

Step by Step

教你使用基础医学科研设备



主编 潘 欣 嵇承栋



上海科技教育出版社



潘欣

医学博士，副教授，同济大学临床检验诊断学硕士研究生导师，2005—2007 年在美国纽约西奈山医学中心从事博士后工作。现任上海市杨浦区知识产权质控组长，同济大学附属杨浦医院中心实验室主任。长期从事基础医学研究，在骨质疏松、乳腺癌、心肌梗塞、病原微生物、分子病理、实验室生物安全、专利评价等基础研究领域有较深入的钻研。先后主持国家自然科学基金面上项目 2 项、全军医学科研“十五”计划、教育部留学回国人员科研启动基金、上海市卫计委科研项目、同济大学附属杨浦医院引进人才科研启动项目、同济大学附属杨浦医院学科带头人攀登计划。负责的子课题项目包括上海市科委重点项目、国家“十一五”新药创制重大专项、国家“十一五”传染病重大专项、军队后勤重大科研项目、国家 973 计划。以第一作者或通讯作者发表论文 90 余篇，主编专著 5 部，参编著作 12 部，获得授权专利 2 项。



嵇承栋

医学硕士，副主任医师，硕士生导师，专利管理工程师，技术经纪人。现任同济大学附属杨浦医院科研管理部主任，同时担任上海市医学会医学科研管理专业委员会委员兼秘书等多项社会任职。长期从事上海市知识产权工作讲师团讲师工作，并多年主持知识产权主题国家继续教育项目。主持知识产权相关的上海市科委软科学重点项目 2 项，上海市卫计委课题 3 项，上海市知识产权局知识产权战略项目、吴阶平科研基金项目各 1 项，同时主持和参与了国家自然科学基金等市级以上科研项目 9 项。以第一作者发表 SCI 论文 3 篇，发表中文核心期刊论文 50 余篇，主编专著 3 部，获得授权专利 4 项，曾获上海市科学技术奖三等奖、上海市职工技术创新金奖及上海市发明创新大赛三等奖各 1 项，获评同济大学首届“十佳医务青年”。

编委会

- 主 编 潘 欣（同济大学附属杨浦医院）
嵇承栋（同济大学附属杨浦医院）
- 副主编 付强强（同济大学附属杨浦医院）
- 编 委 （以姓氏笔画为序）
- 马 瑜（同济大学附属杨浦医院）
付强强（同济大学附属杨浦医院）
许 畅（同济大学附属杨浦医院）
陈 霞（同济大学附属杨浦医院）
姚纯旭（同济大学附属杨浦医院）
嵇承栋（同济大学附属杨浦医院）
曾思良（上海师范大学天华学院）
潘伯驹（中国医学科学院北京协和医院）
潘 欣（同济大学附属杨浦医院）

Step 教你使用基础医学科研设备
by Step

FOREWORD

前言

本书按照高等院校附属医院基础科研培训教育的目标要求,吸收、借鉴了国内外相关著作的精华内容与编写经验,以附属医院中心实验室为实验场所,从基础医学研究角度依据仪器设备的功能,系统地设计了相关实验教学。全书共七章,结合荧光显微镜的特点,介绍了常用荧光染料和活细胞荧光染色试剂,并讲解了蔡司荧光显微镜的操作方法;详细描述了使用生物安全柜处理组织细胞样本的技术手段和意外事件的处置措施,较全面地论述了组织细胞培养方法及形态学检测技术、免疫荧光染色技术;以三种组织细胞破碎仪为线索较深入地介绍了不同类型生物样本、难溶悬液的制备方法;以多功能酶标仪为线索阐述了核酸、蛋白的定量方法;以荧光定量 PCR 仪为线索,论述了使用相对标准曲线法完成目的基因表达多少的相对定量分析;以化学发光成像系统为线索,介绍了免疫印迹图像的捕获、数据获取与分析的技术;还介绍了常用 miRNA 引物、模拟体、抑制体、靶位点生物信息软件的使用方法。在使用本书进行教学实践的过程中,实验教学和仪器设备内容可结合各院校附属医院实验条件选择开设。书后附有参考文献,可供进一步查阅。

