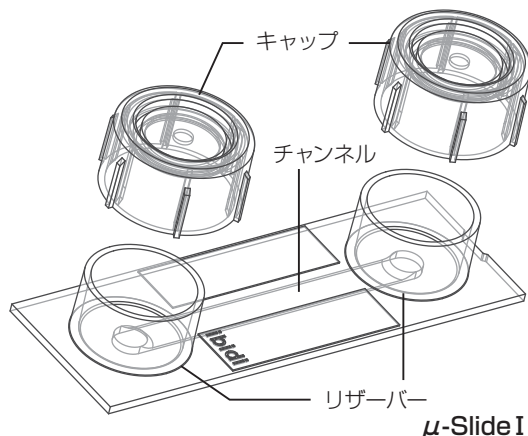


## μ-Slide I (マイクロスライド I) チャンネル内の濃度勾配

μ-Slide I のマイクロチャンネルは試薬の化学濃度勾配を作るのに適しています。簡単なピペット操作を行うだけで、濃度勾配を作り出すことができます。この濃度勾配による実験は、細胞性粘菌の *Dictyostelium discoideum* などの速く遊走する細胞の走化性を促進することが示されています。対照的に、ゆっくり遊走する細胞の走化性実験には、当社の μ-Slide Chemotaxis (マイクロスライドケモタキシス) (ib80301 : 未コーティング (疎水性)、または ib80302 : Collagen IV コーティング) をおすすめします。

### ショートレシピ

- 細胞を μ-Slide I に播種し、細胞が十分に接着するまで待ちます。ステップ「1. 細胞の播種」参照。
- ステップ「2. 濃度勾配を作るためピペット操作手順」に従って濃度勾配を確立します。
- 手順「4. 観察領域の決定」に従って、最も濃度が急勾配の地点を見つけます。
- タイムラプス顕微鏡観察により細胞運動を解析します。



### 1 細胞の播種

- 通常どおり細胞を調製し、細胞懸濁液 100 μl をチャンネルに注入します (図1A参照)。細胞濃度は  $3 \sim 7 \times 10^5$  個/ml を推奨します。
- 付属のキャップでリザーバーにゆるくフタをします。細胞が接着するのを待ちます。
- 長時間培養する場合、各リザーバーに培地 600 μl を追加してください。
- 細胞播種の詳細は、μ-Slide I の取扱説明書または [www.ibidi.com](http://www.ibidi.com) を参照してください。

### 2 濃度勾配を作るためのピペット操作手順

濃度勾配を設定するために必要なものは、標準的なピペットと化学誘引物質溶液のみです。

- 必要に応じてリザーバーを空にします。チャンネルは培地 100 μl を充填したままにしておきます (誘引物質は入れません)。
- 片方のリザーバーに化学誘引物質を 20 ~ 40 μl 入れます (図1B参照)。
- 反対側のリザーバーから同量 (20 ~ 40 μl) の液を吸引します (図1C参照)。
- 付属のキャップでリザーバーにゆるくフタをします。

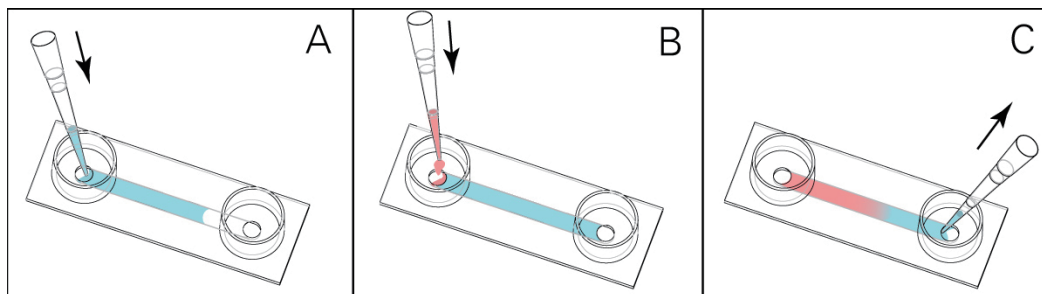


図1 : ピペットによる勾配操作



図2 : 緑色で着色した溶液を用いた場合の濃度勾配の画像

濃度勾配は着色溶液を用いれば目視できます。

### 3 濃度分布

蛍光色素ローダミン6Gで測定したところ、化学誘引物質の分布は半放物線形であることが示されました（溶液10μMおよび100μM、化学誘引物質としてローダミン40μl）。

