

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 1mm^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

水、渗透和包埋，如图 1 所示。

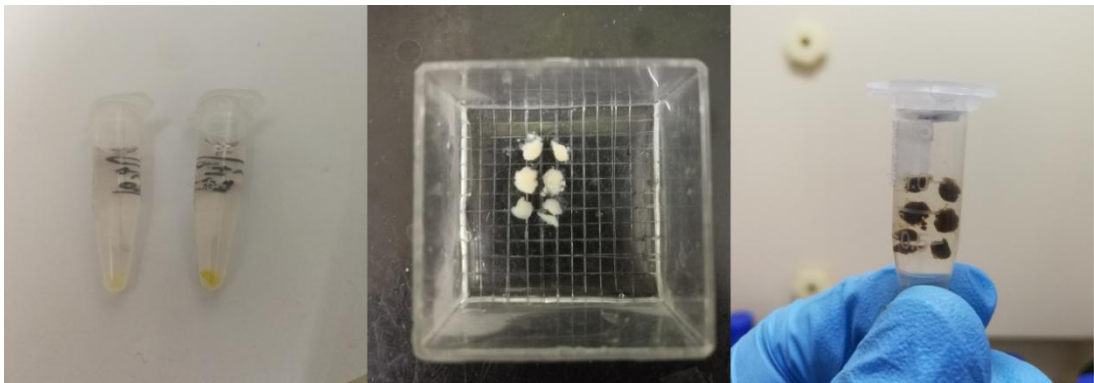


图 1 细胞样品的琼脂前包埋

3.2 组织或具有方向性且需要特殊摆放位置的样品，代表类型有：肌肉、脊髓和线虫等。

对于组织样品而言，该方法更为方便。将事先切好的样品（1mm*1mm*2mm）按方向摆放在琼脂层中，凝固后做好顺序标记，方法与细胞类似，如图 2 所示，将其与未经琼脂前包埋的样品同时制备，然后进行后续制样操作，最终切片观察差异。

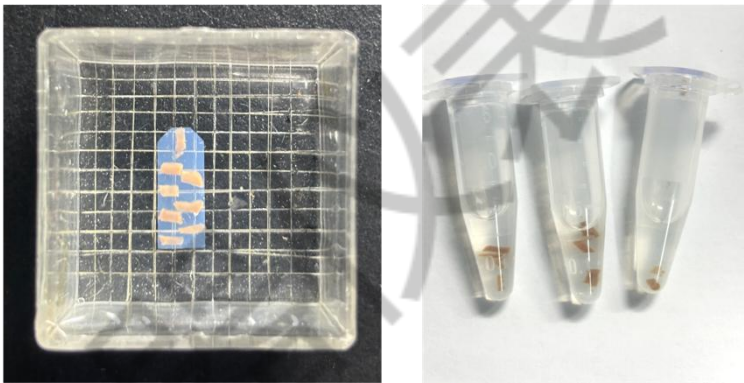


图 2 肌肉样品的琼脂前包埋

实验证明，改进后的方法在样品负荷量、试剂用量、重金属污染等上都有极大改善，详情见表 1。

表 1 透射电镜生物样品制备的传统方法和改进方法的比较

衡量指标	传统方法	改进方法
琼脂前包埋	无	有
集成数量	1 例/管	6-10 例/管
单批次数量	20-30 例/批	50-60 例/批
锇酸用量	1 例/200μl	6-10 例/ml

换洗效率	15-20s/例	15-20s/6-10 例
树脂用量	2ml/例	2ml/6-10 例
样品方向	不易控制	易控制
人为因素	有	无
废液量	多	少
成本	大	小

从工作效率上看，表中改进后的制样方法大大提高了样品制备的数量。传统方法单人一次操作 20-30 例样品，而改进后若以 6 例/组，单批制样至少可达 50-60 例。极大的提升了样品制备量，减少工作负荷。

从试剂的使用量上看，如钨酸这类剧毒试剂的用量得到了极大的缩减，一方面，使技术人员尽可能少的与有毒有害物质的接触；另一方面，大大减少了重金属废液的回收处理和对环境的危害。除此之外，环氧树脂的使用量也缩减了 3-5 倍，大大节省了样品制备的成本。

从实验的影响因素上看，集成式制样保证了样品制备的一致性，成组集体操作，避免了人为因素带来的干扰。另外，琼脂作为一种大孔径的网状交联结构，一方面能起到固定单颗粒样品（如细胞、藻类、细菌等）使之成团的作用；另一方面，这种大孔径网状结构又能对溶液中的杂质颗粒起到过滤作用，保护样品不受污染，为样品的制备提供稳定环境。

从实验的结果上看，如图 2 所示，对集成式制样的样品与常规流程制样进行电镜观察，对比细胞样品及肌肉组织样品发现其结构及形态并无差别。琼脂作为一种比较稳定的试剂，在样品制备过程中不参与任何反应，为生物样品的制备提供了有利条件。

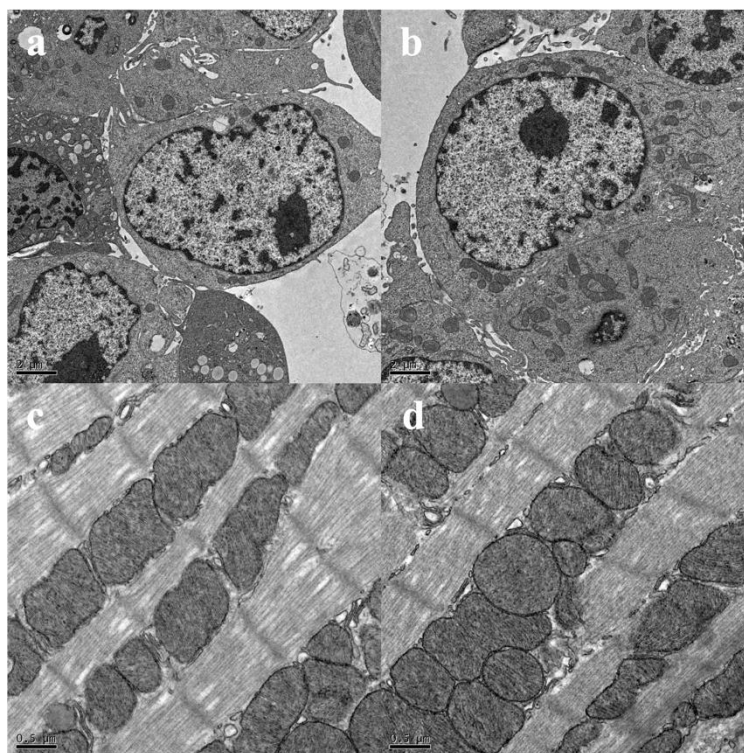


图 3 a 细胞样品的琼脂前包埋集成制样;b 细胞样品的常规单管制样,放大倍数 5000x; c 肌肉样品的琼脂前包埋集成制样;d 肌肉样品的常规单管制样,放大倍数 20000x。

4 专业技术人才介绍

4.1 个人简介-徐雪

2019 年 7 月-至今,中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心(神经科学研究所),公共技术服务中心电镜技术平台,工程师

2016 年 9 月-2019 年 6 月,温州大学,化学与材料工程学院,纳米材料,研究生,硕士

2012 年 9 月-2016 年 6 月,湖南科技大学,化学化工学院,化学,本科,学士

4.2 专业技术研究方向

生物电镜样品制备,超薄切片

4.3 获奖及荣誉

2020 年被中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心评为“2020 年度优秀个人”