

SEM観察のための生物試料作製法

ー コツと注意点 ー

日本電子株式会社
技術顧問 近藤 俊三

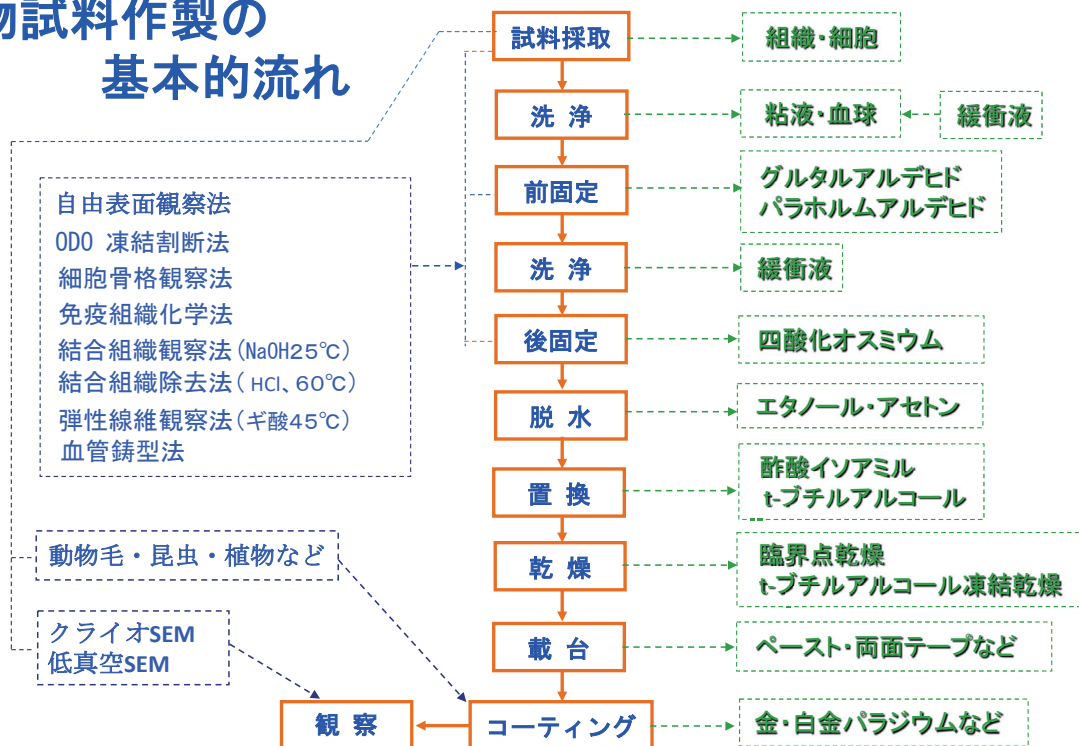
はじめに

動物を構成する細胞や組織の特徴

1. 細胞や組織の主な成分はタンパク質や脂質・糖類などである。
2. 構成元素は C, H, O, N, P など軽い元素からなる。
3. 一般に多量の水分を含む。
4. 軟らかく変性しやすいものが多い。

このような組成の試料を、そのまま高真空のSEMに持込むと試料は変形や破壊などを生じる。そのため、形態や微細構造の保持と電子線照射に耐え、さらに試料からの情報を得やすくするための処理が必要となる。

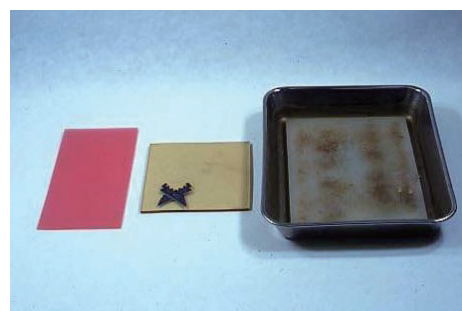
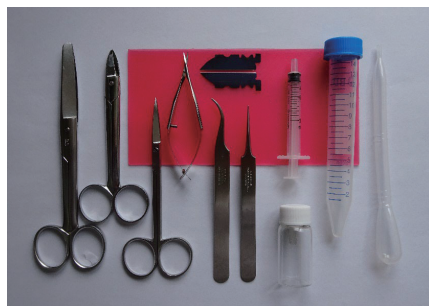
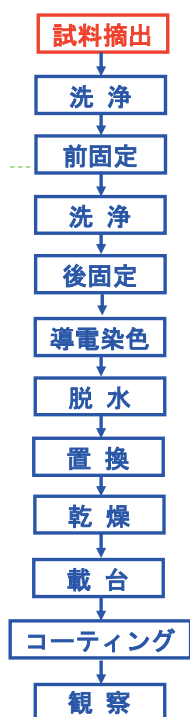
生物試料作製の 基本的流れ



