

## 【SEM観察試料作製の基本】 24.10.25

- ① 【細切】 載台可能な試料の大きさは観察内容等により変わるので、確認が必要。細切は、必要であれば行う。不必要に大きいと試薬を無駄に使うことになるので、適度な大きさにする。
- ② 【前固定】 グルタルアルデヒド (GTA) は2%程度で用いられることが多い。固定時間は最低でも2時間は必要と言われている(浸透速度0.5mm/h)。一晩浸漬したままにしても大丈夫だが、極端に長時間、浸漬したままだと組織の収縮や硬化などが起こる可能性がある。やむを得ず実験を中断する場合、数日程度であれば大丈夫だと思われる。

グルタルアルデヒド (日新EM製であれば、どれでも可)  
→0.1Mリン酸緩衝液(NaでもKでもどちらでもよい)で2~5%の溶液にして使用(推奨はNa)。

- ③ 【洗浄】 10分間、3回、よく攪拌する。浸透圧保持のため、固定液に用いたものと同じ種類の緩衝液で洗浄。
- ④ 【後固定】 1%四酸化オスミウム(1%の場合、浸透速度0.8mm/h)：室温、1~4hr。脂質をよく固定する。凹凸があったり、複雑な形でチャージしやすい試料の場合は、四酸化オスミウムの浸漬時間をやや長めにするとよい(3時間程度)。うっかり長くしすぎると前固定の場合と同様に収縮等の可能性がある。

**四酸化オスミウム**(日新EM等の電子顕微鏡グレード(EMグレード)のもの)  
→オスミウム結晶または溶液を上記緩衝液と同じもので1~2%に調整する。結晶の場合は、1g入りの物を購入し、緩衝液に溶かして、4%液として保管し、使用の都度、1% or 2%に調整すると便利。強力な酸化剤で蒸発しやすく、毒性が強いため、**取扱いはドラフト内で行う。**

- ⑤ 【洗浄】 固定液で用いた緩衝液で洗浄。1分、1回、室温。直ちに脱水を行う。
- ⑥ 【脱水】 脱水のやり方は非常に多数あり、人によって違う。50,70,80,90,95,100%という人もいれば、50,70,90,100%x3という人もいて、それぞれの脱水時間も5~20分とまちまちだが、低濃度では短め、高濃度では長めでもいい。脱水濃度や時間は、情報を集めたり、実験を繰り返したりして、最終的には決める。初めは一般的な濃度・時間で充分。
- ⑦ 【乾燥】 t-ブチルアルコールを2~3回交換し、しっかりと置換する。実験のスケジュールで夜間や休日に浸漬を行った場合、試料が浸漬した状態を保てるならば、数日間そのままでも構わない(密閉する。保管中に液量が減ってきているようであれば、その都度、足せばよい)。

t-ブチルアルコール (特級ならどこのメーカーでも可)  
→固定が終わった試料を直径7.5cm(最大でも10cm) x 高さ10cm以内の容器に入れ(フタ付き)、試料が浸る程度のt-ブチルアルコールを入れる。多すぎると乾燥に時間がかかりすぎてしまう。これに浸した状態で電顕室に持ち込む。夕方持ち込み、翌朝渡しが基本。

- ⑧ 【載台】 試料に方向性がなければ（どのように載せてもいいのなら）、電顕室職員が試料台にテープを張り、試料を載せ、蒸着まで引き受けることが可能。利用者自身が載せる場合は、凍結乾燥終了時刻以降に電顕室で載台作業を行う。分野に試料台があれば、分野で載台できる。

試料を研究室で保管したい、後日同じ試料を再度観察したい可能性がある、などの場合は試料台は分野で用意する。試料の保存の必要がなければ、電顕室の試料台を使用可。張り付けるカーボンテープは電顕室にあるものを使用。裏に穴があいているネジ切りタイプしか使用できない。各サイズM4と記載で、高さ7mmのもの。

- ⑨ 【蒸着】 電顕室職員が試料の大きさ・形に合った蒸着を行う。当室の蒸着金属源は「白金パラジウム」を用いている。
- ⑩ 【観察】 生物試料の場合、高加速電圧だと試料損傷が大きい可能性があるため、まずは3kVで観察を行い、状況に応じて変更する。