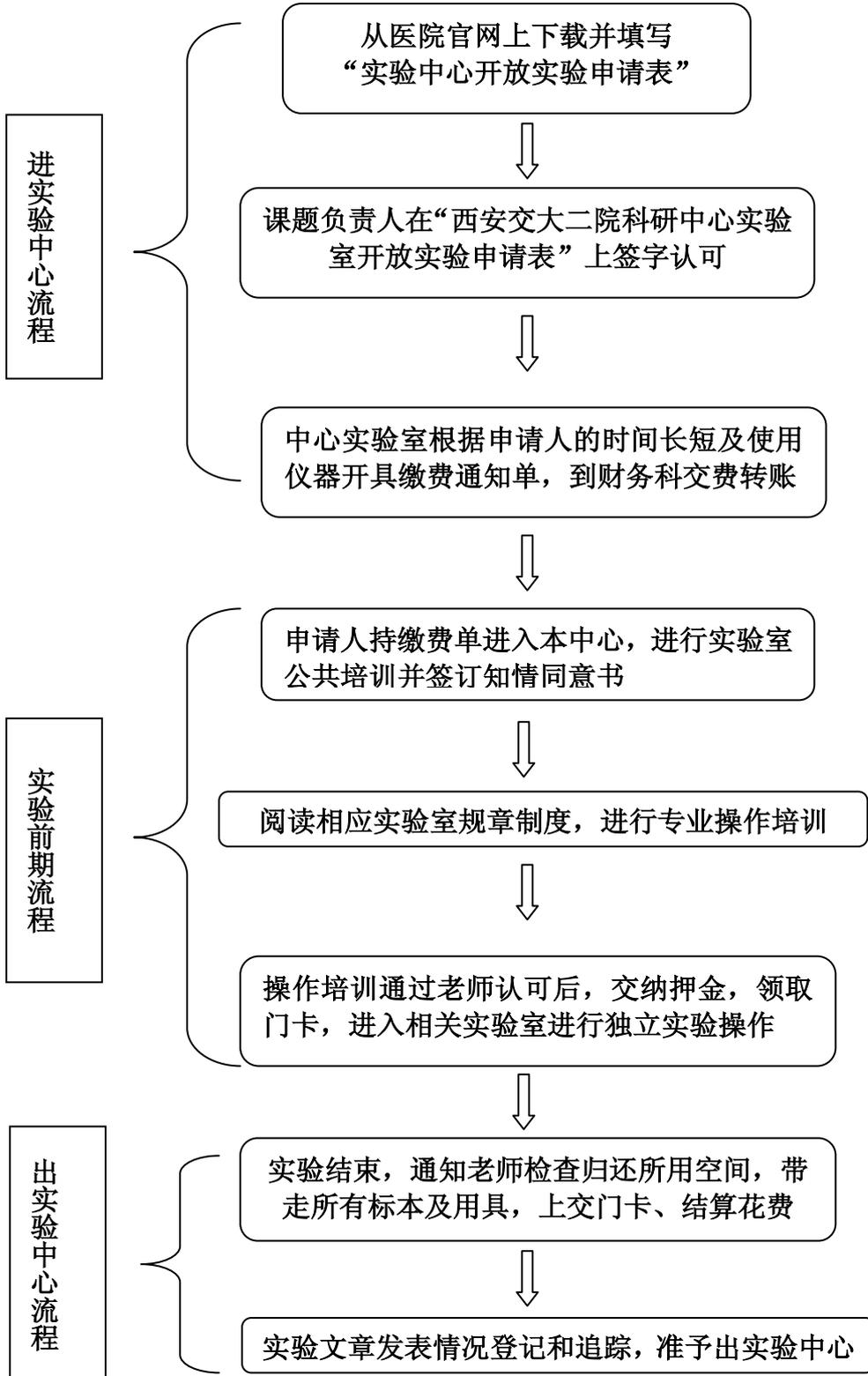


# 第一章 实验室管理

## 一、 实验人员进入科研中心实验室流程图



编写人：袁国莲

## 二、实验室安全管理条例

### 总 则

为确保实验人员的人身安全和实验室仪器设备的正常运转,以及整个实验室的财产安全,防止安全事故发生,特制定本条例,请大家自觉遵守。

**第一条** 加强安全保卫工作,禁止闲杂人员进入工作区和实验区。建立每日巡查、记录、报告制度,做好防火、防水、防盗工作,消除安全隐患。实验人员未经培训不得进行实验,未经许可不得私带他人进入实验区。

**第二条** 实验人员未经专业培训不得擅自使用任何仪器;培训后经主管老师同意方可独立操作仪器,操作时应严格按规章执行,防止不当操作造成仪器损坏或人身伤害;使用特殊仪器需提前预约,专人指导,专人操作。

### **第三条 防水安全细则:**

1. 值班人员务必在每天下班前检查各室水管是否关好。
2. 预先知道断水时,应将纯水机设置为“standby”状态,关闭制冰机。
3. 办公区如漏雨时,首先要告知医院总值班和电工房(87678222),及时断电,特别是重点部位要全部断电;然后挪开贵重物品如电脑等,锁好实验区,及时报告主任。
4. 水管爆裂时要先关掉水管总阀门,打开地漏,及时通知水工班 87679527,报告主任。

### **第四条 用电安全细则:**

1. 实验设备在带电情况下严禁搬动、移动或震动,以防损坏机器。
2. 实验室设备、电源一旦发生故障,应立即关电停机,严禁带故障运行;不能用湿手接触电器,防止漏电。
3. 严格超负荷运转仪器设备,杜绝使用电磁炉、电热器等大功率电器。
4. 出现触电事故,应先切断电源,可用绝缘物挑开电线,就地施救,若触电者出现休克现象,要立刻进行人工呼吸,并请医生治疗。
5. 蒸汽灭菌器、高压锅必须专管专用,专人定时按规程操作严格执行。

### **第五条 防火安全细则:**

1. 工作人员做到四知:知报警电话,知重点部位,知消防器材位置,知消防器材使用方法,

并掌握一定的灭火技能，在日常工作中能及时有效地扑救初级火灾。

2. 实验室严禁明火燃烧，慎用酒精灯；消防器材摆放在明显固定位置，定期检查，严禁随意移动位置，挪作他用。
3. 工作人员应保管好酒精等易燃易爆品，存放有机溶剂的地方切记杜绝明火，下班后及时关闭烤箱，防患于未然。
4. 一旦发生火灾，一定要迅速而冷静地切断火源和电源，并尽快采取有效的灭火措施，如系酒精、二甲苯、乙醚等起火，切忌用水，应迅速用沾水的布类和沙土覆盖或灭火器扑火；若为大火应迅速拨打火警电话“119”，同时报告医院总值班（87679234）、科主任、保卫科，并组织师生从安全通道撤离。疏散学生后，工作人员方可离开。
5. 保持实验环境整洁，走道畅通，设备器材摆放整齐。开启冰箱、烘箱取放物品后应随手关严，严禁将炙热物品直接放入冰箱。仪器使用完毕后关机、拔出插头，将仪器各部旋钮恢复到原位。仔细检查实验室内水、空调、电源、门窗，无疏漏后方可离开。

#### **第六条 化学试剂安全细则：**

1. 实验室使用的化学药品及试剂已做好相应标识并按规定条件存储放置，专人专管，严禁随意取用。
2. 实验人员使用相关化学药品及试剂前，应先仔细阅读说明书及注意事项，并在指定位置进行实验，试验后废液应集中收集并做统一处理，禁止随意倾倒。
3. 浓酸、烧碱具有强烈的腐蚀性，切勿溅到皮肤和衣服上。清洗室酸缸使用时做好防护。使用浓硝酸、盐酸、硫酸、高氯酸、氨水等有毒有害试剂时，均应在通风橱内操作。
4. 使用氯仿、乙醚、二甲苯、丙酮等有机溶剂时，必须在通风橱内进行，同时要远离火焰、热源，使用完毕将试剂瓶塞严，放在冷暗处保存；低沸点的有机溶剂应在水浴锅内加热。
5. 剧毒试剂专人专管，定期检查备案。使用剧毒、强致癌等试剂时，严格按照操作规范进行。相应器皿、器具按实验室要求统一放置、处理。禁止随意在实验室内扩散。

