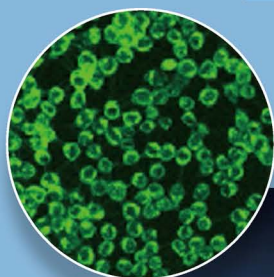


STANDARD OPERATION PROCEDURE
OF LARGE-SCALE INSTRUMENTS IN
MEDICAL RESEARCH LABORATORY

医学实验室 高端仪器设备 标准操作规程

主编 李 力 钟艳平



广西科学技术出版社

医学实验室高端仪器设备 标准操作规程

主 编 李 力 钟艳平

副主编(按姓氏笔画为序)

何 敏 吴 华 谢 莹 臧 宁 黎丹戎

编 者(按姓氏笔画为序)

韦世录 左文朴 成晓静 李卫东 李 刚

李洪涛 郑 华 林 兴 周 怡 雷丹青

廖共山 廖 明



广西科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学实验室高端仪器设备标准操作规程 / 李力, 钟艳平主编. — 南宁 : 广西科学技术出版社, 2015.6
ISBN 978-7-5551-0435-3

I. ①医… II. ①李… ②钟… III. ①医学检验—
医疗器械—技术操作规程 IV. ① R446 ② TH776

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 094215 号

医学实验室高端仪器设备标准操作规程

主 编 李 力 钟艳平

责任编辑 : 林 坚
责任校对 : 文秋鸾

封面设计 : 韦娇林
责任印制 : 韦文印

出 版 人 : 韦鸿学
社 址 : 广西南宁市东葛路 66 号
网 址 : <http://www.gxkjs.com>

出版发行 : 广西科学技术出版社
邮政编码 : 530022

经 销 : 广西新华书店发行
印 刷 : 广西大华印刷有限公司
地 址 : 南宁市高新区科园大道 62 号
开 本 : 787mm×1092mm 1/16
字 数 : 310 千字
版 次 : 2015 年 6 月第 1 版
书 号 : ISBN 978-7-5551-0435-3
定 价 : 45.00 元

邮政编码 : 530007

印 张 : 14.875
印 次 : 2015 年 6 月第 1 次印刷

版权所有 侵权必究

质量服务承诺 : 如发现缺页、错页、倒装等印装质量问题, 可直接向本社调换。

前 言

后基因组时代生物医学的迅速发展，与生命科学的进步息息相关。今天的生命科学已不仅仅是描述性、实验性的科学，定量科学成为了必然趋势，没有对生命各类生命现象的精确测量，便难以对生命过程进行全方位的调控与干预，而精确测量就完全要依靠分析测试仪器，所以医学实验仪器是医学科学研究的重要支撑条件。近年来，质谱仪、测序仪、动物活体成像设备、激光共聚焦显微镜、双光子显微镜、流式细胞仪、电子显微镜、超高速离心机等一系列大型精密仪器为研究生物大分子的结构和功能提供了定位、定性、定量甚至实时的数据和多维的图像，也为分子生物学、细胞生物学领域的重大发现提供了强有力的设备支撑。通过这些大型仪器采集的数据和图像成为每一篇生命科学论文中最重要和核心研究结果，诠释着生命现象的复杂本质，引领着相关研究领域的发展方向。

对生物医学研究中的大型仪器设备的开发利用和规范的管理，是对生命各类生命现象进行精确测量的根本保证。标准操作程序（standard operation procedure, SOP）是仪器管理中常用的一种标准的作业程序。SOP 在这里为“最优化”的概念，是经过不断实践总结出来的在当前条件下可以实现的最优化的操作程序设计。本书由多年承担广西医科大学研究生和本科生的科学研究指导和实验仪器设备正确使用技能培训的老师撰写，不仅详细介绍了医学实验室常见大型仪器使用的 SOP，而且结合大型仪器在医学中的应用，详细介绍了检测实例，体现了编写者对相关仪器设备的了解和熟悉，更是编写者对开发利用大型仪器的宝贵经验的分享。因此本书既可作为科学实验仪器设备学课程培训的教材，提供如何正确使用相关实验仪器设备的教程，更是医学实验室管理和生物医学科学研究有价值的参考书。

医学实验室高端仪器设备的开发利用和科学管理，需要具备较好的医学、生物学、数学、计算机科学、信息学等多学科知识和掌握实验仪器设备正确使用方法。由于编写人员理论水平和实验经验有限，书中难免存在不足之处，还望读者提出批评和改进意见，以便今后进一步修订提高。

