



生物光学成像的样品制备

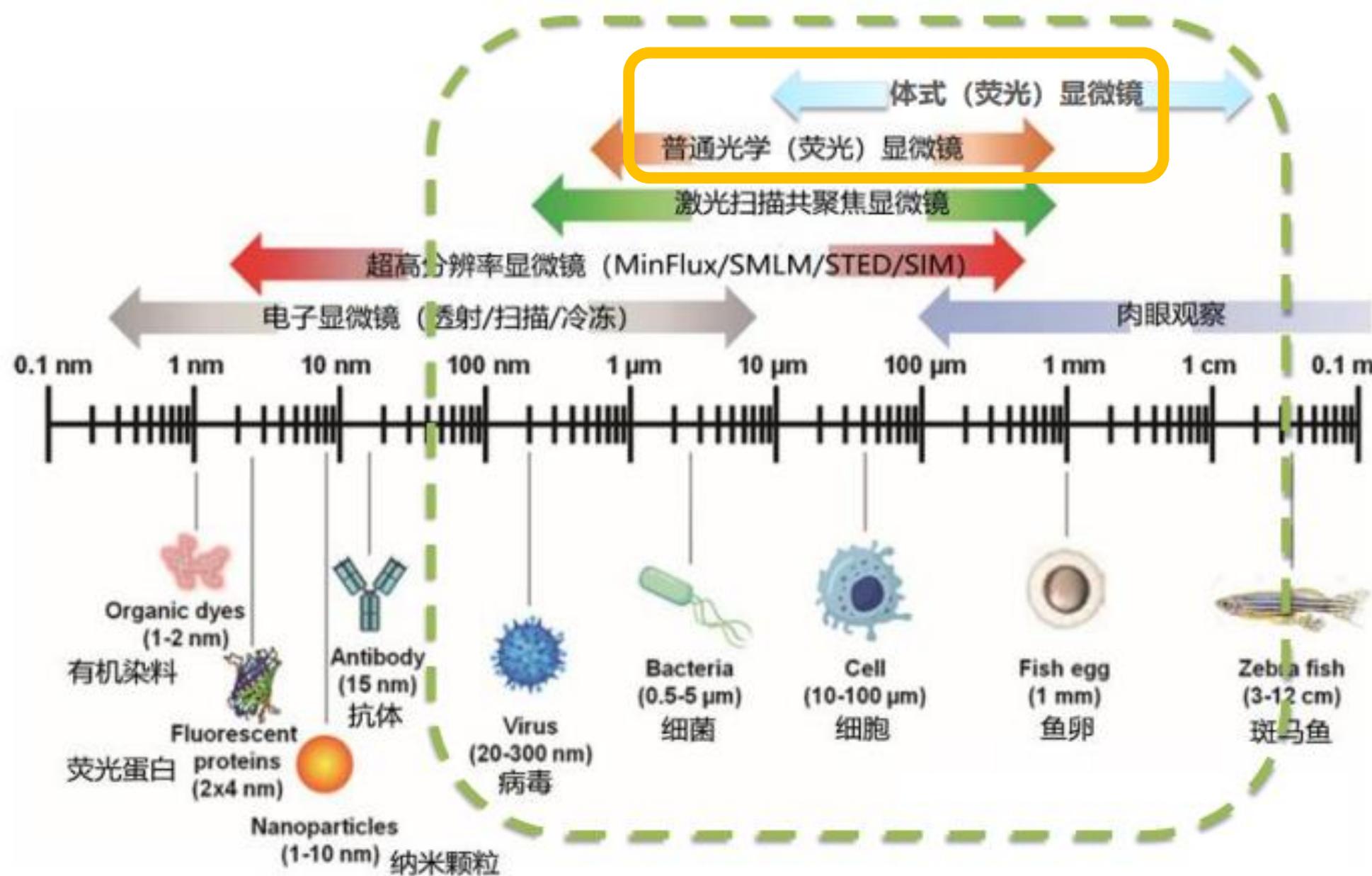
王光欣

中国科学院水生生物研究所
分析测试中心

2020. 08. 22

主要内容

- 1、光学成像平台简介
- 2、成像制样的基本思路和常见方法
- 3、常见生物样品的处理方法
- 4、应用案例



平台仪器



Leica SP8



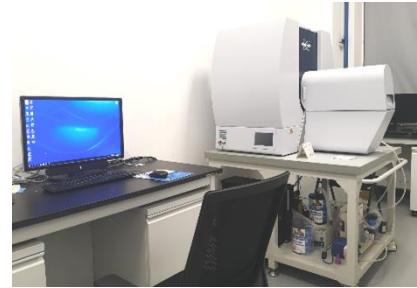
Leica DLS



Leica STED



Zeiss LSM
710 NLO



Micro—CT
Skyscan 1276



便携式X光成像仪
AL-WJ9



Amersham
Typhoon RGB



体式显微镜
Leica M205



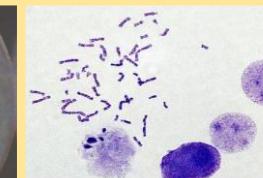
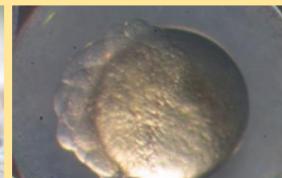
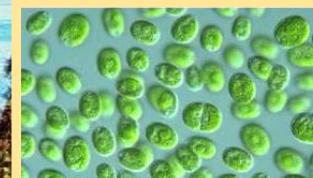
全自动玻片扫描仪
Aperio VERSA 8



