

1994年度日本電子顕微鏡学会技術認定試験問題

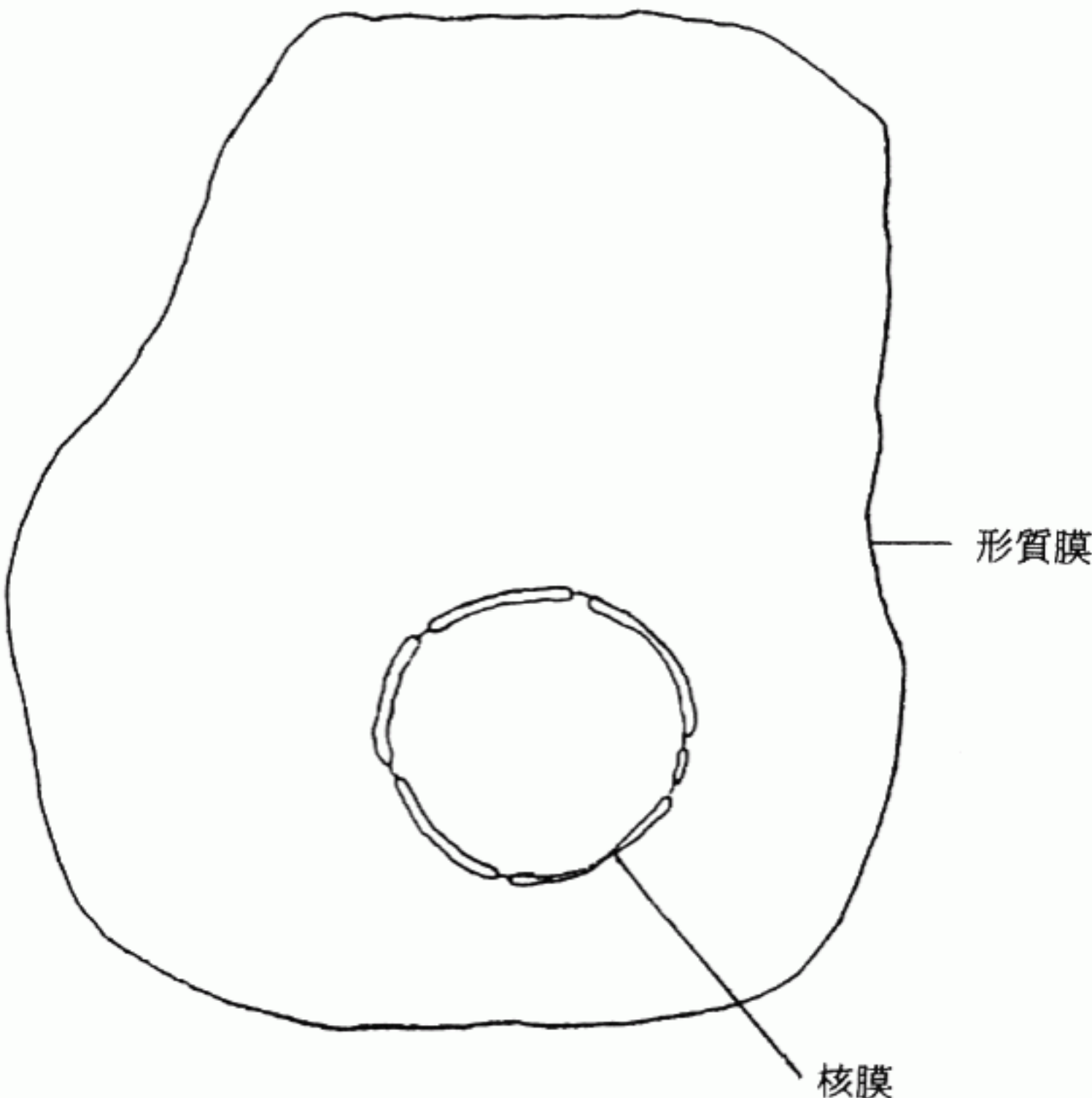
特殊技術 I 筆記 (生物)

必須問題

問1～問6のすべてに答えよ。

問 1. 下図は一般的な細胞の輪郭(形質膜)と核膜を描いたものである。以下に挙げる細胞小器官の特徴を捉えて図示し、引出し線で細胞外に名称を記せ。

- A. 核小体
- B. ミトコンドリア
- C. 粗面小胞体
- D. 滑面小胞体
- E. 遊離リボゾーム
- F. ゴルジ装置
- G. リソゾーム (ライソゾーム)
- H. 中心体
- I. 微小管
- J. ペルオキシゾーム



問 2. 血球, 培養細胞, 原虫などの浮遊細胞を超薄切片法で観察したい。固定から包埋までの代表的な方法を2つ挙げ, 各々の手順について注意すべき点を含めて述べよ。

