

生理学実習トレーニングコース

2009年8月24日～8月28日

実習題目

免疫電子顕微鏡法

担当者

脳形態解析部門 重本隆一、神谷絵美

岡崎市明大寺町字東山5-1

生理学研究所

TEL; 0564-59-5278

FAX; 0564-59-5275

e-mail; shigemot@nips.ac.jp

1.学問的背景

生体のはたらきを知るためには、まずその構造を知り、機能分子がその構造の中でいかなる分布、局在、動態を示すかを知ることが、基本的に重要である。電子顕微鏡レベルで分子の局在を可視化するためには、特殊な例を除き、特定の分子を選択的に、且つできるだけ高解像度で標識することが必要となる。免疫電子顕微鏡法(免疫電顕法)とは、超微形態レベルで抗原分子の局在を特異抗体を用いて観察する免疫組織化学法のことである。免疫電顕法としては酵素抗体法、酵素抗原法、金属標識抗体法、放射製同位元素標識法などがあるが、本コースでは神経科学で広く使われている酵素抗体法と金属標識抗体法を、神経伝達物質受容体の局在解析を例として紹介する。

電顕酵素抗体法の原理

根本原理は光学顕微鏡(光顕)を用いた場合とほとんど変わらない。すなわち、抗原抗体反応という特異反応を基盤とした免疫組織化学のひとつである。組織細胞中の抗原性を有する分子を、これと特異的に反応する一次抗体、一次抗体と特異的に反応する二次抗体を経て、酵素-horseradish peroxidase (HRP)で標識する。この酵素の触媒する化学反応により、基質-diaminobenzidine (DAB)から電顕的に観察可能な反応産物を生成、沈着させる。光顕の場合と違って、この酵素の反応産物に osmification を施して、電子密度の高い電顕観察が可能なものとする必要がある。

金属標識抗体法

上記の酵素抗体法では、酵素の反応産物が拡散してしまい、正確な抗原の場所が同定しにくいという短所がある。より高解像度で抗原分子の局在を観察するために金属標識抗体法では、金粒子(あるいは金コロイド)で標識した二次抗体を用いる。この方法を用いると、受容体などの分子の局在は、約 20nm の解像度で検出することができる。一方、一次抗体の反応を増幅する過程が少ないことから、検出感度は酵素抗体法に比べ低くなる。

Pre-embedding 法と Post-embedding 法

上記のような、検出系の違いによる方法の分類以外に、組織を電顕包埋して超薄切片を作成する前に免疫反応を行うか(Pre-embedding 法)、電顕包埋して超薄切片を作成した後に免疫反応を行うか(Post-embedding 法)、という違いによる分類がある。前者はより技術的に容易であり、感度も高いが、抗体等の試薬が厚い切片の表面近辺にしか浸透しない、あるいは postsynaptic density や synaptic cleft には浸透しにくいことによる false negative の問題がある。超薄切片の表面で免疫反応を行う後者はこのような問題が少なく、定量性もより高いが、技術的により困難であり、十分な感度を持って適用できる一次抗体が少ない、という欠点がある。

凍結割断レプリカ免疫標識法

凍結割断レプリカ免疫標識法は細胞膜上の受容体、イオンチャネル等の膜蛋白質や脂質分子を抗体等のプローブを介してレプリカ上で金標識する方法である。preembedding法やpostembedding法などの従来の免疫電子顕微鏡法に比べ以下のような利点と欠点がある。

利点

1. 2 次元的に膜上分子の局在を捉えられる。
2. 高感度で定量的な解析が可能。
3. immunoblot 法に適用できる抗体は多くの場合使用可能。

欠点

1. 脳などの複雑な組織の場合、細胞や膜ドメインの同定が困難。
2. 特殊な設備が必要。

受容体の免疫電顕を行うにあたっては、以上のような各方法のメリット、デメリットを十分吟味した上で、これらの方法を組み合わせる必要がある。

2.実験の手順

(A) Pre-embedding 法

[準備する試薬]