编者

2014 年 10 月 22 日

目录

第一章 Nikon A1 激光扫描共聚焦显微镜系统 / 1

- 第一节 仪器操作规程 / 1
- 第二节 采用激光扫描共聚焦显微镜观察线粒体膜电位变化 / 5
- 第三节 激光共聚焦显微镜动态观察大黄素 β - 环糊精包合物在细胞内的分布 / 7
- 第四节 应用激光共聚焦显微镜动态观察药物对细胞内钙离子浓度的影响 / 12

第二章 Leica DM6000B 全自动染色体图像分析系统 / 15

- 第一节 仪器操作规程 / 15
- 第二节 人淋巴细胞（外周血）培养及染色体制备 / 19

第三章 ZEISS PALM 激光捕获显微切割系统 / 24

- 第一节 仪器操作规程 / 24
- 第二节 LCM 联合基因芯片在肿瘤差异表达基因研究中的应用 / 27
- 第三节 LCM 结合 SELDI-TOF-MS 技术筛选肿瘤差异表达蛋白质 / 31

第四章 VEGA 3 LMU 扫描电子显微镜 / 34

- 第一节 仪器操作规程 / 34
- 第二节 VEGA 3 LMU 扫描电子显微镜含水标本制备及观察 / 37
- 第三节 VEGA 3 LMU 扫描电子显微镜不含水标本制备及观察 / 40
- 第四节 利用 VEGA 3 LMU 扫描电子显微镜能谱分析功能分析精液元素成分 / 42

