

ibidi アプリケーションガイド

ibidi マイクロスライドを用いた顕微鏡観察

ibidi マイクロスライドの原理 : カバースリップに関する基礎知識 2

豆知識: 多くのibidi製品は、なぜ製品名に「μ」がついているのか 2

ibidiポリマーカバースリップ 3

ガラスカバースリップボトム 3

油浸オイル適合性 3

多様なibidi マイクロスライド底面: 実験系に最適な底面を見つける

4

ibiTreat 4

ノンコーティング 4

Bionert 4

ガラス 4

コーティング: I型コラーゲン、IV型コラーゲン、ポリ-L-リジン 5

弾性支持面(ESS) 5

ibidi チャンバースライドの形状 6

チャンバー形状 6

オールインワンチャンバー: 1つのスライドで多様な用途を可能にする 6

チャンネルスライド: 高い細胞分布の均一性と背景むらのない位相差顕微鏡画像取得を可能にする 8

Ph+スライド: メニスカスフリーの位相差顕微鏡観察 9

顕微鏡観察で重要になるパラメータ

..... 10

顕微鏡観察に関与する物性パラメータ 10

カバースリップの厚さ 10

開口数 10

屈折率 11

物質分散/アッペ数 11

透過率 11

自家蛍光 11

顕微鏡観察技術と培養表面: ベストマッチを見つける

..... 12

底面素材と光学顕微鏡技術との適合性 12

倒立顕微鏡 13

正立顕微鏡 13

位相差顕微鏡 14

微分干渉コントラスト (DIC) 顕微鏡 16

広視野蛍光顕微鏡 17

共焦点顕微鏡 18

二光子顕微鏡 (多光子顕微鏡) 19

FRAP (光褪色後蛍光回復法) 20

LSFM (ライトシート蛍光顕微鏡) 20

FRET (フェルスター共鳴エネルギー遷移) 21

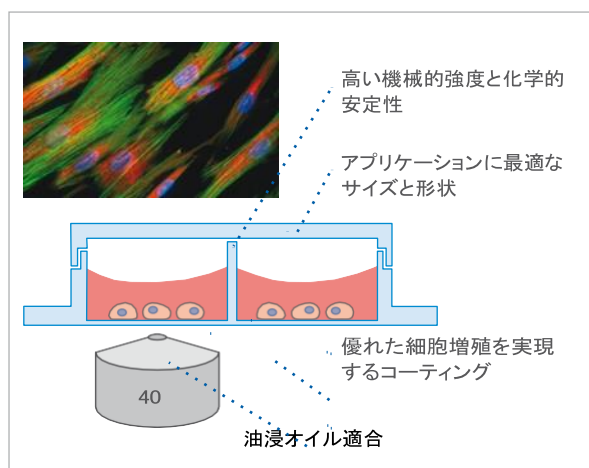
FLIM (蛍光寿命イメージング) 21

全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF) 22

超解像顕微鏡観察

(STED、SIM、(F)PALM、(d)STORM) 23

ibidiマイクロスライドの原理: カバースリップに関する基礎知識



細胞培養用途で使用されるプラスチック容器の底部は、1mm程度の厚さであることが多い。これは、標準的なカバーガラスの5倍以上の厚みになります。このような容器は、高倍率の顕微鏡観察には適しません。

ibidi社が提供する[マイクロスライド](#)、[マイクロディッシュ](#)、[マイクロプレート](#)は、底面が、薄いカバースリップで構成されており、高倍率顕微鏡観察まで適応できるようになっています。

そのカバースリップ素材として、ibidiポリマーおよびガラスより選択できるようになっています。ibidiポリマーは、優れた光学性能を有しながら細胞接着性が良く、細胞培養～顕微鏡観察の多様なシチュエーションで活躍します。一方、ガラス製カバースリップは、細胞に特別なコーティングが必要な場合や、[TIRF](#)や[STED](#)、[STORM](#)などの超解像顕微鏡観察で使用する場合に推奨されます。

このような、底面がカバースリップで構成されるスライドは、基本的には倒立顕微鏡で使用します。「[顕微鏡観察技術と培養表面](#)」の章では、様々な顕微鏡技術に応じた、情報を見つけることができます。

	#1.5 ibidi ポリマーカバースリップ	#1.5H ibidi ガラスカバースリップ	#1.5 ガラスカバースリップ	スライドガラス*
厚さ	180 μm (+10/-5 μm)	170 μm (+/-5 μm)	170 μm (+20/- 10 μm)	1 mm
材質	ポリマー	D 263 M Schott high precision glass	D 263 M Schott high precision glass	ガラス
ガス透過率	あり	なし	なし	なし

豆知識: ibidiの製品名に「μ」がついている理由

“μ”はギリシャ語のアルファベット(“Mu”)の小文字です。単位接頭語としての“μ”は“micro”の記号として用いられ、100万分の1(10⁻⁶)を表します。

ibidi が製品名の多くにμを付けた理由は以下の通りです:

- 真核細胞のサイズがマイクロオーダー(直径10~100μm)であること。
- 細胞観察に使用するのが様々な“マイクロ”scopyであること。
- ほとんどの容器の底面厚が180”マイクロ”mであること。
- 我々、物理学を好むものが、「μ」のようなギリシャ文字を使うことが好きであること。

ibidi ポリマーカバースリップ

ibidiポリマーカバースリップは、[マイクロスライド](#)、[マイクロディッシュ](#)、[マイクロプレート](#)の底面を構成する薄いプラスチック製カバースリップです。ibidiでは、ほとんどのアプリケーションでibidiポリマーの使用を推奨しています。その厚さは $180\ \mu\text{m}(+10/-5\ \mu\text{m})$ であり、ガラス製カバースリップ標準規格でいうNo.1.5に該当します。油浸オイルにも適合するなど、光学顕微鏡観察に必要とされる要件をすべて満たしており、さまざまな顕微鏡観察方法での使用が可能です。ibidi ポリマーカバースリップは、ガス透過性を有している点も見逃せない特徴です。このため、細胞培養時の容器内部の二酸化炭素や酸素交換が、蓋を閉めた状態でも円滑におこなわれます。ibidi ポリマーカバースリップは、化学修飾やタンパクコーティングすることもできるため、ibiTreat、Bioinert、コラーゲンIVコーティング、Poly-L-Lysineコーティングなど、多様な底面選択を可能にしている点も注目すべき点です。これにより、様々な実験や細胞タイプに応じた、最適な細胞生育環境を提供します。詳しい情報は、この章の「[多様なibidiマイクロスライド底面](#)」をご覧ください。

ガラスカバースリップ

ibidiでは、ホウケイ酸カバーガラスボトムマイクロスライドも提供しています。これらは、特に、TIRF、超解像顕微鏡観察、一分子顕微鏡観察用途で提供しています。

ibidiでは、精細な顕微鏡観察に対応するために、厚さ幅の少ない($170\ \mu\text{m}/\pm 5\text{mm}$) D 263 M Schott glass coverslipsを採用しています。この厚さはガラス製カバースリップの標準規格#1.5Hに該当します。

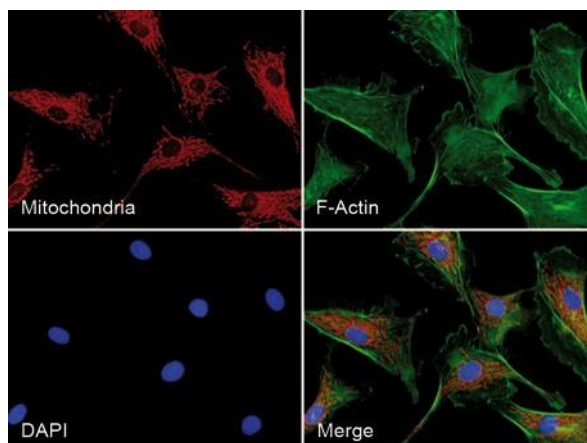
※ガラスボトムの容器では、培養用プラスチックと比較すると細胞接着力が弱く、時にコーティングを必要とする場合があります。またガラスカバースリップはガス透過性がない点も違いとして挙げられます。

油浸オイル適合性

油浸オイルは、顕微鏡の分解能を、物理的限界に高める際、用います。油浸オイルは、対物レンズとカバーガラス間の空間を、空気の代わりに満たし、レンズの集光能を向上させます。これにより、取得画像の解像度とS/N比を向上させます。このため高倍率顕微鏡観察用スライドは、油浸オイル適合であることが理想的です。

ibidiマイクロスライド、ディッシュ、プレートで使用されているibidiポリマーは、油浸オイルに適合し、この点からも顕微鏡観察に適した素材と言えます。

ibidi製品に適合する油浸オイルについては、[ibidiのWEBサイト](#)をご覧ください。

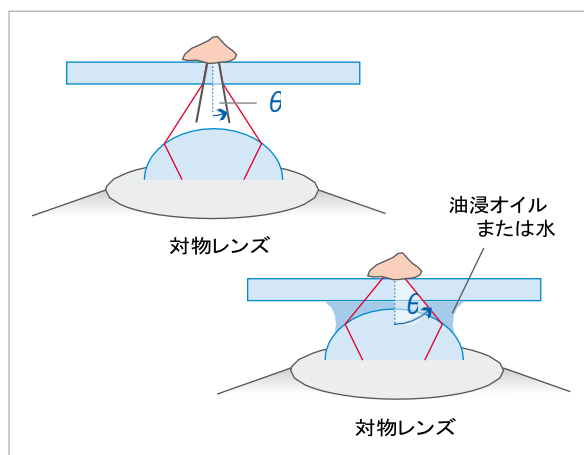


ウシ内皮細胞の免疫蛍光染色画像
赤: MitoTracker™ Red CMXRosで染色したミトコンドリア
緑: Alexa Fluor™ 488 Phalloidinで染色したF-アクチン、
青: DAPIで染色した核

このガラス製カバースリップが採用された製品は、以下の通りです。

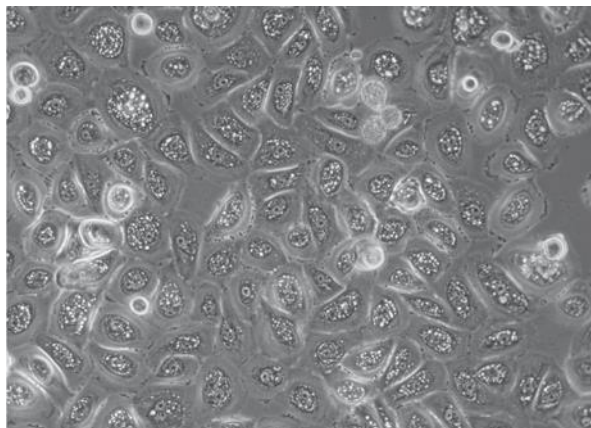
- ・ [μ-Dish 35 mm, high Glass Bottom](#)
- ・ [μ-Slide VI 0.5 Glass Bottom](#)
- ・ [μ-Slide 2 Well | 4 Well | 8 Well Glass Bottom](#)
- ・ [μ-Slide 2 Well Ph+ | 4 Well Ph+ Glass Bottom](#)

また、ibidiでは、汎用品ガラスボトムディッシュとして、厚さ $170\ \mu\text{m}(+20\ \mu\text{m}/-10\ \mu\text{m})$ 、標準規格#1.5)ガラスカバースリップボトムのタイプもあります。費用対効果の良いディッシュとしてご使用ください。