0.1M phosphate buffer (PB), 0.2M PB

PBS

TBS (50mM Tris-buffered saline) pH 7.4

Paraformaldehyde (PFA)

glutaraldehyde

picric acid

Triton-X100

Blocking solution

5% Bovine serum albumin

5% Normal goat serum

0.2% Cold water fish gelatin

in PBS

Incubation buffer

PBS

BSA-c (Aurion)

osmic acid

uranyl acetate

resin (Fluka durcupan ACM kit)

primary antibody

secondary antibody

biotinylated anti-rabbit (or mouse or guinea pig) IgG

immunogold labeled anti-rabbit (or mouse or guinea pig) IgG

Aurion の試薬類

[切片の作成]

1. 固定液を用意する。

*電顕用固定液の作り方

dH ₂ O	300ml～
PFA	40g (4%)
0.2M PB 500ml	ここで熱して溶解させる。 (溶解しないときは 2N NaOH を 4-5 drops たらす)
saturated picric acid	150ml (15%)

pH を 7.35 に合わせ、total 1000ml にメスアップして、これを氷冷しておく。

完全に冷えたら、析出したピクリン酸をろ過し、使用直前に 0.05%になるように glutaraldehyde を加える(注 1)。

注 1) 使用する抗体や望ましいマテリアルの固さによって glutaraldehyde の量は適宜調節する。

2. 動物の固定

ラットもしくはマウスを深麻酔下に灌流固定する。

氷冷した PBS で約 1 分程血液を洗い流し、その後ただちに上記の固定液を 12 分間灌流する。

ラット(BW 200-300g)では約 500ml、マウスでは約 100ml 程度の固定液が流れるように、ポンプの速度を調整する。とりだした脳は固定後 2-3 回 0.1MPB で wash する。

3. 切片の作成

microslicer (ビブラトーム)で、目的部位の入るような 50μm 厚の切片を作成する。切った切片は十分に PB で洗っておく。

[免疫染色]

1. 切片を TBS で洗う。次に PBS で洗う。
2. 0.05% Triton-X in PBS で20分間処理する。抗体などの浸透性をよくするため。
3. 切片を PBS で洗う。
4. ブロッキング

切片を blocking solution に 30-60 分間浸して非特異的吸着をブロックする。

5. 切片を Incubation buffer で洗う。10分間、2回。
6. 切片を Incubation buffer で希釈した 1 次抗体の液につける。

抗体を適当な割合で希釈し、切片を浸す。4℃で一昼夜震盪する。

7. 切片を Incubation buffer で洗浄。20 分 X 3 回
8. 切片を Incubation buffer で希釈した 2 次抗体に反応させる。

Biotin 標識 2 次抗体(Vecter)あるいは 0.8nm 金標識 2 次抗体(Aurion)を希釈し、切片を 4℃で一晩震盪する。

9. 切片を Incubation buffer で洗浄、10 分 X 4 回。次に PBS で洗浄。10分間、2回。

ここから先、DAB 染色で発色する場合は以下の 10-12 へ、immunogold 法を用いる場合は以下の 13-19 に進む。

10. ABC 反応

Avidin Biotine Complex (Vecter, ABC standard, 1:100)は 30 分前に調整。

切片を ABC 溶液で約 1-2 時間反応させる。

11. 切片を PBS で洗浄。10 分 X 2 回、さらに Tris/Cl で 1 回洗浄。

12. DAB 染色

切片を 0.02% DAB 溶液 (dissolved in Tris/Cl) で 20 分間 pre-incubation する。その後、同じ溶液に 0.0003-0.003%の H₂O₂ を加えて発色する。

切片は発色後は PB で洗浄する。10 分 X 2 回。

このあと 20 のオスミウムの反応へ。

13. immunogold 法用の切片を PBS で十分に洗浄。5 分 X 2 回。

14. 切片を 2% glutaraldehyde(in PBS, 10 min)で後固定する。

15. 切片を PBS で洗浄。5 分 X 2 回。

16. さらに切片を ECS (Aurion) で洗浄。10 分 X 4 回。

17. 銀増感反応。

銀増感用の SE-EM (Aurion)で 90 分間反応。

反応後、取り出して検鏡し、目的の染色がうっすらとわかる程度に増感する。

18. 切片を ECS で洗浄。10 分 X 4 回。

19. PB で洗浄。10 分 X 2 回。

20. 1% OsO₄ in 0.1M PB で後固定。25 分。

このときに、切片が折れ曲がらないように気をつける。

なるべく切片を底に張り付かせるような感じで。

21. dH₂O で洗浄。10 分 X 2 回。

22. 1% 酢酸ウランで電子染色。35 分。暗所で。(注 3, 4)

