

# 神经所电镜技术平台实验室操作规范

## 目 录

电镜技术平台实验室管理制度.....	2
一、总则.....	2
二、实验室仪器预约和使用规定.....	3
三、违规处理.....	4
神经所电子显微镜室透射电镜使用须知.....	5
一、电子显微镜使用规则和注意事项.....	5
二、电镜样品制备操作流程.....	6
1. 常规电镜样品的取材和固定.....	6
2. 免疫电镜样品的取材和固定.....	7
3. 生物样品制备基本步骤.....	7
4. 高压冷冻与冷冻替代制样基本流程.....	8
5. 自动条带式超薄切片收集系统使用流程.....	10
三、超薄切片室工作制度.....	12
四、超薄切片机使用须知.....	13
五、电子显微镜实验室工作人员职责.....	14
附录：电子显微镜日常调机和 CCD 观察照相步骤.....	15
神经所组织切片室仪器使用须知.....	17
一、组织切片室简介.....	17
二、组织切片室规章制度.....	17
三、仪器管理人员.....	18
四、仪器管理员职责.....	18
五、组织切片室仪器使用须知.....	19
1. 冰冻切片机使用须知.....	19
2. 振动切片机使用须知.....	20
3. 滑动和石蜡切片机使用须知.....	21
附录：仪器操作规程.....	21
HM525 冰冻切片机操作说明.....	21
Leica CM1950 冷冻切片机操作规程.....	23
Leica VT1200S 振动切片机操作手册及注意事项.....	30
大和滑动切片机操作规程.....	32

# 电镜技术平台实验室管理制度

## 一、总则

为保障实验室科研工作的安全顺利进行，特作如下规定：

1. 实验室安全工作要坚持各级主管领导负责制，切实抓好安全教育，树立“预防为主，安全第一”的思想，把安全工作真正落实到实处。
2. 实验室要建立健全有关操作规程，建立安全值班制度；值班人员要坚守岗位，认真做好安全管理工作；工作人员要配合值班人员进行安全检查；每次实验结束和下班前，都要切断电源、水源、气源等，消除火种、关锁好门窗等。
3. 凡有危险性的实验，管理人员必须首先讲清操作规程和安全事项，其后必须同时由两人以上进行实验，不得随便让非实验人员操作。
4. 剧毒药品汞酸要在通风橱内使用，同时要戴口罩、护目镜及双层手套进行操作，并严格做好使用记录；易制毒试剂如丙酮等要严格按照有关规定进行领用，使用时要做好防护措施，使用完要做好使用记录。
5. 实验室要加强对易燃、易爆危险品如乙醇、丙酮、氯仿、环氧丙烷等溶剂的管理，使用时均要在通风橱内进行。
6. 严禁乱拉乱接电源线，经常检修，维护线路以及通风、防火设备等。严禁在实验室内抽烟与未经批准动用明火。
7. 如发生事故或其他紧急情况，应立即采取必要措施并及时报警。
8. 凡违反有关规定造成事故，要及时上报，不准隐瞒不报，并按有关规定对主管领导与当事人予以严肃处理。

实验室安全负责人：孔好

联系电话：021-54921722

火警：119      匪警：110

急救电话：120

电镜技术平台实验室

二〇一七年十月制定

## 二、实验室仪器预约和使用规定

为了更好的满足所内科研人员使用透射电子显微镜、条带式超薄切片自动收集系统、高压冷冻-冷冻替代装置、超薄切片机、修块机、全自动制样机、冰冻切片机、振动切片机、滑动切片机、石蜡切片机等仪器的需要，合理使用实验室资源，本实验室制定如下实验预约和仪器使用规定，从 2017 年 10 月 1 日开始实施。

1. 本实验室所有设备均已纳入中科院仪器设备共享管理平台，提供仪器共享和网上实验预约，其中透射电子显微镜、超薄切片机、条带式超薄切片自动收集系统和高压冷冻-冷冻替代装置可通过中科院仪器设备共享管理平台（<http://samp.cas.cn/sams>）进行预约，冰冻切片机、振动切片机、滑动切片机和石蜡切片机可通过神经所网站（10.10.168.38）→所级中心→电镜技术平台页面进行预约。使用仪器设备需预先在仪器设备共享管理平台登记，使用人必须经过负责人培训和允许方能独自操作。

2. 实验预约时间：电子显微镜实验室（透射电子显微镜、超薄切片机、条带式超薄切片自动收集系统、高压冷冻-冷冻替代装置及样品制备间）开放时间为周一至周五（9:00—17:30），组织切片室（冰冻切片机、振动切片机、滑动切片机和石蜡切片机）开放时间为周一至周六（9:00—23:00）。

3. 如果需要取消已预约的时间，请在预约时间前，在仪器设备共享管理平台上申请撤销实验时间，不按时取消者按预约时间进行收费。

4. 实验中遇到仪器故障，请本实验室工作人员解决，切忌自己排除和隐瞒。

5. 实验结束，请务必填写实验记录单，并填写仪器状态。

6. 实验结束后及时清理仪器，恢复原状。

7. 本实验室仪器均为神经科学国家重点实验室出资购买及维护，使用该仪器需按操作时间进行收费，收费标准如下表所示。

设备名称	服务项目	所 内	院 内	院 外
透射电镜 JEOL-1230	电镜观察	50元/小时	300元/小时	600元/小时
	样品制备	100元/例	200元/例	300元/例
	超薄切片	50元/例 (含3个铜网)	100元/例 (含2个铜网)	160元/例 (含2个铜网)
条带式连续超薄切片收集系统	自动收集连续切片	80元/小时	暂不提供服务	

ATUM system	手动收集连续切片	150元/小时	暂不提供服务	
冰冻切片机 Microm HM525/Leica CM1950	冰冻切片	15元/小时	100元/小时	150元/小时
振动切片机Leica VT1200s	振动切片	5元/小时	50元/小时	100元/小时
大和滑动切片机	滑动切片	5元/小时	50元/小时	100元/小时
高压冷冻-冷冻替代装置 Leica EM HPM100+AFS2	高压冷冻-冷冻替代制样	2014年3月-至今暂未收费, 仅收取液氮和使用的耗材费用		

### 三、违规处理

本实验室的透射电镜和其它设备是公用大型贵重仪器,为了安全和高效地使用仪器,请自觉遵守本仪器使用规定。

在以上规定中: **征得本实验室工作人员同意再开始实验;实验结束后请通知本实验室工作人员;不要自己打开、调节和关闭透射电镜;不要关闭冷冻切片机箱体温度;不要自己改变室内通风及温度控制;用完仪器后请务必登记;在实验中如仪器出现问题请向本室工作人员报告,严禁擅自处理或隐瞒等属重要规定。**对于违反这些规定者,我们将如实上报所仪器委员会,第一次违反者将给予全所通报批评,第二次违反者将给予禁用仪器一个月的处分。

办公室: 生理楼 125 室      联系电话: 54921722

电镜样品制备间 121 室      电子显微镜室 129、133 室

超薄切片机室 131、135 室隔间

冰冻切片机、振动切片机室新大楼 627 室

滑动切片机、石蜡切片机室新大楼 627 室

## 神经所电子显微镜室透射电镜使用须知

### 一、电子显微镜使用规则和注意事项

1. 透射电镜开放时间为每周一至周五（9：00—17：30），国定假日恕不接待。
2. 观察样品请提前一周预约登记，要求网上填写预约单，如取消预约请提前1天以上申请撤销实验，否则将按预约时间全额收取仪器使用费。
3. 进入本室须更换拖鞋，随时保持室内清洁，不得大声喧哗和嘻闹，仪器使用过程中不得同时超过3人。
4. 实验者必须经过工作人员培训、掌握仪器的操作方法后，才能独立操作仪器做实验。所外人员观察电镜必须由工作人员全程协助操作。
5. 实验开始前请先刷园区卡记录开始时间，并在征得工作人员同意后再开始实验，不得擅自启动仪器。
6. 在观察过程中，使用人员不得擅自变更仪器已设定的参数，不得触碰任何开关。
7. 遇到仪器故障或状态不稳定，应及时告知工作人员，并上报部门主管，严禁擅自处理和隐瞒仪器故障，待异常情况排除和解决后才能继续使用。
8. 除工作人员外，其他人不得触碰开关机开关。
9. 样品杆非常脆弱，使用时必须轻拿轻放，严禁样品杆掉落，样品杆上的封闭圈定期涂上真空油脂，以免插拔样品杆时漏气，导致仪器高压断开。
10. CCD相机在强电子束照射下会瞬间损坏，采图时必须保证 **Current density** 值调至  $15.0 \text{ pA/cm}^2$  以下才能插入相机探头，确保检测荧光屏电流的光标在黄绿色区域内。
11. 拔出样品杆前必须关闭灯丝电流，否则会导致高压自动断开；拔出样品杆前必须将样品杆归零，否则将损坏样品杆。
13. 实验结束后请及时刷园区卡记录结束时间，并在公用仪器使用登记本上如实登记使用情况，要求填写开始时间、结束时间和设备状态，姓名栏必须填写中文全名。
14. 实验数据拷贝只能使用一次性光盘，严禁使用U盘、移动硬盘。由于存储空间有限，请实验者务必及时备份自己的实验数据，实验数据的安全由实验者本人负责。

15. 对违反规定造成仪器设备损坏者，上报公共技术服务中心视情节轻重予以处理。

16. 透射电子显微镜按操作时间收费，标准如下：

- a. 所内各课题组收费 50 元/小时；
- b. 院内各单位收费 300 元/小时；
- c. 院外其他科研单位收费 600 元/小时；
- d. 刻录数据光盘 10 元/张。