细胞原位成像工作站
nikon

主要内容

- 1、光学成像平台简介
- 2、成像制样的基本思路和常见方法
- 3、常见生物样品的处理方法
- 4、应用案例



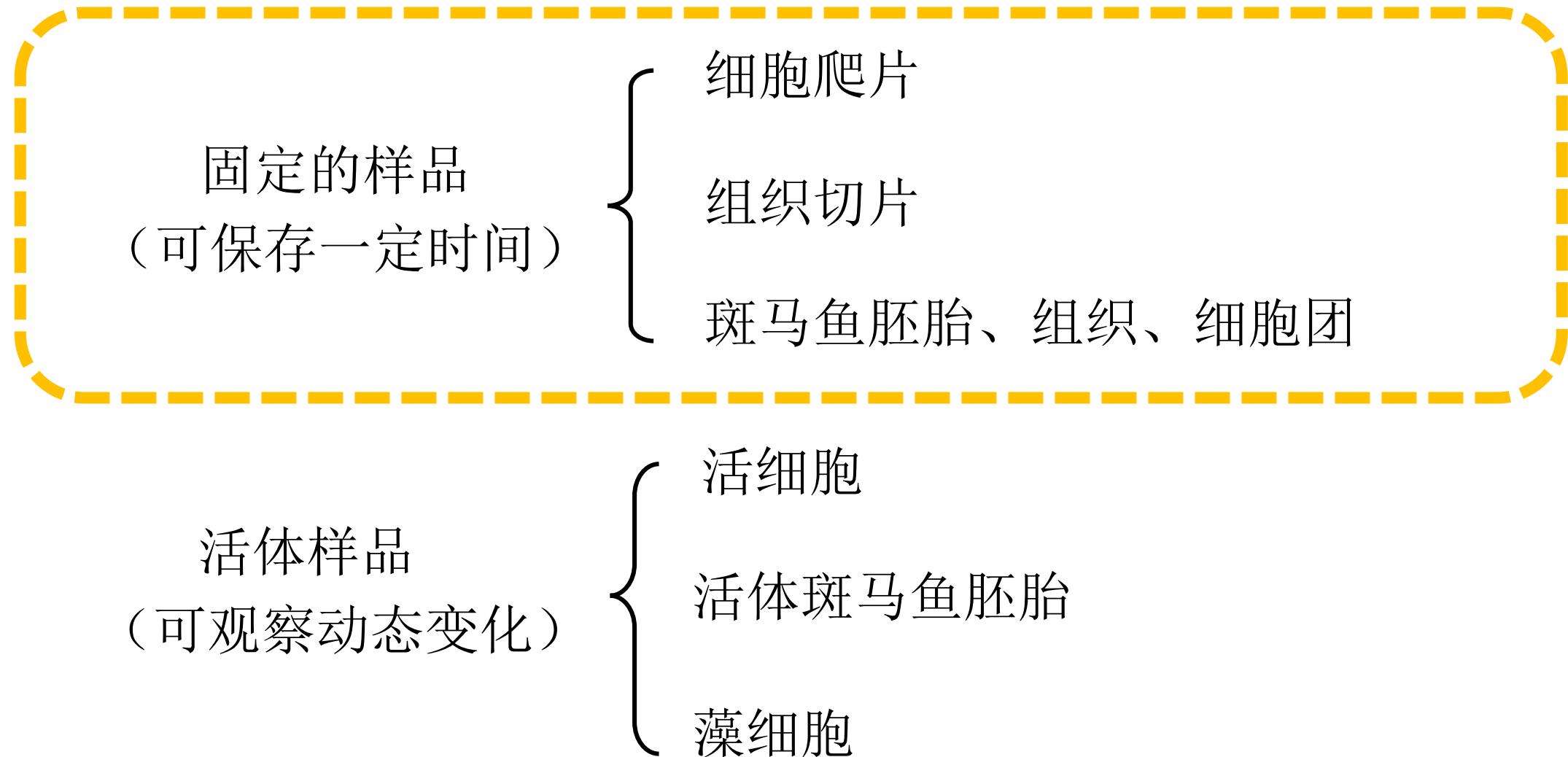
重金属和藻



常见制样方法	特点
徒手切片	常见于植物样本，厚度20-25um
涂片、压片	适用于微小、漂浮的样本
石蜡切片	可长期保存，厚度均匀，3-8um
冰冻切片	保持样品新鲜度，常用于免疫组化，6-15um
振动切片	适合脑、眼睛等较软组织，避免冰晶形成和组织抗原破坏，常15-100um
半薄切片	包埋剂为塑料或者环氧树脂，厚度1-2um

主要内容

- 1、光学成像平台简介
- 2、成像制样的基本思路和常见方法
- 3、常见生物样品的处理方法
- 4、应用案例



1. 取样

2. 固定

3. 组织切片

4. 染色/免疫组化/原位杂交

5. 封片

6. 保存

准备并清洁使用的器具

选择合适的时期和组织

保持完整性和原有形态

固定 (fixation)：利用物理或化学的方法，迅速杀死细胞，使细胞、组织的形态结构尽可能地保持原态。

4%多聚甲醛磷酸缓冲液：最常用的固定液，但固定时间不宜过长最好的保持细胞和组织的形态结构；

95%乙醇：脱水性较强，易引起组织收缩、变硬。适用于苏木精-伊红染色，~~最大限度地保存抗原的免疫活性~~；

丙酮：组织穿透性和脱水性强，抗原保存完好，对核的固定差。

~~不要使用可能带有自发荧光的固定剂~~

甲醇：固定时间短，细胞收缩小，细胞核保存较好，结构清晰。

Bouin's液：组织穿透性弱而收缩性强，温度和pH值都会影响固定效果。

10%中性缓冲甲醛固定液：免疫组织化学常用固定液，组织穿透性较好，收缩较小。不适合湿固定的涂片。

- 1. 取样**
- 2. 固定**
- 3. 组织切片**
- 4. 染色/免疫组化/原位杂交**
- 5. 封片**
- 6. 保存**

细胞贴壁培养

将玻片放入孔板的孔内后，加细胞悬液时只滴到玻片上，一直滴到液体布满整个玻片又不会溢出玻片边缘，放在培养箱里，等细胞贴壁后再滴加培养基布满整个孔底，继续培养。

细胞固定

4%多聚甲醛磷酸缓冲液，室温15min。



细胞培养过程中，仅仅镜检可以使用塑料培养皿、培养瓶，但这些容器的底部较厚，会影响成像效果，因此正式成像时请使用玻璃爬片。



接触抑制

正常细胞



平面观

细胞贴壁



2 小时后



24 小时后

组织切片

石蜡切片



全自动脱水机



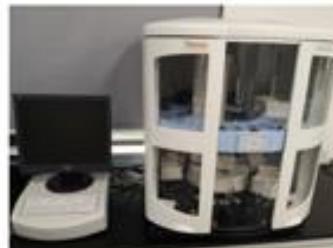
全自动包埋机



切片机



漂烘仪



全自动染色机

- 可以连续切2~3μm的薄片，片子薄而均匀，无皱褶
- **组织固定较好，抗原定位准确，室温下可长期存放**
- 用于免疫组化的石蜡切片应当在较低的温度下进行
 - ① 脱水、透明等过程应在4°C下进行
 - ② 组织充分脱水、透明、浸蜡，低温石蜡包埋（60°C以下）
 - ③ 37°C恒温箱过夜烤，减少脱片
- 操作繁琐，容易造成**组织内抗原性的丧失**
- **保持剥离组织的纯度，没有脂滴、杂质等污染**
- **石蜡自发荧光较强**

组织切片

冰冻切片



- 能够较完好地保存细胞膜表面和细胞内多种酶活性以及抗原的免疫活性
- 形态变化不大，能够较好的保存脂肪、类脂等成分

- 含水量较多的组织中较易出现冰晶，应当避免冰晶的出现
 - (1) **速冻**: 使组织温度骤降，减少冰晶的形成。液氮速冻后置于-80°C冰箱贮存备用。
 - (2) **蔗糖溶液**: 将组织置于20%~30%蔗糖溶液1-3天。利用高渗吸收组织中水分，减少组织含水量，可防止或减少冰晶的形成。
- 操作时样品易破碎
 - 易破碎的样品在冰冻前可用10%明胶或2%琼脂糖包埋
- 不易做连续切片和较薄的切片

组织切片

振动切片



- 利用刀片振动原理，将新鲜的活体组织或固定过的组织切成 $20\mu\text{m}$ 薄片~ 1mm 以上厚片
- 一般厚度精度控制大约为 $1\mu\text{m}$ ，如果做荧光染色建议切成薄片
- 新鲜组织可不固定不冰冻
- **能较好地保留脂溶性物质和细胞膜抗原**

(1) 与冰冻切片相比，不需要对组织冷冻，不会形成冰晶或造成组织抗原的破坏

(2) 与石蜡切片相比，不需要脱水、透明、浸蜡等过程，避免对抗原的损害

- **主要用于脑组织、脊髓、肝脏、眼睛及其他较软器官组织**

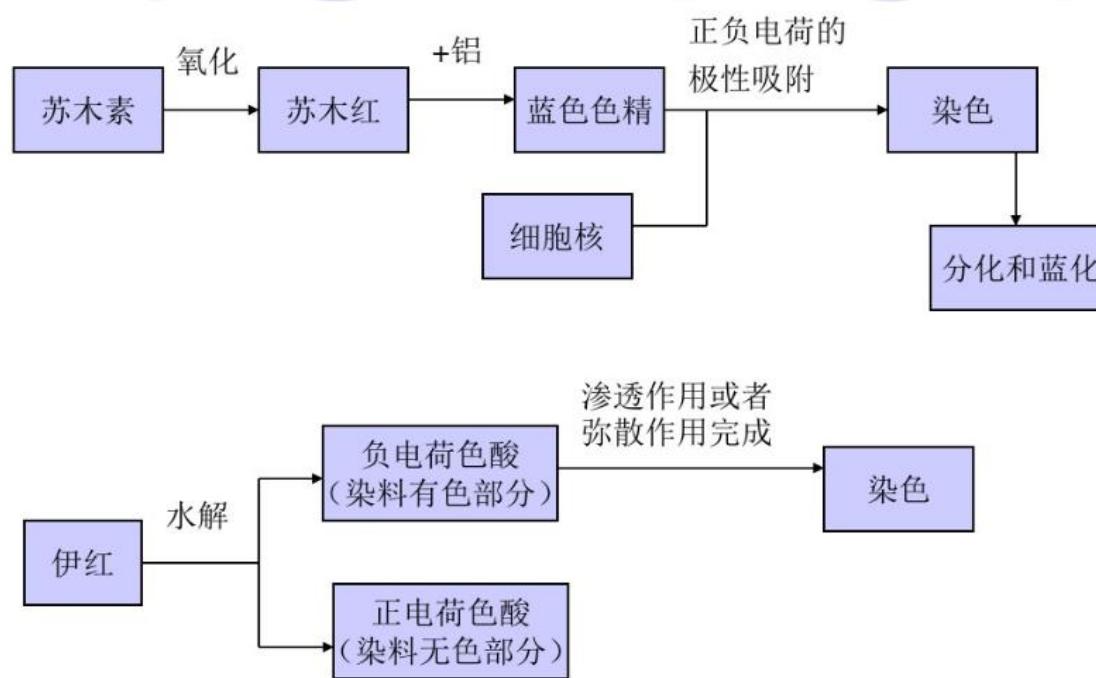
- 1. 取样**
- 2. 固定**
- 3. 组织切片**
- 4. 染色/免疫组化/原位杂交**
- 5. 封片**
- 6. 保存**

