

Microinjection

Koujin/Hashiguchi 020719

(1) マイクロインジェクションに必要なもの

micromanipulator 5171 (Eppendorf)
sterile femtotips (Eppendorf / 5242 952.008)
loading pipet
micro loader (Eppendorf / 5242 956.003)
filter (MILLIPORE ; サンプレップ4-GV フィルター)
fluorescent protein (フィルターを通したタンパク質を使用するのが望ましい)

(2) 蛍光タンパク質の濾過

フィルター(MILLIPORE ; サンプレップ4-GV フィルター)を1.5 mlのmicro tubeにセットする。
3~5 μ lのD.W をフィルターに添加。
15,000 r.p.mで2~3分遠心する(4°C)。
フィルターを新しいmicro tubeに移す。
3~5 μ lの蛍光ラベルタンパク質を添加。
15,000 r.p.mで2~3分遠心する(4°C)。
フィルターをはずす。
micro tube内に回収されたタンパク質をマイクロインジェクションに使用する。

(3) microinjectionの作業手順

35 mm glass-bottom dishにまかれた細胞を、顕微鏡のステージ上にセットする(培地; 2ml の観察用培地、37°C)。
明視野でフォーカスを合わせる。
蛍光ラベルタンパク質をピペットマンでfemtotips (滅菌済み)にロードする。
femtotipsの先は繊細で壊れやすいので、壊さないように気を付ける。
femtotipsに蛍光ラベルタンパク質をロードしたのち、マイクロインジェクターにセットする。
joystickでfemtotipsを視野内にもってくる (fast speedモード)。
slow speedモードで下限設定を行う。
インジェクション。
培地交換を行う (37°C)。
細胞をチェック。
インジェクションがうまくいっているようであれば、ミネラルオイルを添加し観察。
詳しくは、micromanipulator 5171のマニュアルを参考。

参考文献

- ・実験医学 Vol.18 No.11 (7月号)2000 1519-1524
「生細胞蛍光イメージング」