

QUANTOMiX™

QX-102

アプリケーションマニュアル

本取扱説明書の著作権は QuantomiX.Ltd に属しており、書面での同意がない限り記載されている情報を無断で使用もしくは複製することは禁じられています。ここに記載されている仕様、製品またはサービスの種類や内容は、予告なく変更させていただくことがあります。このアプリケーションマニュアルにより提供される情報は正しいものと考えておりますが、各アプリケーションの適用はお客様の責任において実行してください。

#### QuantomiX Ltd.

12 Hamada Street, Tamar Science Park, rhovot POB4034, Nes-Ziona 70400, Israel

Tel:+972-8-9462244, Fax:+972-8-9465874

<http://www.quantomix.com>

#### 日本語版における注意

このマニュアルは QX-102 Applications Manual, Issue2.0 に基づき、エムエス機器株式会社が編集をおこなったものであり、日本語版マニュアルに関する著作権は弊社が有しています。また、内容は予告無しに変更することがありますので、ご了承ください。

なお内容は弊社の判断により、適宜加筆・省略してある場合があります。

最新日本語版マニュアルダウンロードサイトのお知らせ

最新のマニュアルは、<http://www.technosaurus.co.jp/support/qx-manual.htm> からダウンロードしていただけます。

## 目次

<b>安全のために</b>	5
<b>Chapter1 : Introduction (イントロダクション)</b>	7
<b>マニュアルの内容</b>	7
<b>テクニカルサポート</b>	7
<b>QX-102 アプリケーション</b>	8
<b>Chapter2 : Liquid Samples (液体サンプル)</b>	9
<b>Chapter3 : Particles in Solution (液中の粒子)</b>	11
<b>メンブレンコーティングについて</b>	11
<b>Poly-L-Lysine コーティング</b>	11
<b>サンプルアプリケーション (カプセルへのサンプルの導入)</b>	13
<b>Chapter4 : Biological Applications (生物学的アプリケーション)</b>	15
<b>一般的なプロトコル</b>	15
<b>QX-102 メンブレンコーティングプロトコル</b>	17
<b>フィブロネクチンコーティング</b>	18
<b>ゼラチンコーティング</b>	19
<b>Poly-L-Lysine コーティング</b>	20
<b>サンプルアプリケーションプロトコル (カプセルへのサンプルの導入)</b>	21
<b>細胞培養</b>	21
<b>接着系細胞</b>	22
<b>浮遊細胞と微生物</b>	23
<b>ネイティブ・未処理サンプルの取り扱い</b>	25
<b>固定プロトコル</b>	26
<b>アルデヒド類</b>	26
<b>グルタルアルデヒド固定</b>	27
<b>パラホルムアルデヒド固定</b>	28
<b>有機溶媒</b>	29
<b>メタノール固定</b>	29

一般的な染色プロトコル	30
酢酸ウラン染色	30
PTA（リン・タングステン酸）染色	32
四酸化オスミウム染色	33
免疫金標識プロトコル	35
免疫金標識反応	37
イメージングの準備	40
Appendix A : Glossary（用語解説）	41
Appendix B : Troubleshooting（トラブルシューティング）	43

## 安全のために



### 警告

- a. 生物学的サンプル特にヒト・霊長類由来の細胞株・病原性微生物等を扱う際は適切な安全指針に従ってください。
  
- b. 固定や染色で使用する多くの試薬は毒性を持っています。  
重金属染色（オスミウム染色やウラン染色など）は、長期的に累積する毒物です。  
有毒物質を扱う場合は次のような安全に関する原則を守ってください。  
容器ラベルやMSDS(Material Safety Data Sheet)をよく読んでください。  
一般に毒物はドラフトチャンバー内で取り扱わねばなりません。  
その際には、実験用手袋・保護眼鏡・白衣を必ず着用してください。  
すべての毒性廃棄物は、その地域のガイドラインに従って廃棄してください。

## Chapter1 : Introduction (イントロダクション)

### マニュアルの内容

このマニュアルには、材料系物質や生物学的サンプルを QX-102 カプセルでイメージングするためのプロトコルが記載されています。

このアプリケーションマニュアルは、次のような構成になっています。

Chapter/appendix	Heading	Provides
1	Introduction	QX-102 を使うためのイントロダクション
2	Liquid Sample	液体状サンプルを QX-102 カプセルに導入する一般的なプロトコル
3	Particles in Solution	粒子をカプセルのメンブレンに接着させるためのコーティング
4	Biological Applications	種々の生物学的アプリケーションサンプルハンドリング・固定方法・染色方法・抗体標識方法
A	Glossary	このアプリケーションマニュアルの用語解説
B	Troubleshooting	トラブルシューティング

QX-102 カプセル・テクノロジー 及び 付属品の詳細は、QX-102 ユーザーズマニュアルを参照してください。

### テクニカルサポート

エムエス機器株式会社 担当者 または [support@technosaurus.co.jp](mailto:support@technosaurus.co.jp) までお問い合わせください。

## QX-102 アプリケーション

QX-102 カプセルは、種々のウェットサンプルイメージングを可能にします。

サンプル例としては、液体サンプル（エマルジョン・食品・油・塗料・インク・薬品など）・ペーストまたは泡状サンプル（化粧品や食品など）・液体中の粒子・接着系 / 浮遊系培養細胞・微生物などがあります。

水と脂質の混合物はコントラストが付きやすく wetSEMTM テクノロジーでうまく可視化することができ、食料や化粧品のようなサンプル中の脂質の構造の解析を可能にします。

QX カプセルは、EDS（electron dispersive spectroscopy = エネルギー分散型 X 線分析装置）を装備した SEM システムでの EDS 解析にも使用可能です。液体のサンプルは直接 QX カプセルに導入し、簡単にイメージングできます。液体中のビーズのようなサンプルでは、メンブレンにビーズを付着させるためのコーティングを施す必要がある場合があります。

