



# 功能化磁性复合纳米材料富集磷酸化肽 综合实验设计

余凌竹<sup>1,2</sup>, 鲁建<sup>1,2</sup>, 谭言飞<sup>1,2</sup>

(1. 四川大学 生物医学工程学院, 成都 610064; 2. 四川大学 国家生物医学材料工程技术研究中心, 成都 610064)

**摘要:** 随着国家对培养科研创新人才的发展需求, 改革传统实验教学内容, 将国家发展需求以及科学前沿的研究内容引入综合实验教学设计, 结合生物医学工程专业多学科交叉的特点, 设计了研究型综合实验——功能化磁性复合纳米材料富集磷酸化肽。该实验包含大量自主探索的研究性实验内容, 覆盖化学、材料、生物医学等学科领域, 具有较大的应用前景及可拓展性, 通过多学科交叉与融合, 旨在开发学生的科研创新思维, 增强独立研究能力, 培养科研创新人才。

**关键词:** 研究型综合实验; 实验教学; 磁性复合纳米材料; 磷酸化肽

中图分类号: G642.0

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20220103

## Comprehensive Experimental Design for Enrichment of Phosphopeptides by Functionalized Magnetic Composite Nanomaterials

YU Lingzhu<sup>1,2</sup>, LU Jian<sup>1,2</sup>, TAN Yanfei<sup>1,2</sup>

(1. College of Biomedical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** Along with the demand of our country on cultivating scientific and innovative talents, we are encouraged to reform traditional experiment teaching content by focusing on the country's development needs and introducing frontier science to the designation of comprehensive experiment. Taking the multidisciplinary characteristics of biomedical engineering into account, we innovatively design a research-based comprehensive experiment, that is functional magnetic composite nanomaterials for enrichment of phosphopeptides. This experiment, which covers chemistry, materials, biomedical and other disciplines, exhibits great application prospect and scalability, and leaves the student with abundant research space for further exploration and development. This experiment integrating multiple disciplines not only develops the innovative thinking of students, but also enhances the research ability for potential scientific and innovative talents.

**Key words:** research-based comprehensive experiment; experimental teaching; magnetic composite nanomaterials; phosphopeptides

目前, 我国正处于建设创新型国家的关键历史时期<sup>[1]</sup>。研究生是科技创新的重要后备力量和生力军, 研究生科研能力的训练是国家培养具有创新思维和创新能力的科研创新人才的重要途径, 提高研究生教学质量已成为高校深化教育教学改革的核心目标<sup>[2]</sup>。综合型实验教学作为学生实践能力和科研能力培养过程中的重要环节, 在考查学生综合运用知识的能力以及训练学生的实验操作技能等方面发挥着至关重要的作用。然而, 传统

实验教学以按部就班的实验内容和教师讲解为主, 实验教学体系僵化, 内容单一, 缺乏对实验过程的探索性、趣味性和实用性, 不能充分调动学生的积极性, 实验教学沦为“依葫芦画瓢”的机械学习, 并不能培养学生独立思考、探索以及解决实际问题的能力<sup>[3]</sup>。近年, 四川大学以国家“双创”示范基地建设为契机, 启动了创新创业教育改革行动计划, 通过大学实验课程教学改革项目的实施, 拟建设一批创新性、研究型综合实

收稿日期: 2022-02-24; 修回日期: 2023-03-15

基金项目: 四川大学实验技术立项(SCU202021, SCU221093)。

作者简介: 余凌竹(1988-), 女, 博士, 高级实验师, 主要从事大型仪器分析、管理以及实验技术开发。E-mail: yulingzhu@scu.edu.cn

验,旨在缩短学生在所学的专业基础知识同科研、生产实践中实际问题能力之间的差距,提高学生科研、实践和创新创业能力,为从事国家需求为导向的科学研究奠定坚实的基础<sup>[4-6]</sup>。

