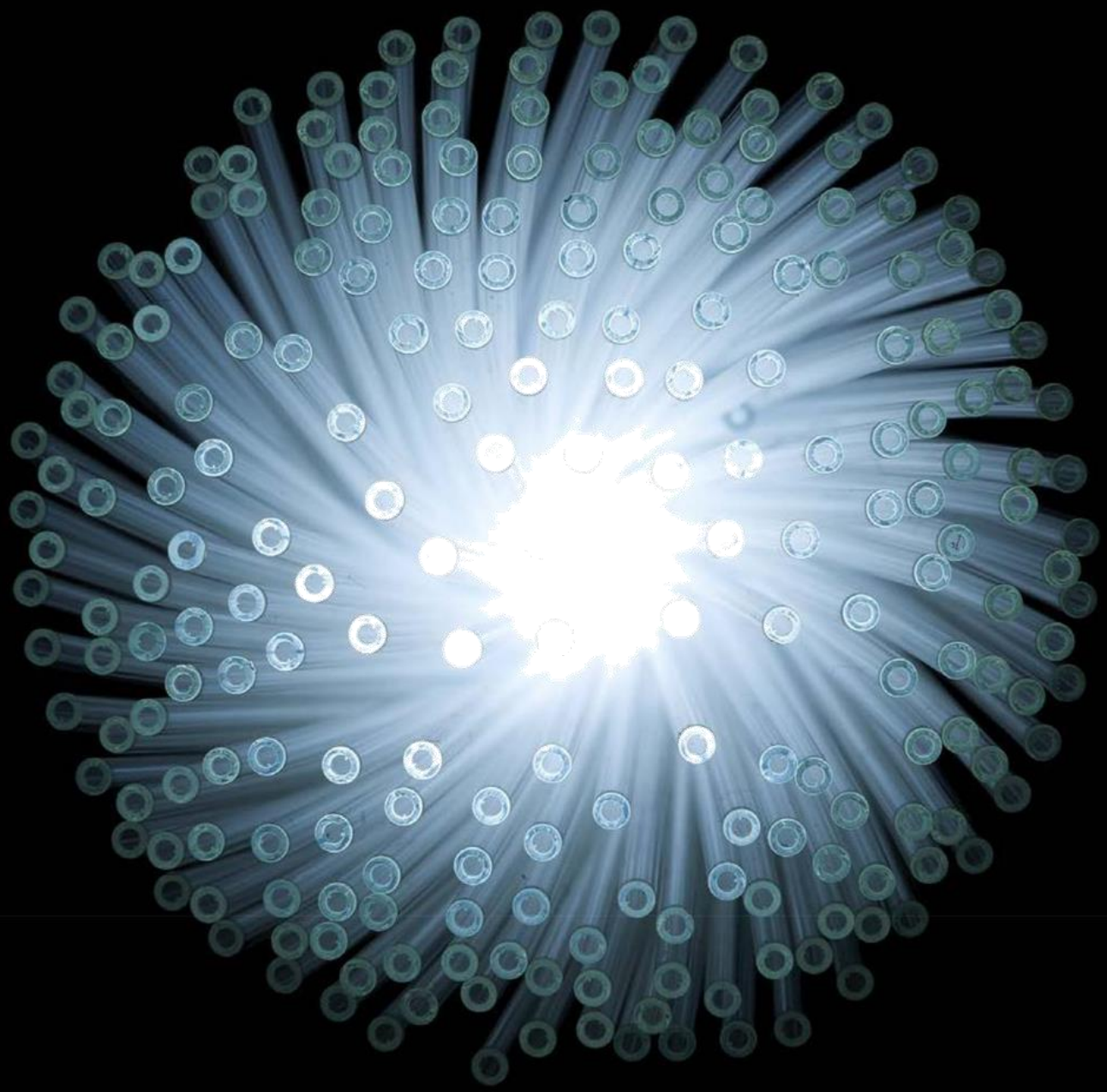


Pipette cookbook 2018

P-97＆P-1000 微电极拉制仪

校译　刘新英　博士

Pipette cookbook 是由 AdairOesterle 博士与 Sutter 仪器公司编写。Pipette cookbook 的打印版本包含在所有新的 P-97 和 P-1000 拉制仪中，PDF 版本可以在 Sutter 网站上找到并免费下载。

http://www.sutter.com/contact/faqs/pipette_cookbook.pdf

Pipette cookbook 的修订和增补版本每两到

三年发布一次，如果您有任何建议，

意见及/或更正，请联系 Sutter，。

我们欢迎您的反馈！

Adair Oesterle at Getty Museum–not pulling pipettes!

SutterInstrumentCompany

OneDigitalDrive

Novato,CA94949

415-883-0128

www.sutter.com

目录

..... 4

简介 5

在 P-87 或 P-80/PC 上使用 Pipette Cookbook 6

SUTTER 毛细玻璃管 7

加热片及配件 8

要素： 10

参数设置 11

参数设置一般准则 12

RAMP TEST 13

“安装加热片”-按步骤 15

第 1 章 电生理概述 23

第 2 章 贴壁细胞，线虫和果蝇-推荐程序 38

第 3 章 蜂尾针-主要推荐线虫用（线虫注射） 46

第 4 章原核，细胞质和 CRISPR 注射 48

第 5 章 胚胎干（ES）细胞的显微注射 52

第 6 章 ICSI（细胞内单精子注射） 54

第 7 章 核移植 56

第 8 章 固定电极 58

第 9 章非洲爪蟾（蛙卵）显微注射 60

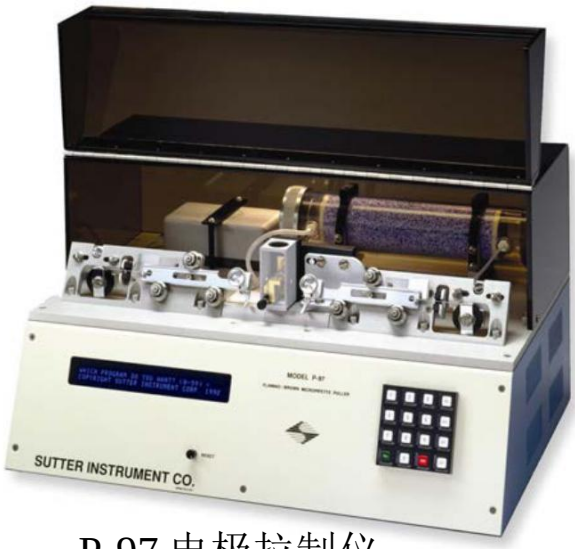
第 10 章 大口径电极 62

第 11 章 吸入电极：细胞转移，单细胞力学，和卵裂球活检 66

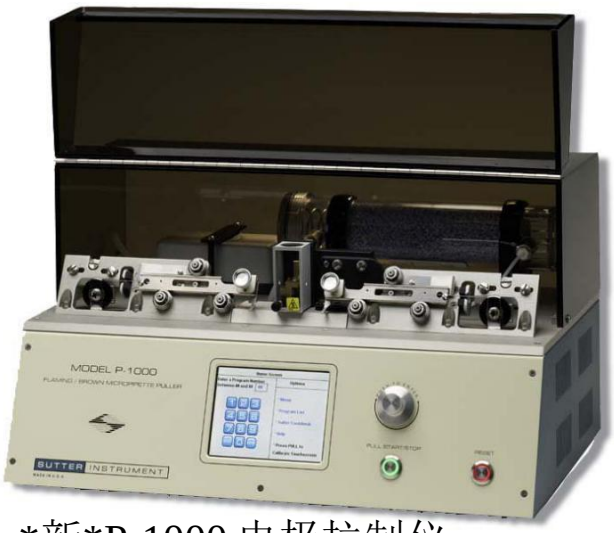
第 12 章 铝硅酸盐玻璃及其定制程序 68

第 13 章 ZIKA 研究和蚊卵注射 72

刘新英 校译



P-97 电极拉制仪



*新*P-1000 电极拉制仪

*新的 P-1000 拉制仪将 Pipette cookbook 程序整合到其存储器中。

P-1000 cookbook 的新功能可用于查找和安装这个文本中的大多数程序。通过选择加热片类型，玻璃的尺寸和应用，您可以安装系统预先写好的程序。要微调您从 cookbook 目录中安装的程序，请参见第 11 页关于如何调整参数设置的说明。

刘新英 校译

简介

Sutter 仪器的 Pipette Cookbook 根据具体应用编写，描述了这些应用所需的电极。虽然我们尽量扩大所涵盖的电极应用和电极类型的范围，但可能仍然没有包括您所需的内容。其他应用偶尔会添加到新版本的 Cookbook 中，如果您对将来修订的有任何建议，请联系 Sutter 仪器公司。

每章的开头都是各种应用的一般性讨论，以及应用所需的电极形态（颈部长度，口径大小，电阻等）的详细说明。在每一章中，我们为您的应用提供玻璃管尺寸（外径和内径）和加热片类型的“理想”组合，以及推荐的参数设置。然后，我们提供有关如何调整和“调整”推荐参数设置的建议，以便您修改电极的形态。如果适用，我们还提供了有关 Xenoworks 显微注射设备的信息，设置以及该应用程序所需的设置。

我们在每章所提供的“理想的”加热片和玻璃管的组合，以及相关的推荐参数设置是基于多年的经验所得，是基于深入的研究和客户反馈的结果。如果您无法匹配针对特定应用的加热片和玻璃管的组合，或者您缺少“推荐要素”，您可以参考“通用查询表”找到一个替代方案。通用查询表是根据安装在拉制仪中的加热片类型和玻璃管的尺寸（外径和内径）编写。程序以 A，B，C，D，和 E 四个类型列在表格中，每个“类型”分类在 97 页说明。重要的是要记住，通用查询表中提供的程序对于您的应用可能并不“理想”。有一些加热片和玻璃管的组合对于特定的应用并不合适，并且可能产生非常不稳定的结果。因此，我们想再次强调，每章中提供的内容仅是我们所知的最佳方法。

刘新英 校译

拉制正确形状的电极的最常见困难可归因于不合适的参数设置。程序中只要有一个调整不佳的参数设置-太高或太低-都会导致口径大小，颈部和电阻的很大变化。这些过高或过低的设置可以被视为程序中的“不良要素”。有关参数设置和我们的建议值的范围的一般准则，请参阅第 11 页。如果保持每个参数在建议值范围内，则编写程序或调整设置时“迷失”或偏离轨道的可能性较小。一些不理想的参数设置可能是某些已经离开实验室的研究人员随意建立的。还有可能，您正在使用的程序是采用了其他人的设置，而该设置原本用于其他不同型号 Sutter 拉制仪和/或加热片和玻璃管的不同组合。

请注意，简单复制其他人推荐的程序通常会导致尖端大小不合适，甚至导致加热片烧坏。如果您是从 Sutter 以外的人那里获得了参数设置，最好进行 Ramp 测试，以确保您使用的加热设置不会损坏或烧坏加热片。有关 Ramp 测试的信息，请参见第 12 页。

如果按照 Cookbook 中的程序仍然没有拉制出合适的电极，这可能是由于拉制仪上的校准不良或机械调整造成的。确保拉制仪处于良好的工作状态非常重要。务必检查加热片是否完全位于喷气口的中心位置，并设置喷气口在加热片底部下方 2 至 3mm 处，毛细玻璃管放置在加热片内的合适位置，并且加热片形状是正确的。如果您发现所提供的程序以及对参数设置的更改建议未产生良好结果，请参阅第 11 页，“参数设置的一般准则”和第 15 章“差异性”。如果您觉得您的拉制仪可能需要调整或维修，请联系 Sutter 仪器并咨询关于翻新您的拉制仪的事项。

在 P-87 或 P-80/PC 上使用 Pipette Cookbook

若使 P-97/P-1000 Pipette cookbook 中的程序适应较早型号的 Sutter 微电极拉制仪，包括 P-87 和 P-80/PC，请执行以下操作：

如果您有 P-87，请将图表中列出的加热设置减少 5-10 个单位。P-97 加热片的可用功率比 P-87 高 25％，P-97 Ramp 测试时的电流增加率更为平缓。当在 P-87 上使用 P-97 程序时，需要改变加热设置以适应这些差异。如果程序设置了延迟值，则需要设置 175 到 250 之间的时间值来代替延迟值。

如果您有 P-80/PC，请将图表中列出的加热设置减少 10 个单位。P-80/PC 上的时间模式功与 P-97 和 P-1000 上的延迟模式相同。如果 Pipette Cookbook 程序中提供了延迟值，请在 P-80/PC 上设置同样大小的时间值。如果 Pipette Cookbook 程序中提供了时间值，请将 P-80/PC 的时间值设置在 50-110 之间

P-80/PC 输出调节器的压力应设置为 50psi。可通过左拉杆后面的垂直千分尺调节气体电磁阀的阀门开关来控制氮气的气流。建议千分尺设置在 1 到 1.25 之间。

有关冷却方式，时间和延迟的详细信息，请参阅您的 P-97 或 P-1000 手册。

刘新英 校译

在 P-1000 上使用 Pipette Cookbook

新的 P-1000 拉制仪将 Pipette cookbook 程序整合到其存储器中。

P-1000 Cookbook 的新功能可用于查找和安装这个文本中的大多数程序。通过选择加热片类型，玻璃管的尺寸和应用，您可以安装预先写好的程序。要微调您从 cookbook 目录中安装的程序，请参见第 11 页关于如何调整参数设置的说明。铝硅酸盐玻璃程序和 E 型方案没有整合入 P-1000。拉制铝硅酸盐玻璃的程序可以在第 12 章中找到。您也可试试 P-1000 拉制仪新的预热功能，以帮助稳定您的程序。有关其他建议，请联系 Sutter 技术支持。

SUTTER 毛细玻璃管

标准壁硼硅酸盐玻璃管（有丝）

目录编号	外径	内径	总长度	每件包装
BF100-50-10	1.00mm	0.50mm	10cm	225
BF100-50-15	1.00mm	0.50mm	15cm	225
BF100-58-10	1.00mm	0.58mm	10cm	250
BF100-58-15	1.00mm	0.58mm	15cm	250
BF120-60-10	1.20mm	0.60mm	10cm	225
BF120-69-10	1.20mm	0.69mm	10cm	250
BF120-69-15	1.20mm	0.69mm	15cm	250
BF150-75-10	1.50mm	0.75mm	10cm	225
BF150-86-7.5	1.50mm	0.86mm	7.5cm	250
BF150-86-10	1.50mm	0.86mm	10cm	250
BF150-86-15	1.50mm	0.86mm	15cm	250
BF200-100-10	2.00mm	1.00mm	10cm	225
BF200-116-10	2.00mm	1.16mm	10cm	250
BF200-116-15	2.00mm	1.16mm	15cm	250

标准壁硼硅酸盐玻璃管（无丝）

目录编号	外径	内径	总长度	每件包装
B100-50-10	1.00mm	0.50mm	10cm	225
B100-50-15	1.00mm	0.50mm	15cm	225
B100-58-10	1.00mm	0.58mm	10cm	250
B100-58-15	1.00mm	0.58mm	15cm	250
B120-69-10	1.20mm	0.69mm	10cm	250
B120-69-15	1.20mm	0.69mm	15cm	250
B150-86-7.5	1.50mm	0.86mm	7.5cm	250
B150-86-10	1.50mm	0.86mm	10cm	250
B150-86-15	1.50mm	0.86mm	15cm	250
B200-116-10	2.00mm	1.16mm	10cm	250
B200-116-15	2.00mm	1.16mm	15cm	250

刘新贵 校译

薄壁硼硅酸盐玻璃管（有丝）

目录编号	外径	内径	总长度	每件包装
BF100-78-10	1.00mm	0.78mm	10cm	250
BF100-78-15	1.00mm	0.78mm	15cm	250
BF120-94-10	1.20mm	0.94mm	10cm	250
BF120-94-15	1.20mm	0.94mm	15cm	250
BF150-110-7.5	1.50mm	1.10mm	7.5cm	250
BF150-110-10	1.50mm	1.10mm	10cm	225
BF150-117-10	1.50mm	1.17mm	10cm	250
BF150-117-15	1.50mm	1.17mm	15cm	100
BF165-120-10	1.65mm	1.20mm	10cm	250
BF200-156-10	2.00mm	1.56mm	10cm	250
BF200-156-15	2.00mm	1.56mm	15cm	100

薄壁硼硅酸盐玻璃管（无丝）

目录编号	外径	内径	总长度	每件包装
B100-75-10	1.00mm	0.75mm	10cm	225
B100-75-15	1.00mm	0.75mm	15cm	225
B120-90-10	1.20mm	0.90mm	10cm	225
B150-110-7.5	1.50mm	1.10mm	7.5cm	225
B150-110-10	1.50mm	1.10mm	10cm	225

加热片及配件

盒形加热片

P-1000，P-97，P-87，P80PC，P80C，PC-84，P-77B

FB215B 2.0mm盒形加热片，1.5mm宽.....

FB220B 2.0mm盒形加热片，2.0mm宽.....

FB230B 2.0mm盒形加热片，3.0mm宽.....

FB255B 2.5mm盒形加热片，2.5mm宽.....

FB245B 2.5mm盒形加热片，4.5mm宽.....

FB315B 3.0mm盒形加热片，1.5mm宽.....

FB320B 3.0mm盒形加热片，2.0mm宽.....

FB330B 3.0mm盒形加热片，3.0mm宽.....

槽形加热片

P-1000，P-97，P-87，P80PC，P80C，PC-84，P-77B

FT315B 1.5mm宽槽形加热片.....

FT320B 2.0mm宽槽形加热片.....

FT330B 3.0mm宽槽形加热片.....

FT345B 4.5mm宽槽形加热片.....

刘新英 校译

配件

BX-10：电极盒（容纳10个电极）.....

BX-20：电极盒（容纳 20个电极）.....

定制加热片：定制铂/铱加热片.....

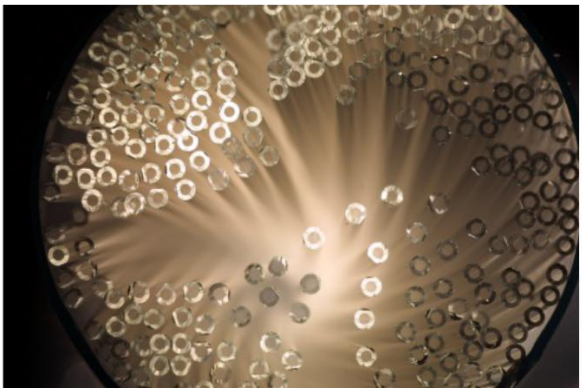
P97，P87和P2000 拉制仪的 FPS 防火抛光垫片.....

FS1875铂/铱片，18mm×75x0.05mm（0.002in）.....

CTS 划痕瓷片（用于制作大口径 20至200微米电极）.....

IMOXAB说明书（订货时注明产品）.....

电极盒



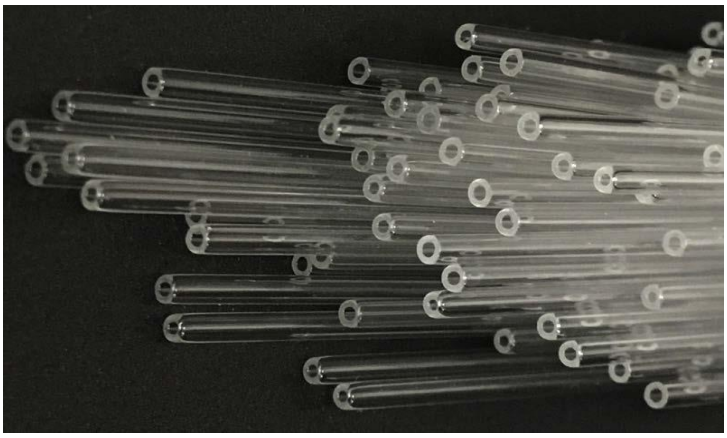
Sutter毛细玻璃管

瓷片（参见第10章）

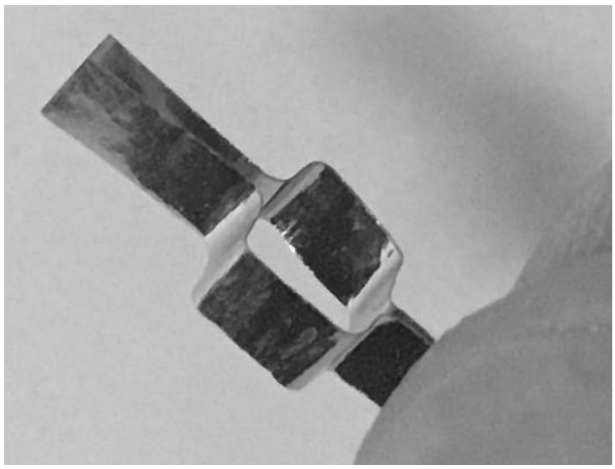
刘新英 校译

三个要素

- 玻璃



- 加热片类型和尺寸（加热元件）



2.5mm x 2.5mm 形盒加热片

盒形加热片在喷气口正上方

- 参数设置=PROGRAM

HEAT	Pull	VEL	DEL	PRESSURE
Ramp+10	60-90	80	90	200

玻璃

在描述特定应用的每个章节中，例如，脑片膜片钳记录，推荐使用特定的玻璃类型，特定的壁厚，以及有芯或者无芯毛细玻璃管。Cookbook 中较少涉及石英玻璃，因为像 P-97 和 P-1000 这样的电极拉制仪不能熔化石英玻璃，但是在第 13 章中提到了（并推荐使用 P-2000 拉制仪）Zika 研究和蚊卵注射。有关玻璃管的更多信息，请参阅第 14 章-Craze lab lore。

加热片

加热片是用于熔化玻璃的加热元件。加热片有两种基本的形状，盒形或槽形。加热片的列表，请参阅第 8 页。它们也有各种宽度和 ID（盒或槽的内径或开口。加热片是由铂：铱（90:10）制成，可以通过运行 Ramp 测试为加热片确定合适的加热值。Ramp 测试会在 12 页进一步讨论。

参数设置

P-97 和 P-1000 拉制仪使用以下参数来控制玻璃的熔化和拉制：Pipette Cookbook 将为描述的每个应用提供一个初始程序，其中加热，拉力，速度，时间/延迟和压力都设置为建议值。请参阅 SutterInstrument YouTube 频道，找到 Scientists Empowering Scientists Webinar，“How to Make Better Pipettes”，其中对参数设置进行了更详细的说明。拉制仪附带的手册也将包含参数设置的说明。以下为每种参数的简要说明：

HEAT（加热）-这是加热片上通过的电流大小。该值并不代表温度，而是指多少电流被输送到加热片。加热片需要产生足够的热来熔化玻璃，并且该数值取决于加热片形状，加热片尺寸和玻璃管的尺寸和壁厚。如果加热参数过高或过低，可能烧坏加热片或损坏拉制仪。因此，不要凭空猜测加热值。如果加热值设置不理想，拉出的电极差异会很大。要确定合适和安全的加热值，应该运行 Ramp 测试。有关 Ramp 测试的更多信息，请参见第 12 页。

PULL（拉力）-这是玻璃软化后施加的硬拉力。该拉力值决定提供给产生硬拉力的拉力螺线管的电流量。拉制仪可以通过硬拉（Pull=<0>）拉制玻璃，此时仅使用拉制仪内的柱塞的重力来拉动玻璃。拉制膜片钳电极时，如果您需要 3-5mm 颈部和 1-3μm 口径的电极，通常需要将拉力设定为<0>。当制作 30 至 100MΩ 的尖锐电极或制作显微注射针时，通常会设置为 50-150。

刘新英 校译

VOL（速度）-这是玻璃开始熔化时两个拉杆的分离速度。速度通过拉制仪内的换能器检测，这是一项专利功能，速度与玻璃的粘度直接相关。速度是停止加热并开始冷却和硬拉的“跳变点”。当速度低时，电极颈部将变短。当速度值足够低时，如拉制膜片钳电极时，拉制仪将进入多个循环或“LOOPS”。拉制膜片钳电极时典型的速度为 18-65，当使用单行程序时，速度越低，程序循环的次数越多。LOOPING 将在第 29 页进一步讨论。制作 30 至 100MΩ 的尖锐电极或制作显微注射针时，典型的拉力值为 50-150。

TIME（时间）-这是在拉制玻璃管时，冷却玻璃管和加热片的气体的持续时间。使用时间模式时，玻璃软化，达到速度的跳变值，然后同时拉动玻璃并冷却。冷却持续时间由时间值确定，每个时间单位相当于给予冷却气体 0.5ms。传统上，当使用槽形加热片或薄壁玻璃拉制用于脑片膜片钳记录的电极时，建议使用 150（75ms）的时间。使用盒形加热片和拉制薄壁玻璃时，建议使用 250（125ms）的较高时间值。

DELAY（延迟）-这是冷却模式的另一个选项，其提供比时间模式（最大 127.5ms）更长的冷却持续时间（300ms）。在延迟模式下，玻璃软化，达到速度的跳变值，然后启动 300ms 的冷却。延迟值决定了在启动硬拉之前玻璃的冷却时间，并在拉动玻璃时继续冷却玻璃。因此，通过冷却玻璃同时延迟硬拉，您可以确定玻璃拉动时的粘性程度。这是拉制电极时控制玻璃的更复杂的方式。40-90 单位低延迟值将使玻璃在硬拉之前的冷却时间减少，硬拉开始时，玻璃会

更加软化，这会导致电极颈部变长。100-250 较高的延迟值将使玻璃在硬拉开始之前的冷却时间变长，玻璃将更粘稠，这将导致电极的颈部变短。当拉制膜片钳电极时，经常使用延迟冷却模式以向玻璃提供更长的冷却持续时间，这有助于产生更短的颈部的电极。如第 30 页和第 31 页所示，拉力值设为<0>，延迟模式设为<1>会拉制出颈部较短的电极。

压力-这是用于冷却加热片和玻璃的气体压力。默认压力设定为 500 个单位，它表示 2PSI 的冷却气体。时间和延迟模式（冷却的持续时间）都需要与压力同时工作，以冷却玻璃。压力越高，对玻璃和加热片的冷却就更强。压力的增加将使玻璃冷却更快，缩短了颈部。压力的降低会是玻璃冷却更慢，并允许更长，更平的颈部。

参数设置一般准则

在设计程序或调整现有参数设置时，如果您不知道从何处入手或什么时候参数设置的过高或过低，则很容易“迷惑”或者设置非常不稳定的参数。如果您想从头开始设计一个程序，请参见为各种应用提供的“Cookbook”的方案。在那里，您会发现默认的设置是一个很好的起点。如果您是在调整和微调现有的参数设置，下面是建议每一个参数的设置范围的一般原则。这些范围都是一般的经验法则，根据加热片和玻璃的组合，您使用玻璃管的外径和内径，和您目标的电极的最终形态的不同，经常会有例外情况：

刘新英 校译

HEAT： **Ramp-5 到 Ramp+15** 可用于大多数应用程序！

PULL： **0** **膜片钳**，3-5mm 颈部和 1-3μm 口径
30-70 显微注射，6-8mm 颈部，0.9-0.5μm 口径
70-150 高 MΩ，9-15mm 颈部，0.5-0.06μm 口径

VELOCITY： **20-60 膜片钳**，3-5mm 的颈部和 1-3μm 口径
50-80 显微注射，6-8mm 颈部，0.9-0.5μm 口径
70-100 高 MΩ，9-15mm 颈部，0.5-0.06μm 口径

TIME： **250 盒形，150 槽形膜片钳**，3-5mm 的颈部和 1-3μm 口径
250 盒形，150 槽形显微注射，6-8mm 颈部，0.9-0.5μm 口径
250 盒形，150 槽形高 MΩ，9-15mm 颈部，0.5-0.06μm 口径

DELAY： **1** **膜片钳**，3-5mm 的锥度和 1-3μm 口径
60-110 显微注射，6-8mm 颈部，0.9-0.5μm 口径
40-90 高 MΩ，9-15mm 颈部，0.5-0.06μm 口径

PRESSURE： **200-500** **薄壁玻璃**

RAMP 测试

要选择合适的加热值，您必须首先通过运行 Ramp 测试确定融化玻璃管所需要的热量。Ramp 测试得到的加热值取决于安装在拉制仪上的加热片类型和玻璃管的类型和尺寸。通常盒形加热片 Ramp 测试值将比槽形加热片的值高 1.5-2 倍。

何时需要运行 Ramp 测试

§ 初次使用拉制仪
§ 更换加热片后
§ 更换玻璃管型号后
§ 撰写或编辑一个程序之前

如何在 P-97 运行 Ramp 测试（对于 P-1000，按显示屏的右上角的“Ramp”）

・・使用 P-97 时，输入的任何程序数<0-99>
§ 按<CLR>键进入控制功能
§ 按<0>至不清除所有的参数值
§ 按<1>运行 RAMP TEST
§ 安装玻璃管，然后按<PULL>

要中断 Ramp 测试或 Ramp 测试后重置显示，按<RESET>

刘新英 校译

当执行 Ramp 测试时，会发生以下事件

1. 拉制仪 HEAT 值递增
2. 一旦温度使玻璃软化，拉杆将拉长玻璃
3. 当达到出厂设置的斜坡速度（跳变点），加热将停止
4. Ramp 测试值将在显示器上显示

预计 Ramp 测试值

加热片＃	加热片尺寸	预计 Ramp 测试值	最大加热值
FT330B	3.0mm 宽槽形	250-300（参见下面的警告）	RAMP+20
FB255B	2.5mm x 2.5mm 盒形	-480-540	RAMP +30
FB330B	3.0mm x 3.0mm 盒形	-550-650	RAMP +40
FB245B	2.5mm x 4.5mm 盒形	-750-880	RAMP +75

*警告-如果您的槽形加热片的 Ramp 测试值超过 300 个单位，可能过高，表明加热片可能形状不佳，因此低效加热玻璃管。请拆下您的加热片，并按照第 14 章中的说明重塑它。

推荐加热值

加热片形状	推荐值
3mm 槽形	Ramp+15
2.5mm x 2.5mm 盒形	Ramp
3.0mm x 3.0mm 盒形	Ramp
2.5mm x 4.5mm 盒形	Ramp

