技术与方法

新型捞片器具在昆虫触角连续切片中的应用*

戎念杭[1**] 付丙鲜[2***] 祝增荣[3] 洪 健[1]

（1. 浙江大学农生环测试中心，杭州 310058；2. 浙江农林大学农业与食品科学学院，临安 311300；3. 浙江大学昆虫科学研究所，杭州 310058）

摘 要 **【目的】** 透射电子显微镜技术在生物学研究中发挥着越来越深入广泛的作用，通过透射电镜技术获得生物组织连续切片，从而对其神经网络等延伸结构进行连续追踪及三维重构是非常迫切的科研诉求。但捞片方法的限制使得连续切片的获得困难重重，尤其是对于组织致密的昆虫外骨骼如昆虫触角而言，常因包埋剂浸透不够充分而导致聚合欠佳，增加了连续切片收集的难度。为解决捞取昆虫触角连续切片过程中的系列问题，获得完整、平整的触角连续切片，我们自行研制了一种适用于狭缝载网捞片的组合器具。**【方法】** 用组合器具中的捞样器和放样台分别捞取及放置超薄切片。**【结果】** 捞取的昆虫触角切片不会局部脱离树脂切片而产生不同程度的折叠，不会整片脱离树脂切片而滑落至树脂切片一侧，样品切片完整无破损、无皱褶，连续切片成条贴附在狭缝覆膜区。**【结论】** 新型捞片器具为获得昆虫触角连续切片提供了有力支持。

关键词 外骨骼，感器，外周神经支配，透射电镜，狭缝载网

The application of a new fishing apparatus in obtaining serial ultrathin sections of insect antennae

RONG Nian-Hang[1**] FU Bing-Xian[2***] ZHU Zeng-Rong[3] HONG Jian[1]

(1. Analysis Center of Agrobiology and Environmental Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. School of Agricultural and Food Science, Zhejiang Agriculture and Forest University, Linan 311300, China; 3. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract **[Objectives]** Transmission electron microscopy is playing a more and more important role in biological research, including tracking extended structures such as neural networks and three dimensional reconstruction. Consequently, the demand for continuous sections of biological tissues for transmission electron microscopy has greatly increased. However, limitations of the current fishing method make the acquisition of continuous sections difficult, especially when samples are comprised of dense insect exoskeleton, such as continuous sections of the antennae. Insufficient penetration of the agent usually causes poor polymerization, which undoubtedly increases the difficulty of collecting intact serial sections. To solve these problems, we developed a kind of combined device for collecting sections with slot grids. **[Methods]** A hybrid device comprised of a special fishing loop and a lofting platform was developed and its ability to fish for serial sections and place them onto slot grids was evaluated. **[Results]** No partial detachment and folding occurred in the serial sections obtained by this combined device; specimen sections neither separated completely, nor slid to the side of the resin section. Sample sections were intact without any damage or wrinkles, and serial sections clung to the slot area in a line. **[Conclusion]** The new device is an improvement on previous methods of obtaining continuous sections of insect antennae for electron microscopy.

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金青年科学基金项目（31600520）；中国博士后科学基金项目（2016M601970）；中国博士后科学基金项目（2013M531470）

**第一作者 First author，E-mail：nhrong@zju.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：bxfu658@aliyun.com

收稿日期 Received：2017-04-06，接受日期 Accepted：2017-09-01

Key words exoskeleton, sensilla, peripheral innervations, transmission electron microscope, slot grids

透射电子显微镜技术已成为生命科学领域不可缺少的研究手段，随着透射电镜技术在生物学研究中的不断深入，人们对其要求也越来越高，例如高清构建组织细胞的三维架构，使得对微观结构的形态学探究从二维平面上升到三维立体范畴。电子断层扫描技术（Electronic tomorgraphy，ET）、透射电镜连续切片技术（Serial section transmission electron microscopy，SSTEM）（Soto *et al.*，1994；Denk and Horstmann，2004；Briggman and Denk，2006）是透射电镜三维重构的主要途径。