第五章 H-7650 透射电子显微镜 / 45

- 第一节 仪器操作规程 / 45
- 第二节 常规透射电子显微镜生物样品制备与观察 / 48
- 第三节 悬浮液样品的负染色制备与观察 / 53



第四节 应用免疫电子显微镜胶体金技术定位裸鼠神经元细胞内蛋白 / 56

第六章 EPC10 膜片钳操作系统 / 60

第一节 仪器操作规程 / 60

第二节 大鼠心室肌细胞动作电位及钙、钠离子通道电流的检测 / 65

第七章 BD Influx™ 流式分选系统 / 69

第一节 仪器操作规程 / 69

第二节 肿瘤细胞中 SP 细胞流式分选 / 75

第八章 岛津 LC-6AD 高效液相色谱仪 / 79

第一节 仪器操作规程 / 79

第二节 应用高效液相色谱分离脑组织中的氨基酸 / 84

第九章 BioLogic DuoFlow Pathfinder 20/80 中高压层析系统 / 89

第一节 仪器操作规程 / 89

第二节 应用 BioLogic DuoFlow Pathfinder 20/80 System 纯化
五步蛇毒 / 97

第十章 Odyssey 红外成像系统 / 101

第一节 仪器操作规程 / 101

第二节 Odyssey 红外成像系统用于 Western Blotting 后膜信号扫描 / 105

第十一章 Bio-Rad 双向电泳及其图像扫描和分析系统 / 110

第一节 仪器操作规程 / 110

第二节 二维电泳技术用于细胞来源的蛋白分离 / 131

第十二章 表面增强激光解析电离飞行时间质谱仪 / 136

第一节 仪器操作规程 / 136

第二节 应用 SELDI-TOF 质谱仪进行血清样品的差异分析 / 141

第十三章 Esquire4000 电喷雾线性离子阱质谱仪 / 147

第一节 仪器操作规程 / 147

第二节 用线性离子阱质谱仪鉴定血清白蛋白 / 149

第十四章 Tempo LC MALDI 纳流液相系统 / 152



第一节 仪器操作规程 / 152

第二节 应用 Tempo LC 分离多肽混合物 / 159

第十五章 MALDI-TOF/TOF 基质辅助激光解析质谱仪 / 162

第一节 仪器操作规程 / 162

第二节 iTRAQ 结合 MALDI-TOF/TOF 筛选和鉴定血清标志蛋白 / 167

第十六章 ABI3100 遗传分析系统 / 174

第一节 仪器操作规程 / 174

第二节 应用 ABI3100 测序系统的 SNaPshot 多重分型技术研究 IL-1B-1473 基因多态性 (SNP) / 177

第十七章 iScan 芯片扫描系统 / 181

第一节 仪器操作规程 / 181

第二节 应用 iScan 芯片扫描系统进行全基因组外显子区 SNP 位点扫描 / 183

第十八章 ABI7500 荧光定量 PCR 系统 / 192

第一节 仪器操作规程 / 192

第二节 应用 ABI7500 荧光定量 PCR 系统检测 rs12624116 基因单核苷酸多态性 / 195

第十九章 QIAGEN PyroMark Q96 ID 焦磷酸测序系统 / 200

第一节 仪器操作规程 / 200

第二节 应用 QIAGEN PyroMark Q96 ID 焦磷酸测序系统检测 rs94489 基因多态性 / 202

第二十章 Bio-Rad BioPlex200 悬浮液相芯片系统 / 206

第一节 仪器操作规程 / 206

第二节 应用 Bio-Rad BioPlex200 悬浮液相芯片系统检测血清中甲胎蛋白 (AFP) / 209

参考文献 / 215

中英文对照 / 222

第一章 Nikon A1 激光扫描共聚焦显微镜系统

第一节 仪器操作规程

一、仪器的基本原理

激光扫描共聚焦显微镜（Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM）采用激光作为光源，逐点、逐行、逐面快速扫描成像，扫描的激光与图像信号收集共用一个物镜，物镜的焦点即扫描激光的聚焦点，也是瞬时成像的物点。系统经一次调焦，扫描限制在样品的一个平面内，即可获得样品某一焦面的平面图。若调焦深度不一样时，就可以获得样品不同深度层次的图像，这些图像信息通过计算机叠加、分析和模拟，可显示细胞样品的立体结构。

传统的光学显微镜使用的是场光源，样本上每一点的图像都会受到邻近点的衍射或散射光的干扰；而激光扫描共聚焦显微镜利用激光束经照明针孔形成点光源对样本内焦平面的每一点扫描，样本上的被照射点在探测针孔处成像，由探测针孔后的光电倍增管（PMT）或冷电耦器件（cCCD）逐点或逐线接收，迅速在计算机监视器屏幕上形成图像。照明针孔与探测针孔相对于物镜焦平面是共轭的，焦平面上的点同时聚焦于照明针孔和发射针孔，焦平面以外的点不会在探测针孔处成像，这样得到的共聚焦图像是标本的光学横断面，克服了普通显微镜图像模糊的缺点。

激光共聚焦扫描显微镜既可以用于观察细胞形态，也可以用于细胞内生化成分的定量分析、光密度统计以及细胞形态的测量，配合稳定完美对焦系统可以实现长时间活细胞动态观察。

二、仪器的结构

激光共聚焦显微镜主要由激光光源、全自动显微镜、扫描装置、检测器、计算机系统（包括数据采集、数字信号处理和转换、应用软件）、图像输出设备、光学装置和共聚焦系统组成（图 1-1）。整套仪器由计算机控制，各部件之间的操作切换都可在计算机操作平台界面中方便灵活地进行。



(注：①电动倒置荧光显微镜；②共聚焦显微镜扫描头；③共聚焦显微镜总控制器；④光谱探测模块；⑤检测器；⑥电源开关；⑦激光器开关；⑧遥控操作系统；⑨共聚焦显微镜工作站 + 检测器)

图 1-1 激光共聚焦显微镜

(一) 显微镜光学系统

倒置荧光显微镜是 LSCM 的主要组件，它关系到系统的成像质量。物镜的转换、滤色片的选取、载物台的移动调节、焦平面的记忆锁定都由计算机自动控制。

(二) 扫描装置

LSCM 使用的扫描装置一般为镜扫描。通过计算机控制的步动电动机带动显微镜移动，以实现在同一焦平面上的逐点扫描；或通过沿 Z 轴方向逐渐改变焦平面，来完成对样品不同层面的扫描；亦可对细胞或组织厚片进行类似 CT 断层扫描的无损伤连续光学切片，经过计算机三维重建的处理，能够从任意角度观察标本的三维剖面或整体结构。

(三) 激光光源

LSCM 使用的激光光源有单激光和多激光系统。多激光器系统在可见光范围使用多谱线氩离子激光器，常用的激发波长为 405 nm、488 nm、543 nm 和 633 nm。

