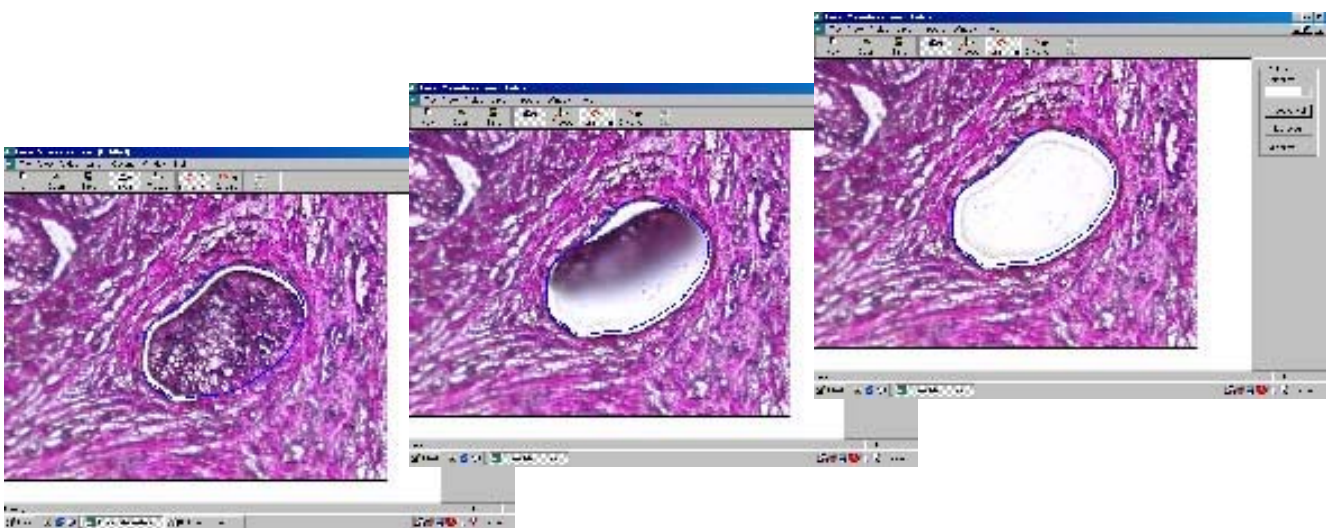


AS LMD

Application Solutions Laser Microdissection System

LMD Sampling Manual



2005 年 1 月改訂

AS LMD Sampling Manual

1 . サンプルングまでの準備-----	2
1 - 1 . ポリエルリジンによるフォイルのコーティング-----	2
1 - 2 . フォイル付きスライドガラスの滅菌-----	2
2 . 標本の作製と染色-----	3
2 - 1 . 染色の必要性-----	3
2 - 2 . 凍結サンプル-----	3
2 - 3 . パラフィン包埋サンプル-----	6
2 - 4 . 培養細胞-----	8
2 - 5 . サイトスピン-----	9
2 - 6 . 血液スメア-----	9
2 - 7 . 染色体-----	9
3 . サンプル回収後の処理-----	10
3 - 1 . DNA の抽出-----	10
3 - 2 . RNA の抽出-----	11
3 - 3 . RNA からの cDNA 作製-----	12
3 - 4 . PCR-----	13
3 - 5 . タンパク質の分析-----	14
4 . アプリケーション例-----	15
4 - 1 . 肺凍結サンプルからの RNA 抽出 (固定方法の検討) -----	15
4 - 2 . 腎臓系球体からの RNA 抽出と RT-PCR-----	17
4 - 3 . 運動神経細胞の回収と定量リアルタイム PCR-----	19
5 . 参考-----	22
5 - 1 . 参考文献-----	22
5 - 2 . フォイル付きスライドガラスの作製-----	23
5 - 3 . 凍結標本作製のための参考資料 - 冷凍剤の融点と沸点の関係 (1) -----	26
5 - 4 . 凍結標本作製のための参考資料 - 冷凍剤の融点と沸点の関係 (2) -----	27
5 - 5 . 凍結標本作製のための参考資料 - 表面張力の関係 -----	28

1 . サンプルングまでの準備

AS LMD での標本作製には必ずフォイル付きスライドガラス(90FOIL-SL25)、またはフォイル付きカバーガラス(90COVER-GLASS25)が必要です。

スライドガラスのフォイル面に標本を貼りつけてください。

また、サンプルの回収には PCR チューブが必要となります。別途ご準備下さい。

・ 0.5ml 用 エッペンドルフ社PCRチューブ

PCR-tube 0,5ml (500本) Order-No.: 0030 124.502

・ 0.2ml 用 BIOZYM社PCRチューブ

PCR チューブ 0.2ml 用 (1000 本) Order-No.: 23710920 ¥14,000

(ライカマイクロシステムズ取り扱い品)

1 - 1 . ポリエルリジンによるフォイルのコーティング

染色中にフォイルから切片が剥がれやすくなることがあります。染色中の切片の剥離を防止するためポリエルリジンでフォイルをコーティングします。

・ パラフィン包埋標本作製する場合はキシレン処理等でサンプルがフォイル面から非常に剥がれやすい状態になります。パラフィン包埋標本の場合は必ず事前のポリエルリジン処理を行なってください。

・ 凍結標本の場合も剥がれやすいものがありますので必要に応じてポリエルリジン処理を行なってください。(薄切の厚いサンプル、接着面の少ないサンプル、凍結してから長時間経っているサンプルなど)

フォイル付きスライドガラスのフォイル面にポリエルリジン (SIGMA、P8920) を 1 滴滴下しピペットの腹でフィルム面一面に伸ばします。ポリエルリジンが乾燥すれば完成です。

参考) ポリエルリジン以外では BSA でコートする方法で良好な結果が得られています。

BSA 法

BSA (ホールインセラムアルブミン) を蒸留水で 1% に薄めた液にスライドを浸す。乾燥後 25% グルタルアルデヒドに 2 ~ 3 回、各 3 分間浸した後、蒸留水を 2 ~ 3 回、各 3 分間浸し乾燥後使用する。

1 - 2 . フォイル付きスライドガラスの滅菌

フォイル付きスライドガラスは出荷時に UV 照射されています。その他、オートクレーブ滅菌、乾熱滅菌 (180、8 時間 または 200、2 時間) などが可能です。

RNase 除去用の市販リムーバースプレーなども有効です。

必要に応じて滅菌を行なってください。

ただし、フィルム面へポリエルリジンコートを行う場合、乾熱滅菌処理によりポリエルリジンは効果がなくなってしまいます。ポリエルリジンコートを行う場合は滅菌処理の後に行なうようにして下さい。

