



Title	LR-WHITE樹脂による免疫組織化学：光顕から電顕まで
Author(s)	伊藤，利章；笠井，登
Description	研究・技術発表
Citation	北海道大学農学部技術部研究・技術報告，7，10-14
Issue Date	2000-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35390
Type	departmental bulletin paper
File Information	7_p10-14.pdf



LR-WHITE 樹脂による免疫組織化学

— 光顕から電顕まで —

生物組織構造解析センター

伊藤 利章

生物資源生産学専攻 園芸緑地学講座 笠井 登

(作物・分析系 共同利用班)

1. はじめに

電子顕微鏡は、材料系、医学生物系を問わず、超微細構造の観察に必須の実験機器として広く利用されといるが、近年では細胞組織化学分野での利用も著しい。すなわち、組織や細胞の機能と構造の変化を同時にとらえ、生命現象を解明しようとする研究分野で、これは細胞組織内に分布する物質を特異的に可視化し、その局在性を構造上に重複させて観察することにある。

細胞組織化学的研究を行うには、免疫組織化学的手法があるが、これは抗原と抗体の特異的反応を利用し、物質の局在性を解明するものである。金コロイド免疫電顕法は、電子顕微鏡で、間接蛍光抗体法は、蛍光顕微鏡での局在観察を目的とする。金コロイド免疫電顕法は細胞レベルでの局在を理解するのに適した手法であるが、組織レベルでは間接蛍光抗体法が勝る。従来、蛍光抗体法では、試料包埋樹脂としてテクノビット等が常用されているが、超薄切片を作製するには多少技術が必要とされ、電子顕微鏡での観察に適していない。しかし、LR-WHITE 樹脂は、超薄切片の作製が容易ということで電子顕微鏡では常用される。したがって、この樹脂のみを使い間接蛍光抗体法および金コロイド免疫電顕法を実施し、LR-WHITE 樹脂の間接蛍光抗体法への有用性を検討する。

2. 実験材料および抗体について

実験材料は、タマネギとアスパラガスを準備した。タマネギは店頭で販売されているものを用い、その頂芽部の組織を試料とした。アスパラガスは、農学部附属農場より採取し、その根端部を試料とした。

抗体は、マウス抗DNA Ig M、ビオチン化抗マウス Ig M、Streptavidin-gold conjugates:Φ 10nm、ウサギ抗アリナーゼ Ig G、抗ウサギ Ig G-Gold conjugates:Φ 15nm、また、蛍光顕微鏡観察のために、FITC標識抗マウス Ig M、FITC標識抗ウサギ Ig Gを用いた。

これらの抗体を用いて、アスパラガス根端部細胞ではDNAを、タマネギ頂芽部細胞ではアリナーゼの局在を観察する。DNAは、承知の通り細胞核、ミトコンドリアおよびプラスチド（色素体）に存在する。アリナーゼは、酵素でタマネギ頂芽部細胞の液胞中に局在することが本学部生物化学講座北村（現卒業）により解明されている。

3. 試料作製

①アスパラガス根端部細胞の場合

採取したアスパラガス根の先端部分から1 mm程度細切し、固定液（4 %パラホルムアルデヒド、1 %グルタルアルデヒド、0.1 Mカコジル酸緩衝液、pH 7.2）中で4℃で2時間固定後、0.1 Mカコジル酸緩衝液、pH 7.2で洗浄し、4℃で一晩保存した。固定後の試料は、常法の通りエタノールシリーズで完全に脱水し、LR-WHITE樹脂に置換後、50℃で24時間で重合させた。

重合し包埋された試料はトリミング後、ウルトラミクロトームでガラスナイフを用い、0.5～1 μmの厚さの切片を作製し、APSコートのスライドガラスに載せた。

また、より小さくトリミングされた試料ブロックは、ダイヤモンドナイフを用い、80 nmの厚さの超薄切片を作製し、支持膜を張ったニッケルグリッドに載せた。

②タマネギ頂芽部細胞の場合

タマネギ頂芽部を露出させ、1 mm x 1 mm角程度に細切し、固定液（4 %パラホルムアルデヒド、0.5 %グルタルアルデヒド、0.1 Mカコジル酸緩衝液、pH 7.2）中で4℃で2時間固定後、0.1 Mカコジル酸緩衝液、pH 7.2で洗浄し、4℃で一晩保存した。固定後の試料は、常法の通りエタノールシリーズで完全に脱水し、LR-WHITE樹脂に置換後、加速剤を少量添加し、-20℃で72時間紫外線重合させた。

