

走査電子顕微鏡サンプル作製

表面観察/植物組織・細胞

【 著者 】 後藤友美、佐藤繭子、若崎真由美、武田紀子、豊岡公徳

【 公開日 】 2020. 5. 18

【 最終更新 】 2020. 9. 13

概要・原理

装置・器具・試薬

1. 試料

植物 例) シロイヌナズナなどの根・葉・茎頂

2. 必要な試薬

(固定)

25% グルタルアルデヒド水溶液 EMグレード (TAAB社など)

パラホルムアルデヒド (和光純薬など)

カコジル酸ナトリウム (EMS社など) [カコジル酸バッファー使用時]

リン酸二水素ナトリウム (NaH_2PO_4) [リン酸バッファー使用時]

リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4) [リン酸バッファー使用時]

オスミウム酸2%水溶液 EMグレード (EMS社など)

(脱水)

メタノール (またはエタノール)

t-ブチルアルコール[凍結乾燥装置使用の場合]

酢酸イソアミル[臨界点乾燥装置使用の場合]

3. 必要な器具

- ・ 固定用ガラス瓶(蓋付)15ml用 ・ カミソリ刃 ・ パラフィルム ・ スポイト ・ ピンセット
- ・ 固定液に沈める小物 (レンズペーパー、ユニカセットなど)
- ・ ポンプ (ダイヤフラム型ドライ真空ポンプなど)
- ・ 真空デシケーター (コック・メーター付き)
- ・ t-ブチルアルコール凍結乾燥装置 もしくは 臨界点乾燥装置
- ・ 試料台
- ・ 接着剤 (カーボンテープ、カーボンペーストなど)
- ・ 金属膜コーティング機器 (オスミウムコーターやイオンスパッタなど)

詳細

1. 固定液の事前作製

1-1 前固定液

SEM用の前固定液として、2種類を示す。当研究室ではTEMで用いる前固定液をそのまま流用しているため、1-1-1前固定液①を用いているが、1-1-2前固定液②も一般的によく使われる。

1-1-1 前固定液①

・4%パラホルムアルデヒド・2%グルタルアルデヒド/0.05Mカコジル酸buf.(pH7.4)

8% パラホルムアルデヒド溶液 *1	12.5 ml	25 ml
25% グルタルアルデヒド溶液	2 ml	4 ml
0.5 M カコジル酸緩衝液 *2	2.5 ml	5 ml
D.W	8 ml	16 ml
	25ml	50 ml

*1 8%パラホルムアルデヒド溶液作製法

- ①20ml程のD.Wをビーカーに入れ、レンジで温める。
- ②パラホルムアルデヒドを2g加える。以降、換気注意。
- ③65℃に加熱しながらスターラーで攪拌。
- ④1N NaOHを200 μ l加える。溶液が透明になるまで加えるが、加えすぎないこと。
- ⑤25mlまでD.Wでメスアップする。
- ⑥常温から4℃まで冷ます。

*2 0.5M カコジル酸緩衝液(buf.)作製法

- ①カコジル酸ナトリウム 10.7g、DW 90ml を攪拌して溶かす。
- ②1N HCl で p H7.4 に調整する。
- ③100ml まで D W でメスアップする。

1-1-2 前固定液②

・2%グルタルアルデヒド/0.05M リン酸 buf.(pH7.4)

25% グルタルアルデヒド	2 ml	4ml
0.2M リン酸 buf. *3	6.25ml	12.5ml
DW	16.75ml	33.5ml
	25ml	50ml

以降の洗浄液や後固定液もリン酸 buf.を用いる。

*3 0.2M リン酸 buf. (pH 7.4)作製法

- A 液：0.2M リン酸二水素ナトリウム(NaH_2PO_4)
- B 液：0.2M リン酸水素二ナトリウム(Na_2HPO_4)

A 液 19ml+B 液 81ml で混合すると pH7.4 の 0.2M リン酸 buf.になる。

1-2 後固定液

1% 四酸化オスミウム in 0.05 M カコジル酸buf.

