

扫描电镜细胞处理步骤

1. 收集 固定

1.1 1000rpm离心5-10 min
1.2 2.5%戊二醛在4 °C固定细胞

2. 漂洗

2. 用0.1M的PBS清洗3次，每次10-15分钟

3. 后固定

3.用 1% 锇酸 在4 °C固定1-2小时

4. 漂洗

4. 用0.1M的PBS清洗3次，每次10-15分钟

5. 脱水

5. 采用浓度梯度乙醇（50%、70%、90%、95%、100%、100%）进行脱水，每次10-15分钟

6. 置换

6.用梯度醋酸异戊酯（50%、70%、90%、100%、100%）置换乙醇，每次10-15分钟

7. 干燥

7. 临界点干燥法进行干燥

8. 镀膜

8. 将细胞爬片粘贴样品台，在真空条件下进行真空喷镀仪镀膜(喷金)

9. 电镜 观察

常见问题解析

1. 不导电或导电差的样品，为什么要喷金？

在扫描电镜中，电子束会轰击细胞表面，对于不导电或导电性差的样品，电子束轰击产生的多余电子或游离粒子不能及时导走，会在样品表面累积，导致充电现象。充电会使样品表面电位发生变化，影响电子束的聚焦和扫描，进而造成图像扭曲、变形、晃动等，严重影响成像质量。而喷金后，金的高导电性使样品表面多余的电荷能够及时传导出去，从而避免充电效应，获得清晰、准确的图像，同时喷金可以增加样品表面的二次电子产率。在SEM成像中，二次电子信号是反映样品表面形貌的重要信号。

2. 为什么要用梯度醋酸异戊酯置换乙醇？

醋酸异戊酯的极性较低，临界点干燥时，能够更好地与二氧化碳置换，干燥效果更好，避免细胞收缩。

3. 细胞表面出现结晶、油脂、固定剂沉淀等，可能的原因什么？

①细胞的培养液残留；②固定后未充分清洗固定液；③脱水剂不纯净，含有杂质；④导电胶涂抹过多污染细胞。