研究型综合实验是一种以理论讲解、实践指导、实验探索和综合能力提升相结合的实验教学方法,以教师为主导,学生为主体,以培养研究型创新人才为目的的新的实验教学模式<sup>[7-8]</sup>。研究型实验教学将科研需求导向,科研的思维方法和技能融入实验教学中,增加实验项目的探索性和研究性,增加实验项目实施的意义,激发学生的科研热情和创新意识,培养学生自行解决问题的能力,满足学生个性化发展的需求。本学院的生物医学工程专业作为国家一级重点学科,是一门由化学、材料、高分子、生物医学和电子传感技术等学科高度交叉的新工科,具有很强的特殊的专业性要求,而学生通常具有不同的学科背景,在进入研究生阶段从事科学研究之前,尚缺乏针对性的研究型综合实验,突破学生专业限制,实现多学科知识、实验技能和科技创新的融合。为此,本文科学设计“功能化磁性复合纳米材料富集磷酸化肽”的研究型综合实验,通过实验教学和科学研究探索相结合,提高了学生主动探索的积极性,满足学生科研自主化,开拓性和创新性的发展要求。

## 1 功能化磁性复合纳米材料富集磷酸化肽综合实验的设计依据

蛋白质是组成生命体细胞、组织的重要成分,人体的很多具体功能是通过蛋白质来实现的。大多数的蛋白质在翻译合成过程中通过各种官能团(如甲基、乙酰基、糖基以及磷酸基等)的共价结合来添加修饰,形成超过 300 种的蛋白翻译后修饰(post-translational modification, PTMs)形式<sup>[9]</sup>。其中,蛋白磷酸化是一种最常见的蛋白翻译后修饰的方式,指在蛋白激酶的催化作用下,特定的氨基酸(主要是丝氨酸、苏氨酸以及酪氨酸)上修饰磷酸基团的过程<sup>[10]</sup>。据估计,在真核细胞中近 30% 的蛋白质存在磷酸化。可逆的蛋白磷酸化作为调节细胞过程的信号开关,调控着诸如细胞信号转导、代谢,细胞增长、黏附和迁移等多种生物学行为<sup>[11-12]</sup>。此外,蛋白磷酸化也是生命系统内功能障碍的指示剂。异常的蛋白磷酸化

与心脑血管疾病、帕金森症、阿兹海默症、糖尿病以及癌症等多种疾病的发生和发展密切相关<sup>[13-14]</sup>。因此,对磷酸化蛋白的鉴定和分析在揭示磷酸化蛋白组学相关的生物学和病理学过程,以及相关疾病的预防和早期诊断等方面具有重要的研究意义,成为现代生物医学研究的前沿。质谱法由于具有高灵敏度、高检测通量以及快速的数据处理能力,已成为磷酸化蛋白研究中最常用的检测方式。利用质谱检测磷酸化蛋白主要是基于自下而上(bottom-up)的生物质谱分析策略,即对蛋白质混合物酶解后的肽段进行分析,再追溯其相关蛋白质信息。然而,由于磷酸化肽在生物体中含量低(通常为  $10^{-9}$  mol/L),在质谱中的离子化效率差以及受到非磷酸化分子对磷酸化肽信号的抑制作用,采用质谱法直接检测磷酸化肽面临诸多困难。因此,在质谱检测之前,对磷酸化肽进行高效和特异性的富集是目前磷酸化蛋白组学研究的前提。

磁性纳米粒子具有优异的磁响应性、良好的生物相容性、低毒性以及特殊的靶向性等性质,在核磁共振成像、肿瘤治疗、靶向药物载体、基因治疗载体以及生物分离等研究领域具有非常广阔的应用前景<sup>[15]</sup>。基于磁分离的磁性纳米材料,可以简化分离过程,减少材料和样品的损失,极大地增加富集效率和样品的回收利用,通过对其进行进一步修饰特异性键合磷酸化肽的亲分子而制备的功能化磁性复合纳米材料,有望实现对磷酸化肽的快速、高效和特异性的分离和富集,为深入地研究磷酸化蛋白组学提供可能。本文围绕磷酸化蛋白质组学研究这一前沿性的研究课题,再结合在生物医学领域具有广阔应用前景的功能化磁性复合纳米材料的制备而设计的研究型综合性实验——功能化磁性复合纳米材料富集磷酸化肽,囊括了材料、化学、生物医学等交叉学科领域,旨在开拓学生的科研视野,实现多学科的交叉融合,培养具有创新思维和独立实践能力的科研创新人才。

## 2 功能化磁性复合纳米材料富集磷酸化肽综合实验的设计

### 2.1 实验目的

1) 学习羧基修饰的磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米材料的制备以及氨基功能化的方法,掌握扫描电镜、激光

