

ICS 11.020
CCS C 05



团 体 标 准

T/CRHA XXX—202X

生物医学电镜样本超薄切片技术规程

Technical specifications for ultrathin sectioning of biomedical electron
microscopy samples

(征求意见稿)

202X-XX-XX 发布

202X-XX-XX 实施

中国研究型医院学会 发布

目 次

前言.....	II
引言.....	III
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 仪器设备.....	2
5 试剂和材料.....	2
6 技术流程.....	3
附录 A（资料性）常用试剂配方.....	7
附录 B（资料性）流程示意图.....	11
附录 C（资料性）切片颜色与切片厚度判定对照表.....	12
参考文献.....	13

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国研究型医院学会超微与分子病理学专业委员会提出。

本文件由中国研究型医院学会归口。

本文件起草单位：中国人民解放军总医院第四医学中心、北京国家卫健委北京医院、北京中国医科院阜外医院、北京大学附属第一医院、北京大学医学部、首都医科大学附属安贞医院、中日友好医院、天津医科大学、解放军北部战区总医院、复旦大学附属中山医院、山东济南市中心医院、山东省立医院、湖北武汉大学附属人民医院、陕西第四军医大学西京医院、四川大学华西医院、深圳大学总医院、华中科技大学协和深圳医院、广州市金域医学检验中心、捷欧路（北京）科贸有限公司、上海衡道医学病理诊断中心有限公司。

本文件主要起草人：……

引 言

超微病理学，是指运用电子显微镜在亚细胞水平，观察、研究细胞及细胞外间质细微变化的病理学亚专业学科，在生物医学诊断和研究中发挥着至关重要的作用。

本文件所述生物医学电镜样本超薄切片技术，是超微病理学的工作基础，技术人员通过对生物医学电镜样本的取材、固定、浸洗、脱水、渗透包埋形成包埋块，进而运用超薄切片机切成一定厚度的薄片并染色，最终得以在电镜下观察到组织和细胞的超微结构变化。

本文件旨在规范生物医学电镜样本超薄切片技术流程。

本文件通过对生物医学电镜样本超薄切片技术中组织样本、细胞学样本、血液样本这三类样本的取材、固定、浸洗、脱水、渗透包埋、超薄切片、染色的七个流程进行规范，建立标准化操作流程，进而提高超薄切片质量。

生物医学电镜样本超薄切片技术规程

1 范围

本文件规定了生物医学电镜样本中，组织样本、细胞学样本、血液样本超薄切片技术相关的术语和定义，以及取材、固定、浸洗、脱水、渗透包埋、超薄切片、染色的操作规程。

本文件适用于生物医学电镜样本超薄切片技术中，组织样本、细胞学样本、血液样本的操作规程。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

3.1

电子显微镜 electron microscope

一种基于电子显微技术的高端科学仪器，能够实现对微观世界的观测和分析，简称“电镜”。

3.2

取材 sampling

对生物样本采集的过程。

3.3

固定 specimens fixed

应用适宜的试剂使组织细胞的生物活性终止，使其尽可能保持原有形态结构和所含各种物质成分的过程。

3.4

浸洗 rinse

应用适宜的试剂去除组织细胞中的残留固定液的过程。

3.5

脱水 dehydration

应用适当的化学试剂逐渐将样本中的游离水完全取代的过程。

3.6

渗透包埋 penetration embedding

使包埋剂逐渐取代脱水剂，并把液态包埋介质聚合成质地均匀、硬度适宜的固态的过程。

3.7

超薄切片 ultrathin section

对经过包埋后的样本进行精准定位修块，再采用超薄切片机，将其切成厚度为 70nm 左右的薄片的过程。

3.8

染色 stain

利用重金属盐的高分子密度与组织细胞内的细微结构发生不同程度的结合，提高样本切片细节之间的电子散射强弱对比，在透射电镜观察时，重金属染色的区域会吸收更多的电子，形成较暗的区域，而未染色的区域则相对较亮，从而增强了样品的对比度。