***注意**-根据于加热片的形状和大小不同（见上表），如果您的加热设定大于 Ramp 值 20 至 50 个单位以上，可能会烧坏加热片！

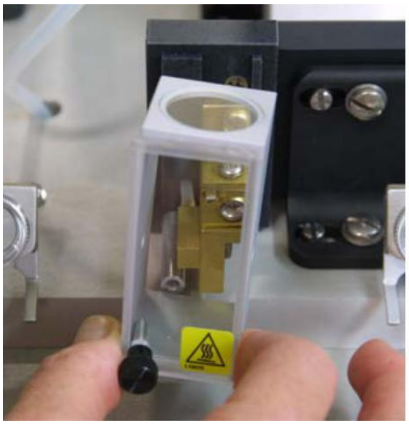
刘新英 校译

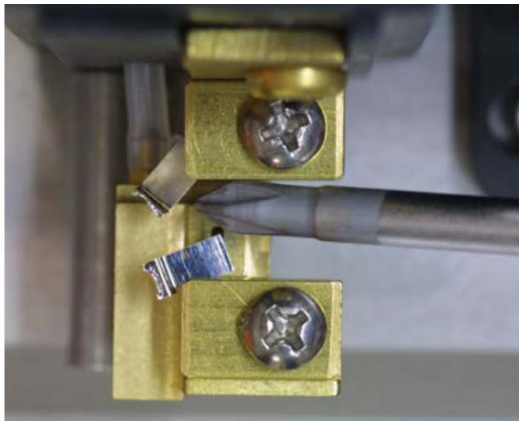
“安装加热片”-按步骤

参见 SutterInstrumentYouTube频道视频

安装加热片-第1/11步

拆下防潮室，松开加热片夹持螺丝并拆下旧的或已损坏加热片。

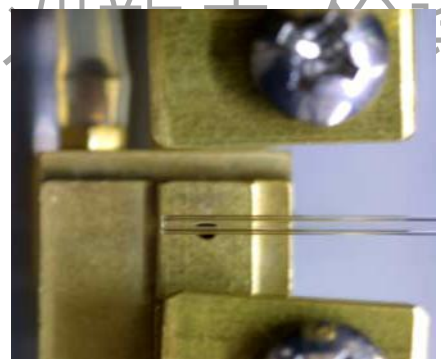




安装加热片-第2/11步

在右侧拉杆上安装一根玻璃管。将玻璃滑动到黄铜夹片的左边缘并如下图所示夹紧玻璃。

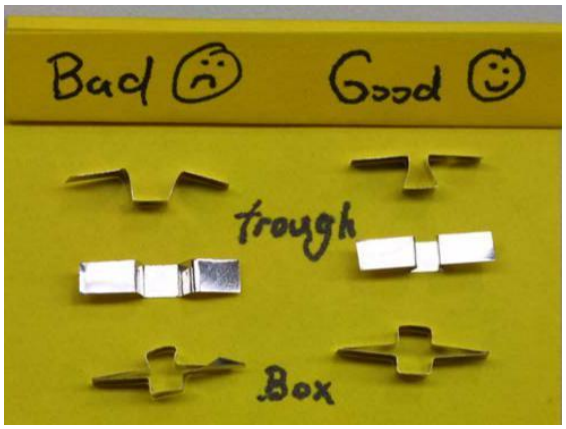
刘新苗 校译



安装加热片-第 3/11 步

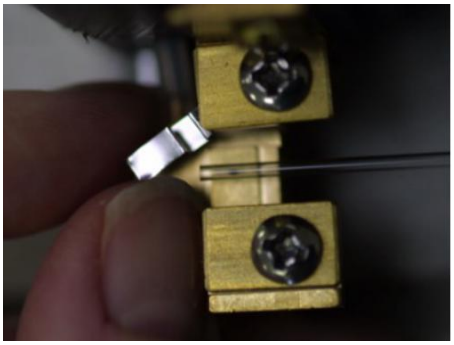
在安装加热片之前，必须对其进行整形。

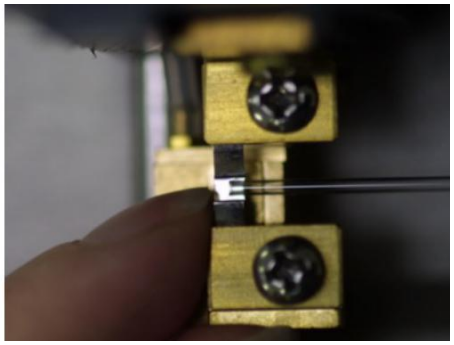
用您的手指和尖嘴钳，将加热片弯成正确的形状。



安装加热片-第 4/11 步

保持加热片如图所示，安装加热片使玻璃管正好通过加热片的中心。用您的手指不会损伤加热片且任何油脂都会在第一轮 Ramp 测试过程中消耗掉。





安装加热片-第 5/11 步

如果用槽形加热片替换盒形加热片-将两个夹片向下移动大约3mm。

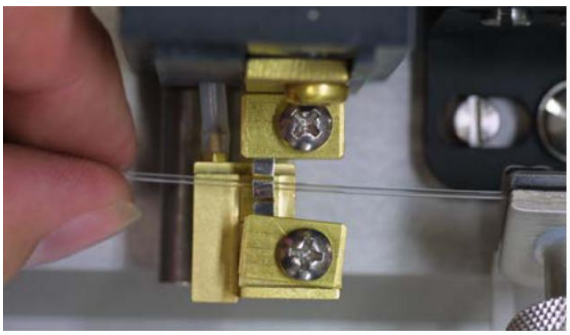
如果用盒形加热片替换槽形加热片-将两个夹片向上移动大约3mm。

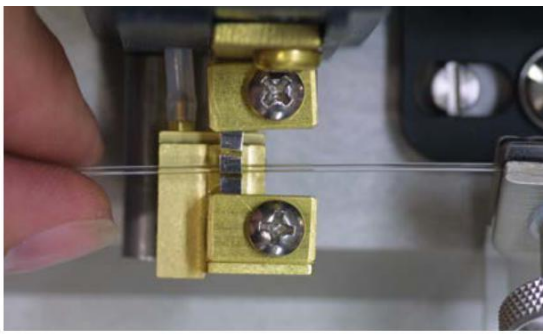
松开螺丝移动顶部夹片

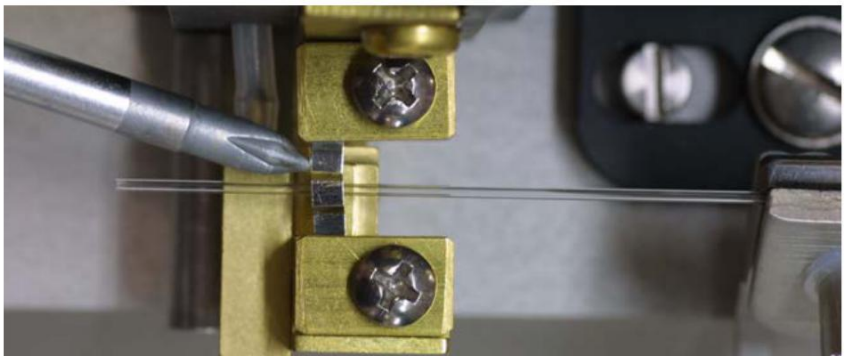
松开螺丝移动底部夹片

安装加热片-第 6/11 步

以玻璃管为工具。捏住玻璃的左端轻轻的前后晃动，轻轻推动加热片前后移动，使玻璃管正好位于加热片中心。然后用螺丝刀的前端轻推加热片左右调整使加热片正对喷气口正上方（非常重要）。见第17页



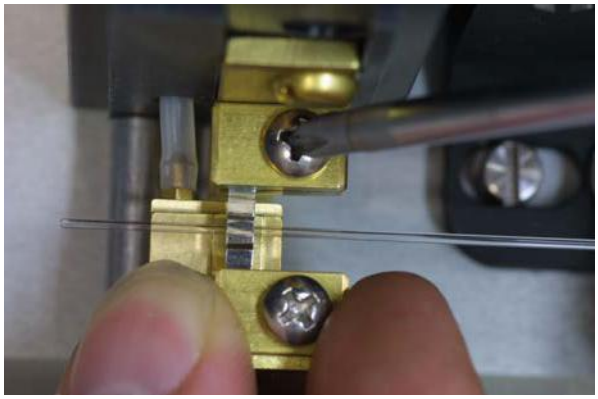




刘新英 校译

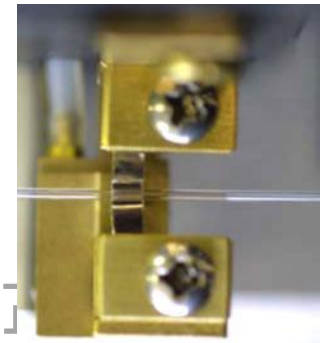
安装加热片-第 7/11 步

一旦玻璃管位于加热片正中且加热片位于喷气口正上方，拧紧螺丝之前，将手指放置在黄铜夹片。这样可以阻止紧固螺丝加热片移位。

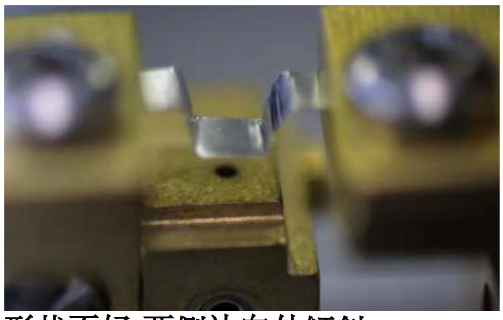


槽形加热片安装：

BAD-没有位于喷气口的正上方



GOOD-位于喷气口的正上方



形状不好-两侧边向外倾斜

形状很好-两侧边向内倾斜

盒形加热片安装：BAD＆GOOD

安装加热片-第 8/11 步

保持玻璃管在原位，从上方和水平方向检查加热片的对齐情况。

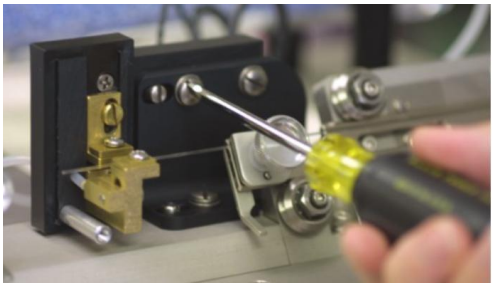
当加热片位置不正确，重新对齐。

对于大的调整，重复步骤4-7。

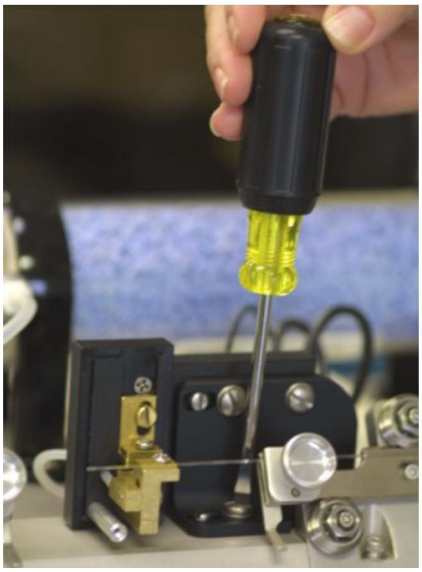
对于小的调整，可以通过偏心螺丝调整（见下文）

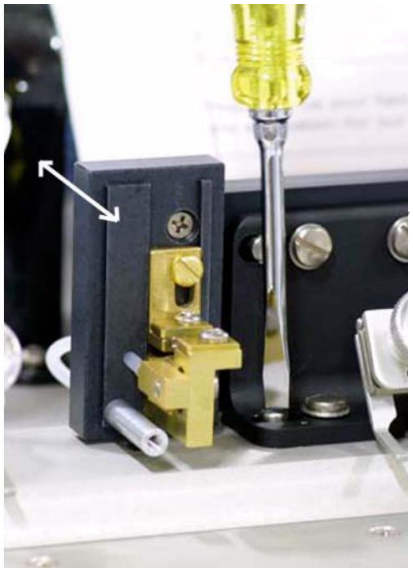
偏心的调整

拧松锁定螺丝，转动偏心螺丝上下调节夹片组件，然后拧紧锁定螺丝



拧松锁定螺丝，转动偏心螺丝调节前后，再拧紧锁定螺丝





安装加热片-第 9/11 步

一旦正确安装加热片，更换防潮室。

安装一根玻璃管并确保它不碰到防潮室或加热片。

如果玻璃仍然碰到防潮室或加热片，联系Sutter 索取附加说明。

安装加热片-第 10/11 步

打开现有的或新的程序。

使拉杆对接在一起。

夹住玻璃管并运行新的Ramp 测试。

任何时候您安装一个新的加热片，打开一包新的玻璃管，改变加热片的对齐，位置或形状，都必须运行一个新的Ramp 测试。

最后一步！检查以确保您的加热片位于喷气口正上方。见17-18页。

刘新英 校译

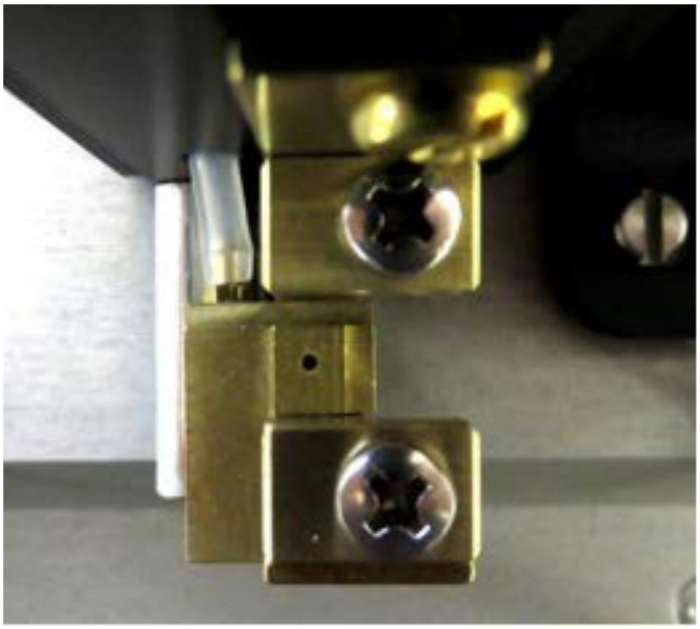
将加热片置于喷气口正上方-第 11/11步

如果您的加热片没有置于喷气口正上方（从右到左），这不仅会使一个电极比另一个更长，并且左右电极将具有不同的电阻，它还将导致稳定的程序变得非常不稳定。**这对于膜片钳电极程序来说尤其如此！**

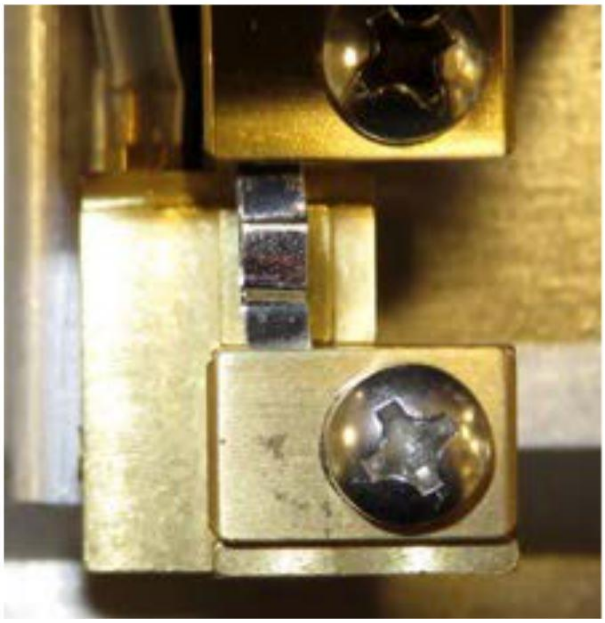
安装新的加热片后，先拉制一对颈部较长的电极，比较左右电极，检查他们的从颈部到尖端的长度是否相同，这一点非常重要。使用以下设置拉制长颈部电极：

HEAT	PULL	VEL	TIME	PRESSURE
RAMP	70	70	250	500

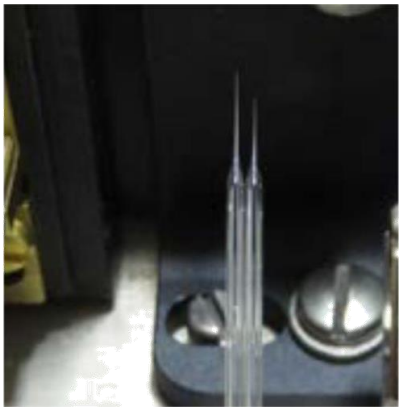
然后将左右电极从拉制仪中取出，将电极肩部对齐，以便相互比较。如果右侧电极较长，则表明加热片位置偏右。在这种情况下，右电极“看到”更多的热量，左电极“看到”更少的热量和更多的冷却。要纠正这个问题，您需要松开加热片夹紧螺丝，然后向左侧轻轻推动加热片 0.1 至 0.5mm。如果右电极较长且左电极较短，则将加热片移至左侧。如果左电极较长而右电极较短，则将加热片移至右侧。然后您需要再拉一对电极来检查它们现在是否是相同的长度。如果仍然不等长，继续从右到左调整加热片，直到两个电极长度相等。经常需要多次调整加热片直到它完全居于喷气口正上方并且两个电极颈部长度相同。



在前后夹片之间您会看到下面的喷气口。您必须确保加热片完全位于喷气孔的正上方位置。还要注意，喷气孔在略微凸起的黄铜方块上。

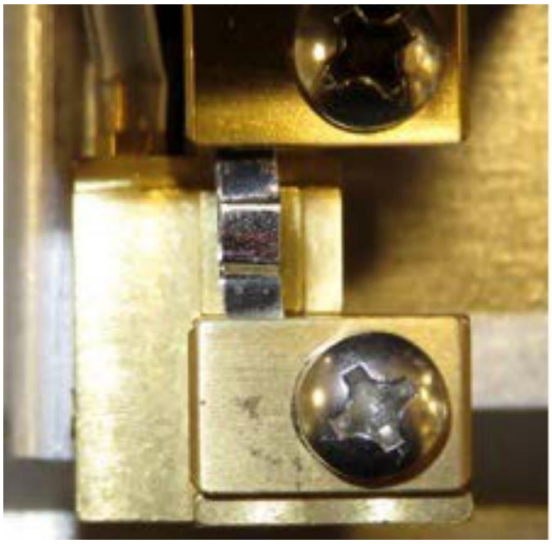


当加热片完全位于喷气孔正上方，黄铜凸起暴露于右侧和左侧的加热片的量相等。



当加热片位置偏左，左侧电极颈部会更长。向右移动加热片。

当加热片位置偏右。右侧电极颈部会更长。向左移动加热片。



加热片完全位于
喷气孔和
黄铜凸起的正上方。

⇨

左右两根电极
将相同的长度。
调整完毕。

第 1 章 电生理概述

电生理学研究生物组织中电荷（离子）的流动，并依赖于能够测量该电流的电记录技术。最常见的记录技术使用玻璃电极（称为膜片钳电极和尖锐电极）来建立与细胞或组织内部或外部的电接触并测量该离子流。玻璃电极通常由1.0mm，1.2mm或1.5mm外径的薄壁或厚壁毛细玻璃管制成。应用所需的尖端口径，颈部长短和电阻取决于记录类型（细胞内或细胞外），组织或细胞的类型和大小，以及内液和浴液的类型和浓度。将电极制成研究人员所需的规格后，将电极内填充盐溶液，并将氯化物包被的银丝或铂丝插入电极的后端，与电极内液和组织或细胞建立电化学连接。带有氯化物涂层的银丝连接回放大器，放大器测量和记录电流。

两种主要的记录技术包括细胞外或被动记录和细胞内或电压和膜片钳记录技术，后者可以将细胞电位钳制或维持在由实验者想要的水平。

细胞外记录可测量：

电流密度改变-使用 single-unit 记录，场电位记录和单通道记录

细胞内记录测量：

- 跨膜电流-电压钳
- 穿过细胞膜的电压-电流钳
- 细胞的胞内电位

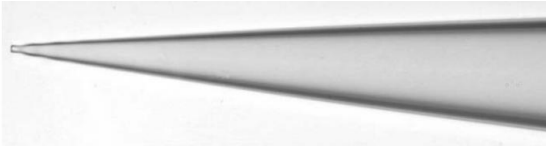
刘新英 校译

细胞外记录

细胞外记录，当前被称作松散膜片记录，是今天最常使用的现代膜片钳技术的前代方法。细胞外记录是通过胞外微电极（玻璃电极）测量神经元或轴突周围的细胞外空间的电压电势变化。这种松散膜片钳形式在电极和细胞之间形成的封接低电阻较低，所以记录电极和细胞膜之间发生的相互作用很小。在细胞外记录，细胞膜既不破碎也不穿透，和single unit的内容互不干扰。细胞外记录的最大的优点是，它是侵入性最小电生理学方法，其允许来自相同细胞反复记录，而不必刺穿并因此破坏细胞。应用包括研究离子通道在整个细胞表面上的分布，对脆弱的膜的记录，以及做稳定的长期记录。该应用所要求的电极倾向于在1-3MΩ范围，并且具有3-6mm的颈部和1-3μm口径。如果电极太小（超过3μm或3MΩ），会在不经意间自发的与细胞膜形成GΩ封接。如果电极过大（1μM或1MΩ以下）,可能会改变细胞形态或记录时把细胞吸入电极。

胞外微电极图片

400x，1.5mm x 0.86mm厚壁玻璃



400x，1.5mm x 1.1mm薄壁玻璃

胞外微电极-推荐程序

目标=1-3μm 口径，1-10MΩ 电阻，3-5mm 短平的颈部

3mm 盒形（FB330B）加热片＆1.5mm x 1.1mm（B150-110-10）薄壁玻璃

HEAT	PULL	Velocity	Time	Pressure	Loops
RAMP	0	65	250	500	2-3

3mm 盒形（FB330B）加热片＆1.5mm x 0.86mm（B150-86-10）厚壁玻璃

HEAT	PULL	Velocity	Time	Pressure	Loops
RAMP+5	0	19-26	1	500	4-5

刘新英 校译

3mm 槽形（FT330B）加热片＆1.5mm x 1.1mm（B150-110-10）薄壁玻璃

HEAT	PULL	Velocity	Time	Pressure	Loops
RAMP+15	0	90	150	500	3

3mm 槽形（FT330B）加热片＆1.5mm x 0.86mm（B150-86-10）厚壁玻璃

HEAT	PULL	Velocity	Time	Pressure	Loops
RAMP+10	0	55-65	150	500	4

- 如需更大的尖端和更低的电阻，降低速度，以增加一个循环
- 如需更小的尖端和更高的电阻，增加速度，以减少一个循环

由于细胞外记录的电极尖端与细胞靠近，但不与细胞或组织紧密接触，允许的电极的颈部长度，尖端口径，和电阻的范围更大。对于那些公差范围更严格的工作，请执行以下操作：

- 实现更低的电阻和更大的口径，使用薄壁玻璃和盒形加热片
- 为了实现更高的电阻和小口径，使用厚壁玻璃和槽形加热片

**对于不同的加热片和玻璃管的组合，请参阅“膜片钳电极的通用查询表”，增加速度，并比最后一列所示增加一个循环。*

细胞内记录

电阻与几何形状

细胞内记录用于研究静息膜电位，细胞内电位和诱发电位。细胞内记录涉及使用一根玻璃电极刺穿细胞膜并进入细胞内空间。然后参考电极放置细胞外空间的浴液内，并测量这两个电极之间的电势（电压）的差。

用于细胞内记录的微电极范围很宽。微电极由许多类型和尺寸的毛细玻璃管拉制，硼硅酸盐玻璃是用于细胞内记录的最常见的玻璃。石英（或熔融石英）和硅铝酸盐在强度，刚度和形成小口径的能力上较硼硅酸盐略优，但也更昂贵。硅铝酸盐可以用P-97和P-1000拉制仪拉制，但石英或熔融石英必须使用P-2000激光拉制仪拉制。

细胞内方法需要使用尖锐或钝的膜片钳型电极。尖锐的电极将具有更长颈部和更小口径，30至100MΩ或更高的电阻。钝电极具有粗短颈部和较大的口径， 1-20MΩ范围内的低电阻。

低电阻微电极，钝且短

对于低于1-20MΩ电阻的电极，请参阅膜片钳电极章节找到相关玻璃管，加热片和程序的建议。如果您需要现有加热片或玻璃管的特定设置，请参阅Cookbook末尾的通用查询表。膜片钳电极程序将产生非常短的3-4mm颈部。如果您需要稍长的颈部，请安装建议的参数，但使用更高范围的速度设置，以使拉制仪的循环次数少一次。

高电阻微电极，尖且长

刘新英 校译

对于具有 30 至 100MΩ 电阻和更高电阻的尖锐微电极，尖端口径和颈部的几何形状通常是决定电极是否能成功刺穿细胞的关键因素。小口径和较平的颈部在细胞被刺穿时造成的损伤比较小。但它们倾向于产生高电阻，这会增加噪声并使电流记录更加困难。注入染料等也可能会受到影响。

较平的颈部还具有以下优点：它产生较少的组织凹陷。当微电极进入组织时，倾向于引起组织的局部压缩。在微电极停止之后，组织将逐渐扩展恢复其原始状态，可能导致被刺穿的细胞与其余的扩张组织一起被携带到微电极上。重要的是，尖端后面的颈部具有细长且渐进的斜度，并且没有颈部突然变大的拐点或“肩部”。肩部中的弯曲可以在其进入细胞或组织时或者当细胞或组织在肩部周围扩展时引起过度损伤。因此，建议在尖端需要进入细胞或组织的情况下使用颈部较平的电极，并且只有当您从组织表面的细胞进行记录时才使用在尖端附近具有显著变形的钝电极。微电极的整体形状和颈部长度很关键。如果将电极推进到细胞或组织中的微操纵器不产生纯粹的直线前进，则长的柔性颈部具有明显的优点，因为它们允许组织稳定尖端并且减少了不希望产生的横向运动。另一方面，较短的颈部和非常坚硬的微电极可以用来穿透非常坚韧和刚性的膜。

- *“关于细胞内记录更多的考虑”见23-26页。*

细胞内微电极图片

厚壁玻璃，1.0mm x 0.50mm玻璃，0.3μm-0.5μm 口径，9mm 肩部（**400X**）。

细胞内微电极-推荐程序

- 采用2.5mm x 2.5mm 盒形（FB255B）加热片程序

1.0mm x 0.5mm（BF100-50-10）厚壁玻璃w/加热片

Heat	Pull	Velocity	Delay	Pressure
RAMP	55-95	75	90	400

1.2mmx0.69mm（BF120-69-10）厚壁玻璃w/加热片

Heat	Pull	Velocity	Delay	Pressure
RMAP	60-80	80	70-90	300-500

1.5mmx0.86mm（BF150-86-10）厚壁玻璃w/加热片

Heat	Pull	Velocity	Delay	Pressure
RMAP	70-90	80	100-200	500

刘新英 校译

- 使用3.0mm x 3.0mm 的盒形（FB330B）加热片程序

1.0mm x 0.5mm（BF100-50-10）厚壁玻璃w/加热片

Heat	Pull	Velocity	Delay	Pressure
RAMP	55-125	75	90	500

1.2mmx0.69mm（BF120-69-10）厚壁玻璃w/加热片

Heat	Pull	Velocity	Delay	Pressure
RAMP+5	55-80	90	60-90	500

1.5mmx0.86mm（BF150-86-10）厚壁玻璃w/加热片

Heat	Pull	Velocity	Delay	Pressure
RAMP	45-75	80-95	110-150	500

- 对于更低的电阻和更大的口径，使用更低的拉力值或更高时间/延迟值
- 对于更高的电阻和更小的口径，使用更高的拉力值或更低的时间/延迟值

**对于不同的加热片和玻璃管的组合，请参阅"通用查询表"，并使用适合您的加热片和玻璃的组合 C 型或 D 型方案。D 型方案将提供比 C 型方案更长的颈部，更小口径，更高电阻*

关于细胞内记录其他问题

胞内记录是一项要求很高的技术。也许最困难的方面在于，虽然未能获得成功的记录可能是由于各种原因造成的，但往往找不到原因。本说明旨在介绍成功进行细胞内记录的要求。这不是一个完整的操作指南，而是对关键要素的最低标准的理解。

第一个要求是深度理解所需的技术和设备。多数人通过在可以成熟使用胞内记录的实验室中工作或通过一个高级课程来增进这种理解。理想的情况是和实验室中在这方面具有丰富成功经验的前辈一起工作。如果您以这种方式学习，充分利用它。在一个成功的大实验室里，您可能不需要学习记录的所有细节就能得到很好的记录。所以您必须防范这一点。获得大量的关于每个细节的说明。问问题。

可以建立一个实验室并独立地自学技术。这显然需要查阅您所在领域的论文的方法部分，但从一门课程中获取实验手册也是明智之举。除了相关的生物学，您还必须学习电子学的基础知识。需要了解基本电路和仪器。应该确保在开始之前能够向具有丰富经验的人详细咨询。当您认为自己完成了所有事情但仍没有得到任何结果时，您应寻求帮助。

生物学

很明显，您需要一个健康的样本。氧气足够吗？组织脱水严重吗？另外，机械必须非常稳定。如果是分离组织，装载方案是否稳定？如果有灌流，流量是否完全稳定？如果要做在体记录，则必须确保记录部位没有移动，同时保持呼吸和循环。关于准备工作还有很多其他问题，我们无法在书中涵盖所有问题，更不用说在这篇简短的说明中。

刘新泉 校译

当您将电极插入样本的过程中，您需要知道期望什么。如何知道什么时候电极接触组织？如何知道什么时候已经穿透？有线索可以提高您的成功率吗？根据您所看到的，能分辨电极在组织内的位置吗？如果您无法从该领域经验丰富的人那里获得这些知识，那么您必须成为一名优秀的观察者并自己确定这些线索。肯定会有一些坚硬的表面，所以如果您弄断了很多电极，不要感到惊讶。随着时间的推移，这将会有所改善，尤其是当您在电极到达记录槽底部之前开始获取细胞时。

电子产品

用于细胞内记录的放大器有多种设计，但它必须具有相当高的输入电阻和低偏置电流。大多数用于细胞内记录的微电极具有 10 至 500MΩ 的电阻。如果放大器的输入电阻没有明显大于记录电极的输入电阻，由于微电极的电阻将产生较大的电压降，则放大器处测量的电压将减小。这是一个简单的分压器，您需要在这个水平上了解电子设备。当您只是测量电压时，用于细胞内记录的理想放大器不会产生或吸收任何电流。在这种情况下任何流动的电流在通过微电极及细胞膜时都产生电压降，从而改变实际和测量的膜电位。可容忍的偏置电流量取决于电极电阻和目标细胞。电阻为 1MΩ 时，纳安级电流（偏置电流相当大）产生 1mV 的电压降。设计一个偏置电流仅为几 pA 的放大器并不困难，但用户应不时检查偏置电流。当输入直接接地和通过高阻值电阻接地（100MΩ 是一个合适的值）时，您可以简单地看一下放大器输出电压的差异。然后可以根据欧姆定律确定偏置电流。（您必须非常了解并理解这一点）。 如果输入电阻足够高并且偏置电流足够低，则可以精确地测量直流电压。具有这些功能的设备可称为静电计。由于微电极的高电阻，