预约单	样品量	取材固定	制样周	预约切片	预约电镜	采图
阅读电镜样品制备流程，网上预约制样并填写电镜预约单。	确定样品数量，取相应量固定液。	准确取材，迅速固定，及时送样。	样品制备，耗时 1 周时间。	网上预约超薄切片时间，时长因样品量和定位难易而定。	网上预约电镜观察时间，一次不超过 8h。	电镜下观察细胞结构，拍照，拷贝数据，付费。

## 二、电镜样品制备操作流程

### 1. 常规电镜样品的取材和固定

**组织样本：**脱离生物体的组织如果不及时进行适当的处理，会出现自溶现象。因此，为了使细胞结构尽可能的保持真实状态，取材时必须做到快、小、准、冷。动作迅速，尽快从活体中取出样品，小于 1 立方毫米，投入 2.5%戊二醛中，固定 2 小时或更长时间。取材中机械损伤要小，操作宜轻，避免牵拉、挫伤和挤压。操作温度最好在低温下进行，以降低酶的活性，防止自溶。取材部位要准确。

**细胞样本：**细胞样本对外界环境较为敏感，取样过程需迅速操作。

A. 悬浮细胞——将悬浮细胞连同培养液放在尖头离心管中离心 5min，2000r/min，后弃上清液，加入 2.5%GA（0.1mPB 配制，pH 7.4），并用滴管轻轻吹打，使细胞悬浮于固定液中，并在 4℃下固定 2-3h 或过夜。由于电镜样本制备过程中会不可避免地损失掉一部分细胞，因此细胞必须达到一定数量，即为离心后细胞量一般为  $10^6$ （至少为黄豆样大小）。若细胞数量较少可用 2—3%琼脂或明胶包埋。



B. 单层贴壁细胞——以  $1 \times 10^8$  个细胞数接种到多聚赖氨酸包被后的塑料薄膜盖玻片 (Thermanox coverslip, EMS Catalog #72274) 上。细胞培养 24h 后移去培养液, 用 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (PBS) 轻轻冲洗细胞, 吸去磷酸缓冲液后迅速加入新鲜的 2.5%戊二醛 (pH 7.4) 进行前固定 2h。

**脑片样本:** 用含 4%多聚甲醛、1%戊二醛或 0.2%苦味酸的 0.1M 磷酸缓冲 (PB) (pH 7.2-7.4) 作为灌注液, 以大鼠为例, 首先用 50 毫升生理盐水 (37℃) 清洗血液, 接着用 50 毫升灌注液 (37℃) 快速灌注固定, 然后用 250-300 毫升冷灌注液 (4℃) 慢速灌入, 持续 10-15 分钟后取材, 置组织于 2.5%戊二醛固定液中 3h 以上 (因组织大小和厚度而定), 在 4℃冰箱中保存。

振动切片取 100-200um 厚度的脑片。将组织取出, 滤纸吸干水分后, 用 502 胶固定在载物台上, 保证正对刀片的一面为实体组织, 加入  $1 \times$  PB 缓冲液 (冰的), 液面要没过组织块。收集脑片后选取特定研究区域, 如皮层区、海马区、胼胝体区等, 放入 0.1M PB 缓冲液中漂洗三次后进行后续制样步骤。

## 2. 免疫电镜样品的取材和固定

免疫电子显微镜的基本原理是应用电子显微镜下可观察到的 (高电子密度的) 各种标记物来标记某种抗原物质, 达到对这种抗原物质在细胞中的超微定位, 或对神经组织进行超微结构研究的目的, 因此, 固定液浓度选择的主要依据是是否有利于最大限度地保存要标记的抗原的免疫活性, 与此同时最大限度地保存细胞或神经组织的超微结构。

免疫电镜样本取材步骤与常规电镜大致相同, 主要区别在于固定液浓度上, 一般多采用含 4%多聚甲醛、0.1-0.5%戊二醛或 0.2%苦味酸的 0.1M 磷酸缓冲液 (PB) (pH 7.2-7.4)。上述浓度仅供参考, 由于样本情况不同, 所适合的固定液浓度也不相同, 进行免疫电镜实验前, 请提前致电电镜室咨询相关准备事宜。

## 3. 生物样品制备基本步骤

1) 取材和固定: 组织块小于 1 立方毫米, 2.5%戊二醛前固定 3 小时或更长时间。

2) 用 0.1M 磷酸漂洗液漂洗 15min, 3times

3) 后固定: 用 1%锇酸固定 2-3h

4) 用 0.1M PB 缓冲液漂洗 15min, 3times

5) 脱水: ddH<sub>2</sub>O 稀释酒精溶液, 梯度脱水后组织变脆要慢慢移动, 在 4℃ 的 50、70、80、90%梯度酒精中脱水, 在每一浓度酒精中停留 5-10min, 在 100% 酒精再停留 15min, 换液 3 次。

50%乙醇	10-15min
70%乙醇	10-15min
80%乙醇	10-15min
90%乙醇	10-15min
100%乙醇	15min, 3times
纯环氧丙烷	15 min, 3times

6) 渗透:

纯环氧丙烷+包埋液 (2: 1)	室温 1h
纯环氧丙烷+包埋液 (1: 1)	室温 2h
纯环氧丙烷+包埋液 (1: 2)	室温 2h 或者可过夜
纯包埋液	室温 3-4h

7) 包埋和聚合:

37 °C烘箱内	过夜
45 °C烘箱内	12h
60 °C烘箱内	48h

8) 超薄切片机切片, 切片厚度 70 nm

9) 4%醋酸铀-1%枸橼酸铅双染色

10) 透射电镜 JEOL JEM-1230 (80KV) 观察, 采图。

#### 4. 高压冷冻与冷冻替代制样基本流程

##### 4.1 样品准备

样品类型	材料准备方式	HPF 样品 Loading	冷冻保护剂
微生物 (micro-organism) 或 培养细胞 (culture cells)	离心或是 membrane filter 浓 缩	1) caeierke 可以先用 1-Hexadecene 浸一下, 用小块 滤纸吸一下 carrier; 2) 将样品加入 carrier 中。	1-Hexadecene 浸 泡 Carrier



动物组织	切成小块，大小不能超过 carrier 体积； 活检枪取材	直接加到含有 1-Hexadecene 或 20%BSA/PBS carrier。	1- Hexadecene 或 20%BSA in PBS
------	----------------------------------	---	-------------------------------------

## 4.2 神经组织制备步骤

### (1) 取材

方法一：快速将脑组织从活体中取出（断头法），低温（0℃）下在人工脑脊液（ACSF, artificial cerebrospinal fluid）中振动切片，切片厚度 200 μm，然后于 37℃ 下，在 ACSF（不断通 95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 混合气）中复苏 30min。

方法二：快速将脑组织从活体中取出（断头法），用活检枪（biopsy）快速准确取出样品进行高压冷冻。

### (2) 高压冷冻

快速（1min 之内）将复苏好的组织切割成很小的样品，迅速放入添加了 20%BSA/ACSF (w/v) 冷冻保护剂的三明治式载体（carrier）中，推入高压冷冻仪（HPM100）进行高压冷冻。

### (3) 冷冻替代

（全程在液氮中）将载体从样品托上卸载下来，转移至已预冷至 -140℃ 的冷冻替代液中，按已设置好的冷冻替代步骤进行置换，冷冻替代的 protocol 如下：

-140℃ — -90℃，1h；

-90℃ — -90℃，72h；

-90℃ — -60℃，6h；

-60℃ — -60℃，24h；

将冷冻替代液换成纯丙酮；

-60℃ — -30℃，6h；

-30℃ — -30℃，12h；

-30℃ — 0℃，6h；

0℃ — 0℃，2h；

0℃ — 25℃，5h；

换纯丙酮，r.t.，15min；

换纯丙酮，r.t.，15min；

渗透

丙酮/ Epon812 树脂 = 2/1，r.t.，2h；

丙酮/ Epon812 树脂 = 1/2，r.t.，2h；

纯 Epon812 树脂, r.t., overnight;

聚合

37℃, 12h;

45℃, 12h;

60℃, 48h。

超薄切片:

超薄切片 70nm, 收集于镍网上(若免疫标记, 可在此步进行, 完成后在进行后续步骤)

染色

铀染 30 min, 铅染 7min。

电镜观察

烘干后于 JEOL -JEM1230 透射电镜上观察拍片。

#### 4.3 使用规范及注意事项

- 1) 严格遵守网上预约机制进行使用, 请提前一周预约。
- 2) 明确样品类型、数量和储存条件, 以便工作人员提前配备实验所需器具和试剂。
- 3) 递送样品时请附带 2-3 篇相关文献, 以备参考。
- 4) 若涉及到实验材料需现场解剖的情况, 请自行准备好解剖工具及缓冲液。
- 5) 高压冷冻实验过程中请遵从工作人员指示进行操作, 不可随意调整仪器参数。
- 6) 实验中会频繁进行液氮填充, 为避免液氮喷洒冻伤, 请戴好手套和口罩, 穿好实验服进行操作, 严禁穿短裤和拖鞋进入实验室。
- 7) 涉及到多个课题组人员同时进行实验的情况, 请按照工作人员的时间分配, 有序进行上机操作。
- 8) 实验周期较长, 请及时做好样品登记手续, 以便工作人员电话联系进行电镜检测。

