

20241209 (ver. 1.1)

クライオ電子顕微鏡用グリッド作製マニュアル

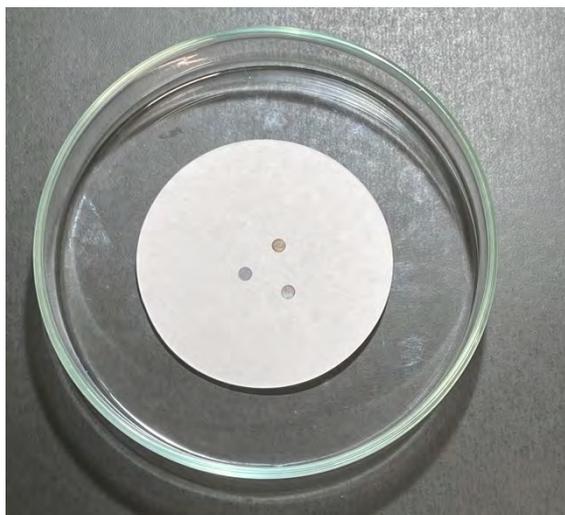
JEC-3000FC and Vitrobot Mark IV

岡山大学異分野基礎科学研究所国際構造生物学研究センター
沼本修孝

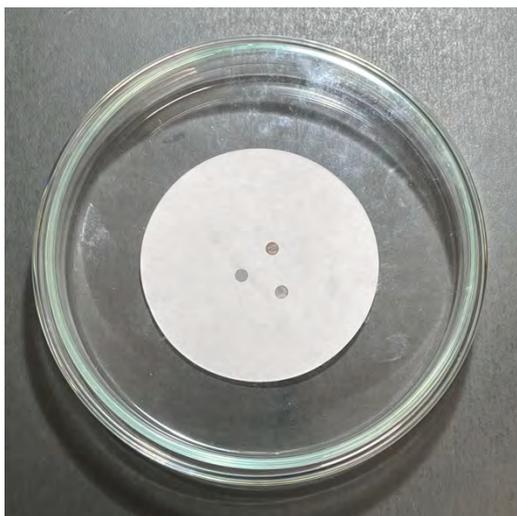
I. グリッドのアセトン処理

*購入したグリッドには、製造時のプラスチック成分が残存している場合がある。
その場合、次のステップの親水化処理の効果が減少するため、プラスチック成分を取り除く。
必要が無ければ、省略してよい。