多様なibidiマイクロスライド底面 実験系に最適な底面を見つける

細胞の増殖、分化、シグナル伝達などは、細胞培養面と密接な関係にあります。ibidiでは、さまざまな用途に応じて使い分けられるよう、表面加工やコーティングを施した多様な製品を提供しています。



ibidiTreatしたibidi ポリマーカバースリップ上に播種したヒト初代ケラチノサイト

ibiTreat

接着細胞の播種を目的とした表面加工

ibiTreatされたibidiポリマーは、接着細胞を培養する際、最も推奨される培養面です。

ibiTreatとは、本来、疎水性が高く、細胞が接着しにくいibidiポリマーに対し、行われる親水化処理です。物理的 surface 修飾を行い、表面を親水性にすることで細胞接着しやすくしています。

このため、ibiTreatを行った底面では、タンパク質コーティング等を必要とすることなく、ほとんどの接着細胞がその上で良好に増殖・培養できます。強い細胞接着力は、血流をシミュレートするような強い流速を用いるフロー培養でも役立ちます。このibiTreatされたibidiポリマーは、10,000を超える論文に掲載されています。

ノンコーティング

コーティングなどを施し使用する疎水性底面

ノンコーティングと記載がある表面は、ibiTreatを施していないibidiポリマーが採用されています。疎水性が高く、細胞接着が起こりにくいため、一般的な接着細胞培養には適していません。接着細胞培養では、コーティングして使用してください。非接着性細胞の浮遊培養に適しますが、厳密に接着を抑制したい場合には、Bioinert表面の使用を推奨します。

ガラス

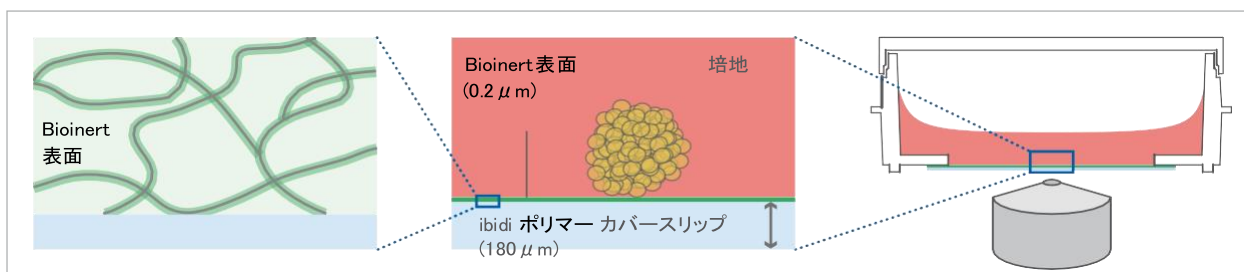
TIRFまたは超解像顕微鏡観察向け底面

ibidi社製製品の多くは、ibidiポリマーだけではなく、ガラスボトムの利用が可能です。このガラスボトムは、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなど、一般的な(ECM)コーティングと併せても使用できます。また、シラン処理、プラズマ処理、化学活性化など、ガラスに対する化学修飾することも可能です。

Bioinert

浮遊細胞とスフェロイドの培養

Bioinert表面は、ibidi ポリマーに対し、薄いポリオールハイドロゲル層を共有結合させたものです。この加工は、細胞表面との相互作用を阻害し、細胞接着を防ぎます。このため、浮遊細胞やスフェロイドの培養に理想的です。Bioinertされた表面は、一般的な超低接着(ULA)コーティングとは異なり、長時間の実験でも非接着性を維持します。なお、Bioinert加工は、ibidiポリマーの光学性能に干渉せず、顕微鏡観察には影響を与えません。



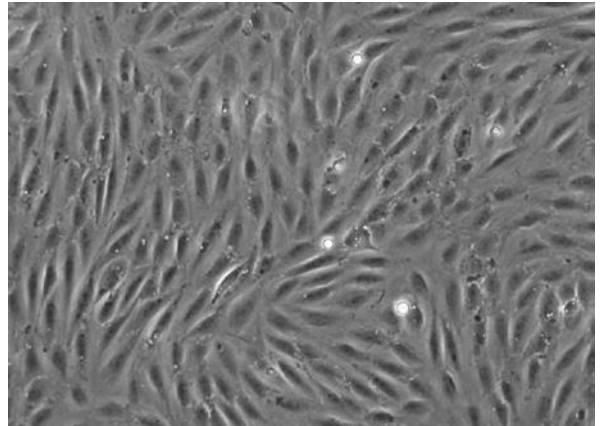
コーティング:I型コラーゲン、IV型コラーゲン、ポリ-L-リジン

細胞外マトリックスを必要とする接着細胞培養で利用できるコーティングされた表面

ibidi では、ibidi ポリマーに対し、コラーゲンI・IVおよびポリ-L-リジンでコーティングした製品も提供しています。また、3D培養や表面コーティングで使用できる高品質I型コラーゲンも提供しています。

I型コラーゲン

I型コラーゲンは、人体に最もよくみられるコラーゲンです。皮膚や骨など体のさまざまな部位でコラーゲン線維は作られています。このため、I型コラーゲンは、細胞接着促進のための培養容器表面コーティングにしばしば利用されます。また、3D細胞培養で使用するゲルとしても使用されます。ibidiでは、コーティング済ディッシュ・スライドに加え、ラット尾より作られる高品質の**コラーゲン型**自体も提供しています。



Collagen IVでコーティングしたibidi ポリマー カバースリップ上のRAT1細胞

IV型コラーゲン

IV型コラーゲンは、細胞外マトリックス(ECM)にある薄層基底膜の主要構成成分の1つです。IV型コラーゲンコートは、細胞接着・増殖促進を目的で使用されることがあり、上皮細胞、内皮細胞、神経細胞、筋細胞培養などでしばしば使用されます。

ポリ-L-リジン(PLL)

ポリ-L-リジン(PLL)は必須アミノ酸であるL-リジンの、重合体です。このポリマーは、細胞培養で最も使用される接着基質の1つです。多種多様な細胞型で用いられますが、神経細胞培養では特に一般的です。PLLを介した細胞接着は、インテグリン非依存的な機構で行われます。

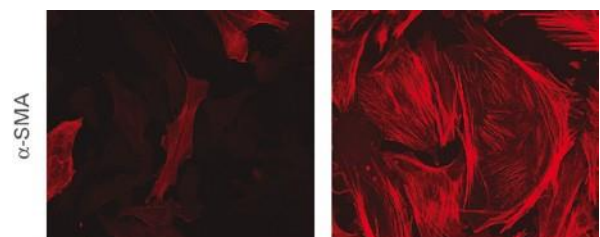
弾性支持面(ESS)

弾性表面上における接着細胞の培養

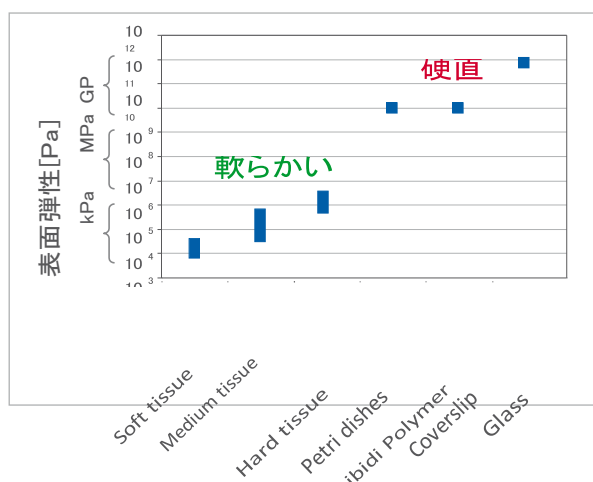
生きている組織とin vitro培養では、細胞生育環境は大きく異なります。特に表面の硬さ/弾性の違いは、細胞の増殖、分化、および機能に大きく影響を及ぼします。一般的な細胞培養用プラスチックの弾性率(ヤング率)は~1 GPaです。ガラスのヤング率は約70 GPaです。対照的に、哺乳類の細胞が置かれる一般的な環境は100kPa未満である。したがって、プラスチックシャーレで培養した場合、普段より100,000倍硬い環境に細胞は存在していることになります。

マイクロディッシュ ^{35mm、high}ESSで採用している elastically surface (ESS)は、細胞や組織と同レベルの弾性培養面を提供します。3種類の異なる硬さを選択できるようになっており、組織で見られる弾性のほとんどをカバーすることができます。

ESS表面は疎水性が高く、細胞接着しにくいいため、コラーゲンなど、細胞外マトリックスによるコーティングを施し、使用します。



弾性表面(ESS 28kPa)上で分化させた線維芽細胞



ibidiチャンバースライドの形状: 実験系に最適な形状を見つける

チャンバースライドの形状



オープンウェルフォーマット
(チャンバースライド)

- 一般的な形式
- 取り扱いやすい
- 大量～少量まで対応可能



チャンネルフォーマット
(チャンネルスライド)

- Noメニスカス
- 均一な細胞分布を実現
- スモールサイズ設計

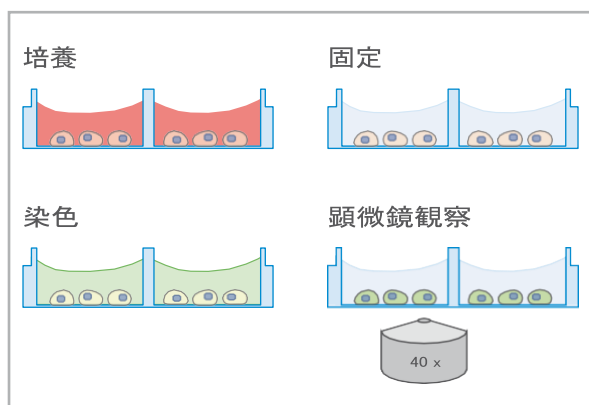


特殊形状

- 用途に応じた設計(濃度勾配を与える、ゲルマトリックスを使用する、など)

細胞を用いる実験系は多様です。ibidi社では、実験系に合わせた様々な形状の容器を提供しています。それら全てにおいて、高度なイメージングに適合できるよう、形状と材質の組み合わせにこだわっています。加えて、細胞培養、染色、イメージングなど実験の各工程が効果的に実施できるよう、作業時間を減らし、実験ステップを減少させることにもこだわっています。このため、多くの実験が“オールイン・ワン”でこなせるような仕様となっています。標準的な製品の他に、血管新生、走化性、創傷治癒、または細胞遊走アッセイのような特定の細胞機能解析に特化した製品も用意しています。

オールイン・ワンチャンバー:1つのスライド内のすべてのステップ



ibidiの提供するオールイン・ワンチャンバーは、免疫蛍光染色の実験ステップを減少させます。

ibidiでは、細胞培養から顕微鏡イメージングまでのすべての実験段階を1つのチャンバーで行うことができる容器を“オールイン・ワンチャンバー”と呼んでいます。これを使用することで、細胞培養、固定作業、ライブセルイメージングなどの、日常のラボルーチンを効果的に行うことができるようになります。

[マイクロスライド 2 ウェル](#) | [マイクロスライド 4 ウェル](#) | [マイクロスライド 8 ウェル](#) などは、免疫蛍光染色に使用可能で、培養から顕微鏡観察まで、すべての工程を1枚のスライド上で実施できます。これらの容器は、底面がカバースリップであるため、観察対象をカバーガラスで封入する必要はなく、高倍率の対物レンズ使用時でも、そのまま底面より観察することができます。

