

常规透射电镜生物样品制样条件的摸索总结

黄静, 彭彬

(川北医学院形态学研究所电镜结构研究室, 四川 南充 637000)

【摘要】透射电镜被用来作为形态学研究的工具,被广泛应用于生物学领域,但生物样品透射电镜制样过程繁琐,需要从事透射电镜制样的工作人员长期大量反复的摸索才能保证制样的质量。现就本研究室实际摸索的条件及相关文献的阐述进行总结,以期更好的服务于临床和科研。

【关键词】透射电镜;生物样品;制样条件;总结

【中图分类号】R361.2 **【文献标志码】**A

Exploration and summary of preparation conditions of biological samples for TEM

HUANG Jing, PENG Bin

(Electron Microscopy Room, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Transmission electron microscopy (TEM) has been widely used in morphological research. However, the preparation of biological samples for TEM are troublesome and poor of quality. It is necessary for electron microscope technician to explore the conditions repeatedly and for long times, this paper summarizes the actual conditions and related literature, which service better for clinical and scientific research.

【Key words】TEM; Biological samples; Sample conditions; Summary

实验样品的选择制作是临床及科研工作的重要环节,取样时样品大小、取样部位、取样后固定液的选择、固定时间等对实验成败至关重要。而样品制作中,锇酸配制和使用方法、包埋剂的选择、渗透时间温度设置、组织修块、超薄切片室的环境条件、染色处理等,会对实验结果产生较大影响。如何保证样品的质量是电镜工作技术人员面临的实际问题。现将样品的取材固定及后期处理的关键技术和注意事项予以总结,以期期望为临床和科研人员提供一些帮助。

1 常规透射电镜样品的取材及固定

1.1 取材要求及注意事项

“快、小、利、净、准、冷”是取材的基本要求。“快”是为了避免组织细胞因缺血缺氧导致自溶,破坏超微结构;“小”由于电镜使用的固定液戊二醛的渗透速率慢(仅为0.5 mm/h),为避免固定不充分,取材大小以1 mm³为宜;“利”是取材工具要锋利,以避免取材工具来回拉扯组织造成人为假象;“净”

是避免组织取材时残留血迹污迹,影响实验结果;“准”是针对取材的部位要准确,尤其是需要定位的组织(肠道、呼吸道、眼组织、皮肤、神经等)^[1];“冷”可以降低酶活性,避免组织细胞因环境温度、固定液温度而加速自溶,破坏超微结构。因此,所用实验容器、溶液和器械均需要预冷。以上各个环节均会影响到最终实验结果^[2-3]。

1.2 固定液的选择

固定的作用是尽可能使组织和细胞接近其生存时的状态,减少动物死亡后组织细胞的变化,使细胞器的精细结构完好无损的保存下来,同时使细胞内各种成分固定,避免在后续操作中因冲洗、脱水等环节的溶解和消失。电镜制样过程中,常用的固定液为戊二醛和锇酸,起前后固定作用^[4]。戊二醛对细胞精细结构具有很强的亲和力,在使用过程中应该避光、密封、低温(4℃)保存,并且需要充分漂洗后才能转入后固定液锇酸中。锇酸作为后固定液,它和氮原子具有较强的亲和力,对细胞中的蛋白质成分具有良好的固定作用,同时还具有电子染色作用,

基金项目:四川省南充市校企合作项目(18SXHZ0152)。

作者简介:黄静(1987-),女,硕士,助理实验师。E-mail:406727448@qq.com

通讯作者:彭彬,博士,教授。E-mail:340255492@qq.com

是生物透射电镜技术中广泛使用的固定液。但锍酸具有极强的挥发性、剧毒,对人体的呼吸道、粘膜和皮肤等具有损伤,因此需要在通风橱中进行操作。同时锍酸受热和光极易挥发,需要避光 4 ℃ 保存,再者它是一种强氧化剂^[5],要求在配制过程中使用到的所有器皿都要洗净(酸缸浸泡)、烘干备用。

2 常规透射电镜样品的制备

2.1 实验室环境条件要求

实验室环境条件包括了实验室的温湿度、实验用水^[6]、环境通风及危险有害化学物品保存条件。温湿度条件对取样、后固定、环氧树脂配制、渗透、聚合、切片、染色等步骤均有影响。实验用水体现在试剂的配制,尤其是柠檬酸铅染液的配制,铅盐极易与空气和水中的二氧化碳结合产生碳酸铅沉淀从而污染切片,在电镜下呈黑色致密的圆形或不定形颗粒,影响电镜观察。戊二醛、锍酸、环氧树脂、环氧丙烷等都具有挥发毒性,通风措施是保障整个实验过程中上述有害物品释放的安全。此外,危险化学物品,特别是醋酸双氧铀染色剂,因具有放射性,需要铅罐保存以保障安全。

