大学科学技术实验中心编制

服务内容与形式

蜂巢

2024/09



委托
检测

仪器
共享

项目
合作

技术
培训

科研
咨询



平台
管理

平台
建设

实验
教学

人才
培养

技术
研发

目录

蜂巢

2024/09



- 前沿科技
 - 相干拉曼散射显微成像，让细胞研究跨入新纪元·····1

- 实验技术
 - 基于GC-MS的中药农药残留分析·····4
 - 小鼠眼球注射实验操作和方法，让你的科研更进一步·····6
 - 小鼠气管滴注与模型评价·····7
 - 透射电子显微镜常规生物样本取材注意事项·····8

- 基本实验技术
 - 手把手带你玩转差异代谢物筛选之火山图·····9

- 实验室安全
 - 实验动物与动物实验——安全篇·····12



相干拉曼散射显微成像，让细胞研究跨入新纪元

上海微创生成生物技术有限公司 研发资深总监 熊小超 博士

基于非线性光学效应的相干拉曼散射显微成像技术，集合高分子特异性、高灵敏度、高空间分辨率和高成像速度优势，全方位满足生命科学、材料学等领域的前沿需求。振电科技 (VibroniX) 的 SuperView 和 UltraView 相干拉曼散射显微成像设备具有无标记、快速、高化学特异性的独特成像能力，可以用于研究细胞和组织的化学组成和代谢活动。该技术可以弥补细胞代谢研究中常使用的成像质谱、正电子发射断层扫描 (PET) 或核磁共振 (NMR) 等检测方法在还原活体代谢过程的不足，可用于各种代谢小分子的无标记化学成分分析，帮助更好地了解细胞的代谢通路，开展药物研发与药效评估以及疾病诊断与研究等应用。

1 相干拉曼散射及成像原理

拉曼散射的发展历史可以追溯到1920年代，印度物理学家 Raman 在研究光的散射时发现，当单色光入射到物质中时，散射光中除了有与入射光频率相同的成分外，还包含与入射光频率不同的成分，这就是拉曼散射。这一发现被认为是光谱学中的一项重大突破，并在1930年获得了诺贝尔物理学奖。

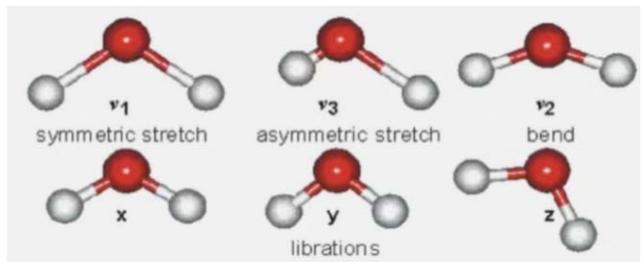


Sir Chandrasekhara Venkata Raman
(照片来自诺贝尔基金会档案)

拉曼散射的信号通常很弱，其应用受到了一定的限制。直到1960年代，随着激光技术的出现和不断发展，人们发现使用激光作为入射光可以提高拉曼散射信号的强度，从而促进了拉曼光谱技术的快速发展。

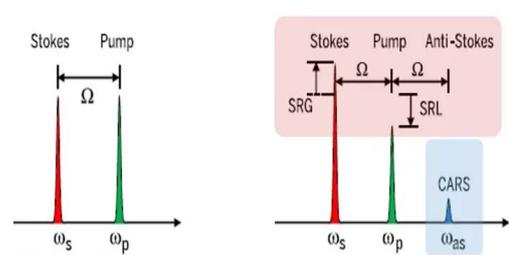
相干拉曼散射技术 (Coherent Raman Scattering, CRS)

是一种用于研究分子振动和转动行为的光谱测量手段。它结合了拉曼散射和激光干涉技术，允许高分辨率和高灵敏度地探测样品中的分子振动信息。



图：水分子经历的震动示例

相干拉曼散射技术 (Coherent Raman Scattering, CRS) 利用共振效应来放大需要检测的拉曼信号，需要同时输入两束光，除了泵浦光外，还需要与斯托克斯光同频率的入射光来产生共振，当斯托克斯光束 ω_{Stokes} 和泵浦光束 ω_{Pump} 在样品处重合且频率差 $\Delta\omega = \omega_{\text{Pump}} - \omega_{\text{Stokes}}$ 与分子振动频率 Ω 匹配时：此时泵浦光能量往往会因为受激拉曼散射效应而减弱，而斯托克斯光能量则会被放大，这两种现象又分别被称为受激拉曼损耗 (Stimulated Raman Loss, SRL) 和受激拉曼增益 (Stimulated Raman Gain, SRG)，二者都属于受激拉曼散射 (Stimulated Raman Scattering, SRS) 范畴。此外还会产生一个新频率信号称为相干反斯托克斯拉曼散射 (Coherent Anti-Raman Scattering, CARS)。因此，相干拉曼具有两种形式——SRS和CARS。

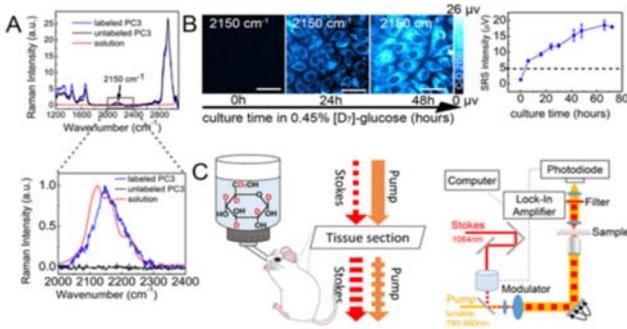


通过上述方法拉曼信号被放大，最高可至自发拉曼的一百万倍，极大提升了图像信噪比和成像分辨率。

2 相干拉曼应用案例

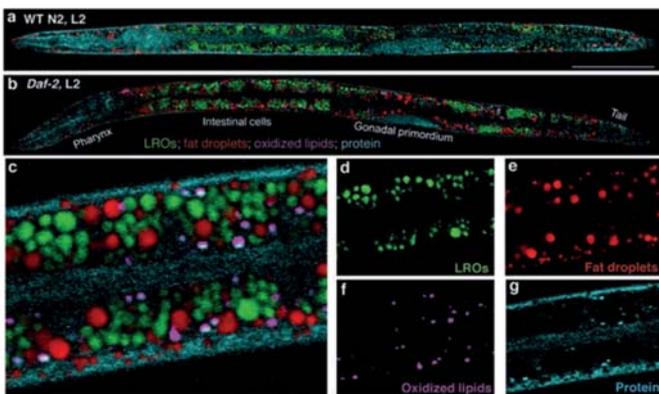
案例1：细胞代谢

通过小鼠饮用含氘代葡萄糖的水可以在组织切片中通过 SRS 成像检测到特异条带 2150cm⁻¹, 后续代谢过程中可以在各个组织中检测到 CD 键的信号, 例如肌肉, 心脏, 胰腺, 肾脏, 十二指肠和 fat pad 中。而且不同浓度的氘代葡萄糖的 SRS 信号随时间变化基本为线性, 提供了量化的可能。而且可以拍摄时间序列图像追踪动态变化过程。



Zhang, L. et al. Spectral tracing of deuterium for imaging glucose metabolism. Nat Biomed Eng 3, 402–413 (2019).