#### **第七条 废弃物处理细则：**

实验室废弃物（废气、废液、废渣）、实验动物尸体及器官等处理原则：

1. 专人负责实验废弃物的登记、收集和处理，应配套污物收集桶，任何人不得将实验废物私自带出实验室。
2. 有废气、毒气产生的实验必须在通风橱中操作，不得随意扩散有害气体，操作结束后及时清理操作台。
3. 实验中产生的有害废液，严禁直接倒入下水道。二甲苯统一回收。含血液、病毒、细菌的废液集中收集，每天下午由专人高压灭菌后放入指定位置集中销毁；废液容器应随时盖紧，放于实验室较阴凉并远离火源和热源的指定位置，统一处理。
4. 废渣按医疗垃圾处理倒入医用垃圾桶。用过的注射器应针、柄分离，枪头、针头盖好后放入专用利器盒，注射器倒入医用垃圾桶。
5. 实验人员解剖动物尸体及标本等废弃物应当天立即送医疗区指定地点进行集中焚烧。

#### **第八条 病原微生物管理细则：**

1. 实验室只允许进行第三类病原微生物（指一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害，传播风险有限，实验室感染后很少引起严重疾病的微生物）和第四类病原微生物（指通常情况下不会引起人类或者动物疾病）的研究，绝对不允许进行第一二类病原微生物的研究。
2. 实验前应配戴用于微生物实验的个人防护装备，包括防护服、防护帽、口罩、手套等。  
病原微生物的分离、鉴定、保存及处理均应按照微生物的标准操作程序和技术规范进行操作。
3. 微生物实验样本类型，微生物名称，感染动物、材料的处理及特殊事件的发生都应进行相应的记录。
4. 病原微生物菌（毒）种的保存及使用应在规定的位置，若发生污染等情况，应采用适当的消毒剂进行消毒处理。
5. 所有的微生物实验废弃物，必须通过物理高压灭菌或进行化学消毒处理，废弃物应严格按“三废处理规章制度”执行。

#### **第九条 发生意外事故的应急处理**

1. 皮肤破伤：包括皮肤的破损、针刺和切割伤，应尽可能挤出损伤处的血液，除尽异物，用肥皂和清水冲洗伤口或沾污的皮肤；如果粘膜破损，应用生理

盐水(或清水)反复冲洗。伤口应用消毒液(如 70%酒精、0.2%次氯酸钠、0.2%~0.5%过氧乙酸、0.5%碘伏等)浸泡或涂抹消毒，并包扎伤口。

2. 烧伤：涂以獾油等烧伤治疗剂。
3. 化学药品腐蚀伤：若为强酸，先用大量清水冲洗，再以 5%碳酸氢钠或 5%氢氧化铵溶液中和之；强碱腐蚀则先以大量清水冲洗后，再以 5%醋酸或 5%硼酸洗涤中和。
4. 眼睛溅入液体：立即用生理盐水连续冲洗至少 10 分钟。必须迅速。避免揉擦眼睛。
5. 吸入病原菌菌液：应立即吐入容器内消毒，并用 1：1000 高锰酸钾溶液漱口；可根据菌种不同，服用抗菌药物予以预防。
6. 菌液流洒桌面，应倾倒适量 84 消毒液或 0.1%新洁尔灭于污染面，让其浸泡半小时后抹去；若手上沾有活菌，亦应浸泡于上述消毒液 10 分钟后，再以肥皂及水洗刷。
7. 被溅的地面用经消毒剂浸泡的吸水物质覆盖，消毒剂起作用 10~15min 后，用消毒剂冲洗清理该地方，并以可行的方法移走吸水性物质。
8. 意外事故均应登记记录在科室“意外事故记录本”上。

**实验室预备的应急药品：**碘酒、酒精、高锰酸钾、无菌生理盐水、灭菌纱布、灭菌棉签、绷带、胶布。84 消毒液、新洁尔灭、过氧乙酸等消毒液。

**编写人：黄娜、李君、王娜、武坤毅**

实验人员严格遵守实验室相关规定，如有违反，经劝诫、警告无效情况下，直接通知导师暂停其实验。

科研中心实验室

2014-1-1

# 第二章 细胞培养技术

## 一、原代培养:

- 1、 **概念:** 将动物机体的各种组织从机体中取出, 经各种酶(常用胰蛋白酶)、螯合剂(常用 EDTA)或机械方法处理, 分散成单细胞, 置合适的培养基中培养, 使细胞得以生存、生长和繁殖, 这一过程称原代培养。
- 2、 **培养方法:** 最常用的原代培养有组织块培养和分散细胞培养。

组织块培养是将剪碎的组织块直接移植在培养瓶壁上, 加入培养基后进行培养。

分散细胞培养则是将组织块用机械法或化学法使细胞分散。如欲从胎儿或新生儿的组织分离到活性最好的游离细胞, 经典的方法是用蛋白水解酶(如 胰蛋白酶和胶原酶)消化细胞间的结合物, 或用金属离子螯合剂(如 EDTA)除去细胞互相粘着所依赖的  $Ca^{2+}$ , 再经机械轻度振荡, 使之成为单细胞。

## 二、传代培养:

- 1、 **概念:** 当原代培养成功以后, 随着培养时间的延长和细胞不断分裂, 一则细胞之间相互接触而发生接触性抑制, 生长速度减慢甚至停止; 另一方面也会因营养物不足和代谢物积累而不利于生长或发生中毒。此时就需要将培养物分割成小的部分, 重新接种到另外的培养器皿(瓶)内, 再进行培养。这个过程就称为传代 (passage) 或者再培养 (subculture)。对单层培养而言, 80% 汇合或刚汇合的细胞是较理想的传代阶段。

### 2、 传代方法:

#### (1) 悬浮生长细胞传代

离心法传代: 离心(1000 转/分)去上清, 沉淀物加新培养液后再混匀传代。

#### (2) 半悬浮生长细胞传代 (Hela 细胞)

此类细胞部分呈现贴壁生长现象, 但贴壁不牢, 可用直接吹打法使细胞从瓶壁脱落下来, 进行传代。

#### (3) 贴壁生长细胞传代

采用酶消化法传代, 常用的消化液有 0.25% 的胰蛋白酶液。

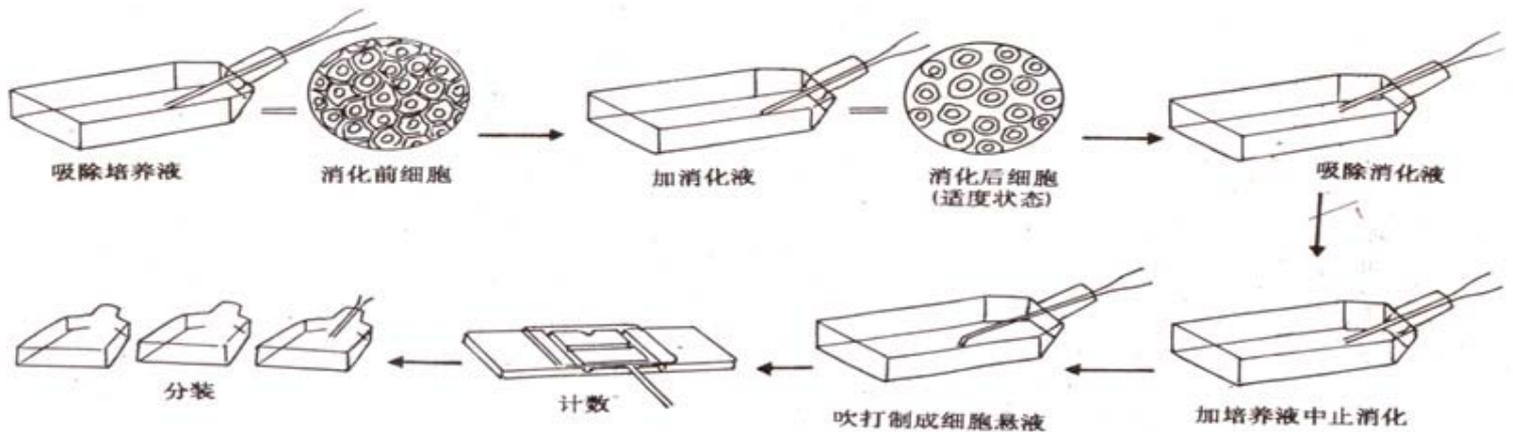


图 消化法传代培养步骤

### 三、冻存与复苏:

#### 1、原则：慢冻快融

当细胞冷到零度以下，可以产生以下变化：细胞器脱水，细胞中可溶性物质浓度升高，并在细胞内形成冰晶。

如果缓慢冷冻，可使细胞逐步脱水，细胞内不致产生大的冰晶；相反，结晶就大，大结晶会造成细胞膜、细胞器的损伤和破裂。复苏过程应快融，目的是防止小冰晶形成大冰晶，即冰晶的重结晶。

