

八工神経系の固定、包埋、染色

ITO Kei, 1990 March

** 基本操作 **

【標本の移動】

小さな標本は、ピペットマンのチップの先を剃刀で切って太くして、液ごとそれに吸いこんで移動する。

ある程度大きな標本は、ピンセットの先を微妙に広げて支え、標本を軽くはさむようにすくい上げる。2本の先端の間に烏口のように液がたまり、その中に標本を保持して移動する。先に力を入れると、簡単に破壊してしまうので注意。

【液の交換】

液を替えるときは、チューブを立てて少し置き、標本が沈んだら液を静かにピペットマンで吸う。

1令、2令幼虫の脳は小さく、なかなか沈まないで、小型エッペンドルフスタンド（宝酒造の粗品スタンドなど）に40cm程の紐をつけ、中におもりを入れたものを作る（粗品スタンドは紙製なので軽すぎて、そのままではうまく振り回せない）。チューブをこの「遠心機」にのせて、水平に振り回すと、20秒くらいですぐに沈む。（ふつうの遠心機を使うと、Gが強すぎて標本が潰れてしまう。）

【標本の整形】

微小メスや虹彩剪刀で標本の一部を切るときは、取り除きたい方をピンセットでつまみ、切断する。とって置きたい方をつまむと、必ずや破壊する。

** 固定液 **

【ホルマリン P B S】

10%ホルマリン（=4%ホルムアルデヒド）

売っているホルマリン液は、37%程度なので、10%混ぜると正味4%程度になる。

八工の場合、室温で数時間か、4°CでO/N。

12時間以上置くと、抗体の付きが悪くなる。

水性なので、油分の多いものは固定液をはじく。固定前に70%エタノールで軽く洗う。

固定後は水or P B S で洗う。

【カルノア液（Carnoy）】

60%エタノール

30%クロロホルム

10%酢酸

強力な激しい固定液。

室温で15~30分が標準。1時間を越すと表面の収縮が激しく、良くない。

アルコール性なので、油分の多いものもすぐ固定可能。

固定後はエタノールで洗う。

** 標準的な固定法 **

【中枢神経系（CNS）のみを取り出す場合。（ホルマウント用）】

脳の取り出し方は、「解剖提要」参照。

脳をエッペンドルフチューブに入れ、カルノア液を400~500μl加える。

チューブを横倒しにして、ゆっくり振とう。室温・30分。

95%、90%、70%エタノールに、各5分、ゆっくり振とう。

0.3% Triton X / P B S 中で、4°C保存。

【体全体を固定する場合。（切片用）】

昆虫のクチクラは固定液を全く通さないで、物理的に穴をあけ、内部に固定液を入れる必要がある。実際は、切片にしたいところ（頭部など）以外を切断し、断面から固定液を入れるようにするのがよい。しかし昆虫の内部組織は体に固定されておらず、余りぎりぎり切ると、切断時の圧力で位置関係がおかしくなる。

昆虫の体表面はワックスが分泌されているので、ホルマリン固定の場合は、固定前に70%程度のエタノールで油分を落とす。解剖するさいPBS中にエタノールを入れておくと良い(50%程度)。

カルノア液の場合は、そのまますぐに固定液に入れて差し支えない。

幼虫 :

- ・PBS中で、尾部をピンセットでちょっとかぎ裂きにする。(切断してしまわない)。
- ・PBSを入れたエッペンドルフチューブに集める。
- ・70%エタノールを入れ、数分おく。
- ・ホルマリンを入れ、室温1時間程度、横倒しでゆっくり振とう。
- ・標本をPBS中に取り出し、虹彩剪刀で、体の中央あたりで切断。
- ・エッペンドルフに入れ、再び固定(ホルマリン室温数時間)
- ・PBSで洗う。

