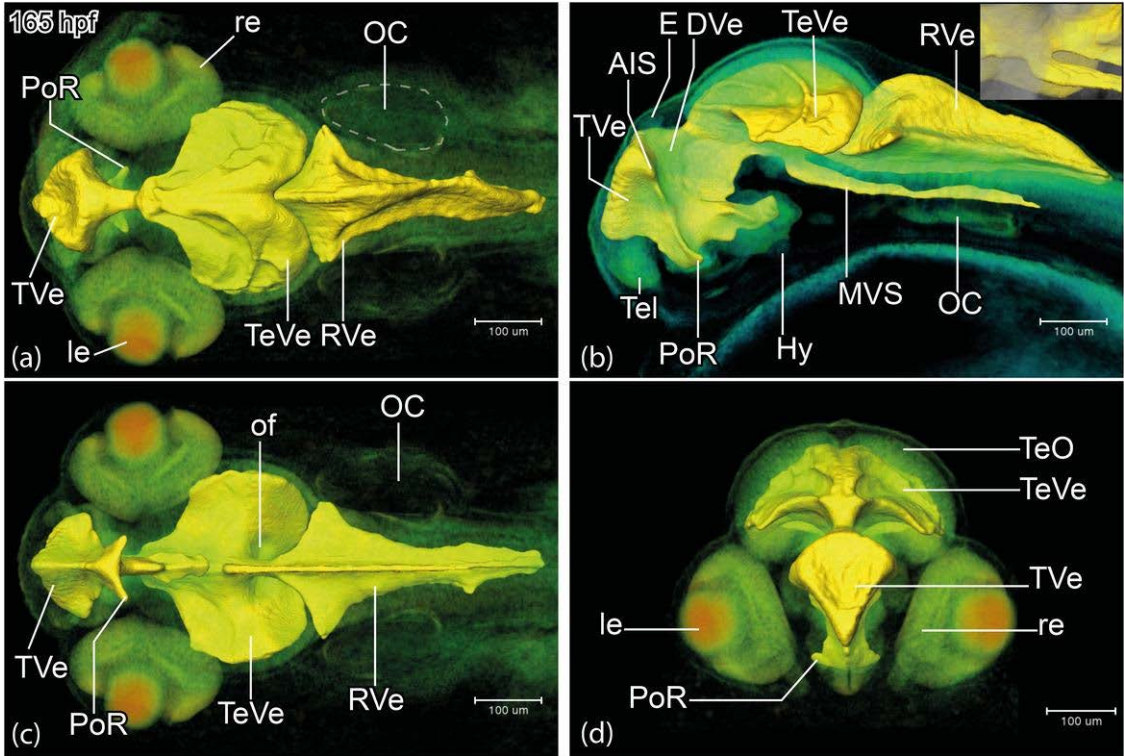


# 蜂巢

第3期  
2023 9月



鳉鱼胚胎脑部发育四个胚胎阶段大脑及脑神经Micro-CT成像(J Comp Neurol. 2022;530(12):2132.)

# 服务内容与形式

蜂巢

2023/9



委托  
检测

仪器  
共享

项目  
合作

技术  
培训

科研  
咨询



平台  
管理

平台  
建设

实验  
教学

人才  
培养

技术  
研发



- 前沿科技
  - [cyTOF质谱流式细胞技术平台](#) . . . . . 1
  
- 实验技术
  - [生物样品中短链脂肪酸的分析技术](#) . . . . . 2
  - [透射电子显微镜样品制备中脑组织的超薄切片](#) . . . . . 3
  - [肿瘤细胞PI染色以及流式细胞仪检测细胞周期](#) . . . . . 4
  
- 仪器推荐
  - [安捷伦7000B三重四级杆气相质谱仪](#) . . . . . 5
  - [高内涵成像分析及MetaXpress软件模组简介](#) . . . . . 6
  - [小动物活体Micro-CT成像系统](#) . . . . . 8
  
- 知识问答
  - [动物伦理申请与审核内容知多少](#) . . . . . 10
  
- 实验室安全常识
  - [洗眼器的使用方法](#) . . . . . 12



## cyTOF质谱流式细胞技术平台

上海华盈生物医药科技有限公司/孙江鹏, 王世东, 梁丁芳 (15821683924)

### 质谱流式细胞技术原理

质谱流式细胞技术 (CyTOF) 是将流式细胞术和质谱分析联合使用的一项技术。这项技术采用了携带重金属及其同位素标签的抗体来标记细胞的表面蛋白和胞内蛋白。抗体标记完成后细胞通过流式细胞分选技术被分离成单个细胞进入到等离子炬中离子化, 然后离子云通过四极杆筛选出合适大小的离子送入飞行时间质谱, 在飞行时间质谱中通过质荷比进行分离, 从而获得单细胞的质谱数据。最后可以通过生信软件进行多样化的数据分析。

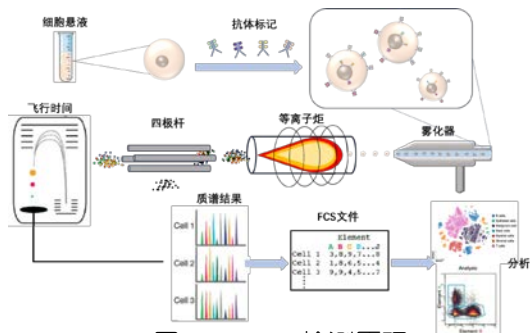


图1: CyTOF检测原理

### 质谱流式细胞技术优势

单细胞测序技术可以通过检测携带barcode的RNA片段获得单细胞的信息, 但是由于检测的是RNA水平, 无法准确的反映单细胞功能状态, 同时通量较低一次性只能检测2万个细胞的信息, 因此在单细胞研究方面依然存在一些局限性。

传统流式细胞术可以基于荧光标签对细胞中多个参数进行检测, 从而实现对细胞亚群的分类和功能的分析, 但是目前可用的荧光基团数量有限, 无法选择较多数量的通道; 同时荧光基团的发射谱带较宽, 会产生谱带重叠的现象, 需要进行补偿计算。这些原因大大限制了传统流式细胞术的发展。

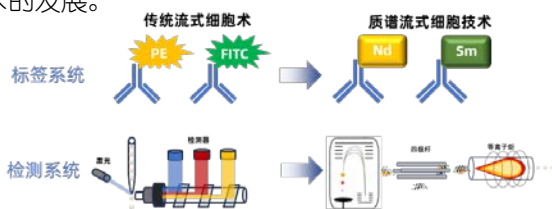


图2: CyTOF技术优势

而质谱流式细胞技术采用重金属元素及其同位素作为抗体标签, 并使用ICP质谱进行检测。可以实现多达几十个通道同时检测, 同时因为ICP质谱具有很高的分辨能力, 可以明确的区分开标记的重金属元素及其同位素, 相邻通道的干扰可以忽略不计。目前质谱流式细胞技术的检测量更是可以达到数百万个细胞, 可以提供一个完整准确的单细胞信息。

