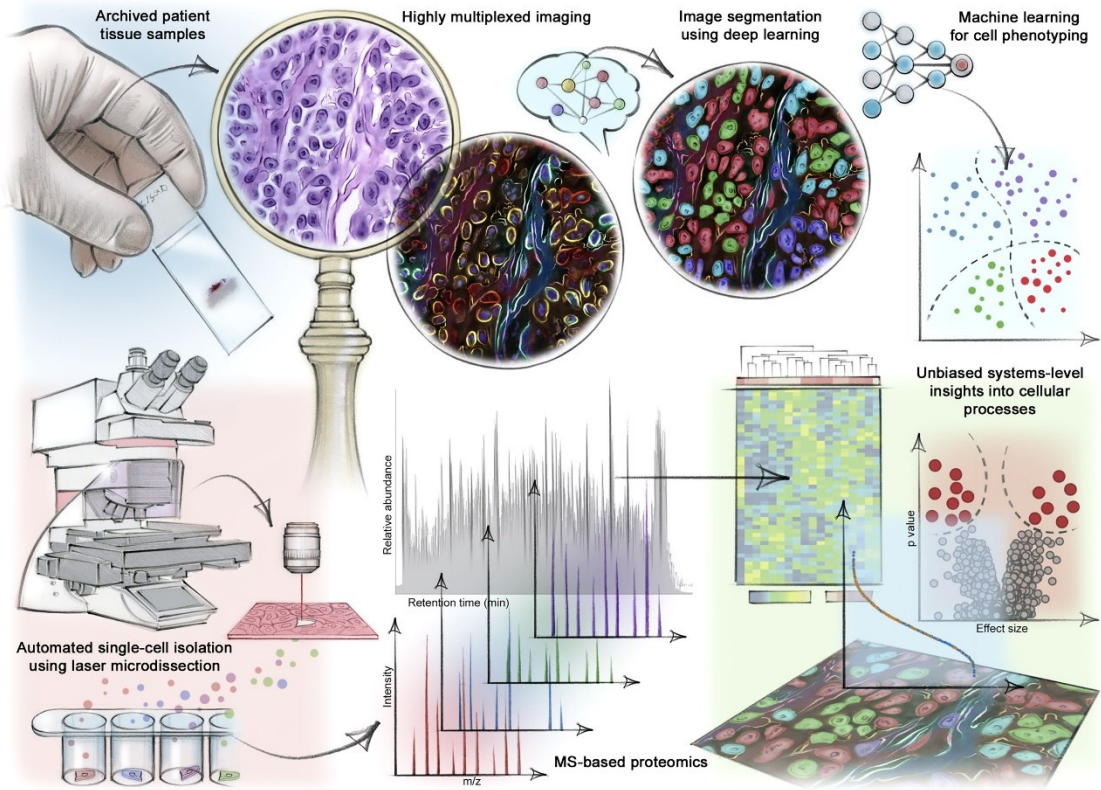




蜂巢

第4期
2023 10月



Combining antibody-based bioimaging with the unbiased characterization of proteomes for system-level cellular phenotyping (Molecular Cell, 2022; 82(12):2335-2349.)

服务内容与形式

蜂巢

2023/10



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

目录

蜂巢

2023/10



- 前沿科技
 - 非变性质谱技术：药物研发中的潜力与挑战 ····· 1
 - 空间单细胞蛋白组学技术 ····· 3
 - 生物成像量化分析技术 ····· 5

- 实验技术
 - 透射电子显微镜样品制备中脑组织的固定 ····· 6
 - 慢病毒转染的原理和简单实验步骤 ····· 7
 - 啮齿类动物手术指导原则 ····· 9

- 仪器推荐
 - Columbus小动物呼吸代谢监测系统 ····· 11

- 实验室安全常识
 - 化学品安全技术说明书 ····· 13

- 讲座回放
 - 中药复方研究的高内涵技术应用展望 ····· 15



非变性质谱技术：药物研发中的潜力与挑战

分析测试实验室/庄小禹

蛋白质是生命的物质基础，通过与不同生物分子之间的相互作用，执行着生命体内的各种重要功能。蛋白质的功能与其三维结构息息相关。在生物制药领域，大型蛋白质不仅是药物的主要靶标，它们本身也以单克隆抗体、抗体-药物偶联物和融合蛋白的形式被用作药物。因此，表征蛋白质与其它分子之间的相互作用、解析蛋白质及其复合物的高阶结构，对于深入理解蛋白质的功能、生理现象以及指导药物研发具有至关重要的意义。

随着生物物理方法的不断发展和成熟，包括X-射线晶体衍射(X-ray)、核磁共振(NMR)、冷冻电镜(cryoEM)、表面等离子体共振光谱(SPR)、等温滴定热法(ITC)在内的跨学科方法使得蛋白质结构解析、蛋白质相互作用研究取得了显著进展。这些方法现在也广泛应用于临床前药物开发，以研究药物作用的分子机制。尽管如此，在药物研发过程中遇到的许多复杂技术问题仍然不能得到充分解决。比如孤儿受体(orphan receptors)、膜蛋白复合物(membrane protein complexes)、动态蛋白低聚物(dynamic protein oligomers)虽然具有作为治疗靶点的巨大潜力，但由于它们缺乏已知的活性、在其自然生理环境之外固有的不稳定性，以及其动态性、异质性的特点，都对传统的生物物理方法提出了挑战。在这种情况下，非变性质谱技术可以作为结构生物学和相互作用组学研究的有力补充工具，提供分子质量、寡聚态、构象变化、异质性、配体结合、靶蛋白-小分子亲和力、蛋白复合物在亚基相互作用网络等重要生物学信息。在下面的篇幅中，本文将主要介绍非变性质谱技术的特点和应用场景，特别是它如何在药物研发中发挥重要作用。

1 非变性质谱技术及其特点

非变性质谱(Native Mass Spectrometry, Native MS)是一种在近乎“原生(native)”生态环境的条件下利用质谱技术分析和研究生物大分子高级结构、相互作用和动力学的方法。与传统质谱不同的是，非变性质谱通过温和的离子化方式(软电离方式)，能够完整地将蛋白质及其复合物从溶液中转移至气相并被质谱直接检测，从而极大程度地维持了蛋白质的立体结构和弱相互作用。非变性质谱技术在使用极少量蛋白非结晶样品的前提下，可以出色的分析速度高精度、高

分辨率地测量完整蛋白质及其复合物的质量，提供化学计量学信息，揭示结合的药物或内源性配体，并且能够同时观察溶液中存在的多个组分。非变性质谱与串联质谱(tandem MS)、离子淌度(IMS)、电荷检测质谱(CDMS)等技术的创新联用也在不断开发和完善，大大提升了生物信息的广度、深度、丰富度。其中，串联质谱模块能够采用多种离子活化方式使前体离子碎裂，逐级拆分复杂的大型蛋白质复合物。这不仅有助于表征复合物的四级结构，一些活化方式还可以在不损失翻译后修饰的情况下进行“自上而下(top-down)”的蛋白质序列分析及修饰位点定位。离子淌度分离(IMS)模块与非变性质谱的组合则相当于在质谱内部引入了一个额外的分离维度，可以实现对质量相同而形状不同的离子进行分离，同时获得与类似于投影面积的离子碰撞截面信息(CCS)。由于离子淌度谱具有毫秒级的分析速度，因此使用非变性IMS-MS的方法可以像“拍快照”一样记录离子化后的蛋白质，这对于捕捉蛋白的动态构象变化、分析瞬时存在的低聚体和复合物具有重要意义。

