

忙しいあなたに送る 96穴プレートを用いた免疫染色

(ショウジョウバエ通信14号より 1998.4月)

文責：国立遺伝学研究所発生遺伝研究部門 岡部 正隆

監修：国立遺伝学研究所発生遺伝研究部門 広海 健

はじめに

通常のショウジョウバエの組織染色はwhole mountで行われるために、Eppendorf チューブの中で染色を行います。組織がチューブの底に沈むのを待ち、何回もピペットで試薬を交換して行います。組織がうまく沈まないために、試薬の交換時に組織を吸い取ってしまい、貴重なサンプルが徐々に減っていく……、こんな経験がどなたにでもあろうかと思えます。

今回は、イエローチップで作ったバスケットと96穴プレートを使って、楽にwhole mountの免疫染色を行う方法を御紹介します。組織片を入れたバスケットをピンセットでウェルからウェルに移動して染色するため、途中で組織片を無くすことはありませんし、リンスの度に組織片が底に沈むのを待つ必要がありません。ですから、同時に複数種類の変異体を染色するのも苦になりません。また、germ line cloneやembryoにmicro injectionを行った時など、わずかな数(~ 10個)のembryoを染色する時にも適しており、決してembryoを紛失することがありません。

毎日会議に追われていて、組織学実験を行うことを既にあきらめてしまった教官の方々も、この方法でしたら大きな道具を必要としませんから、セミナー中や会議中にもこっそりと染色を続けることができます。きっと御満足いただけることでしょう。実験の合間に会議に出席しておられる広山健(仮名)さんは、「ピンセットでバスケットを隣のウェルに移すだけなので、ファイルの間にプレートを忍ばせておけば、会議中でもできる。」と絶賛しています。

< 必要なもの >

(どの研究室にもあるものは書いてありません。)

- ・ Falcon 3912 Micro Test III Flexible Assay Plate (平底96穴プレート)
- ・ Falcon 3913 Micro Test III Flexible Lid (フタ)
- ・ ナイロンメッシュ

< バスケットの作成 >

イエローチップを用意します。先端から2.7mm位のところ(メーカーによって多少位置が異なるかもしれませんが)を鋭いカミソリでカットします。先端側は捨ててしまい、ピペットマンに接続する側を使います。カットした断端をバーナーで一瞬あぶり、机に置いたナイロンメッシュに押しつけます。そうしますと、底にナイロンメッシュが張り付いたバスケットができます。一度に20~30個のイエローチップをナイロンメッシュに溶接し、実体顕微鏡でメッシュの裏側から観察し、メッシュがイエローチップにしっかり溶接されているかをチェックします。次に、イエローチップの溶接面の周りにはみ出しているメッシュや、溶接面に生じたバリをはさみできれいに切り取ります。これを平底96穴プレートのウェルに入れてみま。ウェルからはみ出す部分をカミソリで切りとり、バスケットがちょうどウェルにおさまるようにしま

す。バスケットがウェルからはみ出していると、96穴プレートにフタをした時に毛細管現象でとなりのウェルに試薬が移動する原因になります。これでバスケットが完成しました。私達は作りおきしたバスケットを50mlのFalcon tubeに入れて保存しています。もちろん、バスケットは洗って再利用できます。

< 96穴プレートとバスケットの基本的な使い方と注意点 >

各ウェルの中に試薬を注ぎ、ピンセットで組織を入れたバスケットをウェルからウェルに移動することによって染色を進めて行きます。注意点は以下の通りです。

1. 気泡を入れないように注意をする。
2. バスケットを次のウェルに移動するときは、必ずキムワイプの上にバスケットを一瞬置いて前の溶液を拭い去る。
3. over nightの反応以外では、きちっとフタをしない。
4. 1次抗体の反応など、over nightでの反応を行う時は、プレートとフタの間につまようじを一本入れる。(プレートとフタが密着したときに生じる毛細管現象によって、ウェルの中の抗体がなくなることを防ぐため。)
5. 抗体は使う直前にウェルに注ぎ、使い終わったウェルの中の試薬はアスピレーターでこまめに除しておく。
6. 一つのバスケットの中に入れる組織の量が多すぎると、染色むらを起こす場合がある。(一つのバスケットに入れる組織の量の上限は、3齢幼虫10匹分のmouth hook+eye discもしくはembryoであれば10個程度です。)