电子断层扫描技术即利用透射电镜对厚度在 0.1 μm 至 1 μm 的生物样本切片，在一定倾转范围内以一定角度间隔倾转样本，同时获得一系列样本在与电子束方向垂直平面的投影，而后通过反投影图像以及综合所有方向的投影，获得生物样本的三维结构（Leapman，2004）。电子断层扫描技术是获得大分子、细胞器、小细胞等的高清三维结构信息非常有利的方法，但不适于重构体积较大的目标，因为该技术所能观察的切片厚度极限为 1 μm 左右，高压电镜也仅可以观察稍厚一点的切片（Denk and Horstmann，2004）。

透射电镜连续切片即用钻石刀对样品包埋块进行连续超薄切片，一般用覆盖有方华膜（Formar film）的单孔载网捞片，染色后在透射电镜下获得连续图像，再进行后期矫正、勾勒、渲染、三维重构，最终获得三维结构，连续切片技术可以实现对较大体积样品结构的连续追踪。这项技术从理论而言比较简单，但操作过程技术难度较大，且容易导致信息损失及错误，如捞片时易使切片皱褶、染色过程中易产生污染、单孔载网在电镜下观察时易发生电子束击破单孔膜、电子束损害易使样品切片变形等，使得利用透射电镜进行三维重构成为一项难度较高的工作（Denk and Horstmann，2004；Briggman and Denk，2006；Knott *et al.*，2008）。近年来兴起的超高分辨率荧光显微镜三维重构技术可以研究活细胞甚至活体，连续块面扫描电镜三维重构技术可以自动获取相对透射电镜图像更大面积的连续校准图像，但二者目前所能达到的分辨率均不能与透射电镜连续切片的高清晰度三维重构相媲美（Denk and Horstmann，2004；Harris *et al.*，2006；Rust *et al.*，2006；Knott *et al.*，2008）。透射电镜连续切片三维重构依然是获得生物组织高清三维结构的经典技术，但介于透射电镜三维重构的高难度技术要求，其应用并不广泛，尤其是对于硬度较大、骨化程度较高的昆虫外骨骼而言，获得其完整平整的连续超薄切片更加困难。White 等（1986）基于透射电镜技术三维重构了秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 整个虫体神经系统的结构及其连接，Wang 等（2010）采用该技术三维重构了拟南芥的精细胞、卵细胞及其中的细胞核、线粒体和质粒，目前尚无有关昆虫外骨骼的相关报道。

连续超薄切片及捞片是透射电镜三维重构的关键一环，很多学者曾针对超薄切片制备过程中的诸多问题提出过解决方案（Briggman and Denk，2006；Knott *et al.*，2008），Harris 等（2006）针对超薄切片过程中出现的系列问题进行了探讨，其中就提出如：35°钻石刀可以减少压缩形变，封闭式环境切片可以得到厚度均一的超薄切片等解决方案；并且随着超音速钻石刀（Al-Amoudi *et al.*，2003；Matias *et al.*，2003）的产生及应用，样品在切片过程中的压缩形变已经可以大幅减少。我国学者在研究过程中也在不断关注及解决一些有关超薄切片的技术问题，金立强和张东生（2007）对超薄切片皱褶的产生及消除进行了探讨，沈伟和杨海贤（2004）对超薄切片的疑难问题进行了研究，杨传红等（2001）对超薄切片技术的质量控制进行了研究，郭新秋（2003）等提出了解决超薄切片震颤的方法，王贝贝等（2014）研制的超薄切片染色装置可以有效防止染色污染。在应用透射电镜技术研究昆虫触角方面，也有相关研究对昆虫触角的处理方法、超薄切片过程的抗干扰保护、捞样及放样器具等进行了系统研发，保证了连续超薄切片的质量，尤其是捞样

及放样器具的研制及使用，对于大硬度样品切片在捞片过程中所产生的诸多问题提供了很好的解决方案（付丙鲜等，2013，2015a，2015b，2015c，2016a，2016b）。本研究将在付丙鲜等（2015a，2015b）所研制器具的基础上，对于该新型捞片器具及其在捞取昆虫触角连续切片中的应用作进一步阐释。我们在此所要探讨和解决的是常规透射电镜技术应用于昆虫触角研究中，在使用狭缝载网以自上而下的粘取式捞片方法捞取昆虫触角连续超薄切片时所产生的系列问题。新型捞片器具同样适用于方孔载网捞片及其他各种样品——尤其是大硬度样品的捞片操作。

