

アポトーシスの検出 (whole mount)

In Situ Cell Death Detection Kit, AP (Roche:No.1684 809)

固定 : 4% PFA/PBS、4℃で一晩固定

保存 : MtOHに置換して、-20℃保存

アルカリバッファ : (1M Tris/pH9.5, 0.5M MgCl₂, 1M NaCl) 各 1ml、DW 7ml, 1/2 Tween 2ul

基質 : 20ul NBT/BCIP + 1ml アルカリバッファ (氷冷する)

- 1) PBST に置換 (PBST を半量ずつ加えていく ; 50%, 75%, 87.5%, 100%)
↓
- 2) 6% H₂O₂/PBST で色素の漂白, 37℃, 15min-1h (眼が薄茶色になるまで)
↓
- 3) PBST で 1 回洗浄
↓
- 4) PK/PBST で 37℃, 10min - 1h 消化 (1ul proteinase K/1ml PBST) (胚、孵化仔魚は 10min)
↓
- 5) PBST で 10 min, 1 回緩やかに攪拌洗浄
↓
- 6) 4% PFA/PBST で PK を不活化、室温、10min
↓
- 7) PBST で 10 min, 4 回緩やかに攪拌洗浄 O. N. 可能
↓
- 8) TUNEL 反応, 37℃, 2h (10ul ボトル 1 (酵素液)+90 ul ボトル 2 (NTP) + 0.5ul 1/2Tween)
(ネガコン : ボトル 2 のみ)
(ポジコン : サンプルを DNase I 3U/ml 添付バッファで 37℃, 10min 消化、PFA 固定、PBST 洗浄×4)
↓
- 9) PBST で, 15min, 緩やかに攪拌 4 回洗浄 O. N. 可能
↓
- 10) Converter AP (AP-labeled anti-FITC ; Tween を 0.2%加える)、37℃, 2h
↓
- 11) PBST で, 15min, 6 回緩やかに攪拌洗浄 O. N. 可能
↓
- 12) アルカリバッファに置換
↓
- 13) NBT/BCIP 基質で発色、遮光、on ice で 15min (核が発色したら、すぐに洗浄)
↓
- 14) PBST で, 15min, 3 回洗浄
↓
- 15) MtOH に置換 (半量ずつ加えていく ; 50%, 75%, 87.5%, 100%)
↓
- 16) 50%, 80% glycerol/CMEF の順に置換、緩やかに攪拌のこと (各 1h)

切片でのアポトーシス染色

アルカリバッファ： (1M Tris/pH9.5, 0.5M MgCl₂, 1M NaCl) 各 1ml、DW 7ml, 1/2 Tween 2ul

基質：20ul NBT/BCIP + 1ml アルカリバッファ (氷冷する)

1) 脱パラ、PBS

↓

2) TUNEL 反応, 37C, 1h (10ul ボトル 1(酵素液)+90 ul ボトル 2 (NTP)、試薬節減のため、ガラスウールとプラスチックカバーグラスを乗せる。

(ネガコン：ボトル 2 のみ)

(ポジコン：サンプルを DNase I 3U/ml 添付バッファで 37C, 10min 消化、PFA 固定、PBST 洗浄 × 4)

↓

3) PBST で, 5min、2 回洗浄

↓

3) PBS で洗浄

↓

4) Converter AP (AP-labeled anti-FITC)、37C, 30min。試薬節減のため、ガラスウールとプラスチックカバーグラスを乗せる。

↓

5) PBST で, 5min、2 回洗浄

↓

6) PBS で, 5min 洗浄

↓

7) アルカリバッファに置換

↓

8) NBT/BCIP 基質で発色、遮光、on ice で 15min (核が発色したら、すぐに洗浄)

↓

9) DW で, 2 回洗浄

↓

10) バルサムで封入

増殖細胞の検出 (whole mount)

PCNA (proliferating cell nuclear antigen; clone PC10)モノクロー抗体

サンプルの固定/保存 : 4% PFA/PBS、4Cで一晩固定。MtOHに置換して、-20C 保存

抗体 : PCNA Ab-1/Ready to use (フナコシ LVC/MS-106-R7)