QX-102 カプセルは、小さな細胞培養ディッシュのようなデザインになっており、いろいろな細胞生物学のアプリケーションに対応できます。サンプル調製は光学顕微鏡の試料調製と類似していて、乾燥、コーティング、包埋、のステップは不要です。接着系 / 浮遊系培養細胞や微生物も QX-102 カプセルでイメージングできます。細胞サンプルは、コントラストをつけるための適切な染色をした後や免疫標識をした後、あるいは処理なしのままイメージングできます。

このアプリケーションマニュアルは、以下のようなカテゴリのサンプル調製プロトコルについて書かれています。

- 液体サンプル
- 溶液中の粒子
- 生物学的アプリケーション

## Chapter2 : Liquid Samples（液体サンプル）

QX-102 カプセルは、以下のようなウェットサンプルのイメージングに使用できます。

- 種々の食品
- 化粧品・クリーム
- エマルジョン
- オイル・グリース
- 塗料・インク

液体サンプルは、通常メンブレンのコーティングやサンプルの前処理無しで直接イメージングできます。

### ☞ 液体サンプルのイメージング

1. カプセルを開ける
2. リキッドディッシュへ 15  $\mu$  L の液体を慎重に入れる



### Notes

- a. 液体を入れる際は、標準的な実験用ピペットを使用してください。
- b. ピペットチップがカプセルのメンブレンに触れないよう注意してください。
- c. クリーム状・ペースト状・フォーム状 やその他の高粘性のサンプルを入れるときは、カプセルのメンブレンとサンプルの間に空気の泡による隙間ができないようご注意ください。

3. カプセルを閉める
4. QX-102 ユーザーズマニュアル（Chapter3）に従ってイメージングする

## Chapter3 : Particles in Solution (液中の粒子)

QX-102 は、液体中の巨大分子・粒子・繊維などの種々のサンプルをイメージングする目的に適しています。イメージングできるのは、サンプル全体のうちカプセルのメンブレンにごく近い部分です。従ってサンプルをイメージングするためには、サンプルとメンブレンは接触してはなりません。イメージングの間、カプセルは逆向きにセットさせるため、サンプルのサイズ・重量・溶液の組成によってはサンプルがメンブレンから離れてしまうことが考えられます。このような場合は、メンブレンをコーティングすることが有用です。

### メンブレンコーティングについて

最適なコーティング方法は試料や実験の目的によって異なります。

生物学的アプリケーションにおけるコーティングプロトコルは、Chapter4 をご参照ください。

以下に、Poly-L-Lysine (Poly-L-Lysine は、マイナスチャージを持つ試料に対して適しています) を使用してのメンブレンのコーティング方法を述べます。

他のコーティング試薬も使用可能です。ただし、イメージングの妨げにならないように、電子密度の高いものを含まないものを、できるだけ薄くコーティングしなくてはならないことを考慮に入れてください。

### Poly-L-Lysine コーティング

Poly-L-Lysine はプラスチャージを持つポリマーで、マイナスチャージを持つ試料に対して適しているコーティング試薬です。

Poly-L-Lysine コーティングに必要な試薬

- 0.1% w/v Poly-L-lysine in water (for example Sigma Cat.No.P8920)
- Distilled water

☞ Poly-L-Lysine を使用したカプセルメンブレンのコーティング

1. 0.1% Poly-L-Lysine 15  $\mu$  L をリキッドディッシュへ入れ、室温で 60min インキュベートする（一晩程度までの長時間インキュベートも可。）
2. 液を取り除き、蒸留水で 2 回リンスする
3. サンプルを入れるまでリキッドディッシュに蒸留水を満たしたままにしておく。  
(時間をおいて使用する場合は水を取り除き、リキッドディッシュを乾かしてください。)

### Poly(sodium-4-styrenesulfonate) コーティング (PSS)

PSS はマイナスチャージを持つポリマーで、プラスチャージを持つ粒子を接着できます。

PSS コーティングに必要な試薬

- 30% w/v Poly(sodium-4-styrenesulfonate) in water (for example Aldrich, cat. No. 527483)
- Distilled water

PSS を使用したカプセルメンブレンのコーティング

1. 30% の原液を蒸留水で 0.3% に希釈する
2. 希釈した溶液 15 $\mu$ l をリキッドディッシュへ入れ、室温で 60min インキュベートする  
(一晩程度までの長時間インキュベートも可)
3. 液を取り除き、蒸留水で 2 回リンスする
4. サンプルを入れるまでリキッドディッシュに蒸留水を満たしたままにしておく。  
(時間をおいて使用する場合は水を取り除き、リキッドディッシュを乾かしてください)

### サンプルアプリケーション（カプセルへのサンプルの導入）

吸着または遠心により、コーティングを施したメンブレンに、粒子を接着させることができます。イメージングの際の溶液としては、可能な限り、QX イメージングバッファーを使用してください。イメージングバッファーは、SEM イメージング中に電子ビームがサンプルに与えるダメージを最小限にするように作られています。

粒子をメンブレンに強力に接着することが出来て、且つ粒子が特別な溶液に懸濁されている必要が無い場合には、イメージングの前に、溶液をこの QX イメージングバッファーに置換することをお勧めします。

☞ Poly-L-Lysine コーティングしたメンブレンへのサンプルの導入

1. サンプルを適当な濃度に希釈する
2. 懸濁液 15  $\mu$  L をリキッドディッシュに入れ、室温で 60min インキュベートするか、あるいは 96 穴マイクロプレート用ホルダーを装着した遠心機で 500g・5min 遠心をする
3. 数回蒸留水でリンスした後、QX イメージングバッファー 15  $\mu$  L を入れる
4. カプセルを閉める
5. QX-102 ユーザーズマニュアル（Chapter3）に従ってイメージングをおこなう

## Chapter4 : Biological Applications (生物学的アプリケーション)

本章では、QX-102 カプセルを使用して生物学的サンプルのイメージングをおこなうためのプロトコルについて述べます。サンプルは、未処理のもの・固定したもの・染色したもの・免疫標識したものをイメージングできます。

