

现代生物技术译丛

细胞实验指南 (下册)

[美] D. L. 斯佩克特 L. A. 莱因万德 著
R. D. 戈德曼

黄培堂 等 译

科学出版社

2001

内 容 简 介

本书由美国冷泉港实验室邀请 125 位专家共同研讨和撰稿,是一部最新、最权威的综合性的细胞实验技术操作指南。本书汇总了被细胞生物学家们证明行之有效的众多的技术和方法,它们由三大主体组成:细胞的培养及其生物化学分析、光学显微镜及细胞结构和基因及其产物的亚细胞定位。本书内容丰富,包括从无脊椎动物到脊椎动物细胞的基本培养方法、细胞器的分离及生化分析,光学显微镜及电子显微镜水平的蛋白质定位,最近发展的共聚焦、去卷曲、多光子显微镜技术,活细胞的蛋白质动力学研究以及一系列进行蛋白质和大分子复合物显微镜研究的最先进技术方法,单拷贝基因及其转录产物的定位和原位杂交等,实为每个进行细胞和组织生物学研究的实验室乃至任何生命科学实验室所不可少的。

本书与备受称赞的冷泉港实验室出版社的《分子克隆实验指南》和《抗体》两本实验指南具有同样的特点,对即使具有多年工作经验的研究者也极其有用。本书可供在不同领域从事生命科学研究的人员参考。

David L. Spector, Robert D. Goldman, Leslie A. Leinwand

Cells: A Laboratory Manual

Volume 1: Culture and Biochemical Analysis of Cells

Volume 2: Light Microscopy and Cell Structure

Volume 3: Subcellular Localization of Genes and Their Products

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998

图字 01-1999-1642

图书在版编目(CIP)数据

细胞实验指南(上、下册)/[美]D. L. 斯佩克特等著;黄培堂等译.

-北京:科学出版社,2001.2

(现代生物技术译丛)

书名原文:Cells: A Laboratory Manual

ISBN 7-03-007598-6

I. 细… II. ①斯… ②黄… III. 细胞学-实验-指南

IV. Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 19309 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2001 年 2 月第一次印刷 印张:92 插页:16

印数:1—4 300 字数:2 116 000

定价(上下册):220.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈杨中〉)

目 录

序言
前言
致谢
缩写

上 册

第一卷：细胞的培养及生物化学分析

第 1 章 细胞的培养及分析	(1)
第 1 节 哺乳动物细胞培养	(1)
第 2 节 培养中细胞的生长及调控	(8)
第 3 节 作为细胞和组织培养中底物的细胞外基质成分	(19)
第 4 节 成纤维细胞的分离和培养	(27)
第 5 节 上皮细胞的培养	(32)
第 6 节 人毛细血管内皮细胞的分离	(36)
第 7 节 淋巴细胞的分离与转化	(44)
第 8 节 鼠胚干细胞的培养和体外分化	(47)
第 9 节 原代神经细胞的分离和培养	(62)
第 10 节 鸡胚胎成肌细胞的分离和培养	(71)
第 11 节 新生大鼠心脏细胞的分离和培养	(79)
第 12 节 成年大鼠心室肌肉细胞的分离和培养	(83)
第 13 节 体细胞融合	(90)
第 14 节 细胞同步化	(93)
第 15 节 凋亡分析	(102)
第 16 节 流式细胞计量术	(118)
第 17 节 纤毛类原生动物腹纤毛类的培养和使用	(126)
第 18 节 四膜虫的培养和操作	(132)
第 19 节 衣藻的培养和遗传分析	(148)
第 20 节 盘基网柄菌的培养和分析	(156)
第 21 节 酿酒酵母的培养和转化	(165)
第 22 节 非洲栗酒裂殖酵母的培养和转化	(182)
第 23 节 海洋无脊椎动物胚胎的培养	(188)
第 2 章 代谢标记和蛋白质修饰	(201)