注 3) 時間を節約したいときは 1% uranyl acetate in 70% EtOH を作製して、脱水と同時に uranyl acetate 染色を行ってもよい。

注 4) uranyl acetate は溶けにくいので、20 の段階で作成し、よく攪拌する。

23. 脱水。

50% EtOH より脱水開始。10 分ずつ 70, 90, 95, 100 (2 回), 無水 EtOH と上げていく。(注 5)

100% EtOH 終了後、100% EtOH をガラスの vial 瓶に置いて、切片を移す。さらに無水 EtOH で 10 分脱水する。

注 5) 厳密に flat にしたいときは、70%EtOH の段階でスライドガラスとカバーガラスに切片をにはさみこみ、重しをのせて、周囲からアルコールを滴下して脱水する。

24. プロピレンオキシドに置換。

切片は試料瓶に残し、アルコールを捨て、プロピレンオキシドを注ぎ入れる。10 分 X 2 回。乾かないように素早く。

25. レジン作成。

Fluka durcupan ACM kit で、重量比 A:B:C:D=10 : 10 : 0.3 : 0.3 になるように混ぜ合わせる。

なかなか混ざらないので 22 の段階であらかじめ作成しておくが良い。

26. 切片をレジンになじませる。

アルミホイルで作った容器にレジンを注ぎ入れ、切片を馴染ませる。室温で一晩おいておく。

補) immunogold と DAB 反応の二重染色

一次抗体、二次抗体は両方一緒に混ぜてよい。

銀増感をした後に、ABC→DAB 反応をする。逆の場合は DAB 粒子まで増感されてしまう。

[平板包埋]

スライドガラスの上に resin を垂らして section を乗せる。

重なった部分がないように実体顕微鏡で確かめる。

その上にシリコンコート(or シランコート)したカバーガラスを載せ、周囲にはみ出た resin を小さく切ったろ紙で吸い取る。できるだけ resin が薄くなるように、上に鉛の重しを載せておく。(5 分 -1 時間.) この操作は hot plate の上で行ったほうがよい。その後ろ紙や重しを取り除き、60℃で一晩以上重合させる。

[円柱包埋]

1. 両刃剃刀でカバーガラスをはずす。
2. 検鏡して切り出す部分を決定。
3. 実体顕微鏡で 0.5-1mm 四方を切り出す。
4. レジンをつけたつま楊子で切り出した部分をすくい上げてスライドガラスの上に載せ、上からもう一枚スライドガラスを載せ、実体顕微鏡で見ながら、上から押さえて、resin を平らにする。
5. スライドガラスをはずし、カバーガラスをかけて検鏡。見たいものが表にあるのか裏にあるのか確認。裏にあればそのまま OK. 表なら裏返す。実際にこのあと包埋したときにものが一番表面にくるようにするため。
6. ビームカプセルを、切り出した切片が中央になるように上にかぶせて、その中に抗体、部位、日付などを鉛筆で書いた小さい紙をまるめていれて、上からレジンを山盛

りになるまで注ぎ込む。その上にカバーガラスを載せて、平らになるようにする。そのまま 60℃で 2 昼夜重合させる。

[トリミング]

1. 円柱形の容器より固まったレジンを取り出す。
2. 目的の部分の周囲をステンレス剃刀で削り、目的の切片の周囲にピラミッドを作る。さらに細かく周囲まで両刃剃刀で削って整える。
3. 表面のトリミング。ガラスナイフである程度の近さまで近づける。ナイフ面と切片が平行になるようにあわせる。その後ぎりぎりまで近づける。Semithin モード(0.5μm)で面出しする。
4. ある程度面が出たら、はずしてもう一度検鏡し、さらに周囲を 両刃剃刀の刃で細長い台形を作成するようにトリミングする。

[超薄切片作成]