ここに記載してあるプロトコルは幅広く適用可能なものですが、得られる結果はアプリケーション・サンプルに依存します。必要に応じて最適化をおこなってください。

### 一般的なプロトコル

細胞接着・固定・免疫標識などのサンプル調製法の多くは光学顕微鏡や蛍光顕微鏡の細胞学的染色で用いられる一般的なプロトコルに類似しています。

QX-102 カプセルにおける一般的な染色プロトコルは重金属を使用し、電子顕微鏡で使用されるプロトコルに由来しています。プロトコルは簡便で、図 1 に示されるようにサンプルを包埋したり乾燥させたりする必要がありません。ほとんどの場合サンプル調製にかかる典型的な時間は半日未満です。

リキッドディッシュは、小型細胞培養ディッシュとして使用可能です。電子透過性を有するカプセルのメンブレンは通常の培養ディッシュと同じように、接着系細胞がその上で広がり生育することが出来る性質を有しています。浮遊系細胞も予めコーティングを施したメンブレンに吸着または遠心によって接着できるでしょう。



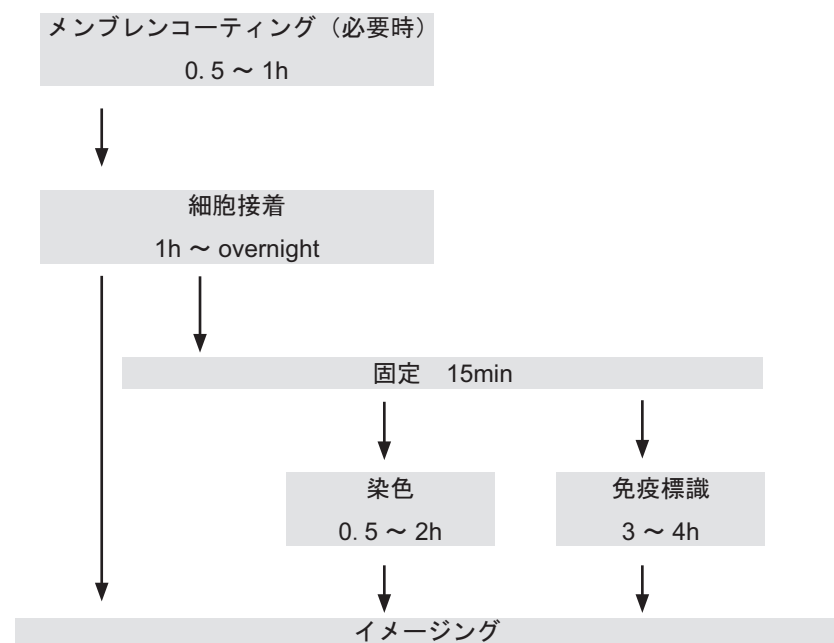


図1 フローチャート

試料をカプセルに入れた後、そのままの状態あるいは固定した状態でイメージングできます。

重金属を使用した一般的な染色によってコントラストを向上させることができます。

免疫金標識で特異的な蛋白質あるいは細胞構造を標識することができます。

免疫金標識されたサンプルは、細胞の詳細を可視化するためにカウンターステインすることも可能です。

サンプル調製のために以下の事柄について下記で説明します。

- QX-102 メンブレンコーティング
- QX-102 のサンプルアプリケーション（カプセルへのサンプルの導入）
- 未処理サンプルの扱いについて
- サンプルの固定
- 一般的な染色方法
- 免疫金標識

## QX-102 メンブレンコーティングプロトコル

カプセルのメンブレンでは、特別な処理無しでほとんどの細胞を生育させることができます。

しかし多くの場合、最適な生育を保証するためにカプセルのメンブレンをコーティングすることが推奨されます。使用できる接着因子は、フィブロネクチン・コラーゲン・ゼラチンのような細胞外マトリクス構成物・Poly-L-Lysine のようなチャージを持つポリマーです。

最適な接着因子は試料により異なり、実験的に決定されます。

また最適なプロトコルを選択する際には、コーティングの層は出来るだけ薄く且つ電子密度の高いものを含まないものでなくてはならないことを考慮してください。

以下の接着因子についてコーティングプロトコルを述べます。

- フィブロネクチン
- ゼラチン
- Poly-L-Lysine

## フィブロネクチンコーティング

フィブロネクチンは、多くの細胞の成長を助けます。

もしフィブロネクチンが適合しない場合は、コラーゲン・ラミニンまたは細胞外マトリクス構成物の混合物を試してください。

フィブロネクチンコーティングに必要な試薬

- 0.1% Fibronectin solution(for example, Sigma F-1141)
- PBS

### フィブロネクチンを使用したカプセルメンブレンのコーティング

1. フィブロネクチンを最終濃度 0.01% になるように PBS で希釈する
2. 0.01% フィブロネクチン 15  $\mu$  L をリキッドディッシュへ入れ、室温で 30min 放置する
3. 液を取り除き、PBS で 2 回洗浄する
4. 適切な培地で 2 回洗浄する
5. 細胞の播種までは培地を満たしておく



#### Note

コーティングしてから 1 日以内に細胞をプレートすることをお勧めします。

## ゼラチンコーティング

ゼラチンコーティングに必要な試薬

- Gelatin(for example, Sigma Cat. No. G6144)
- Distilled water
- PBS

### ゼラチンを使用したカプセルメンブレンのコーティング

1. 37°Cの蒸留水で 0.1% (w/v) 濃度で固まりが残らなくなるまでゼラチンを溶解する
2. もし必要であれば、メンブレンをコーティングする前にゼラチン溶液をろ過滅菌するかコーティングした後でリキッドディッシュを UV 滅菌する
3. 0.1% ゼラチン 15  $\mu$  L をリキッドディッシュへ入れて、室温で 60min 放置する
4. 液を取り除き、PBS で 2 回洗浄する
5. 細胞の播種までは PBS を満たしておく



#### Notes

- a. コーティングしたカプセルはその日のうちにご使用ください。
- b. ゼラチンの濃度が高い方が試料の接着性が良い場合もあります。

## Poly-L-Lysine コーティング

Poly-L-Lysine はプラスチャージを持ったポリマーで、全体としてマイナスチャージを持った細胞を接着することができます。細胞の成長やその他の生理的機能に影響を及ぼすことがあるので、接着系細胞を培養する場合は適していません。しかし、浮遊系細胞や微生物の接着には適しています。