- ガラスシャーレの中にアセトンで浸した濾紙を置き、ケースから取り出したグリッドを載せる。表面（カーボン面 = 少し黒っぽく見える面）を上向きに。



- フタをして、一晩静置。
アセトンが蒸発しきるのでそのまま次の親水化処理へ進む。

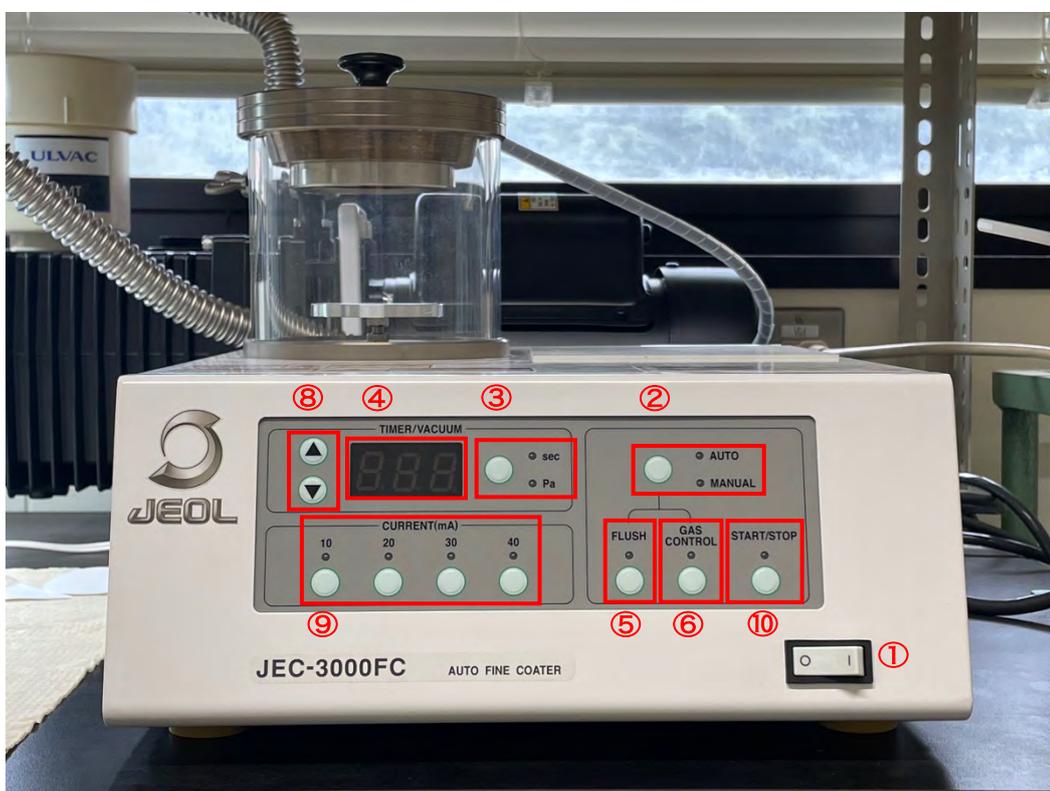


II. グリッドの親水化処理

*親水化処理はグリッド凍結の直前に行う

1. 装置の空打ち

- JEC-3000FC を使います。
- その日始めて使う際は、チャンバー内に何も入れずに空打ちを行う。
- チャンバーのカバー、フタを閉じて① 電源スイッチを ON。



- ② MANUAL、③ Pa にインジケータが点灯していることを確認。
*もしそうでなければ、○ボタンを押して切り替える
- ④ デジタル表示部に現在のチャンバー内圧力が表示されている。
3 以下になるのを待って、⑤ FLUSH を押す。
- 再度④ デジタル表示部が 3 以下になるのを待って、⑥ GAS CONTROL を押す。

- ④ デジタル表示部が目的の圧力（7 Pa, 20 Pa, etc.）になるまで待つ。
必要であれば、本体裏面の⑦ ニードルバルブを調整する。
- ③ ○ボタンを押して、sec にインジケータが点灯していることを確認。
- ⑧ 上下キーで目的の時間（10 sec, 60 sec, etc.）に合わせる。
- ⑨ CURRENT で目的の値（10 mA, 40 mA, etc.）の○ボタンを押す。



- ⑩ START/STOP を押して親水化処理開始。
- 終了後、① 電源スイッチを OFF。チャンバー内の圧力が大気圧に解放されるまで少し待つ。
- （空打ち終了後、チャンバー内にグリッドを入れて、上記操作を同様に行う）

2. グリッドの親水化

- ケースから取り出した（あるいは、アセトン処理後の）グリッドを、スライドガラスに並べる。表面（カーボン面）を上向きに。



グリッドをピンセットでつまむ際は、キズをつけないよう、外周部をつまむ。
グリッドは曲がりやすいので細心の注意を払う（**曲がったグリッドは測定に使えません**）。

