



中国科学院水生生物研究所
INSTITUTE OF HYDROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES

中科院水生所

透射电镜样品制备技术 及其应用

分析测试中心
邢振飞
2020.06.05

报告内容

- 一、电子成像技术平台情况简介**
- 二、电镜样品制备技术的原理**
- 三、电镜样品制备技术的应用**
- 四、免疫电镜技术的原理**
- 五、免疫电镜技术的应用**

电子成像技术平台情况简介



透射电镜



场发射扫描电镜



冷冻电子显微镜系统



超薄切片机



微波电镜组织处理机



全自动修块机



全自动组织包埋机



全自动染色机



冷冻干燥机



离子溅射仪

蛋白-病毒--细菌--细胞--组织
全套电子成像技术服务及配套设备

超薄切片仪器设备



Leica EM UC7 超薄切片机

主要用于**超薄**和**半薄切片**



组织处理机

主要用于**固定**，**漂洗**、**脱水**，**渗透**

超薄切片仪器设备



微波组织处理机

主要用于**渗透、包埋、聚合**



Leica EM TRIM2 修块机

主要用于**研磨修块**

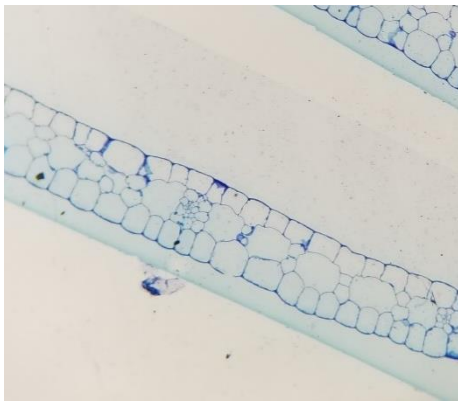
报告内容

- 一、电子成像技术平台情况简介
- 二、透射电镜样品制备技术的原理**
- 三、透射电镜样品制备技术的应用
- 四、免疫电镜技术的原理
- 五、免疫电镜技术的应用

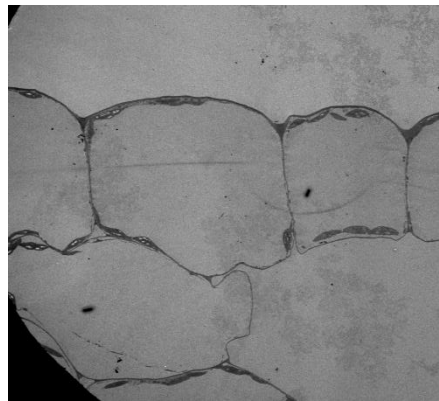
透射电镜样品制备技术

样品制备技术:

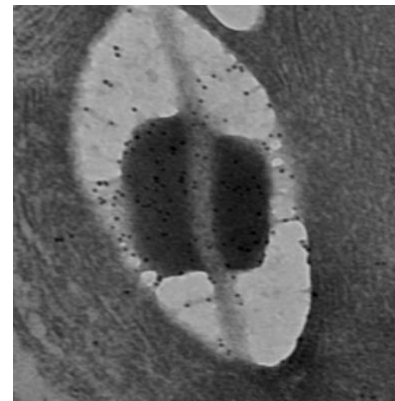
包括半薄切片技术、超薄切片技术、免疫电镜技术、负染色技术等



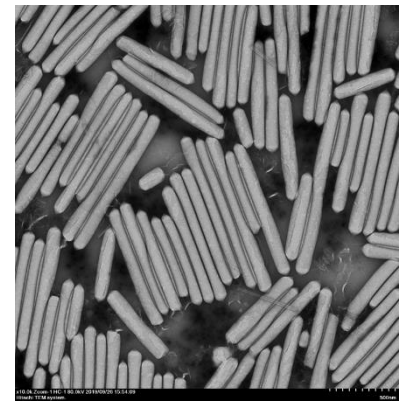
半薄切片



超薄切片



免疫电镜



负染

电子显微镜制样发展历程

年代	研究者	电子显微镜制样技术
1934	Marotn	发表了第一张 生物组织 茅膏菜属植物叶切片的电子显微图
1946	Williams和Wyckoff	将金属投影用于增加电镜图象反差
1947	Claude	开始使用铀固定剂
1949	Neumann	甲基丙烯酸酯被用作包埋介质
1950	Latta和Hartmann	用玻璃刀进行 组织切片
1952	Palade	将 缓冲液与钨酸 混合，作为组织固定液
1956	Palade和Siekevitz	用电子显微镜分析细胞碎片
1953	Porte r和Blum	介绍切片机和切片技术
	Molan	使用 钻石刀 进行 超薄切片 ，并创立冷冻超薄切片术
1955	Hall和Huxley	以 磷钨酸为负染色剂 观察了灌木病毒及烟草花叶病毒的超微结构
1956	Luft	高锰酸钾作为固定剂
1956	Glauert	环氧树脂 作为包埋介质
1958	Watson	介绍用重金属 铅和铀 对组织切片进行染色
1959	Moran	采用冷冻置换技术制备生物样品.
1961	Luff	介绍Epon包埋介质
1957	Steere	开始研究冷冻断裂技术
1963	Sabatini及同事	用戊二醛作预固定液保存细胞超微结构及活性，进行细胞化学方面研究

常用固定剂

戊二醛

优点：渗透能力强，组织块可长期保存，能固定核酸，安全。电镜**最常用固定剂**。

缺点：没有电子染色作用。

钨酸

优点：能与蛋白质、脂类结合形成密度，可以电子染色

缺点：**渗透能力弱**，不能固定**核酸、糖原**，有**剧毒**。

多聚甲醛

优点：能和蛋白质、脂类核酸等起反应，并**保存部分细胞内酶的活性**，适合**免疫电镜**。

缺点：反应速率较慢，对微细结构保存和组织反差不如戊二醛。

高锰酸钾

优点：是磷脂蛋白结构优良的固定剂，保存**膜系统良好**（质膜、神经髓鞘、内质网、叶绿体类囊体等）

缺点：细胞内的颗粒纤维结构固定效果不佳

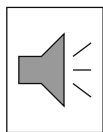
植物组织取材



- 取大片叶子(0.5cm^2)于预先准备好的戊二醛中 4°C 固定1h
- 将预先固定的叶片放到滴有预冷固定液的载玻片上，把叶片切成细长条 ($1-2\text{mm}^2$)
- 随后将修剪好的叶片移至装有预冷固定液的离心管内
- 最后置于 4°C 冰箱内固定过夜

动物组织取材

- 将动物麻醉或急性处死，再解剖暴露的所需脏器。
(可以先将带有多余组织的脏器直接固定30min)
- 再将多余组织去掉，再把所取脏器切成小块 (1-2mm³)
- 将小块移至固定液中最后置于4℃冰箱内固定过夜



针对一些体积小于0.5cm的鱼类可以直接放进固定液中固定

取材小技巧

野外取材:冰壶或冰盒内放一瓶预冷的戊二醛固定液，先切取比标准要求稍大的组织块，放入冰壶或冰盒内保存的固定液中，带回实验室后，再按要求切成标准小块或小条进行固定。对于植物材料，还可以采集植株**保湿**带回实验室，再进行取材。

浸泡固定:是最常用的固定方法。组织块切小后立即浸到大量固定液中。使用青霉素小瓶或者圆底2ml离心管，每瓶放组织块6块左右，4°C固定2-4小时或更长时间。适用于各种实质性器官，如**心肝、肾、肌肉**等。