即使放大器输入端的很小电容也会衰减较高频率的信号（RC 滤波器）。因此，大多数设计用于细胞内记录的放大器具有“电容中和”特征。这通常是从放大器输出端通过电容返回输入端的可调节的同相反馈。最重要的特征是可以控制通过电极的电流。这样可以测量电极电阻和向细胞注入电流。

微电极电阻

电极电阻是比较和筛选微电极的常用手段，但电阻取决于许多因素，应予以考虑。重要的是要意识到相同的玻璃管做成微电极后可能具有较大差异，这取决于填充内液和电阻测量方法。这就是我们如此依赖电子显微镜来评估精细微电极的原因。通过向电极注入已知的直流电流并测量电极上产生的电压降，根据欧姆定律（V = I * R 或 R = V / I）确定电阻。您必须在达到稳定值后测量电压降。如果电极的时间常数较长并且电流在电流施加结束之前没有达到稳定水平，则延长注入电流的时间。如果有内置电流测量，请确保它有时间使电压降稳定。电流的幅度和符号会对电压降产生显着影响。微电极不是全自动的纯欧姆电阻器，并且可以表现出显著的整流效果。例如，对于强去极化电流，K 醋酸盐微电极的电压降低得多于超极化电流。整流的微电极不能通过单个电阻值正确表征。您必须至少指定测量电流的符号和幅度才能有用。如果您想比较现在用的电极和另一个实验室拉制的电极，最好填充电极并以可比较的方式测量电阻。通过建立直接比较，您可以按照自己的方式制作电极。

显微操纵器和其它机械问题

刘新英 校译

微电极尖端的位置必须相对于组织保持稳定。否则会出现严重的问题。显微操作器必须是稳定的，但在组织中的电极尖端的稳定性不只是由显微操作器的功能决定的。实验台安装的位置和方式应避免引入多余的振动。实验台必须被放在一起，以尽量减少任何残余振动或干扰的影响。

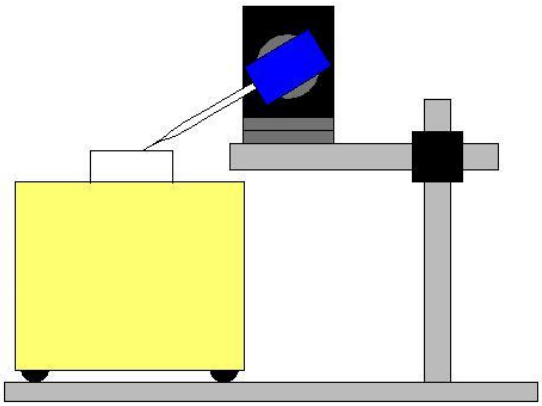
机械注意事项

第一个机械考虑是位置。实验台的位置越稳定越好。直接建在基岩上的坚固混凝土地板是理想的选择。远离弹性地板。把一盘水放在地板上，跳起来，用力踩下脚。如果在水中看不到任何涟漪，说明这个位置很好。如果您不在一楼，请寻找建筑物的角落或至少外墙。检查附近的通风机风扇，电梯和其他设备的振动源。尽量远离有公共汽车或卡车交通的繁忙街道。检查可以猛烈关闭的重型门。将闭门器设置得缓慢而柔和。找到最佳位置后，您需要将您的实验台搭建在一个可以与其他任何存在的振动隔离开来的平面上。有很多方法可以做到这一点。通常的做法是使用气浮防震台或类似的商业产品。在许多情况下，通过使用质量和阻尼材料来减弱振动，可以很好地利用重型平衡台或由混凝土板制成的简单工作台。确保地板能够承受重量。避免在实验台上安装任何振动源。注意要避免使用会将振动导入设备的硬电缆或电线管。如果实验台安装在完全没有振动或干扰的支架上，则漂移可能是唯一仍然需要考虑的机械问题。但是，尽管做了各种尝试，可能仍然会有很少的干扰。只要组织和微电极的尖端完美地一致移动，尖端和组织的相对位置将保持不变。考虑将微电极通过显微操纵器连接回组织所涉及的每个机械元件的性质。这种连接应尽可能结实和牢固。如果组织或微电极有任何移动，希望它们能一起移动而相对位置没有变化。

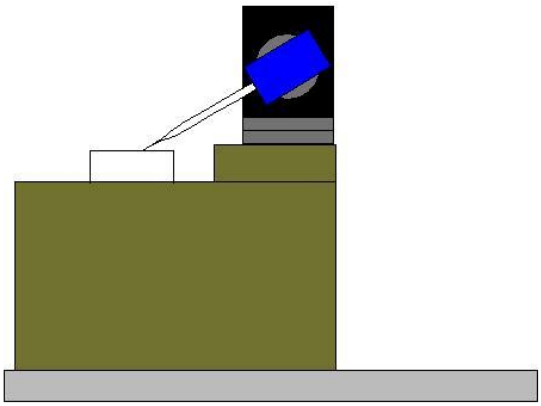
如何使组织与微电极的连接变牢固？显然，我们不能指望组织样本是刚性的，但应该约束它，防止它的移动。如果组织位于移动的液体中，则需要特别注意这个问题。盛放组织的小室或容器与微操纵器之间的每个机械元件都值得仔细注意。理想的情况是将小室和机械手都直接连接在一个大的钢块或石块上。

最糟糕的情况是长而薄的弹性连接。注意细长的元件，不管它们看起来多么刚性。当连接重物时，薄的柔性元件变得更加成问题。想象一下，您移动一个弹簧的一端，弹簧的另一端有一个重量。当您在一端移动弹簧时，另一端的重量会延迟移动，并最终重新建立与弹簧另一端的原始关系。弹簧和重量也可以作为谐振器，可以增强振动。

注意不稳定的机械连接。重要的是要意识到有少许晃动的松散连接可以在长连接件的末端产生更大的运动。大型平面配合在一起似乎比较理想，但也容易引起很多问题。如果其中一个表面略微凸起或有高点，则可能发生摇摆。使用压板可能比较理想，但要小心施加的力不会在它会产生倾翻效应的边缘。用固定螺丝夹在孔中的圆棒也容易产生晃动，即使连接很紧。



可以看到此实验台的问题吗？橡胶垫脚，细长的元件，重量压在弹性杆的一端。



这是一个理想的实验台

砂桶，网球和摩托车内胎都可以当做隔振元件。来吧，尝试任何您喜欢的。只要保持组织-微操之间的连接短，直接，刚性好，就会有效。

微操

当推进微电极时，它必须处于非常好的控制之下，并且运动应该尽可能接近纯直线运动。这是显微操纵器的工作。您如何确保您的显微操作器能够胜任？我们首先考虑典型参数。最常考虑分辨率，反向间隙，精度，重复精度，稳定性和行程范围，但真正重要的是什么？在成功获得记录方面，良好的稳定性和分辨率通常比卓越的准确性，反向间隙和范围更为重要。移动范围相当重要。您必须有足够的行程才能使微电极从装载位置进入组织中的所需位置。明明很有希望成功，但在抵达组织底部之前就走完行程而无法完成记录回让人非常沮丧。

非常高的绝对精度或重复精度并不是很必要。每一片组织可能不是非常一致，并且电极接近组织的角度不可能总是相同的。知道几微米内的相对位置是很方便的，如果反向间隙为几微米或更小，它会有所帮助。您想知道电极进入组织中有多深，以便知道是否经过各个组织层。您当然想知道您是否已完全穿过组织，但知道精度高于几微米的位置真的没有多大帮助。

当您驾驶汽车时，如果您的导航说在约1公里处右转，那么绝对精度达到1米的里程表将没什么优势。您只是想知道何时应该寻找岔路口以及何时开始认为您错过了岔路口。您不希望测量两点之间的距离并且不看路就转弯。如果您试图刺穿细胞，您不会对自己说，“我现在已经完全进入组织37.5微米了。再推进0.5微米，就会到达目标细胞位置了。“更可能的想法是，碰到组织后，电极已经行进超过300微米以上了，但仍然没有看到任何电活动。由于切片厚度只有200微米，我最好再拉出来再试一次。”

有些人认为短距离的合适移动速度（> 2毫米/秒）是刺穿细胞的重要条件，但经验表明，使用对特定速度没有任何实际要求的机械手就可以获得出色的结果。可以使用诸如“buzzing-in”和敲击桌子之类的技术来代替快速移动。同样重要的是要知道，使用压电驱动的快速微操在产生纯粹的直线运动方面往往非常差。

刘新英 校译

尽管移动的距离和速度可以很好的标明，但难以标明的是在移动期间发生的事情。如果微电极是完全刚性，则必须在没有任何横向偏移的情况下直线前进。如果您采取步进移动，微电极的尖端是否会消失并重新出现在新位置？尖端移动时是否显得模糊？这些都不是好兆头。实时显示运动是很好的，但是尖端应始终可见，并且在整个移动过程中应该以清晰的焦点出现。如果您发现某些速度由于机械共振而产生振动，请不要担心，在进行关键步骤时不要使用这些速度。

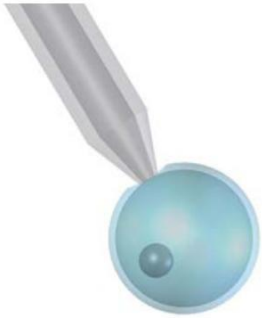
没有微电极和放大器，微操纵器几乎没有用处。微电极必须在尽可能靠近放大器探头安装，以便电路连接尽可能短。通常的做法是将探头安装到微操纵器上，然后将微电极安装在一个小的塑料支架中，该塑料支架直接连接探头。如果使用这种方法，请将探头安装在尽可能靠近微操的位置，以避免额外的重量和弹性问题。使用适合您的玻璃外径的电极支架，以便可以牢固地夹紧到位。如果探头不能直接安装在微操上，请避免使用弹性杆或在温度变化较小的情况下会发生移动的塑料材料。

*对于显微操纵仪（MP-285，MP-225，MPC-200，MP-265和QUAD），显微操纵器架和平台（MT和MD系列），请参阅Sutter仪器目录

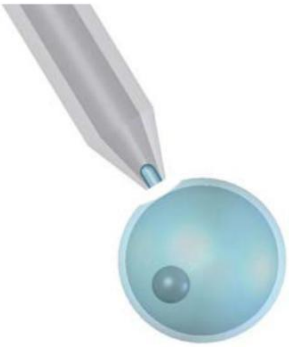
膜片钳电极

膜片钳技术是电生理研究中，在细胞水平研究神经元电活动。该技术需要使用颈部3-4mm和口径1-3μm的钝电极隔离细胞膜的一个膜片。通常，膜片电极用于电隔离和研究通过神经元表面膜的孔（离子通道）的电荷（离子）的移动。基本上有四种不同的记录模式：细胞贴贴附式，全细胞记录，外面向外式和内面向外式。

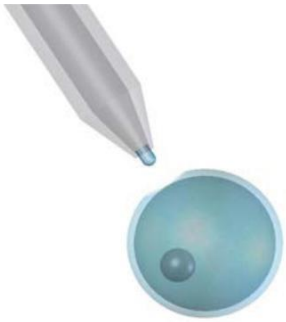
细胞贴附膜片钳



全细胞膜片钳



内面向外式膜片钳



外面向外式膜片钳

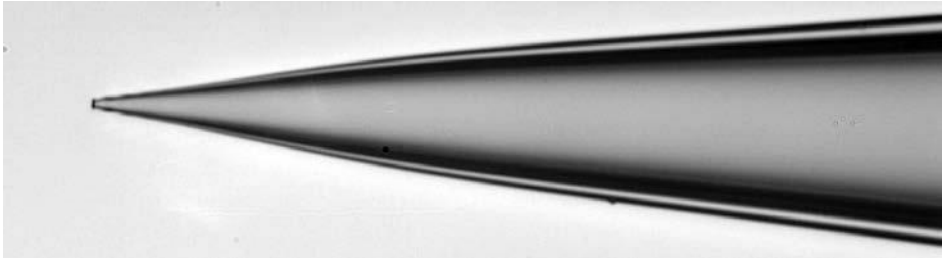
膜片钳技术是基于一小片细胞膜与其余部分的膜形成的电隔离。为了实现这种隔离，要将膜片钳电极抵住细胞膜，并在电极内产生的轻微抽吸或负压。在电极和细胞膜的脂质之间产生紧密的封接，由于在膜片钳电极的外部和周围的浴溶液之间产生高电阻（达到 GΩ 范围）被称为“G 欧封接”。细胞贴附膜片钳是用于测量完整细胞的单离子通道的电流（电压钳）的非侵入性的方法。全细胞式与细胞贴附式一样，也是通过电极施加额外的负压力到细胞膜。然后给予负压吸引吸破细胞膜形成全细胞模式，细胞内液会被电极内液替代。在这种情况下，细胞的内部和电极内液相连接，通过整个细胞膜的电流被记录。全细胞记录模式等同于使用锐利电极的细胞内记录，优势是可以记录到很小或者很平比较难以刺入的细胞。

膜片钳电极图片

全细胞记录，培养和分离的细胞

用于分离/培养细胞膜片钳电极的理想形态是颈部短粗，大锥角以及 2-3μm 口径。最好使用厚壁玻璃和 2.5mm 或 3.0mm 盒形加热片拉制。

五次循环



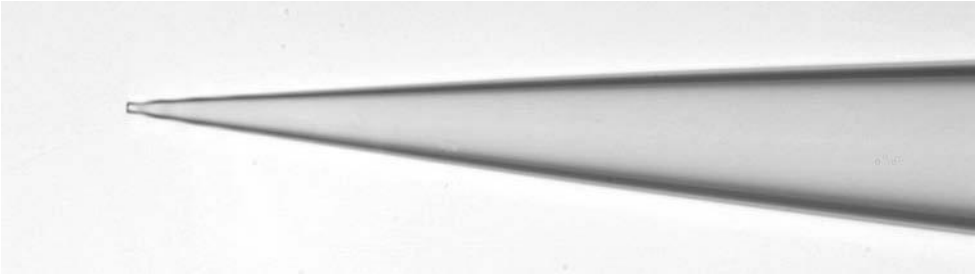
1.5mm x 0.86mm厚壁玻璃，2～ 3 μm 口径，3-4mm 颈部（400 倍放大）

组织切片记录

对于切片记录的理想的形态是一个的细长颈部，小锥角，以及 1-2μm 口径。最好使用薄壁玻璃，2.5mm 或 3.0mm 盒形加热片以及 2-3 步拉制程序拉制。如果电极深入切片时发现细胞正逐渐丢失或感觉电极在追逐细胞，通常是因为颈部过短而宽，选择速度设置，使用两步拉制而不是三步拉制。这样可以减少锥角并使颈部更加修长。

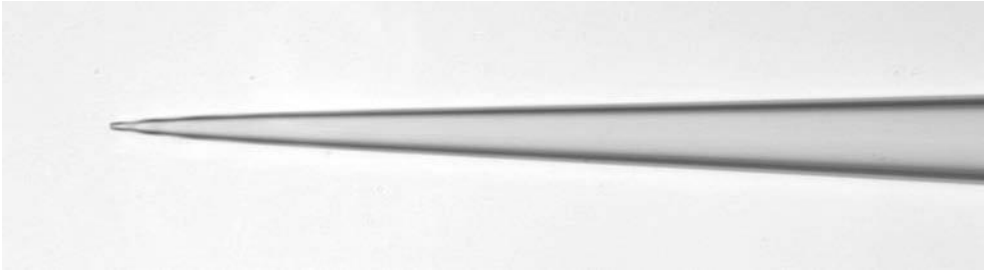
刘新英 校译

三次循环



1.5mm x 1.1mm 薄壁玻璃，2-3μm 口径，4mm 颈部（400X）

两次循环



1.5mm x 1.1mm 薄壁玻璃，1-2μm 口径，5mm 颈部（400X）

循环

一般来说，系统提供的用于拉制膜片电极的程序开始只有一行程序，拉制仪在拉制电极的多个阶段都将使用这一行程序。当程序设置拉力为（0），低速度（18-65）和且只有一行程序时，玻璃管在第一阶段加热过程中将不会被拉断。如果玻璃管在第一阶段没有被拉断，而第二行没有设置参数，拉制仪将返回到第一行，也被称为“循环”，并一次一次重复此行程序，直到玻璃管被拉断。

全细胞膜片应用通常需要电极口径在2-3μm之间，颈部3-4mm，电阻1-5MΩ之间。为了实现这一目标形态，最好用厚壁1.5mm x 0.86mm玻璃，2.5mm或3.0mm盒形加热片（FB255B，FB330B）和一个4-5次循环的程序。如需要5-10MΩ之间更高的电阻，可以增加速度，使用4次循环而不是5次循环将更容易实现这一目标。

有些脑片膜片钳上的工作通常需要1-2μm的稍小口径，颈部更修长的电极。在这种情况下，最好用薄壁玻璃（1.5mm x 1.1mm，1.2 x 0.96mm，和1.0mm x 0.78mm）和一个槽形或盒形加热片。

如果您的目标是1-10ΩM之间的电阻和1-3μm之间的口径，请参考下面的部分，“编写稳定膜片钳程序”开始。

如果您的拉制仪安装的是3mm槽形（FT330B）加热片，请参阅通用查询表找到一个适当的程序。如果您是采用1.5mm x 0.86mm玻璃，推荐使用2.5mm x 2.5mm盒形加热片或采用3mm x 3mm槽形加热片并锁定4至5循环。使用2.5mm或3mm盒形加热片组合与延迟模式的冷却会产生最短，最粗短颈部和最大锥角。

刘新英 校译

如果您是采用1.5mm x 1.1mm玻璃，推荐使用2.5mmx2.5mm盒形加热片或3mm的槽形加热片并锁定2至3个循环。使用槽形加热片和时间模式冷却将产生最稳定的结果，而使用2.5mm或3mm盒形加热片和延迟模式冷却会产生最短，最粗短锥度和最高锥角。如果拉制薄壁玻璃使用多于3个循环或3行程序，往往导致口径差异较大，并且开口将更有可能具有不均匀的，喇叭形的开口，分裂或破裂的开口。

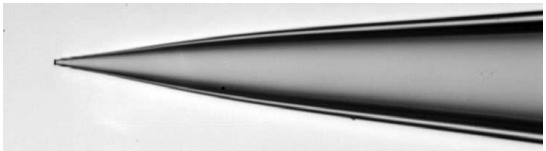
预热模式

当使用 P-1000 拉制仪，您也可以使用 THERMOLOCK™功能，预加热并使黄铜夹片保持在70°C（请参阅 P-1000 手册说明）。如果您的速度设定“不稳定”，残留在黄铜夹片（夹住加热片）的温度变化会导致电极形状的较大差异。通过选择稳定的中点速度值，您会缓冲在加热方面的这些细微变化，您的拉制仪会执行预期的循环的次数。使用阈值的速度会导致在锥角和循环数上的较大变化。您会发现，中点速度的两侧没有太多的回旋余地，因此识别确切的速度范围非常重要。

写一个稳定的膜片钳电极程序：中点速度=稳定速度

若使编写的程序拉制的电极保持一致，您必须找到中点速度。这个值是非常稳定的速度设定。要做到这一点，您必须在不改变推荐循环次数的条件下找到速度设置的整个范围。通过使用速度范围内的绝对中点，您将创建最稳定且可重复的程序。在建立和使用中点速度之后，如果您会发现电阻过高或过低，请参见第 32 页和 33 微调程序设置。

全细胞记录-厚壁玻璃



使用1.5mm x0.86mm的玻璃管和2.5mm×2.5mm盒形加热片，采用下列设置：

Heat	Pull	Velocity	Delay	Pressure	Ideal # of Loops
Ramp	0	22	1	500	5次

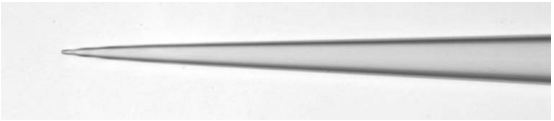
使用上面这行程序，拉制几根电极，只改变速度，找到允许5次循环整个速度设置的范围。要查找整个范围，以一个单位的增量逐步增加速度，直到拉制仪循环4次，然后逐渐降低速度，直到拉制仪循环6次。见下面例子：

Velocity	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Loops	7	6	6	5	5	5	4	4	4

(Mid-Point Velocity)

刘新宇校译

脑片记录-薄壁玻璃



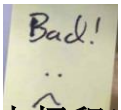
使用1.5mm x1.1mm玻璃管和2.5mm x2.5mm盒形加热片，采用下列设置：

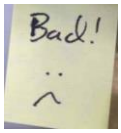
Heat	Pull	Velocity	Delay	Pressure	Ideal # of Loops
Ramp	0	65	250	500	2次

使用上述单行程序，拉几根电极，只改变速度找到的整个范围内，其允许两个循环。要查找的整个范围，逐步提高速度在三个单位递增，直到拉制仪循环一次，直到拉制仪循环三次，逐渐降低速度。见下面例子：

Velocity	53	56	59	62	65	68	71	74	77
Loops	3	3	2	2	2	2	2	1	1

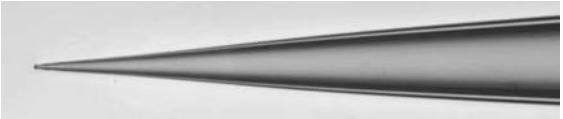
Threshold (Mid-Point Velocity) Threshold





写一个稳定的膜片钳电极程序：续

脑片表层记录 -厚壁玻璃

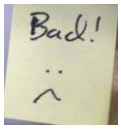


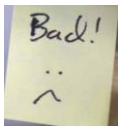
使用1.5mm x 0.86mm的玻璃和2.5mm×2.5mm盒形加热片，采用下列设置：

HEAT	PULL	VELOCITY	Delay	Pressure	LOOPS
525	0	26	1	500	4

使用上述单行程序，拉一系列电极，只改变速度（2个单位的增量增加或者降低）找到其允许4个循环整个速度范围。要查找整个范围， 以2单位增量的逐步增加速度，直到拉制仪循环3次，逐渐降低速度，直到拉制仪循环5次。见下面例子：

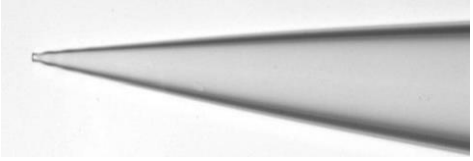
Velocity	21	**23**	**25**	**27**	**29**	**30**	**32**	**34**	36
Loops	5	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	3
		Threshold			**(Mid-Point Velocity)**			**Threshold**	





刘新英 校译

大膜片钳电极，3-5μm 口径（全细胞或切片膜片记录）

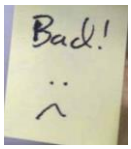


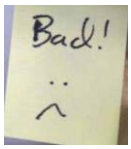
使用1.65mm x1.20mm或2.0mm ×1.56mm的玻璃管和2.5×2.5盒形加热片,采用以下设置：

Heat	Pull	Velocity	Time	Pressure	Ideal # of Loops
Ramp	0	45	250	500	3 - 4 times

使用上述单行程序，拉一系列电极，只改变速度（以2个单位增量升高或降低）找到其允许3个循环的整个范围。要查找整个范围，以3单位增量的逐步增加速度，直到拉制仪循环2次，逐渐降低速度，直到拉制仪循环4次。见下面例子：

Velocity	**33**	**36**	**39**	**42**	**45**	**48**	**51**	**54**	57
Loops	**4**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	2
		Threshold			**(Mid-Point Velocity)**			**Threshold**	





A：为了拉制口径更小和较高的电阻的电极...

提高速度允许拉制仪少循环一次。薄壁玻璃的目标为 2 个循环而不是 3 个循环，厚壁玻璃的目标为 4 个循环而不是 5 个循环。

通过逐渐增加速度，并选择中点值找到循环 4 次（而不是 5 次）的速度范围内。例如，使用 2.5mm 盒形加热片，1.5mm×0.86mm 玻璃和下列设置：

找到允许 4 个循环的速度范围，并设定中点值...

Heat	**Pull**	**Velocity**	**Delay**	**Pressure**	**Loops**
525	0	**26**	1	500	**4 (**instead of 5)

如果您想较小的口径，但不需要长的颈部，根据您以前建立的一个在线 5 次循环的程序编写出 5 行相同参数。然后在第 4 行减少 3 个单位的速度（为第 5 行尖端形成时多留一点的玻璃。还可以增加的最后一行的拉力值和/或增加最后一行加热值 5-20 单位。每次修改一个参数，这样不会“迷失和困惑”。

Line	**Heat**	**Pull**	**Velocity**	**Delay**	**Pressure**
1	525	0	21	1	500
2	525	0	21	1	500
3	525	0	21	1	500
4	525	0	**18**	1	500
5	**525+**	**10-40**	**21-25**	1	500

如果您使用薄壁玻璃且需要较小的口径，但不希望增加的颈部长度，可以编写多行程序并在最后一行减小加热量，而不是增加它。使用较低的热，以产生较小的口径可能是有些反直觉的，但是，当薄壁玻璃形成尖端时，如果有太多的热量或太少冷却，在最后一行，会产生钝管样尖端而非细尖。

刘新英 校译

B：为了使电极具有较大口径，更短颈部和更低的电阻...

降低速度允许拉制仪额外循环一次。薄壁玻璃设定为 3 次循环，而不是 2 个循环，厚壁玻璃设定为 5 至 6 个循环，而不是 4 个循环。

Heat	Pull	Velocity	Delay	Pressure	Loops
525	0	24	1	500	4
		(change to 19-21) →	→	→	→ **(now looping 5 times)**

做更大的口径电极的另一种方式是写多行程序和降低在最后一行的速度和/或者加热值。所以，如果您有一个循环 5 次的程序，您可以先写出到 5 行相同的程序，并只改变尖端形成的最后一行的参数。最好是每次改变一个参数并看到的改变的结果。

Line	**Heat**	**Pull**	**Velocity**	**Delay**	**Pressure**
1	525	0	21	1	500
2	525	0	21	1	500
3	525	0	21	1	500
4	525	0	21	1	500
5	**520-500**	0	**19**	1	500

注意：如果速度或热量在最后一行下降得过多，则玻璃在第 5 次行程序不会被拉断，会再回到第 1 行，完成玻璃管的拉制。如果发生这种情况，不要让加热值降低这么多。

Cheat Sheet – a.k.a The Handy Dandy Parameter Adjustment Guid

SUTTER INSTRUMENT
P-97 & P-1000 PARAMETER CHEAT SHEET

	INCREASE	DECREASE
I I	Smaller Tip, Longer	Larger Tip, Shorter
P U	INCREASE Smaller Tip, Longer	DECREASE Larger Tip, Shorter
VE LO CIT	INCREASE Smaller Tip, Longer	DECREASE Larger Tip, Shorter
TIME (cooling) Δ 25 units	INCREASE Larger Tip, Shorter	DECREASE Smaller Tip, Longer
DELAY (w/ Hard Pull) Δ 10 units	INCREASE Larger Tip, Shorter	DECREASE Smaller Tip, Longer
DELAY =1 (w/ Pull = 0) FOR PATCH PIPETTES USING THICK WALLED GLASS Delay (1) = 300ms of cooling. Do NOT increase or decrease the Delay!		
Δ 100 units	Larger Tip, Shorter	DECREASE Smaller Tip, Longer

刘新英 校译

References for Electrophysiology

- Advanced Micropipette Techniques for Cell Physiology, K.T Brown, D.G. Flaming
- The Axon Guide - For Electrophysiology & Biophysics: Laboratory Techniques http://www.moleculardevices.com/pdfs/Axon_Guide.pdf
- Patch Clamping An Introductory Guide to Patch Clamp Recording, Areles Molleman
- The American College of Neuropsychopharmacology web site http://www.acnp.org/g4/GN401000005/CH005.html
- Curtis, H.J. & Cole, K. S. Membrane action potentials from the squid giant axon. J. Cell. & Comp. Physiol. 15: 147-157, 1940
- Huxley AL and Hodgkin AF. Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of Loligo. Journal of Physiology 1: 424-448, 1952(a).
- Neher E and Sakmann B. Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibers. J Physiol 258: 705－729, 1976
- General descriptions about electrophysiology and various approaches: http://www.answers.com/topic/electrophysiology
- "Single Channel Recording" 2nd edition 1995 by Sakmann & Neher
- Where to take a concentrated short course to learn electrophysiology techniques
- Marine Biological Lab, Woods Hole, MA http://www.mbl.edu/education/courses/
- Cold Spring Harbor Lab, Cold Spring Harbor, NY http://meetings.cshl.edu/courses.html

第 2 章 贴壁细胞，线虫和果蝇-推荐程序

此类应用所需的电极通常使用厚壁或薄壁有芯玻璃管拉制而成，如Sutter BF100-50-10，BF100-58-10和BF100-78-10。此类应用需要颈部长度为大约6-8mm和口径小于1μm。尖端和颈部需要足够细以免会造成损伤，并颈部不要太长以免过细，不耐用。为了固定电极良好的耐久性，最好是通过使用一个2.5mmx2.5mm盒形加热片保持锥度在较短的一边。如果您要拉制口径<1μm的细针，使用有芯玻璃管更容易注入内液。开始最好使用1mmx0.58mm或1mmx0.78有芯玻璃管和2.5mmx2.5mm的盒形加热片（FB255B）。虽然采用3mmx3mm盒形加热片（FB330B）也可以很好的拉制这类电极，但更窄2.5mm盒形加热片可以避免颈部变得太长，纤细。如果您使用的拉制仪不能更换加热片，请找在通用查询表加热片的形状和大小，并使用专为1mmOD玻璃管定制的程序。

2.5mm×2.5mm盒形加热片定制程序（FB255B）

1.THICK壁玻璃-BF100-58-10（1.0mm x 0.58mm）或BF100-50-10（1.0mm x 0.5mm）

HEAT	PULL	VEL	DEL	PRESSURE
Ramp-10	60-80	80	130-170	500

2.薄壁玻璃-BF100-78-10（1.0mm×0.78mm）

HEAT	PULL	VEL	DEL	PRESSRE
Ramp+10	60-90	80	90	200

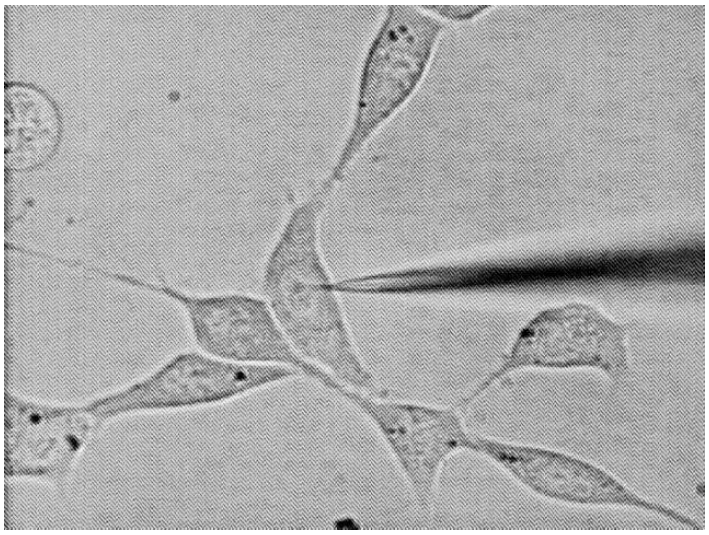
刘新英 校译

- **大口径&短颈部** =增加10个单位的延迟或压力
- **小口径&长颈部** =减少10个单位的延迟或压力
- **减小肩部** 使尖端更窄，更修长=增加10个单位拉力

根据您的具体应用和技术，这些电极可以按“原样”，折断或磨制使用。如果您按“原样”使用，最好是用较低的拉力值，这样尖端口径不会太小。如果要折断或磨掉尖端以增加口径，最好是增加10-20单位的拉力值，这样在折断或磨制时不容易导致尖端过大。如果要磨制尖端，使其更尖锐，更开放，最好是引入5-10单元额外拉力，以便最终尖端保持相同的外径。

使用P-97或P-1000，该应用的最持久和最尖锐的针头可以用铝硅酸盐玻璃-AF100-64-10拉制。甚至更尖锐的针可以使用SutterBV-10磨制（第19章）尖端来实现。对于更短的和快的颈部，您可能想尝试“Bee Stinger Needle”（蜂尾针）这个应用程序（第3章）。

贴壁细胞，线虫和果蝇（**Drosophila**）的显微注射

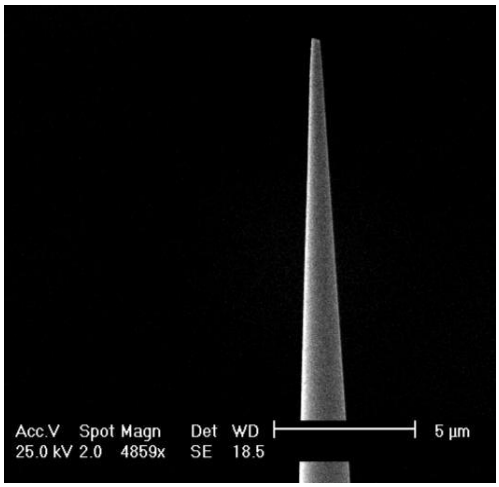


薄壁玻璃（1.0mmx0.78mm，BF100-78-10），0.7-0.9μm 口径，5-7mm 颈部（400x）

刘新英 校译

厚壁玻璃（1.0mmx0.50mm，BF100-50-10），0.6-0.9μm米口径，6-8mm 颈部（400x）

薄壁显微注射电极



显微注射电极的扫描电子显微镜（~5000 x）

用于贴壁细胞，线虫，及果蝇的 Xenoworks数字微量注射仪。

XENOWORKSDIGITAL 注射仪设置：

- 范围设置：1
- 传输压力（补偿）=10-40百帕
- 注射压力：（脉冲或连续）

推荐方法.....