Solutions for Innovation JEOL

〔組織の切り出し〕器具

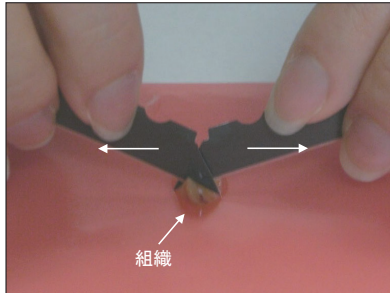
組織の切り出しや細胞の採取に用いる器具



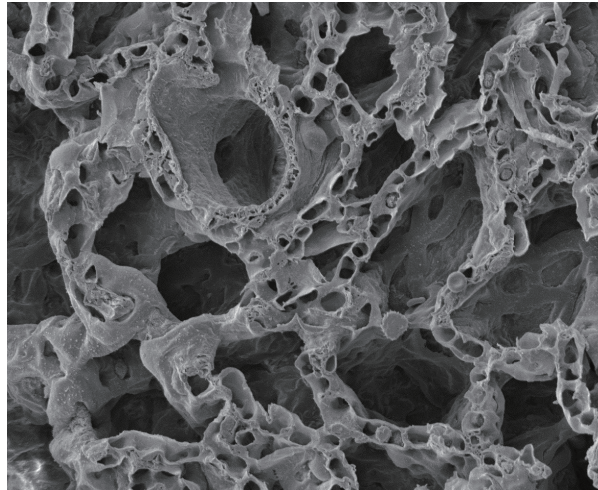
Solutions for Innovation JEOL

【組織の切り出し】 肺組織

注意点：組織を切り出すとき負荷をかけない



交叉したカミソリ刃を左右に引いて試料を切る

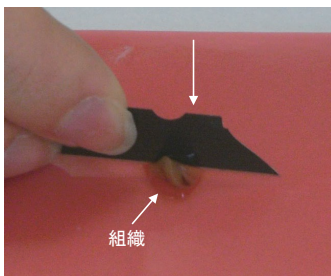


適切な組織の切り出し（マウス肺）

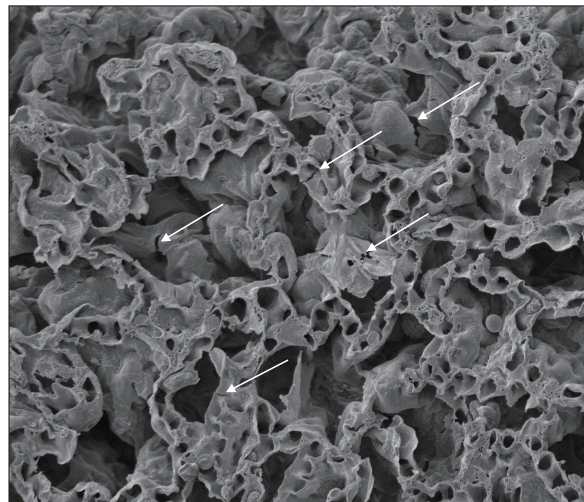
Solutions for Innovation JEOL

【組織の切り出し】 肺組織

押し切りの例 → 肺胞はつぶれ亀裂もみられる（矢印）



矢印は組織を切る方向を示す



Solutions for Innovation JEOL

[遊離細胞の採取]

遊離細胞は遠心機で細胞を濃縮し、上澄みを廃棄して固定液を注入

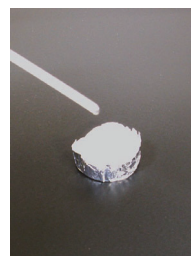


培養細胞などは遠心機で濃縮する

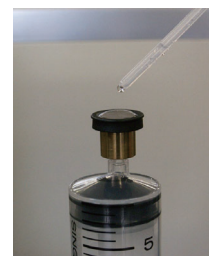


固定液に滴下

固定処理



アルミ皿滴下



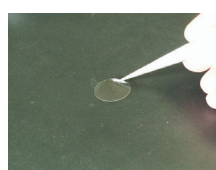
SEMポアで吸引接着



カバーガラスの加熱



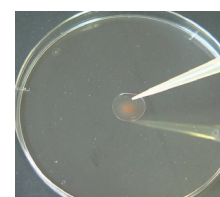
カバーガラスの端を曲げる



曲げた部分を摘んで移動



0.1% ポリ-L-リジン水溶液処理
(分子量：8000以上)

