

Development of Fluorescent Electron Microscope and new FL-Reagent

New Fluorescent Dye "Fluolid"

(Fluorescence + Solid = Fluolid)

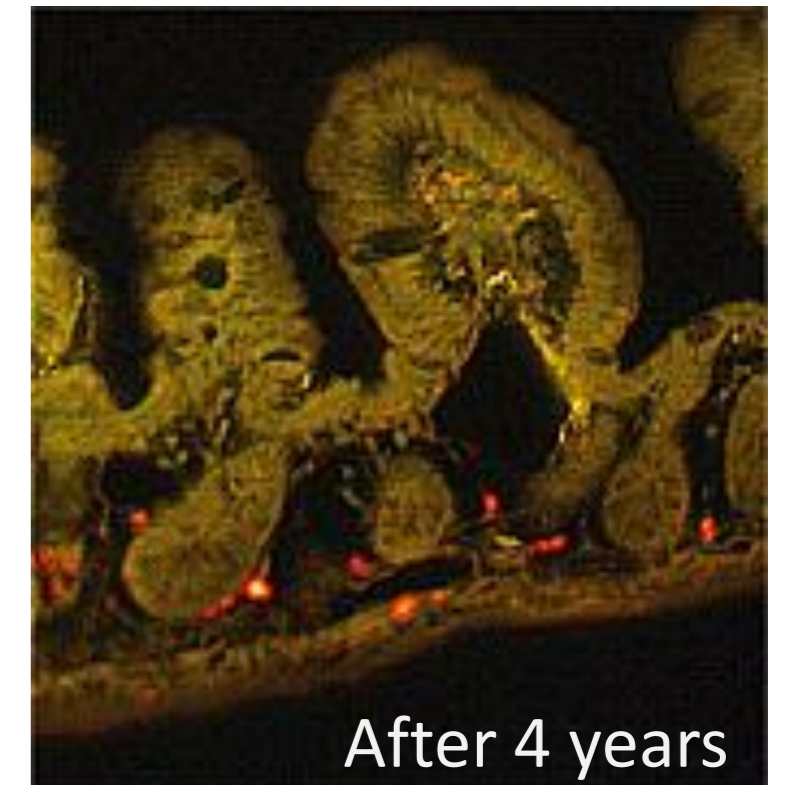
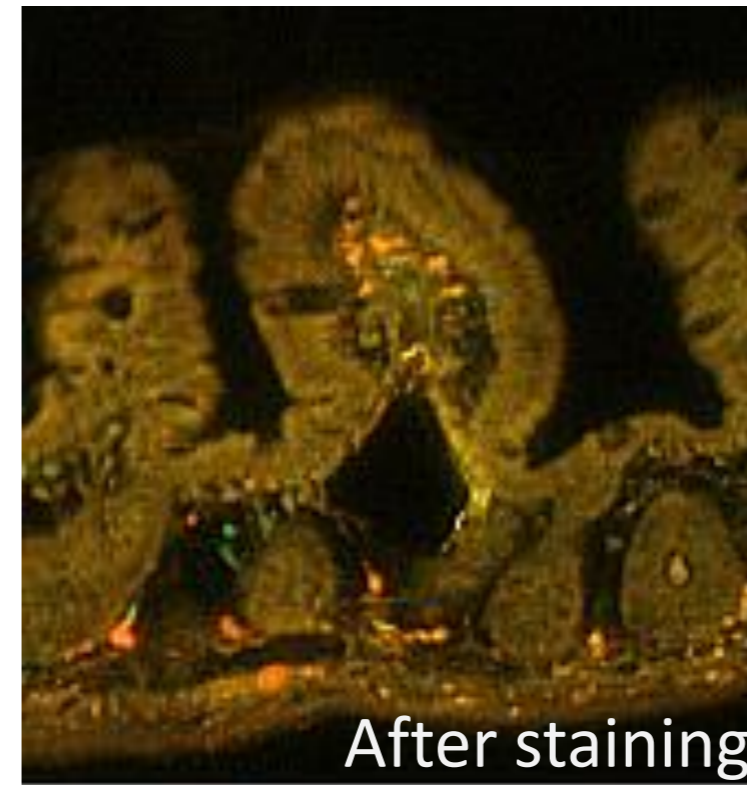
Feature

1. Fluorescence with solid state ⇒ Strong!
 2. Thermal-stability
 3. pH-stability
 4. Photo-stability
 5. Resistance to UV rays
 6. Wide Stokes shift
- Excellents stabilities