1 材料与方法

1.1 灰飞虱触角包埋块的制备

准备含 2% PFA（多聚甲醛）及 2.5%戊二醛的 0.1 mol·L^{-1} PBS 固定液（pH 7.2~7.4），取灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 成虫，放入盛有固定液的 1 号青霉素小瓶中杀死，并用注射器手动抽真空直至虫体沉入固定液中，放置冰上。在体视显微镜下，迅速解剖下头部，并置入盛有固定液的 2 号青霉素小瓶中，解剖完所有样品后，视样品下沉情况，可再次抽真空，直至样品完全下沉。

将准备好的样品，转移至盛有新鲜固定液的 2.5 mL 离心管中，放入 0~4℃层析柜中低速上下摆动的脱色摇床上，前固定 4 h。倒掉固定液，用 0.1 mol·L^{-1} PBS 漂洗样品 3 次，每次 15 min，在 0~4℃脱色摇床进行。将样品转移至通风橱，用 1%的锇酸溶液后固定样品 2 h，室温脱色摇床进行。用 0.1 mol·L^{-1}PBS 漂洗样品 3 次，每次 15 min，室温脱色摇床进行。用 50%，70%，80%，90%和 95%的乙醇溶液对样品进行脱水处理，每种浓度处理 15 min，再用 99.9%的乙醇处理 20 min，最后用环氧丙烷过渡处理 3 次，每次 10 min。脱水处理均在脱色摇床进行，低浓度乙醇处理时在冰上进行，样品可在 70%乙醇中于 4℃保存，从 80%乙醇处理开始所有的操作均在室温进行。用体积比为 3∶1，2∶1，1∶1，1∶2，1∶3 的环氧丙烷与 Spurr 包埋剂的混合液对样品进行梯度渗透，依次处理样品 30 min，45 min，1 h，1.5 h，3 h，而后换管，用纯包埋剂处理样品 24 h，中间更换一次纯包埋剂，梯度渗透于室温脱色摇床进行。

将纯包埋剂置于 20 孔平面型包埋板 PELCO110（编号：GP110；模具尺寸：89 mm×76 mm×7 mm；空穴尺寸：4.6 mm×14 mm×4 mm）的包埋孔中，用解剖镊将渗透好的样品从包埋剂中取出，先在滤纸上吸去样品表面存留的包埋剂，而后放入包埋孔的包埋剂中，在体视镜下用较细昆虫针如 1 号昆虫针做成的解剖针对样品进行调整，使要切片观察的部位处于包埋孔最顶端位置。将包埋板密封好后放入烘箱，70℃聚合 8~16 h，即得到包埋好的样品块。

1.2 灰飞虱触角包埋块进行修块、定位和连续超薄切片

将聚合好的灰飞虱 *L. striatellus* 触角树脂包埋块在 Leica EM UC7 型超薄切片机上进行修块、定位，顶面修成约 0.5 mm^2 的梯形，如图 1 所示。在超薄切片机上切取 70~90 nm 成带的连续超薄切片，如图 2 所示。

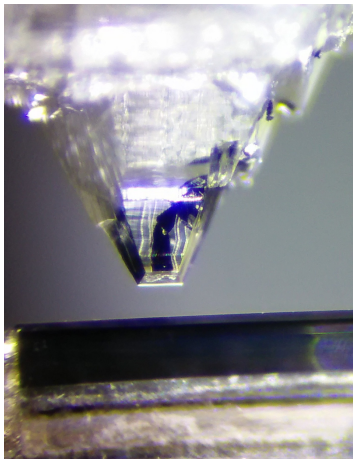

图 **1** 用于超薄切片的灰飞虱触角包埋块

Fig. 1 The trimmed block of antenna of *Laodelphax striatellus* for ultrathin sectioning

1.3 用捞片组合器具捞取及放置超薄切片

1.3.1 捞片组合器具设计及介绍 捞片组合器具由放样台和捞样器两部分组成。放样台为适合操作高度的立方体，可用不锈钢制成，顶面的四个边缘间隔均布设有平行排列的放样孔（图 3），