2 鉴定单体蛋白结构

非变性质谱可以了解氨基酸突变和翻译后修饰对蛋白质结构的影响。例如通过比较野生型蛋白和与癌症相关的突变体的电荷分布及碰撞截面信息，找出其中的特征差异，可以快速并灵敏地筛选出突变蛋白。在生物制药环节中，单克隆抗体(mAb)和抗体偶联药物(ADC)等药用蛋白的结构和修饰必须高度控制和调节。非变性质谱可以分离抗体中的多种糖型，对糖型进行鉴定、定量以及提供糖蛋白的百分比信息，还可以直接用于监测具有特定修饰的抗体的生产。此外，非变性质谱还能研究由于二硫键差异引起的抗体结构变化。ADC药物中因小分子药物与抗体偶联位置不同而产生的位置异构体和差异也可通过结合离子淌度谱以及气相活化的策略来分辨。非变性质谱从“整体”“原生态”的角度对蛋白进行分析，与传统蛋白组学中的“从局部推测整体”的策略完美互补，二者结合可以对蛋白质的一级序列和高级结构进行全面表征。

对于一些结构不稳定或动态变化的蛋白质的表征，非变性质谱有着更为突出的优势。例如具有广泛的生理功能并与一些淀粉样蛋白疾病相关

的内在无序蛋白 (Intrinsically disordered proteins, IDPs), 它们在独立的结构中不具有确定的三维结构, 生理条件下会在不同构象之间转化。由于非变性质谱可以瞬时捕捉系统构象动力学的结构而不影响整体平衡, 因此极大地克服了IDPs构象不均一性的分析和研究的难点。

3 蛋白质与小分子相互作用分析

在研究蛋白质与小分子配体间的相互作用时, 非变性质谱保持非共价相互作用的能力能被最好地体现出来。如前所述, 非变性质谱能够直接测量“蛋白质-配体”复合物的质量, 确定小分子配体结合的化学计量学和特异性, 还可以量化解离常数并研究抑制剂的作用机理。非变性质谱技术可以捕捉在mM到 μ M范围内的解离常数的相互作用, 相较于其它研究蛋白质-小分子结合的生物物理技术, 非变性质谱具有极低的样本消耗、测量快速、信息量高、直接检测等优点。特别是非变性质谱可以识别小的化学片段和蛋白质之间的弱结合, 即使是在苗头化合物分子对蛋白质功能影响不大的情况下。因此, 自21世纪初以来, 非变性质谱就已被应用于制药领域, 用于蛋白质和核酸靶点的化合物库筛选、基于片段的药物设计、苗头化合物验证和先导化合物优化。自动化微芯片阵列nanoESI源、在线体积排除色谱 (SEC)、微流控设备的结合也大幅提高了药物筛选的速度, 推动了非变性质谱测量的自动化发展。

尤其值得关注的是, 非变性质谱可作为膜蛋白研究的有力补充工具。膜蛋白, 如G蛋白偶联受体 (GPCR)、转运蛋白和离子通道, 履行着多种生物功能, 在制药领域具有极高的价值, 目前占据了药物靶点的50%以上。然而, 由于它们在生物膜环境之外表达水平较低, 且容易失去结构完整性, 因此通常需要在亲脂性环境中制备 (如去垢剂胶束、nanodisc、共聚物) 以维持它们的结构完整性。在非变性质谱中, 可以通过在质谱仪内激发蛋白质微胶束复合物的振动, 并释放蛋白质离开洗涤剂来克服这一挑战。近来, “nativeomics方法”的提出大大拓宽了非变性质谱的应用范围, “nativeomics”将“非变性质谱”与“代谢组学”分析相结合, 在一个实验中实现了观察和分离完整的非共价结合的配体-蛋白质复合物——将配体从蛋白质复合物中分离 (解离) ——将释放的配体进行分离和解构以进行结构阐明/鉴定。该方法适用于捕获和分析完整膜蛋白复合物的内源性配体及结合的药物, 已经成功应用在揭示潜在的蛋白质功能调控因子、获取与膜孔蛋白和线粒体转运蛋白接触的功能性脂质组/代谢组信息等方面。

此外, 在研究药理作用机制方面, 非变性质谱也可用于阐明小分子及其结合对象之间的互作机理, 如药物的抑制机制、药物的协同作用、药物对翻译后修饰及受体结构的影响。随着搭载更高分辨率质量分析器和更有效的去溶剂方法的质谱平台的出现, 非变性质谱被越来越多地用于治疗相关的膜蛋白复合物研究, 分析复杂的配体结

合事件, 包括GPCR这种极具挑战的跨膜受体。

4 蛋白复合物结构和淀粉样多肽分析

如前文所提到的, 非变性质谱因其在识别蛋白质动态和多样性方法相对于传统结构生物学技术具有突出优势, 因此常作为这些经典方法的有力补充, 对核磁共振、X-射线晶体学、冷冻电镜等技术表征不足的蛋白质复合物结构模型进行改进完善。通过串联质谱步骤对大型蛋白质复合体进行活化拆分, 以及获得如碰撞截面这种颗粒度参数, 都有助于理解复合物的组成和亚基的组装方式。随着近年来非变性质谱与氘氘交换质谱 (HDX-MS)、化学交联质谱 (CXL-MS) 等技术用的常态化, 这些数据与人工智能结构预测算法的进一步整合, 将有效解决蛋白质及蛋白复合物结构预测存在的精度问题, 推动结构生物学的发展。

淀粉样蛋白的表征是非变性质谱的又一重要应用领域。许多神经退行性疾病, 如帕金森病和阿尔茨海默病, 都与蛋白质或多肽聚集成的淀粉样原纤维有关, 而早期形成的中间体对疾病的发展至关重要。然而, 由于淀粉样原纤维形成过程的中间体具有分散性、多态性和瞬时态特性, 因此分析和识别这些短暂存在低聚态中间体非常具有挑战性。非变性质谱能够捕获淀粉样物质形成早期阶段有聚集倾向的蛋白质单体, 并测试逆转这一过程的药物治疗方法。此外, 非变性质谱还能提供淀粉样蛋白组装方式的信息以及确认有毒低聚体的种类, 这些信息是其他生物物理技术所不具备的。

5 非变性质谱技术的发展和展望

尽管非变性质谱在结构生物学研究、膜蛋白研究、药物靶点研究等方面都取得了显著进展, 但其发展仍面临诸多挑战。例如提高结构解析分辨率、增加分析通量、改善操作易行性、提升数据收集的自动化程度等。此外, 未来的研究关注点包括: 如何直接从生理环境中分析可溶性及膜结合蛋白质, 以最大程度减少样品制备过程中的误差; 如何优化多种离子活化方式以获得更具体的化小分子结合位点信息; 如何解锁跟踪动态蛋白质/小分子相互作用的能力, 从而确定各个的相互作用介导的生理途径, 提高成功找到药物候选物的机会。我们相信, 随着非变性质谱技术的发展和研究规模的扩大, 其在药物研发领域的应用将日益常规, 最终从多个方面推动药物开发。



空间单细胞蛋白组学技术

上海华盈生物医药科技有限公司/纪东瑞, 王世东

1 空间单细胞蛋白组学发展

随着单细胞测序技术的发展和應用，人们对组织细胞异质性的了解越来越深入，尤其是肿瘤微环境中不同免疫细胞亚型的发现推动了人们对于癌症患者预后和治疗耐受的认识。但是伴随着研究的深入，人们发现仅仅依靠细胞的频率和比例无法真实反映细胞的状态，缺乏空间位置的细胞信息是不完整的。为此，近年来以空间转录组和空间蛋白组为主的空间组学技术应运而生。这些空间组学着眼于研究组织存在哪些细胞、细胞在组织中的位置、它们的生物标志物共表达模式，以及它们如何相互作用以影响组织微环境[1]。

