



Application

Newcastle disease virus (NDV) 感染細胞を用いた RNA-FISHと免疫染色実験

製品名

マイクロスライド イビトリート
 μ -slide 8well, ibiTreat : #1.5 polymer coverslip, tissue culture treated, sterilized (#80826)

メーカー名

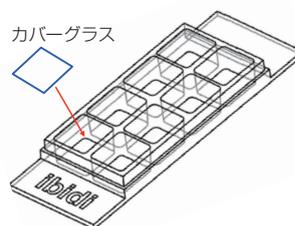
イビディ
ibidi 社

このアプリケーションノートは、京都大学ウイルス研究所 分子遺伝学研究分野 呉 成旭 様のご厚意により掲載させていただきました。ここに深く感謝申し上げます。

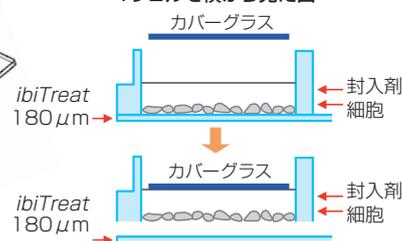
実験概要

細胞はウイルスに感染すると、インターフェロン (IFN) という抗ウイルス性サイトカインを産生して免疫応答を開始する。本アッセイでは、HeLa 細胞にNewcastle disease virus (NDV) を感染させ、NDV ナクレオキャプシドタンパク質 (NP) とI型IFN (IFN- β) mRNA の発現を免疫染色法とRNA-FISH 法によってそれぞれ検出した。また、ibidi μ -Slide 8well コーティング ibiTreatを用いて、蛍光検出したサンプルを保存できるかどうか確認するため、およそ半年間室温で遮光保存し、再度観察を行い、RNA-FISHと免疫蛍光染色したサンプルの保存状態を確認した。

カバーガラスによる封入のイメージ



1ウェルを横から見た図

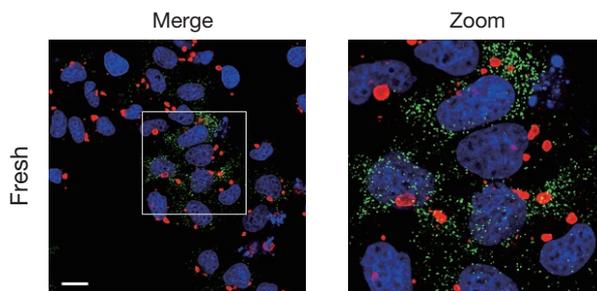


実験材料

細胞	: HeLa細胞 (ヒト子宮頸がん由来上皮細胞)
培地	: DMEM (ナカライテスク #08459-35) + 10% FBS + 1% ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク #26253-84)
培養容器	: ibidi μ -slide 8 well, ibiTreat: #1.5 polymer coverslip, tissue culture treated, sterilized (ibidi #80826)
FISHキット	: ViewRNA ISH Cell Kit (Affymetrix #QVC0001)
FISHプローブ	: interferon, beta 1, fibroblast (Affymetrix #VA4-15818)
抗体	: (一次抗体) Anti-NDV-N mouse monoclonal IgG (広島大学坂口先生より供与) (二次抗体) AlexaFluor 488 Donkey anti-Mouse IgG (H+L) (Life Technologies#A-21202)
封入剤	: Fluoromount-G (SouthernBiotech #0100-01)
カバーガラス	: MICRO COVER GLASS 9×9 (松浪硝子 特注)
顕微鏡	: レーザー共焦点顕微鏡 TCS-SP8 (ライカマイクロシステムズ)
染色後の保存条件	: 室温・遮光保存

アッセイプロトコール

1. HeLa 細胞を 2.5×10^4 cells/well で播種し (培地量は $250 \mu\text{L}/\text{well}$)、NDV を 12 時間感染させた。
2. 4% PFA で細胞を固定し、ViewRNA ISH Cell Kit を用いて RNA-FISH を行った (キット添付マニュアル参照)。
3. RNA-FISH 後のサンプルを 0.5% BSA/PBS-T でブロックングし、NDV-NP に対する免疫染色を行った (一次抗体反応: 4°C 一晚、二次抗体反応: 室温 1 時間)。
4. DAPI 染色後、細胞を封入し、共焦点顕微鏡にてサンプルを観察した。