#### 2、低温保护剂的作用：在细胞冻存时加入低温保护剂，能大大提高冻存效果。

常用的低温保护剂是 DMSO，它是一种渗透性保护剂，可迅速透入细胞，提高胞膜对水的通透性，降低冰点，延缓冻结过程，能使细胞内水分在冻结前透出细胞外，在胞外形成冰晶，减少胞内冰晶，从而减少冰晶对细胞的损伤。

#### 3、传统冻存程序：冷冻管置于 4℃ 10 分钟 → -20℃ 30 分钟 → -80℃ 16~18 小时（或隔夜） → 液氮槽长期储存。

#### 4、细胞复苏方法：

冻存细胞从液氮中取出后，立即放入 37℃ 水浴中，轻轻摇动冷冻管，使其在 1 分钟内全部融化（不要超过 3 分钟）。解冻后的细胞加入到离心管中，离心 800 转×3 分钟，以去除 DMSO，然后接种到含完全培养液的细胞培养瓶中进行培养，24 小时后再用新鲜完全培养液替换旧培养液。

### 四、细胞计数:

1、实验原理：当待测细胞悬液中细胞均匀分布时，通过测定一定体积悬液中的细胞的数目，即可换算出每毫升细胞悬液中细胞的细胞数目。

## 2、具体操作：

- (1) 将计数板及盖片擦拭干净，并将盖片盖在计数板上。
- (2) 将细胞悬液吸出少许，滴加在盖片边缘，使悬液充满盖片和计数板之间，静置 3min，注意盖片下不要有气泡，也不能让悬液流入旁边槽中。
- (3) 计算板四大格细胞总数，压线细胞只计左侧和上方的。然后按公式计算：

$$\text{细胞数/mL} = \text{四大格细胞总数} / 4 \times 10^4$$

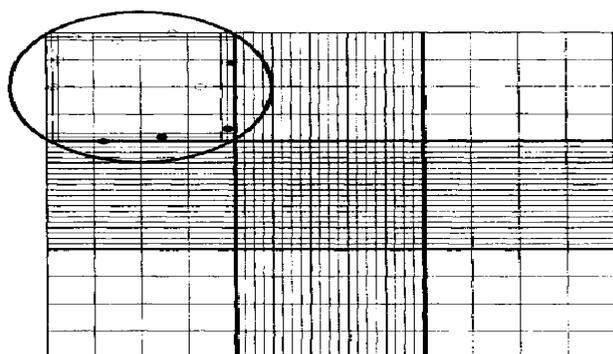
注：□ 公式中乘以  $10^4$  因为计数板

中每一个大格的体积为：

$$1.0\text{mm (长)} \times 1.0\text{mm (宽)} \times 0.1\text{mm}$$

$$\text{(高)} = 0.1\text{mm}^3 \text{ 而 } 1\text{ml} = 1000\text{mm}^3$$

- 镜下偶见有两个以上细胞组成的细胞团，应按单个细胞计算，若细胞团 10% 以上，说明分散不好，需重新制备细胞悬液)



## 五、细胞活力的检测：

### 1、台盼蓝染色法

- (1) 原理：正常的活细胞，胞膜结构完整，能够排斥台盼蓝，使之不能够进入胞内；而丧失活性或细胞膜不完整的细胞，胞膜的通透性增加，可被台盼蓝染成蓝色。通常认为细胞膜完整性丧失，即可认为细胞已经死亡。因此，借助台盼蓝染色可以非常简便、快速地区分活细胞和死细胞。台盼蓝是组织和细胞培养中最常用的死细胞鉴定染色方法之一。注意凋亡小体也有台盼蓝拒染现象。台盼蓝染色后，通过显微镜下直接计数就可以对细胞存活率进行比较精确的定量。台盼蓝染色只需 3-5 分钟即可完成，并且操作非常简单。

- (2) 步骤：

- 4%台盼蓝母液：称取 4g 台盼蓝，加少量蒸馏水研磨，加双蒸水至 100ml，用滤纸过滤，4℃ 保存。使用时用 PBS 稀释至 0.4%。
- 染色：细胞悬液与 0.4%台盼蓝溶液以 9:1 混合混匀。（终浓度 0.04%）
- 镜下观察，死细胞被染成明显的蓝色，而活细胞拒染呈无色透明状。
- 计数：在三分钟内，分别计数活细胞和死细胞。
- 统计细胞活力：活细胞率(%) = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) × 100%

## 2、MTT 比色法：

- (1) 原理：MTT 法又称 MTT 比色法，其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。二甲基亚砜（DMSO）能溶解细胞中的结晶，用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。
- (2) MTT 的配制：称取 MTT 0.5 克，溶于 100 ml 的磷酸缓冲液（PBS）中，用 0.22μm 滤膜过滤除菌，放 4℃ 避光保存即可。在配制和保存的过程中，容器最好用铝箔纸包住。
- (3) 步骤：
  - 单细胞悬液接种于 96 孔培养板：1×10<sup>5</sup> 细胞/孔，每孔培养基总量 200 μl，37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养一段时间（根据实验目的决定培养时间）。
  - 每孔加入 20 ul MTT 溶液（5 mg/ml，即 0.5%MTT），继续培养 4 h。
  - 吸去孔内培养液，对于悬浮细胞需要离心后再吸弃孔内培养上清液，加入 DMSO 150 ul/孔，振荡 2-5 分钟，使结晶物充分溶解。
  - 在酶联免疫检测仪 OD490nm 处测量各孔的吸光值。记录结果，以时间为横坐标，吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

编写人：黄娜、李宝华、闵晓云、马宁

# 第三章 PCR（聚合酶链式反应）技术

## 一、基本原理

1、**概念：**PCR 类似于 DNA 的天然复制过程，其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。由变性--退火--延伸三个基本反应步骤构成：

□ **模板 DNA 的变性：**模板 DNA 经加热至 94℃ 左右一定时间后，使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应作准备；

□ **模板 DNA 与引物的退火(复性)：**模板 DNA 经加热变性成单链后，温度降至 55℃ 左右，引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合；

□ **引物的延伸：**DNA 模板--引物结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下，以 dNTP 为反应原料，靶序列为模板，按碱基配对与半保留复制原理，合成一条新的与模板一样的双链。

2、**PCR 的反应动力学：**PCR 的三个反应步骤反复进行，使 DNA 扩增量呈指数上升。反应最终的 DNA 扩增量可用  $Y=(1+X)^n$  计算。