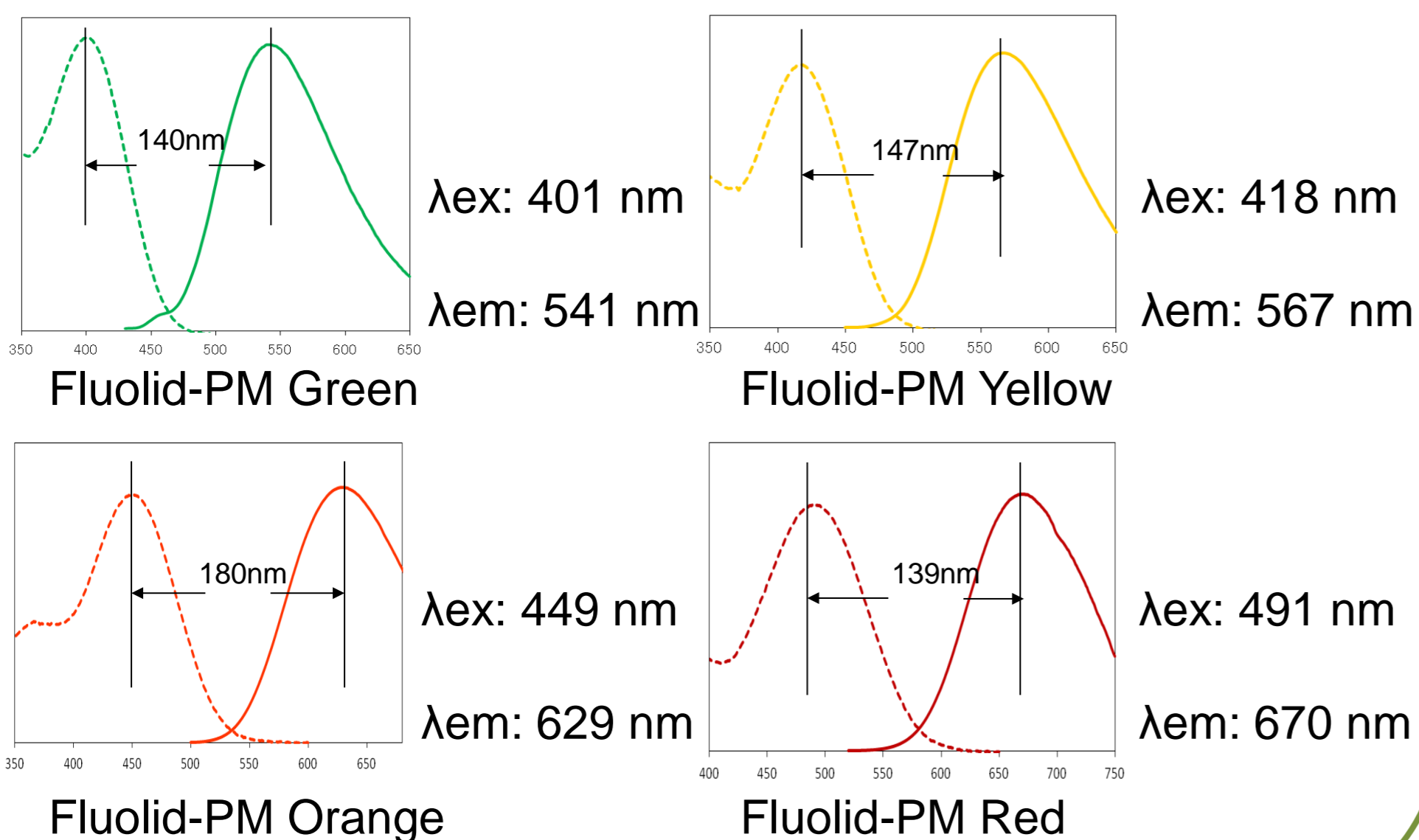
The "Fluolid" shows fluorescence with same wavelength (365 nm).

Image of immunostaining with Fluolid

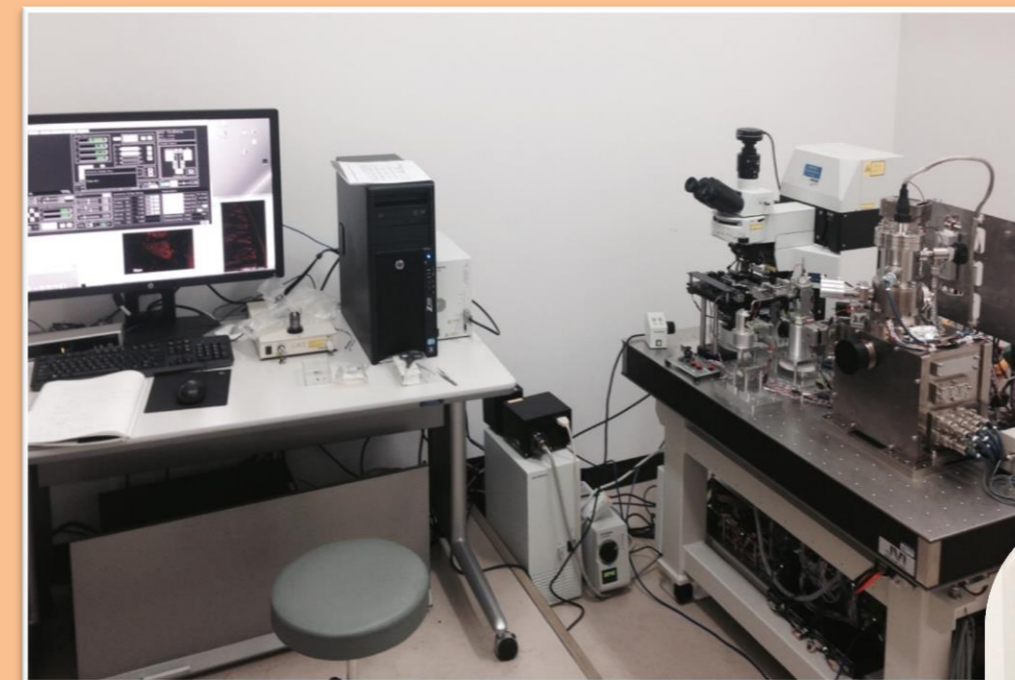


It is possible to keep the fluorescent on the plate for long time.