第 24 节	用 ³² P-磷酸稳态标记 HeLa 细胞	(201)
第 25 节	mRNA 体外细胞核连缀转录分析	(207)
第 26 节	蛋白质的代谢放射标记	(218)
第 27 节	³² P 代谢标记细胞研究蛋白质的磷酸化	(223)
第 28 节	利用透化细胞与细胞器研究蛋白质的磷酸化	(231)
第 29 节	用外源底物进行蛋白质激酶分析	(246)
第 30 节	激酶的动力学：应用于双相底物酶的简单酶动力学	(259)
第 31 节	磷酸酶的简单制备	(266)
第 32 节	蛋白质的甲基化和异戊烯化作用	(273)
第 33 节	蛋白质的糖基化	(278)
第 3 章	亚细胞的分离	(289)
第 34 节	亚细胞的分离	(289)
第 35 节	用阳离子硅胶分离技术分离细胞膜	(296)
第 36 节	桥粒的分离	(307)
第 37 节	粗微体的亚细胞分离	(310)
第 38 节	核糖体、核糖体亚基和多核糖体的纯化	(326)
第 39 节	高尔基体的分离和分析	(335)
第 40 节	从哺乳动物组织中分离过氧化物酶体（微体）	(347)
第 41 节	从细胞、组织中分离线粒体	(356)
第 42 节	完整叶绿体的分离	(362)
第 43 节	从组织或悬浮培养物中制备细胞核	(368)
第 44 节	细胞核基质：用于显微和生化分析的制备	(377)
第 45 节	用于细胞核蛋白输入的细胞渗透方法	(383)
第 46 节	利用瞬时种间异核体分析核质穿梭	(389)
第 47 节	核纤层以及富含核纤层组分的制备和鉴定	(393)
第 48 节	分离核仁	(404)
第 49 节	用于生化和形态分析的染色体制备	(410)
第 50 节	DNA 的纯化和 Southern 印迹分析	(418)
第 51 节	细胞和组织总 RNA 的纯化和 Northern 印迹分析	(432)
第 52 节	非洲爪蟾生发泡内含物的涂布制备	(439)
第 53 节	从肌肉和非肌肉细胞中纯化肌球蛋白和肌动蛋白	(442)
第 54 节	微管、微管相关蛋白和微管依赖的运动蛋白的分离	(460)
第 55 节	中间丝的分离和纯化	(476)
第 4 章	蛋白质鉴定与分析	(485)
第 56 节	蛋白质浓度的测定	(485)
第 57 节	蛋白质单-双向凝胶电泳	(490)
第 58 节	蛋白质双向凝胶电泳	(501)
第 59 节	蛋白质染色检测	(508)
第 60 节	蛋白质的放射自显影、荧光显影和磷光成像检测	(512)

第 61 节	一维和二维肽图	(515)
第 62 节	肽的 RP-HPLC 图谱和纯化	(523)
第 63 节	蛋白质和肽的序列分析	(528)
第 5 章	蛋白质表达和相互间作用	(531)
第 64 节	T7 表达系统的蛋白产生	(531)
第 65 节	用 GST 基因融合载体表达和纯化蛋白质	(549)
第 66 节	杆状病毒表达: 利用杆状病毒穿梭载体在大肠杆菌中产生重组杆 状病毒 DNA	(556)
第 67 节	哺乳动物表达载体	(576)
第 68 节	哺乳动物细胞中进行基因的诱导表达	(585)
第 69 节	双杂交系统/相互作用陷阱	(598)
第 6 章	在细胞生物学中作为工具的抗体	(627)
第 70 节	抗体纯化和标记概述	(627)
第 71 节	表位标记	(631)
第 72 节	免疫沉淀	(636)
第 73 节	免疫印迹法和免疫印迹亲和纯化	(639)
第 74 节	人类自身抗体及其靶抗原的特性	(648)

下 册

第二卷: 光学显微镜及细胞结构

第 7 章	活细胞和细胞周期的观察	(661)
第 75 节	用光学显微镜观察活细胞	(661)
第 76 节	用荧光技术监测体内分子动力学	(672)
第 77 节	噬动轨迹法分析组织培养中细胞的运动	(677)
第 78 节	绿色荧光蛋白的异源表达	(685)
第 79 节	荧光漂白技术	(700)
第 80 节	活细胞中胞内自由钙的成像和检测	(717)
第 81 节	光学镊子的构造	(723)
第 8 章	大分子的制备和导入细胞	(733)
第 82 节	抗体和 DNA 探针的荧光标记	(733)
第 83 节	活体细胞的定量微注射	(744)
第 84 节	爪蟾卵细胞和胚胎的注射	(761)
第 85 节	啮齿类动物肌肉直接注射 DNA	(773)
第 86 节	哺乳动物细胞转染 DNA	(781)
第 87 节	利用阳离子型脂质体将 DNA 导入哺乳动物细胞	(786)
第 88 节	电穿孔和电融合	(793)
第 89 节	反义寡核苷酸的传递	(801)

第 90 节	腺病毒表达载体的用途和使用方法	(814)
第 91 节	复制缺陷型疱疹病毒扩增子载体及其在基因转移中的应用	(834)
第 92 节	反转录病毒介导的基因转导	(841)
第 93 节	使用反转录病毒载体进行谱系分析	(857)
第 9 章	光学显微镜和表面荧光显微镜	(873)
第 94 节	光学显微镜	(873)
第 95 节	视频显微镜和图像增强	(912)
第 10 章	共焦显微技术、多光子显微技术及去旋方法	(925)
第 96 节	共焦显微技术及去旋技术	(925)
第 97 节	多光子激发荧光显微技术	(941)
第三卷：基因及其产物的亚细胞定位		
第 11 章	细胞器、蛋白质和基因表达的显像	(951)
第 98 节	进行荧光显微镜观察的细胞和组织标本的制备	(951)
第 99 节	组织中的 β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶活性检测	(965)
第 100 节	用酶检测法进行蛋白质的免疫定位	(976)
第 101 节	细胞结构的非免疫荧光标记	(980)
第 102 节	免疫荧光显微术简介	(995)
第 103 节	微管、微管相关蛋白和中间纤维的免疫染色	(1004)
第 104 节	肌动蛋白的免疫荧光定位	(1011)
第 105 节	核蛋白的免疫荧光定位	(1015)
第 106 节	酿酒酵母的免疫荧光方法	(1018)
第 107 节	果蝇组织的免疫荧光方法	(1023)
第 108 节	线虫的免疫荧光方法	(1031)
第 109 节	DNA 复制的分析：非同位素标记方法	(1037)
第 110 节	RNA 合成的分析：非同位素标记方法	(1046)
第 12 章	原位杂交	(1055)
第 111 节	DNA 荧光原位杂交	(1055)
第 112 节	染色体比较杂交	(1085)
第 113 节	光谱核型分析法分析染色体	(1093)
第 114 节	用 ³ H 标记探针对组织碎片标本 DNA 和核 RNA 进行原位杂交	(1099)
第 115 节	果蝇染色体 DNA 的整体荧光原位杂交	(1106)
第 116 节	RNA 原位杂交	(1118)
第 117 节	脊椎动物胚胎和分离器官的 RNA 整体原位检测	(1129)
第 118 节	爪蛙胚胎 RNA 的整体原位检测	(1138)
第 119 节	原位 PCR	(1143)
第 13 章	电子显微术	(1161)
第 120 节	利用透射电子显微术成像	(1161)
第 121 节	透射电子显微镜的样品制备方法	(1165)