HE染色

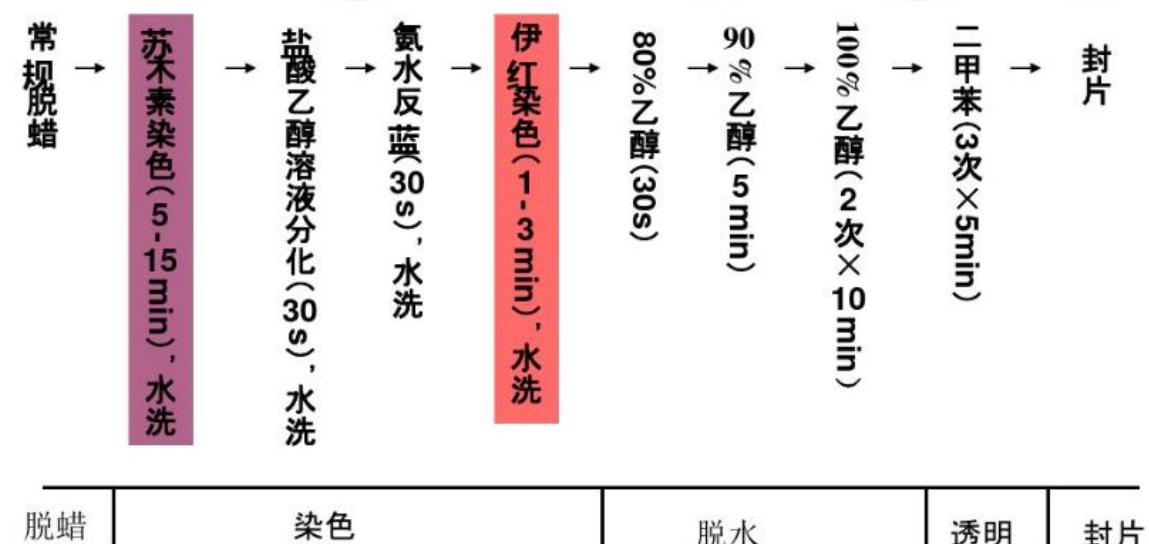
苏木精 – 伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining)

简称HE染色法，石蜡切片技术里常用的染色法之一。苏木精染液为碱性，主要使细胞核内的染色质与胞质内的核酸着紫蓝色；伊红为酸性染料，主要使细胞质和细胞外基质中的成分着红色。

HE染色原理



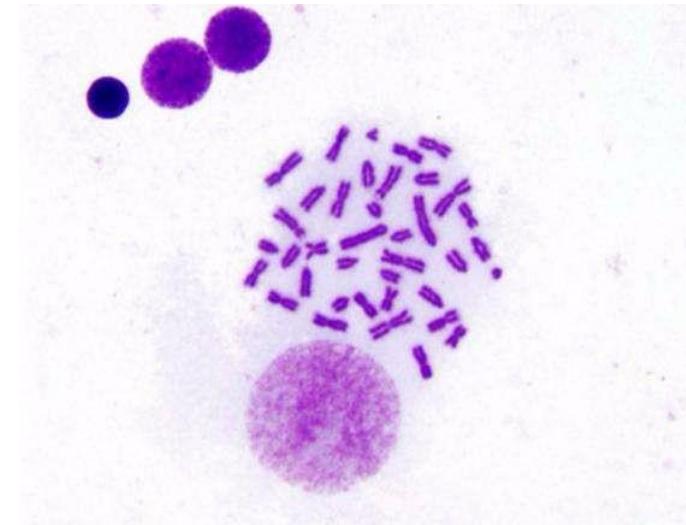
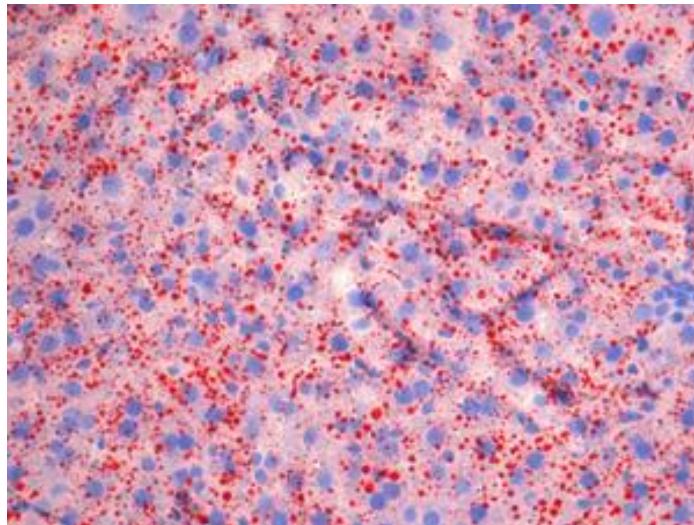
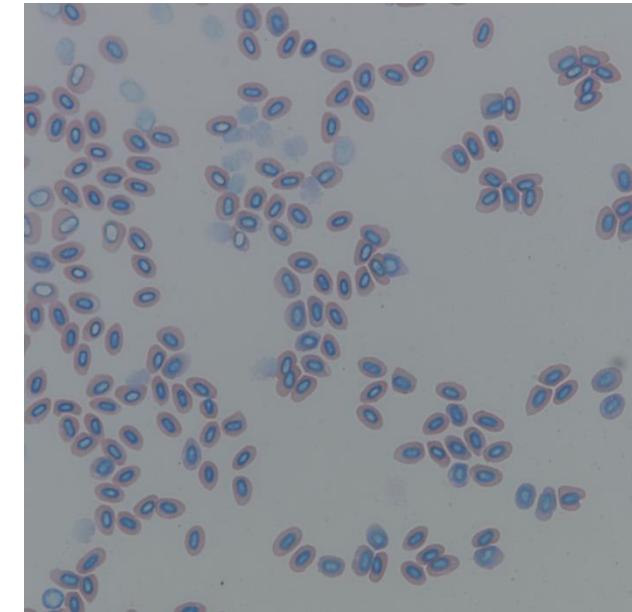
染色步骤



