

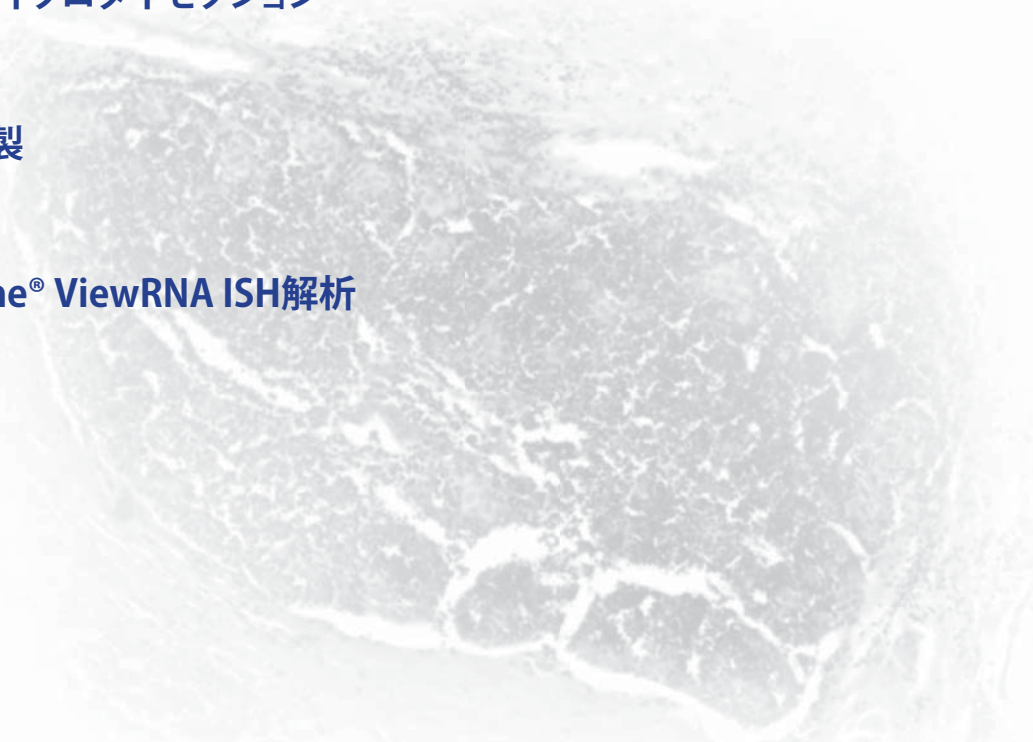


# APRO Science News Vol.8

## レーザーマイクロ ダイセクション 特集。

組織学・病理学から分子生物学・生化学へのアプローチ

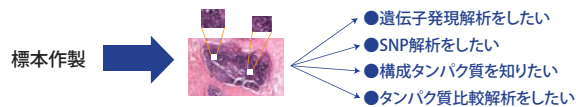
- レーザーマイクロダイセクション
- 切片作製
- ブロック作製
- 組織染色
- QuantiGene® ViewRNA ISH解析



