文章编号:1000-5404(2005)03-0273-02

经验交流

电镜样品取材的意义与应用

Significance and practice of sampling by electron microscopy

陶忠芬,可金星,肖桃元,黄文琪,王 莉 (第三军医大学高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

电子显微镜(简称电镜)在现代生物医学研究中起着越来越重要的作用,电镜技术是医学超微结构研究的重要手段[1]。生物医学研究的对象多种多样,有组织、细胞、微生物及生物大分子等。而生物样品制备的特殊性使得制样过程耗时长而复杂,对取材、固定、脱水、包埋、切片等一系列程序提出了严格的要求,每一步都要特别认真、细致,一环紧扣一环,其中任何一个环节失误都会造成制样失败。取材、固定是电镜标本制作的第一步,而且需要送样者(大多不是电镜专业人员)亲自操作,出现问题最多,如果做不好,后续程序将是徒劳。为提高超微结构研究的质量,现就送样中存在的一些问题及我室的体会总结如下,供有关研究者参考。

1 透射电镜组织标本的取材与固定

1.1 取材前的准备

明确实验目的,正确选择分组和时点,制定出实验流程,应合理安排取材时机。备足实验器具和实验试剂,取材必用的器材需清洁、预冷。实验动物尽量维持正常生理状态,避免受到刺激或因条件的变化(如严寒或酷暑)而造成实验的失真。实验组、实验对照组和正常对照组的动物需在相同条件下取材,在时间上尽量同步,采用相同的固定剂,取材的部位完全相同,以增加实验的可比性和可靠性[2]。

1.2 取材的基本要求

透射电镜样品取材的基本要求,尽量活体取材,如人体穿刺活检、外科手术标本、动物活体解剖等。取材的要求概括为5个字:快、小、冷、准、狠。①快:为了能观察到尽量接近生理生活状态时的生物组织或细胞的结构,取材越快越好[2]。样品必须在离体后1 min内浸入固定液中,以免时间过长,出现细胞自溶。如需多部位取材,最好灌注固定,多人配合;②小:固定液的穿透能力有限,组织块大小不超过1 mm×1 mm×1 mm。气管、肠道、血管剖开,用生理盐水或0.1 mol/L PBS冲洗干净后再固定。肠道、血管、皮肤、肌肉等修块成1 mm×1 mm×2 mm长条状,根据切片方向或观察要求确定其长轴与血管、肌肉的长轴平行或垂直,便于作定向包埋和定位;③冷:为了降低自溶酶的活性,尽量在低温下操作,所用容器和器械应预冷,取好的标本放在4 ℃冰箱保存。建议夏天不要取材。如果必须在高温天气取材的,最好在空调下进行,而且在修块时,将冰块放在蜡板下保持低温;④准:取材的部位一定要准确,如肾、脑、癌变部位等,根据研究目的和欲观察的部位准确切取组织;⑤狠:处死动物时要干净利落。取材用的器械应锋利,取材时动作简洁但要轻柔,切取组织时禁用剪刀,避免挤压、牵拉,防止组织结构的人工损伤性变化。

1.3 取材的方法

1.3.1 实验动物的取材 做好上述准备后,取1只实验动物快速断脊处死(也可将动物麻醉),暴露所取部位,最好在不中断血液供给的情况下,用锋利的手术刀切下一小块组织,迅速置于事先滴有2.5%戊二醛的蜡板上,用锋利的双面剃须刀片修去镊子碰过的部分,将需要的样品切成1 mm×1 mm×1 mm的小块,用牙签将小块移入盛有冷固定液的青霉素小瓶中(事先贴好标签),盖好瓶盖,置4 ℃冰箱内继续固定。若组织块带有血液而使小瓶内固定液浑浊则应更换新鲜固定液[3]。取肺时,要密封青霉素小瓶抽气使组织块沉底,或用纱布条压在上面,使标本全部浸在固定液中。固定时间为2~4 h,若不能及时送电镜室,4 ℃冰箱内保存,并每周更换新鲜固定液(2.5%~4%戊二醛,pH 7.2~7.4)。

