

# MMI Cellcut 型激光捕获微切割技术的应用及操作体会\*

张诗武 孙保存 张丹芳 刘燕青 齐丽莎 赵秀兰

(天津医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所 天津 300060)

**摘要** 人类基因组序列的破译提供人类基因最基本的结构信息,同时一些功能性基因组技术的出现,如基因芯片技术、微阵列比较基因组杂交技术、蛋白质组学技术的产生,人们越来越渴望从组织切片上,获取某一特定的同类细胞,从而对这些或者个细胞内癌基因、抑癌基因、侵袭转移相关蛋白、信号转导蛋白、细胞增殖和分化相关蛋白等进行研究,但以往各种技术所获得的细胞都不可能是单一同类细胞群。显微切割(microdissection)技术<sup>[1,2]</sup>是自20世纪90年代初出现的新技术,能从组织切片上切割下几百个、几十个同类细胞。利用显微切割技术可以将组织内单一细胞群切割下来进行研究,避免间质细胞及一些炎症细胞造成背景“污染”,从而使得研究结果准确,避免假阳性和假阴性结果出现。

**关键词** 激光捕获微切割 肿瘤病理

MMI Cellcut 激光显微切割系统,是通过紫外激光切割需要分离的组织,然后通过有粘性的 Eppendorf 管盖进行收集,就可将特定类型细胞从组织切片上分离下来,该仪器操作简便,切割精细、准确,性能稳定,图像分辨率高。应用涉及多方面:①通过细胞形态及基因分析对肿瘤的深入研究;②基因组研究;③微卫星序列不稳定性;④基因定量分析;⑤蛋白质研究;⑥比较基因组杂交等。天津肿瘤医院于2005年自瑞士购买一台 MMI Cellcut 型激光捕获微切割仪,与国内多个单位联合开展卵巢癌、胶质瘤、黑色素瘤、绒毛膜癌、前列腺癌等研究,实验结果较为理想。现将 MMI Cellcut 型激光捕获微切割仪在切割单一细胞群技术操作方法和经验体会介绍如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

SL uCUT 型激光捕获微切割仪一台,附有分离膜的金属框架若干,管盖有粘性的 Eppendorf 管若干。常规梯度脱蜡、脱水试剂。载玻片采用 75% 酒精和 1% 盐酸泡洗。

### 1.2 切割操作步骤

**1.2.1 组织切片** 使用一张附有分离膜的金属框架,将组织切片按常规方法铺在分离膜上。常规的方法对切片进行脱蜡、染色等操作。二甲苯透明,空气中风干。

**1.2.2 扫描切片** 利用 limit1 和 limit2 定义切片的左上角和右下角,使用 4× 物镜扫描切片,得到一幅路标图像。在路标图像上双击鼠标,即可将显示图像自动转到所选的区域。当载物台移动距离超出限定的距离时,管盖会被自动提起。然后管盖会自动

重新被放下。

**1.2.3 切割** 在 Toolbar 上点击相应的按钮,选择不同的绘图方式。如选择勾画任意形状的图形,选定切割路径后,点击“CUT”键,系统会根据刚才定义好的路径快速、简便地自动切割选定的样本。如果一次切割没有完全黏附下来,可以重新再切割一次,切割完毕后提起收集管,收集显微切割获得的样本。在切割之前对相应的显微镜下图像进行采集保存,切割后双击载玻片上的空白位置放下 Eppendorf 管,此时可清晰看见刚才切割后的标本。用于单步收集样本的 Eppendorf 管在管盖上包含一个 diffuser(扩散体)。在切割的过程中,diffuser 可以提高组织样本的成像质量。

### 1.3 切割过程中的经验体会

**1.3.1 切割时的物镜选择** 大部分情况下,在 20× 和 40× 物镜下可以得到较好的切割效果。用户需要在物镜选项的下拉框中选择适当的物镜。如果使用 4× 物镜会导致切割时样本范围过大,导致切割样本不能粘贴到 Eppendorf 管盖上,或者采样不精确导致实验失败。

**1.3.2 切割参数的选定** 在进行样本切割之前,可以在组织的其他部位,或是铺有同样组织的不需要分离的切片上检测激光参数。画一条线,或是一个圆形,开始使用缓慢的速度切割这个样本。在切割的过程中改变聚焦和能量的设定,并观察其对切割效果的影响。切割样本成功应满足能量尽可能低而聚焦最佳。在调整激光参数时,可以从较高能量开始。在能量比较高时,调整激光聚焦会方便一些。使用不同的聚焦进行多次切割,并比较其结果。减小激光能量时,聚焦会保持在定义的范围。逐步减小激光能量,并重复尝试不同的聚焦,直到切口连