幼虫の体をいきなり切断すると、表皮が収縮して内臓が出てしまい、内部の位置関係がぐちゃぐちゃになる。

蛹前期: 蛹クチクラの出来る前(蛹化後12時間程度まで)は、幼虫に準ずる。

蛹中期: 内部構造のまだ出来上がる前(蛹化後3日程度まで)。

- ・PBS中で、囲蛹殻(puparium)をピンセットでつまみ、前後に引っ張って取る。
- ・腹部にピンセットでかぎ裂きをつける。
- ・PBSを入れたエッペンドルフチューブに集める。
- ・70%エタノールを入れ、数分おく。
- ・ホルマリンで室温1時間程度、横倒しでゆっくり振とう。
- ・幼虫同様、軽く固定してから、虹彩剪刀で胸部を切断する。
- ・再び固定、PBSで洗う。

蛹の中は内部組織が崩壊しているので、いきなり切断すると、圧力で内部のものが出してしまう。

蛹末期: 蛹内で翅や毛などがはっきり確認できる場合(蛹化後3日後半から)。

- ・エタノール入りPBS中で、囲蛹殻(puparium)をピンセットでつまみ、前後に引っ張って取る。
- ・胸の後半、または腹部との境界で切断。
- ・翅、脚(たたまれている)をピンセットでつまみ、根元を虹彩剪刀で切断。こうすると固定液の入り良くなる上、突起がなくて包埋のさい扱いやすい。
- ・胸部の切断部をつかみ、他方のピンセットで触覚の上付近を軽くつまむ。そして前方へ引っ張ると、胸・頭部をおおっていた透明な蛹クチクラが取れる。首のところがぐっと引っ張られて変形するが、クチクラが取れたら元に戻るのでOK。
- ・出来たら、口器をピンセットで引っ張り、切断する。固定液の入り良くなる。
- ・PBSを入れたエッペンドルフチューブに集める。
- ・標本が液になかなか沈まなければ、液を除いて70%エタノールを入れ、数分おく。
- ・ホルマリンを入れて、横倒しで室温、数時間振とう。
- ・PBSで洗う。

成虫 :

- ・エタノール入りPBS中で、胸の後半、または腹部との境界を虹彩剪刀で切断。

(エタノールを入れていないと、解剖中に目覚めたハエがどんどん飛んでいってしまう。)

- ・翅、脚をピンセットでつまみ、根元を虹彩剪刀で切断。こうすると固定液の入り良くなる上、突起がなくて包埋のさい扱いやすい。
- ・出来たら、口器をピンセットで引っ張り、切断する。固定液の入り良くなる。
- ・PBSを入れたエッペンドルフチューブに集める。
- ・標本が液になかなか沈まなければ、液を除いて70%エタノールを入れ、数分おく。
- ・ホルマリンを入れて、横倒しで室温、数時間振とう。
- ・PBSで洗う。

成虫は筋肉がしっかりしており、すぐに切断しても差し支えない。

【固定後の保存】

PBSで洗ったら、70%、90%のエタノールを通して、90%エタノール中で4°C保存。

カルノアの場合は、100%エタノールで洗い、95%、90%のエタノールを通して、90%エタノール中で4°C保存。
この状態で数週間は保存可能。

パラフィンへの包埋法

- ・前日に、60°Cの恒温器をセットしておく。当日、温度の安定していることを確認。
- ・必要量のパラプラストを中に入れておき、融かしておく。
(50mlのディスポーザブル試験管で融かすと便利。)
- ・当日脱水開始前に、パラフィンディスペンサーのヒーターをつけておく。温度設定を確認する。

【脱水+透徹】

エタノール系列で脱水してから、キシレンで透徹するのが一般的だが、ここではクチクラを切りやすくするという噂のあるブタノール透徹法を用いている(「顕微鏡標本の作り方」p.55)。

90%エタノール中で保存してある場合、以下の液を順番に入れる。横倒しにして指定時間振とう。

35%正ブタノール、50%エタノール/水	15分
55%正ブタノール、40%エタノール/水	15分
75%正ブタノール、25%エタノール/水	15分
100%正ブタノール	15分
100%正ブタノール	1時間以上

【浸透の準備】(脱水・透徹中に行なう)

