

TUK Solution for multicolor -プロトコル例-

【本品以外に必要な試薬】

- CLEM-Green 発現ベクター
(関連製品 Code No. 163-28901, 160-28891, 163-28881)
- CLEM Red 発現ベクター
(関連製品 Code No. 165-28461, 169-28621, 166-28631, 163-28641, 160-28651, 167-28661)
- HB Solution
(関連製品 Code No. 080-10591)
- 0.1mol/L リン酸緩衝液, pH 7.2 (Code No. 165-27165)
- 25%グルタルアルデヒド溶液
- 4%酸化オスミウム溶液 (Code No. 157-01141)
- エタノール (Code No. 051-00476)
- Epok812 (応研商事： 02-1002)
- DDSA (応研商事： 02-1004)
- MNA (応研商事： 02-1006)
- DMP-30 (応研商事： 02-1008)
- 細胞培養用に表面処理された 35mm ディッシュ
- 細胞培養用培地
例：D-MEM (Code No. 044-29765)に 10%FBS を添加したもの。
- トランスフェクション試薬 (Code No. 299-73203)
- ガラスボトムディッシュ (iBidi： ib81158)
- ダブルクリップ (ASKUL： 極豆)

【試薬の調製】

2.5%グルタルアルデヒド溶液の調製^{*1}

25%グルタルアルデヒド溶液を 0.1mol/L リン酸緩衝液, pH 7.2 で 10 倍希釈して下さい。

※1 half Karnovsky 溶液 (2.5%グルタルアルデヒドと 2%パラホルムアルデヒドの混液)でも可能です。この場合 25%グルタルアルデヒド溶液と 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Code No. 161-20141)、希釈液として HB Solution を用いて調製して下さい。

1%四酸化オスミウム溶液の調製

4%酸化オスミウム (VIII)溶液を HB Solution で 4 倍希釈して下さい。

エポキシ樹脂の調製

50 mL ビーカー

↓ 5.2 mL Epok812

↓ 1.2 mL DDSA

↓ 3.6 mL MNA

↓ 0.16 mL DMP-30

全量約 10 mL 、スターラーバーを入れて、室温で 30 分攪拌 (最長 2 時間)。

【CLEM-Green および CLEM-Red 発現細胞の準備】

- 1) 35 mm ディッシュに任意の細胞(0.6×10^6 cells)^{※2}を播種。
- 2) 37°C、5% CO₂ で 20 分~16 時間インキュベート。
- 3) CLEM-Green、CLEM-Red 発現ベクターをトランスフェクション^{※3}。

※2 播種濃度は細胞種ごとに検討下さい。 0.6×10^6 cells は MDCK 細胞を用いた場合の例となります。

※3 ScreenFect™ A(Code No. 299-73203)を用いる場合(35 mm ディッシュ 1 枚当たりの調製)

下記①Diluted ScreenFect™ A と②Diluted DNA を混合し、5~20 分インキュベートし、細胞へ添加。

37°C、5% CO₂ で 2~3 日間インキュベートする。

① Diluted ScreenFect™ A の調製 :

Dilution buffer for ScreenFect™ A 125 μL と ScreenFect™ A Transfection Reagent 15 μL を混合。

② Diluted DNA の調製 :

Dilution buffer for ScreenFect™ A 125 μL と CLEM/CLEM-Red 発現ベクター 2.5 μg を混合。

【実験手順】

以下の作業ではサンプルの乾燥に十分気をつけて行って下さい。

1. 細胞の固定と蛍光復活処理

- 1) CLEM-Green および CLEM Red 発現細胞の培養液を除去。
- 2) 前固定: 2.5%グルタルアルデヒド溶液 (half Karnovsky 溶液でも可能) 0.5 mL を加え、

4℃、1時間静置。

- 3) 2.5%グルタルアルデヒド溶液を除去。
- 4) HB Solution で洗浄^{※4}。
- 5) 後固定：1%四酸化オスミウム溶液 0.5 mL を加え、4℃、10 分間静置^{※5}。
- 6) 1%四酸化オスミウム溶液を除去。
- 7) HB Solution で洗浄^{※4}。
- 8) 蛍光復活(再惹起)：TUK Solution for multicolor 1.0~1.5 mL を加え、4℃、10 分間静置^{※6}。
- 9) HB Solution で洗浄^{※4}。
- 10) HB Solution を加え静置。

