

透射电镜细胞处理步骤

1. 收集 固定

- 1.1 1000rpm × 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% 钨酸 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. 采用浓度梯度丙酮（50%、70%、90%、95%、100%、100%）进行脱水，每次10-15分钟

6. 渗透 包埋

- 6.1 环氧树脂+纯丙酮（1：1）37度12小时
- 6.2 纯环氧树脂 37 °C 10-12小时；
- 6.3 纯环氧树脂 37 °C烘箱内过夜；
- 6.4 纯环氧树脂 60 °C烘箱内 12-24小时；

7. 切片

7. 超薄切片机将包埋的样品切成50-100 nm的超薄切片

8. 染色

- 8.1 3%双氧乙酸铀染色15-20分钟，用蒸馏水冲洗3-5次
- 8.2 用柠檬酸铅染液染色5-10分钟，蒸馏水冲洗，自然干燥

9. 电镜 观察

常见问题解析

1. 细胞质出现空洞，可能的原因有哪些？

①固定时间不足，导致固定液没有全部渗透，应该4℃固定过夜；②脱水不彻底，导致树脂渗透不完全，应该增加100%丙酮处理次数和时间。

2. 锇酸后固定结束发现样本发黑，这是为什么？

锇酸后固定后样本应该呈现棕黑色，如果颜色过浅，固定时间不够；如果样本呈现黑色，发生脆裂，说明固定时间过长，应严格控制后固定时间，不能超过2小时。

3. 图像上有固定位置的异常黑点或者黑斑，可能是什么原因引起？

①细胞上有污染物，清洗不干净；②载网不干净；③物镜光阑受到污染。