

## 免疫電顕法実験手技について

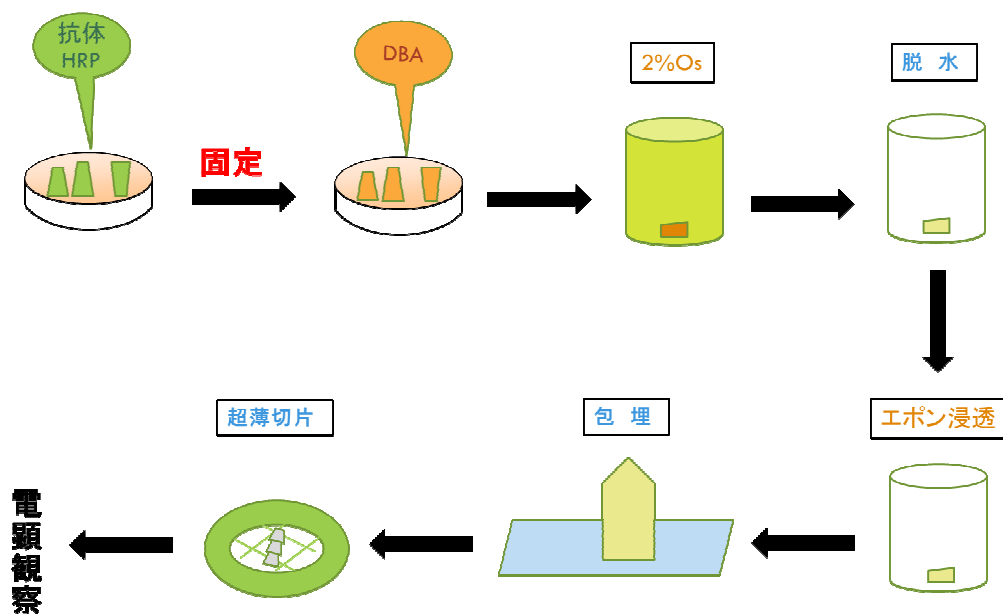
○程晶磊 正岡実 高木佐知子 浅野文子  
生物・生体技術支援室 生体機能解析技術グループ

### ・はじめ

免疫電顕法は包埋前染色法、包埋後染色法、無包埋染色法、免疫レプリカ法と免疫 SEM 法に分類されている。我々は多様な免疫電顕試料作製の依頼を受けている。それぞれ実験の特徴があり、良質の免疫電顕資料を作製する事がとても難しい。長年の作製探索及び経験に基づいて生物試料免疫電顕法である包埋前染色法（DAB 染色）、無包埋染色法（凍結超薄）と免疫レプリカ法の実用手技をまとめた。

### 一. 包埋前染色法～HRP 標識蛋白質の DAB 染色法

手順：培養細胞の場合

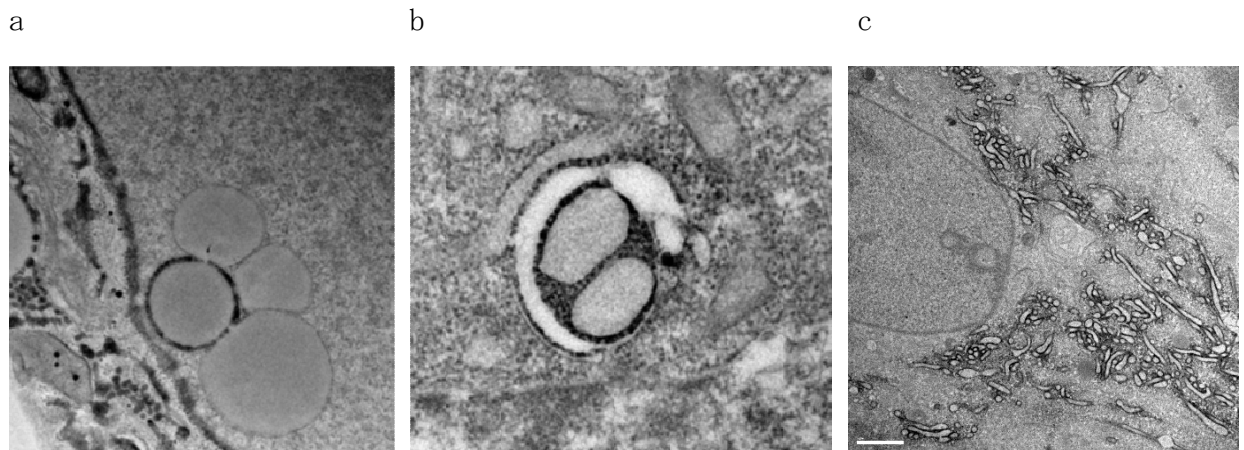


### 注意点

- ・ 培養細胞の場合、カバガラスの形は表と裏が区別出来るようにする。
- ・ 抗体液が乾燥しないように。
- ・ DAB 染色の時間は実体顕微鏡で染色具合を観察しながら決める。

