

文章编号: 1000-6281(2016)05-0462-04

# 电镜超薄切片批量染色的新方法

王贝贝<sup>1</sup>, 尹伟<sup>1</sup>, 刘双双<sup>1</sup>, 尚卫娜<sup>2</sup>, 谢礼<sup>3</sup>, 杨平<sup>1</sup>,  
郭建胜<sup>1</sup>, 王丽<sup>1</sup>, 洪健<sup>4\*</sup>

(浙江大学 1. 医学院公共技术平台, 2. 生命科学研究院, 浙江 杭州 310058; 3. 浙江省农业科学研究院, 浙江 杭州 310021; 4. 浙江大学农生环测试中心, 浙江 杭州 310058)

**摘 要** 超薄切片染色是透射电镜生物样本制备中的关键环节。本文介绍了一种透射电镜超薄切片染色的新方法, 利用简单自制的染色液防污存储与批量染色装置, 可对超薄切片载网进行批量化染色, 不但极大提高染色效率, 而且减少了染色过程中染色液、样品的污染, 达到染色液的重复利用, 同时减少重金属对操作者的伤害和对环境的污染。

**关键词** 超薄切片; 批量染色

**中图分类号:** Q336 **文献标识码:** A **doi:** 10. 3969/j. issn. 1000-6281. 2016. 05. 015

在生物电镜样品制备中, 超薄切片是一种经典方法, 电子染色是其中的关键步骤之一。超薄切片电子染色一般采用醋酸铀和柠檬酸铅为染色剂, 传统操作方法是: 将载有超薄切片的载网的样品面向下悬浮在醋酸铀或柠檬酸铅染液滴上, 染色数分钟后用镊子分别夹持载网, 将每一片载网依次在双蒸水中上下反复冲洗多次, 晾干后使用; 这种常规染色方法的缺点显而易见: ① 效率低下, 对于大量样品耗时; ② 样品染色时间不等, 样品染色不均一; ③ 柠檬酸铅极易与空气中的二氧化碳结合产生碳酸铅沉淀污染切片; ④ 染色后需要对每个超薄切片载网分别进行多达几十次的清洗, 费时, 费力; ⑤ 染液无法重复使用, 消耗量大; ⑥ 醋酸铀和柠檬酸铅具有一定的毒性; ⑦ 每次需要清洗染色容器, 对环境造成污染。

针对常规染色技术容易出现的问题, 电镜工作者和专业厂商不断推出各种创新或改良方法与产品<sup>[1,2]</sup>, 但仍存在一些问题, 如: ① 大部分染色装置只能对 20 个左右的载网进行操作, 无法满足日益增长的电镜样品需求; ② 使用这些染色套装染色完毕, 仍要清洗器皿和染色板, 操作繁琐, 清洗干净与否影响下次染色质量; ③ 染色液无法重复使用, 消耗量大; ④ 染色装置价格较高。

本文介绍了一种染色液防污存储及批量化染色的新方法<sup>[3]</sup>, 此方法利用电镜实验室常用的实验器材, 简单易行, 同时可对超薄切片载网进行批量染色, 极大提高染色效率, 不但减少染色及存储过程中的铅污染, 而且将染色操作与染色液存储相结合, 染色液重复利用, 减少对环境的污染。

## 1 实验材料

带有超薄切片的载网, 自制染色胶条(塑料薄片和双面胶, 也可购买市售染色胶条), 固体 NaOH, 10 mL 离心管, 50 mL 离心管、醋酸双氧铀、柠檬酸铅。

## 2 实验方法

(1) 醋酸铀染色液保存于 15 mL 带盖离心管中, 避光保存; 柠檬酸铅染液保存于 10 mL 带盖离心管中, 置于底部有固体 NaOH 的 50 mL 离心管中(图 1)。

(2) 自制染色胶条(图 2a, 也可用市售染色胶条): 取具有一定硬度的塑料薄片裁剪成长度小于带盖离心管高度的染色胶条, 在胶条中间段一面贴上双面胶, 用于粘着载网。将带有超薄切片的载网粘于染色胶条的两侧, 确定不会脱落; 如果在胶条正

收稿日期: 2016-03-30; 修订日期: 2016-04-26

**基金项目:** 浙江省公益技术应用研究(浙江省科技厅资助项目 No. 2015C37049); 浙江大学实验技术研究项目(No. SYB201401, No. SYB201407); 浙江省高教实验室工作项目(No. YB201403); 浙江省教育厅科研项目资助(No. Y201534707)。

**作者简介:** 王贝贝(1978-), 女(汉族), 杭州人, 博士, 实验师。 E-mail: beibeiwang@zju.edu.cn

\* **通讯作者:** 洪健(1957-), 男(汉族), 杭州人, 求是特聘研究员。 E-mail: jhong@zju.edu.cn



图 1 染色防污染存储(左:醋酸铀染液存储于 15 mL 离心管;右:柠檬酸铅染液存储于 10 mL 离心管,并置于含固体 NaOH 的 50 mL 离心管中)。  
Fig. 1 The storage of dye liquor. Left: uranyl acetate stored in 15 mL centrifuge tube. Right: lead citrate stored in 10 mL centrifuge tube which was put in 50 mL centrifuge tube containing NaOH.