(四) 检测系统

LSCM 为多通道荧光采集系统，一般有三个荧光通道和一个透射光通道，能升级到四个荧光通道，可对物体进行多谱线激光激发，样品发射荧光的探测器为感光灵敏



度高的光电倍增管 (PMT)。PMT 前设置针孔, 由计算机软件调节针孔大小, 光路中设有能自动切换的滤色片组, 满足不同测量的需要, 也有通过光栅或棱镜分光后进行光谱扫描功能的设置。

三、仪器操作规程

1. 打开显微镜: 先打开周边设备电源 (卤素灯、电动载物台、汞灯), 再打开显微镜电源到 “On”。

2. 打开激光共聚焦系统:

(1) 把激光共聚焦系统后面橘红色的开关打到 “On”, 再把激光器电源的钥匙顺时针转动到 “On”。

(2) 把 488 激光器控制板上的钥匙转到 “On”, 并把旁边的开关打到 “AC”; 等待 20 s 左右的时间再把控制板左边的开关由 “Stand By” 打到 “Operate”。

3. 打开共聚焦控制箱电源。

4. 打开电脑, 待系统稳定后, 鼠标左键双击桌面上 “NIS-Elements” 软件图标, 在弹出的下拉菜单选择 “Confocal A1/C1”。

(1) 当硬件初始化结束后, NIS-Elements 启动运行, 随即 Camera Settings 自动打开, 该窗口也可以通过 View 菜单下 Acquisition 栏里找到。

(2) 设定光路配置: 点击 “滤色片和染料” 画面中的 “Setting” 按钮 → 选择探测模式 ([DU4] 标准探测器) → 激活自动光路 (点击 “AUTO” 按钮) → 为各个通道选择被观察的染料 → 在需要使用的通道对应的复选框上打钩 → 选择是否使用透射探测器 → 确认光路设置点击 “Ok” 按钮, 光路设置窗口关闭。

(3) 应用扫描设置: 选择扫描方式 (单向 / 双向); 选择图像精度; 选择扫描速度; 选择隔行扫描; 选择平均或累积方法。

(4) 获取实时图像: 按照所需的成像要求, 选择表 1-1 所列出的按键。

表 1-1 实时图像拍摄按键功能表

按键名称	功能
Live 按钮	用于显示活动图像。活动图像窗口自动打开并显示活动图像。所谓活动图像就是当前显微镜上观察的实时图像
XY 按钮	用于拍摄当前活动窗口所对应的正式图像, 当进行拍摄时, 会弹出一个独立于活动图像的窗口
XYZ 按钮	用于拍摄当前活动窗口所对应的正式图像, 再进行 XYZ 三维重建
XY Time 按钮	用于拍摄当前活动窗口所对应的正式图像, 并给予时间序列, 再进行 XY、T 三维重建
XYZ Time 按钮	用于拍摄当前活动窗口所对应的正式图像, 并给予时间序列, 再进行 XYZ、T 四维重建
Photo Activation 按钮	用于设定光刺激观察模式



(5) 图像调节：改变激光功率、探测器的电压获得良好的图像，相应的选择按钮名称及功能见表 1-2。

表 1-2 图像质量选择按键功能表

按键名称	功能
HV	设定 PMT 所加电压
Offset	设定 PMT 的 BL Offset 值
Laser	设定激光功率值
HV (TD)	设定透射探测器上所加电压
Offset (TD)	设定透射探测器的 Offset 值

5. CCD 操作：

- (1) 把 CCD 系统前面的绿色开关打到“On”。
- (2) 打开电脑，待系统稳定后，鼠标左键双击桌面上“NIS-Elements”图标，在弹出的下拉菜单选择“Confocal Ri”。
- (3) 在“Camera Settings”栏设定输出图像的格式：图像大小、拍摄方法以及帧的比率。
- (4) 选取曝光模式（手动和自动）。
- (5) 在工具栏中点击“”按钮，显示活动图像，即实时图像。
- (6) 点击摄像头按钮，即可拍摄图片。
- (7) 关机顺序按照开机的反方向顺序。