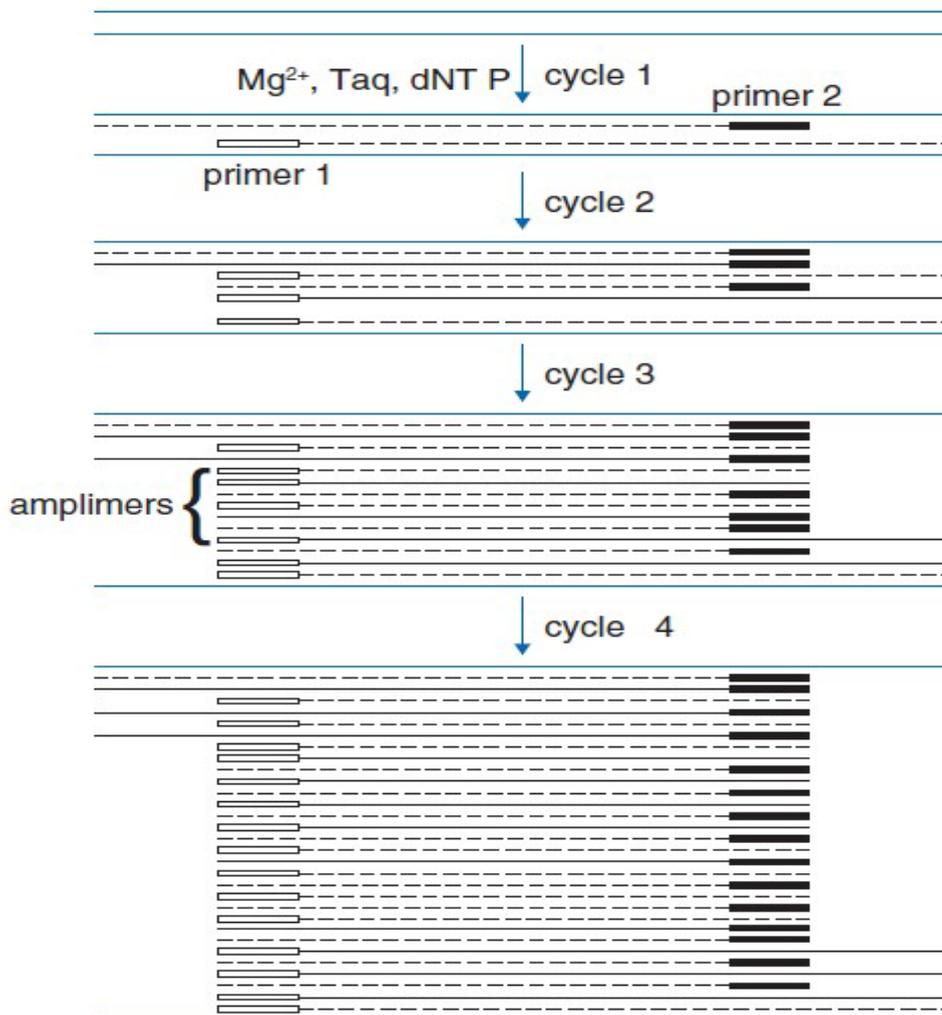
Y 代表 DNA 片段扩增后的拷贝数

X 表示平均每次的扩增效率

n 代表循环次数。

平均扩增效率的理论值为 100%，但在实际反应中平均效率达不到理论值。反应初期，靶序列 DNA 片段的增加呈指数形式，随着 PCR 产物的逐渐积累，被扩增的 DNA 片段不再呈指数增加，而进入线性增长期或静止期，即出现“停滞效应”，这种效应称平台期。受到 PCR 扩增效率及 DNA 聚合酶、PCR 的种类和活性及非特异性产物的竞争等因素的影响，大多数情况下，平台期的到来是不可避免的。

DNA 链互补的半保留复制链重复循环变性--退火--延伸三过程，就可获得更多的“半保留复制链”，而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟，2~3 小时就能将目的基因扩增放大几百万倍。到达平台期(Plateau)所需循环次数取决于样品中模板的拷贝。



PCR 原理示意图

## 二、实验内容和步骤

- 1) 本实验选择的模板为从肿瘤细胞中提取的 mRNA，经逆转录形成 cDNA；
- 2) 按照所选试剂盒加入各组分，包括 Taq DNA 聚合酶、含  $Mg^{2+}$  的缓冲液、dNTP、上下引物、cDNA 模板、ddH<sub>2</sub>O，一般好的试剂盒将前 3 种做成 mix，很大程度上方便了操作者；
- 3) 进行 PCR 反应程序：

PCR 起始激活步骤：95°C 4min 1 个循环

{	变性： 94°C 45~60s	35~45 个循环
	退火： 55°C 1min	
	延伸： 72°C 1~2min	

注：各步骤的时间、循环数及退火温度需根据具体实验而定。

#### 4. 注意事项:

- 1) PCR 反应非常灵敏, 能使很微量的 DNA 分子得以扩增, 所以应当注意防止反应体系被痕量模板 DNA 污染。实验用的小离心管、移液枪头和缓冲液等都应在使用前经灭菌处理。必要时设置阳性对照, 即用少量已知的靶序列在同样条件进行 PCR, 和阴性对照, 即不含模板 DNA 的 PCR。
- 2) 单链、双链 DNA 以及通过反转录得到的 cDNA 均可作为 PCR 扩增的模板。DNA 模板要求不能混有蛋白酶、核酸酶、Taq DNA 聚合酶抑制剂等有害于 PCR 的物质。

### 三、琼脂糖凝胶电泳

#### 1、实验原理

电泳是分子生物学技术中分离生物大分子的重要手段。琼脂糖凝胶电泳由于其操作简单、快速、灵敏等优点, 已成为分离和鉴定核酸的常用方法。

在 pH 值为 8.0~8.3 时, 核酸分子碱基几乎不解离, 磷酸全部解离, 核酸分子带负电, 在电泳时向正极移动。采用适当浓度的凝胶介质作为电泳支持物, 在分子筛的作用下, 使分子大小和构象不同的核酸分子泳动率出现较大的差异, 从而达到分离核酸片段检测其大小的目的。核酸分子中嵌入荧光染料 (如 EB) 后, 在紫外灯下可观察到核酸片段所在的位置。

琼脂糖浓度与分辨 DNA 大小范围的关系

琼脂糖浓度 (W/V)	大小范围 (bp)
0.6%	1000 - 23000
0.8%	800 - 10000
1.0%	400 - 8000
1.2%	300 - 7000
1.5%	200 - 4000
2.0%	100 - 3000

#### 2、实验步骤

- 1) 制备 2% 的胶, 称取 1g 琼脂糖, 加入到 50ml 1× TAE 中, 在微波炉中加热使琼脂糖颗粒完全溶解, 冷却至 50-60°C, 加 2μl EB 溶液, 轻轻摇晃, 混匀;
- 2) 提前将梳子插好, 倒入凝胶槽;
- 3) 待凝胶成形后, 小心拔出梳子, 放入盛有电泳缓冲液的电泳槽中, 电泳缓冲

液液面高出凝胶 2~3mm;

- 4) 用移液枪取 8 $\mu$ l 待测 DNA 样品, 与上样缓冲液混合均匀, 小心地加入到凝胶上样孔中;
- 5) 打开电泳仪, 插好导线, 电压 85V, 电泳 50min。也可根据指示染料移动的位置, 确定电泳是否终止。
- 6) 电泳完成后切断电源, 取出凝胶, 置于紫外透射仪上观察电泳结果, 并照相记录。

### 3、注意事项

#### 1) 影响琼脂糖电泳的几个因素:

- (1) DNA 分子的大小: 线性 DNA 分子的迁移率与其分子量的对数值成反比。
- (2) 琼脂糖浓度: 一定大小的 DNA 片段在不同浓度的琼脂糖凝胶中的迁移率是不相同的。相反, 在一定浓度的琼脂糖凝胶中, 不同大小的 DNA 片段的迁移率也是不同的。若要有效地分离不同大小的 DNA, 应采用适当浓度的琼脂糖凝胶。
- (3) DNA 构象: 一般迁移速率超螺旋环状 DNA>线状 DNA>单链开环 DNA。当条件变化时, 情况会相反, 还与琼脂糖的浓度、电流强度、离子强度及 EB 含量有关。
- (4) 电流强度: 每厘米凝胶电压不超过 5V, 若电压过高分辨率会降低, 只有在低电压时, 线性 DNA 分子的电泳迁移率与所用电压成正比。
- (5) 嵌入染料的存在会降低线性 DNA 迁移率, 所以不提倡将嵌入染料加在电泳缓冲液中。
- (6) 电泳缓冲液的组成及其离子强度影响 DNA 的迁移率, 无离子存在时, 核酸基本不泳动, 离子强度过大产热厉害, 熔化凝胶并导致 DNA 变性, 一般采用 1 $\times$ TAE, 1 $\times$ TBE, 1 $\times$ TPE (均含 EDTA, pH8.3 左右)。

#### 2) 溴化乙锭 (EB) 为致癌剂, 操作时应戴手套, 尽量减少台面污染。

#### 3) 电泳指示剂: 核酸电泳常用的指示剂有两种, 溴酚蓝 (bromophenol blue, Bb) 呈蓝色; 二甲苯晴 (xylene cyanol, Xc) 呈蓝色。二甲苯晴携带的电荷量比溴酚蓝少, 在凝胶中的迁移率比溴酚蓝慢。

