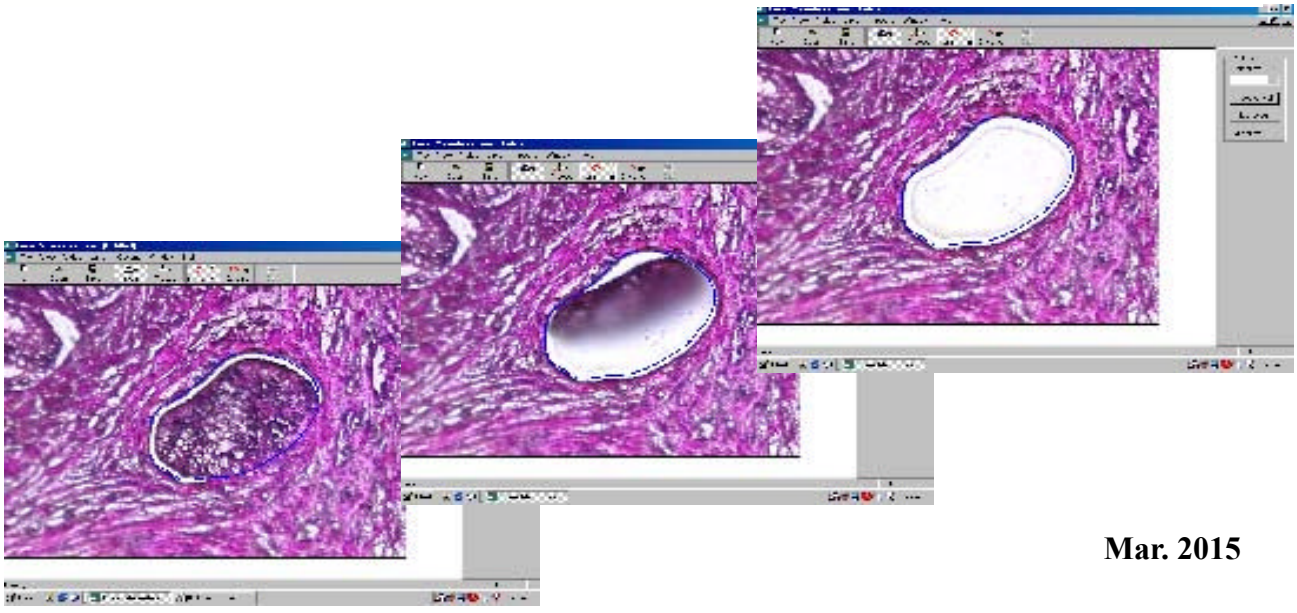
Leica
MICROSYSTEMS

LMD6500/7000

LMD Sampling Manual



Mar. 2015

LMD Sampling Manual

1. サンプリングまでの準備 ・・・

LMD6/7

LMD6000/LMD6500/LMD7000　消耗品リスト

※2017 年 11 月 1 日より価格改定

Nov 2017

★フォイル付スライド

品名	品番	定価
フォイル付スライドグラス 2.0μm（PEN） 50 枚	11505158	￥36,000
フォイル付スライドグラス 1.2μm（PPS） 50 枚	11505273	￥50,000
フォイル付フレーム 1.4μm(PET) 50 枚	11505151	￥39,000
フォイル付フレーム 0.9μm（POL） 50 枚	11505188	￥41,000
フォイル付フレーム 1.2μm（PPS） 50 枚	11505268	￥61,000
フォイル付フレーム 4.0μm（PPS） 50 枚 （LMD7,LMD7000 用）	11600294	￥60,000
フォイル付スライドグラス 4μm（PEN）50 枚 （LMD7,LMD7000 用）	11600288	￥36,000
フォイル付フレーム 4μm(PEN) 50 枚 （LMD7,LMD7000 用）	11600289	￥50,000
RNase-Free フォイル付スライドグラス 2.0μm(PEN) 50 枚	11505189	￥50,000
RNase-Free フォイル付フレーム 1.4μm(PET) 50 枚	11505190	￥55,000
RNase-Free フォイル付フレーム 0.9μm（POL） 50 枚	11505191	￥55,000
蛍光用フォイル付フレーム 1.1μm 5 枚	11600250	￥44,000

※150 倍対物レンズを使用する場合には、フォイル付きフレームをご使用下さい。

※プロテオーム用 DIRECTOR スライドは AMR 社様までお問い合わせください。

★ PCR チューブ （電動ステージ/スキャニングステージ 両ステージ対応チューブのみ掲載）

0.5ml 用 Axygene 社 PCR チューブ（DNase フリー／RNase フリー／エンドトキシンフリー）フナコシ社取扱

PCR チューブ シングルフラット蓋 0.5ml（1000 本） 品番: PCR-05-C ¥5,600（参考価格）

0.2ml 用 Axygene 社 PCR チューブ（DNase フリー／RNase フリー／エンドトキシンフリー）フナコシ社取扱

PCR チューブ シングルフラット蓋 0.2ml（1000 本） 品番: PCR-02-C ¥6,600（参考価格）

0.2ml 用 グライナー社 PCR チューブ

PCR チューブ 0.2ml シングル フラット蓋（500 本 x2） 品番:683201 ¥10,000（参考価格）

※製品の仕様や価格は予告なく変更される場合があります。

★ 培養細胞用ディッシュ

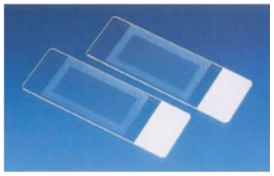
品名	品番	定価
LCC ディッシュ ペンフォイル 20 枚入(2um)	11505172	￥25,000
LCC ディッシュ ペンフォイル 20 枚入(4um) （LMD7,LMD7000 用）	11600295	￥33,000

※価格は 2017 年 10 月現在のものです。製品の仕様や価格は予告なく変更する場合があります。

ライカマイクロシステムズ株式会社

〒169-0075 東京都新宿区高田馬場 1-29-9

www.leica-microsystems.co.jp e-mail: lmc@leica-microsystems.co.jp



フォイル付スライドグラス

フォイル付フレーム

１－４．Poly-L-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 Poly-L-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を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。特に、パラフィン包埋標本の場合は事前の Poly-L-リジン処理を推奨します。
- 凍結標本の場合も、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剥がれやすいものがありますので必要に応じて Poly-L-リジン処理を行って下さい。