送样指南

1、所内样品：将样品取好后直接送到分析测试中心3楼320透射电镜样品前处理室，或者先到透射电镜样品前处理室取固定液自己先固定再送样。

细胞类样品：允许离心的离心去上清后加固定液。

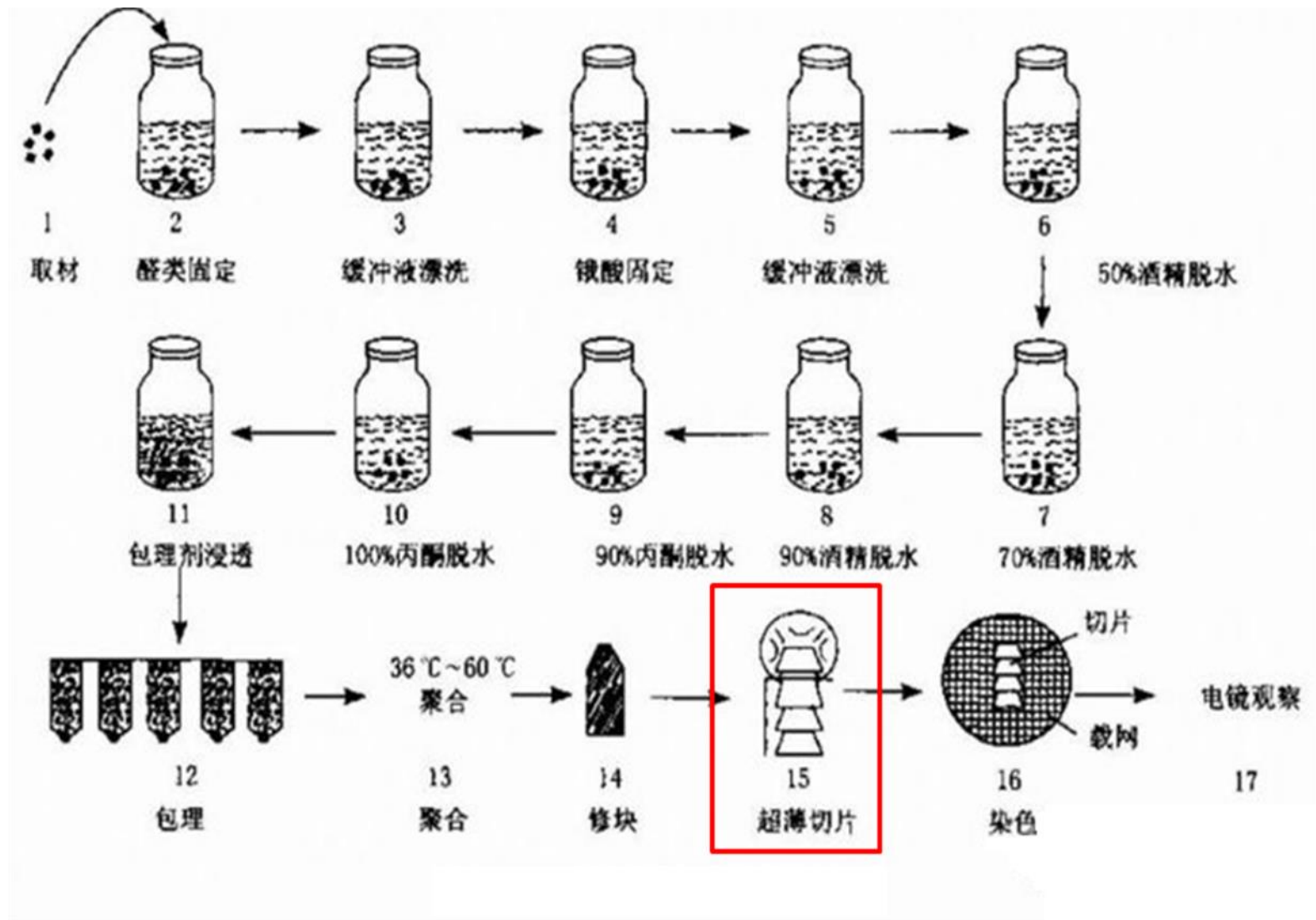
不可以离心的可以将带有样品的培养基一起送到电镜样品前处理室沟通固定方法。

2、所外样品：将样品取好后直接加入固定液先4℃固定过夜再冰盒邮寄送样。

细胞类样品：允许离心的离心去上清后加固定液。

不可以离心的可以将带有样品的培养基一起加入一定体积的固定液原液进行固定。

制样流程



新鲜样品



化学固定



常温脱水

包埋/聚合



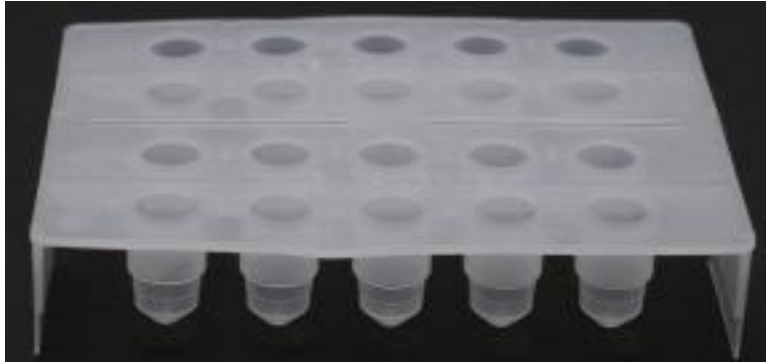
修块



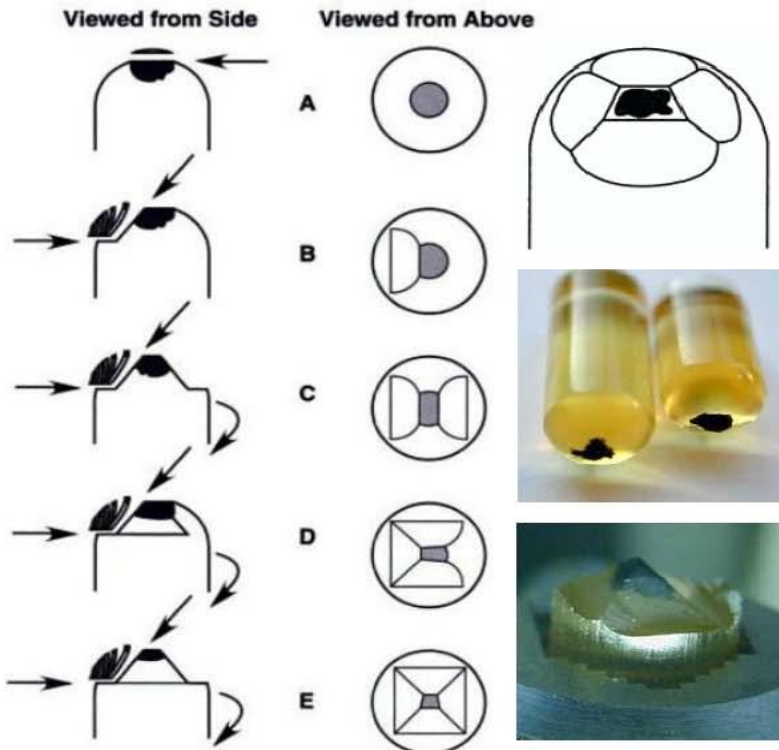
常温切片



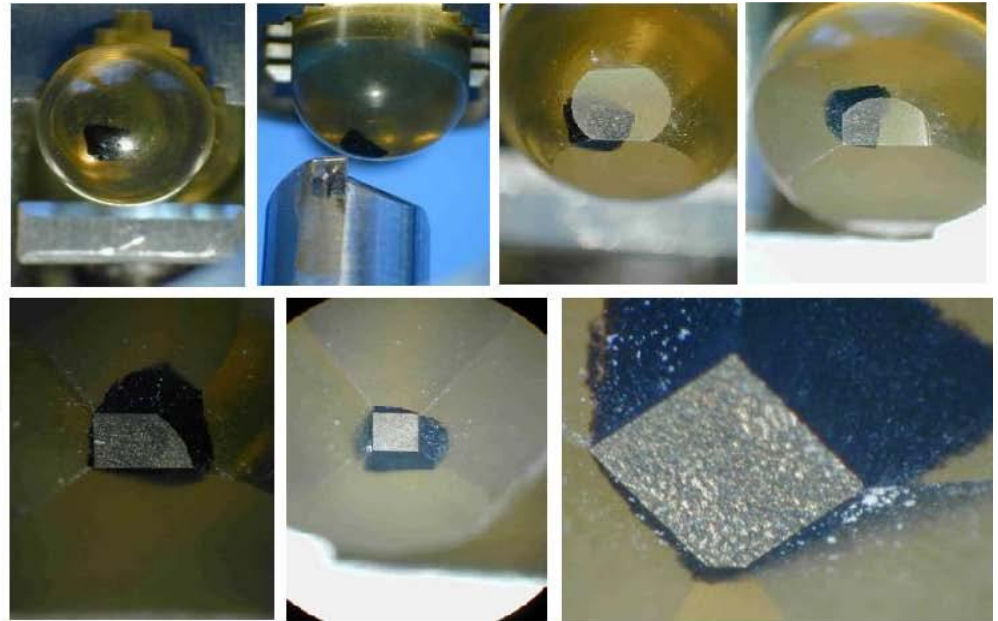
包埋聚合



组织修块



手动修块



修块机修块

组织切片

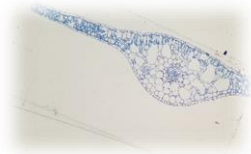


切片机



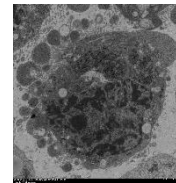
玻璃刀切片

厚度 $0.5-2.5\ \mu\text{m}$



钻石刀切片

厚度 $70-75\text{nm}$



染色方法

甲苯胺蓝染色法：

甲苯胺蓝1g，硼酸钠1g。蒸馏水100ml。硼酸钠先溶于水，配成1%的水溶液，然后将甲苯胺蓝溶于该溶液中，配成1%的甲苯胺蓝染色液。

亚甲基蓝染色法：

亚甲基蓝1g，硼酸钠1g。蒸馏水100ml。硼酸钠先溶于水，配成1%的水溶液，然后将亚甲基蓝溶于该溶液中，配成1%的甲苯胺蓝染色液。

染色方法

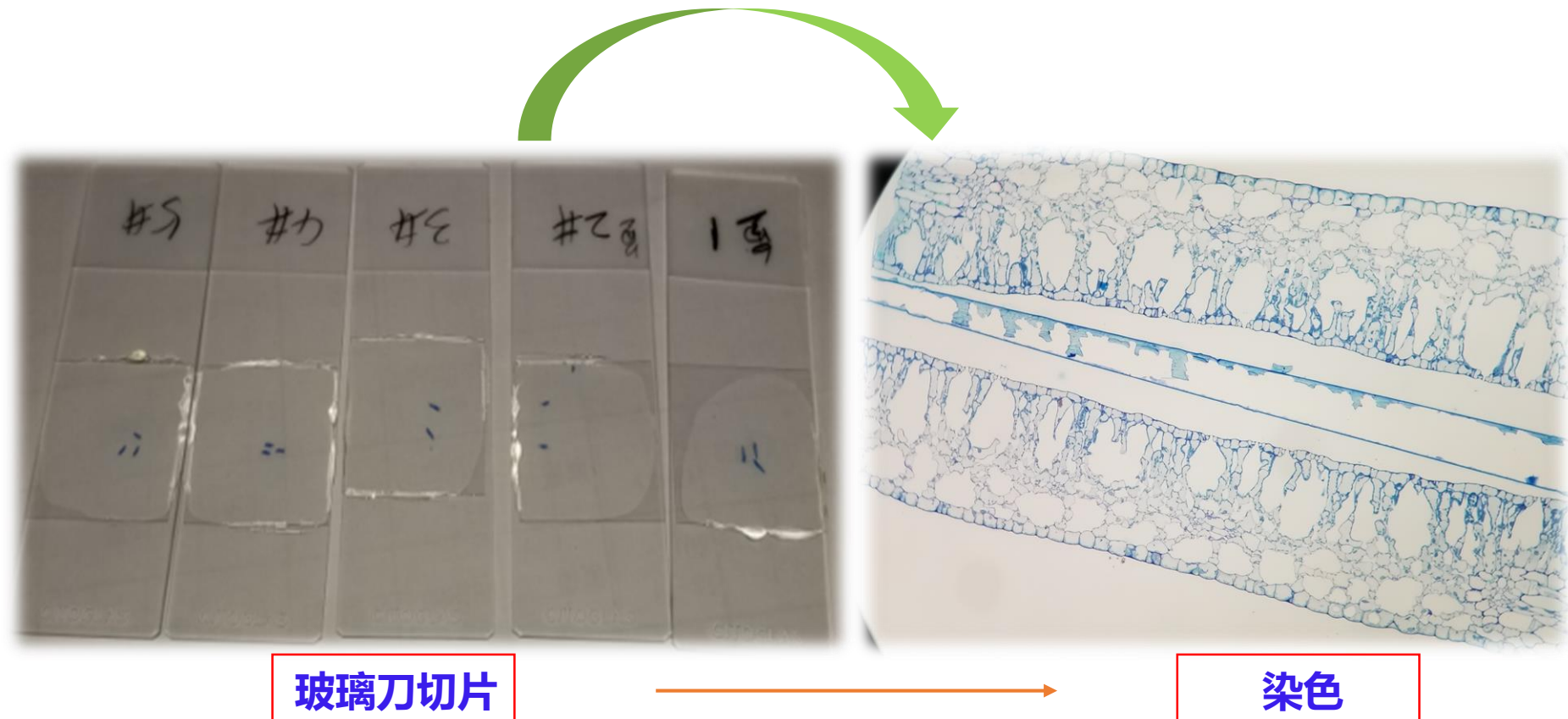
醋酸双氧铀染色法：

可以提高核酸、蛋白质和结缔组织纤维成分的反差，对膜的染色效果较差；常用浓度为**2%**酒精（50%或70%）溶液，切片染色可在室温或37℃环境里进行，时间为15~30分钟

