



Application

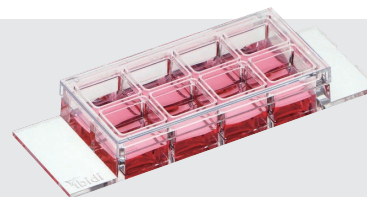
ibidiポリマーを利用した初代培養神経細胞の観察事例

製品名

μ-Slide 8 Well high ibiTreat (Cat.No. ib80806)

メーカー名

ibidi



下記のデータは、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室、森川勝太様/河野玲奈様/小山隆太准教授/池谷裕二教授より情報をご提供いただきました。

概要

神経細胞は、シナプスを介して情報伝達を行っている。シナプスは、数マイクロメートル程度の微細構造であるため、顕微鏡観察を行う際、低ノイズ・高解像度での画像取得が求められる。

今回、ガラスに代わる顕微鏡観察用カバーリップ素材である“ibidi ポリマー”の性能を検証するために、マウス初代培養神経細胞の画像を取得し、ガラスボトムディッシュと比較した。画像取得には、Nikon共焦点顕微鏡A1HD25を使用し、ライブセルイメージングとPFA固定（免疫蛍光染色）したサンプルを観察した。なお、より精細な観察を実現するために、画像にはデコンボリューション法による画像処理を加えている。

この結果、ibidi ポリマーでも、ガラスボトムディッシュと遜色ないクオリティーの画像が取得できた。このように、ibidiポリマーは、神経細胞観察においても、その性能が発揮できることがわかった。

方法

〈比較対象：使用ディッシュ〉

- μ-Slide 8 Well high ibiTreat
- glass bottom dish (IWAKI ガラスベースディッシュ 3911035, #110606)

〈コーティング〉

Poly-D Lysine (Sigma Aldrich, #P6407)

〈サンプル〉

マウス初代培養神経細胞

実験① マウス初代培養神経細胞に、アデノ随伴ウイルス (AAV2retro-hSyn-Cre, AAVdj-EF1-FLEX tdTomato) を用いて tdTomato を発現させ、ライブセルイメージングで画像を取得した*1。

実験② ①の後に、PFAで固定後、Gephyrinの免疫染色とDAPI染色を行い観察した*2。

*1,2 取得した画像に対し、デコンボリューション処理を行っている。

〈抗体情報〉

Anti-Gephyrin (Synaptic systems, #147002)：抑制性のポストシナプス局在タンパク質

Anti-VGlu1 (Synaptic systems, #135304)：興奮性のプレシナプス局在タンパク質

Anti-PSD95 (Frontier Institute, #PSD95 Rb Af1720)：興奮性のポストシナプス局在タンパク質

〈試薬〉

DAPI (Sigma Aldrich, #D9542)

〈顕微鏡〉

偏斜撮影：KEYENCE BZ-X710

共焦点蛍光顕微鏡観察：Nikon A1HD25

対物レンズ：CFI プランアポクロマート VC 20X

CFI SR HP プランアポクロマート Lambda S 100XC Sil

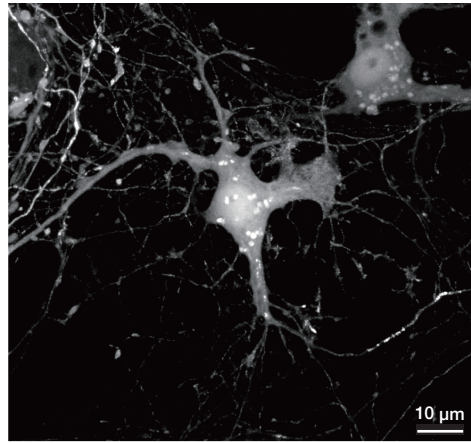
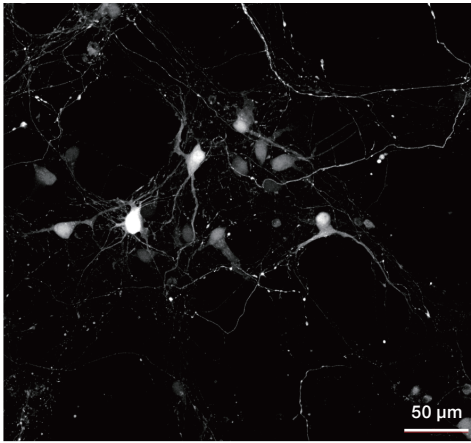
CFI アポクロマート TIRF 100XC Oil

