

凍結乾燥機を使用した生物系試料の電子顕微鏡観察

林 育生

工学系技術支援室 分析・物質技術系

はじめに

これまで電子顕微鏡による観察は主に金属、セラミックス、粒子等が中心に行われてきたが、現在、本系では生物系試料の観察も展開しようとしている。生物系試料の電子顕微鏡観察は、金属やセラミックスと異なり、試料に多くの水分を含んでいるため、高真空下で試料が変形するなどの問題がある。そのため、試料の前処理の技術が重要となってくる。そこで、今回は生物系試料の前処理の手法の1つであるt-ブタノール凍結乾燥法を用いた生物系試料の電子顕微鏡観察技術の習得を目的に行った。

1. t-ブチルアルコール凍結乾燥機による凍結乾燥試料の作製

1-1. 使用した装置の概要

本研修で使用した t-ブタノール凍結乾燥機は、写真1に示した日本電子の JFD-320 という装置である。この装置は t-ブタノール専用の凍結乾燥機で、簡便に試料を作製することができる。



写真1 JFD-320(日本電子)

1-2. 試料

本研修では試料として写真2に示した水に分散したセルロースの繊維を使用した。セルロースは、水酸基が多く水分を多く含むため、自然乾燥では水溶液中に分散している様子を観察することが難しいとされている。



写真2 水分散セルロース繊維

1-3. 作製手順

はじめに、ポリ L リシンは基板と試料を化学吸着させることができるため、Si 基板上にポリ L リシンを1滴垂らし、ポリ L リシンを Si 基板に固定する。次に、ポリ L リシンを吸着させた基板をセルロース溶液に数秒漬け、セルロース繊維を基板に固定する。セルロース繊維を固定した基板を軽く蒸留水で洗浄し、t-ブタノールに10分間漬ける。10分後、t-ブタノールを捨て、新しいt-ブタノールを入れる。これを3回繰り返し、水とt-ブタノールを置換する。最後にt-ブタノールを入れたままの容器をJFD-320に写真3の



写真3 凍結乾燥機への試料のセットの仕方

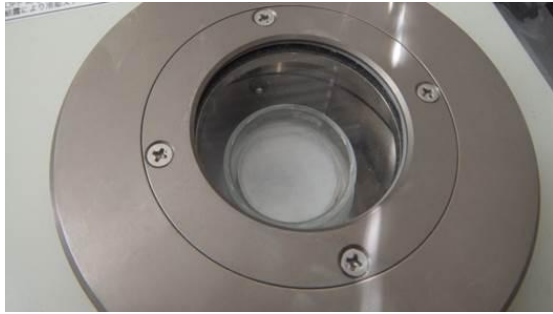


写真 4 凍結時の様子

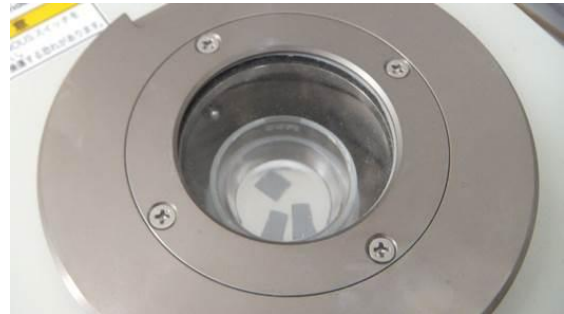


写真 5 乾燥後の様子

ような形にセットする。JFD-320 にセットしたら、t-ボタンを凍結し、完全に凍結してから真空引きを行う。写真 4 から写真 5 のようになるまで真空引きを行う。

2. 凍結乾燥した試料の SEM 観察

2-1. 実験装置の紹介

本研修で使用した SEM は、写真 6 に示した日本電子の JSM-7500F という装置です。この装置には、ジェントルビームモードという電子線を試料直前で減速するという機能が付いている。この機能は、試料に対する電子線のダメージを軽減することができ、生物系の試料を観察するのに有用である。また、今回試料へのコーティングは、写真 7 に示した Filgen の OPC-60A という装置を用いて、オスミウムコーティングを 10nm の厚さで行った。



写真 6 JSM-7500F(日本電子)

2-2. 観察結果

写真 8 に凍結乾燥したセルロース繊維の SEM 像を示す。比較のために、写真 9 に凍結乾燥機を使用せずに、自然乾燥で作製したセルロース繊維の SEM 像を示す。凍結乾燥していない試料ではセルロースの繊維が潰れた様子でしか観察されなかったが、凍結乾燥した試料ではセルロースが 3 次元に絡み合う様子を観察することができた。これはセルロースの繊維に対して、凍結乾燥を行うことが有効であるという結果である。



写真 7 OPC-60A(Filgen)

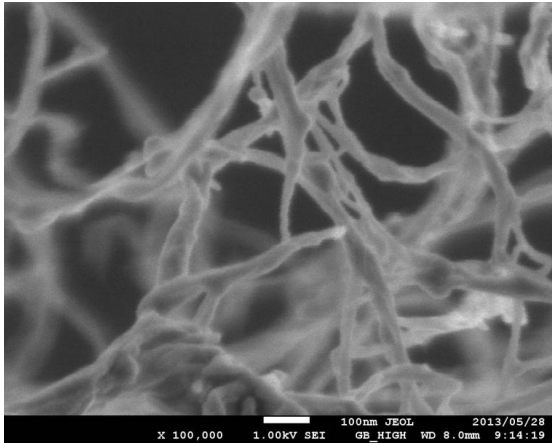


写真 8 凍結乾燥した試料の SEM 像

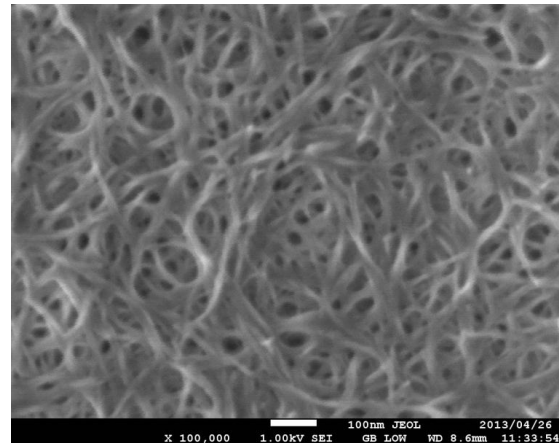


写真 9 凍結乾燥をしていない試料の SEM 像

3. まとめ

本研修は、t-ブタノール型凍結乾燥機の操作技術の習得と生物系試料の SEM 観察技術の習得を目的として行った。

- ・t-ブタノール型凍結乾燥機の操作技術を習得し、生物系試料の調製方法を習得することができた。
- ・生物系試料の SEM 観察の方法について理解することができた。

4. 謝辞

今回の研修で、凍結乾燥機 JFD-320 の使用方法や試料の調製方法を教えてくださった日本電子西日本ソリューションセンターの磯野様に厚く御礼申し上げます。