Optical properties of Fluolid

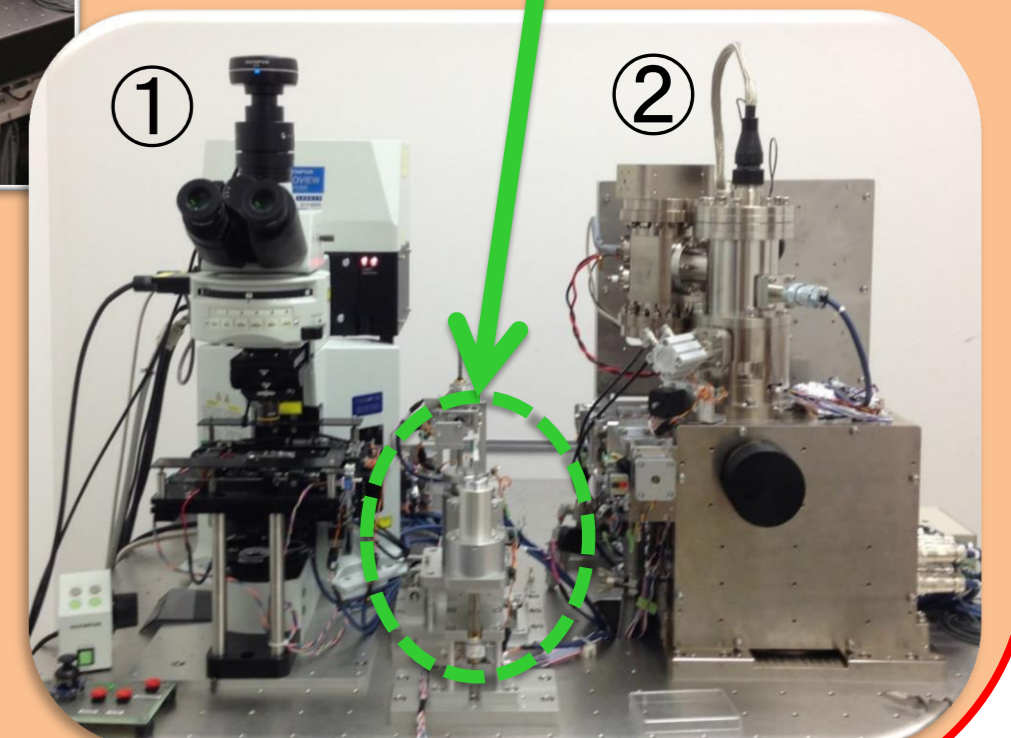


Fluorescent Scanning Microscope "FL-SEM"



Cooperation Automatic Transport System: **CAT's**

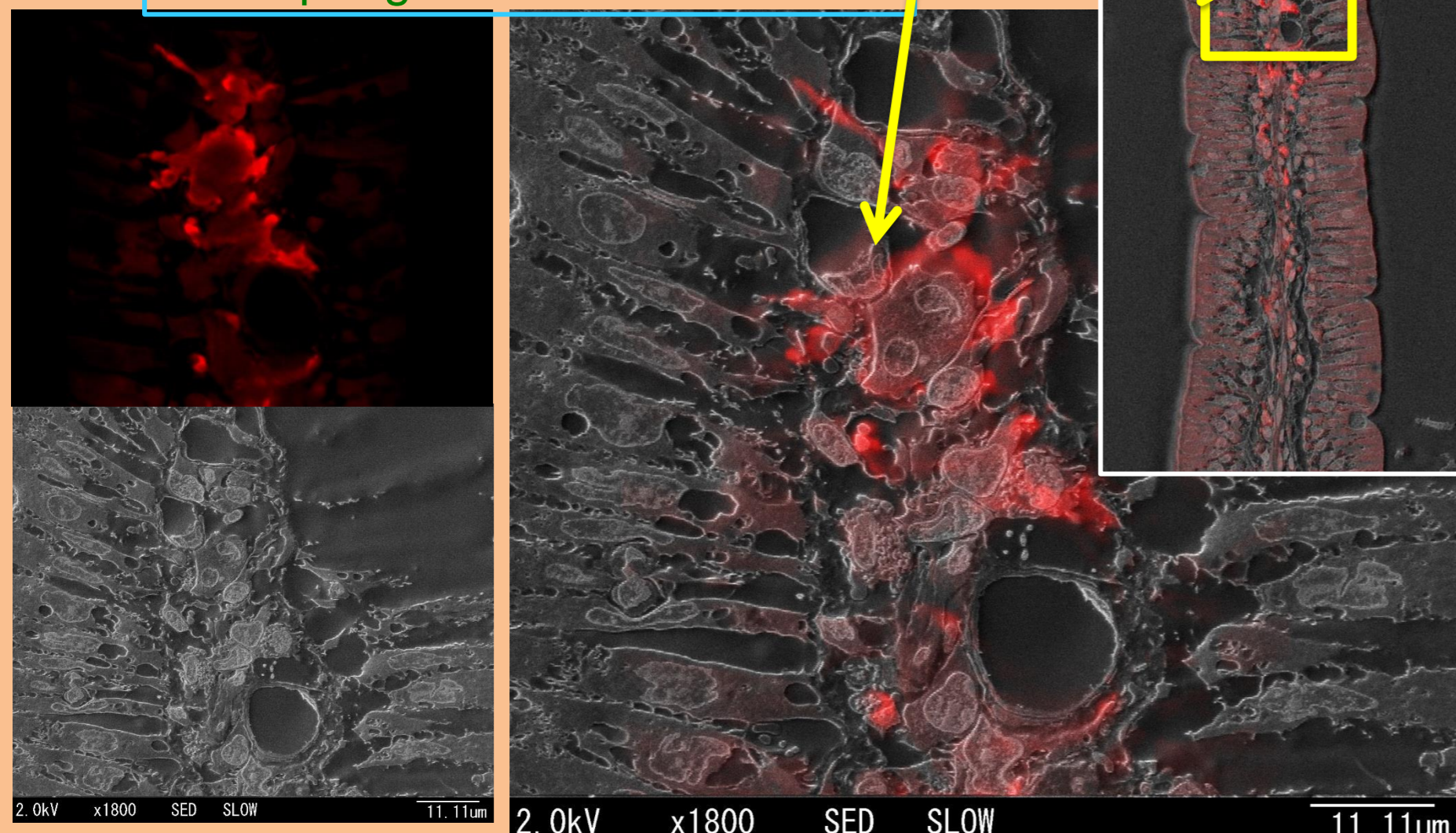
- ① Optical microscope (Olympus Co., Ltd.)
- ② Scanning electron microscope (TCK Co., Ltd.)