第 122 节	用扫描电子显微术成像	(1195)
第 123 节	扫描电子显微镜的样品制备方法	(1206)
第 124 节	扫描式透射电子显微术	(1226)
第 125 节	DNA 及 DNA 结合蛋白的电子显微术	(1235)
第 126 节	核酸和核蛋白复合物的快速印迹法	(1250)
第 127 节	电镜的细胞化学染色及酶检测	(1260)
第 128 节	免疫电镜技术	(1278)
第 129 节	细胞和分子的快速冷冻	(1291)
第 130 节	冷冻置换	(1309)
第 131 节	超薄低温切片的免疫细胞化学	(1315)
第 132 节	冷冻断裂和冷冻断裂细胞化学	(1334)
附录 1	细胞生物学常用储存液、缓冲液及培养基	(1376)
附录 2	细胞生物学基本数据与资料	(1397)
附录 3	显微镜技术：镜头、滤光片及发射/激发谱	(1408)
附录 4	亚细胞组分的定位标志	(1419)
附录 5	化学试剂安全注意事项	(1422)
附录 6	供应厂商	(1428)

第二卷：光学显微镜及细胞结构

D. L. 斯佩克特

冷泉港实验室

R. D. 戈德曼

西北大学医学院

L. A. 莱因万德

波尔德的科罗拉多大学

第 7 章 活细胞和细胞周期的观察

第 75 节 用光学显微镜观察活细胞

导 言

现在已经能通过各种分子的、生化的、免疫学和显像技术直接观察活体的已知类型分子的动力学特性。例如，广泛使用的绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）标记方法（见第 78 节）就能直接观察活体细胞的特殊结构成分。不过，为了在显微镜视野下观察活的和健康的哺乳动物细胞，还存在一些与培养基的温度和 pH 等相关的技术问题。当观察非哺乳动物细胞或植物细胞时，这不是一个重要问题。

按经典分类，活细胞实验能分成两类：确定自然行为的发育学研究和研究调控因子效应的诱导性改变。体内体外现象之间的关系对于哺乳动物活细胞研究极为重要。在活细胞显微镜观察期间精确地模拟分离样品的宿主条件十分重要。本节论述了活细胞显微镜观察的多种方法。

1. 历史

早期使用显微镜观察的样品通常是活的，或者说至少短时间是活的。固定和染色技术随着显微镜的进步而发展。由于显微镜光学的改进，光学系统的局限性确定了样品制备的必要性。显微镜研究者根据光学的局限性作出了适当的让步。放大、数值孔径值、分变率限度、工作距离和色彩偏差纠正被认作为相关因素。另外，各种照明方法包括亮视野、暗视野、相差和荧光相继被引入主流显微镜。随着这些类型显微镜的利用，人们接受了这样一个事实：即样品需要制备成能满足显微镜光学局限的要求。通常大多数这些的制备需要固定样品。

用相机与显微镜结合使用来证实影像。常规的胶片照相显微镜适用于大多数亮视野、暗视野和荧光显像，因为曝光时间易于满足。在有必需特殊设备的实验室将活细胞制成胶片，这些胶片的大多数使用亮视野方式制成，因为胶片的显影需要较大光强度。由于染料的毒性和长时间曝光的光毒作用，不可能制成活细胞荧光胶片。

虽然与存活样品相比，固定的细胞产生的信息较少，但也有一些优点。固定的细胞更扁平，持续时间更长，它们不能运动，也不需要持续的饲养，能用不同的化合物染色来选择性地增强对比度。大多数抗褪色溶剂与固定细胞（但不是活细胞）是相容的。

当活细胞的影像被记录在常规胶片上时，显微镜工作者被胶片的敏感度和分辨率所限定，同时也限定了实验的种类。当与现代的、增强的或冷的电荷偶联装置（charge coupled device, CCD）摄像机和光电倍增管扫描技术相比时，胶片有许多局限性。因此，早期活细胞池受到了相关技术固有地限定。早期的显微镜并没有现代显微镜的图像对比

