

電顕リサーチ支援システム EM-PAS の利用について

1. 本システムの利用に際して、試料作製依頼者（以下、依頼者）の所属分野はバイオイメージングラボ利用登録をお願いします。
2. 依頼者は電顕フリートライアル経験者を対象とします。未受講者は依頼申込日から半年以内に電顕フリートライアル（年4回実施）に参加して下さい。
3. 試料作製は形態観察用の標準的なプロトコールに基づいて行われます。
4. 詳細な電顕観察は依頼者または共同研究者が行って下さい。
5. 原則として1つの依頼につき試料は3種類までとします。同時に4種類以上を希望される場合は混雑状況によりますので、事前にご相談下さい。
6. 試料作製に要した消耗品等の実費（参考資料1）は、毎年度末にバイオイメージングラボ使用料と併せて所属長宛に請求されます。なお、支払方法は運営交付金または委任経理金に限ります（科学研究費補助金による支払いは出来ません）。
7. 試料作製に用いられる機器の修繕に必要な経費は、宮崎大学フロンティア科学実験総合センター清武キャンパス運営委員会の方針に基づき、受益者である依頼者または所属長に請求されます。
8. 人体から採取された試料の作製は、宮崎大学倫理委員会から研究承認が得られた研究題目に関わる試料に限ります。また、病原菌感染の恐れがある試料をはじめ、適さないと判断された試料は取り扱われません。

電顕試料作製プロトコール

試料の固定

前固定： 2%パラホルムアルデヒド/2.5%グルタルアルデヒド/
0.1M カコジル酸 buffer pH7.4, 4°C, 2 時間
洗浄： 0.1M カコジル酸 buffer pH7.4, 4°C, 5 分 × 2 回
後固定： 1%OsO4/0.1M カコジル酸 buffer pH7.4, 4°C, 2 時間
洗浄： 0.1M カコジル酸 buffer pH7.4, 4°C, 10 分

脱水・置換

脱水： 50% エタノール, 4°C, 10 分
70% エタノール, 4°C, 10 分
80% エタノール, 4°C, 10 分
90% エタノール, 室温, 10 分
95% エタノール, 室温, 10 分
99.5% エタノール, 室温, 10 分 × 2 回
100% エタノール, 室温, 10 分 × 2 回
置換： プロピレンオキサイド(PO), 室温, 15 分 × 2 回

樹脂包埋

樹脂浸透： PO：エポン樹脂 = 2：1, 30~60 分
PO：エポン樹脂 = 1：1, 30~60 分
PO：エポン樹脂 = 1：2, 30~60 分
エポン樹脂単独, 一晚
重合： 試料をビームカプセルに入れ 60°C, 24 時間

超薄切片作製

準超薄切片作製：1 μm 切片作製後トルイジンブルーで染色
光顕観察：目的構造の確認
超薄切片作製：60~80nm 切片作製

電子染色

ウラン染色：0.5%酢酸ウラン染色液, 20°C, 30 分
鉛染色：3%クエン酸鉛染色液, 20°C, 7 分

電顕確認

電顕確認：透過電子顕微鏡（日立 HT7700）, CD に記録

切片提供