脉冲模式：　　贴壁细胞=200-1000百帕

线虫＆果蝇=50-200百帕

脉冲宽度=0.20s

可选方法.....

连续模式：　　贴壁细胞=200-1000百帕

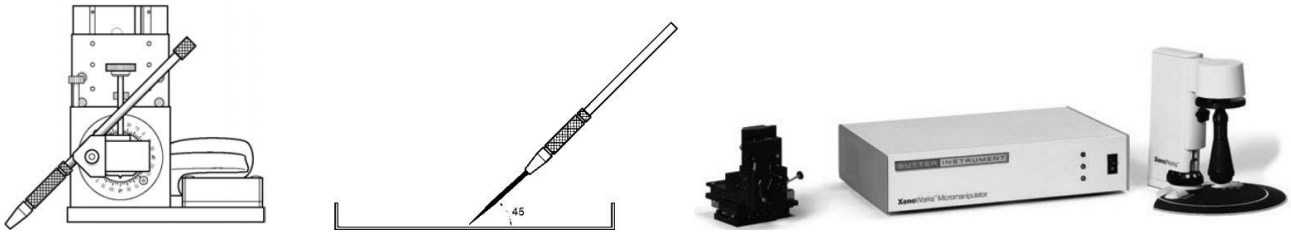
线虫＆果蝇=50-200百帕

刘新英 校译

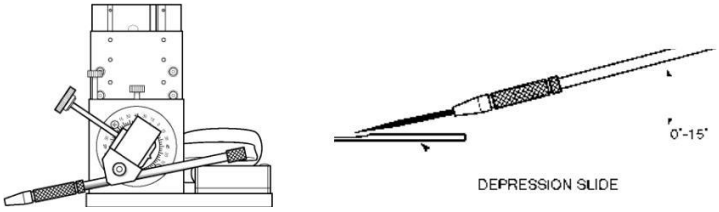
注射的持续时间由按下注射键/脚踏开关的时间确定。

使用传输/补偿压力替代连续注射方法：增加传输压力直到产生所需的流量。对于更高的压力，切换到范围设置2，这将增加一倍可用的压力。

XENOWORKS显微操纵器（BRMR）位置：



贴壁细胞



线虫和果蝇

电极形态

首选形态-小锥角

A. 薄壁玻璃，具有0.3-0.7μm 口径，5-8mm 细长颈部

B. 厚壁玻璃，具有0.3-0.7 μm 口径，5-8mm 细长颈部

可选形态-短粗颈部*

C. 蜂尾针-厚壁玻璃，粗短2-3mm 颈部和0.5μm 口径

D. 蜂尾针-薄壁玻璃，粗短4-5mm 颈部和0.5μm 口径

见第三章Pipette cookbook或联系Sutter寻求关于如何拉制蜂尾针式电极的指导。通常不建议粗短的颈部形态，因为这种形态的电极更容易堵塞。

刘新英 校译

清理或疏通电极

如果电极堵塞，最好先用Clear按钮尝试清尖端碎片。如果不能清除，您可以尝试轻轻弄碎电极去除尖端的堵塞部分。通常颈部比较细长的电极，在他们变得过大大之前，可以多折断几次。

磨制/折断/开放-电极尖端：

最好是使用未包被的玻璃或塑料表面，在其上拖动或轻击玻璃的尖端。如果您使用带涂层培养皿底部，不但不容易弄碎，还有可能进一步堵塞尖端。

电极尖端堵塞的原因：

DNA的浓度过高

注射液污染或没过滤差好

降低尖端向下放入盘中/介质时没有足够的补偿压力

脏玻璃-沿着玻璃毛细管的内壁的碎片的小颗粒

延长使用-由于膜上的脂质和蛋白质包被到电极尖端，多次注射后电极尖端最终会变钝和/或永久阻塞（-20-50μm）

清理/疏通：

使用CLEAR按钮冲洗尖端和/或点击/打破尖端以形成新的锋利的开口。

如果您建立一个补偿压力，允许轻微的“出血”，或从顶端泄漏，这可能会延长电极的“生命”，并在注射的细胞时有助于防止堵塞。

使用购买/预先制作的电极做贴壁细胞显微注射

不建议！为什么？参阅第39-40。

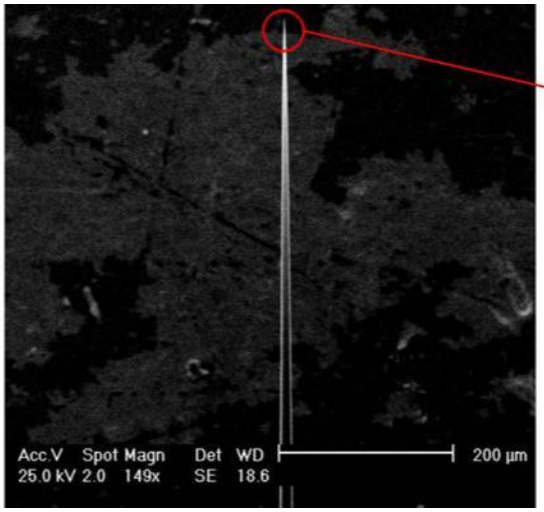
已拉制显微注射电极-您真的知道您买的是什么？

用于显微注射的电极，特别是那些用于贴壁细胞，前核，秀丽隐杆线虫，果蝇（Drosophila），斑马鱼和爪蟾的注射电极在拉制出来后几分钟到一小时内处于最佳状态时使用。拉制好并被存储的显微注射电极更容易受到污染。

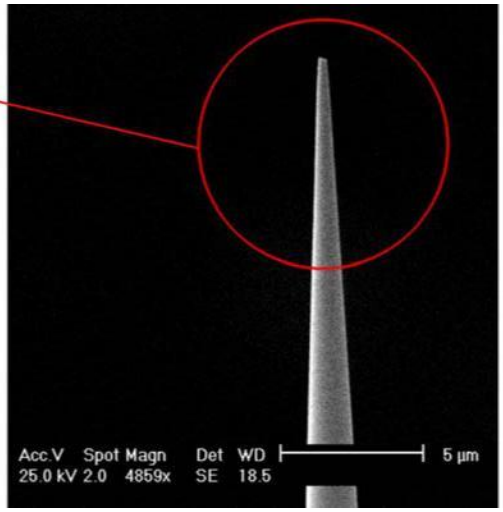
作为质量控制措施，Sutter仪器会定期对每一个我们销售的电极拉制仪拉制的电极进行电子显微镜扫描。在过去的十年里，有时会有客户要求我们检测他们从制造商那里购买的已拉制电极。在此期间，数百已拉制电极已被检验，我们看到了一个趋势，这些电极尖端会沾染一些杂质。在他们的无菌包装中提供的，已拉制电极在清洁，无尘的环境被打开，装上短截线，溅射涂覆有金10nm的（极化子），然后在扫描电子显微镜（SEM，飞利浦xL30）观察到。

下图比较了使用SutterP-1000拉制仪新拉制的显微注射电极与厂家销售的已拉制电极

新拉制的显微注射电极（P-1000 Sutter 拉制仪）

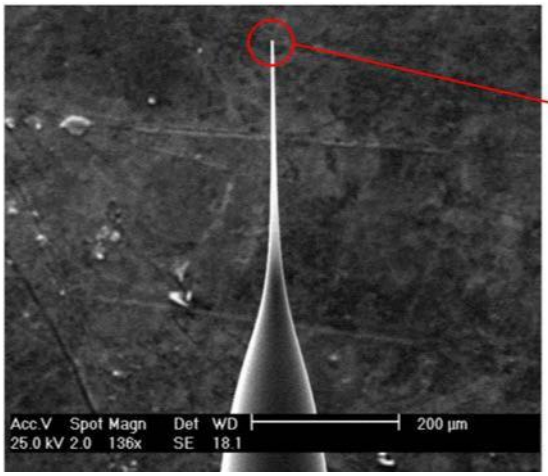


1a. 低倍镜下（140x- ）新拉制电极的 SEM 分析。

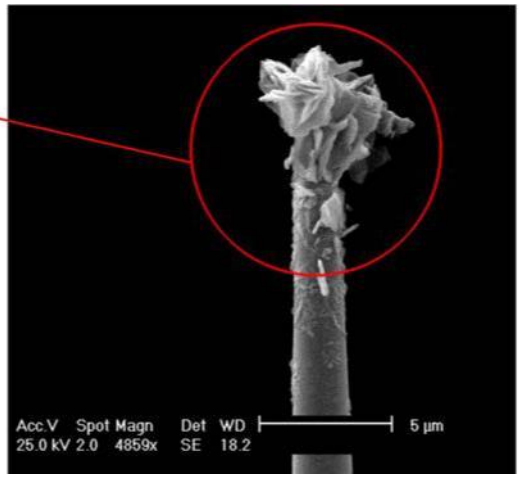


1b.高倍镜下（5000X）新拉制电极的 SEM 分析

制造商销售的拉制好的显微注射电极



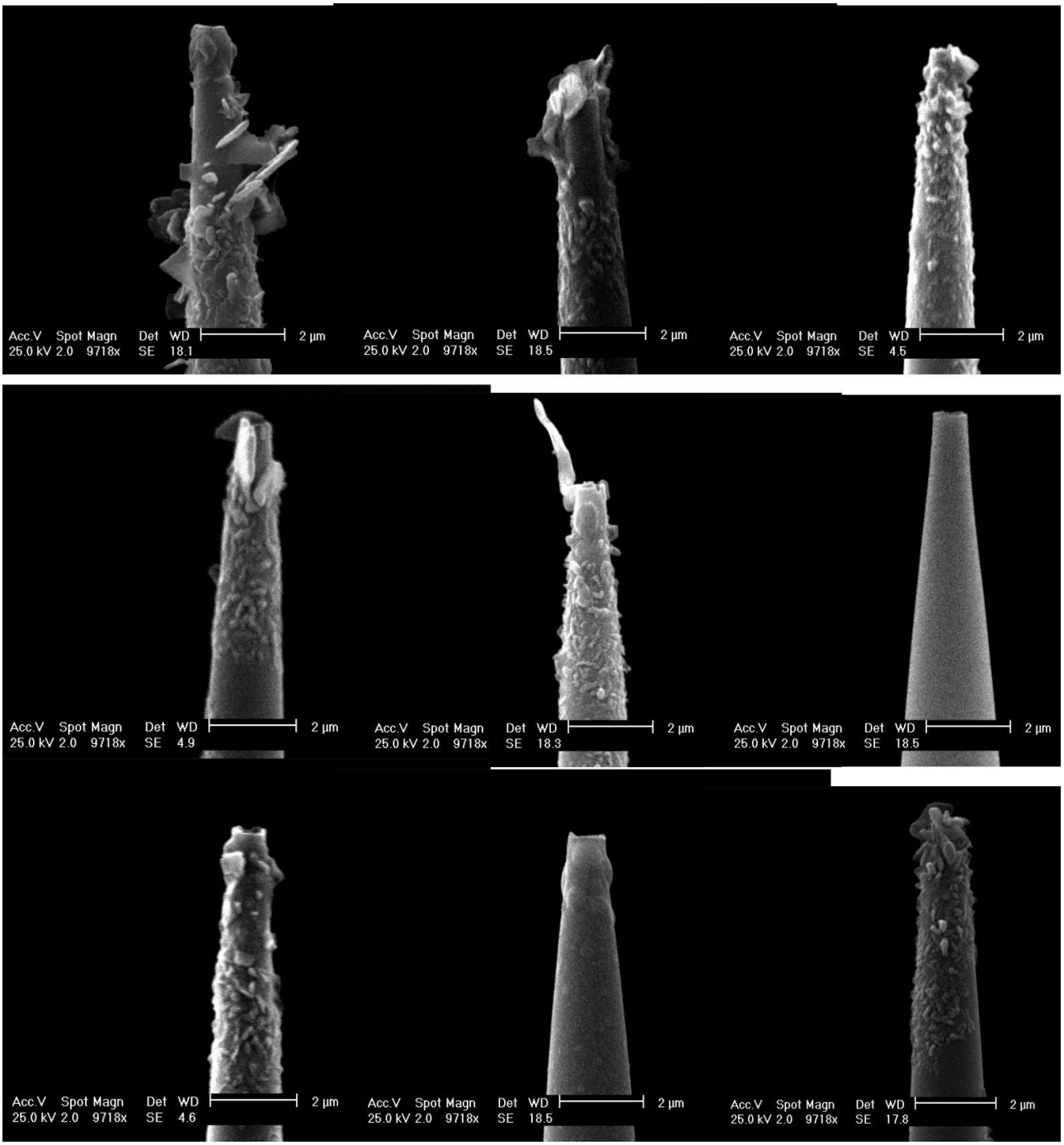
2a.电极的SEM通过预拉电极（-140倍）的生产销售。



2b.制造商出售的预拉电极的 SEM揭示了污染（-5000

已拉制显微注射电极（续）

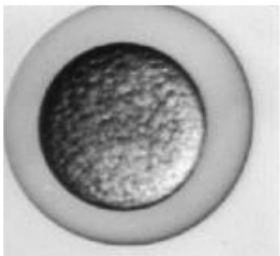
高倍镜下分析发现超过80%已拉制电极有各种级别污染。10,000扫描电子显微镜下检查已拉制电极的代表图像展示如下：

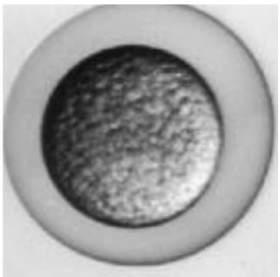


厂家销售的已拉制的显微注射电极的SEM分析（-10,000x）。

虽然已拉制电极的污染有各种可能的来源，这些颗粒是非典型的灰尘和粘液。人们可以假设这种污染起源，但需要用其他类型和分析的水平确定这些污染物。

斑马鱼胚胎注射





电极形态：

斑马鱼显微注射电极一般开始使用6-8mm颈部。理想的电极应该尖端后有一个1-2mm的修长内径。这种小锥角能够在打破尖端后仍保持在电极的小口径（4-10μm）。为了确保您的电极具有修长的颈部，最好将拉力值设置在45-110单位之间。

使用下面提供的设置拉制您的显微注射针。尖端被破坏之前，预期的尖端口径大小约0.3-0.7μm之间。为了折断尖端，使用解剖显微镜和一对镊子来折断并移除最后1-2mm的颈部。

首选形态-小锥角，然后折断至4-10μm口径

薄壁玻璃，具有0.3-0.7μm口径，5-8mm长颈部

A.

厚壁玻璃，具有0.3-0.7 μm口径，5-8mm长颈部

B.

然后折断或者磨制尖端在20x镜下观察

尖端折断至6 μm

有一个清楚的锋利的6 μm尖端-使用BV-10磨制

2.5mm×2.5mm盒形加热片的程序（FB255B）

1.厚壁玻璃-BF100-58-10（1.0mm×0.58mm）或BF100-50-10（1.0mm×0.5mm）

HEAT	PULL	VEL	DEL	PRESSURE
Ramp -10	60-80	70	130-170	500

2．薄壁玻璃- BF100-78-10 (1.0 x 0.78)

HEAT	PULL	VEL	DEL	PRESSURE
Ramp +10	60-90	70	90-200	200

大口径，短颈部=增加延迟或压力

小口径，长颈部=以5个单位增量增加拉力或加热值

Xenoworks数字微量注射器用于斑马鱼胚胎注射

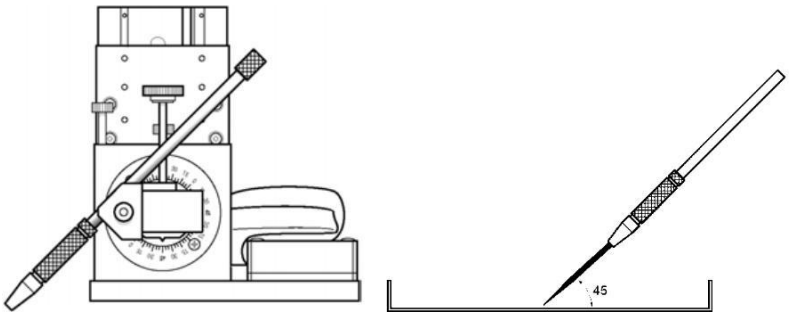
A.BREXenoworks数字注射仪设置：

- 范围设置=1
- 传输压力（补偿）=5-15
- 注射模式=脉冲式
- 脉冲宽度=0.04s
- 设定压力=开始于4,500hPa-平均范围=3500-5000hPa

当您已经填充了电极且折断至4-10μm尖端，我们的目标是建立可注射适当体积的压力和持续时间。为了校准电极开口所需的压力和持续时间，填充电极内液与将该溶液注入到置于带有千分尺的载玻片上的一滴油中（S8微米刻度为1mm/0.01mm的div）。溶液注入油中并调整压力以产生一个直径0.1mm水珠，这相当于500个皮升的压力。典型的体积范围从500微升至1个纳升，并应表示10%或更少的卵体积。

刘新英 校译

MP-225SUTTER显微操作位置斑马鱼胚胎注射



30-45度角接近斑马鱼胚胎

第 3 章 蜂尾针-主要推荐线虫用（线虫注射）

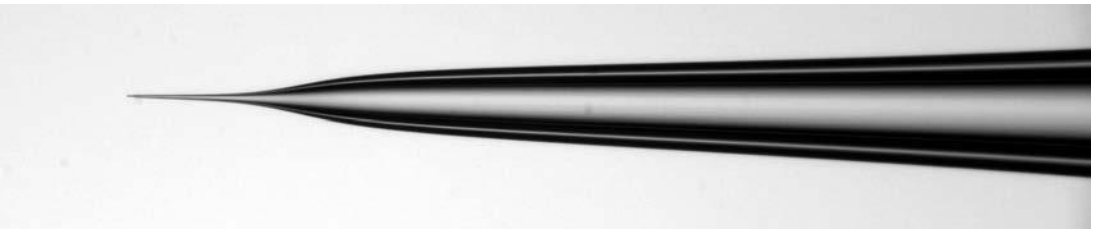
0.5 μm尖端内径

4-5mm颈部总长度

50-500 μm 最终“蜂尾针”颈部和尖端

使用2.5mm x 4.5mm盒形加热片（FB245B）*（槽形加热片无法制成此型电极）*

使用1.0mm x 0.78mm或1.0mm x 0.50mm硼硅玻璃



此方案可与任一1mm x 0.78mm（BF100-78-10）薄壁玻璃或1mm x 0.5mm（BF100-50-10）厚壁玻璃配合使用。下面我们提供了采用2.5mm x 4.5mm盒式加热片拟循环三次单行程序。

Heat	Pull	Velocity	Time	Pressure
Ramp	100	10	250	500

您的目标是3个循环！

刘新央 校译

这一行程序的速度设定为控制程序循环次数的决定因素。3次循环似乎效果最好并产生最稳定的结果。如果不按预期程序运行（循环过多或过少），请将速度设定以1-2个单位增量向上或向下进行的小的调整，以确保它循环三次。速度的增加将导致程序循环的次数更少，速度的下降将导致其循环更多。如果您需要微调“蜂尾针”样注射针颈部的最终长度，写3行相同程序，进行小的调整，只修改最后一行的速度（图B，40页）。轻微降低速度会缩短颈部长度，轻微升高速度会增加颈部长度。

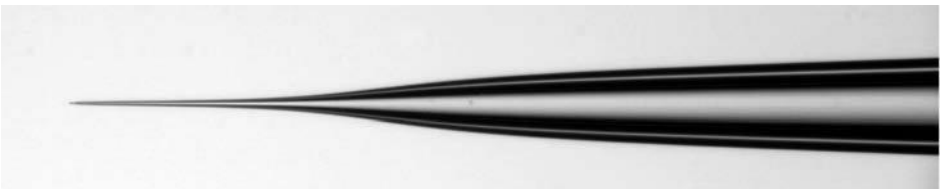
体积更小，更短的盒式加热片（2.5mm和3.0mm盒式加热片），似乎并不能制造这种形态的电极。2.5mm×4.5mm盒式加热片是制作蜂尾针形状最可靠的加热片。在“通用查询表”中所列的其他程序不能做出这个形态电极，因此，如果使蜂尾针针遇到困难，请与Sutter的技术支持。

特别注意事项： *虽然这个形态有时被告知可以做很好的贴壁细胞显微注射，并可能被证明对有些程序时是真的，往往颈部更平的电极是更好的选择。*

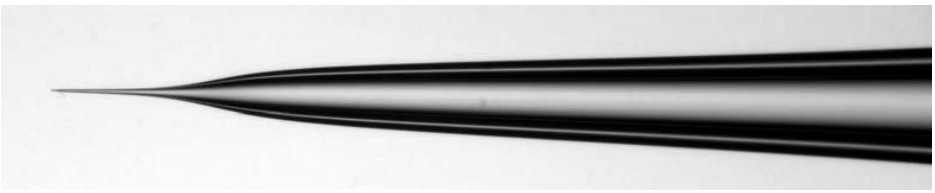
蜂尾针

（推荐用于秀丽隐杆线虫）

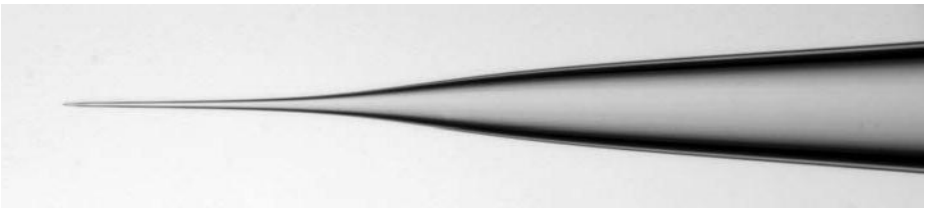
图A（40x）. 1.0mm x 0.5mm的厚壁玻璃（BF100-50-10）~0.5μm口径，4-5mm颈部，一行程序与3个循环



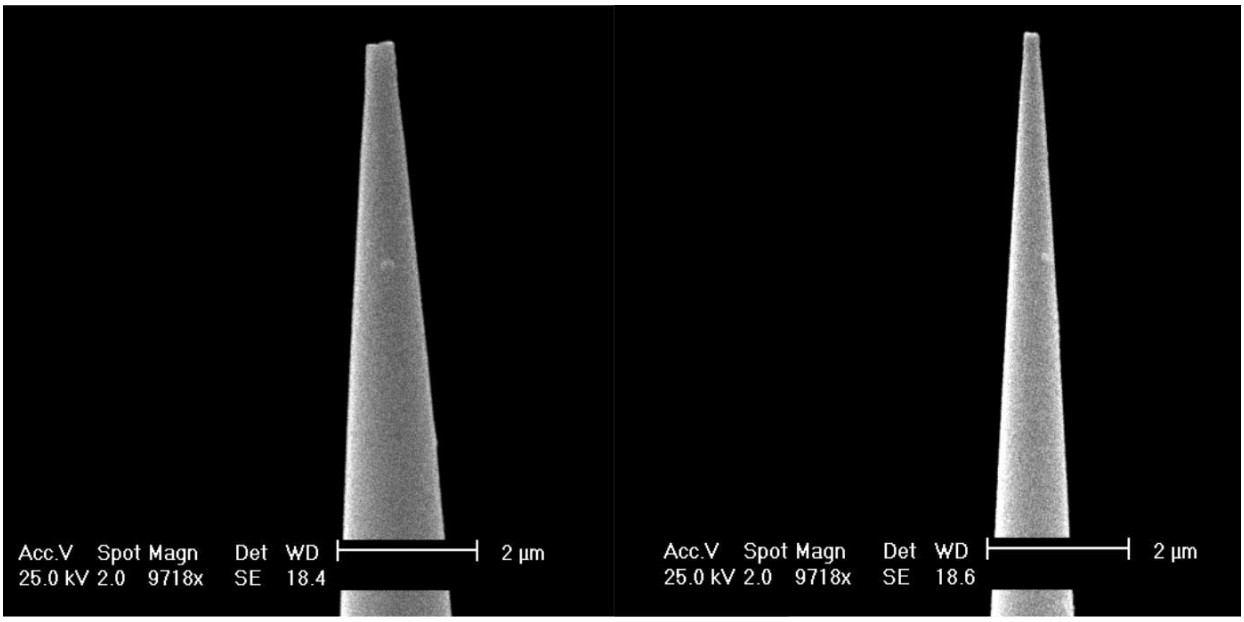
图B（40x）. 1.0mm x 0.5mm的厚壁玻璃（BF100-50-10）~0.5μm口径，w/a 较上图所示更短的颈部。三行程序，在第三行有速度的降低



图C（100x）. 1.0mm x 0.7mm 薄壁玻璃（BF100-78-10）0.7-0.5μm 口径，4-5mm 颈部，一行程序 3 个循环

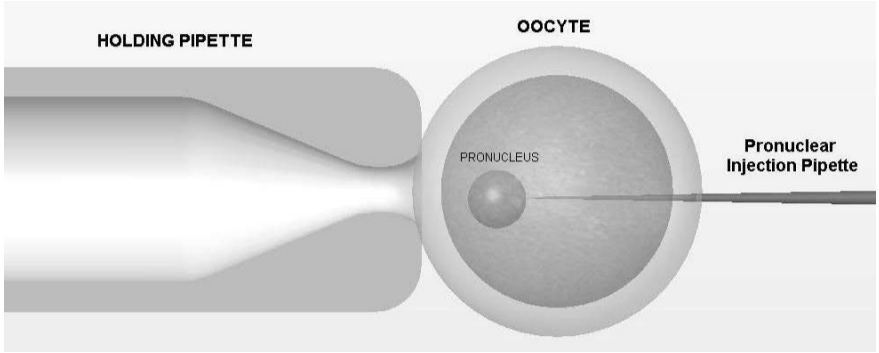


厚壁注射针　　薄壁注射针



蜂尾针型注射针的扫描电子显微镜（-10,000MAG）

第 4 章原核，细胞质和 CRISPR 注射



显微注射到原核（原核注射）是用于生产转基因动物，包括转基因小鼠的最常用的技术之一，也是生物科学中最有用的研究工具之一。原核注射涉及机械引入DNA（转基因）到哺乳动物受精的卵母细胞前核。所述DNA被注入到卵细胞后，卵子被植入到代孕动物。然后DNA将整合到现有的基因序列中而这种整合使动物的每一个细胞生来就具有新序列的拷贝。这种制备转基因动物的技术提供了一种用于研究哺乳动物发育和病理学的优异方法。

电极形态

所需的原核注射电极通常具有0.7至0.3μm尖端和6-8mm长颈部。原核注射针的锥角较小，电极到尖端没有明显的“肩部”。如果电极尖端后的内径快速增加，并具有“肩”，这可能会导致对卵母细胞过度损伤。此外，如果电极的最终尖端被taping off并且折断“打开它，所得到的电极的ID应保持在1μm

刘新英 校译

首选的形态-细长颈部，尖端后低肩部

薄壁玻璃后面0.70-0.30μm尖端，6-9mm细长颈部

使用 “原样”电极或“tapping off”的尖端

微注射实验人员做原核注射大约一半用“原样”注射针且不会折断尖端，直到它变得堵塞，无法冲洗。另一半微注射实验人员习惯在使用前用折断，或者用tapping off使电极能够有良好的流量通过尖端。虽然所使用的技术往往是由您的前辈决定的，也有可能是通过您的注射的方法是否能够很好的控制电极形态来确定。因此，由于有时无法找到合适的参数设置，也有人使用tapping off尖端的技术。下面提供的程序设置旨在制作尖端内径和颈部适合做注射的电极，而无需使用折断或者tapping off。如果您喜欢**“tapping off”的尖端**，请将拉力值设置为比建议值高10至30个单位或使用较低的延迟值。

原核注射-推荐程序

原核注射电极通常使用1.0mm x 0.78mm薄壁有芯玻璃（BF100-78-10）拉制。这种类型的电极相当特殊并且有非常严格的公差，需要约7-8mm细长颈部和小于1μm米尖端口径和颈部必须细到不足以造成过度的损伤，因此尖端后细长的颈部与最小“肩”部最为适用。颈部长度太短（小于6mm）和口径过大（超过1μm）将导致过多的损害。在另一方面，颈部过长（超过8mm）或口径太小（低于0.2μm）将使其难以通过尖端注入稀释的DNA。

目标=7-8mm细长颈部，0.5-0.9μm尖端，尖端后没有明显的肩部。

原核注射针（400x）1.0mm x 0.78mm 有芯玻璃 0.5-0.9 μm 尖端，7-8mm 颈部。最终颈部是渐进的，尖端的后面具有最小的“肩部”。

推荐使用盒形加热片和薄壁玻璃程序：

2.5mm x 2.5mm标准盒形加热片（FB255B）和BF100-78-10玻璃

Line 1	Heat	Pull	Velocity	Delay	Pressure
	Ramp	90	70	80	200

2.5mm x4.5mm宽盒式加热片（FB245B）和BF100-78-10玻璃

	Heat	Pull	Velocity	Time	Pressure
Line 1	Ramp	0	20	200	500
Line 2	Ramp+10	80-100	70-80	200	500

刘新英 校译

如果颈部太长且尖端太小，以10个单位增量增加延迟或时间值，然后以5个单位的增量逐渐减小拉力。

如果锥度太短和尖端过大，以5个单位增量增加拉力值，然后再以5个单位增量降低延迟或时间（冷却）。

CRISPR 注射电极

对于这些类型注射针，尖端必须断至比原核和细胞质注射所需略大。因此，最好使用略高拉力设置，使电极更长一点，尖端更修长。这样可以防止当破碎背面并保持尖端后面的窄锥形太大电极开口。

推荐范围参数设置

HEAT=RAMP-5-10
PULL=40-120
VEL=60-80
TIME=175-250
DELAY=60-100
PRESSURE=200-400

Xenoworks数字注射仪用于原核，细胞质和CRISPR注射

XENOWORKSDIGITAL 注射仪设置：

- 范围设置：1
- 传输压力（补偿）=20-40百帕
- 注射压力：（脉冲或连续）=500-1000百帕

推荐方法.....

