Biocytin - Streptavidin Fluorescent Conjugate Staining

遮光

0. 神経細胞にtdTomatoを発現した脳から急性スライスを作製する。

1. パッチ電極に0.5%biocytinを含め、20分程度ホールセル記録後を保つ。

2. 細胞から静かに電極を外す。

3. 24穴wellプレートに移し、PB wash

4. 4%PFA / 0.1MPB 4°C ON

以下室温

5. PB wash

6. PBS wash

7. PBS-X, 30 min 振盪

8. 蛍光標識Streptavidin溶液, 30 min (遮光) 振盪

9. PB wash

10. 1 µg/ml DAPI in PB, 15 min 振盪

11. PBS wash

12. 2% gelatin, 15 min

13. スライドガラスにマウント

14. 50% (v/v) glycerol/2.5% (w/v) triethylene diamine in PBSまたはVECTASHIELD Hard setで封入

15. 観察

Slice: 　　　　　　 　 　　Date:

<切片プレート>

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| A |  |  |  |  |  |  |
| B |  |  |  |  |  |  |
| C |  |  |  |  |  |  |
| D |  |  |  |  |  |  |

**溶液**

**蛍光標識ストレプトアビジン反応液**

Streptavidin-Alexa Fluor 633 10 µg/ml (1 mg/mlストックを100倍希釈)

Triton-X 100 0.5%

in PBS

**0.5% Triton X-100 in PBS (PBS-X)**

20% Triton X-100を40倍希釈

**2 % Gelatin液**　　　　（50°Cに温めて溶かし、室温に冷ましてから使用）

Gelatin 0.4 g

in PBS 20 ml

**Mounting medium**

250 mg triethylene diamine

5 ml glycerol

5 ml PBS

**Reagents**

Streptavidin-Alexa Fluor 633 (Invitrogen): S21375, 1 mg, \36,750

VECTASHIELD Hard set (Vector): H-1400, 10 ml, \18,000