

24h APFのpupal wingの抗体染色

2003 館野 実

- 24hAPFのpupal caseをむく。中身がpupal cuticle内を移動しないよう（ふわふわ浮かんだものがwing pupal cuticle内へ移動しないように。固定時にwingにくっつき汚くなる）。
- 4% paraformaldehyde/PBS 4度ONで固定。
- PBS中で解剖。高級解剖はさみをお勧めします。Fine Science Toolsの15000-00を使っています。4万円くらいだったような。
- まず後端にはさみの先端が少しはいるくらいの穴をはさみであけます。
- 穴にはさみを少し入れて、abdomenの側方を片方ずつ切れ込みをいれます。穴をおおきくするのが目的です。
- abdomenの腹側正中線に沿って頭のとっぺんまで切ります。腹開きです。
- abdomenはじゃまなのではさみで切り取ります。
- 右手にp20のピペットマンを持って中身を吹き飛ばします。全部とばす必要はありません。左手のピンセットで頭のどこかをしっかりとつまんでおく。
- 脳、気管は残ります。ピンセットで除きます。
- ここまでは頭が左向きでした。こんどは右にむけてpupal wingのpupal cuticleに穴をあけます。
- 左手のピンセットで胸の背側を中から解剖皿のそこに押しつけて固定しておきます。
- 右手に「よくとがった」タングステンニードルを持ち、pupal wingのpupal cuticleに穴をあけます。中のpupal wingには達しないように。（何本か作って一番とがっているのを使っています。3rd larvaのdiscのpropodial membraneを剥くのと似た要領です。こちらのほうが簡単です。RUBIN LAB MANUAL参照）
- 穴が開いたらそのままwing先端に向かってニードルの先端をすべらせて穴を大きくします。ニードルの先端が「カギ」型になってたりするのをを使うとwingに傷をつけにくいので良い。
- 再び頭を左にむけて、pupal wingを、包んでいるpupal cuticleから離します。
- 今度はあまりとがっていないタングステンニードルを右手に持ち、穴に先端を少し入れ、wingの付け根までpupal cuticleを裂きます。先端を肩のあたりに突き刺して外に向けて裂くのがよいかもしれません。たいていの場合、wingのdorsal側のanterior/posterior boundaryのあたりに裂け目ができます。今度はwingの肩のあたり（大きく曲がっているところ）に先端を入れ、「てこ」の原理(?)でwingの肩の部分pupal caseから露出させます。そのままニードルをwingの先端に滑らせてanterior側をpupal caseから出します。同じようにしてposterior側も出します。stageが早いとcuticleとwingを離すのに手こずるかもしれません。
- これでwingがpupal caseから出ました。wingのpupal caseはthoraxのcuticleにつながったままです。
- 先端をよく研いで、ぴったり合ったピンセットを両手に持ち、wingをおおっていたpupal cuticleをびりびりと破って取り除きます。このとき、剥くのはwingの曲がっているあたりで止めます（thoraxまで剥くと極端に構造が弱くなり、wingが胸からとれてしまい、無くしやすいので）。
- 両羽根できたら解剖皿のPBSをゴミと一緒に抜き、4%paraformaldehyde/PBSを500 micro入れて室温で20分固定。小さな箱にいれておくとゴミが入らないし、気化したformaldehydeを吸わなくてすむので良い。何匹かまとめてやっています。
- 固定液を吸い取り、PBSTritonX100(0.3%)を入れてwash（20分x4回）。このあとMeOHに置き換えれば-20度で保存可。
- 先太チップで0.5ml ultraclear PCR tubeに移す（AXYGEN PCR-05-C, thin wall, clear, FLAT TOPを使っています）。
- 1次抗体in PBSTritonX100(0.3%)入れて4度でO/N,とてもゆっくり回す（回さなくても良いのですが、

念のため)。300 micro litter。抗体が貴重な時は100 microで（心配ですがうまく行きました）。

- PBSTritonX100(0.3%)を入れてwash（20分x4回）。とてもゆっくり回す。
- 2次抗体in PBSTritonX100(0.3%)入れて室温で2時間,とてもゆっくり回す。
- PBSTritonX100(0.3%)を入れてwash（20分x4回）。とてもゆっくり回す。
- 50% glycerol 2hr + 80% glycerol o/n。とてもゆっくり回す。
- mount + 観察。スライドグラスの上でpupal wingをthoraxから切り分けます。
- mountantが少なすぎるとwingがつぶれて広がるので注意。

in situ hybridizationにも使えます。胚とほとんど同じです。

- MeOH中に保存したpupal wing。
- MeOH/PBTween20(0.1%) 1:1で5分。
- PBTween20(0.1%)で5分x3回。
- 12.5 micro g /ml Proteinase K in PBTween20(0.1%)、4分。
- 2mg/ml Glycine in PBTween20(0.1%) 4分 x 2回。
- PBTween20(0.1%) 5分 x 2回。
- 5% paraformaldehyde in PBTween20(0.1%) 20分。
- PBTween20(0.1%) 5分 x 4回。
- PBTween20(0.1%) / ハイブリ液 1 : 1 10分。
- ハイブリ液 20分。
- ハイブリ液 60分 60度。
- ハイブリ液を捨て、probeを加えてo/nでhybridization。
- +ハイブリ液 20分 60度 x 2回。
- PBTween20(0.1%) / ハイブリ液 1 : 1 10分。室温。
- PBTween20(0.1%) 20分 x 2回。
- anti-DIG Ab-AP conjugate 1/3000 in PBTween20(0.1%) 1時間。
- PBTween20(0.1%) 20分 x 4回。
- AP buffer 5分 x 3回。
- 解剖皿に先太チップで移す。
- +2.25 microlitter of NBT
- +1.75 microlitter of X-phosphate / 1ml of AP buffer
- 発色、暗所で。1時間~o/n。

館野 実

202-0021 東京都西東京市東伏見2-7-5 早稲田大学人間総合研究センター山元研究室
電話0424-50-5824 FAX 0424-50-5825

※ このprotocolは碓井 和也さんに教えていただいた、8hAPFのpupal wing discの解剖法を相当参考にしました。感謝いたします。