フォイル付きスライドガラスのフォイル面に Poly-L-リジン（SIGMA、P8920）を１滴滴下し、ピペットの腹でフォイル面に伸ばします。Poly-L-リジンが乾燥すれば完成です。

※　その他、BSA などのタンパク質でコートする方法も良好な結果が得られています。

BSA 法

BSA（ウシ血清アルブミン）1%溶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。

良くある質問　（Q&A）

Q.1　LMD 消耗品のフォイル付きスライドとフォイル付きフレームの違いを教えてください。

A.1 「フォイル」とは、プラスチック素材を薄く伸ばした膜を意味します。
「フォイル付きスライド」とは、スライドガラスにフォイルを張ったもの、
「フォイル付きフレーム」とは、金属フレームにフォイルを張ったものになります。

Q.2　フォイル付きスライド／フレームの名称に書かれているカッコ書きのアルファベットは何ですか？

A.2　カッコ書きのアルファベットは、フォイル素材の名称です。

PEN　：Polyethylene Naphthalate　（ポリエチレン　ナフタレート）
最もポピュラー、明視野観察向き。素材が粗面の為、切片や細胞の貼りつきが良い。
核酸を対象とした実験に最も多く使用される。質量分析にも使用可能※。

PET　：Polyethylene Terephthalate　（ポリエチレン　テレフタレート）
プラスチック可塑剤が少なく、質量分析にも使用可能※。

PPS　：Polyphenylene Sulfide　（ポリフェニル　スルフィド）
PEN とほぼ同様の用途に加えて、自家蛍光が少なく蛍光観察向き。

POL　：Polyester　（ポリエステル）
比較的平滑面の為、染色体標本向き。

※質量分析をされる場合は、まず PEN フォイルでお試しください。

Q.3　蛍光染色をする場合は、どの消耗品を選択するのが良いですか？

A.3　通常の蛍光顕微鏡で観察できる明るさであれば「フォイル付スライドグラス 1.2μm（PPS）」をお選びください。微弱な蛍光の場合は、「蛍光用フォイル付フレーム 1.1μm 5 枚」をお勧め致します。

Q.4　質量分析をする場合は、どの消耗品を選択するのが良いですか？

A.4　質量分析では、「フォイル付フレーム 1.4μm(PET)」が推奨されますが、「フォイル付スライドグラス 2.0μm（PEN）」も可能と思われます。もし回収した対象物のピークが重なるようでしたら、AMR 社の「DIRECTOR Laser Microdissection Slide」をご検討ください。

Q.5　回収用の PCR チューブは、どのメーカーの物も使用できますか？

A.5　基本的にフラットタイプのキャップの付いた PCR チューブで形状を選びますので、安全の為、弊社で確認の取れている商品をご使用ください。
弊社で確認の取れている PCR チューブは、取扱い説明書巻末に掲載していますのでご参照ください。
ステージタイプ（電動ステージ、スキャニングステージ）によって多少異なります。ご注意ください。

Q.6　PCR チューブのキャップの中にバッファーを入れて回収できますか？

A.6　できます。ただし周辺環境によりバッファーが乾燥する場合がありますので、事前にご確認頂いた上で長時間にわたっての回収はお避けください。またバッファー量ですが、0.5mlPCR チューブがおおよそ 50～60μL で 0.2mlPCR チューブが 20～30μL くらいもしくは、チューブキャップ底面が液で覆われる量が目安です。

Q.7　回収後、市販の核酸抽出キットは使用できますか？

A.7　できます。Qiagen 社、Invitrogen 社、タカラバイオ社などの他各社のキットがご利用いただけます。
キットの種類としては、微量サンプル向きのものがお勧めです。

Q.8　厚みの違うフォイル商品がある場合は、どちらを選択したら良いのでしょうか。

A.8　厚みがあるフォイルは、回収する対象物が小さい場合にご使用ください。厚みがある分より落下しやすくなっております。ただし厚みがある分使用できる機種は、LMD7 と LMD7000 に限られます。

１－５. フォイル付スライドガラス/フレームの滅菌

・ フォイル付きスライドは工場出荷時に UV 滅菌されていますので、そのままお使いいただいて問題ありません。再度の滅菌が必要な場合はクリーンベンチの殺菌灯や UV クロスリンカーを用いた UV 照射による滅菌を推奨します。
・ オートクレーブは、蒸気がフォイルとガラスの間に入ってしまう恐れがあるので、できれば避けてください。
・ RNase 除去用の市販リムーバースプレーなども有効です。
・ 特に清浄なスライドが必要な場合は RNase-free スライドをお買い求め下さい。

※ ただし、フィルム面へ Poly-L-リジンコートを行う場合、乾熱滅菌処理によりコート効果がなくなってしまいます。Poly-L-リジンコートを行う場合は滅菌処理後に行なって下さい。

2. 標本の作製と染色

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。ここでは凍結標本および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。LMD を使うためにはフォイル付きスライドガ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に耐性なので、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のスライドガラスと同じプロトコールが適用可能です。
ただし、最終的にカバーガラスを載せずに乾燥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を推奨します。

☆無染色標本について
実験の内容によっては無染色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、OCT 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ティ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。
  ※ 固定・染色をする場合であっても、洗浄が不十分で OCT コンパウンドが残ると切れが悪くなる場合があります。

- 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、より強いレーザー条件でのカッティングが必要になります。
  LMD では、標本がレーザーの UV（349nm/355nm)を吸収することにより標本を気化することでカッティングを行ないます。無染色の標本の場合、UV の吸収効率が落ち、カッティ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。

  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）
- 固定液 （エタノール／酢酸＝19:1、RNAlater、アセトン など）
- トルイジンブルー溶液 （粉末を RNase-free 水に溶解し、適度な濃度に調整して下さい。）