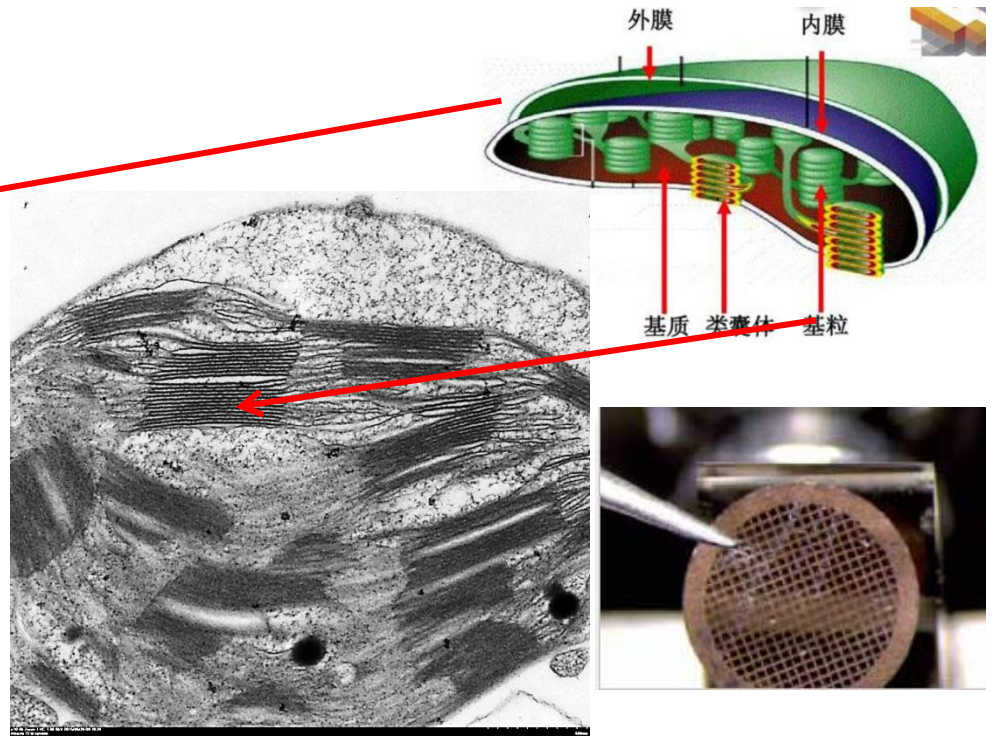
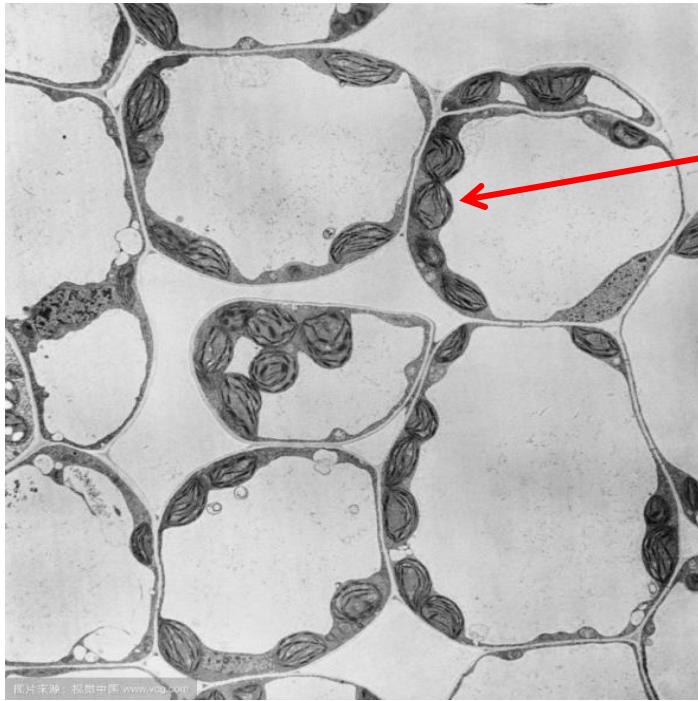
柠檬酸铅染色法：

硝酸铅1.33g，柠檬酸铅1.76g。蒸馏水30ml。将药品依次加入50ml容量瓶中，振荡5min，间歇摇荡30min，直至溶液呈乳白色悬浮液，加入1mol/L NaOH 8mL，溶液立即清澈透明，最后加入蒸馏水定容50mL。

半薄切片



超薄切片

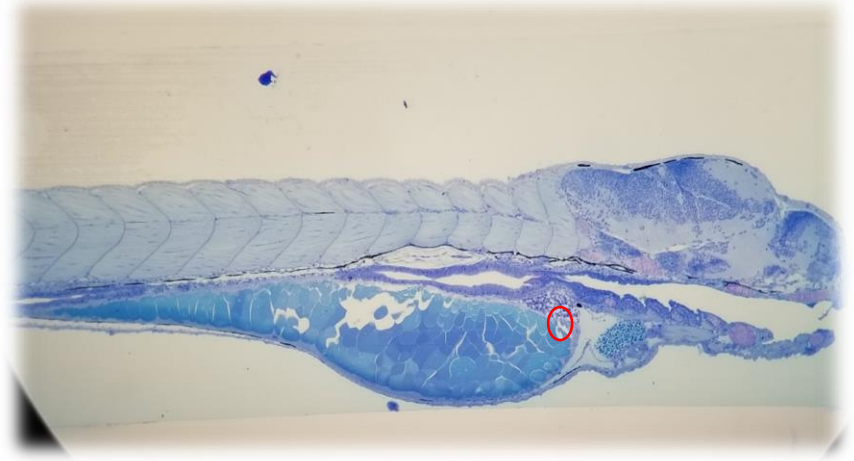


活体与切片的结合

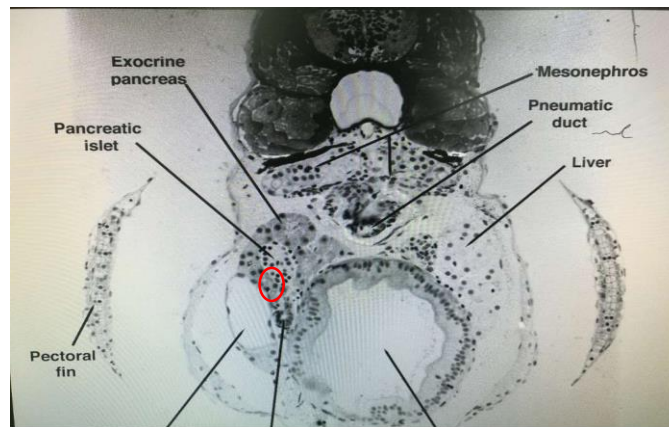
荧光显微镜 观察



半薄切片纵切面 观察



半薄切片横切面 观察

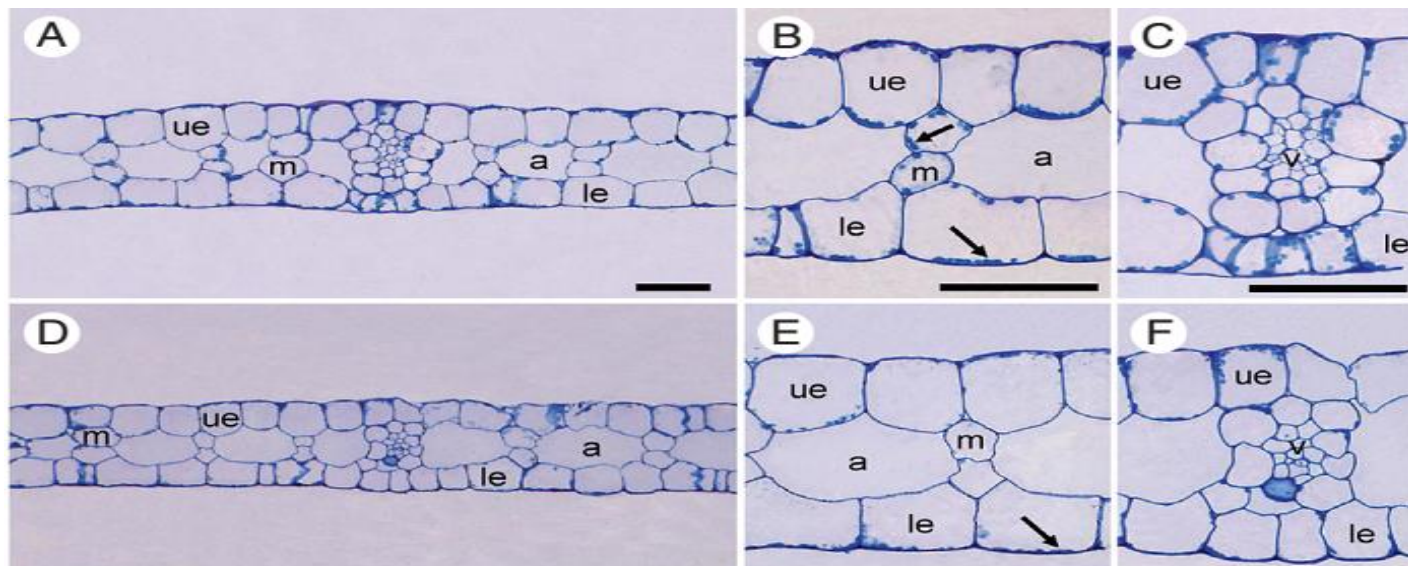


报告内容

- 一、电子成像技术平台情况简介
- 二、透射电镜样品制备技术的原理
- 三、透射电镜样品制备技术的应用**
- 四、免疫电镜技术的原理
- 五、免疫电镜技术的应用