增强作用。因此，那时制造的活细胞显微镜用今天的标准来看既显贫乏又局限于高对比度样品。

2. 最近技术进展

下列进展已经使活细胞显微镜更容易使用：

- 图像对比增强光学技术，例如微分干涉相差（differential interference contrast, DIC）、Hoffman、相差和 Varel、荧光和共焦显微镜（见第 9 和第 10 章）。
- 电视摄像机和能进行电子对比延伸的定量 CCD 摄像机。
- 台式计算机使定量图像能力成为主流科学。
- 染料和标记技术的发展。
- 微环境控制系统发展与图像技术齐头并进。

今天，这些技术已经提供了进行活细胞实验的仪器基础，使工程装备需要较少的时间，这样，给研究者留下更多时间从事生物学研究（Pentz and Schulle 1989；Webb 1986；Shotton 1988）。

细胞能保存在培养箱里，但是，把显微镜放在培养箱却不切实际。合理的延伸是在显微镜载物台上复制出培养箱条件。细胞需要一定的已知的可调控条件如营养、废产物的剔除、二氧化碳、生长表面基质或在组织情况下的支架和温度控制。为了使细胞可见，它们必须是处在既能保持其活性又能与显微镜光学限制性相适宜的一种环境中。

3. 微环境池

样品容纳和微环境控制有两种基本形式。在适当地分析单个细胞的应用上，样品必须包含在光学容器里。显微观察的两种最通用方法是打开培养皿和不打开培养皿，前者使培养皿的液体暴露于的空气，后者密封。

典型的打开培养皿系统是活细胞观察的最简单的形式，一般来说能适用于短期实验或必须进行物理性接触细胞的实验。观察在容器里生长细胞的传统方法，是观察位于一个外周加热的显微镜载物台上的细胞，对于研究者仅需要较低分辨率显微镜的基本方式是适当的；由于大多数研究需要使用荧光、DIC、和/或共焦方式的高分辨率图像显示，故应当使用一种更先进的环境控制系统。

目前，已研制了各种类型的简单培养池用于显微镜下观察活细胞，使用比较普遍的类型有：Maximow 池、Romicron 池和 Rose 池。Maximow 池是最简单的早期培养池，就是一块用厚玻璃做的微培养凹玻片。密封培养系统较早的制品是把一垫圈放在盖片和玻片之间，或两盖片之间构成的。Romicron 池也由平板玻璃制成，但是在玻片底部中间带一光学圆柱形凹槽，使凹槽底部透视清晰。双盖片技术用于盖住培养池，由小圆形盖玻片上放一大四方形玻片组成，小圆形盖玻片上培养基中有原代移置物或目的细胞。较小的盖玻片通过毛细管作用吸附较大的玻片，然后，这种双层盖片倒置、横放在圆柱形培养池上，再密封（典型方法用蜂蜡）。这种培养池适用于不需要灌注的实验和短期实验，pH、CO₂、温度和废产物累积不会造成重大影响。Rose 池是一种更精制的简便密封的培养池，由带一贯穿的圆形开口作为培养池的厚玻璃板制成，池的顶和底密封，典型的方法用两块盖玻片放在开口玻璃板的上下口，时常在玻璃板和盖玻片之间加上 O 型橡皮

圈或垫圈，允许灌注液进出培养室。在这种由盖玻片、O形圈和玻璃板组成的“三明治”的顶上和底下盖玻片上都有铝边，便于操作盖玻片，盖玻片可以拧紧形成密封。虽然这些简单的培养小室可以适用于许多目的，但在本节描述的较复杂培养池一般来说能提供先进的环境控制系统，适用于更复杂的实验观察。

4. 为什么用培养池？

培养池可以是具有光学、液体和温度控制能力的任何结构，可以是一个简单的培养皿、培养瓶，也可以是一个复杂的专用活细胞环境系统。

- 用传统的、衍射限定的光学方法观察生物体的单个活细胞是非常困难的，有时还不可能，因此，细胞不得不在分离培养状态下进行研究。
- 样品必须在一扁平透视的表面上进行研究。
- 还必须有一盛液体的结构，用于盛适当体积的液体培养基。
- 可能需要灌注来维持 pH 控制、除去废产物和添加改变细胞生理学的试剂。

5. 环境控制技术的种类

除了一个培养池的光学和物理学条件外，还要使用许多温度控制方法，在研究哺乳动物细胞时特别重要。热调控装置运用各种技术包括气流样品加热、电子抗性元件、帕尔帖作用（Peltier effect）、泵及热控制液体、红外发光和初表面热转移器。

温度控制因素包括范围、精确度、速度和恢复。在满足这些要求的努力中，采纳激烈步骤可能是必要的。在这些年，用极端的方法控制了温度，例如把整个显微镜放在一培养箱里，仅让目镜暴露在外。这是很昂贵的，并且对显微镜有害。另一选择方法是将加热空气泵进显微镜载物台上的 Plexiglas 培养池里，最普遍的是使用加热板或平台加热器给培养皿或盖玻片培养池保温，最糟糕的技术是加温空气吹风机和/或在平台周围用红外灯加温。这是因为这些装置都是通过不断开关加热器来维持温度的，通常引起焦点漂移和污染。对于以上技术的一个可供选择的解决方法是利用初表面热转移器调节细胞温度，让电流通过覆盖在光学表面上的电导体控制光学腔或盖玻片的温度，这种技术已证明比传统方法有更多优点。