少容量で扱いたい場合には、[μ-スライド VI⁰⁴](#)のようなチャンネルフォーマットがより適します。上面がオープンなチャンバースライド同様に、免疫蛍光染色に必要な実験ステップを減少できることに加え、使用する試薬量を削減し、抗体などの費用節約に役立ちます。

補足: チャンバースライド、リムーバブル

マイクロスライド リムーバブルチャンバー (3 ウェル | 8 ウェル | 12 ウェル) は、一般的なスライドガラス(厚さ 1mm)に、取り外し可能なシリコンチャンバーを接着させた製品です。正立顕微鏡観察および倒立顕微鏡観察、共に使用することができます。また、封入材とカバーガラスを使用して、サンプルを封入したスライドを作成できるため、免疫蛍光染色後の検体の長期保存が可能です。

細胞培養～免疫蛍光染色の全段階を1枚のスライドで行うことができる点、少数の細胞と少量の抗体しか必要としない点はオープンウェルフォーマットのチャンバースライドと一緒です。

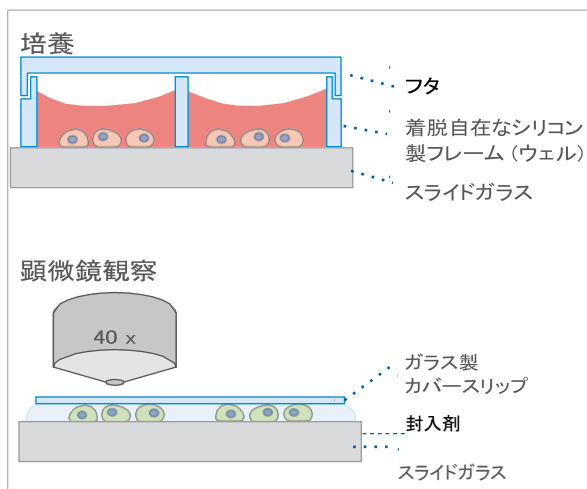
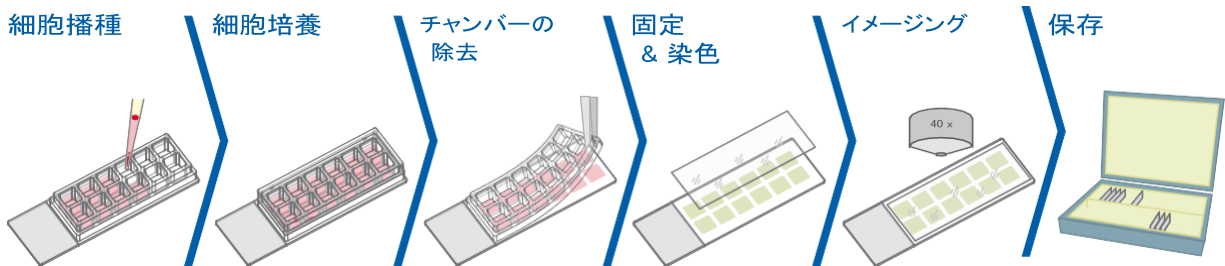
注意:細胞を播種した場合、底面はガラスボトムになります。ガラスボトムは細胞を直接播種して問題ありませんが、培養用プラスチックと比較すると細胞接着力が弱く、細胞を播種する前にコーティングが必要になる場合があります。



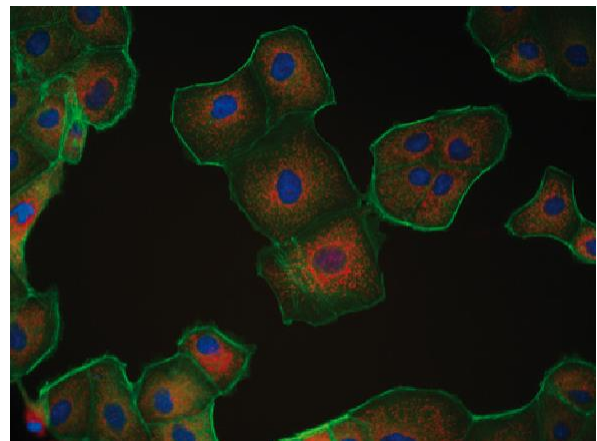
マイクロスライド リムーバブルチャンバー (3 ウェル | 8 ウェル | 12 ウェル)

細胞培養～免疫蛍光染色、正立顕微鏡観察および倒立顕微鏡観察まで全てを行うことができる、着脱自在なシリコン製チャンバーが付いたマイクロスライド。

マイクロスライド リムーバブルチャンバー12 ウェル を用いた免疫蛍光染色一例



ibidi マイクロスライド リムーバブルチャンバーは細胞培養(上図)、および、免疫蛍光染色後、正立顕微鏡を用いた細胞観察すること(下図)が可能です。



Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞の三色免疫蛍光染色

赤: MitoTracker™ Red CMXRosで染色したミトコンドリア、
緑: Alexa Fluor™ 488 Phalloidinで染色したF-アクチン、
青: DAPI染色した核

チャンネルスライド:高い細胞分布の均一性と背景むらのない位相差顕微鏡画像取得を可能にする

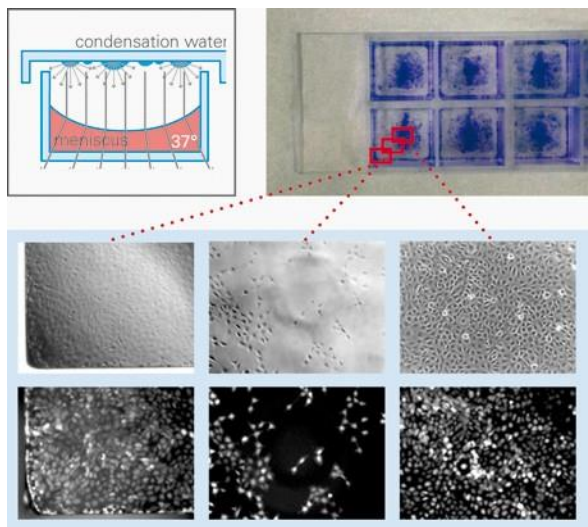
均一な細胞分布

ibidi チャンネルフォーマットのスライドは、本来、還流培養で使用するために開発された製品ですが、均一な細胞分布を実現するためにも役立ちます。

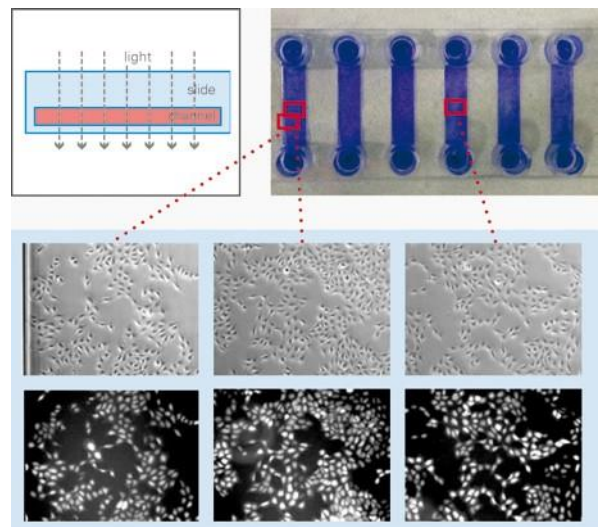
オープンウェルフォーマットの場合、培地界面にメニスカスを生じるため、細胞分布に偏りが生じやすくなります。これに対し、チャンネルフォーマットのスライドは、閉鎖形状です。このため、メニスカスを生じず、チャンネル内の細胞密度はスライド内の位置や、細胞播種中および播種後の操作や処理によって偏りを生じません。

この違いを実際に検証するために、オープンウェルフォーマットの[マイクロスライド 8 ウェル](#)とチャンネル[スライド VI⁰⁴](#)で培養細胞を肉眼および顕微鏡でそれぞれ観察したのが次の結果です。マイクロスライド8ウェルで培養した場合、細胞がウェル中央に偏り、ウェルの淵に近い領域の細胞密度が少なくなっているのがわかります(逆に、ウェルの縁に集まっていたものも一部みられました)。対照的に、[マイクロスライド VI⁰⁴](#)における細胞分布は均一なのがわかります。細胞分布の不均一は、位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡、いずれの顕微鏡観察にも影響します。

マイクロスライド 8ウェル



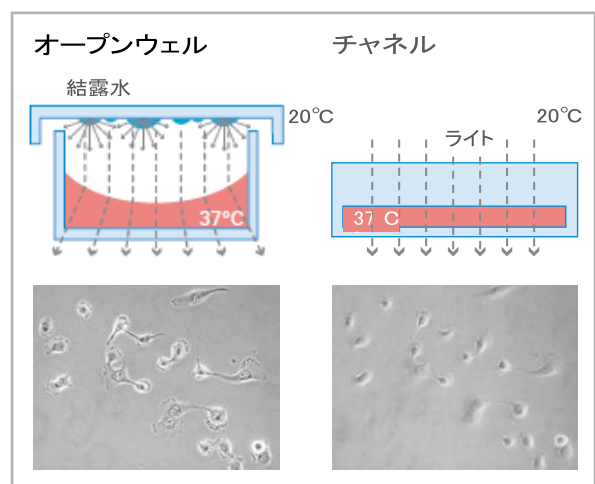
マイクロスライド VI⁰⁴



マイクロスライド 8ウェル(左)とマイクロスライド VI⁰⁴(右)におけるスライド形状と細胞分布 クリスタルバイオレット染色を用いた細胞観察(上)、位相差顕微鏡を用いた細胞観察(中央) および蛍光顕微鏡による細胞観察(下)

結露を生じない

オープンウェルフォーマットの容器をインキュベーターから取り出すとフタに結露を生じる場合があります。この結露は、位相差顕微鏡観察の邪魔になる場合があります。チャンネルフォーマットでは、その構造的な特徴より結露は生じず、画像取得の障害にはなりません。



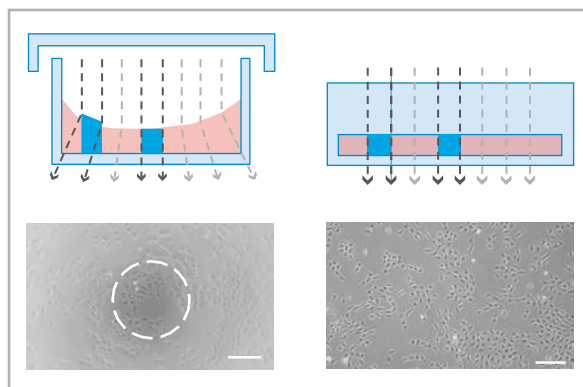
位相差顕微鏡の背景むらがない

また、オープンウェルチャンバーの培地界面に生じるメニスカスは、位相差顕微鏡観察時における、背景コントラストのむらとなる場合があります。この点においても、チャンネルスライドは、チャンバースライドより、位相差顕微鏡観察に適していると言えます。

「顕微鏡技術と培養表面：完璧な組み合わせを見つける」もご参照ください。

Ph+スライド:メニスカスフリーの位相差顕微鏡観察

Ph+(Phase Contrast +)マイクロスライドとマイクロディッシュは、ウェル中央部に特殊な中間プレートが配置されたオープンウェルフォーマットの製品です。培地や試薬の出し入れは、プレート末端の開口部より行います。このプレート下の界面は、チャンネルスライド同様、メニスカスを生じません。これにより、メニスカスの影響を受けない位相差顕微鏡を実現します。このようにPh+は、メニスカスフリーの位相差顕微鏡実現する革新的技術です。