問 3. フリーズフラクチャー法とフリーズエッチング法について以下の各問に答えよ。

- 1) 二つの方法は微細構造をどのように観察したいかによって使い分けられている。この点に留意して両者の違いを簡潔に説明せよ。
- 2) これらの方法を行うために試料を急速凍結する時, 氷晶防止剤を用いない方がよいのはどちらの方法か。その理由を述べよ。
- 3) レプリカ膜作製のため白金などの金属蒸着とともにカーボン蒸着も行う。カーボン蒸着がなぜ必要なのか簡単に述べよ。

問 4. 走査電子顕微鏡における二次電子像と反射電子像の違いを次の点に関して述べよ。

- 1) 信号の発生源
- 2) 試料作製法
- 3) 生物試料への応用

問 5. 膜性細胞小器官を走査電子顕微鏡で観察したい。試料作製法について述べよ。

問 6. ダイヤモンドナイフ使用上の注意を箇条書きにして述べよ。

生物選択問題

問1～問7から4問を選び答えよ

選択しない4問には解答欄に×印を入れよ。

(注意) 5問以上答えた場合は全て無効となる。

問 1. ATPase の実験結果を読み、問いに答えよ。

1 mm³ の肝臓の組織を6%のショ糖を含む2%グルタルアルデヒド (カコシル酸緩衝液 pH 7.4) で4°C, 30分固定したのち、同じ緩衝液で洗浄した。その後40 μm の凍結切片を作製し反応を行い、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片観察を行ったところ鉛を補足剤に用いたATPase の反応が弱かったので、再度実験を行い、基質であるATP を倍に増やして、37°C, 30分反応を行い、電顕観察を行った。40 μm 切片の辺縁では活性は陰性であったが、深部に向かって次第に活性が観察されるようになり、最深部で活性は最も強かった。深部に近づくに従って反応最終産物も次第に粗大になった。この実験では、組織の全域に弱い核染が見られ、反応産物の拡散が疑われたので、実験ノートを見直すと、この実験における反応液は反応終了時に白濁していたとの記録があった。また核染は無基質対照実験では観察されなかった。

- 1) 切片辺縁に陰性所見が見られた原因は何か。その解決策を述べよ。
- 2) 電子顕微鏡で活性の局在を検討する場合、切片の辺縁から深部にかけてのどの部位で所見を採るのが適当か理由を挙げて考えを述べよ。
- 3) 核染が見られた原因として何を最も疑うべきかを述べ、その解決策を述べよ。

問 2. グルタルアルデヒドと四酸化オスミウムの二重固定を施し、エポキシ樹脂に包埋した。この試料を用い、免疫電顕の post-embedding 法で下垂体前葉の成長ホルモンの局在を観察したい。超薄切片作製から電子顕微鏡で観察するまでの過程をフローチャートで示せ。

問 3. 植物組織の透過電子顕微鏡観察で問題になる次の1)-4) について、理由を説明せよ。

- 1) 固定液が組織に浸透しにくい。(具体例を2つ挙げよ)
- 2) 固定時に組織が破壊されやすい。
- 3) 薄切がしにくい。
- 4) 観察時に切片が破れやすい。

問 4. 植物組織の電子顕微鏡試料作製に関する以下の問いに答えよ。

- 1) 緑葉の細片がグルタルアルデヒド固定液中で浮かんだ。沈めるために行われる物理的手法は何か。
- 2) 固定後に酢酸ウラニルでブロック染色を行いたい。リン酸緩衝液を用いるのが不適當である理由は何か。
- 3) 前固定で、液の浸透をよくするためにグルタルアルデヒドと混合して用いることができる固定剤2例を挙げよ。
- 4) 四酸化オスミウムで後固定し、エタノールで脱水した。含水量の多い組織では何%ぐらいのエタノールで脱水を始めるべきか。
- 5) エポキシ樹脂に包埋したが、薄切時に試料表面で樹脂が剝離した。これを避けるための対策は何か。

問 5. 液体培地で培養している酵母の細胞構造を、超薄切片法で観察したい。細胞壁、核、ミトコンドリア、リボゾームを含む微細構造を見るためには、試料作製をどのように行えばよいか。試料採取から電子顕微鏡観察までの具体的手順を記せ。

問 6. ウイルス粒子の微細構造をネガティブ染色法で観察したい。次の問いに答えよ。

- 1) 染色液の選択と、その選択の理由を述べよ。
- 2) 支持膜の選択と、その使用上の注意を述べよ。
- 3) 観察・撮影に際しての注意を述べよ。

問 7. 蛍光抗体法によって浮遊細胞の形質膜に強い陽性反応が証明されたので、この免疫反応部位を電子顕微鏡レベルで分析する依頼を受けた。透過電子顕微鏡と走査電子顕微鏡で証明するための方法を述べよ。