下面列举了使用传统培养池所遇到的一些常见的困难：

- 在安装时常发生盖玻片破损
- 泄漏，有时甚至泄漏到显微镜的里面
- 缺乏适应不同体积测定要求的灵活性
- 流速固定的特征
- 流速慢于已有记录的生物现象
- 最小体积大于操作所要求的
- 不适当的温度控制
- 缺乏与所有显微镜样式的相容性

选择微环境系统

1. 显微镜因素

通常，倒置显微镜被用于培养细胞的观察，但是，有些情况下，正置显微镜也是适用的。当适用正置显微镜时，由于显微镜的已有样式不得不做一些改进，需要特别考虑的显微镜的一个主要部件是物镜。必须特别注意考虑好放大率、工作距离和数值孔径，所有这些都与景深有关。当观察哺乳动物细胞时，沉浸型物镜将需要控制温度，认识这一点也十分重要。如果使用传导聚光器，对其工作距离、尺寸和靠近培养池等因素必须给予考虑。载物台的几何形状也必须与环境小室匹配。

2. 微环境的物理特性

当使用一种开放系统时，下列特性需要予以关注：容积、清晰光圈、材料、底部厚度、几何形状、蒸发与浓缩、周围光线、视角和生物相容性。

当选择一种封闭系统时，下列特性需要予以关注：固定或可变的容积、光学表面分离、灌流特性、容积交换率、层流、剪切力和流道的几何形状。

3. 典型的培养皿观察

在用低数值孔径（numerical aperture, NA 值）物镜观察细胞的实验中，通常使用开放的培养皿和相差或 DIC 显微镜。然而，现代的尖端实验对细胞的环境要求更高，特别是当涉及到显微镜时。例如，在长期的发育期间或诱导变化的研究期间，在没有限定显微镜分辨率的载物台上确切地模拟宿主条件，并且维持模拟灵活性以便改变变量时，对细胞的环境要求是必需的。

模拟应该包括温度、培养基、pH 和环境毒素的控制。通过灌流的调控能控制培养基和 pH。必须针对样品的相容性估计人工环境的毒性（Inoue 1986）。如果人工环境无毒或者是生物学惰性的，最难控制的因素之一就是温度。在所有关于精确温度控制重要性及其对材料作用的相关文章中，都明显指出在大多数哺乳动物活细胞实验中温度都是至关重要的因素（Taylor and Wang 1989; Taylor et al. 1994）。

需要高 NA 值物镜的实验时，大多数研究者都小心地使用有支撑作用的盖玻片获得光学相容性，使用外周平台加热器模拟宿主环境，由于危及细胞的安全或糟糕的显像，通常，这意味着牺牲热控制的精确性和细胞的适当灌流，由于细胞受损、显像不佳，而造成资料不准确。

开放性显微观察的传统方法的特性和缺陷总结为图 75.1。

已知塑料制的常规培养皿有下列特性：

- 不均匀塑料表面降低了显像作用。
- 由于注塑过程在光学表面形成的张力，阻碍了利用偏振光的光学系统的使用，包括 DIC（见第 9 章）。
- 底部的厚度，阻碍了高数值孔径值物镜的使用。
- 从热源到细胞的低效热转移，导致温度稳定周期过长。