DAB 溶液 : DAB トリス錠(武藤化学 No. 4065-1)を 50ml DWに溶かし、TBSTで2倍に希釈。

1/2 Tween 100ul 添加。 5mlに小分けして、凍結保存

- 1) PBSTに置換 (PBSTを半量ずつ加えていく ; 50%, 75%, 87.5%, 100%)
↓
- 2) 6% H₂O₂/PBSTで色素の漂白, 37C, 15min-1夜 (眼が薄茶色になるまで)
↓
- 3) PBSTで1回洗浄
↓
- 4) PK/PBSTで37C, 10min - 1h消化 (1ul proteinase K/1ml PBST) (胚、孵化仔魚は10min)
↓
- 5) PBSTで10 min, 1回緩やかに攪拌洗浄
↓
- 6) 4% PFA/PBSTでPKを不活化、室温、10min
↓
- 7) PBSTで10 min, 4回緩やかに攪拌洗浄 O.N. 可能
↓
- 8) PCNA Ab-1(チューブの液 100ulに1/2 Tween 1ul 添加して使用). 室温で3時間、緩やかに攪拌
↓
- 9) PBSTで15 min, 6回緩やかに攪拌洗浄 (どこかで ON)
↓
- 10) Histofine シンプルステイン P0 (Multi) (ニチレイ H0206)
(チューブの液 100ulに1/2 Tween 1ul 添加して使用). 室温で3時間、緩やかに攪拌
↓
- 11) PBSTで15 min, 6回緩やかに攪拌洗浄 (どこかで ON)
↓
- 12) DAB 溶液 (H₂O₂ マイナス) で 10min
↓
- 13) DAB 溶液/H₂O₂ (1ml DABに1/10 H₂O₂ 5ul 添加) で on ice, 1.5h 発色 (アルミホイルで遮光)
↓
- 14) 水道水で10 min, 2回洗浄、PBSTに置換
↓
- 15) MtOHに置換 (MtOHを半量ずつ加えていく ; 50%, 75%, 87.5%, 100%)
↓
- 16) 50%, 80% glycerol/CMEFの順に置換、緩やかに攪拌のこと (各1h)

ポイント=気長に洗浄すること

Anti-PCNA
—切片での免疫染色—

使用する抗体

PCNA Ab-1 (PC10): mouse monoclonal antibody (Ready-to-use), NeoMarkers

シンプルステイン PO (MULTI): ニチレイ

固定法：PFA 固定、ブアン固定

- 1) Xylene で脱パラフィン (1)、10 分
- 2) Xylene で脱パラフィン (2)、5 分
- 3) 100% EtOH、5 分
- 4) 75%%EtOH、5 分
- 5) DW、2 分
- 6) PBS (minus tween)
- 7) PCNA Ab-1 を滴下、タッパー内 (DW を入れる) で 45 分、インキュベート
- 8) PBST で洗浄 (1)、10 分
- 9) PBST で洗浄 (2)、10 分
- 10) PBS (minus tween)で洗浄、2 分
- 11) シンプルステイン PO (MULTI)を滴下、タッパー内 (DW を入れる) で 30 分、インキュベート
- 12) PBST で洗浄 (1)、10 分
- 13) PBST で洗浄 (2)、10 分
- 14) DAB/H₂O₂ (5ml DAB stock solution + 25ul 1/10 H₂O₂)を滴下し発色：室温で 30 分程度
- 15) 水道水で洗浄 x 2 回
- 16) DW、1 分
- 17) 75%%EtOH、5 分
- 18) 100% EtOH、5 分 x 2 回
- 19) 無水 EtOH、5 分
- 20) Xylene (1)、5 分
- 21) Xylene (2)、5 分
- 22) バルサムで封入

BrdU による増殖細胞の検出 (whole mount)

(BrdU ラベリング & ディテクションキット II、(Roche))

BrdU 標識

胚、仔魚を 10mM BrdU 水溶液に 1 夜インキュベート

4% PFA/PBS、4C で一晩固定。MtOH に置換して、-20C 保存

免疫染色

- 1) PBST に置換 (PBST を半量ずつ加えていく ; 50%, 75%, 87.5%, 100%)
↓
- 2) 6% H₂O₂/PBST で色素の漂白, 37C, 15min-1 夜 (眼が薄茶色になるまで)
↓
- 3) PBST で 1 回洗浄
↓
- 4) PK/PBST で 37C, 10min - 1h 消化 (1ul proteinase K/1ml PBST) (胚、孵化仔魚 10min、後期仔魚 1h)
↓
- 5) PBST で 10 min, 1 回緩やかに攪拌洗浄
↓
- 6) 4% PFA/PBST で PK を不活化、室温、10min
↓
- 7) PBST で 10 min, 4 回緩やかに攪拌洗浄 O. N. 可能
↓
- 8) anti-BrdU + incubation buffer (1:100) に 1/2 Tween を 1% 加える
37C, 3h
↓
- 9) PBST で 6 回洗浄 (20min x 6)
↓
- 10) Anti-mouse TgG-AP (stock solution+PBST/1:9) に 1/2 Tween を 1% 加える
↓
- 11) PBST で 6 回洗浄 (20min x 6)
↓
- 12) アルカリバッファに置換
↓
- 13) NBT/BCIP 基質発色、遮光、on ice で 30min (核が発色したら、すぐに洗浄)
↓
- 14) PBST で、15min, 3 回洗浄
↓
- 15) MtOH に置換 (MtOH を半量ずつ加えていく ; 50%, 75%, 87.5%, 100%)
↓
- 16) 50%, 80% glycerol/CMEF の順に置換、緩やかに攪拌のこと (各 1h)