Poly-L-Lysine コーティングに必要な試薬

- 0.1% w/v Poly-L-lysine in water (for example sigman Cat. No. P8920)
- Distilled water

☞ Poly-L-Lysine を使用したカプセルメンブレンのコーティング

1. 0.1% Poly-L-Lysine 15  $\mu$  L をリキッドディッシュへ入れ、室温で 60min インキュベートする（一晚程度までの長時間インキュベートも可。）
2. 液を取り除き、蒸留水で 2 回リンスする
3. サンプルを入れるまで蒸留水を満たしておく（または、水を取り除き、無菌条件下でリキッドディッシュを乾かしてください。）

## サンプルアプリケーションプロトコル (カプセルへのサンプルの導入)

### 細胞培養

接着系細胞に対して、QX カプセルは直接細胞が接着し、成育する細胞培養ディッシュとして使用できます。多くの細胞株（例 HeLa, CHO, A431, NIH3T3）は QX カプセル上で標準的な培養液で培養出来、特別な生育条件を必要としません。

アッセイや処理は、カプセルの中で生育している細胞に対して直接おこなうこともできます。

必要な場合は、通常の培養ディッシュで培養し、処理してから、イメージングの前にカプセルのメンブレンに接着させることも可能です。

懸濁培養した細胞を Poly-L-Lysine のような接着因子でコーティングしたメンブレンに接着させることも可能です。浮遊系細胞でも、メンブレンに接着させて染色・標識をカプセルの中でおこなうことができます。また、先にカプセルの外で染色などの処理をしてからメンブレンに接着させてイメージングすることも可能です。



#### 警告

- a. 細胞培養では、MP-10 マルチウェルプレートを清浄、無菌な状態で使用することが重要です。
- b. 毒性のある試薬を使用した MP-10 マルチウェルプレートは再使用しないでください。

## 接着系細胞

接着系細胞を播種するために必要な試薬

- Normal growth medium
- Trypsin or non-enzymatic detachment reagent
- PBS

☞ 接着系細胞をカプセルに蒔く

1. フィブロネクチンやその他の適切なものでメンブレンをコーティングする  
詳細は、QX-102 メンブレンコーティングプロトコルを参照のこと
2. トリプシンなどで細胞を培養ディッシュから剥がす
3. PBS もしくは培地で洗浄後、再度新しい培地で懸濁して細胞数をカウントする
4. 15  $\mu$  L の播種用培地に適当な数の細胞が含まれるように希釈する  
ガイドラインは Table1 を参照のこと



### Note

通常、各リキッドディッシュに 1000 ~ 2000 個の細胞を蒔くと翌朝には sub-confluent になります。  
最適な細胞密度はアプリケーションによっても異なってくるので、適宜調節してください。

Table1: 細胞の希釈目安

Cells/dish	Cell concentration	Seeding volume
1000	$6.6 \times 10^4$ /ml	15 $\mu$ l
1500	$1 \times 10^5$ /ml	15 $\mu$ l
2000	$1.3 \times 10^5$ /ml	15 $\mu$ l

5. 細胞懸濁液 15  $\mu$  L でカプセルのメンブレンに細胞を播種する
6. MP-10 マルチウェルプレート周囲のリザーバーへ 200  $\mu$  L ずつ蒸留水を入れる



### Note

湿度を維持しサンプルを乾かさないようにするため、MP-10 マルチウェルプレートのリザーバーを蒸留水で満たすことは重要です。  
詳細は QX-102 ユーザーズマニュアルを参照してください。

7. 通常の培養環境下（例 加湿したインキュベータ・5%CO<sub>2</sub>）で一晩あるいは細胞が接着するまでインキュベートする

多くの接着系細胞に適応できる細胞培養プロトコルの概要は以下のようになります。

☞ 接着系細胞をカプセルに導入するためのプロトコル例

1. 0.01% フィブロネクチン で 30min メンブレンをコーティングする
2. PBS で 2 回洗浄する
3. 新鮮な培地で 2 回洗浄する
4. 各カプセルに 2000 個くらいの細胞を播種する
5. MP-10 マルチウェルプレートのリザーバーへ蒸留水を 200  $\mu$  L ずつ入れる
6. プレートの蓋を閉めて細胞が接着するまで 37°C でインキュベートする（通常は一晩）

## 浮遊細胞と微生物

QX-102 カプセルを用いて、懸濁培養されたリンパ球・バクテリア・原虫のような微生物や浮遊系細胞のイメージングが可能です。これらの生物は通常直接メンブレンには接着しないので、コーティングが必要になります。コーティングには、Poly-L-Lysine やゼラチンを使用します。細胞はインキュベータまたは遠心によってメンブレンに接着させます。試料は、未染色の状態または下記のプロトコルに従って固定・染色された状態でイメージングします。

細胞は、培地またはバッファーに懸濁した状態で、メンブレンに接着させ、後の処理を行うことができます。濁液時の適切な希釈倍率は生物のタイプと培養条件に依存するので、実験的に決める必要があります。

特定の抗原に対するラベルは、免疫標識を用いて、メンブレンへの接着前・接着後どちらでも行うことができます。

以下のプロトコルは、懸濁液中の細胞である細菌・酵母その他の単細胞生物をメンブレンに接着させる場合に適用可能です。

#### ☞ カプセルへの浮遊系細胞または微生物の導入

1. Poly-L-Lysine かゼラチンでカプセルのメンブレンをコーティングする  
詳細は、QX-102 メンブレンコーティングプロトコルを参照のこと
2. PBS でメンブレンを洗浄し、使用するまで PBS を満たしておく  
(時間を置いて使用する場合は蒸留水で洗浄後一晩乾かしてください。)
3. 細胞・微生物・粒子の懸濁液を適当に希釈する  
(例 E.coli の場合一晩培養したものを 100 倍希釈すると 1 カプセルあたり適当なバクテリア数の懸濁液を作ることができます。)
4. 15  $\mu$  L の懸濁液をリキッドディッシュへ入れ、室温で 1 時間インキュベートするかあるいは 96 穴プレートホルダーを装着した遠心機で室温にて 500g・5min 遠心する