2% OsO₄ 5 ml

0.5 M カコジル酸 buf. (pH7.4) 1 ml

10 ml にメスアップ。

但し、前固定液でリン酸buf.を使用する場合、後固定液もリン酸buf.で作製する。

1-3 脱水剤

以下のメタノール（またはエタノール）水溶液を作製する。

(12.5% 必要に応じて) , 25%, 50% 75%, 90%水溶液

2. 操作手順

2-1 細切、前固定、後固定

- 1) 植物個体を乾燥させないように、また、挫滅しないよう注意を払いながら、ハサミまたはカミソリで採取する。
- 2) パラフィルムやシリコン板上に前固定液を垂らし、前固定液に試料を浸けながら、カミソリで5~10 mm程度に細切する（写真1）。観察しない部分は可能な限り取り除いておくとうい。ピンセットまたはスポイトで、試料を潰さないよう前固定液を入れた固定ビンに移す（写真2）。
- 3) 脱気する（沈みにくいものは、レンズペーパーやユニカセット等（写真3）で液に沈ませる工夫を行うこと）デシケーターで -0.08MPa x 5~6回（写真4）。サンプルの様子を見ながら適宜追加して行う。沈まない試料は取り除いた方がよい。
- 4) 前固定: (室温,2時間 もしくは 4°C, 一晚)
- 5) 0.05Mカコジル酸 Buf.で5分×3~6回洗う(アルデヒド臭が残らないように、丁寧に洗う)
- 6) 後固定 室温, 1~3時間、(サンプルの黒化具合を見ながら適宜調整)。(写真5)
- 7) 蒸留水で3回洗う。