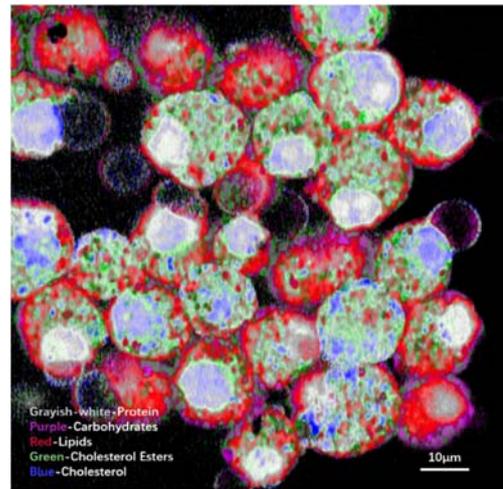
相干拉曼的无标记无损成像方式能够帮助研究员对肿瘤成因和药物作用进行深度和在体研究。除了斑马鱼, 小鼠, 线虫, 文昌鱼等动物都可以运用相干拉曼技术进行原位代谢研究。



Wang, P. et al. Imaging Lipid Metabolism in Live Caenorhabditis elegans Using Fingerprint Vibrations. Angew Chem Int Ed Engl 53, 11787–11792 (2014).

案例2：细胞内多组分成分分析

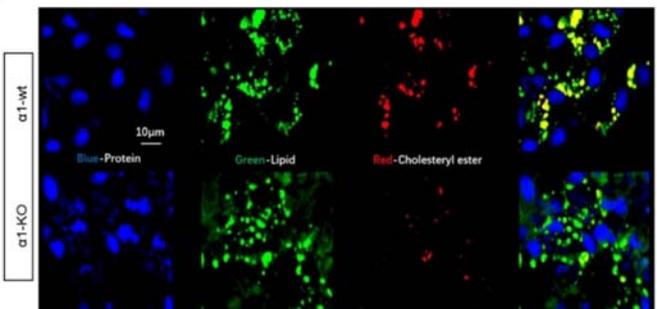
- 无标记SRS高光谱扫描在区分蛋白质、碳水化合物、脂类、胆固醇酯和胆固醇等六种物质成分上的独特优势。该技术提供了高化学特异性和高分辨率的成像, 无需荧光标记, 减少了对细胞的干扰, 使得图像易于解读。
- 为细胞生物学研究和相关疾病的诊断与治疗提供了一种强大的工具。



上图, 多色叠加图像展示了通过无标记SRS高光谱扫描, 并进行光谱分析得到的细胞中不同物质的分布图像。该图像使用40x NA 0.95 air物镜拍摄。灰白色: 蛋白; 紫色: 碳水化合物; 红色: 脂类; 绿色: 胆固醇酯; 蓝色: 胆固醇。(细胞由上海瑞金医院内分泌研究所提供。比例尺, 10 μm)

案例3：巨噬细胞中检测胆固醇脂含量

通过对胆固醇脂的分析, 可以揭示α1基因缺失如何影响巨噬细胞的基本生理功能, 为进一步理解巨噬细胞在免疫应答和炎症反应中的行为提供线索。相干拉曼技术能够在2800-3000cm⁻¹的拉曼范围内清晰地区分巨噬细胞中的蛋白质、脂质和胆固醇酯。Lasso算法的应用使得脂质、蛋白质和胆固醇酯能够以直观的颜色编码(绿色、蓝色、红色)被同时拆分和可视化, 提供了细胞内部生化过程的全面视图。利用相干拉曼光谱技术拍摄巨噬细胞可以为研究巨噬细胞的代谢和功能提供一种强有力的工具, 有助于推动免疫学和疾病治疗领域的研究进展。为细胞生物学研究和相关疾病的诊断与治疗提供了一种强大的工具。

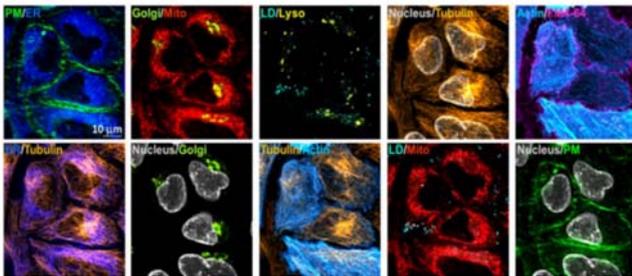


上图, UltraView显微成像系统在2800-3000cm⁻¹拍摄的巨噬细胞的SRS图像, 使用Lasso算法可拆分出脂质(绿色)、蛋白质(蓝色)和胆固醇酯(红色), 镜头使用的是40X NA 0.8 water。(巨噬细胞为海军军医大学免疫学研究所提供。比例尺, 10 μm)

案例4：超多重免疫组化

- 突破现有荧光免疫组化5重分析极限
- 实现~30种颜色的超多重染色

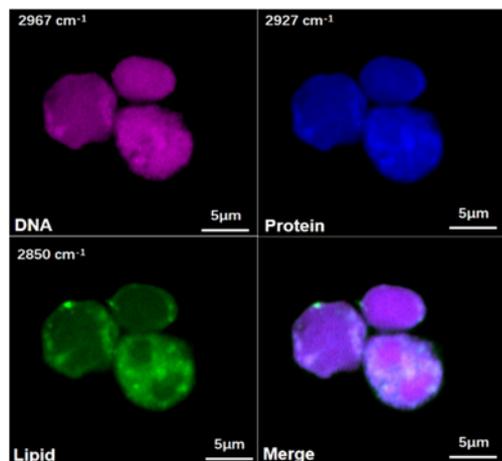
相干拉曼专用的拉曼染料提供了相比普通荧光更窄的光谱宽度因此在给定的光谱窗口内，能够使用更多种的探针来标记更多类的标志物，**实现~30种颜色的超多重染色**。相比普通基于荧光的多重免疫组化技术，基于拉曼染料的相干拉曼的多重免疫组化技术可以通过**一次样品孵育后直接成像**，无需复杂的重复洗染过程。该技术适合发育生物学、神经系统的结构功能、肿瘤微环境、原位 RNA 分析或生物大分子动态组装过程等的研究。



Hu, F. et al. Super-multiplexed optical imaging and barcoding with engineered polyynes. *Nat Methods* 15, 194–200 (2018).

案例5：病理诊断-白血病细胞类型诊断

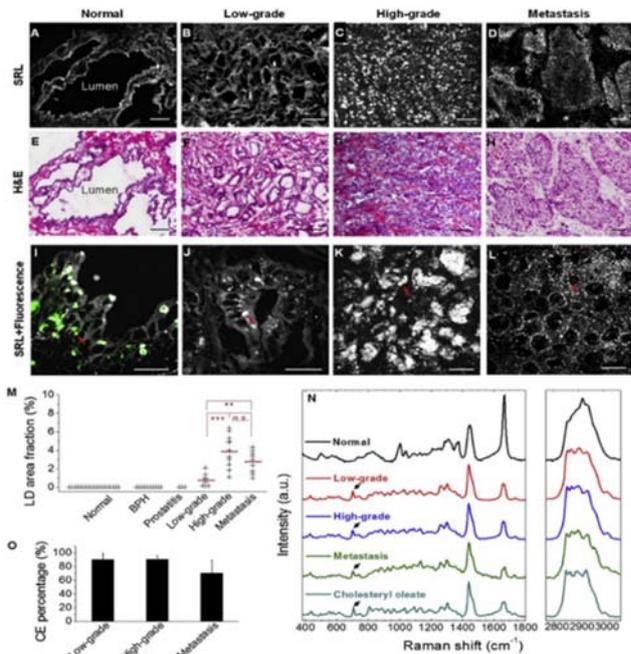
利用UltraView成像系统的SRS模式，能够高分辨率地捕捉细胞内部结构，如核仁、细胞核和细胞质。通过在核酸、蛋白质、脂质等生物分子的特征峰波数位置采集图像，能够提供细胞化学成分的细节信息，并实现细胞区域的清晰区分。这种高化学特异性的成像方法不仅快速诊断白血病细胞类型，有助于科研和临床中对白血病细胞类型的精确识别。