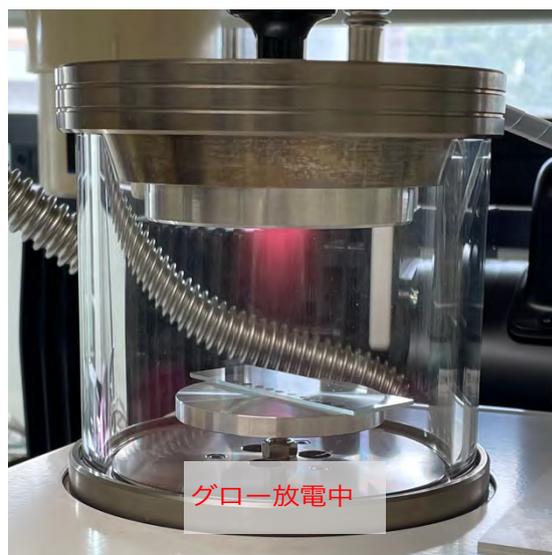
- 後で取りやすいよう、スライドガラスの端に並べておくとよい。



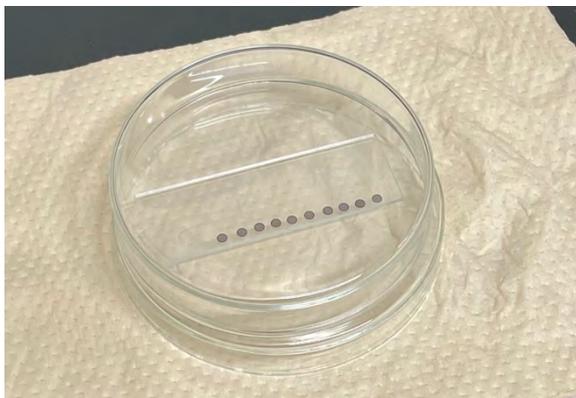
- JEC-3000FC のチャンバーを外し、スライドガラスに並べたまま、装置のステージに置く。



- チャンバーのフタをしっかりとセットし、1. 装置の空打ち の時と同様の操作で親水化を行う。



- 親水化処理後は、ホコリをかぶらないようガラスシャーレ等でフタをしておくとうい。



3. 代表的な親水化パラメータ

- 標準：7 Pa, 10 mA, 10 sec
 - 薄い氷でも安定な粒子：20 Pa, 20 mA, 45 sec
 - +2 nm C：20Pa, 10mA, 30s（片面）
 - UltraAuFoil：20 Pa, 40 mA, 60 sec
- *UltraAuFoil の場合はグリッドの両面を親水化処理する

III. Vitrobot を用いたクライオグリッド作製

1. Vitrobot の起動

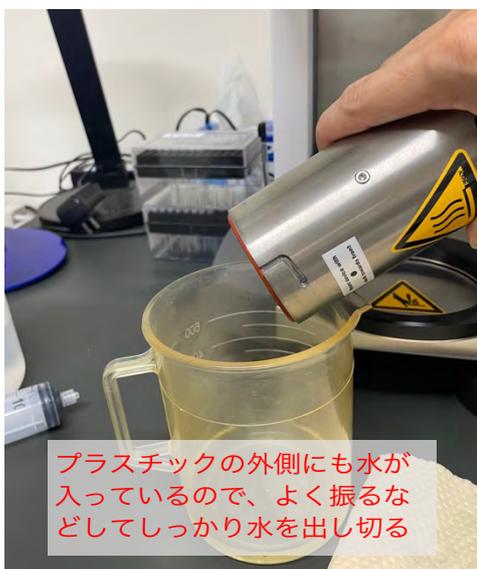
- Humidifier を取り外し、中のミリ Q 水を確認。シリンダーを左に少し回して下に下ろすと外れる。



