

## FM4-64 による液胞染色 edited by Nomura

3 ml の SD 培地で  $OD_{610}=0.5$  まで培養。

↓

1.5~2 ml をエッペンチューブへ 5000 rpm, 1 min (小型遠心機)で集菌。

↓

49 $\mu$ l の YPD に懸濁、1  $\mu$ l の 2 mM FM4-64 を加える (final 40 $\mu$ M)

↓ 20 min 培養 (菌体が沈まないように注意)

生理食塩水を 1 ml 加えた後、5000 rpm, 1 min で集菌

↓

3 ml の SD 培地に懸濁

↓ 90~120 min, 28°C で培養

各種試薬を添加

(例) MG 処理の場合: 空の試験管に培養した菌体を 995 $\mu$ l 移し、そこへ 5  $\mu$ l の 2 M MG を加える (negative control として菌体 995 $\mu$ l に 5 $\mu$ l の H<sub>2</sub>O 加えたものも調製)。→28°C で培養

↓

顕微鏡で観察。

経時観察の際は、各時間において培養液を遠心し、菌体を濃縮した後観察を行った。

\* 経時観察は MG 溶液に懸濁後、基本的に 15, 30, 45, 60 min 後に行った。

\* 試薬の種類が多い場合、濃度をふる際ならびに経時ポイントが多くなる場合は、必要に応じて実験系のスケールアップをする。