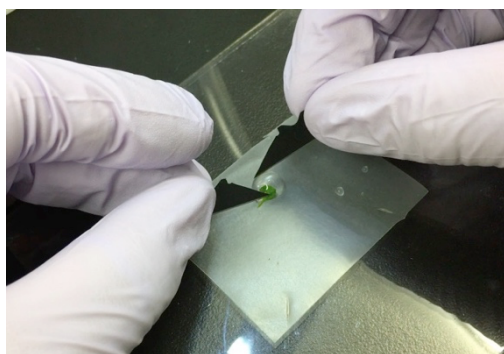


写真 1

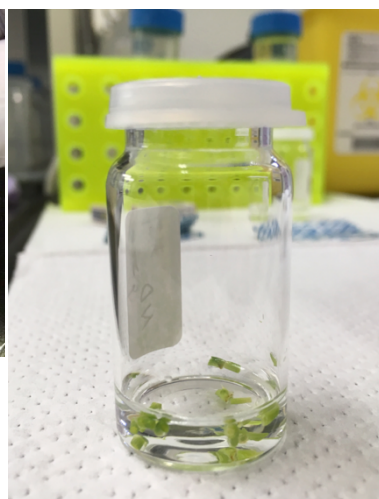


写真 2

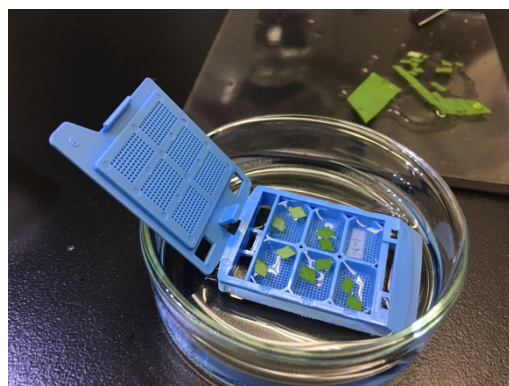


写真 3

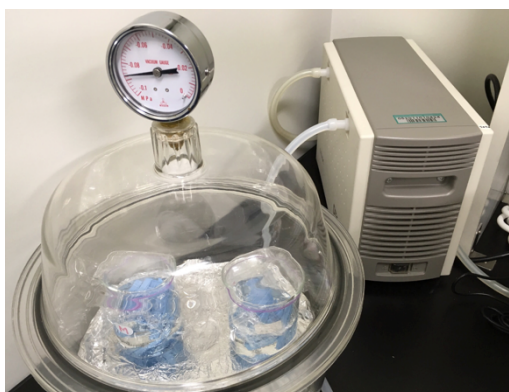


写真 4

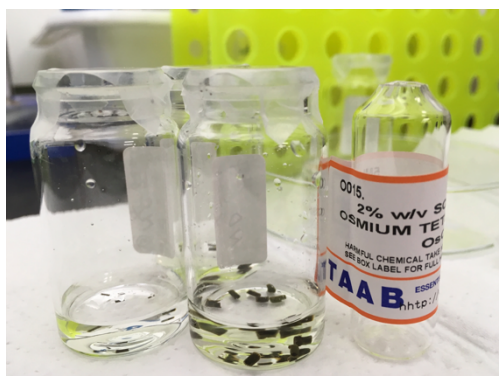


写真 5

2-2 脱水、乾燥

2-2-1 t-ブチルアルコール凍結乾燥装置を用いる場合

- 1) 25, 50, 75, 90, 100% メタノール(またはエタノール)で脱水する。各30分 ×1 または 2回。
- 2) メタノール：t-ブチルアルコール=1:1を30°Cで20分置換する。
- 3) t-ブチルアルコールのみを30°Cで30分×3回繰り返して置換する。
- 4) 置換後、試料を凍結乾燥装置に装填し、凍らせ(写真6)、試料室を排気、昇華・乾燥させる。(冷蔵庫で凍らせてから凍結乾燥装置に入れる方法もある)

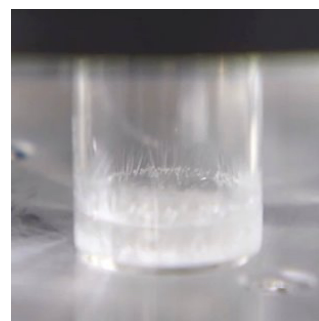


写真 6

2-2-2 臨界点乾燥装置を用いる場合

- 1) 25, 50, 75, 90, 100% メタノール(またはエタノール)で脱水する。各30分 ×1 または 2回。100%は2~3回行うと確実に脱水される。
- 2) メタノール：酢酸イソアミル=1:1に入れ、常温で試料が沈むまで静置。
- 3) 酢酸イソアミルに常温で15分×2回置換する。
- 4) ドラフト内で試料を乾かさないように臨界点乾燥用カゴに素早く移し、臨界点乾燥装置にセットし、乾燥させる。

2-3 載台、導電処理

- 1) 乾燥した試料をピンセットで傷つけないようにつまみ、試料台の上に接着剤(カーボンテープやカーボンペーパーストなど)を用いて載せる。
- 2) 金属膜コーティング機器(オスミウムコーターやイオンスパッタ)を用いて、導電処理を行う。

工夫とコツ

t-ブチルアルコール凍結乾燥

t-ブチルアルコールの凝固点は 25.5°C と高く、凝固している場合は 30°C に加温し、分注して使用するとよい。
t-ブチルアルコールは吸湿すると、凝固点が下がる場合がある。凍結させる時の t-ブチルアルコールの量は試料が少し隠れる程度で、入れすぎに注意する。

金属膜コーティング

金属コーティング膜は、試料に導電性を付与して帯電を防止するばかりでなく、二次電子の発生効率増大と電子線による試料損傷の軽減にも効果がある。コーティングに使用される金属には金、金パラジウム、白金、白金パラジウム、オスmiumなどがある。高倍率観察を目的としている場合、1~2nm程度の薄いオスmium膜をコーティングできるオスmiumコーターの使用が良い。

参考文献

豊岡公德, 若崎真由美, 武田紀子, 佐藤繭子「走査電子顕微鏡を用いた植物組織・細胞の新しい捉え方」 *Plant Morphology* PLANT MORPHOLOGY 32 3-9

新・走査電子顕微鏡 日本顕微鏡学会関東支部 編 共立出版

電顕入門ガイドブック改訂版 日本顕微鏡学会 電子顕微鏡技術認定委員会編 国際文献印刷社