粒度仪及热重分析的原理及操作技能。

2) 了解基质辅助激光解析飞行时间质谱分析原理及其在磷酸化肽检测方面的应用。

3) 激发学生聚焦生物医学研究前沿,融合多学科和所学知识开展面向需求引导的科学研究。

## 2.2 实验原理

### 2.2.1 功能化磁性复合纳米材料制备原理

现有  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米材料的制备方法包括共沉淀法、溶胶-凝胶法、高温分解法、微乳液法、超声波化学法以及水热/溶剂热法等<sup>[16]</sup>。其中,溶剂热法是以有机试剂为溶剂,利用高压反应釜在高温高压条件下合成磁性纳米材料的方法。以氯化铁、柠檬酸钠和醋酸铵为原料,在乙二醇为溶剂的高温高压反应下可获得羧基修饰的磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米材料。

乙二胺核的树状大分子 (polyamidoamine dendrimer, PAMAM) 具有良好的空间排布结构、好的化学稳定性以及由分支单元形成的大量空腔,在成像、药物传递、基因治疗、催化和纳米医学等领域受到广泛关注<sup>[17]</sup>。PAMAM 树状大分子表面带有大量的一级胺和二级胺。通过酰胺反应可以将带有大量氨基的 PAMAM 树状大分子固定到羧基修饰的磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米材料上,获得 PAMAM 树状大分子功能化的磁性复合纳米材料。

### 2.2.2 功能化磁性复合纳米材料富集磷酸化肽的原理

基于亲和材料富集磷酸化肽的机理可以分为螯合作用、静电相互作用以及氢键。基于不同的作用机理衍生出固定金属离子亲和色谱法,金属氧化物亲和色谱法和基于氨基的亲和色谱法<sup>[18]</sup>。PAMAM 功能化的磁性复合纳米材料表面带有大量正电荷的氨基 ( $\text{pK}_a \geq 9$ ), 可以利用氨基与磷酸基团 ( $\text{pK}_a = 1 \sim 2$ ) 间可逆的氢键和静电相互作用特异性富集磷酸化肽,实现在弱酸性条件下对磷酸化肽的富集,在强酸性条件下释放,再结合  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米材料的磁分离性,实现对磷酸化肽的快速、高效和特异性的分离和富集。

### 2.2.3 基质辅助激光解析飞行时间质谱鉴定磷酸化肽的原理

基质辅助激光解析 (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI) 的基本原理是将分析物分散在基质分子中并形成晶体,用激光照射晶体时,基质分子吸收激光的能量并将其转移到被酸化的分析物中,由于激光引起的快速加热,导

致基质的解析和分析物的电离及气化,基质/样品之间发生电荷转移使样品分子电离,结合时间分析质量分析器 (time-of-flight mass spectrometry, TOF), 获得肽段的精确质量。将肽段进一步进行二级质谱解析或与文献比对,确定磷酸化肽段。

## 2.3 实验试剂和仪器

### 2.3.1 实验试剂

六水合氯化铁 ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (99%), 醋酸铵 ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) (99%), PAMAM (乙二胺核, 3代) (20 wt% 于甲醇中),  $\alpha$ -酪蛋白 (99%), 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) (98%), 三氟乙酸 (TFA) (99%), N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA) (98%) 购买于 Sigma Aldrich 公司。1-羟基苯并三唑 (HOBt) (98%) 购买于 Aladdin 试剂公司。柠檬酸钠 ( $\text{Na}_3\text{CT}$ ), 乙二醇 (EG), 醋酸 (HAc), N,N-二甲基甲酰胺 (DMF), 乙腈, 乙醇, 分析纯, 购买于成都科龙试剂公司。脱脂牛奶购买于本地超市, 实验过程中使用去离子水 (RO)。

### 2.3.2 实验仪器

激光粒度分析仪 (Nano-ZS90, Malvern), 扫描电镜 (S-4800, Hitachi), 热重分析仪 (STA449C Jupiter, Netzsch), 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (Auto Flex III, Bruker), 震动样品磁强计 (PPMS, Quantum Design), 磁力搅拌/加热器 (RCT basic, IKA), 超声波清洗器 (SB-52 DTD, 宁波新艺超声设备公司), 数显摇床 (MS 3 digital, IKA), 涡旋振荡器 (Genius 3, IKA), 烘箱 (202-00A, 北京中兴伟业仪器有限公司) 和电子天平 (ME104, 梅特勒-托利多仪器有限公司)。