結果①: ライブセルイメージング観察結果

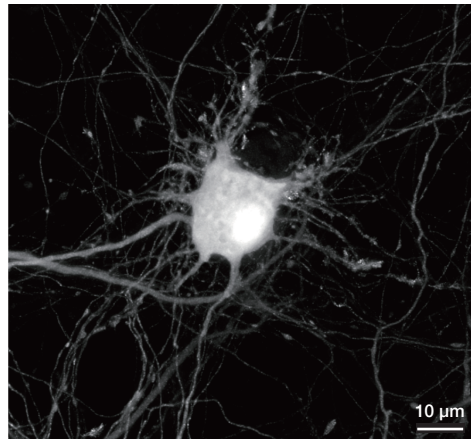
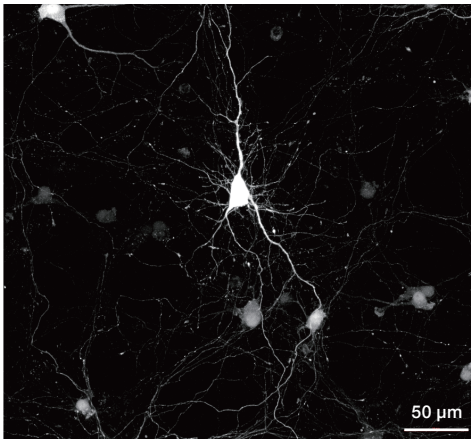
対物レンズ20×

対物レンズ100×

glass bottom



ibidi polymer

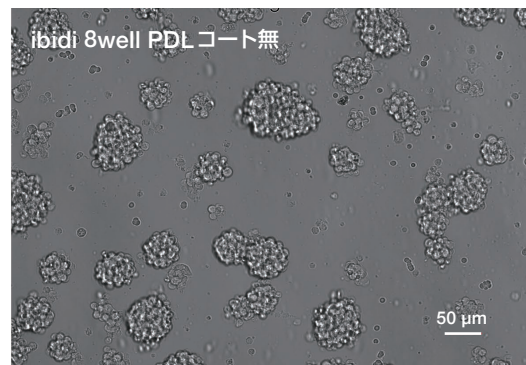
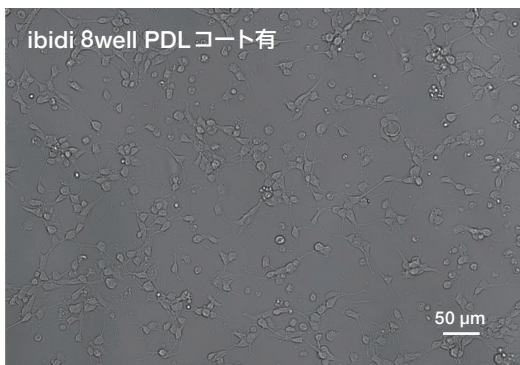


- ・ Mouse primary culture neuron (DIV7)
- ・ 使用レンズ : CFI プランアポクロマート VC 20X
CFI SR HP プランアポクロマート Lambda S 100XC Sil

補足 : ibidi polymer底面接着について

ibidi 8well PDLコート有

ibidi 8well PDLコート無



- ・ Mouse primary culture neuron (DIV1)
- ・ 使用顕微鏡 : KEYENCE BZ-X710

今回、初代培養神経細胞をibidiポリマーに直接播種することも試みたが接着しなかった。このため、ibidiポリマーに対し、Poly-D-Lysineコートを実施したのちに細胞を播種して観察に使用した。

このように、ibidiポリマーはガラススライド同様に、コーティングを施し使用することも可能である。

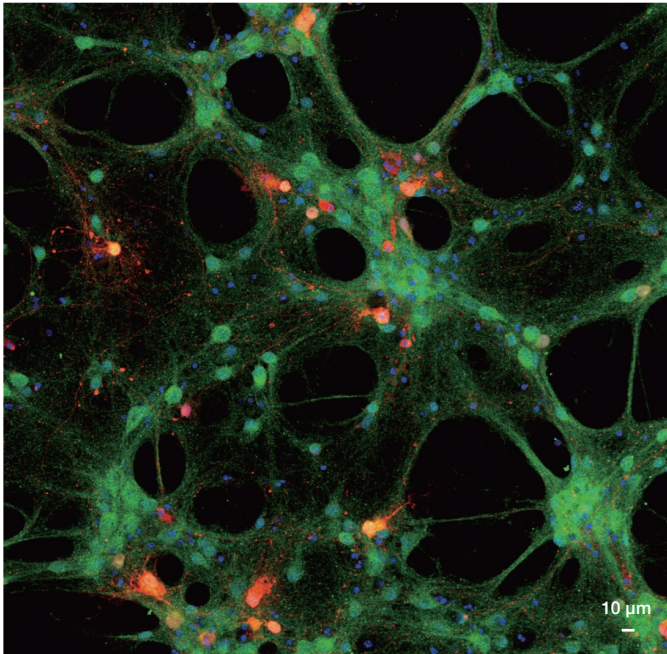
コーティング方法の詳細はアプリケーションノート「Application Note 08 ibidi μ-Slides および μ-Dishes のコーティング手順」をご参照ください。