染色的时间，应根据室温，及组织的具体情况来确定，做之前做预实验。

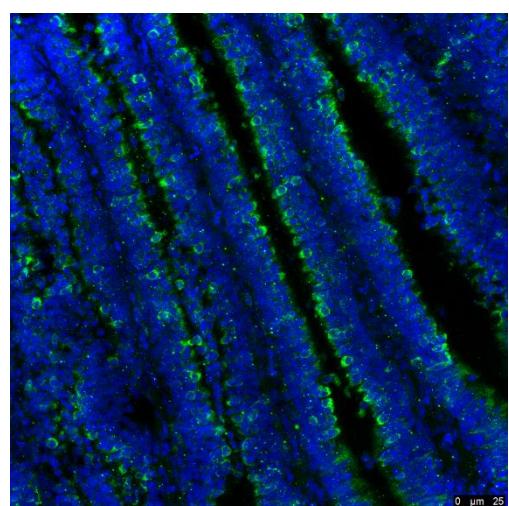
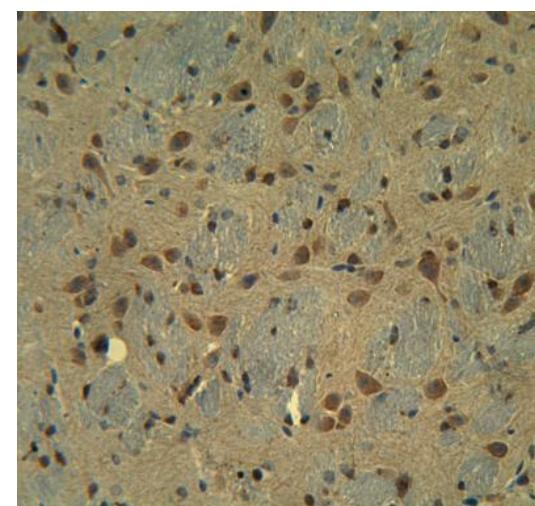
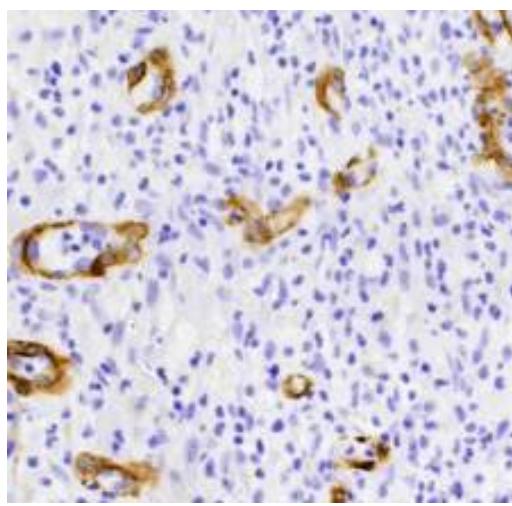
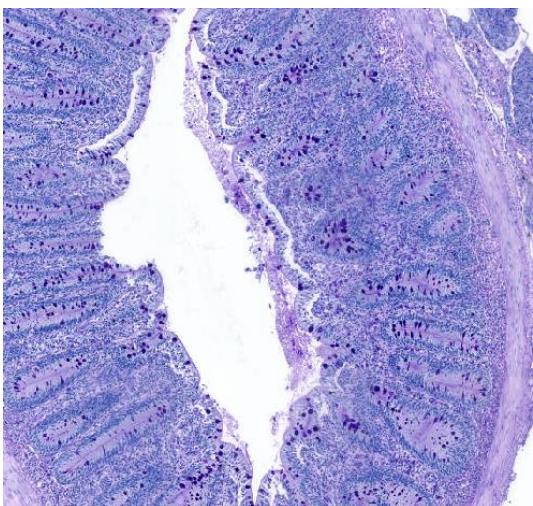
其他常见染液

- 吉姆萨（Giemsa）：常用于血液涂片
- 甲苯胺蓝：适合塑料包埋的组织染色，呈蓝色
- 油红O：适合指示油脂，呈橘红色
- 洋红：经典的染色体染料



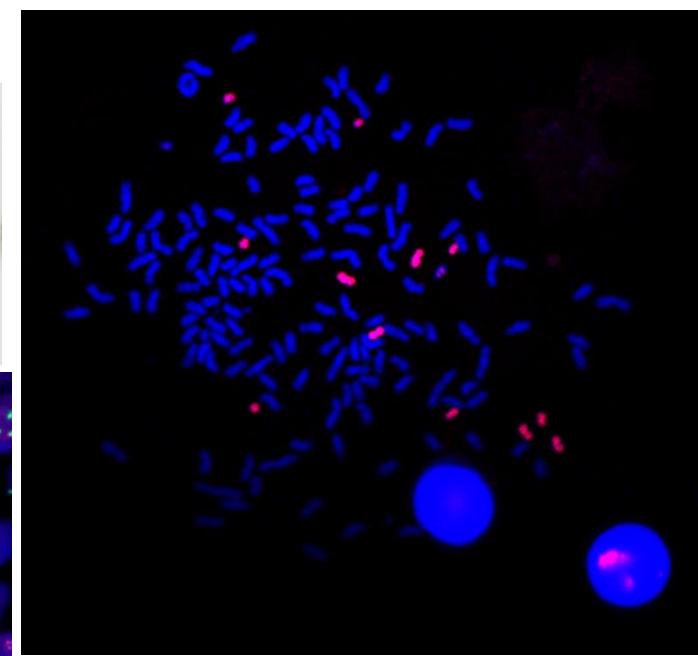
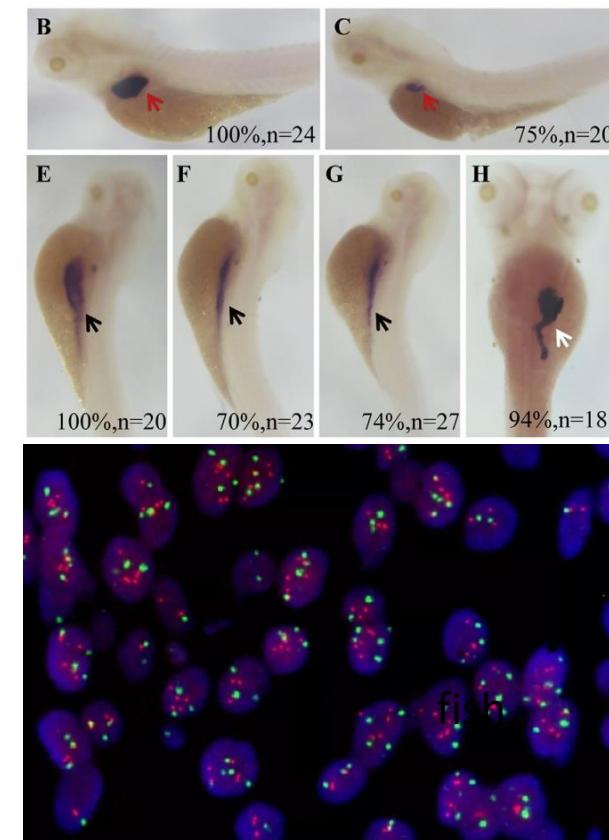
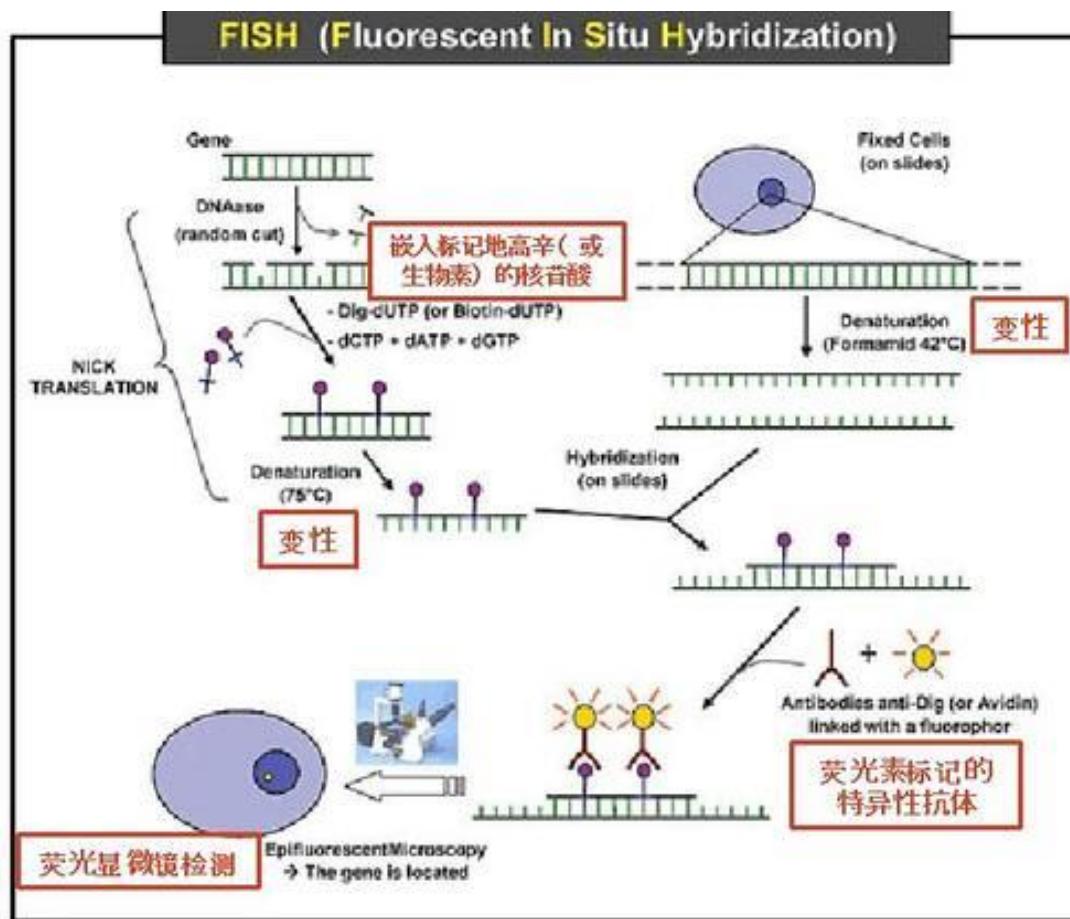
免疫组化