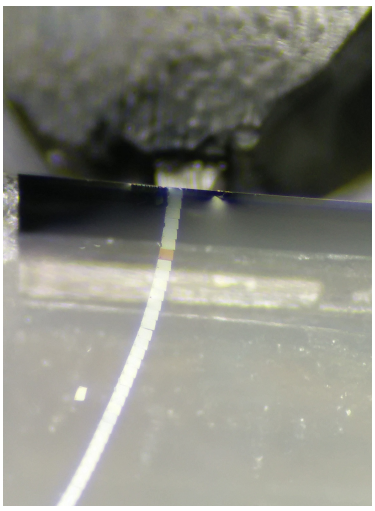

图 2　灰飞虱触角包埋块连续超薄切片带
Fig. 2　The serial sections of the block of antenna of *Laodelphax striatellus*

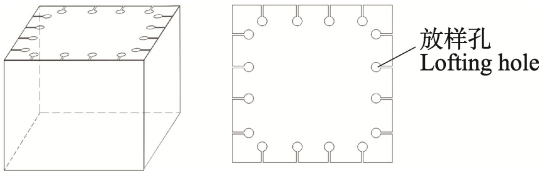

图 3　放样台整体及顶面示意图
Fig. 3　Sketch of whole and the top surface of the lofting platform

用于捞片操作时放置载网和捞片环。放样孔由一圆形盲孔以及与盲孔连接的条形槽构成，条形槽开在放样台边缘，狭缝载网放在放样孔的盲孔内（图 4）。捞样器包括位于前端的捞片环与位于后端棒状的手柄（图 5）。捞片环具有柄部，有金属片腰形环和金属丝腰形环两类，其中金属片腰形环又分为一字型腰形捞片环和 T 字型腰形捞片环（图 6），分别可捞取横向及纵向漂浮的连续切片，金属片腰形环周边间隔均布开有多个圆孔。金属丝腰形环也分为一字型腰形捞片环和 T 字型腰形捞片环。捞样器的手柄可采用木质或金属，手柄由握持端向与捞片环连接的前端逐渐变细。放样台的放样孔深度大于捞片环和载网的总厚度，放样孔条形槽的深度大于捞片环的柄部厚度，放样孔直径比所使用的载网直径大 70 μm，放样孔条形槽的宽度大于捞片环的柄部宽度，放样孔条形槽的长度小于捞片环的柄部长度。金属片捞片环的腰形环体外径与载网外径相同，腰形环的长、短内径分别比狭缝载网腰形孔的长、短径大 50～100 μm。金属丝捞片环的腰形环长、短径分别比狭缝载网腰形孔的长、短径大 50～100 μm。

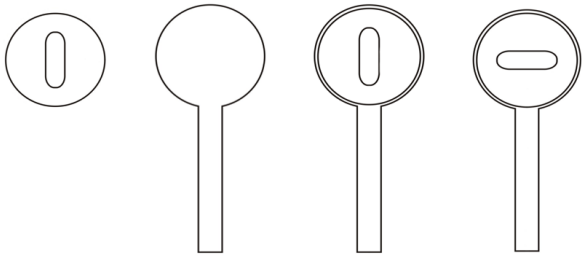

图 4　狭缝载网、放样孔及狭缝载网放置于放样孔内示意图
Fig. 4　Sketch of the slot grid, lofting hole, and placing the slot grids into the lofting holes

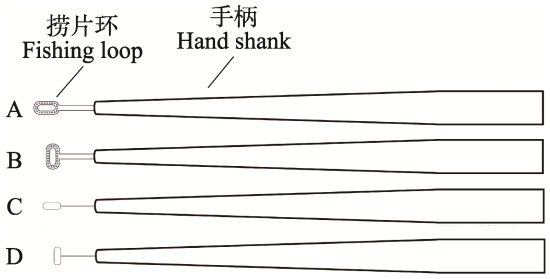

图 5　捞样器示意图
Fig. 5　Sketch of the fishing apparatus

A. 一字型金属片腰形环捞样器；
B. T 字型金属片腰形环捞样器；
C. 一字型金属丝腰形环捞样器；
D. T 字型金属丝腰形环捞样器。

A. Fishing apparatus of “一” type lumbar fishing loop made of sheet metal; B. Fishing apparatus of “T” type lumbar fishing loop made of sheet metal; C. Fishing apparatus of “一” type lumbar fishing loop made of metal wire; D. Fishing apparatus of “T” type lumbar fishing loop made of metal wire.