脉冲模式： 压力=500-1000百帕

脉冲宽度=0.20s

可选方法.....

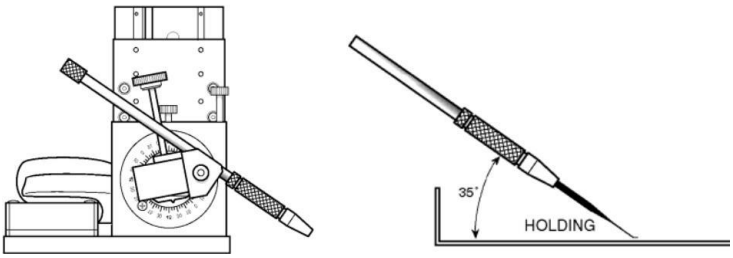
连续模式： 压力=500-1000百帕

注射的持续时间由按下注射键/脚踏开关的时间确定。

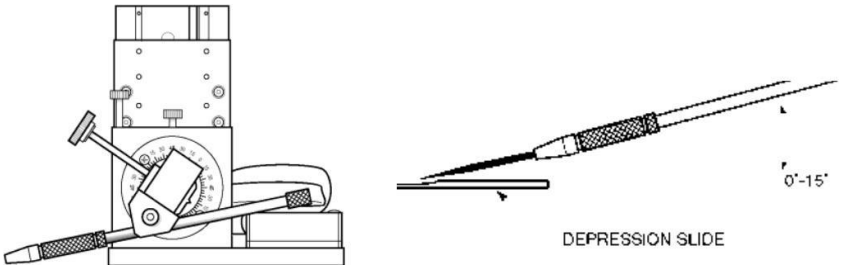
使用传输/补偿压力连续注入的备用方法：增加传输压力直到产生所需的流速。对于更高的压力，切换到范围设置2这将增加一倍可用的压力。

刘新英 校译

Xenoworks显微操纵器（BRMR＆BRML）位置为原核，细胞质和CRISPR注射



固定电极角度25-35度-左侧（BRML）Xenoworks机械手



注射针角度15-35度-右侧（BRMR）Xenoworks微操

小角度比较理想。角度将取决于培养皿的侧壁（浅最好）或孔的深度。

电极堵塞

拉制仪的原核注射过程中，堵塞是不可避免的，但人们希望电极堵塞之前能够做多次注射。一系列注射后，电极会阻塞，在这个阶段，可以使用微量注射仪的的“CLEAR”功能清理电极。如果清理失败，可以然后点击关闭尖端以去除堵塞区并继续注射。如果遇到一个注射针直接或过早堵塞，这是很少由于电极本身引起，而是可以通过许多因素，列出如下：

- 用于稀释DNA的培养液不干净
- DNA不干净，并且具有残留的聚集体
- 最后一次注射浓度尚未“降解”
- DNA的稀释不充分（常推荐1：100稀释）
- 玻璃的内孔脏，通常由灰尘和玻璃颗粒导致

注射系统注意事项

电极开口的要求不仅是DNA结构和稀释浓度决定，也取决于设备上显微注射系统的类型。一些注射仪不能提供足够的注射压力（旧设备，垫片泄漏，低端设备），这可以极大地影响“似乎”可用的电极尖端的大小。最好是拉制合适形态的电极（小口径和细长颈部，这将维持高存活率），并使用设计合适的注射器完成这项工作。请参见第18章描述了在世界各地的转基因设施中常用的SutterXenoworks显微注射系统。

用于成功修复卵母细胞和整合入DNA，一些人认为膜少量创伤是一个关键因素。结果，tapping off尖端，以进一步打开它通常可以被视为好的做法和首选的技术。

刘新英校译

YAC（酵母人工染色体）DNA的是非常大的，并且经常需要用颈部更短，口径较大的电极。经常有必要折断或tapping off最终尖端以使开口更大，以防止DNA的堵塞或剪切。

第 5 章 胚胎干（ES）细胞的显微注射

胚胎干细胞已被用于在小鼠基因组添加基因拷贝（转基因）或破坏基因（敲除）。ES细胞显微注射技术已对基因功能，改变的基因表达，和基因调节的研究的造成显著影响。显微注射胚胎自妊娠3天的孕鼠收集。固定电极（通常放置在样本的左侧）将胚胎固定在适当位置，而相对的注射针（在右侧）介导ES注射入胚胎。注射针被推入固定胚胎的空腔中，并且用微正压进入胚胎将细胞排出。显微注射后，通过手术将胚胎转移回代孕母亲。胚胎干（ES）细胞的显微注射需要一个很长和精细的微电极将胚胎干细胞转移到胚泡中。

电极形态

ES细胞注射针具有8-12mm长颈部，其尖端锥度尽可能平行，并且最终尖端内部直径比ES细胞稍大（15-25μm内径）。使用手动微注射仪像Xenoworks模拟微量注射仪，将10-15细胞轻轻抽吸入注射针，然后用轻微正压将ES细胞转移到胚泡。

ES细胞微注射仪通常具有使用BV-10磨制仪和粗糙金刚石板（第19章）磨制的35至45度的斜角。在磨制之前，最好是通过折断电极尖端使其产生一个10到15μm开口。有时也需要使用抛光仪在斜面的前端产生一个小尖峰。

ES细胞-推荐程序

这类电极通常使用1mm x 0.75mm（B100-75-10）毛细玻璃管拉制。建议使用2.5mm x 4.5mm（FB245B）或3.0mm x 3.0mm（FB330B）盒形加热片。使用这种玻璃管无论是搭配4.5mm或3mm宽盒形加热片，请采用以下设置：

刘新英 校译

Heat	Pull	Velocity	Time	Pressure
Ramp + 20	30	120	200	200

- 如果您发现该颈部过长，以5个单位增量降低加热值（但不要小于Ramp值），然后以10个单位增量逐渐增加时间。
- 如果您发现该颈部过短，以25个单位增量缩短时间，然后以10个单位增量增加拉力。

技术说明：

ES细胞注射到胚胎需要类似于用于DNA的原核显微注射显微操作的系统。请参见第18章描述了Xenoworks显微注射系统。

*如果您使用拉制仪不能更换加热片，请在通用查询表中找到拉制仪加热片类型，使用合适的玻璃及其专用程序。此类应用推荐使用类型D或E程序。

胚胎干细胞（ES）注射

电极（400x）

使用瓷片（CTS）刻划电极并折断产生18-23μm尖端，8-10mm的颈部，磨制30度的斜面（BV-10磨针仪＆104D细砂轮）

电极从初始尖端4-5mm处划断

然后磨制有18-23μm 口径的斜面

ES细胞转移用的 Xenoworks模拟注射仪（BRI）

刘新宇 校译

建议建立

↓

注射器尺寸：100μl或250μl

油或水：使用轻质矿物油或水填充管路与注射器（油可以更好的控制）

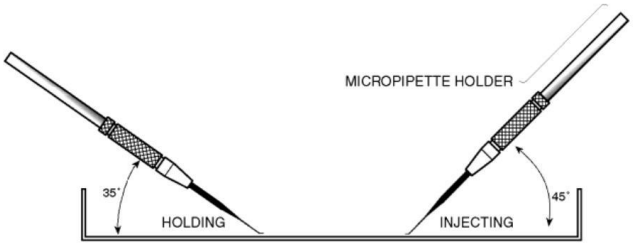
Fluorinert ™FC-77：电极可选的填充液。通常帮助更好的控制细胞

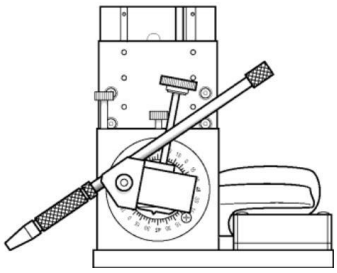
粗调/细调旋钮：用细调旋钮来控制采集和传送/注射干细胞

*推荐设置-联系**Sutter**或查看*

***BREcookbook**获取更多的技术支持*

ES细胞转移时 Xenoworks微操作（BRMR＆BRML）的位置





建议设备用于悬浮细胞时使用成角度电极（ICSI，干细胞，核移植）

第 6 章 ICSI（细胞内精子注射）

ICSI是体外受精（IVF）一种高级形式，传统上是在试管中进行。ICSI电极用于抽吸并注入单个精子细胞到单个卵母细胞形成受精。它是生殖医学研究中最重要的进步之一。在这种技术中的卵母细胞和精子置于载玻片上并在倒置显微镜下观察。2个装有微电极的显微操作系统安装在显微镜台上。通常固定电极放置在左侧，固定卵母细胞的位置，而ICSI注射电极放置到右边。

一般考虑

在拉制精子注射微电极时要考虑的最重要的因素是电极尖端的内径。根据定义，单精子注射电极必须穿透卵母细胞的细胞膜，因此必须呈现最小横截面，以尽量减少在注射过程中的对卵母细胞的损伤。电极的内径由精子细胞的大小和形态来确定，因此，电极的ID应该足够大，以容易地吸出精子，但应过大导致精子在电极内聚成一团。对于此应用程序ID的典型范围为4-7μm之间。

电极形态

对于薄壁的，无芯的硼硅酸盐毛细玻璃管（B100-75-10），应设置参数使其能够拉制10-15mm颈长的小锥角电极。尖端直径无关紧要，因为电极尖端将被折断，然后磨制形成4-7μm之间的适当的尖端口径。这个过程是首先折断尖端以创建3-5μm尖端然后使用SutterBV-10磨制（Chapter19）形成最终尖端。电极尖端应当磨制出正确的ID和所需要的角度，通常是30至40度之间。如果需要，可在电极尖端制作小尖峰并使用抛光仪弯曲电极。

刘新英 校译

ICSI-推荐程序

此类电极通常由1mm x 0.75mm（B100-75-10）毛细管玻璃拉制。建议在2.5mm x 4.5mm（FB245B）或3.0mm x 3.0mm（FB330B）盒形加热片。使用此型号玻璃管无论是4.5mm或3mm宽盒形加热片，请采用以下设置：

	Heat	Pull	Velocity	Time	Pressure
Line 1	Ramp	0	20-30	200	500
Line 2	Ramp	30	120	200	500

- 如果您发现该颈部过长，以5个单位增量降低加热值，然后以10个单位增量逐渐增加时间。
- 如果您发现该颈部过短，以25个单位增量缩短时间，然后以50个单位增量增加拉力。

*如果您使用拉制仪不能更换加热片，请在通用查询表中找到拉制仪加热片类型，使用合适的玻璃管及其专用程序。此类应用推荐使用D类或E类程序。

ICSI 微电极-细胞内精子注射

ICSI 拉制仪（400x）

刻划电极并使用抛光仪在初始尖端1至2mm处折断。钝尖电极可用于小鼠PIEZO注射，或者可以磨制尖端以用于小鼠，牛和马ICSI（~4-7μm）

上述吸移管是PIEZOICSI需要的类型（PMM4G）

上图电极使用BV-10与104D细砂轮磨制30-60s

Xenoworks模拟注射仪（BRI），用于ICSI

建议建立

刘新英 校译

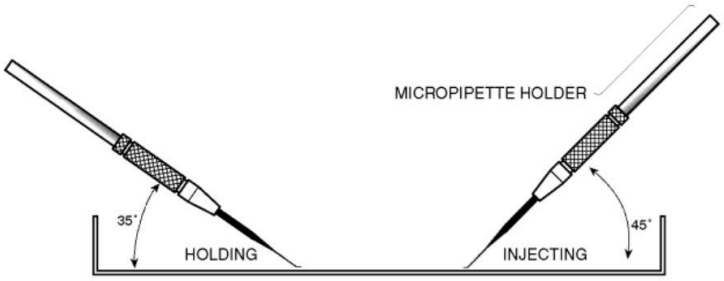
注射器尺寸：50μl或100μl

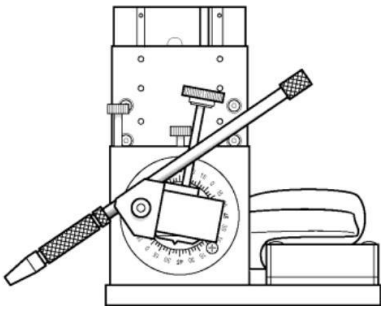
油或水：使用轻质矿物油或水填充管路与注射器（油可以更好的控制）

Fluorinert ™FC-77：电极可选的填充液。通常帮助更好的控制细胞

粗调/细调旋钮：用细调旋钮来控制采集和传送/注射精子

ICSI 注射时 Xenoworks显微操纵器（BRMR＆BRML）位置





建议设备用于悬浮细胞时使用成角度电极（ICSI，干细胞，核移植）

第 7 章 核移植

核移植是用于克隆动物的方法之一。它涉及从动物的供体细胞取出细胞核，然后通过细胞融合或移植将供体细胞核植入去核卵母。然后刺激卵母细胞开始形成胚胎。发生这种情况后，胚胎移植到代孕妈妈，偶尔供体动物的完美复制品将诞生

一般考虑

在拉制核转移微电极时要考虑的最重要的因素是电极尖端的内径。电极必须穿透细胞膜，因此必须呈现最小横截面，以尽量减少在注射过程中的损伤。电极的内径由细胞核的大小来确定，因此，电极的ID应该足够大，以容易进行核转移。对于此应用程序ID的典型范围为15-21μm之间。

电极形态

对于薄壁的，无芯的硼硅酸盐毛细玻璃管（B100-75-10），应设置参数使其能够拉制10-15mm颈长的小锥角电极。尖端直径无关紧要，因为电极尖端将被折断清洁，或者磨制形成5-15mm之间的合适的尖端口径。使用抛光仪折断电极形成一个清楚的钝端，将得到的钝针与类似PrimetechPMM4G 这样的压电装置一起使用（参见Sutter仪器目录）。如果需要带斜面电极，而不是钝尖，首先折断尖端以制作3-5mm口径然后使用SutterBV-10磨制（Chapter19）形成最终口径。电极尖端应当磨制出正确的内径和所需要的角度，通常是30至40度之间。如果需要，可在电极尖端制作小尖峰并使用抛光仪弯曲电极。

核移植-推荐程序

刘新英 校译

此类电极通常由1mm x 0.75mm（B100-75-10）毛细管玻璃拉制。建议在2.5mm x 4.5mm（FB245B）或3.0mm x 3.0mm（FB330B）盒形加热片。使用此型号玻璃管无论是4.5mm或3mm宽盒形加热片，请采用以下设置：

	Heat	Pull	Velocity	Time	Pressure
Line 1	Ramp	0	20-30	200	500
Line 2	Ramp	30	120	200	500

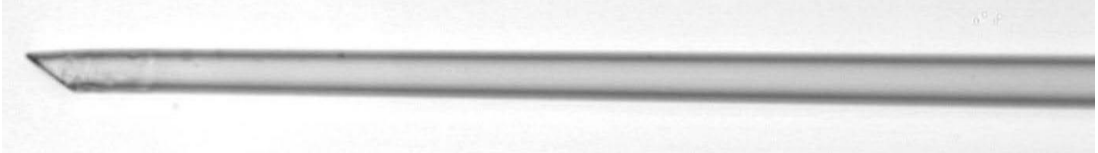
- 如果您发现该颈部过长，以10个单位增量降低加热值，然后以25个单位增量逐渐增加时间。
- 如果您发现该颈部过短，以25个单位增量缩短时间，然后以20个单位增量增加拉力。
- 对胚胎干细胞（ES）细胞，细胞核移植（NT）和克隆其他信息：
- The following PBS/Nova web site
  http://www.pbs.org/wgbh/nova/sciencenow/3209/04-clon-nf.html
- Institute for Laboratory Animal Research
  http://dels.nas.edu/ilar_n/journal/33_4/v33_4Nuclear.shtml
- Nuclear Transfer: Bringing in the Clones
  http://www.pnas.org/misc/classics4.shtml

核移植（NT）

核电极（400x）

电极从距初始尖端2-3mm 处折断（-15-21μM）

上图电极磨制 30 斜角-使用104D 细砂轮与 BV-10 磨针仪



Xenoworks模拟注射仪（BRI）用于核移植

英 校译

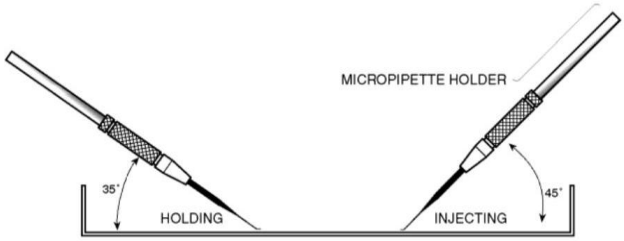
建议建立

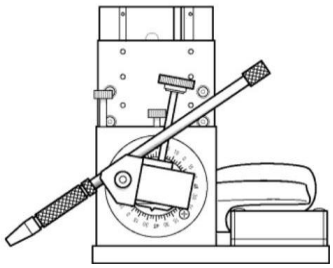
注射器尺寸：100μl或250μl

油或水：使用轻质矿物油或水填充管路与注射器（油可以更好的控制）

粗调/细调旋钮：用细调旋钮来控制采集和传送/注射

核移植时Xenoworks显微操纵器（BRMR＆BRML）的位置





建议设备用于悬浮细胞时使用成角度电极（ICSI，干细胞，核移植）

第 8 章 固定电极

当使用诸如原核注射，ICSI和ES细胞注射等技术时，固定电极用于显微注射过程中固定所述细胞或胚泡。固定电极具有清洁的90度断面，经过火抛光形成光滑表面与细胞接触。固定电极通常具有相当大的内径和外径，它提供了良好的支撑，并降低了显微注射期间卵母细胞的任何可能的变形。根据卵母细胞的大小，抛光的程度，拉制电极的毛细玻璃管的壁厚，固定电极传统上具有5-15μm之间的内径和75-125μm之间的外径。

固定电极-推荐程序

此类电极通常由1mm x 0.75mm（B100-75-10）毛细管玻璃拉制。建议在2.5mm x 4.5mm（FB245B）或3.0mm x 3.0mm（FB330B）盒形加热片。使用此型号玻璃管无论是搭配4.5mm或3mm宽盒形加热片，请采用以下设置：

Heat	Pull	Velocity	Time	Pressure
Ramp + 30	0	150	0	200

这将拉制出一个颈部长，粗细均匀的电极。

如果您发现该颈部过长，以10个单位增量降低加热值，然后以25个单位增量逐渐增加拉力。

如果您发现该颈部过短，以25个单位增量缩短时间，或使用更宽4.5mm盒加热片（FB245B）。

制作固定电极所需其他步骤

折断玻璃管-折断电极使其内径在50-75mm之间的。这取决于您打算“固定”的细胞的大小和您需要提供给尖端热抛光的程度。为了使折断时电极能够产生20mm或更大的口径大小，最好是使用一个瓷片或“玻璃划玻璃”需要的位置将电极划痕。有关说明，请第10章。抛光仪也可以使用，但使用抛光仪在口径大小超过25mm处折断玻璃时，玻璃容易以某一角度断裂或导致锻造加热元件的变形和弯曲。

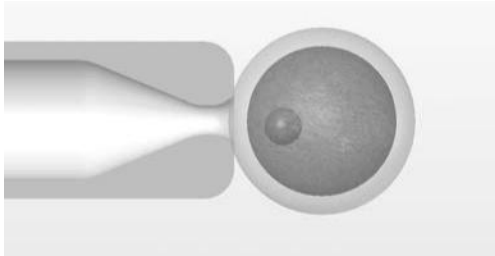
刘新英 校译

热抛光的尖端-热抛光做是为了形成一个光滑的表面与细胞相接触，及最适合内径和外径固定在您的细胞。如果固定电极太小，从另一侧注入该细胞时，细胞容易跑掉。如果固定电极太大，则容易扭曲细胞或将细胞吸入到电极。对电极进行热抛光需要抛光仪。

弯曲电极-根据您的应用程序和设置，有时需要在电极的颈部来制作一个20至35度的弯曲。当细胞在培养皿中，而不是在载玻片中，通常需要电极有个一个弯曲且最好有一个特定的角度。此步骤需要抛光仪。

*如果您使用拉制仪不能更换加热片，请在通用查询表中找到拉制仪加热片类型，使用合适的玻璃及其专用程序。此类应用推荐使用E类程序。

固定电极图片



小电极固定（400×）

锻造和热抛光

5μmID×15μmOD

小电极固定（40x）

在低倍镜下看弯曲

5μmID×15μmOD，锻造，抛光和弯曲

中型/大型固定电极（400x）。

使用瓷片划痕并折断电极，

然后热抛光。15μmID×80μmOD

刘新英 校译

Xenoworks（BRI）模拟注射器或（BRE）数字注射仪用于保持

建议建立

*建议建立-联系**Sutter***

注射器尺寸：500μl或1000μl

气体或水：使用气体或水填充管路与注射器（用水可以进行更精细的控制

粗调/细调旋钮：用细调旋钮来控制固定

第 9 章非洲爪蟾（蛙卵）显微注射

爪蟾卵母细胞用于研究神经系统是如何在细胞水平工作，神经如何发育形成正确的连接，以及神经如何组织让动物产生行为。爪蟾卵母细胞，包括非洲爪蟾卵母细胞和热带爪蟾卵母细胞，是研究胚胎发育的重要模型具有许多优点，包括卵的体积较大，卵裂球易于识别，可以承受广泛的手术干预和培养（体外）能力。因此，爪蟾卵母细胞是早期胚胎发育和细胞生物学研究的重要和独特的资源。爪蟾卵母细胞中所用的技术包括全细胞膜片记录，神经元成像和网络模型。

爪蟾显微注射-推荐

这类电极通常使用1mm x 0.75mm（B100-75-10）或1×0.5（B100-50-10）毛细玻璃管拉制。建议使用2.5mm x 4.5mm（FB245B）或3.0mm x 3.0mm（FB330B）盒形加热片。使用这种玻璃管无论是搭配搭配4.5mm或3mm宽盒形加热片，请采用以下设置：

Heat	Pull	Velocity	Time	Pressure
Ramp	30	120	200	200 – 300

- 如果您发现该颈部过长，以10个单位增量降低速度，然后以25个单位增量逐渐增加压力。
- 如果您发现该颈部过短，以25个单位增量降低压力，然后以10个单位增量增加加热值，除非知道加热片可以承受的热量，否制此值不能大于Ramp+30。

折断电极形成 3-5μm尖端

刘新英 校译

这些设置将拉制出一个10-12mm长颈部和一个很小的精细尖端。对于非洲爪蟾卵母细胞显微注射，需要使用镊子，剪刀或刀片折断尖端做一个3-5・m的开口。理想的开口是粗糙的，锯齿状的，更容易刺入爪蟾卵母细胞膜。也可以将尖端进行打磨，做成一个干净，尖锐，皮下进样针。

**如果您正在做细胞内记录，您需要一个更尖锐电极，不能折断尖端。请参阅通用查询表，找到符合您的拉制仪，玻璃管类型的图表，并尝试 B 型或 C 方案拉制尖锐的电极。*

**如果您使用拉制仪不能更换加热片，请在常规查找表中找到拉制仪加热片类型，使用合适的玻璃及其专用程序。此类应用推荐使用 D 类程序。*

非洲爪蟾显微注射电极，3μm-5μm 口径

首先将毛细管玻璃拉制出很长的，均匀的，渐进的锥角（100x）。

要做出适当的尖端开口，必须折断最后的尖端

用镊子折断

用镊子折断电极做一个大概3-5μmID断端（400xMAG）。

轻轻扯断（在taught piece of Kimwipe）尖端

3-5μm尖端薄壁或厚壁玻璃（400×MAG）。

用BV-10磨角

使用BV-10，104D细砂轮45度角磨至3-5μmID（200×MAG）。

Xenoworks数字微量注射器（BRE）用于非洲爪蟾卵母细胞注射

外贸英 标译

XenoworksDIGITAL 注射仪设置

- 范围设定：1或2
- 传输压力（补偿）=5-15百帕
- 注射压力：（PULSE或连续）=50-200百帕

推荐方法.....

脉冲模式： 压力=50-200百帕

脉冲宽度=0.20秒

可选方法.....

