

电子显微镜超薄切片常规技术

傅 湘 琦

(中国科学院动物研究所)

本文将简要介绍国内电子显微镜(简称电镜)超薄切片的常规技术,供初学者便于了解和使用这种技术。表1介绍了人的眼睛借助仪器可以观察的范围。

在电镜日常工作中,如何提高电镜的分辨率使之

达到预期的目的,标本制备工作是十分重要的环节。也是电镜工作中最繁重、最艰巨的工作。这方面国内外均有专著出版。现结合前人的经验和国内一些实验室常用的方法和操作规程加以介绍。

表1 样品的大小和观察方法

样品的大小	划分范围	样 品 例	研 究 方 法
100 μ 以上	解剖学	人卵细胞(0.2 mm)至各种器官	肉眼、放大镜
10—100 μ	组织学	组 织	各种光学显微镜
0.2—10 μ	细胞学	细胞、细菌	X线显微镜扫描电镜
2000 Å 以下	分子细胞学	病毒、细胞内小器官,细胞内结晶体,磷脂质的排列,蛋白质分子	电子显微镜
10 Å	分子、原子构造	分子、原子的排列	电镜可能达到的范围,将来有发展

一、固定和包埋

按照国内外制备动物组织和细胞超薄切片标本的常规固定包埋技术,采用戊二醛——四氧钼双重固定,环氧树脂*618, *812包埋。所用试剂准备、操作过程及注意事项如下:

1. 固定及浸洗用试剂

(1) 0.2M 二甲砷酸钠缓冲液作固定剂缓冲液的原液。配方如下:

Na(CH₃)₂ · AsO₂ · 3H₂O 4.28 克

重蒸水加至 100 毫升

在 pH7.2—7.4, 0—4°C 条件下,保存备用。

(2) 0.1N 盐酸: 调整固定剂的 pH 用浓盐酸(市售的,含 36% HCl, 约为 11.6M)。

浓盐酸 8.60 毫升

重蒸水 1.000 毫升

(3) 0.1N 氢氧化钠: 作调整固定剂的 pH 用。先配 1N NaOH 作为原液,用 1N 重蒸水稀释成 0.1N。

1N NaOH 4 克

重蒸水加至 100 毫升

(4) 巴比妥醋酸等渗缓冲液: 戊二醛和钼酸固定后浸洗组织和细胞小块用。

A 液: 巴比妥钠 2.94 克

醋酸钠 · 3H₂O 1.94 克

重蒸水加至 100 毫升

B 液: 氯化钠 8.06 克

氯化钾 0.42 克

氯化钙 0.18 克

重蒸水加至 100 毫升

在 0—4°C 条件下保存备用。

取 A、B 液加盐酸配制等渗缓冲液:

A 液 10 毫升

B 液 3.4 毫升

0.1N 盐酸 11 毫升

重蒸水加至 50 毫升

在 pH7.2—7.4, 0—4°C 条件下保存备用。

(5) 1/15M 磷酸缓冲液原液: 配磷酸缓冲的戊二醛固定液及浸洗液用。

A 液: 1/15M KH₂PO₄ 液

KH₂PO₄ 1.816 克

重蒸水加至 100 毫升

B 液: 1/15M Na₂HPO₄ 液

Na₂HPO₄ · 12H₂O 5.5 克

重蒸水加至 200 毫升

(6) 1/15 磷酸缓冲液

1/15M A 液 5 毫升

1/15M B 液 20 毫升

蔗糖 2.05 克

改变A液与B液的比例,以调整pH至7.2—7.4。蔗糖的最终浓度约为0.24M。

(7) 2% 四氧钨原液

四氧钨 1 克
重蒸水 50 毫升

四氧钨很容易被油脂等杂质还原,降低固定效果,因此配药所用器材务必用清洗液清洗干净。钨酸是极毒物,操作者应尽可能避免与其接触,其蒸汽对呼吸道粘膜,眼角膜都有固定作用,且价格昂贵,使用要倍加小心和节约。配好液体,冰箱保存备用。