续、精细和清晰。

**1.3.3 分组操作** 一般在需要将不同的样本收集在不同的收集管中的时候,可以使用分组切割的功能。定义每一个组的绘图属性,如每组的名字,颜色和线的宽度,每个属于同一组的样本,会使用相同的颜色勾画出来。

**1.3.4 距离测量** 当需要测量切割范围的大小时,点击屏幕上方菜单栏的标尺按钮可以在屏幕上测量不同的距离。这时,鼠标指针会转换为标尺。按下鼠标左键,并拖拽出要测量样本的长度,但释放鼠标左键时,会显示出测量距离的精确长度。此外,进行多次切割时,如果需要回到以前标记好的某个位置时,可以使用屏幕上菜单栏的位置按钮就可以记录 XY 载物台的当前位置。使用删除按钮可以将记录的位置删除,可以同时记录多个感兴趣的位置,也可以使用位置记录的滑块,在不同的位置之间进行切换。

**1.3.5 激光位置的校正** 为进行精确的显微切割,需要精确地校正激光显示在屏幕上的位置。长时间的使用,仪器受到震动,实验室温度大范围的变化,或是意外地移动或是碰撞仪器时,可能会需要重新校正激光的位置。如果发现实际切割路径和勾画的线路不符合,可能需要调整激光的位置。它需要对每个物镜进行调整。在屏幕上方菜单栏 Calibration 选项下选择 Set Laser Position 选项。将鼠标指针对齐刚刚打的孔,然后右击鼠标,并确认接受这个位置。然后对每个物镜(一般都按照从低倍物镜向高倍物镜调整顺序),都使用同样的方法进行校正。当选择好样本后移动载物台上的切片,或是选好的切片拿开后又放回载物台上切割,那么切割路径可能会与选择的路径不相符。

#### 1.4 常见问题处理

**1.4.1 图像不清楚、图像过暗、过亮** ①请检查白光照明是否充足,光线有没有受到遮挡;②对于没有盖玻片的样本,使用有扩散体的反应管管盖,以得到更佳的成像质量,切割以后将有扩散体的反应管管盖置于切片上没有图像的地方,然后放下管盖就可以获得切割后的图像。

**1.4.2 线条不清晰** 较亮样本选择暗色线条,较暗样本选择明亮颜色线条,或者使线条变得更粗。

**1.4.3 观察不到切割的过程**:①激光没有打开(钥匙和按钮),一般在打开软件之前打开钥匙,在进行切割之前打开激光按钮;②软件中放大倍数的选择与物镜不匹配。

**1.4.4 切割不理想,切下的组织与其余组织之间仍存在粘连**:切割速度过快,或激光能量过低,此时可以进行多次切割直至组织被切割下来。也可能是因为反应管管盖长期暴露于空气中导致管盖的粘性

降低。如果切割路径与勾画的路径不吻合,一般来说是因为激光的位置没有调整好,或者软件上的放大倍数和显微镜的放大倍数不一致,此外切割过程中,切割速度过快、激光聚焦不好,或是能量过低,切割可能会受影响。

**1.4.5 无法收集切割下的样本** 可能是因为切割的组织靠近金属框架,因为金属框架的阻挡,导致 Eppendorf 管的管盖没有完全降落在组织切片上。

## 2 结果

参照上述操作步骤和常见问题处理方法,使用 MMI Cellcut 型激光捕获微切割仪在组织切片上进行切割,可以较为满意获得所需要的样本,切割的样本也能保证细胞完整被切割下来,细胞群单一,切割形状任意,显微镜下也可清晰的观察切割前后的图像(见图 1)。从图可以看出,切割细胞完整,细胞群单一,切割形状任意,显微镜下可见切割图像清晰,切割后的细胞完整,(HE×200)。

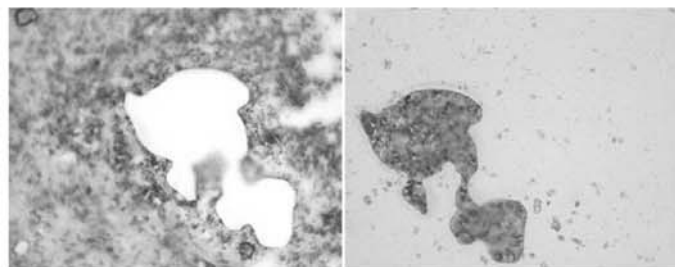


图 1 镜下切割前后的图像

左图为冰冻切片上切割后的原组织,右图为切割下来的组织

## 3 讨论

显微切割技术的突出特点是可以从含有不同成分的组织中非常特异地获取某一特定的同类细胞甚至某一个单一细胞,因此非常适合用于一些疾病的研究。用于显微切割的组织可以是冷冻组织、石蜡包埋组织或细胞涂片。石蜡切片和冰冻切片的制备与常规相同,即连续切片,平铺于普通未涂胶的载玻片上,切片厚度  $4\sim 10\mu\text{m}$ <sup>[3]</sup> 时因为切片过于附着在载玻片上而导致切割失败,因此对于冰冻切片,可预先在载玻片上铺上薄薄的一层 1% 的琼脂糖胶,每张切片用胶量约为  $200\mu\text{L}$  然后再将切片平铺于琼脂糖胶的表面,切割效果也比较理想,冷冻切片需经甲醛或乙醇固定<sup>[1]</sup>。