<https://www.n-genetics.com/products/1236/1033/14480.pdf>

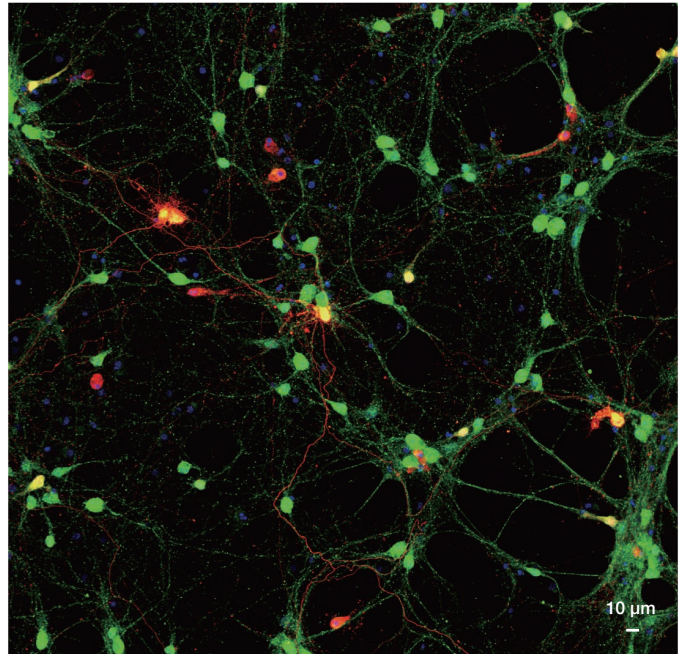
結果②：免疫染色結果

対物レンズ20×

glass bottom



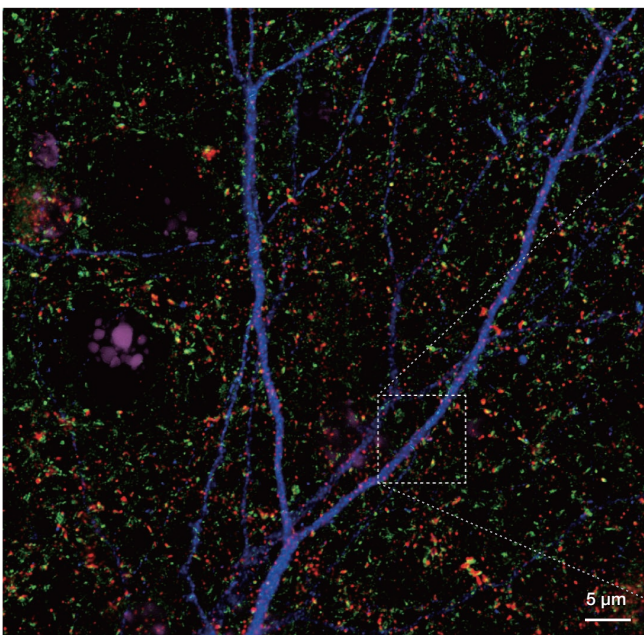
ibidi polymer



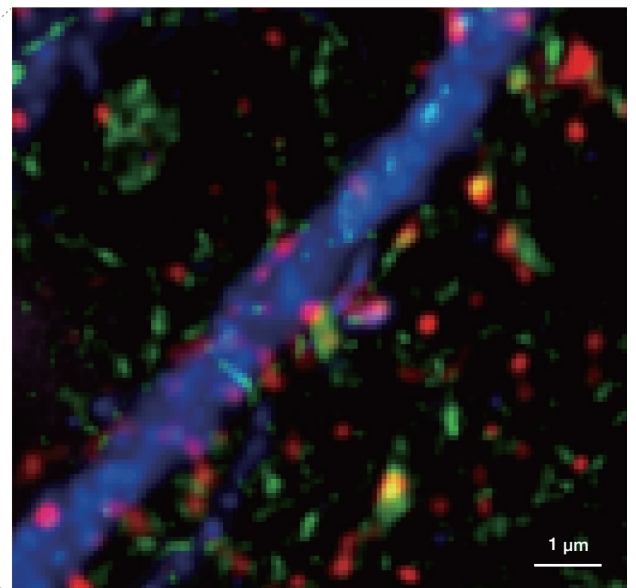
青色：DAPI 赤色：tdTomato 緑色：Gephyrin (抑制性ポストシナプス局在性タンパク質)
使用レンズ：CFI プランアポクロマート VC 20X

<結果> ドット状に観察されるポストシナプスが明瞭に観察できた(本実験では、ibidi polymerにおいて特に明瞭であった)。

対物レンズ100× (ibidi polymer)