编写人: 张婷、李胜利、卫阳、魏琳琳

# 第四章 免疫组织化学技术

## 一、基本原理

1、**概念：**应用免疫学及组织化学原理，对组织切片或细胞标本中的某些化学成分进行原位的定性、定位或定量研究，这种技术称为免疫组织化学技术或免疫细胞化学技术。

免疫组化正是利用抗体与抗原之间的结合具有高度的特异性，再用某种酶（常用辣根过氧化物酶）或生物素等处理后再与前述抗原成分结合，将抗原放大，由于抗体与抗原结合后形成的免疫复合物是无色的，因此，还必须借助于组织化学方法将抗原抗体反应部位显示出来（常用显色剂 DAB 显示为棕黄色颗粒）。通过抗原抗体反应及呈色反应，显示细胞或组织中的化学成分，在显微镜下可清晰看见细胞内发生的抗原抗体反应产物，从而能在细胞或组织原位确定某些化学成分的分布、含量。

## 2、染色方法：

1) 按标记物质的种类，如荧光染料、放射性同位素、酶（主要有辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶）、铁蛋白、胶体金等，可分为免疫荧光法、放射免疫法、酶标法和免疫金银法等。

2) 按染色步骤可分为直接法（又称一步法）和间接法（二步、三步或多步法）；与直接法相比，间接法的灵敏度提高了许多。

3) 按结合方式可分为抗原—抗体结合，如过氧化物酶-抗过氧化物酶（PAP）法和亲和连接，如卵白素-生物素-过氧化物酶复合物（ABC）法、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结（SP）法等，其中 ABC 法和 SP 法是最常使用的方法。

## 3、几种常用免疫组织化学方法的原理

### 1) 免疫荧光方法

是最早建立的免疫组织化学技术。它利用抗原抗体特异性结合的原理，先将已知抗体标上荧光素，以此作为探针检查细胞或组织内的相应抗原，在荧光显微镜下观察。当抗原抗体复合物中的荧光素受激发光的照射后即会发出一定波长的荧光，从而可确定组织中某种抗原的定位，进而还可进行定量分析。由于免疫荧光技术特异性强、灵敏度高、快速简便，所以在临床病理诊断、检验中应用比较广。

### 2) 免疫酶标方法

免疫酶标方法是继免疫荧光后，于 60 年代发展起来的技术。基本原理是先以酶标记的抗体与组织或细胞作用，然后加入酶的底物，生成有色的不溶性产物或具有一定电子密度的颗粒，通过光镜或电镜，对细胞表面和细胞内的各种抗原成分进行定位研究。免疫酶标技术是目前最常用的技术。本方法与免疫荧光技术相比的主要优点是：定位准确，对比度好，染色标本可长期保存，适合于光、电镜研究等。

### 3) 免疫胶体金技术

免疫胶体金技术是以胶体金这样一种特殊的金属颗粒作为标记物。胶体金是指金的水溶胶，它能迅速而稳定地吸附蛋白，对蛋白的生物学活性则没有明显的影响。因此，用胶体金标记一抗、二抗或其他能特异性结合免疫球蛋白的分子(如葡萄球菌 A 蛋白)等作为探针，就能对组织或细胞内的抗原进行定性、定位，甚至定量研究。由于胶体金有不同大小的颗粒，且胶体金的电子密度高，所以免疫胶体金技术特别适合于免疫电镜的单标记或多标记定位研究。由于胶体金本身呈淡至深红色，因此也适合进行光镜观察。如应用银加强的免疫金银法则更便于光镜观察。

## 4、免疫组化技术的优点

1) 特异性强 免疫学的基本原理决定了抗原与抗体之间的结合具有高度特异性，因此，免疫组化从理论上讲也是组织细胞中抗原的特定显示，如角蛋白(keratin)显示上皮成分，LCA 显示淋巴细胞成分。只有当组织细胞中存在交叉抗原时才会出现交叉反应。

2) 敏感性高 在应用免疫组化的起始阶段，由于技术上的限制，只有直接法、间接法等敏感性不高的技术，那时的抗体只能稀释几倍、几十倍；现在由于 ABC 法或 SP 法的出现，使抗体稀释上千倍、上万倍甚至上亿倍仍可在组织细胞中与抗原结合，这样高敏感性的抗体抗原反应，使免疫组化方法越来越方便地应用于常规病理诊断工作。

3) 定位准确、形态与功能相结合 该技术通过抗原抗体反应及呈色反应，可在组织和细胞中进行抗原的准确定位，因而可同时对不同抗原在同一组织或细胞中进行定位观察，这样就可以进行形态与功能相结合的研究，对病理学研究的深入是十分有意义的。

## 二. 免疫组化在病理诊断和研究中的应用

由于免疫组化具有特异性强、灵敏度高显著特点，且能将形态研究与功能研

究有机地结合在一起，所以，这门新技术已被广泛地应用于生物学和医学研究的许多领域。在病理学研究中，免疫组化技术的作用和意义更为重要。以肿瘤研究为例，在免疫组化技术出现以前，对肿瘤的诊断和分类还局限于细胞水平，而引入免疫组化技术后，则使研究的深度提高到了生物化学水平、分子水平。近年来，伴随基因探针研究而兴起的核酸分子原位杂交技术也正在蓬勃发展，更使免疫组化如虎添翼，两者相得益彰，将研究推进到了基因水平。

### 三、实验内容和步骤

#### 实验一 石蜡标本制作步骤

1. 4%甲醛(若准备做免疫组化使用多聚甲醛)固定组织,过夜即可(组织的厚度注意不能超过1cm),一般不超过24h。
2. 流动自来水冲洗过夜。
3. 70%~80% 过夜(若不及时包埋,70%酒精内可存放一个月左右)。
4. 95%乙醇 I 1.5 h。
5. 95%乙醇 II 1.5 h。
6. 无水乙醇 I 2 h。
7. 无水乙醇 II 2 h。
8. 二甲苯 I 30 min。
9. 二甲苯 II 30 min。
10. 石蜡 I 1 h。
11. 石蜡 II 40 min。
12. 石蜡 III 30 min。
13. 包埋成蜡块。

#### 实验二 HE 染色步骤

1. 蜡块切为4~6 $\mu$ m厚的蜡片,将切好的蜡片放入40 $^{\circ}$ C水浴锅中,待其展开铺平无褶皱时,敷于干净载玻片上,放入60 $^{\circ}$ C烤片机上60min。
2. 脱蜡至水:
  - ①二甲苯 I 10 min
  - ②二甲苯 II 10 min
  - ③无水乙醇 I 10 min

- ④无水乙醇 II 10 min
  - ⑤95%乙醇 5 min
  - ⑥85%乙醇 5 min
  - ⑦蒸馏水 2 min×3 次 ---控净
3. 染色:
- ①苏木素 5-6 min (冬季气温低, 染色时间可适当延长)
  - ②自来水冲洗 3 次 ---控净
  - ③盐酸酒精分化 30 s (镜下控制)
  - ④自来水冲洗 3 次
  - ⑤稀氨水返蓝 1s
  - ⑥自来水冲洗 10 min
  - ⑦伊红溶液 30s ~ 1min
4. 脱水透明:
- ①85%乙醇 1 min
  - ②95%乙醇 5 min
  - ③无水乙醇 I 5 min
  - ④无水乙醇 II 5 min
  - ⑤二甲苯 I 5 min
  - ⑥二甲苯 II 5 min
5. 中性树胶封片。

### 实验三 免疫组化操作步骤

1. 蜡块切为 4~6um 厚的蜡片, 将切好的蜡块放入 40℃温水浴中, 待其展开铺平无皱褶时, 敷于干净载玻片上, 放入 60℃烤箱 60 分钟。
2. 将烤好的切片置入二甲苯两次脱蜡, 10~30 分钟/次或更久。
3. 切片移入无水酒精内 5~10 分钟, 以洗去残留的二甲苯。再逐级移入降级酒精, 95%, 90%, 80%每级为 5 分钟即可, 纯水洗 2 分钟×3 次。
4. 抗原修复: 将组织切片放入盛有抗原修复液(工作液)的玻璃烧杯中(浸没组织), 放入微波炉中高火 3 分钟, 低火 10 分钟, 取出冷却 30 分钟后, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 分钟。
5. Triton-x-100 60 分钟。(是否需要此步骤根据个人抗原表达位置而定)
6. 3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水浴锅(37℃)中孵育 30 分钟, 以消除内源性过氧化物酶的活性。

