



テクニカル レポート 203:

# 光学顕微鏡、電子顕微鏡 の技法

## Flex I<sup>®</sup> 培養プレートの細胞観察

Document: Microscope Techniques Tech Report, Rev 1.1

06-24-2009

*Culturing Cells in a Mechanically Active Environment<sup>™</sup>*  
Flexcell International Corporation • 437 Dimmocks Mill Road, Suite 28 • Hillsborough, NC 27278  
800-728-3714 • (919) 732-1591 • FAX: (919) 732-5196 • [www.flexcellint.com](http://www.flexcellint.com)

COPYRIGHT © 2009 FLEXCELL<sup>®</sup> INTERNATIONAL CORPORATION



## 光学顕微鏡用 組織化学染色

明視野顕微鏡、位相差顕微鏡、  
偏光顕微鏡

1. **ギムザ染色**: Flex I® メンブレン上の培養細胞の一般染色
  - a. 酢酸メタノール(氷酢酸 1容量、無水メタノール 3容量)で細胞を固定します(5分間、25°C)。
  - b. 固定液を吸引し、1%ギムザ染色液(酢酸メタノール溶液)を加えます。染色液は、使用直前に0.22 ミクロンのフィルターでろ過してください。2分間(25°C)染色します。
  - c. 染色液は吸引して保存します(細胞に放射性物質を使用していなければ、染色液は再度使用することができます)。使用前に再ろ過してください。
  - d. 細胞を60%メタノール水溶液で1-2分間静かに洗浄します。液を吸引して、洗浄を繰り返してください。細胞が明るい赤色に染まってきます。
  - e. ウェルのラバーをプラスチックプレートから外してください。メンブレンは幾つかの扇形小片にカットし、カバーガラスを載せ、光学顕微鏡で観察します。

**ご注意:** 一般染色としてこの方法はうまくいき、ラバー面への細胞接着を損なうことはありません。

2. その他、クリスタルバイオレット(crystal violet)、コッサ(Von Kossa)によるリン酸カルシウム染色、アリザリンレッド(Alizarin Red)によるカルシウム染色などの染色法が用いられます。
  - a. Von KossaとAlizarin Redの場合は無酸性の固定液が最適で、60%メタノール液を使用することができます。細胞のシート面に割れ目ができるかもしれませんが、細胞はその状態において保存されます。
  - b. その他の固定液としては、2%中性緩衝ホルマリン液あるいは4%パラホルムアルデヒドがお勧めできます。

## 落射蛍光顕微鏡(EPIFLUORESCENCE)

1. この場合、フルオレセイン(fluorescein)やローダミン(rhodamine)蛍光色素で使用される波長においては、シリコンラバー材のバックグラウンド蛍光は無いが無視できるくらいです。
2. 上記と同じ手順に従ってください。
3. カバーガラスと用いる封入剤および油浸オイルは無蛍光性であることを確認してください。
4. Flex I® メンブレンは幾つかの小片にカットして、強力瞬間接着剤あるいはシリコン性接着剤でスライドガラスに接合することもできます。この小片の上面に、蛍光色素あるいは他の色素を注意深く添加することも可能です。複数の蛍光プローブやその他の染色を同一の細胞集団に対して適用する必要がある場合、この技法は便利でしょう。さらに、使用する蛍光色素量を制限することができます。費用の節約にもなります。

## 透過型電子顕微鏡用 試料調製

### 固定法

1. メデュームを細胞から吸引する必要があります。加温(37°C)したリン酸緩衝生理食塩水(PBS、pH7.2)でシート状の細胞を静かに洗浄してください。
2. PBSを細胞シートから吸引し、4%パラホルムアルデヒドの0.1Mカコジル酸緩衝溶液(pH7.4)で5分間固定します。
3. 2%四酸化オスミウムのカコジル酸緩衝溶液(pH7.4)で細胞を後固定することもできます。細胞は、その後カコジル酸緩衝液で2回洗浄します。

### 脱水法

細胞は、アルコール濃度の段階的上昇(50-100%)による脱水法で脱水します。

### 包埋法



1. 細胞がFlex I® プレートウェル内のメンブレン上にある状態のままで、エポン(EPON)あるいは他の包埋用樹脂で包埋します。
2. 包埋樹脂が硬化したら、EPONのブロックを培養プレートのウェルから一個の円盤として取り出してください。
3. ここで細胞はEPON円盤の底面側に位置することになります。円盤から直接でも、さらに複数の小片にしてからでも切り出すことができ、周囲部から中心部へと、作製される切片の方向性を維持しながら行ってください。

## 走査型電子顕微鏡用 試料調製

### 固定法

細胞の洗浄と固定については、アルコール濃度の段階的上昇による脱水ステップも含め、上述の方法で行うことができます。

### 脱水法

さらに乾燥させるために、細胞をヘキサメチルジシラザン(hexamethyldisilazane、HMDS)で5-30秒処理を行います。標本をドラフトチャンバー内室温で風乾することも可能です。

### 切片作製法

ラバーメンブレン切片を、細胞が接着した状態で切り出すことができます。これをアルミニウム台に載せ、金-パラジウムでスパッタリング薄膜処理後、走査型電子顕微鏡で解析します。