

透過電子顕微鏡サンプル作製 ver.2 構造観察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、豊岡公徳
【公開日】2020. 5. 10
【最終更新】2020. 5. 14 ver.1, 2022. 12. 23 ver.2

1. 試料

植物(葉・根・茎など)

例)シロイヌナズナ・イネ・アズキ・培養細胞

2. 事前準備

2-1 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)

カコジル酸ナトリウム (EMS社など)

オスミウム酸2%水溶液 EMグレード (EMS社など)

低融点アガロース(Life Technologies UltraPure™ agaroseなど)[培養細胞で使用]

(脱水)

メタノール (またはエタノール)

アセトン[種子などデンプン顆粒やタンパク質顆粒など多く含む場合]

プロピレンオキサイド (和光純薬など)

(包埋)

エポキシ系樹脂 (TAAB社製 Epon 812など)

2-2 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
- ・ 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)
- ・ カプセル台 (BEEM社など)
- ・ シリコン製平板包埋板(日新EM社など)

2-3 固定液等の事前作製

2-3-1 前固定液

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% パラホルムアルデヒド(PFA)/2% グルタルアルデヒド(GA) in 0.05 Mカコジル酸バッファー (buf).

8% PFA水溶液 *1	25 ml
25% GA水溶液	4 ml
0.5 M カコジル酸ナトリウム buf (pH7.4)	5 ml
蒸留水	16ml
<hr/>	
	50ml *2

*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。

*2 サンプルによっては Sucrose（終濃度 0.15 M）を加えることもある。

0.75M Sucrose: 2.57g Sucroseを蒸留水 10mlで溶解する。出来上がりの量の1/5量を加えて、0.15Mとする。

2-3-2 2-3%低融点アガロース

ネジロビン・ビーカーなどに0.2-0.3g agaroseを入れ、10ml 蒸留水を加え、電子レンジ等で加熱して完全に溶解する。使用后、残りは冷蔵庫で保存。

2-3-3 後固定液

・1% 四酸化オスミウム in 0.05 M カコジル酸buf.

2% OsO ₄	5 ml
0.5 M カコジル酸ナトリウム Buffer (pH7.4)	1 ml
<hr/>	
	10 ml にメスアップ。

2-3-4 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)

3. 操作手順

3-1 細切、前固定、後固定

3-1-1 シロイヌナズナ・イネ・アズキなど（葉・根・子葉・胚軸など）

- 1) 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前固定液を垂らし、前固定液に試料を浸けながら、カミソリで1~3 mm

程度に細切する(写真1)。観察しない部分は可能な限り取り除いておく方が良い。植物の葉や茎は、表面にワックス層があることが多く、樹脂がはがれやすいことが多いので、細切法を工夫する。ピンセットまたはスポイトで、試料を潰さないよう前固定液を入れた固定ビンに移す(写真2)。その際、試料を入れすぎないように注意する。

3) 脱気する(沈みにくいものは、レンズペーパーやユニカセット等(写真3)で液に沈ませる工夫を行うこと)デシケーターで -0.08MPa x 5~6回(写真4)。サンプルの様子を見ながら適宜追加して行う。沈まない試料は取り除いた方が良い。(固定液がどうしても浸透しない場合は、極低濃度の界面活性剤を加えることもある。)

4) 前固定: (室温, 2-4時間 もしくは 4°C , 一晚)

5) 0.05M カコジル酸バッファーで3~6回以上洗う(アルデヒド臭が残らないよう、丁寧に洗う)

6) 室温, 1~3時間、後固定(サンプルの黒化具合を見ながら適宜調整)。(写真5)

