

2007 年度改訂

WEB 公開版

[一部の内容が印刷配布版と異なります]

電子顕微鏡の使用法

早稲田大学 教育学部 理学科 生物学専修

生物学実験 IV: 実験書

担当: 加藤尚志

Copyright © 2003-2007

by Department of Biology, School of Education, Waseda University. All Rights Reserved.

不許複製: 本書の内容の全てあるいは一部について、許可なく利用、転載・複製などを行わないでください。

電子顕微鏡の使用法

目的と概要

自然科学領域の新知見獲得において電子顕微鏡が果たしてきた役割は非常に多い。しかも近年、応用的な手法の開発も進み、ますます重要な研究手段となっている。

生物組織、細胞、さらには高分子の構造形態を観察する際に電子顕微鏡は様々な情報を与えてくれる。

本実習では走査型電子顕微鏡（SEM : Scanning Electron Microscope）を実際に使用して装置の原理、仕組み、操作法を理解し基礎操作を習得する。加えて生物組織、血液などの生物系試料は含水量が多いため電子顕微鏡観察前に特殊な前処理法が必要となる。この前処理法を用いて動物の赤血球像、ヨーグルト中の乳酸菌像を電子顕微鏡にて観察する。

使用装置

- 走査型電子顕微鏡（日立 S-2400）
- イオンスパッタ装置（日立 E-101）
- 遠心分離機（KUBOTA-6910 スイングローターRS-30）

尚、実習内容を変更して、透過型電子顕微鏡（日立 H-7650）を使用した実験を行う場合があるが、その場合は適宜指示する。

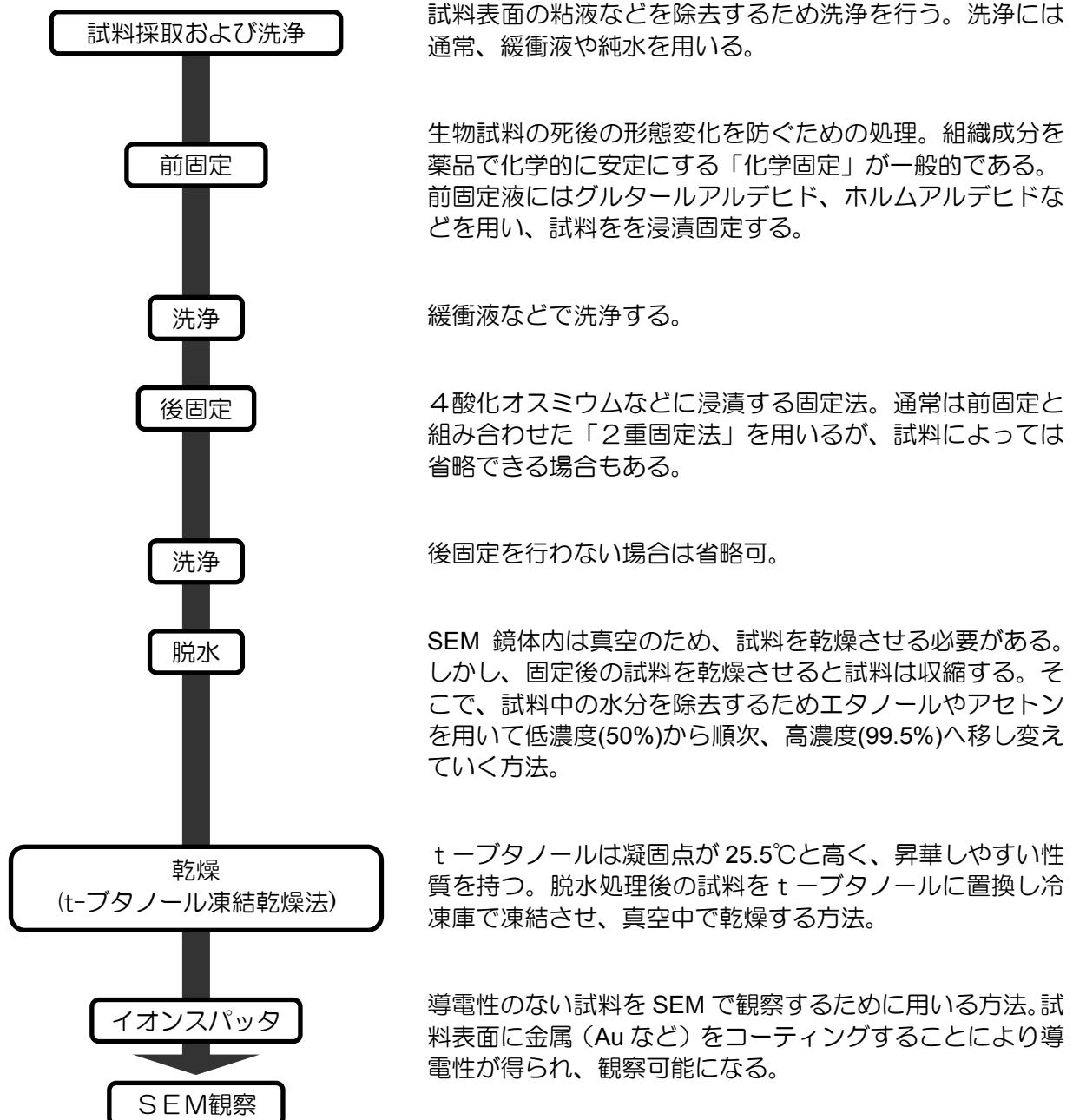
試料

- 動物（哺乳類または両生類）血液
- 市販ヨーグルト
- 観察用試料（小昆虫、花粉など）

試薬及び器具

- | | |
|--------------------|------------------|
| ● 0.1M リン酸緩衝液 | ● 25% グルタルアルデヒド |
| ● 99.5% エタノール | ● t-ブタノール |
