

柑橘组织细胞的激光显微切割

Laser Microdissection of Citrus Tissue Sample

姜楠[#], 贾慧慧[#], 伍小萌^{*}, 郭文武^{*}

园艺植物生物学教育部重点实验室, 园艺林学学院, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: wuxm@mail.hzau.edu.cn; guoww@mail.hzau.edu.cn

[#]共同第一作者

引用格式: 姜楠, 贾慧慧, 伍小萌, 郭文武. (2018). 柑橘组织细胞的激光显微切割. *Bio-101* e1010197.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010197.

How to cite: Jiang, N., Jia, H. H., Wu, X. M. and Guo, W. W. (2018). Laser microdissection of citrus tissue sample. *Bio-101* e1010197. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010197. (in Chinese)

实验原理及目的: 通过激光显微切割系统, 精细切割收集目标样品, 进一步进行特定柑橘组织细胞样品的遗传信息或基因表达分析, 突破了传统的取样技术限制, 更为精细准确的分析特定组织细胞内分子活动。

关键词: 激光显微切割, 组织细胞, 精细准确

材料与试剂

1. 将切片粘片到显微切割专用膜玻片上 (例: Leica 显微切割载玻 PEN 膜, catalog number: 11505158)
2. 切割玻片 (Leica 显微切割系统配套膜玻片耗材, 例: Leica 显微切割载玻 PEN 膜, catalog number: 11505158)
3. 收集管 (Axygen 0.5ml 薄壁 PCR 管)

仪器设备

1. 激光显微切割仪 (Leica, model: LMD 7000)

实验步骤

1. 开启 Leica LMD 7000 系统


首先打开显微镜控制箱, 绿灯亮起, 显微镜面板亮起进入操作界面。然后打开激光

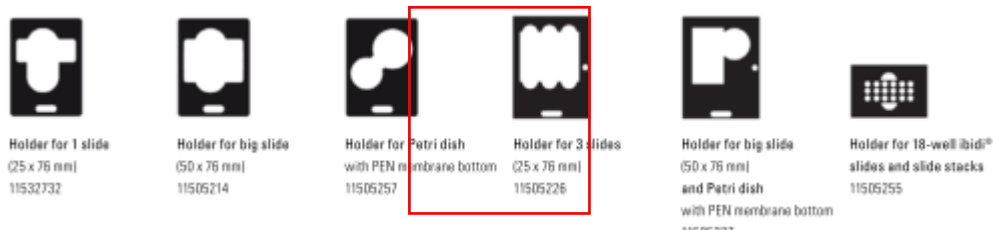
模块，先将控制箱前面安全锁打开，再依次打开控制箱后面激光电源，该模块的预热时间为 5-10 min，当左右指示灯同时显示绿色时完成预热，可以正常使用。该系统在开机后会进行自检，等自检结束后打开计算机上的软件 LMD V7.5.1。


注：

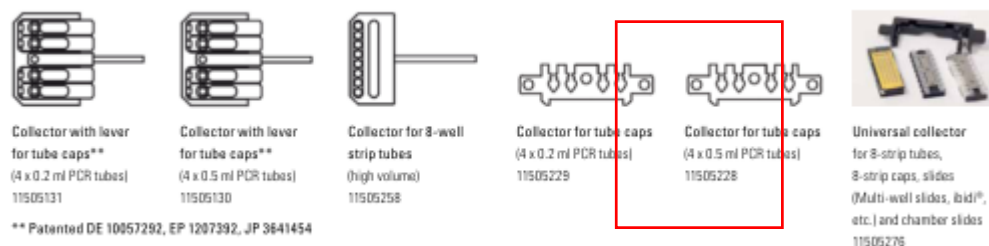
- 1) 不要反复启动激光模块，否则会影响使用寿命。
- 2) 使用过程中若长时间不使用激光器，其会自动回到非激活状态，当再次使用时激光器就会自动激活，不需要开机时的预热过程。

2. 激光显微切割样品上机

2.1 将已经制备好的玻片样品面朝下固定在显微切割系统配套的样品板上，常用样品板上最多可以同时容纳 3 张载玻片，细微的偏离就会造成很大偏差，所以必须保证玻片放置准确。点击软件工具栏中“”将样品板平推进显微镜载物台卡槽内，确认样品板已经固定牢靠，可进行下一步操作。