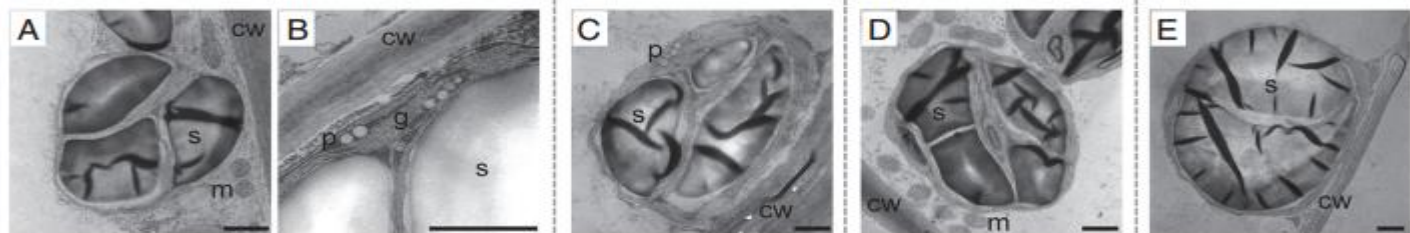
水车前叶片

半薄切片



HC-acclimated

超薄切片



LC-acclimated



Epidermal cells (Dusk)

Epidermal cells (Dawn)

Mesophyll cells (Dusk)

Mesophyll cells (Dawn)