精确的细胞空间位置信息的确定需要对空间单个细胞进行表型注释，但是当前广泛采用的空间转录组技术无法达到单细胞分辨率，另外由于RNA和蛋白表达存在不一致性，基于RNA定义的细胞表型和功能状态必须要非常谨慎。相对而言，目前已有几种常用的空间蛋白组学技术可以在单细胞分辨率下检测组织空间上每个细胞的蛋白表达和定位，从而精确评估细胞表型和功能。其中，美国Akoya Biosciences公司推出的PhenoCycler-Fusion (PCF) 空间单细胞蛋白组学分析平台能够以前所未有的蛋白检测通量和速度对数百万个单细胞进行空间表型分析，推动了空间生物学的发展。

2 PCF空间单细胞蛋白组学原理

PCF采用oligo偶联抗体检测技术结合自动化高分辨荧光显微镜，可实现超多靶标的空间定位及单细胞分辨率下的细胞表型分析。所有抗体先一次性与组织切片结合，再启动抗体和荧光探针的“杂交—成像—剥离”三步循环。最多可实现100多种蛋白靶标的同步检测。

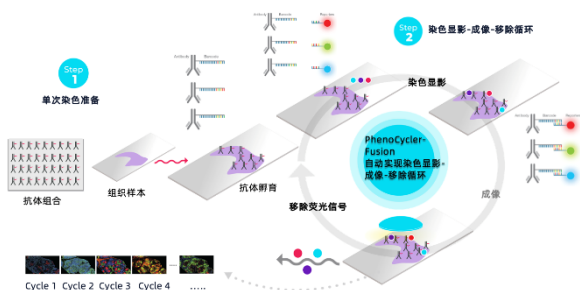


图1: PCF空间单细胞蛋白组学原理示意图

3 PCF空间单细胞蛋白组学优势

相比其他空间蛋白组技术，PCF空间单细胞蛋白组学展现了多方面的优势：(1) 单细胞分辨率，可精确到250nm；(2) 全片扫描，最大成像面积18mm X 35mm；(3) 抗体一次性杂交，减少反复洗脱带来的实验误差；(4) 样本兼容性高，新鲜冷冻切片和石蜡包埋组织切片均适用；(5) 使用灵活，既有商品化抗体Panel，也可定制化检测；(6) 检测速度快，1分钟成像100多万细胞。

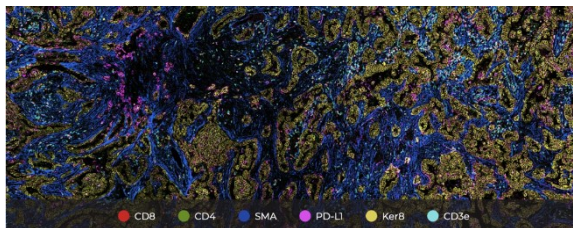


图2: PCF空间成像示例

4 PCF空间单细胞蛋白组学应用

PCF空间单细胞蛋白组学技术应用场景非常广泛，目前已经应用在肿瘤微环境研究、组织炎症研究、以及胃肠道、神经、肾脏等其他组织结构的研究中。借助PCF技术强大的组织空间数据分析和挖掘能力，很多应用该技术的研究成果发表在Cell、Nature、Science等国际顶级期刊上。

4.1 PCF揭示肝细胞癌中的潜在细胞机制

粘膜相关恒定T细胞 (MAIT) 在肝脏中广泛存在，但其在肝细胞癌中的作用尚不清楚。研究人员使用PCF空间单细胞蛋白组对15例肝细胞癌患者肿瘤样本上的37个蛋白标志物进行了原位成像检测[2]。结果发现了MAIT细胞在癌旁组织富集且在肿瘤内部浸润程度很低。同时MAIT在接近肿瘤时开始失能，且耗竭程度在肿瘤临近边缘时加速。

接着研究人员使用细胞邻域分析和卷积神经网络模型分析发现了高表达PD-L1的肿瘤相关巨噬细胞 (CD163⁺TAM) 在肿瘤边缘与MAIT细胞有强相互作用。最终研究人员通过证实了抗PD-L1治疗可以阻断PD-L1⁺CD163⁺TAM细胞对MAIT细胞的抑制作用。该研究揭示了免疫治疗新的细胞互作靶点，为ICB治疗提供了新的见解。

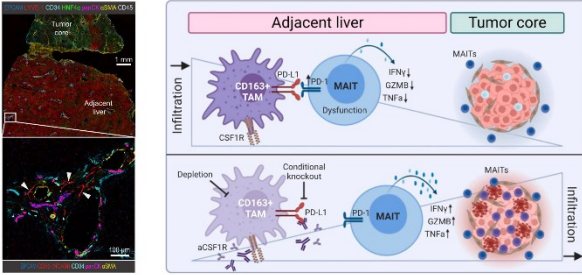


图3: PCF揭示PD-L1+TAM细胞与MAIT细胞互作机制

4.2 PCF技术构建人类肠道组织结构图谱

美国NIH建立的人类生物分子图谱项目(Human Bio-Molecular Atlas Program, HuBMAP)计划通过各种单细胞分析技术、空间单细胞成像技术实现人体各种组织器官的空间结构图谱的绘制。PCF空间单细胞蛋白组学技术被成功应用在肠道组织结构分析的研究中[3]。该研究利用PCF空间单细胞蛋白组技术分析了小肠和结肠不同组织区域的空间细胞分布和表型,建立了不同肠道区域的组织空间单细胞参考图谱。

研究分析了来自8个健康捐献者的64张不同肠道区域样本的组织。PCF空间单细胞蛋白组检测了54个蛋白指标,总共注释了25种细胞类型,覆盖了不同的基质细胞、表皮细胞和免疫细胞类型。不同细胞亚型在不同肠道区域的占比和密度不尽相同,说明了肠道不同区域的功能异质性。

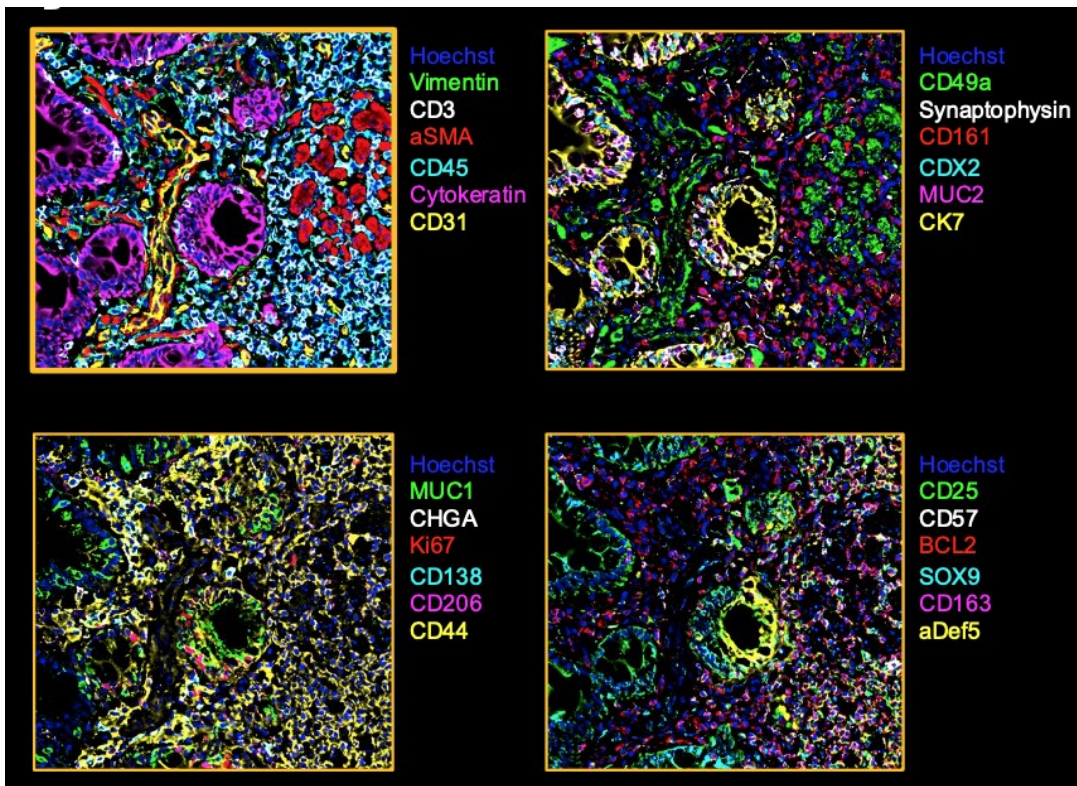


图4: PCF技术绘制肠道组织结构图谱

5 总结

空间单细胞蛋白组学技术对生物医学等领域带来了深刻的变革,借助PCF空间单细胞蛋白组学可以在空间单细胞分辨率下真正地洞察疾病发生进展和治疗反应的机制以及发现疾病预后的新型空间标志物。