上图使用振电科技UltraView成像系统SRS模式，60x NA 1.2 Water物镜拍摄。1至3张图像为在核酸、蛋白、脂质特征峰附近波数位置采集的图像，将图像叠加能显示核仁、细胞核和细胞质区域的区分。（白血病细胞为中国医学科学院血液学研究所提供。比例尺，5 μm）

案例6：病理诊断-脂质在癌细胞中累积

通过 SRS 成像和 HE 对比发现，对于前列腺癌患者的腺体内富含脂质，进一步分析发现这些脂质为胆固醇酯，而正常前列腺组织内为酯化的脂质和蛋白。通过相干拉曼显微镜对人类患者癌组织中的单细胞水平的脂肪生成进行了定量分析，发现前列腺癌中所有阶段均富含胆固醇酯，表明胆固醇酯是人类前列腺癌组织中中性脂质的主要形式，可以作为前列腺癌诊断的分子标记物。



Yue, S. et al. Cholesteryl Ester Accumulation Induced by PTEN Loss and PI3K/AKT Activation Underlies Human Prostate Cancer Aggressiveness. *Cell Metabolism* 19, 393-406 (2014).

3 振电科技 (Vibronix) 相干拉曼技术特色

- 高分子特异性**：相干拉曼散射成像通过探测目标分子的特征分子键振动来提供成像所需的对比度，分子特异性高
- 高空间分辨率**：搭配高倍数物镜，最高可实现350 nm成像分辨率
- 多窗口光谱聚焦**：自动化大范围多窗口的相干拉曼光谱成像
- 高灵敏度**：较自发拉曼高一百万倍
- 高成像速**：采用高速二维振镜，最高10 fps刷新率
- 高级成像模式**：自定义3D成像和大视野拼图

欢迎详询和体验全球最快、最灵敏的相干拉曼单细胞检测：XiaoChao.Xiong@microport.com, 或yxia@microport.com。



基于GC-MS的中药农药残留分析

分析测试平台/冯静文, 刘新华

1 引言

随着中药的广泛应用, 其安全性和质量问题越来越受到关注。中药材在生产过程中受到大气、土壤、水质中的有毒有害成分的影响, 以及种植过程中过量的施用农药、化肥等, 导致中药材普遍存在着农药残留量超标等问题, 农药残留检测成为了中药质量控制的重要环节。

2 农药的种类及农药残留检测的必要性

农药残留是指农药使用后残存于中药材中的农药原体、有毒代谢物、降解物和杂质的总称。常见的农药残留类型包括: 有机氯农药(如DDT、六六六)、有机磷农药(如甲基对硫磷、乐果)、氨基甲酸酯类农药(如甲萘威、呋喃丹)、拟除虫菊酯类农药(如氯氰菊酯、氰戊菊酯)^[1]。

农药残留可能对人体健康造成急性或慢性毒性反应, 如神经毒性、致癌性等; 许多国家和地区对中药材中的农药残留有严格的限量要求, 农药残留超标影响中药的出口和国际市场准入; 高浓度的农药残留还可能降低中药药效或引发毒副作用。因此, 检测中药材中的农药残留非常必要。

3 农药残留的检测方法

农药残留的常规检测方法有快检技术和传统检测方法。快检技术主要有酶抑制法、免疫分析法、化学比色法等, 快检方法简单, 检测成本低, 检测速度快, 易于实现现场速测, 但灵敏度低、重现性差、检测精度不高, 易受样品基质干扰、适用范围窄; 传统检测方法主要有色谱法包括气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)法, 以及GC/LC与质谱连用(GC/LC-MS/MS)技术, 这些方法均具有良好的灵敏度、准确度、精密度和可靠性; 也存在样品处理和预处理复杂、成本高、需要经过培训的人员以及检测所需的时间长等局限性^[1]。

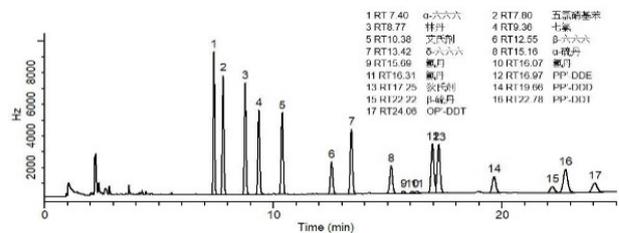
4 药典农药残留分析检测标准

1980年对WHO将农药残留测定单独列为检测项目, 中国药典也对中药农药残留的分析方法提出了明确的要求, 规定了常见的农药如有机氯、有机磷和拟除虫菊酯类农药相应的最大残留限量标准。标准与国外相差不大, 有毒有害物质残留标准限量基本达到国际标准。

中国药典(ChP2020)推荐气相色谱法(GC)和气相色谱-质谱联用技术(GC-MS), 由于其

高灵敏度和高选择性, 被广泛用于检测中药材中可能存在的农药残留。药典还规定了一些具体的前处理方法, 如固相萃取(SPE), 用于农药的提取与净化。

此外, 鼓励采用多残留检测方法, 如GC-MS一次性检测多种不同类别的农药, 提升检测效率。



5 GC-MS技术的优势及样品处理办法

5.1 GC-MS技术的优势

GC-MS/MS技术可一次性测定多种农药, 还可以对复杂基质中药材农药多残留进行测定, 效率明显高于GC技术, 兼具气相色谱的高灵敏度与质谱准确性的优势。适用范围广, 可分析挥发性和半挥发性有机化合物, 特别适合分析多种农药。此外, 不仅可定性分析出农药种类, 还可定量分析出其含量, 满足不同检测要求^[2]。

5.2 样品前处理方法

在使用GC-MS进行中药材农药残留检测之前, 样品前处理是一个关键步骤^[3]。

直接提取法: 粉末加氯化钠摇散, 再加入乙醇进行匀浆处理, 离心分取上清液。

固相萃取法(SPE): 利用固相吸附剂对样品中的农药进行选择分离, 去除干扰物质, 提高检测灵敏度。液体样品的前处理大多应用固相萃取技术, 用来萃取净化其中的不挥发性或半挥发性化合物。

快速样品处理法(QuEChERS): 基于SPE的样品前处理技术, 可有效避免液-液分配中出现的乳化现象, 减少有机溶剂用量, 缩短前处理时间。分为提取和净化2个步骤。提取步骤中使用无水硫酸镁来帮助提取, 同时也使用氯化钠或无水乙酸钠用于“对碱敏感的化合物”的提取。净化过程中采用N-丙基乙二胺(PSA), 以去除有机酸和极性色素; 有些搭配使用C18填料, 以去除脂类和甾醇, 或使用石墨化炭黑减少色素的

干扰。该方法简便快捷，适合多种农药的前处理，尤其是在复杂基质样品中的应用较为广泛。

6 结论

GC-MS技术凭借其高灵敏度、高选择性以及多样化的前处理方法，已经成为中药材农药残留检测的主流技术手段。通过合理的前处理方法，能够有效检测并量化农药残留，保障中药材的质量和安

参考文献：

1. 雷豆豆,宋鹏悦,徐青斌,等.色谱及联用技术在中药材农药残留检测中的应用进展[J/OL]. 分析试验室,1-15[2024-09-25].
2. 吴振廷,王春颖,朱琳,等.中药材农药残留成分检测方法研究进展[J]. 内蒙古林业科技, 2023, 49(1):60-64.
3. 刘琪.改进QuEChERS技术结合GC-MS/MS测定西洋参中的农药多残留[D]. 山东农业大学, 2019.



