



Application

100倍対物レンズを使用した共焦点蛍光顕微鏡観察におけるガラスとibidiポリマーの性能比較

製品名

ibidi μ -Dish 35mm High, ibiTreat (Cat.No.ib81156)

メーカー名

ibidi 社

下記のデータは、筑波大学 医学医療系 宮本 崇史様のご厚意により掲載させて頂きました。

概要

ibidi μ -Dish 35mm Highの底面素材には“ibidi ポリマー”が採用されています。このibidi ポリマーは、高倍率の蛍光顕微鏡観察において優れた性能を発揮します。

本アプリケーションノートでは、小胞体 (ER) およびミトコンドリアを対象とした、100 倍対物レンズを用いたオルガネラの蛍光観察に、ibidi μ -Dish 35mm Highを使用し、ガラスボトムディッシュと比較検証を行いました。

この結果、ibidi ポリマーを採用したディッシュでは、ガラスボトムディッシュと遜色ないレベルで観察できることがわかりました。

背景

ibidi ポリマーは、以下の点において、高解像度顕微鏡観察に最適な条件を提供するとされる。

- ① 自家蛍光が低く、屈折率等、ガラスに近い光学特性を持つ。
- ② 均一かつ薄く加工でき、作動距離の短い高倍率レンズを使用出来る (Application note 2020 <03> 参照)。

ガラス／培養用プラスチック／ibidi ポリマーの光学特性比較

	屈折率 (589 nm)	自家蛍光	アッベ数	厚さ (規格)
ガラス製カバースリップ	1.52	低い	55	#1.5 0.17 mm (+0.02/-0.01 mm)
培養用プラスチック	1.45	高い	33	多様 (厚い)
ibidi ポリマー	1.52	低い	56	#1.5 0.18 mm (+0.01/-0.005 mm)

手法・実験条件

顕微鏡観察用ディッシュ：

ibidi μ -Dish 35mm High, ibiTreat (Cat.No. ib81156)

<比較対象>M社製ガラスボトムディッシュ (カバーガラス厚：#1S、0.16 ~ 0.19 mm)

細胞：Hela 細胞

顕微鏡：

共焦点レーザー顕微鏡システム Nikon A1R HD25

励起／検出波長 (小胞体観察時) : 425.5-442.5 nm/ 459-499 nm

励起／検出波長 (ミトコンドリア観察時) : 542-582 nm/ 603.5-678.5 nm

対物レンズ：

Nikon SR HP Plan Apo Lambda S 100xC Sil

(シリコン浸レンズ、倍率 100 倍、開口数 NA 1.35、作動距離 WD 0.3 mm、カバーガラス厚対応範囲 0.15 ~ 0.19 mm)

プラスミド DNA (小胞体局在因子発現ベクター)：pECFP-FRB-Cb5

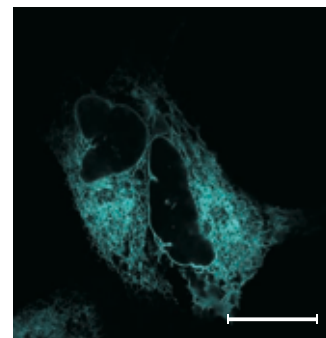
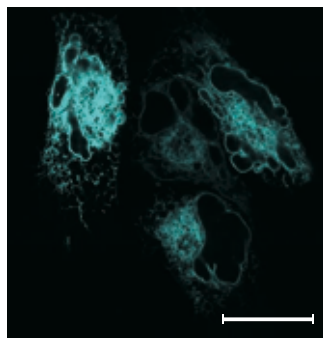
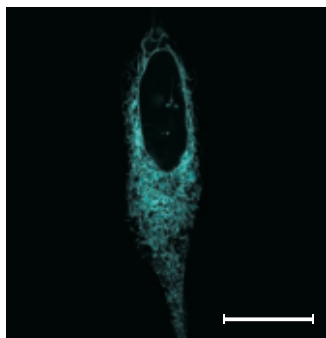
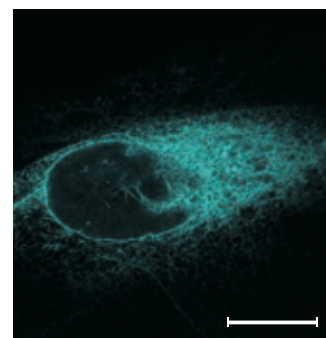
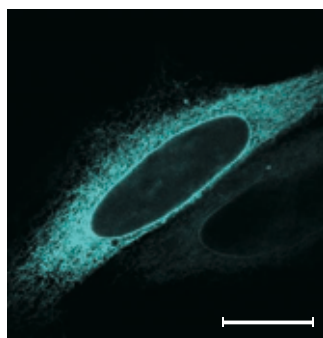
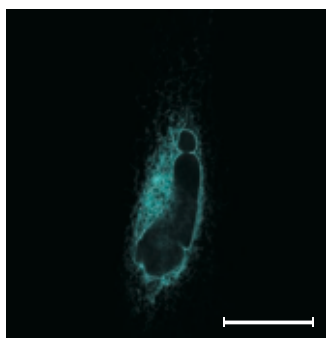
ミトコンドリア染色試薬：MitoTracker™ Red CMXRos (Thermo Fisher, M7512)