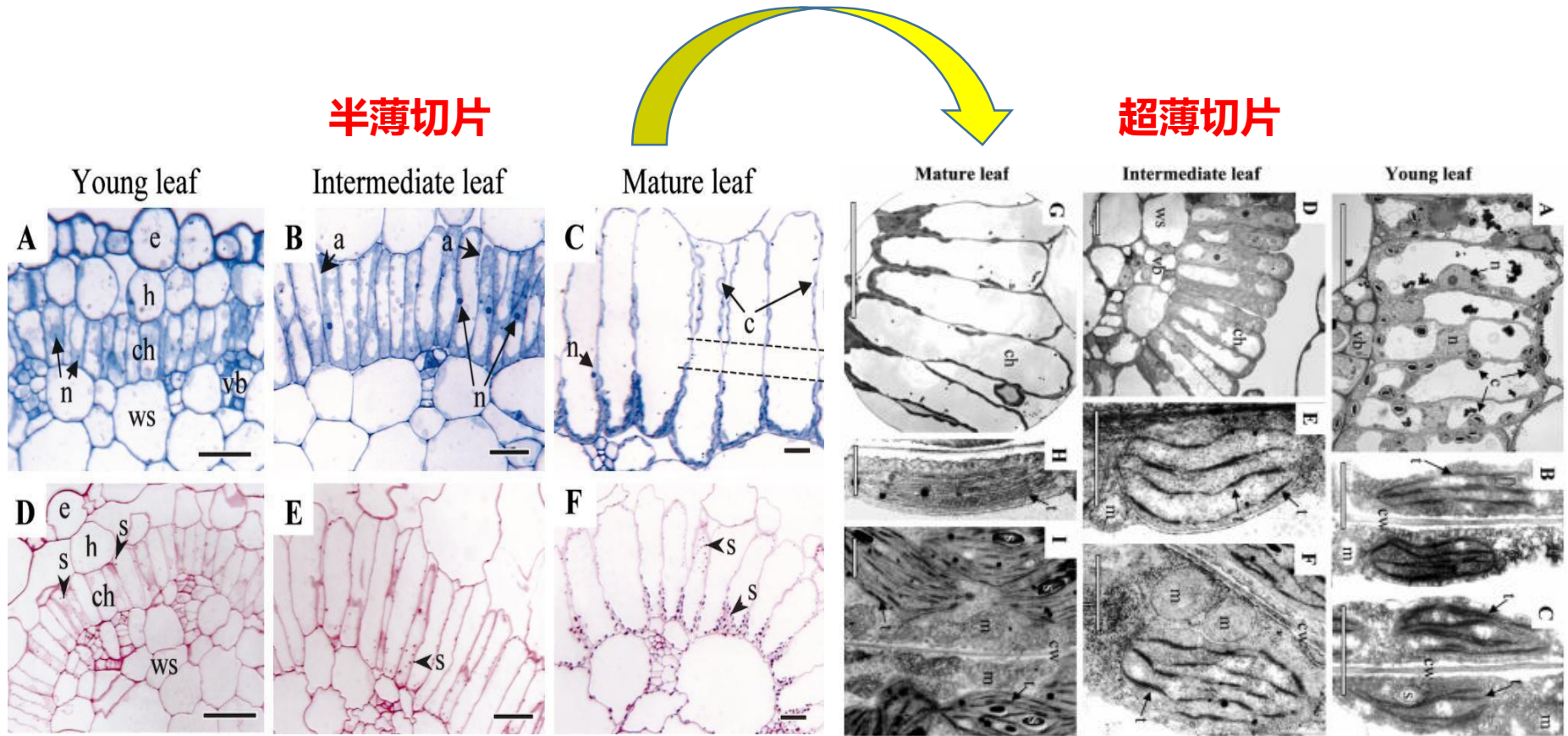
光合作用与结构之间的联系的研究，光镜与电镜结合

Shijuan, Han, et al. *Annals of Botany* 6:6. 2020. DOI: 10.1093/aob/mcaa005

异子蓬叶片

半薄切片

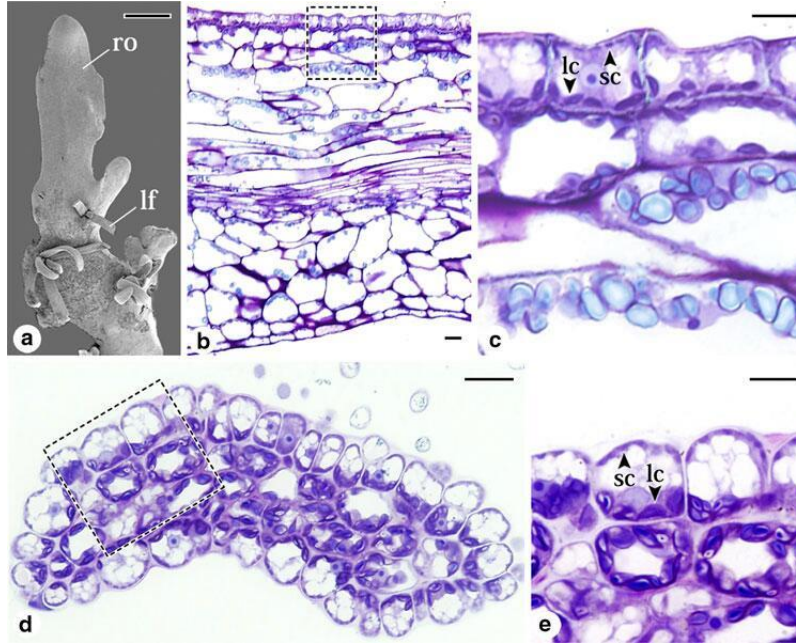
超薄切片



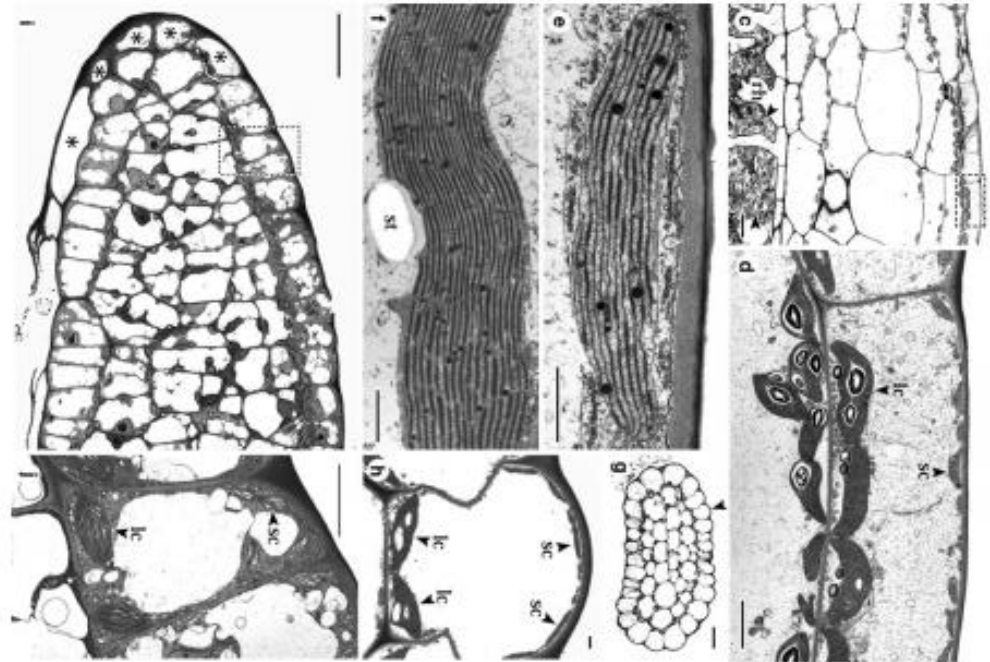
陆生植物中细胞器分布的研究，光镜与电镜结合

河苔草科植物叶片

半薄切片



超薄切片

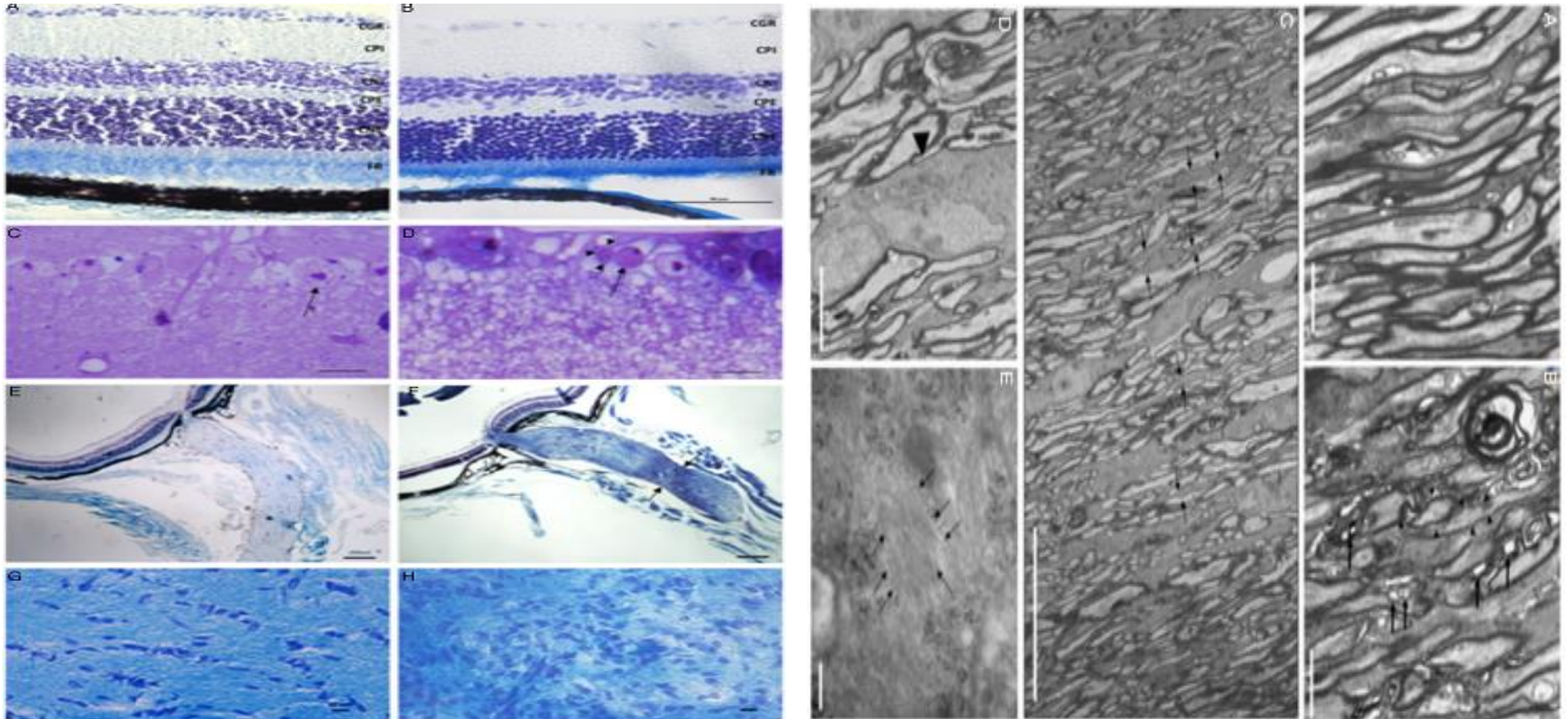


河苔草科植物中叶绿体分布及叶绿体形态的研究

小鼠视网膜

半薄切片

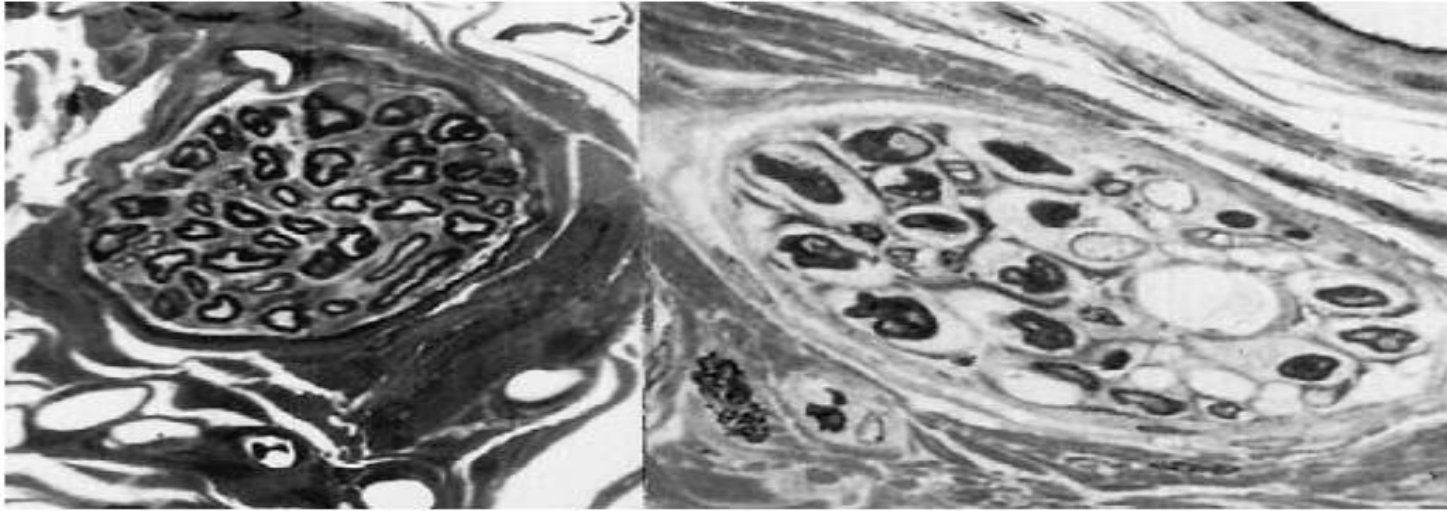
超薄切片



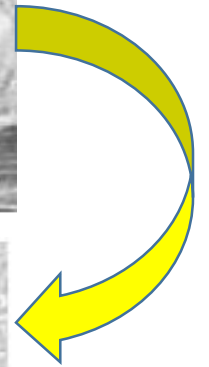
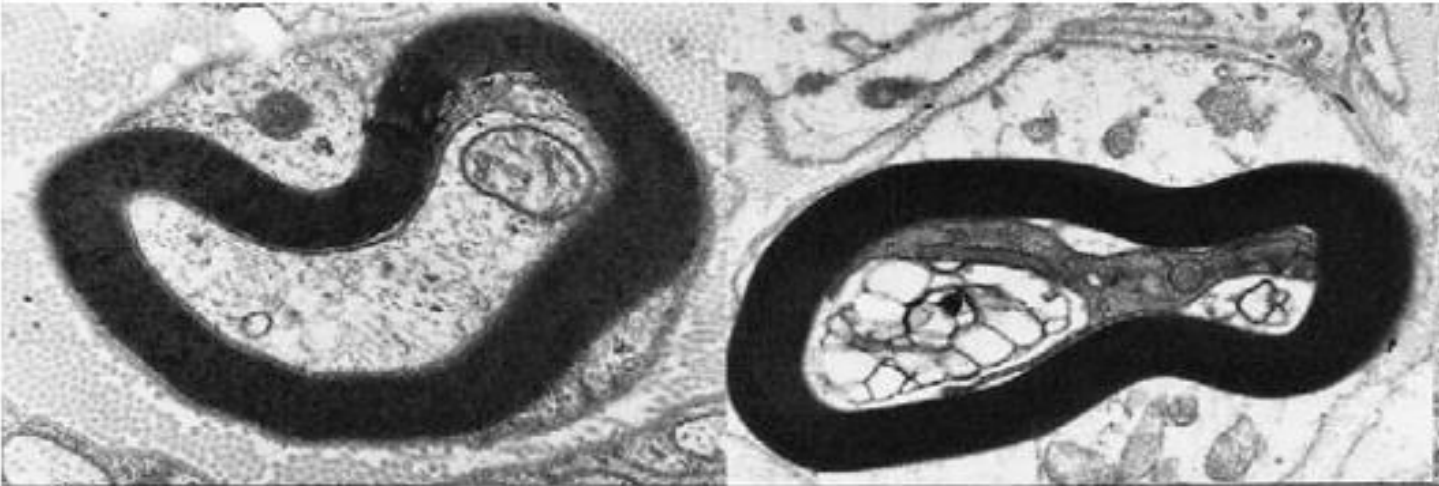
小鼠视网膜神经节细胞的研究

小鼠爪部皮下神经细胞

半薄切片

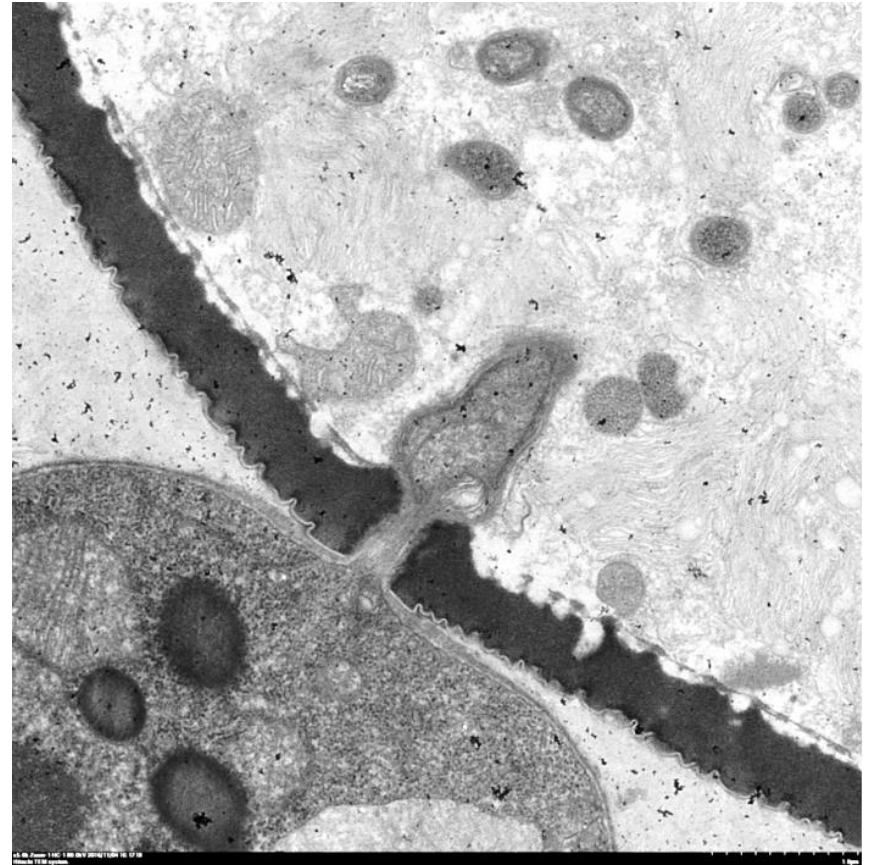
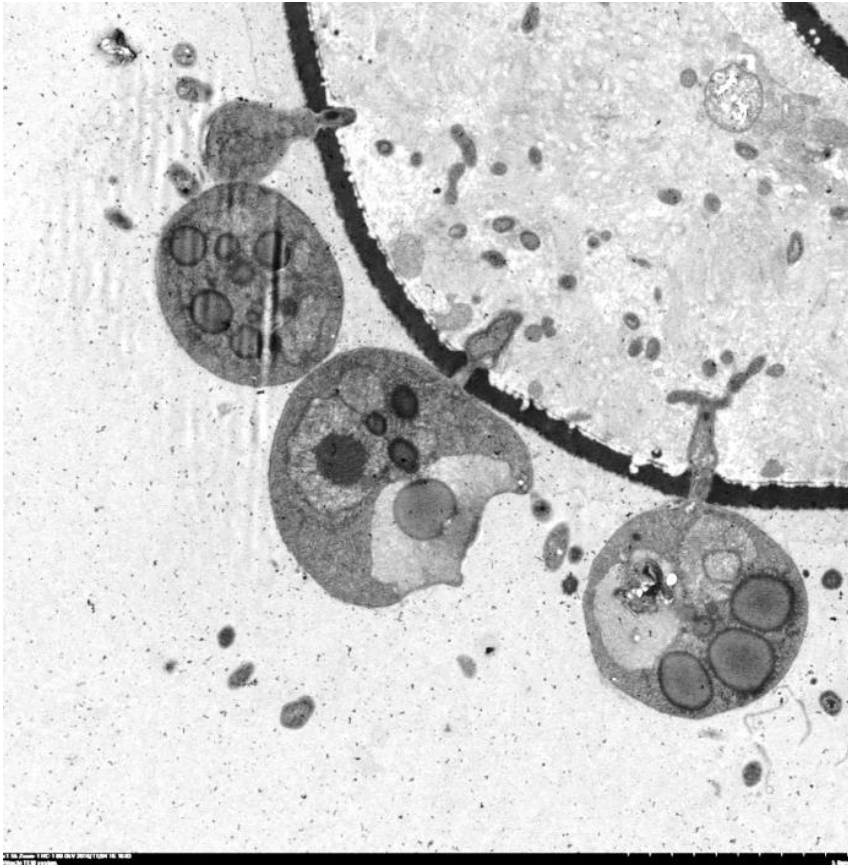