※4 洗浄方法

下記 1~3 を行って下さい。

1：HB Solution 1.0 mL を加え、5 分間静置し、デカントにて破棄。

2：HB Solution 1.0 mL を加え、5 分間静置し、デカントにて破棄。

3：HB Solution 1.0 mL を加え、5 分間静置し、デカントにて破棄。

※5 固定時間は細胞種及び組織によって処理時間・濃度を変更して下さい。

※6 培養細胞（CHO 細胞や HeLa 細胞）では 10 分間程度で十分なことを確認していますが、培養細胞や組織によっては 10~60 分の間で処理時間を検討して下さい。

2.脱水処理

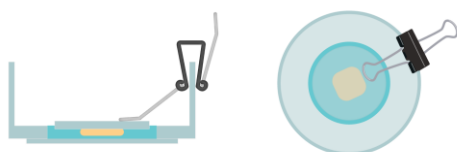
- 1) 蛍光復活済み固定化細胞/35 mm ディッシュ(HB solution 除去済み)に 50%エタノール 1 mL を加える。
- 2) 50%エタノールを除去し、50%エタノール 1 mL を加える。
- 3) 50%エタノールを除去し、70%エタノール 1 mL を加える。
- 4) 70%エタノールを除去し、70%エタノール 1 mL を加え、5 分間静置。
- 5) 70%エタノールを除去し、90%エタノール 1 mL を加える。
- 6) 90%エタノールを除去し、90%エタノール 1 mL を加え、5 分間静置。
- 7) 90%エタノールを除去し、100%エタノール 1 mL を加える。
- 8) 100%エタノールを除去し、100%エタノール 1 mL を加え、5 分間静置。

3.エポキシ樹脂への包埋

- 1) 100%エタノール置換および蛍光復活済み固定化細胞/35mm ディッシュにエポキシ樹脂 1 mL を加える。
- 2) エポキシ樹脂を除去し、エポキシ樹脂 1 mL を加える。

4.観察用の薄切切片作成および蛍光観察

- 1) 超薄切片を作成し、カバーガラスに回収（観察まではカバーガラスを 4well-plate に入れて遮光 4℃保管）。
- 2) ガラスボトムディッシュの中央に TUK Solution for multicolor を 200~300 μ L 添加。
- 3) 超薄切片を下にして、TUK Solution for multicolor にカバーガラスが浸るようにする。
- 4) ダブルクリップをガラスボトムディッシュの縁に取り付け、ダブルクリップのワイヤー部分の頭でカバーガラスを固定し、蛍光顕微鏡にて観察^{※7}。



注 1：乾燥を避けるため、カバーガラスは TUK Solution for multicolor に浸るように沈めて下さい。

注 2：クリップのピンは切片の位置を避け、カバーガラスを抑えるようにしてカバーガラスが動かないようにして下さい。

※7 蛍光顕微鏡観察は試料作成から 1 週間以内に行う。透過型電子顕微鏡を用いる場合は、TEM 電子顕微鏡用グリッドに回収。

5.走査型電子顕微鏡観察

- 1) 薄切切片をカバーガラスごと蒸留水で洗浄し、室温で一晩乾燥。
- 2) 走査型電子顕微鏡にて観察^{※8}。

※8 お使いの電子顕微鏡のプロトコルに従って、試料を観察して下さい。場合によって最適な観察条件をご検討下さい。

【関連製品】

緑色蛍光タンパク質 CLEM-Green および、赤色蛍光タンパク質 CLEM-Red 発現ベクターをご用意しています。

コード No.	品名	容量	製品説明
163-28901	pCLEM-Green-nuc	20 μ g	CLEM-Green に核移行シグナルが付加されたベクターです。
160-28891	pCLEM-Green-C	20 μ g	CLEM-Green の C 末端側にマルチクローニングサイトが付加されたベクターです。
163-28881	pCLEM-Green-N	20 μ g	CLEM-Green の N 末端側にマルチクローニングサイトが付加されたベクターです。
166-28631	pCLEM-Red-ER	20 μ g	CLEM-Red に小胞体に局在する配列が付加されたベクターです。
169-28621	pCLEM-Red-gol	20 μ g	CLEM-Red にゴルジ体に局在する配列が付加されたベクターです。
163-28641	pCLEM-Red-lyso	20 μ g	CLEM-Red にリソソームに局在する配列が付加されたベクターです。

コード No.	品名	容量	製品説明
165-28461	pCLEM-Red-mito	20 μ g	CLEM-Red にミトコンドリアに局在する配列が付加されたベクターです。
160-28651	pCLEM-Red-C	20 μ g	CLEM-Red の C 末端側にマルチクローニングサイトが付加されたベクターです。
167-28661	pCLEM-Red-N	20 μ g	CLEM-Red の N 末端側にマルチクローニングサイトが付加されたベクターです。
080-10591	HB Solution	100mL	細胞洗浄時に使用します。