(8) 0.1M 二甲砷酸钠缓冲的戊二醛固定剂: 固定组织可用缓冲的2.5%或5%戊二醛固定剂,固定细胞可用1%或2.5%戊二醛。配比见表2。

表2 戊二醛固定剂配比表

组 成	用 量(毫升)	种 类		
		5% 戊二醛	2.5% 戊二醛	1% 戊二醛
0.2M 二甲砷酸钠		50	50	50
重蒸水		30	40	46
25% 戊二醛(市售原装)		20	10	4

在pH 7.2—7.4, 0—4℃条件下保存备用。

(9) 磷酸缓冲的4%戊二醛固定液:

A 液 约 10 毫升
B 液 约 50 毫升
25% 戊二醛 约 12 毫升

通过改变A与B的比例,调pH至7.2—7.4。戊二醛的最终浓度约为4%。在0—4℃条件下保存备用。

(10) 巴比妥醋酸等渗缓冲的1%四氧钨固定液:

巴比妥醋酸等渗缓冲液A液 10 毫升
巴比妥醋酸等渗缓冲液B液 3.4 毫升
0.1N 盐酸 约 11 毫升
2% 四氧钨 25 毫升
重蒸水加至 50 毫升

2. 脱水用试剂

采用丙酮或纯酒精系列。纯丙酮内加无水硫酸钠吸水。

3. 环氧树脂包埋剂

国产环氧树脂#618包埋剂药品调配适当,正确操作,在保存细微结构和适合切片方面都比较理想,采用十二烷基琥珀酸酐(Dodeceny succinic anhydride,简称DDSA)作固化剂,2,4,6-三(二甲氨基甲基)苯酚2,4,6-Tri(dimethyl aminomethyl)phenol(简称

DMP-30),作加速剂,较传统#618配方更易切片。

(1) #618 包埋剂

#618 5 毫升(单体)
顺丁烯二酸酐(Maleicanhydride) 2 克(固化剂)
苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalata,简称D、B、P) 1.5—2 毫升(增塑剂)
二乙基苯胺(Diethylaniline) 0.4 毫升(加速剂)

将#618倒入烧杯内,加热至80℃备用。用注射器量取所需量之#618于30毫升广口瓶内,加入顺丁烯二酸酐,继续放入80℃温箱约5—10分钟,使其溶解(因顺丁烯二酸酐的熔点为56℃左右,需加温溶解),磁搅拌器或玻璃棒搅拌均匀,中速,约5—15分钟,冷至室温,用注射器加入D、B、P,搅拌约5分钟,备用。用前半小时左右,用带针头小注射器在搅拌情况下逐滴加入二乙基苯胺,加完后继续搅拌5—10分钟,即可使用。

(2) #812 包埋液

A 液 Epon812 6.2 毫升
DDSA 10.0 毫升
B 液 Epon812 10.0 毫升
MNA(methyl nadicanhydride) 8.9 毫升

将A液与B液按一定比例混合后,用0.25毫升注射器逐滴加入1—2%含量的DMP—30加速固化,边加边搅。A液与B液的比例根据气候不同而变动,A液多则软,B液多则硬。通常冬天使用A:B=1:4,夏天使用A:B=1:9左右。为了节省药品,也可经计算好用量后,将#812、DDSA、MNA三种成份加在一起一次配制,用前加DMP—30。

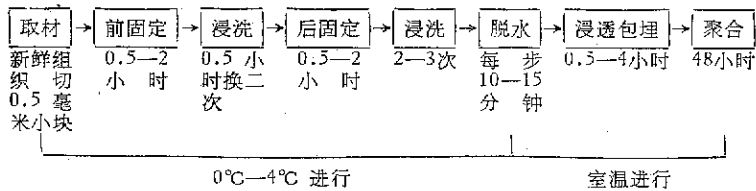
上述二种包埋剂,皆忌潮气。配制时,所用器材在用前均需烤干,配制需在相对湿度50%以下的环境进行,如果天气太潮,可以略加通风,或在烤箱内配。最好随配随用。为了节省包埋剂,配前需根据包埋材料的多少估计用量,以免多配浪费。