四、仪器的维护及保养

1. 保持仪器室的干燥、整洁，尽量做到恒温恒湿。
2. 开机注意先后顺序。
3. 当镜头表面沾有油污或指纹时，可用脱脂棉蘸少许无水乙醇和乙醚的混合液（3：7）轻轻擦拭。
4. 在任何情况下操作人员不能用棉团、干布块或干镜头纸擦拭镜头表面，否则会刮伤镜头表面，严重损坏镜头；也不要用水擦拭镜头，否则会在镜头表面残留一些水渍，可能导致滋生霉菌，严重损坏显微镜。
5. 仪器工作的间歇期间，为了防止灰尘进入镜筒或透镜表面，可将目镜留在镜筒上，或盖上防尘塞，或用防尘罩将仪器罩住。
6. 显微镜尽可能不移动，若需移动应轻拿轻放，避免碰撞。
7. 不允许随意拆卸仪器，特别是中间光学系统或重要的机械部件，以免降低仪器的使用性能。



五、常见故障及排除方法

1. 如果在视野内看到的物像不符合实验要求（物像偏离视野），可慢慢调节载物台移动手柄。调节时应注意玻片移动的方向与视野中看到的物像移动的方向正好相反。如果物像不甚清晰，可以调节微动调焦手轮，直至物像清晰为止。

2. 卤素灯开启到光亮度稳定大约需要 2 s，在拍摄 DIC 图像时，如果直接拍摄会导致曝光不一致问题。解决此问题可以配置透射光光闸或者在拍摄 DIC 图像之前利用宏命令等待 2 s。同样，关闭卤素灯也需要约 2 s 时间，请将荧光通道拍摄放在 DIC 通道之前，或者等待 2 s 拍摄。

3. 若物镜沾水或沾油，需用特殊镜头纸（光滑面朝向镜头）擦净方可使用。

第二节 采用激光扫描共聚焦显微镜 观察线粒体膜电位变化

一、实验目的

线粒体作为细胞的产能中心、代谢中心和凋亡中心，在生命过程中发挥着重要的生理功能，且参与了多种重要的细胞病理过程。线粒体 DNA 的结构异常、蛋白质数量的变化，可导致线粒体电子传递链和氧化磷酸化功能失常，与细胞能量代谢、细胞增殖、细胞凋亡以及癌变细胞恶性表型的维持有密切关系。本实验以特异性结合细胞线粒体的荧光染料作为线粒体膜电位的荧光指示剂，采用激光共聚焦显微镜成像技术观察并检测其膜电位荧光强度的变化，考察不同条件下线粒体膜电位的变化情况，以探讨相关生理机制。

二、实验基本原理

罗丹明 123（Rhodamine 123）是一种可透过细胞膜的阳离子荧光染料，是线粒体跨膜电位的指示剂。其在正常细胞中能够依赖线粒体跨膜电位进入线粒体基质，荧光强度减弱或消失。而在凋亡发生时，线粒体膜完整性被破坏，线粒体膜通透性转运孔开放，引起线粒体跨膜电位的崩溃，Rh123 重新释放出线粒体，从而发出强黄绿色荧光，可用激光共聚焦显微镜或流式细胞仪检测，通过荧光信号的强弱来检测线粒体膜电位的变化和凋亡的发生，可用于培养的细胞或从组织中提取出的线粒体的膜电位检测。



三、材料与设备

(一) 试剂

含 10% 新生牛血清、50 U/mL 青霉素和 50 U/mL 链霉素的 DMEM 培养液，细胞膜电位探针，荧光探针罗丹明 123，化疗药物。

(二) 设备

激光共聚焦显微镜 Nikon A1。

(三) 所需样本

细胞株或原代培养细胞。

四、实验方法

(一) 细胞的提取及培养

从组织样品直接分离原代细胞或培养的细胞株，收集细胞悬液，细胞密度控制在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL 之间，用 10% 新生牛血清、50 U/mL 青霉素和 50 U/mL 链霉素的 DMEM 培养液培养。

(二) 荧光探针的负载

1. 细胞膜电位探针负载：将制成的细胞悬液离心后，加入一定量细胞膜电位荧光探针罗丹明 123，37 °C 避光负载 30 min。漂洗 3 次，每次 5 min。

2. 线粒体膜电位探针的负载：同样将细胞悬液离心后，加入一定量的线粒体膜电位探针，37 °C 避光负载 15 min。漂洗 3 次，每次 5 min。

(三) 激光共聚焦显微镜测定荧光强度

1. 用台盼蓝检测细胞活性，当细胞存活率大于 90% 方可上机测定。将负载好的细胞悬液滴于载玻片上，盖片后固定于载物台上，在荧光显微镜下初调焦平面，观察细胞形态及负载情况。

