



透過型電子顕微鏡サンプル作製

免疫電顕用化学固定試料作製法

【 著者 】 後藤友美、佐藤繭子、若崎真由美、武田紀子、豊岡公徳

【 公開日 】 2020. 5. 14

【 最終更新 】 2020. 5. 14

概要・原理

免疫電顕法とは、抗原と抗体の特異反応(抗原・抗体反応)を利用して、組織や細胞中の抗原の局在を電顕レベルで明らかにする方法である。このプロトコルは、免疫染色を樹脂包埋後に行う包埋後染色法の試料作製法である。包埋後染色法の長所は、微細構造の保存に優れていること、細胞内抗原検出が可能であること、半定量的検討が可能であること、二重染色が可能であることが挙げられる。一方、短所は、固定・脱水・包埋による抗原性の失活あるいは減弱が避けられないことである。

装置・器具・試薬

1. 試料

植物 例)シロイヌナズナ・アズキ

2. 必要な試薬

(固定)

25% グルタルアルデヒド水溶液 EMグレード (TAAB社など)

パラホルムアルデヒド (和光純薬など)

(脱水)

メタノール (またはエタノール)

(包埋)

LR Whiteレンジキット(Hard) (London Resin社)

3. 必要な器具

- ・固定用ガラス瓶(蓋付)15ml用 ・カミソリ刃 ・パラフィルム ・スポイト ・ピンセット
- ・固定液に沈める小物 (レンズペーパー、ユニカセットなど)
- ・ポンプ (ダイヤフラム型ドライ真空ポンプなど)
- ・真空デシケーター (コック・メーター付き)
- ・恒温機 または 紫外線重合装置 (堂阪イーエム TUV-200など)
- ・底部がピラミッド型のポリエチレンカプセル (ビームカプセル; BEEM社など) または ゼラチンカプセルカプセル台 (BEEM 社など)

詳細

1. 固定液等の事前作製

1-1 固定液

下記の前固定液をフタが閉まる10ml固定瓶等に5-10mlずつ分注する。

・ 4% PFA/ 2% GA in 0.05Mリン酸Buf.

8% PFA水溶液 *1	25 ml
25% GA水溶液	4 ml
0.5 M リン酸 Buf (pH7.4) *3	5 ml
蒸留水	16ml
<hr/>	
	50ml

*1 8% PFA水溶液作製法(25ml)

- ①20ml程の蒸留水をビーカーに入れ、電子レンジで温める（煮沸する直前まで）。
- ②パラホルムアルデヒドを2g加える。以降、換気注意する。
- ③65°C(100°C以下)に加熱しながらスターラーで攪拌。
- ④5N NaOHを約20 μ l加える。溶液が透明になるまで攪拌する。
- ⑤25mlまで蒸留水でメスアップする。
- ⑥使用する温度まで冷ます。

*3 0.5 M リン酸 Buf (pH7.4)

- ① 0.5M K₂HPO₄を作製する
- ② 0.5M KH₂PO₄を作製する
- ③ ①に②を加え、pHを7.4にあわせる（約4：1の割合になる）

1-2 脱水剤

以下のメタノール（またはエタノール）水溶液を作製する。

（12.5% 必要に応じて）, 25%, 50% 75%, 90%, 100%水溶液（100%はモルキュラーシーブスを加え、静置）

1-3 包埋剤

LR Whiteレンジキット (Hard) (London Resin社)（4°C保存）を使用前に脱気しておく。

2. 操作手順

2-1 細切、固定

- 1) シロイヌナズナの植物個体を乾燥させないように、また、挫滅しないよう注意を払いながら、ハサミまたはカミソリで採取する。
- 2) パラフィルムやシリコン板上に固定液を垂らし、固定液に試料を浸けながら、カミソリで0.5~1mmに細切する（写真1）。ピンセットまたはスポイトで、試料を潰さないよう固定液を入れた固定ビンに移す（写真2）
- 3) 試料が沈むまで脱気する。沈まない試料は取り除いた方がよい。
- 4) 4°Cで2時間、固定(写真3)。
- 5) 0.05M リン酸 Buf.で5分×3回洗う。