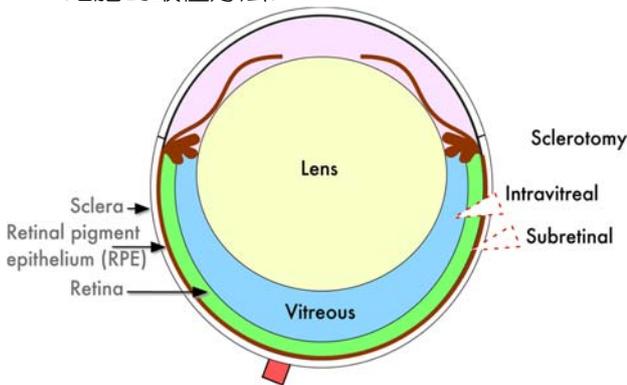
小鼠眼球注射实验操作和方法，让你的科研更进一步！

瑞沃德生命科学/吴清勤

1 背景

目前在全球范围内因为眼部疾病致盲人数约有4000万，这其中有相当一部分属于遗传性视神经病变，如老年黄斑变性、Leber先天性黑矇、Leber遗传视神经病变等等^[1]。

眼球作为相对独立的器官，球内注射是最有效的药物递送方式。眼球注射可突破血眼屏障，使药物迅速浓集于眼内，继而在眼内扩散到达作用部位。具有代表性的眼内注射给药途径有视网膜下（subretinal）注射和玻璃体腔（Intravitreal）注射，玻璃体内注射能够使基因药物可以较快扩散至视网膜或脉络膜部位。视网膜下注射可将药物直接传递到视网膜和视网膜色素上皮细胞（RPE）之间的潜在空间，是将药物直接递送至RPE细胞的最好方法。



2 视网膜下注射

实验仪器耗材：手术器械、吸入式麻醉机、Hamilton注射器（30G、33G）、托品酰胺、去氧肾上腺素、手术显微镜

实验步骤：

动物麻醉：小鼠置于诱导盒内进行吸入式异氟烷麻醉，捏合小鼠脚趾确认是否麻醉完全。将小鼠转移到解剖显微镜下，连接鼻部持续给予异氟烷。待注射眼睛滴加一滴丙美卡因(或类似的表面麻醉剂)防止注射引起局部反射，轻触结膜确定麻醉深度。

扩瞳：倾斜鼠头部，使待注射眼睛在视野范围内，用棉签擦去任何多余的液体。向待注射眼球滴加1-2滴1%托品酰胺和0.5%去氧肾上腺素用于扩大瞳孔。

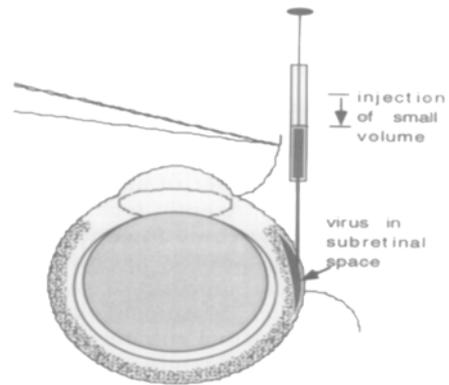
巩膜切口：使用镊子在上下眼睑之间滑动，使眼球从眼窝中伸出，暴露巩膜。采用30G针头在角巩膜缘后面做一个小的巩膜预切口，如果液体从切口处流出，则针头穿刺过深而进入玻璃体腔，之后注射过程中的液体可能进入玻璃体腔角巩膜缘稍后处切口。

注射：用镊子轻轻捏紧缘下约1mm处的结膜保持眼球固定。将装好注射液的33G注射针插入预切口，针与眼球表面相切，沿巩膜内表面穿过，

尖端进入约1mm，穿过巩膜和脉络膜，到达视网膜下间隙。操作注射器平稳注入适量液体，注意注射过程避免晃动引起额外的组织损伤。

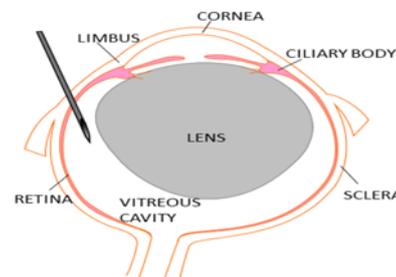
注射后，停留针头约30秒，以防漏液，然后将针头慢慢抽出。取出镊子，重新放置结膜，轻轻将眼睛放回眼窝，闭上眼睛。如果需要双侧眼球注射，将另一面眼球转到显微镜视野下重复上述步骤，视网膜下注射进针示意图^[2]。R480玻璃电极注射泵搭配显微操纵器可满足大小鼠眼球精准注射实验，采用更细的玻璃毛细管代替常规33G注射针头保证更小的注射损伤。

可在角膜和注射区域涂抹抗生素眼药膏防止感染，将动物放在加热垫上使其完全恢复（2-3分钟），然后将其转移回笼子继续饲养。



3 玻璃体内注射

玻璃体内注射与视网膜下注射类似，在用镊子保持眼球稳定的同时，将装好药物的针头，相对视神经约60度角，从角巩膜缘后预切口，插入约1mm进行玻璃体腔注射。需要注意晶状体占据玻璃体腔的大部分，应小心避免刺穿晶状体。



参考文献：

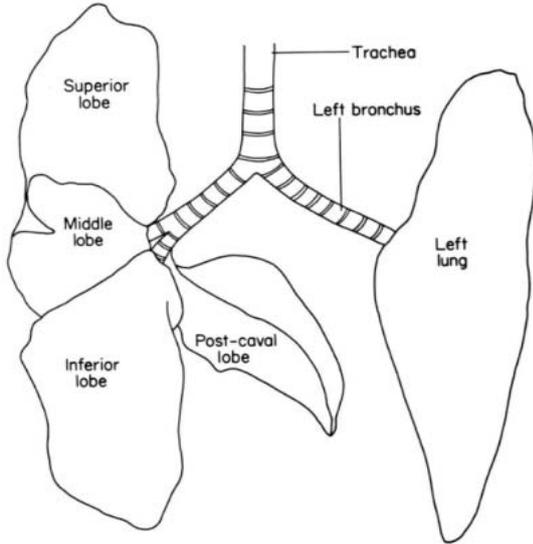
1. Bourne R, et al. Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2017;5:e888–e897.
2. Katherine JW, et al. Subretinal injection of gene therapy vectors and stem cells in the perinatal mouse eye. *J Vis Exp*. 2012;(69):4286.

小鼠气管滴注与模型评价

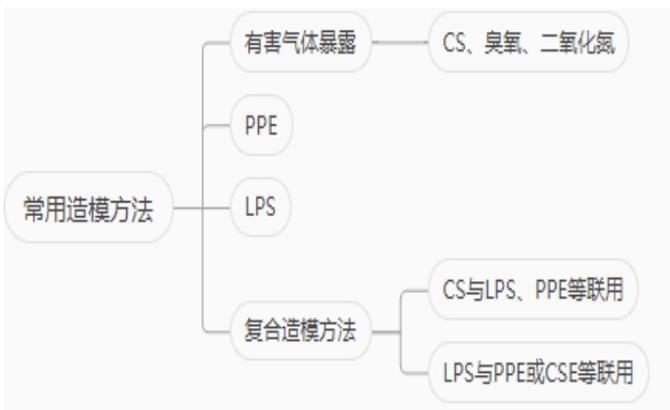
深圳灵赋拓普生物

1 背景

小鼠左肺仅有1叶，右肺有4叶，分为右前叶、右中叶、右后叶和较小的腔后叶，共5叶。



气管滴注这一给药方式具有给药量准确、动物应激小等优点而广泛。应用于肺相关疾病造模，常见的慢阻肺造模方法有：



2 如何进行气管滴注？

Step1: 滴注前准备动物：♀ ♂均可，6-8w, balb/c、C57BL/6J均可；其他用品：麻醉机（含异氟烷）、鼠板、10-100μl移液枪、棉签、小鼠压舌灯、镊子、皮筋等。

