

# 果蝇脂肪组织高压冷冻-冷冻替代透射电镜 (HPF-FS TEM)

## High Pressure Freezing-freezing Substitution Transmission Electron Microscope (HPF-FS TEM) of *Drosophila* Fat Tissue

丁隆, 黄勋\*

中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京

\*通讯作者邮箱: [xhuang@genetics.ac.cn](mailto:xhuang@genetics.ac.cn)

引用格式: 丁隆, 黄勋. (2019). 果蝇脂肪组织高压冷冻-冷冻替代透射电镜 (HPF-FS TEM). *Bio-101* e1010302. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010302.

How to cite: Ding, L. and Huang, X. (2019). High pressure freezing-freezing substitution transmission electron microscope (HPF-FS TEM) of *Drosophila* fat tissue. *Bio-101* e1010302. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010302. (in Chinese)

**摘要:** 透射电镜可以很好地反映生物学样品超微精细结构, 高压冷冻固定比传统的化学固定对组织的原有形态破坏程度低, 因而具有更加保真的优势。此实验以果蝇脂肪组织为例描述高压冷冻-冷冻替代透射电镜观察果蝇组织的方法。

**关键词:** 高压冷冻固定, 透射电镜, 果蝇, 脂肪组织

### 材料与试剂

1. 果蝇三龄幼虫
2. 液氮
3. 钨酸 (四氧化钨)
4. 丙酮
5. 醋酸双氧铀
6. Embed 812 树脂
7. NaCl
8. KCl
9. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
10. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
11. HCl
12. 1× PBS (见溶液配方)

### 13. 样品替代液 (见溶液配方)

#### 仪器设备

1. Leica Microsystems HPM 100 高压冷冻仪
2. Leica Microsystems AFS-2 冷冻替代仪
3. Leica Ultracut UCT 切片机
4. JEM-1400 TEM 电子显微镜
5. Gatan832 4k × 2.7k CCD
6. 烘箱

#### 实验步骤

1. 在 1× PBS 中解剖出来的三龄幼虫脂肪体进入 Leica Microsystems HPM 100 高压冷冻固定，并自动进入液氮。
2. 样品在液氮中被转移到替代液中并置入 Leica Microsystems AFS-2 冷冻替代仪 -90 °C 孵育 72 小时。
3. 以 8 °C 每小时的速率升温到 -60 °C 并在此温度维持 12 小时。
4. 再次以 5 °C 每小时的速率升温到 -30 °C 并在此温度维持 10 小时。
5. 再升温至 10 °C 并维持 10 小时。
6. 用纯的丙酮将样品快速洗四次。然后用 1% 的醋酸双氧铀染色 1 小时，然后用纯丙酮洗三次。
7. 用 Embed 812 树脂梯度渗透，按丙酮对树脂比例 2:1 渗透 3 小时，1:1 渗透 5 小时。然后用纯树脂渗透两次，每次 8 小时。
8. 将样品转移至新鲜纯树脂中，60 °C 烘箱中包埋聚合 3 天。
9. 用 Leica Ultracut UCT 切片机进行超薄 (60 nm) 切片，并将切片收集排列于槽铜网格。
10. 用 JEM-1400 TEM 电子显微镜在 80 kV 下操作观察，用 Gatan832 4k × 2.7k CCD 采集图片 (Ding 等, 2018)。

## 溶液配方

### 1. 1× PBS

137 mmol/L NaCl

2.7 mmol/L KCl

10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

用 800 ml 蒸馏水溶解 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4, 加水至 1 L

分装后在 15 psi (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) 高压蒸汽灭菌 20 min, 或通过过滤除菌, 保存至室温

### 2. 样品替代液

2%四氧化钨及 2%水用丙酮配制

## 参考文献

1. Ding, L., Yang, X., Tian, H., Liang, J., Zhang, F., Wang, G., Wang, Y., Ding, M., Shui, G. and Huang, X. (2018). [Seipin regulates lipid homeostasis by ensuring calcium-dependent mitochondrial metabolism](#). *EMBO J* 37(17).