2 . 標本の作製と染色

AS LMD でのサンプル回収にはフォイル上へのサンプルの固定が不可欠です。ここでは凍結標本の作製方法、パラフィン包埋標本の作製方法を中心に説明します。

2 - 1 . 染色の必要性

染色は形態観察のために必要です。

AS LMD を使うためにはフォイル付きスライドグラスへのサンプリングが必要ですが、フォイル自体は各種溶媒や熱処理も可能なので、通常の HE 染色、トルイジンブルー染色のほかにも免疫染色等も通常通りのプロトコールで問題なく可能です。

ただし、最終的にカバーガラスをせずドライアップさせることが基本になりますので通常よりも濃い染色に仕上がります。染色液の濃度と時間は通常よりも薄い濃度・短時間での染色を心がけてください。

凍結サンプルからの RNA 分析のように短時間で全ての処理を終わらせなければならない場合はトルイジンブルーなどの簡便な染色で行ないます。

無染色標本について

実験の内容によっては無染色・無処理でのサンプリングが必要になる可能性も考えられます。

- ・ 凍結標本で薄切後の処理ができない場合、OTC コンパウンドで包埋すると OCT コンパウンドの影響でレーザーでの十分なカットングができないことがあります。薄切後の処理ができない場合は OCT コンパウンドに包埋せず、そのまま凍結して下さい。
- ・ 無染色でマイクロダイセクションを行なう場合、染色がある場合と比べてカットングにより強い条件でのレーザー設定が必要になります。
AS LMD では、標本がレーザーの UV (337.1nm) を吸収することにより標本を気化することでカットングを行ないます。無染色の標本の場合、標本が UV を吸収せずに反射してしまい、カットング効率が落ちてしまいます。
レーザーでの鋭いカットを行なうためには UV を吸収しやすい青・紫系の染色(トルイジンブルーなど)が最適です。

AS LMD を使用する場合はできるだけ染色するように心がけてください。

脳などの柔らかい標本では、あまり問題は起こりませんが、特に皮膚細胞のような UV を反射しやすい標本では染色の有無で切れ味が劇的に変わってしまうこともあります。

2 - 2 . 凍結サンプルの作製

必要な試薬類

- ・ OCT コンパウンド
- ・ 凍結溶媒（液体窒素 / n-ヘキサンやドライアイス / アセトン等）
- ・ RNase - Free 水（DEPC 処理水や市販の RNase - Free 水）
- ・ エタノール / 酢酸 = 19 : 1 溶液
- ・ トルイジンブルー溶液（粉末を RNase - Free 水に溶かし、適度な濃度に調整して下さい。）

1) 凍結ブロックの作製

RNA・タンパク質の分析には凍結サンプルをご使用下さい。

分析するサンプルを OCT コンパウンドに包埋し、液体窒素 / n-ヘキサンやドライアイス / アセトン等で凍結して下さい。（6 - 2 . 凍結標本作製のための参考資料 - 冷凍剤の融点と沸点の関係（1）p25 参照）

OCT コンパウンドで包埋した場合、OCT コンパウンドの影響でレーザーでのカッティング時に標本が切れにくくなることがあります。切片作製時の水洗ステップで OCT コンパウンドはしっかりと洗浄して下さい。

水洗・染色等の作業ができない場合は、OCT コンパウンドに包埋せず、サンプルを直接凍結する。植物のような硬い標本の場合は OCT の代わりに水で包埋する等の処理を行なってください。

2) 切片の作成

凍結ブロックを作成しクリオスタットにセットします。

フォイル付きスライドガラスを氷冷しておきます。

クリオスタットで凍結切片を作成しフォイル付きスライドガラスに貼りつけます。



エタノール / 酢酸 = 19 : 1 溶液（氷冷）に 3 分間浸します。（サンプルの固定）p15 参照

氷冷水に 1 分間浸します。（RNase - Free の水で水洗：OCT コンパウンドの除去）

トルイジンブルー溶液で染色

(0.05%溶液、30sec ~ 1min 染色液の濃度と時間は標本の種類・切片の厚さによって変更して下さい。形態観察に十分な染色が得られる条件で低濃度・短時間の染色が望ましい条件です。)

氷冷水に1分間浸します。(RNase - Freeの水で水洗)

氷冷水に1分間浸します。(RNase - Freeの水で水洗)

乾燥(約5分)

(ドライヤー冷風)

- ・ 乾燥について

スライドガラス表面に水分が大量に残っているとカットしても落ちない、十分カットできないことがあります。逆に表面の水分が飛んでいれば十分です。乾燥の時間は上記プロトコールでは5分程度と記載していますが、標本によっては30秒程度で十分な場合もありますし、ドライヤーでの乾燥を行わない場合は20~30分程度の乾燥が必要です。

AS LMDの原理上標本は完全に乾燥しているほうが望ましいですが、完全に乾燥しない生乾き程度の状態であれば十分落下・回収が可能です。

目で見て乾いたかな?と思われる程度の乾燥を行なって下さい。

2 - 3 . パラフィン包埋サンプル

必要な試薬類

- ・ キシレン
- ・ エタノール
- ・ 96%エタノール
- ・ 70%エタノール
- ・ 蒸留水
- ・ PBS
- ・ ヘマトキシリン溶液（マイヤーヘマトキシリン）
- ・ エオシン溶液（水溶性エオシン）

パラフィンブロック作製時は、通常サンプルをホルマリン・パラホルムアルデヒド等での固定が行なわれます。

この過程は核酸を切断してしまいますので、特に RNA を分析する場合パラフィン包埋の標本からは抽出が非常に難しいと言われてています。

RNA の抽出を行う場合はできるだけ凍結標本からの分析を行なうようにして下さい。

また、パラフィン切片を作製する場合キシレン等の処理ステップが多くなりスライドガラスからの標本剥離が置きやすくなります。パラフィン切片作製時には必ずフォイル面へのポリエルリジンコーティングを行なって下さい。