1）凍結ブロックの作製

- RNA およびタンパク質の分析には凍結サンプルをご使用下さい。

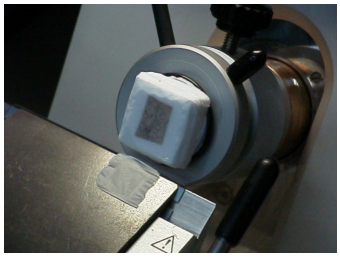
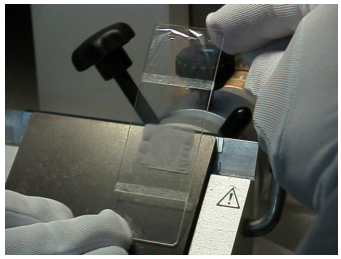
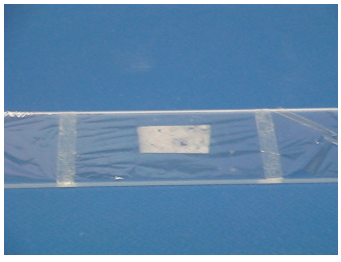
- 分析するサンプルを OCT コンパウンドに包埋し、液体窒素／n-ヘキサンやドライアイス／アセトン等で凍結して下さい。（５－２. 凍結標本作製のための参考資料－冷凍剤の融点と沸点の関係（1）p. 28 参照）

- 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グラスをクリオスタット庫内で冷却しておきます。
↓
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。

↓
切片を室温に馴染ませ、フォイル面にしっかり張り付かせます。
↓
固定液（氷冷）に 3 分間浸します。（固定について p.7 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)
↓
冷風ドライヤーで風乾(約 5 分)

固定について

凍結切片作成の際は、固定は行わない状態で凍結をして、薄切した切片をフォイル付きスライドに載せた後で固定することを推奨します。この際、固定液はアセトンなどの有機溶媒で固定をします。これはタンパク質を凝集させ形態を固定することと、脱脂を行い最終サンプルをより乾燥しやすくするためです。RNA の品質保持に関しては、特に *RNAlater*®を用いて固定をすることをお勧めします(p. 18, 19 参照)。

※　p. 18 以降のアプリケーション例では異なる固定液を使用している場合がありますが、RNA の品質の保持のみに着目した場合はアセトン(および *RNAlater*®との併用)を推奨します。

染色について

染色操作中に RNA が分解する可能性がありますので、トルイジンブルーなどの簡便な染色方法を推奨しますが、HE 染色や他の染色方法も適用可能です。

洗浄について

上記プロトコールでは氷冷したRNase-free水による洗浄を推奨していますが、70%エタノールや 100%エタノールで最後の洗浄を行うことも有効です。これはドライヤーによる乾燥が早くなるためです。ただ、急激に組織の脱水が起こり、組織が収縮する場合がありますので、注意してください。また、洗浄が不十分で OCT コンパウンドが最終サンプルに残ると、レーザーでの切れが悪くなります。洗浄が不十分な場合は、洗浄のステップを増やすか、洗浄する時間を長めにして下さい。特に分厚いサンプルの場合ご注意下さい。

乾燥について

スライドガラス表面に水分が大多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。また、切片に水分が残っているとRNAの品質の劣化につながります。実験の目的に応じて充分にサンプルを乾燥させてください。また、GFP の蛍光を確認しながら切る場合など、完全に乾燥することが難しいサンプル乃場合は、できるだけ時間をかけずにサンプルを回収して下さい。

２－３．パラフィン包埋サンプルの作製

● 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。この過程で核酸やタンパク質は共有結合により架橋されます。架橋された核酸は回収の際に断片化してしまいます。現在、複数の試薬メーカーからホルマリン固定サンプルからの RNA 回収キットが市販されていますが、こうしたサンプルから RNA を回収・分析することは難しい場合もあります。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フォイル面への Poly-L-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ミクロトームにセットします。
↓
ミ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）

※ ここでの乾燥は充分に行ってください。乾燥状態が染色過程以降でのサンプル剥離に影響を及ぼします。

2）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）
↓
95%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。

3）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。
↓
エオジン溶液で 1 分染色します。
↓
蒸留水ですすぎ、標本を乾燥します。

※　染色後の乾燥は充分に行ってください。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い場合があります。また、回収する核酸やタンパク質の安定のためにもサンプルは乾燥しているほうが好ましいです。

2－4. 培養細胞 Living cells

● 必要な試薬類

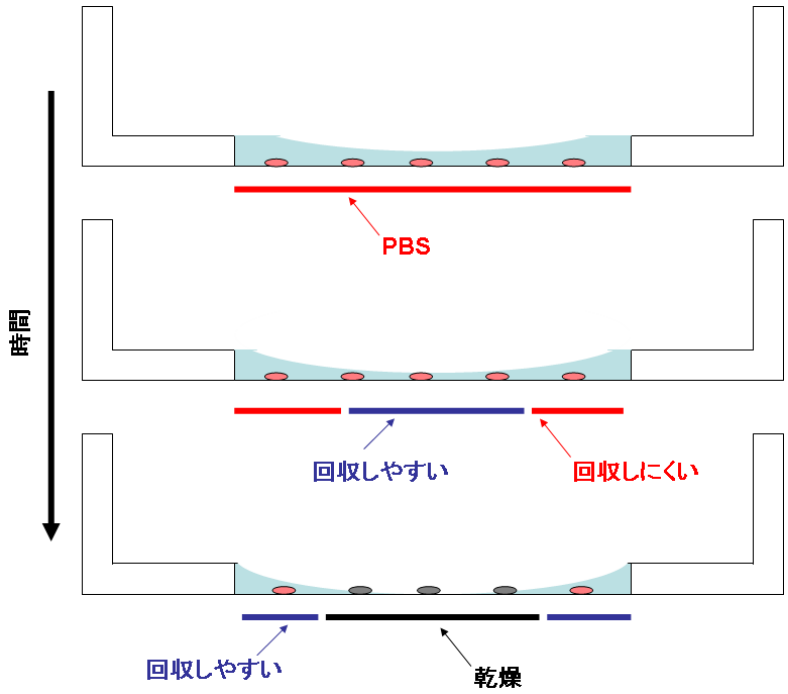
- PBS
- 培地
- ディッシュコート用タンパク質

1） 細胞の準備

細胞はLCCディッシュペンフォイル(ライカマイクロシステムズ社；11505172)に播種します。
この際、必要に応じてディッシュのフォイル面をタンパク質でコートしておきます。

2） LCCモジュールを用いた培養細胞の回収

ソフトウェア上でLCCモジュールを選択して下さい。
↓
回収容器にPBSや培地を入れてステージのコレクターにセットして下さい。
↓
ディッシュから培地を除き、PBSで洗った後、PBS(約80 μl)を加えます。
↓
ディッシュをステージにセットします。
↓
目的の細胞をカットします。
この際、ディッシュの中心部から周辺部に向かって回収を行います。
ディッシュが乾燥する前に回収を終えて下さい。