#### 警告

メンブレンへの細胞の吸着を妨げないため、懸濁液に血清やホルムアルデヒドが含まれないようにしてください。

5. (オプション) 細胞の接着を安定させるため、細胞を 4% ホルムアルデヒド/PBS で 10min または 2.5% グルタルアルデヒド/PBS で 5min 固定をする
6. PBS (5 の固定を行った場合は蒸留水) で洗浄をおこない、染色もしくはイメージングに進む

## ネイティブ・未処理サンプルの取り扱い

QX-102 カプセルのウェット環境は、ネイティブの未固定の状態での細胞の可視化を可能にします。未染色のサンプルでさえ、しばしば、細胞のさまざまな構成要素が作り出すコントラストによってあるていどの細部が識別可能です。細胞の異なる部分に存在する、塩・鉄分・リンなどの高密度物質がコントラストを向上させる場合もあります。

高倍率でイメージングしている間の細胞に吸収される照射電子ビームのレベルが、細胞の生存能に影響を与えることが予想されます。短時間のイメージングならば構造的なダメージは見られず、繰り返し(積算)スキャンを使って長時間イメージングと同様なイメージを得ることができます。

従って、生きた細胞で短時間のイメージングを行うことが出来る可能性があります。

生細胞は、先述のプロトコルでメンブレンに接着させ、培養液または PBS 中で直接イメージングが可能です。

## 固定プロトコル

一般的な染色の多くや免疫標識のプロトコルは、試料の固定をおこなってから実行されます。

固定の目的とは、

- 細胞構造を出来るだけ生きた状態と同じ状態に保持する
- 後のステップでの形状変化や損傷からサンプルを保護する

細胞学・免疫染色・電子顕微鏡の研究で一般に使用されている固定試薬の多くが QX-102 カプセルで使用可能です。すべての細胞構造を保持することの出来る固定試薬は存在しないので、固定試薬の選択は試料及び観察したい細胞内の微小構造によって決まります。

免疫標識では、最も適切な固定プロトコルの選択は、抗原と抗体の性質にも影響されます。



### 警告

全ての固定試薬は程度の違いはありますが有毒です。

すべての作業は手袋・実験用白衣を着用してドラフトチャンバーの中で実行してください。

取り扱いと廃棄物処理についてはその地域のガイドラインに従ってください。

## アルデヒド類

パラホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒドのような、蛋白質を架橋するアルデヒド試薬による固定は、通常最初に選択されるべき方法です。

グルタルアルデヒドによる固定は不可逆的なのに対し、パラホルムアルデヒドによる固定は長時間溶液中で反応させることにより部分的に逆反応が起こります。

グルタルアルデヒドはパラホルムアルデヒドよりも浸透速度が遅いので、パラホルムアルデヒドよりも長い固定時間を必要とします。以下にグルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドによる標準的な固定プロトコルについて述べます。最適な試薬濃度および固定時間はアプリケーションによって異なるので実験的に決定する必要があります。後で免疫染色をおこなうサンプルの固定は、対応するエピトープのダメージを避けるために特別な注意が必要です。アプリケーションによっては、グルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドの混合物が良い結果をもたらす場合もあります。

## グルタルアルデヒド固定

グルタルアルデヒド固定に必要な試薬

- 25% Glutaraldehyde solution EM grade(for example, Agar.Cat.No.R1020)
- PBS

### ☞ サンプルのグルタルアルデヒド固定

1. グルタルアルデヒドの原液を最終濃度 2% になるように PBS で希釈する
2. PBS で 4 回洗浄する
3. 2% グルタルアルデヒドを入れ、室温で 30min インキュベートする
4. PBS で 4 回洗浄する
5. 染色または標識反応に進む



### Note

アプリケーションによっては、より低いグルタルアルデヒド濃度 (0.2% ~ 1%) でより長時間インキュベートした方が良い結果が得られる場合があります。

## パラホルムアルデヒド固定

パラホルムアルデヒド固定に必要な試薬

- Paraformaldehyde, EM grade(for example, a 16% solution, Electron Microscopy Sciences, Cat. No. 15710)
- PBS

### ☞ サンプルのパラホルムアルデヒド固定

1. パラホルムアルデヒドを最終濃度 4% になるように PBS で希釈する
2. PBS で 4 回洗浄する
3. 4% パラホルムアルデヒド /PBS で、室温で 15min 固定する
4. PBS で 4 回洗浄する
5. 染色または標識反応に進む



#### Note

染色や標識プロトコルによっては、2% パラホルムアルデヒドの方が良い結果が得られる場合があります。

## 有機溶媒

アルコールのような有機溶媒も一般的に使用される固定試薬です。

これらの試薬は細胞を脱水し脂質を取り除くので、細胞の構造の一部を破壊します。

標識対象のエピトープをアルデヒド固定剤よりも良く保存する場合もあることから、免疫標識が必要な場合はこれらの固定剤が選択される場合もあります。



#### 注意

QX-102 カプセルは アセトンやトルエンには耐性がないことに御注意ください。他の有機溶媒についてはお尋ねください。(QX-102 ユーザーズマニュアルもご参照ください。)

## メタノール固定

メタノール固定に必要な試薬

- Methanol cooled to  $-20^{\circ}\text{C}$
- PBS

### ☞ サンプルのメタノール固定

1. 試料を室温で PBS で 4 回洗浄する
2.  $-20^{\circ}\text{C}$  に冷やしたメタノールに置き換える
3.  $4^{\circ}\text{C}$  もしくは室温で 5min インキュベートする
4. 室温で PBS で 4 回洗浄する
5. 染色または標識反応に進む

## 一般的な染色プロトコル

QX-102 カプセルにおけるイメージのコントラストはサンプルの構成元素の原子番号の差によってもたらされます。従って、ウランやオスミウム化合物のような重金属で染色を行うことによって、主成分が炭素・水素・酸素・窒素である生物学的サンプルのコントラストは改善されます。一般に重金属染色は細胞内の構成物を非特異的に染色しますが、重金属とさまざまな分子との間の親和性が異なることを利用して細胞内の構造を可視化することができます。