| ● フォルムバル（2 塩化エチレン） | ● 血液用抗凝固剤 (EDTA) |
| ● ろ紙 | ● カーボンテープ |
| ● カバーガラス | ● マイクロピペット |
| ● その他必要なガラス器具 | ● パスツールピペット |

<生物試料 前処理法（代表例）>



<実験操作 1. 動物の赤血球像>

1. 溶液調整

- 1) 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.3) (生物実験室であらかじめ準備済み)
次の2つの溶液を用意
A. 0.1M リン酸 1 ナトリウム溶液
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW=156.03) 1.56g/100ml
B. 0.1M リン酸 2 ナトリウム溶液
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (MW=358.22) 3.58g/100ml
A 液を適当量ビーカーに取り、pH メーターで pH を測定しながら、B 液を適当量加え pH7.3 とする。
- 2) 2% グルタルアルデヒド (GA)、1.5% GA 溶液、25% GA が用意されているので、純水を用いて上記濃度の溶液を各 10ml 用意する。
- 3) 50% エタノール溶液 99.5% (=100%) エタノールが用意されているので、上記濃度を 20ml 用意する。
- 4) 哺乳類用 固定液 (7ml 遠沈管に用意)
0.1M リン酸緩衝液 1ml
2% GA 1ml
上記2種の溶液を等量加えると、浸透圧 445mOSm の溶液が出来上がる。
- 5) 両生類用 固定液 (7ml 遠沈管に用意)
0.1M リン酸緩衝液 1ml
1.5% GA 1ml
上記2種の溶液を等量加えると、浸透圧 386mOSm の溶液が出来上がる。

2. 血液採取 → 固定

マウス(エーテル麻酔後)またはカエルの心臓に穿刺し、抗凝固剤を添加したシリンジで血液を適当量採取し、採取後は直ちに用意してある各固定液に浸漬する。浸漬時間は室温で約2時間であるが、その間、試料が分離しないよう適宜、手で振り混ぜる。