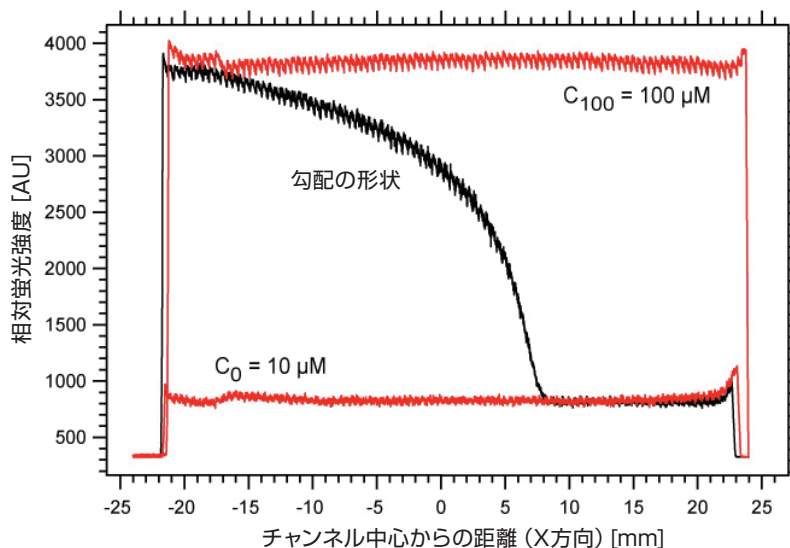


図3：蛍光色素で測定した濃度分布。蛍光強度をx方向の距離に対してプロットしています。対照のC<sub>0</sub>およびC<sub>100</sub>の2つを、別々のチャンネルで測定しました。

濃度分布は2つの平行なプレート間（チャンネル上面と底面）の特徴的なフローから生じることが、濃度分布の形状から示されます。測定値は、細胞の10μm上で共焦点法を用いて得られました。化学誘引物質溶液は40μl使用しましたが、容量を変えても形状は同様となります。

### 4 観察領域の決定

細胞の反応は観察領域により異なります。ビーズを用いると、化学誘引物質の濃度勾配を目視できます。

以下の手順を推奨します。

- あらゆる種類の小さな鏡検用ビーズを使用することができます。たとえば、FITCフィルターセットにはMolecular Probes社の蛍光ビーズ (FluoSpheres<sup>®</sup>, 10μm F8836) を提案します。希望する蛍光波長をチェックするか、位相差顕微鏡を使用してください。
- ビーズの推奨濃度：ビーズ5×10<sup>6</sup>個/ml
- 化学誘引物質溶液にビーズを直接添加し、**2**で述べたピペット操作手順に従ってください。
- チャンネルの最奥部に達したビーズの位置を見つめます。化学誘引物質溶液40μlの位置は、チャンネル中心から約7～9mm（またはチャンネル開口部から30mm）のところと予想されます。

最大勾配は $X_{max}$ 近辺の領域で見つけることができます。この領域は1.5 mm以上の幅があります。細胞を使用しながら濃度分布を目視化するためには、蛍光ビーズを使用して、細胞を観察しなければならない領域を決定することを推奨します。