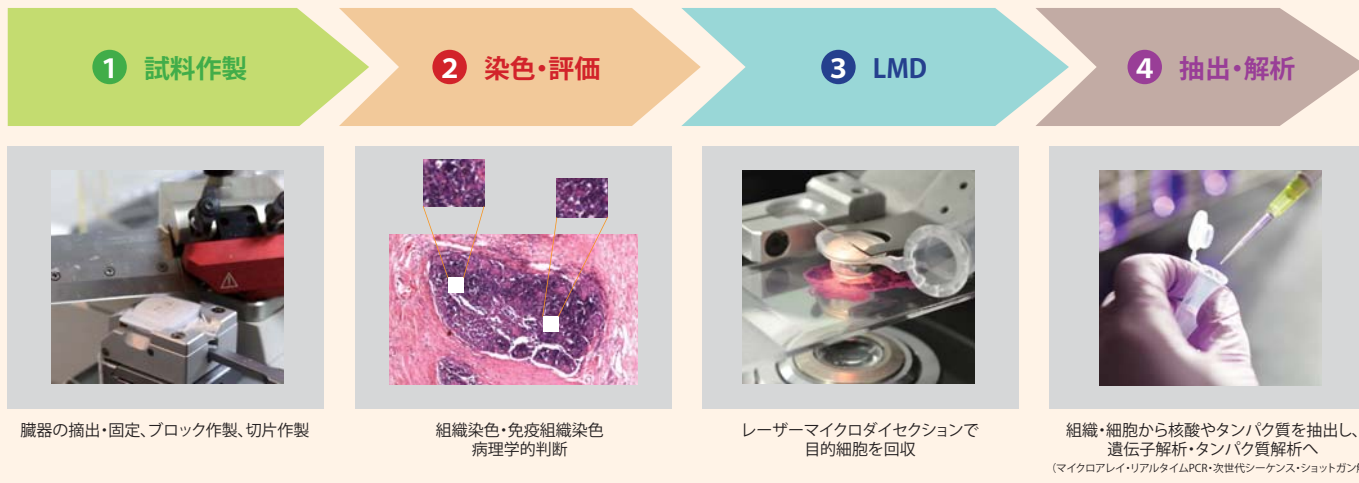
# レーザーマイクロダイセクション ～目的の細胞、組織のみを狙ってサンプルを回収します～

レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法は、目的の細胞、組織を顕微鏡で観察・確認をしながら、特定の領域のみをレーザーで切り出して回収することが可能です。摘出した臓器から、必要な領域のみを切り出して解析に使用することで、バックグラウンドが低く、特異性の高いデータを、再現性よく得ることを可能とします。

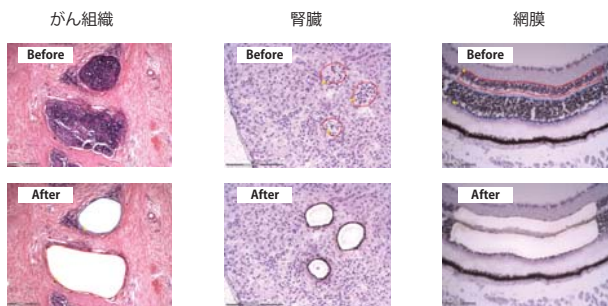
レーザーマイクロダイセクション法を用いることで組織学・病理学から分子生物学・生化学へのアプローチが可能になります。



## 試料作製から解析までの受託ワークフロー



- 実施使用例  
 ・がん組織からがん細胞を回収する    ・腎臓から糸球体を回収する    ・網膜から特定の領域を回収する



### ●未固定凍結ブロックの作製法

- ・クリオモールドに OCT コンパウンド(4℃)を満たし、その中に摘出した組織を沈める。
  - ・ドライアイス・エタノール(アセトンでも可)に浮かべて、凍結するまで待つ。
  - ・余分な液体を拭き取り、-80℃で保管する。
  - ・ドライアイスと同梱して冷凍便で送付する。
- ※切片の向きに指定がある場合には、組織を沈める向きに注意する。  
 ※低温での作業になる為、保護の為の手袋等を着用し、注意して実施する。

核酸抽出には凍結ブロックがおすすめです。

### ■ココがPoint!

液体窒素を用いて組織を凍結させると、組織や包埋剤がひび割れたり、気泡で組織形態が悪くなる場合があります。  
 上記の通り、ドライアイス・エタノールを使用することで、ひび割れや気泡を軽減できる為、お勧めします。

### ●試料作製の注意点

- ・核酸、タンパク質の抽出には、未固定の凍結ブロックをお勧めします。
- ・FFPE(ホルマリン固定パラフィンブロック)からのLMDは可能ですが、核酸は分解している可能性があります。基本的にマイクロアレイには向きません。
- ・次世代シーケンスを利用すれば、FFPE サンプルから回収したmRNAを用いて発現解析を実施することが可能です。
- ・FFPE サンプルからタンパク質を網羅的に同定するショットガン分析が可能です。ペプチド断片を回収しますので、ウェスタンブロット等には使用できません。また、ショットガン分析を実施する場合の染色方法は、ヘマトキシリン染色に限ります。

FFPEから次世代シーケンス解析とショットガン解析が可能です!