本书的编写工作得到了同济大学附属杨浦医院科研部的嵇承栋副主任医师、付强强主管医师的全情参与,同时上海师范大学天华学院的曾思良老师、中国医学科学院北京协和医院病理科的潘伯驹老师也为本书的编写提供了他们的研究心得。本书是国家重点基础研究发展计划 2013CB531601、国家自然科学基金 30972633、上海市卫生和计划生育委员会科研项目 201640253 和同济大学附属杨浦医院学科带头人攀登计划 YE2201608 资助的研究成果,凝聚了广大学者的心血,在此一并致以真诚的感谢。

由于时间仓促,我们的学术水平和编写能力有限,本书的错误和疏漏之处,希冀广大读者在阅读与实践过程中及时给予指正,谢谢。

潘 欣

2017 年 9 月

Step教你使用基础医学科研设备
by Step

目 录

CONTENTS

第一章 荧光显微镜

1. 概述 001
2. Axio Observer Z1倒置荧光显微镜系统 003
3. Axio Observer Z1倒置荧光显微镜操作与控制 005

第二章 生物安全柜与细胞培养

1. 生物安全柜结构与使用 019
2. 细胞培养箱的使用 026
3. 原代骨髓间充质干细胞培养 029
4. 原代骨髓间充质干细胞爬片的制备与染色 ... 032

第三章 组织细胞破碎仪与样品制备

1. 细胞破碎法概述 039
2. SKSI珠磨破碎仪使用 040
3. 使用SKSI珠磨破碎仪制备核酸样品 042
4. 制备过氧化物酶体与组织细胞全蛋白样品 ... 046
5. 使用超声破碎仪制备难溶解试液 053

第四章 多功能酶标仪与样品检测

1. 多功能酶标仪使用 057
2. 使用多功能酶标仪 μ Drop模块进行核酸样品...
的定量检测 060
3. 使用多功能酶标仪进行蛋白样品的定量检测 062

第五章 荧光定量PCR

1. 概述	067
2. StepOne Plus荧光定量PCR仪	067
3. 采用相对标准曲线法完成RT-PCR	072

第六章 免疫印迹与化学发光成像系统

1. 免疫印迹常用设备	087
2. 免疫印迹转膜流程	090
3. 免疫印迹化学发光成像	093
4. 免疫印迹数据分析	100

第七章 miRNA相关设计

1. miRNA概述	111
2. 在线查找miRNA序列的软件	112
3. miRNA引物设计与软件使用	114
4. miRNA作用靶点预测	115
5. miRNA模拟体与抑制体设计	124

参考文献	125
------------	-----

本章内容概要

1. 荧光成像简介。
2. Axio Observer Z1倒置荧光显微镜结构。
3. Axio Observer Z1倒置荧光显微镜操控。

1 概述

1.1 荧光显微镜工作原理

荧光显微镜有透射照明型和落射照明型两种。透射照明型荧光显微镜的激发光经暗场聚光镜达被检标本的下方,激发光不进入物镜,而产生的荧光进入物镜。其效果低倍镜下明亮,高倍镜下暗淡,不适于观察非透明标本。落射照明型荧光显微镜又称反射型荧光显微镜,激发光从物镜与目镜间的镜筒进入,经物镜照射到标本上,产生的荧光再反射给目镜观察,适于透明及非透明标本。近代荧光显微镜多属此类。

照明系统光路中有激发滤色镜和中间镜,是为选择被观察的荧光色素光谱的激发光而制作的。激发滤色镜是从高压汞灯光谱中选取被观察的荧光色素所需的激发光波段的滤色镜;中间镜是反射短于激发光波长的光同时可透过长于激发光波长的光的滤色镜。被中间镜反射的激发光集中于物镜标本上,通过它的照射和激发而产生荧光。

