

染色プロトコル

Ueda, 1995 July

X-gal 染色法 (embryo) v2.0

準備 採卵

固定液作成 :

1% glutaraldehyde in 0.1M Cacodylate buffer (pH7.3)*1 500ml/tube
heptane 500ml/tube
glutaraldehydeとheptaneを混ぜた後、激しくふって飽和させる

コリオン膜除去 (以下の操作は断らない限り室温で行う)

2.5% 次亜塩素酸ソーダ 2min 染色壺中で

ナイロンメッシュにあけて水道水で水洗

ティッシュで余分な水気を切り、メッシュを鋏でカットして三角にする

固定

heptaneで卵をEPチューブに流し込む

30min duck roterで撹拌

卵黄膜除去

heptaneと一緒に卵をホールスライドに移す

heptaneを捨て (ついてきた固定液も)、残りも息をかけて揮発させる

乾燥しないようにすみやかにPBT (0.3% Triton-X in PBS*2) を加える

卵黄膜をピンセットとタンゲステン針ではぐ (1hr 以内、時間とともに剥がれにくくなる)

embryoをPBTとともにEPチューブに移す

PBTで洗う

液を捨て、新しいPBTを500ml加える duck roterで撹拌

3~4回繰り返す 各10 min

染色

37 に温めた staining solution*3 1ml にX-gal (8% in DMSO, -20 保存) を 25ml 加える

16,000rpm で 20min 遠心して結晶を取り除く

各チューブに200mlの上清を使い embryo を染色する (37 2hr over night)

適当なところで液をPBTに交換し、反応を止める

脱水と封入

EtOHシリーズで脱水

20%、40%、70%、90%、100%EtOH (2回)、500ml各10min

Xylene、2回、各10min

カバーガラスにBioliteを1滴、滴下し、microdispencerでembryoを中に流し込み、カバーガラスをかけて封入する

溶液の組成

- *1 0.1M Cacodylate buffer (pH7.3)
 - 1.07g Na-Cacodylate
 - 25ml D.D.water
 - 35ml conc HCl
 - 50mlにメスアップ

- *2 PBS
 - 130mM NaCl
 - 7mM Na₂HPO₄ 2H₂O
 - 3mM NaH₂PO₄ H₂O

- *3 staining solution (pH7.2)
 - 150mM NaCl
 - 7mM Na₂HPO₄ 2H₂O
 - 3mM NaH₂PO₄ H₂O
 - 1.0mM MgCl₂ H₂O
 - 3.1mM K₄ [Fe(CN)₆]
 - 3.1mM K₃ [Fe(CN)₆]
 - 0.3% Triton X-100

胚の抗体染色法 v4.0 (931119)

MAb22C10

ABC kit Eliteを使用

準備 採卵

固定液作成： 4% paraformaldehyde in 0.1M PBS(PBS) 500ml/tube
heptane 500ml/tube
4% paraformaldehydeは65℃で2ml/mlの1N NaOHを加え溶かす
paraformaldehydeとheptaneを混ぜた後、激しくふいて飽和させる

コリオン膜除去（以下の操作は断らない限り室温で行う）

2.5% 次亜塩素酸ソーダ 2min 染色壺中で

ナイロンメッシュにあけて水道水で水洗

ティッシュで余分な水気を切り、メッシュを鋏でカットして三角にする

固定

heptaneで卵をEPチューブに流し込む

30min duck roterで攪拌

卵黄膜除去

固定液（下層）を捨てる

100% MetOHを600ml加え振る 2~3sec vortexで激しく！

下に沈んだembryoを少量のMetOHとともに新しいEPチューブに移す

MetOHで洗う MetOHを捨て、新しいMetOH 500mlを加える

PBTで洗う

MetOHを捨て、PBT(0.3% Triton-X in PBS)を200ml加える duck roterで攪拌

3~4回繰り返す 各10 min

blocking

10% FBS, PBT 100ml 15 min duck roterで攪拌

1次抗体処理

各チューブに5mlのa b-gal mAbを加える（希釈率 1:500）

1 hr（あるいは4 over night） duck roterで攪拌

PBTで洗う

1次抗体溶液を回収し（4 保存、数回使用）PBTを200ml加える

3~4回繰り返す 各10 min duck roterで攪拌

blocking

blocking serum（黄ラベル）をEPチューブに1滴とり、サンプル数 x 1.5ml を
サンプル数 x 100ml のPBTに加えまぜる（残りは4 保存）