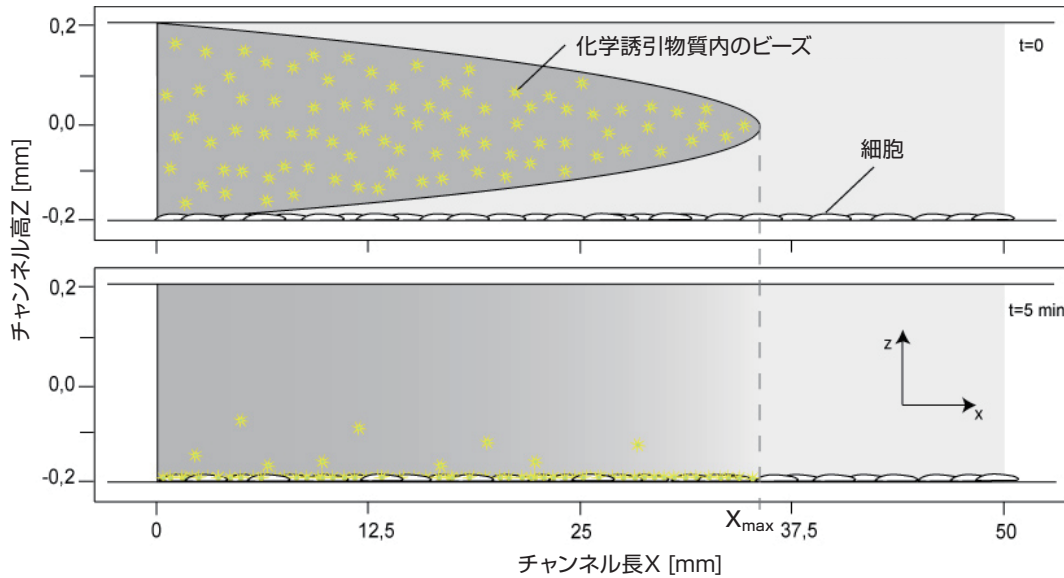


図4：化学誘引物質とビーズをチャンネルに流した後、引き伸ばされた放物線状の形ができます。数分後、勾配が確立され、ビーズが対象領域を示しながら落下します。

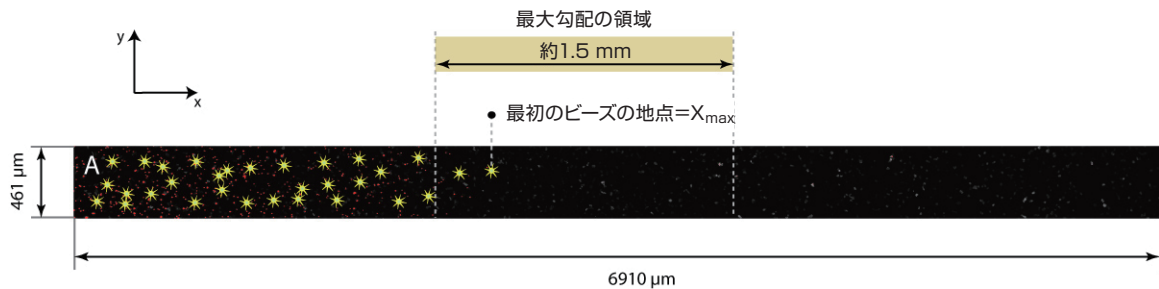


図5：最大勾配領域は、誘引物質溶液内の最初のビーズによって定められます。

## 5 ピペット採取した化学誘引物質の範囲

さまざまな量の化学誘引物質に対して、ピペット採取した化学誘引物質の最大勾配 $X_{max}$ の近似位置を算出することができます。 $X_{max}$ はチャンネル開口部から測定した地点であり、化学誘引物質に充填するために使用します。

$$X_{max} = \frac{3}{2} \cdot \frac{V}{h \cdot w}$$

$V$ はピペット採取した容量、 $h$ はチャンネルの高さ、 $w$ は幅です。μ-Slide I 内の形状は一定なので、誘引物質溶液40μlを使用します。

$$X_{max} = \frac{3}{2} \cdot \frac{40\text{mm}^3}{0.4\text{mm} \cdot 5\text{mm}} = 30\text{mm}$$

エッジ効果の干渉のため、ピペット操作手順の再現性を±1mmとしました。したがって、ビーズを使用して観察領域を正確に限局化することを推奨します。

## 6 濃度分布の時間展開

化学誘引物質、粘性、温度の拡散により異なりますが、濃度勾配はしばらくすると不鮮明になります。

小さい分子の化学誘引物質 (たとえばcAMP) :

ピペット操作手順直後に観察時間を開始します。小分子は、単一細胞を約30 ~ 60分間使用するのに適した勾配を形成します。

大きい分子の化学誘引物質 (たとえばVEGF) :

ピペット操作手順直後に観察時間を開始します。勾配は単一細胞が約0.5 ~ 2時間走化するのに十分な勾配です。勾配は非常に長時間目視できますが、単一細胞の走化性にとって勾配が十分な勾配であるかどうかは、実験によって大きく異なります。したがって、1つのチャンネルで、さまざまな位置でさまざまな濃度を扱う実験が、非常に長時間行えるようにしています。

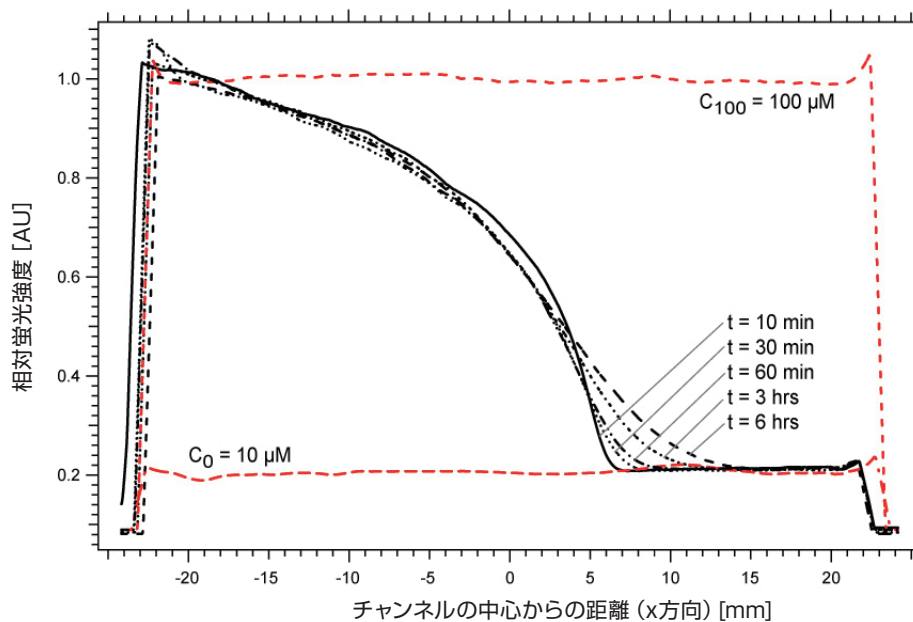


図6：ピペット操作した濃度勾配は時間の経過とともに平らになります。

濃度勾配を長時間安定させたい場合は、さらに長時間 (48時間を超える) の勾配安定性が得られる当社の **μ-Slide Chemotaxis** を推奨します。ゆっくり遊走する細胞用に設計されています。詳細は当社までお問い合わせください。