

急速凍結固定された生体試料のラマンイメージング

Raman Imaging of Rapid Cryo-Fixation Biological Sample

○水島健太¹、熊本康昭¹、山中真仁¹、藤田克昌^{1,2}

(1. 阪大工、2. 先端フォトバイオ)

○Kenta Mizushima¹, Yasuaki Kumamoto¹, Masahito Yamanaka¹, Katsumasa Fujita^{1,2},

(1. Osaka Univ., 2. AIST Advanced Photo-Bio Lab.)

E-mail: fujita@ap.eng.osaka-u.ac.jp

ラマン顕微鏡は細胞や生体組織の様々な分子を同時に無標識イメージングできるが、微弱なラマン散乱光を検出するため、比較的高強度のレーザー光が照明に用いられる。高い信号対雑音比で観察する場合は、高強度レーザー照射による試料ダメージと、長時間測定中の細胞の動きにより、正確なラマン分光画像が得られない可能性がある。測定中の試料の動きを抑えるために試料を化学固定や脱水固定などの手法が用いられるが、これらは細胞内分子の状態を変化させ、試料を変質させてしまう。

本研究では、高い信号対雑音比のラマン観察像を得るために、急速凍結固定した試料を低温に維持したまま長時間露光による観察が可能なラマン顕微鏡を開発した。凍結時の氷晶形成による試料の損傷を抑えるために、液体窒素温度の液体プロパンの直接接触による急速凍結により試料を固定した。そして、内部に液体窒素を循環させた金属板に試料を接触させ、試料を低温状態(-50 °C)に維持したまま観察を行った。また、ラマン観察には、ライン照明方式を利用した。[1][2]

Fig. 1 に HeLa 細胞を急速凍結固定し、低温状態で得られたラマン観察像と明視野像を示す。本実験では 1 ライン毎に 20 秒間試料を露光した。この時の信号対雑音比は、従来生細胞を観察する際の実験条件(1 ライン当たり 5 秒露光)[1]と比較して、約 2 倍に向上した。また、明視野像からは凍結固定の際の氷晶発生による細胞の損傷は見られなかった。さらに、凍結固定された細胞および常温下にある細胞のラマン観察像と明視野像を比較したところ、細胞内構造や分子の分布に大きな変化は確認されなかった。これらの結果から、急速凍結固定による生体試料の固定は、高い信号対雑音比でのラマン散乱観察に有用であることが示された。

謝辞:本研究は、JST、CREST(グラント番号: MPMJCR1925)の支援を受けたものである。

[1] K. Hamada. et al, J. Biomed. Opt. **13**, 044, (2008)

[2] Palonpon. et al, Nat. Protoc. **8**, 677-692, (2013)

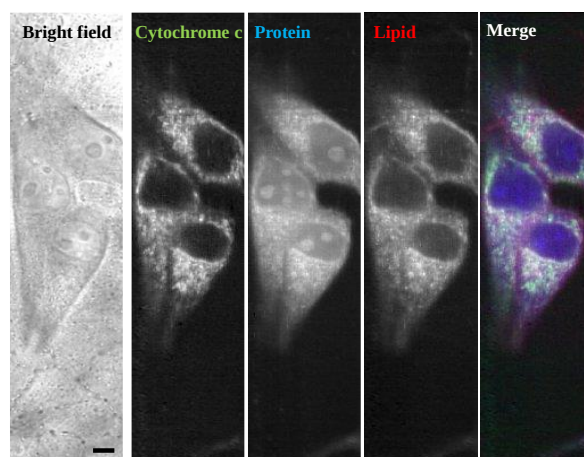


Figure 1. Bright field image and Raman images of HeLa cells with rapid cryofixation. Exposure time was 20 seconds per line for the Raman images. The excitation wavelength and the power were 532 nm and 3.0 mW/um² at the sample plane respectively. In the color-merged image, green, blue and red colors show cytochrome c, protein and lipid, respectively. Scale bar is 5 um.