※その他、培養条件・撮影条件等は補足情報に記載

結果：100倍対物レンズ撮影結果

① ER観察結果

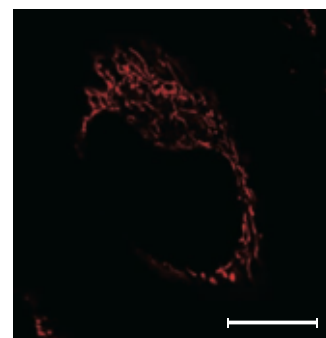
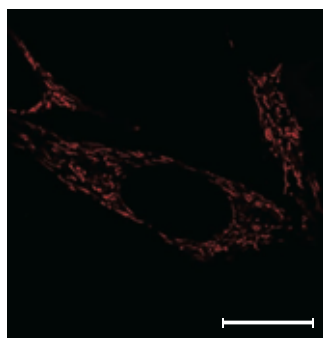
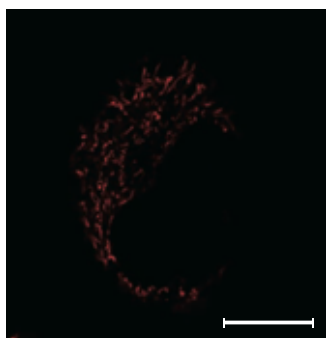
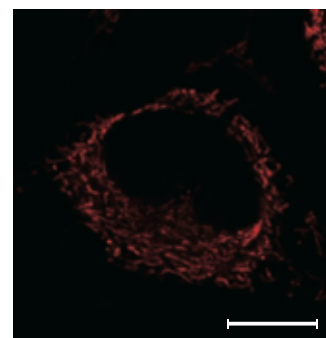
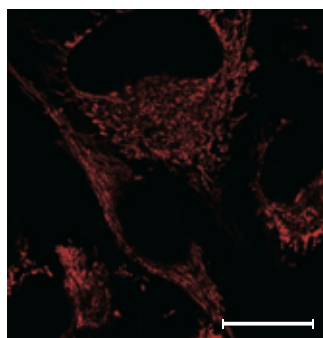
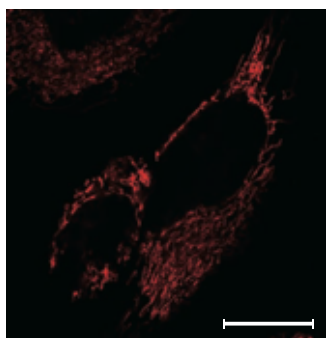
ガラス

ibidi ポリマー
(ibiTreat)

スケールバー：20 μm

② ミトコンドリア観察結果

ガラス

ibidi ポリマー
(ibiTreat)

スケールバー：20 μm

● 結論

ibidi ポリマーは、対物レンズ100倍使用したオルガネラの顕微鏡観察において、ガラスと遜色のない画像が取得できる。



お客様のコメント

プラスチックボトムにもかかわらず、ガラスボトムディッシュと同じような感覚で蛍光撮影ができたのは驚きでした。明視野撮影であれば、ガラスボトムよりibidiポリマーのほうがきれいに観察できる点もお勧めできるポイントです。