1.3.2　使用捞片组合器具捞取及放置超薄切片至狭缝载网　首先用睫毛针将超薄切片带轻轻断开，使得断开的超薄切片带可以被狭缝载网的狭缝覆膜区轻松容纳。若采用一字型金属片腰形捞片环或一字型金属丝腰形捞片环，可用睫毛针将断开的超薄切片带调成水平方向，再从水槽右侧一方进行捞取。若采用 T 字型金属片腰形捞片环或者 T 字型金属丝腰形捞片环，则可用睫毛针

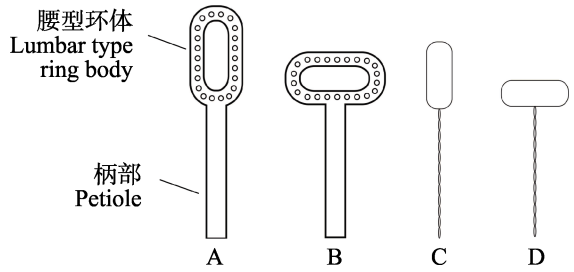

图 6 捞片环结构示意图

Fig. 6 Sketch of structure of the fishing loop

A. 一字型金属片腰形捞片环；
B. T 字型金属片腰形捞片环；
C. 一字型金属丝腰形捞片环；
D. T 字型金属丝腰形捞片环。

A. “—” type lumbar fishing loop made of sheet metal;
B. “T” type lumbar fishing loop made of sheet metal;
C. “—” type lumbar fishing loop made of metal wire;
D. “T” type lumbar fishing loop made of metal wire.

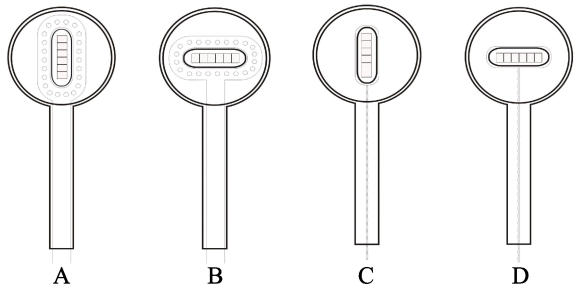

图 7 不同捞片环将连续切片放置于位于放样孔内的狭缝载网上使用状态示意图

Fig. 7 Sketch of placing serial sections onto the slot grids with various fishing loops while the slot grids placed in the lofting holes

A. 一字型金属片腰形捞片环捞取的连续切片放置于放样孔内的狭缝载网示意图；B. T 字型金属片腰形捞片环捞取的连续切片放置于放样孔内的狭缝载网示意图；C. 一字型金属丝腰形捞片环捞取的连续切片放置于放样孔内的狭缝载网示意图；D. T 字型金属丝腰形捞片环捞取的连续切片放置于放样孔内的狭缝载网示意图。

A. Sketch of placing serial sections onto the slot grids with “—” type lumbar fishing loop made of sheet metal while the slot grids placed in the lofting holes;
B. Sketch of placing serial sections onto the slot grids with “T” type lumbar fishing loop made of sheet metal while the slot grids placed in the lofting holes;
C. Sketch of placing serial sections onto the slot grids with “—” type lumbar fishing loop made of metal wire while the slot grids placed in the lofting holes;
D. Sketch of placing serial sections onto the slot grids with “T” type lumbar fishing loop made of metal wire while the slot grids placed in the lofting holes.

将断开的超薄切片带调成竖直方向，从水槽右侧一方进行捞取。将捞有超薄切片的捞样器转移至体视显微镜下，事先在放样台的放样孔中放置狭缝载网，将捞片环柄部的适当位置靠在放样孔的条形槽边缘作为稳固支点，轻轻将捞片环的腰形孔套住狭缝载网的腰形孔。用滤纸片从腰形环沿长径一端慢慢吸水，水被滤纸吸走的同时，超薄切片随即贴附在狭缝载网的腰形孔覆膜区（图 7）。将捞样器拿开，必要时可用睫毛针从一侧轻轻将金属片腰形环或金属丝腰形环与狭缝载网轻轻剥离，用镊子将载有超薄切片的狭缝载网放入样品盒中，用于后续染色和透射电镜观察。

1.3.3 使用狭缝载网直接捞取超薄切片 首先用睫毛针将超薄切片带轻轻断开，使得断开的超薄切片带可以被狭缝载网的狭缝覆膜区轻松容纳。用镊子夹取狭缝载网与水面成 45°夹角自上而下粘取超薄切片带，并用滤纸片从载网一侧缓缓吸水，而后放入样品盒中，用于后续染色和透射电镜观察。