7) 蒸留水で3回洗う。

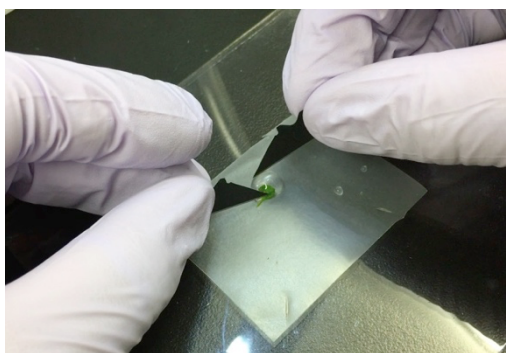


写真1

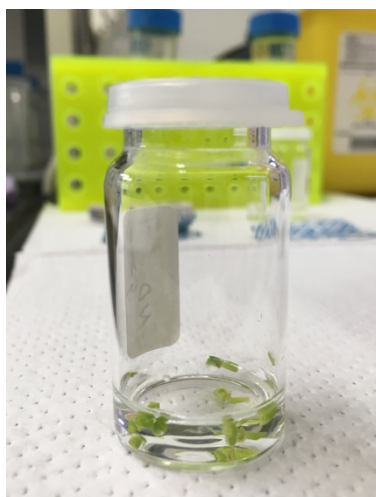


写真2

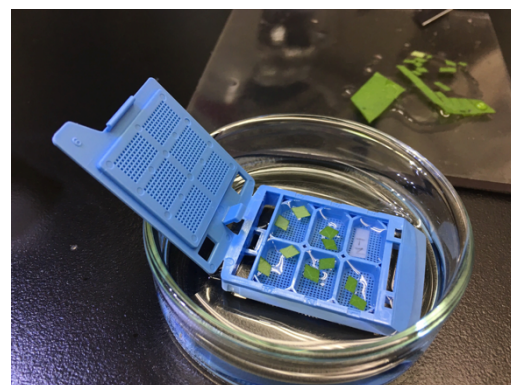


写真3

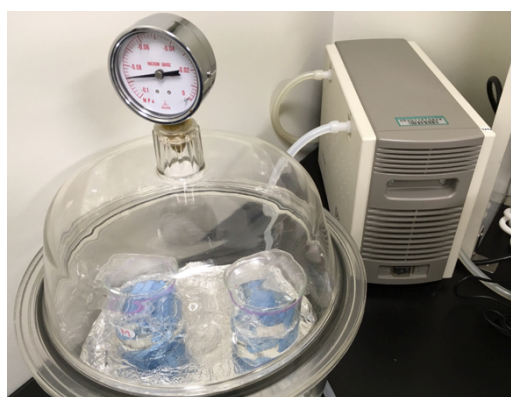


写真4

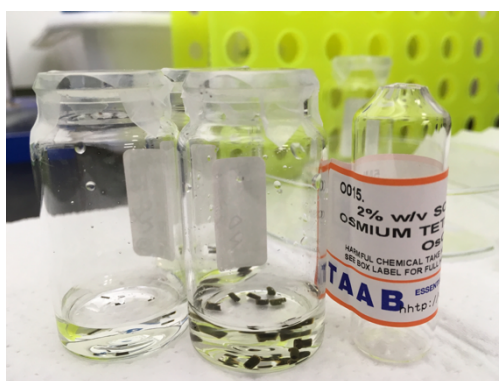


写真5

3-1-2培養細胞(タバコ培養細胞・コケ原系体など)

1) 15mlのファルコンチューブにタバコ培養細胞の懸濁培養液を入れ、1,000rpmで1分間遠心する。0.5-1mlの細胞のペレットができるくらいが良い。

2) 培養液を捨て、前固定液を細胞の約10倍量程加え、軽く混ぜる。

3) 脱気する。5分間×3回以上。

4) 室温で1時間、前固定。(写真6)

5) 1000rpmで1分ほど遠心して細胞を沈め、上清を取り除き、0.05Mカコジル酸buf 5mlを加え軽く混ぜる。これを3~4回繰り返して、固定液を洗浄する。

6) コケ原糸体などは遠心せずにピンセットでつまんで寒天に埋める。1.5mlチューブで温めて融解し触っても熱くない程度に冷ました2-3%低融点Agaroseを等量加え、固まる前にピペッティングし、1,000rpmで1分間遠心する。余分な寒天部分を取り除き、細切する。または、固まる前にスライドガラスの上で細胞を等量混ぜ、ゲルが固まり次第、カミソリで1mm角の立方体に細切する。(写真7)

7) 0.1Mカコジル酸buf : 2% OsO₄溶液が1:1、最終濃度OsO₄が1%で、後固定(室温,3時間)を行う。

8) 蒸留水で3~4回洗う

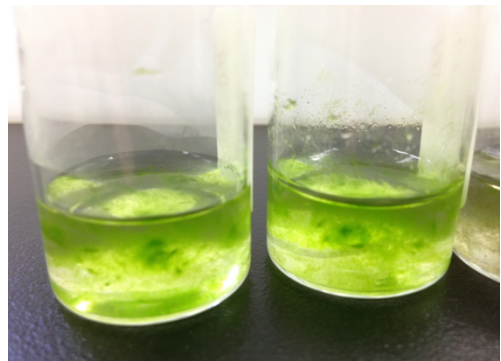


写真6

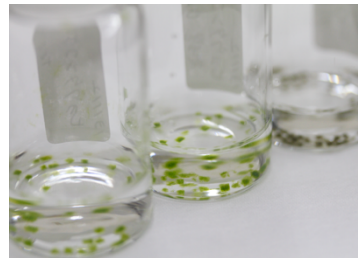
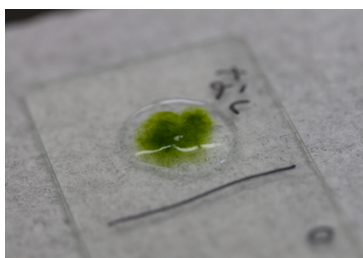


