

高压冷冻及冷冻替代技术操作指南

操作流程概览

序号	核心操作要点	关键参数 / 注意事项
1. 高压冷冻	1. 仪器预冷备液氮 2. 空打校验 3. 样品装 Carrier 冷冻	1. 替代仪预冷至 **-90°C** 2. A 型 200 μm 朝上、B 型平底面朝下 3. 无气泡、全程液氮防护
2. 冷冻替代	1. 液氮下取样品 2. 投入替代液 3. 启动程序	1. 镊子预冷、样品不离液氮 2. 替代液现配现用 3. 7 段温控程序 (-90°C \rightarrow 0°C)
3. 扫尾工作	高压冷冻仪放液氮	Bake out, 耗时约 6h (可过夜)
4. 树脂渗透及包埋	丙酮清洗 \rightarrow 梯度渗透 \rightarrow 纯树脂浸透 \rightarrow 烘箱聚合	1. 0°C + 常温丙酮各洗 30min 2. 5 步渗透, 60°C 聚合 48h
5. 试剂配方	1. 两种冷冻替代液 2. Epon812 包埋树脂	1. 移液工具需中和处理 2. 树脂密封 -20°C 保存, 用前回温 3. 废液需聚合无害化

此操作手册用于指导使用冷冻电镜中心 Leica EM ICE 高压冷冻仪和 Leica EM AFS2 冷冻替代仪进行操作。用户可根据上图中的流程图查询正文中相对应的部分。虽然制样过程中可以根据需要对操作步骤进行顺序上的调整, 但是建议初学者按照指导操作尽量避免错误发生。

请注意, 高压冷冻和冷冻替代为精密实验设备, 任何不当的操作可能会导致非常严重的损害, 因此有任何不确定的请询问管理员。有耗材或工具需求也请联系管理员。

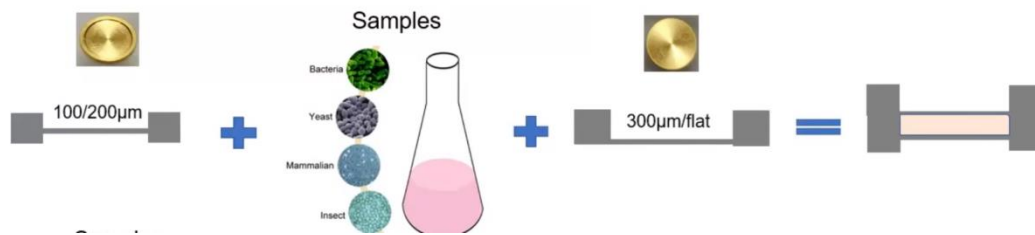
1. 高压冷冻

- ① 高压冷冻前, 腔室内加上液氮, 冷冻替代仪降温至 -90°C 备用。
- ② 一小杯丙酮冷却到 -90°C , 放在冷冻替代仪的样品仓内。
- ③ ICE 仪器内, 大的液氮杜瓦瓶和小的储存杜瓦瓶都加满液氮。
- ④ 装入 2 个半圆板和中间板, 空打一次, 确认温度、压力曲线正常 (查看曲线)。

注: 冷却速率 $\geq 15000^{\circ}\text{C}/\text{s}$; 压力 $\geq 2000\text{bar}$ 。

⑤空打完成之后，依次放好两个半圆板，中间板。选出 A 型 Carrier (200um 面朝上) 放入中间板圆孔内。取新鲜的足够小的样品立刻置于 0.1M 的 PB/Cacodylate (pH7.2-7.4) 清洗一下，然后用滤纸吸取表面水分（黄色标记此步骤可以省略，也可以把取出的样品直接置于冷冻保护剂内），紧接着转移到含有冷冻保护剂（十六碳烯）的培养皿内进行分割，将分割好的部分，装入 A 型 Carrier，加入适量冷冻保护剂（十六碳烯），滤纸吸取多余液体，使冷冻保护剂略高于 Carrier。盖上 B 型 Carrier (平底面朝下)，确保两个 Carrier 中间没有气泡存在。合上顶部红色盖子，启动冷冻程序。