2. 预设扫描条件：根据荧光探针设定激发光波长和发射光波长。调节焦平面，调节激光的强度和电压，选择最清晰的荧光图像，以点面 1 024 像素扫描。

(四) 数据分析与处理

用图像处理系统进行数据处理，得出平均荧光强度。每个图像随机选择区域进行测定，测定结果的均值为各区域的平均值，结果以均值 $\pm$ 标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组间比较用方差分析中 t 检验法。

五、实验结果分析

1. 膜电位荧光强度的变化：不同条件处理后，膜电位荧光强度的变化。

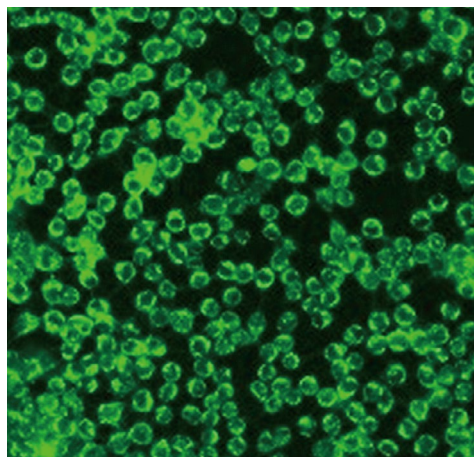


图 1-2 对照组

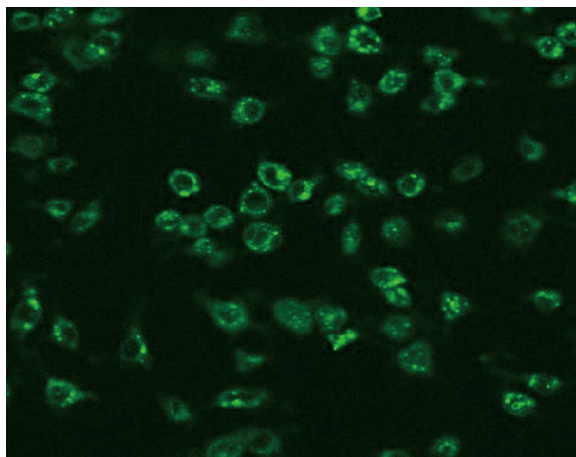


图 1-3 实验组

2. 与对照相比是否有显著性差异。对照组为未经药物处理的细胞，实验组经化疗药物处理后导致线粒体跨膜电位的降低。

3. 联系相关生理机制进行探讨。说明该药物具有疏水、亲脂的特性，它能够通过细胞膜和线粒体膜的疏水屏障，并在线粒体内膜膜电位的电场力推动下，进入到线粒体基质。而肿瘤细胞线粒体内膜膜电位远远高于正常细胞，因此所获得的推动力也就远远大于正常细胞，进而造成了药物在肿瘤细胞线粒体基质内的积聚，从而引起线粒体的膜电位降低。

第三节 激光共聚焦显微镜动态 观察大黄素 β - 环糊精包合物在细胞内的分布

一、实验目的

研究药物在细胞的跨膜转运不仅可以揭示细胞对药物摄取规律，同时可为药物的剂型研究、给药方案确定、药物作用机制等方面提供理论依据。大量文献报道，细胞对药物的摄取常通过 HPLC 方法测定。但该法在测定过程中，必须裂解细胞，同时难以在间隔时间较短内动态观察细胞对药物的摄取，属于定态分析方法。而采用的激光扫描共聚焦显微镜技术将定量分析与图像分析有机结合，研究药物的跨膜转运，可以对活细胞、活组织内自发荧光的药物实时动态观察并定量分析，还可以获得细胞形态学改变及药物在细胞内分布的三维图像。



二、实验原理

大黄素 β - 环糊精包合物是一种荧光物质，能在激光的照射下发射出 530 nm 的绿色荧光。激光扫描共聚焦显微镜是近代最先进医学图像分析仪器之一，广泛应用于细胞分子生物学等各领域，由于其高清晰度成像，配备完美对焦系统和强大的图像分析软件，可以实现对活细胞、活组织内自发荧光药物的定性、定量、定时、定位动态分析。本研究利用大黄素 β - 环糊精包合物自发绿色荧光的特性，采用激光扫描共聚焦显微镜研究大黄素 β - 环糊精包合物在细胞中的摄取和分布规律，观察不同透膜抑制剂如 NaN_3 、甘露醇和环孢菌素 A 等对细胞摄取药物的影响，探讨药物的跨膜转运机制。