4. 包埋用器材准备

由于环氧树脂包埋获得成功的重要条件之一是避免潮气。因此,包埋用器材用品需在60~80℃干燥2小时以上,烘干备用。所用器材包括:

青霉素小瓶(包括瓶塞) 若干
毛细吸管(包括橡皮头) 若干
5 毫升注射器 1—2 只
2 毫升注射器 1—2 只
1 毫升注射器 1—2 只
0.25 毫升注射器 1—2 只
30 毫升广口瓶 1—3 个
牙签 1 盒
硫酸纸 1 张
胶囊(2号) 若干

5. 操作步骤:



(1) 取材：尽可能新鲜。组织块用刀片切成每边不超 0.5 毫米小块，取材后立刻放入固定液。

(2) 前固定：用戊二醛固定液，一般固定液体积可为材料的 40 倍左右。

(3) 浸洗：用二甲砷酸缓冲戊二醛固定，则用巴比妥醋酸等渗缓冲液洗，若用磷酸缓冲戊二醛固定，则用含蔗糖磷酸缓冲液浸洗。如组织块在取材当天不能进行包埋，可在 0—4°C 的浸洗液内过夜。

(4) 后固定：用 1% 四氧铈固定液固定，临用前由 2% 贮备液配成 1%，测试 pH 后即可使用。

(5) 浸洗：用巴比妥等渗缓冲液浸洗。

(6) 脱水：可用丙酮或酒精系列。以丙酮为例，50%，70%，90% 各 10—15 分钟左右。纯丙酮（内放无水硫酸钠）2—3 次，每次 10—20 分钟。90% 丙酮以前的步骤在 0—4°C 进行，100% 以后的在室温进行。除 70% 丙酮可略稍长放置，其他浓度丙酮不宜放置过久，以免细胞成分大量丢失或引起收缩或膨胀，组织变脆难以切片。若用酒精系列脱水时，也可在 50% 或 70% 酒精内加入 2% 含量的醋酸双氧铈预染。

(7) 浸透包埋：可用丙酮与包埋剂 1:1 混合液过渡，也可直接进入包埋剂浸透。一般认为前者较好。纯包埋剂浸透分两次进行，一次在瓶内进行，一次在胶囊内进行。第一次 0.5—4 小时，第二次 4 小时以上或过夜。纯包埋剂浸透可在 30°C 温箱内进行，不会使包埋剂固化，又能加速浸透并保持包埋剂处于均匀混合状态，以利于以后的切片。

(8) 聚合：浸透后 #618 或 #812 包埋的材料均可在 60°C 温箱聚合 24—48 小时，#618 包埋块为淡黄透明，#812 聚合块应为褐黄透明。

以上均按常规方法将组织块包埋于 2 号胶囊内。

6. 注意事项：

(1) 试剂及包埋剂用玻璃器材必须清洁，药品称量必须准确。

(2) 转入包埋液前，组织块的水分必须脱尽，进入纯丙酮后的操作，使干湿差拉大在华氏 13—15 度左右，尽可能在相对湿度 50% 以下的环境进行，以避免潮气。

(3) 包埋剂需用前配制，充分搅拌均匀，配后即用，否则切片困难。

(4) 为了减少细胞成分在固定、脱水包埋过程中的丢失。取材后保证充分固定、脱水及浸透的前提下，应尽可能快地包进胶囊。

(5) 包埋块的软硬度，直接影响切片能否顺利进

行。应根据季节不同适当调配药品的比例。

(6) 包埋完毕，所用器材需即时清洗干净，烘干备用。

二、切片

1. 准备

(1) 铜网：国内已有成品出售，其直径为 3 毫米，具边框，300 目，网目有正方形和圆形等规格。新铜网可用乙醇清洗，干燥。用过的铜网，泡于醋酸戊酯中 1—3 天，再用乙醇洗 2 次，使其干燥后待用。