1. 最終的にもう一度検鏡。レジンの表面から切片までの深さを計算する。
2. ダイヤモンドナイフの刃をセット。
3. dH₂O をたっぷり注ぎ、その後水を引いて適量に調節。
4. ぎりぎりまでナイフを近づけ、ultrathin section にして 50-75nm に設定。
5. 超薄切片を切る。連なって切れてくるので、水を動かして手前に持ってくる。
6. あらかじめ膜を張った one slot grid を用意。これを半分ほど水に沈めて切片をヒョイとすくう。
7. grid を乾燥させたあと、その後すぐ電顕で検鏡できる。

(B) Post-embedding 法

[準備する試薬]

0.1M phosphate buffer (PB), 0.2M PB

PBS

Paraformaldehyde

Glutaraldehyde

picric acid

10% ,20%,30% glycerol in 0.1M PB

liquid propane cooled by liquid nitrogen

dry methanol

Lowicryl HM20

uranyl acetate

ethanol

Na-ethanolate

Blocking solution (BS)

2% human albumin in TBS (0.9% NaCl) + 0.1% Triton X-100

BS+ polyethylene glycol 6000 (PEG, 5mg/ml)

Lead citrate

primary antibody (rabbit, mouse, or guinea pig)

immunogold (10nm or 15nm) labeled anti-rabbit (or mouse or guinea pig) IgG

[凍結置換法による Lowicryl ブロックの作成]

1. 動物の固定までは、preembedding 法と同じ。
2. 観察したい脳部位から microslicer で 500 μ m の厚さのスライスを切る。
3. 作製したスライスを cryoprotection の溶液 (10% ,20%,30%glycerol in 0.1M PB)に 30 分ずつ浸す。
4. 500 μ m $\times$ 1500 μ m くらいの大きさにトリミングする。

5. -185°C に冷却した液体プロパン中に落とし込み凍結する。(Leica CPCを用いる)
6. Leica AFS を用いて凍結置換する。

1% uranyl acetate in dry methanol, -90 °C で 24 時間

4 °C /時間 で温度を-45 °C へ

dry methanol で 2-3 時間おきに3回洗浄

dry methanol: Lowicryl=1:1, -45 °C, 2-3 時間

dry methanol: Lowicryl=1:2, -45 °C, 2-3 時間

Lowicryl, -45 °C, 48 時間

UV による重合、-45 °C, 24 時間

5 °C /時間 で温度を 0 °C へ

0 °C, 36 時間

[切片の作成と免疫反応]

1. ultramicrotome にて 85nm の超薄切片を作成する。切った切片は glue で mesh grid に貼り付ける。
2. grid を Na-ethanolate に2秒間つけて etching を行う。
3. dH₂O で洗浄。
4. grid を blocking solution に 60 分間浸してブロッキングする。
5. 一次抗体を blocking solution で希釈し、grid を浸す。室温で一晩静置する。
6. TBS で洗浄。
7. 二次抗体を blocking solution+ PEG で希釈し、grid を浸す。室温で 3-5 時間。
8. TBS で洗浄した後、dH₂O で洗浄し乾燥させる。
9. Uranyl acetate と Lead citrate で電子染色。