参考文献

- [1] Bressan D, Battistoni G, Hannon GJ. The dawn of spatial omics. *Science*.2023;381(6657): eabq4964.
- [2] Ruf B, Bruhns M, Babaei S et al. Tumor-associated macrophages trigger MAIT cell dysfunction at the HCC invasive margin. *Cell*. 2023;186(17):3686-3705.e32.
- [3] Hickey JW, Becker WR, Nevins SA et al. Organization of the human intestine at single-cell resolution. *Nature*. 2023;619(7970):572-584.

技术咨询

梁丁芳, 15821683924
dliang@wayenbiotech.com

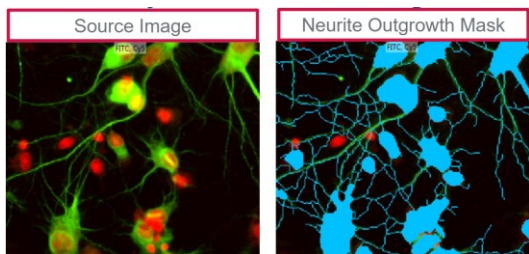


生物成像量化分析技术

分子生物与药理实验室/杨扬

1 生物成像技术

自从16世纪末罗伯特·胡克 (Robert Hooke) 发明第一台显微镜起，光学设备的革新就一直在推动生命科学的发展。能实时、实地、清晰地看见生物体内细微的动态变化一直是不少生物学家梦寐以求的能力，有了显微镜技术后，这种能力已经不再遥不可及。多年来，凭借荧光显微成像技术带来的高度特异和清晰的细胞、亚细胞成像，已实现了细胞内离子、细胞器、活细胞的清晰成像。将这些方法扩展到药物研究领域，更成为了药物研发和评价的利器。在基于显微镜明场与荧光成像以外，核磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI)、计算机断层扫描 (computed tomography, CT) 成像、光热成像 (photothermal imaging, PTI)、拉曼成像 (raman imaging, RI)、超声成像 (ultrasound imaging, USI)、光声成像 (photoacoustic imaging, PAI) 等生物成像技术都为获取生物细胞和组织微观结构，了解细胞、组织、器官与系统的各种生理与病理过程提供了可行性。2014年获得诺贝尔化学奖的超分辨成像技术更是将人们观察的范围提升到了分子级别。



2 生物成像的量化分析趋势

然而，传统的生物成像所获得的实验数据多以定性、定位和人工计数的方式呈现，而研究结论通常也以主观描述与半定量形式表述，如基于HE染色的病理诊断。“Seeing is believing”，在当前已能获得大量客观生物成像数据，纳入表型组学的研究观念，将成像数据量化已成为生物研究

技术邻域不可阻挡的发展趋势。第一，形态学图像的量化结合目前已科学化的统计学方法能够获得更客观与可靠的实验结论。第二，由于形态学实验结果2D或3D的属性，单通道的标记即可形成区域参数 (面积、长度、宽度等)、信号强度、形状特征 (圆度、相互距离等) 多维度的量化数据，可通过多个参数组合阐述生物学相关意义。第三，运用目前已被广泛使用的生物信息分析方法可对高通量图像的量化信息与生物相关性互作信息进行多维分析，由此获得全新生物学或药理学运行规律的发现。因此，在目前已能获得高通量与高质量生物图像数据的基础上，生物成像量化分析技术的发展已成为大势所趋。

3 公共技术服务平台技术资源

当前我们平台的成像设备包括：

- 光谱组织切片扫描分析系统 (PE, Vectra)
- 激光扫描共聚焦显微镜 (Leica, SP8)
- 高内涵成像分析系统 (MD, ImageXpress Micro-4)
- 量化成像分析流式细胞仪 (Luminex, ImageStreamX Mark II)

以上述仪器为代表的多套大型设备，并在技术工作流程构建中配备了IDEAS、Metaxpress、IN Carta等多个图像分析软件。



透射电子显微镜样品制备中脑组织的固定

细胞生物与组织病理学实验室/钟霄毓

生物标本透射电镜的常规制备过程包括如下步骤：取材——固定——脱水——包埋——半薄切片——光镜定位——超薄切片——染色——电镜观察。本文将着重介绍小鼠脑组织的固定方法。

1 前固定

生物标本对固定的要求非常严格，活体组织在离体后需立即进行固定处理，否则细胞内的水解酶释放会造成蛋白质的溶解，产生细胞器自溶的变化。固定可以稳定细胞内各种化学成分及糖类，脂肪等物质在存活时的位置及形态，使标本的组织结构得到很好的保持。固定后组织结构不收缩，不膨胀，不变形，没有人为假象。通常，生物组织使用化学固定的方法，这类化学固定剂可以和细胞内的蛋白质结合形成交联，从而稳定蛋白质的结构。

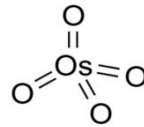
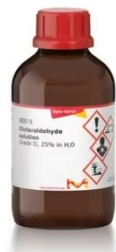
目前常用的化学固定方法为戊二醛——四氧化锇双固定，脑组织的常规固定方法亦是如此，即用戊二醛固定组织内的蛋白质，用四氧化锇固定脂类物质。由于醛类固定剂的分子量小，渗透速度较快，而四氧化锇分子量大渗透速度较慢，所以两类固定剂需配合使用。戊二醛固定剂的PH值一般要求在7.2~7.4之间。脑组织取材后，放入2.5%的戊二醛固定液中4°C固定2小时或更久。

2 缓冲液清洗

由于戊二醛和四氧化锇，一个是还原剂，另一个是氧化剂，两者之间如果洗涤不彻底，残留在样品内的醛类物质会与四氧化锇发生化学反应而产生细小的还原锇颗粒沉淀，这将会影响后续的染色效果及电镜观察。所以，为了防止标本内产生二氧化锇颗粒的沉淀，样品在戊二醛固定后需经缓冲液洗涤多次。通常，脑组织在经戊二醛固定后，使用磷酸盐缓冲液洗涤3次，每次10分钟或过夜。

3 后固定

四氧化锇是一种微黄色的单斜晶体，对脂类物质有很好的固定作用，是唯一能固定脂类分子的固定剂，可以很好地保存磷脂等细胞内各种膜结构，如细胞膜，内质网膜，线粒体膜等。四氧化锇也可以很好的固定不饱和脂肪酸。所以四氧化锇是保存细胞微结构的首选固定剂，由于锇是重金属，因此四氧化锇不仅是固定剂，同时也是电子染色剂，提高电子染色的反差。脑组织在经磷酸盐缓冲液清洗后在1%四氧化锇中4°C固定2小时后，进行后续的操作。



四氧化锇，化学式 OsO_4 ，为白色或淡黄色结晶，有类似氯的气味，剧毒。危险化学品目录管制试剂。



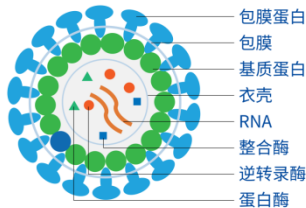
慢病毒转染的原理和简单实验步骤

病毒与免疫实验室/王晓宇

1 慢病毒

慢病毒 (Lentivirus) 载体是以人类免疫缺陷型病毒 (HIV) 为基础发展起来的基因治疗载体, 它对分裂期和非分裂期细胞均具有感染能力, 并可以在体内较长期的表达且安全性高。