ディッシュのコートについて
　細胞の接着が弱いと、レーザーを照射した際の圧力で細胞が剥がれて回収できない場合があります。接着が弱い場合は、コラーゲン、ゼラチン、ファイブロネクチン、マトリゲルなどのタンパク質でディッシュのフォイル部分をコートして下さい。

培地について
　生細胞を回収する際は、培地に浸した環境でレーザー照射を行い、細胞を回収します。この際、血清などのタンパク質を含んだ培地のままでは表面張力が強く、切り取ったフォイルが落下しにくい場合があります。回収直前に培地をPBSに置換して回収を行うと効率が上がります。培地を除いた後で、80～100 μl程度のPBSを加えてカッティングを行って下さい。

カッティングのコツ
　細胞は、顕微鏡により観察できる範囲より広く微細な構造を伸展させている場合があります。細胞を傷つけずに回収するためには、ある程度の幅で余裕をもってレーザーを照射して下さい。

細胞の回収とトリプシン処理
　生細胞を回収する際は、事前に培養用の培地やPBSを入れた回収容器をセットしておきます。回収容器に落下したフォイルは培地の液面にトラップされて沈まない場合があります。そのまま培養を続けることも可能ですが、回収した細胞をトリプシンで処理した後で、再度培養用の容器に移して培養を続ける方が細胞の生存率が高くなります。

培養条件
　回収した細胞はなるべく少量の培地の中で培養してください。馴化培地を用いたり、マトリゲルなどのタンパク質でコートした容器で培養することも有効です。

２－５．サイトスピン　Cytospins

非接着性の細胞を遠心力でスライドに張り付かせます。
装置の取り扱い説明に従い、標準的な手順で実験操作を行って下さい。

例：ヒト白血球の場合

１）細胞の前処理とサイトスピン
分画した白血球をエタノール固定します。
　↓
固定された細胞１滴を1 mlの50%酢酸に懸濁します。
　↓
装置の取り扱い説明に従いサイトスピンを行います。
※　サイトスピン後に固定することも可能です。

２）染色
細胞が張り付いたスライドを空気乾燥し、染色（ギムザ染色など）を行います。

２－６. 血液スメア　Blood smear

　常法に従い実験操作をして下さい。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抹します。乾燥後、ギムザ染色を行います。

２－７. 染色体

　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フォイル付フレームのサンプリングを行ないます。

細胞の調製は常法に従い行います。

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）を培養液中に加え、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。一晩乾燥し、ギムザ染色を行います。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

ここでは、Proteinase K 処理による標準的なプロトコールをご紹介します。その他、市販のDNA回収用キットも適用可能です。詳しくはキットの販売メーカーにお問い合わせ下さい。

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セーションなど、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。（ダイセクションサンプルを100μlのバッファーに回収した場合は100mg/ml Proteinase K溶液を5μl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（20～100μl程度）、 バッファー内に直接サンプルの回収を行います。
※ 回収後に緩衝液を加える場合は、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緩衝液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ションします。（over night が好ましい）
※ Proteinase Kによる反応はチューブを逆さまにしたまま恒温室で行うか、あるいは15秒程度遠心し、チューブの底に溶液を集めヒートブロックで行います。

4） 99℃で10分間インキュベーションし、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。

※ 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。

※ サンプル量が充分な場合は、Proteinase K処理後に、フェノール抽出とエタノール沈殿によりタンパク質などを除くことをお勧めします。

※ DNAの抽出は市販されているDNA抽出キット等を使って実験を行うこともできます。
例） DNeasy® Blood/Tissue キット（キアゲン社製）
AllPrep DNA/RNA Micro キット（キアゲン社製）
ISOGEN（ニッポンジーン社製）
など

３－２. RNAの抽出

ここでは、キアゲン社 RNA 抽出用キット(RNeasy® Micro)を用いた場合を例としてご紹介します。その他、市販の RNA 回収用キットも適用可能です。詳しくはキットの販売メーカーにお問い合わせ下さい。

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。

１） RNA の抽出にはキアゲン社製 RNeasy® Micro キット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、
キアゲン社製キットを使用する場合、RNeasy® Micro キット(Cat. No. 74004) RLT緩衝液を使用します。キットを使用しない場合は通常のRNA実験に使用する変性剤を含む緩衝液に回収してください（グアニジンチオシアネートおよび2-メルカプトエタノールを含む緩衝液など）。

４） ダイセクションを行う際に緩衝液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（20～100μl程度）、 緩衝液中に直接サンプルを回収します。
※ 回収後に緩衝液を加える場合は、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緩衝液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。
※ 必要に応じて、ピペッ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） 回収後の手順はキットのプロトコールに従って実験を進めるか、酸性フェノールによるRNAの回収法など、一般的なRNA回収プロトコールに従って下さい。

７） 回収した RNA サンプルは-80℃で保存して下さい。

※ RNAを扱う実験操作は常法に従い、清浄なゴム手袋の使用、DEPC水の使用など心がけてください。

※ RNAの抽出は市販されているその他RNA抽出キット等を使って実験を行うこともできます。

例） AllPrep DNA/RNA Micro キット （キアゲン社製）
ISOGEN （ニッポンジーン社製）
など

３－３. RNA からの cDNA の合成

cDNAの作製は一般的なcDNA合成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付属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。
実際にはランダムプライマーとオリゴ(dT)プライマーの使い分けなど
目的に応じて実験を行ってください。

参考プロトコール

試薬等

4 µl	dNTP Blend, 10 mM	(Applied Biosystems N8080260)
4 µl	$MgCl_2$; 25mM	
2 µl	GeneAmp 10x Buffer II	(Applied Biosystems N8080010)
1 µl	Random hexamer primers	(Applied Biosystems N8080127)
1 µl	MuLV reverse transcriptase	(Applied Biosystems N8080018)
1 µl	RNase Inhibitor (optional)	(Applied Biosystems N8080119)

実験操作

1）RNA溶液とDEPC水を加え、反応溶液の全量を20μlとします。
↓
2） 室温で10分間インキュベーションします。
↓
3） 42℃で60分間インキュベーションします。
↓
4） その一部をPCRの鋳型として使用します。