插入于成像系统的吸收滤色镜是将观察时所必需的荧光提取出来的滤色镜。

从标本发出的荧光和在标本面上反射出来的激发光经物镜而到达中间镜。中间镜反射掉对于观察所不需要的激发光(即短波长的光),使长波长的荧光透过。继而通过吸收滤色镜排除残留的激发光或不使用的光,有目的地提取观察目标所需的荧光。

1.2 荧光物质

生命科学领域中常用的荧光物质主要有荧光素、荧光蛋白、金属荧光复合物、细胞荧光素等。

1.2.1 荧光素

荧光素是一种能吸收激发光的光能产生荧光,并能作为染料使用的有机化合物。适用于标记的荧光素须具备以下条件:①通常是环状复合物,与延伸物相连接。单键与双键的交替数目越大,被激发的分子稳定性越大,即荧光增强。②分子平面性和硬度越大,荧光倾向越大。③有些分子尤其是螯合物,加入金属离子可产生强烈荧光。④浓度、温度、pH值和离子强度可对分子的荧光效率产生显著影响。荧光物质的稀释溶液,可在室温下使用。此外,结合物在一般贮存条件下性能稳定,可保存使用较长时间。常用的荧光素主要有异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、四乙基罗丹明(tetraethyl rhodamine B200, RB200)和四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC)等。

1.2.2 荧光蛋白

荧光蛋白是从生物体内提取或通过转基因表达而获得的一种光致发光的物质,目前主要有绿色荧光蛋白、藻胆蛋白和植物荧光蛋白等。荧光蛋白的显著优点是与生物相容性好,标记生物分子后不影响其生物活性,发光强度高,易于识别与检测。

1.2.3 金属荧光复合物

金属离子中的镧系稀土离子铕(Eu^{3+})、铽(Tb^{3+})、钐(Sm^{3+})、钕(Nd^{3+})和镝(Dy^{3+})通过具有双功能基团的螯合剂与蛋白偶联形成的复合物,经紫外光(340 nm)激发后产生的荧光(613 nm),不但强度高,而且荧光衰变时间也长,为10~1000 μs ,一般生物类样品的自然本底荧光的衰变时间只有几微秒,待其全部衰变后,再测量稀土元素的特异荧光,可以完全排除非特异本底荧光的干扰。此外, Eu^{3+} 或 Sm^{3+} 的激发光与发射光之间有很大的斯托克斯位移(约270 nm),而且激发光的光谱较宽,有利于增高激发能,增强镧系标记物的比活性,而发射荧光的谱带很窄,又有助于降低本底,提高分析的特异性和灵敏度。

1.2.4 细胞荧光素

1.2.4.1 Calcein-AM

钙黄绿素的衍生物 Calcein-AM 不带电荷,能透过细胞膜,在细胞内会被酯酶水解成带电荷的水溶性绿色荧光物质钙黄绿素(Calcein),后者不能透过细胞膜,因而保留在细胞内。在pH值6.5时以波长为493 nm的

激发光激发 Calcein, 可产生 514 nm 的荧光。Calcein 荧光的激发波长和发射波长随 pH 值变大而逐渐向长波方向移动, 如 pH 值为 4 时, λ_{ex} 为 481 nm, λ_{em} 为 510 nm; pH 值为 8 时, λ_{ex} 为 489 nm, λ_{em} 为 512 nm; pH 值为 13 时, λ_{ex} 为 495 nm, λ_{em} 为 516 nm。

1.2.4.2 CM-Dil

CM-Dil 是一种活细胞荧光标记染料, 它的 CM 基团 (即氯甲基替代基团) 能与多肽及蛋白上的巯基反应从而使该分子在醛类物质中保持稳定, 有着强而稳定的红色荧光 (激发峰 553 nm/ 发射峰 570 nm)。CM-Dil 对细胞无毒, 且稳定长效, 能很好地长期示踪细胞。CM-Dil 标记后荧光在胞内表达稳定, 阳性标记率达 98% 以上, 标记细胞形态良好, 能有效地观察细胞在体外的诱导分化情况, 将标记的细胞注入体内, 可以有效地显示移植细胞在活体组织中的迁移及分化。CM-Dil 标记细胞后再进行固定、渗透及石蜡包埋操作都不会影响其荧光, 是免疫荧光、免疫组化和原位杂交中理想的细胞荧光标记染料。

