

扫描/透射电镜生物样品取材基本要求

取材准备

- 1.试剂 所需 2.5%戊二醛、0.1M PH7.35 的磷酸盐缓冲液，注明配制日期及启用日期，置于 4 摄氏度冰箱预冷（2.5%戊二醛预冷至少 1 小时以上；磷酸盐缓冲液不宜长时间预冷，容易结晶）。
- 2.仪器与器材 锋利刀片（手术刀片或飞鹰双面刀片）、镊子、低温操作台、1.5mlEP 管、培养皿（或者硬纸卡，盛戊二醛用）、注射器（植物组织用）、冷冻离心机（细菌、细胞、藻类等需要离心的样品使用）

取材要求

1) 快

取材动作要迅速，材料离体后 1min 钟内必须进入戊二醛固定液，使组织、细胞尽可能保持原来生活状态，解剖器械要用锋利的刀片（新的手术刀片或飞鹰双面刀片）划切，避免牵拉或挤压，尽量减少取材中的机械损伤。（动物处死后 5min 内完成此步骤，时间越短越好！）

2) 准

取材要准确

- ①器官要准确；
- ②部位要准确：如观察肾脏肾小球或脑神经元需取皮质而不要取髓质，观察胰岛尽量取胰尾。
- ③胃肠道、皮肤、角膜、视网膜、耳蜗、骨骼肌等要注意方向性（横切或纵切），

取材成条状 ($0.5\text{mm}\times 1\text{mm}\times 3\text{mm}$) , 确保要观察的部位在较长的切面上。

3) 冷

取材过程应在 $0\sim 4$ 摄氏度的操作台上操作 (或者是冰上操作 , 但要注意切勿使组织直接接触或贴近冰面 , 需要以操作面板隔离 , 以免操作时间过长而造成组织结冰出现冰晶损伤) , 所有器械、容器、**2.5%戊二醛**、**PBS** 需 4°C 预冷足够长的时间。

4) 小

不定位组织大小为 $1\text{mm}\times 1\text{mm}\times 1\text{mm}$ (尽可能小 , 可以更小为 $0.5\text{mm}\times 0.5\text{mm}\times 1\text{mm}$, 越薄越好) , 如肝、肺、脾等不需要看特定结构的非定位器官组织 ; 定位组织如神经、骨骼肌、肾、脑、肠、血管、胰岛等组织取材大小为 $0.5\text{mm}\times 1\text{mm}\times 3\text{mm}$ 的长条状 (越薄越好) 。

生物器官组织取材

- 1 浸入固定 麻醉 (**1%戊巴比妥钠** $5\text{ml}/\text{kg}$ 体重腹腔注射) 或断头急性处死 , 解剖出所需器官 , 用解剖刀 (锋利刀片) 取一小块组织 , 立即 (越快越好 , $1\sim 3\text{min}$ 完成此操作) 放入盛有预冷 **2.5%戊二醛** 的培养皿 (或硬纸片上) 中 , 随后立即沿小块组织边缘 (已经被固定) 用锋利刀片取 $1\text{mm}\times 1\text{mm}\times 1\text{mm}$ 或 $0.5\text{mm}\times 1\text{mm}\times 3\text{mm}$ 大小组织置于盛有预冷 **2.5%戊二醛** 1.5ml EP 管中继续固定 , 4°C 保存 (请勿靠近冰箱边上造成标本冷冻结冰 !!!) 。
- 2 灌注固定 脑组织等 (初次取材者或未常规做灌注固定者此方法慎用 , 因在结果出来前无法评价其固定是否成功) 。

培养细胞取材

- 1 贴壁细胞 培养好的细胞不经漂洗直接倒出培养液后迅速加足量预冷 **2.5%戊二醛** 固定 1h (**戊二醛** 完全浸没细胞) , 随后用细胞铲或细胞刮成 45° 倾角快速铲下细胞 (勿用胰蛋白酶消化)

后全部转移到 15~50ml 离心管内，转速 500~800rpm 离心 5min 成团（细胞团大小约半个至一个绿豆大小为宜），随后去除大部分上清液（留 1ml 左右，切勿丢失细胞），将离心管里的细胞轻轻吹散后转移到 1.5ml 的 EP 管内，垂直静置自然沉降 1h 后轻轻吸去上清液（切勿丢失细胞），再沿管壁缓缓加入 1ml 新预冷 2.5%戊二醛，随后置于 4℃冰箱固定保存。（此过程操作轻柔，切勿损伤细胞！）

- 2 悬浮细胞 直接将细胞培养液全部转移到 15~50ml 离心管内，转速 500~800rpm 离心5min 成团（细胞团大小约半个至一个绿豆大小为宜），随后去除大部分上清液（留 1ml 左右，切勿丢失细胞），将离心管里的细胞轻轻吹散后转移到 1.5ml 的 EP 管内，垂直静置自然沉降 1h 后轻轻吸去上清液（切勿丢失细胞），再沿管壁缓缓加入 1ml 新预冷 2.5%戊二醛，随后置于 4℃冰箱固定保存。（此过程操作轻柔，切勿损伤细胞！）
- 3 细菌悬液（固体培养基自行转移成悬浮液） 直接将细菌悬液全部转移到 15~50ml 离心管内，转速 800~1000rpm 离心 5min 成团（细胞团大小约半个至一个绿豆大小为宜），随后去除大部分上清液（留 1ml 左右，切勿丢失细菌），将离心管里的细菌轻轻吹散后转移到 1.5ml 的 EP 管内，垂直静置自然沉降 1h 后轻轻吸去上清液（切勿丢失细菌），再沿管壁缓缓加入 1ml 新预冷 2.5%戊二醛，随后置于 4℃冰箱固定保存。（此过程操作轻柔，切勿损伤细菌！）

植物组织取材

植物取材较容易，取一小块植物组织浸入盛有预冷 2.5%戊二醛培养皿（或硬纸卡）上，随后用锋利刀片切成 0.5mm×0.5mm×3mm 小长条薄片，随后抽取气体。

抽取气体 将植物组织同固定液一起倒入注射器，用乳胶手套食指堵住注射器出口，右手拉动针栓，将注射器口垂直向上，松开食指，右手轻推针栓使液面上的气泡从注射器口排出，反复多次，直至组织沉入固定液。

扫描/透射电镜生物样品运输基本要求

用封口膜将 1.5mlEP 管管盖再次封好，做好标记，填好送样申请单（必须填，随样品寄出纸质版申请单）。随后插在海绵板或可以减震的塑料上，用废旧报纸包裹，放入 1~2 个冰袋，样品尽可能远离冰袋固定放置，以防样品出现冰晶损伤。寄出。