

激光扫描共聚焦显微技术实验教学的思考

刘继红¹, 汪成楚²

(1. 北京大学 医药卫生分析中心, 北京 100083; 2. 北京邮电大学 资产管理处, 北京 100876)

摘要: 开设激光共聚焦技术实验课, 通过仪器演示和实验操作, 帮助学生理解课堂的理论教学内容, 了解和掌握这门新技术, 为他们在未来科研工作中利用该技术进行科学研究奠定基础。

关键词: 激光扫描; 共聚焦显微技术; 原理; 实验教学

中图分类号: G642.423 **文献标识码:** C **文章编号:** 1002-4956 (2006) 01-0086-02

Thought of Laser Scanning Confocal Microscopy Experiment Teaching

LIU Ji-hong¹, WANG Cheng-chu²

(1. Peking University Medical and Health Analysis Center, Beijing 100083, China; 2. Department of Property Management of Beijing University of Post & Technology, Beijing 100876, China)

Abstract: We open the experiment of laser scanning confocal microscopy through which students can understand the theory and perform the technique of laser scanning confocal microscopy in order that they can applicate the technique into their future research.

Key words: laser scanning; confocal microscopy; theory ; experiment teaching

激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM) 是 80 年代发展起来的目前世界上先进的细胞分子生物学分析仪器, 是以光学为基础, 融机械、电子、计算机为一体的高精度现代化显微测试仪器, 它克服了传统光学显微镜把被观察物体一定纵深范围的结构都加以成像的缺点, 把物体分为若干光学断层, 逐层扫描成像。激光共聚焦显微技术是一种对荧光标记的细胞和组织进行形态学的定位与定量分析的高精度显微成像技术。近十年来, 人们已广泛应用该技术来观察和分析细胞内的微细结构和分子在细胞内的分布, 观察细胞内离子、蛋白分子的变化, 包括细胞内钙、活性氧、转录因子、表面分子、细胞凋亡、细胞膜流动性、胞内分子的运动、细胞间的缝隙连接、蛋白间的相互作用等。共聚焦的分析研究已经涉及到生物医学的几乎所有领域。由于激光共聚焦显微镜能对细胞和组织进行无损伤的连续光学切片, 并且可以对生活状态的细胞进行实时的动态观察, 使它在生物医学的研究中占有独特的地位, 但目前科研人员对激光共聚集技术的运用还远远不够, 因此, 在科研人员中普及激光共聚焦技术是非常必要的。

我校根据科研的实际需要, 为医学部的研究生开设了激光共聚焦技术的实验课, 目的在于帮助学生理解课堂的教学内容, 提高激光共聚焦显微技术的应用能力, 以便日后在科研中加以充分利用。

1 激光扫描共聚焦显微镜的工作原理

激光共聚焦显微镜是对于荧光标记的细胞和组织进行形态学定位与定量分析的一种先进的仪器。它使用激光作为光源, 采用点照明和点探测技术, 并用光电倍增管完成信号的转化和放大, 用计算机软件采集和处理图象并进行数据分析。激光通过一个照明针孔到达样品, 样品只被一个具有精密几何形状的光点照射焦平面上, 只有被照射到的特定点所发射的荧光通过探测针孔到达检测器, 该点以外的任何发射荧光均被该针孔阻挡。照明针孔与探测针孔对被照射点或被探测点来说是共轭的, 这就是激光扫描共聚焦显微镜系统中共焦的真正含义。计算机以像点的方式将成像点显示在屏幕上, 由光路中的扫描系统在整个样品上扫描, 在显示器上产生一幅完整图像。只要载物台沿着 Z 轴上下移动, 将样品新的一个层面移到共焦面上, 样品的这个新层面又成像在显示器上。随着 Z 轴的不断移动, 就可得到样品不同层面连续的光切图像。我们将从

收稿日期: 2005-07-07 修改日期: 2005-09-16

作者简介: 刘继红 (1973—), 女, 硕士, 助理研究员。

共焦显微镜系统获得的连续光切图像比喻为显微CT,这些连续的光切图像可通过三维重组,模拟出样品真实的立体结构。另外,由于CLSM可方便地随时跟踪样品,还可以用于活细胞的实时动态观察。

2 激光共聚焦实验课设计

我们根据本校研究生和科研的实际情况开设实验课,注重学生兴趣的培养,开设一些与传统的验证性实验有本质区别的综合性、设计性和研究探索性实验,使本实验课的学习和研究生的科研方向能有机地结合起来,更好地发挥研究生学习的积极性和主动性,培养学生的实践能力和创新能力。实验课的设计包括如下部分:

(1) 仪器概述 北京大学医药卫生分析中心细胞实验室有两台激光扫描共聚焦显微镜,Leica TCS NT 和 Leica TCS SP2。TCS NT 是滤片型 Confocal, TCS SP2 是光谱型 Confocal。主要讲解激光扫描共聚焦显微镜的原理,演示激光扫描共聚焦的工作过程。我们按照4个系统:激光光源系统、荧光显微镜系统、扫描系统、电子控制和数据处理系统分别来介绍仪器,讲述每个系统的组成和它们所起的作用。

(2) 结合医学科研实际,讲解共聚焦应用 根据我校研究生基本为医学专业背景,对于课程理论知识和概念了解不深,比较缺乏兴趣的情况,我们采用理论联系实际的教学方法。

首先,我们选择一些典型的实验作为讲解共聚焦应用的实例,如PC12细胞内钙的动态观察、心肌细胞的自发钙震荡、PC12细胞线粒体膜电位的测定、兔卵细胞的纺锤体形态、细胞的缝隙连接、细胞内活性氧的测定、巨噬细胞的NF- κ B的核转位等。通过这些生动的实际例子,激发学生的学习兴趣,使他们透彻地理解课堂的理论知识,把理论学习与将来的科研工作结合到一起。

另外,针对激光共聚焦在无损伤的三维光切和对细胞动态观察方面的优势,我们还从每年的测试样品中抽取几个既能体现激光共聚焦特色又能体现最新科研发展趋势的实际例子来讲解,例如:“985项目”肾上腺素受体激动剂对小鼠心肌细胞功能的影响、国家自然科学基金项目“早期惊厥对皮层神经元功能研究”、“树突细胞的生物物理特性”等。我们用这些科研项目作为例子来给学生讲解演示,并通过图象处理的方法得到细胞三维重组的立体图象或者是动态细胞的变化过程的动画

图象,使学生们形象地了解并抓住共聚焦的优势所在。由于实验内容与科研课题结合紧密,还使学生了解了校内外学科研究的发展方向。

(3) 跟踪技术前沿,设计探索性实验 注意跟踪激光扫描共聚焦技术发展前沿,把最新的应用技术引入到实验课中,启发学生根据自身的科研方向,进行研究探索性实验的设计。近年来,激光扫描共聚焦显微镜在观察活细胞方面的优势得以创新发展,开发出新的硬件和软件,使之能适应更复杂、更精密的实验,如FRAP(荧光漂白恢复)、FRET(荧光能量共振转移)、FLIP(荧光漂白周围区域的荧光降低)等。FRAP和FLIP是研究细胞内分子的扩散和运输,核浆穿梭等的实验手段,而FRET是研究空间距离很近的两种蛋白质或是一种蛋白的不同亚基之间相互作用的实验手段之一。通过这些新技术的介绍和演示,使学生们大开眼界,我们还积极鼓励学生根据自己的科研方向来进行实验的探索和设计,培养学生的创新能力和实践能力。学生主动学习的积极性被充分调动起来,课堂上出现了研究、讨论问题的活跃气氛。有的同学还结合自己的科研课题,提出了一些具体的实验设想和问题。

(4) 学生参与实验全过程 我们设计一些实验,让学生参与细胞的制备、利用激光共聚焦显微镜采集图象、图象处理和数据分析等实验的全过程。

通过参与激光共聚焦实验的全过程,研究生们真实地接触和学习了这项技术,为他们在以后的科研工作中充分利用这项技术奠定了基础。

激光共聚焦技术是一门新兴的实验科学,在实验过程中采用启发式教学方式,将理论与实践结合,激发了学生的兴趣,调动了学生的积极性,优化了教学过程,取得了满意的教学效果,但是还需要在长期的工作中进一步总结经验,积极开展教学研究,逐步提高教学质量,以期达到更好的教学效果。

参考文献 (References):

- [1] 何其华. 激光扫描共聚焦显微镜在检测活体组织和细胞中的应用[J]. 中国医学装备, 2004, 1(4): 43-47.
- [2] 凌振宝, 林君, 邱春玲, 等. 智能仪器课程实验内容改革的实践与探索[J]. 实验技术与管理, 2004, 21(1): 128-129.
- [3] 宋智, 杨宏云, 刘桂芳. 新时期理工科院校实验教学改革研究与探索[J]. 实验技术与管理, 2003, 20(3): 71-75.
- [4] 张静. 专业实验教学改革探索[J]. 实验技术与管理, 2003, 20(5): 163-166.