

生物样品透射电镜取材注意事项

|  |  |
| --- | --- |
| 样品的取材与固定是生物电镜技术中最关键的一步，样品的质量直接决定了 电镜数据的质量。取材导致的结构差，后期实验中无法补救。对取材的基本要求 是：确保样品尽可能接近自然生活状态，同时确保位置准确。 |  |
| 需要的器材：2.5%电镜专用戊二醛、PBS 或生理盐水、锋利的手术刀、镊子、牙签、吸管、 封口膜、细胞刮、离心机、切割板 (光盘或塑料盘) 、0℃碎冰 (不要冰袋) 、1.5ml 尖头 ep 管、铅笔、记号笔。 |
| 一、动物组织取材流程及要求取材流程：与时间赛跑，争分夺秒。1、试剂、容器、器械 4℃预冷，取材冰上操作 (0℃碎冰，不要冻存的冰袋，无条件可室温) 。提前滴一些 2.5%戊二醛在切割板上；2、动物麻醉/处死，快速打开需要取材的位置。趁血液还在流动时，迅速切取一块组织，生理盐水或 PBS 快速冲洗后浸泡到切割板上的戊二醛中进一步切割；有方向性的样品：如肌丝、脊髓、肠道、血管等，沿着组织伸展方向切成 1mm\*1mm\*3mm 的长条， 以便分辨方向。薄片状样品：如视网膜、粘膜等可以切的大一些 3mm\*3mm 左右。无方向性的样品：选择位置准确的部位切成 1mm³小块，切记宁缺毋滥，保证取的每一块都是准确的。如：观察肾小球取肾皮质，观察肺泡避开气管取肺叶。有被膜的样品：去除被膜或者将被膜破孔方便渗透。样品大小尽量接近，不规则或稍大一点 没关系。一定要避免修整样品时造成边缘组织机械损伤，这样反而效果不好。3、切的时候避免刀片对样品的挤压，应该拉刀法 (斜着前后拉动手术刀) 切断，切样时， 配合牙签轻轻拨动样品，将样品切成符合要求的形状。疏松多孔及柔软的样品可以大一些， 避免样品溶解或压坏。最后将样品用沾水的牙签粘入 1.5ml尖头 EP 管。不要用镊子夹样品。 加满 2.5%戊二醛。4℃避光保存。如果样品漂浮，可用纸或纱布将组织压到液面以下。4、取好的样品封口膜封口，气泡膜包裹厚一点再邮寄。样品不要和冰袋直接接触，防冻伤。注意事项：1、组间位置一致。同一器官不同部位的同种细胞，结构也有较大差异；2、器具锋利，柔软的组织要用手术刀轻轻拉断，尽量避免压断，保证切面锋利。3、冰上操作时，用制冰机的碎冰，如果没有碎冰，可以室温取材，冰袋易冻伤样品。4、取材速度，条件是灵活的，把握整体原理，不要刻意为了保证位置或大小，切坏了样品。 尤其是要避免样品挤压以及冰袋冻坏样品。关于灌注取材：灌注取材要求较高，尽量不要灌注。因为灌注不充分或者灌注方式不对 (电镜样品专用灌注 法) ，反而会导致超微结构较差。直接取材时，严格操作，结构都不会太差。 |



二、细胞细菌取材流程及要求

贴壁细胞取材流程：

1、请用 6cm-10cm 的培养皿培养细胞，方便后续操作；

2、细胞倒掉培养液，PBS清洗2次后用胰酶或者复合酶消化细胞（和平时

消化传代细胞一样，避免消化过度对细胞造成损伤）。

3、1500-2000rpm/min 5min离心去除胰酶，后加入1ml PBS重悬细胞；

4、得到的细胞悬液吸入离心管，离心 (2000-3000rpm) 3-5min，弃上清， 然后加入新的 2.5%戊二醛固定液。如细胞无法成团，可加入 5ul 左右血 清混合后再次离心，直至管底出现致密细胞团块。再次更换固定液后， 室温避光固定 30min 后，4℃保存。细胞团块需要有绿豆大小，如图所示。 太大的团块可用牙签挑成几块。

