

走査型電子顕微鏡における生物試料の前処理方法の比較とその効果

吉田 すずか

北海道大学

1. はじめに

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。

2. 方法

試料は、処理された HeLa 細胞を使用した。HeLa 細胞は、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。

自然乾燥では、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、乾燥させた。

化学固定法では、処理後の HeLa 細胞が入った細胞懸濁液を静置し、上清の PBS を除去した後に前固定液 (*1) を添加し、48 時間静置した。その後、前固定液を除去し、後固定液 (*2) を添加し 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。各処理において遠心分離用のカラムを使用し、3000 rpm で 1 分間分離して上澄み液を除去 (*3) した。

*1：前固定液：GA 2.5%、PFA 2%となるよう下記のとおり調整 (total 4 mL)

10% グルタルアルデヒド溶液 1 mL

4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 2 mL

HEPES 緩衝液 1 mL

*2：後固定液：1% オスミウム (VIII) 溶液

*3：細胞と固定液等を分離する際に遠心分離用カラムを使用。(3000 rpm, 1分)

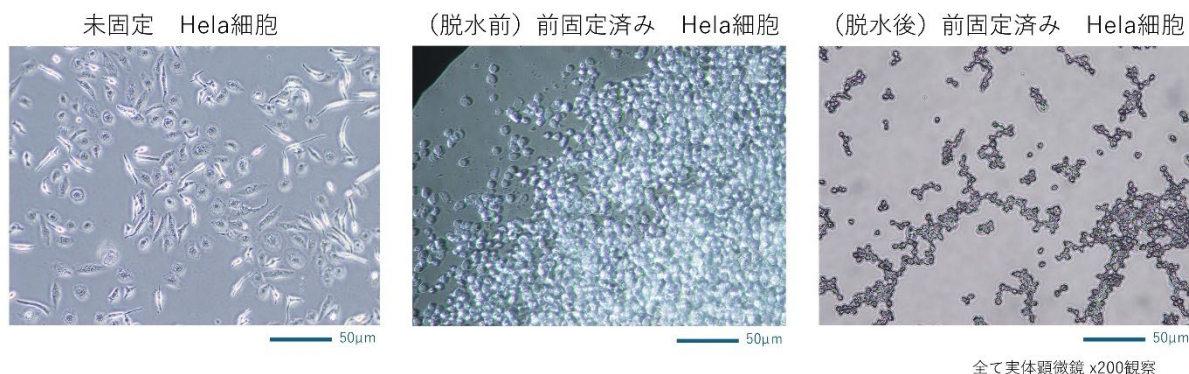
Lv-SEM 用冷却ホルダー (JEOL 製) を用いて、液体窒素で HeLa 細胞を凍結乾燥した。冷却ホルダーにカーボンテープを接着させ、細胞を塗布し、事前に冷却していた霜防止キャップを取り付けた。その後、冷却ホルダーを液体窒素で凍結させ、SEM 用のホルダーに装着した。SEM のチャンバー内に入れる直前にキャップを外し、30 Pa の低真空モードに設定した SEM のチャンバー内に 90 分以上静置した。

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。

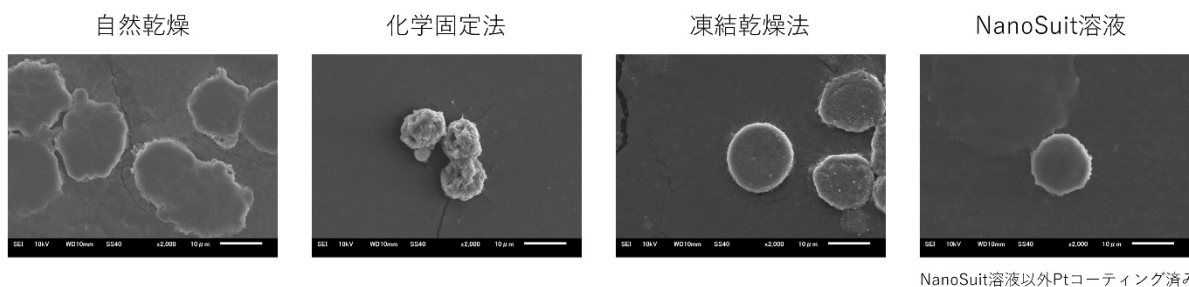
NanoSuit 溶液で処理したものを除き、Pt コーティングを 20 mA で 60 秒蒸着させた。加速電圧 10 kV、照射電流量 40 で SEM 観察を行なった。

3. 結果

下記の画像は、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。工程を経るにつれて、細胞が収縮した。



下記の画像は、SEM で観察した像である。自然乾燥では、細胞が破裂して本来の細胞の形で観察することが出来なかった。化学固定法では、細胞は破裂していなかったものの上記の画像より細胞の収縮が見られた。凍結乾燥法と NanoSuit 溶液を使用した細胞は、一部収縮・破裂していたものの、細胞本来の外形を維持していた。



4. おわりに

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。