超薄切片



药物诱导小鼠四肢皮下神经细胞病变的研究

半薄定位到电镜观察

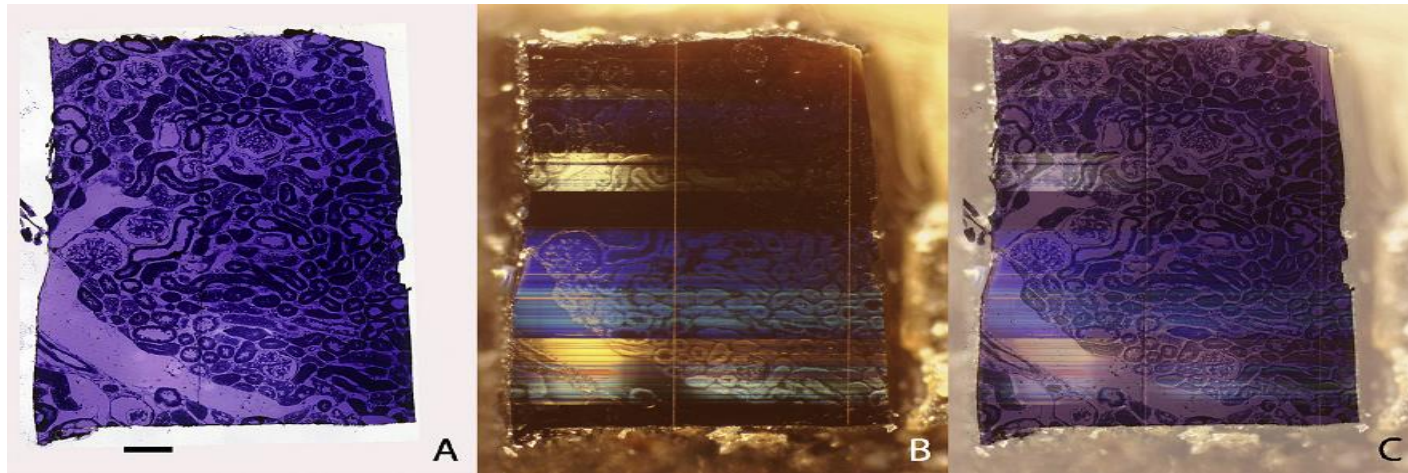


真菌入侵藻细胞过程

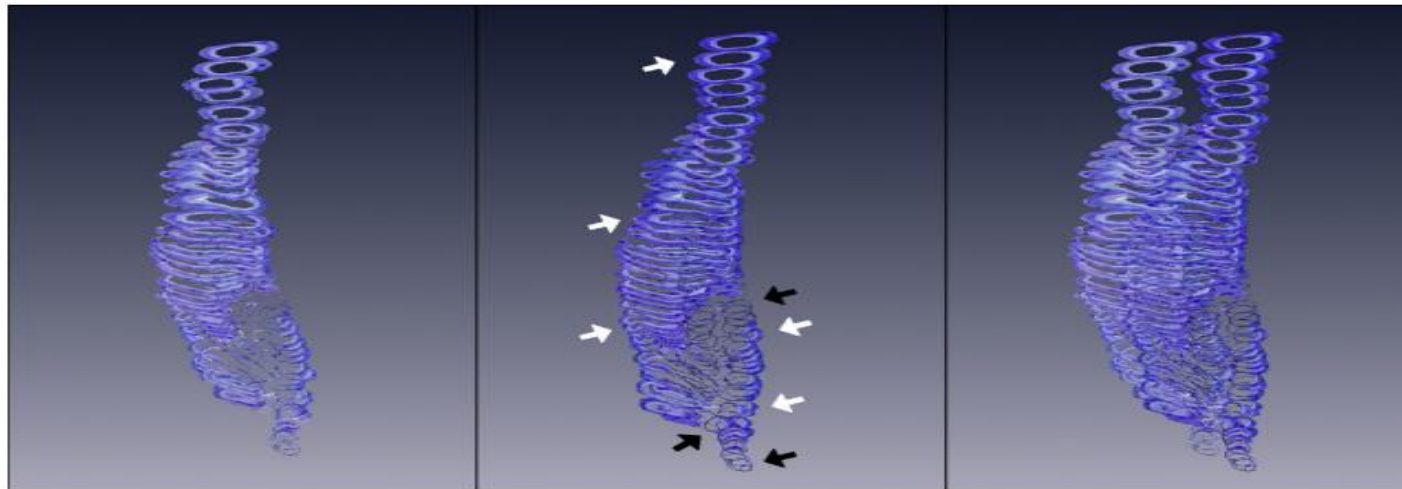
利用**半薄切片定位**，目标附近连续切片，染色观察从大量切片中进行海选所得。

小鼠肾脏的三维重建

半薄切片



三维重建



三维重建近曲小管 (PT) 到细降支 (DTL) 的镶嵌带

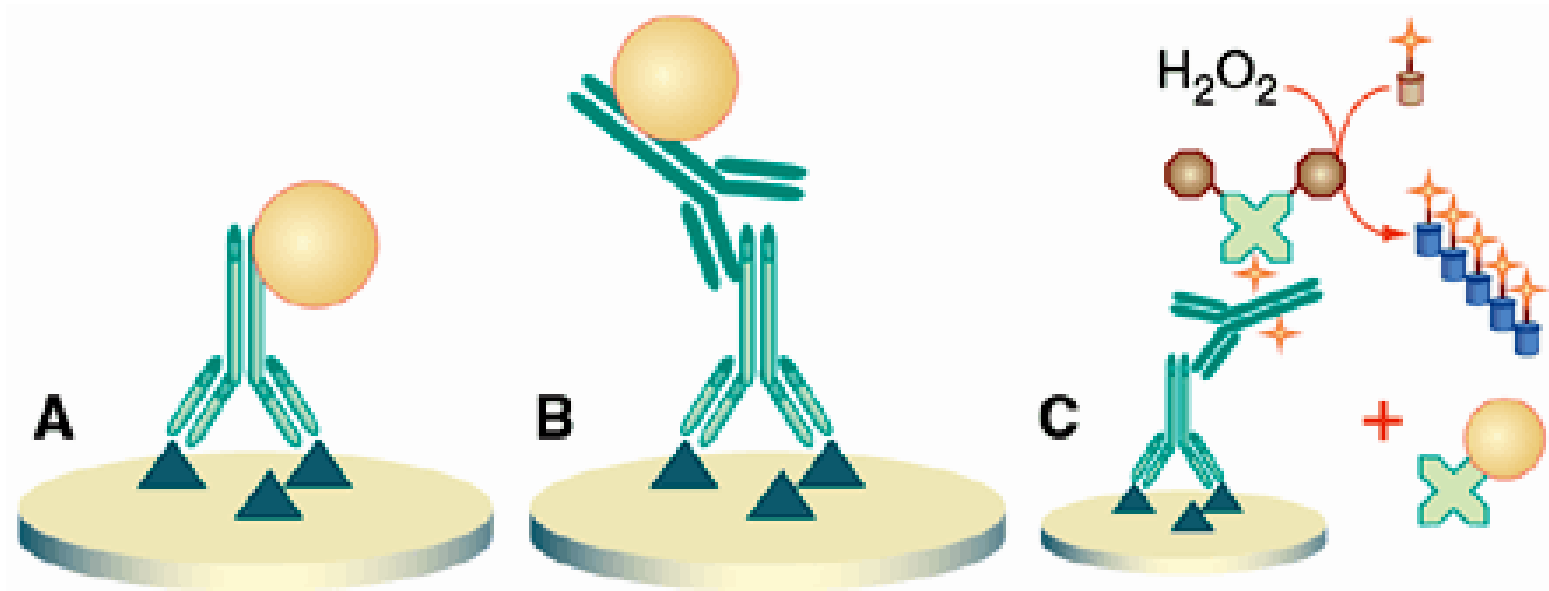
报告内容

- 一、电子成像技术平台情况简介
- 二、透射电镜样品制备技术的原理
- 三、透射电镜样品制备技术的应用
- 四、免疫电镜技术的原理**
- 五、免疫电镜技术的应用