三、材料与设备

（一）试剂

大黄素 β - 环糊精包合物红外和紫外光谱鉴定（包含率为 66.93%，含药量为 20.53%）、RPMI-1640 培养基、小牛血清、胰酶、二甲基亚砜（DMSO）、 NaN_3 、环孢菌素 A、甘露醇、Hoechst 33258。

（二）仪器

激光共聚焦显微镜 Nikon A1、二氧化碳培养箱。

（三）细胞

人鼻咽癌细胞 CNE-1 细胞。

四、实验方法

（一）激光共聚焦显微镜工作条件

采用完美对焦系统动态双向扫描模式，选择激发波长 488 nm，发射波长 530 nm，激光功率 9.0 mW，光电倍增管电压 110 V 条件下摄图。

（二）大黄素及大黄素包合物在细胞内的分布情况

取对数生长期细胞，以 5×10^4 个 /mL 密度接种于共聚焦培养皿，每皿体积 2 mL，贴壁 24 h。加入工作浓度为 5 mg/L Hoechst 33258 对细胞核染色 30 min 后，分别加入无细胞毒浓度为 20 mg/L 的大黄素和大黄素包合物，在激光共聚焦显微镜下摄图。

（三）药物浓度对细胞摄取特性的影响

取对数生长期细胞，以 5×10^4 个 /mL 密度接种于共聚焦培养皿，每皿体积 2 mL，贴壁 24 h 后，分别加入无细胞毒浓度为 5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L 的大黄素及大黄素包合物的培养基，在激光共聚焦显微镜下摄图，记录药物进入细胞的时间、荧光强度。

（四）内吞抑制剂 NaN_3 和甘露醇对细胞摄取特性的影响

取对数生长期细胞，以 5×10^4 个 /mL 密度接种于共聚焦培养皿，每皿体积 2 mL，贴壁 24 h 后，撤去原培养基，除空白组外，分别以 50 mmol/L 甘露醇和



15 mmol/L NaN_3 的培养基孵育 30 min 后, 各组加入浓度为 5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L 大黄素包合物, 在激光共聚焦显微镜下摄图, 记录药物进入细胞的时间、荧光强度。

(五) 统计学处理

采用激光共聚焦显微镜系统荧光定量分析软件 NIS-Elements AR 测定细胞的荧光强度。使用 SigmaPlot10.0 对实验数据进行分析, 组间差异比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

五、实验结果分析

(一) CNE-1 细胞对不同浓度大黄素包合物摄取规律

大黄素包合物浓度在 5~40 mg/L 范围内, 低浓度时随浓度增加, 细胞摄取的荧光强度值增加, 但高浓度时细胞内荧光强度变化不明显, 提示鼻咽癌 CNE-1 细胞对包合物的摄取并不完全遵循被动扩散方式, 可能同时存在某种载体的介导。结果见图 1-4。

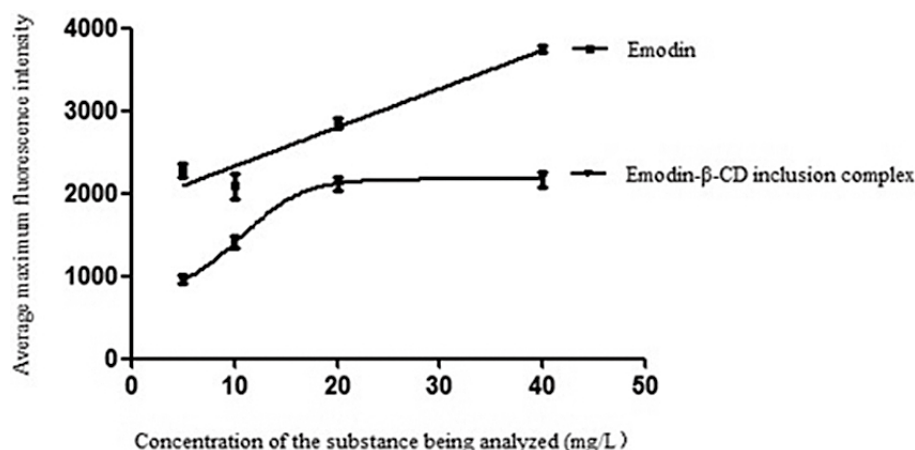


图 1-4 不同浓度大黄素及其包合物对细胞摄取特性的影响 ($n=3$)