次の染色方法について以下に述べます。

- 酢酸ウラン
- リン・タングステン酸
- 四酸化オスミウム

**酢酸ウラン染色**（現在、日本では使用が規制されています。）

ウランは染色で使用される最も重い金属で、サンプル全体にわたるコントラストを高める試薬として使用されます。酢酸ウランは、核酸・蛋白質・膜構造に結合します。



### 警告

ウラン化合物は、毒性と放射性を有します。

使用・保管・廃棄物処理は、その地域・施設の管理者の指示に従ってください。

酢酸ウラン染色に必要な試薬

- Uranyl acetate(5% stock, pH 3.5 with HCl, kept at 4°C in the dark)
- Tannic Acid(2% stock in water)
- 4% PFA in PBS
- PBS
- Distilled water
- 0.45  $\mu$  m syringe filters

### ☞ サンプルの酢酸ウラン染色

1. 染色する前に 1% タンニン酸を蒸留水で調製する（用時調製）  
0.5% 酢酸ウランを蒸留水で調製する（用時調製）  
（酢酸ウランは原液を蒸留水で希釈後、0.45  $\mu$  m シリジフィルターで濾過する）
2. PBS で 4 回洗浄する
3. 4% パラホルムアルデヒド/PBS で 15min 固定する  
詳細は固定プロトコルを参照のこと（P.28）
4. PBS で 4 回洗浄する
5. 蒸留水で 5min4 回洗浄する
6. 1% タンニン酸で 5min インキュベートする
7. 蒸留水で 5min2 回洗浄する
8. 0.5% 酢酸ウランで 30min インキュベートする



### Notes

- a. ウランはリン酸塩が存在すると沈殿物を形成するので、ウランで染色する前にカプセル中の試料を蒸留水で良く洗浄してリン酸塩を除く必要があります。
- b. 以下の各ステップは室温でおこなってください。



### Note

最適な試薬濃度・インキュベート時間は試料に依存します。

9. 蒸留水で 5min2 回洗浄する
10. 40 ページの「イメージングの準備」に従ってイメージングの準備をする



## PTA (リン・タングステン酸) 染色

PTA はアニオン染色です。

核の DNA、核小体に結合する塩基性タンパク質などの電荷をもつ構造物をポジティブに染色し、ミトコンドリアのマトリクスを強く染色します。

PTA 染色に必要な試薬

- Phosphotungstic acid (for example sigma Cat. No. P4006), 2% stock solution in double distilled water, pH 1.5.



警告

PTA 溶液は酸性です。適切な防護服を使用してください。

- Double distilled water
- 2% Glutaraldehyde in PBS



Notes

ストック試薬は室温で約 1 ヶ月保管できます。

手順

1. PBS で細胞を 4 回洗浄する
2. 2% グルタルアルデヒド /PBS で 30min 細胞を固定する



Note

2% パラホルムアルデヒドと 1% グルタルアルデヒドの混合液 (PBS 中) で 30min 固定することもできます。

3. PBS で 3 回洗浄する
4. 再蒸留水で 3 回洗浄する
5. 2%PTA で 30min インキュベートする
6. 再蒸留水で 5 回洗浄する
7. 40 ページの「イメージングの準備」に従ってイメージングの準備をする

## 四酸化オスミウム染色

四酸化オスミウムは、電子顕微鏡観察において固定試薬および重金属染色試薬として古くから使用されてきた試薬です。この試薬は、膜構造・小胞の脂質に対する優れた固定試薬であり染色試薬です。接着系細胞 (HeLa 細胞) で最も顕著に染色される部位が脂質滴です。

(Quantomix 社の Web Site : [www.quantomix.com](http://www.quantomix.com) 内の gallery 参照)

いくつかの細胞内構造も可視化されます。可視化される細胞構造は固定プロトコルに依存します。グルタルアルデヒド固定では、核小体が見られますが、核全体の染色は弱くなります。パラホルムアルデヒド固定では、核がより良く染色されますが、いくつかの細胞内構造が失われます。最初の選択肢としては、グルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドの混合が推奨されます。



警告

四酸化オスミウムは毒性・揮発性を有しています。

この試薬を使用するすべての作業はドラフトチャンバーの中で手袋・実験用白衣を着用しておこなってください。

使用・廃棄物処理は、その地域・施設の管理者の指示に従ってください。

四酸化オスミウム染色に必要な試薬

- 4% OsO<sub>4</sub>(for example, Sigma Cat. No.75632)
- 2% Paraformaldehyde/0.1% Glutaraldehyde in PBS
- Distilled water
- PBS

## ☞ サンプルの四酸化オスミウム染色



## Note

以下の各ステップは、室温でおこなってください。

1. PBS で細胞を 4 回洗浄する
2. 2% パラホルムアルデヒド / 0.1% グルタルアルデヒド / PBS で 30min 固定する
3. PBS で 4 回洗浄する
4. 蒸留水で 4 回洗浄する
5. 4% の原液を蒸留水で希釈し、0.1% 四酸化オスミウム溶液を調製する
6. 0.1% 四酸化オスミウムで 30min インキュベートする



## Note

最適なインキュベート時間はサンプルに依存するので、実験的に決定してください。

7. 蒸留水で 4 回洗浄する
8. 40 ページの「イメージングの準備」に従ってイメージングの準備をする

## 免疫金標識プロトコル

金コロイド粒子は、QX-102 カプセルで容易に可視化できます。

プロテイン A・免疫グロブリン・ストレプトアビジンのような種々の分子に結合した金粒子が市販されており、特異的な抗原の免疫標識に利用できます。免疫金標識を QX-102 カプセルと組み合わせることにより、ひとつの分子にひとつの金粒子が接着しているのが確認できるので、次のようなユニークな利点が挙げられます。