一般市售的慢病毒为复制缺陷型病毒, 即病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞, 也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒。慢病毒中的毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代, 属于假型病毒。但该病毒仍然具有可能的潜在的生物学危险, 因此建议不要使用编码已知或可能会致癌的基因的假型病毒, 除非已经完全公认某个基因肯定没有致癌性, 否则均不建议采用假型病毒进行生物学实验。



2 慢病毒载体

市售的慢病毒载体包括载体质粒 (PFV:PLVX)、辅助质粒psPAX2 (pHelper 1) 和辅助质粒pMD2G (pHelper2) 三种质粒组成。载体质粒PFV载体中含有 HIV的基本元件 5'LTR 和 3'LTR以及其他辅助元件。通常根据不同的实验目的针对载体质粒进行改造来进行启动子活性研究、基因表达研究和RNA干扰等研究。pHelper 1载体中含有 HIV 病毒的 gag基因, 编码病毒主要的结构蛋白; pol基因, 编码病毒特异性的酶; rev基因, 编码调节 gag和 pol基因表达的调节因子。pHelper 2载体中含有单纯疱疹病毒来源的 VSV-G 基因, 提供病毒包装所需要的包膜蛋白。

3 慢病毒实验步骤

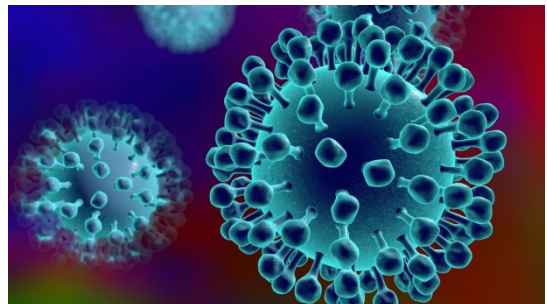
3.1 细胞株

HEK293T, 慢病毒的包装细胞, 为贴壁依赖性上皮样细胞, 生长培养基为DMEM (含10% FBS)。

3.2 慢病毒包装实验操作步骤

1) 质粒转染与病毒上清收集

- 转染前24 h, 用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞, 重新接种于 10cm 细胞培养皿, 37°C、5% CO₂培养箱内培养, 待细胞密度达70-80%时即可用于转染;
- 转染前 2 H将更换细胞培养基;
- 向一灭菌离心管中加入所制备的各DNA溶液 (载体质粒 10 μg, pHelper 1.0载体5μg, pHelper 2.0载体 5 μg), 与相应体积的 Opti-MEM混合均匀, 调整总体积为 0.5 ml, 在室温下温育 5 min。
- 取50μl转染试剂与450μl转染培养基混合, 在室温下温育 5 min。把稀释后的 DNA与稀释后的转染试剂混合, 轻轻地颠倒混匀, 不要振荡。
- 混合后, 在室温下温育 10分钟。将上述转染混合物滴加到 293T 细胞培养液中, 摇匀, 于37 °C, 5% CO₂细胞培养箱中培养。
- 培养 6-8H后倒去含有转染混和物的培养基, 每盘细胞更换10 ml的10% FBS 完全培养基, 37°C、5% CO₂培养箱内继续培养。转染后24 H, 用显微镜观察含标签荧光 (GFP/RFP) 细胞的数量判定转染效率。确定转染成功后 (荧光细胞比例 ≥70%), 进行第一次收毒操作。收集细胞培养基于一个无菌50ml离心管中, 4°C保存。更换新鲜的10% FBS培养基10 ml, 继续培养24 H。
- 转染后48 H, 进行二次收毒操作。收获含病毒培养基于无菌50 ml离心管, 4°C保存。



2) 慢病毒浓缩与纯化

- 将收获的含病毒颗粒的培养基，经过 0.22 μm 滤膜过滤并收集于无菌超速离心管中，密封；
- 超速离心 80,000 g,离心4 H; 弃去离心后上清，用 Virus store buffer重悬沉淀；
- 收集重悬液，再次经过 0.22 μm滤膜过滤除菌，分装于无菌病毒管中；每个病毒管上贴好相应的标签，于-80°C冰箱保存。

3) 慢病毒质量检测

- 物理检测:检测内容为病毒颜色、是否存在可见不溶性物质。
- 无菌检测:将病毒加入293T细胞验证，正常培养24 H后镜检，无任何细菌及真菌污染情况。
- 滴度检测

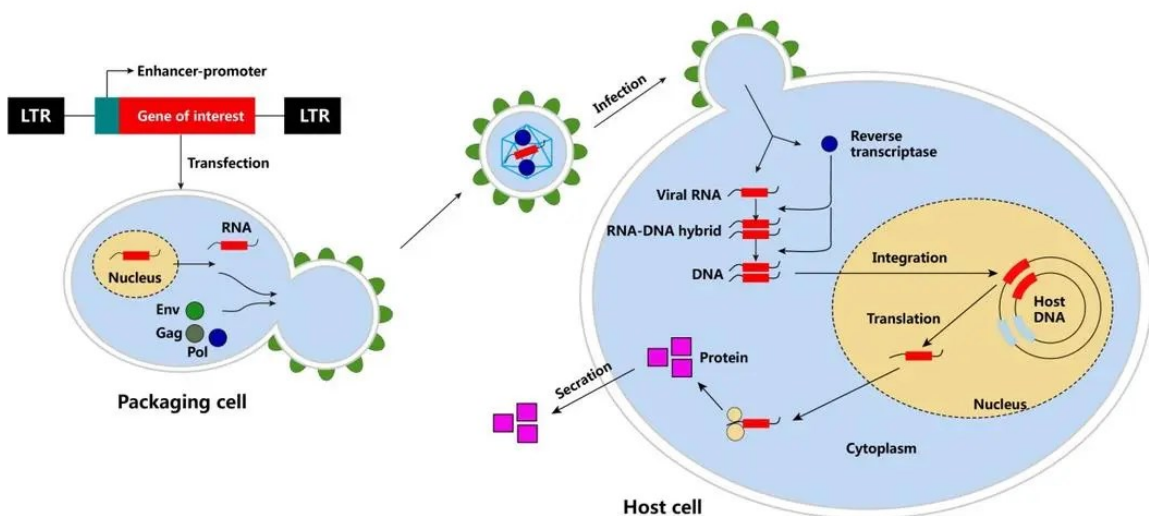
4) 贴壁类细胞慢病毒转染使用方法

- 在感染前一天，把目的细胞种植在96孔板中，细胞数为3-5 × 10⁴个细胞/孔，100μl/孔；
- 设计实验组：使用1 × LV-Enhance将病毒进行稀释，稀释后滴度为1 × 10⁸TU/ml、1 × 10⁷TU/ml、1 × 10⁶TU/ml。
- 混匀后加入到孔板内培养，8-12 H后观察细胞状态并更换为完全培养基。
- 感染3-4天后，观察荧光表达情况（建议预实验使用带有荧光标记的病毒进行）。对于生长缓慢或代谢慢的细胞，可以适当延长感染时间再进行观察，中途可以进行换液，保持细胞的生长活性。
- 通过感染效率，判定目的细胞的最适条件。

病毒量=MOI × 铺板细胞数 × 1.3/病毒滴度

注：

- ① 1.3数值为细胞的生长速度，24 H细胞数较铺板时的大概比值，细胞不同数值会存在一些差异。
- ② MOI值也可根据相关文献数据进行实验。
- ③ 部分资源摘自网络。



慢病毒包装和侵染细胞过程
(图片来源www.creative-biogene.com)



