

# 生物样品的前包埋与集成制样

徐雪

(中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心, 北京 100081)

**摘要:** 简要介绍了一种生物样品集成制样的方法。

**关键词:** 生物电镜样品制备、集成制样

## 1 背景和意义

透射电镜是生物医学领域应用最广泛的一种电子显微镜,其基本原理是利用电子束作为照射源,高速电子束穿透极薄的样本后进行逐级放大,可反映样本内部的超微结构。不过为了得到较好的成像效果,就需要对含水较多的生物样品进行更精细的处理,其流程较为复杂,包括生物样品制备和超薄切片技术。

生物样品制备在透射电子显微分析技术中占有相当重要的位置。制备流程包含:固定、脱水、渗透、包埋等步骤。传统方法样品标记常以不同管号作为区分,这种分组不仅增加了样品数量,同时增大了试剂使用量,尤其对于一些有剧毒或严重污染环境的药品,增加了废液的处理成本。另外,由于样品在不同的管内,也会造成处理过程中操作时间及换洗程度的人为因素影响。再加上一些特殊样品形状和大小的限制,使得透射电镜的生物样品制备费时又费力。因此,探究生物制样新方法,改进传统制样工艺,已成为当前生物电镜的发展急需突破的瓶颈。

## 2 原理和现状

生物组织透射电镜样品制备流程及作用原理

### 2.1 取材

通常生物样品用锋利的双面刀片切割成  $1\text{mm}^3$  的样品块,取样小,利于后续操作时各种化学试剂的渗入。取材要求部位准确,操作迅速,刀具要锋利、没有人为损伤,尽量保证低温取样。

### 2.2 固定

这是采用物理或化学的方法将细胞快速杀死的过程。细胞死亡的过程越迅速、越短暂,细胞形态保留得越真实。常规超薄切片技术中,利用化学固定剂的交联作用,将生物大分子有效地固定在细胞原来的位置、原有的结构,以防止后续操作的试剂对生物大分子的抽提、溶解,从而对结构产生破坏作用。

## 2.3 脱水

是用脱水剂置换样品中水分的过程。生物样品平均含水量高，这一点是妨碍样品制备和观察的重要因素。水分的存在，还会进一步阻碍后续操作中脂溶性包埋剂的渗入。

## 2.4 渗透、包埋、聚合

指树脂类的包埋剂通过分子运动渗入到细胞内，并将组织在包埋模具中用包埋剂包裹，当改变实验条件后，包埋剂会变硬，使组织成为硬的包埋块，利于后续的超薄切片过程。

## 2.5 超薄切片

超薄切片的厚度为 50~90nm，将切片从水槽中捞到直径只有 3mm 的金属载网上，以便放入镜筒内观察。

## 2.6 染色

用重金属盐溶液增加样品不同结构、不同区域对入射电子束的散射能力，从而呈现出不同的黑白反差。

由于上述样品制备流程长，操作变量多，导致在固定、脱水、渗透中不同管子处理时容易产生人为因素影响，所以前包埋与集成制样可以有效避免这种人为因素影响。

## 3 设计和成果

基于样品制备的流程，我们对传统的生物样品制备进行了改进和创新。主要通过琼脂这种无色透明、低熔点、化学性质稳定的网状大孔径的化学试剂，对样品进行前包埋、集成和标记，将多个样品聚集在一起，集体制样操作，提高工作效率，节省实验成本，减少有毒有害试剂对环境的污染。

根据样品形态和类型，我们将生物样品主要分为两大类：

### 3.1 单细胞或体积较小的的颗粒状样品，代表类型有：细胞、藻、菌和花粉粒等。

由于单细胞或体积较小的样品不成团、易分散，尤其是像贴壁细胞这类样品，需要经常离心，并且在不断换洗中损失较多。因此，为解决这个问题，我们先将细胞低速离心去上清，将沉淀成团的样品放在事先铺有液态琼脂薄层中固定位置，以此类推，滴加 6-8 个其他样品组成一组，凝固后做好顺序标记，然后进行样品的后固定、脱