## Question

## Answer

LMDでは、どれくらいのサイズを切り出すことが可能ですか?	1細胞を切り出すことは可能ですが、周辺の細胞はレーザーで消失します。
LMDには、どれくらいのサンプル量が必要ですか?	組織によって異なりますが、核酸(1μg)の回収には、厚さ 10μm, 5mm x 10mm 程度、部位特異的なショットガン分析には、厚さ 10μm, 2mm x 4mm 程度が必要です。
LMDには、どのようなサンプルを用意すれば良いですか?	基本的には、上記の未固定凍結ブロックとしてご提供ください。固定したサンプルをご提供いただき、ブロック作製から実施することも可能ですが核酸やタンパク質が分解する可能性があります。
LMDには、どれくらいの費用が必要ですか?	初めてのご依頼の場合には、検討が必要になります。その結果を踏まえて、追加で実施する作業・費用をご案内します。

## ブロック作製

パラフィンブロック、凍結ブロックを作製します



標本作製を行うためには、パラフィンブロックもしくはOCTコンパウンドに包埋した凍結ブロックを作製する必要があります。

パラフィンブロックは、形態保持に優れており比較的長期に保存することが可能ですが、レーザーマ

イクロダイセクション後に核酸抽出を実施する場合には、未固定凍結ブロックからの実施をお勧めします。パラフィンブロックからの実施も可能ですが、核酸は分解している可能性があります。

ブロックの種類	おすすめの用途
未固定凍結ブロック	核酸抽出、タンパク質抽出
パラフィンブロック(FFPE)	免疫組織染色、 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション、(タンパク質の)ショットガン分析

ご提供組織からブロック作製を実施する場合には、未固定組織では輸送が出来ませんので、固定後の組織をご提供ください。未固定凍結ブロックの作製法方は、前ページをご参考ください。

受託項目名	価格(税別)
ブロック作製	¥3,000~/ブロック

※レーザーマイクロダイセクションの費用に、ブロック作製の費用は含まれません。

## 切片作製

組織ブロックより薄切を行い、標本スライドを作製します



レーザーマイクロダイセクションを実施する場合には、薄切した切片をメンブレンスライドに載せる必要があります。切片としてご提供を頂ける場合には、メンブレンスライドをお送りしますので、ご相談下さい。

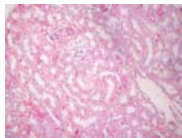
- 熟練した技術者が対応します。
- 迅速に対応します
- 薄切する部位など、ご要望に応じたスライドを作製します。
- スライドに載せる切片の枚数はご要望に応じます。

受託項目名	価格(税別)
切片作製 (1切片/1スライド)	¥1,000~/スライド
切片作製 (2切片/1スライド)	¥1,500~/スライド
切片作製 (3切片/1スライド)	¥2,000~/スライド

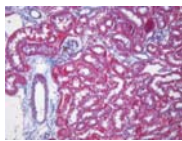
※レーザーマイクロダイセクションの費用に、切片作製の費用は含まれております。

## 組織染色

各種組織染色、免疫組織染色を行います



HE染色



マッサントリクローム染色

通常レーザーマイクロダイセクションを実施する際には、HE染色を実施しております。また、部位特異的なショットガン分析を実施する場合には、ヘマトキシリン染色を実施しております。目的領域の確認において、その他の染色や免疫組織染色が必要な場合は、ご相談下さい。

免疫組織染色したサンプルからレーザーマイクロダイセクションを実施することは可能ですが、核酸は著しく分解している可能性があります。またIgGが大量に付着しているため、タンパク質解析に使用することは出来ません。

連続切片を作製して免疫組織染色を行い目的部位を確認した後に、隣り合った切片をレーザーマイクロダイセクションに使用することも可能です。染色した組織から目的領域を確認するために、病理学的な判断を必要とする場合には、専門医による対応を実施することが可能です。