反面均贴上双面胶,则可对多达 80 个载网同时进行染色。

(3)将带有载网的胶条置于装有醋酸铀染色液的离心管中,盖好管盖,染色 15~20 min(图 2b),然后用双蒸水清洗带有载网的胶条。

(4)将带有载网的胶条置于装有柠檬酸铅染色液的 10 mL 离心管中,敞开离心管的管盖,置入底部有固体 NaOH 的 50 mL 离心管中,盖紧 50 mL 离心管盖,染色 5 min(见图 2c)。之后取出胶条,以 NaOH 水溶液、双蒸水依次清洗带有载网的胶条。

(5)待载网干燥后用镊子取下。

(6)醋酸铀及柠檬酸铅染色液无需倒出,可直接置于染色管中保存供下次使用(本实验室可反复染色 20 次以上):装有醋酸铀染液的 15 mL 离心管直接盖好管盖即可,装有柠檬酸铅染液的 10 mL 的离心管和外部的 50 mL 离心均需盖好管盖。

3 实验结果

与常规染色方法比较,新的批量染色法无需清

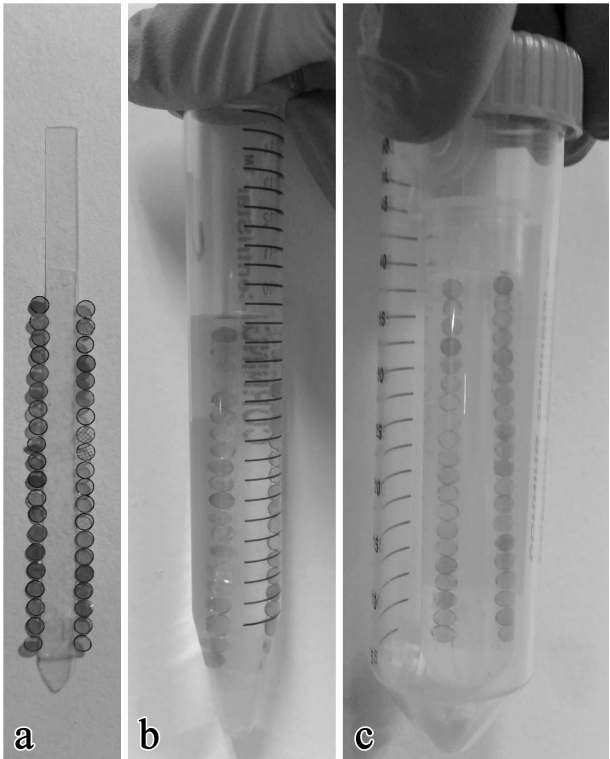


图 2 新型批量化染色方法。a. 自制染色胶条及粘着的载网;b. 醋酸铀染色;c. 柠檬酸铅染色。  
Fig. 2 New method for batch staining. a. The self-made staining strip;b. Staining by uranyl acetate;c. Staining by lead citrate.

洗染色用具,节省染色时间。而且,染液存储与使用在同一容器中进行,染液可反复使用,节省实验耗材,同时减少对环境污染(表 1);电子显微镜观察结果显示,批量染色法所获得电镜图片的对比度适中,结构清晰,无污染。肾小球基底膜电子致密物结构清晰可见(图 3a)与传统染色法无明显区别(图 3b)。以同一病人肾活检组织块切片,捞片后取载网加到使用不同使用批次的染液中,进行染色,观察

表 1 两组染色方法操作时间及所需试剂量比较  
Table 1 Comparison of the staining time and the staining solution consumption by the new batch-staining method and the traditional staining method

|            | 载网数   | 新型批量方法组   | 传统方法组       |
|------------|-------|-----------|-------------|
| 染色用时       | 5 片   | 30 min    | 30 min      |
|            | 40 片  | 40 min    | 75 min      |
|            | 80 片  | 50 min    | 150 min     |
|            | 400 片 | 250 min   | 750 min     |
| 醋酸铀、柠檬酸铅用量 | 5 片   | 8 mL、8 mL | 1 mL、1 mL   |
|            | 40 片  | 8 mL、8 mL | 8 mL、8 mL   |
|            | 80 片  | 8 mL、8 mL | 16 mL、16 mL |
|            | 400 片 | 8 mL、8 mL | 80 mL、80 mL |

