

1996年度日本電子顕微鏡学会技術認定試験問題

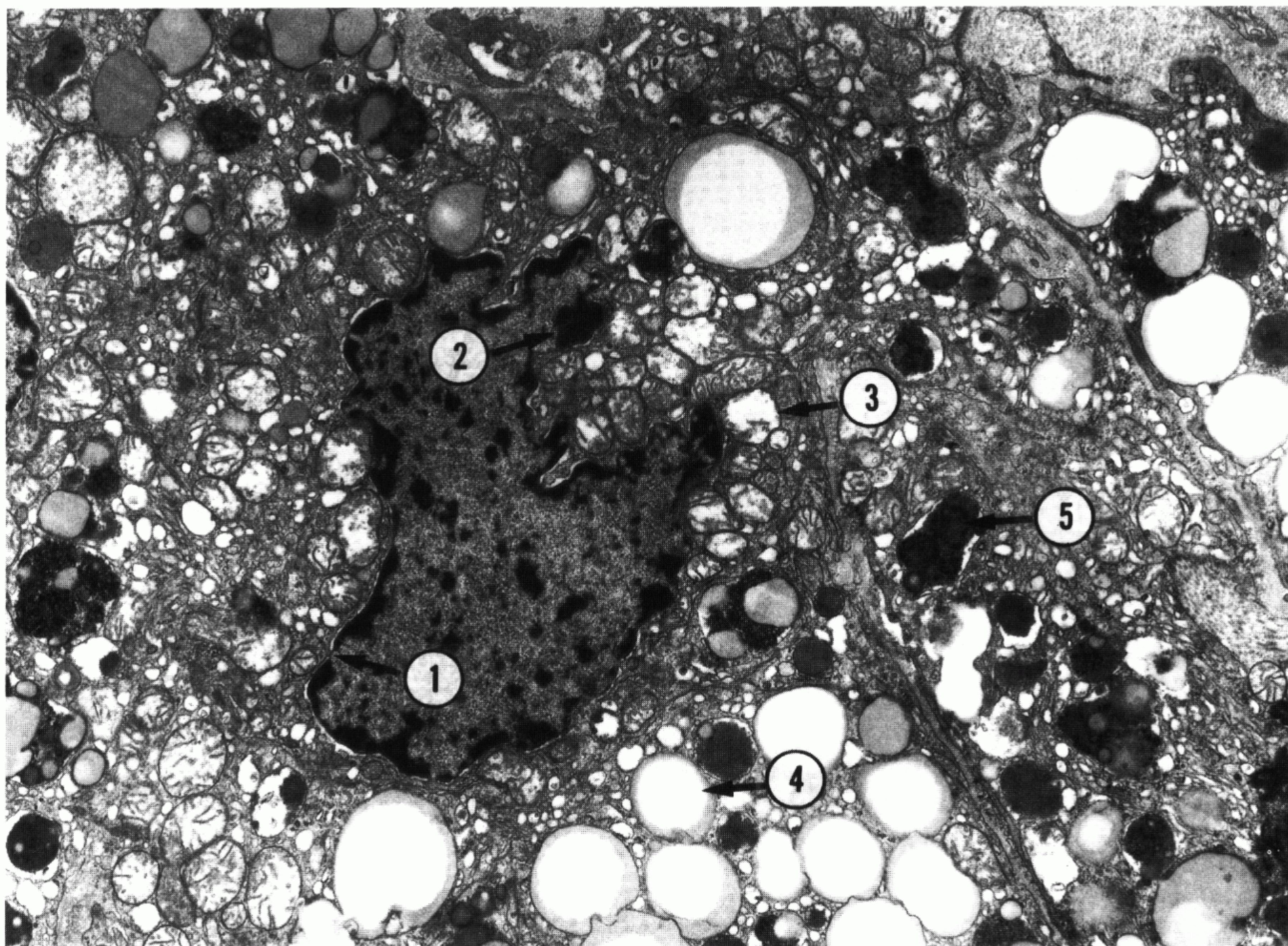
特殊技術 I 筆記 (生物)

必須問題は問1～問6の全てに答え、選択問題は動物、植物、微生物の何れか2つから、各2問ずつ選択すること。

生物必須問題

問1. 次の電顕写真について問に答えよ。

1. 矢印① (1) 隙間の名称は何か。
2. 矢印② (1) 電子密度の高い部分の名称は何か。
(2) この部分には存在している物質の名称は何か。
3. 矢印③ (1) 矢印で示す丸い細胞内小器官の名称は何か。
(2) この細胞内小器官の機能は何か。
(3) この細胞内小器官の像から試料作製上の注意に関して何が考えられるか。
4. 矢印④ (1) この中心が白い細胞内小器官の名称は何か。
(2) この細胞内小器官にはいかなる物質が含まれると考えられるか。
5. 矢印⑤ (1) この電子密度の高い細胞内小器官の名称は何か。
(2) この細胞内小器官はどのような機能を営むか。
6. この電顕像を更に改良したい。改良点を2つ述べよ。