2.2 将收集管安装在收集架上，常用收集架最多可以放 4 个 0.5 ml 收集管，安装时移动收集管管帽至收集架的末尾处，直至卡到不能移动位置，收集管尾部向回折卡到收集器里，否则会导致部分收集样品丢失，点击“”，将收集器放入卡槽内。



注:

- 1) 样品板放入样品载物台时要确定样品板已经固定牢稳, 方可进行切割。
- 2) 收集器放入卡槽时要确保收集器放入平整, 并且收集管不可过高, 以防机器弹回卡槽时卡住, 损坏仪器。

3. 激光切割仪器校准

对仪器的各部分进行校准, 是确保精细取材的关键。整个系统是全自动化的, 所有操作通过操作杆和软件系统均可完成, 请勿私自调节显微镜上部件。

3.1 玻片位置校准

样品上机完成后, 选择菜单栏中 **options—settings—slidholder** 将视野调制玻片膜的左下角, 右上角定位保存, 完成玻片位置的校准。

3.2 收集管校准


将显微镜调至最低倍数, 选择收集管, 载物台上的校准孔会自动移至视野中对准收集管, 调节焦距应看到视野中有白色圆形的收集管, 此时将焦距调至收集管底部, 点击“**Learn Inspection Settings**”, 系统会自动保存此时的坐标, 当切割目的材料收集后, 切换“**Specimen**”至“**Collector**”就会将视野从载玻片调至收集管, 并且聚焦清晰。

3.3 切割线校准

切割线校准对于高倍镜下切割目标细胞非常重要。具体方法: 点击菜单栏“**Laser—Calibrate**”会弹出对话框是否继续校准, 点击—**yes**。在视野四角依次出现激光切割出一个十字线, 用鼠标点击—**确认**。进行四次校准后点击 **OK** 即完成, 切割线校准时应选用合适的切割参数在没有材料的膜区域进行避免材料不同组织硬度不同导致位置偏离。

4. 激光显微切割参数调试


激光显微切割参数的摸索是该体系的核心部分, 不同组织材料、同一组织不同类型细胞、不同切片厚度均需要对切割参数进行调试。尤其当目的细胞要在高倍镜下进行切割, 并且镶嵌于周围细胞之中时更需要合适的切割参数以降低激光对目的细胞的伤害。“华柑 2 号”珠心胚起始细胞多为 6-15 个细胞群, 需要在 40x 镜下切割, 对激光显微切割的精准度有更高的要求。激光显微切割参数主要有以下几个方面: 激光能量 (**power**)、激光切割线孔径 (**Aperture**)、切割速度 (**Speed**)、激光开始发射

时的能量 (Head Current)、总功率 (Pulse Frequency)。点击工具栏“ Laser”即可弹出激光控制面板，对不同参数进行调节。各种参数并不是单独决定，而是相互影响相互制约的。正如，将激光孔径设置为一个固定值时，调节激光能量，切割的孔径也会变化。



5. 勾画目标组织细胞

该系统提供先画选目标细胞再切割 (Draw + Cut) 和边画边切 (Move + Cut) 两种模式。其中边画边切适合较大的目的组织，可以在短时间内完成切割。而先画选再切割的方式，可以有效地缩短收集时间。目标细胞的选择有圆形 (Ellipse)、矩形 (Rect)、折线 (Ptop) 等几种方式，也可以选择手动勾画。对于目标组织或细胞的勾画方面该系统两个比较突出的方面：目的细胞自动识别功能，当目的细胞的形态规则易区分时先记录这个细胞，点击“Autoshape”便可以自动识别并勾画出目标细胞；实现点到点跨视野的切割，满足了大视野、高精度的要求。因为在越高倍数下切割目的组织，切割就越精确，但在高倍数下视野就会变小，点到点跨视野切割就成功的解决了这个问题。

6. 切割及图像数据收集

图像采集时选择工具栏“ Save”，将图片存放在目的盘即可。“shape list”中显示切割数据包括每个切割块的面积、切割数等，同时可以通过设置目标细胞大小，自动估计每个切割块的目标细胞数，方便统计切割量。

7. 取出收集管、关闭系统

选择“ Unload”从收集器上小心取下收集管将管尾盖向管盖，防止收集样品溅出。点击“ Unload”将显微镜上的样品板弹出，取下载玻片。将显微镜亮度调节到最暗，换物镜至最低倍数，将载物台降至最低。先关闭软件，再关闭激光器，最后关闭显微镜控制器，将操作杆放回原位。待仪器散热后将保护罩盖上。