### 质谱流式细胞技术应用

CyTOF相关的文章目前已有2100多篇, 其中研究内容涉及肿瘤、心血管、血液、衰老等多种方向。且有30%的文章发表在《Nature》、《Cell》、《Science》等期刊及其子刊上。

加州大学旧金山分校的研究者在《Cell》上的一篇研究通过CyTOF分析了10例头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 患者的肿瘤和淋巴结中的免疫细胞, 作者针对肿瘤和淋巴结中的CD8+ T细胞亚群进行分析, 发现淋巴结组织含有更高比例的Tpex, 同时与肿瘤组织中的Tpex、Tcm和Tem亚群呈正相关关系, 这预示着淋巴细胞中的Tpex可能作为HNSCC免疫反应中重要的一部分。

作者继续使用CyTOF对免疫治疗患者血液进行了检测, 结果显示: 与对照组相比接受aPD-L1治疗的患者淋巴结部位的Tpex占比显著降低, 而血液中Tex-int细胞增加。由此作者推断出aPD-L1治疗会激活淋巴结中Tpex的增殖和分化并向外周血中运输Tex-int。

最后作者使用空间单细胞蛋白技术研究了癌转移淋巴结在免疫治疗中的作用, 发现癌转移淋巴结Tpex周围形成了不良的免疫环境, 阻止了淋巴结中的Tpex响应免疫治疗。

这项研究通过CyTOF和空间单细胞蛋白组学联用, 对HNSCC患者抗肿瘤免疫时淋巴结中的重要细胞亚群进行了分析。揭示了抗肿瘤免疫时淋巴结可能存在的正向作用。

伴随着单细胞蛋白组学的发展, CyTOF作为其中重要的一项技术, 必然会推动科研的巨轮, 带领我们走向下一个时代。

参考文献: Rahim MK et al. Dynamic CD8+ T cell responses to cancer immunotherapy in human regional lymph nodes are disrupted in metastatic lymph nodes. Cell. 2023;186(6):1127-1143.e18.





# 生物样品中短链脂肪酸的分析技术

分析测试平台/冯静文, 刘新华

## 1 概述

短链脂肪酸是肠道菌群代谢饮食中残留的膳食纤维产生的代谢物。临床研究表明, 其具有调节肠道菌群平衡、改善肠道功能, 以及抗肿瘤、抗炎和调控基因表达的作用。近年来, 短链脂肪酸作为肠道菌群的代谢产物已被证实参与宿主的能量代谢, 已成为预测肥胖、糖尿病等代谢性疾病及抑郁症, 阿尔兹海默等神经精神疾病的生物标志物。通过检测生物样品(主要是血液、尿液、粪便、细胞培养液)中短链脂肪酸的含量可辅助临床疾病的诊断、治疗, 因此建立完善的短链脂肪酸的定量检测方法具有重要意义。

## 2 测定方法

### 2.1 高效毛细管电泳法 (HPCE)

高效毛细管电泳法该方法快速、简便, 样品量少且反应条件温和, 适用于短链脂肪酸的常规分析。临床上常用毛细管电泳-紫外和毛细管电泳-荧光对粪便短链脂肪酸的含量进行检测。

### 2.2 液相色谱法 (LC)

短链脂肪酸并不能产生荧光或吸收紫外线的化学基团, 需先对短链脂肪酸的化学结构进行改造, 再采用相关紫外线或荧光检测器对其进行检测。常见的荧光衍生试剂和紫外衍生试剂有重氮甲烷、喹啉及苯并酰胺及苯甲酰甲基、对硝基苄基、对-溴苯甲酰甲基等。紫外检测器、质谱检测器等是较为常用检测器。在色谱柱的选择中, 采用离子色谱柱方法重复性好、准确度高、专属性和耐用性强, 已成为检测短链脂肪酸的优势分析方法。

### 2.3 气相色谱法 (GC)

1952年, James A T等首次证实GC可用于检测短链脂肪酸。短链脂肪酸具挥发性, GC法的特点之一是检测挥发性物质。在用GC对短链脂肪酸进行检测时, 首先要对其进行预处理。气相色谱法在测试的过程中通常使用火焰离子化检测器、火焰光度检测器、热导检测器等。火焰离子化检测器是一种首选的检测器, 定量分析方面具有优势, 具有较高的灵敏度。气相色谱柱常选用毛细管柱, FFAP柱的分离效果更佳。

### 2.4 核磁共振法 (NMR)

核磁共振方法是基于特定原子核的磁特性, 利用原子核在磁场中吸收和发射电磁辐射的作用进行检测。同位素核 $^1\text{H}$ 和 $^{13}\text{C}$ 已被用于粪便样品中的短链脂肪酸研究。

## 3 基于GC的预处理方法

GC法测定短链脂肪酸应用最广泛, 检测时, 首先要对生物样品进行预处理, 主要有以下几种方法:

### 3.1 有机溶剂萃取技术

乙醚、乙酸乙酯、氯仿和二氯甲烷等为常用短链脂肪酸的萃取剂。萃取技术操作简单常作为短链脂肪酸样品提取方式被广泛应用, 但由于短链脂肪酸会随有机溶剂一起挥发, 因此液-液萃取法往往会导致回收率偏低。

### 3.2 酸化水提技术

短链脂肪酸极易溶于水, 用水提取短链脂肪酸常加入盐酸、硫酸、偏磷酸等以抑制其水解。酸化水提法对于短链脂肪酸的定量分析具有重要意义。

### 3.3 水提乙醚萃取

短链脂肪酸水溶性较大, 可用沸点低, 易去除的乙醚萃取。水提乙醚萃取与有机溶剂提取技术相似, 当样品量较少时, 可先将样品稀释一定体积再进行萃取, 减小实验误差。

### 3.4 有机溶剂萃取技术

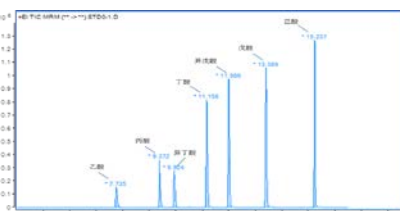
短链脂肪酸中的羧基极性较强, 在GC柱中易产生吸附, 在低浓度 ( $< 1\text{mmol/l}$ ) 时会时常发生, 要进行衍生化处理技术。衍生化还可以降低挥发性酸的蒸发损失, BF<sub>3</sub>-甲醇法是脂肪酸衍生化的最常用方法。常见的衍生化试剂有苄基溴、五氟苄基等。

