

【TEM観察超薄切片作製の基本】 24. 10.25

- ① 【細切】 固定液の組織への浸透を良くするため、出来るだけ小さめに切る（1mm角以下）。方向性のあるもの等は棒状に切ることもある。エタノールで脱脂したカミソリを用いる。
- ② 【前固定】 2.5%グルタルアルデヒド(GTA)を用い、4℃または室温で2hr～一晩。固定時間は最低でも2時間は必要と言われている(浸透速度0.5mm/h)。タンパクを良く固定するが脂質はほとんど固定しない。一晩浸漬したままにしても大丈夫だが、極端に長時間、浸漬したままだと組織の収縮や硬化などが起こる可能性がある。実験の都合により浸漬したままの状態をやむを得ず中断する場合、数日程度であれば大丈夫だと思われる。

グルタルアルデヒド（日新EM製であれば、どれでも可。他社製品未確認）
→0.1Mリン酸緩衝液(NaでもKでもどちらでもよい)で2～5%の溶液にして使用(推奨はNa)。

- ③ 【洗浄】 10分間、3回、よく攪拌する。浸透圧保持のため、固定液に用いた緩衝液で行う。
- ④ 【後固定】 1%四酸化オスミウム(1%の場合、浸透速度0.8mm/h)：室温、1～4hr。脂質をよく固定する。うっかり長くしすぎると前固定の場合と同様に収縮等の可能性がある。

四酸化オスミウム(日新EM等の電子顕微鏡グレード(EMグレード)のもの)
→オスミウム結晶または溶液を上記緩衝液と同じもので1～2%に調整する。結晶の場合は、1g入りの物を購入し、緩衝液に溶かして、4%液として保管し、使用の都度、1% or 2%に調整すると便利。強力な酸化剤で蒸発しやすく、毒性が強いため、**取扱いはドラフト内で行う。**

- ⑤ 【洗浄】 固定液に用いた緩衝液で行う。1分、1回、室温。直ちに脱水を行う。
- ⑥ 【脱水】 エタノールの濃度や処理時間や回数は研究者(試料)によって様々である。硬組織の場合は、時間を長く、回数も多くする。
一般的な脱水：50、70、90(各1回),100%(3回)。各10～20分程度を室温で。低濃度は処理時間短め、100%はやや長めが良いといわれている。
脱水濃度や時間は、情報を集めたり、実験を繰り返したりして、最終的には決める。初めは一般的な濃度・時間で充分。
- ⑦ 【置換】 エポキシ系樹脂（疎水性）に包埋することが多いが脱水剤のエタノールに溶解しにくいいため、包埋の前に置換剤を使用して、樹脂浸透のための前処理を行う必要がある。下記のいずれかの試薬で10～15分処理を2回した後、さらに置換剤と樹脂の等量混合液に一晩浸漬してから包埋する。

置換剤：酸化プロピレン(推奨、非常に揮発性の高い有機溶媒でピペットで吸引しにくい)、n-ブチルグリシジルエーテル(QY-1)、メチルグリシジルエーテル(QY-2)

- ⑧ 【包埋】 エポキシ系樹脂としては、近年はSpurr樹脂が製造中止になっているため、Quetol651が多い。重合時間等は試薬の取扱説明書もしくは過去の文献に従う。60℃、3日間処理が一般的。直径8mm以内のカプセルまたは幅8mm以内の平板型に包埋する。
- シリコン包埋板の場合、樹脂が固まりにくい傾向があるようである。あまり方向性がないものについてはカプセル包埋の方が確実かもしれない。
- ⑨ 【厚切】 ウルトラマイクロトームを用いてトリミング（片刃カミソリ）⇒厚切（ガラスナイフ）を行う。伸展機に乗せ、60℃で乾燥させる⇒1%トルイジンブルーで染色。先端の試料部分は最終的には0.5mm四方程度にする。あまり長くしすぎると、切っている間に折れてしまう。トリミングの装置がある分野は研究室でトリミングしたものを持ち込んでもよい。
- ⑩ 【光顕】 目的の試料が切片に含まれているかを確認。含まれていれば超薄切片の作製へ。
- ⑪ 【超薄切】 ウルトラマイクロトーム・ダイヤモンドナイフを使用して、60～80nm程の超薄切片を作製。予約が必要。
- ⑫ 【染色】 電子染色（主に切片の場合）：酢酸ウラン代替のTIブルーを使用。二重染色を行う場合、鉛染色液はクエン酸鉛を用いることが多い。溶液濃度、染色時間等は取扱説明書を参考にする。平均的には染色液に10分程度浮かせるもしくは浸漬する→蒸留水に浸漬→別の容器のきれいな蒸留水に浸漬→濾紙の上に置き乾燥させる。
- ⑬ 【観察】 予約をして、電子顕微鏡観察を行う。

* 青字の作業は電子顕微鏡室にて行う。

* 11)の作業が完了する前までにグリッドにフォルムバル支持膜を張る（電子顕微鏡室にて行う）。グリッドは「No.100～200」を使用する。当日使用する分だけでなく、後日使用する分もまとめて一度に20～30枚程度まとめて膜を張ることが可能（所要時間 膜張に1時間、乾燥に1時間）。

* 超薄切片をグリッドに載せる直前に親水化処理を行う（電子顕微鏡室にて行う、所要時間1分）。

* 緩衝液はどちらでもよいといわれているが、どちらかといえばリン酸Naが望ましい（Kは動物の血管を収縮させてしまうことがあるらしい）。