- レーザーマイクロダイセクションにはHE染色を実施します。
- マッサントリクローム染色、PAS染色等の組織染色にも対応します。
- 専門医による病理学的判断を実施することも可能です。

受託項目名	価格(税別)
組織染色	¥1,000~/スライド
免疫組織染色	¥5,000~/スライド
病理学的判断	¥5,000~/スライド

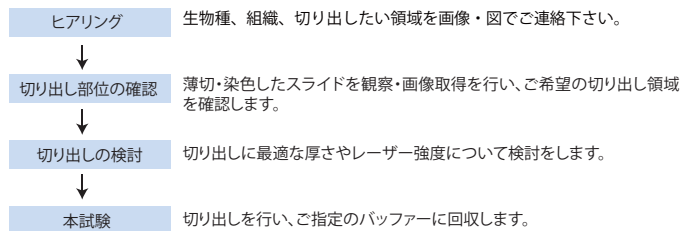
※レーザーマイクロダイセクションの費用に、HE染色の費用は含まれております。  
 ※免疫組織染色に使用する抗体は、ご提供を頂くか別途で実費請求と致します。  
 ※免疫組織染色の実績の無い抗体の場合には、条件検討からの実施をお勧めします。条件検討例として、顕活化条件(3点)×抗体濃度(3点)=9条件(¥5,000×9= ¥45,000)

## レーザーマイクロダイセクション

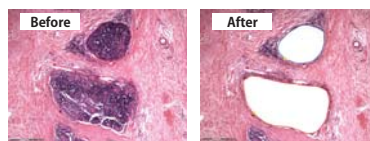
顕微鏡下で目的の細胞・組織を切り出して回収します

染色後の組織標本から必要な部位のみを切り出して回収します。病態部位と正常部位とを切り分けて回収することが可能です。必要に応じて核酸抽出(RNA抽出)やタンパク質抽出を実施することが可能です。

- ご依頼までの流れについて



※追加のご依頼は本試験のみを実施します。



受託項目名	価格(税別)
レーザーマイクロダイセクション及びRNA抽出(検討)	¥148,000~/スライド、核酸抽出
レーザーマイクロダイセクション(追加)	¥20,000~/スライド
核酸抽出(追加)	¥25,000~/回
タンパク質抽出	¥25,000~/回

※切り出す組織の面積や個数等、作業内容に応じて価格が変動します。

# QuantiGene® ViewRNA ISH解析

臨床検体(FFPE)から *in situ* ハイブリダイゼーションが可能です

## サービスの特徴

- ・高感度
- ・FFPE(ホルマリン固定) サンプルにも対応
- ・2種類の mRNA を同時に検出可能

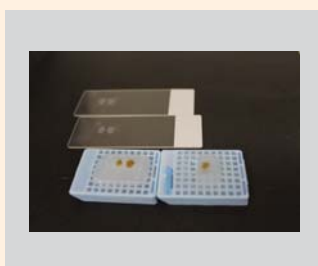
## こんな方におススメ

- ・従来法で、良好な結果が得られなかった方
- ・臨床検体(FFPE)でISHを諦めていた方
- ・新しくISHの実施を検討されている方

QuantiGene® ViewRNA ISH解析は、従来法とは全く異なる新しい高感度 *in situ* hybridization (ISH)法です。Affymetrix/Panomics 社独自のプローブ設計技術とbranched DNA (bDNA) によるシグナル増幅法に加え、数十merの短いプローブを用いてハイブリ効率を高めることで、高感度にISHを実施することが可能です。