5、取好的样品封口膜封口，气泡膜包裹厚一点再邮寄。样品不要和冰袋直接接触，防冻伤。

悬浮细胞取材流程：

细胞悬液离心(1500-3000rpm) 3-5min，弃掉培养基后加入 2.5%戊二醛室温避光固定 30min， 再转入 4℃保存，4℃冰袋运输。细胞团块需要有绿豆大小，如图所示。太大的团块可用牙 签挑成几块。取好的样品封口膜封口，气泡膜包裹厚一点再邮寄。样品不要和冰袋直接接 触，防冻伤。

细菌取材流程：

1、固定培养的细菌：牙签挑取菌落置于室温 2.5%戊二醛，避光固定 30min。再转入 4℃保 存，4℃冰袋运输。样品包裹厚一点，不要和冰袋直接接触，以免冻伤。细胞团块需要有绿 豆大小，如图所示。太大的团块可用牙签挑成几块。

2、悬浮培养的细菌：细菌悬液离心 (5000-10000rpm) 3-5min，弃掉培养基后加入 2.5%戊 二醛室温避光固定 30min，再转入 4℃保存。细胞团块需要有绿豆大小，如图所示。4℃冰袋 运输。取好的样品封口膜封口，气泡膜包裹厚一点再邮寄。样品不要和冰袋直接接触，防 冻伤。

注意事项：

1、不要过度消化细胞，会造成细胞大量损伤；

2、离心的目的是让细胞聚集成团，转速不可太高，会导致细胞变形；

3、样品保存邮寄时，避免冻伤。



三、外泌体、噬菌体、病毒、脂质体等：

1、建议提供浓缩液至少 50ul，样品的纯度及浓度尽量高。

2、保存及运输方式以样品结构性状稳定为要点。如：冻存的外泌体及病毒，不好反复冻融， 所以建议干冰邮寄。新鲜提取的外泌体及噬菌体等，4℃可存放 3-5 天，所以样品可冰袋邮 寄。部分样品可能在常温更能稳定保存其形态，即可常温邮寄。

3、取好的样品封口膜封口，气泡膜包裹厚一点再邮寄。

四、植物组织取材及要求

取材流程：

1、PBS 冲洗样品表面，去除泥沙等污染物。

2、用锋利的手术刀或剪刀切割样品，切样时，可配合牙签轻轻拨动样品，将样品切成符合 要求的形状，有方向的样品：如根尖、茎等，沿着组织伸展方向切成 1mm\*1mm\*3mm 的长条， 以便分辨方向。薄片状样品可以切的大一些 3mm\*3mm 左右。没有方向的样品切成 1mm³小块， 切记宁缺毋滥，保证取的每一块都是准确的，如观察果皮就要去除果肉。观察果肉就要去除 果皮。观察叶片就需要避开叶脉。有膜壳的样品要去除膜壳或者将膜壳破孔方便渗透；

2、注意切割边缘整齐，去除机械损伤的位置。

3、最后将样品用沾水的牙签沾入 1.5ml尖头 EP 管。加满 2.5%戊二醛。4℃避光保存。不要 用镊子夹样品。如果样品漂浮，可用纸或纱布将组织压到液面以下。如果需要抽气，注意抽 气的程度，太强烈可能会导致结构变化。

4、取好的样品封口膜封口，气泡膜包裹厚一点再邮寄。样品不要和冰袋直接接触，防冻伤。

注意事项：

1、组间位置一致。同一器官不同部位的同种细胞，结构也有较大差异；

2、样品大小尽量接近，不规则或稍大一点没关系。

3、器具锋利，柔软的组织要用手术刀轻轻拉断，尽量避免压断，保证切面锋利。一定要避 免修整样品时造成边缘组织机械损伤，这样反而效果不好。

4、冰上操作时，用制冰机的碎冰，如果没有碎冰，可以室温取材，冰袋易冻伤样品。 5、取材速度，条件是灵活的，把握整体原理，不要刻意为了保证位置或大小，切坏了样品。 尤其是样品挤压以及冰袋冻坏样品。



五、样本储存运输标准

储存：样本取材后，4℃避光保存时间最好不超过 1 个月。

运输：固定液充满 EP 管，封口膜封口。如下图，气泡膜或报纸包裹 7-8 层。纸质送样单+ 泡沫盒+冰袋的方式运输，冰袋 2-3 个 (-20℃冰袋，不要太多，夏季 3-4 个) ，顺丰寄付。 送样登记表电子版发到邮箱**service@share-bio.com** ；

送样地址：上海市闵行区剑川路951号1幢南区615室

收件单位：上海圣尔生物科技有限公司

收 件 人：张段玲

联系电话：17821053233

