

生物样品常规超薄切片制备流程

样品前处理:

一、细胞、细菌等样品:

1. 固定

- 1) 前固定: 收集样品, 缓冲液冲洗后加入 2.5%戊二醛缓冲固定液(电镜品质), 4℃ 固定 2 小时以上, 最好过夜;
- 2) 冲洗: 缓冲液冲洗 3 次, 每次 5-9 分钟, 水洗 1 次, 7-10 分钟;
- 3) 后固定: 向样品中加入 1%或 2%四氧化锇固定液进行后固定, 4℃固定 1-3 小时;
- 4) 冲洗: 缓冲液冲洗 3 次, 每次 5-9 分钟。

2. 脱水

用 30%——50%——70%——80%——90%——100%——100%酒精对样品进行梯度脱水, 每步 5-10 分钟, 为保证脱水完全, 100%酒精重复 2-3 次。

3. 渗透(根据环氧树脂的品种, 严格按配方比例混合并搅拌均匀)

丙酮置换样品中酒精, 5-10 分钟;

然后进行环氧树脂的渗透, 每步比例与时间分别为:

丙酮: 环氧树脂= 3:1, 1-3 小时(室温)

丙酮: 环氧树脂= 1:1, 1-3 小时(室温)

丙酮: 环氧树脂= 1:3, 3 小时-过夜(室温)

环氧树脂 100%: 12-24 小时(室温)

以上各步都在旋转混合仪上进行摇晃旋转, 以加速渗透。

4. 包埋与聚合

- 1) 包埋液的配制: 向 100%环氧树脂中加入 1.5%-2%的催化剂, 混合后搅拌 20-30 分钟;
- 2) 样品的放置: 树脂注入包埋模具或胶囊中, 再将样品按所需的方位摆放在包埋模具或胶囊的树脂中, 样品一定要放置在底部, 防止聚合过程中移动;
- 3) 聚合: 45℃预聚合 12 小时, 然后 60℃聚合 24 小时。

5. 切片(略)

6. 染色(略)

二、植物组织(叶片、茎、根等)与真菌:

1. 固定

- 1) 前固定: 采集样品, 缓冲液冲洗后, 将样品放入 2.5% 戊二醛缓冲固定液(电镜纯度)中。样品抽真空让其沉入固定液, 确保固定液充分进入细胞, 4℃固定过夜;
- 2) 冲洗: 缓冲液冲洗 3 次, 每次 5-9 分钟, 水洗 1 次, 7-10 分钟;

3) 后固定：向样品中加入 1%或 2%四氧化锇固定液进行后固定，室温或 4℃固定 3-4 小时；

4) 冲洗：缓冲液冲洗 3 次，每次 5-9 分钟。

2. 脱水

用 30%—50%—70%—80%—90%—100%—100%酒精对样品进行梯度脱水，每步 20-30 分钟，为保证脱水完全，100%酒精重复 2-3 次。

3. 渗透（根据环氧树脂的品种，严格按配方比例混合并搅拌均匀）

丙酮置换样品中酒精，20-30 分钟；

然后进行环氧树脂的渗透，每步比例与时间分别为：

丙酮：环氧树脂= 3:1，3 小时（室温）

丙酮：环氧树脂= 1:1，3 小时（室温）

丙酮：环氧树脂= 1:3，3 小时-过夜（室温）

环氧树脂 100%： 24-72 小时（室温）

以上各步都在旋转混合仪上进行摇晃旋转，以加速渗透。

4. 包埋与聚合

1) 包埋液的配制：向 100%环氧树脂中加入 1.5%-2%的催化剂，混合后搅拌 20-30 分钟；

2) 样品的放置：树脂注入包埋模具或胶囊中，再将样品按所需的方位摆放在包埋模具或胶囊的树脂中，样品一定要放置在底部，防止聚合过程中移动；

3) 聚合：45℃预聚合 12 小时，然后 60℃聚合 24 小时（Spurr 树脂 70℃聚合 24 小时）。

5. 切片（略）

6. 染色（略）

三、活体动物组织：

1. 固定

1) 灌注固定：①脑、心脏等组织：用 2.5%戊二醛和 4%多聚甲醛混合缓冲固定液对实验动物进行灌注固定；②肝、肺等其他组织：可在腹腔中滴入上述混合固定液后取材；