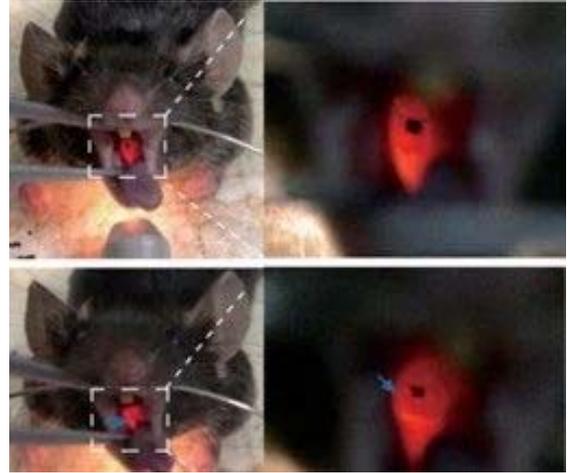
Step2: 将动物置于诱导箱中麻醉，然后放在鼠板上用皮筋固定门齿和腹部（皮筋可以用乳胶手套上的那根，柔软且弹力适中）。

Step3: 镊子拉出小鼠舌头，插入棉签，以沾干口腔内的唾液，否则过多的唾液容易遮挡视线，不利于观察到开合的声门；

Step4: 手指捏住舌头，伸入压舌灯，观察声门开合的位置；

Step5: 向声门缓慢滴加10-40μl药物；

Step6: 药物滴加完成后，用无针头的注射器从鼻孔向下缓慢推大约500ul空气，使药物均匀分布；



Step7: 将给药后的鼠放在耳边，可听到清晰的呼吸音，类似于人咳嗽或“咯痰”声，说明给药成功。鼠放回鼠笼，1min内即可苏醒。

3 模型评价

以黑墨水示意药物分布，可以看到左右肺叶均有着色。



根据药物毒性或小鼠对药物的反应不同可以发现，有的小鼠在给药后会出现体重下降、毛发凌乱等问题，这些现象也可以从侧面反映出药物对小鼠发挥了作用。

4 评价

小鼠在自然体位下，食管和气管是并行的，食管贴近背部，气管贴近胸部，因此在灌胃时需要灌胃针从嘴角进针，贴住上颚然后下行。而气管给药时需要向胸部贴近才能看到声门。

给药工具除了移液枪外，还可以选择灌胃针进行气管给药，此时灌胃针在气管中上下移动时，可感觉到气管没有食管那么光滑，进而进一步判断给药位置。

透射电子显微镜常规生物样本取材注意事项

细胞生物与组织病理学实验室/姜逸

1 引言

实验样品的选择制作是临床及科研工作的重要环节，取样时样品大小、取样部位、取样后固定液的选择、固定时间等对实验成败至关重要。我科电镜平台主要提供送样检测服务，故而在此重点叙述由各课题组自行完成的取材部分及其注意事项，以期各研究人员后续呈现良好的实验结果，完成研究目标提供一些帮助。

2 取材要求

“快、小、利、净、准、冷”是取材的基本要求。

“快”是为了避免组织细胞因缺血缺氧导致自溶，破坏超微结构，尽量在1min内将标本浸入固定液；

“小”由于电镜使用的固定液戊二醛的渗透速率慢（仅为0.5 mm/h），为避免固定不充分，取材大小以1mm³为宜；

“利”是取材工具要锋利，以避免取材工具来回拉扯组织造成人为假象（一次性超薄双面刀片为佳）；“净”是避免组织取材时残留血迹污迹，影响实验结果；

“准”是针对取材的部位要准确，尤其是需要定位的组织（海马、眼球、肾皮质、肠道等），要求取材者有一定的形态学基础；

“冷”可以降低酶活性，避免组织细胞因环境温度、固定液温度而加速自溶，破坏超微结构。因此，所用实验容器、溶液和器械均需要预冷，样本转运过程也需自备冰盒。



3 常见问题

- ①取材时间过长，样品固定不及时，引起自溶；
 - ②取材的组织块太大，这是比较常见的失误，结果一是组织固定不好，不能保存良好的超微结构，二是真正在电镜下观察的组织仅针尖大，多了也无用。
 - ③标本受挤压、牵拉，造成人工假象；
 - ④部位不准确或对切片方向不明确，如需要观察肾小球却取到肾髓质部位，观察癌变部位却取到周围组织或坏死组织，肌肉组织块修成与肌丝方向不垂直的长条等；
 - ⑤标本漂在固定液上，固定不好，如肺、脂肪组织等。解决办法就是密封抽气或用无菌脱脂棉球压于其上，使组织块沉底，全部浸泡在固定液中。
- 以上问题均会影响实验结果，需要透射电镜服务的课题组务必牢记取材要求。

参考文献：

1. 陶忠芬,可金星,肖桃元,等.电镜样品取材的意义与应用[J].第三军医大学学报,2005,(3):273-274.
2. 黄静,彭彬.常规透射电镜生物样品制样条件的摸索总结[J].川北医学院学报,2021,36(1):119-121.



手把手带你玩转差异代谢物筛选之火山图

病毒与免疫室 王晓宇

1 原理介绍

在代谢组学的数据分析流程中，差异代谢物筛选是最基本的分析内容。差异代谢物筛选的常见计算指标，主要有倍数变化（FC值）、差异显著性（p值、q值）、变量投影重要性（Variable important in projection, VIP值，常来源于PLS-DA/OPLS-DA分析）。其中，使用倍数变化（FC值）与差异显著性（p值、q值）结合筛选差异代谢物是最常见的筛选方法。

倍数变化（Fold Change, FC值）通过计算代谢物特征在两组样本中的丰度定量平均值的比值，从而直观反映出代谢物特征在两个组别之间的相对变化趋势。后续在数据可视化中一般会进行Log2转换，以便于展示相对变化趋势，即将度量相对变化趋势的量纲从 $(0, \infty)$ 转化为 $(-\infty, \infty)$ ，对数变换后的FC值的绝对值越大，表示代谢物在两个组别间的丰度定量变化越大。其中FC值的具体计算公式如下：

$$FC = \frac{\bar{x}_{treatment}}{\bar{x}_{control}}$$

从上述计算公式可看出，FC值仅从两个组别的平均值计算得到，没有考虑到组内和组间的变异，容易受个别样本的影响（极大值或极小值），因此还需要结合统计学显著性检验的结果，进行差异代谢物的筛选。而差异显著性分析，一般是指通过统计学假设检验的方法来比较组间代谢物的丰度定量差异，如t检验、方差分析等。这些方法会计算出一个p值，一般以 $p < 0.05$ 作为显著性的筛选标准，表示在给定的显著性水平0.05（5%的置信度）下，该代谢物在不同样本组（例如对照组和治疗组）之间的浓度变化存在统计学上显著的差异。p值越小，差异越显著。

2 绘制流程

MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca/) 是开放获取的在线代谢组学分析平台，提供从数据预处理到统计和机器学习等多种分析工具，用户可在网站进行在线分析，获得可发表的高质量数据可视化结果图表。

