

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
钻石切片刀	Daitome	Ultra 45°
透射电子显微镜	HITACHI	HT7700/HT7800
200 目方华膜铜网	中镜科仪	BZ11262a
离心机	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司	TG16-W

2、主要实验试剂

试剂	厂家	货号
电镜固定液	biossci	BP0130
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	02660-AB
钨酸	Ted Pella Inc	02602-AB
醋酸双氧铀	Ted Pella Inc	02624-AB
琼脂糖	Solarbio	A8201

二、透射电镜制片步骤

1、取材固定：离心收集细胞或细菌沉淀，4℃固定保存及运输。

1.1 消化离心法

- 1) 确认细胞数量充足（离心后细胞团约1-2个芝麻大小）。
- 2) 电镜专用 2.5% 戊二醛固定液。
- 3) 常规胰酶消化细胞，用完全培养基终止消化，离心收集细胞悬液。把细胞悬液置入洁净 1.5ml 尖头 EP 管内。
- 4) 1000rpm 离心 5-10min，弃去上清，离心后在 ep 管底细胞沉淀成团（细胞团约 1-2 个芝麻大小）。
- 5) 弃去上清，留取致密细胞团，缓慢注入 1ml 常温 2.5% 戊二醛固定液，用牙签挑起，使细胞沉淀不要沉底，室温避光固定 3-5min，转入 4℃ 保存。

1.2 刮除离心法

- 1) 确认细胞数量充足（离心后细胞团约 1-2 个芝麻大小），直接倒出培养液后，弃去多余培养基，迅速加足量常温 2.5% 戊二醛固定 3-5min（戊二醛完全浸没细胞）。
- 2) 随后用细胞铲或细胞刮成 45° 倾角轻柔刮下细胞。顺着一个方向，不要来回刮细胞。
- 3) 将细胞悬液全部转移到 1.5ml 尖头 EP 管内。
- 4) 转速 1000rpm 离心 5min-10min，弃去上清。

5) 细胞沉淀成团(细胞团约1-2个芝麻大小)注入1ml 常温 2.5%戊二醛固定液,用牙签挑起,使细胞沉淀不要沉底,转入4°C保存。

1.3 .悬浮细胞

将细胞悬液全部转移到1.5ml 尖头 EP 管(或者15ml尖底离心管)内,转速1000rpm 离心5-10min成团(细胞团约2个芝麻大小),轻轻吸去上清液(切勿丢失细胞),再沿管壁缓缓加入 1ml 常温 2.5%戊二醛,,用牙签挑起,使细胞沉淀不要沉底,室温避光固定3-5min,转入4°C保存。

2、琼脂预包埋:细胞悬液用离心机1200rpm离心5min,弃上清加入 0.1M 磷酸缓冲液 PB (PH7.4),混匀漂洗 3min 后再1200rpm离心5min,重复洗涤 3 次。弃去上清,细胞沉淀中提前加热溶解制备 1%琼脂糖溶液,稍冷却后加入 EP 管内,在琼脂糖凝固之前将细胞沉淀用镊子挑起悬浮包裹于琼脂糖内。

3、后固定: 0.1M 磷酸缓冲液 PB (PH7.4) 配制的 1%锇酸避光室温固定 2h。0.1M 磷酸缓冲液 PB (PH7.4) 漂洗 3 次,每次 15min。

4、室温脱水:组织依次入 30%-50%-70%-80%-95%-100%-100%酒精上行脱水每次 10min,100%丙酮两次,每次 10min。

5、渗透包埋:丙酮:812 包埋剂=1:1, 37°C 2-4h, 丙酮:812 包埋剂=1:2, 37°C 渗透过夜,纯 812 包埋剂 37°C 5-8h。将纯 812 包埋剂倒入包埋板,将样品插入包埋板后 37°C烤箱过夜。

6、聚合:包埋板放于 60°C烤箱聚合 48h,取出树脂块备用。

7、超薄切片:树脂块于超薄切片机 70nm 超薄切片,200 目方华膜铜网捞片。

8、染色:铜网于 2%醋酸铀饱和酒精溶液避光染色 10min;超纯水清洗3 次;枸橼酸铅溶液避二氧化碳染色 10min;超纯水清洗 3 次,滤纸稍吸干。铜网切片放入铜网盒内室温干燥过夜。

9、透射电子显微镜下观察