(2) 制膜：用福尔蒙瓦尔 Formvar，即聚乙烯醇缩甲醛 Polyvinylformal（简称 PVF），用氯仿配成 0.2—0.5% 的浓度，一般夏季用 0.2%，冬季用 0.3%，1—2 天溶解。然后用洗净的新玻片在该溶液中轻置片刻，平稳取出，在空气中使其干燥。此时玻片形成薄膜，用刀片在膜四周各划一刻痕，然后用口哈一哈气，轻轻放入盛蒸馏水的大烧杯内，使玻片上薄膜缓缓地漂浮在水面上。再将铜网排列在膜上，用滤纸或玻片捞起，烘干后备用。

(3) 修块：将包埋好的组织块，先用热水溶去胶囊，然后再在双目解剖镜下修成四面锥体（金字塔形），使相对的剖面尽量平行，这样可使切片保持方形连续成带。

(4) 制刀：用肥皂水洗净事先裁成 3 厘米宽的玻璃条，擦干，再用丙酮擦玻璃面，放制刀机上制刀。

(5) 刀槽：用氧化锌橡皮膏围成一个长半圆的小水槽，橡皮膏外面要小心地烫上一层石蜡免得漏水。烫蜡时千万勿伤刀口。

2. 切片

将已修成四面锥形块的包埋块夹在样品夹上，插入切片机的推进头内。带有刀槽的玻璃刀装在切片机的刀架上，水槽内用注射器轻轻注入蒸馏水或 10—20% 乙醇或丙酮液作为漂浮收集液，槽内必须清洁，以免污染切片。

3. 切片的收集

使水槽内液面略低于刀刃，在双筒放大镜下看出切片的干涉色，借助这种干涉色来判断切片厚度。

暗灰色	400 埃以下
灰色	400—500 埃
银色	500—700 埃
金黄色	700—900 埃
紫色	900 埃以上

紫色的切片,实际上已太厚,无法观察。用细玻璃针选 500 埃以下的播在一起,厚的挑掉。然后用铜网带有福尔蒙瓦尔膜的一面,在小水槽表面一蘸,切片即附于膜上。

三、染色

1. 醋酸铀染色法

染色液一般用 1—3% 的饱和醋酸铀,可以用 70% 乙醇或丙酮配制。亦可以用重蒸水配制,在室温 37°C 染色 20—30 分钟,染色完毕,用水浸洗即可。

2. 铅染色法

此法较常用者为柠檬酸铅染色液,配法如下:

硝酸铅	1.39 克
柠檬酸三钠	1.73 克
重蒸水	30 毫升

将以上悬液盛于 50 毫升容量瓶中,激烈间隙摇动 30 分钟后,加入 8 毫升 1 N 新鲜 NaOH,该时乳白色的混浊液立即变为无色透明溶液,用重蒸水加至 50 毫升过滤后,再用 3,000 转离心机离心 10—15 分钟,取管中上层液备用。染色时间一般组织切片数分钟至 30 分钟。

上两种染色法,其操作过程是:先将染色液用吸管滴在事先制好的蜡盘蜡的表面上,然后将铜网的切片面向下盖在滴在蜡面的小染液珠上,染色充分后用吸管吸去染液水珠,注入蒸馏水于蜡面与切片间浸洗数次。再用钟表镊子一个铜网一个铜网的夹下来,切片面向上放在铺有滤纸的玻璃皿内,盖好盖子放干燥器内,干燥后即可镜检。为了方便起见,也可自制一个铜网夹,将预染色的铜网先放夹内,连夹一起放入染液,一次也可染许多个铜网,染色步骤同上。