

# 주사전자현미경 측정을 위한 생물 시료 전처리 방법

## I. Materials

### 1. Sample

### 2. Solution

Washing solution: PBS(Phosphate Buffered Saline), 3차 sterilized DDW

Fixation solution 1차: 5% Paraformaldehyde in PBS,

5% Glutaraldehyde in PBS

2차: 1% Osmium ( $\text{OsO}_4$ )

Dehydration solution: Ethanol (EM grade), 3-Methylbutylacetate

### 3. 기구

Glass pasteur pipette, Rubber

Glass petri dish, Glass bottle

CPD sample basket

Sample holder, Carbon tape

### 4. 기기

CPD: Critical Point Dryer (임계점건조기)

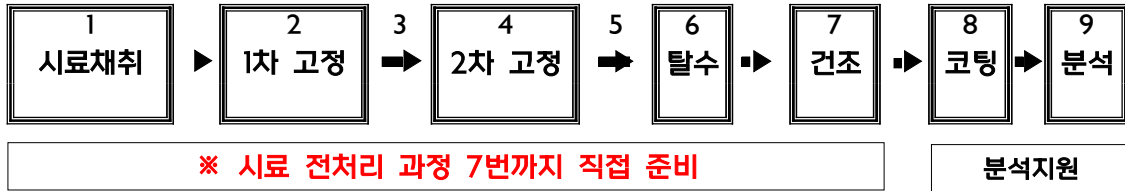
Coater:  $\text{OsO}_4$  Coater

Hum hood

### 5. 분석기기

FE-SEM I (JSM-6701F), FE-SEM II (Apreo 2 S LoVac)

## II. Method



### 1. 시료 채취

원시료에서 분리할 경우에는 관찰 위치를 감안하여 훼손 없이 채취한다.

\* tip: 미생물류: 배양한 배지까지 블록형태로 채취

진딧물 등의 작은 시료 : filter paper 등에 심어서 전처리

### 2. 1차 고정

5% Paraformaldehyde: 5% Glutaraldehyde in PBS= 1:1의 1차 고정액을 제조하여 시료를 고정함 (2~4hr/room temp)

\* 냉장고(4℃)에서 1주일간 보관 가능.

### 3. Washing

PBS나 DW로 2회 washing

### 4. 2차 고정

1% Osmium ( $\text{OsO}_4$ )로 고정 (1:30~2hr)

\*  $\text{OsO}_4$ : 중금속으로 시료(조직)과 반응하여 연한 생체시료를 단단하게 만들고 세포내의 각 층 막 구조물을 잘 보존하며 쉽게 부서지지 않게 해준다.

## 5. Washing

PBS나 DW로 2회 washing

## 6. 탈수

- 1) 30, 50, 70, 80, 95, 100%(vol/vol) Ethanol 제조 각 % step별로 10분간 처리  
마지막 100%는 10분간 3반복 처리
- 2) 100% 3-Methylbutylacetate에 10분간 2번 반복 처리

## 7. 건조

CPD: Critical Point Dryer (임계점건조기)를 이용하여 탈수액을 건조함  
Ethanol 100% step에서 기기 ON (sample chamber 5°C 유지)

## 8. 코팅

Pt 또는 Au 외

## 9. 분석

FE-SEM