1) 切片の作成

あらかじめサンプル（パラフィンブロック）を冷やしておきます。（-5℃で3～4分）

パラフィンブロックをマイクロトームにセットします。

マイクロトームで作成した連続切片を紙に乗せ水槽に移します。

水槽に浮いている切片を紙の上に乗せ恒温槽（40℃）に移します。

切片のしわが十分伸びてから、フォイル付きスライドガラス上にサンプルを乗せます。

ホットプレート（40℃）に乗せ2時間乾燥させます。（最低1時間以上）

注意)ここでの乾燥はしっかりと行ってください。ここでの乾燥状態が染色過程でのサンプル剥離に影響を及ぼします。

2) HE 染色

AS LMD 使用時には、最終的にカバーガラスをせずドライアップさせることが基本になりますので標本は通常よりも濃い染色に仕上がります。染色液の濃度と時間は通常よりも薄い濃度・短時間での染色を心がけてください。

a) 脱パラフィン

キシレンに3分間浸し、脱パラフィンを行います。

100%エタノールに30秒浸します。(×3回)

96%エタノールに30秒浸します。

70%エタノールに30秒浸します。

蒸留水に浸します。

b) HE 染色

ヘマトキシリン溶液で5分染色します。

PBSに5分浸します。

エオシン溶液で1分染色します。

蒸留水ですすぎ、標本を乾燥します。

注意)染色後の乾燥はしっかりと行ってください。湿った状態でダイセクションを行うとレーザーでのカット後にサンプルが落下しにくかったり、場合によってはレーザーでのサンプルカットに影響を及ぼす場合もあります。(完全に乾燥することが望ましいですが、多少生乾きの状態でも十分回収できることもあります。)

2 - 4 . 培養細胞 Living cells

培養細胞でダイセクションを行う場合、AS LMDのLCCモジュール (Living Cell Cutting) をお持ちの場合とそうでない場合で培養方法が異なります。

LCCモジュールが使用できる状態であれば細胞が培養液中に浸ったままでのダイセクションが可能です。

どちらの場合もAS LMD用のフォイル上に培養することになります。培養のためにコーティングが必要な場合は、適切なコーティングをフォイル面上に行なってください。

1) LCCモジュールが使用でない場合

通常仕様のAS LMDで培養細胞のマイクロダイセクションを行う場合はフォイル付きスライドガラスまたはフォイル付きカバーガラスのフォイル面上に直接培養します。

フォイル付きスライドガラス(フォイル付きカバーガラス)を滅菌し、シャーレに入れてください。

フォイル上で細胞を培養してください。

フォイル付きスライドガラス(フォイル付きカバーガラス)をシャーレから出し、十分乾燥させてからAS LMDにセットして下さい。

2) LCCモジュールが使用できる場合

専用のディッシュに培養します。専用ディッシュ内のフォイル面に直接細胞を培養して下さい。

AS LMDにセットする場合、ドライ系の対物レンズでのカットを行う場合は、対物レンズが培地に浸らないよう、ギリギリまで培地を捨ててからAS LMDにセットして下さい。水浸対物レンズでのカットを行う場合は十分に培地が残っている状態で培地に対物レンズを浸してダイセクションを行ないます。

また、1)の方法でダイセクションを行なうことも可能です。

2 - 5 . サイトスピン Cytospins

標準的な手順で塗沫を行ってください。
遠心機でスライドに細胞を塗沫します。

例)人の白血球:マイクロダイセクション用スライドにエタノールで固定された白血球をサイトスピンします。専用の遠心バケットに入れられた50%酢酸1mlに固定された細胞を1滴滴下します。

遠心後スライドを空気乾燥し、ギムザ染色を行います。

2 - 6 . 血液スメア Blood smear

標準的な手順で塗沫を行ってください。

採取された血液から1滴をマイクロダイセクション用スライドに塗沫してください。
一晚空気乾燥し、ギムザ染色を行います。

2 - 7 . 染色体 Chromosome preparation

染色体標本でマイクロダイセクションを行う場合は、場合によっては高倍率の対物レンズが必要になります。100x以上の倍率での対物レンズでのダイセクションが必要な場合はカバーガラスへのサンプリングを行いません。

サンプリングにはフォイル付きカバーガラスを使用して下さい。

染色体の塗沫は標準的な手順で行ってください。

末梢血液の白血球細胞を72時間培養します。(対数増殖期まで培養)

コルセミド(コルヒチン)を培養液に加え、そのまま培養を続けます。

(細胞周期を分裂中期で休止させます。)

培養後、細胞を集め低調液で処理します。

メタノール/酢酸(3+1, v/v)で固定し、マイクロダイセクション用スライド上に滴下します。

一晚乾燥し、ギムザ染色液を行います。水洗した後、空気乾燥してください。

3 . サンプル回収後の処理

3 - 1 . DNAの抽出

DNA抽出実験ではキアゲン社抽出用試薬で非常に効率良く抽出できます。キアゲン社試薬をお使いの場合は別冊のDNA抽出用のプロトコールを参照して下さい。

抽出したDNAサンプルはPCR反応、PCR-SSCP法、サザンハイブリダイゼーションなど、さまざまな実験に使用できます。

- 1) DNA抽出には次のDNA抽出用バッファーを使用してください。
10mM Tris-HCl pH8.0 ; 1% Tween-20 ; 5mg/ml Proteinase K
Proteinase Kは、インキュベーション直前に加えて5mg/ml濃度の溶液としてもかまいません。 ; 例) ダイセクションサンプルを100 μ lのバッファーに回収した場合は100mg/ml Proteinase K溶液を5 μ l加えます。)
- 2) ダイセクションを行う際にバッファーをあらかじめ回収用マイクロチューブのキャップ内に満たしておき (20 ~ 100 μ l程度) バッファー内に直接サンプルの回収を行います。
注意) 回収後サンプルの確認を行う場合は、ダイセクション終了後チューブホルダーからマイクロチューブを取り外す前にキャップ内にバッファーを満たしてからキャップを閉じてください。
- 3) 55 で1時間以上インキュベートします。(over night が好ましい)
注意) Proteinase Kによる反応はチューブを逆さまにしたまま恒温槽で行うか、あるいは15秒程度遠心し、チューブの底に溶液を集め恒温槽で行います。
- 4) 99 で10分間インキュベートし、Proteinase Kを失活させます。
- 5) その一部をPCR反応の鋳型DNAとして使用してください。

アドバイス) 単細胞など、非常に少量の細胞からDNAを抽出した場合は1回のPCRでは電気泳動後のバンドとして確認が難しいケースが多いので、できれば1回目のPCR産物を鋳型とした2回目のPCR反応 (場合によってはnested PCR) を行ってください。

アドバイス) 多量のDNAが回収されていることが期待され、DNAをできるだけ純粋な状態にしておきたい場合は、55 でのインキュベート後、中性フェノールでの抽出とエタノール沈殿での濃縮によりDNAを回収することをお勧めします。