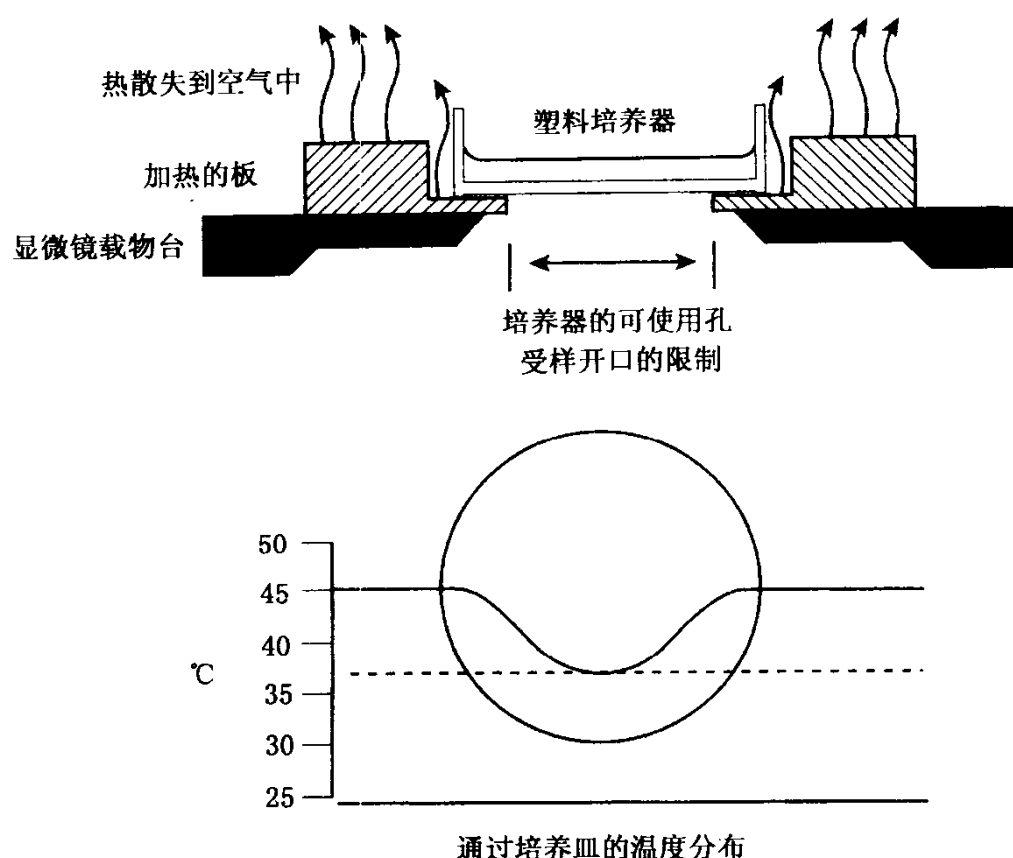


图 75.1 传统的开放培养皿显微镜。由于缓慢而低效载物台加热器导致不均匀的温度分布限制了传统技术，此外，塑料平皿导热性差，因此，在灌流期间或在灌流后，温度不能很快恢复。最终，因热转移板的开口限制了平皿的可视范围

传统培养皿加热器都是环状加热装置，必须通过两种导热能力差的介质（空气和塑料）把热辐射到目标，因此将导致：

- 不均匀的温度分布
- 在温度恢复期间，过长的热转移时间（大约数分钟）
- 金属表面的热膨胀，在三维显像或共焦应用期间引起明显垂直位移

如果这些因素不成为问题，一种基座加温载物台是适用的和可选择的。不过，如果实验需要更精确的温度控制或光学相容性，应考虑下文论述的技术。

4. 培养皿活细胞系统的进展

解决这些问题的另一个方法是利用基面（first surface）热传递技术的微环境系统。这一技术用一种透明、热传导的薄膜层来包被玻璃基质的下面，结合这层包被从而为细胞成像优化出一种复合培养皿结构，可一次性使用。该技术通过一个热敏电阻反馈回路，直接向细胞提供温度控制。反馈回路是通过玻璃基片的包被底面传导电流，不会明显影响它的透射波谱。使用这一技术的热响应可以快到每秒 0.1°C 。因为反应时间很快，控制器可以在数秒内调节电流控制，使得在培养皿中补偿因表面蒸发或灌注产生的温度改变成为可能。高的响应时间可以增加高速安全电路，在发生故障时可以保护细胞。这一技术提供了在一个均匀玻璃表面在各种厚度都能获得高清晰度的成像能力，包括常见用于高 NA 值的 1.5 号盖玻片。培养皿环境适合于所有模式的显微镜技术，包括明视野、暗视野、相差、DIC、荧光、反射干涉和共焦显微技术，而且不仅仅局限在这些方

