材料与方法书写格式举例

1 材料与方法

1.1 实验动物及标本处理

1.1.1 实验动物及分组

26 只SPF 级10 月龄Sprague Dawley（SD）雌性大鼠，体质量（425±50）g；45 只SPF 级3 月龄SD 雌性大鼠，体质量（300±25）g，均由上海中医药大学实验动物中心购买并饲养，合格证号：［SCXK（沪）2008-0016］。所有大鼠同一室内按组分笼饲养，室温18~22℃，12 h光照，12 h 黑暗的条件下，自由进食、饮水，饲喂大鼠标准饲料，大鼠全价颗粒饲料由实验动物中心提供。其中18 只10 月龄大鼠饲养至16 月龄作为自然衰老绝经状态模型、18 只3 月龄大鼠行去势手术后作为去势绝经状态模型、27 只3 月龄大鼠适应性喂养1周作为青年模型、8 只10 月龄大鼠饲养至22 月龄作为老年模型开始本实验，8 周后处死。在两组模型组中，10 只大鼠下丘脑检测性激素促卵泡成熟激素（follicle stimulating hormone，FSH）、促黄体生成素（luteinizing hormone，LH）、雌二醇（estradiol，E2）及超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、丙二醛（malondialdehyde, MDA）、总抗氧化能力（totalanti-oxidative capacity, T-AOC）；5 只大鼠下丘脑检测线粒体DNA（mitochondria DNA，mt-DNA）损伤基因CoⅠ、CoⅢ表达；3 只大鼠电镜下检测下丘脑线粒体微观结构。由于18 月龄大鼠饲养周期较长，与去势5 月龄大鼠实验时间前后相错，因此血清、下丘脑性激素水平和氧化损伤指标分开检测和统计，两次均设青年模型组，一次10 只，另一次9 只。

1.1.2 去势手术方法

大鼠经3% 戊巴比妥钠1.4 mL·kg-1 腹腔注射（ip）麻醉后，背位固定，剪除腹部长毛，充分消毒术野，沿正中线开腹，暴露Y 型子宫，在子宫远端找到包埋在脂肪团中的卵巢，分离、套线结扎近端后剪除卵巢，止血后将子宫角送回腹腔，同法摘除另一侧卵巢，缝合腹部切口。

1.1.3 血清制备

大鼠经3% 戊巴比妥钠1.4 mL·kg-1 ip 麻醉后，背位固定，沿正中线开腹，充分暴露腹主动脉，抽取血液5~6 mL，放置2 h 后，血样经4 000 rpm，4℃离心10min，取血清，-60℃冰箱保存。

1.1.4 下丘脑取材

取下大鼠头颅，快速沿背侧正中线开颅，充分暴露大脑并仔细翻开，断开视交叉，以神经分离棒分离并取出下丘脑，称重，置于Eppendorf 离心管中于-60℃保存。

1.2 主要试剂及来源

FSH、LH、E2 放免药盒（20091120、20100520），北京北方生物技术研究所；SOD、MDA、T-AOC、考马斯亮兰蛋白测试盒（20091026、20100508），南京建成生物工程研究所第一分所；反转录试剂盒（PrimeScript®RT reagent Kit Perfect Real Time, TaKaRa Code：DRR037A），Real Time PCR 试剂盒［SYBR® PremixEx TaqTMⅡ（Per fect Real Time）, TaKaRa Code：DRR081A］均购自上海硕盟生物科技有限公司；细胞色素氧化酶亚单位Ⅰ（CoⅠ）和Ⅲ（CoⅢ）［7-8］及内参照3-磷酸甘油醛脱氢酶（GADPH）基因序列由上海博彩生

物科技有限公司合成。引物序列如下：

CoⅠ：

F：5’-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3’，

R：5’-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3’；

CoⅢ：

F：5’-CGTAGTAGGCAAACAATAAGG-3’,

R：5’-TTCTATTCACCNTCTCGGAAA G-3’;

GADPH

F：5’-GGTCGGAGTCAACGGATTTG-3’，

R：5’-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3’1.3

1.3 观察指标和测定方法

1.3.1 检测血清和下丘脑性激素水平

FSH、LH、E2 按试剂盒要求操作。

1.3.2 检测下丘脑SOD、MDA、T-AOC 活性

黄嘌呤氧化酶法检测组织SOD，硫代巴比妥酸（TBA）比色分析法检测组织MDA，分光光度比色法检测组织T-AOC，按试剂盒要求操作。

1.3.3 利用RT-PCR 方法检测下丘脑线粒体DNA 损伤基因指标CoⅠ、CoⅢ

提取下丘脑组织块中RNA，按照反转录试剂盒的实验操作将RNA 反转录成cDNA，然后按照Real Time PCR 试剂盒的实验操作，以GADPH 作为内参用FTC-2000 型荧光定量基因扩增仪进行cDNA 的扩增，并进行数据处理。

1.3.4 电镜检测下丘脑组织线粒体形态变化

下丘脑取材后直接置于2.5% 戊二醛溶液固定2 h，1% 锇酸后固定2 h，酒精和90% 丙酮阶梯脱水，100% 丙酮浸透、包埋、超薄切片，醋酸双氧铀- 柠檬酸铅双染色后透射电子显微镜下镜检。

1.4 统计学方法

所有数据应用SPSS15.0 软件包进行统计分析。两组间比较用*t* 检验；数据符合方差齐性要求，多组间差异采用单因素方差分析（ANOVA 分析）及LSD 法进行多重比较；若数据不符合方差齐性要求，多组间差异则采用Kruskal-Wallis 非参数检验及LSD 法进行多重比较。以*P*<0.05 & *P*<0.01 为差异有统计学意义。

——（神经药理学报,2011,1(02):28-34.）