1.3.4 使用捞片组合器具捞取及放置超薄切片至方孔载网 首先用睫毛针将超薄切片带轻轻断开，使得断开的超薄切片带可以被方孔载网轻松容纳。参照 1.3.2 用捞片组合器具捞取及放置超薄切片至方孔载网，并用滤纸片从载网一侧缓缓吸水，而后放入样品盒中，用于后续染色和透射电镜观察。

1.3.5 使用方孔载网直接捞取超薄切片 首先用睫毛针将超薄切片带轻轻断开，使得断开的超薄切片带可以被方孔载网轻松容纳。用镊子夹取方孔载网与水面成 45°夹角自上而下粘取超薄切片带，并用滤纸片从载网一侧缓缓吸水，而后放入样品盒中，用于后续染色和透射电镜观察。

1.4 染色及观察

捞取的超薄切片经醋酸双氧铀 50%乙醇饱和溶液及柠檬酸铅溶液各染色 15 min、5 min 后，在 Hitachi H7650 型透射电镜中进行观察。

2 结果与分析

经透射电镜检查，采用自上而下的粘取式捞

片方法捞片时，狭缝载网及方孔载网上的样品切片均易产生皱褶、折叠，方孔载网粘取的样品切片边缘已被撕裂、破损，如图 8（A，C）所示，有时样品切片还会大半脱离树脂切片大幅折叠、甚至整体滑脱出树脂切片；采用捞片组合器具捞取的样品切片，不论放置在狭缝载网还是方孔载网上，样品切片均平整美观，无皱褶、折叠、破损等，如图 8（B，D）所示。图 9 为采用捞片组合器具捞取的 *L. striatellus* 触角超薄切片所显示的由一个神经元支配的毛形感器表皮以下树突部分。

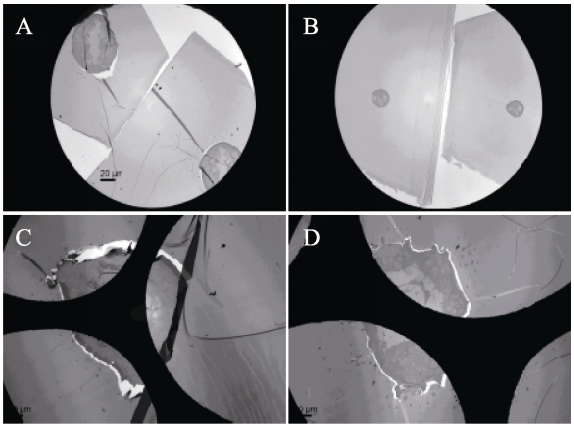

图 8　组合器具捞片与传统粘取式捞片结果对比

Fig. 8　Contrast of the results of fishing ultrathin sections with the combined device vs the common method

A. 狭缝载网粘取式捞片结果；B. 狭缝载网组合器具捞片结果；C. 50 目载网粘取式捞片结果；D. 50 目载网组合器具捞片结果。

A. Sections fished with slot grids from top to bottom; B. Sections fished with the combined apparatus onto the slot grids; C. Sections fished with 50 mesh grids from top to bottom; D. Sections fished with the combined apparatus onto the 50 mesh grids.

3　讨论

超薄切片捞片操作，是透射电镜生物样品常规制备过程中非常关键的一环。传统的捞片方法常使用镊子夹住载网自上而下粘取水面上漂浮的超薄切片，而后再将载网从水面提起，在此过程中，很容易使超薄切片受到来自载网膜、水面等各种作用力的影响而产生皱褶，从而在很大程度上影响对样品的观察。尤其是对于组织致密、

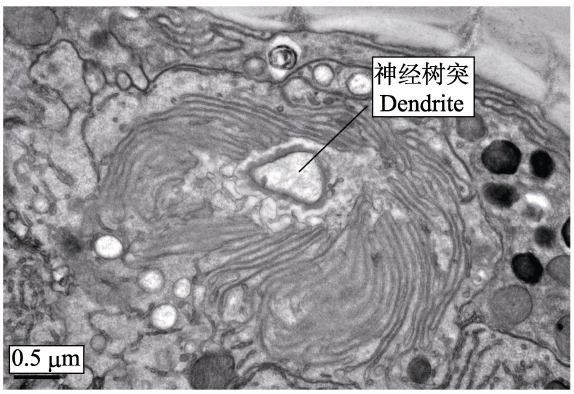

图 9　由一个神经元支配的 *Laodelphax striatellus* 触角毛形感器表皮以下树突部分

Fig. 9　The dendrite below the antennal cuticle of a sensillum trichodeum of *Laodelphax striatellus*

