

電子顯微鏡前處理方法

～NanoSuit溶液編～

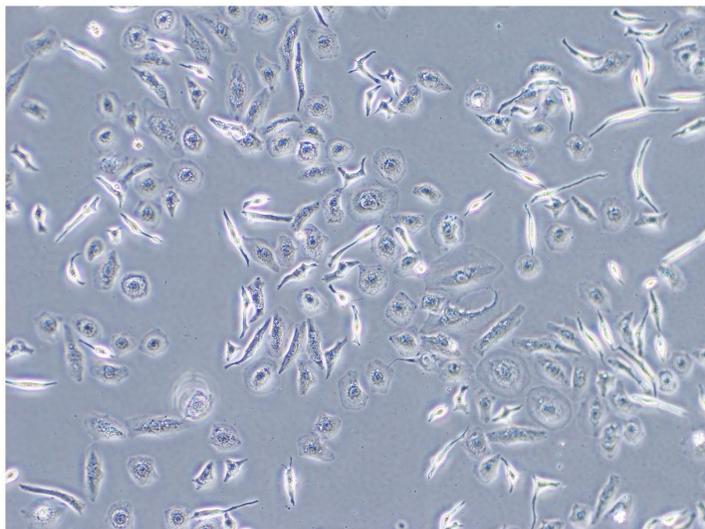
目的

- ▶ 当施設の走査電子顕微鏡（以下SEM）は、金属試料を中心とした無機物を扱う利用者に多く使用されている。一方で、年々有機物を扱う利用者も増加しており、真空中で変形してしまう有機物試料でもSEMの観察に必要な前処理を行う必要がある。特に生物試料を観察する際は試料に化学的な処理を加えて、可能な限り目的の構造を生きている状態に近い様子で鮮明にとらえるために、試料の前処理は非常に重要な要素になってくる。

そこで、様々な前処理方法の中から自然乾燥、化学固定法、冷却ホルダーによる凍結乾燥法、NanoSuit溶液を用いてSEM像の比較をした。

試料

未固定 Hela細胞



50μm

試料：Hela細胞(処理済み)

【処理内容】

Hela細胞を、E-MEM（高グルコース）500 mLに非動化FBS 50 mLを添加した培地で37 °CのCO₂インキュベータで培養した。その後、0.05%トリプシン処理液を2分ほど添加し活性を止め、PBSで3回洗浄を行なった。

今回使用する
試薬



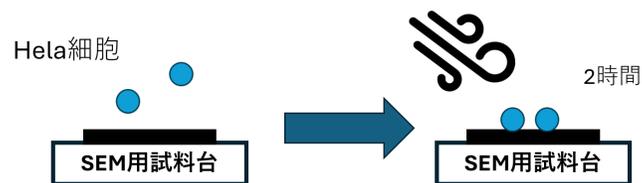
NanoSuit溶液

NanoSuit溶液では、細胞用のNanoSuit溶液Ⅲを用いた。

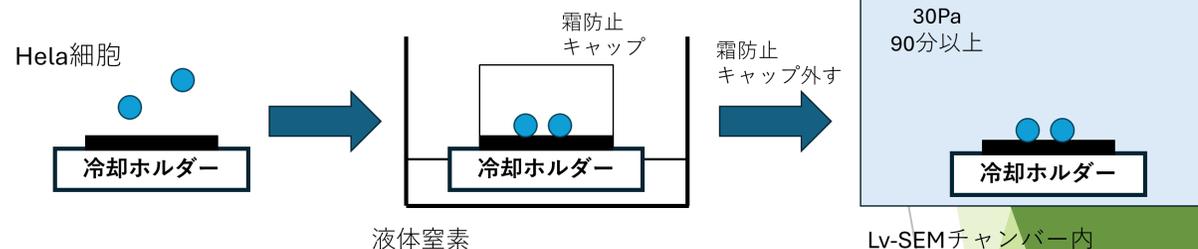
超純水で50倍希釈したものをSEM用の試料台に貼ったカーボンをテープの上に塗布した細胞の上に垂らし、プラズマ照射を行った。