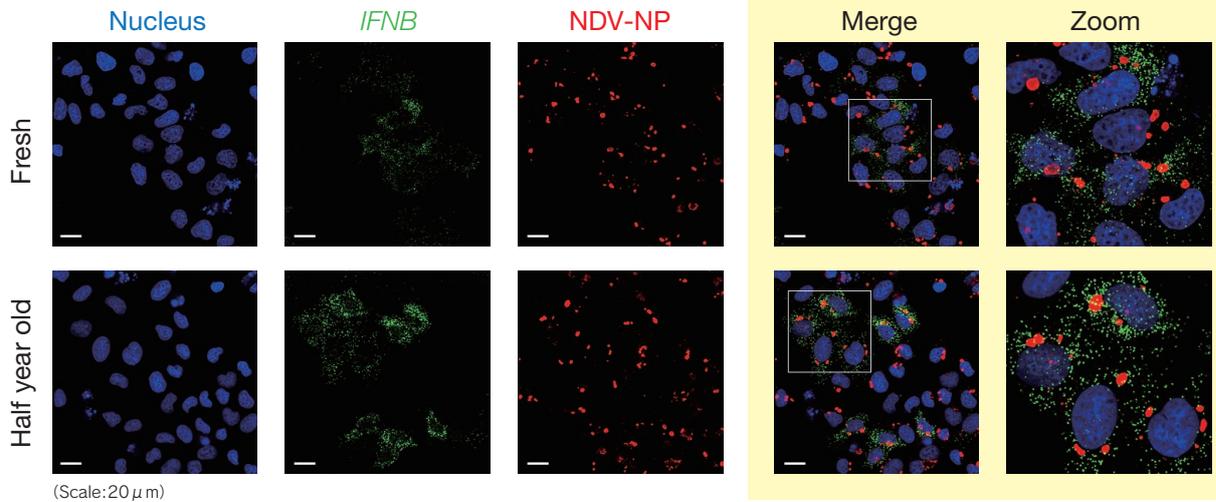
結果の詳細は次ページを参照

ibidi μ -Slide 8 well コーティング ibiTreat* (Cat No.ib80826)

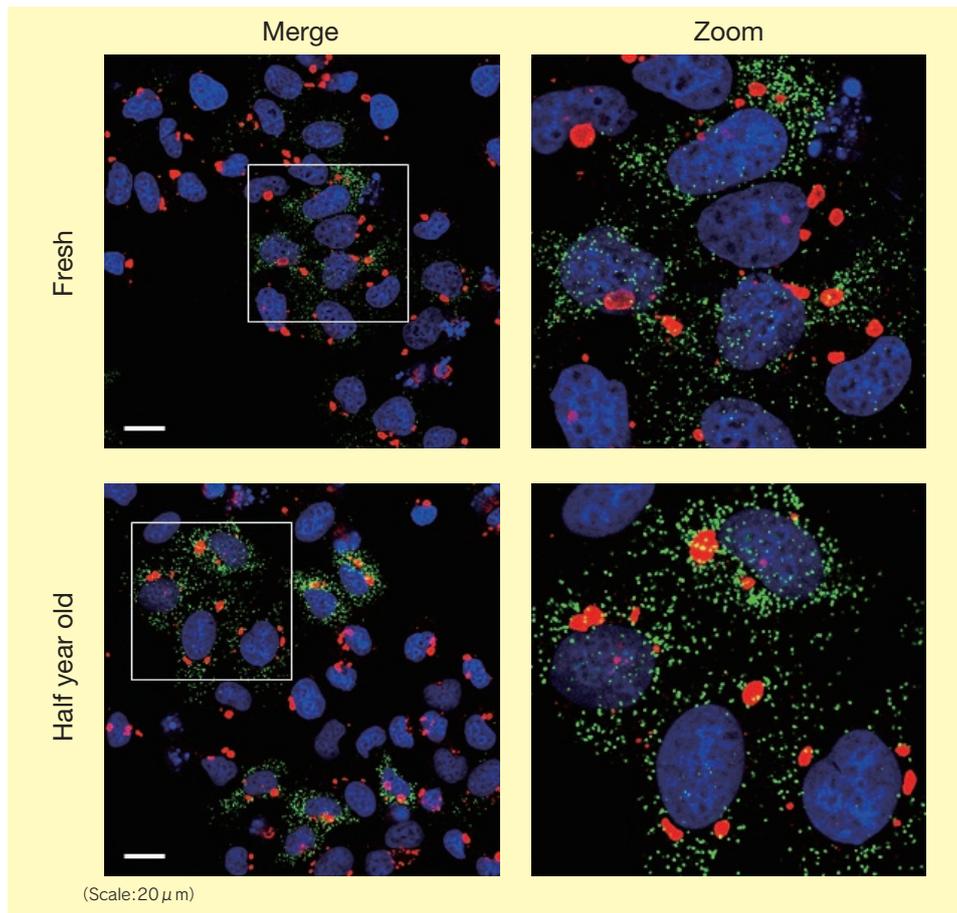
- 一体成型なので液漏れがありません (解体は不可)
- 細胞を移し換えることなく免疫蛍光染色やFISHが可能
- Culture-Insertを使った、創傷治癒 (細胞間相互作用) 研究も可能
- ibidi社独自のプラスチックフィルムを使用 (ガラスと同等の光学性能、低い自家蛍光) \Rightarrow 倒立顕微鏡で底面側から直接観察可能



結果



Merge と Zoom を拡大した写真は下記である。



お客様のコメント

NDV 感染から12 時間後、ほぼすべての細胞でNDV-NP (赤) の発現が見られ、一部の感染細胞では *IFNB* mRNA (緑) の発現が強く誘導されていた。
 また、約半年後のサンプルでも蛍光強度は変わらず保持されており、保存状態は良好であった。