アドバイス) DNAの抽出は市販されているDNA抽出キットを使って実験を行うこともできます。例) QIAGEN DNA blood/tissue kits

3 - 2 . RNAの抽出

RNA抽出実験ではキアゲン社抽出用試薬で非常に効率良く抽出できます。キアゲン社試薬をお使いの場合は別冊のRNA抽出用のプロトコルを参照して下さい。

抽出したRNAサンプルはcDNAの作製、RT-PCR、ノーザンハイブリダイゼーション、マイクロアレイによる発現解析など、さまざまな実験に使用できます。

注意) RNAの抽出には通常RNAを取り扱う場合と同じ条件で実験を行ってください。

例) 必ず手袋を使用する、水はDEPC処理水を使用する、など。

1) RNAの抽出にはQIAGEN RNeasy Kitの使用をお勧めします。市販キットをお持ちでない場合は、一般的なRNA抽出法でRNAの抽出を行ってください。
(酸性フェノールによる抽出: AGPC法)

3) RNA抽出用バッファーには、QIAGENキットを使用する場合QIAGEN RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74 106) RLTバッファーを、キットを使用しない場合は通常のRNA実験に使用しているバッファーに回収してください。

例) グアニジンチオシアネート (GTC)、2-メルカプトエタノール (2-ME) を含むバッファー

4) ダイセクションを行う際にバッファーをあらかじめ回収用マイクロチューブのキャップ内に満たしておき (20 ~ 100 μ l程度)、バッファー内に直接サンプルの回収を行います。

注意) 回収後サンプルの確認を行う場合は、ダイセクション終了後チューブホルダーからマイクロチューブを取り外す前にキャップ内にバッファーを満たしてからキャップを閉じてください。

5) キャップをした後、15秒程度遠心し溶液をチューブの底に集めてください。
アドバイス) 場合によってはピペティングでキャップを洗い、遠心する操作を2~3回繰り返してください。

6) 回収後の手順はQIAGEN RNeasy キットのプロトコルに従って実験を進めるか、一般的なRNA回収プロトコルに従って実験を行ってください。
(酸性フェノールによるRNAの回収)

6) 回収したRNAサンプルを保存する場合は-80 で保存してください。

3 - 3 . RNA からの cDNA 作製

注意) RNAの抽出には通常RNAを取り扱う場合と同じ条件で実験を行ってください。

例) 必ず手袋を使用する、水はDEPC処理水を使用する、など。

cDNAの作製は一般的なcDNA作製プロトコールで実験を行って下さい。

市販キットを使用する場合はキットのプロトコールに従って実験を行ってください。

実験の一例を下記に示します。

実際には目的に応じた形で実験を行ってください。

(プライマーにランダムプライマーを用いるか、オリゴ(dT)プライマーを用いるか) など

cDNA作製例)

サンプルごとの反応溶液は次のものから構成されます。

4 μ l	dNTP-Mix; 10 mM each	(Applied Biosystems N8080260)
4 μ l	MgCl ₂ ; 25mM	
2 μ l	GeneAmp 10x Buffer II	(Applied Biosystems N8080010)
1 μ l	Random hexamer primers	(Applied Biosystems N8080127)
1 μ l	MuLV reverse transcriptase	(Applied Biosystems N8080018)
1 μ l	RNase Inhibitor (optional)	(Applied Biosystems N8080119)

RNA溶液とDEPC水を加え、反応溶液の全量を20 μ l とします。

室温で10分間放置し、その後42度で60分間放置します。

その一部をPCRの鋳型として使用します。

3 - 4 . PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCRは一般的なPCRプロトコールで実験を行って下さい。
市販キットを使用する場合はキットのプロトコールに従って実験を行ってください。

注意) アニーリングの温度は設計したプライマーのTm値から決定してください。

PCR例)

下記反応溶液を作製し、PCR反応を行ってください。

1x Taq-buffer complete with 1.5 mM MgCl₂
dNTP-mix (à 200µM)
(Taq)-polymerase (1u)
Primer 1 (2 µM)
Primer 2 (2 µM)
Template DNA
蒸留水を加え、トータル量を50 µlとする

Cycle	Denaturing	Annealing	polymerisation
1	95°C, 2 min.		
30	94°C, 30sec.	50°C, 45sec.	72°C, 1min
1			72°C, 5min

増幅したDNAサンプルはアガロースゲル電気泳動などで確認してください。

3 - 5 . タンパク質分析 Protein-Analysis

抽出したサンプルからSDS-PAGE、ウェスタンブロット、二次元電気泳動、プロテインチップによる発現解析、各種カラムを用いた精製など、さまざまな実験に使用できます。

DNA、RNA回収の場合と同様にサンプルの回収を行ってください。

例) SDS-PAGE

- ・ SDS-PAGE用バッファーに直接回収します。
10% (v/v) グリセリン, 5% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 2% (w/v) SDS,
0,05% (w/v) BPB (Bromphenolblue)、 2 mM Tris-base
- ・ 10分間煮沸し、電気泳動を行います。

二次元電気泳動

- ・ 二次元電気泳動サンプル回収バッファーに直接回収します。
9.5 M urea、 2% NP40、 5% 2-メルカプトエタノール
- ・ 一次元目の泳動を行います。
(必要に応じてソニケーション等の操作で組織を可溶化してください。)

4 . アプリケーション例

4 - 1 . 肺凍結サンプルからの RNA 抽出 (固定方法の検討)

この検討では、AS LMD 標本作製と RNA の回収について、特に固定法についての検討を行なう。ここでは、RNA の回収量ではなく品質 (断片化されていない mRNA) の回収に対しどのような固定条件が良いかの検討を行なっている。

各種 RNA 実験 (マイクロアレイ等) を行なうためには (断片化されていない) 高品質の mRNA の回収が不可欠である。この検討では 1.5kb 長の mRNA が保存されていることを RT-PCR により確認した。

固定方法として 70%エタノール、100%エタノール、エタノール：酢酸 = 19 : 1 溶液の 3 種類で検討した。

LMD を使用した細胞採取方法の検討

<<材料>> マウス肺の O.C.T. compound 凍結標本

<<方法>> フォイル付きスライドグラスを乾熱滅菌 (180 °C, 8h)
Poly-L-lysine コーティング
フォイル付きスライドグラスを氷冷

O.C.T. Compound の凍結切片 (20 μ m 厚) を作製

フォイル付きスライドグラスへ切片の貼りつけ

固定 3 分間 (100% EtOH or 70%EtOH or EtOH/Acetic Acid 19:1) (氷冷条件)

DEPC 処理水で水洗 (氷冷水) (1min)

染色 (0.05% トルイジンブルー, 10sec)

