

ICSI 向けのセットアップ - 2

ICSI 向けのセットアップ2回目は、顕微鏡の視野内にピペットの先端を出す方法、通称「針出し」のコツをご紹介します。と思います。

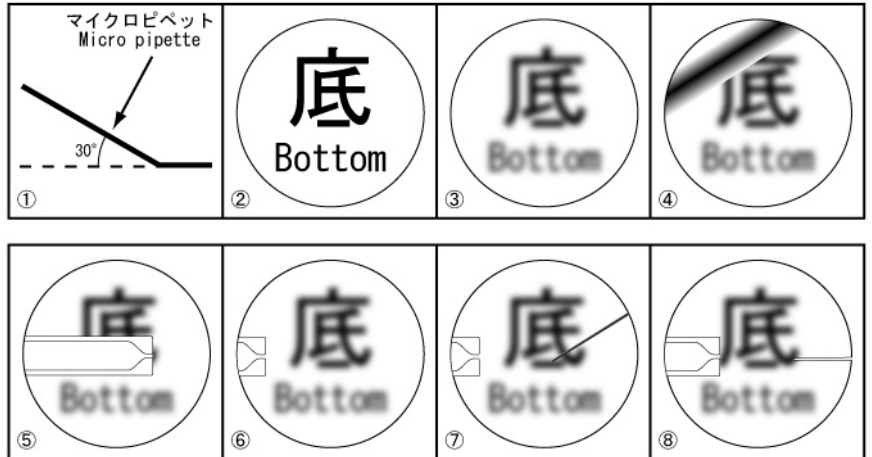
針出しの仕方

針出しのために顕微鏡を覗きながらする操作は、粗動 Y 軸の操作と顕微鏡のフォーカス移動がほとんどです。

マニピュレーターの Z 軸を不用意に動かしますと、針がステージに接触して折れてしまうことがあります。

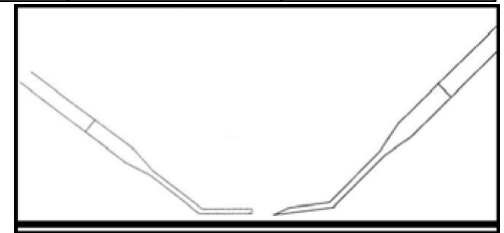
ですので、Z 軸は顕微鏡視野内にピペットが映ってから最後に高さを合わせるために使うようにします。

ディッシュはまだステージに置かず、対物レンズは 10 倍やそれ以下の低倍率を用います。



(1) 針出しは先端が太く比較的壊れにくいホールディングピペットから行います。①ピペットの先端は通常は約 30 度に曲がっていますので (Web News No.3 参照)、インジェクションホルダーの進入角が約 30 度になっていることをまず確認して下さい。ホルダーの角度を微調整する際にはユニバーサルジョイントのお辞儀ノブをお使い下さい。

(2) 顕微鏡のフォーカスを②ステージの表面から③少し上で合わせます。まず顕微鏡は覗かず、粗動を使ってピペットを光軸付近に移動させます。目視で、ピペットの先端が対物レンズを少し越えるくらいの所に持っていきます。



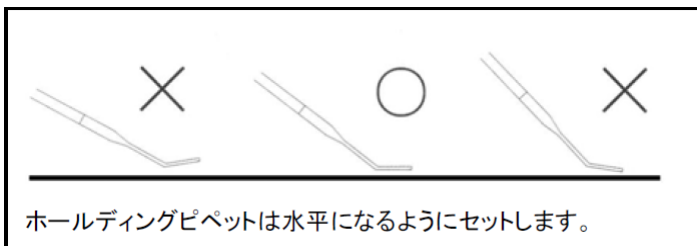
(6)終了。横から見た図。

(3) Y 軸粗動を動かしてみます。④ピペットが視野内に入ると影が見えます。斜めに見える場合は、インジェクションホルダーのノブ (HIR) を回して真横になるように調整します。影が見えないようでしたら、顕微鏡でフォーカス位置を変えて繰り返します。⑤最後に顕微鏡のフォーカスノブで針先にピントを合わせて、ホルダー側は終わりです。

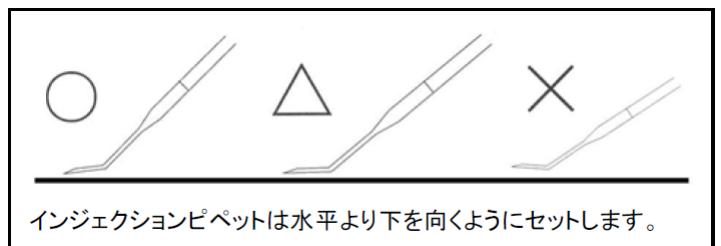
(4) ⑥粗動 X 軸を使ってホールディングピペットを視野内の左側へ退避します。この際、ホールディングピペットがステージに近接しすぎているようでしたら、少し上に移動してピントを合わせなおして下さい。インジェクションピペットも約 30 度に曲がっています。インジェクションピペットは精子の尾を傷つけて不動化するためにも用います。その作業の関係でピペットは若干下を向くようにセットします。ホールディングピペットと同じく、まず顕微鏡を覗かずに目視でピペットをホールディングピペットの先端付近まで移動します。

(5) ⑦顕微鏡を覗き、ホールディングピペットと同じ要領で粗動 Y 軸を使ってピペットの影を探します。影が見つからない場合は粗動で X 軸を少しだけ進め、また粗動 Y 軸を動かしてみます。見つからない場合は顕微鏡のフォーカスを上下させながら繰り返します。ピペットを見つけたら、ホールディングピペットと同様にホルダーの HIR で真横になるように調節し、ピントを合わせます。

(6) 顕微鏡のフォーカスを上下させてホールディングピペットとの位置関係を確認します。インジェクションピペットがホールディングピペットより上にある場合は、先にフォーカスを少し下げ、ピントが合うまで Z 軸でインジェクションピペットを下げます。これをホールディングピペットの高さまで繰り返します。こうすることでピペットがステージに誤って接触してしまうことがなくなります。⑧両方にピントがあった状態で針出しは終了です。



ホールディングピペットは水平になるようにセットします。



インジェクションピペットは水平より下を向くようにセットします。

(7) 粗動 Z 軸でピペットを両方とも上に退避させ、ディッシュをステージに置きます。ピペットにフォーカスをもう一度合わせ、(6)の方法でホールディングピペットからディッシュの底を目指します。

ご不明な点等がございましたら、お気軽に弊社までお問い合わせ下さい。