4 仪器设备

4.1 包埋聚合器

用于对完成渗透的样本进行聚合硬化。

4.2 体视显微镜

用于观察辅助对聚合完成及定位完成的样本进行修块。

4.3 超薄切片机

用于对修块完成的样本进行半薄及超薄切片。

4.4 恒温加热板

用于对半薄切片进行烤片。

4.5 光学显微镜

用于观察辅助对半薄切片进行定位。

5 试剂和材料

5.1 0.2mol/L 磷酸缓冲液贮存液（试剂配方见附录 A 表 A.1）。

5.2 0.1mol/L 磷酸缓冲液工作液（试剂配方见附录 A 表 A.2）。

5.3 戊二醛固定液（试剂配方见附录 A 表 A.3）。

5.4 灌注固定液（试剂配方见附录 A 表 A.4）。

5.5 2%四氧化锇固定液贮存液（试剂配方见附录 A 表 A.5）。

5.6 1%四氧化锇固定液工作液（试剂配方见附录 A 表 A.6）。

5.7 Epon 812 包埋剂（试剂配方见附录 A 表 A.7）。

5.8 1%甲苯胺蓝染液（试剂配方见附录 A 表 A.8）。

5.9 乙酸双氧铀染液（试剂配方见附录 A 表 A.9）。

5.10 柠檬酸铅染液（试剂配方见附录 A 表 A.10）。

6 技术流程

6.1 技术流程图

技术流程示意图见附录 B。

6.2 取材

6.2.1 组织样本

6.2.1.1 直接解剖取材

动物麻醉，暴露所需脏器，确定取材位点，用锋利刀片切割下小块组织，用 0.1mol/L 磷酸缓冲液迅速冲洗组织液、血液等污物。在预先准备好的蜡盘上面滴一滴 2.5%戊二醛固定液，将离体组织快速置入液滴内，根据组织的大小、形状要求，用双面刀片把组织块切成几个 1mm³ 的样本颗粒、1mm²×3mm 样本条或厚度小于 1mm 的样本薄片。

6.2.1.2 灌注固定取材

动物麻醉，暴露心脏，剪开左心室，将针管插入升主动脉，开始缓慢注入生理盐水，同时剪开右心房或回流静脉放血。待右心房流出的液体为无色或略带红色时终止灌洗，同时打开灌注固定液。待被灌流的组织适度硬化后，用锋利刀片切割下小块组织，根据组织的大小、形状要求，用双面刀片把组织块切成几个 1mm³ 的样本颗粒、1mm²×3mm 样本条或厚度小于 1mm 的样本薄片。

6.2.1.3 原位固定取材

动物麻醉，边解剖边将 2.5%戊二醛固定液滴加到取材位点，待组织达到适当硬度后，切取下来用锋利刀片切割下小块组织，根据组织的大小、形状要求，用双面刀片把组织块切成几个 1mm³ 的样本颗粒、1mm²×3mm 样本条或厚度小于 1mm 的样本薄片。

6.2.2 细胞学标本

将液体倒入 2ml 离心管内，使用水平转子离心机，以 1000r/min 低速离心 5min，使离心管底部形成细胞团；弃上清，加入缓冲液，5000r/min，离心 10min，在管底形成致密细胞团块，确保牙签小心挑起细胞团块而不散，若收集到的细胞团块较大，应分割成 1.5mm³ 的小块；弃上清，轻轻注入 2.5%戊二醛固定液。

6.2.3 血液标本

抗凝管采血，使用水平转子离心机，将抗凝全血以 1000r/min 低速离心 15min，离心管抗凝血液析出三层细胞，底层红色的是红细胞，中间层白色的是白细胞和血小板，上层透明的是血浆，用吸管缓慢吸取上清液，再根据需求吸取对应分层的细胞，参照 6.1.2 的流程收集细胞团块。