※ RNAを扱う実験操作は常法に従い、清浄なゴム手袋の使用、DEPC水の使用など心がけてください。

３－４. PCR

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付属のプロトコールに従って実験を行ってください。

参考プロトコール

試薬等

1x Taq-buffer complete with 1.5 mM $MgCl_2$
dNTP-mix (200μM)
(Taq)-polymerase (1unit)
Primer 1 (2 μM)
Primer 2 (2 μM)
Template DNA
蒸留水を加え、トータル量を50μlとする

反応条件

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

※ 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。

※ 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. タンパク質の分析

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。

SDS-PAGE

・ SDS-PAGE用サンプル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（Bromophenol blue）, 2 mM Tris-base

・ 10分間煮沸し変性させます。

・ ゲルにロードしSDS-PAGEにかけます。

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。

・ その後は常法に従って下さい。

※ 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下さい。

4. アプリケーション例

4－1. マウス肝臓からの RNA 抽出（RNA*later*®による組織固定と RNA 安定化）

サンプルの作製

・ 未固定肝臓を OCT コンパウンドに包埋後、凍結しクリオスタットで 10μm 厚の切片に薄切します。

標本のスライドへの貼り付け

・ クリオスタット庫内でフォイル付スライド(ないしはフレーム)に切片を載せ、庫内から短時間取り出し、室温下で吸着させる。

固定

・ 吸着したらすぐに RNA*later*® 5 μl を切片に滴下し、ピペットの側面で組織全体に行き渡らせる。この際、切片をフォイルに吸着させてから RNA*later*®を載せて下さい。充分に組織がスライドに馴染む前に固定をすると組織が剥離しやすくなります。RNA*later*®を滴下した後、室温で乾燥させます。

染色・洗浄・乾燥

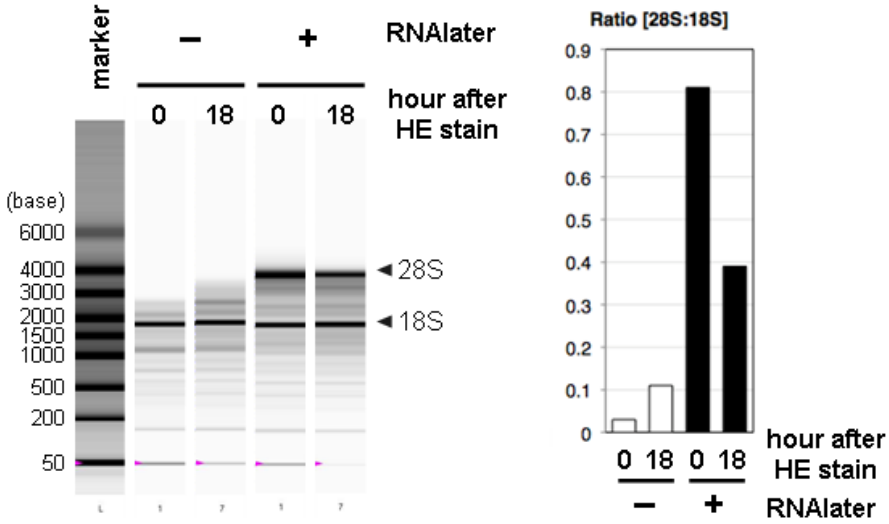
下記の順序で操作を行い、染色、洗浄、乾燥をして下さい。

・新鮮 MiliQ 水（氷冷）、10 秒 （50 ml チューブ内でスライドをゆっくり上下）
↓
・マイヤーヘマトキシリン （氷冷）、 200μl、1 分 （氷冷したアルミブロックの上にスライドを置き、ヘマトキシリンを滴下）
↓
・新鮮 MiliQ 水（氷冷）、10 秒 （50 ml チューブ内でスライドをゆっくり上下）
↓
・エオジン （氷冷） 200μl、2 分 （氷冷したアルミブロックの上にスライドを置き、エオジンを滴下）
↓
・70%エタノール（氷冷）、10 秒 （50 ml チューブ内でスライドをゆっくり上下）
↓
・95%エタノール（氷冷）、10 秒 （50 ml チューブ内でスライドをゆっくり上下）
↓
・エタノール（氷冷）、 10 秒 （50 ml チューブ内でスライドをゆっくり上下）
↓
・キシレン（室温）、 1 分
↓
・風乾、1 分

結果

- 6 x 10^6 平方マイクロメートルの切片を RNeasy® Plus Micro キット(キアゲン社製) を用いて RNA を回収した。RNA の品質を Experion™ RNA HighSens (BIO-RAD 社製)用分析キットを用いて解析し、28S:18S リボゾーム RNA の量比を電気泳動結果から計算した。
- RNA*later*®効果検討のため、HE 染色後すぐにダイセクションした場合、18時間室温放置後にダイセクションした場合を比較した。また、RNAlater を使用しない場合も併せて検討した。