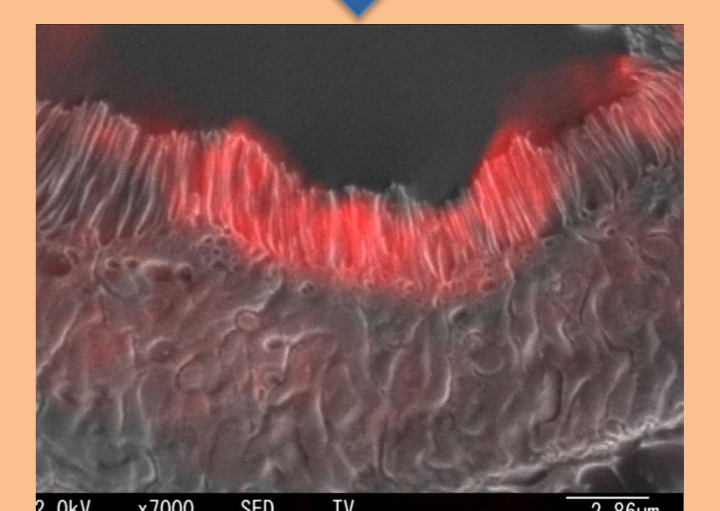
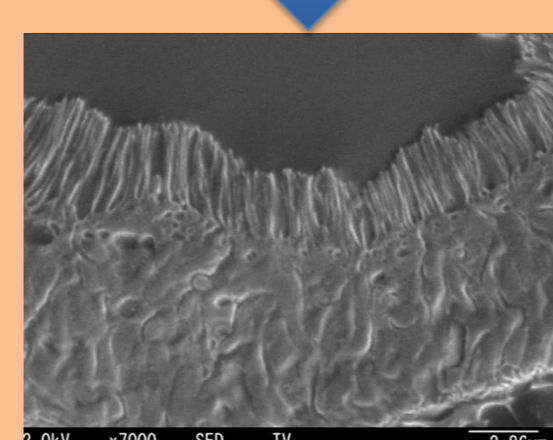
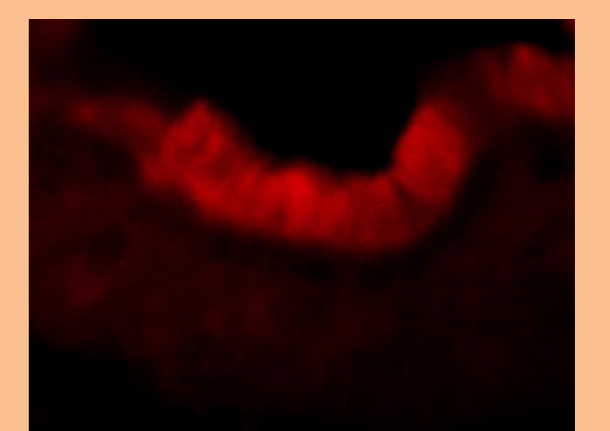
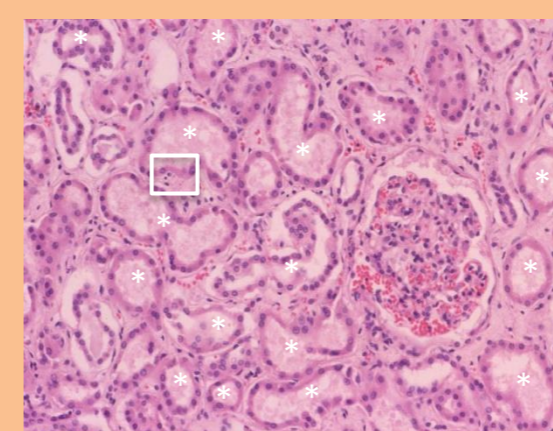
FL-SEM Images of sample plate

