

- (a) 細胞培養に必要な器具
培養細胞用35mm glass-bottom culture dish (medium ; 2ml growth medium)
 - (b) 染色に必要なもの
蛍光ラベルしたタンパク質
フィルター (MILLPORE; サンプルレップ4-GV フィルター)
GFP、CFP、YFP、DsRedなどを目的タンパク質に融合させた発現プラスミド
Hoechst 33342 (100 μ g/ml stock)
 - (c) 観察に必要なもの
観察用培地 (example; DMEM without phenol red, 20mM Hepes Buffer , pH.7.3, 80 μ g/ml kanamycin sulfate, 10% fetal calf serum、あるいは L-15 mediumなど)
mineral oil
microscope
 - (d) その他
microinjector
- (1) 細胞について
35mm glass-bottom culture dish (Mat-Teck No.1.5)に細胞をまいておく
- (2) GFP (CFP, YFP, DsRed) 融合遺伝子の細胞への導入
いくつかのトランスフェクション法を使用しているが、観察の2日前にトランスフェクションを行っておくことを薦める。「トランスフェクション」の項を参照。
- (3) 核の染色
glass-bottom dishに用意した細胞にHoechst 33342を2 ul加える (100 μ g/ml as a stock sln : final 100 ng/ml)。
37°CのCO2 incubatorで30分インキュベートする。
2mlの観察用培地 (37°C) で洗う。5分3回。
37°CのCO2 incubatorで2時間以上置いてから観察する。
- (4) 蛍光ラベルタンパク質の細胞への導入
マイクロインジェクション法を使用。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。
「マイクロインジェクション」の項を参照。
- (5) 観察
細胞を2mlの観察用培地(37°C) に培地交換する。
およそ1mlのmineral oil (37°C) をculture dishに加え、顕微鏡のステージ上に手早くセットする。
クレンメルでdishを固定する。
観察。

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」
- 細胞工学 Vol.17 No.6 1998 956-965
「生細胞のマルチカラー蛍光画像化」
- 細胞工学 Vol.18 No.4 1999 506-511
「生細胞で核-細胞質間輸送を観る」