- PBS 冲洗 3 次，每次 5 分钟。
7. 5%-10%正常山羊血清封闭，37℃孵育 20 分钟，倒去血清，勿洗，滴加适当比例稀释的一抗，4℃过夜。
  8. 37℃水浴孵育 40 分钟。PBS 冲洗 3 次，每次 5 分钟。
  9. 滴加适当比例稀释的辣根酶标记链酶卵白素(二抗)，37℃孵育 15-30 分钟。  
PBS 冲洗 3 次，每次 5 分钟。
  10. 显色剂显色 (DAB)。待组织颜色变黄，自来水充分冲洗。
  11. 置入苏木素 2 ~ 3 分钟，自来水充分冲洗。
  12. 盐酸酒精分化 30 秒-2 分钟 (具体时间观察组织颜色变化)，自来水冲洗。
  13. 脱水：染色完后切片经 80%，90%，95%及无水酒精逐级脱水，每级 5-10 分钟。
  14. 透明：切片侵入二甲苯透明，更换 2 次，每次 10 分钟。
  15. 封片：先擦干切片周围的二甲苯，再滴加适量中性树脂，加盖玻片封固。

**注意:**以上为各种免疫组化方法的大体步骤，可根据个人组织与课题不同而略有差别，请各位同学查阅文献制定相应的实验步骤。

**编写人:** 武坤毅、王娜、李君、陈海燕、姬媛媛

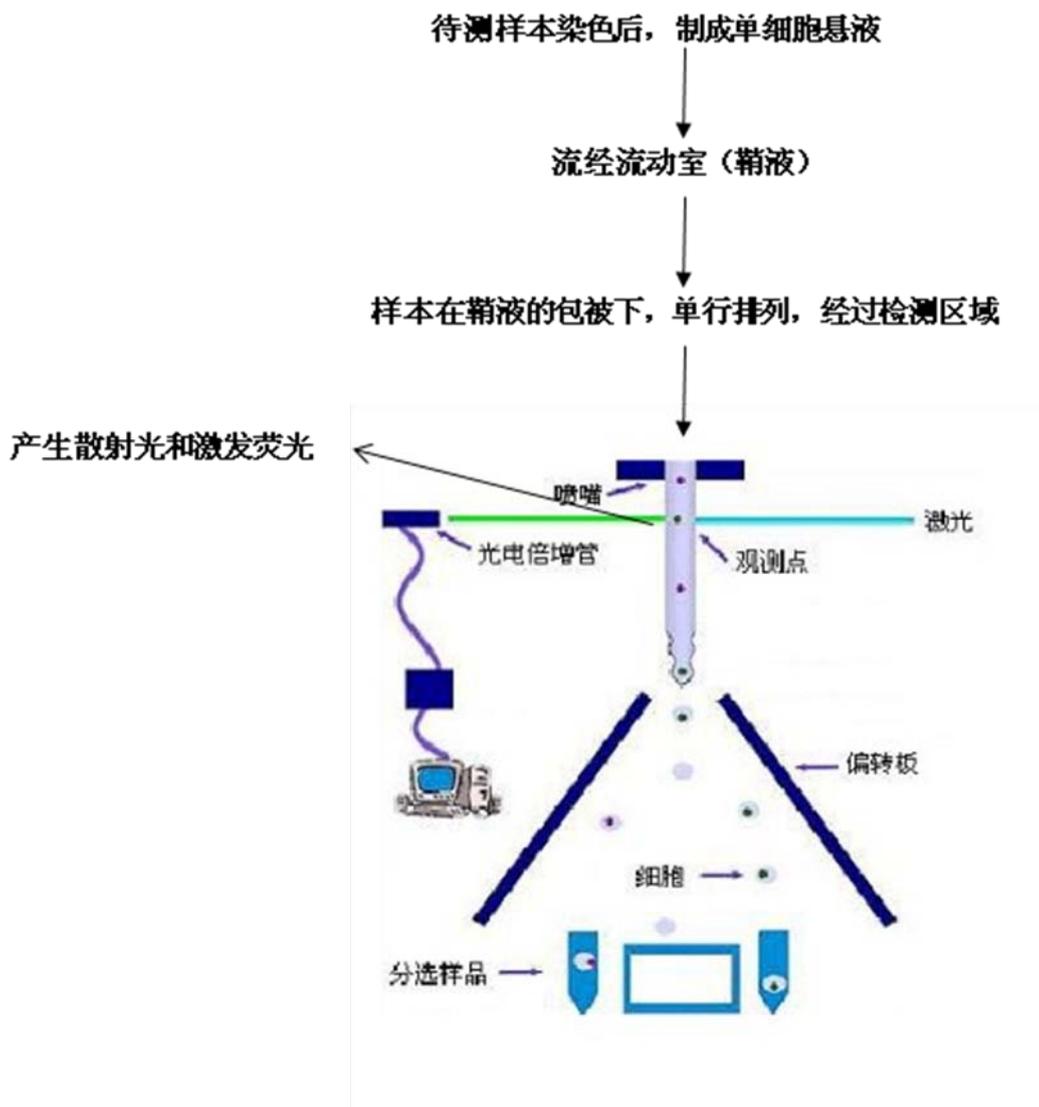
# 第五章 分选流式细胞仪

## 一、基本原理

### 1、流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)概念:

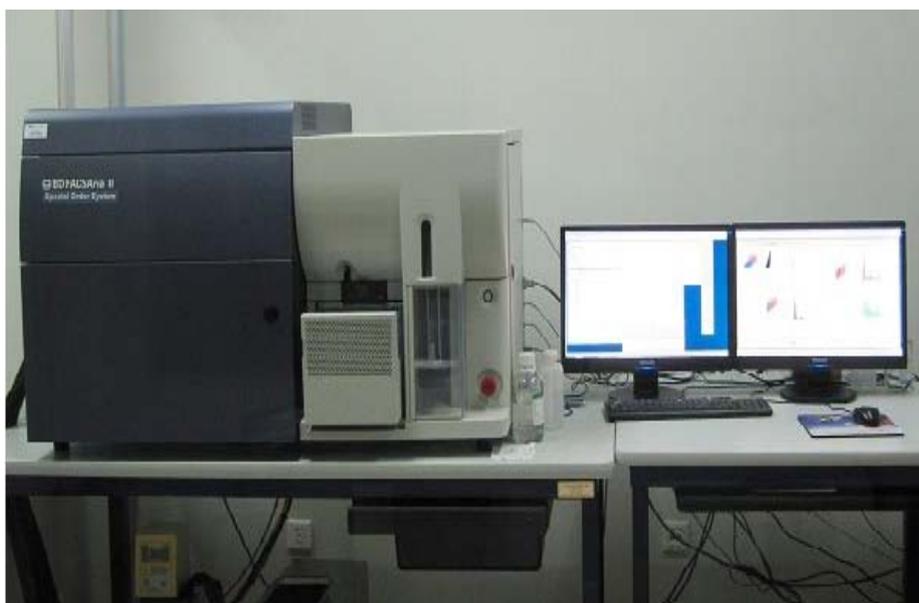
FCM 是 70 年代发展起来的高科学技术，它集激光技术、流体力学、细胞化学、细胞免疫学于一体，同时具有分析和分选细胞功能。它不仅可测量细胞大小、内部颗粒的性状，还可检测细胞表面和细胞浆抗原、细胞内 DNA、RNA 含量等，可对群体细胞在单细胞水平上进行分析，在短时间内检测分析大量细胞，并收集、存储和处理数据，进行多参数定量分析。此外，能够分类收集（分选）某一亚群细胞，分选纯度 > 95%。在血液学、免疫学、肿瘤学、药理学、分子生物学等学科广泛应用。

### 2、流式细胞仪的工作原理:



## 二、分选流式细胞仪检测范围

1、分选流式细胞仪（FACSAriaTMII）：是 BD 公司最新推出的一款流式分选仪器，融合全新的设计理念和高度智能化的软件系统，是全球独一无二的台式高速细胞分选仪，支持 6 根激光运行，能够进行复杂的多色实验，具有更高的灵敏度，分辨率，更高的分选效率。



### 2、分选流式细胞仪的检测范围：

- 1) 细胞的结构：细胞大小、颗粒度、细胞表面面积、核浆比例、DNA 含量与细胞周期、RNA 含量、蛋白质含量等。
- 2) 细胞功能：特异性抗原（细胞表面/胞浆/核）、细胞内细胞因子、细胞活性、酶活性、激素结合位点、细胞受体等。