免疫细胞化学发展历程

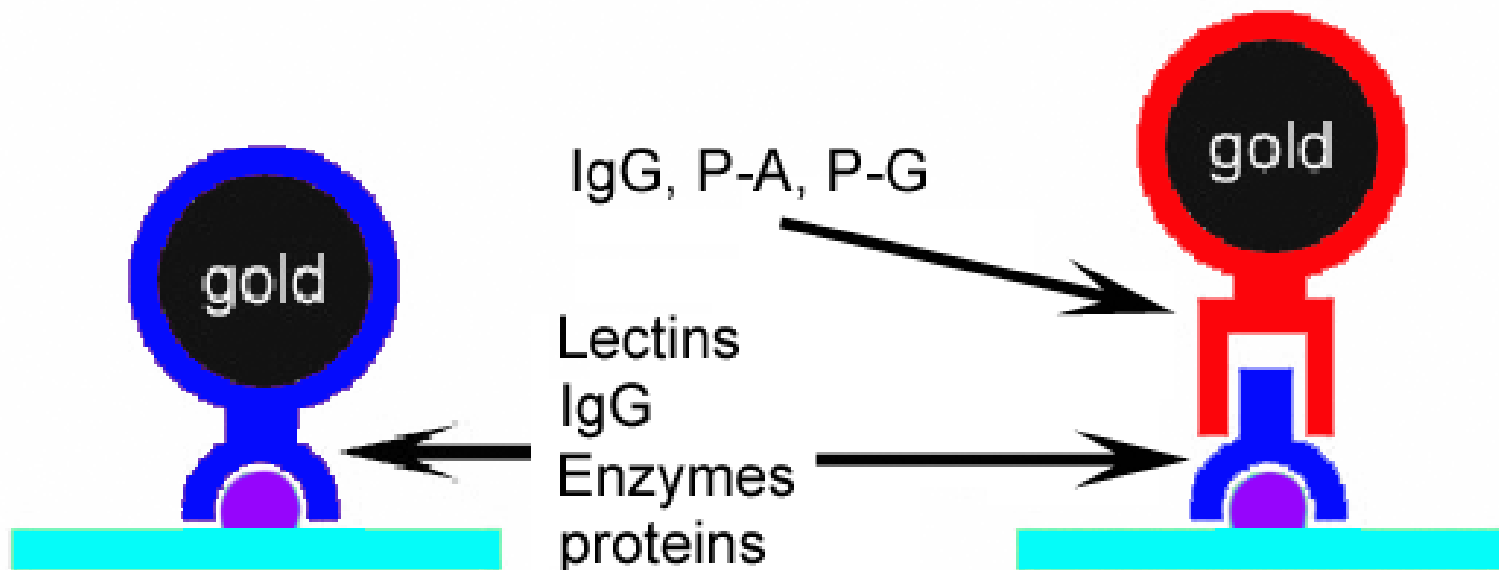
年代	研究者	免疫电子显微镜技术
1939	Kausche he和Ruska	对蛋白质吸附于胶体金进行探讨
1939	Horisberger	将蛋白质吸附于胶体金方法用于扫描电子显微镜
1956	Coons	建立免疫荧光技术
1959	Singer	建立马脾铁蛋白标记抗体的方法
1962	Feldherr和Marshall	胶体金颗粒作为一种示踪物用于电子显微技术研究
1971	Faulk和Taylor	胶体金作为抗血清特异标记物用于透射电子显微镜
1974	Romano及同事	首次制备蛋白质A-金复合物（间接免疫金染色法）
1977	Horisberger及同事	建立了制备免疫球蛋白金颗粒基本方法
1978	Rpth及Bendayan	提出包埋后免疫金标记技术
	Geoghegan	发表了胶体金标记物在光镜水平的应用

免疫细胞化学原理示意图



抗 原 - 抗 体 - 标 记 物

标记方式示意图



直接标记

间接标记

直接标记：操作便捷，特异性高。但**敏感性差**

间接标记：敏感性较高，可**提高5-10倍**

包埋剂的选择

➤ 常规包埋剂：**Epon 812**, Spurr

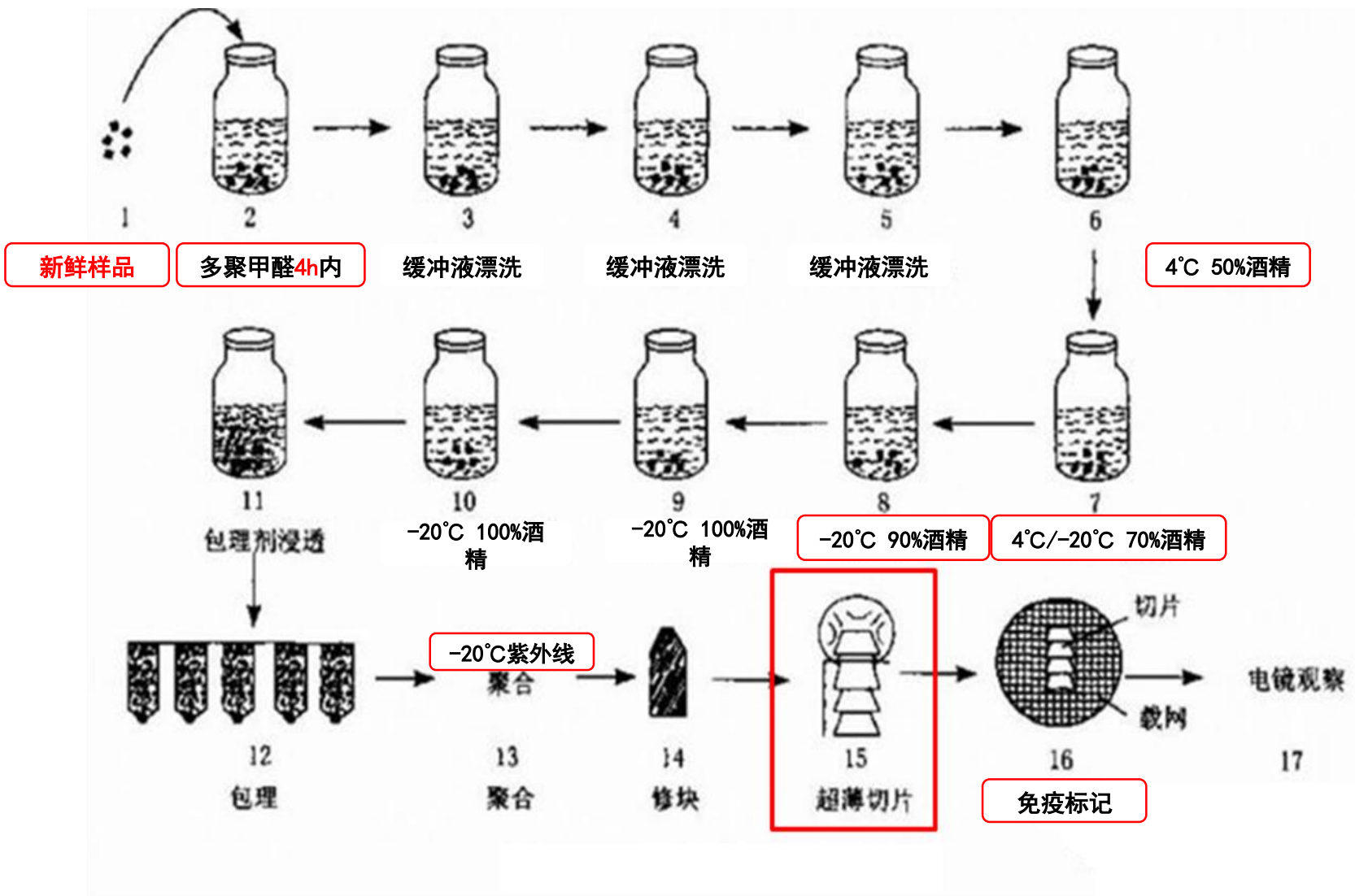
植物和真菌细胞壁成分、凝集素探针标记的糖基等的标记。

➤ 低温或水溶性包埋剂：**K4M**, LR White, LR Gold

多用于蛋白类的标记



制样流程

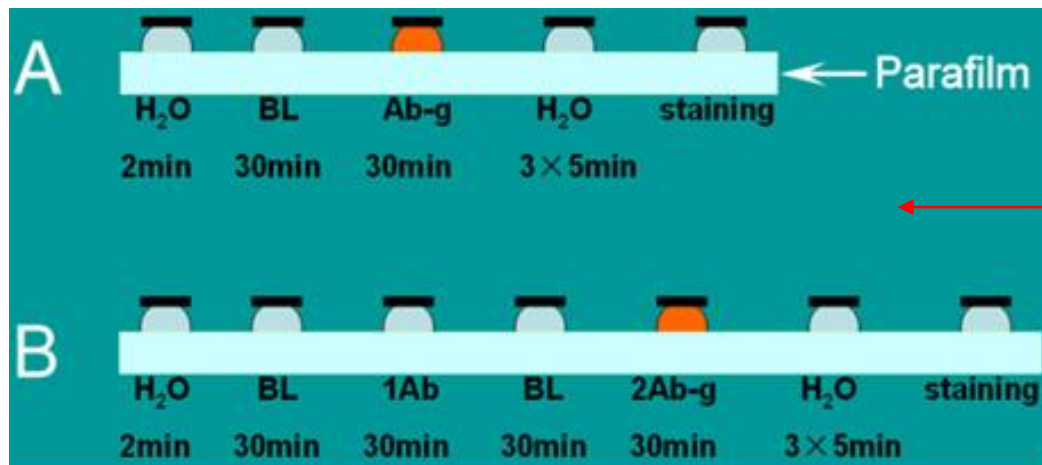


送样指南



取新鲜样品于离心管中 直接加入固定液（3%多聚甲醛+0.05%-0.1%戊二醛）固定后立即送样。固定时间不要过久，以免抗原失活。便于携带的植株可以直接带植株。抗体自备！！！！

免疫标记流程



免疫金标记操作流程示意图
(A.直接标记；B.间接标记)

