

軟骨・硬骨二重染色

染色液の調製

- ・ Alcian Blue

小型魚類の場合、HCl入りは適さないので 酢酸系を用いる。(CH₃COO₂Ca を溶かしてしまうので?)

- * Alcian Blue 20mg in 70% EtOH 80ml + CH₃COOH 20ml
(70% EtOH と CH₃COOH は8:2)

試料の固定と保存

1. 4% PFA/PBS or 10%ホルマリン/PBS で試料を1夜固定(4)
2. PBST で3回洗浄(各10分)
3. 半量ずつMtOH に置き換えていく(50,75,92,5,100% MtOH の順)(各5分以上/サンプルのサイズによる)
4. -20 で保存(長期保存可能)

下準備

染色するとき、鱗があると染まって見にくくなるので除去する

染色手順

1. サンプルをMtOH からDW に置換
半量ずつ置換(50,75,92,5,100%)(各5分以上/サンプルのサイズによる)
2. PK(Protainase K)処理 (PBST 10ml に対してPK 10μl)
50 で1時間ほど置く
水洗(水道水でもよい)
3. 漂白
1.0% KOH + 1.0% H₂O₂ (魚の大きさによって1.0%, 3.0%, 10%)
黒褐色になる程度(30分ほど)置いたら
水洗(水道水でもよい)
4. 軟骨染色
調製したAlcian Blue に漬ける 2時間~O.N.(1時間ぐらい様子見る。
ここで染めすぎると硬骨が染まらなくなるので長時間置くときは冷蔵庫に入れるな
どして低温下に置いて進行を遅らせる)
5. 99% EtOH : CH₃COOH = 8:2 の比率で調製した溶液で洗う

6. 水洗
7. 硬骨染色
2% KOH 10ml に対して染色原液(Alizarin Red) 1 μ l 程度を加えた溶液(目安：うすい紫色)に漬ける 2時間 ~ O.N.
8. 1% KOH 溶液に漬ける
9. グリセロールに置換
80% glycerol(glycerol : 1% KOH = 8:2)

参考：改良二重染色法による魚類透明骨格標本の作製,河村・細谷(1991),Bull.Natl.Res.Inst.Aquaculture No.20,11-18

文責：三浦友裕(2006)

仔稚魚の硬骨及び軟骨の染色

Enzyme cleaning of Alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage.

1. 10%ホルマリンに2~3日以上固定(長期の場合は、中性ホルマリン). Alc 固定標本も可
2. 水洗 2~3日(十分に) 仔稚魚では1昼夜
3. 10mg alcian blue 8GN + 90ml EtOH + 10ml (glacial) acetic acid. 24~48hrs. 仔稚魚では1昼夜(固定状態でかなり変化)ⁱ
4. 95% EtOH 80% 60% 40% 20% DW それぞれ仔魚が沈むまで浸漬
5. 30ml 飽和 aqueous sodium borate (水酸化ナトリウム、ホウ素)、+ 70ml DW + 1g (約1/4 tea spoon) trypsin. 液を2~3日ごとに取り換え(液がブルーになれば取り換え). 軟骨が鮮明に見え、筋肉が脱色するまで2~3wks. 仔魚では1昼夜以内で十分.
6. 0.5%KOH + Alizarin Red Sⁱⁱ (十分に) 硬骨が赤化するまで(約24hrs)ⁱⁱⁱ
7. 0.5%KOH – glycerine series (3:1、1:1、1:3) pure glycerine 黒色素を除去する場合、3%H₂O₂液 100mlに3~4滴
8. 透明標本は、pure glycerine 中に保存 (チモールを少量加える)

ⁱ Alcian blue 染色の確認: 体幅の最も厚い箇所の筋肉をほぐし、担鰭骨の基部がよく染まっているか確認する.

ⁱⁱ 別に定める方法であらかじめ準備しておく

ⁱⁱⁱ 鱗の除去はアリザリン Red に染色後で可能(この方がはがし易い)

文責: 三浦友裕(2006)

水圏資源生態学研究室より資料提供