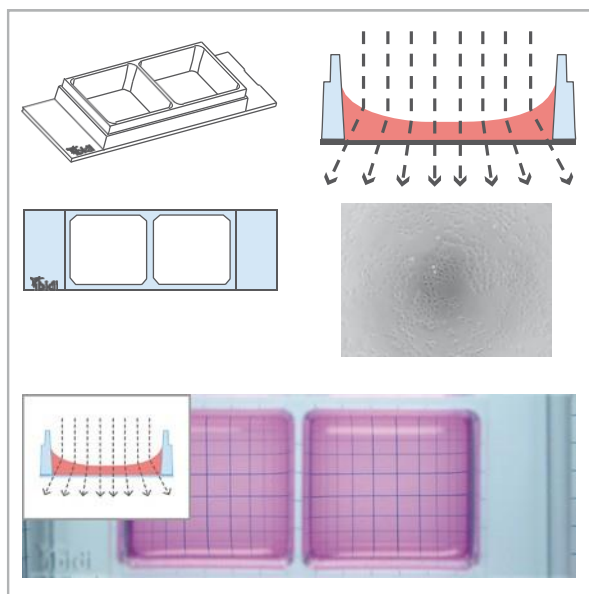


あなたのアプリケーションに応じて、以下のラボウェアフォーマットが選択できます：

- ・ [マイクロスライド 2 ウェル Ph+](#)
- ・ [マイクロスライド 2 ウェル Ph+ ガラスボトム](#)
- ・ [マイクロスライド 4 ウェル Ph+](#)
- ・ [マイクロスライド 4 ウェル Ph+ ガラスボトム](#)
- ・ [マイクロディッシュ 35 mm Quad](#)

Ph+のスライドはメニスカスの影響を防ぎます

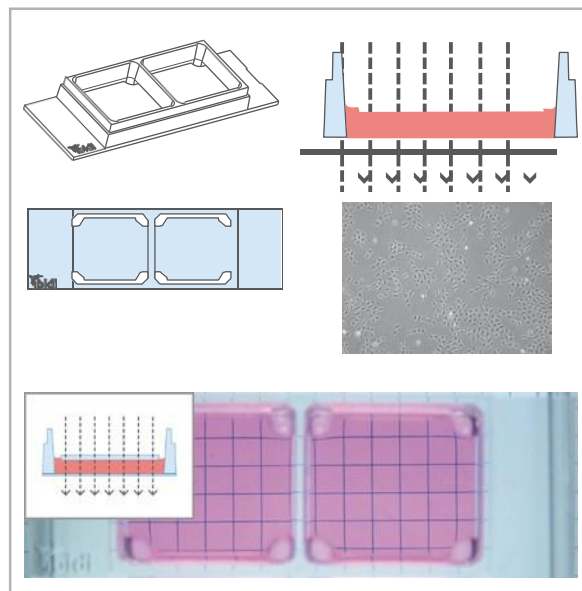
マイクロスライド 2 ウェル



- ・ 位相差顕微鏡観察には不向き
- ・ このムらは蛍光顕微鏡観察には影響しません。

メニスカスの影響一例。光は気相-水相-界面で屈折するため、顕微鏡でのコントラストが悪くなる。コントラストの影響が無い領域は、中央部分のわずかな部分だけである。

マイクロスライド 2 ウェル Ph+



- ・ 位相差顕微鏡観察に最適
- ・ 蛍光顕微鏡観察にも最適

Ph+スライドを使用した場合、メニスカスの影響を受けず、コントラストの良い細胞領域が増える。

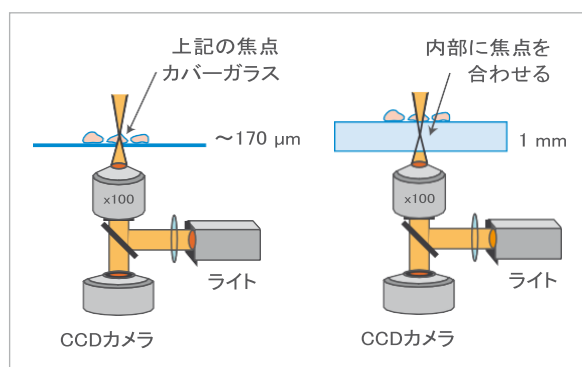
顕微鏡観察で重要になるパラメータ

顕微鏡観察に関する物性パラメータ

物質	厚さ	屈折率nD (589nm)	自家蛍光	Abbe数
ibidi ポリマー カバースリップ ibiTreat、Uncoated、 およびBioinertを含む	#1.5 (180 μm +10/-5 μm)	1.52	低	56
ibidi ガラスカバース リップ・D 263 M	#1.5H (170 μm +/-5 μm)	1.52	低	55
市販のカバーガラス	#1.5 (170 μm +20/-10 μm)	1.52	低	55
ポリスチレン (一般的な培養用ペトリディッシュ、 フラスコ)	様々 (通常は1mm)	1.56	高	53

カバースリップの厚さ

カバーガラスの厚さは、画像クオリティーに影響を与える重要なパラメータです。厚みが異なる場合、球面収差および色収差の影響を考慮し、対物レンズの補正環を調整する必要が生じます。顕微鏡観察に用いる対物レンズのほとんどは、標準カバーガラスの規格0.17 mm (170 μm +20/-10 μm, #1.5)に併せた仕様となっています。ibidi ポリマーカバースリップも、この規格に適合できるように厚さ180 μm(+10/-5 μm, #1.5)で作られており、顕微鏡観察のための理想的な条件を提供しています。



[マイクロ・ディッシュ^{35mm high}](#)、[マイクロスライド 2 ウェル、4ウェル、8ウェル](#)、および[マイクロスライド 2 ウェルPh+ 4ウェルPh+](#)では、厚さ170 μm(+/-5 μm)のカバーガラススポット#1.5Hも利用できます。

開口数

開口数(NA)は、その分解能と明るさを規定する顕微鏡の対物レンズにとって重要な値です。対物レンズの一定距離における観察対象に対して集光できる能力を現し、分解能に関する単位となります。開口数が高いほど、対物レンズによる分解能は上がり、取得する画像の解像度は高くなります。(開口数はどの対物レンズにも記載されており、確認することができます。)

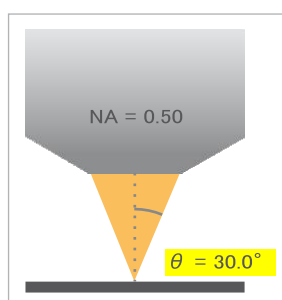
開口数NAは、以下の式で定義されています。

$$NA = n \sin \theta$$

n = レンズを使用する媒質の屈折率
(例: 浸油オイル用1.52)

θ = レンズに入射する光の最大角

ドライで使用する対物レンズの、最大NAは~0.95です。液浸対物レンズを使用した場合、この値は、最大NAは約1.4まで上昇します。



開口数0.5(20x/0.5)の20倍対物レンズの例。

[「顕微鏡技術と培養表面: 完璧な組み合わせを見つける」](#)もご参照ください。

屈折率

屈折率 n_D は、特定の物質中の光の速さを真空と比較して現した値です。屈折率はしばしば「光学密度」と呼ばれます。この値は、開口数(NA)を計算する上で重要です。

屈折率は次式で定義されます:

$$n_D = c / \eta$$

c = 真空中光の速度

η = 特定の媒質内の光速

また、屈折率は波長に依存する値です。基本的には、 n_D は、589nmでの光学材料の屈折率を使用します。

ibidiポリマーカバースリップの屈折率は1.52です。この値は、ガラス(カバースリップ)、対物レンズ、油浸オイル同様の屈折率になります。

分散/ アッベ数

分散とは、波長に依存する屈折率の変動度合いを意味します。したがって、分散は色収差に関与します。

光学材料中の分散性はAbbe数を用いて定量します。3種類の異なる波長の屈折率より算出します。アッベ数が高い材料であれば、異なる波長の屈折率がほぼ同じとなり、波長に依存する光の分離が減少します。

透過率

光の透過率は、特定波長の光が通過できる割合を示しています。顕微鏡観察において、カバースリップの透過率が高いほど、蛍光励起や画像取得に寄与することが少なくなります。ibidi ポリマーカバースリップは、様々な波長において、高い透過性を有し、多様な顕微鏡アプリケーションに対応します。

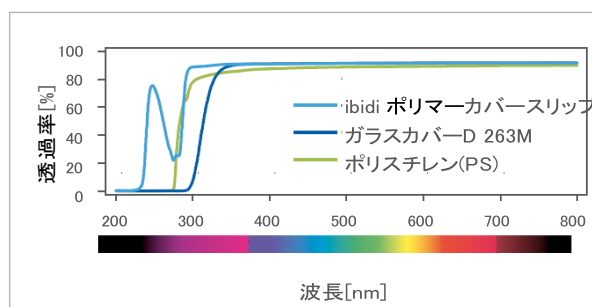
自家蛍光

自家蛍光は、目的の蛍光分子とは異なる物質が潜在的に有する、物質固有の蛍光のことです。自家蛍光は、イメージングにおいて、ノイズまたはバックグラウンドの原因になります。自家蛍光は、微弱な蛍光シグナルを観察する際に特に問題になります。すべての物質および培地はある程度の自家蛍光を示しますが、その強度は、物質の種類によって異なり、励起/蛍光波長などにも依存します。

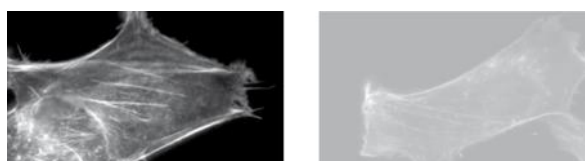
物質	屈折率 n_D
真空	1 (定義による)
空気	1.0003
水	1.33
グリセロール	1.47
イマージョンオイル	1.52
ガラスカバースリップ	1.52
ibidiポリマーカバースリップ (ibiTreat、UncoatedおよびBioinertも含む)	1.52

このため、アッベ数が高い材料ほど色ばらつきが少なく、色収差の小さい顕微鏡観察のための優れた光学的品質が提供できます。

一般に、高分解能顕微鏡観察には、アッベ数が55以上の材料が適しているとされます。ibidi で使用している、ibidiポリマーカバースリップのAbbe数は56、D 263 MのSchottホウケイ酸ガラスのアッベ数は55です。



自家蛍光がS/N比影響した一例



ibidi ポリマーカバースリップを使用した低自家蛍光画像

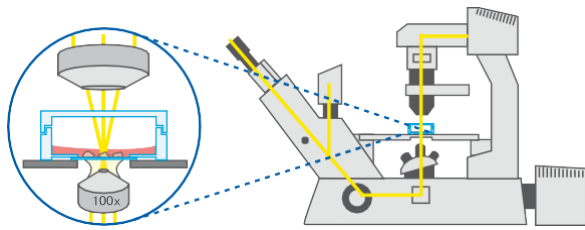
標準培養フラスコを用いた高自家蛍光画像

顕微鏡技術と培養表面:完璧な組み合わせを見つける

底面素材と光学顕微鏡技術との適合性

	ibidi 高分子カバースリップ	ibidi ガラスカバースリップ	標準ポリスチレンプレートおよびディッシュ
<u>位相差顕微鏡</u>	++	++	++
<u>微分干渉(DIC)顕微鏡</u>	++	++	-
<u>広視野蛍光顕微鏡</u>	++	++	-
<u>共焦点顕微鏡</u>	++	++	-
二光子顕微鏡(多光子顕微鏡)	++	++	-
<u>FRAP(光退色後蛍光回復法)</u>	++	++	-
<u>FRET (フェルスター共鳴エネルギー遷移)</u>	++	++	-
<u>FLIM (蛍光寿命イメージング)</u>	++	++	-
<u>全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF)</u>	+	++	-
<u>超解像顕微鏡観察</u>	+	++	-