连续模式： 压力=50-200百帕

注射的持续时间由按下注射键/脚踏开关的时间确定。

使用传输/补偿压力替代连续注射方法：增加传输压力直到产生所需的流量。对于更高的压力，切换到范围设置2，这将增加一倍可用的压力。

第 10 章 大口径电极

20μm-200μm 尖端口径：使用瓷片（CTS）或“玻璃划玻璃”

如果不使用机械装置做划痕然后折断玻璃，很难制作尖端口径超过20 μm的电极。抛光仪通常用于制作5-20μm之间尖端口径，但一旦需要较大的尖端，抛光仪的精细的加热片通常过于脆弱难以有效地折断玻璃或产生一个干净的断面。正是在这种情况下，我们推荐使用厚壁玻璃和陶瓷片或“玻璃划玻璃”制作20-200μm之间的尖端和干净的90度断面（参阅第60）。

瓷片（第60）的前面是带有Sutter标志的表面。瓷片的前边缘是粗糙可以做玻璃划痕。在100至200倍显微镜下检查电极的颈部，并确定电极需要被划痕以制作特定的尖端ID。用记号笔标记玻璃会使你目标更明确。您也可以沿着颈部“盲目”从高到低下做玻璃划痕，在“试错”中找到合适的位置。您会发现，随着玻璃管颈部直径增大，弹性会减小，而这种触觉反馈有时可以帮助我们确定做划痕的位置以制作特定的尖端大小。

使用P-97或P-1000微电极拉制仪，任何加热片和厚壁玻璃1mm x 0.5mm（B100-50-10），1.2mm x 0.69mm（B120-69-10），或1.5mm x 0.86mm（B150-86-10），请尝试以下参数设置：

采用1.5mm x 0.86mm OD/ID玻璃和采用3mmx3mm盒形加热片实施的一例程序：

Heat	Pull	Velocity	Time	Pressure
Ramp + 25	0	150	0	200

取下所得到的长颈部电极且将其保持垂直向上放到光或黑暗的背景。使用瓷砖的前边缘，以相对于颈部90度角做玻璃划痕，然后使用瓷片在“划痕”的位置的上方用力施压折断玻璃。可能会需要一些练习，才能够始终在正确的位置干净地折断玻璃。请参考图片上的第58。

刘新英 校译

制作 15-75 μm 尖端的其他“招数”

完全折断

我发现，通过简单地弯曲颈部的最细的一面，通过类似刷牙的方式，并使用我的食指弯曲玻璃，玻璃就会自然在15-30μm尖端之间折断，成功率高达70%。。

斜角折断

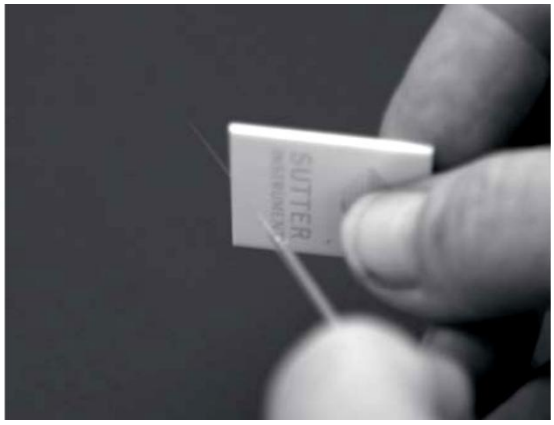
要制造一个半粗糙斜断面和20-25μm尖端开口，首先要拉制长颈部电极，扯下一块Kimwipe纸巾，绷紧在烧杯上，把电极尖端快速并轻轻捅过纸巾。此技术最终产生20-25 μm斜断面，大约90％成功率。如果您使用

1或2层的纸巾，您往往能获得10-20 μm带斜角断面，如果您使用厕纸，您通常可以得到50-75 μm斜断面。其他纸制品仍有待测试！

对于图像参见第61页。

重要提示：我们建议您打碎玻璃时佩戴护目镜且向外用力，远离您的眼睛。

瓷片（CTS）图片



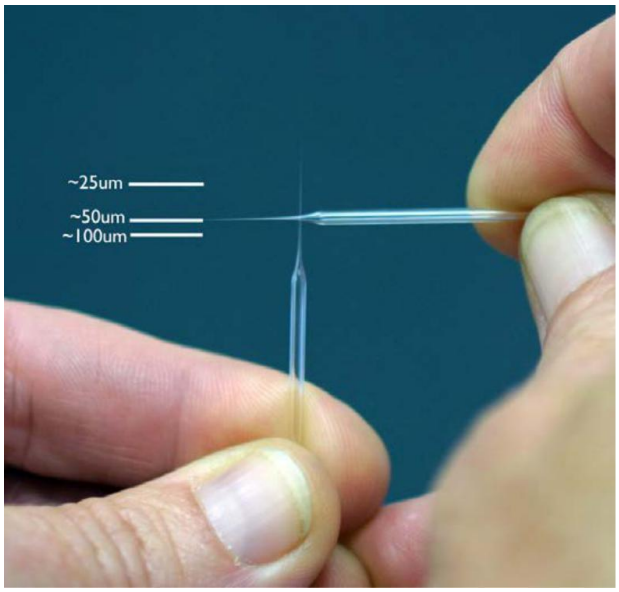
瓷片，编号CTS，每片$15.00

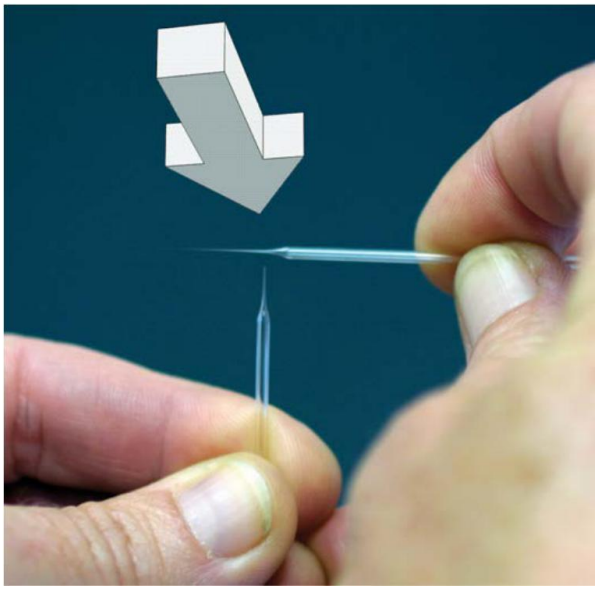
使用瓷片的前缘（标识侧）与颈部成90度角做划痕

“玻璃划玻璃”

(© Adair L. Oesterle)

使用玻璃划玻璃，产生一个25-100μm尖端w/ 完全折断，此技术在下图进行说明。





步骤 1　只有划痕，没有折断！

第 2 步划痕上方位置移动＆施加平滑连续的压力，以折断玻璃。

对左手电极划痕，用右手电极的较厚区域（肩部）。非常轻微的接触，（右手）做划痕的电极仅1mm水平移动是此方法的全部要求。两电极在25μm或更大口径处的相互作用感觉像粗糙的砂纸。一个方向运动就足够了。不要来回做拉锯运动！不要在做划痕的同时折断玻璃，这样效果不好。做完划痕后，移动划痕电极到划痕的位置上方，施加一个平滑连续的力（步骤2），以在期望的位置折断玻璃。

一般的经验法则：　**1/4** 尖端=25μm　**1/2** 尖端=50 μm

2/3尖端=75 μm　**3/4**尖端=100-200 μm

SutterInstrumentYouTube 频道，科学家赋权科学家研讨会“Achieving the Impossible”（17:55）的视频演示。
https://www.youtube.com/watch?v=gC4Ktmb6ndk

大电极图片，20μm-200μm 尖端

用瓷片或玻璃划玻璃方法：

25μm尖端，厚壁玻璃

50μm尖端，厚壁玻璃

75μm尖端，厚壁玻璃

刺穿 Kimwipe，Kleenex 或其他面巾纸，

刘新典 校译

15μm尖端，厚壁玻璃，通过刺穿Kleenex制作

30μm尖端，厚壁玻璃，通过刺穿Kimwipe制作

75μm尖端，厚壁玻璃，通过刺穿纸巾制作

制作大开口长颈部电极技术表

尖端口径	毛细玻璃管尺寸	方法
1-5μm	任何 Sutter 生产的毛细玻璃管(薄壁或者厚壁)	1) 将电极尖端轻轻触碰绷紧或者松弛的一片 Kimwipe 纸巾。俗称“挠纸巾” 2) 在显微镜平台上培养皿中的盖玻片的边缘上折断
6-15μm	任何 Sutter 生产的毛细玻璃管(薄壁或者厚壁)，使用抛光仪 铝硅酸盐玻璃，使用改进的“玻璃划玻璃”技术	1) 使用抛光仪-联系 Sutter 获取更多信息 2)使用铝硅酸盐玻璃及改进的“玻璃划玻璃”技术。 使用抛光仪-联系 Sutter 获取更多信息
15-50μm	Sutter 标准及厚壁毛细玻璃管 B100-50-10,B120-69-10, B150-86-10, B150-75-10 和铝硅酸盐玻璃	使用“玻璃划玻璃”技术。 使用瓷片划痕法(Part # CTS) ***见第** 10 章
	Sutter 标准及厚壁毛细玻璃管 B100-50-10,B120-69-10, B150-86-10, B150-75-10 和铝硅酸盐玻璃 注意: 薄壁玻璃难度较大，不推荐!	1) 使用瓷片划痕法(Part # CTS) ***见第** 10 章 2）钻石刀– 不推荐! 钻石刀太过笨重，不适合在电极颈部做划痕。瓷片更加精细且能够提供更好的物理反馈
100-175 μm	Sutter 标准及厚壁毛细玻璃管 B100-50-10,B120-69-10, B150-86-10, B150-75-10 和铝硅酸盐玻璃 注意: 薄壁硅酸盐玻璃难度较大，不推荐!	用电极拉制仪做单手动拉制 联系 Sutter 获取更多信息 使用较高的加热值(小心!) 不施加冷却以产生大的内径。 联系 Sutter 获取更多信息

邓鹏博 校译

第 11 章 吸入电极：细胞转移，单细胞力学，和卵裂球活检

吸入电极最常用于小细胞，珠或颗粒收集和显微操作，并且还用于研究细胞的粘弹性质。它们也用于ICSI和ES细胞的过程。

用于抽吸管的理想的形态是尖端具有清洁的90度断面和颈部长且均匀，两壁平行。所需的尖端大小将取决于被吸入到电极的细胞的大小，以及是否细胞膜，或整个细胞的一部分。用于吸入电极尖端的大多数在10-50μm之间。

对于尖端20μm及以上电极，可以首先拉制长颈部电极，然后按第10章中的说明在电极颈部的目标位置做划痕并折断。玻璃划玻璃技术可以很好地用于制作20-50 μm之间口径的电极，如果尖端超过50μ，最好是使用瓷片。为了制作10-20μm之间口径的电极，可以使用抛光仪和/或购买的更硬更坚固铝硅酸盐玻璃，可在接近尖端ID较小的前端做划痕和折断。对于尖端5-10μm，最好是使用抛光仪。对于有关使用抛光仪的更多信息，请联系Sutter。

最理想的情况是使用2.5mm x 4.5mm盒加热片（FB245B）加热和拉力值较长且均匀的颈部，两壁保持平行。我们建议使用厚/标准壁玻璃，因为它们更容易在尖端形成干净的折断。最好是用Sutter硼硅玻璃：B100-50-10，B120-69-10，B150-86-10。薄壁硼硅玻璃也可以使用，但在制作较大口径的电极时，薄壁玻璃难度更大。如果您更喜欢使用薄壁玻璃，试试我们的铝硅玻璃A100-64-10，A120-87-10和A150-100-10。关于铝硅酸盐玻璃的详细信息请参阅第12章

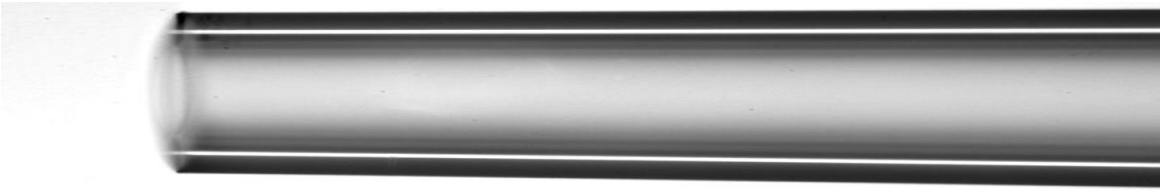
请采用下面的参数设置，并按照第10章中的说明来做划痕，折断玻璃以得到正确的尖端口径。

１０μm尖端，厚壁玻璃

刘新英 校译

25μm尖端，厚壁玻璃

50μm的尖端，厚壁玻璃



*对于较长的1-2cm颈部75-150μm ID的尖端，请与Sutter技术支持联系获取特别说明。

Xenoworks 注射仪（BRI & BRE）用于吸入

Xenoworks模拟注射仪（BRI），用于吸入

建议装置

注射器尺寸：10ml，50ml或100ml-根据细胞和收集颗粒的数目和大小决定

油或水：使用轻质矿物油或水填充管路与注射器（油可以更好的控制）

粗调/细调旋钮：用细调旋钮来控制吸入

电极形态：取决于应用，联系Sutter技术支持咨询

Xenoworks数字注射器（BRE）用于吸入

刘新英 校译

建议建立

范围设定：1或2（如果需要较低的压力范围，注射仪能够进行定制）

传输通道：使用传输转盘在远程用户界面来控制吸入

电极形态：取决于应用，Sutter联系技术支持咨询

注意：请联系 Sutter 技术支持获取最适合于您的应用的程序（电极形态，注射仪类型＆注射仪的设置）。

第 12 章 铝硅酸盐玻璃及其定制程序

由于良好的耐久性和硬度，人们对使用铝硅酸盐玻璃制造微电极的兴趣逐渐增加。与硼硅酸盐玻璃相比，铝提供了更好的硬度，化学耐久性，并且降低了导电性。

硼硅酸盐毛细玻璃管的内外径的比率在其整个颈部保持不变，铝硅酸盐玻璃则在靠近尖端时有显着变薄的倾向。此特性允许拉制具有长的颈部和小口径电极时形成极细的尖端。

P-97和P-1000可以拉制硼硅酸盐和硅铝酸盐玻璃，但硅铝酸盐具有更高的熔融温度，因此使用该玻璃时，您会看到更高的Ramp值。在P-97和P-1000中使用的最常见的加热片是3mm的槽形加热片（FT330B）和2.5mm x 2.5mm（FB255B），3mm x 3mm（FB330B）和2.5mm x 4.5mm（FB245B）盒形加热片。如果您的拉制仪安装了这四种加热片的其中一个，您在使用这种玻璃时不改变加热片。如果您的加热片小于2.5mm宽，您使用铝硅酸盐玻璃时尝试运行坡度测试，可能会烧坏加热片，因为熔化这种玻璃所需要的热量超过加热片所能产生的热量水平。

66页提供的自定义程序设计为使用硅铝酸盐玻璃制造电极专用。要找到开始的推荐的程序和参数设置，请按步骤1-4找到程序。

1）验证安装在您的拉制仪加热片的类型：

3mm槽形（FT330B）

2.5mm x 2.5mm盒形（FB255B）3mm x 3mm盒形（FB330B）

2.5mm x 4.5mm盒（FB245B）

如果安装在您的拉制仪上的不是上面列出的加热片，请与Sutter的技术服务以获得更多帮助。

刘新英 校译

2）验证的铝硅酸盐玻璃的OD和ID：

铝硅酸盐玻璃：1.0mm外径×0.64mmID	AF100-64-10和A100-64-10
铝硅酸盐玻璃：1.2mm外径×0.77mmID	AF120-77-10和A120-77-10
铝硅酸盐玻璃：1.2mm外径×0.87mmID	AF120-87-10和A120-87-10
铝硅酸盐玻璃：1.5mm外径×1.00mmID	AF150-100-10和A150-100-10

3）选择您的电极的“类型”：

A型=膜片钳型电极，2-4mm的颈部，1-3μm尖端，1-10MΩ

B型=短显微注射针，5-7mm颈部，0.9-0.5μm端，10-50MΩ

C型=原核注射或细胞内记录，6-8mm颈部，0.5-0.1μm尖端，60-150MΩ

D型=长锥形，细胞内记录，0.3-0.06μm尖端，100-200MΩ

E型=非常长的颈部，固定，ICSI，NT，干细胞，非洲爪蟾和吸入，来进行划痕＆折断。请参阅5-10章了解更多详细信息。

4）*找到提供适用于您的加热片程序的那一页...*

选择适合您的铝硅玻璃的外径和内径...

然后选择最符合您的应用程序“类型”A，B，C，D或E程序。

铝硅酸盐玻璃W/3mm槽形加热片（FT330B）

铝硅酸盐玻璃：AF100-64-10和A100-64-10，AF120-77-10和A120-77-10AF120-87-10和A120-87-10，AF150-100-10和A150-100-10

Type	Heat	Pull	Vel	Time	Pressure	Loops
A	Ramp	0	30	150	400	3
B	Ramp	70	70	200	400	1
C	Ramp + 5	80	80	175	400	1
D	Ramp + 10	90	90	175	400	1
E	Ramp + 10	0	120	100	200	1

铝硅酸盐玻璃w/2.5mmx2.5mm盒形加热片（FB255B）

或W/3.0mmx3.0mm盒加热片（FB330B）

铝硅酸盐玻璃：AF100-64-10和A100-64-10，AF120-77-10和A120-77-10AF120-87-10和A120-87-10，AF150-100-10和A150-100-10

Type	Heat	Pull	Vel	Time/Delay	Pressure	Loops
A	Ramp - 10	0	25-35	250	500	3-4
B	Ramp - 5	60	70	200	400	1
C	Ramp - 10	90	80	40 (delay)	200	1
D	Ramp	120	70	60 (delay)	400	1
E	Ramp + 20	0	150	100	100	1

刘新英 校译

铝硅酸盐玻璃w/2.5mmx4.5mm盒形加热片（FB245B）

铝硅酸盐玻璃：AF100-64-10和A100-64-10，AF120-77-10和A120-77-10AF120-87-10和A120-87-10，AF150-100-10和A150-100-10

Type	Heat	Pull	Vel	Time/Delay	Pressure	Loops
A	Ramp - 20	0	20	200	400	3
B	Ramp - 20	40	80	200 (delay)	500	1
C	Ramp - 15	80	80	200 (delay)	400	1
D	Ramp - 20	80	80	80 (delay)	400	1
E	Ramp	0	150	200	400	1

使用铝硅酸盐玻璃的特殊优势和注意事项

1 更高的耐久性和硬度-由于良好的耐久性和硬度，人们对使用铝硅酸盐玻璃制造微电极的兴趣逐渐增加。与硼硅酸盐玻璃相比，铝硅酸盐玻璃提供了更好的硬度，化学耐久性，并且降低导电性。。

2 极其精细的技巧-硼硅酸盐毛细玻璃管的内外径的比率在其整个颈部保持不变，铝硅酸盐玻璃则在靠近尖端时有显着变薄的倾向。此特性允许拉制具有长的颈部和小口径电极时形成极细的尖端。

3 更短的锥度-铝硅酸盐玻璃冷却速度超过硼硅酸玻璃，因此通常可以产生颈部更短的电极。当拉制显微注射和细胞内记录电极（上表中的B和C型）中，人们通常发现颈部长度约是使用硼硅酸盐玻璃时的1/2至2/3。当拉制膜片钳电极（上面的表中A型）最好是选择一个<速度>设置，允许三个循环。如果<速度>设置太低，则程序将循环4或5次。通常，在这种情况下，您可以得到更大的3-6μ尖端，但尖端并不总是能有一个干净平滑的断面。

4 较高的熔融温度-相比于硼硅酸盐玻璃，铝硅酸盐玻璃需要较高的热设置。请不要使用小于2.5mm宽的加热片，设置加热值之前必须要运行Ramp测试。如果您看到加热片变得非常明亮的橙色，到白色，它可能是接近烧断，您将需要换成以更大尺寸的加热片。

5 循环-拉制铝硅酸盐玻璃时，壁会变得非常薄，由于这种特性，比使用硼硅酸盐玻璃时，即循环超过3次单行程序更可能产生较大的尖端口径。循环4-6次的程序可能产生更大的3-6μ口径，但是您会体验到差异的增加并且尖端不会总产生平滑的断面。

刘新英 校译

6 敏感性参数设置-由于铝硅酸盐玻璃具有更短的范围内工作温度，您会发现，这种玻璃对于参数设置小的调整更为敏感。加热值的小变化将使电极形态发生大的变化。因此我们建议您调整<拉力>和<速度>设置，使电极形态逐渐变化并不要改变加热设置。

7 精尖与长管-如果引入太多的热量和/或过少的冷却，玻璃将具有拉伸的趋势，并形成一个钝尖而不是一个精细尖端。为了避免牵拉管部，确保加热设定是在<斜坡>和<斜坡-30>之间且冷却不能小于40延迟或175时间。

8 直与曲颈部-当拉制C型，D型和E型具有更长颈部的电极，有时可能会碰上颈部具有弯曲或在尖端后在最终颈部轻微弯曲的问题。特别是使用有芯玻璃时。该弯曲可能是通过一个加热片内热平衡的灵敏度。为了将颈部的弄直，可使用偏心调整（见88页）来调整加热片内的玻璃的位置。通常降低加热片内玻璃会消除或减少弯曲发生的几率。

铝硅酸盐玻璃的技术数据

铝硅酸盐玻璃（Schott 8252）

铝硅酸盐玻璃的组成与硼硅酸盐玻璃类似，但它是更加坚硬，并具有更好的化学耐久性。相比硼硅酸盐，硅铝酸盐更难以制造且材料和制造成本比硼硅酸盐大约3倍以上。铝硅酸盐玻璃中氧化铝组合物的百分比更高（14％的A12Ø3）比硼硅酸盐（2.3％的A12Ø3）并且还具有相对小量的氧化钙，氧化镁和氧化硼。详情参见下面的表格。

GLASS TYPE	SiO_2%	B_2O_3%	Na_2O %	$A1_2O$%	BaO%	CaO%	MgO%
Borosilicate Pyrex Corning 7740 Schott COE 33	80.6	13.0	4.0	2.3			
Aluminosilicate Schott 8252	60.0	4.5	<0.02	14.0	9	10	2.5

GLASS TYPE	Annealing Point	Softening Point
Borosilicate Pyrex Corning 7740 Schott COE 33	560	821
Aluminosilicate Schott 8252	725	935

英 校译

7740硼硅酸盐玻璃技术数据表

http://www.corning.com/Lifesciences/technical_information/techDocs/descglasslabware.asp?region=na&language=EN＃7740LowExpansion

8252铝硅酸盐玻璃技术数据表

http://www.schott.com/tubing/english/download/8252_data_sheet.pdf?PHPSESSID=91

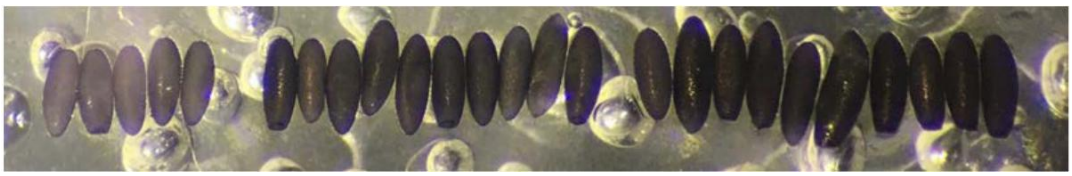
石英玻璃（贺利氏HSQ300）-P-97和P-1000拉制仪不能熔化石英！

制造微管和微电极最纯净最坚硬的玻璃是石英玻璃。石英具有approx.1600℃的熔化温度，这个级别的热量已经超出P-97和P-1000可提供的热量。SutterP-2000拉制仪可以提供足够的热量。

http://www.sutter.com/products/product_sheets/p2000.html

Quartz Heraeus HSQ 300	Fe	Cu	Na	Al	K	Ca	Mg
parts per million (ppm)	**0.1**	**<0.05**	**0.3**	**15**	**0.4**	**0.05**	**0.05**

第 13 章 ZIKA 研究和蚊卵注射



用于蚊卵注射所需的电极通常使用有芯薄壁铝硅酸盐玻璃拉制，Sutter零件编号AF100-64-10。铝硅酸盐玻璃1比硼硅玻璃坚硬结实10倍，在电极需要通过绒毛膜或坚韧的纤维膜插入的情况下推荐。蚊卵注射需要在相当短的颈部长度-大约6-8MM和1μ以下的尖端，尖端和颈部需要足够精细以避免对绒毛膜造成伤害，颈部不应该过长否制会脆弱不耐用。为了保持电极良好的耐久性，最好是通过使用2.5mm x 2.5mm盒式加热片保留稍短一边的颈部。任何时候做尖端口径小于1 μm的电极，有芯玻璃都更加容易装载内液。最好的材料是AF100-64-10有芯玻璃和2.5mm x 2.5mm盒形加热片（FB255B）。

刘新英 校译

2.5mm x 2.5mm盒形加热片程序（FB255B）

3 铝硅酸盐玻璃-AF100-64-10

HEAT	PULL	VEL	DEL	PRESSURE
Ramp - 10	50	60	60-90	300

参数设置调整

- **大口径，短颈部**= 以 10个单位的增量增加延迟或压力
- **小口径：长颈部**=以 10个单位增量减少延迟或压力
- **减少肩**使尖端更窄，更平=以 10个单位增量增加拉力

电极可以按“原样”，折断或磨制使用。如果您按“原样”使用，最好是用较低的拉力值，这样尖端口径不会太小。如果要折断或磨掉尖端以打开它，最好是额外增加10-20单位的拉力值，这样在折断或磨制时不容易导致尖端过大。如果要磨制尖端，使其更尖锐，更开放，最好是引入5-10单元额外拉力，以便最终尖端保持相同的外径。

用于 Zika Eradication yanjiu **IAEA&Sutter仪器的显微注射套件**

Sutter仪器与奥地利国际原子能机构（IAEA）合作，帮助开发和优化兹卡根除研究显微注射套件。以下方案被开发并优化用于DNA显微注射和细胞质转移。

P-2000激光拉制仪

使用P-2000激光的拉制仪和石英玻璃，可以为此应用拉制最耐用的电极。蚊子卵的壳是非常难以穿透，我们已经发现，石英电极相较于硼硅或铝硅酸盐玻璃电极最持久耐用。如果没有P-2000，我们建议使用P-1000拉制仪和AF100-64-10铝硅酸盐玻璃。

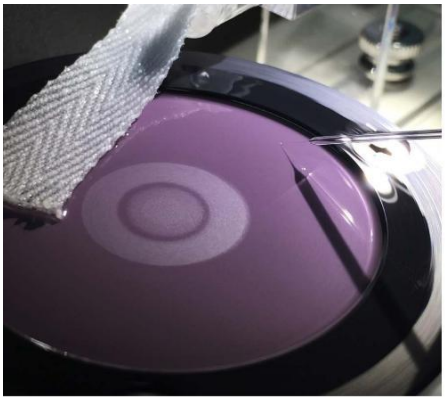
刘新英 校译

使用Sutter仪器P-2000CO2激光拉制仪和QF100-70-10石英玻璃，使用以下设置为具有9-11mm颈部长度的尖锐电极：

HEAT	FIL	VEL	DEL	PULL
800	5	50	145	200

BV-10磨针仪

然后使用两个不同砂轮，104D（精）和104E（非常细）砂轮磨制电极，以确定哪个产生更好的电极。经测定，该104E砂轮（非常细）可以更好的控制尖端口径且产生更平滑的斜面。15-30秒磨制时间足以产生1-3μm尖端开口。



BREXenoworks数字注射仪

对模拟油压注射仪和Sutter气压BRE数字注射仪进行了测试，以确定哪种注射仪的类型用于显微注射和DNA显微注射和细胞质转移时更高效。

刘新英 校译

收集细胞质中，发现使用气压SutterXenoworks BRE数字注射仪相比模拟注射器稍微好用一些，并且发现使用模拟注射仪时，抽吸细胞质较高的负压会脱油且在管道中产生气泡。一旦有气体在模拟注射仪的充油管道中，这将大大降低负压和正压的控制力。当使用数字Sutter注射仪，因为整个系统是气压的，无需油，不会遇到这些问题。当使用模拟系统试图转移和等体积分配所收集的细胞质到蚊卵中，如果细胞质的体积分配不平等，输送过程的控制体验非常不好。另外，使用气压Sutter Xenoworks BRE数码注射仪时，发现递送等体积到受体卵子中时吸取胞质时具有良好的控制，远远优于模拟的油压注射仪。对于连续和脉冲模式用于注入细胞质进行了测试，这两种模式下工作相当良好的传输。为了将DNA注射，我们发现应首选具有稍高补偿压力的脉冲模式。

BREXenoworks数字注射仪

PrimeTechPMM4G™ 压电驱动 W/FC-770

因为IAEA中使用较小和较少造成损伤的玻璃电极，并且因为蚊子卵的细胞质中具有非常高的粘度，这些因素倾向于造成电极尖端容易堵塞。因此， PMM4G压电驱动器被应用以使玻璃电极产生可被精细控制的微振动，可在抽吸及转移时帮助促进高粘度细胞内液进出电极。石英玻璃使用Sigmacote®进行预处理，并使用Sutter P-2000拉制，使用104F板在BV-10磨制仪磨出斜面，然后预填充Fluorinert FC-770，这是传统上在小鼠ICSI过程中用于“carry”电极尖端的微振动。也有人意识到，当暴露在气体中的细胞质会迅速凝固，所以转移细胞质时保持电极在油面以下非常重要。

经测定，为了保证更高的存活率，而使用更小和更少损伤的3-7μm内径的电极时，如果没有压电钻头从供方卵细胞中抽取细胞质非常困难，有时甚至不可能。当使用与PMM4G压电驱动结合这些较小的斜面电极产生电极微振动（强度：5，速度：6）时，抽吸和转移细胞质成为可能，并且我们还发现，我们还发现，与压电驱动器配合使用时，我们可以更好地控制喷油器的负压和正压。PMM4G压电驱动器与经过Sigmacote®预处理的玻璃相结合是两个关键因素，这使我们能够使用较小的3-7μm斜面电极精确控制抽吸和转移。

PrimeTechPMM4G压电钻

如果仅进行 DNA 注射并且不进行细胞质转移，则无需使用压电钻。但是，如果压电钻是装置中的一部分，则可以使用它来清洁电极，并允许长时间使用电极而不会阻塞。

–
Sigmacote®

由于胚胎细胞质的高粘度和粘性，电极尖端经常会堵塞，并且在必须更换电极尖端之前只能进行 5-10 次注射。当磨制电极斜面以形成 1-3μm 内径的尖端时，堵塞现象得到了大大减少。此外，在毛细管玻璃上涂上一种称为 Sigmacote®的硅化试剂，以使玻璃电极的粘性降低。

- 包被的毛细管玻璃-GOOD

将大约 10ml 的 Sigmacote®引入玻璃毛细管中，将玻璃首尾相连倾斜 4 倍，以使溶液从一端流到另一端以覆盖玻璃管腔，然后将溶液吹出。然后将毛细管玻璃在烘箱中在 200℃下干燥过夜。然后使毛细管玻璃冷却并将其放置在容器中以用于制备注射电极。观察到使用硅化预涂层的玻璃制成电极，注射电极可用于 50 多次注射而不会被堵塞。

- 包被电极和烤干-BAD

将电极拉制后，用 Sigmacote®处理，并尝试磨制斜面，但将电极烘烤干燥后，电极杆身中剩余的纳升或皮升溶液会移至尖端并烤成固体凝胶，堵塞电极的锥度和尖端。

- 包被电极和气体干燥-GOOD

拉制完电极并磨出斜面，在注射之前使用 Sigmacote®包被玻璃电极内部，可以成功地使玻璃电极的黏性降低。
将约 0.5 微升 Sigmacot®回装到电极中，然后通过毛细管作用填充尖端。将尖端插入 ETOH 的烧杯中，并在 BRE Digital Injector 上使用高压，将剩余的 Sigmacote®清洗干净，然后将玻璃尖端干燥。

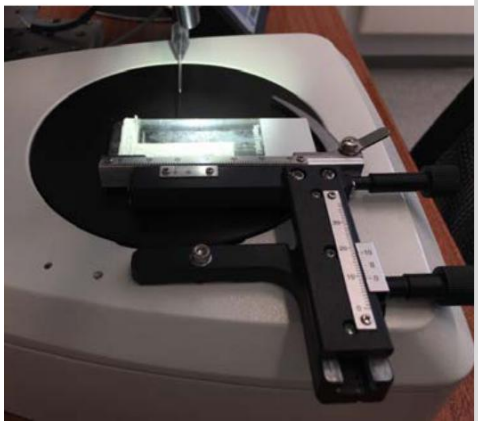
刘新英 校译

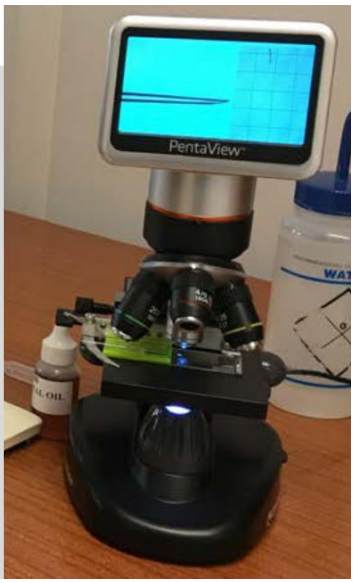
其他工具

•带标尺的显微镜的机械载物台

•用于操纵卵子的“美甲”刷子

•带监视器的玻璃电极检查显微镜





第14章

实验室误传-误解，无证据的误传和迷信行为

实验室误传 1：切勿触摸加热片。

答案：错！

实验室误传 2：切勿使用您的手指触摸玻璃的中心，。

回答：FALSE，如果使用P-97和P-1000和其他基于加热片的拉制仪。

答案B：TRUE，如果使用P-2000的基于激光的拉制或无RNA酶的情况。

实验室误传＃3：您总是需要洗玻璃。

答案：错

实验室误传＃4：最好用手加热抛光玻璃的后端，一次一个，一件一件，用火.....在实验室，浪费您宝贵的研究时间！

回答：FALSE.....如果您正在使用Sutter玻璃，所有电极都已经预抛光

答案B：TRUE（可能），如果您使用非Sutter玻璃电极。

刘新英 校译

实验室误传＃5：如果是干燥机变粉红色没关系，粉色很漂亮。

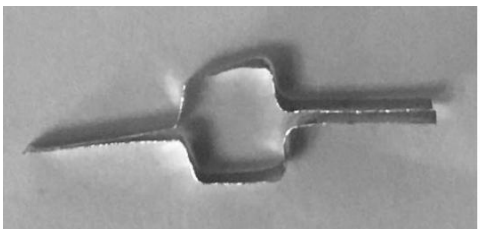
答案：错

实验室误传 1：切勿触摸加热片。

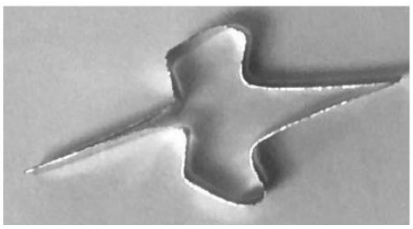
答案：错！

您可以在安装，重新定型或重新对准加热片时触摸加热片……但很明显，烫时不可以！另一方面，一旦安装了加热片，最好避免玻璃与加热片接触，因为这样会使加热片弯曲或凹陷。如果使用玻璃挤压来改变加热片的形状，则加热片的加热特性也会改变。