The tip of villus in rat duodenum

Macrophage in connective tissue



Mechanism of FL-SEM images

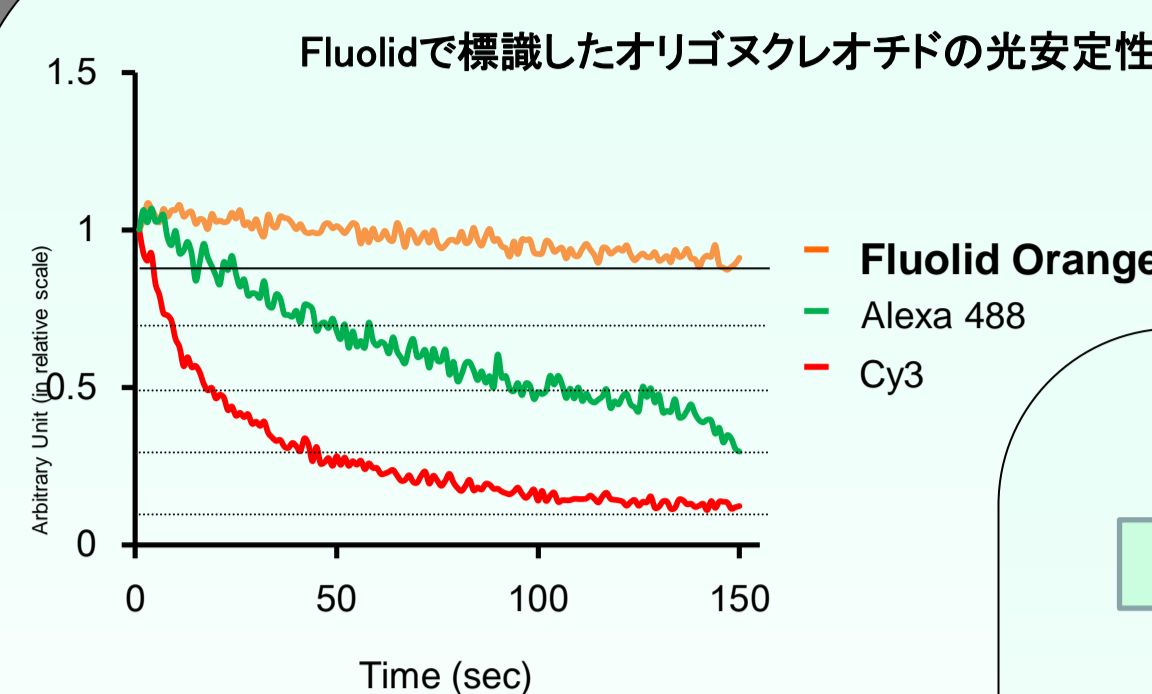


Fluolid 物理特性

従来の蛍光試薬との物理性質を比較

	IST Fluolid	Traditional Dye
光安定性	高い (太陽光下で2年以上安定)	低い
熱安定性	高い (200°C以上)	低い (室温で徐々に分解)
pH安定性	高い (pH 1-14)	低い (pH 5-9)
Stokes Shifts	大きい (about 100-150nm)	小さい (about 10-50nm)
固体状態での蛍光	強く蛍光を示す	消光する
保存条件	室温	Under -20°C

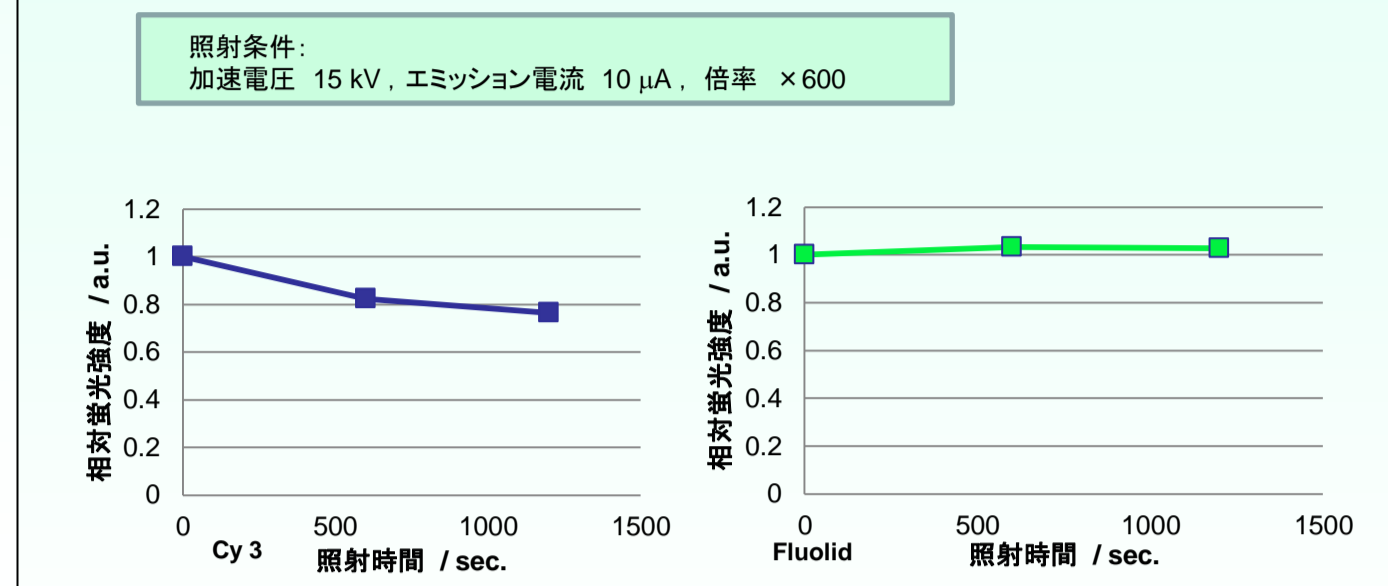
高い安定性



実験:
Fluolid Orange, Alexa 488, Cy3で標識したオリゴヌクレオチドを励起波長488nmで150秒間ブリーチングした。

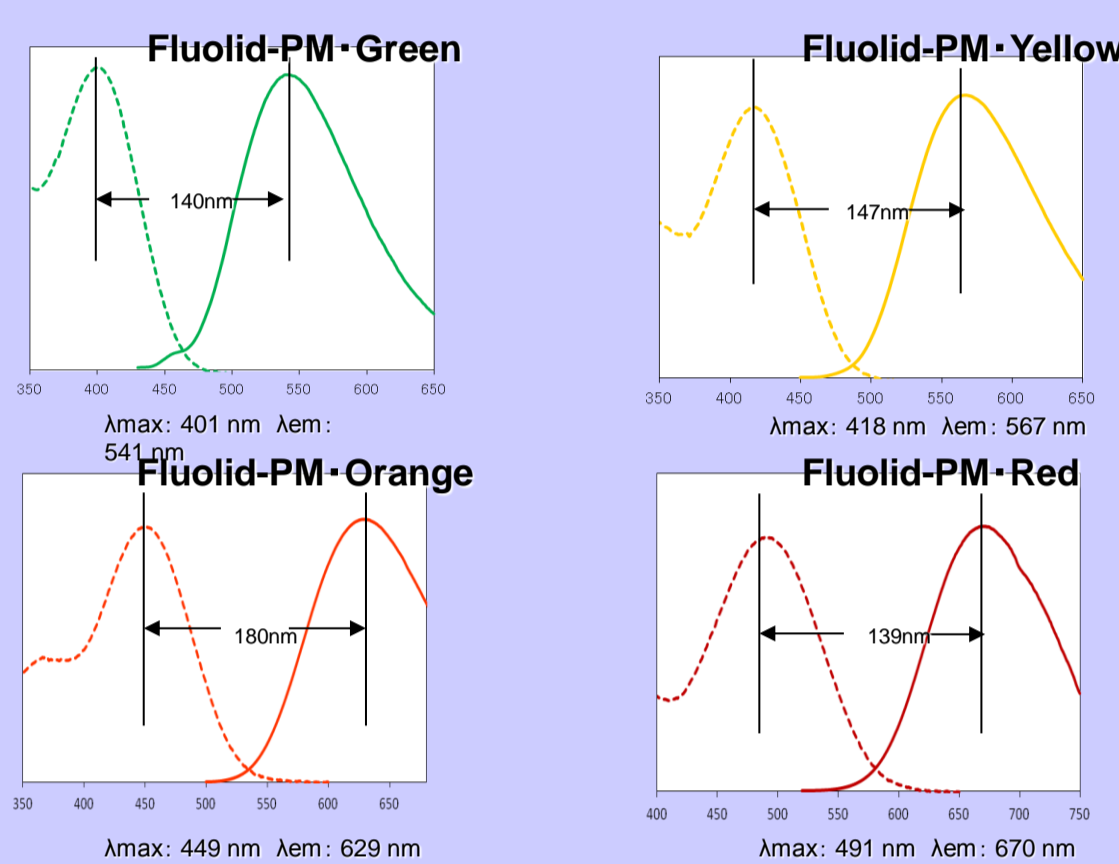
結果:
Alexa488やCy3と比較してFluolid Orangeで標識したオリゴヌクレオチドは非常に安定している。