#### 5. 自动条带式超薄切片收集系统使用流程

- 1) 实验前要与工作人员沟通方案, 根据样品具体情况制定相应的三维重构电镜样品制备流程、染色和切片收集方案。
- 2) 取样送样当天登录预约系统 (<http://samp.cas.cn/admin.jsp>), 预约“电镜制样系统”, 一周后预约“自动条带式超薄切片系统”, 并确定好所需收集片数和切

片厚度。

- 3) 对 Kapton 条带和硅片进行清洁及亲水化处理，准备适宜长度的收集材料。  
使用泡沫条和酒精清洁钻石刀，防止灰尘划伤切片。
- 4) 保持切片室湿度 50%，温度 22-26℃。
- 5) 打开机器下方总电源开关，然后打开 RMC 切片机电源，打开 ATUMtome 收集装置电源，最后打开关联电脑。点击 PT-PC 软件，通过该软件对切片机进行调试，按要求安装 Kapton 条带，保持条带张力为 2900 mV 左右。
- 6) 点击 BACK 和 OH 按钮点亮光源，将样品装到样品头上，先单面刀片粗修，再使用修块刀细修成规则的长方形（截面约为 1.5 mm×1 mm）。
- 7) 使用旧的钻石刀进行对刀，待切下完整切片后，再使用新的钻石刀超薄切片，点击 Set Uper 和 Set Lower 设置切片窗口，设置切片厚度为 40-50 nm，切片速度为 0.4-0.6 mm/sec，点击 START CUT 按钮自动切片，待其切片状态稳定，且形成连续条带后停止切片。
- 8) 升高收集装置，将其自左向右滑动靠近钻石刀刀口上方位置，收集器探头尽量平行于切片条带的中心位置，降低探头接触水面，探头距刀口的距离建议为切片长度的 1.5 倍，锁定装置，防止 X 轴和 Y 轴方向移动。
- 9) 点击 START CUT 按钮，待切片稳定再点击 START TAPE 按钮，进行连续超薄切片的收集，切片过程易受到外界条件的影响（湿度、温度、振动、静电），造成切片无法顺利爬片，可人为通过睫毛棒将切片拨上条带，全程需要人工实时监控和干预。
- 10) 完成收集后，将收集装置升高，高于钻石刀水槽边缘，移出收集装置，断开条带，对收集轮上的条带进行特定比例剪裁，使用导电胶将其按照顺序粘贴在 4 英寸的硅片上。对切片的厚度和顺序进行标识。
- 11) 完成以上工作后，切片机附近及台面收拾干净，各种工具归置原处，做好机器使用记录后可以关灯离开。
- 12) 使用 Q150T-ES 镀膜仪对硅片上的连续切片进行脉冲式喷碳，厚度为 10-15nm，利于后期场发射扫描电镜采图。
- 13) 喷碳后的样品按照样品顺序放置收纳盒内，将其放置密闭的低真空仓内即可（保证清洁和干燥）。

注：1) -2) 步骤由委托用户操作，3) -13) 步骤由工作人员操作。

### 三、超薄切片室工作制度

本平台目前有三台超薄切片机,分别为Leica EM UC6、Leica EM UC7 和 RMC 超薄切片机, 超薄切片机室工作制度如下:

1. 做好对超薄切片机的维护和调试,按照正确使用流程使用机器,保证超薄切片机的安全使用,技术人员做好卫生整洁,避免发生事故,使超薄切片机工作维持正常工作。
2. 超薄切片机在接受预约后,技术人员及时与实验者进行沟通,及时准备实验,进行半薄切片操作,课题组实验者定位该样品,并在光镜下实时检测目标部位或细胞来确定技术人员是否开始超薄切片。
3. 超薄切片机开放时间为每周一至周五(9:00~17:30),周末(周六、周日)及法定节假日不开放,技术人员在工作时间进行合理安排,保证各个课题组实验顺利进行。
4. 技术人员应按实验计划认真做好实验准备工作,确保工作环境适宜,保证超薄切片的稳定收集,便于后期拍摄采图。
5. 技术人员根据课题组的课题要求,翻阅书籍和文献,不断完善自己的专业技能,以满足更多的课题组的实验需求。
6. 在超薄切片机自动切片的过程中,实验相关人员应保持有人在监视,不应擅自离开机器,直至自动切片完毕为止,保证实验的质量和完整性。
7. 在超薄切片过程中,使用试剂涉及有毒有害的物质,注意自身保护,以免造成技术人员和实验者的人身伤害。
8. 技术人员对超薄切片机的突发意外情况,要及时合理的进行处理并做详实的记录,及时与维修工程师进行交流解决问题。
9. 超薄切片机使用权限仅限管理技术人员,实验者不得擅自使用,对违反使用导致仪器、器械损坏的人员,要追究当事人责任。
10. 超薄切片机使用完毕后,技术人员注意刀具以及实验台的清洁,将设置复原归位,即可切断电源,将仪器的外部遮灰罩套上,待仔细检查后方可离开。每次超薄切片机使用完毕后,对工作进行详细记录以便数据追踪。

## 四、超薄切片机使用须知

1. 超薄切片机网上预约为项目预约，请提前一周电话预约，由技术人员操作，实验者定位该组织，并在光镜下实时检测目标部位或细胞。
2. 超薄切片机开放时间为每周一至周五（9:00~17:30），周末（周六、周日）及法定节假日不开放。
3. 超薄切片机使用权限仅限管理人员，其他人员不得擅自使用。
4. 超薄切片机所用为 **Diatome** 钻石刀，价格昂贵，实验者所切包埋块中确定无金属颗粒、无骨质成分及其他硬性的材料，若发生因样品不当导致钻石刀受损，由该实验者负全责。
5. 仪器使用完毕后，实验者在委托人一栏中如实登记实际使用情况，请将贴有样品切片的玻片带走。
6. 超薄切片机的收费标准如下：
  - a) 所内各课题组收费 50 元/例，含 3 个铜网；
  - b) 所外生科院内各单位收费 100 元/例，含 2 个铜网；
  - c) 生科院外其他科研单位收费 160 元/例，含 2 个铜网。

## 五、电子显微镜实验室工作人员职责

- 1) 向各课题组来本平台做测试观察的实验者提供技术咨询和电镜样品制备方案。
- 2) 生物电镜样品制备的用户请提前至工作人员处领取固定液，样品交由工作人员后，先预约电镜制样系统，两周后预约电镜；负染类样品可直接预约电镜。
- 3) 透射电子显微镜属于大型精密仪器，设备具体操作、调试由本平台工作人员负责，电镜 CCD 观察采图环节由实验者完成。工作人员需要对首次实验者提供专业培训和要点讲解。
- 4) 实验开始时，应帮助实验者找到电镜样品，设置好仪器参数后采集一张符合标准的图像，然后再让实验者独立实验。
- 5) 换样时必须轻拿轻放样品杆，严禁样品杆掉落，样品杆上的密封圈要定期涂上真空油脂，以免插拔样品杆时漏气，导致仪器高压断开；拔出样品杆前必须关闭灯丝电流。
- 6) 实验结束后检查仪器状态、灯丝、光阑状况，如发现异常情况及时上报并做故障排查。
- 7) 保持实验室清洁整齐，经常检查实验室的空调温度，水循环系统、氮气瓶是否处于正常工作状态。实验完毕离开实验室前，要关好门、窗、水、电，确保仪器安全。
- 8) 每周检查一次计算机容量，发现硬盘容量小于 5 G 时，应检查各个课题组的数据量和时间，将超过一周的数据删除。
- 9) 实时填写仪器使用记录，日常要做好更换灯丝、设备维护、调试和维修记录。
- 10) 工作人员严禁带无关人员进入实验室，不要在实验室公共电脑上安装其他软件。
- 11) 工作人员使用丙酮、环氧丙烷等易制毒试剂需要填写剧毒药品、易制毒品使用追踪表。实验中产生的树脂、钨酸、醋酸铀废液严禁倒入水槽，务必回收存放指定位置。

## 附录：电子显微镜日常调机和 CCD 观察照相步骤

1. 打开 LENS ON;
2. 等待 10~15min 后, 打开 **HT ON**;
3. 等待 15min 后取出样品杆, 装入载有样品的铜网后送入样品室; (此步为工作人员操作)
4. 待达到允许的真空度后, 打开 **Beam ON**;
5. 打开灯丝后, 观察到荧光屏上的光斑, 用 **Brightness** 旋钮 (左侧控制面板上) 调节亮度, 逆时针旋转缩小光斑, 顺时针旋转扩大光斑, 光斑尽量保持在中央。若出现偏光, 即荧屏上明暗不均一, 则需按下左侧面板的 **Bright shift**, 再拖动鼠标右键, 在荧光屏下边观察边进行移动调整, 直至光斑在荧光屏中心为止;
6. 右侧面板上的轨迹球用以移动样品, 找到目标观察物; 拨动左侧面板的 **MAG/CAML** 钮控制放大倍数, 右拨为放大, 左拨为缩小; 调到目标的放大倍数后旋转 **Focus** 钮用以聚焦, 拨下荧光屏上的小镜子观察, 直至聚焦清楚;
7. 观察电脑屏幕上 Current Density 的数值, 旋转 **Brightness** 钮将其调节至 15 pA/cm<sup>2</sup> 以内。切记: Current Density 的数值不能超过 15 pA/cm<sup>2</sup>!!
8. 插入 CCD, 即在 Digital Microscopy 软件上 Camera Inserted 前打钩, 点击 **Start View**, 若图片还未聚焦清楚, 可再次聚焦。
9. 选择满意的区域后, 点击 **Start acquire** 获取图片, 点击 **123**, 保存图片。若要改变倍数或变更网格位置观察, 都先要撤出 CCD, 方可进行调节, 切勿插入 CCD 时调节, Current Density 的数值会随倍数改变而改变!!
10. 看完样品后撤出 CCD, 倍数降至 2000 倍, **Beam OFF** 关灯丝; 等待 10~15min 后 **HT OFF**, 关闭高压; (以下步骤均由工作人员操作)
11. 等待 10~15min 后关闭左边面板上的 HT。
12. 最后的使用者必须确认 CCD 相机完全正常并置于退出状态, 关闭灯丝电流、高压, 归零样品杆, 将桌面整理干净后方可离开!!