根据抗原与抗体特异性结合的原理，利用荧光素、生物素或地高辛等标记的抗体对组织切片或者细胞涂片上的组织或细胞内相应抗原进行原位显示，经过组织化学的显色反应以后，可对相应抗原物质定位、定性或定量检测。



原位杂交

利用核酸分子单链之间有互补的碱基序列，将有带有特定标记的已知序列核算(即探针)与组织、细胞或染色体上的核酸进行杂交，结合成专一的核酸杂交分子，经一定的检测手段将待测核酸在组织、细胞或染色体上的位置显示出来。



1. 取样

- 甘油和PBS混合液 (9: 1)

2. 固定

- 纯甘油

3. 组织切片

- PBS

- 荧光抗淬灭剂

● 封片液不宜过多，否则会引起样品漂动

4. 染色/免疫组化/原位杂交

5. 封片

6. 保存

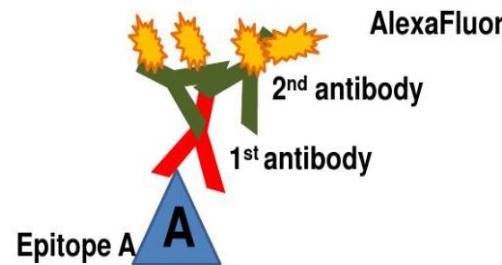
斑马鱼胚胎

- 早期发育阶段全体透明
- **发育到24h开始产生色素**
- 具有一定厚度，需要**通透化处理**
- 可用1%低熔点琼脂包埋，以固定好合适的观察角度（动物极较轻，植物极较重）



整体免疫荧光

1. 固定胚胎/组织样品
2. PBST洗5min×3
3. 透化1-2h
4. 室温血清封闭1-2h
- 5. 4°C一抗过夜孵育**
6. 室温PBST洗10min×3
- 7. 室温二抗避光孵育2h**
8. PBST洗10min×3
9. DAPI染核
10. PBST洗10min×3
11. 封片



抗体耦联免疫荧光染料

一抗特异性高
二抗带有荧光基团
容易出现非特异性染色反应
条件参数需要摸索优化

	Green		Red		Far-Red	
	FITC	494/518	TRITC/Rhodamine	555/580		
			Texas Red	594/615		
Cyanine	Cy2	492/510	Cy3	554/568	Cy5	649/666
Alexa Fluor	Alexa Fluor 488	495/519	Alexa Fluor 546 Alexa Fluor 555 Alexa Fluor 568 Alexa Fluor 594	555/565 556/575 578/603 590/617	Alexa Fluor 647	650/668
BODIPY	BODIPY FL	503/512	BODIPY TMR BODIPY TR	543/569 592/618		

荧光蛋白标记

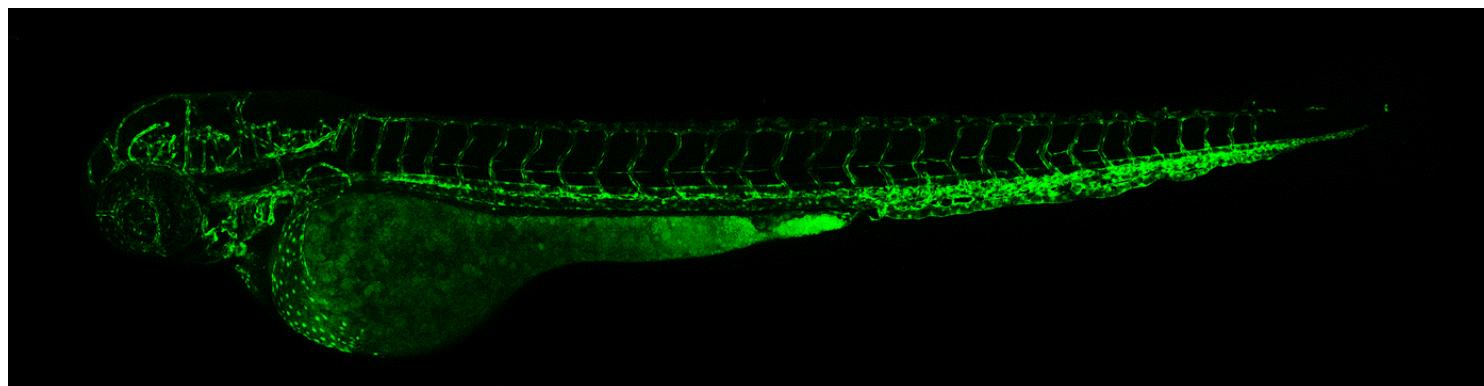
活细胞/胚胎

- GFP/EGFP/RFP等荧光融合蛋白表达载体的构建
 - ① 细胞：外源基因+GFP质粒，转染
 - ② 斑马鱼：EGFP转基因鱼，显微注射
- 载体的转染存在效率问题
- 有的样本荧光蛋白在活体死亡后强度减弱



细胞光毒性损伤

光漂白导致的荧光淬灭



细胞器及DNA

活体荧光染料

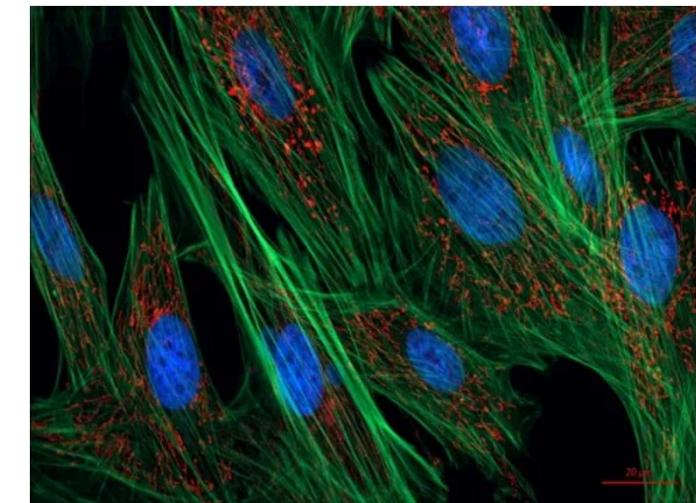
线粒体：MitoTracker可以透过细胞膜。在用固定剂破坏膜电位之后也不会被洗掉。