### 3.5 固相微萃取技术

固相微萃取是基于吸附和解析进行样品处理。萃取头上涂膜的类型、样品基质的pH条件、短链脂肪酸的形态和反应时间对样品的吸附起决定性作用。

## 4 总结

短链脂肪酸检测的进步将推动短链脂肪酸的机体内代谢、生理作用以及临床应用的研究与深入。因此, 一个良好和可靠的检测技术是必不可少的。





# 透射电子显微镜样品制备中脑组织的超薄切片

细胞生物与组织病理学实验室/钟霄毓

透射电镜样品包埋后，需经超薄切片后才能进行透射电镜观察。超薄切片的厚度通常为70nm左右，获得如此薄的切片需经许多技术环节，必须使用专门的超薄切片机完成。

各个厂家生产的超薄切片机各有优势，但它们有一些共同的组成部分：夹持样品的样品夹和样品臂，重力或马达驱动使样品臂在上下运动中通过锋利的刀刃切出切片；有水槽的刀；刀台；注水系统；调节样品和刀间距的机械与电动装置，立体显微镜和照明系统。按推进原理，超薄切片机还可分为机械推进式和热膨胀推进式两类。超薄切片机虽然工作模式和操作模式不同，但所有切片机在切片过程中都有一个共同点，就是样品臂上下运动，并通过刀刃在样品臂每次下降经刀刃切片之前均相对刀刃做微小推进，使每一张超薄切片从包埋块切下来时，切片厚度与样品臂向刀刃推进的距离近似或相同，约70nm左右。

本实验室使用的超薄切片机型号为Leica EM UC7，徕卡EM UC7超薄切片机用于轻松制备半薄、超薄切片，以及获得完美光滑样品表面。可制备厚度从15微米至1纳米的高品质超薄切片，获得适用的重复性结果，配备徕卡专利共心移动技术，即便在低水位等不同的条件下也能实现优秀的样品切片，将光学照明调至合适位置避免了样品材料不必要的损失，杰出的LED照明使刀锋和块面更加清晰可见，可前后左右移动的全电动刀台具有自动修块模式和测量功能，节约宝贵时间。

透射电子显微镜样品制备中脑组织的超薄切片方法为：

## 1 修整包埋块

修整包埋块简称“修块”，一张超薄切片的面积约为包埋块顶面的1/3到1/2，所以切片之前必须修块。金字塔型是经典的修块形状，一般要经过粗修和细修，一般将包埋块顶面修成 $300\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$ 的等腰梯形也可修为直角梯形或长方形。将脑组织包埋块放在样品夹中，用双面刀片修去包埋块顶端多余的树脂，直至暴露出黑色的脑组织样品，以暴露出的样品为中心，用双面刀片倾斜 $45^\circ$ 角修出4个斜面，去掉多余的树脂和样品，修成金字塔状。保留的顶端切片区域大小视个人而定，通常切片面积越大涵盖的内容也就越多，但大切片带来的挤压变形也越严重。

## 2 超薄切片

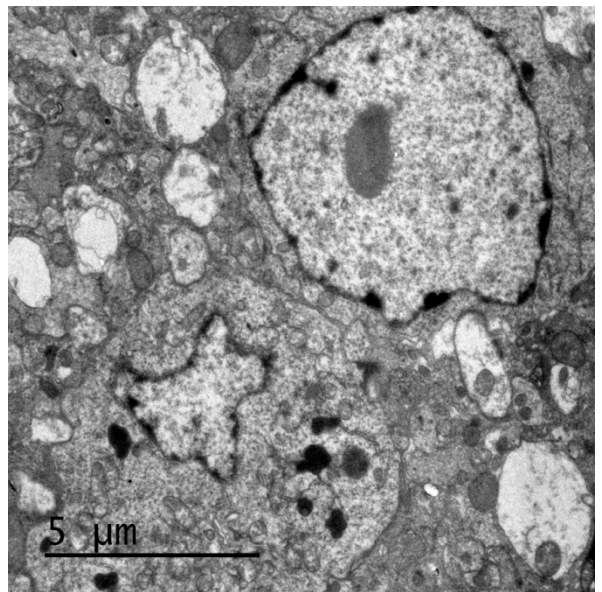
将修好的脑组织包埋块固定在样品夹上，顶端露出约2mm左右，将钻石刀安装在刀台上，使刀慢慢靠近包埋块顶端，称为对刀，切忌在推进时刀刃碰到包埋块。调整光源强度，逐渐缩短刀刃与包埋块的距离，使之尽可能靠近，直到刀刃与样品间的亮带刚刚消失为止，调整水槽液面，进行超薄切片。

## 3 染色

将切好的脑组织切片捞出，铺于铜网上，用乙酸双氧铀和柠檬酸铅进行双染，分别染色10min，每次染好都要洗涤干净，自然晾干后，便可进行透射电镜的观察。

## 参考文献：

Rahim MK et al. Dynamic CD8+ T cell responses to cancer immunotherapy in human regional lymph nodes are disrupted in metastatic lymph nodes. *Cell*. 2023 Mar 16;186(6):1127-1143.e18.







## 肿瘤细胞PI染色以及流式细胞仪检测细胞周期

### 病毒与免疫实验室/王晓宇

#### 1 前言

流式细胞术(Flowcytometry)是对细胞进行自动分析和分选的装置。它可以根据单个细胞表面或细胞内化学成分的不同,快速测量、存贮、显示悬浮在液体中的分散细胞的一系列重要的生物物理、生物化学方面的特征参量,并可以根据预选的参量范围把指定的细胞亚群从中分析并分选出来。

对不同类型细胞,主要通过采集前向散射光(FCS)将体积大小不同的细胞分开,并采集侧向散射光(SSC)将胞内粒度不同的细胞分开。进而,通过识别细胞表面和细胞内特异的荧光标记,实现对细胞因子、细胞表面抗原等的检测。该技术作为一种快速细胞分析技术,更广泛应用于肿瘤学、血液学等科研以及临床检测。

荧光染料Propidium iodide (PI, 碘化丙啶)是一种可对DNA染色的细胞核染色试剂,在嵌入双链DNA后释放红色荧光。PI-DNA复合物的激发和发射波长分别为535nm和615nm。

细胞周期是指从一次细胞分裂形成子细胞开始到下一次细胞分裂形成子细胞为止所经历的过程,可反映细胞增殖的速度。

细胞周期由多个阶段组成,通常包括G1期(细胞大小增加)、S期(DNA合成和复制)、G2期(细胞进一步生长),以及M期(有丝分裂和细胞分裂)、G0期(细胞静息休眠)。

在细胞周期的不同时期,细胞核内的DNA含量存在差异。使用染料对DNA进行染色(如PI染料),可根据其荧光强度判断细胞所处时期——DNA含量多,荧光强度高,DNA含量少,荧光强度低。