## 三. 分选流式细胞仪应用领域

### 1. 细胞分选

流式细胞仪可根据实验需要，分选某一亚群细胞,分选纯度>95%，目前细胞分选主要用于科学研究，临床应用较少。

### 2. 细胞生物学

- 1) 定量分析细胞周期；
- 2) 分析生物大分子如 DNA、RNA、抗原、癌基因表达产物等；

### 3. 肿瘤学

- 1) DNA 倍体含量测定是鉴别良、恶性肿瘤的特异指标；

- 2) 近年来已应用 DNA 倍体测定技术, 对白血病、淋巴瘤及肺癌、膀胱癌、前列腺癌等多种实体瘤细胞进行探测;
- 3) 用单克隆抗体技术清除血液中的肿瘤细胞。

#### 4. 免疫学

- 1) 研究细胞周期或 DNA 倍体与细胞表面受体及抗原表达的关系;
- 2) 进行免疫活性细胞的分型与纯化;
- 3) 分析淋巴细胞亚群与疾病的关系;
- 4) 免疫缺陷病如艾滋病的诊断;
- 5) 器官移植后的免疫学监测等。

#### 5. 血液学

- 1) 血液细胞的分类、分型, 造血细胞分化的研究;
- 2) 血细胞中各种酶的定量分析, 如过氧化物酶、非特异性酯酶等;
- 3) 用 NBT 及 DNA 双染色法可研究白血病细胞分化成熟与细胞增殖周期变化的关系;
- 4) 检测母体血液中 Rh(+) 或抗 D 抗原阳性细胞, 以了解胎儿是否可能因 Rh 血型不合而发生严重溶血;
- 5) 检测血液中循环免疫复合物可以诊断自身免疫性疾病, 如红斑狼疮等。

编写人: 闵晓云

# 第六章 激光共聚焦显微镜

## 一、基本原理

### 1、激光共聚焦显微镜组成：

德国 LeicaTCS SP8 激光共聚焦显微镜，是目前最先进的细胞生物学分析仪器之一，包括激光照射系统，扫描检测系统，显微镜系统，计算机系统及相关软件等。

Leica SP8 系统组成图



### 2、激光共聚焦显微镜工作原理：

激光扫描共聚焦显微镜以激光作为光源，激光器发出的激光通过照明针孔形成点光源，经过透镜、分光镜形成平行光后，再通过物镜聚焦在样品上，并对样品内聚焦平面上的每一点进行扫描。样品被激光激发后的出射光波长比入射光长，可通过分光镜，经过透镜再次聚焦，到达探测针孔处，被后续的光电倍增管检测到，并在显示器上成像，得到所需的荧光图像，而非聚焦光线被探测针孔光阑阻挡，不能通过探测针孔，因而不能在显示器上显出荧光信号。这种双共轭成像方式称为共聚焦。因采用激光作为光源，故称之为“激光共聚焦显微镜”。

## 二、主要参数

### 1、物镜参数：

放大倍率	性能（平场/消色差等）	数值孔径	工作距离	干/水/油
10×	平场复消色差物镜	≥0.40	≥2.20	干
20×	平场复消色差物镜	≥0.70	≥0.59	干
40×	平场复消色差物镜	≥0.85	≥0.24	干
63×	平场复消色差物镜	≥1.40	≥0.13	油

## 2、激光器参数：

蓝光激光器 488nm 20mW；绿光激光器 552nm 20mW；  
红光激光器 638nm 20mW；近紫外激光器 405nm 50mW。

## 3、检测器系统：

三个荧光扫描检测器（其中一个支持光谱功能的磷砷化镓的检测器）；  
一个透射光 DIC（明场/相差/微分干涉）扫描检测器。

## 4、光谱扫描功能：

高速多通道光谱分析和扫描，可获得透射光谱图像；光谱分辨率 2nm，可连续以≥1nm 波长调节；光谱扫描范围：400-800nm；光谱扫描步进：1nm。

## 5、扫描分辨率及灰度级：

分辨率：≥4096×4096 pixels；灰度级：≥12bit。

## 6、扫描方式：

XYZTλ 任意组合，可实现点扫描、线扫描、曲线扫描、区域扫描、光谱波长扫描等。

## 三、 主要用途

用于组织切片、活细胞的荧光标记、三维图像重建分析研究；细胞生物物质、离子的定性、定量、定时和定位分布检测等。

1、对活细胞或组织切片进行连续扫描，可获得精细的细胞骨架、染色体、细胞器和细胞膜系统的三维图像。可以得到比普通荧光显微镜更高对比度、高解析度图像、和具有高灵敏度。

2、多维图象的获得，X、Y、Z、T、λ（光谱波长）、θ（旋转角度）、I（光强度）、A（区域）等多位组合扫描，根据需要进行多维组合观察。

3、细胞内离子荧光标记，单标记或多标记，检测细胞内如 pH 值和钠、钙、镁等离子浓度的比率及其动态的变化。

4、荧光探针标记的活细胞或组织切片标本，膜标记、免疫物质、受体或配体，核酸等观察；可以在同一张样品上同时进行多重荧光标记观察。

编写人：王娜



酶底物合成酶的基因组成，带有这种操纵子的细菌会持续发光，不需要给与外源性底物。

基因、细胞和活体动物都可被荧光素酶基因标记。标记细胞的方法基本上是通过分子生物学克隆技术，将荧光素酶的基因插到预期观察的细胞的染色体，通过单克隆细胞技术的筛选，培养出能稳定表达荧光素酶的细胞株。将标记好的细胞注入小鼠体内后，观测前需要注射荧光素酶的底物-荧光素，为约280道尔顿的小分子。荧光素脂溶性非常好，很容易透过血脑屏障。注射一次荧光素能保持小鼠体内荧光素酶标记的细胞发光30-45分钟。每次荧光素酶催化反应只产生一个光子，这是肉眼无法观察到的，PE公司生产的IVIS成像系统，应用一个高度灵敏的制冷CCD相机及特别设计的成像暗箱和成像软件，可观测并记录到这些光子。

## 2) 荧光标记:

荧光成像的标记对象较为广泛，可以是动物、细胞、微生物、基因，也可以是抗体、药物、纳米材料等。常用的有绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白(DsRed)及其它荧光报告基因，标记方法与体外荧光成像相似，荧光成像具有费用低廉和操作简单等优点。同生物发光在动物体内的穿透性相似，红光的穿透性在体内比蓝绿光的穿透性效率高，近红外荧光为成像观察的最佳选择。虽然荧光信号远远强于生物发光，但非特异性荧光产生的背景噪音使其信噪比远远低于生物发光。虽然许多公司采用不同的技术分离背景光，但是受到荧光特性的限制，很难完全消除背景噪音。这些背景噪音造成荧光成像的灵敏度较低。

尽管目前大部分高水平的文章还是应用生物发光的方法来研究活体动物体内成像。但是，荧光成像有其方便、直观、标记靶点多样和易于被大多数研究人员接受的优点，在一些植物分子生物学研究和观察小分子体内代谢方面也得到应用。对于不同的研究，可根据两者的特点以及实验要求，选择合适的方法。例如利用绿色荧光蛋白和荧光素酶对细胞或动物进行双重标记，用成熟的荧光成像技术进行体外检测，进行分子生物学和细胞生物学研究，然后利用生物发光技术进行动物体内检测，进行活体动物体内研究。

荧光发光是通过激发光激发荧光基团到达高能状态，而后产生发射光。考虑到不同荧光物质的发射光谱EX(excitation spectrum)和激发光谱EM(emission spectrum)的不同，要选择对应的激发和发射滤片。常用荧光蛋白和荧光染料的激发和发射波长见表1

表1 常用荧光蛋白和荧光染料的激发和发射波长

	EX(mm)	EM(mm)
<b>GFP</b>	<b>480</b>	<b>520</b>
<b>dsRed/RFP</b>	<b>530</b>	<b>600</b>
<b>Cy5</b>	<b>630</b>	<b>680</b>
<b>Cy5.5</b>	<b>630</b>	<b>700</b>
<b>Cy7</b>	<b>700</b>	<b>780</b>