補足情報①：手法・実験条件補足

〔細胞培養〕

Hela細胞を、10 cm dish (CORNING, #430167) 上で培養。培養液組成は以下の通り。

- 培養液組成： DMEM (Thermo Fisher, 11965118)
FBS (Thermo Fisher, 10270-106, lot 42Q9180K、最終濃度10%)
Zell Shield (Minerva Biolabs GmbH, 13-0050、最終濃度1%)

〔培養～CR-Cb5トランスフェクション～顕微鏡観察〕

1. Hela細胞、 2×10^5 cells/dishを培養ディッシュへ播種した後、CO₂インキュベーターで4時間静置した。
2. FuGENE HD Transfection Reagent (Promega社) 1.5 μ Lを用いて、プラスミドDNA (pECFP-FRB-Cb5) 0.5 μ gのトランスフェクションを行い、24時間培養した。
3. 培養液を除去後、1 mLのPBSで1回ウォッシュを行い、2 mLの蛍光顕微鏡観察用培養液(*)に置換し、共焦点蛍光顕微鏡観察を実施した。

- 撮影条件詳細： 光源波長：561.0 nm
レーザー出力：0.2
ピンホールサイズ：45.98 μ m
走査条件：Scan Direction: One way、Scan Speed: 0.031、Line Average/Integrate Count: 2

〔培養～ミトコンドリア染色～顕微鏡観察〕

1. Hela細胞、 2×10^5 cells/dishを培養ディッシュへ播種した後、CO₂インキュベーターで24時間静置した。
2. MitoTracker™ Red CMXRos (mitoR) を終濃度500 nMで培地に添加。
3. 30分後、1 mLのPBSで1回ウォッシュ後、2 mLの蛍光顕微鏡観察用培養液*に置換し、撮影を行った。

- 撮影条件詳細： 光源波長：561.0 nm
レーザー出力：0.2
ピンホールサイズ：45.98 μ m
走査条件：Scan Direction: One way、Scan Speed: 0.031、Line Average/Integrate Count: 2

- *蛍光観察用培養液： Phenol red-free DMEM (Thermo Fisher, 31053028)
FBS (Thermo Fisher, 10270-106, lot42Q9180K、終濃度10%)
Penicillin-Streptomycin Solution (Sigma-Aldrich, P4333、終濃度1%)
L-Glutamine (Thermo Fisher, 25030081、終濃度4 mM)

**■ 共焦点レーザー顕微鏡システム A1R HD25**

光毒性が低く褪色の少ない、高速・高解像度・広視野レゾナントスキャナー搭載した最新モデル

- 最速每秒720フレームの高速性
- 最大1K (1024×1024画素) の高解像度を実現
- 業界最大視野数 25でハイスループットイメージングが可能に

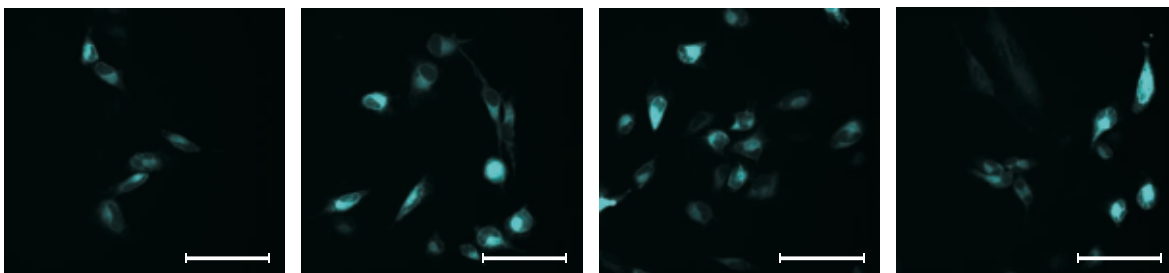
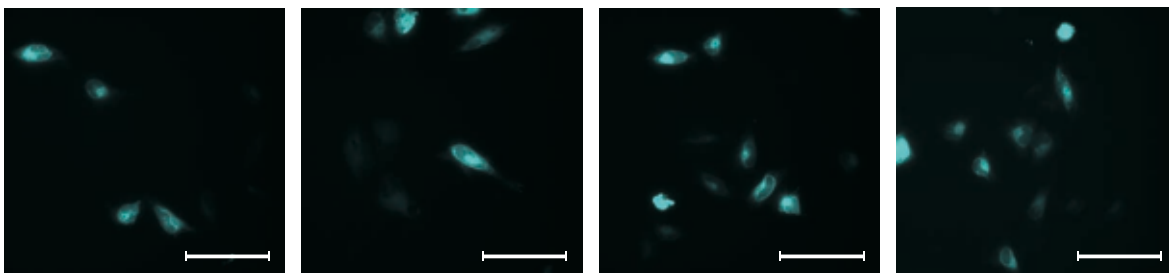