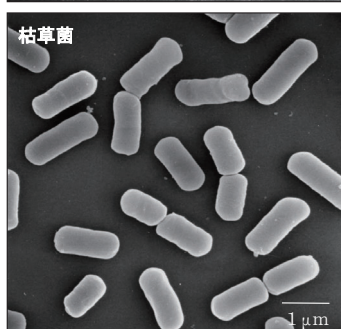
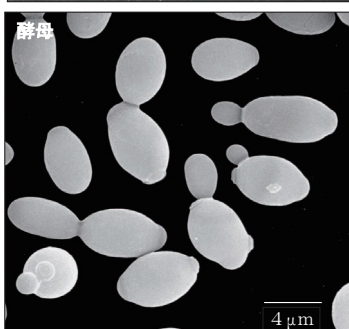
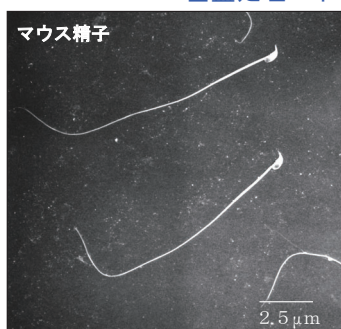
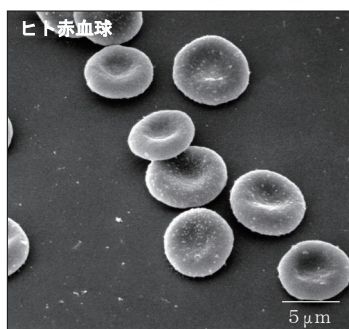


固定液

Solutions for Innovation JEOL

[遊離細胞の観察例]

基盤処理：ポリ-L-リジン（分子量：8000以上）





[緩衝液]

組織や細胞の自己融解や変性などの防止ならびに固定液の希釈（pH調整）・洗浄の目的で使用。

1)リン酸緩衝液

一般的で使用しやすい。Millonig や Sorensen の緩衝液がよく用いられている。

（第1リン酸ナトリウムと第2リン酸ナトリウムの混合比で pHを調整する）

2)カコジル酸緩衝液

リン酸緩衝液の短所（酵素活性など）を補える緩衝液であるが pHの安定度ではやや劣る。

ヒ素を含むことから取り扱いや廃棄に注意。

浸透圧

哺乳動物の体液の浸透圧は約300mOsmolである。固定に用いられる浸透圧はこの値よりも少し高い浸透圧（340mOsm位）が用いられる。

緩衝液の浸透圧

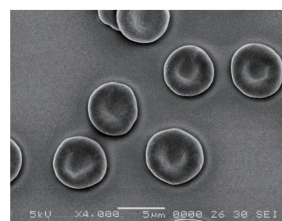
0.1M	リン酸緩衝液	215mOsm
0.2M	リン酸緩衝液	400～415mOsm
0.1M	カコジル酸緩衝液	160mOsm
0.2M	カコジル酸緩衝液	380mOsm

固定液の浸透圧

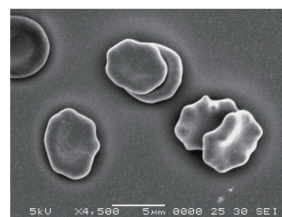
1%	グルタルアルデヒド	120mOsm
2%	グルタルアルデヒド	230mOsm
1%	四酸化オスミウム	36mOsm
2%	四酸化オスミウム	72mOsm