2.2 制备过程中的注意事项

2.2.1 包埋剂的选者及使用注意事项 通常选用环氧树脂作为电镜样品的包埋剂,其具有聚合缩小、对组织损伤小、耐电子轰击等特点。环氧树脂有两种化学反应基团,其结构链的两端有环氧基,链中有羟基,因此将树脂和含有胺、酸酐的硬化剂(DD-SA 和 MNA)和加速剂(DMP-30)三者按照一定的比例混合加温,就会产生二维聚合,形成稳定、抗热、抗溶的惰性物质^[7]。包埋剂的配制和使用过程中需要注意控制环境湿度,因为包埋剂极易受潮导致样品不能得到很好的浸透与聚合,影响交联反应的发生,切片时易形成褶皱和颤痕,导致切片破碎不全。配制中,以环境温度 25 ℃、环境湿度 50% 左右为宜,可利用除湿机及空调等设备保持室温和湿度。配制好的包埋剂在低温干燥密封条件下可以保存数月。在搅拌混合包埋剂时,要防止气泡产生,配制好后静置 30 min 再使用^[8]。加速剂 DMP-30 需要用量准确,过多会使组织块变硬,过少会使组织变软,均不利于切片^[9]。使用剩余的包埋剂可以存放于 -20 ℃ 保存数月,但应避免反复冻融。另外,凡是涉及到树脂环节,如有条件,应使用微波处理,这样包埋效果会更好^[10]。

2.2.2 修块技术及注意事项 修块是把从包埋模具取出的包埋块通过手工或者修块机去掉多余的树脂,从而暴露出超薄切片所需组织块。手工修块一

般用单面刀片倾斜 45° 向外粗修出四个斜面,使包埋块顶端呈现锥体形状,然后再将顶面修平。修块机原理同手工。最后修成的组织块顶端截面呈等腰梯形,四边光滑平整,才有利于切出连续的带形切片,切片之间所形成的夹角也更容易用睫毛笔断片,便于切片的捞取。修块刀片须经常更换,并注意不要划伤手指。修块机需要经常清洁吸尘器或更换过滤网,避免长期积累的树脂堵塞吸尘器导致不能正常工作,导致在修块时大量树脂残留组织块上,影响超薄切片^[11-12]。

2.2.3 超薄切片技术及注意事项 超薄切片是用超薄切片机,将修块好的组织块切成 70 ~ 100 nm 厚的薄片,包括了制作玻璃刀、上样、上刀、对刀、加水、切片和捞片等环节。玻璃刀的制作需经过长期反复练习,要注意玻璃条对半折断时力度在 5 以下,自然断裂为佳。良好的玻璃刀在解剖显微镜下观察刀刃为一条光滑的亮线,没有锯齿,应力线明显。如果发现某一段呈锯齿状且有闪烁的光点,则这一段刀锋稍差,只能用来修块或半薄切片。玻璃刀最好现制现用,避免灰尘^[13]。钻石刀的使用需特别小心,因其价格昂贵,建议在熟练掌握玻璃刀使用的基础上使用,并注意钻石刀使用前后的清洁,对刀时要轻拿轻放,防止碰撞。切片时须将已经修块的包埋块的长边成水平放置,并让长边在下,将刀锋与样品保持一定距离,然后慢慢进刀。在暗视野下观察到刀和组织块间有一条大小均匀的亮光出现后,在刀槽中慢慢加水至观察到水面反光为止,水必须干净^[14]。切片速度一般为 2 ~ 5 mm/s,厚度为 50 ~ 100 nm。通过切片颜色来观察切片厚度,蓝紫色太厚,暗灰色太薄,均不能使用,而微黄色偏厚,银灰或者银白者适中,可以使用。在实践过程中,切片常常会出现褶皱、震颤、切空片、跳片、散片等情况,是由于前期样品制备过程处理不得当所致,比如渗透不完全、修块切面不平整、刀刃刀槽不干净、空气中湿度过大、环氧树脂吸潮、环境中的灰尘等^[15-18],因此,超薄切片须置于洁净、恒温、防震的环境中。在切片过程中应避免人员走动,以减少灰尘污染切片的机会^[19-20]。捞片操作需要丰富的经验,必须耐心谨慎,保持手持铜网稳定。另外,须注意选择质量良好的铜网。

2.2.4 染色技术及注意事项 染色是利用重金属染色剂(铀和铅)与细胞结构的结合能力不同,增加样品局部的电子散射能力,提高图像反差。铀可以结合细胞中大多数成分,提高核酸、蛋白质和结缔组织的反差,且对细胞各结构均有亲和力,尤其是提高膜结构和脂类物质的反差,对糖原和核糖体等着色。