1.2.4.3 Hoechst 染料

Hoechst 染料最初由德国 Hoechst AG 公司发明, 其所有的试剂都以数字编号命名, 主要有 Hoechst 33258、Hoechst 33342 和 Hoechst 34580。三种染料都可由 350 nm 左右的紫外光激发, 都在 461 nm 处发出蓝靛色荧光。未被结合的染料最大发射光波长区间为 510 ~ 540 nm。Hoechst 与 DNA 双螺旋的小沟 (minor groove) 结合, 更倾向于与腺嘌呤胸腺嘧啶富集序列 (AT rich sequence) 的 DNA 链, 即富含 AT 的双链 DNA 使荧光强度显著增强。Hoechst 可穿过细胞膜, 可结合于活细胞或固定过的细胞。Hoechst 33258 常用于检测细胞凋亡, 正常细胞的细胞核经染色后呈正常的蓝色, 凋亡细胞由于染色质固缩, 细胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染, 荧光显微镜下观察颜色有些泛白。Hoechst 能与 DNA 结合, 干扰 DNA 复制和细胞分裂, 有致畸和致癌危险, 其使用和废弃须谨慎。

2 Axio Observer Z1 倒置荧光显微镜系统

2.1 Axio Observer Z1 倒置荧光显微镜结构

Axio Observer Z1 是 Carl Zeiss 公司的高端倒置荧光显微镜, 该系统主要包括显微镜镜体、光源和电脑控制三部分。光源包括明场卤素灯 (halogen lamp) 光源和暗场长寿命金属卤化物灯 (metal halide arc lamp) 荧光光源。Axio Observer Z1 倒置荧光显微镜可以实现多维活细胞快速动态荧光成像、动态荧光强度测量分析、固定组织细胞荧光成像、三维断层扫

