

HNK-モノクロー抗体による whole mount 染色

— 神経堤細胞の免疫染色による検出 —

固定法：4% PFA、MtOH 保存 (in situ 用サンプルでよい)

1 次抗体：HNK1-モノクロー抗体 (B D 社；別名 C D 57、カタログ番号 559048)

2 次抗体：Histofine simple stain PO/Multi (ニチレイ)

1 次抗体の希釈液：160 ul Blocking reagent + 80 ul normal goat serum + 1360 ul PBST

DAB 溶液：DAB トリス錠 (武藤化学) を 100ml DW に溶かす (処方の 1/2 濃度)。分注して -20C
保存可能

1) MtOH 保存サンプル

↓

2) DW に置換

↓

3) 3% H₂O₂/1% KOH で脱色。室温

↓

4) 蒸留水で洗浄し、PBST に置換

↓

5) PK 消化 (1/2000 PBST)。37C, 10 min

↓

6) 4% PFA 固定。室温、10 min

↓

7) PBST 洗浄。10 min x 5 times

↓

8) 1 次抗体：HNK1-モノクロー抗体 (希釈液で 1/200 に希釈して使用)、室温、4 h

↓

9) PBST 洗浄。15 min x 6 times、どこかで O,N.洗浄

↓

10) 2 次抗体：Histofine simple stain PO/Multi (原液のまま使用)、2 h 以上

↓

11) PBST 洗浄。15 min x 6 times

↓

12) 発色：10ml 1/2 DAB + 6ul H₂O₂。遮光、氷上で発色。30 分後に発色を確認。適当なところで停止

↓

13) 水道水で洗浄して反応を停止

↓

14) MtOH に置換

↓

15) グリセロールに置換