

透射电镜检测实验报告

一、实验材料

1. 细胞株

骨髓间充质干细胞（经成骨诱导）

2. 主要试剂

DMEM 培养基（武汉普诺赛，PM150210/500 ml）

OPTI-MEM 培养基（美国 Gibco，31985062）

FBS（美国 Gibco，12664025）

青霉素-链霉素溶液（双抗，武汉普诺赛，PB180120）

0.25%胰酶（美国 Hyclone，SH30042.01/100 ml）

PBS（南京生兴生物，SN331）

3. 主要仪器设备

超纯水仪（美国密理博公司，Milli-Q synthesis）

高压灭菌锅（西安仪创公司，BXM-30R）

4℃冰箱（青岛 Haier 集团，BCD-416）

超净工作台（苏净集团安泰公司，SW-CJ-1F）

CO₂ 培养箱（美国 ThermoFisher，3131）

倒置相差显微镜（日本 Olympus，CKX31 型）

离心机（美国 Eppendorf，5417R）

透射电镜（日本电子株式会社，JEM-2100）

二、实验方法

1. 细胞处理

(1) 待成骨诱导的细胞汇合度为 70~90%时，弃掉培养瓶中的原培养基，加入无菌的 PBS 冲洗 2 次，加入 1 ml 的 0.25%胰酶，37℃ 孵育 1~2 min。

(2) 显微镜观察到大量细胞脱离呈漂浮状态时，立即加入两倍胰酶量的含血清的培养基，终止胰酶消化，倾斜培养皿或培养瓶，自上而下吹打，使未脱落的细胞脱离。

(3) 将培养瓶的液体转移到灭菌的 15 ml 的离心管中，1000 rpm 离心 5 min。

(4) 将离心管上清液去掉，加入新鲜的培养基吹打均匀，使重悬于培养基中。

(5) 用血细胞计数板进行细胞计数：取少量细胞悬液，将细胞悬液滴入盖有盖玻片的血细胞计数板中间平台两侧的沟槽中，使细胞悬液充满盖玻片与计数板间（不要有气泡），静置 2~3 min，通过显微镜计算四个大方格（由 4×4 的小方格组成）中的细胞，计算细胞总量。公式为：细胞数/ml=四大格细胞总数/4×10⁴。

(6) 将细胞以 5×10⁴ 个/孔的量将细胞接种于 24 孔细胞培养板，每板接种 9 孔分为 3 组分别为：Group-1、Group-2 和 Group-3，每组 3 个孔，每孔加入 500 μl 培养基（不含抗生素）培养 12 h。

(7) 将细胞培养板中的培养基去掉，对细胞进行药物处理，在给药后 12、24、48、72 h 时分别取出一个细胞培养板，对细胞进行后续实验。

2. 透射电镜检测

(1) 细胞按照以上分组处理后，1×PBS 洗涤细胞，用 0.25%胰酶消化后，制成细胞悬液。

(2) 2000 rpm、4°C，离心 5 min，弃上清，

(3) 加入适量 1×PBS 重悬细胞，室温下静置 5 min。

(4) 2000 rpm、4°C，离心 5 min，弃上清。

(5) 沿管壁缓慢滴入预冷过的 2.5%戊二醛，4°C过夜固定。

(6) 弃上清，沿管壁缓缓加适量 1×PBS，冲洗细胞团。

(7) 室温静置 10~15 min，重复 2 次。

(8) 加适量 1%的锇酸，4°C静置固定 2 h，1×PBS 再次洗涤 3 次。

(9) 电镜样品经 50%→70%→80%→90%→95%→100%→100%的乙醇梯度脱水，每个步骤的时间 10~20 min。

(10) 用树脂包埋剂包埋样品，超薄切片（厚度 70~90 nm）

(11) 柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50%乙醇饱和溶液分别染色 15 min。

(12) 透射电镜下，收集图像，观察样品的超微结构。

三、实验结果

透射电镜实验结果（图 1）显示，自噬小体形态为双层膜结构包绕的球形空泡，内容为细胞器和各种胞质内容物。在药物作用 12、24、48、72 h 后，与 Group-1 细胞相比，Group-2 和 Group-3 细胞随着时间推移出现大量自噬小体，且 Group-2 的自噬小体数量要多于 Group-3。