### ☀️注意事项:

- 1) 使用仪器过程中如发现任何不正常情况、或有任何不清楚的时候, 请立即联系有关老师! 不可擅自改变操作步骤。
- 2) 除工作人员外, 其他人不得触碰开关机开关;
- 3) 样品杆非常脆弱, 使用时必须轻拿轻放, 严禁样品杆掉落, 样品杆上的封闭圈定期涂上真空油脂, 以免插拔样品杆时漏气, 导致仪器高压断开;



- 4) CCD 相机在强电子束照射下会瞬间损坏，必须保证 Current density  $< 15.0$  pA/cm<sup>2</sup> 的条件下才能插入相机，在整个使用过程中必须保证相机上检测荧光屏电流的光标在黄绿色区域内，一旦光标进入红色区域，相机将瞬间损坏；
- 5) 拔出样品杆前必须关闭灯丝电流，否则会导致高压自动断开；
- 6) 拔出样品杆前必须将样品杆归零，否则将损坏样品杆；
- 7) 所有测试数据均需按规定存放在指定文件夹内，为防止电脑中毒，严禁在仪器设备上使用外来 U 盘，所有数据必须用光盘刻录。

## 神经所组织切片室仪器使用须知

### 一、组织切片室简介

组织切片室隶属于神经科学国家重点实验室，是神经所重要的公共实验室之一。室内有冰冻切片机（Leica CM1950、Microm HM525）、振动切片机（Leica VT1200S）、石蜡切片机（Leica RM2255）、滑动切片机（大和）等仪器，它们是显微免疫细胞化学研究的重要工具，在细胞分子生物学、病理学和肿瘤诊断中具有广泛的应用。组织切片室内仪器使用率较高，涉及课题组达二十多个，为组织形态学的研究提供设备支持。

### 二、组织切片室规章制度

- 1. 预约机制：**实验人员需严格遵守网上预约机制，请在 <http://10.10.168.38/> 网站上预约使用。如需取消预约请提前一天申请撤销，若不及时取消，将按照系统默认的预约时间段收费。
- 2. 培训制度：**仪器管理员不再接受零散培训，课题组人员如需培训，请至各课题组管家处登记，由管家对人员进行统计，或与其他课题组人员一起，集中 5-10 人后，发邮件至仪器管理员申请培训。
- 3. 门禁开通：**新进人员经过培训后，由管家发邮件至平台主管申请开通门禁。未经培训而擅自使用仪器者，一经查出立即通报批评。
- 4. 门禁使用：**出入切片室请按门禁使用方法正确开启和关闭大门，严禁在室内将反锁栅打开使门无法正常关闭。
- 5. 设备调整：**严禁擅自调整仪器设定的参数（除切片厚度、温度），不得随意改变仪器设备及配件的组装，严禁擅自固定相关仪器底座。未经许可不得关闭冰冻切片机等低温仪器，以免对其他人实验造成影响。
- 6. 公用放置：**实验配件如冻头、毛笔及防卷板等，使用结束后请及时放回原位，不得随意带回自己实验室保存。如有特殊需求，请提前告知工作人员。
- 7. CO<sub>2</sub> 换气：**室内有两瓶 CO<sub>2</sub> 气体，轮流使用，如发现当前瓶中气体不足，请及时将写有“空瓶”的牌子挂上，并致电告知仪器管理员。
- 8. 应急处理：**实验过程中请严格遵守仪器使用规则，如不小心将缓冲液或 OCT 洒入仪器狭缝中，请及时进行清理或寻求管理人员帮助，不可置之不理。
- 9. 故障处理：**仪器使用中如发现异常或故障，请及时拨打办公室电话。不得擅自拆卸零件，若发现人为拆卸而导致的仪器损毁，将上报相关部门给予严肃

处理。

10. **室内卫生：**实验过程中产生的垃圾请及时清理，以免落入仪器狭缝中引起堵塞，使仪器无法正常运行。仪器使用结束后，检查刀座上刀片是否卸载下来，分类安放刀片、玻片和牙签等锋利物品，妥善保管好随身物品。严禁将脑片、固定液等实验废弃物丢入水槽。
11. **仪器使用记录：**仪器使用结束后请及时登记好实际使用时间，要求填写开始时间、结束时间和设备状态，姓名栏必须填写中文全名。月底会根据仪器的实际使用时间进行统计收费，未按要求登记者将直接按网上预约时间进行收费。
12. **违规处理：**为了安全高效地使用本室仪器，请自觉遵守以上规章制度。未开通门禁不得使用本室仪器；不要关闭冰冻切片机箱体温度；不要改变室内通风及温度控制；用完仪器后请务必登记；在实验中如仪器出现问题请向本室工作人员报告，**严禁擅自处理或隐瞒**等属重要规定，对于违反上述规定者，我们将如实上报所仪器委员会，第一次违反者将给予全所通报批评，第二次违反者将给予禁用仪器一个月的处分。

### 三、仪器管理人员

设备名称及型号	负责人	紧急联系电话
<b>Leica 1950 冰冻切片机</b>	王旭	<b>18636901879</b>
<b>Leica 振动切片机</b>	王旭	
<b>Leica 石蜡切片机</b>	王旭	
<b>美康 2010 冰冻切片机</b>	潘立君	<b>15221972327</b>
<b>美康 2007 冰冻切片机</b>	潘立君	
<b>大和 滑动滑动切片机</b>	潘立君	

### 四、仪器管理员职责

- 1) 认真落实仪器设备的日常清理、维护、调试及检测工作，了解仪器运行状态，及时做好仪器设备的使用、维修和保养记录。
- 2) 学习和探究相关仪器的最佳使用方法，协调和帮助相关课题组完成组织切片

实验工作。

- 3) 妥善保管实验室内所有仪器及备用配件，做好与仪器相关的一些低值易耗品和材料的采购、存储和发放，负责好固定资产和低值易耗品的登记工作。
- 4) 保存好仪器设备的使用说明和技术资料等文件，认真做好归档工作，做到有据可依。
- 5) 负责实验室内仪器设备清洁工作，对堆积的废弃耗材进行分门别类，统一回收处理。
- 6) 检查实验室内气瓶等消耗品的使用情况，及时给予补充和更换。
- 7) 实时了解仪器运行状态，及时做到故障信息反馈，咨询仪器使用人员操作中所发现的异常问题，并与工程师沟通和联系，确定故障解决方案，做好仪器维修工作。
- 8) 仪器突发故障后，须在预约系统上更新仪器设备状态，及时告知各课题组发生故障的仪器设备和情况；待仪器恢复正常工作后，第一时间通知用户可以使用。
- 9) 积极组织仪器的培训工作，接收课题组管家关于仪器培训的申请后，及时与申请人联系并确定培训时间；培训结束后再次确认参加培训人员信息，做好登记。
- 10) 负责课题组新进人员门禁的开通，门禁使用过程中遇到问题及时帮助解决。
- 11) 了解上级主管部门的仪器管理公告，贯彻落实仪器设备的最新管理方案。

## 五、组织切片室仪器使用须知

### 1. 冰冻切片机使用须知

目前本室有三台冰冻切片机，分别为 HM525-2007，HM525-2010，Leica CM1950，使用规则如下：

1. 冰冻切片机使用须在神经所网站（[10.10.168.38](http://10.10.168.38)）→所级中心→电镜技术平台页面进行预约。
2. 冰冻切片机开放时间为每周一至周六（9:00~23:00），19:00 之后若要切片的同学须征得管理人员的同意之后方可使用。周日及法定节假日不开放。
3. 初次使用本仪器的科研人员，须经管理人员指导后方可使用，不得擅自对仪器进行参数设置或开关机操作，如发现仪器异常，请立刻通知管理人员，待

故障排除后方可再次进行使用。

4. 仪器使用完毕后，请及时清理使用过程中产生的垃圾，包括机箱内部，实验台附近，并检查刀座上刀片是否卸载下来，以上几点确定无误后在实验登记本上如实填写仪器使用时间。
5. 科研人员如向平台借用冻头，需按时归还，大批量、经常切片的课题组可以作为耗材来我室领取冻头，自行保管。
6. 对违反使用规则造成仪器损坏者，上报有关部门并视情节轻重予以处理。
7. 需要取消预约的科研人员，请提前一天申请撤销该项预约，若不及时取消，将按照系统默认的预约时间段收费。
8. 冰冻切片机由神经科学国家重点实验室出资购买及维护，使用该仪器需按实际操作时间进行收费（不足半小时按半小时计），标准如下：
  - a) 所内课题组收费 15 元/小时；
  - b) 所外生科院内单位收费 100 元/小时；
  - c) 生科院外其他单位收费 150 元/小时。