#### 2 实验步骤

##### 2.1 贴壁肿瘤细胞悬液细胞制备

- 取对数期生长的细胞,弃培养基,用5 ml PBS清洗2次。
- 用1 ml含EDTA胰酶,放入细胞培养箱中消化90 sec。
- 加入培养基5 ml 终止消化。
- 300 g 离心5 min 收集细胞(离心力和离心时间根据细胞特性进行调整)。
- 小心弃上清(可以重复用PBS清洗一次,可选)。
- 细胞计数。将细胞数量调整为所需浓度后,将细胞移至流式管,并标记组别。

##### 2.2 肿瘤细胞固定

- 轻轻加入70%乙醇10 ml -20度(或4度)固定过夜。
- 300 g 离心5 min收集固定后的细胞,小心弃上清。
- 使用预冷的PBS清洗一次, 300 g 离心5 min, 加入1 ml PBS。

##### 2.3 PI染色

- 将细胞重悬于含0.1 mg/ml RNase A 37度孵育30 min。
- 加入20 mg/ml PI,室温孵育20 min。轻轻混匀(看不到细胞团块)。
- 使用70 mm的细胞过滤网过滤后,可用流式细胞仪进行细胞周期分布检测。

##### 2.4 流式上机

- 使用贝克曼Cytometer流式分析系统,鞘液桶加入1 L流式鞘液,开启流式细胞仪和电脑。
- 双击桌面CytExpert软件,运行开机流程,按照提示放入蒸馏水清洗,初始化。
- 选择散点图,使用阴性对照选择合适的电压,调整FCS和SSC。
- 使用阳性对照管调节合适的PE的电压。
- 取样品管分别流式上机。
- 保存数据。
- 按照流程用Coulter Clenz清洗20 min,用蒸馏水20 min 清洗。
- 清洗完毕后关闭CytExpert软件,关闭流式细胞仪,关闭电脑,废液桶中液体倒入废液回收桶。



CytoFLEX LX 流式细胞分析仪 (5激光19色)



## 安捷伦7000B三重四级杆气相质谱仪

分析测试实验室/刘新华

### 1 组成

- (1) 气相色谱：进样仪器；
- (2) 离子源：电子轰击离子源 (EI) 是气质联用中最常用的离子源；  
电子轰击离子源 (EI) 的作用是用灯丝产生激发电子，轰击样品分子，将被分析的样品分子电离成带电的离子，并使这些离子在离子透镜的作用下，形成离子束，进入质量分析器被分离。
- (3) 四级杆质量分析器：质谱仪的核心，它将离子源产生的离子按质荷比(m/z)的不同进行分离；
- (4) 碰撞池：使用六极杆碰撞池，使用氮气作碰撞气体，氦气作碰撞池抑制气体，少量氦气可以降低离子源热氦离子带来的噪音；
- (5) 检测器：三轴 HED-EM 检测器消除了光子 and 中性离子的干扰，具有良好的信噪比结果；
- (6) MassHunter软件：安捷伦气相串联质谱仪的仪器控制 and 数据分析软件，主要由三部分组成：仪器控制软件 (Data Acquisition)、定性分析软件 (Qualitative Analysis)、定量分析软件 (Quantitative Analysis)。

### 2 主要技术指标

- (1) 离子传输速率：达500MRM/每秒；
- (2) 扫描速度：最高可达6250u/s；
- (3) 质量扫描范围最高可至1050u；
- (4) 灵敏度：可达飞克级检测水平的超高原灵敏度；
- (5) 全扫描 (MS1 SCAN)、产物离子扫描 (Product Ion)、多反应监测 (MRM)、前体离子扫描等多种模式。

### 3 应用特点

安捷伦7000B GC/MS/MS四极杆系统是安捷伦质谱产品系列的新成员。MS/MS能够减少样品处理，缩短分析周期，消除错误结果，简化数据浏览，提高效率。7000B采用久经时间考验的MSD部件，为GC-MS/MS的稳定操作设置了一个更高的标准。MassHunter 软件支持整个系统和分析过程，使MS分析从调谐到最终生成报告，变得更加简便。

- (1) 高灵敏度的电子轰击源和ramped-iris检测器提高了整个质量范围的灵敏度；
- (2) 行业领先的每秒500次的多反应监测速度，最短的1毫秒驻留时间，并确保碰撞反应池无记忆效应；

- (3) 采用“氦气淬灭”技术的高压、线性碰撞池能够减少亚稳态氮原子引起的中性噪音；
- (4) 专利的双曲面四极杆使性能达到1050 u；
- (5) 整体石英四极杆独特的稳定性使分析器可加热到200℃，消除了低温条件下常见的金属四极杆污染现象；
- (6) 集成的微板流路控制技术可减少离子源维护，缩短分析周期，延长色谱柱寿命；
- (7) 仪器体积小，占实验台少：该仪器仅有14英寸 (35厘米) 宽；
- (8) 惰性离子源可程序升温至350℃，改进了对活性化合物和后流出组分的响应；
- (9) 电子轰击源 (EI) 和化学电离源 (PCI 和 NCI) 均可用；
- (10) 三轴高能量电子倍增管检测器使中性噪音更低；
- (11) 带一个机械前级泵的差分泵真空系统；
- (12) 提高效率的多种功能：如安捷伦自动调谐，快速数据浏览和免参数积分仪；
- (13) 可使用氢气作为载气，操作安全。

### 4 在中药研究领域应用

安捷伦7000B三重四级杆气相质谱仪满足针对复杂体系中痕量有机物高通量、高灵敏度和自动化检测的需求，应用于中药中有效成分的定性定量分析、中药及食品中农药及兽药残留的气质分析、药物代谢中的成分分析及定量、药物质量控制及违禁添加物、对香精香料香气成分分析等。







## 高内涵成像分析及MetaXpress软件模组简介

分子生物与药理实验室/吕春明

高内涵筛选 (High Content Screening, HCS) 及高内涵分析 (High Content Analysis, HCA) 是近年来药物研究领域的重大技术突破之一，是一种在保持细胞结构和功能完整的前提下以细胞为检测对象，通过显微成像方法对细胞内标记的信号进行采集并分析图像中的信息来诠释细胞内物质活动的技术。高内涵可同时检测被筛选样品对细胞形态、生长、分化、迁移、凋亡、代谢途径及信号转导等多个环节的影响，从单一实验中取得大量信息，从而发现药物的生物活性和潜在毒性，同时可进行药理机制研究。

将高内涵和传统的细胞生物学方法相结合，能够把结构、功能和生物活性等各方面的数据有机结合起来。高内涵药物筛选及药理研究已经成为药物创新开发领域中重要部分。高内涵筛选技术随着拍照系统和数据处理系统的不断完善，目前有宽场和共聚焦两种拍照系统，并不断地创新和更新中，而数据处理系统有功能强大的MetaXpress软件，目前还有人工智能处理软件IN Cata。高内涵可在保持细胞结构和功能完整的前提下，可高通量的获得大量细胞信息、候选样品的药理学活性及潜在毒性及其作用机制等方面的相关信息。在现代药理学药理毒理研发中，无论是药物初筛、靶点发现与明确、候选药物优化，还是在临床前安全性方法的研究都颇具优势<sup>[1]</sup>。高内涵的工作流程见图1。