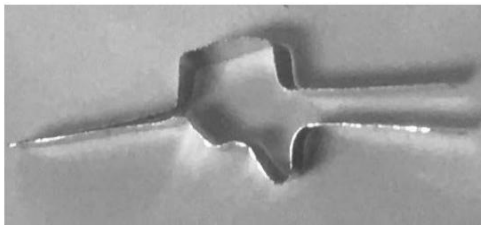
加热片有时会与玻璃的碰撞而凹陷或弯曲。而且，有时在拧紧加热片固定螺钉时，加热片的翼部可能会向内推，导致加热片会被挤压（压扁）成一个高大的矩形。在这种情况下，需要向外拉动加热片的翼以使其变形。您可以用手指处理加热片，并使用小的扁平的尖嘴钳来重整其形状或弄平加热片的底部，顶部和侧壁。



GOOD=整齐的方形



压扁=高大的矩形

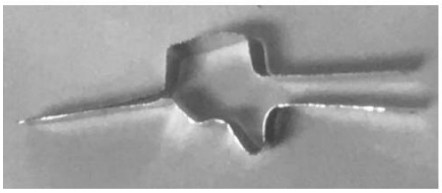
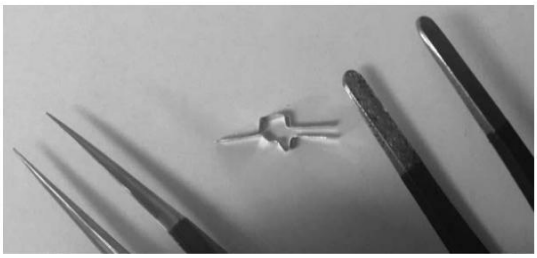
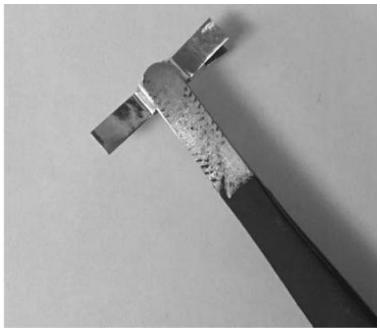


压扁=与玻璃碰撞

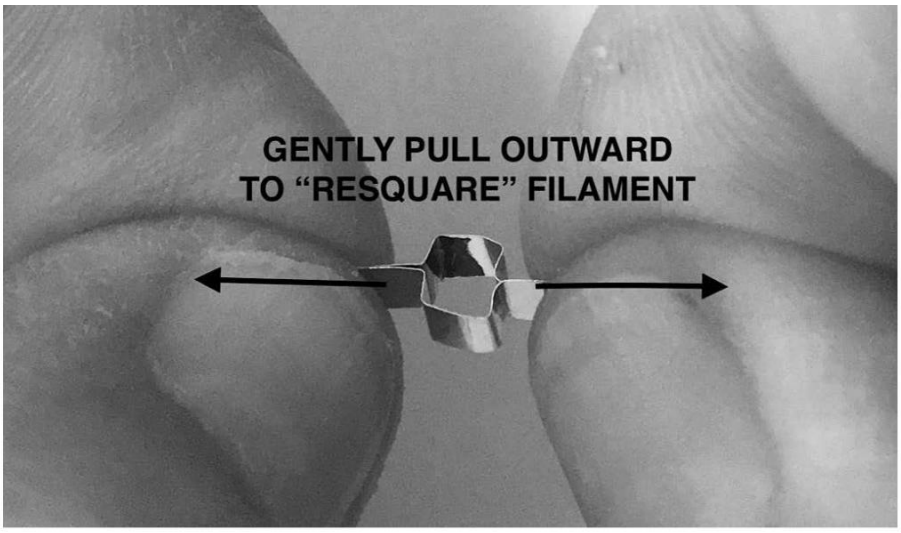
处理加热片时，您只需保持轻柔即可。不必使用镊子或手套，但是您必须非常小心，不要在握住加热片的同时挤压或弯曲加热片

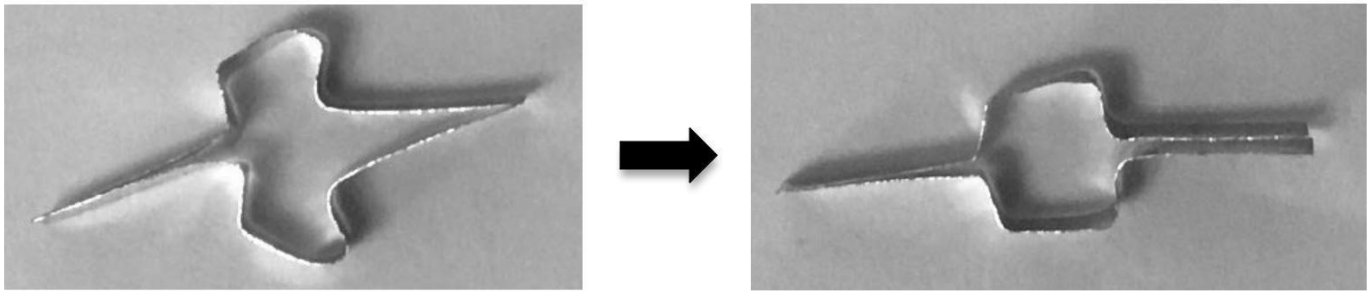
手指上的油脂是否沾到加热片上都没有关系，因为加热片上的任何油脂或碎屑会在第一次加热时（运行 Ramp 测试或拉动电极时）很容易地燃烧掉。实际上，即使在玻璃变软之前，加热片上的油或碎屑也会燃烧

重塑加热片

采用平的扁嘴钳压平顶部或底部壁。





拧紧加热片固定螺钉时，固定夹可以旋转并推动加热片的翼

向内变形并使加热片变形。如果加热片已经压扁，现在变成一个高大的矩形，请移除加热片并轻轻向外拉动两翼以“重新整平”加热片

实验室误传 2：切勿用您的手指触摸玻璃的中心。

回答：FALSE，如果使用P-97和P-1000和其他基于加热片的拉制仪。

答案B：TRUE，如果使用P-2000的基于激光的拉制或无RNA酶的情况。

P-97 和 P-1000 拉制仪使用铂：铱加热片熔化玻璃。将玻璃安装在拉杆上时，许多研究人员担心，手指上的油脂会转移到玻璃上，从而以某种方式损坏加热片或拉杆，或将污染物引入实验中。在玻璃变软之前，玻璃上的油会燃烧掉，这实际上使玻璃沿锥形和尖端灭菌。

P-2000 拉制仪使用 CO2 激光和反射镜向玻璃的正面和背面提供热量。如果在使用 P-2000 拉制仪时用手指操作玻璃中心，则这些油在玻璃加热时会释放出来并转移到反射镜上。当反射镜有这些油覆盖时，它将热量反射到玻璃的另一侧的效果变差。反射镜受损的反射表面会引起变化，如果不清理，会燃烧到反射镜中心并永久损坏反射镜。

由于 P-97 和 P-1000 拉制仪使用加热片作为热源，并且没有将镜子传递给玻璃的热量，因此从毛细管玻璃上烧掉的油不会损坏加热片，玻璃或拉制仪。

在无 RNase 的条件下操作时，需要对玻璃单独进行的清洗和消毒，并且应该用手套或无菌镊子处理玻璃。无论研究人员使用哪种类型的拉制仪，都是如此。

RNase 是在所有细胞类型和生物体中发现的酶，具有很高的比活性，这意味着 RNA 样品中的少量污染足以破坏 RNA。典型实验室中 RNase 污染的主要来源包括人与手和皮肤的接触，水溶液和试剂的接触以及环境暴露于空气，灰尘和大多数表面。

刘新英 校译

酸洗玻璃，然后用 D2O 和 ETOH 冲洗，然后烘烤干燥。尽管这确实使玻璃比其他供应商提供的清洁，但玻璃并未被视为无菌的。将毛细管玻璃在 180°C 或更高温度下烘烤数小时，或将其浸入新鲜制备的 0.1％（v / v）DEPC 水溶液或乙醇中 1 小时，然后沥干并进行高压灭菌，即可对毛细管玻璃进行净化。高压灭菌会破坏任何未反应的 DEPC，否则它们会与其他蛋白质和 RNA 反应。

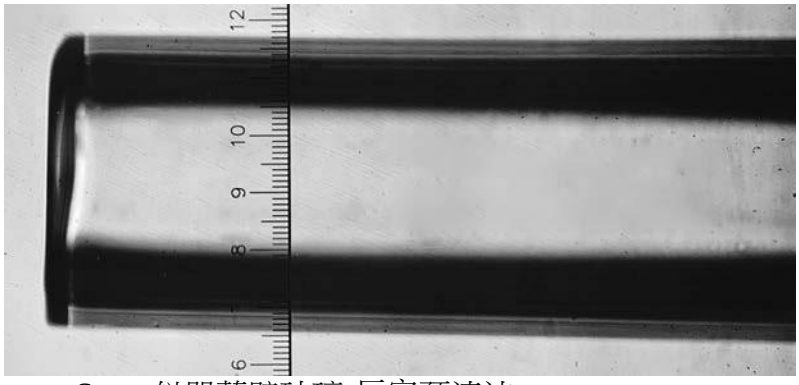
实验室误传＃3：玻璃管经常需要清洗。

答案：错

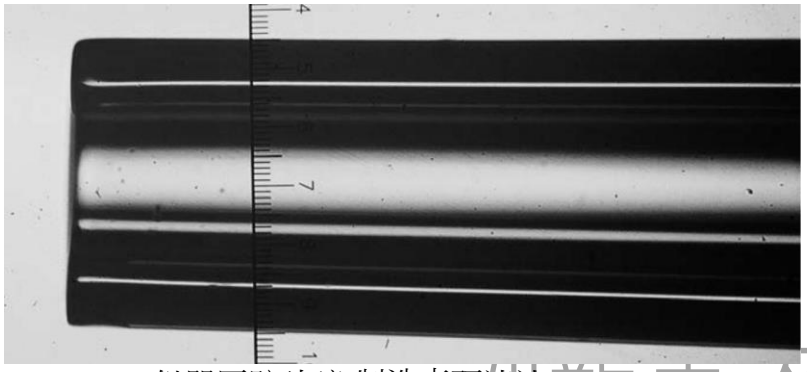
Sutter 毛细管玻璃已预先清洗，除非需要无 RNase 的条件，否则无需在实验室中清洗。有关 RNase 和毛细管玻璃去污的更多详细信息，请参阅“实验室误传＃2”的最后部分

酸洗玻璃，在 D2O 中超声清洗，然后在 ETOH 中清洗，沥干水分并烘烤干燥。这使玻璃清洁，并且没有大多数颗粒和灰尘。虽然这不会使玻璃无菌，但通常可以使玻璃比其他公司提供的更干净。

干净的玻璃



Sutter仪器薄壁玻璃-厂家预清洁



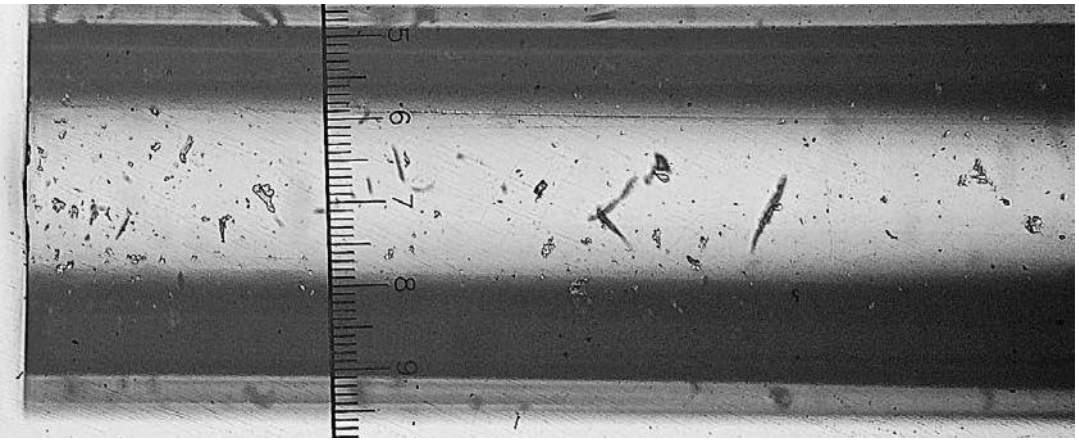
Sutter仪器厚壁玻璃-制造商预清洁

刘新央 校译

脏玻璃

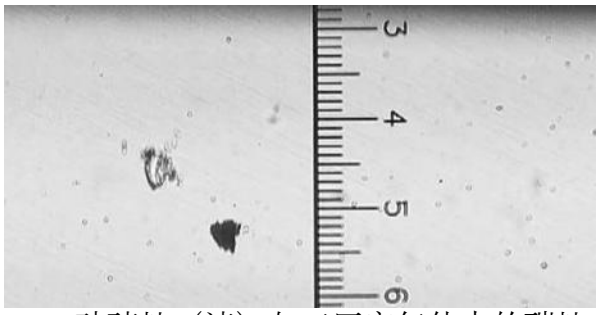
如果您的玻璃管是旧的，已经打开了很长时间或暴露在空气中，则最好在光学显微镜下以 50 倍的放大倍率检查玻璃，以查看玻璃是否被颗粒，灰尘或油脂污染。通常，在加热和拉动毛细管玻璃时，这些油和颗粒会从毛细管玻璃的外部燃烧掉，但是当这些颗粒或油进入玻璃管腔时，尤其是在玻璃管的后端或不属于玻璃管的区域加热，可能导致电极堵塞。

玻璃管中的碎片-玻璃和塑料屑

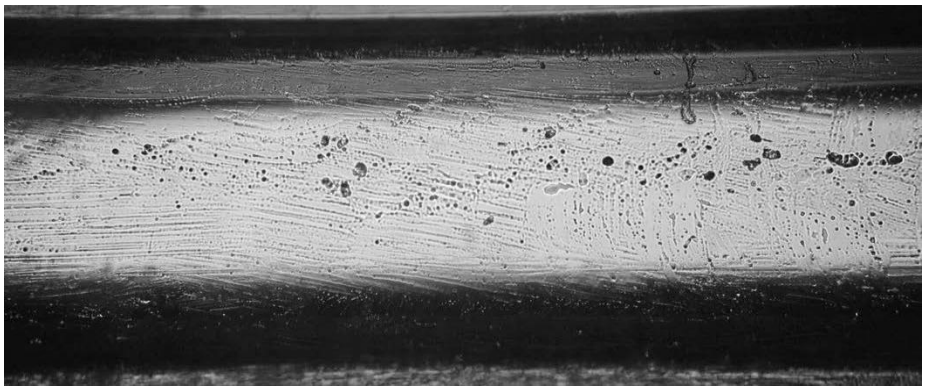


未抛光的玻璃的锋利边缘可和塑料容器相互摩擦，在该玻璃管中产生大量的碎片。

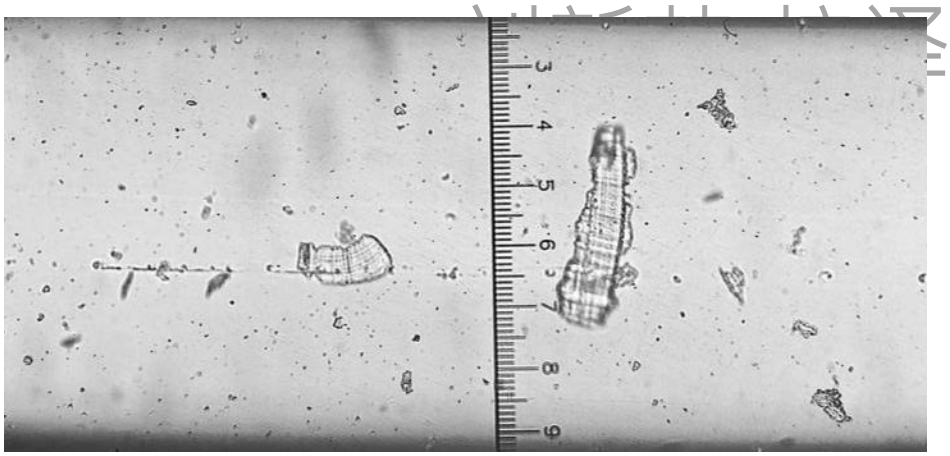
DIRTY玻璃-续



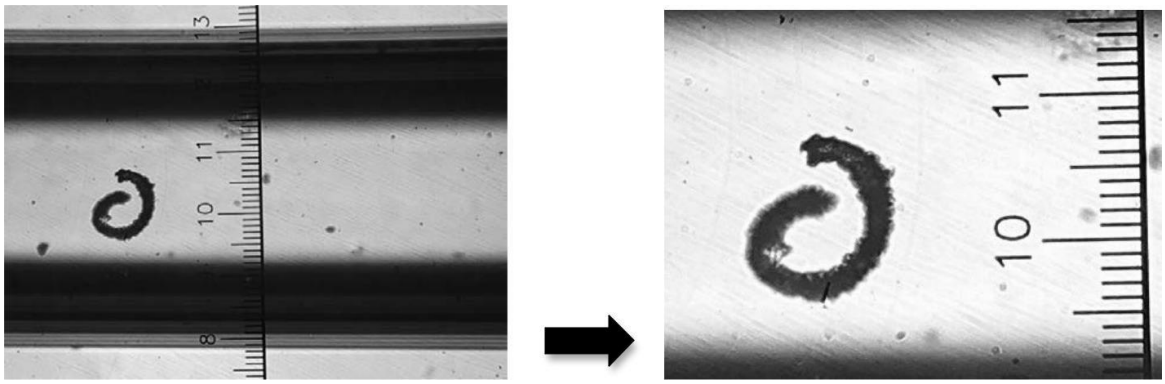
玻璃粒（清）与工厂空气体中的碳粒（黑色）。



手指油脂及皮肤皮屑



碎裂的玻璃和皮肤皮屑



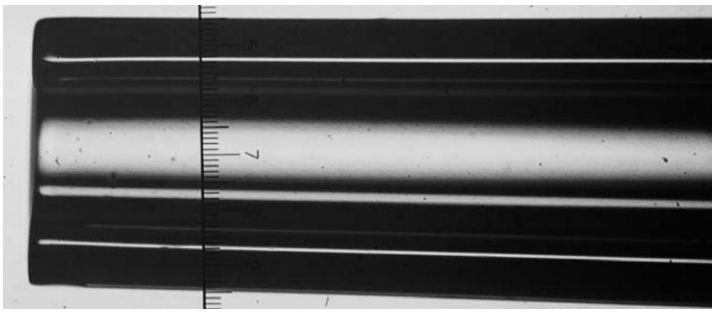
我的天啊！谁知道！显然不干净！

实验室误传＃4：最好用手加热抛光玻璃的后端，一次一个，一件一件，用火.....在实验室，浪费您宝贵的研究时间！

答案：错，用Sutter玻璃时。

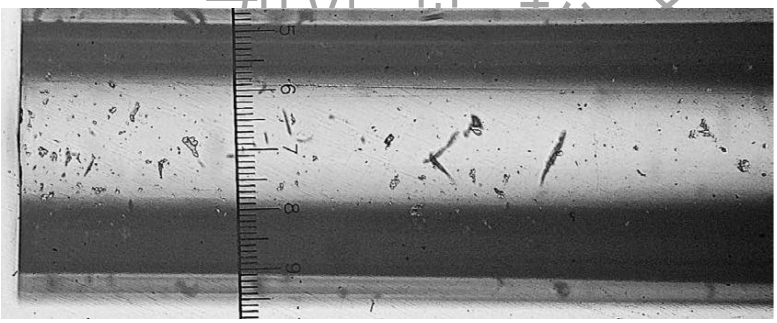
答案：对使用非Sutter玻璃时（最有可能）。

Sutter 玻璃不仅预洗，毛细玻璃的后端也预抛光使玻璃并不需要在实验室进行抛光。这是一项免费服务，我们不对尾部抛光的玻璃收取额外的费用。一些 Sutter 玻璃也提供重度抛光。重度抛光的玻璃管货号以“HP”结束，例如，BF150-86 10HP。所有其他玻璃对玻璃尾部提供中等程度的抛光。

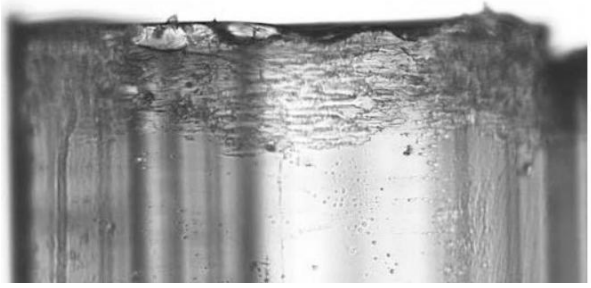


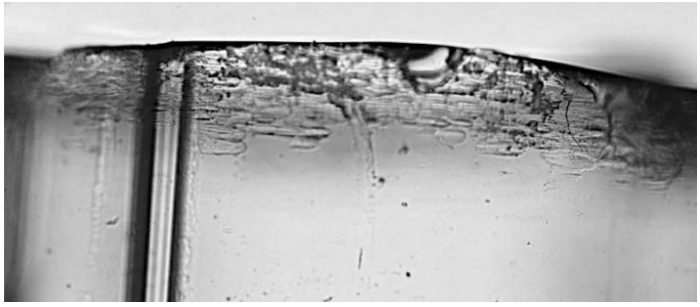
带光滑的抛光过的尾部的 Sutter玻璃管

从其他供应商的毛细管玻璃（如下所示）可能不具有抛光的尾部。在这种情况下在玻璃的尾部将具有尖锐或粗糙的边缘，随着时间的推移，该边缘会损伤 O 形圈，垫片和探头的氯化银丝。



从其他供应商的玻璃-没有抛光刃口锋利





其他供应商的玻璃-尾部没有抛光，切割不好

对玻璃进行刻痕和切割，使其尾端锋利或磨损或粗糙。如果未将玻璃尾端切干净，然后用火抛光进行“处理”，则粗糙的锋利边缘会产生小的玻璃碎片，这些碎片会粘附在玻璃内壁上，并在填充时会堵塞玻璃电极尖端与溶液。玻璃的后端也将损坏探头和电极夹持器内部的 O 形圈和垫圈。

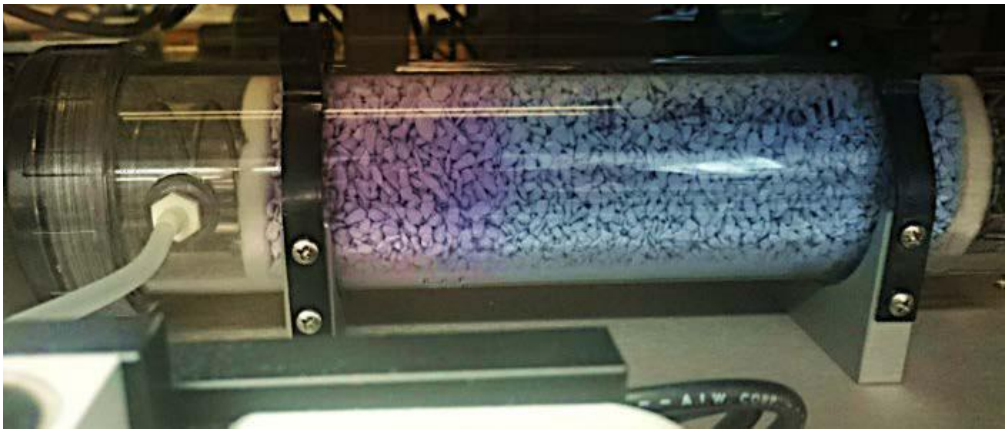
实验室误传＃5：如果干燥剂变成粉红色没关系，粉红色漂亮。

答案：错的厉害..:-)

罐中的干燥剂具有指示剂（氯化钙），干燥时呈蓝色，当干燥剂变湿时变为粉红色。用于冷却玻璃和加热片的空气通过干燥剂滤罐过滤，以除去冷却空气中的水分。冷却空气应该干燥，因为湿度会导致冷却速率变化，从而影响玻璃的拉动方式。此外，在冷却玻璃存在的情况下，湿度也被认为会在玻璃尖端形成羟基离子*，并且有人认为这可能会干扰膜片钳实验中对细胞膜的良好密封。

来自干燥剂罐的干燥空气还用于在拉动之前和之后将调湿室（加热片和钳口周围的矩形室）吹扫 5 秒钟，因此在加热玻璃之前要除去湿气。在一年中的潮湿时间，或在潮湿的环境中，建议您使用默认设置 5 秒吹扫气室，或将吹扫时间增加到 10-15 秒以排除湿气。在 P-97 上，您可以转到控制设置并选择功能 4 和 5 来更改拉动前后的吹扫时间。在 P-1000 上，您可以进入程序菜单并更改吹扫时间。

如果干燥剂滤罐的最右边仍然有蓝色颗粒，则说明您仍然有活动的干燥剂，您无需将其更换。罐中的所有干燥剂均为淡紫色或粉红色后，就全部消耗掉了并且潮湿，应该对其进行再生或更换。请找到 SutterInstrument YouTube 视频，以获取有关如何更换干燥剂的说明。https://www.youtube.com/watch?v=BLvYLLJmcnY



干燥剂的1/3 消耗掉....还好。无需更换。

干燥剂完全消耗.....全部湿润。马上更换！

*玻璃形成的熔体属性第 1ST版

由David派伊（编者），Innocent 约瑟夫（编者）米安吉洛蒙特内罗（编者）

刘新英 校译

第15章

差异的问题

玻璃管颈部长度，尖端大小或阻力的变化通常是参数设置不稳定的结果。如果您已经尝试了本书中提供的建议的加热片，玻璃和程序设置，但仍无法获得稳定可靠的结果，请查看以下主题。

- 皮带轮（黑色或银色的轮子）无法自由旋转或平滑滚动：将两个拉杆从加热片上推开，并进入其“卡扣式”位置。在此位置，电缆将不再滑入滑轮的凹槽中，并且滑轮无摩擦。旋转滑轮，看看它们是否旋转并自由旋转。如果有阻力或感觉粗糙，请尽快与 Sutter 联系以获得技术支持。
- 加热片陈旧或损坏：如果您的铂金加热片（盒式或槽式）使用了 2 年以上，或者拉制仪的使用量很高，则该加热片可能会变细，从而给玻璃提供不均匀的加热。如果您的加热片很旧，它将具有哑光的外观，看起来非常暗淡，类似于很旧的铝箔。如果状况良好，则其表面将干净而有光泽。还可能是您的加热片在与玻璃的碰撞中幸存下来，但已经弯曲或变形。解决方案：更换加热片。
- 加热片形状和对齐方式：如果您刚刚更换了加热片并且产生差异，请检查加热片的形状，并确保加热片在空气喷嘴上居中。
- 为了确保您的加热片在喷嘴上完全居中，请拉一个长颈部的电极，并比较左右电极的颈部长度。如果长度不同，则松开加热片固定螺钉，并朝较短电极的方向“轻推”加热片。重复此过程，直到两个电极的长度相同。槽形长丝的形状应使其壁向内与底部成 80 度角。玻璃应穿过盒状加热片的中心或槽形加热片的底部 1/3。请参阅第 13-18 页，并与 Sutter 仪器联系，以获取有关将加热片和玻璃对准的更多说明。
- 新加热片=新 Ramp 测试！如果更换了加热片，则需要运行新的 Ramp 测试。如果从槽形加热片更改为盒形加热片（请参见第 87 页），则新的 Ramp 值可能会增加两倍。运行 Ramp 测试（请参阅第 12 页），并相应地调整发热量。
- 拉杆和轴承上积满污垢和机油：检查拉杆的斜切边缘和轴承（拉杆所在的位置）中的 V 形槽是否有污垢。可以使用沾有 70％乙醇的 Q-tip 或涂药器清洁轴承凹槽。要检查是否有障碍物，请压下弹簧挡块，并确保拉杆从左向右平稳滑动。您还应该能够通过稳定拉杆并使拇指或手指在轴承上滚动来旋转轴承。
- 不要上油！

翻新-您可以发送您的 P-97 拉制仪到 Sutter 仪器进行翻新！主板将会升级，所有磨损部件将被替换，您会得到一个额外 1 年保修。这通常推荐用于 10 至 15 年的拉制仪。Sutter 联系了解详细信息。

刘新英 校译

“15个问题”

当使用 Sutter的P-87，P-97或P-1000 电极拉制仪的工作时，所有的问题，约95%的可能是拉制仪设置的参数的不稳定导致，加热片位置不佳，玻璃的错位，加热片形状不对，和/或气体喷射的位置不对。请提供以下信息，以便我们让您知道，这些基本的问题中是否有目前您遇到问题的成分。

1） 您有哪些型号的拉制仪（P-87，P-97 或 P-1000），序列号是什么？较新的拉制仪的序列号将是“P97-____”或“P1000-___”
旧拉制仪的序列号为 4-5 个数字的序列号。

2) 目前所用玻璃管 Ramp 测试的值？

3) 拉制仪使用槽或盒形加热片？

4) 加热片的宽度或加热片的产品编号？

5） 应用：脑片膜片钳，全细胞膜片钳，分离/培养细胞膜片钳，显微注射（和类型），细胞外记录，或高电阻的细胞内记录?