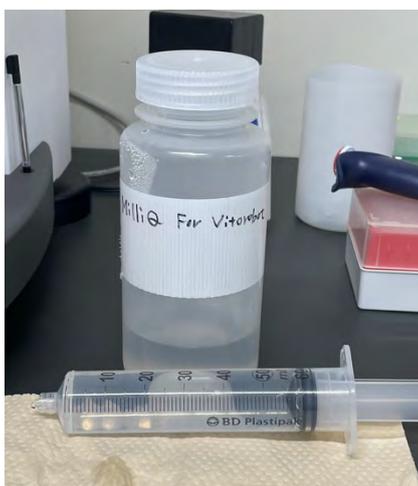
ケーブルを抜くときは、リング状の部分を押し込みながら引き抜く



- ミリ Q 水が少なかったり、古そうだったら捨てる。

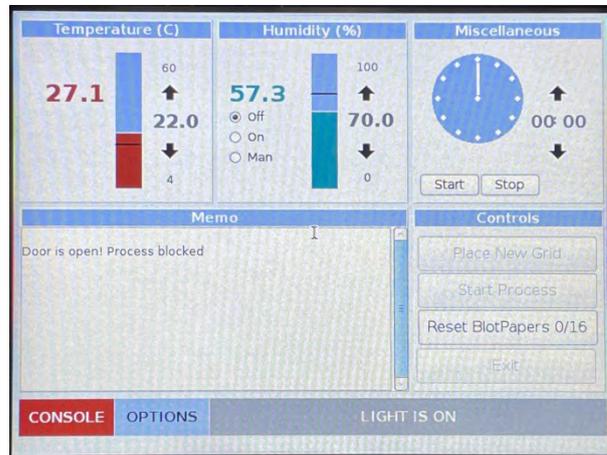


- Humidifier を外すときの逆の要領で元通りに取り付ける。
きちんと取り付けられていないと湿度コントロールができないので、ガタつきがないかなどよく確認する。
- ミリ Q 水を、50 ml シリンジにいっぱいに（50 ml より少し多く）入れ、Humidifier の注水用チューブに取り付ける。

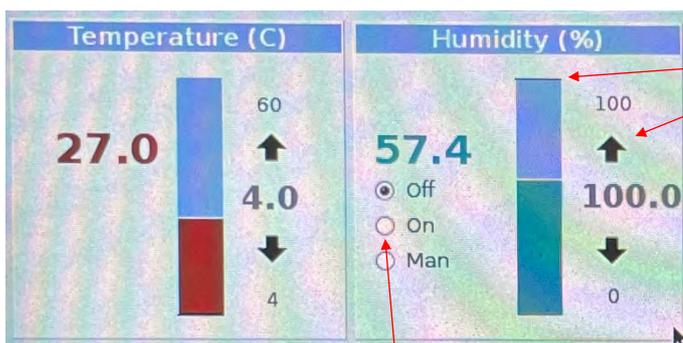


- シリンジ内のミリ Q 水を全て注水したら、5 ml 程度逆流させる（弁が閉まる）。
- シリンジを外す。

- Vitrobot 本体の電源（背面下部）を ON。
OS の起動画面が表示された後、メインの画面が表示される。



- 希望の温度と湿度を入力する

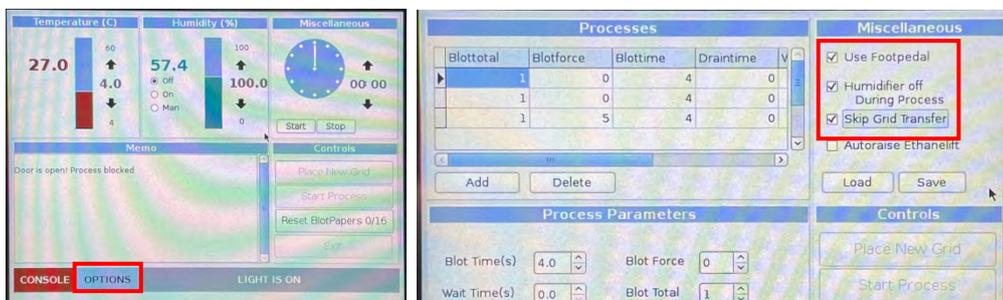


矢印キーで数値を動かすか、黒いバーをスライドさせる

*低温に設定する場合、湿度コントロールは温度が下がってから ON にする

*温度が安定するまで、数十分かかる

- **OPTIONS** ボタンを押し、画面右側、上から3つにチェックを入れる。



- 手袋を着用し、濾紙を両側のパッドに1枚ずつ取り付ける。



*濾紙の表裏を毎回決まった方向に揃えるほうが無難

*湿度 100%の環境下に十分に馴染ませて使うか、blotting 直前に装着して比較的乾燥した状態で使うか、流儀があるが、毎回同じやり方に統一することが大事。

*グリッドの数が多いなど、時間が長くなるときは途中で濾紙を交換するのもよい。交換後は、パッドが少し動いていることがあるので一度空打ちする。

2. エタン container の準備とエタンの液化

- エタン container の構成部品、ピンセット類、グリッドケース、液体窒素用ポットなどを確認。



- エタン container を組み立て、液体窒素を満たして冷却する。



*エタンカップの中も液体窒素を満たす（短時間で蒸発する）。

*十分に冷却されるまでは、液体窒素が激しく沸騰するので液体窒素を継ぎ足す。沸騰が収まり、container が液体窒素で十分満たされるようにする。

- エタンカップの液体窒素が完全に蒸発したのを確認する。
- 手袋、保護メガネをつける（液体エタンが目に入ると失明の恐れがある）。
- エタンポンペのレギュレーター下流側の栓ふたつ（②，③）が閉まっていることを確認し、元栓（①）を少し開ける。