電子線への耐久性評価



Cy3は照射する度に蛍光強度が低下
FluolidはCy3に比べ電子線に対して高い耐久性を有することが判明した。

ストークスシフト



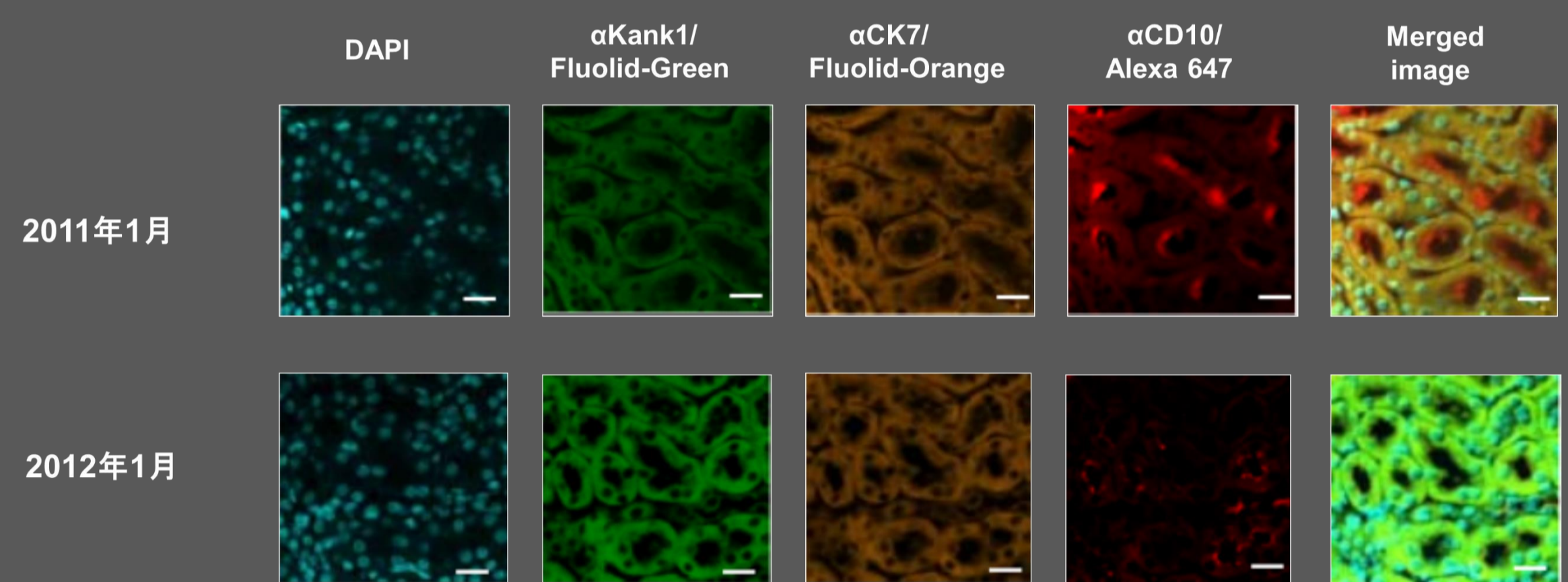
Compound	Absorption λ _{max} [nm]	ε [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Emission λ _{max} [nm]
Green	401	11750	541
Yellow	418	12750	567
Orange	449	14440	629
Red	491	14440	670

Solvent : DMSO

Fluolid-PM	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	DM (ゼンシタス)
Green	401	541	DM 479
Yellow	418	567	DM 496
Orange	449	629	DM 554
Red	491	670	DM 594

○測定装置: 励起波長 JASCO V-560
蛍光波長 HITACHI F-4500
○各フィルターはあくまで参考です。
御使用の際は専門メーカー等に御相談下さい。
○(*) : 試作品のためフィルターについては検討中です。