硬度较大的生物样品如昆虫触角而言，常由于包埋剂难以浸透而导致触角与树脂聚合不良，若采用传统方法自上而下粘取昆虫触角的超薄切片，除了容易产生皱褶，还会使触角切片与周边树脂切片呈不同程度的脱开、错位，触角切片大幅折叠甚至整片脱离树脂切片，触角切片在与树脂切片脱开过程中被撕裂、破损，严重影响了对昆虫触角的观察研究。虽然市售环形捞样器可有效解决捞片过程中所产生的切片皱褶等问题，但并不适用于连续切片收集时常用的狭缝载网。当将环形捞样器套在狭缝载网支持膜上，用滤纸吸水时，超薄切片会随滤纸吸水所产生的细小水流而漂移，最后在水完全被吸干时随机贴附在载网上，无法保证超薄切片最终附着在狭缝载网腰形孔处的支持膜上。

针对以上问题，本文在介绍新型捞片组合器具（付丙鲜等，2015a，2015b）的基础上，对于该组合器具在获得昆虫触角连续超薄切片中的应用进行了实验与探讨。该组合器具成功解决了昆虫触角超薄切片在传统方法捞片过程中出现的皱褶，触角切片与树脂切片脱开、错位，触角切片折叠甚至整片脱离树脂切片，触角切片在脱离树脂切片过程中被撕裂、破损等问题。捞片环的腰形环体设计可方便地控制超薄切片最终在狭缝载网上的贴附位置，同时大大减小了捞取的超薄切片在环中水体表面的不定向漂移以及超薄切片随滤纸吸水所产生的细小水流的漂移，从

而使连续超薄切片易于贴附在狭缝载网腰形孔处的支持膜上。使用该组合器具以及狭缝载网可制备昆虫触角连续超薄切片，对昆虫外周神经系统进行连续追踪观察和研究。组合器具同样适用于其他各种样品超薄切片及使用方形载网等进行的捞片操作，尤其是为获得大硬度样品的完整超薄切片提供了强有力支持。

捞片组合器具解决了透射电镜超薄切片制备中大硬度样品捞片存在的系列问题，并解决了所有样品的捞片皱褶问题。可使捞取在载网上的超薄切片平整、无皱褶，难浸透、聚合不佳的大硬度样品切片仍与树脂切片嵌合良好，无明显脱开、错位，样品切片不折叠或整片脱离，样品切片完整、无破损，spurr 树脂超薄切片即使在经过有机溶剂展片后，样品与树脂切片也只是轻微脱离，不影响切片质量。

参考文献 (References)

Al-Amoudi A, Dubochet J, Gnaegi H, Lüthi W, Studer D, 2003. An oscillating cryo-knife reduces cutting-induced deformation of vitreous ultrathin cryosections. *Journal of Microscopy*, 212(1): 26–33.

Briggman KL, Denk W, 2006. Towards neural circuit reconstruction with volume electron microscopy techniques. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(5): 562–570.

Denk W, Horstmann H, 2004. Scanning electron microscopy to reconstruct serial block-face three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biology*, 2(11): 1900–1909.

Fu BX, Hong J, Zhu ZR, 2013. A method of insect antennae processing for transmission electron microscopic research. CN, B, ZL 2013100261562. 2013–05–22. [付丙鲜, 洪健, 祝增荣, 2013. 一种昆虫触角的透射电镜样品处理方法. CN, B, ZL 2013100261562. 2013–05–22.]

Fu BX, Hong J, Zhu ZR. 2015a. A combined device suitable for fishing ultrathin sections with slot grids. CN, A, ZL 2015202492369. 2015–07–22. [付丙鲜, 洪健，祝增荣, 2015a. 适用于狭缝载网捞片的组合器具. CN, A, ZL 2015202492369. 2015–07–22.]