(C) 凍結割断レプリカ免疫標識法

I 背景

凍結割断レプリカ法は細胞膜の二次元的な形態を電子顕微鏡で観察する方法とし

て 1960 年代に開発された。凍結割断レプリカはギャップジャンクションやタイトジャンクションなどの観察には優れた標本であったが、膜表面の形態情報が少ない事や脳などの細胞構築が複雑な組織では細胞種の同定が必ずしも容易ではないことから、その応用は比較的狭い領域に限られていた。しかし、1995 年になり故藤本和博士により SDS 処理凍結割断レプリカ標識法 (SDS-digested Freeze-fracture Replica Labeling, SDS-FRL) が開発された。この方法は膜内粒子等の膜表面レプリカ形態の上に抗体などの特異的プローブによって複数種の分子を金コロイド標識によって同定する事を可能とし、凍結割断レプリカ法の応用範囲は広がった。この方法によりギャップジャンクションを構成する connexin やタイトジャンクションの occludin 以外にも、膜内粒子だけでは同定できなかった膜ドメインに存在する各種受容体、チャネル、トランスポーター、接着分子、細胞膜の裏打ち分子などの膜蛋白質や足場蛋白質が検出できるようになった。また特に SDS-FRL 法の特徴として、特定の脂質成分の分布を検出することにより、膜ドメインの可視化が可能になった事が挙げられる。我々の部門では脳組織を用いて、グルタミン酸受容体、GABA 受容体、グルタミン酸トランスポーター、GABA トランスポーター、イオンチャネル、水チャネル、伝達物質放出関連蛋白など 100 種を超える機能分子について SDS-FRL 法によるスクリーニングを行ってきた。その結果、この方法が従来の免疫電顕法に比べ数々の有利な点をもっており、従来法を補完する方法として大変優れている事を見出した。特に、細胞膜蛋白質分子がレプリカ膜裏面に 2 次元的に露出される事から標識効率がきわめて高く、非常に定量的な分布解析が可能となった。またグリッドマップ法や単一膜由来の相補的なレプリカ膜面を対応させる方法によって、さらに得られる情報は増大する。

II SDS-FRL 法の実際

1) 脳切片の作成

我々の部門では、藤本の原法を脳組織のオリエンテーションを保ち細胞の同定が可能となるように改良し、固定脳の切片や未固定脳スライスに用いている。他の組織でも凍結割断レプリカを作製できる標本であれば同様に免疫標識できると思われる。ただ化学固定や下記の SDS 処理の最適条件は組織によって、また標識する分子によって個別に検討する必要がある。固定を強くするほど組織構造の保持はよくなるが、得られる膜レプリカ断片が小さくなり像の解釈が困難となることがある。免疫反応についても Immunoblot 法で検出可能な分子は同じ抗体を用いれば SDS-FRL 法でも基本的に検出可能である事が多いが、化学固定によって抗原性が変化したり結合蛋白質によって抗原がマスクされたりする等の理由により、弱い固定あるいは未固定の標本の方が検出効率がよいこともある。我々の用いている標準プロトコルを次ページに示す。

2) 加圧凍結装置による凍結

我々の部門では、加圧凍結装置 (HPM010) を用いて試料キャリアに挟んだ脳切片を凍結している。これにより、大量の切片から比較的よい形態を保持した標本を安定して得ることができるようになった。また化学固定した組織だけでなく、未固定の脳スライスを凍結する事も比較的容易である。他の方法でも割断レプリカが安定して得られているようであれば、SDS-FRL 法を適用する事に問題はないと思われる。凍結した切片は液体窒素中で長期保存が可能である。

3) 割断と蒸着

キャリアに挟んだ状態で凍結保存された切片は、ダブルレプリカテーブルにセットし

て、凍結切断装置 (BAF060) で切断、蒸着を行う。凍結試料の温度を一定温度によく保ってから切断し蒸着する事が、安定して良い形態のレプリカを得るためには重要である。細胞膜分子の保持をよくするために蒸着はカーボン、プラチナ・カーボン、カーボンの順序で行う。レプリカ面全体で均一な分子の保持を得るために最初のカーボンは垂直方向からの回転蒸着を行う。切断面の陰影をつけるプラチナ・カーボンについては目的に応じて 60 度の一方向蒸着または 25 度の角度での回転蒸着を行う。最後のカーボンは垂直方向からの回転蒸着を行い、レプリカ膜に強度を与える。

4) レプリカの SDS 処理

得られたレプリカは SDS 溶液中で一晩揺らせながら処理したり、短時間オートクレーブにかけるなどして裏側に残った組織の溶解除去を行う。この時の界面活性剤の濃度、温度、時間等の溶解条件は組織の種類、化学固定、標的分子によって個別に適化する必要がある。切片全体のオリエンテーションを保つためにできるだけ大きなレプリカをとり、最後にグリッドに載せるまでそれを保持するようにする。それが困難な時やより詳しい細胞構築の情報が必要な場合はグリッドマップ法を行う。