蛍光試薬の安定性

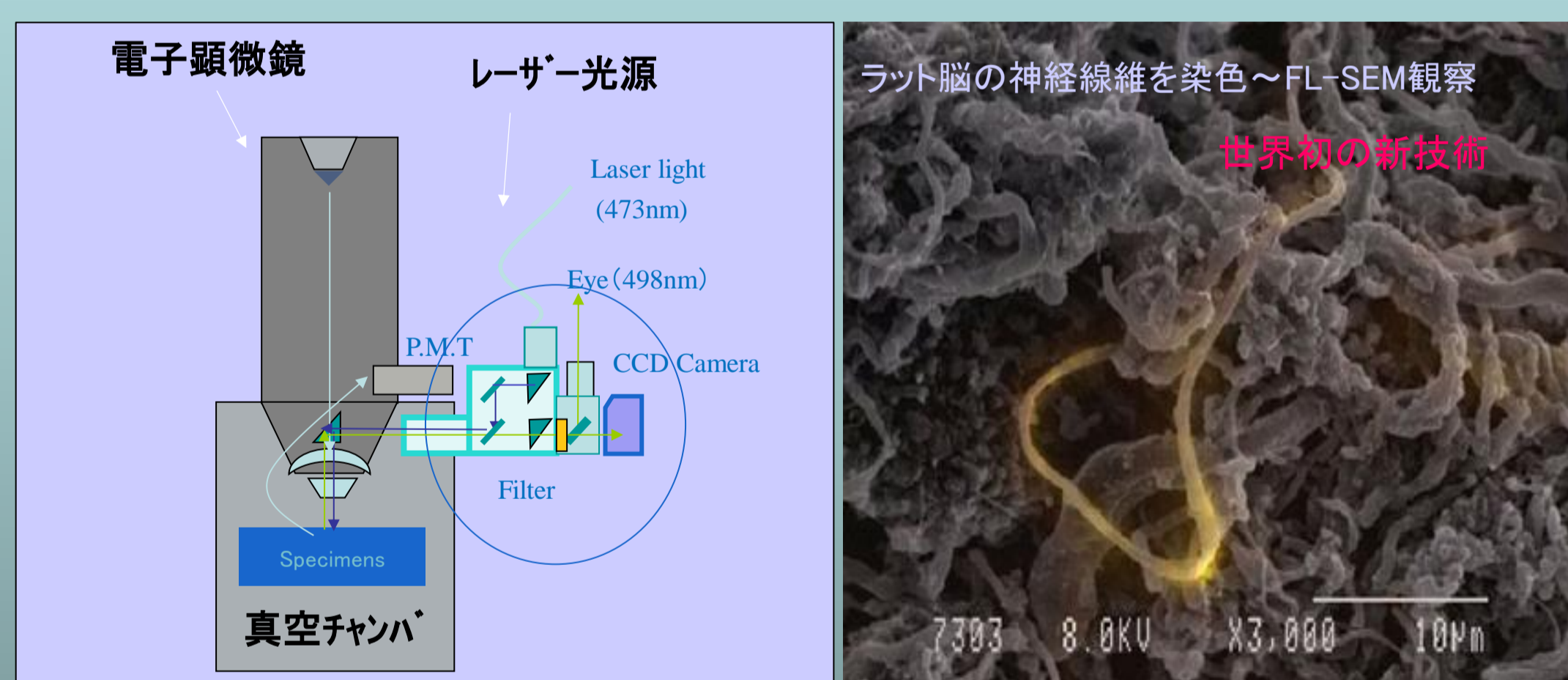


マウスの正常腎臓切片をそれぞれのタンパク質に対する1次抗体とDAPIを用いて同時に染色し、さらに、それぞれの1次抗体に対して、蛍光色素で標識した2次抗体 (IgG) で染色した。
Zhu et al. (*Biotechnol. Letts.*, 33, 1759-1766, 2011) Bar = 20 μm.

蛍光電子顕微鏡開発

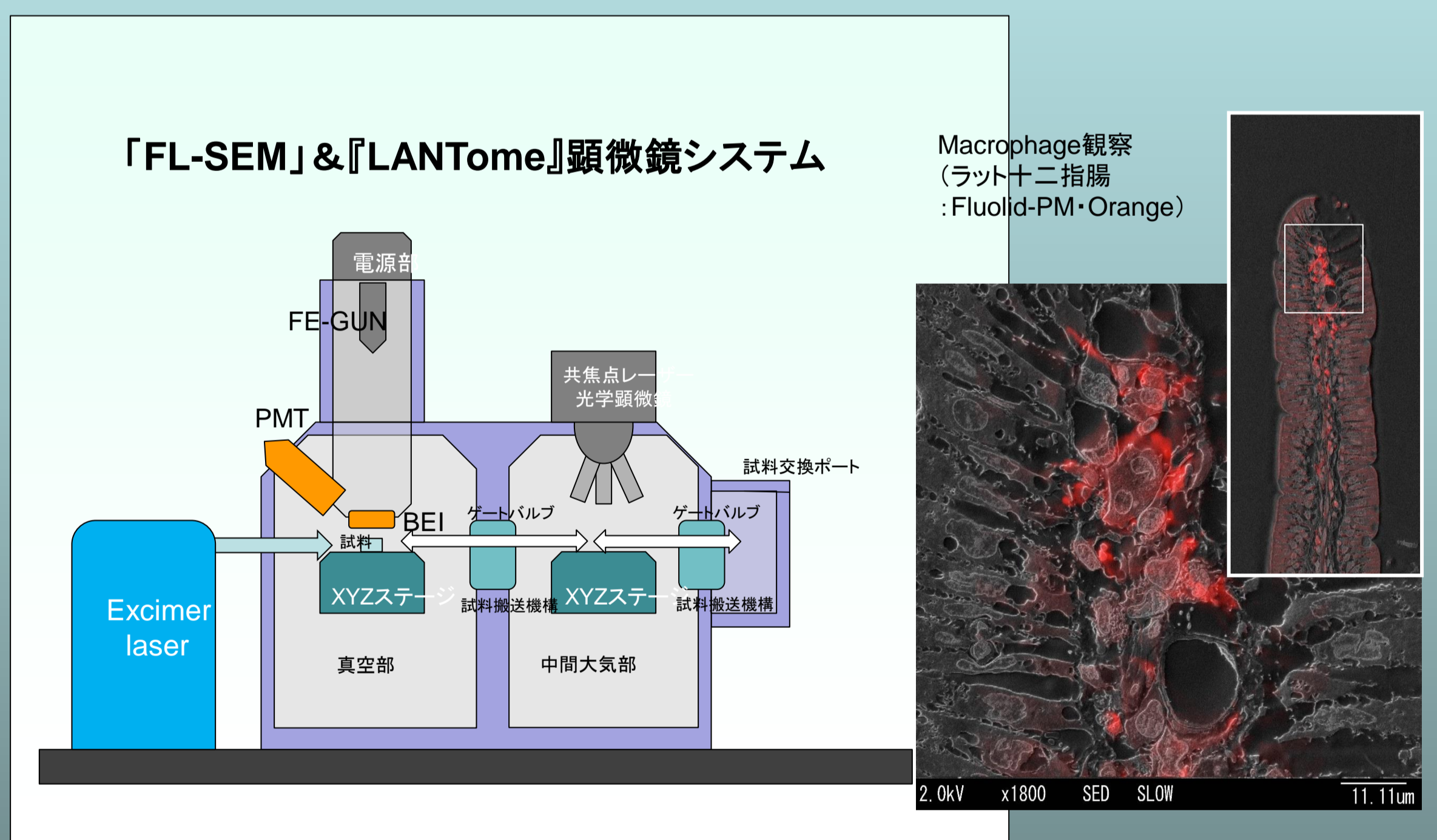
蛍光電子顕微鏡 (FL-SEM)