浸透液:

60°C恒温器内に、3つのシャーレを準備する。

シャーレ1 パラフィンを入れ、ブタノールを適量加える。

シャーレ2 パラフィンのみを入れる。

シャーレ3 パラフィンのみを入れる。

舟:

白い陶器製のパラフィン型(舟)を、必要数キシレンでよく拭く。

アルコールグリセリンを塗る。

(70%エタノールとグリセリンを等量ずつ混ぜたもの。これを塗っておかないと、あとでパラフィンが陶器に貼り付いてはがれない。)

60°C恒温器に入れ、暖めておく。

メッシュ:

金網(メッシュ)を長方形に切り、4周を折り返して、パラフィン型(舟)と同型の箱型にする。舟にちょうど納まる形にしておくとう便利。

新品は、石鹼で洗う。再利用品は、前の標本の残っていないことを確認。

【パラフィン浸透】

先を切ったピペットマンで、ブタノール中の標本をすべて吸い、メッシュの箱に入れる。

以下のように、メッシュを移してゆく。

シャーレ1(パラフィン+ブタノール)に入れ、15分。

シャーレ2(第1パラフィン)に入れ、15分。

シャーレ3(第2パラフィン)に入れ、15分。

時間は適当でもよいが、長く置きすぎると収縮が強くなりすぎる。

多数の標本を同時に包埋する場合、ラベルは浸透時にはがれてしまうことが多いので、信用しない。明らかに見分けのつく標本(蛹と幼虫など)を組み合わせて1回に2、3種程度を包埋し、それが包埋段階に入ったなら次の組を浸透に回すと良い。

同時にたくさん処理しても、包埋の位置合わせ時に時間がかかるので、時間がかかりすぎてしまう。その意味でも、1回には2、3種が妥当。

【包埋の準備】（浸透中に行なう）

パラフィン融かし用ハンダごて（先に平たい銅板を付けたもの）を、スライダックにつなぎ、60～70 Vにする。100 Vにじかにつなぐと、恒温すぎてパラフィンが蒸発し、部屋がパラフィン蒸気でモウモウとしてしまうので注意。

大きめのタライ、アイスボックスなどに、水道水を汲む。

タッパーウエアに湯沸かし器の熱湯（65℃くらい）をいっぱいにし、密閉する。これを、パラフィン保温用の簡易恒温機として使用する。

実体顕微鏡の鏡筒を高くして、タッパーウエア上面にピントがあうようにする。

【包埋】

パラフィン型（舟）に、パラフィンディスペンサーで、一杯にパラフィンを入れる。

（ディスペンサーを使わないときは、恒温機の中の融けたパラフィンを注ぐ。）

舟と、標本の入ったシャーレ3を、タッパーウエアに載せる。

（タッパーウエアの蓋は柔らかいので、裏返して底を上にするると扱いやすい。）

舟の外側側面に、標本のラベルをつける（細く切ったビニールテープが便利）。

ピンセットの先でハンダごての先をつまみ、十分熱する。熱くなったら、標本をつまみ、ひとつずつ舟に移す。

（ピペットマンで吸うと、吸った途端に冷えて固まってしまうのでダメ。）

（ピンセットが冷えてきたら、またハンダごてをつまんで暖める。シャーレ、舟のパラフィンが冷えて、膜が張ってきたら、ハンダごての先を突っ込んで暖める。ここの口ウが溶けて少しパラフィンに色が付くが、まあ気にしない。）

全部移したら、実体顕微鏡でのぞきながら、先を熱したピンセットまたは針で、向き、配置を整える。通常の舟で、シヨウジョウバエを包埋する場合、一つにつき3列5ケの15ケくらい並べて良い。