DEPC 処理水で水洗 (氷冷水) (1min , 2times)

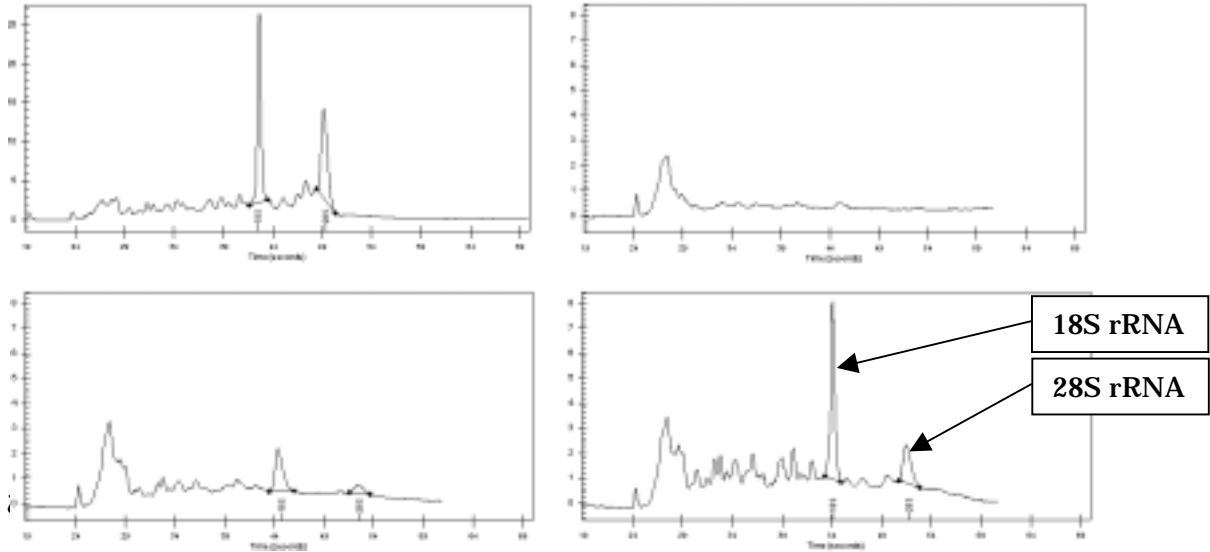
乾燥 (ドライヤー冷風) (30sec)

保存 (氷中にガラス製染色バットを置きその中に保存。あるいは - 80 °C)

AS LMD で回収 (常温放置時間 < 30min)

RNA 抽出

Agilent Bioanalyzer で 28S / 18S rRNA の品質を確認した。

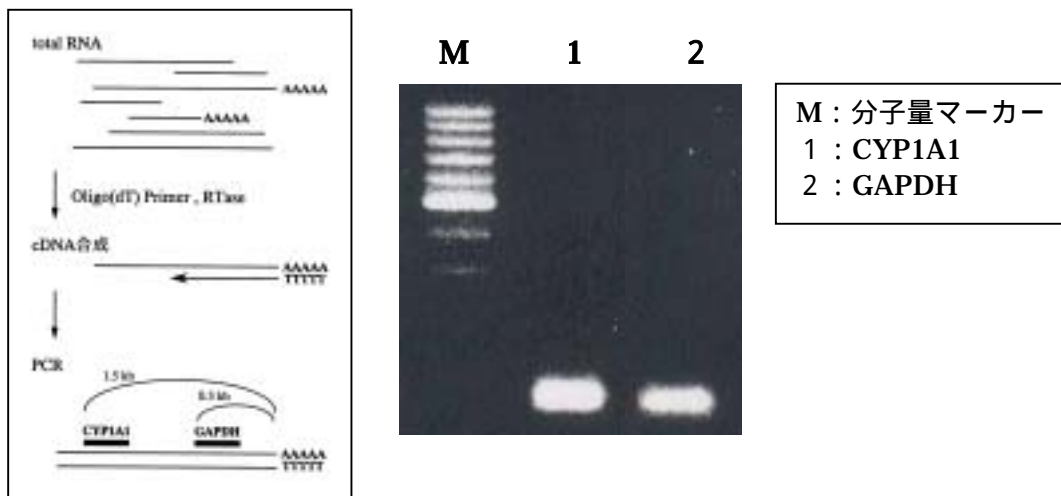


rRNA Ratio [28S / 18S]	固定前	100%EtOH	70%EtOH	EtOH/Acetic Acid
	0.66	ND	0.18	0.35

固定液にエタノール/酢酸 (19 : 1) を用いることにより、十分に品質の保たれた RNA を回収することができた。

エタノール/酢酸固定の標本から抽出した mRNA をテンプレートとして RT-PCR を行った。PCR の遺伝子には GAPDH 及び CYP1A1 を使用。それぞれ mRNA の Poly-A 領域から 0.3kb、1.5kb の位置で PCR プライマーを設計。両遺伝子についてそれぞれ RT-PCR での増幅が可能であった。

この結果からもエタノール/酢酸固定により各種 RNA 実験に十分な品質の mRNA が抽出可能であると言える。



提供：筑波大学 基礎医学系 附属病院 病理部
大窪千草 先生、野口雅之 教授

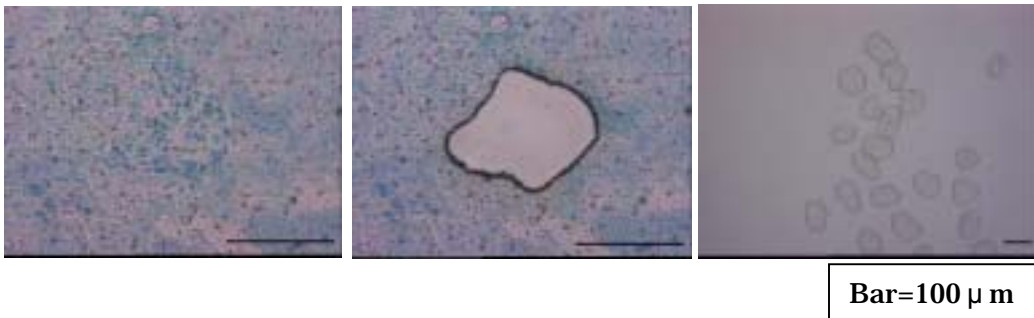
4 - 2 . 腎臓系球体からの RNA 抽出と RT-PCR

1) 凍結切片の準備

- ・ フォイル付きスライドグラス
- ・ サンプル-----ラット腎臓皮質の一部を、**Rnase free** の状態で採取し、 線滅菌プラスチックチューブに入れ、液体窒素で凍結。-80 で保存 (OCT コンパウンドは使用しない。)
- ・ 薄切-----サンプルを OCT コンパウンドで包埋し、ドライアイスで急速に凍結させる。新しいナイフを用い、クリオスタットで 5 μ m 厚で凍結切片を作製。フォイル付きスライドグラスに貼付。
- ・ 固定-----薄切後直ちにクリオスタット内に準備した 70%アルコール (RNA 用エタノールを DEPC 処理水で希釈) に浸漬 (1 分)。
- ・ 洗浄-----OCT コンパウンドを取り除くため、DEPC 水で十分すすぐ。
- ・ 染色-----0.05%トルイジンブルー溶液で染色 (30 秒)
- ・ 乾燥-----ドライヤーで風乾。