2.1 准备数据

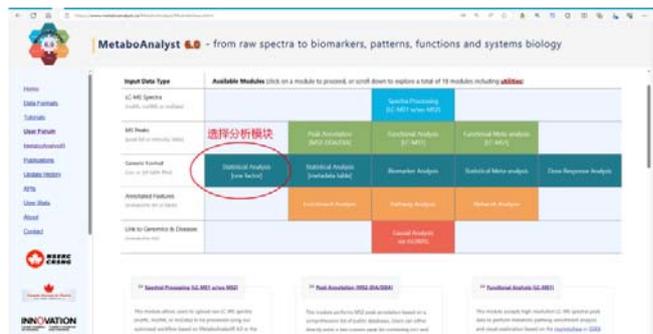
准备代谢组学矩阵文件，即csv文件，使用MetaboAnalyst官方提供的数据为例，文件格式如下：

| Sample | ko15 | ko16 | ko18 | ko19 | ko21 | ko22 | wt15 | wt16 | wt18 | wt19 | wt21 |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|
| Label | KO | KO | KO | KO | KO | KO | WT | WT | WT | WT | WT |
| 200.1/292 | 147887.5 | 451600.7 | 65290.38 | 56540.93 | 85146.33 | 162012.4 | 175177.1 | 82619.48 | 51951.61 | 69198.22 | 15327 |
| 205/2791 | 1778569 | 1567038 | 1482790 | 1039130 | 1223132 | 1072038 | 1950287 | 1466781 | 1572679 | 1275313 | 1356 |
| 206/2791 | 237993.6 | 289714 | 201393.4 | 150107.3 | 178989.7 | 156797 | 276541.8 | 222366.2 | 211717.7 | 190850.9 | 18826 |
| 207.1/271 | 380873 | 460623.7 | 351750.1 | 219288 | 286848.6 | 235022.6 | 417169.6 | 324892.5 | 277990.7 | 220972.4 | 252 |
| 219.1/252 | 235544.9 | 173023.4 | 82364.59 | 79480.4 | 185792.4 | 174458.8 | 244584.5 | 161184.1 | 72029.38 | 75096.99 | 23816 |

第一行表示样本信息，第二行表示样本组别信息，第三行之后表示代谢物特征的定量信息，可以是峰强度、相对丰度定量或浓度等。

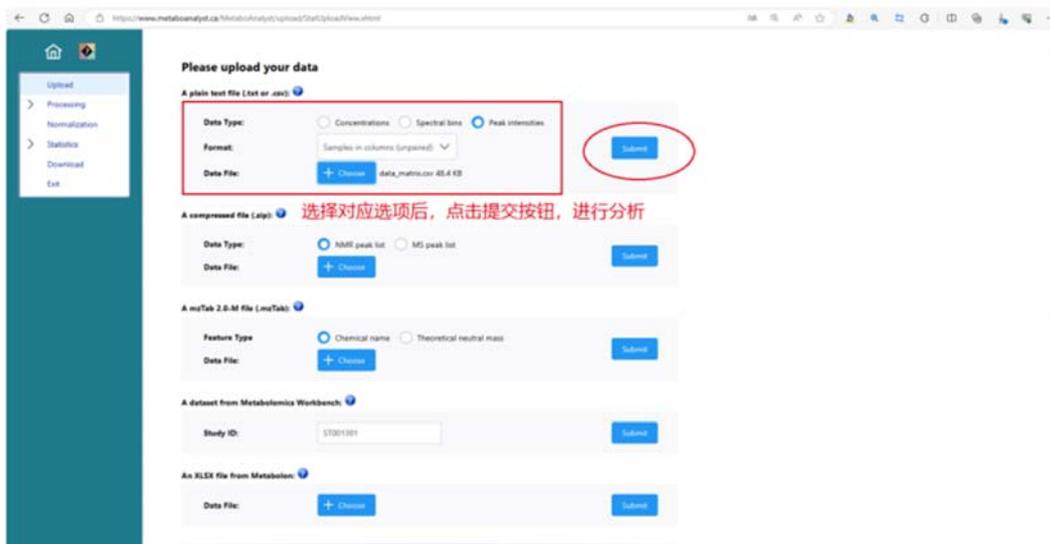
2.2 进行分析

1) 通过浏览器登陆MetaboAnalyst网站 <https://www.metaboanalyst.ca/>，选择“Click here to start”红色按钮，选择“Statistical Analysis[one factor]”选项，进入分析模块的数据导入界面，或是直接登陆进入对应的分析模块 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/upload/StatUploadView.xhtml>)：

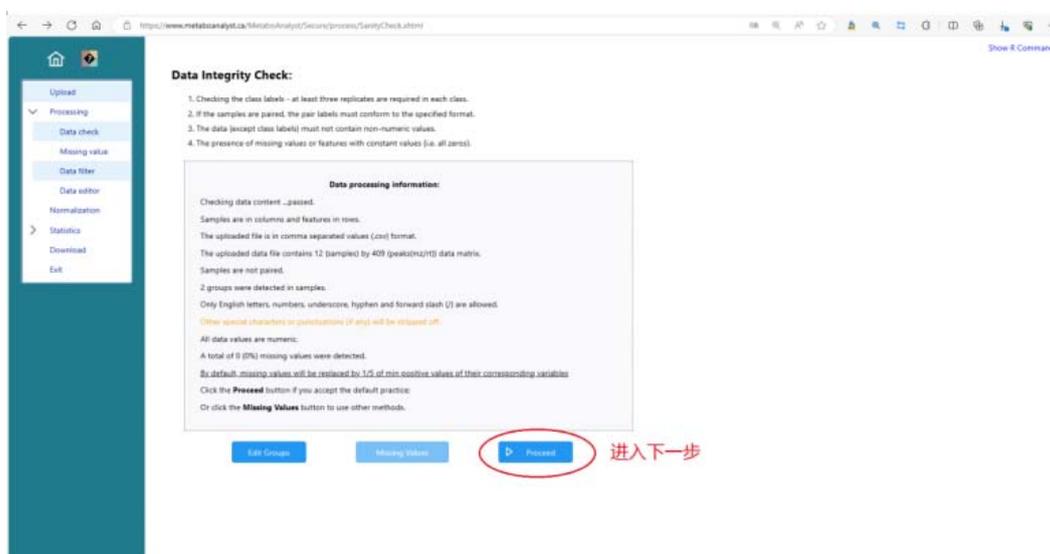


2) 选择“A plain text file”平文本文件格式。

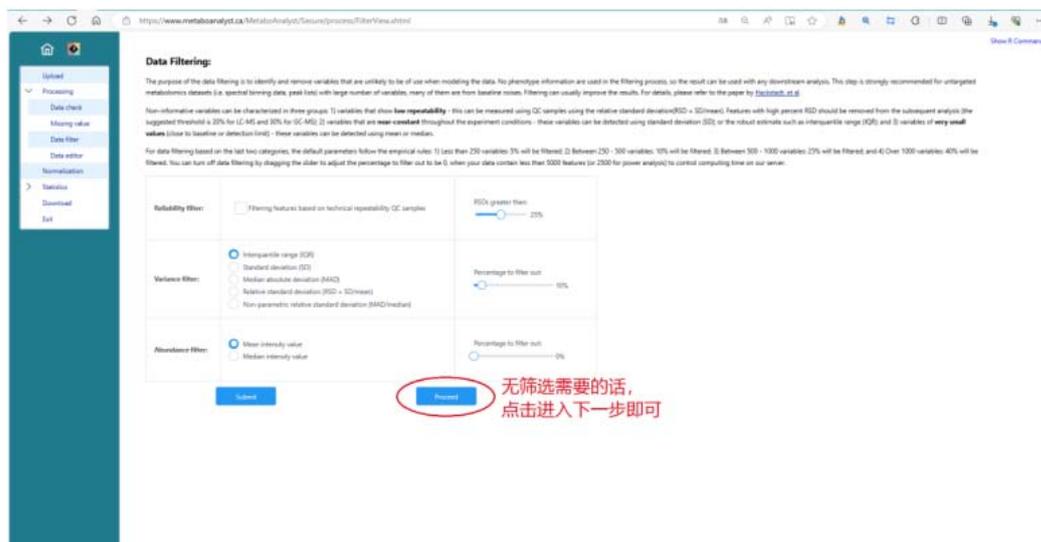
因为这里采用官方给出的MS峰强度面积，“Data Type”选择“Peak intensities”即可，“Format”选择“Samples in columns(unpaired)”模式，点击“+Choose”蓝色按钮选择矩阵文件，点击“Submit”按钮提交即可；



