



## 细胞样本透射电镜实验报告

### 一、实验器材及试剂

#### 1、实验器材

名称	厂家	型号
超薄切片机	Leica	Leica UC7
透射电子显微镜	JEOL	JEM-2100Plus
钻石切片刀	Daitome	Ultra 45°
200 目膜铜网	中镜科仪	BZ11022B

#### 2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
电镜固定液	Servicebio	G1102
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	100092183
丙酮	国药集团化学试剂有限公司	10000418
812 包埋剂	SPI	90529-77-4
锇酸	Ted Pella Inc	18456

### 二、实验步骤

- 固定：**弃去培养基后，用胰酶消化或细胞刮取法收集细胞于离心管中，常规离心收集细胞（细胞团大小约绿豆粒大），弃上清，加入新鲜电镜固定液，轻柔吹散细胞团并重悬，于 4℃避光固定、保存与运输。使用 0.1 M 磷酸盐缓冲液（PB，pH 7.4）漂洗 3 次，每次 15 min。
- 后固定：**用 0.1 M 磷酸缓冲液 PB（pH 7.4）配制的 1%锇酸避光室温固定 2 h。0.1 M 磷酸缓冲液 PB（pH 7.4）漂洗 3 次，每次 15 min。
- 室温脱水：**样品依次于 30%、50%、70%、80%、95%、100%、100% 酒精中上行脱水，每次 20 min；再于 100% 丙酮中处理两次，每次 15 min。
- 渗透包埋：**丙酮：812包埋剂=1：1，37℃ 2-4 h；丙酮：812包埋剂=1：2，37℃ 渗透过夜；纯812包埋剂，37℃ 5-8 h。将纯812包埋剂倒入包埋板，将样品插入包埋板后，37℃

烤箱过夜。

- 5、**聚合：**将包埋板置于 60℃ 烤箱中聚合 48 h，取出树脂块备用。
- 6、**超薄切片：**树脂块于超薄切片机进行 60–80 nm 超薄切片，用 200 目方华膜铜网捞片。
- 7、**染色：**铜网于 2% 醋酸铀饱和酒精溶液中避光染色 8 min；70% 酒精清洗 3 次；超纯水清洗 3 次；2.6% 枸橼酸铅溶液中避二氧化碳染色 8 min；超纯水清洗 3 次，滤纸稍吸干。将载有切片的铜网放入铜网盒内，室温干燥过夜。
- 8、**图像采集：**透射电子显微镜下观察，采集图像分析。

### 三、结果判读：

- 1、**切片质量：**合格切片应厚度均匀（通常为 60-80nm，干涉色呈银灰色至淡金色），无颤痕、刀痕、撕裂或褶皱。
- 2、**染色对比度：**染色适度，细胞膜、核酸等结构电子密度高、轮廓清晰，与细胞质基质对比明显。背景干净，无大颗粒染色沉淀污染。
- 3、**结构保存：**细胞膜连续，细胞器（如线粒体、内质网）膜结构清晰可辨，无明显肿胀、收缩或空泡化等固定或脱水假象。
- 4、**成像质量：**图像聚焦准确，亮度与对比度适中，无明显的像散、污染或漂移现象。标尺清晰、准确。

### 四、注意事项：

- 1、**固定关键：**样本离体后需立即固定，固定液应新鲜预冷，以保证超微结构的最佳保存。钡酸剧毒且易挥发，所有操作须在通风橱内进行并严格避光。
- 2、**脱水与渗透：**脱水应彻底，避免水分残留导致渗透不均。渗透时间需充足，确保包埋剂完全替换组织中的丙酮。
- 3、**切片操作：**使用锋利的钻石刀，并根据树脂硬度调整切片参数，以获得连续、均匀的切片。
- 4、**染色控制：**铀染和铅染时间需精确。铅染时需避免接触二氧化碳，染色后务必充分清洗，以防醋酸铀结晶或碳酸铅沉淀污染。
- 5、**操作洁净：**所有涉及捞片、染色的器皿及溶液需保持高度清洁，防止引入灰尘、纤维等污染物。

仅供科研用途，不可用于临床诊断！