3. 遠心分離

固定が終了した試料を「1000rpm / 5min」という条件で、スイングローターを用いて遠心する。分離後、上清部分は廃棄。

4. 脱水

試料の水分を有機溶媒(エタノール、アセトン)で置換させるため、最初は低濃度から徐々に高濃度の溶液へ置き換える。具体的な方法を以下に示す。

- 1) 遠心分離した沈殿部分に 50% エタノール 1ml を加え、よく振り混ぜる。そのまま 10min 浸漬し、時々振り混ぜる。
- 2) 次に 99.5% エタノール 1ml 加え、同様に 10min 浸漬、振り混ぜる。この時、エタノールの最終濃度は 75 %エタノールとなっている。
- 3) さらに 99.5% エタノール 2ml 加え、同様に 10min 浸漬、振り混ぜる。この時、エタノールの最終濃度は 87.5 %となっている。
- 4) 「1000rpm / 2min」で遠心分離後、上清部分は廃棄し沈殿部分に 99.5%エタノール 1ml を加え振り混ぜる。時々、振り混ぜつつ 10min 浸漬し、その後、遠心分離。上記操作を2回繰り返す。

5. SEM 試料台の準備

- 1) SEM 用試料台の直径より少し長めにカーボンテープを切り、試料台に貼り付ける。
- 2) カーボンテープの上にカバーガラスを置き、密着させる。
- 3) フォルムバルをパスツールピペットで 1 滴、カバーガラスの中心に滴下し、ピペットの先端でフォルムバルを伸ばし、完全に乾燥させる。

6. t-ブタノール浸漬

4-4) で遠心分離した沈殿部分に t-ブタノール溶液 1~2ml を加え、振り混ぜつつ 10min 浸漬させ、その後、「1000rpm/5min」で遠心分離。同様の操作を 2 回繰り返す。
2 回目の浸漬後、遠心分離は行わずに試料（7ml 遠沈管）と SEM 試料台を持って、地下の SEM 室へ移動する。

7. 乾燥（今回は自然乾燥だが、通常は t-ブタノール凍結乾燥）

5-3) で用意した試料台のフォルムバルが乾いていることを確認後、t-ブタノールに浸漬してある試料をパスツールピペットで 1 滴、中心に滴下し室温で自然乾燥させる。

8. イオンスパッタ（金属コーティング）

SEM 室に設置されている「イオンスパッタ E-101」を用いて、試料表面に金属膜（Au）を付ける。イオンスパッタ装置の使用方法は別途、使用マニュアルを参照のこと。

9. SEM 観察

- 加速電圧：10kV
 - ワーキングディスタンス：10mm
 - 倍率：1 万倍程度
- 赤血球像の観察が可能。

＜実験操作 2. ヨーグルト中の乳酸菌像＞

1. 溶液調整

- 1) 2% グルタルアルデヒド (GA)、25% GA が用意されているので、純水を用いて上記濃度の溶液を 10ml 用意する。
- 2) 50% エタノール溶液 99.5% (=100%) エタノールが用意されているので、上記濃度を 20ml 用意する。
- 3) ヨーグルト用 固定液
2% GA 1ml
乳酸菌は動物の細胞とは異なるため、固定液の浸透圧は考慮しない。そのため 2% GA のみで固定できる。

2. 試料採取 → 洗浄

市販のヨーグルトを少量採り、7ml 遠沈管に純水 1~2ml と共に入れ、よく振り混ぜて懸濁させ洗浄する。その後、「1000rpm/2min」で遠心分離→上清部は廃棄。
純水 1~2ml を加え懸濁→遠心分離、この操作を合計 3 回繰り返す。

3. 固定 → 遠心分離

洗浄が終了した試料の沈殿部分に 1-3) で用意した固定液 1ml を加え振り混ぜ懸濁させる。時々、振り混ぜつつ約 2 時間、室温で浸漬させる。
固定が終了した試料を「1000rpm / 2min」という条件で、スイングローターを用いて遠心する。分離後、上清部分は廃棄。