調整液の浸透圧

0.1M	ショ糖	100mOsm
0.1M	ブドウ糖	100mOsm

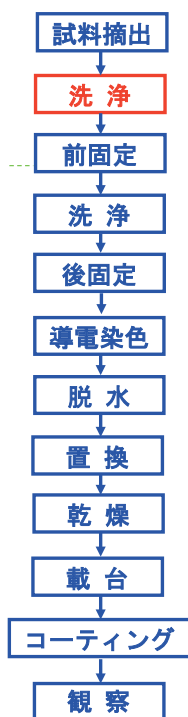


0.1Mリン酸緩衝液
1%グルタルアルデヒド



0.1Mリン酸緩衝液
2.5%グルタルアルデヒド

〔組織の洗浄〕 マウス小腸

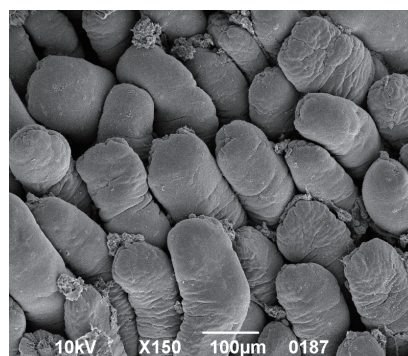


血液や組織片・粘膜などの除去処理

- 1) 緩衝液の噴射
- 2) 流水洗浄
- 3) ピンセット

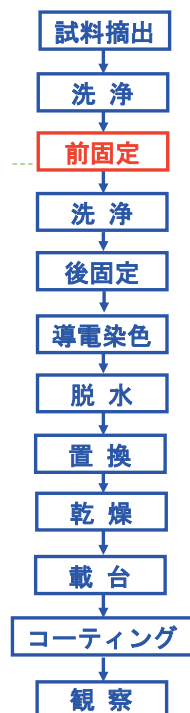


緩衝液による灌流洗浄



粘液が除去された小腸

〔固定〕 アルデヒド系固定剤(還元剤)



A. グルタルアルデヒド

- 1) アルデヒド基を2つ持ち、タンパク質を強く固定する。
- 2) 組織への浸透はアルデヒド系の中では遅い。
- 3) 無色～淡黄色の液体で保存は冷蔵庫。

B. パラホルムアルデヒド

- 1) アルデヒド基は1つ、タンパク質の固定作用は弱い。
- 2) 組織への浸透は早く、酵素や抗原の活性を保持。
- 3) 粉末や顆粒状で水には殆ど溶解しない。

C. アクロレイン

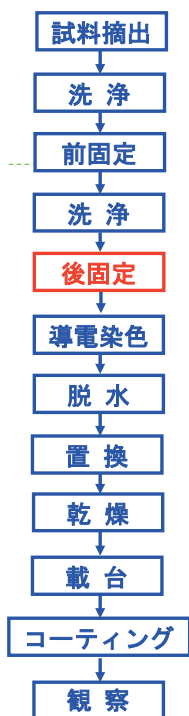
- 1) 組織への浸透は早い。
- 2) 揮発性が高く毒性が強い。



グルタルアルデヒド
アクロレイン パラホルムアルデヒド



振盪器



[固定] 重金属系固定剤（酸化剤）

1. 四酸化オスミウム (OsO_4 、分子量 254)

- 1) リン脂質（膜系）をよく固定。
- 2) 無色～淡黄色の針状結晶で揮発性は高い。
- 3) 蒸気（ガス）にも固定作用あるためドラフトを使用。
- 4) 長時間の浸漬するとタンパク質は破壊される。



OsO₄ 固定試料

2. 過マンガン酸カリウム (KMnO_4 、分子量 158)

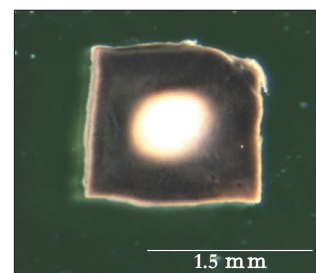
- 1) 膜系を良く固定するが細胞内構造（リボソームなど）の固定には不向き。
- 2) 植物や微生物などの固定に使用。



四酸化オスミウム

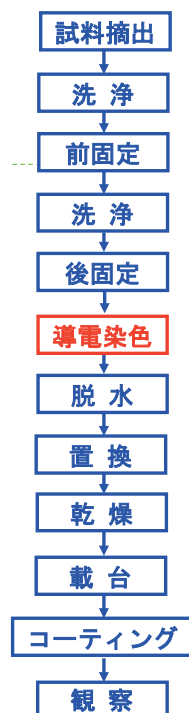


二重栓ビン



OsO₄ 固定液は浸透が遅い

[導電染色]



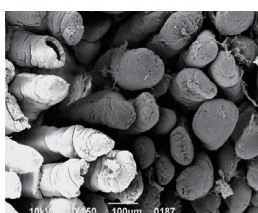
[目的]