配置が崩れないようにそっと水の上に運ぶ。

舟の下を水につけ、上から息でふうふう吹く。

表面が冷えて薄い膜が張ったら、そっと水中に沈める。一気に冷えて固まる。

（ゆっくり冷やすと、ざくざくした結晶が出来やすい。）

そのまま30分程度おく。

【包埋後の後始末】

パラフィンディスペンサー、ハンダごての電気を切る。

シャーレ3は、そのまま恒温機に戻す。

メッシュは、標本が残っていないことを確認し、恒温機の中に敷いたキムタオルの上に並べておく。パラフィンが融けて、キムタオルに吸われ、きれいになる。

タッパーウエアは、お湯を捨てる前にこぼれたパラフィンを拭いておく。

シャーレ1はブタノールが蒸発するので、密栓できる容器に移す。移すときは、標本が混入しないよう、ろ紙でろ過する。

シャーレ2、シャーレ3はそのままでも良い。シャーレ2にはブタノールが相当混入しているので、絶対にシャーレ3と混ぜない。

当分実験しないときは、恒温機を切っても良いが、しばらく包埋が続くときはそのままでもよい。

【舟からの取り出し】

パラフィンが十分冷えたら、水から取り出す。

針で、4周を少しづつけずる。

4周に十分溝がついたら、片側の長片にそって深く針をさし、パラフィンを持ち上げる。

うまく行けば、パカッとパラフィンがとれる。

失敗して割れてしまったら、落胆せず、出来るだけうまく舟から取り出し、まぎれないように互いに張り付けておく。

舟の側面のラベルをはがし、取り出したパラフィンに貼っておく。

舟に残ったパラフィンをキシレンでよく拭いておく。

包埋のすんだ標本は、通常の染色法に関しては、数十年は保存可能。

切片の作成

【パラフィンの切り出し】

剃刀でパラフィンの塊の周囲の余分なところを除く。

透過光のもとで、実体顕微鏡でのぞきながら、大まかにひとつづつの標本に分ける。

切片の方向を考え、切片の面と平行な面（上面と下面）を、剃刀できれいに仕上げる。

上面は、わりと標本ぎりぎりにする。下面はかなり長めに残す（数ミリ）。

側面になる部分は、大きめに残しておく。

切りだした標本は、なくならないように箱にまとめておく。舟が便利である。

パラフィンのくずは、集めて、恒温機の中のろ紙に入れる。ろ紙の下に試験管を置いておくと、融けたパラフィンがろ過されて試験管にたまる。包埋には使い古したパラフィンの方がなじみがよいらしいので、これを再利用する。

【台木への取り付け】

パラフィン融かし用ハンダごて（先に平たい銅板を付けたもの）を、スライダックにつなぎ、60～70 Vにする。100 Vにじかにつなぐと、高温すぎてパラフィンが蒸発し、部屋がパラフィン蒸気でモウモウとしてしまうので注意。

台木の表面にパラフィンをのせ（すでについていることが多い）、ハンダごてで融かす。

十分熱して、パラフィンがさらさらになったら、切り出した標本を、実体顕微鏡で向きを確認して載せる。

載せたただけだと、標本の周囲がきちんと台のパラフィンとなじまないの、ハンダごてを軽く周囲に当てがい、互いのパラフィンを良くなじませる。当てがはずると標本が融けてしまうので注意。