- RNA*later*®により RNA の分解が抑えられ 18 時間後のサンプルでも充分量の RNA が回収できた。



提供: 滋賀県立成人病センター研究所　遺伝子研究部門
木下　和生　先生

４－２. 肺凍結サンプルからの RNA 抽出（有機溶媒固定）

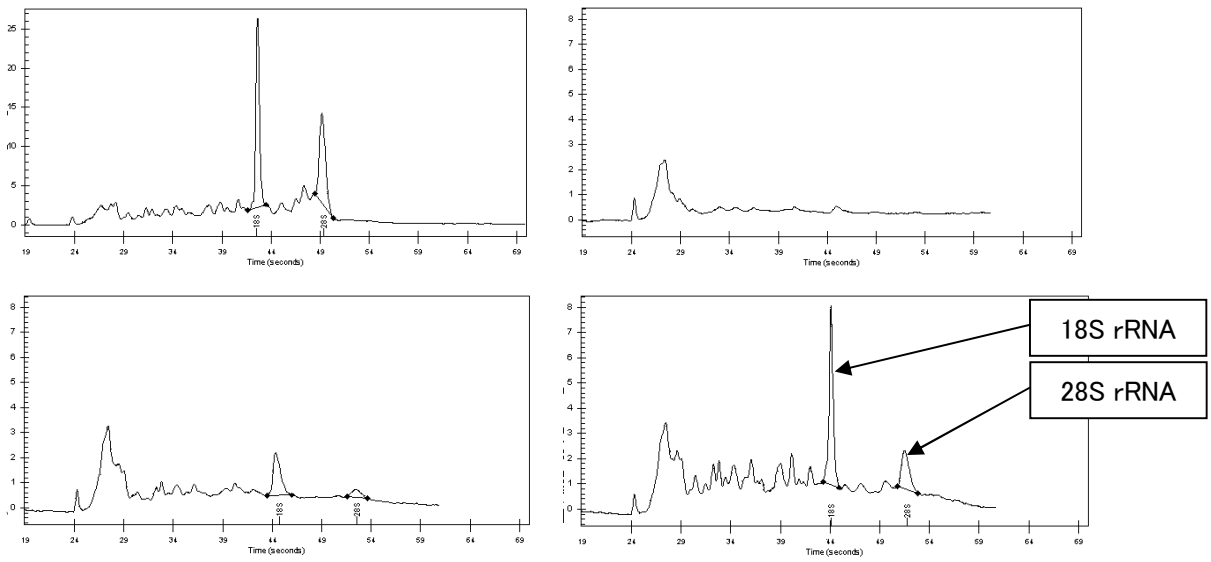
ここでは、LMD 標本作製と RNA の回収について、特に固定法についての比較を行なった。各種 RNA 実験（マイクロアレイ等）を行なうためには断片化されていない mRNA の回収が不可欠であり、この検討では 1.5kb 長のmRNA が保存されていることを RT-PCR により確認した。

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。
※　ここでは触れていませんが、RNA*later*®やアセトンでの固定がより有効な場合もあります。

サンプル
・ マウス肺の OCT コンパウンド凍結標本

方法
・ フォイル付スライドグラスを Poly-L-リジン　コーティング
　↓
・ フォイル付きスライドグラスを氷冷(ないしはクリオスタット庫内で冷却)
　↓
・ OCT コンパウンド抱埋凍結切片（20μm 厚）を作製
　↓
・ フォイル付きスライドグラスへ切片を貼りつける
　↓
・ 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℃）
　↓
・ 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。

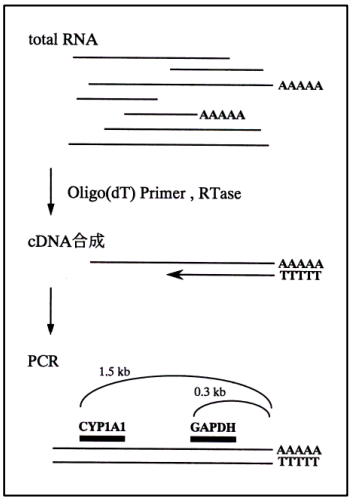


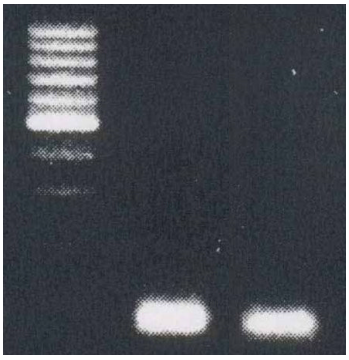
	① 固定前	② 100%EtOH	③ 70%EtOH	④ EtOH/Acetic Acid
rRNA Ratio[28S/18S]	0.66	ND	0.18	0.35

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。





M：分子マーカー
1：CYP1A1
2：GAPDH

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

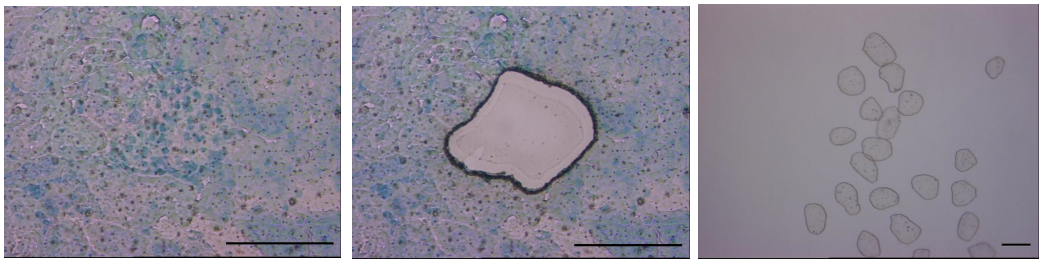
４－3. 腎臓糸球体からの RNA 抽出と RT-PCR

1） 凍結切片の準備

- **スライド**： 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、清浄なプラスチックﾁｭｰﾌﾞに入れ、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5μm 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**： 冷風ドライヤーで風乾。

2） LMD による回収

- 0.5 ml PCR チューブのキャップに TRIzol® （インビトロジェン社製）30μl を入れる。
- 糸球体のみを回収。



Bar=100μm

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、卓上遠心機でスピンダウン。
- キャップを開け、キャップ内部に再度 TRIzol®を 20μl 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）
- キャップを閉めスピンダウン。
- さらに TRIzol®を 150μl 加え、2～3 分室温でインキュベート。
- クロロホルム 40μl を加え、軽く転倒混和し、室温で 3 分間インキュベーション。
- 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 50μl 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（ﾆｯﾎﾟﾝｼﾞｰﾝ社）を 1μl 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 30μl(あるいは 20μl)を加え、沈殿物を溶解させ、これを RNA 溶液とした。

4) RT-PCR

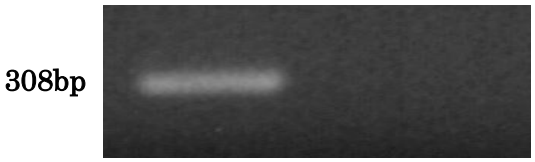
・ RNA 溶液の一部を RT-PCR のテンプレートとして使用。
・ RT-PCR は SuperScript One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq (LIFE TECHNOLOGIES 社)を使用。

・ 反応液(/1tube)

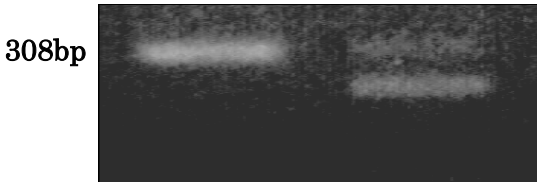
2X Reaction Mix		25μl
Template RNA		6μl
Sense/Anti-Sense Primer(GAPDH or VEGF, 各 10μM)	各	1μl
RT/PLATINUM Taq Mix		1μl
DEPC water	to	50μl