啮齿类动物手术指导原则

医学实验动物室

1 背景

本文详述了啮齿类动物手术过程中需要遵守的操作原则，在IACUC方案中列出了相关替代流程的操作可除外。实验研究者有责任确保动物得到充足的麻醉/术后护理，提供护理的人员必须熟悉方案流程，同时具备进行如下所示评估的技能和能力，并且必须能够在发生术后并发症时提供充足的兽医支持。值得注意的是，以下的这些原则描述的均是最低标准。

2 麻醉和镇痛

啮齿类动物麻醉指南和要求需在啮齿类动物麻醉护理的SOP中概述。除非有充足的理由，所有手术的镇痛给药应在术前或术中开始，并持续至术后至少24小时。需要局部麻醉时，应在组织切开前注射局部麻醉剂，利多卡因在注射2-5min内起效，布比卡因在注射15min内起效。

3 手术区域准备

啮齿类动物手术操作区域必须位于设施内不同时开展其他活动的区域。使用前该区域必须清洁并保持整洁，所有物品、设备表面均应清洁和消毒。

4 器械和创巾准备

1) 手术前必须采用可接受的方法对手术器械进行灭菌，方法包括高压灭菌、环氧乙烷灭菌和特定的冷灭菌技术，单独使用酒精不是可接受的灭菌方法。

2) 灭菌器的功能以及器械包的无菌性确认必须按照高压灭菌器监测和无菌包装储存标准执行。

3) 手术过程中，可使用热珠灭菌器对器械进行重复灭菌：使用无菌纱布擦拭器械上的所有有机材料后，将其放入微珠中30-45秒，此操作最多用于4只动物的手术器械灭菌，后续就必须拆用新的手术器械包。

4) 所有的植入物（微型泵、导管、缝合材料）必须无菌。

5) 应使用无菌铺巾覆盖未剃毛的区域，铺巾可接受的材料包括棉布、透明粘性铺巾和大纱布方块。另外还需建立手术器械的无菌区域，以防污染。

5 手术人员准备

所有手术人员必须戴口罩和手术帽，口罩将口鼻完全罩住，手术帽需将所有的头发包裹。手部刷洗完毕后，穿无菌手术服，戴无菌手套（不能接触手套的外表面）。整个过程保持器械和手套的无菌。

6 动物准备

1) 手术因麻醉时间、体腔暴露面积等原因，易出现术中体温变化，需额外提供温水毯等保温措施。

2) 双眼涂抹眼膏，防止角膜干燥。

3) 必须清除切口周围区域的所有毛发，可以使用剃毛刀或脱毛膏（使用不当可导致皮肤的化学烧伤），脱毛的区域需要足够大，以防器械或缝线接触到未备好的皮肤。

4) 对切口部位进行手术部位准备：（注：仅用酒精不能满足切口的消毒需求），从手术切口部位开始向外旋转，以环形方式，使用碘伏或氯己定纱布进行消毒，每次使用后，丢弃纱布，重复至少三次。注意避免使用酒精等抗菌剂过度湿润手术区域，可能会加剧体温的丢失，造成低体温。



7 切口闭合

- 1) 必须至少分两层闭合体腔（体壁和皮肤）。
- 2) 为防止动物撕咬伤口裂开，除非方案另有说明，否则必须采用简单间断缝合方式闭合伤口。
- 3) 也可以使用伤口夹、组织胶闭合皮肤，注意涂胶过多是导致动物自残和伤口裂开的常见原因。外部缝线必须是单股材料，以防止毛细作用及可能的伤口感染。

8 术后护理

- 1) 动物苏醒后，将动物送回笼中饲养，除非方案另有说明。作为支持性治疗计划的一部分，可提前24-48小时将食物置于笼盒中。
- 2) 研究人员应第二天一早检查动物状态，之后至少每天检查一次，持续7-10天，直至拆除缝线或伤口夹，确保动物可正常进食、饮水、活动和走动。
- 3) 检查手术切口部位是否有透明或脓性分泌物、发红、肿胀、动物撕咬或伤口裂开。
- 4) 若出现感染、疝气、器官功能障碍等并发症，及时咨询兽医。除非方案中有描述，否则未经兽医人员确认，不允许进行修复手术。事先未获得批准而进行的修复代表二次手术和不合规事件。
- 5) 任何异常（例如脱水、嗜睡、食欲不振）均需要咨询兽医进行支持治疗，并持续频繁的监测和护理。如果动物得到了适当及时的治疗，但症状持续恶化，则需要考虑对其进行安乐。

9 记录保存

必须保存每只或每笼动物的手术记录。建议使用手术记录卡，信息包括日期、手术名称、使用的麻醉剂和镇痛药以及给药时间、术后的监测记录。动物监测期间记录卡必须固定在笼盒上，最终由实验室按照相关法规作为永久记录保存。

10 非存活手术

- 1) 建议提供额外的热量来稳定动物的麻醉状态，但不做严格要求。
- 2) 所有的手术器械和植入物必须洁净，但不一定无菌。对于>4小时的长时间手术，建议使用无菌器械，以避免与细菌污染相关的炎症。
- 3) 手术区域必须剔除毛发，但该部位不需要无菌清洗。
- 4) 术者可以穿戴新的检查手套，而非无菌手套。

参考文献：

Principles of Rodent Surgery. IACUC of WAYNE STATE UNIVERSITY. 12/2019
转自微信号谭索究竟





Columbus小动物呼吸代谢监测系统

医学实验动物室

1 系统组成简介

哥伦布公司 (Columbus Instruments) 的综合的实验动物监测系统 (CLAMS) 是同类产品中的佼佼者。CLAMS 集合各个子系统而成，系统可以根据需要组合。系统可以在设定条件下进行开路热量，活动，体重，喂食，饮水，食物控制，跑轮，尿液收集，睡眠，体温，心率等测定：Oxymax/CLAMS 是一个“一步测试解决方法 (one-test solution)”，可同时进行1到32个动物的多个参数的监测评估。

2 应用领域

主要应用于营养、肥胖、糖尿病、心血管等内分泌与代谢相关性疾病研究，运动学、生理学等其他生命科学领域。

3 特点

- 模块化用户定制设计，满足GLP实验要求
- 连续自动运行至少3天，不需重新启动系统
- 多种不同进食器，适合某种特殊需要
- 食物监测精度高0.01克，且能设置阈值
- 尿液冷冻收集，随时监测尿液量变化
- 良好的扩展性，动物的体温和心率监测等

4 呼吸代谢热量测定评估

哥伦布公司 Oxymax 系统是全球领先的对实验动物进行开路间接卡路里测量的系统。通过计算代谢过程中的氧-二氧化碳交换量来评估产生的热量。通过消耗的气体量(氧气)和产生的代谢物(二氧化碳)之间的关系揭示实验动物所用食物的能量含量。这个“产热值”通过气体交换量再来计算热量。

Oxymax 可选安装甲烷传感器，以用于反刍动物的研究。

修正的公式可用于热量计算。

- $VO_2 = ViO_2i - VoO_2o$
- $VCO_2 = VoCO_2o - ViC$
- $RER = VCO_2/VO_2$



主要特点:

- 质量流量测量：质量流量是一种直接测量流体的质量，而不是体积。不像体积，会受到温度和压力的影响；质量测试提供了一种恒定和可比较的测试单位。
- 代谢笼符合长期居住的条件：符合国际相关部门的规定。
- 最少的气体残留：传感器的灵敏度可以检测出 0.001% 的气体成分变化。这个精度要求气体交换的差异很小。
- 操作简单：所有的连线和管路都减到最少程度。软件包括校准和设置的指导。数据组织，格式和输出可链接到通用的数据删减和回顾程序。用户成千上百小时的操作是此产品表现的最佳测试。