固まる前に、標本が傾いていないかチェックする。

良く冷やす。水につけても良い（逆さまにして水面に浮かべる）。

【トリミング】

実体顕微鏡で、標本の向きを見る。ファイバー照明を真横から当てると、標本がパラフィンの中に浮かび上がって見やすい。

側面を少しづつ削り、標本の周囲1～2ミリをきれいに長方形に残す。余り大きく残す必要はない。小さいほど、1枚のスライドグラスにたくさん載せられるので便利である。

マイクロトームの刃に平行な2片は、特に十分平行にする。垂直な2片は、切片の境界を分かりやすくするため、少し非平行にしても良い。

トリミングのさい、パラフィンを一度に大きく削ると、負荷がかかってせっかく取り付けたのが折れてしまいやすい。カンナのように少しづつ削る。

【スライドグラスの準備】

伸展台のスイッチを入れ、温度を40℃くらいに設定する。

スライドグラスを95～100%エタノールで拭く。

乾いたキムワイプでよく拭く。

切片のりをほんのちょっとたらし、薬指で塗り広げる。

25mg/ml 卵アルブミン in 50%グリセリン

卵白グリセリンを使うと、抗体反応でバックが出やすいので、アルブミンを使う。

【マイクロトームの調整】（American Optics社のマイクロトームの場合）

マイクロトームの蓋をあけ、蓋の裏の写真に描いてあるとおりに、注油する。

ハンドルのストッパーをはずし、なめらかに回ることを確認する。

粗動ハンドルは、左奥。これを回して台木取り付け部を前後させる。

1回転ごとの送り出し量＝切片の厚さは、右後面のノブを回して調整。

パラフィン切片で快適に切れるのは、上記の標本作成でハエを切る場合、7μ程度がよい。

刃は使い捨てなので、右端から順番に使っていき、左端まで使いきったら新しい刃に替える。使った部分はマジックなどで塗っておくと、あとから分かりやすい。

左の方を使っているとき、右端がホルダーから出っぱり、危ないので、ビニールテープで刃の部分を覆っておくと安全。

刃の角度は、ホルダー基部のネジを回すと変えられる。普通はいじる必要はない。

【標本の取り付け】

台木をセットする。

Zライトかファイバー照明を真横から当て、標本を見やすくする。

取り付け部の3本のネジの締め加減を調整し、向きを決める。

3本のネジはどれも締め込んだ状態になっていること。向きを変えるときは、どれかのネジをゆるめ、ほかのネジをしめて、ゆるみをなくす。

左右方向は、刃と合わせる。

上下方向は、取り付け部基部と標本の表面が平行になるようにする。刃は斜めになっているので、当てにしない。

【切片の作成】

切片のりを塗ったスライドグラスを1枚取り、伸展台の上に置く。

水をスライドグラスにたらす。表面張力を利用して盛り上げる。台にこぼれないように注意。

面相筆2本、ピンセット、剃刀を用意しておく。

粗動ハンドル(左)で、標本を刃先ぎりぎりまで持ってくる。

ハンドル(右)をなめらかに回して、切片を切る。1回転1秒強が良い。

切れ初めは、左右にクルクル巻いてしまう。これは標本が微妙に斜めで、一部しか切れていないためなので、気にしない。

しばらく切り続け、全体が切れるようになっても、左右に曲がってしまうときは、以下のように修正する。

1) 標本が刃に対して傾いていないか確認する。

刃に対して傾いていると、曲がってしまう。

2) 切片の上下片が平行か確認する。

実体顕微鏡できちんと平行にしたつもりでも、台木に近い方は斜めになっていることもある。剃刀できれいに平行にする。

3) 1、2がOKなのに曲がるときは、刃の切れ味が不均等なためである。刃を左右にずらして、切り直してみる。切れないところや、うまく切れるところを見つけたら、印をつけておくと良い。

4) 1、2を逆用して、わざと標本を傾けたり、上下片を斜めにしたりして、うまくまっすぐ切れるようにしても良い。

切片がリボン状にならず、パラパラになってしまうときは、温度が低いためであることが多い。ガンガンストーブを焚くか、Zライトで暖める。

【切片のリボンの、スライドグラスへの貼り付け】

リボンがある程度の長さになったら、剃刀で刃先の1つ下の切片の境界で切る。

(刃先についている切片は残しておく。でないと次の切片がうまく切れない。)

面相筆の先を水で軽く濡らし、リボンの上端をすくい上げる。

もう1本の面相筆で下端を支え、スライドグラスに運ぶ。

下端から、そっと水の上に置く。表面(上側)に水がつかないように注意。

並べる範囲は、スライドグラスでなく、使うカバーグラスの大きさに合わせる。カバーグラスより数ミリ小さい範囲に並べる。リボンは、伸展台で数割伸びるので、その分も見込んでおく。