5) グリッドマップ法

蒸着された組織をそのまま Lexan プラスチックを使って番地つきグリッドに貼り付け、核染色を施した後、光学顕微鏡写真を撮影する。これによりグリッドの番地と細胞構築を後で対応させる事ができる。グリッドに載せたレプリカはそのままの状態組織の溶解と免疫反応を行ったのちに、さらに標識面にカーボンを蒸着する。最後に Lexan を溶解させてレプリカをグリッドにオリエンテーションを保ったまま固定する。詳しくは下記のプルトコルを参照。

6) 免疫反応

他の免疫標識法と同様、よい結果を得るために最も重要な事は、一次抗体の標的抗原に対する親和性と反応特異性である。最近はノックアウト動物を用いる事により標識の特異性を容易に確認できるようになったが、一次抗体の濃度や反応時間、温度、一次抗体溶液組成などを至適化する重要性は変わらない。二次抗体は金コロイドのついた市販のものを使用するが、一般にサイズが小さいほど感度は高くなる傾向がある。異なる種の一次抗体とサイズの違う金コロイドを結合した二次抗体を使えば多重染色も可能である。

7) 電顕観察

免疫反応を終了したレプリカはコロジオン膜を貼ったグリッドに載せ、乾燥後、透過型電子顕微鏡で観察する。細胞構築のオリエンテーションが必要な場合はその前に反射光による実体光学顕微鏡写真を撮影すると大まかな構造が分かり有用な事が多い。凍結状態の細胞膜は切断時に脂質二重層の疎水性領域を境に二分され易いため、細胞質に面した脂質面 (protoplasmic face, P-face) と細胞外に面した脂質面 (exoplasmic face, E-face) の相補的な膜面が暴露される。そこでこれら相補的なレプリカ膜面を対応させる場合は組織構造のパターンから同じ場所を光顕上で探し出す。その後電子顕微鏡下で細胞体等の大きな構造を手がかりに対応する膜面を同定する。

免疫標識についてはステレオ観察により金コロイドが蒸着面の裏側にあるのを確認する。もし蒸着面上にあればそれは非特異的結合であると判断できる。また用いた抗体が細胞膜内の分子ドメインに反応するものであれば、標識は P 面に認められるはずである。逆に細胞外ドメインに対する抗体であれば E 面に標識が認められなければならない。そうでない金コロイド標識については非特異的結合、あるいは溶解されず残っ

た隣接膜面への標識であると判断できる。溶解されず残った組織が付着している場合はレプリカのところどころに影のような残渣が観察され、溶解条件を検討する必要がある。

8) 定量的分布解析

定量的な解析法については目的に応じて様々な方法があるが、我々の部門では神経細胞のシナプス内およびシナプス外での膜蛋白質標識の数や密度、分布パターンを Digital micrograph や AnalySIS といった電子顕微鏡用画像解析ソフトを使って解析している。

生理学研究所 脳形態解析部門での標準プロトコル

SDS-FRL protocol

Tissue preparation;

Fresh, or paraformaldehyde (2 or 4%)-fixed brain

Slice at 150 μ m or less

Fixed materials should be immersed in 30% glycerol or sucrose in 0.1 M PB for one overnight

Freezing;

HPM 010 using copper carrier pair with a spacer ring made of sticky tape

Replication;

BAF 060 fracture and replicate at -120° C

Coating parameter;

1 st layer	Carbon 5 nm from vertical position with rotation
2 nd layer	Platinum 2 nm from 60° unidirectional
3 rd layer	Carbon 15-20 nm from vertical position with rotation

Removal of attached tissue: Choose one of three conditions below

1. Autoclaving at 105° C for 15 min
2. Incubation in SDS solution at 80° C for one overnight on a shaker
3. Incubation in SDS solution at 60° C for one day and 35° C for one

day on a shaker

SDS solution: 2.5% SDS and 20% sucrose in 15 mM Tris buffer (pH 8.3)

SDS-FRL procedure

Wash with fresh SDS solution

Wash x 3 with Washing Buffer (WB, TBS + 0.1% Tween-20 + 0.05% BSA + 0.05% NaN₃)

Blocking at room temperature for 30 min with 15 •l of blocking buffer (WB + 5% BSA)

Add primary antibody (15 •l, final 30 •l) and incubate for one overnight at 15 ° C on a shaker (60 rpm)