## 2. 振动切片机使用须知

目前本室有振动切片机一台，为 Leica VT1200 S，使用规则如下：

1. 振动切片开放时间为周一至周六 9:00—23:00，周日及法定节假日不开放，使用前必须在神经所网站（[10.10.168.38](http://10.10.168.38)）→所级中心→电镜技术平台页面进行预约。
2. 使用者必须经过实验室工作人员培训后方可单独使用。使用中应遵守操作规程，如发现故障应即时向负责人报告，严禁擅自处理或隐瞒。
3. 每次实验的实验者请不要超过 2 人，无关人员请不要私自进入实验室。
4. 实验结束后，请把试验台和仪器清洗干净，废动物组织扔到垃圾筒，实验中使用的刀片、502 胶水、PBS 请自行准备，用完带走，请勿遗留在实验室。
5. 实验结束，请务必填写实验记录单和仪器状态。
6. 振动切片机由神经科学国家重点实验室出资购买和维护，使用该仪器按实际操作时间收费，标准如下：
  - a. 所内各课题组收费 5 元/小时；
  - b. 院内各单位收费 50 元/小时；
  - c. 院外其他科研单位收费 100 元/小时。

### 3. 滑动切片机和石蜡切片机使用须知

目前本室有大和滑动切片机和石蜡切片机（Leica RM2255）各一台，使用规则如下：

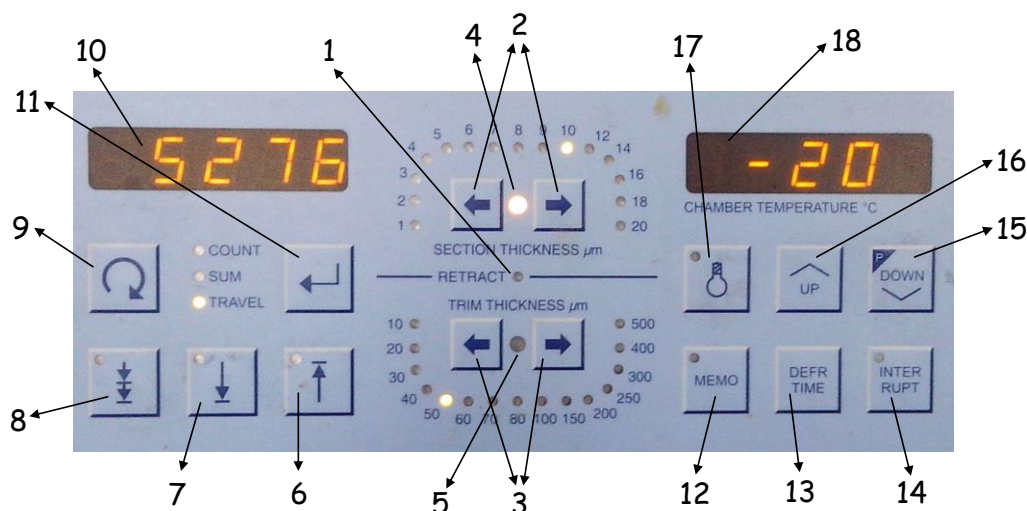
1. 开放时间为周一至周六 9:00—23:00，周日及法定节假日不开放，使用前必须在神经所网站（[10.10.168.38](http://10.10.168.38)）→所级中心→电镜技术平台页面进行预约。
2. 使用者必须经过实验室工作人员培训后方可单独使用。使用中应遵守操作规程，如发现故障应即时向负责人报告，严禁擅自处理或隐瞒。
3. 每次实验的实验者请不要超过 2 人，无关人员请不要私自进入实验室。
4. 实验结束后，请把试验台和仪器清洁干净，废动物组织扔到垃圾筒，实验中使用的刀片、502 胶水、PBS、毛笔、载玻片等自行准备，用完带走，勿遗留在实验室。
5. 实验结束，请务必填写实验记录单和仪器状态。
6. 滑动切片机由神经科学国家重点实验室出资购买和维护，使用该仪器按实际操作时间收费，标准如下：
  - a. 所内各课题组收费 5 元/小时；
  - b. 院内各单位收费 50 元/小时；
  - c. 院外其他科研单位收费 100 元/小时；
  - d. 耗材：一次性刀 20 元/把。

### 附录：仪器操作规程

#### HM525 冰冻切片机操作说明

##### 一、仪器主界面说明：





箱体温度设定：16 和 15 键调整

切片厚度设置：2 键调整

修片厚度设置：3 键调整

精细推进指示灯：4

修整推进指示灯：5

粗进，退回：6

粗进，向前：7

修片和切片转换键：8

滚屏键：9

显示屏，左侧：10

重置键：11

记忆键：12

除霜时间设定：按住 13 不放，利用 16 或 15 键调整；手动即时除霜：按住 13 和 11 键

除霜程序终止：14

半导体制冷激活：连续快速按 15 两次

时间设定：同时按住 12 键和 13 键不放，用 16 和 15 键设定

冷冻箱照明开关：17 键

显示屏，右侧：18

## 二、仪器操作说明：

1. 设置好 HM525 机箱内的温度（一般已设好）；
2. 将组织样品放到冷冻头上，用包埋剂固定，放在 CO<sub>2</sub> 速冻装置上进行冷冻（注：将黄铜冷冻头固定在装置上，将组织样品放在冷冻头上，样品周围辅助放少许冷冻包埋剂 O.C.T 后，打开二氧化碳钢瓶阀门，再打开装置上的阀门，控制气流的大小进行冷冻）；
3. 将样品已经冻好的冷冻头固定在仪器内的底座上，调整组织样品切面方向与刀座平行
4. 调整好刀座及角度，安装好一次性刀片，选择 TRIM 模式，选择合适的切片厚度，摇动手轮进行修块。在此过程中，可不断调节冷冻头角度直至所需的样品切面；
5. 粗修完选择 SECTION 模式，选择合适的切片厚度，放下防卷板，摇动手轮进行精细切片，适当调节防卷板的前后位置，使切片平整的进入防卷板与刀片间的狭缝；用睫毛笔或玻片收集所需的切片；



- 切片完成后，及时卸下刀片，将废弃的刀片放入专门的回收盒内，将切片机机箱内清理干净，做好使用登记。

### 三、注意事项：

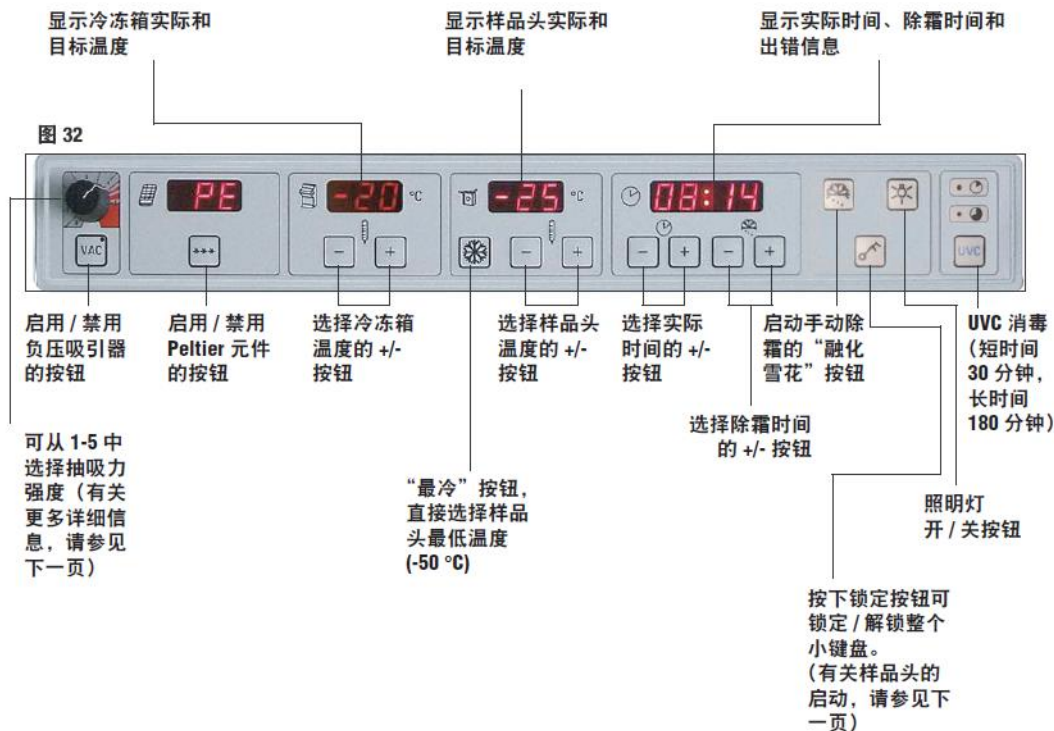
- 刀座的间隙角与刀片的角度有关，一般设置为 10 度；
- 在调整冷冻头角度的时候一定要盖上刀片保护器，小心被刀片划伤；
- 在仪器使用过程中，在切片后取片前这个时间间隙中，一定要记住锁上手轮，防止手轮意外滑动造成的样品损坏或人员受伤等事故；
- 仪器使用完，一定要取下刀片，防止给之后使用仪器的人员造成伤害。