注：两个 Carrier 之间加完样品和冷冻保护剂后，不能存在气泡。



2. 冷冻替代

- ①打开高压冷冻液氮储存罐的门，位于高压冷冻仪的桌面以下。移走储存罐，放置在台阶顶。
- ②用手从杜瓦瓶中取出样品舱，转移到特定的充满液氮的样品塔盘上。打开旋钮，释放样品盖。
- ③液氮里预冷两把镊子尖端，从样品盖中去除透明的半圆柱体。仔细转移中间黑色中板到特殊的释放装置中，顶出 Carrier。（注：镊子尖端必须预冷到液氮温度。样品要时刻保持在液氮环境中，从而避免冰晶的形成。）在液氮液面下，将 Carrier 放置在黑色的样品储存盒中（如果后续接着做冷冻替代可以省去这一步）
- ④把制好的冷冻替代液（最好现配）拿出，放进液氮里，激一下，让其短暂接近于液氮温度，然后直接把 Carrier 放到冷冻替代液里（取走不含组织的一片，打不开的就两片一起投入）。
- ⑤将冷冻管放入能动替代仪的腔室内；设定程序，程序如下：

STEP	T1°C	T2°C	slope	Time	Reagent
1	-90	-90	0	08:00	Acetone
2	-90	-60	5	06:00	Acetone
3	-60	-60	0	08:00	Acetone
4	-60	-60	5	06:00	Acetone
5	-30	-30	0	08:00	Acetone
6	-30	0	5	06:00	Acetone
7	0	0	0	02:00	Acetone

3. 扫尾工作

Bake out, 放出高压冷冻仪的液氮, 大概要六小时, 可过夜。

4. 树脂渗透及包埋

①在冷冻替代仪器程序 0° 将要结束之前, 提前半小时用带有纯丙酮的离心管放入仪器中预冷, 把样品从替代液的冻存管中捞出, 放入已预冷好的丙酮里 (0°) 清洗一次, 时间 30min; 然后纯丙酮常温在清洗一次, 时间 30min。

②清洗完成后开始进行如下流程:

步骤	渗透液	浓度	Time	T (°C)	Where
1	Epon812/丙酮	1: 1	3h	25	摇床
2	Epon812/丙酮	3: 1	过夜	4° 或者干燥箱常温	摇床
3	Epon812	100%	3h	25	摇床
4	Epon812	100%	3h	25	摇床
5	Epon812 (转移到包埋板)	100%	48h	60	烘箱

5. 所需试剂配方

冷冻替代液

(1) 1% OSO₄+0.5% UA+5% MeOH

OSO ₄	0.25 g
MeOH (甲醇)	1.25 ml
UA	0.05 g
丙酮	23.5 ml
合计	25 ml

①将称量好的 UA 放入甲醇 1.25 ml 中进行溶解。

②再量取 10 ml 丙酮用丙酮去稀释钨酸。

③再将两者混匀在定容到 25 ml。

④再进行分装冷冻保存。

注意事项: 使用过程中使用的移液工具都需进行中和处理才能丢弃

(2) 1% OsO₄+5% MeOH

OsO ₄	0.25 g
MeOH	1.25 ml
丙酮	23.5 ml
合计	25 ml

- ①先量取 10 ml 丙酮用丙酮去稀释钨酸。
- ②加入甲醇。
- ③定容到 25 ml。
- ④再进行分装冷冻保存。

注意事项：使用过程中使用的移液工具都需进行中和处理才能丢弃

包埋树脂**TED Epon resin 812 包埋剂**

树脂	剂量	适中	剂量	偏硬
Resin	23.8 ml	29.51 g	25.7 ml	31.4 g
DDSA	16.0 ml	16.08 g	9.3 ml	9.35 g
NMA	11.5 ml	14.15 g	16.5 ml	20.30 g
DMP-30	0.8 ml	0.78 g	0.8 ml	0.78 g

配制方法：

- ①依次加入试剂 Resin、DDSA、NMA 后超声 20 分钟。
- ②再加入 DMP-30 混匀然后超声 20 分钟。
- ③抽真空

保存方法：密封、-20℃冰箱保存。

使用方法：使用前需要回温后到室温再打开容器盖。

处理方法：更换后的废液，不能直接丢弃，需要进行聚合无害化后才可当成普通垃圾丢弃。

注意事项：包埋剂无论单体还是混合物，都具有一定毒性，有的会对皮肤具有刺激性或者致癌，请使用或是配制过程中戴好手套。