

# サンプル調整について

TCS STED CW および TCS STED with gated technology における超解像の観察には、搭載されている STED レーザー(592nm)で誘導放出をされる蛍光波長を持つ色素を用いる必要があります。また、超解像を実現する STED レーザーは非常にパワーが強いため、サンプル調整にはいくつかの注意が必要です。ここでは、染色の選択とサンプル調整の注意点についてご紹介します。

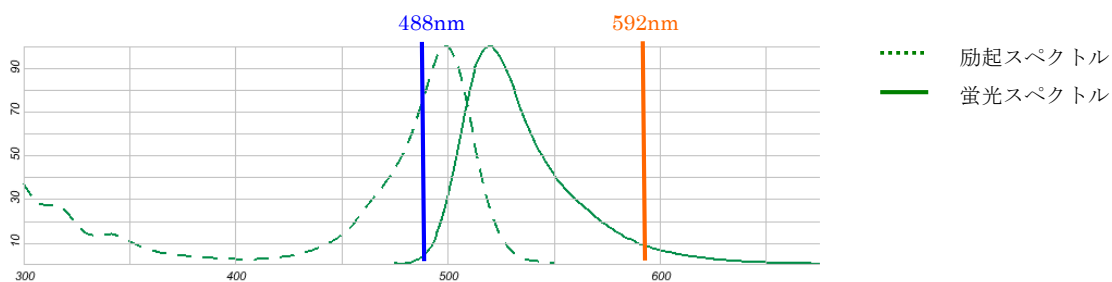
## 1. 蛍光色素の選択

STED レーザー(592nm)で誘導放出が起こる蛍光スペクトルを持った色素を選択します。基本的には以下のような特徴を持つ蛍光色素を選択してください。

- TCS STED with gated technology の場合は 470nm–520nm の範囲の波長で励起される。(TCS STED CW の場合は、458,476,488,514nm のいずれかの波長で励起される。)
- **励起スペクトルに 592nm の吸収が無い。**(色素例については3ページ目「Point ※1」をご参照ください)
- 蛍光スペクトルの裾野が 592nm にかかる。

例えば以下の様な色素です。

<Alexa 488>



使用可能な蛍光例

蛍光色素	蛍光タンパク
Alexa488	Citrin (推奨)
ATTO 488	eGFP 注3)
Chromo 488	EmGFP 注3)
Chromo 505	eYFP (推奨)
FITC	Venus (推奨)
DyLight 488	
Oregon Green 488	
Oregon Green 514	

**注1) 592nm で励起される色素がサンプルに含まれないようにしてください。STED 光によりサンプルがダメージを受ける場合があります。**

**注2) DAPI、Hoechst がサンプルに含まれないようにしてください。STED 光によりサンプルがダメージを受ける場合があります。**

**注3) サンプルによってはSTED 光によりダメージを受けることがあります。結果はサンプルに依存しますので使用の際はご注意ください。**

2. 2色のSTED画像を撮影する場合

項目1と同じ条件の色素をういます。2色を区別するために、励起波長の異なる色素を組み合わせてください。

組み合わせ例:

Channel 1		Channel 2	注意
Abberior STAR 440SX	+	Chromeo 505/Oregon Green 488 etc.	推奨
BD Horizon V500	+	Chromeo 505/Oregon Green 488 etc.	ビオチンラベルが必要 推奨
Atto 425	+	Dylight 488/Alexa488/Oregon Green/Chromeo 505 etc.	STED効果が低いので、 100nm以上の大きさのターゲットの時に使用すること STED CWのみに使用。

3. 色素選択についての注意事項

- 各色素は使用される環境によってスペクトルがシフトすることがありますので、ご注意ください。

4. カバーガラス

- カバーガラス厚は0.17mm以外のものは使用しないで下さい。
- 培養細胞はカバーガラス上、もしくは、ガラスボトム of 細胞培養チャンバー上に培養してください。

**Point**



- カバーガラス直下が最も分解能が上がります。
- より高い分解能を得るためには、明るい染色が必要です。
- 592nmを吸収する色素や物質が含まれているとSTED光によりサンプルがダメージを受ける場合があります。

※1)592nmを吸収する色素の例:

**DAPI、Hoechst**、TRITC、Cy3、Alexa546/555/568/594、PI、DsRed、TexRed、mCherry など

※DAPI、Hoechst は、592nmを吸収します。

※蛍光顕微鏡等で確認したときに赤く光るものは、592nmの吸収があるものがほとんどです。

## 5. 封入剤

<ターゲットがカバーガラスに近接(10 $\mu$ m 以内)にある場合>

封入剤	RI
Prolong Gold	1.46
Mowiol +/-2.5% DABCO (1.4-Diazabicyclo-82.2.29-octan)	1.5
86% glycerol +4% NPG (N-propyl-gallate)	1.452
86% glycerol +2.5% DABCO(1.4-Diazabicyclo-82.2.29-octan)	1.452

**注1) Slowfade、Vecashield、Paraphenylenediamine(PPD)は使用しないで下さい。**

Prolong Gold を使用する場合の注意点

- ターゲットはカバーガラスにできるだけ近い位置にくるように調整する(めやすとして、カバーガラスから10 $\mu$ m 以内)
- ターゲットがカバーガラスから離れた位置にある場合は、封入剤には TDE(下記参照)を試す。

<厚みのある組織切片やターゲットがカバーガラスから距離があるサンプルの場合>

TDE を使用すると観察しやすくなる場合があります。

Thiodiethanol (TDE, Sigma, #8859)を使用する場合

- TDE 濃度が 97% (屈折率 1.514)になるように徐々に濃度をあげていく。
  - ◇ プロトコル例
    - 5-10 min 10% TDE(100 $\mu$ L TDE, 50 $\mu$ L PBS5x, 850 $\mu$ L water)
    - 5-10 min 25% TDE(250 $\mu$ L TDE, 50 $\mu$ L PBS5x, 700 $\mu$ L water)
    - 5-10 min 50% TDE(500 $\mu$ L TDE, 50 $\mu$ L PBS5x, 450 $\mu$ L water) -
    - 3 times 5-10 min 97% TDE(970 $\mu$ L TDE, 50 $\mu$ L PBS5x, 30 $\mu$ L water)
- カバーガラスを無色透明のマニキュアや他のシーリング剤でシーリングする。
- シーリング剤がサンプルの蛍光を消光したり、自家蛍光を発しないことを確認する。

## 6. 退色防止剤の例

- N-propyl gallate (NPG、4%)
- DABCO (2.5%) 等使用できます。