在动态观察的 10 min 内, 不同浓度大黄素在细胞内达到最大荧光强度所需的时间较短, 其最大荧光强度持续时间也较短; 而包合物在到达最大荧光强度所需的时间较长, 其最大荧光强度持续时间也较长。结果见图 1-5、图 1-6。

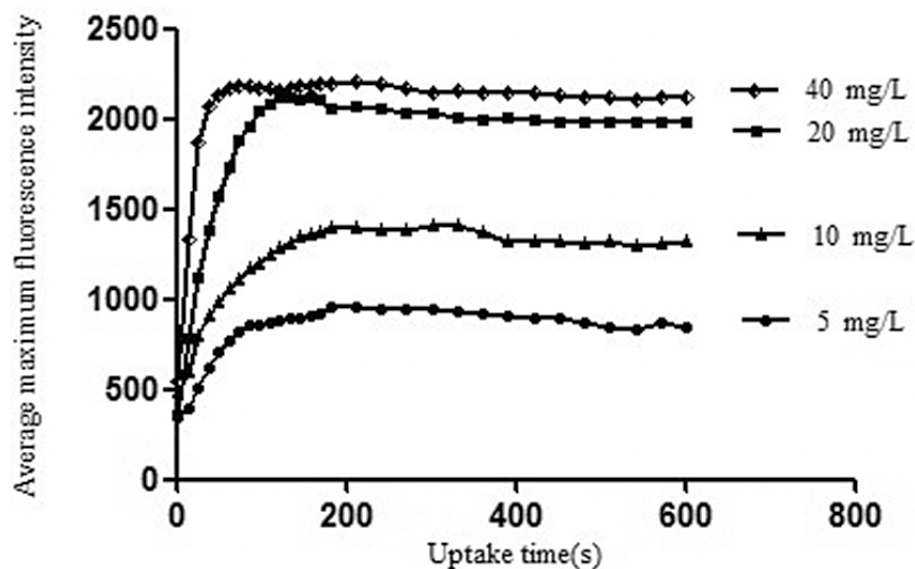


图 1-5 CNE-1 细胞对大黄素包合物的摄取曲线图

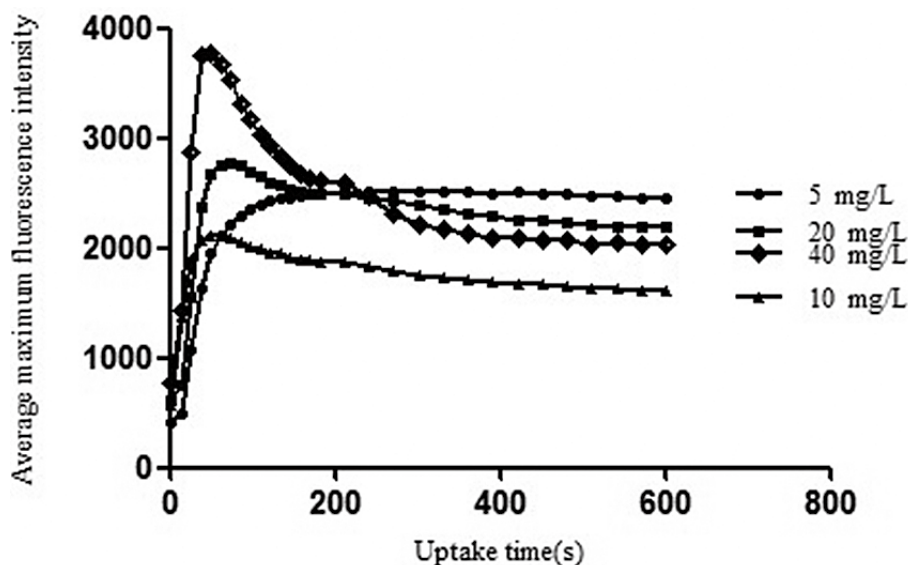


图 1-6 CNE-1 细胞对大黄素的摄取曲线图

(二) 大黄素和大黄素包合物在 CNE-1 细胞内的分布情况

激光共聚焦显微镜下可见大黄素和大黄素包合物在 CNE-1 细胞内均以颗粒的形式主要分布于胞浆中，细胞核内基本无分布。结果见图 1-7、图 1-8。