1.3.2 特殊样品的取材 电镜技术已广泛用于临床疑难病症的诊断,如肾穿、肌活检及手术病理标本的电镜诊断。对临床标本的取材,严格按取材的五点基本要求,肾穿刺标本立即挤入预先准备好的固定液,然后切取条状组织的两端(保证取到肾小球)送电镜室,如组织破碎,则尽量捡2~3块适当大小的组织送电镜室,余下组织再转入甲醛或其他固定液送光镜室制样。肌活检标本除及时固定外,组织块应垂直于肌纤维修作长条状(1 mm×1 mm×2 mm)。外科活检标本应准备好固定液到手术室等待,切下的组织按前述方法及时固定并修小,低温条件下尽快并与事先填好送检单送往电镜室。胸/腹水脱落细胞、血细胞电镜检查方法见细胞的取材与固定。

1.4 细胞的取材与固定

1.4.1 贴壁细胞 贴壁细胞可从瓶壁轻轻刮下或消化下来(消化液浓度应低于传代消化),收集在尖底离心管或EP管中,1 000 r/min,离心5~10 min,待样品在离心管底部集结成团后(以轻轻晃动不散开为佳),用吸管吸出上清液,再沿管壁缓慢加入固定液。细胞团块较大的可用刮匙将样品取出并割成小块再固定。如果贴壁培养细胞(如神经细胞)主要观察细胞生长状态及细胞间的关系,细胞应保持在支撑物原位进行固定、脱水、原位包埋[4]。

单层细胞用1%~2%戊二醛(pH 7.2~7.4)固定1~2 h即可送电镜室,或置4 ℃冰箱内保存。

1.4.2 悬浮细胞(体液细胞同) 直接将培养细胞、血液或

作者简介:陶忠芬(1977-),女,重庆市荣昌县人,助理实验师,主要从事电镜技术方面的研究。电话:(023)68752348
通讯作者:肖桃元,电话:(023)68752348
收稿日期:2004-08-03;修回日期:2004-12-27

胸/腹水等收集到尖底离心管或EP管中，按上述方法离心固定、保存。如需专门观察某种血细胞（如白血病时）或血小板，则先经梯度离心收集细胞。

1.5 常见问题及对策

①取材的组织块太大，这是比较常见的失误，结果一是组织固定不好，不能保存良好的超微结构，二是真正在电镜下观察的组织仅针尖大，多了也无用。组织块应在固定液中尽快修小，体积一般不超过1 mm×1 mm×1 mm；②取材时间过长，样品固定不及时，引起自溶。要求操作迅速，尽量在1 min内将标本浸入固定液；③部位不准确或对切片方向不明确，如需要观察肾小球却取到肾髓质部位，观察癌变部位却取到周围组织或坏死组织，肌肉组织块修成与肌丝方向不垂直的长条等，造成半薄切片定位困难。要求取材者要有一定的形态学实验基础，或事先有光镜切片对照，需要定位的在取材时作出某些标记；④标本受挤压、牵拉，造成人工假象。取材一定要用锋利的刀片，避免牵拉、挤压损伤，修好块后移标本时避免用镊子用力夹取，应用牙签轻轻挑起；⑤标本漂在固定液上，固定不好，如肺、脂肪组织等。解决办法就是密封抽气或用纱布条压于其上，使组织块沉底，全部浸泡在固定液中；⑥细胞离心转数过大，细胞团太紧，引起细胞变形破坏或中间部位固定不好而自溶。应根据细胞的种类和性质选择恰当离心速度、时间，细胞的量在离心成团后如火柴头大小较为合适；⑦细胞团太小或离心不够紧，制样过程中逐渐丢失。因此要注意离心速度和细胞的量；⑧未按要求自配固定液或用其它非标准固定液（如用手术室浸泡器械的戊二醛），固定效果不佳。应到电镜室取电镜专用戊二醛（用0.1 mol/L磷酸缓冲液配制，浓度为2.5%～4%、pH 7.2～7.4），固定液不宜放置过久，颜色变黄或pH改变则不能用。不了解电镜技术，或者特殊部位的取材应向专业人员咨询，遵守严格的操作规程。