和比较第一到第二十批次染色液所染色效果以及其染色污染情况。(100 kV 透射电子显微镜观察检测两组样品的染色效果,如图 4 所示,第 1(图 4a),第

10(图 4b)和第 20(图 4c)次使用的染液所染样品均污染极低。

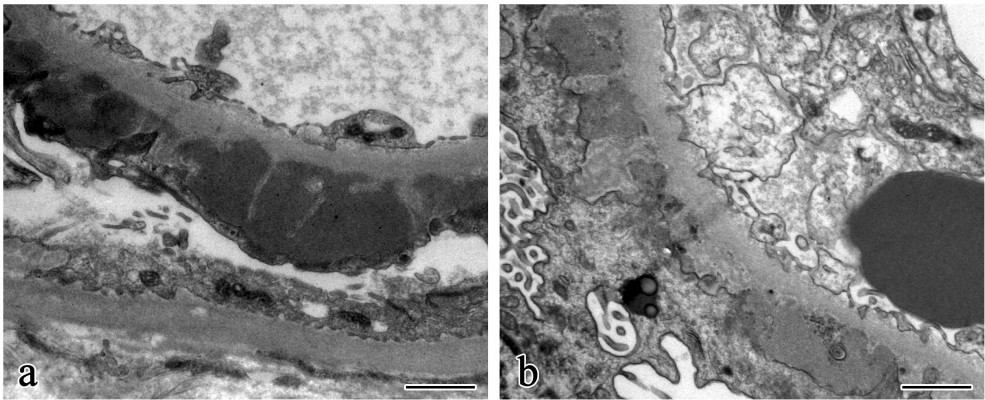


图 3 肾活检病人肾小球超微结构。a. 以新型批量染色方法染色;b. 以传统染色方法染色。a, b: Bar = 1  $\mu\text{m}$

Fig. 3 Ultra-structure of human glomeruli of membranous glomerulopathy.

a. Stained by the new batch-staining method; b. Stained by the traditional method.

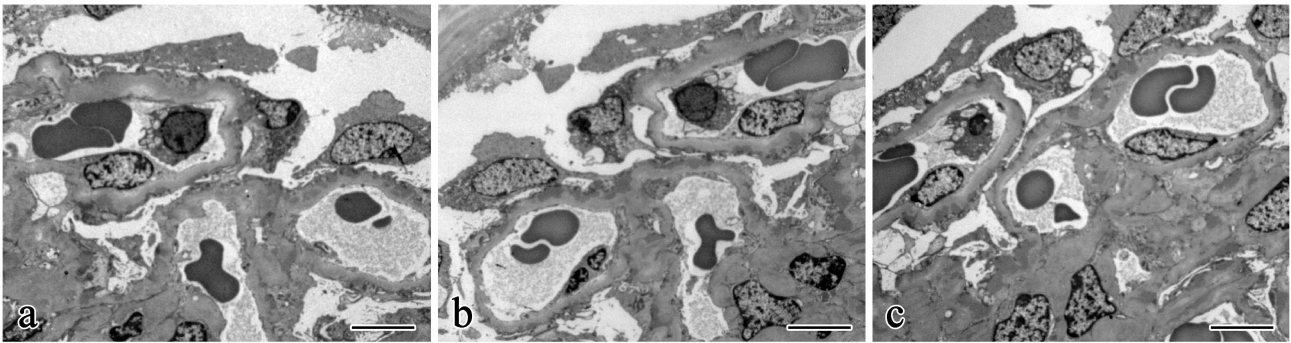


图 4 同一病理组织超薄切片的染色污染比较,膜性肾病肾脏组织活检样品。

a. 染色液第 1 次使用;b. 染色液第 10 次使用;c. 染色液第 20 次使用。a ~ c: Bar = 5  $\mu\text{m}$

Fig. 4 Comparison of the pollution of ultra-thin sections stained with different batch of staining solutions, of which the sections were sectioned from the same tissue block of a patient with membranous glomerulopathy. a. The first used staining solutions; b. The 10<sup>th</sup> used staining solutions; c. The 20<sup>th</sup> used staining solutions.

参考文献:

[ 1 ] 贺子义,胡冰,史永红. 提高电镜超薄切片染色效率的自制装置[J]. 电子显微镜学报,2011,30(1):72-74.

[ 2 ] 李铮,李虹,颜世利,等. 新型一次性染色装置改进超薄切片染色技术[C]. 电子显微镜学报,2012,增刊:131-132.

[ 3 ] 王贝贝,王丽,洪健. 一种电镜超薄切片批量染色装置:中国,201420368138. 2[P]. 2014-12-03.

# A new method for batch staining of ultra-thin sections

WANG Bei-bei<sup>1</sup>, YIN Wei<sup>1</sup>, LIU Shuang-shuang<sup>1</sup>, SHANG Wei-na<sup>2</sup>, XIE Li<sup>3</sup>, YANG Ping<sup>1</sup>,  
GUO Jian-sheng<sup>1</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, HONG Jian<sup>4\*</sup>

(1. Core Facilities, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou Zhejiang 310058; 2. Life Sciences Institute, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310058; 3. Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou Zhejiang 310021; 4. Center of Analysis and Measurement, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310058, China)

**Abstract** The staining of ultra-thin sections is the most critical step in TEM biological sample preparation. Here we reported a new method for ultra-thin sections staining which could batch stain ultra-thin sections based on a simple equipment for storing the dye solution and batch staining. This method improved the efficiency for ultra-thin section staining and reduced the pollution of samples. Furthermore, it also protected environment as well as the operators from heavy metal toxicity.

**Keywords** ultra-thin sections; batch staining

\* Corresponding author