溶酶体：LysoTracker，用于溶酶体追踪，可进行活细胞标记；LysoSensor，荧光亮度收PH值变化影响，用于检测溶酶体形成。

内质网：DIOC6，非特异性，较高浓度标记内质网，较低浓度标记线粒体。

高尔基体：使用NBD C6-ceramide和BODIPYFL C5-ceramide等荧光染料对其进行标记。

细胞核：DAPI标记半通透细胞，能够穿透细胞膜，可以用于固定和活细胞之中；Hochest染色剂毒性相对较低，比较适合标记活细胞。



▲ 蓝色为DAPI标记细胞核，绿色为Alexa Fluor 488标记细胞微管，红色为MitoTracker Red标记的线粒体

制片

- 新鲜藻类样品一般**现场制片**
- 需要将藻液吹打分散呈**均匀的、悬浮状**
- 具有纤毛的藻细胞运动较快，可以用**0.05%的低熔点琼脂**固定在盖玻片上
- 提前制片时注意封片，避免藻细胞失水变形

叶绿素

- 自发荧光现象
- 激发光谱和接收光谱较宽，有时会干扰目的荧光信号的检测
 - ① 加强目的信号的荧光强度
 - ② 调整目的信号的接收波段，减少叶绿素的信号的重叠接收。
- 去除叶绿素：**将藻细胞固定在盖玻片上，泡在甲醇溶液，-20℃下20min**

- ✓ 红细胞血红蛋白中的卟啉。正常情况下，卟啉和铁离子相结合，抑制了荧光作用；如在血液中加酸使铁离子游离，或缺铁性贫血，血细胞也呈红色荧光。
- ✓ 某些肿瘤细胞在紫外或蓝光激发可呈现明显的自发荧光。
- ✓ 维生素A具有绿色自发性荧光。
- ✓ 某些药物也呈现颜色荧光，如奎宁，四环素等。

设置空白对照和实验对照

主要内容

- 1、光学成像平台简介
- 2、成像制样的基本思路和方法
- 3、水生生物样品处理方法
- 4、应用案例



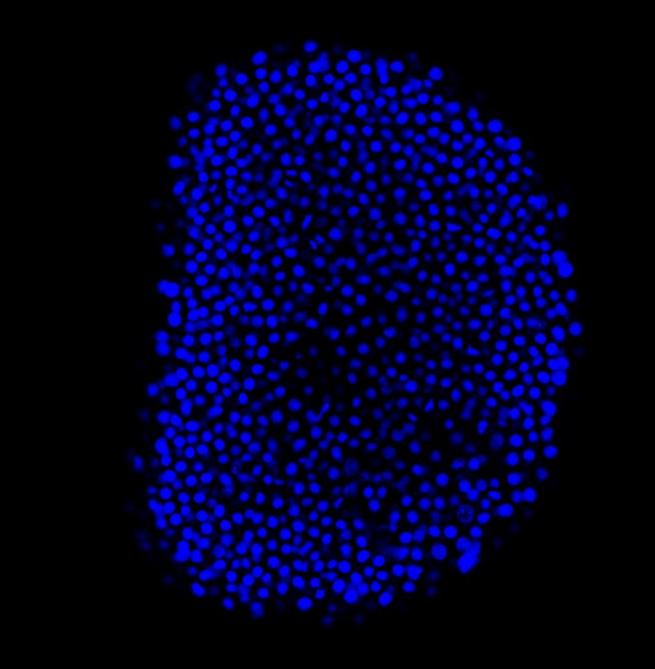
斑马鱼胚胎的制样

- 1、胚胎固定：择合适时期的斑马鱼卵，带卵膜固定15min，4%PFA
- 2、透化：PBS洗5min×3次，使用Triton-100透化30-40min
- 3、封闭：使用封闭液(Triton-100 0.2% +BSA 1% +DMSO 1% in PBST pH7.3），3次×10min，最后一次1h以上。
- 4、一抗孵育：4°C，过夜。（如果一抗之间具有潜在的竞争，例如共定位，首先孵化信号较弱的抗体）
5. 使用封闭液清洗。胚胎发育不超过24h，15min×4次；24h-48h，15min×8次。
- 6.二抗孵育：室温避光，1h。
7. .使用封闭液清洗。15min×3次。
- 8.琼脂糖固定：剥去卵壳，用1%低熔点琼脂糖固定
- 9.荧光抗淬灭剂，4°C保存。

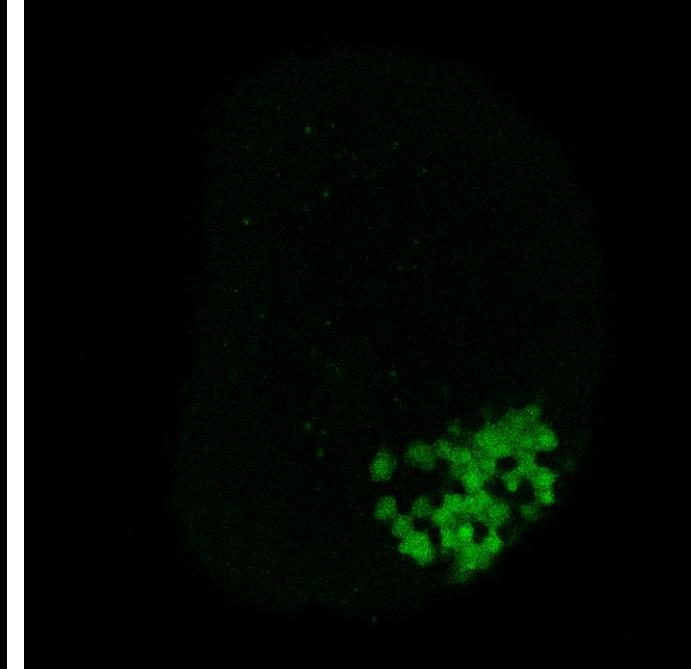


斑马鱼胚胎的制样

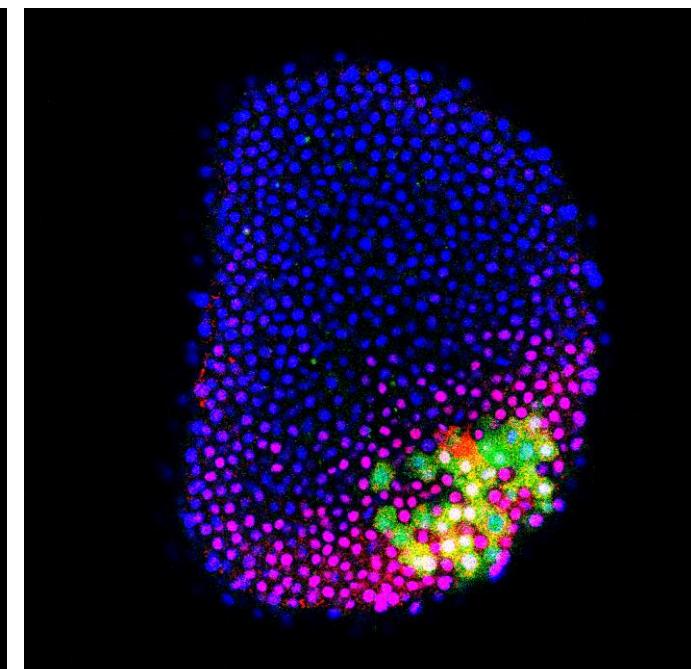
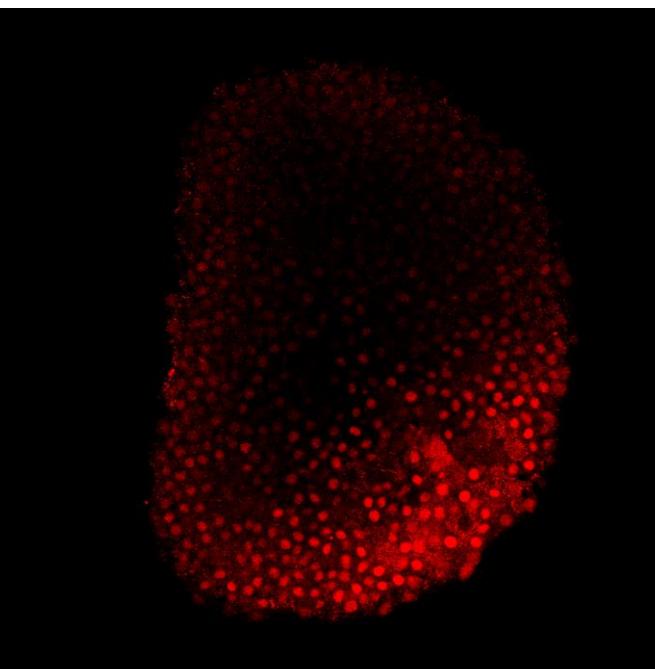
DAPI