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。



左: GAPDH
右: no RT/PLATINUM Taq Mix



左: GAPDH
右: VEGF188 (311bp)
VEGF164 (239bp)

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

４－４. 運動神経細胞の回収と定量リアルタイム PCR

1. サンプル作製

1） 切片作製

① 200 ml 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。
② 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 コンパウンドと脊髄を入れ、容器ごと①に入れて固める。 ※この状態で-80℃保存可能。
③ 凍結した組織を 30μm 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）

2） 固定/染色/洗浄

① 切片を載せたスライドをエタノールに入れて、1 分間浸す（＝固定する）。
② エタノールから取り出して、RNase-free 水に浸漬し洗浄（5 分）。
③ スライドガラスを 0.03%トルイジンブルー溶液に約 5 分（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。
④ 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 水に 1 分浸し、2～3 回ゆっくりと上下させ洗浄。
⑤ 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て洗浄。
⑥ 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。この際、サンプル面に触れないように注意すること。
細胞（青紫に農染）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④と同様に DEPC 水に再度浸して色を抜く。
⑦ 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、冷風ドライヤーで
完全に乾燥させる。 ※ 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 RNeasy® Mini キット(キアゲン社製)を使用。
※ サンプル量により RNeasy® Micro キット(キアゲン社製)の方が適する場合があります。

● 事前の準備

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

● プロトコール

1） LMD により回収した各サンプルの容量をチューブごとに、RNase-free 水を加えて約 40 μl に合わせ、ピペッティングにより細胞を完全に溶解する。
※ 長時間の回収を行った場合、チューブ内の RLT buffer 量が減っていることがあります。
2） RLT buffer で lysate を 350 μl にメスアップし、緩やかに縣濁する。
3） 70%Etoh を 350 μl 加え、ピペッティングでよく縣濁する。
4） キット付属のスピンカラムを 2 ml-collection tube にセットし、700 μl になった溶解液をカラムに移す。 10,000 rpm. 15 sec 遠心。
5） フロースルーを捨て、RW1 buffer で洗浄。(700 μl の RW1 buffer をカラムに入れ 10,000 rpm. 15 sec 遠心。フロースルーを捨てる。
6） カラムを新しい 2ml-collection tube にセットし、500μl の RPE buffer で洗浄。10,000 rpm. 15 sec 遠心し、フロースルーを捨てる。
7） 500 μl の RPE buffer でカラムを洗浄。10,000 rpm. 2 min 遠心し、フロースルーを捨てる。
8） 15,000 rpm. 2 min 遠心。(メンブランの乾燥)
9） カラムを新しい 1.5 ml-collection tube にセットし、50 μl の RNase-free 水をカラムに入れ、1 min.放置。12,000 rpm. 1 min 遠心し、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 酢酸ナトリウム溶液、3 倍量の EtOH を加える。
・ －20℃または－80℃で over night 静置
・ 遠心後、ペレットを 10.8 μl の RNase-free 水に溶解。

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。

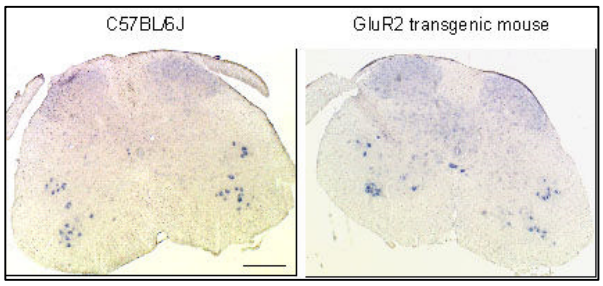


図1. ChAT(choline acetyltransferase)の *In situ* hybridyzation. Bar=450 μm

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）

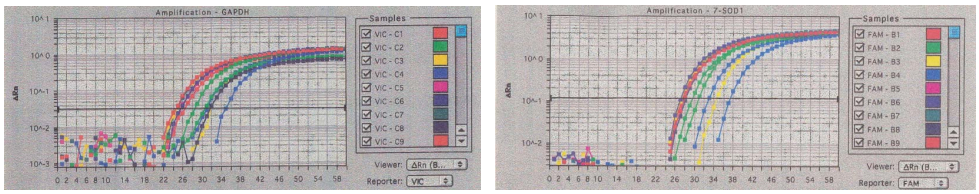


図2. GAPDH および SOD1 のリアルタイム定量 PCR（Applied Biosystems 社 Sequence Detection System を使用）。10 細胞相当量の mRNA からの増幅、定量が可能。mRNA の精製にはキアゲン社RNeasyMini を使用。

GluR2 expression level in motorneurons 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
舘野 美成子 先生、 杉本 久子 先生、 高橋 良輔 先生

４－５. 蛍光免疫染色サンプルのウェスタンブロッティング解析

1. サンプル作製

1） 凍結切片作製

① 腫瘍組織を摘出し、OCT コンパウンドに包埋し、アセトン-ドライアイスで凍結。
② クリオスタット（Leica CM1950）で厚さ 20 μm 厚の切片を作成。
③ フォイル付きスライド（PPS）に切片をマウント。

2） マイクロウェーブ迅速処理を用いた免疫染色

① 切片を 1×Morphosave (VENTANA)に浸し、室温で 15 分間処理し、組織を固定。
② DW でスライドを洗浄 （1 分間、室温）。
③ 0.05 M TBS (pH 7.6) でスライドを洗浄 （室温、1 分間）。
④ PAP Pen で組織を囲む（乾燥厳禁）。
⑤ 0.05 M TBS (pH 7.6) でスライドを洗浄 （室温、1分間）。
⑥ Blocking One Histo (ナカライ)で、5 分間、室温で処理しブロッキング。
⑦ 0.05 M TBS (pH 7.6) with 0.05% Tween 20 でスライドを洗浄 （室温、1分間）。
⑧ 一次抗体処理（ラットモノクローナル抗体）、MI-77 マイクロウェーブ処理を 2 分間、後、室温で 15 分間インキュベーション。
⑨ 0.05 M TBS (pH 7.6) with 0.05% Tween 20 で MI-77 マイクロウェーブ処理、1 分間（スライドの洗浄）。
⑩ 二次抗体処理（FITC 抗-ラット抗体）、MI-77 マイクロウェーブ処理を 2 分間、後、室温で 10 分間インキュベーション。
⑪ 0.05 M TBS (pH 7.6) with 0.05% Tween 20 で MI-77 マイクロウェーブ処理、1 分間（スライドの洗浄）。
⑫ DW でスライドを洗浄 （室温、1 分間）。
⑬ スライドを風乾。