拡大図



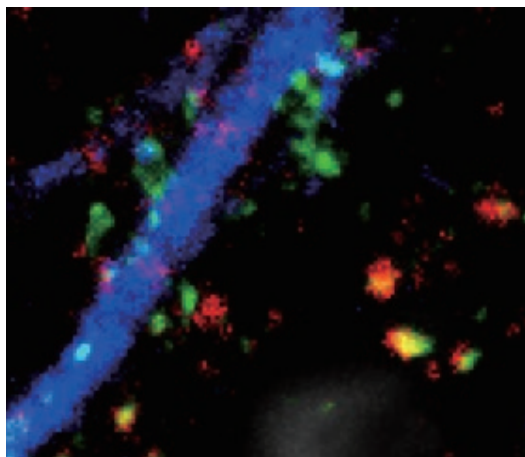
紫色：DAPI 青色：tdTomato 緑色：VGLUT1 (興奮性プレシナプス局在性タンパク質) 赤色：PSD95 (興奮性のポストシナプス局在タンパク質)

<解説>

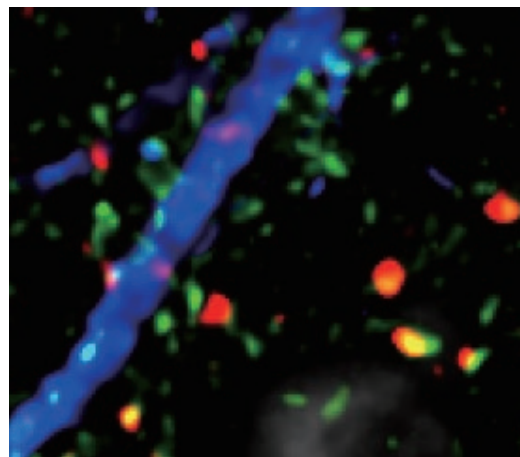
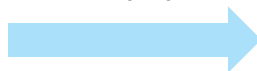
この図では、tdTomato (青色)として観察される神経細胞の樹状突起に沿って、興奮性ポストシナプスマーカー PSD95 (赤色)のシグナルが認められる。さらに、拡大図では、同じく興奮性プレシナプスマーカー (緑色)であるVGLUT1のシグナルが隣接した部分に認められるため、形成された興奮性シナプスが観察できていることを示唆している。

補足：Nikon A1HD25 デコンボリューションの効果

デコンボリューション無し



デコンボリューション有り

Deconvolution type
3D blind紫色：DAPI 緑色：VGLUT1
青色：tdTomato 赤色：PSD95

結論

μ-Slide 8 Well high ibiTreatを用いて神経細胞を観察した結果、ibidi ポリマー上で高精細な画像が取得でき、神経細胞の詳細な部分まで観察することができた。



お客様のコメント

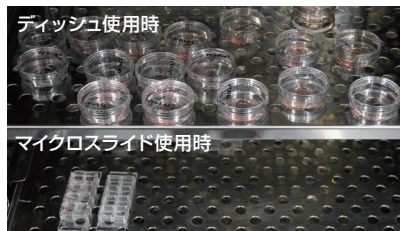
これまで使用していたガラスボトムディッシュと比較しても同等クオリティの画像を取得することができ満足しています。

また、これまで、1サンプルに対して1つのディッシュを用いていましたが、ibidi マイクロスライドを用いると最大8サンプルを同時に培養・撮影することができるため、作業効率が上がったことや、インキュベーター内のスペース削減に繋がったことも大変気に入りました。

NGC 担当者のコメント

森川様の研究室では、イメージング用に非常に多くのディッシュを扱われており、インキュベーター内は、日夜、大量のディッシュで埋め尽くされております（写真参照）。

今回、ibidiのマイクロスライドを利用して神経細胞の画質にフォーカスし、評価を行っていただきましたが、マイクロスライドの利用は画質の面だけでなく、インキュベーターのスペース削減という意味でもメリットを感じていただけたようです。



本アプリケーションノートで使用した顕微鏡の後継機



第10世代 共焦点レーザー顕微鏡システム AX R

ピクセル解像度と感度が飛躍的に向上。

広視野かつ細胞への侵襲を抑えたイメージングを実現し、新たな生物学的発見をサポート。

- 高精細 従来機比4倍となる 8K×8K 構造の理解を支える高解像度イメージング
- より広く 業界随一の広視野（対角 25 mm）イメージングで、より多くの情報をキャッチ
- より速く 毎秒720フレーム 生細胞にやさしい高速イメージング（AX R）
- AI搭載 最先端のAI搭載で焦点データの取得、処理、解析をアシスト



株式会社 ニコンソリューションズ

お問い合わせ先（フリーダイヤル）：(0120) 586-617

製品紹介サイト：https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP/products/confocal-microscopes/ax