

Kaedeマウスへの照射方法について

1. Spot cure SP-7による照射

Kaedeにphotoconversionを誘導したい場合、顕微鏡下では観察する視野に励起光が集光されているため、通常の100 Wの水銀ランプでも十分。

しかし、dishの中の広い面に照射して、多くの細胞に一気にphotoconversionを誘導したい場合や、マウスに照射する場合、光が大きく広がった状態なので100 Wでは出力不足。

そこで、250 WのSpot cure SP-7が必要。

2. 均一照射ユニットの利用

ランプから出る光は、当然、拡散しながら進んでいるので、そのままでは使いにくい。そこで、Spot cure SP-7と同時に購入できる「均一照射ユニット」が必要。

均一照射ユニットは、出てくる光を直交させるだけでなく、虫の目のような複眼レンズによって平行光にする働きも持っている。これにより、安定した照射が実現しやすい。

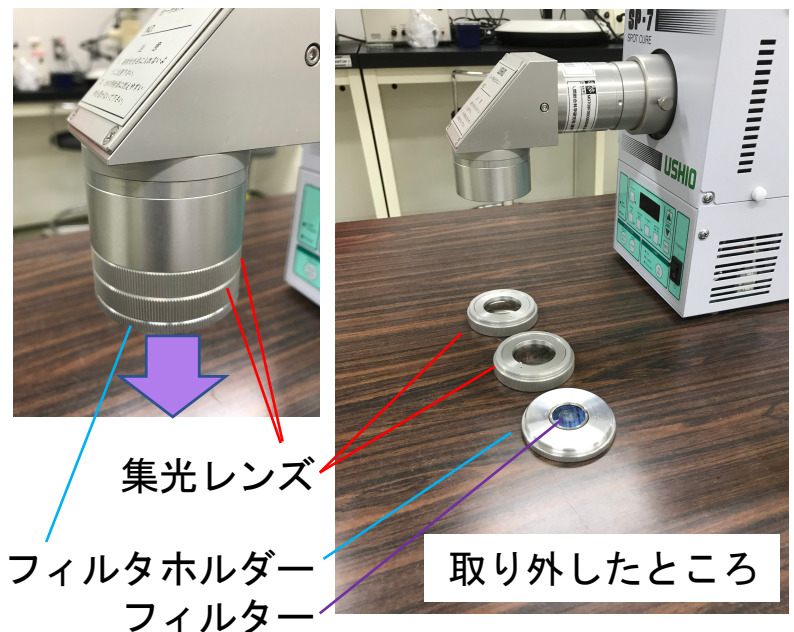


3. 均一照射ユニットの光学系

出てくる直進光は、かなり範囲が広いので、通常はより細いビームに絞り込み、光の強度を上げたい場合が多い。また照射光の波長を制御する必要もある。

均一照射ユニットの出口はネジ山が切られているので、光学系を結合できる。購入時に2枚の集光レンズが付属しており、これらを2枚とも装着すると、光の照射範囲は、直径約1 cm程度の円になる。

イメージング用のガラスボトムdishのガラス部分全体に均一に照射することなども可能になる。



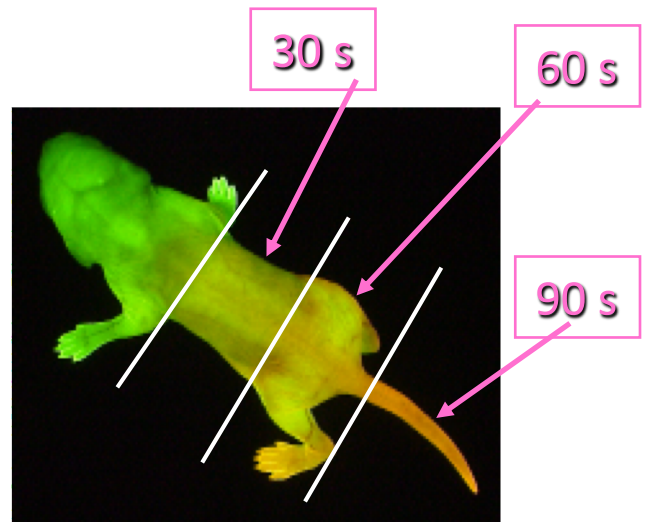
均一照射ユニットと同じ口径で、中央に25φ穴を開けたフィルターホルダーをアルミで自作し、この穴に通常のイメージングなどに用いるフィルターを装着している。

4. 照射時間の決め方

Spot cureを用いて、直径1 cmの円状に照射する場合、30秒～5分程度の照射で段階的に緑から赤にphotocomversionできる。

(参考：生後2～3日目の新生仔マウスに照射した例)

ただし、ここで注意が必要なのは、照射する紫～紫外光は、細胞にとって非常に毒性が強い、ということである。実際、1分程度の連続照射でかなりの細胞が、数時間～翌日までに死滅する。



これを回避して、赤くなった細胞を確実に生かすためには、インターバル照射を行うことが有効である。例えば、5秒照射、15秒インターバル、を繰り返して最終的な照射の積算時間が30秒～数分になるようにする。

考え方としては、短波長の光照射によって、細胞内に活性酸素が発生していると予想される。しかし細胞にはこれを消去する機能もあるため、活性酸素量がアポトーシスのスイッチが入ってしまう閾値を超えない範囲で照射を中断し、発生した活性酸素が消去されるまでインターバルで待つ、ということだと推論しているが、実験的に事実かどうかは確認していない。

もう一つ考慮すべき点として、分子レベルでのKaedeタンパク質のphotoconversion効率と実際の蛍光波長変化の相関がある。Kaedeは4量体を形成しており、この4量体内では非常にFRETが起こりやすい立体配置になっている。したがって4量体中の1つのKaedeタンパク質だけが赤になったとしても、残り3つの緑のエネルギーが赤くなったKaedeタンパク質に移動して赤い蛍光を発するため、25%よりもはるかに赤くなったように検出される。4量体中2つのKaedeタンパク質が赤くなってくれば、全体としては相当に赤くなったように検出されることになる。kikGRに比べるとKaedeは変換効率がかなり低い、それでもかなり赤くなったように検出される理由がここにある。

5. 実際の照射

Spot cureにはシャッターにタイマーを設定する機能があるので、これを利用している。

例えば、5秒照射、25秒インターバルの場合、シャッターの秒数を5秒に設定する。時計を準備して、秒針が0になったところでシャッターopenボタンを押すと、5秒間だけシャッターが開いて照射し、その後自動的にシャッターが閉じる。そのまま25秒待ち、時計の秒針が30になったところで、再びシャッターopenボタンを押す。これを繰り返して、照射時間のトータルが目的の時間に達するまで繰り返す。



シャッターopen
時間設定

6. 非常に狭い領域に局限して照射したい場合

ごく狭い領域に局限して照射したい場合には、Spot cureでは対応が難しい。

そこでそういう場合には、405 nmの半導体レーザーを用いて、光ファイバーで目的の位置に誘導して照射している。

この方法であれば、数十個程度の細胞だけにピンポイントで照射してphotoconversionを誘導することも可能である。

参考：肝臓表面のごく限られた領域だけに照射した例



光ファイバー

照射口