MetaXpress高内涵图像采集和分析软件可在同一个界面中完成图像采集和数据分析的全部工作，并可进行活细胞成像。



图1 高内涵工作流程<sup>[2]</sup>

下面介绍一下MetaXpress软件的常用模组：

### 1 血管生成模块Angiogenesis

在单一波长下识别和测量管（细长物体）和节点（管之间的连接点），还可用于在细胞体不清晰或位于视野范围之外的情况下测量神经突生长。

### 2 细胞周期模块Cell Cycle Module

使用1-3个波长将细胞按细胞周期分为G0/G1期、S期、G2期、早期有丝分裂、晚期有丝分裂、凋亡。含：DNA染色、有丝分裂染色(如磷酸-组蛋白H3)、凋亡染色。

### 3 细胞评分模块Cell Scoring Module

细胞评分模块可用于分析2个波长成像的细胞。其中W1为所有细胞核的染色(例如DAPI、Hoechst或DRAQ5)，W2是细胞评分的目标染色，该模块将评分阳性或阴性细胞。

### 4 粒度模块Granularity Module

粒度模块可用于分析每个图像和每个细胞的颗粒（斑点）的数量和强度。该模块不需要核波长。需要使用核染色剂（例如 DAPI、Hoechst 或 DRAQ5）来确定每个细胞的颗粒数量。

### 5 微核模块Micronuclei Module

仅需要一种波长（核染色）。专有算法。根据细胞形态区分表型、细胞核数量、微核与细胞核的距离、微核与“气泡”或“芽”的比较。多个测量输出。

### 6 有丝分裂指数模块Mitotic Index Module

有丝分裂指数模块可用于分析细胞图像，以区分正常细胞周期中的有丝分裂细胞和间期细胞。该模块需要核波长和有丝分裂特异性染色波长。用于该模块的典型有丝分裂特异性染色剂是组蛋白H3 S10磷酸化。DNA染色剂标记所有细胞，有丝分裂细胞仅用有丝分裂特异性染色剂标记。

### 7 多波长细胞评分(MWCS)模块Multi Wavelength Cell Scoring (MWCS) Module

MWCS模块可用于分析1-7个波长的细胞成像。第一个波长应始终是所有细胞核的染色(例如，DAPI、Hoechst或DRAQ5)。只用1个波长可用于基本细胞计数。对于2个或更多个波长，它将为每个波长的细胞区分，并为其在每个波长分

配其评分的“概况”。

### 8 轴突模块 Neurite Outgrowth

识别和测量连接到细胞体的过程。可选择使用核染色来辅助细胞体识别。细胞体/突起可以是荧光图像或透射光图像。

### 9 迁移模块 Translocation

迁移模块可以用来测量从一个隔室到另一个隔室(例如, 细胞核到细胞质)的强度移动。但是, 目前仍有大量的技术难题有待解决, 如荧光蛋白灵敏度不高时如何处理, 多荧光如何避免串色, 高内涵作为药物筛的选通量有待增加。

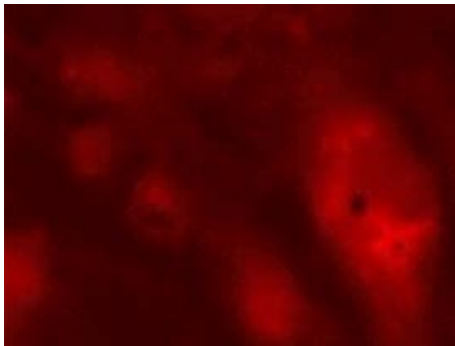
同时, 对活细胞的实验来说, 荧光标示物因其对细胞器和细胞质染色, 染料浓度如何选择可以保证毒性小不影响细胞活性同时又要满足拍照需求防止衰变。高内涵的技术需要在不断实践中完善。

#### 参考文献:

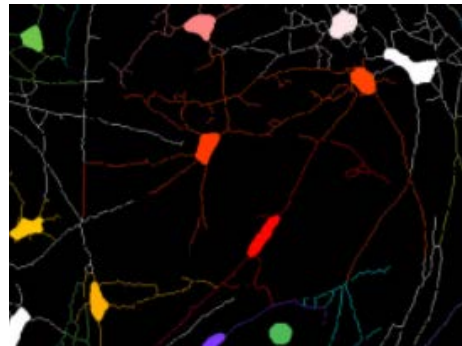
- [1]. Fraietta I, Gasparri F. The development of high-content screening (HCS) technology and its importance to drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov, 2016, 11(5): 501-14.
- [2]. [www.bio-equip.com/news.asp?id=453084713](http://www.bio-equip.com/news.asp?id=453084713).



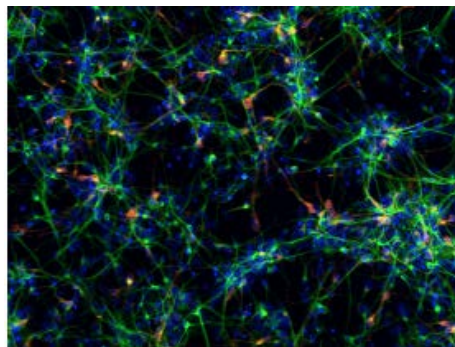
ImageXpress Micro 4 高内涵成像分析系统



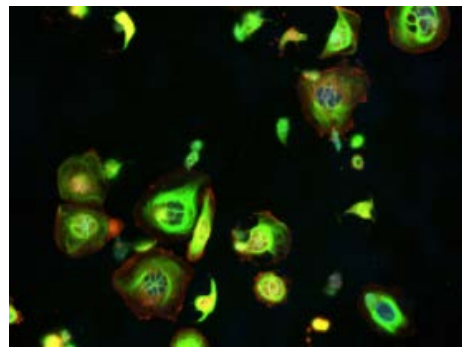
心肌细胞



神经细胞



干细胞



毒性筛选



## 小动物活体Micro-CT成像系统

医学实验动物室

小动物活体Micro-CT影像系统是实验动物中心主要大型仪器之一，应用领域涉及骨、肿瘤、心血管和肺部等疾病研究。Quantum GX2 Micro-CT成像系统模式灵活，兼容离体样本、小鼠、大鼠及兔子等多种样本，具备快速、低剂量的扫描模式，适合对活体动物进行长时程研究，能够对离体样本进行高分辨扫描。该仪器可在动物正常生理状态下以非侵入性的方式进行骨骼、肺和脂肪组织的结构成像，成为骨相关研究、心脑血管相关研究、呼吸系统相关研究、代谢疾病研究、癌症研究、移植研究等领域的利器。