- 細胞膜とレセプターの関係のイメージング
- 検出限界が非常に低く単分子の標識の認識が可能。  
この結果得られる 10nm の解像度で超微細な局在や分布を研究することが可能。
- 金粒子の数をカウントすることで標識の定量が可能

免疫標識プロトコルは以下の 4 つのステップから構成されます。

- 固定
- ブロッキング
- 抗体結合
- 抗体に結合した金粒子による検出

免疫金標識のフローチャートは図 2 を御参照ください。

細胞表面の抗原の標識は、固定していない細胞でも固定した細胞でも行うことができます。細胞内の抗原の標識は、固定し透過化した細胞で行うことができます。

固定プロトコルによっては、いくつかのエピトープを遮蔽したり変性させたりすることがあるため、それぞれの抗原に最適な固定プロトコルは実験的に決定する必要があります。

加えて、非特異的バックグラウンドに対する最適なブロッキングや一次抗体の濃度とインキュベート時間は、対象とする抗原と抗体に依存します。場合によって、非特異的結合を防ぐために特別なバッファーでインキュベーション・洗浄することが必要な時もあります。従って、すべての標識反応に対応した標準的なプロトコルというものはありません。最適な条件は、特定の抗原・抗体を使用した以前の経験や免疫蛍光標識等を使用した予備実験で決めることが必要な場合もあります。

ここでは概要と一般的なガイドラインについて述べますので、ユーザーが決定した最適条件に応じてプロトコルを変更してください。

市販のコロイド金標識抗体は、0.8nm から 100nm まで様々なサイズのものがあり、小さな粒子はより効率的に標識できる長所を持ちますが、観察には銀増感する必要があります。一方で、大きな粒子は何も処理を施すことなく可視化することができます。それぞれのコロイド金標識抗体の最適使用条件についてはメーカーの推奨する条件をごらんください。

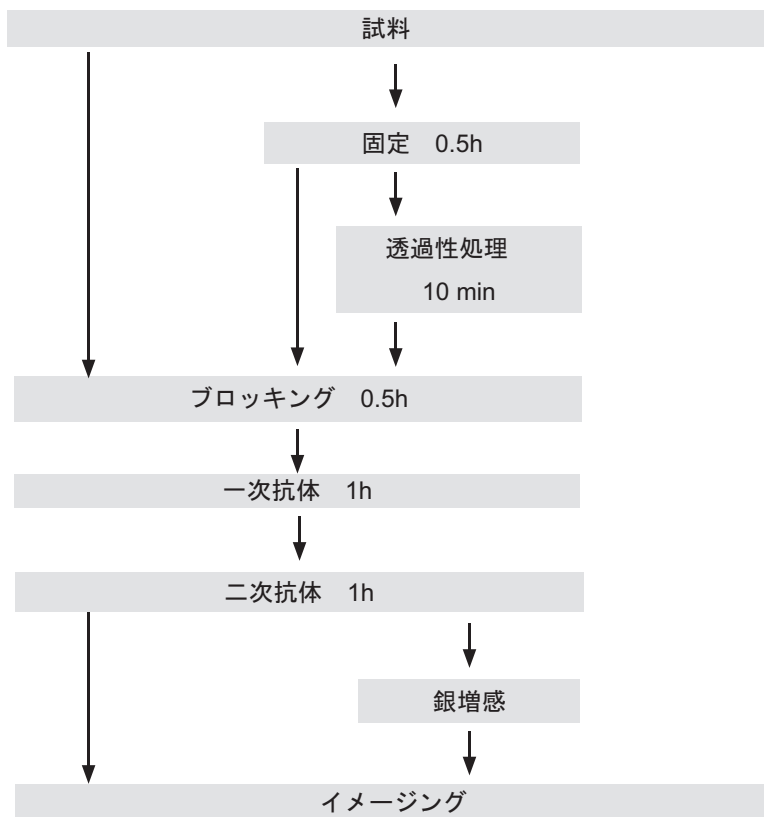


図 2 免疫標識プロトコルフローチャート

標識反応の特性を評価するためには適切なコントロール反応と比較する必要があります。実験には常に、一次抗体を加えないコントロール反応が含まれる必要があります。

### 免疫金標識反応

免疫金標識に必要な試薬

- PBS
- Fixative
- 0.2% Triton® X-100 in PBS (for intracellular antigens)
- Blocking agent (BSA, normal Serum or other)
- Primary antibody
- Gold particle conjugate
- Distilled water
- Silver staining kit (for example, AURION R-GENT SE-EM, Cat.No. 500.033)

☞ QX-102 カプセルにおけるサンプルの免疫金標識

1. フィブロネクチンまたはその他の接着因子でメンブレンをコーティングする
2. メンブレンに細胞を接着させる



Note  
以下の各ステップは、室温でおこなってください。

3. PBS で 4 回洗浄する
4. 固定プロトコルに従って、細胞を固定する  
生細胞（非固定）を標識する場合は、このステップを省略する
5. PBS で 4 回洗浄する  
(細胞内抗原の場合)
  - a. パラホルムアルデヒドもしくはグルタルアルデヒド固定の細胞に関しては、0.2%Triton X-100/PBS で 10min インキュベートして透過化する  
(メタノール固定を適用している場合は、追加の透過化は必要ありません。)
  - b. PBS で 5min2 回洗浄する
6. 非特異的バックグラウンドを防ぐため、1%BSA と 5% の二次抗体の由来動物種からの血清 /PBS などのブロッキング液で 30min インキュベートする
7. 一次抗体 /1%BSA/PBS でインキュベートする  
並行して一次抗体なしでコントロール実験もおこなう



## Notes

- a. 抗体の最適濃度を決めるために抗体の段階希釈をおこなってください。
- b. 室温で 30min ~ 60min インキュベートすると通常良い結果が得られます。
- c. 抗体によっては、37°Cでのインキュベートや 4°Cで長時間（数時間から一晩）インキュベートするほうが良い標識の得られるものもあります。

8. 1%BSA/PBS で 4 回洗浄する



## Notes

- a. バックグラウンドが高い場合は、0.05% ~ 0.1% Tween20 のような弱い界面活性剤を洗浄液に加えてください。
- b. 細胞表面の染色や標識の時には界面活性剤を使用しないでください。