GFP



P-Smad (红色)





衣藻的制片

1. 提前准备

- ① 藻细胞：细胞浓度 $10^5\sim10^6$ cells/mL。
- ② 载玻片和盖玻片：先用水冲洗干净，再浸泡于75%乙醇中，备用
- ③ 将50%的PI（聚乙烯亚胺）用灭菌ddH₂O稀释至1%。

PI可以有效的使细胞贴附，但是聚乙烯亚胺也具有很强的毒性。



2. 盖玻片处理：

- ① 将6孔板洗干净，中间放入15mL离心管的盖子。用干净的镊子小心取出盖玻片，置于15mL离心管的盖子上，在超净台中吹干
- ② 取100~200μL 1%的PI溶液滴在盖玻片上，轻轻晃动使PI在盖玻片上摊平，然后立在无尘纸上吸掉多余液体，放置1-2min后拿到超净台中吹干（约30min~1h）

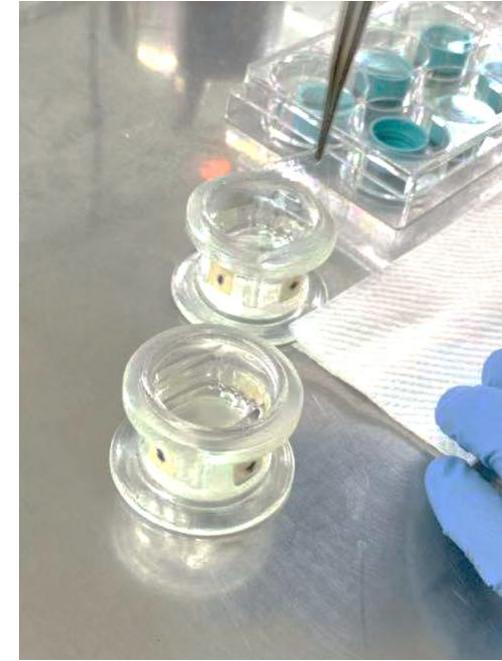




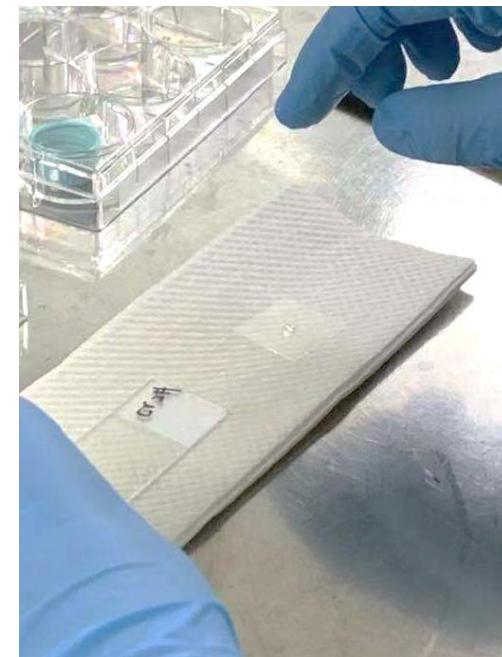
衣藻的制片

3. 藻细胞处理

- ① 取2mL藻液，2500rpm离心3min—弃上清—PBS（pH7.4）漂洗，重复3次
- ② 漂洗后离心，弃上清，加2mL TAP（培养液）重悬藻细胞，加入探针L（带红色荧光基团），孵育30min
- ③ 2500rpm离心3min—弃上清—PBS（pH7.4）漂洗，重复3次
- ④ PBS重悬，调整浓度



4. 固定：取20 μ L藻液滴加于盖玻片上，在无尘纸上立一下吸掉多余水分，放置1-2min（不要放置太久，细胞会变形），此时藻细胞被粘附在盖玻片上。



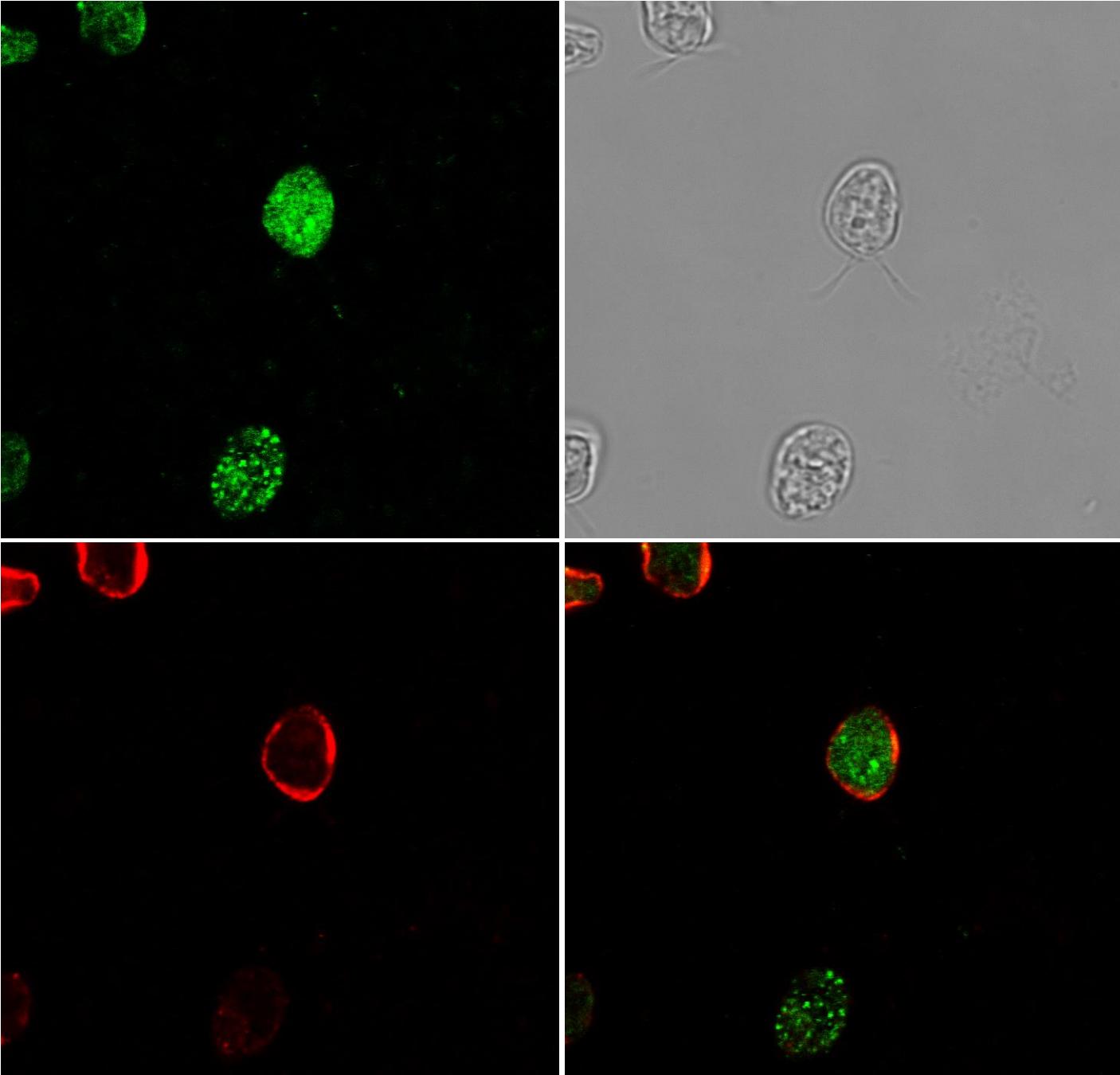
5. 去除叶绿素：用镊子将上述盖玻片放入甲醇溶液中浸泡，-20°C，20min。