倒立顕微鏡



倒立顕微鏡の模式図。容器底面を介して細胞を観察する。

用途:

倒立顕微鏡は、生細胞イメージングのための非常に一般的な技術であり、細胞を細胞培養容器の底部を通して観察することになります。

この技術は、正立顕微鏡と比較した場合いくつかの利点があります。倒立型顕微鏡では、細胞が接着する底面側より、直接開口数の大きい対物レンズを容易に接近させることができます。また、培地を入れた容器内の細胞観察にも容易にできます。このため、高倍率のライブセルイメージングに適しています。また、培地交換など、顕鏡しながら操作しやすい点もメリットになります。そして、対物レンズを上面から接近させる必要がないため、無菌性を保つことが容易であることも重要なメリットです。

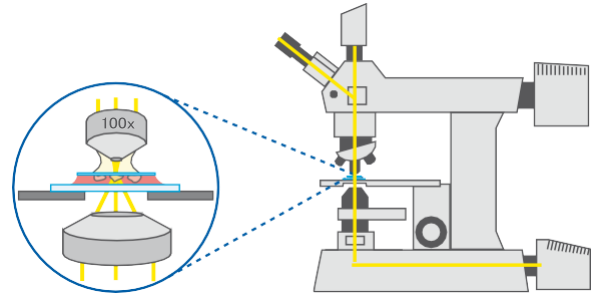
原理:

倒立顕微鏡では、透過光の光源とコンデンサーはステージの上に配置され、ステージ下方向に照射します。対物レンズは、ステージの下にあり、ここで細胞を通過した光を回収し観察します。したがって、倒立顕微鏡観察時、培養容器の底部は重要であり、ibidi ポリマーカバースリップおよびibidi ガラス カバースリップのような光学的特性が優れた素材を使用した容器が推奨されます。

ibidi Solutions:

- すべての ibidi マイクロスライド、マイクロディッシュ、マイクロプレートは、倒立顕微鏡の使用を前提に設計されています。
- ibidi では、倒立顕微鏡対応、ヒーティングシステム／ガスインキュベーションシステムも販売しています。このシステムは、マルチウェルプレートホルダーを使用することで、プレートの観察にも使用できます。

正立顕微鏡



正立顕微鏡の模式図。スライドとカバーガラス封入した細胞を上面から観察する。

用途:

正立顕微鏡を生物研究で使用する場合、位相差顕微鏡観察または広視野蛍光顕微鏡観察であることが多く、ライブセルイメージングや染色したスライドに封入した組織切片観察などに用いられます。

正立顕微鏡観察は、倒立顕微鏡観察と比較するといくつかの欠点があります。

ライブセルイメージングに使用する場合、培地、容器の蓋／フレームなどの影響で、サンプル上面よりレンズを近接させることが難しく、作動距離が短い高倍率レンズの使用が難しくなります。このため、取得画像の解像度は低く、取得蛍光シグナルは弱くなりがちになります。このため、ibidiではライブセルイメージングでは倒立顕微鏡を推奨しています。

原理:

正立顕微鏡では、透過光の光源とコンデンサーがステージの下に位置し、上方向に向けて照射します。対物レンズはステージの上に置かれ、下から来る光を集光します。したがって、ディッシュまたはスライド上面よりサンプルを観察する形になります。対物レンズを培地に浸しサンプルに接近させるものもありますが、これは一部のシステムに限られます。

ibidi Solutions:

- リムーバブルチャンバー(3 ウェル | 8 ウェル | 12 ウェル)は、フレーム部を外し、普通のスライドとして利用できるので、正立顕微鏡にも適合します。
- マイクロスライド VI - フラットは、上部突起がない構造のスライドであり、正立顕微鏡観察にも適合します。

位相差顕微鏡

用途:

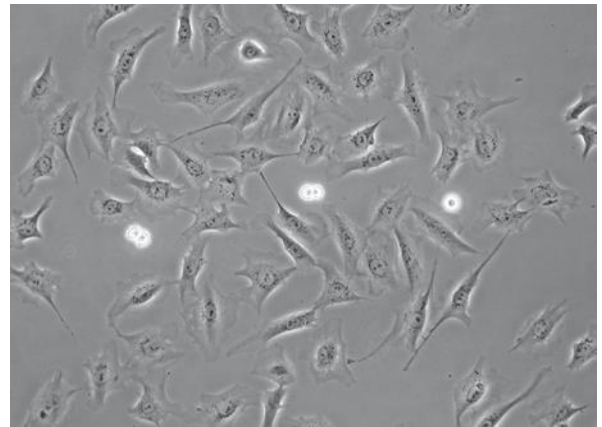
位相差顕微鏡は、細胞観察の際、最も頻繁に用いられる手法です。固定や標識なし(ラベルフリー)で、コントラストの良い細胞の形状が観察できるため、培養中の細胞観察などに用いられます。

原理:

未染色の細胞は、普通の明視野顕微鏡で観察したとしても、十分なコントラストが得られず、ほとんど観察することができません。これを解消するために用いられるのが位相差顕微鏡です。

位相差顕微鏡は、細胞を通過した光を回収し、細胞の厚みや構造の違いによって生じる小さな位相の差を、像のコントラストとして捉える手法です。

培地のメンスカスによる違いも、コントラストとして反映されてしまうため、メンスカスは、透過光の位相を乱し、正確な位相差画像取得の阻害要因となります。



Rat1細胞の位相差顕微鏡観察

F. Zernike. „Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects“.

Physica, 1942, part I: 10.1016/S0031-8914(42)80035-X, part II: 10.1016/S0031-8914(42)80079-8.

E. Horn, R Zantl. Phase-Contrast Light Microscopy of Living Cells Cultured in Small Volumes. Microsc Anal, 2006, 20(3):5-7

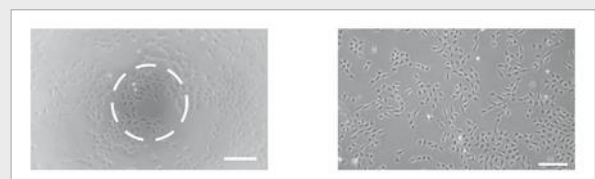
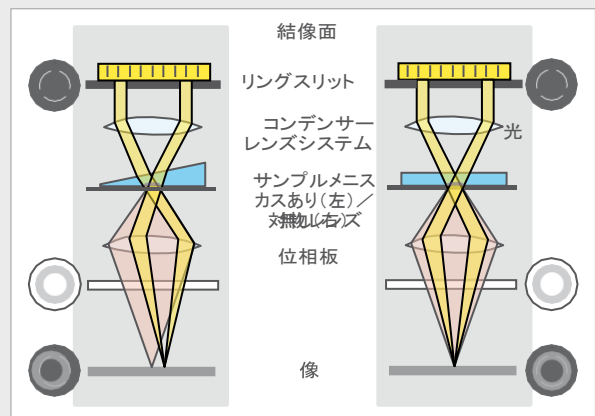
ibidi Solutions:

位相差顕微鏡観察では、気-液界面に形成されるメンスカスは、画質を著しく低下させる要因になります。メンスカスは、ウェルが小さい程、影響が大きく、96ウェルプレートなどでは特に注意が必要になります。メンスカスにより生じた光の回折が位相を乱し、光路上の位相リングと位相板の正しい関係を狂わせます。

ibidi は優れた位相差画像を保証できるいくつかの製品を提案できます。:

- [マイクロスライドアンジオジェネシス](#)
- [マイクロプレート アンジオジェネシス 96well](#)
- [チャンネルスライド全般](#)
- [マイクロスライド Ph+](#)

「[チャンネルスライド](#)」、[アプリケーションノート03\(PDF\)](#)も併せて参照ください。

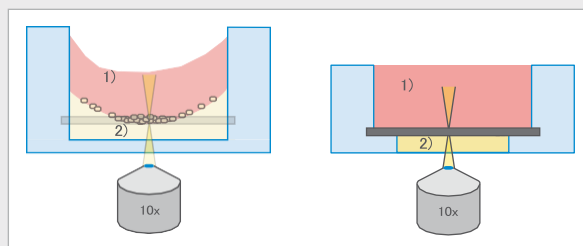


メンスカスあり
アライメントなし、位相差不良。

メンスカス無し
正しいアライメント、良好な位相コントラスト。

ibidi マイクロスライドアンジオジェネシスとマイクロプレートアンジオジェネシス

[マイクロスライドアンジオジェネシス](#)および [マイクロプレートアンジオジェネシス96ウェル](#)の「内部ウェル構造」は、メニスカスを抑制します。このため、血管新生実験だけではなく、位相差画像取得用途でも利用できます。



標準ウェル

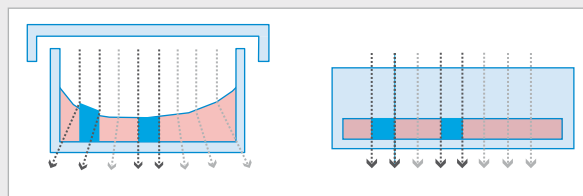
- 1) メニスカスを生じた気-液界面
大部分の観察領域で位相差不良
- 2) ゲル表面のメニスカス
すべての細胞を同一焦点面で観察できない

マイクロスライド/
プレートアンジオジェネシス

- 1) 平面の気-液界面
全観察領域で位相差良好
- 2) 平らなゲル表面:
すべての細胞が1つの光学平面にあ

ibidi チャンネルスライド

[チャンネルスライド](#)は位相差顕微鏡観察に理想的です。細胞が播種されている状態では、チャンネル内は培地で満たされているため、メニスカス形成はありません。このため、チャンネル全領域について、メニスカスフリーの位相差顕微鏡観察が可能です。

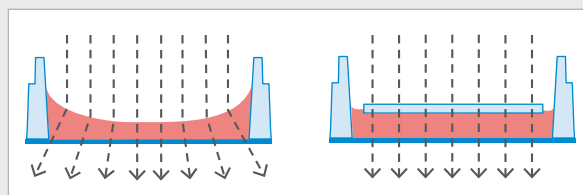


96 ウェルプレートなど小型オープンウェルフォーマットの容器
強力なメニスカス、
低コントラスト/位相差不良

チャンネルスライド
メニスカスなし
全領域で良好な位相差

ibidi マイクロスライド Ph+

[マイクロスライド Ph+](#)は、位相差顕微鏡用途で、特別に設計されたスライドです。各ウェル内に配置されたプレートが、メニスカスの形成を妨げ、ウェルのどの部分においても鮮明な位相差画像を保証します。