6) 您的目标颈部长度，尖端大小和/或电阻是什么？

7) 玻璃管的OD和ID（外径和内径）？

8) 玻璃管的产品编号？

9) 参数设置（加热值，拉力值，速度，时间/延迟和压力）？

10) 您是否使用了单行的程序？

11) 如果单行的程序，检查2号线，以确保它是空白，让我们知道有多少次循环。

12) 如果是多行程序，提供程序的所有线路，并指出在哪一行玻璃隔开。

13） 发送安装在拉制仪（顶视图和从左向右水平视图）的加热片的图像。每个视图提供两个图像，一个右侧拉杆带玻璃管，和一个没有玻璃管。我们总共需要 4 张图像。

14）完全将拉杆向后推（拉动后再回到其位置），这会将电缆从黑色或银色的滑轮上提起（到拉杆的最右边和最左边）。现在旋转黑色或银色滑轮，让我们知道它是否自由旋转并且旋转了很多圈。是否有阻力和不均匀的摩擦。

15）拉制仪内部还有一对皮带轮，也可能需要检查这些皮带轮。拧下前面板螺钉，将前面板放下，滑轮安装在基板的中央和正下方。

提供对每个问题的答复将迅速提高我们解决问题和解决您现在遇到的问题的能力。如果确定拉制仪存在无法在现场轻松解决的电子和/或机械问题，我们建议您将拉制仪退回 sutter 工厂进行修理或翻新。

刘新英 校译

第16章

安装盒或槽形加热片-回顾

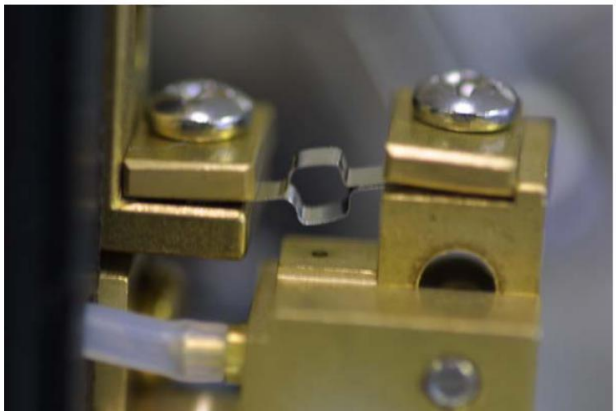
盒形加热片不需要整形，但需要安装，因此它在喷气孔上从右到左居中，并在玻璃周围居中。玻璃应该穿过加热片的中间。

盒形加热片不居中于喷气口&玩儿具有动物

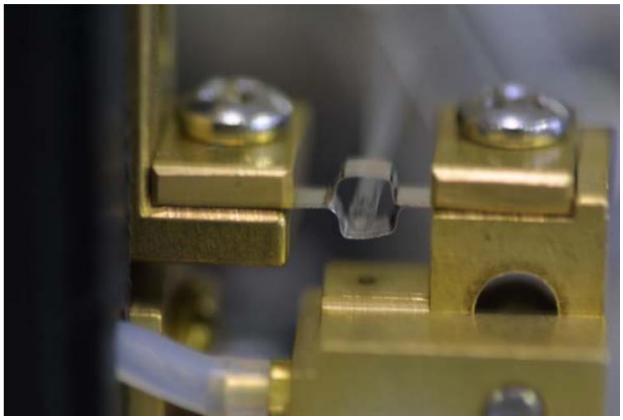
这是不好的！

盒式加热片在喷气孔上方居中并距黄铜夹片的左边缘1.0mm。

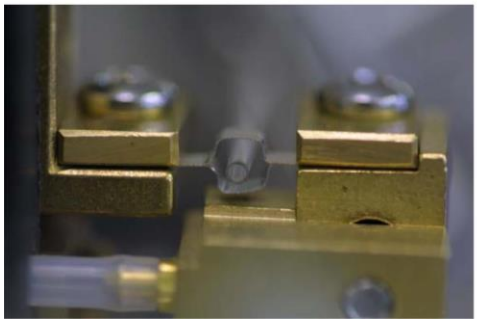
这是好的！



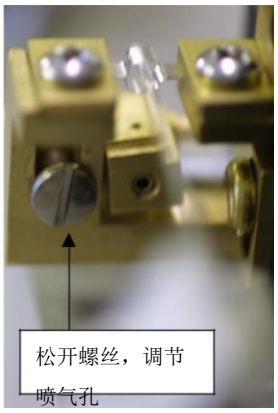
不好...调节铜夹，使他们更平（第10页）



好. 铜夹很平，玻璃居中，喷气孔距加热片下面3mm。



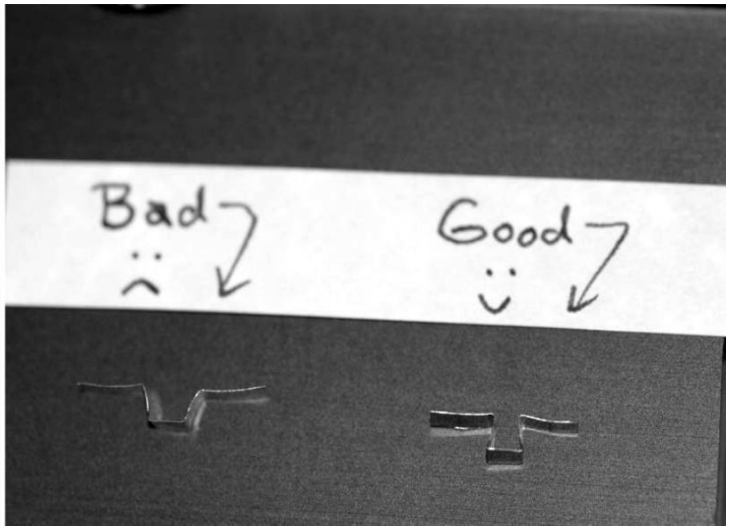
不好...距喷气口太近



不好...距喷气口太远，倾斜

槽形加热片形状及对齐

3mm槽加热片（FT330B）



顶视图　　侧面图

不好的形状　　好形状　　不好的形状　　好形状

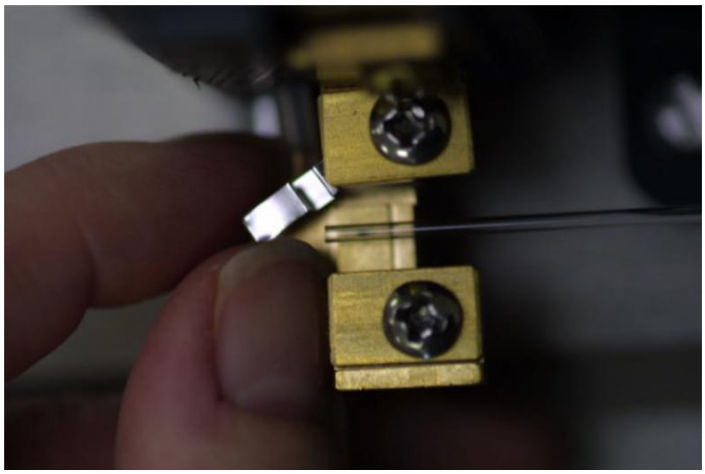
BAD 加热片形状：如上图 3mm 的槽形加热片（FT330B ）“不好的”加热片形状与向外倾斜的侧壁（这是不好的！）将提供低效率的供热，超过 300 单位的 ramo 值，烧毁加热片的机会较大。如果您的 ramp 测试值或加热值高于 300 个单位，最好是去掉加热片，并根据所显示的 “好形状”重塑它。您重塑了加热片后，运行新的 ramp 测试和调整您的加热设置，以不超过 15 单位以上的 ramp 测试值，并保持在 300 个单位加热值以下。

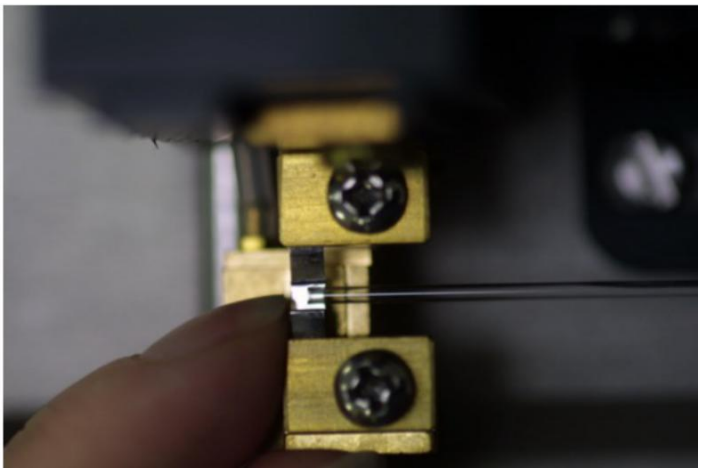
刘新芽 校译

GOOD 加热片形状：如上图中 3mm 槽形加热片（FT330B）的“好”形状将为玻璃提供有效加热，ramp 值在 240-290 单位，和一到两年长加热片寿命。侧壁应该内倾至 80 度且加热片的顶部应该有一个 2mm 的开口。

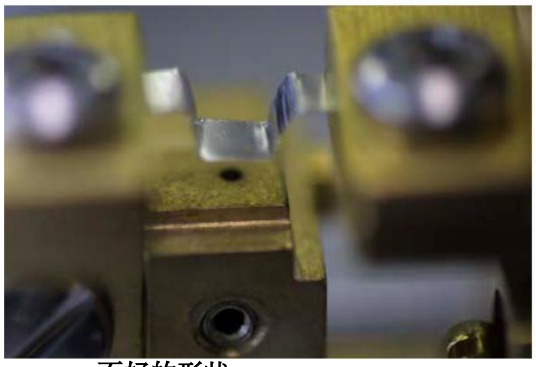
安装您的加热片：

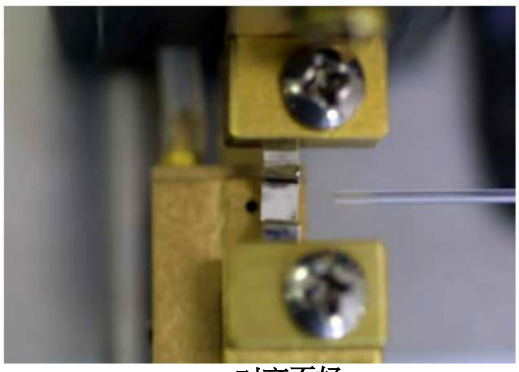
将一块玻璃放在右拉杆上，然后将加热片安装在玻璃上。加热片应放在喷气口上方。通常，当加热片位于距黄铜夹片左边缘 0.5 到 1mm 处时，其中心位于空气喷嘴上方。

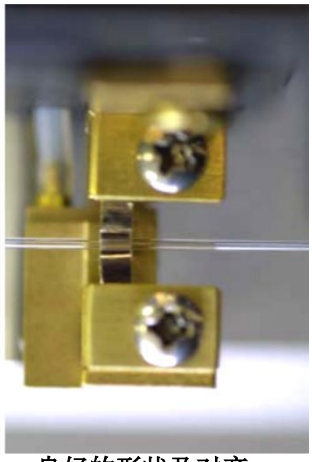


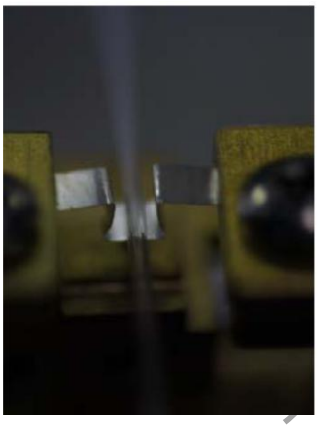


槽形加热片继续……。


不好的形状

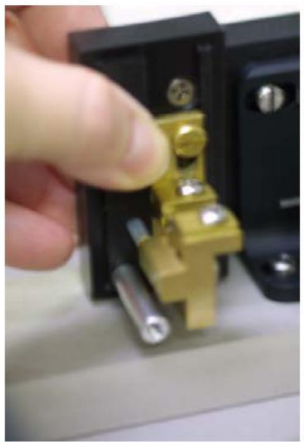

对齐不好

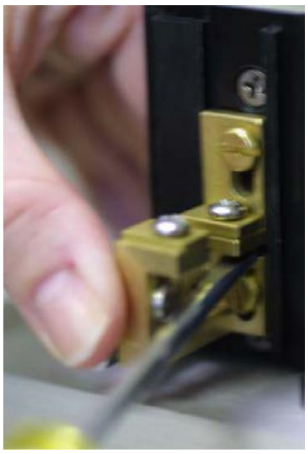

良好的形状及对齐


好

好

从槽形加热片改为盒形加热片：如果从槽形加热片变为盒状加热片，则需要调整黄铜夹的位置槽的位置高于盒，因此您需要松开黄铜螺钉（一次拧一次）并将每个钳口向下滑动约 3mm。





第一步：松开铜螺丝，然后…	第二步：将铜夹下滑 3mm,然后拧紧铜螺丝	第三步：拧松底部铜螺丝然后….	第四步：使用螺丝刀将铜夹下压 3mm,然后拧紧铜螺丝

偏心的调整

盒形或槽形加热片位置（多为1-2mm）大调整

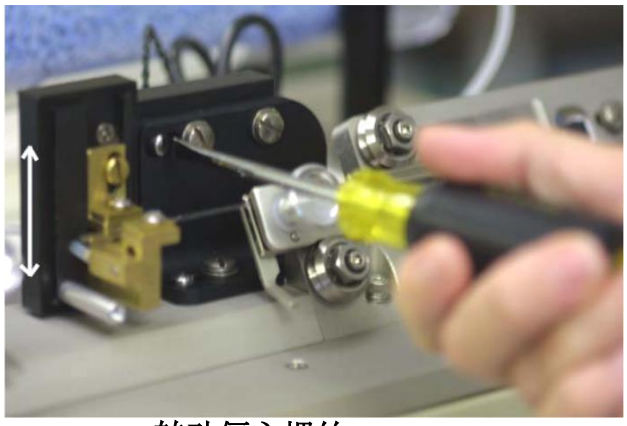
如果您发现玻璃在上下位置没有处于加热片的中心，最好通过调节黄铜夹进行较大的调节（如第 87 页所示）。如果加热片未在前后位置居中（玻璃管更靠近加热片的前壁或后壁），则最好松开固定螺钉并将加热片向前或向后移动。

偏心调整（精细-少于1 到 2mm的位置变化）

要微调玻璃管在加热片中的位置，可以使用偏心调整来固定垂直和水平对齐方式。偏心轮允许您调整加热片相对于玻璃管的位置。对于槽形加热片，玻璃应居中放置，并在加热片内稍低位置。对于盒形加热片，玻璃管应在水平和垂直轴上居中放置。

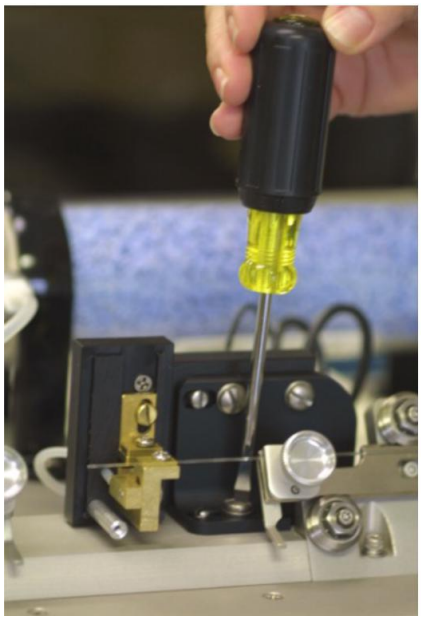
垂直偏心调整（上下移动加热片）

松开锁紧螺丝

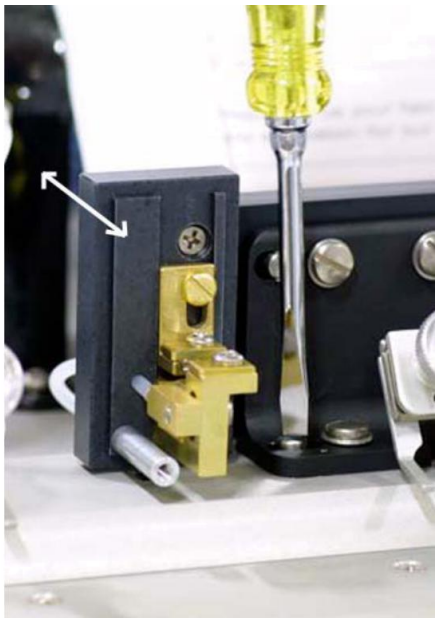


转动偏心螺丝

水平偏心调整（前后移动加热片）



松开锁紧螺丝



转动偏心螺丝

*****永远记得您调整偏心后旋紧固定螺丝！

第17章

有丝的玻璃-什么是“有丝的”玻璃＆谁需要它？

您可以选择使用“有丝”或“无丝”毛细管玻璃。如果的 Sutter 产品编号以 BF，AF 或 QF 开头的硼硅酸盐，铝硅酸盐或石英玻璃，则是带丝的。例如，BF150-86-10 表示以下内容：带细丝的硼硅酸盐玻璃，外径为 1.5 毫米，内径为 0.86 毫米，长度为 10 厘米。

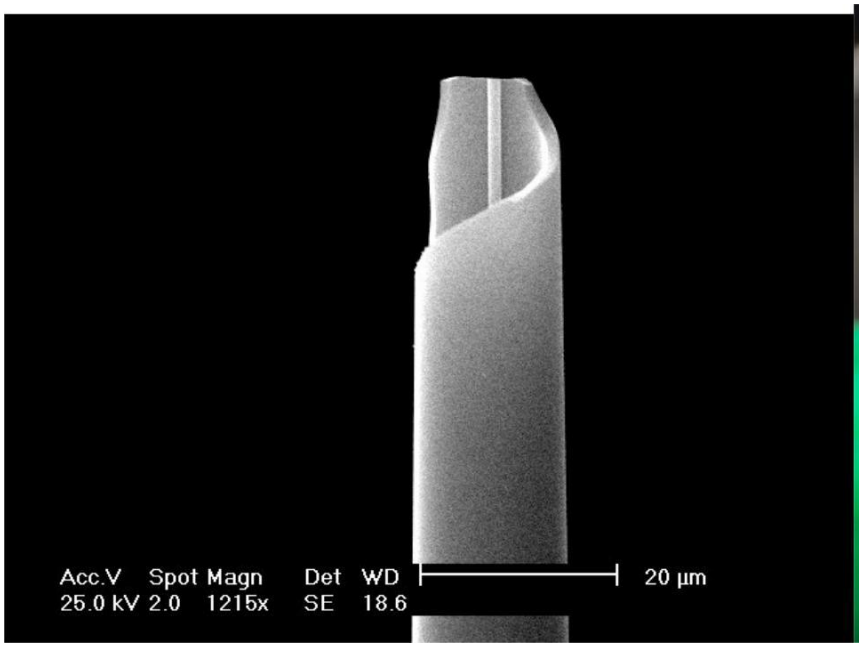
在进行显微注射或电生理学应用时，只要您需要制作尖端在 3μm 或以下的微电极，最好购买有丝玻璃。没有细丝，从电极尾部填充内液将变得很难甚至不可能，这通常会导致填充不良，并在电极的溶液中引入气泡。

“丝”是指∽160 微米的玻璃棒，该玻璃棒已退火到管道的内壁。内腔中的细丝起虹吸作用，，使溶液很容易填充到到电极颈部和尖端中。尖端尺寸小于 1 微米的微电极绝对需要玻璃丝，但是大多数研究人员甚至选择将丝状玻璃用于 1-3μm 尖端的膜片钳电极。细丝将不会干扰建立高阻封接，并且在填充内液时减少电极内气泡的产生。

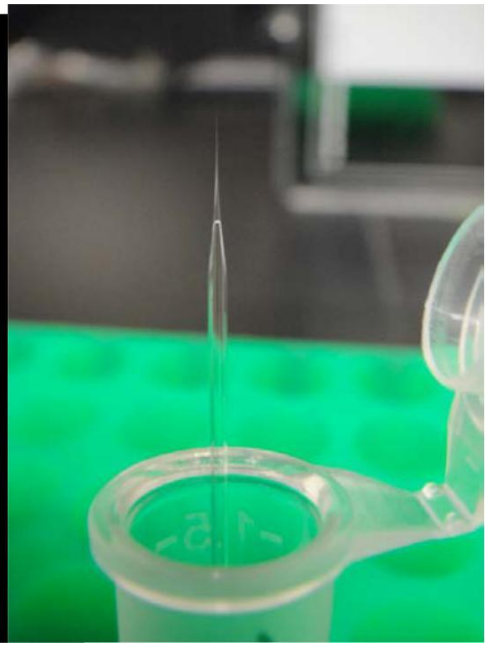
填充膜片钳电极时，尖端和大部分颈部将在 30-60 秒内充满。当填充锋利而长的微电极或微注射电极时，尖端和大部分颈部将在 2-3 分钟内充满。

当加热毛细管玻璃并将其从 Sutter 电极拉制仪中拉出以形成微电极或微量注射电极时，玻璃的内径和该细丝的尺寸将逐渐减小。如果您制作的电极的尖端内径为 0.5μm，则玻璃内的细丝在尖端处最终达到约 80nm。

刘新英 校译



有丝毛细管的电镜图象，尖端折断以显示退火至内壁的细丝（硼硅酸盐玻璃棒）。



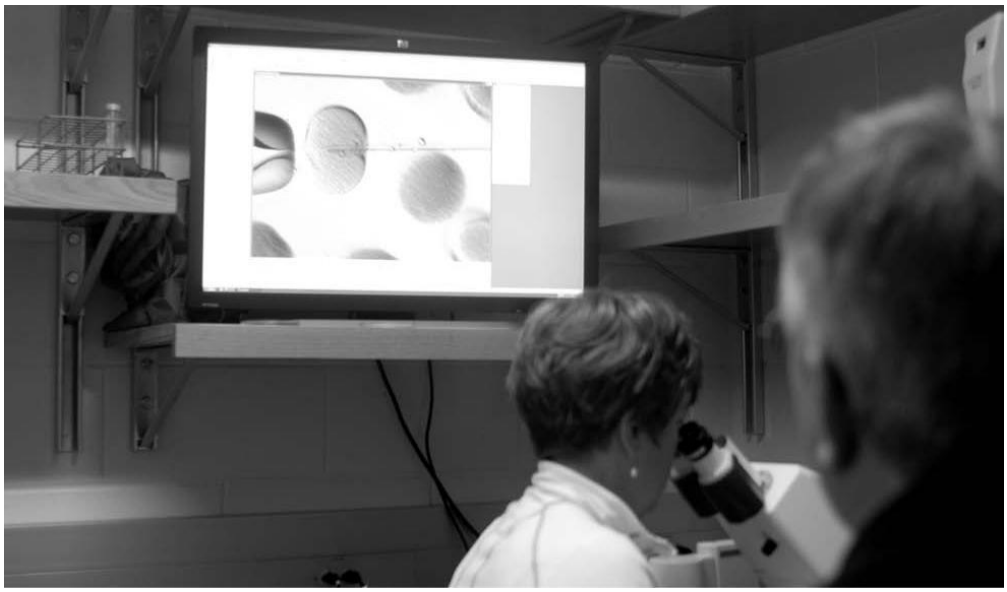
使用 BF100-78-10 有丝玻璃通过毛细作用填充微电极

Xenoworks显微注射系统

利用我们在电动微定位，气压控制方面和机电设计的 30 年经验和专业知识，我们创建了 XenoWorks™显微注射系统。 XenoWorks 系统旨在满足细胞和胚胎组织操纵的各种应用程序的需求。通过结合微型操纵器，微型注射器和显微镜安装适配器，XenoWorks 系统可以配置为广泛的应用。

刘新英 校译

应用：原核注射，贴壁细胞注射，ICSI-细胞质单精子注射，
ES细胞-胚胎干细胞注射，NT-核移植，线虫显微注射
果蝇显微注射，和斑马鱼显微注射。



海洋生物实验室，干细胞课程，Woods Hole，MA　照片由David McFarland

Xenoworks微操作机器人

其特点包括：

- 步进电机控制
- 六速，调速非常精细
- 工作，Home 和 Z-极限存储位置
- 可调摇杆（高度和张力）
- Y 轴闭锁以进行纯 X 轴移动
- 建立操作规程
- 松闸

Xenoworks数字注射仪

功能包括：

- 内置压缩机-静音
- 两个压力端口-“Hold”和注射/转移
- 为 80psi（最大）注射压力
- 两个注射模式：连续或脉冲
- 遥控键盘

刘新英

Xenoworks模拟注射仪

功能包括：

调整和精细控制

与气体，水或油一同使用

可互换的注射器，以修改灵敏度

用于保持，转移和低压注射。

Xenoworks显微注射系统推荐配置

任何 Xenoworks 显微注射系统的配置将取决于它的应用。下面列出了一些比较常用的应用和推荐配置。

原核注射 *推荐系统配置：*

1x 显微操作器（右），编号＃BRMR

1×显微操纵器（左），编号＃BRML

1x数字微注射器，编号＃BRE110/BRE220

2×显微镜适配器

胚胎干细胞转移到囊胚 *推荐系统配置：*

1x 显微操作器（右），编号＃BRMR

1×显微操纵器（左），编号＃BRML

1x数字微量注射器，编号＃BRE110/BRE220或2x模拟微量注射器 BRI

2×显微镜适配器

胞浆内单精子注射（ICSI） *推荐系统配置：*

1×显微操作器（右），编号＃BRMR

1×显微操纵器（左），编号＃BRML

2x模拟微注射器，编号＃BRI

2×显微镜适配器

刘新英 校译

压电辅助ICSI *推荐系统配置：*

1×显微操作器（右），编号＃BRMR

1×显微操纵器（左），编号＃BRML

2x模拟微量注射器，编号＃BRI

2×显微镜适配器

贴壁细胞，果蝇，斑马鱼和线虫显微注射 *推荐系统配置：*

1×显微操作器（右），编号＃BRMR

1x数字微量注射器，编号＃BRE110/BRE220

1×显微镜适配器

核移植 *推荐系统配置：*

1×显微操作器（右），编号＃BRMR

1×显微操纵器（左），编号＃BRML

2x模拟微量注射器，编号＃BRI

2×显微镜适配器

对于其他显微注射的应用，请联系Sutter仪器与这些和其他注射需要的建议。

第19章

BV-10 磨制仪

BV-10 磨制仪是一种精细，简单的方法，可对电极进行精确的磨制，以实现 0.1 至 75 μm 的尖端。独特的磨盘驱动系统无振动，可更好地控制磨制过程。使用 Brown and Flaming 所描述的技术（Science，August 1974,Vol 185）,磨制仪可以非常迅速制作尖端口径一致电极。

细胞内记录电极经过磨制可以产生一个非常尖的点，降低尖端直径，而且玻璃内径横截面较大而导致电阻降低，因此微注射电极针可受益于磨制。这极大地促进了穿透和保持非常小的或难以操作的细胞。对于细胞内记录电极，建议使用 104F 金刚石研磨板，磨制时间在 5 到 20 秒之间。

微注射针头经过磨制，可以以微小的创伤进入细胞，同时增加通过针头的物质流动。第 5、6 和 7 章介绍了胚胎干（ES）细胞注射，胞浆内精子注射（ICSI）和核移植（NT）所需的电极形态。用于这些应用的电极最需要斜面电极。使用 BV-10 磨制仪（如下图所示）和 104D 细金刚石板，磨制时间在 30 到 240 秒之间，可以以所需的角度制作出尖锐的斜面（通常在 15 到 45 度之间）。

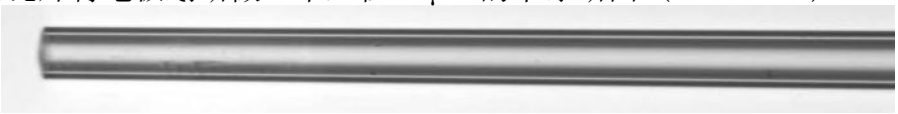
刘新岳 校译

电极磨制前后的图像

磨制前

用镊子将电极折断做一个大概25μm 内径的断面（400xMAG）

使用瓷片将电极划断做一个直径 25μm 的干净断面（400xMAG）

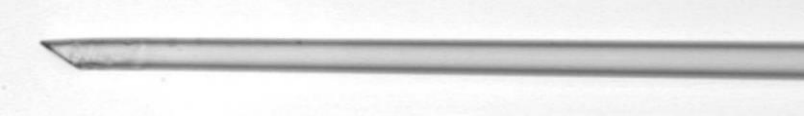


磨制后

使用BV-10 以 25 度角磨制电极，25μm 内径（400xMAG）

分析类 仪器

使用BV-10 以 35 度角磨制电极，15μm 内径（400xMAG）



使用BV-10 以 45 度角磨制电极，2-3μm 内径（400xMAG）

通用查询表

通用查询表提供根据加热片类型整理的 120 个程序。例如，如果您正在使用 3mm 的槽形加热片（FT330B），您需要查看该加热片程序的图表。加热片尺寸位于每个图表的左上角。首先找到一系列图表（每种加热片 6 个图表），然后选择所使用玻璃管的内外直径或产品编号。一旦您找到了您的加热片和玻璃组合方案图表，您将需要确定哪些程序专为您的应用定制的类型。每个表提供 5 种程序类型;A 型，B，C，D，和 E.A 型方案将提供最短的锥度和最大的端部，当您沿图表向下移动，颈部变长，尖端变小。因此，最长的颈部和最小的尖端是类型 D 和 E 程序。下面是对每个程序的“类型”的形态和应用一般描述。

A型-膜片钳或细胞外记录，1-10MΩ

这些程序适合制作具有短的颈部，大的尖端和低电阻电极。

预期可以得到 3-5mm 颈部，1-3μm的尖端，和1-10MΩ的电阻。

B型-贴壁细胞，线虫，果蝇，斑马鱼＆10至30MΩ

这些程序适用于制作具有短至中等长度的颈部，不到 1μm 尖端和较低电阻。预期可以得到 5-7mm 颈部，0.9-0.7μm 尖端，和 10-30MΩ的电阻。

刘新英 校译

C型-原核注射和细胞内记录，40至80MΩ

这些程序适用于制作中等长度的颈部，小而锐利的尖端。预期可以得到 7-9mm 颈部，0.8-0.5μm 尖端，和 40-80MΩ的电阻。这些程序也用于制做小细胞或卵子的注射电极，通常需要折断尖端。

类型D-细胞内记录，>100MΩ

这些程序适用于制作长颈部，非常小的尖端。预期可以得到 8-13mm 颈部，0.5-0.06μm 尖端，和 80-100MΩ 以上的电阻。。

E型-胚胎干细胞，ICSI，胚胎干细胞，核移植，Holding，非洲爪蟾和20-200μ米 尖端

这些程序适用于制作具有超长颈部 10-15mm，非常小的尖端，一般需要折断以制作 5-100μm 尖端。

这些电极需要额外的步骤，如切割，磨制和/或火抛光，以产生最终电极。在 P-1000 拉制仪，为这些应用选择 cookbook 中的 D 类程序。如需更长的颈部，增加速度至 150 个单位并降低压力至 100 个单位。

笔记

刘新英 校译

106

刘新英 校译

笔记

刘新英 校译

107

刘新英 校译

笔记

刘新英 校译

415-883-0128
www.sutter.com

108

刘新英 校译