2) AS LMD によるサンプリング

- ・ 0.5mlPCR チューブのキャップに TRIzol (インビトロジェン社) 30 μ l を入れる。
- ・ 糸球体のみを回収。



3) RNA の抽出

- ・ サンプリング終了後、PCR チューブ(チューブ A)を回収しキャップを閉め、Spin Down (3~5 秒)
- ・ キャップを開け、キャップ内部に再度 TRIzol を 20 μ l 入れピペッティング。(キャップ内を洗浄し、サンプルを完全にチューブへ回収するため)
- ・ キャップを閉め Spin Down (3~5 秒)
- ・ さらに TRIzol を 150 μ l 加え、2~3 分室温でインキュベート。
- ・ クロロホルム 40 μ l を加え、軽く転倒混和し、室温で 3 分間インキュベート。
- ・ 4、12,000xg で 15 分間遠心分離
- ・ チューブ A の水層を別のチューブ (チューブ B) に移し、氷上に静置。
- ・ チューブ A に DEPC 処理水を 50 μ l 加え、軽く転倒混和。
- ・ チューブ A を 4、12,000xg で 15 分間遠心分離。
- ・ チューブ A の水層をチューブ B に移す。
- ・ 水層の 1 / 30 の 3M 酢酸ナトリウムを加え、さらに Ethachinmate (ニッポジーン社) を 1 μ l 加え、軽く転倒混和。
- ・ 水層の 2 倍量の 75%エタノールを加え、軽く転倒混和。
- ・ 4、12,000xg で 5 分間遠心分離。
- ・ 沈殿物を確認し、溶液を除去。
- ・ 軽く乾燥させ、DEPC 処理水 30 μ l (あるいは 20 μ l) を加え、沈殿物を溶解させ、こ

れを RNA 溶液とした。

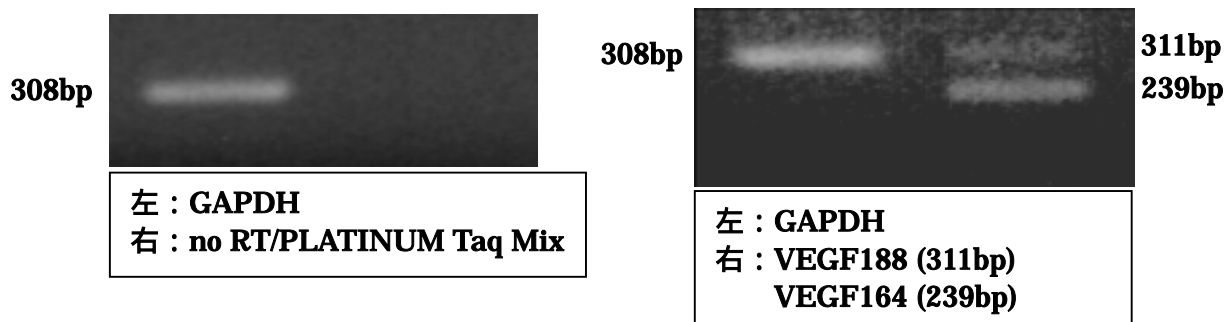
4) RT-PCR

- RNA 溶液の一部を RT-PCR のテンプレートとして使用。
- RT-PCR は SuperScript One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq (LIFE TECHNOLOGIES 社)を使用。
- 反応液 (/ 1 tube)

2 X Reaction Mix	25 μ l
Template RNA	6 μ l
Sense/Anti-Sense Primer(GAPDH or VEGF, 各 10 μ M)	各 1 μ l
RT/PLATINUM Taq Mix	1 μ l
DEPC water	to 50 μ l

5)結果

- RT-PCR
得られた Total RNA から RT-PCR を行ったところ、GAPDH および VEGF に特異的なバンドを確認することが出来た。



提供：麻布大学 生物科学総合研究所
井上 薫 先生 代田 欣二 教授

4 - 3 . 運動神経細胞の回収と定量リアルタイム PCR

1 . 切片作製

1) スライドガラスの前処理

フォイル付きスライドガラスのフォイル周辺を autoclaving tape でシールし、乾熱滅菌する。(200 2 hr)

2) 切片作製

200ml ビーカーにイソペンタンを入れ、液体窒素で冷やしておく。

マウスから脊髄を取りだし(無固定) プラスチックの容器に OCT compound と脊髄を入れ、容器ごとに入れて固める。この状態で-80 保存可能。

凍結した組織を 30 μm に薄切し、スライドガラスの上に貼りつける。

(1 枚のスライドガラスに 7 - 8 切片)

3) 染色

100%エタノールに入れて、1分間浸す(=固定する)。

エタノールから取り出して、RNase-Free MQ 中で wash (5 分)。

スライドガラスを 0.03%トルイジンブルー溶液に 5 分くらい(染色具合による)浸す。浸した直後に、2、3回スライドガラスをゆっくりと上下させる。

トルイジンブルー溶液からスライドガラスを引き上げ、ペーパータオルの上で水気を切った後、DEPC-MQ 液に 1 分浸す。2、3回ゆっくりと上下させる(=wash)。

洗い 2 回目：スライドガラスを引き上げ、水気を切った後、70%エタノール液に 1 分間浸す。2、3回ゆっくりと上下させる。

スライドガラスの裏面・側面の水分をキムワイプで丁寧に拭き取り、顕微鏡下で染色の程度をチェックする(絶対に表を拭かないように)。

細胞(青紫に濃染)と細胞以外の部分(薄い青紫)がはっきり区別できれば OK。

濃すぎる場合は と同様に DEPC-MQ に再度浸して色を抜く。

(支障が出るほど濃すぎることはほとんどない)