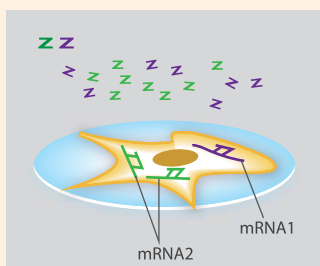
## QuantiGene® ViewRNA ISH解析の受託ワークフロー

### 1 サンプル前処理



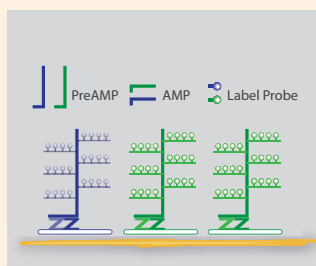
臓器の抽出・固定、ブロック作製、切片作製

### 2 ハイブリダイズ



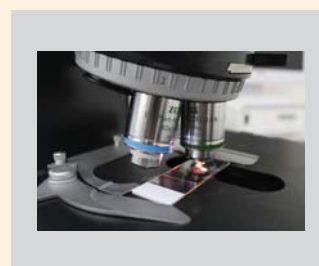
1種類の目的遺伝子に対して数十merの短いプローブを10種類以上使用します。同じサンプル上で、2種類のmRNAを同時に検出可能です。

### 3 シグナルの増幅



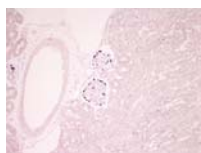
Pre-Amplifier(PreAMP)、Amplifier(AMP)、Label Probeの順に、ハイブリダイゼーションを行い、シグナルを増幅させ、蛍光または色素で検出します。

### 4 観察・納品

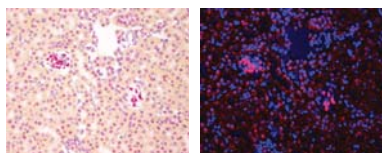


ご希望に応じて、画像取得を行います。作製したスライドを納品します。

### マウス腎臓の染色例



従来法 (DIG labeled Probe ISH)



View RNA ISH

従来法 (赤:VegfA, 青:核)、View RNA ISH (赤:VegfA, 青:核)

※従来法で検出できていないシグナルは、View RNA ISHでも同様のパターンで検出できます。  
※従来法では検出できなかったRNA量でも、View RNA では高感度に検出が可能です。

### 【おすすめのサンプル調製方法について】

#### <4%パラホルムアルデヒド固定>

View RNA ISH解析は、ホルマリン固定サンプルからでも対応は可能ですが、新たに調製される場合は、4%パラホルムアルデヒド固定をお勧めしております。

1. 組織の体積の10倍以上の4%パラホルムアルデヒド/PBS溶液で約1時間の固定(4℃)を行う。
2. 4%パラホルムアルデヒド/PBS溶液を交換し、約12時間(4℃)の固定を行う。
3. 下記の操作でアルコールによる脱水を行う。
  - ・PBS、10分×2回(4℃)
  - ・25%エタノール/PBS、10分(4℃)
  - ・50%エタノール/PBS、10分(4℃)
  - ・75%エタノール/DW、10分(4℃)
  - ・100%エタノール、10分×2回(4℃)
4. -20℃で冷凍保存する。

※4%パラホルムアルデヒド/PBS溶液は要時調製してください。

(固定液中で保管・郵送も可能ですが、過固定となりますので、速やかに送付下さい。)

※ブロック作製、切片作製の費用は、別途必要です。

※1度実施したサンプルについて追加で別のプローブで別の遺伝子を検出する場合には、追加分析(¥25,000/スライド)とViewRNAプローブの費用で対応が可能です。

※ご依頼に際して、遺伝子名、Accession No.をお知らせ下さい。既製品で入手可能かカスタムになるか確認をします。

### 受託項目名

### 価格(税別)

QuantiGene® ViewRNA ISH解析	¥198,000/分析
追加分析	¥25,000/スライド
ViewRNA プローブ	¥64,000/カスタム ¥27,000/既製品
画像取得	¥500/スライド

研究用試薬・機器・受託サービス



## 株式会社 アプロサイエンス

お問合せ: tel.088-683-7211 ✉info@aprosci.com

<http://aproscience.com/>

本社

〒771-0360 徳島県鳴門市瀬戸町明神字板屋島124-4 TEL:088-683-7211 FAX:088-683-7212

東京営業所

〒101-0051 東京都千代田区神田神保町2-34-7 TEL:03-6272-9301 FAX:03-6272-9302

販売店