問2. 血液細胞の形質膜表面の蛋白質、糖蛋白質等を免疫電顕的に検出したい。往々にして、これらの抗原性

は通常の2～2.5%グルタルアルデヒド固定では失活してしまい検出できない。無固定では陽性反応は

得られやすいが、形態の保存が悪く、データとして使用に耐えない。そのような場合どのようにして固定条件を決定すれば良いか。

問 3. 低温樹脂包埋の利点、欠点を述べよ。

問 4. Reynolds の鉛染色液の作製法について、次の文章の () の中に適切な語句または数字をいれよ。

1.33 g の (①) 鉛と 1.76 g の (②) を 30 ml の (③) に溶かす。この液は白濁しているが、これに 1N の (④) を約 8 ml 加えると白濁がとれる。さらに (③) を加えて全量を 50 ml にする。この染色液の pH は (⑤) くらいになる。

問 5. 生体内構造で①急速凍結ディープエッチング法、②

フリーズフラクチャー法の両方で観察可能なもの、①のみで観察可能なものをそれぞれ例をあげ、後者については、なぜ①のみで観察可能なのかを説明せよ。

問 6. コロイド金を使用した免疫電顕は、凍結超薄切片法(無包埋法)と樹脂包埋法に大別される。また、後者には包埋前染色法と包埋後染色法がある。これらの方法にはそれぞれ長所と短所がある。各々の長所と短所を述べよ。また、包埋後染色法の欠点を補うために特殊な樹脂が開発されているが、その代表的な樹脂の名を一つ挙げてその使用法を述べよ。

生物選択問題 (動物)

問 7. 培養皿に接着している培養細胞を樹脂包埋超薄切片法で観察する方法について下記の設問に答えよ。

(1) 培養細胞を培養皿から剥離するときに酵素処理による方法と、培養皿に固定液を注ぎ、固定後にセルスクレーパーを用いる方法がある。両者の長所と短所を2つ以上述べよ。

(2) (1) のいずれかの方法で剥離した細胞はばらばらになってしまい不便である。このために一般には種々の方法で細胞塊にして後の処理をおこなう。細胞塊にする方法を一つ挙げよ。

(3) 緩衝液中に浮遊状態にある肝細胞の細胞分画(例:ミトコンドリア分画、ミクロゾーム分画などを考えればよい)がある。この分画を超薄切片法で観察する場合のプロセスの概要を簡条書きで記せ。

問 8. 組織における物質 A の局在を調べるために、包埋前染色法により以下のようにして免疫電顕法をおこなった。下線の部位について下記の設問に答えよ。

1. 組織をホルムアルデヒドで固定したあと、しょ糖液に移し、クリオスタット切片(凍結切片)を作製した。

2. クリオスタット切片をヤギ正常血清とインキュベートし

た。

3. ウサギ抗 A 抗体とインキュベートした。

4. リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗ってから、ペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG とインキュベートした。

5. PBS で洗ってから、グルタルアルデヒドで再固定した。

6. DAB (ジアミノベンチジン) 反応をおこなった。

7. 水で洗ってから四酸化オスミウムで固定した。

8. アルコール系列で脱水した後、ゼラチンカプセルを使いエポキシ樹脂に包埋した。

9. 重合後ゼラチンカプセルをとり、超薄切片を作製した。

10. 電子染色したあと、透過電顕観察した。

設問 (1) グルタルアルデヒドではなく「ホルムアルデヒド」で固定した理由は何か。

設問 (2) 「ヤギ正常血清とインキュベート」した理由は何か。

設問 (3) 「DAB (ジアミノベンチジン) 反応」において、反応液として DAB のほかに何を加えるか。

設問 (4) 「四酸化オスミウム固定」する理由は何か。

設問 (5) 「電子染色」するとき、特に注意する点は何か。

生物選択問題 (植物)

問 9. 以下の設問に答えよ。

(1) 代表的な細胞内小器官を含む高等植物細胞の電顕切片像の模式図を描き、各部の名称を記せ。

(2) 植物の①細胞間隙、②細胞壁、③液胞、④澱粉顆粒、⑤プラスチドは細胞の固定を困難にしている。それぞれについて困難にしている理由を述べよ。

生物選択問題 (微生物)

問 11. ウイルスの観察で氷包埋法が従来のネガティブ染色法より優れている点と劣っている点をそれぞれ2つ

ずつ述べよ。

問 12. あるウイルスを単離、精製した。このウイルスの微

細構造を調べる方法を2つあげ、それぞれの方法について、試料作製から撮影、プリントまでの具体的

な手順をくわしく記せ.