電子線照射による帯電や試料損傷、二次電子の発生不良などの回避や軽減、さらには無コーティング観察・金属コーティング量の削減などを目的とする。

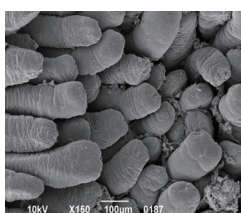
[タンニン酸の特徴]

1. タンパク質や糖と反応する。
2. 重金属塩を還元する。

[処理効果]

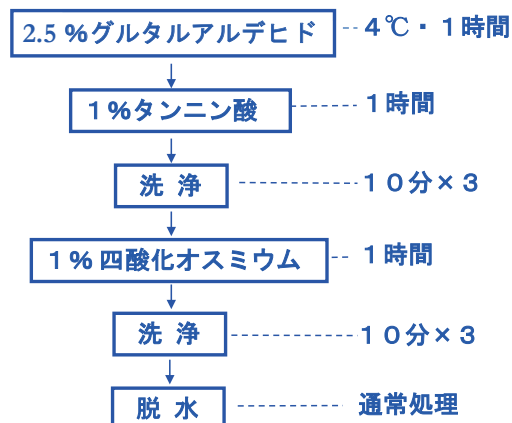


導電染色処理無しのマウス小腸



導電染色処理後のマウス小腸

[処理方法]

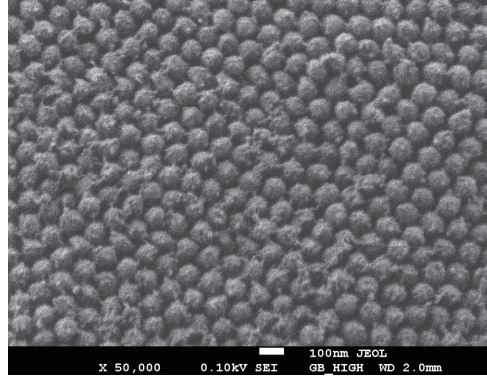
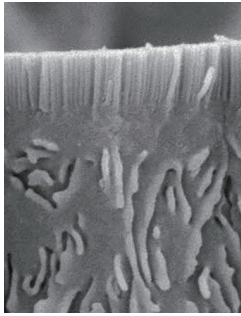


[導電染色の影響]

[利点]

無コーティング観察が可能

小腸の微絨毛コントロール像

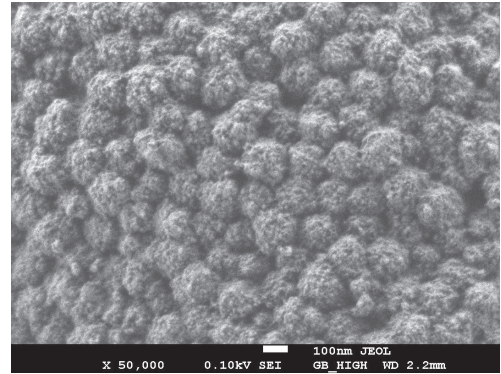


2.5% GA+1%タンニン酸 + 1% OsO₄

[欠点]

アーチファクトを生ずる可能性あり

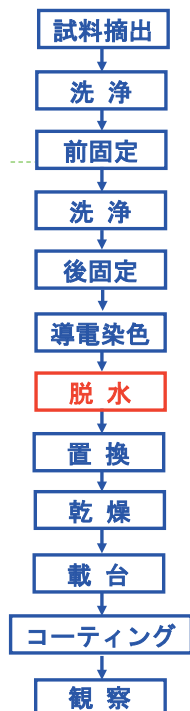
過度の導電処理を行った微絨毛の像



2.5% GA処理後1%タンニン酸+1% OsO₄ × 3

Solutions for Innovation JEOL

[脱水]



脱水溶剤

- 1) エタノール：主に動物の細胞・組織
- 2) アセトン：主に植物、微生物

脱水操作

- 1) 低濃度から高濃度(上昇系列)へ段階的に進める。
(例) 50%, 70%, 80%, 90%, 100% × 3 各10分
- 2) 可溶性タンパクや脂質などの流出を抑えるため
低濃度(～80%)の脱水は氷温でおこなう。