### 四、常见故障排除：

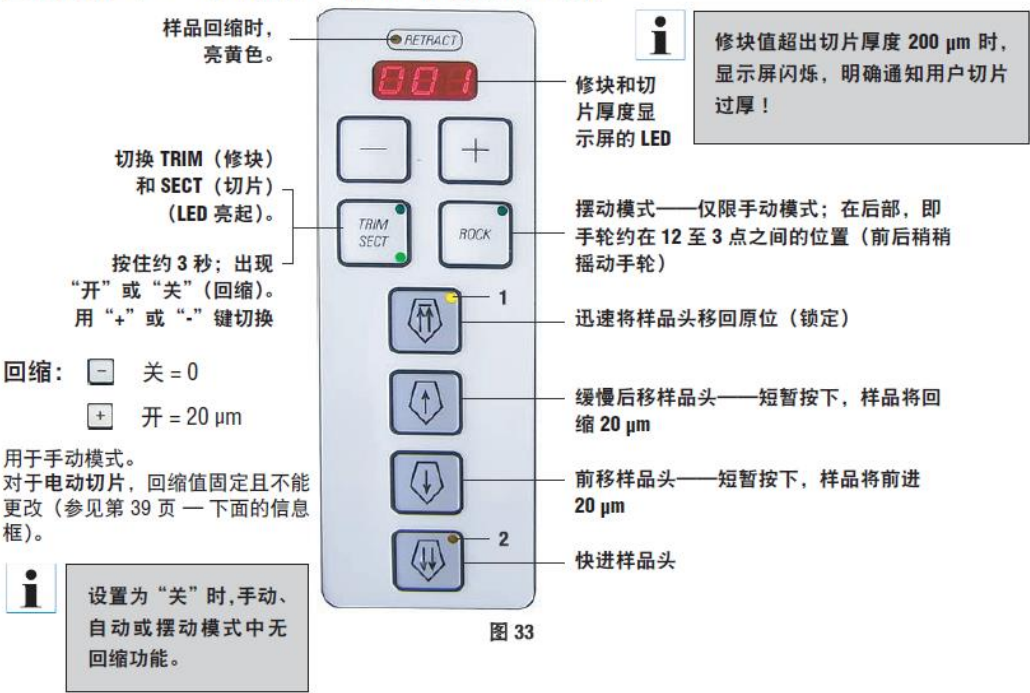
故障	原因	解决办法
箱壁和切片机上结霜	1.冰冻切片机遇到气流（开窗、开门、开空调） 2.气息进入冷冻箱导致结霜	1.改变冰冻切片机的安装位置 2.戴口罩
切片软化	样品冷冻不足 防卷板冷冻不足，使切片升温	选择较低的温度 等待切片刀和防卷板达到冷冻箱温度
切片碎裂	样品冷冻过度	选择较高的温度
切片不平整	静电/气流 样品冷冻不足 样品面积过大 防卷板位置不正确 防卷板未与刀刃对齐 间隙角不正确 切片刀变钝	消除这些因素 选择较低的温度 粗修样品的切面，提高切片厚度 重新放置防卷板 正确对齐 正确设置角度 使用切片刀的其他部位
尽管温度合适且防卷板正确对齐，但切片不平整	切片刀或防卷板上有污垢 防卷板边缘损坏 切片刀变钝	用干布或刷子清扫 更换防卷板 使用切片刀的其他部位
防卷板上的切片打卷	防卷板超出刀刃不够	重新正确调整
切片和样品回位时有刮擦声	防卷板超出刀刃过多，刮到样品	重新正确调整
切片有皱褶	切片刀损坏 防卷板边缘损坏	使用切片刀的其他部位 更换防卷板

## Leica CM1950 冷冻切片机操作规程



### 一. 控制键盘说明



控制面板区 2 — 电动粗进、切片和修块厚度显示屏



## 设置切片 / 修块厚度

使用控制面板 2 中的  -  键。

切片厚度范围：1 - 100  $\mu\text{m}$

值：1.0 $\mu\text{m}$ - 5.0 $\mu\text{m}$	调整幅度 0.5 $\mu\text{m}$
5.0 $\mu\text{m}$ - 20.0 $\mu\text{m}$	调整幅度 1.0 $\mu\text{m}$
20.0 $\mu\text{m}$ - 60.0 $\mu\text{m}$	调整幅度 5.0 $\mu\text{m}$
60.0 $\mu\text{m}$ - 100.0 $\mu\text{m}$	调整幅度 10.0 $\mu\text{m}$

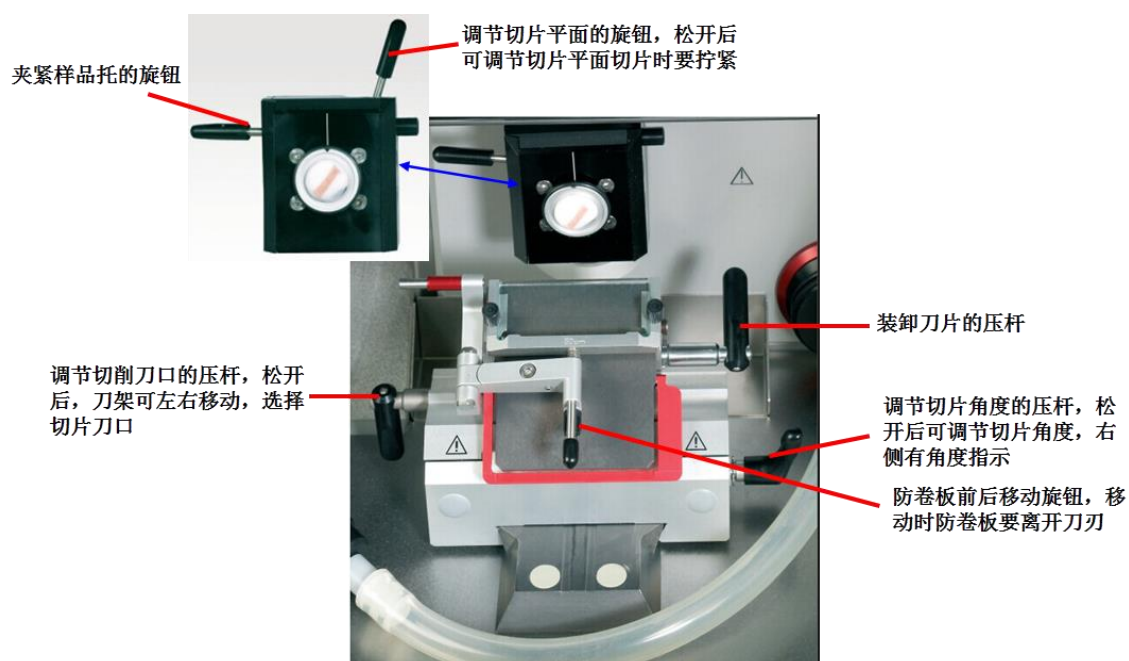
修块厚度范围：1 - 600  $\mu\text{m}$   
(建议用于研究)

值：1.0 $\mu\text{m}$ - 10.0 $\mu\text{m}$	调整幅度 1.0 $\mu\text{m}$
10.0 $\mu\text{m}$ - 20.0 $\mu\text{m}$	调整幅度 2.0 $\mu\text{m}$
20.0 $\mu\text{m}$ - 50.0 $\mu\text{m}$	调整幅度 5.0 $\mu\text{m}$
50.0 $\mu\text{m}$ - 100.0 $\mu\text{m}$	调整幅度 10.0 $\mu\text{m}$
100.0 $\mu\text{m}$ - 600.0 $\mu\text{m}$	调整幅度 50.0 $\mu\text{m}$

修片厚度设置范围：  
(建议用于临床)

值：10  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$

## 二 机箱中各部件作用



## 三 操作说明

### (一) 开关机 (此步基本由工作人员操作)

1. 利用主机右侧的开关开启电源，用箱体温度设置按钮将切片机温度设置到切片所需温度，当设置温度时温度显示窗口显示设置温度，设置停止 5 秒后显示实际温度。只要按下箱体温度设置按钮，即可随时检查设置温度。样品头温度设置按同样方法进行。若样品头设为最低温度 (-50 度)，则按样品头最低温度设置按钮即可。

2. 第一次开机时利用基准时间设置按钮设置一个基准时间，一般为北京时间，利用除霜时间设置按钮设置一除霜时间，一般为晚上 12 时左右，如果在该时间切片，应将时间推迟，当设置除霜时，时间显示窗口显示除霜时间，5 秒后显示基准时间。手动除霜时先按下手动除霜按钮，听到峰鸣音后，按箱体温度设置按钮，则箱体手动除霜；如按箱体温度设置按钮，箱体手动除霜，按此顺序再按一次可关闭手动除霜，如按样品头温度设置按钮，则样品头除霜，按此顺序在按一次关闭。
3. 利用主机右侧的开关关闭电源，关闭后应将玻璃窗打开，若要再次开机，应先检查切片机内是否有水，如有应吹干后再开机，并取出隔板检查切片机箱体底部是否有水，如有需拨开底部的塞子，将水排除，吹干后再开机。若第二天需用切片机，应该提前一天开机制冷，以免影响第二天的工作。如常年开机，夜晚可将切片机温度设到零下十度以下，不能高于零下十度。
4. 若要关闭压缩机，按一下锁定开关，再按一下样品头温度设置按钮，则样品头压缩机关闭，若按箱体温度设定按钮则箱体压缩机关闭，重复以上步骤，压缩机又打开。

## (二) 切片步骤

1. 根据自己的样品，参照如上方法设定最佳的机箱温度和样品头温度，利用切片机的厚度调节按钮调节切片厚度，调整切片角度，安装切片刀。如是一次性刀片，请利用刀架的左右移动来使用不同的刀口，勿移动刀片
2. 启动 Peltier 元件，将样品放到样品托上，利用包埋剂固定，放到冷台上冷冻，在即将完全冷透前用热交换装置压平。
3. 将冷却透的样品放到样品头上，用快进样品头按钮将样品移近刀口，调整要切的平面，在修块模式下设定好修块的厚度开始修片，修完片后再转变为切片模式，设定好切片厚度即可放下防卷板切片；如得到的切片不平整可调节防卷板的前后的位置，使切出的样品平整的进入防卷板与刀片的狭缝，取出后染色观察。

