

LSPR-TIRF 顕微鏡を用いた高分解能細胞イメージング

New technique of high resolution cell imaging by use of LSPR-TIRF microscope

○増田 志穂美¹, 柳瀬 雄輝², 臼倉 英治³, 岡本 晃一¹, 玉田 薫¹

(1.九州大学 先導研, 2.広島大学, 3.名古屋大学)

○Shihomi Masuda¹, Yuhki Yanase², Eiji Usukura³, Koichi Okamoto¹, Kaoru Tamada¹

(1.Kyushu Univ., 2.Hiroshima Univ., 3.Nagoya Univ.)

E-mail: masuda@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

1. 緒言

全反射照明蛍光(TIRF)観察法は、エバネッセント光を用いてカバーガラス近傍(100 nm 程度)の蛍光分子のみを励起、観察する方法である。さらに、銀微粒子シートをつけたカバーガラスを用いることで、エバネッセント光をより狭い範囲に制限し、20 nm 程度の界面領域のみを観察できることが先行研究によりわかっている [1]。本研究では、細胞適合性を示すオレイルアミン被覆金微粒子(AuOA)を用いて、金属微粒子シートによる細胞接着界面の TIRF 観察を試みた。さらに、細胞接着時間、蛍光分子、染色液濃度を変えたときの蛍光画像の比較から、観察条件の検討を行った。

2. 実験方法

疎水処理をしたカバーガラス上に、AuOA 微粒子膜を Langmuir-Schaefer (LS)法により一層転写し、ラット好塩基性白血病細胞(RBL-2H3)を接着させた。細胞を固定化し、細胞膜を破壊した後、アクチンを PE、PE-Cy7 および TRITC 色素で蛍光染色し、TIRF 顕微鏡による観察を行った(図 1)。また、実験パラメーターの変化による蛍光強度の変化に関する評価を行った。

3. 結果・考察

図 1 に、PE-Cy7 の励起スペクトルおよび蛍光スペクトルと AuOA の吸収スペクトルを重ね合わせたグラフを示す。細胞接着後の光学顕微鏡観察から、AuOA による細胞への影響がないことを確認した。TIRF 顕微鏡観察では、励起光を垂直入射、斜め入射、全反射で照射したすべての場合において、AuOA シートによるプラズモン電場増強効果が得られた。図 2 は、カバーガラス(左)および AuOA シート(右)を観察基板として得られた垂直入射での蛍光画像である。プラズモン増強効果を得るためには、励起あるいは発光波長とプラズモン共鳴波長とが重なる必要があるが、ここでは PE-Cy7 の励起波長と発光波長の両方が AuOA の共鳴波長と重なっている。ガラス基板上の観察画像との比較から、微粒子シートを観察基板とすることで、空間分解能が上がり通常の方法では見ることのできなかった細胞の接着部分の微細な構造が観察できた。当日は、様々な条件で行った高分解能観察の結果について報告する。

[1] E. Usukura, *Applied Physics Letters*, 2014, **104**, 5.

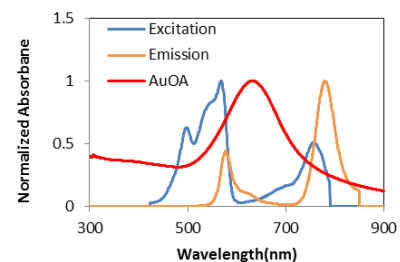


図 1 AuOA と PE-Cy7 のスペクトルの重なり

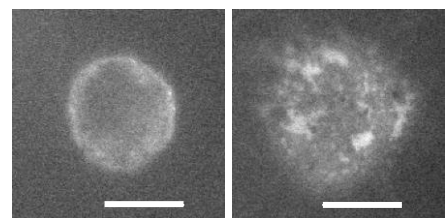


図 2 金微粒子シートの有無による細胞接着面の TIRF 顕微鏡画像の変化