Fu BX, Hong J, Zhu ZR, 2015b. A combined device suitable for fishing ultrathin sections with slot grids. CN, U, ZL 2015202492369. 2015–08–12. [付丙鲜, 洪健, 祝增荣. 2015b. 适用于狭缝载网捞片的组合器具. CN, U, ZL 2015202492369. 2015–08–12.]

Fu BX, Rong NH, Zhu ZR, 2015c. Adjustable lofting platform with functions of anti shake and anti displacement. CN, A, ZL 2015105957733. 2015–12–16. [付丙鲜, 戎念杭，祝增荣, 2015c. 可调节式防抖防位移放样台. CN, A, ZL 2015105957733. 2015–12–16.]

Fu BX, Rong NH, Zhu ZR, 2016a. An adjustable lofting platform with functions of anti shake and anti displacement. CN, U, ZL 201520726360X. 2016–01–13. [付丙鲜, 戎念杭，祝增荣, 2016a. 一种可调节式防抖防位移放样台. CN, U, ZL 201520726360X. 2016–01–13.]

Fu BX, Rong NH, Zhu ZR, 2016b. A semi enclosed environment box for ultrathin section. CN, U, ZL 2015207263775. 2016–01–13. [付丙鲜, 戎念杭，祝增荣, 2016b. 一种半封闭式超薄切片环境箱. CN, U, ZL 2015207263775. 2016–01–13.]

Guo XQ, Wang G, Wang RB, 2003. A method for solving the ultra thin section tremo. *Research and Exploration in Laboratory*, 32(10): 321–323. [郭新秋, 王戈, 王瑞斌, 2003. 一种解决超薄切片震颤的方法. 实验室研究与探索, 32(10): 321–323.]

Harris KM, Elizabeth Perry E, Bourne J, Feinberg M, Ostroff L, Hurlburt J, 2006. Uniform serial sectioning for transmission electron microscopy. *The Journal of Neuroscience*, 26(47): 12101–12103.

Jin LQ, Zhang DS, 2007. Formation characteristics and elimination methods of ultra thin section folds. *Journal of Nanjing Medical University*, 27(2): 207–208. [金立强, 张东生, 2007. 超薄切片褶皱的形成特点和消除方法. 南京医科大学学报, 27(2): 207–208.]

Knott G, Marchman H, Wall D, Lich B, 2008. Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *The Journal of Neuroscience*, 28(12): 2959–2964.

Leapman RD, 2004. Novel techniques in electron microscopy. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(5): 591–598.

Matias VRF, Al-Amoudi A, Dubochet J, Beveridge TJ, 2003. Cryo-transmission electron microscopy of frozen-hydrated sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185(20): 6112–6118.

Rust MJ, Bates M, Zhuang XW, 2006. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution. *Nature Methods*, 3(10): 793–795.

She W, Yang HX, 2004. Discussion on difficult ultrathin sectioning technology. *Journal of Tianjin Medical University*, 10(3): 447–448. [沈伟, 杨海贤, 2004. 疑难超薄切片技术的探讨. 天津医科大学学报, 10(3): 447–448.]

Soto GE, Young SJ, Martone ME, Deerinck TJ, Lamont S, Carragher BO, Hama K, Ellisman MH, 1994. Serial section electron tomography: A method for three-dimensional reconstruction of large structures. *Neuroimage*, 1(3): 230–243.

Wang BB, Wang L, Hong J, 2014. A batch dyeing device of ultrathin section of electronic microscope. CN, U, ZL 2014203681382. 2014–12–03. [王贝贝, 王丽, 洪健, 2014. 一种电镜超薄切片批量染色装置. CN, U, ZL 2014203681382. 2014–12–03.]

Wang DY, ZhangQ, Liu Y, Lin ZF, Zhang SX, Sun MX, Sodmergena, 2010. The levels of male gameticmitochondrial DNA are highly regulated in Angiosperms with regard to mitochondrial inheritance. *The Plant Cell*, 22(7): 2402–2416.

White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S, 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 314(1165): 1–340.

Yang CH, Lai HW, Tang GY, 2001. Quality control of ultra thin section technology. *Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 17(5): 441–442. [杨传红, 赖晃文, 唐庚云, 2001. 超薄切片技术的质量控制. 临床与实验病理学杂志, 17(5): 441–442.]