電子顕微鏡観察（SEM）におけるサンプル処理について

（グルタル固定サンプル編）

作成者：山口

2014年8月31日加筆

1.　電顕グレードのグルタルアルデヒドで固定された海産植物プランクトンサンプルの処理を行う際、まず最初にサンプルの塩抜きを行う必要がある。直径4 mmの濾過筒（和田研にある）に25 mm、0.2 μm目合いのヌクレポアフィルターをセットし、そこにポリエルリジンを1滴垂らす。これはプランクトンをフィルターに電気結合させる物質であり、プランクトン粒子の電子の衝突による飛散を防ぐことができる。10分程度の放置後に、余分な液体は再び吸い取る。サンプルをオートピペッターを用いて入れる。そこにMQを何度が加えて塩をぬく。この操作を行わないと、表面に塩が残り、綺麗な写真がとれない。また、細胞の変形を防ぐために、限りなくやさしく引くようにする。

2.　続いて、脱水処理を行う。これはエタノールシリーズを用いて行う。各濃度のエタノール（30%, 50%, 70%, 90%, 100%）を準備し、濃度が低い方から順に使っていく。オートピペッターを用いて、適量をフィルター内に注入していく。各濃度10分を目安にエタノールを添加していく。この時も引く圧力には十分注意する。ダストの混入を防ぐためにも、蓋のようなものをした状態で放置した方がよい。100%に関しては、20分程度時間をかけて処理を行い、完全に脱水する。

珪藻のケイ質殻など堅い殻を持たない生物の場合、最後の凍結乾燥時にべこっとへこむ可能性があるので、ブタノールで固定した状態で保存する。しかし、実際にはバクテリアや植物プランクトンの観察の際にはブタノール処理は行っていない。

3.　100％のエタノールによる処理を行った後には、凍結乾燥機を用いて乾燥を行う。電顕室にも乾燥機はあるが、フィルターの乾燥には適さないので、梅澤研究室の凍結乾燥機を用いている。十分に乾燥を行わないとうまく像が見れない可能性があるので注意する。普段は2時間程度で十分乾燥させることができる。

4.　フィルターの乾燥が終われば、続いてアルミ製の試料台へとフィルターを貼り付ける。両面テープを試料台の大きさに合わせ貼り付けを行い、そこにサンプルを濾過した箇所をはさみで大きさを合わせ貼り付ける。

5.　試料台へのフィルターのセットが終われば、続いて電顕室にて白金の蒸着を行う。普段は20 mAを3回位置を変えながら行う。強いアンペアで長くやった場合、白金が厚く蒸着されるために微細な構造が見れなくなるので注意する。

6.　蒸着終了後、SEMを用いて観察ができるようになる。

＊電顕室は金井先生が管理されているので、前日までに部屋の予約を行い、使用当日に鍵を借りるようにする。