描成像和重建 3D 图像等功能。

Axio Observer Z1 倒置荧光显微镜结构如图 1.1 所示。

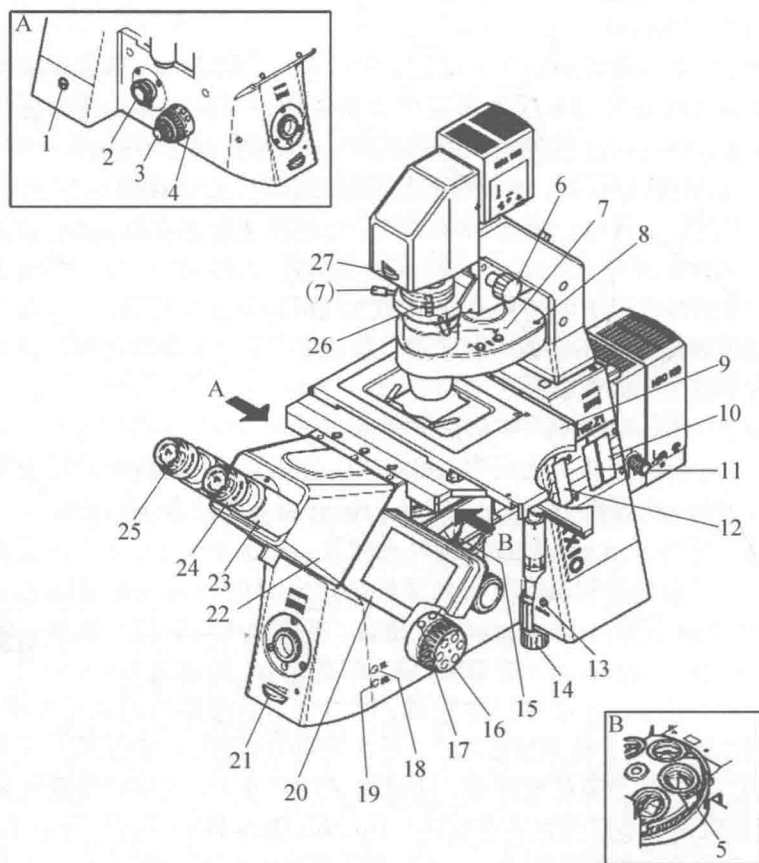


图 1.1 Axio Observer Z1 倒置荧光显微镜结构示意图

A 机身中部左侧放大图

1. 显微镜机身开关
2. 左口相机
3. 粗调 / 细调旋钮
4. 调焦限位器

B 机身中部右侧放大图

5. 物镜转盘
6. 聚光镜垂直调节器
7. 对中螺丝
8. 聚光镜

9. 载物台

10. 三孔滤片拉板
11. 反射光孔径光阑或衰减器
12. 反射光视场光阑
13. 光源管理器
14. 载物台 XY 轴调节器
15. 反射光转盘
16. 粗调 / 细调旋钮
17. 调焦限位器
18. 透射光开关

19. 反射光开关

20. TFT 显示屏
21. 透射光光强调节旋钮
22. 观察筒
23. 双目筒
24. 目镜
25. 目镜调节环
26. 滤片支架
27. 透射光视场光阑

2.2 Axio Observer Z1倒置荧光显微镜性能

Axio Observer Z1 倒置荧光显微镜有鲜艳的荧光, 具有稳定性、灵活性和可靠性好等特点。该显微镜特别适合于活细胞高质量图像的获取, 其独有的塑料微分干涉观察方式解决了普通微分干涉观察方式不能观察塑料培养皿内细胞的问题。其 Z 轴步进精度能达到 15 nm 以下, 同时各类荧光转换、荧光 / 白光 / 照相切换都是电动的, 物镜转盘和荧光转盘的电动马达的精度能达到 100 ms 以下, 不仅能满足长时程记录细胞荧光信号的要求, 而且能比较有效地避免荧光淬灭。

显微镜具有稳定的支架和灵活的电动操控, 可采用手动模式、触摸屏控制模式或程序控制模式进行操作, 适合习惯偏好不同的操作者使用。

3 Axio Observer Z1倒置荧光显微镜操作与控制

3.1 Axio Observer Z1倒置荧光显微镜操作步骤

3.1.1 开机

打开显微镜电源开关“power supply”, 打开显微镜左侧机身开关。

若观察荧光, 打开荧光激发光源 X-cite 的电源开关, 可根据需要自行调节其上的激发光强度档位, 上方液晶显示屏显示的是累计使用时间。注意开关间隔不小于 30 min。若仅观察明场, 只须打开卤素灯 HAL 电源开关, 不必开启荧光激发光源。

打开电脑和软件。双击电脑桌面上带有“ZEN”字样的蓝色图标, 进入主界面(图 1.2)。

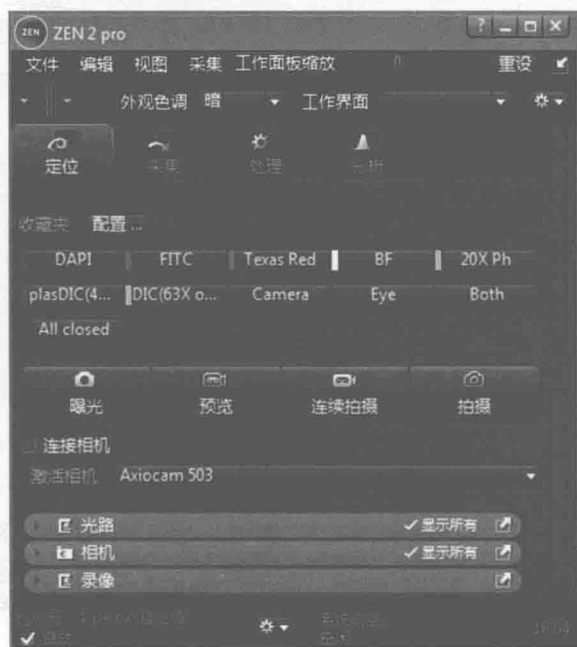


图 1.2 倒置荧光显微镜ZEN软件操作主界面

3.1.2 透射光(TL)观察(光源:卤素灯 HAL)