写真7

3-2 脱水、樹脂置換

1) 12.5, 25, 50, 75, 90, 100% メタノールで脱水する。各30分 ×1 または 2回。デンプン顆粒やプロテインボディー、オイルボディーなど含む大きな子葉や根茎などは、さらに100% アセトンで数回、数日間、脱水すると良い。

2) メタノール : プロピレンオキサイド=1:1で 30分~1時間、置換する。

3) プロピレンオキサイドのみで1時間、2回置換する。

4) プロピレンオキサイド : エポソ812 = 3:1, 1:1, 1:3でそれぞれ半日ずつ、置換する。

(さらに段階を細かく踏んで樹脂置換をしてもよい。浸透しにくい試料では時間を長くする。)

5) エポソ812のみに交換し、2回交換する。

6) 包埋当日午前、新しく作り脱気したエポソ812樹脂に交換し、数時間、置換する。

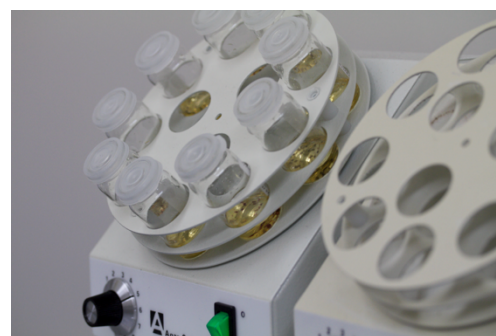


写真8

*樹脂置換作業は常温で行い、置換はローテーター(ロータリー型振盪器:写真8)でゆっくり回転させる。

3-3 包埋

- 1) ビームカプセルに印刷または鉛筆で記入したラベルを入れ、台に立てる（方向を整える必要があるサンプルの場合はシリコン包埋板で包埋する）
- 2) 爪楊枝でサンプルをとり、カプセル内またはシリコン包埋板の先端に置く。（写真9）
- 3) 新しい樹脂をビームカプセルに足し（写真10）、60°Cで24時間熱重合させる。樹脂によっては重合温度に達するまで、温度を上げるステップを踏んで温度を上げることもある（写真11）。

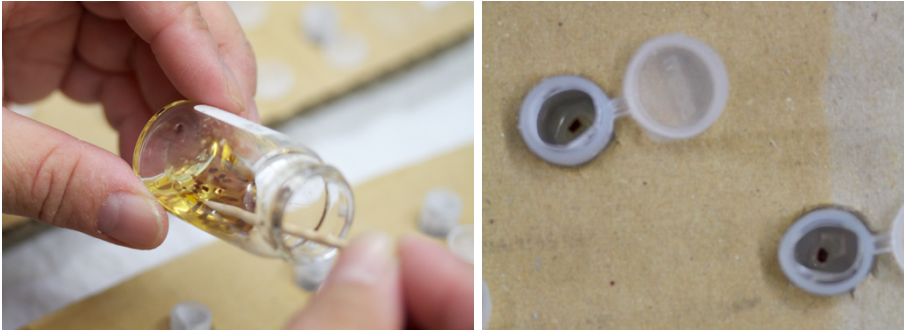


写真9

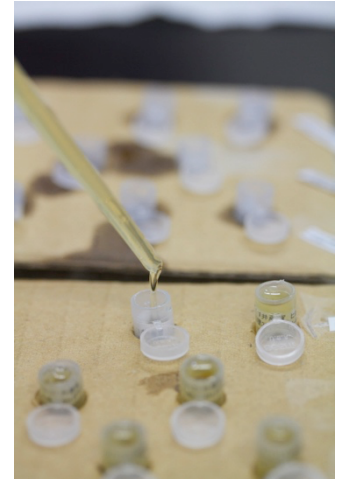


写真10

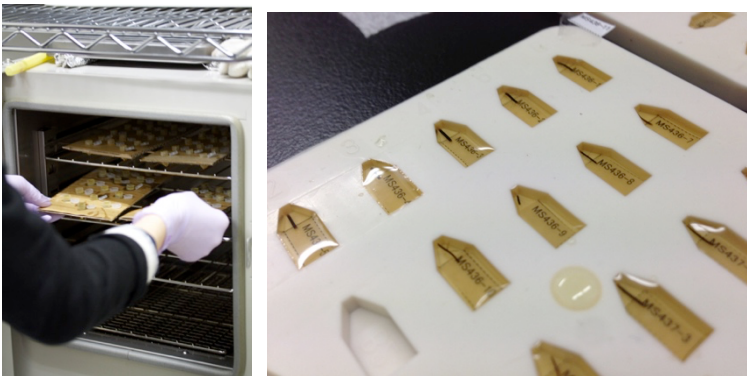


写真11

4. 実験に関する注意・補足

4-1 安全管理

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や四酸化オスミウム、アセトンやメタノールなど、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。