2 扫描电镜的取材与固定

扫描电镜用于观察组织细胞表面的超微结构，与电视机原理相似，如各种管腔面、组织表面/断面、培养细胞表面等，因此，取材的要求主要是待观察面的暴露并使之朝上，制样时，无须切片，而是对表面进行处理以使能在扫描电镜下观察。取材的基本要求同透射电镜，只是组织块可大可小，观察面几毫米至2 cm直径，如需观察组织断面，则将组织块修成长条状，以便冷冻断裂。保护好观察面并作好标记，注意清除覆盖于样品表面的粘液、分泌物、组织液、血液、杂质等（如气管、肠道）。根据不同的样品，不同的实验要求，选用适当的清洗液和清洗方法。培养细胞可连载体一起固定处理，悬浮细胞、血细胞收集后涂片固定。固定液仍用2.5%～4%戊二醛。

总之，电镜样本制作取材和固定是取得高质量超微结构图像的关键，如果没有严谨的科学态度，操作马虎随便，其后果是后续实验室程序徒劳无功，造成人力物力和时间的浪费。本研究针对电镜样本制作取材中遇到的问题提出相应的对策和注意事项，供相关人员参考。

关键词：电子显微镜；样品；取材；固定
中图法分类号：R446 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] 肖桃元，可金星，陈代伦. 电镜技术进展与临床应用[J]. 中华临床杂志，2002，2(7)：30－32.
[2] 杨勇骥. 实用生物医学电子显微镜技术[M]. 上海：第二军医大学出版社，2003. 75－76.
[3] 李伯勤，张圣明. 医学超微结构基础[M]. 济南：山东科学技术出版社，2003. 271－272.
[4] 凌诒萍，俞 彰. 细胞超微结构与电镜技术[M]. 上海：上海医科大学出版社，2000. 79－80.

（编辑 陈聪连）

经验交流

文章编号：1000-5404(2005)03-0274-02

房水引流物植入术对难治性青光眼的早期疗效观察

Early therapeutic effect of aqueous humor drainage device implantation for refractory glaucoma

应 希，谢汉平，向 利 （第三军医大学西南医院全军眼科中心，重庆 400038）

青光眼是一种常见的致盲眼病。随着现代眼显微外科技术的发展，青光眼滤过手术的成功率达70%～90%。然而某些特殊类型的青光眼，如无晶体眼或人工晶体眼青光眼、常规滤过手术失败的青光眼、发育性青光眼、新生血管性青光眼、葡萄膜炎继发青光眼、外伤后房角后退性青光眼等，由于眼部的病情复杂，并难以建立有效的滤过通道而导致滤过手术失败，通常称为难治性青光眼。自1969年Molteno发明引流植入物以来，难治性青光眼的治疗有了突破性的进展。随着引流物和手术方式的不断改进，其疗效不断提高，但仍存在一些难以避免的手术并发症。本研究分析我院2001年至2003年以来采用房水引流物植入术治疗14例难治性青光眼所出现的早期并发症，从而评估其早期临床疗效。现报告如下。

1 材料和方法

1.1 一般资料

2001年1月至2003年12月本院眼科治疗的各种难治性青

作者简介：应 希（1977－），女，重庆市人，硕士，医师，主要从事青光眼的基础与临床方面研究。电话：023-68752724
通讯作者：谢汉平，电话：023-68754401
收稿日期：2004-11-09；修回日期：2005-01-20