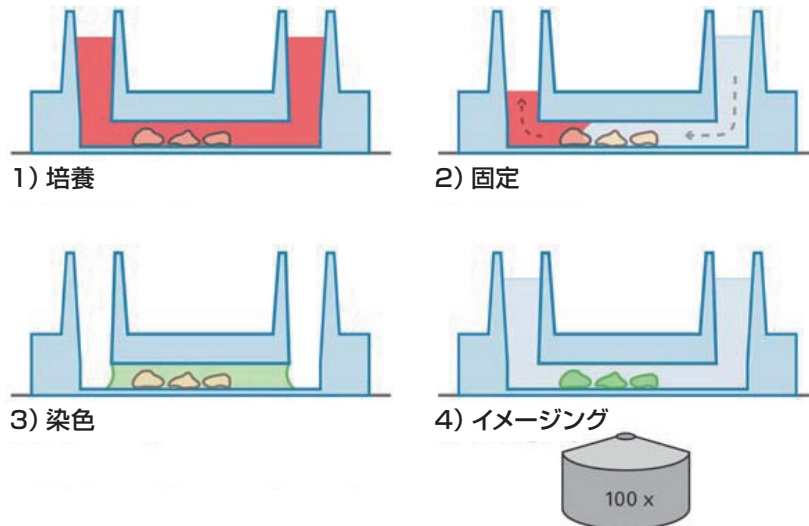


μ-Slide VI^{0.4} を用いた細胞培養および免疫蛍光染色

μ-Slide VI^{0.4} を用いたHT-1080癌細胞培養の例について示します。培養後、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。

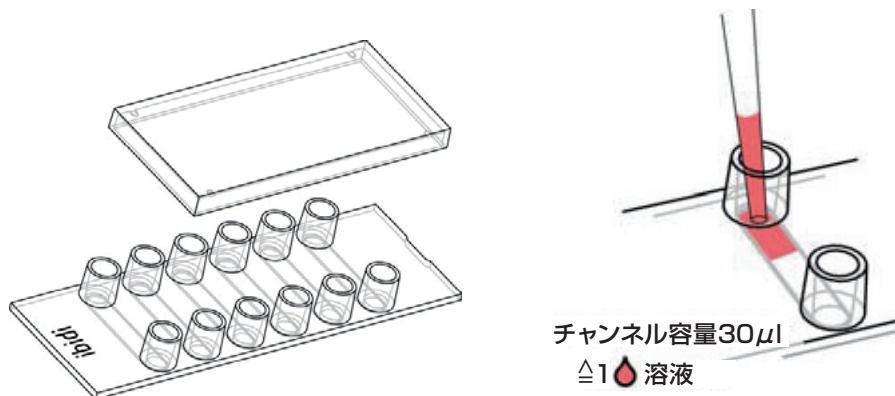
プロトコールは次の4つの主なステップからなります：



上図 μ-Slide「オールインワン」キャリアー

1 培養

- μ-Slide VI^{0.4}、ibiTreat (ib80606) を無菌条件下で開封し、μ-Slide専用ラック (ib80003) 上に置きます。3×10⁵ cells/mlのHT-1080細胞懸濁液30μlを各チャンネル内に注入します。下の図にしたがって、チャンネル内に直接注入してください。



- 付属のフタをウェルにかぶせます。
- スライドをセットしたラックをインキュベーター (37℃、5% CO₂) に入れて細胞を接着させます (60分間)。その後、新しい培地60μlを両方のウェルに添加します。
- オーバーナイトで細胞を培養します。

2 細胞の固定

- アスピレーターを用いて、すべてのウェルから培地を吸引します（未だチャンネル内の培地は残ったままです）。各チャンネルの片側の空ウェルに PBS 200μl をゆっくり注入し、各チャンネルの反対側のウェルからゆっくり200μl を吸引します。**チャンネル内に含まれるすべての液体を吸引しないでください。**
- 3.7%パラホルムアルデヒドを含むPBS溶液~100μlを用いて細胞を固定します。10分後、片側のウェルにPBS 200μlを注入して反対側のウェルからウェル内の溶液を除去することによってチャンネル内の液体を流します。**チャンネルを決して乾燥させないでください。**

浸透処理およびブロッキング

- 上述した手順にしたがって細胞をPBS 200μlで再度洗浄します。
- 0.1% Triton® X-100 (Fluka) を含むPBS溶液~100μlを添加し、3 ~ 5分間インキュベートします。
- 細胞をPBSで洗浄します。
- 1% BSAを含むPBS溶液~100μlを添加し、20分間インキュベートします。
- 細胞をPBSで洗浄します。

3 染色

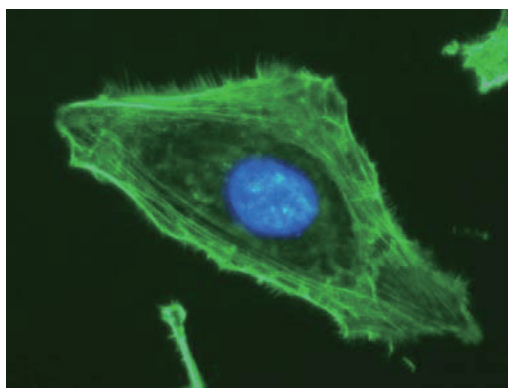
- アスピレーターを用いて、チャンネルから液体をすべて除去します。**チャンネルを乾燥させないでください。**
- その直後に、Alexa Fluor® 488 ファロイジン (1 Unit + PBS 500μl + 1% BSA, Invitrogen社) 25μl を添加します。室温で20分間インキュベートします。
- 細胞をPBSで洗浄します。
- DAPI (0.1μg/ml, Sigma-Aldrich) 25μl を添加し、3 ~ 5分間インキュベートします。
- 細胞をPBSで洗浄し、チャンネルがいっぱいになるまでibidi Mounting Mediumを注入します (約50μl)。ibidi Mounting Mediumは、光退色防止のためにDABCOを含むグリセロール溶液です*。スライドは約4週間保存可能です。

* 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

4 イメージング

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。

HT-1080細胞



緑色：F-アクチン細胞骨格
青色：細胞核
(Zeiss Axiovert 135 ; Plan-Neofluar 40×/0.75)