スライドガラスの裏面・側面の水分をキムワイプで丁寧に拭き取り、ドライヤーの“Cool”の風に当てて完全に乾燥させる。大体 5 分くらい。

この状態で-80 で保存可能。

2 . RNA の抽出と精製

RNA 抽出と精製には QIAGEN RNeasy Mini Kit を使用。

事前の準備

- 1) RLT buffer を必要量分注して、 β -mercaptoethanol を加えておく(10 μ l β -ME / RLT buffer 1ml)。1 サンプル当たり、350 μ l の RLT buffer が必要。
- 2) RPE buffer に EtOH が入っていることを確認。
- 3) RNase free water で作った 70% EtOH。
- 4) 20 - 25 にセットした遠心機。

プロトコール

- 1) 各サンプル(LMD で集めた細胞が入っているチューブ)の volume をチューブごとに、RNase-free water を加えて大体 40 μ l に合わせ、ピペティングをしっかりと行ない細胞を完全に溶解する。
* 長時間の回収を行った場合はチューブ内の RLT buffer は多少減っている。
- 2) RLT buffer で lysate を 350 μ l にメスアップし、緩やかに懸濁する。
- 3) 70%EtOH を 350 μ l 加え、ピペティングでよく懸濁する。
- 4) RNeasy の spin column にセットし、(2ml-collection tube にセット) 700 μ l になった lysate をカラムに移す。10,000rpm. 15sec. r/t 遠心分離。
- 5) フロースルーを捨て、RWI buffer で洗浄。(700 μ l の RWI buffer をカラムに入れ 10,000rpm. 15sec. r/t 遠心分離。フロースルーを捨てる。
- 6) RNeasy カラムを新しい 2ml-collection tube にセットし、500 μ l の RPE buffer でカラムを洗浄。10,000rpm. 15sec. r/t 遠心分離し、フロースルーを捨てる。
- 7) 500 μ l の RPE buffer でカラムを洗浄。10,000rpm. 2min. r/t 遠心分離し、フロースルーを捨てる。
- 8) 15,000rpm. 2min. r/t 遠心分離。(メンブランの乾燥)
- 9) RNeasy カラムを新しい 1.5ml-collection tube にセットし、50 μ l の RNase-Free Water をカラムに入れ、1min. 放置。12,000rpm. 1min. r/t 遠心分離し、RNA を溶出する。
- 10) エタノール沈殿法で RNA を濃縮
 - ・ RNA 溶液に 3 / 10 量の 10M NH₄OH 溶液、3 倍量の EtOH を加える。
 - ・ - 20 または - 80 で over night
 - ・ 遠心分離後、沈殿物を 10.8 μ l の RNase-Free Water に溶解。

マウス脊髄から神経細胞を回収。10細胞相当量の mRNA から増幅。
トランスジェニックマウスで導入遺伝子の発現増加を定量 PCR により確認できた。

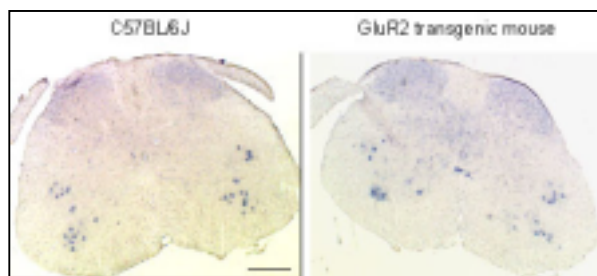


図 1 . ChAT(choline acetyltransferase) の *In situ* hybridization. Bar=450 μm

ChAT の発現で運動神経細胞を確認。脊髄において運動神経細胞は非常に少ない。運動神経細胞における遺伝子発現量を正確に定量するためにはマイクロダイセクションによる細胞回収が不可欠。
(マイクロダイセクションでの回収時にはトルイジンブルーで染色)



図 2 . GAPDH および SOD1 のリアルタイム定量 PCR (Applied Biosystems 社 Sequence Detection System を使用)。10細胞相当量の mRNA からの増幅、定量が可能。mRNA の精製には Q I A G E N 社 RNeasyMini を使用。

GluR2 expression level in motor neurons of GluR2 transgenic mice

Mouse	GluR2	GluR3	GluR4	ChAT	SOD1
C57BL/6J (n=3)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
GluR2-transgenic mice (n=3)	4.78 ± 0.85	1.02 ± 0.54	1.21 ± 0.26	1.17 ± 0.38	1.09 ± 0.31

表 1 . 各遺伝子の発現量は GAPDH の発現量で補正後、コントロール C57BL/6J マウスでの発現量を基準に相対値で表記。GluR2 トランスジェニックマウスでは、導入した遺伝子 (GluR2) の発現量が特異的に増加していることが確認できた。

提供：理化学研究所 脳科学総合研究センター 運動系神経変性研究チーム
館野 美成子 先生 杉本 久子 先生 高橋 良輔 先生

5 . 参考

5 - 1 . 参考文献

- 1) Kolble K.
The LEICA microdissection system: design and applications.
J Mol Med. 2000;78(7):B24-5.
- 2) Mori M, Mimori K, Yoshikawa Y, Shibuta K, Utsunomiya T, Sadanaga N, Tanaka F, Matsuyama A, Inoue H, Sugimachi K.
Analysis of the gene-expression profile regarding the progression of human gastric carcinoma.
Surgery. 2002 Jan;131(1 Suppl):S39-47.
- 3) Inoue K, Sakurada Y, Murakami M, Shirota M, Shirota K.
Detection of gene expression of vascular endothelial growth factor and flk-1 in the renal glomeruli of the normal rat kidney using the laser microdissection system.
Virchows Arch. 2003 Feb;442(2):159-62.