隣のリボンに対して斜めになってしまったら、ピンセットで修正する。位置のずれたときも同様。

リボン間の隙間が空きすぎたときは、リボン間の水の表面にピペットマンの先を当て、表面を吸うと、左右のリボンが寄ってくる。水を吸うのではなく、表面を吸うのがポイント。うまくやれば、隙間なくぴったりとくっつけられる。

貼り付けたリボンが、全体としてスライドグラスの片側に寄ってしまったときは、ピペットマンで空いた側の水を吸い、狭くなった側に移すと、中央に直る。

1枚貼り終わったら、針か剃刀でスライドグラスを押しながら、伸展台の端に移動して並べてゆく。指などで押すと、水と伸展台が触れ、水が台にこぼれてしまう。

リボンがずれないようにときどき見ながら、水が乾くまで置いておく。

乾いたら伸展台の電気を切り、室温でそのまま半日以上乾燥させる。

乾燥されたスライドグラスは安定だが、ほこりが付きやすいので蓋をかぶせて置く。

【マイクロトームの後かたづけ】

台木を取り外す。

粗動ハンドルで、台木取付部を引っ込めておく。

ハンドルの回転が滑らかなことを再確認しておく。
ハンドルのロックをかける。
こぼれたパラフィンくずを掃除する。
ビニールをかけておく。

【染色の方法】

ホールマウント標本

エッペンドルフに標本を入れ、液を入れる(400-1000 μ l)。
エッペンドルフを横倒しにして、ゆるく振とうする。
(標本が底に固まっていないことを確かめる。)

切片

液が少量しかないor貴重なとき

蓋をできる平たい箱(菓子箱など)の底にペーパータオルを敷き詰める。
水でビシャビシャにする。
スノコ上のもの(フリージングボックスの中仕切が便利)を置く。
上にスライドグラスを水平に並べる。
液をのせ、表面張力で盛り上げる。(スライドグラス全面で $\sim 300 \mu$ lくらい)
反応中はときどき中を見て、液が蒸発or流れてしまっていないことを確認。
スライドグラスの裏面が濡れていると、スノコに液が流れやすい。並べる前に裏側はよく拭いておく。
液をスライドグラスの一部分だけにのせればよいときは、PAPペンかクレヨンで、のせたいところの境界に塗る。これが液をはじき、他の部分に流れない。

液が大量にあるときor安いとき

染色壺に液を入れる。
小型 : スライドグラス5枚 液50ml
大型 : スライドグラス15枚 液150ml
が標準。

【 渡銀法 I 】 (ボディアン - ホルメス、プレスト、大塚 : Ito 改変)

The Atlas of the Insect Brain : pp.188、組織学研究法 : pp.358

固定 (ブアン、カルノア、A A F)

ブアン = 70%エタノールで洗う。 / カルノア、A A F = 95%エタノールで洗う。

パラフィン包埋

切片

脱パラフィン、hydrate、水洗

侵銀 20% 硝酸銀 (sodium nitrate) 37° C 暗所 2-3 (or 3-5) 時間

太い神経の集まるところが、褐色になる

蒸留水で水洗 1分

渡銀 硝酸銀・緩衝液 (pH 8.2 ± 0.4) 37° C 暗所 10-20時間 原液

0.11 M	ホウ酸 (boric acid)	6.80 g/l		
0.0225 M	ホウ砂 (borax)	8.58 g/l		
	以上の混合液を	50ml	25ml	8ml
20%	硝酸銀	250-500 μ l	125-250 μ l	40-80 μ l
ピリジン	(pyridine)	2-6ml	1-3ml	320-960 μ l
水		250ml	125ml	40ml
total		300ml	150ml	48ml

水洗しない

還元 ヒドロキノン・亜硫酸ナトリウム 55° C 3-7分 or 25-30° C 5-10分 (バックの汚れ少)

黄褐色になる

ヒドロキノン (hydroquinone)	3g	1g
無水亜硫酸ナトリウム (sodium sulphite Na ₂ SO ₃)	30g	10g
in 水	300ml	100ml