プロトタイプ機における成果

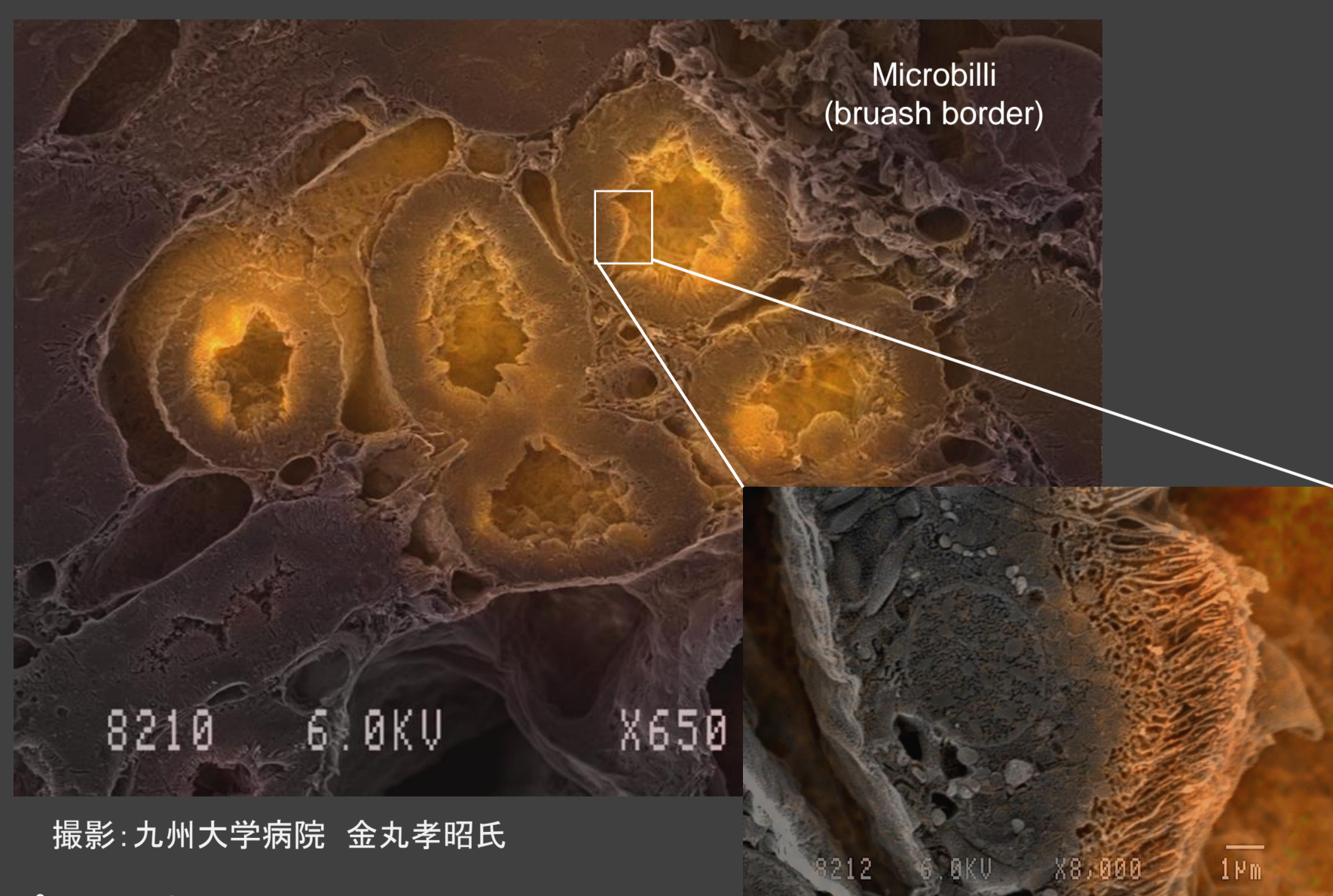


1. A fluorescence scanning electron microscope, *Ultramicroscopy*, 109, 344-349, (2009).
2. ELECTRON MICROSCOPY SPECIAL ISSUE, *Materials Today* Supplement 1, Vol. 12, 41-48, (2010)

新型蛍光電子顕微鏡 (FL-SEM)



蛍光試薬技術と新規蛍光顕微鏡技術の融合 I



- プロトタイプの問題点
1. カセレン光学系では高倍率が困難
 2. 真空内部に光学部品を挿入しているためメンテナンスが困難
 3. レーザー共焦点顕微鏡では景深が浅大化

蛍光試薬技術と新規蛍光顕微鏡技術との融合 II

新旧の分解能比較 Rat尿管: 刷子縁