5 食物消耗测定评估

Oxymax/CLAMS 可以通过三种方法来递送食物。每一种方法适合于某种特殊需要。

- 头顶喂食器 (Overhead Feeder)：最常用的食物递送方法，适合随意地在头顶得到食物。提供了一种动物熟悉的食物递送和监测
- 端侧喂食器 (End-Side Feeder)：两个同心的漏斗状容器消除了食物的散落。整个喂食器装置放在一个可测量装置上，此装置可保留散落出来的食物，测算动物所消耗的食物量。

- 中央喂食器 (Center Feeder)：中央喂食器递送食物实通过一个弹簧装置的平板来进行的。当食物被消耗时，平板会抬升剩下的食物到一个高度以方便动物继续得到食物。

食物消耗量测量：精度为 0.01克。

喂食探测和评价：比较两次质量读数的差异就能测出食物的消耗量。显示出来的差异量超出使用者设置的阈值，通常此阈值为 -0.01g 或 -0.02g，确证了进食和作为有效的事件将会被记录到日志文件中；如果此差异没有超过设定的阈值，则此事件将会从日志中除去，没有进餐记录。

6 饮水消耗测定评估

饮水量监测方法：提供两种液体消耗的监测机制：“舔”和“体积”。

舔舐监视：舔舐探测是利用标准导电率的原理进行的，一个微小的或者察觉不到的电流通过动物从吸管传到导体表面。每次对吸管的接触产生一个计数。Oxymax/CLAMS 对每次测试列表间隔记录。

体积监测：哥伦布公司的专利技术 (Volumetric Drinking Monitor, VDM)。消耗的液体体积，精度为 20ul。多重 VDM 吸管可以对动物进行偏向性试验或输送药剂。

Oxymax/ CLAMS软件允许用户指定代谢笼的吸管，确定每个管路里传输的液体。使用标准的吸管不需要对动物进行训练以适应唯一的饮水环境。VDM 可以承受粘性物质。这样可以使用这个装置传输流质食物。

7 活动监测评估

通过红外 (IR) 光电管技术进行一维、二维和三维监测动物的活动。红外光束的一次打断计数一次 (count)。把 IR 光电管放置在 X 或 XY 方向可以覆盖一个平面。这些光束高度与动物的活动面垂直交叉。IR 光电管放置在高于动物的高度上可以监测动物的站立或跳跃 (Z 轴)。系统可以提供 X, XY, XZ 或 XYZ 的配置。

活动评价：系统把活动数据根据两个时间间隔制成数据表格。第一个间隔是跟热量测量相伴所发生的。这个间隔较长，根据笼的数目而决定的。第二个间隔较短，提供很高解析度的动物行为的瞬时测量。这个过程典型的记录时间是 10-30 秒。高解析度的结果可以从第二个活动数据表产生。Oxymax/CLAMS 表格显示每个轴的总的和步行计 Oxymax/CLAMS 活动监测显示窗口 数据，以及独立的第二个高解析度的瞬时数据表。

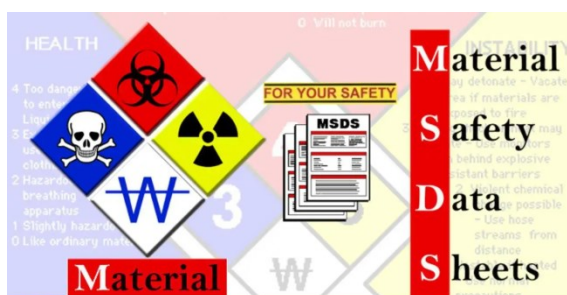




化学品安全技术说明书 科技实验中心

化学品安全技术说明书 (MSDS)

MSDS (Material Safety Data Sheet)即化学品安全技术说明书/化学品安全说明书/化学品安全数据说明书,是化学品生产商和进口商用来阐明化学品的理化特性(如PH值,闪点,易燃度,反应活性等)以及对使用者的健康(如致癌,致畸等)可能产生的危害的一份文件。它提供化学品的理化参数、燃爆性能、对健康的危害、安全使用贮存、泄漏处置、急救措施以及有关的法律法规等十六项内容。



欧盟及国际标准化组织 (ISO) 均采用SDS (Safety Data Sheet) 术语,美国、加拿大,澳洲以及亚洲许多国家则采用MSDS术语。

我国在2008年前的标准GB16483-2000中称为CSDS,2008年重新修订的标准GB16483-2008《化学品安全技术说明书内容和项目顺序》中,与国际标准化组织进行了统一,缩写为SDS。

SDS与MSDS 两种缩写在供应链上所起的作用完全一致,仅在内容上有一些细微的差别。

《国际化学品安全卡》(ICSC)

《国际化学品安全卡》(ICSC)是联合国环境规划署(UNEP)、国际劳工组织(ILO)和世界卫生组织(WHO)的合作机构国际化学品安全规划署(IPCS)与欧洲联盟委员会(EU)合作编辑的一套具有国际权威性和指导性的化学品安全信息卡片。卡片扼要介绍了2000多种常用危险化学物质的理化性质、接触可能造成的人体危害和中毒症状、如何预防中毒和爆炸、急救/消防、泄漏处置措施、储存、包装与标志及环境数据等数据,供在工厂、农业、建筑和其他作业场所工作的各类人员和雇主使用。

在全世界推广使用国际化学品安全卡已经被国际劳工组织列为《全球职业安全、健康和环境计划》的重要内容之一。国际化学品安全卡信息的传播有力地促进了全球的化学品安全管理、环境保护和可持续发展。

ICSC共设有化学品标识、危害/接触类型、急性危害/症状、预防、急救/消防、泄漏处置、包装与标志、应急响应、储存、重要数据、物理性质、环境数据、注解和附加资料14个项目。

化学品的标识数据提供了一种化学物质的CAS登记号、化学物质毒性作用登记号(RTECS)、UN编号、欧盟编号(EC)和中英文化学品名称。卡片(中文版)还提供了中国危险货物编号等信息,供使用者检索查询ICSC数据。



化学品安全技术说明书查询网址

- Chemical Book: <https://msds.chemicalbook.com/>
- Merck/Sigma公司MSDS: <https://www.sigmaaldrich.cn/CN/zh>
- 安全文化网: <http://msds.anquan.com.cn/>
- 国际化学品安全卡 (ICSC中文版) 查询系统: <http://icsc.brici.ac.cn/>

中国GB/T 16483-2008

中国为同国际标准 eqvISO110—14—1:1994(E) 接轨也制定了相关的标准GB/T16483-2008《化学品安全技术说明书内容和项目顺序》，规定MSDS要有十六部分的内容

1 化学品及企业标识 (chemical product and company identification)

主要标明化学品名称、生产企业名称、地址、邮编、电话、应急电话、传真和电子邮件地址等信息。

2 危险性概述 (hazards summarizing)

简要概述本化学品最重要的危害和效应，主要包括：危害类别、侵入途径、健康危害、环境危害、燃爆危险等信息。

3 成分/组成信息 (composition/information on ingredients)

标明该化学品是纯化学品还是混合物。纯化学品，应给出其化学品名称或商品名和通用名。混合物，应给出危害性组分的浓度或浓度范围。无论是纯化学品还是混合物，如果其中包含有害性组分，则应给出化学文摘索引登记号 (CAS号)。

4 急救措施 (first-aid measures)

指作业人员意外的受到伤害时，所需采取的现场自救或互救的简要处理方法，包括：眼睛接触、皮肤接触、吸入、食入的急救措施。

5 消防措施 (fire-fighting measures)

主要表示化学品的物理和化学特殊危险性，适合灭火介质，不合适的灭火介质以及消防人员个体防护等方面的信息，包括：

危险特性、灭火介质和方法，灭火注意事项等。

6 泄露应急处理 (accidental release measures)

指化学品泄露后现场可采用的简单有效的应急措施、注意事项和消除方法，包括：应急行动、应急人员防护、环保措施、消除方法等内容。

7 操作处置与储存 (handling and storage)

主要是指化学品操作处置和安全储存方面的信息资料，包括：操作处置作业中的安全注意事项、安全储存条件和注意事项。

8 接触控制 / 个体防护 (exposure controls/personal protection)