超薄切片通常采用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色。醋酸双氧铀在配制使用时,需要用纯水或者新鲜蒸馏水,避免水长时间放置酸化,增加二氧化碳含量,因为铀对光和高温具有不稳定性,故需贮藏于棕色瓶和4℃的冰箱内。醋酸双氧铀每次配制少量,一般使用2~3个月后可重新配制。优质的染色液应具黄绿色荧光,如放置时间过长,易水解生成碱性盐而呈黄白色水合物,此时黄绿色荧光消失,容器底部易形成沉淀,因此,每次使用前最好先离心,去除沉淀。柠檬酸铅在配制使用时,所用的水必须要去除二氧化碳,避免二氧化碳和铅反应生成碳酸铅。碳酸铅颗粒在电镜下呈现为黑色致密的圆形或者不规则颗粒,从而影响观察。柠檬酸铅染液在配制时需用氢氧化钠将PH值调节为12,保存时需要隔离空气,出现沉淀则需要废弃。使用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后均需要漂洗干净,但是漂洗的力度不易过大,避免将切片冲洗掉^[20]。染色的温度和时间随地域和季节差异及实验室条件不同各有不同,当室温为25℃左右,醋酸双氧铀染色15 min,柠檬酸铅染色30 min较为适合。漂洗后待自然干燥方可上机观察。

3 小结

常规透射电镜样品的制备过程是一项精细繁琐而又技术性很强的工作,本研究小组经过多年反复摸索认识到在整个操作过程中,任何一个细节没有做到位,任何一个条件不满足,都难以得到理想的电镜结果。因此,在样品制备前一定要做好充分准备,熟知每一个步骤的原理及注意事项,尽量避免可能导致结果失败的因素,才能最终得到自己想要的结果,得到客观准确的实验数据。

参考文献

[1] 范晓燕,林方兴,杨勇骥.透射电镜生物样品常规制备中定位技术的探讨[J].解剖学杂志,2014,36(6):823-824.

- [2] 陶忠芬,可金星,肖桃元,等.电镜样品取材的意义与应用[J].第三军医大学学报,2005,27(3):273-274.
- [3] 钟秀荣.透射电镜样品取材及固定为主的研究生教学和指导[J].解剖学杂志,2016,39(1):123-124.
- [4] 余学问,王家传,梁莹莹.超微病理技术中锇酸理化状态的质量控制[J].临床与实验病理学杂志,2019,35(1):103-107.
- [5] 于红丽.用双蒸水代替磷酸缓冲液进行电镜样品制备[J].徐州医学院学报,2005,25(1):47-49.
- [6] Dijkstra MJ, Reuse LE. Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting[M]. Springer, 2003:186-197.
- [7] 刘庆红,何幼英.不同湿度下Epon812、Epon618对电镜制样的影响[J].临床与实验病理学杂志,2015,31(7):824-825.
- [8] 姚军,骆新兰,朱小兰.不同剂量DMP30包埋剂对电镜样品制片质量的影响[J].诊断病理学杂志,2013,20(7):438-440.
- [9] 刘庆红.包埋剂冰冻后仔透射电镜制样中的应用[J].电子显微学报,2001,20(6):220-227.
- [10] Anthony SY, Raita TS. Microwave Procedures for Electron Microscopy and Resin-Embedded Sections[J]. Micron, 1998, 29(10):155-160.
- [11] 肖欣,周正平.生物样品透射电镜超薄切片质量问题探讨[J].贵州医药,2015,39(12):1103-1104.
- [12] 吕光艳,曲淑贤,崔颖.电镜超薄切片常见问题产生的原因及对策[J].大连医科大学学报,2006,28(4):78-80.
- [13] 郭新秋,王弋,王瑞武.一种解决超薄切片震颤的方法[J].实验室研究与探索,2013,32(10):321-323.
- [14] 周广荣.样品切片制备及电镜观察技巧[J].分析仪器,2015,6(8):68-71.
- [15] 武忠弼,周晓军.超微病理诊断学[M].上海:科学技术出版社,2003:5-41.
- [16] 王鹏,陈明霞,樊小君.一种减少超薄切片污染的简单方法[J].电子显微学报,2006,25(S1):279-280.
- [17] 郝宏京,毛同林,李克斌.肌肉样品在制备过程中不同温度对其反差的影响[J].电子显微学报,2002,21(5):830-831.
- [18] 于红丽,董富兴,戚大石.透射电镜样品制备中常见污染问题的探讨[J].徐州医学院学报,2012,32(2):92-94.
- [19] 李博.关于透射电镜样品污染问题的探讨[J].临床与病理杂志,2014,34(5):648-650.
- [20] 张丽芳,姚梅宏,曲丽娟.透射电镜超薄切片染色铅污染的补救方法[J].临床与实验病理学杂志,2014,30(7):816.

(收稿日期:2020-03-16

修回日期:2020-06-22)