- レギュレーター下流側の栓②を開ける。下流側の針が少し動けばよい（ ~ 0.01 MPa）。
- 栓③を開ける。必要に応じて、栓②を調節する。わずかに気体が出ていればよい。
- チューブの先をエタンカップの底まで差し込んでエタンを液化させる。



*液化が始まると、音が変わる

*チューブの先が液面からわずかに下を保つよう、液面上昇に合わせて調節する

*エタンカップとスパイダーの境界ギリギリまで液化させる。



スパイダー

- 液化が完了したら、ポンベの元栓を閉じ、次いで下流側の栓も閉じる。
- すぐにスパイダーを取り外す。



エタンカップが液体エタンで満たされていることを確認

*スパイダーをそのままにしておくと、凍り付いて外せなくなる

*エタンが固化して白いものが沈んでいるように見えたら、常温のスパイダーを逆さまに置いて熱を伝えて溶かす。
溶けたらすぐにスパイダーを外す。



- 霜が混入しないよう透明カバー（大きいビーカーでも可）をかぶせておく。
必要に応じて、containerの端から液体窒素を継ぎ足す。

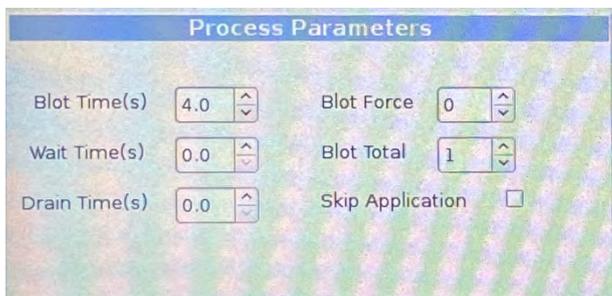


端のくぼみから注ぎ込む

3. Vitrobot での急速凍結操作

*湿度コントロールを ON にしてあることを確認。

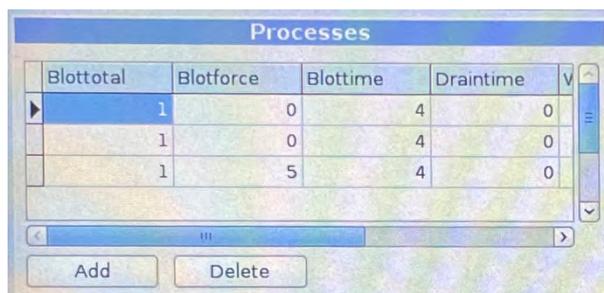
- Vitrobot 本体画面 > **OPTIONS** > Process Parameters で希望の条件を設定。



*Blot time: 2 – 10 s, Blot Force: 0 – 10 程度が標準的?