3.1.2.1 明场观察

软件打开后(图 1.2)点击进入定位界面,选择“BF”按键,硬件将自动切换到透射光明场,选择“Eye”按键切换至眼睛观察;适当调节机身前方旋钮 21 至合适光强;选择合适的物镜,聚焦并调至视野中央。

3.1.2.2 相差观察

该机器所配“20×”为相差物镜。选择“20×Ph”按键,硬件将自动切换到相差观察方式,选择“Eye”按键切换至眼睛观察;调节机身前方旋钮 21 至合适光强;选择合适的物镜,聚焦并调至视野中央。

3.1.2.3 微分干涉观察

a. Plas DIC

该机器所配“40×”为 Plas DIC,该光学元件插于物镜转盘下方插槽中。聚光镜上方起偏器 26 移出光路,选择“Plas DIC (4...”按键,物镜转盘下方的滑块调至 Plas DIC,选择“Eye”按键切换至眼睛观察;适当调节机身前方旋钮(图 1.1 中 21)至合适光强;选择合适的物镜观察样本,聚焦并调至视野中央。

b. DIC

该机器所配“63×”为 DIC。聚光镜上方起偏器 26 移入光路,选择“DIC (63×o...”按键,物镜转盘下方的滑块调至空位,选择“Eye”按键切换至眼睛观察;适当调节机身前方旋钮(图 1.1 中 21)至合适光强;选择合适的物镜观察样本,聚焦并调至视野中央。



Plas DIC和DIC区别: DIC只能观察玻璃制品如载玻片, Plas DIC既能观察玻璃制品也能观察塑料制品如培养皿、多孔板等。

3.1.3 反射光/荧光(RL)观察(光源: X-cite)

根据样品的荧光染料类型,选择 DAPI/GFP /DsRed,选择“Eye”按键切换至眼睛观察;选择合适的激发光源 X-cite 强度档位;选择合适物镜观察样本,聚焦并调至视野中央。



3.1.4 图像采集

双击桌面“ZEN”蓝色图标, 打开软件。

3.1.4.1 单张图片采集

如图 1.2, 点击“Camera”按键或者“Both”按键进行图片采集。

在定位界面下, 点击“预览”按键进行图像预览, 点击“曝光”按键或者展开下方相机蓝色对话框(图 1.3), 在曝光时间一项中选择“曝光”按键进行自动测光, 也可以手动输入曝光时间或者移动滑块调节。拍摄荧光图片时可将图像下方尺寸菜单(图 1.4)中“灰度显示”前的空格处打勾, 以作曝光时间参考, 红色代表过曝的点。

所配置的相机为彩色相机, 在模式栏下选择相机的“彩色”或“单色...”按键, 即彩色或黑白模式(推荐拍摄荧光图片选择黑白模式), 预览速度一般选择慢速, IP Quality 一般选择 High。

► 彩色模式下, 须调节白平衡。明场观察时, 有两种方法调节白平衡: ①将视野移至空白区域或将样品移出光路, 点击白平衡栏中的自动按键进行自动白平衡。②找好视野后, 点击“挑选...”按键, 将鼠标移至预览图片上, 此时鼠标变成采样符号, 点击图片中的非样品区域, 完成手动白平衡。

► 黑白模式下白平衡参数不可调, 即无须调节(荧光观察时推荐)。

点击图 1.2 中的“拍摄”按键完成拍图。若为黑白模式拍摄的荧光图像, 在拍摄好的图片下方的尺寸菜单下展开 C1 框, 点击“颜色”按键, 选择其中相应的颜色。



图1.3 相机对话框界面