6. 封片：取出盖玻片，晾干甲醇，滴加7 μ L抗淬灭剂压片，指甲油封片，4°C可保存一个月。



衣藻的制片

叶绿素
荧光探针（红色）



总结

固定液
封闭液
通透剂
制片方式
荧光染料



种类
浓度
作用时间



多次试验
优化条件参数

光学成像技术平台已熟练开展的检测项目

➤ 普通共聚焦成像及FRAP、FRET、光转化、光激活等特殊成像

用于测定荧光强度、共定位、三维重构和蛋白动力学数据和蛋白相互作用等结果

➤ 双光子共聚焦成像

利用双光子激发化学合成小分子纳米材料标记目标蛋白，或进行厚样品的深度观察

➤ 超分辨STED成像

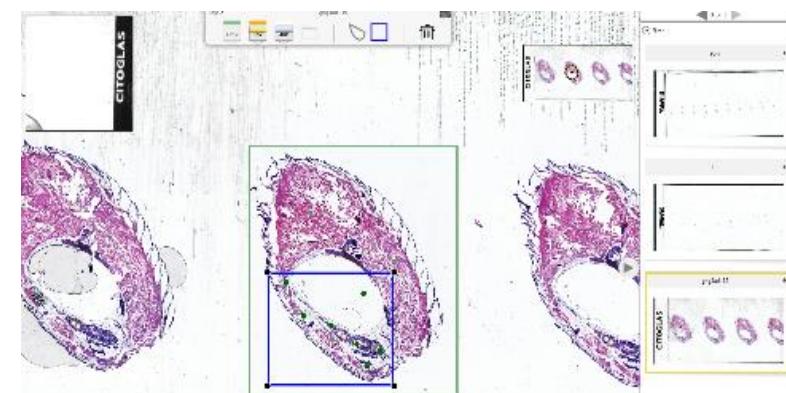
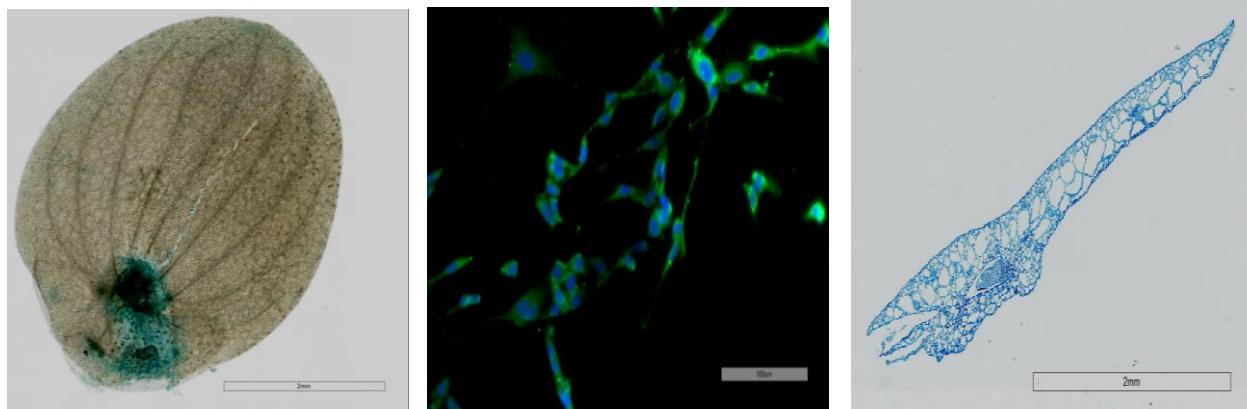
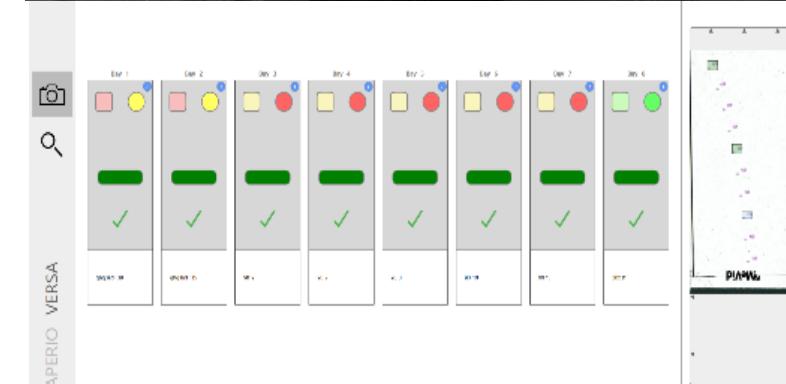
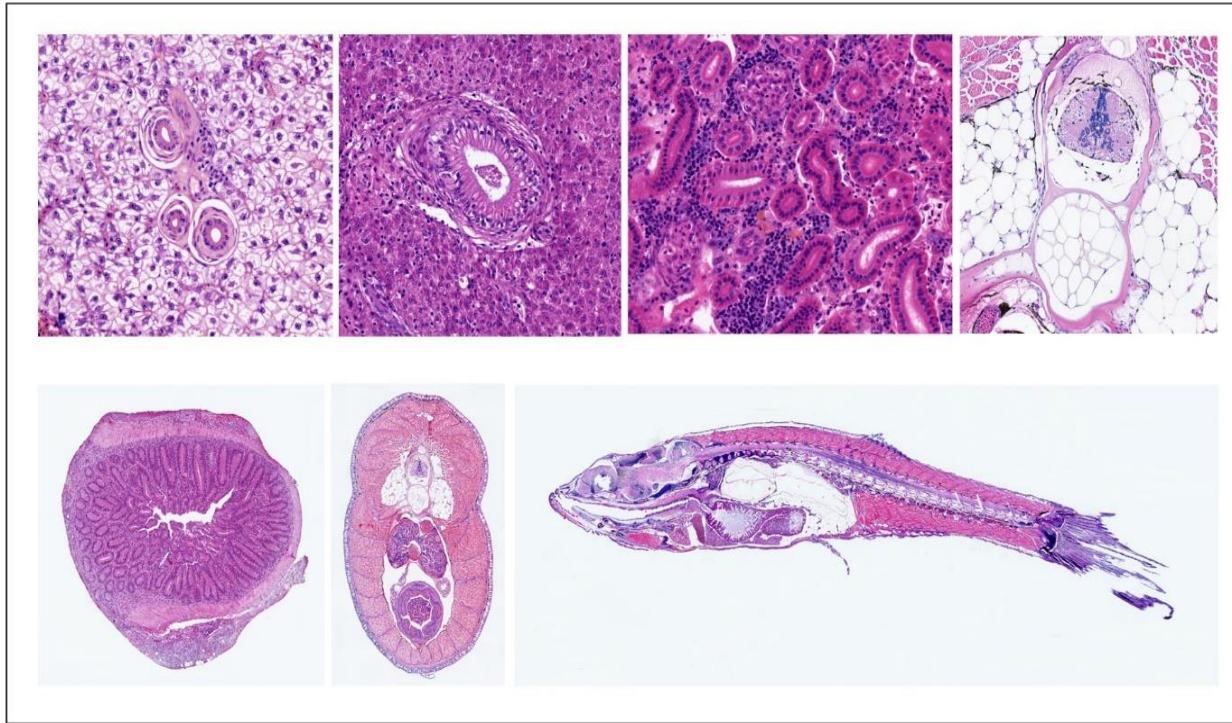
获得分辨率XY \leqslant 120nm的全光谱超高分辨率成像

➤ 特定单细胞或区域制备

在显微镜下精确从各种各样的组织样本中分离出特定的单细胞或整个区域的组织



组织切片制样及切片扫描





中科院水生所

谢谢！

周芳
TEL: 68780321
MAIL:
zhoufang@ihb.ac.cn

王鑫
TEL: 68780321
MAIL:
wangxin@ihb.ac.cn

王光欣
TEL: 68780321
MAIL:
wanggx@ihb.ac.cn