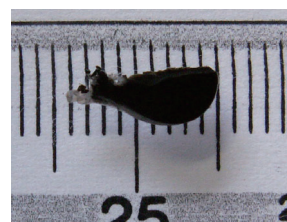
注意点

組織の収縮は避けられない

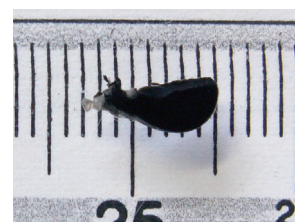
無水エタノール



モレキュラシープ
硫酸銅

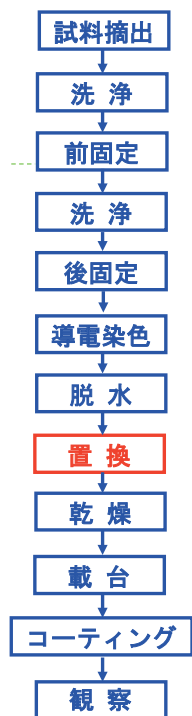


脱水前の腎組織

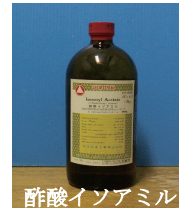


脱水後の腎組織

Solutions for Innovation JEOL



[置換]



酢酸イソアミル



t-ブチルアルコール

1. 臨界点乾燥（液化炭酸ガス、ドライアイス）

置換剤：酢酸イソアミル

*：液化炭酸ガスと良く混じる

*：蒸発しにくい

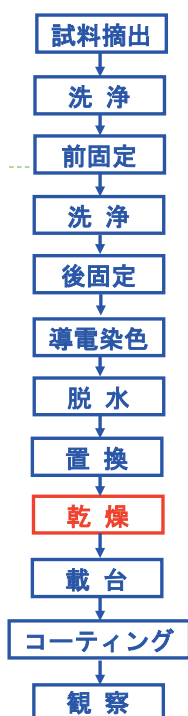
*：プラスチック製品を溶かす

注：高圧ガス製造取り扱い許可が必要

2. t-ブチルアルコール凍結乾燥

置換剤：t-ブチルアルコール

*：凝固点が 25.5 °C と高い



[乾燥] 臨界点乾燥

[試料の移動] ピンセットあるいはピペットで移動



ピンセット



ピペット



溶媒の乾燥に注意

[注意点]

1) 酢酸イソアミルの乾燥器への持込は試料が乾燥しない程度の量とする。

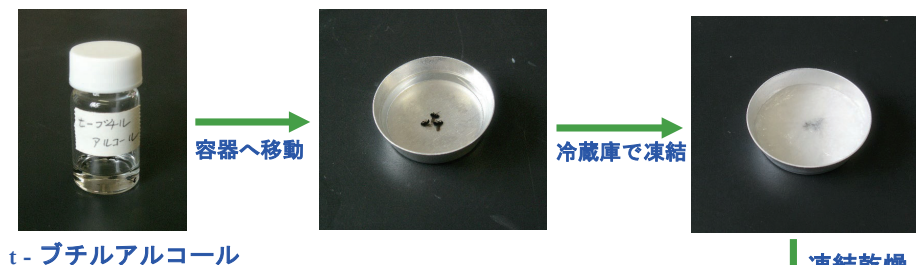
2) 装置内の試料は液化炭酸ガスでよく洗う。



臨界点乾燥器 JCPD-5



[乾燥] t-ブチルアルコール凍結乾燥

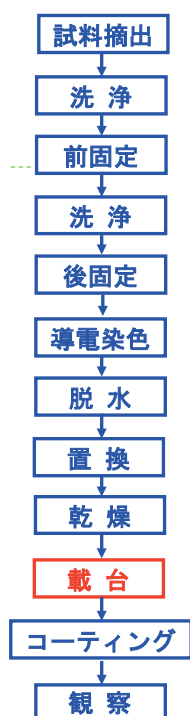


凍結乾燥



[注意点]

- 1)昇華したt-ブチルアルコールがロータリーポンプのオイルを劣化させる。
- 2)シャーレに培養した細胞は剥離しやすい。



[載台]