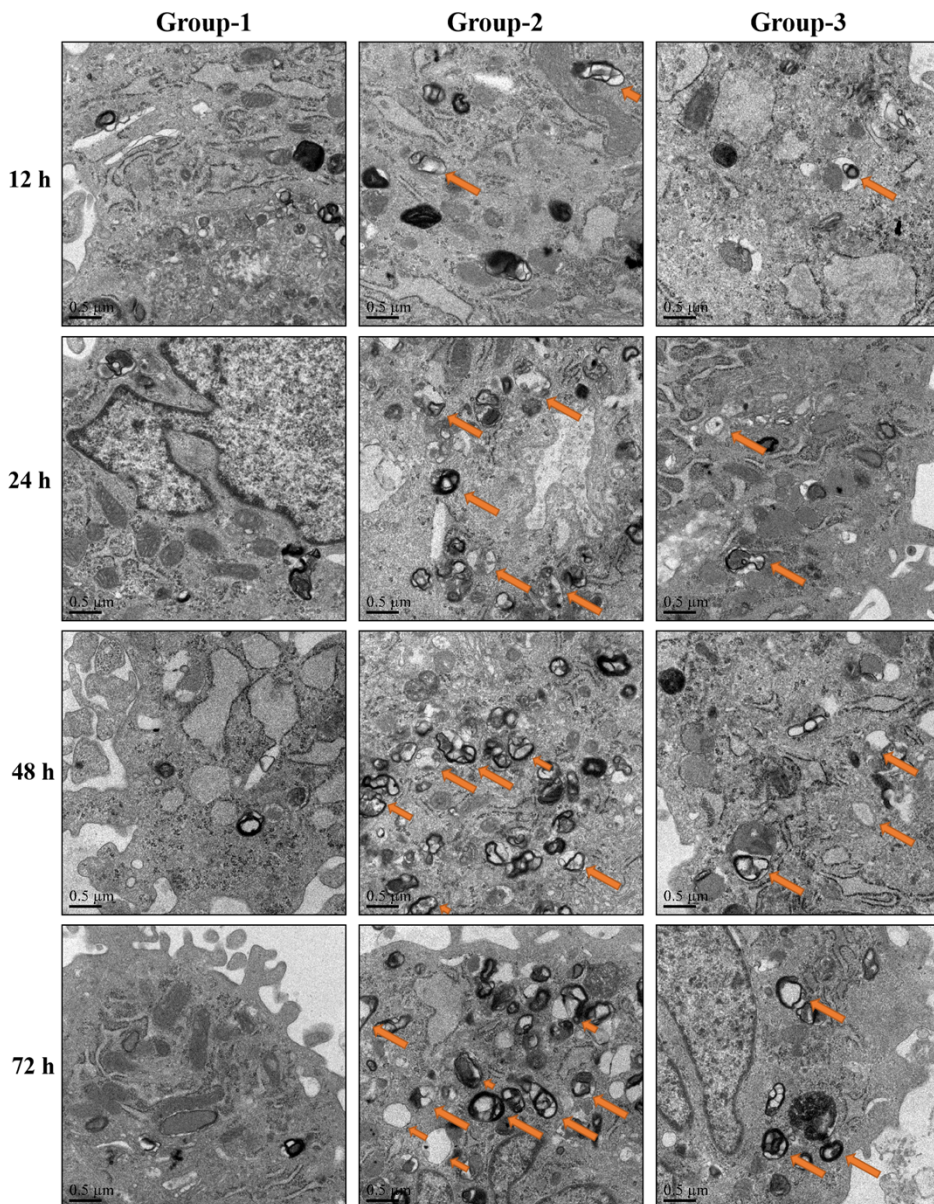


图 1 电镜下成骨细胞超微结构观察（20000×）