4. 脱水

＜動物の赤血球像＞の「脱水」と同じ。具体的には、

- 1) 遠心分離した沈殿部分に 50% エタノール 1ml を加え、よく振り混ぜる。そのまま 10min 浸漬し、時々振り混ぜる。
- 2) 次に 99.5% エタノール 1ml 加え、同様に 10min 浸漬、振り混ぜる。この時、エタノールの最終濃度は 75 %エタノールとなっている。
- 3) さらに 99.5% エタノール 2ml 加え、同様に 10min 浸漬、振り混ぜる。この時、エタノールの最終濃度は 87.5 %となっている。
- 4) 「1000rpm / 2min」で遠心分離後、上清部分は廃棄し沈殿部分に 99.5%エタノール 1ml を加え振り混ぜる。時々、振り混ぜつつ 10min 浸漬し、その後、遠心分離。上記操作を 2 回繰り返す。

5. t-ブタノール浸漬

4-4)で遠心分離した沈殿部分に t-ブタノール溶液 1~2ml を加え、振り混ぜつつ 10min 浸漬させ、その後、「1000rpm/5min」で遠心分離。同様の操作を 2 回繰り返す。
2 回目の浸漬後、遠心分離は行わず、よく振り混ぜて懸濁させる。

6. ろ紙への吸着

ろ紙を 1cm 四方程度に切り取り、「t-ブタノール浸漬」終了後の懸濁液を 1 滴、滴下する。この際、ろ紙の裏表（懸濁液を滴下した面）が、わからなくなならないよう端を折り曲げるなどのマーキングを行う。

7. t-ブタノール凍結乾燥

試料を吸着させたろ紙を小型シャーレに入れ、t-ブタノールをろ紙が浸るくらいまで入れる。小型シャーレを冷蔵庫に入れ、t-ブタノールを凍結させる。冷蔵庫は地下の SEM 室のものを使用。

8. 乾燥 → 試料台への載台

6で凍結させた小型シャーレを、t-ブタノール凍結乾燥装置を用いて乾燥させる。

t-ブタノール凍結乾燥装置の使用方法是付属のマニュアルを参照のこと。

SEM 試料台にカーボンテープを貼り付け、テープの上にもろ紙を接着させる。ろ紙の表裏を間違えないよう、注意すること。

9. イオンスパッタ（金属コーティング）

SEM 室に設置されている「イオンスパッタ E-101」を用いて、試料表面に金属膜（Au）を付ける。イオンスパッタ装置の使用方法是別途、使用マニュアルを参照のこと。