水洗 流水 蒸留水

渡金 塩化金・酢酸 25° C 10-15分

塩化金 1%

酢酸 1%

灰 - 灰黒色になる

水洗 蒸留水

着色 2% 蓚酸 (oxalic acid) 20-25° C 10-30分

黒紫色になる

増感するとき 増感液 1-2分

ヒドロキノン 0.3g

クエン酸 0.3g

in 水 115ml

使用時に20% 硝酸銀を5ml (1/23 vol.) 加える

塗金 1% 塩化金・酢酸 1分

着色 2% 蓚酸 3分

水洗 流水

定着 5% チオ硫酸ナトリウム 3-15分

水洗

必要に応じて対染色

脱水、透徹、封入

【 渡銀法 II 】 (ボディアン - ホルメス、プレスト、ハイゼンベルグ)

Drosophila A LABORATORY MANUAL (M. Ashburner) : PP.277、試薬組成はPP.329

硝酸銀以外の試薬は、すべて毎回新しく作る。

硝酸銀は、暗所で数カ月保存可

固定 (カルノア)

95%エタノールで洗う。

パラフィン包埋

切片

脱パラフィン (キシレン 10分 × 4)

hydrate (エタノール 100% 90% 70% 50% 30% 各5分)、水洗 (蒸留水 5分)

渡銀

硝酸銀・緩衝液 (pH8.4)	37° C	暗所	10-20時間	原液	
211mM ホウ酸(boric acid)		20ml	15ml	5ml	13.08g/l H ₃ BO ₃
43.25mM ホウ砂(borax, Na borate)		20ml	15ml	5ml	16.48g/l Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O
20% 硝酸銀		385 μl	289 μl	96 μl	
ピリジン (pyridine)		1.5ml	1.125ml	375 μl	
in 水 total		200ml	150ml	50ml	

水洗しない

還元 ヒドロキノン・亜硫酸ナトリウム 55° C 7-9分

or 25-30° C 5-10分 (バックの汚れ少)

黄褐色になる

ヒドロキノン (hydroquinone)	3g	1g
無水亜硫酸ナトリウム (sodium sulphite Na ₂ SO ₃)	30g	10g
in 水	300ml	100ml

水洗 流水 3分 蒸留水 1分

渡金 1%塩化金 室温 20分 (明光下)

灰 ~ 灰黒色になる

水洗 蒸留水 2分 × 2

着色 2% 蓚酸 (oxalic acid) 室温 10分

黒紫色になる

水洗 蒸留水 2分 × 2

定着 5% チオ硫酸ナトリウム 5分

水洗

必要に応じて対染色

脱水 (エタノール 30% 50% 70% 90% 100% 各5分)

透徹 (キシレン 10分 × 2) 封入

【酵素抗体法によるBrdUの検出】

ファルマシア社の細胞増殖検出キット(Cat. No. RPN20)が便利である。

2%過酸化水素/メタノール 室温 ゆるく振とう 20分
内在性ペルオキシダーゼをつぶす。

PBSで洗う 4分×3回

2N塩酸/PBS + 0.3%Triton-X 室温 ゆるく振とう 20分

核酸の二重鎖を分解

PBSで洗う 4分×3回

1次抗体 室温 ゆるく振とう スライド1~2時間 ホールマウント2~数時間

PBSで洗う 4分×3回

2次抗体 室温 ゆるく振とう スライド0.5~1時間 ホールマウント1~数時間

PBSで洗う 4分×3回

DAB + 増感剤 室温 ゆるく振とう 発色を見ながら5~20分

ペルオキシダーゼによってDABが発色する。

ホール： リン酸緩衝液500μl + DAB液2μl、増感液1μl

切片： リン酸緩衝液50ml + DAB液1ml、増感液4.3μl

水で洗う 4分×3回

対染色(切片のみ) エオシンYを用いて、染色20分

脱水(エタノール系列 すばやくやらないと、エオシンが溶けてしまう。)

70%、90%、95%、100%エタノール

透徹(キシレン+クレオソート)、封入(カナダバルサム)