標準ウェル
強力なメニスカス

Ph+ ウェル
メニスカスなし

微分干渉(DIC)顕微鏡

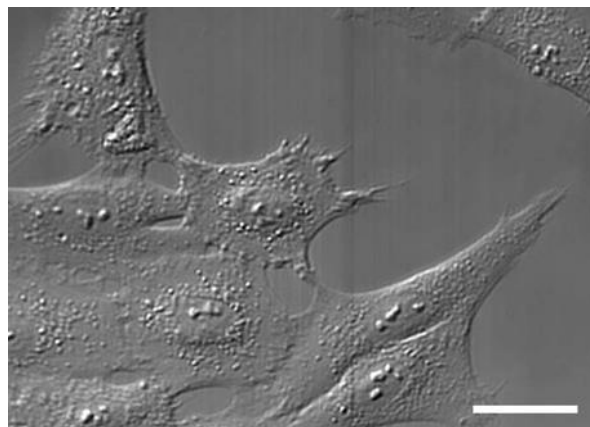
用途:

位相差顕微鏡観察同様に、DIC顕微鏡観察もラベルフリーの明視野顕微鏡観察技術です。透明なサンプルのコントラストを強調し、3D画像のような陰影を鮮明に提供します。その感度は大変高く、薄い細胞でも鮮明な陰影画像を提供できます。一方で、細胞が持っていない構造まで、存在するかのように見える場合がある点には注意が必要です。例えば、液胞やクロマチンのような屈折率の異なる生細胞内部の領域が、隆起物として見える場合があります。

原理:

DIC顕微鏡観察は、光の偏光を利用し、この位相変化を画像の強度(コントラスト)に変換します。この際、屈折率の異なる隣接構造が接する“境界”のみ、コントラストが強調されます。このため、この効果は微分と呼ばれています。この点、構造体のある“領域”が強調される位相差顕微鏡観察とは異なります。

位相差と比較すると、DIC顕微鏡観察はメニスカス形成の影響は受けにくいですが、しかし、DIC顕微鏡観察は、光路に置く、スライドや蓋などの材質が、ibidiポリマーやガラスのような低複屈折である物質しか使えないという制限を受けます。このため、一般的な培養容器であるポリスチレン製プラスチックのディッシュなどはDIC顕微鏡観察に使用できません。



Rat1細胞のDIC顕微鏡像 スケールバー20 μ m

ibidi Solutions:

- ibidiポリマーカバースリップはDIC顕微鏡観察適合素材です。
- ibidiガラスカバースリップもDIC顕微鏡に適合しています。
- ibidi はマイクロディッシュ用DIC Lidおよびマイクロスライド用DIC Lidを提供しています。
注意: マイクロディッシュおよびマイクロスライドに付いているフタは、DICに適合しないプラスチックが使用されています。このため、DIC専用のLidを販売しています。
- 注意: ibidi チャンネルスライドはフレーム素材がDICに適合していないためDIC観察に用いることはできません。

広視野蛍光顕微鏡

用途:

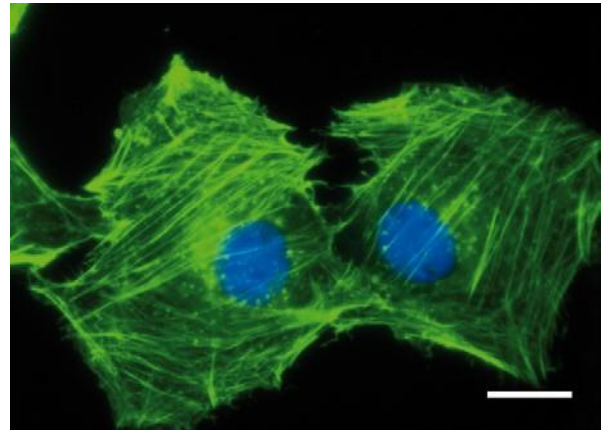
蛍光顕微鏡観察に広く利用されているのが、広視野蛍光顕微鏡です。

蛍光顕微鏡観察は、細胞内の特定の構造、分子、またはタンパク質の検出に使用されます。生きている細胞や固定された組織を問わず、多くの対象に対し「蛍光標識」する手段が確立されており、標識ターゲット特異的な情報を取得するために用いられます。複数の蛍光色素を使用して、同時に複数のターゲットを可視化する場合があります。

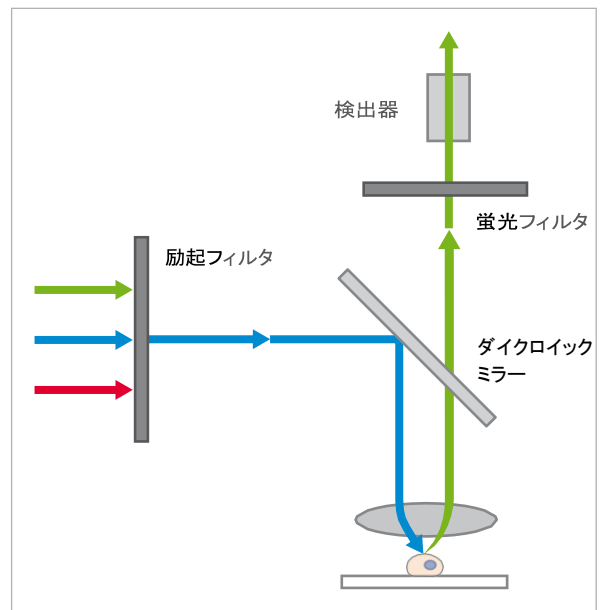
原理:

蛍光顕微鏡観察は、特定の細胞構造を観察するために、緑色蛍光タンパク質(GFP)など蛍光分子で標識することより始まります。蛍光分子は、特定波長の光を吸収し(励起)た後に、より長い波長(蛍光)を発します。このため、蛍光顕微鏡観察では、励起光と蛍光をフィルターで分離し観察します。分離が機能すると、暗色のバックグラウンドの中で、標識された構造が蛍光を発し、標識した分子が存在する構造体を可視化することができます。

広視野蛍光顕微鏡は励起～検出までを行うことのできる、最もシンプルな顕微鏡です。スポットに対し励起光を照射する共焦点顕微鏡とは対照的に、標本全体を一度で照射するため、焦点面全体からの蛍光シグナルを同時に検出します。このため、スフェロイドや組織のような厚い試料では低コントラストの画像となりがちで、接着細胞のような、バックグラウンドの要素が少ないサンプルで、よく使用されます。



線維芽細胞をibidi ポリマー カバースリップ上で24時間培養後、パラホルムアルデヒドで固定した。固定したサンプルは、F-アクチンおよび核DNAをファロイジン(緑色)およびDAPI(青色)でそれぞれ染色し、観察を行った。使用した広視野蛍光顕微鏡、Carl Zeiss Axiovert 100、対物レンズPlan-Neofluar 100x/1.3オイル、スケールバー10 μ m。



広視野顕微鏡の光路

ibidi Solutions:

- ibidiポリマーカバースリップと ibidiガラスカバースリップは、蛍光顕微鏡観察に最適な素材です。いずれのibidiラボウェアも、広視野蛍光顕微鏡観察に使用いただけます。

共焦点顕微鏡

用途:

共焦点顕微鏡は、広視野蛍光顕微鏡と同様に、蛍光分子で標識した、生細胞や固定した細胞、組織切片を蛍光観察する手法のひとつです。その分解能は大変高く、細胞内の詳細な構造を解明するために広く用いられています。

共焦点顕微鏡の特徴は、励起光を1点に絞るため、焦点領域外の蛍光をほとんど拾わないこと、および、正確な焦点深度の情報が得られる点にあります。このため、共焦点顕微鏡観察では、厚みのある構造の特定深度の情報を視覚化することができます。異なる焦点深度の複数の画像を重ねることで3D構造の解析にも利用されます。

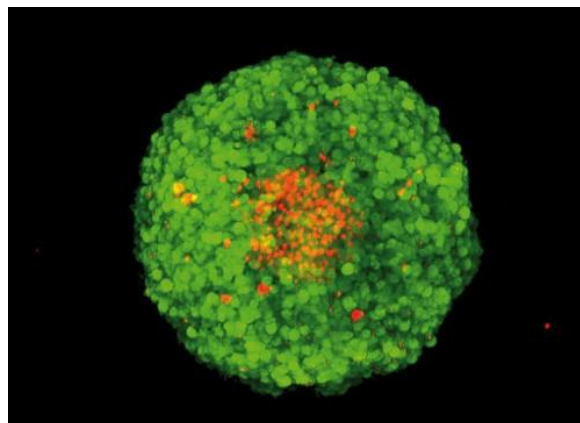
しかし、共焦点顕微鏡を使用する場合、観察できる深度には限界があります。厚みのある大きなスフェロイドやオルガノイド、組織、小動物のような厚みのあるものは、二光子顕微鏡やLSFMで撮影するのが最適です。

原理:

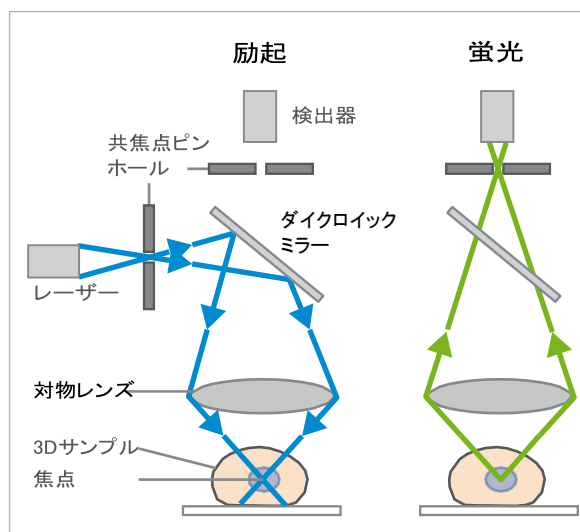
共焦点顕微鏡も蛍光検出の光学経路があります。広視野顕微鏡がサンプル全体を一度に照射するのに対し、共焦点顕微鏡では、レーザー光をサンプル内の特定深度で集光させます。これにより、サンプルの特定スポットのみ励起されます。さらに、光路上のピンホールが、スポット外の蛍光信号はカットされます。このため、共焦点顕微鏡では、励起スポット由来の信号だけを検出できます。

このスポットを動かし、ラスタパターンでスキャンすることにより、1つの光学面の画像が得られます。このようにして得られた画像をZ軸方向に積算すれば、立体的な観察対象を三次元で可視化することもできます。

また、異なる波長のレーザーや励起/蛍光フィルターを組み合わせることで、多色蛍光観察することも可能です。



FDA/PI染色MCF-7スフェロイドのZ-スタック、共焦点顕微鏡による取得。緑色: FDA染色生細胞。赤色:スフェロイド中でPI染色された死細胞。



共焦点顕微鏡の励起光と蛍光検出

ibidi Solutions:

- ibidiポリマーカバースリップと ibidiガラスカバースリップは、蛍光顕微鏡観察に最適な素材です。いずれのibidiラボウェアも、共焦点蛍光顕微鏡観察に使用いただけます。

二光子顕微鏡(多光子顕微鏡)

用途:

二光子顕微鏡(もしくは多光子顕微鏡)は、共焦点顕微鏡では観察できないレベルの厚い生体サンプルの観察に使用される顕微鏡技術です。最大約1mmまでサンプル内部を可視化でき、組織、オルガノイド、臓器、胚や動物全体などを対象とした3D画像化に使用されます。