重合し包埋された試料はトリミング後、ウルトラミクロトームでガラスナイフを用い、0.5～1 μmの厚さの切片を作製し、APSコートのスライドガラスに載せた。

また、より小さくトリミングされた試料ブロックは、ダイヤモンドナイフを用い、80 nmの厚さの超薄切片を作製し、支持膜を張ったニッケルグリッドに載せた。

4. 間接蛍光抗体法

①アスパラガス根端部細胞の場合

スライドガラス上の切片をPBSで10分間洗浄後、ブロッキング液(5%BSA in PBS)で室温で30分間処理した。その後、ブロッキング液で200倍希釈した一次抗体(マウス抗DNA Ig M)を滴下し、37℃で1時間反応させた。PBSで10分間洗浄後、ブロッキング液で200倍希釈した二次抗体(FITC標識抗マウスIg M)を滴下し、37℃で1時間反応させた後、PBSで10分間洗浄した。液を軽く吸い取り退色防止剤を滴下し、カバーガラスを被せ落射蛍光顕微鏡で観察した。

②タマネギ頂芽部細胞の場合

アスパラガスと同様の行程で行った。ただし、一次抗体はウサギ抗アリナーゼ Ig Gを二次抗体にはFITC標識抗ウサギIg Gを用いた。

5. 金コロイド免疫電顕法

①アスパラガス根端部細胞の場合

ニッケルグリッド上の切片をPBSで10分間洗浄後、ブロッキング液(1%BSA in PBS)で室温で30分間処理した。その後、ブロッキング液で200倍希釈した一次抗体(マウス抗DNA Ig M)を滴下し、4℃で一晩反応させた。PBSで10分間洗浄後、ブロッキング液で10倍希釈した二次抗体(ビオチン化抗マウスIg M)を滴下し、室温で2時間反応させた後、PBSで10分間洗浄した。そして、ブロッキング液で25倍希釈した三次抗体(Streptavidin-gold conjugates: Φ 10nm)を滴下し、室温で1時間反応させた。

免疫染色終了後、常法の通り酢酸ウランおよびクエンサン鉛による二重染色をし、電子顕微鏡で観察した。

②タマネギ頂芽部細胞の場合

ニッケルグリッド上の切片をPBSで10分間洗浄後、ブロッキング液(1%BSA in PBS)で室温で30分間処理した。その後、ブロッキング液で250倍希釈した一次抗体(ウサギ抗アリナーゼ Ig G)を滴下し、室温で2時間反応させた。PBSで10分間洗浄後、ブロッキング液で50倍希釈した二次抗体(抗ウサギIg G-Gold conjugates: Φ 15nm)を滴下し、室温で1時間反応させた。

免疫染色終了後、常法の通り酢酸ウランおよびクエンサン鉛による二重染色をし、電子顕微鏡で観察した。

6. 観察結果

①アスパラガス根端部細胞のDNAの局在

アスパラガス根端部のDNAの局在写真を図1に示す。蛍光顕微鏡観察では、各細胞の核に蛍光物質が結合しているのがよくわかる。中心部には核小体が存在するためその部分は結合していない。また、切片が薄いため核が存在しない細胞がある。小さな点として結合しているのは、プラスチドDNAあるいはミトコンドリアDNAである(a)。電子顕微鏡観察では、核DNAは核内の比較的電子密度の高い部分に金コロイドが結合し広く散在し、プラスチドDNAは、電子密度の低い部分に結合し、局在していることがわかる(b)。ミトコンドリアDNAは、一部に金コロイドの結合がみられる(c)。

②タマネギ頂芽部細胞のアリナーゼの局在

タマネギ頂芽部のアリナーゼの局在写真を図2に示す。蛍光顕微鏡観察では、全ての細胞に蛍光物質の結合はなく、細胞核に結合していないことがわかる(a)。電子顕微鏡観察では、液胞中の電子密度の高い部分に金コロイドが結合し、低い部分には結合していない(b)。

7. まとめ

以上電子顕微鏡と蛍光顕微鏡による比較観察を実施したが、LR-WHITE樹脂は、間接蛍光抗体法が可能であると言えよう。免疫電顕法では観察視野が小さく、しかも金コロイドを観察するためには数万倍まで拡大しなければ確認できないため全体像(組織レベルでの物質の局在)を理解するには一苦勞である。しかし、間接蛍光抗体法の顕微鏡観察では一目瞭然である。今後この樹脂の利用増加が期待される。最後に、抗体を恵与していただいた北大農学部生物化学講座の皆さまに感謝する。