*Blot Force は装置の個体差が大きいので、その装置での経験的な値を使う

*Processes で、一度 blot してからもう一度サンプルを添加するなどの設定も可

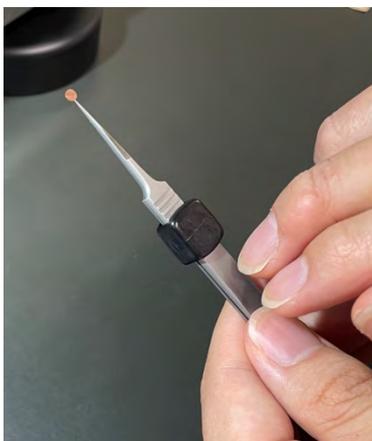


- Vitrobot 本体画面で **Place New Grid** が表示されていることを確認。

*違うステータスになっていたら、何度か foot pedal を踏んで **Place New Grid** が表示されるようにする。



- Vitrobot 用ピンセットでグリッドの端をつまんで、黒の留め具で固定。



*少し振ってみて、グリッドが落ちないか確認する。

- ピンセットを Vitrobot のアームに固定。



きちんとはまれば
クリック感がある

利き手側にカーボン面が
向くように取り付ける

- Foot pedal を 2 回踏む。ピンセットがボックス内に上がる。



* Place Ethane Container の表示が変わる

- 必要に応じて液体窒素を継ぎ足して、エタン container をステージに置く。



- Foot pedal を踏む。エタン container が持ち上がり、画面の表示が変わる。



*この状態でFoot pedalを踏むと、Process を押したのと同じで次のステップに進む

*Place New Gridを押すと、エタン containerのステージが下がり、ピンセットも降りてくる = 前のステップに戻る

*前のステップに戻れるのはこの段階だけ

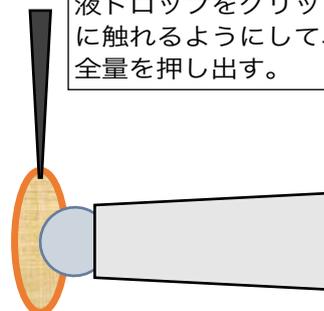
- 問題がなければ Foot pedal を踏む。
ピンセットが下がるので、サンプルを 3 μ l 前後アプライ。



本体横の小窓を開け、ピペットを挿入する。



*ピペットチップの先端をグリッドに当てない様にし、押し出した溶液ドロップをグリッドに触れるようにして、全量を押し出す。



- Foot pedal を踏んで、設定値での blotting -> plunge freezing を実行。
- ピンセットとエタン container が降りてきたら、ピンセットを取り外し、エタン container をステージから降ろす。



*必要に応じて液体窒素を継ぎ足す



*ピンセットは手前に引いても、奥に押し込んでも外れる。

*外すときははずみで、グリッドをエタンカップの壁に当てて曲げてしまわないよう、細心の注意を払う。

*エタンcontainerを降ろすときに、グリッドがエタンから出てしまわないように注意。

肘を机に、手首をエタンcontainerのフチに押し当て固定するとよい。

- グリッドをエタンから液体窒素へ素早く移動する。



*グリッドを液面から持ち上げる高さを最小限にするよう注意。

- グリッドを液体窒素面から 5-10 mm 程度上まで出して昇温させ（室温まで上昇するわけではない）、残留の液体エタンを気化させて取り除く。

*昇温すると数秒で、グリッドのカーボン面が霜が降りたように白くなる

*そのまま待つと、白っぽいものが消えていくので、完全に消えてからさらに数秒待つて液体窒素内に戻す。

*以上を数回繰り返す、グリッドに残留したエタンをなるべく除去する

- グリッドを液体窒素に浸けたまま、ピンセットの黒い留め具を上にならずして固定を解除する。グリッドを落とさないようにしっかりとピンセットを押さえる。

- グリッドを、グリッドボックスに収納する。



*グリッドを液面から持ち上げる高さを最小限にするよう注意。

*グリッドボックスに収納する際にグリッドを曲げないように注意する。

*グリッドの下半分ぐらいを入れたらピンセットをはなして落とし込む感じ。

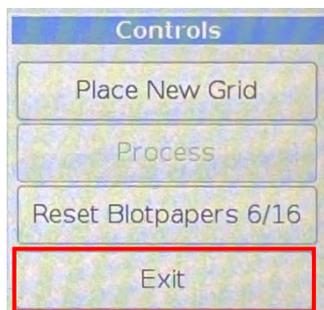
- p.14 からの操作を、サンプルの数だけ繰り返す。

*一度使用したピンセットはよく乾燥させてから再度使用する。

- グリッドケースを液体窒素内で保管する。

4. Vitrobot のシャットダウン

- Vitrobot 本体画面 > **Exit** > **Yes**



- 本体裏の電源スイッチを OFF。

- 濾紙を外し、チャンバーの扉は少し開けておく（内部を乾燥させるため）。

*濾紙を 2-3 箇所しか使っていなかったら残しておく場合もある



*濾紙の留め具をなくしてしまわないように注意

- しばらく使わない場合、humidifier 内のミリ Q 水を捨てておく。
シリンダーを外しておいてもよい。



以上