4-2 細切と固定

植物を固定する際、動物の固定に比べ、グルタルアルデヒド(GA)の濃度が高い方が良い場合がある。また、固定時間は長め、固定温度も常温で行うことが多い。固定液が浸透し易いようできる限り細切す

る。パラホルムアルデヒド水溶液(PFA)調製時に NaOH を加えすぎないように注意する。

バッファー(buf)として、リン酸bufやカコジル酸buf、Good bufなどを使えるが、構造観察をする場合、カコジル酸buf使うとコントラストが上がるので可能であれば使うと良い。サンプルによっては浸透圧調整のためSucrose (終濃度 0.15 M) を加えることもある。できる限り育成条件に近くなるよう調製することを推奨する。

4-3 脱水

一般的に脱水にはエタノールが用いられるが、デンプン顆粒や結晶を含むような植物試料ではさらに分子量の小さいメタノールで脱水すると良好な結果を得られる場合がある。さらに、100%アセトンにより脱水する場合もある。

4-4 EPON 樹脂調整・樹脂浸透

エポキシ系樹脂は硬化による収縮や変形が少なく、硬化物は三次元構造をとるため電子線に強いなどの利点がある。熱をかけて重合硬化させる(熱重合)。室温・遮光保存で長時間安定であるが、吸湿性があるので、デンケーターなどに保存し、湿気の高い環境での使用は避ける。重合不全をおこす場合は、吸湿・酸化しやすい加速剤を新しいものへ変更することを推奨する。

当研究室では、エポキシ系包埋剤のエポン812 (TAAB社、日新EM社など) を用いている。粘性は高いが、コントラストも良く安定した結果が得られている。

当施設では、50mlのEPON812樹脂を調製する場合、プラスチックビーカーにピペットで① EPON812 (23.2 ml) を入れ(写真12)、泡が立たないように丁寧にスターラーで攪拌しながら、ピペットで② DDSA(12.6 ml)、③ MNA(14.2 ml)を加え、最後に1mlシリンジで④ DMP-30 (0.75ml)の順にムラがなくなるまで混合する。

(配合比の例) 植物組織など

① EPON812	23.2 ml
② DDSA	12.6 ml
③ MNA	14.2 ml
④ DMP-30	0.75 ml

十分に混合した後、ポンプで脱気しながら気泡を取り除く。

エポン812でも浸透が悪く、剥離や樹脂浸透不良が見られる場合はスーパーやアクリル系包埋剤のLR Whiteなど低粘性樹脂を用いるとコントラストは低下するがうまくいく場合がある。以下の作業は常温で行い、置換はローテーター (ロータリー型振盪器) でゆっくり回転させる。



写真12

5. 操作フローチャート

操作フローチャート	
植物の葉・根・子葉・胚軸など	培養細胞
↓	↓
試料採取	細胞の収集
↓	遠心1000rpm/1min
細切	上清捨て
↓	↓
前固定	
4%パラホルムアルデヒド/2%グルタルアルデヒド/0.05Mカコシル酸緩衝液	
↓	↓
脱気	
-0.08M Pa ×5-6回	5分×3回
↓	↓
室温・2-4時間 or 4℃ 一晩	室温・1時間
↓	↓
洗浄	
↓	遠心1000rpm/1min
↓	↓
0.05Mカコシル酸緩衝液×3-6回	0.05Mカコシル酸緩衝液×3-4回
↓	↓
↓	寒天封入
↓	2-3%低融点アガロースゲル
↓	↓
後固定	
1%OsO ₄ /0.05Mカコシル酸緩衝液	
室温1-3時間	室温3時間
↓	↓
洗浄	
蒸留水3-4回	
↓	
脱水	
メタノール(エタノール)各濃度 30分×1-2回	メタノール(エタノール)各濃度 30分×1-2回
↓	↓
※デンプン顆粒やプロテインポティー オイルポティーなど含む大きな子葉や根茎など	↓
アセトン 数回、数日間	↓
↓	↓
樹脂置換	
メタノール(エタノール)：プロピレンオキシド=1:1 30分-1時間	
プロピレンオキシド 1時間×2回	
プロピレンオキシド：エポキシ樹脂=3:1 半日	
プロピレンオキシド：エポキシ樹脂=1:1 半日	
プロピレンオキシド：エポキシ樹脂=1:3 半日	
エポキシ樹脂 2回	
↓	
(包埋当日に)エポキシ樹脂 数時間	
包埋	
60℃ 24時間	