DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.06.012

技术与方法

血小板电镜和光镜标本的制备

李爱莲 郑怀恩* 朱思和** （病理解剖学教研室）

血小板功能活跃，参于多种生理、病理过程，其形态学研究日益广泛。不同电镜标本制备方法不同，程序多较复杂。我们在原有制备方法的基础上进行了改进、综合，探索出一套一次性取材，光镜、透射电镜（TEM）和扫描电镜（SEM）标本连续制作的方法，本文予以介绍。

材料和方法

先将所用注射器、针头、试管、吸管等做硅化处理，以防血小板粘附。硅化的方法是用10%硅油DC200二甲苯溶液涂布器皿内面，待二甲苯挥发后250℃烘烤4h，蒸馏水洗净后备用。用注射器抽血4ml，3.8%枸橼酸钠抗凝，迅速混匀两者，分别制作下列标本。

一、血小板整体粘附电镜标本

1．将0.5ml抗凝血铺于有Formvar膜的铜网上，37℃温育8min。

2．用37℃ 0.89%氯化钠溶液反复冲洗铜网，洗净红细胞和白细胞。

3．用3%缓冲的戊二醛液固定15min，0.1mol磷酸缓冲液浸洗数次。

4．1%锇酸后固定15min，再用0.1mol磷酸缓冲液浸洗。

待铜网上标本自然干燥后作TEM观察。

二、血小板涂片、超薄切片和扫描电镜标本

（一）富含血小板血浆（PRP）的分离：将4.5ml抗凝血注入10×100mm试管，室温下离心8min，800r/min，试管上部的血浆即为PRP。吸出PRP约0.5ml作SEM标本；取两小滴作涂片两张；留在试管内的PRP用以制作TEM标本。PRP涂片自然干燥后瑞氏染色，供光镜观察。

（二）SEM标本的制备：

1．将吸出的0.5mlPRP滴在铺好Formvar膜的盖玻片上，37℃温育10min。

2．0.1mol磷酸缓冲液洗盖玻片4～5次，3%缓冲的戊二醛固定15min。

3．1%锇酸后固定15min。

4．用系列浓度的丙酮脱水，醋酸异戊酯置换，临界点干燥，真空喷镀，SEM观察。

（三）TEM标本的制备：

1．向PRP加入等量0.3%戊二醛液，室温下固定10min。

2．离心10min，3000r/min。

3．吸出上层血浆，沿试管壁加入3%缓冲的戊二醛液2ml，室温下固定30min。

4．轻轻拨出试管内表面的黄膜（buffy coat），其表层即血小板，下层为白细胞。用磷酸缓冲液冲洗后，将黄膜修成1.5×2mm小块，再放入3%缓冲的戊二醛液内4℃下固定3h。

5．1%锇酸后固定2h。

6．醋酸铀块染，系列丙酮脱水，环氧树酯618包埋。

7．超薄切片，两铅染色，TEM观察。

结果

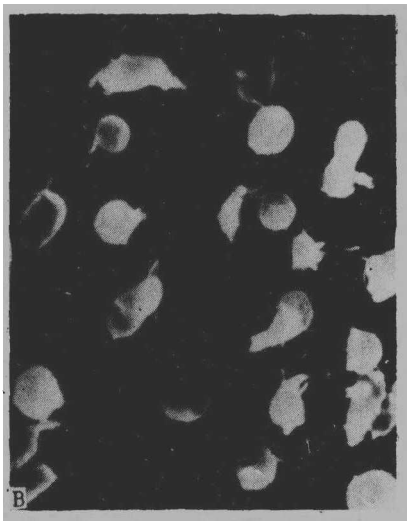
油镜下，见PRP涂片中血小板分布均匀而密集，形状比较规则，内含多少不等的紫红色颗粒。整体粘附的血小板TEM下有圆形、星形、扩展形、聚集形等，部分血小板颗粒可辨，伪足尤为清楚。TEM超薄切片观察见小血管排列密集，各种细胞器清晰可见，结构保存良好（图A）。SEM见血小板轮廓清晰，以圆形、椭圆形为主，血小板表面有开放小管的开口和不同形状的伪足突起（图B），

*防原医学教研室 **电镜室

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图A、血小板超薄切片透射电镜观察
血小板(P)内颗粒丰富，结构清晰。×15 000



图B、扫描电镜图象
血小板多呈椭圆形或圆形，有小的伪足形成。 ×3 900

讨 论

血小板具有粘附、聚集、释放等多种功能，静止状态的血小板与激活状态的血小板在超微结构上有显著不同，因而在制备标本时尽量避免外界因素影响十分重要。我们的实验结果显示，PRP涂片中的血小板与全血涂片中的血小板结构一致，SEM标本中的血小板符合正常血小板的形态特征，TEM标本则很好地揭示了细胞内部的超微结构。本文采用的方法，一次取材后可同时制备多种血小板标本，供不同水平的形态学研究，同以往报告的各种方法对比程序比较简单，减少了标本制备过程中的外界影响，细胞结构保存良好。应用同时制备的标本，对血小板进行光镜与电镜，表面与内部等多方面形态学研究，观察结果可以互相对照，互相印证，互相补充，以对血小板各种生理、病理的结构特点获得更全面，更客观的认识。还可根据需要，选用相应的方法制备某一种血小板标本，如选用较小试管（5 × 8 mm）离心，2 ml血即能获得足够的标本。血小板TEM标本也能同时观察血白细胞的超微结构。

应该注意的问题：（1）所用玻璃器皿均需硅化处理，一次硅化后使用次数如接近10次则需重新硅化。（2）开始所用的固定液、缓冲液温度不宜低于室温，否则可使血小板微管解聚。（3）SEM、TEM标本脱水时间要短，以防样品变脆、收缩。（4）TEM标本包埋时需注意标本极性，将血小板层朝向切面。

（本文承史景泉教授审修，特此致谢）
（收稿：1988.3.10；修回：1988.8.20.）

一种直接制备绒毛细胞高分辨染色体的方法

张 琳 王兴华 何祖国 姚 宏（大坪医院 妇产科）

自Simoni首创绒毛细胞染色体直接制备法以来[1]，中期染色体的制备已成为产前诊断的常规技术之一，但对制备绒毛细胞高分辨染色体方法的报道极少。我们用溴化乙锭

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net