3) 进入“数据完整性检查”界面后, 如果不需要修改样本组别信息, 直接点击“Proceed”按钮进入下一步;

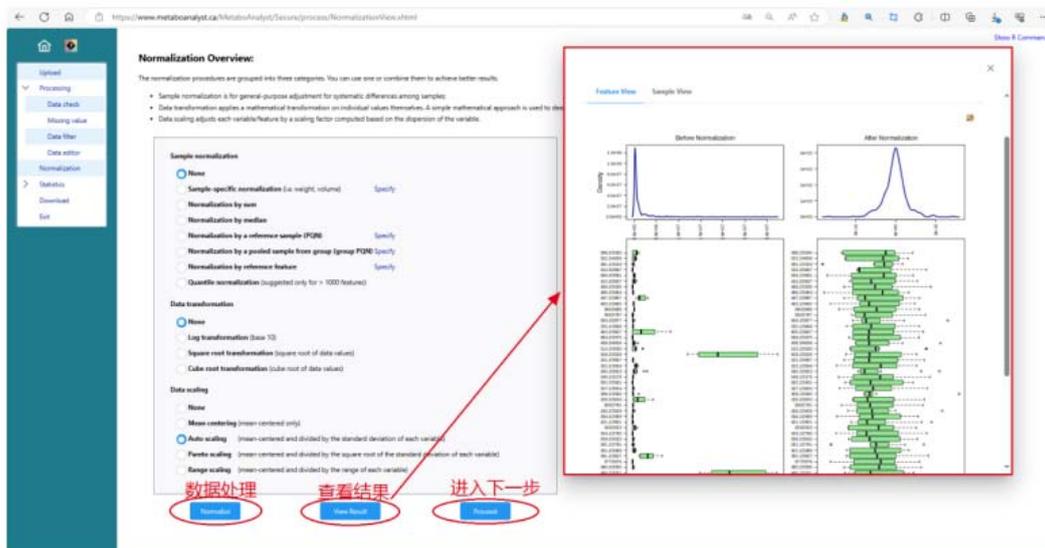


4) 进入“数据筛选”界面后, 如果不需要进行过滤操作, 则直接点击“Proceed”按钮进入下一步即可;

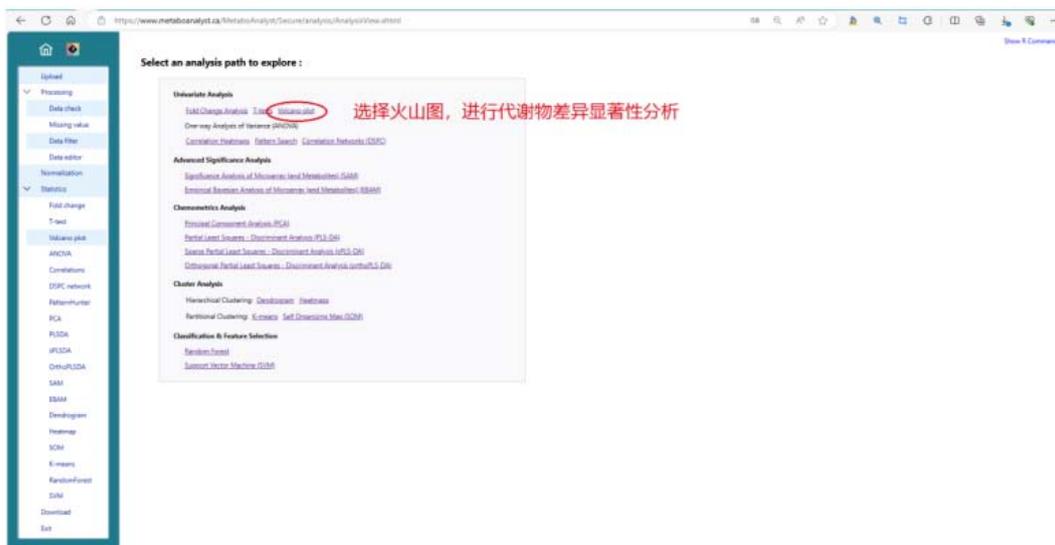


5) 进入“数据归一化”界面，需要选择三个归一化参数。一般默认选择“None”，“Sample normalization”一般选择“None”。“Data transformation”

一般选择“None”；“Data scaling”一般选择“Auto scaling”，该缩放方法较为常用；点击“Normalize”选项进行数据处理，可通过“View Result”选项查看数据处理前后的数据分布变化。点击“Proceed”进入下一步；



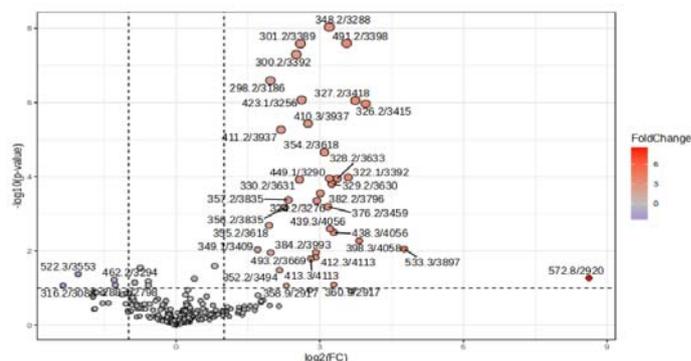
6) 进入“探索分析”界面后，选择“Volcano Plot”即可进行变异倍数和差异显著性的联合分析，具体分析选项的注释见图；



3 结果查看

选择右侧导航栏的“Download”，跳转到结果下载界面，即可下载对应的图表及分析结果文件，也可点击“Generate Report”按钮下载报告。如点击“volcano_xx_dpi72.png”，即可查看火山图绘制结果。

注：资料和图片来源于迈理奥代谢组学官网





实验动物与动物实验——安全篇

——靠前一步防事故 主动作为除隐患

滨州医学院教务处

实验动物生物安全是对实验动物可能产生的潜在风险或现实危害的防范与控制。由实验动物造成的各种风险和危害存在于生产和使用实验动物的各个环节，如实验动物的引种、保种、繁育、运输以及动物实验操作等过程。对于高等学校本科实验教学来说，尤其要注意实验动物饲养与动物实验操作过程中生物安全隐患，实验动物从业人员必须对生物安全有一个科学的认知，确保师生生命健康与环境安全。

1 实验动物生物安全危害源

动物实验过程中可能产生各种潜在的生物危害因素，若处理不当，不仅危害操作人员和实验动物的安全，也会污染实验环境和公共卫生。动物饲养室和实验室常见的生物危害源主要有以下四种。

1.1 感染性病原体气溶胶

生物气溶胶是一种常见的生物危害，是指含有生物性粒子的气溶胶。生物性粒子可以是细菌、真菌、病毒、毒素等，也可以是致敏花粉、孢子、过敏原、唾液和动物排泄物等。除具有一般气溶胶特性外，还具有传染性、致敏性等特点。生物气溶胶无处不在，难防难控，可自然发生也可人为产生，受感染的动物可通过呼吸或排泄释放生物气溶胶。当实验人员处理实验动物时，如病原感染、饲喂、换笼、采血和解剖等，也会产生生物气溶胶。在病毒接种或动物感染等常规操作，以及玻璃容器破碎或误操作等意外情况下，均可产生病毒性气溶胶。因此，在动物实验室过程中，科学控制人员活动范围和操作程序，合理使用生物安全柜和消毒剂，在操作间和隔离间等重要区域采用空气熏蒸消毒，以及适当增加换气次数和安装过滤设备等，对于降低生物危害风险至关重要。