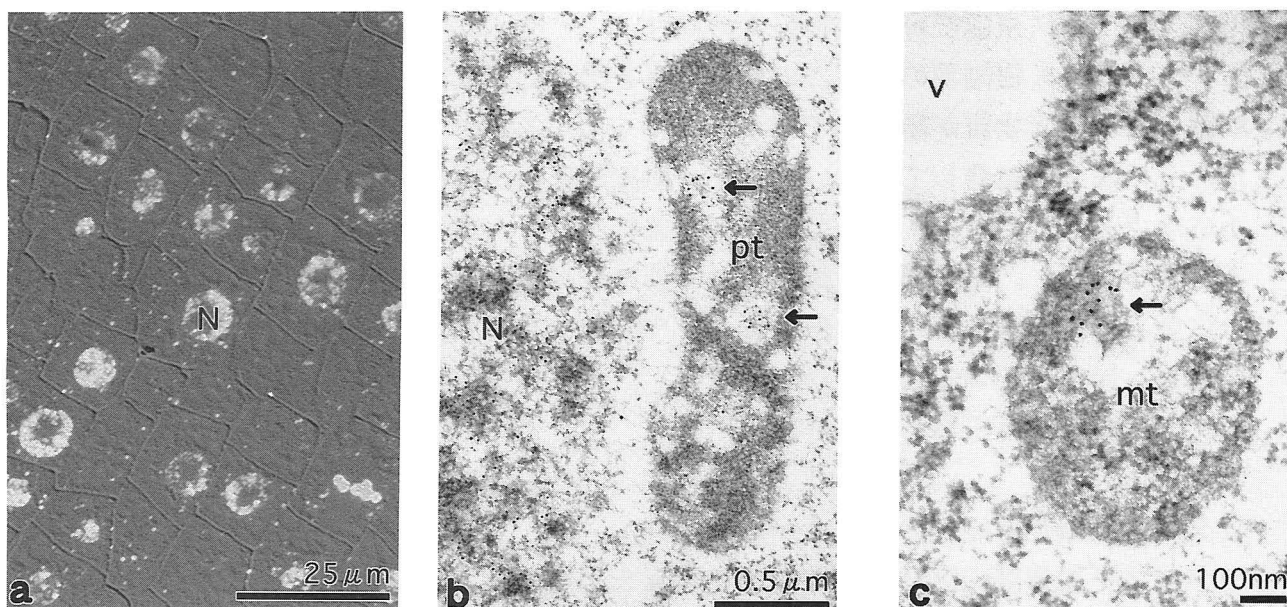


図1 アスパラガス根端部のLR-WHITE樹脂切片によるDNAの局在

- (a) 蛍光顕微鏡による観察、ノマルスキー像に蛍光像を重ねた。
細胞核 (N)
- (b、c) 電子顕微鏡観察による観察、金コロイド (矢印)。
細胞核 (N)、プラスチド (pt)、ミトコンドリア (mt)、液胞 (v)

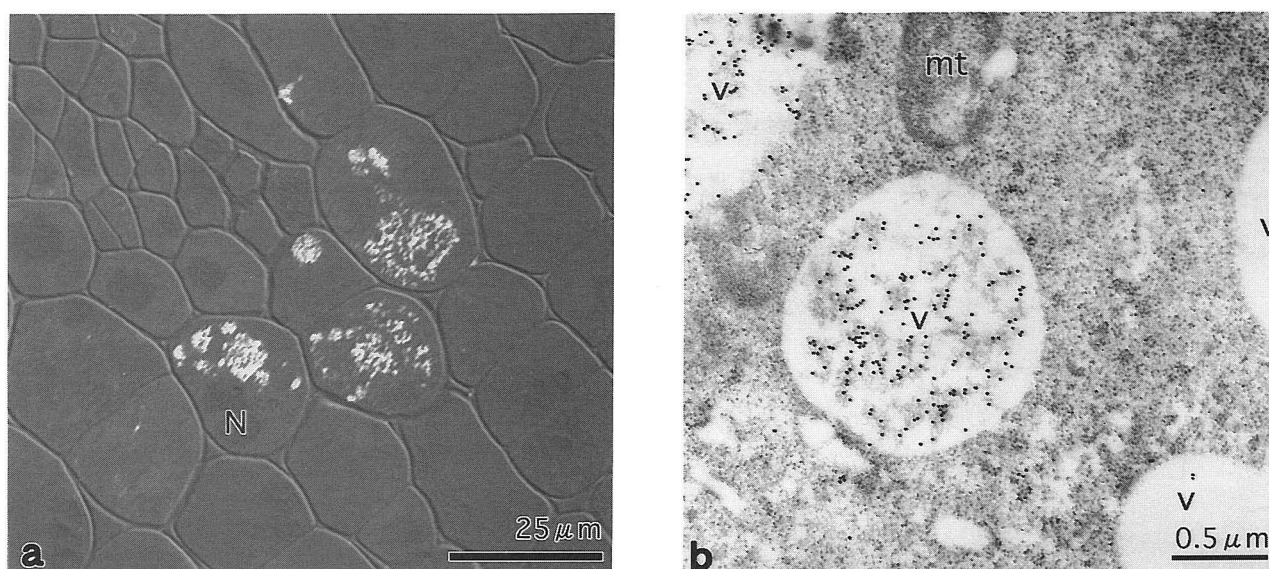


図2 タマネギ頂芽部のLR-WHITE樹脂切片によるアリナーゼの局在

- (a) 蛍光顕微鏡による観察、ノマルスキー像に蛍光像を重ねた。
細胞核 (N)
- (b) 電子顕微鏡観察による観察
ミトコンドリア (mt)、液胞 (v)