- ・ 染色温度 4℃ 必要がある時、オスミウム後固定も 4℃。
- ・ 超薄切片作製後の電子染色は弱めにする。

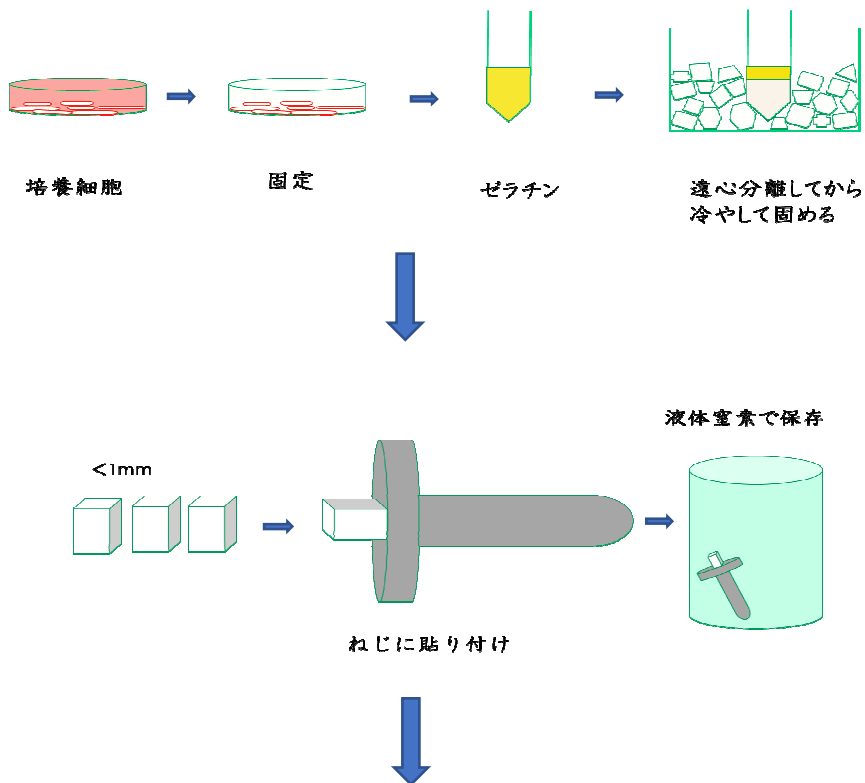
電顕写真イメージ：

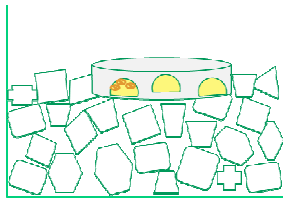
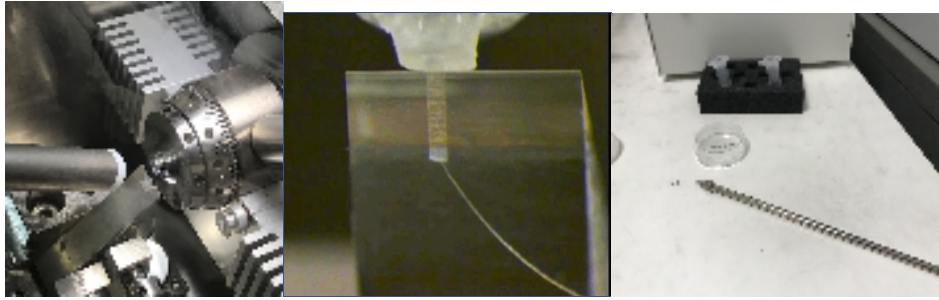