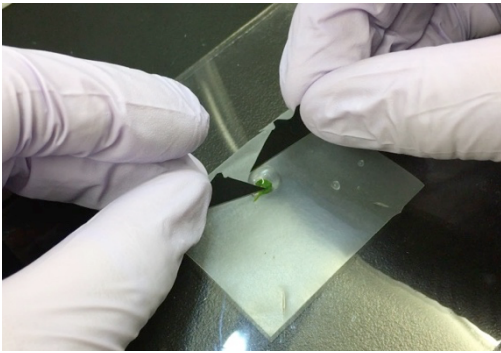


写真 1

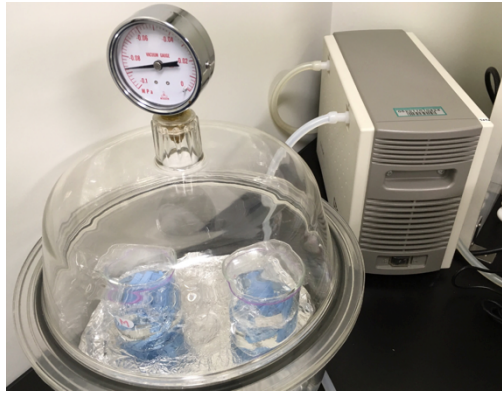


写真 2

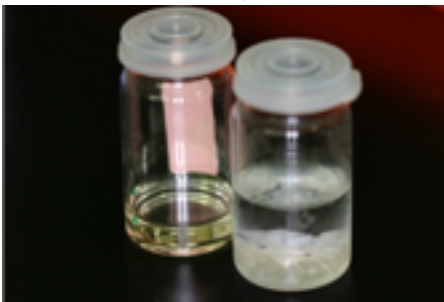


写真 3

2-2 脱水、樹脂置換

- 1) 25,50,75,90,100% メタノールに置換し、冷蔵庫に静置。各30分を2回行うと良い。100%メタノールは3回以上行う。
- 2) 100% メタノール :LR White=1:1を1時間 以降4°Cに静置。
- 3) 100% メタノール :LR White=1:2を1時間以上。
- 4) LR Whiteのみに交換し、4°Cで一晩静置する。

2-3 包埋

- 10) ビームカプセルかゼラチンカプセルに鉛筆またはプリンター印刷したラベルを入れ、台に立てる。
- 11) 爪楊枝で試料をとり、ビームカプセルの底に置く。
- 12) 新しい樹脂をビームカプセルに盛り上がるくらい足し、気泡が入らないように蓋を閉める。
- 13) 55°Cで24時間、熱重合する。プログラム制御付き恒温器の場合は、急激な重合によるカプセルや樹脂の変形を防ぐため、5時間かけて55°Cにあげ、55°Cで24時間、熱重合すると良い。
または、紫外線重合装置により-20°Cで72時間、紫外線重合する。

工夫とコツ

1. 実験に関する注意・補足

電子顕微鏡の試料作製に用いられるグルタルアルデヒド、メタノールなど、試薬の多くには危険性・有害性がある。手袋、マスク、保護メガネなどを着用し、換気の良い場所またはドラフトチャンバー内で作業を行うこと。

固定試薬、緩衝液など危険性や有害性のある試薬は、各所属機関の指針に従い、正しく処分すること。

2. 細切と固定

構造観察とは異なりオスmium酸を用いて固定すると抗原性が失われてしまうことが多いため、PFA/GAのみの固定となる。また、LR-Whiteや Lowicryl HM20などアクリル系樹脂に包埋する場合は、ビームカプセルやゼラチンカプセルなどのフタを閉めて無酸素状態で加熱や紫外線重合する必要がある。そのため、固定・脱水・包埋時に試料が見つらく、方向性をつけて包埋することが難しいことを考慮して、細切することが重要である。

生きた状態に近い構造を保つことだけでなく、使用する抗体が認識するだけの抗原性を保った状態で固定を行うことが重要である。そのため、できる限り低温（4°Cなど）で固定・脱水し、可能であれば低温包埋すると良い。

参考文献

電顕入門ガイドブック改訂版 日本顕微鏡学会 電子顕微鏡技術認定委員会編