#### 参考文献

- 1 Bonner RF, Emmert-Buck MR, Cole K, et al Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue Science, 1997, 278: 1481, 1483
- 2 Suarez-Quian CA, Goldstein SR, Pohida T, et al Laser capture microdissection of single cells from complex tissues Biotech-

- niques,1999,26:328~35
- 3 Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al Laser capture microdissection. *J. Science*,1996,274(8):998
  - 4 Takeshima Y, Amatya VJ, Daimaru Y, et al Heterogeneous genetic alterations in ovarian mucinous tumors :application and usefulness of laser capture microdissection. *J. Hum Pathol*, 2001,32(11):4203
  - 5 Roth MJ, Hu N, Emmert-Buck MR, et al Genetic progression and heterogeneity associated with the development of esophageal squamous cell carcinoma. *J. Cancer Res*,2001,61(10):4098

## The application and experience of MMI cellcut laser capture micro-dissection technology

Zhang Shiwu Sun Baocun Zhang Danfang Liu Yanqing Qi Lisha Zhao Xiulan  
(Central Lab of Tianjin Medical University Cancer Hospital, Tianjin 300060)

**Abstract** Decoding of human genome sequence provide the basic structural message of human gene, meanwhile some functional genome technologies have emerged, such as gene array technology, micro-array technology, micro-array relatively genome technology, protein genome technology. We hope to get some specific isogenic cells from tissue section to research the oncogene, anti-oncogene, metastasis relevant proteins, signal transduction proteins, proliferation and differentiation relevant proteins in these specific cells, however the cells obtained by the previous technologies are not simple isogenic cell mass. Microdissection technology is a new technology emerged in early 90's, by this technology, we can dissect hundreds of or decades of isogenic cells from tissue sections. By this technology, single cell mass can be dissected from tissue, this avoid the background contamination of mesenchymal cells and some inflammatory cells, thus the result can be much more precise and avoid getting false positive and false negative results.

**Key words** Laser capture micro-dissection Cancer

(下接第 17 页)

构就会触发保存程序执行,即按用户输入保存路径将实验数据以文本、word 或 excel 格式保存(用户只需确定文件的后缀,如.txt、word、excel),以方便用户在线或离线对数据进行分析。

### 3 结论

用汇编、VB、VC 等文本编程语言集成系统,用户必须熟悉这些语言复杂的应用,而本系统象画流程图一样将程序“画”出来,且界面更生动灵活、性能可靠,突出图形化编程语言的优势,在继电器性能测试中得到很好的应用。通过对本课题的研究,认识到虚拟仪器技术不仅可简化仪器系统结构,而且能有效地降低生产成本和缩短开发周期。以 PC 机为

基础的虚拟仪器数据采集系统,它不仅具有高档仪器的测量性能,又能很好地满足测量需求的多样性,是一种特别适合我国国情的虚拟仪器设计方案。

### 参考文献

- 1 杨乐平,李海涛. LabVIEW 程序设计与应用. 北京:电子工业出版社,2005:1~3
- 2 刘君华. 基于 LabVIEW 的虚拟仪器设计. 北京:电子工业出版社,2003:2~4
- 3 陆俭国,李志刚. 电器试验技术与实验方法. 北京:机械工业出版社,1995:24
- 4 LabVIEW Drivers User' Guide. Taiwan:Advantech Corporation, 2003
- 5 LabVIEW User Manual. USA:National Instruments Corporation, 2003

## The application of virtual instruments technology to measurement system of relay

He Huiying<sup>1</sup> Jiang Dong<sup>2</sup> Li Zhigang<sup>1</sup>

(1. Province-Ministry Joint Key Laboratory of Electromagnetic Field and Electrical Apparatus Reliability  
Hebei University of Technology Tianjin 300130)

(2. The Sci-Tech Information Institute of Hebei Province Shijiazhuang 050021)

**Abstract** The concept of virtual instruments was introduced in this paper, and the measurement system of dynamic characteristic of relay based on LabVIEW graphical programming environment was developed. This system is excellent for short cycle of development and friendly interface and simple operation.

**Key words** Virtual instrument Relay LabVIEW Data acquire