処理後のHela細胞をSEM用の試料台に貼ったカーボンテープの上に塗布した後に、ドラフトチャンバー内で2時間静置し、乾燥。

自然乾燥

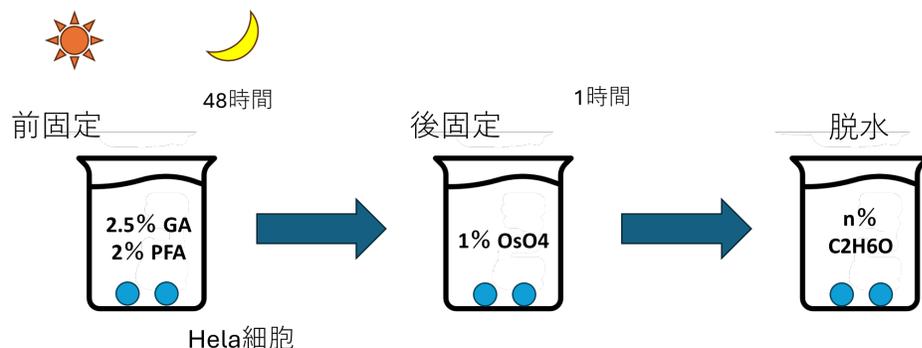


凍結乾燥



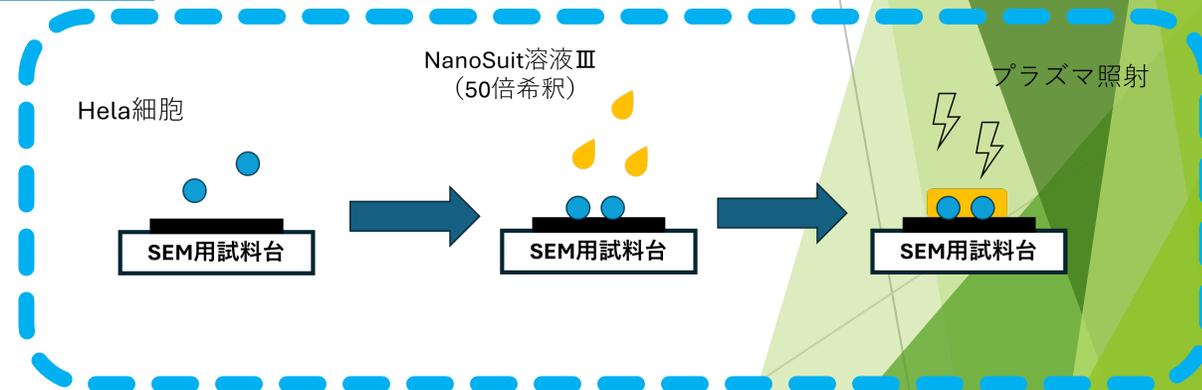
冷却ホルダーにカーボンテープを接着させ、細胞を塗布し、冷却ホルダーを液体窒素で凍結させ、30 Paの低真空モードに設定したSEMのチャンバー内に90分以上静置した。

化学固定



処理後のHela細胞に前固定液を添加し、48時間静置したのちに後固定液に1時間静置した。後固定液を除去した後に、30%⇒50%⇒70%⇒90%⇒95%⇒99%の上昇系列のエタノールにて各3分ずつ脱水処理を行なった。

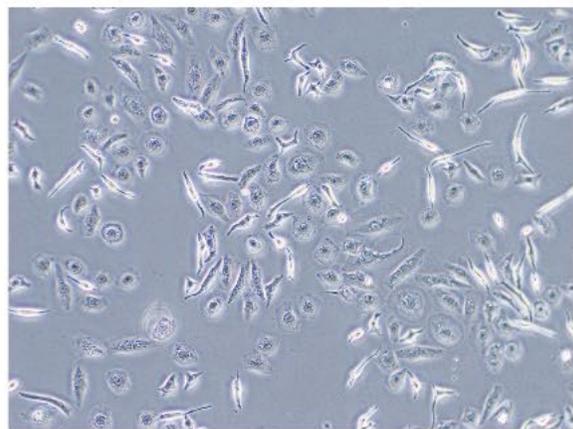
NanoSuit溶液



結果 1

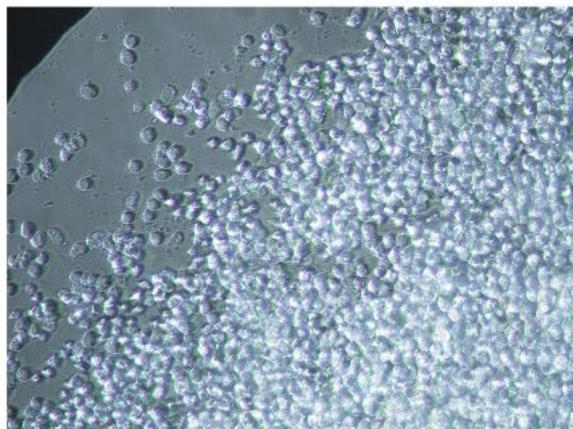
実体顕微鏡の200倍で観察した未固定、前固定済みの脱水前、前固定済みの脱水後のHela細胞である。