**注意：**切片后为防止别人改变参数，可利用控制面板上的键盘锁定按钮将键盘锁定，即按下键盘锁定按钮 5 秒钟左右，时间窗口中间的两个点停止闪烁，表示键盘锁定，此时再按键盘锁定按钮 5 秒钟即可解除键盘锁定。

## 四、建议工作温度（仅供参考）

组织类型	冷冻箱温度	样品头温度
脾	-15 °C 到 -20 °C	-11 °C
肝	-10 °C -15 °C	-20 °C 最高 -15 °C
肠	-10 °C -15 °C	-20 °C A*: 最高 -20 °C E*: -20 °C
心脏	-10 °C  -15 °C	A: -20 °C E: -20 °C 到 -30 °C 最高 -20 °C
卵巢	-10 °C -15 °C	E: -20 °C 最高 -15 °C
输卵管	-10 °C -15 °C	E: -20 °C 最高 -15 °C
肾脏	-10 °C -15 °C -20 °C	-20 °C A: 最高 -15 °C -20 °C
肌肉	-18 °C 到 -20 °C	-15 °C
带脂肪的皮肤	-19 °C	-32 °C 到 -40 °C
固体脂肪	-19 °C	-21 °C 到 -25 °C
胃	-10 °C -15 °C	-20 °C 最高 -15 °C
脑	-15 °C	-10 °C, *E

**\*A = 块状, \*E = 完整**

上面给出的温度是长期经验的总结，但这些只是近似值，因为每种组织可能还需要特殊的调整。

## 五、常见故障排查



故障	原因	解决办法
箱壁和切片机上结霜	冷冻切片机遇到气流（开窗、开门、开空调）。 气息进入冷冻箱导致结霜。	改变冷冻切片机的安装位置。 戴口罩。
切片软化	样品冷冻不足。 防卷板冷冻不足，使切片升温。	选择较低的温度。 等待切片刀和 / 或防卷板达到冷冻箱温度。
切片碎裂	样品冷冻过度。	选择较高的温度。
切片不平整	静电 / 气流。 样品冷冻不足。 样品面积过大。  防卷板位置不正确。 防卷板未与刀刃对齐。 间隙角不正确。 切片刀变钝。	消除这些因素。 选择较低的温度。 粗修样品的切面，提高切片厚度。 重新放置防卷板。 正确对齐。 正确设置角度。 使用切片刀的其他部位。
尽管温度合适且防卷板正确对齐，但切片不平整	切片刀和 / 或防卷板上有污垢。 防卷板边缘损坏。 切片刀变钝。	用干布或刷子清扫。 更换防卷板。 使用切片刀的其他部位。
防卷板上的切片打卷	防卷板超出刀刃不够。	重新正确调整。
切片和样品回位时有刮擦声	防卷板超出刀刃过多，刮到样品。	重新正确调整。
切片有皱褶	切片刀损坏。 防卷板边缘损坏。	使用切片刀的其他部位。 更换防卷板。
切片时发出喀嗒声	样品在样品托上冷冻不足。 样品托未夹紧。 切片刀未夹紧。 样品切片过厚，与样品托分离。 样品的质地不均匀，而且非常坚硬。  切片刀变钝。 刀片宽度与待切样品不吻合。 间隙角不正确。	重新将样品冷冻到样品托上。 检查样品托的固定情况。 检查切片刀的固定情况。 重新将样品冷冻到样品托上。 增加切片厚度; 如果需要的话，可缩小样品表面积。 使用切片刀的其他部位。 使用不同宽度的刀片。 正确设置角度。
清洁时在防卷板和刀片上产生冷凝水	刷子、镊子以及布的温度过高。	将所有工具储存在冷冻箱的储物架上。
故障	原因	解决办法

防卷板调整后损坏	防卷板高出刀刃过多。按切片刀方向进行调整。	更换防卷板。 下次调整要更小心！
切片厚薄不均	进行组织切片的温度不正确。 刀片宽度与待切样品不吻合。  刀背结冰。 手轮转速不匀。 切片刀未夹紧。 样品托未完全夹紧。 在已经冷冻的样品托上加冷冻包埋剂；样品冷冻后从样品托上分离。 切片刀变钝。 切片厚度不合适。 间隙角不正确。 切片机未充分干燥。 样品干缩。	选择正确的温度。 使用不同宽度的刀片。 (c 型或 d 型)。 将冰清除。 调整速度。 检查切片刀的固定情况。 检查样品托的固定情况。 将冷冻包埋剂添加到常温的样品托上，装上样品进行冷冻。 使用切片刀的其他部位。 选择正确的切片厚度。 正确设置角度。 干燥切片机。 制备新的样品。
组织粘在防卷板上	防卷板的温度过高或位置不当。  防卷板的边角有脂肪。 防卷板未正确固定。 切片刀生锈。	冷却防卷板，或者重新正确放置。 清除防卷板上的脂肪。 正确固定。 除锈。
防卷板折起时平整的切片蜷曲	防卷板的温度过高。	冷却防卷板。
切片撕裂	进行组织切片的温度过低。 切片刀变钝或者出现污垢、灰尘、霜冻或生锈。 防卷板顶部边缘损坏。 组织中有硬颗粒。 刀背上有污垢。	提高温度并等待。 消除这些因素。  更换防卷板。 --- 清洁。
冷冻切片机不工作	电源插头的连接不正确。 保险丝损坏，或触发了断路器。	检查连接是否正确。 更换保险丝，或将断路器拨回原先位置。若无法做到，请拨打技术服务电话。
无法取下样品托	样品下面的湿气使样品与速冻架或样品头冻在一块。	往接触点涂高浓度酒精。
冷冻箱不制冷或制冷不足	制冷系统或电子驱动故障。	拨打技术服务电话。
滑窗积冷凝水	空气湿度及室温过高。	遵守安装地点的要求。
样品不冷冻或冷冻不足	制冷系统或电子驱动故障。	拨打技术服务电话。
灯不亮	灯坏了。 开关坏了。	检查灯，必要时更换。 拨打技术服务电话。



## Leica VT1200S 振动切片机操作手册及注意事项

### 一、仪器基本构造



图 1 主机



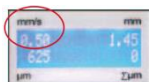
图 2 控制面板

## 二、操作方法


- 1、打开仪器开关。
- 2、缓冲液盘卡在冰浴盘中，冰浴盘中放上冰，缓冲盘中倒入 4℃ 的缓冲液，将冰浴盘卡在燕尾槽上。
- 3、用 502 胶将组织块粘在样品座上，待 502 胶干后将样品座卡在缓冲盘中。
- 4、用六角螺丝刀拧松刀架，双面刀片夹在刀架上，再拧紧刀架固定刀片。

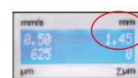
**注意：本仪器固定刀片的螺丝已滑丝，不可过度拧螺丝，只要将刀片固定紧即可！**

- 5、在控制板上设定切片速度，按  键使 LED 灯亮起，旋转旋钮 1 设定切片速度，




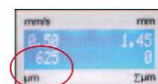
图中红圈圈标出的为切片速度的数值。

- 设定切片振幅，按  键使 LED 灯亮起，旋转旋钮 1 设定切片振幅，








图中红圈圈标出的为切片振幅数值。

- 设定切片厚度，按  键使 LED 灯亮起，旋转旋钮 1 设定切片厚度，



图中红圈圈标出的为切片厚度数值。

**注意：① 按  键可设定数值变化的幅度；② 必须在 auto 模式才能设定切片厚度值时，manual 模式将不能设定切片厚度值。**

- 6、按  和  键调节样品台的高度，按  和  键调节样品前后位置，最终将样品的位置调至接近切片位置。

- 7、（1）如果手动切片，按  键至 MAN 左下角的 LED 灯亮起，点击  键开始切片。

- （2）如果自动切片，按  键至 AUTO 右上角的 LED 灯亮起，再按  键至 CONT 左下角的 LED 灯亮起；按  和  键将样品移至切片后面，点击  键设定第一个切片窗口，再将样品移至切片前面，点击  键设定第二个切片窗口。点击  键开始切片。