### 2.3.3 其他实验用品

高温反应釜, 聚四氟乙烯内胆, 烧杯, 移液枪, 磁铁和 EP 管购买于探索平台。

## 2.4 实验内容

### 2.4.1 功能化磁性复合纳米材料的制备

1) 采用溶剂热法制备  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米材料  
将 0.69 g 的  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.24 g 的  $\text{Na}_3\text{CT}$  和 1.98 g 的  $\text{NH}_4\text{Ac}$  加入到包含 36 mL 乙二醇的聚四氟乙烯内胆中。将上述分散液于室温下剧烈搅拌 1 h。随后, 将该聚四氟乙烯内胆转移到高温反应釜中, 放入烘箱在 200 °C 下加热 16 h。反应结束后, 反复用乙醇和水洗涤产物多次并利用外部磁场进行分离。最后, 将制备的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米球重新分散到 15 mL 去离子水中备用。

## 2) 采用酰胺反应制备 PAMAM 功能化的磁性复合纳米材料

将 0.25 mL 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  悬浮液、135 mg 的 EDCI、95 mg 的 HOBt 和 295  $\mu\text{L}$  的 DIPEA 加入包含 0.5 mL 的水和 6.5 mL 的 DMF 的混合溶液中。将上述悬浮液在 2000 r/min 下振荡 1 h 以激活羧基。然后，将 150  $\mu\text{L}$  的 PAMAM 加入上述溶液中，继续振荡 24 h。反应结束后，将得到的功能化磁性复合纳米球用 DMF 和去离子水洗涤多次并通过外部磁性进行分离。最后，将制备的磁性复合纳米球分散在 0.5 mL 水中备用，如图 1(a) 所示。

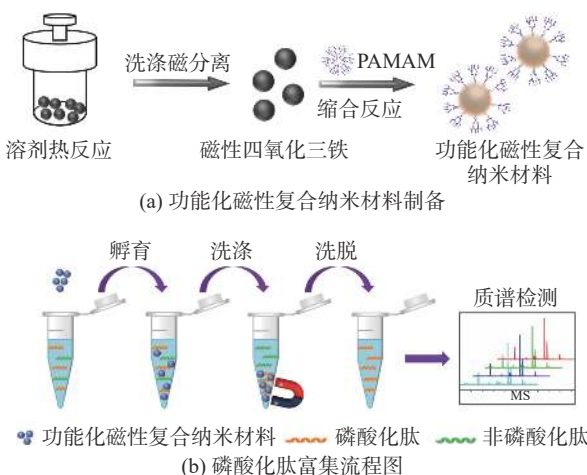


图 1 材料合成及富集过程示意图

## 2.4.2 功能化磁性复合纳米材料的表征

### 1) 激光粒度仪表征 (dynamic light scattering, DLS/Zeta 电位)

将少量样品分散在去离子水中，超声分散。取 1.5 mL 上述分散液于比色皿中，观测样品的水合直径及粒径分布情况，重复 3 次测试；将少量样品分散在去离子水中，超声分散。取 1 mL 上述分散液于电位池中，考察样品的表面电位，重复 3 次测试。

### 2) 扫描电镜表征 (scanning electron microscopy, SEM)

将单晶硅片置于乙醇溶液中超声 10 min 进行清洁。随后，取 10 mL 的 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的样品分散液于硅片上，自然干燥后，放入扫描电镜中，对样品表面微观形貌进行观察。

### 3) 磁性能表征 (vibrating sample magnetometer, VSM)

取 5~10 mg 粉末样品装入一端封口的 1 cm 塑料管中。再利用棉花堵住另一端管口，形成密闭

的腔室。室温下，将该塑料管放入磁强计中检测，获得样品的磁化曲线和饱和磁化强度。磁场强度测定范围为  $0\sim 16\times 10^5$  A/m。

### 4) 热重分析 (thermogravimetric analysis, TGA)

称取 10 mg 粉末样品于氧化铝坩埚中，将其放入热重分析仪中。在氮气保护下，以 10 K/min 的升温速度将样品从 35  $^{\circ}\text{C}$  升至 900  $^{\circ}\text{C}$ ，最终得到样品在升温过程中的重量变化，评估材料表面修饰 PAMAM 树状大分子的含量。

