

酵素抗体法 (whole mount)

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

ブロッキングバッファ : 500ul 10% blocking solution, 50ul DMSO, 4.45ml PBSTw

抗体 : ブロッキングバッファで1,000 倍希釈

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) 抗体でインキュベート (ブロッキングバッファで1,000 倍希釈) , 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) **ウサギ・マウス抗体の場合 (amt-Kit 等)** : Histofine シンプルステイン P0 (Multi) (ニチレイ H0206)
山羊抗体の場合 (amt-DGT 等) : anti-Goat. P0
(標識抗体 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 溶液に 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