a: 細胞の核膜、小胞体膜を黒く染められた。b: 細胞質にあるオートファジーの膜と中一部を黒く標識された。c: ミトコンドリアの膜を黒く染色された。

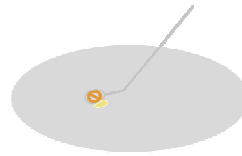
## 二. 無包埋染色法～凍結超薄法

手順：





氷の上、メチルセルロース/  
ウラン液で染色封入

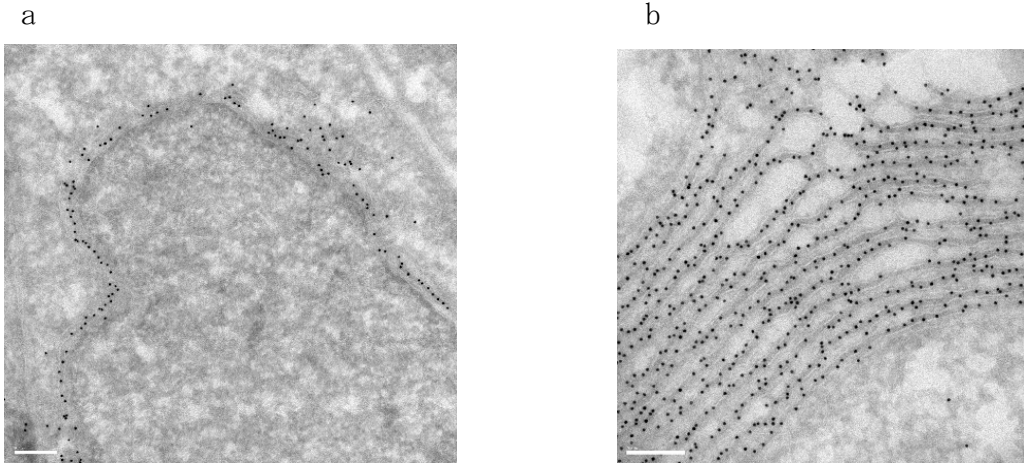


濾紙で余分な液を吸い取る

#### 注意点：

- ・氷晶防止ため、2.3M ショ糖 in PB で揺らして一晩浸透する。
- ・浸透後切片切りやすい形（図の様な）と大ききで作製する。
- ・切片切る面を台形にするようにトリミングする。
- ・トリミングする時温度やや高く設定する。（ $-70^{\circ}\text{C}$ ）
- ・チャンバー、試料、ナイフそれぞれの温度設定が少しずれる。
- ・専用の静電気取る装置を使用する。
- ・試料をピックアップする溶液は表面張力を抑えるため、ショ糖ゼラチンかショ糖メチルセルロースかを使用する。
- ・染色封入する時、中性のウランに一回浸入して水洗ってから封入液に浸入する。
- ・水洗いは素早くする。
- ・最後ループでグリッドを拾いて、濾紙の上で“一”を書いて余分の液をとる。

