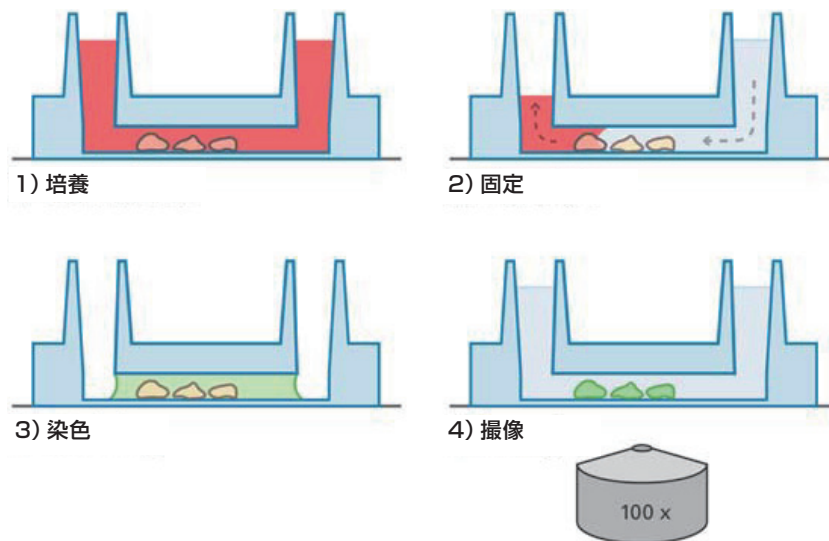


μ-Slide y-shaped (マイクロスライドYシェイプ) を用いた細胞培養および免疫蛍光染色のためのアプリケーションノート

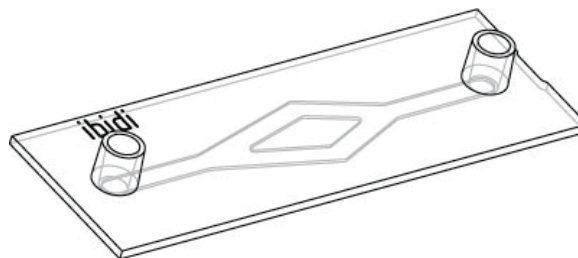
ibidi社のμ-Slide y-shapedを用いたHUVECの培養および染色の方法を示します。この例では、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) のフォン・ヴィレブランド因子 (vWF) をCy5®で、また分化抗原群分子31 (CD31) をAlexa Fluor 488®で、間接的染色法で染色し、細胞核をDAPIで対比染色しました。プロトコルは以下の4つの主要な段階から構成されています。

μ-Slide「オールインワン」キャリア



1 培養

- ibidi μ-Slide y-shaped ibiTreat (ib80126) を滅菌条件下で取り出し、μ-Slide専用ラック (ib80003) に設置します。細胞 1×10^6 個/mLのHUVEC 200 μLをチャンネルに注ぎ、リザーバーから液体を除去します。下に示したチャンネルに直接ピペットで移します。



- 付属のフタでリザーバーにフタをします。
- 専用ラックに入れたスライドをインキュベーター (37°C、5% CO₂) に入れ、細胞を接着させます (約60分間)。その後、両方のリザーバーに新しい培地60 μLを注入します。
- オーバーナイトで上培養します。
- スライドをibidiポンプシステムに滅菌条件下で接続し、インキュベーター (37°C、5% CO₂) 内で、灌流培養します。シアストレスは7.5 dyne/cm²を推奨します。
- 3日以内に、培地1 mLあたり6 mLの培地交換を行う必要があります。

2 細胞の固定、透明化、ブロッキング

- 吸引装置を用いて、すべてのリザーバーから培地を吸引します。1つのリザーバーにPBS 1000μLをゆっくり注入しながら、反対側のリザーバーから吸引して、細胞を洗浄します。
注意：チャンネルは常に液体で満たして気泡が生じないようにし、細胞の損失を予防してください。
- 細胞を2%パラホルムアルデヒド/PBS約150 μLで固定します。20分後、1つのウェルに0.1% Triton® X-100 (Fluka) /PBS約150 μLを注入しながら、もう1つのリザーバーから液体を吸引して、チャンネル内の液体を除去します。チャンネルを絶対に乾燥させないでください。
- 1000 μLの1%BSA/PBSで上記のように細胞を洗浄します。

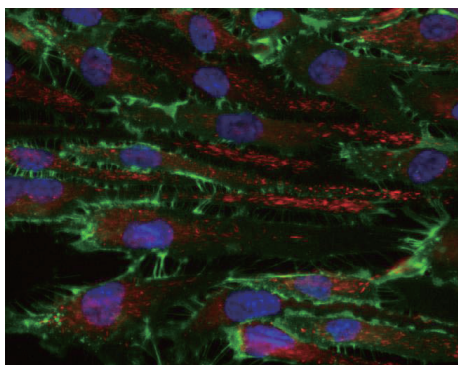
3 染色およびマウンティング

- 必要な抗体溶液を前もって調製してください (当社使用：濃度0.1 μg/mLのDAPI、抗vWF抗体 (ウサギ) (Sigma) および抗CD31抗体 (マウス) (Sigma) 1 : 1000、抗ウサギ抗体 (ヤギ) Cy5® (1 mg/mL) (Invitrogen corp.) 1 : 150および抗マウス抗体 (ニワトリ) Alexa Fluor®488 (2 mg/mL) (Invitrogen corp.) 1 : 200)。
- DAPI (Sigma) を1%BSA/PBSに溶解させた溶液200μLをチャンネルに注入し、室温 (RT) にて30分間インキュベートします。
- 1%BSA/ PBS 1000 μLで上記のように細胞を2回洗浄します。
- 抗vWF抗体 (ウサギ) を1%BSA/PBSに溶解させた溶液200μLをチャンネルに注入し、RTで45分間インキュベートします。
- 1%BSA/PBS 1000 μLで上記のように細胞を2回洗浄します。
- 抗CD31抗体 (マウス) を1%BSA /PBSに溶解させた溶液200μLをチャンネルに注入し、RTで45分間インキュベートします。
- 1%BSA/PBS 1000 μLで上記のように細胞を2回洗浄します。
- 抗マウス抗体 (ニワトリ) Alexa Fluor®488 200μLを注入し、RTで30分間インキュベートします。
- 1%BSA/PBS 1000 μLで上記のように細胞を2回洗浄します。
- 抗CD31抗体 (マウス) を注入し、RTで30分間インキュベートします。
- 細胞を2回洗浄します。
- 1%BSA/PBS 1000μLで上記のように細胞を洗浄し、グリセロール (2%DABCO添加PBS中80%) を200μL注入し、マウンティングおよび退色防止*を行います。スライドは約4週間保存できます。

* 参考文献：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.による Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase (AMP活性化蛋白質キナーゼによる細胞構造のエネルギー依存的制御) Nature Aug 2007; doi:10.1038/nature05828

4 撮像

- 適切なフィルターセット (およびオプションとして浸漬油) 付きの蛍光顕微鏡で細胞を観察します。



HUVEC、
 緑：CD 31 (PECAM-1)、
 赤：第VIII因子 (vWF)、
 青：DNA核 (Zeiss Axiovert 135、Plan-Neofluar 40x/0.75)