Wash with WB x 3

Blocking (15 •l) for 30 min at room temperature

Add 2nd Ab (15 •l, final 30 •l, final dilution 1/30) at 37 ° C for 1 h

Wash with WB x 3

Wash with MilliQ water x1

Pick-up replica on a grid

グリッドマップ法

Grid map protocol

- 1 Transfer replica-table onto the brass block in drying chamber immediately after replication with BAF060, and leave it for 2 min for temperature equilibration and complete water evaporation.
- 2 Transfer each replicated sample with carrier onto a carrier holder.
- 3 Carefully remove adhesive tape around the sample.
- 4 Dry the surface of replica by N₂ flow for 1 min.
- 5 Dip a gold finder grid into 1.5-2% Lexan solution in 1, 2-dichloromethane, and place it on a replica under a stereomicroscope.
- 6 Make sure that the grid is placed in parallel to the sample.
- 7 Add one drop of Lexan to fill space between the replica and grid if necessary.
- 8 Leave the grid on replica for 2 min so that solvent can evaporate completely.
- 9 Transfer carriers into a cup filled with PBS.
- 10 Peel the excess Lexan coat around the grid off with ceramic forceps and leave samples for 2 min in PBS.
- 11 Gently agitate the carriers to separate tissue and replica from the carrier.
- 12 For identification of tissue orientation on the grid, incubate the replicas attached with grid with H33342 solution (1 •g / ml in PBS) for 30 min and then wash them with PBS.
- 13 Observe the replicated tissue by a fluorescence microscope (UV excitation, blue

emission) equipped with a water-immersion objective lens, and record the geometry of tissue on the finder grid by a CCD camera.

14 For removal of tissue from the replica, autoclave them in a Tris HCl solution (pH 8.3) containing 2.5% SDS for 30 min @ 121° C.

During step 15-16, gentle agitation should be applied using a shaker.

15 After several washes in PBS, replicas attached to grids are now ready for labelling.

Immunoreaction should be done in 50 µl of solution in 2ml tube.

16 After immunolabelling steps, wash them with distilled water and air-dry completely.

17 Coat the labelled surface of them with 10 nm Carbon at room temperature.

18 Remove Lexan resin from the grid attached replica as follows.

Place each grid into well of a round bottom ceramic tray filled with 5ml 1, 2-dichloromethane.

Leave it for 30 min

Transfer a grid into next well of a round bottom ceramic tray filled with 5ml 1, 2-dichloromethane 5min. Repeat this step 4 times.

Rinse twice with 1, 2-dichloromethane and then air-dry.

(3) 参考文献

- 1) 現場で役立つ電子顕微鏡試料作製法 関西電子顕微鏡応用技術研究会編 金芳堂 1999.
- 2) 酵素抗体法 改訂三版 渡辺慶一、中根一穂編 学際企画 1992.
- 3) The Fine Structure of the Nervous System; Neurons and Their Supporting Cells, Alan Peters, Sanford L Palay, Henry deF Webster, Oxford University Press 1991.
- 4) 重本隆一. 膜分子をみる:凍結割断レプリカ免疫標識法. 日本組織細胞化学会編 組織細胞化学 2005, 67-72, 2005.
- 5) 重本隆一, 深澤有吾. 凍結割断レプリカ免疫電子顕微鏡法. 生体の科学 57, 273-280, 2006.
- 6) Masugi-Tokita M, **Shigemoto R.** High-resolution quantitative visualization of receptors at central synapses. Current Opinion in Neurobiology, 17:387-93, 2007.
- 7) Fukazawa Y, Masugi-Tokita M, Tarusawa E, Hagiwara A **Shigemoto R.** SDS-digested Freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL). In: 'Handbook of Cryo-Preparation Methods for Electron Microscopy', Cavalier Annie, Spehner Danièle, Humbel Bruno M. (eds). CRC Press Inc, Boca Raton, USA, 2009.
- 8) Fukazawa Y, **Shigemoto R.** Glutamate receptor organization: Ultrastructural insights. In: 'Encyclopedia of Neuroscience', Adelman G, Smith BH (eds). Elsevier, Neatherland, 2008.