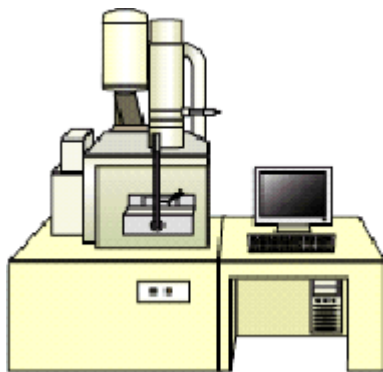
10. SEM 観察

- 加速電圧：10kV
- ワーキングディスタンス：10mm
- 倍率：1 万倍～2 万倍程度

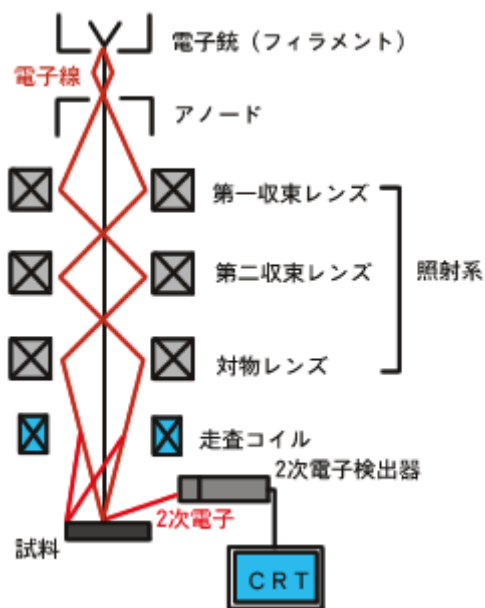
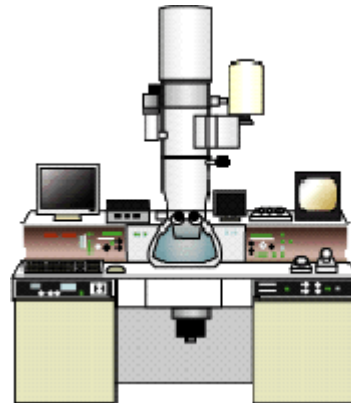
乳酸菌（球菌、桿菌などヨーグルトの種類によって異なる）の観察が可能。

< 走査型電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡の相違点（参考） >

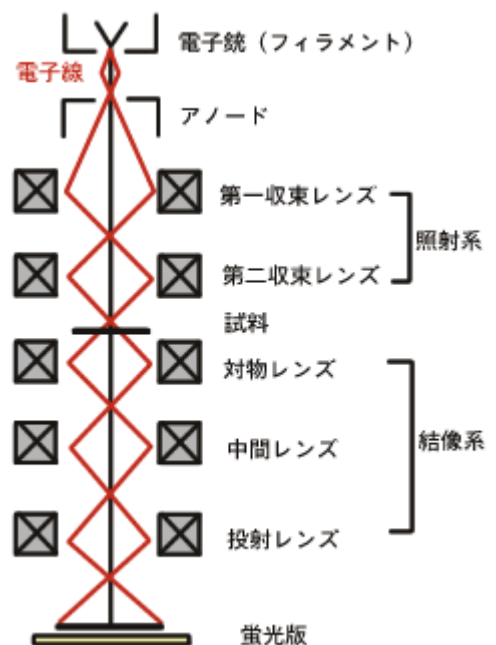
走査型電子顕微鏡
(Scanning Electron Microscope)



透過型電子顕微鏡
(Transmission Electron Microscope)



電子線を試料表面に照射することによって得られる「2次電子」を用いて試料表面の微細な構造を観察する。
倍率：10～100万倍



薄切した試料や薄く研磨した試料に電子線を透過させることにより、試料内部や微細な構造を観察する。
倍率：50～150万倍

< 予習内容および実験レポート作成におけるポイント >

- Q1. 光学顕微鏡と電子顕微鏡の違いは？分解能の点から述べよ。また、電子顕微鏡の鏡体内を真空に保つのはなぜか？
- Q2. 走査型電子顕微鏡以外にどのような電子顕微鏡があるだろうか？また、いかなる領域でどのように利用されているか？
- Q3. 生物試料の電子顕微鏡用試料作成において、良い試料を得るために固定の段階で注意しなくてはならないことは何か？
- Q4. 走査電子顕微鏡試料で、昆虫などの小動物は固定液で固定していないが、観察できるのはなぜか？
- Q5. 焦点合わせについて、正焦点、不足焦点、過焦点では像の見え方にどのような違いがあるか？
- Q6. 加速電圧、ワーキングディスタンスが像の見え方に及ぼす影響について述べよ。

< タイムスケジュール >

1 日目

13:00	■ 実験の概要説明（各班で血液担当と乳酸菌担当に分ける）
13:30	■ 溶液調製
13:30	■ 血液、ヨーグルトを準備
14:30	■ 試料採取→洗浄
14:30	■ 固定
16:30	
16:30	■ 脱水→試料台準備→ろ紙準備
17:30	
17:30	■ t-ブタノール→浸漬
18:00	
18:00	■ 自然乾燥→t-ブタノール凍結乾燥→イオンスパッタ
19:00	

2 日目

SEM 観察を A 班と B 班を時間差をつけて午前と午後に分ける。

A 班 9:30～12:30

B 班 13:30～16:30