

μ-Slide I を用いる細胞培養および免疫蛍光染色に関するアプリケーションノート

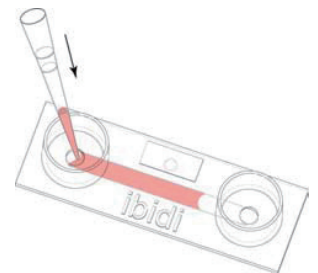
このプロトコールでは、**μ-Slide I**を用いたラット繊維芽細胞 (Rat1) 培養の例を示します。その後、F-アクチン細胞骨格を Alexa Fluor® 488 ファロイジンで染色し、DAPIで核を対比染色しました。

プロトコールは次の4つの主なステップからなります

1. 細胞の播種
2. 細胞の固定
3. 浸透処理およびブロッキング
4. 染色

1 細胞の播種

1) **μ-Slide I**、**ibiTreat (ib80106)** を無菌条件下で開封し、**μ-Slide専用ラック (ib80003)** 上に置きます。 3×10^5 cells/mlのRat1細胞懸濁液100μlをチャンネル内に注入します。右の図または当社のウェブサイトに掲載されている図にしたがって、チャンネル内に直接注入してください。



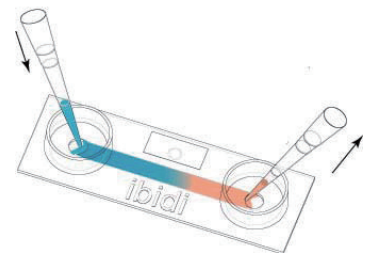
2) 付属のキャップをウェルにゆるくかぶせます。キャップは完全に閉めないでください。

3) ラックをCO₂インキュベーター (37℃、5%) 内に入れて細胞を接着させます (60分間)。その後、新しい培地0.5mlを両方のウェルに添加します。

4) オーバーナイトで培養します。

2 細胞の固定

5) 細胞培養用アスピレーターまたはピペットを用いて、ウェルからすべての培地を吸引します。(未だチャンネル内の培地は残ったままです。) 空のウェルに PBS 1mlをゆっくり注入し、反対側のウェルからゆっくり吸引することによって、細胞を PBSで洗浄します。**チャンネル内のすべての液体を吸引しないでください。**



6) 3.7%パラホルムアルデヒドを含むPBS溶液~200μlを用いて、同じ手順で細胞を固定します。**チャンネルの反対側から**ウェル内の溶液を除去し、10分間インキュベートします。

3 浸透処理およびブロッキング

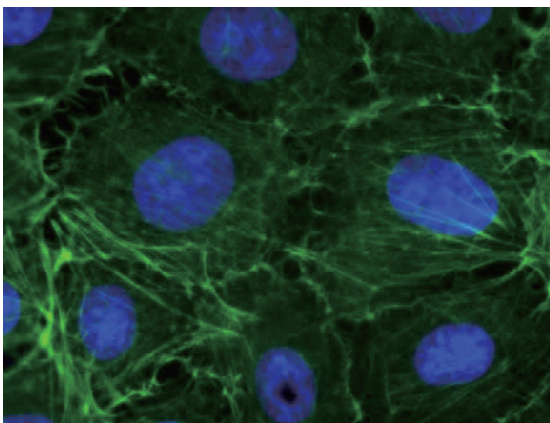
- 7) ステップ 5) の手順と同じ方法で細胞をPBS 1mlで再度洗浄します。
- 8) 0.1% Triton® X-100 (Fluka) を含むPBS溶液~200μlを添加し、3 ~ 5分間インキュベートします。
- 9) 細胞をPBSで洗浄します。
- 10) 1% BSAを含むPBS溶液~200μlを添加し、20分間インキュベートします。
- 11) 細胞をPBSで洗浄します。

4 染色およびマウント

- 12) チャンネルから液体をすべて除去します。チャンネルから液体を吸引後は、チャンネルを乾燥させないでください。
- 13) Alexa Fluor® 488ファロイジン (1 Unit + PBS 500μl + 1% BSA, Invitrogen社) 100μlを添加します。室温で20分間インキュベートします。
- 14) 細胞をPBSで洗浄し、チャンネルから溶液を吸引して空にします。
- 15) DAPI (0.1μg/ml, Sigma-Aldrich) 100μlを添加し、3 ~ 5分間インキュベートします。
- 16) 細胞をPBSで洗浄し、液体をすべて除去します。マウントおよび光退色防止のために80%グリセロール (PBSに溶解し、2% DABCOを添加) を添加します*。ウェルに付属のキャップをかぶせます。スライドは約4週間保存可能です。
- 17) 適切なフィルターセットおよびオプションで油浸オイルを使用して、蛍光顕微鏡下で細胞を観察します。

* Lee J.H., Koh H., Kim M., Kim Y., Lee S.Y., Karess R.E., Lee S.-H., Shong M., Kim J.-M., Kim J. & Chung J.; Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. Nature Aug 2007; doi: 10.1038/nature05828として公表

Rat1細胞



緑色：F-アクチン細胞骨格
青色：細胞核
(Zeiss Axiovert 135 ; Plan-Neofluar 100×/1.3)