在生产、操作处置、搬运和使用化学品的作业过程中，为保护作业人员免受化学品危害而采取的防护方法和手段。包括：最高容许浓度、工程控制、呼吸系统防护、眼睛防护、身体防护、手防护、其他防护要求。

9 理化特性 (physical and chemical properties)

主要描述化学品的外观及理化性质等方面的信息，包括：外观与性状、pH值、沸点、熔点、相对密度 (水=1)、相对蒸气密度 (空气=1)、饱和蒸气压、燃烧热、临界温度、临界压力、辛醇/水分配系数、闪点、引燃温度、爆炸极限、溶解性、主要用途和其他一些特殊理化性质。

10 稳定性和反应性 (stability and reactivity)

主要叙述化学品的稳定性和反应活性方面的信息，包括：稳定性、禁配物、应避免接触的条件、聚合危害、分解产物。

11 毒理学资料 (toxicological information)

提供化学品的毒理学信息，包括：不同接触方式的急性毒性 (LD50、LD50)、刺激性、致敏性、亚急性和慢性毒性，致突变性、致畸性、致癌性等。

12 生态学资料 (ecological information)

主要陈述化学品的环境生态效应、行为和归宿，包括：生物效应 (如LD50、LD50)、生物降解性、生物富集、环境迁移及其他有害的环境影响等。

13 废弃处置 (disposal)

是指对被化学品污染的包装和无使用价值的化学品的安全处理方法，包括废弃处置方法和注意事项。

14 运输信息 (transport information)

主要是指国内、国际化学品包装、运输的要求及运输规定的分类和编号，包括：危险货物编号、包装类别、包装标志、包装方法、UN编号及运输注意事项等。

15 法规信息 (regulatory information)

主要是化学品管理方面的法律条款和标准。

16 其他信息 (other information)

主要提供其他对安全有重要意义的信息，包括：参考文献、填表时间、填表部门、数据审核单位等。

MSDS/SDS编写基本要求

- 格式必须规范，必须严格按照法规或标准的编写指南来对SDS中内容进行编排；
- 物质信息需与真实产品相一致；
- 分类准确、信息完整、语言规范且简洁明了；
- 一份完整的SDS需要由16个部分组分，缺一不可。

讲座回放

蜂巢
2023/10



中药复方研究的高内涵技术应用展望

高内涵成像技术与应用研讨会——上海站

上海中医药大学 杨扬
2023年5月26日

一、高内涵技术从高通量筛选到表型定量

中医药临床疗效

二、中药复方来源活性化合物评价面临的挑战

基于高内涵成像技术

三、中药复方的研究的优势与意义

通过建立方法
回答为什么有效？

四、中药复方体外研究的意义与价值

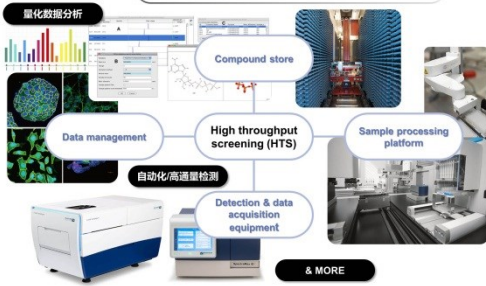
可深入研究

五、中药复方的高内涵应用研究策略

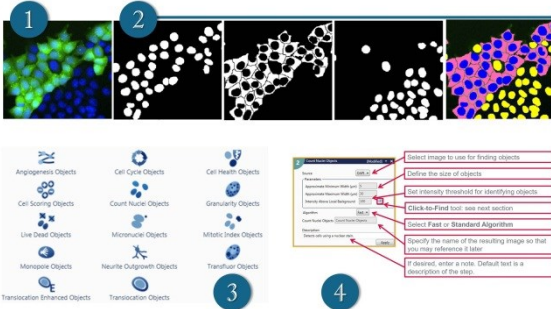
系统还原复方疗效

六、中药复方高内涵应用的研究展望

一、高内涵技术与高通量筛选



一、高内涵技术与表型定量



二、中药复方来源活性化合物评价面临的挑战

中药复方研究

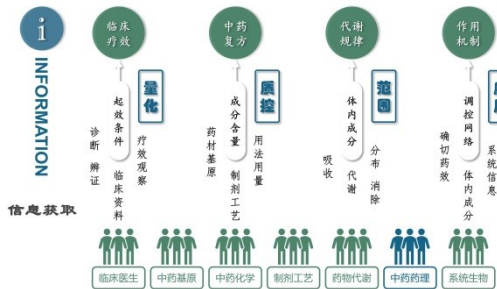


传统医药 — 质量控制 见微知著
用药途径 — 代谢过程 方法设计
成分众多 — 成分组合 系统还原

中药复方中哪些成分起效？
中药复方如何起效？

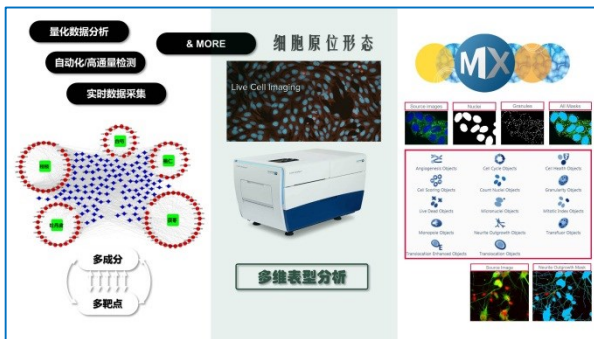
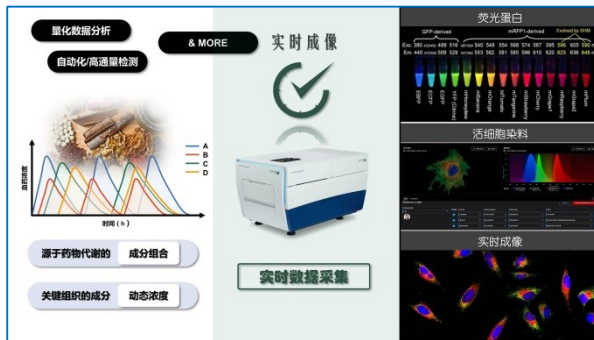
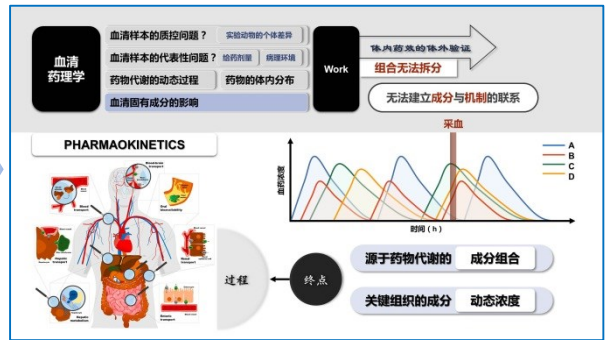
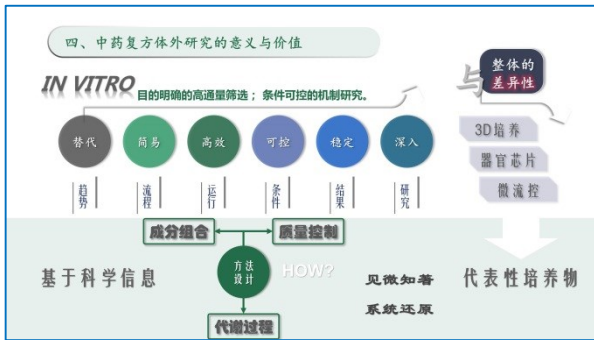
天然产物研究
有效成分明确，作用规律清晰，最大程度揭示中药复方的临床疗效。

多学科联动



三、中药复方的研究的优势与意义





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>

投稿信箱：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