9. 1%BSA もしくは 5% 血清のような蛋白質液中の金標識二次抗体(コロイド金結合二次抗体、Protein A- 金、Protein G- 金など) でインキュベートする



## Note

適切な希釈条件や使用条件は、メーカー推奨の値を参考にしてください。

10. PBS で 4 回洗浄して結合しなかった抗体を除く
11. 金粒子が 30nm よりも小さい場合は、銀増感をおこなう



## Note

AURION R-GENT SE-EM kit をお勧めしますが、同様のキットも市販されています。

12. 蒸留水で 6 ~ 10 回洗浄する
13. 40 ページの「イメージングの準備」に従ってイメージングの準備をする

## イメージングの準備

QX イメージングバッファーは、SEM イメージング中の電子線によるサンプル損傷を最小限に抑えるように作られており、できる限り使用してください。特に生物学的サンプルに対しては使用を強くお勧めします。

試料をイメージングバッファー中で長期間保存することはお勧めしません。

生きた試料のイメージングでは、QX イメージングバッファーの代わりに培地か PBS を使用してください。



### 注意

QX-102 カプセルでのイメージングには、DMSO を含む液は適当ではありません。

### SEM イメージングの準備

1. サンプル調製が完了した後、リキッドディッシュの液を QX-102 イメージングバッファー 15  $\mu$  L で置換する
2. カプセルを閉じる



### Notes

最適なイメージを得るため、すぐにイメージングすることをお勧めします。

もしサンプルの入ったカプセルの保存が必要ななら、カプセルを閉じた状態で 4°C で短期間保存できます。

冷却保存したカプセルは SEM に入れる前に室温に戻してください。

3. カプセルのメンブレンを上にして SEM のサンプルステージに設置し、QX-102 ユーザーズマニュアルに従ってイメージングをする

## Appendix A : 用語解説

用語	解説
SEM	走査型電子顕微鏡
MP-10	マルチウェルプレート 滅菌済み・最高で 24 個までの QX-102 カプセルの液体操作が並行して行える透明なホルダー。細胞培養容器として、また種々の操作中にカプセルを保持したりするために用いられる。
MA-4	マルチウェルアスピレーター カプセルのメンブレンにダメージを与えることなく安全に QX-102 カプセルから液を吸引できる。
QX-102	種々の液体やウェットサンプルの SEM イメージングに使用できるカプセル
リキッドディッシュ	QX-102 カプセルのベース部分。小さな細胞培養ディッシュとして設計されている。
シーリングスタブ	QX-102 カプセルのパーツで、カプセルをシールして SEM 内でカプセルの気密性を保持する。
Calibration Capsule	イメージング条件を最適化するためのコントロールサンプルが入った QX カプセル
QX Imaging Buffer	QX-102 カプセルの SEM イメージングに最適なバッファー
BSA	Bovine Serum Albumin
BSE	Back-scattered electrons
BSED	Back-scattered electrons detector
PBS	Phosphate-Buffered Saline
ECM	Extracellular Matrix
PFA	Paraformaldehyde
GA	Glutaraldehyde
w/v	Weight to Volume

Appendix B : Troubleshooting (トラブルシューティング)

ステップ	問題	原因	解決方法	
液体操作	液体がリキッドディッシュから漏れてくる	カプセルメンブレンが損傷している	いかなる場合にもカプセルメンブレンに触れないようにする 常にカプセルはMP-10マルチウェルプレートに置く 液体をリキッドディッシュから吸引する時はMA-4マルチウェルアスピレーター以外のものを使用しない	
		粒子 / 細胞サンプルが液体操作中にカプセルのメンブレンから離れてしまう	アスピレーターの吸引力が強すぎる	アスピレーターの吸引力を弱くする (ユーザーズマニュアルの MA- 4 の項参照)
		* 特にリキッドディッシュの中心の辺りから	粒子 / 細胞サンプルがカプセルのメンブレンに良く接着していない	接着因子の濃度を高くするか違う接着因子を試す
細胞培養	細胞がカプセルのメンブレンに接着しない	接着因子がその細胞の培養に適していない	別の接着因子を使用する	
	細胞の生育が悪い	生育環境が適切でない 細胞によってはQX-102カプセル内での生育に特別な環境が必要な場合もある 毒性のある物質がごく少量 MP-10マルチウェルプレートにこぼれ、細胞の成長に影響を与えている	細胞密度あるいはインキュベーション期間を調節する 細胞密度あるいはインキュベーション期間を調節する	
細胞染色	染色や標識をすると細胞が損傷してしまう	作業している間にサンプルが乾燥した	リキッドディッシュに液体が少ない状態 (液を吸引した後など) で長時間放置しない	

イメージング	シグナルが観察されない	サンプルがカプセルメンブレンに密着していない	サンプルをカプセルメンブレンに接着させる プロトコルを確認する * Chapter3, 4 を御覧ください
	イメージが鮮明でない	サンプルの構成要素間に十分なコントラストがない	サンプルのコントラストを重金属染色などで高めることが必要 * Chapter4 を御覧ください

QX-102 アプリケーションマニュアル (No. 1QUA0002/0-1)

2005年 4月 第1版 (UQX003 Issue 2.0 Sep. 2004\*)  
2005年 12月 第1-1版 (UQX003 Issue 2.1 Nov. 2005\*)

**エムエス機器株式会社**

<http://www.technosaurus.co.jp>

東京	〒162-0805	東京都新宿区矢来町113番地	TEL : 03-3235-0661 (代)	FAX : 03-3235-0669
大阪	〒532-0005	大阪市淀川区三国本町2丁目12番4号	TEL : 06-6396-0501 (代)	FAX : 06-6395-2588
福岡	〒812-0054	福岡市東区馬出1丁目2番23号	TEL : 092-631-1012 (代)	FAX : 092-641-1285

\* この取扱説明書に記載の仕様及び付属品の種類、内容を予告なく変更させて頂くことがあります  
\* この取扱説明書の一部または全部を無断で複写、複製、転載することは禁じられています