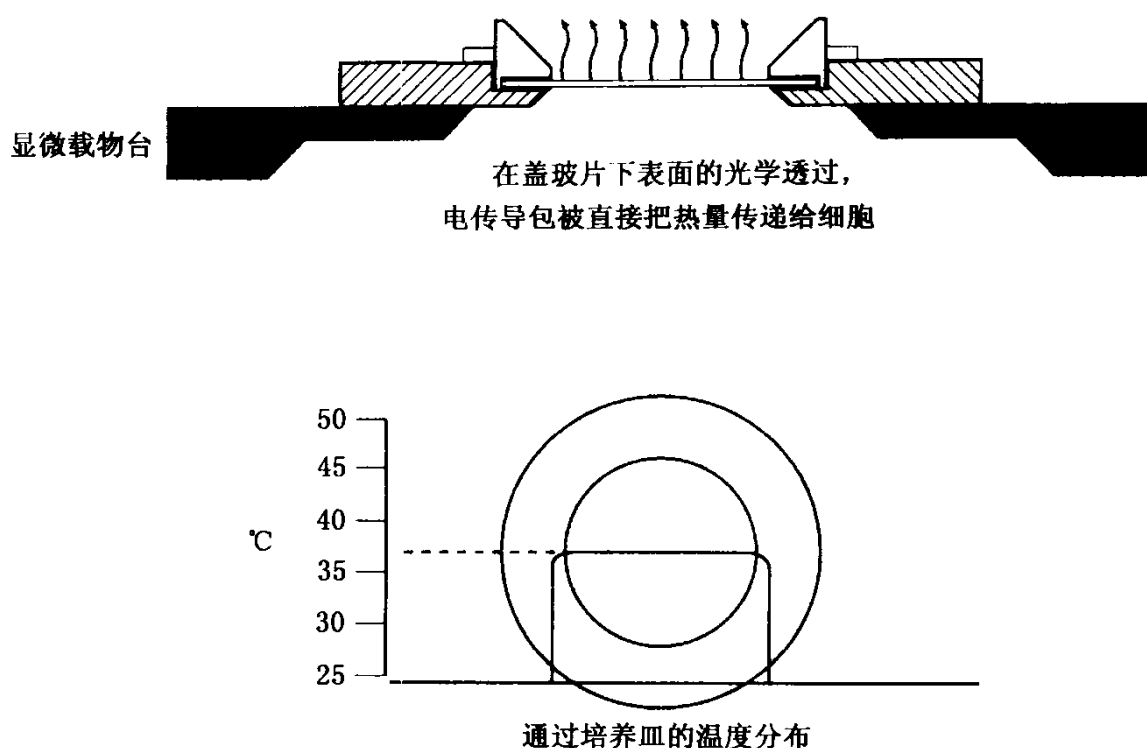


图75.2 基面热传导。这一系统的好处是高精度的温度控制、热恢复快、温度分布均一

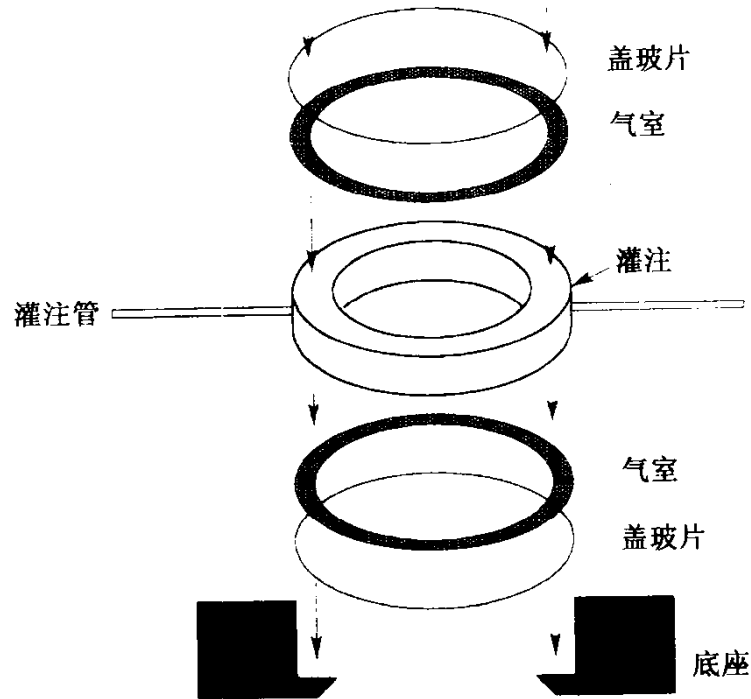
面。

基面热传导技术，在 1993 年才引入到盖片上，为许多基本定律的采纳提供了基础。从此以后，这一技术和辅助设备得到了大量应用。在以精确、易用、所获光学图像优异而为大家熟识后，这项技术不仅仅用于培养，还能为特殊应用预计和提供大量衍生产品。据 Delta TC3 系统（见图 75.2，Biopetechs, Inc.）应用辅助设备获益的一些例子如下：

- 组织切片样品，无论是天然还是人工合成的，都很易悬浮于培养皿的光学参照面上。这些光学参照面距物镜的适当聚焦距离以便于观察。
- 局部灌注抑制物或改变基侧的离子浓度可动力学观察细胞或离子的跨膜转移或细胞或离子的扩散。
- 一种铰链式的灌注接合器装置为培养皿提供了方便、低廉的定位灌注针的方法，常用来在长期试验中保持低体积灌注。
- 在显微技术中可以使用盖玻片顶面来定义光学表面，它在样品和培养皿液体表面之上。当以透射光模式获得一系列图像时，空气和培养皿表面液体相互作用会发生改变，引起图像对比漂移。在培养基顶面形成一个光学平面能避免这一问题。
- 加热顶面避免在盖片下表面上形成浓缩，加热罩可重复使用，用低压电源提供功率。
- 在培养皿中环绕一层单独的冰冻液冷却环以用来把样品的温度降低到低于环境温度。

5. 传统的密闭系统室

当需要把样品与外界完全隔绝(DeBlasio et al. 1987; Farkas et al. 1993, 1995)或使用不能用于开放培养皿的更高级的显微方法时，就需要密闭系统室。在这种情况下，细胞被置于一个温度控制、灌注的光学腔或平铺在盖片上，这盖片相当于显微镜光学腔的一部分。市售的这些密闭系统有几种一般的配置，它们几乎都利用相同的基本特性(图 75.3)。



固有的缺点

- 光学表面之间分开太大，限制了透射显微镜的聚光器的数值孔径
- 光学腔体积固定
- 需要长的流体交换速率
- 灌注湍流产生了细胞表面剪切/流速
- 与某些光镜不兼容
- 载入和取出细胞困难
- 易渗漏
- 需要使用暖空气鼓风机控制温度