6.3 前固定

取材后，用牙签挑起其中 2-3 粒样本，移至盛有 1-2ml 2.5%戊二醛固定液的小瓶，4℃ 固定 2-4h。

6.4 浸洗

0.1mol/L 磷酸缓冲液充分浸洗 3 次，4℃，10min/次。

6.5 后固定

1%四氧化钼固定液进行后固定，4℃，2h。

6.6 浸洗

双蒸水浸洗 3 次，4℃，10min/次。

6.7 脱水

30%乙醇 1 次，室温，10min/次；
50%乙醇 1 次，室温，10min/次；
70%乙醇 1 次，室温，10min/次；
90%乙醇 1 次，室温，10min/次；
100%乙醇 2 次，室温，10min/次；
100%丙酮 2 次，室温，10min/次。

6.8 渗透包埋

6.8.1 梯度渗透

推荐使用环氧树脂 Epon 812 作为包埋剂。

100%丙酮:包埋剂=3:1，室温，0.5h；

100%丙酮:包埋剂=1:1，室温，0.5h；

100%丙酮:包埋剂=1:3，室温，1h；

纯包埋剂，室温，过夜。

6.8.2 包埋聚合

包埋胶囊或包埋板提前放入 60℃干燥箱烘干备用，用注射器吸取备好的包埋剂，灌满包埋胶囊或包埋板，并在一侧放入样本标签纸，用牙签挑起组织块，放入包埋胶囊或包埋板的顶端，随后一起放入恒温箱，逐级加温聚合，一般采用 37℃，6h；45℃12h；60℃，24h。

6.9 超薄切片

6.9.1 半薄切片定位

6.9.1.1 粗修块

将包埋块夹在专用夹持器中，放在体视显微镜下面，采用单面刀片首先修去顶面多余树脂，直到暴露出黑色样本，再以此样本平面为中心，用单面刀片倾斜 45° 角修出 4 个斜面，去掉多余树脂，将顶面修成梯形或长方形，四周修成金字塔状，随后在超薄切片机上，将修好的包埋块固定在超薄切片机样本夹槽中，顶端露出约 2mm，用无水槽玻璃刀修平顶面，直至切出一张完整的切片。

6.9.1.2 半薄切片

换用新刀口，切出数张 0.5-1 μm 后的半薄切片，用捞片环捞取切片，提前准备好洁净的载玻片，滴加双蒸水备用，将捞取的切片转移至双蒸水液滴上，60℃恒温加热板上烤干。

6.9.1.3 半薄切片染色

将甲苯胺蓝染液滴于载玻片的半薄切片上，边加热边染色约 3min，倾去染液，注意勿使切片干燥，自来水冲洗多余染液后用双蒸水进行漂洗，随后用滤纸吸取切片周围水分，烘干封片，光镜下观察并定位。

6.9.1.4 细修块

再次将包埋块夹在专用夹持器中，放在体视显微镜下面，根据光镜定位位置，保留定位位置的组织平面，以此位置平面为中心，用单面刀片倾斜 45° 角修去四周多余组织。

6.9.2 超薄切片前准备

6.9.2.1 安装包埋块

将经过半薄切片定位后修好的包埋块固定在超薄切片机样本夹槽中，顶端露出约 2mm，居于切片上限及下限范围内。

6.9.2.2 安装钻石刀或玻璃刀

将钻石刀或带有水槽的玻璃刀放置于刀台夹缝中固定紧，使刀刃与刀台夹缝旁边的标尺等高。

6.9.2.3 对刀

调整超薄切片机双目镜位置及倍数，看清刀口与样本顶面的位置关系，打开超薄切片机的暗视野底光，使样本顶面产生反光，判断刀口与样本之间的距离，在低倍镜视野下进行粗调，使刀口快速靠近样本，再在高倍镜视野下进行细调，使刀口更加贴近样本，直到最后刀刃与样本间细小的亮缝刚刚消失为止。

6.9.2.4 设置切片窗

调节样本臂使所切样本平面的底边略高于刀刃 5-8mm 处，按“START”键设置切片起始位置，随后调节样本臂使所切样本平面的顶边略低于刀刃 3-5mm 处，按“END”键设置切片结束位置。