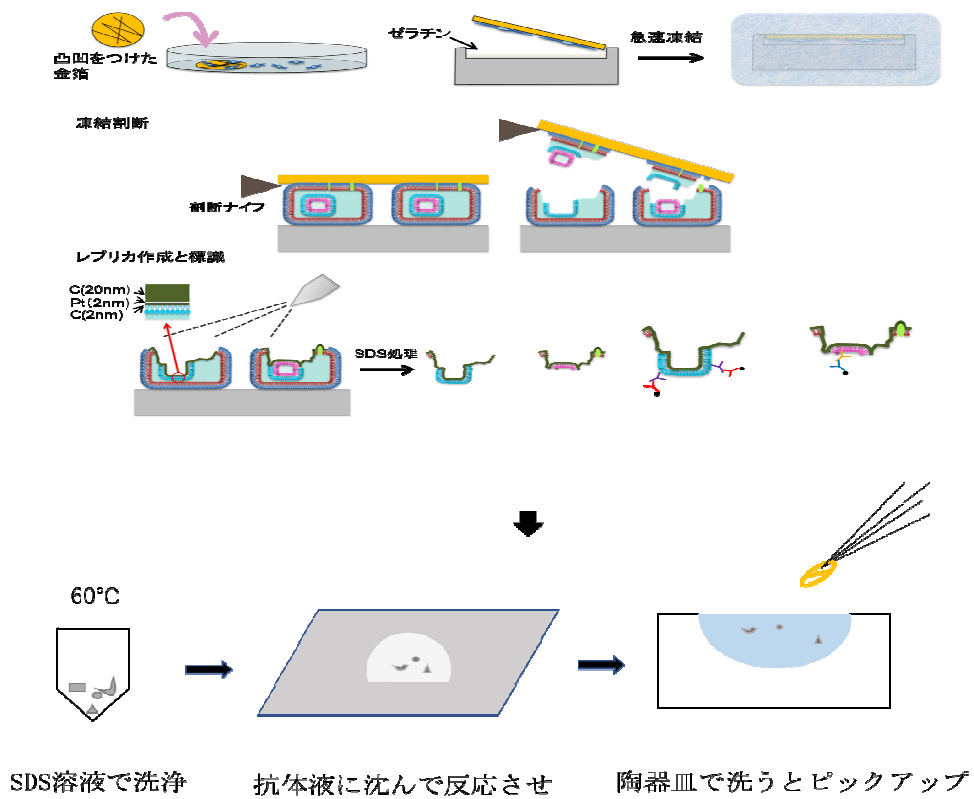
#### 電顕写真イメージ：

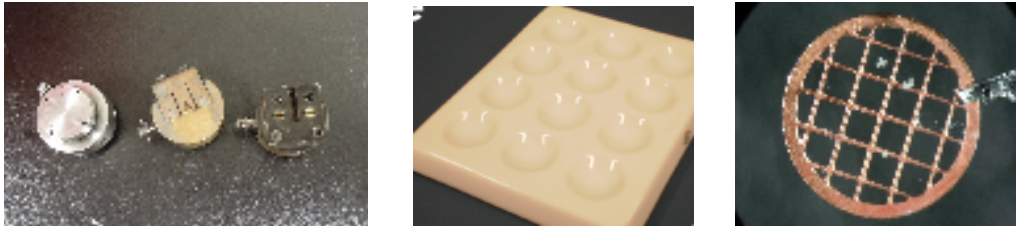


a:細胞核膜の外膜を金コロイドに標識された。b:細胞質の小胞体膜を金コロイドに標識された。

### 三. 免疫レプリカ法

手順：

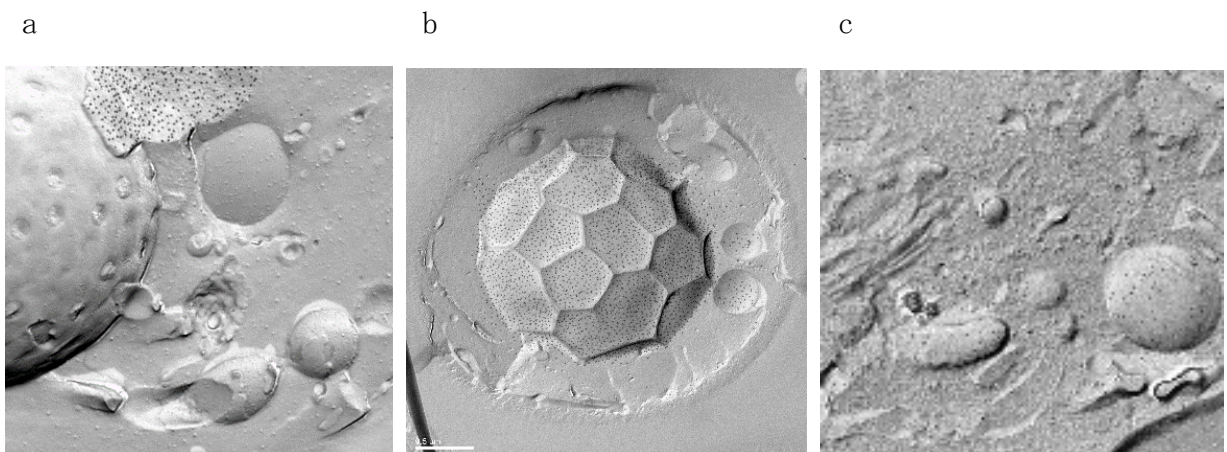




### 注意点：

- ・レプリカ試料を製作するのが加圧急速凍結機器（HPM010）と凍結切断・真空蒸着装置（BAZ 400）を使う。
- ・加圧急速凍結されたサンプルは長期に液体窒素中で保存可能。蒸着して完成されたレプリカは $-20^{\circ}\text{C}$ で長期保存可能。
- ・サンプルを試料台に載せたりする行動は液体窒素中で行う。
- ・切断後白金とカーボンで蒸着する。
- ・自分の作りたい試料に合わせて、装置用の道具を作る。
- ・試料にかかった圧力の強さと時間が重要である。試料の載せ方や真空のレベルや切断蒸着温度などは、目的に応じて条件探索する。
- ・レプリカ作製後、SDS 溶液  $60^{\circ}\text{C}$ で一晩洗浄する。
- ・免疫染色する時に、ほとんどの操作は実体顕微鏡の下で行う。
- ・免疫染色が行った後、DW で洗浄して、グリッドでピックアップ。
- ・洗浄とピックアップし易いため、上図の陶器皿を使用することがおすすめ。

