

蛍光顕微鏡観察プロトコール

前培養

1. 3ml の SG-Ura で 30℃、150rpm で O/N 振盪培養する(OD₆₀₀=1 以上)
2. 1ml の培養液を 1.5ml エッペンチューブに入れ、10000rpm、1min、RT で集菌する。
3. 3.7%ホルムアルデヒド 500ul で懸濁して、15 分間室温で静置する。(固定)
退色を防ぐためにアルミホイルなどで斜光する。
4. 10000rpm、1min、RT で遠心をして上清を捨てる。
5. 1×PBS 1ml で 3 回リンスする。(10000rpm、1min、RT)
6. 1×PBS 50ul で懸濁する。

プレパラート作成

1. 懸濁液 3ul をスライドガラス(NOTO-GLASS,MICRO SLIDER CatNo.5116)に乗せる
2. カバーガラスを使い細胞をつぶさないように懸濁液を薄くのばし、乾燥させる。
3. 乾燥したら、蛍光用の固定剤(Thermo Mountant,PermaFluor 商品コード TA-006-FM)を 1 滴たらし、新しいカバーガラス(MATSUNAMI,NEO MICRO)でカバーする。18mm*18mm から 24mm*60mm まで大きさがあるので、懸濁液全体を覆える大きさを選んで使用する。

顕微鏡での観察

1. まず、電圧安定機の電源を入れ、蛍光顕微鏡の電源、PC の電源を入れる(蛍光顕微鏡は前回電源が落とされてから再度入れるまで 30 分待つ)
2. 光源の安定のために 15 分ほど放置する。

PC の設定

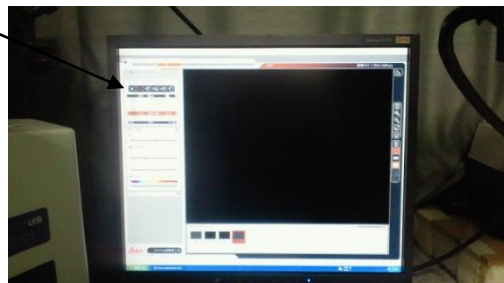
3. デスクトップから Leica ApplicationStudioV3 を選択。
4. 取り込み→λを選択し利用したいフィルターのチェックを入れる。GFP を観察したい場合は GFP にチェックをいれる。
5. 取り込み→カメラ→カメラオプションの、カメラが DFC425 FX になっているかを確認する。
6. 露光の調整から、露光、ゲイン、ガンマ値を設定する。

露光 : 5.15s

ゲイン : 7.0x

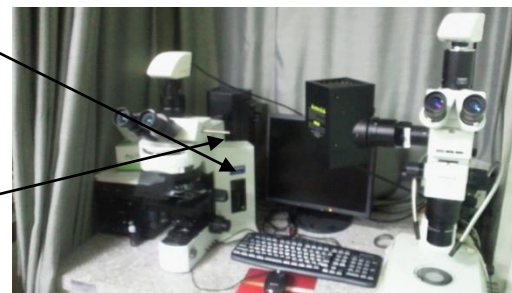
ガンマ : 3.08

で行った。必要に応じて値を調節する。



蛍光顕微鏡の設定

7. カメラが DFC345 FX になっているか確認する。DFC425 になっていた場合は、六角レンチでゆるめて交換する。レンチはランプ電源の上に収納されている。
8. 先に光学条件下で見た場合は、ランプの電源をつける。
ランプの光量はステージ右下の黒いダイヤルで調節できる。
9. レンズをのぞいて観察を行う場合は、レンズ / カメラ切り替えバーを押し込む。
10. 蛍光条件下で観察したい場合は、ランプの電源を切りフィルターを GFP にあわせ、SHUTTER を入れる。



11. 蛍光の退色を防ぐため、観察しない時には SHUTTER は切っておく。

×100 レンズを使う場合にはプレパラート表面にオイルを塗布してからレンズを変える。

観察画像の取り込み

12. カメラから PC に映像を取り込むときは、レンズ/カメラ切り替えバーを引き出す。
13. 画面が一時停止になっていた場合は PC ソフト左上の取り込みボタンを押し、ライブ状態にする。(チャンネル設定一番左のボタン)
14. ブラウズ→ナビゲーターから保存したいフォルダを選択しパスの設定ボタンを押す。
15. PC ソフトの取り込みタブからオーバーレイの取得をクリックする。
16. 新規シーケンスの作成で名前をつけ、OK を押す。
17. 8. の選択で GFP 以外にも複数のフィルターを選択していた場合、画面に出てきた指示に従い顕微鏡のフィルターを交換し、OK を押す。
顕微鏡のフィルターの番号と PC ソフトのフィルターの番号が違っているので注意する。
18. 画像を撮影し終わったら保存からブラウズを選択。
19. 画面右のエクスポートボタンをクリック
20. 画面下のサムネイルから保存したい画像を選択
21. エクスポートフォルダを選択し、画像形式を選択する。JPEG ファイルが扱いやすいのでそれを薦める。
22. 取り込んだ画像データは、デスクトップ→MyDocument へのショートカットを選択し、保存先のフォルダにある。
23. 画像を全て撮影し終わったら画像の保存先を Default に戻しておく。(14.参照)
24. 顕微鏡使用後は、PC、顕微鏡の電源を落としてから、電圧安定機の電源を落とす。
次に使用者がいる場合は電源をきらずに置いておく。
25. ×100 の高倍率レンズ及びオイルを使用した際には、アルコールエーテルをケイドライに塗布し、下からレンズに押し付け、一方向に拭く。
26. 観察した後のプレパラートはガラスゴミとして廃棄する。