6.9.2.5 调节水槽液面：

转动超薄切片机中样本臂使样本头低于刀刃，将双蒸水加到刀槽里，使之略高于刀刃和刀槽，随后用注射器缓慢抽吸液体降低液面，使液面刚刚浸润到刀刃，超薄切片机双目镜下可见刀刃处有较亮的反光面。

6.9.2.6 设置超薄切片速率

钻石刀切片速率建议 1mm/s 为宜，玻璃刀切片速率建议 2-5mm/s 为宜。

6.9.2.7 设置超薄切片厚度

50-70nm 为宜。

6.9.3 启动进行超薄切片

按照 6.8.2 中调整好的位置以及设定好的参数，启动设备，开始自动进行切片，所得超薄切片被收集到钻石刀或玻璃刀所带的水槽中，在超薄切片机目镜下观察超薄切片的收集情况，通过颜色判定切片厚度是否符合设置要求，并用睫毛笔挑掉不完整切片（切片颜色与切片厚度判定对照表见附录 C）。

6.9.4 捞片

用弯头精密镊子夹住载网边缘轻轻弯折一下，使载网有支持膜的一面向下，与切片成 45° 角，快速轻触切片，使切片平整贴附在载网的支持膜上，提起镊子，用滤纸接触载网边缘，吸干水分。

6.10 染色

6.10.1 乙酸双氧铀染色

根据样本数量，将封口膜裁剪到合适大小，洁净面向上，置于培养皿中央。用滴管吸取乙酸双氧铀染液，滴在封口膜上，液滴间距适中，用弯头精密镊子夹住载网，确认切片面向下，轻置于液滴上，盖好培养皿，避光，室温染色 20min。

6.10.2 清洗

准备 3 个盛有 25ml 双蒸水的烧杯，用弯头精密镊子在乙酸双氧铀染液表面夹住载网，快速插入烧杯内双蒸水中，在水面提升浸入，反复 30 次，依次在 3 个烧杯中进行，用滤纸吸干水分，室温晾干。

6.10.3 柠檬酸铅染色

根据样本数量，将封口膜裁剪到合适大小，洁净面向上，置于培养皿中央，在封口膜四周放置固体氢氧化钠，用滴管吸取柠檬酸铅染液，滴在封口膜上，液滴间距适中，用弯头精密镊子夹住载网，确认切片面向下，轻置于液滴上，盖好培养皿，避光，室温染色 7min。

6.10.4 清洗

准备 3 个盛有 25ml 双蒸水的烧杯，用弯头精密镊子在柠檬酸铅染液表面夹住载网，快速插入烧杯内双蒸水中，在水面提升浸入，反复 30 次，依次在 3 个烧杯中进行，用滤纸吸干水分，室温晾干。

附录 A
(资料性)
常用试剂配方

0.2mol/L 磷酸缓冲液贮存液配方见表 A.1。

表 A.1 0.2mol/L 磷酸缓冲液贮存液

A 液 (0.2mol/L 磷酸二氢钠水溶液)	B 液 (0.2mol/L 磷酸氢二钠水溶液)
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 27.60g	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 35.61g
或 NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 31.21g	或 Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O 53.65g
	或 Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 71.64g
去离子水 1000ml, 混匀后 4℃ 保存	去离子水 1000ml, 混匀后 4℃ 保存

0.1mol/L 磷酸缓冲液工作液配方见表 A.2。

表 A.2 0.1mol/L 磷酸缓冲液工作液

pH 值	7.0	7.1	7.2	7.3	7.4	7.5	7.6
A 液/ml	19.50	16.50	14.00	11.50	9.50	8.00	6.50
B 液/ml	30.50	33.50	36.00	38.50	40.50	42.00	43.50
去离子水/ml	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00

戊二醛固定液配方见表 A.3。

表 A.3 戊二醛固定液

戊二醛终浓度/%	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
0.2mol/L 磷酸缓冲液/ml	50	50	50	50	50	50
25%戊二醛水溶液/ml	4	6	8	10	12	16
去离子水/ml	100	100	100	100	100	100