※ 「マイクロウェーブ迅速試料処理装置 MI-77 型」は日本オートマティック・コントロール株式会社の製品です。

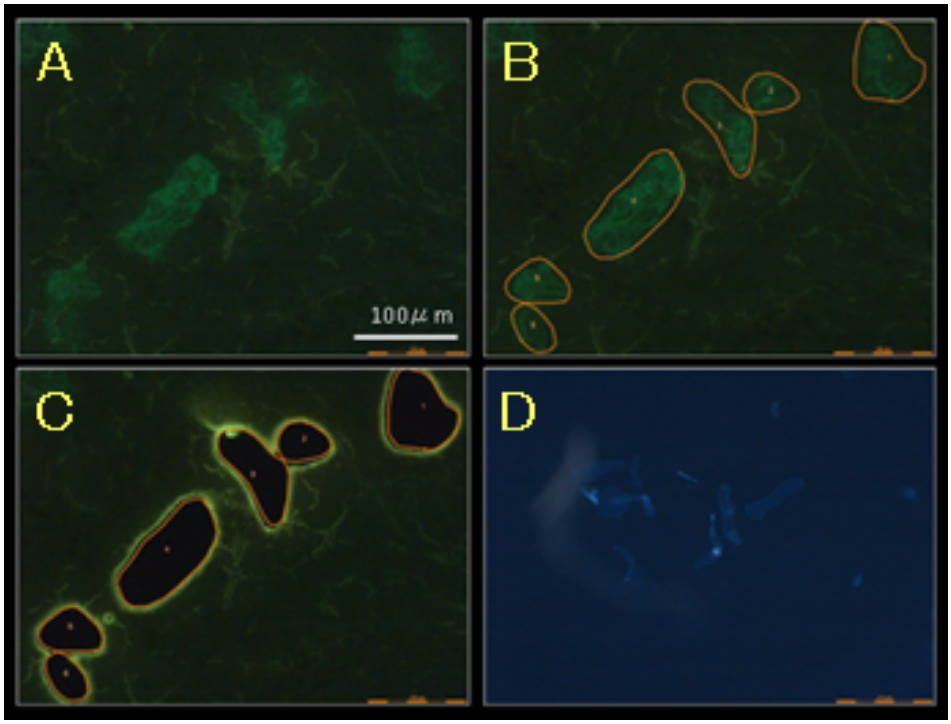
2. サンプル回収、その他

● サンプルの回収

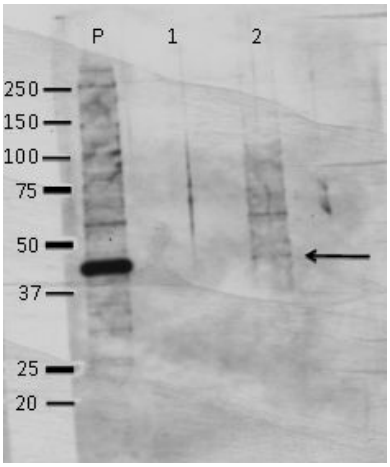
① LMD によりカットしたサンプルは、事前に SDS サンプルバッファーを入れておいたチューブキャップに回収。観察の利便性を考慮して、サンプルバッファーに BPB は入れておかず、ゲルにアプライする直前に適量の BPB を加える。

② 回収サンプル量は、約 461,942 μm^2 程度で内部標準とするアクチンが検出できた。

③ SDS-PAGE、およびウェスタンブロッティングは常法に従い行った。



A～C： 蛍光標識された部位のみを回収。 D： 回収後のサンプル。



蛍光免疫染色サンプルからのウェスタンブロッティングによるタンパク質の検出。
P：ポジティブコントロール、2：サンプル

提供： 愛媛大学大学院医学系研究科 システムバイオロジー部門
分子ネットワーク解析学講座 生化学・分子遺伝学分野
福田 尚代 先生、 東山 繁樹 先生
愛媛大学大学院医学系研究科 病態解析学講座 ゲノム病理学分野
宮崎 龍彦 先生

5. 参考

5－1. 参考文献

1） Kölble, K.
The LEICA microdissection system: design and applications.
J. Mol. Med. 2000; **78**: B24–25.

2） Mori, M., Mimori, K., Yoshikawa, Y., Shibuta, K., Utsunomiya, T., Sadanaga, N., Tanaka, F., Matsuyama, A., Inoue, H. and Sugimachi, K.
Analysis of the gene–expression profile regarding the progression of human gastric carcinoma.
Surgery 2002; **131**: S39–47.

3） Inoue, K., Sakurada, Y., Murakami, M., Shirota, M. and 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; **442**: 159–162.

4） Tateno, M., Sadakata, H., Tanaka, M., Itohara, S., Shin, R.–M., Miura, M., Masuda, M., Aosaki, T., Urushitani, M., Misawa, H. and Takahashi, R.
Calcium–permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model.
Hum. Mol. Genet. 2004; **13**: 2183–2196

５－２. 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）

ライカマイクロシステムズ株式会社 BSD 事業部

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ため､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言われている。

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１０μｍ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２００μｍ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の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。

５－３. 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（2）

ライカマイクロシステムズ株式会社 BSD 事業部

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

純水のみの場合	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）

５－４. 凍結標本作製のための参考資料－表面張力の関係

ライカマイクロシステムズ株式会社 BSD 事業部

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
ダイ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**

MEMO

Leica
MICROSYSTEMS

ライカ マイクロシステムズ株式会社

本　　社　〒169-0075　東京都新宿区高田馬場1-29-9　Tel.03-6758-5680　Fax.03-5155-4336
大　阪セールスオフィス　〒531-0072　大阪市北区豊崎5-4-9 商業第2ビル10F　Tel.06-6374-9771　Fax.06-6374-9772
名古屋セールスオフィス　〒460-0003　名古屋市中区錦2-15-20 三永伏見ビル2F　Tel.052-222-3939　Fax.052-222-3784
福　岡セールスオフィス　〒812-0025　福岡市博多区店屋町8-30 博多フコク生命ビル12F　Tel.092-282-9771　Fax.092-282-9772

http://www.leica-microsystems.co.jp　E-mail: lmc@leica-microsystems.co.jp