接着剤の条件

- 1)導電性を有する
- 2)真空中でガスの放出が少ない
- 3)電子線照射に安定である

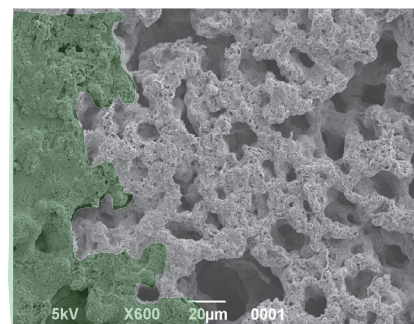


注意点

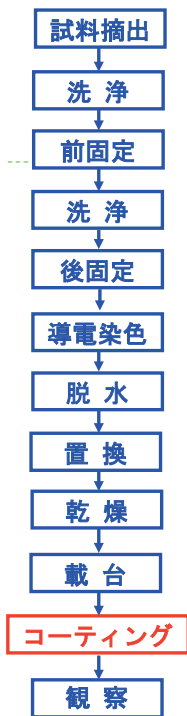
ペーストを溶かしている有機溶媒は気化しやすい

↓
固形化

↓
シンナーなどの有機溶剤で溶解



[金属コーティング]



コーティング法

- 1) イオンスパッタ法
- 2) イオンビームスパッタ法
- 3) オスミウムプラズマ重合法
- 4) 抵抗加熱蒸着法
- 5) その他

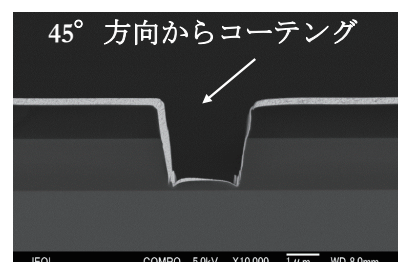
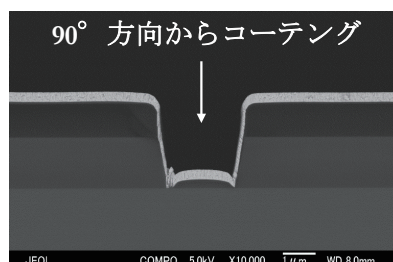
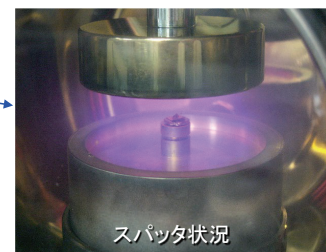
コーティング金属

金 (< 15 nm)
 パラジウム (5 ~ 10 nm)
 白金パラジウム (3 ~ 5 nm)
 白金 (2 ~ 4 nm)
 四酸化オスミウム



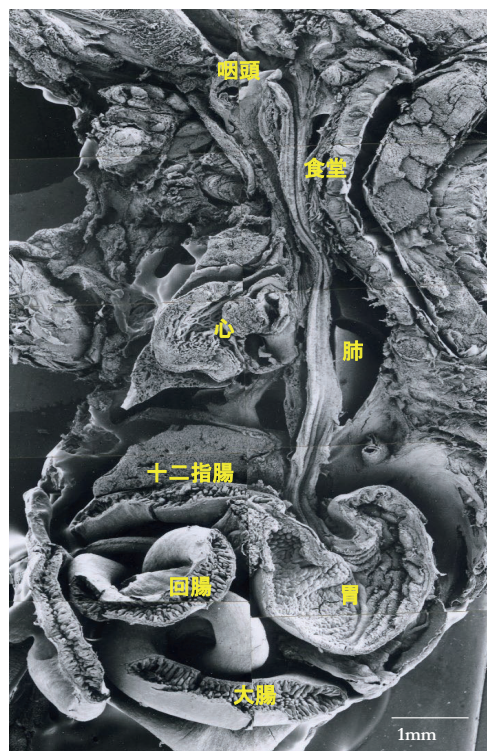
イオンスパッタ装置の注意点

試料の凹凸や向きによってコーティング量に差ができる



入り組んだ試料の観察例

(16.5日マウス胎児の消化器系観察)

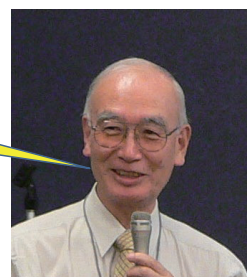


Solutions for Innovation JEOL

まとめ

今回、基本的な生物試料作製法を紹介した。
SEMは多種多様な試料が観察対象となっている。今回、
紹介した基本的な試料作製法がユーザーズミーティング
に参加された皆様方の参考になれば幸いに思います。

ご静聴ありがとうございました



近藤俊三 / 日本電子（株）

Solutions for Innovation JEOL