1.2 动物性过敏原气溶胶

动物性过敏原是一种通过气源传播的生物危害，主要有动物的分泌物和排泄物，包括动物的皮屑、毛发、尿液和唾液等。动物过敏原进入空气形成气溶胶，可通过吸入、皮肤或眼部接触引起实验人员的过敏反应，而诱发实验动物过敏症。其主要表现为鼻炎、哮喘、眼睛发痒和皮疹等。所致哮喘不仅会在从业人员接触实验动物或暴露于相关环境时，引起咳嗽、呼吸急促等症状，而且会出现慢性哮喘症状，可持续数月或数年。

动物性过敏原气溶胶，通常具有较宽的粒径范围，几乎遍布整个饲养室或实验室，室内过敏原浓度的高低与环境湿度、动物密度和人员操作活动频率（更换笼具、打扫卫生和动物操作）等密切相关。因此，必要的环境控制措施，是降低动物性过敏原的有效途径。

1.3 动物排泄物

动物排泄物通常含有试验研究的感染性病原体、抗微生物药物和耐药菌株等，长期堆积易产生生物气溶胶、氨气、硫化氢等有害气体。动物饲养密度大、更换垫料、动物捕捉或粪便清理不及时，均会造成室内氨气浓度增加，特别是大动物排泄物量多，更容易产生高浓度氨气。工作人员长期在高浓度氨气环境中操作，可引起呼吸系统疾病，如慢性鼻炎、气管炎、支气管炎及眼结膜炎。因此，动物饲养室和实验室应保证足够的通风量和换气次数，保持适当的饲养密度，定期更换垫料并及时清理粪便。饲养笼盒先采用消毒剂浸泡，再进行高温、高压灭菌。

1.4 实验废弃物

实验废弃物可分为感染性废弃物、病理性废弃物和损伤性废弃物三类。感染性废弃物包括接触过或潜在接触过实验动物或病原微生物的实验废弃物。病理性废弃物包括质粒、细胞、单克隆抗体、临床组织样本及实验动物组织、尸体等废弃物。损伤性废弃物包括使用后的注射针头、刀片等锐器。实验过程中产生的废弃物必须按相关要求进行分类处理，动物尸体须装入标记“医疗废物”的黄色垃圾袋内，并存放于专用动物尸体冷冻柜中保存，由专业机构定期处理。其他废弃物（如注射器、针头、刀片等）需分开包装、密封，严禁与动物尸体混合装运。

2. 实验动物生物侵害对象

2.1 对人员的危害

在实验动物饲养和动物实验研究中，对实验动物从业人员的危害，主要表现为各种人兽共患病和实验性病原体感染及传播。由于动物饲喂、卫生保洁和各类实验操作需要密切接触实验动物，因此，饲养人员和实验人员是生物危害的主要受害者。其次，动物采购、运输、检疫和管理人员，因间接接触动物或存在短暂接触史，也是生物危害的潜在感染者。另外，必须特别注意的是，接触实验动物人员的家庭成员，也是实验动物生物

危害的间接受害者。其危害程度，由病原体的量、对人体的致病性、感染途径和人的易感性等四个方面的因素所决定。

2.2 对环境的危害

实验动物设施内的危害因素一旦向外扩散，必将引起周围环境污染，甚至导致区域性生物灾害，引发社会安全问题。普通动物实验设施对环境的危害，主要来自动物饲养和实验过程中的“三废”，即被污染的空气、污水和废弃物（手套、器械、工作服、动物尸体、排泄物及垫料等）。特殊动物实验设施通常进行感染性实验，因管理疏漏，导致实验动物在实验期间带毒（菌）逃逸，或实验完毕未按规定处置动物尸体，可导致有害生物或病原体向外扩散，对人和环境造成生物灾害。

2.3 对实验动物的危害

实验动物感染人兽共患病或其它疾病，可引起非特异性死亡，严重干扰实验结果，并造成时间、人力、物力和经济方面的巨大损失。一旦发生动物烈性传染病，将导致大批动物死亡，造成难以弥补的损失。

实验动物饲养和实验设施的结构不合理，或设备使用不当、管理不严、防范不力，常导致实验动物受到外援病原体的污染，如普通环境饲养的动物，因隔离和缓冲设施缺失，常被野猫、野鼠及昆虫污染饲料和饮水，从而引发交叉感染和传染病流行。类似情况在屏障环境中也时有发生，因不同品种或不同微生物等级的动物管理不当，或实验感染动物发生逃逸等现象，可导致动物间交叉感染，引发生物安全事故。

3 实验动物生物安全防范及措施

规范的操作流程是生物安全的基础，相应的管理制度仅仅是一种补充，不能代替标准操作规程。实验动物饲养室和实验室，通常采取“操作手册”方式管理，其中明确告知潜在的安全危害，并规定具体的操作程序，以避免或减少各种危害的产生。基于本校教学动物饲养和实验环境，下面列出了一些基本的安全防范措施，仅供参考。

- 根据教学、科研工作所需的动物规格、遗传质量及微生物等级要求，供应具有动物质量合格证的动物并在实验前隔离检疫一周。
- 严格遵守无菌原则，认真执行规章制度和操作规程，明确划分污染区和清洁区，防止有害生物侵入动物饲养室和实验室。
- 不同品种、品系及微生物控制级别的动物须严格分开饲养，以防不同动物或实验目的不同的动物群体间发生交叉感染。

**不离不弃是科研，生死相依是安全。
既然我们选择了动物实验，便要全
程兼顾生物安全。**

- 实验动物从业人员应做好个人防护，在工作前，穿戴好工作衣、帽、口罩、手套，严格按标准操作规程执行。
- 为不损害动物身体健康，不影响观察指标并防止被动物咬伤，应采取适当措施限制动物活动，使其处于安静状态。
- 为防止有害试剂、药品等污染环境，避免有害生物交叉污染，动物饲养室内禁止进行动物实验操作。
- 动物饲养室和实验室须定期消毒、灭菌、杀虫，防止传播媒介的滋生。消毒、杀虫剂不应影响动物健康及动物实验造成不良影响。
- 实验后处死或非传染病死亡的动物尸体，应用黑色尸体袋包装并置于冰柜内冷藏，委托有专业资质的机构定期进行无害化处置。
- 发生动物咬伤事件，应立即用3%-5%肥皂水或0.1%新洁尔灭溶液冲洗伤口，再用2%-3%碘酒或75%酒精进行局部消毒。
- 被动物咬伤且有出血者，应及时到校医院就诊，并根据伤人动物的种类、分级和健康状况确定是否接种有关疫苗和免疫血清。
- 新入职的工作人员，应接受生物安全教育和业务培训，掌握生物危害的来源及个人防护措施。
- 为保障职工身体健康，动物饲养员须每年进行1次健康体检，患有人畜共患传染病者，不得从事实验动物管理工作。
- 确诊或疑似动物烈性传染病或人畜共患传染病的动物，立即处以安乐死并对污染区域严格消毒；动物尸体、排泄物及污染物用黄色塑料袋包装密封后，由专业机构进行无害化处置。
- 实验动物发生重大疫情，立即向学校突发卫生类公共事件应急处置工作组报告，紧急启动应急预案。



服务优质
共享开放
管理先进
运行高效





工匠精神

精益求精 追求卓越
传承弘扬 专心专注



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