

Observation of biological specimen by JEM-1400Flash - Flow from sample preparation to observation -

Related product : Transmission Electron Microscope(TEM)

JEM-1400Flash

简介

透射电子显微镜可以观察细胞内部的显微结构，而这是光学显微镜无法做到的。要想深入了解线粒体和叶绿体等细胞器的具体结构，就需要使用这种强大的工具。然而，观察过程需要在真空条件下完成，因此使用TEM无法观察活体样品。此外，为了保证电子束的穿透效果，还需要将样品剪切成薄片。

本操作说明书以使用JEM-1400Flash获取植物组织数据为例介绍了生物样品的制备流程。

样品制备流程

制备生物样品的方法有多种。这里，我们以化学固定法以及使用超薄切片的方法为例介绍样品制备程序。样品制备流程如下：1.样品剪切，2.固定，3.脱水，4.置换，5.包埋，6.聚合，7.修块，8.超薄切片，9.染色。以下是有关各个程序的具体说明。

1. 样品剪切

利用剃须刀片将标本切成小块，这样后续处理时化学物质很容易渗透。

2. 固定

一种只需使用少量试剂即可阻止生物样品结构变化的方法。化学固定分为2个阶段：预固定和后固定。预固定用于固定蛋白质，后固定用于固定脂类。

注：四氧化锇容易挥发和反应，直接接触可能导致使用者呼吸系统、皮肤和粘膜受损。因此，该方法应在通风橱内执行。

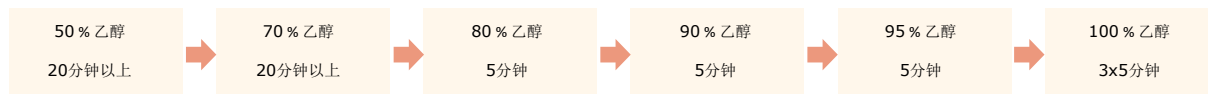
试剂

- 预固定溶液：2.5 %戊二醛，2 %多聚甲醛，0.1 M HEPES*¹（半份karnovsky）
- 后固定溶液：1%四氧化锇溶液（OsO₄，0.1 M HEPES）
- 清洗溶液：0.1 M HEPES或蒸馏水
- 样品瓶

*¹ HEPES: 缓冲液2- [4- (2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl]乙磺酸缩写

3. 脱水

使用乙醇或丙酮对细胞进行脱水处理。如果有水分残留，后续在包埋树脂过程中残留的水分会阻碍树脂聚合。根据以下流程将样品浸泡在不同浓度的乙醇中，使乙醇替代原有水分。



4. 置换

用乙醇脱水后，再使用环氧丙烷(PO)或类似物质作为中间剂与环氧树脂混合。

试剂

- PO
 - 环氧树脂
- ※此前使用TAAB的EPON 812*²。

1. 仅PO 2x5分钟
2. PO :树脂 = 2 : 1 2小时
3. PO :树脂 = 1 : 1 2小时
4. PO :树脂 = 1 : 2 2小时
5. 仅树脂18至24小时

— 树脂调整 —

- 1) 测量属性如表格中所示的EPON 812*²、DDSA*³和MNA*⁴并将其置于烧杯内。
- 2) 使用搅拌机搅拌均匀
- 3) 添加DMP-30*⁵并搅拌
- 4) 对树脂进行排气并清除气泡

*² EPON 812 :树脂,
*³ DDSA · *⁴ MNA :硬化剂,
*⁵ DMP-30 :加速剂

表：环氧树脂化合物

(%)	软	适中	硬
EPON812	48	48	48
DDSA	30	19	12
MNA	20	33	40
DMP-30	2	2	2

参考：TAAB数据表12a

5. 包埋

要制备超薄切片，需要将样品包埋到树脂等硬质包埋剂内。液体树脂会在随后的聚合过程中固化。

工具

- 环氧树脂
 - 硅胶包埋板（图1）
- 1) 倾倒树脂
 - 2) 将样品置于硅胶包埋板尖端
 - 3) 静置一会使其混合



图1 硅胶包埋板

6. 聚合

加热树脂使其固化，以便将包埋在树脂中的样品切成薄片。将硅胶包埋板置于60°C烤箱内三天。聚合过程中应保持温度稳定以防止树脂聚合失败。

工具

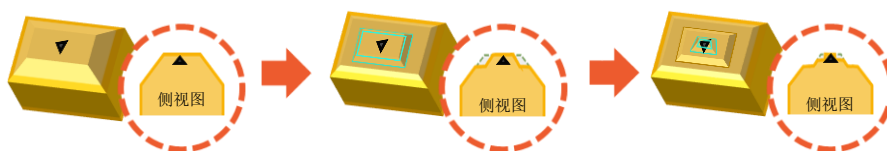
- 树脂聚合烤箱

7. 修剪块

在光学显微镜下修剪样品，使待观察区域与放置样品铜网大小相匹配，并对待观察表面塑形。

工具

- 剃须刀
- 光学显微镜



8. 超薄切片

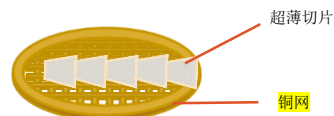
使用玻璃刀清除树脂使组织表面外表面。然后，用金刚石刀和超微切片机制成可穿透电子束的薄片，再将其放在铜网上。

工具

- 超微切片机
- 铜网
- 金刚石刀
- 玻璃刀
- 睫毛笔（图2）



图2.睫毛笔



9. 染色

此操作旨在增强包含大量轻元素的生物样品的衬度。通过将重元素附着在样品上增强散射衬度。在铜网上对超薄切片进行染色时，使用醋酸双氧铀和柠檬酸铅作为染色剂进行双重染色。醋酸双氧铀可以对细胞核和核糖体染色，而柠檬酸铅可以对细胞膜、糖原颗粒和核糖体染色。

试剂

- 醋酸双氧铀*6
- 柠檬酸铅

*6 醋酸双氧铀是一种受国际管制的化合物，该化合物只能在有相关许可的设施中使用。醋酸双氧铀的替代物有多种，包括乙酸铀。

结果

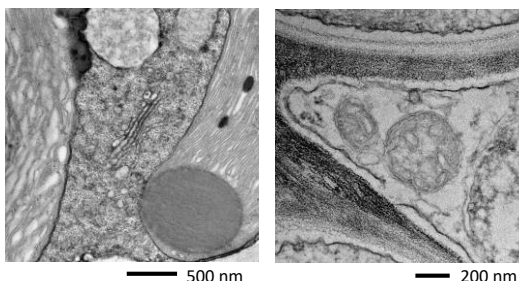
图3所示为TEM (JEM-1400Flash)的观察图像，观察对象是根据上述流程制备的超薄样品切片。

图3.枫叶TEM图像

上图为细胞器膜结构的清晰截图。

图3中左图所示中间为高尔基体，两侧为叶绿体。

右图所示线粒体膜结构。



Copyright © 2021 JEOL Ltd.

Certain products in this brochure are controlled under the "Foreign Exchange and Foreign Trade Law" of Japan in compliance with international security export control. JEOL Ltd. must provide the Japanese Government with "End-user's Statement of Assurance" and "End-use Certificate" in order to obtain the export license needed for export from Japan. If the product to be exported is in this category, the end user will be asked to fill in these certificate forms.