实际操作 间接标记

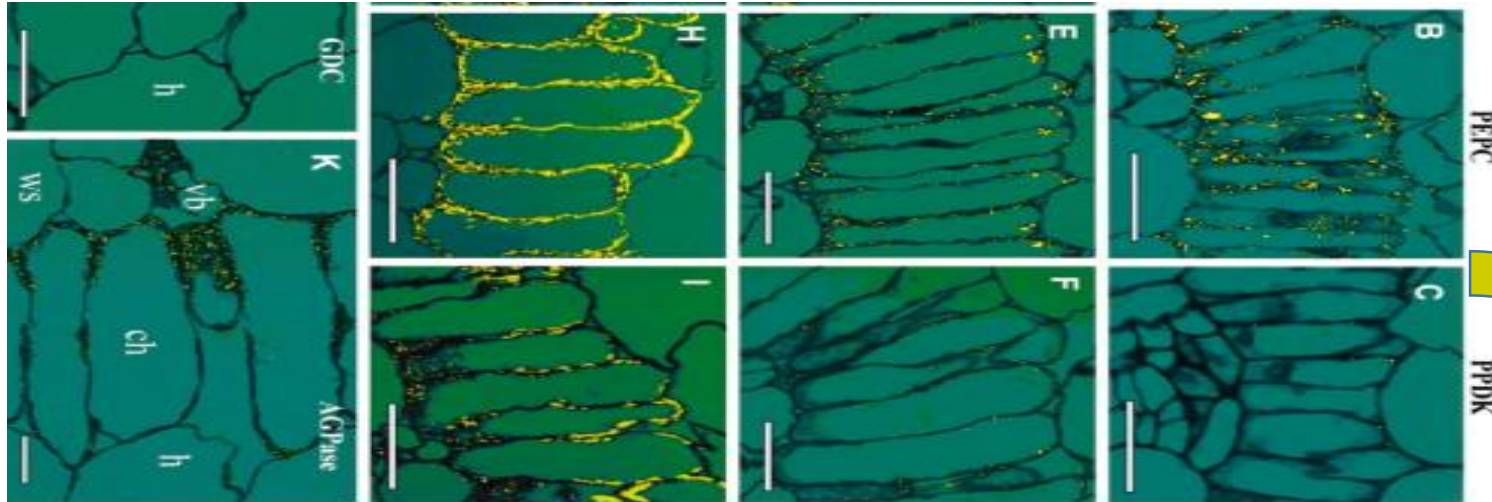


报告内容

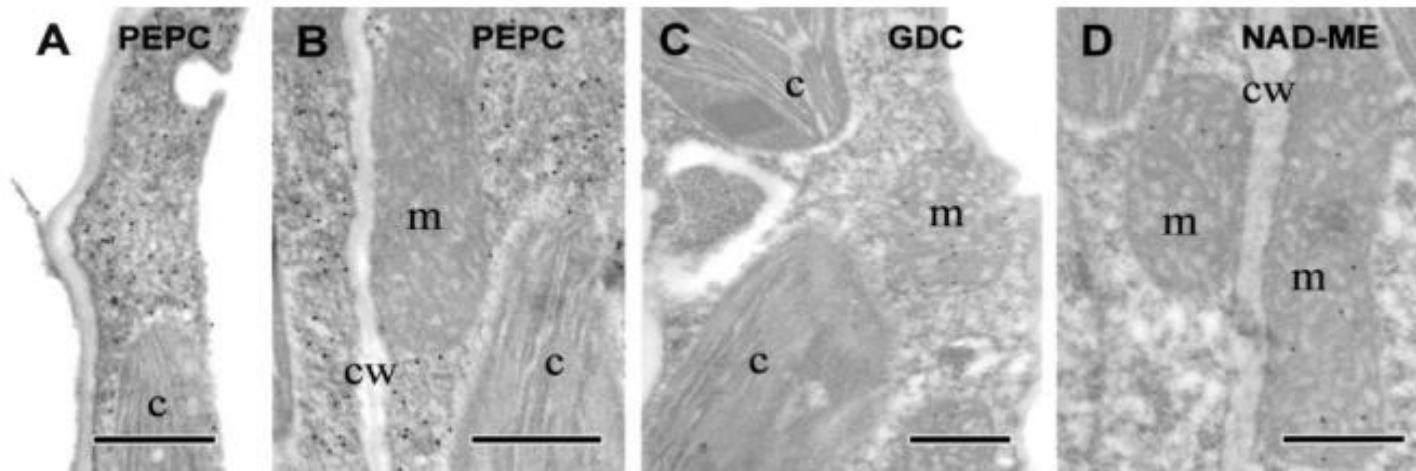
- 一、电子成像技术平台情况简介
- 二、透射电镜样品制备技术的原理
- 三、透射电镜样品制备技术的应用
- 四、免疫电镜技术的原理
- 五、免疫电镜技术的应用**

免疫电镜技术

免疫组化

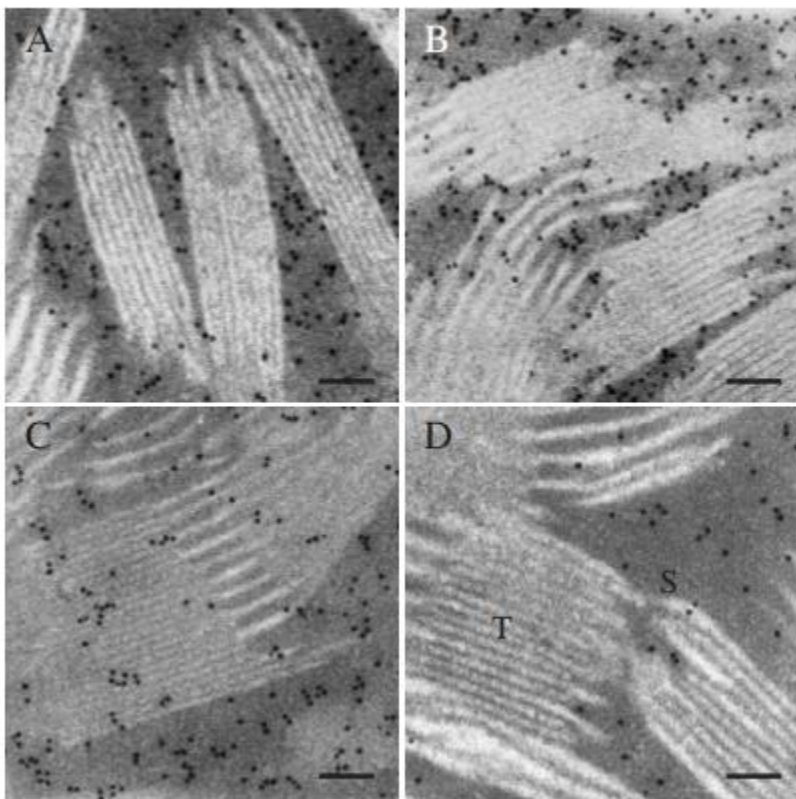


免疫电镜

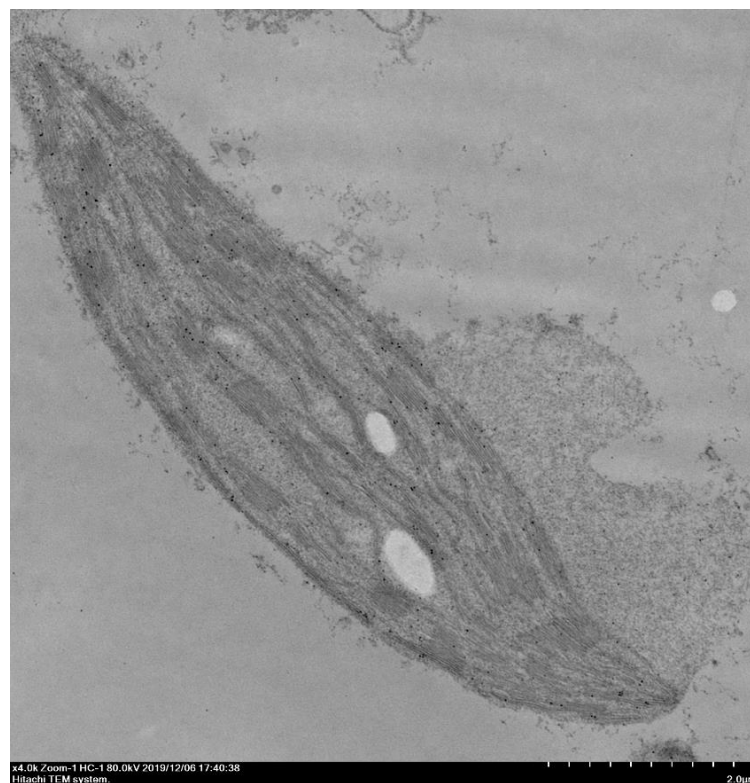


免疫组化与免疫电镜的结合观察PEPC酶的定位

免疫电镜技术

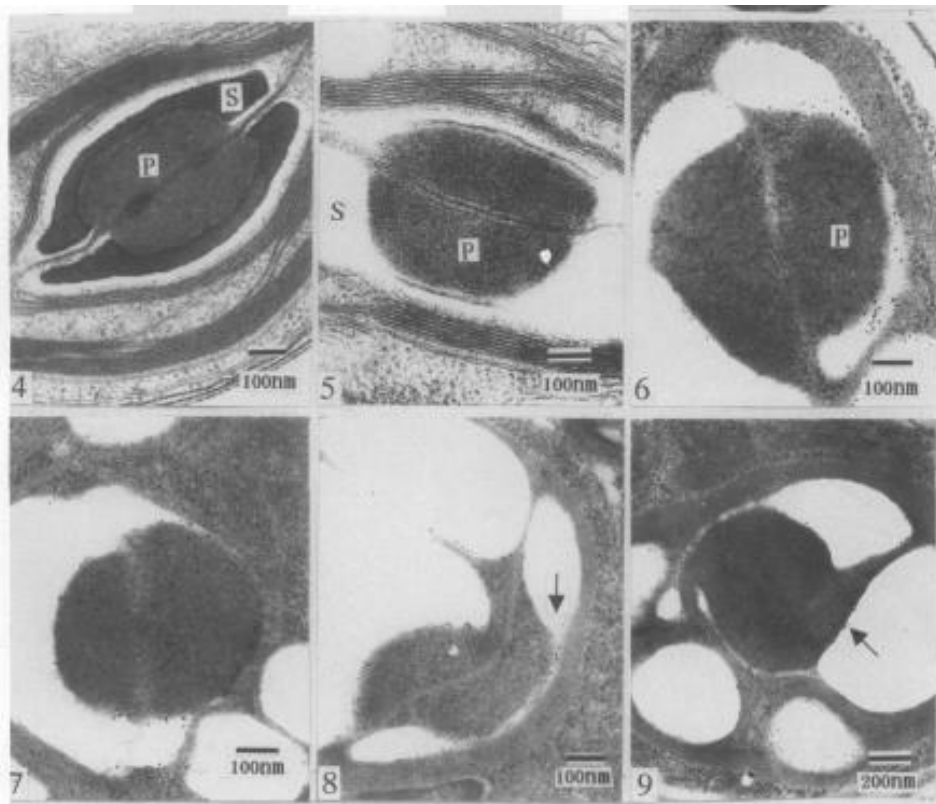


水稻叶片叶绿体上
Rubisco酶定位A-B
RCA酶定位C-D



拟南芥叶绿体上的Rubisco酶定位

免疫电镜技术



Rubisco酶分布 较集中于淀粉核的表面，
显示了淀粉核与光合作用的密切关系



观察绿藻淀粉核上Rubisco酶的标记结果

谢 谢

欢迎来中心技术交流！



肖 媛

TEL : 68780321/13517197620

MAIL : xiaoyuan@ihb.ac.cn

邢振飞

TEL : 68780321/18571580302

MAIL : xingzhenfei@ihb.ac.cn

QQ群 : 291 421 172