< 96穴プレートを用いた免疫染色の一例 eye discの染色 >

「ウェルの使い方」

このFalconのプレートはたてにA~H、横に1~12の番号が振ってあります。通常、1回の免疫染色で2枚のプレートを使用しています。各ウェルに注ぐ試薬は以下の通りに決めてありますが、すべての試薬を注入してから始めるという意味ではありません。A~Hまでの全ての列を使って8種類の遺伝子型の組織を同時に染色できますが、各列で異なる抗体を使う場合は隣の列の抗体の混入を防ぐために1列あけるようにしています。

プレート1

- ・ 1、2は固定液 (PLP)
- ・ 3はPBS
- ・ 4 ~ 6はPBT (PBS + 0.1% TritonX-100)
- ・ 7はPBT+n (PBT + 50ul/ml Normal Goat Serum)
- ・ 8は1次抗体
- ・ 9 ~ 11はPBT
- ・ 12はPBT+n

プレート2

- ・ 1は2次抗体
- ・ 2 ~ 4はPBT
- ・ 5は0.5mg/ml DAB
- ・ 6は0.5mg/ml DAB + 0.003% H2O2
- ・ 7 ~ 9はPBT
- ・ 10はPBS
- ・ 11は50% Glycerol
- ・ 12は80% Glycerol

「解剖と固定」

- ・スライドガラスの上に固定液を数滴のせ、固定液の中で3齢幼虫を解剖します。
- ・一方のピンセットでmouth hook、もう一方のピンセットで胴体を把持して、胴体を前後に引きちぎります。eye discとbrain, 中腸が固定液に曝され固定が始まります。引きちぎる時に、mouth hookとbrainの間でeye discが前後に引っ張られますが、適度な張力を保ちながら4、5秒待つとeye discが前後に延ばされて、形良く固定されます。
- ・組織をバスケットに移します。

- ・バスケットを1番のウェルにセットし、あらかじめ固定液を1、2番のウェルに注いでおきます。イエローチップの先端を1mm程切り、必ずPBTでチップの内面を濡らしておきます。解剖を行っていたスライドガラスから少量の固定液とともにdiscを1番のウェルに移します。この時、PBTでイエローチップの内面を濡らしておかないと、解剖したdiscがチップの内壁に張り付いてしまいます。
- ・バスケットの中で固定を開始させますと、discが底のメッシュに張り付いたまあいびつな形で固定されてしまいます。やはり固定液の中で解剖するか、バスケットに移動させる前にスライドガラスの上などで固定を始めることをお勧めします。
- ・解剖に用いた固定液はかなり汚れているので、1番の固定液で軽くすすいだ後、2番の固定液に移します。解剖に10分、ウェルの中で30分固定します。固定が終了したらバスケットを3番のウェルに移し、他の列の固定が終了するまで時間調整します。
- ・mouth hookの色(y+ とy-)でgenotypeを区別することにより、同じバスケット内にコントロールの組織を入れることができます。また、discとembryoを混ぜて扱えば、同時に染色することが出来ます。
- ・embryoの染色の場合は、固定が終わったembryoをメタノールもしくはPBTとともにバスケットに移して、先に進めます。

1次抗体に入れるまでは以下の通りです。

プレート1

- ・1、2の固定液 合計30分
- ・3のPBSで時間調整
- ・4～6のPBTで合計1～2時間
- ・7のPBT+nは30分以上
- ・8の1次抗体は4度でover night

抗体液は140ul/ウェル使用します。この時、フタとプレートの間につまようじを入れることを忘れずに。

(2日目)

- ・9～11のPBTは合計2時間
- ・12のPBT+nは30分

プレート2

- ・1の2次抗体は室温で2時間

- ・ 2 ~ 4 のPBTは合計 2 時間
- ・ 5 の0.5mg/ml DABは 3 分
- ・ 6 の0.5mg/ml DAB + 0.003% H₂O₂で発色し、実体顕微鏡で色具合をチェック
- ・ 7 ~ 9 のPBTは合計 3 0 分
- ・ 1 0 のPBS は 2 分
- ・ 1 1 の50% Glycerol に入れて、組織が底に沈むまで
- ・ 1 2 の80% Glycerol でover night

最後に観察しやすいようにマウントして出来上がりです。

「この方法のオリジナルは、ワシントン大学セントルイス校のRoss L Cagan博士のアイデアです。」