未固定 Hela細胞



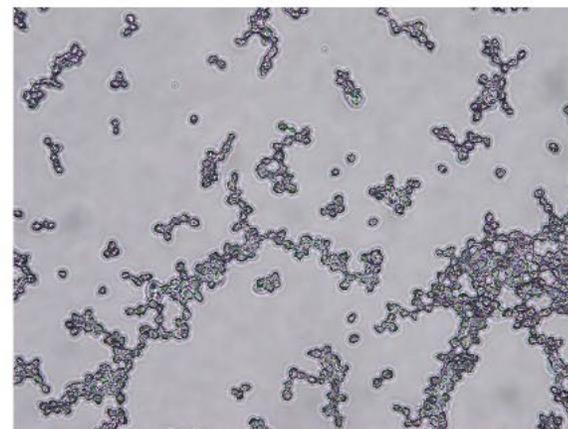
50µm

(脱水前) 前固定済み Hela細胞



50µm

(脱水後) 前固定済み Hela細胞



50µm

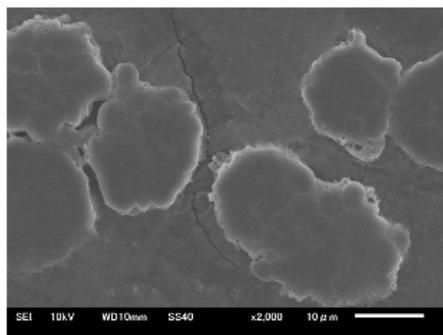
全て実体顕微鏡 x200観察

工程を経るにつれて、細胞が収縮した。

結果 2

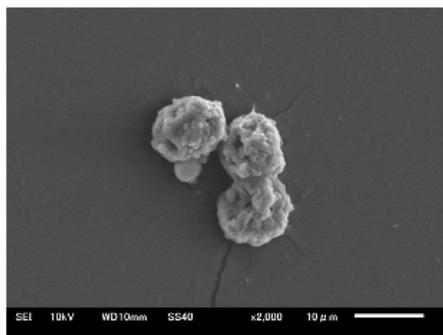
NanoSuit溶液で処理したものを除き、Ptコーティングを20 mAで60秒蒸着させた。加速電圧10 kV、照射電流量40でSEM観察を行なった。

自然乾燥



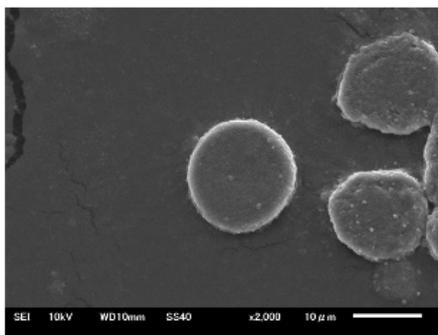
細胞破裂

化学固定法



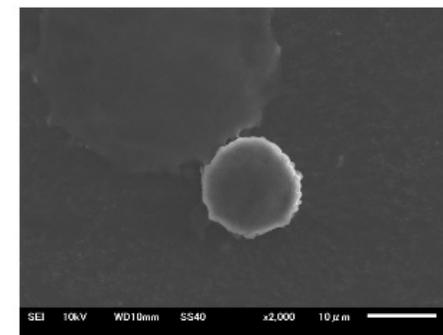
細胞収縮

凍結乾燥法



細胞の外形を
維持

NanoSuit溶液



NanoSuit溶液以外Ptコーティング済み

細胞の外形を
維持

まとめ

- ▶ それぞれの前処理によって、生物試料の外形に差が出た。凍結乾燥法とNanoSuit溶液を使用した細胞では生きている状態に近い様子で観察ができた。また、NanoSuit溶液では、凍結乾燥法に比べて前処理の時間が大幅に短縮できた。