15 min duck roterで撹拌

2次抗体処理

anti mouse IgG (青ラベル) をEPチューブに1滴とり、上記サンプルに 0.5ml を加えませ
る (各サンプルよりblocking液を集め IgGを加えた後、再分配) (残りは4 保存)

1 hr duck roterで撹拌

PBTで洗う、およびABC reagentの準備 (下項参照)

2次抗体溶液を回収し (4 保存、数回使用)、PBTを200ml加える

3~4回繰り返す 各10 min

ABC reagent 処理

reagent A 20ml

reagent B 20ml

PBT 1ml

混合

(注 使用30分前につくる、100ml / 各チューブ)

30min duck roterで撹拌

PBTで洗う

溶液を捨てPBTを200ml加える

3~4回繰り返す 各10 min duck roterで撹拌

発色 (溶液は翌日も使用可)

0.02% H₂O₂ 1.5ml (H₂O 1.5ml + conc H₂O₂ 1ml)

0.1%DAB in 0.1M Tris buffer (pH7.2) 1.5ml

混合

ホールスライドにサンプルを取り、PBTを捨てる

DAB溶液を200mlぐらい加え発色させる

適当なところで液をPBTに交換し、反応を止める

脱水と封入

EtOHシリーズで脱水

20%、40%、70%、90%、100%EtOH (2回)、500ml各10min

Xylene、2回、各10min

カバーガラスにBioliteを1滴、滴下し、microdispencerでembryoを中に流し込み、カバー
ガラスをかけて封入する

(注)

1) 固定液

4% paraformaldehydeはneuronのcell bodyを良く染める。1% glutaraldehyde (cacodylate buffer) はそれに比べて繊
維を強く染める。glutaraldehydeはhand peelでもMetOHでも染色性は変わらない。

成虫原基におけるb-galactosidaseの抗体染色法

ABC kit Eliteを使用 v.2

0.1M PBS(PBS)で幼虫、蛹を洗う

解剖 2ml PBS/Falcon 1008 dish

@幼虫を裏返しにしたままだと、discの裏側(基部)が染色されないなので、できるだけばらばらにした方がよい

固定 Nunc 4 well dishに移す

4% paraformaldehyde in 0.1M PIPES, 2mM MgSO₄, 1mM EDTA 500ml/well 30min

@paraformaldehydeは65 で2ml/mlの1N NaOHを加え溶かす

wash

固定液を捨てPBT(0.1% Triton-X in PBS)を500ml加える

数回繰り返す total 30min

EP tubeに移す(2mlのEP tubeの下を切ったもの)

blocking

10% FBS in PBT 100ml 15min

1次抗体

1:200 anti b-galactosidase Ab in blocking solution 100ml 室温 1hr

(あるいは、blocking液を別のEP tubeに取り、Abを0.5ml加え、攪拌後戻す)

wash

溶液を回収し、PBTを100ml加える

数回繰り返す total 30min

blocking

blocking serum ストック(黄ラベル) 1.5ml

PBS 100ml

15min

2次抗体

anti mouse IgG(青ラベル)を0.5ml加える

(blocking液を別のEP tubeに取り、Abを0.5ml加え、攪拌後戻す)

1hr

wash

溶液を回収し4 にストック。PBSを100ml加える

数回繰り返す total 30min

ABC reagent 処理

reagent A 2ml
reagent B 2ml

PBS 100ml
(注 使用前30分につくる)
30min

wash

溶液を捨てPBSを100ml加える
数回繰り返す total 30min

発色

0.02% H₂O₂ (H₂O 1.5ml + conc H₂O₂ 1ml) 50ml
0.1%DAB in 0.1M Tris buffer (pH7.2) 50ml