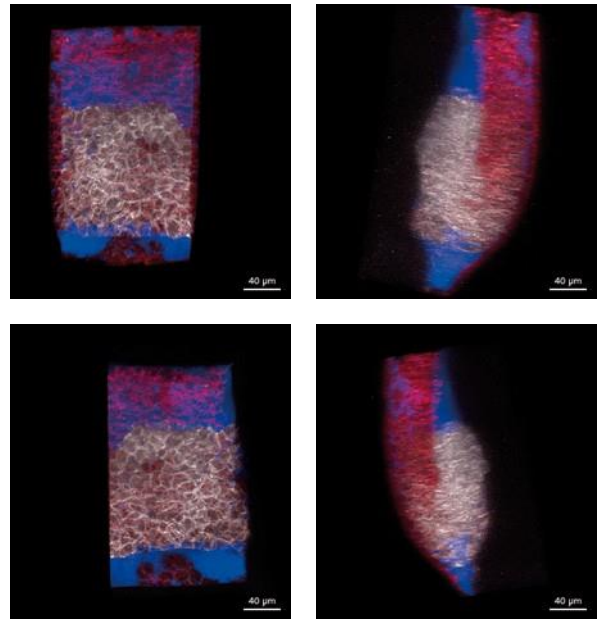
共焦点顕微鏡と比較した場合、二光子顕微鏡は長波長の励起光を用いるため、光退色や励起に伴う細胞ダメージが少ない点も特徴で、生きた試料を扱う際のアドバンテージになります。

原理:

広視野蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡など、一般的な蛍光顕微鏡と同様に、二光子顕微鏡でも、蛍光分子を励起し、蛍光を取得します。しかしながら、二光子顕微鏡では、特定波長の光子1つで励起するのではなく、二つまたは複数個の光子を、同時に(一般的には数フェムト秒以内に)当てることで、蛍光分子を励起します。

この方法では、複数の光子が有するエネルギーを結合できるので、赤外線のような低エネルギーの光子でも、GFPのような蛍光分子を励起できます。赤外線は、蛍光顕微鏡で用いられる標準的な励起光よりも、透過力が強いいため、深部観察の励起に適します。また、赤外線はエネルギーレベルが低いいため、ダメージが少なく、励起することができます。

二光子励起では、2つの光子を同時に蛍光分子に当てる必要があるため、強度が高いレーザーを、特定のスポットに集中させます。十分な光子密度を実現できるのはこの焦点付近だけなので、励起が起こるのもこの領域に限定されます。従って、二光子顕微鏡で取得されるシグナルは、バックグラウンドノイズが非常に少なくなる点が特徴です。共焦点顕微鏡と同様に、スポットを動かしてスキャンすることで画像を取得します。



原腸陥入開始時(受精後6時間)のゼブラフィッシュ胚の背側胚輪の共焦点画像スタックを回転表示した画像。GFP (白色):脊索前板前駆細胞、lyn-TagBFP (赤色):細胞膜

胚にはデキストランローダミンを注入し、間質液(青色)を標識している。画像は、Bioimaging Facility of the Institute of Science and Technology Austria (IST)にて他光子顕微鏡LaVision BioTec TriM Scope microscopeで撮影。

R.K.P. Benninger, D.W. Piston. Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues. *Curr Protoc Cell Biol*, 2013, 10.1002/0471143030.cb0411s5

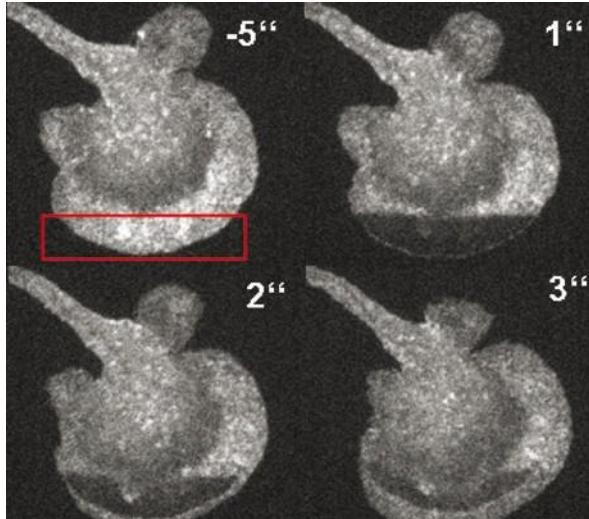
ibidi Solutions:

- ibidiポリマーカバースリップと ibidiガラスカバースリップは、蛍光顕微鏡観察に最適な素材です。いずれの ibidi ラボウェアも、二光子顕微鏡観察に使用いただけます。

FRAP(光褪色後蛍光回復法)

用途:

FRAPは、蛍光標識した分子の生細胞内における分子の拡散速度を調べるための蛍光観察手法です。細胞内の分子拡散、生体膜の流動性、タンパク結合の解析などに使用されます。



LifeActを用いた一次樹状細胞におけるF-アクチン拡散のFRAPでの可視化

原理:

FRAP実験は、次の3つのステップで構成されます。

①観察領域の蛍光強度測定します。②観察領域にレーザービームを集束し、その領域の蛍光分子を褪色させます。③分子拡散により周辺の蛍光分子と、領域内の光褪色した分子の交換が起こり、観察領域の蛍光が回復します。この分子拡散速度が早いほど、この蛍光回復は早くなります。したがって、この蛍光回復速度を測定することによって、拡散係数と分子の移動速度を推定します。

LSFM(ライトシート蛍光顕微鏡)

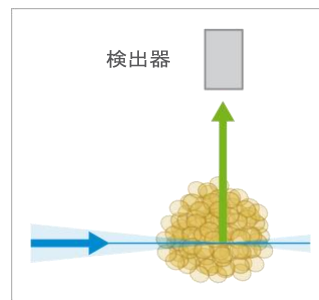
用途:

LSFMは、胚、スフェロイド、オルガノイドや動物全体などを対象とした比較的厚い生体試料の生細胞3Dイメージングに使用されます。LSFMは、バックグランドシグナルが低いこと、光毒性を最小にできること、共焦点顕微鏡と比較してスキャン速度が速いなどのメリットがあり、厚い生体標本の分析にもちいる場合には、落射型蛍光顕微鏡よりも優れているとされます。

原理:

LSFM/SPIM (Single/Selective Plane Illumination Microscopy)にはいくつかの異なるシステムがあります。ただし、それらは共焦点蛍光顕微鏡や広視野蛍光顕微鏡とは異なる以下の共通する特徴を持っています。一つ目は、非常に薄いシート状に励起されることです。もう一つの違いは、励起と検出の光学経路が分離していることです。焦点以外の蛍光を拾わないように、照明に対して異なる軸(例えば、直交)で蛍光を検出します。不必要な焦点外蛍光分子は励起されず、スキャンされていない領域の光褪色や光損傷を抑制することができます。さらに、LSFMでは、共焦点顕微鏡のようなスポットのスキャンではなく、平面スキャンで画像を取得します(光学的切片法)。このため、スキャン速度は高速です。

このような特性より、低細胞ストレス、低バックグ라운드蛍光、および時間節約などがメリットとして挙げられ、繊細な生体試料の3D生細胞イメージングを行う場合に有用な手法となります。



LSFMの原理設定

ibidi Solutions:

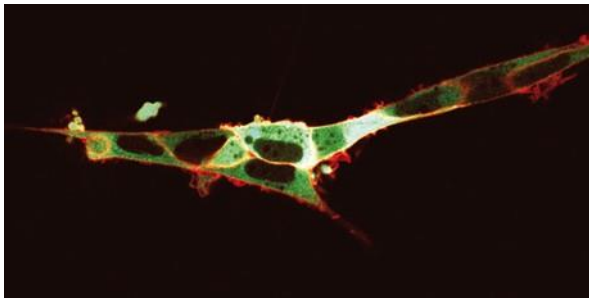
ibidiポリマーカバースリップと ibidiガラスカバースリップは、蛍光顕微鏡観察に最適な素材です。いずれのibidiラボウェアも、FRAPにご使用いただけます。また、LSFM観察にも適合できる可能性があります。

注意:LSFMに適合できるかどうかは、容器の形状、使用されるLSFMシステムおよびその光路設定によって異なります。このため、厳密には個別にチェックする必要があります。

FRET(フェルスター共鳴エネルギー遷移)

用途:

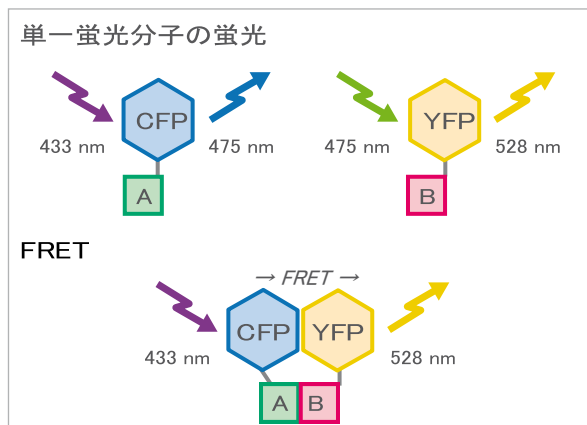
FRETは、2つの異なる蛍光分子の空間的近接性がわかるため、標識ターゲットの相互作用を評価するために使用できます。例えば、タンパク質-タンパク質相互作用またはタンパク質のコンホメーション変化を分析するために使用されます。また、細胞内カルシウム濃度変化の可視化に利用されるなど、FRETを利用した細胞内特定物質のバイオセンサーとしても利用されます。観察は、広視野顕微鏡や共焦点蛍光顕微鏡などを用いることが一般的です。



FRETを用いた細胞質カルシウム濃度の可視化 細胞外膜にNK-1を発現させ、細胞質にカルシウムバイオセンサーYellow Cameleon 3.6(YC3.6)を発現させたHEK293細胞。蛍光標識したNK-1リガンド(SP-TAMRA)を加えると、細胞膜が赤く光る。受容体が活性化されると、カルシウム放出が起こり、YC3.6蛍光特性変化を誘導します。CFPの励起はFRETによりCFPとYFPに分配され蛍光を放出します。この結果、FRETの起こった細胞質が緑色に観察されます。M. Roelse, Wageningen, The Netherlandsより提供。

原理:

ある蛍光分子(ドナー)の蛍光スペクトルと、もうひとつの蛍光分子(アクセプター)の励起スペクトルに重なりがあることが、FRETが起こるための要件になります。要件を満たす2つの蛍光分子が近接すると、ドナーとなる蛍光分子が励起状態される際に、アクセプターである蛍光分子にその励起エネルギーが移動し、蛍光が発せられるようになります。通常、FRETは10 nm未満の距離(フェルスター半径)で起こります。



FRETタンパク質相互作用アッセイ模式図 受容体AとそのリガンドBを、それぞれCFPとYFPで標識している。リガンドが受容体に結合すると、YFPはFRETによって蛍光を発する。

FLIM(蛍光寿命イメージング)

用途:

FLIMは、タンパク質や核酸などの特定分子の状態およびその分布を可視化する手法です。細胞内のカルシウムイオン量、pH、酸素濃度、および分子間相互作用などの測定に用いられます。光学条件しだいでは、一分子レベルの検出もできます。標準的な蛍光顕微鏡観察と比較して、FLIMが扱うことができる深度は高く、厚い試料の分析も可能です。

原理:

蛍光強度分布が取得画像に反映される一般的な蛍光顕微鏡とは対照的に、FLIMは、蛍光分子から発せられる光の減衰を分析し、蛍光寿命を測定します。蛍光寿命は、励起状態に留る時間、つまり、蛍光分子の励起が起こってから、光子を放出し、基底状態に戻るまでの平均時間として定義されます。