传统的动物实验方法常常需要在多个时间点宰杀实验动物以获得数据。相比之下，小动物活体成像技术具有直接观测、可同时观测多个实验动物、对同一个研究个体可进行长时间反复跟踪成像又无需处死动物等优点，有非常广泛的应用场景。Quantum GX2 Micro-CT采用可从原始的全视野扫描图像中，对局部任意区域进行高分辨率重建。在进行全身扫描后，通过ROI 模式选定目标区域，并对该区域进行高分辨率图像重建。换言之，实验人员可以根据需求，选择不同的扫描视野，并对不同范围的区域进行多种分辨率的图像重建。



### 仪器基本信息及主要参数：

仪器基本信息：

仪器名称：小动物活体Micro-CT影像系统

型号：Quantum GX2

生产厂家：珀金埃尔默企业管理(上海)有限

公司

放置位置：实验动物中心

管理员：朱娴丹、黄辉老师

联系方式：51322609

### 主要技术参数

- 分辨率：1-100 $\mu$ m
- 最快成像速度：3.9s
- 可选视野（FVOs）：18,36,72和86mm
- 成像物种：斑马鱼/小鼠/大鼠/豚鼠/兔
- 成像模式：23种
- 最低辐射剂量：5mGy

### 应用实例

#### 1 小鼠肺部纤维化成像

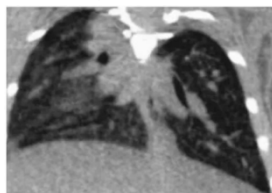


图1. 正常肺

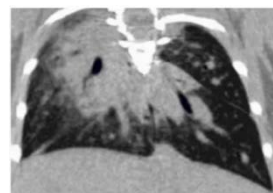


图2. 纤维化肺

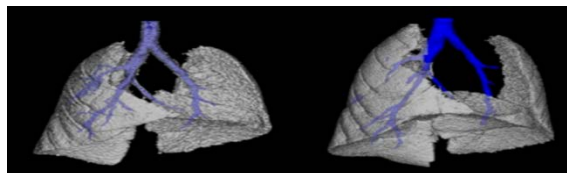


图3. 小鼠肺部纤维化后，密度增大，3D成像后可见肺部缺损严重

#### 2 大鼠足部骨关节成像

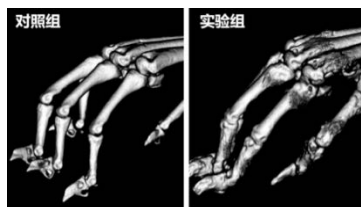


图4. Micro-CT分别对正常大鼠（对照组）足关节成像，和关节炎大鼠（实验组）足关节成像图像

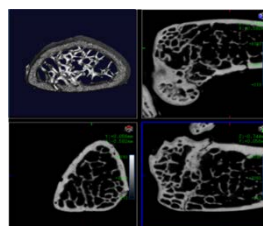


图5. 小鼠股骨3D成像截取图及股骨三视图



## 4 小鼠头部血管造影成像

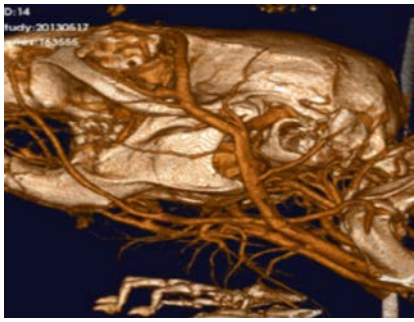


图6.小鼠通过尾静脉注射临床前造影剂后，小鼠头部血管成像图像

## 5 小鼠全身脂肪成像

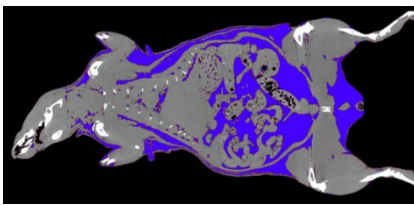


图7. Micro-CT根据小鼠不同组织密度差异进行组织成像，上图蓝色为小鼠皮下脂肪以及内脏脂肪成像图像

## 6 卵巢摘除 (OVX) 致大鼠骨质疏松模型

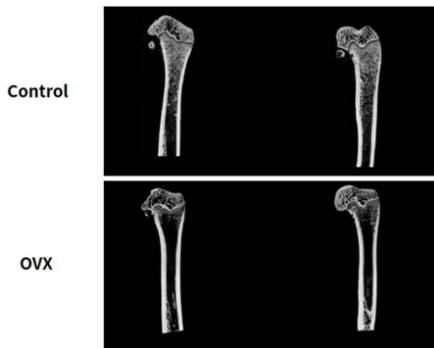


图8. 雌性SD大鼠卵巢切除10周后，股骨离体扫描显示：OVX组骨小梁明显减少

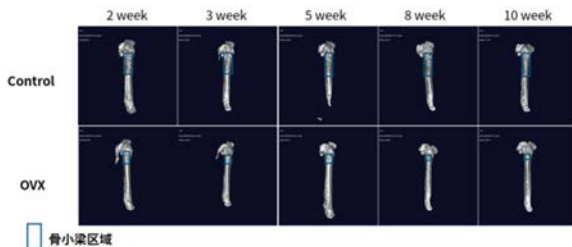


图9. 雌性SD大鼠卵巢切除后分别2/3/5/8/10周后，通过大鼠股骨活体扫描显示：随术后时间的增加，OVX组股骨骨小梁区域逐步缩小

## 7 高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型 (DIO)

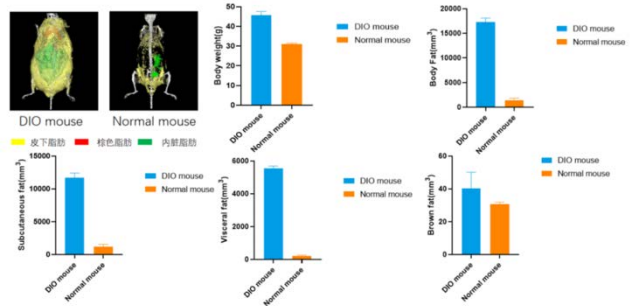


图10. 对比Normal小鼠，DIO小鼠总体脂肪、皮下脂肪、内脏脂肪以及棕色脂肪含量均更高

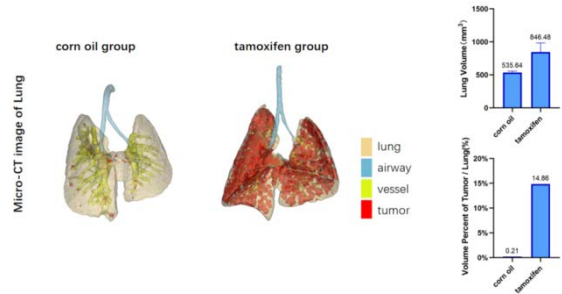


图11. 玉米油/他莫昔芬注射诱导Scgbl1-CreERT2/Kras(G12D) 小鼠5个月后，通过CT检测显示他莫昔芬注射组小鼠肺体积增加、肿瘤区域也明显扩大