ショウジョウバエ後胚発生の基本常識

ITO Kei 1989.4.26

<基本知識>

1. ショウジョウバエの成長

卵 (24時間) 1令幼虫 (24時間) 2令幼虫 (24時間) 3令幼虫 (48時間) 蛹 (96時間) 成虫

2. ショウジョウバエの神経系 (幼虫)

昆虫の神経系は梯子状神経系と呼ばれ、各体節ごとに神経節がある。ショウジョウバエは胸部3体節、腹部8体節を持つが、各体節の神経節はバラバラでなく、一つに融合して、胸の前方にコンパクトにまとまっている。

頭には大きく2つの神経節がある。食道の下に食道下神経節 (Suboesophageal Ganglion) があり、そこから上方に食道の両側に、球状の食道上神経節 (Supraoesophageal Ganglion) (または脳 brain とも言う) がある。食道下神経節は、後ろの胸部、腹部神経節と一体化して舌状になっている。

脊椎動物では、中枢神経では神経細胞本体が内側にあり、軸索やシナプスはその外側をとりまいている (ヒトなどの大脳は例外)。昆虫などの節足動物では逆で、外側に細胞本体があり、内側に軸索などがある。その点では、位相的にはヒトの大脳と同じ関係である。

3. ショウジョウバエの神経系 (成虫)

幼虫には、目と呼べるものはない。しかし蛹の間に複眼ができ、それと同時に複眼からの情報を処理するためのOptic Lobeが形成される。幼虫の食道上神経節の球の外側半分づつが大きく成長し、同時に神経節の前にあった複眼のもと (複眼の成虫原基 = eye disc) が複眼の形になりながら脳の両側に来る。これらがつながって、成虫の複眼と、それにつながる脳を形成する。

また、幼虫はずん胴だが、成虫は首がある。首の形成にともない、初めは一体に見えた食道下神経節と胸部神経節の間にくびれが入る。

結果として、成虫では中枢神経系は、頭部にある食道上、下両神経節と、胸部にある胸部、腹部神経節のふたつに大きく分かれる。

4. ヒストロジー (組織学)

I 固定 fixation

生物の中にはいろいろな活性をもつ酵素がある。これらは生物が死ぬと、制御が利かなくなつて勝手に働いてしまう。いわゆる死後変化というやつである。このため、タンパク質や核酸が分解されてしまうこともある。

これを防ぐため (他にもいろいろな理由があるが)、殺したらすぐにタンパク質などを変性させてしまう必要がある。これが固定 (fixation) である。

II rehydration、dehydration

ある種の固定液は油性である。しかし酵素反応や染色を行うには、水性でないと困る。そこで組織を「水に戻す」必要がある。95%、90%、70%のエタノールに組織を次々に数分づつひたし、徐々に水分を増やしていく。70%の次に、水に浸せば、組織は水に戻る。これがrehydrationである。

一方、切片を作ったり、プレパラートに封入するには、油性の方がよい。水分があると油である切片作成用パラフィンや封入剤をはじいてしまう。そこで先と逆の順序で、水から油に持って行く。95%の次に2回ほど100%エタノールに浸すと、出来上りである。これがdehydrationである。

III 透徹 clearize

固定された組織は、ふつう白く濁っている (変性されたタンパクは、焼肉と同様白くなる)。これでは組織が観察できないので、透明にする必要がある。これが透徹である (素直に透明化と訳せば良いものを、、、)。dehydrateした組織をキシレンにしばらく浸せば、なぜか知らないが透明になる。

IV ホールマウント whole mount

正統的には、組織はパラフィンなどの柔らかい固体に埋め込み (包埋)、10ミクロンくらいに薄く切って切片にする。

これは高倍率で詳しく観察できるが、なにせ面倒なので多くのサンプルを見るには面倒である。そこで小さくて透明になるようなサンプルの場合には、切片にしないでそのままプレパラートに入れて見てもよい。カナダバルサムという樹脂を使って、スライドガラスをカバーガラスの間を密封する。これがホールマウントである。