## 2.4.3 功能化磁性复合纳米材料对磷酸化肽的富集和质谱检测

### 1) 模型蛋白和生物样品消解液制备

将 1 mg 的  $\alpha$ -酪蛋白溶解在 1 mL 的  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (25 mmol/L, pH=8.3) 溶液中，然后与胰蛋白酶以 1:40 (w/w) 的比例混合后在 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 16 h，获得  $\alpha$ -酪蛋白消解液。将 55  $\mu\text{L}$  的脱脂牛奶溶解到 1 mL 的  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液中，随后在 14000 r/min 下离心 20 min，取上清液在 100  $^{\circ}\text{C}$  下煮沸 15 min 使蛋白质变性，待完全冷却后，加入 60  $\mu\text{g}$  的胰蛋白酶在 37  $^{\circ}\text{C}$  下消解 16 h，获得脱脂牛奶消解液。最后，将上述制备的消解液放入 -20  $^{\circ}\text{C}$  的冰箱中储存备用。

2) 将  $\alpha$ -酪蛋白消解液用富集缓冲液 (70% ACN- $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mol/L HAc) 稀释成  $10^{-6}$  mol/L 浓度。取 100  $\mu\text{g}$  功能化的磁性复合纳米材料加入上述溶液中，在室温下孵育 45 min 达到吸附平衡。利用外部磁场将富集后的材料与溶液分离，移除上清液，并用富集液洗涤 (200  $\mu\text{L}/\text{次}$ ) 3 次去除非特异性吸附的肽段。最后，在上述材料中加入 20  $\mu\text{L}$  的洗脱液 (50% ACN- $\text{H}_2\text{O}$ , 2% TFA)，剧烈振荡 20 min 将捕获的磷酸化肽洗脱下来用于质谱测试，如图 1(b) 所示。

### 3) 质谱检测

取 1.5  $\mu\text{L}$  洗脱液与 1.5  $\mu\text{L}$  DHB 基质 (25 mg/mL, ACN :  $\text{H}_2\text{O}$  :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  = 70 : 29 : 1, v/v/v) 混合后滴加到靶板上，自然干燥后放入质谱仪中进行测试。测试时使用正离子模式，测试范围从 1000~3500 Da。将材料富集  $\alpha$ -酪蛋白消解液后的洗脱液同富集前的  $\alpha$ -酪蛋白消解液质谱图进行对比，并将鉴定的肽段与  $\alpha$ -酪蛋白消解液中标准的磷酸化肽段进行对比，如表 1 所示。确定富集磷酸化肽的数量，对材料在模型蛋白中富集磷酸化肽的性能进行评估。

## 4) 实际生物样本中磷酸化肽的富集

将 100  $\mu\text{g}$  功能化的磁性复合纳米材料加入 200  $\mu\text{L}$  由富集液稀释的脱脂牛奶消解液中, 经上述相同的富集、洗涤和洗脱过程后, 将洗脱液用于质谱检测。脱脂牛奶消解液中的磷酸化肽主要来源于  $\alpha$ -酪蛋白和  $\beta$ -酪蛋白, 将检测的肽段分子量与表 1 进行对照, 确定富集磷酸化肽的数量, 将脱脂牛奶消解液富集前和富集后的洗脱液的质谱图进行对比, 评估材料在实际生物样本中富集磷酸化肽的性能。必要时将该材料应用于真实病人血清和唾液样本中磷酸化肽的富集, 通过质谱分析和数据库检索, 寻找疾病相关潜在生物标志物, 为磷酸化蛋白组学相关生物学过程和病理学过程研究提供可能。