蛍光寿命は分子間相互作用やイオン濃度などの蛍光分子が存在する局所環境に依存します。一方で、蛍光分子の濃度変化、FRETのアクセプター分子が近接しているときにも減少します。この性質を利用して、FLIMとFRETの組み合わせることで、精度の高い分子間相互作用の測定にも利用されます。

H.C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, G.P.C. Drummen. *Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM*. *Molecules*, 2012, 10.3390/molecules17044047

ibidi Solutions:

ibidiポリマーカバースリップと ibidiガラスカバースリップは、蛍光顕微鏡観察に最適な素材です。いずれのibidiラボウェアも、FRETおよびFLIM測定に使用することが可能です。

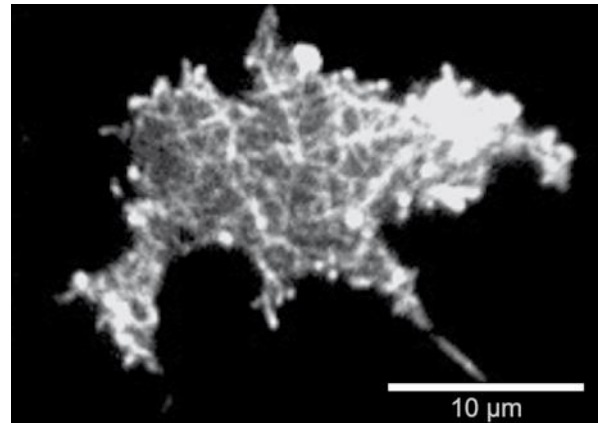
全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF)

用途:

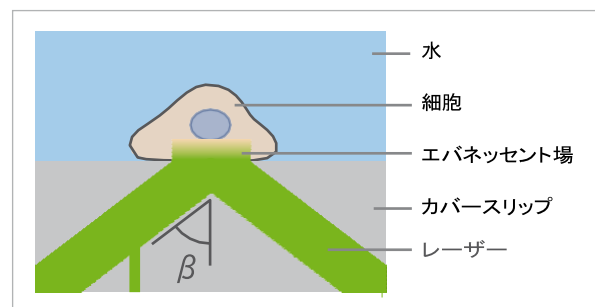
TIRFは、生細胞の膜表面や付近で起こる過程を画像化するのに用いられる蛍光観察技術です。TIRFは焦点深度が浅く、サンプルの奥深くに位置する構造体の観察には用いることはできません。一方で、非常に良いS/N比で、膜近傍を画像化することができます。このため、TIRFは、受容体-リガンド相互作用、エンドサイトーシス、ウイルス感染、細胞接着など、膜表面で起こる生命現象を可視化するために用いられます。

原理:

TIRFには、水($n_D=1.33$)とガラス($n_D=1.52$)のような屈折率の異なる2種類の光学媒体が必要です。入射光の全反射がこれらの媒体の界面で発生した場合、エバネッセント場が形成されます。このエバネッセント場を利用することで、試料の深さ約100~200 nmの領域にある蛍光分子の励起に利用できます。したがって、カバーガラスと試料の界面で起こる蛍光のみが可視化されます。



Dictyostelium discoideum DdLimE-GFP細胞のTIRFによる生細胞イメージング。表面近傍に形成されたF-アクチンネットワークが確認できる。ガラスカバースリップ#1.5H使用。



TIRF顕微鏡の原理。

ibidi Solutions:

- TIRF顕微鏡観察では、ibidi ガラスカバースリップを推奨しています。
- すべてのガラスカバースリップが採用されたibidiラボウエアでは、TIRFに使用することが可能です。

超解像顕微鏡観察 (STED、SIM、(F)PALM、(d)STORM)

用途:

超解像顕微鏡は、一般的な広視野または共焦点蛍光顕微鏡では分析できない分解能で、細胞内構造体を可視化します。この技術では、光の回折限界をはるかに超える空間的な分解能が得られます。

原理:

分解能とは、2つのドットを識別する能力として定義されます。一般には、分解能は、波長とレンズの開口数に依存し、アッペ回折限界にしたがった物理的な制限を受けます。実際、広視野および共焦点蛍光顕微鏡では、この回折限界により最大分解能が約200 nmに制限されます。

超解像顕微鏡では、隣接する蛍光分子の物理的または化学的性質を利用することで、5~20 nmにまで分解能を向上させます。例えば、一つの蛍光分子が“オン”であるのに対し隣接する蛍光分子が“オフ”であれば、それらの識別を可能になります。こういった、蛍光分子の“オン”“オフ”を解析するなどして、ナノレベルの顕微鏡観察を可能にしています。

これまでに、いくつかの超分解能顕微鏡技術が開発されています。:

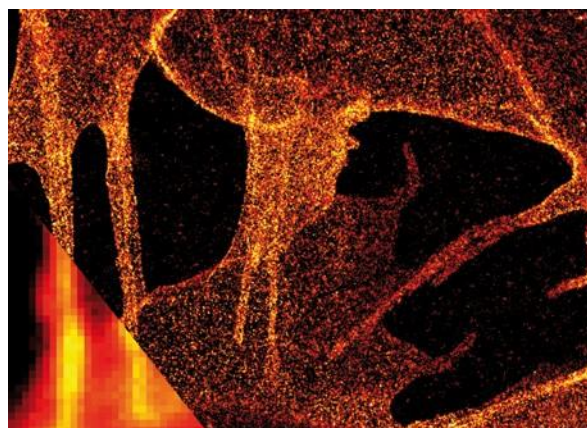
- Stimulated emission depletion (STED)
- Saturated structured illumination microscopy (SSIM)
- REversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions (RESOLFT)
- Photoactivated localization microscopy (PALM)
- Fluorescence photoactivation localization microscopy (FPALM)
- (d)STORM Stochastic optical reconstruction microscopy (d)STORM

S.W. Hell. Far-field optical nanoscopy. *Science*, 2007, 10.1126/science.1137395

S.W. Hell. Microscopy and its focal switch. *Nat Methods*, 2009, 10.1038/nmeth.1291

B. Huang, H. Babcock, X. Zhuang. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell*, 2010, 10.1016/j.cell.2010.12.002

S.J. Sahl, S.W. Hell, S. Jakobs. Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 10.1038/nrm.2017.71



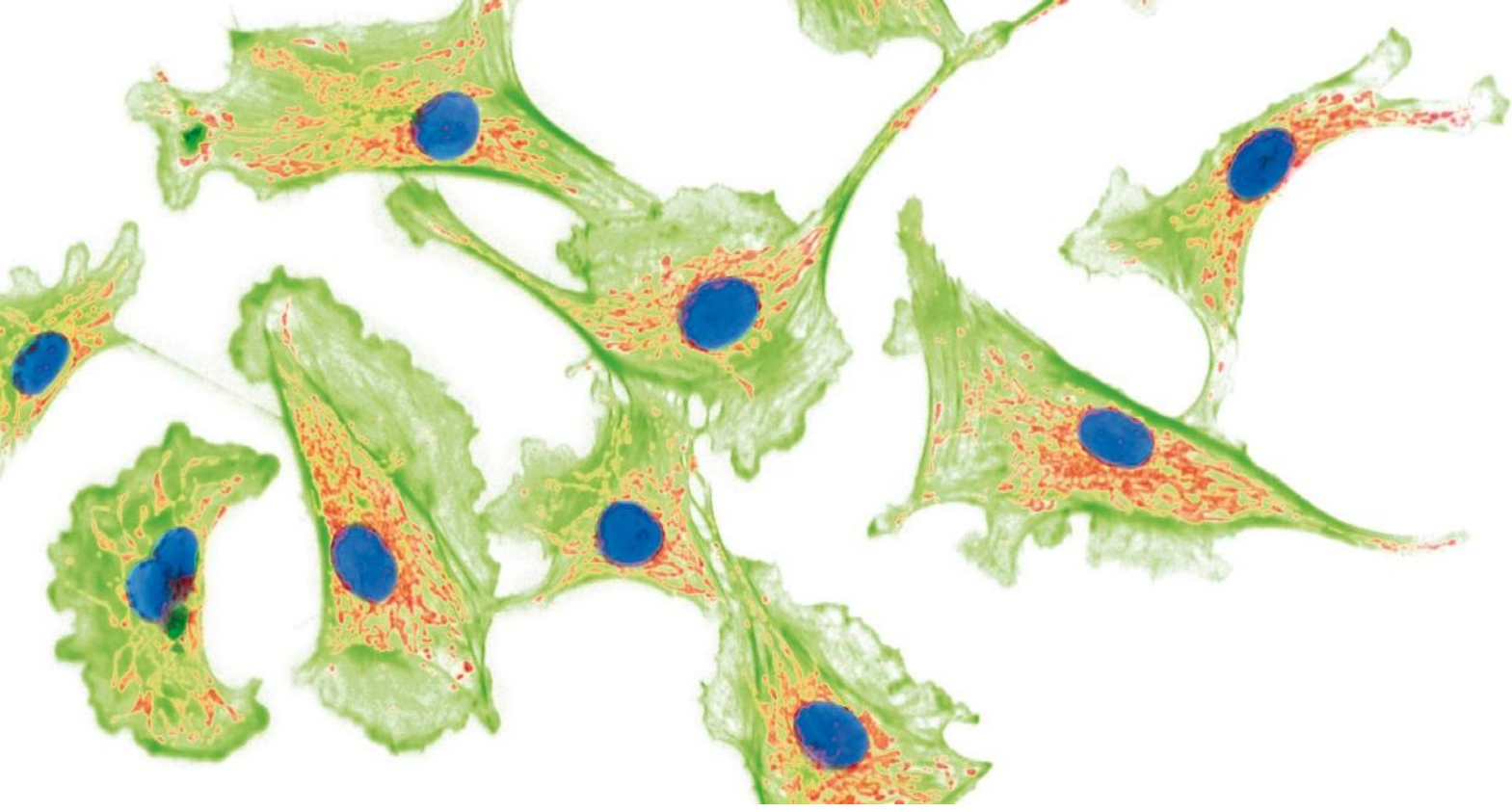
取込とそれに続く銅触媒アジデアルキルシクロ付加(CuAAC)を介して染色した。左下:広視野顕微鏡との比較。Würzburg, Markus Sauerより提供。

ibidi Solutions:

- 超解像顕微鏡観察では、ibidi ガラスカバースリップを推奨しています。
- すべてのガラスカバースリップが採用されたibidiラボウェアでは、超解像顕微鏡観察に使用することが可能です。

注意: dSTORMはibidi ポリマーカバースリップで使用実績があります。

ibidi ポリマーカバースリップでお試されるのであれば、無料サンプルをご提供いたします。お気軽にお問い合わせください。



製造業者

ibidi GmbH

Lochhamer Schlag 11
82166 Gräfelfing
Germany

Toll free within Germany:
Phone: 0800 / 00 11 11 28
Fax: 0800 / 00 11 11 29

International calls:

Phone: +49 89 / 520 46 17 - 0
Fax: +49 89 / 520 46 17 - 59

E-Mail: info@ibidi.com

北米本社

ibidi USA, Inc.

2920 Marketplace Drive
Fitchburg, WI 53719
USA

Toll free within the US:
Phone: +1 844 276 6363

International calls:

Phone: +1 608 441 8181
Fax: +1 608 441 8383

E-Mail: ibidiusa@ibidi.com
ibidi.com

ibidi 製品はすべて研究用です。

© ibidi GmbH
FL_AG_031, V 1.22019 / 06

無料サンプル、アプリケーションノート、操作動画の取り扱
いについては、弊社URLにアクセスしてください。

ibidi.com