

# 水稻花药超薄制样标准流程

## 试剂准备

1. 0.2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  31.2g/L
2. 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71.6g/L
3. pH 7.2 的 0.2M PB 250ml=0.2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  70ml+0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  180ml
4. pH 7.2 的 0.1M PB 500ml= pH 7.2 的 0.2M PB 250ml +ddH<sub>2</sub>O 250ml
5. 2.5% 戊二醛固定液 1L=0.1M PB 500ml+25% 戊二醛 100ml+ ddH<sub>2</sub>O 400ml  
(配制后的固定液 pH 应为 7.3-7.4)
6. 0.8% 锇酸=10ml 4% 锇酸+15ml ddH<sub>2</sub>O+25ml 0.2M PB
7. 812 树脂

总量	80ml	160ml	200ml
Epon812	40ml	80ml	100ml
DDSA	10ml	20ml	25ml
NMA	30ml	60ml	75ml
DMP-30	1.6ml	3.2ml	4ml

## 实验步骤

### 一、取材

取尽可能快速（田中采样，材料运输时保存在冰盒中）和体积尽量小（准确时期和部位，尽量去除内外稃）的样品于 2.5% 戊二醛固定液（制备方法见后面配方）中，用注射器充分抽真空，至材料完全沉底，将材料移至 2ml EP 管后，置于 4 度层析柜内转动过夜（可于 4 度冰箱放置最多 2 周）。

### 二、制样流程

**注意：以下吸液全部采用一次性滴管，禁止使用移液器！！准备好专门处理锇酸污染物品的废弃桶，并提前在废弃桶内倒入适量的玉米油。**

### 第一天

1. 漂洗。于冰上尽可能的**快速和完全**吸去前固定液（戊二醛固定液），加 2 ml 0.1M PB 缓冲液，加好后置于 4 度层析柜中摇床振荡 1h。

---

2. 将 EP 管置于室温下，吸去前溶液，加 2ml 0.1M PB 缓冲液，于摇床振荡 1.5h。

3. 后固定（钨酸固定）。换适量（约 3 滴）0.8%钨酸（已经由老师配好，须严格操作，具体见注意事项）没过材料，置于摇床轻轻震荡，常温避光过夜（晚 5:30 至次日早 8:30）。由于钨酸易挥发，此步骤需用封口膜紧紧封住试管口，并取一塑料泡沫盒覆盖 EP 管架避光。

**注意事项：钨酸有剧毒，放置于专用冰箱内，必须在通风橱内才可开盖，取一次性滴管，小心吸取钨酸溶液后加在试管中，千万不要滴到试管外壁或通风橱内，且接触过钨酸的手套和吸管不可再触碰任何地方，直接扔在钨酸专用废弃桶内，待实验结束后统一处理，具体见后面“钨酸废液处理方法”。（清理方法：用玉米油充分涂抹被污染的区域，涂抹好后在表面覆盖一层保鲜膜，该状态保持一个月）。**

## 第二天

**注意：经钨酸固定后的材料很脆，请小心操作！！**

4. 漂洗。用吸管小心并尽量完全吸去钨酸溶液，扔入钨酸专用废液桶内，常温下加 2ml 0.1M PB 没过材料进行漂洗，共漂洗 3 次，每次置于摇床振荡 15min。最后一次漂洗时更换新的试管（为了置换掉被钨酸污染的试管）。

**注意事项：钨酸废液与接触过钨酸的手套和 EP 管必须扔在钨酸专用废弃桶内（第一天和第二天所用的物品和废液全部扔在钨酸专用废液桶内，第三天及以后的废液扔在普通废液瓶内）。**

5. 于摇床常温梯度脱水，各梯度皆为 2ml 量。20%乙醇 30min，40%乙醇 30min，60%乙醇 30min，加 70%乙醇，换新的试管（因为后面要放入 4 度冰箱，为了充分排除可能的钨酸污染），于 4 度冰箱过夜或保存材料（可保存 2-3 周）。

## 第三天

6. 换 2ml 新鲜 70%乙醇 30min，90%乙醇 30min，100%乙醇 3 次，每次 30min。常温摇床振荡。

**提前配置好所需比例的【无水乙醇/环氧丙烷】【环氧丙烷/树脂】溶液**

7. 换 1ml【无水乙醇：环氧丙烷（2:1）】溶液没过材料，摇床振荡 10min。

---

**注意事项：环氧丙烷有一定毒性且极易挥发，因此在配制溶液时需要在通风橱内快速操作并拧紧试剂瓶盖，在步骤 6-9 中加液时也需要快速添加并盖紧试管盖。**

8. 换 1ml 【无水乙醇：环氧丙烷（1:1）】溶液没过材料，摇床振荡 10min。
9. 换 1ml 【无水乙醇：环氧丙烷（1:2）】溶液没过材料，摇床振荡 10min。
10. 换 500ul 纯环氧丙烷没过材料，摇床振荡 10min，共重复 3 次。
11. 在最后一次的 500ul 纯环氧丙烷追加 2 滴树脂，盖好盖子摇床低速振荡 2h。
12. EP 管中追加 3 滴树脂，盖好盖子摇床低速振荡 2h。
13. EP 管中追加 5 滴树脂，盖好盖子摇床低速振荡 2h。
14. 吸去部分混合液使其剩余 500ul，加入 500ul 纯树脂，盖好盖子摇床低速振荡过夜。

**注意事项：未聚合的树脂有一定毒性，避免直接接触皮肤。**

#### 第四天

15. 开盖 1h 挥发掉 EP 管中的环氧丙烷。
16. 换 500ul 纯树脂没过材料，常温低速振荡 4h。
17. 换 500ul 纯树脂没过材料，常温低速振荡 4h。
18. 换 500ul 纯树脂没过材料，常温低速振荡过夜。

#### 第五天

19. 将渗透好的材料在模具中进行包埋，置于 37℃烘箱 5h-12h（除树脂气泡，此时可随时调整样品位置），45℃烘箱 2h，65℃烘箱 48h。

**注意事项：包埋时尽量保证样品处于包埋孔两端的中间位置，垂直于两端，并避免出现气泡。**