## 8 肺癌模型

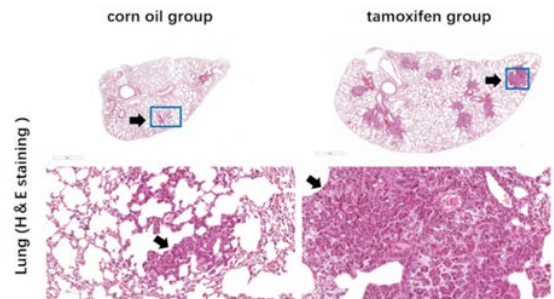


图12. 小鼠肺脏组织进行HE检测后显示：他莫昔芬注射组小鼠肺脏形成肿瘤，并且病理上表现为腺癌（箭头所示）

### 参考文献

- Li L, Hu G, Xie R, et al. Salubrinal-mediated activation of eIF2 $\alpha$  signaling improves oxidative stress-induced BMSCs senescence and senile osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;610:70-76.
- Halm S, Haberthür D, Eppler E, Djonov V, Arnold A. Micro-CT imaging of Thiel-embalmed and iodine-stained human temporal bone for 3D modeling. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2021;50(1):33. Published 2021 Jun 2.
- Fan Z, Ross RP, Stanton C, et al. *Lactobacillus casei* CCFM1074 Alleviates Collagen-Induced Arthritis in Rats via Balancing Treg/Th17 and Modulating the Metabolites and Gut Microbiota. *Front Immunol.* 2021;12:680073.
- Dudak J, Zemlicka J, Karch J, et al. High-contrast X-ray micro-radiography and micro-CT of ex-vivo soft tissue murine organs utilizing ethanol fixation and large area photon-counting detector. *Sci Rep.* 2016;6:30385.

(以上内容源于网络)



