

动物细胞扫描电镜观察

溶液配制:

(1) 2%锇酸水溶液: 锇酸是一种淡黄色晶体 (剧毒), 封装在安剖瓶中, 低温保存。使用时常配成 2-4% 的水溶液做贮备液。配制锇酸水溶液时, 先将装有锇酸的安剖瓶洗净, 二次水冲洗, 然后用划玻璃砂轮在管中间划一印纹后放入洗净的装蒸馏水的棕色玻璃瓶中 (加入的蒸馏水量按浓度计算好), 打破安剖瓶, 盖好盖震荡, 置于冰箱中慢慢溶解备用。一般 2-3 天可完全溶解为无色透明溶液。

(2) 多聚甲醛-戊二醛固定液配制: 10%多聚甲醛溶液 20 ml; 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液 50 ml; 25%戊二醛 10ml; 二次水 20 ml。

一、正常细胞和非游离面观察:

除上皮组织外, 多数细胞和组织都被包埋在结缔组织中。为了观察这些结构, 必须破坏和去除结缔组织。具体方法如下:

将组织块置于戊二醛磷酸缓冲液 (pH7.2-7.5) 中固定 2 h;

磷酸缓冲液冲洗 2 遍;

2%锇酸水溶液中后固定 2 h;

磷酸缓冲液冲洗 2 遍;

将样品置于 8 mol/L 的 HCl 中。60°C 水浴震荡 20-40 min;

水洗后, 系列乙醇梯度脱水, 50%乙醇 (15min, 1 次) → 60%乙醇 (15min, 1 次) → 70%乙醇 (15min, 1 次) → 75%乙醇 (15min, 1 次) → 85%乙醇 (15min, 1 次) → 95%乙醇 (15min, 1 次) → 100%乙醇 (15min, 2 次);

叔丁醇置换 2 次, 冻干机中冷冻干燥;

粘台, 喷金, 上机观测。

二、弹力纤维显示法

应用多聚甲醛和戊二醛固定组织块 2 h;

将固定组织置于 88%乙酸中, 45°C 下孵育 70-100 min;

用稀盐酸 (0.002 mol/L) 水解 10 min;

蒸馏水冲洗 2 遍;

系列乙醇梯度脱水，方法同上；

叔丁醇置换，冷冻干燥；

粘台，喷金，上机观测。

三、细胞器显示法

2%锇酸缓冲液固定；

系列等级固定：5%、30%、50%的二甲亚砜（DMSO）中固定各 30-60 min；

将样品浸于 DMSO 中，样品杯置于液氮中使其冷冻和断裂；

室温中将冰溶解，水洗；

置于 0.1%锇酸中 1-3 d；

系列乙醇脱水、叔丁醇置换、冷冻干燥；粘台，喷金，上机观测。

参考文献：

周德山，蔡文琴. 扫描电子显微镜特殊制片技术. 电子显微学报. 1991. 148-152