### 3) 生物发光与荧光检测的优势与劣势比较:

荧光发光需要激发光，但生物体内很多物质在受到激发光激发后，也会发出荧光，产生的非特异性荧光会影响到检测灵敏度。特别是当发光细胞深藏于组织内部，则需要较高能量的激发光源，也就会产生很强的背景噪音。作为体内报告源，生物发光较之荧光的优点之一为不需要激发光的激发，它是以酶和底物的特异作用而发光，且动物体自身不会发光，这样生物发光就具有极低的背景。虽然荧光信号远远强于生物发光，但极低的自发光水平使得生物发光的信噪比远高于荧光。另外，生物发光信号可以用于精确定量。因为荧光酶基因是插入细胞染色体中稳定表达的，单位细胞的发光数量很稳定。即便标记细胞在动物体内有复杂的定位，亦可从动物体表的信号水平直接得出发光细胞的相对数量。而对于荧光，光在体内路径较长。信号水平取决于激发光的强度、发光细胞的数量、靶点的深度，光线穿过的组织对其的吸收及散射等因素，使得荧光强度很难定量。对于不同的研究，可根据两者的特点（表2）以及实验要求，选择合适的方法。

表2 生物发光及荧光特点的比较

	优 点	缺 点
<b>生物发光</b>	高灵敏度 对环境变化反应迅速 成像速度快，图像清楚 在体内可检测到 $10^2$ 细胞	信号较弱，需要灵敏的 CCD 镜头 需要注入荧光素 仪器精密度要求高 细胞或基因需要标记
<b>荧光</b>	多种蛋白及染料可用于 多重标记，标记相对简单 可同时用于 FACS 分类 未来可能用于人体	非特异性荧光限制了灵敏度 体内检测最低约 $10^6$ 细胞 需要不同波长的激发光 很难精确体内定量

## 2. 光学原理

光在哺乳动物组织内传播时会被散射和吸收，光子遇到细胞膜和细胞质时会发生折射现象，而且不同类型的细胞和组织吸收光子的特性并不一样。在偏红光区域，大量的光可以穿过组织和皮肤而被检测到。利用PE公司的IVIS系统最少可以看到皮下的500个细胞，当然，由于发光源在老鼠体内深度的不同可看到的最少细胞数是不同的。在相同的深度情况下，检测到的发光强度和细胞的数量具有非常好的线性关系。可见光体内成像技术的基本原理在于光可以穿透实验动物的组织并且可由仪器量化检测到的光强度，同时反映出细胞的数量。

### 三、实验步骤

#### 1) 构建细胞株

应用单克隆细胞技术的筛选，将荧光素酶的基因稳定整合到预期观察的细胞的染色体内，培养出能稳定表达荧光素酶蛋白的细胞株。目前，常用的细胞株基本上都已标记好，市场上已有销售。

#### 2) 建立动物模型

可根据实验需要通过尾静脉注射、皮下移植、原位移植等方法接种已标记的细胞或其他。在建模时应认真考虑实验目的和选择荧光标记，如标记荧光波长短，则穿透效率不高，建模时不宜接种深部脏器和观察体内转移，但可以观察皮下瘤和解剖后脏器直接成像。深部脏器和体内转移的观察大多选用荧光素酶标记。

#### 3) 活体成像

小鼠经过常规麻醉（气麻）后放入成像暗箱平台，软件控制平台的升降到一个合适的视野，自动开启照明灯（明场）拍摄第一次背景图。下一步，自动关闭照明灯，在没有外界光源的条件下（暗场）拍摄由小鼠体内发出的特异光子。明场与暗场的背景图叠加后可以直观的显示动物体内特异光子的部位和强度，完成成像操作。值得注意的是荧光成像应选择合适的激发和发射滤片，生物发光则需要成像前体内注射底物激发发光。

#### 4) 数据处理

小动物活体成像图像处理软件除了提供含有光子强度标尺的成像图片外，还能计算分析发光面积、总光子数、光子强度的相关参数供实验者参考。

### 四、应用领域

小动物活体光学成像技术已在生命科学基础研究、临床前医学研究及药物研发等领域得到广泛应用。通过活体动物体内成像系统，可以观测到疾病或癌症的发展进程以及药物治疗所产生的反应，并可用于细菌、病毒学研究、构建转基因动物模型、siRNA 研究、干细胞研究、蛋白质相互作用研究以及细胞体外检测

等领域。主要应用如下：

### **1. 癌症与抗癌药物研究：**

- 1) 长时间监测肿瘤生长及转移；
- 2) 抗肿瘤药物研发；药效评价、观测药物靶向、分布及代谢
- 3) 癌症分子机理研究；研究癌症相关基因的作用、观测肿瘤内部特异性分子事件的发生

### **2. 免疫学研究**

- 1) 监测免疫疾病的发生发展及治疗效果
- 2) 监测免疫细胞的免疫应答
- 3) 免疫疾病机理研究

### **3. 感染性疾病研究**

- 1) 长时间观测病原体在动物体内的动态感染情况
- 2) 监测抗感染免疫反应
- 3) 抗生素及疫苗等抗感染药物研发

### **4. 干细胞研究**

- 1) 监测干细胞的移植、存活和增殖
- 2) 示踪干细胞在体内的分布和迁移

### **5. 糖尿病研究**

- 1) 胰岛移植相关研究
- 2) 针对糖尿病的细胞治疗研究
- 3) 糖尿病相关信号通路研究

### **6. 心血管疾病研究**

- 1) 研究细胞治疗心血管疾病效果
- 2) 了解疾病发展的分子机理和药物治疗心血管疾病效果
- 3) 心血管疾病相关基因的作用及其治疗

### **7. 神经疾病研究**

- 1) 神经肿瘤研究
- 2) 神经退行性疾病的研究
- 3) 神经干细胞研究
- 4) 研究神经疾病中相关基因的表达

### **8. 药物研发**

- 1) 抗肿瘤癌症药物研发

- 2) 关节炎治疗药物研发
- 3) 感染性疾病的药物研发
- 4) 抗炎症药物的研发
- 5) 抗病毒药物的研发
- 6) 神经系统疾病的药物治疗
- 7) 构建新型老鼠模型

## **9. 基因和细胞治疗**

- 1) 实时监测非侵入性基因送递和治疗： 不同载体的基因传递、传递DNA治疗疾病、使用RNA治疗疾病。
- 2) 细胞治疗

**编写人：魏琳琳、姬媛媛**

## 附件一：

### 科研中心实验室组长及联系方式

组 别	姓 名	科室联系电话	科研交流平台 QQ群
细胞组	黄 娜	029-87678330	169106358
分子组	张 婷	029-87678330	
组化组	武坤毅	029-87678330	

## 附件二：

### 科研中心实验室技能培训套餐

姓 名		专 业		导 师	
联系电话		培训时间		培训教师	
细胞室技能培训套餐					
套餐 A					
1. 传代培养                      2. 台盼蓝染色                      3. 细胞计数                      4. 图像采集					
套餐 B					
1. 原代培养                      2. 台盼蓝染色                      3. 细胞计数                      4. 图像采集					
套餐 C					
1. 细胞复苏                      2. 细胞冻存					
套餐 D					
1. 流式细胞样本制备                      2. 上机演示					

## 附件三：

### 科研中心实验室技能培训套餐

姓 名		专 业		导 师	
联系电话		培训时间		培训教师	
<b>分子室技能培训套餐</b>					
<b>套餐 A</b>					
2. 基因组 DNA 提取		2. PCR	3.核酸电泳	4.凝胶成像	
<b>套餐 B</b>					
1. RNA 提取		2.反转录	3.核酸电泳	4.凝胶成像	
<b>套餐 C</b>					
1.RNA (DNA) 提取		2.实时定量 PCR			
<b>套餐 D</b>					
1.蛋白提取		2. 蛋白电泳 SDS-PAGE	3. 转膜	4. 抗体孵育	
5.曝光		6. 目的信号采集			
<b>套餐 E</b>					
1. 酶联免疫吸附 (ELISA)			2. 酶标仪检测		

## 附件四：

### 科研中心实验室技能培训套餐

姓 名		专 业		导 师	
联系电话		培训时间		培训教师	
组化室技能培训套餐					
<b>套餐 A</b> 1. 石蜡切片    2. HE 染色        3. 图像采集及分析					
<b>套餐 B</b> 1. 冰冻切片    2. 抗原抗体反应        3. DAB 显色    4. 图像采集及分析					
<b>套餐 C</b> 1. 石蜡切片    2. 抗原抗体反应        3. 荧光染色    4. 倒置荧光显微镜检测					
<b>套餐 D</b> 1. 冰冻切片    2. 抗原抗体反应        3. 荧光染色    4. 激光共聚焦显微镜检测					
<b>套餐 E</b> 1. 细胞免疫荧光染色    2. 荧光显微镜和激光共聚焦对比检测					