# 知识问答

## 蜂巢

2023/9



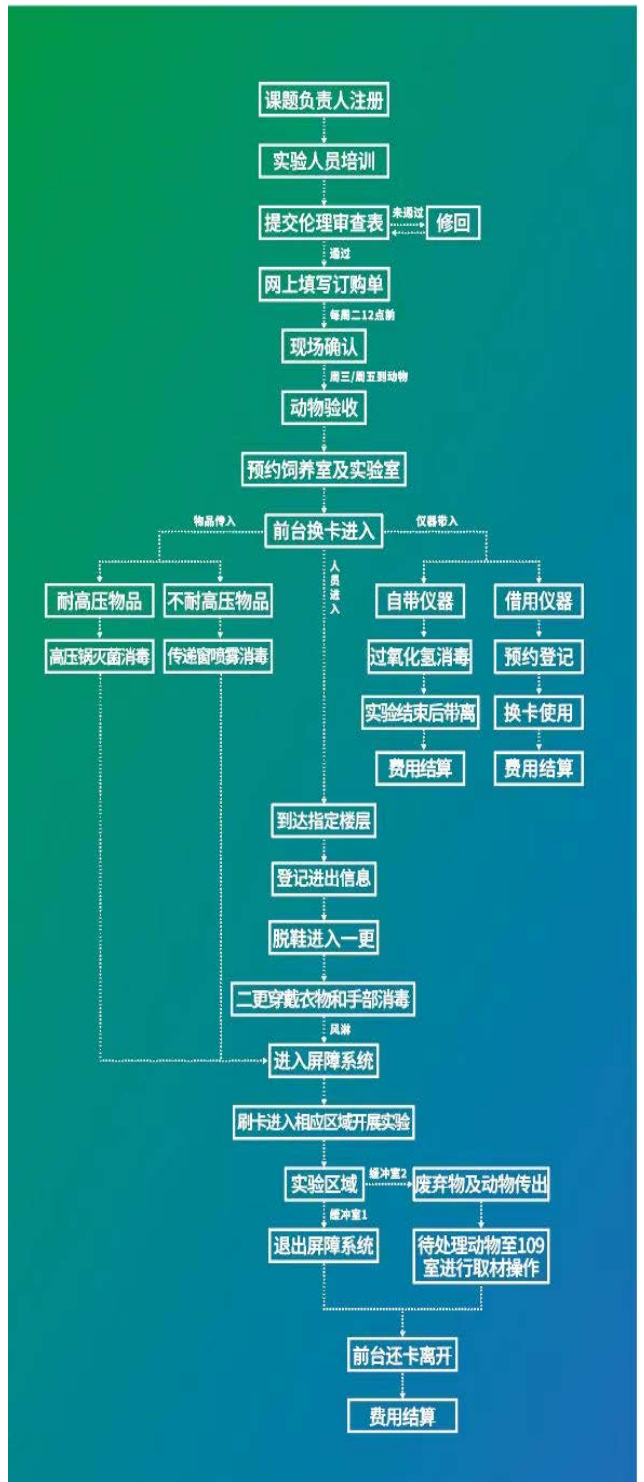
## 动物伦理申请与审核内容知多少

医学实验动物室/吴文斌

- 问：如果我们想开展一些课题的研究作为前期的工作基础，这样课题的经费来源和课题编号如何写？
- 答：这种情况课题编号可以写“zichou”
- 问：填写内容里需要填写培训卡编号，是否必须参加培训获得培训卡后方可申请伦理？
- 答：是的，我们开展动物实验的顺序就是先参加培训，通过培训考试拿到培训卡后再申请伦理审查，待审核批复通过后方可订购动物。
- 问：申请伦理时，有“是否在本中心饲养”，如果不在上中医动物中心饲养怎么填写？
- 答：只有极个别特殊的情况下我们才允许不在动物中心饲养，比如乳鼠、新生鼠等提取细胞这种情况。其他情况必须在动物中心饲养，如果不在动物中心饲养，起不到伦理监管的作用。否则在那里做实验就在相应的地方申请伦理。
- 问：实验的目的和必要性一定要写的很详细么？
- 答：是的，这个需要写详细，申请动物实验伦理不是简单的写一下动物的数目，描述一下实验方案就可以，动物实验需要多方面的评判，对于有些意义不大，简单重复的实验，伦理委员会经过商议审核有权拒绝。
- 问：关于伦理审查中动物的种类和数量的原因有什么需要注意的事项？
- 答：要注意以下几个方面：1. 动物的种类和品系要写清楚。2. 动物的数目和具体分组要写清楚，并且要把具体的组别名称写出来。例如选用60只c57小鼠分成6个组别，每组10只。分别是空白对照组，模型组，阳性对照组，中药复方甘草汤低剂量，中剂量，高剂量组。这里特别需要注意的是每个组别的名称都需要写明确。不能只写中药低中高剂量组。同时如果是有英文缩写的地方也需要备注英文全称或者是中文名称。3. 订购动物的数目要和订购栏（动物数量）相统一，请勿在订购栏写40只雄性，但是在具体使用原因处又写分5组，每组10只。这样数目不一致也会被驳回。
- 问：对于实验中要重复做几次的问题如何看待？
- 答：对于重复性原则的概念要明确，首先实验中本身设有6只以上的动物数目就是组内的重复。同样重复性还是在相同的实验条件下，其他人员也可以重复出相类似的结果或者趋势，而不是简单的把实验做3次。建议按照一次实验的数目来申请，如果实验最后出现意外等不可控因素，可以跟伦理委员会说明情况后重新申请。
- 问：造模方法需要写详细么？
- 答：是的，需要把实验步骤写详细，不仅方便伦理委员会审核专家审核判断实验过程中有无违反伦理的事件发生，也能帮助实验人员完善一些需要注意的伦理细节，同时也可以判断申请人员对实验内容掌握的熟悉程度。
- 问：在给药方式的内容上有什么需要注意的问题么？
- 答：需要把给药的方式写出来，并且写明给药的剂量，体积和给药的频次。
- 问：关于麻醉和镇痛有明确的规定么？
- 答：目前国家标准中已经明确规定“水合氯醛和乌拉坦”是禁止使用的麻醉剂。目前比较推荐的是“舒泰50和塞拉嗪”的联合使用，或者是气体麻醉“异氟烷”的使用。丙泊酚也可以使用，但是丙泊酚维持时间较短只有20-30分钟左右，一般也不常用。镇痛剂推荐“利多卡因和美洛昔康”联用，对于多数的手术都有良好的止痛效果。如果可以买到阿片类的镇痛药（例如丁丙诺菲，曲马多等）和上述的两个药三联使用，镇痛效果更佳。可以阻断疼痛在传导通路中的转导，传递，调节和感知度从而产生最佳的镇痛作用。需要注意的是只要涉及到手术操作都必须使用镇痛药。

- 问：仁慈终点往往不知道要写哪些内容？
- 答：首先要明确什么是实验终点什么是仁慈终点。实验终点是按照实验方案顺利完成实验后取材获得实验数据。而仁慈终点要对自己的实验有清醒的认知，预估实验操作中可能对实验动物造成何种伤害，并且此伤害不可逆转，严重影响了实验动物的生活状态，必须采用安乐死的方式来中止实验。可以参考国标内容给出的参考意见并根据自身的实验内容来做出最合理的预判。
- 问：动物处死的方式使用物理方式是否可以？
- 答：单纯的使用物理方式已经是禁止的，并且除了小鼠在麻醉状态下可以配合物理方式（脱颈椎）以外，其余实验动物均不能使用脱颈椎的方式结束动物的生命。
- 问：实验中关于有毒有害物质的判断标准是什么？
- 答：首先涉及到病毒细菌等实验，只要是生物安全级别在II级以上的物质就不能在正压实验室内操作，必须去生物级别在II级以上的负压实验室进行。同时使用的试剂等要区分哪些是有毒有害的物质，可以看外包装上的标识或者试剂的介绍，在使用的过程中要写清楚使用注意事项和防护措施，以免造成生物安全隐患。
- 问：我们做的实验实验方法或者实验的药品等需要保密，能不能只写代码等？
- 答：伦理审核的内容只要申请者写了需要保密，我们都有义务保证不泄露，所以申请者完全可以放心。申请的内容都需要真实明确，所以还是需要写明确。
- 问：如果申请内容被驳回了，修改后多久会再次审核？
- 答：一般的审核周期是两周，如果再次修回，在保留审核意见的情况下，一般会在3天内给出批复（修回的伦理请告知）。
- 对于一些非常规的实验方案建议附上参考文献，并且把相关的实验步骤节选在备注栏内。

附：动物实验流程图







## 洗眼器的使用方法

科技实验中心

当化学品物质或者有毒有害物质喷溅到工作人员服装或者身体上的时候，应该立即使用洗眼器的喷淋系统进行冲洗，可有效防止进一步的损伤。

洗眼器的使用方法如下：

- 1、打开进水控制阀。
- 2、打开防尘盖。
- 3、按顺时针方向轻推洗眼开关推板（如果配备洗眼器踏板，可以踩下踏板）。
- 4、开关打开之后，洗眼阀门开启，双眼上前即可冲眼。
- 5、使用完毕后，关闭顺序如下：
  - 关闭进水控制阀（如果工作区一直有人，进水控制阀建议一直开启，如果没人工作，建议关闭，尤其是冬季等）。
  - 等待15秒以上，然后逆时针方向推回推板，洗眼阀门关闭（等待15秒以上是让洗眼器管道内的积水排尽）。
  - 将防尘盖复位。



壁挂式洗眼器

壁挂式洗眼器只有洗眼系统，安装在工作现场的墙壁上使用



复合式洗眼器

复合式洗眼器同时具备喷淋系统和洗眼系统，直接安装在地面上。

当被有害化学物质喷溅到作业者服装或者身体上的时，使用复合式洗眼器的喷淋系统进行至少多于15分钟的冲洗；

当有害化学物质喷溅到现场作业者眼部、面部、脖子或者手臂等部位时，可以使用复合式洗眼器的洗眼系统进行冲洗，冲洗时间至少15分钟。

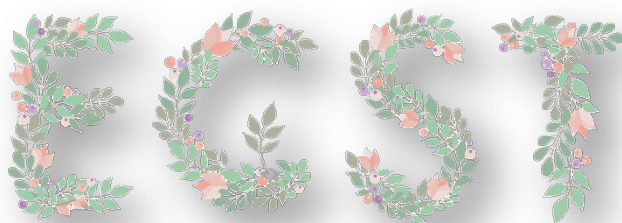
服务优质  
共享开放  
管理先进  
运行高效





## 工匠精神

精益求精 追求卓越  
传承弘扬 专心专注



## 服务理念

团结敬业 协作奉献  
奋进探索 求实创新





声明：《蜂巢》为内部学术参考资料汇编，每月汇编一期，由上海中医药大学科技实验中心编写并仅在上海中医药大学系统内部科研人员中推送、传播，仅供内部科研人员参考使用，不得用于商业宣传。  
欢迎投稿。



**《蜂巢》编辑工作组：**  
主编：王宇  
主审：可燕  
编委：任艳、陆雄、杨以阜、杨扬、张超超  
编辑排版：周莉、张文超  
组稿：刘聪颖  
宣传：张文超

仪器预约网址：<https://kjsyzx.shutcm.edu.cn>  
投稿邮箱：[kjsyzx\\_shutcm@163.com](mailto:kjsyzx_shutcm@163.com)  
地址：蔡伦路1200号，上海中医药大学创新楼6楼  
邮编：201203  
电话：021-51322387