表 1  $\alpha$ -酪蛋白和  $\beta$ -酪蛋白消解液中磷酸化肽分子量对照表<sup>[19-22]</sup>

肽段	分子量	肽段	分子量	肽段	分子量
$\alpha$	1026	$\alpha$	1610	$\alpha$	2618
$\alpha$	1197	$\alpha$	1660	$\alpha$	2634
$\alpha$	1223	$\alpha$	1758	$\alpha$	2677
$\alpha$	1237	$\alpha$	1832	$\alpha$	2703
$\alpha$	1240	$\alpha$	1847	$\alpha$	2716
$\alpha$	1253	$\alpha$	1927	$\alpha$	2720
$\alpha$	1267	$\alpha$	1943	$\alpha$	2736
$\alpha$	1294	$\alpha$	1951	$\alpha$	2746
$\alpha$	1331	$\alpha$	1981	$\alpha$	2806
$\alpha$	1336	$\alpha$	2079	$\alpha$	2826
$\alpha$	1367	$\alpha$	2202	$\alpha$	2857
$\alpha$	1383	$\alpha$	2247	$\alpha$	2882
$\alpha$	1411	$\alpha$	2289	$\alpha$	2867
$\alpha$	1455	$\alpha$	2420	$\alpha$	2934
$\alpha$	1459	$\alpha$	2455	$\alpha$	2951
$\alpha$	1466	$\alpha$	2548	$\alpha$	3007
$\alpha$	1482	$\alpha$	2565	$\alpha$	3063
$\alpha$	1539	$\alpha$	2588	$\alpha$	3087
$\alpha$	1594	$\alpha$	2598	$\alpha$	3132
$\beta$	1031	$\beta$	2352	$\beta$	3024
$\beta$	1104	$\beta$	2409	$\beta$	3042
$\beta$	1473	$\beta$	2432	$\beta$	3054
$\beta$	1881	$\beta$	2556	$\beta$	3024
$\beta$	1994	$\beta$	2560	$\beta$	3122
$\beta$	2061	$\beta$	2779	$\beta$	3477
$\beta$	2107	$\beta$	2926		
$\beta$	2186	$\beta$	2965		

## 3 结束语

本研究型综合实验聚焦生物医学前沿, 融合了材料、化学和生物医学等多学科理论知识和实验技能, 使学生掌握磁性复合纳米材料制备方法及相关表征原理和目的, 并根据这种新型磁性复合纳米材料建立针对磷酸化肽的快速、高效和特异性的分离和富集方法, 结合质谱检测对目标磷酸化肽段进行鉴定和分析。该实验以解决现有生物医学领域难点和热点问题为出发点, 以丰富传统实验教学内容, 提高学生综合实验技能和科研创新能力为目的, 鼓励学生参与科学实验的设计、实施和改进, 满足了学生科研自主化、开拓性和创新性的发展要求。通过对磁性复合纳米材料的进一步改性, 该项目可拓展至药物的靶向递送、核磁共振成像、肿瘤热疗以及基因治疗载体等生物医学应用。此外, 通过探索 PAMAM 修饰比例以及缓冲液条件对材料富集性能的影响等开放性研究内容, 大大增强了学生对综合型实验以及科学研究的兴趣, 为培养具有创新思维和独立实践能力的科研创新人才奠定了坚实的基础和方向。

## 参考文献

- [1] 黄鹤燕, 郑奎, 索志荣, 等. 探索大型仪器开放共享在人才培养中的作用[J]. 高教学刊, 2020, 21: 99-101.
- [2] 饶中浩, 赵佳腾, 霍宇涛, 等. 行业特色拔尖创新人才培养实验教学探索——以热管实验平台构建为例[J]. 实验室研究与探索, 2019, 38(8): 201-203.
- [3] 董立军, 王薇, 吕东煜, 等. 以培养创新型人才为导向的基础分析化学实验教学改革的探索与应用[J]. 大学化学, 2021, 36(9): 71-76.
- [4] 宋红杰, 郭彩红, 熊庆, 等. 基于创新能力培养的探索型分析科学实验的设计[J]. 实验技术与管理, 2017, 34(9): 20-22.
- [5] 董丽萍, 敖天其. “双一流”背景下高校教学实验室建设新思路与实践[J]. 实验技术与管理, 2019, 36(11): 26-28.
- [6] 靳明, 景雪拳, 韦丽红, 等. 面向培养科研能力的研究与创新实验设计与实践[J]. 实验室研究与探索, 2020, 39(9): 204-207.
- [7] 戚康标, 王宏斌, 何炎明, 等. 开放式研究性实验教学的设计与管理[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(7): 25-28.

(下转第 131 页)