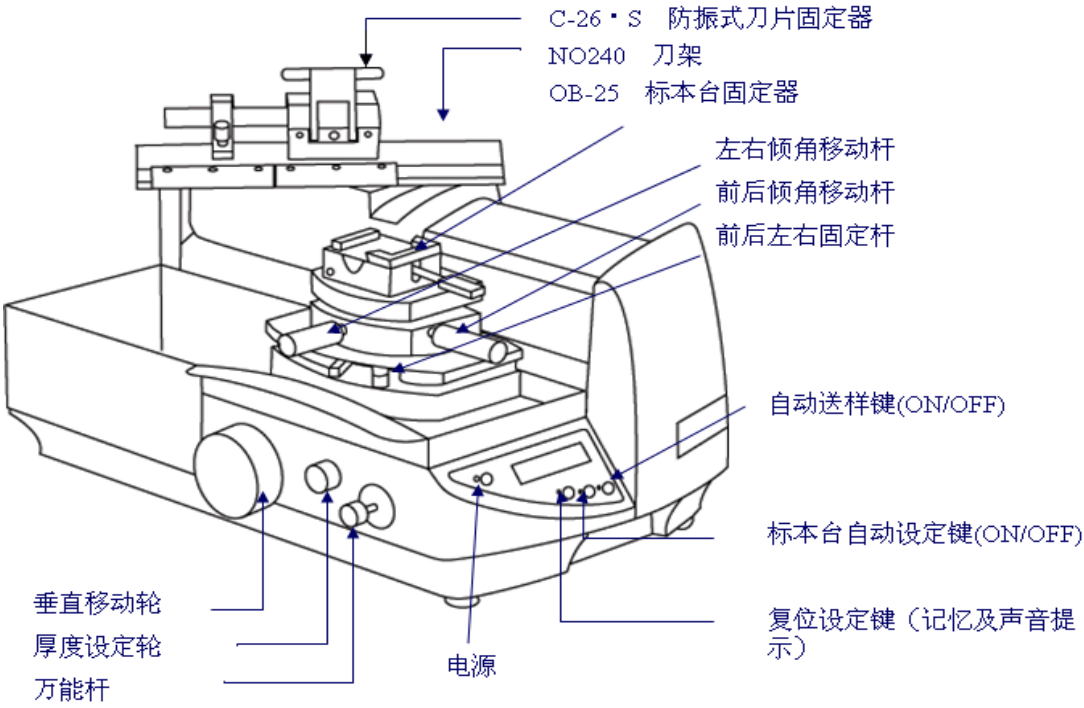
- 8、切下的片子用毛笔捞起，放在盛有缓冲液的盒子里。

- 9、切片完成后，应及时清理切片机，保持切片机及切片刀干净整洁。

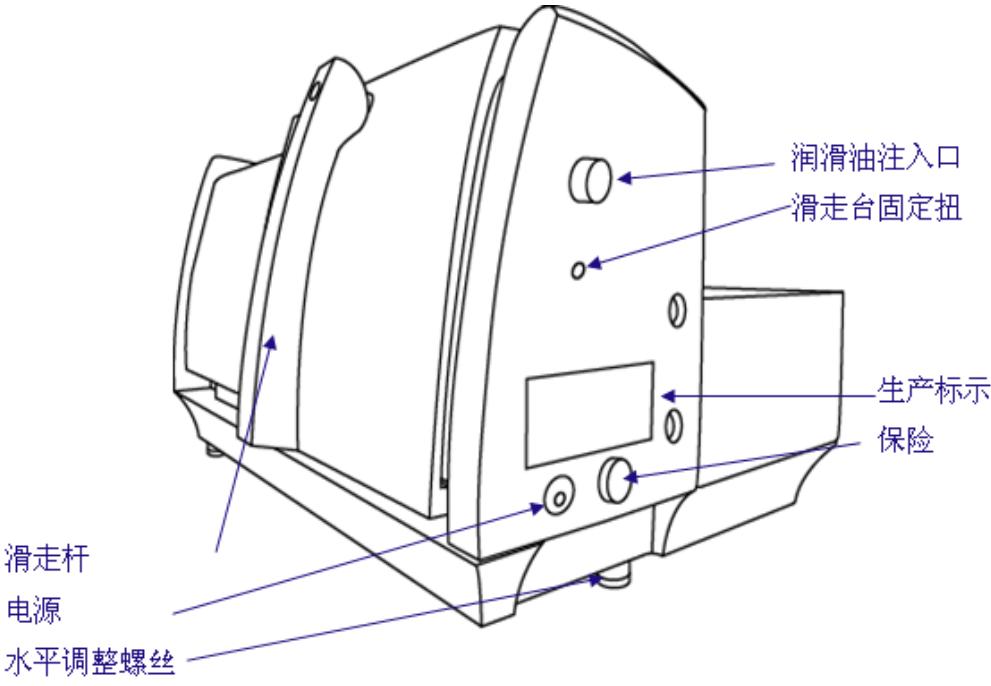
**注意：装卸刀片时注意安全，避免刀片割伤；实验后用蒸馏水清洗仪器，以免 PBS 缓冲液结晶而引起仪器钝涩。**

# 大和滑动切片机操作规程

## 一、仪器基本构造



- 1.
- 2.



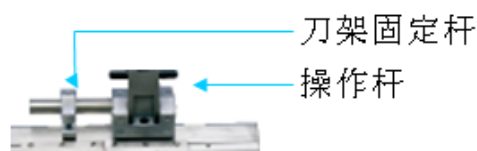
- 3.

## 二、操作方法

### 1. C-26 S 防振式刀固定器

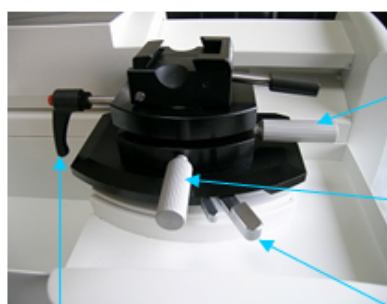
向上扳动操作、按一下就可以将刀架取下。

做硬组织切片时、请将刀架固定杆轻轻的拧紧、防止晃动发生。



### 2. OB-25 标本固定器

用手将杆向上抬，标本块就可以取下来了。标本块横纵方向都可以安装。



3.前后动旋钮调节标本固定器的前后倾角。

4.左右动旋钮调节标本固定器的左右倾角。

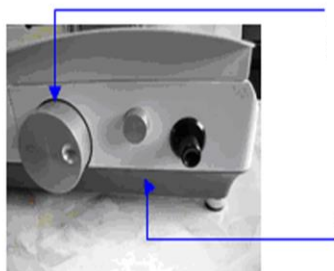
5.前后左右动固定杆调节标本固定器前后左右的移动。向内侧拉固定。

6.标本固定器固定杆将固定杆逆时针方向旋转、标本台处于自由动作状态、选择合适的组织切片方向，并且取下标本固定器时，使用本固定杆。

**⚠ 注意** 禁止在前后左右动固定杆关闭的状态下，调节前后左右动旋钮；有造成部件损坏的可能性。并且标本固定器固定杆过力拧紧的话，有可能造成部件损坏的可能性。

## 7.碎屑箱

可以很简单的取下，清扫。



## 8.垂直移动轮

转动一周标本台上下移动 400(可以按照回旋方向及 1 圈进行设定)

## 9.厚度设定轮

厚度 0~120 $\mu$ m

最小间隔 0.25 $\mu$ m

## 10.液晶显示部操作

**电源: OFF的状态下, 消耗电力几乎为0**

**ODO显示: 显示切片总厚度**

切片厚度表示〈 〉中显示设定的切片厚度使用「厚度调节扭」调节切片厚度

左右显示2种切片厚度(图中例为2.00 $\mu$ m和10.00 $\mu$ m)  
操作「万能杆」移动〈 〉切换厚度, 便捷、快速的选择切片厚度  
例: 「2.00」与「10.00」2种数值, 「10.00」粗切, 切换到「2.00」薄切。

**复位键**  
● 短押(1秒以内) 累计值复位(P17.4-5参照)  
● 长押(1秒以内) 「ODO」清零, 并记忆此时高速位置。

**自动送样ON/OFF键**  
自动送样功能: 推拉滑走杆切割时, 标本台按〈 〉中定好的数值自动上升。  
● 短押(1秒以内)  
按一下标本按照现在设定的切片厚度尺寸下降。  
自动送样进行2回时, 再按一下标本台又回到第一回选择时的位置。  
● 长押(1秒以上)  
自动送样功能进行ON、OFF切换时, ON时自动送样灯亮绿灯

**リトラクションon/off**  
リトラクション機能:  
为了防止切片刀在切片中回刀时, 刀擦碰标本, 标本台配合切片自动下降「任意 短押(1秒以内)」  
● 按一下, 标本按照设定的切片厚度尺寸上升或下降(-10 $\mu$ m为出厂设定) 移动值可以任意设定(参照P.17).  
● 长押(1秒以上) 功能进行ON/OFF切换时, ON时以灯亮绿灯。



## 11. 万能杆



万能杆；

可以上、下、内、外4方向操作。

向外侧方向长时间推有2种可能。

※可以变更万能杆的操作方法  
(详细说明请参照P.16.7详细固定6关连设定)下面的说明为出厂设置。

。



向上推动，标本台上升。



长推1.5秒以上标本台快速上升。



(1秒以内)

向外侧推1秒以内时，可以选择显示屏上的2种切片厚度，推动操作杆使< >移动，就可以按照选中的厚度进行切片了。



< >设定交换時、发出「BI」或者「BIBI」两种不同声音提示。

(表示左侧设定)

(表示右侧设定)



(长推3秒以上)

标本台按照设定好的高度自动移动。



ODO: 从任意的位置至「0.00」移动。



向内侧拉 表示部< >内的设定厚度单位设定。



向下推标本台向下移动。



长推1.5秒以上标本台向下快速下降。

### 三、常见问题(故障原因和排除方法)

问题	原因	排除
滑走沉重	缺少润滑油	请向注油口内注入专用润滑油。
前后左右动不能够固定	仪器受损	与厂商联系更换部件。
按钮按动无反应	仪器出现死机或零件故障	请将电源拔下再插入后，重新启动。  问题不能够解决时，请联络销售商进行修理。
切片厚度不均匀和发生晃动	刀架固定不好	刀固定器的安装方法进行调整。
	刀架位置不合适	刀架的角度调整，使刀架与标本固定器距离拉近。
	刀架有脏东西粘附或者损坏了	刀架凹凸不平，有脏东西，装上刀片的时候容易造成晃动。  请再擦拭一遍刀架，  刀架有破损的时候，请更换新的刀架。
	包埋标本块与标本固定器不能够固定	请将包埋标本块的周围，下部与标本固定器内部的石蜡屑清除干净。  标本固定器的弹簧（耗材）功能退化时，请与销售商联系。
	机器没有水平放置	请调节水平调整螺丝。
	使用滑走杆过于用力	请轻握滑走杆，不要用力过强。
	周围有震动较大的机器	放置相对震动较小的场所使用。