灌注固定液配方见表 A.4。

表 A.4 灌注固定液 (多聚甲醛-戊二醛混合固定液)

试剂名称	所需体积 (ml)
10%多聚甲醛溶液	20
0.2mol/L 磷酸缓冲液	50
25%戊二醛溶液	10
去离子水	20

2%四氧化钨固定液贮存液配方见表 A. 5。

表 A. 5 2%四氧化钨固定液贮存液

试剂名称	所需剂量
四氧化钨	0.5g
去离子水	25ml

将 0.5g 包装的四氧化钨安剖瓶放入清水中浸泡，去除瓶上的标签并洗净外壁的有机物质。准备一棕色试剂瓶，充分洗净后加入 25ml 去离子水。用小砂轮划割安剖瓶，放入棕色试剂瓶中，用洁净玻璃棒捣破安剖瓶，快速盖上瓶盖，用封口膜将瓶口密封，黑纸包裹 4℃ 避光保存。

1%四氧化钨固定液工作液配方见表 A. 6。

表 A. 6 1%四氧化钨固定液工作液

试剂名称	所需剂量
2%四氧化钨固定液贮存液	1 份
0.2mol/L 磷酸缓冲液	1 份

Epon 812 包埋剂配方见表 A. 7。

表 A. 7 Epon 812 包埋剂

A 液: B 液	1:4	1:5	1:6	1:7	1:9
剂量/ml	10 40	10 40	10 40	10 40	10 40

Epon812/ml	5.03	20.12	5.08	20.32	5.11	20.44	5.13	20.52	5.16	20.64
DDSA/ml	1.09	4.36	0.90	3.60	0.77	3.08	0.67	2.68	0.54	2.16
MNA/ml	3.88	15.52	4.02	16.08	4.12	16.48	4.19	16.78	4.30	17.20
DMP-30/ml	0.15	0.60	0.15	0.60	0.15	0.60	0.15	0.60	0.15	0.60

备注 A液 (Epon812、DDSA), B液 (Epon812、MNA)

