

半薄切片定位等技术的应用

杜安娜

(中国科学院 武汉病毒研究所 分析测试中心, 湖北 武汉 430071)

摘要: 本文简要描述了半薄切片定位技术、连续超薄切片扫描电镜成像、顶扣包埋技术的应用。

关键词: 半薄切片定位;扫描电镜

1 半薄切片定位技术实现小鼠耳蜗内微米级 Corti 器毛细胞纵切超微结构观察

半薄切片定位技术是将样品切成 1-3 μm 厚的切片, 经甲苯胺蓝染色液染色, 在光学显微镜下观察, 以辨认结构所在位置, 再进行超薄切片, 从而达到精准定位的目的。小鼠耳蜗样品先利用包埋板定向包埋后, 利用半薄切片定位技术先确定 Corti 器所在位置, 再进行角度旋转定位, 最终实现小鼠耳蜗顶回、中回和底回的 corti 器内外柱细胞、内外毛细胞精准纵切和横切的目的, 得到超微结构观察结果, 解决了毛细胞难以获得超微结构的问题。

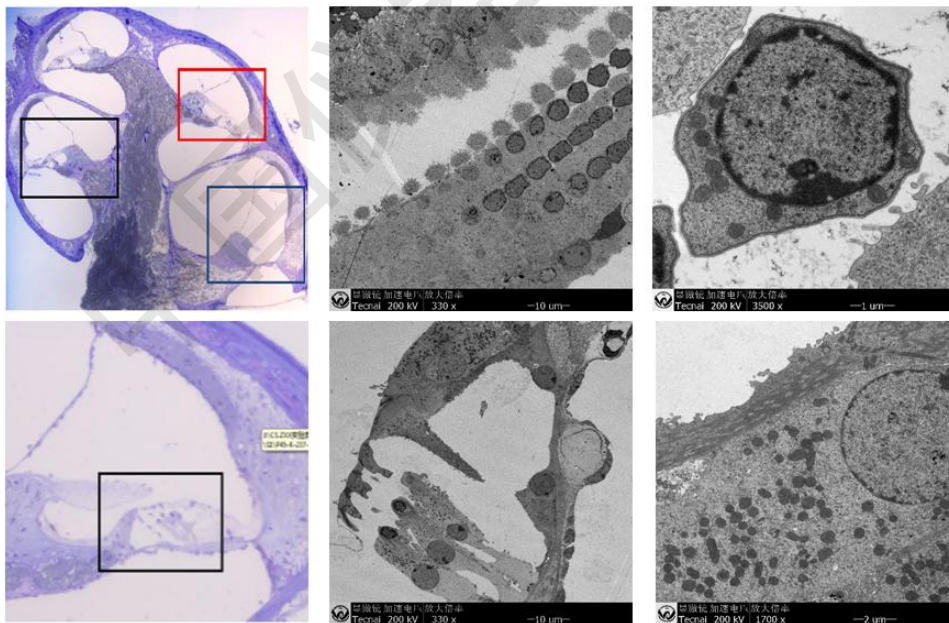


图 1 各蜗回内柱细胞、毛细胞纵切透射电镜图

2 连续超薄切片扫描电镜成像实现小鼠耳蜗小尺度三维重构

小鼠耳蜗样品先以半薄切片技术精准定位超薄切片位置，再以 90 纳米的厚度进行超薄切片，形成的连续条带贴于喷碳处理的硅片上，在扫描电镜上观察目的结构并采集成像，进行三维重构。此方法为手工操作，因受限于切片用钻石刀水槽的长短大小、手工操作的不稳定性及形成连续切片条带的难度等因素，可实现约 50-100 片切片的连续观察，约 5um-10um 样品厚度的结构重构。

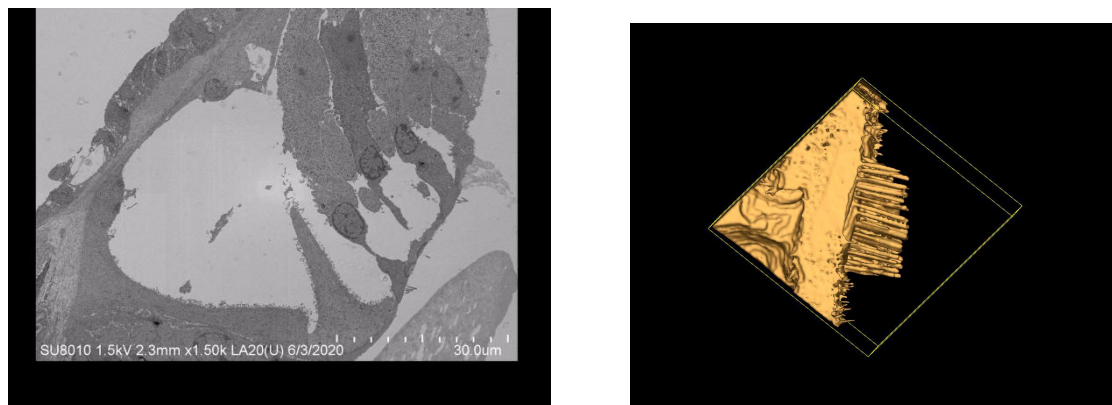


图 2 耳蜗耳毛三维重构图

3 顶扣包埋实现单层贴壁培养的神经细胞原位超薄切片超微结构观察

传统的细胞超薄切片制备方法是先利用消化的方法或者细胞刮子将贴壁细胞收集并离心沉淀成细胞团，对细胞团进行制备处理。对于神经细胞来说，非贴壁状态的细胞会发生细胞突起断裂，细胞缩成球形的情况，顶扣包埋法是对贴壁状态下的细胞在培养皿中进行原位制备处理，能保留神经细胞最接近贴壁生长时的扁平状态，细胞突起也不会出现断裂的情况，应用于感染病毒的细胞中病毒粒子的观察，因切片能很好的切到细胞扁平状态的最大切面，病毒粒子更易被观察到。

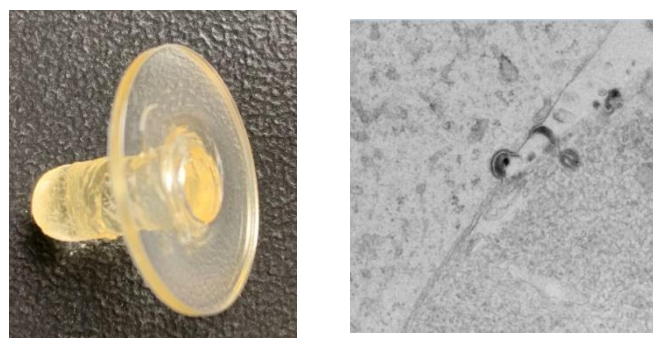


图 3 顶扣包埋观察神经细胞中病毒粒子在跨突触传播