图 75.3 传统的密闭室系统。这一系统的缺点是：光学腔体积固定，灌注时产生涡流，与某些光镜不兼容

传统的密闭系统室被密闭形成的两个气室分成两个光学表面。然后这个“三明治”和几个其他结构夹在一起。有了这种密闭方法，灌注速率、体积和各种显微技术的光学稳定性就相互关联。在大多数情况下，采用这种配置灌注会引起涡流，造成细胞移动，各种显微镜的光学兼容性不能进行互换。而且，通常是通过周围的加热器或穿过载物台下的温暖空气达到温度控制。不管哪种形式，温度控制都不可靠，而且对一些要求高的实验不能保持在一个合理的范围内。

当选用密闭系统室时，需要考虑以下因素：

- 显微技术的预定模式是否适合光学兼容性
- 温度控制，包括均一性
- 室体积
- 灌注
- 灌注交换体积速率
- 细胞表面剪切
- 成像孔

- 光学耦合（油）的高数值孔径物镜的热效应

6. 密闭室系统的进展

通过使用微管灌注技术可提供这些问题的解决方法。将灌注凹槽结合在一个光学表面上，定义为光学腔，可制成微管流活细胞微观察室，避免了大多数其他的普通室采用的灌注圈，使得光学腔只有一个气室，这样就把灌注载片与盖片分开。这些槽的物理配

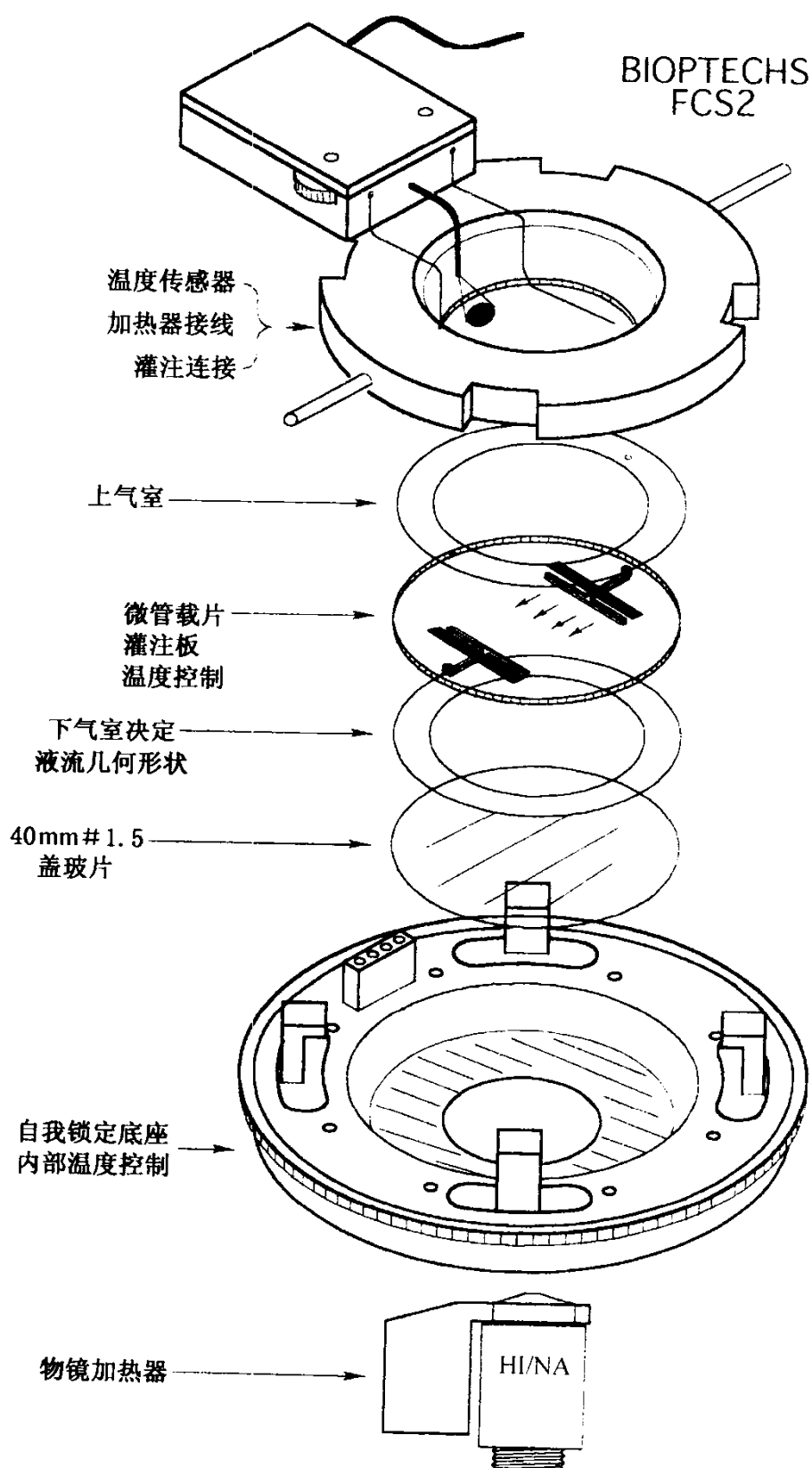


图 75.4 微管灌注技术。这一系统的特点是精确的温度控制，高体积灌注速率与标准显微技术的可容性