株式会社ニコンソリューションズ
バイオサイエンス営業本部
TEL (フリーダイヤル)：0120-586-617
E-mail：Nsl-bio.Marketing@nikon.com
製品紹介ページ： https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP

補足情報②：40倍対物レンズ撮影結果

① ER 観察結果

ガラス

ibidi ポリマー
(ibiTreat)スケールバー：100 μ m

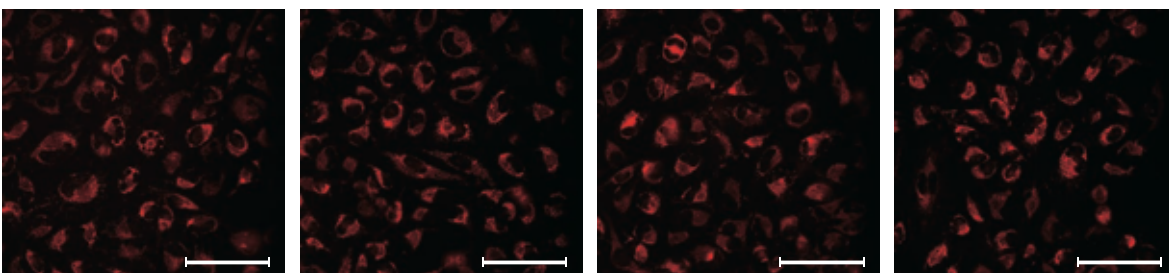
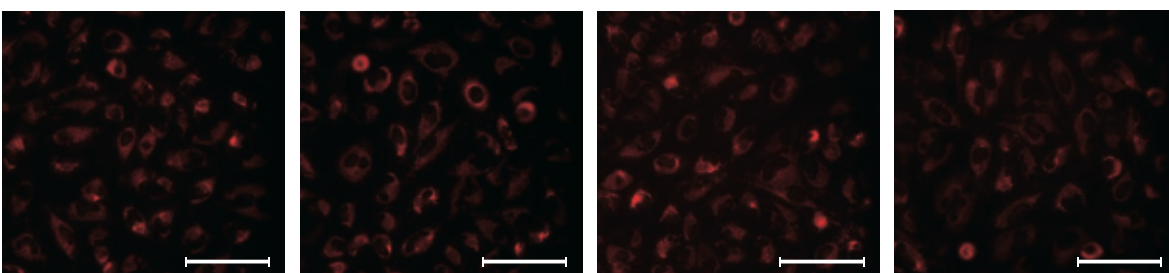
〔撮影条件〕

顕微鏡：ニコン 電動倒立顕微鏡 Ti2-E + sCMOS camera Zyla 4.2 PLUS

レンズ：Plan Apo λ 40x (倍率40倍、開口数NA 0.95、作動距離WD 0.21 mm、カバーガラス厚対応範囲0.11 ~ 0.23 mm)

② ミトコンドリア観察結果

ガラス

ibidi ポリマー
(ibiTreat)スケールバー：100 μ m

〔撮影条件〕

顕微鏡：ニコン 電動倒立顕微鏡 Ti2-E + sCMOS camera Zyla 4.2 PLUS

レンズ：Plan Apo λ 40x (倍率40倍、開口数NA 0.95、作動距離WD 0.21 mm、カバーガラス厚対応範囲0.11 ~ 0.23 mm)