5 - 2 . フォイル付きスライドガラスの作製

フォイル付きスライドガラスはライカマイクロシステムズより完成品が販売されています。完成品をお使い下さい。フォイルシートからフォイル付きスライドガラスを作製する場合は下記プロトコールに従って作製してください。

1) 準備するもの

器具

- ・ スライドガラス (シリコンコート済みのものが好ましい)
- ・ プラスチック板 (フォイル切断用下敷き)
- ・ スライドガラス立て
- ・ 紙 (型取り用)
- ・ ピンセット
- ・ 両面テープ
- ・ カッター
- ・ 鉛筆
- ・ 定規
- ・ 手袋
- ・ スポンジ



試薬

- ・ フォイル
- ・ 40% (70%) エタノール



フォイル



70%エタノール,40%エタノール

2) フォイルの貼り付け

a) スライドガラスの準備

スライドガラスは通常市販されているもので行います。

スライドガラスの両端に両面テープを貼ります。



b) フォイルの準備

フォイルの大きさを決め、カットする大きさを紙に描きます。



紙の上にプラスチック板を置きます。



プラスチック板を 40%エタノールで湿らせます。



その上にフォイルを敷き、しわを伸ばします。
(フォイルの上も 40%エタノールで濡らしてスポンジ等でしわを伸ばします。)



フォイルが乾く前に、下敷きの線に沿ってカットします。



注意)このマニュアルの手順ではしわを伸ばすために40%エタノールでフィルムを湿らせていますが、実際には蒸留水で行ってもどの濃度のエタノールで行ってもかまいません。

c) フィルムの貼りつけ

カットしたフィルムにスライドガラスを乗せ、両面テープでフィルムを固定します。
(フィルムにスライドガラスを押しつけるような要領で貼りつけます。)



仕上げにスポンジ等でしわを伸ばします。

フィルムの裏側(スライドガラスとフィルムの接着面)まで十分に乾燥すれば完成です。
(乾燥時間はフィルム貼りつけに使用したエタノール濃度に依存します。)

アドバイス)ステップbのフィルムのカットは裁断機などを利用して、先にフィルムを適当な大きさにカットしておいてもかまいません。その場合は、ステップcで貼りつける前にフィルムを湿らせてしわを伸ばしてから貼りつけるようにしてください。

5 - 3 . 冷凍剤の融点と沸点の関係 (1)

ライカマイクロシステムズ株式会社 SP グループ

冷凍剤として最良の液化プロパン法とその他の冷凍剤の利点

氷晶の問題を解消するために液化プロパンが冷凍剤として好まれる理由は、有機溶媒の表面張力が低く、組織を良く濡らして液体と組織との接触面を十分に確保でき、よって十分な凍結速度を保証できるからである。

液体窒素の場合は、組織との接触面で窒素が気化し、組織との間に断熱層を形成するため著しく凍結速度が落ちる。

このため、サンプルを液体窒素で直接凍結する方法では効率が悪いので、以下の方法をとる。最良の方法は、あらかじめ液体窒素で純粋なプロパンガスを冷却し、液化プロパンを作製し冷凍剤とする方法である。

窒素の融点と沸点との差は 15 しかないが、プロパンの場合 145 もある。

組織中の水分が氷晶を作らないためには、10,000 /SEC の凍結スピードが必要であるとされている。

このスピードを得られる凍結剤は液化プロパンと液化エタンになる。

ただし、完全な無氷晶の部分は表面から 10 μm と限られる。

サンプルの深部に至るまでの凍結時間が長い程、氷晶が多くなる。

電子顕微鏡用の標本作製では、この方法が取られる。

光学顕微鏡観察の場合は、小さな氷晶はわからないため約 200 μm の深部まで利用できると考えられている。

このため大きなサンプルを凍結する際は、どうしても氷晶を防ぐことはできないが、影響を少なくするために以下の方法が多く施設で取られている。

冷凍剤としては十分に低い温度ではないが、簡便に取り扱うことができることから、アセトンや n-ヘキサンが使用される。

その理由は、プロパンと同様に沸点と融点との差が大きいためである。

ドライアイスアセトン

アセトン中にドライアイスを入れ、-79 のアセトンにサンプルを漬けて凍結させる方法。

液体窒素 / n-ヘキサン

n-ヘキサンを金属製の容器に入れ、それを容器ごと液体窒素に漬けて n-ヘキサンを冷却し、サンプルを n-ヘキサンに漬けて凍結させる。

* n-ヘキサンは-95 で凍結してしまうため、全部凍結してしまわないように容器の底部のみを液体窒素に漬けるようにして温度管理を行う。

5 - 4 . 冷凍剤の融点と沸点の関係 (2)

ライカマイクロシステムズ株式会社 SP グループ

bp. Boiling point 沸点 (液体の沸騰点、気体化する温度)
 mp. Melting point 融点 (固体の融解点、液体化する温度)

参考 :	bp.沸点	mp.融点	差(±)
水 (Water)	100	0	100
{ 液化 } ヘリウム(Helium)	-268.9	-272.2	3.3

冷凍剤 :

{ 液化 } 窒素(Nitrogen)	-195	-210.01	15.01
{ 液化 } 酸素(Oxygen)	-182.96	-218.4	35.44
{ 液化 } エタン(Ethane)	-88	-172	84
{ 液化 } プロパン(Propane)	-42	-187.7	145
{ 液化 } イソペンタン(Isopentane)	27.85	-159.9	187.75
{ 液化 } フロン 12(Freon 12)*	-29.79	-158	128.21
アセトン(Acetone)	56.5	-94	150.5
n-ヘキサン(n-Hexane)	69	-95 (-100)	164

*フロン 12 は、デュポン社 (アメリカ) の登録商品名。2000 年現在製造中止。

ガラス状 (無氷晶) 凍結のために要求される各冷凍剤の凍結スピード比較表

純水の場合	10 ⁻⁶ K/SEC	(1,000,000 /SEC)不可能である
細胞内の水分の場合	10 ⁻⁴ K/SEC	(10,000 /SEC)可能

冷凍剤 :

		CE*
ETHANE	-172	1.3
LN2 at RT*(BILING)	-195	0.1
LN2 COOLING to FP*(SLUSH)	-210	0.2
ISOPENTAN	-160	0.5
FREON 12	-158	0.5

* CE : 液化プロパン(LN2)を 1 とした場合の凍結スピード比。
 エタン(Ethan)は 1.3 で液化プロパンよりも上であるが高価である。
 他は 0.5 台、液化プロパンよりも冷凍能力が劣る。

* RT : 室温環境にて使用 / 液体の状態 (Room Temperature)

* FP : 真空引きした状態で使用 / 固体 (ゲル) 状態 (Freezing Point)

5 - 5 . 表面張力の関係

ライカマイクロシステムズ株式会社 SP グループ

冷凍剤として使用する場合の溶剤の表面張力

表面張力が小さいほど濡れやすくなり、冷凍剤として好まれる。

溶剤	表面張力(20 dyne/cm)
水	72.7
エチレングリコール	48.4
シクロヘキサン	35.2
ジアセトンアルコール	30.2
キシレン(o,m,p)	30.0, 28.6, 28.3
エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート	28.2
n-ブチルアセテート	25.2
メチルエチルケトン(MKE)	24.6
n-ブチルアルコール	24.6
アセトン	24.0
ミネラルスピリット	24.0
メチルイソブチルケトン(MIBK)	23.6
メタノール	22.6
ヘキサン	18.6