2) 前固定：迅速取出实验组织所需部位，用手术剪或锋利的刀片快速切割为不大于 1mm³的组织块，投入 2.5% 戊二醛缓冲固定（电镜纯度）中，4℃或室温固定 2 小时以上；

3) 冲洗：缓冲液冲洗 3 次，每次 5-9 分钟，水洗 1 次，7-10 分钟；

4) 后固定：向样品中加入 1%或 2%四氧化锇固定液进行后固定，室温或 4℃固定 1-3 小时；

5) 冲洗：缓冲液冲洗 3 次，每次 5-9 分钟。

2. 脱水

用 30%—50%—70%—80%—90%—100%—100%酒精对样品进行梯度脱水，每步 20-30 分钟，为保证脱水完全，100%酒精重复 2-3 次。

3. 渗透（根据环氧树脂的品种，严格按配方比例混合并搅拌均匀）

丙酮置换样品中酒精，5-10 分钟；

然后进行环氧树脂的渗透，每步比例与时间分别为：

丙酮：环氧树脂= 3:1，1-3 小时（室温）

丙酮：环氧树脂= 1:1，1-3 小时（室温）

丙酮：环氧树脂= 1:3，3 小时-过夜（室温）

环氧树脂 100%： 12-24 小时（室温）

以上各步都在旋转混合仪上进行摇晃旋转，以加速渗透。

4. 包埋与聚合

1) 包埋液的配制：向 100%环氧树脂中加入 1.5%-2%的催化剂，混合后搅拌 20-30 分钟；

2) 样品的放置：树脂注入包埋模具或胶囊中，再将样品按所需的方位摆放在包埋模具或胶囊的树脂中，样品一定要放置在底部，防止聚合过程中移动；

3) 聚合：45℃预聚合 12 小时，然后 60℃聚合 24 小时。

5. 切片（略）

6. 染色（略）

超薄切片步骤：

一、修块

1、手工修块：将包埋块夹在特制的夹持器上，放在显微镜下，用锋利的刀片先削去表面的包埋剂，露出组织，然后在组织的四周以和水平面成 45° 的角度削去包埋剂，其侧面修成锥形体，其样品正面修成体形或方型，如需要定位，可对样品面打一个角。如果多余树脂较多，也可以用砂纸。

2、用修块机 Leica EM TRIM2 进行精确修块，标准的金字塔修块步骤如下：

1) 修样品的顶端，把树脂全部修掉，直至露出黑色的样品为止。

2) 旋转样品垂直方向的角度（侧面倾斜角度 35° ~45°）修第一个侧面，直至露出黑色的样品为止。

3) 旋转样品杆水平方向的角度 90° 修第二个侧面，方法如第二步。

4) 重复第三步两次，修出第三个和第四个侧面。

二、半薄切片定位

半薄切片进行光学显微镜观察的目的：**a 定位**：通过光学显微镜观察，确定所要观察的范围，然后保留要用电镜观察的部分，修去其余部分。**b 便于对同一组织的同一部位进行光学显微镜和电镜的对比观察。**

1、在洁净的载玻片上滴一滴水，将切下的半薄切片用镊子或睫毛笔转移水滴上。

2、将载玻片放在 45° C 加热板上干燥，使切片展平，干燥后经甲苯胺蓝染色，光学显微镜观察定位。

- 3、半薄切片定位以后，将块的顶端修成金字塔形，顶面修成梯形或长方形(最好是梯形)，每边的长度为 0.2mm ~ 0.3mm。

三、超薄切片机使用方法

用户经培训后取得资格可自行使用超薄切片机，使用步骤如下：

- 1) 开机检查：查看是否处于切片模式，检查顶灯底灯的亮度是否正常；
- 2) 安装包埋块：将修好的包埋块放入夹头并用六角扳手旋紧，将夹头放入机械臂；
- 3) 切片刀安装：将玻璃刀/钻石刀安装在刀台上，用手旋好螺丝以固定刀，并注意检查刀台是否固定于底座上；
- 4) 检查刀间隙角，调整刀台角，选择适当的夹头角度等；
- 5) 设定切片窗口（上下范围）；
- 6) 对刀；
- 7) 选择所用切片速度和厚度；
- 8) 在刀槽内注水，注意水面平整；
- 9) 切片、捞片；
- 10) 关机、清理切片机，拿走个人物品，保持切片台面整洁；
- 11) 登记使用记录。