1%甲苯胺蓝染液配方见表 A. 8。

表 A. 8 1%甲苯胺蓝染液

试剂名称	所需剂量
甲苯胺蓝	1g
0.1mol/L 磷酸缓冲液	100ml

乙酸双氧铀染液配方见表 A. 9。

表 A. 9 2%乙酸双氧铀染液

试剂名称	所需剂量
乙酸双氧铀	1g
50%乙醇	50ml

柠檬酸铅染液配方见表 A. 10。

表 A. 10 柠檬酸铅染液

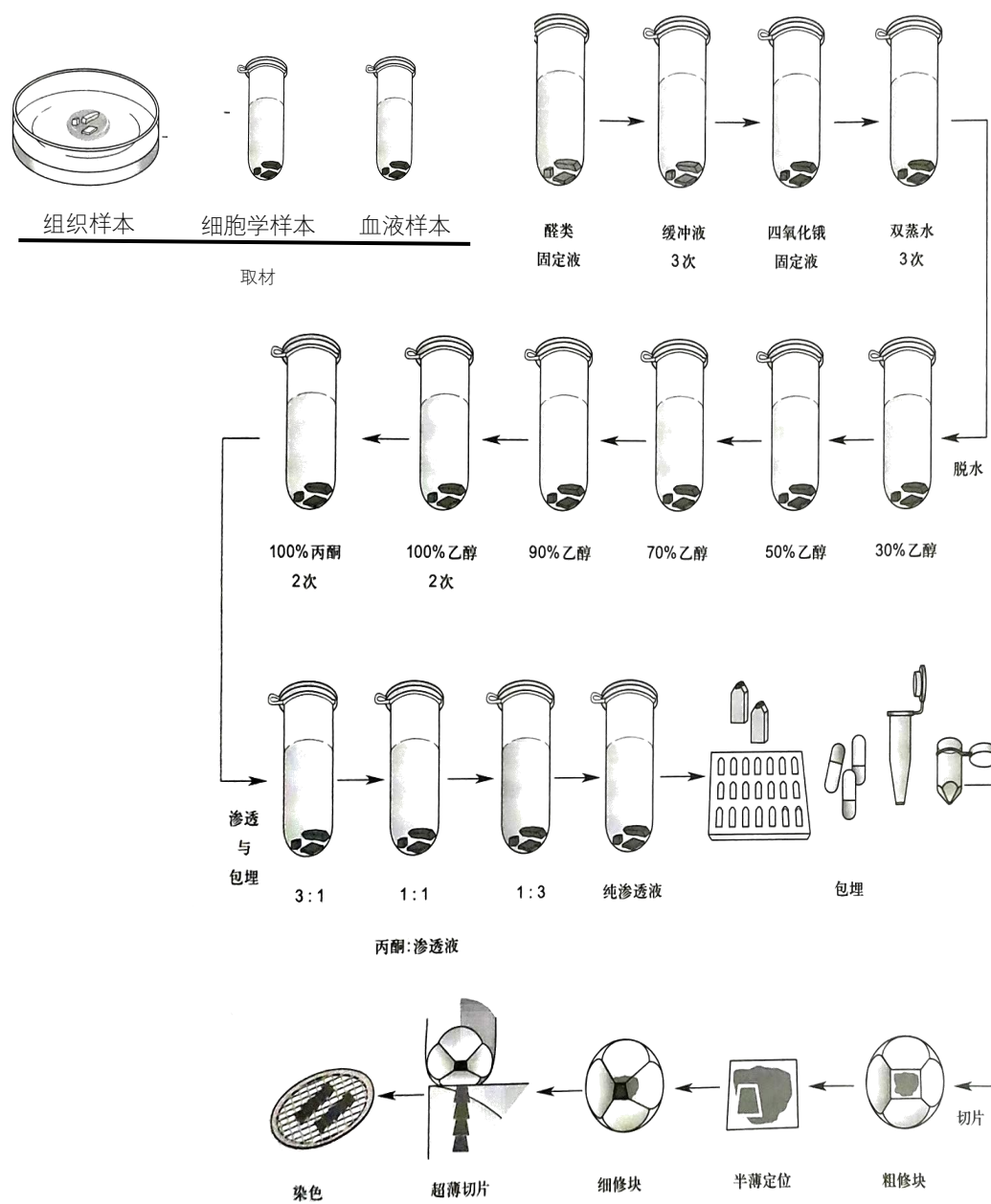
试剂名称	所需剂量
硝酸铅	0.265g
柠檬酸钠 (2 分子结晶水)	0.352g
去离子水	6ml

将上述试剂和去离子水置于 10ml 容量瓶中，盖上瓶盖摇动 30min，使乳白色柠檬酸铅悬液充分混合。加入 1mol/L 的氢氧化钠溶液 1.6ml，待溶液变清亮后加去离子水，定容至 10ml。

附录 B
(资料性)
流程示意图

技术流程见图 B1。

图 B.1 技术流程图



附录 C
(资料性)
切片颜色与切片厚度判定对照表

切片颜色与厚度判定见表 C. 1。

表 C. 1 切片颜色与切片厚度判定对照表

切片颜色	切片厚度
暗灰色	<40nm
灰色	40-50nm
银白色	50-70nm
金黄色	70-90nm
紫色	>90nm

参 考 文 献

- [1] 丁明孝.梁凤霞.洪健.李伯勤.王素霞.朱平.生命科学中的电子显微镜技术[M].北京：高等教育出版社，2021.
 - [2] 付洪兰.实用电子显微镜技术[M].北京：高等教育出版社，2004.
 - [3] 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，2010.
 - [4] 杨勇骥.汤莹.叶煦亭.雷长海.医学生物电子显微镜技术[M].上海：第二军医大学出版社，2012.
-