### 電顕写真イメージ



a: 酵母のレプリカ電顕写真、細胞内の構造を立体的に映って、核や液胞やミトコンドリアなどの内外膜層も正確に区別出来る。b: 酵母細胞の液胞膜 E 面金コロイドに標識された。c: 哺乳類細胞のレプリカ、ゴルジ体や小胞体とアウトファージの膜に金コロイド標識を見られる。

・まとめ：

以上のように免疫電顕法は、電顕標本に免疫組織化学反応をさせ、超微形態上で物質の局在を特定する方法である。電顕技術と免疫組織化学法両方を求められ、その他の形態学法と比べて難しいので、普及していない現状である。しかし、きれいな免疫電顕法による写真を載せた論文は非常に説得力があるから、これからも我々が免疫電顕法を探索しつつ、技術の進歩をさせ、本大学の多分野の研究にサポートしていくと考えている。

・参考文献：

1. 程 晶磊, 『 快速凍結切断レプリカ標識法 』, 平成 23 年度 第 7 回名古屋大学技術研修会報告集
2. Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries  
Jinglei Cheng, Akikazu Fujita, Hayashi Yamamoto, Tsuyako Tatematsu, Soichiro Kakuta, Keisuke Obara, Yoshinori Ohsumi , Toyoshi Fujimoto  
Nature Communications volume 5, Article number: 3207 (2014)
3. ROR1 Sustains Caveolae and Survival Signalling as a Scaffold of cavin-1 and caveolin-1 Tomoya Yamaguchi, Can Lu , Lisa Ida , Kiyoshi Yanagisawa , Jiro Usukura , Jinglei Cheng, Naoe Hotta , Yukako Shimada, Hisanori Isomura, Motoshi Suzuki , Toyoshi Fujimoto , Takashi Takahashi  
Nat Commun , 7, 10060 2016 Jan 4
4. Syntaxin 17 Regulates the Localization and Function of PGAM5 in Mitochondrial Division and Mitophagy  
Masashi Sugo, Hana Kimura, Kohei Arasaki , Toshiki Amemiya, Naohiko Hirota, Naoshi Dohmae, Yuzuru Imai, Tsuyoshi Inoshita, Kahori Shiba-Fukushima, Nobutaka Hattori , Jinglei Cheng, Toyoshi Fujimoto, Yuichi Wakana, Hiroki Inoue, Mitsuo Tagaya  
EMBO J , 37 (21) 2018  
Nov 2
5. Predominant localization of phosphatidylserine at the cytoplasmic leaflet of the ER, and its TMEM16K-dependent redistribution  
Takuma Tsuji, Jinglei Cheng, Tsuyako Tatematsu, Aoi Ebata, Hiroki Kamikawa, Akikazu Fujita, Sayuri Gyobu, Katsumori Segawa, Hiroyuki Arai, Tomohiko Taguchi, Shigekazu Nagata, Toyoshi Fujimoto  
PNAS July 2, 2019 116 (27) 13368–13373;

6. PML isoform II plays a critical role in nuclear lipid droplet formation  
Yuki Ohsaki , Takeshi Kawai , Yukichika Yoshikawa , Jinglei Cheng, Eija  
Jokitalo , Toyoshi  
Fujimoto  
*J Cell Biol* (2016) 212 (1): 29-38.
7. Asymmetrical distribution of choline phospholipids revealed by click chemistry and  
freeze-fracture electron microscopy  
Shohei Iyoshi , Jinglei Cheng, Tsuyako Tatematsu, Sho Takatori, Masayasu  
Taki, Yukio Yamamoto, Adrian Salic, Toyoshi Fujimoto  
*ACS Chem. Biol.* 2014, 9, 10, 2217-2222
8. All-trans-retinol generated by rhodopsin photobleaching induces rapid recruitment  
of TIP47 to lipid droplets in the retinal pigment epithelium  
Eiko Tsuiki , Akikazu Fujita, Yuki Ohsaki, Jinglei Cheng, Toshiaki Irie, Kiwamu  
Yoshikawa, Haruki Senoo, Kazuaki Mishima, Takashi Kitaoka, Toyoshi Fujimoto  
*Investigative Ophthalmology & Visual Science* June 2007, Vol. 48, 2858-2867.